

应用指南

Applied Biosystems QuantStudio Absolute Q 数字PCR应用指南



目录

数字PCR概述	3
QuantStudio Absolute Q数字PCR系统介绍	5
主要应用.....	8
临床及基础研究	8
公共卫生健康领域	22
生物制药方向	24

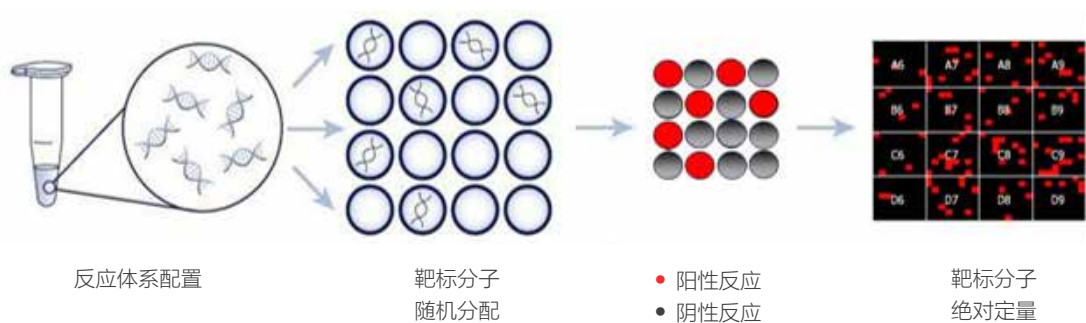
数字PCR概述

数字PCR (Digital PCR, dPCR)是一种灵敏且精准的核酸绝对定量手段。无需使用任何标准品或标准曲线，无需借助Ct值比较，即可实现对核酸靶标的绝对定量，同时大大提高了低丰富靶标检测能力。数字PCR技术在核酸定量研究方法上为您开辟全新的视野，引领您进入一个崭新的靶标序列精确定量研究领域。

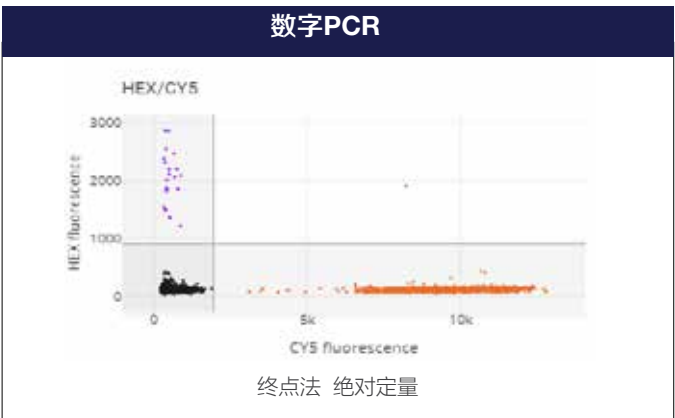
数字PCR原理

在数字PCR反应中，每个反应体系被随机均匀的分配到数以万计独立的PCR反应单元，其中含有靶标分子的单元经PCR扩增后呈现阳性信号，另一部分不含有靶标分子的单元在PCR扩增后则显示为阴性，利用阳性和阴性PCR反应

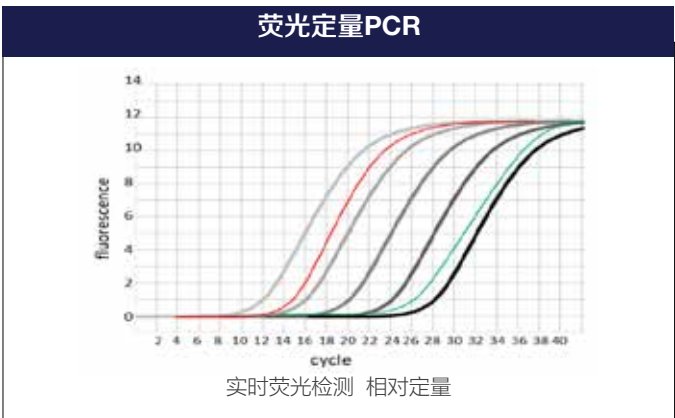
单元数目计算样本中的靶标分子的绝对数量，并通过泊松分布原理进行统计分析获得最终结果，无需再参照标准品和标准曲线即可得出靶标分子的精确拷贝数。



数字PCR与荧光定量PCR优势比较



- **绝对定量**
更好的准确性和精确度
- **无需标准曲线**
更好的重复性，不同实验室，不同操作人员等
- **更灵敏**
更适合痕量靶标检测
- **对抑制剂更耐受**
稀释靶标的同时稀释抑制剂
- **分辨率更高**
更适微小变化检测



- **更简便**
- **更经济**
- **更成熟**
- **更高检测通量**
- **更宽泛的靶标浓度动态范围**

数字PCR概述

应用领域

- 分子标准品定量
- 极微量病原微生物检测和载量测定
- 稀有突变靶点检测
- CNV (拷贝数变异)分析鉴定
- 融合基因及转录子绝对定量(转基因组分表达鉴定)
- 无创产前检查(NIPD)
- 线粒体突变检测
- NGS测序文库的绝对定量
- DNA甲基化定量检测
- 生物制品中宿主DNA残留检测
- 基因治疗&细胞治疗产品质控
- 转基因GMO检测和污染评估
- 肉类成分鉴定
- 基因表达差异精细分析
- 单细胞基因表达分析

数字PCR发展史



现有数字PCR平台的局限性

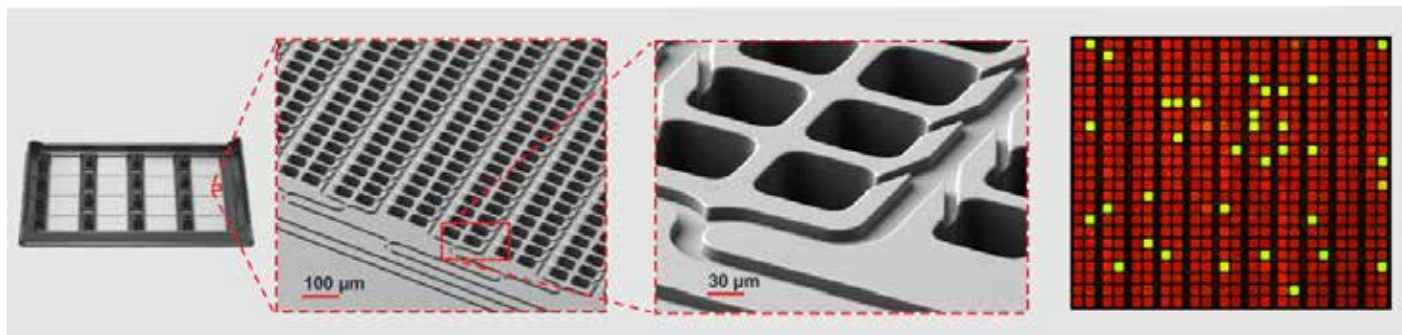
- 显著的样品浪费/死体积
 - 宝贵的样品和昂贵的试剂被浪费，增加二次采样误差
- 有限或不一致的液滴分隔方式
 - 对样本质量要求高
 - 基于假设的液滴体积(无质控)获得靶标检测浓度
- 繁琐的工作流程
 - 多个仪器，多步手工操作
- 获得结果所需时间长
 - 通常3-5个小时
- 仅限终点法分析
 - 无质控，增加假阳性可能

QuantStudio Absolute Q 数字 PCR 系统介绍

工作流程：“如同qPCR”简便，快速



MAP16 微流体阵列式芯片板



MAP16芯片板：

每块板16个样本

每次实验可按列选择4个芯片检测

未使用的芯片可再次使用

芯片：

固定20480个微孔，0.417nL/微孔

9微升上样体系

95% 上样量分析，<5%的死体积

99%的液滴生成率

QuantStudio Absolute Q 数字 PCR 系统介绍

QuantStudio Absolute Q 光学系统

- **通道数**: 5色荧光通道(兼容染料: FAM, VIC/HEX, JOE, CY3, TAMARA, ABY, ROX, JUN, TYE655, CY5, Texas Red)
- **激发光源**: 高功率红绿蓝3个LED光源
- **光学检测器**: CMOS
- **滤光片**: 5个激发光滤光片波长; 5个发射光滤光片波长

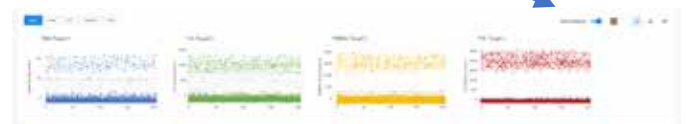
Optical configuration				
The QuantStudio Absolute Q system comes in a single optical configuration. It is pre-calibrated at the factory but can be field-calibrated for enhanced spectral compensation.				
Channel	Color	Excitation filter Peak λ	Emission filter Peak λ	Examples of compatible dyes
1	Blue	466	520	FAM™
2	Green	514	560	VIC™ HEX™
3	Yellow	549	589	ABY™
4	Red	589	625	ROX™
5	Dark Red	630	684	JUN™

QuantStudio Absolute Q 分析软件

- 控制仪器并分析实验结果
- 编辑热循环程序
- 光路通道选择
- 布板编辑
- 监测运行程序
- PC与仪器断开连接后, 仪器可继续运行程序
- PCR扩增前后信号对比排除假阳性或非正常液滴
- 多芯片联合分析功能pooling
- 散点图和直方图阈值线自动划定
- 检查质控参数(参考通道, 液滴排除分析)
- 具有SAE模块即安全、审计和电子签名功能, 符合FDA 21 CFR 11合规性要求



切换1D散点图上的按钮以查看不合格的微孔/液滴



QuantStudio Absolute Q 数字PCR系统介绍

QuantStudio Absolute Q dPCR — 新一代数字PCR系统

- **结果更精准** — 死体积<5%；且ROX通道具有质控功能；自动排除假阳性
- **检测更快速** — 从反应体系制备到结果只需1.5小时
- **流程更简便** — 实验流程与qPCR实验一样简单
- **通道更丰富** — 具备5荧光通道，轻松实现多重检测
- **通量更灵活** — 单次可以检测4、8、12或16个样本
- **全自动一体机** — 安装后无需校正，极少手动操作及维护



临床及基础研究

QuantStudio Absolute Q 数字PCR

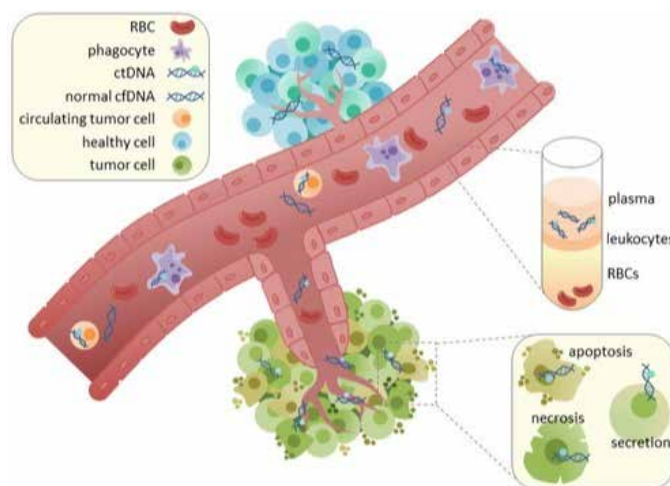
肿瘤液体活检研究



液体活检：微创，最常使用无细胞DNA (cfDNA)或循环肿瘤DNA (ctDNA)来分析肿瘤
的分子特征，以帮助做出更有效和动态的治

液体活检的优势：

- 微创取样且可重复
- 与传统组织活检相比更具成本效益
- 从样品到结果的周转时间更快
- 捕获更多的肿瘤异质性

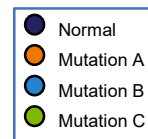


肿瘤演化-时间异质性和空间异质性



需求:

- **敏感性和特异性**
 - 低丰度驱动突变基因
- **时效性**
 - 快速识别突变以帮助做出决策
- **可靠性**
 - 检测结果可靠



临床及基础研究主要应用

肿瘤液体活检研究

背景简介

EGFR是治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的重要药物靶点。在用酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)治疗NSCLC期间，通常会出现早期反应，随后检出可能预先存在的亚克隆突变或获得性耐药突变。早期检测耐药突变可以更好地为患者治疗提供信息，并指导适当、更有效的药物选择。导致TKI耐药的一种关键EGFR突变是T790M突变。只有少数临床检测被批准作为患者活检(FFPE或血浆)的伴随诊断，而CLIA/CAP指导下的大量实验室开发的检测试剂(LDT)逐渐成为肿瘤诊断或肿瘤治疗中常规监测方法。

材料与方法

EGFR T790M模拟无细胞DNA (cfDNA)标准品(SeraCare、SeraSeq ctDNA)与商业化EGFR T790M dPCR检测试剂相结合，用于验证QS Absolute Q数字PCR平台。测试的cfDNA标准品经过合成片段化，然后与背景材料混合，以完全模拟从患者血液样本中纯化的cfDNA。包含预混液、EGFR T790M dPCR引物探针和以下三种cfDNA标准品在平台上以一式三份重复检测：100%野生型(WT) EGFR、1.0% EGFR T790M和0.1% EGFR T790M (图1)。

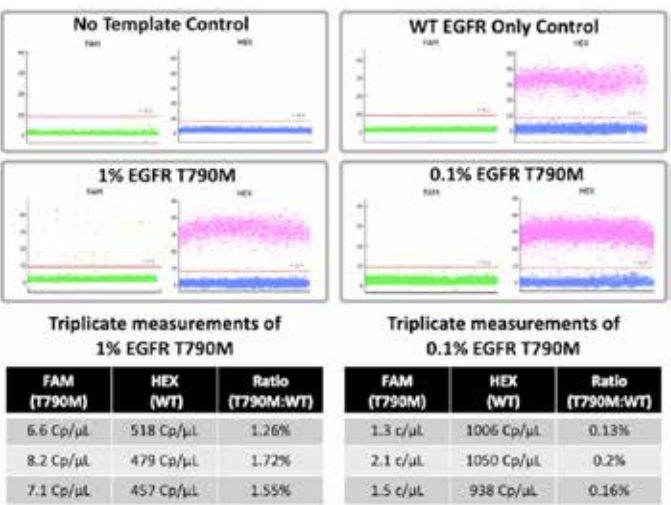


图1. EGFR T790M稀有突变定量检测。反应体系中的模板分为不包含模板、仅包含WT EGFR、在WT EGFR背景中的1% EGFR T790M或0.1% EGFR T790M。探针包括FAM标记的EGFR T790M 探针以及HEX标记的WT EGFR标记探针。结果散点图显示y轴上的单个液滴荧光信号强度。两个表格显示了对1.0%和0.1% EGFR T790M样品进行三次重复检测结果统计及丰度结果。

结果

WT EGFR对照的所有重复显示在T790M (FAM)通道中没有阳性液滴，表明探针对WT扩增子具有特异性并且没有其他荧光串扰进入FAM通道。FAM和HEX通道中的阳性阈值是使用无模板对照设置的。在使用0.1% T790M样品的三次重复之一检测结果中，QS Absolute Q得出的WT EGFR浓度为1006 Cp/μL，EGFR T790M为1.3 Cp/μL。因此，EGFR T790M的丰度被确定为0.13%。

结论

虽然下一代测序(NGS)是一种用于广泛核酸序列检测的宝贵工具，但它在检测稀有突变事件方面的精度较低。在最近的一项研中，Stetson等人指出，NGS只能准确量化>1%的稀有突变。数字PCR为临床医生提供了必要的工具，用于绝对量化和增强对超罕见(<1%)突变的精确检测，且无需NGS的复杂操作及生物信息分析即可便捷快速获得检测结果。

全自动一体化QS Absolute Q dPCR平台能够在高丰度WT EGFR背景下精确定量含有<1.0% T790M EGFR的样品，具有高重现性、高精度和高灵敏度。

参考文献

Dueck ME, Lin R, Zayac A, Gallagher S, Chao AK, Jiang L, Datwani SS, Hung P, Stieglitz E. Precision cancer monitoring using a novel, fully integrated, microfluidic array partitioning digital PCR platform. Sci Rep. 2019 Dec 20;9(1):19606. doi: 10.1038/s41598-019-55872-7. PMID: 31862911; PMCID: PMC6925289.

临床及基础研究主要应用

肿瘤液体活检研究 — 提供检测灵敏度

背景简介

数字PCR (dPCR)的主要优势在于对低丰度靶标的检测，且无需标准品及标准曲线的情况下即可对靶标核酸进行绝对定量。同时提高了对低丰度靶标检测的准确性和重复性。然而，任何数字PCR的检测限都取决于多个因素，包括目标核酸的浓度和每次反应的上样量(图2)。如果靶标的浓度非常低，可能需要进行多个反应体系混合，以获得能够检测到靶标所需的样本量。

对于低丰度样本，上样量的多少会影响靶标的检出率。在本方案中，Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™数字PCR的多芯片合并检测解决方案，可以同时利用多达16块芯片，对丰度为0.1% (mutant allele frequency (MAF))的稀有突变靶标进行检测。

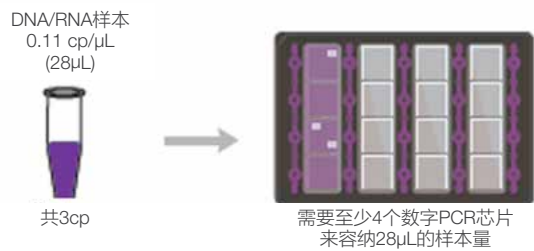


图2. 通过增加样本的上样量，扩大反应体系，再经过多块芯片合并检测可以提高稀有靶标检测的灵敏度。

以液体活检中稀有靶标检测为例，对肿瘤患者个体的血液样本中循环肿瘤DNA (ctDNA)进行检测。在此应用中，ctDNA分子拷贝数可能因人而异，也可能每天都会变化，而且浓度通常非常低 — 通常每微升只有几个分子。如果ctDNA分子的浓度异常低，受试样本量会直接影响可检测到的ctDNA分子的数量。此外，由于液滴分隔技术的局限性，许多现有dPCR平台在生成的液滴总数方面缺乏一致性和再现性，导致检测不可靠。这种不一致可能会导致每次反应的总分析样本量以及实验之间存在差异，未分析浪费的样本进一步导致二次取样误差。与基于液滴式dPCR平台不同，QuantStudio Absolute Q芯片式数字PCR系统采用全自动且高度一致的微流体阵列芯片(MAP)技术 — 每次可在>20,000个微孔内检测95%的上样量，这处于行业领先水平。

本方案利用检测肿瘤突变基因PIK3CA p.H1047R的Applied Biosystems™ TaqMan® Liquid Biopsy dPCR Assay (货号：A44177)，体现了QuantStudio Absolute Q芯片式数字PCR系统的多芯片合并检测功能的优势。利用突变等位基因频率为0.1%的样本，在4块dPCR芯片(~81,920个微孔)中进行数字检测。

工作流程和方法

DNA样本和dPCR反应体系

利用基因组DNA (Promega人类男性对照品)和含PIK3CA p.H1047R突变的质粒DNA，制备0.1%丰度的DNA混合物。最终基因组DNA浓度约为1.15 ng/μL。本研究采用针对PIK3CA p.H1047R的TaqMan液体活检dPCR Assay。该产品可以检测野生型和携带突变的等位基因(分别使用VIC™和FAM™染料标记探针)。根据表1中列出的体积准备数字PCR反应。

MAP16芯片板上样和多芯片合并检测

制备dPCR反应体系后，向MAP16板中加入9 μL的反应体系，然后再加15 μL的分隔缓冲液，再将准备好的MAP16板移至QuantStudio Absolute Q dPCR系统中。对QuantStudio Absolute Q数字PCR系统采用TaqMan液体活检dPCR Assay的标准热循环参数。dPCR运行后，采用QuantStudio Absolute Q分析软件确定靶标浓度。使用样本进行8块芯片检测，随后分别对4块芯片进行合并分析，从而获得两个重复样本。

试剂	最终浓度	每次反应的体积
数字PCR预混液(5X)	1X	1.8 μL
TaqMan液体活检dPCR Assay (20X)	1X	0.45 μL
野生型基因组DNA +携带突变的质粒DNA	最大体积	6.75 μL
水	加至9 μL	无

表1. 在Applied Biosystems QuantStudio Absolute Q芯片式数字PCR系统上用于肿瘤基因突变PIK3CA p.H1047R检测的数字PCR体系配置。

临床及基础研究主要应用

肿瘤液体活检研究 — 提供检测灵敏度

利用相同的质粒和人类基因组DNA分别制备高浓度的阳性对照品以及低丰度0.1%的DNA模板进行正交试验。该DNA模板用于2个独立重复实验样本，上样后的最终浓度为每次反应33 ng，或每次反应约10,000个野生型分子和10个携带突变的分子。

结果

dPCR完成后，采用QuantStudio Absolute Q分析软件分析所有反应。4块芯片合并检测0.1%低丰度靶标和单芯片检测高浓度阳性对照品的dPCR结果参见表2。在两种条件下报告的携带突变的和野生型PIK3CA分子的浓度均与预期相似。如表2所示，在大约81,815个分隔微孔中，经计算，携带PIK3CA突变的等位基因的浓度为每次反应11.5个拷贝(cp/反应) — 这与经确定为6.9 cp/反应的阳性对照反应类似。最后，观察到的多芯片合并(Pooling)检测低丰度样本的突变丰度为0.1%，结果符合预期。

总结

多芯片合并检测(Pooling)是一种通过提高给定样本可分析的总体积来提高灵敏度的有效方法。在本技术文档中，使用MAP16板的四块芯片(36 μ L dPCR反应体系)，分析总输入样本量为28.8 μ L的0.1% MAF DNA模板。总体而言，该方法适用于精准医疗领域的众多稀有靶标检测应用，例如监测治疗效果、筛查微小残留病或快速识别与突变相关的耐药性等。

低丰度 0.1% MAF 样本 (4 个芯片/重复样本)				高浓度阳性对照品 (单个芯片/重复样本)		
重复样本	PIK3CA p.H1047R cp/反应(MAF)	野生型cp/反应	液滴总数	PIK3CA p.H1047R cp/反应(MAF)	野生型cp/反应	液滴总数
1	10.44 (0.09%)	11,904.84	81,809	5.31 (0.06%)	9,293.67	20,361
2	12.60 (0.11%)	11,452.32	81,821	8.46 (0.08%)	11,129.31	20,462
平均值	11.52 (0.10%)	11678.58	81,815	6.84 (0.07%)	10,211.49	20,411.5

表2. 低丰度0.1% MAF DNA模板与含0.1% MAF的高浓度阳性对照品的稀有靶标检测结果。低丰度样本的36 μ L反应体系和高浓度阳性对照品的每9 μ L (1个芯片)反应体系，在每种条件下检测到的靶标分子总数以及分析的液滴总数。采用QuantStudio Absolute Q分析软件计算浓度。

临床及基础研究主要应用

拷贝数变异(CNV)检测

背景简介

近端脊髓性肌萎缩症(Spinal Muscular Atrophy, SMA)是一种由脊髓运动神经元退行性变导致的遗传性神经肌肉病，主要临床特征为肌无力和肌萎缩，伴有脊柱侧弯、关节变形等并发症。根据患者起病年龄和临床病程，将SMA由重到轻分为4型。2018年，SMA纳入我国《第一批罕见病目录》。据《中国SMA患者生存现状报告白皮书》，我国约有SMA患者2万-3万人，若不加加以干预，80%的患者很难活过2岁。

SMA病因

大部分SMA致病原因是由于位于5号染色体q臂(q13)的运动神经元存活基因1(Survival motor neuron, SMN)的缺失或突变所致。SMN1控制疾病的发生与否，而其旁系同源存活运动神经元2 (SMN2)与发病后的程度轻重相关。除了基因3'端的5个关键核苷酸差异外，SMN1和SMN2几乎相同。SMA其在活产婴中发病率为1/10000~1/6000。人群携带者(图3)比率为1/50~1/40。

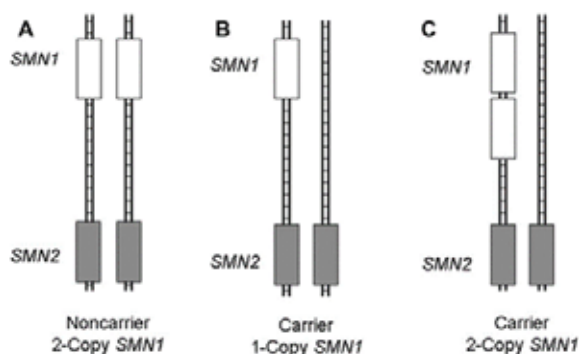


图3. SMA携带者和非携带者。(A)非携带者有两个SMN1拷贝，每个5号染色体上有一个。(B) SMA携带者在一条染色体上有一个SMN1拷贝，在另一条染色体上有0个拷贝。(C) SMA携带者，一条染色体有两个SMN1拷贝，第二条染色体有0拷贝。

治疗药物

不同检测方法的研究已经证明SMN2拷贝数和疾病严重程度相关。美国食品和药物管理局(FDA)批准的治疗药物中，诺西那生钠(Spinraza, Biogen)和Risdiplam(Evrysdi, 罗氏)为运动神经元生存蛋白2 (SMN2)的调节剂，可以通过对SMN2基因的剪切使其表达功能性SMN蛋白，从而达到治疗SMA的目的。SMN2拷贝数用于为接受这些批准疗法的SMA患者设计治疗方案，对具有2或3个SMN2拷贝的患者可进行治疗。随着诺西那生钠注射液被纳入国家医保，急需SMN1和SMN2拷贝数的简便快速且高度准确、灵敏的检测方案来满足对SMA治疗的快速增长需求。

目前基因检测方法及其局限性

当前用于SMA的基因分型和拷贝数确定方法复杂、耗时或缺乏较高拷贝数的分辨率。多重连接依赖探针扩增法(MLPA)和实时定量PCR (qPCR)可以检测SMN1缺失。MLPA是一种多步骤方法，需要PCR后毛细管电泳和较长的出结果时间(~ 20小时)。而qPCR需要使用标准曲线进行标准化。更重要的是，当拷贝数大于3时，MLPA和qPCR都无法始终如一地区分SMN1或SMN2的拷贝数差异。基因组测序(GS)技术在拷贝数检测方面取得了进展。最近报道使用全基因组测序和先进的拷贝数分析软件进行SMA诊断和携带者识别。然而，GS在诊断及筛查方面仍然存在局限性，包括成本、样本处理时间、复杂的数据分析和正交验证等。

临床及基础研究主要应用

拷贝数变异(CNV)检测

数字PCR检测的优势

数字PCR (dPCR)改善了其他方法平台的局限性，无需标准品即可对样本中目标基因进行绝对定量，且能够在较宽的范围内可靠、准确、快速的测定0到6之间的SMN1和SMN2的拷贝数。更适合用于携带者筛查、患者筛查、用药指导及预后。

材料及方法

DNA样本

人类基因组DNA的对照样品(n=10)来自Coriell细胞库。这些样本中的大多数(n=8)都具有由Coriell细胞库提供的SMN1和SMN2拷贝数。在10个样本中，5个来自具有0个SMN1拷贝的SMA患者(表3)。源自患者的样本(n=15)购自运动神经元疾病研究实验室(Nemours Alfred I. duPont Hospital for Children)。从患者来源的成纤维细胞中分离基因组DNA和淋巴母细胞系以及SMN1和SMN2拷贝数使用QuantStudio 3D及Absolute Q数字PCR系统分别检测。

Coriell ID	SMN1 copy number	SMN2 copy number	Description
NA03815	1	1	Known carrier for spinal muscular atrophy
NA00232	0	2	Spinal muscular atrophy type I (SMAI)
NA09677	0	3	Spinal muscular atrophy type II (SMA2)
NA11254	2	0	Ataxia-telangiectasia
NA17117	3	0	Human variation panel control
NA03814	1	5	Known carrier for spinal muscular atrophy
NA22592	0	3	Spinal muscular atrophy type II (SMA2)
NA10684	0	2	Spinal muscular atrophy type I (SMA1)
NA23687	1	2	Known carrier for spinal muscular atrophy
NA23255	0	3	Spinal muscular atrophy type III (SMA3)

表3. 来自Coriell细胞库的对照DNA样本及其SMN1和SMN2拷贝数。

多重数字PCR引物和探针序列及设计

基于水解探针的多重检测旨在使用FAM、VIC、TYE665和TAMRA分别识别SMN1、SMN2、总SMN (SMN1+2)和RPPH1 (图4)。SMN1探针(FAM)与序列c.840C杂交，而SMN2探针(VIC)与c.840T杂交。总SMN (SMN1+2, TYE665)以内含子1为靶标 — SMN1和SMN2之间的区域相同。内参对照旨在靶向高度保守的RPPH1基因(TAMRA)，该基因始终以2个拷贝的形式存在。

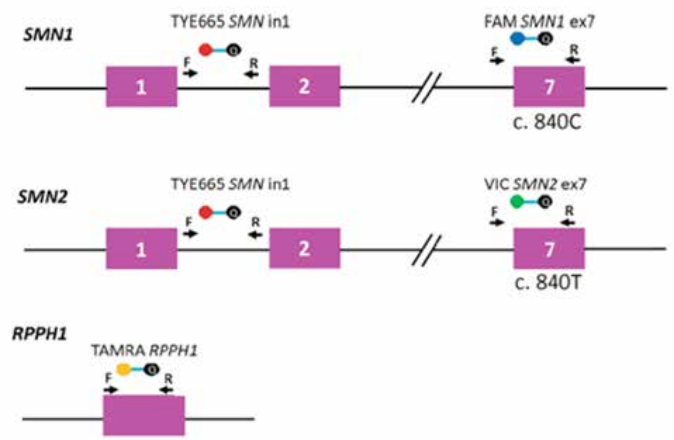


图4. 4色多重检测设计的示意图，显示了4个探针的位置。箭头代表每个测定的正向和反向引物。连接两个圆圈的条形代表探针，而填充红绿蓝颜色的圆圈代表不同的荧光团，黑色圆圈代表暗猝灭剂。虚线(//)表示不连续序列。

Name	Description	Oligonucleotide Sequence(5'>3')
SMN1f	Forward primer	5'-AATGCTTTTAAACATCATATAAGCT-3
SMN1r	Reverse primer	5'-CCTTAATTTAAGGAATGTGAGCACC-3
SMN1p	Probe	5'-FAM-TCCTTACAGGGTTTCAACAAAATCAA-QSY-3
SMN2f	Forward Primer	5'-AATGCTTTTAAACATCCATATAAAGCT-3
SMN2r	Reverse Primer	5'-CCTTAATTTAAGGAATTGAGCACC-3
SMN2p	Probe	5'-VIC-TCCTTACAGGGTTTGTAGACAAAATCAA-OSY-3
totalSMNf	Forward Primer	5'-GGAAGTTTCAGGAAGTGGTAGG-3
totalSMNr	Reverse Primer	5'-CCACCAGGACTGCCTTTATATC-3
totalSMNp	Probe	5'-TYE675-AGAAGATGGCAGTTTGGAT-IAbRQSp-3
RPPH1f	Forward Primer	5'-CTTTCGGAGCTTGA-3
RPPH1r	Reverse Primer	5'-GAGAGTAGTCTGAATTGGGTATGA-3
RPPH1p	Probe	5'-6-TAMRA-ACCTCACCTCAGCCATTGAACCTCAC-IAbROSp-3

表4. 用于多重dPCR检测的引物和探针列表。

临床及基础研究主要应用

拷贝数变异(CNV)检测

数字PCR实验条件

对照DNA样品稀释至10 ng/μL工作储备液。使用Qubit 4 荧光计(Invitrogen)测量盲样DNA样品并稀释至10 ng/μL。数字PCR反应体系包含5X预混液、2.5–25ng人类 gDNA、1800 nmol/L SMN1/SMN2引物、900 nmol/L RPPH1引物、900 nmol/L总SMN引物和250 nmol/L的每个探针。每个MAP板芯片孔通过移液器手动加载10 μL PCR反应混合物，然后加入15 μL分离缓冲液。盖上垫圈盖，将板放入 Absolute Q 并在以下条件下运行：3分钟活化，95°C，95°C孵育5秒和62°C孵育30秒共40个循环。全自动Absolute Q控制软件控制样品液滴生成到MAP分区、热循环和成像信号收集。

结果

多重SMA基因分型分析

优化后的反应体系及引物探针首先利用对照DNA样本进行测试。dPCR扩增后液滴信号结果(图5A)。所有SMN探针(SMN1外显子7、SMN2外显子7和总SMN内含子1)均针对每个基因组包含2个拷贝的参考基因(RPPH1) 进行均一化及拷贝数测定。SMN1外显子7 (图5B)、SMN2外显子7(图5C)和总SMN内含子1(图5D)的散点图显示了液滴之间极好的分离效果。多重SMA基因分型分析在对SMN1:SMN2拷贝数为0:3 (NA23255)，3:0 (NA17117)和1:1 (NA03815)的对照样本进行分类时显示出高特异性和灵敏度。

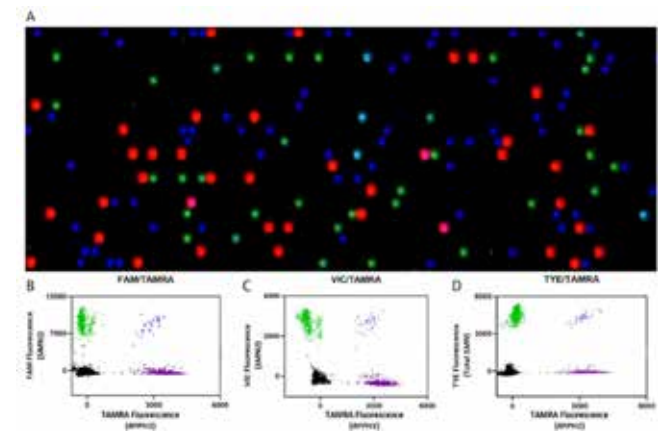


图5. 利用NA03815基因组DNA作为样本的SMA 4色多重dPCR检测荧光信号结果(A)和散点图(B-D)。散点图显示为SMN1外显子7 (B; FAM)、SMN2外显子7 (C; VIC)和总SMN内含子1 (D; TYE665)，这些靶标都与参考基因RPPH1 (TAMRA)二维呈现。分析软件从PCR后图像强度中减去PCR前图像强度，以便去除未表现出放大行为的荧光信号，从而消除假阳性信号。

对照样本SMN1和SMN2拷贝数检测

利用Absolute Q dPCR SMA多重4色测定法对来自Coriell细胞库的10个基因组DNA测试样本中的SMN1、SMN2和总SMN的拷贝数进行检测。所有10个Coriell DNA样品在系统上一式三份检测，以进行验证和可重复性检测。SMN1 (图6A)、SMN2 (图6B)和总SMN (图6C)之间的测定内变异性(通过%CV测量)很低，表明具有很强的可重复性。

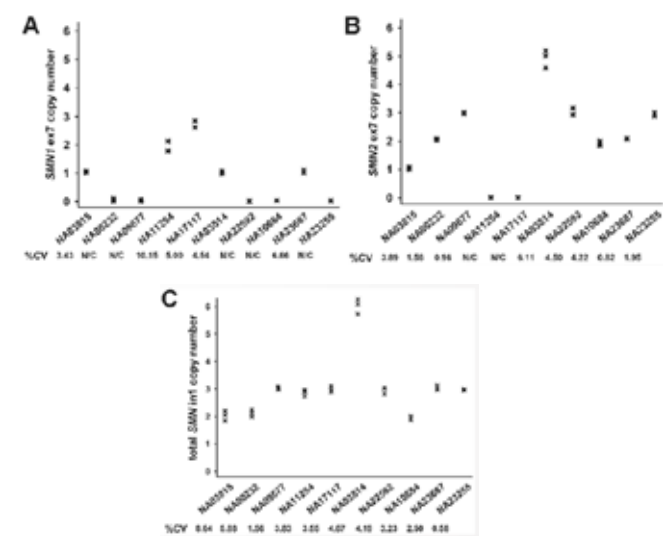


图6. Absolute Q dPCR SMA基因分型引物探针的重复性测试。对来自Coriell细胞库的对照DNA样品(n=10)进行了SMN1 (A)、SMN2 (B)和总SMN (C)拷贝数分析。每个样品一式三份测定。每次测定的试验内精密性(通过%CV测量)列在图上的每个样品下方。

临床及基础研究主要应用

拷贝数变异(CNV)检测

临床盲样的SMN1和SMN2拷贝数检测

分别利用Absolute Q和QuantStudio 3D dPCR检测一组来自患者(n=15)的盲样并进行了比较。这组样本包含来自13名SMA患者和2名非SMA对照的gDNA。Absolute Q dPCR正确识别了队列中所有SMN1纯合缺失的SMA样本。临床盲样的两数字PCR平台对SMN1 (图7A)、SMN2 (图7B)和总SMN (图7C)的拷贝数测量结果一致。SMN1 (图7D)、SMN2 (图7E)和总SMN (图7F)检测结果的Bland Altman分析也同样表明Absolute Q和QuantStudio 3D dPCR检测之间具有很强的一致性。

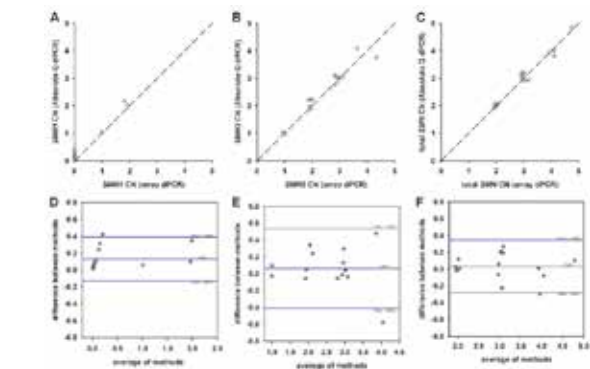


图7. QuantStudio 3D和Absolute Q dPCR检测之间的一致性。(A–C)使用QuantStudio 3D和Absolute Q dPCR分析检测的SMN1 (A)、SMN2 (B)和总SMN (C)拷贝数的散点图。每组测定的等式线在每个图中显示为虚线。(D–F) SMN1 (D)、SMN2 (E) 和总SMN (F)检测的Bland Altman差异图。对于每个测定，偏差显示为蓝色实线，标记为平均值，定义的一致限并标记为平均值 ± 1.96SD (标准偏差)。

结论

SMN1和SMN2拷贝数的准确量化对于SMA的筛查、诊断以及治疗策略的制定至关重要。本研究描述了一种多重dPCR分析方法的开发，该方法可提供准确、快速的SMN1和SMN2拷贝数定量。QS Absolute Q dPCR系统通过类似于qPCR的工作流程提供SMN1和SMN2拷贝数的可靠检测，与其他当前可用的dPCR平台相比，减少了实际操作步骤及人为操作误差。可快速精准获得检测结果。

参考文献

Jiang L, Lin R, Gallagher S, Zayac A, Butchbach MER, Hung P. Development and validation of a 4-color multiplexing spinal muscular atrophy (SMA) genotyping assay on a novel integrated digital PCR instrument. *Sci Rep.* 2020 Nov 16;10(1):19892. doi: 10.1038/s41598-020-76893-7. PMID: 33199817; PMCID: PMC7670453.

临床及基础研究主要应用

基因编辑效率评估

背景介绍

QuantStudio Absolute Q数字PCR平台上开发了可以量化RNA碱基编辑活性的快速且敏感的定量方法。这种检测方法可以对细胞系或患者样本中的RNA编辑事件进行快速绝对定量，并提供了详细的操作流程方案(简易流程如图8所示)，具体包括引物探针设计、优化方案，细胞系的培养及处理，RNA的纯化及反转录，Absolute Q反应体系配置及仪器操作、结果定量和统计分析等。

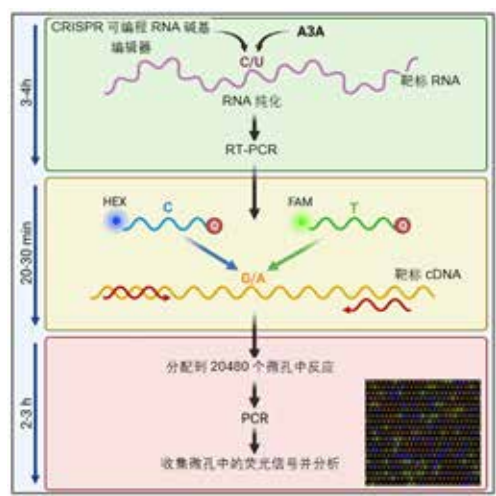


图8. CRISPR可编程RNA碱基编辑器，如APOBEC3A或其他酶在特定位置或热点处对RNA转录本进行编辑的数字PCR检测流程。

APOBEC3A是一种促成肿瘤突变的DNA和RNA胞苷脱氨酶，在病毒感染或许多其他不同的基因毒性应激后，会在癌细胞中被瞬时表达。APOBEC3A可通过促进特定RNA茎环结构中C到U的脱氨基作用(如图9所示)，以独特方式产生RNA突变。点突变DDOST558C>U是APOBEC3A在患者肿瘤中产生的最常见的RNA热点突变。DDOST558C>U点突变位于DDOST mRNA形成的茎环结构的一个环内，为APOBEC3A的活性或其对RNA的编辑效率检测创建了最佳底物。

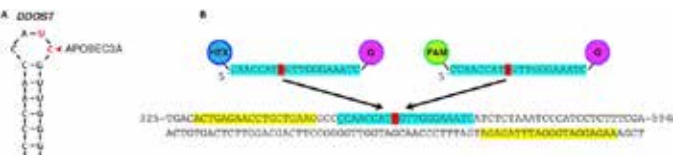


图9. APOBEC3A促进基因DDOST中特定茎环结构的RNA编辑 (A) DDOST mRNA中的茎环结构示意图，这是患者肿瘤样本中频率最高的APOBEC编辑的RNA位点。 (B)根据DDOST的基因组序列设计用于监测DDOST558C>U RNA编辑事件的PCR引物和探针的设计。

dPCR是一种灵敏和定量的方法，用于检测SNP、罕见突变、拷贝数变异和基因重排等。dPCR的基础是将PCR反应划分成数千个独立的纳米微孔，使其相当于同时运行数千个PCR反应。在PCR扩增后，分别评估微孔内的荧光，并按照泊松分布，确定模板序列的绝对定量。重要的是，可以同时使用两个或更多的荧光探针来确定分子群体中两个序列的绝对比例。

实验目的

为了定量APOBEC3A或其他类型的RNA编辑系统诱导的RNA编辑效率，本文选择DDOST558C>U作为监测APOBEC3A介导的RNA编辑活性的靶标，并开发了基于Absolute Q数字PCR (dPCR)的检测方法，以明确且定量检测癌细胞或患者肿瘤中该RNA编辑事件的效率和水平。

实验材料与方法

RT及数字PCR反应体系

试剂	最终浓度	体积
逆转录(RT)反应体系		
RT缓冲液(10×)	2×	2 μL
RT随机引物(10×)	2×	2 μL
dNTP混合物(25×)	2×	0.8 μL
ddH2O	不适用	4.2 μL
MultiScribe逆转录酶(20×; 50 U/μL)	2×	1 μL
总计	不适用	10 μL
数字PCR (dPCR)反应体系		
Absolute Q DNA数字PCR预混液(5×)	1×	1.8 μL
DDOST WT靶标探针(HEX) (10×)	1×	0.9 μL
DDOST突变靶标探针(FAM) (10×)	1×	0.9 μL
ddH2O	不适用	4.4 μL
cDNA	不适用	1 μL
总计	不适用	9 μL

临床及基础研究主要应用

基因编辑效率评估

数字PCR操作步骤

按照反应体系中描述配置，并将9μL的PCR反应体系装载至dPCR芯片板。

步骤	温度	时间	循环
预热	96°C	10 min	1
变性	95°C	5 s	45次循环
退火/延伸	56°C	10 s	

表5. 数字PCR步骤

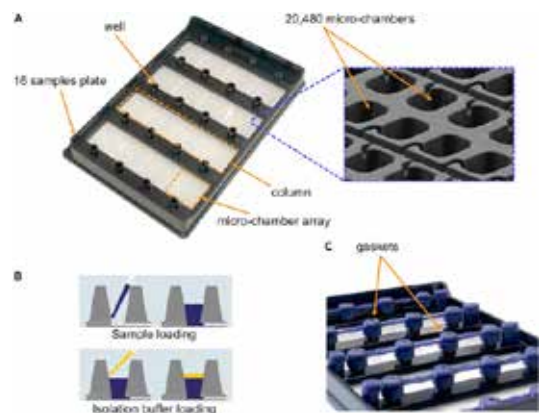


图10. 在数字PCR芯片板上加载样本。(A)左图：数字PCR芯片板及其上样孔。右图：放大微孔芯片中存在的20480个纳米孔部分；(B)如何在数字PCR板的孔中装载样本的示意图；(C)数字PCR板垫片。每个孔加载15μL的分离缓冲液(图3B)。利用垫片封闭板上样品孔(图3C)将芯片板放置QuantStudio Absolute Q数字PCR仪器中。



图11. 数字PCR设置，打开QuantStudio Absolute Q数字PCR软件获得的设置页面示例，设置芯片板上要分析的样本、与探针相关的荧光染料以及PCR条件。

- 打开QuantStudio Absolute Q数字PCR软件，选择要运行的样品孔，将软件上的每个微孔芯片分配给特定样本(图11)。
- 选择“Preheat Two-Step(两步预热)”，并按以下步骤设置反应(表5)。
- 给每种探针分配一个荧光(例如FAM或HEX)通道(图11)。
- 命名运行文件并开始运行。
- 在PCR反应完成后，打开QuantStudio Absolute Q数字PCR软件。选择要分析的文件。
- 如果运行的是需要独立分析的不同样本集，则对样本进行分组。
- 调整x轴和y轴上的阈值，分配阳性FAM和HEX信号，如图12所示。

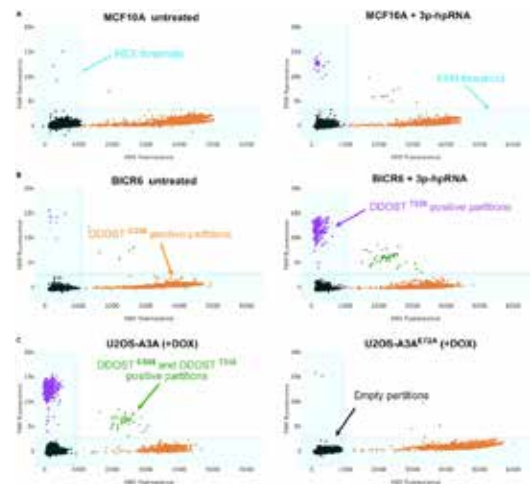


图12. 阳性和阴性纳米孔的定量。(A-C)分别用3p-hpRNA转染48小时和36小时的MCF10A (A)和BICR6 (B)细胞系或用DOX (200 ng/mL)处理48小时的U2OS-A3A/A3AE72A DOX诱导细胞系(C)中HEX (WT)信号(以橙色显示)和FAM(突变体)信号(以紫色显示)的散点图示例。有双阳性信号的微孔以绿色显示，没有任何扩增的微孔以黑色显示。在同一组样本中统一应用确定HEX和FAM阳性信号的阈值。

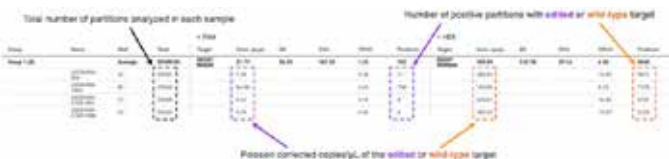


图13. 数字PCR反应完成后生成的表格示例。

临床及基础研究主要应用

NGS测序文库精准定量

背景简介

新一代测序(NGS)技术的进步加速了在基因组水平上对靶标的发现和检测。测序文库的准确量化对于最大限度地提高数据质量和输出质量至关重要。然而，通常用于评估NGS文库浓度的常规定量PCR (qPCR)方法无法准确评估完整文库片段的浓度。此外，在一些情况下，测序文库的核酸量有限，可能难以满足qPCR定量的上样需求。

多项研究表明，在测序前采用数字PCR (dPCR)对NGS文库进行定量，有助于优化测序运行性能、数据生成和数据质量。dPCR可实现绝对(而非相对)定量，在低浓度下比qPCR更灵敏、更精确。还可以利用多重dPCR，识别并量化代表可测序分子的特定文库片段(图15)。

在本应用中，采用Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™数字PCR系统对可测序文库分子进行NGS文库定量。在本研究中定量了具有不同长度插入序列的四个NGS文库。

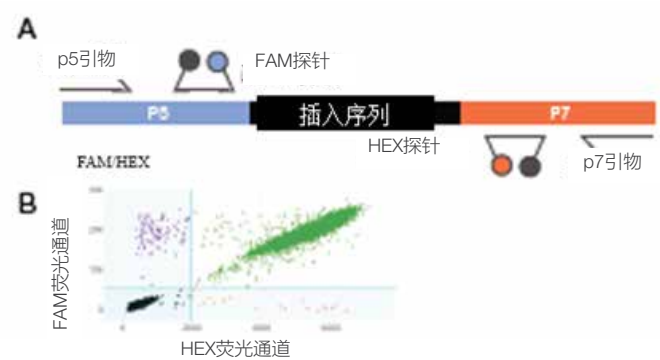


图15. 用于NGS文库定量的dPCR检测原理及结果。
(A) 双重检测方法只能扩增具有P5和P7接头的文库。
(B) 利用dPCR通过计算双阳性液滴总数，可以对测序文库片段进行绝对定量。

材料和方法

文库制备、分离和稀释

采用BluePippin™系统(Sage Science, Inc.)根据片段长度分离单一大小的ATAC-seq文库，即可制成四个独立的NGS文库。它们的平均片段长度分别为300、500、700和1000个碱基对。在片段分离后，对于每个文库，采用Q5™高保真DNA聚合酶(New England Biolabs, Inc.)进行扩增，采用SPRIselect™试剂盒(Beckman Coulter, Inc.)进行纯化。将扩增后的文库以1:200000的比例稀释，即可制成“稀释液1”，然后针对4种片段长度中的每种长度，连续以1:4的比例稀释，总共进行6次稀释。

dPCR试剂制备

在每次反应中使用5μL NGS文库的每份连续稀释液对NGS文库进行dPCR定量。dPCR试剂参见表6。制备dPCR反应体系后，向MAP16芯片板的一个芯片中加入9 μL的反应体系，然后加入15 μL的分隔缓冲液。然后将准备好的MAP16芯片板移至QuantStudio Absolute Q数字PCR系统。每次数字PCR运行均采用以下热循环参数：在96℃下保持10分钟，然后在95℃下变性5秒和61℃下退火和延伸30秒共45个循环。在FAM和HEX通道中收集荧光信号。

试剂	体积或终浓度
数字PCR预混液 (5X)	1.8μL (1X)
正向引物	(900 nM)
反向引物	(900 nM)
P5 FAM探针	(250 nM)
P7 HEX探针	(250 nM)
稀释后的文库	5μL
无核酸酶水	添加至9μL

表6. 用于NGS文库定量的数字PCR反应体系配置。

QuantStudio Absolute Q软件分析

采用Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™分析软件计算每个稀释系列的NGS文库浓度。该软件会报告对FAM™标记探针呈阳性、对HEX™标记探针呈阳性和对两种探针呈双阳性的靶标浓度。根据设计，包含完整且可测序文库片段的液滴对P5 (FAM)和P7 (HEX)探针均呈阳性。双阳性以2D荧光散射视图右上象限中的液滴簇表示(图1B，绿点)。然后在公式1和2(如下所示)中使用双阳性的浓度来确定每个稀释点的原始文库的浓度。

临床及基础研究主要应用

NGS测序文库精准定量

结果

可测序文库片段的定量

四个文库的片段长度各异。采用六份连续4倍稀释液对每个文库进行量化。针对具有特定片段的每个文库的稀释系列，QuantStudio Absolute Q dPCR系统报告的浓度(单位: cp/μL)参见图16。在所有条件下均观察到浓度降低，这符合对4倍稀释系列的预期。对于300 bp、500 bp、700 bp和1000 bp NGS文库，根据报告的浓度及公式1和2计算得出各个NGS文库的原始浓度分别为2.65 nM、3.06 nM、4.63 nM和16.98 nM (表7)。

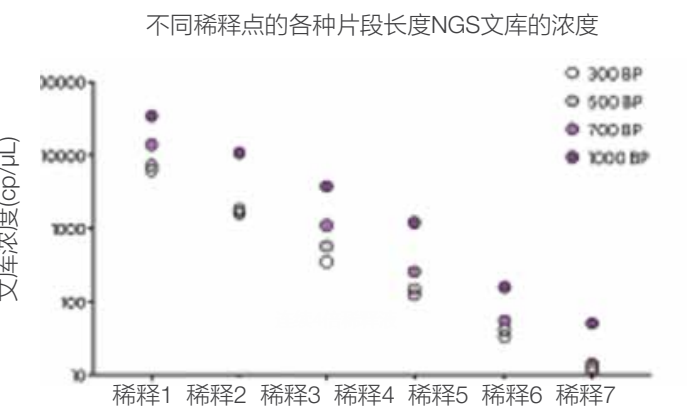


图16. 针对四种不同长度片段的NGS文库(即 300 bp、500 bp、700 bp和1000 bp)，QuantStudio Absolute Q dPCR系统检测可测序NGS文库浓度，以每微升的拷贝数(cp/μL)为单位；采用6种4倍梯度稀释系列对每种长度片段进行定量

文库	300 bp	500 bp	700 bp	1000 bp
稀释液1	2.06	2.41	4.62	11.44
4倍	2.13	2.44	2.33	14.26
16倍	1.86	3.02	5.86	19.93
64倍	3.17	2.67	5.45	25.64
256倍	2.82	3.50	4.67	13.44
1024倍	3.87	4.31	4.81	17.18
平均值	2.65	3.06	4.63	16.98
标准差	0.78	0.74	1.22	5.18

表7. 在6种浓度稀释系列对每种浓度下分别检测四种长度片段的NGS文库浓度。

(公式1)

$$\frac{\text{原始未稀释文库浓度(cp/μL)}}{\text{文库浓度(cp/μL)}} = \frac{\text{浓度} \cdot (\text{cp/μL}) \times 9 \text{ μL dPCR反应}}{5 \text{ μL 稀释后的文库输入}} \times 2 \times 10^5 \times \text{附加稀释}$$

(公式2)

$$\frac{\text{原始未稀释文库浓度(M)}}{\text{文库浓度(cp/μL)}} = \frac{\text{原始未稀释文库浓度(cp/μL)}}{\text{文库浓度(cp/μL)}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ μL}}{6.02 \times 10^{23} \text{ cp/mol}}$$

微流体阵列式芯片在液滴生成方面的优势

采用微流体阵列式芯片(MAP)技术进行dPCR的另一个好处是，试剂分区具有可靠性。MAP技术利用带固定体积阵列的纳升级芯片板，确保对于所有dPCR反应，可用分区覆盖率均超过95%。

为比较MAP与基于液滴式dPCR的液滴生成效率，采用液滴式dPCR与QuantStudio Absolute Q dPCR系统对四个NGS文库进行并行量化。为量化NGS文库，在两种系统上均进行46个样本对的检测。每个MAP dPCR反应阵列共有20480个固定微孔，其中在QuantStudio Absolute Q dPCR系统上进行反应的平均液滴数量(标准差(SD))为20412个(SD 127)。

每次反应预计会有20000个液滴，其中液滴式dPCR平均生成液滴数量为12138个(SD 1267)。而QuantStudio Absolute Q dPCR系统每次反应的最少液滴生成数量为19645个；基于液滴式dPCR反应的最少液滴生成数量只有8629个(图17)。

最后，基于液滴式dPCR (图17B)与QuantStudio Absolute Q dPCR系统(图17C)的典型2D分区荧光图的比较表明，后者所得双阳性与阴性之间的信号分离效果更好。分离方面的改进有助于对dPCR数据进行一致的阈值化，从而获得更可靠和可再现性的定量结果。

临床及基础研究主要应用

NGS测序文库精准定量

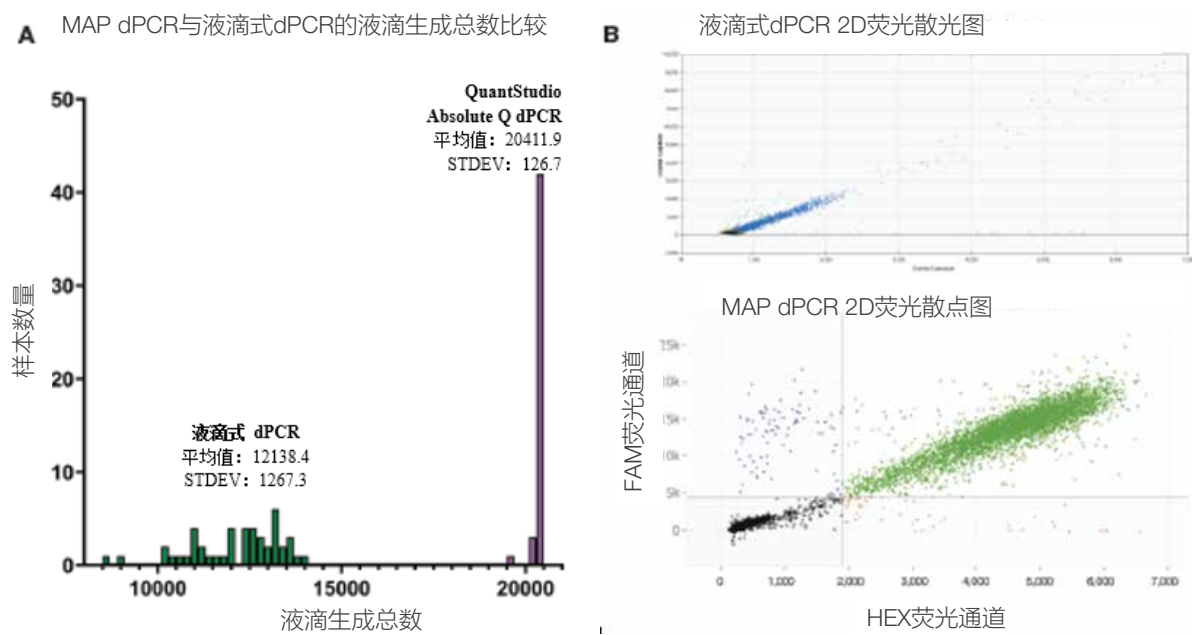


图17. MAP dPCR卓越的液滴生成效率和信号区分。(A)对于采用 MAP dPCR(紫色)和基于液滴式dPCR平台(绿色)在各自仪器上进行液滴生成并运行分析的46个样本，每次dPCR反应的全部液滴生成数的频率分布。(B)通过液滴式dPCR平台(上图)和QuantStudio Absolute Q数字PCR系统(下图)获得的1000 bp文库的二维荧光图

结论

dPCR在NGS文库定量方面具有优势，因为它可以区分完整的可测序文库分子并进行绝对定量。鉴于NGS文库的最终浓度会因制备方法及其方法性能而变化，因此每次dPCR检测的一致性对于保证大范围输入浓度的定量分析可靠性具有至关重要的意义。

当反应体系中每个液滴平均存在1.59个靶标拷贝时，dPCR定量的精度达到最高水平。这意味着液滴生成总数对于高浓度样本至关重要，因为更多的分析液滴可以通过平均值更接近1.59来提高精度。进行NGS文库定量时，由于样本经扩增，靶标的浓度通常非常高。QuantStudio Absolute Q dPCR系统可对大量液滴进行一致分析，即使在高靶标浓度下也能确保高精度，从而确保NGS文库定量的高质量。

公共卫生健康领域应用

Absolute Q 数字 PCR 污水中新冠病毒检测

污水中新冠病毒检测

背景简介

基于污水的流行病学(Wastewater-based epidemiology, WBE)调查可以通过特定病原体为生物标志物对疾病的爆发和传播予以监测。以污水为样本对流行病进行监测有助于了解社区层面的病原体流行率, 包括新冠病毒SARS-CoV-2, 并预测未来病例数量的增加与否, 充当一种针对整个社区的生物标志物靶标。

目前, 污水流行病学研究主要挑战是其原始样本中新冠靶标浓度极低, 即污水中的核酸生物标志物, 与血液、口腔拭子等原始样本中的可用性相比极为稀少, 需要对污水样本进行前处理, 优化核酸提取、核酸检测方法等以提高新冠病毒的检出率。

实验方法

通过膜过滤处理50–500 mL污水

将污水样品(50–500 mL)以10,000 x g离心10分钟, 然后将上清液通过Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™ 0.45 μm尼龙膜过滤器过滤。用镊子将滤膜取出用刀片将膜切成小块, 并将碎片添加到15 mL Falcon™管。将MagMAX的裂解缓冲液(2 mL)加到装有膜片的管中, 并高速涡旋。然后向管中加入蛋白酶K, 并在65°C下孵育20分钟。然后以4,000 x g离心管3分钟以收集上清液到深孔板内。随后利用 KingFisher Flex或Duo提取核酸(图18)。



图18. 污水膜过滤处理工作流程。

体系配置

检测污水中的SARS-CoV-2靶标, 可能还需要更灵敏的技术平台如数字PCR系统。使用Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™数字PCR系统可以利用多达四个光学通道同时对污水相关目标进行多重检测(体系配置见表8)。

Reagent	Final Concentration	Reaction Volume
4X Combinati 1-step RT MM	1X	2.25μL
Combinati SARS-CoV-2 Wastewater Surveillance Assay(20X)	1X	0.45μL
Extracted RNA		2.0μL
Water	Fill to 9μL	*4.3μL

表8. 利用SARS-CoV-2污水监测试剂盒试剂的数字PCR反应体系配置。

公共卫生健康领域主要应用

污水中新冠病毒检测

实验结果

如表9和图19所示，以N1和N2为SARS-CoV-2靶标进行更灵敏的检测和定量，可获得极低拷贝的靶标，在一定程度上提高了检出率。同时还需要检测污水中可靠的内控靶标基因进行均一化校正，以帮助结果标准化，并有助于限制样品制备误差的影响。以人类便靶标-胡椒温和斑疹病毒 (PMMoV)为内控，检测亚利桑那大学西部中心在污水流行病学测试期间收集的四个污水样本。

结论

荧光定量PCR仍然是新冠检测的金标准方法，而数字PCR (dPCR)无需标准曲线即可对靶标进行绝对定量，也可以成为重要补充手段。赛默飞基于污水的流行病学为社区常规监测疾病相关生物标志物提供了灵活全面的解决方案，从样本浓缩富集，到新冠核酸提取纯化以及后续靶标检测，在完全符合污水检测行标的情况下，全面助力疫情防控。

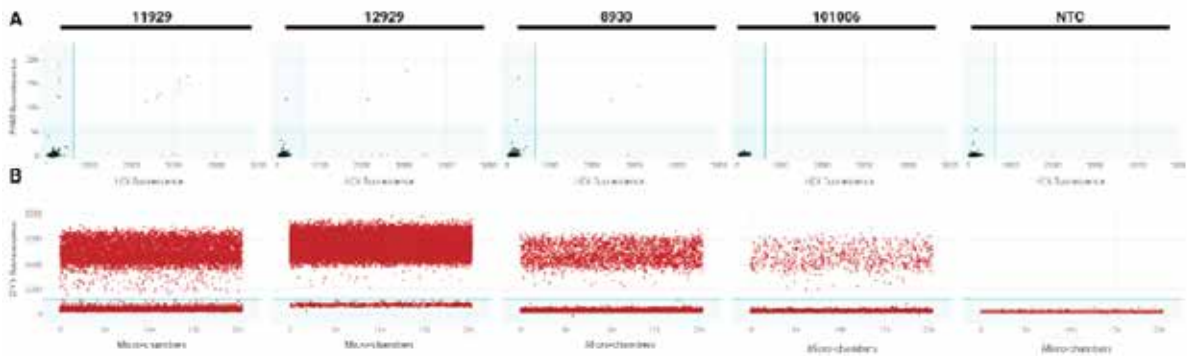


图19. 新型冠状病毒(SARS-CoV-2, SC2)污水监测4-重检测的数字PCR结果。A)分别用于SC2 N1和N2目标检测的FAM和HEX通道二维散点荧光图。单阳性FAM和HEX液滴分别用紫色(左上象限)和绿色(右下象限)表示，双阳性液滴用绿色B表示。CY5通道中的阳性液滴代表胡椒温和斑疹病毒 (PMMoV)内控靶标。

Sample	Total count	N1 (cp/μL)	95%CI	FAM Positives	N2 (cp/μL)	95%CI	HEX Positives	BCoV (cp/μL)	95%CI	TAMRA Positives	PMMoV (cp/μL)	95%CI	TYE Positives
11929	20426	1.29	0.58	11	1.29	0.58	11	0.12	0.1	1	1195.75	26.15	8020
12929	20209	0.83	0.43	7	0.83	0.43	7	0	0	0	810226	174.09	19520
8930	20475	0.35	0.24	3	0.35	0.24	3	0	0	0	32132	12.2	2568
10600	20464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84.07	5.98	705
NIC	20480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表9. 通过QuantStudio Absolute Q数字PCR软件报告的靶标浓度。

QuantStudio Absolute Q 数字PCR 生物制药方向应用

AAV病毒滴度定量

背景简介

腺相关病毒(AAV)在多项临床试验和临床前研究中证明具有有效性和安全性，因而在基因和细胞治疗中得到广泛应用。此外，两个反向末端重复序列(ITR)之间的高转导效率和高效转基因包装(约4.8 kb)，使AAV基因疗法成为基因治疗的一种有吸引力的技术[1,2]。重组AAV(rAAV)生产的一般步骤包括转染宿主细胞，然后采用分析法去除工艺杂质以生成高质量载体，从而满足基因和细胞治疗应用的严格要求。然而，在这些应用中，AAV载体生产面临诸多挑战，需要在多个生产步骤中实现准确定量。

AAV载体生产中遇到的挑战

rAAV以各种低滴度浓度进行批量生产，需要通过浓缩和定量来满足剂量递增研究所需的优化浓度。为此，在AAV制造过程的多个步骤中实现准确和可再现定量的重要性日益突显。尽管定量PCR (qPCR)仍然是用于AAV定量的强大工具，但其需要利用标准品生成标准曲线以提供相对定量。

为了应对这一挑战，QuantStudio™ Absolute Q™数字PCR系统中采用了微流控阵列芯片板(MAP)技术，旨在显著提高物理分隔的一致性。MAP16 dPCR芯片板具有由20,480个微反应室组成的固定体积阵列，以确保可靠分布到所有dPCR反应99%以上的可用微反应室中。在本研究中，我们将基于液滴式数字PCR和基于MAP芯片式QuantStudio Absolute Q dPCR系统进行了对比，以评估5个数量级浓度的检测一致性和AAV病毒滴度的定量。

材料与方法

DNA稀释

为了分析所产生的微反应单元的绝对定量和一致性，使用了包含AAV ITR-2区域的DNA片段的稀释系列模板。将DNA片段连续稀释10倍，共计5个稀释度。加载到每个dPCR反应中的靶标的浓度范围约在18,373至1.8 cp/μL之间。使用针对AAV ITR-2(货号：A52740)的Applied Biosystems™ Absolute Q™病毒滴度检测试剂盒，通过dPCR进行病毒滴度定量。

QuantStudio Absolute Q dPCR试剂准备

如表10所示，为每个稀释度制备3个dPCR反应。简单来说，就是通过混合Applied Biosystems™ Absolute Q™ DNA数字PCR预混液(5X)(货号：A52490)、Absolute QAAV ITR-2检测试剂盒(带有VIC™染料；货号：A52740)、DNA样本和水制备9 μL dPCR反应体系。将反应体系进行短暂涡旋并以10,000 xg的速度离心1分钟，然后加载到MAP16 dPCR芯片板上。之后，将15 μL的 Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™分隔缓冲液(货号：A52730)加入到每个样本孔中，在将芯片板加载到QuantStudio Absolute Q数字PCR系统之前用MAP芯片板密封条覆盖样本孔。实验的工作流程如图1所示。热循环参数为：96°C 10分钟，然后是96°C 5秒(40个循环)和60°C 15秒。

生物制药方向应用

AAV病毒滴度定量

试剂	1个反应的体积(μL)	1个反应+额外10%的体积(μL)	3个反应+额外10%的体积(μL)
AbsoluteQDNA数字PCR预混液(5X)	1.8	2.0	5.9
Absolute Q AAV ITR-2检测试剂盒(20X)	0.45	0.5	1.5
DNA样本	1.8	2.0	5.9
水	4.95	5.4	16.3
总计	9	9.9	29.6

表10. dPCR反应体系的制备。



图20. 基于MAP的QuantStudio Absolute Q数字PCR系统快速简便的实验工作流程。

结果

使用QuantStudio Absolute Q数字PCR分析软件进行数据分析

使用Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ 数字PCR分析软件计算每个稀释度的AAV靶标浓度。软件根据VIC染料通道中的阳性微反应室数量报告靶标浓度。与不含靶标的微反应室相比, 含有AAV靶标的微反应室在VIC染料通道中荧光强度更高。随着稀释度的递增, 阳性微反应室的数量从第一个稀释度到最后一个稀释度逐渐减少(图21)。

然后在公式1中使用软件报告的浓度, 以根据每个稀释度测定原始储备液的浓度。用于QuantStudio Absolute Q数字PCR系统的体积如表10所示。对于在基于液滴的数字PCR系统上运行的样本, 总反应体积为20 μL, 样本输入为4 μL。

(公式1)

$$\text{储备液浓度(cp/μL)} = \frac{\text{软件浓度(cp/μL)} \times \text{反应体积μL}}{\text{样本输入(μL)}}$$

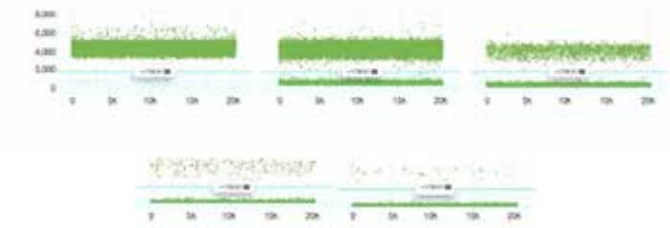


图21. 1D点图显示了对连续稀释样本中的AAV进行基于dPCR的定量。在使用QuantStudio Absolute Q数字PCR系统时, 可以通过计算荧光标记为阳性的微反应室总数在跨越5个浓度梯度的动态范围内对10倍系列稀释样本进行AAV拷贝数的绝对定量。

生物制药方向应用

AAV病毒滴度定量

AAV定量动态范围的测定

根据10倍连续稀释的5个稀释度计算储备液浓度，以对储备液浓度进行定量。表11总结了在使用经过类似处理的样本和遵循推荐方案的情况下，QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR平台的相应软件报告的浓度。使用公式1计算每个稀释度的储备液浓度。

QuantStudio Absolute Q数字PCR系统准确测量了5个浓度梯度动态范围内的AAV浓度。然而，基于液滴的dPCR平台有4个浓度的动态范围显示较窄(表11，图22A)，其中浓度最高的样本“检测无结果”。在这两种方法中的10倍连续稀释条件下，浓度和预期一样降低。95%置信区间(CI)的线性回归分析表明，在所有稀释度的动态范围内，QuantStudio Absolute Q数字PCR系统通过计算得出的储备液浓度和预期储备液浓度之间具有良好的相关性。而基于液滴的dPCR平台在最高浓度下检测无结果(图22B)。

10倍连续稀释	预期浓度 (cp/μL)	软件报告浓度(cp/μL)	
		QuantStudio Absolute Q数字 PCR系统	基于液滴的 dPCR
稀释度2	1,837	2,193	2,174
稀释度3	184	217	218
稀释度4	18	21	22
稀释度5	2	2	3

表11. QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR平台上连续稀释样本的预期AAV浓度和软件报告的AAV浓度。

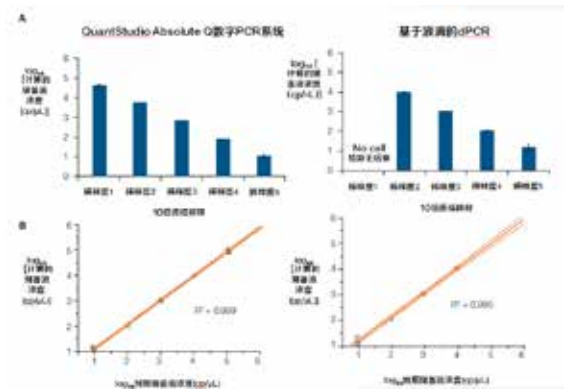


图22. QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR上AAV定量的动态范围。(A)使用QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR通过公式1和表2中的报告浓度值计算得出的AAV浓度。跨越5个稀释度的定量，以cp/μL为单位。(B)预期储备液浓度值与dPCR绝对定量值之间的相关性。对于液滴dPCR中的线性回归计算，仅考虑了检测到的动态范围内的数据。显示了回归线(实线)及其相关的95%CI (虚线)。

生物制药方向应用

AAV病毒滴度定量

QuantStudio Absolute Q数字PCR系统中稳定、一致的反应体系分隔

MAP芯片的另一个优势是稳定的反应体系物理分隔。MAP技术使试剂实现了完全自动化、高度一致的物理分隔，每个数字PCR阵列有20,000多个微反应室，且所有可用微反应室的利用率都在99%以上。为了对基于MAP的dPCR和基于液滴的dPCR之间的微反应体系生成效率进行对比，使用基于液滴的dPCR与QuantStudio Absolute Q数字PCR系统同时对5个稀释度进行了AAV定量。

为确保在分析中使用的都是正确填充的微反应室，QuantStudio Absolute Q数字PCR分析软件会对每个阵列中的每个微反应室进行检查，并且仅接受填充均匀且没有明显碎片迹象或非PCR相关荧光信号的微反应室。图4显示了在QuantStudio Absolute Q数字PCR系统上运行时每个稀释度可接受的微反应室数量。总计15个反应，20,480个微反应室中平均有20,473个可分析的微反应室单元(液滴范围为20,470–20,476个，可用微反应室超过99.9%)，标准偏差(SD)为2.7。相比之下，基于液滴的dPCR差异较大，在较高的浓度下这一点更加明显。对于稀释度1和2，分析液滴的平均值和SD分别为 $18,485 \pm 1,158$ (液滴范围为17,172–19,358个)和 $14,475 \pm 5,817$ (液滴范围为8,028–18,167个)。

此外，MAP技术将所有稀释度的样本浪费率(死体积)降低至<5%，而基于液滴的dPCR在样本损失率上的可变性较高，其中，稀释度2样本显示基于20,000个预期液滴的样本损失率高达 $26.3 \pm 23.7\%$ (范围为9.2–59.9%)。用可接受的微反应室或液滴的总数乘以每个微反应室的报告体积(432 pL)或液滴的报告体积(1 nL)，计算出样本浪费百分比。从基于MAP的dPCR的初始dPCR体系输入(9 μ L)或基于液滴的dPCR的初始dPCR体系输入(20 μ L)中减去总分析体积，以确定浪费样本的总体积。用总浪费样本除以每个体系的初始输入体积，然后再乘以100%，以确定样本浪费(死体积)百分比。

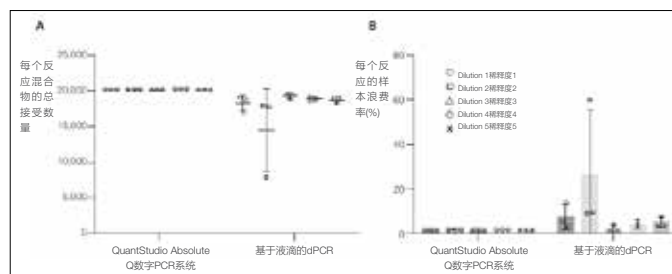


图23. 基于MAP的QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR平台之间有关数字化一致性和样本浪费百分比的对比。(A) 对于在基于MAP的QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR平台上同时运行的5个AAV稀释液，每个dPCR反应的可接受微反应室或液滴总数的分布。(B) QuantStudio Absolute Q数字PCR系统和基于液滴的dPCR平台中每个反应的样本浪费百分比。

结论

在整个生产过程中，rAAV是以不同的滴度浓度生产获得的，因此准确检测rAAV的动态范围至关重要。QuantStudio Absolute Q数字PCR系统具有简单的工作流程和快速的周转时间，能够充分满足在细胞和基因治疗研究中快速准确地定量rAAV的需求。

QuantStudio Absolute Q数字PCR系统中采用的MAP技术可实现高效的反应体系物理分隔，20,480个固定纳米孔的利用率达99%以上，并且能够最大限度地减少样本和试剂的浪费率。此外，与基于液滴的数字dPCR平台相比，基于MAP芯片的QuantStudio Absolute Q数字PCR系统可检测5个浓度梯度，具有更宽的AAV定量动态范围。当与Absolute Q病毒滴度检测试剂盒(可以单独使用或与靶基因的定制检测试剂盒进行多重分析)配合使用时，dPCR可以轻松、准确地定量完整病毒载体，以评估生物制药和基因治疗研究的质量。

生物制药方向应用

残留质粒定量检测

背景简介

在基因疗法、细胞治疗、疫苗及类似生物疗法的开发过程中需要对残留DNA进行检测，以评估产品质量和安全性。生物制剂中残留DNA的量必须符合世界卫生组织(WHO)、欧洲药典、美国食品药品监督管理局(FDA)及其他全球监管机构制定的监管指南要求。resDNASEQ定量质粒DNA—卡那霉素抗性基因(pDNA-KanR)试剂盒(A50337)通过基于qPCR系统检测含有卡那霉素抗性基因的残留质粒DNA。该试剂盒能够通过靶向常用质粒中存在的卡那霉素抗性基因进行快速、灵敏定量。从而有助于确保从广泛的样品类型(从采用不同样品基质的中间样品到原料药)中获得可靠定量数据。

数字PCR (dPCR)系统用于基因和细胞治疗

r对生物治疗产品中的残留质粒DNA进行检测和定量时，准确性和一致性是提供高置信度的关键因素。虽然dPCR逐渐成为精确核酸定量的标准方法，但许多不同商业化的dPCR技术平台都存在一些阻碍其广泛应用的局限性，例如工作流程繁琐、需要较长时间才能获得结果、液滴生成数量及大小不一致导致大量样品被浪费进而影响检测结果准确性等等。QS absolute Q新一代数字PCR的上市可以很好的弥补目前商业化平台的不足。

材料与amp;方法

经使用已知含有三种KanR基因型的不同样品证明，resDNASEQ定量质粒DNA—卡那霉素抗性基因检测与QuantStudio Absolute Q数字PCR系统兼容。resDNASEQ试剂盒包括卡那霉素阳性对照品、10X KanR检测引物探针和阴性对照品(水)。此外，需额外配套使用在QuantStudio Absolute Q dPCR 系统上运行的适当试剂和耗材，包括QuantStudio MAP 16数字PCR芯片板和Applied Biosystems™ Absolute Q™ DNA数字PCR预混液(5X)。所有消耗品参见表1。为了在不同浓度下量化三种KanR变异基因型，对每个变体样品进行连续稀释(表2)。然后在 dPCR 上检测。

标准品名称	DNA标准品 (μL)	DNA 稀释 缓冲液(μL)	浓度 (拷 贝/μL)	稀释 倍数
Std 0	10 μL的阳性对照品	990	3 x 10 ⁵	100x
Std 1	20 μL的Std 0	180	3 x 10 ⁴	10x
Std 2	20 μL的Std 1	180	3 x 10 ³	10x
Std 3	20 μL的Std 2	180	3 x 10 ²	10x
Std 4	20 μL的Std 3	180	3 x 10 ¹	10x
Std 5	20 μL的Std 4	180	3	10x
Std 6	100 μL的Std 5	100	1.5	2x

表14. 标准曲线制备。

在QuantStudio Absolute Q数字PCR系统上进行分析时，按照标准 QuantStudio Absolute Q dPCR方案(表15)制备每种浓度标准品的dPCR反应体系。将每个9 μL反应混合物装载到 QuantStudio MAP16 芯片板的一个孔中，然后覆以分隔缓冲液(表15)。每个标准品(Std 2、4、5和6)一式三份装载到QuantStudio Absolute Q MAP16芯片板中(例如，参见表16)，然后装载到 QuantStudio Absolute Q数字PCR系统上。每次数字 PCR 运行均采用以下参数：96°C 10分钟，然后进行95°C变性5秒以及61°C下退火和延伸30秒共45个循环。使用Applied Biosystems™ FAM™染料通道收集数据。

dPCR反应体系	体积(μL)
5X数字PCR预混液	1.8
10X KanR引物探针	0.9
H ₂ O	1.3
标准/模板	5
总体积	9
封闭液	体积(μL)
QuantStudio Absolute Q分隔缓冲液	15

表15. dPCR反应体系和分隔缓冲液的配比。

生物制药方向应用

残留质粒定量检测

向QuantStudio Absolute Q MAP16芯片板上未使用的芯片孔中添加24 μL的分隔缓冲液。				
	1	2	3	4
A	Std 2	Std 2	Std 2	NTC
B	Std 4	Std 4	Std 4	NTC
C	Std 5	Std 5	Std 5	NTC
D	Std 6	Std 6	Std 6	空

表16. dPCR芯片板设置示例。

结果

Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q数字PCR软件以拷贝/μL为单位报告输出数据，因此根据样品输入体积(5 μL)对这些数据进行了调整，以便将其与qPCR结果进行比较。KanR qPCR方案指定采用10 μL样本输入体积并根据拷贝数生成数据。对此，为了将dPCR结果与qPCR数据进行比较，根据下列公式调整了dPCR结果。

预期qPCR拷贝 = ((dPCR 拷贝/μL) x 2) x 10

使用新的dPCR工作流程检测了三种不同的KanR基因型。对于所有三种基因型，采用dPCR工作流程精确检测(图24)。

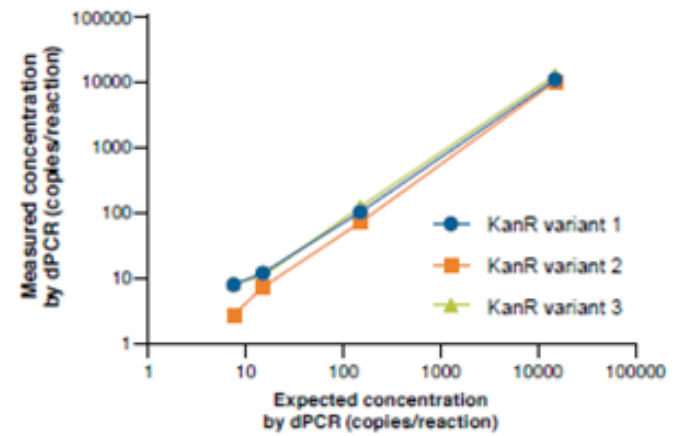


图24. 3种不同KanR 基因型的dPCR结果。对于所有三种KanR基因型，精确测量qPCR LOQ (Std 5)和LOD (Std 6)的稀释样品的浓度。

结论

生物制剂产品需通过各种复杂生物工艺。监管机构对此类产品的安全具有严格的检测标准。resDNASEQ定量质粒DNA — 卡那霉素抗性基因(pDNA-KanR) 试剂盒提供一种重要的检测方法，可确保残留质粒不会遗留到最终制剂中。我们在此介绍该检测方法迁移到QuantStudio Absolute Q数字PCR系统的可行性。可使用QuantStudio Absolute Q dPCR系统通过KanR检测对残留质粒进行绝对定量。该方法无需生成或使用标准曲线，即可量化每个反应中的痕量残留。QuantStudio Absolute Q dPCR系统凭借简易性和高灵敏度，包括与自定义检测的兼容性，在90分钟内即可完成样品检测。可对qPCR结果进行快速、便捷复核确认。

赛默飞世尔科技

上 海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588

成 都

成都市临江西路1号川投大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

南 京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

北 京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 010-87946888

沈 阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西 安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

广 州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

武 汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2~5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号与官方网站。

赛默飞世尔科技在全国共有14个商业办公室。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞
基因科学中国
官方微信

免费 800 820 8982
服务电话 400 820 8982
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.