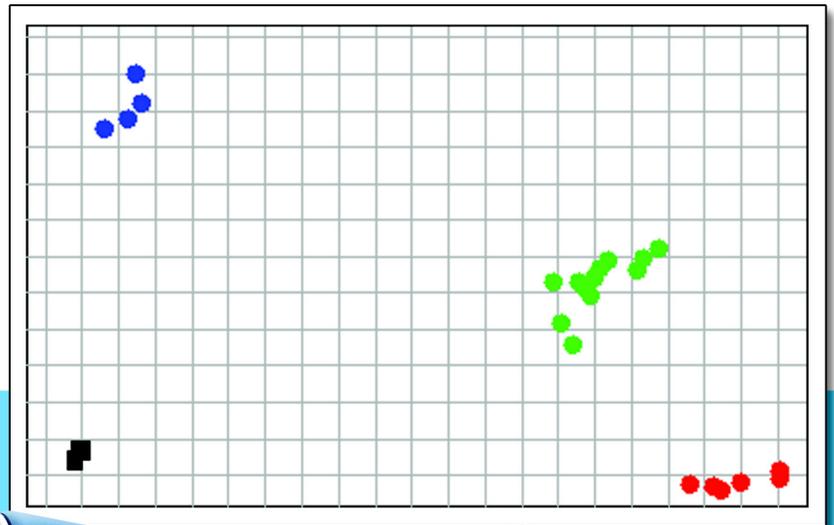


Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

基因分型实验



Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 基因分型实验

使用入门

1

设计实验

2

准备反应

3

运行实验

4

分析实验

5

© Copyright 2007, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

NOTICE TO PURCHASER: Label License

The StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems are covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods.

Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, and VIC are registered trademarks, and FAM, StepOne, StepOnePlus, TAMRA, and VeriFlex are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Excel, Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

部件号 4377732 修订版 C
06/2010

目录

	前言	v
	如何使用本指南	v
	如何获取更多信息	vii
	如何获取支持	x
	本文档中使用的安全惯例	xi
	仪器上的符号标志	xii
	仪器上的安全标签	xiii
	使用仪器的一般安全注意事项	xiv
	化学品安全注意事项	xv
	化学品废料安全注意事项	xvi
	电气安全注意事项	xvii
	LED 安全注意事项	xviii
	生物危害安全注意事项	xviii
	工作场所安全注意事项	xix
	产品符合的安全标准和电磁兼容性 (EMC) 标准	xix
第 1 章	使用入门	1
	关于 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统	2
	支持的耗材	4
	关于基因分型实验	6
	如何使用本指南	9
	关于示例实验	10
	示例实验工作流程	13
第 2 章	设计实验	15
	本章概述	16
	创建新实验	17
	定义实验属性	18
	定义方法和材料	20
	设置 SNP 检测	21
	设置样本和重复数	24
	设置运行方法	26
	查看反应设置	28
	订购实验材料	31
	完成 Design Wizard (设计向导)	34

第 3 章	准备反应	37
	本章概述	38
	准备样本稀释	39
	准备反应预混液	40
	准备反应板	42
第 4 章	运行实验	45
	本章概述	46
	准备运行	47
	（可选）启用通知设置	49
	启动运行	51
	监视运行	55
	卸载扩增仪并传输数据	62
第 5 章	分析实验	67
	本章概述	68
	打开实验以便分析	69
	查看等位基因鉴别曲线	71
	查看反应板布局	75
	查看反应孔表	78
	查看 QC 摘要	82
	查看原始数据曲线	83
	查看多组分曲线	85
	查看扩增曲线	87
	查看分析设置	94
	公布数据	99
附录 A	替代实验工作流程	101
	Advanced Setup（高级设置）工作流程	102
	QuickStart 工作流程	103
	Template（模板）工作流程	105
	Export/Import（导出/导入）工作流程	107
	参考文献	111
	术语表	113
	索引	127

如何使用本指南

关于系统说明文档 下文所列指南随 Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems（以下简称“StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统”）一起提供。

注意：本手册中使用 Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 指两种产品：Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System 和 Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System。

指南	目的和目标读者	部件号	中文版部件号
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	说明如何在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行实验。每个入门指南都可用作：	4376786	4377732
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>	<ul style="list-style-type: none"> 教程，使用随 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software（以下简称“StepOne™ 软件”）提供的示例实验数据。 您自己执行实验的指南。 	4376787	4377721
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments</i>	专为使用 StepOne 或 StepOnePlus 系统执行实验的实验室人员及主要研究人员而编写。	4376785	4377739
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>		4376784	4377733
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation, Networking, and Maintenance Guide</i>	说明如何安装和维护 StepOne 和 StepOnePlus 系统。 专为负责安装和维护 StepOne 或 StepOnePlus 系统的实验室人员而编写。	4376782	4377795
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Quick Reference Card</i>		4376783	4377789
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide</i>	提供有关您可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上使用的试剂的信息，包括： <ul style="list-style-type: none"> TaqMan® 和 SYBR® Green 试剂简介 以下实验类型的描述和设计指南： <ul style="list-style-type: none"> 定量实验 基因分型实验 存在/不存在实验 专为使用 StepOne 或 StepOnePlus 系统执行实验的实验室人员及主要研究人员而编写。	4379704	4377715

指南	目的和目标读者	部件号	中文版部件号
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Site Preparation Guide</i>	说明如何准备场地以接收和安装 StepOne 和 StepOnePlus 系统。 专为为准备场地以便安装 StepOne 或 StepOnePlus 系统所需的任务制定日程表、管理以及执行这些任务的工作人员而编写。	4376768	4378356
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software Help</i>	说明如何使用 StepOne 软件以便： <ul style="list-style-type: none">• 使用 StepOne 和 StepOnePlus 系统设置、运行和分析实验。• 监视联网的 StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪。• 校准 StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪。• 使用 RNase P 实验验证 StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪的性能。 专为以下人员而编写： <ul style="list-style-type: none">• 使用 StepOne 或 StepOnePlus 系统执行实验的实验室人员及主要研究人员。• 负责安装和维护 StepOne 或 StepOnePlus 系统的实验室人员。	未提供	未提供

假定 本指南假定您已具备以下条件：

- 熟悉 Microsoft Windows® XP 操作系统。
- 熟悉因特网和因特网浏览器。
- 熟悉如何处理 DNA 和/或 RNA 样本并为 PCR 扩增准备这些样本。
- 熟悉数据存储、文件传输以及复制和粘贴操作。
- 若您计划将 StepOne 或 StepOnePlus 系统集成到您的现有实验室数据流中，则需具备联网经验。

文字体例 本指南采用以下体例：

- **粗体**文字表示用户操作。例如：
键入 **0**，然后对剩余的每个字段按一下 **Enter** 键。
- **斜体**文字表示新的或重要的内容，也用于表示强调。例如：
在开始分析之前，请**始终**准备好新鲜基质。
- 右箭头符号 (▶) 用于分开您从下拉菜单或快捷菜单中依次选择的多个命令。
例如：
依次选择 **File** (文件) ▶ **Open** (打开)。

用户警示文字 在 Applied Biosystems 用户文档中，有两种用户警示文字。每种警示文字表示需遵守事项或执行操作的不同重要性级别，如下所述：

注意： 提供使用产品的引起关注或帮助性信息，但并非使用产品不可或缺的事项或操作。

切记！ 提供正确操作仪器、精确使用试剂盒或确保安全使用某化学品所必须遵守的要求或必须执行的操作。

用户警示文字示例如下：

注意： 在控制台也可使用 Calibrate（校准）功能。

切记！ 要验证您的客户机连接，您需要一个有效用户 ID。

安全警示文字 在用户文档中，也会出现安全警示文字。有关详情，请参阅第 xi 页“安全警示文字”。

如何获取更多信息

相关文档 其它 StepOne 和 StepOnePlus 系统文档

下面表格中所列的文档不随 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪提供。这些文档将在 2007 年 7 月提供。

文档	部件号
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Planned Maintenance Protocol</i>	4376788

与基因分型实验相关的文档

文档	部件号
<i>Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card</i>	4312212
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Ordering TaqMan® SNP Genotyping Assays Quick Reference Card</i>	4374204

文档	部件号
<i>Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card</i>	4371394
<i>Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card</i>	4367636
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856

与存在/不存在实验相关的文档

文档	部件号
<i>DNA Isolation from Fresh and Frozen Blood, Tissue Culture Cells, and Buccal Swabs Protocol</i>	4343586
<i>NucPrep® Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol</i>	4333959
<i>PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol</i>	4318925

与相对标准曲线和比较 C_T 实验相关的文档

文档	部件号
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

与标准曲线实验相关的文档

文档	部件号
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

与试剂指南相关的文档

文档	部件号
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol</i>	4367218
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4304965
<i>SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4310251
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol</i>	4308335
<i>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol</i>	4351891
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol</i>	4371135
<i>TaqMan® Genotyping Master Mix Protocol</i>	4371131
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol</i>	4304449
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859
<i>Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note</i>	127AP08

注意：有关更多文档，请参阅第 x 页“如何获取支持”。

从软件 Help（帮助）系统中获取信息

StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）系统描述如何使用用户界面的每项功能。要在软件中访问 Help（帮助）系统，请执行下列操作之一：

- 按 **F1** 键。
- 单击工具栏中的 。
- 依次选择 **Help**（帮助）▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助）。

要在 Help（帮助）中查找所需主题：

- 查看目录。
- 搜索特定主题。
- 搜索按字母顺序排列的索引。

将您的意见和建议 发送给我们

Applied Biosystems 欢迎您对我们的文档提出您的宝贵意见和建议，以不断提高我们的用户文档质量。请将您的意见或建议发电子邮件至：

techpubs@appliedbiosystems.com

切记！上述电子邮件地址仅用于提交与文档相关的意见和建议。要订购文档、下载 PDF 文件或寻求技术疑问的帮助，请登录 <http://www.appliedbiosystems.com> 网站，然后单击 **Support**（支持）链接。（请参阅第 x 页“如何获取支持”。）

如何获取支持

有关不同地区产品服务和技术支持的最新信息，请登录 <http://www.appliedbiosystems.com> 网站，然后单击 **Support**（支持）链接。

在 **Support**（支持）页面上，您可以：

- 搜索并查阅常见问题与解答 (FAQ)
- 直接向技术支持人员提交问题进行咨询
- 订购 Applied Biosystems 用户文档、MSDS、分析证书及其它相关文档
- 下载 PDF 文档
- 获取有关客户培训的信息
- 下载软件更新和补丁程序

此外，在 **Support**（支持）网页上还提供全球各地 Applied Biosystems 技术支持和销售机构的电话和传真号码。

切记！当按照本指南的指导，或您需要安排维护您的 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪（如年度计划维护或温度验证/校准）时，请与 Applied Biosystems Care Center 联系。要获取中心的电话号码或向中心发送电子邮件，请登录 <http://www.appliedbiosystems.com/support/contact>。

本档中使用的安全惯例

安全警示文字 在 Applied Biosystems 用户文档中包括四种安全警示文字，显示在需提醒用户对相应危险引起注意的位置。每种警示文字—**切记**、**注意**、**警告**、**危险**—表示需遵守事项或执行动作的不同重要性级别，如下所述：

定义

切记! — 表示正确操作仪器、精确使用试剂盒或确保安全使用某化学品所必须遵守的要求或必须执行的操作。

 **注意** — 表示潜在的危險状况，如果不加以避免，则可能导致轻微或中度伤害。它也用于警示避免不安全的操作。

 **警告** — 表示存在潜在的危險状况，如果不加以避免，则可能导致死亡或严重人身伤害。

 **危险** — 表示存在紧迫的危險状况，如果不加以避免，则可能导致死亡或严重人身伤害。此信号词仅限于极端危險的情况。

除“切记”警示外，Applied Biosystems 文档中出现的其它每种警示文字都伴有一个放入三角框的危險警告符号标志。这些危險符号标志与 Applied Biosystems 仪器上附带的危險符号标志相同（请参阅第 xii 页“安全符号标志”）。

示例

切记! 您必须为每个 96-孔反应板创建一个单独的样本输入电子表格。

 **注意** **化学品危险。** TaqMan® Universal PCR Master Mix 对眼睛和皮肤有刺激性。无保护下吞咽或吸入会导致不适感觉。请认真阅读 MSDS 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、防护服和手套。

 **警告** **人身伤害危险。** 仪器操作期间，受热的封盖和样本加热块的温度可能超过 100 °C。

 **危险** **电气危险。** 接地电路的良好连通性对于确保安全操作至关重要。在未连接导线的情况下，切勿操作扩增仪。

仪器上的符号标志

电气符号标志

下表描述 Applied Biosystems 仪器上可能显示的电气符号标志。

符号标志	描述	符号标志	描述
	表示主电源开关处于 On （打开）位置。		表示可连接到另一仪器的信号地标的端子。这并不是受保护的接地端子。
	表示主电源开关处于 Off （关闭）位置。		表示保护性的接地端子，在对仪器进行任何电气连接之前，必须先将此类端子正确接地。
	表示备用开关，通过此开关仪器可切换到 Standby （备用）状态。若此开关处于备用状态则可能存在危险电压。		表示可以接受或供应交流电流或电压的端子。
	表示按压伸缩式主电源开关的 On/Off （打开/关闭）位置。		表示可以接受或供应交流或直流电流或电压的端子。

安全符号标志

下表描述 Applied Biosystems 仪器上可能显示的安全符号标志。每种符号标志可能单独出现，也可能伴随有文字说明，用来解释相关的危险情况（请参阅第 [xiii](#) 页“仪器上的安全标签”）。这些安全符号标志也可能出现在“危险”、“警告”和“注意”警示文字的旁边，及其它产品支持文档中。

符号标志	描述	符号标志	描述
	表示您应查阅手册以获取进一步信息，应遵守相应的注意事项执行操作。		表示存在移动部件，应遵守相应的注意事项执行操作。
	表示部件表面灼热或存在其它高温危险，应遵守相应的注意事项执行操作。		表示存在遭受电击的危险，应遵守相应的注意事项执行操作。
			表示仪器内存在激光，应遵守相应的注意事项执行操作。

环境符号标志

下列符号标志适用于 2005 年 8 月 13 日之后投入欧洲市场的所有 Applied Biosystems 电子和电气产品。

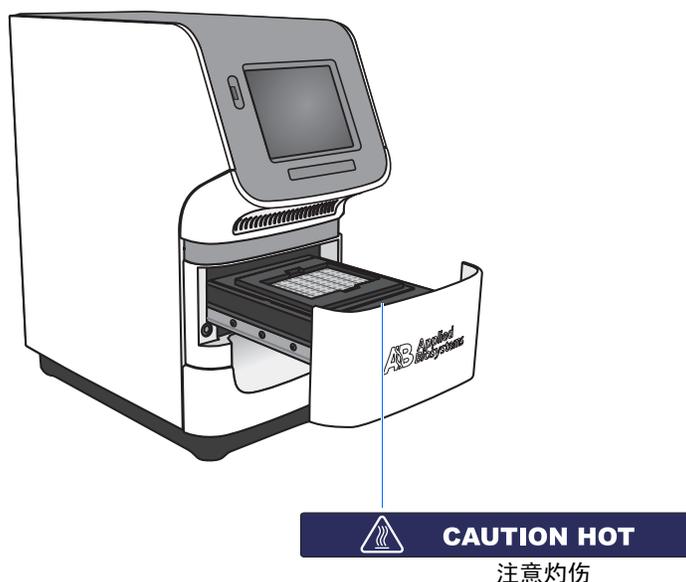
符号标志	描述
	<p>本产品不得作为未分类的城市废弃物进行处置和丢弃。按照当地处理城市废弃物的规定和指导原则进行适当处置并丢弃，以减小电子电气产品废弃物 (WEEE) 对环境的影响。</p> <p>欧盟客户： 有关本仪器的废品丢弃和回收再利用，请致电您当地的 Applied Biosystems 客户服务办事处。请登录 http://www.appliedbiosystems.com 网站以获取欧盟范围内客户服务办事处的联系方式列表。</p>

仪器上的安全标签

以下“注意”、“警告”和“危险”声明可能会显示在 Applied Biosystems 仪器上，并伴有前文描述的安全符号标志。

英语	法语
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	ATTENTION Produits chimiques dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	ATTENTION Déchets dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels et la réglementation locale associées à la manipulation et l'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	ATTENTION Surface brûlante.
DANGER High voltage.	DANGER Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	AVERTISSEMENT Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié de Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	ATTENTION Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	DANGER Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau LED de Classe 3B (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Evitez toute exposition au faisceau.

警告声明位置 StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪在下列位置含有警告声明：



使用仪器的一般安全注意事项

 **警告** 人身伤害危险。若以 Applied Biosystems 未说明的方法使用本仪器，则可能导致人身伤害或对仪器造成损坏。

移动和抬起仪器

 **注意** 人身伤害危险。本仪器只能由适用的场地准备指南中所规定的专业人员或代理机构指派的合格人员进行移动和定位。如果在安装之后您决定抬起或移动本仪器，切勿在没有其他人帮助的情况下独自一人将仪器抬起或移动，同时应使用适当的搬移器具并采用正确的抬移方法。若以不当方式抬起本仪器，可能导致疼痛和永久性脊背损伤。视仪器的实际重量而定，移动或抬起仪器可能需要两人或更多人共同完成。

移动和抬起计算机和显示器

 **警告** 切勿尝试在没有其他人帮助的情况下独自一人抬起或移动计算机或显示器。视计算机和/或显示器的实际重量而定，移动或抬起这些设备可能需要两人或更多人共同完成。

抬起计算机和/或显示器之前应考虑的因素：

- 确保在您抬起计算机或显示器时已稳固且舒适地抓紧设备。
- 确保在设备的当前位置与要安放的新位置之间的搬移通道上没有任何障碍物阻挡。
- 不要在抬起仪器的同时弯腰颤动。
- 迈腿移动时应让您的脊背处于自然而稳定的状态。
- 在抬起和搬移设备时，所有参与者应注意协调动作，步调一致。
- 不要直接从包装箱中抬起设备，而应小心地将包装箱倾斜侧放并稳固地握住包装箱，同时由其他人协助将设备滑出包装箱。

操作仪器

确保操作本仪器的任何人员均具备以下条件：

- 已接受过实验室一般安全操作规程和本仪器特别安全操作规程的培训与指导。
- 已阅读并理解所有适用的 Material Safety Data Sheet (MSDS)（材料安全数据表）。请参阅第 xv 页“关于 MSDS”。

清洁或对仪器清除污染

 **注意** 在采用非制造商建议的清洁或清除污染方法之前，请与制造商确认此方法不会损坏本仪器。

化学品安全注意事项

化学品危险警告



警告

危险化学品。 在使用及操作任何化学品之前，请参阅由设备制造商提供的 Material Safety Data Sheet (MSDS)（材料安全数据表），并遵守所有相关注意事项。



警告

化学品存放危险。 切勿使用玻璃容器收集或贮存废料，以防玻璃破裂或破碎造成化学品污染。贮存试剂和废料的瓶子可能会破碎或泄漏。每只废料瓶都应固定在低密度聚乙烯安全容器内，并封紧封盖；而且手柄应锁定在朝上的位置。在使用及操作试剂和废料瓶时，应穿戴合适的保护眼罩、防护服和手套。

化学品安全指南

为将化学品的危险性降至最低，您需要：

- 在您贮存、使用或丢弃任何化学品或危险材料之前，请阅读并理解由化学品制造商提供的 Material Safety Data Sheets (MSDS)（材料安全数据表）。（请参阅第 xv 页“关于 MSDS”。）
- 尽量避免接触到化学品。在操作及使用化学品时，应穿戴适当的人身防护品（例如，安全防护眼镜、手套或防护服）。有关更多的安全指南与指导，请参阅 MSDS。
- 尽量将吸入化学品的危险性降至最低。切勿让贮存化学品的容器敞开封口放置。仅在通风良好的环境中使用化学品（例如，通风橱）。有关更多的安全指南与指导，请参阅 MSDS。
- 定期检查化学品有无泄漏或溅溢。如果发现化学品泄漏或溅溢，请按照制造商在 MSDS 中建议的清洁方法进行清洁。
- 遵守所有当地、本省/州和本国有关化学品贮存、使用和丢弃的法律及规章要求。

关于 MSDS

化学品制造商在向新客户提供具有危险性的化学品时，都会向客户提供当前最新的 Material Safety Data Sheets (MSDS)（材料安全数据表）。当制造商更新 MSDS 内容后，也会在第一次向客户发货时提供危险化学品的 MSDS。MSDS 为您提供安全贮存、操作、运送和处理化学品需了解的安全性信息及指导。

每次当您收到危险化学品包装内提供的新 MSDS 时，请确保在您的文件档案中替换适当的 MSDS。

获取 MSDS

Applied Biosystems 每天 24 小时向您免费提供任何化学品的 MSDS。要获取 MSDS：

1. 请登录网站 <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html>
2. 在 MSDS Search（MSDS 搜索）页面的 Search（搜索）字段中：
 - a. 输入化学品名称、货号或您希望在 MSDS 中列明项目的其它相关信息。
 - b. 选择您要使用的语言。
 - c. 单击 **Search**（搜索）。

3. 要查看、下载或打印所需文档：
 - a. 用鼠标右键单击文档标题。
 - b. 选择：
 - **Open**（打开）— 查看文档
 - **Save Target As**（目标另存为）— 下载文档的 PDF 版本，并存储到您所选的磁盘目录下
 - **Print Target**（打印目标）— 打印文档
4. 要通过传真或电子邮件发送 MSDS 的副本，请在 Search Results（搜索结果）页面上：
 - a. 在文档标题下选择 **Fax**（传真）或 **Email**（电子邮件）。
 - b. 单击文档列表底部的 **RETRIEVE DOCUMENTS**（检索文档）。
 - c. 输入所需信息。
 - d. 单击 **View/Deliver Selected Documents Now**（立即查看/传送所选文档）。

注意：对于非由 Applied Biosystems 销售的化学品的 MSDS，请与化学品制造商联系。

化学品废料安全注意事项

化学品废料危险



注意 **危险废料**。在处理及丢弃废料时，请参阅 Material Safety Data Sheets (MSDS)（材料安全数据表）及当地有关规章的要求。



警告 **化学品废料危险**。由 Applied Biosystems 仪器产生的化学品废料具有潜在的危险性，并可能导致人身伤害、疾病或死亡。



警告 **化学品存放危险**。切勿使用玻璃容器收集或贮存废料，以防玻璃破裂或破碎造成化学品污染。贮存试剂和废料的瓶子可能会破碎或泄漏。每只废料瓶都应固定在低密度聚乙烯安全容器内，并封紧封盖；而且手柄应锁定在朝上的位置。在使用及操作试剂和废料瓶时，应穿戴合适的保护眼罩、防护服和手套。

化学品废料安全指南

为将化学品废料的危险性降至最低，您需要：

- 在您贮存、处理或丢弃化学品废料之前，请阅读并理解由废料容器中化学品的制造商提供的 Material Safety Data Sheets (MSDS)（材料安全数据表）。
- 提供存放废料的主容器和辅助容器。（主容器用于贮存立即会产生废料。辅助容器用于贮存从主容器中溅溢或泄漏的废料。两个容器都必须与废料材料的化学特性相容，而且必须符合本国、本省/州及当地有关废料贮存的规章要求。）

- 尽量避免接触到化学品。在操作及使用化学品时，应穿戴适当的人身防护用品（例如，安全防护眼镜、手套或防护服）。有关更多的安全指南与指导，请参阅 MSDS。
- 尽量将吸入化学品的危险性降至最低。切勿让贮存化学品的容器敞开封口放置。仅在通风良好的环境中使用化学品（例如，通风橱）。有关更多的安全指南与指导，请参阅 MSDS。
- 在通风橱中操作及处理化学品废料。
- 将废料容器倒空后，应使用提供的封盖将容器密封好。
- 应按照专业实验室的完善操作规程并遵守当地、本省/州和本国有关环保和人身防护的法规要求来丢弃废料托盘和废料瓶中的废料。

丢弃废料 如果在您操作仪器时产生具有潜在危险性的废料，则您必须：

- 确定由您的实验室中特定应用、试剂和底物生成的废料的性质（必要时进行化验分析）。
- 确保实验室中所有工作人员的健康和人身安全。
- 确保按照当地、本省/州和/或本国的有关法规，贮存、传输、运送和丢弃仪器产生的废料。

切记！ 放射性或具有生物危害性的材料可能需要采取特别的方法使用和处理，并需遵守严格的丢弃规定。

电气安全注意事项



危险

电击危险。 如果在扩增仪面板未处于其正确位置的情况下操作 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪，则可能导致严重的电击伤害。切勿拆下扩增仪上的各种面板。若从扩增仪上拆下面板，则高压触点会暴露在外边。

保险丝



警告

火灾危险。 使用不适当的保险丝或高压电源可能会损坏扩增仪的线路系统并引起火灾。在打开扩增仪电源开关之前，检查并确保已正确安装保险丝，而且实验室的供电电压与扩增仪的额定电压相匹配。



警告

火灾危险。 为在长时间内免遭火灾危险，更换保险丝时请使用本仪器指明使用的正确类型和额定值的保险丝。

电源  **危险 电气危险。**接地电路的良好连通性对于确保仪器的操作安全至关重要。在未连接导线的情况下，切勿操作扩增仪。

 **危险 电气危险。**使用适合您当地电气设施和供电电压的正确型号且获得许可的电缆和电线。

 **危险 电气危险。**将扩增仪的电源插头插入具有适当电流能力且正确接地的供电插座内。

过电压额定值 StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪的安装（过电压）类别为 II 类，并属于便携式仪器。

LED 安全注意事项

为确保 LED 操作安全：

- 本系统必须由 Applied Biosystems 技术代表进行维护。
- 当操作扩增仪时，所有扩增仪面板必须正确安装在仪器上。在安装好所有扩增仪面板的情况下，才可确保无可检测的辐射泄露。若 LED 正工作时拆下任何面板（维修期间安全联锁装置禁用），您可能会暴露于超过 3B 类额定值的 LED 辐射中。
- 切勿取下安全标签或禁用安全联锁装置。

生物危害安全注意事项

一般生物危害  **警告 生物危害。**生物样本，如人和其它动物的组织、体液、传染性试剂和血液等样本，均具有传播传染疾病的潜在危险性。应遵守所有适用的当地、本省/州和/或本国相关法规。穿戴适当的防护设备，包括但不限于：保护眼罩、面罩、衣服/实验室防护服和手套。所有操作必须在设施装配完备的场所并使用适当的安全仪器（如身体防护设备）执行。操作人员在处理具有潜在传染性危害的物质之前，必须按照适用法规和公司/机构的要求进行培训。认真阅读并遵守下列适用指导和/或规章的要求：

- *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*（微生物和生物医学实验室生物安全规章）中列示的 U.S. Department of Health and Human Services（美国卫生与公众服务部）指南（存档编号 017-040-00547-4；网址 <http://bmbi.od.nih.gov>）
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens（职业安全和健康标准，血液传染性病原体部分）（29 CFR§1910.1030，网址 http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html）。
- 您所在公司/机构有关操作/处理具有潜在传染性物质的生物安全制度和条例。

有关预防生物危害的更多说明与指导，请访问以下网站查阅：

<http://www.cdc.gov>

工作场所安全注意事项

工作场所采用正确的人机工程学配置将会减少或预防对人产生的负面影响，如疲劳、疼痛和损伤等。通过合理装配工作场所并提供自然、舒适的工作环境条件，可以最大限度地减少或消除此类不良影响。

 **注意** **肌肉骨骼和重复性动作危害。** 此类危害由一些潜在危害因素引起，包括但不限于重复性动作、不当姿势、强制用力、停留在静态且有损健康的位置、挤压性接触以及其它工作环境因素。

要防止肌肉骨骼和重复性动作危害，您应该：

- 配备可以将您支撑在舒适且自然工作位置的装置，并可允许轻松地操作键盘、显示器和鼠标。
- 适当地放置键盘、鼠标和显示器，使身体和头部均处于放松的自然状态。

产品符合的安全标准和电磁兼容性 (EMC) 标准

美国和加拿大安全标准



StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪已经过测试并证明符合：

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92 标准，“Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements.”（测量、控制和实验室用途的电气设备的安全性要求，第 1 部分：一般要求）

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010 标准，“Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials.”（用于加热材料的实验室设备的特别要求）

FDA “Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard 21 CFR 1040.10 and 1040.11”（1968 健康与安全法案辐射控制工作标准第 21 CFR 1040.10 和 1040.11 部分）（若适用）

加拿大电磁兼容性 (EMC) 标准

本仪器已经过测试并证明符合 ICES-001, Issue 3: “Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators.”（工业、科研和医疗领域射频发生装置安全标准，第 3 卷）

欧洲安全和电磁兼容性 (EMC) 标准



安全性

本仪器符合欧洲安全要求（Low Voltage Directive 73/23/EEC - 低电压标准）。本仪器已经过测试并证明符合 EN 61010-1:2001 标准，“Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control and Laboratory Use, Part 1: General Requirements.”（测量、控制和实验室用途的电气设备的安全性要求，第 1 部分：一般要求）

EN 61010-2-010 标准，“Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials.”（用于加热材料的实验室设备的特别要求）

EN 61010-2-081 标准, “Particular Requirements for Automatic and Semi-Automatic Laboratory Equipment for Analysis and Other Purposes.” (用于分析和其它用途的自动和半自动实验室设备的特别要求)

EN 60825-1 标准, “Radiation Safety of Laser Products, Equipment Classification, Requirements, and User’s Guide.” (激光产品辐射安全性、设备分类、要求和用户指南)

电磁兼容性 (EMC)

本仪器符合欧洲有关辐射和抗扰性的要求 (EMC Directive 89/336/EEC - 电磁兼容性指令)。本仪器已经过测试并证明符合 EN 61326 (Group 1, Class B) 标准, “Electrical Equipment for Measurement, Control and Laboratory Use – EMC Requirements.” (测量、控制和实验室用途的电气设备 – 电磁兼容性要求)

澳大利亚电磁兼容性 (EMC) 标准



本仪器已经过测试并证明符合 AS/NZS 2064 标准, “Limits and Methods Measurement of Electromagnetic Disturbance Characteristics of Industrial, Scientific, and Medical (ISM) Radio-frequency Equipment.” (工业、科研和医疗领域射频装置的电磁干扰特性限制及测量方法)

本章包括：

■ 关于 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统	2
■ 支持的耗材	4
■ 关于基因分型实验	6
■ 如何使用本指南	9
■ 关于示例实验	10
■ 示例实验工作流程	13

注意： 有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键或单击工具栏中的 ，或依次选择 **Help**（帮助）▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助），以访问 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software v2.0 的 Help（帮助）信息。

关于 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统

该 Real-Time PCR System 有两个型号：

系统	特征
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System（以下简称“StepOne™ 系统”）	<ul style="list-style-type: none"> • 48 孔平台 • 三色系统
Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System（以下简称“StepOnePlus™ 系统”）	<ul style="list-style-type: none"> • 96 孔平台 • 四色系统 • VeriFlex™ 样本加热块

StepOne 和 StepOnePlus 系统使用基于荧光的聚合酶链反应 (PCR) 试剂执行检测，提供：

- 采用实时分析法定量检测靶核酸序列（以下简称“靶序列”）。
- 采用 PCR 扩增后（终点）分析法定性检测靶序列。
- PCR 产物的定性分析（通过发生在 PCR 扩增后的解链曲线分析获得）。

关于数据采集

StepOne 和 StepOnePlus 系统可根据扩增仪执行的实验类型，在 PCR 扩增期间采集不同点上的原始荧光数据：

实验类型		数据采集点
实时运行	标准曲线	扩增仪在每个 PCR 延伸步骤后采集数据。
	相对标准曲线	
	比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)	
PCR 扩增后（终点）运行	基因分型	扩增仪在以下时间点采集数据： <ul style="list-style-type: none"> • PCR 扩增前（用于存在/不存在实验，PCR 扩增前采集数据是可选项，但建议选择此选项。） • （可选）在 PCR 扩增期间。扩增仪可在运行期间（实时）采集数据；在运行期间采集数据有助于进行故障排除。 • PCR 扩增后
	存在/不存在	

无论哪种运行类型，数据采集点或 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪读取均包括三个阶段：

- 1. 激发** — 扩增仪对扩增仪内反应板上的所有反应孔照明，从而在每次反应中激发出荧光。
- 2. 发射** — 扩增仪光学部件采集从反应板反应孔中发出的残余荧光。设备采集的结果图像仅包括与发射波长范围相对应的光。
- 3. 采集** — 扩增仪以数字形式表现固定时间间隔内采集的残余荧光。StepOne™ 软件存储原始荧光图像以便分析。

笔记

运行之后，StepOne 软件将使用校准数据（空间、染料和背景）以确定每次读取中荧光信号的位置和强度、与每种荧光信号相关的染料和信号意义。

关于滤光器 StepOne 和 StepOnePlus 系统使用以下滤光器：

StepOne 系统		StepOnePlus 系统	
滤光器	染料	滤光器	染料
1	FAM™ 染料	1	FAM™ 染料
	SYBR® Green 染料		SYBR® Green 染料
2	JOE™ 染料	2	JOE™ 染料
	VIC® 染料		VIC® 染料
3	ROX™ 染料	3	TAMRA™ 染料
			NED™ 染料
		4	ROX™ 染料

关于 VeriFlex™
技术

StepOnePlus 扩增仪包含六个单独进行温度调节的 VeriFlex™ 样本加热块，帮助优化热循环条件。您可将其中一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为一个不同的温度，可创建最多六个不同的样本温度区，也可将所有六个可创建最多六个不同的样本温度区，也可将所有六个 VeriFlex 样本加热块都设置为同一个温度。

有关详情

有关信息：

- StepOne 和 StepOnePlus 系统，请参阅 *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software Help*。

注意：要访问 Help（帮助），请从 StepOne 软件内依次选择 **Help**（帮助）
▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助）。

- 存在/不存在实验，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 存在/不存在实验入门指南》。
- 相对标准曲线和/或比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 实验，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 相对标准曲线和比较 C_T 实验入门指南》。
- 标准曲线实验，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 标准曲线实验入门指南》。

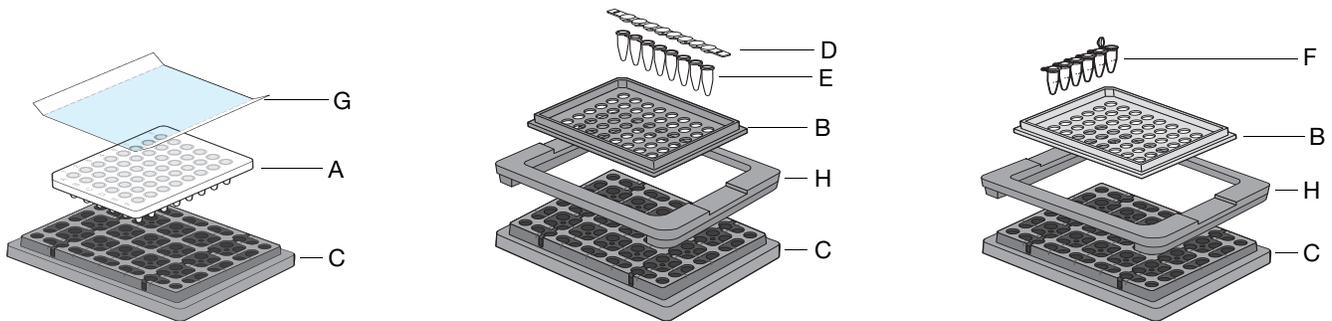
笔记

支持的耗材

StepOne 系统 StepOne 系统支持下列耗材。这些耗材可配合标准和 Fast 试剂/实验方案使用。

切记！即使在使用标准试剂执行实验时，在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上也只应使用 Fast 耗材（反应板、反应管条带和反应管）。

耗材	部件号
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate • MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film 	<ul style="list-style-type: none"> • 4375816 • 4375323 和 4375928
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358293 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358297
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 48-Well Tray • MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor • MicroAmp™ 96-Well Support Base 	<ul style="list-style-type: none"> • 4375282 • 4375284 • 4379590



#	耗材
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ 96-Well Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap
G	MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
H	MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor

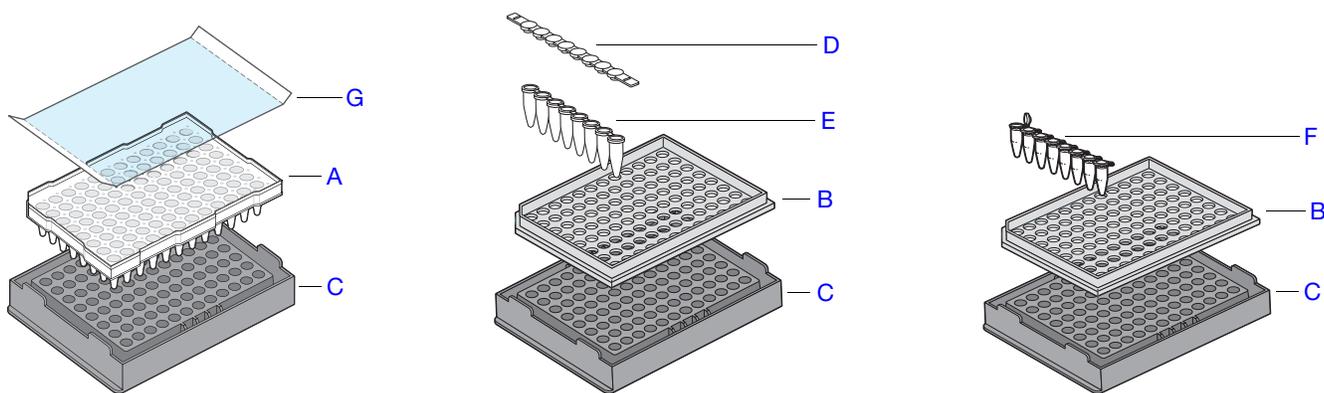
笔记 _____

StepOnePlus 系统

StepOnePlus 系统支持下列耗材。这些耗材可配合标准和 Fast 试剂/实验方案使用。

切记！即使在使用标准试剂执行实验时，在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上也只应使用 Fast 耗材（反应板、反应管条带和反应管）。

耗材	部件号
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode • MicroAmp™ Optical Adhesive Film 	<ul style="list-style-type: none"> • 4346906 和 4366932 • 4360954 和 4311971
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358293 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358297
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ 96-Well Tray for VeriFlex™ Blocks • MicroAmp™ 96-Well Support Base 	<ul style="list-style-type: none"> • 4379983 • 4379590
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Adhesive Film Applicator • MicroAmp™ Cap Installing Tool (Handle) 	<ul style="list-style-type: none"> • 4333183 • 4330015



#	耗材
A	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ 96-Well Tray for VeriFlex™ Blocks
C	MicroAmp™ 96-Well Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap
G	MicroAmp™ Optical Adhesive Film

笔记

关于基因分型实验

终点实验 基因分型实验为终点实验。在终点实验中：

- 在 PCR 过程结束时采集数据。
- 反应特征以 PCR 结束时累积的靶序列数量描述 (Saiki *et al.*, 1985)。
- 数据点是报告荧光的归一化强度值或 R_n 。

注意：某些终点实验也包括 PCR 扩增前数据点。若发生这种情况，系统根据以下公式计算 ΔR_n (ΔR_n) 值：

$\Delta R_n = R_n$ (PCR 扩增后荧光信号读取) – R_n (PCR 扩增前荧光信号读取)，其中 R_n = 归一化报告荧光信号强度

注意：本指南中，术语“实验”是指使用 StepOne 或 StepOnePlus 系统执行一次反应板运行的整个过程，包括设置、运行和分析。

终点实验的实时 PCR 数据

StepOne 软件为存在/不存在实验和基因分型实验提供了采集实时数据的选项。若一旦实验失败，实时数据可帮助您确定实验失败的原因。

关于 TaqMan® SNP Genotyping Assays

基因分型检测可检测单个核酸序列的变异体，而不定量靶序列。每个反应存在两个探针允许基因分型靶序列中单核苷酸多态性 (SNP) 位点的两个可能的变异体。

每个 TaqMan® SNP Genotyping Assay 包含一个备妥可用的反应管，其中含有：

- 两个序列特异性的引物，用于扩增目标多态性
- 两个等位基因特异性的 TaqMan® MGB 探针，用于检测特定目标多态性的等位基因

关于 TaqMan® MGB 探针

每个等位基因特异性的 TaqMan® MGB 探针具有以下组分：

- 在其 5' 端具有报告染料
 - VIC® 染料链接到等位基因 1 探针的 5' 端。
 - FAM™ 染料链接到等位基因 2 探针的 5' 端。

等位基因 1 VIC® 染料标记的探针对应于随每份订单提供的检测信息文件 (AIF) 中的通读序列方括号内的第一个核苷酸。等位基因 2 FAM™ 染料标记的探针对应于 AIF 中通读序列方括号内的第二个核苷酸。对于通读序列 ATCGATT[G/T]ATCC，VIC® 染料标记的探针将结合到 G 等位基因，而 FAM™ 染料标记的探针将结合到 T 等位基因。

- 小沟结合物 (MGB)，它会升高解链温度 (T_m) (对于给定探针长度)，并允许设计更短的探针 (Alfonina *et al.*, 1997, Kutvavin *et al.*, 1997)。使用更短探针会使匹配与错配探针之间的 T_m 值产生更大差异，并进行更高效的基因分型。

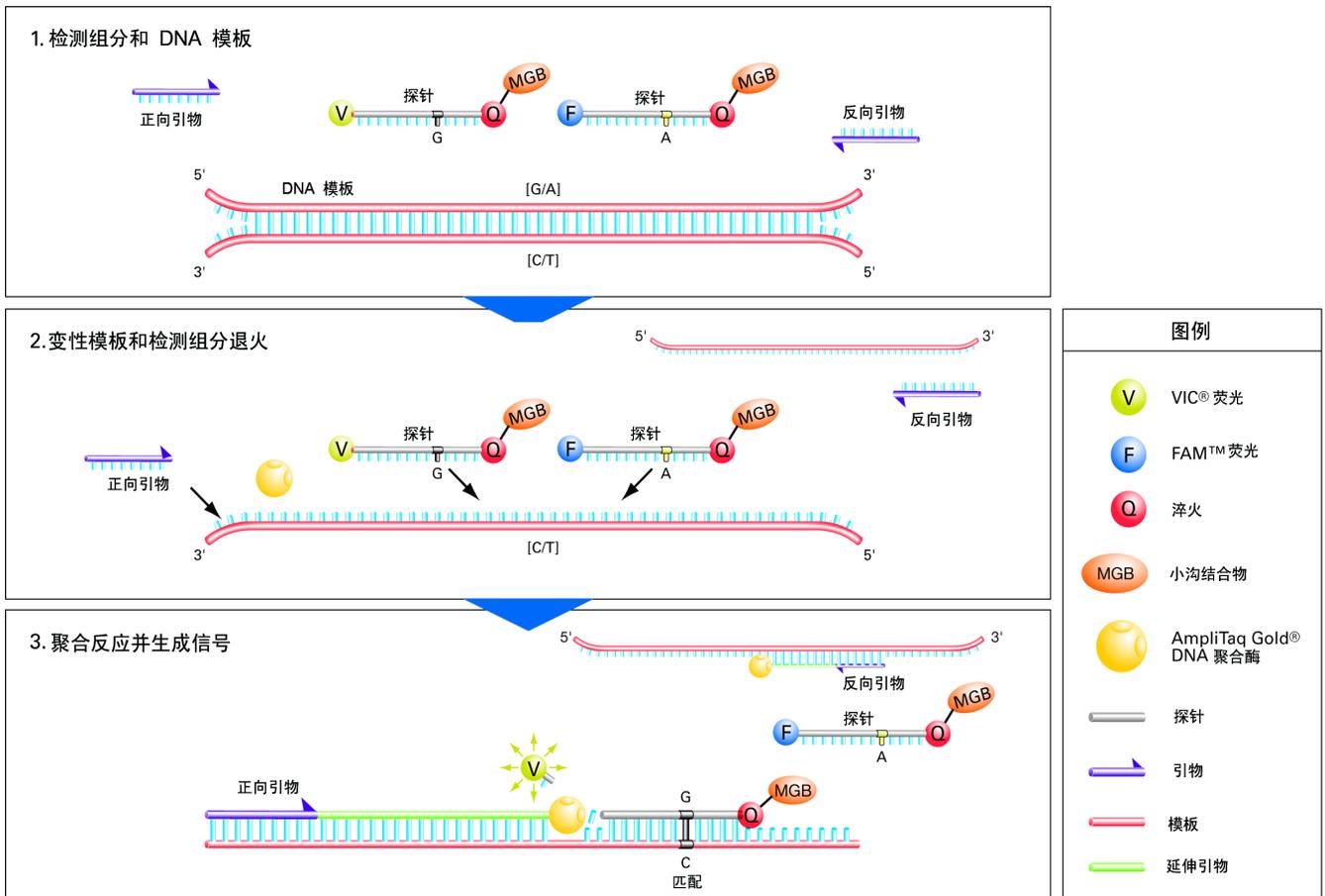
笔记

- 在其 3' 端具有无荧光淬灭基团 (NFQ)，从而允许检测比荧光淬灭基团具有更高灵敏度的报告染料荧光。

切记！Applied Biosystems 不建议将 TAMRA™ 染料在 StepOne 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。TAMRA 染料可在 StepOnePlus 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。

5' 核酸酶检测 下图是 5' 核酸酶检测的示意图。PCR 扩增期间：

- 每个 TaqMan® MGB 探针在正向和反向引物位点之间专门退火为其互补序列。
- 当寡核苷酸探针完整时，淬灭染料接近报告染料会淬灭报告荧光信号。
- AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶使结合到基因组 DNA 模板的引物延伸。
- AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶（采用其 5' 核酸酶活性）使与靶序列杂交的探针裂解。
- 使与靶序列杂交的探针裂解会将报告染料与淬灭染料分离，从而导致报告基团发出的荧光增加。PCR 扩增生成的荧光信号表示样本中存在何种等位基因。



笔记 _____

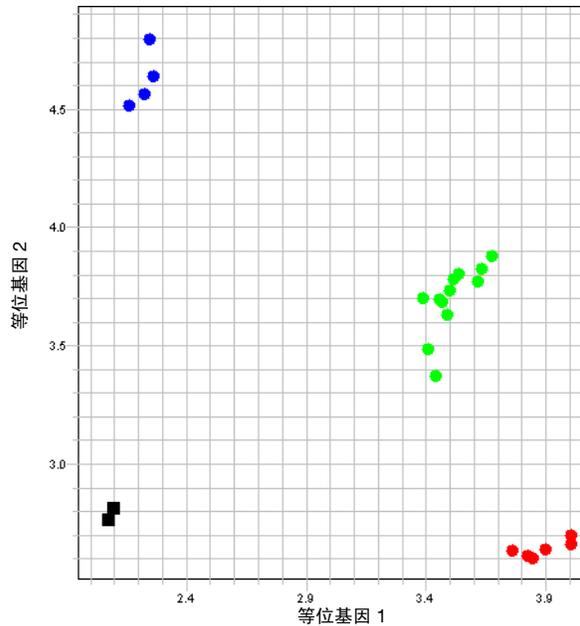
**尽量减少非特异性
荧光**

在 TaqMan® 检测中，因为探针与序列之间的核苷酸错配降低了裂解探针的机率，因此非特异结合的探针发出的荧光会减弱。较短的探针长度意味着一个碱基对错配将对结合产生更大的负面影响。错配探针将不会与等位基因紧紧结合，从而使 AmpliTaq® Gold DNA 聚合酶很可能置换探针，而不裂解染料。

读取和分析反应板

StepOne 软件同时对反应板中的 DNA 样本进行基因分型。首先，软件会在每个反应孔中将报告染料的荧光归一化为参比染料的荧光。接下来，软件会在等位基因鉴别曲线上以图谱形式显示每个样本反应孔中报告染料的归一化荧光强度 (Rn)，这将对比等位基因特异性探针的报告染料荧光强度。最后，StepOne 软件按聚类算法群聚样本数据，并根据样本在图上的位置为每个簇的样本指定一个基因型识别。

注意：仅当实验中存在一种基因型时，StepOne 软件聚类算法才不识别基因型。



数据点聚类可随水平轴（等位基因 1）、垂直轴（等位基因 2）或者对角线（等位基因 1/等位基因 2）变化。此变化是由于 PCR 扩增后报告染料荧光强度范围之间的差异造成的。下表显示了样本中荧光信号与序列之间的相互关系。

以下荧光强度明显升高 ...	表示 ...
仅 VIC® 染料标记的探针荧光	等位基因 1 的纯合性
仅 FAM™ 染料标记的探针荧光	等位基因 2 的纯合性
VIC® 和 FAM™ 染料标记的探针荧光	等位基因 1 - 等位基因 2 杂合性

笔记

支持的试剂 StepOne 和 StepOnePlus 系统为基因分型实验支持以下试剂：

- TaqMan 试剂
- 其它基于荧光的试剂

切记！ 对于 Fast 母液或 Fast 实验方案，不支持基因分型实验。

如果您在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上使用其它基于荧光的试剂，请注意以下几点：

- 您必须使用 **Advanced Setup**（高级设置）工作流程设计您的实验，而不要使用 **Design Wizard**（设计向导）。（请参阅第 102 页“**Advanced Setup**（高级设置）工作流程”。）
- 对于 Applied Biosystems TaqMan 试剂，StepOne 软件将在 **Reaction Setup**（反应设置）屏幕上自动计算反应体积。

如何使用本指南

本指南可用作执行您自己实验的教程和指南。

将本指南用作教程 通过使用随 StepOne 软件提供的示例实验数据，您可将本指南用作在 StepOne 或 StepOnePlus 系统上执行标准曲线实验的教程。按照第 2 至 5 章的操作步骤描述执行：

章节	步骤
2	使用 StepOne 软件中的 Design Wizard（设计向导）设计实验。
3	准备实验，使用第 2 章中 Design Wizard（设计向导）计算出的试剂和体积。
4	在 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪上运行实验（独立布局或并置布局）
5	分析结果。

有关详情，请参阅第 10 页“关于示例实验”。

结合您自己的实验使用本指南 完成第 2 至 5 章中的教程练习之后，您可使用本指南来指导您执行您自己的基因分型实验。第 2 至 5 章中的每一步操作均含有一组指导，您可使用这些指导执行您自己的实验。

笔记 _____

此外，您也可使用 StepOne 软件中提供的其它工作流程之一来执行您的实验。下表提供了 StepOne 软件中所有可用工作流程的摘要。

工作流程	描述	请参阅 ...
Design Wizard (设计向导)	根据软件的指导设置新实验。Design Wizard (设计向导) 会在您创建自己的实验时引导您选择最佳方法。建议新用户使用 Design Wizard (设计向导)。 注意：Design Wizard (设计向导) 中的设计选项比 Advanced Setup (高级设置) 中的设计选项更有限。	第 2 章
Advanced Setup (高级设置)	使用高级选项设置新实验。当您创建您自己的实验时 Advanced Setup (高级设置) 允许设计灵活性。建议有经验的用户使用 Advanced Setup (高级设置)。	第 102 页
QuickStart	运行新实验而无需反应板设置信息。若需要，您可在运行后添加所有设计参数。	第 103 页
Template (模板)	使用来自模板的设置信息设置新实验。	第 105 页
Export/Import (导出/导入)	从含有实验设置信息的 ASCII 文本文件导入实验设计。	第 107 页

关于示例实验

为了详细阐述如何执行基因分型实验，本指南将指导您按步骤执行示例实验的设计和分型。示例实验是一个有代表性典型设置的实验，您可使用它快速熟悉 StepOne 或 StepOnePlus 系统。

描述 示例基因分型实验的目的是检测 SNP rs8039，其中可能包含基因型 AA、AC 和 CC。在示例中，使用 TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay ID C_11711420_30 对 20 份未知基因组 DNA (gDNA) 样本进行基因分型。并对反应进行了设置，以便相同反应孔中存在定位 SNP rs8039 的等位基因的 PCR 引物和探针。PCR 扩增使用 TaqMan® Universal PCR Master Mix 执行，并根据 *Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* 中描述的实验方案运行。

反应板布局 为 StepOne 扩增仪创建了基因分型示例实验。对于 StepOne 扩增仪，软件显示 48 孔反应板布局：

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C_11711420...	C_11711420...	Sample 1	Sample 10	Sample 11	Sample 12	Sample 13	Sample 14
B	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	Sample 20	Sample 3
C	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 21	Sample 22
D								
E								
F								

您可为 StepOnePlus 扩增仪创建示例实验；但是，您的反应板布局将与整个本指南中显示的 48 孔反应板布局不同。对于 StepOnePlus 扩增仪，软件显示 96 孔反应板布局：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C_1171	C_1171	Sample 1	Sample 10	Sample 11	Sample 12	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18
B	Sample 19	Sample 20	Sample 21	Sample 22	Sample 23	Sample 24	Sample 25	Sample 26	Sample 27	Sample 28	Sample 29	Sample 30
C												
D												
E												
F												
G												
H												

关于示例实验数据 在本入门指南中，您将使用两个文件：

- 在第 2 章中，您将创建一个包含设置数据的基因分型示例实验文件，并将其保存到您的计算机上的以下实验文件夹：

<驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments\
Genotyping Example.eds

- 在第 5 章中，您将在包含运行数据的基因分型示例实验文件中查看结果。示例实验的数据文件随 StepOne 软件一同安装。您可在您的计算机上找到示例实验的数据文件：

<驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments\examples\
Genotyping Example.eds

笔记

其中：

- <驱动器>指安装 StepOne 软件的计算机硬盘的驱动器盘符。软件的默认安装驱动器是 D 盘驱动器。
- <软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

示例文件夹中的数据文件

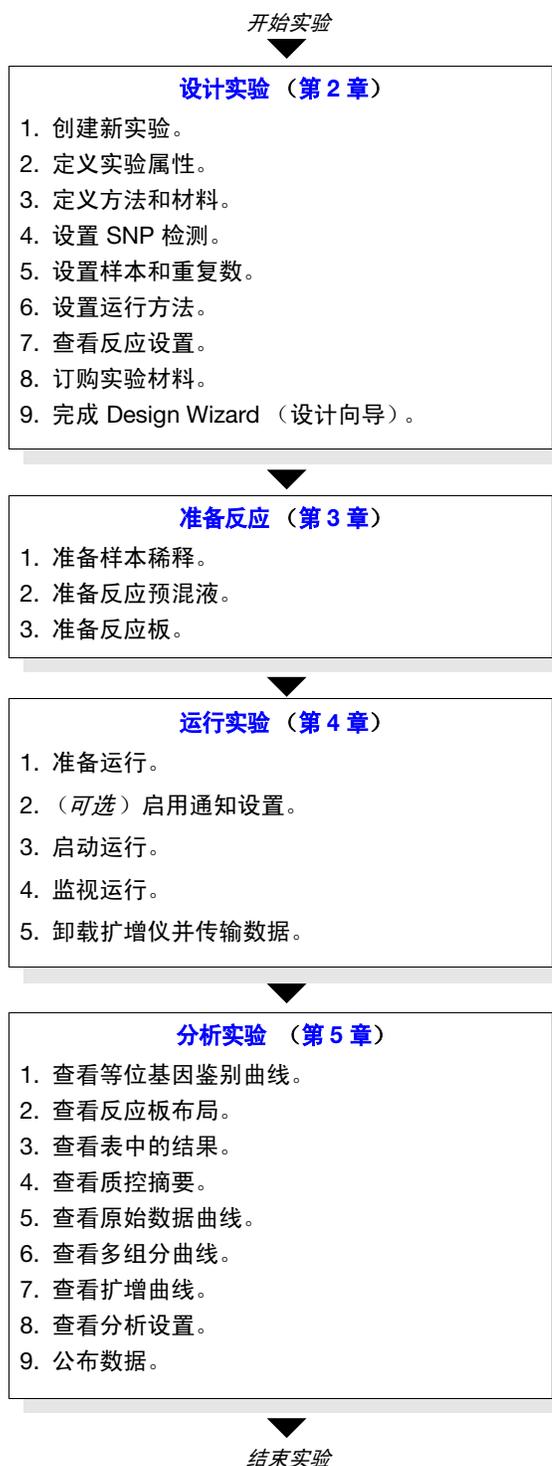
示例文件夹包含几个数据文件，当您分析自己的数据时可参考这些文件，如下文所列。数据文件随 StepOne 软件一同安装。

注意： 确保当执行本指南中的教程步骤时使用 Genotyping Example.eds 文件。96-Well Genotyping Example.eds 文件是基因分型方法的一个不同示例。

StepOne 扩增仪	StepOnePlus 扩增仪
Comparative CT Example.eds	96-Well Comparative CT Example.eds
Multiplex Example.eds	96-Well Multiplex Example.eds
Genotyping Example.eds	96-Well Genotyping Example.eds
Presence Absence Example.eds	96-Well Presence Absence Example.eds
Relative Standard Curve Example.eds	96-Well Relative Standard Curve Example.eds
RNase P Experiment.eds	96-Well RNase P Experiment.eds
Standard Curve Example.eds	96-Well Standard Curve Example.eds
SYBR Example.eds	96-Well SYBR Example.eds

示例实验工作流程

关于实验工作流程 下图显示基因分型示例实验的工作流程。



笔记

笔记

2

设计实验

本章包括：

■ 本章概述	16
■ 创建新实验	17
■ 定义实验属性	18
■ 定义方法和材料	20
■ 设置 SNP 检测	21
■ 设置样本和重复数	24
■ 设置运行方法	26
■ 查看反应设置	28
■ 订购实验材料	31
■ 完成 Design Wizard（设计向导）	34

注意： 有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键或单击工具栏中的 ，或依次选择 **Help**（帮助） ▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助），以访问 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software v2.0 的 **Help**（帮助）信息。

笔记

本章概述

本章描述如何使用 StepOne™ 软件中的 Design Wizard（设计向导）设置基因分型示例实验。当您为示例实验输入设计参数时，Design Wizard（设计向导）会引导您选择 Applied Biosystems 建议的最佳方法。

工作流程 下面显示设计随本入门指南提供的示例实验的工作流程。

注意： 使用 StepOne 软件中的 Design Wizard（设计向导）设计示例实验。当您设计您自己的实验时，您可选择替代工作流程（请参阅第 9 页“结合您自己的实验使用本指南”）。

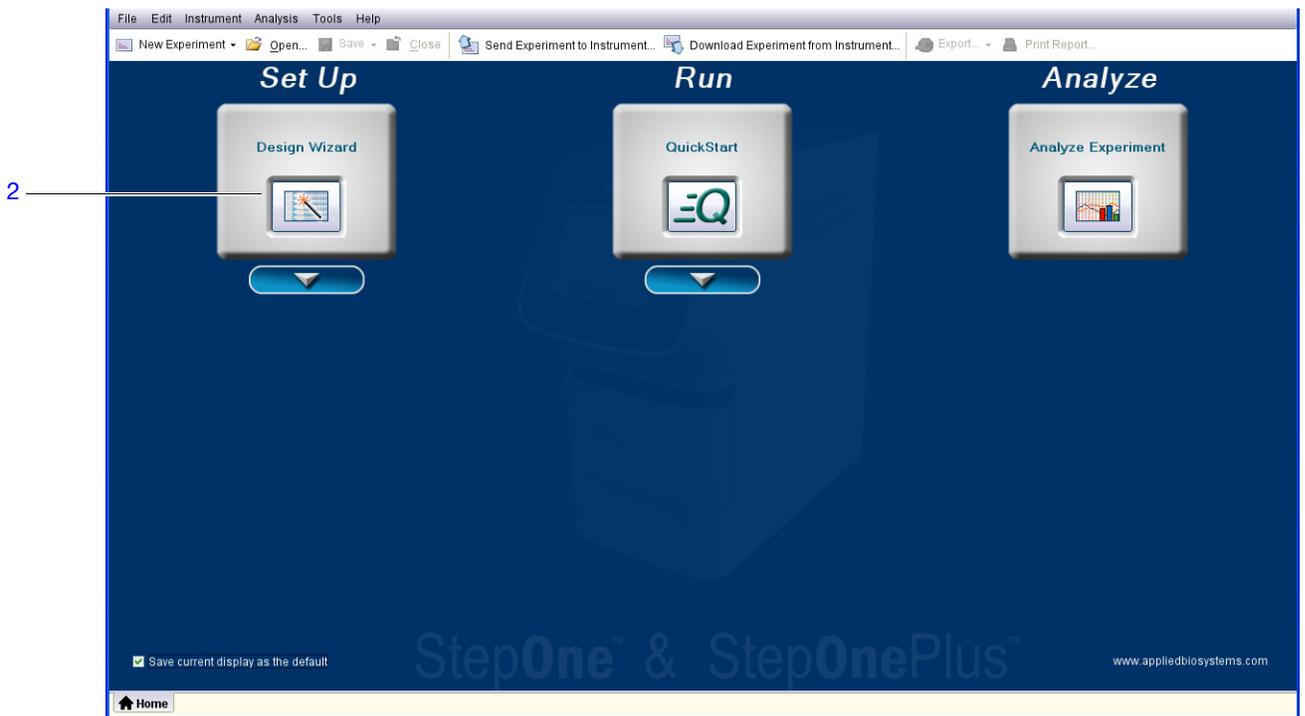


笔记

创建新实验

使用 StepOne 软件中的 Design Wizard（设计向导）创建新实验。

- 创建实验**
1. 双击 （StepOne 软件快捷图标）或依次选择 **Start**（开始） ▶ **All Programs**（所有程序） ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software**（StepOne 软件） ▶ **<软件名>**
其中，<软件名>是 StepOne 软件的当前版本。
 2. 从 Home（主页）屏幕上，单击  **Design Wizard**（设计向导）以打开 Design Wizard（设计向导）屏幕。



有关详情 有关详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记

定义实验属性

在 **Experiment Properties**（实验属性）屏幕上，输入实验的标识信息，选择扩增仪类型，然后选择要设计的实验类型。

完成此屏幕

1. 单击 **Experiment Name**（实验名称）字段，然后输入 **Genotyping Example**（基因分型示例）。
2. 让“Barcode”（条码）字段保留为空。

注意：MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate 没有条码。

3. 单击 **User Name**（用户名）字段，然后输入 **Example User**（示例用户）。
4. 单击 **Comments**（注释）字段，然后输入 **Genotyping Getting Started Guide**（基因分型入门指南）。
5. 选择 **StepOne™ Instrument (48 Wells)**（StepOne 扩增仪（48 孔））。

注意：为 StepOne 扩增仪创建了示例实验。您可为 StepOnePlus 扩增仪创建示例实验；但是，您的反应板布局将与本指南中显示的布局不同。软件为 StepOne 扩增仪显示 48 孔反应板布局，为 StepOnePlus 扩增仪显示 96 孔反应板布局。要为 StepOnePlus 扩增仪创建示例实验，请选择 **StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)**（StepOnePlus 扩增仪（96 孔））。

6. 选择 **Genotyping**（基因分型）实验类型。
7. 单击 **Next >**（下一步）。

1A. Define: Experiment Properties Experiment Properties Help

Instructions: Enter identifying information, then select the type of experiment to design.

How do you want to identify this experiment? = Required

- 1 * Experiment Name: Genotyping Example
- 2 Barcode (Optional):
- 3 User Name (Optional): Example User
- 4 Comments (Optional): Genotyping Getting Started Guide

Which instrument are you using to run the experiment?

StepOnePlus™ Instrument (96 Wells) StepOne™ Instrument (48 Wells)

Set up, run, and analyze an experiment using a 3-color, 48-well system.

What type of experiment do you want to design?

Quantitation Genotyping Presence / Absence

Design a genotyping experiment to detect single nucleotide polymorphism variants of a target nucleic acid sequence in a sample.

Next >

笔记

设计指南 当您设计自己的实验时：

- 输入一个实验名称：
 - 输入一个描述性且便于记忆的名称。您最多可在 Experiment Name（实验名称）字段中输入 100 个字符。

注意： 您不可在 Experiment Name（实验名称）字段中使用下列字符：
正斜线 (/)、反斜线 (\)、大于号 (>)、小于号 (<)、星号 (*)、问号 (?)、双引号 (")、垂直线 (|)、冒号 (:) 或分号 (;)。

- 实验名称用作默认文件名。
- (可选) 如果您正使用 MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate，则输入一个最多 100 个字符的条码，以识别您在实验中使用的反应板。

注意： MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate 没有条码。

- (可选) 输入一个用户名以识别实验的所有人。您最多可在 User Name（用户名）字段中输入 100 个字符。
- (可选) 输入注释以描述实验。您最多可在 Comments（注释）字段中输入 1000 个字符。
- 选择您正用于运行实验的扩增仪：
 - **StepOne™ Instrument (48 Wells)**（StepOne 扩增仪（48 孔））
 - **StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)**（StepOnePlus 扩增仪（96 孔））

注意： 您可使用 StepOne Software v2.0 或更高版本为 StepOne 和 StepOnePlus 扩增仪设计实验。您在 Experiment Properties（实验属性）屏幕中选择的扩增仪会影响反应板布局 and 材料列表。

注意： 要设置默认扩增仪类型，请依次选择 **Tools**（工具）▶ **Preferences**（首选项），然后选择 **General**（一般）选项卡（默认）。从 Default Instrument Type（默认扩增仪类型）下拉菜单中，选择适当扩增仪。

- 将实验类型选为 **Genotyping**（基因分型）。

有关详情 有关以下项目的详情：

- 完成 Experiment Properties（实验属性）屏幕，单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。
- 耗材，请参阅第 4 页“支持的耗材”。
- 定量实验，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 试剂指南》。

笔记

定义方法和材料

在 **Methods and Materials**（方法和材料）屏幕上，定义：

- 您进行样本基因分型要使用的试剂
- 您进行基因分型将使用的 DNA 模板的状态（湿式或干式）
- 最适合于 PCR 反应的升降温速度
- 方法中包括的各阶段

关于示例实验设计

示例实验在 PCR 反应中使用 TaqMan® 试剂和湿式基因组 DNA (gDNA) 模板。因为反应不含 TaqMan® Fast 试剂，因此 StepOne 或 StepOnePlus 系统采用标准升降温速度执行实验。另外，因为扩增仪会为 PCR 扩增执行热循环，因此实验的运行方法包括 Pre-PCR Read（PCR 扩增前荧光信号读取）、Amplification（扩增）和 Post-PCR Read（PCR 扩增后荧光信号读取）阶段。

完成此屏幕

1. 为试剂项选择 **TaqMan® Reagents**（TaqMan 试剂）。
2. 为模板类型选择 **Wet DNA (gDNA or cDNA)**（湿式 DNA（gDNA 或 cDNA））。
3. 为升降温速度选择 **Standard (~2 hours to complete a run)**（标准（约两小时完成运行））。
4. 选择 **Pre-PCR Read**（PCR 扩增前荧光信号读取）和 **Amplification**（扩增），以将阶段添加到运行方法中。

注意：也需要 PCR 扩增后荧光信号读取。

5. 选择 **Next >**（下一步）。

1B. Define: Methods & Materials Methods & Materials Help

Instructions: Select the reagents, select the type of DNA template to use, select the stages for the instrument run, then review the instrument ramp speed for this genotyping experiment.

1 Which reagents do you want to use for genotyping?

TaqMan® Reagents Other

The PCR reactions contain two primers and two TaqMan® probes. The primers are designed to amplify the sequence containing the SNP. Each TaqMan probe is designed to hybridize to one allele sequence and generate fluorescence signal when the allele sequence is amplified.

2 What type of template do you want to use in the PCR reactions?

Wet DNA (gDNA or cDNA) Dry DNA (gDNA or cDNA)

You are adding the purified, resuspended DNA to the final reaction mix. Use an optimized protocol to extract the DNA. Then, make sure the A260/280 ratio is greater than 1.7, the DNA does not contain PCR inhibitors, agarose gel electrophoresis shows the DNA is intact, and the DNA has not been heated above 60 °C.

3 Use the standard ramp speed in the instrument run for this genotyping experiment.

Standard (~ 2 hours to complete a run)

For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your PCR reactions.

4 Which stages do you want to include in the instrument run?

Pre-PCR Read Amplification Post-PCR Read

笔记

设计指南 当您设计自己的实验时：

- 若您在实验中不使用 TaqMan® 试剂扩增和检测靶序列，则选择 **Other**（其它）。

注意： 若您选择 Other（其它），则 Reaction Setup（反应设置）屏幕不可用。

- 若您正使用基因组 DNA (gDNA) 或 cDNA 以外的模板，则选择描述您的样本状态的选项（**Wet DNA**（湿式 DNA）或 **Dry DNA**（干式 DNA））。
- 选择 **Standard**（标准）升降温速度运行扩增仪。

切记！ 对于基因分型实验，不支持 Applied Biosystems Fast 试剂。

- 若您计划在热循环仪（而不是 StepOne 或 StepOnePlus 系统）上执行 PCR 扩增，则取消选取 **Amplification**（扩增）选项。

注意： PCR 扩增前荧光信号读取为可选项，但建议选择此选项。StepOne 软件使用 PCR 扩增前荧光信号读取归一化 PCR 扩增后荧光信号读取数据。

有关详情 有关以下项目的详情：

- **Materials & Methods**（方法和材料）屏幕，单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。
- **Advanced Setup**（高级设置），请参阅第 102 页“**Advanced Setup**（高级设置）工作流程”。

设置 SNP 检测

在 Set Up SNP Assays（设置单核苷酸多态性检测）屏幕上，输入实验中单核苷酸多态性检测的数量，然后定义每个 SNP 检测的属性。

关于示例实验设计

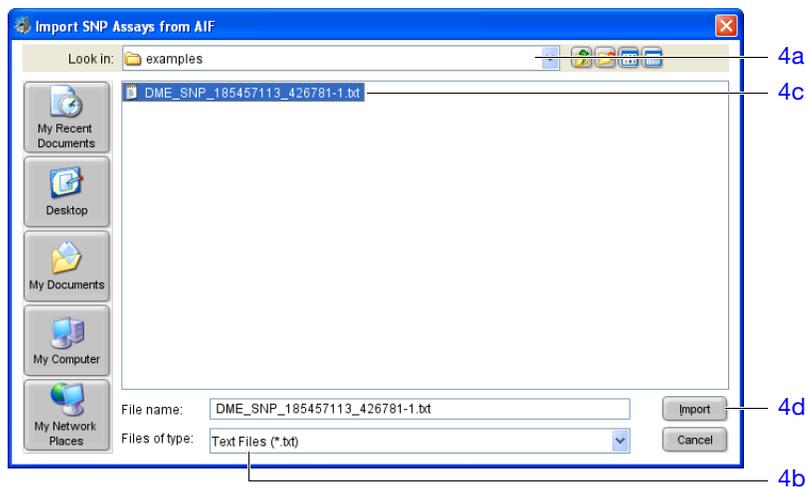
示例实验对样本的 SNP rs8039 进行评估。因为该检测为 TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay（检测 ID C_11711420_30），因此可从随该分析产品一起提供的检测信息文件 (AIF) 中导入单核苷酸多态性检测信息，或从 Applied Biosystems 网站下载此信息。

完成 SNP Assays
(单核苷酸多态性
检测) 屏幕

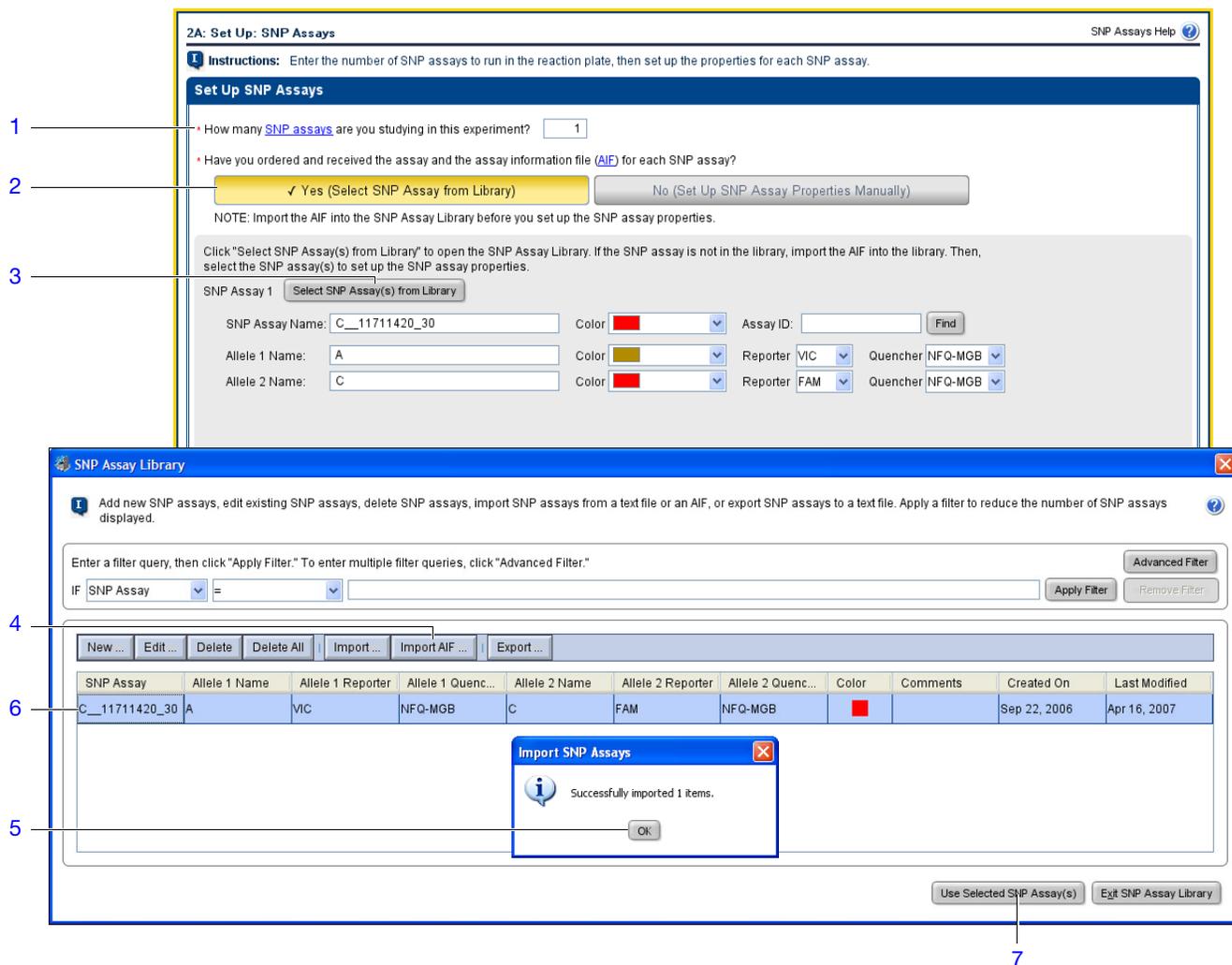
1. 对于正研究的单核苷酸多态性检测的数量，请输入 1。
2. **Click Yes (Select SNP Assay from Library)**（是（从检测库中选择单核苷酸多态性检测））。
3. 单击 **Select SNP Assay(s) from Library**（从检测库中选择单核苷酸多态性检测）。
4. 单击 **Import AIF**（导入检测信息文件），然后使用 **Import SNP Assays from AIF**（从检测信息文件导入单核苷酸多态性检测）对话框以从检测信息文件导入单核苷酸多态性检测：

笔记

- a. 导航至：
<驱动器>:\Applied Biosystems**<软件名>**\experiments\examples
- b. 从 Files of type（文件类型）下拉列表中选择 **Text Files (*.txt)**（文本文件 (*.txt)）。
- c. 选择 **DME_SNP_185457113_426781-1.txt**。
- d. 单击 **Import AIF**（导入检测信息文件）。



5. 在 Import SNP Assays（导入单核苷酸多态性检测）对话框中，单击 **OK**（确定）。
6. 选择 **C_11711420_30** 单核苷酸多态性检测。
7. 单击 **Use Selected SNP Assay(s)**（使用所选单核苷酸多态性检测）。
8. 选择 **Next >**（下一步）。



设计指南 当您设计自己的实验时：

- Applied Biosystems 建议您在一块反应板上评估不超过 6 个单核苷酸多态性。

注意： Design Wizard（设计向导）允许您在每块反应板上评估不超过两个单核苷酸多态性。Advanced Setup（高级设置）或 Quickstart 则不限制您可评估的单核苷酸多态性的数量。

- 以不同名称和颜色标识每个单核苷酸多态性检测。
- 若您不选择手动设置您的单核苷酸多态性检测，请确保您指定给每个等位基因的报告荧光染料正确无误。

切记！ Applied Biosystems 不建议将 TAMRA™ 染料在 StepOne™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。TAMRA 染料可在 StepOnePlus™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。

有关详情

- 有关 Targets SNP Assays（靶单核苷酸多态性检测）屏幕的详情，单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记

设置样本和重复数

在 **Set Up Samples and Replicates**（设置样本和重复数）屏幕上，输入实验中的样本数量，输入样本名，然后输入阴性对照和阳性对照的数量。

关于示例实验设计 示例实验评估：

- 20 个未知样本
- 2 个阴性对照
- 2 个阳性对照（杂合子和等位基因 2 纯合子）。

完成 **Samples and Replicates**（样本和重复数）屏幕

1. 对于样本数量，请输入 **20**。
2. 对于重复数，请输入 **1**。
3. 单击 **All Sample/ SNP Assay Reactions**（所有样本/单核苷酸多态性检测反应）。
4. 对于阴性对照（不含模板的反应孔）的数量，请输入 **2**。
5. 对于阳性对照（含有已知基因型样本的反应孔）的数量，请输入 **2**。
6. 对于阳性对照 1，选择 **Allele 1/Allele 2 Heterozygous**（等位基因 1/等位基因 2 杂合子）。
7. 对于阳性对照 2，选择 **Allele 2 Homozygous**（等位基因 2 纯合子）。
8. 选择 **Next >**（下一步）。

笔记

设计指南 当您设计自己的实验时：

- 使用 1 至 48 之间的样本数。为每个样本指定唯一的名称和颜色。
- Applied Biosystems 建议为每个单核苷酸多态性检测使用至少一个阴性对照。
- 将每个实验中的反应总数限制到 48 个或更少。若所需的反应总数大于 48，则减少单核苷酸多态性检测、样本、重复数或阳性对照和阴性对照数量；或在两个或更多反应板中分别运行反应。
- 若您正在 StepOnePlus 扩增仪上运行实验，并计划编辑 Run Method（运行方法）（参阅第 26 页）以便将一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为一个不同温度，则需要：
 - a. 使用 Advanced Setup（高级设置）设计您的实验，而不要使用 Design Wizard（设计向导）。
 - b. 在 Plate Setup（反应板设置）屏幕上，选择 **View Plate Layout**（查看反应板布局）选项卡，然后选择 **Enable VeriFlex™ Block**（启用 VeriFlex 块）复选框。

切记！ 如果您未在 Plate Setup（反应板设置）屏幕上选择 **Enable VeriFlex™ Block**（启用 VeriFlex™ 样本加热块）复选框，您将不能在 Run Method（运行方法）屏幕（参见第 26 页）上将一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为不同的温度。

有关详情 有关 Samples & Replicates（样本和重复数）屏幕的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记 _____

设置运行方法

在 Run Method（运行方法）屏幕上，查看默认运行方法的反应体积和温度变化过程设置。若需要，您可调整默认运行方法或用 Run Method（运行方法）库中的某种方法进行替换。

关于示例实验设计

示例实验使用下文显示的 TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay 方法运行 25- μ L 反应。因为 StepOne 系统用于执行热循环，因此运行方法包含 PCR 扩增的一个循环阶段。

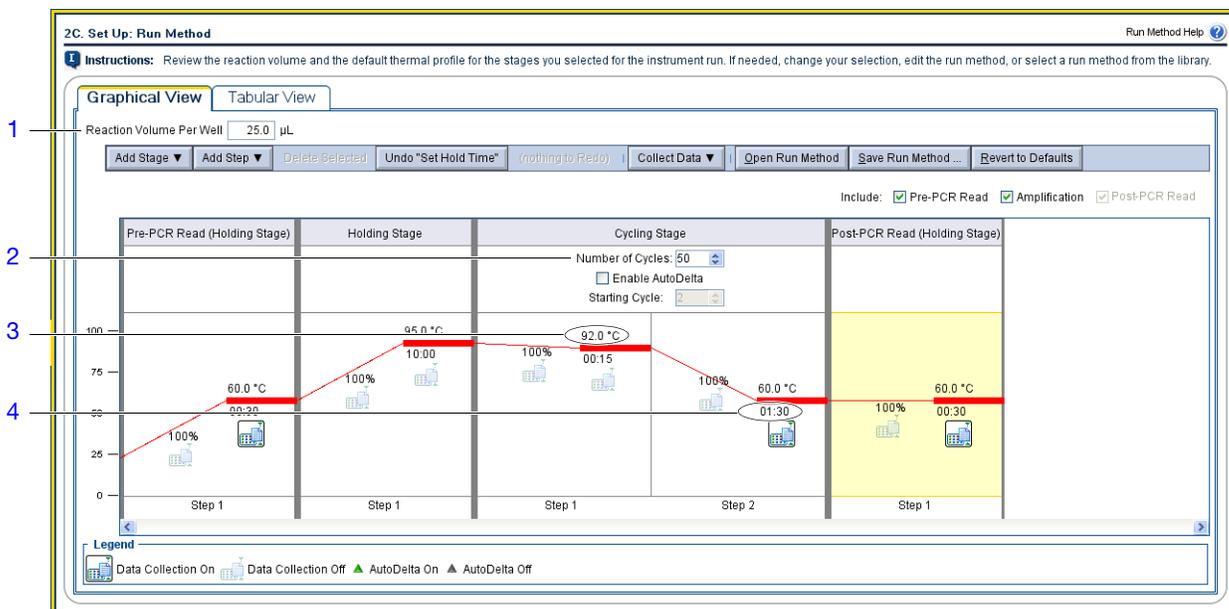
	PCR 扩增前荧光信号读取	热循环		PCR 扩增后荧光信号读取	
阶段/步骤	保持阶段	保持阶段	循环（50 个循环）		保持阶段
			变性	退火/延伸	
温度	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
时间 (mm:ss)	00:30	10:00	00:15	01:00	00:30
数据采集	是	否	否	是	是

注意：在以上方法中，为 Anneal/Extend（退火/延伸）步骤启用数据采集，以便扩增仪在 PCR 扩增期间采集实时数据。尽管进行基因分型不必一定要实时数据，但是当故障排除失败的 PCR 时这些数据会十分有用。

查看 Run Method（运行方法）屏幕

1. 单击 **Reaction Volume Per Well**（每个反应孔的反应体积）字段，然后输入 **25**。
2. 单击 **Cycling Stage**（循环阶段）的 **Number of Cycles**（循环次数）字段，然后输入 **50**。
3. 调整 **Cycling Stage**（循环阶段）的第一步：单击温度设置 (95 °C)，然后输入 **92 °C**。
4. 调整 **Cycling Stage**（循环阶段）的第二步：单击时间设置 (01:00)，然后输入 **01:30**。
5. 单击 **Next >**（下一步）。

笔记



设计指南 当您设计自己的实验时：

- 输入 10 至 30 μL 的每个反应孔反应体积。Applied Biosystems 建议为基因分型实验使用 25 μL 的反应体积。
- 查看默认运行方法。若您的实验需要不同的设置，则根据需要调整默认方法。
- 单击 **Open Run Method**（打开运行方法）以查看运行方法库。库中可能含有用于您的实验的运行方法。
- 考虑在运行方法中包括扩增。当故障排除基因分型实验时实时数据会十分有用。
- 若您正在 StepOnePlus 扩增仪上运行实验，并且希望将一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为一个不同温度，则需要：
 - a. 使用 **Advanced Setup**（高级设置）设计您的实验，而不要使用 **Design Wizard**（设计向导）。
 - b. 在 **Plate Setup**（反应板设置）屏幕（第 25 页）上，选择 **View Plate Layout**（查看反应板布局）选项卡，然后选择 **Enable VeriFlex™ Block**（启用 VeriFlex 块）复选框。

切记！ 如果您未在 **Plate Setup**（反应板设置）屏幕上选择 **Enable VeriFlex™ Block**（启用 VeriFlex™ 块）复选框，您将不能在 **Run Method**（运行方法）屏幕上将一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为不同的温度。

- c. 在 **Run Method**（运行方法）屏幕中，选择 **Graphical View**（图形视图）选项卡。

笔记

- d. 对于您想要更改的每个 VeriFlex™ 样本加热块，单击其温度，然后输入所需温度值。。

注意： 您可将一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为一个不同的温度，也可将所有 VeriFlex 样本加热块都设置为同一个温度。如果两个相邻的 VeriFlex 样本加热块被设置为不同的温度，则二者之间的温度差异必须不超过 0.1 至 5.0 °C 的范围。最高温度为 99.9 °C。

有关详情 有关以下项目的详情：

- Run Method（运行方法）库或完成 Run Method（运行方法）屏幕，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。
- 为 VeriFlex 样本加热块设置温度，通过单击  或按 **F1** 键访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。
- 使用 Advanced Setup（高级设置），请参阅第 102 页“Advanced Setup（高级设置）工作流程”。

查看反应设置

在 Set Up Reaction Setup（设置反应设置）屏幕上，输入要准备的反应体积和额外反应数，然后查看 PCR 母液、检测预混液、稀释后样本靶以及样本储液的浓度设置，并在必要时进行更改。

关于示例实验设计

示例实验需要足够用于 24 次反应的反应预混液，以及 10% 的额外剂量以考虑移液错误的用量。每个 25- μ L 反应均包括以下组分：

组分	μ L/ 反应孔
2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12.50
20X TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay	1.25
基因组 DNA 模板（3 至 20 ng）+ 无 DNA 酶水	11.25
总剂量	25.00

完成 Reaction Setup（反应设置）屏幕

1. 单击 **Reaction Volume Per Well**（每个反应孔的反应体积）字段，然后输入 **25 μ L**。
2. 单击 **Excess Reaction Volume**（额外反应体积）字段，然后输入 **10%**。
3. 确认母液浓度为 **2.0X**。
4. 确认检测预混液浓度为 **20.0X**。

笔记

2D. Set Up: Reaction Setup

Instructions: For each SNP assay in the reaction plate, review the calculated volumes for preparing the PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Print Reaction Setup

1 Reaction Volume Per Well: 25 µL

2 Excess Reaction Volume: 10 %

3 Reaction Mix Calculations Sample Dilution Calculations

4 Select SNP Assay: C_11711420_30

Reactions for SNP Assay 1

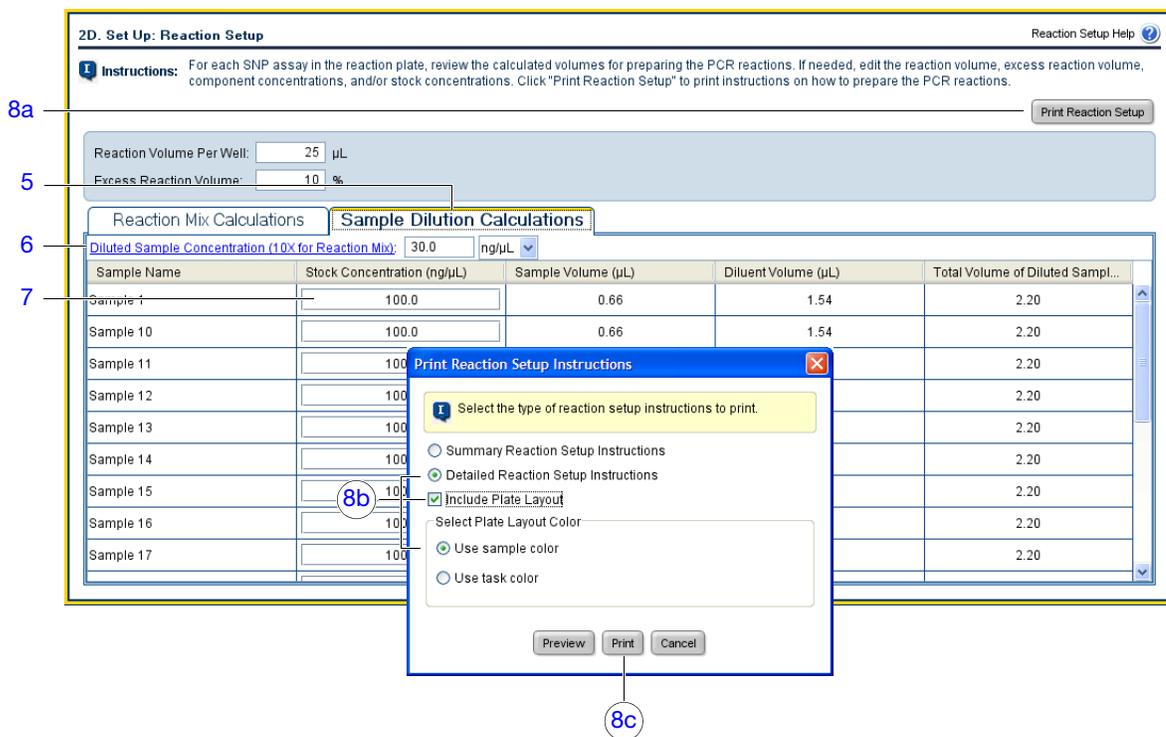
Master Mix Concentration: 2.0 X

Assay Mix Concentration: 20.0 X

Component	Volume (µL) for 1 Reaction	Volume (µL) for 8 Reactions (Plus Excess)
Master Mix (2X)	10.00	88.00
Assay Mix (20X)	1.00	8.80
Sample (100)	2.00	17.60
Water	7.00	61.60
Total Volume	20.00	176.00

5. 选择 **Sample Dilution Calculations**（样本稀释计算）选项卡。
6. 单击 **Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix)**（稀释后样本浓度（对于反应预混液为 10×）），然后输入 **30 ng/µL**。
7. 确认所有样本的储液浓度为 **100ng/µL**。
8. 打印反应板布局报告以便参考：
 - a. 单击 **Print Reaction Setup**（打印反应设置）。
 - b. 在对话框中，选择：
 - **Detailed Reaction Setup Instructions**（详细反应设置说明）
 - **Include Plate Layout**（包括反应板布局）
 - **Use sample color**（使用样本颜色）
 - c. 单击 **Print**（打印），以将反应设置说明发送到打印机。
9. 单击 **Next >**（下一步）。

笔记



设计指南 当您设计自己的实验时：

- 输入 10 至 30 μL 的每个反应孔反应体积。Applied Biosystems 建议为基因分型实验使用 25 μL 的反应体积。
- 输入至少 10% 的额外反应体积，以允许移液不精确及其它实验错误的用量。
- 若您使用干式 DNA 模板，则重新计算组分及其剂量。

有关详情 有关 Reaction Setup（反应设置）屏幕的详情，请单击 或按 **FI** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

订购实验材料

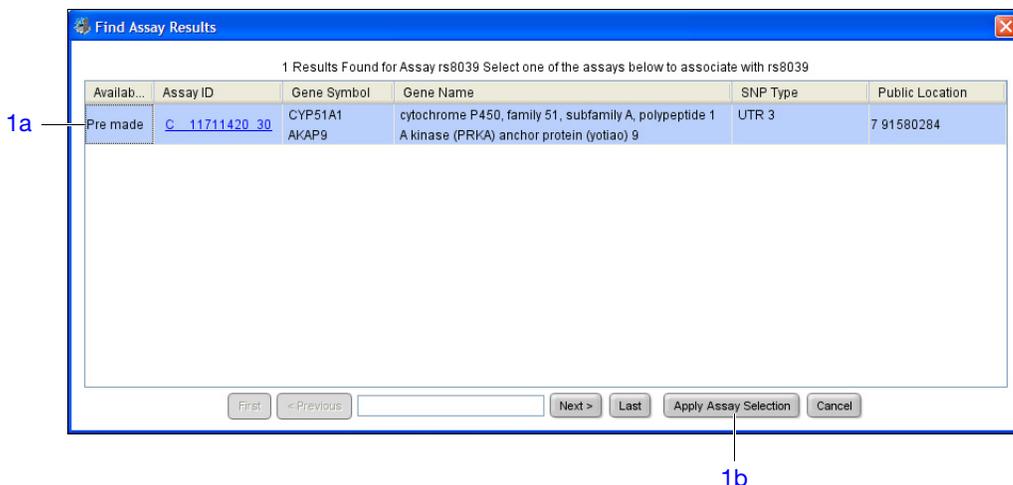
在 **Materials List**（材料列表）屏幕上，查看建议用于准备 PCR 反应板的材料列表。（可选）打印材料列表，创建购物列表，然后从 **Applied Biosystems Store**（Applied Biosystems 产品仓库）订购所建议的材料。

注意：要访问 **Applied Biosystems Store**（Applied Biosystems 产品仓库），您需要有因特网连接。产品供应情况和价格可能因您所在地区或国家的不同而有所差异。在某些国家，不能通过 **Applied Biosystems Store**（Applied Biosystems 产品仓库）在线订购。请与您当地的 **Applied Biosystems** 代表联系以寻求帮助。

注意：**StepOne** 软件会根据您的实验设计建议订购的材料。假定您自己设计您的实验、订购您的所需材料，然后进行准备（第 3 章），并当收到您的材料时运行（第 4 章）反应板。

完成 **Ordering Materials**（订购材料）屏幕

1. 在 **Enter Gene Name or RS Number**（输入基因名或信号试剂编号）字段，输入 **rs8039**，然后单击 **Find Assay**（查找分析产品），以从 **Applied Biosystems** 网站获取分析产品：
 - a. 在 **Find Assay Results**（查找分析产品结果）对话框中，选择 **C_11711420_30** 检测。
 - b. 单击 **Apply Assay Selection**（应用分析产品选择）。



2. 从 **Display**（显示）下拉菜单中，选择 **All Items**（所有项）（默认），然后查看建议的材料。若需要，使用右侧的滚动条查看所有项。

注意：有关某特定项的详情，请单击部件号链接。您将被连接到 **Applied Biosystems Store**（Applied Biosystems 产品仓库）上的产品信息页面。要访问 **Applied Biosystems Store**（Applied Biosystems 产品仓库），您需要有因特网连接。

笔记

3. (可选) 单击 **Print Materials List** (打印材料列表) 以将材料列表发送到您的打印机。
4. (可选) 创建购物列表:
 - a. 选取以下项目旁边的复选框:
 - MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates
 - MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
 - MicroAmp™ 96-Well Support Base
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - C_11711420_30

注意: 为 StepOne 扩增仪创建了示例实验。若您在 Experiment Properties (实验属性) 屏幕中选择了 StepOnePlus 扩增仪 (第 18 页), 则会列出 96 孔耗材 (例如, MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate), 而不是 48 孔耗材。

- b. 单击 **Add Selected Items to Shopping List** (将所选项添加到购物列表)。
5. (可选) 在 Applied Biosystems Store (Applied Biosystems 产品仓库) 上创建一个购物篮:

注意: 要访问 Applied Biosystems Store (Applied Biosystems 产品仓库), 您需要有因特网连接。产品供应情况和价格可能因您所在地区或国家的不同而有所差异。在某些国家, 不能通过 Applied Biosystems Store (Applied Biosystems 产品仓库) 在线订购。请与您当地的 Applied Biosystems 代表联系以寻求帮助。

- a. 检查并确认 Experiment Shopping List (实验购物列表) 中包括所需材料且数量正确, 然后单击 **Order Materials in List** (订购列表中的材料)。
 - b. 在 Order Materials - Log In (订购材料 - 登录) 对话框中, 输入您在 Applied Biosystems Store (Applied Biosystems 产品仓库) 的用户名和密码, 然后单击 **Login and Submit** (登录并提交)。

注意: 如果您没有 Applied Biosystems Store (Applied Biosystems 产品仓库) 帐户, 单击 **Register Now** (立即注册) 以创建一个帐户。

- c. 当您已连接到 Applied Biosystems Store (Applied Biosystems 产品仓库) 时, 请按照提示完成您的订单。
6. 转到第 34 页 “完成 Design Wizard (设计向导)”。

设计指南 当您设计自己的实验时：

- 选择您的实验所需的所有材料，并将它们添加到购物列表。

切记！ StepOne 和 StepOnePlus 系统仅运行 Fast 耗材（反应板、反应管条带和反应管）。当执行基因分型实验时，运行在 Fast 耗材上使用 TaqMan[®] Universal PCR Master Mix 并采用标准 PCR 扩增条件准备的反应。

- 要访问 Applied Biosystems Store（Applied Biosystems 产品仓库），请执行以下操作：
 - 确保您的计算机有因特网连接。
 - Applied Biosystems 建议使用下列浏览器和 Adobe[®] Acrobat[®] Reader 版本，以便使用 Applied Biosystems 网站：

桌面操作系统	Netscape [®] Navigator	Microsoft [®] Internet Explorer	Macintosh [®] Safari	Adobe [®] Acrobat [®] Reader
Windows [®] 2000/NT/XP/Vista	v6.x 或更高版本	v6.x 或更高版本	不适用	v4.0 或更高版本
Macintosh [®] OS 9+ 或更高版本	不支持	不支持	v2.0.4 或更高版本	v4.0 或更高版本

注意： 确保已在浏览器中启用 cookies 和 Java Script 选项，以便网站正确运行。

有关详情 有关 Materials List（材料列表）屏幕的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记

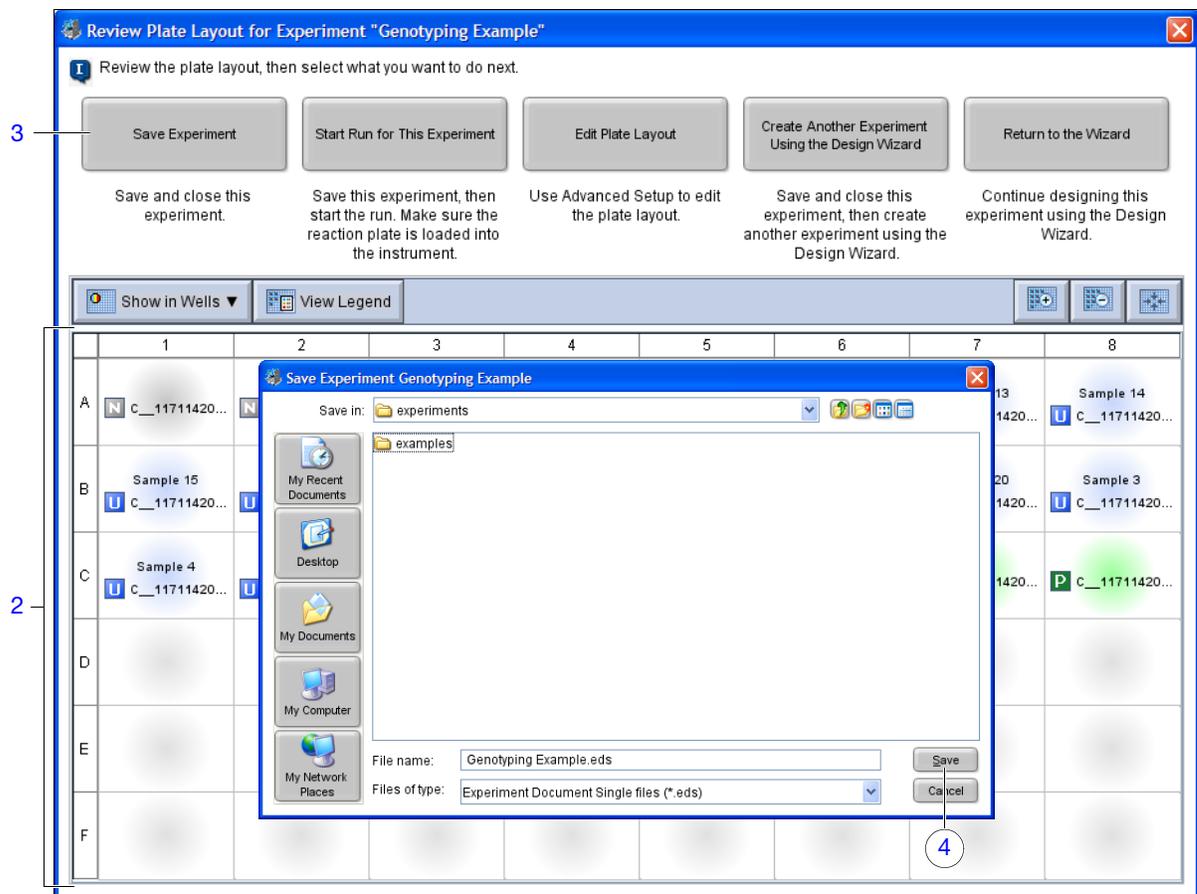
完成 Design Wizard (设计向导)

在 Review Plate Layout for Experiment (查看实验反应板布局) 对话框中, 选择一个选项以完成 Design Wizard (设计向导) 设置、查看反应板布局并启动运行。

完成 Design Wizard (设计向导)

1. 在 StepOne 软件屏幕的底部, 单击 **Finish Designing Experiment** (完成设计实验)。
2. 查看反应板布局。如果反应板布局不正确, 选择 **Return to the Wizard** (返回向导), 然后检查您输入的值。
3. 单击 **Save Experiment** (保存实验)。
4. 在 Save Experiment (保存实验) 对话框中, 单击 **Save** (保存) 以接受默认文件名和位置。示例实验被保存并关闭, 并且您返回到 Home (主页) 屏幕。

注意: 默认情况下, 示例实验被保存到 <驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments 文件夹。



笔记

设计指南 当您设计自己的实验时：

- 在 Review Plate for Experiment (查看实验的反应板) 窗口中，选择相应的退出选项：

单击	如果您想要 ...
Save Experiment (保存实验)	保存并关闭该实验，而不进行任何进一步更改或开始运行。
Start Run for This Experiment (开始运行该实验)	保存该实验并开始运行。确保反应板已装入扩增仪。
Edit Plate Layout (调整反应板布局)	<ul style="list-style-type: none"> • 使用 Advanced Setup (高级设置) 调整反应板布局。 • (仅限 StepOnePlus 扩增仪) 使用 Advanced Setup (高级设置) 为一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置一个不同温度。
Create Another Experiment Using the Design Wizard (使用设计向导创建另一实验)	保存并关闭当前实验，然后使用 Design Wizard (设计向导) 创建另一个实验。
Return to the Wizard (返回向导)	返回实验以使用 Design Wizard (设计向导) 进行更改。

- 默认情况下，实验将保存到 <驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments 文件夹。要更改：
 - 某特定实验的保存位置，使用 Save Experiment (保存实验) 对话框导航到所需位置。
 - 默认保存位置，选择 **Tools (工具)** ▶ **Preferences (首选项)**，然后选择 **General (一般)** 选项卡 (默认)。在 Default Data Folder (默认数据文件夹) 字段中，浏览到所需位置。

有关详情 有关使用 Advanced Setup (高级设置) 的详情，请参阅第 102 页 “[Advanced Setup \(高级设置\) 工作流程](#)”。

笔记

笔记

3

准备反应

本章包括：

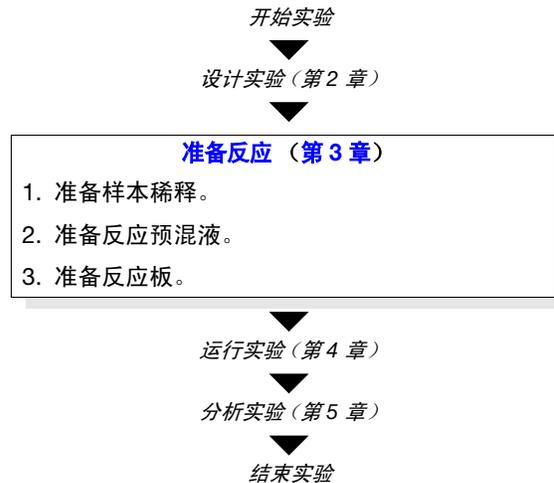
■ 本章概述	38
■ 准备样本稀释	39
■ 准备反应预混液	40
■ 准备反应板	42

注意： 有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键或单击工具栏中的 ，或依次选择 **Help**（帮助） ▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助），以访问 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software v2.0 的 **Help**（帮助）信息。

本章概述

本章说明如何为基因分型示例实验准备 PCR 反应，并提供有关如何为您的基因分型实验准备 PCR 反应的指南。

工作流程 下面显示为随本入门指南提供的示例实验准备 PCR 反应的工作流程。



有关详情 有关准备 TaqMan[®] SNP Genotyping Assays 的详情，请参阅：

- *Custom TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol*
- *Custom TaqMan[®] Genomic Assays Protocol*
- *TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol*
- *TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol*
- *Performing a Custom TaqMan[®] SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card*
- *Performing a TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card*
- *Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol*
- *Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Quick Reference Card*

注意： 本章中的操作步骤重点说明湿式 DNA 样本的使用。如果您使用的是干式 DNA，则有关复溶样本及其放置在反应板中以便使用的详情，请参阅随您的 PCR 套件提供的化学试剂实验方案。

准备样本稀释

采用 StepOne 软件计算的体积将样本储液稀释为工作浓度（请参阅第 28 页“查看反应设置”）。

关于示例实验 下表列出了为基因分型示例实验计算出的体积。终浓度为 30.0 ng/μL。

反应管	样本名	样本储液浓度 (ng/μL)	体积 (μL)		
			样本储液 (μL)	无 DNA 酶水 (μL)	稀释后样本总量 (μL)
1	样本 1	100.0	0.66	1.54	2.20
2	样本 2	100.0	0.66	1.54	2.20
...
21	样本 21	100.0	0.66	1.54	2.20

所需材料

- 用于稀释样本的无 DNA 酶水
- 微量离心管
- 移液枪和移液枪枪头
- 样本储液
- 反应管振荡器
- 离心机

准备样本

1. 为每份样本标记一个单独的微量离心管：**Sample 1**（样本 1）、**Sample 2**（样本 2）、...至 **Sample 20**（样本 20）。
2. 向每个空反应管中添加 1.54 μL 无 DNA 酶水。
3. 向每个反应管中添加 0.66 μL 的适当样本储液。
4. 振荡每份稀释的样本 3 至 5 秒，然后短暂地离心反应管。

准备指南

当您为自己的实验准备样本时：

- 使用无 DNA 酶水稀释样本。
- 对于每项实验，每个反应孔均使用相同量的 DNA。
- 切勿加热 DNA 样本。

有关详情

有关准备 TaqMan® SNP Genotyping Assays 的详情，请参阅适用于您正在 PCR 反应中所用试剂的实验方案（请参阅第 38 页“有关详情”）。

笔记

准备反应预混液

采用 StepOne 软件计算的剂量为实验准备反应预混液。StepOne 软件根据在 Methods and Materials（方法和材料）屏幕上所做的选择确定要使用的反应预混液组分（请参阅第 28 页“查看反应设置”）。对于基因分型实验，反应预混液含有除样本、缓冲液或阳性对照之外的所有组分。

- 所需材料**
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG (2X)
 - TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay (20X)
 - 无 DNA 酶水
 - 微量离心管
 - 移液枪
 - 移液枪枪头
 - 离心机

准备反应预混液



注意 化学品危险。TaqMan[®] 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 对眼睛和皮肤有刺激性。无保护下吞咽或吸入会导致不适感觉。请认真阅读 MSDS 并遵守操作规程。穿戴合适的保护眼罩、防护服和手套。

1. 对于单核苷酸多态性检测，将所需剂量的每种组分添加到适当大小的反应管中：

组分	反应体积			
	每个反应孔 (μL)		24 Rxns. 包括 10% 额外剂量 (μL)	
	干式	湿式	干式	湿式
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (2X)	12.50	12.50	330	330
SNP Assay Mix (20X)	1.25	1.25	33	33
H ₂ O (水), 无 DNA 酶	11.25	0	297	0
反应预混液总量	25.00	13.75	660	363

2. 轻轻吸入并排出反应预混液，然后盖上各反应管盖。
3. 短暂离心反应管。

笔记

- 准备指南** 当您为自己的实验准备反应预混液时，请确保：
- 为每个单核苷酸多态性实验单独准备反应。
 - 在您的计算中包括额外体积，以便为试剂转移期间发生的损失提供多余体积。
 - 包括所有所需组分。
 - 根据制造商的指导说明准备试剂。
 - 将检测预混液置于冰柜中避光储存，直到您准备使用。过多暴露在光线下会影响荧光探针。
- 使用之前，请执行以下操作：
- 摇晃瓶子，彻底混合母液。
 - 振荡反应管以重新悬浮检测预混液，然后短暂地离心反应管。
 - 将任何冷冻样本置于冰上将其解冻。解冻时，进行振荡以重新悬浮样本，然后短暂地离心反应管。
- 有关详情** 有关准备反应预混液的详情，请参阅适用于您正在 PCR 反应中所用试剂的实验方案（请参阅第 38 页“有关详情”）。

准备反应板

使用第 40 页的操作中得到的反应预混液和第 39 页的操作中得到的稀释样本装载反应板。根据 StepOne 软件中生成的反应板布局将反应物添加到反应孔（请参阅第 24 页“设置样本和重复数”）。

所需材料

- 离心机
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film
- 移液枪和移液枪枪头

注意：StepOne 和 StepOnePlus 系统仅运行 MicroAmp™ Fast 耗材。

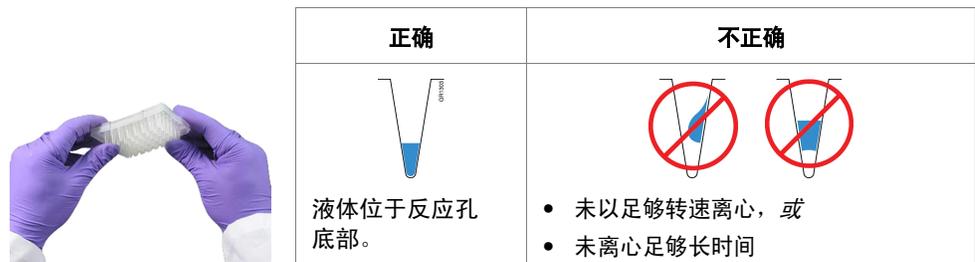
准备反应板：干式 gDNA

1. 将 2.5 μL 适当样本（3 至 20 ng 的纯化基因组 DNA）移液到 48 孔光学反应板的每个反应孔中。
属于同一基因分型检测的所有反应孔必须含有相同量的样本或对照物。
2. 在室温下将其置于黑暗、无扩增子位置，以通过蒸发来干燥样本。（干燥期间使用不脱毛棉纸盖上反应板。）
3. 将 25 μL 反应预混液移入每个反应孔。

切记！确保各反应孔间未发生交叉污染。

4. 用孔板高透光度盖膜密封反应板。
5. 振荡反应板 3 至 5 秒钟。
6. 短暂离心反应板。
7. 确认液体位于反应板每个反应孔的底部。如果不是，则再次以更高的转速离心反应板更长时间。

切记！注意不要让反应板的底部染上尘土。反应板底部染上液体或其它污染物会进而污染样本加热块，并产生不正常的高背景信号。



笔记

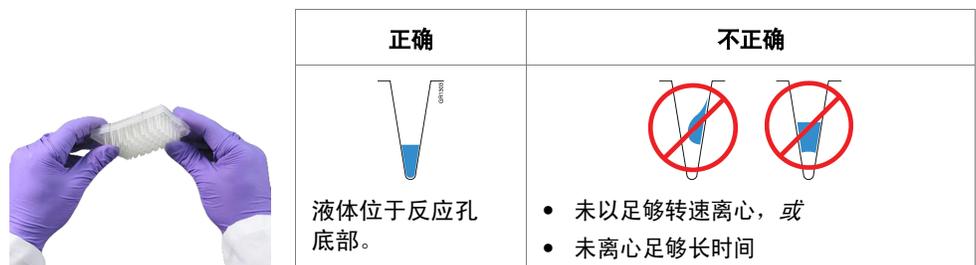
准备反应板：湿式
gDNA

1. 使用 8.75 μL 无 DNA 酶水稀释 2.5 μL 的样本。每个反应中 DNA 样本和无 DNA 酶水的剂量应为 11.25 μL 。
2. 用移液枪向反应板的每个反应孔中移液对于反应板类型而言剂量适当的一等份对照物或样本（如步骤 1 所示）：
 - a. 对于每个未知反应，向相应反应孔中添加 11.25 μL 样本。
 - b. 对于每个阴性对照反应，向相应反应孔中添加 11.25 μL 无 DNA 酶水。
 - c. 对于每个阳性对照反应，向相应反应孔中添加 11.25 μL 阳性对照物。

切记！ 确保您为阳性对照模板添加的基因型与为反应孔指定的基因型一致。

3. 将 13.75 μL 反应预混液移入相应反应孔。
4. 用孔板高透光度盖膜密封反应板。
5. 振荡反应板 3 至 5 秒钟，然后短暂离心。
6. 短暂离心反应板。

切记！ 注意不要让反应板的底部染上尘污。反应板底部染上液体或其它污染物会进而污染样本加热块，并产生不正常的高背景信号。

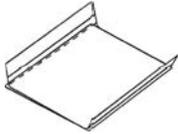
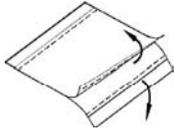
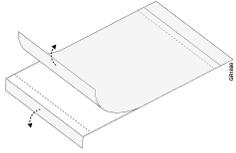
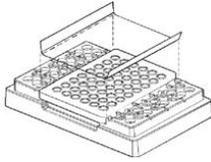
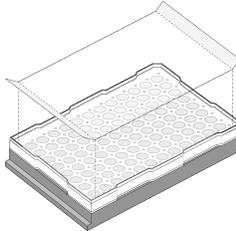
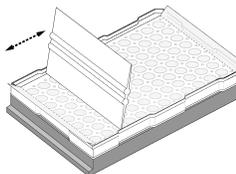
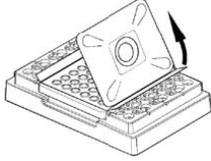
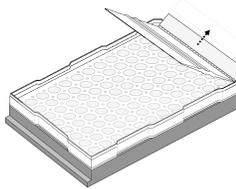


准备指南 当您为自己的实验准备反应板时：

- 确保您使用适当的耗材。
- 确保反应位置与 StepOne 软件中的反应板布局一致。
- 若您将要运行少于 40 个反应，请使用反应管条带而不要使用反应板。
- 对每个反应装载 3 至 20 ng 纯化的基因组 DNA
- 属于同一基因分型检测的所有反应孔必须含有相同量的样本或对照物。
- 一个反应板上可运行多个反应，但是必须单独进行分析。

笔记

- 若您使用孔板高透光度盖膜密封您的反应板，则按以下方式密封每个反应板：

操作	示例	
	StepOne™ 系统	StepOnePlus™ 系统
1. 将反应板置于 96 孔底座的中央。确保反应板与 96 孔底座的顶部表面齐平。		
2. 根据需要装载反应板。		
3. 从盒中取出单张孔板高透光度盖膜（以下简称“盖膜”）。 <ul style="list-style-type: none"> 对于 StepOne 系统反应板，向上弯曲两端的卡舌。使盖膜的背面朝上。 对于 StepOnePlus 系统反应板，向后折一端的卡舌。使盖膜的背面朝上。 		
4. 通过旋转运动，从中央密封表面剥开白色保护性背衬。切勿触摸中央密封表面。 切记！若不当地剥离孔板高透光度盖膜可能会导致模糊，但不会影响结果。当盖膜与仪器中的受热封盖接触时，模糊状况将消失。		
5. 手持盖膜的末端卡舌，将盖膜降低放在反应板上（粘附面向反应板）。确保盖膜完全盖住反应板的所有反应孔。		
6. 在施加稳定压力的同时，在盖膜上水平并垂直缓慢地移动敷贴器，以确保盖膜与反应板的整个表面之间接触良好。		
7. 当使用敷贴器将盖膜的边缘固定到位的同时，抓紧末端卡舌的一端并向上迅速脱离。对另一端卡舌重复此操作。		
8. 为了确保形成紧密、无蒸发的密封： <ol style="list-style-type: none"> 重复步骤 6。 沿盖膜外部边缘的所有四个侧面对敷贴器的边缘施加稳定压力。 注意：孔板高透光度盖膜不会一接触便粘附。需对盖膜施加压力以确保形成紧密、无蒸发的密封。		
9. 检查反应板以确保所有反应孔均被密封。您应查看盖膜表面上是否有所有反应孔的压痕。		

有关详情 有关准备反应板的详情，请参阅适用于您正在 PCR 反应中所用试剂的实验方案（请参阅第 38 页“有关详情”）。

笔记 _____

4

运行实验

本章包括：

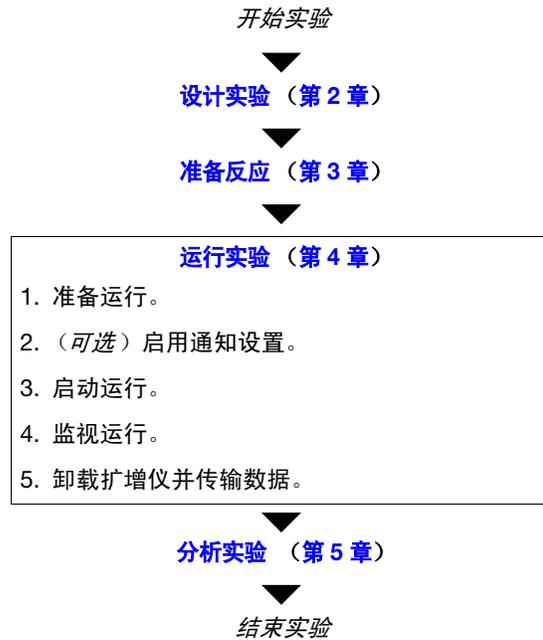
■ 本章概述	46
■ 准备运行	47
■ （可选）启用通知设置	49
■ 启动运行	51
■ 监视运行	55
■ 卸载扩增仪并传输数据	62

注意： 有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键或单击工具栏中的 ，或依次选择 **Help**（帮助） ▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助），以访问 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software v2.0 的 Help（帮助）信息。

本章概述

本章说明如何在 Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 上运行实验。

示例实验工作流程 下面显示运行随本入门指南提供的示例实验的工作流程。



笔记

准备运行

打开您在第 2 章中创建的示例实验文件，然后将密封的反应板装载到 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪以准备运行。

打开示例实验

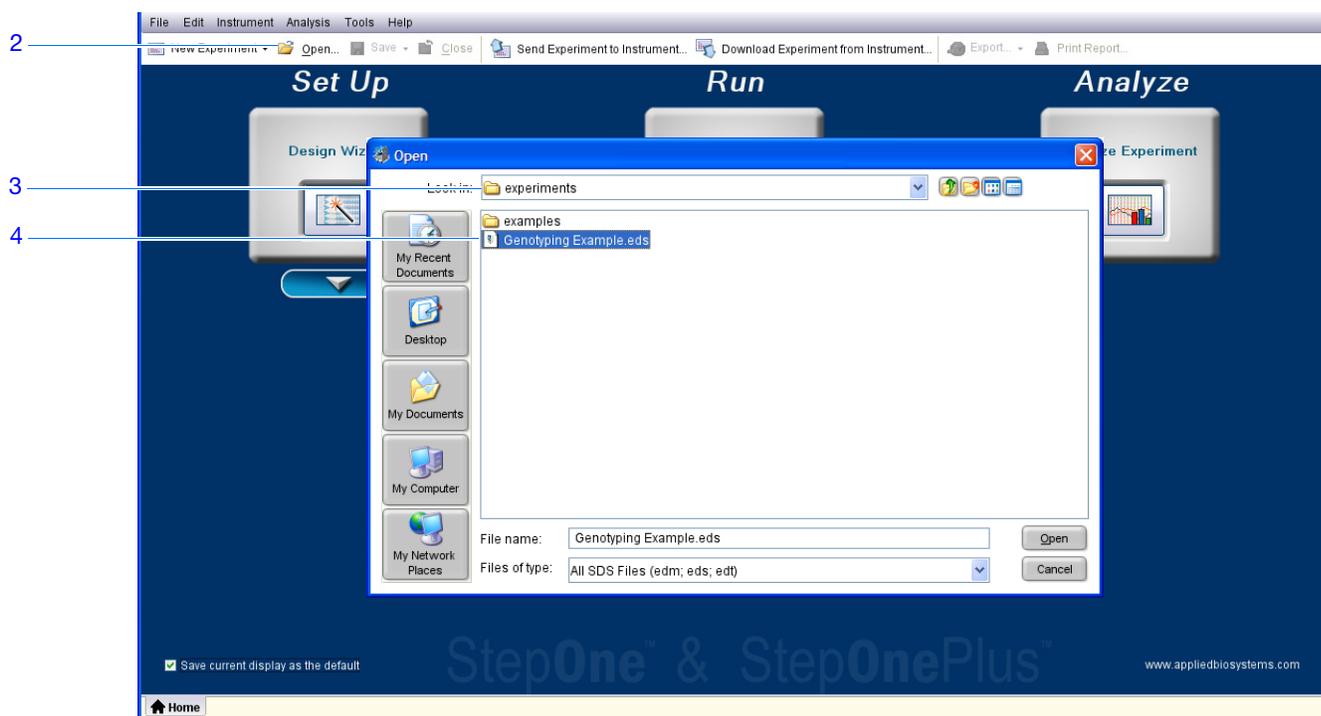
1. 双击  (StepOne 软件快捷图标) 或依次选择 **Start** (开始) ▶ **All Programs** (所有程序) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software** (StepOne 软件) ▶ **<软件名>**

其中，<软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

2. 从 Home (主页) 屏幕上，单击 **Open** (打开)。

3. 在 Open (打开) 对话框中，导航到 **experiments** (实验) 文件夹 (默认):
<驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments

4. 双击 **Genotyping Example** (基因分型示例) 以打开您在第 2 章中创建的示例实验文件。



笔记

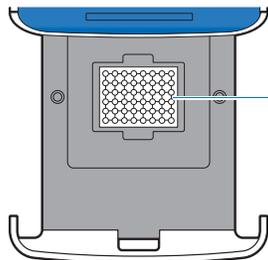
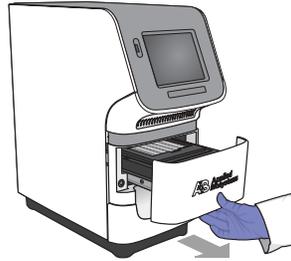
将反应板装入
扩增仪

注意 人身伤害危险。 仪器操作期间，样本加热块温度可能超过 100 °C。若刚使用过仪器，请让双手远离样本加热块直到其达到室温。



切记！当您拿取反应板时，请戴上无粉手套。

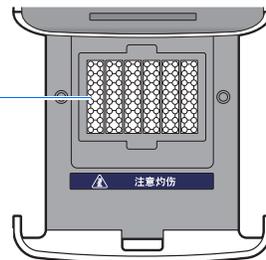
1. 打开扩增仪抽屉。



StepOne 扩增仪样本
加热块



注意



StepOnePlus 扩增仪
VeriFlex™ 样本加热块

2. 将反应载体放置在样本加热块中：

- 若使用反应板：将反应板放入样本加热块，让 A1 反应孔位于样本加热块左后角。
- 若使用反应管条带：将包含反应管条带的托盘放入样本加热块。
- 如果使用反应管：将包含反应管的托盘放入样本加热块。



笔记 _____

切记！为通过部分装载以下扩增仪获取最佳性能：

StepOnePlus 扩增仪 - 至少装载 16 个反应管并按以下方式布局：

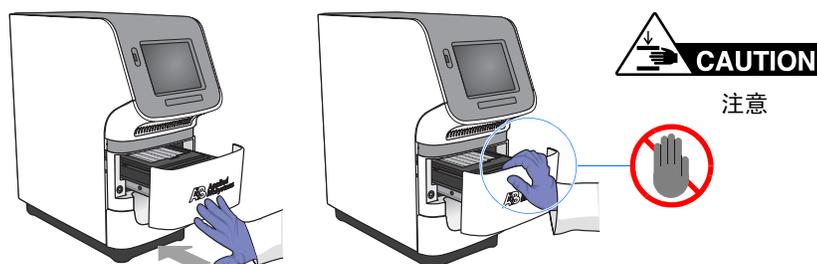
- 8 个反应管的相邻列，采用 A 至 H 行。例如，填充第 1 列（A 至 H 行）和第 2 列（A 至 H 行）反应孔。

或

- 8 个反应管的相邻行，采用 3 至 10 列。例如，填充 A 行（3 至 10 列）和 B 行（3 至 10 列）反应孔。

StepOne 扩增仪 - 在样本加热块中至少装载 4 个反应管。

3. 小心地关闭扩增仪抽屉。



(可选) 启用通知设置

启用通知设置，以便 StepOne 软件在 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪开始和完成实验或如果运行期间出现错误时，通过电子邮件提示您。启用通知设置功能是可选的，并不会影响 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统的性能或运行持续时间。

切记！仅当您所使用的计算机正在运行 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪并且已连接到以太网时，才可用通知设置功能。

注意：正远程监视 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪的计算机也可提供通知系统。有关详情，请参阅第 59 页“远程监视”。

关于示例实验 在示例实验中：

- 已设置了 StepOne 软件以便在 StepOne 或 StepOnePlus 系统结束运行以及如果操作期间遇到任何错误时，将通知发送到三个用户（mycompany.com 上的科学家、管理员和技术员）。
- 示例 SMTP 服务器 (www.mycompany.com) 设置了安全套接字层 (SSL) 加密，且使用时需要身份验证。

笔记

设置通知设置

1. 在 StepOne 软件中，从导航窗格中单击  **Run**（运行）。
2. 单击  **Notification Settings**（通知设置）。
3. 为 Enable Notifications（启用通知）选择 **Yes**（是）。
4. 选择需要通知的事件：
 - a. 选取 **Instrument Error**（扩增仪错误）。
 - b. 选取 **Run Completed**（完成运行）。
5. 在 Enter e-mail addresses for notifications（输入通知电子邮件地址）字段中，输入：**scientist@mycompany.com**、**supervisor@mycompany.com**、**technician@mycompany.com**。
6. 在 Outgoing Mail Server (SMTP)（发送邮件服务器 (SMTP)）字段中，输入 **smtp.mycompany.com**。
7. 设置身份验证设置：
 - a. 为 Server requires authentication（服务器是否要求身份验证）选择 **Yes**（是）。
 - b. 在 User Name（用户名）字段中，输入 **Example User**（示例用户）。
 - c. 在 Password（密码）字段中，输入 **密码**。

Notification Settings

Enable Notifications: Yes No

Select the events to generate notifications:

- Instrument Error
- Run Started
- Run Completed

Enter e-mail addresses for notifications:
Separate e-mail addresses with commas.
For example: jane_smith@mydomain.com,awong@bigmailhost.com

scientist@mycompany.com, supervisor@mycompany.com, technician@mycompany.com

Outgoing Mail Server (SMTP):
smtp.mycompany.com
For example: smtp.mycompany.com

Server requires an encrypted connection? Yes No

Server requires authentication? Yes No

(Server Authentication) User Name: Example User

(Server Authentication) Password: *****

运行指南 当您设置 StepOne 或 StepOnePlus 系统进行自动通知时：

- 必须将您的系统设置为可用于网络。请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 安装、联网和维护指南》。
- 选择您想要接收电子邮件通知的事件：
 - **Instrument Error**（扩增仪错误）— 选择时，将每次运行期间扩增仪遇到的所有错误向收件人发送电子邮件通知。
 - **Run Started**（启动运行）— 选择时，将在扩增仪每次启动运行时向收件人发送电子邮件通知。
 - **Run Completed**（完成运行）— 选择时，将在扩增仪每次完成运行时向收件人发送电子邮件通知。
- 获取接收通知的电子邮件地址。

切记！ 使用英文半角逗号 (,) 分隔多个地址。

- 如果您需要以下信息，与您的系统管理员或信息技术部联系：
 - 将接收通知的用户的电子邮件地址
 - 简单邮件传送协议 (SMTP) 服务器在 LAN 上的网络地址
 - 服务器的用户名和密码（若访问时要求提供）
 - 服务器的安全套接字层 (SSL) 设置（打开或关闭）

启动运行

根据您的 StepOne 或 StepOnePlus 系统的布局启动运行：

布局	描述	请参阅 ...
并置	使用黄色线缆将计算机连接到扩增仪	下文“并置启动”
独立	<ul style="list-style-type: none"> • 计算机与扩增仪未连接，或 • 计算机和扩增仪连接到同一网络上。 	第 52 页“独立启动”

并置启动 若您的计算机已通过黄色线缆直接连接到您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪，则执行下列步骤。

1. 在 StepOne 软件中，从导航窗格中单击  **Run**（运行）。
2. 单击 **START RUN** （启动运行）。



笔记

独立启动 若您的计算机和 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪未通过黄色线缆直接连接在一起，则执行下列步骤。开始于：

- 第 52 页 “通过网络将实验发送到扩增仪”（若您的计算机和扩增仪连接到同一网络上）。
- 或
- 第 52 页 “使用 USB 驱动器将实验传输到扩增仪”（若您的计算机和扩增仪未连接到同一网络上）。

通过网络将实验发送到扩增仪

1. 在 StepOne 软件中，单击  **Send Experiment to Instrument**（将实验发送到扩增仪）。
2. 在 Send Experiment to Instrument（将实验发送到扩增仪）对话框中：
 - a. 单击 **Browse**（浏览），导航到示例实验文件，然后单击 **Open**（打开）。
 - b. 选择要接收实验文件的扩增仪。

注意： 若您的扩增仪未列出，请根据《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 安装、联网和维护指南》中的说明，设置进行监视的扩增仪。

- c. 单击 **Send Experiment**（发送实验）以通过网络将实验发送到您的扩增仪。

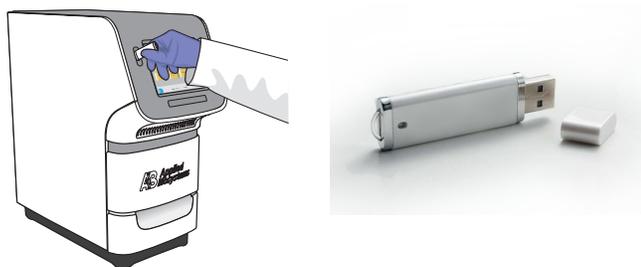


3. 当出现提示时，单击 **OK**（确定）以关闭确认对话框。
4. 转到第 53 页 “使用触摸屏启动扩增仪运行”。

使用 USB 驱动器将实验传输到扩增仪

1. 将 USB 驱动器连接到计算机的一个 USB 端口上。
2. 在 StepOne 软件中，选择  **Save**（保存） ▶ **Save As**（另存为）。
3. 在 Save（保存）对话框中，导航到 USB 驱动器，然后单击 **Save**（保存）。

4. 从您的计算机上拔下 USB 驱动器，然后将其连接到您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪的 USB 端口上。



5. 转到下面“使用触摸屏启动扩增仪运行”。

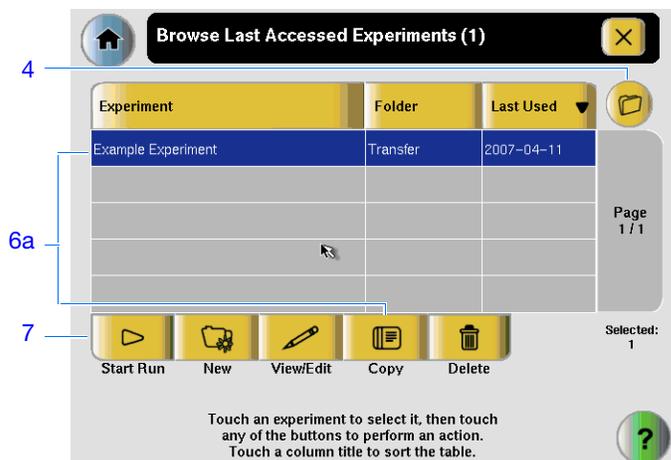
使用触摸屏启动扩增仪运行

1. 触摸 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪触摸屏以将其激活。

注意：如果触摸屏幕未显示在 Main Menu（主菜单）屏幕上，则触摸 。

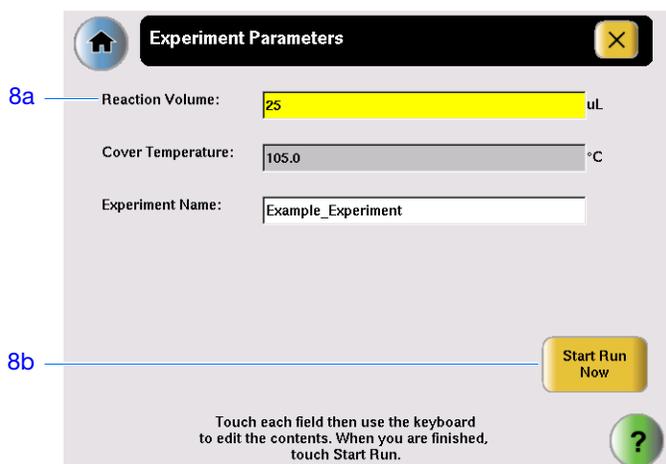
2. 等待 USB 符号出现在触摸屏上。
3. 在 Main Menu（主菜单）屏幕上，触摸 **Browse/New Experiments**（浏览/新实验）。
4. 在 Browse（浏览）屏幕上，触摸  **Folders**（文件夹）。
5. 在 Choose an Experiment Folder（选择实验文件夹）屏幕上：
 - 若您已传输 USB 驱动器上的实验，则触摸 **USB**。
 - 若您通过网络连接发送了实验，则触摸 **Default**（默认）。
6. 在启动运行之前，将示例实验保存到您的扩增仪：
 - a. 在 Browse（浏览）屏幕上，触摸示例实验名，然后触摸 **Copy**（复制）。
 - b. 在 Save Experiment（保存实验）屏幕上，导航到目标文件夹，然后单击 **Save & Exit**（保存并退出）。
7. 在 Browse（浏览）屏幕上，触摸示例实验名，然后触摸  **Start Run**（启动运行）。

笔记



8. 在 Run Parameters（运行参数）屏幕上：

- a. 触摸 **Reaction Volume**（反应体积）字段，使用小键盘输入示例实验的反应体积，然后触摸 **Done**（完成）。
- b. 触摸 **Start Run Now**（立即启动运行）。



监视运行

根据您的 StepOne 或 StepOnePlus 系统的布局监视运行：

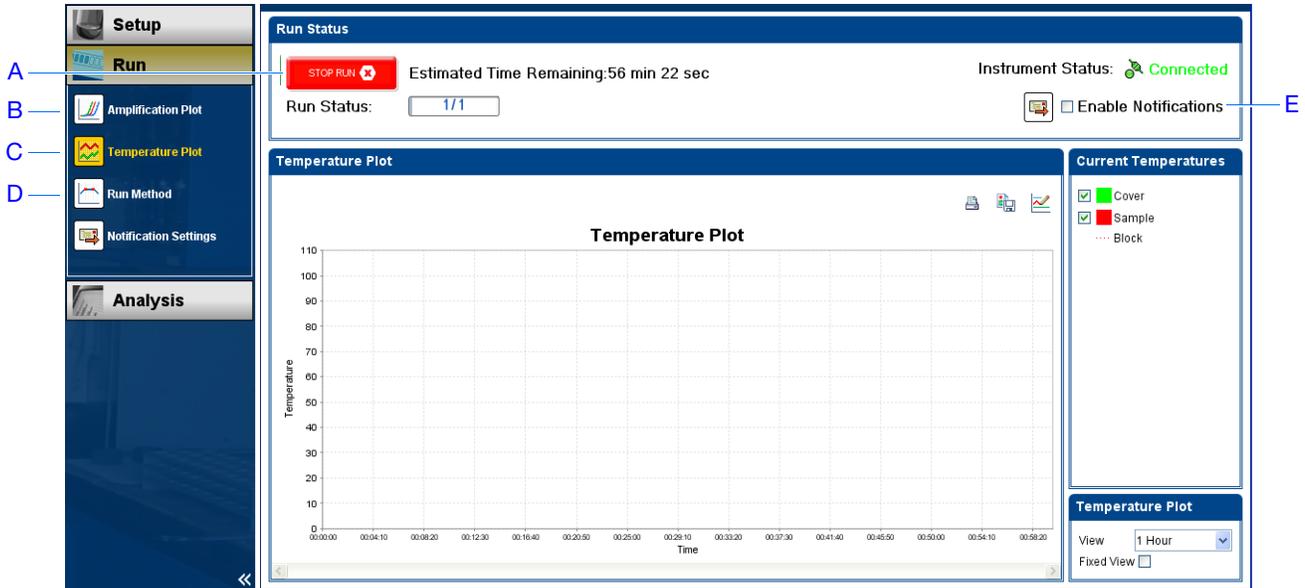
布局	描述	请参阅 ...
并置	使用黄色线缆将计算机连接到扩增仪。	下文“并置监视”
独立（联网）	计算机和扩增仪连接到同一网络上。	第 59 页“远程监视”
独立（基本）	计算机与扩增仪未连接。	第 61 页“独立监视”

并置监视

若您的计算机已通过黄色线缆直接连接到您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪，则您可按照下文所述实时查看运行进度。运行期间，定期查看 StepOne 软件提供的所有三条曲线是否存在潜在问题。

#	要 ...	操作
A	停止运行	<ol style="list-style-type: none"> 在 StepOne 软件中，单击 STOP RUN（停止运行）。 在 Stop Run（停止运行）对话框中，单击以下项之一： <ul style="list-style-type: none"> Stop Immediately（立即停止）以立即停止运行。 Stop after Current Cycle/Hold（当前循环/保持阶段后停止）以在当前循环或保持阶段之后停止运行。 Cancel（取消）以继续运行。
B	实时查看扩增数据	选择  Amplification Plot （扩增曲线）。 请参阅第 56 页“关于 Amplification Plot（扩增曲线）屏幕”。
C	实时查看运行的温度数据	选择  Temperature Plot （温度曲线）。 请参阅第 57 页“关于 Temperature Plot（温度曲线）屏幕”。
D	在 Run Method（运行方法）屏幕上查看运行进度	选择  Run Method （运行方法）。 请参阅第 58 页“关于 Run Method（运行方法）屏幕”。
E	启用/禁用通知设置	选取或取消选取 Enable Notifications （启用通知）复选框。 请参阅第 49 页“（可选）启用通知设置”。

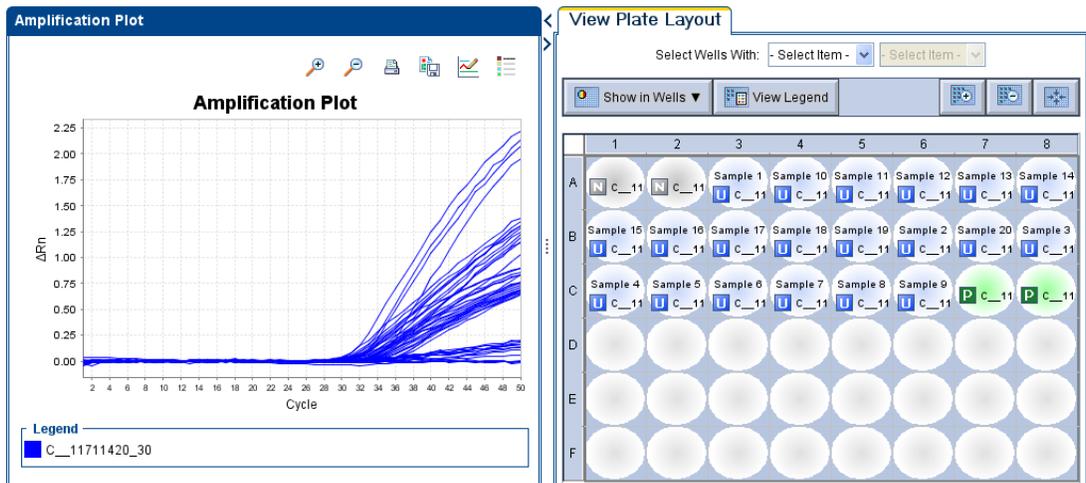
笔记 _____



关于 Amplification Plot（扩增曲线）屏幕

Amplification Plot（扩增曲线）屏幕允许您在您的扩增仪运行期间采集荧光数据时查看样本扩增。若设置了某种方法以采集实时数据，Amplification Plot（扩增曲线）屏幕上会显示在 View Plate Layout（查看反应板布局）选项卡中所选反应孔的数据。扩增曲线将对照归一化染料荧光 (ΔRn) 和循环数。下图显示示例实验期间显示的 Amplification Plot（扩增曲线）屏幕。

要在 Amplification Plot（扩增曲线）屏幕上查看数据，在 View Plate Layout（查看反应板布局）选项卡上选择您想要查看的反应孔。



Amplification Plot（扩增曲线）屏幕对识别和检查异常扩增十分有用。异常扩增可能包括以下情况：

- 阴性对照反应孔中荧光增强。
- 预期循环中不存在可检测荧光（在相同情况下使用相同试剂从先前类似的实验运行确定）。

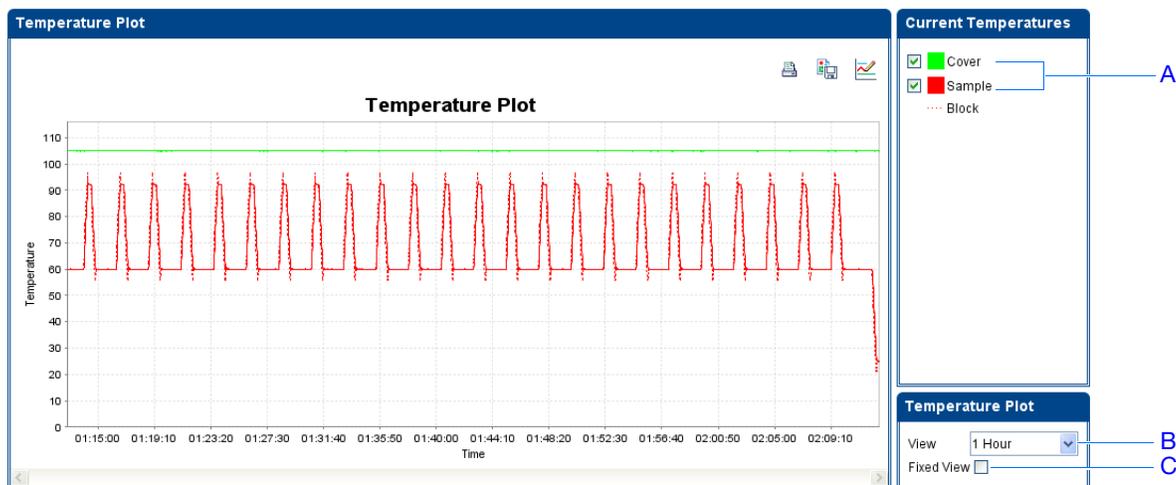
笔记

若您注意到异常扩增或完全不存在信号，则根据 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）中的说明对错误进行排除故障（单击  或按 **F1** 键）。

关于 Temperature Plot（温度曲线）屏幕

运行期间，Temperature Plot（温度曲线）屏幕上实时显示样本加热块、热盖和样本（计算得出的）的温度。下图显示示例实验期间显示的 Temperature Plot（温度曲线）屏幕。

	要 ...	操作
A	添加/删除温度曲线	选择 Cover （热盖）或 Sample Block （样本加热块）以在曲线中切换显示相关数据。
B	更改按曲线显示的时间	从 View （查看）下拉菜单中，选择要在曲线中显示的时间量。
C	在扩增仪运行期间显示固定的时间窗口 如果整条曲线未在屏幕上拟合，则在运行进行时未更新屏幕。例如，如果您从 View（查看）下拉菜单中选择 10 分钟，曲线将显示数据 10 分钟时间。如果运行超过 10 分钟： <ul style="list-style-type: none"> 则在运行过程中取消选择 Fixed View（固定视图）时更新曲线。 则在运行过程中选择了 Fixed View（固定视图）时不更新曲线。 	选择 Fixed View （固定视图）。



Temperature Plot（温度曲线）屏幕对识别硬件故障十分有用。当监视 Temperature Plot（温度曲线）屏幕时，观察 Sample（样本）和 Block（样本加热块）曲线是否出现异常情况。

笔记

- 通常，Sample（样本）和 Block（样本加热块）曲线应大约相互对应。两条曲线存在显著偏差可能表示存在问题。
- Cover（热盖）曲线应保持方法中指定的常温。偏离一致温度可能表示存在问题。

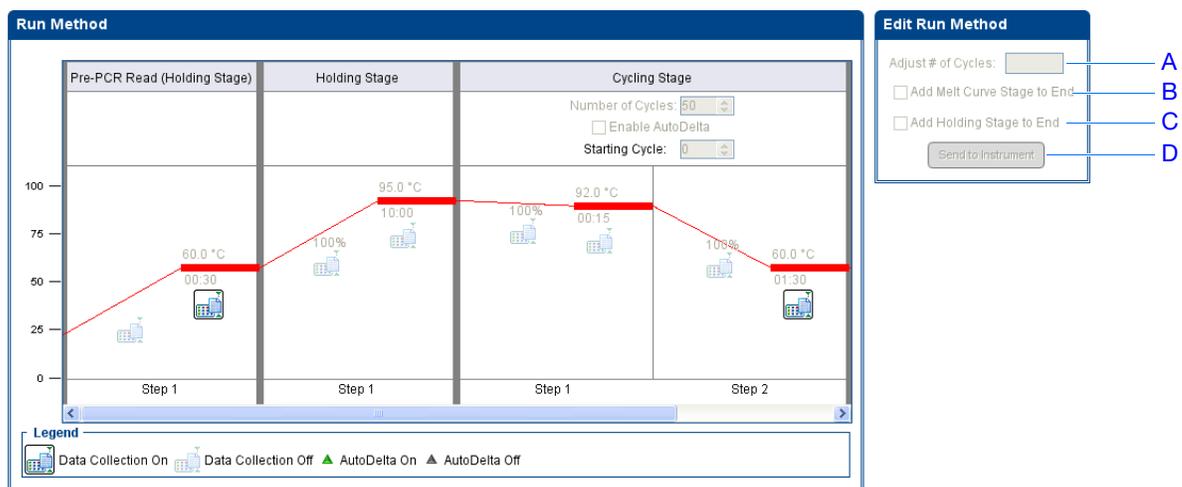
若您注意到异常温度曲线，则根据 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）中的说明对错误进行排除故障（单击  或按 F1 键）。

注意：Current Temperatures（当前温度）组中显示的 Sample（样本）温度为估计值。

关于 Run Method（运行方法）屏幕

Run Method（运行方法）屏幕显示为正在进行的运行所选的运行方法。在整个运行过程中软件会更新 Run Status（运行状态）字段。下图显示示例实验中显示的 Run Method（运行方法）屏幕。

	要 ...	操作
A	更改循环次数	在 Adjust # of Cycles（调整循环数）字段中，输入要应用于 Cycling Stage（循环阶段）的循环数。
B	将解链曲线阶段添加到运行的末尾	选择 Add Melt Curve Stage to End （将解链曲线阶段添加到末尾）。
C	将保持阶段添加到运行的末尾	选择 Add Holding Stage to End （将保持阶段添加到末尾）。
D	应用您的更改	单击 Send to Instrument （发送到扩增仪）。



若出现提示，单击错误以了解详情，并根据 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）中的说明对问题进行排除故障（单击  或按 F1 键）。

远程监视 若将您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪连接到网络，您可使用 StepOne 软件的 Remote Monitor（远程监视）从网络上的任何一台计算机上实时查看运行进度。

切记！ 联网的计算机不能控制 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪，只能监视它。

远程监视您的扩增仪：

1. 在 StepOne 软件中，依次选择 **Instrument**（扩增仪） ▶ **Remote Monitor**（远程监视）。
2. 在导航窗格中，选择您的扩增仪。

若导航窗格中未列出您的扩增仪：

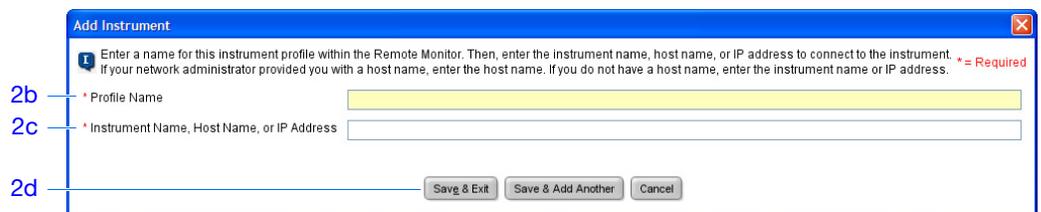
- a. 单击 **Add Instrument**（添加扩增仪）。
- b. 在 Remote Monitor（远程监视）中为扩增仪配置文件输入一个名称。

注意： 输入任何能帮助您识别扩增仪的名称。当您发送实验、下载实验或监视扩增仪时，您输入的配置文件名将在 Remote Monitor（远程监视）和扩增仪下拉菜单中显示。

- c. 在 Instrument Name（扩增仪名称）、Host Name（主机名）或 IP Address（IP 地址）字段中：
 - 如果您知道主机名，则输入主机名。
 - 如果您不知道主机名，则输入扩增仪名称或 IP 地址。

注意： 扩增仪名称和 IP 地址在扩增仪触摸屏上显示。转到 **Settings Menu**（设置菜单） ▶ **Admin Menu**（管理菜单） ▶ **Set Instrument Name**（设置扩增仪名称）或 **Set IP Address**（设置 IP 地址）。与您的系统管理员或信息技术部联系，以获取主机名。

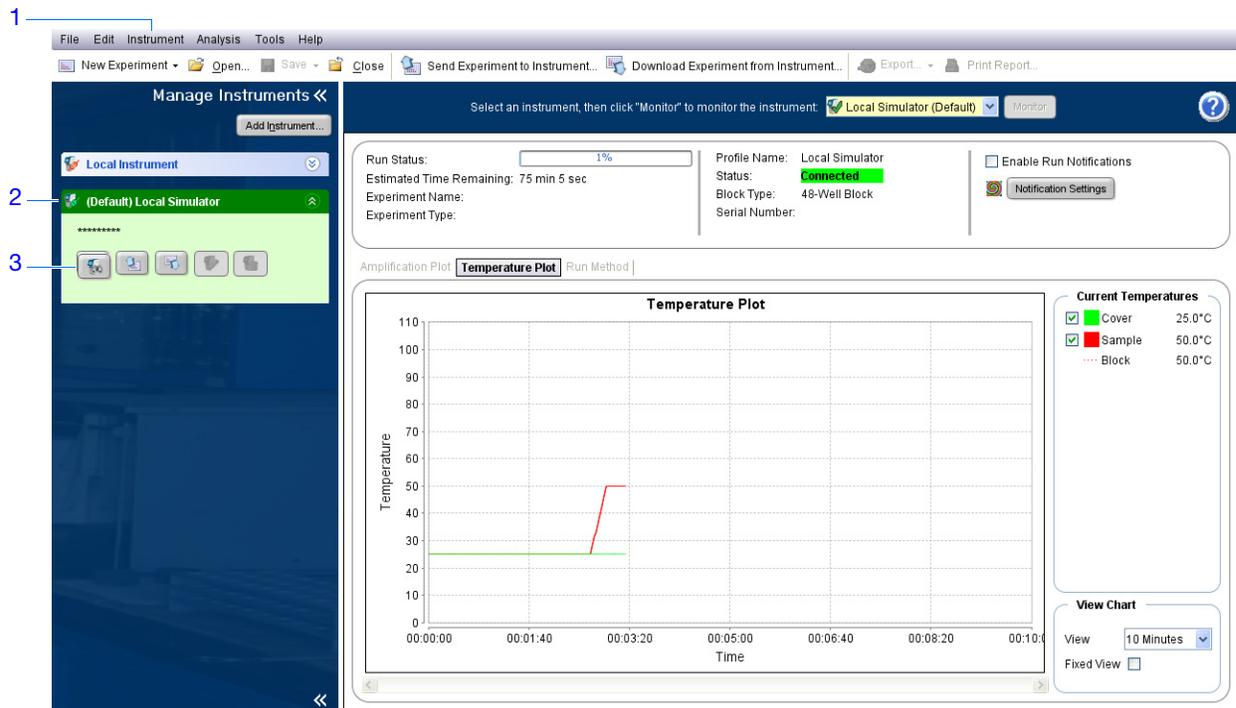
- d. 单击 **Save & Exit**（保存并退出）。



注意： 有关配置 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪以便联网使用或使用 Remote Monitor（远程监视）功能的详情，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 安装、联网和维护指南》。

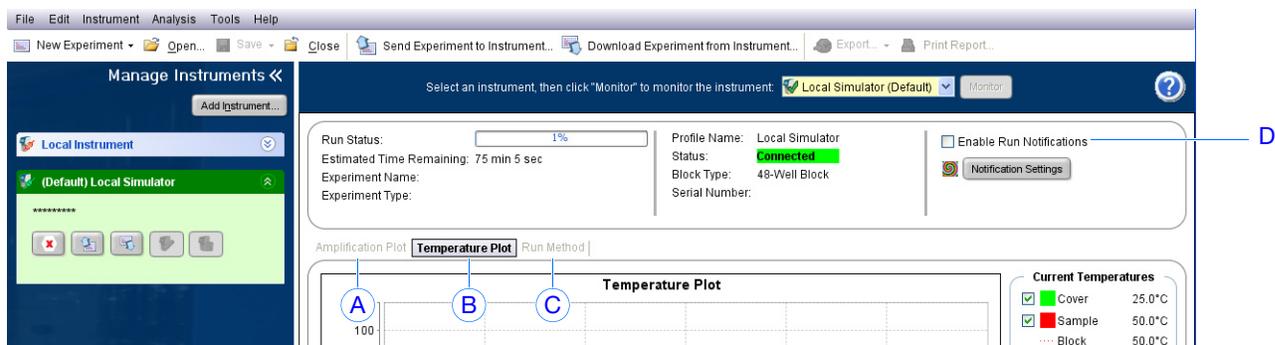
笔记

3. 为您的扩增仪单击  **Start monitoring the instrument**（开始监视此扩增仪）。扩增仪将信息发送到您的计算机可能需要几分钟。



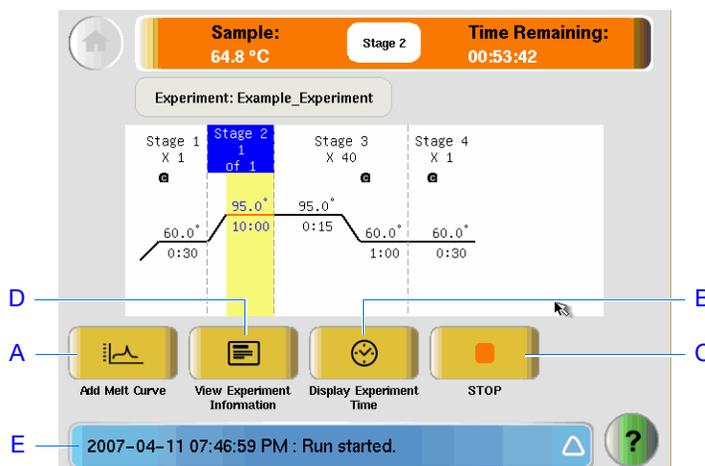
4. 按下文描述查看数据。

#	要...	操作
A	实时查看扩增数据	单击 Amplification Plot （扩增曲线）。 请参阅第 56 页“关于 Amplification Plot（扩增曲线）屏幕”。
B	实时查看运行的温度数据	单击 Temperature Plot （温度曲线）。 请参阅第 57 页“关于 Temperature Plot（温度曲线）屏幕”。
C	在 Run Method（运行方法）屏幕上查看运行进度	单击 Run Method （运行方法）。 请参阅第 58 页“关于 Run Method（运行方法）屏幕”。
D	启用/禁用通知设置	选取或取消选取 Enable Notifications （启用通知）复选框。 请参阅第 49 页“（可选）启用通知设置”。



独立监视 若您已从您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪上启动运行，您可从触摸屏上查看运行进度。Run Method（运行方法）屏幕上显示实验方法，并在扩增仪执行温度变化过程时突出显示这些步骤。

#	要...	操作
A	将解链曲线阶段添加到运行	触摸 Add Melt Curve （添加解链曲线），然后触摸 OK （确定）。
B	显示运行的剩余时间	触摸 Display Experiment Time （显示实验时间），然后触摸 以返回 Run Method（运行方法）屏幕。
C	停止运行	触摸 STOP （停止），然后触摸： <ul style="list-style-type: none"> Stop（停止）以在扩增仪完成当前循环或保持阶段之后停止运行。 Abort（中止）以立即停止运行。 以继续运行（无任何改变）。
D	查看实验信息	触摸 View Experiment Information （查看实验信息），然后触摸 以返回 Run Method（运行方法）屏幕。
E	查看错误日志	触摸状态栏以显示错误日志。



笔记

卸载扩增仪并传输数据

当您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪显示 Main Menu（主菜单）屏幕时，从扩增仪上卸载反应板，并将实验数据传输到计算机以进行分析。

卸载反应板



注意

人身伤害危险。 仪器操作期间，样本加热块温度可能超过 100 °C。在样本盘降温至室温之前，请勿触碰扩增仪。

注意： 当 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪完成一次运行时，系统会将运行详情保存到运行历史记录，在扩增仪完成另一次运行之前，该运行历史记录会保留在系统中。

1. 当 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪触摸屏上显示 Run Report（运行报告）屏幕时，触摸 .
2. 打开扩增仪抽屉。
3. 从样本加热块中取出反应板。
4. 小心地关闭扩增仪抽屉。



选择数据传输方法

根据您的 StepOne 或 StepOnePlus 系统的布局将实验传输到您的计算机以便进行分析：

布局	描述	请参阅 ...
并置	用黄色线缆连接计算机和扩增仪。	下文“并置数据传输”
独立（联网）	计算机和扩增仪连接到同一网络上。	第 63 页“远程数据传输”
独立（基本）	计算机与扩增仪未连接。	第 64 页“独立数据传输”

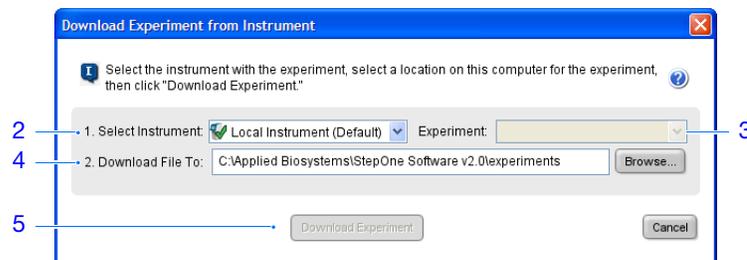
笔记

并置数据传输 若您的计算机已通过黄色线缆直接连接到您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪，则无需执行任何操作。StepOne 软件会在运行之后自动将实验数据从扩增仪传输到计算机。

注意： 在并置布局中，您可从计算机或从扩增仪触摸屏启动运行。但 StepOne 软件仅在从计算机启动运行时才自动传输实验数据（请参阅第 51 页“并置启动”）。

远程数据传输 若您的计算机和 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪已连接到同一以太网上，则通过网络从扩增仪下载实验：

1. 在 StepOne 软件中，单击  **Download Experiment from Instrument**（从扩增仪下载实验）以打开 Download Experiment from Instrument（从扩增仪下载实验）对话框。
2. 从 Select Instrument（选择扩增仪）下拉菜单中选择您的扩增仪。
3. 从 Experiment（实验）下拉菜单中选择示例实验文件。
4. 在 Download File To（文件下载位置）字段中：
 - a. 单击 **Browse**（浏览）。
 - b. 导航到：
<驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments\
其中：
<驱动器>指安装 StepOne 软件的计算机硬盘的驱动器盘符。软件的默认安装驱动器是 D 盘驱动器。
<软件名>是 StepOne 软件的当前版本。
 - c. 单击 **Select**（选择）。
5. 单击 **Download Experiment**（下载实验）以通过网络将示例实验文件从您的扩增仪下载到您的计算机。



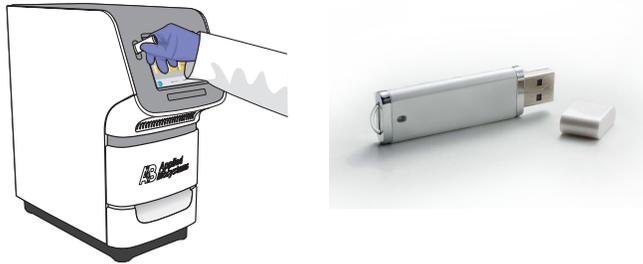
6. 当出现提示时，单击 **OK**（确定）以关闭确认对话框。



笔记

独立数据传输 若您的计算机未连接到您的 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪，则使用 USB 驱动器将实验从扩增仪传输到计算机：

1. 若尚未连接到扩增仪，则将 USB 驱动器连接到其 USB 端口上。



2. 触摸 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪触摸屏以将其激活。

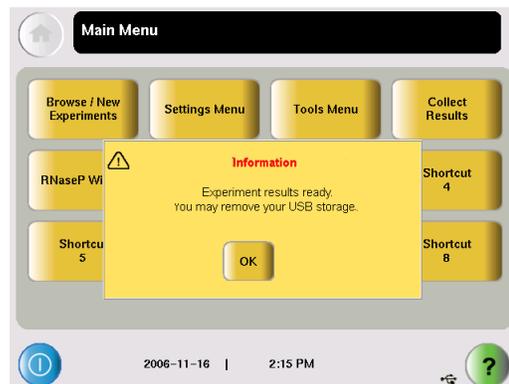
注意： 如果触摸屏幕未显示在 Main Menu（主菜单）屏幕上，则触摸 。

3. 等待 USB 符号出现在触摸屏上。

4. 从 Main Menu（主菜单）中，触摸 **Collect Results**（采集结果）以将数据保存到 USB 驱动器中。

注意： 若您的扩增仪找不到 USB 驱动器，则拔下 USB 驱动器，然后重试。若扩增仪仍未识别 USB 驱动器，则尝试另一 USB 驱动器。

5. 提示数据已成功传输时，触摸 **OK**（确定）。



6. 从您的扩增仪上拔下 USB 驱动器，然后将其连接到您的计算机的 USB 端口之一上。

7. 从计算机桌面上，使用 Windows 资源管理器打开 USB 驱动器。

笔记

8. 复制示例实验文件到:

<驱动器>:\Applied Biosystems*<软件名>*\experiments\

其中:

- <驱动器>指安装 StepOne 软件的计算机硬盘的驱动器盘符。软件的默认安装驱动器是 D 盘驱动器。
- <软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

笔记

笔记

5

分析实验

本章包括：

■ 本章概述	68
■ 打开实验以便分析	69
■ 查看等位基因鉴别曲线	71
■ 查看反应板布局	75
■ 查看反应孔表	78
■ 查看 QC 摘要	81
■ 查看原始数据曲线	82
■ 查看多组分曲线	84
■ 查看扩增曲线	86
■ 查看分析设置	93
■ 公布数据	98

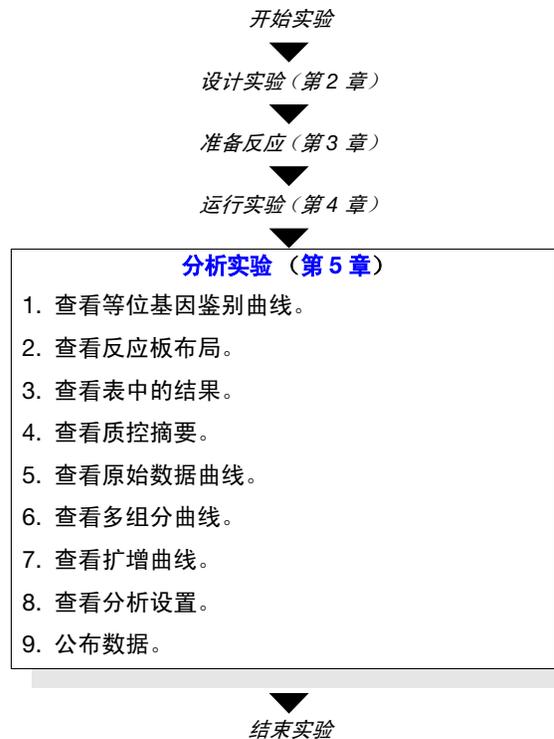
注意： 有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键或单击工具栏中的 ，或依次选择 **Help**（帮助） ▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助），以访问 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software v2.0 的 Help（帮助）信息。

笔记

本章概述

本章说明如何查看、分析和公布已分析的实验。

工作流程



如何评估结果 在以下三个步骤中查看结果：

1. 初始查看 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）（请参阅第 71 页）、反应板布局（请参阅第 75 页）和反应孔表（请参阅第 78 页），以评估 StepOne 软件进行的基因型识别。
2. 彻底查看 QC Summary（质控摘要）（请参阅第 81 页），以评估导致 QC 标记的样本。查看显示异常扩增的样本的原始数据（请参阅第 82 页）和扩增数据（请参阅第 86 页）。
3. 必要时，手动定义分析设置（请参阅第 93 页）或修改识别（请参阅第 97 页）。

在评估结果后，您可按第 98 页“公布数据”的说明公布结果。

打开实验以便分析

打开实验以准备分析。

关于示例实验 对于基因分型示例实验，使用随 StepOne 软件一同安装的数据文件。该数据文件是使用第 2 章中提供的相同设计参数而创建，并随后在 StepOne™ 扩增仪上运行和分析。

您可在您的计算机上找到示例实验的数据文件：

```
<驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments\examples\  
Genotyping Example.eds
```

其中：

- <驱动器>指安装 StepOne 软件的计算机硬盘的驱动器盘符。软件的默认安装驱动器是 D 盘驱动器。
- <软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

打开实验

1. 双击  (StepOne 软件快捷图标) 或依次选择 **Start** (开始) ▶ **All Programs** (所有程序) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software** (StepOne 软件) ▶ **<软件名>**

其中，<软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

2. 从 Home (主页) 屏幕上，单击 **Open** (打开)。
3. 在 Open (打开) 对话框中，导航到 **examples** (示例) 文件夹：
<驱动器>:\Applied Biosystems\<软件名>\experiments\examples
4. 双击 **Genotyping Example** (基因分型示例) 以打开示例实验数据文件。

注意： 示例文件夹包含几个数据文件；确保选择 **Genotyping Example** (基因分型示例)。有关其它数据文件的信息，请参阅第 12 页“[示例文件夹中的数据文件](#)”。

笔记

查看等位基因鉴别曲线

在 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）中初始查看实验结果，此曲线对比单核苷酸多态性检测的等位基因特异性探针的归一化报告染料荧光强度 (R_n)。有关此曲线的完整描述，请参阅第 8 页“读取和分析反应板”。

关于示例实验数据 对于示例实验，请确认 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）显示以下内容：

- 三种可能的基因型聚类（等位基因 1 纯合子、等位基因 2 纯合子和等位基因 1/2 杂合子）
- 阴性对照聚类

查看曲线 1. 从 Experiment Menu（实验菜单）窗格中，依次选择 Analysis（分析）
▶  Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）。

注意：如果未显示任何数据，单击 **Analyze**（分析）。

2. 单击 **View Plate Layout**（查看反应板布局）选项卡，然后单击任何空反应孔以选择它。

注意：在 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）中，软件会突出显示在 View Plate Layout（查看反应板布局）选项卡中选择的所有反应孔。若曲线为所有反应孔显示单一颜色，则选择反应板布局中的所有反应孔。

3. 在扩增曲线中，从 SNP Assay（单核苷酸多态性检测）菜单中选择 **C_11711420_30**。

- 若启用了 Autocaller（自动识别），则 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）会为所选单核苷酸多态性已评估的每个样本显示等位基因符号。

样本在曲线上按以下方式分类：

符号标志	沿以下位置分类 ...	样本的基因型为 ...
●（红色）	曲线的 X 轴	所选单核苷酸多态性检测的等位基因 1 纯合性。
●（蓝色）	曲线的 Y 轴	所选单核苷酸多态性检测的等位基因 2 纯合性。
●（绿色）	纯合子聚类间的中间位置	所选单核苷酸多态性检测的等位基因杂合性（等位基因 1 和等位基因 2）。
■（黑色）	图的左下角	阴性对照。
×（黑色）	图中的任何位置	Undetermined（不确定）。

笔记

- 若未启用 Autocaller（自动识别），则 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）会为每个样本显示一个十字标记（× - Undetermined（不确定））。

4. 对于图中的每个聚类：

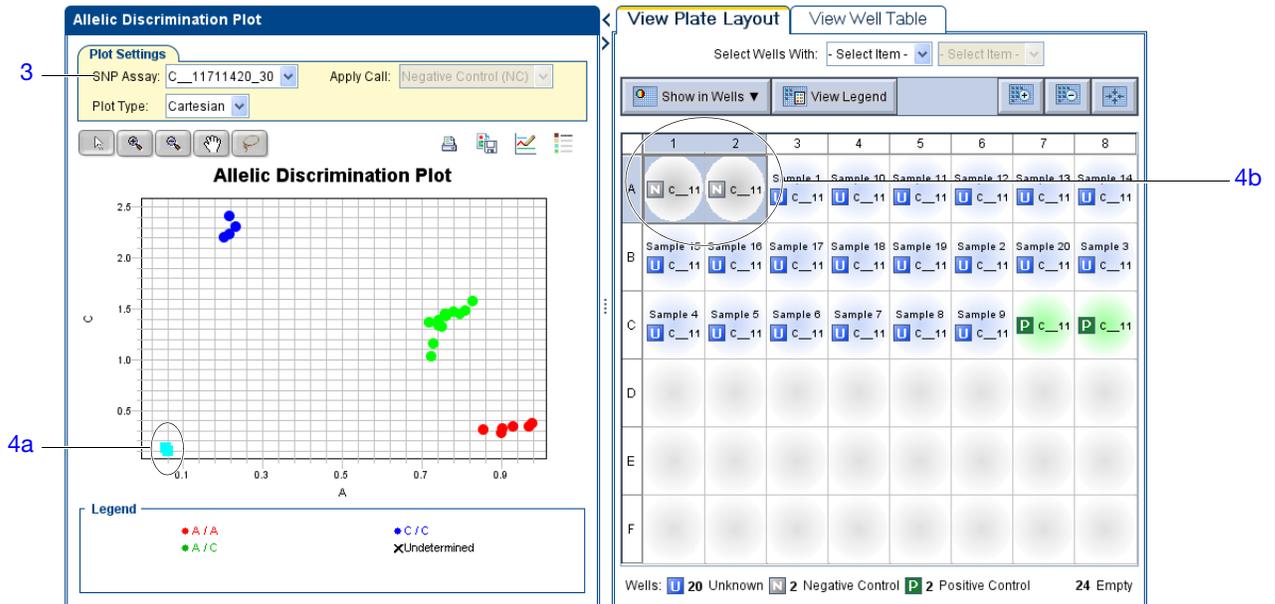
- 在聚类周围单击并拖放一个框，以在反应板布局 and 反应孔表中选择相关反应孔。
- 确认在反应孔表中选择了期望的反应孔。

例如，如果您选择图左下角的聚类，则仅应选择阴性对照。若阴性对照间存在未知样本，则可能表示该样本未扩增。

- 对图中的所有其它聚类重复步骤 4a 和 4b。

元素	描述
SNP Assay（单核苷酸多态性检测）下拉菜单	确定 StepOne 软件在图中显示的单核苷酸多态性检测数据。
Plot Type（曲线类型）下拉菜单	确定 StepOne 软件将用于显示数据的曲线类型（Cartesian（笛卡儿）或 Polar（极性））。
Apply Call（应用识别）下拉菜单	当选择某一数据点时，此菜单允许您为散点图内的数据点指定等位基因识别。
工具栏	包含以下用于处理散点图的工具： <ul style="list-style-type: none"> •  - 单击单个数据点，或在一组数据点周围单击并拖放一个框以选择数据点。 •  - 包围数据点以进行选择。 •  - 重新放置散点图。 •  - 放大散点图。 •  - 缩小散点图。
图例	散点图中的符号说明。

下图显示示例实验的 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）。



分析指南 当您分析自己的实验时：

- 确认所有对照均为正确的基因型。
- 若使用阳性对照，则确认阳性对照的识别：
 - a. 从反应孔表中，选择含有阳性对照的反应孔，以在 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）中突出显示对应的数据点。
 - b. 检查阳性对照的数据点是否沿图的期望轴聚类。例如，如果您选择 Positive Control Allele 1/Allele 1（阳性对照等位基因 1/等位基因 1），则对照应沿 X 轴聚类。
 - c. 对含有其它阳性对照的反应孔重复步骤 a 和 b。
- 筛查阴性对照聚类是否存在未扩增的未知样本：
 - a. 选择 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）左下角聚类中的数据点，以选择反应孔表中的对应反应孔。
 - b. 检查反应孔表中的所选反应孔为阴性对照，而不是未知样本。
- 随阴性对照聚类的样本可能：
 - 不含 DNA
 - 含有 PCR 抑制剂
 - 具有序列缺失纯合性
- 通过重新检测，确认未紧密聚类或随阴性对照聚类的样本的结果。
- 若您选择运行重复反应，则仔细查看异常值的数据集，以确保基因型识别的准确度。若存在异常值，则重新检测以确认相关样本的结果。

笔记

- 观察图中的聚类数。若 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）含有三个以下的代表性基因型聚类（杂合子的、纯合子等位基因 1 和纯合子等位基因 2），则您可能必须启用 2-Cluster Calling（2 个聚类识别）功能，StepOne 软件方可对样本进行基因分型。

若图中含有三个以下的聚类：

- a. 单击 **Analysis Settings**（分析设置）。
- b. 单击 **Edit Default SNP Assay Settings**（调整默认单核苷酸多态性检测设置）。
- c. 选择 **2-Cluster Calling Enabled**（启用 2 个聚类识别），然后单击 **Save Changes**（保存更改）。
- d. 单击 **Apply Analysis Settings**（应用分析设置）。
- e. 单击 **Reanalyze**（重新分析），以使用 2-Cluster Calling（2 个聚类识别）功能重新分析实验。

注意：结果显示将同步。例如，在反应板布局中选择一个反应孔会在反应孔表和 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）中选择相应的数据。

有关详情 有关 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

查看反应板布局

在反应板布局中查看实验结果。反应板布局采用与运行实验所用反应板类型对应的反应孔形式，显示实验的检测专用设置和分析属性。

关于示例实验数据 对于示例实验，确认 StepOne 软件将：

- 6 个样本识别为等位基因 1 纯合 (●)
- 4 个样本识别为等位基因 2 纯合 (●)
- 12 个样本识别为杂合 (●)
- 2 个样本识别为阴性对照 (■)

确认反应板中无反应孔导致 QC 标记 (▲)。

查看布局

1. 单击 Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）旁边的 < 图标，以最大化显示反应板布局。
2. 单击  **Show in Wells**（显示反应孔详情），然后选择或取消选择一个您想要显示反应孔的参数。
3. 在反应板布局包含所有所需参数之前，重复步骤 2。

参数	描述
Sample Name (样本名)	加样到反应孔的样本名称。
Task (任务)	为反应孔指定的任务： <ul style="list-style-type: none"> •  — Unknown (未知) •  — Negative Control (阴性对照) •  — Positive Control (阳性对照)
SNP Assay Name (单核苷酸多态性检测名称)	反应孔评估的单核苷酸多态性的名称。
Assay ID (检测 ID)	反应孔评估的单核苷酸多态性的检测 ID 编号。
Allele 1 (等位基因 1) / Allele 2 (等位基因 2)	反应孔评估单核苷酸多态性的相关等位基因的名称。
Allele 1 Dyes (等位基因 1 染料) / Allele 2 Dyes (等位基因 2 染料)	反应孔评估单核苷酸多态性的相关等位基因报告染料和淬灭染料的名称。
SNP Assay Color (单核苷酸多态性检测颜色)	反应孔评估的单核苷酸多态性的颜色。

笔记 _____

参数	描述
Sample Color (样本颜色) / Task Color (任务颜色)	应用到反应孔的样本或任务的颜色。
Genotype Call (基因型识别)	为样本指定的等位基因识别： <ul style="list-style-type: none"> ● Homozygous 1/1 (纯合 1/1) ● Homozygous 2/2 (纯合 2/2) ● Heterozygous 1/2 (杂合 1/2) ■ Negative Control (阴性对照) × Undetermined (不确定)
Flag (标记)	反应孔导致的 QC 标记数量, 如 ▲ 符号中所列。

下图显示示例基因分型实验的反应板布局。

The screenshot displays the 'View Plate Layout' interface. At the top, there are tabs for 'View Plate Layout' and 'View Well Table'. Below the tabs, there are dropdown menus for 'Select Wells With:'. A legend on the left side lists various parameters that can be shown in the wells, such as Sample Name, Task, SNP Assay Name, Assay ID, Allele 1, Allele 2, Allele 1 Dyes, Allele 2 Dyes, SNP Assay Color, Sample Color, Task Color, Genotype Call, and Flags. The main area shows a 96-well plate layout with wells labeled by column (2-8) and row (E-F). Each well contains a sample name and a genotype call represented by a colored circle and a symbol. A summary at the bottom indicates the status of the wells: 20 Unknown, 2 Negative Control, 2 Positive Control, and 24 Empty.

笔记

分析指南 当您分析自己的实验时：

- 在反应板布局中，会在用户忽略的反应孔左上角显示 ；在 QC 标记设置忽略的反应孔的边角显示 。
- 请记住任何导致 QC 标记的样本位置 ()。理解这些错误位置有助于您诊断可能发生的任何故障。
- 您可选择整个反应板、反应板的某些区域或特定的反应孔：
 - 单击反应板左上角以选择所有 48 个反应孔。
 - 单击鼠标左键并在相应区域周围拖动以进行选择。
 - 从 **View Plate**（查看反应板）选项卡的 **Select Items**（选择项目）菜单中选择 **Sample**（样本）、**Target**（靶）或 **Task**（任务）。然后从第二个 **Select Items**（选择项目）菜单中选择样本、靶或任务名称，以使用反应孔选择工具选择特定类型的反应孔。
- 您可调整反应板布局：
 - 使用 （Zoom In（放大））、（Zoom Out（缩小））和 （Fit All（适合所有））按钮以增大或缩小显示的反应孔。
 - 使用箭头选项卡扩展反应板布局以覆盖整个屏幕。

有关详情 有关反应板布局的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记 _____

查看反应孔表

在反应孔表中查看实验结果的详情，并识别任何带标记的反应孔。反应孔表以表格形式显示实验的检测专用设置和分析属性。

关于示例实验数据 对于示例实验，确认反应板中无反应孔导致 QC 标记 (▲)。

查看反应孔表

1. 选择 **View Well Table**（查看反应孔表）选项卡。
2. 单击 **Flag**（标记）列标题以排序数据，以便在表格顶部显示导致标记的反应孔。
3. 确认对照的完整性：
 - a. 从 **Group By**（分组方式）菜单中，选择 **Task**（任务）以在反应板上按其功能组织表格行。
 - b. 确认每个对照都未显示标记 (▲)。
 - c. 单击 – 图标以折叠阴性和阳性对照列表。
4. 单击 **View Well Table**（查看反应孔表）选项卡旁边的 >，以同时显示 **Allelic Discrimination Plot**（等位基因鉴别曲线）和反应孔表。

下图显示示例基因分型实验的反应孔表。

列	描述
Well（反应孔）	反应板上的反应孔位置。
Omit（忽略）	标有复选标记指示已从分析中删除的反应孔。
Flag（标记）	▲ 指示反应孔导致了符号内所列数量的标记。
Sample Name (样本名)	样本的名称。
SNP Assay Name (单核苷酸多态性检测名称)	反应孔评估的单核苷酸多态性检测的名称。

笔记 _____

列	描述
Assay ID (检测 ID)	反应孔评估的单核苷酸多态性的检测 ID 编号。
Task (任务)	分配给反应孔 (Unknown (未知)、 Negative Control (阴性对照) 或 Positive Control (阳性对照)) 的任务。
Allele 1 / 2 (等位基因 1/等位基因 2)	反应孔评估单核苷酸多态性的相关等位基因的名称。
Allele 1 / 2 Dyes (等位基因 1 染料/等位基因 2 染料)	反应孔评估单核苷酸多态性的相关等位基因报告染料和淬灭染料的名称。
Allele 1 / 2 R_n (等位基因 1/2 R_n)	反应孔评估单核苷酸多态性的相关等位基因报告染料的归一化荧光信号强度 (R_n)。
Pass Ref (参比荧光)	反应孔的参比荧光染料信号。
Call (识别)	为样本指定的等位基因识别, 可能的识别包括: <ul style="list-style-type: none"> ● ● Homozygous 1/1 (纯合 1/1) - 等位基因 1 纯合 ● ● Homozygous 2/2 (纯合 2/2) - 等位基因 2 纯合 ● ● Heterozygous 1/2 (杂合 1/2) - 杂合 ● ■ Negative Control (阴性对照) ● × Undetermined (不确定)
Quality(%) (质量百分比)	为基因型识别计算出的质量值。
Method (方法)	指定用于识别样本的方法 (若由 StepOne 软件指定则为 Auto (自动), 若由用户应用则为 Manual (手动))。
Comments (注释)	为相关样本反应孔输入的注释。
Allele 1 / 2 C_T (等位基因 1/等位基因 2 C_T)	反应孔评估单核苷酸多态性的相关等位基因样本的阈值循环 (C_T)。
QC Flag (质控标记) 列	
反应孔表中会显示实验数据导致的 QC 标记列。若实验数据未导致 QC 标记, 则 StepOne 软件不显示对应的标记列。以下列之一中若显示 ▲ 则表示导致标记的相关反应孔。	
BADROX	反应孔产生大于分析设置中所定义极限的参比荧光信号。
OFFSCALE	反应孔产生大于 StepOne 或 StepOnePlus 系统可测量水平的荧光。
NOSIGNAL	反应孔未产生可检测水平的荧光。
CLUSTER#	对于按反应孔评估的单核苷酸多态性检测, 实验数据生成的聚类数大于分析设置中定义的极限。
PCFAIL	对于相关等位基因, 阳性对照未产生大于分析设置中所定义极限的 R_n , 表示对照未扩增。
SMCLUSTER	相关聚类中的数据点数少于分析设置中所定义的极限。
AMPNC	阴性对照已产生大于分析设置中所定义极限的 R_n , 表示可能已进行扩增。

笔记 _____

列	描述
NOAMP	对于任何一种等位基因，反应孔均未产生大于分析设置中所定义极限的 R_n ，表示反应孔可能未扩增。
NOISE	反应孔产生的背景荧光（噪声）大于反应板上的其它反应孔，超过分析设置中所定义的极限倍数。
SPIKE	反应孔的扩增曲线含有一个或多个与曲线中其它点不一致的数据点。
EXPFAIL	软件无法识别反应孔扩增曲线的指数级区域。
BLFAIL	软件无法计算反应孔数据的最佳拟合基线。
THOLDFAIL	软件无法计算相关反应孔的阈值。
CTFAIL	软件无法计算相关反应孔的阈值循环 (C_T)。

分析指南 当您分析自己的实验时：

- 若您正使用阳性对照，也请确认阳性对照的完整性：
 - a. 从 Group By（分组方式）菜单中，选择 **Task**（任务）以在反应板上按其功能组织表格行。
 - b. 确认阳性对照未显示标记 (▲)，且其归一化报告染料荧光强度 (R_n) 适合基因型（例如，若评估阳性对照等位基因 1/等位基因 1，则您可能期望看到等位基因 1 探针的 R_n 显著增强，而等位基因 2 探针的 R_n 几乎未增强）。
 - c. 为每种阳性对照重复步骤 b。
- 查看未知样本的数据。对于 Flag（标记）列中显示 ▲ 的每一行，记下其中的数据和相关反应孔导致的标记。
- 通过以下方式选择表格的某些区域或特定类型的反应孔：
 - 单击鼠标左键并在要选择表中某一区域的区域周围拖动。
 - 然后从 View Table（查看表）选项卡的 Select Items（选择项目）菜单中选择 **Sample**（样本）、**Sample**（靶）或 **Task**（任务），然后从第二个 Select Items（选择项目）菜单中选择样本、靶或任务名称，以使用反应孔选择工具选择特定类型的反应孔。
- 通过从 Group By（分组方式）菜单中选择一个选项，以分组反应板布局的行。然后，您可通过单击单个列表旁边的 +/- 图标，或单击  **Collapse All**（全部折叠）或  **Expand All**（全部扩展），以折叠或扩展列表。
- 通过选择相应反应孔的 **Omit**（忽略）复选框，以从分析中忽略该反应孔。要在分析中包括该反应孔，则取消选取 **Omit**（忽略）复选框。

注意：每当忽略或包括一个反应孔时，您都必须重新分析实验。

有关详情 有关反应孔表的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记

查看 QC 摘要

查看实验数据导致的 QC 标记的摘要，并对出现的标记进行故障排除。QC 摘要显示所有 QC 标记的出现次数及位置。如果某个标记未出现在实验中，则其出现次数为 0。如果出现次数不是 0，则会在位置列中列出的反应孔位置显示该标记。单击某个标记即会显示该标记的详情，包括所有带标记反应孔的列表。

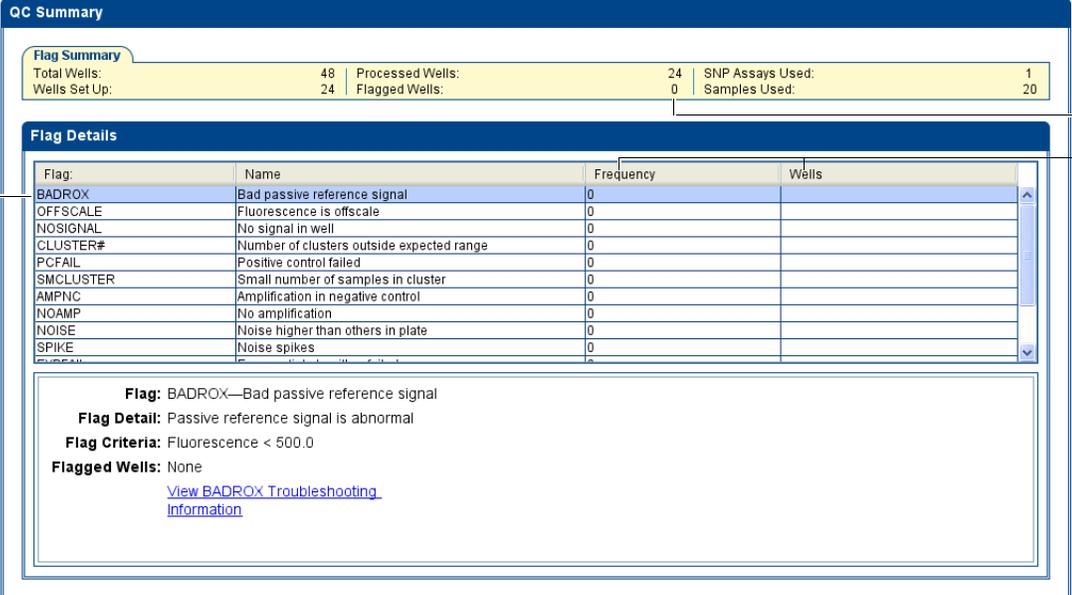
关于示例实验数据 在基因分型示例实验中，您可查看 QC Summary（QC 摘要）屏幕上有无任何因实验数据导致的标记。在示例实验中，未导致任何标记。

查看摘要

1. 在导航栏中，选择  **QC Summary**（质控摘要）。
2. 查看 **Flag Summary**（标记摘要）。在示例实验中，有 0 个标记反应孔。
3. 在 **Flag Details**（标记详情）表中，查看 **Frequency**（频率）和 **Wells**（反应孔）列以确定实验中出现了哪个标记。在示例实验中，**Frequency**（频率）列中所有标记均显示为 0。

注意： **Frequency**（频率）列中显示的 0 表示标记未出现在实验中。

- 4.（可选）单击每个标记行以显示该标记的详情。



QC Summary

Flag Summary

Total Wells:	48	Processed Wells:	24	SNP Assays Used:	1
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	0	Samples Used:	20

Flag Details

Flag	Name	Frequency	Wells
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
CLUSTER#	Number of clusters outside expected range	0	
PCFAIL	Positive control failed	0	
SMCLUSTER	Small number of samples in cluster	0	
AMPNC	Amplification in negative control	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	

Flag: BADROX—Bad passive reference signal
Flag Detail: Passive reference signal is abnormal
Flag Criteria: Fluorescence < 500.0
Flagged Wells: None
[View BADROX Troubleshooting Information](#)

笔记

分析指南 当您分析自己的实验时：

- 在 **Flag Details**（标记详情）中选择每个出现次数大于 0 的 QC 标记，查看导致 QC 标记的反应孔的频率和位置，然后单击标记的故障排除链接。

注意： 当您在 **Flag Details**（标记详情）表中选择某个标记时，反应孔表会突出显示导致该标记的反应孔。

有关详情 有关 QC 标记的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

查看原始数据曲线

必要时，查看 **Raw Data Plot**（原始数据曲线）以检查 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪采集的原始光谱是否存在不规则性。

Raw Data Plot（原始数据曲线）显示 **Show Cycle**（显示循环）滑块指示的运行循环期间在每个通道（1 至 3）中采集的原始荧光的幅度。该曲线显示在反应板布局或反应孔表中选择的反应孔的原始光谱。

关于示例实验数据 在示例实验中，您可从相应光学滤光器查看 **Raw Data Plot**（原始数据曲线）屏幕有无信号的稳定增长（无突变或下降）。

- 查看曲线**
1. 在导航窗格中，选择  **Raw Data Plot**（原始数据曲线）。
 2. 在反应孔表中，选择您要检查的反应孔。
 3. 单击  **Show a legend for the plot**（显示曲线图例）（默认）。

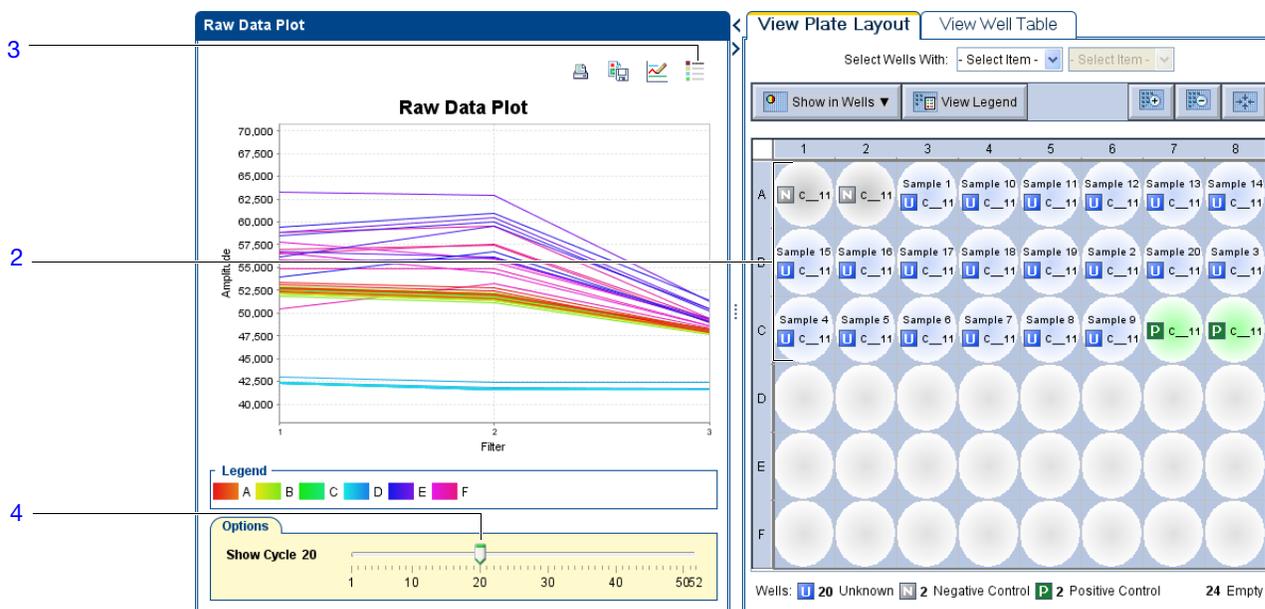
注意： 这是一个切换按钮。当显示图例时，该按钮更改为 **Hide the plot legend**（隐藏曲线图例）。

注意： 图例会显示反应板每一行的颜色代码。

4. 拖动 Show Cycle （显示循环）滑块以查看原始数据曲线的每个滤光器的临时变化。这些滤光器为：

StepOne 系统		StepOnePlus 系统	
滤光器	染料	滤光器	染料
1	FAM™ 染料	1	FAM™ 染料
	SYBR® Green 染料		SYBR® Green 染料
2	JOE™ 染料	2	JOE™ 染料
	VIC® 染料		VIC® 染料
3	ROX™ 染料	3	TAMRA™ 染料
			NED™ 染料
		4	ROX™ 染料

下图显示示例基因分型实验的原始数据。



分析指南 当您分析自己的实验时，请检查每个滤光器的以下项目：

- 特征性信号增长
- 无突变或下降

有关详情 有关 Raw Data Plot （原始数据曲线）的详情，请单击 或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help （StepOne 软件帮助）。

笔记

查看多组分曲线

Multicomponent Plot（多组分曲线）显示 PCR 运行期间所选反应孔中每种染料的完整光谱表现。

关于示例实验数据 在示例实验中，查看 Multicomponent Plot（多组分曲线），以检查：

- ROX™ 染料（参比荧光）
- FAM™ 染料（报告基团）
- 尖峰、下降和/或突变
- 阴性对照反应孔中的扩增

查看 Multicomponent Plot（多组分曲线）

1. 在导航栏中，选择  **Multicomponent Plot**（多组分曲线）。
2. 在反应板布局中选择一个未知反应孔，以在 Multicomponent Plot（多组分曲线）屏幕上显示相应数据。

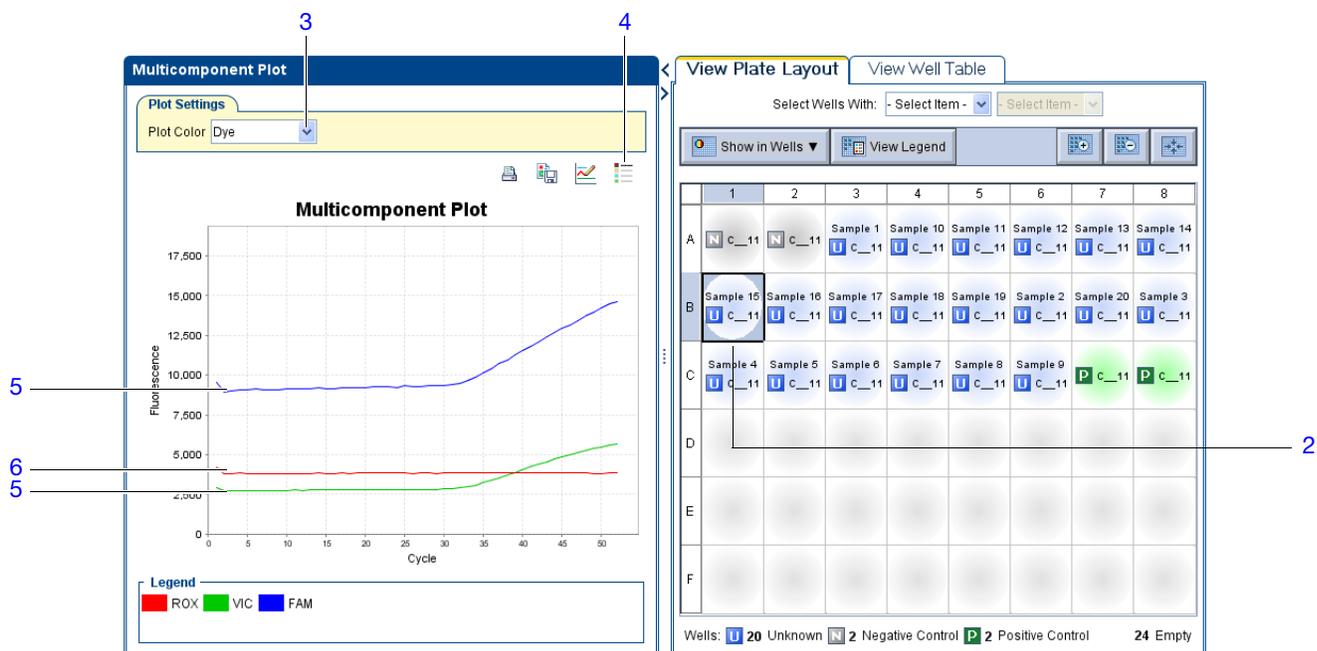
注意：如果您选择多个反应孔，则 Multicomponent Plot（多组分曲线）屏幕同时显示所有所选反应孔的数据。

3. 从 Plot Color（曲线颜色）下拉菜单中，选择 **Dye**（染料）。
4. 单击  **Show a legend for the plot**（显示曲线图例）（默认）。

注意：这是一个切换按钮。当显示图例时，该按钮更改为 **Hide the plot legend**（隐藏曲线图例）。

5. 检查 FAM™ 和 VIC® 染料信号。在示例实验中，FAM™ 和 VIC® 染料信号在整个 PCR 扩增期间不断增长，表示扩增正常。
6. 检查 ROX® 染料信号。在示例实验中，ROX 染料信号在整个 PCR 处理期间保持稳定，为典型数据。
7. 一次选择一个阴性对照反应孔并检查其有无扩增。在示例实验中，阴性对照反应孔中无扩增。

笔记



分析指南 当您分析自己的实验时，请查看：

- 参比荧光 — 参比染料荧光水平应在 PCR 处理期间保持相对稳定。
- 报告染料 — 报告染料荧光含量应显示与基线相应的平直区域，当扩增进行时荧光快速增长。
- 信号中的任何异常 — 荧光信号中应无任何尖峰、下降和/或突变。
- 阴性对照反应孔 — 阴性对照反应孔中应无任何扩增。

有关详情 有关 Multicomponent Plot（多组分曲线）的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

笔记

查看扩增曲线

若您为实验采集实时数据，则查看扩增数据以进一步了解实验数据导致的标记。

Amplification Plot（扩增曲线）屏幕上显示所选反应孔内所有样本的扩增情况。使用扩增曲线确认实验结果：

- **ΔR_n 随循环变化** – ΔR_n 是 PCR 扩增前荧光信号读取与 PCR 扩增后荧光信号读取之间，报告基团生成的归一化荧光信号的差异。此曲线将 ΔR_n 作为循环数的一个函数显示。您可通过此曲线来识别并检查不规则扩增，并查看运行的阈值和基线值。
- **R_n 随循环变化** – R_n 是归一化为参比荧光的荧光信号的报告染料荧光信号。此曲线将 R_n 作为循环数的一个函数显示。您可通过此曲线来识别和检查不规则扩增。
- **C_T 随反应孔变化** – C_T 是荧光达到扩增曲线中的阈值时的 PCR 循环数。此曲线将阈值循环 (C_T) 作为反应孔位置的函数显示。您可使用此曲线查找异常扩增（异常值）。

每条曲线可采用下列图形方式查看：线性或 \log_{10} 。

注意：有关 Amplification Plots（扩增曲线）的详情，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 试剂指南》或 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

关于示例实验数据

在示例实验中，查看 Amplification Plot（扩增曲线），以检查：

- 基线值和阈值是否正确
- 有无异常值

查看结果

1. 在导航栏中，选择  **Amplification Plot**（扩增曲线）。

2. 在 Amplification Plot（扩增曲线）中：

- 从 Plot Type（曲线类型）下拉菜单中，选择 **ΔR_n vs Cycle**（ ΔR_n 随循环变化）。
- 从 Plot Color（曲线颜色）下拉菜单中，选择 **Allele**（等位基因）。
- 单击  **Show a legend for the plot**（显示曲线图例）（默认）。

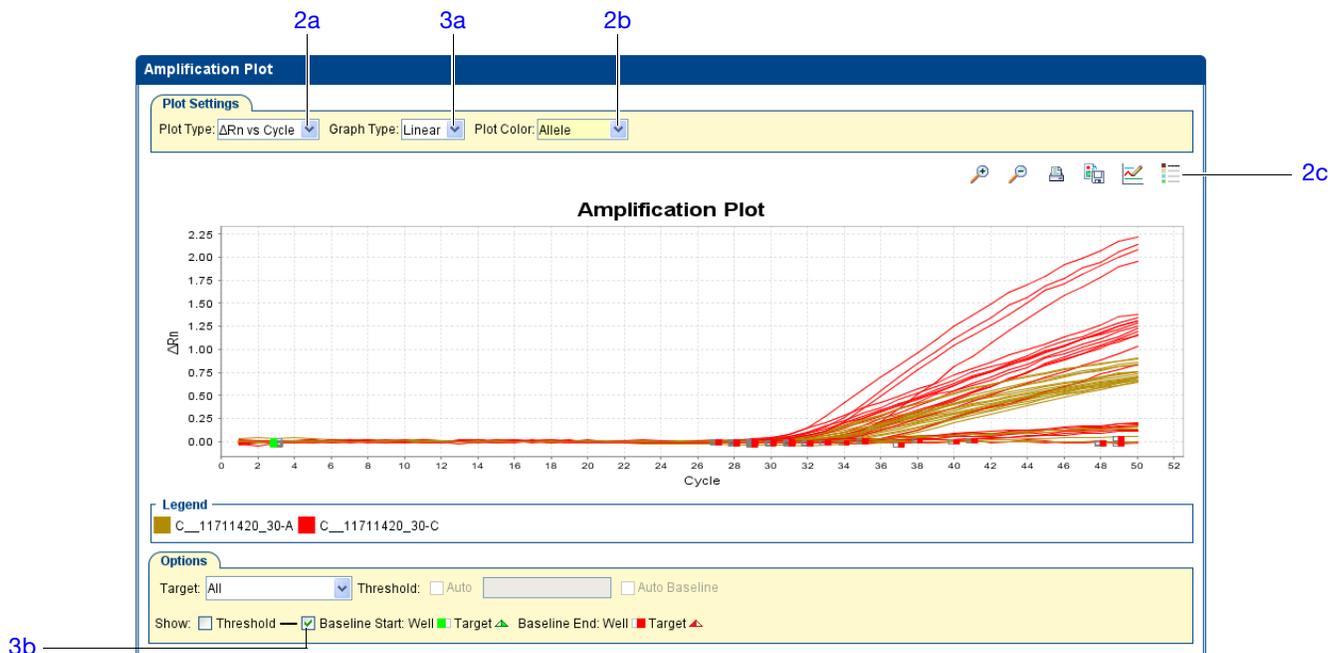
注意：这是一个切换按钮。当显示图例时，该按钮更改为 **Hide the plot legend**（隐藏曲线图例）。

3. 查看基线值：

- 从 Graph Type（图形类型）下拉菜单中，选择 **Linear**（线性）。
- 选择 **Baseline**（基线），以显示开始循环和结束循环。

笔记

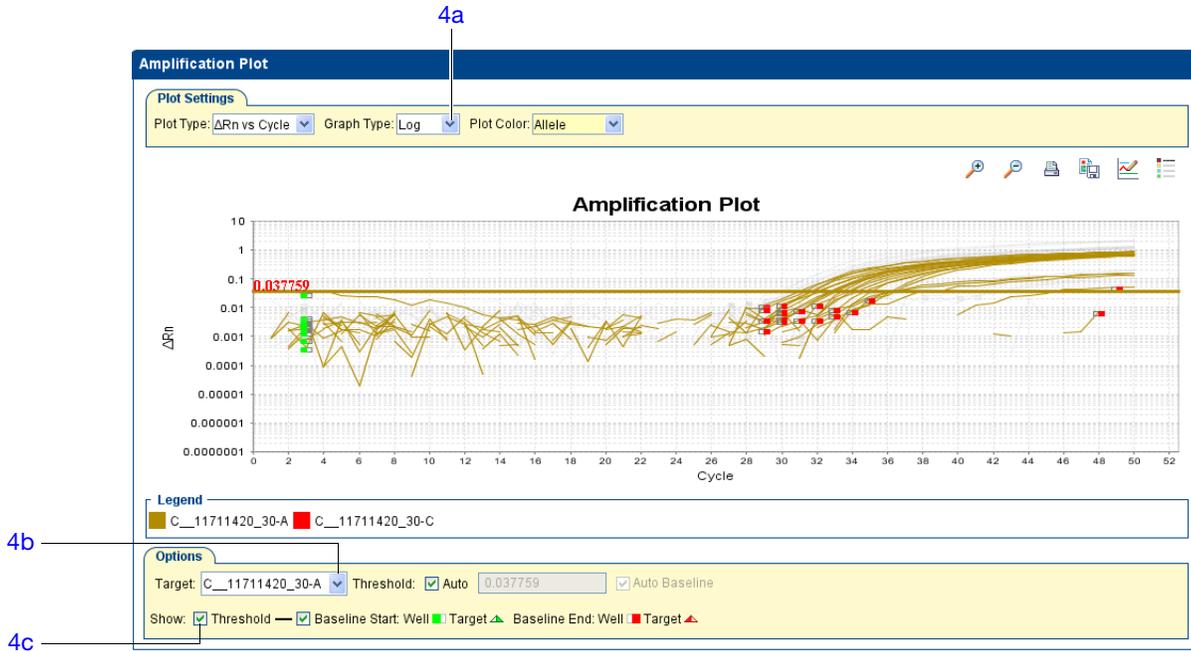
- c. 检查并确认基线设置正确：结束循环应设置为在其中检测到显著荧光信号的循环数之前的几个循环。在示例实验中，基线设置正确。



4. 查看阈值：

- 从 Graph Type（图形类型）下拉菜单中，选择 **Log**（对数）。
- 从 Target（靶）下拉菜单中，选择 **C_11711420_30-A**。
- 选择 **Threshold**（阈值）以显示阈值。
- 确认阈值设置是正确的。在示例实验中，阈值位于指数级扩增阶段。
- 为 **C_11711420_30-C** 重复步骤 4a 至 4d。

笔记



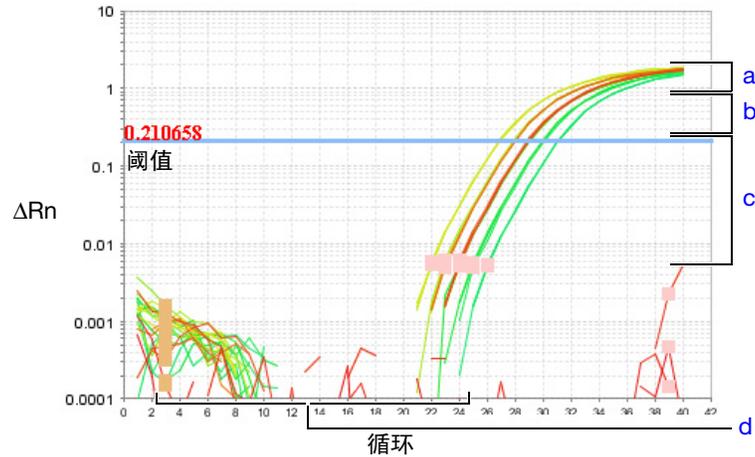
5. 查找任何异常值:

- 从 Plot Type（曲线类型）下拉菜单中，选择 C_T vs Well（ C_T 随反应孔变化）。
- 确认重复反应孔已达到类似扩增。示例实验未使用重复反应孔。

分析指南 当您分析自己的实验时，请查看：

- 有无异常值
- 有无典型扩增曲线 — StepOne 软件自动计算基线值和阈值（基于数据显示典型扩增曲线的假定）。典型扩增曲线具有四个不同的部分：
 - 平台期
 - 线性期
 - 指数级增长期（几何级增长期）
 - 基线

笔记



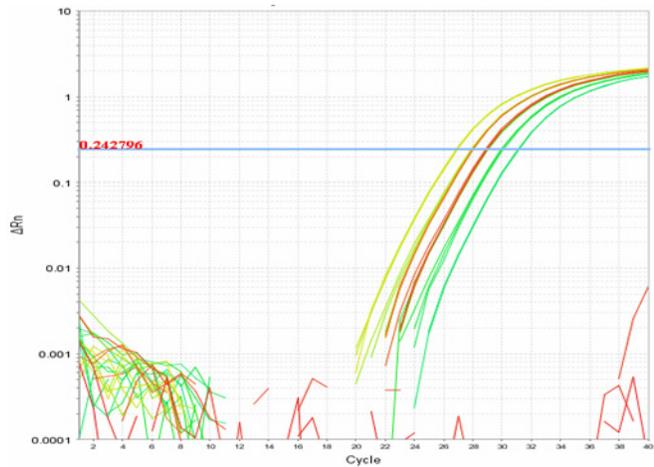
切记！实验性错误（如污染物或移液错误）可产生非典型扩增曲线，从而导致 StepOne 软件计算出错误的基线值和阈值。因此，Applied Biosystems 建议您在分析完成后检查 Amplification Plot（扩增曲线）屏幕，并查看为每个反应孔指定的基线值和阈值。有关详情，请参阅 *StepOne™ Software Help*（帮助）信息。

- 基线值和阈值是否正确 – 请参阅第 90 页上的阈值示例和第 91 页上的基线示例。

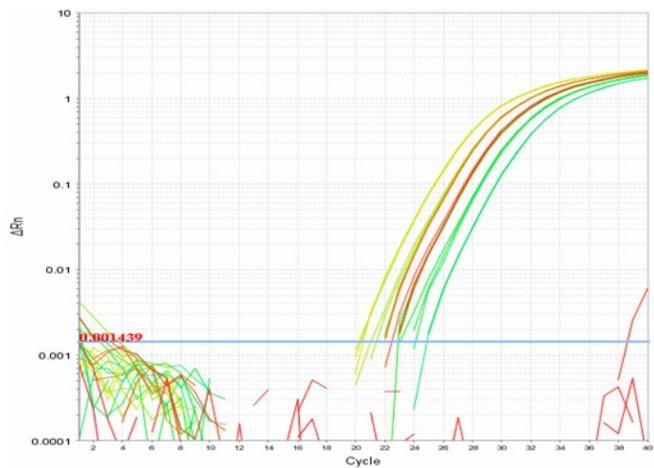
阈值设置正确

阈值设置在扩增曲线的指数级增长期之内。

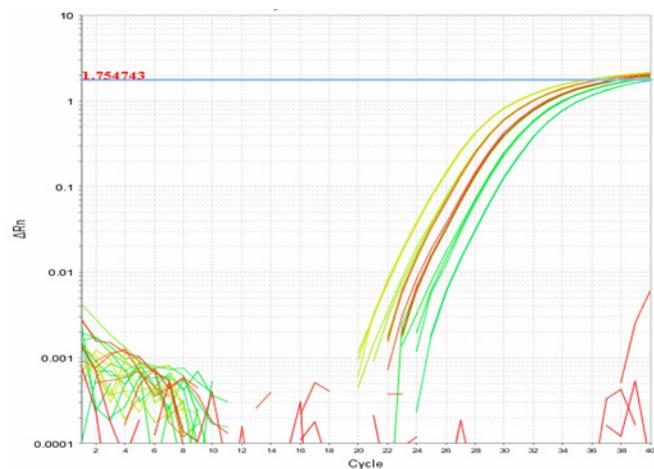
高于或低于最优化值的阈值设置将会增大重复组的标准偏差。

**阈值设置太低**

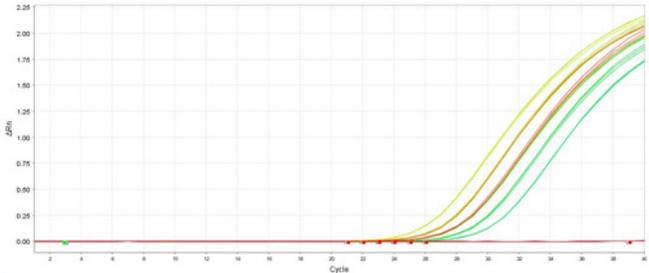
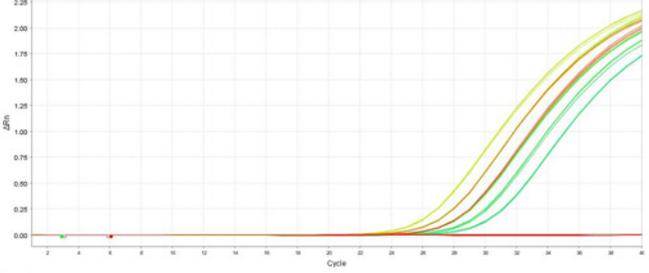
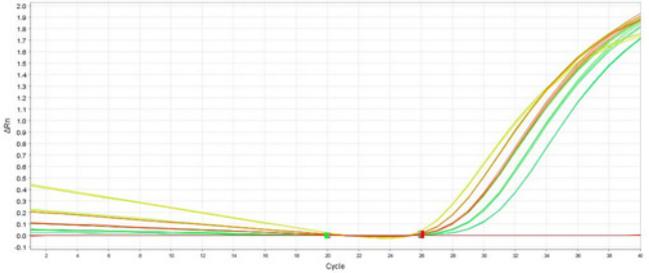
阈值设置在扩增曲线的指数级增长期之下。其标准偏差远高于正确设置阈值时曲线的标准偏差。向上拖动阈值条，使之处于扩增曲线的指数级增长期内。

**阈值设置太高**

阈值设置在扩增曲线的指数级增长期之上。其标准偏差远高于正确设置阈值时曲线的标准偏差。向下拖动阈值条，使之处于扩增曲线的指数级增长期内。



笔记 _____

<p>基线设置正确</p> <p>扩增曲线从最大基线之后开始。</p>	
<p>基线设置太低</p> <p>扩增曲线从远离最大基线的右侧位置开始。应增大 End Cycle（结束循环）的值。</p>	
<p>基线设置太高</p> <p>扩增曲线从最大基线之前开始。应减小 End Cycle（结束循环）的值。</p>	

如果您的实验不符合上述指南，则进行下列故障排除：

- 手动调整基线和/或阈值（请参阅 **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助））。
或
- 通过右键单击反应板布局中的一个反应孔并选择 **Omit**（忽略），以忽略该反应孔。

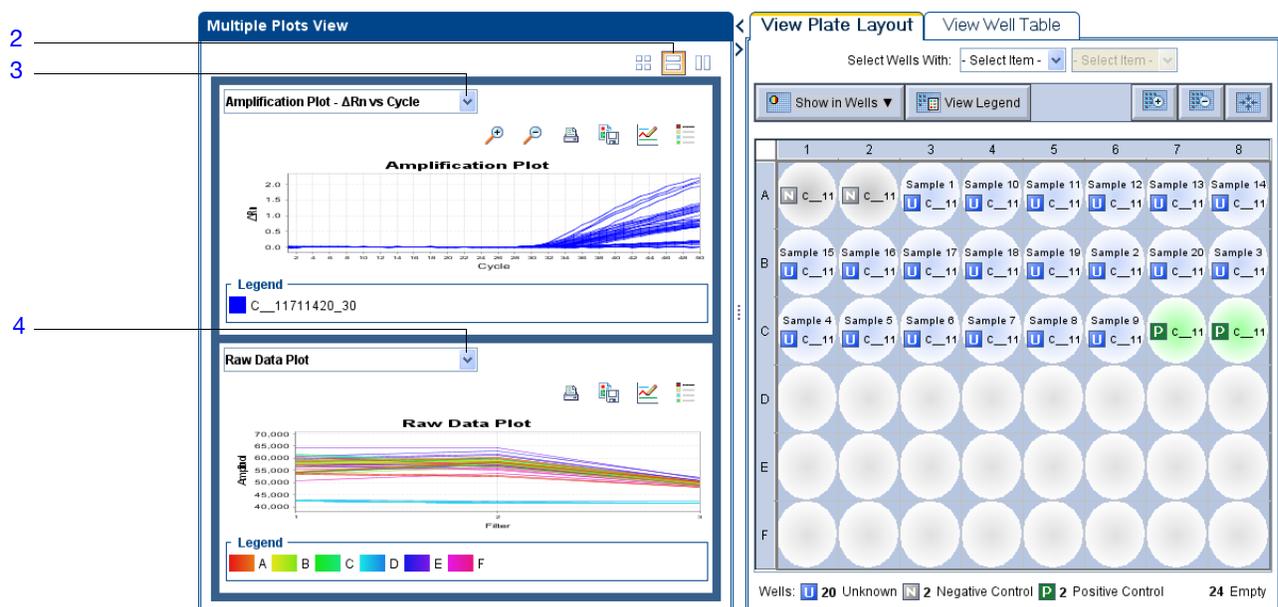
笔记 _____

如何同时查看多条曲线

多曲线视图可显示最多四条曲线以便同时分析。您可单独查看每条曲线，或以横排或竖排方式查看两条曲线，或以 2×2 矩阵方式同时查看所有曲线。

查看多条曲线中的结果：

1. 在导航栏中，选择  **Multiple Plots View**（多曲线视图）。
2. 单击  以横排（平行）显示两条曲线。
3. 在顶部曲线中，选择 **Amplification Plot (ΔR_n vs. Cycle)**（扩增曲线（ ΔR_n 随循环变化）），以查看为反应板布局中所选的几个反应孔运行的扩增结果。
4. 在底部曲线中，选择 **Raw Data Plot**（原始数据曲线），以查看反应板布局中所选的几个反应孔的原始数据。



有关详情 有关 Amplification Plot（扩增曲线）或 Multiple Plot View（多曲线视图）的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help（StepOne 软件帮助）。

查看分析设置

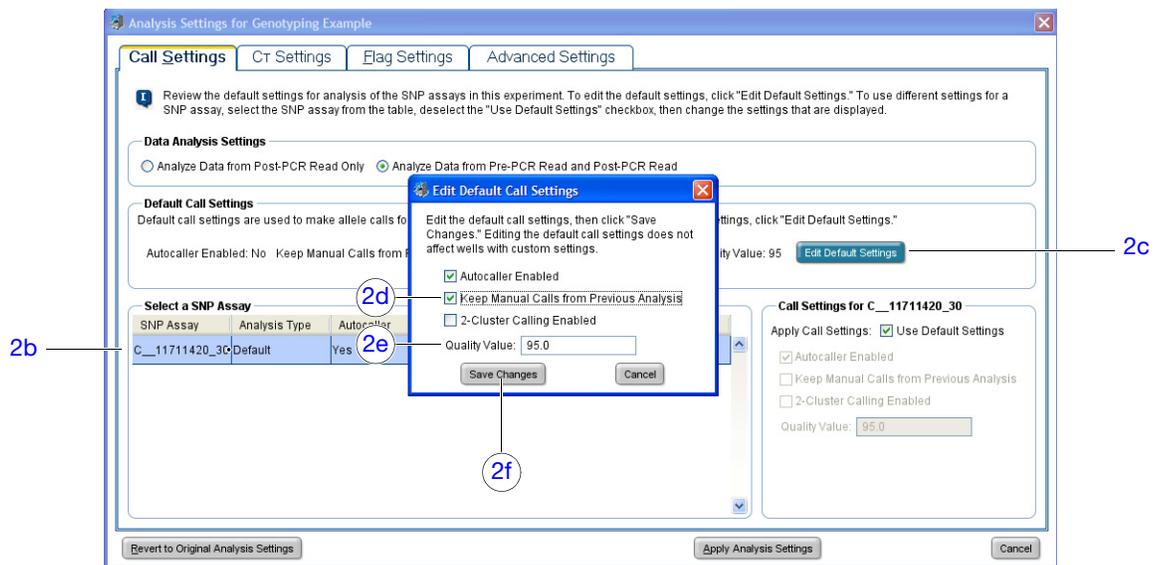
如果您不满意 StepOne 软件识别基因型的方式或 QC 标记的阈值，则应查看分析设置和/或识别并根据需要进行调整。

关于示例实验数据

在示例实验中，查看分析设置并根据需要进行调整，以了解识别、 C_T 和标记设置对分析基因分型数据的作用。

修改分析设置

1. 在实验中，单击 **Analysis Settings**（分析设置）。
2. 调整识别设置：
 - a. 选择 **Call Settings**（识别设置）选项卡。
 - b. 从 **Select a SNP Assay**（选择一种单核苷酸多态性检测）表中选择 **C__11711420_30**。
 - c. 单击 **Edit Default Settings**（调整默认设置）。
 - d. 如果您已进行手动识别，则在 **Edit Default Call Settings**（调整默认识别设置）对话框中选择 **Keep Manual Calls from Previous Analysis**（保留先前分析中的手动识别）。
 - e. 在 **Quality Value**（质量值）字段中，输入一个百分比值以用作自动识别样本的质量间隔。此值越大，等位基因识别就越严格。
 - f. 单击 **Save Changes**（保存更改）保存您的设置。

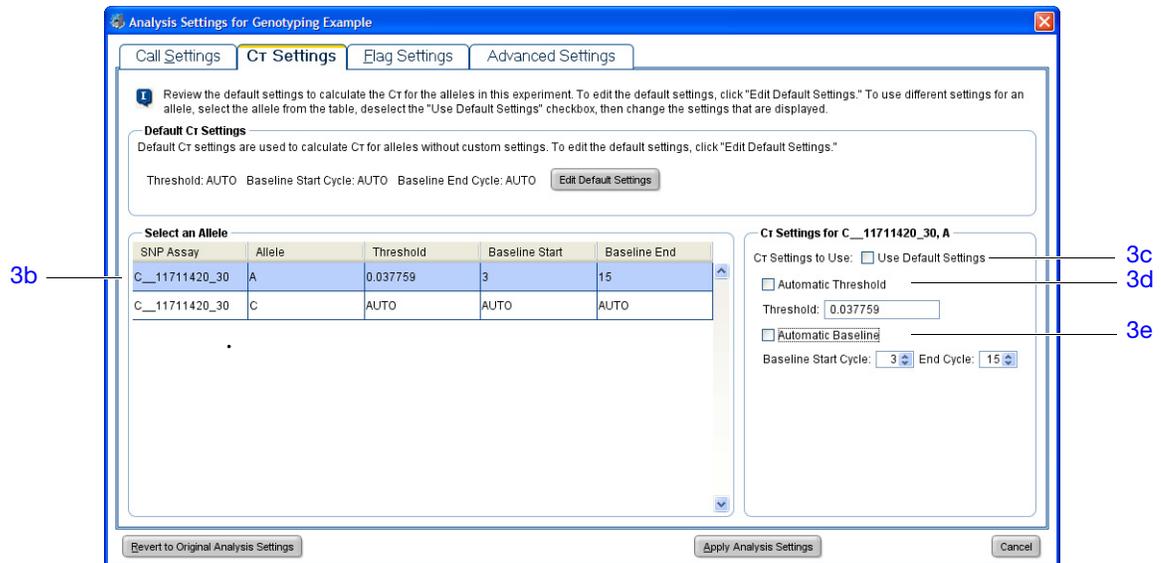


笔记

3. 调整 C_T 设置:

- 选择 **C_T Settings** (C_T 设置) 选项卡。
- 从 **Select an Allele** (选择等位基因) 表中选择等位基因 **A**。
- 取消选取 **Use Default Settings** (使用默认设置)。
- 取消选取 **Automatic Threshold** (自动阈值), 然后输入一个新阈值。
- 取消选取 **Automatic Baseline** (自动基线), 然后输入新基线值。
- 为等位基因 **C** 重复步骤 3b 至 3e。

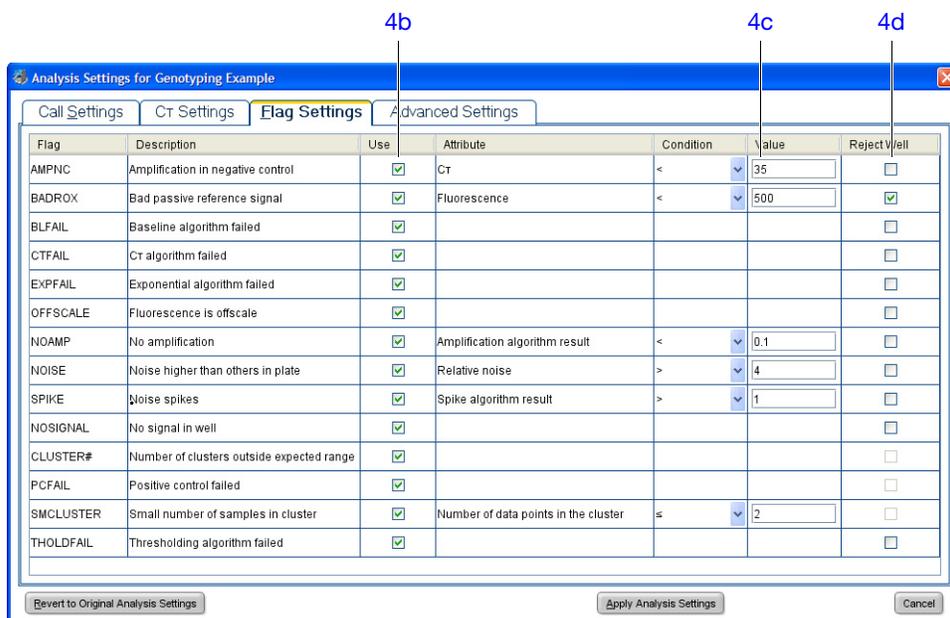
注意: 有关设置基因分型运行的阈值循环的详情, 请参阅 **StepOne Software Help** (StepOne 软件帮助)。



4. 调整标记设置:

- 选择 **Flag Settings** (标记设置) 选项卡。
- 在 **Use** (使用) 列中, 选择您想要启用的每个标记的复选框。
- 根据需要调整被启用标记的值。
- 若您想要被启用的 QC 标记自动忽略对其定义的状态测试呈阳性的反应孔, 则为该标记选择 **Reject Well** (拒绝反应孔) 复选框。

注意: 在符合特定条件时 (例如, 当反应孔缺少数据时), QC 标记允许您标记状态并忽略反应孔。有关详情, 请参阅 **StepOne Software Help** (StepOne 软件帮助)。



5. 单击 **Apply Analysis Settings**（应用分析设置）。

6. 单击 **Reanalyze**（重新分析）以使用新设置分析数据。

分析指南 当您分析自己的实验时：

- 如果您的实验仅包括两个聚类，从 **Edit Default SNP Assay Settings**（调整默认单核苷酸多态性检测设置）对话框中选择 **2-Cluster Calling Enabled**（启用 2 个聚类识别），以激活 2 个聚类识别算法。
- **C_T Settings**（C_T 设置）仅可用于包括扩增数据的实验。仅包括 PCR 扩增前和 PCR 扩增后荧光信号读取的实验不使用阈值循环 (C_T) 系统进行分析。
- 您可采用以下方式识别样本数据：
 - 自动，使用 **Autocaller**（自动识别）功能（请参阅第 96 页）
 - 手动，使用工具栏和散点图（请参阅第 97 页）

有关详情 有关 **Analysis Settings**（分析设置）的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助）。

笔记

指定自动识别

1. 在实验中，单击 **Analysis Settings**（分析设置）。
2. 从 **Select a SNP Assay**（选择一种单核苷酸多态性检测）表中选择所需单核苷酸多态性检测。
3. 单击 **Edit Default Settings**（调整默认设置）。
4. 如果您已进行手动识别，则选择 **Keep Manual Calls from Previous Analysis**（保留先前分析中的手动识别）。
5. 选择 **Autocaller Enabled**（启用自动识别）以激活自动分析。
6. 若您期望分析的数据仅包括两个聚类，则选择 **2-Cluster Calling Enabled**（启用 2 个聚类识别）。
7. 在 **Quality Value**（质量值）字段中，输入一个百分比值以用作自动识别样本的质量间隔。（此值越大，等位基因识别就越严格。）
8. 单击 **Save Changes**（保存更改）保存您的设置。
9. （可选）指定标记：
 - a. 选择 **Flag Settings**（标记设置）选项卡。
 - b. 根据需要指定标记。

注意： 当您指定标记时，在符合特定条件时（例如，当反应孔缺少数据时），您可标记状态并忽略反应孔。有关详情，请参阅 *StepOne™ Software Help*（帮助）信息。

 - c. 单击 **Apply Analysis Settings**（应用分析设置）以关闭 **Analysis Settings**（分析设置）对话框。
10. 单击 **Reanalyze**（重新分析）以使用新设置分析数据。

指定手动识别

1. 在实验中，单击 **Analysis Settings**（分析设置）。
2. 从 **Select a SNP Assay**（选择一种单核苷酸多态性检测）表中选择所需单核苷酸多态性检测。
3. 设置标记分析设置：
 - a. 单击 **Edit Default Settings**（调整默认设置）。
 - b. 取消选取 **Autocaller Enabled**（启用自动识别）。
 - c. 单击 **Save Changes**（保存更改）保存您的设置。
4. （可选）指定标记：
 - a. 选择 **Flag Settings**（标记设置）选项卡。
 - b. 根据需要指定标记。

注意： 当您指定标记时，在符合特定条件时（例如，当反应孔缺少数据时），您可标记状态并忽略反应孔。有关详情，请参阅 *StepOne™ Software Help*（帮助）信息。

 - c. 单击 **Apply Analysis Settings**（应用分析设置）。
5. 单击 **Reanalyze**（重新分析）以使用新设置分析数据。
6. 在导航栏中，选择  **Allelic Discrimination Plot**（等位基因鉴别曲线）。
7. 从 **SNP Assay**（单核苷酸多态性检测）菜单中选择一种标记。Allelic Discrimination Plot（等位基因鉴别曲线）中显示代表所选标记的十字标记（× — Undetermined（不确定））。
8. 赋予识别标记：
 - a. 单击 （选择工具）。
 - b. 在图中的所需数据点周围单击并拖放一个框。
 - c. 在 **Apply Call**（应用识别）菜单中，选择所需识别。
 - d. 重复步骤 8b 和 8c 以将识别应用到剩余数据点。
9. 若您正在为多个单核苷酸多态性检测指定识别标记，请从单核苷酸多态性检测下拉菜单中选择不同的标记并重复步骤 8。

笔记

公布数据

您以下列几种方式公布实验数据：

- 将曲线另存为图像文件
- 打印曲线
- 打印反应板布局
- 创建幻灯片
- 打印报告
- 导出数据

有关详情 有关公布数据的详情，请单击  或按 **F1** 键以访问 StepOne Software Help (StepOne 软件帮助)。



替代实验工作流程

A

本附录包括：

- **Advanced Setup**（高级设置）工作流程..... 102
- **QuickStart** 工作流程 103
- **Template**（模板）工作流程..... 105
- **Export/Import**（导出/导入）工作流程..... 107

注意： 有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键或单击工具栏中的 ，或依次选择 **Help**（帮助）▶ **StepOne Software Help**（StepOne 软件帮助），以访问 Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software v2.0 的 **Help**（帮助）信息。

笔记

Advanced Setup (高级设置) 工作流程

当您使用 StepOne™ 软件中的 Advanced Setup (高级设置) 创建实验时, 可根据您的设计设置实验。

1. 双击  (StepOne 软件快捷图标) 或依次选择 **Start** (开始) ▶ **All Programs** (所有程序) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software** (StepOne 软件) ▶ **<软件名>**

其中, <软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

2. 从 Home (主页) 屏幕上, 单击  **Advanced Setup** (高级设置)。

注意: 如果您未看到 Advanced Setup (高级设置) 图标, 单击 Design Wizard (设计向导) 图标下方的箭头以扩展 Set Up (设置) 菜单。

3. 完成设置屏幕以设置新实验:

- a. 单击  **Experiment Properties** (实验属性) (默认), 输入实验名称, 然后选择实验属性。

- b. 单击  **Plate Setup** (反应板设置):

实验类型	操作
基因分型	定义 SNP 检测, 然后将它们分配到反应板的反应孔中。
所有其它实验	定义靶序列, 然后将它们分配到反应板的反应孔中。

- c. 单击  **Run Method** (运行方法), 查看反应体积和温度变化过程, 然后根据需要进行调整。

- d. 单击  **Reaction Setup** (反应设置), 查看 PCR 反应的组分和计算的剂量, 然后根据需要进行调整。

- e. (可选) 单击  **Materials List** (材料列表), 查看材料列表, 然后订购您需要准备反应板的材料。

4. 准备 PCR 反应:

实验类型	操作
相对标准曲线	<ol style="list-style-type: none"> a. 准备模板。 b. 准备样本稀释。 c. 准备标准品稀释序列。 d. 准备反应预混液。 e. 准备反应板。
标准曲线	

笔记

实验类型	操作
比较 C_T	a. 准备模板。
基因分型	b. 准备样本稀释。
存在/不存在	c. 准备反应预混液。
	d. 准备反应板。

5. 运行实验：

- a. 将反应板装入扩增仪。
- b. 开始运行反应板
- c. (可选) 监视运行。
- d. 从扩增仪上卸载反应板。

6. 分析数据：

- a. 在 StepOne 软件中打开实验。
- b. 从 Experiment Menu (实验菜单) 中，单击 **Analysis** (分析)。
- c. 如果未分析数据，则单击 **Analyze** (分析)。
- d. 在导航窗格中，选择分析屏幕以查看数据 (例如，选择 **QC Summary** (QC 摘要) 以查看数据的质控摘要)。

QuickStart 工作流程

当您使用 QuickStart 工作流程创建实验时，您可在扩增仪上运行反应而无需反应板设置信息。

1. 准备 PCR 反应：

实验类型	操作
相对标准曲线	a. 准备模板。
标准曲线	b. 准备样本稀释。
	c. 准备标准品稀释序列。
	d. 准备反应预混液。
	e. 准备反应板。
比较 C_T	a. 准备模板。
基因分型	b. 准备样本稀释。
存在/不存在	c. 准备反应预混液。
	d. 准备反应板。

笔记 _____

2. 启动 QuickStart 实验:

- a. 双击  (StepOne 软件快捷图标) 或依次选择 **Start** (开始)
 - ▶ **All Programs** (所有程序) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software** (StepOne 软件) ▶ **<软件名>**
 其中, <软件名>是 StepOne 软件的当前版本。
- b. 从 Home (主页) 屏幕上, 单击  **QuickStart** (快速启动)。
- c. 选择 **Experiment Properties** (实验属性) 选项卡 (默认), 输入实验名称, 然后选择实验属性。
- d. 选择 **Run Method** (运行方法) 选项卡, 查看反应体积和温度变化过程, 然后根据需要进行调整。

3. 运行实验:

- a. 将反应板装入扩增仪。
- b. 开始运行反应板
- c. (可选) 监视运行。
- d. 从扩增仪上卸载反应板。

4. 在 StepOne 软件中, 完成反应板设置:

实验类型	操作
基因分型	<ol style="list-style-type: none"> a. 选择并完成 Define SNP Assays and Samples (定义 SNP 检测和样本) 选项卡。 b. 选择并完成 Assign SNP Assays and Samples (指定 SNP 检测和样本) 选项卡。
所有其它实验	<ol style="list-style-type: none"> a. 选择并完成 Define Targets and Samples (定义靶序列和样本) 选项卡。 b. 选择并完成 Assign Targets and Samples (指定靶序列和样本) 选项卡。

5. 分析数据:

- a. 在 StepOne 软件中打开实验。
- b. 从 Experiment Menu (实验菜单) 中, 单击 **Analysis** (分析)。
- c. 如果未分析数据, 则单击 **Analyze** (分析)。
- d. 在导航窗格中, 选择分析屏幕以查看数据 (例如, 选择 **QC Summary** (QC 摘要) 以查看数据的质控摘要)。

Template (模板) 工作流程

您可使用模板以创建新实验。当您创建许多具有相同设置信息的实验时，模板会非常有用。

创建模板

1. 双击  (StepOne 软件快捷图标) 或依次选择 **Start** (开始) ▶ **All Programs** (所有程序) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software** (StepOne 软件) ▶ **<软件名>**

其中，<软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

2. 打开某个现有实验，或创建一个新实验。

注意： 您可以使用 **Design Wizard** (设计向导) (请参阅第 2 章) 或 **Advanced Setup** (高级设置) (请参阅第 102 页) 创建一个新实验。

3. 选择 **File** (文件) ▶ **Save As Template** (另存为模板)。
4. 输入文件名，选择模板位置，然后单击 **Save** (保存)。
5. 单击  **Close** (关闭)。

使用模板创建实验

1. 从 Home (主页) 屏幕上，单击  **Template** (模板)。

注意： 如果您未看到 **Template** (模板) 图标，单击 **Design Wizard** (设计向导) 图标下方的箭头以扩展 **Set Up** (设置) 菜单。

2. 找到并选择您在步骤 d 中创建的模板，然后单击 **Open** (打开)。使用来自模板的设置信息创建新实验：
 - 实验属性
 - 反应板设置
 - 运行方法
 - 反应设置
3. (可选) 如果您要修改实验，使用 **Advanced Setup** (高级设置) (请参阅第 102 页)。
4. 单击  **Save** (保存)，输入文件名，然后单击 **Save** (保存) 以保存该实验。

笔记 _____

5. 准备 PCR 反应:

实验类型	操作
相对标准曲线	a. 准备模板。 b. 准备样本稀释。 c. 准备标准品稀释序列。 d. 准备反应预混液。 e. 准备反应板。
标准曲线	
比较 C_T	a. 准备模板。 b. 准备样本稀释。 c. 准备反应预混液。 d. 准备反应板。
基因分型	
存在/不存在	

6. 运行实验:

- a. 将反应板装入扩增仪。
- b. 开始运行反应板
- c. (可选) 监视运行。
- d. 从扩增仪上卸载反应板。

7. 分析数据:

- a. 在 StepOne 软件中打开实验。
- b. 从 Experiment Menu (实验菜单) 中, 单击 **Analysis** (分析)。
- c. 如果未分析数据, 则单击 **Analyze** (分析)。
- d. 在导航窗格中, 选择分析屏幕以查看数据 (例如, 选择 **QC Summary** (QC 摘要) 以查看数据的质控摘要)。

Export/Import (导出/导入) 工作流程

使用 Export/Import (导出/导入) 工作流程以使用从另一个实验导出的设置数据设置新实验。仅导出和导入了反应板设置数据。

注意： 可将从 StepOne Software v1.0 的实验中导出的设置数据导入 StepOne Software v2.0 或更高版本的实验中。但不能将从 StepOne Software v2.0 或更高版本的实验中导出的设置数据导入 StepOne Software v1.0 的实验中。

导出设置数据

1. 双击  (StepOne 软件快捷图标) 或依次选择 **Start** (开始) ▶ **All Programs** (所有程序) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne Software** (StepOne 软件) ▶ **<软件名>**

其中, <软件名>是 StepOne 软件的当前版本。

2. 打开某个现有实验, 或创建一个新实验。

注意: 您可以使用 **Design Wizard** (设计向导) (请参阅第 2 章) 或 **Advanced Setup** (高级设置) (请参阅第 102 页) 创建一个新实验。

3. 选择 **File** (文件) ▶ **Export** (导出)。
4. 选择 **Export Properties** (导出属性) 选项卡 (默认), 然后:
 - a. 选择 **Setup** (设置)。
 - b. 从下拉菜单中选择 **One File** (一个文件)。
 - c. 输入名称, 然后为导出文件选择一个位置。
 - d. 从 **File Type** (文件类型) 下拉菜单中选择  (*.txt)。

切记! 您不能导出 *.xml 文件。

5. (可选) 单击 **Customize Export** (自定义导出) 选项卡, 然后选择适当的选项。
6. 单击 **Start Export** (开始导出),
7. 当出现提示时, 单击 **Close Export Tool** (关闭导出工具)。

使用导出的文本文件创建实验

您可导入导出文本文件 (*.txt) 的反应板设置数据以完成您的实验的反应板设置数据。

切记! 确保您选择的导出文本文件仅含有反应板设置数据且实验类型匹配。

笔记

1. 从导出文本文件中导入反应板设置数据：
 - a. 使用某种电子表格应用程序（例如 Microsoft® Excel 软件），打开导出的文本文件。
 - b. 根据需要，替换文本文件中的参数。完成时，将该文件另存为制表符分隔文本文件。
 - c. 从 Home（主页）屏幕上，单击  **Advanced Setup**（高级设置）。

注意：如果您未看到 **Advanced Setup**（高级设置）图标，单击 **Design Wizard**（设计向导）图标下方的箭头以扩展 **Set Up**（设置）菜单。

- d. 创建一个新实验或打开某个现有实验。
- e. 选择 **File**（文件） ▶ **Import**（导入）。
- f. 单击 **Browse**（浏览），找到并选择文本文件 (*.txt)，然后单击 **Select**（选择）。
- g. 单击 **Start Import**（开始导入）。将导出文本文件中的设置数据导入打开的实验。

注意：如果您的实验已经包含反应板设置信息，软件会问您是否您想用文本文件中的数据替换反应板设置。单击 **Yes**（是）以替换反应板设置。

2. 使用 **Advanced Setup**（高级设置）以完成设置您的实验（请参阅第 102 页）。
3. 准备 PCR 反应：

实验类型	操作
相对标准曲线	a. 准备模板。 b. 准备样本稀释。 c. 准备标准品稀释序列。 d. 准备反应预混液。 e. 准备反应板。
标准曲线	
比较 C_T	a. 准备模板。 b. 准备样本稀释。 c. 准备反应预混液。 d. 准备反应板。
基因分型	
存在/不存在	

4. 运行实验:
 - a. 将反应板装入扩增仪。
 - b. 开始运行反应板
 - c. (可选) 监视运行。
 - d. 从扩增仪上卸载反应板。
5. 分析数据:
 - a. 在 StepOne 软件中打开实验。
 - b. 从 Experiment Menu (实验菜单) 中, 单击 **Analysis** (分析)。
 - c. 如果未分析数据, 则单击 **Analyze** (分析)。
 - d. 在导航窗格中, 选择分析屏幕以查看数据 (例如, 选择 **QC Summary** (QC 摘要) 以查看数据的质控摘要)。

笔记



笔记

参考文献

- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., *et al.*, **1997**. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25:2657–2660.
- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., and Meyer, R.B. **1997**. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25:3718–3723.
- Kwok, S. and Higuchi, R. **1989**. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.
- Lakowicz, J.R. **1983**. Energy Transfer. In Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press 303–339.
- Lee, L. G., Connell, C. R., and Block, W. **1993**. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21:3761–3766.
- Livak, K.J., Marmaro, J., and Todd, J.A. **1995**. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening [letter]. *Nat. Genet.* 9:341–342.
- Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. **1990**. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125–128.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. **1987**. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.*, **1985**. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

术语表

AIF	参见 检测信息文件 (assay information file, AIF) 。
AutoDelta	运行方法中，用于升高或降低循环阶段每个后续循环的温度和/或增加或减少每一步骤时间的设置。当为循环阶段启用 AutoDelta 时，其设置在温度变化过程设置中用一图标指示： <ul style="list-style-type: none">• AutoDelta 启用：▲• AutoDelta 禁用：▲
C_T	参见 阈值循环 (threshold cycle, C_T) 。
delta Rn (ΔRn)	参见 基线校准后归一化报告荧光强度 (baseline-corrected normalized reporter, ΔRn) 。
EFF%	参见 扩增效率 (amplification efficiency, EFF%) 。
IPC	存在/不存在实验中，阳性内对照 (IPC) 的缩写。在 StepOne™ 软件中，指 IPC 靶序列在含有 IPC 和不含 IPC 阻断剂的反应孔中的任务。另请参见 阳性内对照 (internal positive control, IPC) 。
IPC 阻断剂 (IPC blocking agent)	添加到 PCR 反应中以阻断阳性内对照 (IPC) 扩增的试剂。
IPC+	参见 阴性对照 IPC 反应孔 (negative control-IPC wells) 。
PCR 扩增后荧光信号读取 (post-PCR read)	用于基因分型和存在/不存在实验，扩增后发生的仪器运行部分。在基因分型实验中，PCR 扩增后荧光信号读取期间采集的荧光数据在等位基因鉴别图中显示，并用于做出等位基因响应。在存在/不存在实验中，PCR 扩增后荧光信号读取期间采集的荧光数据在存在/不存在曲线中显示，并用于做出检测响应。也称为“终点荧光信号读取”。
PCR 扩增前荧光信号读取 (pre-PCR read)	用于基因分型和存在/不存在实验，扩增前发生的仪器运行部分。PCR 扩增前荧光信号读取为可选项，但建议选择此选项。PCR 扩增前荧光信号读取期间采集的荧光数据可用于归一化 PCR 扩增后荧光信号读取期间采集的荧光数据。
QuickStart	StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统中的功能，允许您在不输入反应板设置信息的情况下运行实验。QuickStart 需要并置布局，同时打开扩增仪电源开关且扩增仪 - 计算机连接完整。
R² 值 (R² value)	从标准曲线的回归线计算得出的回归系数。R ² 值表示标准曲线回归线与标准反应的单个 C _T 数据点之间的拟合程度。值 1.00 表示回归线与数据点完全拟合。
refSNP ID	标识参比 SNP (refSNP) 簇 ID 的编号。由国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的核苷酸序列变异的单核苷酸多态性数据库 (dbSNP) 生成。refSNP ID 可用于为 Applied Biosystems SNP 基因分型检测搜索 Applied Biosystems 资料库。也称为“rs 编号”。

Rn	参见 归一化报告荧光强度 (normalized reporter, Rn) 。
ROX™ 染料 (ROX dye)	Applied Biosystems 提供并在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统上预校准的染料。ROX 染料用作参比荧光。
rs 编号 (rs number)	参见 refSNP ID 。
SNP	单核苷酸多态性的缩写。SNP 可包括碱基差异或一个碱基的插入或缺失。
SYBR® Green 试剂 (SYBR Green reagents)	包含两个设计用于扩增靶序列的引物和用于检测双链 DNA 的 SYBR® Green 染料的 PCR 反应组分。
TaqMan® 试剂 (TaqMan reagents)	包含设计用于扩增靶序列的引物和设计用于检测靶扩增的 TaqMan® 探针的 PCR 反应组分。
Tm	参见 解链温度 (melting temperature, Tm) 。
VeriFlex™ 技术 (VeriFlex™ Technology)	StepOnePlus™ 扩增仪包含六个单独进行温度调节的 VeriFlex™ 样本加热块，可为 96 个样本反应孔创建最多六个不同的温度区。在 StepOne™ 软件中启用 VeriFlex 样本加热块之后，您便可以为一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置一个不同的温度。
y 轴截距 (y-intercept)	标准曲线中，回归线与 y 轴交叉点的 y 轴值。y 轴截距表示数量等于 1 的样本的期望阈值循环 (C _T)。
靶序列 (target)	您想要扩增并检测的核酸序列。
靶序列库 (Target Library)	在 StepOne™ 软件中，要添加到实验的靶序列集合。库中的靶序列包含靶序列名称、报告基团、淬灭基团和靶序列颜色。库中的靶序列可能也包含关于靶序列的注释。
靶序列颜色 (target color)	在 StepOne™ 软件中，为靶序列指定的颜色，用于在反应板布局和分析曲线中标识靶序列。
保持阶段 (holding stage)	温度变化过程中包括一个或多个步骤的阶段。您可向温度变化过程中添加一个保持阶段，以活化酶、灭活酶或孵育反应。
报告基团 (reporter)	用于检测扩增的荧光染料。若您正使用 TaqMan® 试剂，则报告染料加在 5' 端。若您正使用 SYBR® Green 试剂，则报告染料为 SYBR® Green 染料。
比较 C _T 方法 (comparative C _T (ΔΔC _T) method)	确定样本中靶序列的相对数量的方法。采用比较 C _T (ΔΔC _T) 方法，StepOne™ 软件测定样本和对照样本中靶序列和内对照的扩增情况。采用内对照归一化测量值。通过比较每份样本中靶序列的归一化数量和对照样本中靶序列的归一化数量，软件确定了每份样本中靶序列的相对数量。
标准化数量 (normalized quantity)	靶数量除以内对照数量。
标准品 (standard)	包含已知标准品数量的样本。标准品反应用于在定量实验中生成标准曲线。另请参见 标准曲线 (standard curve) 和 标准品稀释序列 (standard dilution series) 。

标准品数量 (standard quantity)	<p>PCR 反应中的已知数量。</p> <ul style="list-style-type: none"> 在标准曲线实验中，指标准品中的靶序列数量。在 StepOne™ 软件中，标准品数量的单位可以采用质量、拷贝数、病毒载量或测量靶序列数量的其它单位。 在相对标准曲线实验中，指标准品中的已知数量。标准品数量可以指 PCR 反应中 cDNA 的数量或标准品储液的数量。对于相对标准曲线实验，其单位是不相关的，因为它们在计算中相互抵消。
标准品稀释序列 (standard dilution series)	<p>标准曲线和相对标准曲线实验中，一组包含一系列已知数量的标准品。标准品稀释序列通过连续稀释标准品来准备。例如，标准品储液用于准备第一稀释点，而第一稀释点用于准备第二稀释点，依次类推。在 StepOne™ 软件中，准备标准品稀释序列所需的剂量根据稀释点的数量、标准品重复数、起始数量、序列倍数以及储液标准品浓度计算。另请参见标准曲线 (standard curve)。</p>
标准曲线 (standard curve)	<p>在标准曲线和相对标准曲线实验中：</p> <ul style="list-style-type: none"> 标准品反应产生的 C_T 值的曲线（根据标准品数量绘制）的最佳拟合线。另请参见“回归线”。 一组包含一系列已知量值的标准品。来自标准曲线反应的结果用于生成标准曲线。标准曲线根据稀释序列中点的数量、标准品重复数、起始数量和序列倍数定义。另请参见“标准品稀释序列”。
标准曲线方法 (standard curve method)	<p>用于确定样本中靶序列的绝对数量的方法。采用标准曲线方法，StepOne™ 软件测定样本和标准品稀释序列中靶序列的扩增情况。来自标准品稀释序列的数据用于生成标准曲线。软件使用标准曲线插入样本靶序列的绝对数量。另请参见标准品 (standard)和标准曲线 (standard curve)。</p>
并置布局 (colocated layout)	<p>通过黄色电缆将 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪直接连接到并置计算机的系统布局。在该布局中，您可使用并置计算机上的 StepOne™ 软件或扩增仪触摸屏控制扩增仪。</p>
步骤 (step)	<p>温度变化过程设置的组成部分。对于温度变化过程中的每个步骤，您可以设置升降温速度（解链曲线步骤的升降温增量）、保持温度、保持时间（持续时间），且您可以打开或关闭该步骤的升降温或保持部分的数据采集。对于循环阶段，也可根据 AutoDelta 状态定义一个步骤。使用含有 VeriFlex™ 样本加热块的 StepOnePlus™ 扩增仪，每个步骤包含 6 个温度（每个 VeriFlex 样本加热块 1 个）。</p>
参比荧光 (passive reference)	<p>产生荧光信号的染料。因为参比荧光信号应在所有反应孔内显示一致，因此它用于归一化荧光报告染料的荧光信号，以考虑由于各反应孔之间微小的浓度或剂量差异而产生的与 PCR 无关的荧光波动。参比荧光信号的归一化确保了可获得更高的数据精确度。</p>
触摸屏 (touchscreen)	<p>您触摸以控制 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪的显示屏。</p>
纯染料 (pure dye)	<p>参见代客合成染料 (custom dye)和系统染料 (system dye)。</p>

淬灭基团 (quencher) 加在 TaqMan® 探针的 3' 端的分子，用于防止荧光报告基团在探针未受触动时发出荧光信号。使用 TaqMan® 试剂时，无荧光淬灭基团 - 小沟结合物 (NFQ-MGB) 可用作淬灭基团。使用 SYBR® Green 试剂时，不使用淬灭基团。

切记！ Applied Biosystems 不建议将 TAMRA™ 染料在 StepOne™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。TAMRA 染料可在 StepOnePlus™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。

代客合成染料 (custom dye) 非 Applied Biosystems 提供的染料。代客合成染料可能适合于在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统上的实验中使用。当使用代客合成染料时，应将代客合成染料加入 Dye Library（染料库）并执行代客合成染料校准。

切记！ Applied Biosystems 不建议将 TAMRA™ 染料在 StepOne™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。TAMRA 染料可在 StepOnePlus™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。

单核苷酸多态性检测 (SNP assay) 用于基因分型实验中，包含用于扩增 SNP 的引物和两个用于检测不同等位基因的探针的 PCR 反应。

单核苷酸多态性检测库 (SNP assay library) 在 StepOne™ 软件中，要添加到基因分型实验的单核苷酸多态性检测的集合。库中的单核苷酸多态性检测包含单核苷酸多态性检测名称、单核苷酸多态性检测颜色以及每个等位基因的名称或碱基、报告基团、淬灭基团和等位基因颜色。库中的单核苷酸多态性检测可能也包含关于单核苷酸多态性检测的检测 ID 和注释。

等位基因 (allele) 对于一个给定的靶序列，等位基因指重复组中出现的任何不同序列。

等位基因鉴别曲线 (allelic discrimination plot) 显示 PCR 扩增后荧光信号读取采集的数据。等位基因鉴别曲线是等位基因 1 探针发出的归一化报告荧光强度信号的图表，根据等位基因 2 探针发出的归一化报告荧光强度信号绘制。

点 (point) 标准曲线中的一个标准品。标准曲线中每个点的标准品数量根据起始数量和序列倍数计算。

定量方法 (quantitation method) 在定量实验中，用于确定样本中靶序列数量的方法。在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统中，均有三种类型的定量方法：标准曲线、相对标准曲线和比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)。

订购分析产品 (made-to-order assays) 在订购时生产的 TaqMan® Gene Expression Assays 或 TaqMan® SNP Genotyping Assays。仅提供符合生产质控规格的分析产品。

独立布局 (standalone layout) 未通过黄色电缆将 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪连接到计算机的系统布局。在该布局中，您仅可使用扩增仪触摸屏控制扩增仪，且您可使用 USB 驱动器或网络连接在扩增仪和计算机之间传输数据。

对照样本 (reference sample) 在相对标准曲线和比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 实验中，用作相对定量结果基础的样本。也称为“校准品”。

多组分曲线 (multicomponent plot)	整个 PCR 运行期间所选反应孔的每种染料的完整光谱表现的曲线。
反向引物 (reverse primer)	侧向连接扩增子 3' 端的寡核苷酸。反向引物和正向引物一起在 PCR 反应中用于扩增靶序列。
反应板布局 (plate layout)	反应板中反应孔和其中所分配内含物的网格图示。在 StepOne™ 系统中，网格含有 6 行和 8 列。在 StepOnePlus™ 系统中，网格含有 8 行和 12 列。 在 StepOne™ 软件中，您可将反应板布局用作选择工具以分配反应孔内含物、查看反应孔分配以及查看结果。反应板布局可打印输出、包括在报告中、导出以及另存为演示短片以便播放。
反应预混液 (reaction mix)	包含用于运行 PCR 反应的除模板（样本、标准品或对照）之外的所有组分的溶液。
反转录酶 (reverse transcriptase)	将 RNA 转化为 cDNA 的酶。将反转录酶添加到 PCR 反应中以执行一步法 RT-PCR。
高级设置 (Advanced Setup)	StepOne™ 软件中允许您根据实验设计来设置您的实验的功能。Advanced Setup（高级设置）可在您的实验设计和设置中为您提供最大程度的灵活性。
管家基因 (housekeeping gene)	基本细胞功能中涉及的并被组成型表达的基因。管家基因也可用作内对照。另请参见内对照 (endogenous control)。
归一化报告荧光强度 (normalized reporter, Rn)	荧光报告染料产生的荧光信号被归一化为参比荧光的荧光信号。
忽略反应孔 (omit well)	重新分析前执行的操作，用于从分析中忽略一个或多个反应孔。因为算法不应用到忽略的反应孔，因此忽略的反应孔无结果。
化学试剂 (chemistry)	参见试剂 (reagents)。
回归系数 (regression coefficients)	从标准曲线中的回归线计算得出的值，包括 R ² 值、斜率和 y 轴截距。您可使用回归系数评估标准品的结果质量。另请参见“标准曲线”。
回归线 (regression line)	标准曲线和相对标准曲线实验中，标准曲线的最佳拟合线。回归线公式： $C_T = m [\log (Qty)] + b$ 其中，m 指斜率，b 指 y 轴截距，Qty 指标准数量。 另请参见回归系数 (regression coefficients)。
基线 (baseline)	在扩增曲线上，适合 PCR 起始阶段的荧光水平，在此基线下荧光信号几乎没有改变。

基线校准后归一化报告荧光强度 (baseline-corrected normalized reporter, ΔR_n)	<p>荧光报告基团生成的归一化荧光信号的量值：</p> <ol style="list-style-type: none"> 在含有实时 PCR 数据的实验中，PCR 扩增期间每一循环荧光报告基团生成的归一化荧光信号的量值。在 ΔR_n 和循环扩增曲线中，每一循环的 ΔR_n 计算如下： $\Delta R_n (\text{循环}) = R_n (\text{循环}) - R_n (\text{基线})$ 其中 R_n = 归一化报告荧光信号强度 在基因分型实验和存在/不存在实验中，在 PCR 扩增前荧光信号读取与 PCR 扩增后荧光信号读取之间报告了归一化荧光信号生成的差异。在等位基因鉴别曲线（基因分型实验）和存在/不存在曲线（存在/不存在实验）中，ΔR_n 计算如下： $\Delta R_n = R_n (\text{PCR 扩增后荧光信号读取}) - R_n (\text{PCR 扩增前荧光信号读取})$ 其中 R_n = 归一化报告荧光信号强度 <p>另请参见归一化报告荧光强度 (normalized reporter, R_n)。</p>
检测 (assay)	StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统中的一种 PCR 反应预混液，包含用于扩增靶序列的引物和用于检测扩增的靶序列的试剂。
检测 ID (Assay ID)	Applied Biosystems 对 TaqMan® Gene Expression Assays 和 TaqMan® SNP Genotyping Assays 指定的标识。
检测信息文件 (assay information file, AIF)	随每个检测指示提供的光盘上的数据文件。文件名包括反应板条码上的编号。AIF 中的信息采用制表符分隔格式提供。
检测预混液 (assay mix)	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays 和 TaqMan® SNP Genotyping Assays 中的 PCR 反应组分。检测预混液包含设计用于扩增靶序列的引物和设计用于检测靶扩增的 TaqMan® 探针。
阶段 (stage)	温度变化过程中一个或多个步骤的组合。有三种类型的阶段：保持阶段（包括 PCR 扩增前读取和 PCR 扩增后读取）、循环阶段（也称为“扩增阶段”）和解链曲线阶段。
解链曲线 (melt curve)	解链曲线阶段所采集数据的曲线。解链曲线的峰值可表示靶序列的解链温度 (T_m) 或可识别非特异性 PCR 扩增。在 StepOne™ 软件中，您可将解链曲线视为归一化报告荧光强度 (R_n) 随温度的变化，或衍生报告荧光强度 ($-R_n'$) 随温度的变化。也称为“熔解曲线”。
解链曲线阶段 (melt curve stage)	温度变化过程中具有温度增量以生成解链曲线的阶段。
解链温度 (melting temperature, T_m)	解链曲线实验中，其中 50% DNA 为双链 DNA，50% DNA 解离为单链 DNA 的温度。 T_m 在解链曲线中显示。
拒绝反应孔 (reject well)	分析期间软件执行的操作，若特定标记应用于某反应孔，则从进一步分析中排除这样的—个或多个反应孔。被拒绝的反应孔包含所计算的直到拒绝点的结果。
空间校准 (spatial calibration)	StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统校准的类型，其中系统描绘出样本加热块中反应孔的位置。使用空间校准数据，以便软件可将反应板运行期间荧光的增强与反应板中的特定反应孔相关联。
库存分析产品 (inventoried assays)	先前生产、已通过质控规格并储存在库存中的 TaqMan® Gene Expression Assays 和 TaqMan® SNP Genotyping Assays。

扩增 (amplification)	仪器运行的一部分，在此期间 PCR 产生靶扩增。对于定量实验，扩增期间采集的荧光数据在扩增曲线中显示，且这些数据用于计算结果。对于基因分型或存在/不存在实验，扩增期间采集的荧光数据在扩增曲线中显示，且这些数据可用于进行故障排除。
扩增阶段 (amplification stage)	<p>仪器运行的一部分，在此期间 PCR 产生靶扩增。扩增阶段称为温度变化过程中的循环阶段，包括重复的变性、引物退火和聚合步骤。</p> <p>对于定量实验，扩增阶段期间采集的荧光数据在扩增曲线中显示，且这些数据用于计算结果。对于基因分型或存在/不存在实验，扩增阶段期间采集的荧光数据在扩增曲线中显示，且这些数据可用于进行故障排除。另请参见循环阶段 (cycling stage)。</p>
扩增曲线 (amplification plot)	<p>显示 PCR 扩增循环阶段采集的数据。可视为：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 基线校准后归一化报告荧光强度 (ΔR_n) 随循环的变化 • 归一化报告荧光强度 (R_n) 随循环的变化 • 阈值循环 (C_T) 随反应孔的变化
扩增效率 (amplification efficiency, EFF%)	<p>PCR 扩增的计算效率。扩增效率通过使用标准曲线中回归线的斜率来计算。斜率接近 -3.32 表示最佳，即 100% PCR 扩增效率。影响扩增效率的因素包括：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 标准品数量范围 — 为了提高效率测量值的准确度和精确度，使用大范围的标准品数量（5 至 6 对数级（10^5 至 10^6 倍））。 • 标准品重复数 — 为了提高标准品数量的精确度并降低移液误差的影响，包括重复数。 • PCR 抑制剂 — 反应中的 PCR 抑制剂可降低扩增效率并改变效率测量值。
扩增子 (amplicon)	PCR 期间扩增的一个 DNA 片段。
模板 (template)	<p>在 StepOne™ 软件的 Design Wizard（设计向导）（和定量实验的 QuickStart）中，要添加到 PCR 反应的核酸的类型。建议的模板根据实验类型不同而有所不同：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 定量实验（标准曲线、相对标准曲线和比较 C_T）– cDNA (complementary DNA) (cDNA (互补 cDNA))、RNA 或 gDNA (genomic DNA) (gDNA (基因组 DNA)) <p>对于定量实验，模板类型选择会影响运行方法、反应设置和材料列表。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 基因分型实验 – Wet DNA (gDNA or cDNA) (湿式 DNA (gDNA 或 cDNA)) 或 dry DNA (gDNA or cDNA) (干式 DNA (gDNA 或 cDNA)) <p>对于基因分型实验，模板类型选择会影响反应设置。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 存在/不存在实验 - DNA <p>对于存在/不存在实验，Applied Biosystems 建议将 DNA 模板添加到 PCR 反应中。</p>
内对照 (endogenous control)	您正检测的所有样本中应以类似水平表达的靶序列或基因。内对照在相对标准曲线和比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 实验中用于为您正在定量的靶序列归一化荧光信号。管家基因也可用作内对照。另请参见 管家基因 (housekeeping gene) 。
起始数量 (starting quantity)	当在 StepOne™ 软件中定义标准曲线时，对应于最高或最低数量。

区 (zone)	<p>在 StepOnePlus™ 扩增仪运行期间，由单独进行温度调节的 VeriFlex™ 样本加热块为 96 个反应孔创建最多六个不同的样本温度。您可将一个或几个 VeriFlex 样本加热块设置为一个不同的温度，也可将所有 VeriFlex 样本加热块都设置为同一个温度。</p> <hr/> <p>注意：对于解链曲线步骤，您需要将所有 VeriFlex 样本加热块都设置为同一个温度。</p> <hr/>
区界线 (zone boundary)	<p>六个单独进行温度调节的 VeriFlex™ 样本加热块创建不同样本温度区的边界。在 StepOne™ 软件中，区界线在反应板布局中显示为深红色线。</p>
任务 (task)	<p>在 StepOne™ 软件中，为靶序列或 SNP 检测在反应孔中所执行反应的类型。可用任务：</p> <ul style="list-style-type: none">• 未知• 阴性对照• 标准品（标准曲线和相对标准曲线实验）• 阳性对照（基因分型实验）• IPC（存在/不存在实验）• 阻断 IPC（存在/不存在实验）
熔解曲线 (dissociation curve)	<p>参见解链曲线 (melt curve)。</p>
设计向导 (Design Wizard)	<p>StepOne™ 软件中的功能，通过在您输入实验设计时引导您选择最佳方法来帮助您设置实验。</p>
升降温 (ramp)	<p>仪器运行期间温度变化的速率。除解链曲线步骤外，升降温以百分比形式定义。对于解链曲线步骤，升降温以温度增量定义。在温度变化过程设置视图中，升降温由一条对角线表示。</p>
升降温速度 (ramp speed)	<p>仪器运行期间发生升降温的速度。可用的升降温速度包括快速和标准。</p> <ul style="list-style-type: none">• 为了采用快速升降温速度获取最佳结果，Applied Biosystems 建议在您的 PCR 反应中使用 TaqMan® Fast 试剂。• 为了采用标准升降温速度获取最佳结果，Applied Biosystems 建议在您的 PCR 反应中使用标准试剂。 <hr/> <p>切记！ 基因分型或存在/不存在实验不支持 TaqMan Fast 试剂。</p> <hr/>
实时 PCR (real-time PCR)	<p>PCR 扩增期间采集荧光数据的过程。实时 PCR 数据用于计算定量实验的结果，或对基因分型或存在/不存在实验的结果进行故障排除。</p>

实验 (experiment)	指使用 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 系统执行一次反应板运行的整个过程，包括设置、运行和分析。您可使用 StepOne 和 StepOnePlus 系统执行的实验类型包括： <ul style="list-style-type: none"> • 定量 — 标准曲线 • 定量 — 相对标准曲线 • 定量 — 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) • 解链曲线 • 基因分型 • 存在/不存在
实验类型 (experiment type)	您可使用 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 系统执行的实验类型包括： <ul style="list-style-type: none"> • 标准曲线 • 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) • 相对标准曲线 • 解链曲线（在 Design Wizard（设计向导）中不可用） • 基因分型 • 存在/不存在 <p>您所选的实验类型会影响设置、运行和分析。</p>
实验名 (experiment name)	设置实验期间输入的、用于标识实验的名称。实验名不可超过 100 个字符，且不能包括以下任何字符：正斜线 (/)、反斜线 (\)、大于号 (>)、小于号 (<)、星号 (*)、问号 (?)、双引号 (")、垂直线 ()、冒号 (:) 或分号 (;)。
试剂 (reagents)	您用于扩增靶序列并检测扩增的 PCR 反应组分。StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统上使用的试剂类型包括： <ul style="list-style-type: none"> • TaqMan® 试剂 • SYBR® Green 试剂 • 其它试剂
手动 C_T (manual C_T)	您在其中输入阈值并选择使用自动基线还是手动基线值的分析设置。软件使用基线和阈值来计算阈值循环 (C_T)。
手动基线 (manual baseline)	您在其中为扩增曲线输入基线起点和终点值的分析设置。您可将手动基线设置应用到反应板上的特定反应孔。
数据采集 (data collection)	扩增仪运行期间扩增仪组件从反应板的每个反应孔检测荧光数据的操作。扩增仪将信号转换为电子数据，然后数据被保存在实验文件中。在 StepOne™ 软件中，数据采集点在温度变化过程设置中由图标指示： <ul style="list-style-type: none"> • 数据采集打开： • 数据采集关闭：
数量 (quantity)	在定量实验中，样本中靶序列的数量。绝对数量可能指拷贝数、质量、摩尔浓度或病毒载量。相对数量指样本中靶序列的归一化数量和对照样本中靶序列的归一化数量之间的倍数差异。

未知 (unknown)	<p>在 StepOne™ 软件中，靶序列或 SNP 检测在包含您正在检测的样本的反应孔中的任务：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 在定量实验中，靶序列在包含具有未知靶序列数量的样本的反应孔中的任务。 • 在基因分型实验中，SNP 检测在包含具有未知基因型的样本的反应孔中的任务。 • 在存在/不存在实验中，靶序列在包含样本（其中是否存在靶序列未知）的反应孔中的任务。
未知 IPC 反应孔 (unknown-IPC wells)	在存在/不存在实验中，含有样本和阳性内对照 (IPC) 的反应孔。
温度变化过程设置 (thermal profile)	运行方法的一部分，为 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪运行的所有步骤和阶段指定温度、时间、升降温和数据采集点。
温度曲线 (temperature plot)	在 StepOne™ 软件中，显示 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪运行期间样本、扩增仪封盖和扩增仪样本加热块的温度。
无扩增对照 (no amplification control, NAC)	参见“阴性对照阻断 IPC 反应孔”。
无模板对照 (no template control, NTC)	参见 阴性对照 (negative control, NC) 。
无荧光淬灭基团 — 小沟结合物 (nonfluorescent quencher-minor groove binder, NFQ-MGB)	加在 TaqMan® 探针的 3' 端的分子。当探针完整时，无荧光淬灭基团 (NFQ) 会阻止荧光报告染料发射荧光信号。因为 NFQ 不会发出荧光，因此它仅产生较低的背景信号，从而产生更精确的定量结果。小沟结合物 (MGB) 会提高解链温度 (T _m)，而不会增大探针长度。它还允许设计较短的探针。
稀释倍数 (dilution factor)	参见 序列倍数 (serial factor) 。
稀释后样本浓度 (Diluted Sample Concentration) (10× 反应预混液)	StepOne™ 软件中，Reaction Setup（反应设置）屏幕的 Sample Dilution Calculations（样本稀释计算）选项卡上显示的字段。在该字段中，为实验中的所有样本输入您想用于添加到反应预混液的样本浓度。“10× 反应预混液”表示软件假定反应预混液的样本或标准品组分的浓度为 10×。例如，如果稀释后样本浓度为 50.0 ng/μL (10×)，则反应中样本的最终浓度为 5 ng/μL (1×)。
稀释剂 (diluent)	将样本或标准品加入 PCR 反应之前，用来稀释样本或标准品的试剂。稀释剂可以是水或缓冲液。

**系统染料
(system dye)**

Applied Biosystems 提供并在 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 系统上预校准的染料。您在实验中使用系统染料之前，请确保系统染料校准在 Instrument Maintenance Manager（扩增仪维护管理器）中是当前校准。

StepOne 系统上的系统染料：

- FAM™ 染料
- JOE™ 染料
- ROX™ 染料
- SYBR® Green 染料
- VIC® 染料

StepOnePlus 系统上的系统染料：

- FAM™ 染料
- JOE™ 染料
- NED™ 染料
- ROX™ 染料
- SYBR® Green 染料
- TAMRA™ 染料
- VIC® 染料

切记！ Applied Biosystems 不建议将 TAMRA™ 染料在 StepOne™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。TAMRA 染料可在 StepOnePlus™ 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。

**相对标准曲线方法
(relative standard
curve method)**

确定样本中靶序列的相对数量的方法。采用相对标准曲线方法，StepOne™ 软件测定了样本、对照样本和标准品稀释序列中靶序列和内对照的扩增情况。采用内对照归一化测量值。来自标准品稀释序列的数据用于生成标准曲线。软件使用标准曲线插入样本和对照样本中靶序列的数量。通过比较每份样本中靶序列的数量和对照样本中靶序列的数量，软件确定每份样本中靶序列的相对数量。

校准品 (calibrator)

参见[对照样本 \(reference sample\)](#)。

斜率 (slope)

从标准曲线的回归线计算得出的回归系数。斜率表示检测的 PCR 扩增效率。-3.32 的斜率表示 100% 的扩增效率。另请参见[扩增效率 \(amplification efficiency, EFF%\)](#)和[回归线 \(regression line\)](#)。

序列 (series)

参见[标准品稀释序列 \(standard dilution series\)](#)。

**序列倍数
(serial factor)**

在 StepOne™ 软件中，定义标准曲线中数量序列的数字值。序列倍数和起始数量用于计算标准曲线中每个点的标准品数量。例如，若使用 1:10 或 10× 的序列倍数定义标准曲线，则曲线中任意两个相邻点之间的差异均为 10 倍。

**循环阶段
(cycling stage)**

在温度变化过程中重复的阶段。循环阶段也称为“扩增阶段”。对于循环阶段，您可启用 AutoDelta 设置。另请参见[扩增阶段 \(amplification stage\)](#)。

**循环阈值
(cycle threshold)**

参见[阈值循环 \(threshold cycle, C_T\)](#)。

衍生报告荧光强度 (derivative reporter, -Rn')	PCR 扩增期间报告基团生成的归一化荧光的第一阴性衍生物。在衍生报告荧光强度 (-Rn') 随温度变化的解链曲线中, 衍生报告荧光强度信号在 y 轴上显示。
阳性对照 (positive control)	在基因分型实验中, 具有已知基因型的纯合子或杂合子 DNA 样本。在 StepOne™ 软件中, SNP 检测在包含具有已知基因型的样本的反应孔中的任务。
阳性内对照 (internal positive control, IPC)	存在/不存在实验中, 添加到 PCR 反应的较短的合成 DNA 模板。您可使用 IPC 区分真阴性结果 (即, 样本中不存在靶序列) 和受 PCR 抑制剂、错误分析设置、或试剂或仪器故障而影响的阴性结果。
样本 (sample)	您正检测的模板。
样本 (Sample) 或标准品 (Standard) (10X)	在 StepOne™ 软件中, Reaction Setup (反应设置) 屏幕的 Reaction Mix Calculations (反应预混液计算) 选项卡上显示的反应组分。软件假定添加到反应预混液的样本或标准品为 10X 浓度。例如, 如果反应体积为 20 μL, 则为 1 次反应计算出的样本或标准品体积为 2 μL。
样本 DNA (Sample DNA) (10X)	在 StepOne™ 软件中, Reaction Setup (反应设置) 屏幕的 Reaction Mix Calculations (反应预混液计算) 选项卡上显示的反应组分。软件假定添加到反应预混液的样本 DNA 为 10X 浓度。例如, 如果反应体积为 20 μL, 则为 1 次反应计算出的样本体积为 2 μL。
样本/SNP 检测反应 (sample/SNP assay reaction)	在基因分型实验中, 一个 PCR 反应中要测试样本和要执行 SNP 检测的组合。每个 PCR 反应只可包含一份样本和一个 SNP 检测。
样本/靶反应 (sample/target reaction)	在定量实验中, 一个 PCR 反应中要测试样本和要检测和定量的靶的组合。在 Design Wizard (设计向导) 中, 您只可在一个 PCR 反应中检测和定量一个靶序列。使用 Advanced Setup (高级设置) 可在一个 PCR 反应中检测和定量一个以上的靶序列。
样本库 (Sample Library)	StepOne™ 软件中的样本集合。Sample Library (样本库) 包含样本名称和样本颜色。
异常值 (outlier)	一组数据中, 明显小于或大于其它数据的数据点。
阴性对照 (negative control, NC)	在 StepOne™ 软件中, 靶序列或 SNP 检测在含有水或缓冲液 (而不是样本) 的反应孔中的任务。阴性对照反应孔中不应发生靶扩增。以前称为 “无模板对照 (NTC)”。
阴性对照 IPC 反应孔 (negative control-IPC wells)	存在/不存在实验中, 含有 IPC 模板和缓冲液或水 (而不是样本) 的反应孔。在阴性对照 IPC 反应孔中仅 IPC 模板应扩增, 因为反应不含样本。以前称为 “IPC+”。
阴性对照阻断 IPC 反应孔 (negative control-blocked IPC wells)	存在/不存在实验中, PCR 反应中含有 IPC 阻断剂 (而不是样本) 的反应孔。阴性对照阻断 IPC 反应孔中不应发生扩增, 因为反应不包含样本且 IPC 的扩增被阻断。以前称为 “无扩增对照 (NAC)”。
引物/探针混合物 (primer/probe mix)	包含设计用于扩增靶序列的引物和设计用于检测靶扩增的 TaqMan® 探针的 PCR 反应组分。

引物混合物 (primer mix)	包含设计用于扩增靶序列的正向引物和反向引物的 PCR 反应组分。
原始数据曲线 (raw data plot)	每个光学滤光器的原始荧光信号（未归一化）的曲线。
远程监视 (Remote Monitor)	StepOne™ 软件中的功能，允许您通过网络监视 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪。使用远程监视，您可以监视扩增仪状态、向扩增仪发送实验、实时监视扩增曲线和温度曲线以及将结果下载到您的计算机。您不能使用 Remote Monitor（远程监视）功能操作 StepOne 或 StepOnePlus 扩增仪。
运行方法 (run method)	定义 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪运行的反应体积和温度变化过程。
正向引物 (forward primer)	侧向连接扩增子 5' 端的寡核苷酸。反向引物和正向引物一起在 PCR 反应中用于扩增靶序列。
终点荧光信号读取 (endpoint read)	参见 PCR 扩增后荧光信号读取 (post-PCR read) 。
重复数 (replicates)	包含相同组分和相同剂量的相同反应的总数。
重复组 (replicate group)	实验中的一组相同反应。
自动 C _T (automatic C _T)	软件据此计算扩增曲线的基线起点和终点值以及阈值的分析设置。软件使用基线和阈值来计算阈值循环 (C _T)。另请参见 阈值循环 (threshold cycle, C_T) 。
自动基线 (automatic baseline)	软件据此计算扩增曲线的基线起点和终点值的分析设置。您可将自动基线设置应用到反应板上的特定反应孔。另请参见 基线 (baseline) 。
阻断 IPC (blocked IPC)	存在/不存在实验中，含有阻断阳性内对照 (IPC) 的 IPC 阻断剂的反应。在 StepOne™ 软件中，指 IPC 靶序列在含有 IPC 阻断剂的反应孔中的任务。另请参见 阴性对照阻断 IPC 反应孔 (negative control-blocked IPC wells) 。
阈值 (threshold)	<ol style="list-style-type: none"> 3. 扩增曲线中，高于基线但处于指数增长区范围内的荧光水平。阈值可以自动确定（参见 自动 C_T (automatic C_T)），也可手动设置（参见 手动 C_T (manual C_T)）。 4. 在存在/不存在实验中，高于此水平 StepOne™ 软件便会指定存在识别标记的荧光水平。
阈值循环 (threshold cycle, C _T)	PCR 循环数，在该循环数下荧光符合扩增曲线中的阈值。

数字

5' 核酸酶检测 7

字母

Advanced Setup (高级设置) 9, 10, 102
 Allelic Discrimination Plot (等位基因鉴别曲线) 71
 评估结果 71–74
 Amplification Plot (扩增曲线) 87
 运行后查看 87–93
 Amplification Plot (扩增曲线) 屏幕
 运行期间监视 56
 AMPNC 标记 79, 80
 Applied Biosystems
 技术支持 x
 客户文档反馈 x
 联络 x
 Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System。
 参见“StepOne 系统”。
 BADROX 标记 79, 80, 82
 BLFAIL 标记 81
 CLUSTER 标记 79, 80
 CTFail 标记 81
 EMC 标准 xix
 Experiment Properties (实验属性) 屏幕 18
 EXPFAIL 标记 81
 Export/Import (导出/导入) 10, 107
 Help (帮助) 系统, 访问 ix
 Materials List (材料列表) 屏幕 31
 Methods and Materials (方法和材料) 屏幕 20
 MSDS
 获取 xv
 描述 xv
 MSDS, 获取 x
 Multicomponent Plot (多组分曲线) 85
 NOAMP 标记 81
 NOISE 标记 81
 NOSIGNAL 标记 79, 80
 OFFSCALE 标记 79, 80
 PCFAIL 标记 79, 80
 QC Summary (QC 摘要) 屏幕 82
 QuickStart 10, 103
 Raw Data Plot (原始数据曲线) 83
 Reaction Setup (反应设置) 屏幕 28
 Run Method (运行方法) 屏幕 26
 运行期间监视 58

Samples and Replicates (样本和重复数) 屏幕 24
 SMCLUSTER 标记 79, 80
 SNP Assays (单核苷酸多态性检测) 屏幕 21
 SPIKE 标记 81
 StepOne 系统
 布局 51, 55, 62
 耗材 4
 滤光器 3, 84
 数据采集 2
 StepOne™ 系统
 试剂 6
 SYBR Green 试剂 3, 84
 TaqMan 试剂 3, 84
 TaqMan® MGB 探针 6
 TaqMan® SNP Genotyping Assays 6
 Temperature Plot (温度曲线) 屏幕 57
 Template (模板) 10, 105
 THOLDFAIL 标记 81

A

安全
 标准 xix
 工作场所 xix
 惯例 xi
 指南 xv, xvi, xvii
 安全标签, 仪器上 xiii
 安全标准 xix
 安全符号标志, 仪器上 xii
 安全性
 人机工程学 xix
 重复性动作 xix
 安全注意事项
 操作仪器之前 xiv
 电气 xvii
 化学品 xv
 化学品废料 xvi
 生物危害 xviii
 移动/抬起 xiv
 移动和抬起仪器 xiv
 仪器操作 xiv
 安装类别 xviii

B

标记 79, 80, 82
 AMPNC 79, 80
 BADROX 79, 80
 BLFAIL 81

CLUSTER 79, 80
 CTFAIL 81
 EXPFAIL 81
 NOAMP 81
 NOISE 81
 NOSIGNAL 79, 80
 OFFSCALE 79, 80
 PCFAIL 79, 80
 SMCLUSTER 79, 80
 SPIKE 81
 THOLDFAIL 81

标准

EMC xix
 安全 xix

标准偏差, 阈值效应 91

并置布局

监视 55
 启动 51
 数据传输 63

C

参比荧光

BADROX 标记 79, 80

重复性动作, 安全性 xix

传输数据 62

创建实验

打印 29, 99
 导出 99
 示例实验 17

D

打印数据 99

单核甘酸多态性 6

单核苷酸多态性检测 6

导出数据 99

等位基因鉴别曲线 8

评估结果 71–74

等位基因鉴别图 8

指定手动识别 98

等位基因识别

手动 98
 自动 97

电磁兼容性标准。参见 EMC 标准

电气安全注意事项 xvii

独立布局

Remote Monitor (远程监视) 59
 监视 61
 启动 52
 数据传输 64
 远程数据传输 63

对照

阳性 24, 25, 73
 阴性 24, 25, 73, 75, 86

多曲线, 查看 93

F

反应板

从扩增仪卸载 62
 订购 31
 装载 48
 准备 42

反应板布局 75

反应孔

反应板布局 75
 反应孔表 78
 未知 75
 未知样本 24
 选择 77
 阳性对照 24, 75
 阴性对照 24, 75

反应孔表 78

反应预混液

订购 31
 设置 28
 准备 40

放射性废料, 处理 xvii

非特异性荧光 8

废料丢弃, 指南 xvii

废料特性, 描述 xvii

分析屏幕

Allelic Discrimination Plot (等位基因鉴别曲线)
 71–74

Amplification Plot (扩增曲线) 87–92

Multicomponent Plot (多组分曲线) 85–86

Multiple Plots View (多曲线视图) 93

QC Summary (QC 摘要) 屏幕 82–83

Raw Data Plot (原始数据曲线) 83–84

等位基因鉴别曲线 71–74

反应板布局 75–77

反应孔表 78–81

分析设置 94–96

分析实验。另请参见故障排除。

查看 Allelic Discrimination Plot (等位基因鉴别曲线) 71

查看 Amplification Plot (扩增曲线) 87

查看 Multicomponent Plot (多组分曲线) 85

查看 QC 摘要 82

查看 Raw Data Plot (原始数据曲线) 83

查看反应板布局 75

查看反应孔表 78

查看分析设置 94

打印数据 99

导出数据 99

分析 68

工作流程 68

指南 73, 77, 81, 83, 84, 86, 89, 96

分析指南 73, 77, 81, 83, 84, 86, 89, 96

符号标志, 安全 xii

G

工作场所安全 [xix](#)

工作流程

Advanced Setup (高级设置) [102](#)

Design Wizard (设计向导) [13](#)

Export/Import (导出/导入) [10](#), [107](#)

QuickStart [10](#), [103](#)

Template (模板) [10](#), [105](#)

故障排除

标记 [79](#), [80](#)

查看 Amplification Plot (扩增曲线) [87](#)

查看 Multicomponent Plot (多组分曲线) [85](#)

查看 QC Summary (质控摘要) [82](#)

查看 Raw Data Plot (原始数据曲线) [83](#)

查看分析设置 [94](#)

调整基线 [94](#)

调整阈值 [94](#)

过电压类别 (额定值) [xviii](#)

H

耗材 [31](#), [39](#), [40](#), [42](#)

另请参见“所需材料” [4](#)

支持的 [4](#)

忽略反应孔 [78](#), [81](#)

化学品安全 [xv](#)

化学品安全注意事项 [xv](#)

化学品废料安全 [xvi](#)

化学品废料安全注意事项 [xvi](#)

J

基线

调整 [94](#)

关于 [89](#)

示例 [92](#)

正确值 [90](#)

技术支持, 联络 [x](#)

监视运行

Amplification Plot (扩增曲线) 屏幕 [56](#)

Run Method (运行方法) 屏幕 [58](#)

Temperature Plot (温度曲线) 屏幕 [57](#)

并置布局 [55](#)

独立布局 [61](#)

独立布局 (远程) [59](#)

检测信息文件 (AIF) [21](#)

检测预混液 [40](#)

结果

指定手动识别 [98](#)

指定自动识别 [97](#)

结果, 判定 [68](#)

警告, 描述 [xi](#)

K

客户反馈, 对 Applied Biosystems 文档 [x](#)

扩增

NOAMP 标记 [81](#)

运行后查看 [87-92](#)

扩增曲线, 典型 [89](#)

L

联机帮助 参见 Help (帮助) 系统

M

模板, 准备 [39](#)

P

培训, 信息 [x](#)

偏差, 标准 [91](#)

Q

其它基于荧光的试剂 [9](#)

启动运行

并置布局 [51](#)

独立布局 [52](#)

R

人机工程学, 安全性 [xix](#)

S

设计实验

创建新 [17](#)

定义方法和材料 [20](#)

定义实验属性 [18](#)

订购材料 [31](#)

工作流程 [16](#)

设置 SNP 检测 [21](#)

设置反应 [28](#)

设置样本和重复数 [24](#)

设置运行方法 [26](#)

完成设计向导 [34](#)

有关详情 [35](#)

指南 [19](#), [21](#), [23](#), [25](#), [27](#), [30](#), [33](#), [35](#)

设计向导 [13](#)

Experiment Properties (实验属性) 屏幕 [18](#)

Materials List (材料列表) 屏幕 [31](#)

Methods and Materials (方法和材料) 屏幕 [20](#)

Reaction Setup (反应设置) 屏幕 [28](#)

Run Method (运行方法) 屏幕 [26](#)

Samples and Replicates (样本和重复数) 屏幕 [24](#)

SNP Assays (单核苷酸多态性检测) 屏幕 [21](#)

完成 [34](#)

生物危害性废料, 处理 [xvii](#)

升降温速度 [21](#)

使用本指南

- 结合您自己的实验 9

- 作为教程 9

使用本指南的假定 vi

示例实验

- 反应板布局 11

- 分析 68

- 工作流程 13

- 描述 10

- 设计 16, 20, 21, 24, 26, 28

- 数据 71, 75, 78, 82, 83, 85, 87, 94

- 数据位置 11

- 运行 46

- 准备 38

- 准备反应 38

试剂

- TaqMan® 试剂 6–8, 20

- 订购 31

- 其它基于荧光的 9

- 支持的 9

手动等位基因识别 98

数据

- 传输 62

- 关于数据采集 2

- 示例实验 9, 69

所需材料 31, 39, 40, 42

T

替代实验工作流程。参见“工作流程”。

通知设置 49

W

危险, 描述 xi

危险。参见安全注意事项

危险符号标志。参见安全符号标志, 仪器上

危险图标

- 参见安全符号标志

危险图标。参见安全符号标志, 仪器上

未知样本 24, 75

文档, 相关 vii

文字体例 vi

无信号标记 79, 80

X

卸载扩增仪 62

选择反应孔 77

Y

阳性/阴性试验

- 结果识别 93

阳性对照

- PCFAIL 标记 79, 80

- 确认 73, 78, 81

- 应用 24, 25

一般生物危害 xviii

移动和抬起, 安全注意事项 xiv

仪器操作, 安全注意事项 xiv

阴性对照 75, 86

- AMPNC 标记 79, 80

- 确认 73, 78

- 应用 24, 25

荧光

- NOISE 标记 81

- NOSIGNAL 标记 79, 80

- OFFSCALE 标记 79, 80

- SPIKE 标记 81

用户警示文字, 描述 vi

用于本指南中的体例 vi

运行方法

- 设置 26

运行实验

- 传输数据 62

- 工作流程 46

- 监视 55

- 启动 51

- 启用通知设置 49

- 提示 58

- 有关详情 49, 58, 59

- 指南 51

- 准备 47

Z

指南

- 分析 73, 77, 81, 83, 84, 86, 89, 96

- 化学品安全 xv

- 化学品废料安全 xvi

- 化学品废料丢弃 xvi

- 设计 19, 21, 23, 25, 27, 30, 33, 35

- 运行 51

- 准备 39, 41, 43

终点实验 6

注意, 描述 xi

装载反应板 42, 48

准备实验

- 反应板 42

- 反应预混液 40

- 工作流程 38

- 样本稀释 39

- 有关详情 38

- 指南 39, 41, 43

准备运行 38, 47

准备指南 39, 41, 43

自动等位基因识别 97

阈值

- 示例 91

- 正确值 90

阈值, 调整 94

Worldwide Sales and Support

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at www.appliedbiosystems.com.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

Headquarters

850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Phone: +1 650.638.5800
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

06/2010