

Pro-16 QuantStudio 7 实时荧光定量 PCR 仪的操作规程

操作规程：

一. 启动电脑等待其启动，打开 PCR 仪器背后电源开关，等待仪器启动；

二. 实验程序的设定；

1. 当触摸屏显示主菜单时，双击桌面 “QuantStudio™Real-Time software” 图标，出现 login 登录界面，点击 “OK” ,打开软件。

2. 点击起始界面的 “三角图标”，展开软件功能按钮。点击左侧 “Set Up” 功能选项中的 “Advanced Setup” 高级设置向导。

3. 在打开的设置界面，左侧为导航树，选择不同的功能选项，右侧为不同的设置功能。

①. 默认条件下，显示为 “Experiment Properties” 实验属性。右侧界面，带有红色 *号位置需要输入（输入实验名称）或者通过鼠标进行选择仪器类型及 Block 类型、实验类型、荧光标记方法以及运行模式），不带*为选填，可以保持空白。

②. 左侧导航树，选择 “Plate Setup” 设置选项。

a. 右侧 “Define Targets” 选项下 “Target Name” 处输入检测基因的名称，“Reporter” 和 “Quencher” 中选择标记的荧光基团及淬灭基团，点击 “Add New Target” 添加所需基因，点击 “Delete Target” 删除多余基因；在 “Define Samples” 处输入检测样本的名称，点击 “Add New Samples” 添加所需样本，点击 “Delete Samples” 删除多余样本。

b. 点击 “Assign Targets and Samples” 切换设置界面用鼠标选择样本放置位置（勾选样本和所要检测的基因），根据样本孔的数量，依次进行设置，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）；

c. 在 “Analysis Settings” 下拉菜单选择合适的 “Reference Sample”（对照样品）和 “Endogenous Control”（内参基因）

- d. 在“select the dye to use as the passive reference”的下拉菜单处选取“None”或“ROX”
- ③. 点击“Run Method”设置反应条件:
 - a. 在“Reaction Volume Per Well”处输入反应体积。
 - b. 点击温度或者时间，根据需要更改温度的大小及时间长短，在“Number of Cycles”处输入循环数。Stage 指温度阶段，点击“Add Stage”可以选择添加 Stage 及类型；点击“Cycling Stage”可以添加 Step，选中某个温度步骤（该区域变成黄色），点击“Add Step”选择 Before 或者 After,既可添加温度步骤。
 - c. 选择采集荧光的温度步骤，在“Cycling Stage”中最后一个 Step，点击“Data Collection”图标，使其处于激活状态。
- 三. 上机。点击仪器屏幕右下角弹出按钮的弹出反应板板槽，将反应板按照设定的程序放置于 RT-PCR 仪的反应板槽中，点击弹入按钮，反应板自动进入仪器。
- 四. 开始运行程序。点击“Save”选取保存位置，保存实验，再点击“START RUN”开始运行程序。
- 五. 结果分析。PCR 反应结束以后，软件会自动计算标准曲线及 CT 值等；如需导出结果，选择“Export”导出实验结果报告。
1. 点击右上角的“Analyze”按钮分析数据 并查看扩增结果;
 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。查看阈值线或基线：选择需要查看的基因，将 show 后的“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。或将“Auto”前面的勾去除，手动调整基线及阈值线；
 3. 点击“Gene Expression”查看基因表达柱状图；

4. 对于 SYBR Green 实验, 在 “Melt Curve Plot” 界面中查看溶解曲线;
5. 查看 “QC Summary” 结果: 反应孔存在异常情况时, 会出现黄三角, 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。

六. 拷贝实验数据。在专用的云端下载或使用实验室专用 U 盘拷贝。

七. 关闭仪器。取出反反应板, 按顺序关闭 QuantStudio 7 软件, 关闭计算机及显示屏电源, 关闭仪器的电源按钮

注意事项

- 一. 实验时选择 Block 类型时, 需更换实验仪器对应的模块。(报告仪器管理员)
- 二. 实验时要用相关配套的耗材, 切忌用不符合耗材, QuantStudio 7 使用的是 0.2ml 反应体系的耗材或者 Array Card。注意耗材如果选用 96 孔板, 直接放置在模块上, 使 96 孔板上 A1 对应板槽上 A1。如果是单管 或者 8 联管则需要使用 tray 来配合。
- 三. 每次实验时, 注意不要将荧光染料沾染到反应管的管盖、管壁和反应模块上。如果不心 沾染到反应模块上, 应立即报告仪器管理员。
- 四. 禁止在反应板的膜或者盖上标记
- 五. 开始运行程序前, 请仔细检查操作流程中采集荧光的温度步骤是否正确。(二 3③c)
- 六. 如果实验反应过程中电脑出现异常, 此时反应会正常运行, 反应结束后, 整个实验的数 据结果都存在机器中。待电脑修复之后, 可以从机器中将这个数据结果 download 至 电脑中, 进行数据的处理分析。