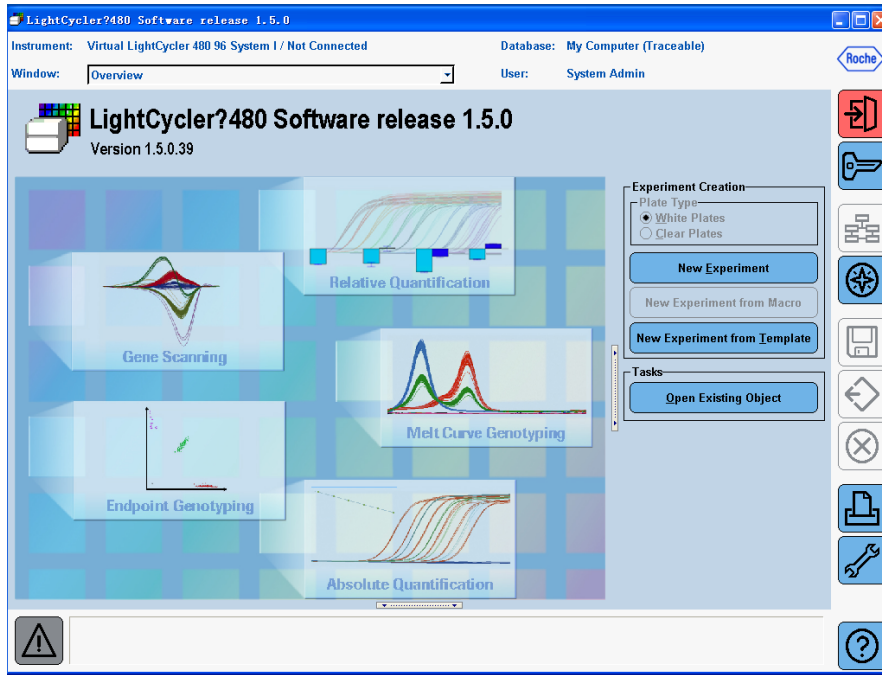


# LightCycler480 Software 1.5 軟體操作（中文版）

## 第一部分 基本界面及圖標

### 一、Overview 界面



Exit：關閉 LC480 操作界面



Log off：從目前使用的數據庫中退出並可登入其他的資料庫



Overview：點擊圖標進入「Overview」界面



Navigator：點擊圖標進入「Navigator」界面，可進行資料導入導出等操作



Save：點擊該圖標進行資料儲存



Export：導出目前打開的文件



Close：關閉目前打開的文件



Print：列印目前打開的窗口

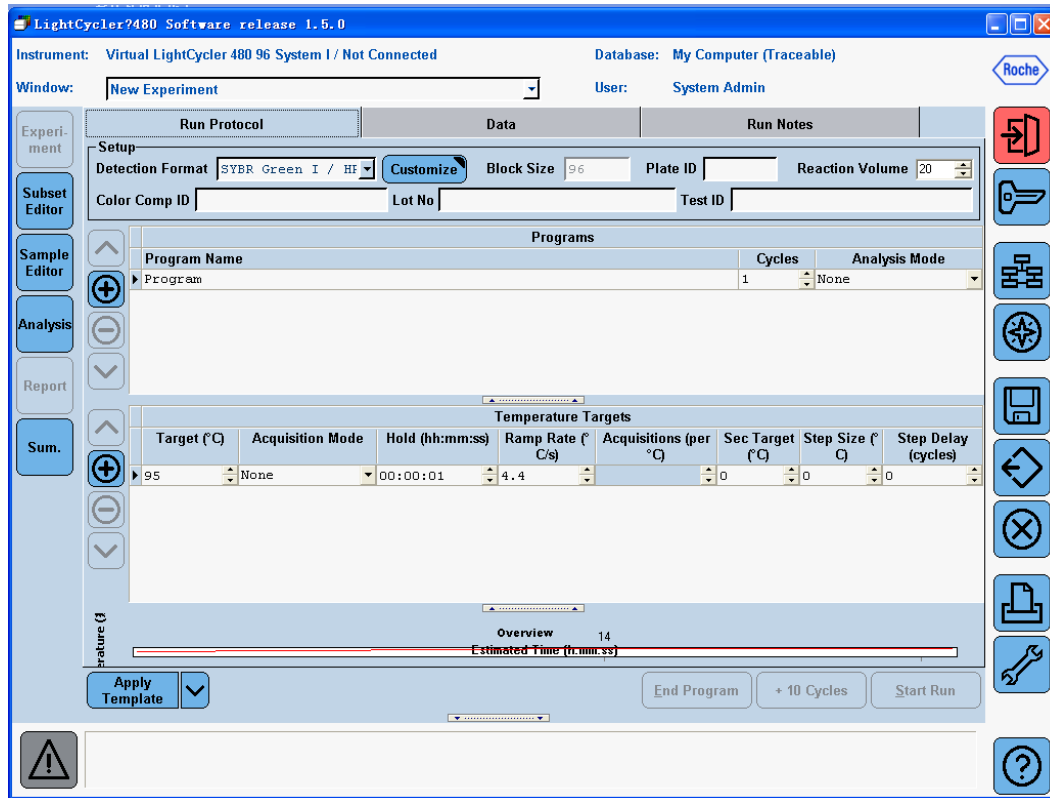


Tools：打開「Tools」界面，可進行密碼修改，建立和編輯用戶，系統設置，查看數據庫狀態、儀器狀態、濾光片組合等操作 **(一般使用者勿操作)**



Help：查看軟件版本，操作說明書等

## 二、New Experiment 界面



Run Module：編輯、運行或查看 PCR 程序及查看 PCR 實時數據



Subset Editor：點擊該模塊後可進行樣本子集的編輯



Sample Editor：點擊後進行樣品資料編輯



Analysis Module: 點擊進行結果分析或查看已保存的分析結果

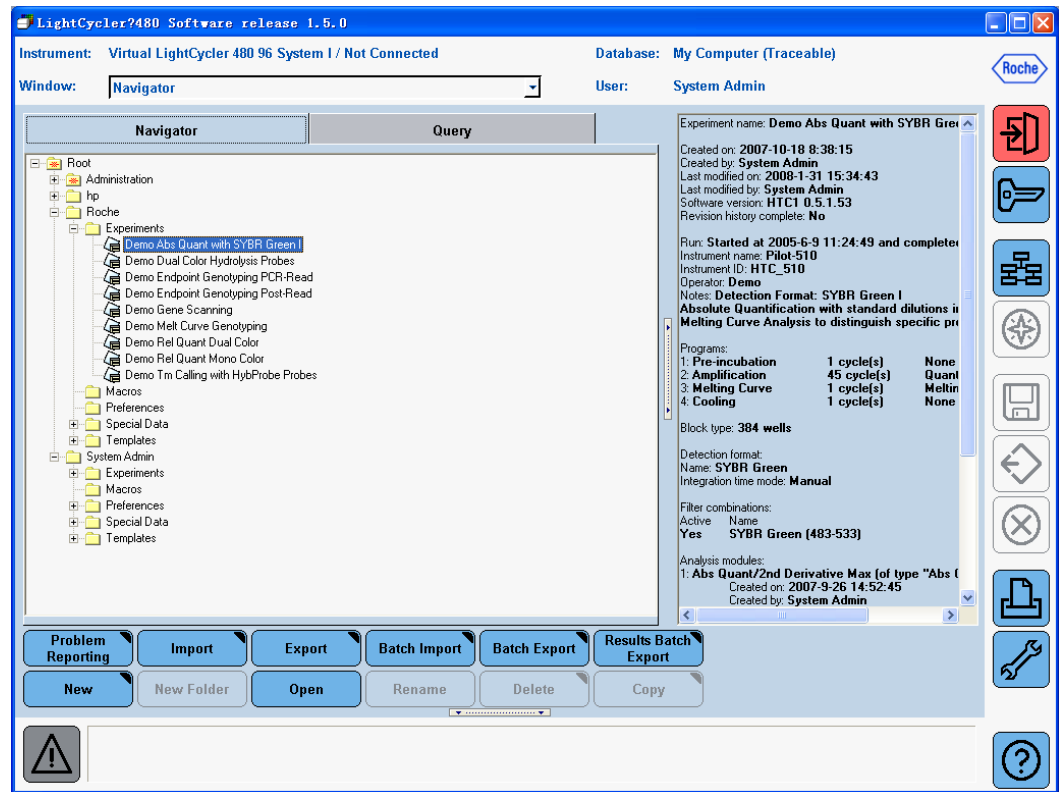


Report Module：選擇需要的內容以報告的形式給出結果



Summary Module: 查看實驗的總體概況，包括實驗名稱，所用的程序，檢測模式，濾光片組合等。概況的內容由系統自動生成

### 三、Navigator 界面







	記錄系統發生的問題
	Import：導入一個文件
	Export：導出一個文件
	Batch Import：導入一批數據
	Batch Export：導出一批數據
	New：新建一個實驗或文件夾
	New Folder：新建一個文件夾
	Open：打開一個文件
	Rename：重新命名
	Delete：刪除選中的目標
	Copy：複製選中的目標

**Note：**所有上述圖標在深藍色時為可使用狀態，灰色時為不可用狀態。各圖標的功能在不同狀態下以顏色來區分是否具備。

## 第二部份 軟體操作

### 1. 打開軟體


打開電腦，Windows XP 系統的用戶名為\_\_\_\_\_，密碼為\_\_\_\_\_，系統啟動完畢，檢查電腦右下角是否有  圖標。如果沒有，點擊桌面  捷徑。然後右鍵點擊  圖標，左鍵點擊「Show」一欄，如最後一句話顯示「Exor 4 server is running」表示資料庫加載成功。如果顯示「Exor 4 failed to start」則表示資料庫沒有加載上，關閉該窗口，右鍵點擊  圖標，選「Shutdown」一欄，退出資料庫，重新點擊桌面「Exor4 for XDMS\_T」文件，加載資料庫。


然後點擊桌面「LC480」捷徑，運行該軟體。輸入用戶名和密碼。  
用戶名稱為\_\_\_\_\_。  
密碼為\_\_\_\_\_。（區分大小寫）

### 2. 用戶管理

為了實驗結果的有效管理，可以建立不同級別的用户。

如：標準用戶（Standard User）、專業用戶（Expert User）、管理者（Local Administrator）。一般實驗室建議建立專業用戶（Expert User）用戶名，然後以該用戶名登錄軟件進行實驗操作。


建立新用戶操作：打開 LightCycler480 操作軟件，點擊右側  按鈕打開「Tools」工具欄，選擇「User Access/Users and Groups」選項。在右邊窗口中點擊「New User」鍵，在右邊「Enter the user's full name」一欄中填寫用戶的全名，在「Enter the name the user wants to log in as」一欄填寫用戶登錄名，在「Enter the user's password」一欄中輸入密碼（密碼須含有 6 個以上字母，1 個以上數字，其中有至少一個字母大寫），在「Confirm the password」一欄中重新輸入一次密碼，加以確認，在「Select the user's role」一欄中選擇用戶級別，然後點擊右下方「Close」按鈕加以確認。

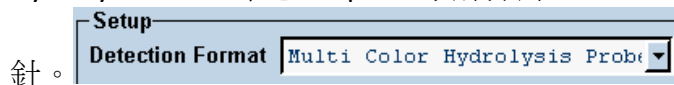
在  「Tools」工具欄中的「System Settings」界面中可以設置各用戶級的權限，以及密碼的時效。

### 3. 儀器自檢

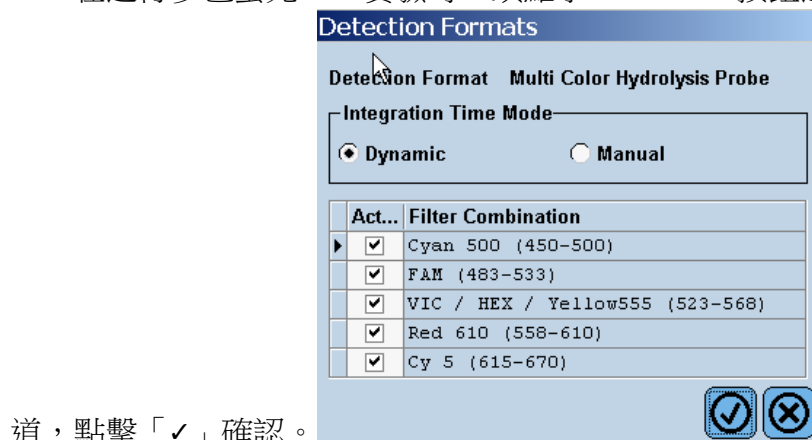
每次開機時，儀器會自動進行初始化自檢程序。自檢通過，儀器左側指示燈變綠。如放置了樣本，儀器右側指示燈變綠。在自檢時，不能放置反應盤，否則自檢無法通過。

#### 四、建立實驗程序

打開 LightCycler480 操作軟體，成功登入後點擊  按鈕，進入 New Experiment/Run Protocol 程序設置界面。在「Detection Format」一欄中選擇所使用的螢光檢測技術，可選擇各類探針和染料，如常見的 SYBR Green I 染料、Mono Color Hydrolysis Probe 單色 TaqMan 水解探針、Multi Color Hydrolysis Probe 多色 TaqMan 水解探針。



在進行多色螢光 PCR 實驗時，須點擊  按鈕選擇用戶所採用的螢光檢測通







道，點擊「✓」確認。

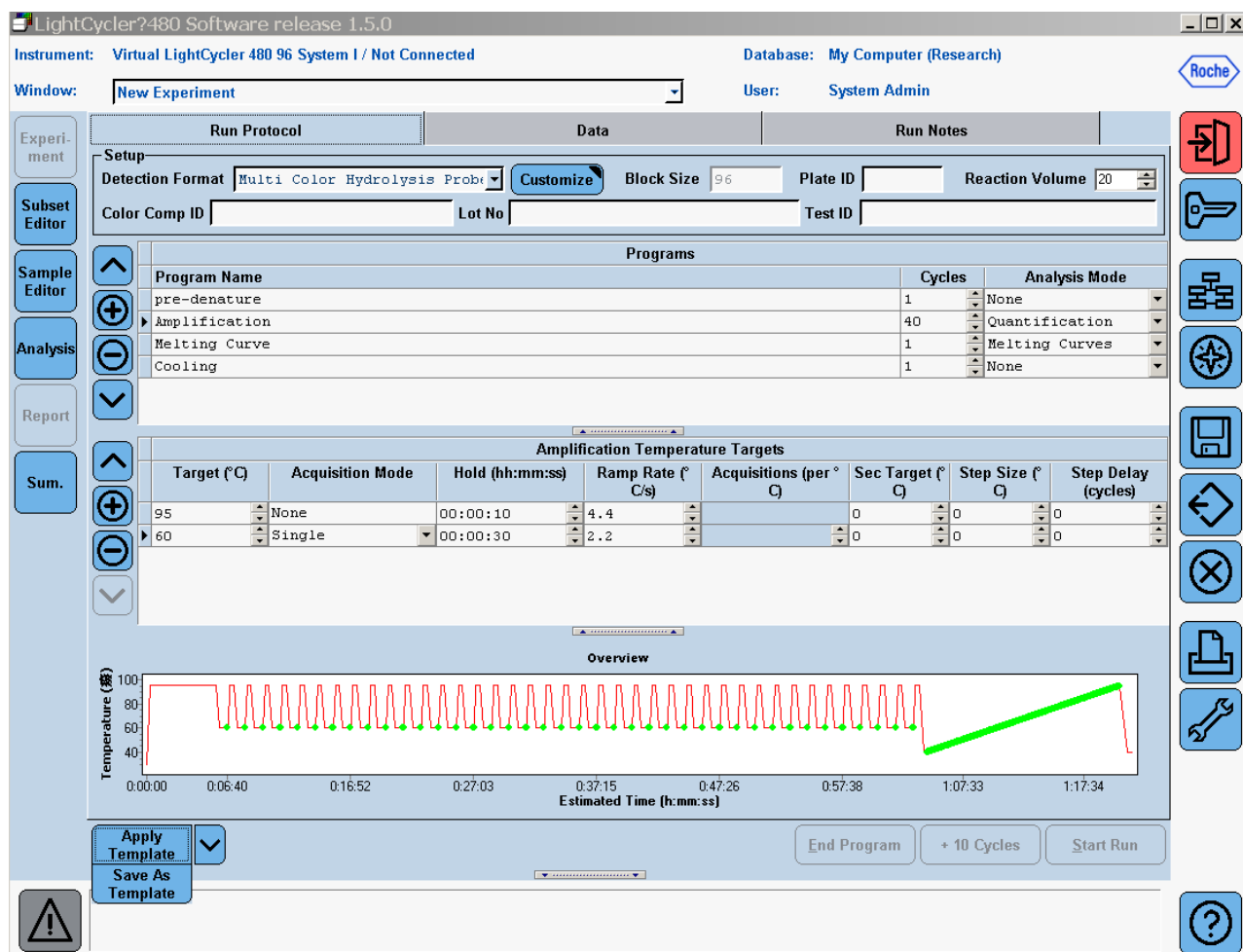
在  一欄中填寫反應體積。

在「Programs」界面中設置實驗程序：在「Program Name」下方命名程序，「Cycles」一欄內填寫該程序的循環數，在「Analysis Mode」一欄選擇該程序的分析模式。定量分析選擇「Quantification」，溶解曲線分析選擇「Melting Curves」，顏色補償實驗選擇「Color Compensation」。


而後在「Temperature Targets」界面內設置所指定程序的內容，在「Target(°C)」處填寫目標溫度，「Acquisition Mode」處選擇信號採集方式，「Hold」一欄填寫該溫度所持續的時間，「Ramp Rate(°C/s)」處填寫升降溫速率（注：如目標溫度為 50°C 以下時，為了減少硬件的損耗，必須將降溫速率調至 1.5°C/s 以下）。

如一個程序有多個步驟，則在 Temperature Targets 界面的左側處點擊 ，增加步驟；也可點擊上下箭頭   調整各步驟的先後順序。如一個實驗中有多個程序，也可在「Programs」界面左側點擊 ，增加程序，也可點擊上下箭頭調整各程序的先後順序。

實驗程度設置完成後，在下方「Overview」界面內會自動生成溫度隨時間變化的溫控曲線，以及估計的運行時間，綠色點表示採集螢光信號的溫度和時間點。可以依照該圖檢查一下程度設置是否正確。




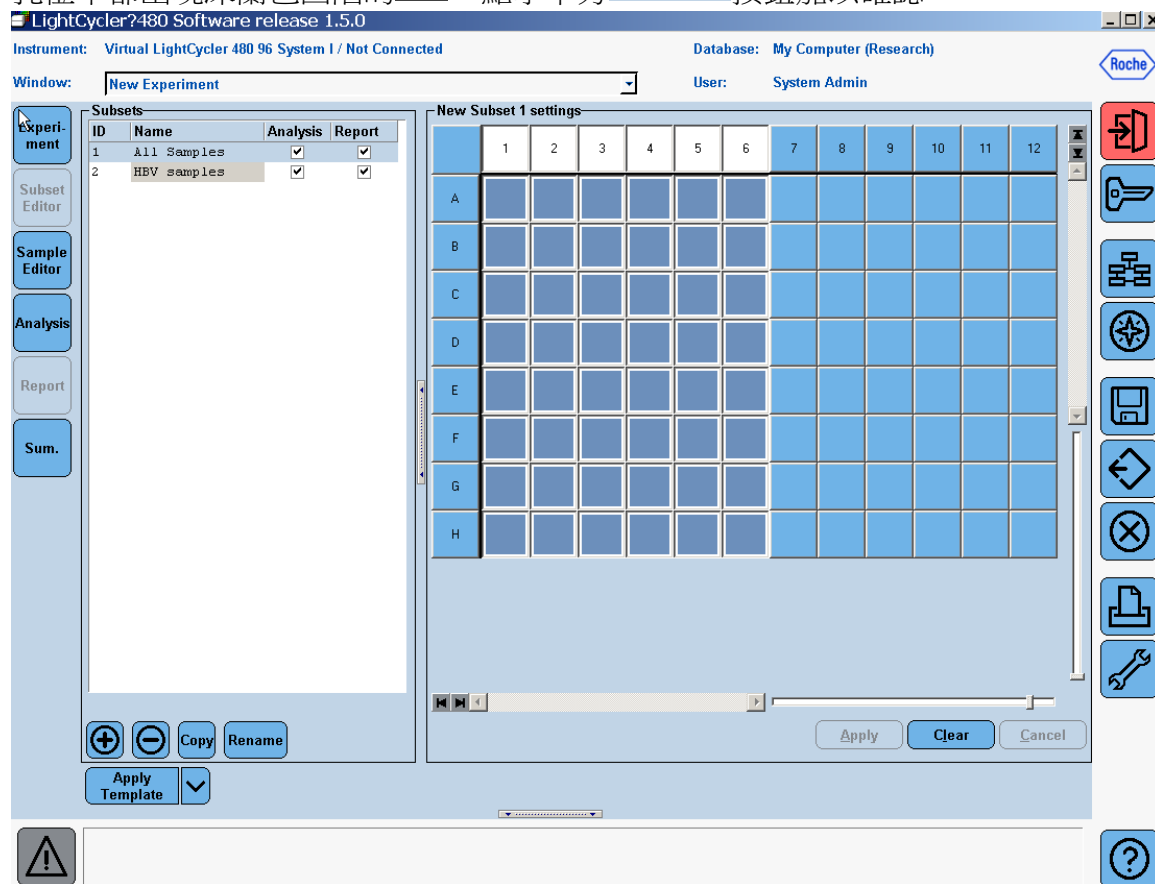
設置好的實驗程序可以保存成模板文件，下次使用同樣的實驗程序時可以調用。

具體操作如下：點擊  按鈕右側的下拉箭頭，選中「Save As Template」選項，系統默認將實驗程序模板文件保存在所登入的用戶名下「Templates」目錄中，用戶可將其存放在其下的子目錄「Run Templates」下，填寫該程序模板文件的名稱，點擊「✓」按鈕即完成保存。調用模板程序時可點擊「Apply Template」按鈕，從目錄樹中選定所要調用的模板，點擊「✓」按鈕確認。

## 五、樣本設置


1. 樣本子集編輯：LightCycler480 軟體擁有一個獨特的樣本編輯管理功能——亞組編輯（Subset Editor），即將反應板上所有的樣本根據用戶需要分成亞組，對亞組進行獨立地分析定量。具體操作如下：

在「New Experiment」界面中，點擊左側 **Subset Editor** 按鈕，進入 Subset 設置界面，點擊 **+** 按鈕新建亞組，並給其命名。點擊 **Copy** 按鈕可複製所選定的亞組，點擊 **Rename** 按鈕可更改所選定亞組的名稱，點擊「Delete」按鈕可刪除所選定的亞組。設置亞組：在 Subsets 界面中選定要設置的亞組名，在右邊反應板孔位處選定該亞組所包含的孔位，使所選定的孔位中都出現深藍色凹陷的 ，點擊下方 **Apply** 按鈕加以確認。



設置亞組可以在一塊反應板上實現多個檢測項目的實驗，前提是這些檢測項目的實驗運程序都一致（這在使用 TaqMan 水解探針時比較容易實現），由於各檢測項目均有各自的質控對照，因而，設定亞組可以單獨對各檢測項目進行分析。

## 2. 樣本屬性編輯

點擊 **New Experiment** 界面左側  按鈕設置樣本信息。

在「Workflow」一欄在選擇實驗方案：

Abs Quant：絕對定量或定性分析；Rel Quant：相對定量；Scanning：基因掃描；Color Comp：顏色補償；Tm：熔解溫度檢測；Melt Geno：熔解曲線法基因分型；Endpt Geno：終點法基因分型。

**Step 1: Select Workflow**

☐ Abs Quant    ☐ Rel Quant    ☐ Scanning    ☐ Color Comp  
☐ Tm    ☐ Melt Geno    ☐ Endpt Geno

在 Select Samples/Subset 選項中選定待編輯的樣本亞組：

**Step 2: Select Samples**

Subset: HBV samples

在界面右方編輯各樣本的名稱屬性等：

Pos：樣本在 96 孔板或 384 孔板上的座標位置；Repl Of：重複樣本設置；

Sample Name：樣本名稱；Quantification Sample Type：定量樣本類型；Concentration：濃度；Target Name：檢測類型。

**Select Filter Combinations**

☒ 483-533    ☐ 558-610

**Abs Quant**

Units

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration	Target Name
A1			STD1	Standard	1.00E2	HBV
A2			STD2	Standard	1.00E3	HBV
B1			STD3	Standard	1.00E4	HBV
B2			STD4	Standard	1.00E5	HBV
C1			NC	Negative Control		HBV
C2			Positive	Positive Control		HBV
D1		D1	Sample1	Unknown		HBV
D2		D1	Sample1	Unknown		HBV
E1		E1	Sample2	Unknown		HBV
E2		E1	Sample2	Unknown		HBV
F1		F1	Sample3	Unknown		HBV
F2		F1	Sample3	Unknown		HBV
G1		G1	Sample4	Unknown		HBV
G2		G1	Sample4	Unknown		HBV
H1		H1	Sample5	Unknown		HBV
H2		H1	Sample5	Unknown		HBV



在進行絕對定量檢測實驗時，參與實驗的樣本有標準品（一般 4 至 5 個）、陰性對照、陽性對照、未知樣本。各樣本的名稱可參考以上「Sample Name」中的命名習慣（STD 表示標準品、NC 表示陰性對照、Positive 表示陽性對照、Sample 表示待檢測的未知樣本），也可以自行編輯。

















在「Quantification Sample Type」一欄內需要對各樣本的類型進行明確地編輯（標準品選 Standard 類型、陰性對照選 Negative Control 類型、陽性對照選 Positive Control 類型、未知樣本選 Unknown 類型），此外標準品系已知濃度的陽性樣本，其設定為 Standard 類型後還需在 Concentration 一欄中對各標準品分別設定其相應的濃度，以及在 Abs Quant/Units 填寫框中填寫相應的濃度單位，如 copies、pg 等。

在 Target Name 一欄中可以填寫該檢測實驗所要檢測的指標，如乙肝病毒、禽流感病毒、沙門氏菌等。

如在實驗中需要設置重複樣本的，可在 Repl Of 一欄中填寫該樣本其所重複的樣本的座標號（注意，只能填寫座標號，不能填寫樣本名）。


如進行的是多色螢光 PCR 檢測實驗，則在 Select Filter Combinations 一欄中選定各檢測通道，分別進行樣本編輯。

在進行定性檢測實驗時，參與實驗的樣本有陰性對照、陽性對照、未知樣本。設置相應較簡單，可參考以下設置

Select Filter Combinations					Abs Quant	
<input checked="" type="checkbox"/> 483-533 <input type="checkbox"/> 558-610					Units <input type="text"/>	
Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration	Target Name
A1			Sample1	Unknown		AIV
A2			Sample2	Unknown		AIV
B1			Sample3	Unknown		AIV
B2			Sample4	Unknown		AIV
C1			Sample5	Unknown		AIV
C2			Sample6	Unknown		AIV
D1			Sample7	Unknown		AIV
D2			Sample8	Unknown		AIV
E1			Sample7	Unknown		AIV
E2			Sample8	Unknown		AIV
F1			Sample9	Unknown		AIV
F2			Sample10	Unknown		AIV
G1			Sample11	Unknown		AIV
G2			Sample12	Unknown		AIV
H1			+	Positive Control		AIV
H2			-	Negative Contr		AIV




## 六、實驗運行

實驗程序和樣本均設置完畢後，即可運行實驗，具體操作：進入「New Experiment」界

面，點擊左側  按鈕，如反應板已經放入儀器，儀器主機正面右側的 LED 燈會由桔黃色變為綠色，軟體界面右下邊的這時點擊「Start Run」按鈕，軟體界面跳出一對話框提示用戶給該實驗文件命名，以保存實驗結果。一般建設用戶以時間命名，以方便日後查找實驗結果，如 20080816-HBV-1，20080817-AIV-2 等。命名後點擊確認鍵，儀器就開始運行了，在運行過程中可觀察到溫度和螢光信號的變化曲線。如進行多重螢光 PCR 實驗，可在螢光歷史「Fluorescence History」界面內上的下拉菜單中切換不同的檢測通道，以分別觀察其擴增情況。

在實驗運行過程中，用戶可以根據需要，點擊「+ 10 Cycles」按鈕增加正在運行的程序 10 個循環，也可以點擊「End Program」按鈕終止正在運行的子程序，直接進入下一個子程序。

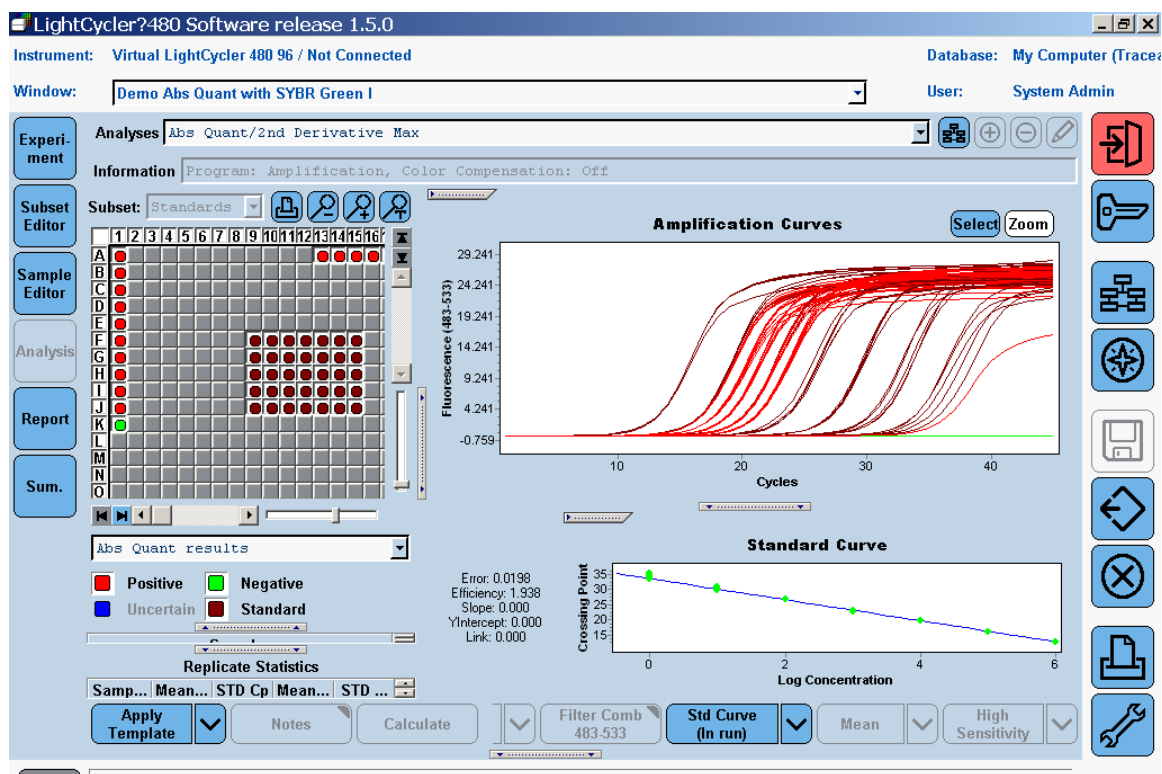
## 七、資料分析（定性和定量）

實驗運行完畢後，點擊界面左側的  按鈕分析數據。或者打開 LightCycler480 軟體，成功登入後點擊右側  圖標，進入 Navigator 導航界面，在目錄樹內選定之前已完成的實驗文件，點擊下方「Open」按鈕，或雙擊文件名打開實驗文件，點擊左側  按鈕，進入分析界面。

在「Create new analysis」窗口內顯示了可使用的分析方法，在「Open existing analysis」窗口內顯示已經進行分析的結果內容。

要進行定性和定量分析可以選擇 Abs Quant 分析功能，其有兩種分析模式，2nd Derivative Max 二階最大求導法和 Fit Points 點擬合法。選定分析功能類型後會跳出對話框，用戶可以自行選擇分析類型、選擇要分析的亞組（Subset），以及命名分析結果（Name）。點擊「✓」按鈕確認。

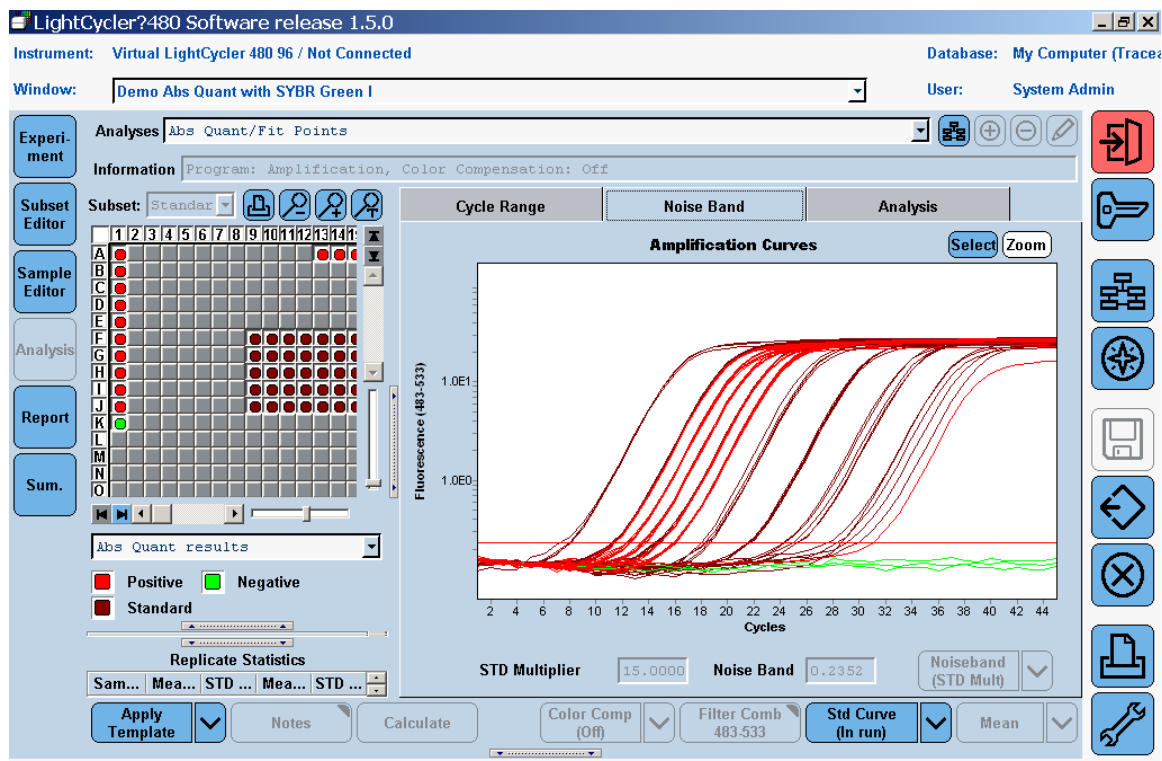
在 Analysis 界面中選擇 Abs Quant / 2nd Derivative Max，點擊「Calculate」按鈕，生成 Cp 值，如實驗中有標準品，則同時生成標準曲線，並且計算出各未知樣本的濃度值。該方法在各種分析方法中優化得比較成熟，適合於反應信號背景值較低時使用。



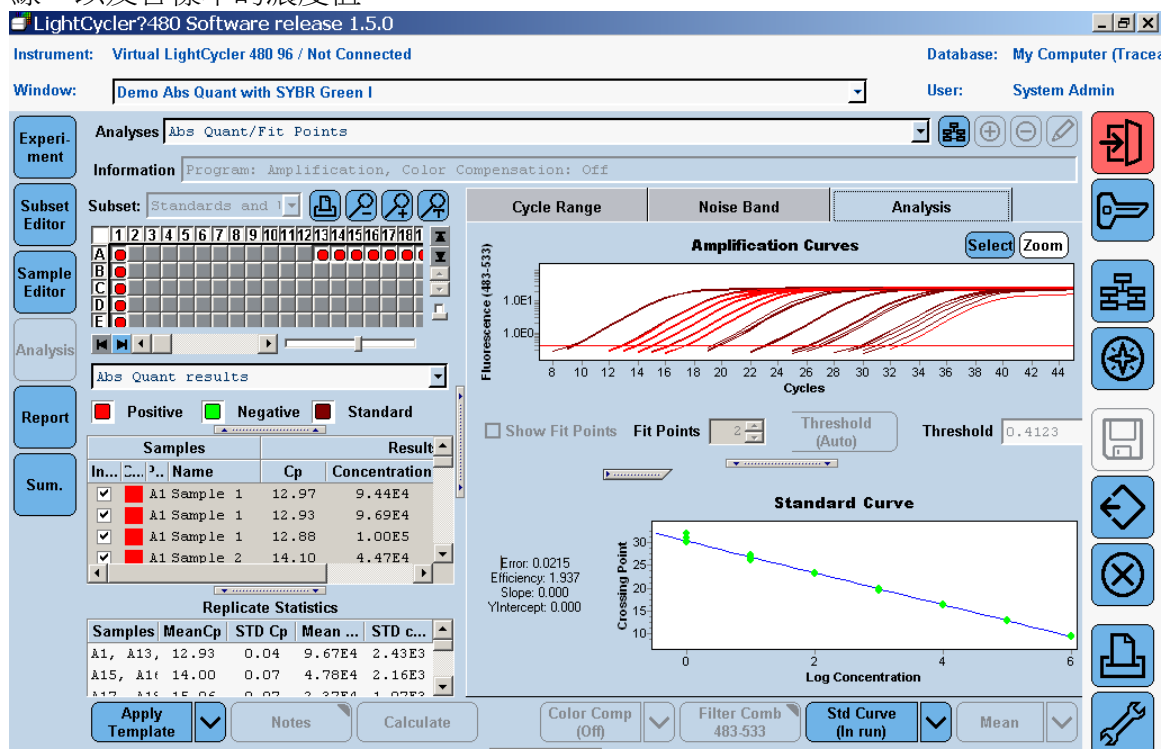
有時從原始螢光曲線能觀察到有個別樣本的曲線不正常，信號噪音比較高，則可選用 Fit Points 點擬合法加以人工調整。具體操作如下：

在 Analysis 界面中選擇 Abs Quant/Fit Points，在「Cycle Range」中 First Cycle 和 Last Cycle 兩欄分別設置分析數據的起始和終止循環數。選定具體數據後，軟體只分析該區間內的實驗曲線。「Background」一欄設置螢光信號本底的區域，一般將螢光值呈 S 形曲線增長前趨於水平的循環區域作為背景本底區。

點擊「Noise Band」按鈕，上下移動紅色的噪音本底線來消除個別樣本由於信號噪音較高而對結果造成的影響。一般將紅線置於盡可能低，但又要足以蓋過陰性線和曲線不平的噪音線，與螢光信號曲線交於線性增長區。軟體只分析紅色噪音本底線上方的曲線數據，所以要確保其上方無曲折不平的噪音信號。




點擊「Analysis」按鈕，再點擊「Threshold」按鈕，使用顯示「Auto」字樣，然後點擊下方 **Calculate** 按鈕，生成各樣本的 CP 值。若是定量分析，則會生成各標準曲線，以及各樣本的濃度值。




點擊軟體右側的  圖標，將分析結果保存入實驗文件，或在目錄樹中另找保存位置。

在進行多色螢光 PCR 實驗時，同時使用相鄰兩個檢測通道進行檢測需要通過顏色補償功能來校正相鄰通道的螢光信號干擾，詳見顏色補償一章。

## 八、報告生成

打開一個分析完結果的文件，或者剛分析完結果並貯存後，點擊左側工具欄中  按鈕，進入結果報告的界面。可在「General」和「Detailed」兩欄中選擇實驗報告所要包含的內容。「General」一欄中顯示的選項為本次實驗結果均需要顯示的報告參數；「Detailed」一欄則顯示本次實驗多次分析中所要的報告參數的明細。點擊「Generate」按鈕，生成報告預覽。點擊右上方「PDF」按鈕可將報告保存為\*.pdf 文件。


報告顯示所包括的內容可以保存成模板文件，同類報告要求的實驗可以調用同的報




告模板。在「General」和「Detailed」兩欄中選定了內容後點擊下方  按鈕右側的下拉箭頭，點擊「Save As Template」將其保存至 Templates/Report Templates 目錄下，點擊「✓」按鈕確認。調用報告模板時點擊「Apply Template」按鈕，選定模板文件，點擊「✓」按鈕確認。


## 九、數據導出與導入

該軟體所產生的實驗數據均保存在其自帶的數據庫中，從 Windows 操作系統中無法找到其實驗數據的文件。這樣可以很好地保護實驗文件不被誤刪和竊取。如用戶希望將實驗結果備份保存，可以將數據從數據庫中導出生成可見的文件，保存於其它電腦中或本電腦的其它目錄下。同時，也可以將實驗文件導入數據庫查看文件內容或對文件進行分析。


導出單個實驗文件的方法：打開 LightCycler480 軟體，成功登入後點擊右側圖標，進入

Navigator 導航界面，在目錄樹內選定實驗文件，點擊下  按鈕，選擇保存文件的目錄位置，點擊「Save」按鈕將文件導出。

導出整個文件夾中所有文件的方法：打開 LightCycler480 軟體，成功登入後點擊  圖標，進入 Navigator 導航界面，在目錄樹內選定要導出文件所在的文件夾，點擊  按鈕，在「Select Folders」一欄中選定保存預導出文件的目錄，點擊 

按鈕，將所要導出的文件目錄均選至右側對話框，點擊  進入「Target」界面，點擊「Browse」按鈕選定導出的文件所要存放的目錄，點擊「Next」按鈕進入「Options」界面，去除不需要導出的文件前的「√」，用戶也可設定導出文件的限制。點擊「Next」按鈕，進入「Start」界面，點擊「Next」按鈕，軟體顯示文件導出的過程和狀態，完成後進入「Done」界面，顯示導出文件的報告。點擊「Done」按鈕確認。

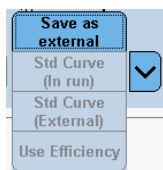
導入單個文件的方法：打開 LightCycler480 軟體，成功登入後點擊右  圖標，進入 Navigator 導航界面，在目錄樹內選定實驗文件，點擊下方「Import」按鈕，選定所要導入的文件，點擊「Open」按鈕，即導入該文件。

導入整個文件夾中所有文件的方法：打開 LightCycler480 軟體，成功登入後點擊右  圖標，進入 Navigator 導航界面，在目錄樹內選定實驗文件，點擊下方「Batch Import」按鈕，進入「Source」界面，點擊「Add」按鈕選定待導入的文件所在的文件夾，點擊「Next」按鈕，進入「Target」界面，選定放置導入文件的文件夾，點擊「Next」按鈕進入「Start」界面，點擊「Next」按鈕，進入「Status」界面，開始導入文件，最後進入「Done」界面，生成導入文件報告，點擊「Done」確認。

## 十、導入外部標準曲線 (單點定標)

同一種同一批號的試劑盒以相同的反應程序進行多輪定量檢測實驗時，無須每次都做四至五個標準品來作標準曲線。第一輪檢測實驗成功完成後，可以將該實驗產生的標準曲線保存下來，下一輪檢測實驗時，只需選與第一輪實驗對應的一種濃度的標準品參與實驗即可。在分析數據時可以調用第一輪的標準曲線進行定量。

標準曲線的保存：使用四至五個標準品以及多個未知樣本進行檢測實驗後，分析數據，最終得到數據結果後，點擊標準曲線下方「Std Curve (In run)」右側下拉箭頭



，選中「Save as external」選項。命名標準曲線，並將其保存於 Special Data\Std Curve 文件夾下，點擊「√」按鈕確認。

已有標準曲線的調用：在使用單點定標的檢測實驗中，所選用的一個標準品仍然定義為「Standard」類型，並且其濃度在已有的標準曲線濃度範圍之內。在分析數據時，一開始無標準曲線生成，點擊「Standard Curve(In Run)」按鈕右側下拉箭頭，選中「Std



Curve(external)」選項，雙擊所要調用的標準曲線文件，點擊「Calculate」按鈕，即可調用先前實驗中的標準曲線進行本次實驗的定量分析。

注意：保存標準曲線文件時所採用的分析模式必須與調用標準曲線時的分析模式一致才能成功調用標準曲線。

## 十一、相對定量實驗設計和分析


進行相對定量實驗時要注意，一般而言，每個樣本均做三個重複，以得到標準誤的數據，進行相對定量實驗時樣本編輯最關鍵，樣本編輯正確了，分析數據便可以一鍵完成。




































### 1. 基礎相對定量 (Basic relative quantification)

所謂相似相對定量是指默認 House keeping 基因和 Target 基因這兩對 primer 的 PCR 擴增效率均為 2.00 時進行的相對定量的算法，其主要是以  $C_p$  值的差值來推算濃度的差異。PCR 手冊規定，靶基因和看家基因這兩對引物的 PCR 擴增效率差異不超過 0.1 的情況下，可進行相似相對定量計算，看一下某基因 mRNA 水平表達量變化的趨勢，如果其擴增效率差異超過 0.1，則不能使用相似相對定量算法（否則在很多期刊發文章時會被要求補實驗或重新做定量實驗）。

出現這種情況時，方法一：重新設計引物，優化反應體系，使擴增效率差異小於 0.1；方法二：採用準確相對定量算法，見列 “Advanced relative quantification”。

進行相似相對定量時，可同時設定多個靶基因跟同一個看家基因進行比較。如下圖：三個樣本，分別用一個看家基因 Reference Gene，兩個不同靶基因 Target A 和 Target B 進

行相對定量。在建立了含有所有本次實驗中檢測樣本孔位的 Subset 後，點擊  按鈕，在 Rel Quant 相對定量界面內設置樣本信息。

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentration	Target Name	Efficiency
A1		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene	2.00
A2		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene	2.00
A3		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene	2.00
A4		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A5		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A6		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A7		A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A8		A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A9		A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A10		A10	NC	Ref Negative		Reference Gene	2.00
A11		A10	NC	Ref Negative		Reference Gene	2.00
A12		A10	NC	Ref Negative		Reference Gene	2.00
B1		B1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene A	2.00
B2		B1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene A	2.00
B3		B1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene A	2.00
B4		B4	Sample2	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B5		B4	Sample2	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B6		B4	Sample2	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B7		B7	Sample3	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B8		B7	Sample3	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B9		B7	Sample3	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B10		B10	NC	Target Negative		Target Gene A	2.00
B11		B10	NC	Target Negative		Target Gene A	2.00
B12		B10	NC	Target Negative		Target Gene A	2.00
C1		C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B	2.00
C2		C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B	2.00
C3		C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B	2.00
C4		C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C5		C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C6		C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C7		C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C8		C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C9		C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C10		C10	NC	Target Negative	▼	Target Gene B	2.00
C11		C10	NC	Target Negative		Target Gene B	2.00
C12		C10	NC	Target Negative		Target Gene B	2.00

在 Repl of 一欄中填寫其所要重複試驗的樣本的座標號，如在 A2 和 A3 位進行 A1 位樣本的兩次重複試驗，則在 A2 和 A3 位的 Repl of 一欄填寫 A1 即可。

在 Sample Name 一欄填寫樣本名，注意，只要是加同一模板的反應孔位，均給其命名為相同的樣本名。例如 A1、B1、C1 孔位，雖然用不同的引物分別擴增不同的基因，但所加的樣本模板是相同的，所以在 Sample Name 一欄中填寫相同的樣本名，可以用鍵盤「Ctrl+C」複製 Reference Gene 的樣本名，然後用鍵盤「Ctrl+V」粘貼至 Target Gene A 和 Target Gene B 的樣本名中，以確保所命名一致。另外，一定要設置陰性對照實驗組，即其它反應體系均不變，只是不加 PCR 模板的質控，一般命名為 NC 或 NTC (No Template Control)


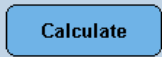
在 Sample Type 一欄中分別選擇各樣本的不同類型。看家基因的檢測孔位均選擇帶有 Reference 的類型，靶基因的檢測孔位均選擇帶有 Target 的類型，如上圖。其中將 Sample1 的類型選為 Calibrator 即標準樣本，在相對定量計算時，其它樣本均與該標準樣本進行比較，以得到基因表達量更多或更少的數據。一般可以將實驗中的空白對照樣本



選為標準樣本，例如用不同的藥物 A、B、C 處理一批細胞，其它有一批細胞是正常培養，沒有處理的，則沒有用藥物處理的細胞可設為標準樣本 **Calibrator**，其它用藥組樣本均與該樣本進行比較。而這些處理組的樣本類型均可以選定為 **Unknown**，檢測看家基因的孔位類型選為 **Reference Unknown**，檢測靶基因的孔位類型選為 **Target Unknown**。陰性對照樣本可根據其所用引物的不同選定類型為 **Reference Negative** 和 **Target Negative**。

在 **Target Name** 一欄中填寫檢測的基因名，如以 **B-actin** 作為看家基因的話，在所有看家基因樣本的 **Target Name** 一欄均填寫 **B-actin**；而靶基因以此類推，如上圖。

**Efficiency** 默認為 **2.00**。將以上樣本編輯完成後，設置 **PCR** 反應程序，即可運行儀器，進行實驗。

實驗結束後，可點擊左側的  按鈕，進入分析界面，選擇 **Relative Quantification** 分析數據，點擊  按鈕即可生成相對定量的數據。































注意，如果陰性對照 **Negative** 樣本產生了擴增曲線，軟體會判定該實驗失敗，採用 **SYBR Green I** 進行實驗時，由於不可避免(很容易)地產生一些非特異擴增和引物二聚體現象，往往會導致軟體無法計算出結果，這個時候可以將陰性對照樣本的類型改為 **Target Unknown** 或 **Reference Unknown** 來看一下實驗的分析結果。但出現陰性對照樣本產生陽性擴增曲線的現象時，一定要進行 **Tm Calling** 分析，看一下熔解曲線峰，以進一步分析所造成的原因。如果其熔解曲線與 **PCR** 目標擴增產物峰的 **Tm** 值一致，即試劑被陽性 **PCR** 擴增片段污染，所得定量結果不準確，要解決該污染問題後重新進行實驗；如果陰性樣本的熔解曲線峰與 **PCR** 目標擴增產物峰的 **Tm** 值不一致，則有可能是引物二聚體或非特異擴增產物的原因，其同樣影響定量結果，要想辦法優化實驗排除其影響。

另外，如果 **Calibrator** 標準樣本的看家基因和靶基因無擴增的話，也會導致軟體無法計算出結果。

## 2、進階相對定量 (Advanced relative quantification)

所謂準確相對定量是指採用 **PCR** 擴增效率校正的相對定量算法，其將 **House keeping gene** 和 **target** 基因的 **PCR** 擴增效率的具體值計算出來後，參與至定量計算中，因而其結果更能夠體現實際的情況。

其設置大致與相似相對定量相同，只是樣本類型處多了標準品，如下：

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentration	Target Name
A1		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A2		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A3		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A4		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A5		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A6		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A7		A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene
A8		A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene
A9		A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene
A10		A10	STD1	Ref Standard	1.00E0	Reference Gene
A11		A10	STD1	Ref Standard	1.00E0	Reference Gene
A12		A10	STD1	Ref Standard	1.00E0	Reference Gene
B1		B1	STD2	Ref Standard	1.00E1	Reference Gene
B2		B1	STD2	Ref Standard	1.00E1	Reference Gene
B3		B1	STD2	Ref Standard	1.00E1	Reference Gene
B4		B4	STD3	Ref Standard	1.00E3	Reference Gene
B5		B4	STD3	Ref Standard	1.00E3	Reference Gene
B6		B4	STD3	Ref Standard	1.00E3	Reference Gene
B7		B7	STD4	Ref Standard	1.00E4	Reference Gene
B8		B7	STD4	Ref Standard	1.00E4	Reference Gene
B9		B7	STD4	Ref Standard	1.00E4	Reference Gene
B10		B10	NC	Ref Negative		Reference Gene
B11		B10	NC	Ref Negative		Reference Gene
B12		B10	NC	Ref Negative		Reference Gene
C1		C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B
C2		C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B
C3		C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B
C4		C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B
C5		C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B
C6		C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B
C7		C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B
C8		C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B
C9		C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B
C10		C10	STD1	Target Standard	1.00E0	Target Gene B
C11		C10	STD1	Target Standard	1.00E0	Target Gene B
C12		C10	STD1	Target Standard	1.00E0	Target Gene B
D1		D1	STD2	Target Standard	1.00E1	Target Gene B
D2		D1	STD2	Target Standard	1.00E1	Target Gene B
D3		D1	STD2	Target Standard	1.00E1	Target Gene B
D4		D4	STD3	Target Standard	1.00E3	Target Gene B
D5		D4	STD3	Target Standard	1.00E3	Target Gene B
D6		D4	STD3	Target Standard	1.00E3	Target Gene B

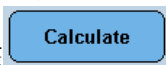
樣本檢測中增加了 STD1、STD2、STD3、STD4 四個「標準品」，其在看家基因檢測中的樣本類型為 Ref Standard，在靶基因檢測中的樣本類型為 Target Standard，在 Concentration 一欄中分別填寫這些「標準品」的濃度（這些濃度不是準確的濃度，這些標準品的濃度也是未知的，可以仍選一個樣本，進行十倍梯度稀釋，分別用看家基因和靶基因的引物對這些稀釋產生的模板進行擴增，而對這些在 Concentration 中填寫的濃度只要體現出這些樣本的十倍濃度差即可，即 1、10、100、1000 或 1、0.1、0.01、0.001

等)。軟體可以通過這些「標準品」作出標準曲線，計算得到相應引物的 PCR 擴增效率。

實驗結束後同樣點擊軟體界面左側的



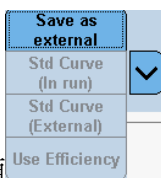
Quantification 分析數據，點擊



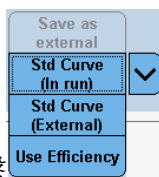
按鈕即可生成相對定量的數據。

注意，所選用的「標準品」如有幾個低濃度的無擴增，會影響標準曲線的生成，導致軟體無法生成數據，因而盡可能選用起始濃度較高樣本進行梯度稀釋。

也可以在進行相似相對定量實驗以後，選用起始濃度最高的樣本進行梯度稀釋，計算出 PCR 的擴增效率，然後將該標準曲線保存（在標準曲線下方點擊「Std Curve (In run)」



右側的下拉箭頭 選擇 Save as external 即可保存），打開前一輪相似相對定量



的實驗結果，在分析界面中點擊「Std Curve (In run)」圖標右側的下拉箭頭，選擇「Std Curve (External)」調用已保存的標準曲線，以使得各引物的擴增效率參與相對定量計算。這樣可避免重複實驗。