Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 6 & 7 Pro 实时定量 PCR 仪

简明中文手册 第二部分:相对定量

Design and Analysis Software V2.3.0



英潍捷基(上海)贸易有限公司 赛默飞世尔科技公司

Applied Biosystems[™] QuantStudio[™] 6 & 7 Pro 实时定量 PCR 仪

- 1. 双击桌面图标 🦵 开启 Design and Analysis Software v2。
- 2. 进入主界面以后,点击 "SET UP PLATE"



3. 选择合适的模板: 在左侧条框中选择以下过滤条件。

Instrument——使用的仪器

Block——加热模块的型号

Run Mode——PCR 模式(快速或者标准)

Analysis——实验类型(相对定量实验选择 Relative Quantification)

选择好后,会在右侧显示出对应模板,点击进入模板。如使用 SYBR Green 染料法,可选择"PCR with Melt"作为起始模板。

ecents My Plate Files System Temp	plates	预设好的模板(Plate File)	Q, III 🔳 Actions
Select properties to filter			Last used - Descending -
Instrument ○ OuantStudio [™] 6 Pro OuantStudio [™] 7 Pro 仪器 Block	Standard Curve • QuantStudio th 7 Pro • 98-Well 0.2-ml, • Standard Curve • Standard	Presence/Absence CuartStudio*** @ Pro Edit Vite 0.2 mL Presence Absence Standard	Standard Curve • QuareStauto TV 6 Pro • 69 Met 0 2-ml, • Standard Curve • Standard Curve
● 96-Well 0.1-mL ● 95-Well 0.2-mL ● 354-Well ■ 354-Well ■ TLDA Run Mode	Comparative Ct • QuartStudio™ 6 Pro • 36-Weil 0.2-mL • Relative Quartification • Standard	Genotyping • OuantStudio [™] 6 Pro • Selvidia (2 ArnL • Selvidiar • Salvidiar	Relative Standard Curve • QuantStudo rd 9 hrs • SeViet Olarnit, • Relative Quantification • Standard
● Fast ● Standard Analysis ● Standard Curve ● Genotyping ● Presence Absence ● Relative Cuartification	美式 Meit Only • GAuntStudo TM 6 Pro • 95 Weil 0.2 m, • No analyse module • Standard	PCR with Melt • QuantStudio [™] 6 Pro • 66 Well 0.2-mL • No analysis module • Standard	PCR Only • QuartiStudio TM 6 Pro • 96-Well 02-mL • No analysis module • Standard
Clear all	Standard Curve • QuantStudio [™] 6 Pro • 96-Well 0.2-mL • Standard Curve • Fast	Comparative Ct • Quant/Studio ¹⁴ 6 Pro • 66/Wel 02+rL • Pleative Quantification • east	Presence/Absence • Quartificuto ¹¹ 49 Fro • 69 Web 0.2-mL • Presence Absence • Resence Absence



4. 进入 Run Method 界面,设定 PCR 条件:反应体积、退火温度、延伸时间和循环数等。

如需添加或删除反应阶段(Stage)和反应步骤(Step),可将鼠标放在对应位置,点击 加减号进行更改。



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



注:梯度反应温度设置仅限于96孔加热模块。QuantStudio 6 Pro 可设置3个反应温度梯度;上图为QuantStudio 7 Pro示意图,可设置6个梯度反应温度。

4.2(可选)设置暂停程序:点击图标①,勾选②Pause Cycle,③设置暂停后的温度 (Pausing Temperature,范围: 4~99.9℃)和暂停前的反应循环数(Pause After Cycle)。

注意:反应板在反应过程中温度较高,为防止烫伤,建议将暂停后温度设定在室温,并 等待反应板温度下降后将其取出。



5. 进入 Plate Setup 界面,进行反应板设置。

5.1 输入样本名(Sample)和基因名(Target),有以下三种方式。

A. 添加&分配方法:

在右侧样本信息栏(Samples)内点击 + 添加新的样本:输入样本名称(Name)、样本扩增曲线的颜色(Color)、样本类型(Type)和生物学分组(Biological Group),如果是标准品(Standard),输入标准品浓度(Quantity),未知样本选择 unknown 即可。未使用的样本点击 🛞 去除。

		un Summary									Ac	tions
2		Q 90% Q	N	¢ …	Sample	s (2) Biogroup	(0)			添加相	祥本 →	+
1 Gample 1	2 Sample 2	3	4 O Criter sample	0		Name‡	Col	or Type	¢ Quant	tity¢ B	liogroup	۲
(KAZ .	(KAZ *) *	1				Sample 1	•	Stand	ard 10.0	10		۲
				_		Sample 2		Unknown	•			۲
G Sample 1	Gample 2 KAZ ×	C interserve	0.00	0.				Unknown Standard Negative Con	troi.			T + *
G Samole 1	Gample 2	选择对应	区域,			tral		加味	r t -4			
KAZ *	(KAZ ×	勾选所在	E扎样品和	基因	L			Positive 2/2	r			J
										1.00		
O Sample 1	Gample 2	O inter street	O interseren	0.1	4		4	俞入或选择	样本相关信	息		
Sample 1	Sample 2 (KA2 *)	e teter service	· Concerne	01	4 Targets	(2) Reagents (9 0	俞入或选择	样本相关信	息 添加書	基因>	• +
Sample 1 KAZ	Sample 2 KAZ *	Griter startub	Concerne	01	• Targets	(2) Reagents (Target‡	0) Golor	俞入或选择 _{Reporter} ≉	中本相关信 Quencher\$	息 添加者 Task	基因 —— Quantity	+
Sample 1 (KAZ =)	Gample 2 (KA2 *) Enter semple	Grite streak	Constant	0	Targets	(2) Reagents (Target‡ RNase P	0) Color	<mark>俞入或选择</mark> Reporter≉ FAM	^{Quencher♥} NFQ-MGB	息 添加表 Task	基因 Quantity	* +
Sample 1 (KAZ *) Differ sense	Sample 2 (KAZ *) Chier sample	Geber sternet		0	Targets	(2) Reagents (Target‡ RNase P KAZ	() Color	<mark>⋒入或选择</mark> Reporter♥ FAM VIC	日本相关信 Quencher年 NFO-MGB NFO-MGB NFO-MGB	息 添加者 Task Urknown	基因 —— Quantity	+ 8 8
C Sample 1 (KAZ •)	Sancie 2 K42 × Ector sample Drtor sample	Color sample	Constantion Constantion Constantion Constantion Constantion		 Targets a a a a b a a b a a	(2) Reagents (Target# RNase P KAZ	0) Color O	會入或选择 Reporter♥ FAM VIC	●样本相关信 Quencher● NFO-MGB NFO-MGB	息 添加者 Task Unknown	基因 →→ Quantity	+

在右侧基因信息栏(Targets)内点击 + 添加新的基因:输入基因名称(Target)、该基因扩增曲线的颜色(Color)、该基因探针的报告荧光基团(Reporter)和淬灭基团

(Quencher),如果使用的是 SYBR Green 染料,或者淬灭基团是其他形式的非荧光淬灭 基团(如 BHQ)在 Quencher 处选择 None。

添加好后在左侧 96 孔板中进行样品板的排布。利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔,然后 勾选右侧的样本和基因前 🔽 完成所有反应孔的样本和基因信息排布。

B. Excel 形式输入样本和基因信息:

在 Excel 表格上对应 96 孔板的位置输入样本名和基因名,单数行为样本名,双数行为基因名。如果不输入基因名称,则空出双数行。然后将对应孔信息直接通过复制和粘贴方式拷贝到 DA2 软件的 96 孔板位置,完成设定。此外,也可直接点击修改 96 孔板上的样本名和基因信息。

A行样本名 Sample 1 Sample 2 Sample 3 Sample 4 Sample 5 Sample 6 Sample 7 Sample 8 Sample 9 Sample 10 Sample 20 Sa	e 11 Sample 12 et 1 Target 1 e 11 Sample 12 et 1 Target 1 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24
A行基因名 Target1	et 1 Target 1 e 11 Sample 12 tt 1 Target 1 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24
B行样本名 Sample 1 Sample 2 Sample 3 Sample 4 Sample 5 Sample 6 Sample 7 Sample 8 Sample 9 Sample 10 Sample 20 Sample 20<	e 11 Sample 12 et 1 Target 1 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24
B行基因名 Target1 Target1 <th< td=""><td>et 1 Target 1 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24</td></th<>	et 1 Target 1 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24 e 23 Sample 24
C行样本名 Sample 13 Sample 14 Sample 15 Sample 16 Sample 17 Sample 18 Sample 19 Sample 20 Sample 21 Sample 22 Sample 22 Sample 23 Sample 24 Sample 24 Sample 23 Sample 24 Sample 24 Sample 24 Sample 24 Sample 24 Sample 24 Sample 25 Sample 26 Sample 24	e 23 Sample 24 e 23 Sample 24
C行基因名 D行样本名 Sample 13 Sample 14 Sample 15 Sample 16 Sample 17 Sample 18 Sample 19 Sample 20 Sample 21 Sample 22 Sample 22 D行其因名	e 23 Sample 24
D行样本名 Sample 13 Sample 14 Sample 15 Sample 16 Sample 17 Sample 18 Sample 19 Sample 20 Sample 21 Sample 22 Sample 22 Sample 24 Sample 24 Sample 25 Sample 24 Sample 25 Sample 24 Sample 25 Sample 24 Sample 25 Sample 25 Sample 26 Sample 26 Sample 26 Sample 27 Sample 26 Sample 27 Sample 27 Sample 28 Sample 28 Sample 29	e 23 Sample 24
D行基因名	
粘贴复制样本和基因信息	
Taget SNP Passive Reference ROX -	≡ ≎ …
1 2 2 4 5 8 7 8 9 10 11 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	12
Sample 1 Sample 2 Sample 3 Sample 4 Sample 5 Sample 6 Sample 6 Sample 8 Sample 9 Sample 9 Sample 9 Sample 10 Sample 9 Sa	Sample 12
A <u>gabet x</u>	J Target 1 x
🕒 Sample 1 🛛 Sample 2 🛛 Sample 3 🔍 Sample 4 🔷 Sample 5 🔍 Sample 6 🖉 Sample 8 🖉 Sample 8 🖉 Sample 9 🖉 Sample 9	Sample 12
B Targer1 x) Target 1 x
Sample 13 Sample 14 Sample 15 Sample 17 Sample 17 Sample 19 Sample 20 Sample 21 Sample 22 Sample 22	Sample 24
。	
Sample 12 Sample 1	Sample 24
• * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

C. 通过 CSV/ TXT 文件导入样本和基因信息:

点击 96 孔板右上角 *** 在下拉菜单中选择 "Export Plate Setup",将排版信息以 csv 或 txt 格式导出,将新的样本信息输入该 csv 或 txt 文件内,再通过 "Import Plate Setup"直接导入样本和基因,完成快速设定。

T	arget SNP	Passive R	leference	ROX	-		0,	65%	0,	"H _a		:=	\$
P	1	2	3	4	5		6						~
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	🔵 Samp	ie ĉ	Undo					
ň	Target 1 x	Target 1 x	Target 1	< Target 1 x	Target 1 x	Target	1	Redo					
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Samp	ie č	Manage	e Dye	s			
8	Target 1 ×	Target 1 x	Terget 1	11 排板信	Teget x 息导入	Target	1	Import	Plate	Setup			
	Sample 13	🕘 Sample 14	Sample 1	5 🔘 Sample 16	Sample 17	O Grow	2.35	Import	TaqM	an™ a	ssay/pl	ates &	card files
с			Enter assay	排板信	息导出	-	•	Export	Plate	Setup			
	Sample 13	Sample 14	Sample 1	5 Sample 16	Sample 17	Samp	ie t	Flip Pla	te Sei	tup			

5.2 设定对照样本和内参基因:通过右上角 Actions 进入 Relative Quantification Analysis Setting,设定对照样本和内参基因。在"General"中选择对照样本,并设定 Error bar 的计算方法。

	nonences		
Reference Sample	Root 💌	Reference Biogroup	Select option
	选择对照样本	(可选)选择生物学对照组
RQ Min/Max Calculation	ş	Confidence Level	Standard Deviation
Select the algorithm to determin	e RQ Min and Max values (error bars)	95.0 🔻	1 🔻
		置信度	标准偏差,
Maximum Allowed EqCo	Mean		
EqCq mean greater than 40	will be adjusted to 40	选择Error ba	r计算方法
Include the adjusted EqCq n	tean in calculation		
		O Multiplex	Singleplex
Analysis Type		0	
Analysis Type Select the type of analysis to per	form		

在"Endo Controls"中,选择内参基因等信息,完成设定后点击"Apply"。

General Endo Controls Refer	rences ACL IT SO II.	1 107772		
Normalization Type Select normalization preference for targets	● Specific endogenous controls ○ Globe 明确内参基因	l normalization 🔾 Skip n	ormalization	
Target	Endogenous Control	Auto	Efficiency	
AMP1			94.0	
RNase P			AUTO	
TUB2	2		AUTO	
	选择内参基因	默认扩增效率 去掉勾选 ,输	为100%,如需更 入扩增效率数值	改

5.3 输入参比荧光(Passive Reference)信息:在 Plate Setup 界面左上角,软件默认选择为 ROX,如果试剂中不含有参比荧光,在下拉菜单中选择 None;如果使用的其他参比 荧光,选择对应的荧光基团种类。

Run Method	Plate Setup	Run Summary									
Target SNP	Passive Reference	ROX	•)	Q,	100%	Q,	⁵ 8,	 \equiv	٥	***

5.4 输入试剂信息(可选):添加使用试剂信息,如试剂的名称(Name)、类型 (Type)、货号(Part Number)、批次号(Lot Number)、过期日期(Expiration Date)。

Targets (2)	Reagents (1)							+
	Name≑	Туре≑	Barcode≑	Part Number≑	Lot Number\$	Expiration Date\$	×	*
	Reagent 1						۲	*

6. 在 Run Summary 中查看设置: ①PCR 程序(Review Method)和②96 孔板样本和基因排 布(Plate setup)。确认无误后点击③右上角 Actions,进行保存(Save 或者 Save As), 输入名称,设定好保存路径,保存模板。当仪器与电脑已经处于连接状态,软件上显示仪 器信息,点击 Send to Run Queue,完成后点击 Done,完成模板上传。

如果显示"No Instrument is available",检查仪器与电脑在是否已经连接,然后点击④右 上角 System,进入 Instruments,再通过⑤右上角 Actions,添加仪器(Add Instrument) 或进行刷新(Refresh)。

DA Plate Gallery » Untitled	O Help + O System +	Help • • System • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
Run Method Plate Setup Run Summary		Plugins
	保存模板 ➡ 📟	Instruments
1. Heview Method	Add to My Plates	Export Settings
3. Save Plate File	Plate Information	SAE Connection Settings
Barcode Optional	Add to h Analysis Modules Analysis Setting	Enable Security
仪器与电脑处于连接状态 CBTPho-DV19 Castellado™ € Pro-		Add Instrument
Send to Ru	n Queue 桥模板上传到仪器	Herresh
4. Start and monitor a run 🔍		

7. 开始实验:

到仪器端,将 96 孔板或者八连管按照设定的排布放入仪器。

7.1 在屏幕上点击"Load Plate File"(左下图所示);

7.2 选择 "Run Queue" 文件夹(右下图所示),选择上传到仪器上的模板。



7.3 在 Properties 下选择保存路径,所有实验结果会自动保存在仪器上,其他可选:

<u>Thermo Fisher Connect</u>:通过网络传输到 ThermoFisher 云端(仪器需连接网络, 并使用云端账户登录仪器);

<u>USB Drive</u>: 可将 U 盘插在仪器上,选择 该选项,结果将同步保存在 U 盘;

<u>Network Drive</u>:需要提前在与仪器相连 的电脑上设置共享文件夹,选择该选 项,结果将传输到电脑的指定文件夹。

Ð	QS6Pro-96-V	Vell-0-2ml_Melt_Fast		۲	1	۲
Data file properties		Properties	Method		Plate	
Data file name		Plate barcode				
QS6Pro-96-Well-0-2m	_Melt_Fast_201	Optional			100	
Thermo Fisher	USB drive	Network Drive:	Th	e instru	ment	
Connect	Not connected	Not connected		DVT00		
Connect	Not connected	Not connected		DVT00	2 Cq1	
					Start ru	n

7.4 设置结束后,点击 Start run,开始实验。

8. 监控实验运行状况

8.1 可通过仪器触屏监控实验运行情况,通过左右滑动,获取不同信息。

8.2 可在 DA2 软件上监控实验运行情况(暂时只能看到实验剩余时间,无法看到实时扩 增曲线)。

9. 数据传输和下载:

实验结束后屏幕上显示"Run Completed"和实验结果传输位置,点击 Done。如果需要 下载之前实验的数据,可回到仪器主界面,点击 Settings→Run History,选择要导出的结 果文件,进行导出。

10. 在 DA2 软件上查看和分析结果,通过 Open File 打开待分析的.eds 文件。



10.1 在 Quality Check 中查看数据,点击 Analyze 进行分析。可在左侧过滤条件中选择要 查看的结果,或者直接在 96 孔板上选择特定样品孔。不同的图表排布方式可通过选择 Activities→Page Layout Setting 进行自定义。



可选择不同扩增曲线图的展现方式:



更改阈值: 自动分析得到的阈值和阈值线展示在扩增曲线上, 可通过输入数值或者拖拽 阈值线的方式更改阈值, 确保阈值线通过扩增曲线的指数增长期。



或通过右上角 Actions→Analysis Setting 进行阈值线的更改。建议对不同的基因进行分别 设置。此外,可在 Well Cq 中对每条扩增曲线的基线起始和结束循环数进行单独设定。

CR Stage/Step	Stage 2, Ste	p 2 💌	Algorithm Setting	Baseline	Threshold 🔹		
Targ	et	Use Default	Auto Threshold	Threshold	Auto Baseline	Baseline Start	Baseline End
efault Setting				AUTO	~	AUTO	AUTO
AZ				0.500		AUTO	AUTO
		6	コンド調査を	£ É	动划定基	纬	

10.2 查看相对定量结果:在 Relative Quantification 中查看分析图表。可在①下拉菜单中选择显示的图表内容,点击②设定该图表的显示格式。

		-				_			_			0		0-	
ne Expression P	lot 🔫	- (1)	ŀ.				(2)		¢	Replicates			Search sample/target	Vew -	2
-			RQ vs	Sample						Sample®	Target*	EqCq Mean®	Adjusted EqCq Mean	∆EqCq Mean‡	
5.0 - 4.5 -										400	IPC	30.172	30.172		
4.0-										400	RNaseP	29.354	29.354	-0.81*	
3.0-2.5-					_	_	-			800	IPC	29.961	29.961		
2.0-							1			800	RNaseP	28.391	28.391	-1.570	
1.0-			-							1600	IPC	30.053	30.053		
0.0	400	800		1600		3200		6400	-	1600	RNaseP	27.379	27.379	-2.674	
			BN	ample aseP						3200	IPC	29.968	29.968		
			-							3200	RNaseP	26.380	26.380	-3.601	
r By: Target		— ①					2	-	¢	6400	IPC	29.925	29.925		
1 2	3	4 5	6	7	8	9	10	11	12	6400	RNaseP	25.455	25,455	-4.470	
-			ĕ	•											
21100-0				•											
		0 0													

11. 结果导出:可将实验结果以图片和Excel表格的形式导出。在需要导出的部分,点击该 图表右上角 ••• ,选择 "Save Image"或者 "Export"进行结果导出。



也可将多个Excel表格同时导出。通过Actions进入到Export,点击Customize,设定参数。

	Export Plate	×	
Export Name	Relative_Quantification_Example		
File Format	CSV 👻	-	导出文件格式
Destination	C:\Users\chunying.li\Desktop	Browse	设定导出文件夹
Export Setting	Default Export Setting	Customize	

选择需要导出的数据①,如果不需要导出,则点击右下角②Export Results为Off状态。可 在每一部分导出数据类型中对需要导出的具体信息进行筛选③,所有都设定好之后,可以 将这种导出方式进行保存④Save Current Setting As。最后点击⑤Export,导出结果。

Amplification D	ata 🗸 🛛 N	fulticomponent	Raw	Raw Data 🗸 Replicate Group Result 🗸			RQ Replicate Group Result 🗸				
elect Columns	Well≎	Well Pos	Omit#	Sample\$	Target\$	Task\$	Reporter\$	Quencher	Amp Sta	Amp Sc	o
Well	1	A1	false		RNaseP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	No Amp	0.0	
Well Position	6	AB	false	6400	RNaseP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Amp	1.344518	
Omit	7	A7	false		IPC	NTC	VIC	TAMRA	No Amp	0.0	
Sample	10	A10	false	6400	IPC	UNKNOWN	VIC	TAMRA	Amp	1.085373	
Target	13	B1	false		RNaseP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	No Amp	0.0	
Task (3)	18	B6	false	6400	RNaseP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Amp	1.352324	
Reporter	19	B7	false		IPC	NTC	VIC	TAMRA	No Amp	0.0	
Amo Status	22	B10	false	6400	IPC	UNKNOWN	VIC	TAMRA	Amp	1.089842	
Amp Score	25	C1	false		RNaseP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	No Amp	0.0	
Curve Quality	30	C6	false	6400	RNaseP	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Amp	1.354033	
Result Quality Issues	31	C7	false		IPC	NTC	VIC	TAMRA	No Amp	0.0	
	4									0	



遍布全球的技术支持服务

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



Thermo Fisher Scientific

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

出版编号 MAN0019192 修订版 A



