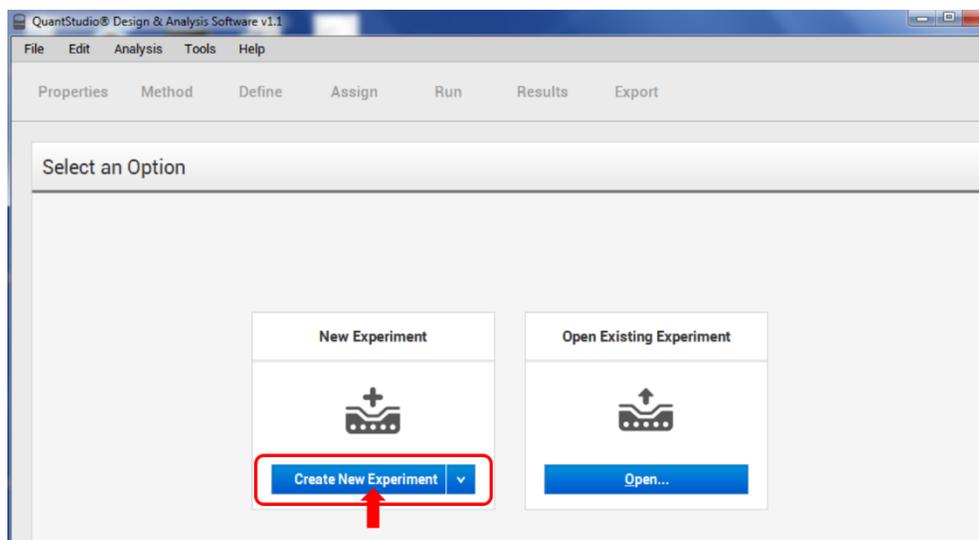




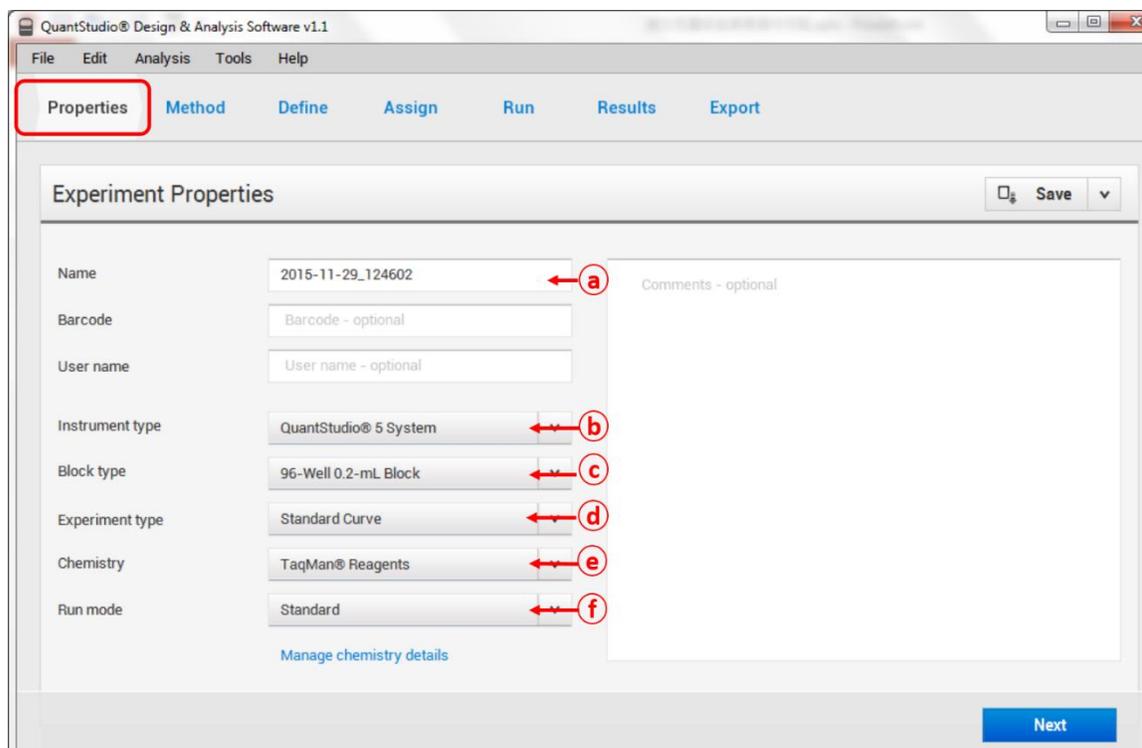
**Applied Biosystems QuantStudio 3 & 5 实时荧光定量 PCR 仪 V1.X 绝对定量简易操作流程**



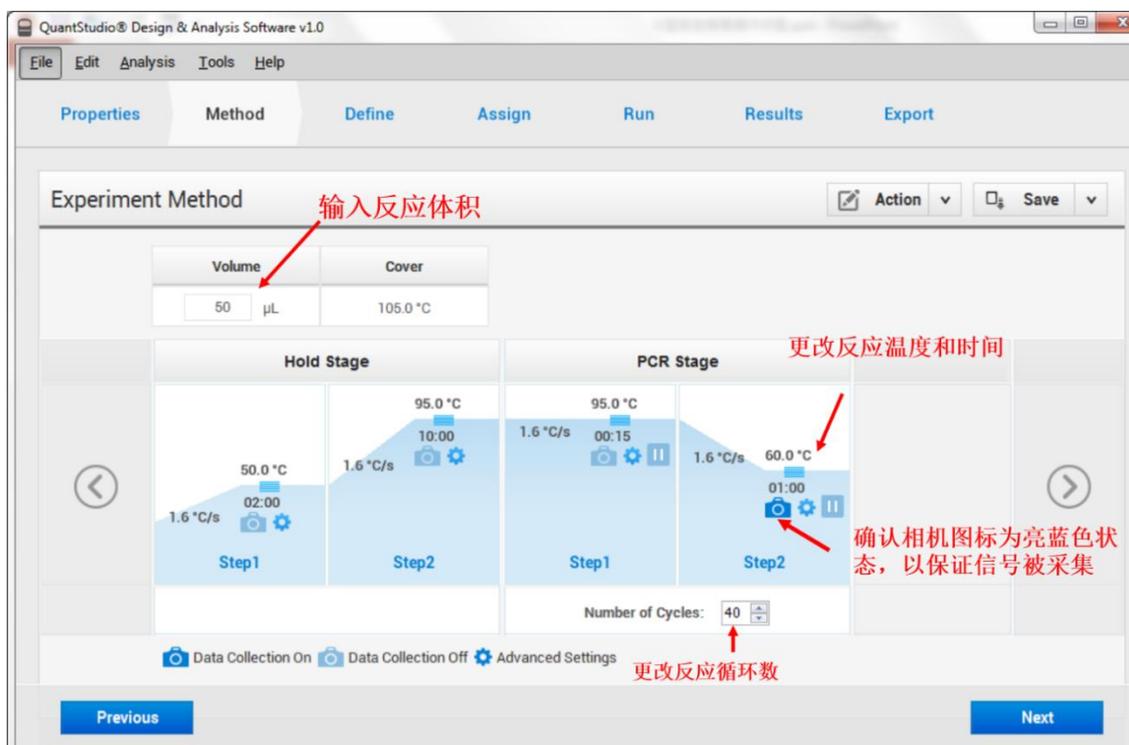
- 1、 双击桌面图标  开启 QuantStudio Design & Analysis Software, 或从开始菜单 > All Programs > Applied Biosystems > Quant Studio Design & Analysis Software> Quant Studio Design & Analysis Software 开启软件。
- 2、 进入主界面后, 点击 “Create New Experiment” 。



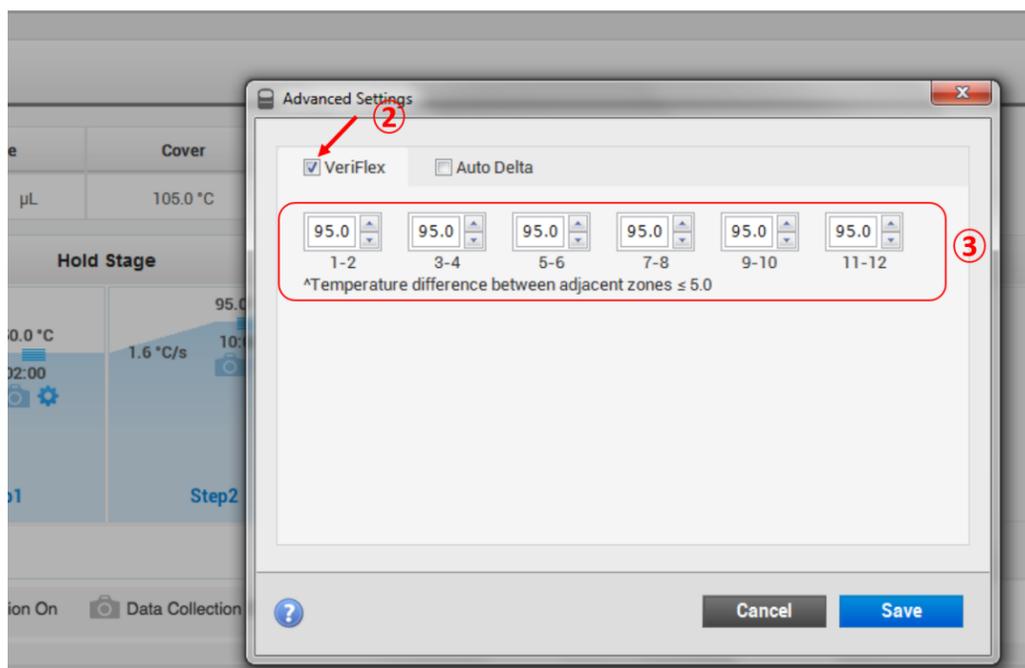
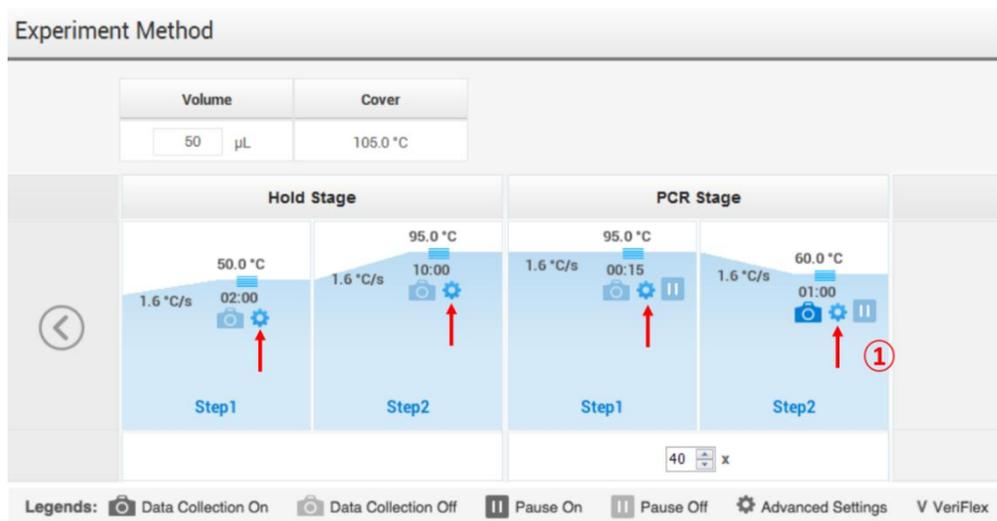
- 3、 在 “Properties” 界面设置实验属性:
  - a. 输入实验的名称;
  - b. 选择仪器型号;
  - c. 选择仪器的 block (加热模块) 类型;
  - d. 选择实验类型: “Standard Curve” ;
  - e. 选择实验试剂类型: Taqman 探针法选择 “Taqman reagents” , SYBR 染料法选择 “SYBR Green Reagents” , 其他选择 “Other”;
  - f. 选择运行模式 (run mode): 普通试剂选择 “Standard” ; 快速试剂选择 “Fast” 。



4、 点击“Next”进入“Method”界面，设置实验的运行程序。

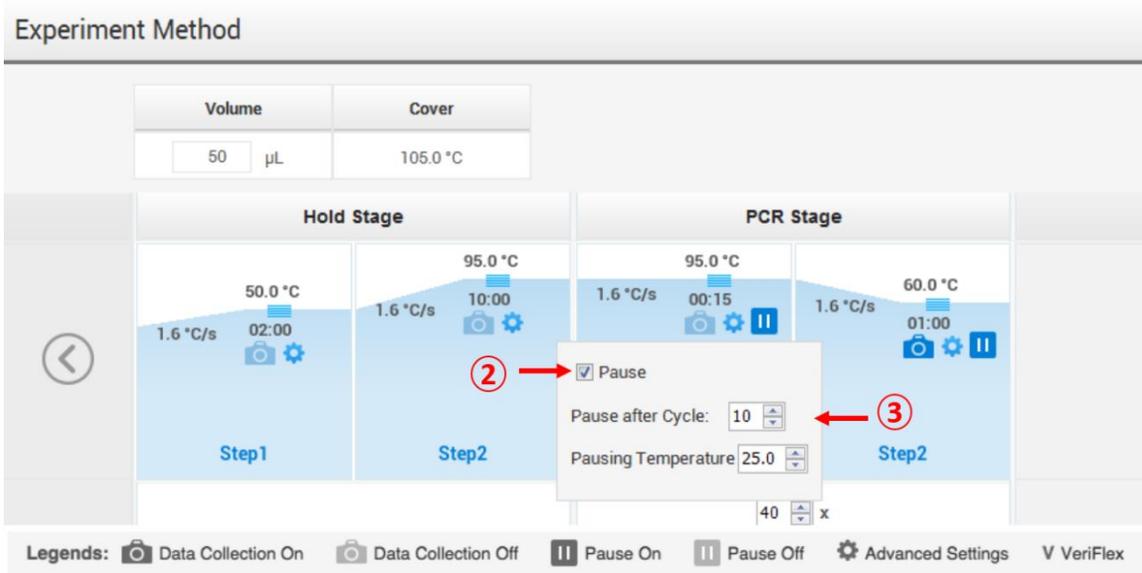
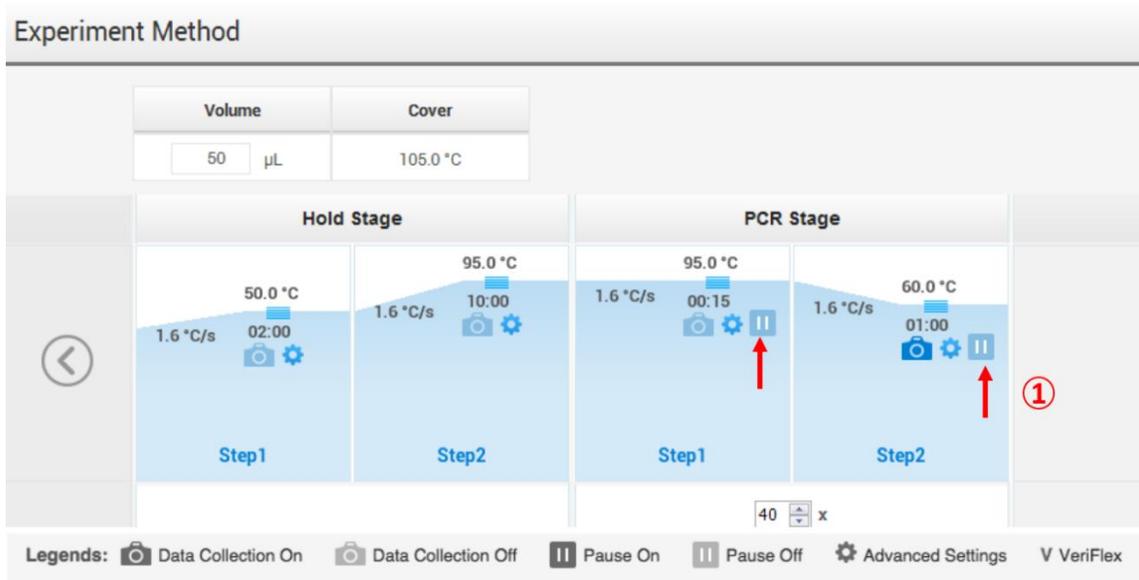


4.1、（可选）设置多梯度反应温度：① 单击 （Advanced Settings）；  
② 勾选veriflex，③ 然后更改block上相应的反应温度，相邻区域温度差异不能超过5℃。

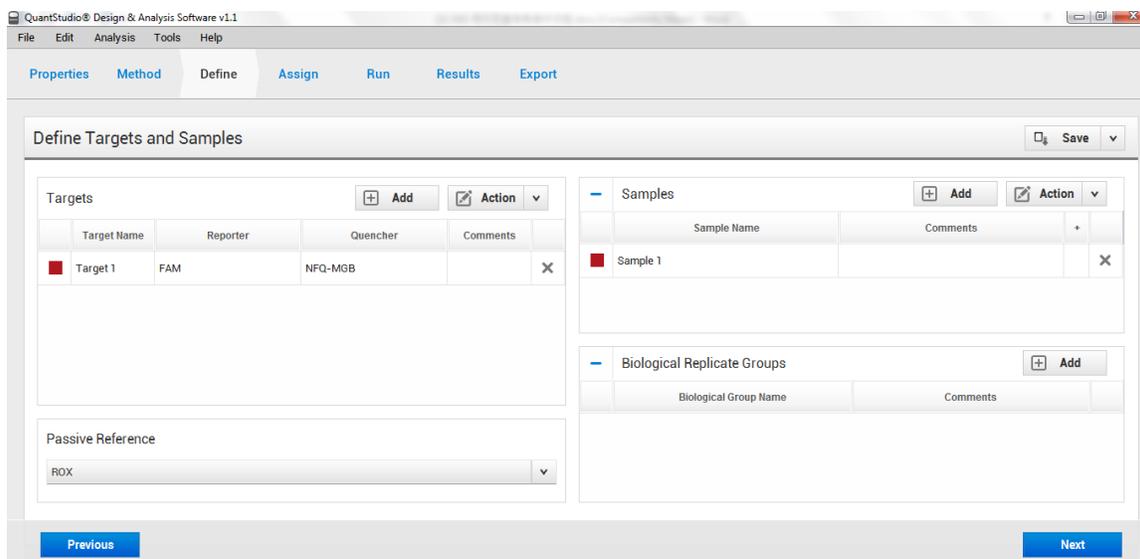


注：QuantStudio 3 可设置3个梯度反应温度；上图为QuantStudio 5示例图，可设置6个梯度反应温度。

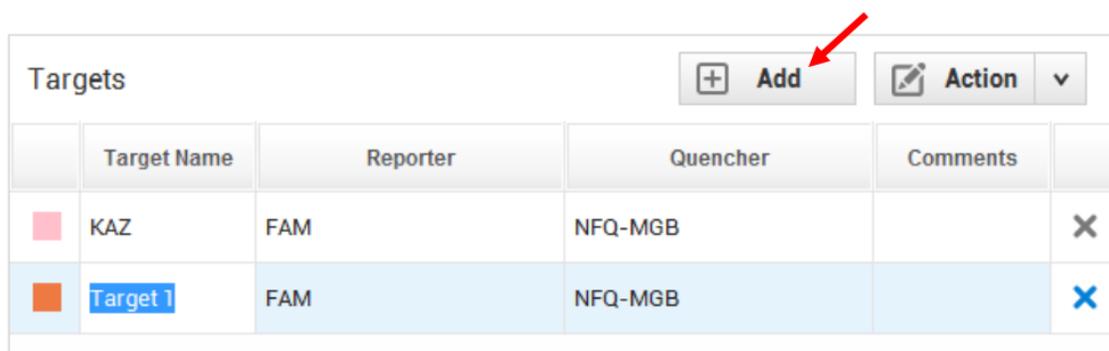
4.2、（可选）设置暂停程序：点击①图标，②勾选Pause，③设置暂停前的反应循环数（Pause after cycles），以及暂停后的温度（Pausing Temperature，范围：4~30℃）。



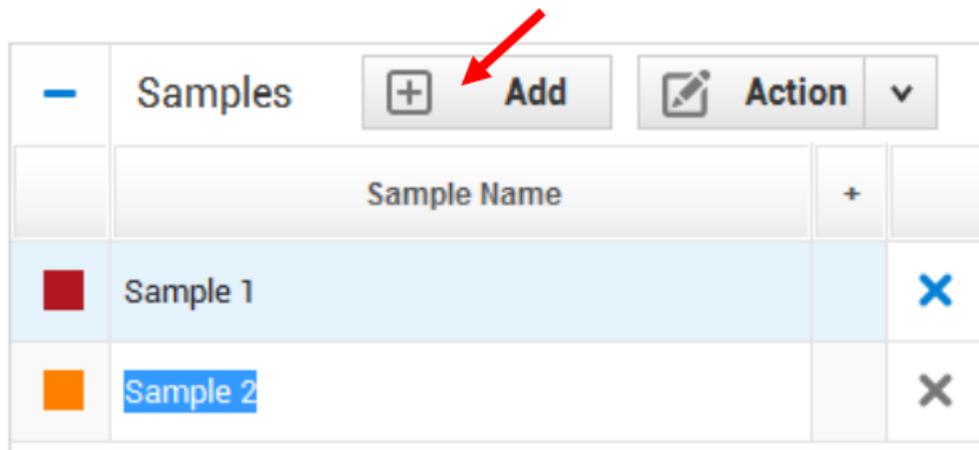
5、 点击“Next”进入“Define”界面，设置待测基因名称（Target）、样品名称（Sample）和参比荧光（Passive Reference）。



5.1、在“Targets”内点击“Add”，添加待测基因。在“Target Name”中编辑基因名称；“Reporter”和“Quencher”中选择所标记的荧光基团及淬灭基团。对于“Quencher”的选择，如果是MGB 探针，请选择NFQ-MGB；如果是TAMRA 探针，请选择TAMRA；如果是其他形式的非荧光淬灭基团则选择“None”。

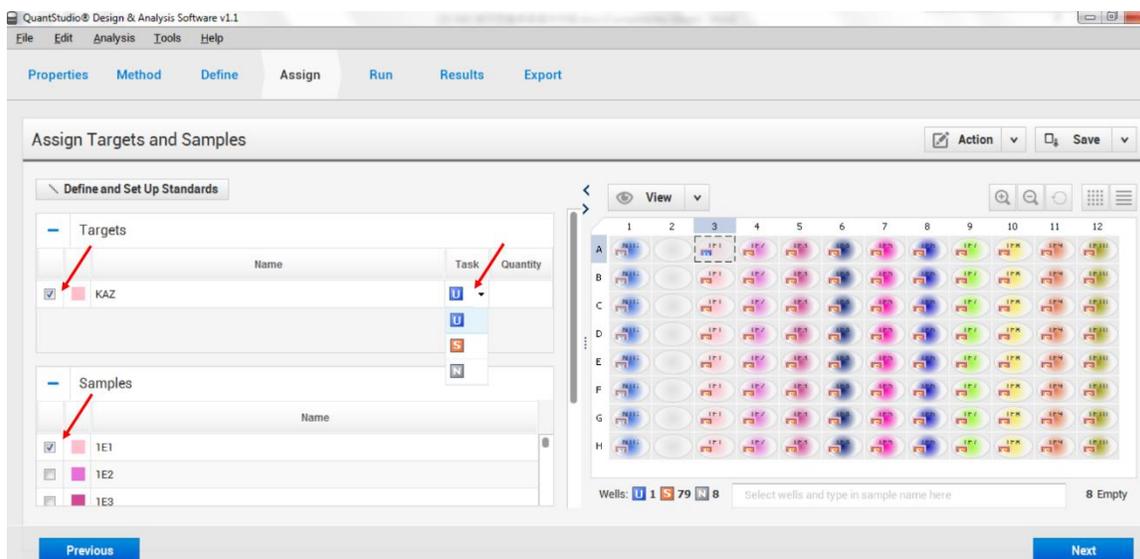


5.2、在“Samples”内点击“Add”，添加待测样品。在“Sample Name”中编辑样品名称。



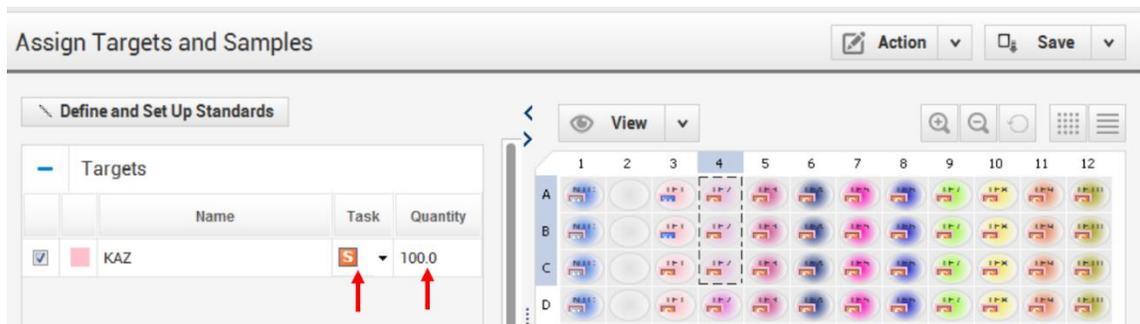
6、 点击“Next”进入“Assign”界面，编辑反应样品板：

6.1、 利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔，然后勾选左侧的基因及样本，同时在“Task”选项中指定该反应孔的类型（S 代表标准品，U代表未知样本，N 代表阴性对照）。

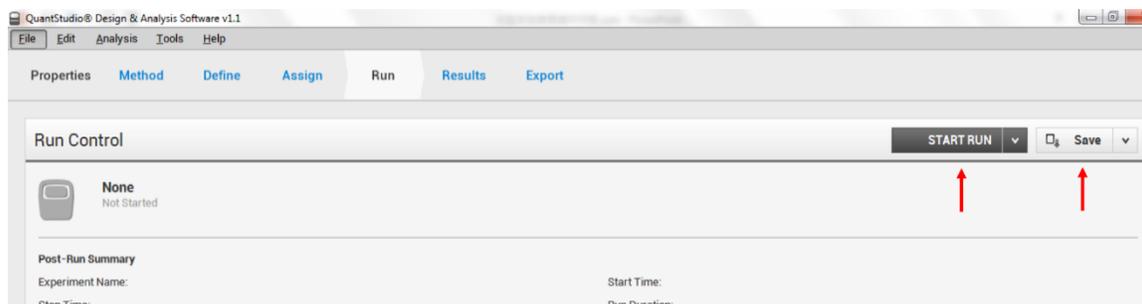


6.2、 设置标准曲线：利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔（一般情况下，每个梯度设置至少三个复孔），而后勾选左侧的基因(Target)和样本(Sample)，在“Task”选项中选择S，并在“Quantity”中输入标准品

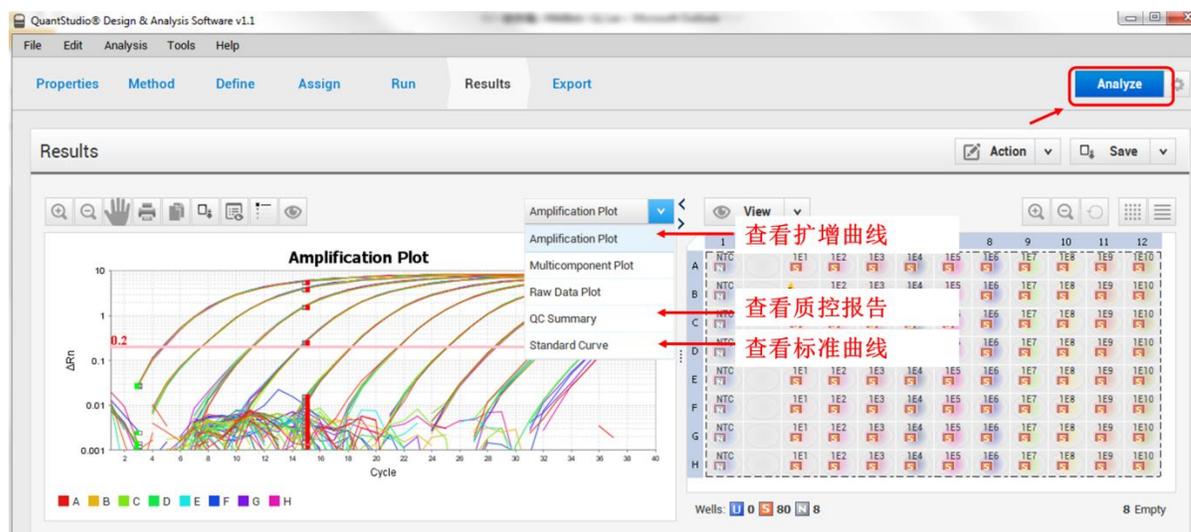
量。重复上述操作，完成标准曲线其他浓度点的设置（建议设置至少5个梯度）。



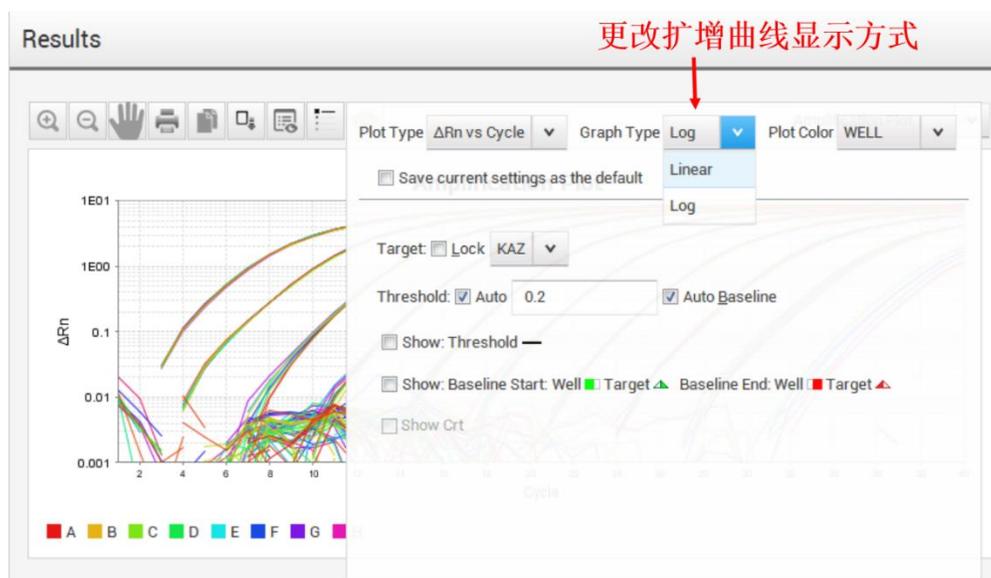
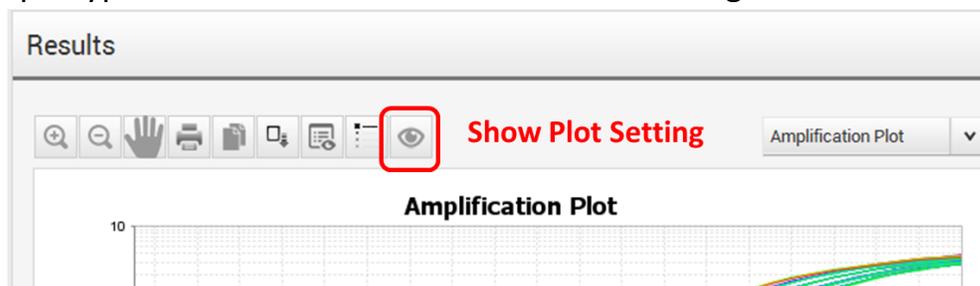
7、 点击“Next”进入“Run”界面，点击“Save”保存文件，然后点击“START RUN”开始运行。



8、 实验运行结束后，进入“Results”界面，点击右上角的“Analyze”按钮分析数据并查看扩增结果。



8.1、更改扩增曲线显示方式：单击 （Show Plot Setting），在“Graph Type”中可更改扩增曲线的显示方式（log 或 linear 图）。

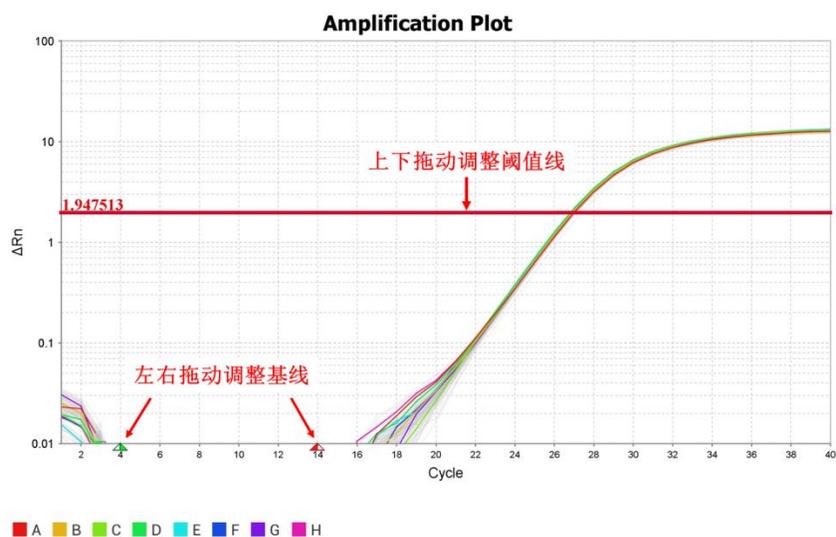
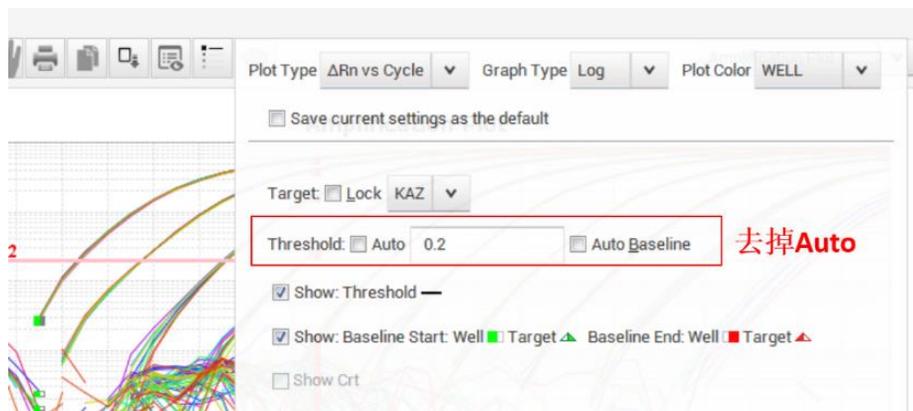


8.2、设置基线和阈值线：软件默认使用“Auto”功能自动设定基线和阈值线。

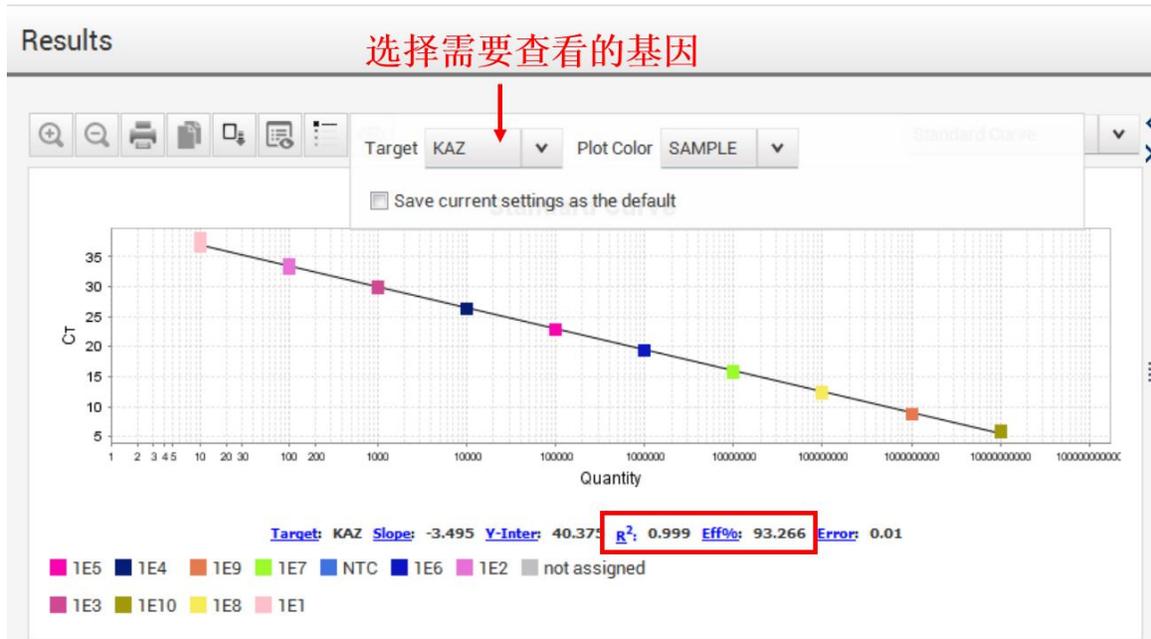
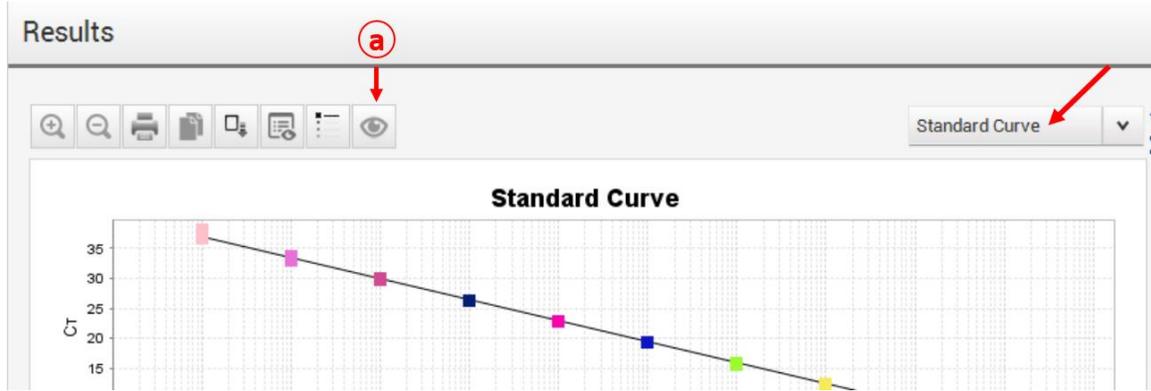
8.2.1、查看阈值线或基线：单击 （Show Plot Setting），选择需要查看的基因，将show前的“Threshold”及“Baseline”选择打勾。扩增曲线图上会出现相应的基线范围和阈值线。



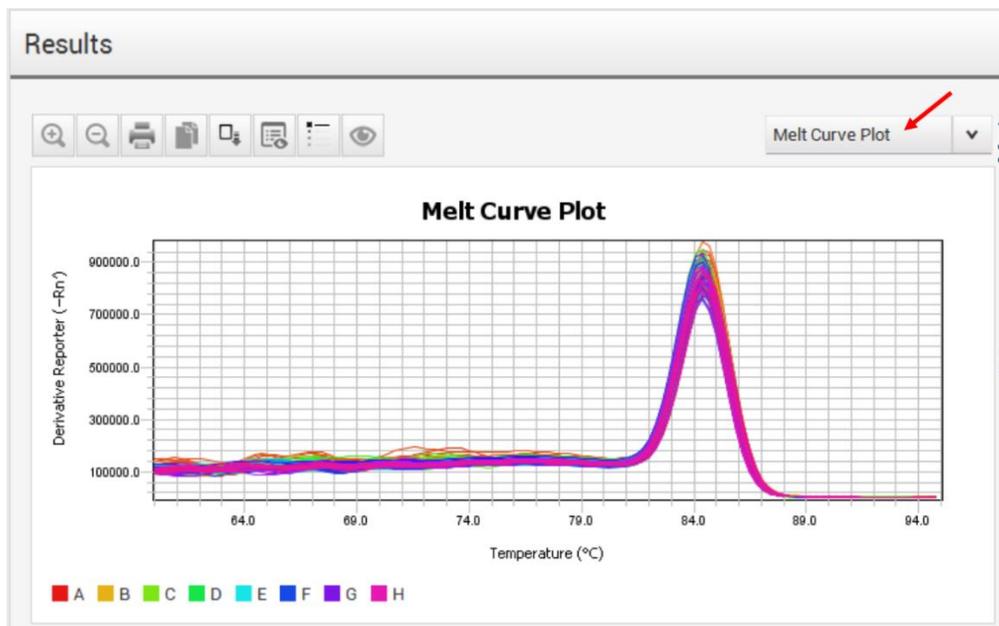
8.2.2、手动设置基线和阈值线：去掉“Auto”的勾选，然后输入阈值，或用鼠标拖动阈值线和基线进行手动调节。



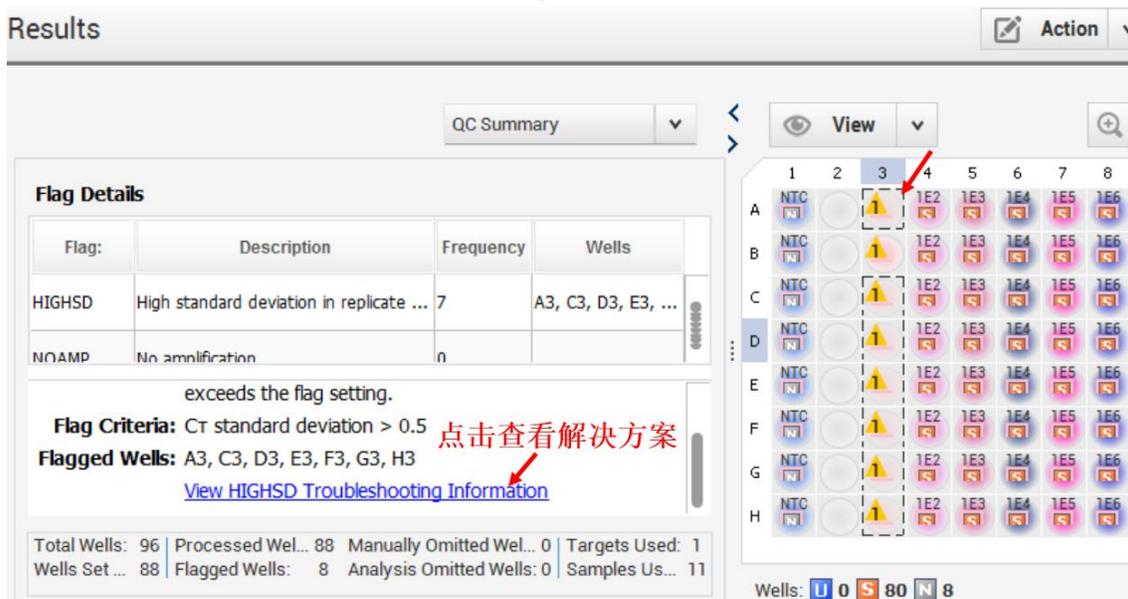
8.3、查看标准曲线 (Standard Curve), 通过单击 **(a)**  (Show Plot Setting), 更改“Target”来选择查看的基因。Eff%代表扩增效率。R<sup>2</sup>值代表标准曲线的数据点与回归曲线的接近程度, 建议在0.99 以上。



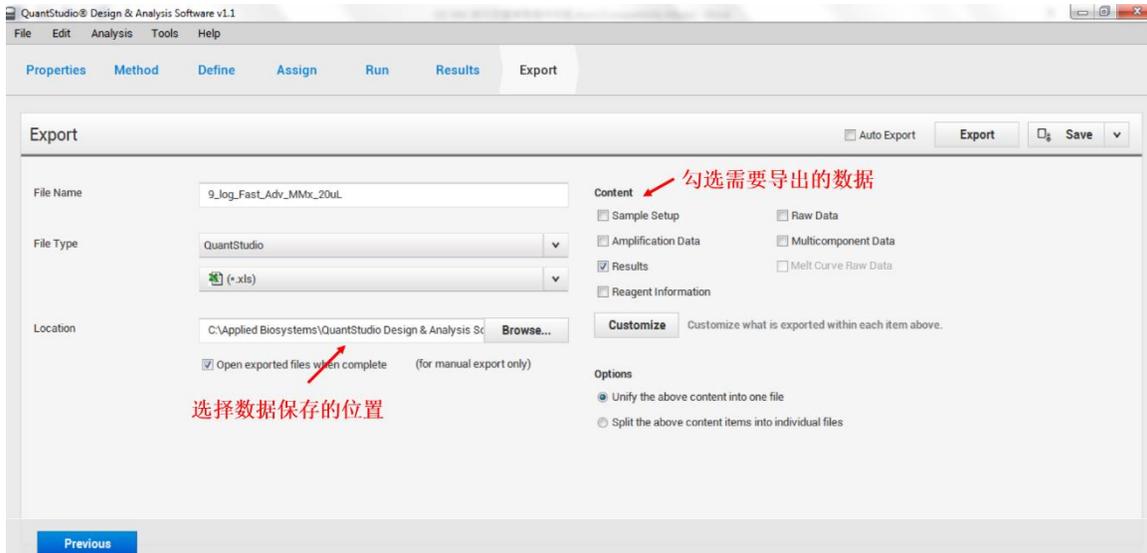
8.4、对于SYBR Green 实验，可以选择“Melt Curve plot”，查看熔解曲线。



8.5、查看“QC Summary”结果：反应孔可能存在异常情况时，会出现黄色三角提示，数字1代表有一种情况，2代表有两种情况，以此类推。详细信息及解决方案可以在“Flag Details”中查看。



9、 数据导出：在“Export”界面下根据需要导出数据。

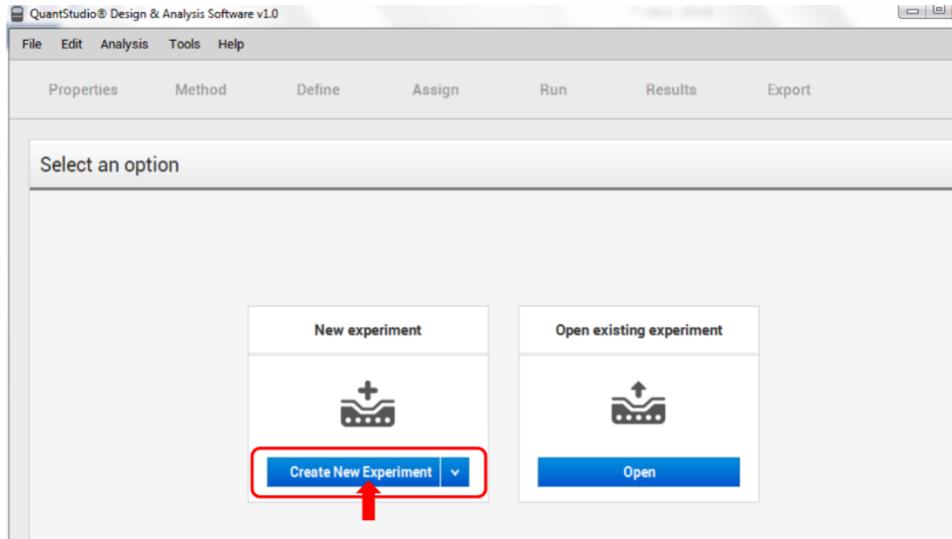




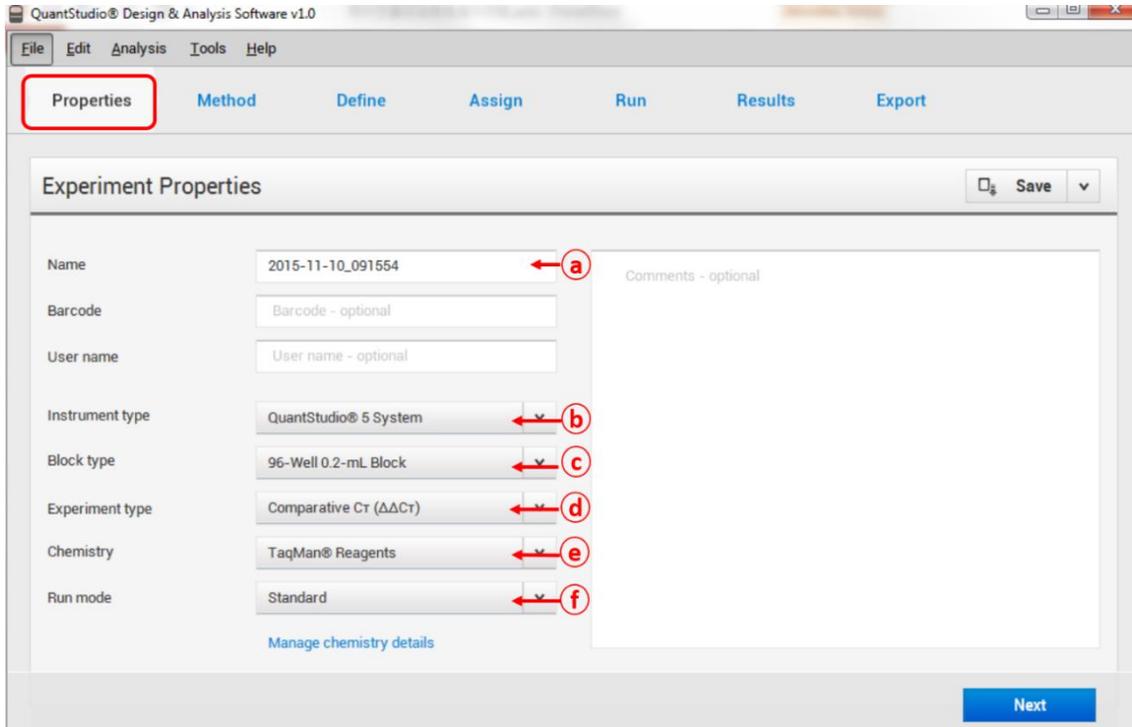
**Applied Biosystems QuantStudio 3 & 5 实时荧光定量 PCR 仪 V1.X 相对定量简易操作流程**

**applied  
biosystems**

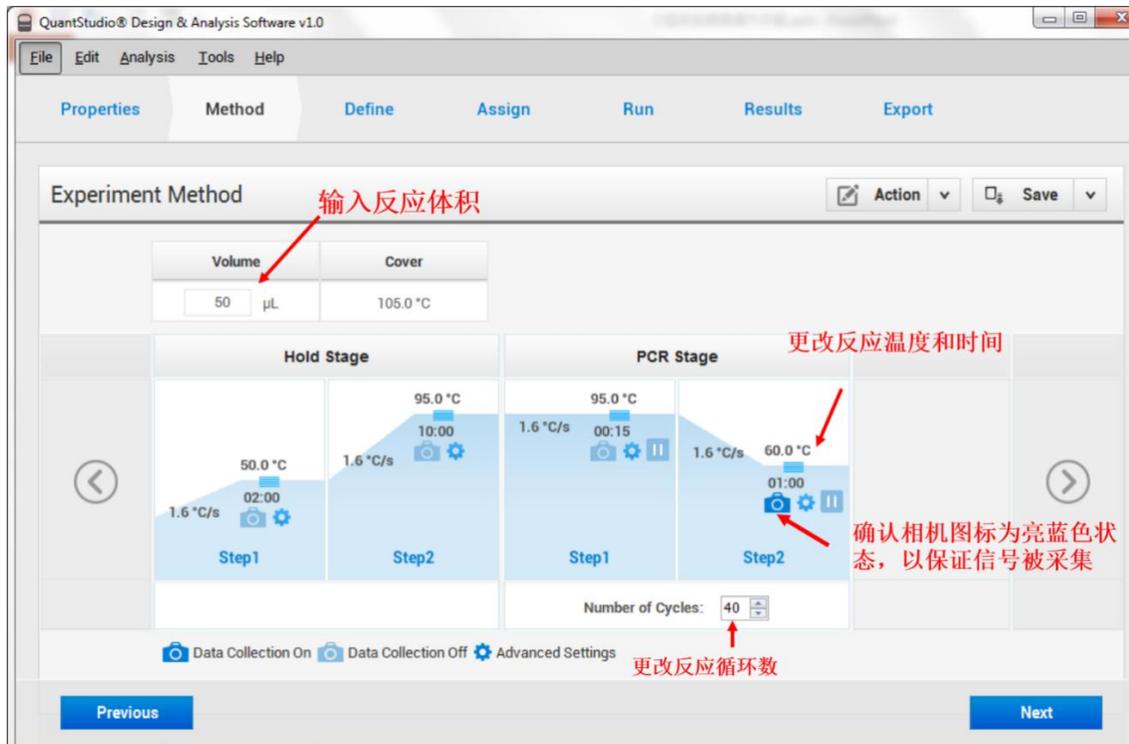
- 1、 双击桌面图标  开启 QuantStudio Design & Analysis Software, 或从开始菜单 > All Programs > Applied Biosystems > Quant Studio Design & Analysis Software > Quant Studio Design & Analysis Software 开启软件。
- 2、 进入主界面后, 点击 “Create New Experiment” 。



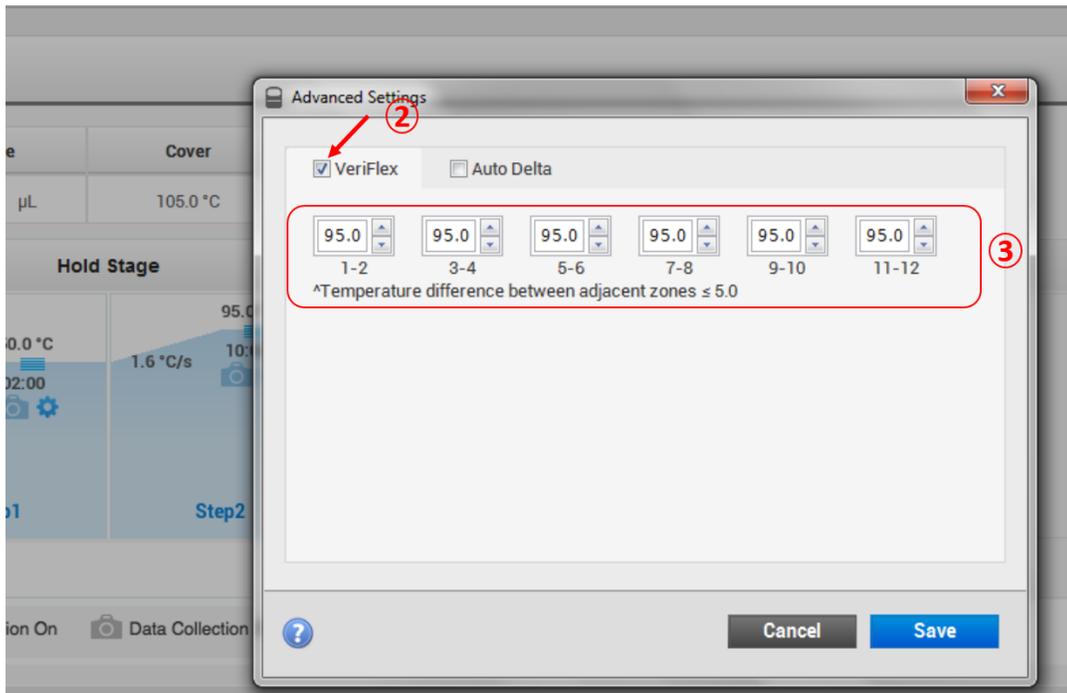
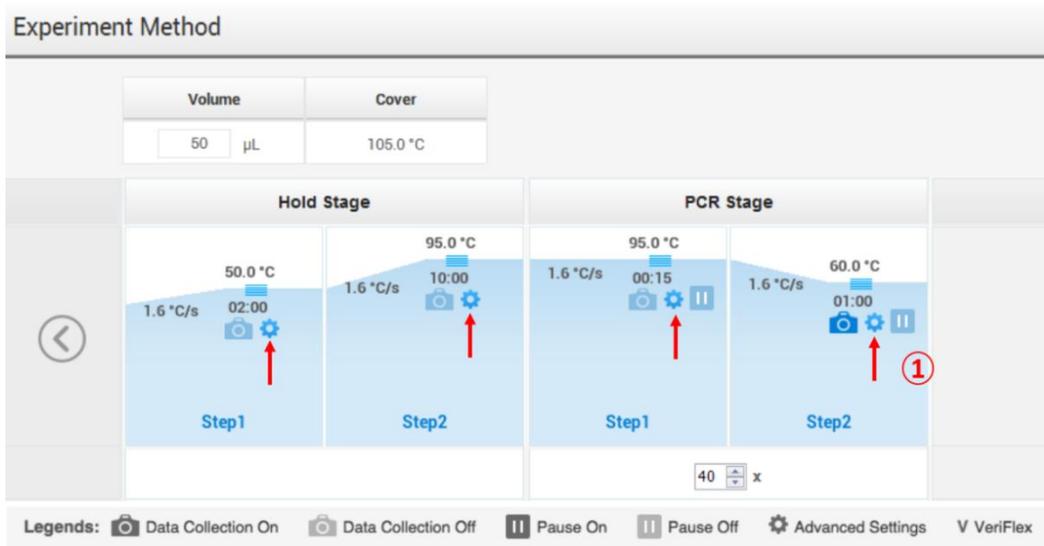
- 3、 在 “Properties” 界面设置实验属性:
  - a. 输入实验的名称;
  - b. 选择仪器型号;
  - c. 选择仪器的 block (加热模块) 类型;
  - d. 选择实验类型: “Comparative C<sub>T</sub>( $\Delta\Delta C_T$ )” ;
  - e. 选择实验试剂类型: Taqman 探针法选择 “Taqman reagents”, SYBR 染料法选择 “SYBR Green Reagents”, 其他选择 “Other”;
  - f. 选择运行模式 (run mode): 普通试剂选择 “Standard”; 快速试剂选择 “Fast” 。



4、 点击“Next”进入“Method”界面，设置实验的运行程序：

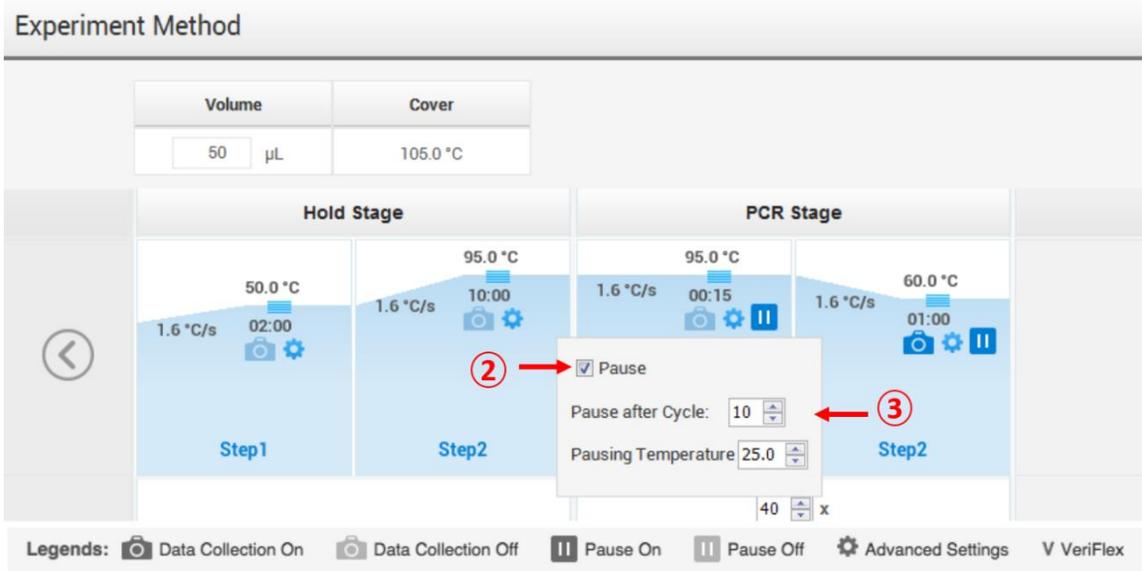


4.1、（可选）设置多梯度反应温度：① 单击  （Advanced Settings）；  
② 勾选veriflex，③ 然后更改block上相应的反应温度，相邻区域温度差异不能超过5℃。

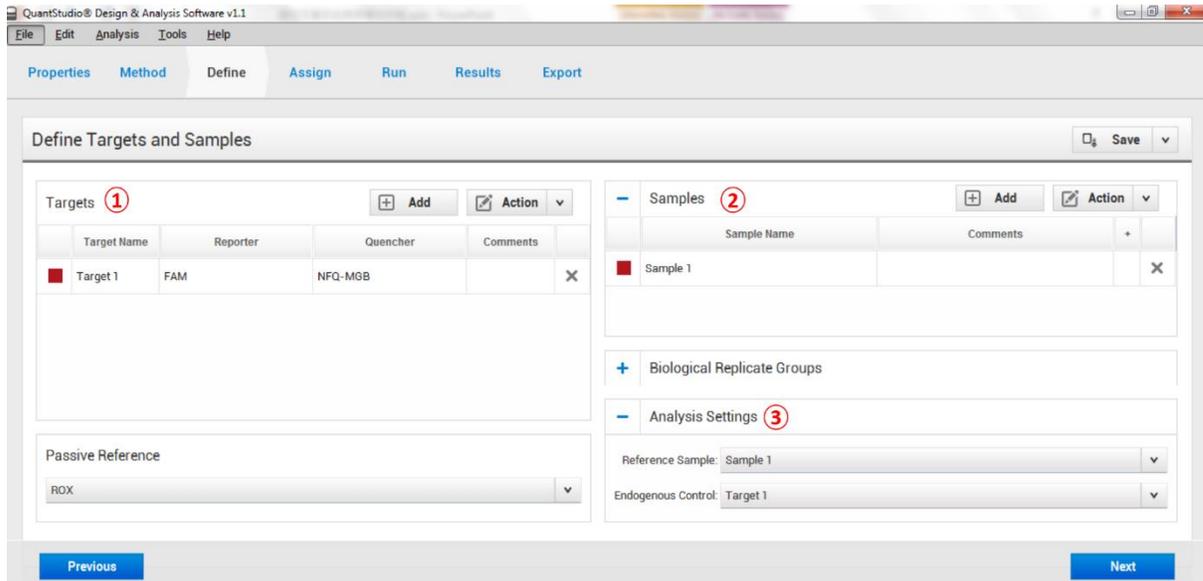


注：QuantStudio 3 可设置3个梯度反应温度；上图为QuantStudio 5示例图，可设置6个梯度反应温度。

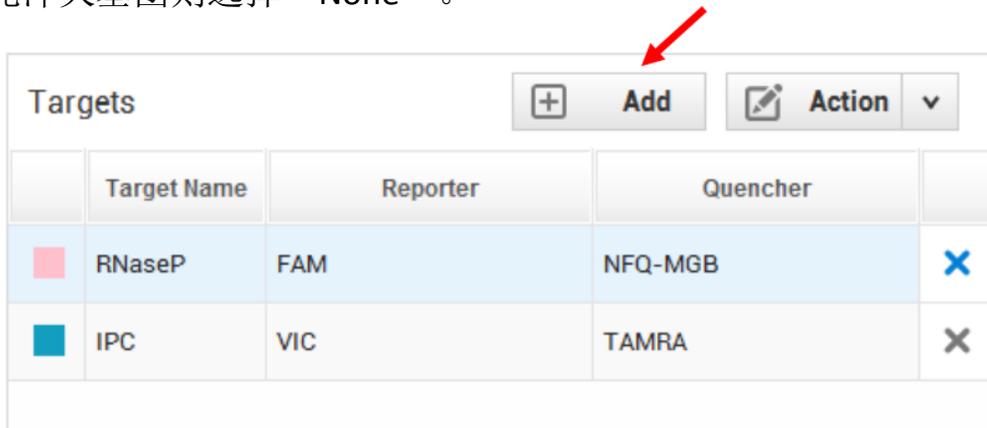
4.2、（可选）设置暂停程序：点击 ①  图标， ② 勾选Pause， ③ 设置暂停前的反应循环数（Pause after cycles），以及暂停后的温度（Pausing Temperature，范围：4~30℃）。



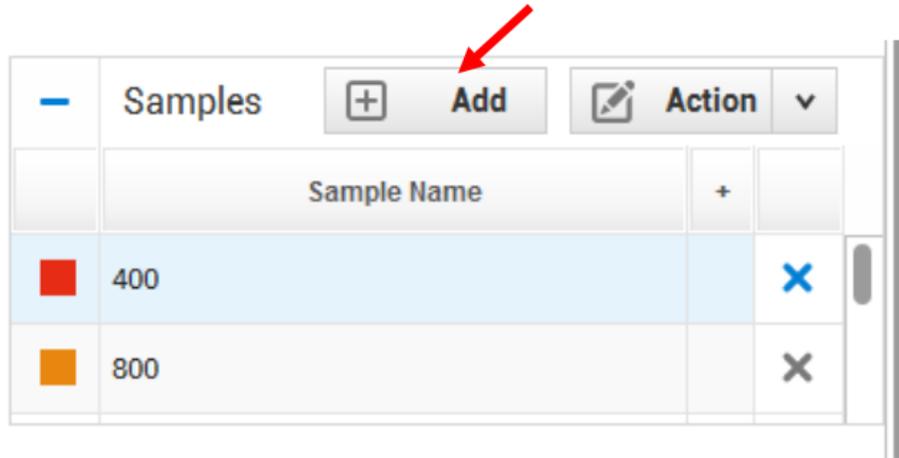
5、 点击 “Next ” 进入 “Define ” 界面， ① 设置待测基因名称 (Target)； ② 设置样品名称 (Sample)； ③ 设置对照样本和内参基因。



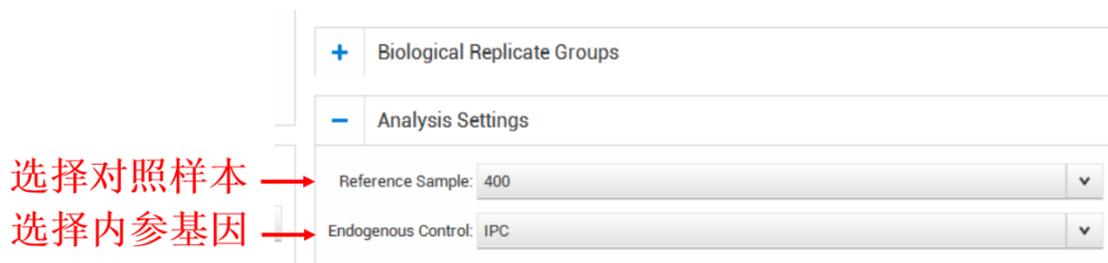
5.1、 在 “Targets” 内点击 “Add”， 添加待测基因。在 “Target Name” 中编辑基因名称； “Reporter” 和 “Quencher” 中选择所标记的荧光基团及淬灭基团。对于 “Quencher” 的选择， 如果是MGB 探针， 请选择 NFQ-MGB； 如果是TAMRA 探针， 请选择TAMRA； 如果是其他形式的非荧光淬灭基团则选择 “None” 。



5.2、在“Samples”下点击“Add”，添加待测样品。在“Sample Name”中编辑样品名称。

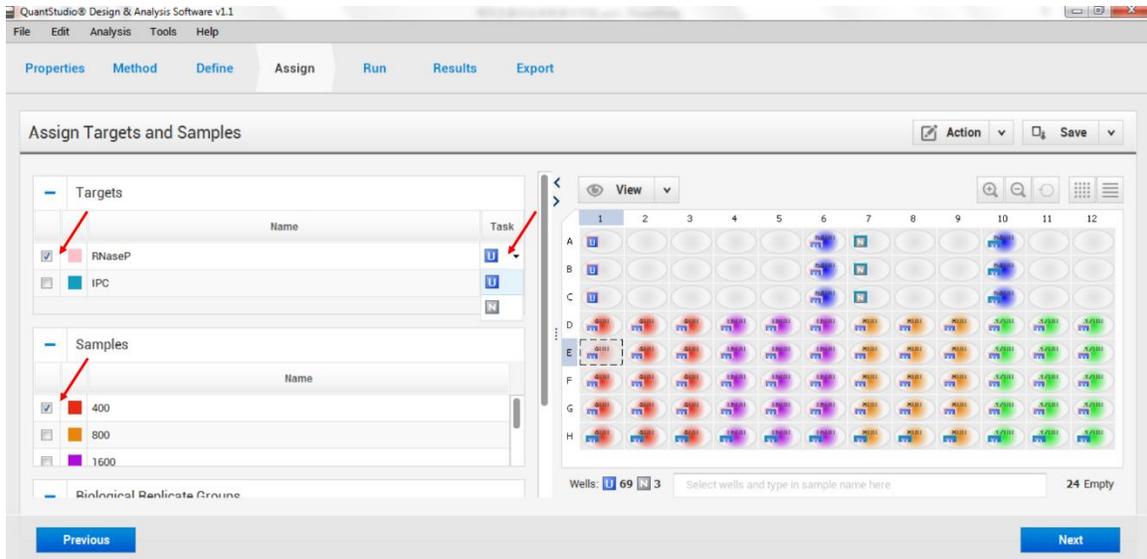


5.3、在 Analysis Settings 里设置对照样本和内参基因：点击下拉菜单选择合适的“Reference Sample”（对照样品）和“Endogenous Control”（内参基因）。

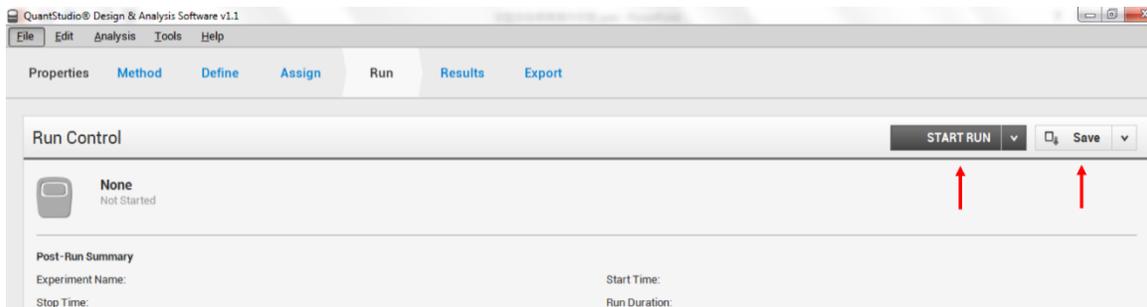


6、 点击“Next”进入“Assign”界面，编辑反应样品板：

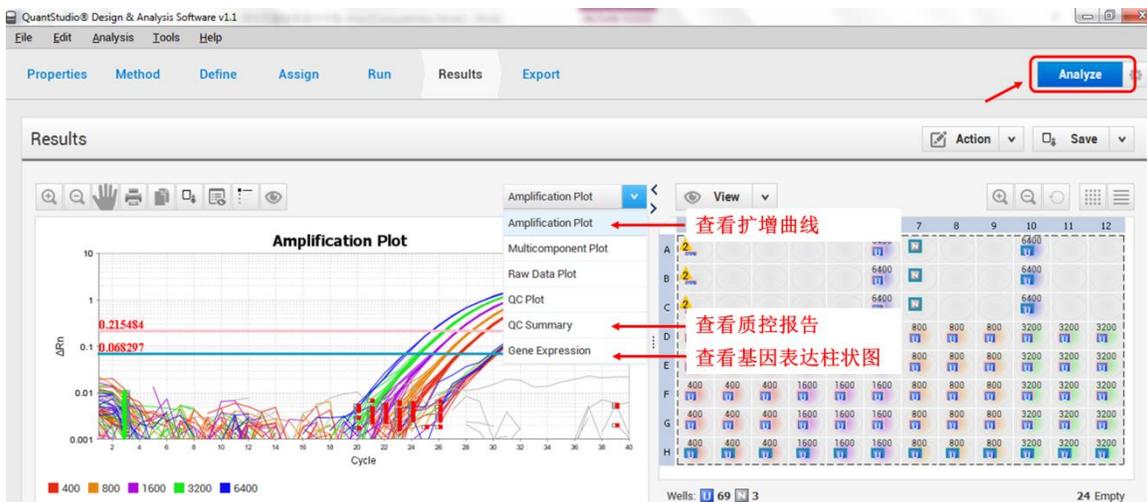
6.1、利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔，然后勾选左侧的基因及样本，同时在“Task”选项中指定该反应孔的类型（U代表未知样本，N代表阴性对照）。



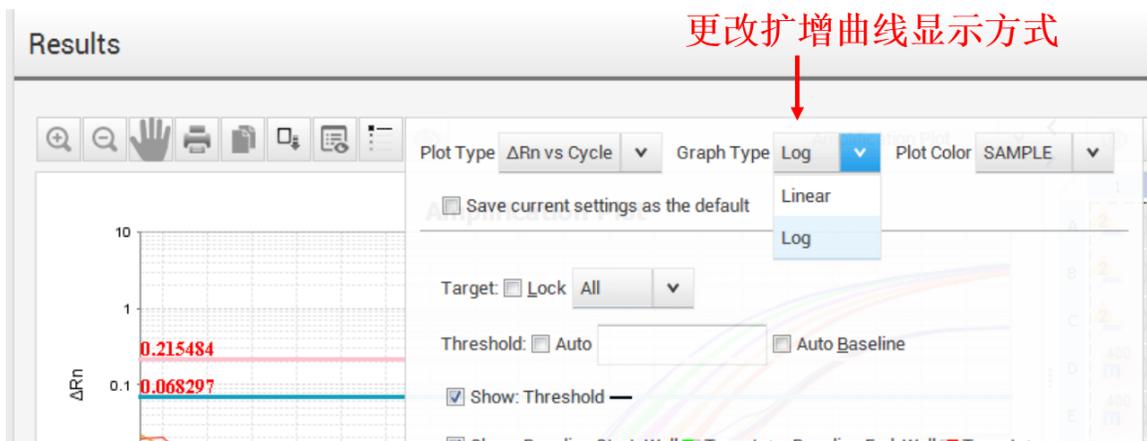
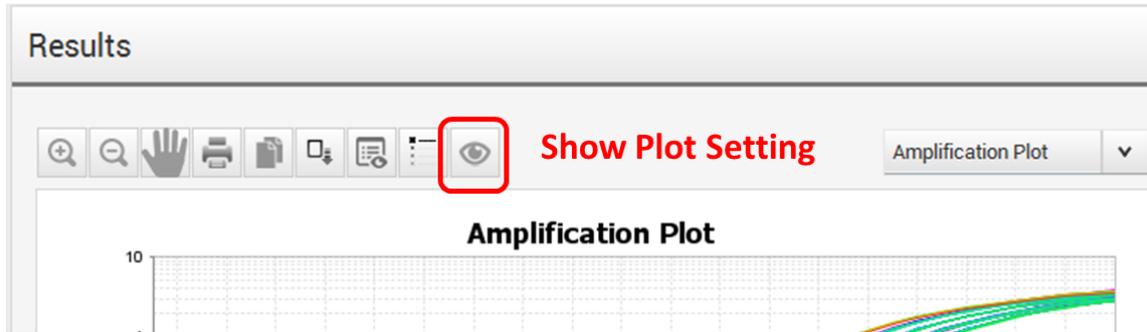
7、 点击“Next”进入“Run”界面，点击“Save”保存文件，然后点击“START RUN”开始运行。



8、 实验运行结束后，进入“Results”界面，点击右上角的“Analyze”按钮分析数据并查看结果。



8.1、更改扩增曲线显示方式：单击 （Show Plot Setting），在“Graph Type”中可更改扩增曲线的显示方式（log 或 linear图）。

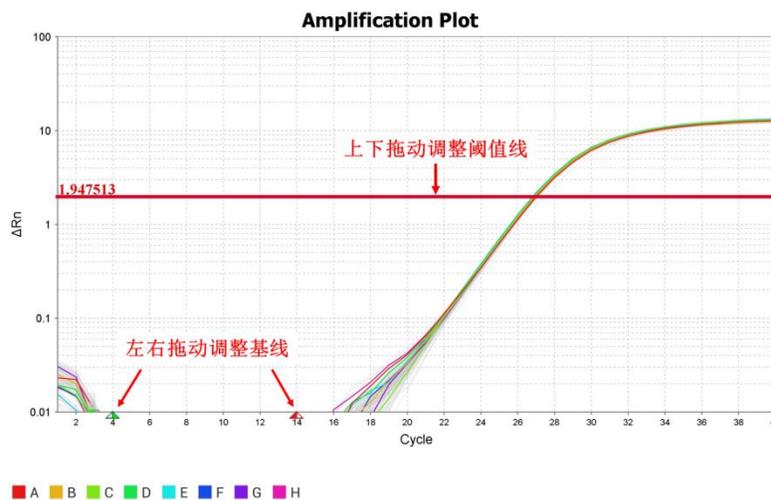
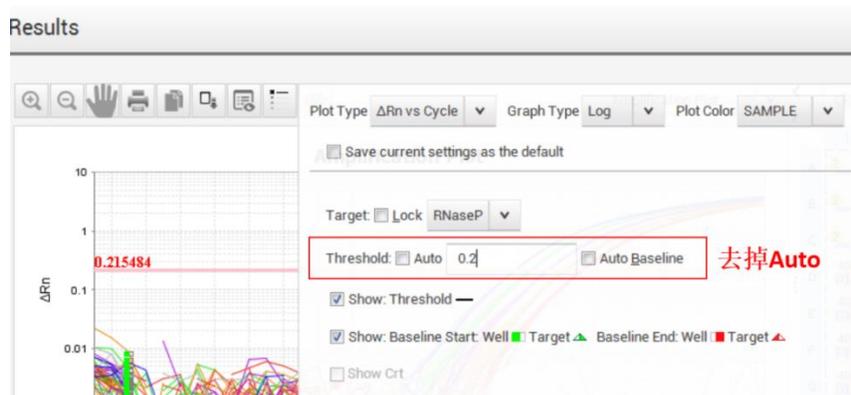


8.2、设置基线和阈值线：软件默认使用“Auto”功能自动设定基线和阈值线。

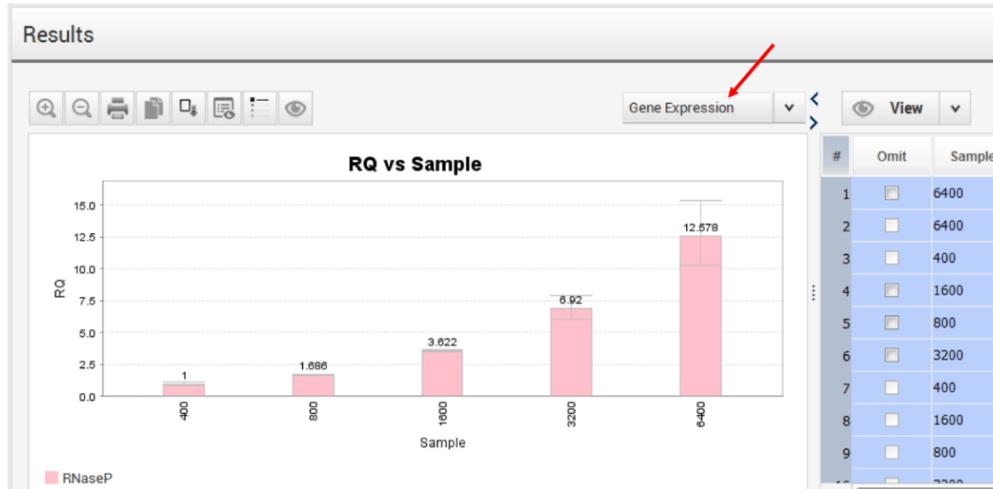
8.2.1、查看阈值线或基线：单击 （Show Plot Setting），选择需要查看的基因，将show前的“Threshold”及“Baseline”选择打勾。扩增曲线图上会出现相应的基线范围和阈值线。



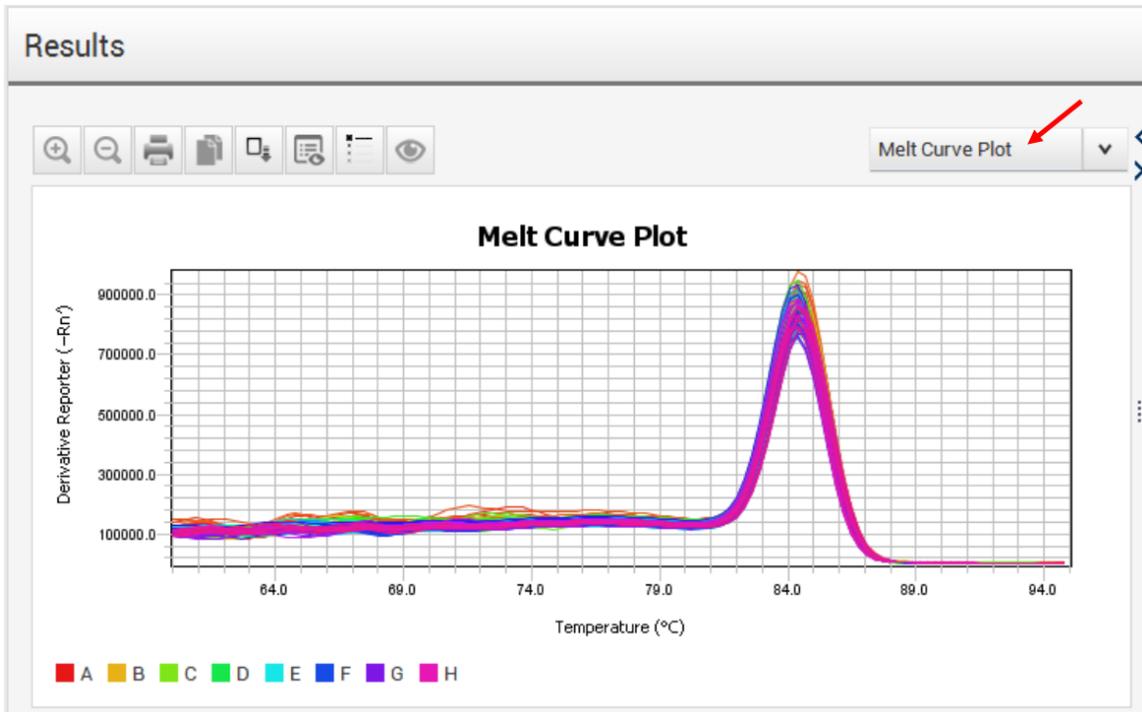
8.2.2、手动设置基线和阈值线：去掉“Auto”的勾选，然后输入阈值，或用鼠标拖动阈值线和基线进行手动调节。



8.3、选择“Gene Expression”查看基因表达柱状图。



8.4、对于SYBR Green实验，可以选择“Melt Curve plot”，查看熔解曲线。



8.5、查看质控报告（QC Summary）结果：反应孔可能存在异常情况时，会出现黄色三角提示，数字1代表有一种情况，2代表有两种情况，以此类推。详细信息及解决方案可以在“Flag Details”中查看。

Results

QC Summary

View

Flag	Description	Frequency	Wells
NOAMP	No amplification	3	A1, B1, C1
NOISE	Noise higher than others in plate	0	

**Flag Detail:** The sample did not amplify.  
**Flag Criteria:** Amplification algorithm result < 0. **点击查看解决方案**  
**Flagged Wells:** A1, B1, C1  
[View NOAMP Troubleshooting Information](#)

Total Wells: 96 | Processed Wells: 72 | Manually Omitted Wells: 0 | Targets Used: 2  
 Wells Set Up: 72 | Flagged Wells: 3 | Analysis Omitted Wells: 0 | Samples Used: 5

Wells: U 69 N 3 24 Empty

9、 数据导出：在“Export”界面下根据需要导出数据。

QuantStudio® Design & Analysis Software v1.1

File Edit Analysis Tools Help

Properties Method Define Assign Run Results Export

Export

Auto Export Export Save

File Name: GeneExpression\_ddCL\_Fast\_Adv\_MMx\_10uL

File Type: QuantStudio (-.xls)

Location: C:\Applied Biosystems\QuantStudio Design & Analysis Sc **Browse...**

Open exported files when complete (for manual export only)

**选择数据保存的位置**

**Content** **勾选需要导出的数据**

- Sample Setup
- Amplification Data
- Tech.Rep.Results
- Results
- Reagent Information
- Raw Data
- Multicomponent Data
- Bio.Rep.Results
- Melt Curve Raw Data

**Options**

- Unify the above content into one file
- Split the above content items into individual files