**Stilla naica®数字PCR系统操作流程**

**一、实验准备**

1. **使用配套的微流控芯片**

如Sapphire芯片，支持1-12样本/次；或Opal芯片，支持1-48样本/次。

1. **准备PCR反应预混液**

（含引物、探针、酶、dNTPs等），需根据实验设计优化浓度（如引物/探针浓度建议0.125-1μM）。

1. **混合与离心：**

将上述试剂加入到离心管中。涡旋混匀后瞬时离心，将所有试剂离心到管底。

**二、加样**

1. **打开芯片**：

打开Sapphire芯片的白色盖子，任意方向旋转1/4圈即可打开，丢弃盖子。

1. **加样操作**：

移取25μL混合好的PCR反应液，加入到Sapphire芯片的孔井中，注意不要与内置油相接触。

1. **封闭芯片**：

使用专用PCR盖封闭孔井。

1. **芯片转移**：

将封闭好的芯片转移到Naica Geode微滴生成和扩增系统中。

**三、微滴生成和PCR扩增**

1. **系统准备**：

打开Naica Geode系统，调节气压到1,250+/-50mbar。

1. **芯片放置**：

打开机器盖，将芯片垂直放置于加热模块上，关闭机器盖并确保密封。

1. **程序选择与启动**：

在主幕菜单中选择“Run”，然后“Open”，在“scripts”或“templates”下拉菜单中选择应用程序点击“Open”（默认的PCR和RT-PCR程序在“templates”中）。

也可以编辑程序参数后启动。

1. **监控与结束**：

通过LiveLogs实时监控压力和温度条件。运行结束后，屏幕上将显示“PCR completed successfully, touch the screen to continue”。打开Naica Geode顶盖，平稳地将芯片转移到Naica Prism3中。

**四、数据采集**

1. **启动Crystal Reader**：

点击位于Naica PC桌面上的Crystal Reader图标。

1. **加载芯片**：

当“open tray”状态变为深灰色的激活状态时，点击该按钮，将芯片转移到Prism3中，Prism3工作指示灯变绿。

**五、设置扫描参数**

1. **实验命名**：

点击“NEW EXPERIMENT”对实验进行命名。

1. **调用或编辑参数**：

调用预设参数：如果您之前已将所有实验参数保存，请单击“LOAD PRESET”并选择。

编辑实验参数：输入荧光染料名称和靶标基因名称（蓝、绿和红）通道。

1. **确认参数**：

确认焦距和LED曝光时间等参数。

**六、选择和编辑扫描样品**

1. **增加或删除样品**：

根据需要增加或删除检测chamber数量。点击图标进入芯片编辑模式，增加/移除扫描样品。

1. **定义样品信息**：

编辑单个或多个样品信息，包括样品名称、类型（U: Unknown未知样品，N: Negative control阴性对照，P: Positive control阳性对照，S: Standard标准品）和稀释因子等。

**七、加载和扫描芯片**

1. **放置芯片**：

清洁芯片底部后放置在托架上，输入芯片条形码。

1. **开始扫描**：

点击“CLOSE TRAY”和“SCAN”开始数据采集。

**八、QC质控**

1. **查看结果**：

* 扫描完成后，将给出三种可能的结果质控标识（High, Moderate, Low）。
* 通过蓝色通道查看阴性微滴，勾选“Display Saturation Map”确定每个通道是否有过曝。

**九、荧光校正（可选）**

1. **使用已有文件**：

使用已有的荧光校正文件进行校正。

1. **新建校正文件**：

选择对应的negative control和monocolour controls，调整thresholds后计算补偿。

**十、确认阈值**

1. **检查一致性**：

检查自动阈值在所有Chamber和通道的一致性。

1. **手动调整**：

根据需要手动调整阈值。

**十一、查看结果**

1. **查看浓度**：

点击“VIEW RESULTS”查看核酸拷贝数浓度及置信度区间。

1. **查看图表**：

通过“Advanced Graphs”查看浓度范围的图表形式。

**十二、数据导出**

1. **选择导出类型**：

选择需要导出的数据类型，包括实验详情、chamber详情、原始数据、质控文件等。

1. **导出数据**：

点击“EXPORT”导出数据。

**注意事项**

1. **操作环境**：

确保操作环境清洁、无尘，避免灰尘和杂质进入芯片或系统内部。保持操作台面平整，避免芯片在转移过程中受到震动或碰撞。

1. **试剂与耗材**：

使用高质量的试剂和耗材，确保实验结果的准确性和可靠性。试剂应保存在适当的条件下，避免受潮、变质或污染。

1. **芯片处理**：

芯片打开后应尽快使用，避免长时间暴露于空气中导致污染或干燥。加样时应避免气泡产生，确保反应液充分混合并充满孔井。

1. **系统操作**：

严格按照操作指南进行系统操作，避免误操作导致实验失败或设备损坏。在操作过程中，密切关注系统状态和实验进度，及时处理异常情况。

1. **数据质控**：

实验结束后，应进行全面的数据质控，确保实验结果的准确性和可靠性。对于异常数据或结果，应进行复核和验证，必要时重新进行实验。

1. **维护与保养**：

定期对系统进行维护和保养，确保系统处于良好状态。清洁系统内部和外部的灰尘和杂质，避免对实验结果产生影响。

1. **培训与资质**：

操作人员应接受专业培训，熟悉系统操作流程和注意事项。确保操作人员具备相应的资质和经验，能够独立进行实验操作和数据分析。