

QuantStudio™ 设计和分析桌面软件

用户指南

桌面软件 v1.5.x 实验设计和分析入门

可与以下产品配套使用：

QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统

QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统

QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统

发布号 MAN0028444

版本 A.0



仅供研究使用。不可用于诊断程序。



修订记录：发布号 MAN0010408（英语）版本 D.0

版次	日期	描述
D.0	2023 年 5 月 22 日	删除了每个实时荧光 PCR 仪的特定用户指南参考。
C.0	2018 年 10 月 19 日	新增了 QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统信息。
B.0	2015 年 12 月 17 日	更新内容包括： <ul style="list-style-type: none">• 将定义和分配功能合并到一个反应板选项卡中• 在反应板布局中显示 VeriFlex™ 温区• 在运行选项卡中进行实时数据监测• 安全、审计和电子签名 (SAE) 功能• 执行已锁定的工作流程• 在开始运行前选择仪器• 能够在结果视图中选择多个靶标• 对用户界面进行各种细微修改
A.0	2015 年 4 月 17 日	新文件。

译自英文出版号 MAN0010408 版本 D.0。本指南中的信息可能随时更改，恕不另行通知。

免责声明：在法律允许的范围内，Thermo Fisher Scientific Inc.和/或其附属公司对与本文件相关或因本文件（包括您对本文件的使用）所产生的特殊的、偶然的、间接性的、惩罚性的、加倍的或后果性的损害不承担任何责任。

购买者须知：许可证免责声明：仅购买本软件产品并不表示获得 Thermo Fisher Scientific 拥有或以其他方式控制的专利权利声明下的任何工艺过程、仪器或其他设备、系统、成分、试剂或试剂盒权利的任何许可权，无论是明示的还是暗喻的。

商标：除非另有说明，否则所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其子公司所有。TaqMan 是 Roche Molecular Systems, Inc. 的商标，经许可和授权后使用。

©2023 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。

目录

■ 第 1 章 产品信息.....	9
产品描述	9
QuantStudio™ 设计和分析桌面软件的特点.....	9
实验类型	10
工作流程概述	13
■ 第 2 章 创建和运行实验的一般流程.....	14
设置全局桌面软件首选项	14
工作流程：创建和运行实验	15
创建模板	15
创建或打开模板	16
输入模板属性	16
确认或编辑运行条件和光学滤光片选择	18
使用快速设置子选项卡分配反应板和反应孔属性.....	19
保存模板文件	20
准备反应	21
PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范.....	21
样品和试剂处理指南	22
在反应板或反应管中设置反应的指南.....	22
开始并监测运行.....	23
在桌面软件中查看实时运行信息	24
在仪器触摸屏上查看实时运行信息	24
在桌面软件中查看运行后摘要.....	25
使用文库、外部文件和模板进行实验设置.....	26
■ 第 3 章 检查结果的一般流程.....	27
关于定量循环 (C _q).....	27
结果选项卡概述.....	28
工作流程：检查运行结果的一般流程.....	30

结果查看和分析指南	30
评估扩增图谱中的结果.....	31
扩增图谱概述.....	31
评估扩增图谱曲线的整体形状.....	31
确认或校正阈值设置.....	32
确认或校正基线设置.....	33
忽略分析结果中的异常值.....	34
优化阴性对照在扩增图谱中的显示.....	35
评估反应孔表视图中的结果	36
反应孔表概述.....	36
反应孔表分组或排序.....	36
使用多组分图谱检查染料信号曲线.....	37
多组分图谱概述	37
查看和评估多组分图谱	37
使用原始数据图谱检查信号曲线.....	38
原始数据图谱概述.....	38
查看和评估原始数据图谱.....	39
检查 QC 摘要中的标记	39
在桌面软件中查看校准结果	40
审查 ROI/一致性校准结果.....	40
审查背景校准结果.....	40
检查染料校准结果.....	40
覆盖校准数据.....	41
导出实验或结果.....	41
导出运行数据和结果的选项	41
导出配置	42
■ 第 4 章 创建、运行和检查标准曲线实验.....	43
标准曲线实验	43
概述	43
反应类型	43
PCR 兼容选项	44
在软件中创建标准曲线实验	44
设置并运行 PCR 反应.....	45
检查结果	46

工作流程：检查标准曲线实验.....	46
标准曲线图谱概述.....	47
查看和评估标准曲线图谱.....	48
标准曲线设置概述.....	48
■ 第 5 章 创建、运行和检查相对标准曲线实验和比较 C_t 实验.....	49
相对标准曲线实验.....	49
概述.....	49
反应类型.....	50
PCR 兼容选项.....	50
比较 C _t 实验.....	51
概述.....	51
反应类型.....	51
PCR 兼容选项.....	52
相对定量：相对标准曲线与比较 C _t	52
在软件中创建相对标准曲线实验.....	53
在软件中创建比较 C _t 实验.....	54
设置并运行 PCR 反应.....	55
检查结果.....	56
工作流程：检查相对标准曲线实验和比较 C _t 实验.....	56
查看和评估标准曲线图谱.....	57
基因表达图谱概述.....	59
QC 图谱概述.....	60
相对定量设置概述.....	61
■ 第 6 章 创建、运行和检查基因分型实验.....	62
基因分型实验.....	62
概述.....	62
反应类型.....	63
PCR 兼容选项.....	63
在软件中创建基因分型实验.....	63
设置并运行 PCR 反应.....	65
检查结果.....	65
工作流程：检查基因分型实验.....	65
等位基因鉴别图概述.....	66

查看和评估等位基因鉴别图谱.....	66
执行手动检测.....	67
检测设置概述（基因分型）.....	68
■ 第 7 章 创建、运行和检查存在/缺失实验.....	70
存在/缺失实验.....	70
概述.....	70
反应类型.....	70
PCR 兼容选项.....	71
在软件中创建存在/缺失实验.....	71
设置并运行 PCR 反应.....	72
检查结果.....	73
工作流程：检查存在/缺失实验.....	73
存在/缺失图谱概述.....	73
查看和评估存在/缺失图谱.....	74
检测设置概述（存在/缺失）.....	75
■ 第 8 章 创建、运行和检查熔解曲线实验.....	77
熔解曲线实验.....	77
概述.....	77
反应类型.....	77
在软件中创建熔解曲线实验.....	78
设置熔解曲线反应.....	79
检查结果.....	79
工作流程：检查熔解曲线实验.....	79
熔解曲线图谱概述.....	80
查看和评估熔解曲线图谱.....	80
熔解曲线设置概述.....	81
■ 附录 A 仪器概述.....	82
打开仪器电源.....	82
查看运行历史记录并从仪器中删除或传输文件.....	82
仪器加载与卸载反应板.....	83
QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 仪加载和卸载反应板.....	83
QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 仪或 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 仪加载和卸载反应板.....	84

■ 附录 B 创建模板的替代流程.....	86
创建自定义实验.....	86
自定义实验概述.....	86
在软件中创建自定义实验.....	87
使用样品定义文件分配样品.....	88
关于样品定义文件.....	88
创建样品定义文件.....	88
从样品定义文件中导入样品信息.....	89
使用反应板设置文件分配样品和靶标.....	89
关于反应板设置文件.....	89
导入反应板设置数据.....	89
从 XLS 文件中分配靶标、样品和生物学重复组.....	90
使用现有 EDT 和 EDS 文件创建新的 EDT 文件.....	91
关于实验模板.....	91
■ 附录 C 创建或编辑运行条件的详细流程.....	92
调整运行条件参数.....	92
设置高级温区（Auto Delta 和 VeriFlex™ 温区）.....	93
添加或调整暂停步骤.....	94
选择光学滤光片.....	94
编辑熔解曲线分解步骤的升温增量.....	95
■ 附录 D 设定反应板/反应孔详细信息和文库的详细程序.....	96
分配反应孔属性（快速设置子选项卡）.....	96
定义和分配反应孔属性（高级设置子选项卡）.....	96
为反应孔分配任务.....	97
靶标和 SNP 检测的检测任务.....	97
定义和设置标准品稀释度.....	98
手动分配标准品稀释度.....	99
定义和分配生物学重复组.....	99
样品、靶标和 SNP 检测库.....	99
文库概述.....	99
应用筛选器以搜索库.....	100
在样品表中定义样品.....	101
在靶标表中定义靶标.....	102

	在 SNP 检测表中定义 SNP 检测	103
■	附录 E 配置分析设置	104
	分析设置指南	104
	查看和配置分析设置	105
	C _t 设置概述	105
	标记设置概述	106
	高级设置概述	106
■	附录 F 配置分析设置	107
	QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统的相关文档	107
	QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统的相关文档	107
	客户和技术支持	108
	产品有限保修	108
■	附录 G 词汇表	109
■	附录 H 索引	111



产品信息

- 产品描述9
- QuantStudio™ 设计和分析桌面软件的特点9
- 实验类型 10
- 工作流程概述..... 13

产品描述

用户使用 QuantStudio™ 设计和分析桌面软件可以打开、运行和分析通过 QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统、QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统、QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统创建的实验。这款软件还可用于创建实验，将实验结果发送到仪器上，收集数据以及分析收集的数据。

QuantStudio™ 设计和分析桌面软件的特点

操作	已解锁模板	已锁定模板 ^[1,2]
属性选项卡		
编辑实验名称；输入/扫描反应板条形码；输入用户名称	✓	✓
选择仪器/模块类型、实验类型、化学品、运行模式	✓	—
输入试剂信息（化学品详情）	✓	✓
运行条件选项卡		
编辑热循环程序、反应体积、光学滤光片选择	✓	—
反应板选项卡		
快速设置子选项卡		
定义反应板属性	✓	—
定义或分配样品	✓	✓
定义或分配靶标或 SNP 检测	✓	—
高级设置子选项卡		

(续)

操作	已解锁模板	已锁定模板 ^[1,2]
定义样品	✓	✓
分配样品	✓	✓
定义靶标或 SNP 检测	✓	—
分配靶标或 SNP 检测	✓	✓
运行选项卡		
开始并监测正在进行的运行	✓	✓
查看剩余时间和图谱 ^[3]	✓	✓
结果选项卡		
检查运行结果（分析后的运行数据）	✓	✓
配置分析设置	✓	—
导出选项卡		
选择运行数据和运行结果（分析后的运行数据）的导出选项	✓	✓
导出运行数据 ^[3] ；导出模板设置	✓	✓

^[1] 如果输入已锁定模板的密码，则可使用列出的所有操作。

^[2] 在将模板保存为已锁定的模板之前，请务必先保存 *已解锁* 版本的备份模板。

^[3] 该功能也可通过仪器触摸屏启用。

实验类型

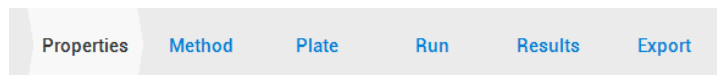
目的	描述
标准曲线实验	
确定样品中的绝对靶标数量。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 该软件检测标准品稀释系列和检测样品中靶标的扩增情况。 2. 该软件利用标准品稀释系列数据生成标准曲线。 3. 该软件利用标准曲线分析检测样品中靶标的绝对数量。

目的	描述
相对标准曲线实验	
确定样品中的相对靶标数量。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 该软件检测标准品稀释系列、参比样品（校准品）、检测样品中感兴趣的靶标和内源性对照靶标的扩增情况。 内源性对照品是一种在所有样品中平等表达的靶标；内源性对照品包括 β 肌动蛋白、GAPDH、18S 核糖体 RNA。该软件可以通过算法将多个内源性对照靶标纳入相对定量计算。 参比样品作为相对定量结果（或 1 份样品）的依据。例如，在一项检测药物对基因表达影响的研究中，未处理的对照品即可作为参比样品。 2. 该软件利用相应标准品稀释系列数据，生成感兴趣的靶标和内源性对照品的标准曲线。 3. 该软件利用标准曲线分析每个样品中感兴趣的靶标和内源性对照品的数量。然后，将每个样品中的靶标数量归一化为样品的内源性对照品数量。 4. 为确定检测样品中靶标的相对数量，该软件使用样品中的归一化靶标数量除以参比样品中的归一化靶标数量。
比较 C_t ($\Delta\Delta C_t$) 实验	
确定样品中的相对靶标数量。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 该软件检测参比样品（校准品）、检测样品中感兴趣的靶标和内源性对照靶标的扩增情况。 内源性对照品是一种在所有样品中平等表达的靶标；内源性对照品包括 β 肌动蛋白、GAPDH、18S 核糖体 RNA。该软件可以通过算法将多个内源性对照靶标纳入相对定量计算。 参比样品作为相对定量结果（或 1 份样品）的依据。例如，在一项检测药物对基因表达影响的研究中，未处理的对照品即可作为参比样品。 2. 以内源性对照品为基准，对感兴趣的靶标的检测结果进行归一化。 3. 为确定检测样品中靶标的相对数量，该软件将样品的归一化 ΔC_q (ΔC_t 或 ΔC_n) 与参比样品的归一化 ΔC_q (ΔC_t 或 ΔC_n) 相比较。

目的	描述
基因分型实验	
检测靶标核酸序列的单核苷酸多态性 (SNP) 变异。	<p>基因分型实验使用预包装的 TaqMan™ SNP 基因分型检测试剂盒，包括以下组分：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 两个序列特异性引物，用于扩增含有感兴趣的 SNP 的序列。 • 两个等位基因特异性 TaqMan™ 探针，用于等位基因 1 和等位基因 2。 <ol style="list-style-type: none"> 1. 该软件以各反应孔中参比荧光染料的荧光值为基准，将报告基团染料的荧光信号进行归一化。 2. 该软件在等位基因鉴别图谱上绘制每个样品反应孔的归一化报告基团染料信号，与等位基因特异性探针的报告基团染色强度进行对比。 3. 该软件对样品数据采用了聚类算法，根据各成簇样品在图谱上的位置，分配基因型检测的结果。
阳性/阴性实验	
确定样品中是否存在靶标核酸序列。	该软件根据用算法确定的检测阈值，检测是否存在靶标。（检测阈值不同于 C_t 阈值； C_t 阈值不用于进行检测。）
熔解曲线实验	
确定使用插入染料的 PCR 扩增产物的熔解温度 (T_m)。	<p>在该软件中，任何使用插入染料的实验类型所默认采用的运行条件都包含熔解曲线分析。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 该软件根据染料荧光随温度的变化绘制熔解曲线。 2. 该软件利用熔解曲线计算出熔解温度 (T_m)。

工作流程概述

在 QuantStudio™ 桌面软件中，使用屏幕顶部的选项卡进入工作流程。



创建模板（EDT 文件）



设定模板参数（属性、方法、反应板和反应孔详细信息）



配置分析设置



在仪器上运行 EDT 文件



检查运行结果（EDS 文件）

2

创建和运行实验的一般流程

- 设置全局桌面软件首选项..... 14
- 工作流程：创建和运行实验..... 15
- 创建模板..... 15
- 准备反应..... 21
- 开始并监测运行..... 23
- 使用文库、外部文件和模板进行实验设置..... 26

设置全局桌面软件首选项

1. 在菜单栏中，选择工具 ▶ 首选项。
2. 在每个选项卡中设置首选项。

选项卡	选项	操作
默认设置	要显示的小数位	输入导出结果中的有效数字位数。
	语言 [如可用]	从下拉菜单中选择软件语言。
实验	基线起始循环数和基线结束循环数	输入用于计算（包含扩增阶段的）运行的基线的第一个和最后一个循环。
	自动分析	选择在每次运行结束时执行自动分析。
	自动保存	选择在每次运行结束时保存更改。
打印	打印反应孔表时使用黑白打印	选择禁用彩色打印。
导出	使用上一次文件位置或 使用默认文件夹	选择用于保存导出结果的位置。 点击浏览器，然后导航至默认位置并选择。
显示格式	日期格式、时间格式和小数点格式	选择显示格式。这些格式也用于数据的导出或导入。

3. 点击保存。

工作流程：创建和运行实验

创建模板（第 15 页）

创建或打开模板（第 16 页）

输入模板属性（第 16 页）

确认或编辑运行条件和光学滤光片选择（第 18 页）

分配反应板和反应孔属性（第 19 页）

保存模板文件（第 20 页）



准备反应（第 21 页）



开始并监测运行（第 23 页）

有关运行后流程，参见以下章节：

- 第三章“检查结果的一般流程”
- 第 41 页的“导出实验或结果”

创建模板


本节介绍了在桌面软件中创建模板的一般流程。有关具体实验类型的设置信息，参见以下章节。


- 第 44 页的“在软件中创建标准曲线实验”
- 第 53 页的“在软件中创建相对标准曲线实验”
- 第 54 页的“在软件中创建比较 Ct 实验”
- 第 63 页的“在软件中创建基因分型实验”
- 第 71 页的“在软件中创建存在/缺失实验”
- 第 78 页的“在软件中创建熔解曲线实验”
- 第 87 页的“在软件中创建自定义实验”

您还可以利用桌面软件的功能更轻松地创建部分或全部实验。例如，您可以通过以下任一方法略创建实验。


- 使用桌面软件库设置样品、靶标或 SNP 检测、运行条件和分析设置（参见第 99 页的“样品、靶标和 SNP 检测库”）。
- 从外部文件或模板中导入实验参数（参见第 26 页的“使用库、外部文件和模板的实验设置”）。

创建或打开模板

在  主页界面，创建新模板或打开现有模板。

- 在  新建实验窗格，执行以下任一任务，即可创建新模板。

任务	操作
不使用既有设置创建模板	点击 创建新实验 。
利用系统模板创建一个模板	<ol style="list-style-type: none"> 选择创建新实验 ▶ 模板。 导航至目标文件并选中，然后点击打开。 随软件安装的系统模板文件位于： <code><drive>:\Program Files (x86)\Applied BioSystems\QuantStudio Design & Analysis Software\templates</code>， 其中 <code><drive></code> 是安装软件所在的驱动盘。


- 在  打开现有实验窗格，执行以下任务，即可打开现有模板。
 - 点击**打开**。
 - 导航至目标文件并选中，然后点击**打开**。

输入模板属性

- 点击**属性**选项卡，可打开并编辑实验属性。
- (可选) 在**名称**字段，修改文件名。



名称字段确定了两个文件名：

- 初始 EDT 文件名。





注意：首次保存 EDT 文件后，修改**名称**字段不会更新 EDT 文件名。如要在首次保存后更改 EDT 文件名，选择  **保存 ▶ 另存为**。

- 仪器运行过程中创建的 EDS 文件的默认文件名。
- (可选) 点击**条形码**字段，然后扫描或输入反应板条形码。
 - (可选) 在**用户名**和**备注**字段输入信息（如适用）。
 - 从下拉列表中选择**仪器类型**、**模块类型**、**实验类型**、**化学品**（试剂）、**运行模式**（快速或标准循环）。

注意：实验类型定义了可供模板设置使用的选项。有关各实验类型中定义参数的更多信息，参见第 20 页的“实验定义”。

6. (可选) 点击**管理化学品详细信息** (参见“输入试剂信息”)。
7. (可选) 点击  **保存** 或选择  **保存** ▶ **另存为**。

输入试剂信息

1. 在**属性**选项卡中, 点击**管理化学品详细信息**。
2. 点击  **添加**。
3. 输入试剂类型、名称、货号、批号和有效期。
4. (可选) 为试剂添加一个自定义属性。
 - a. 在表标题中点击  , 添加一系列自定义属性。
 - b. 点击 **自定义属性** 列标题, 然后输入新属性。
 - c. 在 **自定义属性** 列中, 选择一个单元格, 然后输入其信息。
 - d. (可选) 在标题中点击  , 从表中删除自定义属性。
5. (可选) 点击  , 从表中删除试剂。
6. 点击**关闭**。

使用可选装的条形码扫描仪扫描条形码

该仪器与可选装的手持式条形码扫描仪 (货号 [4488442](#), 单独购买) 兼容。条形码扫描仪读取代码 128 (字母数字), 支持 128 个 ASCII 字符条形码。

1. 点击**条形码**字段。
2. 将扫描仪置于距离反应板或容器标签 20–30 cm 处, 对准条形码的中心, 然后按下触发器。
3. 将扫描光束缓慢移过条形码, 直到扫描仪发出响声。

在扫描条形码时, 扫描仪会自动传输以下信息:

- 将条形码数字字母等效信息传输到条形码字段。
- 传输其他试剂信息 (批号、货号、有效期等)

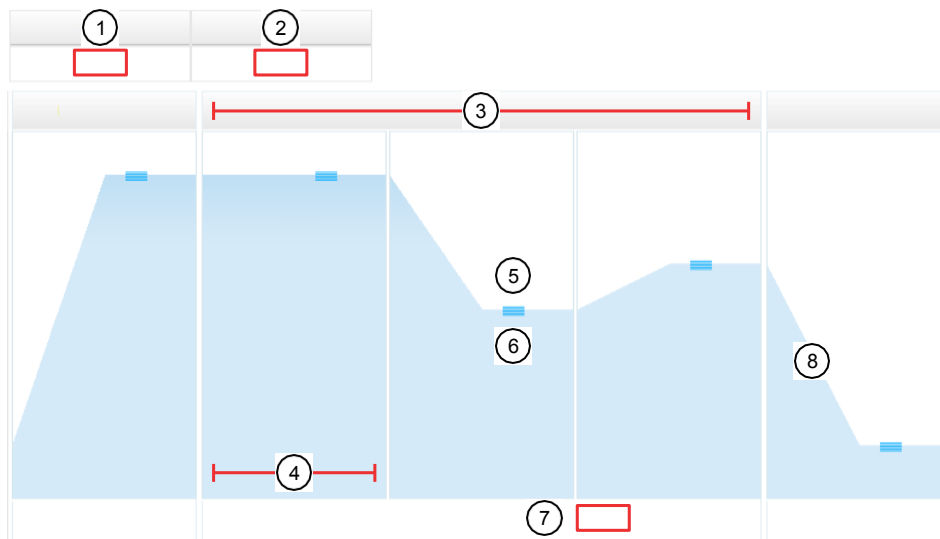
有关手持式条形码扫描仪的更多信息, 参见条形码扫描仪随附的用户文档。

确认或编辑运行条件和光学滤光片选择

根据需要，在**运行条件**选项卡中，进行以下操作。

- (可选) 调整反应体积。
- (可选) 编辑默认运行条件（热循环程序）。
 - 默认运行条件针对 TaqMan™ 检测试剂盒和各种各样的其他试剂进行了优化。
 - 如要编辑默认运行条件，参见第 92 页的“调整运行条件参数”。
- (可选) 编辑默认光学滤光片选择（参见第 94 页的“选择光学滤光片”）。
 - 默认光学滤光片选择适用于出厂校准的（系统）染料。
 - 有关仪器支持的染料及其校准和光学滤光片选择的详细信息，参见仪器用户指南。

运行条件的构成要素



- ① 反应体积
- ② 热盖温度
- ③ 热循环程序阶段
- ④ 阶段内的步骤
- ⑤ 步骤温度
- ⑥ 步骤持续时间
- ⑦ 循环数
- ⑧ 升温速率

使用快速设置子选项卡分配反应板和反应孔属性

注意：本节说明了设置反应板的一般流程。

- 有关设置反应板的详细流程,参见附录 D《设置反应板/反应孔详细信息和文库的详细流程》。
- 有关每种实验类型的具体说明, 参见本指南中的相应章节。

- 在**反应板**选项卡中, 从**反应板布局**或**反应孔表**中, 选择反应板孔。有关更多信息, 参见第 19 页的“选择反应板孔”。
- 点击**快速设置**。
- 为选定的反应孔分配属性。
 - 在文本字段, 输入样品、靶标或 SNP 检测的名称。
 - 在下拉列表中, 选择定义的样品、靶标或 SNP 检测。
有关定义或导入样品、靶标或 SNP 检测的更多信息, 参见第 96 页的“定义和指定反应孔属性 (“高级设置”子选项卡)”。
 - 点击**高级设置**, 然后更改报告基团和淬灭基团染料以及任务 (如适用) 的默认选择。有关更多信息, 参见第 97 页的“为反应孔分配任务”。
- (可选) 为选定反应孔输入备注。
- 在**反应板属性**窗格, 从下拉列表中选择**参比染料**。

选择反应板孔

- 在**反应板布局**中, 选择反应板孔。

任务	操作
选择单个反应孔	点击反应板中的某个反应孔
选择多个反应孔	在反应板中点击并拖动
选择数个连续的反应孔	按住 Shift 并点击反应板中的反应孔
选择数个非连续的反应孔	按住 Ctrl 并点击反应板中的反应孔
选择一系列反应孔	点击列标题
选择所有反应孔	点击反应板网络的左上角
选择一组反应孔	点击某个反应孔, 定义一个角, 然后按住 Shift , 点击对角的另一个反应孔
取消选择单个反应孔	按住 Ctrl 并点击选定的反应孔

- 在反应孔表中，选择反应板孔。

任务	操作
选择单个反应孔	点击表中的某行
选择多个反应孔	在表中点击并拖动
选择数个连续的反应孔	按住 Shift 并点击表中各行
选择数个非连续的反应孔	按住 Ctrl 并点击表中各行
取消选择单个反应孔	按住 Ctrl 并点击选定行

实验定义


您所定义参数因实验类型的不同而有所差异。

实验类型	靶标	SNP 检测	样品	生物学重复组	参比染料	参比品和内源性对照品
标准曲线	✓		✓	✓	✓	
相对标准曲线	✓		✓	✓	✓	✓
比较 C _t	✓		✓	✓	✓	✓
熔解曲线	✓		✓		✓	
基因分型		✓	✓		✓	
存在/缺失	✓		✓		✓	
自定义	✓		✓	✓	✓	


保存模板文件

将模板文件另存为已解锁的模板

注意： 已锁定的模板不能另存为已解锁的模板。

- 使用相同的 EDT 文件名保存模板。
 - 在任意选项卡中，点击  保存。
 - 在菜单栏中，选择文件 ▶ 保存。
- 使用新的 EDT 文件名保存模板。

注意： 已锁定的模板无法以新文件名进行保存。

- 在任意选项卡中，选择  保存 ▶ 另存为。
- 在菜单栏中，选择文件 ▶ 另存为。

将模板文件另存为已锁定的模板

切记！ 在将模板保存为已锁定的模板之前，请务必先保存 *已解锁* 版本的备份模板。

1. 在菜单栏中，选择 **文件** ▶ **另存为已锁定的模板**。
2. 输入并确认密码，然后点击 **OK**，继续保存文件。

注意： 需要使用密码打开编辑选项不受限制的模板。已锁定的模板在没有密码的情况下也能打开，但是编辑选项受限。

注意： 请记录密码，因为密码丢失后无法找回。

准备反应

有关兼容试剂和 PCR 反应所需材料的信息，参见仪器用户指南。

按照生产商提供的说明准备反应。

遵循本节所述的其他指南。

PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范

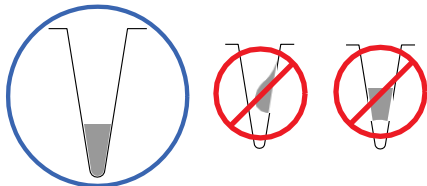
- 穿戴干净手套和实验服。
 - 在处理已扩增的产物或制备样品时，请勿穿戴以前使用过的手套和实验服。
- 如果怀疑手套受到污染，请更换手套。
- 设立独立区域以及专用设备和耗材，以便进行：
 - 样品制备和反应设置。
 - 产物扩增和分析。
- 请勿将已扩增的产物带入反应设置区。
- 小心打开和关闭所有样品试管。避免样品飞溅或喷洒。
- 尽可能盖住反应物和组分。
- 使用外置活塞式移液器或防气溶胶屏障移液器吸头。
- 使用 10% 漂白溶液或 DNA 去污溶液定期清洁实验室工作台和设备。

样品和试剂处理指南

- 使用校准过的移液器和防气溶胶吸头。
- 按照预混液和检测混合液生产商提供的建议制备反应混合液。
- 在计算中包括多余的体积，以弥补在试剂转移过程中的损失。
- 使用 TE 缓冲液或水稀释样品和标准品。
- 在稀释样品和标准品时要小心。错误或不准确地配制稀释液会影响数据的准确性。
- 在使用前，将稀释液和检测混合液避光冷藏。过度暴露在光线下会影响荧光探针或染料性能。
- 在每次使用前进行以下操作：
 - 晃动试剂瓶，充分混合预混液。
 - 通过涡旋混合，使检测混合液重新悬浮，然后对反应管快速离心。
 - 将样品置于冰块上解冻。解冻后，通过涡旋混合使样品重新悬浮，然后对反应管快速离心。

在反应板或反应管中设置反应的指南

- 根据良好实验室规范进行 PCR 和 RT-PCR 有关更多信息，参见第 21 页的“PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范”。
- 确保 PCR 反应的布置与软件中显示的反应板布局一致。
- 确认每个反应孔中的液体位于反应孔的底部且无气泡。如果没有位于底部，再次对反应板离心。



- 确保反应板或反应管密封良好。
- 在将反应板载入仪器前，将反应板或反应管置于 4°C 下并避光保存。
- 保持反应板底部清洁。反应板底部沾上液体和其他污染物会污染样品模块，导致背景信号异常偏高。
- 如有必要，使用记号笔或钢笔在反应管和反应板侧面做标记。不要使用荧光笔。

开始并监测运行

切记！ 在将完成加样的反应板载入仪器之前，查看详细流程（参见第 83 页的“仪器加载与卸载反应板”）。

1. 转接连接运行桌面软件的计算机的仪器。
2. 将反应板载入该仪器中。



小心！（仅限 QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统）该仪器应由经过培训并且熟悉移动部件危险性的的操作人员使用。

3. 在桌面软件中打开模板（EDT 文件）。
4. （可选）在**导出**选项卡中，选择**自动导出**，即可在运行结束后自动导出运行结果。
5. 在**运行条件**选项卡和**反应板**选项卡中，查看模板参数和设置。
6. 在**运行**选项卡中，从**开始运行**下拉列表中选择要使用的仪器。
7. 接受或编辑 EDS 文件的默认名称，然后点击**保存**。

注意： EDS 文件包含运行数据和结果。系统在**属性**选项卡的**实验名称**中创建了 EDS 文件的默认名称。

8. 在仪器运行过程中，监测以下运行：
 - 桌面软件**运行**选项卡中的运行。
 - 仪器触摸屏中的运行。
9. 将反应板从该仪器中卸载。



小心！会造成人身伤害。 在仪器工作期间，反应板温度可能会达到 100°C。必须等待反应板冷却至室温后再取出。

注意：（仅限 QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统）如果仪器未能弹出反应板，请联系技术支持。

注意： 如果仪器和桌面软件之间的连接在运行过程中中断，仪器仍然会完成运行。但是，运行数据（EDS 文件）必须通过 USB 驱动器或网络磁盘从仪器传输到桌面软件中。

在桌面软件中查看实时运行信息

在桌面软件的**运行**选项卡中，可以查看实时运行信息。

- 在**运行**选项卡中，查看剩余运行时间和运行状态。
- 在**运行**选项卡下的**扩增图谱**子选项卡中，查看实时数据和图谱。
 - 点击👁**查看**，选择每个反应孔中显示的数据。
 - 在反应板布局中选择反应孔，可以在图谱中高亮显示对应的曲线。
 - 在图谱中选择曲线，可以在反应板布局中高亮显示其对应的各个反应孔。

注意：对于熔解曲线实验，您只能监测熔解曲线图谱。

在仪器触摸屏上查看实时运行信息

您可以在仪器主界面查看实时运行信息。

- 在仪器主界面，查看模块温度、剩余运行时间和运行状态。
- 点击➤或向左滑动一次，即可查看实时运行条件信息。
- 点击➤或向左滑动两次，即可查看实时数据和图谱。

在仪器触摸屏上查看实时数据和图谱

1. 在仪器运行期间，点击仪器主界面中的➤，或向左滑动两次。
2. 点击**反应孔详细信息**。
3. 点击**样品**、**靶标**或**任务**，选择每种选项的图形表示形式。
4. 点击**关闭**返回主界面。

在仪器触摸屏上调整实时图谱的显示

1. 在仪器运行期间，点击仪器主界面中的➤，或向左滑动两次，即可查看实时数据或图谱。
2. 点击**缩放**。
3. 点击🔍或🔍，即可缩小或放大。
4. 点击箭头可在图形上向左、向右、向上或向下移动。
5. 点击**关闭**，即可返回默认视图。

在桌面软件中查看运行后摘要

您可以在运行结束后查看运行的摘要。

在**运行**选项卡中，点击**运行后摘要**选项卡，查看运行摘要，包括以下信息：

- 实验名称
- 用户名称
- 遇到的错误
- 仪器序列号和仪器名称
- 开始时间、停止时间、运行持续时间

使用文库、外部文件和模板进行实验设置

桌面软件具有以下功能，以便您可以更轻松地使用文库、外部文件和模板创建部分或全部实验。

- 使用桌面软件库设置样品、靶标或 SNP 检测、运行条件和分析设置（参见第 99 页的“文库概述”）。
- 从外部文件或模板中导入部分或全部实验（参见下表）。

表 1 利用外部文件或模板进行实验设置

选项	操作	设置信息
导入样品信息（定义样品）。	导入样品定义文件（参见第 88 页的“使用样品定义文件分配样品”）。	<ul style="list-style-type: none"> — 样品名称 — （可选）自定义样品属性
导入样品、靶标、反应孔分配。	导入反应板设置文件（参见第 89 页的“使用反应板设置文件分配样品和靶标”）。	反应板设置信息： <ul style="list-style-type: none"> — 反应孔编号 — 样品名称 — 样品颜色 — 靶标名称 — 染料 — （可选）其他反应孔信息
在电子表格中设置反应板布局，无需保存为特殊格式。 或 在反应板布局电子表格中使用某列的子集。	从 XLS 文件复制粘贴（参见第 90 页的“从 XLS 文件分配靶标、样品、和生物学重复组”）。	反应板设置信息： <ul style="list-style-type: none"> — 反应孔编号 — 样品名称 — 生物组 — 靶标名称 — 任务 — 染料 — 数量 — 备注 — （可选）其他反应孔信息
使用现有 EDT 或 EDS 文件中的完整模板设置。	根据现有模板或运行结果文件创建新模板（参见第 91 页的“使用现有 EDT 和 EDS 文件创建新的 EDT 文件”）。	<ul style="list-style-type: none"> — 反应板设置信息，同上 — 试剂信息 — 热循环程序 — 分析设置

■ 关于定量循环 (C _q).....	27
■ 结果选项卡概述	28
■ 工作流程：检查运行结果的一般流程	30
■ 结果查看和分析指南.....	30
■ 评估扩增图谱中的结果	31
■ 评估反应孔表视图中的结果.....	36
■ 使用多组分图谱检查染料信号曲线.....	37
■ 使用原始数据图谱检查信号曲线.....	38
■ 检查 QC 摘要中的标记.....	39
■ 在桌面软件中查看校准结果.....	40
■ 导出实验或结果	41

本节包括针对所有实验类型相关的检查结果和配置分析设置的信息。有关特定实验类型的信息，参见本指南中的相应章节。

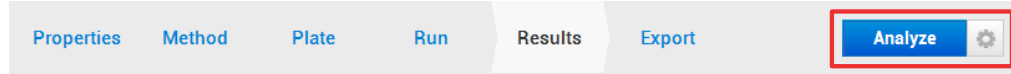
有关结果检查流程的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。


关于定量循环 (C_q)

术语	名称	描述
C _q	定量循环	C _q 是基因表达指标的一般形式。C _q 值 (C _t 和 C _{rt}) 作为样品定量实验的主要输入值：绝对定量 (AQ) 和相对定量 (RQ) C _t 和 C _{rt} 是 C _q 的特定算法计算值。
C _t	阈值循环	扩增图谱中荧光信号达到阈值的 PCR 循环数。 C _t 是使用基线阈值算法时的基因表达指标结果。
C _{rt}	相对阈值循环	根据模型扩增效率曲线计算的阈值 PCR 循环数。 C _{rt} 是使用相对阈值算法时的基因表达指标结果。

结果选项卡概述

在**结果**选项卡中，检查并分析运行数据。在**结果**选项卡中，工作流程栏的右侧会显示另外两个工具。



- 忽略反应孔或更改分析设置后，点击**分析**。
- 点击 ，进入分析设置。

注意： 可用的分析设置和图谱因实验类型而异。

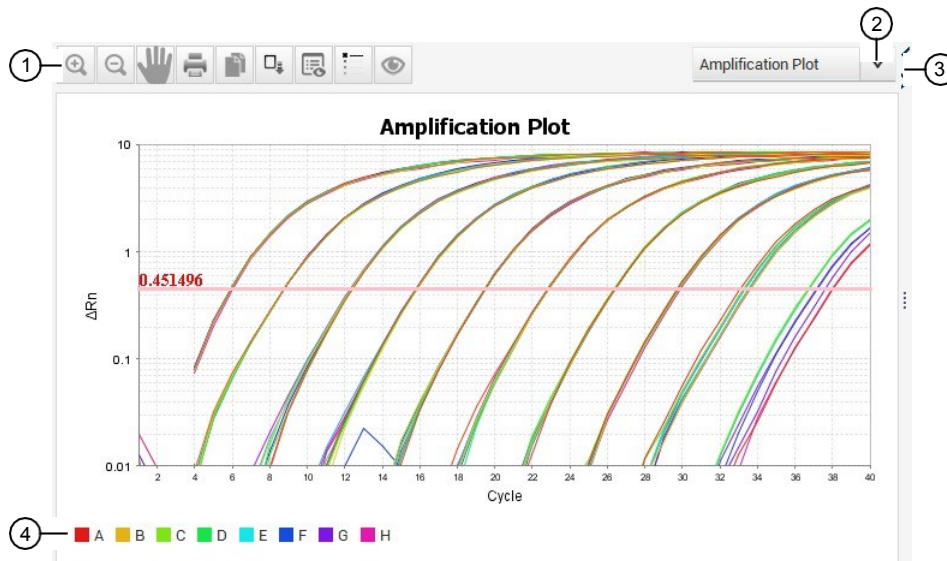


图 1 图谱窗格

- ① 图谱工具栏
- ② 图谱选择列表（因实验而异）
- ③ 展开/收起图谱窗格显示
- ④ 图例

图谱工具栏包括以下选项：

- 缩放
- 打印或复制图谱图像
- 将图谱另存为图片文件
- 配置图谱属性
- 显示/隐藏图例
- 配置图谱设置

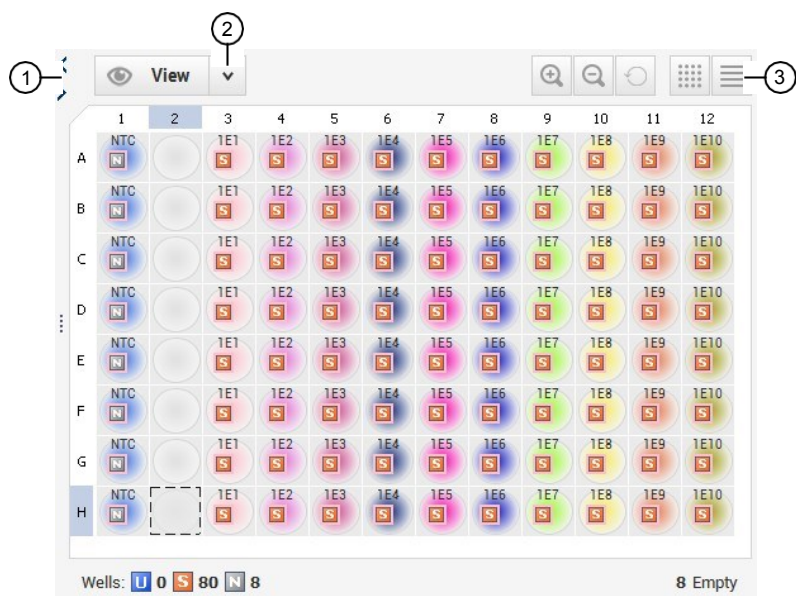


图 2 反应板布局

① 展开/收起反应板布局显示（图中布局为展开状态）

② 视图：选择要显示的反应孔属性

③ 反应板布局工具栏

反应板布局工具栏包括以下选项：

- 缩放
- 显示反应板布局
- 满窗口显示反应板
- 显示反应孔表

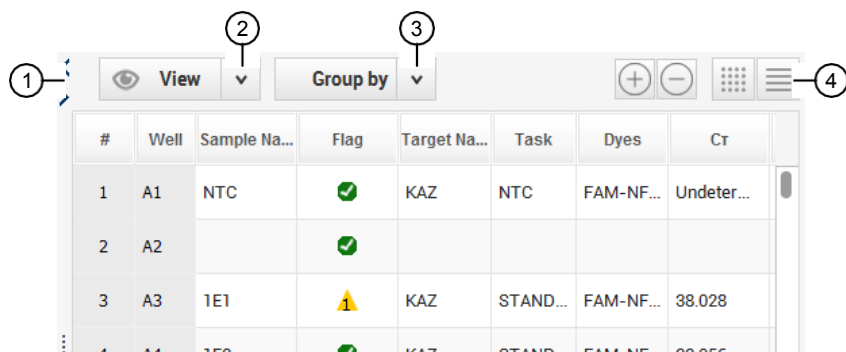


图 3 反应孔表

① 展开/收起反应孔表显示（图中的表为展开状态）

③ 分组依据：选择作为反应孔分组依据的参数

② 视图：选择要显示的反应孔属性

④ 反应孔表工具栏

反应孔表工具栏包括以下选项：

- 展开已分组的反应孔各行
- 显示反应板布局
- 收起已分组的反应孔各行
- 显示反应孔表

工作流程：检查运行结果的一般流程

运行完成后，桌面软件使用在模板开发过程中指定的分析设置自动分析运行数据。然后，软件会在**结果**选项卡中显示运行结果。

查看扩增图谱，确认或校正阈值和基线设置（第 31 页）



评估实验的实验图谱
(例如，查看基因分型实验的等位基因鉴别图谱)
(参见本指南中的相应章节)



检查异常值数据和 (可选) 忽略反应孔 (第 34 页)



(可选) 查看多组分图谱，检查染料信号曲线 (第 37 页)



(可选) 查看原始数据图谱，检查信号曲线 (第 38 页)



(可选) 查看 QC 摘要中的标记 (第 39 页)



(可选) 配置分析设置 (第 104 页)

切记！ 如果您忽略反应孔或配置分析设置，则点击**分析**，重新分析数据。

结果查看和分析指南

- 在**结果**选项卡中调整视图的相关信息，请参见桌面软件的帮助。
- 如要重新分析数据，在☰**反应板布局**中选择所有的反应孔，然后点击**分析**。
- 如要启用运行后数据自动分析，选择**工具** ▶ **首选项** ▶ **实验**，然后选择**自动分析**。

评估扩增图谱中的结果

扩增图谱概述

扩增图谱表示样品扩增与循环数或反应孔的关系。您可以使用扩增图谱进行以下操作：

- 确认或纠正基线和阈值。
- 发现异常值。
- 发现并检查异常扩增。异常扩增表示存在以下任一特征：
 - 阴性对照反应孔中荧光增强。
 - 预期循环数内检测不到荧光信号。

注意：如果注意到异常扩增或完全不存在荧光，请参见仪器用户指南，获取故障排除信息。

三个扩增图谱可供使用。部分图谱可以显示为线性图或对数 (\log_{10}) 图。


表 2 扩增图谱类型

图谱类型	描述	用途
ΔR_n 与循环的关系	ΔR_n 是指归一化荧光信号相对于基线荧光的幅度，在 PCR 扩增期间由报告基因在每次循环时产生。	<ul style="list-style-type: none">• 发现并检查异常扩增。• 查看运行的阈值。
R_n 与循环的关系	R_n 是指归一化到参比染料荧光信号的报告基因染料荧光信号。	<ul style="list-style-type: none">• 发现并检查异常扩增。• 查看运行的基线值。
C_t 与反应孔的关系	C_t 是扩增图谱中荧光达到阈值的 PCR 循环数。	<ul style="list-style-type: none">• 定位异常扩增（异常值）。

评估扩增图谱曲线的整体形状

可以在**结果**选项卡中评估扩增图谱曲线的整体形状。

如果**结果**选项卡中没有显示数据，则点击**分析**。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**扩增图谱**。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：
 - **图谱类型：** ΔR_n 与循环的关系
 - **图表类型：** 日志
 - **图谱颜色：** 靶标、样品或反应孔

选定反应孔的**扩增图谱**显示在  反应板布局中。

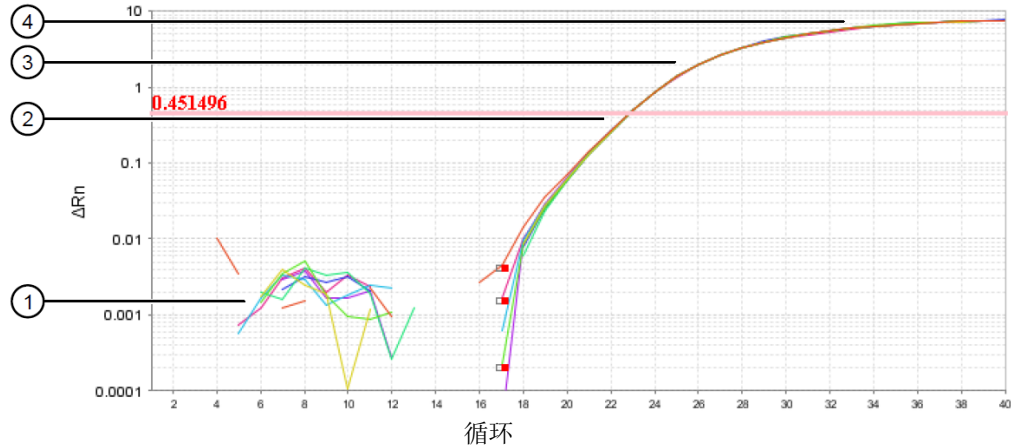



图 4 典型扩增图谱

典型扩增曲线拥有四个不同的部分：

- | | |
|---------------|-------|
| ① 基线 | ③ 线性期 |
| ② 指数级（几何级）增长期 | ④ 平稳期 |

确认或校正阈值设置

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**扩增图谱**。

2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：

- 图谱类型：**ΔRn 与循环的关系**
- 图表类型：**日志**
- 图谱颜色：**靶标、样品或反应孔**

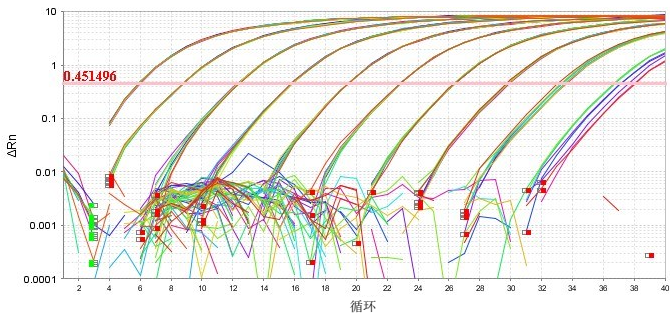
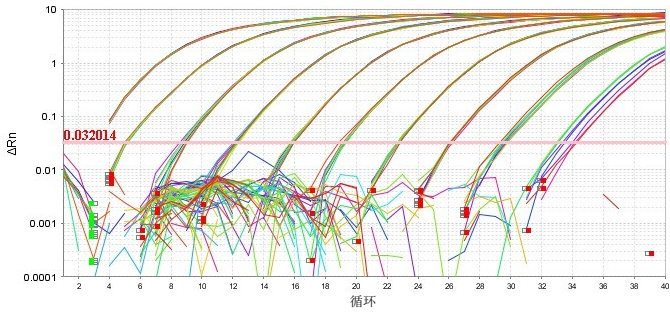
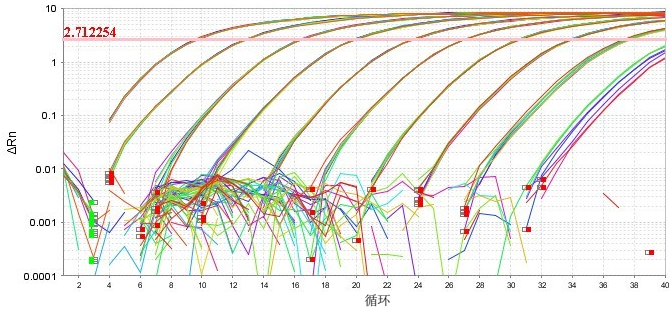
选定反应孔的**扩增图谱**显示在  **反应板布局**中。

3. (可选) 调整阈值。


- 点击并拖动阈值栏，使之处于扩增曲线的指数级增长期内。
- 配置 C_t 分析设置（参见第 105 页的“ C_t 设置概述”）。

表 3 阈值设置示例

将阈值设置在扩增曲线的指数级增长期内。高于或低于最佳值的阈值设置会增大重复样品组的标准差。

阈值设置评估	示例
阈值设置正确。	
阈值设置过低。	
阈值设置过高。	

确认或校正基线设置

1. 在结果选项卡中，从下拉列表中选择**扩增图谱**。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：
 - 图谱类型：Rn 与循环的关系
 - 图表类型：线性
 - 图谱颜色：反应孔
 - 选择显示：基线起始/基线结束

注意：使用起始循环数和结束循环数计算基线。

选定反应孔的**扩增图谱**显示在  反应板布局中。

显示每个反应孔的起始 (■) 和结束 (■) 循环数。

3. (可选) 调整基线的起始和结束循环数 (参见第 105 页的“ C_t 设置概述”)。

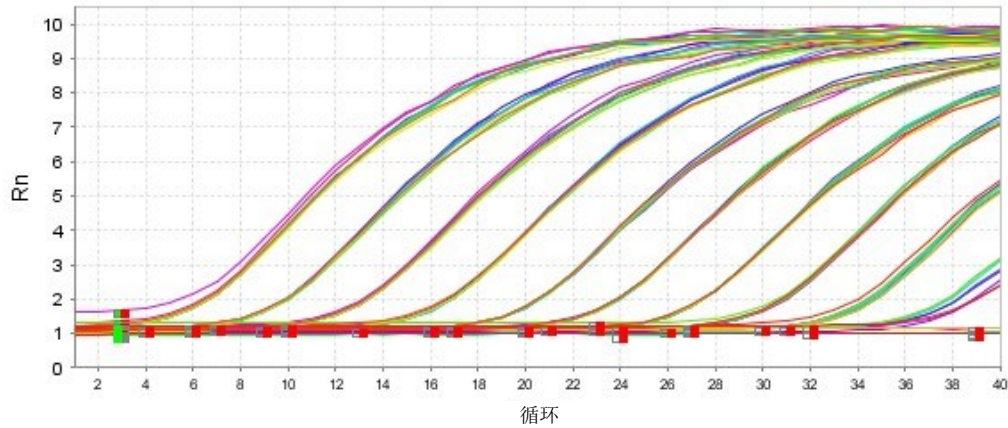


图 5 正确基线示例

结束循环数 (■) 设置为在检测到明显荧光信号的循环数之前的几个循环内。

忽略分析结果中的异常值





异常值反应孔的 C_q (C_t 或 C_{rt}) 值与相关重复反应孔的平均值明显不同。为了确保 C_q (C_t 或 C_{rt}) 的精度, 考虑在分析时忽略异常值。

1. 在**结果**选项卡中, 从下拉列表中选择**扩增图谱**。
2. 点击👁, 然后进行以下选择, 以配置扩增图谱:
 - **图谱类型:** C_t 与反应孔的关系
 - **图表类型:** 线性
 - **图谱颜色:** 反应孔

选定反应孔的 C_t 值显示在☰**反应板布局**中。

3. 点击☰, 检查**反应孔表**中是否有异常值。
 - a. 选择**分组依据** ▶ **重复**。
 - b. 找出每个重复组中的异常值。
具有异常值的反应孔通常带有一个或多个 QC 标记。
4. 忽略☰**反应孔表**或☰**反应板布局**视图中的异常值。
 - 在☰**反应孔表**的异常值行中选择**忽略**。
 - 在☰**反应板布局**中, 右键点击选定的反应孔, 然后选择**忽略**。
5. 点击**分析**, 重新分析删除了异常值的运行数据。

优化阴性对照在扩增图谱中的显示

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**扩增图谱**。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：
 - 图谱类型： **ΔRn 与循环的关系**
 - 图表类型：**线性**
 - 图谱颜色：**靶标**
 - 取消选定**显示：阈值**
 - 取消选定**显示：基线起始和/基线结束**
3. 在  **反应板布局** 或  **反应孔表** 中，选择阴性对照反应孔（不应对特定靶标进行扩增的反应孔）。
4. 点击 （配置图谱属性），然后选择 **Y 轴** 选项卡。
 - a. 取消选择**自动调整范围**。
 - b. 输入**最小值 -1**。
 - c. 输入**最大值 2**。
 - d. 点击**保存**。

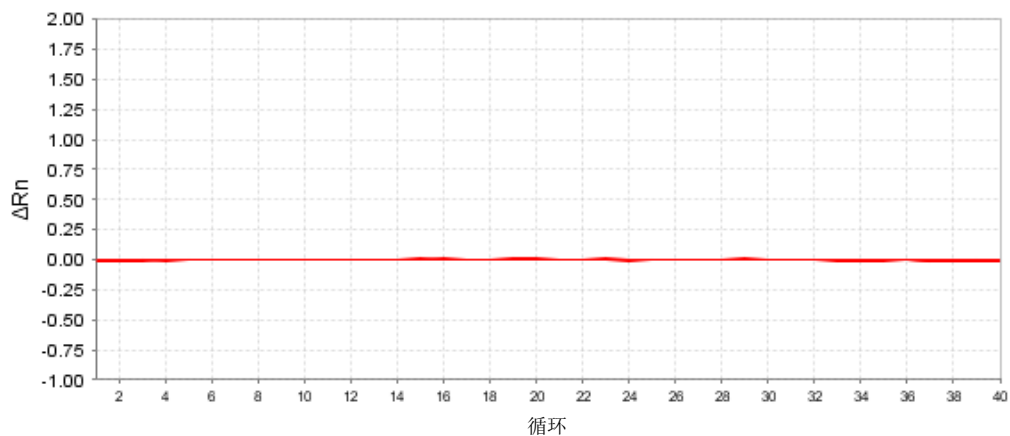


图 6 阴性对照扩增图谱示例

线性图谱中阴性对照的扩增图谱显示为平滑线条。扩展后的 Y 轴表示低水平的扩增。

评估反应孔表视图中的结果

反应孔表概述

≡ 反应孔表显示反应板中每个反应孔的数据。显示的数据取决于具体的实验类型，包括以下信息：

- 样品名称、靶标名称、任务和染料
- 特定方法阶段的具体数值
例如： C_t 或 C_{rit} 、归一化荧光 (Rn)，或熔解温度 (T_m)
- 特定实验类型的具体数值
例如：基因型检测、存在/缺失检测或数量
- 忽略的反应孔
- QC 标记
- 备注

反应孔表分组或排序

≡ 反应孔分组或排序的一些可能选项见下表。现有分组类别取决于具体的实验类型和分析设置。

注意：排序时可以选择多列，但是对各行进行分组时只能选择一个。

分组类别	描述	备注
重复 ^[1,2,3]	按重复样品分组	<ul style="list-style-type: none"> • 检查每个重复样品组的 C_t 或数量值，以评估 C_t 值的精度。
标记	按有标记孔和无标记孔进行分组	<ul style="list-style-type: none"> • 标记表示软件在有标记的反应孔中发现了潜在错误。 • 有关 QC 标记的更多信息，请参见桌面软件的帮助。
C_t ^[1,2,4]	按 C_t 值分组	<ul style="list-style-type: none"> • C_t 值 < 8 — 反应中可能使用的模板过多。 • C_t 值 > 35 — 反应中的靶标数量较少；C_t 值 > 35 — 预计标准差较高。
RQ ^[2]	按 RQ 值分组	<ul style="list-style-type: none"> • RQ 值 < 1 — 与校准样品相比，检测样品中的相对靶标较少。 • RQ > 1 — 与校准样品相比，检测样品中的相对靶标较多。

(续)

分组类别	描述	备注
检测 ^[4,5]	按基因型检测或存在/缺失检测分组	—
Tm1 ^[3]	按 T _m 值分组	Tm1 指主峰。 该分组类别仅适用于以下实验类型： <ul style="list-style-type: none"> • 熔解曲线实验 • 任何有熔解曲线数据收集步骤的实验（例如绝对标准曲线）

^[1] 用于标准曲线实验。^[2] 用于相对标准曲线和比较 C_t ($\Delta\Delta C_t$) 实验。^[3] 用于熔解曲线实验。^[4] 用于基因分型实验。^[5] 用于存在/缺失实验。

使用多组分图谱检查染料信号曲线

多组分图谱概述

多组分图谱显示了每种染料在 PCR 运行期间的完整光谱贡献。


使用多组分图谱获得以下信息。


- 确认参比染料的信号在整个 PCR 过程中保持不变。
- 审查报告基团染料信号的尖峰、低谷和/或突然变化。
- 确认阴性对照反应孔中没有出现扩增。

查看和评估多组分图谱

在**结果**选项卡中，可以查看和评估**多组分图谱**。

如果**结果**选项卡中没有显示数据，则点击**分析**。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**多组分图谱**。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：
 - **图谱颜色：染料**

选定反应孔的**多组分图谱**显示在  反应板布局中。

3. 在反应板布局中，一次选择一个反应孔，然后检查多组分图谱的以下图谱特征。

图谱特征	描述
参比染料	参比染料荧光信号在整个 PCR 过程中应保持相对稳定。
报告基团染料	报告基团染料荧光信号应显示与基线对应的平直区域，随后随着扩增的进行而迅速升高。
信号异常	荧光信号的尖峰、低谷和/或突然变化可能会对数据产生影响。
阴性对照反应孔	阴性对照反应孔不应出现荧光信号的明显增加。

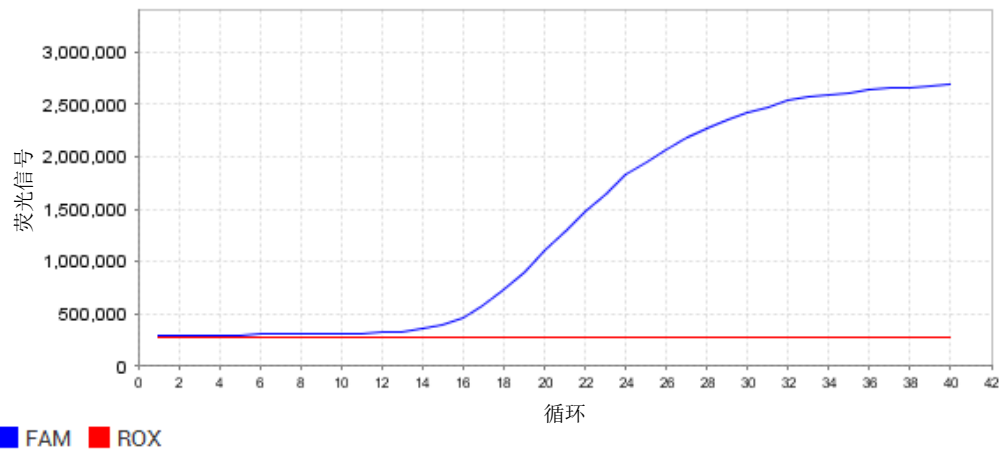


图 7 多组分图谱示例（单个反应孔）

使用原始数据图谱检查信号曲线

原始数据图谱概述

原始数据图谱显示每次实时 PCR 循环过程中每个光学滤光片的原始荧光信号（未归一化）。

查看原始数据图谱，确定相应滤光片信号是否稳定增加（无突变或大跌）。


查看和评估原始数据图谱

在**结果**选项卡中，可以查看和评估**原始数据图谱**。

如果**结果**选项卡中没有显示数据，则点击**分析**。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**原始数据图谱**。

选定反应孔的**原始数据图谱**显示在**反应板布局**中。

2. 点击，显示**显示循环刻度尺**。

3. 点击并拖动**显示循环指针**，从循环数 1 移动至循环数 40，并确认每个滤光片显示特征信号的增加情况。

有关每个滤光片组的更多信息，请参见仪器用户指南（参见附录 F，文件和支持）。

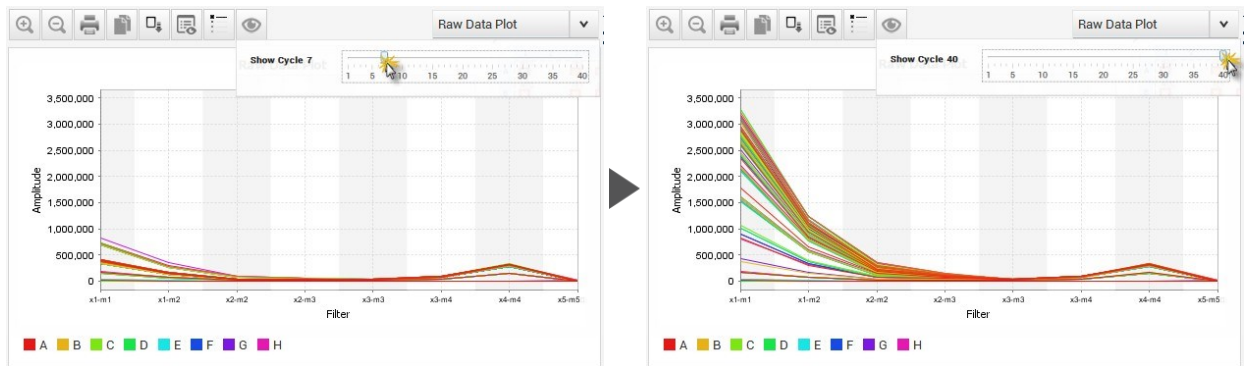


图 8 原始数据图谱示例

检查 QC 摘要中的标记

结果选项卡中的**QC 摘要**显示了 QC 标记列表，包括标记频率和位置。

如果**结果**选项卡中没有显示数据，则点击**分析**。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**QC 摘要**。

2. 检查**标记详情表**和摘要。



标记详情表的**反应孔**列标识了触发标记的反应孔。

3. (可选) 在**标记详情表**中，点击每个标记，即可显示标记的简要说明。

有关标记的更多信息，请参见桌面软件的帮助。

在桌面软件中查看校准结果




从仪器中获得的校准结果可以通过 USB 传输到桌面软件。

1. 在  主页界面上，点击  打开。
2. 导航至目标校准 EDS 文件，并进行选择。





在查看校准数据文件时， 校准 QC 状态显示在  反应板布局 和  反应孔表的右侧。

注意：有关使用  反应板布局 和  反应孔表的更多信息，请参见第三章，“检查结果的一般流程”。





审查 ROI/一致性校准结果

1. 在 ROI 选项卡中，从下拉列表中选择 **滤光片组**，查看相应的结果。
2. 在一致性选项卡中，使用  反应板布局、 反应孔表、 校准 QC 状态检查运行结果。

审查背景校准结果

1. 在  反应板布局 或  反应孔表 中选择反应板孔，查看相应的曲线。有关更多信息，请参见第 19 页的“选择反应板孔”。
2. 检查  反应孔表 中的数据。
 - a. 以表格形式检查每个反应孔的结果。
 - b. 根据反应孔或每个滤光片的归一化后荧光强度，对反应孔进行排序。
 - c. 选择反应孔，检查分析图谱中的数据。
3. 点击  校准 QC 状态，检查校准数据的质量。

检查染料校准结果

1. 在 **校准表** 中选择一个染料行，查看对应的分析数据图谱。
2. 在  反应板布局 或  反应孔表 中选择反应板孔，查看相应的曲线。有关更多信息，请参见第 19 页的“选择反应板孔”。
3. 检查  反应孔表 中的数据。
 - a. 以表格形式检查每个反应孔的结果。
 - b. 根据反应孔或每个滤光片的归一化后荧光强度，对反应孔进行排序。
 - c. 选择反应孔，检查分析图谱中的数据。
4. 点击  校准 QC 状态，检查校准数据的质量。

覆盖校准数据

每个 EDS 文件都包含其运行仪器的校准数据。您可以使用其他仪器的校准数据来分析运行数据。

- 校准数据必须来自同一类型的温控模块（96 孔 0.2 mL 温控模块、96 孔 0.1 mL 温控模块或 384 孔温控模块）。
 - 用于 QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 仪运行的校准数据必须来自 QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 仪的运行。
 - QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 仪运行的校准数据可以覆盖用于 QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 仪运行的校准数据。
 - QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 仪运行的校准数据不能覆盖用于 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 仪运行的校准数据。
1. 打开 EDS 文件，重新进行校准。
 2. 选择分析 ▶ 覆盖校准数据 ▶ 使用来自另一个文件的校准数据。
 3. 导航至包含替代校准数据的 EDS 文件并选中。
 4. 点击打开。
 5. （可选）如要恢复至初始校准数据，选择分析 ▶ 覆盖校准数据 ▶ 恢复至初始校准数据。

导出实验或结果

有关导出实验或结果的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

导出运行数据和结果的选项

任务	操作
将图谱另存为图像文件	点击 
打印图谱	点击 
将图谱复制到剪贴板	点击 
导出运行数据和结果	点击 导出
打印反应板布局	选择文件 ▶ 打印
创建幻灯片	选择文件 ▶ 发送到幻灯片
打印报告	选择文件 ▶ 打印报告

导出配置

数据类型	描述	文件格式
反应板设置文件，用于后续实验	反应板设置信息 例如，孔数、样品名称和颜色、靶标名称、染料和其他反应板内容物。	<ul style="list-style-type: none"> • XLS • XLSX • TXT
已分析的数据，用于进一步分析	QuantStudio™ 格式	<ul style="list-style-type: none"> • XLS • XLSX • TXT
	RDML（实时 PCR 数据标记语言）格式 用于标准曲线、相对标准曲线和比较 C _t 实验。	<ul style="list-style-type: none"> • RDML

4

创建、运行和检查标准曲线实验

■ 标准曲线实验.....	43
■ 在软件中创建标准曲线实验.....	44
■ 设置并运行 PCR 反应.....	45
■ 检查结果.....	46

标准曲线实验

概述

通过标准曲线实验确定样品中的绝对靶标数量。

在标准曲线实验中，软件进行以下操作。

1. 该软件检测标准品稀释系列和检测样品中靶标的扩增情况。
2. 该软件利用标准品稀释系列数据生成标准曲线。
3. 该软件利用标准曲线分析改测样品中靶标的绝对数量。

反应类型

在一次标准曲线实验中可检测多个靶标，但是每个靶标需要有自己的标准曲线。

表 4 标准曲线实验的反应类型

反应类型（任务）	样品描述
标准	含有已知数量或已知相对数量靶标的样品 <ul style="list-style-type: none">• 对于已知数量，使用独立运行条件确定标准样品中的靶标数量。• 对于已知相对数量，生成靶标标准样品的相对稀释系列。

表 4 标准曲线实验的反应类型 (续)

反应类型 (任务)	样品描述
未知	检测样品
无模板对照 (NTC/阴性对照)	水或缓冲液 在 NTC 反应板孔中不得出现靶标扩增。

- 定量实验的精度随着重复反应次数的增加而提高。设置适合实验的重复数。
- 如要准确精确地计算出效率，需在大量的标准品中设置标准品稀释系列，至少有 5 个稀释点，4~6 个对数 (10^4 ~ 10^6 倍)。该操作最好使用质粒或 PCR 产物等浓缩模板。

如果标准品数量有限，靶标丰度低，或已知靶标在给定范围内，可以缩小标准品数量范围。






PCR 兼容选项

表 5 标准曲线实验的 PCR 选项

单重或多重 PCR	PCR 或 RT-PCR ^[1]	检测化学品
单重 多重	PCR 一步法 RT-PCR 两步法 RT-PCR	TaqMan™ SYBR™ Green

^[1] RT-PCR: 反转录-PCR

在软件中创建标准曲线实验

1. 在  主页界面上，创建或打开一个模板。
 - 在  新建实验窗格，点击 **创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在  打开现有实验窗格，点击 **打开**，即可选择打开现有模板。
2. 在 **属性** 选项卡中，输入模板信息。
3. 在 **运行条件** 选项卡中，调整反应体积。
对于大部分实验，默认的运行条件都是合适的。
4. 在 **反应板** 选项卡 (**快速设置**) 中，分配反应板属性。
 - a. 在 **反应板属性** 窗格，从下拉列表中选择 **参比染料**。
5. 在 **反应板** 选项卡 (**快速设置**) 中，定义和分配反应孔属性。
 - a. 在  反应板布局 或  反应孔表 中选择反应孔。

- b. 为选定的反应孔分配样品和靶标。
- 在文本字段输入新的样品和靶标名称。
 - 从下拉列表中选择之前定义的样品和靶标。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或靶标名称将自动填充**报告基团 (FAM)** 和**淬灭基团 (NFQ-MGB)** 的默认值并分配任务（**U**未知）。在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. (可选) 在“**反应板**”选项卡中，设置标准品稀释度（参见第 98 页的（“定义和设置标准品稀释度”））。
7. (可选) 在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。
- a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应孔。
- b. 在**靶标表**中，选择靶标的复选框，然后从下拉列表中选择任务。

反应类型	任务
未知（检测样品）	U
无模板对照	N

8. (可选) 在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，定义和分配生物学重复组（参见第 99 页的“定义和分配生物学重复组”）。

在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，确保**样品表**含有以下样品信息：

- 未知样品的每个技术重复组都有一个样品名称
- (可选) 每个靶标的标准样品

设置并运行 PCR 反应

- 准备 PCR 反应。遵照生产商有关试剂的说明，并按照软件中的反应板布局设置（参见第 21 页的“准备反应”）。
- 在桌面软件中，打开相应模板（EDT 文件）。
- 将反应板载入仪器，开始运行（参见第 23 页的“开始并监测运行”）。

检查结果

工作流程：检查标准曲线实验

查看扩增图谱，确认或校正阈值和基线设置（第 31 页）



评估标准曲线图谱（第 48 页）



检查异常值数据和（可选）忽略反应孔（第 34 页）



（可选）查看多组分图谱，检查染料信号曲线（第 37 页）



（可选）查看原始数据图谱，检查信号曲线（第 38 页）



（可选）查看 QC 摘要中的标记（第 39 页）



（可选）配置分析设置（第 48 页第 104 页）

切记！ 如果您忽略反应孔或配置分析设置，则点击**分析**，重新分析数据。

标准曲线图谱概述

标准曲线图谱是指定为标准品的样品的标准曲线。软件根据标准曲线计算未知靶标的数量。



表 6 需从标准曲线图谱中检查的结果或指标

结果或指标	描述	评估标准
斜率和扩增效率	利用标准曲线中回归线的斜率计算扩增效率。	接近 -3.3 的斜率表示 PCR 扩增效率最佳，达到 100%。 影响扩增效率的因素： <ul style="list-style-type: none"> 引物和探针设计不当 标准品数量范围 — 如要准确精确地计算出效率，需使用大量的标准品，5~6 个对数 ($10^5 \sim 10^6$ 倍)。 标准品重复数 — 如要准确地计算效率，需要采用重复，减少移液不准确造成的影响。 PCR 抑制剂 — 反应中的 PCR 抑制剂和污染会降低扩增效率。 其他可能的因素： <ul style="list-style-type: none"> 反应混合液的组分和属性，如盐含量、DMSO、pH 值等。 样品或试剂移液不准确 分析设置不当 反应板设置错误
R^2 值 (关联系数)	R^2 值计算的是回归线与标准反应的单个 C_q 数据点之间的拟合程度。	<ul style="list-style-type: none"> 1.00 表示回归线与数据点完美拟合。 当 R^2 值 >0.99 时最佳。
误差	标准曲线中回归线斜率的标准误差。 该误差可用于计算斜率的置信区间 (CI)，从而计算扩增效率。	可接受数值由实验标准确定。
C_t 值	阈值循环数 (C_t) 是荧光水平达到阈值时的 PCR 循环数。	C_t 值 > 8 且 < 35 时最佳。 <ul style="list-style-type: none"> C_t 值 < 8 — 反应中可能使用的模板过多。 C_t 值 > 35 — 反应中靶标数量较少；C_t 值 > 35 — 预计标准差较高。


查看和评估标准曲线图谱

在**结果**选项卡中，可以查看和评估**标准曲线图谱**。

如果**结果**选项卡中没有显示数据，则点击**分析**。

1. 从下拉列表中选择**标准曲线**。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：
 - **靶标**：选择感兴趣的靶标
 - **图谱颜色**：样品、靶标或任务
 - 在  **反应板布局** 中，选择所有反应孔

显示标准曲线图谱。斜率、 R^2 值、扩增效率、误差显示在图谱下方。

3. 确认斜率、 R^2 值、扩增效率、误差符合实验标准。
4. 目视检查所有未知样品 C_q (C_t 或 C_{it}) 值是否在标准曲线范围内。
5. 在  **反应孔表** 中，使用 **分组依据** 下拉列表确认所有重复样品的 C_q (C_t 或 C_{it}) 值符合实验标准。

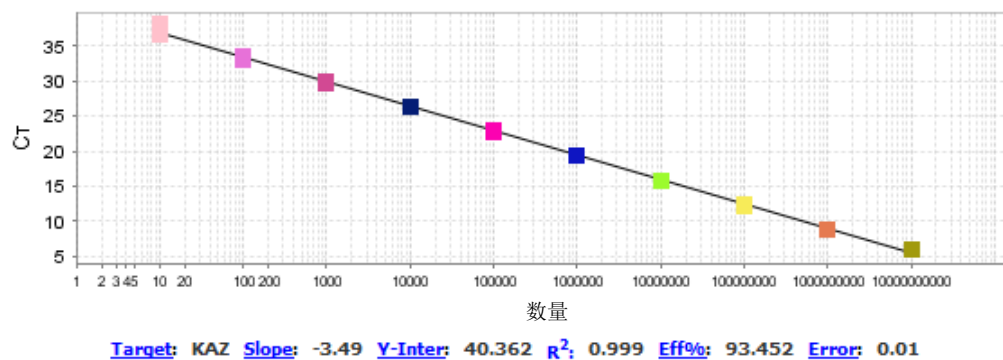


图9 标准曲线图谱示例


如果结果不符合实验标准，使用以下任一策略解决问题：

- 忽略反应孔，然后重新分析。有关更多信息，请参见第 34 页的“忽略分析结果中的异常值”。
- 重复进行实验，调整模板设置和分析设置，以便改善结果。

如要了解有关标准曲线图谱的更多信息，请参见第 47 页的“标准曲线图谱概述”。

标准曲线设置概述

您可以使用另一个实验的标准曲线，并将其应用到当前实验中。两种实验的仪器类型、模块类型和运行条件必须相同。

如要导入外部标准曲线，可选择  **分析设置** ▶ **标准曲线设置**，然后按照界面上的说明进行操作。

有关调整标准曲线设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

5

创建、运行和检查相对标准曲线实验和比较 C_t 实验

■ 相对标准曲线实验	49
■ 比较 C_t 实验.....	51
■ 相对定量：相对标准曲线与比较 C_t	52
■ 在软件中创建相对标准曲线实验.....	53
■ 在软件中创建比较 C_t 实验.....	54
■ 设置并运行 PCR 反应	55
■ 检查结果.....	56

相对标准曲线实验

概述

通过相对标准曲线实验确定样品中的相对靶标数量。

在相对标准曲线实验中，软件进行以下操作。

1. 该软件检测标准品稀释系列、参比样品（校准品）、检测样品中感兴趣的靶标和内源性对照靶标的扩增情况。

内源性对照品是一种在所有样品中平等表达的靶标；内源性对照品包括 β 肌动蛋白、GAPDH、18S 核糖体 RNA。该软件可以通过算法将多个内源性对照靶标纳入相对定量计算。

参比样品作为相对定量结果（或 1 份样品）的依据。例如，在一项检测药物对基因表达影响的研究中，未处理的对照品即可作为参比样品。

2. 该软件利用相应标准品稀释系列数据，生成感兴趣的靶标和内源性对照品的标准曲线。
3. 该软件利用标准曲线分析每个样品中感兴趣的靶标和内源性对照品的数量。然后，将每个样品中的靶标数量归一化为样品的内源性对照品数量。
4. 为确定检测样品中靶标的相对数量，该软件使用样品中的归一化靶标数量除以参比样品中的归一化靶标数量。

有关该方法与比较 C_t ($\Delta\Delta C_t$) 法的比较，请参见第 52 页的“相对定量：相对标准曲线与比较 C_t ”。

反应类型

相对标准曲线实验包括下列用于内源性对照靶标和每个感兴趣靶标的反应类型。

表 7 相对标准曲线实验的反应类型

反应类型（任务）	样品描述
标准	含有已知数量或已知相对数量靶标的样品 <ul style="list-style-type: none"> 对于已知数量，使用独立运行条件确定标准样品中的靶标数量。 对于已知相对数量，生成靶标标准样品的相对稀释系列。
参比样品 ^[1]	作为相对定量结果依据的样品。
未知	检测样品或参比样品
无模板对照（NTC/阴性对照）	水或缓冲液 在 NTC 反应板孔中不得出现靶标扩增。

^[1] 如要将样品鉴定为参比样品，需检查相对定量设置。

- 定量实验的精度随着重复反应次数的增加而提高。设置适合实验的重复数。
- 如要准确精确地计算出效率，需在大量的标准品中设置标准品稀释系列，至少有 5 个稀释点，4~6 个对数（ 10^4 ~ 10^6 倍）。该操作最好使用质粒或 PCR 产物等浓缩模板。

如果标准品数量有限，靶标丰度低，或已知靶标在给定范围内，可以缩小标准品数量范围。

PCR 兼容选项

表 8 相对标准曲线实验的 PCR 选项

单重或多重 PCR	PCR 或 RT-PCR ^[1]	检测化学品
单重	PCR	TaqMan™
多重	一步法 RT-PCR 两步法 RT-PCR	SYBR™ Green

^[1] RT-PCR: 反转录 PCR

比较 C_t 实验

概述

通过比较 C_t ($\Delta\Delta C_t$) 实验，确定样品中的相对靶标数量。

在比较 C_t 实验中，软件进行以下操作。

1. 该软件检测参比样品（校准品）、检测样品中感兴趣的靶标和内源性对照靶标的扩增情况。

内源性对照品是一种在所有样品中平等表达的靶标；内源性对照品包括 β 肌动蛋白、GAPDH、18S 核糖体 RNA。该软件可以通过算法将多个内源性对照靶标纳入相对定量计算。

参比样品作为相对定量结果（或 1 份样品）的依据。例如，在一项检测药物对基因表达影响的研究中，未处理的对照品即可作为参比样品。

2. 以内源性对照品为基准，对感兴趣的靶标的检测结果进行归一化。
3. 为确定检测样品中靶标的相对数量，该软件将样品的归一化 ΔC_q (ΔC_t 或 ΔC_{rt}) 与参比样品的归一化 ΔC_q (ΔC_t 或 ΔC_{rt}) 进行比较。

有关该方法与相对标准曲线法的比较，请参见第 52 页的“相对定量：相对标准曲线与比较 C_t ”。

反应类型

比较 C_t 实验包括下列用于内源性对照靶标和每个感兴趣靶标的反应类型。

表 9 比较 C_t 实验的反应类型

反应类型（任务）	样品描述
参比样品 ^[1]	作为相对定量结果依据的样品。
未知	检测样品或参比样品
无模板对照（NTC/阴性对照）	水或缓冲液 在 NTC 反应板孔中不得出现靶标扩增。

^[1]如要将样品鉴定为参比样品，需检查相对定量设置。

定量实验的精度随着重复反应次数的增加而提高。设置适合实验的重复数。

PCR 兼容选项

表 10 比较 C_t 实验的 PCR 选项

单重或多重 PCR	PCR 或 RT-PCR ^[1]	检测化学品
单重 多重	PCR 一步法 RT-PCR 两步法 RT-PCR	TaqMan™ SYBR™ Green

^[1] RT-PCR: 反转录 PCR

相对定量：相对标准曲线与比较 C_t

使用相对标准曲线实验或比较 C_t 实验确定检测样品中感兴趣的靶标相对于参比样品的相对定量。相对定量实验通常用于以下应用。

- 比较某基因在不同组织中的表达水平。
- 比较某基因在已处理样品中与未处理样品中的表达水平。
- 比较感兴趣的基因在不同基因背景中的表达水平。
- 分析基因表达在特定治疗条件下随时间推移的变化。

表 11 相对标准曲线实验和比较 C_t 实验的比较

特性	相对标准曲线	比较 C_t
典型用途	最适合 PCR 扩增效率欠佳的检测。	最适合对多个样品中多个基因的相对基因表达进行高通量检测。
优势	由于靶标和内源性对照品的 PCR 扩增效率不需要相等，因此所需验证次数少。	<ul style="list-style-type: none"> • 如果靶标和内源性对照品的 PCR 扩增效率一致，不需要使用标准曲线也可确定样品中靶标的相对水平。 • 减少试剂的使用。 • 反应板中有更大空间。
局限性	必须为每个靶标绘制标准曲线，因此反应板内需要更多试剂和更大的空间。	<ul style="list-style-type: none"> • (PCR 扩增效率低) 检测欠佳可能导致结果不准确。 • 在使用比较 C_t 法之前，建议确定靶标检测和内源性对照检测的 PCR 扩增效率大致相等。

在软件中创建相对标准曲线实验

1. 在🏠主页界面上，创建或打开一个模板。
 - 在🔧新建实验窗格，点击**创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在🔧打开现有实验窗格，点击**打开**，即可选择打开现有模板。
2. 在**属性**选项卡中，输入模板信息。
3. 在**运行条件**选项卡中，调整反应体积。
对于大部分实验，默认的运行条件都是合适的。
4. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，分配反应板属性。
 - a. 在**反应板属性**窗格，从下拉列表中选择**参比染料**、**参比样品**、**内源性对照品**。
5. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，定义和分配反应孔属性。
 - a. 在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 为选定的反应孔分配样品和靶标。
 - 在文本字段输入新的样品和靶标名称。
 - 从下拉列表中选择之前定义的样品和靶标。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或靶标名称将自动填充**报告基团 (FAM)** 和**淬灭基团 (NFQ-MGB)** 的默认值并分配任务（**U**未知）。在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. 在**反应板**选项卡中，设置标准品稀释度（参见第 98 页的“定义和设置标准品稀释度”）。
7. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。
 - a. 在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 在**靶标表**中，选择靶标的复选框，然后从下拉列表中选择任务。

反应类型	任务
未知（检测样品）	U
无模板对照	N

8. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，定义和分配生物学重复组（参见第 99 页的“定义和分配生物学重复组”）。

感兴趣靶标和内源性对照靶标的每个反应孔应分配有标准品稀释度、未知和无模板对照任务、相应样品。

在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，确保**样品**表包含以下样品：

- 未知样品
- 参比样品
- （可选）对于靶标标准品的稀释，每个内源性对照靶标和感兴趣靶标的每个稀释步骤均有各自的样品名称。

在软件中创建比较 C_t 实验

1. 在🏠**主页**界面上，创建或打开一个模板。
 - 在📄**新建实验**窗格，点击**创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在📄**打开现有实验**窗格，点击**打开**，即可选择打开现有模板。

2. 在**属性**选项卡中，输入模板信息。

3. 在**运行条件**选项卡中，调整反应体积。

对于大部分实验，默认的运行条件都是合适的。

4. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，分配反应板属性。

- a. 在**反应板属性**窗格，从下拉列表中选择**参比染料**、**参比样品**、**内源性对照品**。

5. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，定义和分配反应孔属性。

- a. 在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中选择反应孔。

- b. 为选定的反应孔分配样品和靶标。

- 在文本字段输入新的样品和靶标名称。
- 从下拉列表中选择之前定义的样品和靶标。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或靶标名称将自动填充**报告基团 (FAM)** 和**淬灭基团 (NFQ-MGB)** 的默认值并分配任务（**U**未知）。在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。

- a. 在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中选择反应孔。

- b. 在**靶标表**中，选择靶标的复选框，然后从下拉列表中选择任务。

反应类型	任务
未知（检测样品）	U
无模板对照	N

7. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，定义和分配生物学重复组（参见第 99 页的“定义和分配生物学重复组”）。

感兴趣靶标和内源性对照靶标的每个反应孔应分配有未知和无模板对照任务，以及相应的样品。

在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，确保**样品**表包含：

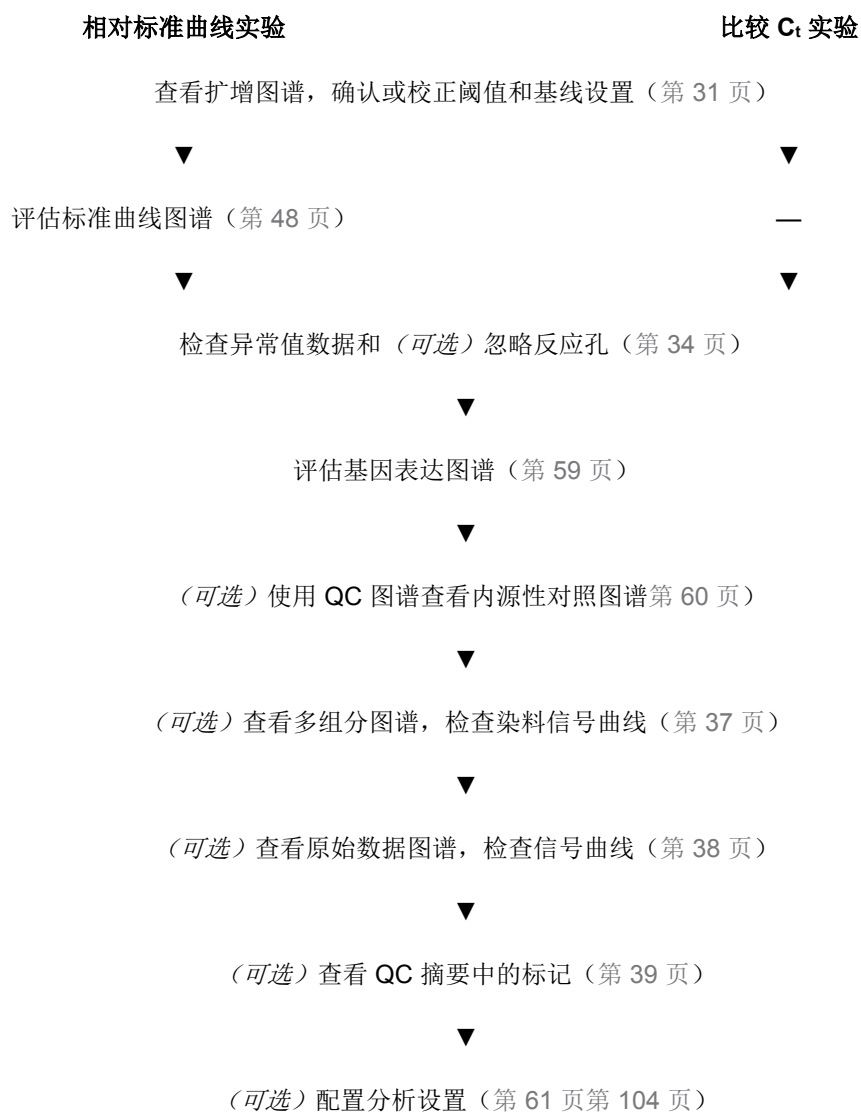
- 未知样品
- 参比样品

设置并运行 PCR 反应

1. 准备 PCR 反应。遵照生产商有关试剂的说明，并按照软件中的反应板布局设置（参见第 21 页的“准备反应”）。
2. 在桌面软件中，打开相应模板（EDT 文件）。
3. 将反应板载入仪器，开始运行（参见第 23 页的“开始并监测运行”）。

检查结果

工作流程：检查相对标准曲线实验和比较 C_t 实验



切记！ 如果您忽略反应孔或配置分析设置，则点击**分析**，重新分析数据。

查看和评估标准曲线图谱

本节仅适用于相对标准曲线实验。

标准曲线图谱概述

标准曲线图谱是指定为标准品的样品的标准曲线。软件根据标准曲线计算未知靶标的数量。

表 12 需从标准曲线图谱中检查的结果或指标

结果或指标	描述	评估标准
斜率和扩增效率	利用标准曲线中回归线的斜率计算扩增效率。	接近 -3.3 的斜率表示 PCR 扩增效率最佳，达到 100%。 影响扩增效率的因素： <ul style="list-style-type: none"> • 引物和探针设计不当 • 标准品数量范围 — 如要准确精确地计算出效率，需使用大量的标准品，5~6 个对数 ($10^5 \sim 10^6$ 倍)。 • 标准品重复数 — 如要准确地计算效率，需要采用重复，减少移液不准确造成的影响。 • PCR 抑制剂 — 反应中的 PCR 抑制剂和污染会降低扩增效率。 • 其他可能的因素： <ul style="list-style-type: none"> — 反应混合液的组分和属性，如盐含量、DMSO、pH 值等。 — 样品或试剂移液不准确 — 分析设置不当 — 反应板设置错误
R ² 值（关联系数）	R ² 值计算的是回归线与标准反应的单个 C _q 数据点之间的拟合程度。	<ul style="list-style-type: none"> • 1.00 表示回归线与数据点完美拟合。 • 当 R² 值 >0.99 时最佳。
误差	标准曲线中回归线斜率的标准误差。 该误差可用于计算斜率的置信区间 (CI)，从而计算扩增效率。	可接受数值由实验标准确定。


表 12 需从标准曲线图谱中检查的结果或指标 (续)


结果或指标	描述	评估标准
C _t 值	阈值循环数 (C _t) 是荧光水平达到阈值时的 PCR 循环数。	C _t 值 > 8 且 < 35 时最佳。 <ul style="list-style-type: none"> • C_t 值 < 8 — 反应中可能使用的模板过多。 • C_t 值 > 35 — 反应中靶标数量较少；C_t 值 > 35 — 预计标准差较高。

查看和评估标准曲线图谱


在结果选项卡中，可以查看和评估标准曲线图谱。

如果结果选项卡中没有显示数据，则点击分析。

1. 从下拉列表中选择标准曲线。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：

- **靶标：**选择感兴趣的靶标
- **图谱颜色：**样品、靶标或任务
- 在  反应板布局中，选择所有反应孔

显示标准曲线图谱。斜率、R² 值、扩增效率、误差显示在图谱下方。

3. 确认斜率、R² 值、扩增效率、误差符合实验标准。
4. 目视检查所有未知样品 C_q (C_t 或 C_{it}) 值是否在标准曲线范围内。
5. 在  反应孔表中，使用 **分组依据** 下拉列表确认所有重复样品的 C_q (C_t 或 C_{it}) 值符合实验标准。

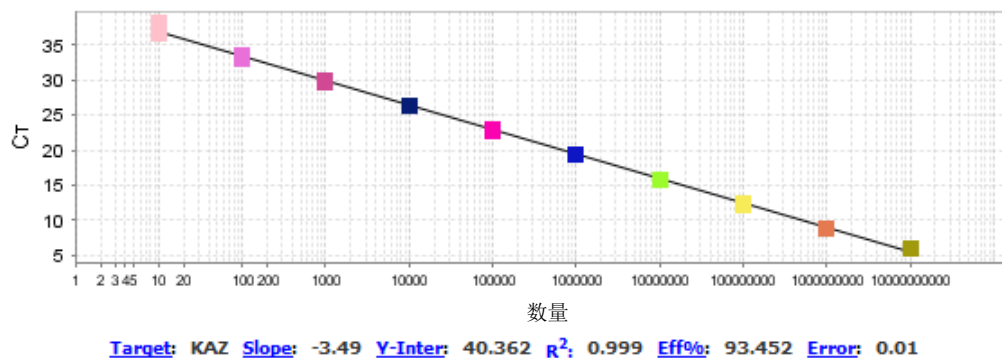


图 10 标准曲线图谱示例

如果结果不符合实验标准，使用以下任一策略解决问题：

- 忽略反应孔，然后重新分析。有关更多信息，请参见第 34 页的“忽略分析结果中的异常值”。
- 重复进行实验，调整模板设置和分析设置，以便改善结果。

如要了解有关标准曲线图谱的更多信息，请参见第 47 页的“标准曲线图谱概述”。

标准曲线设置概述

您可以使用另一个实验的标准曲线，并将其应用到当前实验中。两种实验的仪器类型、模块类型和运行条件必须相同。

如要导入外部标准曲线，可选择 **分析设置** ▶ **标准曲线设置**，然后按照界面说明进行操作。

有关调整标准曲线设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

基因表达图谱概述

基因表达图谱显示了相对标准曲线和比较 C_t 实验的相对定量计算结果。

检查基因表达图谱，评估检测样品中相对参比样品的研究靶标表达水平的倍数变化。

根据实验重点不同，提供了两个图谱。每个图谱均可在线性、log₁₀、Ln、log₂ 标度上查看。

表 13 基因表达图谱

图谱类型	描述
相对定量与靶标关系	按靶标对相对定量 (RQ) 值进行分组。针对每个靶标绘制样品图谱。
相对定量与样品关系	按样品对相对定量 (RQ) 值进行分组。针对每个样品绘制靶标图谱。

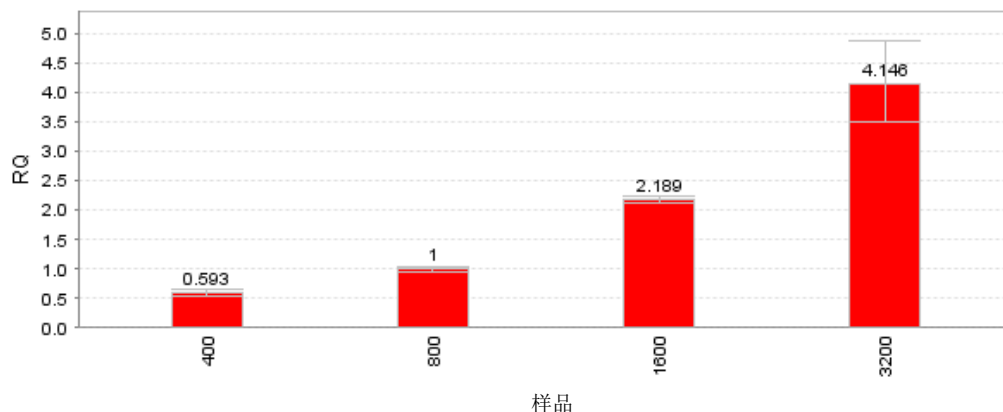


图 11 基因表达图谱示例

在该示例中，存在一个感兴趣的靶标，参比样品（校准品）为样品 800。

QC 图谱概述

QC 图谱是所有样品中潜在内源性对照靶标的 C_q (C_t 或 C_{it}) 表达水平的直观显示 (内源性对照图谱)。

使用 QC 图谱有助于选择实验的最佳内源性对照品。选择数量 [由 C_q (C_t 或 C_{it}) 值表示] 在实验条件下始终保持不变的靶标。

所有靶标均可以在 QC 图谱中显示。您一次最多可以查看四个潜在内源性对照品。

查看和评估 QC 图谱

您在**结果**选项卡中，可以查看和评估 **QC 图谱**。

如果未显示数据，点击**分析**。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择 **QC 图谱**。

显示**内源性对照图谱**。

2. 在右侧窗格中，选择需要显示的靶标，然后从下拉列表中选择颜色和形状。
3. (可选) 在**查看重复结果表**选项卡中，选择从分析中忽略的样品。
4. (可选) 如要更改分析使用的内源性对照品，选择**分析设置** ▶ **相对定量设置** (参见第 61 页的“相对定量设置概述”)。
5. 点击**分析**，查看调整结果。

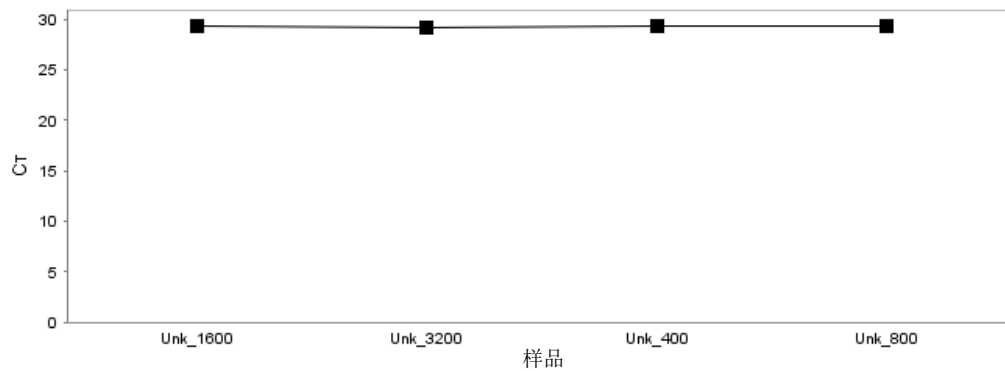


图 12 QC 图谱示例

相对定量设置概述

在结果选项卡中，选择  分析设置 ▶ 相对定量设置，配置以下参数：

参数	描述
分析类型	选择 多重 或 单重 分析。
参比样品	设置参比样品，或将生物学重复组设置为参比样品。
内源性对照品	更改内源性对照品，或选择多个内源性对照品。
效率 (仅限比较 C _t 实验)	设置靶标的扩增效率。 每个靶标的扩增效率均根据相对标准曲线实验中的标准稀释系列进行计算。
异常值剔除 (仅限多重反应)	剔除 ΔC_q (ΔC_t 或 ΔC_{It}) 值小于等于输入值的异常值。
RQ 最小/最大值计算	确定用于计算相对定量最小值和最大值（误差条）的算法。 <ul style="list-style-type: none">• 置信度 — 选择该算法，根据选定的置信度计算相对定量的最小值和最大值。• 标准差 — 选择该算法，根据选定的标准差倍数计算相对定量的最小值和最大值。

有关调整相对定量设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

6

创建、运行和检查基因分型实验

■ 基因分型实验.....	62
■ 在软件中创建基因分型实验.....	63
■ 设置并运行 PCR 反应	65
■ 检查结果	65

基因分型实验

概述

通过基因分型实验检测靶标核酸序列的单核苷酸多态性 (SNP) 变异。

基因分型实验使用预先配制的 TaqMan™ SNP 基因分型检测试剂盒，包括以下组分：

- 两个序列特异性引物，用于扩增含有感兴趣的 SNP 的序列。
- 两个等位基因特异性 TaqMan™ 探针，用于等位基因 1 和等位基因 2

在基因分型实验中，软件进行以下操作。

1. 该软件以各反应孔中参比荧光染料的荧光值为基准，将报告基团染料的荧光信号进行归一化。
2. 该软件在等位基因鉴别图谱上绘制每个样品反应孔的归一化报告基团染料信号，与等位基因特异性探针的报告基团染色强度进行对比。
3. 该软件对样品数据采用了聚类算法，根据各成簇样品在图谱上的位置，分配基因型检测的结果。

反应类型

表 14 基因分型实验的反应类型

反应类型（任务）	样品描述
未知	检测样品
无模板对照	水或缓冲液 在 NTC 反应板孔中不得出现靶标扩增。
等位基因对照品 (1/1)	等位基因 1 的纯合对照样品
等位基因对照品 (1/2)	等位基因 1/等位基因 2 的杂合对照样品
等位基因对照品 (2/2)	等位基因 2 的纯合对照样品

等位基因对照品非必选项，但建议使用。使用等位基因对照品有助于提高聚类算法的准确性，特别在运行的样品数量有限的情况下。

在基因分型实验中，软件对各个反应孔进行检测。对每次反应运行 3 个或更多重复样品，有助于发现可能存在的异常值反应孔。

PCR 兼容选项

表 15 基因分型实验的 PCR 选项

单重或多重 PCR	PCR 或 RT-PCR ^[1]	检测化学品
多重 ^[2]	PCR	TaqMan™




^[1] RT-PCR: 反转录 PCR

^[2] 所有 SNP 基因分型检测试剂盒均为多重检测试剂盒，每个等位基因都有一个探针。可在单一反应孔中进行多次 SNP 检测。

基因分型检测基于终点数据（在任何 PCR 循环阶段以外收集的数据）或实时数据（在 PCR 循环阶段收集的数据）。有关详细信息，请参见本指南的分析设置章节。

我们建议在 PCR 阶段收集实时扩增数据，以便进行故障排除。

在软件中创建基因分型实验

- 在  主页界面上，创建或打开一个模板。
 - 在  新建实验窗格，点击 **创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在  打开现有实验窗格，点击 **打开**，即可选择打开现有模板。
- 在 **属性** 选项卡中，输入模板信息。
- 在 **运行条件** 选项卡中，调整反应体积。

对于大部分实验，默认的运行条件都是合适的。






4. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，分配反应板属性。
 - a. 在**反应板属性**窗格，从下拉列表中选择**参比染料**。
5. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，定义和分配反应孔属性。
 - a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 为选定反应孔分配样品和 **SNP** 检测。
 - 在文本字段输入新样品和 **SNP** 检测名称。
 - 从下拉列表中选择之前定义的样品和 **SNP** 检测。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或 **SNP** 检测名称将自动填充以下默认数值：

等位基因 1	报告基团	淬灭基团	等位基因 2	报告基团	淬灭基团	任务
等位基因 1	VIC	NFQ-MGB	等位基因 2	FAM	NFQ-MGB	 未知

在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. （**可选**）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。
 - a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 在 **SNP 检测**表中，选择 **SNP** 检测的复选框，然后从下拉列表中选择任务。

反应类型	任务
未知（检测样品）	
无模板对照	
等位基因对照品 (1/1) ^[1]	
等位基因对照品 (1/2) ^[1]	
等位基因对照品 (2/2) ^[1]	

^[1]非必选项，但建议使用

在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，确保**样品**表包含以下样品：

- 未知样品
- （**可选**）等位基因对照样品

设置并运行 PCR 反应

1. 准备 PCR 反应。遵照生产商有关试剂的说明，并按照软件中的反应板布局设置（参见第 21 页的“准备反应”）。
2. 在桌面软件中，打开相应模板（EDT 文件）。
3. 将反应板载入仪器，开始运行（参见第 23 页的“开始并监测运行”）。

检查结果

工作流程：检查基因分型实验

评估等位基因鉴别图谱（第 66 页）



(可选) 查看扩增图谱（第 31 页）



检查异常值数据和 *(可选)* 忽略反应孔（第 34 页）



(可选) 查看多组分图谱，检查染料信号曲线（第 37 页）



(可选) 查看原始数据图谱，检查信号曲线（第 38 页）



(可选) 查看 QC 摘要中的标记（第 39 页）



(可选) 配置分析设置（第 68 页第 104 页）

切记！ 如果您忽略反应孔或配置分析设置，则点击**分析**，重新分析数据。

等位基因鉴别图概述

等位基因鉴别图对比了 SNP 检测等位基因特异性探针报告基团染料的 Rn 或 ΔRn 。这是软件算法中针对基因分型检测的中间步骤。

数据点倾向于沿横轴（等位基因 1）、纵轴（等位基因 2）或对角线（等位基因 1/等位基因 2）成簇。

表 16 等位基因鉴别图中的数据集群

大幅增加区域	集群位置	表示
仅限 VIC™ 染料标记探针的荧光	横轴	等位基因 1 的纯合性
仅限 FAM™ 染料标记探针的荧光	纵轴	等位基因 2 的纯合性
VIC™ 和 FAM™ 染料标记探针的荧光	对角线	等位基因 1~等位基因 2 的杂合性

检查等位基因鉴别图谱，评估数据簇。


- 确认对照样品成簇方式符合预期。
- 目视评估三个可能基因分型的成簇。

注意：如果所有样品属于一个基因分型（形成一成簇），则桌面软件成簇算法无法进行基因分型。



查看和评估等位基因鉴别图谱



在结果选项卡中，可以查看和评估等位基因鉴别谱。

如果结果选项卡中没有显示数据，则点击分析。

1. 在结果选项卡中，从下拉列表中选择等位基因鉴别图谱。
2. 点击 ，配置图谱，然后进行以下选择：
 - **SNP 检测：**选择感兴趣的检测
 - **图谱类型：**笛卡尔坐标系或极坐标系

显示选定 SNP 检测的等位基因鉴别图谱。

注意：最初，图谱中的所有点均为青色，因为  反应板布局 中的全部反应孔均被选中。在图谱或  反应板布局 中点击任何位置，即可取消选择全部反应孔。图谱中的数据点更改为识别颜色。

3. 确认对照数据如预期方式成簇。
 - a. 在  反应孔表 或  反应板布局 中，选择包含对照品的反应孔，以在图谱中突出显示相应数据点。
 - b. 检查每个基因型对照品的数据点是否沿图谱的预期轴向成簇。

4. 选择图谱左下角的簇，然后确认在☐☐☐☐**反应板布局**或☐☐☐☐**反应孔表**只选择阴性对照反应孔。

由于以下原因之一，样品可能会意外地与阴性对照品成簇。

- 样品不含 DNA。
- 样品含有 PCR 抑制剂。
- 样品是序列缺失的纯合样品。

5. 检查图谱中的其他簇。

- a. 点击拖动某个簇周围的方框，选择关联反应孔。
- b. 确认在☐☐☐☐**反应板布局**或☐☐☐☐**反应孔表**中选择了目标反应孔。

6. 查看处于三个基因型簇之外的异常值。

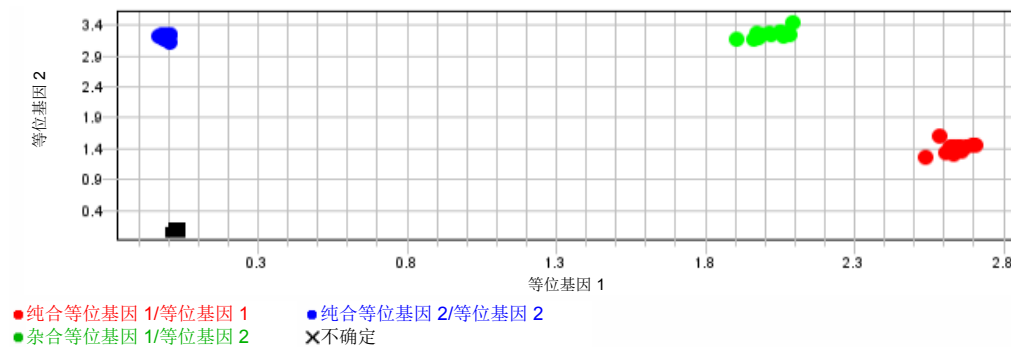


图 13 等位基因鉴别图谱示例


如要确认结果，重新检测异常值和没有扩增的样品（与阴性对照品成簇）

执行手动检测


在**结果**选项卡中，执行手动检测。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**等位基因鉴别图谱**。
2. 如果没有对数据进行分析，则点击**分析**。
3. （仅限多次检测）点击👁️，然后从下拉列表中选择**SNP 检测**。
4. 在**等位基因鉴别图谱**中，使用套索工具选择需要手动检测的样品。
5. 点击👁️，然后从**应用检测**下拉列表中选择**等位基因检测**。
6. 点击**分析**。

切记！如要在重新分析后保持手动检测，则选择⚙️**分析设置** ▶ **检测设置**，然后取消选择**默认设置**，选择**保持之前分析所用的手动检测**。

注意： 如要删除手动检测，则选择  **分析设置** ▶ **检测设置**，取消选择 **保持之前分析所用的手动检测**，然后重新分析。

检测设置概述（基因分型）

在**结果**选项卡中，选择  **分析设置** ▶ **检测设置**，编辑以下设置：

- 数据分析设置
- 对 SNP 检测采用默认检测设置而不进行自定义检测设置
- 单个 SNP 检测的自定义检测设置

表 17 数据分析设置选项（基因分型实验）

数据分析设置	描述
仅分析 PCR 后的读数	只将 PCR 后读取的数据用于检测。
分析 PCR 前读取的数据和 PCR 后读取的数据 ^[1]	从 PCR 后的读数中减去 PCR 前的读数，以确定检测。
分析实时 Rn 数据 ^[2,3]	循环阶段用户选定循环中的归一化报告基团数据 (Rn) 用于确定检测。
分析实时 Rn - 中位数 (Rna~Rnb) ^[2,4,3]	循环阶段用户选定循环中减去了快速基线的 Rn 用来确定检测。减去了快速基线的 Rn 等于 Rn 减去基线区域的中值。减去中位数可以提高数据的准确性。
分析实时 dRn 数据 ^[2,3]	循环阶段用户选定循环中的常规 ΔRn (dRn) 用于确定检测。 ΔRn 是通过减去穿过基线区域的最佳拟合线计算而得到的。如果基线不平直，则此方法较佳。

^[1] 运行条件必须包括预读取阶段。

^[2] PCR 阶段，数据收集功能必须处于开启状态。

^[3] 分析不限于最后一次循环；使用显示踪迹功能调整分析循环，同时查看等位基因鉴别图谱。

^[4] Rna~Rnb 指基线区域从起始循环数到结束循环数的所有循环。

表 18 检测设置选项（基因分型实验）

检测设置	描述
启用自动识别器	使用自动识别器算法识别基因型。
保持之前分析所用的手动识别	如果启用了自动识别器，则在再次分析后保留手动识别。
质量值	质量值专门评估基因分型检测正确性（与正确成簇相关）的概率。 如果质量值小于设置，则无法确定检测结果。

有关调整检测设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

7

创建、运行和检查存在/缺失实验

■ 存在/缺失实验.....	70
■ 在软件中创建存在/缺失实验.....	71
■ 设置并运行 PCR 反应.....	72
■ 检查结果.....	73

存在/缺失实验

概述

通过存在/缺失实验确定样品中是否存在靶标核酸序列。

该软件根据用算法确定的检测阈值，检测是否存在靶标。（检测阈值不同于 C_t 阈值； C_t 阈值不用于检测。）

反应类型

存在/缺失反应类型取决于实验是否设置内部阳性对照 (IPC)。

- 使用 **IPC 的存在/缺失实验（推荐）** 是针对感兴趣的靶标和 IPC 靶标进行的多重检测。IPC 用于确认感兴趣靶标的阴性结果并非由 PCR 失败导致。

表 19 使用 IPC 的存在/缺失实验的反应类型

反应类型（任务）	样品描述
未知	检测样品 和 IPC 模板
阴性对照	水或缓冲液 和 IPC 模板
无扩增对照（NAC；阻断的 IPC） ^[1]	水或缓冲液加阻断剂 和 IPC 模板；阻断剂阻止的扩增

^[1] 该对照需要至少两个重复样品。

- 不使用 IPC 的存在/缺失实验为单重反应。

表 20 使用 IPC 的存在/缺失实验的反应类型

反应类型（任务）	样品描述
未知	检测样品
阴性对照	水或缓冲液

软件对各个反应孔进行检测。每次反应运行三个或更多重复样品，可以帮助确定可能存在的异常值反应孔。

PCR 兼容选项

表 21 存在/缺失实验的 PCR 选项

单重或多重 PCR	PCR 或 RT-PCR ^[1]	检测化学品
单重（不使用 IPC） 多重（使用 IPC）	PCR 一步法 RT-PCR 两步法 RT-PCR	TaqMan™

^[1]RT-PCR: 反转录-PCR




存在/缺失检测根据终点数据（PCR 阶段后收集的数据）进行。

- 收集的数据是报告基因染料的归一化强度值或 Rn。
- 如果终点实验包括 PCR 前的数据点，则软件根据以下公式计算 δRn (ΔRn) 值：

$$\Delta Rn = Rn_{(PCR \text{ 后荧光读数})} - Rn_{(PCR \text{ 前荧光读数})}, \text{ 其中 } Rn = \text{归一化读数}.$$

我们建议在 PCR 阶段收集实时扩增数据，以便进行故障排除。







在软件中创建存在/缺失实验

1. 在  主页界面上，创建或打开一个模板。
 - 在  新建实验窗格，点击 **创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在  打开现有实验窗格，点击 **打开**，即可选择打开现有模板。
2. 在 **属性** 选项卡中，输入模板信息。
3. 在 **运行条件** 选项卡中，调整反应体积。
对于大部分实验，默认的运行条件都是合适的。
4. 在 **反应板** 选项卡（**快速设置**）中，分配反应板属性。
 - a. 在 **反应板属性** 窗格，从下拉列表中选择 **参比染料**。

5. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，定义和分配反应孔属性。
 - a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 为选定的反应孔分配样品和靶标。
 - 在文本字段输入新的样品和靶标名称。
 - 从下拉列表中选择之前定义的样品和靶标。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或靶标名称将自动填充**报告基因 (FAM)** 和**淬灭基因 (NFQ-MGB)** 的默认值并分配任务（未知）。在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。
 - a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 在**靶标**表中，选择靶标的复选框，然后从下拉列表中选择任务。

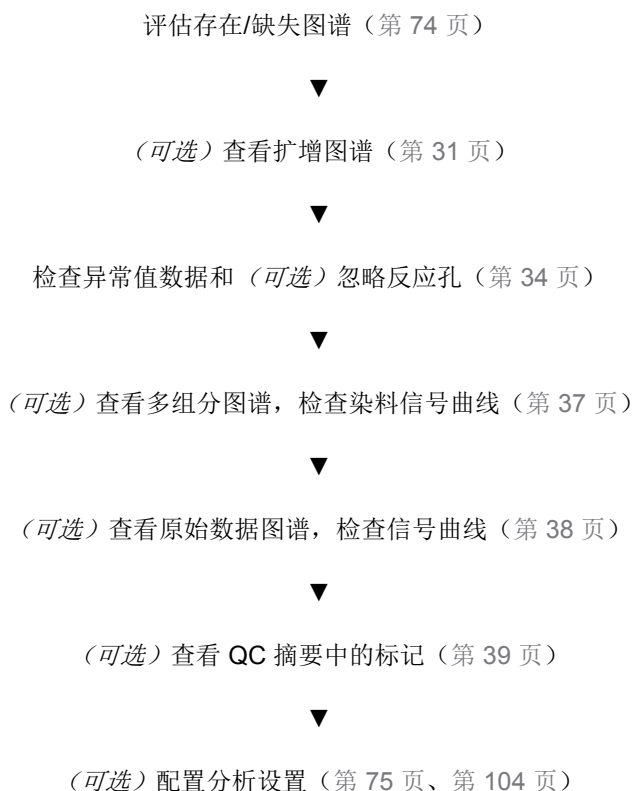
反应类型	靶标	任务
未知（检测样品）	感兴趣的靶标	
	IPC	
阴性对照	感兴趣的靶标	
	IPC	
NAC（阻断的 IPC）	感兴趣的靶标	
	IPC	

设置并运行 PCR 反应

1. 准备 PCR 反应。遵照生产商有关试剂的说明，并按照软件中的反应板布局设置（参见第 21 页的“准备反应”）。
2. 在桌面软件中，打开相应模板（EDT 文件）。
3. 将反应板载入仪器，开始运行（参见第 23 页的“开始并监测运行”）。

检查结果

工作流程：检查存在/缺失实验



切记! 如果您忽略反应孔或配置分析设置, 则点击**分析**, 重新分析数据。

存在/缺失图谱概述

存在/缺失图谱显示了每个反应孔的荧光强度。

检查存在/缺失图谱, 确认对照孔中的扩增是否符合预期, 并检查未知样品的检测情况。

表 22 对照反应的预期结果

反应类型	靶标	结果	检测
阴性对照	IPC	扩增	IPC 成功
	感兴趣的靶标 ^[1]	无扩增	阴性对照
NAC (阻断的 IPC)	IPC ^[2]	无扩增	阻断的 IPC 对照
	感兴趣的靶标	无扩增	阴性对照

^[1] 根据阴性对照反应计算靶标阈值。

^[2] 根据 NAC 反应计算 IPC 阈值。


表 23 未知反应中的检测标准

靶标信号	IPC 信号	检测
高于靶标阈值	高于或低于 IPC 阈值	存在
低于靶标阈值	高于 IPC 阈值	缺失
低于靶标阈值	低于 IPC 阈值	未确认



查看和评估存在/缺失图谱


在结果选项卡中，可以查看和评估存在/缺失图谱。

如果结果选项卡中没有显示数据，则点击分析。

1. 在结果选项卡中，从下拉列表中选择存在/缺失图谱。
2. 点击 , 配置图谱，进行以下选择：
 - **靶标报告基团：**为感兴趣的靶标定义的靶标
 - **对照报告基团：**为 IPC 定义的靶标
 - 要对存在/缺失图谱进行初步审查，请选择以下选项：
 - 显示检测：所有检测
 - 显示 IPC
 - 显示对照品

选定数据点的存在/缺失图谱显示在图谱设置中。☰反应板布局或☰反应孔表中选定反应孔的数据点在图谱中高亮显示（见图 14）。

3. 确认阴性对照反应孔和阻断的 IPC 对照反应孔中的扩增符合预期。从以下两个选项中进行选择：
 - 在☰反应板布局或☰反应孔表中选择对照孔，然后确认数据点在存在/缺失图谱中的位置。
 - 在☰反应孔表中，选择分组依据 ▶ 任务，然后通过阻断的 IPC () 和 NTC () 任务检查反应孔。C_q(C_t 或 C_{ri}) 值应待定。
 - 查看阴性对照的扩增图谱（参见图 15 和第 35 页的“优化阴性对照在扩增图谱中的显示”）。
4. 在存在/缺失图谱中，查看未知样品的信号强度和检测结果。

使用图谱设置（点击 ) 来筛选 IPC 结果和对照反应孔，或者只选择一种检测类型。

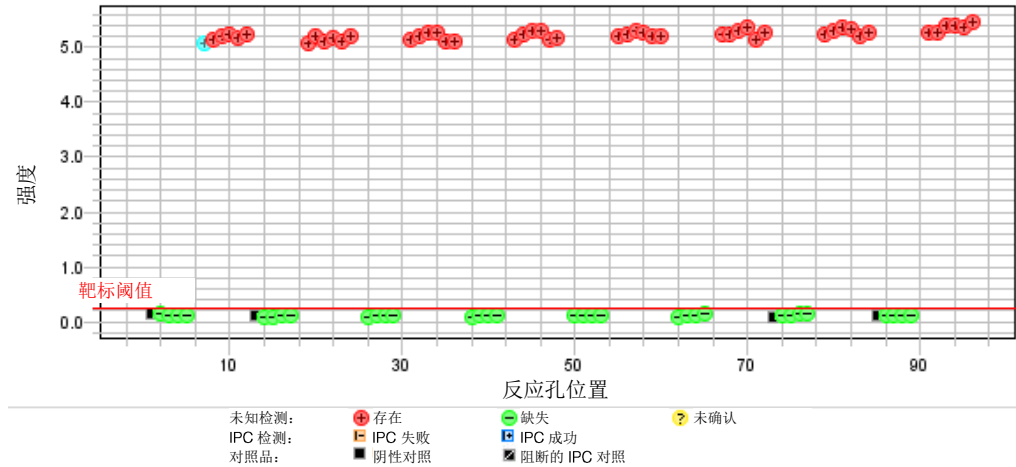


图 14 存在/缺失图谱示例

该示例未显示 IPC 结果。

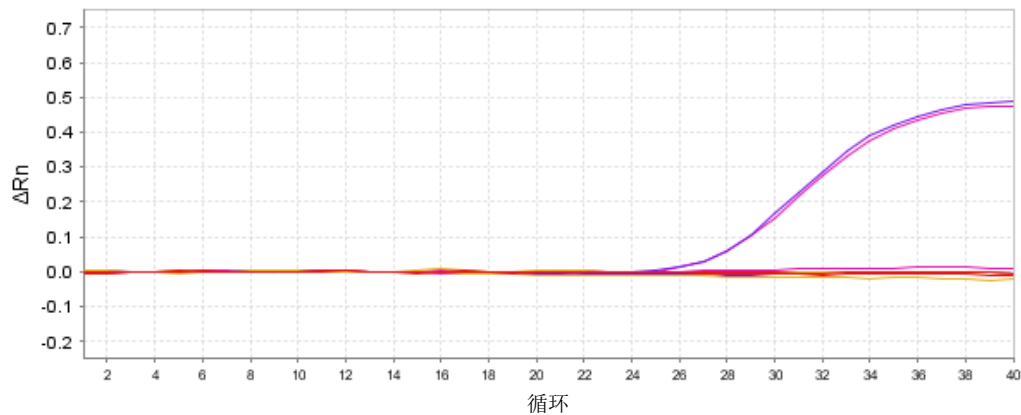


图 15 阴性对照和阻断的 IPC 扩增图谱示例

在阴性对照反应孔中可以看到 IPC 靶标（蓝线）的扩增，而在阻断的 IPC (NAC) 反应孔中看不到。在阴性对照反应孔或阻断的 IPC 反应孔均看不到感兴趣靶标的扩增（红线）。

检测设置概述（存在/缺失）

使用**检测设置**选项卡编辑以下设置：

- 数据分析设置
- 对检测采用默认检测设置而不进行自定义检测设置
- 各个检测的自定义检测设置

表 24 数据分析设置选项（存在/缺失实验）

数据分析设置	描述
仅分析 PCR 后读取的数据	只将 PCR 后读取的数据用于检测。
分析 PCR 前读取的数据和 PCR 后读取的数据	从 PCR 后的读数中减去 PCR 前的读数，以确定检测。

表 25 检测设置选项（存在/缺失实验）

检测设置	描述
置信度值	置信度值用于确定靶标阈值和 IPC 检测阈值。 <ul style="list-style-type: none"> • 置信度值较低或对照品较多通常导致计算的阈值较低。 • 置信度值较高或对照品较少通常导致计算的阈值较高。

有关调整检测设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

8

创建、运行和检查熔解曲线实验

■ 熔解曲线实验.....	77
■ 在软件中创建熔解曲线实验.....	78
■ 设置熔解曲线反应.....	79
■ 检查结果.....	79

熔解曲线实验

概述

通过熔解曲线实验确定使用嵌入染料的 PCR 扩增产物的熔解温度 (T_m)。

熔解温度 (T_m) 是 50% DNA 形成双链和 50% DNA 解离成单链 DNA 的温度。单个扩增产物的熔解曲线在产物的 T_m 处显示单峰。熔解曲线实验中的多个峰表示存在其他扩增产物，通常来自非特异性扩增或形成的引物二聚体。

在该软件中，任何使用插入染料的实验类型所默认采用的运行条件都包含熔解曲线分析。

1. 该软件根据染料荧光随温度的变化绘制熔解曲线。
2. 该软件利用熔解曲线计算出熔解温度 (T_m)。

反应类型

表 26 熔解曲线实验的反应类型

反应类型 (任务)	样品描述
未知	先前运行使用嵌入染料的 PCR 反应
无模板对照 (NTC/阴性对照)	先前运行使用水或缓冲液的 PCR 反应 注: NTC 反应孔中不应存在 DNA。

在软件中创建熔解曲线实验

1. 在🏠主页界面上，创建或打开一个模板。
 - 在🔧新建实验窗格，点击**创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在🔧打开现有实验窗格，点击**打开**，即可选择打开现有模板。
2. 在**属性**选项卡中，输入模板信息。
3. 在**运行条件**选项卡中，调整反应体积。

(可选) 在熔解曲线中编辑升温增量（参见第 95 页的“编辑熔解曲线解离步骤的升温增量”）。
4. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，分配反应板属性。
 - a. 在**反应板属性**窗格，从下拉列表中选择**参比染料**。
5. 在**反应板**选项卡（**快速设置**）中，定义和分配反应孔属性。
 - a. 在🔍**反应板布局**或📄**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 为选定的反应孔分配样品和靶标。
 - 在文本字段输入新的样品和靶标名称。
 - 从下拉列表中选择之前定义的样品和靶标。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或靶标名称将自动填充**报告基团 (FAM)** 和**淬灭基团 (NFQ-MGB)** 的默认值并分配任务（**U**未知）。在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. (可选) 在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。
 - a. 在🔍**反应板布局**或📄**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 在**靶标表**中，选择靶标的复选框，然后从下拉列表中选择任务。

反应类型	任务
未知（检测样品）	U
无模板对照	N

设置熔解曲线反应

熔解曲线实验通常在 PCR 运行条件结束时使用先前扩增的 PCR 产物进行。您也可以使用在另一台仪器上基于嵌入染料的 PCR 运行得到的反应板。

检查结果

工作流程：检查熔解曲线实验

评估熔解曲线图谱（第 80 页）



(可选) 查看多组分图谱，检查染料信号曲线（第 37 页）



(可选) 查看原始数据图谱，检查信号曲线（第 38 页）



(可选) 查看 QC 摘要中的标记（第 39 页）



(可选) 配置分析设置（第 81 页、第 104 页）

切记！ 如果您忽略反应孔或配置分析设置，则点击**分析**，重新分析数据。

熔解曲线图谱概述

熔解曲线图谱显示了选定反应孔中扩增产物的熔解曲线。

检查熔解曲线图谱，确认反应孔中的扩增产物显示一种熔解温度 (T_m)。熔解曲线中的多峰表示非特异性扩增或引物二聚体的形成。


表 27 熔解曲线图谱

图谱	描述
衍生报告基团与温度的关系	显示 Y 轴中衍生报告基团信号与温度的关系。 图谱中的峰表示 SYBR™ Green 信号在该处显著降低，因此扩增产物的 T_m 也显著降低。使用该图谱确认扩增产物的一个 T_m 。
归一化报告基团与温度的关系	显示以参比染料荧光信号为基准，对报告基团染料的荧光信号进行归一化，形成与温度的函数关系。 您可以使用该图谱检查荧光数据的质量。


查看和评估熔解曲线图谱

在**结果**选项卡中，可以查看和评估**熔解曲线图谱**。

如果**结果**选项卡中没有显示数据，则点击**分析**。

1. 在**结果**选项卡中，从下拉列表中选择**熔解曲线图谱**。
2. 点击 ，配置图谱，进行以下选择：
 - **图谱类型**：衍生报告基团
 - **颜色**：样品、靶标或反应孔
 - **靶标**：全部或感兴趣的靶标
 - （对于有多个熔解曲线阶段的自定义实验）选择要查看的熔解曲线阶段。

选定反应孔的**熔解曲线图谱**显示在反应板布局中。

3. 检查图谱是否存在非预期的多个峰，多个峰表示非特异性扩增或引物二聚体的形成。
4. 检查  **反应孔表**，查看每个反应孔中的 T_m 计算值。

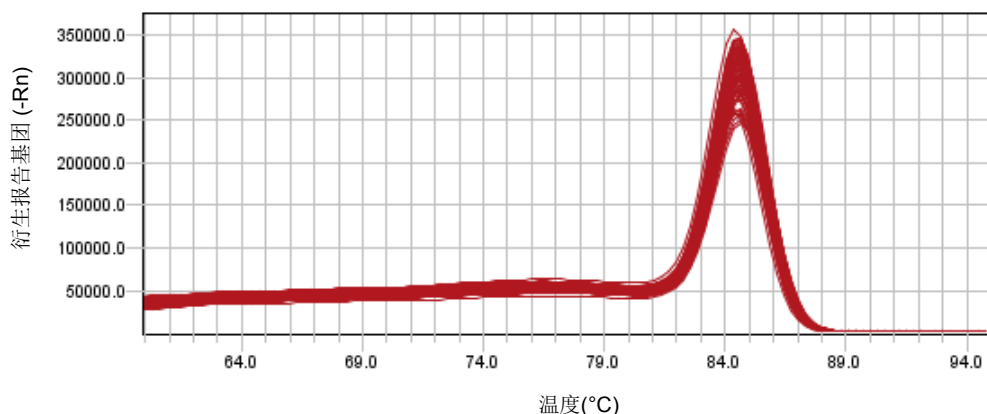


图 16 熔解曲线图谱示例

熔解曲线设置概述

如需要，可使用**熔解曲线设置**选项卡启用或禁用多峰识别功能，并在必要时调整其他峰的检测水平。

- 启用或禁用**多峰识别**。

多峰识别	描述
启用	<ul style="list-style-type: none"> — 预期扩增多个 PCR 产物。 — 将确定多个峰的 T_m。
禁用	<ul style="list-style-type: none"> — 预期扩增一个 PCR 产物。 — 将确定一个峰的 T_m。

- (仅用于多峰识别) 调整其他峰的检测水平。

选项	描述
相对于主峰的峰水平 (%)	指定一个分数水平的值作为附加峰的检测阈值。检测到的峰值是相对于最高峰的高度进行测量的，其最佳分数水平为 100%。默认值为 10%。 例如，如果将分数水平检测阈值设置为 40，报告超过最高峰 40% 的峰，低于 40% 的峰视为噪音。
峰值识别阈值	指定一个绝对荧光水平值作为峰识别阈值。在衍生报告基团 (-dRn') 轴上测量绝对荧光。只有出现在峰识别阈值以上的峰才会被检测到。 例如，如果将荧光水平值设置为 90,000，报告荧光水平值超过 90,000 的峰，低于 90,000 的峰视为噪音。

有关调整熔解曲线设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。



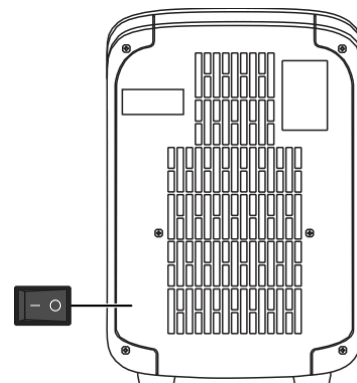
仪器概述

- 打开仪器电源.....82
- 查看运行历史记录并从仪器中删除或传输文件.....82
- 仪器加载与卸载反应板.....83

打开仪器电源

1. 点击触摸屏的任意位置，确定仪器是否处于休眠模式。如果显示主界面，则仪器已打开电源。
2. 如果没有显示主页面，按压后面板上的开关打开仪器电源。

如果无人使用仪器（约两个小时），仪器将自动进入休眠模式（默认启动）以节省电量。



注意：如要自定义休眠模式设置，可点击⊕**设置** ▶ **仪器设置** ▶ **休眠模式**。

查看运行历史记录并从仪器中删除或传输文件

在主界面上，点击⊕**设置** ▶ **运行历史记录**。

- 点击单个运行记录，可查看其详细信息，然后完成以下操作：
 - 点击**删除**即可删除运行记录。
 - 点击**传输**即可导出运行数据。
- 点击**管理**可选择多个运行记录，以便同时查看、删除或传输。

注意：

- 访客（未登录的用户）只能查看访客运行记录。
- 登录到其仪器账户的用户还可以查看自己的运行记录。
- 管理员可以查看所有的运行记录。

注意：如果仪器和桌面软件之间的连接在运行过程中中断，仪器仍然会完成运行。但是，运行数据（EDS 文件）必须使用 USB 驱动器或网络磁盘从仪器传输到桌面软件中。

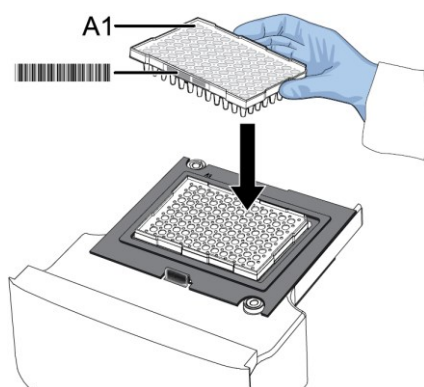
仪器加载与卸载反应板

QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 仪加载和卸载反应板



小心！0.2mL 反应管需要使用平头帽。圆形帽可能会损坏热盖。

1. 加载反应板。
 - a. 打开仪器进样抽屉。
 - b. 将反应板载入反应板适配器，以满足以下标准。
 - 反应板上的反应孔 A1 位于板适配器的左上角。
 - 条码面向仪器前部。



注意：在加载反应板或联管之前，请勿移除黑色的反应板适配器。如果使用联管，联管与适配器之间的连接可能较松，但热盖将施加适当压力，将联管牢固地固定在适配器中。

- c. 关闭仪器进样抽屉。
2. 运行结束时，取下反应板。
 - a. 打开仪器进样抽屉。

- b. 拆下反应板。
- c. 关闭仪器进样抽屉。




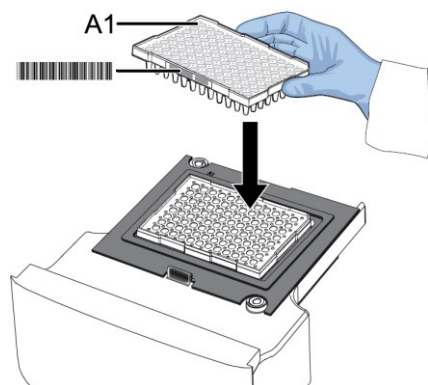
小心！会造成人身伤害。 在仪器工作期间，反应板温度可能会达到 100°C。必须等待反应板冷却至室温后再取出。

QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 仪或 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 仪加载和卸载反应板



小心！ 0.2mL 反应管与 0.1mL 反应管需要使用平头帽。圆形帽可能会损坏热盖。



1. 加载反应板。
 - a. 点击  可弹出仪器进样抽屉。
 - b. 将反应板载入反应板适配器，以满足以下标准。
 - 将反应板上的反应孔 A1 置于反应板适配器的左上角。
 - 确保条码面向仪器前部。




切记！ 该仪器应由经过培训的操作人员使用，并且熟悉移动部件的危险性。

注意：（仅适用于 0.2mL 96 孔板温控模块）在加载反应板或联管之前，请勿移除黑色的反应板适配器。如果使用联管，联管与适配器之间的连接可能较松，但热盖将施加适当压力，将联管牢固地固定在适配器中。

注意： 0.1mL 的 Fast 384 孔板和 96 孔板温控模块配置无需反应板适配器。

- c. 点击  可关闭仪器进样抽屉。
2. 运行结束时，取下反应板。
 - a. 点击  可弹出仪器进样抽屉。

- b. 拆下反应板。
- c. 点击可关闭仪器进样抽屉。



小心！会造成人身伤害。在仪器工作期间，反应板温度可能会达到 100°C。必须等待反应板冷却至室温后再取出。

注意：如果仪器未能弹出反应板，请联系技术支持。



创建模板的替代流程

- 创建自定义实验86
- 使用样品定义文件分配样品88
- 使用反应板设置文件分配样品和靶标89
- 从 XLS 文件中分配靶标、样品和生物学重复组90
- 使用现有 EDT 和 EDS 文件创建新的 EDT 文件91

创建自定义实验

自定义实验概述

对于包含多个 PCR 阶段的检测，如 TaqMan™ 突变检测，需要自定义实验设置。自定义实验还可以灵活地进行二次分析。

自定义实验的默认设置与标准曲线实验的默认设置相同，但是大部分设置可以编辑。






表 28 自定义实验中的默认设置

设置	默认设置
运行条件（热循环程序）	与标准曲线实验的默认设置相同
任务	未知 U 阴性对照品 N 标准品 S
C _t 设置	基线阈值与标准曲线实验的默认设置相同
标记设置	QC 标记开启 无自动省略
自动导出	关闭

表 29 编辑自定义实验中的选项

设置	描述
运行条件（热循环程序）	<ul style="list-style-type: none">可以在软件限值范围内编辑升温速率。可以在任何步骤以及熔解阶段内的任何升温过程中启用数据收集。可以添加任何类型阶段的多个示例，并注明例外情况。可以在运行条件的任何时间添加任何阶段，并注明例外情况。 标注的例外情况： <ul style="list-style-type: none">仅有一个不受限的持续时间阶段（必须在最后时添加）。仅有一个 PCR 前的读数和一个 PCR 后的读数阶段。如果二者均存在于某一运行条件中，则 PCR 前读数必须在 PCR 后读数之前。 例如，以下命令的顺序是有效的：熔解 — PCR — 扩增前读数 — 熔解 — PCR。
分析设置	可编辑
标记	可编辑
光学滤光片	可编辑

在软件中创建自定义实验

- 在  主页界面上，创建或打开一个模板。
 - 在  新建实验窗格，点击 **创建新实验**，即可创建新模板。
 - 在  打开现有实验窗格，点击 **打开**，即可选择打开现有模板。
- 在 **属性** 选项卡中，输入模板信息。
- 在 **运行条件** 选项卡中，根据实验要求编辑默认运行条件。
- 在 **反应板** 选项卡（**快速设置**）中，分配反应板属性。
 - 在 **反应板属性** 窗格，从下拉列表中选择 **参比染料**。
- 在 **反应板** 选项卡（**快速设置**）中，定义和分配反应孔属性。
 - 在  反应板布局 或  反应孔表 中选择反应孔。

- b. 为选定的反应孔分配样品和靶标。
 - 在文本字段输入新的样品和靶标名称。
 - 从下拉列表中选择之前定义的样品和靶标。

注意：在**快速设置**子选项卡中输入的新样品或靶标名称将自动填充**报告基团 (FAM)** 和**淬灭基团 (NFQ-MGB)** 的默认值并分配任务（**U**未知）。在**高级设置**子选项卡中编辑这些数值。

6. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，分配任务。
 - a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应孔。
 - b. 在**靶标表**中，选择靶标的复选框，然后从下拉列表中选择任务。
7. （可选）在**反应板**选项卡（**高级设置**）中，定义和分配生物学重复组（参见第 99 页的“定义和分配生物学重复组”）。

使用样品定义文件分配样品

关于样品定义文件

从样品定义文件中导入样品信息，以并入反应板设置中。样品定义文件为 CSV 文件或 TXT 文件，包含以下设置信息：

- 样品名称
- （可选）自定义样品属性

创建样品定义文件

1. 在电子表格程序中，创建以下列标题：
 - 反应孔
 - 样品名称
 - （可选）列标题最多含有 32 个 用户定义的自定义字段名称（例如，自定义 1、自定义 2 等）
2. 在相应列中输入反应孔编号和样品名称。
3. （可选）输入样品的自定义属性。
4. 将文件另存为制表符分隔的文本 (TXT) 文件或逗号分隔值 (CSV) 文件。

从样品定义文件中导入样品信息

随软件一起提供的示例设置文件位于：

<drive>:\Program Files (x86)\Applied Biosystems\QuantStudio Design and Analysis Software\examples\User Sample Files,

其中 <drive> 是安装软件所在的驱动盘。

1. 在打开的实验中，选择文件 ▶ 导入反应板设置。
2. 点击浏览，导航至样品定义文本文件，然后点击选择。
3. 点击应用。
4. 如果实验已经包含反应板设置信息，则软件提示使用文件中的数据替换反应板设置。点击是，替换反应板设置信息。

样品出现在实验的样品表中。实验中的所有样品和反应孔分配均被替换为该文件中的设置。如已有定义，则自定义样品属性也出现在结果选项卡的反应孔表以及反应板和结果选项卡的反应板布局工具提示信息中。自定义字段可以与结果数据一起导出。

注意： 如要修改自定义样品属性信息，可编辑样品定义文件中的自定义字段，然后再次导入文件。实验中的所有样品信息均替换为新文件中的信息。

使用反应板设置文件分配样品和靶标

关于反应板设置文件

反应板设置文件包含设置信息，如反应孔编号、样品名称、样品颜色、靶标名称、染料、其他反应板内容物。

可以从之前运行的实验中导出反应板设置文件。有关导出实验的说明，参见第 41 页的“导出实验或结果”。

导入反应板设置数据

从以下任一格式的导出文件中为新实验导入反应板设置：

- EDS – EDS 文件格式
- EDT – 用户创建的系统模板文件格式
- TXT – 文本格式
- XML – XML 格式
- CSV – 逗号分隔值格式
- SDT – 序列检测系统 (SDS) 模板文件格式
- SDS – 7900 v2.4 格式

注意：反应板设置信息可以从 96 孔反应板中导入 384 孔反应板中，前提是样品文件须为 TXT 文件。

切记！ 该文件必须只包含反应板设置数据，并且必须与实验类型相匹配。

1. 在**反应板**选项卡中，选择**文件 ▶ 导入反应板设置**。
2. 点击**浏览**，导航至并选择要导入的文件，然后点击**选择**。

随软件一起提供的示例设置文件位于：

```
<drive>:\Program Files (x86)\Applied Biosystems\QuantStudio Design and Analysis Software\examples\User Sample Files, where <drive> is the drive on which the software is installed.
```

3. 点击**应用**。

选定文件的设置数据导入到打开的实验中。

从 XLS 文件中分配靶标、样品和生物学重复组

对于含有单一靶标的反应孔，您可以将 XLS 文件中的分配信息复制黏贴到桌面软件的反应板布局中。

随软件一起提供的示例复制和粘贴文件位于：

```
<drive>:\Program Files (x86)\Applied Biosystems\QuantStudio Design and Analysis Software\examples\User Sample Files.
```

其中 **<drive>** 是安装软件所在的驱动盘。

1. 在 Microsoft™ Excel™ 文件示例的自定义属性选项卡中，确保**反应孔**列按 1~96 的顺序排序，然后选择**反应孔**列和**样品名称**列，**包括**标题。
2. 在软件的**反应板**选项卡中，点击☰**反应孔表**，然后确保反应孔编号按 1~96 的顺序排序。
3. 在☰**反应孔表**中，将鼠标停在**样品**标题下方的第一个单元格内（邻近 A1），点击右键，然后选择**黏贴**或**仅黏贴样品**。

所有未被复制的列均被视为这些列的 NULL 值。

使用现有 EDT 和 EDS 文件创建新的 EDT 文件

关于实验模板

使用模板创建具有相同参数或已有设置的实验。可以将实验保存为已解锁或已锁定（受密码保护）的模板。

您可以在实验模板 (EDT) 文件中保存以下信息：

- 反应板设置信息（定义的样品和靶标或 SNP 检测、样品和靶标或 SNP 检测的反应板分配）
- 试剂信息
- 运行条件（热循环程序）
- 分析设置

随软件一起提供的示例模板位于：

```
<drive>:\Program Files (x86)\Applied Biosystems\QuantStudio Design & Analysis  
Software\templates,
```

其中 <drive> 是安装软件所在的驱动盘。





创建或编辑运行条件的详细流程


■ 调整运行条件参数	92
■ 设置高级温区（Auto Delta 和 VeriFlex™ 温区）	93
■ 添加或调整暂停步骤	94
■ 选择光学滤光片	94
■ 编辑熔解曲线分解步骤的升温增量	95

调整运行条件参数

有关以图形形式显示的运行条件概述，请参见第 18 页的“运行条件的构成要素”。


- 在**运行条件**选项卡中，点击运行条件参数字段，可编辑以下信息：
 - 反应体积
 - 升温速率
 - 步骤温度
 - 步骤持续时间
 - 循环数
- 点击并拖动，可增加或降低某一步骤的温度。
- 点击，可开启或关闭每个步骤的数据采集。

开启**数据采集**可分析整个 PCR 期间收集的数据，以进行实时分析和故障排除。

- （仅限 *QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 仪* 和 *QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 仪*）点击，针对各个步骤配置 **Auto Delta** 或 **VeriFlex™** 温区的设置（参见第 93 页的“设置高级温区（Auto Delta 和 VeriFlex™ 温区）”）。

注意：在熔解曲线阶段，**高级设置**不适用。

当分别启用 **Auto Delta** 或 **VeriFlex™** 温区时，PCR 阶段将显示**A**或**V**。

- 点击，可配置暂停设置。
- 通过仪器设置调整热盖温度（参见仪器用户指南）。



- 参见帮助了解更多有关调整以下参数的信息：
 - 添加或删除阶段
 - 添加或删除阶段中的某个步骤
 - 配置光学滤光片设置

设置高级温区 (Auto Delta 和 VeriFlex™ 温区)

(仅限 QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统) 配置 Auto Delta 和 VeriFlex™ 温区的设置。

- **Auto Delta** — 循环温度的递增或递减，或循环阶段某个步骤持续时间的递增或递减（不适用于持续或不限持续时间阶段）。
- **VeriFlex™ 温区** — 相邻温区 5°C 以内的独立温区。
 - QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 仪：3 个温区
 - QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 仪：6 个温区

注意： VeriFlex™ 温区的温度设置不适用于 384 孔温控模块。

1. 在运行条件选项卡中，点击某个步骤中的 高级设置。

注意： 只有您点击的步骤方可进行更改。

2. 为选定步骤配置 VeriFlex™ 温区或 Auto Delta。

- 选择 VeriFlex™，然后输入每个区域的温度。

注意： 在反应板选项卡中，反应板布局显示 VeriFlex™ 温区。

- 如要查看设置详情，将鼠标停在每个温区的 **V** 上方。
 - 如要隐藏温区的显示，点击 操作 ▶ 隐藏 VeriFlex™ 温区。
-

- 选择 Auto Delta，然后输入起始循环数、温度和时间。

3. 点击保存。

添加或调整暂停步骤

1. 在**运行条件**选项卡中，点击步骤中的 **III**。
2. 选择**暂停**。
3. 输入循环数，在此之后应暂停。
4. 输入暂停温度，温度范围为 4°C 至 99.9°C。



小心！会造成人身伤害。 仪器运行时，反应板温度可达 100°C。如果要在运行暂停期间操作反应板，请输入室温作为暂停温度，并且在处理前冷却反应板至室温。

5. 单击暂停对话框外侧即可返回到运行条件。
6. （可选）如要取消暂停，点击 **III**，然后取消选择**暂停**。

选择光学滤光片

基本不需要编辑光学滤光片设置，编辑仅适用于高级功能或自定义功能。有关每个滤光片读取的染料信息，参见仪器用户指南。

使用光学滤光片设置功能选择一个滤光片组，以匹配自定义染料的特征。

1. 在**运行条件**选项卡中，选择 **操作** ▶ 光学滤光片设置。

界面显示与每个滤光片对应的激发 (x) 和发射 (m) 波长。

2. 选择复选框，启用或禁用滤光片。

如果运行条件中包含熔解曲线阶段，则**熔解曲线滤光片表**可用。否则，请使用 **PCR 滤光片表**，选择光学滤光片。

3. （可选）点击**恢复默认设置**，可重置滤光片。
4. 点击**关闭**。



编辑熔解曲线分解步骤的升温增量

在**运行条件**选项卡中，可以通过以下操作编辑熔解曲线分解步骤的升温增量。

- 选择分解步骤使用的升温增量方法（位于热循环程序的示意图下方）。

选项	描述
持续（默认）	按升温增量持续增加温度 (°C/s)
步骤和保温	按升温增量增加温度 (°C)，并在规定的时间内保持在该温度。
每度的数据点数量	按升温增量增加温度 (°C)，每增加一度时收集制定的数据点数。

- （适用于所有选项）编辑升温增量。
 - 在**分解**步骤中，点击升温增量要素。
 - 输入数值或使用上/下箭头（默认值为 0.15°C/s）
- （仅适用于**步骤和保温**）在每次升温后编辑持续时间。
 - 点击**步骤和保温**旁边的时间字段。
 - 输入数值或使用上/下箭头（默认值为 5s）
- （仅适用于**每个温度的数据点数量**）编辑温度每升高一度时需要收集的数据点数量。
 - 在**分解**步骤中，点击数据点数量要素。
 - 输入数值或使用上/下箭头（默认值为 10 个数据点）



设定反应板/反应孔详细信息和文库 的详细程序

■ 分配反应孔属性（快速设置子选项卡）	96
■ 定义和分配反应孔属性（高级设置子选项卡）	96
■ 为反应孔分配任务	97
■ 定义和设置标准品稀释度	98
■ 定义和分配生物学重复组	99
■ 样品、靶标和 SNP 检测库	99

分配反应孔属性（快速设置子选项卡）

在**快速设置**子选项卡中，通过在文本字段中直接输入或从下拉列表中选择用户定义的和靶标或 SNP 检测，分配反应孔属性。

1. 在**反应板**选项卡中，点击**快速设置**。
2. 在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中，选择反应板孔。
3. 为选定的反应孔分配属性。
 - 在文本字段，输入新样品和新靶标的名称或 SNP 检测。
 - 在下拉列表中，选择用户定义的样品、靶标或 SNP 检测。
有关定义或导入样品、靶标或 SNP 检测的更多信息，请参见定义和分配反应孔属性（高级设置子选项卡）。

注意：在**高级设置**子选项卡中，更改报告基团和淬灭基团染料以及任务的默认选择（参见第 97 页的“为反应孔分配任务”）。

4. （*可选*）为选定反应孔输入备注。

定义和分配反应孔属性（高级设置子选项卡）

在**高级设置**子选项卡中，定义或导入样品、靶标或 SNP 检测，然后分配反应孔属性。

1. 在**反应板**选项卡中，点击**高级设置**。

2. 在**样品表**中，定义样品（参见第 101 页的“在样品表中定义样品”。）
3. 在**靶标或 SNP 检测表**中，定义靶标或 SNP 检测，然后选择检测任务。
 - a. 定义靶标或 SNP 检测（分别参见第 102 页的“在靶标表中定义靶标”或第 103 页的“在 SNP 检测表中定义 SNP 检测”）。
 - b. 在**任务**列下拉列表中选择检测任务（参见第 97 页的“为反应孔分配任务”）。
4. 分配反应孔属性。
 - a. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应板孔（参见第 19 页的“选择反应板孔”）。
 - b. 选择已定义样品的复选框。
 - c. 选择已定义靶标或 SNP 检测的复选框。

为反应孔分配任务

1. 在**反应板**选项卡中，点击**高级设置**。
2. 在**反应板布局**或**反应孔表**中选择反应板孔（参见第 19 页的“选择反应板孔”）。
3. 在**靶标或 SNP**表中，选择某个靶标或 SNP 检测的复选框。
4. 在**任务**列下拉列表中，选择一个检测任务。

靶标和 SNP 检测的检测任务

任务	描述
U 未知（默认）	反应孔包含基因型未知的检测样品。
N 阴性对照 / 无模板对照	反应孔包含水或缓冲液，但不含样品。
S 标准品 ^[1]	反应孔包含已知标准品数量的样品。 注：对于标准品检测任务，在数量列中输入标准品数量。
1 阳性对照等位基因 1 / 等位基因 1 ^[2]	反应孔包含等位基因 1 的纯合样品。
2 阳性对照等位基因 2 / 等位基因 2 ^[2]	反应孔包含等位基因 2 的纯合样品。
12 阳性对照等位基因 1 / 等位基因 2 ^[2]	反应孔包含等位基因 1 和 2 的杂合样品。
I 内部阳性对照 ^[3]	PCR 反应包含短合成 DNA 模板，以区分真阴性结果（即样品中不存在靶标）和由 PCR 抑制剂、错误的检测设置、试剂或仪器故障引起的阴性结果。



(续)

任务	描述
阻断的 IPC ^[3]	反应孔包含 IPC 阻断剂，可阻断 IPC 扩增。
NAC – 无扩增对照 ^[3]	PCR 反应包含 IPC 阻断剂而不包含样品。 阴性对照阻断的 IPC 反应孔中不应出现扩增，因为反应不含样品，且 IPC 扩增被阻断。

^[1] 仅适用于标准曲线和相对标准曲线实验。

^[2] 仅适用于基因分型实验。

^[3] 仅适用于存在/缺失实验。

定义和设置标准品稀释度

注意： 本信息仅适用于标准曲线和相对标准曲线实验。

1. 在反应板选项卡中，选择 操作 ▶ 定义和设置标准品。
2. 在模式下拉列表中选择单重或多重。
3. (可选) 从下拉列表中选择靶标。
4. 输入稀释系列的参数。
 - 稀释点数 — 建议 5 个
 - 重复样品数 — 建议 3 个
 - 起始数量 — 最高或最低标准品数量，无单位。

注意： 数量单位可以是份、份/μL、ng/μL 或相对稀释度。

注意： 使用 E 表示使用科学计数法的指数。例如，如要表示 1.23×10^4 ，输入 1.23E4。

- 连续稀释倍数

注意： 连续稀释倍数用于计算标准曲线上所有点的数量。

- 起始数量是最高值 — 选择 1:10~1:2。
- 起始数量是最低值 — 选择 2 倍~10 倍。

注意： 标准曲线预览 Y 轴值根据起始数量和连续稀释倍数计算所得。实际结果可能与预览结果不同。

5. 选择并安排用于标准品的反应孔。
 - 选择自动选择反应孔。
 - 选择手动选择反应孔，然后使用显示的反应板布局选择反应孔。

6. 选择以**列**或**行**排列标准品。
7. (可选) 点击**重置**，恢复默认值。
8. 点击**应用**，然后点击**关闭**，返回到**反应板**选项卡。

手动分配标准品稀释度

注意：仅适用于标准曲线和相对标准曲线实验。

1. 在**反应板**选项卡下，在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中，选择反应孔。
2. 选择靶标复选框，从**任务**下拉列表中选择 **S**，然后输入数量。
3. 重复操作，以完成标准品稀释系列。

定义和分配生物学重复组

生物学重复组可用于标准曲线、相对标准曲线、比较 C_t 、自定义实验。

1. 在**反应板**选项卡中，点击**高级设置**。
2. 定义**生物学重复组**。
 - a. 在**生物学重复组**表中，点击⊕**添加**。
 - b. (可选) 点击单元格，即可编辑颜色、名称或备注。
 - c. (可选) 点击✕，即可从表中删除生物学重复组。
3. 分配**生物学重复组**。
 - a. 在☰**反应板布局**或☰**反应孔表**中选择反应板孔（参见第 19 页的“选择反应板孔”）。
 - b. 在**生物学重复组**表中，选择生物学重复组复选框。

样品、靶标和 SNP 检测库

文库概述

文库包含保存的信息，以便在未来模板中重复使用。

软件中提供以下文库：

- 染料库
- 样品库



- 靶标库
- SNP 检测库
- 分析设置库

如要评估各文库，使用**工具**菜单或**反应板**选项卡。

- 在菜单栏中，选择**工具** ▶ (**首选库**)。
- 在打开的 EDT 或 EDS 文件的**反应板**选项卡中，点击**高级设置**，然后选择☑**操作** ▶ **从库中导入**。

应用筛选器以搜索库

您可以筛选样品、SNP 检测、靶标和分析设置库。

1. 访问所选择的库。
 - 在菜单栏中，选择**工具** ▶ (**选择的库**)。
 - 在打开的 EDT 或 EDS 文件的**反应板**选项卡中，点击**高级设置**，然后选择☑**操作** ▶ **从库中导入**。
2. 从第一个下拉列表选择一个功能。该表的每一列都是一项可用的功能。
3. 从第二个下拉列表选择一个条件，定义该功能。这些条件因功能而异。
4. 输入作为筛选条件的数值或文本。
5. 点击**应用筛选器**。




在样品表中定义样品

在反应板选项卡中，点击高级设置，然后在样品表中进行以下任一操作：

选项	操作
手动定义样品	<ol style="list-style-type: none"> 1. 点击  添加。 2. 点击一个单元格，编辑样品的属性。 3. (可选) 在表标题中点击 ，添加一个自定义属性列。 <ol style="list-style-type: none"> a. 点击自定义属性列标题，然后使用新样品属性编辑该标题。 b. 在表中点击自定义属性单元格，然后输入属性信息。
从 TXT 或 XLS 文件中导入样品	<ol style="list-style-type: none"> 1. 选择  操作 ▶ 从文件导入。 2. 导航至所需的文件并选中，然后点击打开。
从样品库导入样品	<ol style="list-style-type: none"> 1. 选择  操作 ▶ 从库中导入。 2. (可选) 使用筛选器搜索特定样品 (参见第 100 页)。 3. 选择一个或多个样品，然后点击添加所选项。 <hr/> <p>注意：按住 Shift 并单击或按住 Ctrl 并单击选择多个样品。</p>
将样品保存到样品库中	选择一个样品行，然后选择  操作 ▶ 保存到库。
从表中删除样品	选择一个样品行，然后点击  。

在靶标表中定义靶标

在反应板选项卡中，点击高级设置，然后在靶标表中进行以下任一操作：

选项	操作
手动定义靶标	<ol style="list-style-type: none"> 1. 点击  添加。 2. 点击一个单元格，编辑靶标的属性。
从 TXT 或 XLS 文件中导入靶标	<ol style="list-style-type: none"> 1. 选择  操作 ▶ 从库中导入。 2. 点击导入或导入 AIF。 3. 导航至所需的文件并选中，然后点击导入。 4. 选择一个或多个靶标，然后点击添加所选项。 <hr/> <p>注意： 按住 Shift 并单击或按住 Ctrl 并单击可选择多个靶标。</p>
从靶标库导入靶标	<ol style="list-style-type: none"> 1. 选择  操作 ▶ 从库中导入。 2. （可选）使用筛选器搜索特定靶标（参见第 100 页）。 3. 选择一个或多个靶标，然后点击添加所选项。 <hr/> <p>注意： 按住 Shift 并单击或按住 Ctrl 并单击可选择多个靶标。</p>
将靶标保存到靶标库中	选择一个靶标行，然后选择  操作 ▶ 保存到库。
从表中删除靶标	选择一个靶标行，然后点击  。

在 SNP 检测表中定义 SNP 检测

在反应板选项卡中，点击高级设置，然后在 SNP 检测表中进行以下任一操作：

选项	操作
手动定义 SNP 检测	<ol style="list-style-type: none"> 1. 点击\oplus添加。 2. 点击一个单元格，编辑 SNP 检测的属性。
从 TXT 或 XML 文件中导入 SNP 检测	<ol style="list-style-type: none"> 1. 选择\square操作 ▶ 从库中导入。 2. 点击导入或导入 AIF。 3. 导航至所需的文件并选中，然后点击导入。 4. 选择一个或多个 SNP 检测，然后点击添加所选项。 <p>注意： 按住 Shift 并单击或按住 Ctrl 并单击选择多个 SNP 检测。</p>
从 SNP 检测库中导入 SNP 检测 SNP 检测库	<ol style="list-style-type: none"> 1. 选择\square操作 ▶ 从库中导入。 2. （可选）使用筛选器搜索特定 SNP 检测（参见第 100 页）。 3. 选择一个或多个 SNP 检测，然后点击添加所选项。 <p>注意： 按住 Shift 并单击或按住 Ctrl 并单击选择多个 SNP 检测。</p>
将 SNP 检测保存到 SNP 检测库	选择一个 SNP 检测行，然后选择 \square 操作 ▶ 保存到库。
从表中删除 SNP 检测	选择一个 SNP 检测行，然后点击 \times 。



配置分析设置

■ 分析设置指南.....	104
■ 查看和配置分析设置.....	105
■ C _t 设置概述.....	105
■ 标记设置概述.....	106
■ 高级设置概述.....	106

本节介绍的分析设置适用于所有实验类型，另有说明的除外。

分析设置指南

- 我们建议使用默认分析设置对实验进行分析。
- 如果默认分析设置不适合实验，则在**分析设置**对话框修改设置，然后重新分析实验。
- 将修改后的分析设置保存到**分析设置库**中。


每个实验类型的默认分析设置不同。分析设置决定了以下参数。

- 基线、阈值、阈值循环 (C_t) 的计算方法
- 启用的标记
- 某种实验类型特定的其他具体分析选项

有关不同分析设置类型的详细信息，请参阅以下章节。

- 第 105 页的“C_t 设置概述”
- 第 106 页的“标记设置概述”
- 第 106 页的“高级设置概述”
- 第 48 页的“标准曲线设置概述”
- 第 61 页的“相对定量设置概述”
- 第 68 页的“检测设置概述（基因分型）”
- 第 75 页的“检测设置概述（存在/缺失）”
- 第 81 页的“熔解曲线设置概述”

查看和配置分析设置

1. 在**结果**选项卡中，点击（右上角的）。
2. 查看和（*可选*）配置分析设置。
有关调整分析设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。
3. 点击**应用**。
4. 点击**分析**，即可使用新设置重新分析实验。
5. （*可选*）点击**保存**，即可将设置保存在**分析设置库**。
6. （*可选*）点击**恢复**，即可恢复到默认设置。

C_t 设置概述

默认 C_t 设置适用于大多数应用。这些设置的配置是一个分析非典型或非预期运行数据的选项。

有关调整 C_t 设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

注意： C_t 设置功能不适用于不含 PCR 阶段的实验，如熔解曲线实验。

表 30 C_t 设置

设置	描述
数据步骤选择	确定 C _t 分析的阶段/步骤组合（运行条件中有多个数据收集点时）。
算法设置 — 基线阈值	基线阈值算法用于计算 C _t 值。 该算法是一种表达式估计算法，具体操作是减去基线分量并在指数级区域设置荧光阈值。
算法设置 — 相对阈值	相对阈值 (C _{ri}) 算法用于计算 C _{ri} 值。
默认 C _t 设置	确定设定基线阈值算法的方法。默认 C _t 设置用于没有自定义设置的靶标。 有关调整基线和阈值设置的建议，，请参见表 31。
C _t 靶标设置	<ul style="list-style-type: none"> • 选定默认设置 — 默认 C_t 设置用于计算靶标的 C_t 值。 • 取消选定默认设置 — 软件允许手动设置基线或阈值。 有关调整基线和阈值设置的建议，，请参见表 31。

表 31 阈值和基线手动设置的建议

设置	建议
阈值	输入一个阈值，使阈值： <ul style="list-style-type: none">• 高于背景值。• 低于扩增曲线的平稳期和线性增长期。• 在扩增曲线的指数级增长期内。
基线	选择起始循环数和结束循环数值，使基线在检测到明显荧光信号前结束。

标记设置概述

使用**标记设置**配置以下参数。

- 调整灵敏度，以标记更多或更少的反应孔。
- 更改软件应用到每个实验类型的标记。

有关配置标记设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

高级设置概述

使用**高级设置**选项卡，即可更改单个反应孔的基线设置。

有关调整高级设置的逐步说明，请参见桌面软件的帮助。

注意：高级设置功能不适用于不含 PCR 阶段的实验，如熔解曲线实验。



配置分析设置

- QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统的相关文档 107
- QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统的相关文档..... 107
- 客户和技术支持 108
- 产品有限保修..... 108

QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统的相关文档

文件	发布号
QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统安装、使用与维护指南	MAN0017853
QuantStudio™ 设计和分析桌面软件命令行应用指南	MAN0010409
QuantStudio™ 1 实时荧光 PCR 系统现场准备指南	MAN0017854

QuantStudio™ 3 实时荧光 PCR 系统和 QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统的相关文档

文件	发布号
QuantStudio™ 3 和 5 实时荧光 PCR 系统安装、使用与维护指南	MAN0010407
QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统安装、使用与维护指南(中国)	MAN0028412
QuantStudio™ 设计和分析桌面软件命令行应用指南	MAN0010409
QuantStudio™ 5 实时荧光 PCR 系统 SAE 管理员控制台用户指南	MAN0010410
QuantStudio™ 3 和 5 实时荧光 PCR 系统现场准备指南	MAN0010405



客户和技术支持

请访问 thermofisher.com/support，查询最新服务和支持信息。

- 全球联系电话号码
- 产品支持信息
 - 产品 FAQ
 - 软件、补丁和更新
 - 多种应用和仪器培训
- 订购和网络支持
- 产品文档
 - 用户指南、手册和方案
 - 分析证书
 - 安全技术说明书（SDS，也称为 MSDS）

注意：若想获取其他生产商的试剂和化学品的 SDS，请联系该生产商。

产品有限保修

Life Technologies Corporation 和/或其附属公司根据以下网址中 Life Technologies 的《一般销售条款和条件》对其产品提供保修：www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html。如有任何疑问，请联系 Life Technologies，网址：www.thermofisher.com/support。

词汇表

生物学重复

包含相同组分和体积但评估相同生物来源的不同样品（例如相同品系中三个不同小鼠的样品、相同细胞株的不同萃提取样品或组织样品）的反应。

对于在基因表达项目中使用生物学重复组的分析，生物学重复列表中所显示数值的计算方法是组合不同生物学样品的结果，并将该合集视为一个单一种群（即一个样品）。

对于单重实验中的 ΔC_t 计算（通过内源性对照品归一化），由软件计算技术性重复的平均值。然后将技术性重复的平均值加在一起再取平均值，从而确定该生物学重复的数值。

内源性对照品

一种用于将模板差异和样品间或批次间差异归一化的基因。

终点读数

参见 PCR 后读数。

PCR 后读数

在基因分型和存在/缺失实验中，扩增后出现的仪器运行部分。在基因分型实验中，PCR 后读数过程中采集的荧光数据显示在等位基因鉴别图谱中，并用于等位基因检测。在存在/缺失实验中，PCR 后读数过程中采集的荧光数据显示在存在/缺失图谱中，用于生成检测值。也称为终点读数。

PCR 前读数

在基因分型和存在/缺失实验中，扩增前出现的仪器运行部分。PCR 前读数不是必选项，但建议使用。在 PCR 前读数过程中采集的荧光数据可用于归一化在 PCR 后读数过程中采集的荧光数据。

参比样品

在相对标准曲线和比较 C_t ($\Delta\Delta C_t$) 实验中，作为相对定量结果依据的样品。也称为校准品。

靶标

在 PCR 期间进行扩增和检测的核酸序列。

任务

在软件中，针对靶标在反应孔中进行的反应类型。

技术性重复

含有相同组分和体积，并对相同样品进行评估的反应；对于精度评估至关重要。

索引

A

- 绝对定量 43
- 配件 21
- 高级设置 96
- 高级温区 93
- 算法设置
 - 基线阈值算法 105
 - 相对阈值算法 105
- 等位基因鉴别图谱概述 66
- 扩增图谱
 - 基线 31
 - 基线设置 33
 - 指数级增长期 31
 - 线性增长期 31
 - 优化待查看的阴性对照 35
 - 概述 31
 - 平稳期 31
 - 形状 31
 - 阈值设置 32
- 分析设置
 - 高级设置 105 和 106
 - 配置 104
 - 标记设置 105 和 106
 - 指南 104
 - 熔解曲线设置 81
 - 标准曲线设置 105
- 分析设置库 99
- 分配
 - 生物学重复组 99
 - 样品 19 和 96
 - SNP 检测 19 和 96
 - 靶标 19 和 96
 - 任务 19、96 和 97
 - 反应孔详细信息 96
- 分配标准品稀释度 99
- 从 XLS 文件中分配靶标、样品、生物学重复 90
- Auto Delta 设置 93
- 自动分析 30
- 自动阈值 105

B

- 条形码扫描 17
- 基线阈值算法 105
- 定义和分配生物学重复组 99

C

- 重写校准数据 41
- 查看校准结果 40
- XLS 文件中的列、反应孔编号 90
- 比较 C_t 实验
 - 与相对标准曲线的比较 52
 - 内源性对照品 51
 - 基因表达图谱 59
 - 阴性对照 51
 - 概述和目的 51
 - PCR 选项 52
 - QC 图谱 60
 - 反应类型 51
 - 参比基因 51
 - 相对定量设置 61
 - 重复 51
 - 检查结果工作流程 56
 - 软件中的设置 54
- 耗材 21
- C_q 、 C_t 和 C_{rt} 的比较 27
- 提高 C_t 精度 34
- C_t 设置
 - 算法设置 105
 - 默认 105
 - 选择数据步骤 105
 - 选项卡 105
 - 靶标 105
- 自定义染料 18
- 自定义实验
 - 概述 86
 - 软件中的设置 87

D

定义

生物学重复组 99

样品 101

SNP 检测 103

靶标 102

删除文件 82

相关文档 107

染料库 99

多组分图谱染料信号精度 37

E

内源性对照品

比较 C_t 实验 60

相对标准曲线实验 60

模板示例 91

实验

导出 41 和 42

设置工作流程 15

导入实验数据 89

实验模板 91

实验类型 10

定义实验参数 20

导出

实验或结果 42

实验或结果 41

F

标记 39

G

基因表达图谱

比较 C_t 实验 59

概述 59

相对标准曲线实验 59

相对定量与样品关系 59

相对定量与靶标关系 59

基因分型实验

等位基因鉴别图谱 66

检测设置 68

手动检测 67

PCR 选项 63

存在/缺失图谱 73

反应类型 63

检查结果工作流程 65

软件中的设置 63

I

确定反应孔问题 36

索引词 13

打开仪器电源 82

K

试剂盒 21

L

文库

使用筛选器 100

列表 96

产品有限保修 108

加载反应板 83 和 84

保存已锁定的模板 21

M

熔解曲线实验

概述和目的 77

升温增量 95

反应类型 77

反应 79

检查结果工作流程 79

软件中的设置 78

设置 81

熔解曲线图谱

概述 80

查看和评估 80

方法、创建或编辑 92

监测运行 23

多组分图谱

染料信号精度 37

查看 37

N

反应孔排列中的空值 90

O

忽略反应孔 34

光学滤光片选择 18

光学滤光片设置 94

P

- 零部件和材料 21
- 暂停、添加或调整 94
- PCR 选项
 - 比较 C_t 实验 52
 - 基因分型实验 63
 - 存在/缺失实验 71
 - 相对标准曲线实验 50
 - 标准曲线实验 44
- PCR 反应
 - 设置指南 22
 - 处理样品和试剂 22
 - 制备 21
 - 设置和运行 45、55、65 和 72
- 反应板设置 19
- 导入反应板设置数据 89
- 反应板选项卡 96
- 后运行摘要 25
- 设置首选项 14
- 存在/缺失实验
 - 检测设置 75
 - IPC 70
 - 概述和目的 70
 - PCR 选项 71
 - 反应类型 70
 - 检查结果工作流程 73
 - 软件中的设置 71
- 存在/缺失图谱
 - 概述 73
 - 查看和评估 74

Q

- QC 图谱
 - 比较 C_t 实验 60
 - 概述 60
 - 相对标准曲线实验 60
 - 查看和评估 60
- QC 摘要
 - 检查标记 39
 - 查看 39
- 定量循环 (Cq) 27
- 快速设置 19 和 96

R

- 原始数据图谱
 - 确定信号精度 38
 - 查看 39
- 反应类型
 - 比较 C_t 实验 51
 - 基因分型实验 63
 - 曲线实验 77
 - 存在/缺失实验 70
 - 相对标准曲线实验 50
 - 标准曲线实验 43
- 输入试剂信息 17
- 实时图谱
 - 查看仪器触摸屏 24
 - 缩放 24
- 相关文档 107
- 相对定量设置 61
- 相关定量 49 和 51
- 相对标准曲线实验
 - 分配标准品稀释度 99
 - 与比较 C_t 相比 52
 - 内源性对照品 50
 - 基因表达图谱 59
 - 概述和目的 49
 - PCR 选项 50
 - QC 图谱 60
 - 反应类型 50
 - 相对定量设置 61
 - 重复 50
 - 检查结果工作流程 56
 - 软件中的设置 53
 - 标准品稀释系列 50
- 相对阈值算法 105
- 所需组分
 - 阴性对照 43、50 和 63
 - 参比基因 50
 - 重复 43 和 63
 - 样品类型 43 和 63
 - 标准 43
 - 标准品稀释系列 43
- 导出结果 41 和 42
- 结果选项卡 28
- 检查
 - 扩增图谱 31
 - 多组分图谱 37
 - QC 摘要 39
 - 原始数据图谱 38
 - 标准曲线图谱 47 和 57
 - 反应孔表 36

运行历史记录 82
 检查工作流程运行结果 30

S

样品

分配到反应孔 19 和 96
 定义 101

样品定义文件

创建 88
 电子表格 88

导入样品信息 88

样品库 99

管理样品表 101

保存模板 20 和 21

选择反应孔 19

原始数据图谱信号精度 38

SNP 检测

分配到反应孔 19 和 96
 定义 103

SNP 检测库 99

管理 SNP 检测表 103

标准 43 和 50

标准曲线, 使用不同标准曲线 48 和 59

标准曲线实验

分配标准品稀释度 99
 概述和目的 43
 PCR 选项 44
 反应类型 43
 检查结果工作流程 46
 软件中的设置 44

标准曲线图谱

概述 47 和 57
 查看和评估 48 和 58

标准曲线设置 48 和 59

设置标准品稀释度 98

定义和设置标准品 98

启动运行 23

客户和技术支持 108

T

靶标

分配到反应孔 19 和 96
 定义 102

靶标库 99

管理靶标表 102

任务

分配到反应孔 19、96 和 97

描述 97

模板

调整反应体积 18

创建 16

输入属性 16

保存的信息 91

打开 16

光学滤光片选择 18

设置 15

使用默认方法 18

条款和条件 108

创建或编辑热循环程序 92

传输文件 82

U

加载反应板 83 和 84

保存已解锁的模板 20

V

VeriFlex 设置 93

W

保修 108

反应孔详细信息

分配 96

定义 96

查看仪器触摸屏 24

反应孔表

分组或排序 36

概述 36

选择反应孔 19

工作流程

检查运行结果 30

运行实验 15

设置实验 15

Z

缩放 24

