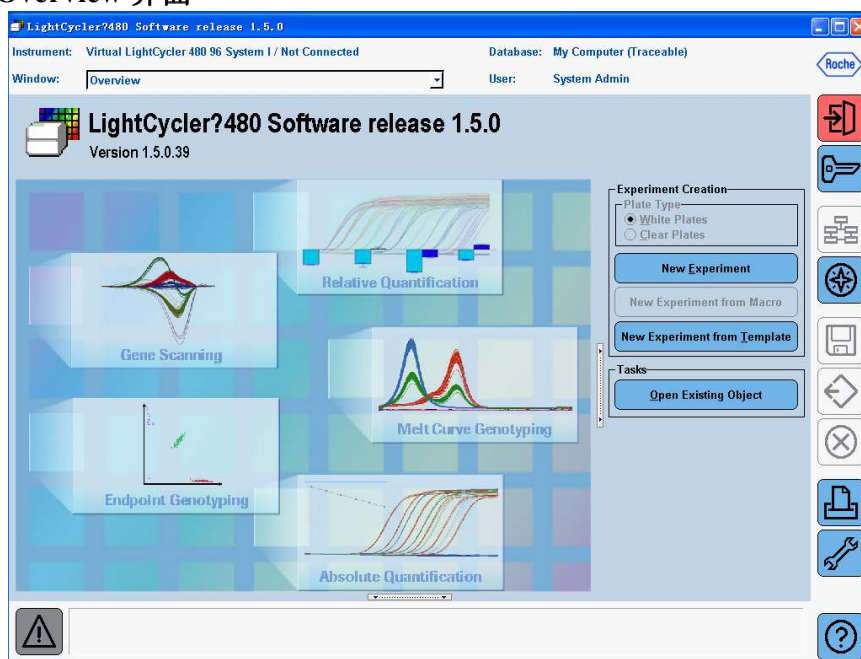


LightCycler480 Software 1.5 软件操作（中文版）

第一部分 基本界面及图标

概述：

一、 Overview 界面



Exit: 关闭 LC480 软件



Log off: 从目前使用的数据库中退出并可登陆其他的数据库



Overview: 点击该图标进入“Overview”界面



Navigator: 点击该图标进入“Navigator”界面，可进行数据的导入导出等操作，详见。。。。。



Save: 点击该图标进行保存



Export: 导出当前打开的文件



Close: 关闭当前打开的文件



Print: 打印当前打开的窗口

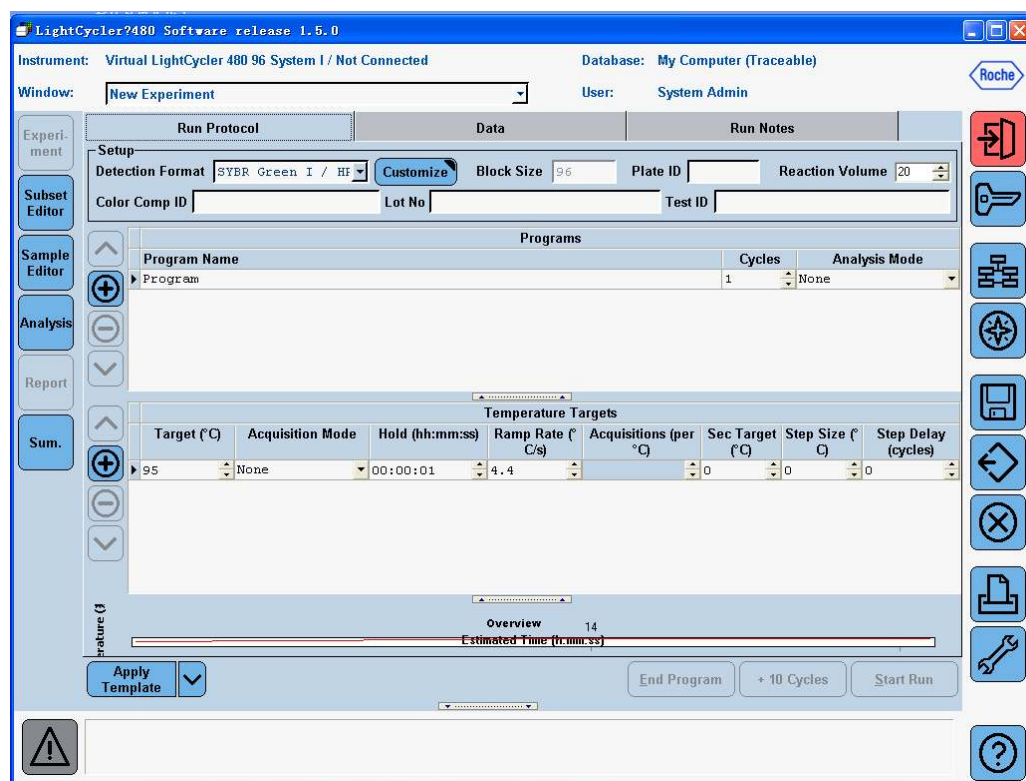


Tools: 打开“Tools”界面，可进行密码修改，建立和编辑用户，系统设置，查看数据库状态、仪器状态、滤光片组合等操作



Help: 查看软件版本，操作说明书等

二、New Experiment 界面



Run Module: 编辑、运行或查看 PCR 程序及查看 PCR 实时数据



Subset Editor: 点击该模块后可进行子集的编辑



Sample Editor: 点击后进行样品信息的编辑



Analysis Module: 点击进行结果分析或查看已保存的分析结果

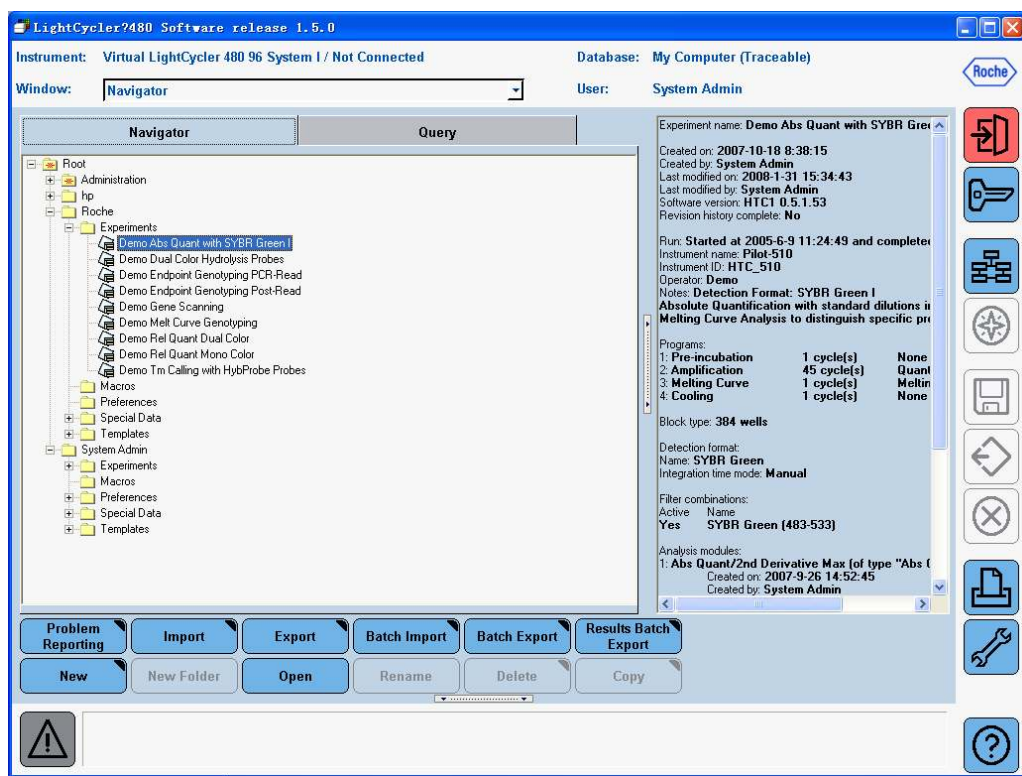


Report Module: 选择需要的内容以报告的形式给出结果



Summary Module: 查看实验的总体概况，包括实验名称，所用的程序，检测模式，滤光片组合等。概况的内容由系统自动生成

三、Navigator 界面






	Problem reporting
	Import: 导入一个文件
	Export: 导出一个文件
	Batch Import: 导入一批数据
	Batch Export: 导出一批数据
	New: 新建一个实验或文件夹
	New Folder: 新建一个文件夹
	Open: 打开一个文件
	Rename: 重命名
	Delete: 删除选中的目标
	Copy: 拷贝选中的目标

Note: 所有上述图标在深蓝色时为激活状态，灰色时为灭活状态也就是不可用状态。
各图标的功能在不同状态下以颜色来区分是否具备。

软件操作


一. 打开软件

打开电脑，Windows 操作系统的用户名为 operator，密码为 LC480（区分大小写），电脑操作系统启动完毕，检查电脑右下角是否有  图标。如果没有，点击桌面“Exor4 for XDMS_R”快捷方式文件。然后右键点击  图标，左键点击“Show”一栏，如最后一句话显示“Exor 4 server is running”表示数据库加载成功。如果显示“Exor 4 failed to start”则表示数据库没有加载上，关闭该窗口，右键点击  图标，选“Shutdown”一栏，退出数据库，重新点击桌面“Exor4 for XDMS_T”文件，加载数据库。

然后点击桌面“LightCycler480 Software”快捷方式文件，运行该软件。输入用户名和密码。用户名默认为 admin（管理者权限），密码为 LightCycler480（区分大小写），如用户已经建立新用户名，则可以按照新用户名登录。

二. 用户管理

为了实验结果的有效管理，可以建立不同级别的用户。
如：标准用户（Standard User）、专业用户（Expert User）、管理者（Local Administrator）。一般实验室建议建立专业用户（Expert User）用户名，然后以该用户名登录软件进行实验操作。


建立新用户操作：打开 LightCycler480 操作软件，点击右侧  按钮打开“Tools”工具栏，选择“User Access/Users and Groups”选项。在右边窗口中点击“New User”键，在右边“Enter the user’s full name”一栏中填写用户的全名，在“Enter the name the user wants to log in as”一栏填写用户登录名，在“Enter the user’s password”一栏中输入密码（密码须含有 6 个以上字母，1 个以上数字，其中有至少一个字母大写），在“Confirm the password”一栏中重新输入一次密码，加以确认，在“Select the user’s role”一栏中选择用户级别，然后点击右下方“Close”按钮加以确认。

在  “Tools”工具栏中的“System Settings”界面中可以设置各用户级的权限，以及密码的时效。

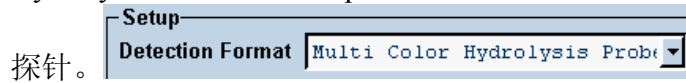
三. 仪器自检

每次开机时，仪器会自动进行初始化自检程序。自检通过，仪器左侧指示灯变绿。如放置了样本，仪器右侧指示灯变绿。在自检时，不能放置反应板，否则自检无法通过。

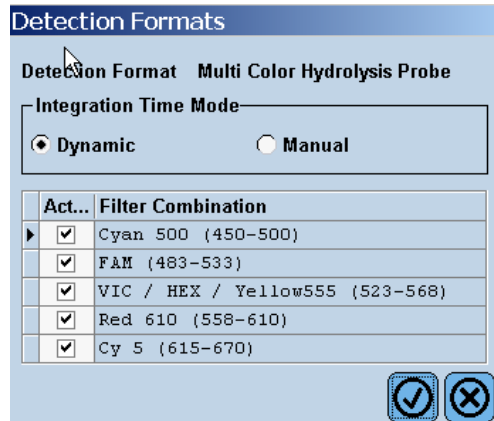
四. 建立实验程序

打开 LightCycler480 操作软件，成功登录后点击  按钮，进入 New Experiment/Run Protocol 程序设置界面。在“Detection Format”一栏中选择所使

用的荧光检测技术，可选择各类探针和染料，如常见的 SYBR Green I 染料、Mono Color Hydrolysis Probe 单色 TaqMan 水解探针、Multi Color Hydrolysis Probe 多色 TaqMan 水解




在进行多色荧光 PCR 实验时，须点击  按钮选择用户所采用的荧光检测通道，点击“√”确认。






在  一栏中填写反应体积。

在“Programs”界面中设置实验程序：在“Program Name”下方命名程序，“Cycles”一栏内填写该程序的循环数，在“Analysis Mode”一栏选择该程序的分析模式。定量分析选择“Quantification”，溶解曲线分析选择“Melting Curves”，颜色补偿实验选择“Color Compensation”。

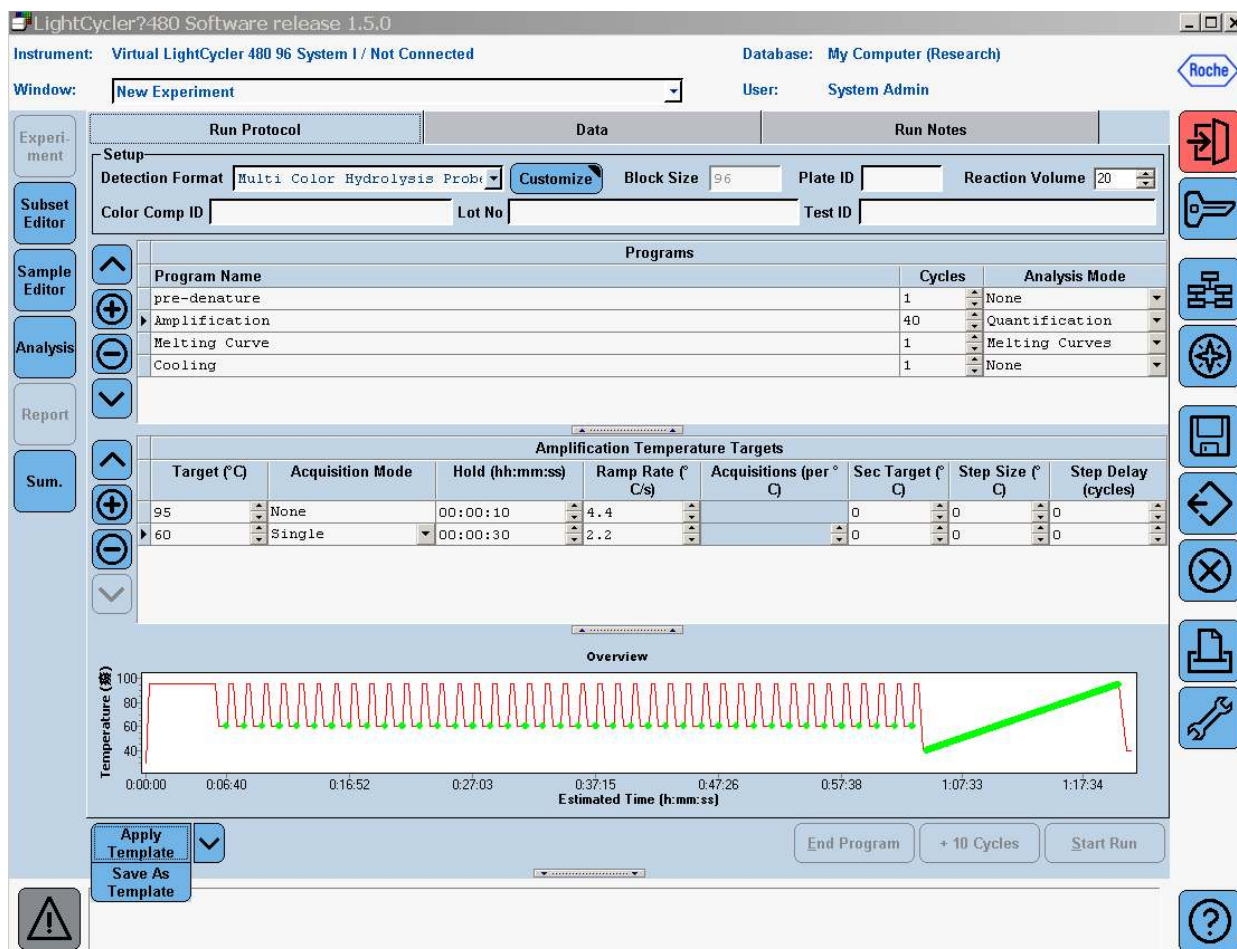
而后在“Temperature Targets”界面内设置所指定程序的内容，在“Target(°C)”处填写目标温度，“Acquisition Mode”处选择信号采集方式，“Hold”一栏填写该温度所持续的时间，“Ramp Rate(°C/s)”处填写升降温速率（注：如目标温度为 50°C 以下时，为了减少硬件的损耗，必须将降温速率调至 1.5°C/s 以下）。如一个程序有多个步

骤，则在 Temperature Targets 界面的左侧处点击 ，增加步骤；也可点击上下箭头


  调整各步骤的先后顺序。如一个实验中有多个程序，也可在“Programs”界面左

侧点击 ，增加程序，也可点击上下箭头调整各程序的先后顺序。

实验程度设置完成后，在下方“Overview”界面内会自动生成温度随时间变化的温控曲线，以及估计的运行时间，绿色点表示采集荧光信号的温度和时间点。可以依照该图检查一下程度设置是否正确。








设置好的实验程序可以保存成模板文件，下次使用同样的实验程序时可以调用。具

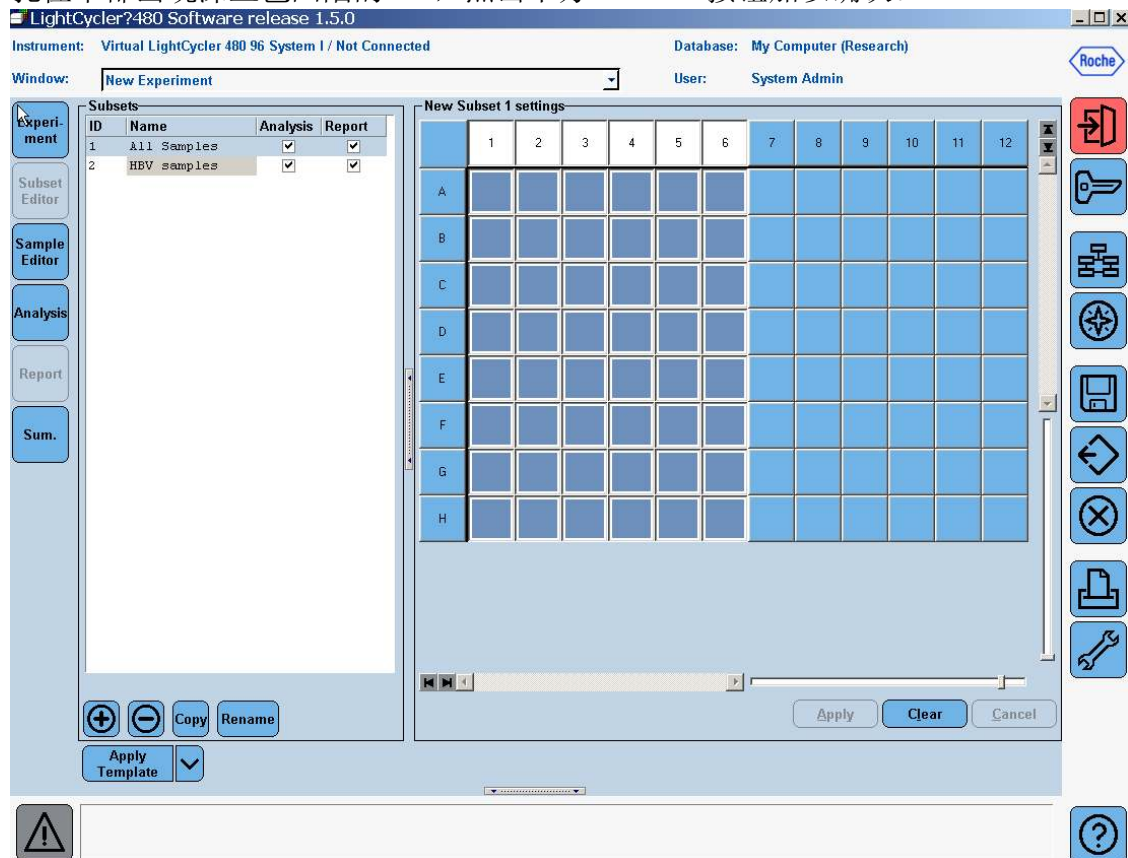
体操作如下：点击  按钮右侧的下拉箭头，选中“Save As Template”选项，系统默认将实验程序模板文件保存在所登录的用户名下“Templates”目录中，用户可将其存放在其下的子目录“Run Templates”下，填写该程序模板文件的名称，点击“√”按钮即完成保存。调用模板程序时可点击“Apply Template”按钮，从目录树中选定所要调用的模板，点击“√”按钮确认。

五. 样本设置

1、样本亚组编辑：LightCycler480 软件拥有一个独特的样本编辑管理功能——亚组编辑（Subset Editor），即将反应板上所有的样本根据用户需要分成亚组，对亚组进行独立地分析定量。具体操作如下：

在“New Experiment”界面中，点击左侧  按钮，进入 Subset 设置界面，点击  按钮新建亚组，并给其命名。点击  按钮可复制所选定的亚组，点击  按钮可更改所选定亚组的名称，点击“Delete”按钮可删除所选定的亚组。设置亚组：在 Subsets 界

面中选定要设置的亚组名，在右边反应板孔位处选定该亚组所包含的孔位，使所选定的孔位中都出现深蓝色凹陷的，点击下方 **Apply** 按钮加以确认。



设置亚组可以在一块反应板上实现多个检测项目的实验，前提是这些检测项目的实验运行程序都一致（这在使用 TaqMan 水解探针时比较容易实现），由于各检测项目均有各自的质控对照，因而，设定亚组可以单独对各检测项目进行分析。

2. 样本属性编辑

点击 New Experiment 界面左侧 **Sample Editor** 按钮设置样本信息。在“Workflow”一栏在选择实验方案：

Abs Quant: 绝对定量或定性分析；Rel Quant: 相对定量；Scanning: 基因扫描；
Color Comp: 颜色补偿；Tm: 熔解温度检测；Melt Geno: 熔解曲线法基因分型；
Endpt Geno: 终点法基因分型。

Step 1: Select Workflow

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

在 Select Samples/Subset 选项选定待编辑的样本亚组：

Step 2: Select Samples

Subset: HBV samples

在界面右方编辑各样本的名称属性等：

Pos: 样本在 96 孔板或 384 孔板上的座标位置；Repl Of: 重复样本设置；

Sample Name: 样本名称；Quantification Sample Type: 定量样本类型；Concentration: 浓度；Target Name: 检测类型。

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

在进行绝对定量检测实验时，参与实验的样本有标准品（一般 4 至 5 个）、阴性对照、阳性对照、未知样本。各样本的名称可参考以上“Sample Name”中的命名习惯（STD 表示标准品、NC 表示阴性对照、Positive 表示阳性对照、Sample 表示待检测的未知样本），也可以自行编辑。

在“Quantification Sample Type”一栏内需要对各样本的类型进行明确地编辑（标准品选 Standard 类型、阴性对照选 Negative Control 类型、阳性对照选 Positive Control 类型、未知样本选 Unknown 类型），此外标准品系已知浓度的阳性样本，其设定为 Standard 类型后还需在 Concentration 一栏中对各标准品分别设定其相应的浓度，以及在 Abs Quant/Units 填写框中填写相应的浓度单位，如 copies、pg 等。

















在 Target Name 一栏中可以填写该检测实验所要检测的指标，如乙肝病毒、禽流感病毒、沙门氏菌等。

如在实验中需要设置重复样本的，可在 Repl Of 一栏中填写该样本其所重复的样本的座标号（注意，只能填写座标号，不能填写样本名）。

如进行的是多色荧光 PCR 检测实验，则在 Select Filter Combinations 一栏中选定各检测通道，分别进行样本编辑。


在进行定性检测实验时，参与实验的样本有阴性对照、阳性对照、未知样本。设置相应较简单，可参考以下设置

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. 运行实验


实验程序和样本均设置完毕后，即可运行实验，具体操作：进入“New


Experiment”界面，点击左侧  按钮，如反应板已经放入仪器，仪器主机正面右侧的 LED 灯会由桔黄色变为绿色，软件界面右下边的这时点击“Start Run”按钮，软件界面跳出一对话框提示用户给该实验文件命名，以保存实验结果。一般建设用户以时间命名，以方便日后查找实验结果，如 20080816-HBV-1，20080817-AIV-2 等。命名后点击确认键，仪器就开始运行了，在运行过程中可观察到温度和荧光信号的变化曲线。如进行多重荧光 PCR 实验，可在荧光历史“Fluorescence History”界面内的下拉菜单中切换不同的检测通道，以分别观察其扩增情况。

在实验运行过程中，用户可以根据需要，点击“+10 Cycles”按钮增加正在运行的程序 10 个循环，也可以点击“End Program”按钮终止正在运行的子程序，直接进入下一个子程序。

七. 数据分析（定性和定量）

实验运行完毕后，点击界面左侧的  按钮分析数据。或者打开 LightCycler480

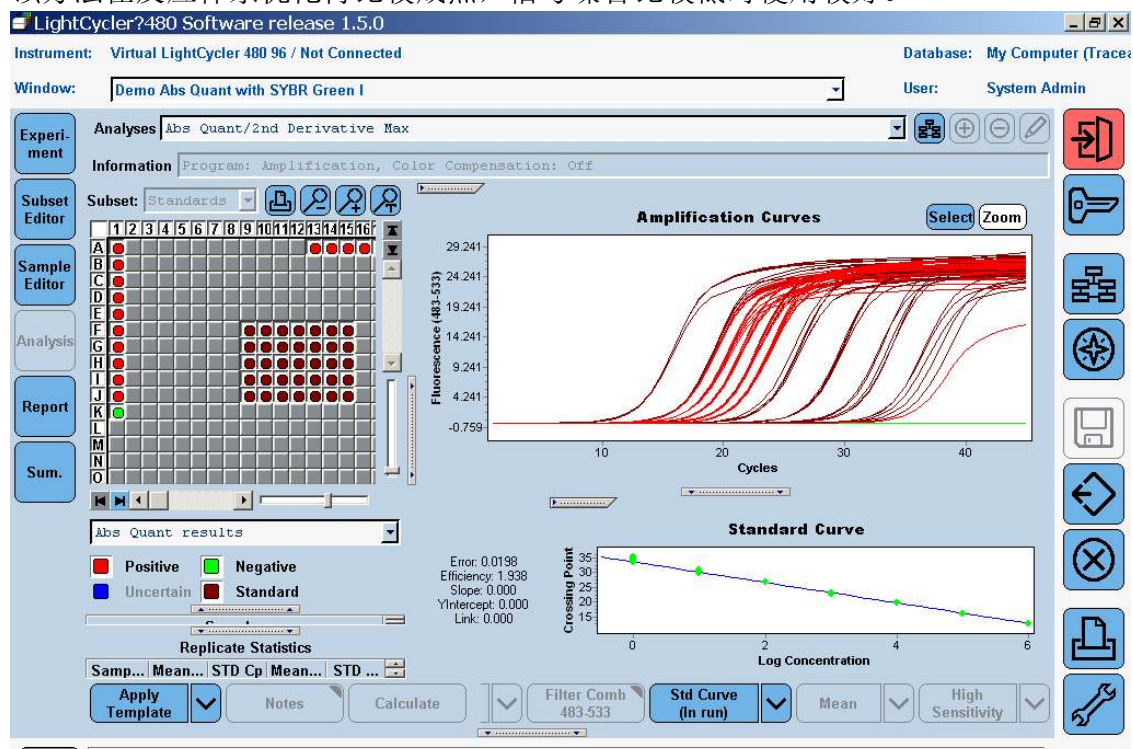
软件，成功登录后点击右侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定之前已完成的实验文件，点击下方“Open”按钮，或双击文件名打开实验文件，点击左侧

 按钮，进入分析界面。

在“Create new analysis”窗口内显示了可使用的分析方法，在“Open existing analysis”窗口内显示已经进行分析的结果内容。

要进行定性和定量分析可以选择 Abs Quant 分析功能，其有两种分析模式， 2^{nd} Derivative Max 二阶最大求导法和 Fit Points 点拟合法。选定分析功能类型后会跳出对话框，用户可以自行选择分析类型、选择要分析的亚组（Subset），以及命名分析结果（Name）。点击“√”按钮确认。

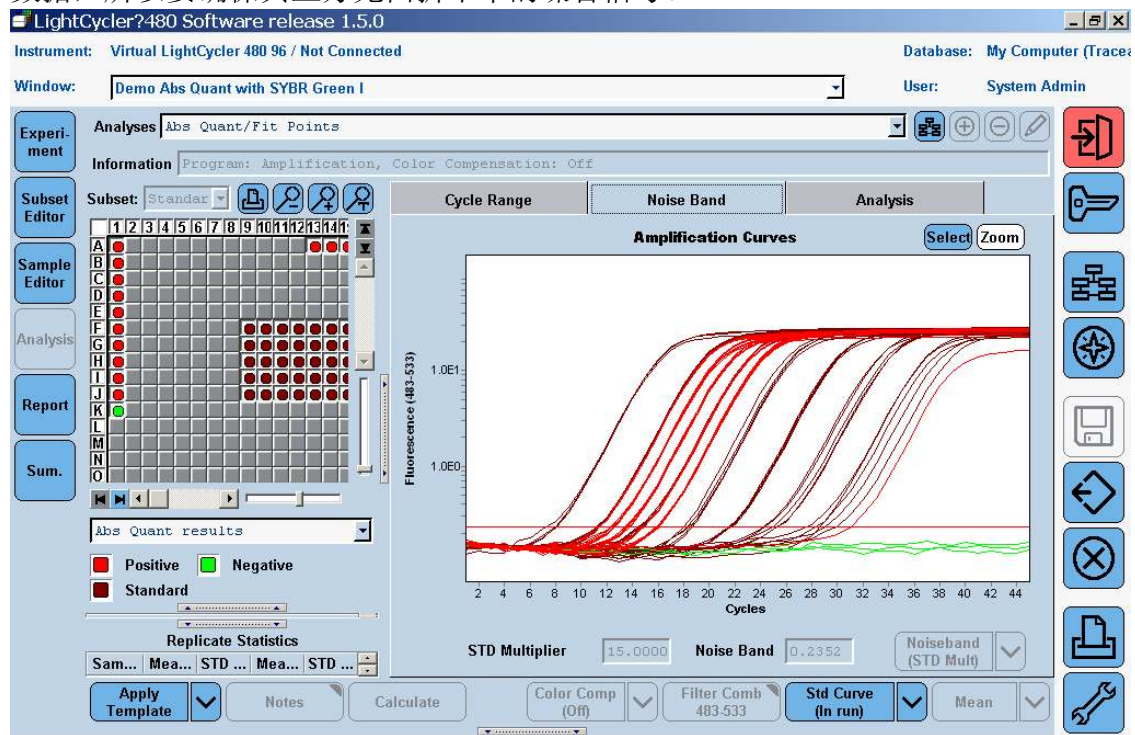
在 Analysis 界面中选择 Abs Quant / 2^{nd} Derivative Max，点击“Calculate”按钮，生成 Cp 值，如实验中有标准品，则同时生成标准曲线，并且计算出各未知样本的浓度值。该方法在反应体系优化得比较成熟，信号噪音比较低时使用较好。



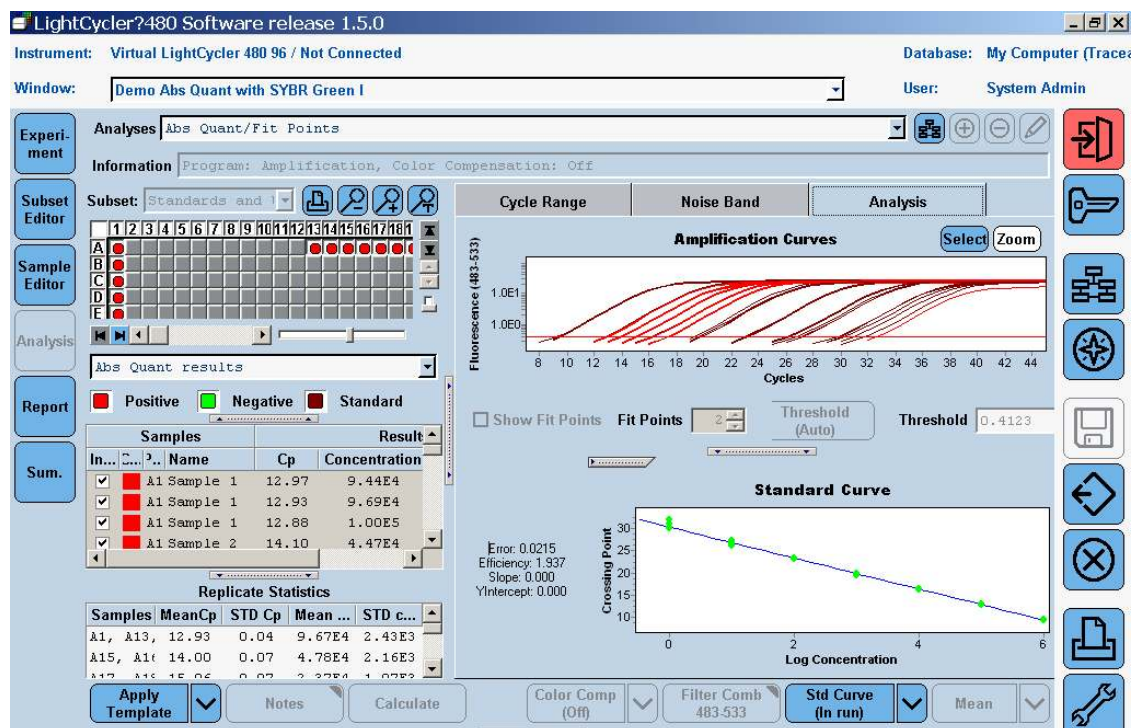
有时从原始荧光曲线能观察到有个别样本的曲线不正常，信号噪音比较高，则可选用 Fit Points 点拟合法加以人工调整。具体操作如下：


在 Analysis 界面中选择 Abs Quant / Fit Points，在“Cycle Range”中 First Cycle 和 Last Cycle 两栏分别设置分析数据的起始和终止循环数。选定具体数据后，软件只分析该区间内的实验曲线。“Background”一栏设置荧光信号本底的区域，一般将荧光值呈 S 形曲线增长前趋于水平的循环区域作为背景本底区。

点击“Noise Band”按钮，上下移动红色的噪音本底线来消除个别样本由于信号噪音较高而对结果造成的影响。一般将红线置于尽可能低，但又要足以盖过阴性线和曲线不平的噪音线，与荧光信号曲线交于线性增长区。软件只分析红色噪音本底线上方的曲线数据，所以要确保其上方无曲折不平的噪音信号。



点击“Analysis”按钮，再点击“Threshold”按钮，使用显示“Auto”字样，然后点击下方 **Calculate** 按钮，生成各样本的 CP 值。若是定量分析，则会生成各标准曲线，以及各样本的浓度值。




点击软件右侧的  图标，将分析结果保存入实验文件，或在目录树中另找保存位置。


在进行多色荧光 PCR 实验时，同时使用相邻两个检测通道进行检测需要通过颜色补偿功能来校正相邻通道的荧光信号干扰，详见颜色补偿一章。

八. 报告生成

打开一个分析完结果的文件，或者刚分析完结果并贮存后，点击左侧工具栏中

 按钮，进入结果报告的界面。可在“General”和“Detailed”两栏中选择实验报告所要包含的内容。“General”一栏中显示的选项为本次实验结果均需要显示的报告参数；“Detailed”一栏则显示本次实验多次分析中所要的报告参数的明细。点击“Generate”按钮，生成报告预览。点击右上方“PDF”按钮可将报告保存为*.pdf 文件。


报告显示所包括的内容可以保存成模板文件，同类报告要求的实验可以调用相同的

报告模板。在“General”和“Detailed”两栏中选定了内容后点击下方  按钮右侧的下拉箭头，点击“Save As Template”将其保存至 Templates/Report Templates 目录下，点击“√”按钮确认。调用报告模板时点击“Apply Template”按钮，选定模板文件，点击“√”按钮确认。




九. 数据导出与导入


该软件所产生的实验数据均保存在其自带的数据库中，从 Windows 操作系统中无法找到其实验数据的文件。这样可以很好地保护实验文件不被误删和窃取。如用户希望将实验结果备份保存，可以将数据从数据库中导出生成可见的文件，保存于其它电脑中或本电脑的其它目录下。同时，也可以将实验文件导入数据库查看文件内容或对文件进行分析。

导出单个实验文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧图标，


进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定实验文件，点击下方  按钮，选择保存文件的目录位置，点击“Save”按钮将文件导出。

导出整个文件夹中所有文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右


侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定要导出文件所在的文件夹，点击  按钮，在“Select Folders”一栏中选定保存预导出文件的目录，点击 

按钮，将所要导出的文件目录均选至右侧对话框，点击  进入“Target”界面，点击“Browse”按钮选定导出的文件所要存放的目录，点击“Next”按钮进入

“Options”界面，去除不需要导出的文件前的“√”，用户也可设定导出文件的限制。点击“Next”按钮，进入“Start”界面，点击“Next”按钮，软件显示文件导出的过程和状态，完成后进入“Done”界面，显示导出文件的报告。点击“Done”按钮确认。

导入单个文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定实验文件，点击下方“Import”按钮，选定所要导入的文件，点击“Open”按钮，即导入该文件。

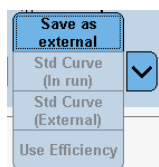
导入整个文件夹中所有文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右

侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定实验文件，点击下方“Batch Import”按钮，进入“Source”界面，点击“Add”按钮选定待导入的文件所在的文件夹，点击“Next”按钮，进入“Target”界面，选定放置导入文件的文件夹，点击“Next”按钮进入“Start”界面，点击“Next”按钮，进入“Status”界面，开始导入文件，最后进入“Done”界面，生成导入文件报告，点击“Done”确认。

十. 单点定标

同一种同一批号的试剂盒以相同的反应程序进行多轮定量检测实验时，无须每次都做四至五个标准品来作标准曲线。第一轮检测实验成功完成后，可以将该实验产生的标准曲线保存下来，下一轮检测实验时，只需选与第一轮实验对应的一种浓度的标准品参与实验即可。在分析数据时可以调用第一轮的标准曲线进行定量。

标准曲线的保存：使用四至五个标准品以及多个未知样本进行检测实验后，分析数据，最终得到数据结果后，点击标准曲线下方“Std Curve (In run)”右侧下拉前头



，选中“Save as external”选项。命名标准曲线，并将其保存于 Special Data\Std Curve 文件夹下，点击“√”按钮确认。

已有标准曲线的调用：在使用单点定标的检测实验中，所选用的一个标准品仍然定义为“Standard”类型，并且其浓度在已有的标准曲线浓度范围之内。在分析数据时，一开始无标准曲线生成，点击“Standard Curve(In Run)”按钮右侧下拉箭头，选中“Std Curve(external)”选项，双击所要调用的标准曲线文件，点击“Calculate”按钮，即可调用先前实验中的标准曲线进行本次实验的定量分析。


注意：保存标准曲线文件时所采用的分析模式必须与调用标准曲线时的分析模式一致才能成功调用标准曲线。








十一．相对定量实验设计和分析

进行相对定量实验时要注意，一般而言，每个样本均做三个重复，以得到标准误的数据，进行相对定量实验时样本编辑最关键，样本编辑正确了，分析数据完全可以一键完成。

1、相似相对定量

所谓相似相对定量是指默认看家基因和靶基因这两对引物的 PCR 扩增效率均为 2.00 时进行的相对定量的算法，其主要是以 C_p 值的差值来推算浓度的差异。PCR 手册规定，靶基因和看家基因这两对引物的 PCR 扩增效率差异不超过 0.1 的情况下，可进行相似相对定量计算，看一下某基因 mRNA 水平表达量变化的趋势，如果其扩增效率差异超过 0.1，则不能使用相似相对定量算法（否则在很多期刊发文章时会被要求补实验或重新做定量实验）。出现这种情况时，方法一：重新设计引物，优化反应体系，使扩增效率差异小于 0.1；方法二：采用准确相对定量算法，见下第 2。

进行相似相对定量时，可同时设定多个靶基因跟同一个看家基因进行比较。如下图：三个样本，分别用一个看家基因 Reference Gene，两个不同靶基因 Target A 和 Target B 进行相对定量。在建立了含有所有本次实验中检测样本孔位的 Subset 后，点击  按钮，在 Rel Quant 相对定量界面内设置样本信息。

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 一栏中填写其所要重复试验的样本的座标号，如在 A2 和 A3 位进行 A1 位样本的两次重复试验，则在 A2 和 A3 位的 Repl of 一栏填写 A1 即可。

在 Sample Name 一栏填写样本名，注意，只要是加同一模板的反应孔位，均给其命名为相同的样本名。例如 A1、B1、C1 孔位，虽然是用不同的引物分别扩增不同的基因，但所加的样本模板是相同的，所以在 Sample Name 一栏中填写相同的样本名，可以用键盘“Ctrl+C”复制 Reference Gene 的样本名，然后用键盘“Ctrl+V”粘贴至 Target Gene A 和 Target Gene B 的样本名中，以确保所命名一致。另外，一定要设置阴性对照实验组，即其它反应体系均不变，只是不加 PCR 模板的质控，一般命名为 NC 或 NTC (No Template Control)

在 Sample Type 一栏中分别选择各样本的不同类型。看家基因的检测孔位均选择带有 Reference 的类型，靶基因的检测孔位均选择带有 Target 的类型，如上图。其中将 Sample1 的类型选为 Calibrator 即标准样本，在相对定量计算时，其它样本均与该标准样本进行比较，以得到基因表达量更多或更少的数据。一般可以将实验中的空白对照样本选为标准样本，例如用不同的药物 A、B、C 处理一批细胞，其它有一批细胞是正常培

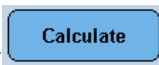
养，没有处理的，则没有用药物处理的细胞可设为标准样本 Calibrator，其它用药组样本均与该样本进行比较。而这些处理组的样本类型均可以选定为 Unkown，检测看家基因的孔位类型选为 Reference Unknown，检测靶基因的孔位类型选为 Target Unknown。阴性对照样本可根据其所用引物的不同选定类型为 Reference Negative 和 Target Negative。

在 Target Name 一栏中填写检测的基因名，如以 B-actin 作为看家基因的话，在所有看家基因样本的 Target Name 一栏均填写 B-actin；而靶基因以此类推，如上图。

Efficiency 默认为 2.00。将以上样本编辑完成后，设置 PCR 反应程序，即可运行仪器，进行实验。



实验结束后，可点击左侧的



分析数据，点击

按钮即可生成相对定量的数据。



































注意，如果阴性对照 Negative 样本产生了扩增曲线，软件会判定该实验失败，采用 SYBR Green I 进行实验时，由于不可避免地产生一些非特异扩增和引物二聚体现象，往往会导致软件无法计算出结果，这个时候可以将阴性对照样本的类型改为 Target Unknown 或 Reference Unknown 来看一下实验的分析结果。但出现阴性对照样本产生阳性扩增曲线的现象时，一定要进行 Tm Calling 分析，看一下熔解曲线峰，以进一步分析所造成的原因。如果其熔解曲线与 PCR 目标扩增产物峰的 Tm 值一致，即试剂被阳性 PCR 扩增片段污染，所得定量结果不准确，要解决该污染问题后重新进行实验；如果阴性样本的熔解曲线峰与 PCR 目标扩增产物峰的 Tm 值不一致，则有可能是引物二聚体或非特异扩增产物的原因，其同样影响定量结果，要想办法优化实验排除其影响。

另外，如果 Calibrator 标准样本的看家基因和靶基因无扩增的话，也会导致软件无法计算出结果。


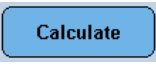
2、准确相对定量

所谓准确相对定量是指采用 PCR 扩增效率校正的相对定量算法，其将看家基因和靶基因的 PCR 扩增效率的具体值计算出来后参与至定量计算中去，因而其结果更能够体现实际的情况。

其设置大致与相似相对定量相同，只是样本类型处多了标准品，如下：

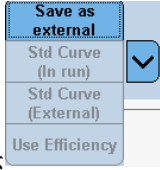
Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentration	Target Name
A1		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A2		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A3		A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A4		A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A5		A4	Sample2	Ref Unknown		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

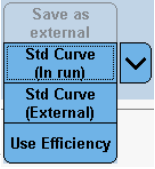
样本检测中增加了 STD1、STD2、STD3、STD4 四个“标准品”，其在看家基因检测中的样本类型为 Ref Standard，在靶基因检测中的样本类型为 Target Standard，在 Concentration 一栏中分别填写这些“标准品”的浓度（这些浓度不是准确的浓度，这些标准品的浓度也是未知的，可以仍选一个样本，进行十倍梯度稀释，分别用看家基因和靶基因的引物对这些稀释产生的模板进行扩增，而对这些在 Concentration 中填写的浓度只要体现出这些样本的十倍浓度差即可，即 1、10、100、1000 或 1、0.1、0.01、0.001 等）。软件可以通过这些“标准品”作出标准曲线，计算得到相应引物的 PCR 扩增效率。

实验结束后同样点击软件界面左侧的  按钮，进入分析界面，选择 Relative Quantification 分析数据，点击  按钮即可生成相对定量的数据。

注意，所选用的“标准品”如有几个低浓度的无扩增，会影响标准曲线的生成，导致软件无法生成数据，因而尽可能选用起始浓度较高样本进行梯度稀释。

也可以在相似相对定量实验以后，选用起始浓度最高的样本进行梯度稀释，计算出 PCR 的扩增效率，然后将该标准曲线保存（在标准曲线下方点击“Std Curve (In

run)”右侧的下拉箭头  选择 Save as external 即可保存），打开前一轮相似相对

定量的实验结果，在分析界面中点击  “Std Curve (In run)”图标右侧的下拉箭头，选择“Std Curve (External)”调用已保存的标准曲线，以使得各引物的扩增效率参与相对定量计算。这样可避免重复实验。