



applied biosystems 7500荧光定量PCR仪

绝对定量实验简易操作流程

SDS 2.0

7500定量PCR仪

绝对定量实验简易操作流程

1. 双击桌面图标 ，或从 Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software > 7500 V2.0 开启软件。进入主界面后选择 Advanced Setup 。
2. 默认进入 Setup 下的 Experiment Properties 界面

2.1 输入实验名称 (Experiment Name)

How do you want to identify this experiment?

* Experiment Name:

Barcode (Optional):

User Name (Optional):

Comments (Optional):

2.2 确认仪器型号

Which instrument are you using to run the experiment?

7500 (96 Wells) 7500 Fast (96 Wells)

Set up, run, and analyze an experiment using a 4- or 5-color, 96-well system.

2.3 在实验类型中，选择 Quantitation-Standard Curve

What type of experiment do you want to set up?

Quantitation - Standard Curve Quantitation - Relative Standard Curve Quantitation - Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$)

Melt Curve Genotyping Presence/Absence

Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.

2.4 选择试剂种类

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents SYBR® Green Reagents Other

The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.

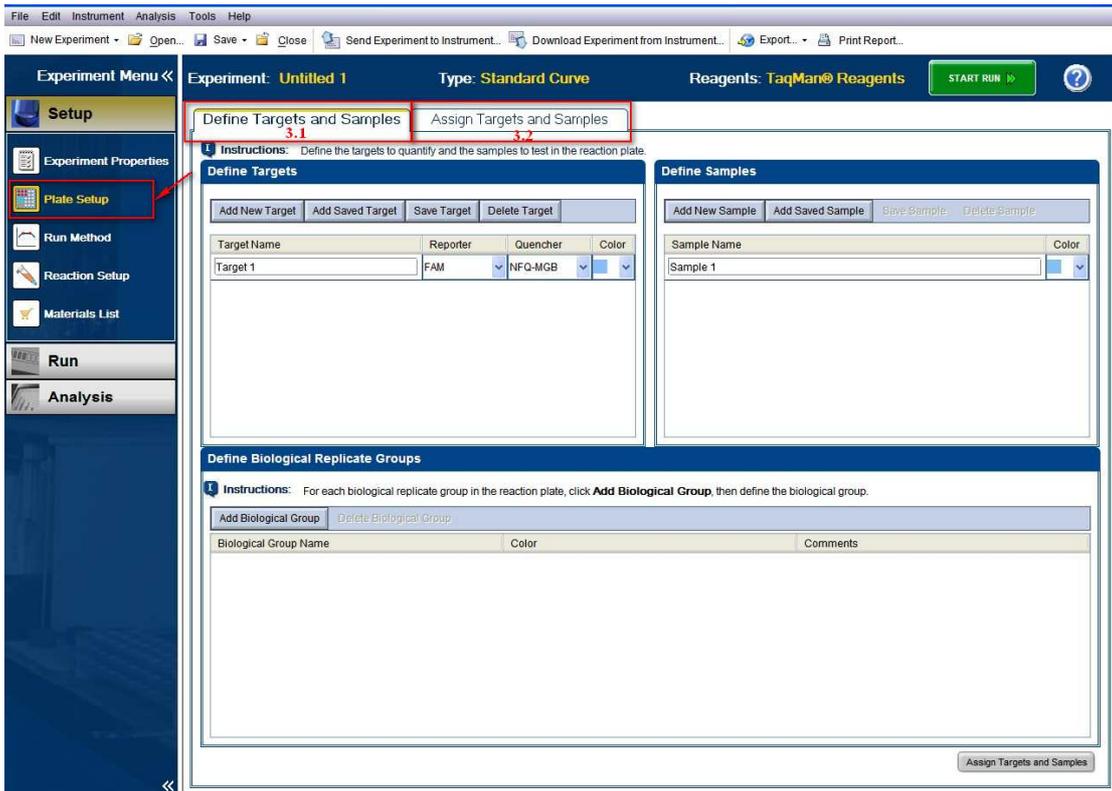
2.5 确认运行模式

Which ramp speed do you want to use in the instrument run?

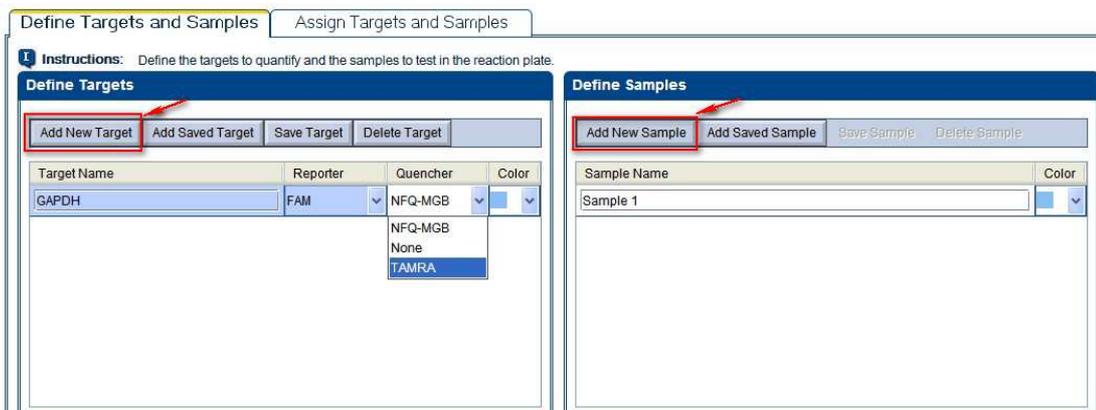
Standard (~ 2 hours to complete a run) Fast (~ 40 minutes to complete a run)

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

3. 进入 Setup 下的 Plate Setup 界面，编辑基因 (Target) 及样本 (Sample) :

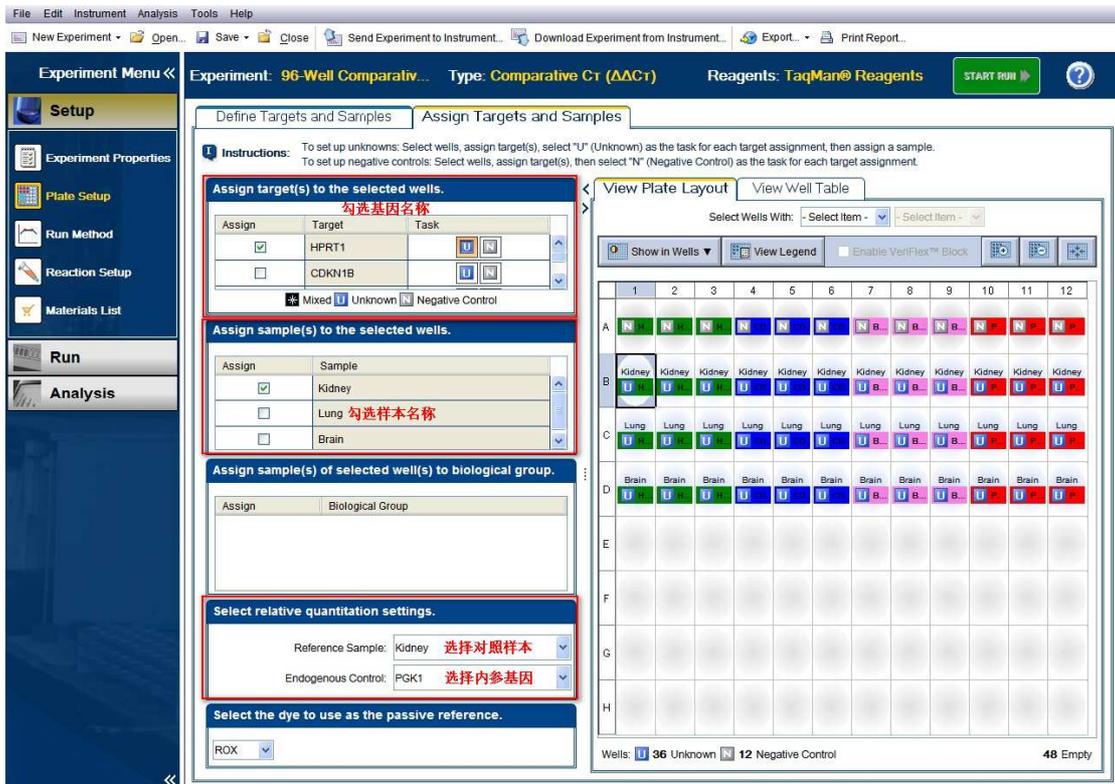


3.1 在 **Define Targets and Samples** 界面中设置基因及样品。利用 **Add New Target** 添加新的基因，并在 Target Name 中编辑基因名称，Reporter 和 Quencher 中选择所标记的荧光基团及淬灭基团。对于 Quencher 的选择，如果是 MGB 探针，请选择 NFQ-MGB；如果是 TAMRA 探针，请选择 TAMRA；如果是其他形式的非荧光淬灭基团（如 BHQ），请选择 None。



还可以利用其他按钮将之前已添加的基因进行保存(Save Target)或删除(Delete Target)。利用 **Add New Sample** 添加新的样本，并编辑样品名称。

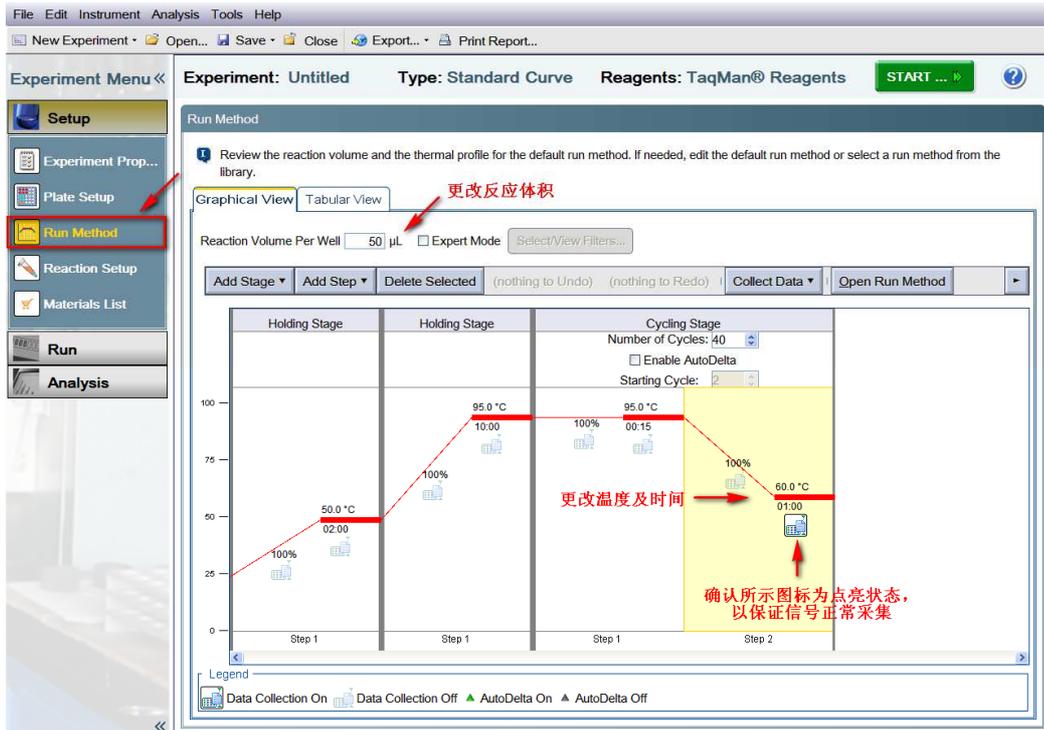
3.2 在 **Assign Targets and Samples** 界面中进行样品板的排布。利用鼠标单选或拖曳以选择反应孔，然后勾选左侧的基因及样本，同时在 Task 选项中指定该反应孔的类型 (S 代表标准曲线数据点， U 代表未知样本， N 代表阴性对照)。



3.3 设置标准曲线：利用鼠标单选或拖曳以选择反应孔（一般情况下，每个梯度设置三个副孔），而后勾选左侧的基因，在Task选项中选择S，然后在Quantity中输入拷贝数。按照相同操作，完成标准曲线其他数据点的设置（建议设置5个梯度）。

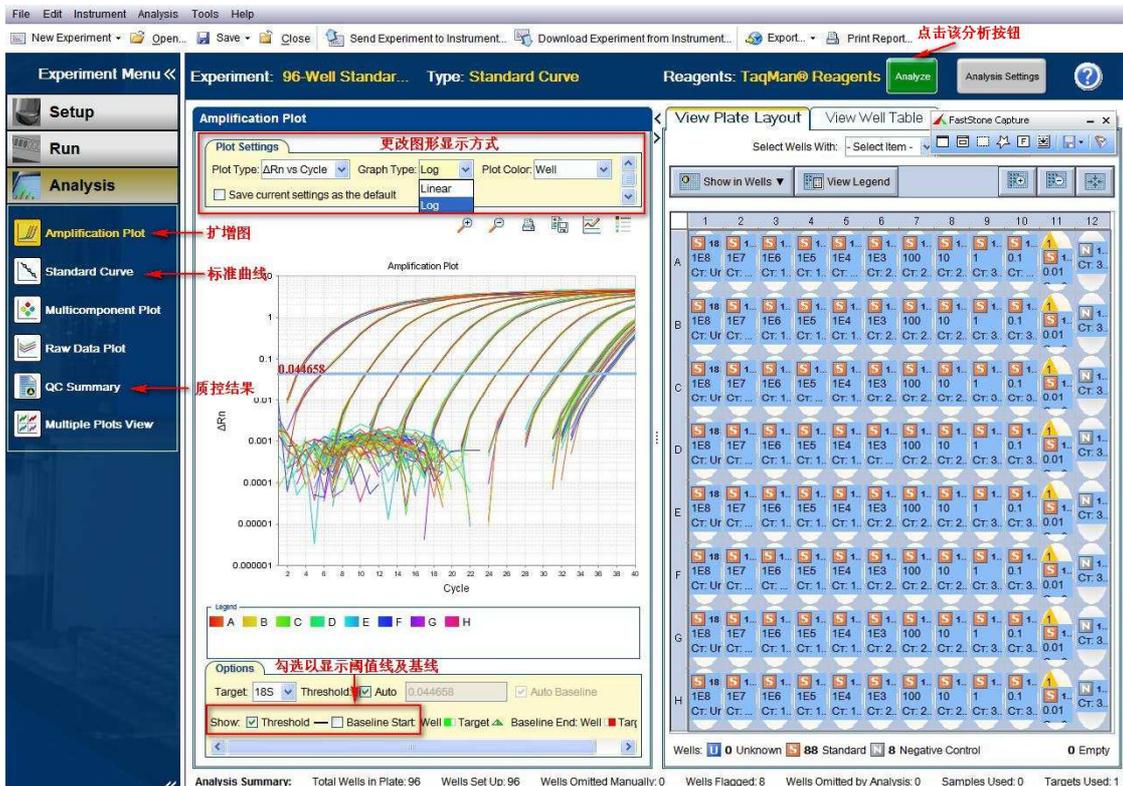


4. 在 Setup 下的 Run Method 界面中，设定反应条件。



5. 点击 Save, 文件储存成 Experiment Document Single Files (*.eds) 格式, 然后按下 按钮, 反应即开始进行。

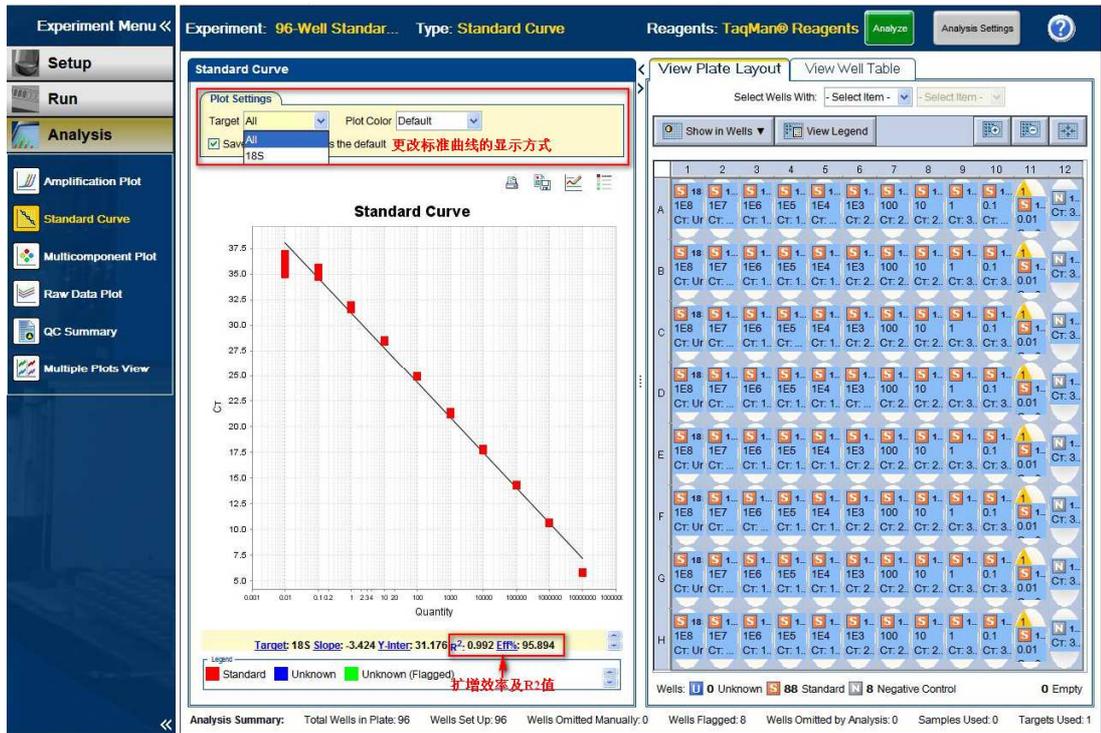
6. 实验结束后, 点击右上角的 Analyze 按钮, 软件将显示实验结果:



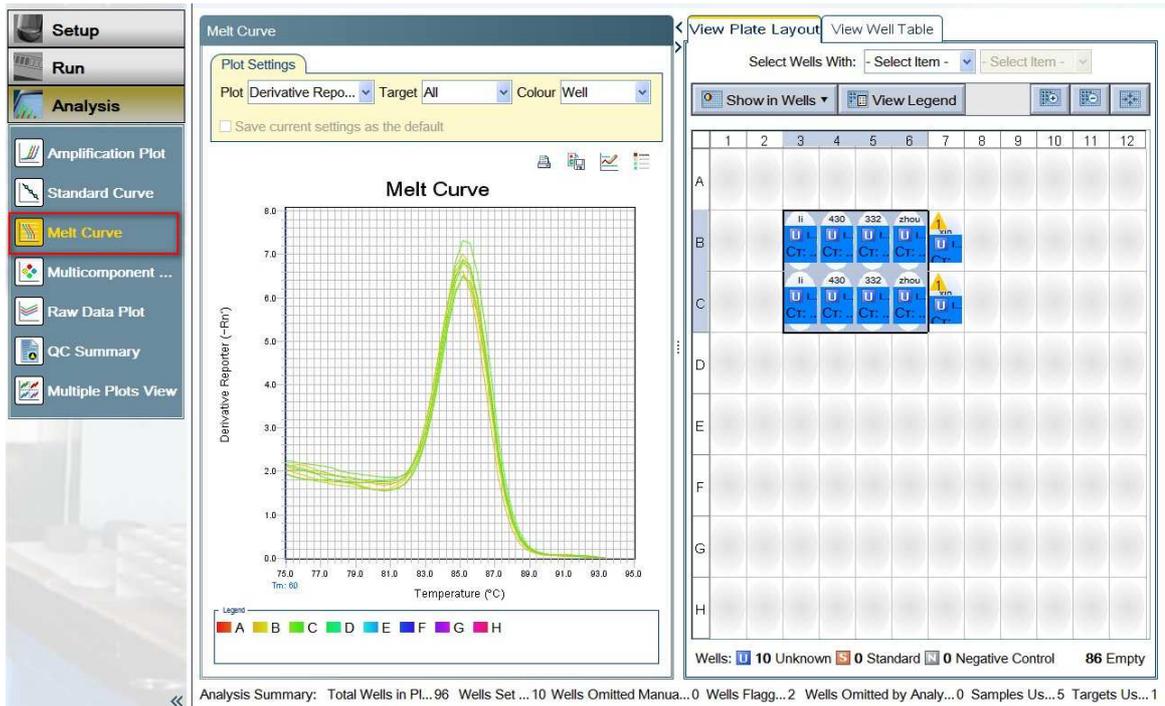
6.1 在扩增图中（见上图），可通过更改 Plot Settings 来改变扩增图的显示方式。如果想查看阈值线或基线，请将 Threshold 及 Baseline 打勾。

6.2 查看标准曲线时，可通过更改 Plot Settings 来改变标准曲线的显示方式。

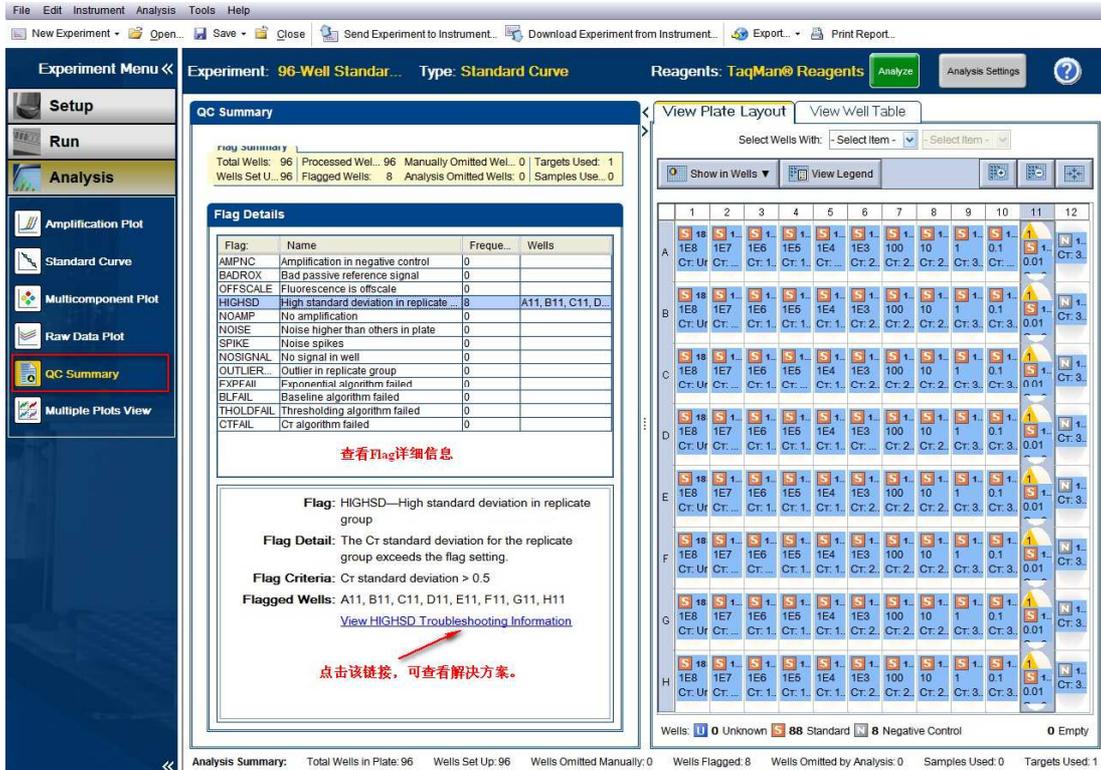
Eff%代表扩增效率。R²值代表标准曲线的数据点与回归曲线的接近程度，建议在0.99以上。



6.3 对于 SYBR Green 法实验，可以在 Melt Curve 界面中查看熔解曲线。



6.4 检查 QC Summary 结果，可以快速查看实验中是否有反应孔存在异常情况。黄色三角中的数字 1 代表有一种异常情况，2 代表有两种异常情况，以此类推。详细信息及解决方案可以在 Flag Details 中查看。



7. 分析之后的结果，可以利用菜单中的File>Export功能，导出Excel格式的结果（左图）。若想存储图片结果，可直接在图片上单击鼠标右键，选择Save As，生成JPEG格式的图片（右图）。

