

荧光定量 PCR 仪

- (1) 开显示器及电脑电源，输入用户名：LCinstall，密码：LCinstall，进入电脑桌面
- (2) 打开仪器电源开关。仪器最左侧指示灯指示仪器状态：红灯闪烁表示仪器自检正在进行；稳定在绿灯状态表示仪器自检完成。中间指示灯指示进样器的状态：红灯表示进样器无样品；绿灯表示进样器中有样品，可进行测试。最右侧按钮为打开和关闭进样器
- (3) 待仪器最左侧指示灯为绿色时，即可用鼠标双击仪器控制软件，输入用户名：yangjun，密码：PCR001，进入软件界面
- (4) 打开仪器控制软件后，在 windows 下拉框中有 2 个命令可供选择：选择 Navigator 可查看已运行的实验，包括对数据的输出；选择 overview，有三种可供选择，New experiment 为新建实验，New experiment from Template 为从模板新建实验，Open Existing Object 打开已存在的目标文件

选择 overview 后，界面最右侧从上至下各图标的含义：

- (1) Exit the application，退出应用，点击该图标，关闭仪器控制软件
- (2) Log in to a database，点击该图标后需要重新输入用户名：yangjun 和密码：PCR001，进入仪器控制软件
- (3) Show the overview 显示大纲
- (4) Show the navigator 显示导航（文件存储路径）
- (5) Save changes to the selected object 保存文件至系统文件夹中，实验设置完成准备就绪后，必须将保存至系统文件夹中，才能点击“Run”按钮运行实验
- (6) Export the selected object to a file 给文件命名，并保存到自交指定的文件中
- (7) Close the selected object 关闭选择的文件
- (8) Print the selected object 打印目标文件
- (9) Open tools 打开维修工具，机器出现故障，参数需要重新设置，均在此进行

选择 **overview** 后，点击 “**New experiment**” 按钮，出现实验程序设置界面：

(1) **Experiment: Detection format** 检测模式，仪器可识别的检测模式有 8 种，具体见检测模式的下拉框；**Reaction volume** 反应体系体积；**Program name** 给程序命名。程序分为四个步骤：

(a) 加热变性阶段。**Analysis Mode** 设置为 **None**。这一步骤主要是将模板 DNA 双链变为单链，**Acquisition Mode** 设置为 **None**，时间 2 分钟，**Ramp Rate** 设置为 4.4°C/s ，其它参数设置为 0

(b) PCR 扩增阶段，循环数根据实验要求设置（一般在 30~45 之间），**Analysis Mode** 设置为 **Quantification**，扩增阶段程序分 3 步：**变性** 95°C ，**None**，时间 10~30 秒，**Ramp rate** 4.4°C/s ；**引物结合阶段** $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ （根据引物退火温度进行设置），**None**，时间 10~30 秒，**Ramp rate** 2.2°C/s ；**链延伸** 72°C ，**Single**，时间 10~30 秒，**Ramp rate** 4.4°C/s

(c) 熔解曲线分析，其程序分为 3 步：①快速升温至 95°C ，将反应体系中的模板双链 DNA 全部变为单链 DNA，**Analysis Mode** 设置为 **None**，时间 20 秒，**Ramp rate** 4.4°C/s ；②将 PCR 反应体系温度冷却至目标 DNA 的退火温度以下，系统默认值为 65°C ，**Analysis Mode** 设置为 **None**，时间 30 秒，**Ramp rate** 2.2°C/s ；③将反应体系温度缓慢升至 95°C ，**Analysis Mode** 设置为 **Continuous**，**Ramp rate** 0.06°C/s

(d) 结束实验，**Target** 为 42°C （可设置为其它数值），**Acquisition Mode** 设置为 **None**，时间 1 小时，**Ramp rate** 2.2°C/s

(e) 为节省编程时间，点击 “**Apply Template**” 图标，出现 “**Apply Template**” 对话框，在 **Root** 根目录下选中模板文件，点击 \checkmark 图标，直接调用模板，然后根据实验要求对相关参数进行修改

(f) 程序编写完成之后，也可将其存储为模板，点击“V”选中“**Save as template**”出现 “**Save template**” 对话框，给文件命名，选中好存储位置后，点击 \checkmark 图标后即可存储为模板，下次开展类似的实验可直接调用该模板

点击 “**Subset Editor**” 按钮，出现子集编辑器界面：

(1) 如果在开展实验过程中，开展两种或两种以上不同属性的实验/或开展同

一属性实验仅使用部分孔道时，则需要对每个孔道进行编辑说明。

- (2) 实例 1: 实验过程中仅使用 A1~D12 这 48 个孔道，其它孔道 E1~H12 未使用。设置方法：点击“+”图标，在 Subses 下面出现“New subset1”，选中“New subset1”后点击“Rename”图标，可对其进行重新命名。鼠标选中 A1~D12 这 48 个孔道，点击“Apply”图标，设置完成。如果设置错误，鼠标选中设置错误的孔道，先点击“Clear”图标，然后点击“Apply”图标，即可清除设置错误区域，随后进行重新设置
- (3) 实例 2: 在一块 96 孔板上开展 3 种不同属性的实验，3 次点击“+”图标，添加 3 个子集（默认名称为 New subset1, New subset2, New subset3），点击“Rename”可对 3 个子集重新命名，鼠标分别选中 New subset1/2/3，在右侧 96 孔板中选中 3 个子集所占的孔道，点击“Apply”图标，完成设置
- (4) 子集编辑器的作用是将 96 孔板分成不同的区域，开展不同属性的实验，最大限度地提高实验效率

点击“**Sample Editor**”按钮，出现样品编辑器界面：分 3 步进行

- (1) Select workflow 选中工作流程，有 8 种可供选中（Abs Quant, Rel Quant, Scanning, Color comp, Tm, Melt geno, Endpt geno），其中 Abs Quant（绝对定量），Rel Quant（相对定量），Tm（熔解曲线分析）最为常用
- (2) Select sample 选择样品，在 Subset 里面选择子集，在子集编辑器里面未设子集，则默认为 All samples
- (3) Edit properties, 对每个孔道样品进行编辑说明

绝对定量分析（Absolute Quantification）

- (1) 鼠标选中 Abs Quant
- (2) 在 Subset 选中要分析区域（选中子集），若没有设立子集，默认值为 All samples；若设立子集，在子集区域对各样品孔进行编辑说明
- (3) Edit Abs Quant Properties 对每个样品孔进行编辑说明。每个样品设置 3 个重复。例如 A1, A2, A3 为同一样品 3 个重复，设置方法为：鼠标选中 3

- 个孔道，在 **Sample name** 中填写样品名称，待测样品天写 **unknown**，标准样品填写 **Standard**，并在后面的对话框中填写标准样品的浓度；点击“**Make Replicates**”设置重复，**A1**，**A2**，**A3** 孔道上“**Repl of**”均显示为 **A1**
- (4) 标准样品 (**Standard**) 浓度梯度设置至少为 5 个，待测样品 (**Unknown**) 超出标准曲线范围，需进行浓缩或稀释后重新测定；待测样品 (设置 3 个重复) 标准误差较大，同样需要重新测定
 - (5) **Positive Control/Calibrator** 正对照：标准模板用纯水替代；**Negative Control** 负对照：引物用纯水替代
 - (6) 实验运行结束，点击“**Analysis**”图标选择分析方法，仪器有两种绝对定量分析方法可供选择：①**Abs Quant/2nd Derivative Max** (机器默认方法，自动计算分析)；②**Abs Quant/Fit Points** (需要人工手动调节分界线)
 - (7) 选择分析方法①，出现“**Create new analysis**”对话框，填写(选择)**Analysis Type/Subset/Program name**，点击“**√**”图标，进入数据分析界面。点击“**Calculate**”图标，开始计算。右下方为标准曲线图，**Error** 值越小越好，**Efficiency** 在 1.8~2.1 范围内符合要求；右上方为样品荧光图像；左下方为实验数据，鼠标选择样品数据，右上方显示该样品荧光图像，图像相近或完全吻合，表示重复性较好，测定结果较为准确。鼠标选中左下方图中任一数据，右击鼠标，选择“**Export Table**”出现“**Save table data**”，给文件命名并选择路径，点击“**Save**”，保存实验数据 (TXT 文本格式)
 - (8) 选择分析方法②**Abs Quant/Fit Points**。需要手动调节上下和左右分界线，调节的最终目的是使 **Error** 值最小，**Efficiency** 值接近 2。**Cycle range** 为循环数范围，左右分界线可采用系统默认值。**Noise Band** 下分界线，调整原则需满足以下 4 个条件：(a) 必须在所有阴性线 (噪音线) 以上；(b) 必须和所有的阳性线相交；(c) 相交点在指数增长期；(d) 满足以上 3 个条件，使分界线尽可能低。**Analysis** 上分界线，刚好使所有阳性线均在分界线以下。其它分析步骤类同于 (7)

相对定量分析 (**Basic Relative Quantification**)

- (1) 在“**Sample Editor**”界面的 **Step1: Select workflow** 中选择 **Rel Quant**

- (2) **Select sample** 选择样品，鼠标选中 96 孔板上每个孔道，对样品进行编辑说明，**Subset** 选择默认值 **All samples**
- (3) 编辑孔道中的每个样品的属性。对照样品在 **Sample name** 填写 **CK**；处理样品在 **Sample name** 填写处理方法（例如 **Dark, High temperature, Heat** 等）。每个样品设置 3 个重复，例如同时选中 **A1~A3** 孔道，点击“**Make Replicates**”即可设置同一样品的 3 个重复，**A1~A3** 中的 **Repl of** 值均为 **A1**。**内参基因**（例如 **actin**）：对照样品设置为 **Ref Poscalibrator**；处理样品设置为 **Ref unknown**；**Target name** 设置为基因名称（**actin**）；**Eff** 值设置为 **2.0**，并在下面的选择框中选中 **Reference**。**待测基因**（例如 **SAG**）：对照样品设置为 **Target Poscalibrator**；处理样品设置为 **Target unknown**；**Target name** 设置为待测基因名称（例如 **SAG**）；**Eff** 值设置为 **2.0**，并在下面的选择框中选中 **Target**
- (4) 实验运行结束，孔道样品属性设置完成后，点击“**Analysis**”图标，选中 **Basic Relative Quantification**。上图“**Result**”出现结果列表，**Target name** 出现基因列表（包括内参基因和待测基因）。下图为“**Sample view**”出现 **Sample for Pairing** 列表，对应出现每个样品的扩增曲线，**Bar chart** 出现数据柱状图
- (5) 在“**Result**”任意选中一个结果，右击鼠标，选中 **Export Table**，即可输出结果（**TXT** 文本文件）；或在 **Sample for Pairing** 中任意选中一个结果，右击鼠标，选中 **Export Table**，同样也可输出结果（**TXT** 文本文件）

相对定量分析（**Advanced Relative Quantification**）

- (1) 方法类同于 **Basic Relative Quantification**，不同的是需要增设待测基因和内参基因的标准曲线，测定扩增效率。浓度梯度至少在 5 个以上
- (2) 内参基因的样品属性设置为 **Reference standard**，待测基因的样品属性设置为 **Target standard**。内参基因：**Sample name** 填写为内参基因名称；**Sample type** 填写为 **Standard**，并填写浓度；**Target name** 填写内参基因名称，并在下面的选中框中选中 **Reference**。待测基因：**Sample name** 填写为待测基因名称；**Sample type** 填写为 **Standard**，并填写浓度；**Target name** 填写待测

基因名称，并在下面的选中框中选中 Target。

- (3) Create new analysis 面板。①Abs Quant Type/Abs Quant/ 2^{nd} Derivative Max/High sensitivity or confidence; ②Subordinate Abs Quant Analysis—Create by Target Name; ③Reference Analysis—Create In-Run; ④Pairing Rule: All to mean 多种待测基因对应内参基因的均值; ⑤Default standard curve settings—always use efficiency, 设置完成, 点击“√”图标
- (4) Advanced Relative Quantification 既可对全板孔道数据、又可对子集孔道数据进行分析处理

Tm 值调用分析 (Tm calling Analysis)

影响 Tm 值因子包括碱基序列、链长度、GC 含量及 GC 分布。荧光值双链大于单链。温度逐渐上升时, 双链逐渐解为单链, OD 值上升, 荧光值下降。短链 DNA 双链碱基不匹配时, Tm 值下降。

- (1) 熔解程序编写, 见“选择 overview 后, 点击“New experiment”按钮, 出现实验程序设置界面”部分中的 (c) 熔解曲线分析
- (2) Tm 分析的作用: 分析扩增产物的特异性