Applied Biosystems

Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™

Real-Time PCR Systems

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

试剂指南

Applied Biosystems

© Copyright 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. 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.

NOTICE TO PURCHASER:

PLEASE REFER TO THE USER'S GUIDE OR PRODUCT INSERT OF THE REAGENTS NAMED HEREIN FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION.

TRADEMARKS:

Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, MicroAmp, MultiScribe, NED, ROX, StepOne, StepOnePlus, TAMRA, TET, 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.

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

部件号 4377715 Rev C

目录

前言

如何使用本指南 vii
如何获取更多信息 ix
如何获取支持 xii

第 1 章 简介

关于 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统 1-2
支持的耗材 1-4
准备实验 1-6
选择实验类型 1-7
选择试剂类型 1-8
选择检测类型 1-9

第 2 章 试剂概述

概述 2-2
TaqMan® 试剂 2-2
SYBR® Green 试剂 2-4
选择适当的试剂类型 2-6
尽量降低 DNA 污染 2-6

第 3 章 定量实验

第 3.1 部分：关于定量实验 3-3
概述 3-4
选择定量方法 3-5
选择一步法 RT-PCR 或两步法 RT-PCR 3-7
选择单一或多重 PCR 3-9
选择试剂类型 3-11
选择检测类型 3-11

第 3.2 部分：设计指南 3-15
Inventoried/Made to Order 检测 3-16
TaqMan® Gene Expression Assays 3-16
Custom TaqMan® Gene Expression Assays 3-18
选择母液 3-19
设计实验 3-20
Custom 检测 3-21
使用 Primer Express® Software 设计引物和探针 3-21
选择试剂 3-24
使用建议的热循环条件 3-27
优化引物浓度 3-30
优化探针浓度 3-32
有关详情 3-34

第 4 章 基因分型实验

第 4.1 部分：关于基因分型实验 4-3
概述 4-4
选择检测类型 4-6

第 4.2 部分：设计指南 4-9
Pre-Designed/Validated 检测 4-10
TaqMan® SNP Genotyping Assays 4-10
TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays 4-11
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination 4-12
选择母液 4-13
设计实验 4-14
Custom 检测 4-14
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays 4-14
选择母液 4-16
设计实验 4-16

第 5 章 存在/不存在实验

第 5.1 部分: 关于存在/不存在实验 5-3
概述 5-4
选择检测类型 5-5

第 5.2 部分：设计指南 5-9
Inventoried/Made to Order 检测 5-10
TaqMan® Gene Expression Assays 5-10
Custom TaqMan® Gene Expression Assays 5-12
TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 5-13
选择母液 5-15
设计实验 5-16
Custom 检测 5-16

附录 A 公式

使用标准曲线法计算标准差 A-2
使用比较法计算标准差 A-5
比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 实验的公式 A-7

附录 B 多重 PCR 中的引物限制

附录 C 检测设计指南

附录 D 试剂部件号

定量实验 D-2
Inventoried/Made to Order 检测 D-2
Custom 检测 D-2
基因分型实验 D-5
Pre-Designed/Validated 检测 D-5
Custom 检测 D-6
存在/不存在实验 D-7
Inventoried/Made to Order 检测 D-7
Custom 检测 D-8

参考文献

术语表

索引

前言

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
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Genotyping Experiments	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： • 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。 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。	4376786	4377732
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments		4376787	4377721
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments		4376785	4377739
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Standard Curve Experiments		4376784	4377733
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation, Networking, and Maintenance Guide	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
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Quick Reference Card		4376783	4377789
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide	提供有关您可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上使用的试剂的信息，包括： • TaqMan® 和 SYBR® Green 试剂简介 • 以下实验类型的描述和设计指南： – 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
Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Site Preparation Guide	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
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software Help	说明如何使用 StepOne 软件以便： • 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： • 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： — 提供使用产品的用户可能有兴趣或有帮助的信息，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 用户文档中也包括安全警示文字。有关详情，请参阅第 xii 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。

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

与基因分型实验相关的文档

文档	部件号
Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card	4312212
Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol	4367671
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol	4334431
Ordering TaqMan® SNP Genotyping Assays Quick Reference Card	4374204
Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card	4371394
Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card	4367636
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol	4312214
TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol	4362038
TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol	4332856

与存在/不存在实验相关的文档

文档	部件号
DNA Isolation from Fresh and Frozen Blood, Tissue Culture Cells, and Buccal Swabs Protocol	4343586
NucPrep® Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol	4333959
PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol	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
Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note	127AP05
Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol	4375575
Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol	4334429
Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide	4362460
TaqMan® Gene Expression Assays Protocol	4333458
User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression	4303859

与标准曲线实验相关的文档

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

与试剂指南相关的文档

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

注意： 有关更多文档，请参阅第 xii 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 xii 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**。

简介 1

本章包括：

关于 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统 1-2
支持的耗材 1-4
准备实验 1-6
选择实验类型 1-7
选择试剂类型 1-8
选择检测类型 1-9

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”）	• 48 孔平台 • 三色系统
Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System （以下简称 “StepOnePlus™ 系统”）	• 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： • 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。

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 VeriFlex 样本加热块都设置为同一个温度。

有关详情

有关本指南中所述的任何主题的详情，请按 **F1** 键，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。

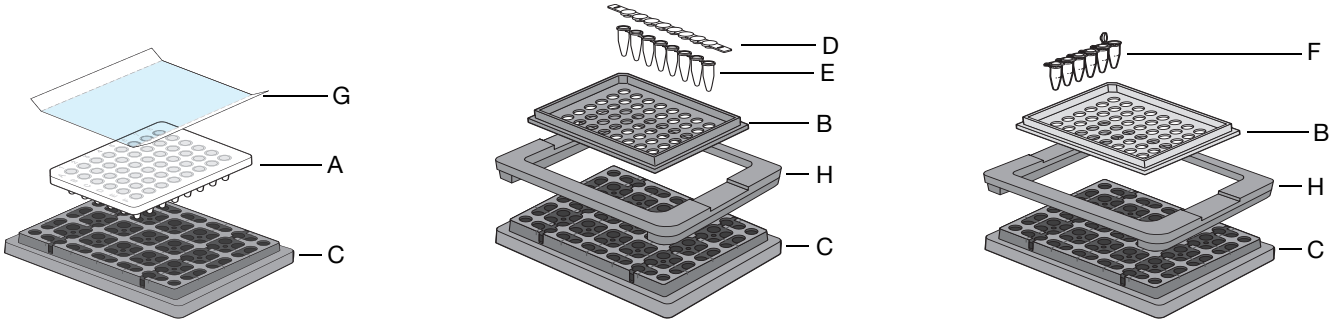
支持的耗材

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
• MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate • MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film	• 4375816 • 4375323 和 4375928
• MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	• 4358293 • 4323032
• MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap	• 4358297
• MicroAmp™ Fast 48-Well Tray • MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor • MicroAmp™ 96-Well Support Base	• 4375282 • 4375284 • 4379590



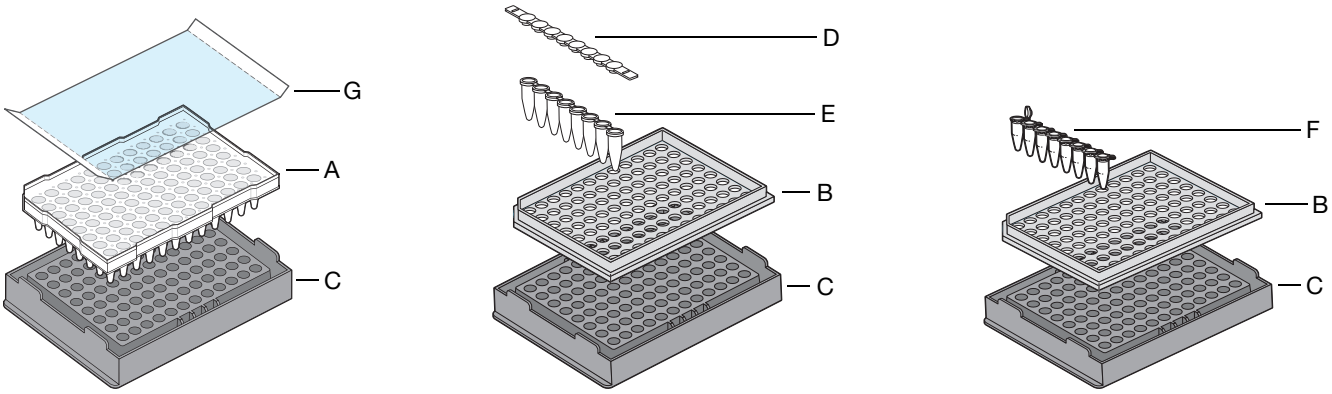
#	耗材
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ 96-Well Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap
G	MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
H	MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor

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
• MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode • MicroAmp™ Optical Adhesive Film	• 4346906 和 4366932 • 4360954 和 4311971
• MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	• 4358293 • 4323032
• MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap	• 4358297
• MicroAmp™ 96-Well Tray for VeriFlex™ Blocks • MicroAmp™ 96-Well Support Base	• 4379983 • 4379590
• MicroAmp™ Adhesive Film Applicator • MicroAmp™ Cap Installing Tool (Handle)	• 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

准备实验

一般工作流程

在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行实验之前，请按如下步骤准备实验：

1. 选择实验类型 （第 1-7 页）。
2. 选择试剂类型 （第 1-8 页）。
3. 选择检测类型 （第 1-9 页）。

本指南中的信息

本章提供有关您可配合 StepOne 和 StepOnePlus 系统使用的实验类型、试剂类型和检测类型的一般信息。

后续章节提供具体信息：

章次	描述
第 2 章 “试剂概述”	• 描述 TaqMan® 和 SYBR® Green 试剂并进行比较。 • 提供有关尽量避免 DNA 污染的信息。
第 3 章 “定量实验”	• 说明实验类型的工作原理。 • 提供实验类型的特定工作流程。 • 提供每种检测类型的设计指南。
第 4 章 “基因分型实验”	
第 5 章 “存在/不存在实验”	

选择实验类型

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。您可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行以下类型的实验：

- 定量实验，包括：
  - 标准曲线
  - 相对标准曲线
  - 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- 基因分型
- 存在/不存在

注意：您也可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行解链曲线分析。有关详情，请单击工具栏中的 ? 或按 **F1** 键，以访问 StepOne 软件内的 Help （帮助）信息。

终点与实时实验

如下文所述，这三种实验类型可分类为实时实验或终点实验。

类别	属性	实验类型
实时	• 当出现 PCR 扩增时，仪器会监视 PCR 的进程。‡ • 在整个 PCR 扩增过程中采集数据。 • 反应特征以循环期间最初检测到靶扩增的时间点描述。§	定量
终点	• PCR 过程结束时采集数据。 • 反应特征以 PCR 结束时累积的靶数量描述。§ • 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 delta R_n (ΔR_n) 值： ΔRn = Rn （PCR 扩增后荧光信号读取） – Rn （PCR 扩增前荧光信号读取） 其中 Rn = 归一化报告荧光强度	基因分型 存在/不存在

‡ Kwok and Higuchi, 1989.
§ Saiki *et al*., 1985.

选择试剂类型

您可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上使用以下类型的试剂 （化学试剂）：

- TaqMan® 试剂
- SYBR® Green 试剂
- 其它基于荧光的试剂

TaqMan 试剂

TaqMan 试剂包括 Applied Biosystems TaqMan® 分析产品 （含有探针和引物组合的预制备预混液）和 Applied Biosystems TaqMan® 母液。您可为以下实验类型使用 TaqMan 试剂：

- 定量实验，包括：
  - 标准曲线
  - 相对标准曲线
  - 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- 基因分型
- 存在/不存在

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。

SYBR Green 试剂

SYBR Green 试剂包括含有 SYBR® Green 染料的引物和母液。您可为以下定量实验使用 SYBR Green 试剂：

- 标准曲线
- 相对标准曲线
- 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)

注意： 您不能使用 SYBR Green 试剂执行多重 PCR 扩增。有关详情，请参阅第 3-9 页 “选择单一或多重 PCR”。

其它试剂

您可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上使用其它基于荧光的试剂，但当使用 StepOne 软件时应注意以下几点：

- 您必须使用 Advanced Setup （高级设置）设计您的实验，而不要使用 Design Wizard （设计向导）。
- 对于 Applied Biosystems TaqMan 和 SYBR Green 试剂， StepOne 软件将在 Reaction Setup （反应设置）屏幕上自动计算反应体积。

选择检测类型

在 StepOne 软件中，您可为定量、存在/不存在和基因分型实验选择以下检测类型：

实验类型	检测类型	请参阅 ...
定量‡	• Inventoried/Made to Order • Custom	下文
存在/不存在		
基因分型	• Pre-Designed/Validated • Custom • User-Designed （用户设计）	第 1-10 页

‡ 定量实验包括标准曲线、相对标准曲线和比较 C_T 实验。

定量实验和存在 / 不存在实验

Inventoried/Made to Order 检测

对于定量实验或存在/不存在实验，若您正在使用以下试剂，则在 StepOne 软件中选择 Inventoried/Made to Order 检测类型：

- **TaqMan® Gene Expression Assays, Inventoried** — 预设计的 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB （小沟结合物）探针和引物组合，可现货购买。检测预混液在单个、预制备的 20× 反应管中提供。
- **TaqMan® Gene Expression Assays, Made to Order** — 预设计的 FAM 染料标记的 TaqMan MGB 探针和引物组合，在订购时生产。检测预混液在单个、预制备的 20× 反应管中提供。
- **Custom TaqMan® Gene Expression Assays** — FAM 染料标记的 TaqMan MGB 探针和引物组合，根据您提交的序列信息通过 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务设计、合成并制备。检测预混液在单个、预制备的 20× 或 60× 反应管中提供。

注意： 要在 StepOne 软件中选择检测类型，请在 Design Wizard （设计向导）或 Advanced Setup （高级设置）中转至 Reaction Setup （反应设置）屏幕，然后从 Assay Type （检测类型）下拉菜单中选择 **Inventoried/Made to Order**。

Custom 检测

对于定量实验和存在/不存在实验，若您正使用 Primer Express® Software 和 TaqMan 或 SYBR Green 试剂设计自己的检测 （引物和探针），则在 StepOne 软件中选择 Custom 实验类型。当您设计自己的检测时，请遵照 Applied Biosystems 检测设计指南以获取最佳结果。

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。

注意： 要在 StepOne 软件中选择检测类型，请在 Design Wizard （设计向导）或 Advanced Setup （高级设置）中转至 Reaction Setup （反应设置）屏幕，然后从 Assay Type （检测类型）下拉菜单中选择 **Custom**。

基因分型实验

Pre-Designed/Validated 检测

对于基因分型实验， Pre-Designed/Validated 检测类型包括：

- **TaqMan® SNP Genotyping Assays** — 预设计的 FAM™ 染料和 VIC® 染料标记的 TaqMan® MGB （小沟结合物）探针和引物组合，提供为 TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays。TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays 在订购时生产 （订购）。检测预混液在单个、预制备的 20× 反应管中提供。
- **TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays** — 预设计的 FAM 染料和 VIC 染料标记的 TaqMan MGB 探针和引物组合，可现货购买 （库存）。检测预混液在单个、预制备的 20× 反应管中提供。
- **Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan® PDARs for AD)** — 预设计的 FAM 染料和 VIC 染料标记的 TaqMan MGB 探针和引物组合，可现货购买 （库存）。检测预混液在单个、预制备的 10× 反应管中提供。

注意： 要在 StepOne 软件中选择一种 SNP 检测，请在 Design Wizard （设计向导）中转至 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕，或在 Advanced Setup （高级设置）中转至 Plate Setup （反应板设置）屏幕。在 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕或 Plate Setup （反应板设置）屏幕上，从库中选择一项检测或创建一项新检测。

Custom 检测

对于基因分型实验， Custom 检测类型包括 Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays。 Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 是 FAM 染料和 VIC 染料标记的 TaqMan MGB 探针和引物组合，这些组合根据您提交的序列信息通过 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务设计、合成并制备。检测预混液在单个、预制备的 40× 或 80× 反应管中提供。

注意： 要在 StepOne 软件中选择一种 SNP 检测，请在 Design Wizard （设计向导）中转至 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕，或在 Advanced Setup （高级设置）中转至 Plate Setup （反应板设置）屏幕。在 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕或 Plate Setup （反应板设置）屏幕上，您可从库中选择一项检测或创建一项新检测。

User-Designed （用户设计）检测

如果您想要为 SNP 检测设计自己的引物和探针，请参阅 *Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide*。

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。

试剂概述 2

本章包括：

概述 2-2
TaqMan® 试剂 2-2
SYBR® Green 试剂 2-4
选择适当的试剂类型 2-6
尽量降低 DNA 污染 2-6

概述

Applied Biosystems 已开发了两种可用于在 Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 上检测 PCR 产物的试剂类型 （化学试剂）：

- TaqMan® 试剂 （下文）
- SYBR® Green 试剂 （第 2-4 页）

TaqMan® 试剂

实验类型

TaqMan® 试剂包括 Applied Biosystems TaqMan® 分析产品 （含有探针和引物组合的预制备预混液）和 Applied Biosystems TaqMan® 母液。这些检测对于目标靶是特定的。母液含有 PCR 反应所需的恒定组分。您可为以下实验类型使用 TaqMan 试剂：

- 定量实验，包括：
  - 标准曲线
  - 相对标准曲线
  - 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- 基因分型
- 存在/不存在

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。

TaqMan 试剂的发展

最初，使用嵌入剂染料测定实时 PCR 产物。此检测方法的主要缺点是，它会检测特异性和非特异性两种 PCR 产物的累积。

通过引入使用 Taq DNA 聚合酶的 5′ 核酸酶活性的荧光标记探针，从而改进了实时 PCR 系统。这些可发荧光探针的有效性促成研发出仅检测特异性扩增产物的实时方法。

TaqMan 试剂工作原理

TaqMan 试剂使用一种可发荧光的探针来检测在 PCR 扩增期间聚积的某种特异性 PCR 产物。下面是其工作原理：

第 1 步 – 使荧光报告染料结合到 5′ 端，淬灭基团结合到 3′ 端，以构建寡核苷酸探针。

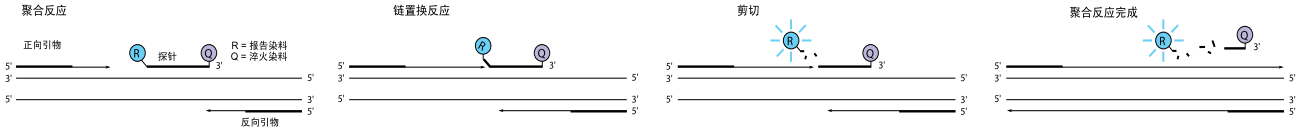
第 2 步 – 当探针完整时，淬灭基团靠近报告基团，由于荧光共振能量传递 (FRET; Förster resonance) (Förster, V. T. 1948)，报告基团发出的荧光会被显著降低。

第 3 步 – 若存在靶，探针会在引物位点之间退火，并在延伸期间被 Taq DNA 聚合酶的 5′ 核酸酶活性裂解。探针的此裂解会：

- 将报告染料与淬灭基团分离，从而增强报告染料的荧光信号。
- 从靶链上除去探针，从而允许引物继续延伸至模板链的末端。因此，包括探针不会抑制整个 PCR 过程。

第 4 步 – 每个循环都有更多的报告染料分子从其各自的探针上裂解，从而导致与产生的扩增子数量成比例的荧光强度增强。核酸靶的起始拷贝数越高，就能越早观察到荧光的显著增强。

图 2-1 描述了此过程。



第 1 步：将报告基团 (R) 和淬灭基团 (Q) 加入 TaqMan® 探针的 5′ 和 3′ 端。

第 2 步：当两个标记都加入探针时，报告染料发出的荧光被淬灭。

第 3 步：在每个延伸循环期间， Taq DNA 聚合酶从探针中裂解出报告染料。

第 4 步：报告基团一旦从淬灭基团中分离后，将发出其特征性荧光。

图 2-1　TaqMan 试剂工作原理

TaqMan® 探针

Applied Biosystems 提供了两种类型的 TaqMan® 探针：

- TaqMan® MGB （小沟结合物）探针，具有无荧光淬灭基团 (NFQ)
- TaqMan® 探针， TAMRA™ 染料用作淬灭基团

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。

Applied Biosystems 提供了以下 TaqMan 探针，以便在 StepOne 系统或 StepOnePlus 系统上使用：

探针	检测	5′ 标记染料	3′ 标记染料	是否为 MGB?	系统
TaqMan® MGB 探针	TaqMan® Gene Expression Assays	FAM™ 染料	NFQ	是	StepOne 和 StepOne Plus 系统
	TaqMan® SNP Genotyping Assays	FAM™ 和 VIC® 染料			
TaqMan® MGB 探针	Custom TaqMan® Gene Expression Assays	FAM™ 染料			
	Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays	FAM™ 和 VIC® 染料			
Custom TaqMan® MGB Probe	Custom 分析产品	FAM™、 TET™、 NED™ 或 VIC® 染料			
Custom TaqMan® Probe	Custom 分析产品	FAM™、 TET™ 或 VIC® 染料	TAMRA™ 染料	否	StepOnePlus 系统

建议的 TaqMan MGB 探针

Applied Biosystems 建议一般使用 TaqMan MGB 探针，尤其是在常规 TaqMan 探针超过 30 个核苷酸时。TaqMan MGB 探针含有：

- **在 5′ 端具有荧光报告染料 —** 在被 Taq DNA 聚合酶的 5′ 核酸酶活性裂解时产生信号。
- **在 3′ 端具有无荧光淬灭基团 (NFQ) —** 允许实时 PCR 系统比带有 TAMRA 染料的探针更精确地测定报告染料的分布 （因为淬灭基团不发荧光）。
- **在 3′ 端具有小沟结合物 (MGB) —** 在不增加探针长度的情况下，升高探针的解链温度 (Tm) (Afonina *et al.*, 1997; Kutyavin *et al.*, 1997)，从而允许设计较短的探针。因此， TaqMan MGB 探针会在匹配和错配探针之间的 Tm 值上显示较大差异；Tm 值的更大差异有助于提供准确的基因分型。

SYBR® Green 试剂

实验类型

SYBR® Green 试剂包括含有 SYBR® Green 染料的引物和母液。您可为以下定量实验使用 SYBR Green 试剂：

- 标准曲线
- 相对标准曲线
- 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)

注意： 您不能使用 SYBR Green 试剂执行多重 PCR 扩增。有关详情，请参阅第 3-9 页 “选择单一或多重 PCR”。

SYBR Green 试剂的发展

结合到双链 DNA 的小分子可分为两类：插入 DNA 的分子和结合 DNA 小沟的分子。 Higuchi (Higuchi *et al.*, 1992) 首创了使用嵌入剂溴化乙锭进行实时 PCR 检测。Hoechst 33258 是在结合到双链 DNA 时其荧光增强的小沟结合染料的一个示例 (Higuchi *et al.*, 1993)。

无论结合方法如何， DNA 结合染料要实时检测 PCR 产物需至少满足两个要求：

- 当结合到双链 DNA 上时荧光增强。
- 无 PCR 抑制

Applied Biosystems 已开发了允许在 PCR 中使用 SYBR® Green I 染料 （而无 PCR 抑制且与溴化乙锭相比检测灵敏度更高）的条件。

SYBR Green 试剂工作原理

SYBR Green 试剂使用 SYBR Green I 染料通过结合到 PCR 期间形成的双链 DNA 来检测 PCR 产物。下面是其工作原理：

第 1 步 — 当将 SYBR Green I 染料加入样本时，它会立即结合到所有双链 DNA。

第 2 步 —PCR 期间， AmpliTaq Gold® DNA Polymerase 会扩增靶，这会形成 PCR 产物或 “扩增子”。双链 DNA 变性为单链分子，且 SYBR Green I 染料被释放。

第 3 步 —引物退火到单链 DNA 上，且 Amplitaq Gold DNA Polymerase 会扩增靶，从而创建更多双链 DNA。随着 PCR 的进行，会形成更多的扩增子。

第 4 步 —然后 SYBR Green I 染料结合到每个 PCR 循环期间生成的每份新的双链 DNA。由于 SYBR Green I 染料结合到所有双链 DNA，结果是与产生的双链 PCR 产物数量成比例的荧光强度增强。

下面的图 2-2 描述了此过程。

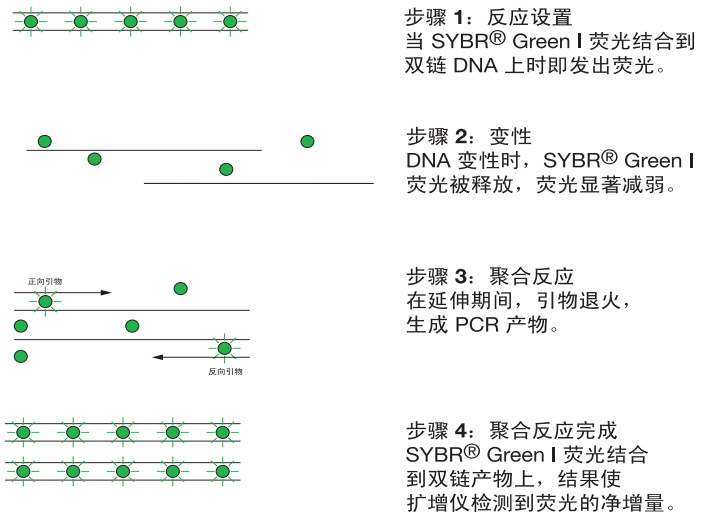


图 2-2　SYBR Green 试剂工作原理

选择适当的试剂类型

TaqMan 和 SYBR Green 试剂可用于下列实验类型。

试剂类型	实验类型		
	定量实验‡（第 3 章）	基因分型实验（第 4 章）	存在/不存在实验（第 5 章）
SYBR® Green 试剂	是	不建议	不建议
TaqMan® 试剂	是	是	是

‡ 包括标准曲线、相对标准曲线和比较 C_T 实验。

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。

定量实验考虑因素

可使用 TaqMan 或 SYBR Green 试剂执行定量实验。当在两种试剂类型之间选择时应考虑以下因素：

试剂类型	描述	优点	局限性
TaqMan® 试剂	TaqMan 试剂使用一种可发荧光的探针来检测在 PCR 循环期间聚积的某种特异性 PCR 产物。	• 通过添加可发荧光的探针以提高特异性。 • 提供多重检测功能。 • 包括已经过优化可在通用热循环条件下运行的预制备检测。 • 可用于一步法或两步法 RT-PCR 扩增。	需要合成唯一的可发荧光的探针。
SYBR® Green 试剂	SYBR Green 试剂使用 SYBR® Green I 染料 （一种双链 DNA 结合染料），在 PCR 循环期间 PCR 产物聚集的同时对 PCR 产物进行检测和分析。	• 经济 （无需探针）。 • 允许解链曲线分析以测量所有 PCR 产物的 Tm。 • 可用于一步法或两步法 RT-PCR 扩增。	可与所有双链 DNA 序列结合，从而降低了特异性。为避免假阳性信号，应使用解链曲线或凝胶分析来检查是否形成非特异性产物。

尽量降低 DNA 污染

当您使用 TaqMan 或 SYBR Green 试剂执行实验时， PCR 过程的 DNA 扩增功能需要特殊的实验室规范。具有较高 DNA 浓度的样本可能会从 DNA 模板对照物或 PCR 遗留物引入潜在污染。

此外，由于 SYBR Green I 染料的非特异性，将会检测任何双链 DNA。当使用 SYBR Green 试剂时，应使用解链曲线或凝胶分析来检查是否形成非特异性产物。请小心谨慎以避免靶 DNA 污染。跨过外显子 — 外显子连接点的基因表达检测可尽量降低 gDNA （基因组 DNA）污染的影响。

使用 UNG 尽量避免重复扩增遗留产物

AmpErase® 尿嘧啶-N-糖基化酶 (UNG) 是由*大肠杆菌*尿嘧啶-N-糖基化酶基因编码的 26-kDa 重组酶。此基因已插入*大肠杆菌*宿主，以指导表达酶的天然形式 (Kwok and Higuchi, 1989)。

UNG 对含有 dU 的单链和双链 DNA 起作用。它在含有 dU 的 DNA 位点通过水解尿嘧啶-葡萄糖苷键起作用。此酶会导致尿嘧啶释放，从而在 DNA 中形成对碱敏感的脱嘧啶位点。重组酶对 RNA 或含有 dT 的 DNA 没有活性 (Longo *et al.*, 1990)。

TaqMan 检测

对于 TaqMan® 检测， AmpErase® UNG 处理可防止重复扩增先前 PCR 反应中的遗留 PCR 产物。当 dUTP 在 PCR 中置换 dTTP 时， AmpErase UNG 处理每 50-µL 反应可除去最多 200,000 copies 的扩增子。

注意： AmpErase UNG （也缩写为 “UDG”，代表尿嘧啶 -DNA- 糖基化酶）包括在某些 Applied Biosystems TaqMan 母液配方中，并且也可单独购买。当购买 TaqMan 母液时，检查产品的构成以查看母液是否包含 AmpErase UNG。

SYBR Green I 染料检测

对于 SYBR Green I 染料检测， AmpErase UNG 处理可防止重复扩增先前 PCR 反应中的遗留 PCR 产物。尽管 *Power* SYBR® Green PCR Master Mix 和 SYBR® Green PCR Master Mix 不含 AmpErase UNG，但它们含有 dUTP，因此与 AmpErase UNG 相容。若怀疑存在 PCR 遗留物污染，可使用 AmpErase UNG 进行问题故障排除。

注意： 可单独购买 AmpErase UNG，或作为 SYBR® Green PCR Core Reagents 试剂盒的一部分购买。

一般 PCR 规范

谨记以下注意事项，以尽量避免样本污染和 PCR 产物遗留物：

- 当为 PCR 扩增准备样本时，请穿戴干净的实验室防护服 （处理扩增过的 PCR 产物时未穿过或样本准备期间使用的防护服）以及干净的手套。每当您怀疑手套受到污染时应进行更换。
- 保持隔离区域、专用设备和耗材，以便进行：
  - 样本准备。
  - PCR 设置。切勿将扩增过的 PCR 产物带到 PCR 设置区域。
  - PCR 扩增。
  - PCR 产物分析。
- 小心地打开和关闭所有样本管。避免 PCR 样本飞溅或喷射。
- 使用带有插入滤塞吸头的正压移液枪或排气移液枪。每次使用后更换吸头。
- 尽可能地使反应和组分保持瓶盖盖紧。
- 使用 10% 漂白剂溶液或 70% 乙醇定期清洁实验台和设备。

定量实验 3

本章包括：

第 3.1 部分 关于定量实验 3-3
第 3.2 部分 设计指南 3-15

第 3.1 部分　关于定量实验

本部分包括：

概述 3-4
选择定量方法 3-5
选择一步法 RT-PCR 或两步法 RT-PCR 3-7
选择单一或多重 PCR 3-9
选择试剂类型 3-11
选择检测类型 3-11

概述

什么是定量实验？

定量实验是一种实时实验，用于在聚合酶链反应 (PCR) 的每个扩增循环期间测定靶核苷酸序列 （靶）数量。其中靶可以是 DNA、 cDNA 或 RNA。

本指南中讨论以下三种类型的定量实验：

- 标准曲线 （第 3-5 页）
- 相对标准曲线 （第 3-5 页）
- 比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) （第 3-6 页）

定量实验的工作原理

在实时定量实验中，反应是在 PCR 产物的扩增达到固定荧光水平时的循环期间时间点来描述的，而不是在固定循环次数后累积的 PCR 产物最终数量来描述。扩增曲线以图形形式显示在执行的循环次数中检测到的荧光。

在 PCR 的最初几次循环中，荧光信号没有明显变化。该预定义的 PCR 循环范围称为*基线*。首先，软件通过计算归一化报告荧光信号强度 （与基线循环相对应的 Rn 值）的数学趋势，生成一个基线简化扩增曲线。然后，算法将搜索扩增曲线上基线校准后归一化报告荧光信号强度 （delta Rn [ΔRn] 值）与所设置阈值交叉的点。ΔRn 值与阈值交叉的循环定义为 C_T。

工作流程

在 Applied Biosystems StepOne 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 上执行定量实验之前，请按如下步骤准备实验：

1. 选择定量方法 （第 3-5 页）。
2. 选择一步法 RT-PCR 或两步法 RT-PCR （第 3-7 页）。
3. 选择单一或多重 PCR 反应 （第 3-9 页）。
4. 选择试剂类型 （第 3-11 页）。
5. 选择检测类型 （第 3-11 页）。
6. 查看您所选检测类型的设计指南 （第 3-15 页第 3.2 部分）。

选择定量方法

关于标准曲线实验

采用标准曲线方法确定样本中靶序列的绝对数量。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。软件使用标准曲线计算样本靶序列的绝对数量。

组分

当设置用于标准曲线实验的 PCR 反应时需要下列组分：

- **样本** － 靶数量未知的样本。
- **标准品**－含有已知标准品数量的样本；用于在定量实验中生成标准曲线。
- **标准品稀释序列**－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。
- **重复数**－包含相同样本、组分和体积的相同反应的总数。
- **阴性对照**－含有水或缓冲液的反应孔，不含样本模板。阴性对照反应孔中不应发生靶扩增。

关于相对标准曲线实验

采用相对标准曲线方法确定样本中靶序列的相对数量。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。

相对标准曲线实验通常用于：

- 比较某基因在不同组织中的表达水平。
- 比较某基因在已处理的样本与未处理的样本中的表达水平。
- 比较野生型等位基因与突变等位基因的表达水平。

组分

当设置用于相对标准曲线实验的 PCR 反应时需要下列组分：

- **样本** － 靶数量未知的样本。
- **对照样本**－用作相对定量结果的依据的样本。例如，在某项药物对基因表达影响的研究中，未处理的对照就是比较合适的对照样本。也称为*“校准品”*。
- **标准品**－含有已知标准品数量的样本；用于在定量实验中生成标准曲线。
- **标准品稀释序列**－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。
- **内对照**－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。内对照用于为您正定量的靶序列归一化荧光信号。管家基因也可用作内对照。
- **重复数**－包含相同样本、组分和体积的相同反应的总数。
- **阴性对照**－含有水或缓冲液的反应孔，不含样本模板。阴性对照反应孔中不应发生靶扩增。

关于比较 C_T 实验

比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 方法用于确定样本中靶序列的相对数量。采用比较 C_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。

比较 C_T 实验通常用于：

- 比较某基因在不同组织中的表达水平。
- 比较某基因在已处理的样本与未处理的样本中的表达水平。
- 比较野生型等位基因与突变等位基因的表达水平。

组分

当设置用于比较 C_T 实验的 PCR 反应时需要下列组分：

- **样本**－靶数量未知的样本。
- **对照样本**－用作相对定量结果的依据的样本。例如，在某项药物对基因表达影响的研究中，未处理的对照就是比较合适的对照样本。也称为*“校准品”*。
- **内对照**－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。内对照用于为您正定量的靶序列归一化荧光信号。管家基因也可用作内对照。
- **重复数**－包含相同样本、组分和体积的相同反应的总数。
- **阴性对照**－含有水或缓冲液的反应孔，不含样本模板。阴性对照反应孔中不应发生靶扩增。

定量方法比较

当在标准曲线、相对标准曲线和比较 C_T 实验之间作出选择时，应考虑以下因素：

实验类型	描述	优点	局限性
标准曲线	使用标准曲线确定样本中靶的绝对量。通常用于定量病毒载量。	允许与已知标准品数量进行比较。	必须为每个靶构建一条标准曲线，因此标准曲线实验在反应板内需要更多试剂和更多空间。
相对标准曲线	使用标准曲线以确定某个靶在样本中的表达相对于相同靶在对照样本中的变化。最适合于具有次佳 PCR 扩增效率的检测。	由于靶和内对照的 PCR 扩增效率并不需要相等，因此它需要的验证最少。	必须为每个靶构建一条标准曲线，因此相对标准曲线实验在反应板内需要更多试剂和更多空间。
比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$)	使用算术公式以确定某个靶在样本中的表达相对于相同靶在对照样本中的变化。最适合于高通量测量多个基因在大量样本中的相对基因表达。	• 只要靶和内对照的 PCR 扩增效率相对相等，便可确定样本中靶的相对水平，而无需使用标准曲线。 • 减少试剂的使用。 • 在反应板中留有更多可用空间。	• 次佳 （低 PCR 扩增效率）检测可能会产生不准确的结果。 • 在您使用比较 C_T 方法之前，Applied Biosystems 建议您确定靶检测和内对照检测的 PCR 扩增效率大致相等。

有关详情

有关定量方法的详情，请参阅 *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*。

选择一步法 RT-PCR 或两步法 RT-PCR

反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 用于定量 RNA。 RT-PCR 可按一步法或两步法步骤执行。

关于一步法 RT-PCR

在一步法 RT-PCR 中，您可在单一缓冲液系统中执行反转录和 PCR 扩增 （图 3-1）。在 RT 和 PCR 步骤之间不添加试剂的情况下反应也将继续进行。一步法 RT-PCR 只需简单地使用一个反应管即可做好 RT 及 PCR 扩增准备。然而，在一步法 RT-PCR 中，您不能使用遗留抑制酶 AmpErase® 尿嘧啶-N-糖基化酶 (UNG)。在一步法 RT-PCR 中，UNG 的存在将在生成 cDNA 时破坏 cDNA。有关 UNG 的信息，请参阅第 2-7 页 “使用 UNG 尽量避免重复扩增遗留产物”。

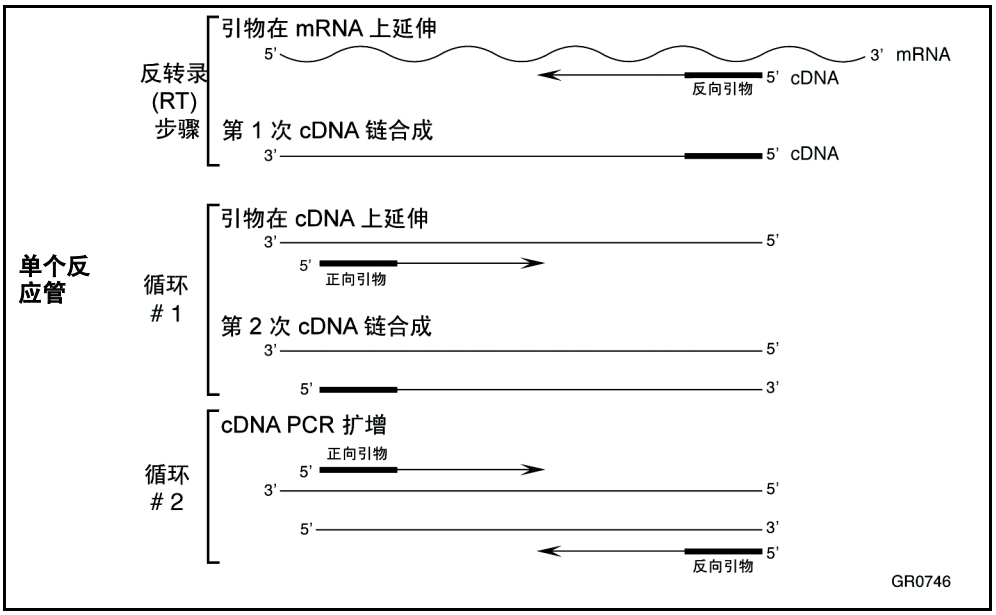


图 3-1　一步法 RT-PCR 扩增示意图

关于两步法 RT-PCR

在两步法 RT-PCR 扩增中，您可执行两个独立的反应：一个用于 RT，一个用于 PCR （图 3-2）。两步法 RT-PCR 适合于检测单个 cDNA 反应产生的多个转录物，或用于贮存一部分 cDNA 以便未来使用。当您使用 dUTP 作为一个碱基执行 PCR 时，您可使用 AmpErase® UNG 酶防止发生遗留污染。有关 UNG 的信息，请参阅第 2-7 页 “使用 UNG 尽量避免重复扩增遗留产物”。

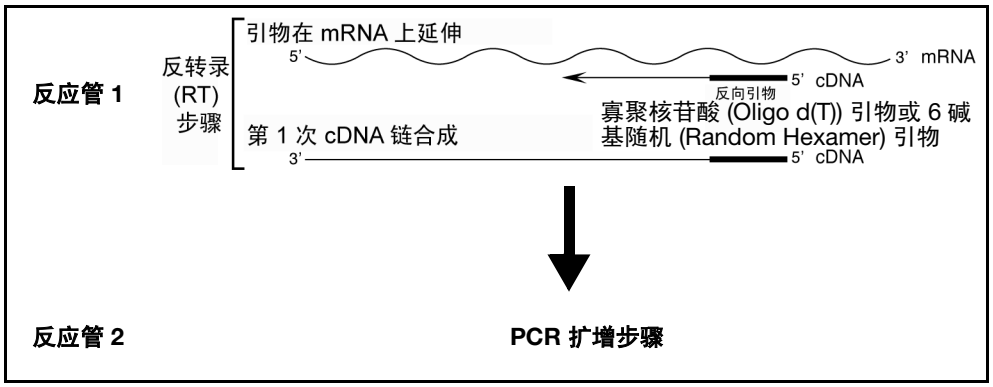


图 3-2　两步法 RT-PCR 扩增示意图

用于 cDNA 合成的引物

对于一步法 RT-PCR，序列特异性反向引物可用于 cDNA 合成。

对于两步法 RT-PCR，以下引物可用于 cDNA 合成。

- 寡核苷酸 $d(T)_{16}$
- 随机引物
- 序列特异性反向引物

最好在经过实验评估所有三个引物系统之后，才选择用于进行反转录的引物。对于不含发夹环的较短 RNA 序列，三个引发系统中任意一个系统的效果将相当。对于含有发夹环的较长 RNA 转录物或序列，请考虑以下指南：

引物	选择指南
寡核苷酸 $d(T)_{16}$	• 仅用于反转录带有 poly-A 尾的真核 mRNA 和反转录病毒 • 避免大于 2 千碱基 （从 poly-A 位点的上游）的较长 mRNA 转录物或扩增子
随机引物	• 首先尝试使用较长反转录物或含有发夹环的反转录物 • 用于转录所有 RNA （rRNA、 mRNA 和 tRNA）
序列特异性反向引物	• 仅用于反转录含有 RNA 的互补序列 • 用于一步法 RT-PCR 扩增中

RT-PCR 方法比较

方法	用于 cDNA 合成的引物	注释
一步法 RT-PCR	序列特异性反向引物	需要单一反应预混液 不可使用 AmpErase® UNG
两步法 RT-PCR	随机六聚体	可贮存 cDNA，以便将来使用 可使用 AmpErase® UNG 需要两种反应预混液
	寡核苷酸 $d(T)_{16}$	
	序列特异性反向引物	

选择单一或多重 PCR

您可采用下列方式之一执行 PCR 反应：

- **单一 PCR 扩增** – 在单一 PCR 中，在反应管或反应孔中存在单一的引物组合。每次反应仅可扩增一个靶或内对照。

  或

- **多重 PCR 扩增** – 在多重 PCR 扩增中，反应管或反应孔中存在两个或更多引物组合。每组扩增一个特定靶或内对照。通常， FAM™ 染料标记的探针用于检测靶， VIC® 染料标记的探针用于检测内对照。

  切记！ SYBR® Green 试剂不可用于多重 PCR。
  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。

图 3-3　单一 PCR 扩增与多重 PCR 扩增

关于多重 PCR 扩增

为了执行多重 PCR 扩增，您必须：

- 确保您选择的内对照比您尝试在所有条件下定量的所有靶具有更高的丰度 （更低的 C_T 值）。
- 将内对照检测作为引物限制检测运行。每个反应中的内对照检测 （对于更高丰度的模板）必须进行引物限制，以避免产生可能改变较低丰度模板的 C_T 的竞争性 PCR。

多重 PCR 中的引物限制

要生成准确的多重检测，一个物种的扩增不影响或控制另一物种的扩增非常重要。否则，高丰度物种的扩增可能会阻止低丰度物种的有效扩增。

若低丰度物种未能有效扩增，则您的实验可能产生不精确的结果，或者严重时可能会完全抑制低丰度物种的检测。您可通过限制用于扩增较高丰度物种的引物浓度来避免发生此情况，从而在已建立 C_T 之后马上 “关闭” 其扩增。但是，相对于正在归一化的引物非限制靶检测，引物限制检测可能更易受反应条件波动的影响。有关详情，请参阅附录 B “多重 PCR 中的引物限制”。

单一 PCR 扩增与多重 PCR 扩增

随着您定量的靶数量的增加，多重 PCR 中的引物限制不断变得更为复杂。当您分析多个数量的靶时，由于以下原因使用单一 PCR 可能更有效：

- 在多重 PCR 中，找到合适的内对照可能十分困难，该内对照需符合以下条件：
  - 比您正定量的所有靶有更高的丰度。
  - 不会随实验条件或样本不同而改变表达水平。

  首先，您必须采用多重或单一形式运行所有靶检测和内对照检测，然后比较从这两种形式得出的 C_T 值，以确定多重 PCR 是否对 C_T 值产生任何影响。
- 在单一 PCR 中，不会随实验条件或样本不同而改变表达水平的任何靶均可用作内对照。因此，在单一形式中您具有的靶越多，您将具有一种或多种合适内对照（根据其归一化您的剩余靶）的几率就会越高。

当在多重 PCR 和单一 PCR 之间进行选择时，应考虑以下因素：

PCR	描述	优点	局限性
单一	在反应管或反应孔中扩增一种靶或内对照的反应。	• 无需对 TaqMan® 检测进行优化。 • 不会随实验条件或样本不同而改变表达水平的任何靶均可用作内对照。 • 可灵活使用 TaqMan® 或 SYBR® Green 试剂。	• 靶和内对照均需要样本。
多重	在反应管或反应孔中扩增一个以上靶或内对照的反应。	• 降低运行成本，及在将样本分到两支单独反应管时对准确移液的依赖性。	• 必须将内对照检测作为引物限制检测运行。 • 需进行验证和优化。 • 在分析多个数量的靶时，可能不如单一 PCR 有效。 • 您不可使用 SYBR® Green 试剂。

选择试剂类型

TaqMan 与 SYBR Green 试剂

您可使用以下试剂在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行定量实验：

- TaqMan® 试剂
- SYBR® Green 试剂

有关在 TaqMan 与 SYBR Green 试剂之间进行选择的信息，请参阅第 2-6 页 “定量实验考虑因素”。

选择检测类型

当您使用 StepOne 软件设计实验时，您可为定量实验选择以下检测类型：

- Inventoried/Made to Order （第 3-12 页）
- Custom （第 3-13 页）

本部分列出每种检测类型的可用产品。

注意： 这些检测对于目标靶是特定的。母液含有 PCR 反应所需的恒定的组分。

Inventoried/Made to Order 检测

产品	属性
TaqMan® Gene Expression Assays	• 预设计的、基因特定引物和探针组合，用于人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*、*秀丽隐杆线虫*、*家犬*（犬）和*猕猴*（恒河猴）基因。 • 探针为 FAM™ 染料标记的 MGB 探针。 • 在方便的 20× 单反应管中提供。 • 作为 Inventoried 或 Made to Order 检测提供。
TaqMan® Endogenous Control Assays 注意： 包括 FAM™ 染料标记的 TaqMan® Endogenous Control Assays，作为 Inventoried TaqMan Gene Expression Assays。	• 已经过优化、预制备、即开即用的内对照检测。 • 低成本高效益的基因表达定量，用于人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*和任何真核物种。 • 选择 FAM™ 染料或 VIC® 染料标记 （引物限制）。
Custom TaqMan® Gene Expression Assays	• 任何物种或生物。 • 您选择的靶。 • 探针为 FAM™ 染料标记的 MGB 探针。 • 在方便的 20× 单反应管中提供。
TaqMan® Gene Expression Master Mix	特制的，用于通过实时 PCR 为常规和有挑战性的实验进行精确定量： • 敏感性检测降至 1 个靶拷贝。 • 多重 PCR，在一个反应中同时扩增两个靶。 • 特异性，以便区分基因家族各成员。 • 使用 TaqMan® Gene Expression Assays 验证其有效性。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix（含有或不含 AmpErase® UNG）	• 为使用 cDNA 或 DNA 作为模板的 TaqMan® 检测提供最佳性能。 • 含有确保获取卓越检测性能的组分。 • 为所有检测使用一种试剂简化了检测执行过程。
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase® UNG	• 提供与上文所列的 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix 相同的属性。 • 允许您在约 35 分钟内在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统上运行定量实验。

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。

有关使用 Inventoried/Made to Order 检测设计您的实验的指南，请参阅第 3-16 页。

Custom 检测

产品	属性
Custom TaqMan® Probes and Primers	• 任何物种或生物。 • 选择染料标记、淬灭基团和合成量。 • 用于配合 Primer Express® Software 和 Applied Biosystems 检测设计指南使用。
Primer Express® Software	为实时 PCR 设计引物和探针的软件。
TaqMan® Gene Expression Master Mix	特制的，用于通过实时 PCR 为常规和有挑战性的实验进行精确定量： • 灵敏度检测降至 1 个靶拷贝。 • 多重 PCR，在一个反应中同时扩增两个靶。 • 特异性，以便区分基因家族各成员。 • 使用 TaqMan® Gene Expression Assays 验证其有效性。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix（含有或不含 AmpErase® UNG）	• 为使用 cDNA 或 DNA 作为模板的 TaqMan® 检测提供最佳性能。 • 含有确保获取卓越检测性能的组分。 • 为所有检测使用一种试剂简化了检测执行过程。
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase® UNG	• 提供与上文所列的 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix 相同的属性。 • 允许您在约 35 分钟内在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统上运行定量实验。
Power SYBR® Green PCR Master Mix	• 高灵敏度定量使您能够进行低拷贝数检测 （最少两份拷贝靶基因）。 • 检测双链 DNA，因此不需要特定探针。 • 含有高度纯化的 AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶 LD，以尽量避免形成非特异性产物 （包括引物-二聚物）。 • 用于配合 Primer Express® Software 和 Applied Biosystems 检测设计指南使用。
SYBR® Green PCR Master Mix	• 检测双链 DNA，因此不需要特定探针。 • 当不需要高灵敏度时，用于标准应用。 • 含有 AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶，以尽量避免形成非特异性产物 （包括引物-二聚物）。 • 用于配合 Primer Express® Software 和 Applied Biosystems 检测设计指南使用。

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。

有关使用 Custom 检测设计您的实验的指南，请参阅第 3-21 页。

第 3.2 部分　设计指南

本部分包括：

Inventoried/Made to Order 检测 3-16
TaqMan® Gene Expression Assays 3-16
Custom TaqMan® Gene Expression Assays 3-18
选择母液 3-19
设计实验 3-20
Custom 检测 3-21
使用 Primer Express® Software 设计引物和探针 3-21
选择试剂 3-24
使用建议的热循环条件 3-27
优化引物浓度 3-30
优化探针浓度 3-32
有关详情 3-34

Inventoried/Made to Order 检测

工作流程　若您在 StepOne™ 软件中选择 Inventoried/Made to Order 检测类型， Applied Biosystems 建议您遵照下面的工作流程：

1. 选择检测：
   - TaqMan® Gene Expression Assays （下文）。
   - Custom TaqMan® Gene Expression Assays （第 3-18 页）。
2. 选择母液 （第 3-19 页）。
3. 使用 StepOne 软件设计实验 （第 3-20 页）。

TaqMan® Gene Expression Assays

产品描述　TaqMan® Gene Expression Assays 是一组范围广泛的库存和订购探针及引物组合，用于对人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*、*秀丽隐杆线虫*、*家犬*（犬）和*猕猴*（恒河猴）基因执行定量实验。

这些检测：

- 使用 TaqMan® 试剂扩增并检测 cDNA 样本中的靶。
- 均使用自动设计和控制质量的系列产品进行设计。库存检测已生产备妥并存放于库存中；订购检测是预设计的，并在订购时生产。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。
- 若可能，在不扩增基因组 DNA （检测 ID 带 *m* 后缀）的情况下，通过设计交叉外显子 — 外显子连接点的探针扩增靶 cDNA。

产品要求　所有 TaqMan Gene Expression Assays 均需要：

- 三种组分：
  - 每个反应孔 1 至 100 ng cDNA 样本 （从 RNA 转化而来），研究中的所有反应孔均具有相同量的 cDNA。
  - 20× Gene Expression Assay Mix （特定于每种靶）。每种检测母液在预制备的 20× 预混液中都包含两个未标记的 PCR 引物，和一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB （小沟结合物）探针。对于探针， 1× 终浓度为 250 nM，而对于每个引物，终浓度为 900 nM。
  - TaqMan® Gene Expression Master Mix、 TaqMan® Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）或 TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG。
- 每个 PCR 循环期间仅需一个 PCR 扩增步骤，并同时进行实时读取以获取结果。

可用检测

TaqMan Gene Expression Assays 可用于人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*、*秀丽隐杆线虫*、*家犬*（犬）和*猕猴*（恒河猴）基因检测。部件号为：

- 库存分析产品部件号为 4331182
- 订购分析产品部件号为 4351372

检测名的前缀表示为其设计检测的物种：*Hs* 代表*智人种*（人类）、 *Mm* 代表*小家鼠*（小鼠）、 *Rn* 代表*褐家鼠*（大鼠）、 *At* 代表*拟南芥*、 *Dm* 代表*黑腹果蝇*、 Ce 代表*秀丽隐杆线虫*、 Cf 代表*家犬*（犬）、 Rh 代表*猕猴*（恒河猴）。

检测名的后缀表示检测安排，如下表所述。

后缀	描述
_m	检测的探针跨过外显子连接点；该检测不检测基因组 DNA。
_s	检测的引物和探针设计处于单个外显子内；该检测检测基因组 DNA。
_g	该检测可能检测基因组 DNA；检测的引物和探针可能处于单个外显子内。
_mH	检测设计用于属于较高序列同源性基因家族的转录物。该检测在靶基因和具有最紧密序列同源性的基因之间提供 10 C_T 至 15 C_T 之间的差异。因此，若在样本中以相同拷贝数存在，则该检测检测到靶转录物比最紧密同源性转录物具有 1000 至 30,000 倍的更大差别 （敏感性）。
_sH	
_gH	
_u	检测的扩增子跨过外显子连接点，且探针位点完全位于其中一个跨过外显子中。

TaqMan® Endogenous Control Assays

TaqMan® Endogenous Control Assays 为：

- Inventoried TaqMan Gene Expression Assays （部件号 4331182）－每个检测在单个、预制备的 20× 反应管中包含一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB 探针。
- 用于所有人类、小鼠和大鼠物种的单个对照检测 （不同部件号）－每个检测包含一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB 探针、 VIC® 染料标记的 TaqMan® MGB 探针或 TAMRA™ 染料标记的探针。具有 VIC 染料标记的 TaqMan Endogenous Controls 为引物限制。

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

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® Gene Expression Assays**。

b. 在 Gene Expression Assays & Arrays （基因表达检测与芯片）页面：
   - 从 Individual Assays （单个检测）下选择 **TaqMan® Gene Expression Assays**。此选项链接到所有 TaqMan Gene Expression Assays，包括含有 FAM 染料标记的探针的 TaqMan Endogenous Control Assays。

   或

   - 从 Individual Control Assays （单个对照检测）下选择 **TaqMan® Endogenous Control Assays**。此选项链接到单个 TaqMan Endogenous Control Assays （含有 FAM 染料标记的 TaqMan MGB 探针、 VIC 染料标记的 TaqMan MGB 探针或 TAMRA 染料标记的探针）。

- 有关 Custom TaqMan Endogenous Control Assays 的信息，请参阅 *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note*。
- 有关使用 TaqMan Gene Expression Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*。

Custom TaqMan® Gene Expression Assays

产品描述

Custom TaqMan® Gene Expression Assays 是根据您提交的序列信息通过 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务设计、合成并制备的 TaqMan 探针和引物组合。Custom TaqMan Gene Expression Assays 允许您对任何生物中的任何基因或剪接变异体执行定量实验。

这些检测：

- 使用 TaqMan® 试剂扩增并检测 cDNA 样本中的靶。
- 均使用专用检测设计软件而开发。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。

产品要求

所有 Custom TaqMan Gene Expression Assays 均需要：

- 一个包括您的靶序列的提交文件。您使用免费的 File Builder 软件创建提交文件，然后将该文件提交给 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务。
- 三种组分：
  - 每个反应孔 1 至 100 ng cDNA 样本 （从 RNA 转化而来），研究中的所有反应孔均具有相同量的 cDNA。
  - 20× Gene Expression Assay 或 60× Gene Expression Assay （特定于每种靶）。每种检测在预制备的 20× 或 60× 预混液中都包含两个靶特异引物，和一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan MGB 探针。对于探针， 1× 终浓度为 250 nM，而对于每个引物，终浓度为 900 nM。
  - TaqMan® Gene Expression Master Mix、 TaqMan® Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）或 TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG。
- 每个 PCR 循环期间仅需一个 PCR 扩增步骤，并同时进行实时读取以获取结果。

有关详情

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® Gene Expression Assays**。

  b. 在 Gene Expression Assays & Arrays （基因表达检测与芯片）页面上，从 Individual Assays （单个检测）下选择 **Custom TaqMan® Gene Expression Assays**。
- 有关订购 Custom TaqMan Gene Expression Assays 的信息，请参阅 *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol:Submission Guidelines*。
- 有关使用 Custom TaqMan Gene Expression Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*。

选择母液

可用母液

Applied Biosystems 用于进行定量实验的 Inventoried/Made to Order 检测设计用于配合以下 TaqMan® 母液使用：

母液	部件号
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)，200 次反应	4369016
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG，250 次反应	4352042
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020

有关详情　有关使用 TaqMan 试剂的信息，请参阅：

- *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol*
- *TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*

设计实验

使用 StepOne 软件　对于 Applied Biosystems Inventoried/Made to Order 分析产品，使用 StepOne 软件设计您的定量实验。 StepOne 软件自动计算以下组分的体积：

- 反应预混液各组分
- 样本稀释
- *（仅限标准曲线和相对标准曲线实验）*标准品稀释序列

注意： 要在 StepOne 软件中选择 Inventoried/Made to Order 检测类型，请在 Design Wizard （设计向导）或 Advanced Setup （高级设置）中转至 Reaction Setup （反应设置）屏幕，然后从 Assay Type （检测类型）下拉菜单中选择 **Inventoried/Made to Order**。

有关详情　有关在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上设计和执行定量实验的信息，请参阅：

- *《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 标准曲线实验入门指南》*
- *《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》*

Custom 检测

工作流程

若您在 StepOne™ 软件中为定量实验选择 Custom 检测类型 （即，您正设计自己的引物和探针）， Applied Biosystems 建议您遵照 Applied Biosystems 检测设计指南的工作流程：

1. 使用 Primer Express® Software 设计引物和探针 （下文）。
2. 选择适当的试剂 （第 3-24 页）。

   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。
3. 使用建议的热循环条件 （第 3-27 页）。
4. 以默认引物和探针浓度开始。若需要，优化引物浓度 （第 3-30 页）和探针浓度 （第 3-32 页）。

切记！ 完整执行这些步骤可让您通过系统快速、可靠地设计和优化检测。作为整体使用该系统，以达到最高的检测成功率。有关 Applied Biosystems 检测设计指南的详情，请参阅附录 C。

注意： 要在 StepOne 软件中选择 Custom 检测类型，请在 Design Wizard （设计向导）或 Advanced Setup （高级设置）中转至 Reaction Setup （反应设置）屏幕，然后从 Assay Type （检测类型）下拉菜单中选择 **Custom**。

使用 Primer Express® Software 设计引物和探针

Primer Express® Software 根据您提供的 DNA 序列使用建议参数选择引物和探针。

若您正在设计自己的检测，遵照第 3-23 页的定量实验引物和探针设计指南概述。有关这些指南的详细说明，请参阅第 3-22 页 “关于引物和探针设计指南”。

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。

注意： 尽管 SYBR® Green I 染料检测不需要探针，但是当您为 SYBR® Green 试剂设计检测时，使用 Primer Express 软件选择一种引物和探针组合仍是一种好方法。尽管将不使用探针，但是引物将符合所有必要的条件；若您需要将检测转换为 TaqMan 试剂以获取更高的特异性，您可在原始 Primer Express 软件文档中立即找到探针。

为定量检测选择扩增子位点

选择一个较好的扩增子位点可确保扩增靶 mRNA/cDNA，而不会同时扩增基因组序列、假基因和其它相关基因。 SYBR Green 试剂可用于筛查扩增子位点以便进行基因表达。

指南

- 扩增子应跨过一个或多个内含子，以避免扩增基因组 DNA 中的靶基因。
- 引物对应特定于靶基因，以避免扩增假基因或其它相关基因。

- 当设计引物时，请使用 Primer Express 软件指南。
- 若找不到较好的序列，可能需要检查序列并重新设计扩增子或只是筛查更多位点。

若您正研究的基因不具有内含子，则不可能设计一个只扩增 mRNA 序列，而不扩增基因组序列的扩增子。在这种情况下，对尚未进行反转录 （RT 阴性对照）的 RNA 样本运行对照。

关于引物和探针设计指南

选择较小扩增子

Primer Express 软件中的一个重要默认参数是在 50 至 150 碱基对范围内选择扩增子。因为较小扩增子会提高扩增效率，因此应首选。

此外，高效检测能够使用比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 执行相对定量 (Livak and Schmittgen, 2001)。此方法不需要标准曲线，从而提高了样本通量。

G/C 含量

若可能，应在 G/C 含量为 30 至 80% 的区域内选择引物和探针。热循环期间，G/C 含量 >80% 的区域可能变性情况不佳，从而导致反应效率较低。富含 G/C 的序列对非特异性的相互作用敏感，该相互作用可能会在使用 SYBR Green 试剂的检测中降低反应效率并产生非特异性信号。因此应避免设计对四个或多个 G 碱基进行检测的引物和探针序列。

解链温度

当您选择具有建议解链温度 (Tm) 的引物和探针时，您可使用通用热循环条件。 Applied Biosystems 建议探针的 Tm 要比引物的 Tm 高 10 °C。

探针的 5′ 端

Primer Express 软件不会选择 5′ 端上带有 G 的探针。甚至在探针裂解后，此位置的 G 碱基的淬灭效果仍将存在。G 碱基的存在会导致可负面影响检测性能的荧光强度值 (ΔRn) 降低。在接近 5′ 端的位置 （但不在 5′ 端位置）含有 G 碱基尚未表明会影响检测性能。

引物的 3′ 端

要降低非特异性产物形成的可能性，请确保引物 3′ 端上的最后五个碱基不含两个以上的 C 和/或 G 碱基。在某种情况下 （如富含 G/C 的模板序列），您可能必须放宽此建议以使扩增子长度保持在 150 个碱基对以下。通常，应避免引物 3′ 端 G 和/或 C 碱基含量过高。

引物和 MGB 探针设计指南概述

<table>
<tr><th>探针指南</th><th>引物指南</th></tr>
<tr><td colspan="2">首先选择探针，然后设计引物使其尽可能接近探针，而不重叠探针 （强烈建议包含 50 至 150 个碱基对的扩增子）。</td></tr>
<tr><td colspan="2">将 G/C 含量保持在 30 至 80% 范围内。</td></tr>
<tr><td colspan="2">避免对相同核苷酸 （尤其是鸟嘌呤）进行检测，其中应避免对四个或多个 G 碱基进行检测。</td></tr>
<tr><td>当使用 Primer Express® Software 时， Tm 应为 68 至 70 °C。</td><td>当使用 Primer Express® Software 时， Tm 应为 58 至 60 °C。</td></tr>
<tr><td>5′ 端上不含 G 碱基。</td><td rowspan="2">3′ 端上的五个核苷酸不得含有两个以上的 G 和/或 C 碱基。</td></tr>
<tr><td>使 TaqMan® MGB 探针尽可能短，但不短于 13 个核苷酸。</td></tr>
</table>

选择试剂

有几种 TaqMan 和 SYBR Green 试剂可用于定量实验。您所使用的试剂取决于您要检测的靶：

- DNA 或 cDNA （下文）。
- RNA，采用一步法 RT-PCR 扩增 （第 3-25 页）。
- RNA，采用两步法 RT-PCR 扩增 （第 3-26 页）。

注意： 若您正在使用 SYBR Green 试剂， Applied Biosystems 强烈建议您使用 *Power* SYBR Green 试剂。

DNA 或 cDNA 定量

试剂	试剂盒	部件号
TaqMan® 试剂	TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
	TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)， 2000 次反应	4369542
	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG， 250 次反应	4352042
	TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
	TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
	10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4305719
	TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 200 次反应	4324018
	TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
	10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， No AmpErase® UNG	4324020
	TaqMan® PCR Core Reagents Kit， 200 次反应	N808-0228

试剂	试剂盒	部件号
SYBR® Green 试剂	*Power* SYBR® Green PCR Master Mix (1 mL)，40 次反应	4368577
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (5-mL)，200 次反应	4367659
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (10 × 5-mL)，2000 次反应	4368708
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (50 mL)，2000 次反应	4367660
	SYBR® Green PCR Master Mix (1-mL)，40 次反应	4344463
	SYBR® Green PCR Master Mix (5-mL)， 200 次反应	4309155
	SYBR® Green PCR Master Mix (50-mL)， 2000 次反应	4334973
	SYBR® Green PCR Core Reagents， 200 次反应	4304886

采用一步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

试剂	试剂盒	部件号
TaqMan® 试剂	TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit	4309169
	TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents 注意： 当需要高温 RT 步骤时使用 TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents。	N808-0236
SYBR® Green 试剂	*Power* SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	4368711
	SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

采用两步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

试剂	步骤	试剂盒	部件号
TaqMan® 试剂	仅限 PCR 扩增步骤	TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
		TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
		TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4304437
		TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase® UNG	4352042
	仅限 RT 步骤	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
		TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
	RT 和 PCR 步骤	TaqMan® Gold RT PCR kit	N808-232
SYBR® Green 试剂	仅限 PCR 扩增步骤	*Power* SYBR® Green PCR Master Mix	4367659
		SYBR® Green PCR Master Mix	4309155
	仅限 RT 步骤	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
		TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
	RT 和 PCR 步骤	*Power* SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	4368711
		SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

关于 AmpliTaq Gold DNA Polymerase

使用热启动酶 AmpliTaq Gold® DNA Polymerase 是 TaqMan 和 SYBR Green 试剂的 Applied Biosystems 检测设计指南的一个组成部分。 AmpliTaq Gold DNA Polymerase 可确保高效反应，并显著降低非特异性产物形成的数量。更进一步的优点如简化检测设置，及可在室温下执行。

注意： TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG 中包括的 DNA 聚合酶能够很快热启动 PCR。其性能类似于 AmpliTaq Gold DNA Polymerase 的性能。

关于 MultiScribe 反转录酶

MultiScribe™ Reverse Transcriptase 是一种重组莫洛尼鼠白血病病毒 (MuLV) 反转录酶，它将 RNA 反转录为互补 DNA (cDNA)。

使用建议的热循环条件

使用为您的样本建议的热循环条件：

- DNA 或 cDNA （第 3-28 页）。
- RNA，采用一步法 RT-PCR 扩增 （第 3-28 页）。
- RNA，采用两步法 RT-PCR 扩增 （第 3-29 页）。

注意： Fast 试剂的热循环条件与标准试剂的热循环条件不同。

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。

若您正在 StepOnePlus 扩增仪上运行实验，您可将一个或几个 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，您也可将所有 VeriFlex 样本加热块都设置为同一个温度。

有关使用 VeriFlex 样本加热块的详情，请单击工具栏中的 ? 或按 **F1** 键，以访问 StepOne 软件内的 Help （帮助）信息。

DNA 或 cDNA 定量

对于 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2✕), No AmpErase UNG，请遵照以下条件：

时间和温度			
初始步骤		PCR （40 次循环）	
AmpErase® UNG 活化‡	活化	熔解	退火/延伸
保持	保持	循环	
2 分 @ 50 °C	20 秒 @ 95 °C	1 秒 @ 95 °C	20 秒 @ 60 °C

‡ 仅当向反应中加入 AmpErase® UNG 时才需要。

对于 TaqMan Gene Expression Master Mix、 TaqMan 2✕ Universal PCR Master Mix 和 *Power* SYBR Green PCR Master Mix，请遵照以下条件：

时间和温度			
初始步骤		PCR （40 次循环）	
AmpErase® UNG 活化‡	AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶活化	熔解	退火/延伸
保持	保持	循环	
2 分 @ 50 °C	10 分 @ 95 °C	15 秒 @ 95 °C	1 分 @ 60 °C

‡ 仅当向反应中加入 AmpErase® UNG，或其包含在母液中时才需要。

采用一步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

对于 TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit 和 *Power* SYBR Green RT-PCR Reagents Kit，请遵照以下条件：

时间和温度			
初始步骤		PCR （40 次循环）	
反转录	AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶活化	熔解	退火/延伸
保持	保持	40 次循环	
30 分 @ 48 °C	10 分 @ 95 °C	15 秒 @ 95 °C	1 分 @ 60 °C

注意：这些条件不适用于 TaqMan EZ RT-PCR Kit。有关适当条件的信息，请参阅 *TaqMan® EZ RT-PCR Kit Protocol*。

采用两步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

对于 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit，请遵照以下条件：

步骤	时间和温度	
1. RT 步骤	步骤 1	步骤 2
	保持	保持
	10 分 @ 25 °C	120 分 @ 37 °C
在将 RNA 反转录为 cDNA （RT 步骤）之后，可储存样本或将其用于下文描述的随后的 PCR 步骤。		

切记！ 对于大多数扩增子及当需要大量 cDNA 时，Applied Biosystems 建议在 37 °C 下进行 120 分钟的反转录，以达到最佳转换效果。

对于 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG，请遵照以下条件：

步骤	时间和温度			
2. PCR 扩增步骤	初始步骤		PCR （40 次循环）	
	AmpErase® UNG 活化‡	AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶活化	熔解	退火/延伸
	保持	保持	循环	
	2 分 @ 50 °C	20 秒 @ 95 °C	1 秒 @ 95 °C	20 秒 @ 60 °C

‡ 仅当向反应中加入 AmpErase® UNG 时才需要。

对于 TaqMan Gene Expression Master Mix、 TaqMan 2× Universal PCR Master Mix （包含 AmpErase UNG）和 *Power* SYBR Green PCR Master Mix，请遵照以下条件：

步骤	时间和温度			
2. PCR 扩增步骤	初始步骤		PCR （40 次循环）	
	AmpErase® UNG 活化	AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶活化	熔解	退火/延伸
	保持	保持	循环	
	2 分 @ 50 °C	10 分 @ 95 °C	15 秒 @ 95 °C	1 分 @ 60 °C

优化引物浓度

通过单独改变正向引物和反向引物的浓度，您可确定提供最佳检测性能的浓度。在 PCR 扩增的指数级阶段，引物始终具有过多的摩尔量。

当您使用 TaqMan Gene Expression Master Mix 或 TaqMan 2× Universal PCR Master Mix 时， Applied Biosystems 建议采用下文 “默认引物浓度”中列出的引物浓度。后跟以下项的详细描述：

- 引物优化矩阵 （下文）
- TaqMan 试剂 （下文）
- SYBR Green 试剂 （第 3-31 页）

默认引物浓度

下表列出的建议引物初始浓度用于 DNA 和 cDNA 定量检测。

试剂	浓度 (nM)	
	正向引物	反向引物
TaqMan® 试剂	900	900
SYBR® Green 试剂	50	50

引物优化矩阵

引物优化矩阵让您确定最低引物浓度会产生最低 C_T 值和最高 ΔR_n 值。

引物优化矩阵有助于补偿非特异性引物结合，这可减少在特定位点进行结合的引物数量。

TaqMan 试剂

对于使用 TaqMan 试剂的定量实验，您可通过选择为固定数量的靶模板提供最低 C_T 值和最高 ΔRn 值的引物浓度来达到最佳性能。

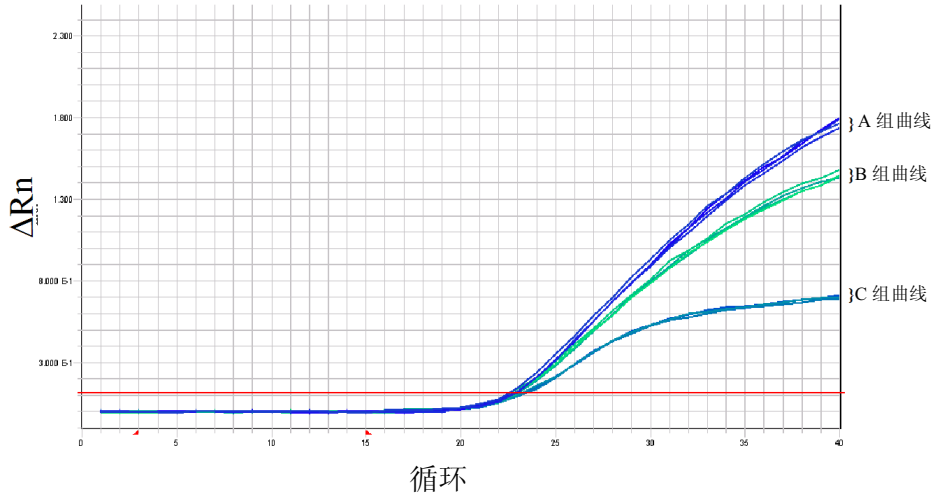
注意： 尽管 C_T 值是在实时定量检测中指定定量值的参数，但是当您尝试获取最大灵敏度和可重复性时， ΔRn 值也十分重要。

第 3-31 页图 3-4 显示了典型 TaqMan 试剂引物优化矩阵实验的结果：

- 图 3-4a 以线性视图显示所有引物浓度组合的扩增曲线。
- 图 3-4b 以对数视图形式显示相同数据。

50-nM 正向和反向引物的组合 （C 组曲线）提供最低 ΔRn 值和最高 C_T 值。所有含有 150-nM 正向或反向引物浓度的其它引物组合 （B 组曲线）提供降低的 ΔRn 值。含有至少 300-nM 正向和反向引物的引物组合 （A 组曲线）提供最高 ΔRn 值和最低 C_T 值；因此， A 组曲线或 B 组曲线中的任何一组均提供最佳性能。

a) 线性视图



b) 对数视图

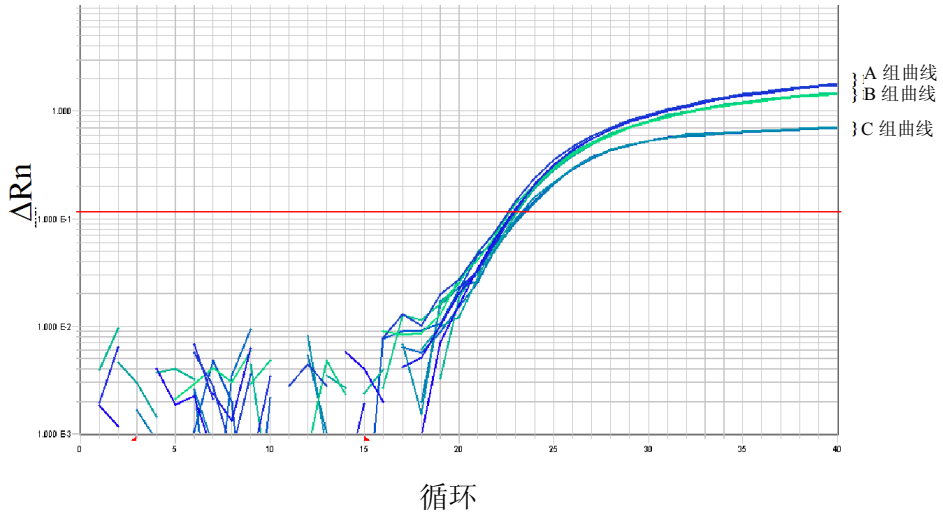


图 3-4　显示引物组合扩增曲线 （线性和对数视图）的引物优化实验结果
曲线组关键字：
A：含有至少 300 nM 正向和反向引物的组合
B：含有至少 150 nM 正向和反向引物的组合
C：含有至少 50 nM 正向和反向引物的组合

SYBR Green 试剂

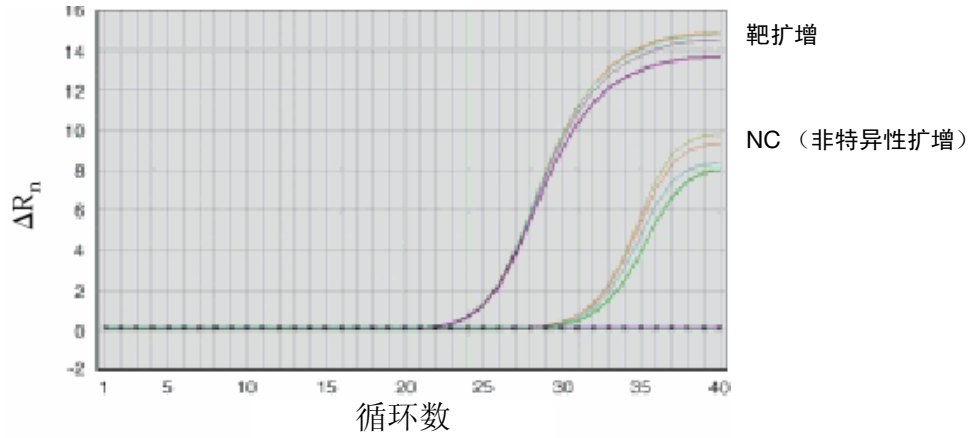
对于使用 SYBR Green 试剂的定量实验，优化引物浓度略微更复杂一些。您应执行与 TaqMan 试剂相同的引物优化矩阵；但是您必须为 SYBR Green 试剂包括阴性对照。当对靶模板运行检测时，您所选的引物浓度应提供较低的 C_T 值和较高的 ΔRn 值，但不应随阴性对照产生非特异性产物。

当您为使用 SYBR Green 试剂的定量检测选择最佳引物浓度时，解链曲线或凝胶分析极其有用。第 3-32 页图 3-5 显示了在 900-nM 正向引物和反向引物的引物浓度下从引物优化矩阵得出的结果：

- 图 3-5a 显示阴性对照反应孔的较强扩增，这表示正在发生明显的非特异性扩增。
- 图 3-5b 显示在缺少模板的情况下所产生的产物的解链温度低于随模板产生的特定产物的解链温度，表示正在发生明显的非特异性扩增。

图 3-5 中显示的结果是形成引物-二聚体的代表。这些结果表示更低的引物浓度可能会提供更佳的结果。此外，您可为目标靶重新设计另一组引物。

a) 扩增曲线，线性视图



b) 解链曲线分析

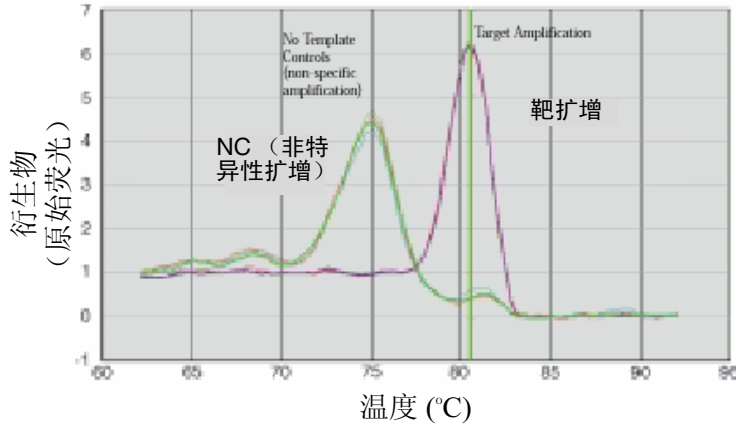


图 3-5　使用 SYBR® Green 试剂得出的扩增数据
(a) 扩增曲线 （线性视图），表示怀疑阴性对照 (NC) 反应孔中发生非特异性扩增
(b) 解链曲线分析，确认 NC 反应孔中的产物具有与特定产物不同的解链温度

优化探针浓度

对于由 TaqMan® 探针进行的检测，建议的探针浓度 250 nM 可确保极佳检测性能。但是，根据检测需要，探针优化可能十分有用。

注意： SYBR Green I 染料检测无需探针。

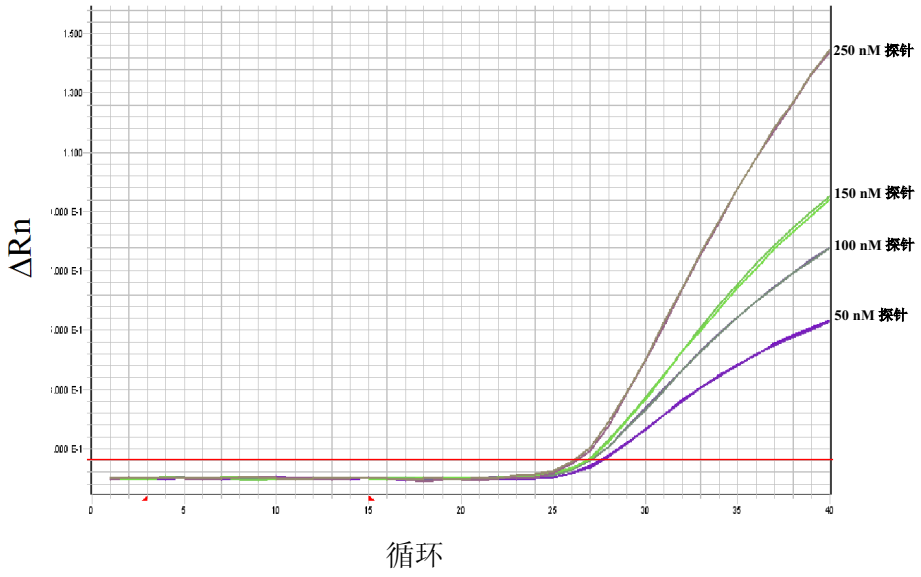
建议探针浓度

为使用 TaqMan 试剂进行的 DNA 和 cDNA 定量检测建议的探针浓度为 250 nM。图 3-6 显示了探针优化实验的结果，其中探针浓度在 50 至 250 nM 之间变化：

- 图 3-6a 显示 ΔRn 值随探针浓度的升高而升高。
- 图 3-6b 显示 C_T 值随充足的探针浓度的变化而变化。

为确保最好的可重复性，尤其是当您想要检测低拷贝数的靶时，请避免采用探针极限浓度。在 250 nM 的探针浓度下运行检测。采用 250-nM 浓度，您可避免探针限制并确保获得较大的 ΔRn 值。较大的 ΔRn 值表示正以高效率执行、提供较高产物产量、并允许进行精确峰值测量的高效检测。

a) 线性视图



b) 对数视图

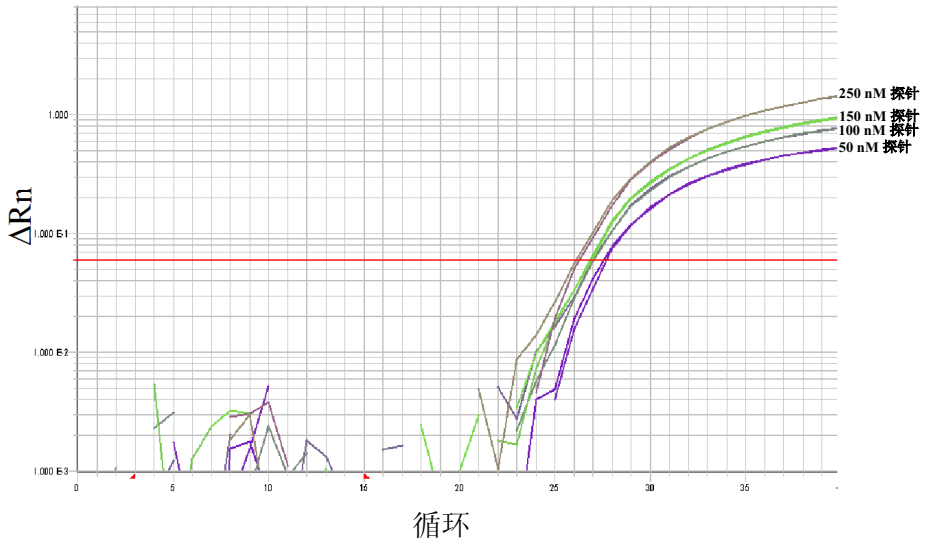


图 3-6　50 至 250 nM 滴定浓度探针的扩增曲线 （线性和对数视图）

有关详情

有关信息：

- 使用 TaqMan 试剂，请参阅：
  - *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol*
  - *TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol*
  - *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*
- 使用 SYBR Green 试剂，请参阅：
  - *Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol*
  - *SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol*
  - *SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol*
- 在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行定量实验，请参阅：
  - *《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 标准曲线实验入门指南》*
  - *《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》*
- 在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行存在/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》*。

基因分型实验 4

本章包括：

第 4.1 部分 关于基因分型实验 4-3
第 4.2 部分 设计指南 4-9

第 4.1 部分　关于基因分型实验

本部分包括：

概述 4-4
选择检测类型 4-6

概述

什么是基因分型实验？

基因分型实验是用于确定未知样本基因型的终点实验。通过这种实验类型，您可区分单核苷酸多态性 (SNP)。

基因分型实验确定未知样本是否属于以下类型：

- 纯合子 （只含有等位基因 1 的样本）
- 纯合子 （只含有等位基因 2 的样本）
- 杂合子 （同时含有等位基因 1 和等位基因 2 的样本）

组分

用于基因分型实验的 PCR 反应包括以下组分：

- **样本**－靶基因型未知的样本。
- **（可选）重复反应** － 含有相同组分和体积的相同反应。
- **阴性对照**－含有水或缓冲液的样本，不含模板；也称为 “无模板对照 (NTC)”。阴性对照应不会扩增。
- **（可选）阳性对照**－含有已知基因型的样本 （含等位基因 1 的纯合子、含等位基因 2 的纯合子、及含等位基因 1 和 2 的杂合子）。

仪器

基因分型实验需要两个步骤：热循环 （PCR 扩增），后跟对所产生荧光信号的终点检测。您可在 Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 或独立的热循环仪上执行热循环步骤 （PCR 扩增）。

若您使用 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统：

- 您可分析 PCR 扩增，这有助于进行故障排除。
- 单独执行终点反应板读取。

基因分型实验工作原理

在基因分型实验中，PCR 为每个等位基因包括一个特定荧光染料标记的探针。这些探针含有不同的荧光报告染料，用以区分每个等位基因。

您可在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上使用 TaqMan® 小沟结合物 (MGB) 探针。每个 TaqMan® MGB 探针含有以下组分：

- 在每个探针的 5′ 端含有报告染料
  - VIC® 染料连接到等位基因 1 探针的 5′ 端
  - FAM™ 染料连接到等位基因 2 探针的 5′ 端
- 小沟结合物 (MGB)

  此修饰提高探针的解链温度 (Tm)，而不增加探针的长度 (Afonina *et al.*, 1997; Kutyavin *et al.*, 1997)，从而允许设计更短的探针。因此， TaqMan MGB 探针会在匹配和错配探针之间的 Tm 值上显示较大差异； Tm 值的更大差异有助于提供准确的基因分型。
- 在探针的 3′ 端含有无荧光淬灭基团 (NFQ)

  因为淬灭基团不会发出荧光，因此实时 PCR 系统可以更准确地测量报告染料的表现。

PCR 期间，每个探针在正向和反向引物位点之间专门退火为其互补序列。AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶仅可剪切与等位基因序列 （匹配）杂交的探针。剪切会将报告染料与淬灭染料分离，从而增加报告染料的荧光。因此， PCR 扩增期间生成的荧光信号表示样本中存在的等位基因。

探针和等位基因序列间的错配

探针和等位基因之间的错配 （图 4-1）会降低探针杂交的效率。另外，AmpliTaq Gold DNA 聚合酶更倾向于置换错配探针，而不是将其剪切以释放报告染料。

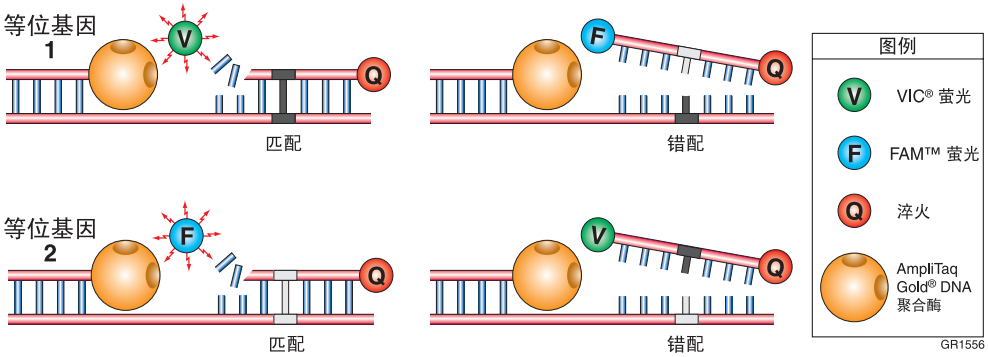


图 4-1　基因分型实验中等位基因与探针序列之间匹配和错配的结果

表 4-1 概述了上面所示基因分型实验示例的可能结果。

表 4-1　基因分型实验结果

以下荧光强度明显升高…	表示…
只有 VIC® 染料荧光	等位基因 1 的纯合性。
只有 FAM™ 染料荧光	等位基因 2 的纯合性。
两种荧光信号	杂合性。

工作流程

在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行基因分型实验之前，请按如下步骤准备实验：

1. 选择检测类型 （下文）。
2. 查看您所选检测类型的设计指南 （第 4-9 页第 4.2 部分）。

选择检测类型

当您使用 StepOne 软件设计实验时，您可为基因分型实验选择以下检测类型：

- Pre-Designed/Validated （下文）
- Custom （第 4-7 页）

本部分列出每种检测类型的可用产品。

注意： 这些检测对于目标靶是特定的。母液含有 PCR 反应所需的恒定组分。

Pre-Designed/ Validated 检测

产品	属性
TaqMan® SNP Genotyping Assays	• 预设计检测，用于高密度、基因组范围的标志覆盖率。 • 用于筛查、关联、候补区域、候补基因或精细定位研究。 • 方便的单反应管形式。
TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays	• 检测为不同药物代谢酶和药物转运蛋白编码的 220 个基因中的多态性。 • 用于研究单核苷酸多态性 (SNP)、插入/缺失 (in/del) 以及多核苷酸多态性 (MNP)。
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination	• 用于特定突变的基因型纯化 DNA 样本；大多数检测会区分单核苷酸多态性 (SNP) 的两个等位基因。 • 添加了小沟结合物 (MGB)，以便更好地进行基因分型。 • 包括等位基因 1 和 2 对照 DNA，以允许在每次实验运行时生成每个纯合子信号。 • 封闭的反应管系统无需 PCR 扩增后处理或凝胶。
TaqMan® Genotyping Master Mix	经过优化可在 SNP 基因分型应用中进行终点荧光检测： • 具有不同的聚类和较高的识别率，以便进行明确的等位基因鉴别。 • 极佳的 PCR 扩增前和扩增后稳定性，以便进行高通量设置和分析。 • 使用 TaqMan® SNP Genotyping Assays 进行有效性验证。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）	• 为使用 cDNA 或 DNA 作为模板的 TaqMan® 检测提供最佳性能。 • 含有确保获取卓越检测性能的组分。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。

注意： 对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持基因分型实验。

有关使用 Pre-Designed/Validated 检测设计您的实验的指南，请参阅第 4-10 页。

Custom 检测

产品	属性
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays	• 任何生物中任何可能的单核苷酸多态性 (SNP)。 • 检测最多六个碱基的插入/缺失 (in/del)。 • 检测最多六个碱基的多核苷酸多态性 (MNP)。 • 方便的单反应管形式。
TaqMan® Genotyping Master Mix	经过优化可在 SNP 基因分型应用中进行终点荧光检测： • 具有不同的聚类和较高的识别率，以便进行明确的等位基因鉴别。 • 极佳的 PCR 扩增前和扩增后稳定性，以便进行高通量设置和分析。 • 使用 TaqMan® SNP Genotyping Assays 进行有效性验证。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix（含有或不含 AmpErase® UNG）	• 为使用 cDNA 或 DNA 作为模板的 TaqMan® 检测提供最佳性能。 • 含有确保获取卓越检测性能的组分。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。

注意：对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持基因分型实验。

有关使用 Custom 检测设计您的实验的指南，请参阅第 4-14 页。

第 4.2 部分　设计指南

本部分包括：

Pre-Designed/Validated 检测 4-10
TaqMan® SNP Genotyping Assays 4-10
TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays 4-11
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination 4-12
选择母液 4-13
设计实验 4-14
Custom 检测 4-14
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays 4-14
选择母液 4-16
设计实验 4-16

Pre-Designed/Validated 检测

工作流程　若您正在使用 Applied Biosystems Pre-Designed/Validated 检测设计基因分型实验， Applied Biosystems 建议您遵照下面的工作流程：

1. 选择检测：
   - TaqMan® SNP Genotyping Assays （下文）。
   - TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays （第 4-11 页）。
   - TaqMan® Pre-Developed Assays Reagents for Allelic Discrimination （第 4-12 页）。
2. 选择母液 （第 4-13 页）。
3. 使用 StepOne™ 软件设计实验 （第 4-14 页）。

TaqMan® SNP Genotyping Assays

产品描述　TaqMan® SNP Genotyping Assays 是一组范围广泛的引物和探针组合，用于基因分型单核苷酸多态性 (SNP) 人类基因研究。

这些检测：

- 使用 TaqMan® 试剂在纯化的基因组 DNA 样本中扩增并检测特定 SNP 等位基因。
- 均使用 Applied Biosystems 的生物信息产品系列和软件，以及 Celera Genomics 和公共数据库中的基因组信息进行设计。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。

产品要求　所有 TaqMan SNP Genotyping Assays 均需要：

- 三种组分：
  - 1 至 20 ng 纯化的基因组 DNA 样本。
  - 20×、 40× 或 80× SNP Genotyping Assay Mix （特定于每种多态性）。每项检测含有序列特定的正向和反向引物 （用于扩增目标 SNP）和两个 TaqMan MGB 探针：一个 VIC® 染料标记的探针检测等位基因 1 序列；一个 FAM™ 染料标记的探针检测等位基因 2 序列。
  - TaqMan® Genotyping Master Mix 或 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）。
- PCR 扩增和终点读取以获取结果。

可用检测

TaqMan SNP Genotyping Assays 作为 TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays 提供：

- 超过 450 万个预设计的基因组范围的检测产品，包括 350 万个人 HapMap SNP 检测产品、 70,000 个人 cSNP 检测产品、 160,000 个人经验证检测产品和 10,000 个小鼠检测产品。
- 采用小规模、中型规模和大规模形式提供。
- Made to Order （即按订购生产）。

有关详情

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.allsnps.com/

  和/或

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® SNP Genotyping Assays**。

  b. 在 SNP Genotyping Assays （SNP 基因分型检测）页面上，从 Pre-Designed/Validated Assays （预设计/预验证检测）下选择 **TaqMan® SNP Genotyping Assays**。
- 有关使用 TaqMan SNP Genotyping Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol*。

TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays

产品描述

TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays 是一组范围广泛的库存引物和探针组合，用于在药物代谢相关基因中进行基因分型 SNP、插入和缺失 (indel) 以及多核苷酸多态性 (MNP) 分析。

这些检测：

- 使用 TaqMan 试剂在纯化的基因组 DNA 样本中扩增并检测特定多态性。
- 均使用 Applied Biosystems 的生物信息产品系列和软件，以及公共 SNP 数据库和公共基因组装备中的基因组信息进行设计。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用。

产品要求

所有 TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays 均需要：

- 三种组分：
  - 3 至 30 ng 纯化的基因组 DNA 样本。
  - 20× Drug Metabolism Genotyping Assay Mix （特定于每种多态性）。每项检测含有序列特定的正向和反向引物 （用于扩增目标多态性序列）和两个 TaqMan MGB 探针：一个 VIC 染料标记的探针检测等位基因 1 序列；一个 FAM 染料标记的探针检测等位基因 2 序列。
  - TaqMan® Genotyping Master Mix 或 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）。
- PCR 扩增和终点读取以获取结果。

有关详情

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.allsnps.com/

  和/或

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® SNP Genotyping Assays**。

  b. 在 SNP Genotyping Assays （SNP 基因分型检测）页面上，从 Pre-Designed/Validated Assays （预设计/预验证检测）下选择 **TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays**。

- 有关使用 TaqMan SNP Genotyping Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol*。

Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination

产品描述

Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan® PDARs for AD) 为库存分析产品，已经过优化可用于区分特定等位基因。

这些检测：

- 使用 TaqMan 试剂在纯化的基因组 DNA 样本中扩增并检测特定多态性。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。

产品要求

TaqMan PDARs for AD 需要三种组分：

- 2 至 20 ng 纯化的基因组 DNA 样本。
- 10× Allelic Discrimination Assay Mix （特定于每种多态性）。每项检测含有序列特定的正向和反向引物 （用于扩增目标多态性序列）和两个 TaqMan MGB 探针：一个 VIC 染料标记的探针检测等位基因 1 序列；一个 FAM 染料标记的探针检测等位基因 2 序列。
- TaqMan® Genotyping Master Mix 或 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）。

注意： 每项检测包括等位基因 1 和 2 对照 DNA，以允许在每次实验运行时生成每个纯合子信号。

有关详情

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.allsnps.com/

  和/或

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® SNP Genotyping Assays**。

  b. 在 SNP Genotyping Assays （SNP 基因分型检测）页面上，从 Pre-Designed/Validated Assays （预设计/预验证检测）下选择 **TaqMan® Pre-Developed Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan® PDARs for AD)**。

- 有关使用 TaqMan PDARs for Allelic Discrimination 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol*。

选择母液

可用母液

Applied Biosystems 用于基因分型实验的 Pre-Designed/Validated 检测设计用于配合以下母液使用：

- TaqMan PDARs for AD 含有 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix（含有 AmpErase® UNG）。
- TaqMan SNP Genotyping Assays 和 Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 可配合以下母液使用：

母液	部件号
TaqMan® Genotyping Master Mix，1 瓶小包装 (1 × 10 mL)，400 次反应	4371355
TaqMan® Genotyping Master Mix，1 瓶大包装 (1 × 50 mL)，2000 次反应	4371357
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 200 次反应	4324018
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020

注意： 对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持基因分型实验。

有关详情　有关使用 TaqMan 母液的信息，请参阅：

- *TaqMan® Genotyping Master Mix Protocol*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*

设计实验

使用 StepOne 软件　对于 Applied Biosystems Pre-Designed/Validated 检测，使用 StepOne 软件设计您的基因分型实验。 StepOne 软件自动计算以下组分的体积：

- 反应预混液各组分
- 样本稀释

注意： 要在 StepOne 软件中选择一种 SNP 检测，请在 Design Wizard （设计向导）中转至 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕，或在 Advanced Setup （高级设置）中转至 Plate Setup （反应板设置）屏幕。在 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕或 Plate Setup （反应板设置）屏幕上，您可从库中选择一项检测或创建一项新检测。

有关详情　有关在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上设计和执行基因分型实验的信息，请参阅 《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 基因分型实验入门指南》。

Custom 检测

工作流程　若您正在使用 Applied Biosystems Custom 检测设计基因分型实验， Applied Biosystems 建议您遵照下面的工作流程：

1. 订购分析产品：Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays （下文）。
2. 选择母液 （第 4-16 页）。
3. 使用 StepOne 软件设计实验 （第 4-16 页）。

Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays

产品描述　Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays 是根据您提交的序列信息通过 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务设计、合成并制备的 TaqMan 探针和引物组合。Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 允许您执行以下操作：

操作	示例
执行任何生物中任何可能的单核苷酸多态性 (SNP) 基因分型研究。	AGTTCATCCATGGTCA --> AGTTCATACATGGTCA 标注为：AGTTCAT[C/A]CATGGTCA

操作	示例
对于基因分型研究，检测最多六个碱基的插入/缺失 (in/del)	AGTTCATCCATGGTCA --> AGTTCATGGTCA 标注为：AGTTCAT[CCAT/*]GGTCA
对于基因分型研究，检测最多六个碱基的多核苷酸多态性 (MNP)	AGTTCATCCGGTCA --> AGTTCATATGGTCA 标注为：AGTTCAT[CC/AT]GGTCA

这些检测：

- 使用 TaqMan 试剂在纯化的基因组 DNA (gDNA) 中扩增并检测特定多态性。
- 均使用专用检测设计软件而开发。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。

产品要求

所有 Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 均需要：

- 一个包括您的靶序列的提交文件。您使用免费的 File Builder 软件创建提交文件，然后将该文件提交给 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务。
- 三种组分：
  - 每个反应孔 1 至 20 ng 纯化的 gDNA 样本。
  - 40× SNP Genotyping Assay 或 80× SNP Genotyping Assay （特定于每种多态性）。每项检测含有序列特定的正向和反向引物 （用于扩增目标 SNP）和两个 TaqMan MGB 探针：一个 VIC 染料标记的探针检测等位基因 1 序列；一个 FAM 染料标记的探针检测等位基因 2 序列。
  - TaqMan® Genotyping Master Mix 或 TaqMan® Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）。
- PCR 扩增和终点读取以获取结果。

有关详情

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.allsnps.com/

  和/或

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® SNP Genotyping Assays**。

  b. 在 SNP Genotyping Assays （SNP 基因分型检测）页面上，从 Custom Assays （代客设计合成检测）下选择 **Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays**。
- 有关订购 Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 的信息，请参阅 *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol:Submission Guidelines*。
- 有关使用 Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol*。

选择母液

可用母液　Applied Biosystems 用于基因分型实验的 Made to Order 检测设计用于配合以下母液使用：

母液	部件号
TaqMan® Genotyping Master Mix，1 瓶小包装 (1 × 10 mL)，400 次反应	4371355
TaqMan® Genotyping Master Mix，1 瓶大包装 (1 × 50 mL)，2000 次反应	4371357
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，200 次反应	4304437
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020

注意： 对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持基因分型实验。

有关详情　有关使用 TaqMan 母液的信息，请参阅：

- *TaqMan® Genotyping Master Mix Protocol*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*

设计实验

使用 StepOne 软件　对于 Applied Biosystems Custom 检测，使用 StepOne 软件设计您的基因分型实验。 StepOne 软件自动计算以下组分的体积：

- 反应预混液各组分
- 样本稀释

注意： 要在 StepOne 软件中选择一种 SNP 检测，请在 Design Wizard （设计向导）中转至 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕，或在 Advanced Setup （高级设置）中转至 Plate Setup （反应板设置）屏幕。在 SNP Assays （单核苷酸多态性检测）屏幕或 Plate Setup （反应板设置）屏幕上，您可从库中选择一项检测或创建一项新检测。

有关详情　有关在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上设计和执行基因分型实验的信息，请参阅 《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 基因分型实验入门指南》。

存在/不存在实验 5

本章包括：

第 5.1 部分 关于存在/不存在实验 5-3
第 5.2 部分 设计指南 5-9

第 5.1 部分　关于存在/不存在实验

本部分包括：

概述 5-4
选择检测类型 5-5

概述

什么是存在/不存在实验？

存在/不存在实验是一种终点实验，用于确定样本中存在还是不存在特定的核苷酸序列 （靶）。不确定靶的实际数量。

存在/不存在实验通常用于检测存在还是不存在病原体 （如，病毒或细菌病原体）。例如，存在/不存在实验可能用于确定汉堡包肉中是否存在*沙门氏菌*。结果将显示是否存在*沙门氏菌*；而不确定细菌的数量。

组分

用于存在/不存在实验的 PCR 反应包括以下组分：

- **样本** － 未知其中是否存在靶的样本。
- **重复反应** － 含有相同组分和量的相同反应。
- **阳性内对照 (IPC)** － 添加到 PCR 反应的较短的合成 DNA 模板。您可使用 IPC 区分受 PCR 抑制剂、错误分析设置、或试剂或仪器故障而影响的失败的结果和反应。

  注意： 在没有 IPC 的情况下也可执行存在/不存在实验；但是， IPC 可确保不会将失败的 PCR 误判为阴性实验结果。
- **阴性对照**－含有水或缓冲液的反应孔，不含样本模板。阴性对照反应孔中不应发生靶扩增。

在 StepOne 软件中，您可以三种不同的方式为存在/不存在实验设置 PCR 反应：

设置	反应孔类型
IPC 设置	有三种类型的反应孔： • **未知 IPC 反应孔**－反应孔含有样本模板和 IPC 模板；是否存在靶未知。 • **阴性对照 IPC 反应孔**－反应孔在 PCR 反应中含有 IPC 模板和水或缓冲液，不含样本模板。在阴性对照 IPC 反应孔中仅 IPC 模板应扩增，因为反应不含样本模板。也称为 “*IPC+*”。 • **阴性对照阻断 IPC 反应孔**－反应孔在 PCR 反应中含有 IPC 阻断剂，不含样本模板。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模板且 IPC 的扩增被阻断。也称为 “*无扩增对照 (NAC)*”。
无 IPC，单一设置	有两种类型的反应孔： • **未知反应孔**－反应孔含有样本模板；是否存在靶未知。 • **阴性对照**－反应孔含有水或缓冲液，不含样本模板。
无 IPC，多重设置	有两种类型的反应孔： • **未知－未知反应孔**－反应孔含有样本模板；是否存在靶未知。 • **阴性对照-阴性对照反应孔**－反应孔含有水或缓冲液，不含样本模板。

终点检测和 PCR 扩增后反应板读取

存在/不存在实验是一种终点实验，其中在 PCR 完成后采集荧光数据。

为了帮助解决存在/不存在实验故障，您可使用 Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 执行实时 PCR 扩增。若您使用 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统执行 PCR 扩增，则单独执行 PCR 扩增前读取和 PCR 扩增后读取。

存在/不存在实验工作原理

PCR 期间，发荧光的探针会在模板 DNA 上的正向和反向引物位点之间专门退火为互补靶。然后在延伸期间， AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶会从每份含有靶的样本中裂解杂交的探针。裂解每个匹配探针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。

在 PCR 循环后， StepOne™ 和 StepOnePlus™ 扩增仪会读取 PCR 扩增期间生成的荧光。荧光信号用于确定每份样本中存在还是不存在靶。报告荧光信号归一化为参比荧光的发射强度，如下：

$$R_{n\,(TT)} = \frac{\text{靶模板序列的发射强度}}{\text{参比荧光的发射强度}}$$

$$R_{n\,(IPC)} = \frac{\text{阳性内对照的发射强度}}{\text{参比荧光的发射强度}}$$

结合 IPC

IPC 是添加到反应板以检测低拷贝、组成型核酸的第二个 TaqMan® 探针和引物组合。 IPC 和靶在同一反应孔中同时被扩增。若某反应孔未显示扩增，StepOne™ 软件会使用 IPC 的阳性信号确认是否是因为缺少靶模板，而不是由于移液错误或抑制而导致反应孔扩增失败。

注意： 在没有 IPC 的情况下也可执行存在/不存在实验；但是， IPC 可确保不会将失败的 PCR 误判为阴性实验结果。

工作流程

在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上执行存在/不存在实验之前，请按如下步骤准备实验：

1. 选择检测类型 （下文）。
2. 查看您所选检测类型的设计指南 （第 5-9 页第 5.2 部分）。

选择检测类型

当您使用 StepOne 软件设计实验时，您可为存在/不存在实验选择以下检测类型：

- Inventoried/Made to Order （第 5-6 页）
- Custom （第 5-7 页）

本部分列出每种检测类型的可用产品。

注意： 这些检测对于目标靶是特定的。母液含有 PCR 反应所需的恒定组分。

Inventoried/Made to Order 检测

产品	属性
TaqMan® Gene Expression Assays	• 预设计的、基因特定引物和探针组合，用于人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*、*秀丽隐杆线虫*、*家犬*（犬）和*猕猴*（恒河猴）基因。 • 探针为 FAM™ 染料标记的 MGB 探针。 • 在方便的 20× 单反应管中提供。 • 作为 Inventoried 或 Made to Order 检测提供。
TaqMan® Endogenous Control Assays 注意： 包括 FAM™ 染料标记的 TaqMan® Endogenous Control Assays，作为 Inventoried TaqMan Gene Expression Assays。	• 已经过优化、预制备、即开即用的内对照检测。 • 低成本高效益的基因表达定量，用于人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*和任何真核物种。 • 选择 FAM™ 染料或 VIC® 染料标记 （引物限制）。
Custom TaqMan® Gene Expression Assays	• 任何物种或生物。 • 您选择的靶。 • 探针为 FAM™ 染料标记的 MGB 探针。 • 在方便的 20× 单反应管中提供。
TaqMan® Gene Expression Master Mix	特制的，用于通过实时 PCR 为常规和有挑战性的实验进行精确定量： • 检测灵敏度低至 1 个靶拷贝。 • 多重 PCR，在一个反应中同时扩增两个靶。 • 特异性，以便区分基因家族各成员。 • 使用 TaqMan® Gene Expression Assays 验证其有效性。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix（含有或不含 AmpErase® UNG）	• 为使用 cDNA 或 DNA 作为模板的 TaqMan® 检测提供最佳性能。 • 含有确保获取卓越检测性能的组分。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。

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。

注意： 对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持存在/不存在实验。

有关使用 Inventoried/Made to Order 检测设计您的实验的指南，请参阅第 5-10 页。

Custom 检测

产品	属性
Custom TaqMan® Probes and Primers	• 任何物种或生物。 • 选择染料标记、淬灭基团和合成量。 • 用于配合 Primer Express® Software 和 Applied Biosystems 检测设计指南使用。
Primer Express® Software	为实时 PCR 设计引物和探针的软件。
TaqMan® Gene Expression Master Mix	特制的，用于通过实时 PCR 为常规和有挑战性的实验进行精确定量： • 检测灵敏度低至 1 个靶拷贝。 • 多重 PCR，在一个反应中同时扩增两个靶。 • 特异性，以便区分基因家族各成员。 • 使用 TaqMan® Gene Expression Assays 验证其有效性。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix（含有或不含 AmpErase® UNG）	• 为使用 cDNA 或 DNA 作为模板的 TaqMan® 检测提供最佳性能。 • 含有确保获取卓越检测性能的组分。 • 通过为所有检测使用一种试剂简化了检测执行。

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。

注意： 对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持存在/不存在实验。

有关使用 Custom 检测设计您的实验的指南，请参阅第 5-16 页。

第 5.2 部分　设计指南

本部分包括：

Inventoried/Made to Order 检测 5-10
TaqMan® Gene Expression Assays 5-10
Custom TaqMan® Gene Expression Assays 5-12
TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 5-13
选择母液 5-15
设计实验 5-16
Custom 检测 5-16

Inventoried/Made to Order 检测

工作流程　若您在 StepOne™ 软件中选择 Inventoried/Made to Order 检测类型， Applied Biosystems 建议您遵照下面的工作流程：

1. 选择检测：
   - TaqMan® Gene Expression Assays （下文）。
   - Custom TaqMan® Gene Expression Assays （第 5-12 页）。
2. 使用 TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents （第 5-13 页）。

   注意： 在没有 IPC 的情况下也可执行存在/不存在实验；但是， IPC 可确保不会将失败的 PCR 误判为阴性实验结果。
3. 选择母液 （第 5-15 页）。
4. 使用 StepOne 软件设计实验 （第 5-16 页）。

TaqMan® Gene Expression Assays

产品描述　TaqMan® Gene Expression Assays 是一组范围广泛的库存和订购探针及引物组合，您可使用它对人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*、*秀丽隐杆线虫*、*家犬*（犬）和*猕猴*（恒河猴）基因执行存在/不存在实验。

这些检测：

- 使用 TaqMan® 试剂扩增并检测 cDNA 样本中的靶。
- 均使用自动设计和控制质量的系列产品进行设计。库存检测已生产备妥并存放于库存中；订购检测是预设计的，并在订购时生产。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。
- 若可能，在不扩增基因组 DNA （检测 ID 带 *m* 后缀）的情况下，通过设计交叉外显子 — 外显子连接点的探针扩增靶 cDNA。

产品要求　所有 TaqMan Gene Expression Assays 均需要：

- 三种组分：
  - 每个反应孔 1 至 100 ng cDNA 样本 （从 RNA 转化而来），研究中的所有反应孔均具有相同量的 cDNA。
  - 20× Gene Expression Assay Mix （特定于每种靶）。每种检测母液在预制备的 20× 预混液中都包含两个未标记的 PCR 引物，和一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB （小沟结合物）探针。对于探针， 1× 终浓度为 250 nM，而对于每个引物，终浓度为 900 nM。
  - TaqMan® Gene Expression Master Mix 或 TaqMan Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase UNG）。

可用检测

TaqMan Gene Expression Assays 可用于人类、小鼠、大鼠、*拟南芥*、*果蝇*、*秀丽隐杆线虫*、*家犬*（犬）和*猕猴*（恒河猴）基因检测。部件号为：

- 库存分析产品部件号为 4331182
- 订购分析产品部件号为 4351372

检测名的前缀表示为其设计检测的物种：*Hs* 代表*智人种*（人类）、*Mm* 代表*小家鼠*（小鼠）、*Rn* 代表*褐家鼠*（大鼠）、*At* 代表*拟南芥*、*Dm* 代表*黑腹果蝇*、Ce 代表*秀丽隐杆线虫*、Cf 代表*家犬*（犬）、Rh 代表*猕猴*（恒河猴）。

检测名的后缀表示检测安排，如下表所述。

后缀	描述
_m	检测的探针跨过外显子连接点；该检测不检测基因组 DNA。
_s	检测的引物和探针设计处于单个外显子内；该检测检测基因组 DNA。
_g	该检测可能检测基因组 DNA；检测的引物和探针可能处于单个外显子内。
_mH	检测设计用于属于较高序列同源性基因家族的转录物。该检测在靶基因和具有最紧密序列同源性的基因之间提供 10 C_T 至 15 C_T 之间的差异。因此，若在样本中以相同拷贝数存在，则该检测检测到靶转录物比最紧密同源性转录物具有 1000 至 30,000 倍的更大差别 （敏感性）。
_sH	
_gH	
_u	检测的扩增子跨过外显子连接点，且探针位点完全位于其中一个跨过外显子中。

TaqMan® Endogenous Control Assays

TaqMan® Endogenous Control Assays 为：

- Inventoried TaqMan Gene Expression Assays （部件号 4331182）－每个检测在单个、预制备的 20× 反应管中包含一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB 探针。
- 用于所有人类、小鼠和大鼠物种的单个对照检测 （不同部件号）－每个检测包含一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan® MGB 探针、VIC® 染料标记的 TaqMan® MGB 探针或 TAMRA™ 染料标记的探针。具有 VIC 染料标记的 TaqMan Endogenous Controls 为引物限制。

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

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® Gene Expression Assays**。

b. 在 Gene Expression Assays & Arrays （基因表达检测与芯片）页面：
   - 从 Individual Assays （单个检测）下选择 **TaqMan® Gene Expression Assays**。此选项链接到所有 TaqMan Gene Expression Assays，包括含有 FAM 染料标记的探针的 TaqMan Endogenous Control Assays。

   或

   - 从 Individual Control Assays （单个对照检测）下选择 **TaqMan® Endogenous Control Assays**。此选项链接到单个 TaqMan Endogenous Control Assays （含有 FAM 染料标记的 TaqMan MGB 探针、 VIC 染料标记的 TaqMan MGB 探针或 TAMRA 染料标记的探针）。

- 有关 Custom TaqMan Endogenous Control Assays 的信息，请参阅 *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note*。
- 有关使用 TaqMan Gene Expression Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*。

Custom TaqMan® Gene Expression Assays

产品描述

Custom TaqMan® Gene Expression Assays 是根据您提交的序列信息通过 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务设计、合成并制备的 TaqMan 探针和引物组合。Custom TaqMan Gene Expression Assays 允许您对任何生物中的任何基因或剪接变异体执行存在/不存在检测。

这些检测：

- 使用 TaqMan® 试剂扩增并检测 cDNA 样本中的靶。
- 均使用专用检测设计软件而开发。
- 已设计并经过优化，可配合 Applied Biosystems TaqMan® 母液使用，采用通用热循环条件。

产品要求

所有 Custom TaqMan Gene Expression Assays 均需要：

- 一个包括您的靶序列的提交文件。您使用免费的 File Builder 软件创建提交文件，然后将该文件提交给 Custom TaqMan® Genomic Assays 服务。
- 三种组分：
  - 每个反应孔 1 至 100 ng cDNA 样本 （从 RNA 转化而来），研究中的所有反应孔均具有相同量的 cDNA。
  - 20× Gene Expression Assay 或 60× Gene Expression Assay （特定于每种靶）。每种检测在预制备的 20× 或 60× 预混液中都包含两个靶特异引物，和一个 FAM™ 染料标记的 TaqMan MGB 探针。对于探针， 1× 终浓度为 250 nM，而对于每个引物，终浓度为 900 nM。
  - TaqMan® Gene Expression Master Mix 或 TaqMan Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase UNG）。

有关详情

- 有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站：

  http://www.appliedbiosystems.com/

  a. 在网站 Home （主页）页面上，从 TaqMan® Products （TaqMan 产品）下选择 **TaqMan® Gene Expression Assays**。

  b. 在 Gene Expression Assays & Arrays （基因表达检测与芯片）页面上，从 Individual Assays （单个检测）下选择 **Custom TaqMan® Gene Expression Assays**。

- 有关订购 Custom TaqMan Gene Expression Assays 的信息，请参阅 *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol:Submission Guidelines*。
- 有关使用 Custom TaqMan Gene Expression Assays 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*。

TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents

产品描述

Applied Biosystems TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 含有以下组分：

- 具有预设计引物和探针的阳性内对照 (IPC)
- IPC DNA 模板
- IPC 阻断剂

这些试剂设计用于：

- 区分阴性结果的类型：
  – 靶的阴性识别和 IPC 的阳性识别表示不存在任何靶。
  – 靶的阴性识别和 IPC 的阴性识别表示 PCR 抑制。
- 避免扩增内对照。
- 允许同时扩增 IPC 和靶，而不会影响靶扩增。
- 使用 VIC® 染料标记的探针检测 IPC。
- 使用 FAM™ 染料标记的探针检测靶。
- 可配合 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase® UNG）使用，采用通用热循环条件。

产品要求

TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents 试剂盒需要以下组分：

- DNA 样本
- 您的目标靶的 TaqMan 检测
- TaqMan 2× Universal PCR Master Mix （含有或不含 AmpErase UNG）

可用试剂盒

Applied Biosystems 提供以下 TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents 试剂盒：

试剂盒	部件号
含有 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix 的 TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents （具有 VIC® 染料）	4308320
TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 注意： 若您正使用此试剂盒，您将需要单独购买其中一种 TaqMan® 试剂： • TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （部件号 4304437） • TaqMan® PCR Core Reagents Kit （部件号 N808-0228）	4308323

切记！ 上面所列试剂盒含有 TAMRA™ 染料标记的探针；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。这些试剂盒可配合 StepOnePlus 系统使用；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　有关使用 TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents 准备 PCR 反应的信息，请参阅 *TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol*。

选择母液

可用母液　Applied Biosystems 用于存在/不存在实验的 Inventoried/Made to Order 检测设计用于配合以下母液使用：

母液	部件号
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)，200 次反应	4369016
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020
TaqMan® PCR Core Reagents Kit	N808-0228

注意： 若您购买含有 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix 的 TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 试剂盒 （部件号 4308320），您不必再单独购买母液。

注意： 对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持存在/不存在实验。

有关详情　有关使用 TaqMan 试剂的信息，请参阅：

- *TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*

设计实验

使用 StepOne 软件

对于 Applied Biosystems Inventoried/Made to Order 检测，使用 StepOne 软件设计您的存在/不存在实验。 StepOne 软件自动计算以下组分的体积：

- 反应预混液各组分
- 对照物和样本
- 样本稀释

注意： 要在 StepOne 软件中选择 Inventoried/Made to Order 检测类型，请在 Design Wizard （设计向导）或 Advanced Setup （高级设置）中转至 Reaction Setup （反应设置）屏幕，然后从 Assay Type （检测类型）下拉菜单中选择 **Inventoried/Made to Order**。

有关详情

在 StepOne 和 StepOnePlus 系统上设计和执行存在/不存在实验的信息，请参阅《Applied Biosystems StepOne™ 和 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 存在/不存在实验入门指南》。

Custom 检测

工作流程

若您在 StepOne™ 软件中为存在/不存在实验选择 Custom 检测类型 （即您正设计自己的引物和探针）， Applied Biosystems 建议您遵照 Applied Biosystems 检测设计指南的工作流程：

1. 使用 Primer Express® Software 设计引物和探针 （第 3-21 页）。
2. 选择适当的试剂 （第 3-24 页）。

   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。

   对于 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案，不支持存在/不存在实验。
3. 使用建议的热循环条件 （第 3-27 页）。
4. 以默认引物和探针浓度开始。若需要，优化引物浓度 （第 3-30 页）和探针浓度 （第 3-32 页）。

切记！ 完整执行这些步骤可让您通过系统快速、可靠地设计和优化检测。作为整体使用该系统，以达到最高的检测成功率。有关 Applied Biosystems 检测设计指南的详情，请参阅附录 C。

注意： 要在 StepOne 软件中选择 Custom 检测类型，请在 Design Wizard （设计向导）或 Advanced Setup （高级设置）中转至 Reaction Setup （反应设置）屏幕，然后从 Assay Type （检测类型）下拉菜单中选择 **Custom**。

公式 A

本附录包括：

使用标准曲线法计算标准差 A-2
使用比较法计算标准差 A-5
比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 实验的公式 A-7

使用标准曲线法计算标准差

示例　与对照样本比较样本

归一化靶数量（下表中的 c-myc_N）为可用于比较不同样本中相对靶数量的无单位数字。进行该比较的方法之一是指定其中一个样本为对照样本。下表中，脑指定为对照样本；脑是任意选择的，因为它有靶的最低表达水平。

相对标准曲线结果

下表中的每个 c-myc_N 值除以脑 c-myc_N 值，得出最终列的值。这些结果表明肾样本含有 5.5× c-myc mRNA（与脑样本相比）、肝样本含有 34.2×，以及肺样本含有 15.7×。

要确定相对值，请执行以下步骤：

1. 对下表中的 c-myc 和 GAPDH 值进行平均。
2. 将 c-myc 均值除以 GAPDH 均值。
3. 指定对照样本。
4. 将样本均值除以对照样本均值。

组织	c-myc ng 总 Raji RNA	GAPDH ng 总 Raji RNA	归一化 GAPDH c-myc_N[‡]	与脑相关的 c-myc_N[§]
脑	0.033	0.51		
	0.043	0.56		
	0.036	0.59		
	0.043	0.53		
	0.039	0.51		
	0.040	0.52		
均值	0.039±0.004	0.54±0.034	0.07±0.008	1.0±0.12
肾脏	0.40	0.96		
	0.41	1.06		
	0.41	1.05		
	0.39	1.07		
	0.42	1.06		
	0.43	0.96		
均值	0.41±0.016	1.02±0.052	0.40±0.025	5.5±0.35

组织	c-myc ng 总 Raji RNA	GAPDH ng 总 Raji RNA	归一化 GAPDH $c\text{-}myc_N$‡	与脑相关的 $c\text{-}myc_N$§
肝脏	0.67	0.29		
	0.66	0.28		
	0.70	0.28		
	0.76	0.29		
	0.70	0.26		
	0.68	0.27		
均值	0.70±0.036	0.28±0.013	2.49±0.173	34.2±2.37
肺	0.97	0.82		
	0.92	0.88		
	0.86	0.78		
	0.89	0.77		
	0.94	0.79		
	0.97	0.80		
均值	0.93±0.044	0.81±0.041	1.15±0.079	15.7±1.09

‡ 通过将 c-myc 均值除以 GAPDH 均值确定 $c\text{-}myc_N$ 值。从 c-myc 和 GAPDH 值的标准差中计算出商的标准差。请参阅第 A-4 页 “公式”。

§ 与脑相关的 $c\text{-}myc_N$ 计算包括除以对照样本值。这是被任意常数除，所以结果与 $c\text{-}myc_N$ 的 cv 相同。

公式　通过将 c-myc 均值除以 GAPDH 均值确定了 $c\text{-}myc_N$ 值。使用下列公式从 c-myc 和 GAPDH 值的标准差中计算出商的标准差：

$$cv = \sqrt{cv_1^{\,2} + cv_2^{\,2}}$$

其中：

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} = \frac{stddev}{meanvalue}$$

使用第 A-2 页表格中的脑样本作示例：

$$cv_1 = \frac{0.004}{0.039}$$

并且

$$cv_2 = \frac{0.034}{0.54}$$

$$cv = \sqrt{\left(\frac{0.004}{0.039}\right)^2 + \left(\frac{0.034}{0.54}\right)^2} = 0.12$$

由于

$$cv = \frac{s}{\bar{X}}$$

$$s = (cv)(\bar{X})$$

$$s = (0.12)(0.07)$$

$$s = 0.008$$

使用比较法计算标准差

示例 第 A-2 页表格中列出的用于确定 c-myc 和 GAPDH mRNA 的 C_T 数据用于说明 $\Delta\Delta C_T$ 计算。下表中列出了人脑、肾脏、肝脏和肺样本的平均 C_T 结果，以及如何处理这些 C_T 以确定 ΔC_T、 $\Delta\Delta C_T$ 和 c-myc mRNA 的相对量。使用标准曲线法确定了这些结果与相对 c-myc 水平一致。

组织	c-myc 平均 C_T	GAPDH 平均 C_T	ΔC_T c-myc–GAPDH‡	$\Delta\Delta C_T$ ΔC_T–$\Delta C_{T, Brain}$§	与脑相关的 c-myc$_N$#
脑	30.49±0.15	23.63±0.09	6.86±0.17	0.00±0.17	1.0 (0.9–1.1)
肾脏	27.03±0.06	22.66±0.08	4.37±0.10	–2.50±0.10	5.6 (5.3–6.0)
肝脏	26.25±0.07	24.60±0.07	1.65±0.10	–5.21±0.10	37.0 (34.5–39.7)
肺	25.83±0.07	23.01±0.07	2.81±0.10	–4.05±0.10	16.5 (15.4–17.7)

‡ 通过从 c-myc C_T 均值减去 GAPDH C_T 均值确定了 ΔC_T 值。从 c-myc 和 GAPDH 值的标准差中计算出差异标准差。请参阅第 A-6 页 “公式”。

§ $\Delta\Delta C_T$ 的计算包括减去 ΔC_T 对照样本值。这是减去一个常数，所以 $\Delta\Delta C_T$ 的标准差与 ΔC_T 值的标准差相同。

通过评估表达确定了与脑相关的 c-myc$_N$ 的给定范围：$2^{-\Delta\Delta C_T}$ $\Delta\Delta C_T + s$ 和 $\Delta\Delta C_T - s$，其中 $s = \Delta\Delta C_T$ 值的标准差。

公式　通过从 c-myc C_T 均值中减去 GAPDH C_T 均值确定了 ΔC_T 值。使用以下公式从 c-myc 和 GAPDH 值的标准差中计算出差异标准差：

$$s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

其中：

s = 标准差

使用第 A-5 页表格中的脑样本作为示例：

$$s_1 = 0.15$$

并且

$$s_2 = 0.09$$

$$s = \sqrt{(0.15)^2 + (0.09)^2} = 0.17$$

比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 实验的公式

公式 通过以下公式计算靶数量 （归一化为内对照并与对照样本相关）：

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

公式推导 描述 PCR 指数扩增的等式：

$$X_n = X_o \times (1 + E_X)^n$$

其中：

- x_n = 循环 n 次时的靶分子数
- x_o = 初始靶分子数
- E_x = 靶扩增效率
- n = 循环次数
- X_o = 初始靶分子数

阈值循环 (C_T) 指示扩增的靶数量达到指定阈值时的分数循环数。因此，

$$X_T = X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

其中：

- x_T = 靶分子的阈值数
- $C_{T,X}$ = 靶扩增的阈值循环
- K_X = 常数

内对照反应的类似等式：

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

其中：

- R_T = 对照分子的阈值数
- R_o = 初始对照分子数
- E_R = 对照样本扩增效率
- $C_{T,R}$ = 对照样本扩增的阈值循环
- K_R = 常数

将 X_T 除以 R_T 会产生以下表达式：

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

X_T 和 R_T 的准确值取决于许多因素，包括：

- 探针中使用的报告染料
- 对探针荧光属性的序列相关影响
- 探针裂解效率
- 探针纯度
- 荧光阈值设置。

因此，常数 K 不得等于 1。

假定靶效率和对照样本效率相同：

$E_X = E_R = E$

$$\frac{X_o}{R_o} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

或

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

其中：

- $X_N = X_O/R_O$，归一化靶数量
- $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$，靶和对照的阈值循环差异

重排得出以下表达式：

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

最后一步是将任何样本 (q) 的 X_N 除以对照样本 (cb) 的 X_N：

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

其中：

- $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$

对于根据 《Applied Biosystems 检测设计指南》设计并优化的扩增子 （扩增子大小 <150 bp），效率接近 1。因此，通过以下公式计算靶数量 （归一化为内对照并与对照样本相关）：

$2^{-\Delta\Delta C_T}$

多重 PCR 中的引物限制

B

要生成准确的多重检测，一个物种的扩增不影响或控制另一物种的扩增非常重要。否则，高丰度物种的扩增可能会阻止低丰度物种的有效扩增。若低丰度物种未能有效扩增，则您的实验可能产生不精确的结果。甚至，严重时可能会完全抑制低丰度物种的检测。您可通过限制用于扩增较高丰度物种的引物浓度来避免发生此情况，从而在已建立 C_T 之后马上 “关闭”其扩增。

引物限制会使两种检测通用的反应组分不会用尽，从而让低丰度物种的扩增以较高的效率继续进行。若更高丰度的物种未知，您应在执行多重 PCR 之前通过在单独反应管中运行两种靶检测来确定该物种。若两种物种均不能持续具有更高的丰度，则应对两种扩增都进行引物限制。

考虑靶和对照样本的相对丰度

在对靶和内对照扩增应用引物限制时，必须考虑两个物种的相对丰度。对于定量实验，可能使用 rRNA 作为内对照。总 RNA 中的 rRNA 浓度始终大于任何靶 mRNA 的浓度。因此，在扩增靶和 rRNA 的多重反应中，仅需限制 rRNA 引物的浓度。

极限引物矩阵

要定义极限引物浓度，使用最低初始模板的值运行一系列正向和反向引物浓度。目标是确定在不影响 C_T 值的情况下减小检测的 ΔRn 值的引物浓度。下表描述建议的正向和反向引物矩阵 （浓度范围为 20 至 100 nM）。

注意： 尽管遵照所有设计标准有助于确认极限引物浓度，但不可能所有检测均遵照所有设计标准。如果极限引物矩阵实验不能确认引物极限浓度，则必须重新设计至少一个引物或在单独反应管中运行反应。

正向引物： 反向引物：	100 nM 100 nM	100 nM 80 nM	100 nM 60 nM	100 nM 40 nM	100 nM 20 nM
正向引物： 反向引物：	80 nM 100 nM	80 nM 80 nM	80 nM 60 nM	80 nM 40 nM	80 nM 20 nM
正向引物： 反向引物：	60 nM 100 nM	60 nM 80 nM	60 nM 60 nM	60 nM 40 nM	60 nM 20 nM
正向引物： 反向引物：	40 nM 100 nM	40 nM 80 nM	40 nM 60 nM	40 nM 40 nM	40 nM 20 nM
正向引物： 反向引物：	20 nM 100 nM	20 nM 80 nM	20 nM 60 nM	20 nM 40 nM	20 nM 20 nM

示例　第 B-2 页图 B-1 中显示了极限引物矩阵实验的结果：

- 图 B-1a 显示仅当将引物浓度降低到大约 50 nM 以下时，才会明显影响 C_T 值。平台区显示可找到合适引物极限浓度的区域。在该区域中， C_T （及相应定量值）未改变，而 ΔRn 值和相应产物产量显著降低。
- 图 B-1b 显示引物浓度和 ΔRn 之间的对应关系。此图显示通过降低正向和反向引物浓度可达到更低的产物产量。

对于此示例，适当的引物极限浓度选择应为至少 50 nM 正向和反向引物。探针浓度应保持在最佳水平 （即使对检测进行引物限制时），以确保产生的信号足够强以便软件可精确进行多组分测定。

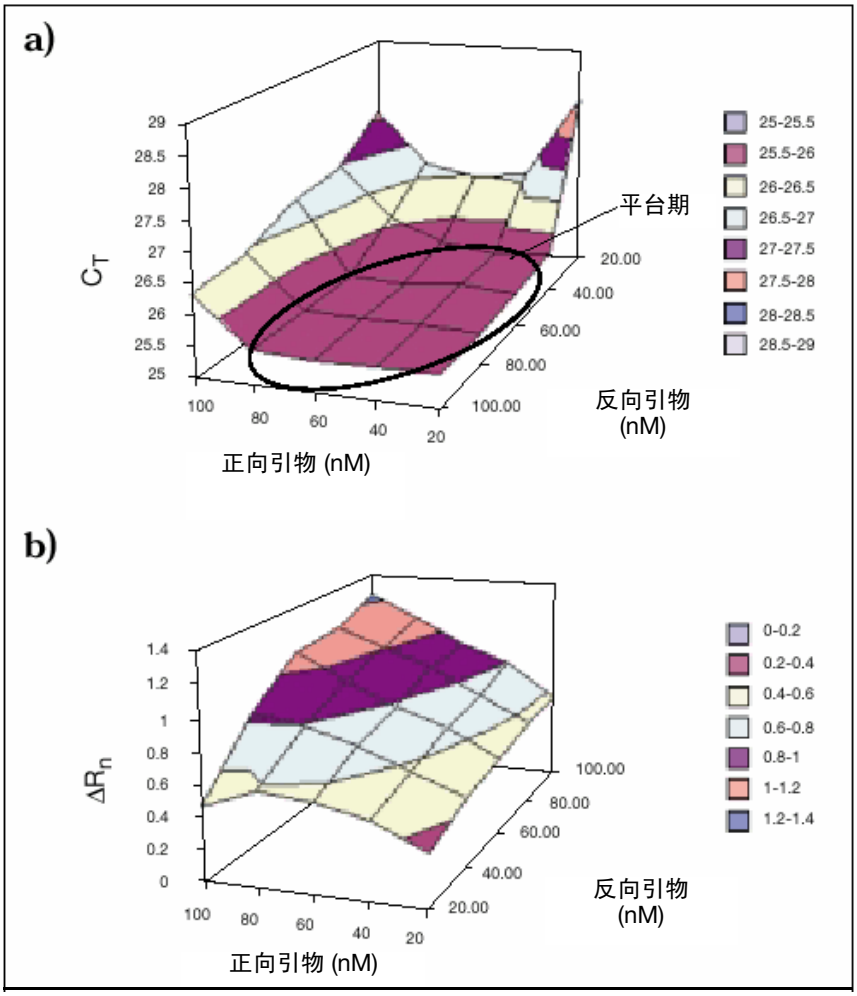


图 B-1　极限引物矩阵实验的结果
(a) 显示 C_T 值受正向和反向引物浓度变化的影响。所示的平台区显示 C_T 值保持稳定的区域。
(b) 显示随着引物浓度的降低 ΔR_n 值的减小。

检测设计指南 C

关于检测设计指南

若您正设计自己的检测 （引物和探针）， Applied Biosystems 建议您遵照 Applied Biosystems 检测设计指南。检测设计指南指导您完成以下操作：

1. **使用 Primer Express® Software 设计引物和探针** – Primer Express 软件使用一组默认参数自动选择引物和探针组合。
2. **选择适当的试剂** – 提供许多 TaqMan® 和 SYBR® Green 试剂。您所使用的试剂取决于您的检测类型。
3. **使用建议的热循环条件** – 使用为您的样本建议的热循环条件 （建议 DNA/cDNA、 RNA 用于一步法 PCR， RNA 用于两步法 PCR）。

   注意： Fast 试剂的热循环条件与标准试剂的热循环条件不同。
4. **使用默认引物和探针浓度或优化引物和探针浓度** – 当您使用 Applied Biosystems 检测设计指南时，您可为非多重优化检测使用默认引物和探针浓度，您也可优化引物和探针浓度。

切记！ 完整执行这些步骤可让您通过系统快速、可靠地设计和优化检测。作为整体使用该系统，以达到最高的检测成功率。

注意： Applied Biosystems 检测设计指南不保证所有检测将提供相同级别的性能和灵敏度。甚至，最严谨的设计参数也不能说明两个不同检测系统之间的所有可能差异。

定量实验的结论

通常，当您为定量实验使用检测设计指南时，可以得出以下结论：

- 对于大多数 TaqMan 检测，当使用 DNA 或 cDNA 作为模板时，900-nM 引物和 250-nM 探针的浓度会产生高度可重复且高度灵敏的检测。
- 由于其检测的非特异性，仅应谨慎绕过 SYBR® Green I 染料引物优化。但是，若遵照所有指南，则当使用 DNA 或 cDNA 作为模板时， 50-nM 正向和反向引物的浓度通常会提供有效的扩增，并具有较好级别的特异性。采用解链曲线或凝胶分析以检查是否形成非特异性产物来验证此假定。
- 大多数 TaqMan 检测应该能够使检测和准确定量达到低于 50 个拷贝靶的灵敏度 （可能具有更高的灵敏度）。
- SYBR Green 检测具有相似的性能；但是，非特异性产物的形成可潜在升高最低检测极限。

基因分型实验的结论

通常，当您为基因分型实验使用检测设计指南时，可以得出以下结论：

您可使用 900-nM 引物、 200-nM 探针和 1 至 20 ng 的基因组 DNA 获取可重复且高灵敏度的检测结果。

试剂部件号

D

本附录包括：

定量实验 D-2
基因分型实验 D-5
存在/不存在实验 D-7

定量实验

Inventoried/Made to Order 检测

检测

产品	部件号
TaqMan® Gene Expression Assays	有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站： http://www.appliedbiosystems.com/
TaqMan® Endogenous Control Assays 注意： 包括 FAM™ 染料标记的 TaqMan® Endogenous Control Assays，作为 Inventoried TaqMan Gene Expression Assays。	
Custom TaqMan® Gene Expression Assays	

母液

母液	部件号
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG，250 次反应	4352042
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 200 次反应	4324018
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020

Custom 检测

检测

产品	部件号
Custom TaqMan® Probes and Primers	有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站： http://www.appliedbiosystems.com/

DNA 或 cDNA 定量

试剂	试剂盒	部件号
TaqMan® 试剂	TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
	TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)， 2000 次反应	4369542
	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase® UNG， 250 次反应	4352042
	TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
	TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
	10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4305719
	TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 200 次反应	4324018
	TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
	10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， No AmpErase® UNG	4324020
	TaqMan® PCR Core Reagents Kit， 200 次反应	N808-0228
SYBR® Green 试剂	*Power* SYBR® Green PCR Master Mix (1 mL)， 40 次反应	4368577
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (5-mL)， 200 次反应	4367659
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (10 × 5-mL)， 2000 次反应	4368708
	Power SYBR® Green PCR Master Mix (50 mL)， 2000 次反应	4367660
	SYBR® Green PCR Master Mix (1-mL)，40 次反应	4344463
	SYBR® Green PCR Master Mix (5-mL)， 200 次反应	4309155
	SYBR® Green PCR Master Mix (50-mL)， 2000 次反应	4334973
	SYBR® Green PCR Core Reagents， 200 次反应	4304886

采用一步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

试剂	试剂盒	部件号
TaqMan® 试剂	TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit	4309169
	TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents 注意： 当需要高温 RT 步骤时使用 TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents。	N808-0236
SYBR® Green 试剂	*Power* SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	4368711
	SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

采用两步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

试剂	步骤	试剂盒	部件号
TaqMan® 试剂	仅限 PCR 扩增步骤	TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
		TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
		TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4304437
		TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG	4352042
	仅限 RT 步骤	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
		TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
	RT 和 PCR 步骤	TaqMan® Gold RT PCR kit	N808-232
SYBR® Green 试剂	仅限 PCR 扩增步骤	*Power* SYBR® Green PCR Master Mix	4367659
		SYBR® Green PCR Master Mix	4309155
	仅限 RT 步骤	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
		TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
	RT 和 PCR 步骤	*Power* SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	4368711
		SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

基因分型实验

Pre-Designed/Validated 检测

检测

产品	部件号
TaqMan® SNP Genotyping Assays	有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站： http://www.appliedbiosystems.com/
TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays	
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination	

母液

母液	部件号
TaqMan® Genotyping Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 10 mL)， 400 次反应	4371355
TaqMan® Genotyping Master Mix， 1 瓶大包装 (1 × 50 mL)， 2000 次反应	4371357
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020

注意： 使用 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案不支持基因分型实验。

Custom 检测

检测

产品	部件号
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays	有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站： http://www.appliedbiosystems.com/

母液

母液	部件号
TaqMan® Genotyping Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 10 mL)， 400 次反应	4371355
TaqMan® Genotyping Master Mix， 1 瓶大包装 (1 × 50 mL)， 2000 次反应	4371357
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020

注意： 使用 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案不支持基因分型实验。

存在/不存在实验

Inventoried/Made to Order 检测

检测

产品	部件号
TaqMan® Gene Expression Assays	有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站： http://www.appliedbiosystems.com/
TaqMan® Endogenous Control Assays 注意： 包括 FAM™ 染料标记的 TaqMan® Endogenous Control Assays，作为 Inventoried TaqMan Gene Expression Assays。	
Custom TaqMan® Gene Expression Assays	

TaqMan Exogenous IPC Reagents

试剂盒	部件号
含有 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix 的 TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents （具有 VIC® 染料）	4308320
TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 注意： 若您正使用此试剂盒，您将需要单独购买其中一种 TaqMan® 试剂： • TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix （部件号 4304437） • TaqMan® PCR Core Reagents Kit （部件号 N808-0228）	4308323

切记！ 上面所列试剂盒含有 TAMRA™ 染料标记的探针；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。这些试剂盒可配合 StepOnePlus 系统使用；TAMRA 染料可在 StepOnePlus 系统上用作荧光报告基团或淬灭基团。

母液

母液	部件号
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020
TaqMan® PCR Core Reagents Kit	N808-0228

注意： 若您购买含有 TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix 的 TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents 试剂盒 （部件号 4308320），您不必再单独购买母液。

注意： 使用 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案不支持存在/不存在实验。

Custom 检测

检测

产品	部件号
Custom TaqMan® Probes and Primers	有关最新可用产品和特定产品用途的信息，请访问 Applied Biosystems 公司网站： http://www.appliedbiosystems.com/

DNA 或 cDNA 定量

试剂盒	部件号
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
TaqMan® Gene Expression Master Mix， 10 瓶小包装 (10 × 5 mL)，2000 次反应	4369542
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 200 次反应	4304437
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix， 2000 次反应	4326708
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4305719
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG，200 次反应	4324018
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG， 2000 次反应	4326614
10 瓶小包装 TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix，No AmpErase® UNG	4324020
TaqMan® PCR Core Reagents Kit， 200 次反应	N808-0228

注意： 使用 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案不支持存在/不存在实验。

采用一步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

试剂盒	部件号
TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit	4309169
TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents 注意： 当需要高温 RT 步骤时使用 TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents。	N808-0236

注意： 使用 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案不支持存在/不存在实验。

采用两步法 RT-PCR 扩增执行 RNA 定量

步骤	试剂盒	部件号
仅限 PCR 扩增步骤	TaqMan® Gene Expression Master Mix，1 瓶小包装 (1 × 5 mL)， 200 次反应	4369016
	TaqMan® Gene Expression Master Mix，10 瓶小包装 (10 × 5 mL)， 2000 次反应	4369542
	TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4304437
仅限 RT 步骤	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
	TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
RT 和 PCR 步骤	TaqMan® Gold RT PCR kit	N808-232

注意： 使用 Fast 或 SYBR® Green 母液和实验方案不支持存在/不存在实验。

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.

Förster, V. T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physics* (*Leipzig*) 2:55–75.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413–417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR:Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026–1030.

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.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25:402–408.

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.

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：

- 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曲线中显示，并用于进行等位基因识别。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，并用于进行检测识别。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。

R^2 值 (R^2 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 ($\Delta\Delta C_T$) method)
确定样本中靶序列的相对数量的方法。采用比较 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 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)

PCR 反应中的已知数量。

- 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、病毒载量或测定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)

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体积根据稀释点的数量、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)。

标准曲线 (standard curve)

在标准曲线和相对标准曲线实验中：

- 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)

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)。

并置布局 (colocated layout)

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。

步骤 (step)

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）。

参比荧光 (passive reference)

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体积差异而产生的与 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。

触摸屏 (touchscreen)

您触摸以控制 StepOne™ 或 StepOnePlus™ 扩增仪的显示屏。

纯染料 (pure dye)

参见客户自己选择的染料 (custom dye) 和系统染料 (system dye)。

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。

客户自己选择的染料 (custom dye)

非 Applied Biosystems 提供的染料。客户自己选择的染料可能适合于在 StepOne™ 和 StepOnePlus™ 系统上的实验中使用。当使用客户自己选择的染料时，应将客户自己选择的染料加入 Dye Library （染料库）并执行客户自己选择的染料校准。

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期间采集的数据。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)
归一化为参比荧光的荧光信号的荧光报告染料产生的荧光信号。

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)

当荧光信号几乎没有改变时，扩增曲线中，适合 PCR 起始阶段期间的荧光强度的一条线。

基线校准后归一化报告荧光强度 (baseline-corrected normalized reporter, ΔRn)

荧光报告基团生成的归一化荧光信号的量值：

1. 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 ΔRn 随循环变化扩增曲线中，每一循环的 ΔRn 计算如下：

   ΔRn （循环） = Rn （循环） – Rn （基线），其中 Rn = 归一化报告荧光信号强度

2. 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， ΔRn 计算如下：

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

另请参见归一化报告荧光强度 (normalized reporter, Rn)。

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)

解链曲线阶段期间所采集数据的曲线。解链曲线的峰值可表示靶序列的解链温度 (Tm) 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 (Rn) 随温度变化，或衍生报告荧光强度 (–Rn′) 随温度变化。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, Tm)

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。 Tm 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一个或多个反应孔。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)

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。

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)。

扩增曲线 (amplification plot)

显示 PCR 扩增循环阶段采集的数据。可视为：

- 基线校准后归一化报告荧光强度 (ΔRn) 随循环的变化
- 归一化报告荧光强度 (Rn) 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%)

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：

- **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)

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：

- 定量实验（标准曲线、相对标准曲线和比较 C_T）– cDNA (complementary cDNA) （cDNA （互补 DNA））、 RNA 或 gDNA (genomic DNA) （gDNA （基因组 DNA））

  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。
- 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））

  对于基因分型实验，模板类型选择会影响反应设置。
- 存在/不存在实验 – DNA

  对于存在/不存在实验， Applied Biosystems 建议将 DNA 模板添加到 PCR 反应中。

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)

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。

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。

区界线 (zone boundary)

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。

任务 (task)

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：

- 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)

参见解链曲线 (melt curve)。

设计向导 (Design Wizard)

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。

升降温 (ramp)

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。

升降温速度 (ramp speed)

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。

- 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。

切记！ 基因分型或存在/不存在实验不支持 TaqMan Fast 试剂。

实时 PCR (real-time PCR)

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。

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：

- 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：

- 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

您所选的实验类型会影响设置、运行和分析。

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：

- 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：

- 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)

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：

- 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 (Tm)，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) (10×)
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 10× 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) (10×)
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 10× 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体积的相同反应的总数。

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) 扩增的 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 IPC 反应孔 (negative control-IPC wells)。

阈值 (threshold)
1. 扩增曲线中，高于基线但处于指数增长区范围之内的荧光水平。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)）。
2. 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。

索引

字母

Advanced Setup （高级设置）工作流程 1-9， 1-10
Custom TaqMan Gene Expression Assays 3-18， 5-12
Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 4-14
Custom 检测类型 1-9， 1-10
    存在/不存在实验 5-16
    定量实验 3-21
Design Wizard （设计向导）工作流程 1-9， 1-10
DNA/cDNA 定量, 热循环条件 3-28
G/C 含量, 和扩增子位点 3-22
Inventoried 检测类型 1-9
IPC 5-4， 5-5
Made to Order 检测类型 1-9
MultiScribe 反转录酶, 定义 3-26
PCR, 一般规范 2-7
Pre-Designed/Validated 检测类型 1-10
Primer Express （引物快速设计）软件
    存在/不存在实验 5-16
    单核苷酸多态性检测 1-10
    定量实验 3-21
    较小扩增子 3-22
RNA 定量
    两步法 RT-PCR 扩增 3-26， D-4， D-9
    热循环条件 3-28， 3-29
    一步法 RT-PCR 扩增 3-25， D-4， D-9
RT-PCR
    方法比较 3-6， 3-8
    两步法 3-7
    一步法 3-7
StepOne 系统
    耗材 1-4
    检测类型 1-9
    滤光器 1-3
    实验类型 1-7
    试剂类型 1-8
    数据采集 1-2
SYBR Green 试剂 1-3
    发展 2-4
    工作原理 2-4
    选择考虑因素 2-6
    优化定量实验 3-31
TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays 4-11
TaqMan Endogenous Control Assays 3-17
TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents 5-13
TaqMan Gene Expression Assays 3-16， 5-10
TaqMan MGB 探针 2-3
    使用 2-4
TaqMan PDARs for AD 4-12
TaqMan SNP Genotyping Assays 4-10
TaqMan 试剂 1-3
    发展 2-2
    工作原理 2-2
    实验类型 2-2
    选择考虑因素 2-6
UNG, 尽量避免遗留产物 2-7

B

比较 C_T 实验
    关于 3-6
    另请参见 “定量实验” 3-6
    组分 3-6
标准品
    实验组分 3-5
标准品稀释序列
    实验组分 3-5
标准曲线实验
    关于 3-5
    另请参见 “定量实验” 3-5
    组分 3-5

C

重复, 实验组分 3-5， 3-6
重复反应 4-4， 5-4
存在/不存在实验
    Custom 检测类型的检测设计指南 5-16
    TaqMan 试剂 2-2
    工作原理 5-5
    检测类型 5-5
    结合 IPC 5-5
    设计 5-16
    为 Custom 检测类型选择试剂 3-24， D-3， D-9
    选择母液 5-15
    已定义 5-4
    在没有 IPC 的情况下执行 5-4
    组分 5-4
错配, 基因分型实验中 4-5

D

定量实验
- Custom 检测类型的检测设计指南 3-21
- SYBR Green 试剂 2-4, 3-31
- TaqMan 试剂 2-2
- 比较 3-6
- 比较 CT 3-6
- 标准曲线 3-5
- 检测类型 3-11
- 检测设计指南的结论 C-1
- 设计 3-20, 3-21
- 实时 PCR 3-4
- 说明 3-4
- 为 Custom 检测类型选择试剂 3-24, D-3, D-9
- 相对标准曲线 3-5
- 选择定量方法 3-5
- 选择母液 3-19
- 选择试剂类型 3-11

对照样本
- 实验组分 3-5, 3-6

多重 PCR 扩增
- rRNA 引物 B-1
- 单一比较 3-9
- 描述 3-9
- 引物限制 3-9

F

发夹环, 和引物选择 3-8

非特异性产物, SYBR Green 染料污染 2-6

H

耗材
- 另请参见 “所需材料” 1-4
- 支持的 1-4

J

基因分型实验
- TaqMan 试剂 2-2
- 错配 4-5
- 工作原理 4-4
- 检测类型 4-6
- 检测设计指南的结论 C-1
- 描述 4-4
- 设计 4-14, 4-16
- 选择母液 4-13, 4-16
- 仪器 4-4
- 组分 4-4

检测类型
- Custom 分析产品 1-9, 1-10
- Inventoried/Made to Order 检测 1-9
- Pre-Designed/Validated 检测 1-10
- 存在/不存在实验 5-5
- 定量实验 3-11
- 基因分型实验 4-6
- 选择 1-9

检测设计指南
- 存在/不存在实验 5-16
- 定量实验 3-21, C-1
- 关于 C-1
- 基因分型实验 C-1
- 热循环条件 3-27
- 选择试剂 3-24
- 引物和探针 3-21, 3-23
- 优化探针浓度 3-32
- 优化引物浓度 3-30

较小扩增子, 选择 3-22

解链温度, 和扩增子位点 3-22

K

扩增子, 选择较小 3-22

扩增子位点
- G/C 含量 3-22
- 解链温度 3-22
- 筛查 3-21
- 探针 5′ 端 3-22
- 选项 3-21
- 引物 3′ 端 3-22

L

两步法 RT-PCR 扩增
- RNA 定量 3-26, D-4, D-9
- 关于 3-7
- 使用的引物 3-8

M

母液
- 为存在/不存在实验选择 5-15
- 为定量实验选择 3-19
- 为基因分型实验选择 4-13, 4-16

N

内对照
- 实验组分 3-5, 3-6

Q

其它基于荧光的试剂 1-8

R

染料结合, 方法 2-4

热循环条件
- DNA/cDNA 定量 3-28
- RNA 定量 3-28
- 两步法 RT-PCR 扩增 3-29
- 一步法 RT-PCR 扩增 3-28

S

设计实验
存在/不存在 5-16
定量 3-20， 3-21
基因分型 4-14， 4-16
实时 PCR
TaqMan 检测过程 2-2
定量实验 3-4
试剂
SYBR Green 试剂 1-8
TaqMan 试剂 1-8， 2-2
考虑因素 2-6
其它基于荧光的 1-8
为 Custom 检测类型选择 3-24， D-3， D-9
选择 1-8， 2-6
数据
关于数据采集 1-2

T

探针
可用 TaqMan MGB 探针 2-3
设计指南概述 3-23
优化探针浓度 3-32
通用母液试剂
聚合酶优点 3-26

W

污染, 尽量降低 DNA 2-6

X

相对标准曲线实验
关于 3-5
另请参见 “定量实验” 3-5
组分 3-5

Y

阳性对照 4-4
样本 4-4， 5-4
实验组分 3-5， 3-6
一步法 RT-PCR 扩增
RNA 定量 3-25， D-4， D-9
关于 3-7
使用的引物 3-8
遗留产物, 使用 UNG 以尽量避免 2-7
阴性对照 4-4
阴性对照, 实验组分 3-5， 3-6， 5-4
引物
发夹环 3-8
两步法 RT-PCR 扩增 3-8
默认浓度 3-30
设计指南概述 3-23
一步法 RT-PCR 扩增 3-8
引物矩阵
定义极限 B-1
极限示例 B-2
如何使用 3-30
引物限制, 多重检测 3-9
优化 3-32

Z

终点实验
存在/不存在 5-5
基因分型 4-4

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 worldís 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

Applied Biosystems

部件号 4377715 修订版 C