Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 3 & 5 实时定量 PCR 仪

简明中文手册

第一部分:绝对定量 (Software v1.X)



英潍捷基(上海)贸易有限公司 赛默飞世尔科技公司

Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 3 & 5实时定量PCR仪

双击桌面图标 , 开启QuantStudio Design & Analysis Software, 或从开始菜
 单 > All Programs > Applied Biosystems > QuantStudio Design & Analysis

Software> QuantStudio Design & Analysis Software开启软件。

2. 进入主界面后,点击 "Create New Experiment"。

QuantStudio™ De	esign & Analysis Sol	ftware v1.4.1						 -
Eile Edit A	nalysis <u>T</u> ools	Help						
Properties	Method	Plate	Run	Results	Export			
Select an	Option							
				N	ew Experiment		Open Existing Experiment	
					*		*	
						i i		
				Creat	e New Experiment		<u>O</u> pen	
					-			

- **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. 选择实验类型为"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";快速试剂可选择"Fast"。

<u>File Edit Analysis T</u> ools	Help		
Properties	Plate Run Results Export		
Experiment Propertie			□ _ē Save v
Name	2017-07-07_093752	Comments - optional	
Barcode	Barcode - optional		
User name	User name - optional		
Instrument type	QuantStudio [®] 5 System	•b	
Block type	96-Well 0.2-mL Block	—	
Experiment type	Standard Curve	← e	
Chemistry	TaqMan® Reagents	b	
Run mode	Standard	← f	
	Manage chemistry details		
			Next

4. 点击"Next"进入"Method"界面,设置实验的运行程序。

e <u>E</u> dit	Analysis	s Iools	Help					
Propertie	s Me	thod	Plate	Run I	Results Export			
Experin	ment M	lethod		输入反应体	积		Action	v □ _ē Save v
		Volum 20	μL	Cover 105.0 °C		单击更	改反应温度和时间	
			Hole	d Stage	PC	R Stage		
	1.0	6 °C/s	50.0 °C 02:00	95.0 °C	95.0 °C 1.6 °C/s 00:15	60.0 °C		
G		Ste	p1	Step2	Step1	Step2	确认相机图标为亮蓝色状 态,以保证信号被采集	C
				J	亘改反应循环数 →	x 🖈 0		
Legend	s: 🙆 D	ata Collec	tion On	Data Collection Off	Pause On 🔲 Paus	e Off 🏾 🍄 Advanced Settings	V VeriFlex	
		4						
Pre	rvious							Next

 4.1 (可选)设置梯度反应温度: ①单击 ♀ (Advanced Settings); ②勾选
 VeriFlex, ③然后更改Block上相应区域的反应温度,相邻区域温度差异不能超过 5℃。

Experimen	t Method				
	Volume	Cover			
	50 µL	105.0 °C			Include: VPre-PCR Re
	Pre-Read Stage	Hold Stage	PCR	Stage	Post-Read Stage
	60.0 °C	95.0 °C	95.0 °C	60.0 °C	60.0 °C
$\langle \rangle$	1.6 °C/s 00:30	1.6 °C/s 10:00	00:15	1.6 °C/s 01:00	1.6 °C/s 00:30
	Step1	Step1	Step 1	Step2	Step1
			40	* X	
Legends:	Data Collection On	Data Collection Off	Pause On 🚺 Pause Of	ff Advanced Settings	V VeriFlex
e µ 0.0.0 22: 0 1	Cover L 105.0 °C Hold Stage 95.0 00 00 00 00 5 Step2	Advanced Settings	uto Delta <u>95.0 x</u> <u>5-6</u> 7-8 nce between adjacent zones ± 5	95.0 + 9-10 11-12	3
ion	On 🚺 Data Collection	0		Cancel Save	

注:梯度反应温度设置仅限于96孔加热模块。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: ① 点击 11 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:

4~99.9°C)∘

	Volume	Cover			
	50 µL	105.0 °C			
	Hold	l Stage	PCR Sta	ige	
	50.0 °C	95.0 °C	95.0 °C	60.0 °C	
	1.6 °C/s 02:00	1.6 °C/s	1.6 °C/s 00:15	1.6 °C/s 01:00	
$\langle \rangle$	© \$		T		
	Step1	Step2	Step1	Step2	
			40 👘	x	
Legends:	Data Collection On	Data Collection Off	Pause On II Pause Off	Advanced Settings	V VeriFlex
Experimen	t Method				
	Volume	Cover			
	50 µL	Cover 105.0 °C			
	Volume 50 μL Hole	Cover 105.0 °C	PCR St	age	
	Volume 50 μL Hole	Cover 105.0 °C d Stage 95.0 °C	PCR St. 95.0 °C	age	
	Volume 50 μL Hole 50.0 °C	Cover 105.0 °C d Stage 95.0 °C 1.6 °C/s 10:00	PCR St 95.0 °C 1.6 °C/s 00:15	age 60.0 °C 1.6 °C/s 01:00	
$\langle \rangle$	Volume 50 μL Hole 50.0 °C 1.6 °C/s 02:00 © Φ	Cover 105.0 °C d Stage 95.0 °C 1.6 °C/s 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	PCR St. 95.0 °C 1.6 °C/s 00:15	age 60.0 °C 01:00 01:00	
\langle	Volume 50 μL Hole 50.0 °C 1.6 °C/s 02:00 © Φ	Cover 105.0 °C d Stage 95.0 °C 1.6 °C/s 0:00 2	PCR St. 95.0 °C 1.6 °C/s 00:15 ○ ♀ Ⅱ • ☑ Pause Pause after Cycle: 10 ↔	age 1.6 °C/s 01:00 01:00 1.6 °C/s 1.6 °C/s 1.6 °C/s 01:00 01:00 01:00 01:00 01:00 01:00 01:00 01:00 01:01	
٢	Volume 50 μL Hole 50.0 °C 1.6 °C/s 02:00 Step1	Cover 105.0 °C d Stage 95.0 °C 1.6 °C/s 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	PCR St. 95.0 °C 1.6 °C/s 00:15 0 °C 11 0 °C 12 0 °C 12	age 60.0 °C 01:00 00 00:00 00:00 00:00 00:00 00:00 00:00 00:00	
٢	Volume 50 μL Hole 50.0 °C 1.6 °C/s 02:00 Step1	Cover 105.0 °C d Stage 95.0 °C 1.6 °C/s 2 Step2	PCR St. 95.0 °C 1.6 °C/s 00:15 © 2 Pause Pause after Cycle: 10 ÷ Pausing Temperature 25.0 ÷ 40 ÷	age 60.0 °C 01:00 00 00 00 00 00 00 00 00 00	

5. 进入"Plate"界面,点击"Advanced Setup",①设置待测基因名称

(Target); ②设置样品名称(Sample)。

Edit	Analysis Tools	Help								
opertie	s Method	Plate	Run	Results	Export					
ssign	Targets and	Samples						Act	ion v	□ _š Save
Quick	Setup Adv	anced Setup	>				S View V		0.0	0
-	Targets 1)	+	Add	Action	*		8 9	10	11 12
	Name	Reporter	Quencher	Comme	nts Task					
8	Target 1	FAM	NFQ-MGB			×	.0000000			
_	Samples ()	Y	Ŧ	Add	Action	v				
	countries 2	umple Name		Commente	E Action	-				
	Sample 1	angre name		commenta		×				
							Wells: 11 0 🖾 0			96 Empl

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;如果是其他形式的无荧光淬灭基团则选择"None"。

-	Т	argets			+ Add		Action	*
		Name	Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity	
V		KAZ	FAM	NFQ-MGB		▼ ▼		×
		Target 1	FAM	NFQ-MGB		-		×

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

-	San	nples	+ Add	Act	ion	۷
		Sample Name	Commer	nts	+	
		Sample 1				×
		Sample 2				×

5.3 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)。

Edit	Analysis	Tools	Help																			
operties	Meth	od	Plate	Rur	n Res	ults	Export															
ssign 1	Fargets	and	Sample	s														C	🖄 Actio	n v	0,	Save
Quick S	Setup	Adv	anced Set	up						<	۲	View	*							0	a 0	
- 1	Targets				+ Add	6	Action	*		T.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Nam		Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity	,		4	-		[m"	1		-		-		IN NO.	194	1210
./	KA7		AM	NEO-MGB						8	11			-	-		-10		-		10	
	TOTAL.		Pum	11 0-1100		m			-	ſ				-		-		-	-		rail	
						5				1	ri Nit		151	12	-	-		-		173	ra lina	12
- 5	Samples				Add		Action	v			PT NUL		15	182	10	-		-	12	ITS IFS	121	153
	1	C.a.	nelo Namo		Commo	-					NIC		IFI	162	183			-	IN IN	ITS IFM	124	10.00
1		34	inpie name		Comme	015					NIC		181	IE/	163	-		-	IE/	IFR	124	1610
(V)	161							×			10		n	a		-			-	R	- ra	
	1E2							×		1	Wells: 🚺	1 🚺 79	8									8 Empt

5.4 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,每个浓度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个浓度梯度)。

Quic	k S	etup	Advanced Set	up					<	<u>ا</u> ا	/iew	*			
-	Т	argets			+ Add		j Action	•	T	1	2	3	4	5	6
		Name	Reporter	Quencher	Comments	Task	Quantity		в				167	1153	
V		KAZ	FAM	NFQ-MGB		5 -	10.0	×		NII		IFI	IF7	183	

 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。

Edit Ar	nalysis Tools	Help		_			
roperties	Method	Plate	Run	Results	Export		
Run Conti	rol					START RUN 🗸	□ _š Save ∨
	None Not Started					1	1
Amplification	Plot Post-F	tun Summary					

 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。

Edit A	nalysis <u>T</u> oo	ls <u>H</u> elp																
operties	Method	Plate	Run	Results	Export												Ana	lyze
esults													(Z Act	tion	• [J₄ Si	sve -
Q Q V	Wale	0, 0, -	۲			Amplification Plot	Ś	ان ھ	ew 🗸						0	Q		
						Amplification Plot	-	1	查看	扩增	曲	线		8	9	10	11	12
10 1			Amplific	ation Plot		Multicomponent Plot	A	RIC	4	13		13	15	TE6	127	128	153	IEI0
		1	/			Raw Data Plot	в	NTC	+ =	182	163	1FA	185	126	167	168	169	1610
1		//	//	//	/	QC Summary	+	NIC	 	质 书	报	古		166	167	158	169	1610
	0.451490	11	1	11	11	Standard Curve	-	10	查看	标准	t th	线		166	167	158	169	1E10
BU 0.1	11	//	/ /	//	/	/ ///		NTC		1E2	163	164	165	166	167	168	169	1E10
	/	11	~/	/ /	/ /		E	EI	-	162	162	164	166	166	107	169	150	1510
0.01		Lak	and 1	alas	the		F	E	4	1	0		8	B		1	1	1
	Ner S	1.10	No.	BACI	A	M N	G	NTC	4	1E2	1E3	1E4	165	126	167	168	169	1610
0.001	2 4 6	8 10 12	14 16 18	20 22 24	20 20 3	32 54 36 38 40	н	NTC	4.	1E2	1E3	1E4	165	166	167	158	169	1E10
				Cycle														

7.1 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)。

Results		
🔍 🔍 💾 📑 📭 📰 🐨 Show Plot Setting	Amplification Plot	~
Amplification Plot		

						1			<u> </u>	
2 Q 👋 🖶 🖻		Plot Type	∆Rn vs Cycle	~	Graph Type	Log	Plot Color	WELL	~	
		Save	e current settin	gs as	the default	Linear				
1E01						Log				
1E00	//	Target:	Lock KAZ	*						
/	//	Thresh	old: 🔽 Auto 🛛 0	2		Auto Bas	eline			
법 0.1		Show: Threshold —								
0.01		📄 Sho	w: Baseline Sta	rt We	ell 🔳 Target 🛆	Baseline	End: Well 🔳 T	arget 🔺		
		Sho	w Crt							
0.001 2 4	6 8 10	11 14								
	E E F E G	i.								

- 7.2 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。
- 7.2.1 查看阈值线或基线:单击 "Show Plot Setting",选择需要查看的基因,将 "Show: Threshold"及 "Show: Baseline"前的选项打勾。扩增曲线图上会出现相应的基线 范围和阈值线。

		Plot Type △Rn vs Cycle v Graph Type Log v Plot Color WELL v
		Save current settings as the default
	/	Target Lock KAZ 、 选择需要查看的基因
		Threshold: V Auto 0.2
	/	Show: Threshold— 自动分析阈值和基线
显示阈值线和基	线	Show: Baseline Start: Well 🛢 Target 🔺 Baseline End: Well 📑 Target 🔺
		Show Crt
DEE	F G	

7.2.2 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。设置好后,点击 "Analyze"分析结果。



7.3 查看标准曲线 (Standard Curve): 通过单击@ 5 "Show Plot Setting",更改

"Target"来选择想要查看的基因。Eff%代表扩增效率。R²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。





7.4 对于 SYBR Green 实验,可以选择 "Melt Curve Plot",查看熔解曲线。 Results



7.5 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。

esults											Ø	Actio	n y
		QC Sumn	hary	~	< >	۲	Vi	ew	~				.
Flag Det	ails				Î		2	3	4	5 1E3	6	7	8
Flag:	Description	Frequency	Wells					1	1E2	1E3	1E4	1E5	166
HIGHSD	High standard deviation in replicate	7	A3, C3, D3, E3,					1	1E2	1E3	1E4	1E5	166
NOAMP	No amplification	a amplification 0						1	1E2	1E3	1E4	165	166
	exceeds the flag setting.				1	NTC		1	1E2	1E3	IEA	165	166
Flag C	riteria: CT standard deviation > 0.5	占击杳	看解决方法	家。		NTC		1	1E2	1E3	1E4	165	166
Flagged	Wells: A3, C3, D3, E3, F3, G3, H3		E AT COS					1	1E2	1E3	1E4	1E5	166
	VIEW HIGHSD Troubleshootin	g informati	on			H NTC		1	1E2	1E3	1E4	165	166
Total Wells Wells Set .	s: 96 Processed Wel 88 Manually 0 88 Flagged Wells: 8 Analysis 0	Omitted Wel.	0 Targets Us s: 0 Samples Us	ed: 1 s 11		Wells:	0	58	0 🛛 8	3			

8. 数据导出:在"Export"界面下根据需要导出数据。

QuantStudio"	Design & Analysis So	ftware v1.4.1			1.00	- and the second	BE Ave - Housed Hard			000	0 - X
Eile Edit	Analysis Tools	Help									
Properties	Method	Plate	Run	Results	Export						
Export								🔄 Auto Export	Export	□ _ê Save	v
File Name		9_log_Fast_	Adv_MMx_20	ıL.		_	Content / 勾边	北需要导出的数据			
File Type		QuantStudio				•	Sample Setup Amplification Data	🔄 Raw Data			
		看 (*xis)				•	Results Reagent Information	🛄 Melt Curve Raw Data			
Location		C:\Applied B	iosystems\Q	JantStudio Design	& Analysis Sc B	rowse	Customize Customize	what is exported within each item abov	/e.		
		🕑 Open expo	orted files whe	n complete	(for manual export o	only)	Options				
	选择数	(据保存的	的位置				 Unify the above content into Split the above content iten 	o one file ns into individual files			



遍布全球的技术支持服务

我们在全球 60 多个国家和地区设立了办事处,拥有 备受赞誉的技术支持团队以及现场服务工程师。您可 以在我们的官方网站上订购产品、下载技术文件,以 及寻找问题答案。也非常欢迎您通过电子邮件、电 话、以及微信平台和我们联系获取信息。







Thermo Fisher Scientific

官方网站: http://www.thermofisher.com 免费热线电话: 8008208982/4008208982 技术支持邮箱: cntechsupport@lifetech.com 微信公众号: 赛默飞生命科学服务平台

