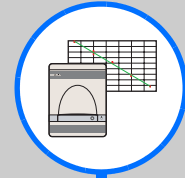
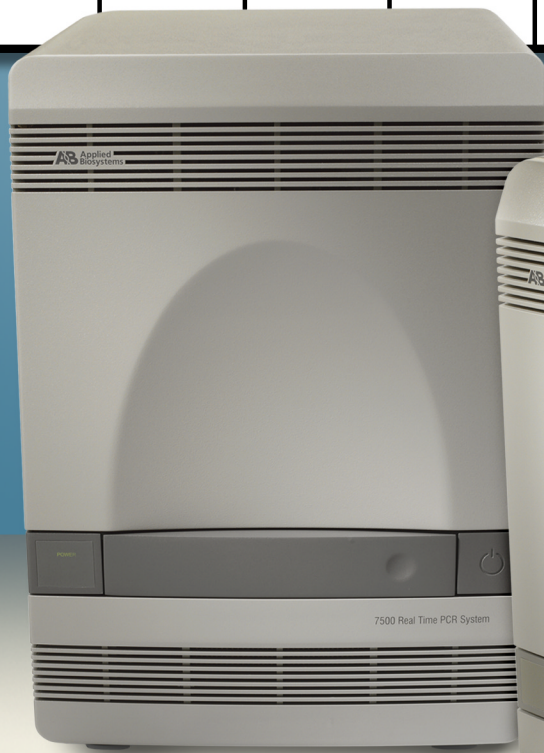
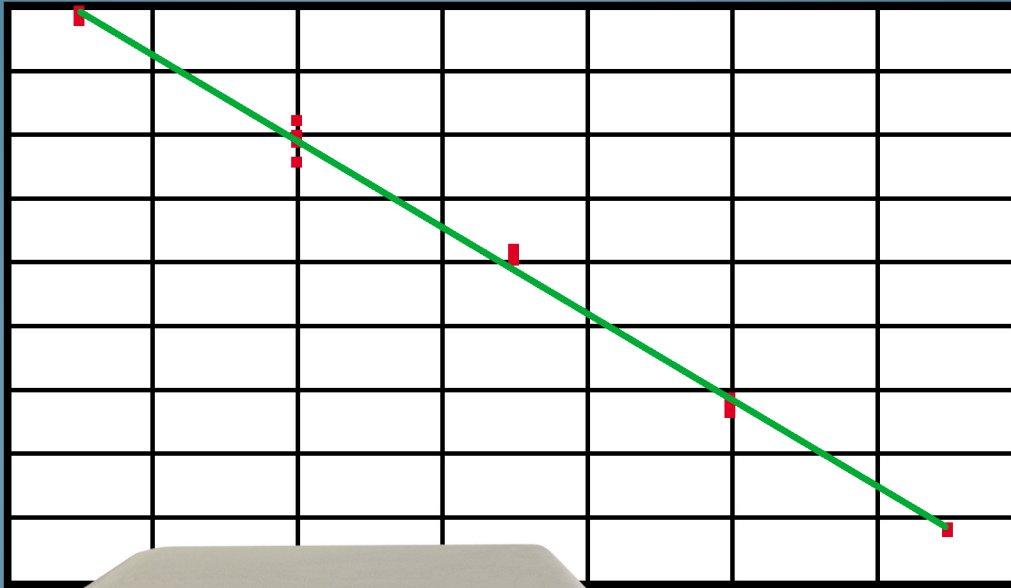
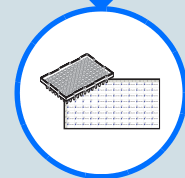


# 绝对定量实验

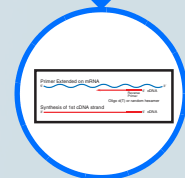
美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪



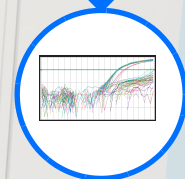
简介和绝对定量  
示例实验



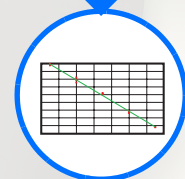
设计  
绝对定量实验



执行反转录



运行绝对定量  
反应板



分析绝对定量  
数据

© Copyright 2004, Applied Biosystems. All rights reserved.

**For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

Authorized Thermal Cycler

This instrument, Serial No \_\_\_\_\_, is an Authorized Thermal Cycler. Its purchase price includes the up-front fee component of a license under United States Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,965,188, owned by Roche Molecular Systems, Inc., and under corresponding claims in patents outside the United States, owned by F. Hoffmann-La Roche Ltd, covering the Polymerase Chain Reaction ("PCR") process to practice the PCR process for internal research and development using this instrument. The running royalty component of that license may be purchased from Applied Biosystems or obtained by purchasing Authorized Reagents. This instrument is also an Authorized Thermal Cycler for use with applications licenses available from Applied Biosystems. Its use with Authorized Reagents also provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents. Purchase of this product does not itself convey to the purchaser a complete license or right to perform the PCR process. Further information on purchasing licenses to practice the PCR process may be obtained by contacting the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404.

**DISCLAIMER OF LICENSE:** No rights for any application, including any in vitro diagnostic application, are conveyed expressly, by implication or by estoppel under any patent or patent applications claiming homogeneous or real-time detection methods, including patents covering such methods used in conjunction with the PCR process or other amplification processes. The 5' nuclease detection assay and certain other homogeneous or real-time amplification and detection methods are covered by United States Patent Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,804,375 and 5,994,056, owned by Roche Molecular Systems, Inc.; by corresponding patents and patent applications outside the United States, owned by F. Hoffmann-La Roche Ltd; and by United States Patent Nos. 5,538,848 and 6,030,787, and corresponding patents and patent applications outside the United States, owned by Applied Biosystems. Purchase of this instrument conveys no license or right under the foregoing patents. Use of these and other patented processes in conjunction with the PCR process requires a license. For information on obtaining licenses, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, or The Licensing Department, Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California, 94501, USA.

#### **Trademarks**

Applied Biosystems, MicroAmp, Primer Express, ROX, and VIC are registered trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

AB (Design), ABI PRISM, Applied Biosystems, Assays-by-Design, Assays-on-Demand, Celera Genomics, FAM, iScience, iScience (Design), and MultiScribe are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

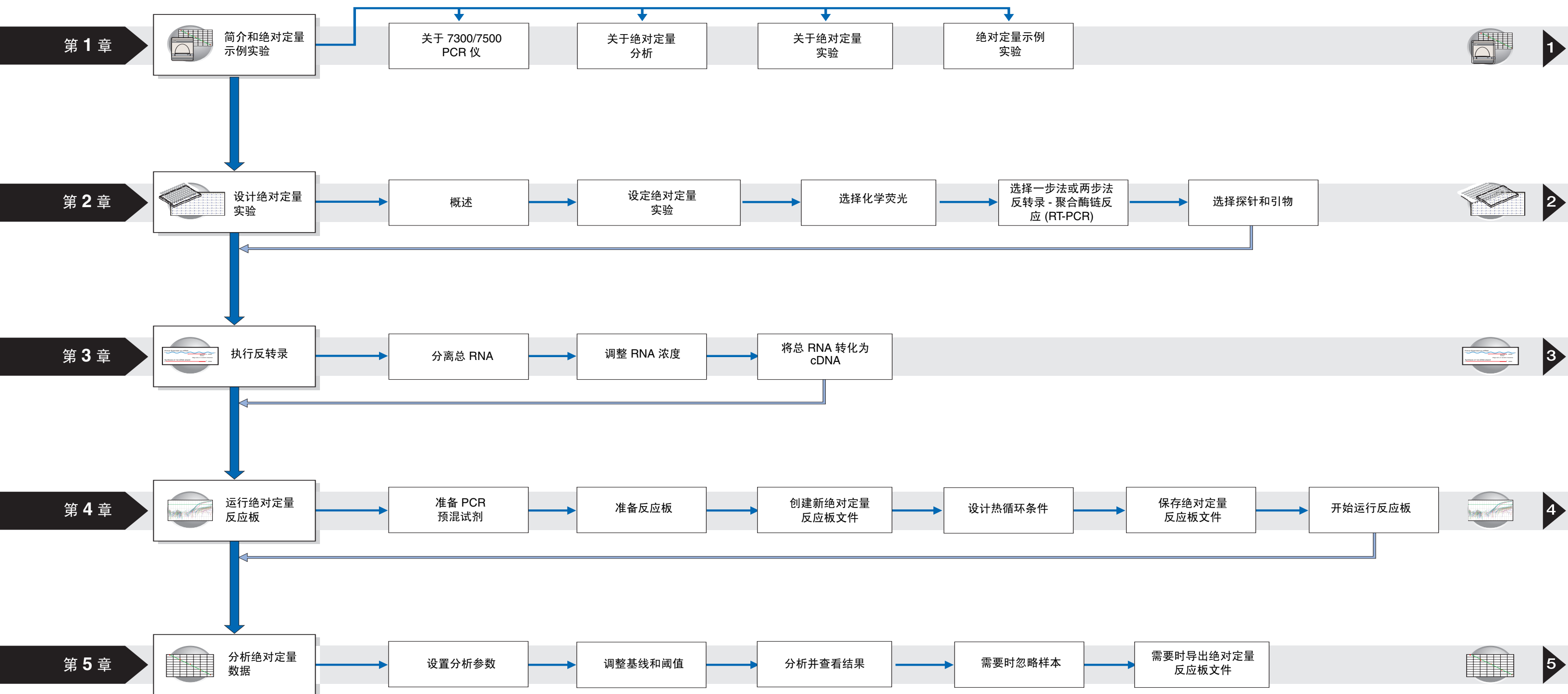
AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR Green is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Part Number 4347963 Rev. A  
3/2004





# 目录

	<b>绝对定量实验工作流程</b>	<b>iii</b>
	<b>前言</b>	<b>vii</b>
	如何使用本指南 .....	vii
	如何获取更多信息 .....	viii
	如何获取服务与支持 .....	viii
	将您的意见和建议发送给我们 .....	viii
<b>第 1 章</b>	<b>简介和绝对定量示例实验</b>	<b>1</b>
	概述 .....	1
	关于 7300/7500 PCR 仪 .....	2
	关于绝对定量分析 .....	2
	关于绝对定量实验 .....	3
	绝对定量示例实验 .....	6
<b>第 2 章</b>	<b>设计绝对定量实验</b>	<b>11</b>
	工作流程 .....	11
	概述 .....	12
	设定绝对定量实验 .....	12
	选择化学荧光 .....	13
	选择一步法或两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) .....	14
	选择探针和引物 .....	15
<b>第 3 章</b>	<b>执行反转录</b>	<b>17</b>
	工作流程 .....	17
	准备 RNA 指南 .....	18
	将总 RNA 转化为 cDNA .....	19
<b>第 4 章</b>	<b>运行绝对定量反应板</b>	<b>21</b>
	工作流程 .....	21
	开始之前 .....	22
	准备 PCR 扩增预混试剂 .....	22

	准备反应板 .....	23
	创建绝对定量 (AQ) 反应板文件 .....	24
	指定热循环条件并开始运行反应板 .....	28
<b>第 5 章</b>	<b>分析绝对定量数据</b>	<b>31</b>
	工作流程 .....	31
	设置分析参数 .....	32
	调整基线和阈值 .....	33
	分析并查看绝对定量数据 .....	39
	忽略样本 .....	44
	导出绝对定量反应板数据 .....	45
<b>附录 A</b>	<b>创建探针</b>	<b>47</b>
<b>附录 B</b>	<b>生成标准曲线指南</b>	<b>49</b>
<b>附录 C</b>	<b>熔解曲线分析</b>	<b>51</b>
	<b>参考文献</b>	<b>53</b>
	<b>索引</b>	<b>55</b>

## 如何使用本指南

**本指南的目的** 本指南为使用美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪（7300/7500 PCR 仪）执行绝对定量实验分析的主要研究人员及实验室人员而编写。

**假定** 本指南假定您已具备以下条件：

- 熟悉 Microsoft® Windows® XP 操作系统。
- 具备处理 DNA 和 RNA 样本及为 PCR 准备样本的一般知识和技能。
- 具备有关硬盘驱动器、数据存储、文件传输、复制和粘贴数据的一般常识。

如果您希望将 7300/7500 PCR 仪集成到现有的实验室数据流系统中，则需具备网络经验。

**文字体例**

- **粗体** 表示用户动作。例如：  
键入 **0**，然后对剩余的每个字段按一下 **Enter** 键。
- *斜体* 表示新的或重要的内容，也用于表示强调。例如：  
在开始分析之前，请 *始终* 准备好新鲜基质。
- 右箭头状尖括号 (>) 用于分开您从下拉菜单或快捷菜单中依次选择的命令。  
例如：  
选择 **File（文件） > Open（打开） > Spot Set（点设置）**。

**用户警示文字** 在美国应用生物系统公司用户文档中，包括以下用户警示文字。每种警示文字表示需遵守事项或执行动作的不同重要性级别，如下所述：

**注释：** 提供使用产品的有趣或帮助性信息，但并非使用产品不可或缺的事项或操作。

**重要！** 提供正确操作仪器、精确使用化学试剂或确保安全使用某化学品所必须遵守的要求或必须执行的操作。



**注意** 表示存在潜在的危險状况，如果不加以避免，则可能导致轻度或中度人身伤害。也用于提醒避免不安全的操作。



**警告** 表示存在潜在的危險状况，如果不加以避免，则可能导致死亡或严重人身伤害。

**安全注意事项** 有关重要的安全注意事项信息，请参阅《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪安装和维护入门指南》和《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪场地准备指南》。

## 如何获取更多信息

有关使用 7300/7500 实时定量 PCR 仪的更多信息，请参阅：

- 美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪联机帮助
- 《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪等位基因鉴别实验入门指南》（货号 4347964）
- 《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪阳性 / 阴性实验入门指南》（货号 4347965）
- 《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪相对定量实验入门指南》（货号 4347966）
- 《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪安装和维护入门指南》（货号 4347967）
- 《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪场地准备指南》（货号 4347968）
- 《序列检测系统化学指南》（货号 4348358）

## 如何获取服务与支持

有关不同地区产品服务和技术支持的最新信息，请登录网站 <http://www.appliedbiosystems.com> 并单击 **Support**（支持）链接查阅。

在 Support（支持）页上，您可以：

- 搜索并查阅常见问题与解答 (FAQ)
- 直接向技术支持人员提交问题进行咨询
- 订购美国应用生物系统公司用户文档、材料安全数据表 (MSDS)、分析证书及其它相关文档
- 下载 PDF 文档
- 获取有关客户培训的信息
- 下载软件更新和补丁程序

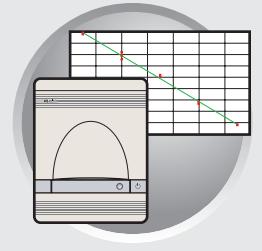
此外，在 Support（支持）网页上还提供全球各地美国应用生物系统公司技术支持和销售机构的电话和传真号码。

## 将您的意见和建议发送给我们

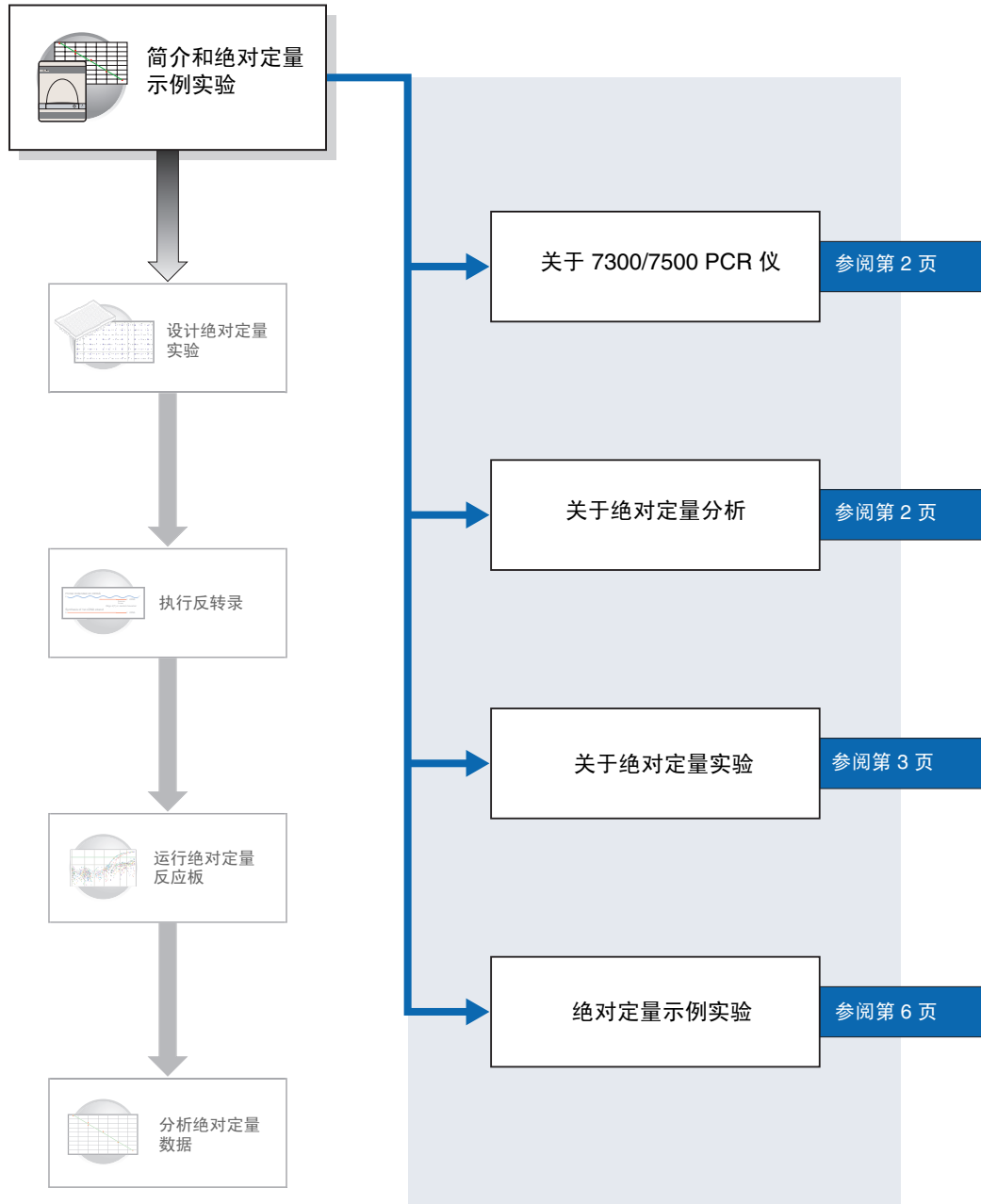
美国应用生物系统公司欢迎您对我们的文档提出您的宝贵意见和建议，以不断提高我们的用户文档质量。请将您的意见或建议发送电子邮件至：

**[techpubs@appliedbiosystems.com](mailto:techpubs@appliedbiosystems.com)**

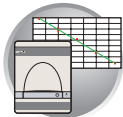




## 概述



注释



## 关于 7300/7500 PCR 仪

**说明** 美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪（7300/7500 PCR 仪）使用基于化学荧光的 PCR 检测手段，提供采用实时分析法的核酸序列定量检测，和采用终点和熔解曲线分析法的核酸序列定性检测功能。

**绝对定量分析** 7300/7500 实时定量 PCR 仪允许使用 96 孔板格式的反应板或试管执行几种检测分析。本指南描述绝对定量 (AQ) 实验分析。

有关其它实验检测与分析的说明，请参阅 《美国应用生物系统公司序列检测系统化学指南》(SDS Chemistry Guide) 和美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪联机帮助 (Online Help)。

## 关于绝对定量分析

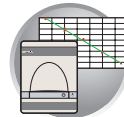
**定义** 绝对定量分析用于确定未知样本中某个目标核酸序列的绝对量值。

**实时 PCR 分析** 绝对定量 (AQ) 分析以实时 PCR 方式执行。在实时 PCR 分析过程中，PCR 基因扩增一直在您的监控之中。在 PCR 进行期间进行数据采集，而不是在 PCR 结束时（终点 PCR）才获取数据。

在实时 PCR 中，反应是在目标的扩增最早被监测到时用循环中的时间点来描述的，而不是在 PCR 结束时通过目标的累积数来描述。

**使用绝对定量反应板文件进行阳性/阴性分析和等位基因鉴别分析** 尽管阳性 / 阴性分析和等位基因鉴别 (AD) 分析是终点分析，美国应用生物系统公司仍建议您使用 7300/7500 PCR 仪执行扩增，并观察实时 PCR 结果。若一旦实验失败，您可通过研究扩增图谱来帮助确定实验失败的原因。

使用绝对定量反应板文件来存储阳性 / 阴性分析和等位基因鉴别 (AD) 分析的实时数据。用于阳性 / 阴性分析和等位基因鉴别分析的绝对定量反应板文件，不需要标准曲线。



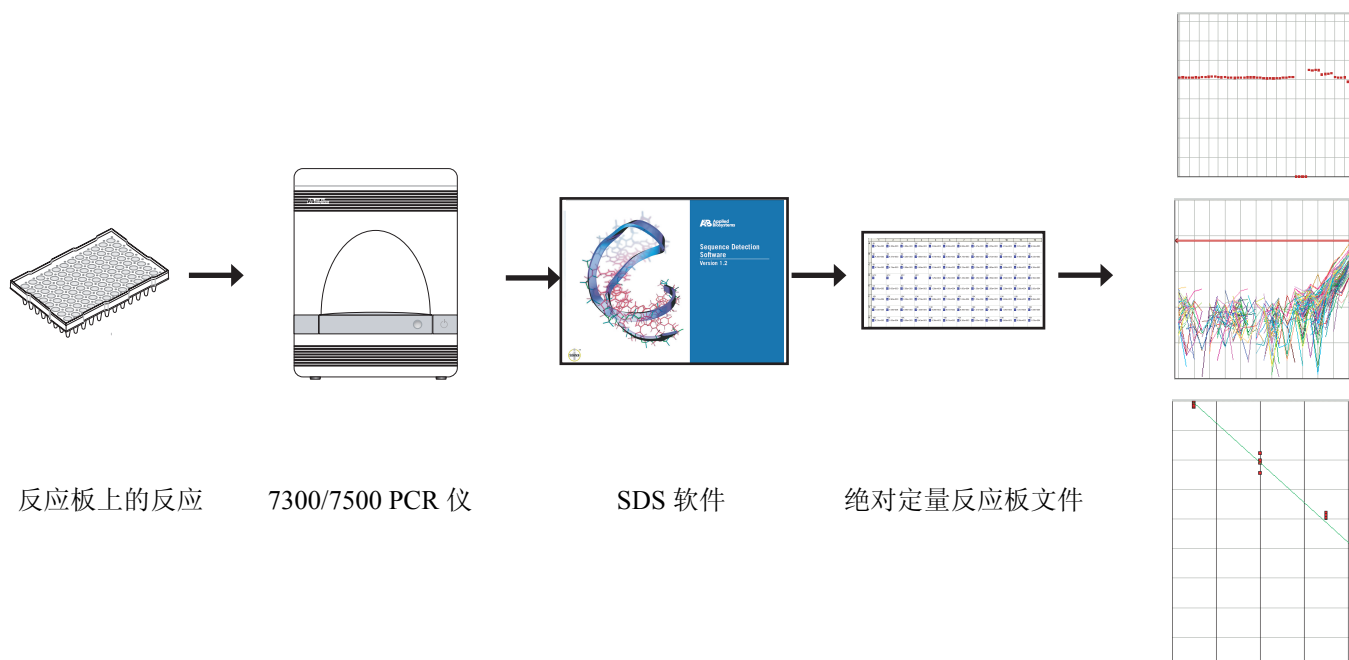
## 关于绝对定量实验

### 绝对定量实验工作流程

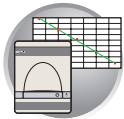
本文中“绝对定量 (AQ) 实验”术语是指绝对定量实验分析的整个过程，以从核糖核酸 (RNA) 生成互补脱氧核糖核酸 (cDNA) (反转录) 为起点，直到分析绝对定量数据结束。绝对定量实验工作流程包括几个步骤，如第 iii 页流程图所示。

绝对定量分析使用标准曲线计算某个未知目标序列的数量。绝对定量实验的结果采用标准曲线中所使用的相同测量单位。

7300/7500 PCR 仪存储从绝对定量反应板文件中的反应板上收集的实时 PCR 数据。每次运行包括一个反应板。7300/7500 PCR 仪提供几种视图用来分析数据。



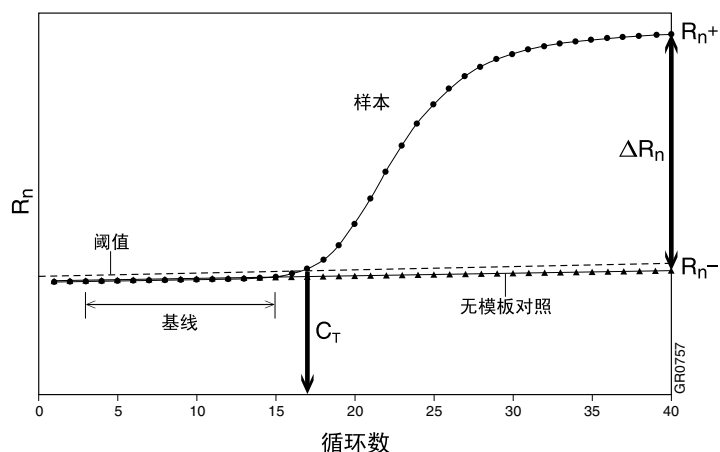
注释



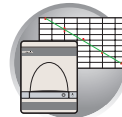
## 定量分析中使用的术语

术语	定义
基线	PCR 的最初几次循环，在此基线上荧光信号几乎没有变化。
阈值	$\Delta R_n$ (校正后报告荧光强度) 的一个值 — 由 SDS 软件自动确定或手动设置 — 用于在实时实验分析中确定 $C_T$ 值。此阈值应设置为高于基线，但应足够地低，使其控制在扩增曲线的指数增长阶段范围之内。阈值线与扩增曲线的交叉点确定 $C_T$ 值。
阈值循环 ( $C_T$ )	荧光信号强度超过设置的阈值强度时所经历的循环数。
无模板对照 (NTC)	不包含模板的样本。用于验证扩增量。
目标核酸 (又称“模板”)	您想要确定是否含有或其数量为多少的核苷酸序列。
阳性参比荧光	一种荧光，其本身产生一种内部荧光，通过参比这种荧光，在数据分析期间对报告基团信号进行标准化。标准化对于纠正由于浓度或体积发生改变而引起的荧光波动现象是必须的。
报告基团	此荧光加在 TaqMan 探针的 5' 端。它发出的荧光信号作为特异性扩增的指示物。
校正后报告荧光强度 ( $R_n$ )	与阳性参比荧光信号强度相比较的报告基团荧光信号强度。
$\Delta R_n$ ( $\Delta R_n$ )	在给定的—组 PCR 条件下所生成信号的量值。( $\Delta R_n = R_n - \text{基线}$ )
标准样本	已知量的样本，用于构建标准曲线。
未知样本	包含您要测定的模板的样本，模板的量未知。

下图显示了一个有代表性的扩增图谱，其中包括上表定义的一些术语。



注释



## 用户需提供的材料

项目	来源
ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (ABI PRISM™ 6100 核酸提取仪)	美国应用生物系统公司 (货号 6100-01)
ABI PRISM Optical Tubes (8 Tubes/Strip) * (ABI PRISM 光学反应管, 每条带 8 支管)	美国应用生物系统公司 (货号 4316567)
ABI PRISM Optical Caps, 8 caps/strip (Flat) (ABI PRISM 光学反应盖板, 每条带 8 个盖板, 平板式)	美国应用生物系统公司 (货号 4323032)
High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒)	美国应用生物系统公司 (货号 4322171)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (TaqMan® 通用 PCR 扩增预混试剂)	美国应用生物系统公司 (货号 4304437)
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (MicroAmp® 光学 96 孔反应板)	美国应用生物系统公司 (货号 4306757)
MicroAmp Optical Tubes * (MicroAmp 光学反应管)	美国应用生物系统公司 (货号 N801-0933)
Optical Adhesive Cover (孔板高透光度盖膜)	美国应用生物系统公司 (货号 4311971)
下列任一来源的标记引物和探针: <ul style="list-style-type: none"> <li>Assays-on-Demand™ Gene Expression Products (Assays-on-Demand™ 基因表达产品) (预先设计的引物和探针)</li> <li>Assays-by-Design™ (代客设计引物和探针) 服务 (预先设计的引物和探针)</li> <li>Primer Express (引物设计) 软件 (定制设计引物和探针)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>美国应用生物系统公司网址</li> <li>与您的美国应用生物系统公司销售代表联系</li> <li>货号 4330710 (1 用户许可证)</li> <li>货号 4330709 (10 用户许可证)</li> <li>货号 4330708 (50 用户许可证)</li> </ul>
带帽试管, 10 mL	美国应用生物系统公司 (货号 4305932)
配备 96 孔板转接器的离心机	主要实验室供应商 (MLS)
手套	主要实验室供应商
微型离心机	主要实验室供应商
微型离心管, 无菌型 1.5 mL	主要实验室供应商
无核酸酶水	主要实验室供应商
移液管滴头, 带过滤塞	主要实验室供应商
正置换移液器	主要实验室供应商
微型漩涡式混合器 (Vortexer)	主要实验室供应商

\* 重要:

当使用 MicroAmp 光学反应管或 ABI PRISM 光学反应管时, 在使用 ABI PRISM 光学反应盖板覆盖之后, 将其安装到直接托盘的电极固定架上 (不可使用托盘 / 固位器)。

注释



## 绝对定量示例实验

**概述** 为更好地说明怎样设计、执行及分析绝对定量实验，本节提供一个示例实验。示例实验是一个有代表性的典型绝对定量实验，您可将其视为快速入门操作程序来熟悉绝对定量实验的工作流程。有关绝对定量实验工作流程的详细描述，将在本指南的后续章节中讲述。在随后的章节中用示例实验框式图给出示例实验中一些相关步骤的细节。

**说明** 绝对定量示例实验的目的是确定两个分组中单个 RNase P（核糖核酸酶 P）基因的重复数。

本示例设计为单一 PCR 扩增，引物和探针使用 Primer Express（引物设计）软件设计。

通过对已知量样本的一系列稀释，制备一组标准样本。

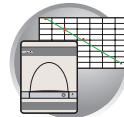
反应设定为两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)，分别使用 High Capacity cDNA Archive Kit（大容量 cDNA 库试剂盒）和 TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix（TaqMan<sup>®</sup> 通用 PCR 扩增预混试剂）参与反转录和 PCR 扩增。

通过运行单个绝对定量反应板生成数据，反应板包含标准曲线和样本，然后使用随 7300/7500 PCR 仪提供的软件对数据进行分析。

注释

---

---



## 绝对定量示例实验过程

1. 设计实验，参阅第 2 章。
  - a. 指定未知样本，准备标准曲线，并确定重复数。
  - b. 订购基于 TaqMan<sup>®</sup> 探针化学荧光的试剂。
  - c. 使用 Primer Express（引物设计）软件设计引物和探针。
2. 提取总 RNA，参阅第 3 章。
3. 使用 High Capacity cDNA Archive Kit（大容量 cDNA 库试剂盒）从总 RNA 生成 cDNA，参阅第 3 章。

- a. 按右表所示，准备反转录 (RT) 预混试剂。

在 *High Capacity cDNA Archive Kit Protocol*（大容量 cDNA 库试剂盒实验方案）中提供了更详细的指导。



**警告** 化学品危险。10× 反转录 (RT) 缓冲液会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。请认真阅读 MSDS 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、衣服和手套。

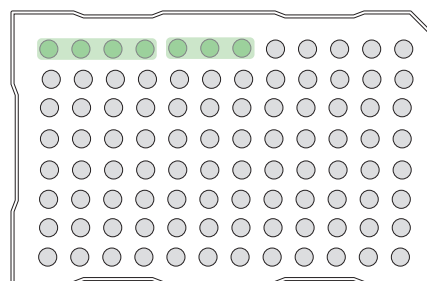
RT Master Mix (RT 预混试剂)		
成分	μL / 1 次反应	μL / 7 次反应 <sup>a</sup>
10× Reverse Transcription Buffer (反转录缓冲液)	10	70
25× dNTP (脱氧核苷三磷酸)	4	28
10× 随机引物	10	70
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (反转录酶), 50 U/μL	5	35
无核酸酶水	21	147
总计	50	350

- a. 每个 RT 反应体积为 100 μL（参阅步骤 3b）。对于 104 次 PCR 扩增反应（参阅步骤 4）的每次反应如果需要 5 μL cDNA，则需要 6 次反转录 (RT) 反应。应包含额外的体积（足够用于一次额外反转录 (RT) 反应）以弥补移液过程中造成的损失，并需有额外的 cDNA 用于建库。

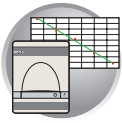
- b. 向反应板的每个反应孔中吸取以下体积的液体，准备 cDNA 库反应板：

- 50 μL 反转录 (RT) 预混试剂
- 30 μL 无核酸酶水
- 20 μL RNA 样本

确保对于每次 50 μL PCR 扩增反应，从总 RNA 转化为 cDNA 的质量为 10 至 100 ng，体积 5 μL。



注释



- c. 使用为两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法给出的各项参数值，设计热循环。

注释：您也可使用一步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)，有关说明，请参阅第 14 页“选择一步法或两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)”。

- d. 在 -20 °C 温度下贮存 cDNA，直到使用时。

4. 按右表所示，准备 PCR 扩增预混试剂。

有关详情，请参阅第 4 章。

注释：Assays-on-Demand™ 和 Assays-by-Design™（代客设计引物和探针）产品的反应体积，显示在随这些产品提供的插卡说明中。

**注意** 化学品危险。TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) 对眼睛和皮肤有刺激性。无保护下吞咽或吸入会导致不适感觉。请认真阅读 MSDS 并遵守操作规程。穿戴合适的护眼罩、衣服和手套。

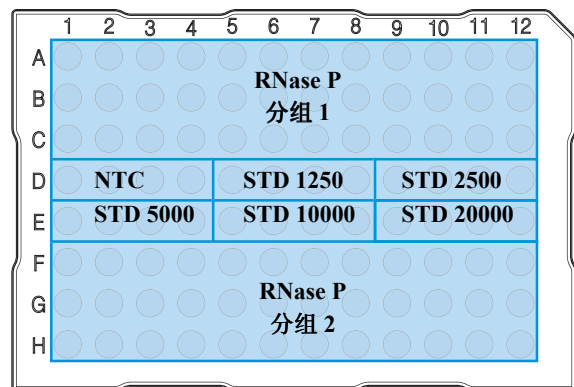
步骤类型	时间	温度
保持	10 分	25 °C
保持	120 分	37 °C

PCR Master Mix (PCR 扩增预混试剂) <sup>a</sup>		
反应成分	μL/ 样本	终浓度
TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) (2×)	25.0	1×
正向引物	5.0	50 至 900 nM
反向引物	5.0	50 至 900 nM
TaqMan 探针	5.0	50 至 250 nM
cDNA 样本	5.0	10 至 100 ng
无核酸酶水	5.0	-
总计	50.0	-

- a. 对于本示例实验，准备了八份 PCR 预混试剂，两个样本分组各使用一份（进行 37 次反应），六个标准样本各使用一份（进行 5 次反应）。应包含额外的体积以弥补移液过程中造成的损失。cDNA 直接加入每一份预混试剂中。

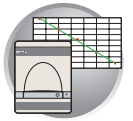
5. 准备反应板。

- 在反应板上作上标签，确保您为每个目标序列包括一组标准样本。标准样本必须与目标序列同在一个反应板上。
- 吸取 50 μL 适当的 PCR 扩增预混试剂（含 cDNA），滴入反应板的每一个反应孔中。
- 将反应板置于冰上直到您准备好将其装入 7300/7500 PCR 仪。



注释





6. 创建绝对定量反应板文件，如第 24 页“创建绝对定量 (AQ) 反应板文件”所述。简言之，

- a. 选择 **File (文件) > New (新建)**。
- b. 从 Assay (实验) 下拉列表中，选择 **Absolute Quantification (Standard Curve) (绝对定量, 标准曲线)**，然后单击 **Next > (下一步 >)**。

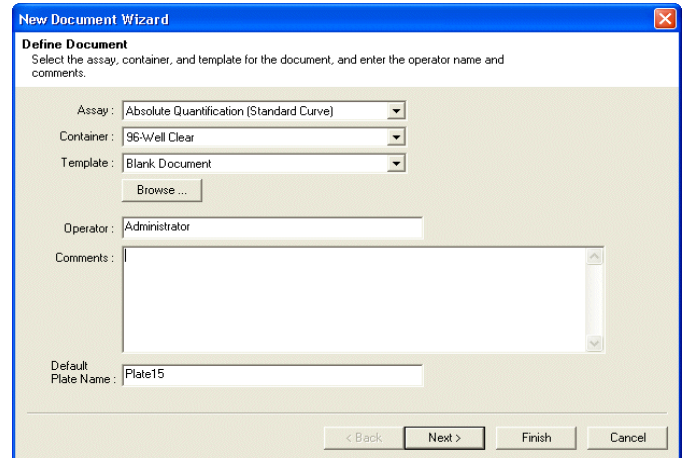
**重要!** 您不能使用相对定量 (RQ) 反应板文件执行绝对定量 (AQ) 实验分析，反之亦然。存储在绝对定量 (AQ) 和相对定量 (RQ) 反应板文件中的信息不可互相交换。

- c. 将探针添加到反应板文件中，然后单击 **Next > (下一步 >)**。
- d. 为每个孔指定探针和任务，然后单击 **Finish (完成)**。

7. 在 Well Inspector (反应孔设定) 窗口 (依次选择 **View (视图) > Well Inspector (反应孔设定)**) 中，输入样本名。

**重要!** 如果您的实验不使用反应板上的所有反应孔，此步骤中请不要忽略任何要使用的反应孔。程序完成后您可以忽略未使用的反应孔。有关忽略未使用反应孔的更详细信息，请参阅联机帮助。

右图显示了完整的反应板设定。

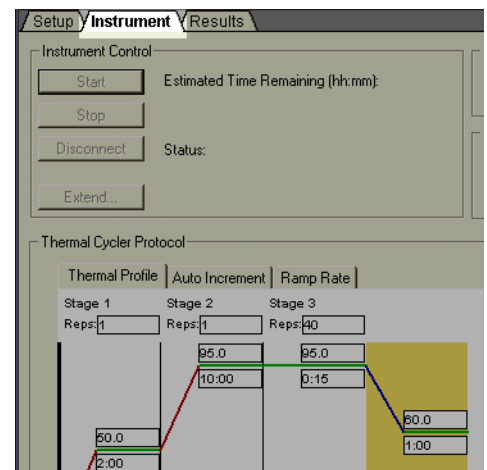


Setup	Instrument	Results	Plate											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1-1	U	1-1	U	1-1	U	1-2	U	1-2	U	1-3	U	1-3	U
B	1-4	U	1-4	U	1-4	U	1-5	U	1-5	U	1-6	U	1-6	U
C	1-7	U	1-7	U	1-7	U	1-8	U	1-8	U	1-9	U	1-9	U
D	NTC	N	NTC	N	NTC	N	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S2	S2
							1.25e+00	1.25e+00	1.25e+00	2.50e+00	2.50e+00	2.50e+00	2.50e+00	2.50e+00
E	S3	S	S3	S	S3	S	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S5	S5
							5.00e+00	5.00e+00	5.00e+00	1.00e+00	1.00e+00	2.00e+00	2.00e+00	2.00e+00
F	2-1	U	2-1	U	2-1	U	2-2	U	2-2	U	2-3	U	2-3	U
G	2-4	U	2-4	U	2-4	U	2-5	U	2-5	U	2-6	U	2-6	U
H	2-7	U	2-7	U	2-7	U	2-8	U	2-8	U	2-9	U	2-9	U

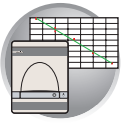
8. 开始绝对定量 (AQ) 程序。

- a. 选择 **Instrument (仪器)** 选项卡。默认情况下，显示两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法中 PCR 步骤的标准 PCR 条件。
- b. 选择 **File (文件) > Save As (另存为)**，输入绝对定量反应板文件的文件名，然后单击 **Save (保存)**。
- c. 将反应板装入仪器中。
- d. 单击 **Start (开始)**。


运行结束后，屏幕上显示信息报告运行是否成功或遇到错误。



注释



9. 分析绝对定量数据，请参阅第 5 章。

- a. 单击  或选择 **Analysis (分析) > Analysis Settings (分析设置)** 以设置分析参数。使用 Auto Ct (自动 Ct) 选项。

注释：有关详情，请参阅第 32 页“配置分析设置”。

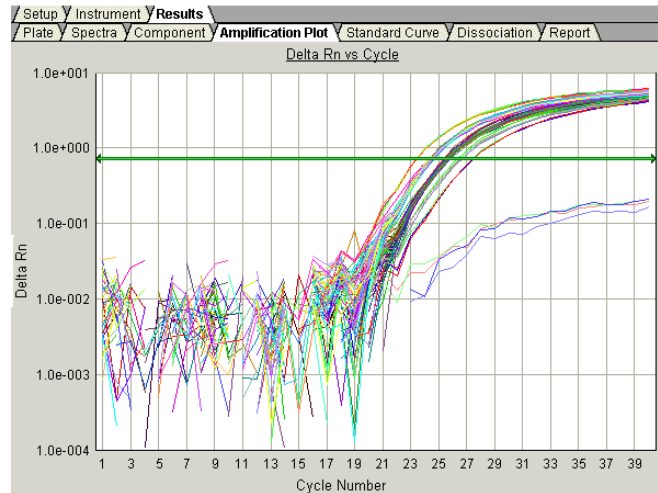
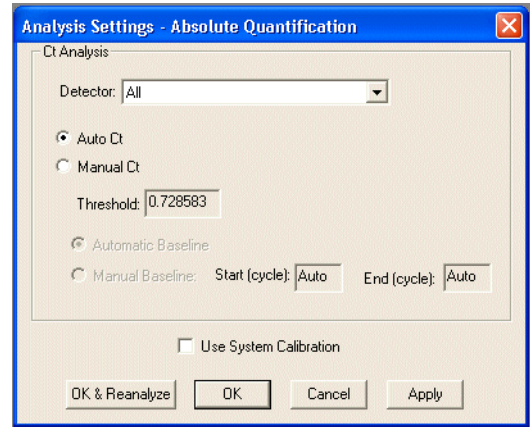
- b. 单击 **OK & Reanalyze (确定并再次分析)**，或选择 **Analysis (分析) > Analyze (执行分析)** 以再次分析数据。

- c. 如果有必要，手动调整基线和阈值。

注释：有关详情，请参阅第 33 页“调整基线和阈值”。

- d. 单击 **OK & Reanalyze (确定并再次分析)**，或选择 **Analysis (分析) > Analyze (执行分析)** 以再次分析数据。

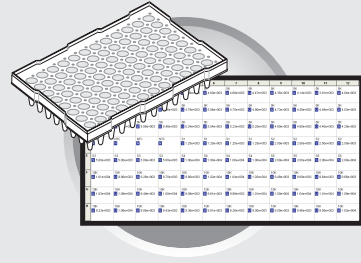
- e. 查看分析结果。



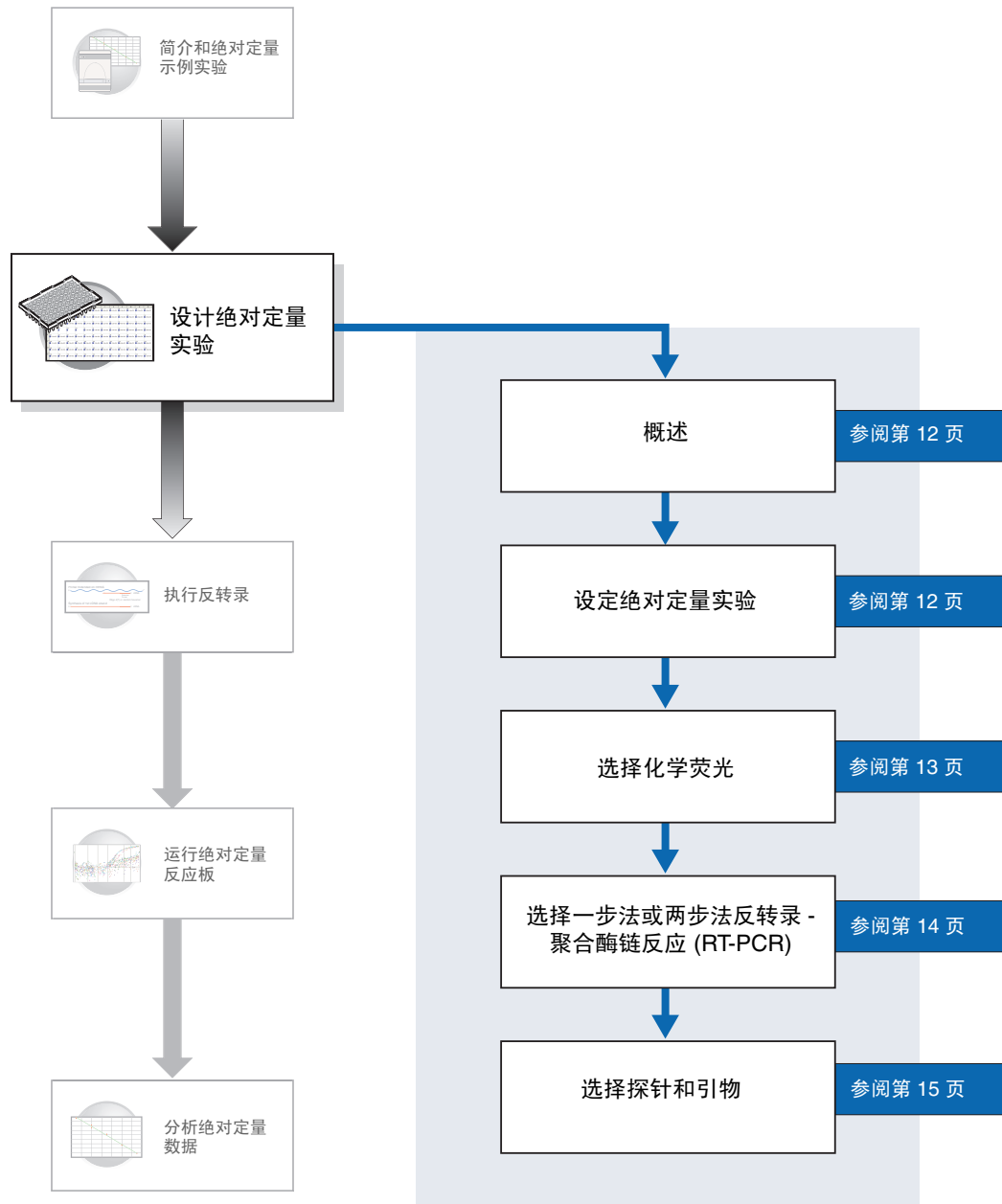
## 结论

根据标准曲线进行推测，分组 1 中的 RNase P (核糖核酸酶 P) 基因的重复数为 5000，分组 2 中为 10000。

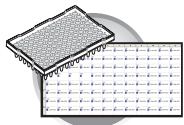
注释



## 工作流程



注释



## 概述

典型的绝对定量实验设计采用传统（单一）PCR 扩增，每个反应中包括单个引物对，加上一个 TaqMan 探针或 SYBR 结合荧光。以下部分描述设计绝对定量实验需考虑的因素。

## 设定绝对定量实验

对于每个绝对定量实验，需要指定：

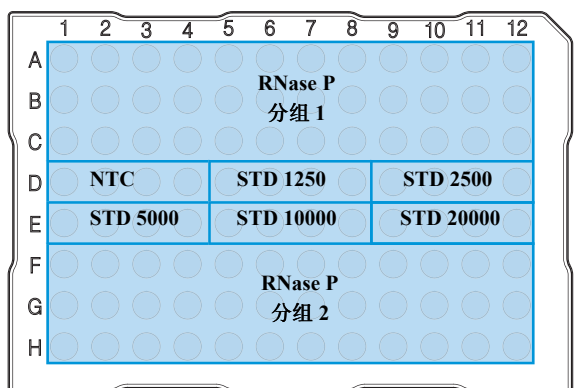
- 一个未知样本 – 即您要确定其量值的核酸序列。
- 一组标准样本 – 本指南假定您已为要确定其量值的每一个目标序列生成了一组标准样本。附录 B 可为您提供有关生成标准样本的详细指导。
- 重复反应孔 – 对于绝对定量实验分析，美国应用生物系统公司建议您对每个样本使用三个或更多重复反应，以确保统计显著性。

有关这些要求的更详细说明，请参阅《SDS 化学指南》。

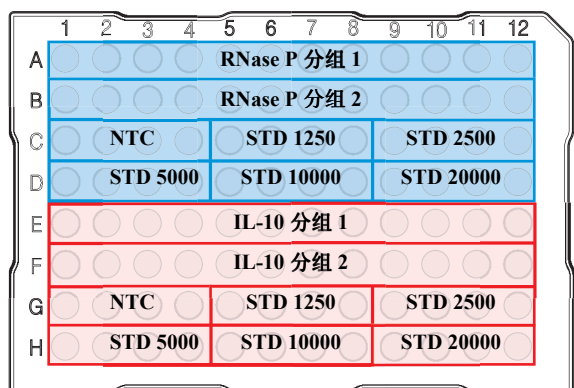
### 示例试验

本示例实验的目的是确定 RNase P（核糖核酸酶 P）基因在两个分组中的数量。由于只是研究分析单一的基因，因此只需要使用一组标准样本 (A)。反应中每个未知样本和标准样本使用了四个重复反应孔，以确保统计显著性。在同时研究分析多个基因的实验中，每个基因需要使用一组自己的标准样本 (B)。

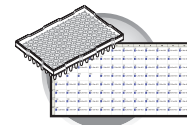
A. 单一基因在两个分组中



B. 两个基因在两个分组中

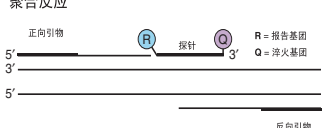
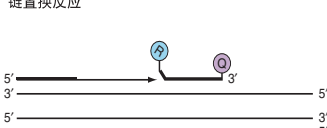
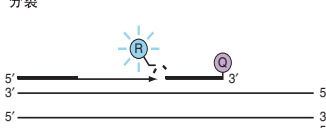
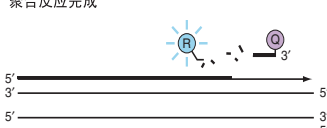
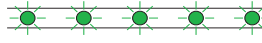
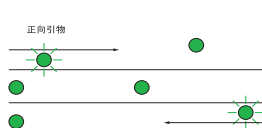


注释

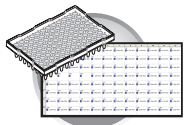


# 选择化学荧光

**关于化学荧光** 美国应用生物系统公司提供两种化学荧光试剂，用于通过实时 PCR 仪检测 PCR 产品，如下表所述。基于 TaqMan 探针和 SYBR Green I 荧光的两种化学荧光试剂都可用于一步法或两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)。有关这些化学荧光试剂的更详细说明，请参阅《SDS 化学指南》。

化学荧光	过程
<p><b>TaqMan® 试剂或试剂盒</b></p> <p><b>说明</b> 基于 TaqMan 试剂的化学荧光使用一种可发荧光的探针来检测在 PCR 循环期间聚积的某种特异性 PCR 产物。</p> <p><b>优点</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>通过探针增强特异性。探针与目标之间的特异杂交产生荧光信号</li> <li>提供多重基因检测功能</li> <li>优化可用的实验分析方法</li> <li>允许在 PCR 期间执行 5' 核酸酶检测分析</li> </ul>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p><b>聚合反应</b></p>  <p>步骤 1: 将报告基团 (R) 和淬灭基团 (Q) 加入 TaqMan 探针的 5' 和 3' 端。</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p><b>链置换反应</b></p>  <p>步骤 1 (续): 当两种基团都加入探针时，报告基团发出的荧光被淬灭。</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 48%;"> <p><b>分裂</b></p>  <p>步骤 2: 在每个延伸循环期间，AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶切断探针，分裂出报告基团。</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p><b>聚合反应完成</b></p>  <p>步骤 3: 报告基团从淬灭基团中分裂后，将发出其特征性荧光。</p> </div> </div>
<p><b>SYBR® Green I 试剂</b></p> <p><b>说明</b> 使用 SYBR Green I 荧光（一种双链 DNA 结合荧光），在 PCR 循环期间 PCR 产物聚集的同时对 PCR 产物进行检测和分析。</p> <p><b>优点</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>降低成本（不需要探针）</li> <li>可扩增所有双链 DNA</li> <li>产生 PCR 扩增运行的特征性解链图表</li> <li>增大相对于产物长度而言的扩增产物检测灵敏度</li> </ul> <p><b>局限性</b> 可与所有双链 DNA 序列结合，从而降低了特异性。为避免假阳性信号，应使用熔解曲线或凝胶分析来检查非特异性产物的构成。</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;">  <p>步骤 1: 设定反应 SYBR® Green I 荧光与双链 DNA 结合时发出荧光。</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>步骤 2: 变性 DNA 变性时，SYBR® Green I 荧光被释放，从而使荧光强度显著减弱。</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 48%;">  <p>步骤 3: 聚合反应延伸期间，引物退火并生成 PCR 产物。</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>步骤 4: 聚合反应完成 SYBR® Green I 荧光与双链产物组合，仪器检测到荧光强度的增值。</p> </div> </div>

注释



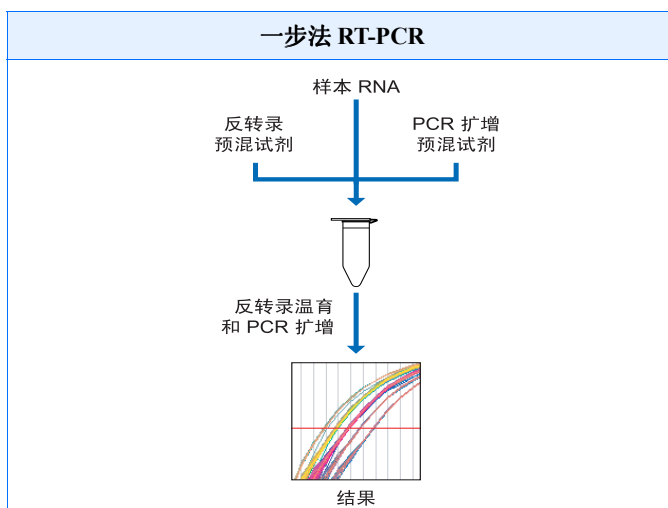
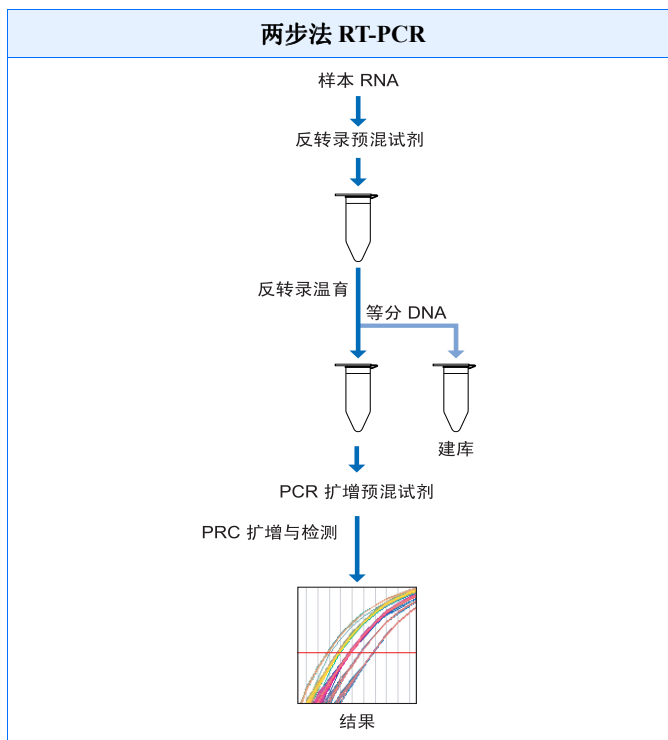
## 选择一步法或两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)

执行实时 PCR 时，您可选择在单一反应（一步法）或在分开的两个反应（两步法）中执行反转录 (RT) 和 PCR 扩增。您要使用的试剂配置取决于您选择的是一步法或两步法 RT-PCR：

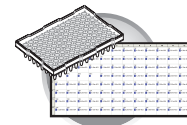
- 两步法 RT-PCR 在两个分开的反应中执行：首先，总 RNA 反转录为 cDNA，然后通过 PCR 对 cDNA 进行扩增。这种方法适合于检测从单个 cDNA 模板发生的多个转录，或保存等分 cDNA 以便未来使用。可使用 AmpErase<sup>®</sup> UNG 酶来防止残留污染。

**重要！** 本指南假定绝对定量实验设计为两步法 RT-PCR。有关附加选项的详情，请参阅《SDS 化学指南》。

- 在一步法 RT-PCR 中，反转录 (RT) 和 PCR 扩增在同一个缓冲液系统中发生，只需简单地使用一个试管即可做好 RT 及 PCR 扩增准备。然而，在一步法 RT-PCR 中，您不能使用残留抑制酶 AmpErase<sup>®</sup> UNG（uracil-N-glycosylase，即尿嘧啶 -N- 糖基化酶）。有关 UNG 酶的更详细说明，请参阅《SDS 化学指南》。



注释



建议两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 使用的试剂盒			
化学试剂	步骤	试剂	货号
TaqMan 试剂或试剂盒	反转录 (RT)	High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒)	4322171
	PCR 扩增	TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂)	4304437
SYBR Green I 试剂或试剂盒	反转录 (RT)	High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒)	4322171
	PCR 扩增	SYBR Green Master Mix (SYBR Green 预混试剂)	4309155
	反转录 (RT) 和 PCR 扩增	SYBR Green RT-PCR Reagents (SYBR Green RT-PCR 试剂)	4310179

### 示例试验

上表列出了在两步法 RT-PCR 中使用 TaqMan 试剂和试剂盒的方法。

## 选择探针和引物

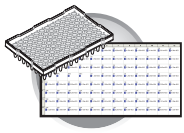
为目标序列选择成套探针和引物。美国应用生物系统公司为选择探针和引物提供三种选择：

- Assays-on-Demand™ Gene Expression Products (Assays-on-Demand™ 基因表达产品) – 提供优化、备妥的 TaqMan 5' 核酸酶实验分析套件，用于人、小鼠或大鼠基因转录。有关引物 / 探针套件的更多信息，请登陆以下网址查阅：  
**<http://www.allgenes.com>**
- Assays-by-Design<sup>SM</sup> (代客设计引物和探针) 服务 – 设计、合成、组合及提供高质量的引物和探针配套服务。如果您所需的引物 / 探针组合当前尚未备妥，可使用这项服务。要订购此服务，请与美国应用生物系统公司代表联系。
- Primer Express<sup>®</sup> (引物设计) 软件 – 帮助您为自己的定量实验分析设计引物和探针。有关使用此软件的更详细说明，请参阅《Primer Express 软件 2.0 版用户手册》(货号 4329500)。  
美国应用生物系统公司提供实验分析设计指南，专为定量分析设计开发。遵照这些实验分析设计指南，可为设计和优化分析提供快捷、可靠的实验系统。有关这些实验分析设计指南的更详细说明，请参阅《SDS 化学指南》。

### 示例试验

RNase P (核糖核酸酶 P) 的引物和探针使用 Primer Express (引物设计) 软件设计。

注释



## 第 2 章 设计绝对定量实验 选择探针和引物

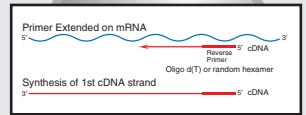
注释

---

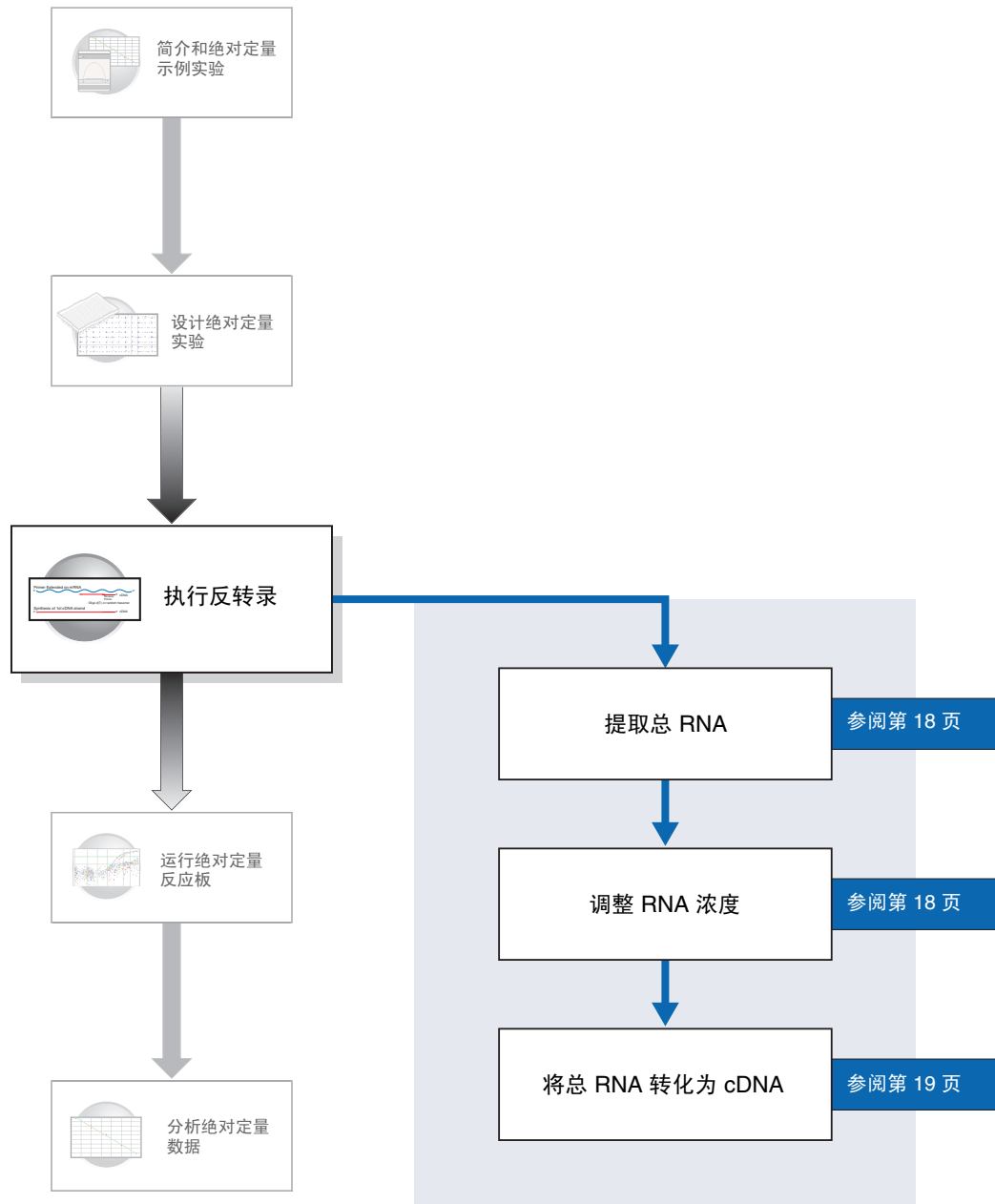
---

---

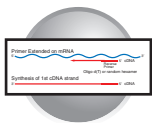




## 工作流程



注释



## 准备 RNA 指南

**提取总 RNA** 美国应用生物系统公司提供多种从不同原材料中提取 RNA 的仪器系统和化学试剂，如从血液、组织、培养细胞、植物材料中提取 RNA。

系统	货号
ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (ABI PRISM™ 6100 核酸提取仪)	6100-01
总 RNA 化学试剂:	
Nucleic Acid Purification Elution Solution (核酸提取洗脱溶液)	4305893
Nucleic Acid Purification Lysis Solution (核酸提取分解溶液)	4305895
Nucleic Acid Purification Wash Solution I (核酸提取洗液 I)	4305891
Nucleic Acid Purification Wash Solution II (核酸提取洗液 II)	4305890
AbsoluteRNA Wash Solution (DNase treatment) (AbsoluteRNA 洗液, DNA 酶处理)	4305545
Tempus™ Blood RNA Tubes (Tempus™ 血液 RNA 试管) (用于使用 6100 PrepStation 在基因分析中采集、稳定和提取全血中的总 RNA)	4342972
<i>Isolation of Total RNA from Whole Blood and from Cells Isolated from Whole Blood Protocol</i> (从全血中提取总 RNA 和从全血中提取细胞及总 RNA 实验方案)	4332809
<i>Tempus™ Blood RNA Tube and Large Volume Consumables Protocol</i> (Tempus™ 血液 RNA 试管和大容量耗材实验方案)	4345218
<i>提取组织 RNA: Isolation of Total RNA from Plant and Animal Tissue Protocol</i> (从植物和动物组织中提取总 RNA 实验方案)	4330252

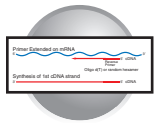
**RNA 的质量** 确保您在绝对定量实验中使用的 RNA 符合以下条件:

- 其  $A_{260/280}$  比率高于 1.9
- 用凝胶电泳观察是完整无损的
- 不含反转录 (RT) 或 PCR 抑制剂

*High Capacity cDNA Archive Kit Protocol* (大容量 cDNA 库试剂盒实验方案) (4312169) 中包括准备 RNA 模板的附加说明。

**调整总 RNA 的始浓度** High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒实验方案) 已经过优化, 可将 0.1 至 10  $\mu\text{g}$  的总 RNA 转化为 cDNA。对于每个 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应, 应将足够量的总 RNA 转化为 cDNA, 以便 cDNA 的终浓度为 10 至 100  $\text{ng} / 5 \mu\text{L}$ 。

注释



## 将总 RNA 转化为 cDNA

使用 High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒)

使用 High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) (货号 4322171) 在两步法 RT-PCR 中执行第一步 (RT)。按照 *High Capacity cDNA Archive Kit Protocol* (大容量 cDNA 库试剂盒实验方案) (货号 4322169) 中描述的手动方法, 将总 RNA 转化为 cDNA。

**重要!** 此实验方案并不随 High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 提供。请从以下网站下载实验方案:

<http://docs.appliedbiosystems.com/search.taf>

要搜索此文件, 在 Product (产品) 列表框中选择 **ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (ABI PRISM™ 6100 核酸提取仪)**, 然后单击网页底部的 **Search (搜索)** 按钮。在 Protocols (实验方案) 标题下会列出此实验方案。

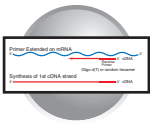
反转录 (RT) 的热循环参数设置

High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 使用以下热循环参数执行反转录 (RT) 步骤。


步骤类型	时间	温度
保持	10 分	25 °C
保持	120 分	37 °C

注释: 一步法 RT-PCR 的热循环条件在 [第 28 页](#) 中加以描述。

注释



**贮存 cDNA** 在转化 cDNA 之后，应将所有 cDNA 样本贮存在  $-15$  至  $-25$  °C 温度下。为将重复冷冻和解冻 cDNA 的次数降至最少，应以等分方式分开贮存 cDNA 样本。

 **警告** 化学品危险。10× 反转录 (RT) 缓冲液会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。请认真阅读 MSDS 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、衣服和手套。

### 示例试验

总 RNA 是从血液中提取的。RNA 浓度使用  $A_{260}$  确定，并稀释为终浓度  $50$  ng/ $\mu$ L。

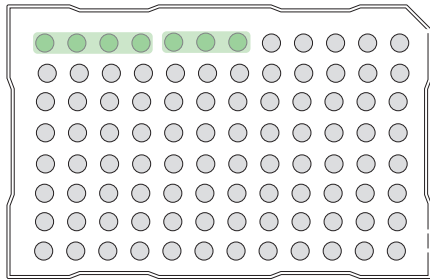
反转录 (RT) 预混试剂按以下方法制备，使用 *High Capacity cDNA Archive Kit Protocol* (大容量 cDNA 库试剂盒实验方案) 提供的指南：

成分	$\mu$ L / 1 次反应	$\mu$ L / 7 次反应 <sup>a</sup>
10× Reverse Transcription Buffer (反转录缓冲液)	10	70
25× dNTP (脱氧核苷三磷酸)	4	28
10× 随机引物	10	70
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (MultiScribe™ 反转录酶), 50 U/ $\mu$ L	5	35
无核酸酶水	21	147
总计	50	350

a. 每个反转录 (RT) 反应体积为  $100$   $\mu$ L (参阅下文)。对于 104 次 PCR 扩增反应 (参阅第 23 页 “准备反应板”) 的每次反应如果需要  $5$   $\mu$ L cDNA，则需要 6 次反转录 (RT) 反应。应包含额外的体积 (足够用于一次额外反转录 (RT) 反应) 以弥补移液过程中造成的损失，并需有额外的 cDNA 用于建库。

然后向每个反应孔中滴入以下试剂，准备 cDNA 库反应板：

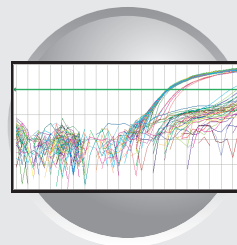
- 50  $\mu$ L 反转录 (RT) 预混试剂
- 30  $\mu$ L 无核酸酶水
- 20  $\mu$ L RNA 样本 (使每个 100  $\mu$ L 反应的 RNA 初始总量为  $1$   $\mu$ g)



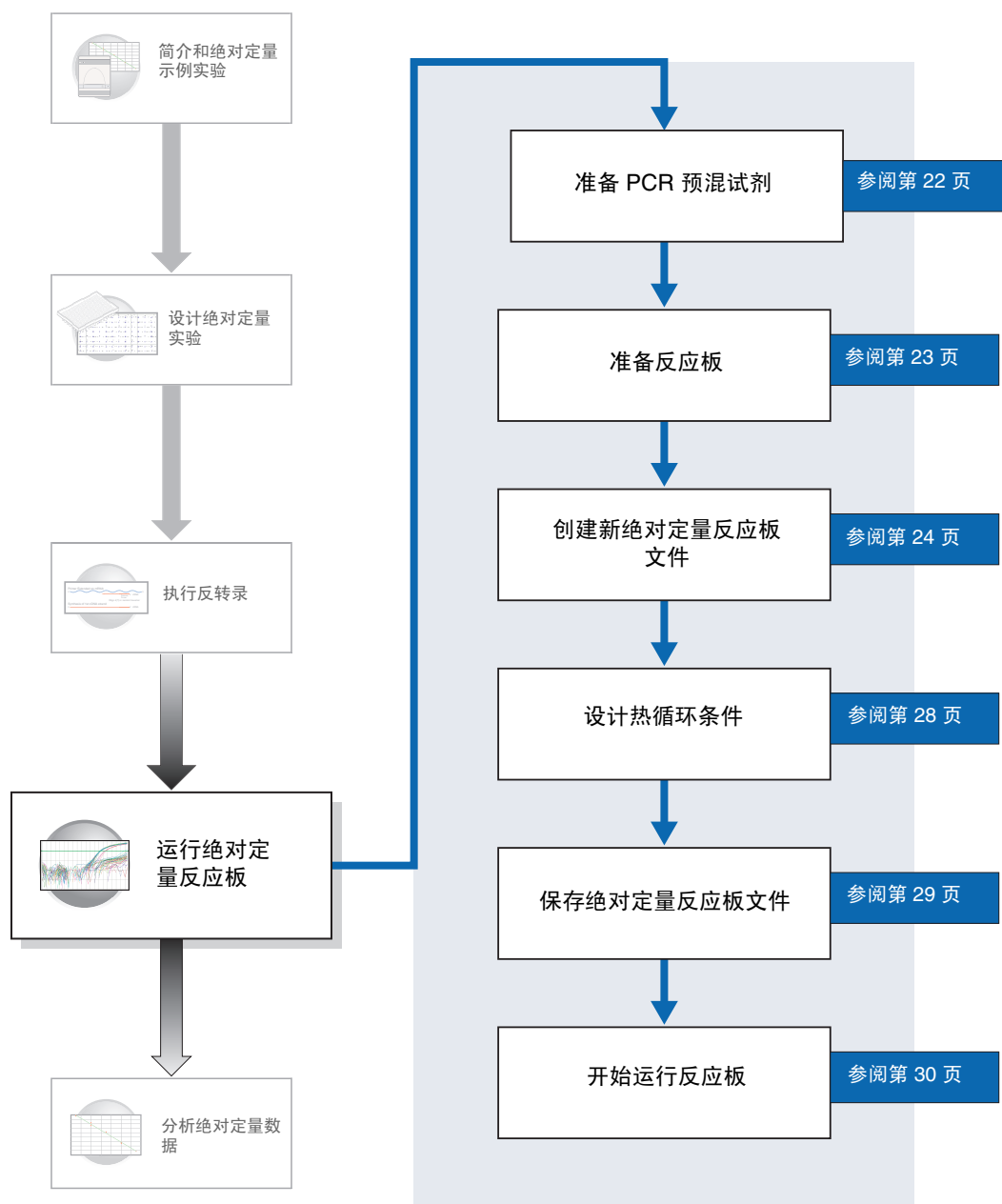
然后使用两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 的热循环参数将 RNA 转化为 cDNA，如第 19 页 “反转录 (RT) 的热循环参数设置” 所述。

将 cDNA 贮存在  $-20$  °C 温度下，直到使用时。

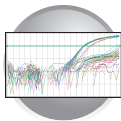
注释



## 工作流程



注释



## 开始之前

检查并确保已定期执行背景和纯荧光校正程序，以确保 7300/7500 PCR 仪处于最佳运行状态。欲了解校正 7300/7500 PCR 仪的更多信息，请参阅联机帮助。

## 准备 PCR 扩增预混试剂

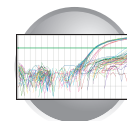
两步法 RT-PCR 的第二步 (PCR) 是扩增 cDNA，使用 TaqMan® Universal PCR Master Mix (TaqMan® 通用 PCR 扩增预混试剂) 试剂执行扩增程序。

*TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂实验方案)* (货号 4304449) 中说明了如何使用试剂盒中的试剂。下表列出了使用预混试剂的常用实验分析条件 (体积和终浓度)。

 **注意** 化学品危险。TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) 对眼睛和皮肤有刺激性。无保护下吞咽或吸入会导致不适感觉。请认真阅读 MSDS 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、衣服和手套。

反应成分	μL / 样本	终浓度
TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) (2X)	25.0	1X
正向引物	5.0	50 至 900 nM
反向引物	5.0	50 至 900 nM
TaqMan 探针	5.0	50 至 250 nM
cDNA 样本	5.0	10 至 100 ng
无核酸酶水	5.0	-
总计	50.0	-

如果您使用 Primer Express (引物设计) 软件来设计探针和引物，必须使用上表列出的体积，对探针和引物进行优化，使之符合常用实验分析条件。所有 Assays-by-Design (代客设计引物和探针) 和 Assays-on-Demand 产品的配方已设计好，使引物和探针的终浓度在建议值的范围之内。



## 准备反应板

1. 在反应板上作上标签，确保您为每个目标序列包括一组标准样本。标准样本必须与目标序列同在一个反应板上。
2. 向反应板的每个反应孔中，加入 50  $\mu\text{L}$  的适当 PCR 扩增预混试剂。

**注释：**准备包含标准样本的反应，与准备包含未知样本的反应方法完全相同。使用相同的引物和探针、PCR 扩增预混试剂和体积，但向每个标准样本反应孔中加入已知量的模板（如 cDNA 或质粒 DNA），而不是加入 cDNA 样本。

3. 将反应板置于冰上直到您准备好将其装入 7300/7500 PCR 仪。

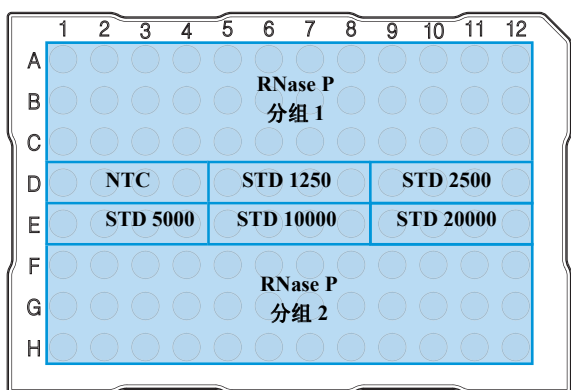
### 示例试验

根据常用实验分析条件准备 PCR 扩增预混试剂。

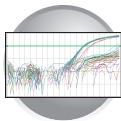
反应成分	$\mu\text{L}$ / 样本	$\mu\text{L}$ / 5 次反应 <sup>a</sup>	$\mu\text{L}$ / 37 次反应 <sup>b</sup>	终浓度
TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) (2X)	25.0	125.0	925.0	1X
正向引物	5.0	25.0	185.0	50 至 900 nM
反向引物	5.0	25.0	185.0	50 至 900 nM
TaqMan 探针	5.0	25.0	185.0	50 至 250 nM
cDNA 样本或标准模板	5.0	25.0	185.0	10 至 100 ng
无核酸酶水	5.0	25.0	185.0	-
总计	50.0	250.0	1850.0	-

- a. 对于六个标准样本的每一个准备一份预混试剂（4 个重复样本，包括补充移液损耗的额外体积）。
- b. 对于所研究的两个分组的每一个准备一份预混试剂（36 个样本，包括补充移液损耗的额外体积）。

在反应板上分布未知样本（要确定其量值的目标序列）和标准模板。将 50  $\mu\text{L}$  的适当 PCR 扩增预混试剂（含 cDNA）加入每个反应孔中。将反应板置于冰上，直到您将反应板装入 7300/7500 PCR 仪。



注释



## 创建绝对定量 (AQ) 反应板文件

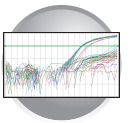
**概述** 绝对定量 (AQ) 反应板文件储存从绝对定量程序中收集的单个反应板的数据。绝对定量 (AQ) 反应板文件也存储有关程序运行的其它信息，包括样本名和探针。

**运行设置要求** 对于您创建的每个绝对定量 (AQ) 反应板文件，请指定探针、标准和探针任务：

- 一个探针虚拟地代表一个基因特异性核酸探针试剂，用于执行分析。您为每个目标序列指定要使用的探针。附录 A 将说明如何创建探针。
- 标准样本是指已知量的目标序列。反应板上的每一个目标序列，必须有一组标准样本。
- 探针任务指定软件在分析期间使用从反应孔中所收集数据的方式。您需要为反应板文件的每个反应孔中的探针指定三项任务中的一项。

任务	符号	应用于探针 ...
Unknown (未知)	U	包含您要确定其量值的目标序列的反应孔。
Standard (标准)	S	包含已知量样本的反应孔。
NTC (无模板对照)	N	包含 PCR 试剂，但不含模板的阴性对照反应孔。





## 创建绝对定量反应板文件

您可将样本信息输入到一个新的反应板文件，也可从现有反应板文件中导入样本信息，或者使用模板文件创建一个新的反应板文件。本节描述如何创建一个新的反应板文件。有关导入样本信息或使用模板文件的说明，请参阅联机帮助。

### 创建新绝对定量 (AQ) 反应板文件：

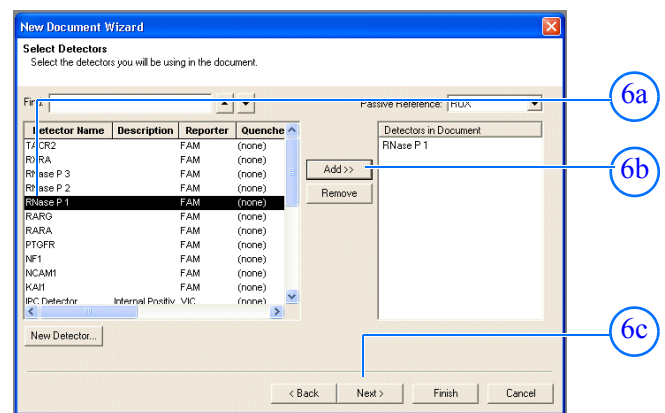
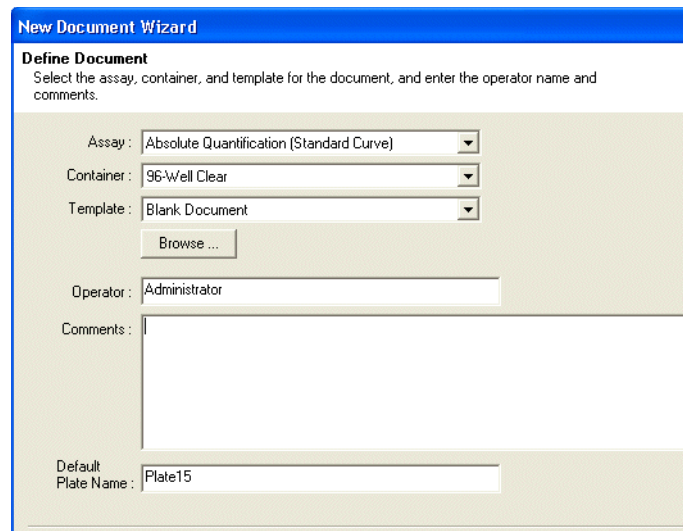
- 依次选择 **Start (开始) > Programs (程序) > Applied Biosystems 7300/7500 (美国应用生物系统公司 7300/7500 PCR 仪) > Applied Biosystems 7300/7500 SDS Software (美国应用生物系统公司 7300/7500 PCR 仪 SDS 软件)** (  ), 以启动 SDS 软件。
- 选择 **File (文件) > New (新建)**。
- 在 **New Document Wizard (新建文件向导)** 窗口中，从 **Assay (实验)** 下拉列表中选择 **Absolute Quantification (Standard Curve) (绝对定量, 标准曲线)**。接受 **Container (反应板类型)** 和 **Template (模板)** 字段中的默认设置 (即分别为 **96-Well Clear (空白 96 孔板)** 和 **Blank Document (空白反应板)**)。

**重要！** 您不能使用相对定量 (RQ) 反应板文件执行绝对定量 (AQ) 实验分析，反之亦然。存储在绝对定量 (AQ) 和相对定量 (RQ) 反应板文件中的信息不可互相交换。

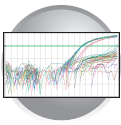
- 在 **Default Plate Name (默认反应板名)** 字段中输入反应板文件名，或接受默认文件名。
- 单击 **Next > (下一步 >)**。
- 选择要添加到反应板文件的探针。

- 单击以选择一个探针。(按住 **Ctrl** 键单击可选择多个探针。) 如果在 **Detector Manager (探针管理器)** 列表中未列出探针，请按 [附录 A](#) 中的指导说明创建探针。
- 单击 **Add >> (添加 >>)**。探针即被添加到反应板文件。

**注释：** 要从 **Document (文件)** 窗口中的 **Detectors (探针)** 列表内删除某个探针，请选择该探针，然后单击 **Remove (删除)**。



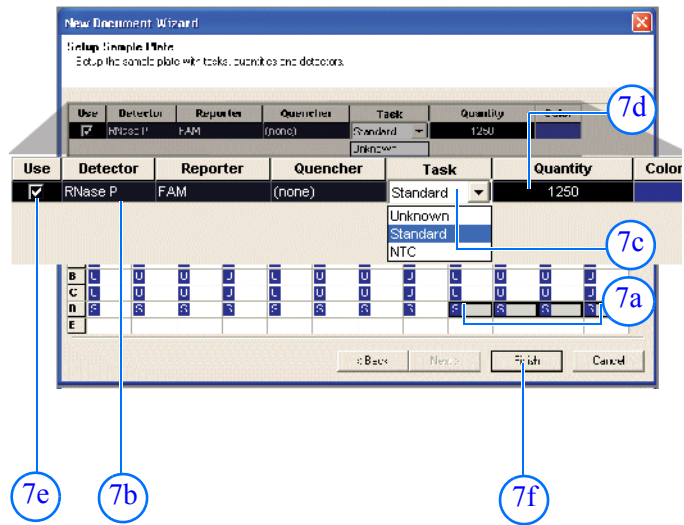
注释



c. 单击 **Next >** (下一步 >)。

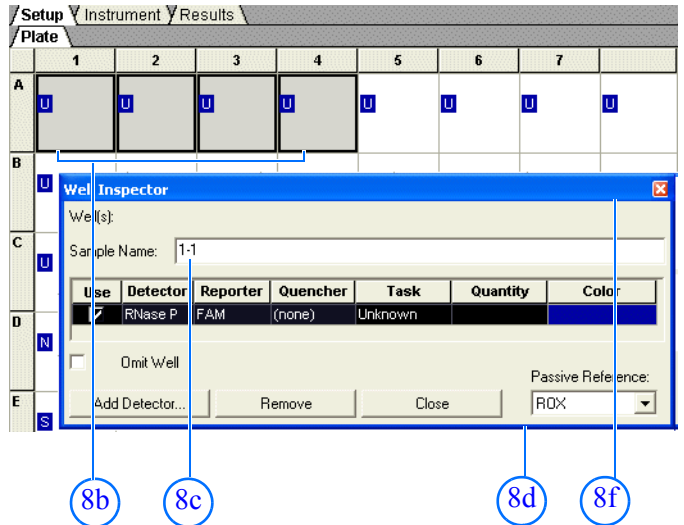
7. 为每个反应孔指定探针和任务。

- 单击一个反应孔 (或对于重复选择一组反应孔) 以选取它 (们)。
- 单击探针名, 为反应孔选定探针。
- 单击 **Task** (任务) 栏的下边, 以指定探针任务。
- 为包含标准样本的反应孔输入量值。
- 单击 **Use** (使用)。  
所选反应孔中显示探针任务和颜色。
- 单击 **Finish** (完成)。  
SDS 软件即创建反应板文件。



8. 输入样本名。

- 单击 或选择 **View (视图) > Well Inspector (反应孔设定)**。
- 单击一个反应孔或拖动鼠标选取多个重复反应孔。
- 输入样本名。
- 如果必要, 更改 **Passive Reference** (阳性参比荧光) 设置。(默认情况下, 选择 **ROX™** 荧光。)
- 重复步骤 **b 至 d**, 直到您为反应板上的所有反应孔均指定好样本名和阳性参比荧光。

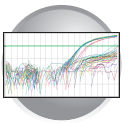


**重要!** 如果您的实验不使用反应板上的所有反应孔, 此步骤中请不要忽略任何要使用的反应孔。程序完成后您可以忽略未使用的反应孔。有关忽略未使用反应孔的更详细说明, 请参阅联机帮助。

**注释:** 您可在一次运行完成之后更改样本设定信息 (样本名、探针、任务)。

- 单击 以关闭 **Well Inspector** (反应孔设定)。

注释



9. 在 Setup (设定) 选项卡上, 检查并核对每个反应孔的信息。

示例试验

在反应板上分布好要确定其量值的目标样本和标准样本。每个反应孔与一个探针关联 (显示为彩色方框)。而且每个反应孔也指定了一项探针任务 - U (未知)、S (标准) 或 N (无模板对照)。

示例实验只定义了一个探针 (名为 RNase P), 因为只需对单一基因进行定量研究。

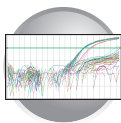
下图显示了为每个反应孔指定好样本名、探针和探针任务之后的示例实验绝对定量反应板文件。

Setup	inst_men	Results										
Plate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1-1 U	1-1 U	1-1 U	1-1 U	1-2 U	1-2 U	1-2 U	1-3 U	1-3 U	1-3 U	1-3 U	1-3 U
B	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-5 U	1-5 U	1-5 U	1-6 U	1-6 U	1-6 U	1-6 U	1-6 U
C	1-7 U	1-7 U	1-7 U	1-8 U	1-8 U	1-8 U	1-9 U	1-9 U	1-9 U	1-9 U	1-9 U	1-9 U
U	NTC U	NTC U	NTC U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U	1-4 U
E	S3 S	S2 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S	S3 S
F	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U
G	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U	2-1 U
H	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U	2-7 U

样本名  
(此处 1 表示分组, 4 表示从中提取样本的个体)

探针任务和颜色

注释

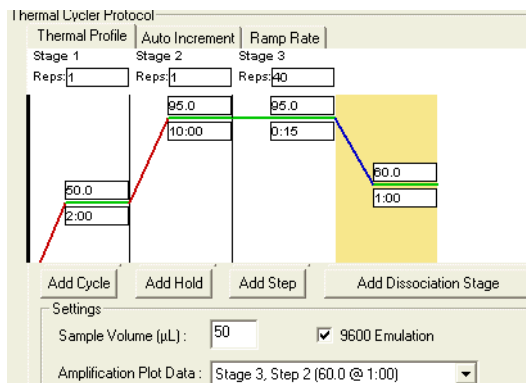


## 指定热循环条件并开始运行反应板

### PCR 扩增的默认热循环条件

如果您选择两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 执行绝对定量实验 (建议采用此方法), 至此您已完成反转录 (RT) 步骤。在工作流程的此位置, 您已准备好对 cDNA 执行 PCR 扩增。

此实验分析法的 PCR 步骤的默认热循环条件 (如下表所示) 应显示在 Instrument (仪器) 选项卡上。

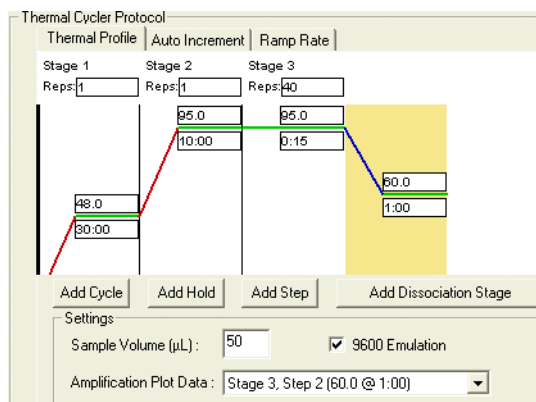


时间和温度 (两步法 RT-PCR)				
1) 反转录 (RT) 步骤	保持	保持	* 仅供参考。此时反转录 (RT) 已完成。	
	10 分 @ 25 °C	120 分 @ 37 °C		
2) PCR 扩增步骤	初始步骤		PCR 扩增 (40 个循环的每个循环)	
	AmpErase® UNG 活化	AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶活化	融解	退火 / 延伸
	保持	保持	循环	
	2 分 @ 50 °C	10 分 @ 95 °C	15 秒 @ 95 °C	1 分 @ 60 °C

### 一步法 RT-PCR 热循环条件

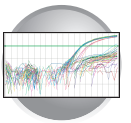
如果您选择一步法 RT-PCR 实验分析法, 则 cDNA 的生成和扩增在工作流程的此位置同时进行。

下表显示一步法 RT-PCR 实验的热循环条件。



时间和温度 (一步法 RT-PCR)			
初始步骤		PCR 扩增 (40 个循环的每个循环)	
反转录	AmpliTaq® Gold DNA 聚合酶活化	融解	退火 / 延伸
保持	保持	循环	
30 分 @ 48 °C	10 分 @ 95 °C	15 秒 @ 95 °C	1 分 @ 60 °C

注释



指定热循环条件并开始运行反应板：

1. 选择 **Instrument (仪器)** 选项卡。

默认情况下，显示两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法中 PCR 步骤的标准 PCR 条件。

2. 验证以下各项：

- 如果您使用两步法 RT-PCR – 则已设置默认的 PCR 热循环条件。
- 如果您使用一步法 RT-PCR – 请按照第 28 页 “一步法 RT-PCR 热循环条件” 中的说明设置各项热循环参数。
- Sample Volume (样本体积) 为 50  $\mu$ L。
- 9600 Emulation (9600 仿真) 选项选取。

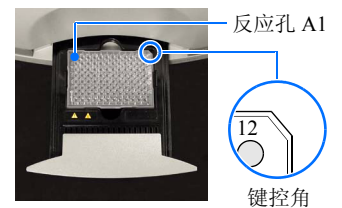
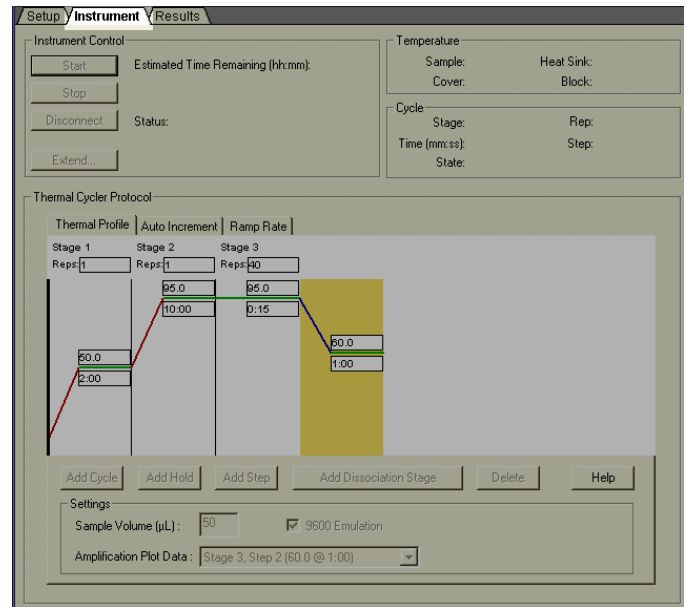
注释：如果您使用 SYBR Green I 化学荧光试剂，而且您希望确定是否存在污染或您想确定熔解温度，请单击 **Add Dissociation Stage (添加熔解步骤)**。有关详情，请参阅联机帮助。

注释：在 7300 PCR 仪上不提供 9600 Emulation (9600 仿真) 功能。

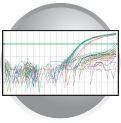
3. 选择 **File (文件) > Save As (另存为)**，为绝对定量反应板文件输入一个文件名，然后单击 **Save (保存)**。

4. 将反应板装入仪器中。

注释：反应孔 A1 位于仪器托盘的左上角。



注释

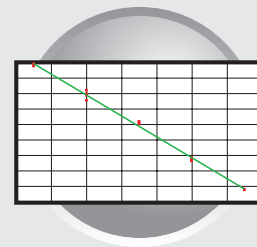


## 5. 单击 **Start**（开始）。

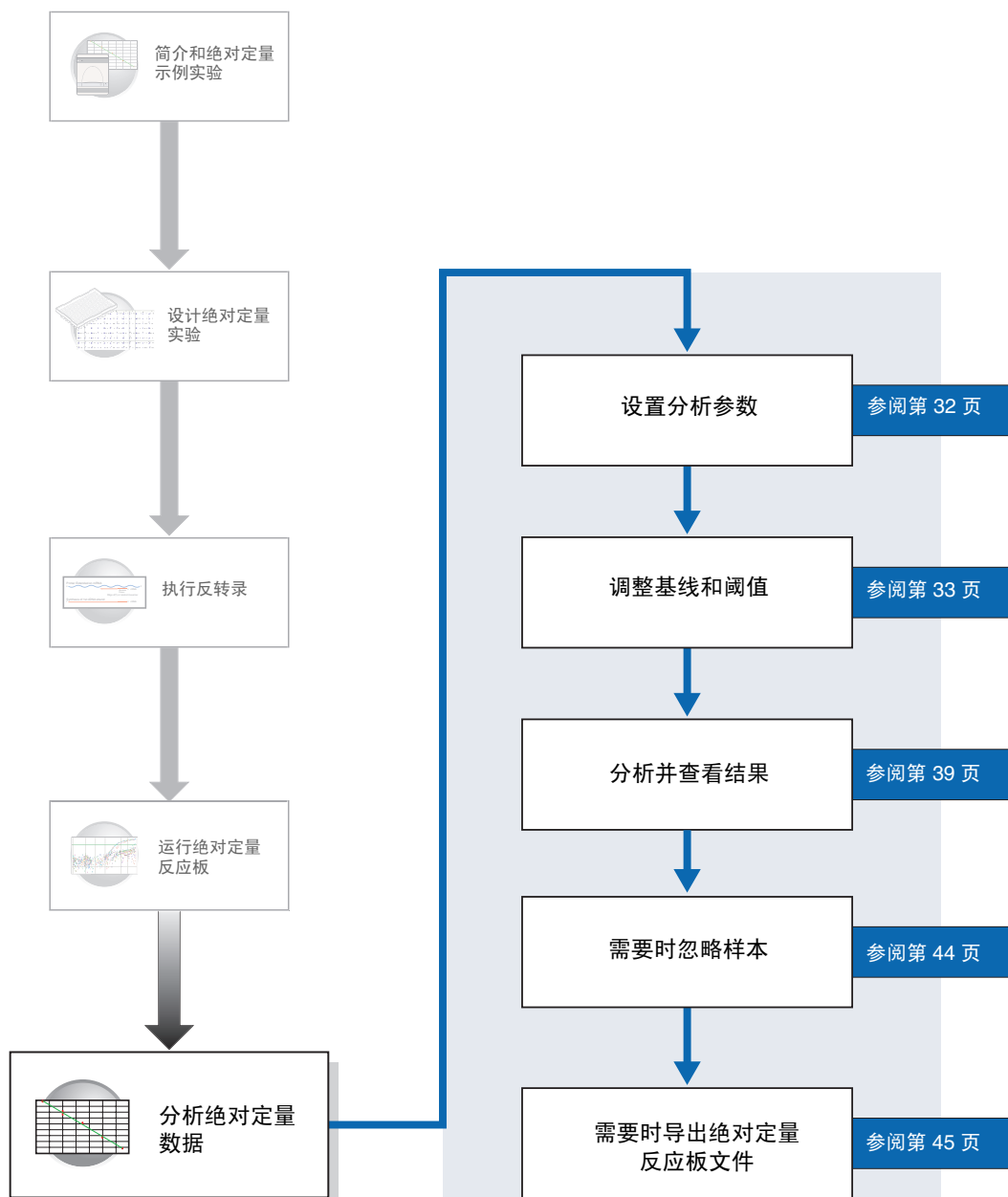
在仪器运行 PCR 程序期间，Instrument（仪器）选项卡上会显示实时状态信息，并报告荧光信号强度。

程序运行结束后，状态值和按钮变为灰色，而且 Analysis（分析）按钮 (▶) 变为可用状态，并显示信息提示您程序是否成功运行。

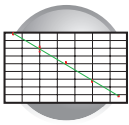
程序运行期间生成的所有数据都保存到您在 [步骤 3](#) 中指定的绝对定量反应板文件中。



## 工作流程



注释




## 设置分析参数

在您可以分析数据之前，必须先指定各项分析参数值。

除非您已为您的实验确定了最佳基线和阈值设置，否则您可使用 SDS 软件的自动生成基线和阈值 (Auto Ct) 功能来确定基线和阈值。如果程序能够为每个反应孔正确地调用基线和阈值，您便可继续进行查看结果。否则，您必须手动设置基线和阈值，有关指导，请参阅第 33 页“手动确定基线和阈值”。

本节描述如何使用 Auto Ct（自动 Ct）功能。

指定分析设置：

1. 单击  或选择 **Analysis（分析） > Analysis Settings（分析设置）**。
2. 从 **Detector（探针）** 下拉列表中，选择 **All（全部）**。
3. 选择 **Auto Ct（自动 Ct）**。SDS 软件将自动为每个反应孔生成基线和阈值。

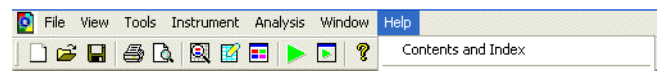
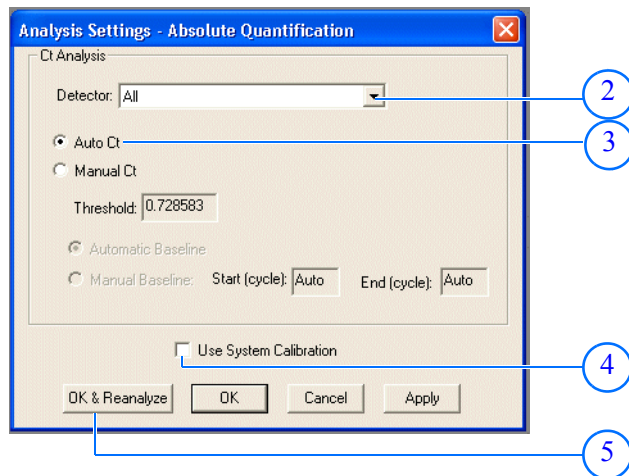
**重要！** 分析完毕后，您必须验证每个反应孔的基线和阈值是否已被正确调用，如第 33 页“调整基线和阈值”所述。

或者，您也可选择 **Manual Ct（手动 Ct）**，以手动指定阈值和基线值。

4. 选择 **Use System Calibrator（使用系统校正器）** 以使用存储在计算机中的校正文件（背景和纯荧光），而不使用存储在反应板文件内的校正信息。

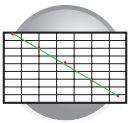
有关系统校正文件的详细说明，请参阅联机帮助。

5. 单击 **OK & Reanalyze（确定并再次分析）** 按钮。
6. 检查扩增图谱；如果必要，按以下部分的说明手动调整基线和阈值。



注释





## 调整基线和阈值

### 自动确定基线和阈值

SDS 软件的  $C_t$  功能，根据数据显示的“典型”扩增曲线为探针计算基线和阈值。

典型扩增曲线包括：

- 平台期 (a)
- 线性增长期 (b)
- 指数增长期 (c)
- 背景 (d)
- 基线 (e)

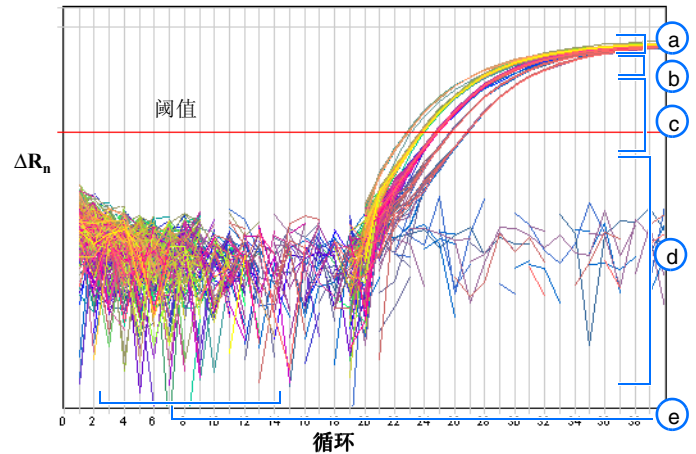
实验性错误（如污染、移液错误等）可能会产生与典型扩增曲线数据偏差极大的数据。这种非典型数据可能会导致软件算法为相关联的探针生成不正确的基线和阈值。

因此，美国应用生物系统公司建议您在分析研究数据后复查所有基线和阈值参数值。如有必要，手动调整这些值，如第 36 页所述。

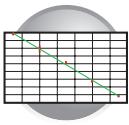
### 手动确定基线和阈值

如果您为研究中的任何探针以手动方式设置基线和阈值，必须为每个探针执行第 36 页所述的步骤。

以下扩增图谱显示不同基线和阈值设置值产生的效果。

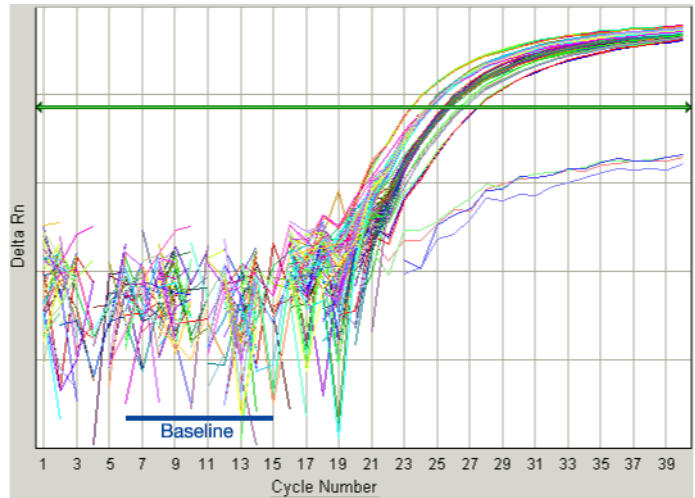


注释



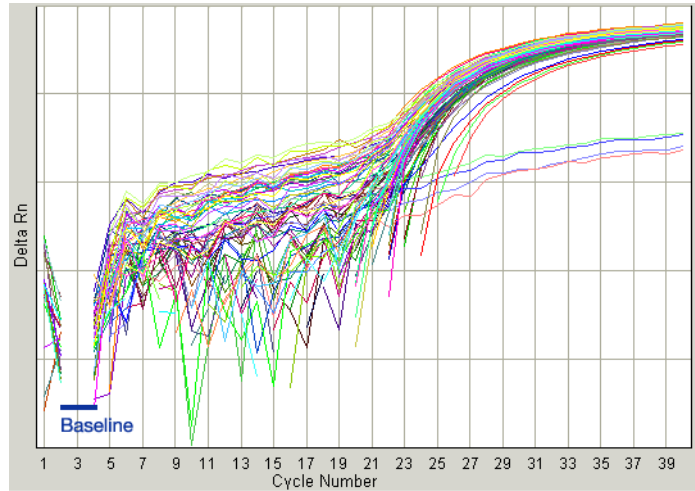
### 基线正确设置

扩增曲线从最大基线之后开始。不需要进行调整。



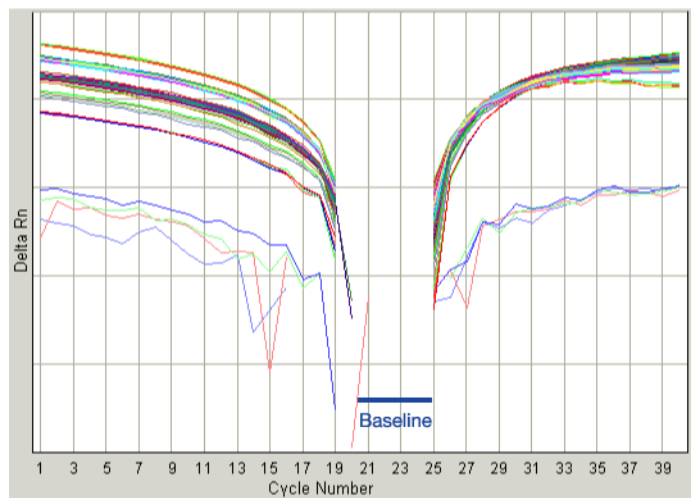
### 基线设置太低

扩增曲线从远离最大基线的右侧位置开始。应增大 End Cycle (结束循环) 的值。

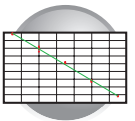


### 基线设置太高

扩增曲线从最大基线之前开始。应减小 End Cycle (结束循环) 的值。



注释

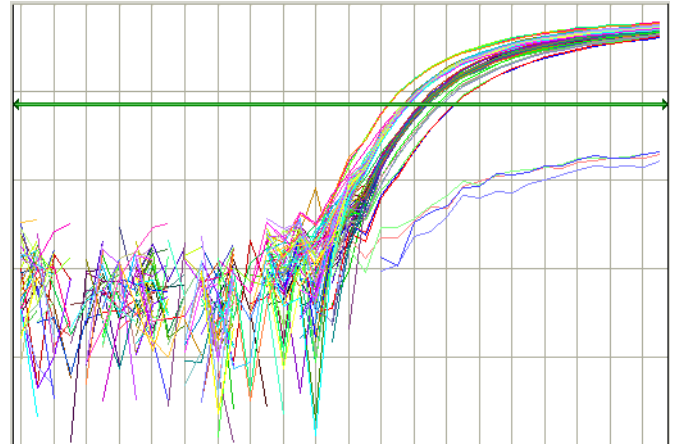


### 阈值正确设置

阈值设置在扩增曲线的指数增长期之内。

高于或低于最优化值的阈值设置将会增大重复组的标准偏差。

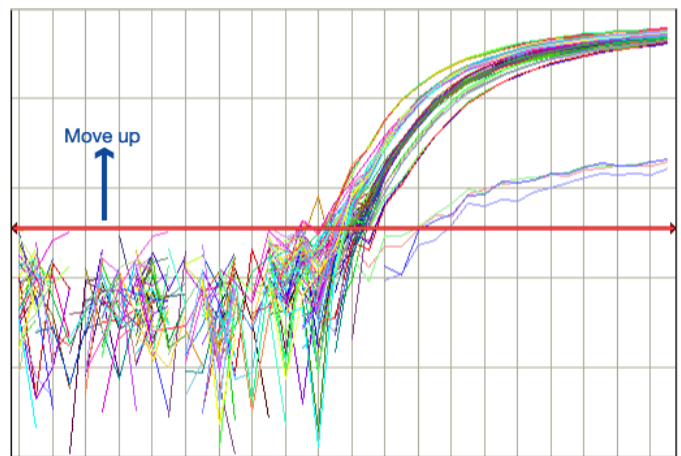
Instrument		Results						
Spectra		Component	Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation	Report
Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered
1-1	RNase P	Unknown	25.51	0.040	4788.97	4732.19	128.616	
1-1	RNase P	Unknown	25.57	0.040	4581.29	4732.19	128.616	
1-1	RNase P	Unknown	25.48	0.040	4877.24	4732.19	128.616	
1-1	RNase P	Unknown	25.54	0.040	4681.28	4732.19	128.616	



### 阈值设置太低

阈值设置在扩增曲线的指数增长期之下。其标准偏差远高于正确设置阈值时图谱的标准偏差。向上拖动阈值条，使之处于扩增曲线的指数增长期内。

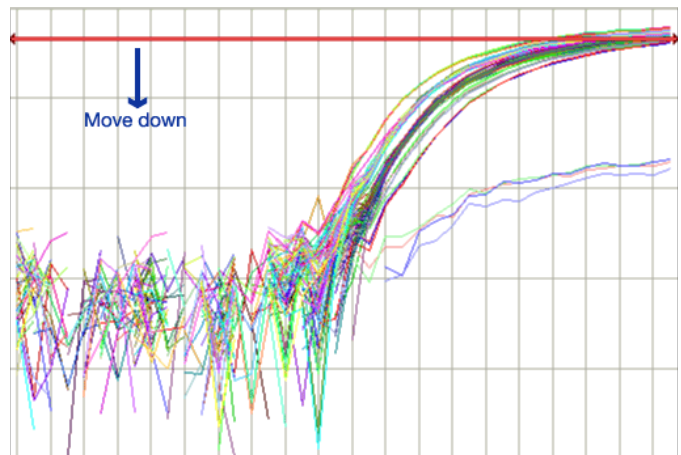
Instrument		Results						
Spectra		Component	Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation	Report
Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered
1-1	RNase P	Unknown	20.27	0.576	8146.32	4586.23	2677.676	
1-1	RNase P	Unknown	21.57	0.576	2171.80	4586.23	2677.676	
1-1	RNase P	Unknown	20.73	0.576	5097.34	4586.23	2677.676	
1-1	RNase P	Unknown	21.28	0.576	2929.45	4586.23	2677.676	



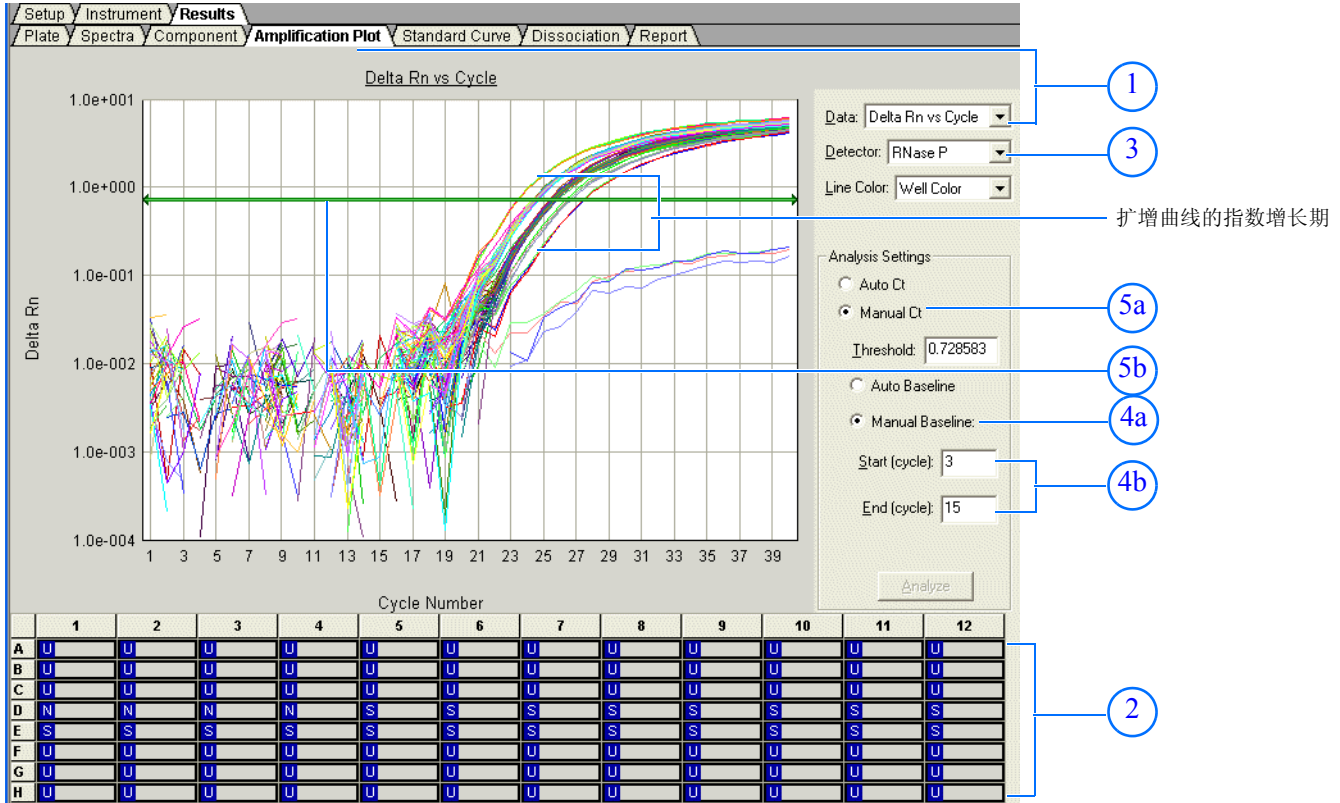
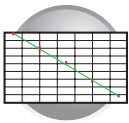
### 阈值设置太高

阈值设置在扩增曲线的指数增长期之上。其标准偏差远高于正确设置阈值时图谱的标准偏差。向下拖动阈值条，使之处于扩增曲线的指数增长期内。

Instrument		Results						
Spectra		Component	Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation	Report
Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered
1-1	RNase P	Unknown	38.24	0.481	4325.50	5015.28	683.698	
1-1	RNase P	Unknown	37.81	0.481	4867.56	5015.28	683.698	
1-1	RNase P	Unknown	37.08	0.481	5960.34	5015.28	683.698	
1-1	RNase P	Unknown	37.78	0.481	4907.72	5015.28	683.698	



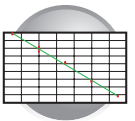
注释



手动调整基线和阈值：

1. 选择 **Amplification Plot**（扩增图谱）选项卡，然后从 **Data**（数据）下拉列表中选择 **Delta Rn vs Cycle**（ $\Delta Rn$  随循环变化）。
2. 选择要在图谱上显示的反应孔。（如果不作选择，图谱将显示为空白。）
3. 从 **Detector**（探针）下拉列表中，选择一个探针。SDS 软件显示所选探针和反应孔的图谱。

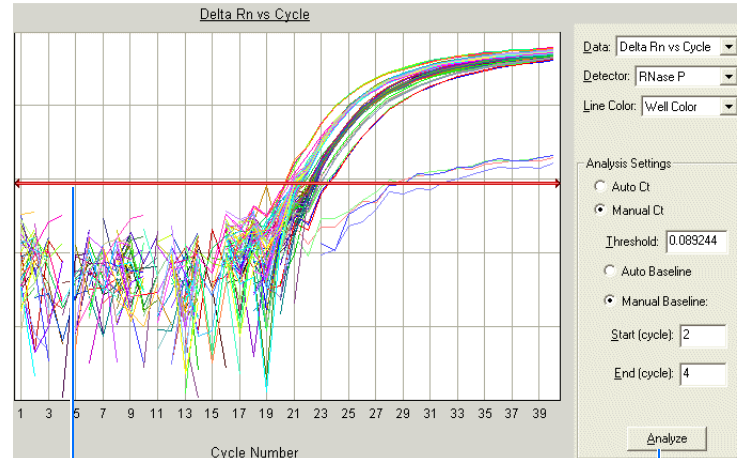
注释



4. 为探针设置基线。

- a. 在 Analysis Settings (分析设置) 下边, 选择 **Manual Baseline (手动设置基线)**。
- b. 在 Start (cycle) (开始循环) 和 End (cycle) (结束循环) 字段中输入相应的值, 确保扩增曲线的增长从 End Cycle (结束循环) 值之后的一个循环处开始。

注释: 在您更改某个探针的基线和阈值设置之后, Analyze (执行分析) 按钮 (Analyze) 变为可用状态, 指示您必须重新分析数据。



用鼠标拖动阈值条, 以调整阈值设置。阈值条变为红色, 表示已更改阈值。

更改基线或阈值之后, Analyze (执行分析) 按钮变为可用状态。

5. 为探针设置阈值。

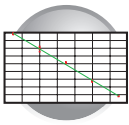
- a. 在 Analysis Settings (分析设置) 下边, 选择 **Manual Ct (手动 Ct)**。
- b. 用鼠标拖动阈值设置条, 直到阈值位于:
  - 背景的上边
  - 扩增曲线的平台期和线性增长期的下边
  - 扩增曲线的指数增长期之内

SDS 软件调整阈值, 并于分析之后在 Threshold (阈值) 字段中显示此值。

6. 重复步骤 3 至 4, 为实验分析中的所有剩余探针设置适当的基线和阈值。

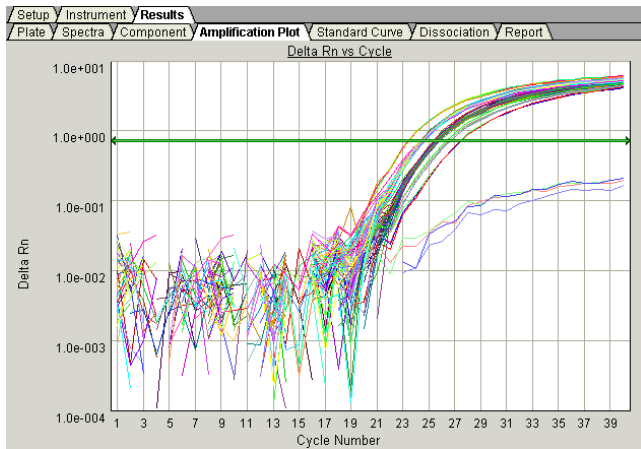
7. 单击 **Analysis (分析) > Analyze (执行分析)**, 以使用调整后的基线和阈值设置重新分析数据。

注释



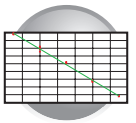
### 示例试验

数据首先使用 Auto Ct（自动 Ct）和 Auto Baseline（自动基线）设置进行分析，生成以下扩增图谱。



通过放大检视，似乎基线和阈值已被正确调用而无需进行调整。

- 扩增曲线从最大基线之后开始。
- 阈值设置在扩增曲线的指数增长期之内。



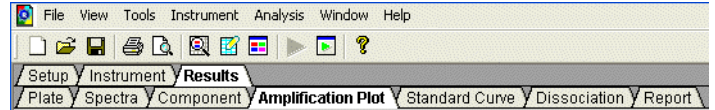
## 分析并查看绝对定量数据

### 关于 Results (结果) 选项卡

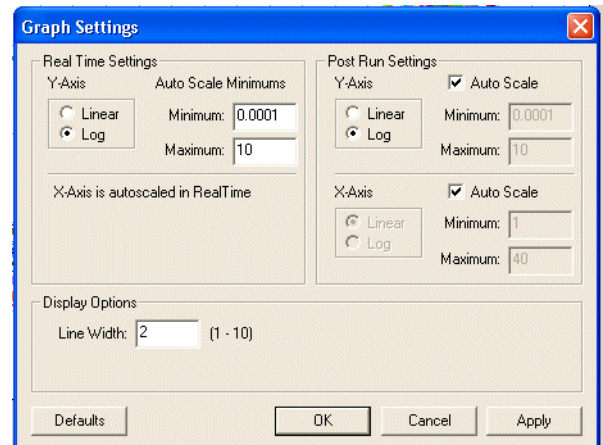
在 Results (结果) 选项卡上, 您可查看到扩增程序的结果, 并可更改参数。例如, 您可忽略一些样本, 或手动设置基线和阈值。如果您更改任何参数, 应重新分析数据。

Results (结果) 选项卡上包括 7 个二级选项卡, 分别描述如下。有关各选项卡的详细说明, 请参阅联机帮助。

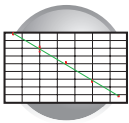
- 要在不同的视图之间移动, 单击选项卡。
- 要选择反应板上的所有 96 个反应孔, 单击反应板的左上角。
- 要调整图形设置, 双击图谱的 y 轴或 x 轴以显示 Graph Settings (图形设置) 对话框。可调整的设置取决于您正查看的图谱。



	1	2	3	4	5	6	7
A	5K U 4.85e+00	5K U 4.59e+00	5K U 4.85e+00	5K U 4.58e+00	5K U 4.87e+00	5K U 4.59e+00	5K U 4.65e+00
B	5K U 4.40e+00	5K U 4.56e+00	5K U 4.20e+00	5K U 4.62e+00	5K U 4.84e+00	5K U 5.12e+00	5K U 4.82e+00
C	5K U 4.70e+00	5K U 4.76e+00	5K U 5.02e+00	5K U 5.50e+00	5K U 5.29e+00	5K U 5.64e+00	5K U 5.28e+00



注释



### Plate (反应板) 选项卡

显示每个反应孔的结果数据，包括：

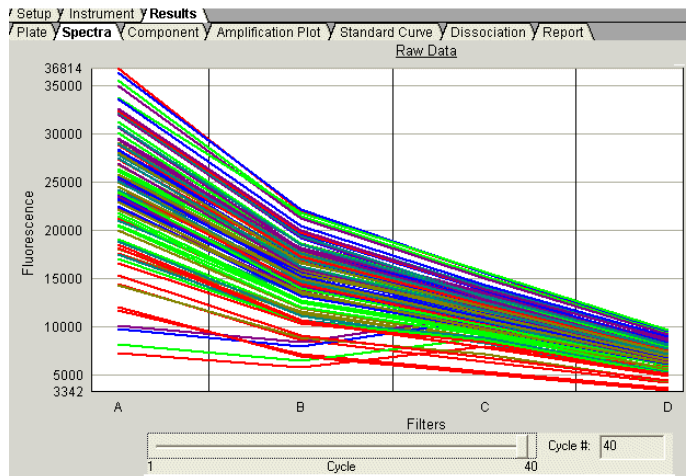
- 每个反应孔的样本名、探针任务和颜色。
- 计算值 - 量值 (默认值)、 $\Delta Rn$  或 Ct。选择 **Analysis (分析) > Display (显示)** 以选择要显示的值。

Setup	Instrument	Results								
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation		Report	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
A	1-1 U 4.79e+00	1-1 U 4.58e+00	1-1 U 4.86e+00	1-1 U 4.68e+00	1-2 U 4.94e+00	1-2 U 4.60e+00	1-2 U 4.68e+00	1-2 U 4.47e+00		
B	1-4 U 4.35e+00	1-4 U 4.57e+00	1-4 U 4.20e+00	1-4 U 4.66e+00	1-5 U 4.79e+00	1-5 U 5.06e+00	1-5 U 4.75e+00	1-5 U 4.86e+00		
C	1-7 U 4.74e+00	1-7 U 4.74e+00	1-7 U 5.08e+00	1-7 U 5.48e+00	1-8 U 5.24e+00	1-8 U 5.54e+00	1-8 U 5.23e+00	1-8 U 5.25e+00		
D	NTC N	NTC N	NTC N	NTC N	S1 S 1.25e+00	S1 S 1.25e+00	S1 S 1.25e+00	S1 S 1.25e+00		
E	S3 S 5.00e+00	S3 S 5.00e+00	S3 S 5.00e+00	S3 S 5.00e+00	S4 S 1.00e+00	S4 S 1.00e+00	S4 S 1.00e+00	S4 S 1.00e+00		
F	2-1 U 1.01e+00	2-1 U 9.90e+00	2-1 U 9.26e+00	2-1 U 9.70e+00	2-2 U 9.86e+00	2-2 U 1.02e+00	2-2 U 1.04e+00	2-2 U 1.02e+00		
G	2-4 U 1.03e+00	2-4 U 1.09e+00	2-4 U 9.49e+00	2-4 U 1.00e+00	2-5 U 9.09e+00	2-5 U 9.61e+00	2-5 U 9.99e+00	2-5 U 1.01e+00		

### Spectra (光谱) 选项卡

显示所选反应孔的荧光光谱。

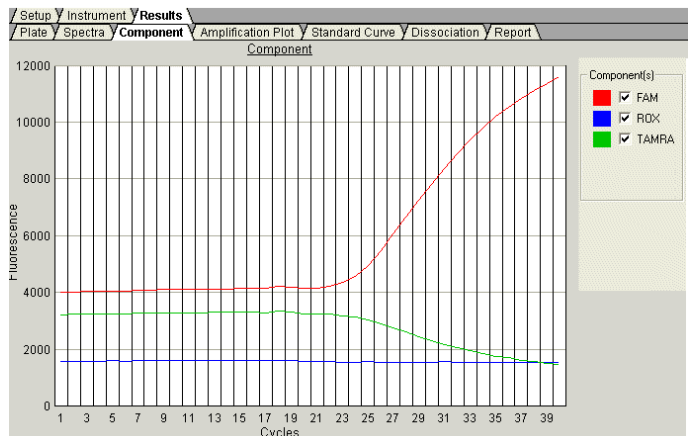
- 用鼠标指针点击并拖动 Cycle (循环) 滑块上的指示器，可查看每一循环的光谱。
- Cycle # (循环次数) 文本框中显示滑块指示器的当前位置。



### Component (成分) 选项卡

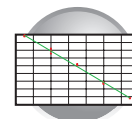
显示整个 PCR 运行期间所选反应孔的每种荧光的完整光谱表现。每次只能显示第一个选取的反应孔。

注释：如果您使用 TaqMan<sup>®</sup> 产品，则在 Component (成分) 选项卡上会显示三个成分 (ROX<sup>®</sup> 荧光、报告基团和 TAMRA<sup>™</sup> 淬灭荧光)，如右图所示。如果您使用 TaqMan<sup>®</sup> MGB 产品，则只显示两个成分 (ROX 和报告基团)。



注释





## Amplification Plot (扩增图谱) 选项卡

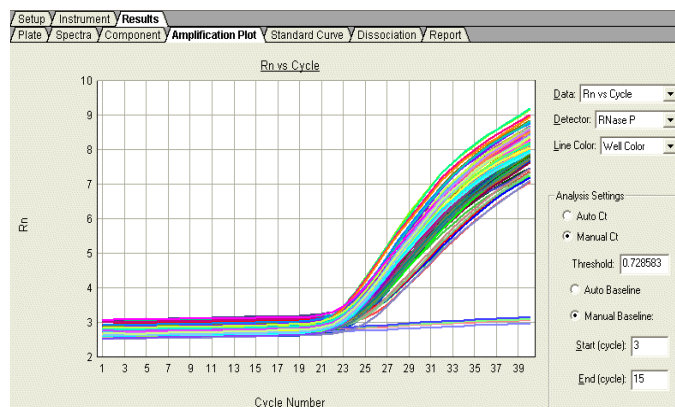
在三个 Amplification Plot (扩增图谱) 上, 您可查看特定样本的扩增后荧光信号读取情况。

Amplification Plot (扩增图谱) 上显示所选反应孔中的所有样本。

### Rn vs. Cycle (Linear) (Rn 随循环变化, 线性) 视图

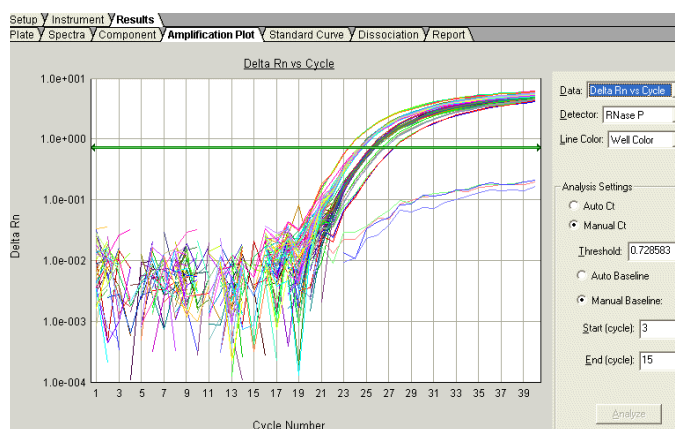
显示校正后报告荧光强度 ( $R_n$ ) 荧光随循环变化的曲线。您可通过此图来识别和检查不规则扩增。

有关校正后报告荧光强度 ( $R_n$ ) 的更详细说明, 请参阅《SDS 化学指南》。



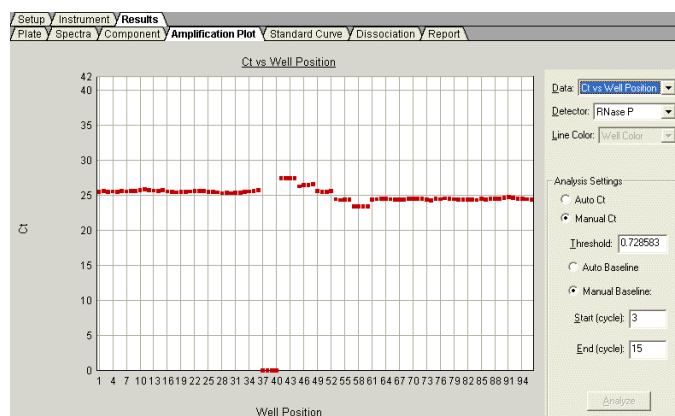
### $\Delta R_n$ vs. Cycle (Log) ( $\Delta R_n$ 随循环变化, 对数) 视图

显示荧光 ( $\Delta R_n$ ) 随循环数变化的曲线。您可通过此图来识别和检查不规则扩增, 也可手动设置运行程序的阈值和基线参数。

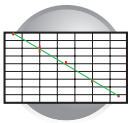


### Ct vs. Well Position (Ct 值与反应孔位置关系) 视图

显示阈值循环 ( $C_T$ ) 与反应孔位置的关系变化图。您可通过此图查找探针数据设置中不当设置的极端值 (有关详情, 请参阅第 44 页“忽略样本”)。



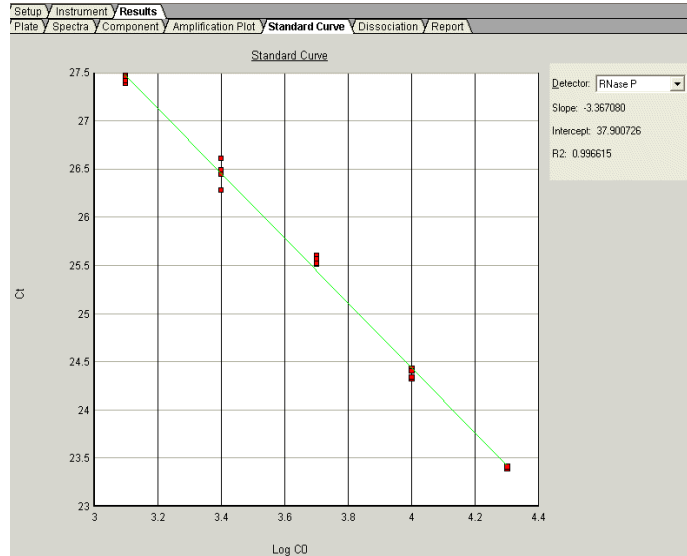
注释



## Standard Curve (标准曲线)

显示指定为标准的样本标准曲线。

SDS 软件根据此标准曲线推断并计算出未知样本的量。

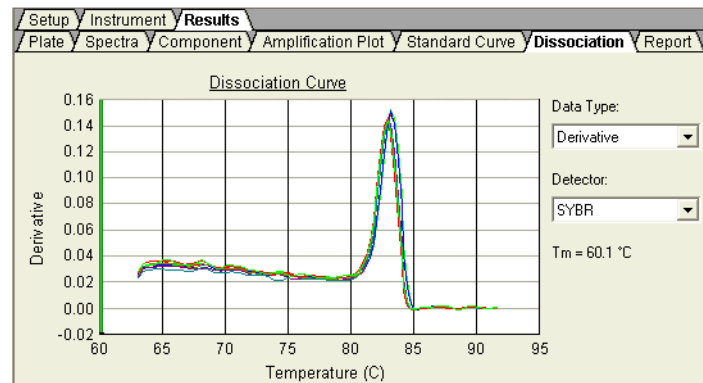


## Dissociation (熔解)

显示与熔解分析相关的融解 ( $T_m$ ) 曲线。当使用 SYBR<sup>®</sup> Green 产品时, 在以下任一情况下会显示此项数据:

- 在 Instrument (仪器) 选项卡上选择了 Dissociation Protocol (熔解实验方案)
- 选择 Dissociation (熔解) 作为实验分析类型

附录 C 和联机帮助中均提供了有关熔解曲线分析的详细说明。



## Report (报告)

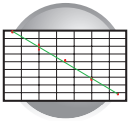
以表格方式显示所选反应孔的数据。报告中的数据栏取决于正运行的实验分析类型。对于绝对定量实验分析, 可能包括以下数据栏: Well (反应孔)、Sample Name (样本名)、Detector (探针)、Task (任务)、Ct、StdDev Ct (Ct 值标准偏差)、Qty (数量)、Mean Qty (平均数量) 和 StdDev Qty (标准偏差数量)。

Qty (数量) 栏中的值根据样本的标准曲线推断并计算得出。

在 Report Settings (报告设置) 对话框中可设置报告显示格式和报告打印方式。有关此对话框的详细说明, 请参阅联机帮助。

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty
A1	1-1	RNase P	Unknown	25.51	0.040	4788.9
A2	1-1	RNase P	Unknown	25.57	0.040	4581.2
A3	1-1	RNase P	Unknown	25.48	0.040	4877.2
A4	1-1	RNase P	Unknown	25.54	0.040	4681.2
A5	1-2	RNase P	Unknown	25.47	0.061	4935.4
A6	1-2	RNase P	Unknown	25.57	0.061	4602.1
A7	1-2	RNase P	Unknown	25.54	0.061	4676.4
A8	1-2	RNase P	Unknown	25.61	0.061	4466.7
A9	1-3	RNase P	Unknown	25.65	0.080	4352.3
A10	1-3	RNase P	Unknown	25.72	0.080	4137.0
A11	1-3	RNase P	Unknown	25.84	0.080	3813.8
A12	1-3	RNase P	Unknown	25.76	0.080	4040.3
B1	1-4	RNase P	Unknown	25.65	0.069	4346.7
B2	1-4	RNase P	Unknown	25.58	0.069	4566.5
B3	1-4	RNase P	Unknown	25.70	0.069	4203.6

注释



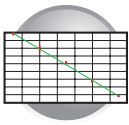
### 示例试验

在两个研究的分组中，RNase P（核糖核酸酶 P）的数量（如 Plate（反应板）和 Report（报告）选项卡上所显示）分别是：分组 1 中为 5000；分组 2 中为 10000。

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1-1 4.79e+00	1-1 4.88e+00	1-1 4.88e+00	1-1 4.88e+00	1-2 4.94e+00	1-2 4.88e+00	1-2 4.47e+00	1-2 4.28e+00	1-2 4.28e+00
B	1-1 4.79e+00	1-2 4.20e+00	1-2 4.68e+00	1-2 4.40e+00	1-5 4.06e+00	1-5 4.06e+00	1-5 4.28e+00	1-5 4.28e+00	1-6 4.43e+00
C	1-1 4.79e+00	1-7 4.06e+00	1-7 4.48e+00	1-8 4.06e+00	1-8 4.24e+00	1-8 4.43e+00	1-8 4.28e+00	1-8 4.28e+00	1-8 4.28e+00
D	k77 N	k77 N	k77 N	k77 N	57 1.28e+00	57 1.28e+00	57 1.28e+00	57 1.28e+00	57 2.50e+00
E	53 1.00e+00	53 1.00e+00	53 1.00e+00	53 1.00e+00	54 1.00e+00	54 1.00e+00	54 1.00e+00	54 1.00e+00	55 1.00e+00
F	2-1 1.01e+00	2-1 1.00e+00	2-1 1.28e+00	2-1 1.70e+00	2-2 1.88e+00	2-2 1.03e+00	2-2 1.03e+00	2-2 1.03e+00	2-2 1.48e+00
G	2-1 1.01e+00	2-2 1.00e+00	2-2 1.40e+00	2-2 1.00e+00	2-5 1.03e+00	2-5 1.03e+00	2-5 1.03e+00	2-5 1.03e+00	2-6 1.00e+00
H	2-1 1.01e+00	2-7 1.00e+00	2-7 1.58e+00	2-7 1.43e+00	2-8 1.38e+00	2-8 1.01e+00	2-8 1.01e+00	2-8 1.01e+00	2-8 1.50e+00

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	Stdev Ct	Qty	Mean Qty	Stdev Qty	Filtered
A1	1-1	RNase P	Unknown	25.51	0.040	4788.97	4732.19	125.618	
A2	1-1	RNase P	Unknown	25.57	0.040	4557.29	4732.19	125.618	
A3	1-1	RNase P	Unknown	25.48	0.040	4877.26	4732.19	125.618	
A4	1-1	RNase P	Unknown	25.54	0.040	4657.28	4732.19	125.618	
A5	1-2	RNase P	Unknown	25.47	0.081	4925.40	4870.19	195.982	
A6	1-2	RNase P	Unknown	25.57	0.081	4622.18	4870.19	195.982	
A7	1-2	RNase P	Unknown	25.54	0.081	4676.46	4870.19	195.982	
A8	1-2	RNase P	Unknown	25.61	0.081	4426.70	4870.19	195.982	
F7	2-1	RNase P	Unknown	24.42	0.004	10094.15	9707.45	370.027	
F9	2-1	RNase P	Unknown	24.45	0.004	9577.00	9707.45	370.027	
F10	2-1	RNase P	Unknown	24.25	0.004	8257.00	9707.45	370.027	
F4	2-1	RNase P	Unknown	24.40	0.004	9704.00	9707.45	370.027	
F5	2-2	RNase P	Unknown	24.45	0.000	9701.42	9707.00	259.267	
F6	2-2	RNase P	Unknown	24.40	0.000	9705.12	9707.00	259.267	
F7	2-2	RNase P	Unknown	24.37	0.003	9741.38	9707.88	220.367	

注释



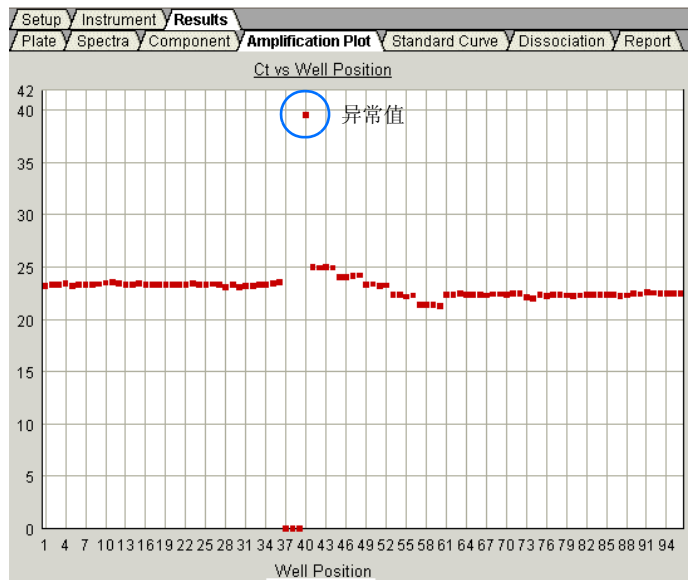
## 忽略样本

实验性错误可能会导致某些反应孔扩增不充分或根本不扩增。这些反应孔一般会产生与关联重复反应孔的平均  $C_T$  值相比显著不同的值。如果在计算中包括这些偏差值（异常值），则会得出错误的测量结果。

为确保精确度，应认真查看重复组以发现可能的异常值。使用  $C_T$  vs. Well Position（ $C_T$  值与反应孔位置关系）扩增图谱，您可手动删除异常值。

### 删除异常值：

1. 选择 **Amplification Plot**（扩增图谱）选项卡。
2. 从 Data（数据）下拉列表中，选择 **Ct vs. Well Position**（ $C_T$  值与反应孔位置关系）。
3. 选择要检查的反应孔，然后通过比较不同分组的  $C_T$  值，验证每个重复分组值的一致性。
4. 如果发现异常值，选择 **View**（视图）> **Well Inspector**（反应孔设定），然后选择相应反应孔的 **Omit**（忽略）复选框。

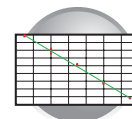


图谱中显示的异常值

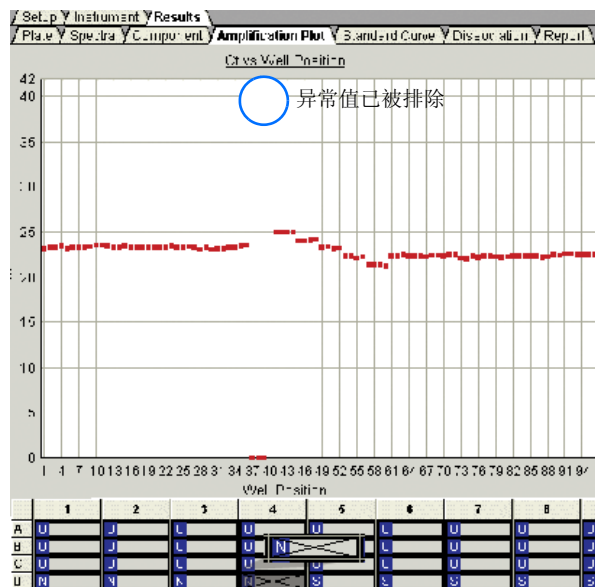
选择 Omit Well（忽略反应孔）复选框

忽略的反应孔被排除并标上叉号

注释



- 单击 或选择 **Analysis (分析) > Analyze (执行分析)**，在排除异常数据的情况下再次分析数据。
- 对您想筛选的其它反应孔重复步骤 3 至 5。



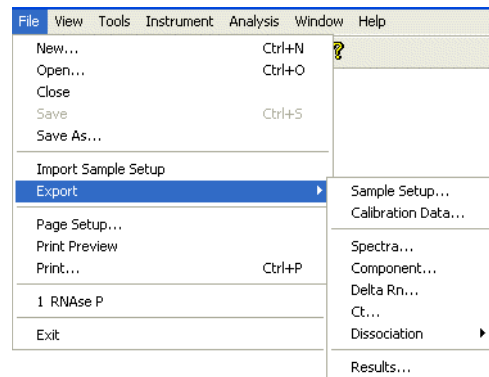
## 导出绝对定量反应板数据

您可将绝对定量反应板中的数值数据导出为文本文件，然后可将数据导入诸如 Microsoft Excel 的电子表格程序软件。

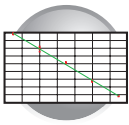
- 选择 **File (文件) > Export (导出)**，然后选择要导出的数据类型。
  - **Sample Setup (样本设定) (\*.txt)**
  - **Calibration Data (校正数据) (\*.csv)**
  - **Spectra (光谱) (\*.csv)**
  - **Component (成分) (\*.csv)**
  - **Delta Rn (校正后报告荧光强度) (\*.csv)**
  - **Ct (阈值循环) (\*.csv)**
  - **Dissociation (熔解) (\*.csv)**

有关导出文件类型的说明，请参阅联机帮助。

- 为要导出的文件输入一个文件名。
- 单击 **Save (保存)**。



注释



第 5 章 分析绝对定量数据  
导出绝对定量反应板数据

注释

---

---

---

# 创建探针

# A

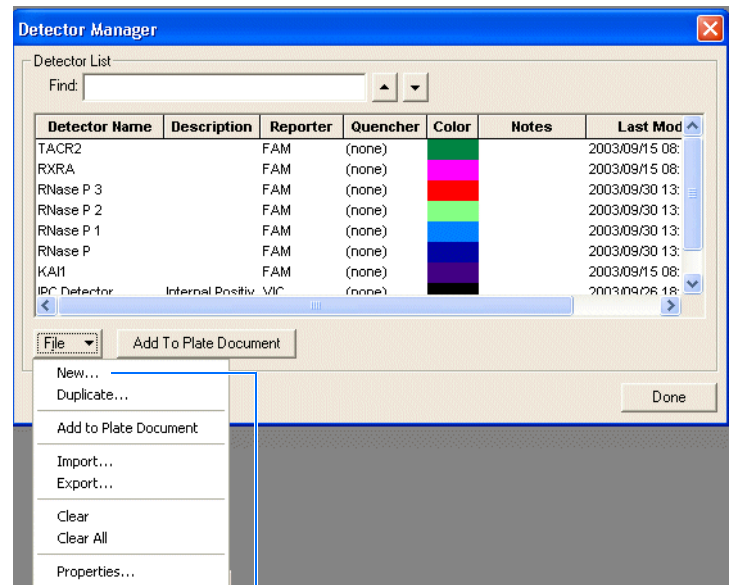
在您使用反应板文件运行反应板之前，需要创建探针并将其应用到反应板上的所有样本。一个探针虚拟地代表一个基因或等位基因特异性核酸探针试剂，用于在仪器中执行分析。

## 创建探针：

1. 选择 **Tools (工具) > Detector Manager (探针管理器)**。

**注释：**必须先打开一个反应板文件（任何类型），然后您才能访问 **Tools (工具)** 菜单。

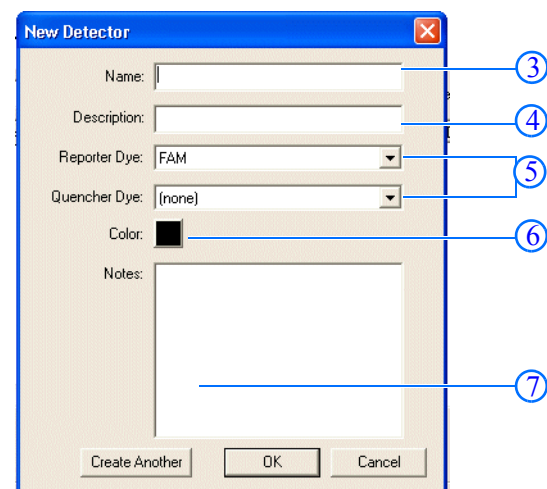
2. 在 **Detector Manager (探针管理器)** 中，选择 **File (文件) > New (新建)**。



3. 在 **New Detector (新建探针)** 对话框中，为探针输入一个名称。

**重要！** 探针名称必须是唯一的，应能反映出分析的目标基因座（如 **GAPDH (磷酸甘油醛脱氢酶)** 或 **RNase P (核糖核酸酶 P)**）。不要为多个探针使用同一个名称。

4. 另外，单击 **Description (描述)** 字段，也可  
为探针输入一个简短的描述。



## 注释

- 在 Reporter Dye（报告基团）和 Quencher Dye（淬灭基团）下拉列表中，为探针选择适当的荧光。

**注释：**在 Reporter Dye（报告基团）和 Quencher Dye（淬灭基团）下拉列表中显示的荧光，是此前您使用 Dye Manager（荧光管理器）输入的荧光。如果您想使用的荧光并未显示在下拉列表中，请使用 Dye Manager（荧光管理器）添加该荧光，然后返回此过程的此步骤。有关详情，请参阅联机帮助。

**注释：**选择 TAMRA 作为 TaqMan™ 探针的淬灭基团，为 TaqMan MGB 探针选择 None（无）。

- 单击 **Color（颜色）** 框，在 Color（颜色）对话框中选择一种颜色来代表探针，然后单击 OK（确定）。
- 此外，也可单击 **Notes（注释）** 字段，然后输入对该探针的任何附加说明。
- 单击 **OK（确定）** 以保存探针，并返回 Detector Manager（探针管理器）窗口。
- 重复步骤 2 至 8，创建剩余的探针。
- 添加完探针后，在 Detector Manager（探针管理器）窗口中，单击 **Done（完成）**。

#### 示例试验

在绝对定量示例实验中，为实验分析中要确定量值的一个目标创建了一个探针。此探针命名为 RNase P 并指定用蓝色。根据常规，所用探针是由 FAM 标记的 TaqMan MGB 探针。TaqMan MGB 探针包含不发荧光的淬灭基团。

在对两个或更多个目标进行定量检测的绝对定量实验中，应为每个目标创建一个探针。

**注释：**随 Assays-on-Demand 产品提供了一个分析信息文件 (AIF)。此文本文件包含您订购的实验分析信息，包括美国应用生物系统公司的实验分析代码、每个实验分析的反应孔定位、引物浓度以及引物序列。此文件也列出了每种实验分析中使用的报告基团和淬灭基团（若适用）。当您创建探针时，可使用报告基团和淬灭荧光信息（也可使用基因名或样本名符号）。您可在诸如 Microsoft Excel 的电子表格程序中查看 AIF 文件的内容。

#### 注释



使用 7300/7500 PCR 仪执行绝对定量实验分析，对标准样本的绝对定量需要通过某些独立方式来确定。通常使用质粒 DNA 或 体外转录 RNA 来准备绝对标准样本。通过  $A_{260}$  测量浓度，并使用 DNA 或 RNA 的分子量转化达到重复数。

为确保正确使用绝对定量标准曲线，应考虑以下要点：

- 标准 DNA 或 RNA 必须为单一的纯种 DNA 或 RNA。例如，从 *E. coli*（大肠杆菌）制备的质粒 DNA 通常已受 RNA 污染，会增大  $A_{260}$  的测量值，并夸大所确定的质粒重复数。
- 需采用精确的移液吸取和滴入操作，因为标准样本必须经过几个量级的稀释。必须对质粒 DNA 或 体外转录 RNA 进行浓缩，以便测量精确的  $A_{260}$  值。浓缩的 DNA 或 RNA 必须稀释  $10^6$  至  $10^{12}$  倍，使其浓度与生物样本中目标的浓度相似。
- 必须考虑对稀释后的标准样本进行稳定处理，特别对于 RNA 尤其重要。将稀释后的标准样本等分为几份，贮存在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  温度下，在使用前只解冻一次。Collins 等科学家通过努力，探索出了生成高置信度标准样本的方法。1995 年，他在一份报告中介绍了他在病毒定量分析中开发绝对定量 RNA 标准样本的步骤。
- 一般而言，不可能使用 DNA 作为 RNA 绝对定量分析的标准样本，因为尚无有效的对照来执行反转录步骤。

注释

---

---

---

# 熔解曲线分析

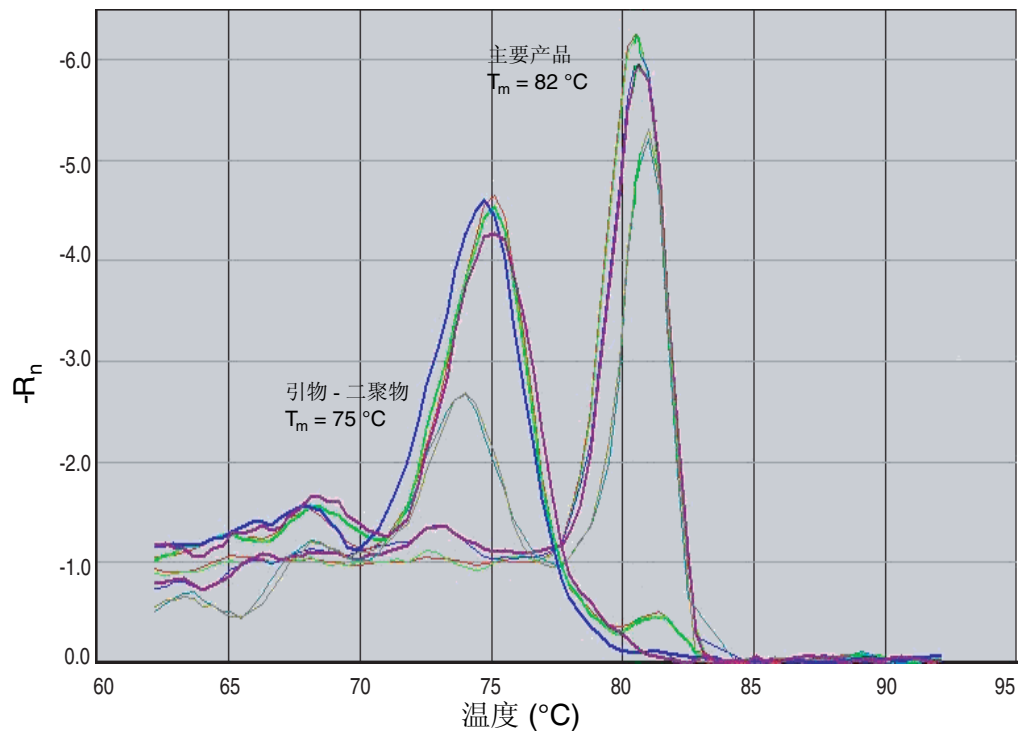
# C

**概述** 7300/7500 PCR 仪支持使用 SYBR® Green I 荧光进行核酸的熔解曲线分析。熔解曲线分析的目的，在于确定未知样本中单一目标核酸序列的融解温度 ( $T_m$ )。熔解曲线的典型应用包括检测非特异性产品和引物浓度优化。

分析过程开始时，将包含 PCR 样本和 SYBR Green I 荧光的 ABI PRISM™ Optical Reaction Plate (ABI PRISM™ 高透光度反应板) 装入 PCR 仪。反应板所装入的 PCR 仪已进行程序设置，使反应板的温度在几分钟内缓慢地上升。

SYBR Green I 荧光的结合特性使仪器可以监测到核酸的杂交活动。在运行期间，仪器记录因双链 DNA 熔解而导致的 SYBR Green 荧光信号的减弱情况。

**结果** 下图显示了检测 cDNA 样本中非特异性扩增的典型熔解曲线。



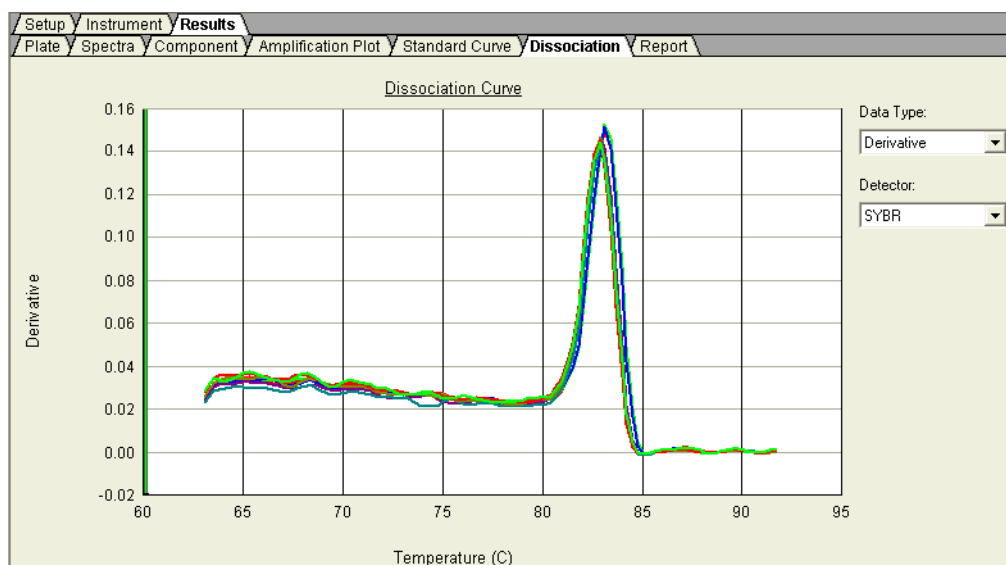
注释

熔解曲线图谱显示了引物 - 二聚物构成的典型双扩增高峰。特异性产品的扩增图谱显示  $T_m$  为 82 °C，而引物 - 二聚物产品的扩增图谱则显示更低的融解温度，即  $T_m$  为 75 °C。

### 查看熔解曲线数据

要查看熔解曲线数据，请选择 **Dissociation（熔解）** 选项卡，然后在 Data Type（数据类型）字段中，选择：

- **Derivative（衍生）** – 显示因温度作用而导致的荧光变化速度的第一次衍生变化的图谱。
- **Raw（原始）** – 显示荧光信号随温度变化的图谱。



联机帮助中提供了有关使用 7300/7500 PCR 仪执行熔解曲线分析的说明。

### 设计熔解曲线分析实验

有关 SYBR Green I 双链 DNA 组合荧光化学荧光试剂的详细说明，请参阅：

- *SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol*  
(*SYBR® Green PCR 和 RT-PCR 试剂实验方案*) (货号 4304965)
- *SYBR® Green PCR Master Mix Protocol*  
(*SYBR® Green PCR 主扩增预混试剂实验方案*) (货号 4310251)

### 用于熔解曲线分析的化学试剂盒

可使用以下美国应用生物系统公司试剂盒：

试剂盒	货号
SYBR Green RT-PCR Reagents Kit (SYBR Green RT-PCR 试剂盒)	4310179
SYBR Green PCR Core Reagents Kit (SYBR Green PCR 核心试剂盒)	4304886
SYBR Green PCR Master Mix (SYBR Green PCR 扩增预混试剂)	4309155

注释

## 参考文献

作者: Collin, M.L.、Zayati, C.、Detmar, J.J.、Daly, B.、Kolberg, J.A.、Cha, T.A.、Irvine, B.D.、Tucker, J. 和 M.S. Urdea 1995 年。标题: Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays (定量支链 DNA 杂交实验分析中所用 RNA 标准样本的制备方法和特征说明)。刊物: *Anal. Biochem.* 226:120-129。

作者: Kwok, S. 和 Higuchi, R. 1989 年。标题: Avoiding false positives with PCR (避免 PCR 假阳性判定的策略)。刊物: *Nature* 339:237-238。

作者: Mullis, K.B. 和 Faloona, F.A. 1987 年。标题: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction (通过聚合酶催化链反应进行体外 DNA 特异性合成)。刊物: *Methods Enzymol.* 155:335-350。

作者: Saiki, R.K.、Scharf, S.、Faloona, F. 等 1985 年。标题: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia ( $\beta$ -珠蛋白基因组序列的酶扩增及限制性酶切位点分析在诊断镰状细胞贫血中的应用)。刊物: *Science* 230:1350-1354。



## 数字及符号

- 5' 核酸酶检测分析 13
- 9600 Emulation (9600 仿真) 模式 29
- $\Delta Rn$  vs. Cycle ( $\Delta Rn$  随循环变化) 视图 41

## 英文字母

- AIF。参见“分析信息文件”
- AmpErase UNG 14
- Applied Biosystems
  - 服务与支持 viii
  - 联络 viii
  - 技术支持 viii
- AQ 反应板
  - 导出数据 45
  - 忽略样本自 44
  - 结果 39
  - 扩增图谱 39
  - 数据类型 45
  - AQ 反应板文件 24
  - 开始运行 30
  - 探针, 创建 47
- Assays-by-Design (代客设计引物和探针) 15
- Assays-on-Demand 15
- cDNA
  - 生成 19
  - 贮存 20
- Ct vs. Well Position (Ct 值与反应孔位置关系) 视图 41
- Ct。参见“阈值循环”
- Delta Rn 4
- Detector Manager (探针管理器) 对话框 47
- High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 19
- Instrument (仪器) 选项卡 29
- MSDS, 获取 viii
- New Detector (新建探针) 对话框 47
- NTC 24
- PCR
  - 实时 2
  - 终点 2
  - 预混试剂, 准备 22
  - 开始运行绝对定量反应板 30

- Primer Express (引物设计) 软件 15
- Rn vs. Cycle (Rn 随循环变化) 视图 41
- Rn。参见“校正后报告荧光强度”
- RNA
  - 始浓度 18
  - 转化为 cDNA 19
  - 准备指南 18
- ROX 荧光 26, 40
- RT-PCR
  - 一步法 14, 28
  - 一步法试剂盒 15
  - 热循环条件 28
  - 两步法 14
- Setup (设定) 选项卡 27
- SYBR Green I 荧光化学荧光试剂 13
- TAMRA 荧光 40
- TaqMan 化学荧光 13
- TaqMan MGB 探针 40
- TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) 22
- Uracil-N-glycosylase (尿嘧啶 -N- 糖基化酶) 14
- X 轴 39
- Y 轴 39

## B

- 报告基团 4, 40
- 标准样本 24
- 标准曲线 12, 49

## C

- 材料 5
- 重复 12
- 淬灭荧光 40

## D

- 导出绝对定量反应板数据 45
- 导入反应板设定信息 25

## F

- 反应板, AQ。参见“绝对定量反应板”
- 反应孔, 重复 12

## 反转录

- High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 19
- 热循环参数 19
- 准备 RNA 指南 18
- 仿真模式, 9600 29
- 分析信息文件 48
- 服务与支持, 获取 viii

## G

## 工作流程

- 绝对定量实验概述 3
- 绝对定量示例实验 7

## H

## 化学荧光 13

## 阈值循环

- AQ 研究设置 32
- 定义 4

## J

## 探针

- 创建 47
- 定义 47
- 添加到 AQ 反应板 25

## 基线 4

## 技术联络, 获得 viii

## 技术支持, 联络 viii

## 校正 7300/7500 PCR 仪 22

## 校正后报告荧光强度 4

## 结果 39

## 警告, 说明 vii

## 绝对定量

- 实验。另请参见“绝对定量实验” 3

## 绝对定量实验

- 成分 12
- 工作流程 3
- 试剂配置 13
- 示例实验 6
- 要求 12
- 探针和引物 15
- 化学荧光 13

## 绝对定量示例实验

- AQ 反应板文件, 示例 27
- PCR 扩增预混试剂 23
- 反转录 20
- 概述 6
- 过程 7
- 试剂配置 15
- 化学试剂 15

## K

## 开始运行绝对定量反应板 30

## 快速实验分析设计指南 15

## 宽度, 线条 39

## 扩增曲线 33

## 扩增图谱

- 代表性 4
- 类型 39

## M

## 美国应用生物系统公司文档客户反馈 viii

## 美国应用生物系统公司技术联络 viii

## 模板文件 25

## 模式, 仿真 29

## P

## 培训, 获取有关信息 viii

## Q

## 曲线

- 标准 12, 49
- 扩增 33
- 融解 42
- 熔解 42, 51

## R

## 荧光

- ROX 26, 40
- SYBR Green I 13, 15
- TAMRA 40
- 报告 4, 40
- 阳性参比荧光 26
- 淬灭荧光 40

## 荧光, 阳性参比 4

## 热循环条件

- 一步法 RT-PCR 28
- 用于 RT 19
- 指定 29
- PCR 默认 28

## 融解曲线 42

## 熔解曲线 42, 51

## S

## 设备 5

## 设计绝对定量实验

- 选择 SDS 化学荧光试剂 13
- 确定试剂配置 13
- 引物和探针 15

## 设置, 图形 39

## 实验方案, 熔解 42



实验分析设计指南 15

试剂配置 14

数据

    从反应板中忽略 44

    从绝对定量 (AQ) 反应板生成 PCR 数据 29

    导出 45

    导入 25

    分析 39

## T

探针 15

体例, 文字 vii

图谱外观 39

图形设置 39

图形外观 39

## W

未知 24

文档, 反馈 viii

文件

    AQ 反应板 24

    导出 45

    模板 25

文字体例 vii

无模板对照 24

## X

显示选项 39

线条宽度 39

选项, 显示 39

选项, 图形 39

## Y

衍生 52

阳性参比荧光 4

异常值 44

引物 15

引物 - 二聚物 52

预混试剂

    PCR 8, 22

    RT 7, 20

原始熔解数据 52

## Z

指南

    熔解曲线分析 51

    生成标准曲线 49

    实验分析设计 15

    准备 RNA 18

终点 PCR 2

注意, 说明 vii

自动缩放选项 39







**iScience.** 为了更好地理解生物系统错综复杂的相互关系，生物学家正在发展具有革命性的研究方法，将先进的技术、信息学和传统实验室研究方法结合起来。

美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 通过与客户密切合作，研究开发了多种具有创新意义的产品、服务及知识资源，使一体化科学 (iScience) 的研究成为可能。

#### 总部

地址: 850 Lincoln Centre Drive  
Foster City, CA 94404 USA (美国)  
电话: +1 650.638.5800  
免费电话 (北美): +1 800.345.5224  
传真: +1 650.638.5884

#### 全球销售与技术支持

Applied Biosystems 拥有遍布全球的庞大销售和服务网络，由经过专业培训且技能精湛的支持和产品应用人员组成，分布在六大洲的 150 多个国家和地区。有关销售办事处和技术支持分部的详细信息，请致电您当地的分公司查询，或登录我公司网站查阅，网址是 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)。

[www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)



Applera 公司致力于为生物学家提供全球领先的技术和信息。Applera Corporation 下属 Applied Biosystems 和 Celera Genomics 两大分公司。

印刷于美国 2004 年 3 月  
部件号 4347963 修订版 A

an **Applera** business