



Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (With RQ Study)

簡易中文操作手冊

SDS 1.3

I. 系統介紹 ~

I.1. 電腦:

- Dell GX280 2.8GHz with Dell 17" Flat monitor
- 256 MB RAM 以上
- 40 GB hard drive 以上
- DVD-RW drive
- Microsoft Windows XP Operating System with Service Pack 2 (SP2)

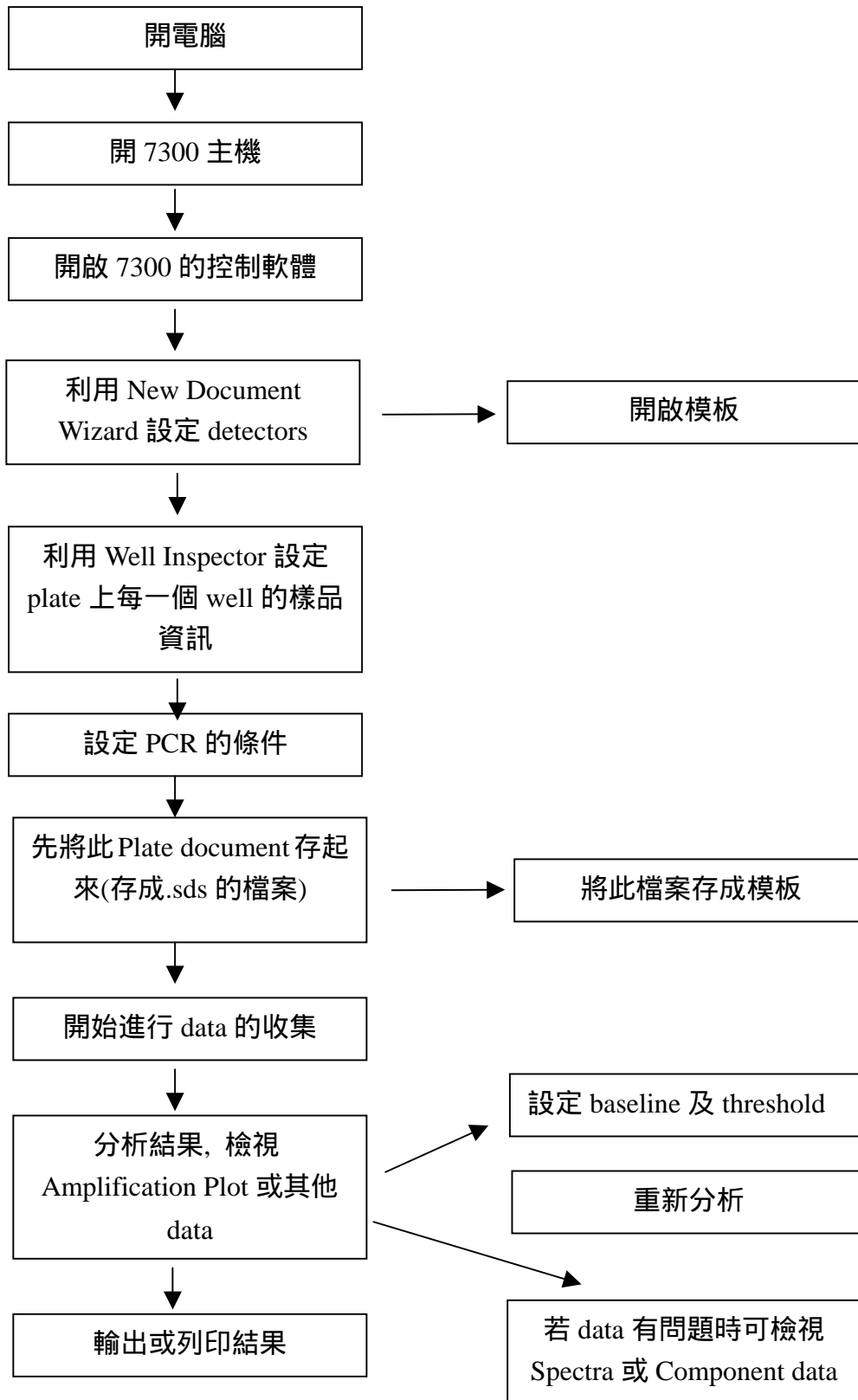
2. 軟體:

- (1) Sequence Detection Software V1.3 定量分析軟體
- (2) Primer Express Software V3.0 探針引子設計軟體
- (3) RQ Study Software 相對定量計算分析軟體

3. 7300 主機:



操作及分析流程~



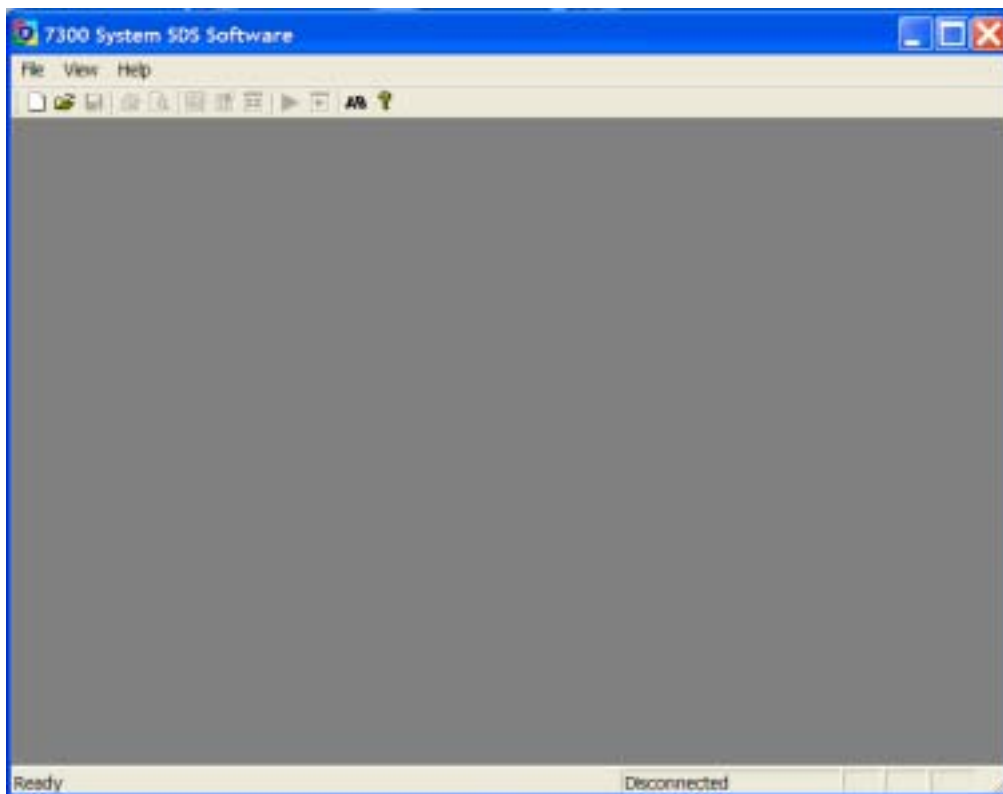
II. 基因定量之操作步驟~

1. 先開電腦，待開機後再將 7300 的電源打開。
2. 開啟 ABI Prism 7300 SDS 軟體：

按兩下電腦螢幕上 7300 軟體的 icon，如下圖：

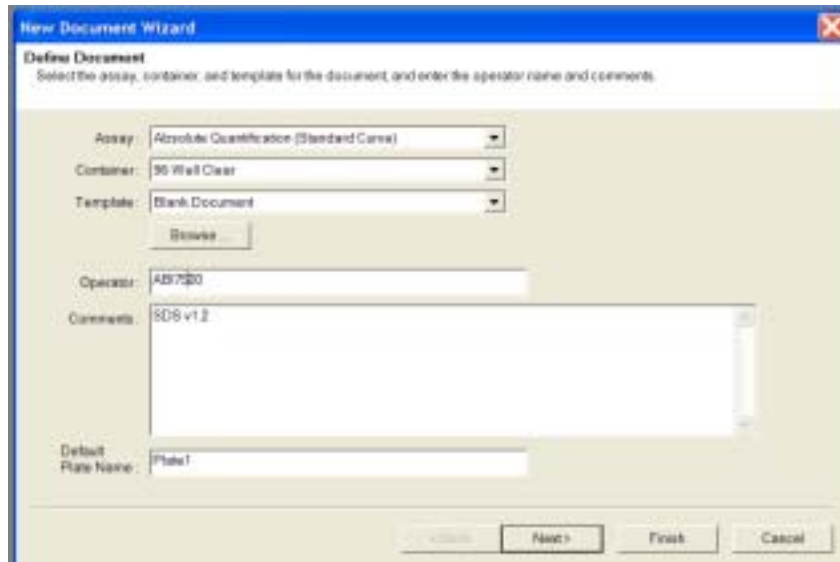


3. 當軟體開啟之後會出現以下視窗：



視窗下方為狀態顯示列。此時右下顯示 Disconnected，左下顯示 Ready。

從 File 選擇 New , 則會出現 New Document Wizard 視窗 , 可設定應用樣品盤種類。



Assay: 依實際情況選擇

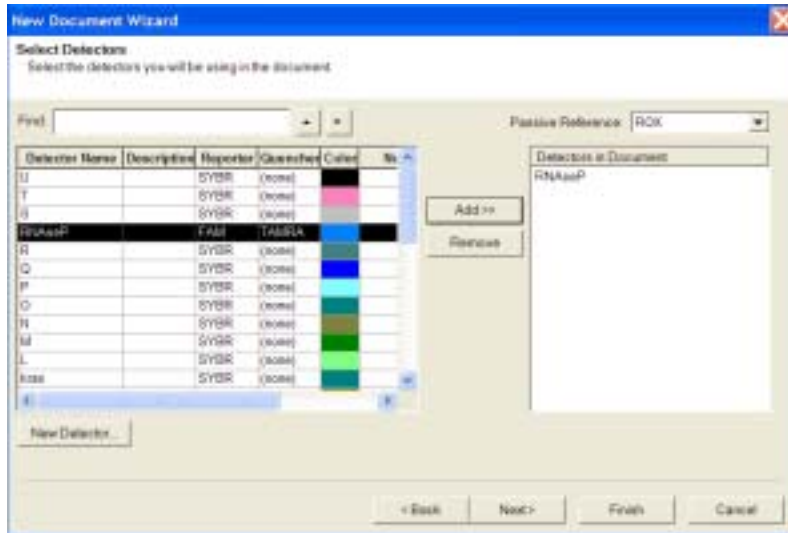
Assay	Applications	When to use this
Absolute Quantification (Standard Curve)	絕對定量	For data collection and data analysis
Relative Quantification (CT)	相對定量	上機 for data collection
Relative Quantification (CT) study	相對定量	For data analysis
Allelic Discrimination	SNP genotyping	For Post read PCR signal and SNP genotyping analysis

Container: 96-well Clear。

Template: 若有已設定好的模版 , 可直接點選 ; 若無 , 選 Blank

Document 即可。

4. 設定完成後按下 Next ，開始選擇此次實驗所用的 Detector ，並按下 Add 將 Detector 加入 Plate Document 後則可按下 Next。



若要設定新的 Detector 則按下 New Detector 則可建立新的 Detector

Name: 可輸入基因名稱。

Reporter Dye: 依實際所使用的螢光種類選擇。

Quencher Dye: 若為一般的 TaqMan Probe 選 TAMRA。

若為 MGB Probe 選 none。

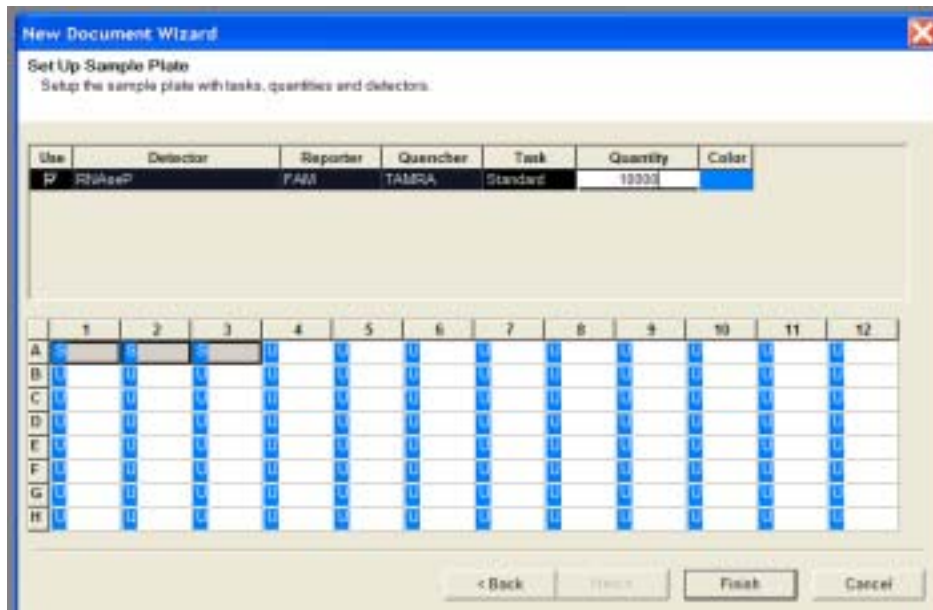
若為 SYBR 選 none。

Color: 代表此 Detector 的樣品在 Plate Document 中之顏色。

若要繼續設定其他的 Detectors ，點選 Create Another ，並輸入正確的資訊。



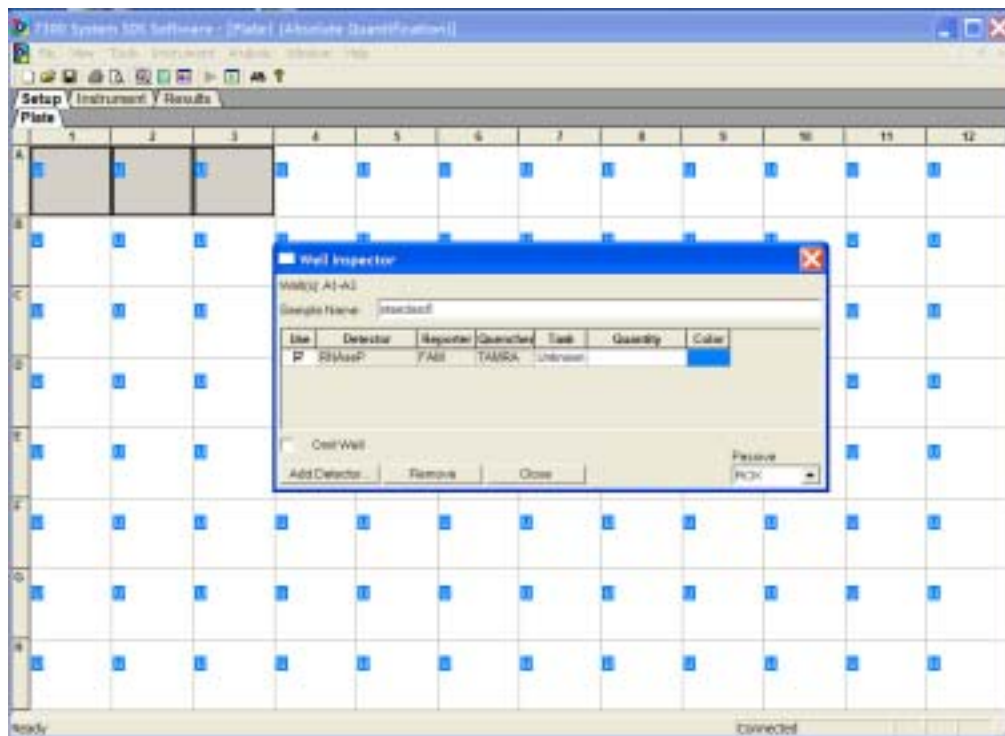
5. 選定 Plate Document 中有放樣品的 Wells , 然後選定適當的 Detector。點選 Detector 列中 Use 的框框 , 並在 Task 欄中選擇其種類為 Unknown, NTC 或 Standard (唯有 Standard 的樣品才能輸入樣品量)。



6. 輸入樣品名稱可從工具列中選擇 Well Inspector 如下圖



當 Well Inspector 視窗出現後則可編輯樣品名稱 (相同名稱者 , 軟體即視為重複樣品 , 會自動計算平均值及標準偏差)。設定如下圖:



7. 若此 Plate Document 常用，可將其存成 Template。

File menu 下選 Save As，輸入檔案名稱並存成 SDS Templates (*.sdt)的格式。

8. 若不存成 Template，請先將此 Plate Document 存下來。File 下選 Save As，並將檔案種類存成 SDS Document (*.sds)。

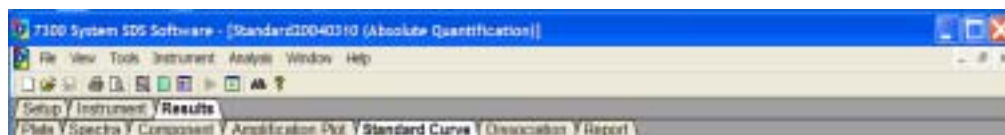
9. 此時可檢查 PCR 條件，並準備開始收集 data (若尚未將樣品盤放入機器中請先放入)。



在 Plate Document 上點選 Instrument , 即進入 PCR 設定之視窗。可直接更改溫度及時間, 亦可利用 Add Cycle, Add Hold, 或 Add Step 改變 PCR 的條件。如下圖:

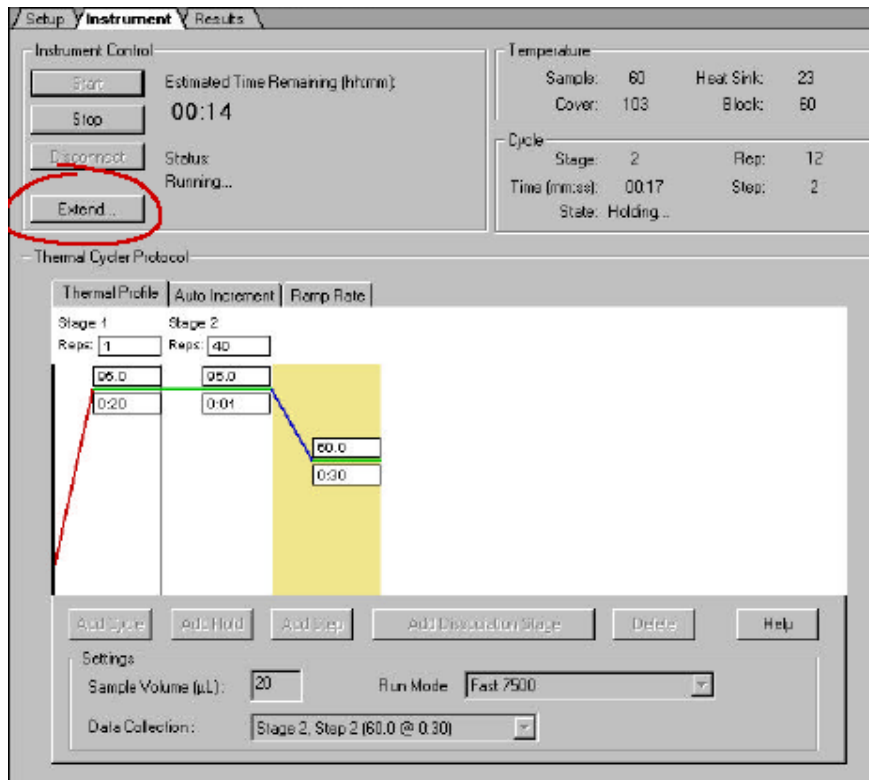


- 若為 SYBR 的反應請點選 Add Dissociation Stage
 - 設定正確的 PCR 反應體積
 - 收集訊號的過程中可同步觀察 Amplification Plot
- 在 Results 下點選 Amplification Plot 即可

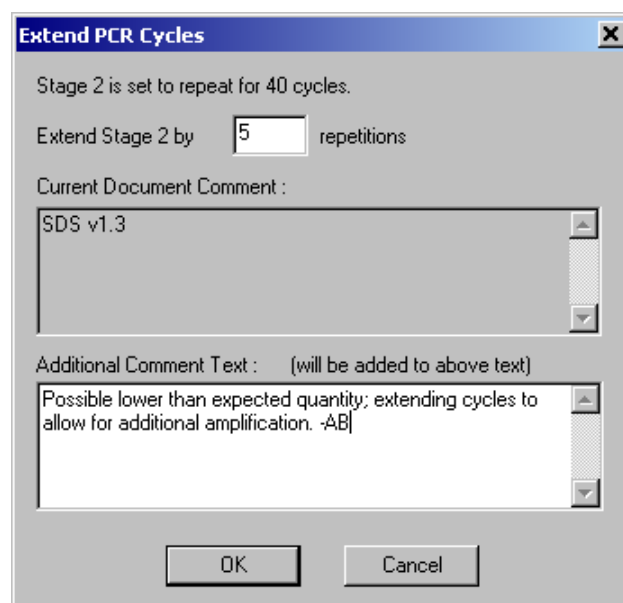


再存一次後按下 Start 即開始進行 PCR 及訊號之收集。

10. 在機器 running 的過程中，若想增加 cycle 數，每個 run 可點選 1 次 Extend 來增加 1~20 個 cycle (必須在最後 3 個 cycle 之前)。如下圖：

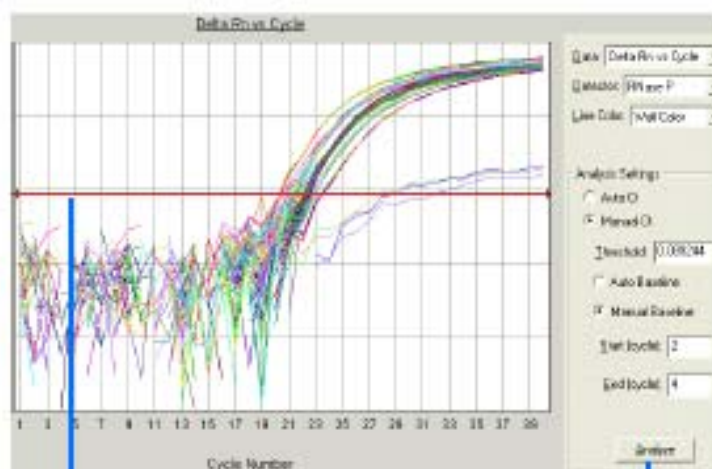
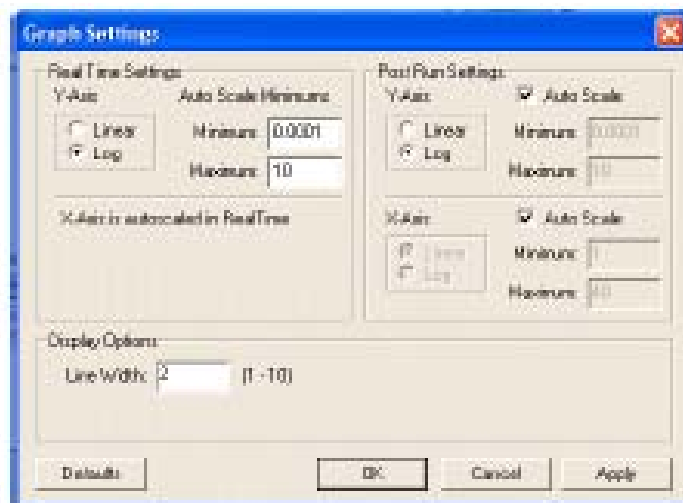


點選 Extend 後，即出現下列視窗，鍵入欲增加的 cycle 數，並可在 Additional Comment Text 中註明延長原因。



III. 結果分析~

1. 若 data 已分析完成，在 Amplification Plot 中 Threshold 為綠色的線；紅色的線表示未分析。欲重新分析請依以下步驟。
2. Amplification Plot 中 data 顯示方式之設定，請於 Data menu 中選擇 Delta Rn vs Cycle。並將圖形之縱座標表示方式改成 Log（在縱座標處按兩下會出現 Graph settings 的視窗，可選擇 data 表示方式）



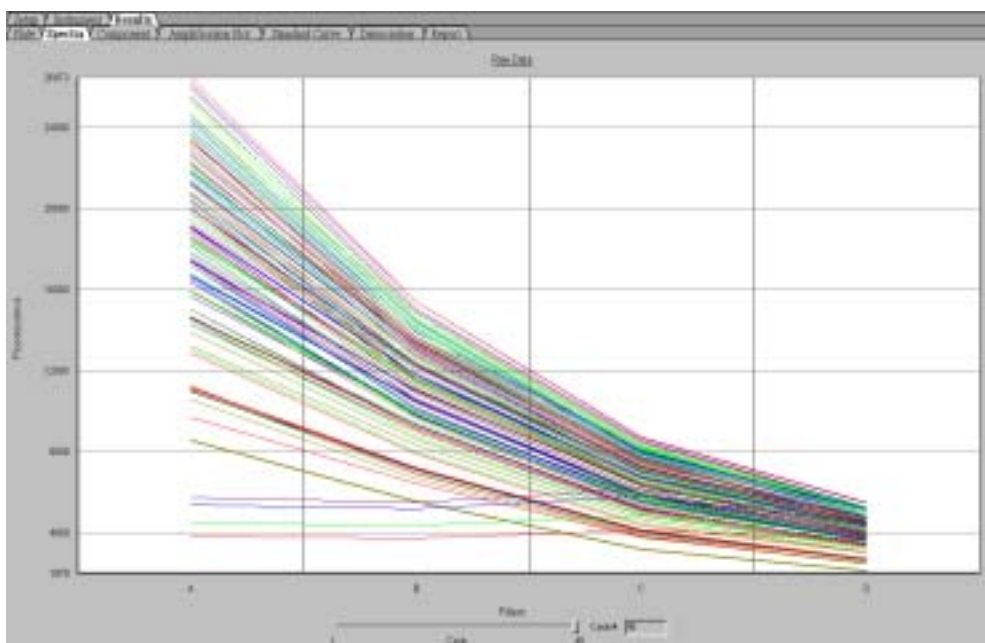
Drag the Threshold bar to adjust the threshold. The bar turns red, indicating that the threshold has been changed.

The Analyze button is enabled after a baseline or threshold setting is changed.

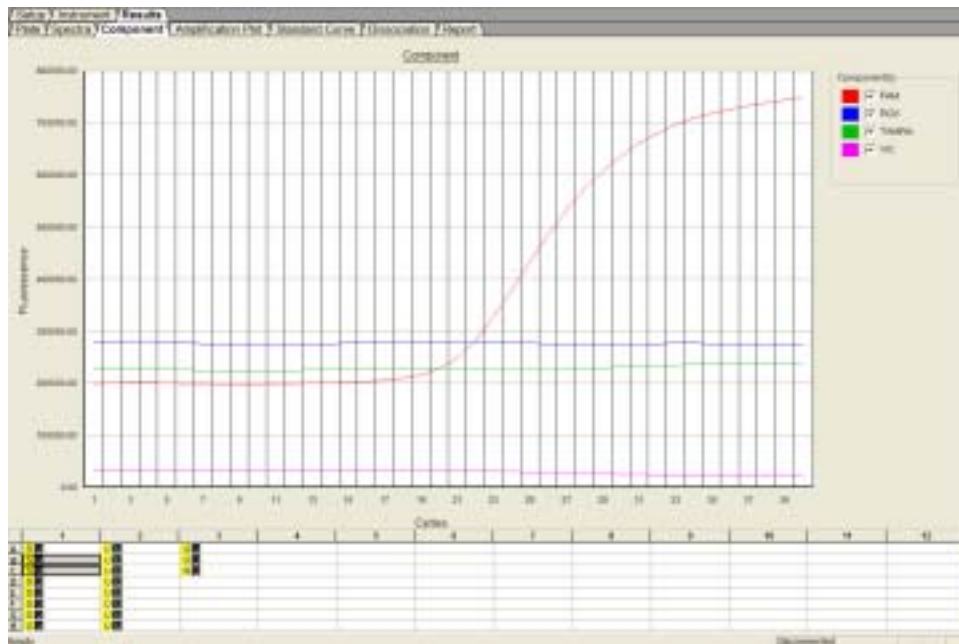
- 在 Analysis setting 中可利用”Auto-Ct”由軟體找出適當的 baseline 及 threshold ; 或者利用”Manual-Ct 自行決定 baseline 及 threshold 的位置。可先以”Auto-Ct ”設定來分析待審視結果後 , 再決定是否要改變 Threshold 或 Baseline。
- 在 Baseline 設定中輸入 Start 及 End Cycles(End Cycle 必須設定在 PCR 開始前 5 個 Cycle)。
- 欲更改 Threshold: 當縱座標為 Log 時將 Threshold 拉到 Geometric phase 的中點
- 當 Baseline 及 Threshold 更改後 , 都須按 Analyze 重新分析。

3. 除了 Amplification Plot 之外尚有其它形式的結果可供參考 :

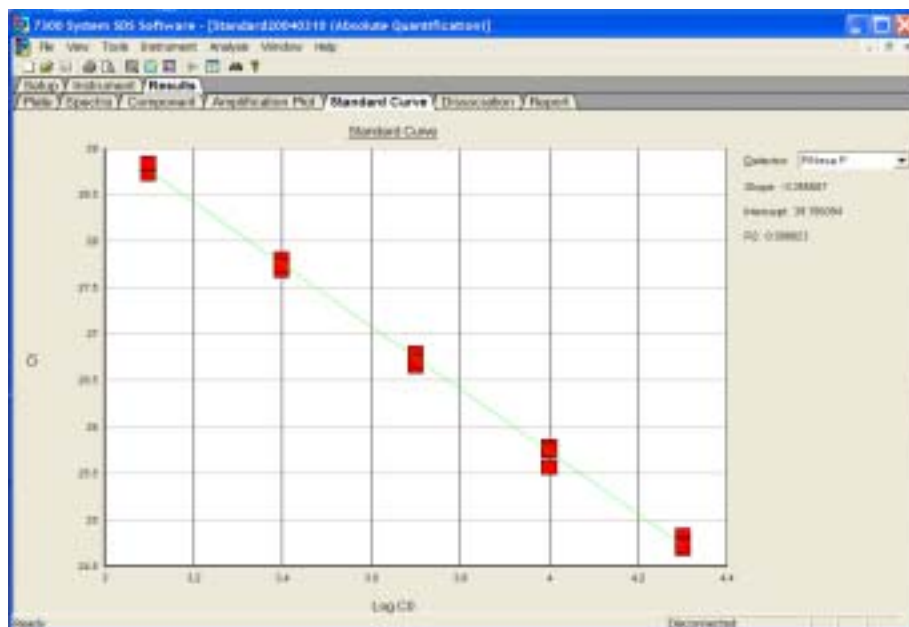
Spectra: 代表四個 filters 所收集到的 raw data



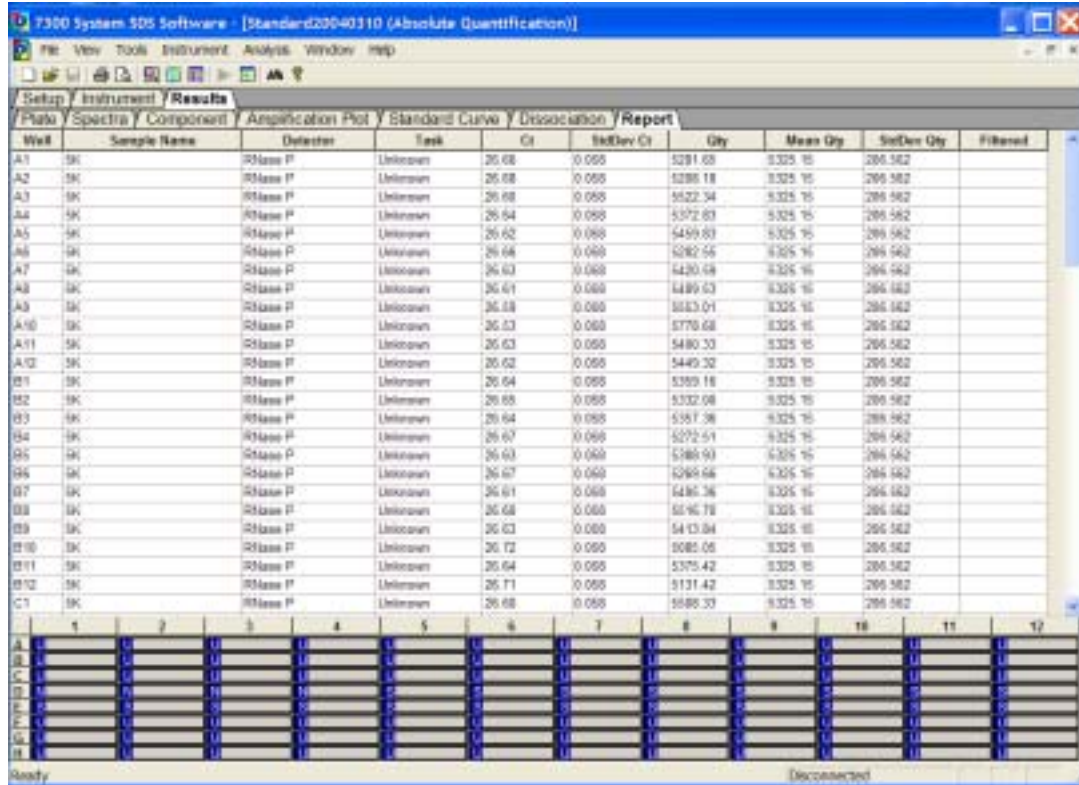
Component: 可標示出每個樣品中各螢光在 PCR 過程中之變化狀況



Standard Curve: 依據所輸入標準品的量軟體會計算出 Standard Curve。



Report: 所有計算完成的 data 均詳列於 Report 中，此為 Excel 可接受的檔案，若有其他的運算可在 Excel 中進行



Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered
A1	SK	Rtase P	Unknown	26.68	0.066	5281.68	8325.95	266.562	
A2	SK	Rtase P	Unknown	26.68	0.066	5286.18	8325.95	266.562	
A3	SK	Rtase P	Unknown	26.68	0.066	5522.34	8325.95	266.562	
A4	SK	Rtase P	Unknown	26.64	0.066	5572.83	8325.95	266.562	
A5	SK	Rtase P	Unknown	26.62	0.066	5459.83	8325.95	266.562	
A6	SK	Rtase P	Unknown	26.66	0.066	5262.66	8325.95	266.562	
A7	SK	Rtase P	Unknown	26.63	0.066	4430.68	8325.95	266.562	
A8	SK	Rtase P	Unknown	26.61	0.066	5489.63	8325.95	266.562	
A9	SK	Rtase P	Unknown	26.58	0.066	5883.01	8325.95	266.562	
A10	SK	Rtase P	Unknown	26.63	0.066	5776.68	8325.95	266.562	
A11	SK	Rtase P	Unknown	26.63	0.066	5480.33	8325.95	266.562	
A12	SK	Rtase P	Unknown	26.62	0.066	5449.32	8325.95	266.562	
B1	SK	Rtase P	Unknown	26.64	0.066	5389.18	8325.95	266.562	
B2	SK	Rtase P	Unknown	26.65	0.066	5332.68	8325.95	266.562	
B3	SK	Rtase P	Unknown	26.64	0.066	5351.36	8325.95	266.562	
B4	SK	Rtase P	Unknown	26.67	0.066	5272.61	8325.95	266.562	
B5	SK	Rtase P	Unknown	26.63	0.066	5385.93	8325.95	266.562	
B6	SK	Rtase P	Unknown	26.67	0.066	5265.66	8325.95	266.562	
B7	SK	Rtase P	Unknown	26.61	0.066	5485.36	8325.95	266.562	
B8	SK	Rtase P	Unknown	26.66	0.066	5546.78	8325.95	266.562	
B9	SK	Rtase P	Unknown	26.63	0.066	5413.84	8325.95	266.562	
B10	SK	Rtase P	Unknown	26.72	0.066	5085.66	8325.95	266.562	
B11	SK	Rtase P	Unknown	26.64	0.066	5375.42	8325.95	266.562	
B12	SK	Rtase P	Unknown	26.71	0.066	5131.42	8325.95	266.562	
C1	SK	Rtase P	Unknown	26.68	0.066	5686.33	8325.95	266.562	

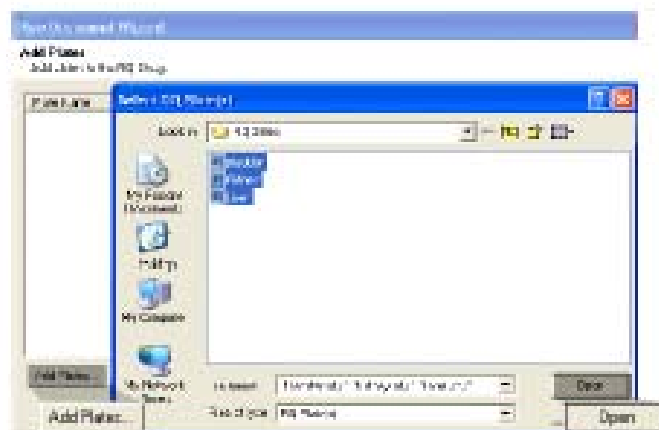
IV. Relative Quantification 結果分析

如果是利用 Relative Quantification (CT) 進行基因定量 , 結果分析則須以 Relative Quantification (CT) Study 進行相對定量的結果分析。

1. 從”File” 下選擇“New”後出現 New Document 的視窗 , 從 Assay 中選擇 “Relative Quantification (CT) Study” 。



2. 按 OK 即出現一 Plate Document 如下圖 : 按下 ”Add Plate” 選擇要分析的 RQ plate



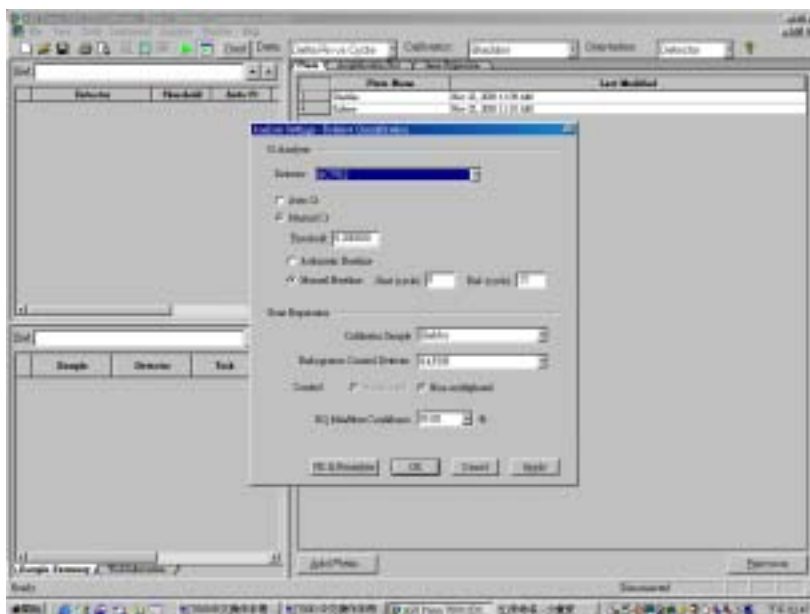
3. 不管是進行 single plate 或者是同時進行多個 plate 的分析，將須進行分析的 plate 加入此 mutiplate document 中進行分析，每次分析的 plate 數目最多不要超過 10 個。

如果要同時分析多個 plate document 時，必須確認：

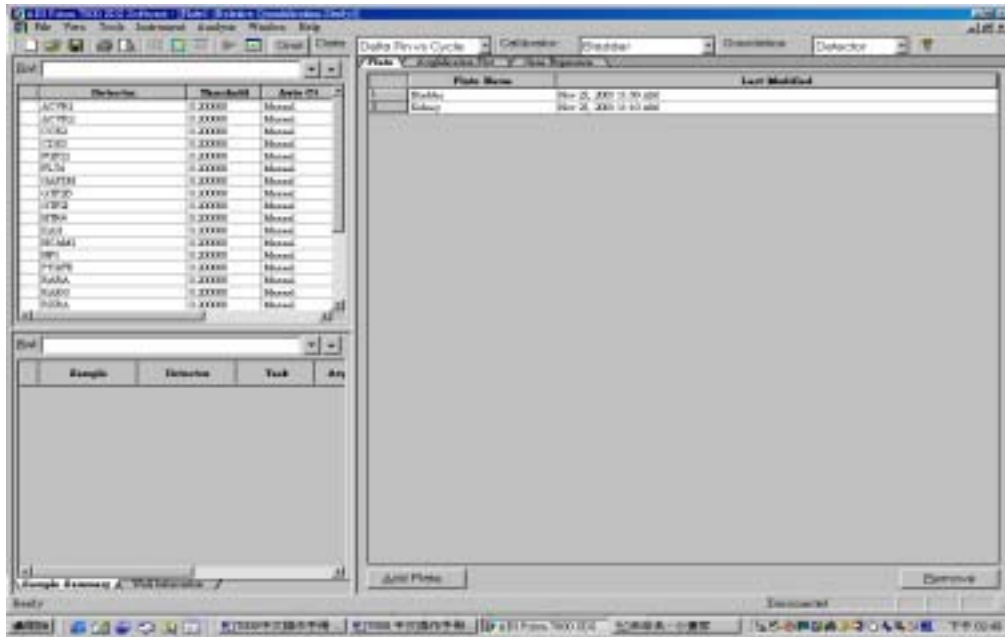
- a. PCR 的條件必須一致，如要有相同的 thermal cycle condition, sample volume 及 data collection 的方式
- b. 在每個 In use well 中，都須有 sample name

4. 接下來則開始進行分析，分析前則須先設定分析條件。從 analysis setting 去設定分析條件

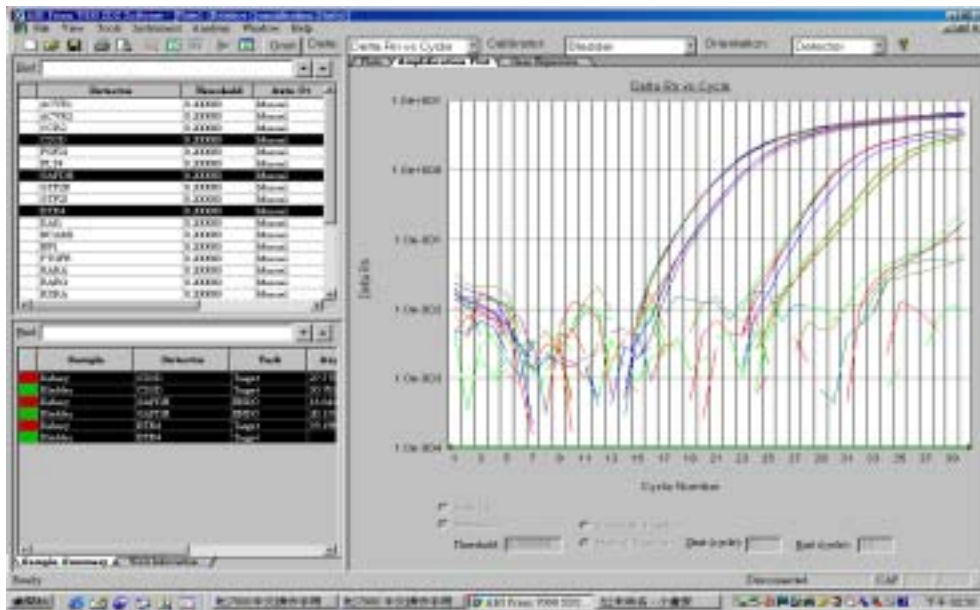
- a. Threshold 及 Baseline 的設定
- b. 從 Gene Expression 設定: Calibrator Sample、Endogenous Control Detector



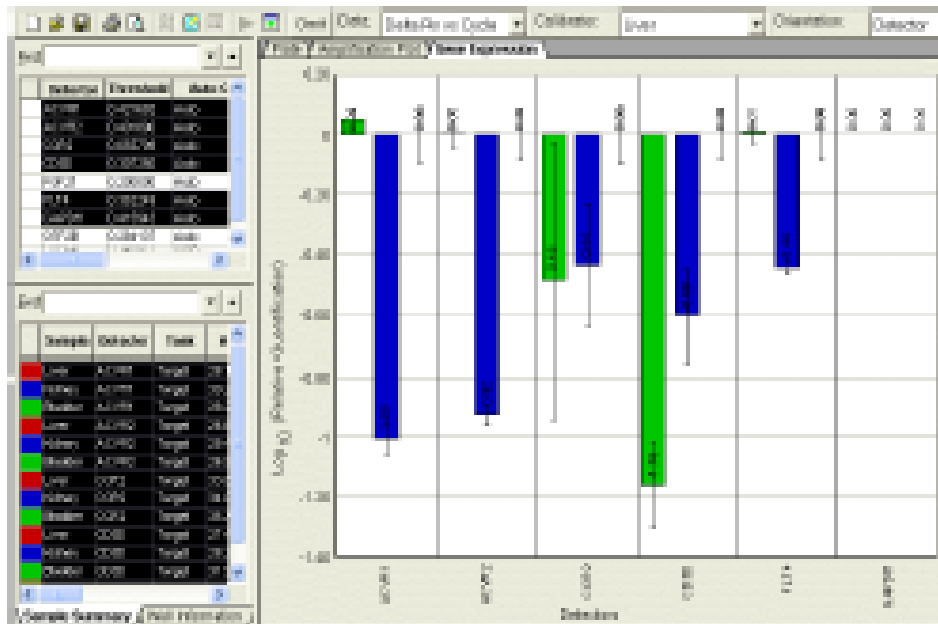
5. 設定好分析條件，按下分析鍵 進行結果分析



6. 可從”Amplification Plot”中分析不同 detector 的 amplification plot



7. 從” Gene Expression”中可得到相對定量的結果



V. 耗材~

Part Number.	Description	Quantity
ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers		
4313663	ABI PRISM™ Optical Adhesive Cover Starter Kit Includes ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers (quantity 20), Applicator (quantity 1), ABI PRISM™ Optical Cover Compression Pad (quantity 1).	20 Covers/Pkg
4311971	ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers	100 Covers/Pkg
96-Well Optical Reaction Plates		
4306737	ABI PRISM™ 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (code 128)	20 Plates/Pkg
4326659	25-Pack, ABI PRISM™ 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (code 128) Includes 25X (4306737) ABI PRISM™ 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (code 128).	500 Plates/Pkg
4314320	ABI PRISM™ 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (code 128) and ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers Includes 4311971 and 5X (4306737) ABI PRISM™ Optical 96-Well Reaction Plates.	100 Plates/Pkg 100 Covers
N801-0560	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (no Barcode)	10 Plates/Pkg
403012	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates and Optical Caps Includes 4306737 and 4323032	20 Plates 2400 Caps/Pkg
Miscellaneous		
4323032	ABI PRISM® Optical Caps, 8 Caps/Strip	300 Strips/Pkg 2400 Caps/Pkg
4312063	MicroAmp® Splash Free Support Base for 96-Well Reaction Plates	10 Bases/Pkg

也可使用八連排(8 Tubes/Strip)Optical Tubes (P/N4316567, 125 strips)

配合八連排(8 Caps/Strip)Optical Caps(P/N 4323032, 300 strips)蓋緊

VI. 注意事項:

1. 在 ABI 7300 上可使用 96 well optical plate、八連排(8 tubes/strip) optical tubes 或單一的 optical tube , 配合適當的 precision plate holder 都可直接上機。
2. 管子及蓋子上請勿標記任何記號 , 避免墨色脫落沾到 PCR block 上增加背景值。
3. 請定期以棉花棒沾二次水清潔 PCR block 增加偵測靈敏度。
4. 為確保機器偵測的靈敏度, 請每月重新 run 一次 background plate 以 update background file。
5. 技術支援請電洽客戶服務專線: 0800251326