

ViiA™ 7 Real-Time PCR System 簡易中文操作手冊

1. 開啟 ViiA™ 7 Software，進入主畫面(Home Screen)後點選 Experiment 欄位中的 Create



，建立新實驗。

2. 進入 Setup 下的 Experiment Properties 後，輸入 Experiment Name，並選擇
 - a. 此次實驗的模板(block)
 - b. 實驗設計(experiment type)
 - c. 使用的螢光試劑
 - d. PCR 反應速度(Standard or Fast)

How do you want to identify this experiment?

* Experiment Name: Comments:

Barcode:

User Name:

*** Which block are you using to run the experiment?**

384-Well Array Card 96-Well (0.2mL) Fast 96-Well (0.1mL)

*** What type of experiment do you want to set up?**

Standard Curve Relative Standard Curve Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) Melt Curve

High Resolution Melt Genotyping Presence/Absence

*** Which reagents do you want to use to detect the target sequence?**

TaqMan® Reagents SYBR® Green Reagents Other

*** What properties do you want for the instrument run?**

Standard Fast

3. 進入 Setup 下的 Define，編輯此次實驗所要偵測的基因(Targets)及樣品(Samples)

- a. 編輯 Targets：利用 **New** 加入新的基因，並編輯基因名稱及所標定的螢光種類

Target Name	Reporter	Quencher	Color
GAPDH	FAM	NFQ-MGB	Blue

，也可利用其他按鍵將編輯好的

target gene 儲存 **Save to Library**，刪除 **Delete** 或將之前已儲存的 target gene 加入

Import from Library 。

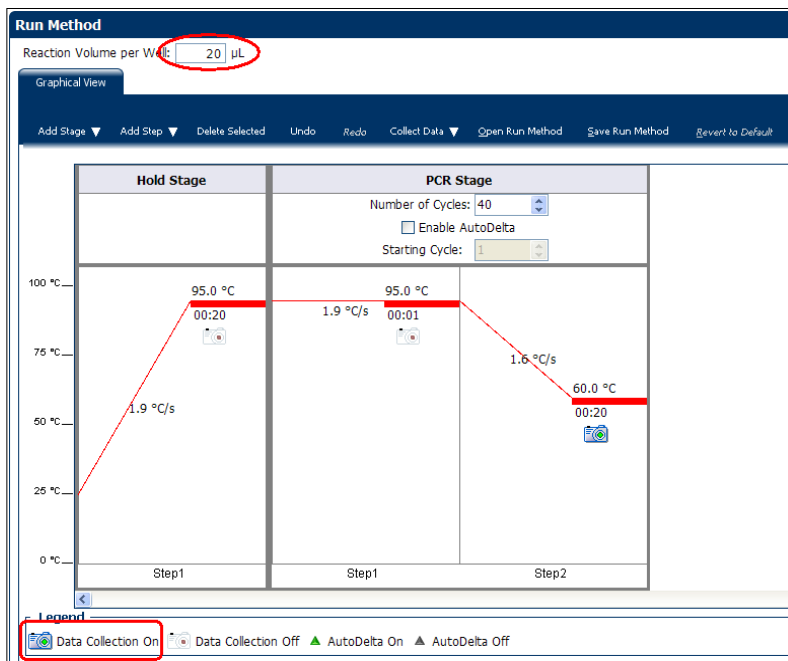
- b. 編輯 Samples：利用 **New** 加入新的樣品，並編輯樣品名稱，也可利用其他按鍵將編輯好的 sample 儲存 **Save to Library**，刪除 **Delete** 或將之前已儲存的 sample 加入 **Import from Library** 。

- 若此次實驗包含 biological group，可在 Biological Replicate Groups 視窗編輯。
- 若選擇的 experiment type 為 Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)，Define 視窗下會出現 Analysis Settings 的設定，可編輯選擇 Reference Sample 和 Endogenous Control。

4. 進入 Setup 下的 Assign，編輯樣品放置的位置：利用滑鼠拖曳選擇 well 並勾選左邊畫面適當的 Target 及 Sample。

- 若選擇的 experiment type 為 Standard Curve，Assign 視窗下會出現 Define and Set Up Standards 精靈 **Define and Set Up Standards**，可協助設定 standards。

5. 進入 Setup 下的 Run Method，確定 PCR 反應條件及體積是否需要修改。



6. 進入 Run 的視窗 **Run**，按下 **START RUN** 進行 Real-Time PCR 反應。



7. Real-Time PCR 反應結束後，進入 Analysis 分析實驗結果。

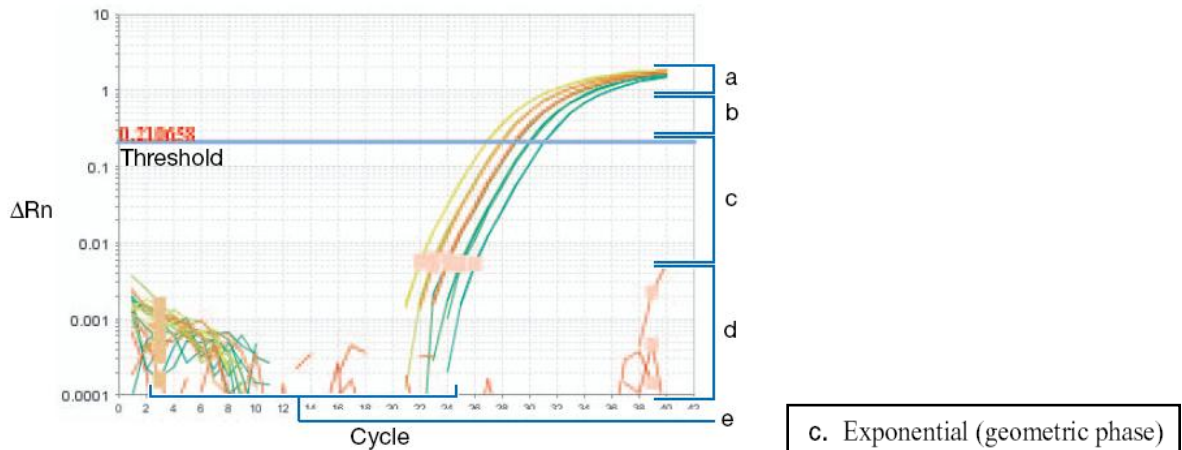
➤ 如果要重新編輯實驗或樣品設定，可從左邊畫面的 Setup 進行實驗盤的編輯。



8. 按下 Analyze 利用軟體內設條件進行初步分析並檢視分析結果。在右方的 Plate Layout 視窗可點任一 well 或點 plate 左上角來全選所有樣品，左方則會出現相對應樣品的圖形。在一般反應完成後，電腦會自動利用內設條件進行分析並直接呈現擴增曲線圖形。

9. 檢視 Amplification plot 結果時，請先將 Plot Type 選擇成 ΔRn vs Cycle Plot Type: ΔRn vs Cycle。

欲檢視 Baseline 設定，將 Graph type 選擇以 Linear 方式表示 Graph Type: Linear，並於擴增曲線圖下方勾選顯示 Baseline 設定，檢查 Baseline 起始與結束位置是否正確。欲檢視 Threshold 設定時，選擇 Graph Type 以 Log 方式表示 Graph Type: Log，並於擴增曲線圖下方勾選顯示 Threshold 設定，利用 Target 選項 Target: ACTB 可檢視不同基因的結果，請確認每個 Target 的 Threshold 位置是否設定於 Exponential (geometric) phase 中 (Exponential phase 請參考下圖所示)。



➤ 若欲更改分析設定，按下 Analysis Settings，在 C_T Settings C_T Settings 下，將 Default Settings 和 Automatic Threshold 的選擇勾勾點掉，並輸入欲更改的 Threshold Threshold: 0.171002 和 Baseline 區間 Baseline Start Cycle: 3 End Cycle: 15，按下 Apply Analysis Settings Apply Analysis Settings 重新分析。

10. 進行絕對定量實驗 (Standard curve) 時，請檢視 Standard Curve 結果：利用 Target 選項 Target: ACTB 可以檢視不同基因的標準曲線，請確認所有待測檢體均落在標準品的濃度區間中，標準曲線的 Slope 代表 PCR 反應效率，若越接近 -3.3 代表 PCR 反應效率達到

100%； R^2 數值代表每個資料點與迴歸曲線接近的程度，應該>0.99 以上。若欲檢視計算結果，點選圖形右方的 **Well Table** 視窗，利用 Group By 下拉式選單 **Group by** 可選擇 Well Table 以 C_T ，Replicate 或 Flag 分組的排列方式。若發現有 outlier 可利用每個 well 前面的 Omit 功能來刪除。

11. 進行相對定量實驗時，請檢視 Gene Expression 結果：可以利用 Plot Type、Graph Type 或 Orientation **Plot Type: RQ vs Sample** **Graph Type: Linear** **Orientation: Vertical Bars** 選擇圖形表示方式，同時可由右方 View Technical Replicates **View Technical Replicates** 來檢視重複樣品平均值的計算結果；如果此次實驗包含 biological group，可點選 View Biological Replicate 視窗來檢視計算結果。
12. 若使用 SYBR Green Reagents 且有設定 Melt Curve Stage，可在 Melt Curve Plot 結果中，檢視是否為單一 melt peak。
13. 檢視 Multicomponent Plot 結果時，選擇以 Dye 分類呈現 **Plot Color Dye**；可以觀察到每個 well 中不同螢光在反應過程的變化情形，也可檢查 NTC well 是否有污染狀況。反應過程中，ROX 螢光訊號應該保持穩定不變。
14. 檢視 Raw Data Plot 結果時，可拖曳圖形下方的 cycle 數以觀察 6 個濾鏡收集訊號的情況，並確認收集的螢光沒有錯誤，下表顯示每個濾鏡收集的螢光種類：

Filter set	Color	Filter wavelength (nm)‡		Supported dyes
		Excitation	Emission	
x1-m1	Blue	470±15	520±15	FAM™ and SYBR® Green dyes
x2-m2	Green	520±10	558±12	VIC®, JOE™, TET™, and HEX™ dyes
x3-m3	Yellow	549.5±10	586.5±10	NED™ and TAMRA™ dyes
x4-m4	Orange	580±10	623±14	ROX™ dye
x5-m5	Red	640±10	682±14	LIZ® dye
x6-m6	Deep red	662±10	711±12	None§

‡ The central wavelengths are the optimized wavelengths.

§ No Life Technologies supported dye currently available.

15. 檢視 QC Summary 報告，可以快速瀏覽此次反應是否有哪些 well 出現異常狀況，若 Flagged Wells 次數>0，請直接查詢下方可能的失敗原因。
16. 若點選 Multiple Plots View，可以同時檢視上述幾種圖形。

17. 分析完的數據結果可進入



來轉成 Excel 檔案格式。若欲存取任一圖形結果，

可直接按圖形右上方 Save to image file



存成 JPEG 檔案格式。