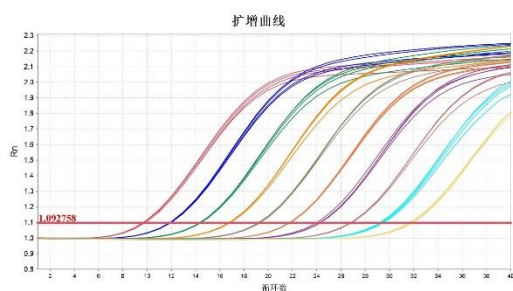


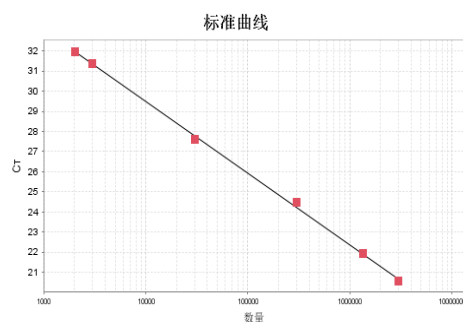
APPLICATION NOTE

利用 Archimed 定量 PCR 进行绝对定量（标准曲线法）分析

Welcome to **Archimed Analyzer**



■ 检测项目1



基因: 检测项目1 斜率: -3.557 Y轴截距: 43.72 R^2 : 0.998 扩增效率%: 91.049 偏差: 0.097

鲲鹏基因（北京）科技有限责任公司



绝对定量（标准曲线法）分析

绝对定量是适合需要测定靶点实际拷贝数时采用的实时荧光定量 PCR 分析方法。要进行绝对定量，需对已知数量——浓度或拷贝数的目标模板（标准品）溶液进行几次连续梯度稀释，采用实时荧光定量 PCR 扩增，利用获得的数据生成标准曲线，标准曲线以各靶点的数量及相应的 Ct 值绘制。然后将未知样本的 Ct 值与此标准曲线进行比较，确定其浓度或拷贝数。

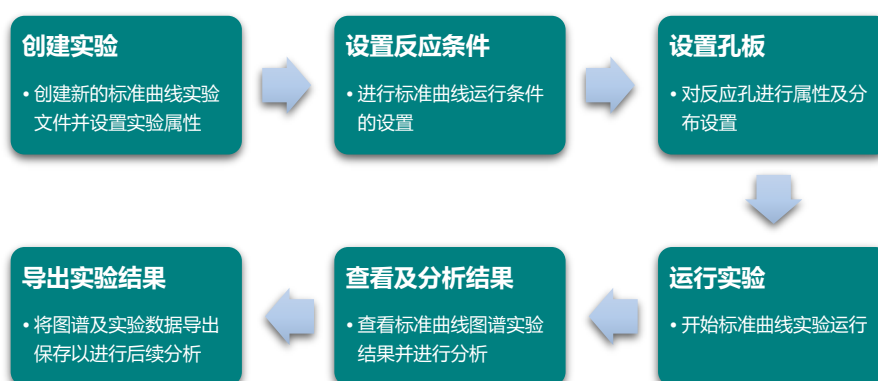
绝对定量实验常用来：

- ✓ 确定一定量的未知样本中基因的拷贝数。
- ✓ 检测病人每毫升血液中病毒颗粒的浓度或数量。
- ✓ 检测转基因食品中转基因核酸含量。

重要提示：应用标准曲线方法进行绝对定量，需具备已知浓度或数量的模板标准品，这表示在生成曲线前，应准确定量模板。定量的准确度与标准曲线的质量直接相关。用于生成标准曲线的模板及定量该模板采用的方法是实验的基础。连续梯度稀释时的加样准确度极为重要，目标模板和连续稀释的实际样本的反转录 RT 和 PCR 扩增效率相当至关重要。

利用 Archimed 荧光定量 PCR 进行绝对定量分析的一般流程

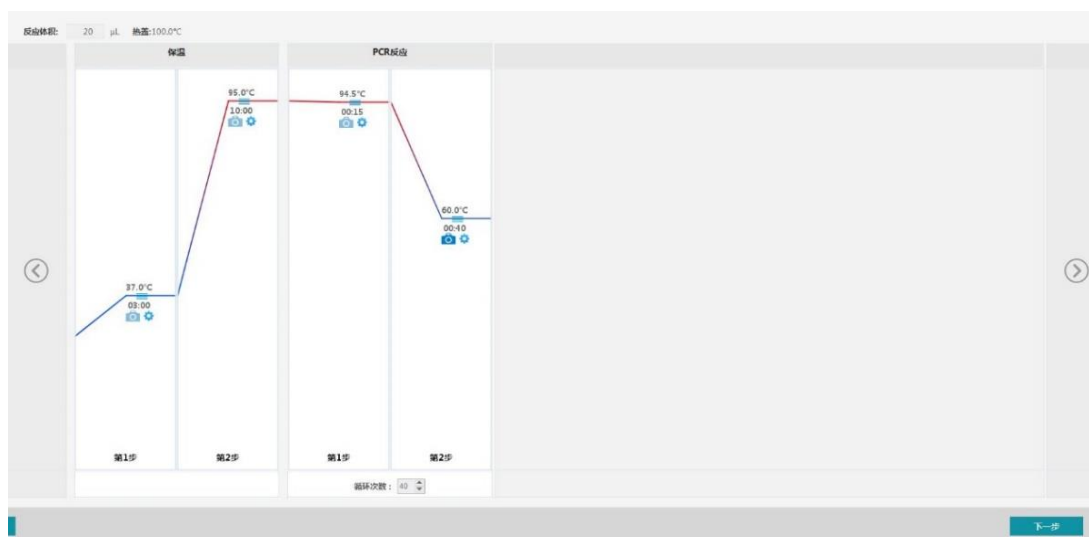
为了帮助实验人员更便捷地进行绝对定量研究，Archimed 定量 PCR 系统在实验条件设置、孔板设置及数据分析等方面均进行了充分优化，力争以最智能化的方式帮助研究者完成该类型实验。利用 Archimed 软件智能设置向导，完成一个绝对定量实验只需以下简单的 6 个步骤：



1. **创建实验：**点击启动界面右下方“创建”按钮，或者通过菜单栏选择“创建”一个新的实验流程；随后，在“实验类型”下拉框中选择，选择“绝对定量”



2. **设置反应条件:** 实验属性设置完成后, 点击页面左侧的运行条件或者右下角的“下一步”, 进入运行条件设置界面



3. **设置孔板:** 运行条件设置完成后, 点击页面左侧孔板设置或者右下角的下一步, 进入孔板设置界面。在孔板视图任意区域单击鼠标右键选择定义和设置标准品, 对标准曲线进行定义, 请根据具体实验需求及情况, 对标准曲线的参数进行设定。根据实际反应管放置的相应孔位选择反应孔, 对样本及检测项目进行相应属性设置, 并勾选分配至对应孔位中, 待测样品孔位将显示相应设置属性

复制

粘贴

只粘贴样品*

填注列

填注行

清除

放大

缩小

放置反应板

全屏

另存为...

打印预览...

打印...

定义和设置标准品

标准品设置

选择一个检测项目

反应模式: 单重反应 | 为标准选择一个检测项目: 检测项目 1

定义标准曲线

浓度梯度数: 5 | 推荐5个

重复数: 3 | 推荐3个

起始值: 1.0 | 为此系列输入最前或最低标准值。

梯度稀释倍数: 1.5 | 选择从 1:10 到 10× 之间选择一个值。

5 个浓度梯度 X 3 个重复反应 = ... 需要的反应孔

为标准曲线选择反应孔

安排标准于: 列 行

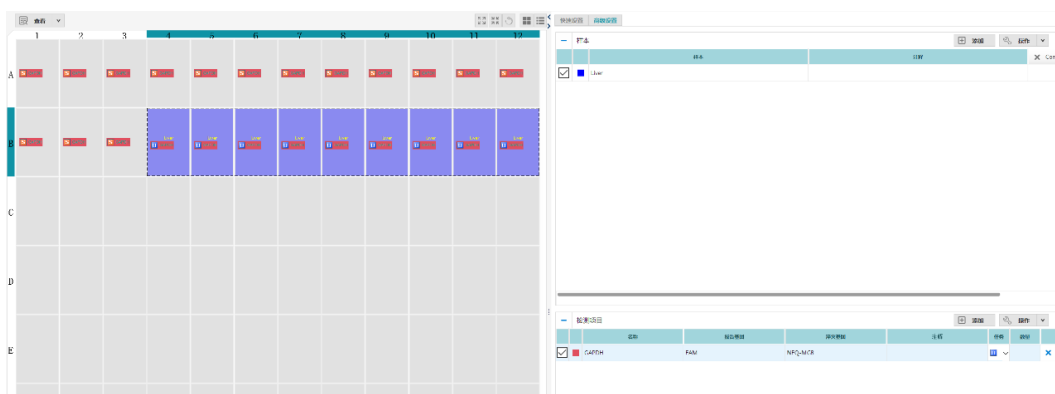
使用反应孔: 自动选择反应孔 操作者自选反应孔

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												

15 需要的反应孔 / 15 被选定的反应孔

A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,A8,A9,A10,A11,A12,B1,B2,B3

应用 重置 关闭

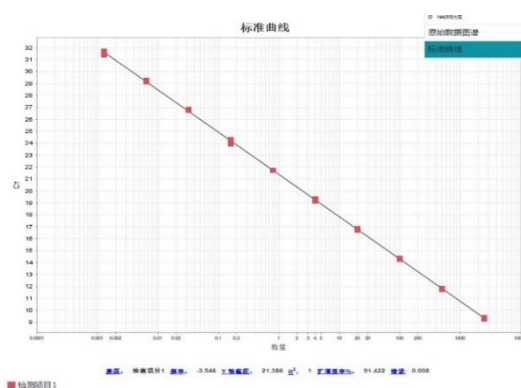
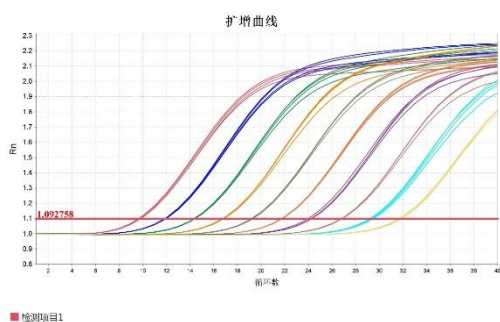


注：Archimed 孔板设置可以在反应运行前、运行中、或运行后设置，运行中或运行后进行孔板设置可以节省时间。

4. **运行实验：**运行条件或孔板设置完成后，点击页面左侧实验运行或右下角的“下一步”，进入仪器运行界面

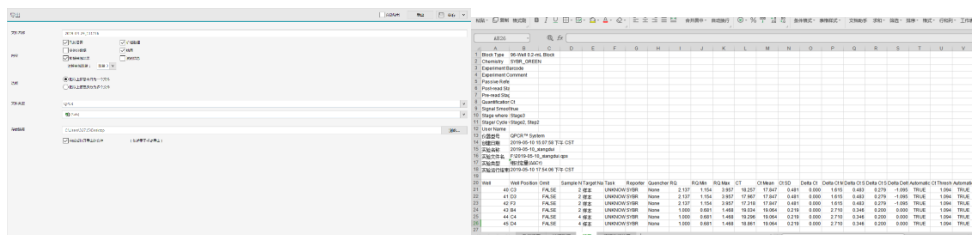


5. **结果查看及分析：**运行完成后，Archimed 软件将使用默认分析设置自动分析数据，**结果分析**界面中显示扩增图谱。选择**标准曲线**选项，即可直接查看绝对定量分析结果，标准曲线 X 轴下方会显示，实验的目标基因、斜率、Y 轴截距、 R^2 、扩增效率%，错误信息，其中斜率在 $-3.2 \sim -3.5$ ， $R > 0.99$ 或 $R^2 > 0.98$ ，扩增效率在 90%~105%，扩增结果就认为是可靠的。同时，软件将以列表形式展示实验结果，包括 CT、CT 平均值、CT SD、目标样本数量等实验信息



#	名称	标准品	标准曲线	反应试剂	Ct	Ct 标准	Ct SD	数量 ¹
87	F1	标准 1	标准曲线 1	STANDA... FAM-NF...	9.238	9.238	0.061	2,500.000
88	F2	标准 1	标准曲线 1	STANDA... FAM-NF...	9.238	9.238	0.061	2,500.000
89	F3	标准 1	标准曲线 1	STANDA... FAM-NF...	9.238	9.238	0.061	2,500.000
90	F4	标准 1	标准曲线 1	STANDA... FAM-NF...	9.238	9.238	0.061	2,500.000
91	F5	标准 2	标准曲线 2	STANDA... FAM-NF...	11.835	11.794	0.034	500.000
92	F6	标准 2	标准曲线 2	STANDA... FAM-NF...	11.760	11.794	0.034	500.000
93	F7	标准 2	标准曲线 2	STANDA... FAM-NF...	11.772	11.794	0.034	500.000
94	F8	标准 2	标准曲线 2	STANDA... FAM-NF...	11.770	11.794	0.034	500.000
95	F9	标准 2	标准曲线 2	STANDA... FAM-NF...	11.770	11.794	0.034	500.000
96	F10	标准 3	标准曲线 3	STANDA... FAM-NF...	14.962	14.907	0.041	100.000
97	F11	标准 3	标准曲线 3	STANDA... FAM-NF...	14.289	14.907	0.041	100.000
98	F12	标准 3	标准曲线 3	STANDA... FAM-NF...	14.266	14.907	0.041	100.000
99	F13	标准 3	标准曲线 3	STANDA... FAM-NF...	14.311	14.907	0.041	100.000
100	F14	标准 4	标准曲线 4	STANDA... FAM-NF...	16.805	16.806	0.060	20.000
101	F15	标准 4	标准曲线 4	STANDA... FAM-NF...	16.805	16.806	0.060	20.000
102	F16	标准 4	标准曲线 4	STANDA... FAM-NF...	16.726	16.806	0.060	20.000
103	F17	标准 4	标准曲线 4	STANDA... FAM-NF...	16.798	16.806	0.060	20.000
104	F18	标准 5	标准曲线 5	STANDA... FAM-NF...	19.249	19.225	0.025	4.000
105	F19	标准 5	标准曲线 5	STANDA... FAM-NF...	19.273	19.225	0.025	4.000
106	F20	标准 5	标准曲线 5	STANDA... FAM-NF...	19.251	19.225	0.025	4.000
107	F21	标准 5	标准曲线 5	STANDA... FAM-NF...	19.238	19.225	0.025	4.000
108	F22	标准 6	标准曲线 6	STANDA... FAM-NF...	21.734	21.735	0.007	0.800
109	F23	标准 6	标准曲线 6	STANDA... FAM-NF...	21.749	21.735	0.007	0.800
110	F24	标准 6	标准曲线 6	STANDA... FAM-NF...	21.725	21.735	0.007	0.800
111	F25	标准 6	标准曲线 6	STANDA... FAM-NF...	21.740	21.735	0.007	0.800
112	F26	标准 7	标准曲线 7	STANDA... FAM-NF...	24.103	24.159	0.159	0.160
113	F27	标准 7	标准曲线 7	STANDA... FAM-NF...	24.247	24.159	0.159	0.160
114	F28	标准 7	标准曲线 7	STANDA... FAM-NF...	23.941	24.159	0.159	0.160

6. **导出结果：**单击“导出”按钮，结果会显示在一个打开的 Excel 中，表格中包含孔板设置、扩增数据、多组分数据、结果等 sheet；用于数据分析的 Ct 值、数量（浓度）相关参数等信息会在结果表格中展示



应用实例分享 (一) ——利用 Archimed 进行绝对定量 (标准曲线法) 分析 HBV 病毒核酸浓度

下面我们将以一个实验为例，展示如何利用 Archimed 定量 PCR 系统来完成绝对定量分析。该实验以 达安基因 HBV 病毒检测试剂盒 作为实验材料，将阳性定量参考品进行梯度稀释建立标准曲线，并对阴性质控品、HBV 强阳性质控品、HBV 临界阳性质控品进行绝对定量分析。

材料和方法：

试剂和耗材：

- 样本：4 个梯度稀释的阳性定量参考品、阴性质控品、HBV 强阳性质控品、HBV 临界阳性质控品
- 试剂：达安基因 HBV 试剂盒
- 耗材：Bio-Rad 8 联管

仪器：

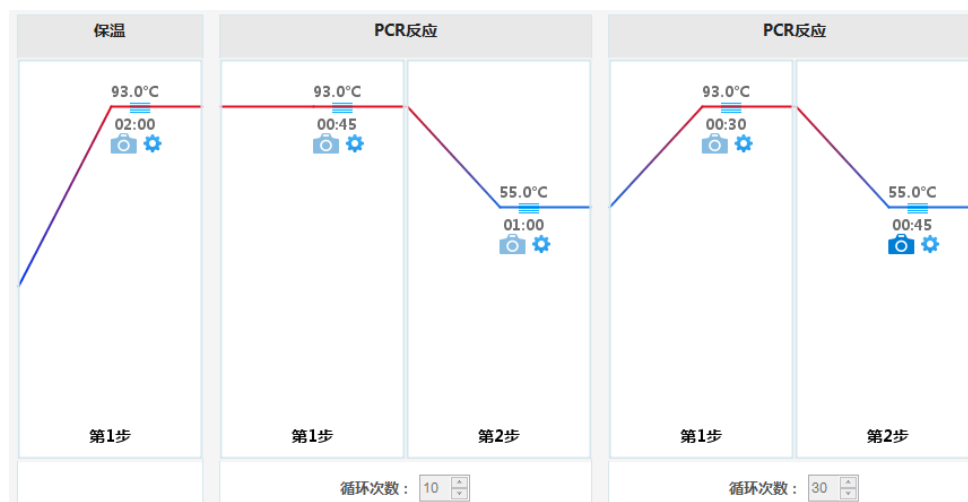
- 品牌：Rocgene (鲲鹏基因)
- 型号：Archimed X6 实时荧光定量 PCR 仪



反应体系：

- PCR 反应液 27 ul
- Taq 酶 3 ul
- 模板 20 ul
- Total 50 ul

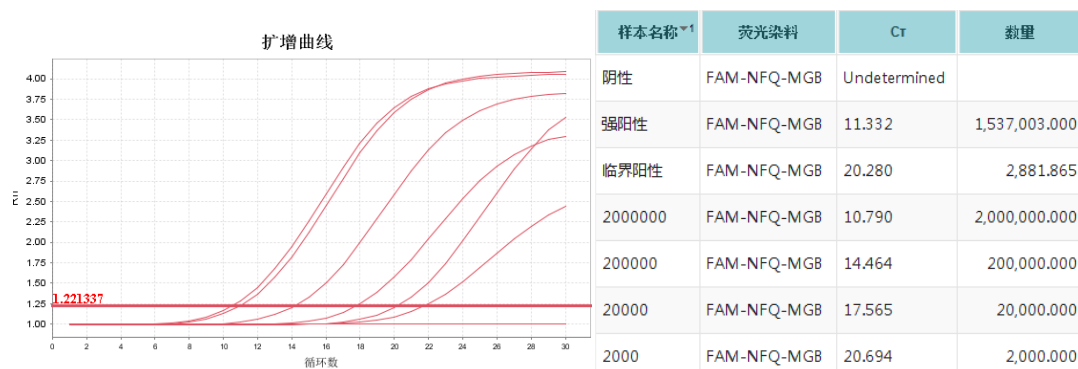
反应程序：



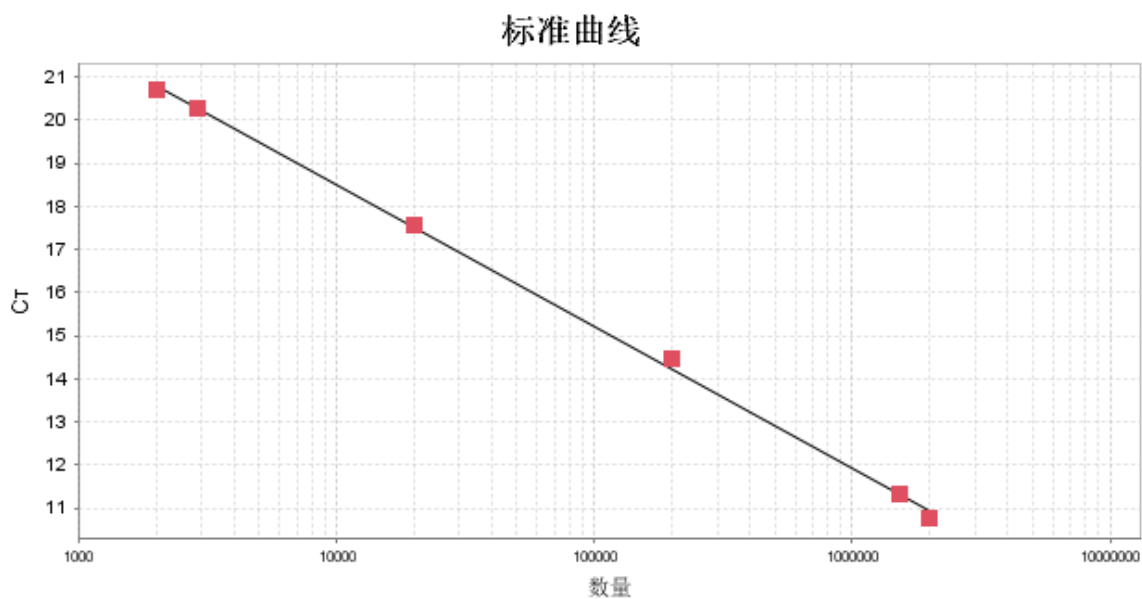
实验结果

根据实验结果分析,利用梯度稀释后的 HBV 病毒核酸阳性标准品成功构建了标准曲线。得到的扩增效率和 R^2 正常, 阴性、强阳性和临界阳性都得到明显的区分和定量。

扩增曲线和绝对定量结果:



绝对定量分析结果得到标准曲线:



基因: 检测项目1 斜率: -3.281 Y轴截距: 31.632 R^2 : 0.998 扩增效率%: 101.724 错误: 0.096

应用实例分享（二）——利用 Archimed 进行绝对定量（标准曲线法）分析仪器的线性动态范围

下面我们将以一个实验为例，展示如何利用 Archimed 定量 PCR 系统来完成绝对定量分析。该实验以质粒 DNA 作为实验材料，对 DNA 模板进行倍数梯度稀释，建立标准曲线，通过绝对定量方法评估 Archimed 的线性动态范围。

材料和方法：

试剂和耗材：

- 样本：已知浓度的质粒 DNA 进行 5 倍连续稀释 10 个梯度
- 试剂：天根 Taqman 试剂
- 耗材：Bio-Rad 八联管

仪器：

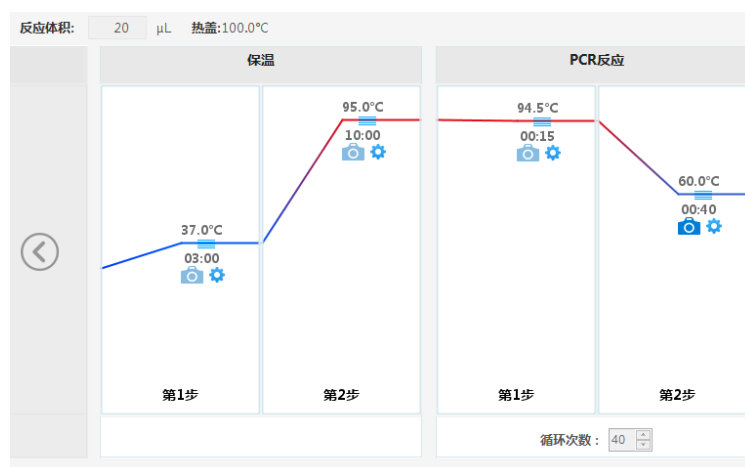
- 品牌：Rocgene（鲲鹏基因）
- 型号：Archimed X6 实时荧光定量 PCR 仪



反应体系：

- MIX 10ul
- FAM 探针 0.5 ul
- 引物 F 0.5ul
- 引物 R 0.5ul
- 模板 3ul
- 水 5.5ul
- Total 20ul

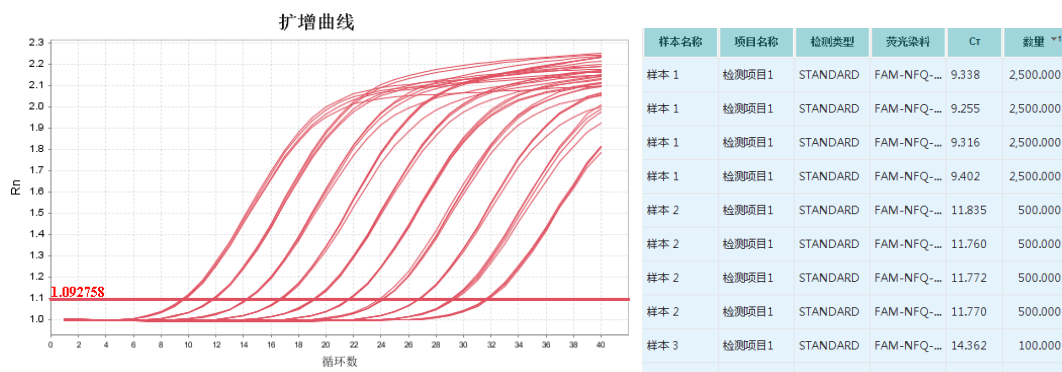
反应程序：



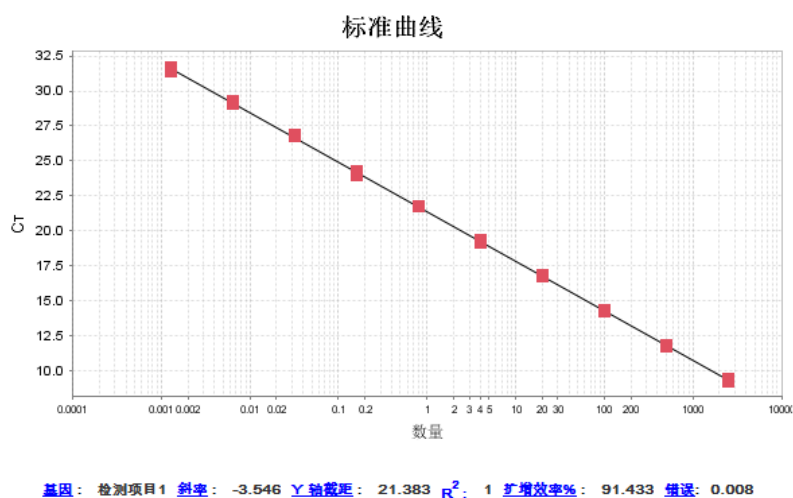
实验结果

根据实验结果分析，利用已知起始浓度的质粒 DNA 的样本梯度稀释，成功构建了标准曲线并进行了绝对定量；在标准曲线上，不同稀释倍数的模板弄的得到了准确定量和区分。表明线性范围较好。

扩增曲线结果：



绝对定量标准曲线结果：

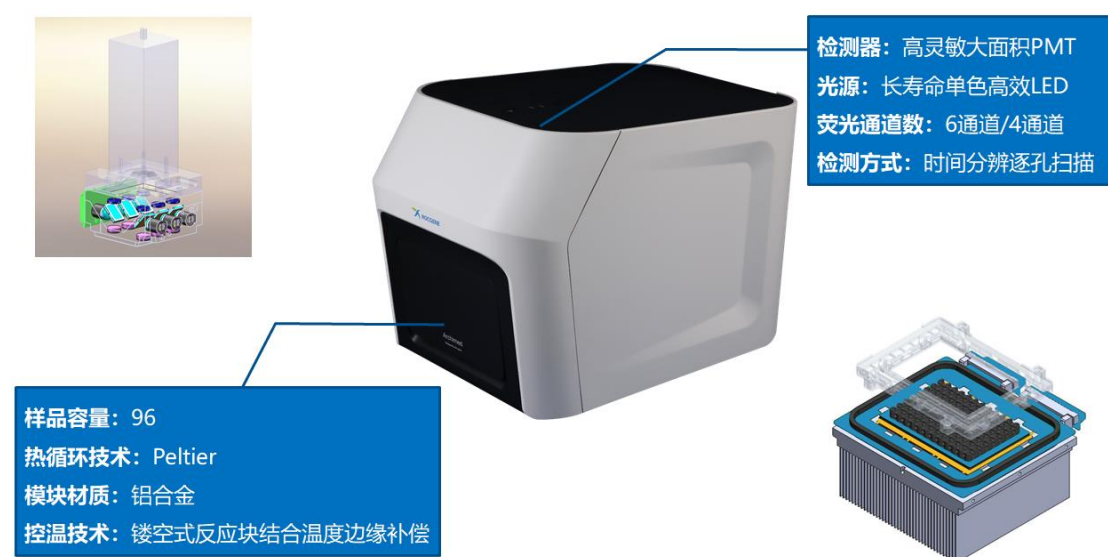


讨论

- 利用 Archimed 荧光定量 PCR 仪可以快速便捷地开展绝对定量的相关检测和研究。Archimed 软件在孔板设置中为操作者提供了十分简便的标准品默认设置；通过上述实验案例，可以看出 Archimed 能够准确快速地对待测样品进行绝对定量分析，结果和数据内容分析内容丰富，全面；
- 在实验样本及实验操作无较大隐患的基础上，Archimed 荧光定量 PCR 仪具有极佳的线性动态范围，能够确保实验分析的灵敏度和准确性。

关于 Archimed 荧光定量 PCR 系统

Archimed 荧光定量 PCR 是鲲鹏基因为了满足中高端用户的切实需求而匠心打造的全球首款时间分辨实时荧光定量 PCR 系统。基于菲涅尔透镜的新型光信号采集技术、专利的时间分辨信号分离技术及独特的控温技术，使 Archimed 系列产品在检测灵敏度、多色串扰、温度均一性及准确性等方面达到国际先进水平。同时，基于全球视野的产品设计理念及制造工艺，赋予 Archimed 国际水准的优异品质。Archimed 将秉承中国智造、追求卓越的工匠精神，携手中国用户成就未来。



鲲鹏基因（北京）科技有限责任公司

地址：北京市昌平区龙域北街 10 号创集合产业园 429 室

电话：010-59724295

邮编：102208

网址：www.rogene.com

