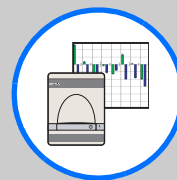
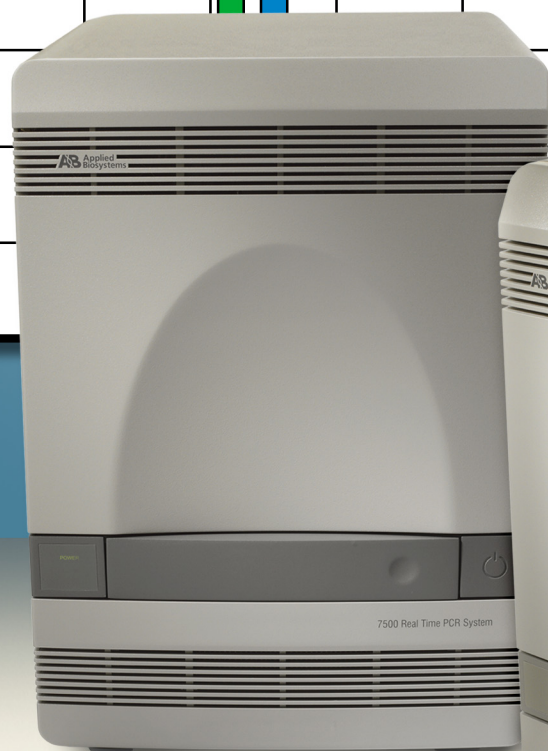
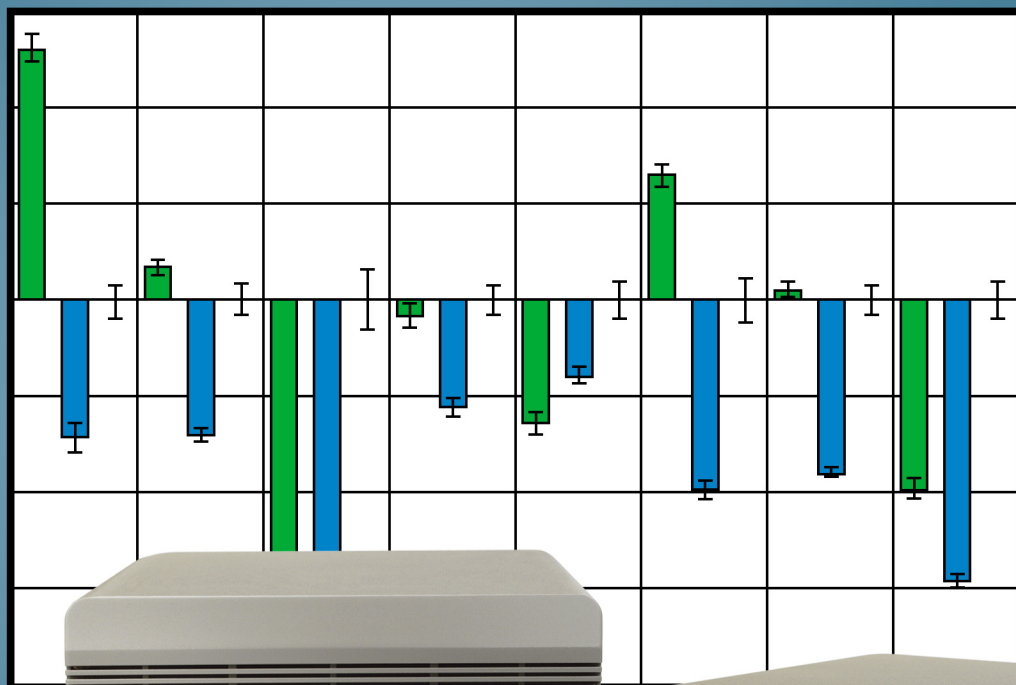
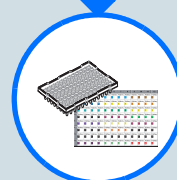


相对定量实验

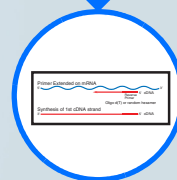
美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪



简介和相对定量
示例实验



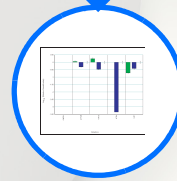
设计相对定量
实验



反转录



从相对定量反应板
生成 PCR 数据



在相对定量研究
中生成 PCR 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.

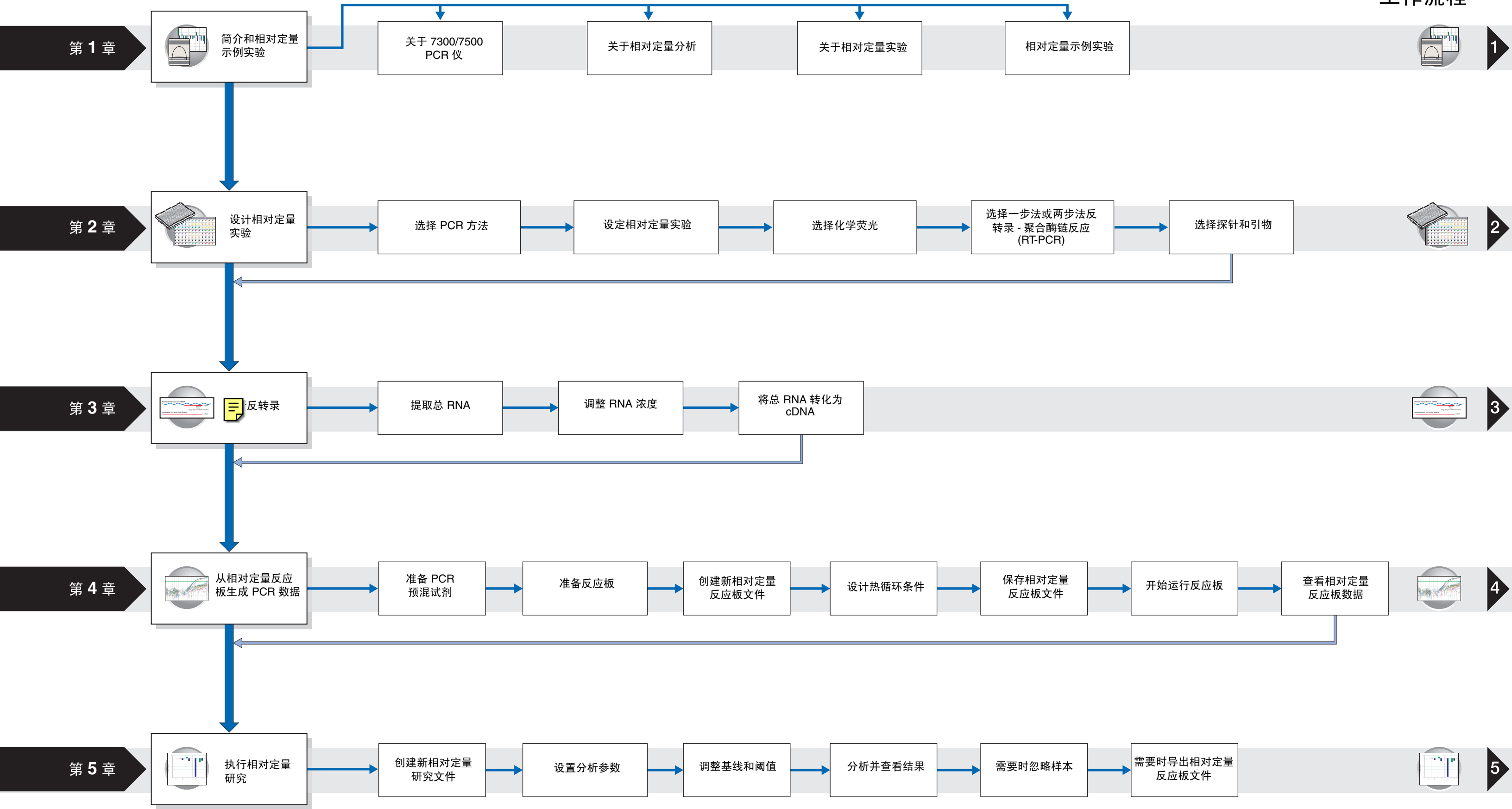
AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

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 4347966 Rev. A
3/2004



目录

	相对定量实验工作流程	iii
	前言	vii
	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
第 1 章	简介和相对定量示例实验	1
	概述	1
	关于 7300/7500 PCR 仪	2
	关于相对定量分析	2
	关于相对定量实验	2
	相对定量示例实验	5
第 2 章	设计相对定量实验	11
	工作流程	11
	选择 PCR 方法	12
	设定相对定量实验	13
	选择化学荧光	15
	选择一步法或两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)	16
	选择探针和引物	17
第 3 章	 自行反转录	19
	工作流程	19
	准备 RNA 指南	20
	将总 RNA 转化为 cDNA	21
第 4 章	从相对定量反应板生成数据	23
	工作流程	23
	开始之前	24
	准备 PCR 扩增预混试剂	24

准备反应板	25
创建相对定量 (RQ) 反应板文件	26
指定热循环条件并开始运行反应板	30
分析和查看相对定量反应板数据	32
导出相对定量反应板数据	34

第 5 章 在相对定量研究中分析数据 35

工作流程	35
创建相对定量研究文件	36
设置反应参数	38
调整基线和阈值	40
分析和查看相对定量研究结果	45
再次分析相对定量研究	49
忽略研究中的样本	50
导出相对定量研究数据	52

附录 A 创建探针 53参考文献 55索引 57

前言

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）执行基因表达相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、重复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 系统的更多信息，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 仪绝对定量实验入门指南》（货号 4347963）
- 《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）
- *ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*（ABI PRISM® 7700 序列检测系统用户布告牌 #2：基因表达相对定量研究）（货号 4303859）

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：

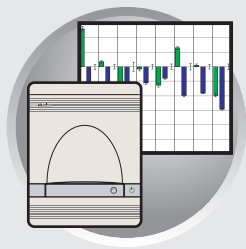
- 搜索并查阅常见问题与解答 (FAQ)
- 直接向技术支持人员提交问题进行咨询
- 订购美国应用生物系统公司用户文档、材料安全数据表 (MSDS)、分析证书及其它相关文档
- 下载 PDF 文档
- 获取有关客户培训的信息
- 下载软件更新和补丁程序

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。

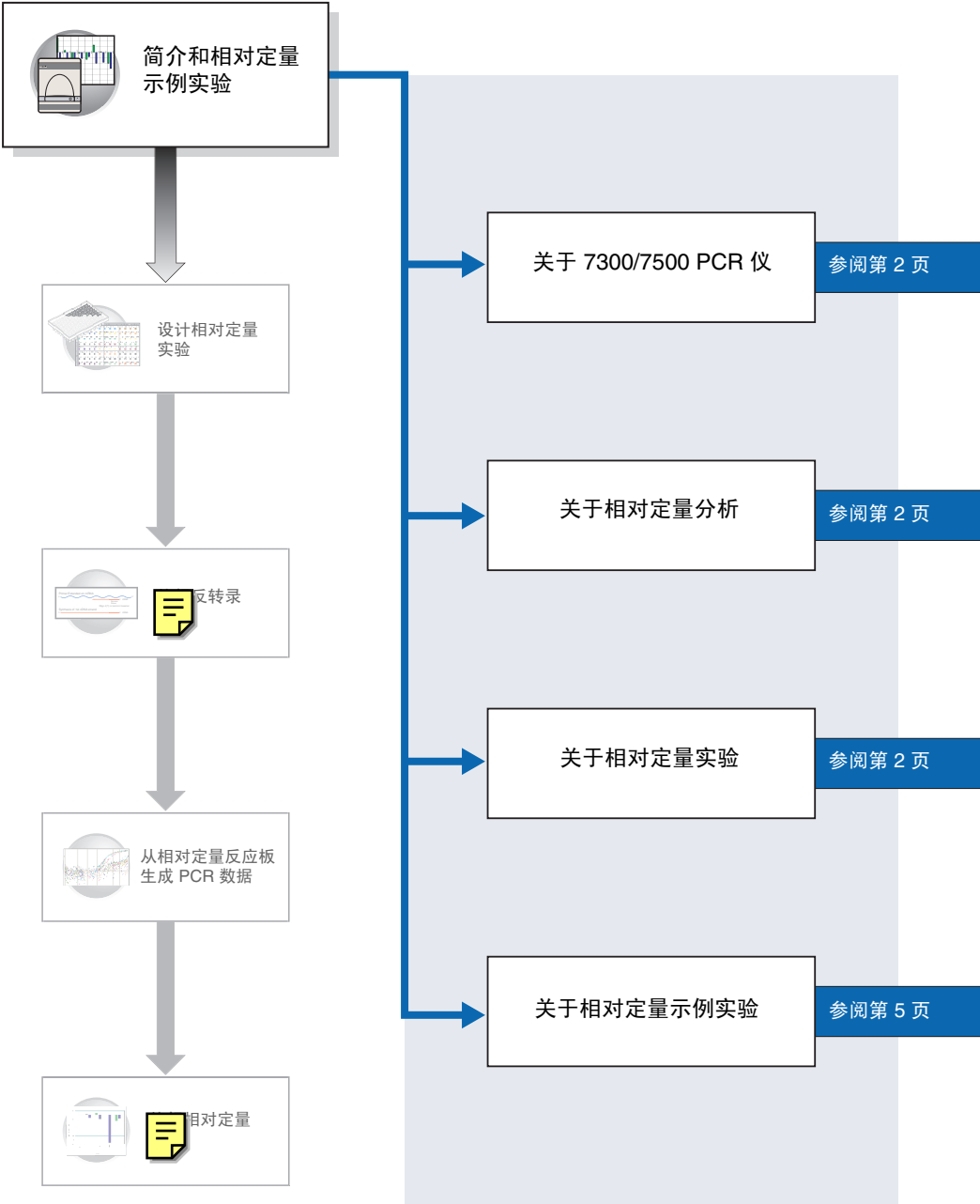
将您的意见和建议发送给我们

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



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。

相对定量分析 7300/7500 实时定量 PCR 仪允许使用 96 孔格式的反应板或试管执行几种检测分析。本指南描述相对定量 (RQ) 实验分析。

有关其它实验检测与分析的说明，请参阅《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)。

关于相对定量分析

定义 相对定量分析用来测定一个测试样本中核酸序列（目标）与校正样本中同一序列表达的相对变化。校正样本可以是一个未经处理的对照或者是在一个时程研究中处于零时的样本（Livak 和 Schmittgen, 2001）。例如，相对定量通常用来比较野生型与突变型等位基因的表达水平或不同组织中某个基因的表达水平。

相对定量可以对每个样本中模板的起始水平之间的差异进行精确比较，而无需知道模板的确切拷贝数。而且，样本中模板的相对水平无需使用标准曲线就可以确定。

实时 PCR 分析 相对定量 (RQ) 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。

实时定量 PCR 分析有两种类型：绝对定量和相对定量。

关于相对定量实验

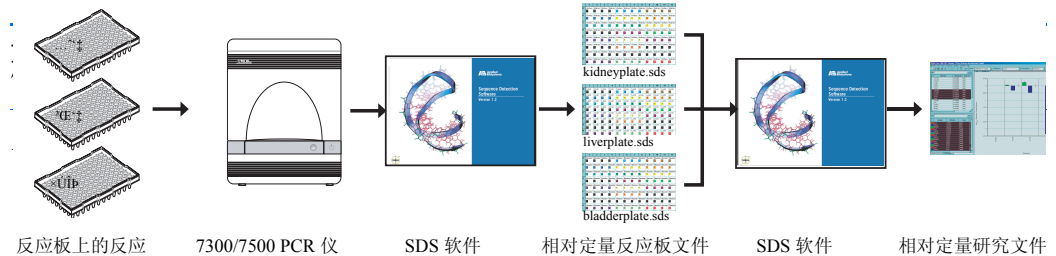
相对定量 (RQ) 实验工作流程 本文档中“相对定量 (RQ) 实验”术语是指相对定量实验分析的整个过程，以从核糖核酸 (RNA) 生成互补脱氧核糖核酸 (cDNA)（反转录）为起点，直到分析相对定量研究结束。有关相对定量实验工作流程，请参阅[第 iii 页](#)。



使用 7300/7500 PCR 仪执行相对定量研究

相对定量分析的数据收集部分是一个单一反应板文件，称为 RQ Plate（相对定量反应板）。运行 PCR 程序期间收集的扩增数据以及样本设定信息都保存在反应板中。

相对定量分析的数据分析部分是一个多重反应板文件，称为 RQ Study（相对定量研究）。在一个研究中您可以分析多达十个相对定量反应板。相对定量研究文件既不控制仪器，也不提供设定或修改反应板的工具。



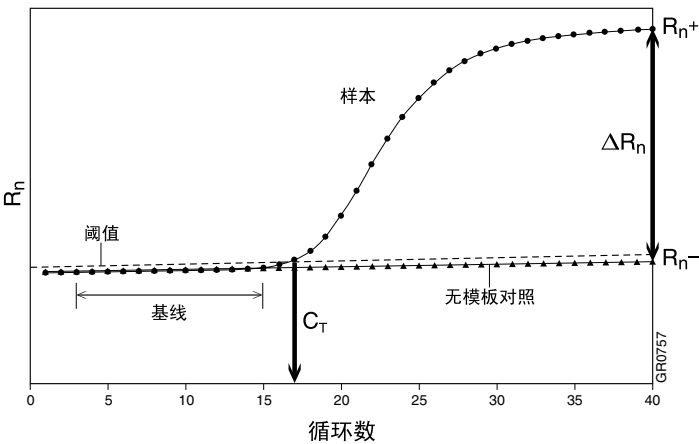
注释：7300/7500 PCR 仪系统软件只使用比较法 ($\Delta\Delta C_T$) 来计算核酸序列的相对定量。

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	ΔR_n （德尔塔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。
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的荧光信号进行标准化。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非常必要。
报告基团荧光	此荧光加在 TaqMan 探针的 5' 端。此荧光提供的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 (ΔR_n)	在给定的一组 PCR 条件下所生成信号的量值。($\Delta R_n = R_n - \text{基线}$)

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。

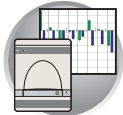
注释



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)
以下任意一种来源的标记引物和探针: <ul style="list-style-type: none">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)Assays-by-Design™ (代客设计引物和探针) 服务 (预先设计的引物和探针)Primer Express (引物设计) 软件 (定制设计引物和探针)	<ul style="list-style-type: none">美国应用生物系统公司网址与您当地的美国应用生物系统公司销售代表联系货号 4330710 (1 用户许可证)货号 4330709 (10 用户许可证)货号 4330708 (50 用户许可证)
带帽试管, 10mL	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

注释



项目	来源
微型离心管，无菌型 1.5mL	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
安全防护眼镜	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 / 固定器）。

相对定量示例实验

- 概述

为更好地说明怎样设计、执行及分析相对定量实验，本节提供一个示例实验。示例实验是一个有代表性的典型相对定量实验，您可将其视为快速入门操作程序来熟悉相对定量实验的工作流程。相对定量实验工作流程的详细步骤将在本指南的后续章节中讲述。后续章节中将出现示例实验描述框，对示例实验的一些步骤细节加以说明。
- 说明

相对定量示例实验的目的，是比较一个人的肝脏、肾脏和膀胱组织中 23 种基因的表达水平。

实验设计采用单一 PCR 扩增法 — 样本和内对照分别在独立的反应孔中进行扩增。使用磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内对照。每个样本和内对照使用四个重复反应孔进行扩增。（本示例实验中，每种组织使用全部 96 孔反应板，因为 23 个基因的四个重复加上内对照的四个重复正好需要全部 96 个反应孔。）

从美国应用生物系统公司 Assays-on-Demand™ 系列产品中选择预设计和标记的引物 / 探针组合。

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® Universal PCR Master Mix（TaqMan® 通用 PCR 扩增预混试剂）参与反转录和 PCR 扩增。

通过运行三个相对定量反应板生成数据，每种组织使用一个反应板。

三个反应板都在一个相对定量研究中进行分析，以肝脏样本作为校正器。

注释



相对定量示例实验过程

1. 设计实验，参阅第 2 章。
 - a. 指定目标、校正器、内对照和重复反应孔。
 - b. 订购使用 TaqMan® 探针的化学荧光试剂。
 - c. 订购适当的 Assays-on-Demand™ 产品，应能为这 23 种基因提供预设计的引物和探针。
2. 从肝脏、肾脏和膀胱组织中提取总 RNA，有关指导，请参阅第 3 章。
3. 使用 High Capacity cDNA Archive Kit（大容量 cDNA 库试剂盒）将总 RNA 反转录成 cDNA。

- 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。

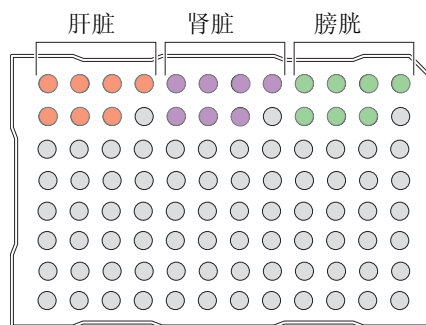
10 × 反转录 (RT) 缓冲液会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。请认真阅读材料安全数据表 (MSDS) 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、衣服和手套。

RT Master Mix（反转录预混试剂）		
成分	μL / 1 次反应	μL / 21 次反应 ^a
10× Reverse Transcription Buffer（反转录缓冲液）	10	210
25× dNTP（脱氧核苷三磷酸）	4	84
10× 随机引物	10	210
MultiScribe™ Reverse Transcriptase（MultiScribe™ 反转录酶），50 U/μL	5	105
无核酸酶水	21	441
总计	50	1050

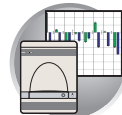
- a. 每个反转录 (RT) 反应的体积为 100 μL（参阅步骤 3b）。对于每种组织的 104 次 PCR 扩增反应（参阅步骤 4）的每次反应，如果需要 5 μL cDNA，则每个组织需要 6 次反转录 (RT) 反应。应包含额外的体积（足够用于每种组织执行一次额外反转录 (RT) 反应）以弥补移液过程中造成的损失，并需备有额外的 cDNA 用于建库。

- 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，体积为 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 16 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：Assay-by-Design 产品的反应体积在产品的插页中已说明；使用 Primer Express（引物设计）软件设计引物和探针时应符合通用分析条件，详情请参阅第 4 章。



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。请认真阅读材料安全数据表 (MSDS) 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、衣服和手套。

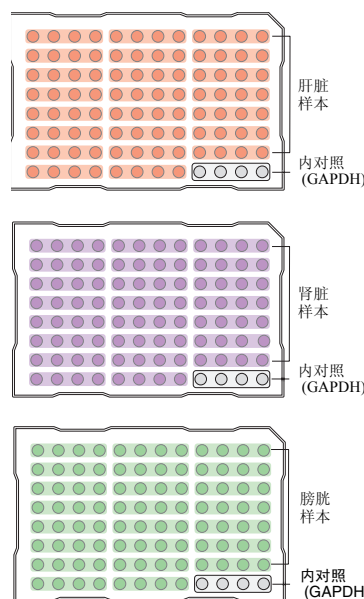
步骤类型	时间	温度
保持	10 分	25 °C
保持	120 分	37 °C

PCR Master Mix (PCR 扩增预混试剂)			
反应成分	μL/ 样本	μL / 5 次反应 ^b	终浓度
TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) (2X)	25.0	125.0	1X
20X Assays-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix (Assays-on-Demand 基因表达实验分型试剂) ^a	2.5	12.5	1X
cDNA 样本	5.0	25.0	10-100 ng
无核酸酶水	17.5	87.5	-
总计	50.0	250	-

- a. 包含正向引物和反向引物以及标记的探针。
b. 共准备 24 份扩增预混试剂，23 种基因每种使用一份，内对照使用一份。需准备 5 个反应体积（4 个重复反应孔加上一份额外反应），以弥补移液过程中造成的损失。

1. 准备反应板。

- a. 在反应板上作上标签，确保每个反应板中都包含一个内对照。
- b. 吸取 50 μL 的适当 PCR 扩增预混试剂（含 cDNA），滴入反应板的每一个反应孔中。
- c. 将这些反应板置于冰上，直到您准备好将其装入 7300/7500 PCR 仪。



注释



2. 创建相对定量反应板文件，如第 26 页“创建相对定量 (RQ) 反应板文件”所述。简言之，

- 选择 **File (文件) > New (新建)**。
- 从 Assay (实验) 下拉列表中，选择 **Relative Quantification (ddCt) Plate (相对定量 (ddCt) 反应板)**，然后单击 **Next > (下一步 >)**。

重要！ 您不能使用绝对定量 (AQ) 反应板文件执行相对定量 (RQ) 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。

- 将探针加到反应板文件中，然后单击 **Next > (下一步 >)**。
- 为每个反应孔指定探针和任务，然后单击 **Finish (完成)**。

除非您已如右侧说明所示指定样本名，否则，您不能将相对定量反应板添加到相对定量研究中。单击 **OK (确定)**。

SDS 软件显示 Well Inspector (反应孔设定) 窗口。

3. 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。运行结束后，可忽略不使用的反应孔。有关忽略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。

New Document Wizard

Define Document
Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.

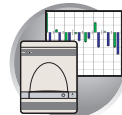
Assay: Relative Quantification (ddCt) Plate
Container: 96-Well Clear
Template: Blank Document
Browse ...
Operator: Administrator
Comments:
Default Plate Name: Plate15
< Back Next > Finish Cancel

SDS v1.2 Software

Note: You will need to enter sample names before saving the RQ Plate document.
You can enter sample names by using the Well Inspector, or by using the 'In-place sample name editing' feature (select well(s) and type text directly into the sample name).
After editing sample name(s), you can then save the RQ Plate document.
OK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
B	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
C	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
D	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
E	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
F	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
G	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
H	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver

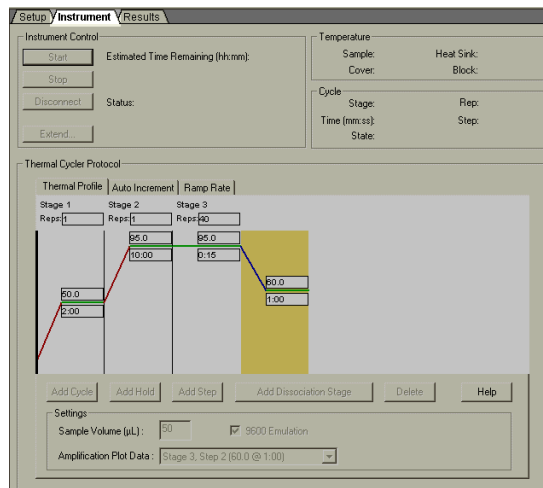
注释 _____



4. 开始运行相对定量 (RQ) 程序。

- 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。
- 选择 **File** (文件) > **Save As** (另存为), 输入相对定量反应板文件的文件名, 然后单击 **Save** (保存)。
- 将反应板装入仪器中。
- 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。



5. 创建相对定量研究 (RQ Study) 文件, 详情请参阅第 36 页 “创建相对定量研究文件”。简言之,

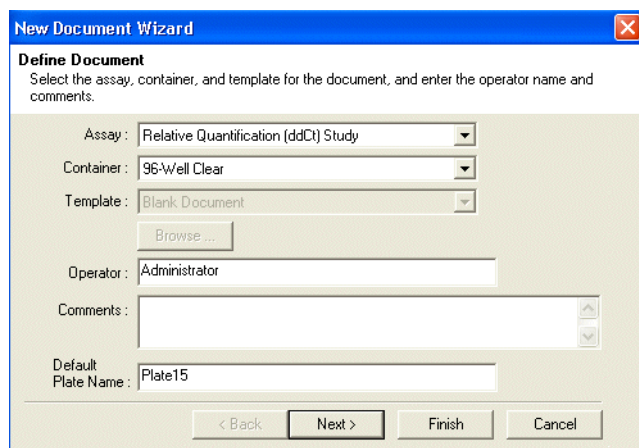
- 选择 **File** (文件) > **New** (新建)。
- 从 Assay (实验) 下拉列表中, 选择 **Relative Quantification (ddCt) Study** (相对定量 (ddCt) 研究), 然后单击 **Next >** (下一步 >)。

重要! RQ Study (相对定量研究) 功能对于 7300 PCR 仪是可选项, 而对 7500 PCR 仪则是标准配置。

- 单击 **Add** (添加), 将反应板添加到研究中, 然后单击 **Open** (打开)。

注释: 在一个 RQ 研究中, 您可添加最多 10 个相对定量反应板。

- 单击 **Finish** (完成)。



注释

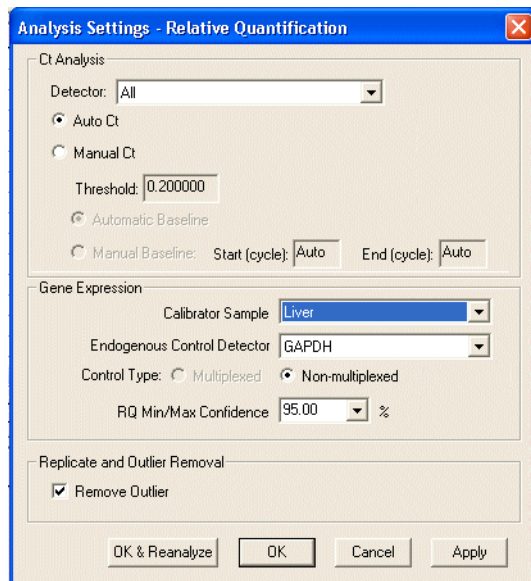


6. 分析相对定量数据，详情请参阅第 5 章。

- a. 使用 Auto Ct（自动 Ct）选项设置反应参数 () 并分析数据。

注释：有关详情，请参阅第 38 页“配置分析设置”。

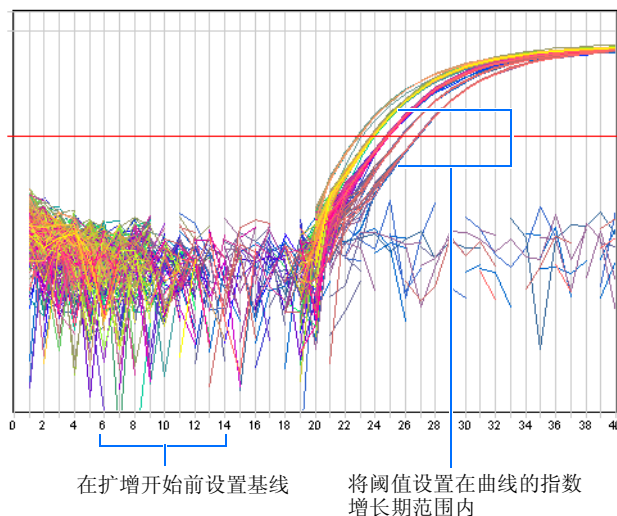
如果您知道您所作实验的最佳基线和阈值设置，可选择 Manual Ct（手动 Ct）和 Manual Baseline（手动基线）选项。



- b. 如果有必要，手动调整基线和阈值。

注释：参阅第 40 页“调整基线和阈值”。

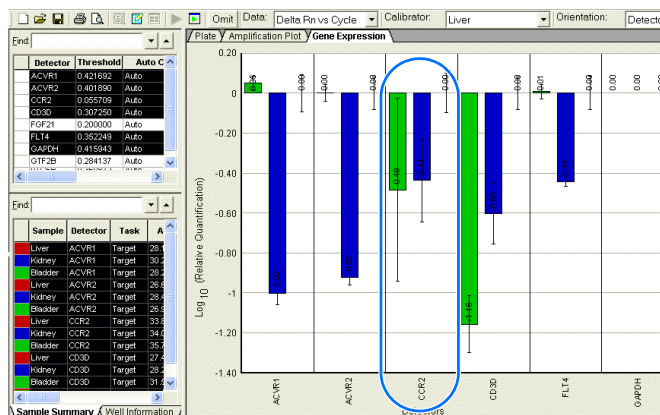
- c. 单击 或选择 **Analysis**（分析）> **Analyze**（执行分析）以再次分析数据。



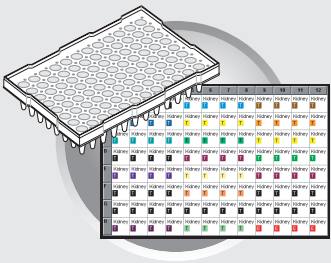
- d. 在 RQ Results（相对定量结果）窗口中单击一个选项卡，以查看分析结果。
- e. 如果需要，保存此相对定量研究 (RQ Study) 文件。

结论

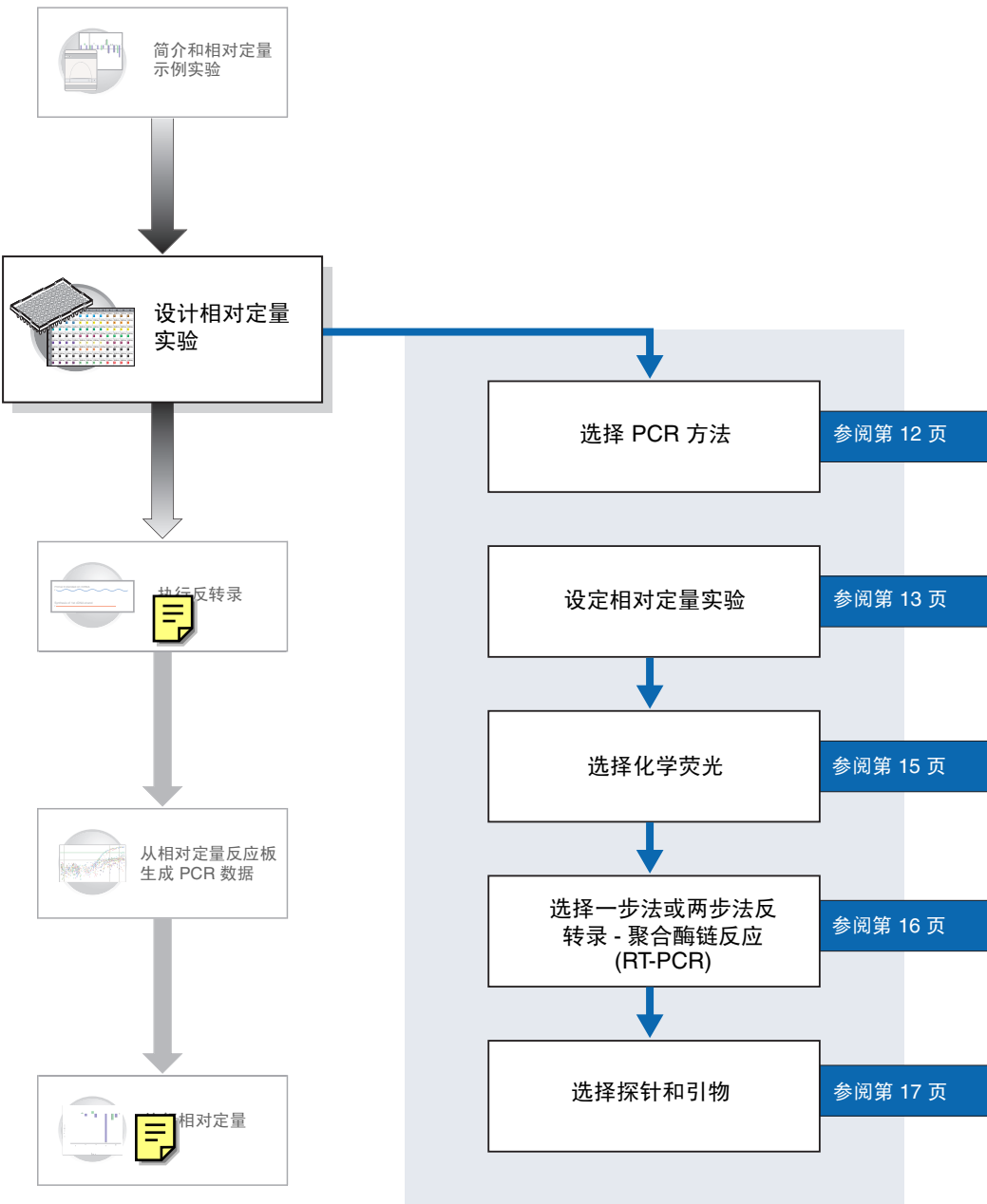
如右图所示，CCR2 在这个人的肝脏中的表达水平比在其肾脏和膀胱组织中要高。



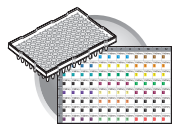
注释



工作流程



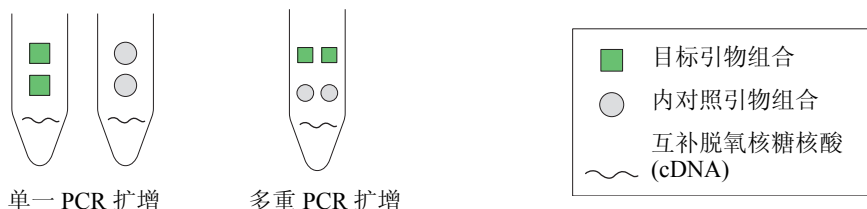
注释 _____



选择 PCR 方法

PCR 方法类型 PCR 可按以下两种方法之一执行：

- 单一反应，在反应管或反应孔中存在单一的引物对。每个反应中只有一个目标序列或内对照可被扩增。
- 多重反应，在反应中存在两个或更多引物对。每个引物对可以扩增一个目标序列或一个内对照。



选择标准 对于相对定量实验，两种方法都可以得出等效的结果。选择某种方法时，需考虑以下因素：

- 您用来检测 PCR 产物的化学试剂类型 — 单一 PCR 扩增可使用 SYBR® Green 或 TaqMan 化学荧光试剂。多重 PCR 扩增只能使用 TaqMan 化学荧光试剂。
- 您计划用来优化和验证实验所需花费的时间 — 在单一 PCR 扩增中扩增目标序列和内对照分别在单独的反应中进行，因而比多重 PCR 扩增需要更短的优化和验证时间。

在多重 PCR 中，需考虑的因素包括引物限制、目标序列与阳性参比序列的相对丰富程度（内对照资源必须比目标序列更丰富），以及研究的目标数目。

重要！ 随着基因目标数的增多，单一扩增由于需要较少的优化操作而比多重扩增更为有效。

此外，多重 PCR 扩增在同一个试管中运行多个反应，可能会增大产物量并减小移液误差的负面效果。

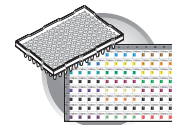
有关多重和单一 PCR 扩增的详情，请参阅《序列检测系统化学指南》(SDS Chemistry Guide)（货号 4348358）。

示例实验

在示例实验中应用单一 PCR 扩增法，因为：

- 要扩增的目标数目（23 个基因，加上一个内对照）较大
- 单一实验所需的优化和验证时间较少

注释



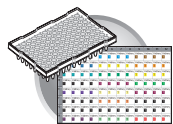
设定相对定量实验

在您决定使用单一或多重扩增方法后，需指定相对定量实验中每个样本需要的成分：

- 目标序列 — 您要研究的核酸序列。
- 校正器 — 用作比较结果基础的样本。
- 内对照 — 出现在所有实验样本中表达水平一致的一个基因。通过使用内对照作为主动阳性参比，您可对目标 cDNA 的量进行标准化，以区分加入到每个反应中的 cDNA 量。请注意：
 - 每种样本类型（例如，在比较多种组织的研究中的每种组织）都需要一个内对照。
 - 如果将样本分配到多个反应板中，则每个反应板必须有一个内对照。此外，在反应板上，每种样本类型的每个反应板都必须包含一个内对照。一般而言，持家基因如 β -actin（ β -肌动蛋白）、glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)（磷酸甘油醛脱氢酶）和 ribosomal RNA (rRNA)（核糖体核糖核酸）被用来作为内对照，因为它们的表达水平趋于相对稳定。
- 重复反应孔 — 对于相对定量研究，美国应用生物系统公司建议每个样本和内对照使用三个或更多个重复反应孔，以确保统计显著性。

有关这些要求的更详细说明，请参阅《序列检测系统化学指南》。

注释



示例实验

在示例实验中，实验目的是比较某人的肝脏、肾脏和膀胱组织中几种基因的表达水平。有 23 种目标基因，包括 ACVR1、ACVR2、CCR2、CD3D 和 FLT4，都是目标序列，以肝脏样本作为校正器。

SDS 软件将校正器样本的基因表达水平设定为 1。因此，如果肾脏中比肝脏中有更多的 ACVR1，则肾脏中 ACVR1 的基因表达水平就会高于 1。同样，如果膀胱中的 CD3D 比肝脏中少，其 CD3D 基因表达水平就小于 1。

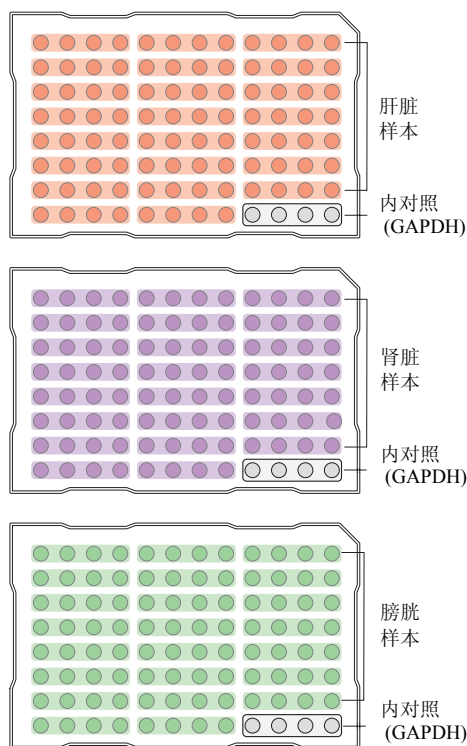
因为相对定量是以 PCR 扩增为基础的，反应中的模板越多，PCR 产物就会越多，从而荧光也越多。为调整添加到反应中的模板量可能存在的差异，将 GAPDH 作为内对照。（从目标基因的表达水平中减去内对照的表达水平。）对于每种组织都准备一个内对照。

示例实验中包含 3 套内对照 — 每种组织一套。而且，每种组织的内对照必须与该组织的目标序列在同一个反应板上执行扩增。最后需注意的，实验采用的是单一 PCR 扩增法；因此，扩增内对照使用的反应孔与扩增目标序列使用的反应孔是不同的反应孔。

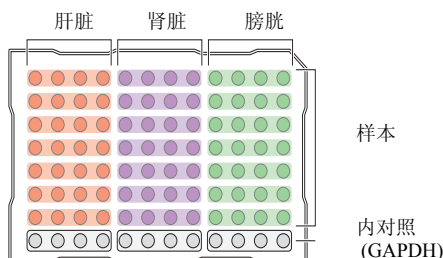
每种样本和内对照使用了四个重复反应孔（如下所示），以确保统计显著性。

注释：在相对定量示例实验中，三种组织的每一种都需要使用独立的反应板，因为研究的基因数目较大。也可将实验设计为将几种样本在同一个反应板上执行扩增，如下图所示。

在相对定量示例实验中，每个反应板包含一种样本类型（组织）。每种组织的内对照与该组织的目标序列设计在同一个反应板上。



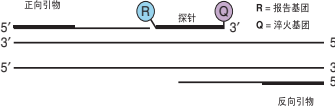
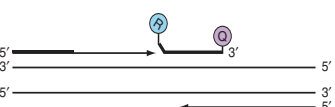
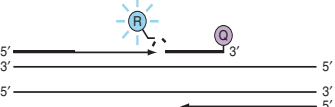

如果示例实验在同一个反应板上运行多种样本类型，那么每个样本类型的内对照也必须包含在同一个反应板上，如下图所示。



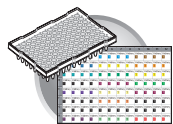
选择化学荧光

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。TaqMan 探针法试剂和 SYBR Green I 化学荧光试剂，二者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 《序列检测系统化学指南》。

化学荧光	过程		
<div>TaqMan[®] 试剂或试剂盒</div> <div>说明</div> <div>TaqMan 化学荧光试剂使用一种可发荧光的探针来检测在 PCR 循环期间累积的某种特异性 PCR 产物。</div> <div>优点</div> <div><ul style="list-style-type: none">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提供多重检测功能优化可用的实验分析方法允许在 PCR 期间执行 5' 核酸酶检测分析</div>	<div><div>聚合反应</div><div></div><div>链置换反应</div><div></div><div>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。</div><div>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。</div><div>分裂</div><div></div><div>聚合反应完成</div><div></div><div>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。</div><div>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。</div></div> <tr><td><div>SYBR[®] Green I 试剂</div><div>说明</div><div>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。</div><div>优点</div><div><ul style="list-style-type: none">降低成本 (不需要探针)可扩增所有双链 DNA产生 PCR 扩增运行的特征性解链图表增大相对于产物长度而言的扩增产物检测灵敏度</div><div>局限性</div><div>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。</div></td><td><div><div>步骤 1: 设定反应</div><div>SYBR[®] Green I 荧光与双链 DNA 结合时发出荧光。</div><div>步骤 2: 变性</div><div>DNA 变性时, SYBR[®] Green I 荧光被释放, 从而使荧光强度显著减弱。</div><div>步骤 3: 聚合反应</div><div>延伸期间, 引物退火并生成 PCR 产物。</div><div>步骤 4: 聚合反应完成</div><div>SYBR[®] Green I 荧光与双链产物组合, 仪器检测到荧光强度的增值。</div></div></td></tr>	<div>SYBR[®] Green I 试剂</div> <div>说明</div> <div>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。</div> <div>优点</div> <div><ul style="list-style-type: none">降低成本 (不需要探针)可扩增所有双链 DNA产生 PCR 扩增运行的特征性解链图表增大相对于产物长度而言的扩增产物检测灵敏度</div> <div>局限性</div> <div>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。</div>	<div><div>步骤 1: 设定反应</div><div>SYBR[®] Green I 荧光与双链 DNA 结合时发出荧光。</div><div>步骤 2: 变性</div><div>DNA 变性时, SYBR[®] Green I 荧光被释放, 从而使荧光强度显著减弱。</div><div>步骤 3: 聚合反应</div><div>延伸期间, 引物退火并生成 PCR 产物。</div><div>步骤 4: 聚合反应完成</div><div>SYBR[®] Green I 荧光与双链产物组合, 仪器检测到荧光强度的增值。</div></div>
<div>SYBR[®] Green I 试剂</div> <div>说明</div> <div>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。</div> <div>优点</div> <div><ul style="list-style-type: none">降低成本 (不需要探针)可扩增所有双链 DNA产生 PCR 扩增运行的特征性解链图表增大相对于产物长度而言的扩增产物检测灵敏度</div> <div>局限性</div> <div>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。</div>	<div><div>步骤 1: 设定反应</div><div>SYBR[®] Green I 荧光与双链 DNA 结合时发出荧光。</div><div>步骤 2: 变性</div><div>DNA 变性时, SYBR[®] Green I 荧光被释放, 从而使荧光强度显著减弱。</div><div>步骤 3: 聚合反应</div><div>延伸期间, 引物退火并生成 PCR 产物。</div><div>步骤 4: 聚合反应完成</div><div>SYBR[®] Green I 荧光与双链产物组合, 仪器检测到荧光强度的增值。</div></div>		

注释



选择一步法或两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)

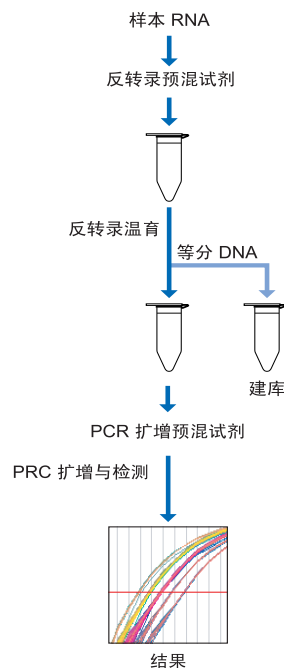
当执行实时 PCR 时，您可选择在同一个反应（一步法）中执行反转录 (RT) 和 PCR 扩增，也可在分开的反应（两步法）中分别执行反转录和扩增。您应使用的试剂取决于您选择一步法还是两步法 RT-PCR：

- 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® UNG 酶来防止残留污染。

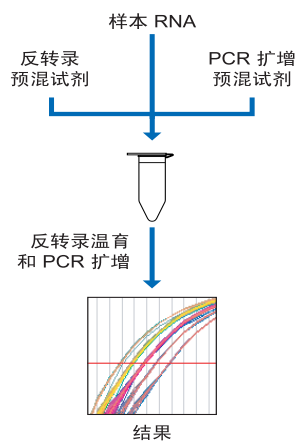
重要！ 本指南假定相对定量实验使用两步法 RT-PCR 设计。有关附加选项的详情，请参阅《序列检测系统化学指南》。

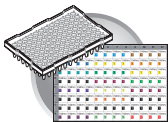
- 在一步法 RT-PCR 中，反转录 (RT) 和 PCR 扩增在同一个缓冲液系统中发生，只需简单地使用一个试管即可做好 RT 及 PCR 扩增准备。然而，在一步法 RT-PCR 中，您不能使用残留抑制酶 AmpErase® UNG（uracil-N-glycosylase，即尿嘧啶 -N- 糖基化酶）。有关 UNG 酶的更详细说明，请参阅《序列检测系统化学指南》。

两步法 RT-PCR



一步法 RT-PCR





建议两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 使用的试剂盒			
化学荧光	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	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	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

示例实验

为所有目标基因预制的探针和引物都可以从 Assays-on-Demand™ 产品系列中找到，使用 TaqMan 化学荧光。两步法 RT-PCR 使用 TaqMan 试剂或试剂盒的化学荧光建议采用的试剂执行，如上表所示。

选择探针和引物

为目标序列和内对照序列选择探针和引物组合。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 / 探针组合的详情，请登陆网站：

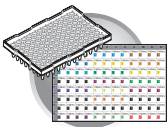
<http://www.allgenes.com>

- Assays-by-DesignSM（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。如果您所需的实验分析当前尚未备妥，可使用此项服务。要订购此服务，请与美国应用生物系统公司代表联系。
- Primer Express[®]（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《序列检测系统化学指南》。

如果您订购的是 Assays-on-Demand 或 Assays-by-Design（代客设计引物和探针）产品，其探针已用一种报告基团荧光标记。如果您自行设计分析，您需要为您定制的探针指定一种报告基团荧光。对于单一实验，您可为目标和内对照选用相同的荧光。对于多重实验，目标的探针一般用 FAM 荧光标记，内对照用 VIC[®] 荧光标记。

注释 _____



示例实验

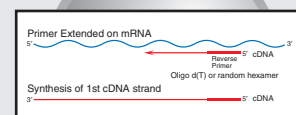
对于示例实验，所研究的所有基因的引物和探针都可从美国应用生物系统公司 Assays-on-Demand™ 产品中获得。每种分析都包含两个未标记的 PCR 引物和一个 FAM™ 荧光标记的 TaqMan® MGB 探针，以 20X 分型试剂形式提供。

在示例实验中，所有的目标探针都是用 FAM 荧光标记，内对照也是用 FAM 荧光标记。

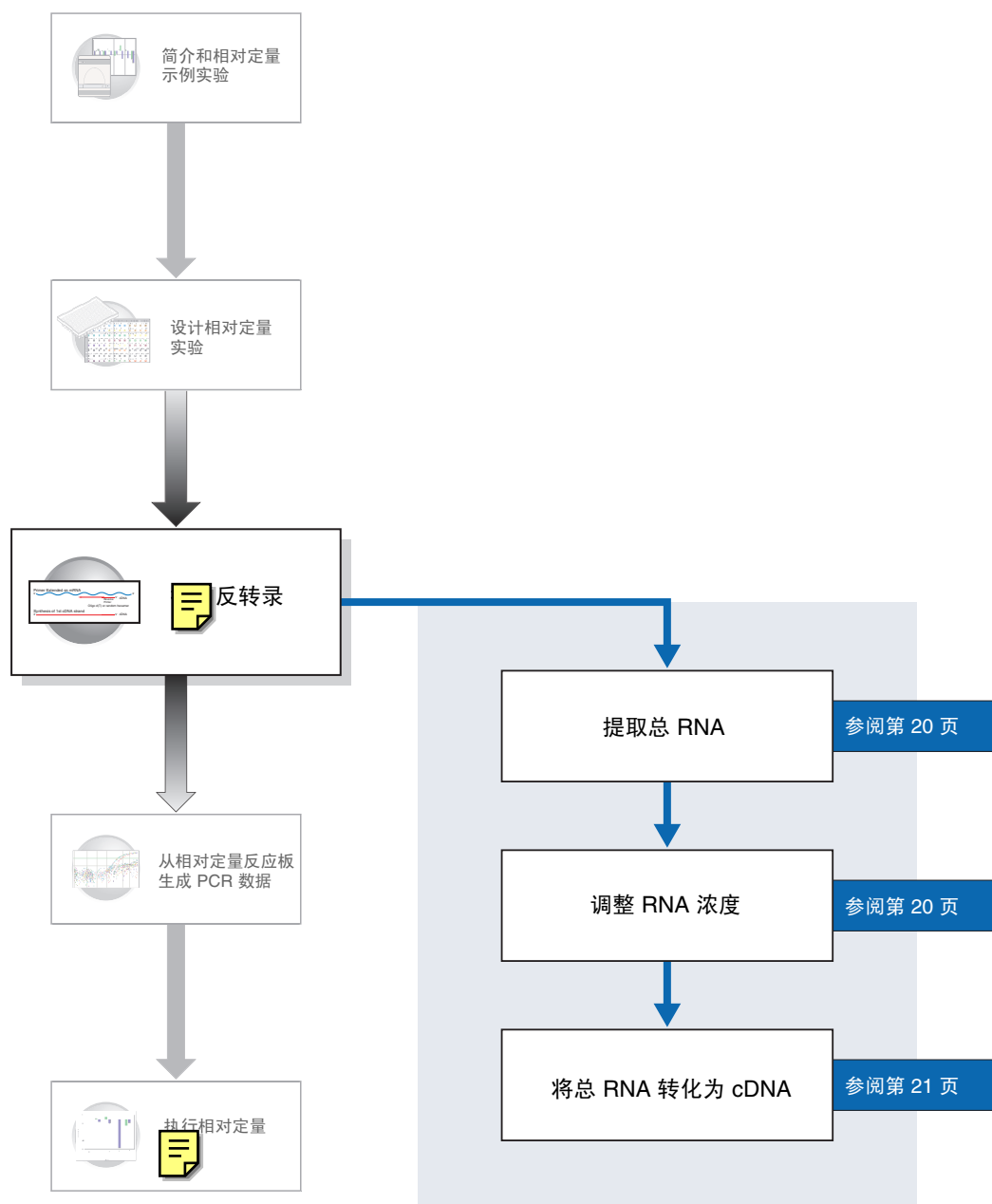
下表提供了示例实验中研究的五种基因及内对照的基因符号、基因名和美国应用生物系统公司试剂代号（通过因特网提供）。

基因符号	基因名	试剂代号
ACVR1	顶体泡蛋白 I	Hs00153836 m1
ACVR2	活素 A 受体 II 型	Hs00155658_m1
CCR2	趋化因子（C-C 基序）受体 2	Hs00174150_m1
CD3D	CD3D 抗原，Δ 多肽（TiT3 复合物）	Hs00174158_m1
FLT4	酪氨酸激酶 4（血管内皮细胞生长因子、血管渗透因子）	Hs00176607 m1
GAPDH	甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	Hs99999905 m1

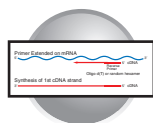
注释 _____



工作流程



注释



准备 RNA 指南

提取 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

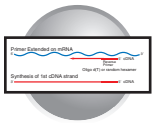
RNA 的质量 确保您在相对定量实验中使用的 RNA 符合以下条件:

- 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 μg 的总 RNA 转化为 cDNA。转化足够的总 RNA, 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 _____



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。

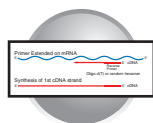
反转录 (RT) 的
热循环参数设置

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 30 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。请认真阅读材料安全数据表 (MSDS) 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、衣服和手套。

示例实验

对于示例实验，RNA 是从个体的肝脏、膀胱和肾脏中提取的。RNA 浓度以分光光度法（使用 A_{260} ）确定，并稀释为终浓度 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

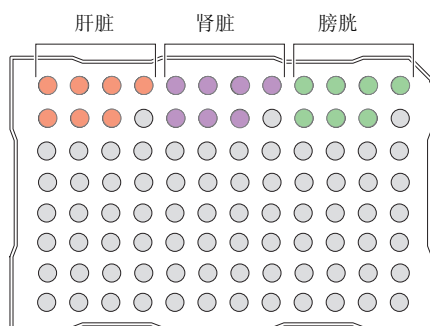
反转录 (RT) 预混试剂按以下方法制备，使用 *High Capacity cDNA Archive Kit Protocol*（大容量 cDNA 库试剂盒实验方案）提供的指南：

成分	μL / 1 次反应	μL / 21 次反应 ^a
10× Reverse Transcription Buffer (反转录缓冲液)	10	210
25× dNTP (脱氧核苷三磷酸)	4	84
10× 随机引物	10	210
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (MultiScribe™ 反转录酶), 50 U/ μL	5	105
无核酸酶水	21	441
每个反应的总体积	50	1050

a. 每个反转录 (RT) 反应体积为 $100 \mu\text{L}$ （参阅下文）。对于每种组织的 104 次 PCR 扩增反应（参阅第 26 页“创建相对定量 (RQ) 反应板文件”）的每次反应，如果需要 $5 \mu\text{L}$ cDNA，则每个组织需要 6 次反转录 (RT) 反应。应包含额外的体积（足够用于每种组织执行一次额外反转录 (RT) 反应）以弥补移液过程中造成的损失，并需备有额外的 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：

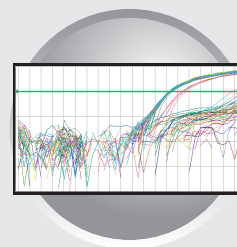
- $50 \mu\text{L}$ 反转录 (RT) 预混试剂
- $30 \mu\text{L}$ 无核酸酶水
- $20 \mu\text{L}$ RNA 样本（使每个 $100 \mu\text{L}$ 反应的 RNA 初始总量为 $1 \mu\text{g}$ ）



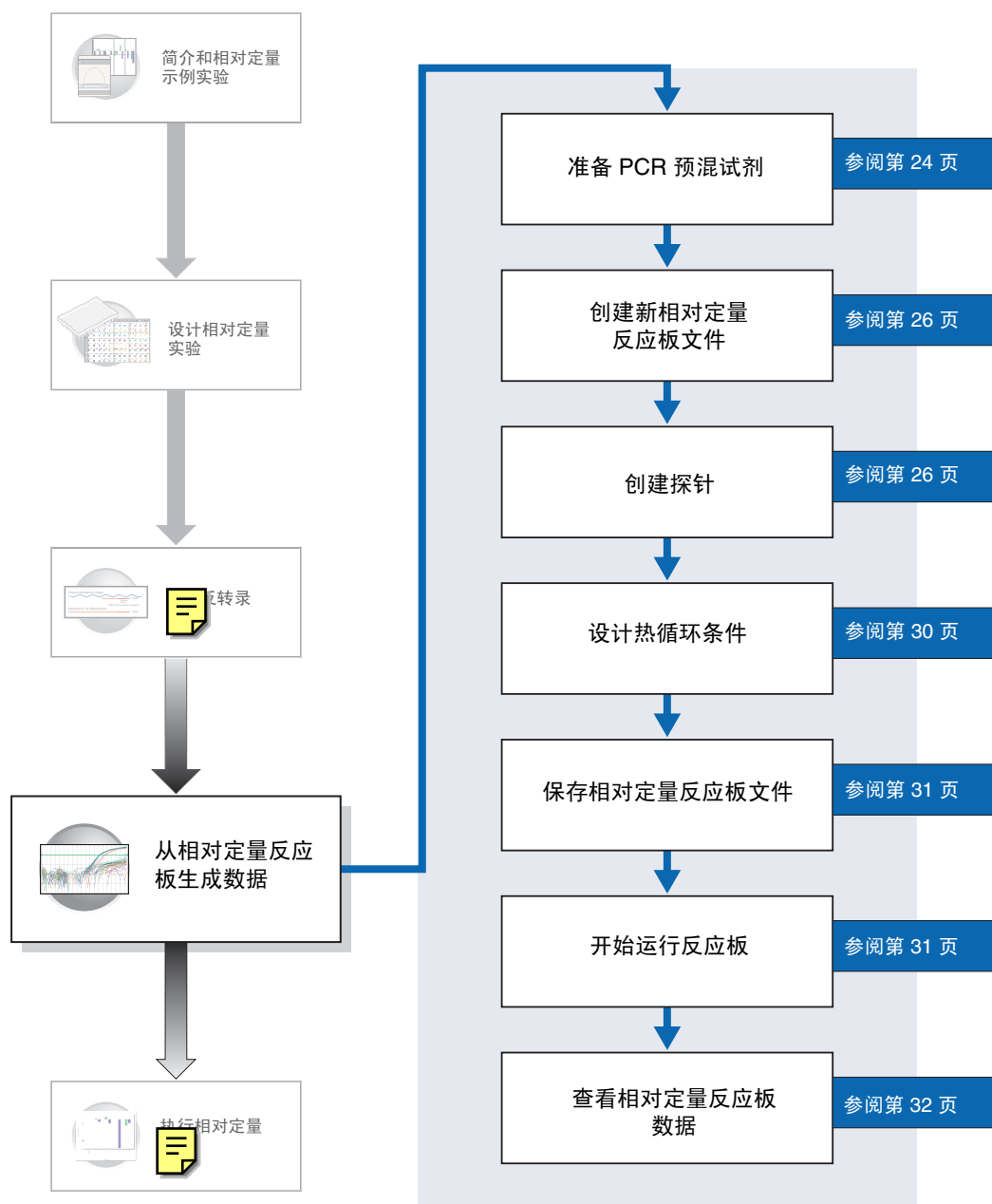
然后使用两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 的热循环参数将 RNA 转化为 cDNA，详情请参阅第 21 页“反转录 (RT) 的热循环参数设置”。

将 cDNA 贮存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 温度下，直到使用时。

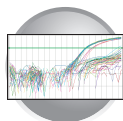
注释



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。

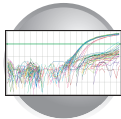
TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂实验方案) (货号 4304449) 中说明了如何使用试剂盒中的试剂。下表列出了使用预混试剂的常用实验分析条件 (体积和终浓度)。

 **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。请认真阅读材料安全数据表 (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) (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	-

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。

注释 _____



准备反应板

- 1. 在反应板上作上标签，确保为每个样本类型（例如，在比较多种组织的研究中的每种组织）都包含一个内对照。如果将样本分配到多个反应板中，则每个反应板必须有一个内对照。此外，在反应板上，每种样本类型的每个反应板都必须包含一个内对照。
- 2. 向反应板的每个反应孔中，加入 50 μ L 的适当 PCR 扩增预混试剂。
- 3. 将这些反应板置于冰上，直到您准备好将其装入 7300/7500 PCR 仪。

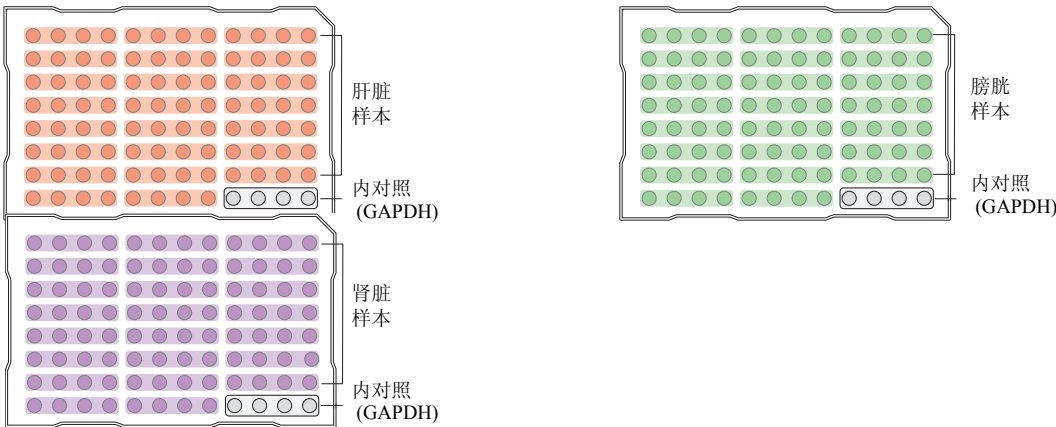
示例实验

相对定量实验使用的引物和探针可从 Assays-on-Demand 产品中获得，以 20 \times Gene Expression Assay Mix（基因表达分型试剂）形式提供。PCR 扩增预混试剂按以下方式准备：

反应成分	μ L/ 样本	μ L / 5 次反应 ^b	终浓度
TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) (2 \times)	25.0	125.0	1 \times
20 \times Assays-on-Demand TM Gene Expression Assay Mix (Assays-on-Demand TM 基因表达实验分型试剂) ^a	2.5	12.5	1 \times
cDNA 样本	5.0	25.0	50 ng（用于 50 μ L 反应）
无核酸酶水	17.5	87.5	-
总计	50.0	250	-

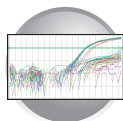
- a. 包含正向引物和反向引物以及标记的探针。
- b. 共准备 24 份扩增预混试剂，23 种基因每种使用一份，内对照使用一份。需准备 5 个反应体积（4 个重复反应孔加上一次额外反应），以弥补移液过程中造成的损失。

样本和内对照分配在 3 个反应板上，如下所示。50 μ L 适当的 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，直到您准备好将其装入 7300/7500 PCR 仪。

注释



创建相对定量 (RQ) 反应板文件

概述 相对定量 (RQ) 反应板文件储存从相对定量程序中收集的单个反应板的数据。每个相对定量反应板必须有一个相对定量反应板文件。相对定量 (RQ) 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 对于您创建的每个相对定量 (RQ) 反应板文件，请指定探针、内对照和探针任务：

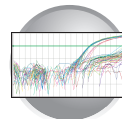
- 一个探针虚拟地代表一个基因特异性核酸探针试剂，用于执行分析。您为每个目标序列指定要使用的探针。[附录 A](#) 中说明如何创建探针。

重要！ 为了在研究中对数据进行比较分析，研究中所有的反应板都必须包含一套共同的探针。

- 内对照（定义请参阅[第 13 页 “设定相对定量实验”](#)）。如果您的实验由多个反应板组成，每个反应板必须有至少一个内对照，而且至少有三个内对照重复反应孔。如果您的实验在一个反应板上包含多个样本，则每个样本必须有一个内对照。相对定量实验中所有的反应板都必须使用相同的内对照（例如 GAPDH）。
- 探针任务指定软件如何使用在分析过程中从反应孔收集的数据。您需要为反应板文件的每个反应孔中的探针指定两项任务中的一项。

任务	符号	应用于探针 ...
Target（目标）	T	包含用于扩增目标序列的 PCR 试剂的反应孔。
Endogenous Control（内对照）	E	包含用于扩增内对照序列的 PCR 试剂的反应孔。

注释 _____



创建相对定量反应板文件

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。

创建新反应板文件：

1. 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。
2. 选择 **File**（文件）> **New**（新建）。
3. 在 **New Document Wizard**（新建文件向导）窗口中，从 **Assay**（实验）下拉列表中选择 **Relative Quantification (ddCt) Plate**（相对定量 (ddCt) 反应板）。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。

4. 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。
5. 单击 **Next >**（下一步 >）。
6. 选择要添加到反应板文件的探针。

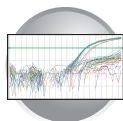
- a. 单击以选择一个探针。（按住 **Ctrl** 键单击可选择多个探针。）如果在 **Detector Manager**（探针管理器）列表中未列出探针，请按附录 A “创建探针”中的指导说明创建探针。
- b. 单击 **Add >>**（添加 >>）。探针被添加到反应板文件。

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）。

- c. 单击 **Next >**（下一步 >）。

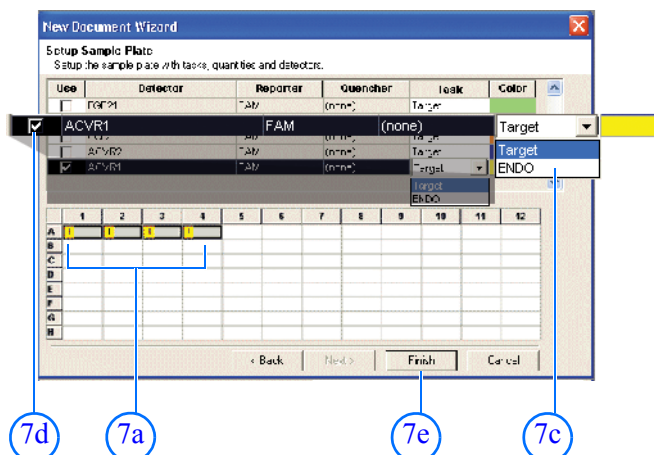
Detector Name	Description	Reporter	Quencher
GTF21		FAM	(none)
GAPDH-VIC		FAM	(none)
GAPDH		FAM	(none)
FLT4		FAM	(none)
FGF21		FAM	(none)
Ecdl		FAM	(none)
CD3D		FAM	(none)
CCr2		FAM	(none)
ACVR2		FAM	(none)
ACVR1		FAM	(none)

注释



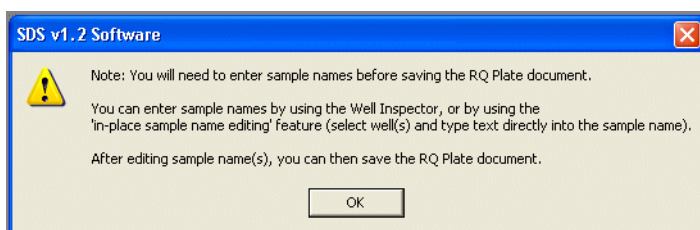
7. 为每个反应孔指定探针和任务。

- 单击一个反应孔（或对于重复样本选择一组反应孔）以选取它（们）。
- 单击为反应孔选择探针。
- 单击 Task（任务）栏的下边，以指定探针任务。
- 选择 **Use**（使用）。
- 单击 **Finish**（完成）。



除非您已如右侧说明所示指定样本名，否则，您不能将相对定量反应板添加到相对定量研究中。单击 **OK**（确定）。

SDS 软件即创建反应板文件，并显示 Well Inspector（反应孔设定）。

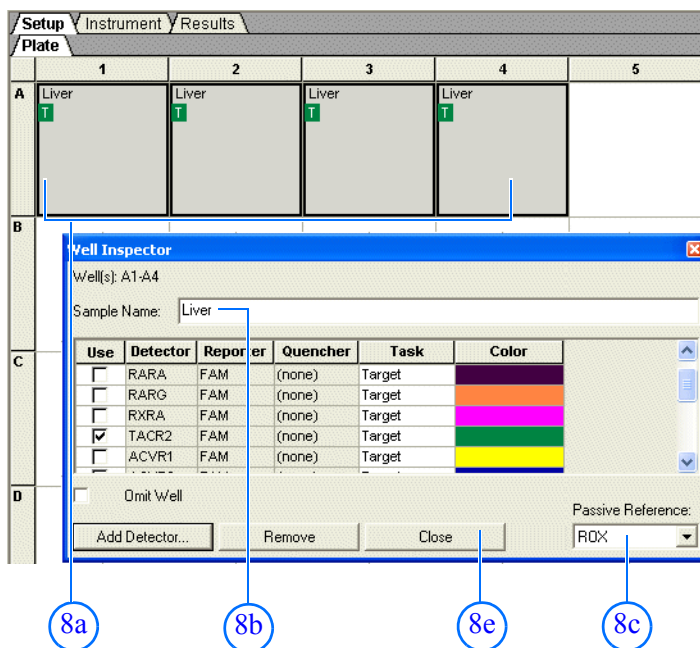


8. 输入样本名。

- 在 Well Inspector（反应孔设定）窗口中，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 a 至 c，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。

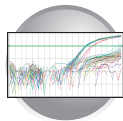
重要！ 如果您的实验不使用反应板上的所有反应孔，此步骤中请不要忽略任何要使用的反应孔。程序完成后您可以忽略未使用的反应孔。有关忽略反应孔的更详细说明，请参阅联机帮助。

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）。



- 关闭 Well Inspector（反应孔设定）窗口。

注释



9. 在 Setup（设定）选项卡上，检查并核对每个反应孔的信息。

示例实验

在相对定量示例实验中，三种组织（肝脏、肾脏和膀胱）每一种的样本分别放置在三个单独的反应板上。因此，需创建 3 个相对定量反应板文件，每个样本反应板使用一个文件。

因为实验采用单一类型，所以每个反应孔中只有一个样本 — 即目标序列或内对照。每个反应孔与一个探针关联（显示为彩色方框）。此外，每个反应孔都指定一项探针任务 — T（目标）或 E（内对照）。

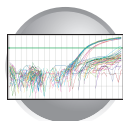
下图显示了在肝脏反应板上为每个反应孔指定好样本名、探针和探针任务之后的示例实验相对定量反应板文件。

Setup Instrument Results												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
B	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
C	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
D	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
E	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
F	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
G	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver
H	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver	Liver

样本名

探针任务和颜色

注释

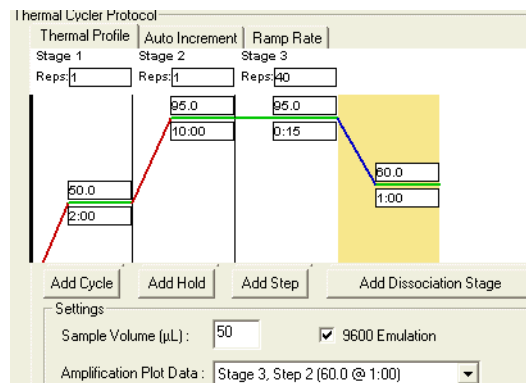


指定热循环条件并开始运行反应板

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) 执行相对定量实验（建议采用此方法），至此您已完成反转录 (RT) 步骤。

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。



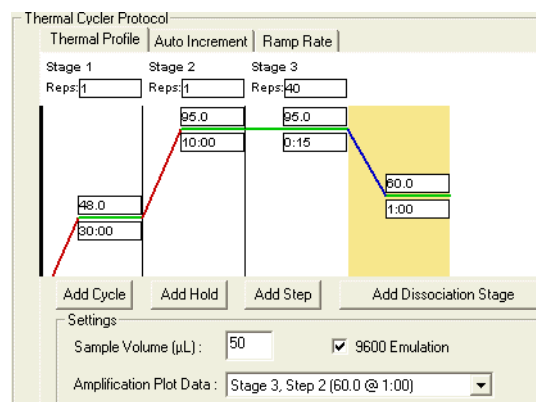
时间和温度（两步法 RT-PCR）			
1) 反转录 (RT) 步骤	保持	保持	* 仅供参考。此时反转录 (RT) 已完成。
	10 分 @ 25 °C	120 分 @ 37 °C	
2) PCR 扩增步骤	初始步骤		PCR 扩增（40 个循环的每个循环）
	AmpErase® UNG 活化	AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶活化	融解
	保持	保持	退火 / 延伸
	2 分 @ 50 °C	10 分 @ 95 °C	15 秒 @ 95 °C
			1 分 @ 60 °C

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。

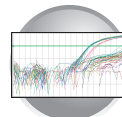
下表显示一步法 RT-PCR 实验的热循环条件。

注释：有关修改热循环参数的指导请参阅联机帮助。



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。

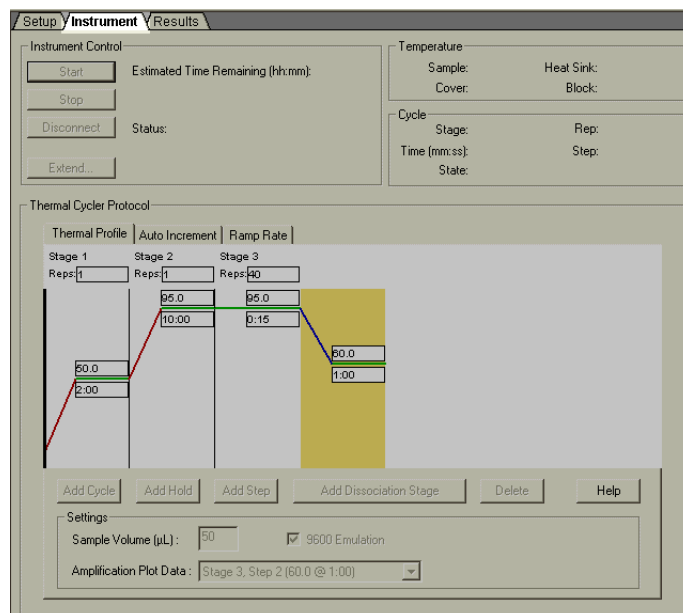
默认情况下，显示两步法反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法中 PCR 步骤的标准 PCR 条件。

2. 验证以下各项：

- 对于两步法 RT-PCR, 默认的 PCR 热循环条件已被设定。
- 如果您使用一步法 RT-PCR, 需要设定热循环参数, 详情请参阅第 30 页“一步法 RT-PCR 热循环条件”。
- Sample Volume（样本体积）为 50 μ 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，请创建一个单独的 Dissociation（熔解）分析或模板。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），为相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。

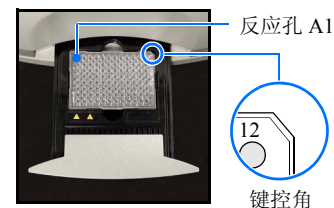
注释：反应孔 A1 位于仪器托盘的左上角。

5. 单击 **Start**（开始）。

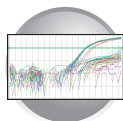
在仪器运行 PCR 程序期间，Instrument（仪器）选项卡上会显示实时状态信息，并报告荧光信号强度。

运行结束后，屏幕上显示信息报告运行是否成功。

程序运行期间生成的所有数据都保存到您在步骤 3 中指定的相对定量反应板文件中。



注释




分析和查看相对定量反应板数据


开始分析

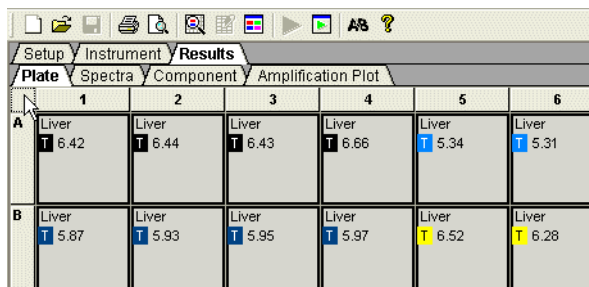
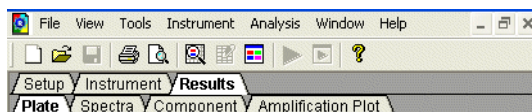
要在运行后分析相对定量反应板数据，请单击  或选择 **Analysis**（分析）> **Analyze**（执行分析）。SDS 软件经过计算将原始荧光数据进行转换建立阳性参比荧光与报告基团荧光的光谱改变之间的比较关系。以这个比较关系为基础，软件生成四种结果窗口：**Plate**（反应板）、**Spectra**（光谱）、**Component**（成分）和 **Amplification Plot**（扩增图谱）。

关于 Results（结果）选项

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。

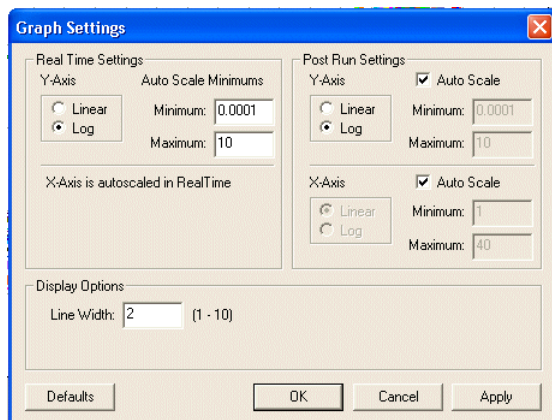
Results（结果）选项卡上包括 4 个二级选项  分别描述如下。有关各选项卡的详细说明，请参阅联机帮助。

- 要在不同的视图之间移动，单击选项 
- 要选择反应板上的所有 96 个反应孔，单击反应板的左上角。



	1	2	3	4	5	6
A	Liver T 6.42	Liver T 6.44	Liver T 6.43	Liver T 6.66	Liver T 5.34	Liver T 5.31
B	Liver T 5.87	Liver T 5.93	Liver T 5.95	Liver T 5.97	Liver T 6.52	Liver T 6.28

- 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曲线图。



注释 _____

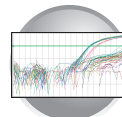


Plate (反应板) 选项卡

显示每个反应孔的结果数据, 包括:

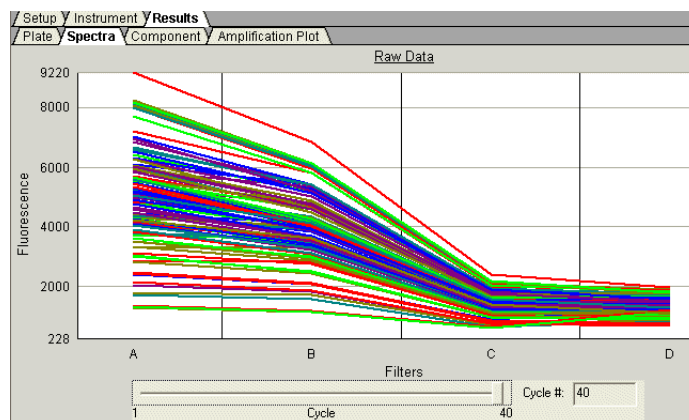
- 每个反应孔的样本名、探针任务和颜色。
- 计算得到的 R_n (校正后报告荧光强度) 值

Results										
Plate										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Liver T 6.42	Liver T 6.44	Liver T 6.43	Liver T 6.66	Liver T 5.34	Liver T 5.31	Liver T 5.23	Liver T 5.10	Liver T 7.83	Liver T 7.76
B	Liver T 5.87	Liver T 5.93	Liver T 5.95	Liver T 5.97	Liver T 6.52	Liver T 6.28	Liver T 6.36	Liver T 6.72	Liver T 2.46	Liver T 2.59
C	Liver T 6.81	Liver T 6.83	Liver T 6.91	Liver T 6.71	Liver T 4.68	Liver T 4.84	Liver T 4.70	Liver T 4.76	Liver T 6.38	Liver T 6.18
D	Liver T 5.94	Liver T 6.09	Liver T 6.18	Liver T 6.22	Liver T 7.01	Liver T 6.94	Liver T 6.97	Liver T 7.00	Liver T 6.85	Liver T 6.79
E	Liver T 6.75	Liver T 6.96	Liver T 7.10	Liver T 7.31	Liver T 5.18	Liver T 5.15	Liver T 5.10	Liver T 5.14	Liver T 5.17	Liver T 5.18

Spectra (光谱) 选项卡

显示所选反应孔的荧光光谱。

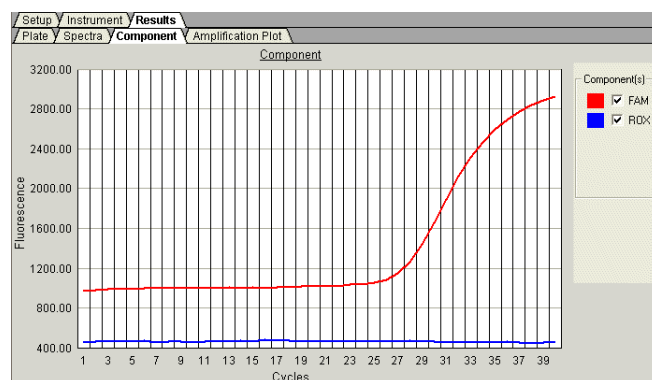
- 用鼠标指针点击并拖动 Cycles (循环) 滑块上的指示器, 可查看每一循环的光谱。
- Cycle # (循环数) 文本框中显示滑块指示器的当前位置。



Component (成分) 选项卡

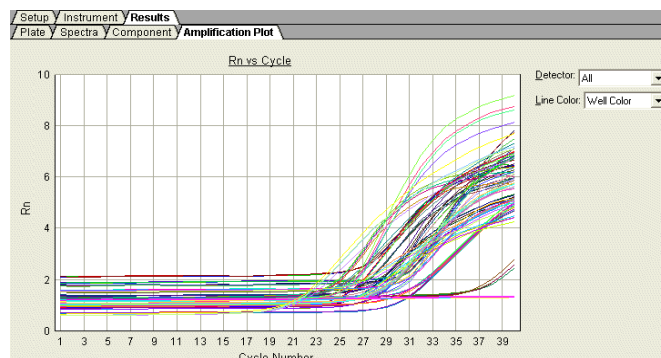
显示整个 PCR 运行期间所选反应孔的每种荧光的完整光谱表现。每次只能显示第一个选取的反应孔。

注释: 如果您使用 TaqMan® 产品, 会有三种成分 (ROX® 荧光、报告基团荧光和 TAMRA™ 淬灭荧光) 显示在 Component (成分) 选项卡上。如果您使用 TaqMan® MGB 产品, 则只显示两种成分 (ROX 和报告基团荧光), 如右图所示。

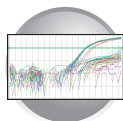


Amplification Plot (扩增图谱) 选项卡

显示 R_n (校正后报告荧光强度) 随所选探针和反应孔的循环数变化的图谱。



注释



再次分析数据

原始荧光数据（光谱）、 R_n （校正后报告荧光强度）值和反应孔信息（样本名、探针和探针任务）均存储在相对定量反应板文件中。

在运行程序后如果您决定忽略某些反应孔或更改某项反应孔信息，则必须再次分析数据。

注释：软件分析数据后，Analyze（执行分析）按钮 (▶) 即变为无效。一旦您更改需再次执行分析的设置，Analyze（执行分析）按钮 (▶) 即恢复为可用状态。

导出相对定量反应板数据

您可将相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。

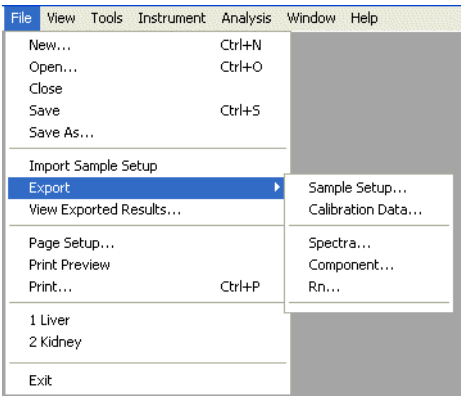
- 1. 选择 **File（文件） > Export（导出）**，然后选择要导出的数据类型：
 - **Sample Setup（样本设定）(*.txt)**
 - **Calibration Data（校正数据）(*.csv)**
 - **Background Spectra（背景光谱）(*.csv)**
 - **Component（成分）(*.csv)**
 - **R_n （校正后报告荧光强度）(*.csv)**

一般而言，对于近期创建和运行的反应板您导出其样本设定数据；而对于现有反应板可导出其它数据类型。

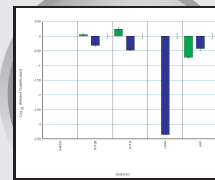
- 2. 为要导出的文件输入文件名。

注释：对话框的名称取决于您要导出的数据类型。

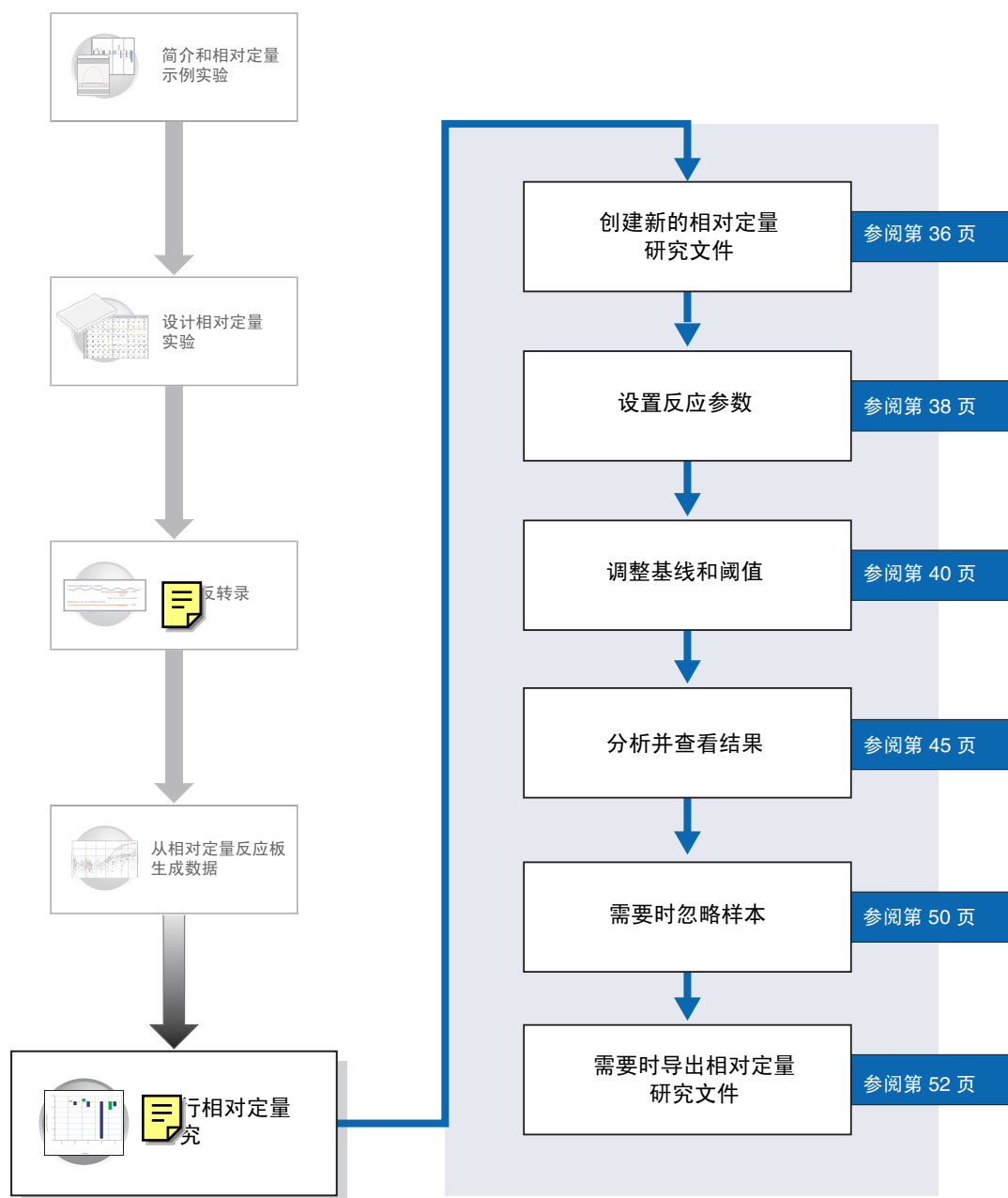
- 3. 单击 **Save（保存）**。



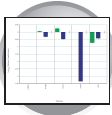
注释 _____



工作流程



注释



创建相对定量研究文件

在研究中要对相对定量反应板进行比较分析，必须首先创建一个 RQ Study（相对定量研究）文件。

重要！ RQ Study（相对定量研究）软件对于 7300 PCR 仪是可选软件包，而对 7500 PCR 仪则是标准配置。

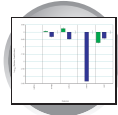
SDS 软件使用相对定量的比较方法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)。有关相对定量计算方法的详情，请参阅 *ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2* (*ABI PRISM® 7700 序列检测系统用户公告牌 # 2*) (货号 4303859)。

在相对定量研究中，您可以 ...	您不能
<ul style="list-style-type: none">选择内对照和校正器样本。选择适用的对照类型。设置基线和阈值及相对定量 Min/Max Confidence Level（最小 / 最大置信度）。忽略个别反应孔和重复样本。	<ul style="list-style-type: none">创建、添加或修改样本。创建、添加或修改探针。更改探针任务。 <p>（您可在相对定量反应板文件中执行这些操作。）</p>

创建新的相对定量反应板文件：

- 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 **Relative Quantification (ddCt) Study（相对定量 (ddCt) 研究）**。接受 **Container（容器）** 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）**）。
- 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 >）**。

注释 _____



5. 将相对定量反应板添加到研究中。

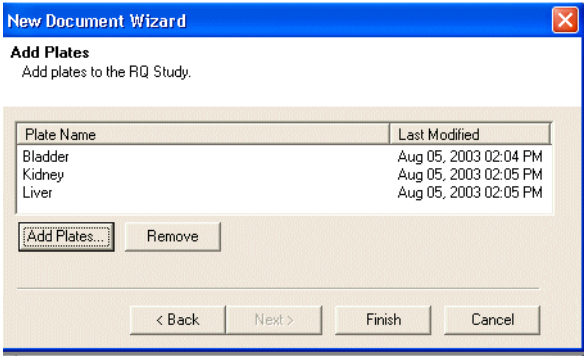
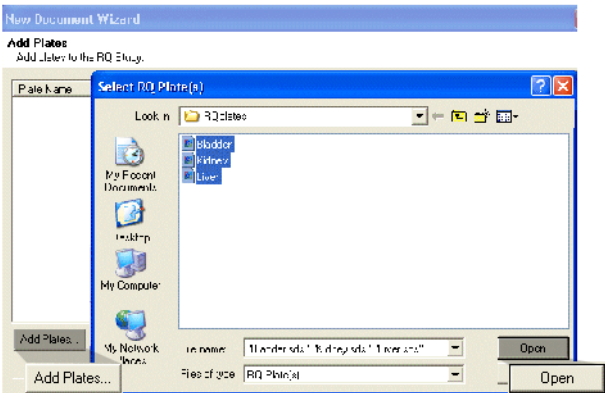
- a. 单击 **Add Plates**（添加反应板）。

注释：在一个 RQ 研究中，您可添加最多 10 个相对定量反应板。

- b. 选择您要添加到研究中的反应板，然后单击 **Open**（打开）。

所选的反应板会显示出来。

重要！ 所有添加到研究中的反应板都必须使用相同的热循环参数 — 即相同的步骤数、循环数、样本体积和仿真模式。SDS 软件如果检测到任何差异，则会拒绝不同设置的反应板。（添加到研究的第一个反应板作为阳性参比反应板，与其它反应板比较。）



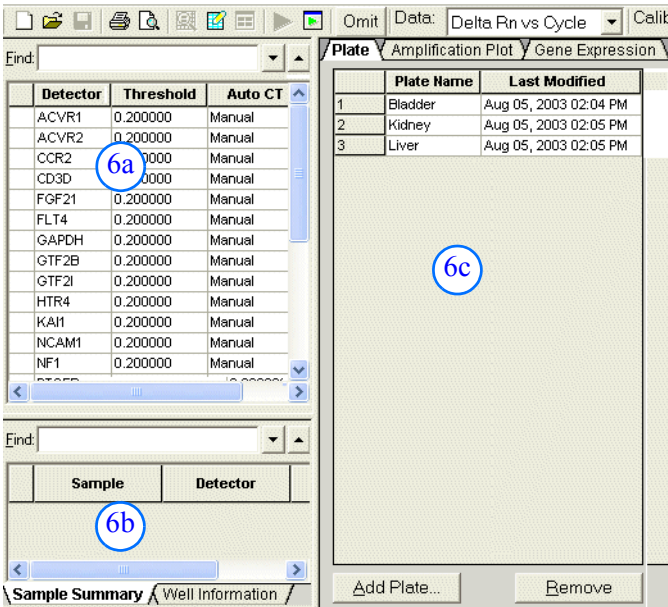
6. 单击 **Finish**（完成）。如果需要，屏幕上提示时保存该相对定量研究文件。

SDS 软件打开一个新的相对定量研究文件，并显示 RQ Study（相对定量研究）主视图，包括三个窗格：

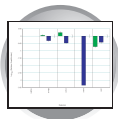
- a. RQ Detector（相对定量探针）窗格 — 在这里您可选择与载入的研究相关联的探针。其中显示每个探针的 Color（颜色）、Detector name（探针名）、Threshold（阈值）、Auto Ct（自动 Ct）和 Baseline（基线）。

注释：此时，Threshold（阈值）、Auto Ct（自动 Ct）和 Baseline（基线）栏中的值均设定为默认值（分别为 0.200000、Manual（手动）和 [6,15]）。

- b. RQ Sample（相对定量样本）窗格 — 显示与所选探针相关联的样本。Sample（样本）窗格显示相对定量计算的数字结果，包括两个二级选项卡：Sample Summary（样本摘要）和 Well Information（反应孔信息）。



注释



- c. RQ Results （相对定量结果）窗格 — 包含 3 个显示结果的选项卡：Plate （反应板）（默认显示在最上边）、Amplification Plot （扩增图谱）和 Gene Expression （基因表达）。

注释：您可此时保存相对定量研究文件，也可等指定分析设置和分析数据完毕后再保存。

设置反应参数

创建相对定量研究文件后，您必须为分析指定参数值。

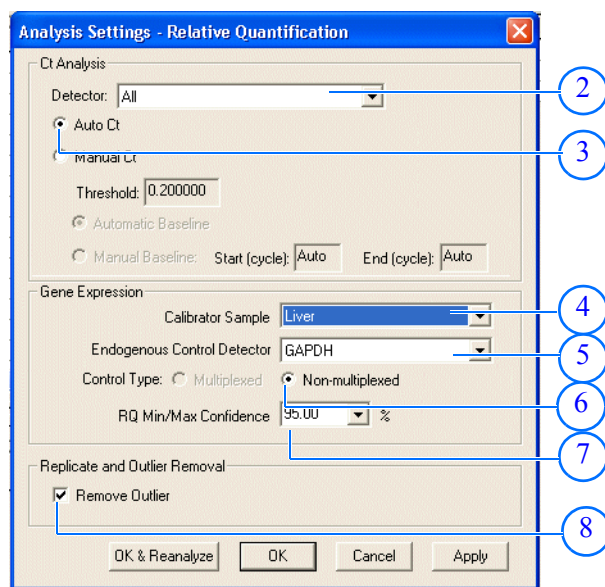
除非您已为您的实验确定了最佳基线和阈值设置，否则您可使用 SDS 软件的自动生成基线和阈值 (Auto Ct) 功能来确定基线和阈值，如下所述。如果程序能够为每个反应孔正确地调用基线和阈值，您便可继续进行查看结果。否则，您必须手动设置基线和阈值，有关指导，请参阅第 40 页“手动确定基线和阈值”。

设置反应参数：

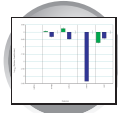
1. 单击 或选择 **Analysis （分析） > Analysis Settings （分析设置）**。
2. 在 Detector （探针）下拉列表中，选择 **All （全部）**。
3. 选择 **Auto Ct （自动 Ct）**。SDS 软件将自动为每个反应孔生成基线和阈值。

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，详情请参阅第 40 页“调整基线和阈值”。

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



注释



4. 选择校正器样本。

注释：如果您的实验只使用单个反应板，必须至少有两种不同的样本，它们有不同的样本名和自己的内对照。（如果需要，您可返回到已保存的相对定量反应板文件并更改样本名。）

5. 选择内对照探针。

6. 如果研究中包含多重反应和非多重反应，则需要选择 **Control Type**（对照类型）。

注释：只有在进行分析的反应板同时包含多重和非多重反应，并且它们有相同的内对照时，**Multiplexed**（多重）或 **Non-Multiplexed**（非多重）选项才激活可用。

7. 选择 **RQ Min/Max Confidence level**（相对定量最小 / 最大置信度）。

注释：SDS 软件使用这个值来计算基因表达水平的误差条信号，详情请参阅第 48 页“基因表达图谱误差条”。

8. 或者，选择 **Remove Outliers**（删除异常值），使 SDS 软件可对包含至少 4 个重复的样本组自动识别并筛选掉异常值。

注释：您也可手动删除异常值，详情请参阅第 50 页“忽略研究中的样本”。

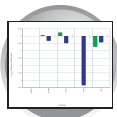
9. 单击 **OK & Reanalyze**（确定并再次分析）按钮。探针信息显示在 **RQ Detector**（相对定量探针）窗格中。

分析完成后，**Threshold**（阈值）栏中显示自动计算得出的阈值。**Auto Ct**（自动 Ct）和 **Baseline**（基线）栏设置为“Auto”（自动）。

有关 **Analysis Settings**（分析设置）对话框的设置详情，请参阅联机帮助。

Find:				Plate		Amplification Plot	Gene Expression
Detector	Threshold	Auto Ct	Baseline		Plate Name	Last Modified	
ACVR1	0.535276	Auto	Auto	1	Bladder	Aug 05, 2003 02	
ACVR2	0.353770	Auto	Auto	2	Kidney	Aug 05, 2003 02	
CCR2	0.056001	Auto	Auto	3	Liver	Aug 05, 2003 02	
CD3D	0.267214	Auto	Auto				
FGF21	0.200000	Auto	Auto				
FLT4	0.451420	Auto	Auto				
GAPDH	0.418936	Auto	Auto				
GTF2B	0.251278	Auto	Auto				
GTF2I	0.280024	Auto	Auto				
HTR4	0.082686	Auto	Auto				
KAI1	0.323054	Auto	Auto				
NCAM1	0.236747	Auto	Auto				
NF1	0.158621	Auto	Auto				
PTGFR	0.301821	Auto	Auto				
PTGFR	0.301821	Auto	Auto				

注释



分析完毕后，您必须验证每个探针的基线和阈值是否已被正确调用，详情请参阅以下部分的说明。

调整基线和阈值

自动确定基线和阈值

SDS 软件根据数据显示的“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)

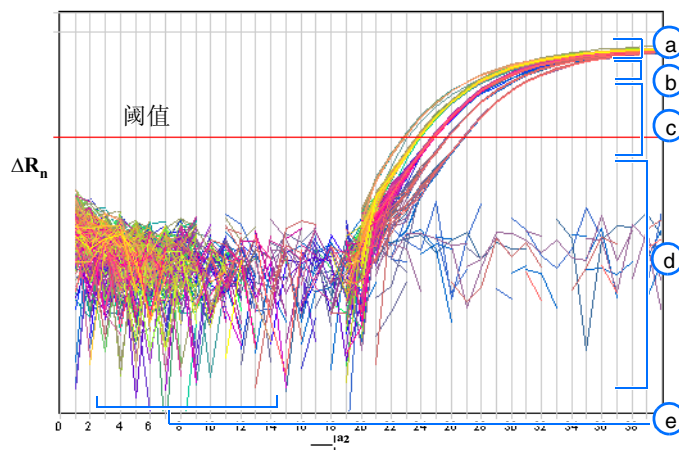
实验性错误（如污染、移液错误等）可能会产生与典型扩增曲线数据偏差极大的数据。这种非典型数据可能会导致软件算法为相关联的探针生成不正确的基线和阈值。

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，详情请参阅[第 43 页](#)。

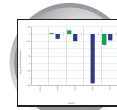
手动确定基线和阈值

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 43 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。

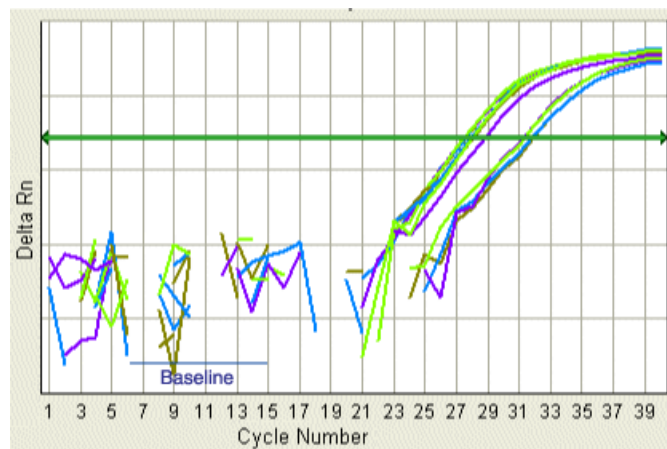


注释 _____



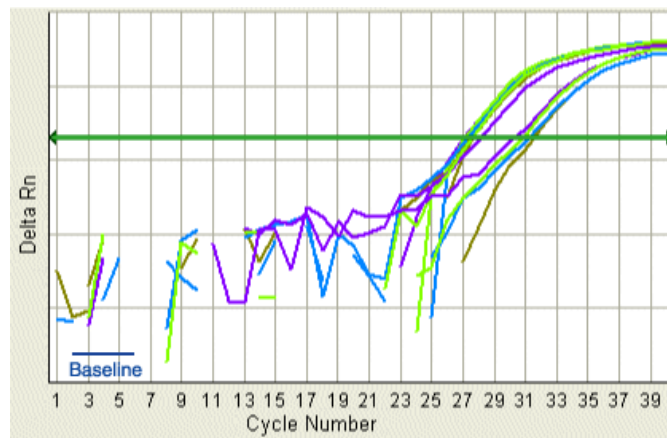
基线设置正确

扩增曲线从最大基线之后开始。不需要进行调整。



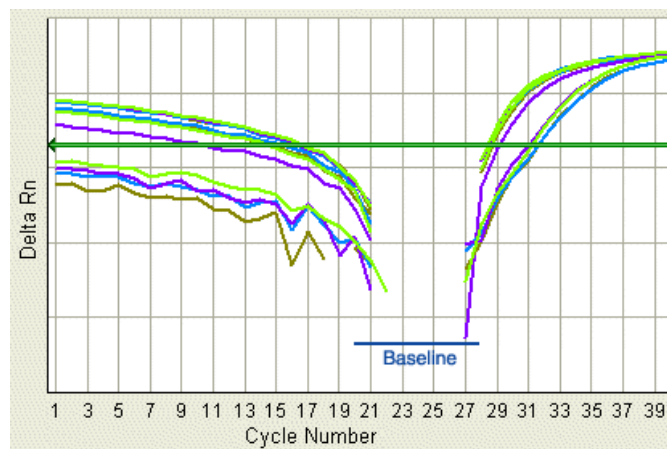
基线设置太低

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。

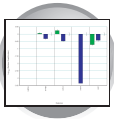


基线设置太高

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



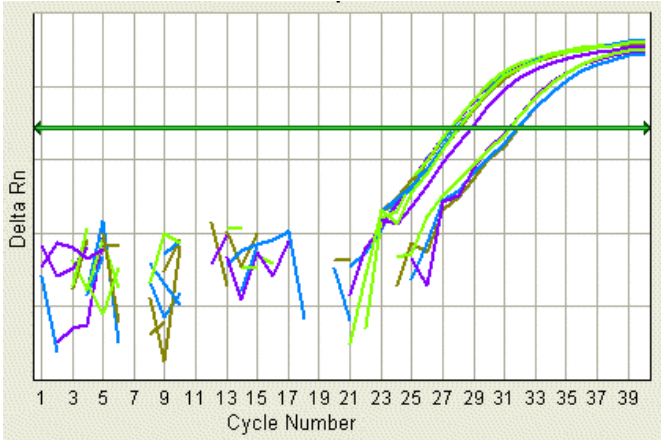
注释



阈值设置正确

阈值设置在扩增曲线的指数增长长期之内。
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。

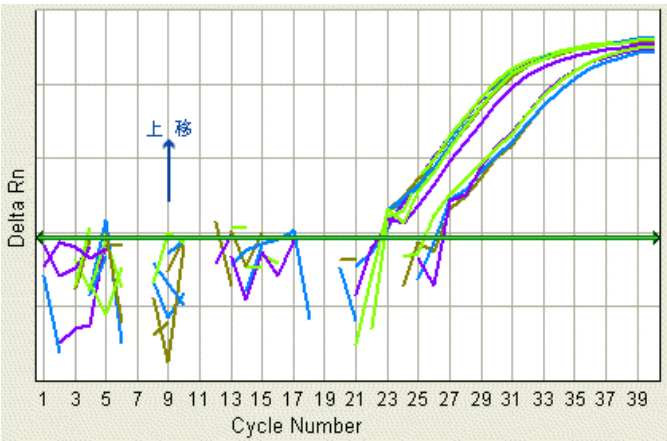
	Sample	Detector	Task	Avg Ct	Avg dCt	dCt std err	ddCt	RQ	P Value	RQ Min	RQ Max	Outl Rerr
	Liver	CD3D	Target	27.492	6.369	0.111	0.000	1.000	1.000	0.828	1.208	0
	Kidney	CD3D	Target	28.203	8.377	0.207	2.008	0.249	0.002	0.175	0.353	0
	Bladder	CD3D	Target	31.585	10.216	0.193	3.847	0.070	0.002	0.050	0.096	0



阈值设置太低

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

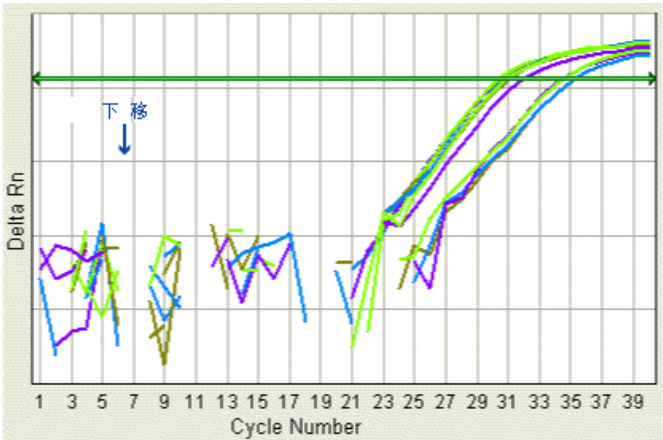
	Sample	Detector	Task	Avg Ct	Avg dCt	dCt std err	ddCt	RQ	P Value	RQ Min	RQ Max	Outl Rerr
	Liver	CD3D	Target	21.117	-0.006	0.246	0.000	1.000	1.000	0.659	1.517	0
	Kidney	CD3D	Target	21.514	1.688	0.264	1.694	0.309	0.002	0.198	0.483	0
	Bladder	CD3D	Target	24.043	2.673	0.281	2.679	0.156	0.002	0.097	0.252	0



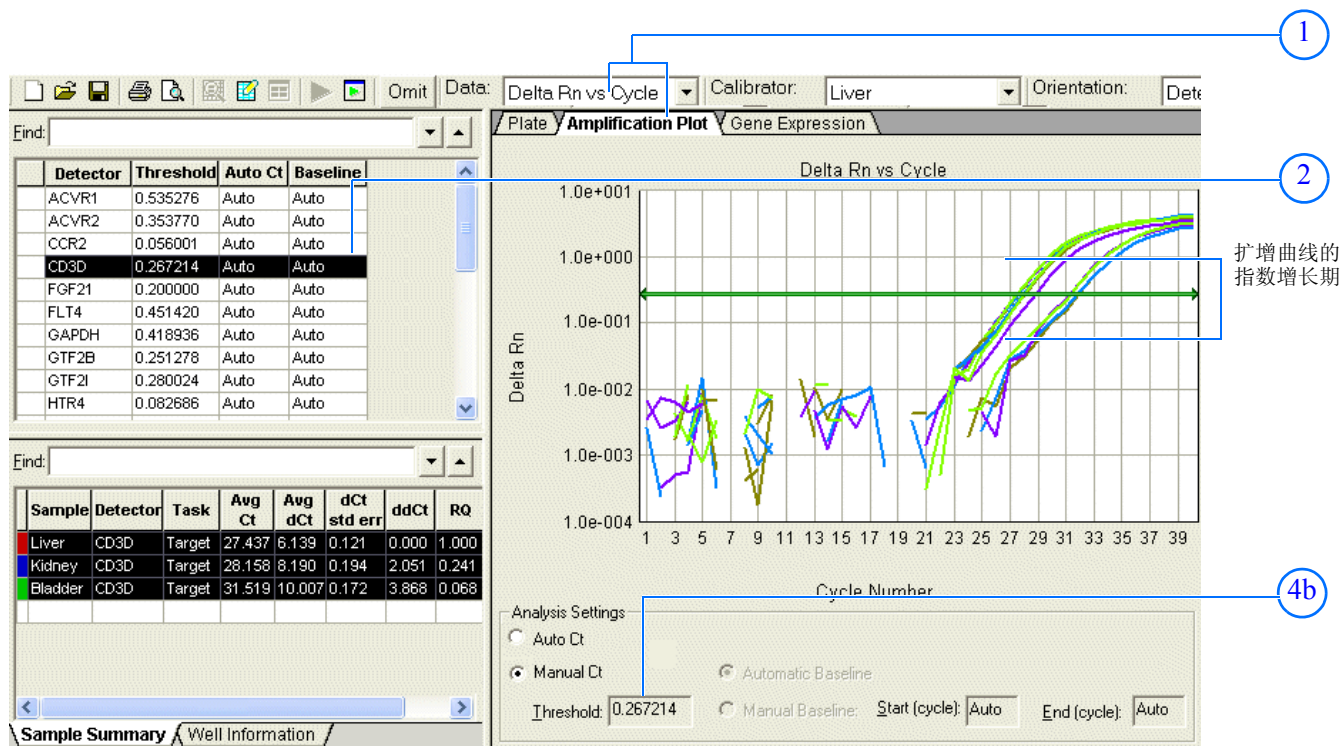
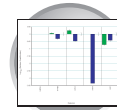
阈值设置太高

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

	Sample	Detector	Task	Avg Ct	Avg dCt	dCt std err	ddCt	RQ	P Value	RQ Min	RQ Max	Outl Rerr
	Liver	CD3D	Target	33.449	12.327	0.114	0.000	1.000	1.000	0.824	1.214	0
	Kidney	CD3D	Target	34.493	14.667	0.449	2.340	0.197	0.002	0.092	0.423	0
	Bladder	CD3D	Target	38.314	16.944	0.377	4.617	0.041	0.002	0.021	0.077	0



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** (ΔRn 随循环变化)。
2. 在 **RQ Detector** (相对定量探针) 窗格中，选择一个探针。

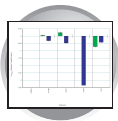
SDS 软件显示如下：

- 在 **RQ Sample** (相对定量样本) 窗格中显示相关联样本 (来自研究中的所有反应板)。
- 在 **RQ Results** (相对定量结果) 窗格中显示所选探针的图形。

注释：当手动调整基线和阈值设置时，您一次只能选择一个探针。如果您选择多个探针，**Analysis Settings** (分析设置) 部分和阈值条就会被禁用。

3. 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)。

注释



- 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 (▶) 变为可用状态，指示您必须重新分析数据。

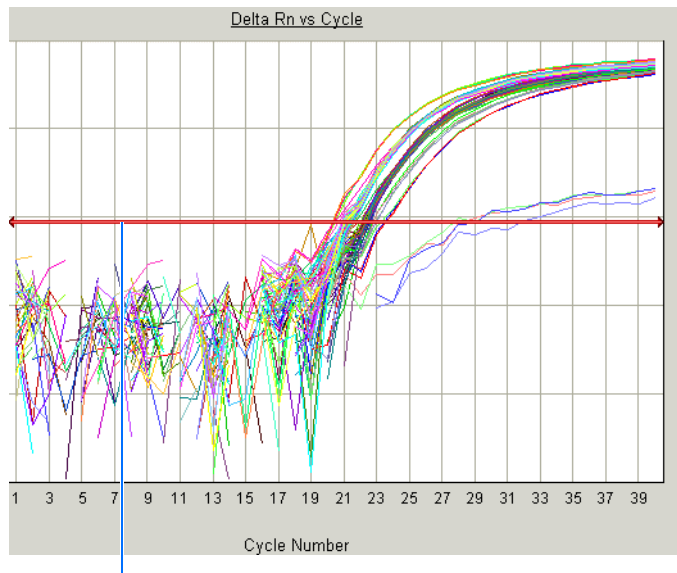
4. 为探针设置阈值。

- 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，并于重新分析之后在 Threshold (阈值) 字段中显示此值。

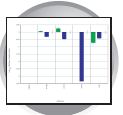
5. 重复步骤 2 至 3，为实验分析中的所有剩余探针设置适当的基线和阈值。

6. 单击 ▶ 或选择 **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。



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。

注释



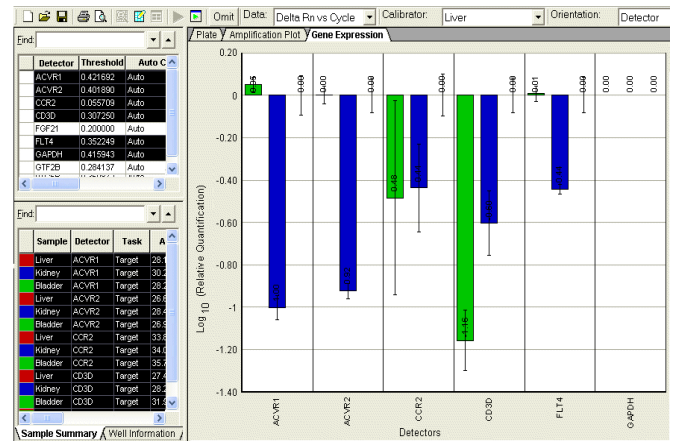
分析和查看相对定量研究结果

选择要包含在 Results Graphs (结果图形) 中的探针

在 RQ Detector (相对定量探针) 窗格中, 单击以选择要包含在 Results Graphs (结果图形) 中的探针。(按住 Ctrl 键单击可选择多个探针; 单击并拖动鼠标可选择多个相邻的探针。)

相应的样本显示在 RQ Sample (相对定量样本) 窗格中。显示的分析结果取决于您在 RQ Results (相对定量结果) 窗口中选择的选项卡 (Plate (反应板)、Amplification Plot (扩增图谱) 或 Gene Expression (基因表达))。

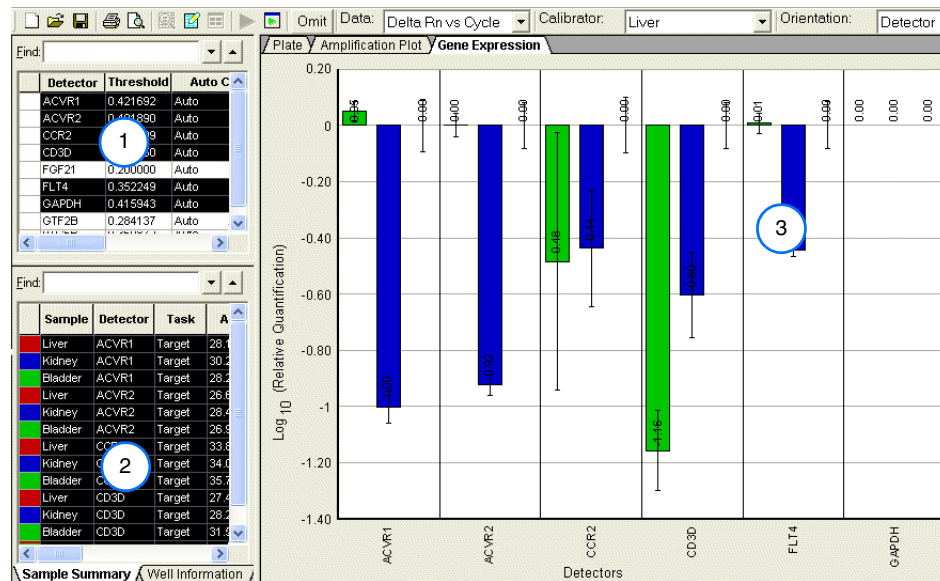
要查看某个特定反应孔的信息, 请选择 **Well Information (反应孔信息)** 选项卡。



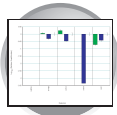
示例实验

假定当肝脏组织用作校正器时, 您想要查看以下基因的比较基因表达水平: ACVR1、ACVR2、CCR2、CD3D 和 FLT4。在 RQ Detector (相对定量探针) 窗格 (1) 中选择探针, 在 RQ Sample (相对定量样本) 窗格 (2) 中显示样本信息, 并在 RQ Results (相对定量结果) 窗口 (3) 中显示结果图形。请注意:

- 选择 Gene Expression (基因表达) 选项卡, 基因表达水平按探针排序显示。
- 膀胱样本的基因表达水平用绿色条表示, 肾脏样本用蓝色条表示。在 RQ Sample Grid (相对定量样本) 窗格和 RQ Results (相对定量结果) 窗口中, 也用这些颜色标示样本。
- 由于将肝脏样本作为校正器, 它的表达水平设置为 1。但是由于基因表达水平是以 \log_{10} (对数) 图给出 (1 的 \log_{10} (对数) 是 0), 校正器样本的表达水平在图中显示为 0。
- 由于目标序列的相对定量按照内对照的相对定量进行了标准化, 因此, 内对照的表达水平是 0, GAPDH (磷酸甘油醛脱氢酶) 就没有指示条。
- 折叠表达变化通过以下方程式计算: $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。



注释



Amplification Plot (扩增图谱)

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。

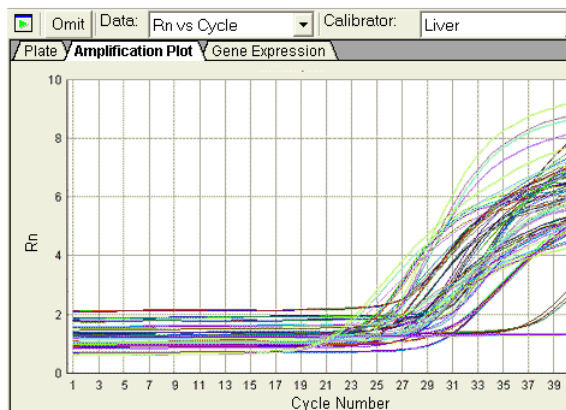
Amplification Plots (扩增图谱) 上显示所选探针的所有样本。

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, 如第 32 页所示。

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

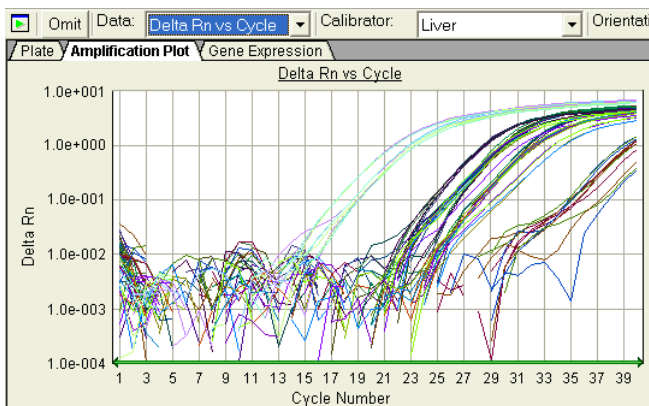
显示校正后报告荧光强度 (R_n) 随循环变化的曲线。您可通过此图来识别和检查不规则扩增。

有关校正后报告荧光强度 (R_n) 的更详细说明, 请参阅《序列检测系统化学指南》。



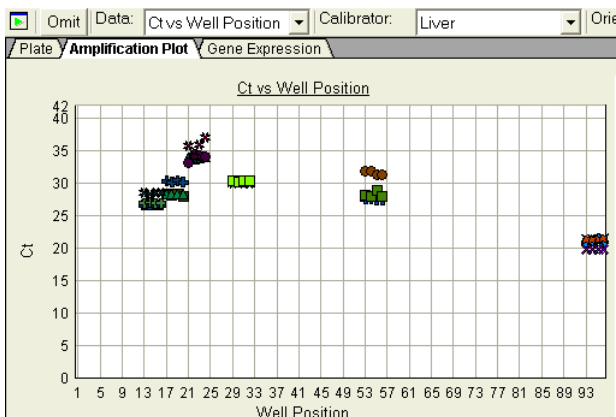
ΔR_n vs. Cycle (Log) (ΔR_n 随循环变化, 对数) 视图

显示 ΔR_n 荧光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。

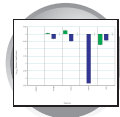


Ct vs. Well Position (Ct 值与反应孔位置关系) 视图

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异常值 (有关详情, 请参阅第 50 页“忽略研究中的样本”)。



注释 _____



Gene Expression (基因表达) 图谱

Gene Expression (基因表达) 图谱显示与校正器相比目标样本的表达水平或折叠差异。

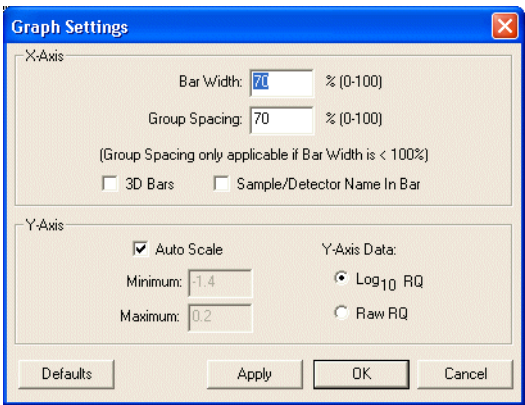
因为校正器是与自己相比，所以其表达水平始终为 1。

调整图形设置

在 Graph Settings (图形设置) 对话框中，您可调整基因表达图谱的图形设置，包括：

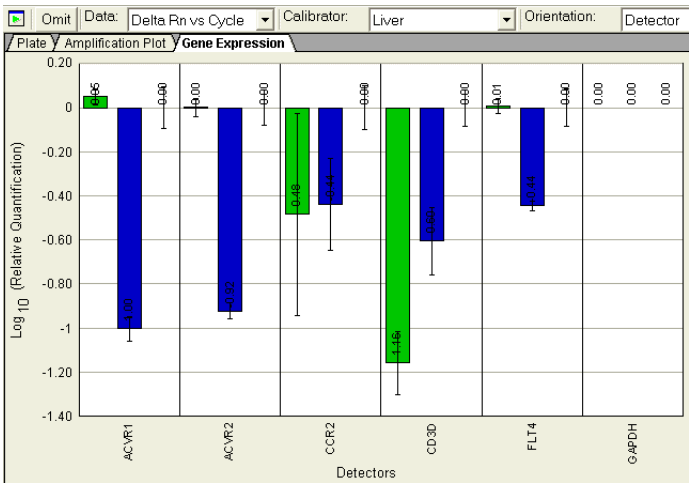
- Bar width (条宽度)
- 3D bars (立体条)
- Auto Scales (自动缩放)
- 数据以 Log₁₀ RQ (相对定量对数) 或 Raw RQ (原始相对定量) 形式显示。

有关调整基因表达图谱图形设置的详情，请参阅联机帮助。

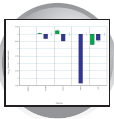


基因表达图谱方向：探针

探针标绘在 x 轴上，每个指示条显示单一样本的探针值。

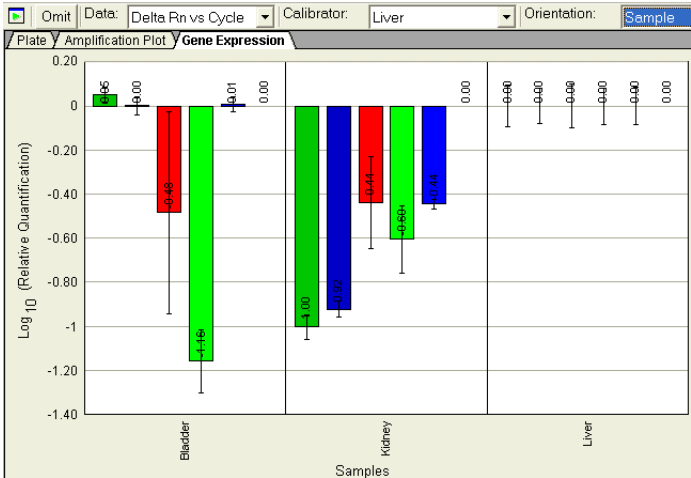


注释



基因表达图谱方向：样本

样本标绘在 x 轴上，每个指示条显示单一探针的一组样本值。

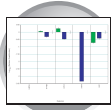


基因表达图谱误差条

如果相关联的表达水平是从一组两个或多个重复样本中计算得出， SDS 软件会在图谱中为每一列显示误差条。误差条显示计算得到的 RQMax（最大相对定量）和 RQMin（最小相对定量）表达水平，它们代表平均表达水平的标准误差（相对定量值）。总体上说，上限和下限确定表达范围，在此范围内可能出现实际的表达水平值。

SDS 软件以 Analysis Settings（分析设置）对话框中 RQ Min/Max Confidence Level（相对定量最小 / 最大置信度）设置为基础（参阅第 38 页），来计算误差条。

注释 _____

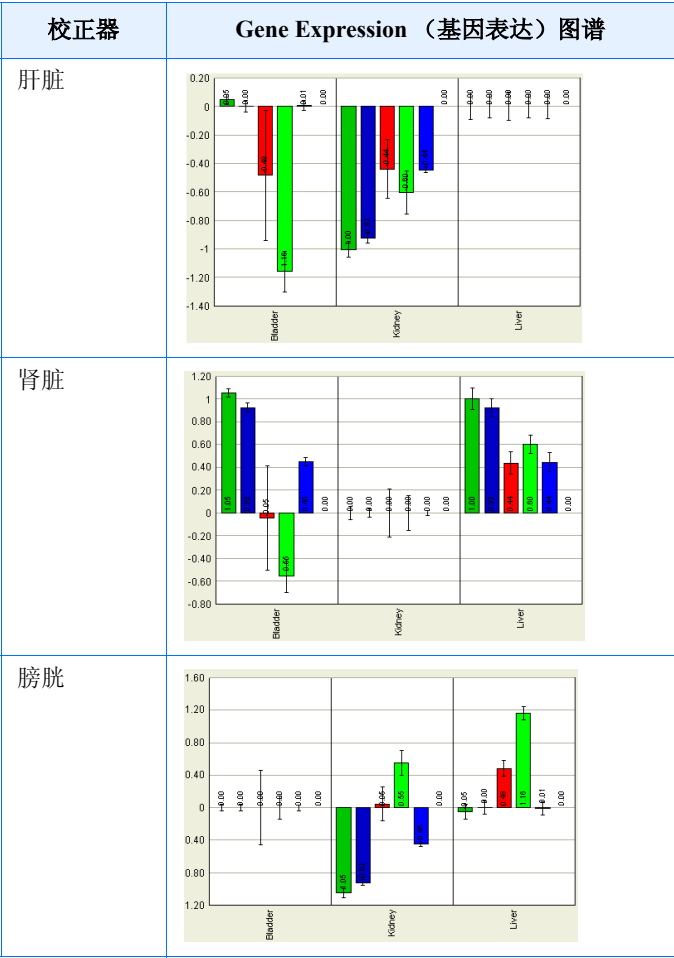


再次分析相对定量研究

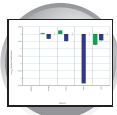
如果您更改任何分析设置，在查看结果之前必须再次分析数据。（您可在 Amplification （扩增）和 Gene Expression （基因表达）图谱之间切换变化，而无需再次分析数据。）

假定您选择肝脏作为校正器，然后执行分析。接下来，查看 Amplification （扩增）图谱和 Gene Expression （基因表达）图谱。然后，如果您想使用肾脏或膀胱作为校正器，在查看结果前您需要再次分析数据。

类似地，如果您想更改基线或阈值、内对照、对照类型或相对定量最小 / 最大参数，均需要再次分析您的数据。



注释 _____



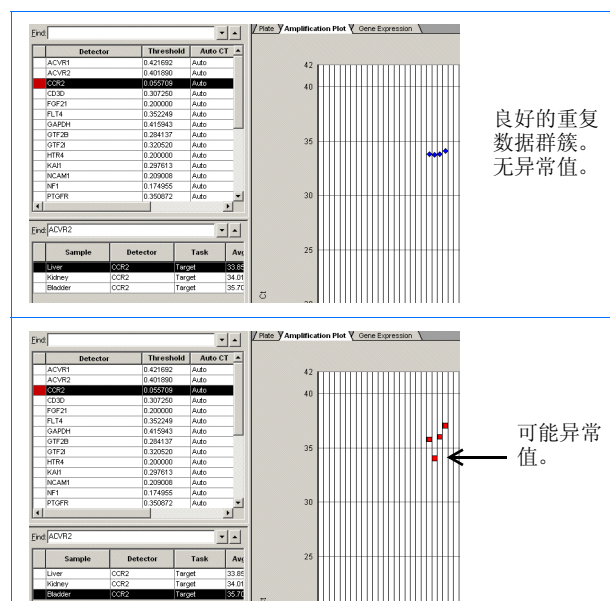
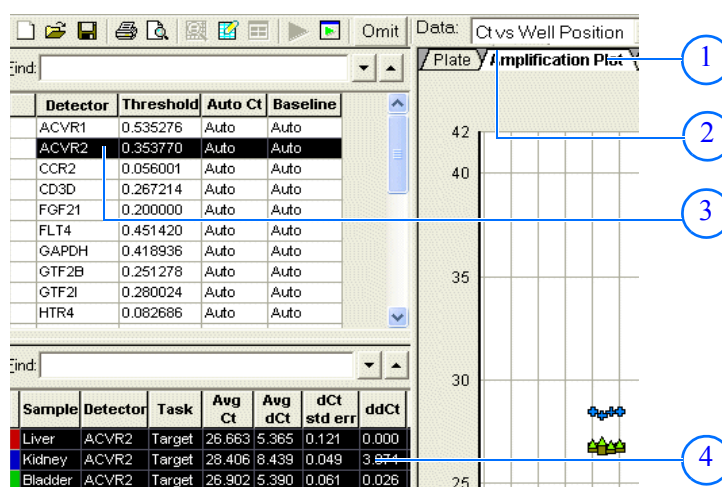
忽略研究中的样本

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。

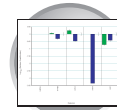
为确保精确的相对定量，您必须仔细查看重复组中是否有异常值。使用 C_T vs. Well Position（ C_T 值与反应孔位置关系）扩增图谱，您可手动删除异常值。

从相对定量研究中删除样本：

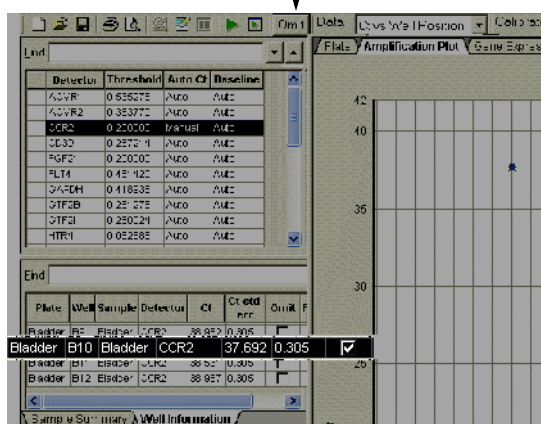
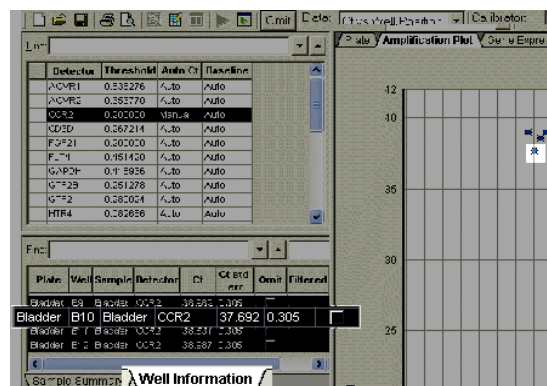
1. 选择 **Amplification Plot**（扩增图谱）选项卡。
2. 从 Data（数据）下拉列表中，选择 **Ct vs. Well Position**（ C_T 值与反应孔位置关系）。
3. 在 RQ Detector（相对定量探针）窗格中，选择一个要检查的探针。所有使用此探针的样本即会显示在 RQ Samples（相对定量样本）窗格中。
4. 在 RQ Samples（相对定量样本）窗格中，单击以选择要在 Amplification Plot（扩增图谱）中显示的样本。
5. 通过比较一组反应孔的分组 C_T 值，验证每个重复分组的同一性。



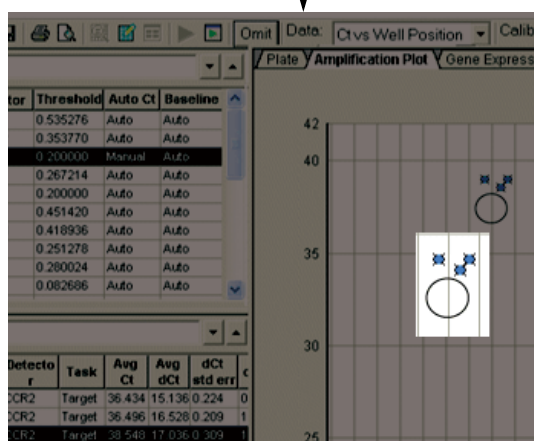
注释



6. 执行下列操作之一：
 - 如果出现异常值，选择 **Well Information**（反应孔信息）选项卡，找到偏离样本，然后选择对应此样本的 **Omit**（忽略）复选框。
 - 如果没有出现异常值，则转到步骤 7。
7. 重复步骤 5 至 6，筛选剩余的重复组。
8. 选择 **Analysis**（分析）> **Analyze**（执行分析）(▶)，在排除异常数据后再次分析数据。
9. 对您想筛选的其它探针重复步骤 3 至 8。

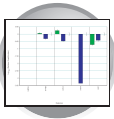


选择 Omit
(忽略)。



在分析过程中
删除异常值。

注释

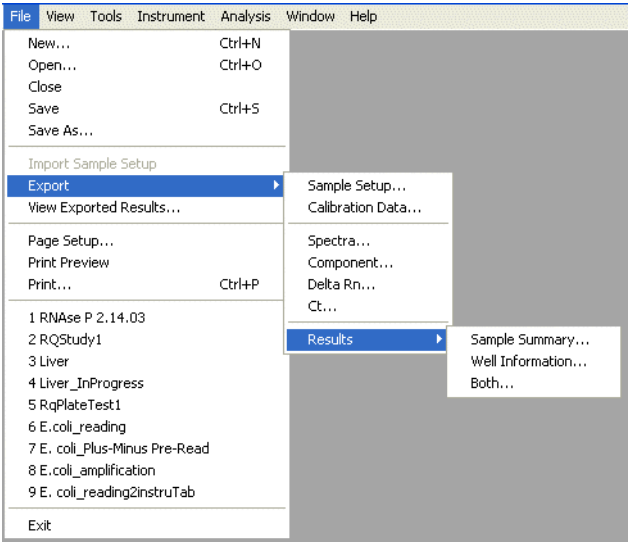


导出相对定量研究数据

您可将相对定量研究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。

1. 选择 **File**（文件）> **Export**（导出）> **Results**（结果），然后选择要导出的数据类型。
 - **Sample Summary**（样本摘要）(*.csv)
 - **Well Information**（反应孔信息）(*.csv)
 - **Both**（二者）(*.csv)

有关导出文件类型的说明，请参阅联机帮助。



2. 为要导出的文件输入文件名。

注释：对话框的名称取决于您要导出的数据类型。

3. 单击 **Save**（保存）。

注释 _____

创建探针

A

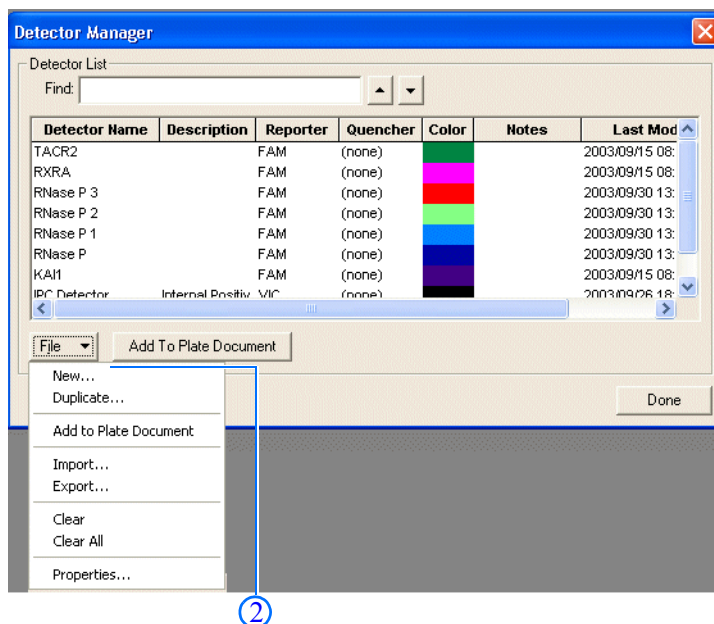
在您使用反应板文件运行反应板之前，需要创建探针并将其应用到反应板上的所有样本。一个探针虚拟地代表一个基因或等位基因特异性核酸探针试剂，用于在仪器中执行分析。

创建探针：

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

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

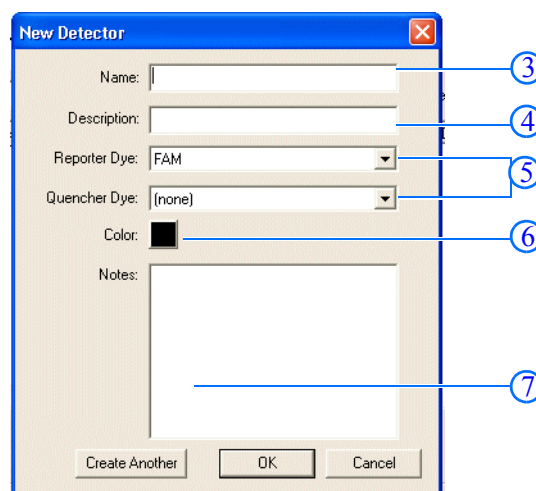
2. 选择 **File**（文件）> **New**（新建）。



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

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

注释：在 Reporter Dye（报告基团荧光）和 Quencher Dye（淬灭基团荧光）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™ 探针的淬灭荧光，而为 TaqMan MGB 探针选择 None（无）。

6. 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）**。
7. 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。
8. 单击 **OK（确定）** 以保存探针，并返回 Detector Manager（探针管理器）窗口。
9. 重复 [步骤 2 至 8](#) 创建剩余探针。
10. 添加完探针后，在 Detector Manager（探针管理器）窗口中，单击 **Done（完成）**。

示例实验

在相对定量示例实验中，为每个目标基因和内对照创建了一个探针。共创建 24 个探针：23 个用于目标基因，1 个用于内对照 GAPDH（磷酸甘油醛脱氢酶）。

例如，ACVR1 基因的探针命名为 ACVR1 并指定为黄色。因为所有 Assays-on-Demand™ 产品都具有 FAM™ 荧光标记的探针，所以选择 FAM 作为报告基团荧光。此外，Assays-on-Demand 产品使用 TaqMan MGB 探针，它使用非荧光淬灭荧光。所以没有为此探针选择淬灭荧光。

注释：Assays-on-Demand 产品在发货时包括一个分析信息文件 (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实验分析代号、每个实验分析的反应孔定位以及引物浓度。此文件也提示每个实验分析使用的报告基团荧光和淬灭荧光（若适用）。当您创建探针时，可使用报告基团荧光和淬灭荧光信息（也可使用基因名或样本名称符号）。您可在诸如 Microsoft Excel 的电子表格程序中查看其内容。

注释

参考文献

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: Livak, K.J. 和 Schmittgen, T.D. 2001 年。标题: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method (使用实时定量 PCR 和 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法对相对基因表达数据进行分析)。刊物: *Methods* 25:402-408。

作者: Saiki, R.K.、Scharf, S.、Faloona, F. 等 1985 年。标题: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia (β -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

- 3D bar (立体条) 47
- 5' 核酸酶检测分析 15
- 9600 Emulation (9600 仿真) 模式 31

英文字母

- AIF (分析信息文件)。参见“分析信息文件”
- AmpErase UNG 酶 16
- Applied Biosystems
 - 服务与支持 viii
 - 联络 viii
 - 技术支持 viii
- Assays-by-Design (代客设计引物和探针) 17
- Assays-on-Demand 17
- Bar width (条宽度) 47
- Component (成分) 视图 33
- Ct。参见“阈值循环”
- Delta Rn 3
- Delta Rn vs. Cycle (ΔRn 随循环变化) 视图 46
- Detector Manager (探针管理器) 对话框 53
- DNA 浓度 20
- FAM 荧光 17, 54
- Gene Expression Plot (基因表达图谱) 47
- High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 21
- Instrument (仪器) 选项卡 31
- MSDS, 获得 viii
- New Detector (新建探针) 对话框 53
- PCR
 - 选择方法 12
 - 单一 12
 - 多重 12
 - 实时 2
 - 终点 2
 - 预混试剂, 准备 24
 - 开始运行相对定量反应板 31
- Plate (反应板) 视图 33
- Primer Express (引物设计) 软件 17
- Results (结果) 选项卡 32
- Rn vs. Cycle (Rn 随循环变化) 视图 46
- Rn。参见“校正后报告荧光强度”

RNA

- 始浓度 20
- 准备指南 20
- 提取 20
- ROX 荧光 28, 33
- RQ Detector (相对定量探针) 窗格 39
- RQ Results (相对定量结果) 窗口 45
- RQ Sample (相对定量样本) 窗格 45
- RQ Study (相对定量研究) 主视图 37
- Setup (设定) 选项卡 29
- Spectra (光谱) 视图 33
- SYBR Green I 化学荧光试剂 15
- TAMRA 荧光 33, 54
- TaqMan 化学荧光试剂 15
- TaqMan MGB 探针 18, 54
- TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂) 24
- uracil-N-glycosylase (尿嘧啶 -N- 糖基化酶) 16
- Well Information (反应孔信息) 选项卡 45
- x 轴 32, 46, 47
- y 轴 32, 46, 47

B

- 报告基团荧光 3
- 比较算法 3, 36
- 标准偏差, 阈值效应 42
- 标准曲线 2

C

- 材料 4
- 参比荧光, 阳性 3, 28
- 阳性参比样本。参见“校正器”
- 重复 13

D

- 单一 PCR 扩增 12
- 导出数据
 - 相对定量反应板 34
 - 相对定量研究 52
- 导入反应板设定信息 27

多重 PCR 扩增 12

F

反应板, RQ 参见“相对定量反应板”

反应孔, 重复 13

反转录

High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 21

热循环参数 21

准备 RNA 指南 20

反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR)

两步法 16, 30

一步法 16, 30

仿真模式, 9600 31

分析信息文件 54

服务与支持, 获取 viii

G

工作流程, 相对定量实验概述 2

H

互补脱氧核糖核酸 (cDNA)

生成 21

贮存 22

另请参见“反转录”

化学荧光 15

阈值

调整 40

定义 3

示例 42

阈值循环

定义 3

为相对定量研究设置 38

J

基线

调整 40

定义 3

示例 41

技术联络, 获得 viii

技术支持, 联络 viii

校正 7300/7500 PCR 仪 24

校正后报告荧光强度 3

校正器

定义 13

在相对定量研究中选择 39

结果, 相对定量研究分析 45

警告, 说明 vii

K

开始运行相对定量反应板 31

宽度, 条 47

宽度, 线条 32, 46, 47

扩增曲线 40

扩增曲线背景 40

扩增曲线的平台期 40

扩增曲线的指数增长期 40

扩增曲线的线性增长期 40

扩增曲线阶段 40

扩增图谱

相对定量反应板 Amplification Plot (扩增图谱) 视图 33

相对定量研究扩增图谱类型 45

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 27

模式, 仿真 31

目标

定义 13

与探针相关联 26

N

内对照

定义 13

对于相对定量反应板 26

与探针相关联 26

为相对定量研究选择 39

P

培训, 获取有关信息 viii

偏差, 标准 42

Q

曲线

标准 2

扩增 40

R

热循环参数

使用 High Capacity cDNA Archive Kit (大容量 cDNA 库试剂盒) 执行反转录 21

添加到研究中的反应板 37

热循环条件

PCR 默认 30

两步法 RT-PCR 30

一步法 RT-PCR 30

指定 31

任务。参见“探针任务”

S

设备 4

设置, 图形 32, 46, 47

设计相对定量实验

PCR 方法 12

选择化学荧光 15

确定试剂配置 15

引物和探针 17

实时 PCR 分析 2

试剂配置 16

数据

从研究中忽略 50

从相对定量反应板生成 PCR 数据 31

导出 34, 52

导入 27

分析 32, 45

T

探针 17, 54

创建 53

定义 53

添加到 RQ 反应板 27

为相对定量研究选择 38

探针任务, 定义 26

体例, 文字 vii

图谱外观 32, 46, 47

图形设置 32, 46, 47

图形外观 32, 46, 47

W

文档, 反馈 viii

文件

导出 34, 52

模板 27

相对定量反应板 26

相对定量研究 36

文字体例 vii

X

显示选项 32, 46, 47

线条宽度 32, 46, 47

相对定量

比较算法 3

参考文献 2

定义 2

实时 PCR 2

实验。另请参见“RQ 实验” 2

示例实验 5

相对定量反应板 3

相对定量研究 3

相对定量 (RQ) 实验

成分 13

相对定量反应板

Amplification Plot (扩增图谱) 视图 33

Component (成分) 视图 33

Plate (反应板) 视图 33

Spectra (光谱) 视图 33

导出数据 34

定义 3

分析 32

结果 32

数据类型 34

再次分析数据 34

探针, 创建 53

添加到相对定量研究 37

开始运行 31

相对定量反应板文件 26

相对定量实验

工作流程 2

试剂配置 15

要求 13

探针和引物 17

化学荧光 15

相对定量示例实验

PCR 方法 12

PCR 扩增预混试剂 25

RQ 反应板文件, 示例 29

成分 14

创建探针 54

反转录 22

说明 5

相对定量研究文件, 示例 45

相对定量研究

Gene Expression Plot (基因表达图谱) 47

导出数据 52

定义 3

对照类型 39

方向 47

忽略样本自 50

结果 45

扩增图谱 45

数据类型 52

再次分析数据 49

置信度 39

添加相对定量反应板 37

相对定量研究文件 36

选项, 显示 32, 46, 47

选项, 图形 32, 46, 47

Y

研究, 相对定量 参见“相对定量研究”

阳性参比荧光 3, 28

异常值 50

引物 17

荧光

FAM 17, 54

ROX 28, 33

SYBR Green I 17

SYBR Green I 试剂 15

TAMRA 33, 54

报告基团 3

预混试剂, PCR 24

Z

指南

准备 RNA 20

置信度 39

终点 PCR 2

注意, 说明 vii

自动缩放选项 32, 46, 47



iScience. 为了更好地理解生物系统错综复杂的相互关系，生命科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。

www.appliedbiosystems.com



Applera 公司致力于为生命科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
货号 4347966 修订版 A

an **Applera** business