美国应用生物系统公司

ABI Prism[®] 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





_	

一. 开	机	3
二. 实	时定量的软件运行	3
1.	ī建文件 ₹针设置	3 4
3. 垣	[样品表	4
4.	◎比荧光 酥琢参数	5 5
6.	动扩增	5
三. 实	时定量的数据分析	6
1.	双据分析 基线设定	6 6
3. 约	。 性图谱	6
4.厉 5. 标	₹妇数据	7 7
6. 习	₩ 报告	7
四.终.	点读板的软件运行	7
四. 终 1. 新 2. 探	点读板的软件运行 f建文件 彩针(DETECTOR)设置	7 8 8
四. 终. 1. 新 2. 探 3. 位	点读板的软件运行 f建文件 针(DETECTOR)设置 Z点(MARKER)设置	7 8 8 8
四. 终 1. 新 2. 挤 3. 位 4. 垣 5. 参	点读板的软件运行 f建文件 發针(DETECTOR)设置 互点(MARKER)设置 复样品表	7 8 8 8 8 8
四. 终 1. 新 2. 新 3. 位 4. 垣 5. 参 6. 约	点读板的软件运行 f建文件 针(DETECTOR)设置 杠点(MARKER)设置	7 8 8 8 8 9
四. 终 1. 新 2. 新 3. 位 4. 填 5. 续 五. 终	点读板的软件运行 f建文件 针(DETECTOR)设置	7 8 8 8 8 9 9
四. 终. 1. 第 2. 第 3. 位 5. 参 5. 参 5. 参 5. 参 5. 参 2. 信	点读板的软件运行	7 8 8 8 8 9 9 9 9
四. 终. 新探位 均参 经 数 信 基 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	点读板的软件运行	7 8 8 8 8 8 8 8 8 8 9 9 9 9 9
四. 终, 新扬位 填参 经 。 数	点读板的软件运行	7 8 8 8 8 8 8 8 8 9 9 9 9 9 9 9
四. 终,新探位垣参约 终, 数信星仍 日 克 二、1. 终,新探位垣参约 终, 数信星仍 日 克 1. 1. 1.	点读板的软件运行	7 8 8 8 8 8 8 8 9 9 9 9 9 9 9 0 0 0



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。

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。

All Prise	1000 505 5al	teene (15	atect]						.IO ×
File Ver	r Tooli Distri	net his	pas Window	+Hip:					-101×
	884	自國目	E P F	8					
Serve (in	strunger Ares	tota /							
Plate /	1					01 0			 02
1	2	1	4	. 5	5 B -	1		- 10	 0
<u>^</u>									
			-						
B									
_							 		
c									



- 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。

Befortur Henre Denerliption Reporter	Gum at ur C	ala Ro	nce Lost Hed	field
h - Add 1s Phis Don.event				

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。

ise :	Detentor	Reporter	Quencher	Tauk	Quantity	Coler
9	PAM	FAM	TAMPLA	Standard		1. Contraction
₹.	MC	VIC	TANKA	Uninew.		

- 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 μL;如果想修改的话,建 议大于 25 μL。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

- 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。
- 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。如果要看完全线性的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。

- 4. 原始数据 切换到 Component 子页面,察看原始数据。正常的 FAM 信号强度, 基线时约为 5000 点,扩增完成达到约 28000 点,中间呈 S 形增长;TAMRA 和 ROX 的信号开始时都比 FAM 的基线要稍低一点,TAMRA 信号到指数增长阶段会降低, 而 ROX 信号是水平稳定的,不随 PCR 进程而改变,因为 ROX 是以固定浓度加入 到 PCR 试剂中的,它本身并不参与 PCR 扩增。
- 5. 原始数据 切换到 Spectra 子页面,也可以察看原始数据。Spectra 与 Component 这两个页面的区别是:Component 显示的是信号强度随时间(即 PCR 循环次数)的 变化,是纵向的;而 Spectra 显示的是每个 PCR 循环点上信号强度在不同波长上的 分布,也就是在4个滤色片上的分布,是横向的。
- 6. 标准曲线 切换到 Standard Curve 子页面,察看标准曲线。注 意:只有在 Set up 时输入标准品的拷贝数后,软件才能自动生成标准曲线。



7. 实验报告 切换到 Report 子页面,察看实验报告。确认无误后,保存结果。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,包括 C_T 值、相对信号强度、原始数据、融解曲线数据和实验结果等。输出的数据可以用 Excel 打开,并可在 Excel 中重新生成扩增曲线、标准曲线等图谱。



四. 终点读板的软件运行

各种等位基因鉴定实验,包括 SNP 检测、基因突变检测等,都包括两个阶段:1、 PCR 扩增;2、扩增后的荧光信号读取(Post-read)和数据处理。第一步既可以在 9700、 9600 等普通的 PCR 仪上进行,也可以在 7000、7900 等定量 PCR 仪上进行;第二步 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。

Views Internet	toola Jutra	nant Anali MR III	Nedon	ridu P							10
1	2	3	4	1		r		,	10	**	12
	-										
	-	-	_					_	-		-
	View View	Vere Tools Judro Vere Tools Judro Christmennet / Nor 8 2	View Tools Instrument Andr Seven Tools Instrument Andr Seven Tools Instrument Andr (Instrument A Neroutic / 1 2 3	Haning Loop Software: (Maine) Were Tools Instrument Analysis Window ■ 88 4 8 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	Harrycon Sco Southwart 20 (Mariel) Wew Tools Instrument Analysis Window Help: Image: Scott	Han Tools Subranet (Netler)) Were Tools Instrument Analysis Window Helpi 日本語 ● ● ◎ ◎ ◎ ◎ ○ ○ ○ > > > (Instrument A Remute / 1 2 3 4 6 6	Hana Toola Sudrament (Padra) Were Toola Sudrament Analysis Window Field 日本語 一個 原 回 新 所 家 (Instrument A Percedic / 1 2 3 4 6 6 7	Attraction Software (Main) View Tools Instrument Analysis Window Field	HTTERCOLLEGE Settimente (Inder) Were Tools Instrument Analysis Window Help 日 2 3 4 6 8 7 9 9 1 2 3 4 6 8 7 9 9	HTTEREOUS Software (Maine) Were Tools Instrument Analysis Window Help ■ 各面 國 面 ● 下 文 (Instrument A Results / 1 2 3 4 6 8 7 8 9 98	HILLE CLOS Software (Notion Field) Were Tools Instrument Analysis Window Field

- 双击任意一个孔 打开 Well Inspector 窗口。该窗口也可以从菜单 View 2. 探针设置 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 New,新建探针,设定探针的名称(建议使用等位 列表中没有合适的探针, File 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。
- Detector 设置好后,点击 Add Marker 按钮,打开 Marker Manager 4. 位点设置 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。
- Marker 设置完成后,在左边的位点列表中选中该 Marker,点击 Copy 5. 选择位点 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。
- 如果用的是 ABI 公司的 PCR 试剂 如 TaqMan Universal PCR Master 7. 参比荧光 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。

- 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 μL。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

- 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。
- 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。
- 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

 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)