

# CFX Opus 定量 PCR 仪器操作指南

CFX Opus 定量 PCR 仪器可以通过 CFX Maestro 软件进行控制、运行和数据分析；也可以独立运行。

## 一、启动 CFX Maestro 软件

- 1、打开 CFX Opus 定量 PCR 仪器电源，在电脑桌面点击 CFX Maestro 图标以打开软件。此过程软件会自动检测已连接的定量 PCR 仪器，并显示在窗口左侧。
- 2、在 Startup Wizard 窗口 (Figure 1) 可以选择新建运行设置 (Run setup)、重运行已保存的程序 (Repeat run) 或是打开结果数据分析 (Analyze)。
- 3、新建运行设置时选择用户自定义 (User-defined) 进入程序编辑窗口。

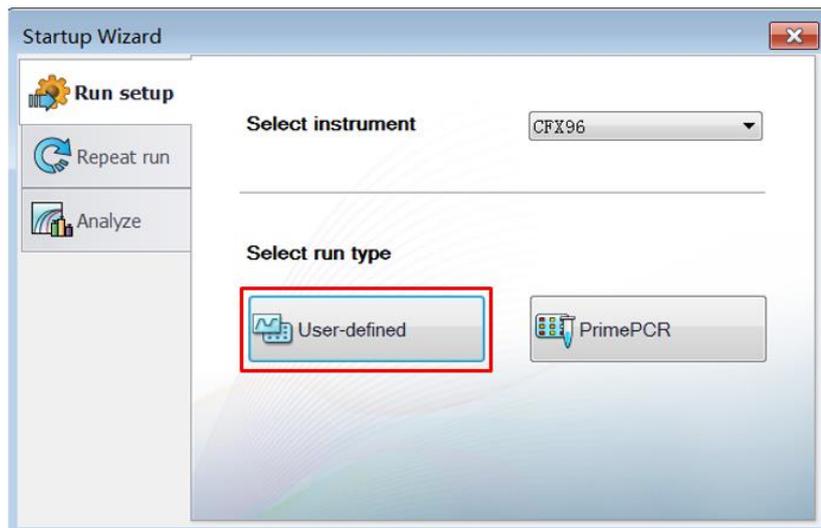


Figure 1

## 二、程序编辑 (Protocol)

- 1、在程序编辑界窗口 (Figure 2)，可以新建一个程序 (Create New)、导入程序 (Express Load) 或是选择已保存程序 (Select Existing)。

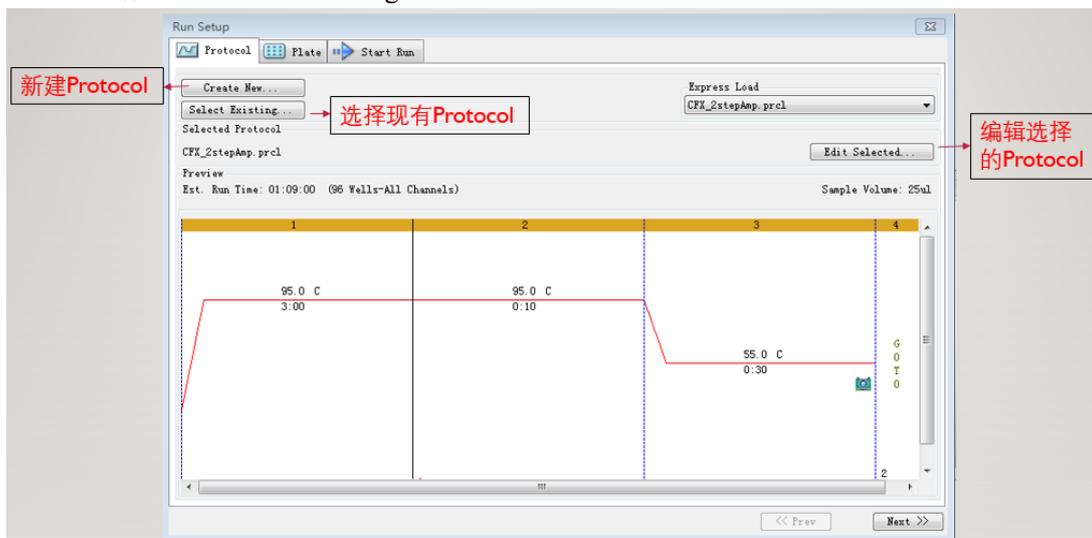


Figure 2

2、 点击 Create New 打开程序编辑器创建一个新程序 (Figure 3)。

可以在编程界面更改程序条件。例如：反应体系；各步温度、时间；循环数；添加熔解曲线；添加荧光检测；设置温度梯度等。

注意：做荧光定量 PCR 时，一定要在每循环结束时 (GOTO 前一步) 添加荧光信号检测。

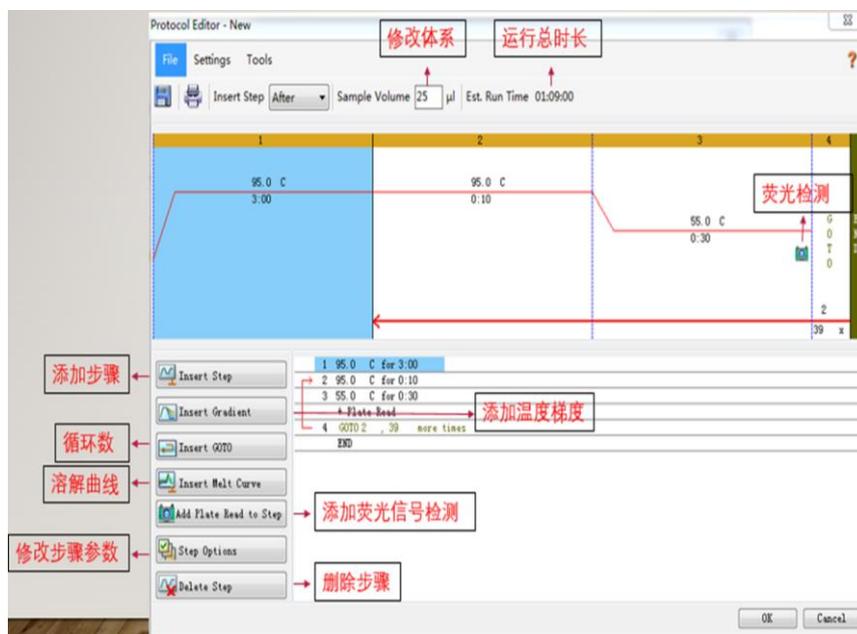


Figure 3

### 2.1、向程序添加步骤

- 在程序编辑器窗口中打开程序。
- 确定在何处插入新步骤。在图形上，选择计划插入新步骤之前的步骤。
- 在左窗格中，单击“Insert Step”。
- 要更改温度或保持时间，请单击图形或程序轮廓上的默认值，然后输入新值。
- (可选) 在左窗格中，单击“Step Options”以显示“步骤选项”对话框，并修改所选步骤的可用选项。

提示：您可以在图形窗格或程序轮廓窗格的右键单击菜单上访问“步骤选项”对话框。

- 单击“OK”，然后单击“是”以保存对程序的更改。出现“Save as”对话框
- 在“Save as”对话框中，键入新程序文件的名称，然后单击“Save”。

### 2.2、插入温度梯度步骤

- 确认梯度板的大小与仪器的模块类型 (96 孔或 384 孔) 相同。
- 如果尚未这样做，请选择板尺寸：Tools> Gradient Calculator，然后从下拉列表中选择适当的板类型。
- 在图形或轮廓窗格中，选择计划插入梯度步骤之前的步骤。
- 在左窗格中，单击“Insert Gradient”。新的温度梯度在图形和轮廓窗格中突出显示 (Figure 4)，梯度中每一行的温度显示在右窗格的“Gradient”表中。
- 要编辑梯度温度范围，请执行以下操作之一：
  - 单击图形或轮廓窗格中的默认温度，然后输入新温度。
  - 单击“Step Options”以在“步骤选项”窗口中输入渐变范围。
  - 在“Gradient”表中更改“Range”值。
- 要编辑时间，请在图形或文本视图中单击默认时间，然后输入新时间。
- 单击“OK”，然后单击“是”以保存对程序的更改。

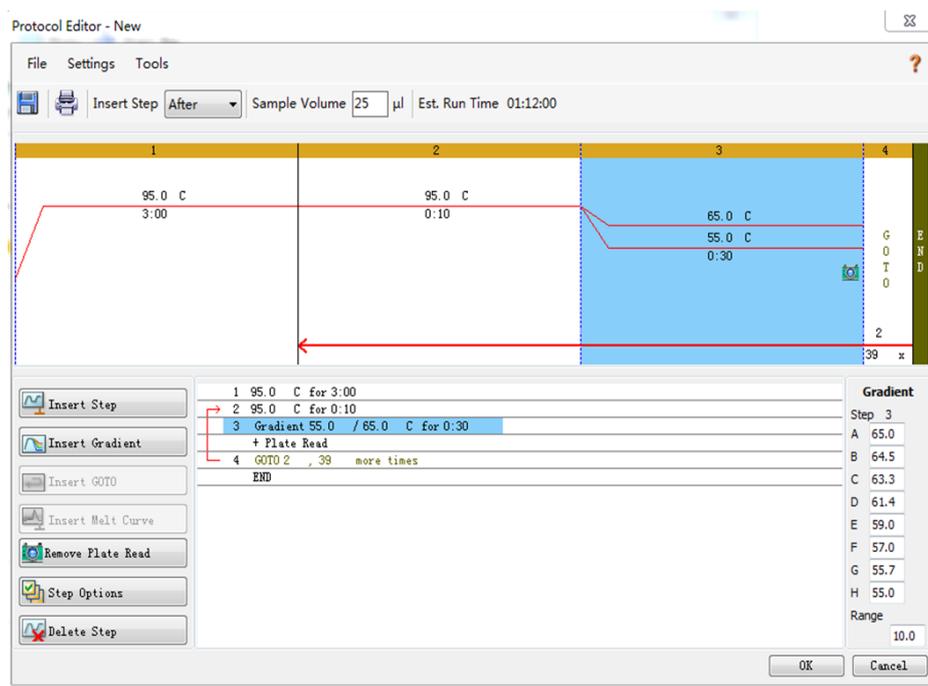


Figure 4

### 2.3、插入 GOTO 步骤 (循环数)

注意：您不能在 GOTO 集合中插入 GOTO 步骤。您无法创建嵌套的 GOTO 循环。

- 在图形中，选择计划插入 GOTO 步骤之前的步骤。
- 在左窗格中，单击“Insert GOTO”。
- 要编辑 GOTO 步骤编号或 GOTO 重复次数（总循环数-1），请在图形或轮廓窗格中选择默认编号，然后输入新值。
- 单击“OK”，然后单击“是”以保存对程序的更改。

### 2.4、插入融化曲线步骤

提示：您不能在 GOTO 循环中插入熔解曲线步骤。

注意：熔解曲线步骤在步骤开始时保留 30 秒钟，程序中未显示。

- 在图形中，选择计划插入熔融曲线步骤之前的步骤。
- 在左窗格中，单击“Insert Melt Curve”。新的熔解曲线步骤在图形和轮廓窗格中突出显示 (Figure 5)。
- 要编辑熔体温度范围或增加时间，请在图形或轮廓窗格中选择默认值，然后输入新值。
- 单击“OK”，然后单击“是”以保存对程序的更改。

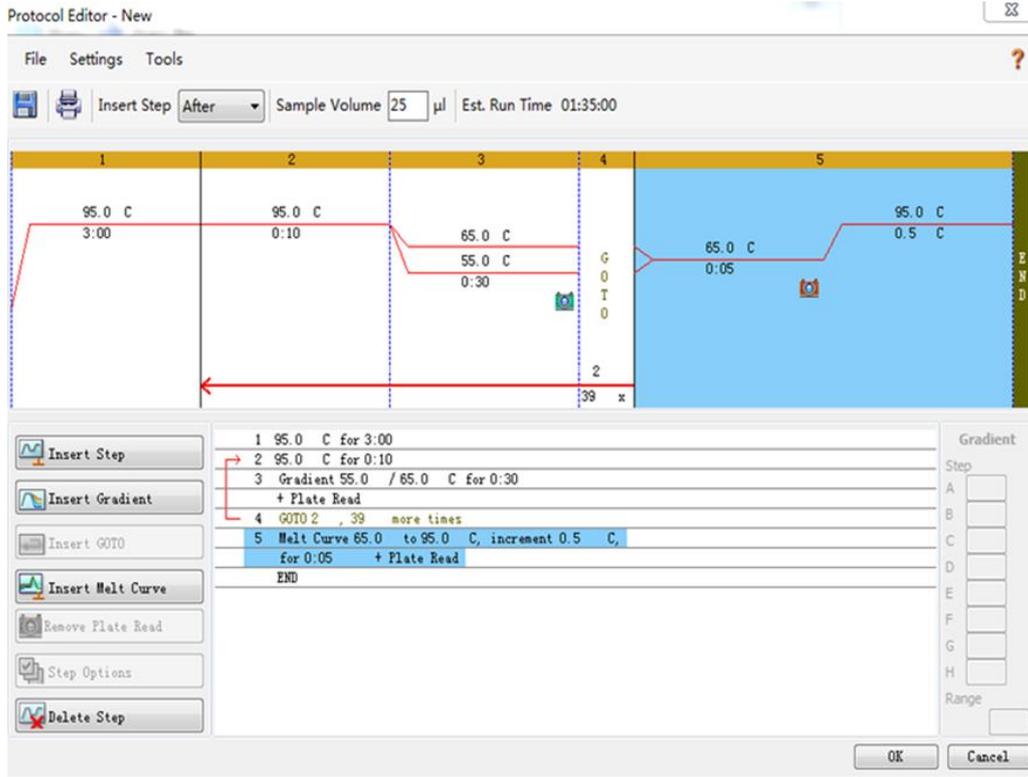


Figure 5

- 3、编辑完程序后，单击“OK”，然后单击“是”以保存对程序的更改。出现“Save as”对话框，在“Save as”对话框中，键入新程序文件的名称，然后单击“Save”。点击“Next”或是左上角的“Plate”进入板信息编辑窗口。

### 三、板信息编辑（Plata）

进入板信息编辑窗口（Figure 6），可以根据需求选择不同的功能。

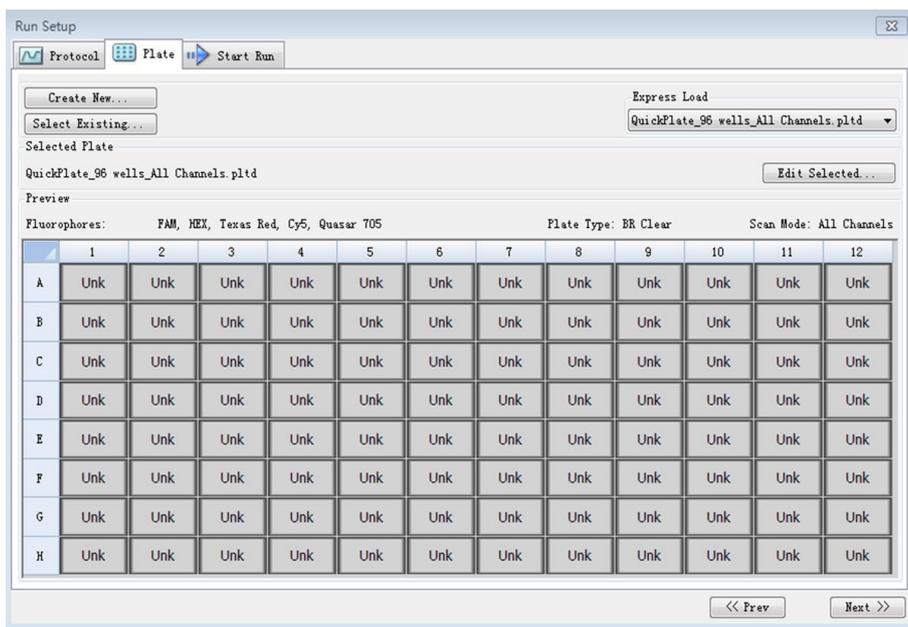


Figure 6

点击 Create New，打开反应板编辑器创建一个新的反应板。

点击 Select Existing，通过浏览器加载一个反应板文件以在试验中使用或对其进行编辑。  
使用 Express Load，下拉菜单直接加载一个反应板文件以在试验中使用或对其进行编辑。  
点击 Edit Selected，打开反应板编辑器编辑所选反应板的孔的内容。

## 1、新建反应板

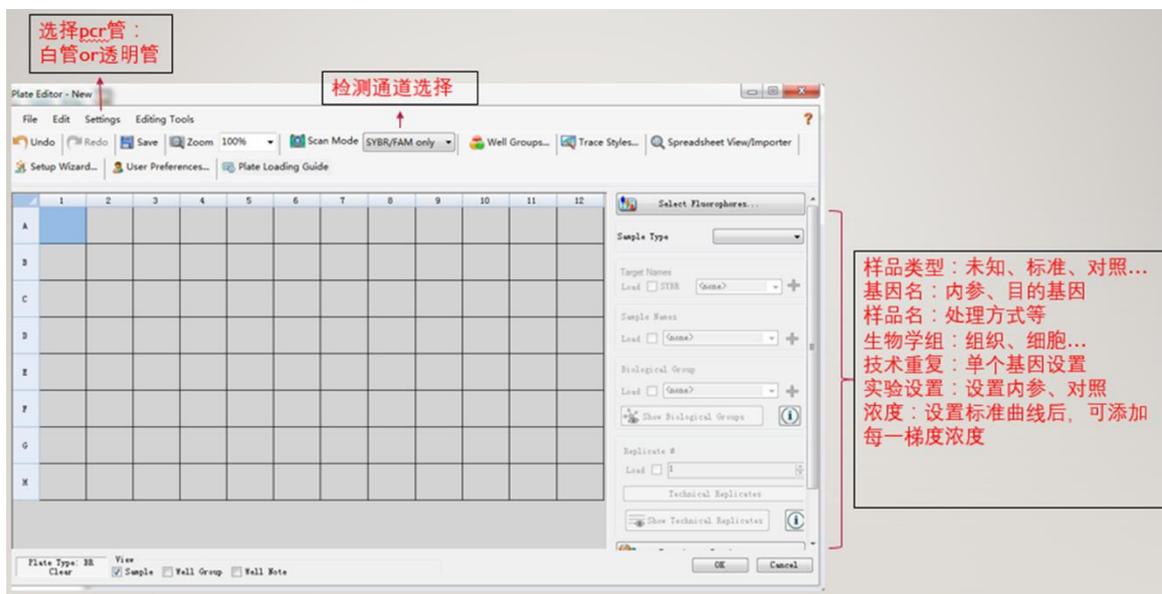


Figure 7

- 在板编辑器窗口点击 Create New，创建一个新板（Figure 8）。
- 要设置板尺寸，请选择 Settings > Plate Size，然后从下拉菜单中选择适当的板尺寸。
- 要设置板类型，请选择 Settings > Plate Type，然后从下拉菜单中选择 BR White 或 BR Clear。
- 要设置扫描模式，请从 Plate Editor 窗口工具栏中的 Scan Mode 下拉列表中选择适当的扫描模式。

### e) 选择板所需的荧光通道：

A. 在右窗格中，单击“Select Fluorophores”。出现“选择荧光团”对话框。您会看到在步骤 d)中选择的扫描模式类型可用的荧光团。

B. 要选择荧光团，请单击其“Selected”复选框。

提示：要从列表中删除荧光团，请清除其“Selected”复选框。

C. 要更改荧光团的显示颜色，请单击其“Color”框。

注意：您选择的颜色代表“板编辑器”窗口和“数据分析”图表中的荧光团。

D. 在“Color”对话框中，选择所需的颜色，或单击“Define Custom Colors”，然后创建一个新的颜色来表示荧光团。

E. 单击“OK”保存更改并退出“选择荧光团”对话框。

f) 您必须至少选择一个孔来装载样品类型。默认情况下，选择孔 A1。在平板窗格中，执行下列操作之一：

- 要加载多个相邻的孔，请单击一个孔并将其拖动到目标孔。
- 要加载多个不相邻的孔，请按住 Ctrl 键并单击每个孔。
- 要加载整列，请单击列号。

Channel	Fluorophore	Selected	Color
1	FAM	<input type="checkbox"/>	
	SYBR	<input checked="" type="checkbox"/>	
2	HEX	<input type="checkbox"/>	
	TET	<input type="checkbox"/>	
	Cal Orange 560	<input type="checkbox"/>	
	Cal Gold 540	<input type="checkbox"/>	
3	VIC	<input type="checkbox"/>	
	ROX	<input type="checkbox"/>	
	Texas Red	<input type="checkbox"/>	
	Cal Red 610	<input type="checkbox"/>	
4	Tex 615	<input type="checkbox"/>	
	Cy5	<input type="checkbox"/>	
	Quasar 670	<input type="checkbox"/>	
	Quasar 705	<input type="checkbox"/>	
5	Cy5-5	<input type="checkbox"/>	

D. 要加载整行，请单击其行号。

E. 要加载整个板，请单击板的左上角。

g) 从右侧窗格的“Sample Type”下拉菜单中为选定的一个或多个孔分配样品类型：

Unknown—装载未知样品的孔

Standard—建立标准曲线的样品孔

NTC (no template control)—无模板对照

Positive Control—阳性对照

Negative Control—阴性对照

NRT (no reverse transcriptase)—无逆转录酶

h) 给所有包含样品类型的孔分配至少一个荧光团。您可以为一个孔或一组孔分配多个荧光团。

注意：每个通道只能分配一个荧光团。您不能从同一通道向同一孔分配多个荧光团。

提示：您可以将靶标与荧光团关联，或者此时您只能将荧光团分配给孔，并在运行实验后将靶标与荧光团关联。

A. 要仅将荧光团分配给选定的孔，请在右窗格的“Target Names”部分中，选择特定荧光团的“Load”复选框。

B. 要将目标与荧光团相关联，请在“Target Names”部分的下拉列表中为特定荧光团选择一个目标名。软件会自动选择其“Load”复选框。

## 2、为反应孔设置技术重复

重要：要设置技术重复，所选的孔必须包含相同的孔内容物。也就是说，所选的孔必须具有相同的 Sample Type 和荧光团。如果合适，还必须为他们分配相同的靶标和样品名称以及相同的生物学组。如果它们不同，则 CFX Maestro 软件将禁用此选项。

a) 在平板窗格中，选择内容相同的孔组。

b) 在右窗格的“Replicate #”部分中，输入技术重复孔数，然后单击“Load”。

c) (可选) 要将重复系列应用于一组选定的孔：

A. 单击“Technical Replicates”。Replicate # 部分展开以显示以下选项：

Replicate size —代表技术重复的孔数。

Starting replicate #—所选技术重复编号起始值。

Loading direction (Horizontal or Vertical)—重复加样方向(水平或垂直)

B. 单击“Apply”将参数应用于序列，然后返回“Replicate #”显示。

## 3、创建标准曲线

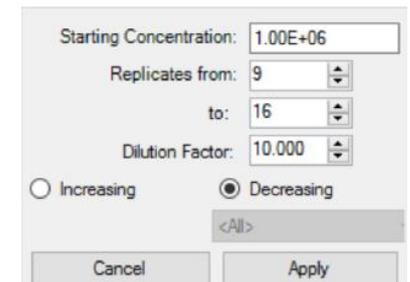
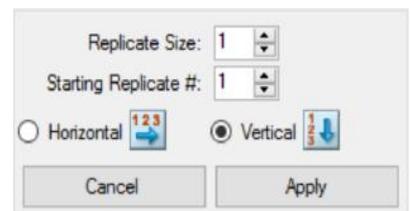
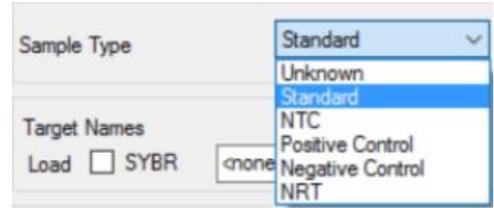
a) 在板窗格中，选择样品孔，在“Sample Type”下拉菜单中选定“Standard”。

b) 在“Target Names”中选择荧光基团，并输入基因名。

c) 给标准品孔设置技术重复。

d) 在右窗格的“Concentration”部分中，单击“Dilution Series”。输入以下信息：

Starting concentration—系列起始的浓度值。



Replicates from and to—标准品孔的技术重复编号。

Dilution factor—稀释因子，即稀释倍数。

Decreasing—稀释系列按稀释系数减小。

Increasing—稀释系列按稀释系数增加。

e) 单击“Apply”将稀释系列应用于孔组，然后返回“Concentration”视图。

#### 4、设置生物学组

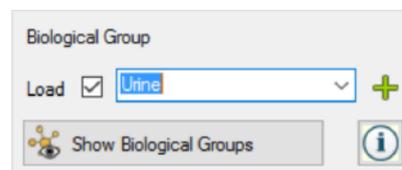
提示：您可以将一个生物组分配给每个孔或一组孔。

a) 设置好“Sample Type”和“Target Names”后。

b) 在平板窗格中，选择需要分配到同一生物学组的孔。

c) 在右窗格中的“Biological Groups”列中输入生物学组名称，或在下拉列表中选择名称。单击“Load”。

d) 对其他生物学组重复上述步骤直到分配完所有生物学组。

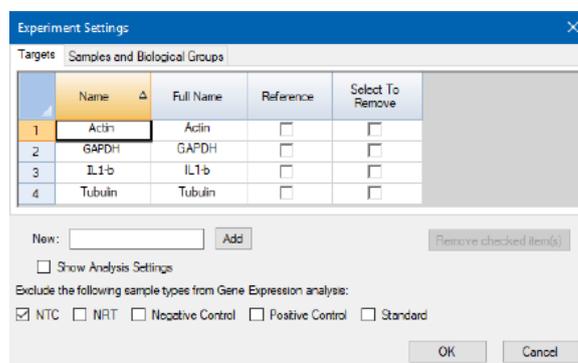


#### 5、实验设置

a) 在板编辑器的右窗格中，单击“Experiment Settings”。出现“实验设置”对话框，显示“Targets”选项卡的内容。

b) CFX Maestro 从基因表达分析中排除了 NTC 样品类型（无模板对照）。

c) 若要包括 NTC 样品类型，请在“排除以下样本类型”部分中清除其复选框。您可以通过选择相应的复选框来选择排除以下样本类型：NRT、Negative Control、Positive Control、Standard。



d) 在“Targets”选项卡中，要选择一个目标作为基因表达数据分析的内参基因，请在“Reference”列中选择它。

e) 在“Samples and Biological Groups”选项卡中，要选择样本作为基因表达数据分析的对照样本，请在“Control”列中选中其复选框。

f) 单击“OK”，将参数保存在“实验设置”对话框中，然后返回到“板编辑器”窗口。

#### 6、创建孔的组别

孔的组别将反应板板划分为可在“数据分析”窗口中独立分析的孔子集。设置好孔组后，可在“数据分析”窗口中选择一个组进行独立分析。例如，设置孔组以分析在一块板上进行的多个实验，或使用不同的标准曲线分析每个孔组。

a) 在板编辑器工具栏中，单击“Well Groups”。

b) 在“数据分析”窗口中，单击“Manage Well Groups”。

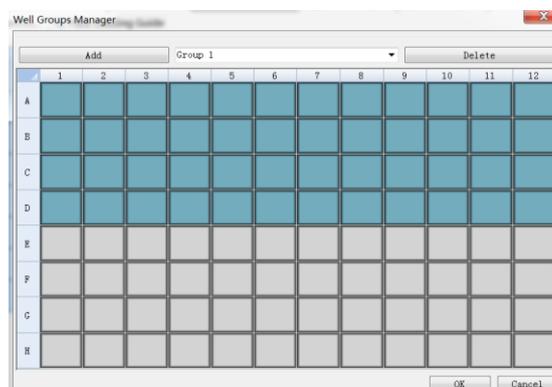
c) 单击“Add”创建一个新组。下拉菜单将第一个组的组名显示为 Group 1。

d) 通过在板组视图中单击并拖动来选择板组中的板孔。选定的孔在 Manager 中显示为蓝色。

e) （可选）要更改孔组的名称，请在下拉菜单中选择其名称，然后输入新名称。

f) （可选）要删除孔组，请在下拉列表中选择其名称，然后单击“删除”。

g) 单击“OK”完成并关闭窗口，或单击“Cancel”关闭对话框而不进行更改。



7、设置完所有板信息后，单击“OK”，然后单击“是”以保存对板信息的更改。出现“Save as”对话框，

在“Save as”对话框中，键入新程序文件的名称，然后单击“Save”。单击“Next”或是左上角的“Start Run”进入下一步。

#### 四、运行实验

进入“Start Run”界面（Figure 9），确认 protocol 和 plate 信息文件，荧光通道信息及 sample volume 无误后，点击“Open Lid”，待定量 PCR 仪盖子自动打开，放入样品板/管（位置与编板信息一致）；点击“Close Lid”，待仪器盖子完全关闭，“Start Run”按钮激活，点击“Start Run”。CFX Maestro 软件会提示您保存数据文件（.pcrd），将数据文件保存至个人文件夹，运行开始。

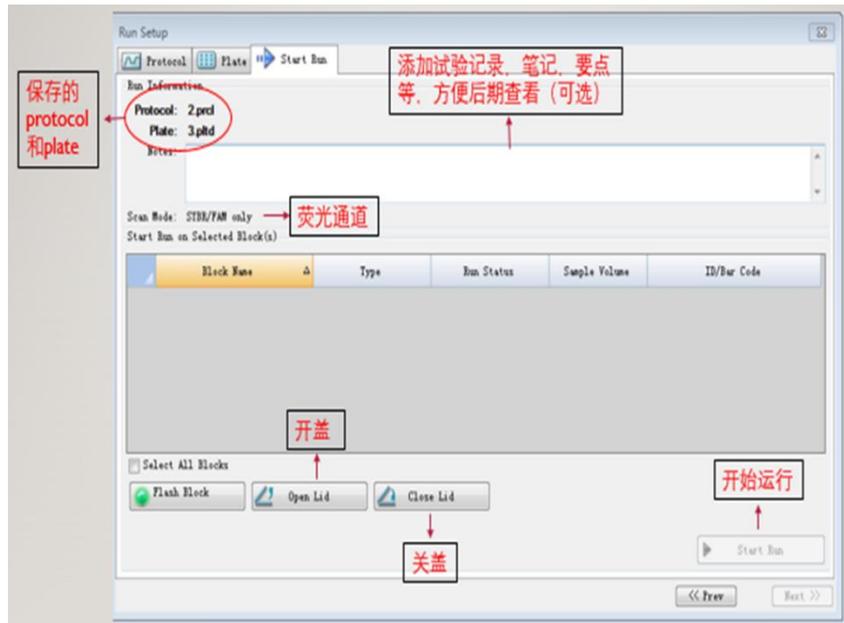


Figure 6

#### 五、定量分析

实验运行结束后，软件会自动弹出数据分析窗口（Figure 10）。

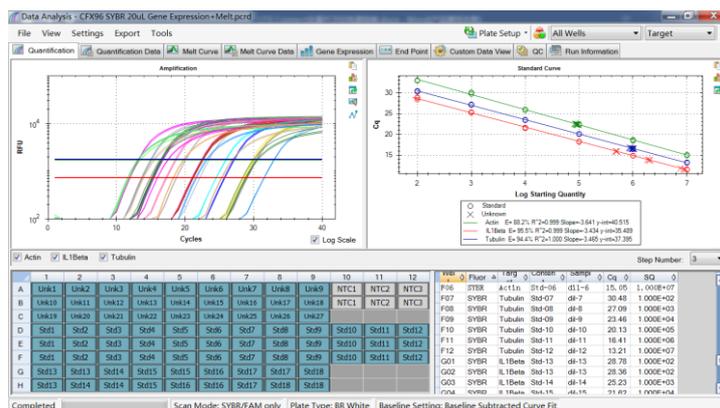


Figure 7

在此窗口我们可以进行数据分析，也可以对板信息进行再次编辑。

点击“Plate Setup > View/Edit plate”，进行板信息的再编辑；

点击“Manage Well Groups”，创建新的分析孔组；

在“All Wells”下拉菜单选择分析孔组。

在“Fluorophore”下拉菜单选择分析依据：以荧光为基础分析还是以目标为分析基础。

### 1、阈值线设置

“Settings > Baseline Setting”选择基线扣除方法，软件会自动计算基线的位置；  
或是在扩增曲线图上，选定需要更改的阈值线，手动拖动以更改基线；  
或是选择“Settings > Baseline Thresholds”，手动扣除基线（仅适用于单一信号，即同一 Target）。

### 2、标准曲线分析

确保未知样品的 Cq 值落在标准曲线的度量范围内；确定扩增效率（E）在 90%~110%之间； $R^2 \geq 0.98$ 。

### 3、图片编辑及文件导出

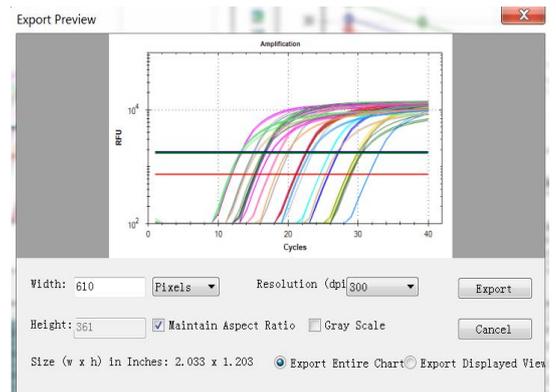
	复制图片至粘贴板。
	打开图片设置窗口。在此窗口，你可以为图片加标题，更改纵横坐标、标签，更改字体、字号等信息。
	导出图片。你可以更改图片分辨率，选择图片格式(PNG, JPG, or BMP)。
	Trace Styles,
	手动扣除基线（仅适用于单一信号，即同一 Target）。

图片导出：编辑好图片后，点击图片右上角“Export”图标，在弹出窗口中选择发表所需的分辨率（dpi）、和图片尺寸，点击“Export”，选择保存的目标文件夹，选择图片格式，保存。

或者在图片上右击鼠标，选择“Copy”，复制至粘贴板，可在 PPT、Word 等中粘贴。选择“Save Image As”，选择目标文件夹及图片格式，保存。此时不可更改图片分辨率。

数据导出：点击“Export > Export All Data Sheets > Excel”导出所有数据至 Excel。

或者在需要数据窗口右击鼠标，选择“Export to Excel”将所选数据导出至 Excel。



## 六、熔解曲线分析

针对染料法（SYBR）荧光定量 PCR，需要通过熔解曲线来判断产物的特异性。在实验结果数据窗口选择“Melt Curve”窗口，查看 Melt Peak 图是否是尖锐单峰，反之说明产物有非特异扩增。

熔解曲线的图也可以编辑导出，数据文件也是。

## 七、基因表达数据分析

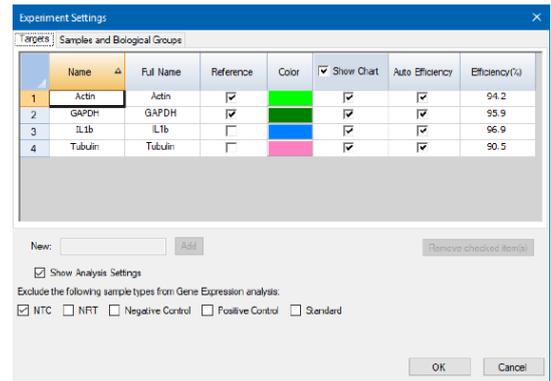
通过严谨的质量控制，您可以使用 Gene Expression Module of CFX Maestro 软件来评估样品之间靶标浓度的相对差异。这种应用最常使用评估 cDNA 样品中靶标的浓度来推断其 mRNA 水平。通常，一个或多个参照基因的含量被用来衡量目标基因的水平。参照基因用来校正上样的差异或各样品取样的差异。通过生物学条件的研究，参照基因的表达水平通常不发生变化。

要进行基因表达分析，孔的内容必须包括以下内容：

A. 两个或多个靶标—代表样品中不同扩增基因或序列的靶标。

B. 一个或多个参考目标—至少一个目标必须是标准化表达的参考基因。在“实验设置”窗口中分配所有参考基因，以在“Normalized Expression”模式（ $\Delta\Delta Cq$ ）下分析数据。不使用参考基因的实验必须使用“Relative Quantity”模式（ $\Delta Cq$ ）进行分析。

C. 普通样品—您的反应必须包括普通样品（最少两个），以查看在“基因表达”选项卡中绘制的数据。这些样品是实验条件下的研究目标。在“实验设置”窗口中分配对照样品（可选）。如果未选择任何对照，则软件将使用最低的 Cq 作为对照。



### 1、基因表达分析设置

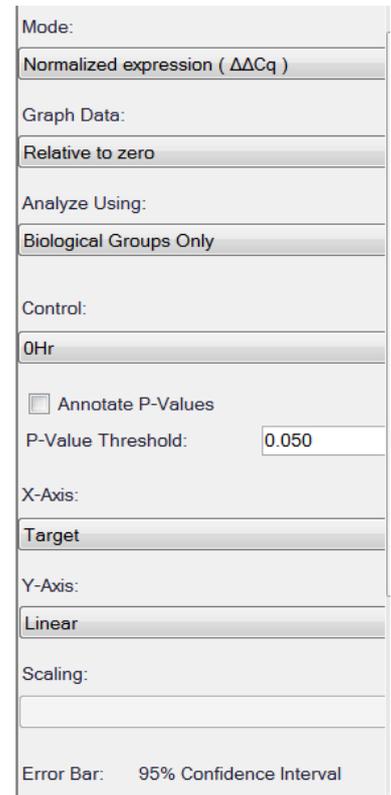
- 点击反应板编辑器中 Experiment Settings 或 Gene Expression Module，打开实验设置窗口。
- Targets 窗口中，点击合适的参照基因的“Reference”一栏，该基因将被使用为内参。
- 点击 Show Analysis Settings 检查窗，为靶标设置反应扩增效率。

Auto Efficiency 检查窗被默认设定。如果实验中运行一个标准曲线，从标准曲线中计算得到的扩增效率将在计算中被使用。或者对合适的靶标输入指定反应扩增效率值，则计算中将使用这一扩增效率值。

- Sample or Biological Group 窗口，选择对照样品或生物学组后的“Control”一栏，该样品或生物学组将作为对照参与分析。对每个基因来说，对照样本的值被指定为 1，同时所有其他样本相对于对照样本的值会被显示出来。

### 2、基因表达分析

- 从 Mode 下拉菜单中选择分析模式：Normalized Expression  $\Delta\Delta C_q$  (t)、Relative Quantity  $\Delta C_q$  (t)。
- 从 Graph Data 下拉菜单中选择：对照相关 (Relative to control) 或零相关 (Relative to zero) 的图形数据。在表中，Graph Data 选项默认是对照相关。
- 从 Analyze Using 下拉菜单中选择：Samples Only (以样品类型分析并绘图)、Biological Groups Only (以生物学组分析并绘图) 和 Sample Biological Group (以样品类型分析数据并作图，并在样品名称后附加生物学组。此时的 P 值是根据生物组计算得出的)。
- 从 Control 下拉菜单中选择对照组。编板时设置好，此时可以不用选择。
- 点击 Annotate P-Values 自动进行 P 值计算；或是在 P-Value Threshold 中自定义置信区间进行 P 值计算。
- 从 X 轴下拉菜单中选择 X 轴以 Sample 显示或 Target 显示。
- 从 Y 轴下拉菜单中选择 Linear, Log2 或 Log10 作为 Y 轴刻度。
- 需要时，可从 Scaling Option 下拉菜单中选择 Highest, Lowest 或 Unscaled。
- 从 Error Type 下拉菜单中选择 Standard Error of the Mean 或 Standard Deviation。



### 3、图片编辑

	复制图片至粘贴板。
	打开图片设置窗口。在此窗口，你可以为图片加标题，更改横纵坐标、标签，更改字体、字号等信息。
	导出图片。你可以更改图片分辨率，选择图片格式(PNG, JPG, or BMP)。
	排序出现在图表 x 轴上的样本或目标的顺序。

	更改图片颜色。
	柱状图。显示目标的相对表达。
	箱型图。将数据显示为四分位数范围。 注意：仅当“Analyze Using”设置为“Biological Groups Only”时可用。
	点状图。显示每个目标的单个样本数据点。 注意：仅当“Analyze Using”设置为“Biological Groups Only”时可用。
	加箭头、圆圈，编辑文本标注。

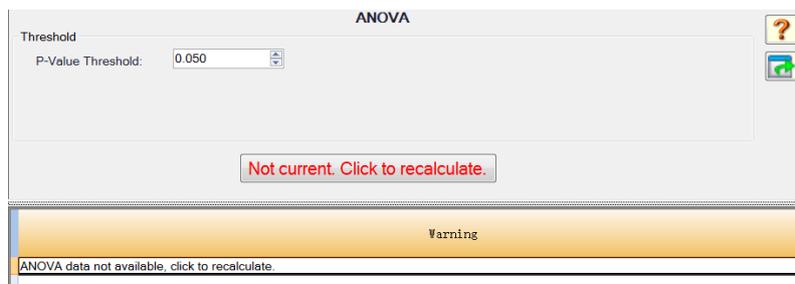
#### 4、图形选择

	绘图	显示标准化的基因表达结果图
	集群图	根据不同目标和样本的表达相似度，在层次结构中显示标准化表达数据。
	散点图	显示对照样品与实验样品的靶标标准化表达。
	火山图	显示所选生物学组中与对照组相比靶标的相对表达，并基于 P-value 指示显着程度。
	热图	根据相对标准化的表达及其在板上的位置，显示与对照样品相比实验样品的靶标调控的直观描述。
	方差分析	使用以下 R 包对基因表达数据显示单向 ANOVA 的结果，以执行 ANOVA 并确定 Tukey 结果：伴随应用回归 (Car)、最小二乘法 (lsmeans)
	参考基因选择	参考基因选择工具可识别测试的参考基因，并根据其稳定性将其分类为“理想”，“可接受”或“不稳定”。

#### 5、统计学分析

CFX Maestro 软件提供 P-Values 注释，通过使用标准 t 检验将样本的表达水平与所选对照样本的表达水平进行比较，自动计算 P-value；用户也可以自定义 P-Values 的阈值范围，软件会根据其定义值重新计算，低于 P-value 的样本会在基因表达图上显示星号 (\*)。

“ANOVA”选项卡显示单向方差分析 (ANOVA) 的结果。方差分析检验以下假设：任何两个生物学组之间的平均靶标表达均相等。无效假设指出所有生物组的平均表达均等，而另一种假设指出至少一个生物组是不同的。Analyze Using 下拉菜单中选择：Biological Groups Only，在“ANOVA”选项卡，点击“Not current. Click to recalculate.”，软件将自动计算，给出结果。



Target	df	P-Value ANOVA	P-Value BH	Contrast	Ratio	Lower Bound (95%)	Upper Bound (95%)	P-Value Tukey	Significant
IL1Beta	2	4.65E-08	9.3E-08						Yes
				0Hr - 1Hr	4.36985	3.5267	5.4145	1.7679E-06	Yes
				0Hr - 2Hr	17.25190	13.923	21.376	4.2732E-08	Yes
				1Hr - 2Hr	3.94794	3.1862	4.8917	2.5587E-06	Yes
Tubulin	2	0.90295	0.90295						No
				0Hr - 1Hr	0.97461	0.81963	1.1589	0.89385	No
				0Hr - 2Hr	0.88658	0.82969	1.1731	0.96907	No
				1Hr - 2Hr	1.01228	0.8513	1.2037	0.97468	No

## 6、图片和数据导出

**图片导出：**编辑好图片后，点击图片右上角“Export”图标，在弹出窗口中选择发表所需的分辨率（dpi）、和图片尺寸，点击“Export”，选择保存的目标文件夹，选择图片格式，保存。

或者在图片上右击鼠标，选择“Copy”，复制至粘贴板，可在 PPT、Word 等中粘贴。选择“Save Image As”，选择目标文件夹及图片格式，保存。此时不可更改图片分辨率。

**数据导出：**点击“Export > Export All Data Sheets > Excel”导出所有数据至 Excel。

或者在需要数据窗口右击鼠标，选择“Export to Excel”将所选数据导出至 Excel。



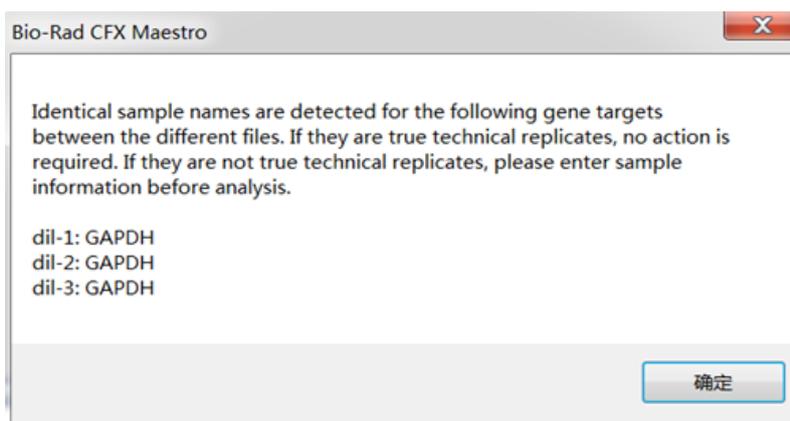
## 八、多板合并分析（Gene Study）

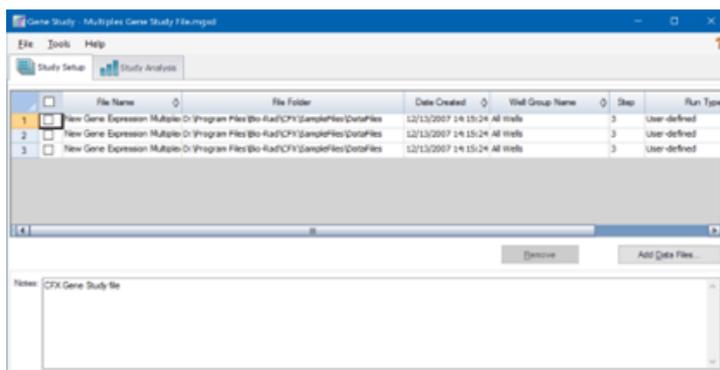
CFX Maestro 软件可以创建一个 Gene Study，以使用运行间校准品（Inter-Run Calibration）在多板实验之间进行归一化，比较来自一个或多个实验的基因表达数据。通过将来自一个或多个数据文件（扩展名为.pcrd）的数据添加到基因研究来创建 Gene Study。软件将它们分组为一个文件（扩展名为.mgxd）。

为了使软件识别每块孔板的运行间校准品，它必须在每个孔板中使用相同的 Target Name, Sample Name, 以及 Biological Group（如果使用的话）。每块孔板运行结束，分别生成各自的数据文件（扩展名为.pcrd）。

### 1、创建 Gene Study

打开 CFX Maestro 软件，选择“File > New > Gene Study”，在“Gene Study”选项卡中点击“Add Data Files”，选择需要合并分析的数据文件，软件会显示作为运行间校准品的样品。点击“确定”，选中的文件将添加到“Gene Study”窗口。

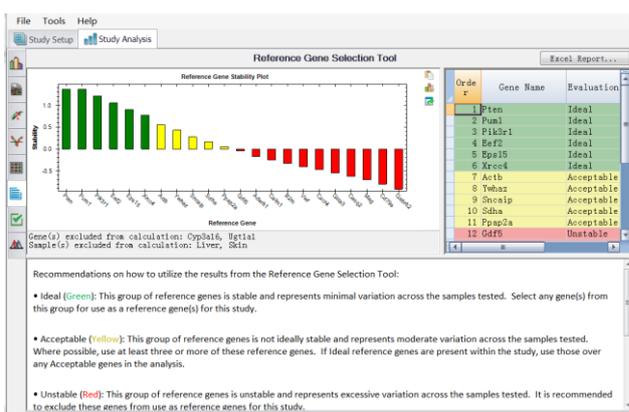




## 2、合并分析（Study Analysis）

选择“Study Analysis”窗口，软件会将多板合并进行基因表达分析。

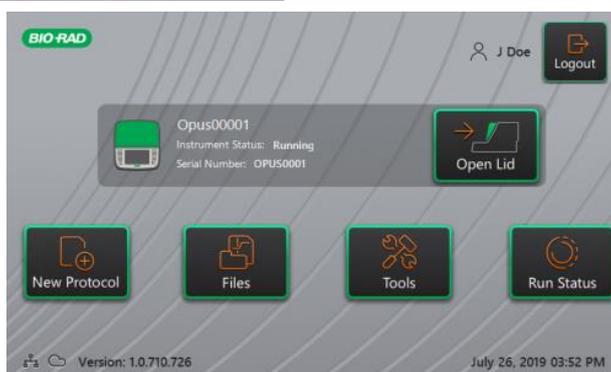
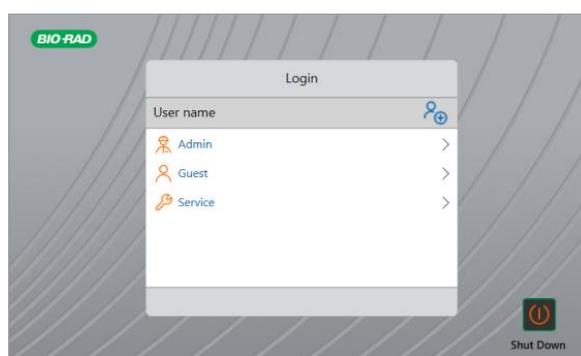
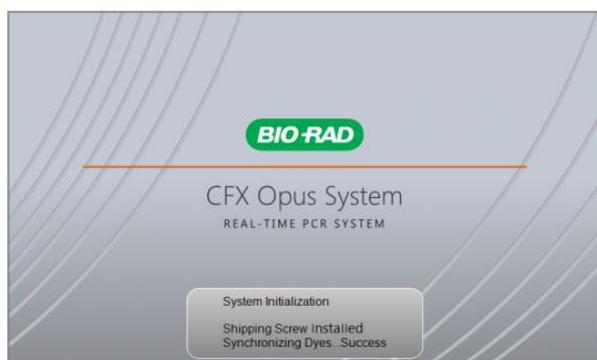
- 此时可以进行基因表达分析的一切操作，根据实验目的进行分析设置。
- 内参基因筛选：在 Experiment Settings 中将所有基因设置为参考（Targets 窗口中，“Reference”一栏全部勾选，点击“OK”保存更改），在“Study Analysis”窗口选择  选项卡，软件会自动计算每个参考基因在所测样品中表达的稳定性，并计算稳定系数（M 值），将所测参考基因分为“理想”，“可接受”或“不稳定”。



3、图片和数据导出与前面一样。

## 九、CFX Opus 独立运行

1、打开仪器电源，待仪器自检结束后，创建用户名或选择用户名，进入主界面（Home）准备就绪。





## 十、仪器推荐使用的试剂耗材

1、PCR 反应板/管：光学级的低位 0.2mL 96 孔板、低位 0.2mL 8 连管或低位 384 板（384 反应模块）。

2、封膜/PCR 管盖：光学级 96 孔板封膜；光学级 8 连管盖。

3、定量 PCR 试剂：不含 ROX 校正的 SYBR 染料试剂，或荧光探针试剂（如图）。

Channel	Fluorophore
1	FAM
	SYBR
2	HEX
	TET
	Cal Orange 560
	Cal Gold 540
3	VIC
	ROX
	Texas Red
	Cal Red 610
4	Tex 615
	Cy5
	Quasar 670
5	Quasar 705
	Cy5-5

## 十一、注意事项

1、正常的开关机顺序有助于延长仪器的使用寿命，减少仪器出故障的频率。

a) 开机：待仪器开机后完成自检后再进行操作；

b) 关机：待仪器运行完程序后，再关机；关机后切断仪器电源。

c) 开关盖：CFXOpus 仪器上盖部分为全自动控制，在通电状态，严禁任何人为干涉上盖开启或关闭的行为，此类行为会导致上盖故障，危及仪器使用。

2、良好的实验室环境有助于延长仪器的使用寿命，减少仪器出故障的频率。推荐以下几个方面：

a) 电源：推荐配备合适的稳压电源。

b) 通风：仪器的通风应该没有阻挡。

c) 温度：温度应该控制在 10-30℃。

d) 湿度：20-80%；梅雨季节，推荐实验室配备除湿机。

e) 实验空间：易于操作、干净、安全。

3、正确的实验操作习惯是取得精确实验数据的必要条件之一。在操作时应注意以下几个方面：

a) PCR 反应应该在一个没有 DNA 污染的干净环境中进行。最好设立一个专用的 PCR 实验室。

b) 纯化模板所选用的方法对污染的风险有极大影响。一般而言，只要能够得到可靠的结果，纯化的方法越简单越好。

c) 所有试剂都应该没有核酸和核酸酶的污染。操作过程中均应戴手套、口罩，勤换手套。

d) PCR 试剂配制应使用最高质量的新鲜双蒸水，采用高压灭菌。

e) 试剂或样品准备过程中都要使用一次性灭菌的塑料瓶和管子，玻璃器皿应洗涤干净并高压灭菌。

f) PCR 的样品应在冰浴上化开，并且要充分混匀。

g) 专用移液器，要求加样精准，移液器定期校正。

h) 样品放置：将 PCR 反应体系加入到 0.2ml 低缘八联管，盖上管盖；或加入低缘 96 孔板，用光学级封膜封好。注意，必须带一次性塑料手套，不要让手指接触到反应管表面。将反应管按顺序放入仪器的加热孔中。

i) 为了最小化实验结果的统计学偏差，先制备混合反应液，所有样本有三个重复。大剂量包装的反应试剂，使用前进行分装（引物、模板，水），尽量减少试剂的反复冻融。

j) 加入试剂之前，混匀一下后瞬时离心，以免放置时间长了浓度不均匀。

k) 无论探针法还是染料法，每次试验都要做 NTC（No Template Control），以验证有无污染发生。