

美国应用生物系统公司

ABI Prism<sup>®</sup> 7000 型荧光定量 PCR 仪

# 操作手册

快速入门指南



美国应用生物系统中国公司 · 技术服务部

2003 年

**AB** Applied  
Biosystems

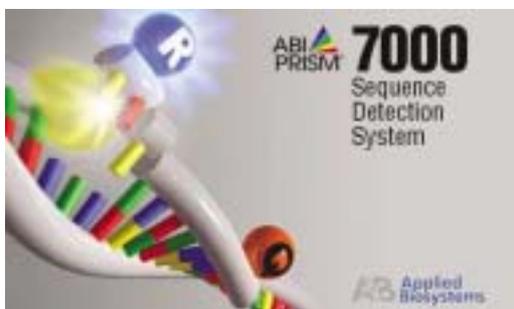
# 目 录

一. 开 机.....	3
二. 实时定量的软件运行 .....	3
1. 新建文件 .....	3
2. 探针设置 .....	4
3. 填样品表 .....	4
4. 参比荧光 .....	5
5. 循环参数 .....	5
6. 启动扩增 .....	5
三. 实时定量的数据分析 .....	6
1. 数据分析 .....	6
2. 基线设定 .....	6
3. 线性图谱 .....	6
4. 原始数据 .....	7
5. 标准曲线 .....	7
6. 实验报告 .....	7
四. 终点读板的软件运行 .....	7
1. 新建文件 .....	8
2. 探针(DETECTOR)设置.....	8
3. 位点(MARKER)设置.....	8
4. 填样品表 .....	8
5. 参比荧光 .....	8
6. 终点读板 .....	9
五. 终点读板的数据分析 .....	9
1. 数据分析 .....	9
2. 信号分布 .....	9
3. 基因分型 .....	9
4. 保存结果 .....	9
六. 日常维护 .....	10
1. 荧光污染的检查与处理.....	10
2. 检测器光源的更换流程.....	10

# ABI Prism® 7000 型荧光定量 PCR 仪 快速入门指南

## 一. 开 机

1. 确认电脑与主机的数据通讯线(灰色 USB 连线)连接正确。
2. 确认电脑处于外接电源供电状态。
3. 启动电脑，以 Administrator 用户名登录，进入 Windows2000 操作系统。
4. 待桌面图标出现后，打开 7000 主机的电源。
5. 待主机的电源指示灯点亮后，启动 7000 SDS 应用软件。

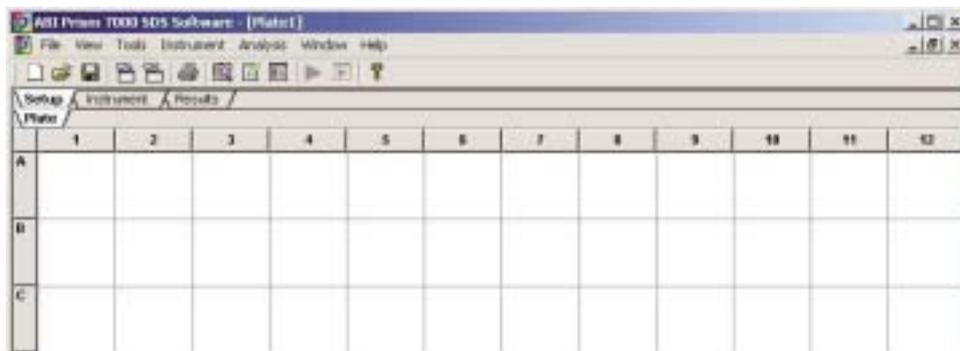


在进行实验之前，请先检查样品加热模块以确定它没有受到荧光污染，具体方法请按照第 6 节的“荧光污染的检查与处理”流程进行。

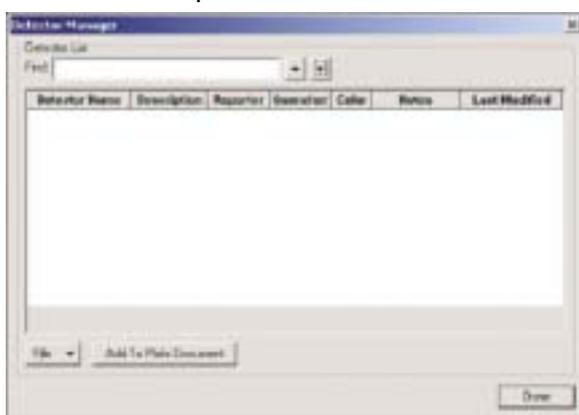
## 二. 实时定量的软件运行

基因表达的绝对定量和相对定量研究、转基因食品的检测(GMO)、各种病原体的检验检疫等各种定量应用；以  $C_T$  值的大小作为样品阴性、阳性判定依据的定性应用；以及 SNP 检测、等位基因鉴定实验等的第一步 PCR 扩增，都是采用实时定量模式，按照以下步骤操作。

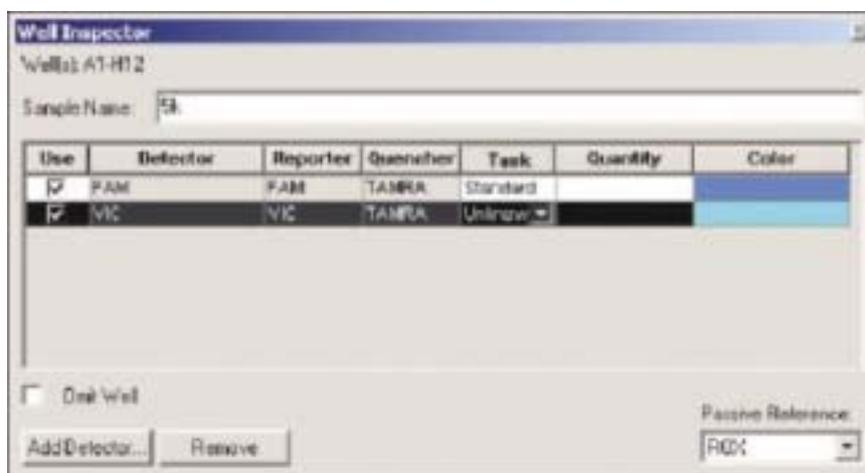
1. 新建文件 菜单 File New, Assay 选择 Absolute Quantification (实时定量模式)，打开一个空白的 96 孔板文件。



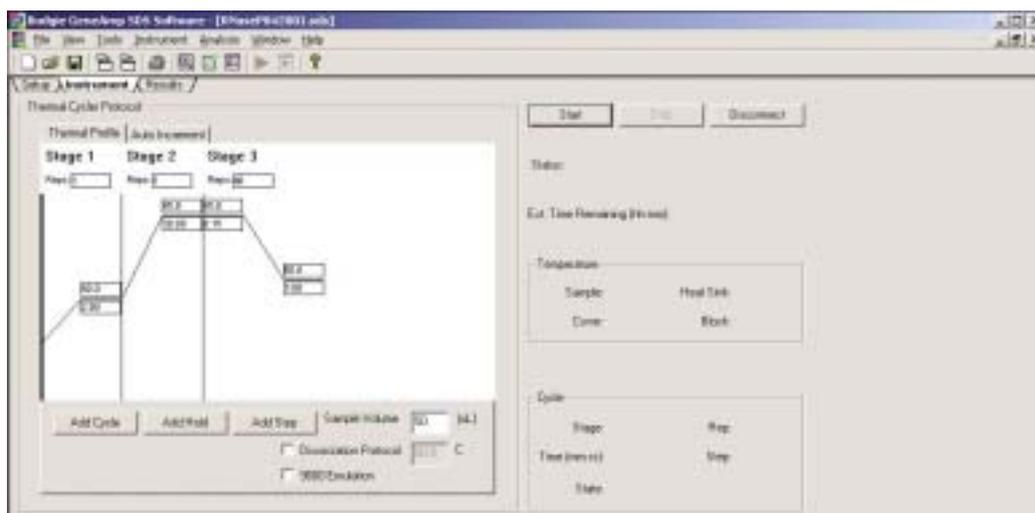
2. 探针设置 双击任意一个孔，打开 Well Inspector 窗口。该窗口也可以从菜单 View Well Inspector 打开。
3. 首次使用软件，或者探针 (Detector) 没有设置好，请点击 Add Detector 按钮，打开 Detector Manager 窗口。该窗口也可以从菜单 Tools Detector Manager 打开。如果 Detector 列表中没有合适的探针，点击按钮 File New，新建探针：设定探针的名称(建议使用所研究基因符号加标记荧光，如 GAPDH\_FAM、ACTIN\_VIC 等)、报告基团(FAM 或者 VIC)、淬灭基团(TaqMan 探针选 TAMRA；MGB 探针选 None)、颜色(任意指定)等。设置完成后点击 OK，该探针即出现在探针列表中。重复此过程，设立其他的探针。
4. 在 Detector Manager 窗口，从探针列表中点击选择所需探针，按住 Ctrl 键可以选择多个探针，再点击 Add to Plate Document 按钮。最后点击 Done 关闭 Detector Manager 窗口。此时 Well Inspector 窗口仍然是打开的。



5. 填样品表 在 96 孔表中选定有样品的一个或多个孔，在 Well Inspector 页面的 Sample Name 栏中填入样品名称；在探针列表的 Use 项下的方框中，打钩选择要用的一个或多个探针；在 Task 栏中选择指定样品类领：阴性对照选 NTC；未知样品选 Unknown；标准品选 Standard。对于 Standard，还要在 Quantity 栏中输入 DNA 拷贝数。注意：只有在这里输入拷贝数后，软件才能自动生成标准曲线。建议标准品的浓度在 5 点以上。建议每个样品(包括标准品)都按照统计学要求作一定数量的复管。



6. 参比荧光 如果使用的是 ABI 公司的定量 PCR 试剂,如 TaqMan Universal PCR Master Mix 或者 SYBR Green PCR Master Mix 等,参比荧光(Passive Reference)选 ROX;如果使用的试剂中不含有参比荧光,请选 None。完成后点击右上角的 X 按钮,关闭 Well Inspector 窗口。
7. 循环参数 切换到 Instrument 页面,设定及修改 PCR 热循环程序:在 ABI 公司默认的程序中,50°C 2 min 是 UNG 酶起作用的步骤,UNG 酶可以预防 PCR 产物(其中以 U 代替 T)对定量 PCR 的污染;95°C 10 min 的作用是激活金牌 Taq 酶,同时灭活 UNG 酶;40 个循环的 95°C 15 sec 和 60°C 1 min 是定量 PCR 的循环步骤。7000 默认在最后一步,也就是 60°C 1 min 复性和延伸时收集荧光信号。如果使用 ABI 公司的定量 PCR 试剂,上述参数不需要调整,直接运行 PCR 循环就可以了。在使用其他厂家试剂的情况下,如果其中没有 UNG 酶,请删除 50°C 2 min 步骤;如果使用的不是金牌 Taq 酶而是其他普通的 Taq 酶,请删除 95°C 10 min 步骤。
8. 循环参数的修改方法 删除:按住 Shift 键并在相应的 Stage 或 Step 中点击,使该步骤被选中变黑,再按 Del 键即可删除。插入:在需要插入参数的位置点击,出现粗黑竖线后,分别点击 Add Hold、Add Cycle 或 Add Step 按钮添加保温、循环或循环中的一个步骤。修改温度和时间:拖动鼠标,选中需要修改的温度或时间数字,输入新的数值即可。

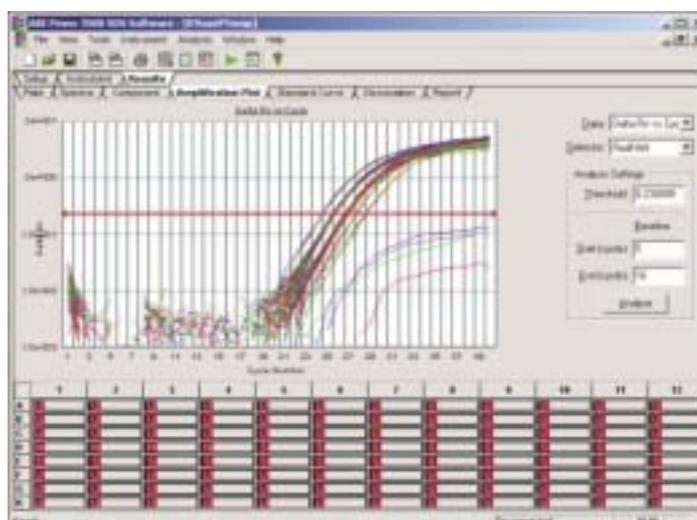


9. 其他设置 反应体积:定量 PCR 的标准反应体积是 50  $\mu$ L;如果想修改的话,建议大于 25  $\mu$ L。融解曲线试验:在 Dissociation Protocol 选项左边的方框中打钩,仪器即在定量 PCR 循环完成后继续做融解曲线试验。如果是采用 SYBR Green I 染料方法进行定量研究,建议进行融解曲线试验,以判定 PCR 反应特异与否。单峰表示单一的 PCR 扩增产物,多峰表示 PCR 扩增有杂带。注意:只有 SYBR Green I 染料方法才需要进行融解曲线试验,TaqMan 探针和 MGB 探针法都不需要。9600 Emulation:选中此项,即可使 7000 的升降温速度减慢,与 9600 和 7700 一样,从而可以直接使用在 9600、7700 型 PCR 仪上优化好的循环条件,而不需任何修改。
10. 启动扩增 点 Save 按钮保存文件设置。确认 96 孔板或全部样品管在主机内放置妥当后,点击 Start 按钮,开始 PCR 循环。屏幕上动态显示 PCR 进程和剩余时间。

11. 监控进程 切换到 Results 页面的 Amp Plot 子页面，可以实时显示 PCR 曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果 Detector 选 FAM 或 VIC，只显示对应探针的变化情况；如果选 All，则同时显示所有探针的反应进程。
12. 保存结果 程序结束后，点 Disconnect 按钮，然后 File Save 保存实验结果。可以保存为.sds 格式，也可以保存为.sdt 格式，作为以后同类实验的模板，节省软件设置时间。

### 三. 实时定量的数据分析

1. 数据分析 切换到 Result 页面，进入扩增曲线(Amplification Plot)子页面，查看软件已经自动分析好的实验结果。注意：此时的数据是软件根据默认值（基线起点为 3，终点为 15）得到的初步结果，还需要根据本次实验的具体情况，精细调节 Baseline（基线）的起止点后，重新分析，以得到更精确的数据。
2. 基线的起点和终点确定原则 基线(Baseline)是指 PCR 开始时信号很低、接近背景且比较平稳的那个阶段。起点要避开开始几个循环由于高温导致的信号增高，设在信号已经降到背景高度且能维持平稳的地方，一般在 3 到 6 个循环之间；终点要避免覆盖信号已经开始有明显增长的地方，一般在本组数据中最小的  $C_T$  值前再 3 个循环处。另外，起点与终点之间最好能间隔 8 个循环以上，以满足统计基线标准偏差的数学要求。调整好起止点以后，再点击 Analyze 按钮，软件即自动计算新的阈值和  $C_T$  值，并更新实验报告。注意：此时扩增曲线页面上显示的阈值数字并不更新，但是这不影响后台数据运算的准确。



3. 线性图谱 在默认的设置中，PCR 扩增曲线图谱的纵坐标代表经过 ROX 和空白校正后的相对荧光信号强度，横坐标代表 PCR 循环次数（从 1 到 40）；纵坐标以对数表示，横坐标以线性表示。如果要完全线性的 S 形图谱，请双击纵坐标轴线，打开坐标设置窗口，将纵坐标改成线性形式。



必须在定量 PCR 仪上进行。以下只叙述第二步 Post-Read 和数据处理的操作方法。如果第一步也在定量 PCR 仪上进行，请按第三节实时定量的实验方法设置和运行软件；待 PCR 完成、数据保存好后，再将同一块板放在 7000 上，按以下步骤操作。

1. 新建文件 菜单 File New, Assay 选择 Allelic Discrimination (终点读板模式，用于 SNP 分析等)，新建一个空白 96 孔板文件。



2. 探针设置 双击任意一个孔 打开 Well Inspector 窗口。该窗口也可以从菜单 View Well Inspector 打开。
3. 首次使用软件，或者 Marker 没有设置好，先点击 Add Detector 按钮，打开 Detector Manager 窗口。该窗口也可以从菜单 Tools Detector Manager 打开。如果 Detector 列表中没有合适的探针，File New, 新建探针，设定探针的名称(建议使用等位基因的名称加标记荧光，如 Allele 1\_FAM、Allele 2\_VIC 等)、报告基团(FAM 或者 VIC)、淬灭基团(TaqMan 探针选 TAMRA；MGB 探针选 None)、颜色(任意指定)等。设置完成后点击 OK，该探针即出现在探针列表中。
4. 位点设置 Detector 设置好后，点击 Add Marker 按钮，打开 Marker Manager 窗口。该窗口也可以从菜单 Tools Marker Manager 打开。如果在 Marker 列表中找不到合适的探针，点 Create Marker，取名(建议使用位点的名称，如 D2S1356 等)，OK，新位点的名字即出现在左边的位点列表中，选中位点，在右边的探针列表中打钩选择与该位点配套的探针，一般 FAM、VIC 各一个组成一套。
5. 选择位点 Marker 设置完成后，在左边的位点列表中选中该 Marker，点击 Copy to Plate Document 按钮，该 Marker 的信息即分成 3 行出现在 Well Inspector 窗口中。重复选好全部所需 Marker，再点击 Done 关闭 Marker Manager 窗口。注意：定量 PCR 实验只要求设置探针(Detector)即可，而 SNP 实验既要设置探针(Detector)，还要设置位点(Marker)。如果没有设置 Marker，软件将不能进行基因分型。
6. 填样品表 在 96 孔表中选定有同类样品的一个或多个孔，在 Well Inspector 页面的 Marker 列表的 Use 项下的方框中打钩，选择要用的 Marker，然后在探针的 Task 栏选择指定样品类型：阴性对照选 NTC；未知样品选 Unknown。没有 Std。
7. 参比荧光 如果用的是 ABI 公司的 PCR 试剂 如 TaqMan Universal PCR Master Mix with or without UNG，参比荧光(Passive Reference)选 ROX；如果所用试剂中不含 ROX 参比荧光，请选 None。  
点击右上角的 X 按钮关闭 Well Inspector 窗口。

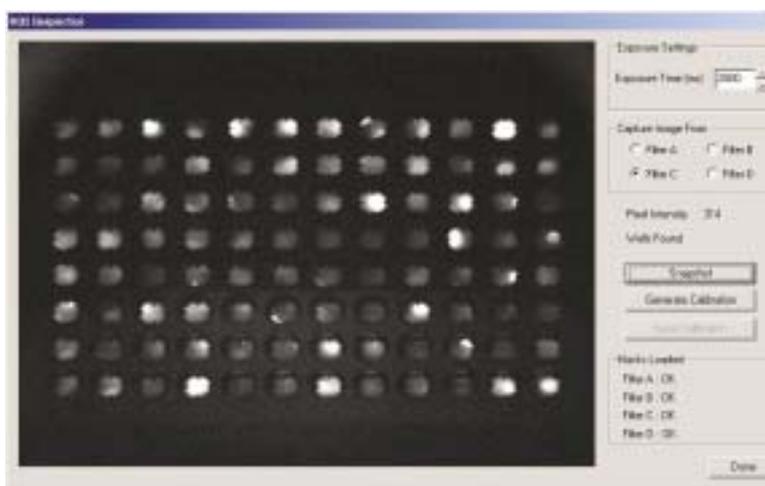
8. 循环参数 切换到 Instrument 页面。PCR 热循环程序只有 60°C 一个步骤，不需要修改。设置反应体积。SNP 的标准反应体积是 50  $\mu$ L。点 Save 按钮保存文件设置。
9. 终点读板 确认 96 孔板或全部样品管在主机内放置妥当后，点击 Post-read 按钮，开始读取数据，大约 10 秒完成。
10. 保存结果 程序结束后点 Disconnect 按钮，然后 File Save 保存实验结果。

## 五. 终点读板的数据分析

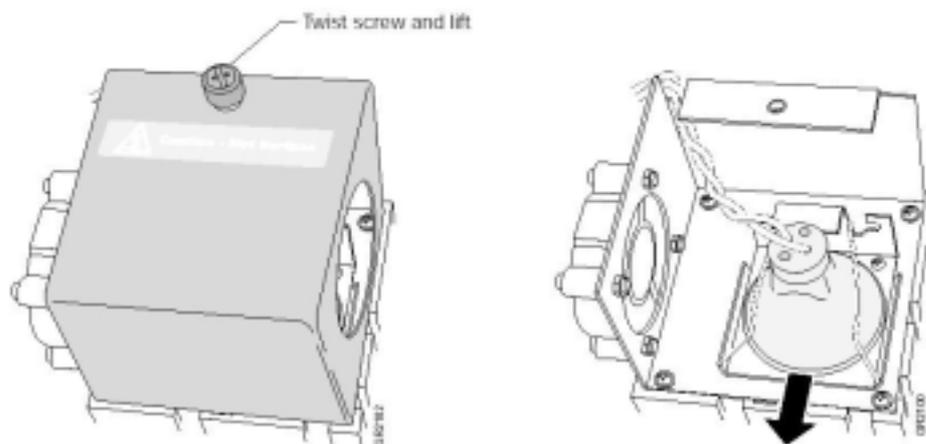
1. 数据分析 切换到 Results 页面，Allelic discrimination 子页面，在 Marker 下拉菜单中选择要查看其数据的 Marker，在下面 96 孔板界面中按 Excel 方式选择需要查看的样品孔，软件即在中间的图谱上显示信号的分布情况。选择不同的 Marker，显示不同的信号。可以点击放大或缩小工具调整图谱的大小。
2. 信号分布 正常的信号应该分为 4 组，靠近原点处为 NTC；靠近 X 轴的是 VIC 信号，是纯合子，其正常信号强度范围在 2-8 之间；靠近 Y 轴的是 FAM 信号，是另一种纯合子，其正常信号强度范围在 4-16 之间；靠近对角线位置的样品中既有 FAM 信号也有 VIC 信号，是杂合子，强度为 FAM 和 VIC 各自的一半左右。
3. 基因分型 点击套索工具，然后通过鼠标圈定 NTC 信号，在 Call 下拉菜单中选 NTC，这些数据点即被分型为 NTC 并显示相应的颜色和图标；同样分型 FAM 纯合子、VIC 纯合子和杂合子。
4. 保存结果 切换到 Report 页面看实验报告。确认无误后，保存分析结果。也可以从 File 菜单中选择 Export，再选择数据类型，输出各种类型的数据。

## 六. 日常维护

1. 荧光污染的检查与处理 新建一个空的 96 孔板, 菜单 Instrument Calibrate 打开 ROI Inspector 窗口, 将 Exposure Time 调到 4096, 选定 Filter B, 点击 Snapshot 按钮 (不要动下面两个按钮, 以免 ROI 设置出错), 此时可以看到排列整齐的 96 孔图像。如果观察到特别明亮的光斑, 则表明该孔存在荧光污染。将光标移动到单个孔的上方可在右侧栏中的 Pixel Intensity 处读出该孔的荧光信号值, 超过 500 以上的需要清洗。清洗时尽量使用较细且无硬物突出的干棉签擦拭; 如果未能去除, 可用去离子水清洗; 如污垢顽固, 可使用 90%乙醇清洗, 但要等乙醇完全挥发干净后方可盖上热盖, 以免有机溶剂损伤热盖上的透镜组。



2. 检测器光源的更换流程 关机冷却约 15 分钟后, 打开仪器顶部盖板, 拧松灯泡保护罩的螺钉, 取下保护罩, 将灯泡拆下, 更换新的灯泡并插好连线。注意: 备用的新灯泡必须保存在干燥环境中。



(Last revised: 2003-10-20)