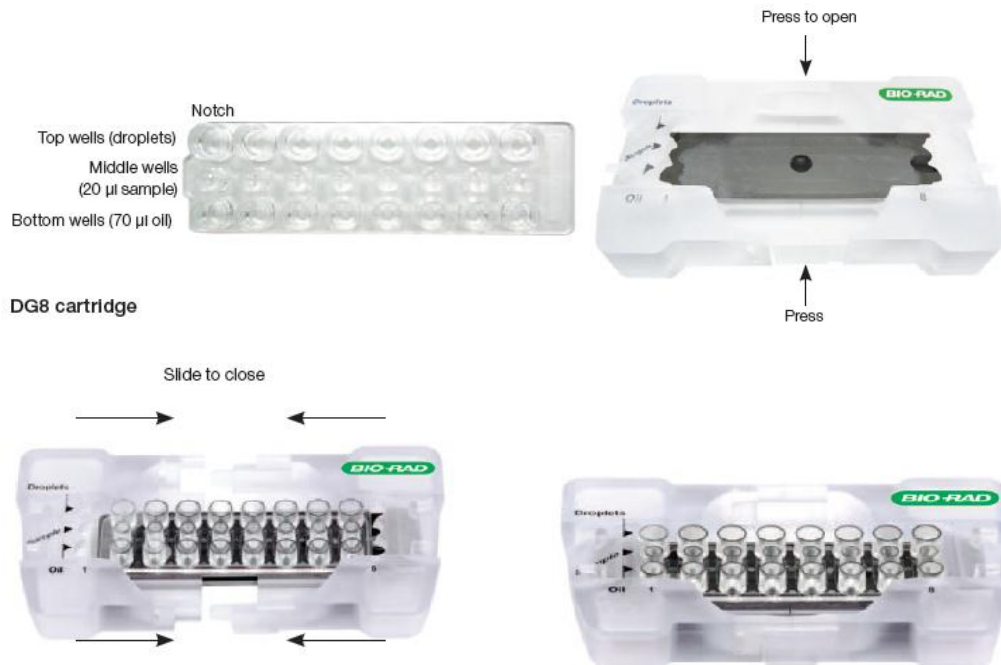


## QX200 简易操作流程

(以英文原版操作手册为准)

- 先打开 QX200 Droplet Reader 后面电源，预热至少 30 分钟后打开电脑和 QuantaSoft 软件；
- 配制 20ul 探针法定量反应体系，选用适宜的探针法预混液(注：RNA 作为模板时选择 One-Step RT-ddPCR Kit for Probes)，推荐终浓度 900nM Primer+250nM Probe，振荡混匀，离心除气泡，注意 20ul 体系中所加样本核酸含量不要超过规定检测范围(1~100000 拷贝片段化核酸或者 1~20000 拷贝完整基因组 DNA)，如完整的人类基因组 DNA 不要超过 66ng/20ul，可提前用限制性内切酶处理样本可提高检测浓度。另外，用质粒作为模板时建议酶切以消除复杂结构，做 CNV 实验时必须对 DNA 模板进行高频酶切；
  - 配制 20ul 染料法定量反应体系，选用 QX200 ddPCR EvaGreen Supermix，推荐终浓度 100nM Primer，单孔模板检测范围为 1~30000 拷贝片段化核酸或者 1~20000 拷贝完整基因组 DNA，其他同上。
- 将一个新的 DG8 cartridge 放入 holder 中，注意缺口方向；



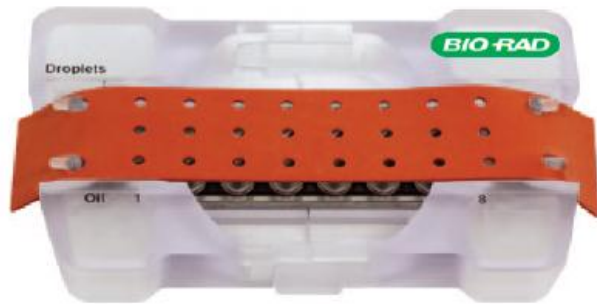
- 将 20ul 样品反应体系加入到 DG8 cartridge 中间一排的 8 个孔内，不足 8 个样品时用稀释一倍的 20ul 1 ×buffer control 补足，建议使用 Rainin 的 8 通道 20ul 排枪和 20ul 枪头（不能用 200ul 枪头），加样时枪头接近孔一侧底部，与侧壁呈大约 15° 角，缓慢打出液体，打出一部分后慢慢提升枪头位置再打出余下液体，不要将枪按至超过第一档位置以免引入气泡；



- 在 DG8 cartridge 最底下一排 8 个孔中各加入 70ul 微滴生成油（DG Oil），同样不能有空着的孔；






6. 盖上胶垫 (gasket), 注意两边的小孔都要钩牢;



7. 将以上 holder 轻轻地平稳放置于微滴生成仪中, 开始生成微滴, 注意仪器上指示灯状态, 一般约 2 分钟完成;

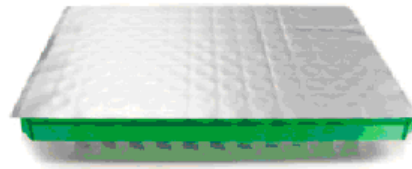


			
Solid green	Power on	DG8 cartridge holder in place	Run complete
Flashing green	---	---	Run in progress
Flashing amber	---	No gasket; empty well or seal	Low volume in well
Off	Power off	No DG8 cartridge holder	Idle

8. 微滴生成于 cartridge 最上面一排孔内, 建议使用 Rainin 的 8 通道 P-50 排枪和 200ul 枪头小心缓慢吸取, 调整吸取体积为 40ul, 将 holder 放平, 枪头以与孔壁呈 30~45° 角放入, 轻触孔底, 约 5 秒吸取 40ul, 再同样缓慢地打入 96 孔板相应位置孔内 (约 5 秒), 枪头贴近孔壁接近孔底, 注意封上盖以防油挥发, 每次弃去已使用过的 cartridge 和胶垫;



9. 转移油滴进入 96 孔板内完成后，将膜有红线标记的一面（反光亮面）朝上置于 96 孔板上并固定好，用预热好的 PX1 热封仪对其进行封膜，推荐的运行程序为：180℃，10s，无需颠倒方向进行二次封膜；



10. 封好膜之后应该在 30 分钟内进行 PCR 反应，或者放于 4℃ 冰箱 4 小时之内进行 PCR，可在任意一台 96 孔 PCR 仪上完成，注意升降温速度  $\leq 2.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 。

A. 探针法推荐反应条件：

1. 95℃，10min；
2. 40 循环 {
  - 94℃，30s
  - T<sub>m</sub>(退火温度按优化摸索得来的条件设置)，60s；
3. 98℃，10min；
4. 4℃，Hold

注：以上为 DNA 作模板时的 PCR 条件，若为 RNA 模板选用一步法预混液，需在第一步前加上 60℃，30min 的逆转录步骤。

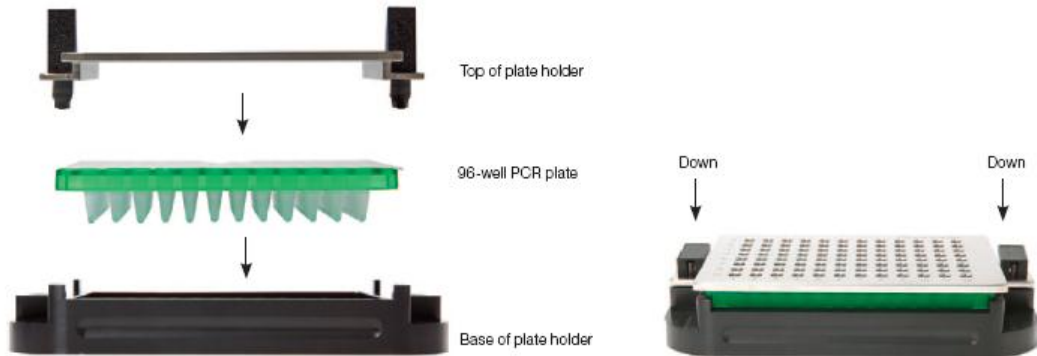
B. 染料法推荐反应条件：

1. 95℃，5min；
2. 40 循环 {
  - 95℃，30s
  - T<sub>m</sub>(退火温度按优化摸索得来的条件设置)，60s；
3. 4℃，5min；
4. 90℃，5min
5. 4℃，Hold

11. 查看微滴读取仪上状态指示灯指示是否正常(以英文说明书上为准)；

Solid green	Power on	Bottle levels OK*	Plate in place	Run complete
Flashing green	---	Oil <30% or waste >70%**	---	Run in progress
Flashing amber	---	Oil <10% or waste >90%***	---	Error during run
Off	Power off	---	No plate	Idle

12. 将之前完成 PCR 的 96 孔板放入 plate holder 中组装好，注意板斜角方位，如下图所示：



Placing the 96-well plate into the plate holder.

13. 组装好之后轻轻地平稳放入微滴读取仪中，如图：



Placing the plate holder into the droplet reader.

14. 打开 QuantaSoft 软件，建议每次实验之前做一次 Flush System，若一周以上未使用建议先做一次 Prime 再做 Flush System。之后对 96 孔板中样品信息进行 Setup，主要是提供实验名称、实验类型（ABS、CNV、RED）、assay 以及探针信息等，完成后即可进行 Run，结束后结果会被自动 Analyze，人工核实修正后保存结果，即完成了一次 QX200 实验。