

Rotor-Gene Q MDx User Manual

实时荧光定量 PCR 分析仪 用户手册

目录

1	安全性信息	1-1
1.1	正确使用	1-1
1.2	用电安全	1-3
1.3	环境	1-4
1.4	生物安全性	1-4
1.5	化学品	1-5
1.6	废物处理	1-6
1.7	机械危害	1-6
1.8	热危害	1-7
1.9	维护	1-7
1.10	Rotor-Gene Q MDx 上的符号	1-8
2	介绍	2-1
2.1	一般信息	2-1
2.1.1	技术支持	2-1
2.1.2	政策声明	2-1
2.1.3	版本管理	2-1
2.2	Rotor-Gene Q MDx 的预期用途	2-2
2.3	Rotor-Gene Q MDx 的性能结构及组成	2-2
3	一般说明	3-1
3.1	热性能	3-1
3.2	光学系统	3-2
4	安装步骤	4-1
4.1	场地要求	4-1
4.2	交流电源连接	4-1

4.3	计算机要求	4-2
4.4	Rotor-Gene Q MDx 拆箱	4-3
4.5	配件	4-3
4.6	硬件安装	4-4
4.7	软件安装	4-5
4.8	软件版本	4-8
4.9	Rotor-Gene Q MDx 仪器所连接计算机上的其他软件	4-8
4.9.1	病毒扫描程序	4-9
4.9.2	系统工具	4-9
4.9.3	操作系统更新	4-9
4.10	软件更新	4-10
5	操作步骤—硬件	5-1
5.1	转子类型	5-1
5.2	反应设置	5-4
5.3	转盘设置	5-8
6	操作步骤—软件	5-1
6.1	快速启动向导	5-1
6.1.1	转子选择	5-3
6.1.2	确认流程	5-4
6.1.3	保存运行	5-4
6.1.4	样本设置	5-5
6.2	高级向导	5-6
6.2.1	新运行向导窗口 1	5-7
6.2.2	新运行向导窗口 2	5-8
6.2.3	新运行向导窗口 3	5-9
6.2.4	编辑流程	5-10
6.2.5	新运行向导窗口 4	5-26
6.2.6	新运行向导窗口 5	5-27

7	分析用户界面	7-1
7.1	工作区	7-1
7.2	工具栏	7-1
7.3	查看原始通道	7-1
7.4	切换样本	7-3
7.5	文件菜单	7-5
7.5.1	新建	7-5
7.5.2	打开和保存	7-6
7.5.3	报告	7-9
7.5.4	设置	7-9
7.6	分析菜单	7-11
7.6.1	分析	7-11
7.6.2	定量	7-12
7.6.3	双标准曲线	7-28
7.6.4	Delta delta C _T 相对定量	7-33
7.6.5	熔解曲线分析	7-37
7.6.6	比较定量	7-41
7.6.7	等位基因区分	7-43
7.6.8	散点图分析	7-44
7.6.9	终点分析	7-47
7.6.10	浓度分析	7-53
7.6.11	高分辨率熔解分析	7-56
7.7	运行菜单	7-57
7.7.1	开始运行	7-57
7.7.2	暂停运行	7-57
7.7.3	停止运行	7-58
7.8	查看菜单	7-58
7.8.1	运行设置	7-58

7.8.2	温度图	7-62
7.8.3	流程进程	7-62
7.8.4	编辑样本	7-63
7.8.5	显示选项	7-72
7.9	安全性菜单	7-72
7.9.1	Windows XP 安全功能配置	7-73
7.9.2	Windows 7 配置	7-82
7.9.3	相同计算机上运行多个用户	7-89
7.9.4	稽查跟踪	7-91
7.9.5	运行签名	7-92
7.9.6	样本锁定	7-94
7.9.7	锁定的模板	7-96
7.10	增益菜单	7-97
7.11	窗口菜单	7-97
7.12	帮助功能	7-98
7.12.1	发送支持 E-MAIL	7-98
8	其它功能	8-1
8.1	分析模板	8-1
8.2	打开第二次运行	8-1
8.3	调整标尺选项	8-1
8.4	输出图	8-2
8.5	扳手按钮	8-5
8.6	选择面积选项	8-6
9	保养程序	9-1
10	光学温度验证	10-1
10.1	OTV 原则	10-1
10.2	Rotor-Disc OTV 试剂盒组件	10-1
10.3	运行 OTV	10-2

11	高分辨率熔解分析	11-1
11.1	仪器操作	11-2
11.2	化学	11-2
11.3	SNP 基因分型举例	11-3
11.4	甲基化分析举例	11-4
11.5	成功进行 HRM 分析的指南	11-6
11.6	样本准备	11-7
11.7	软件安装	11-7
11.8	实时 PCR 数据分析	11-15
11.9	HRM 数据分析	11-16
12	故障排除	12-1
12.1	日志档案	12-1
12.2	HRM 故障排除	12-1
12.3	一般仪器故障	12-3
12.4	Rotor-Gene Q 软件消息	12-7
13	术语	13-1
附录 A		1
技术数据		1
1		
环境条件		1
1		
FCC 声明		4
符合性声明		5
废弃的电子电器设备 (WEEE)		6
附录 B		1

定量分析	1
附录 C	1
Rotor-Gene Q MDx 产品、配件和耗材	1
附录 D	1
责任条款	1
索引	1

1 安全性信息

使用 Rotor-Gene Q MDx 之前，仔细阅读本用户手册并特别注意安全性信息非常重要。必须遵循用户手册中的说明和安全性信息以确保仪器安全运行和维持仪器在安全状态。

本手册中出现下列类型的安全性信息。

<p>警告</p> 	<p>术语警告用于告知您可导致您或其他人人身伤害的情况。有关这些情况的细节在与此相似的方框中给出。</p>
---	---

<p>注意</p> 	<p>术语注意用于告知您可导致此仪器或其他设备损坏的情况。有关这些情况的细节在与此相似的方框中给出。</p>
---	--

本手册中建议旨在补充而非替代用户所在国家中普遍的正常安全性要求。

1.1 正确使用

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W1] Rotor-Gene Q MDx 使用不当可导致人身伤害或仪器损坏。 Rotor-Gene Q MDx 必须仅由经过适当培训的合格人员操作。 Rotor-Gene Q MDx 的维修必须仅由 QIAGEN 的现场维修专员完成。</p>
---	---

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W2] Rotor-Gene Q MDx 是沉重的仪器，提起时请小心，以避免人身伤害或仪器损坏。</p>
--	--

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W3] 运行期间请勿移动 Rotor-Gene Q MDx。</p>
--	--

<p>注意</p> 	<p>仪器损坏 [C1] 避免将水或化学品洒到 Rotor-Gene Q MDx 上。水或化学品泄漏导致的损坏您将不能保修。</p>
---	--

注意：紧急情况下，关掉 Rotor-Gene Q MDx 后面的电源开关，并从电源插座拔掉电源线。

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W4] 实验期间或 Rotor-Gene Q MDx 旋转时不要打开盖子。否则，如果您打开盖锁并把手伸进去，您将冒接触到滚烫、带电或高速运转的部件的风险，并可能伤到您自己和损坏仪器。</p>
--	---

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W5] 如果您需要快速停止实验，请关掉仪器电源，然后打开盖子。让仓室冷却后再把手伸进去，否则您将冒因接触滚烫部件而受伤的风险。</p>
--	---

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W6] 如果仪器以非制造商规定的方式使用，则仪器提供的保护可能减弱。</p>
--	--

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W7] Rotor-Gene Q MDx 下面的松纸影响仪器冷却。建议仪器下面不要有杂物。</p>
---	---

<p>注意</p> 	<p>仪器损坏 [C2] 始终使用转子上的锁定环，这可阻止实验期间管帽从管子上脱落，如果实验期间管帽脱落，它们会损坏仓室。</p>
---	---

<p>注意</p> 	<p>仪器损坏 [C3] 在每次运行之前进行目视检查，确认转子未出现损坏或变形。</p>
---	--

如果实验期间您接触 Rotor-Gene Q MDx，而您又带有静电，严重情况下可重新启动 Rotor-Gene Q MDx。但是，软件将会重新启动 Rotor-Gene Q MDx 并继续实验。

1.2 用电安全

维修前从电源插座断开电源线。

<p>警告</p> 	<p>触电危险 [W8]</p> <p>断开仪器内部或外部的保护导体（接地线）或断开保护导体终端很可能使仪器出于危险中。</p> <p>严禁故意断开保护导体。</p> <p>仪器内部致命电压</p> <p>当仪器连着电源线时，终端可能带电，打开盖子或拆掉部件很可能暴露带电部件。</p>
---	--

为了确保 Rotor-Gene Q MDx 令人满意和安全地运行，请遵守以下建议：

- 电源线必须连接至有保护导体（接地线）的电源插座
- 不要调整或替换仪器内部部件
- 不要运行拆掉盖子或任何部件的仪器
- 如果有液体洒入仪器内部，请关掉仪器，从电源插座断开，并联系 QIAGEN 技术服务部门。

如果仪器用电不安全，防止其他人员使用仪器，并联系 QIAGEN 技术服务部门；出现下列情况时，仪器可能用电不安全：

- 仪器或电源线出现损坏。
- 仪器在不利条件下长时间储存。
- 仪器已遭受严重的运输挤压。

<p>警告</p> 	<p>触电危险 [W9]</p> <p>仪器上有一个用电依从性标签，标出了电源电压和频率以及保险丝评级。仪器应仅在这些条件下运行。</p>
---	--

1.3 环境

运行条件

<p>警告</p> 	<p>爆炸性环境 [W10] Rotor-Gene Q MDx 不是供在爆炸性环境中使用设计的。</p>
---	---

<p>注意</p> 	<p>仪器损坏 [C4] 阳光直射可能使仪器部件褪色和引起塑料件损坏。 Rotor-Gene Q MDx 必须放置在避免阳光直射的地方。</p>
---	---

1.4 生物安全性

含生物来源材料的样本和试剂应作为潜在感染性材料处理。使用出版物例如 HHS 微生物和生物医学实验室生物安全性 (www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm) 中概述的安全实验室程序。

样本

样本可能含有传染性病原体。您应知道此种物质的健康危害，并按照要求的安全性法规使用、储存和处理此种样本。

<p>警告</p> 	<p>含传染性病原体的样本 [W11]</p> <p>此仪器使用的一些样本可能含有传染性病原体。要非常小心和按照要求的安全性法规处理此种样本。始终穿戴安全防护镜、两双手套和实验服。负责人（例如：实验室经理）必须采取必要的预防措施确保周围的工作场所安全，以及仪器操作人员经过适当培训，不会接触到有害水平的相关安全数据表（SDS）或 OSHA,* ACGIH,† 或 COSHH‡ 文件中规定的传染性病原体。排烟和废物处理必须符合国家、州或地方的健康安全法律法规。</p>
---	---

1.5 化学品

<p>警告</p> 	<p>危险化学品 [W12]</p> <p>此仪器使用的一些化学品可能有危害或者在完成程序运行后可能有危害。始终穿戴安全防护镜、手套和实验服。负责人（例如：实验室经理）必须采取必要的预防措施确保周围的工作场所安全，以及仪器操作人员经过适当培训，不会接触到危害水平的相关安全数据表（SDS）或 OSHA,* ACGIH,† 或 COSHH‡文件中规定的毒性物质（化学品或生物制品）。排烟和废物处理必须符合国家、州或地方的健康安全法律法规。</p>
---	---

* OSHA: 职业安全与卫生管理局 (美国)。

† ACGIH: 美国工业卫生师协会 (美国)。

‡ COSHH: 有害物质控制规章 (英国)。

有毒烟雾

如果使用到挥发性溶剂或毒性物质，必须提供高效的实验室通风系统，以驱散可能产生的蒸汽。

1.6 废物处理

使用过的可能含有危险化学品或传染性病原体的耗材和塑料器皿。此类废物必须按照当地安全法规收集和适当处理。

1.7 机械危害

仪器运行期间，必须关闭 Rotor-Gene Q MDx 的盖子。

<p>警告</p> 	<p>运动部件 [W13]</p> <p>为了避免在 Rotor-Gene Q MDx 运行期间接触到运动部件，仪器必须在盖子关闭情况下运行。</p>
---	--

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W14]</p> <p>小心打开和关闭 Rotor-Gene Q MDx 的盖子，以避免卡住手指或衣服。</p>
--	---

<p>注意</p> 	<p>仪器损坏 [C5]</p> <p>确定转子和锁定环安装正确。如果盖子破裂或盖子锁损坏，则不得使用 Rotor-Gene Q MDx。联系 QIAGEN 技术服务部门。</p>
---	---

<p>注意</p> 	<p>仪器损坏 [C6]</p> <p>在寒冷的气候条件下交付 Rotor-Gene Q MDx 并立即使用时，机械部件会出现堵塞。</p> <p>开启仪器之前，请等待至少 1 小时，以便让仪器适应室温条件。</p>
---	---

<p>警告</p> 	<p>运动部件 [W15]</p> <p>在因电源故障引起故障情况下，手动打开盖子前拔掉电源线并等待 10 分钟。</p>
---	--

<p>警告</p> 	<p>过热风险 [W16] 为了确保适当通风，Rotor-Gene Q MDx 的两侧和后面保持最小 10cm 间隙。 不能覆盖保证 Rotor-Gene Q MDx 通风的缝隙和开口。</p>
---	--

1.8 热危害

<p>警告</p> 	<p>热表面 [W17] Rotor-Gene Q MDx 的仓室可达到 120° C (248° F) 以上的温度。很热时避免接触。</p>
---	--

<p>警告</p> 	<p>热表面 [W18] 暂停运行时，Rotor-Gene Q MDx 并不能完全冷却到室温。处理仪器内的转子和任何管子时，务必格外谨慎。</p>
---	--

1.9 维护

请依照第 9 节所述开展维护。对于不当维护造成的损坏，QIAGEN 会收取必要的维修费用。

<p>警告 / 注意</p> 	<p>人身伤害和物资损失风险 [W19] 仅可进行本用户手册之中专门规定的维护操作。</p>
--	---

<p>警告</p> 	<p>失火危险 [W20] 当用含酒精的消毒剂清洁 Rotor-Gene Q MDx 时，请保持 Rotor-Gene Q MDx 盖子敞开以驱散易燃蒸汽。 仅在工作台部件冷却后才可清洁 Rotor-Gene Q MDx。</p>
---	--

<p>警告 / 注意</p> 	<p>触电危险 请勿拆解 Rotor-Gene Q MDx 仪器。</p> <p style="text-align: right;">[W21]</p>
<p>注意</p> 	<p>仪器外壳损坏风险 切勿用酒精或含酒精的溶液清洁仪器外壳。酒精会造成外壳损坏。如需清洁外壳，仅可采用去离子水。</p> <p style="text-align: right;">[C7]</p>

1.10 Rotor-Gene Q MDx 上的符号

符号	位置	说明
	<p>样本仓室附近，盖子打开时可见</p>	<p>热表面警告- 仓室的温度可达到 120°C (248°F) 以上。</p>
	<p>仪器后面</p>	<p>请参阅使用说明书</p>
	<p>仪器后面的铭牌</p>	<p>CE 标志</p>
	<p>仪器后面的铭牌</p>	<p>体外诊断医疗器械</p>
	<p>仪器后面的铭牌</p>	<p>加拿大及美国 CSA 认证标记</p>
	<p>仪器后面的铭牌</p>	<p>合法制造商</p>

符号	位置	说明
	仪器后面的铭牌	欧洲 WEEE 标志
	仪器后面的铭牌	美国联邦通讯委员会 FCC 标志
	仪器后面的铭牌	澳大利亚 C-Tick 标志 (供应商识别号: N17965)
	仪器后面的铭牌	中国 RoHS 标志 (电子电气设备中特定危险物质的使用限制)

2 介绍

感谢您选择 Rotor-Gene Q MDx。我们相信它将成为您实验室的不可或缺一部分。

使用 Rotor-Gene Q MDx 之前，您必须仔细阅读本用户手册，特别注意安全性信息。必须遵守本用户手册中的说明和安全性信息以确保仪器安全运行，并维持仪器在安全状态。

2.1 一般信息

2.1.1 技术支持

在 QIAGEN，我们以我们技术支持的质量和有效性为荣。我们技术服务部门的工作人员为在分子生物学和 QIAGEN 产品使用方面有广泛实践和理论知识的有经验科学家。如果您在 Rotor-Gene Q MDx 或 QIAGEN 产品方面有任何疑问或碰到任何困难，请随时与我们联系。

QIAGEN 的客户是我们产品的先进或专业化使用方面的主要信息来源。此信息对其他科学家以及 QIAGEN 的研究人员有帮助。因此，如果您有关于产品性能或新的应用和技术方面的任何建议，请联系我们。

了解技术支持和更多信息，请致电 QIAGEN 技术服务部门或当地经销商（见封底）。

有关 Rotor-Gene Q MDx 的最新信息，请访问 www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx。

2.1.2 政策声明

当新技术和部件可用时，改进产品是 QIAGEN 的政策。QIAGEN 保留在任何时间更改产品质量标准的权利。为了编制实用和合适的文件，我们感激您对本用户手册的评价。请联系 QIAGEN 技术服务部门。

2.1.3 版本管理

本文档为《Rotor-Gene Q MDx 用户手册》第 2 版，第一次修订，适用于使用 2.3.1 及以上版本的 Rotor-Gene Q 软件的 Rotor-Gene Q MDx 仪器。

2.2 Rotor-Gene Q MDx 的预期用途

Rotor-Gene Q MDx 基于聚合酶链反应（PCR）原理，与 QIAGEN 公司生产的配套检测试剂共同使用，在临床上用于来源于临床样本中的核酸（DNA/RNA）进行定性和定量检测，同时熔解曲线功能支持人体样本特定基因不同表型的分型和特定基因的突变分析。

Rotor-Gene Q MDx 应用聚合酶链式反应（PCR）和高分辨率熔解分析（HRMTM）进行实时和终点法热循环，可用于分子生物学以及浓度测量、蛋白分析和酶促动力学等应用。

如果 Rotor-Gene Q MDx 配合 QIAGEN 专为其设计的试剂盒使用，可用于 QIAGEN 试剂盒操作手册上描述的应用。

如果 Rotor-Gene Q MDx 配合其他 QIAGEN 试剂盒使用，用户有义务验证这些产品在特定应用中的性能。

Rotor-Gene Q MDx 拟用于体外诊断用途。

Rotor-Gene Q MDx 应当由专业用户使用，诸如接受过分子生物技术和 Rotor-Gene Q MDx 操作培训的技术人员和医生。

2.3 Rotor-Gene Q MDx 的性能结构及组成

Rotor-Gene Q MDx 由光学模块、热循环模块、电源线、转子、仓室及软件（版本号：2.3.1）组成。其中光学模块包括光电倍增管（PMT）、光源 LED、光源检测器。热循环模块包括风扇、加热元件、温度传感器。

3 一般说明

Rotor-Gene Q MDx 是一种创新的仪器，可以进行高精度实时 PCR，此仪器非常适于结合 QIAGEN IVD 标记试剂盒进行体外诊断应用。

强大和方便用户的软件对初学者非常简单，并为高级用户提供了开放式实验平台。



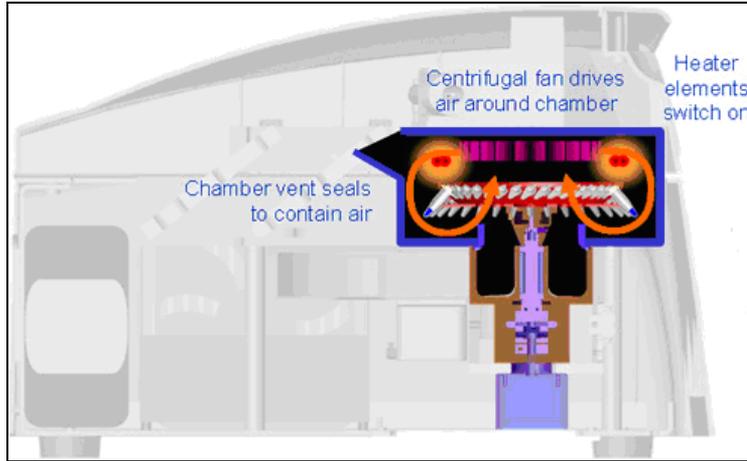
3.1 热性能

Rotor-Gene Q MDx 使用精密的加热和冷却设计，以实现最佳反应条件。独特的旋转模式保证了不同样本间的最佳热均一性和光学均一性，这对精密、可靠的分析非常重要。

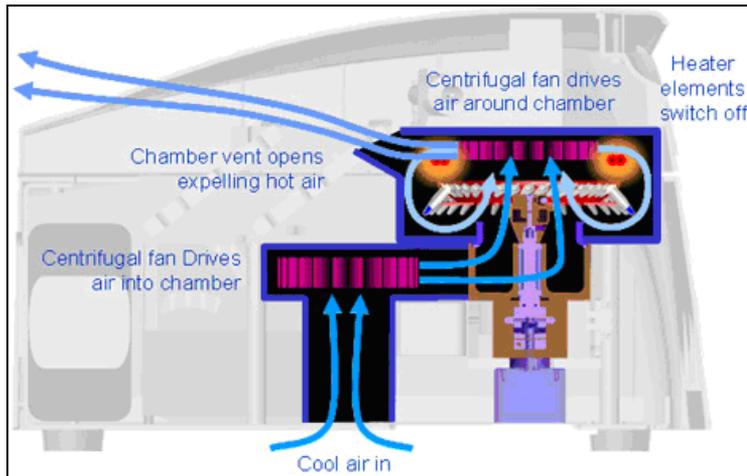
一次运行期间，样本以 400 rpm 持续旋转。离心防止凝结和去除气泡，但是不会沉淀 DNA。此外，运行前样本不需要甩下来。

样本在低质量空气烘箱中加热和冷却。通过盖子中的镍铬元件实现加热。通过从仓室顶部向外排风和通过基底向上吹入环境空气冷却仓室。

加热



冷却

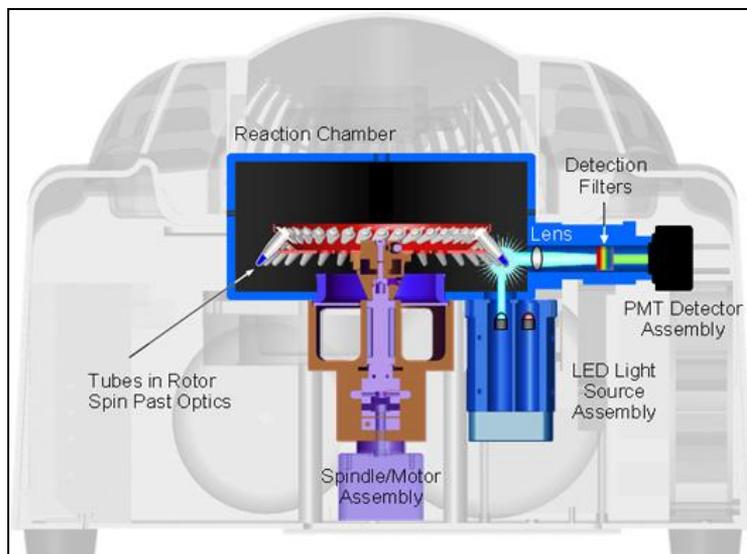


加热和冷却系统图解。

3.2 光学系统

选择最多 6 个激发光源和 6 个检测过滤器，结合短的、固定光程，Rotor-Gene Q MDx 可用于多重反应，确保样本间荧光变异最小并且无需校准或补偿。

样本通过发光二极管从仓室底部被激发。能量通过管子底部的薄壁传递。发射的荧光通过仓室侧面的发射滤片，然后由光电倍增管收集。固定光程保证每个样本激发一致，这意味着无需使用被动的内参比染料，例如 ROX™。



光学系统图解。

可用通道

通道	激发 (nm)	检测 (nm)	检测的荧光基团举例
蓝色	365±20	460±20	Marina Blue [®] , Edans Bothell Blue, Alexa Fluor [®] 350, AMCA-X, ATTO 390
绿色	470±10	510±5	FAM [®] , SYBR [®] Green I, Fluorescein, EvaGreen [®] , Alexa Fluor 488
黄色	530±5	557±5	JOE [™] , VIC [®] , HEX [™] , TET [™] , CAL Fluor [®] Gold 540, Yakima Yellow [®]
橙色	585±5	610±5	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy [®] 3.5, Texas Red [®] , Alexa Fluor 568
红色	625±10	660±10	Cy5, Quasar [®] 670, LightCycler [®] Red640, Alexa Fluor 633
深红色	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
高分辨率 熔解曲线 (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO [®] 9, LC Green [®] , LC Green Plus+, EvaGreen

注意：用于多重目的的报告染料的合理结合，请参考相关的试剂盒说明书，如 Rotor-Gene Multiplex 或 QuantiTect[®] Virus 说明书。

4 安装步骤

4.1 场地要求

Rotor-Gene Q MDx 仪器必须处于直射阳光范围之外，远离热源、振动源和电气干扰。有关的运行条件（温度和湿度）请参阅附录 A。安装场地应无过多的气流、过多的湿气、过多的灰尘，同时温度不可有较大程度波动。

Rotor-Gene Q MDx 仪器的重量和尺寸请见附录 A。请确保工作台面干燥、洁净，并留有添置附件的空间。有关工作台要求的规格的详细信息，请联系 QIAGEN 技术服务部门。

注意：务必将 Rotor-Gene Q MDx 仪器放置在稳定、水平、无振动的台面上。具体请参阅相应的工作条件 – 参见附录 A。

Rotor-Gene Q MDx 仪器必须放置在适当的接地交流电源插座周围约 1.5 m (59 in.) 范围内。

<p>警告</p> 	<p>爆炸性气体环境 [W10] Rotor-Gene Q MDx 并非针对爆炸性环境下的使用而设计。</p>
---	--

<p>警告</p> 	<p>过热风险 [W16] 为了确保适当通风，Rotor-Gene Q MDx 的两侧和后面保持最小 10 cm (3.94 in.) 间隙。 不能覆盖保证 Rotor-Gene Q MDx 通风的缝隙和开口。</p>
---	--

4.2 交流电源连接

电源要求

Rotor-Gene Q MDx 在以下条件下运行：

- 100–240 V AC, 50–60 Hz, 520 VA (峰值)

确保 Rotor-Gene Q MDx 的额定电压与安装地点可用的交流电压一致。电源供电电压波动不要超过额定供电电压的 10%。

接地要求

为了保护操作人员，QIAGEN 建议 Rotor-Gene Q MDx 应正确接地。仪器配备有 3 芯交流电源线，当连接至合适的交流电源插座时，仪器即已接地。为了保持此保护功能，不要从无接地连接的交流电源插座运行该仪器。

安装交流电源线

将交流电源线的一端连接到位于 Rotor-Gene Q MDx 仪器背侧的插孔上，另一端则连接到电源插座上。

4.3 计算机要求

随 Rotor-Gene Q MDx 配备的笔记本电脑满足 Rotor-Gene Q 软件的要求，详情见下表。

计算机系统要求

描述	最低要求
操作系统	Microsoft® Windows® XP 专业版（32 位）； Microsoft Windows 7 专业版（32 位或 64 位）*
处理器	Intel® Core™ 2 Duo T5500 1.66GHz 或更高
主存储器	1 GB RAM
硬盘空间	10 GB HDD
图形显示	图像适配器和至少达到 1200 x 800 像素的显示屏
接口	RS-232 串行端口或 USB 端口

* 运行 Rotor-Gene Q MDx 软件及安全功能需要使用 Microsoft Windows XP 或 Windows 7 专业版操作系统。在家庭版的 Microsoft Windows XP 或 Windows 7 的操作系统上，不可使用安全功能。

4.4 Rotor-Gene Q MDx 拆箱

Rotor-Gene Q MDx 与安装和运行该仪器的所有必要部件一并交付。箱子中还包含所提供的所有部件清单。

建议核对该清单以确保所有部件都在。

注意：安装之前，请确认仪器和交付的附件未出现运输损坏。

配件盒子在泡沫包装的顶部，配件盒子包括：

- 安装指南（英文版；在手册 CD 上提供有翻译版本）
- CD（软件）
- CD（手册）
- 上样模块 96 x 0.2 ml 管子
- 上样模块 72 x 0.1 ml 管子
- 转子支架（拆除以便安全运输）
- 36 孔转子（此转子为红色）
- 36 孔转子锁定环

以下物品包装在泡沫包装的每边：

- USB 和 RS-232 串行电缆
- 国际电源线套装
- PCR 管，0.2ml（1000）
- 带状管和管帽，0.1 ml (1000)

从箱子取出所有这些部件后，从 Rotor-Gene Q MDx 顶部取下泡沫包装。从箱子中小心取出 Rotor-Gene Q MDx 并打开塑料覆盖物。向后滑动打开盖子。

以下项目已经安装在 Rotor-Gene Q MDx 内部：

- 72 孔转子（此转子为蓝色）
- 72 孔转子锁定环

根据您的订单详情，可能会在发货包装之中包含一台便携式计算机。

4.5 配件

转盘和配件可以单独订购供 Rotor-Gene Q MDx 使用。更多详情，请见附录 C。

4.6 硬件安装

打开 Rotor-Gene Q MDx 包装后，按下面所述进行安装：

注意	仪器损坏 [C6] 在寒冷的气候条件下交付 Rotor-Gene Q MDx 并立即使用时，机械部件会出现堵塞。 开启仪器之前，请等待至少 1 小时，以便让仪器适应室温条件。
----	---

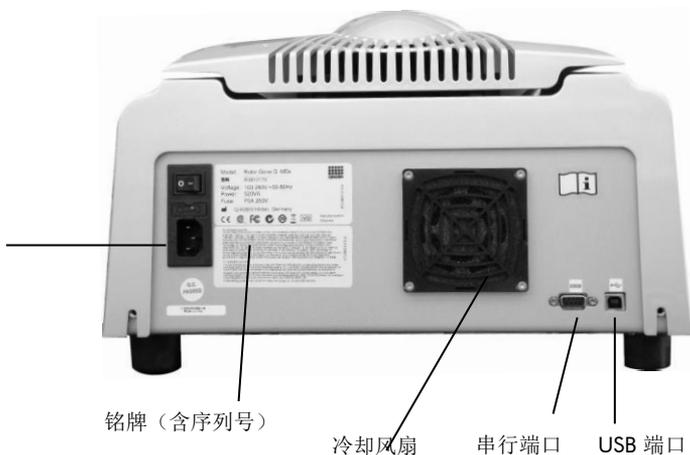


按下面所述进行安装：

1. 把 Rotor-Gene Q MDx 放在水平面上。
2. 确保仪器后面有足够空间供盖子完全打开。
3. 确保仪器后面的电源开关容易够到。
4. 不能堵塞仪器后面。确保需要时电源线可容易拔下，以切断仪器电源。
5. 将提供的 USB 线或 RS-232 串行电缆连接至电脑后面的 USB 或通信端口
6. 将 USB 线或 RS-232 串行电缆连接至 Rotor-Gene Q MDx 后面。
7. 然后将 Rotor-Gene Q MDx 连接至电源。将交流电源线的一端连接至 Rotor-Gene Q MDx 后面的插座，另外一端连接至交流电源插座。

电源开关

电源端口



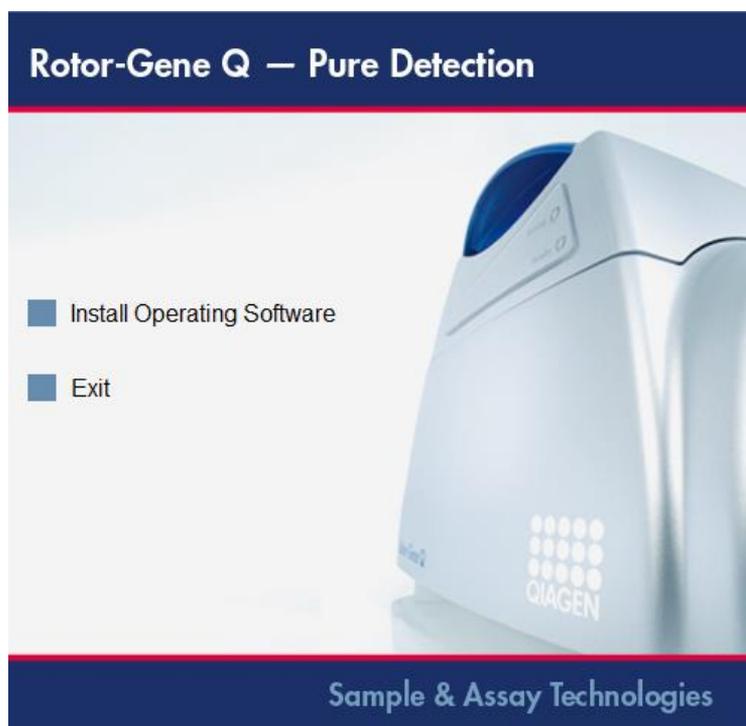
注意：仅可采用仪器随附的 USB 和串行电缆将 Rotor-Gene Q MDx 连接到计算机。请勿采用其他电缆。

4.7

软件安装

1. 要安装 Rotor-Gene Q 软件，请将安装 CD 插入电脑 CD 驱动器。
2. 在出现的窗口中选择“Install Operating Software (安装操作软件)”，按照安装向导进行简单安装。

注意：方便安装同时确保接下来的软件操作步骤得到有效的指导，请参阅仪器随附的《Rotor-Gene Q 安装指南》。



3. 完成软件安装后，将会自动创建一个桌面图标。
4. 移动左手边后面的开关至“1”的位置，打开 Rotor-Gene Q MDx。Rotor-Gene Q MDx 前面的蓝色“Standby (待机)”灯表明仪器已经可以使用。

注意：初次连接计算机时，Rotor-Gene Q MDx 会根据操作系统识别计算机，并弹出大量消息。请参阅仪器随附的 Rotor-Gene Q 安装指南（CD 及纸质版）寻求相关指导。



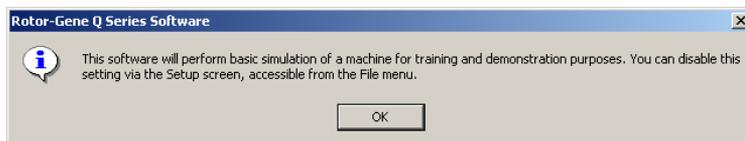
5. 双击 Rotor-Gene Q 系列软件桌面图标，启动软件。



6. 软件首次启动时会出现一个“Welcome (欢迎)”窗口，但是以后的软件升级不会出现此窗口。



- 机器序列号: 输入 Rotor-Gene Q MDx 后面的序列号（6 位数）。
- 端口: 选择 USB 或串行电缆。如果使用串行电缆，选择合适的通信端口或点击“Auto-Detect (自动检测)”按钮
- 自动检测 采用此选项时，将会自动检测对应的 USB 或串行端口，同时显示在“Port（端口）”下拉列表中。
- 虚拟模式运行 (以选中此框，在未连接 Rotor-Gene Q MDx 的电脑上安装 Rotor-Gene Q 软件。软件有全部功能，并可模拟运行。证明):
- 注意：**如果选中此框并且 Rotor-Gene Q MDx 连着电脑，开始运行前会出现以下信息：You are about to run in Virtual mode(您即将以虚拟模式运行)。若要进行真正的运行，必须在“Setup(安装)”窗口中更改设置（见第 7.5.4.节）
- 开始: 输入所有信息后，点击“Begin(开始)”，等待直至初始化完成，这可能需要几秒钟。如果选择虚拟模式，将出现以下信息：

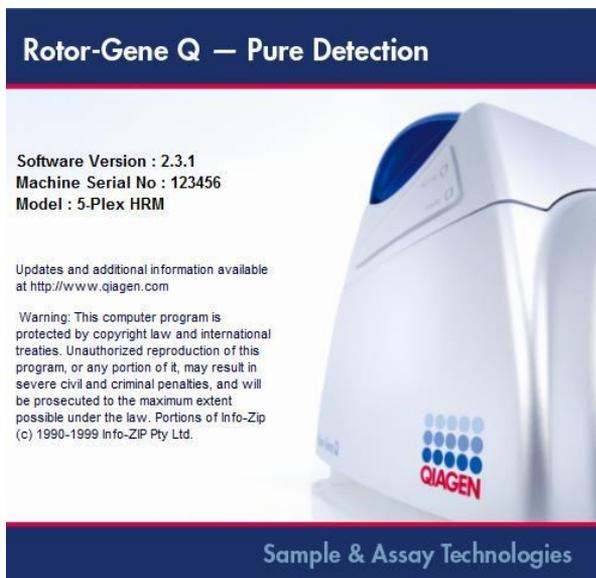


如果未选中“Run in virtual Mode(运行虚拟模式)”框，软件将自动初始化和运行。

- 退出程序: 点击此按钮，退出程序。

4.8 软件版本

要获取软件版本号，点击“Help (帮助)”，然后选择“About This Software (关于此软件)…”。



此窗口显示了关于软件的一般信息，包括软件版本以及仪器的序列号和型号。

4.9 Rotor-Gene Q MDx 仪器所连接计算机上的其他软件

Rotor-Gene Q 软件可以管理 PCR 运行过程中的时间关键过程以及数据采集过程。因此，您必须确保无其他人使用重要的系统资源，并由此造成 Rotor-Gene Q 软件运行速度下降。尤其要特别重视以下要点。

建议系统管理员在对系统实施任何改动之前，充分考虑到这种改动可能对系统资源造成的任何影响。

4.9.1 病毒扫描程序

我们深知，任何与其他计算机交换数据的计算机都面临着计算机病毒的威胁。Rotor-Gene 软件主要安装在存在局部管理政策的环境之中，以便最大限度消除此类威胁。此类政策通常需要使用特定的杀毒工具。由于目前可用的杀毒工具数量庞大，QIAGEN 无法预测如果在 PCR 运行时此类杀毒工具激活，会对 Rotor-Gene 软件造成何种程度的影响。为确保结果的一致性，系统管理员应负责确保 PCR 运行期间：

- 文件访问过程不受病毒扫描程序拦截
- 不会执行病毒数据库更新
- 不会执行文件扫描

我们强烈建议您在实时 PCR 数据采集期间禁用病毒扫描程序活动。仅在 Rotor-Gene Q 软件未运行时，才可在不产生影响仪器性能的风险的前提下，安全地运行上述关键的病毒扫描程序任务。

4.9.2 系统工具

很多系统工具可能会在不需用户干预的前提下，占用大量的系统资源。此类工具的典型示例包括：

- 文件索引，这是很多现代办公应用程序通过后台任务执行的功能
- 磁盘碎片整理，也常常作为后台任务执行
- 任何通过因特网进行更新检查的软件
- 远程监控和管理工具

请您注意，鉴于 IT 环境的动态特性，这一列表可能不够完整，可能在本手册编写期间又出现了未知的工具。作为系统管理员，必须确保在 PCR 运行期间，此类工具不会激活。

4.9.3 操作系统更新

对于用于 Rotor Gene Q MDx 数据采集的计算机，我们强烈建议您关闭其操作系统的自动更新过程。我们会负责密切监测可用的更新，并在判断该等更新安全且重要时，通知用户进行安装。

4.10 软件更新

软件更新可以在 QIAGEN 网站 www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx 上找到，可以从软件内的“Help (帮助)”菜单访问该网站，下载软件，必须在线注册。

此页留空。

5 操作步骤—硬件

本节描述 Rotor-Gene Q MDx 的操作。

5.1 转子类型

首先，选择使用的管子类型和转子。有 4 种转子以适用于不同的管子类型。

注意： 36 孔转子和 72 孔转子随同仪器交付。Rotor-Disc® 转子则属于配件。

重要： 一次运行中使用相同的管子，不要混合不同类型或不同制造商来源的管子，因为这会影响光学均匀性。我们建议使用 QIAGEN 提供的专门为 Rotor-Gene Q MDx 设计使用的管子（见附录 C）。替代制造商的管子可能自发荧光，影响结果的可靠性。此外，替代制造商的管子可能长度更长，导致 Rotor-Gene Q MDx 光程和管子中的反应不能校直。对于由于因在 Rotor-Gene Q MDx 仪器上使用非 QIAGEN 认证的塑料材料而引起的问题，QIAGEN 保留拒绝提供技术支持的权利。

重要： 在 Rotor-Gene Q MDx 上使用任何未经 QIAGEN 认证的塑料材料，都可能造成您的仪器保修失效。

注意 	仪器损坏 每次运行前，目视检查确保转子为出现损坏或变形。	[C3]
--	--	------

36 孔转子

36 孔转子为红色。36 孔转子和 36 孔转子锁定环可以使用 0.2ml 管子。管子不需要使用光学透明管帽，因为 Rotor-Gene Q MDx 是从管子底部而不是从上部读取荧光。也可以使用有半球形管帽的管子。



72 孔转子

72 孔转子为蓝色。72 孔转子和 72 孔锁定环可使用 0.1ml 带状管和管帽，可用于低至 20 μ L 体积。管帽提供安全、可靠的密封。



Rotor-Disc 72 转子

Rotor-Disc 72 转子为深灰色。Rotor-Disc 72 转子和 Rotor-Disc 72 锁定环可以使用 Rotor-Disc 72。Rotor-Disc 72 是一个有 72 个孔供高通量使用的圆盘。为了密封 Rotor-Disc 72，在顶部应用聚合物薄膜并热封。薄膜应用简便并通过提供牢固、持久和防干扰密封防止污染。关于 Rotor-Disc 72 的更多信息，参见第 5.3 节。



Rotor-Disc 100 转子

Rotor-Disc 100 转子为金黄色。Rotor-Disc 100 转子和 Rotor-Disc 100 锁定环可以使用 Rotor-Disc 100。Rotor-Disc 100 是一个有 100 个孔供高通量使用的圆盘。Rotor-Disc 100 旋转等价于 96 孔板，但有额外 4 个参照孔，可以整合 Rotor-Gene Q MDx 和 96 孔实验室工作流程。额外的孔可以方便用于更多样本、额外的对照反应或定向反应，不占用任何标准 96 孔位置。对于无缝 96 孔工作流程兼容性，Rotor-Disc 100 孔使用 96 孔板标注标准，即 A1 - A12 直至 H1 - H12。额外 4 个参照孔标记为 R1-R4。关于 Rotor-Disc 100 的更多信息，参见第 5.3 节。



转子质量标准

转子类型	孔的容量	样本数量	管子类型	推荐反应体积
36 孔转子	200 μ l	36	PCR 管, 0.2ml15 - 50 μ l	20–50 μ l
72 孔转子	100 μ l	72	带状管和管 帽, 0.1 ml	20–50 μ l
Rotor-Disc 72 转子	100 μ l	72	Rotor-Disc 72	20–25 μ l
Rotor-Disc 100 转子	30 μ l	100	Rotor-Disc 100	15–20 μ l

注意：由于光学校直不兼容，Rotor-Gene 3000 不能使用 Rotor-Gene Q MDx 的 36 孔转子和 72 孔转子。请继续使用 Rotor-Gene 3000 老的 36 位转子和 72 位转子。

5.2 反应设置

重要：为确保结果稳定，每次运行时应有足够的控制。

可以使用上样模块 96 x 0.2ml 管子(用于 PCR 管, 0.2 ml)、上样模块 72 x 0.1 ml 管子 (用于带状管和管帽, 0.1 ml 配备单道移液器)、上样模块 72 x 0.1 ml 多道(用于带状管和管帽, 0.1 ml 配备多道移液器)、Rotor-Disc 72 上样模块(用于 Rotor-Disc 72)、或 Rotor-Disc 100 上样模块(用于 Rotor-Disc 100)。所有模块均由铝制成并可预冷。

上样模块 72 x 0.1 ml 管子（如图）有 18 个带状管和多达 8 个 0.5ml 管子，可应用于准备母液（master mix），以及多达 16 个 0.2ml 管子，可应用于构建标准曲线。以下程序描述了使用 72 孔转子的反应设置。相同程序可用于使用 36 孔转子和适当配件的反应设置。

1. 将带状管放在上样模块中并分装反应液。



2. 将管帽稳当地盖在带状管上，并目视检查确认密封。



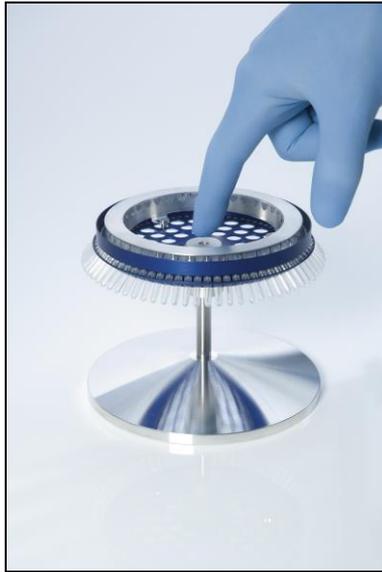
3. 将带状管插入 72 孔转子中，确保每管的朝向无误。

如果未正确放入转子中，样本将不能在检测系统中最佳排列。这将导致获得的荧光信号和检测灵敏度下降。随仪器提供了方便放置管子的转子支架。



重要：为了实现最大的温度均一性，转子的每个位置必须有一个管子。填补转子上的所有位置以确保每个管子气流均匀。保留一组可用的带管帽的空管子，可用于填充未使用的位置。

4. 通过将 3 个定位针推进转子外部缺口，从而将 72 孔转子锁定环插入 72 孔转子。
锁定环确保运行期间管帽留在管子上。



5. 使用转子中心的定位针将组件插入 Rotor-Gene Q MDx 仓室，放到位。若要取出，直接向下推转子中心以松开并拔出。



6. 盖上盖子，并用 Rotor-Gene Q 软件设置运行流程。

5.3 转盘设置

Rotor-Disc 72 或 Rotor-Disc 100 在高通量设计圆盘上分别有 72 或 100 个孔。Rotor-Disc 72 和 Rotor-Disc 100 不使用管帽，而使用转盘热封膜，热封膜应用到转盘顶部并用转盘热封机热封。薄膜通过提供牢固、持久和防干扰密封以预防污染。如下所述进行转盘热封。

重要：开始此操作前，请阅读随转盘热封机提供的产品资料。

1. 使用左手边后面的开关打开转盘热封机电源。
红色“Power(电源)”指示灯亮起。转盘热封机约需 10 分钟达到操作温度，这时绿色“Ready (准备就绪)”灯亮起。
2. 选择固定或可拆卸的密封件。

注意：转盘热封机准备就绪后，让它持续运转是安全的。

3. 使用转盘上的位置 1 标签和转盘上样模块上的管子导向孔把转盘插入转盘上样模块。
4. 通过手动移液或使用一种自动液体处理系统在转盘上设定反应。



5. 通过轻轻折叠膜一半，捏住中心部分，并小心撕下，从一张转盘热封膜取下中心部分。
6. 按“SIDE UP (此面朝上)”标签指示，将膜正确放置在转盘上。确保“SIDE UP (此面朝上)”标签位于转盘上样模块的底部。
膜上中心孔应容易在转盘上样模块的圆柱上滑动直至转盘顶部。



7. 使用转盘上样模块侧面的导轨将组件滑动至转盘热封机中。确保转盘上样模块全部推进去。



8. 要启动加封装置，首先按下热封机顶部的蓝色阳极条，然后向后推黑色按钮。



9. 加封装置降下时，橙色“Sealing (密封)”灯亮起。如果转盘上样模块不在正确位置，会响起告警提示音。

10. 完成加封时，会持续响起提示音并且橙色“Sealing (加封)”指示灯开始闪烁。按下蓝色阳极条，升起并释放加封装置返回原位置。

重要：密封时间不能超过警报提示时间，否则转盘会变形。

注意：为警示您在意外情况下未能释放锁定装置，闪烁的橙色“Sealing (加封)”指示灯将会长亮，而持续响起的提示音将会间歇性发出声音。

11. 从转盘热封机滑出转盘上样模块。让薄膜冷却约 10 秒钟。向下按压去除多余的密封膜。请勿向上拉多余的膜。

12. 从转盘上样模块取出转盘。

13. 使用位置 1 定位标签作为正确定位指导，将转盘装入转子。

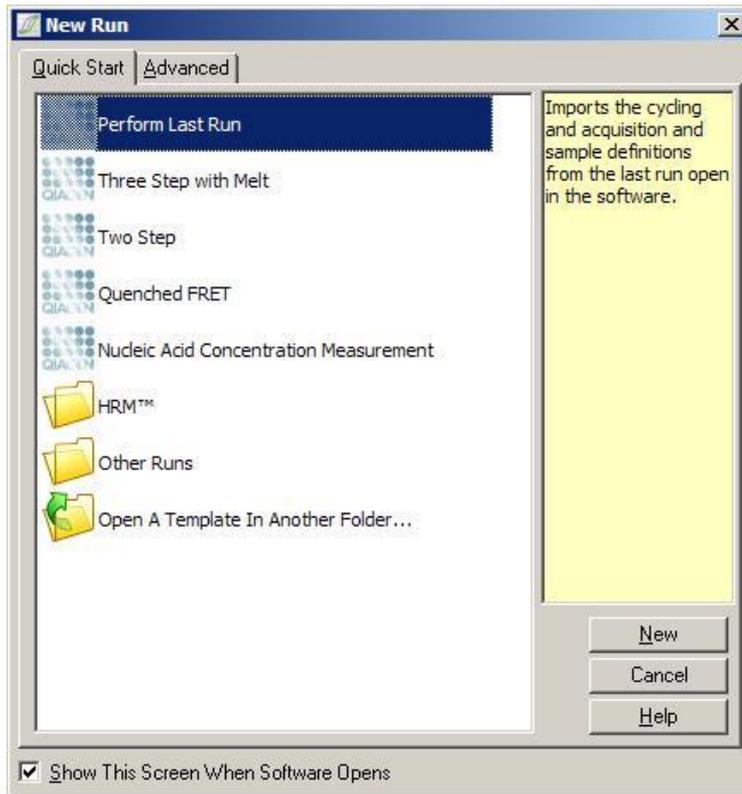
6 操作步骤—软件

可以使用软件启动时出现的快速启动向导或高级向导建立新运行。快速启动向导的设计是方便用户可以尽快运行软件。高级向导提供更多选项，例如增益优化配置和音量设置。为了方便使用，向导有很多带有默认循环条件和采集通道的模板。若要改变向导类型，在“New Run (新运行)”窗口的顶部选择合适的标签。

6.1 快速启动向导

快速启动向导可以使用户尽快开始运行。用户可以从一组常用模板中选择，并进入开始运行所需要的最小参数。快速启动向导假设的反应体积为 25 μl 。选择其他的反应体积，使用高级向导（见第 6.2 节）。

作为第一步，从“New Run (新运行)”窗口列表中双击模板选择运行所需要的模板。



进行上次运行： “Perform Last Run (进行上次运行)” 使用软件中打开的上次运行的循环、采集和样本定义。

包括熔解的三步： 这是一个三步循环流程和通过绿色通道进行数据采集得到的熔解曲线。

两步： 这是一个通过绿色、黄色、橙色和红色通道进行数据采集的两步循环流程。

淬火 FRET： 这是一个三步循环流程和熔解曲线。与包含熔解的三步不同，数据采集在退火步骤结束时进行。

核酸浓度测量： 这是利用嵌入染料测量核酸浓度的默认模板。

HRM: 此文件夹包含高分辨率熔解流程。

其他运行: 此文件夹包含其他流程。

可以使用向导对所有模板中循环和采集流程进行更改。

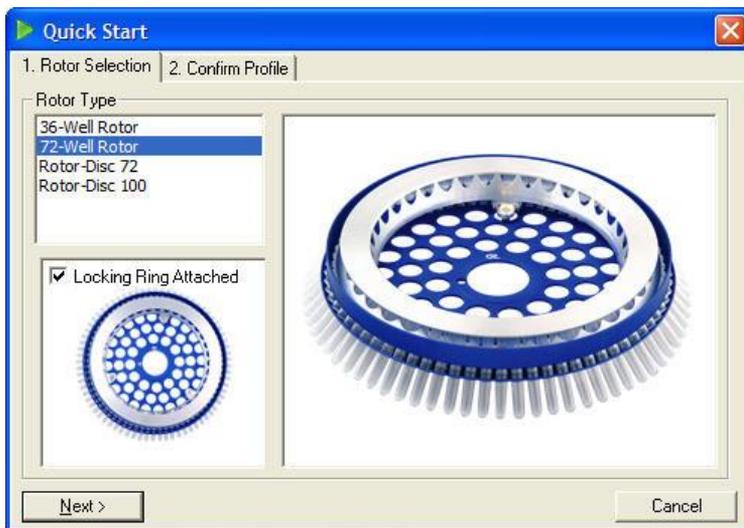
注意: 用户定义的模板可以通过复制或保存*.ret 文件到 **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates** 添加到快速启动向导的模板列表中。文件复制到此路径之后, 模板就会以图标的形式出现在列表中。如果想为您的模板定制图标, 创建一个与模板有相同的文件名的*.ico 图标。

子文件夹可以创建到组相关模板。这样可以对模板进行管理, 使用起来更方便, 例如如果几个用户在使用相同的仪器。

6.1.1 转子选择

在下面的窗口中, 从列表中选择转子的类型。

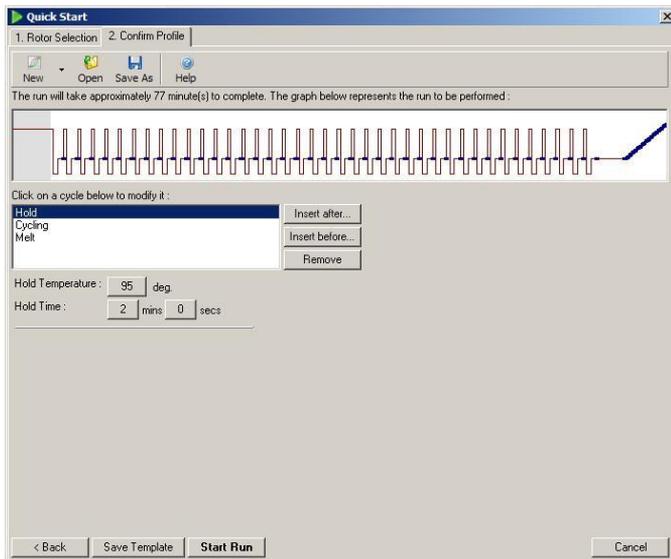
选中“Locking Ring Attached (附上锁定环)”复选框, 然后点击“Next (下一步)”。



6.1.2 确认流程

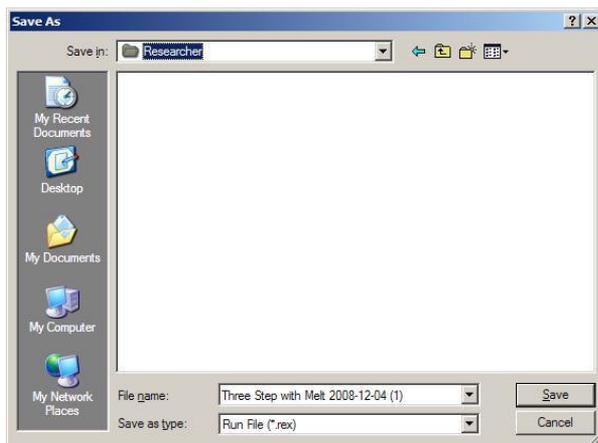
输入所选模板的循环条件和采集通道。这些可以通过“Edit Profile (编辑流程)”窗口进行更改（见第 6.2.4 节）。

若要开始运行，点击“Start Run (开始运行)”按钮。可以在运行开始前点击“Save Template (保存模板)”来保存模板。



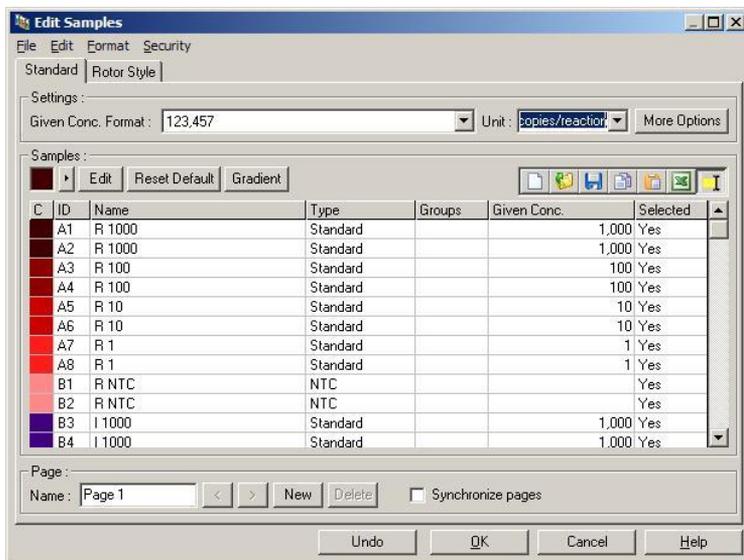
6.1.3 保存运行

点击“Start Run (开始运行)”按钮后，出现“Save As (另存为)”窗口。运行可以保存在用户的预定位置。运行的文件名包括使用的模板和运行日期。序列号（1，2 等）也包括在文件名中，从而实现自动命名同一天使用相同模板的多次运行。



6.1.4 样本设置

一旦运行开始，“Edit Samples (编辑样本)”窗口可以对样本进行定义和描述。

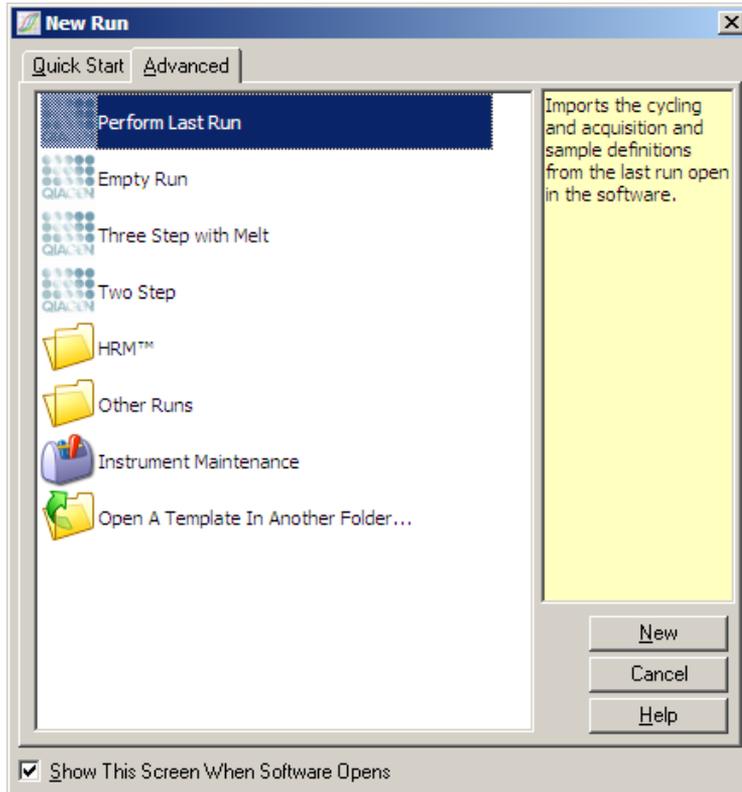


“Edit Samples (编辑样本)”窗口在运行开始后出现，因此用户可以利用此时间输入样本名称。关于在“Edit Samples (编辑样本)”窗口中建立样本定义的更多信息，参见第 7.8.4 节。

6.2 高级向导

高级向导可以使用快速启动向导中不可用的选项，例如增益优化配置和音量设置。

若要使用高级向导，从“New Run (新运行)”窗口的“Advanced(高级)”标签下的列表中双击模板名称选择模板。



此窗口中给出的模板选项与使用快速启动向导时给出的模板相似（第 6.1 节）。

进行上次运行：“Perform Last Run (进行上次运行)”导入软件中打开的上次运行的循环、采集和样本定义。

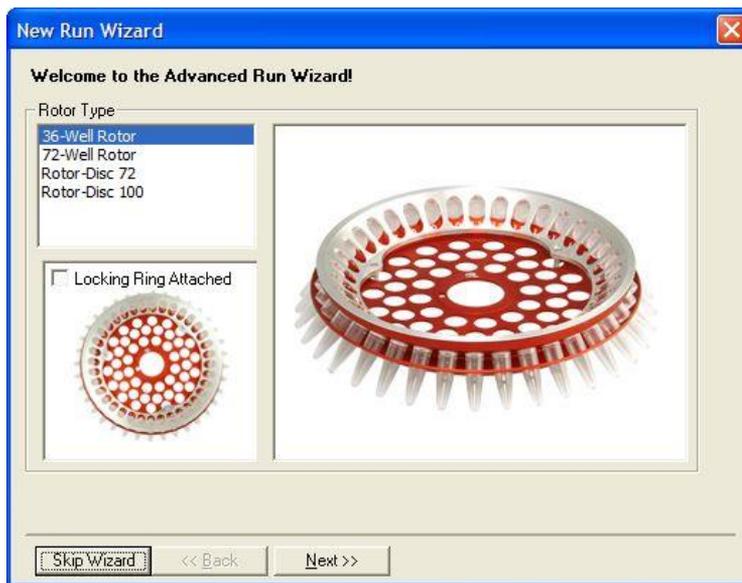
空白运行:	这是一次空白运行，用户可以定义流程的所有参数。
包括熔解的三步:	这是一个三步循环流程和通过绿色通道进行数据采集得到的熔解曲线。
两步:	这是一个两步循环流程，仅绿色通道进行数据采集（为了加速运行）。
HRM:	此文件夹包括两个高分辨率熔解流程。
其他运行	此文件夹包括其他流程。
仪器保养:	这里包括光学温度验证（OTV）期间使用的模板。更多信息，参见章节 10。此模板被锁定从而保证流程始终正确地运转。

注意：用户定义的模板可以通过复制或保存*.ret 文件到 **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates** 添加到模板列表。文件复制到此路径之后，模板将会以图标的形式出现在列表中。

6.2.1 新运行向导窗口 1

在下面的窗口中，从列表选择转子类型。

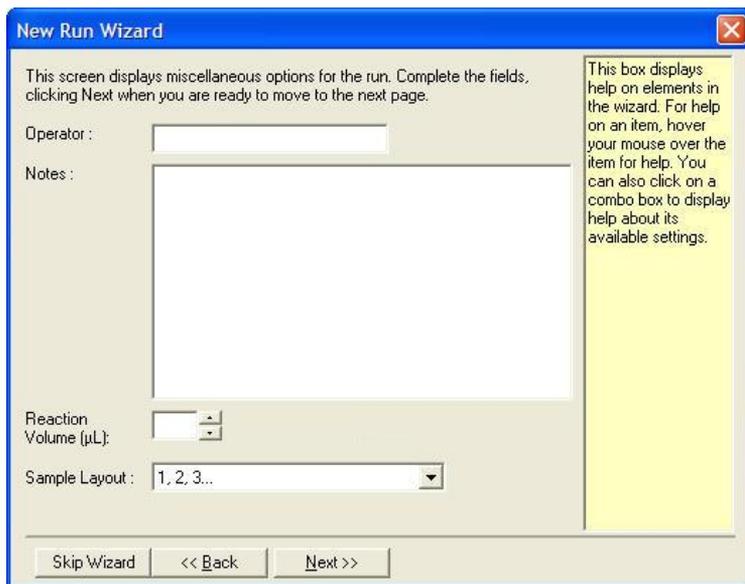
选中“Locking Ring Attached (附上锁定环)”复选框，并点击“Next (下一步)”继续。



6.2.2 新运行向导窗口 2

下一个窗口中，可以输入用户姓名和关于运行的注意。还必须输入反应体积。

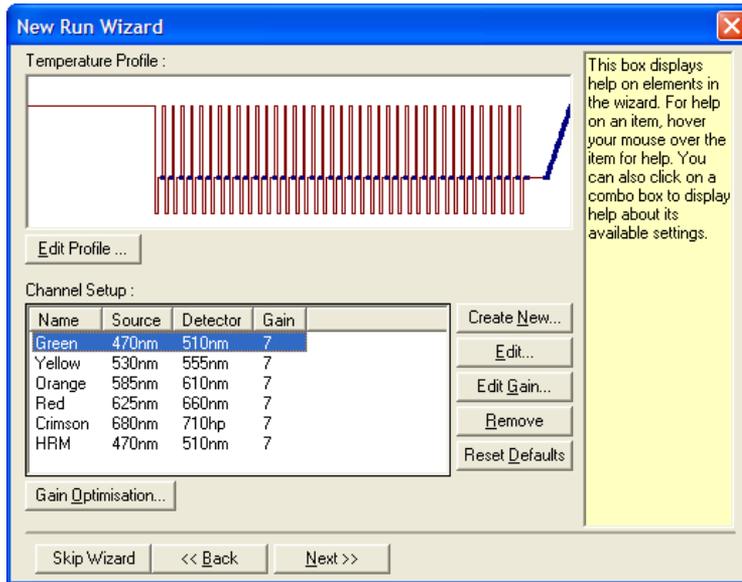
如果窗口 1 中选择了 72 孔转子，下拉菜单中有 3 个 Sample Layout (样本布局) 选项可用，“1, 2, 3...” 是默认选项，大多数用户选择此选项。使用 8 通道移液器将样本装载到邻近的 0.1ml 带状管时，应该选择“1A,1B,1C...” 选项。如果适用，可以选择“A1, A2, A3...” 布局。



6.2.3 新运行向导窗口 3

此窗口中，可以修改“Temperature Profile (温度流程)”和“Channel Setup (通道设置)”。如果点击“Edit Profile (编辑流程)...”按钮，“Edit Profile (编辑流程)”窗口出现，可以修改循环条件并选择采集通道（见第 6.2.4 节）。

建立流程之后，点击“Gain Optimisation (增益优化)...”按钮，使“Gain Optimisation (增益优化)”窗口出现（见第错误!未定义书签。页）。



6.2.4 编辑流程

“Edit Profile (编辑流程)”窗口可以规定循环条件和采集通道。最初的流程显示是根据建立运行时选择的模板（见 6-1 页）。流程以图解的形式显示。流程的各部分列表出现在图形显示的下面。列表可以包括保温（第 6-10 页）、循环(第 6-12 页), 熔解(第 6-15 页)或 HRM，如果仪器有 HRM 通道(第 6-16 页)。

可以点击图形显示的适用区域或列表中的名字然后在弹出的窗口中更改设置，对流程的每个阶段进行编辑。

之后插入...: 这项可以在选择的循环之后添加新循环。

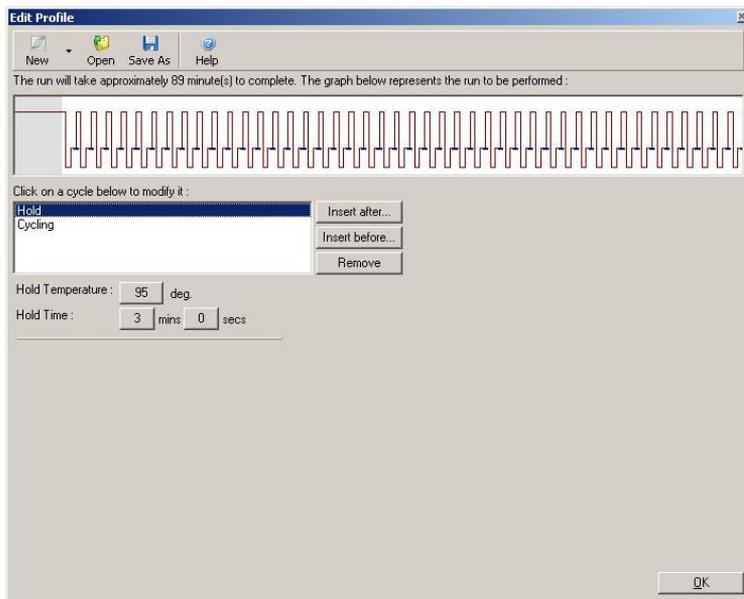
之前插入...: 这项可以在选择的循环之前添加新循环。

删除: 这项可以从流程中删除选择的循环。

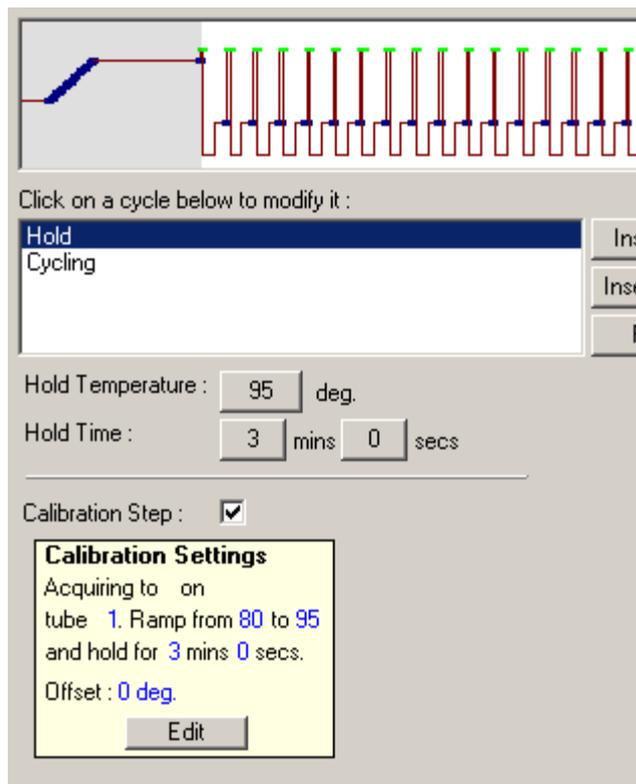
保温

保温命令使 Rotor-Gene Q MDx 在设定时间内保持指定的温度。若要改变温度，点击“Hold Temperature (保温)”按钮

并输入温度或使用滑动条选择预定温度。若要改变保温时间，点击“Hold Time(保温时间)”、“mins (分钟)”和“secs (秒)”按钮。



如果运行光学变性循环，可以选中一个保温步骤以将其作为校正步骤。这样可以在运行该步骤之前先运行一个校正熔解。在默认条件下，这一步被设置在反应中的第一个保温步骤中。但是，如果要求可以更改。



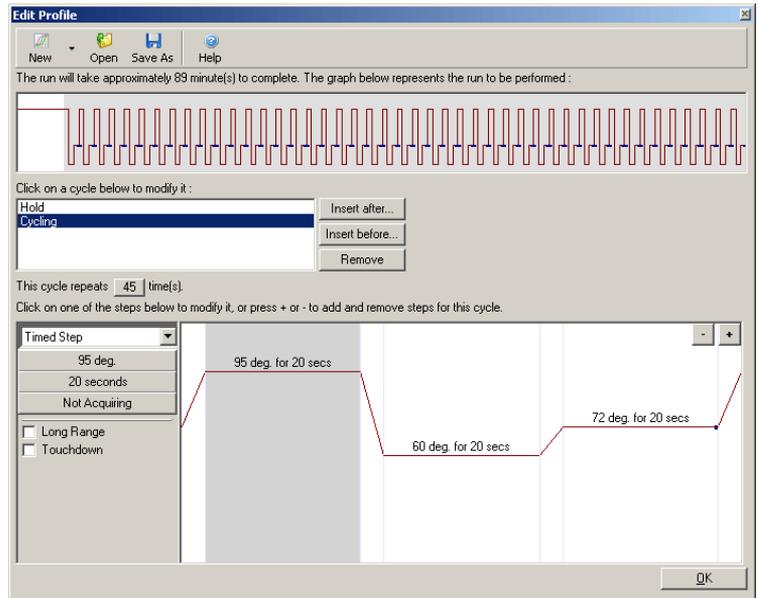
关于光学变性循环的更多信息见 6-12 页。

循环

循环以规定的次数重复用户定义的温度和时间步骤。使用“**This cycle repeats X time(s)** (此循环重复 X 次)”按钮来设定循环次数。

单次循环以图形的形式显示（如下面屏幕截图所示）。可以更改循环的每一步骤。温度可以通过上下拖动温度指示线进行修改。保温的时间可以通过拖动温度的左右边界进行修改，或者点击图形左侧的温度和时间按钮，进行修改。

各步骤可以通过右侧的“-”和“+”键进行添加或删除。



长期：选中此框增加选择的步骤的保温时间，每增加一个新循环增加 1 秒钟。

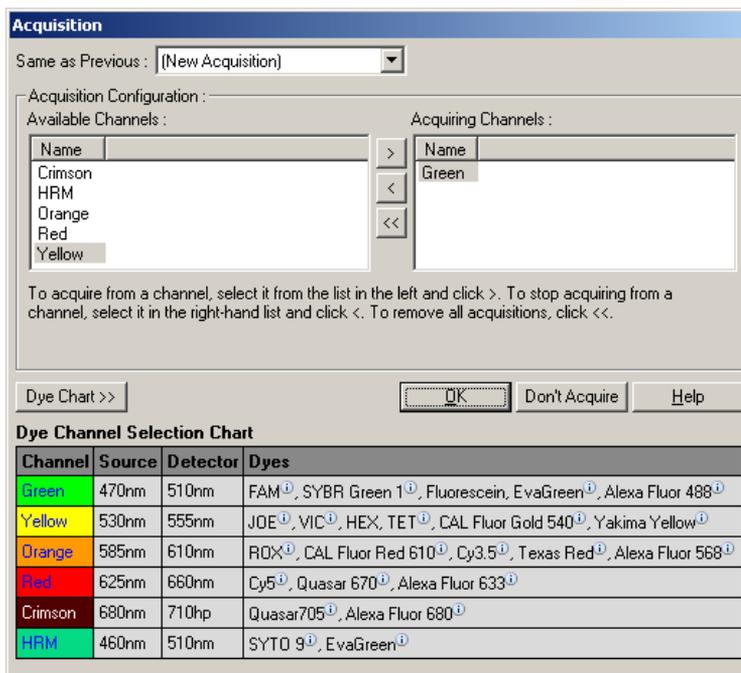
降低：选中此框从规定的最初的循环数以规定的度数逐步降低温度。然后在图示中显示温度降低。

采集

可以在任一循环步骤的任一通道采集数据。设置采集数据的通道，点击“Not Acquiring (不采集)”按钮（如果在此步骤已经设置了采集通道，采集通道会在此位置显示）。



点击“Not Acquiring (不采集)”按钮，弹出“Acquisition (采集)”窗口。



若要选择采集通道，选择通道并利用 > 按钮将其从“Available Channels (可用通道)”列表移动到“Acquiring Channels (采集通道)”列表。若要从“Acquiring Channels

(采集通道)”列表中删除通道，使用 < 按钮。按钮 << 可以从 “Acquiring Channels (采集通道)” 列表中删除所有通道。点击 “Don’ t Acquire (禁止采集)” 按钮也可以从程序中删除所有采集。

如果流程中包括一个以上的循环序列，采集的数据可以追加到从以前循环获得的数据中。使用 “Same as Previous (同前)” 下拉菜单选择追加数据的循环步骤。

染料通道选择表用于帮助用户决定适用于其预期用途染料的通道。表格中给出的染料是常用染料，并不代表仪器的限制。

上面描述的采集选项也应用于 “Melt (熔解)” 步骤，只是后者不能通过 “Same as Previous (同前)” 菜单追加采集数据。

熔解和杂交

熔解是从较低温度到较高温度两个温度之间的斜坡。允许的温度范围为 35 - 99°C。

建立熔解，需要设定一个起始温度、终止温度、温度增量、温度升高前第一个采集温度的保持时间、每个温度点的保持时间以及采集通道。

两个温度之间会产生一个坡度，如果起始温度高于终止温度，步骤的名称将会改为 “Hybridisation (杂交)”。以下屏幕截图中所示 “Acquiring To (采集到)” 选项设置为熔解 A，可以点击修改。“Acquiring (采集)” 窗口将出现并且可以选择通道。

Ramp from 50 degrees to 90 degrees.

Rising by 1 degree(s) each step.

Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step.

Wait for 5 seconds for each step afterwards.

Acquire to Melt A on Green

运行标准熔解时，温度的增量为 1°C，每次采集前先等待 5 秒钟。可以配置 Rotor-Gene Q MDx 进行 0.02°C 增量的熔解。温度步骤变化之间最小的保温时间取决于每个步骤之间的度数。

高分辨率熔解曲线

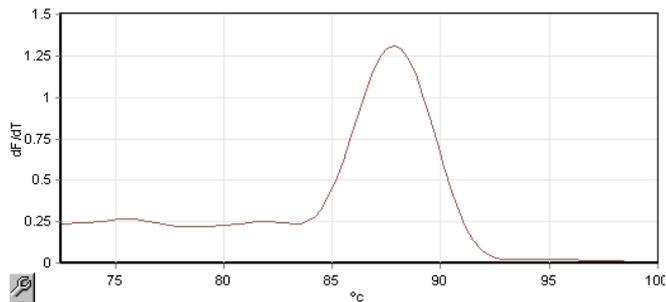
高分辨率熔解曲线（HRM）分析根据 DNA 的解离（熔解）行为对双链 DNA 样本进行描绘，与传统熔解曲线分析相似，但是为更广泛的应用提供了更多的信息。可以根据 DNA 序列、长度、GC 含量或链的互补性以至单个碱基对的变化区分样本。

只有在安装了 HRM 硬件和软件的仪器上才能进行 HRM 分析。利用专门的 HRM 来源和检测器获得数据。HRM 分析还包括熔解开始前的增益优化选项。HRM 完成后，可以用 HRM 分析软件对数据进行分析（章节 11）。

光学变性循环

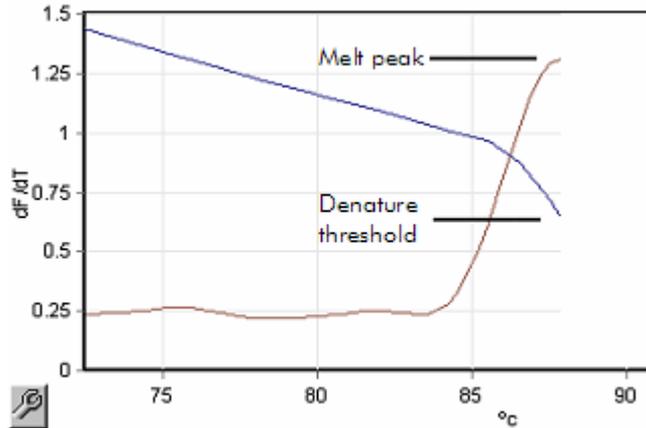
光学变性循环是 Rotor-Gene Q MDx 上使用的一种令人兴奋的技术，可以进行实时熔解分析，测定参考样本的熔解峰值。此技术能够以比设定特定变性温度维持一段保温时间更高的精密度说明 PCR 产物的变性。要进行此技术，仅需要把 PCR 产物的参照管放到转子的位置 1 中。参照管还必须包含能够进行链解离检测的检测化学品。

默认情况下，加热到初始的变性温度时，通过绿色通道从 80°C 升温到 95°C 进行熔解。用户可以调整初始熔解参数。从此数据生成熔解曲线并自动进行分析。



熔解峰与原始数据对比可获得变性阈值。每一步光学变性时，仪器都快速升温并连续采集数据。当参照管到达了变性阈值的荧光水平时，机器立即降温进入退火步骤。在循环时出现的峰并不被计算在内，只有荧光阈值才被作为熔解峰的参考及用于确定变性阈值。

在下面图形中，原始的荧光读数结果和一阶导数重叠了。这里显示了变性阈值与校准期间获得的熔解峰之间的一致性。



运行一个光学变性循环，您需要：

- 在转子的位置 1 放置一个已经扩增好的 PCR 产物。这一样本应该包含与您的扩增片段一致的 PCR 产物和用于监测 PCR 产物分离的检测化学品。
- 一个光学变性流程。您可以创建一个新流程或对已有流程进行编辑（详情就如下）。

光学变性循环与其他循环几乎是相同的。主要的区别就是流程开始自动添加熔解步骤，并且循环步骤中会看见锐利的变性曲线步骤。由于在每个循环中产物的分离都受到监测，因此无需在光学变性循环中设置保温时间。

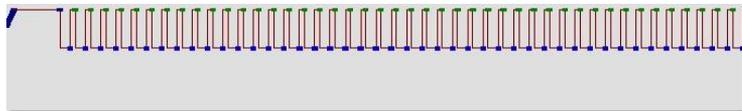
要使用这一技术，必需确定与运行相关的以下信息：

- 初始的变性温度。这个温度与标准循环流程中设置的变性步骤温度相同。
- PCR 样本的管子位置，此样本将会在绿色通道上产生熔解曲线。
- 必须定义一个光学变性循环流程。

按以下方法创建一个新的光学变性循环。

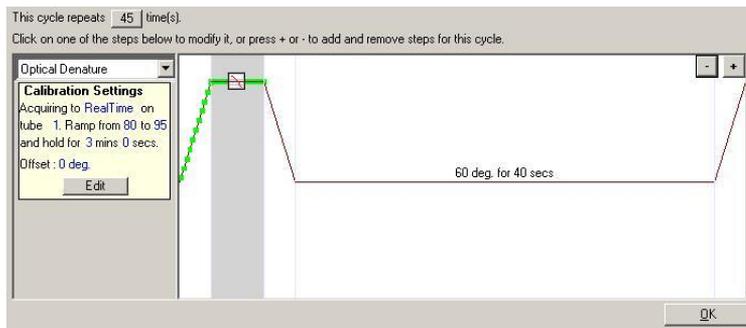
1. 打开“Edit Profile (编辑流程)”窗口，然后点击“New (新建)”，在弹出的窗口中点击“insert after (之后插入)”按钮并从菜单中选择“New Cycling (新循环)”。在图形上点击选择一个温度步骤。在下拉菜单中从“Timed Step

(定时步骤)”更改为“Optical Denature (光学变性)”。将出现包含变性步骤和一个光学变性循环步骤的默认流程。

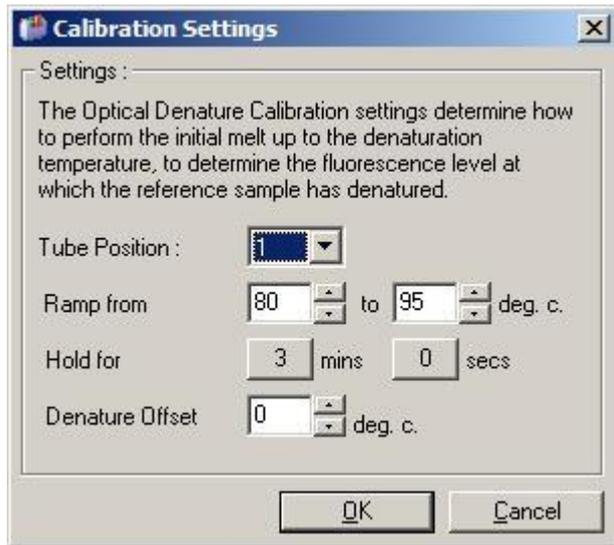


运行一开始的倾斜区域代表校准过程。绿色的点代表加热期间每次循环的采集。蓝色的点代表 60°C 退火结束时的采集。注意，虽然图示显示每一个循环都在相同的变性温度，但事实并非如此。如果在运行结束，样本需要较长的熔解时间，则光学变性过程将根据荧光数据延长直至熔解，而并非根据时间。因此，每个循环的光学变性温度线可能不同。

2. 点击带有光学变性信号图示的第一半。屏幕左侧出现“Calibration Settings (校准设定)”信息。



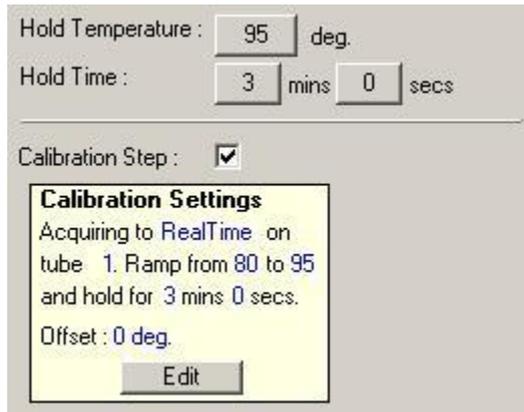
3. “Calibration Settings (校准设定)”信息通常都是正确的，如果需要修改，点击“Edit (编辑)”。 “Calibration Settings (校准设定)”窗口出现。



4. 保证以下几点:

- “Tube Position (管子位置)”中显示的管子必须包含PCR产物，它将会在绿色通道上产生熔解峰。
- 最终斜坡温度不会烧毁样本，但是也足够使样本熔解。
- 保温时间足够使样本变性。
- 变性偏移量设置正确。默认的0°C适用于大多数熔解。伴随非常锐利转变的熔解可能需要 - 0.5°C 到 - 2°C的变性偏移量（用户测定的数值）才能确保检测到熔解转变。

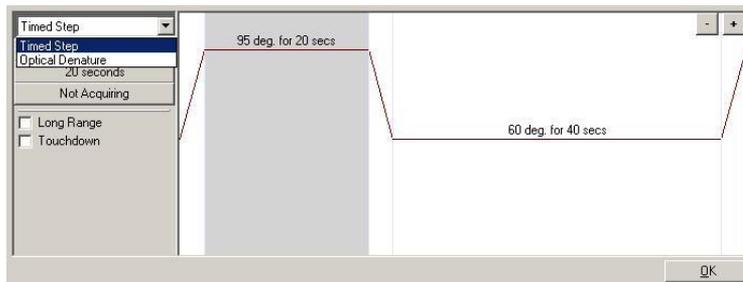
你还可以通过插入一个新的保温步骤来确定变性步骤。点击“Insert before (之前插入)”，然后从菜单选择“New Hold at Temperature (温度的新保温时间)”。将出现校准设定。



校准设定与变性设定是同步的，因此更改变性步骤中的保温时间将会自动更新校准保温时间。这是因为光学变性循环中，校准过程和变性作用是相等的。

改变已有的步骤以使用光学变性循环

要改变一个循环程序中已有的变性步骤，在“Edit Profile (编辑流程)”窗口的列表中选择循环。然后在显示中点击选择变性步骤。



在下拉菜单中点击并选择“Optical Denature (光学变性)”。原有的温度和保温时间被删除，并显示“Optical Denature (光学变性)”图标。

增益优化

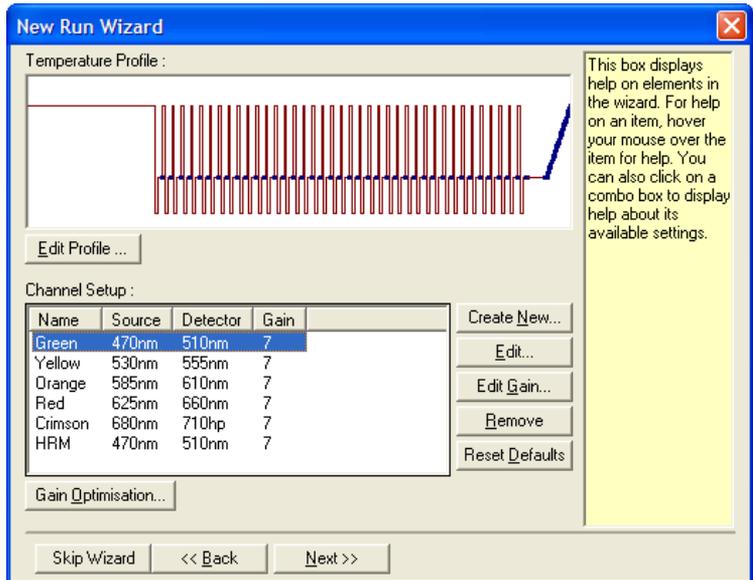
建立一个新运行，使用“Gain Optimisation (增益优化)”功能是非常有帮助的。你可以通过它优化增益设置，从而可以在设定的温度（通常为开始数据采集的温度）提供每个采集通道中的起始荧光预定范围。增益优化的目的是保证所有数

据在检测器的动态范围内收集。如果增益值太低，信号就会在背景噪音中丢失。如果增益值太高，所有信号将会丢失至范围外（变性的范围）。

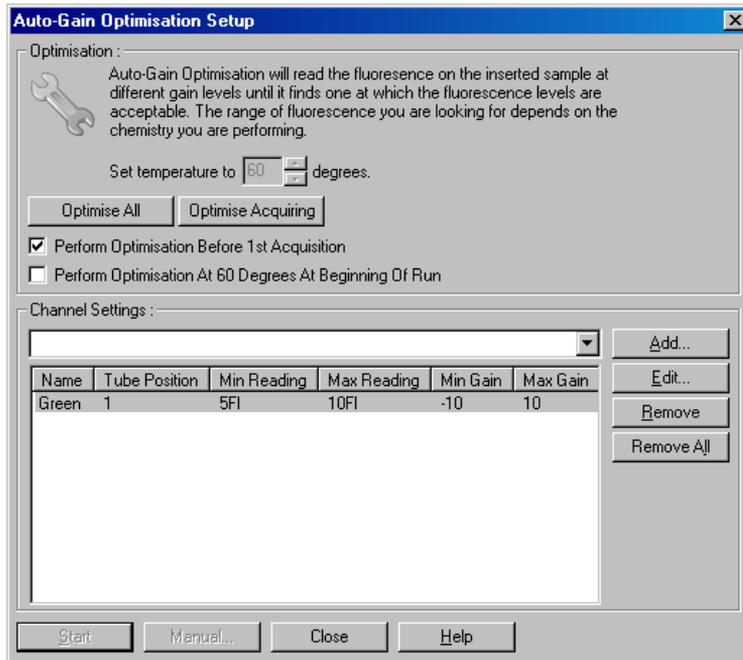
每个通道的增益值范围为-10—10。其中-10=最不灵敏，10=最灵敏。

第一次进行反应时，我们建议准备包含所有反应组分的供试样本。把供试样本放到 Rotor-Gene Q MDx 中并使用增益优化检测最佳增益设定值。如果通过增益优化选择增益值导致信号较弱，那么“Target Sample Range (目标样本范围)”就应该增加。如果导致信号饱和，那么“Target Sample Range (目标样本范围)”就应该减小。

要进行增益优化，在新运行向导窗口 3 中点击“Gain Optimisation (增益优化)…”按钮（见第 6.2.3 节）。



出现“Auto-Gain Optimisation Setup (自动增益优化设置)”窗口。此窗口可以通过自动调整增益设置进行优化，直至所有选中通道的读数都在特定阈值范围内或低于特定阈值。

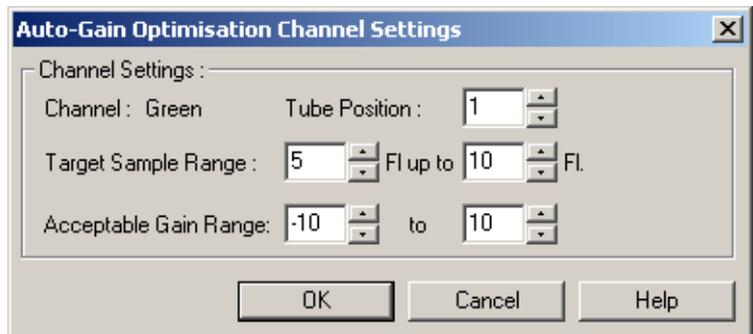


温度设定到： 读数前，Rotor-Gene Q MDx 将会升温或降温来匹配规定的温度。默认时，温度设定为采集温度。

优化所有/优化采集： “Optimise All (优化所有)” 将会尝试优化软件上的所有通道。“Optimise Acquiring (优化采集)” 将会仅优化规定的运行中（循环和熔解）热流程中使用的通道。

第一次采集前进行优化： 选中此框在开始数据采集的一个循环时进行增益优化。建议用于自动增益优化。

- 在运行开始的[x] 选中此框在运行开始前进行增益优化。
度进行优化: Rotor-Gene Q MDx 升温到规定的温度, 进行增益优化, 然后开始第一步骤 (通常为一个变性步骤) 的循环。如果运行期间的增益优化会导致初始步骤占用时间太长, 可以选择此选项。通常推荐 “Perform Optimisation Before 1st Acquisition (第一次采集前进行优化)”, 因为进行的增益优化尽可能地接近运行条件。
- 通道设置: 此下拉菜单允许添加通道。选择需要的通道并点击 “添加”。
- 编辑…: 这里打开了一个可以设定 “Target Sample Range (目标样本范围)” 的窗口。“Target Sample Range (目标样本范围)” 是初始荧光的范围, 应该是为规定的管子中的样本设定的。自动增益优化使用 “Acceptable Gain Range (可接受的增益范围)” 规定的范围内的增益设定进行每个通道的读数。它选择 “Target Sample Range (目标样本范围)” 内能够产生荧光读数的第一个增益设定。在给出的举例中, 自动增益优化寻找在 -10—10 之间能够产生管子 1 中 5 和 10FI 读数的增益设定。总体来说, 对于嵌入染料, 1—3FI 的 “Target Sample Range (目标样本范围)” 比较合适, 而对于探针染料 5—10FI 的范围更合适。

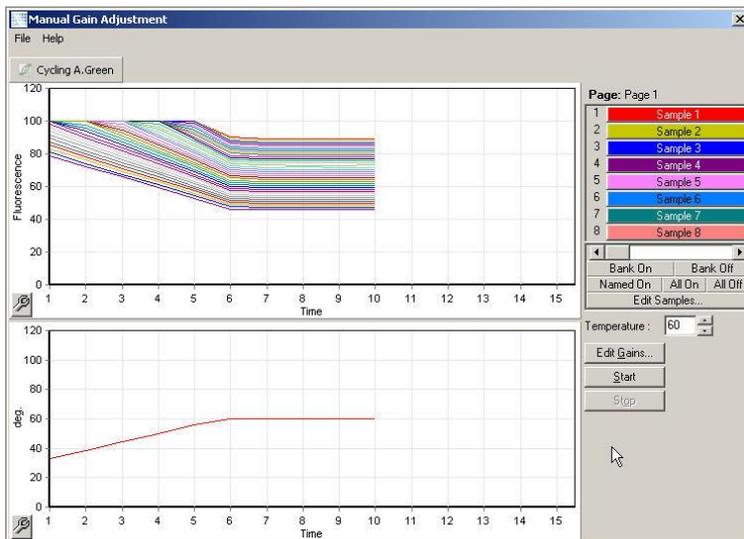


- 删除/全部删除: “Remove (删除)” 删除突出显示的通道。
“Remove All (全部删除)” 删除所有通道。
- 开始: “Start (开始)” 开始增益优化。选择在规定范围内产生荧光信号水平的增益值。如果荧光在规定范围外, 设置产生最接近匹配可能的增益值。
- 手动: 打开 “Manual Gain Adjustment (手动增益调整)” 窗口 (见 6-24 页)
- 运行期间更改增益值: 如果运行开始时, 增益值太高或太低, 可以在前 10 个循环中更改。增益值更改的位置会出现一条垂直线。更改前的循环不包括在分析内。

注意: 增益优化可能选择不在规定范围内的设定值。这可能是由于第一个保温步骤后荧光的变化。然而, 增益优化结果是运行开始的荧光水平的很好说明。

手动增益调整

要进行 “Manual Gain Adjustment (手动增益调整)”, 在 “Auto-Gain Optimisation Setup (自动增益优化设置)” 窗口中点击 “Manual (手动) …”。 “Manual Gain Adjustment (手动增益调整)” 窗口出现。此窗口显示任何实时温度下的荧光读数。当样本背景未知时使用此项, 因此设定的增益值确保样本信号足以检测到。



默认时，所有样本都会出现在显示中。可以使用右侧的切换器从显示中删除或添加样本。切换器由带颜色的单元格组成，每个对应一个显示中的样本。颜色鲜明的单元格的样本显示，褪色单元格的样本不显示。可以通过点击单元格或在几个单元格之间拖动鼠标指针打开或关闭样本。

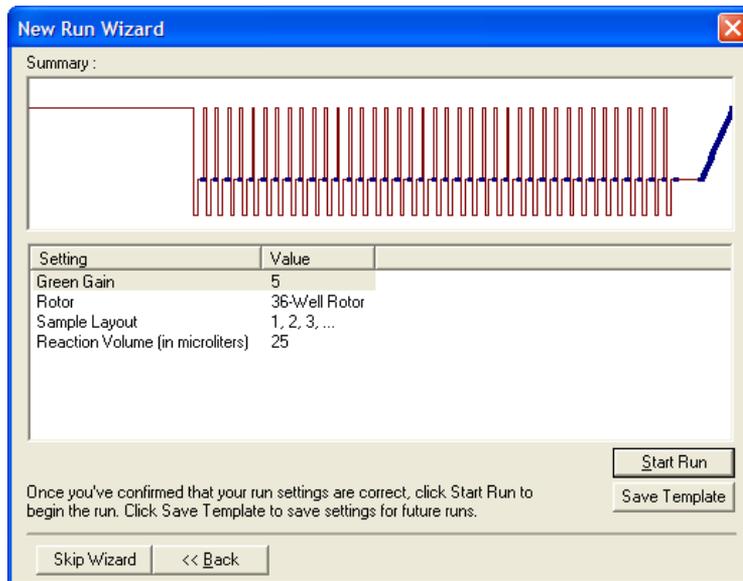
我们推荐按以下方法进行手动增益调整。

1. 在“Manual Gain Adjustment (手动增益调整)”窗口中调整温度到运行所需的采集温度。
注意：Rotor-Gene Q MDx 运行期间不能进行温度调整。
重启 Rotor-Gene Q MDx 应用对温度所做的更改。
2. 点击“Start (开始)”。运行开始。Rotor-Gene Q MDx 温度调整到窗口中规定的温度。窗口中的图表开始显示数据。
3. 等待温度稳定。
4. 记录终点荧光 (FI) 读数。
5. 如果 FI 读数不在要求的水平，点击“Edit Gains (编辑增益值) …”并按照所要求的进行编辑。此过程可能不是瞬时的，因为 Rotor-Gene Q MDx 需要花大概 4 秒来获得每个通道中的每个点，并且这个时间内用户界面是失活的。
6. 重复过程直至 FI 达到预定水平。
7. 点击“Stop (停止)”。如果“Stop (停止)”按钮点击后，程序仍然在获取数据，Rotor-Gene Q MDx 会首先完成数据采

集，然后再停止。对于每个采集通道，此过程可能需要维持 5 秒钟。

6.2.5 新运行向导窗口 4

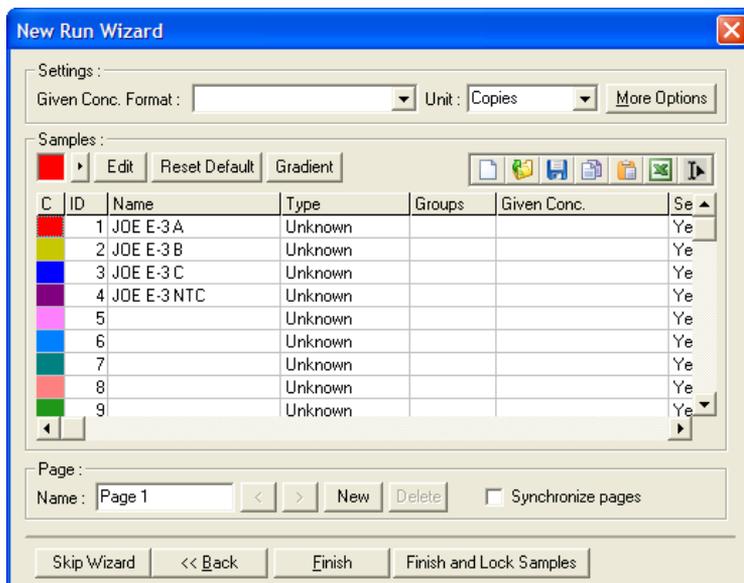
此窗口总结了此运行。检查参数，如果正确，点击“Start Run(开始运行)”。将会提示你给出文件名。你还可以使用“SaveTemplate (保存模板)”按钮保存运行设置作为一个模板用于将来的运行。



6.2.6 新运行向导窗口 5

运行进行时，在此窗口中输入样本类型和说明。此窗口的功能与“Edit Samples (编辑样本)”窗口的功能相同（第 7-63 页）也可以在运行结束后输入样本信息。

“Finish and Lock Sample button (完成并锁定样本按钮)”关闭屏幕并防止样本名称被更改。关于这个和其他安全功能的更多信息，参见安全性菜单（第 7-72 页）。



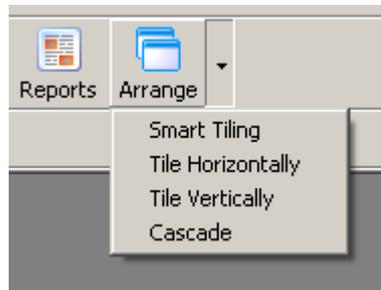
此页留空。

7 分析用户界面

此章节描述了 Rotor-Gene Q 软件的用户界面。

7.1 工作区

工作区就是主窗口的背景。在此区域可以打开原始数据图表和分析结果。如果同时打开几个窗口，可以点击工具栏上的“Arrange (排列)”按钮对窗口进行组织。有几个窗口排列选项可用，可以通过点击靠近“Arrange (排列)”按钮的向下键选择。



7.2 工具栏

这些按钮是常用操作的快捷键。这些操作也可以从下拉菜单中找到。



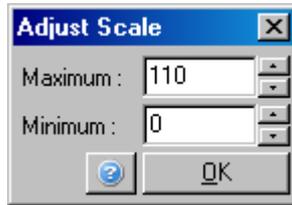
7.3 查看原始通道

点击这些按钮从运行中的特定通道查看原始（未分析的）数据。



查看此数据时，有很多选项可以改变数据外观。还可以转换原始数据以方便不同类型的分析。

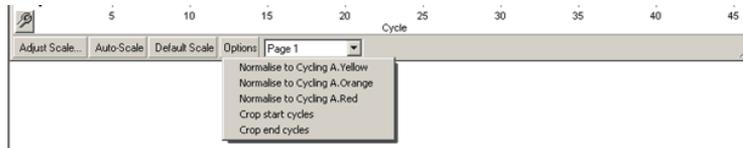
调整范围: 要选择“Adjust Scale (调整范围)”，在合适的窗口上点击鼠标右键。选择“Adjust Scale (调整范围)”将弹出可以规定范围的窗口。



自动定标: “Autoscale (自动定标)”尝试把范围设置成与数据的最大和最小读数相匹配。

默认范围: “Default Scale (默认范围)”把范围重设到显示 0-100 荧光单位的范围。

扳手/板手图标 更多信息参见第 8.5 节



选项: 此选项显示上述下拉菜单，提供原始数据转换的选项。

标准化至…: 此选项能够进行从另一通道中由被动参照染料（例如 ROX）获得的数据到扩增数据的准化。

剪切开始循环: 此选项可以创建一个新通道数据集，其中的一些启动循环已被删除。如果初始循环中观察到较大的跳跃（使用某些化学物质时可能出现），此选项是非常有帮助的。

剪切结束循环: 此选项可以创建一个新通道数据集，其中一些末期循环已被删除。

第一页： 此选项显示当前被选择用于显示原始数据图表的页。“Edit Sample (编辑样本)”窗口允许创建多个样本定义。例如，可以通过不同的线粗细、样本定义和其他显示选项查看数据。此选项是非常有用的，特别是在单通道中进行了相对定量时，因为用户可以通过定义 2 个样本页容易地在目的基因和看家样本间转换。

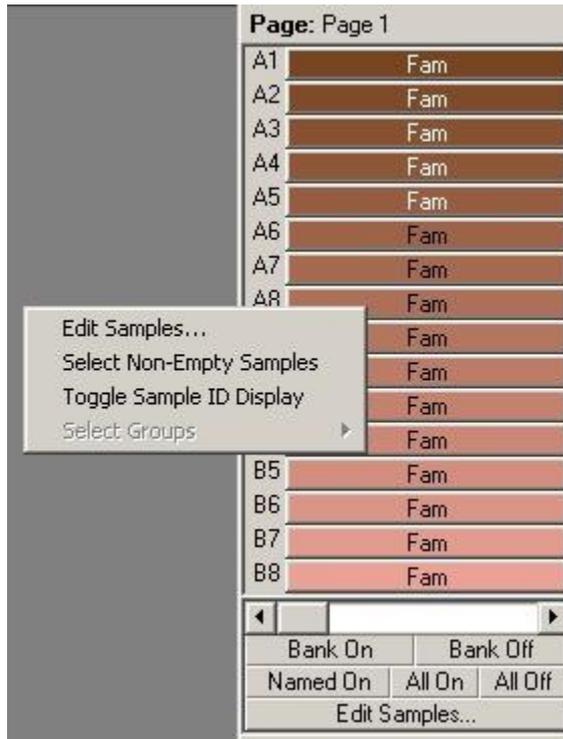
7.4 切换样本

主窗口的右边是一个包括样本图例的切换器，由带颜色的单元格组成，每个对应一个显示中的样本。切换器用于控制显示中可以看见的样本。颜色鲜明的单元格显示，褪色单元格的样本不显示。可以通过点击单元格或通过几个单元格之间拖动鼠标指针打开或关闭样本。“Bank On (库打开)”和“Bank Off(库关闭)”按钮分别隐藏或显示，目前所有样本都分别显示在列表中。可以使用滚动条显示下一组样本。

注意：显示的样本数量是动态的，并且取决于窗口中的可用空间。

点击“Named On (打开命名的样本)”仅显示已经给予名称的样本。这是一种仅显示相关样本的快捷方式。点击“All On (全部打开)”或“All Off (全部关闭)”分别显示或不显示转子中的所有样本。按下“Edit Samples (编辑样本)…”按钮，打开“EditSamples (编辑样本)”窗口，可以对样本名称、类型和标准浓度进行编辑（见第 7.8.4 节）。

下面给出了切换器。其他选项在切换器上点击鼠标右键后出现。



页： 切换器顶部的此标签说明显示的样本页。样本页允许对一个通道数据集进行各种独立分析。例如，你可以在绿色通道运行两个标准曲线并产生独立的报告。关于设置样本页的更多信息参见第 7.8.4 节

切换样本 ID 显示： 如果使用 72 孔转子，样本以 A1-A8、B1-B8 等格式显示。“Toggle Sample ID Display (切换样本 ID 显示)”选项允许用户切换到数字样本顺序（1-72）。

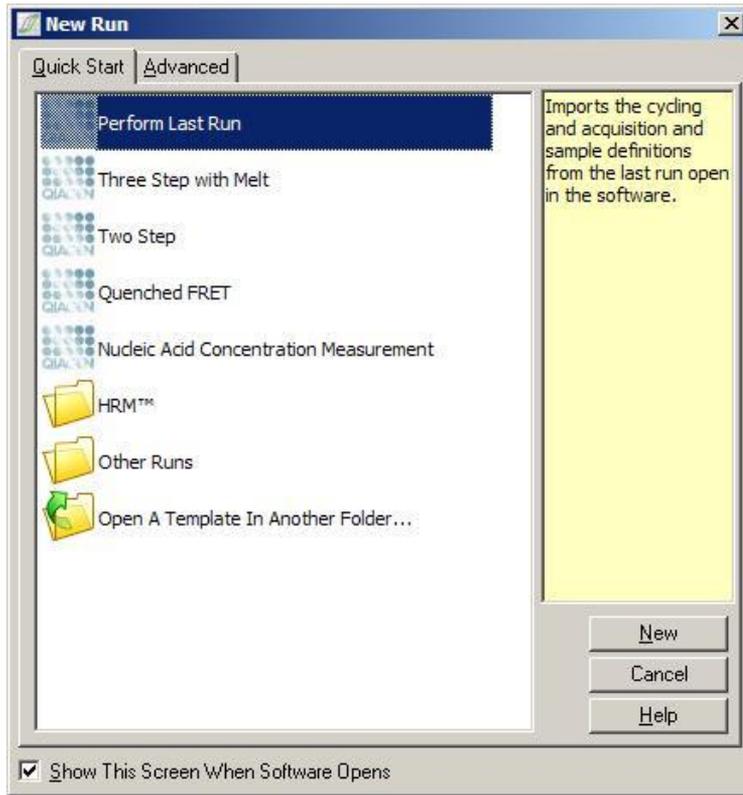
选择非空白样本： 此选项取消选择任何“Edit Samples (编辑样本)”窗口中“Type (类型)”规定为“None (无)”的样本。这样可以确保仅显示与分析相关的样本。

选择组: 如果定义了样本组，这一功能可以在样本组间切换样本的显示（打开/关闭）。组是任意选择的样本组合，这些样本能够给出高级统计结果报告。例如，可以定义处理的和未处理的患者样本组。可以在“**Edit Samples (编辑样本)**”窗口中建立样本组。

7.5 文件菜单

7.5.1 新建

选择“**File (文件)**”，然后选择“**New (新建)**”，出现“**New Run (新运行)**”窗口。此窗口提供“**Quik Start (快速启动)**”和“**Advanced(高级)**”标签下管理的常用模板。一旦选择了模板，向导就会指导你完成运行安装并允许进行设置和流程的修改。



关于提供的模板的信息，参见第 6.1 节和第 6.2 节。

新运行

新运行…: 此选项使用选择的模板开始运行安装。

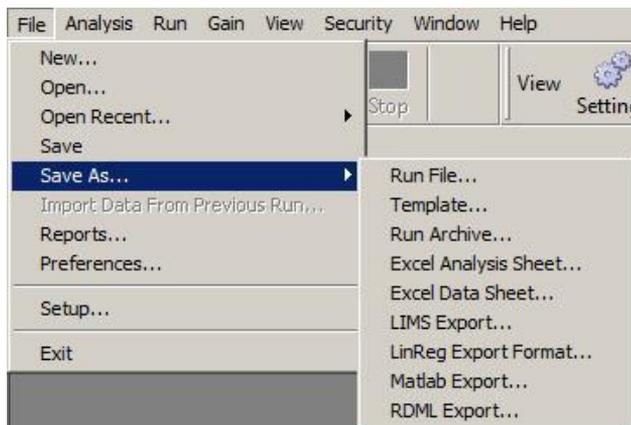
取消: 此选项关闭此窗口。

帮助: 此选项打开在线帮助。

软件打开时显示
此屏幕: 如果选中此框，软件开始时就会显示“New Run (新运行)”窗口

7.5.2 打开和保存

- 打开…: 此选项可以打开以前保存的 Rotor-Gene Q 运行文件 (*.rex) 或 Rotor-Gene Q 运行档案 (*.rea 文件)
- 打开最近的文件…: 此选项显示已经打开或保存的最后 4 个文件。
- 保存: 此选项保存对运行文件所做的任何更改



- 另存为…: 使用此功能保存不同格式的运行文件或数据。选项列表如下。
- 运行文件…: 此选项保存文件的复件。用户可以改变名称和保存位置。这是默认格式。
- 模板…: 此选项保存流程设置和相关设置，但是不保存运行数据。模板可应用于开始将来的运行。
- 运行档案…: 此选项以压缩文件格式保存。在 e-mail 前，以此格式保存文件。这样既可以减少发送文件所需的时间又可以确保文件不会被 e-mail 客户毁坏。
- LIMS 导出: 此选项根据用户的要求以 LIMS 兼容的格式保存分析。请联系 QIAGEN 技术服务获取更多信息。

Excel 数据表…: 此选项把所有原始通道导出到一个 Excel®表中。仅导出选择的样本。

Excel 分析表…: 此选项把目前运行中的所有分析导出到一个单独的 Excel 表中。

LinReg 导出格式…: 此选项把所有原始通道数据以 LinReg（一种有效的分析工具）能够读的格式导出。更多详情参见下文的“Exporting To LinReg (导出到 LinReg)”。

Matlab 导出…: 此选项把数据以科学软件包 Matlab（或其开放源等同品，Octave）能够读的格式导出。此选项可用于方法学研究。

RDML 导出: 此选项可以进行导出兼容 RDML v1.1 的文件。由此创建的 RDML 导出文件为 ZIP 压缩 XML 格式文件，文件扩展名为*.rdml，兼容 <http://www.rdml.org/files.php> 网站上提供的 RDML 模式文档 (http://www.rdml.org/RDML_v1_1_PR.xsd)。

导出到 LinReg

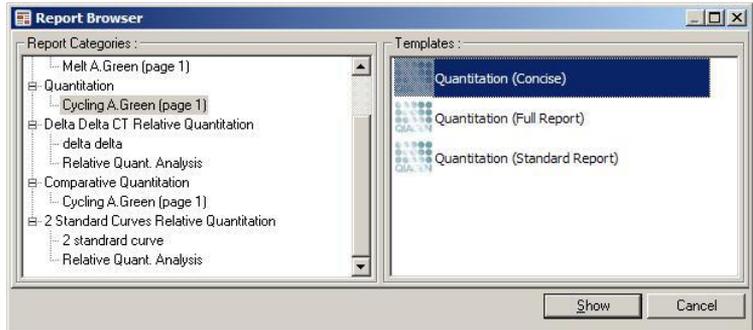
LinReg 是 C. Ramakers 和其同事*开发的一种工具。可来函索取 LinReg 工具(e-mail: bioinfo@amc.uva.nl; 主题: LinRegPCR)。

Rotor-Gene Q 软件允许用户把原始数据以能够被 LinReg 工具导入进行分析的格式导出。

1. 打开包含原始数据的 Rotor-Gene Q 运行文件。
2. 通过选择“Save As (另存为)…”，然后选择“LinReg ExportFormat (LinReg 导出格式)…”导出数据到 LinReg 导出格式。
3. Microsoft Excel 自动显示导出的原始数据。
4. 开始运行 LinReg 工具。
工具会要求你选择原始数据所在位置的单元格范围。工具一次仅能够分析一个原始通道，因此需要选择合适的 Excel 表区域。

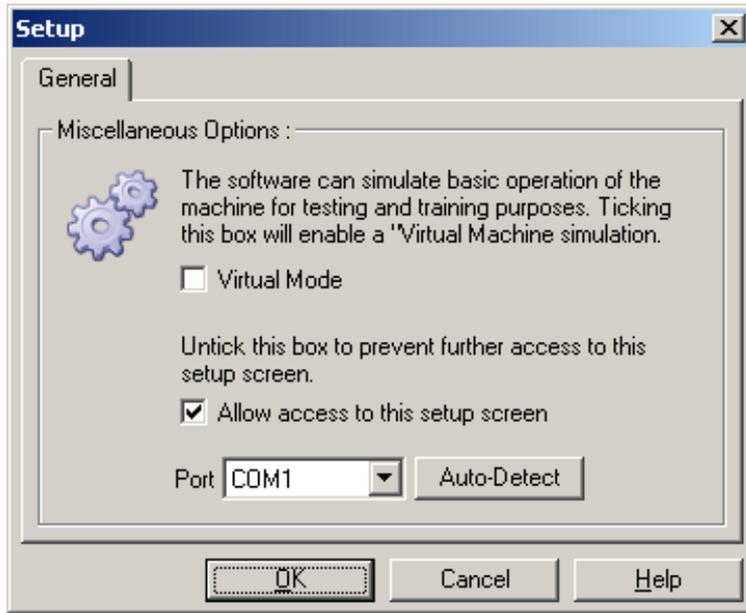
7.5.3 报告

选择“Reports (报告)”之后，弹出“Report Brower (报告浏览器)”窗口。如果数据已经分析，该分析的报告就会显示在“Report Brower (报告浏览器)”窗口中。几个报告类型提供了不同程度的详细信息。



7.5.4 设置

Rotor-Gene Q MDx 的最初设置应该在安装过程中完成。但是，如果安装完成后你想做改动，此选项允许你改变 Rotor-Gene Q MDx 连接设置。

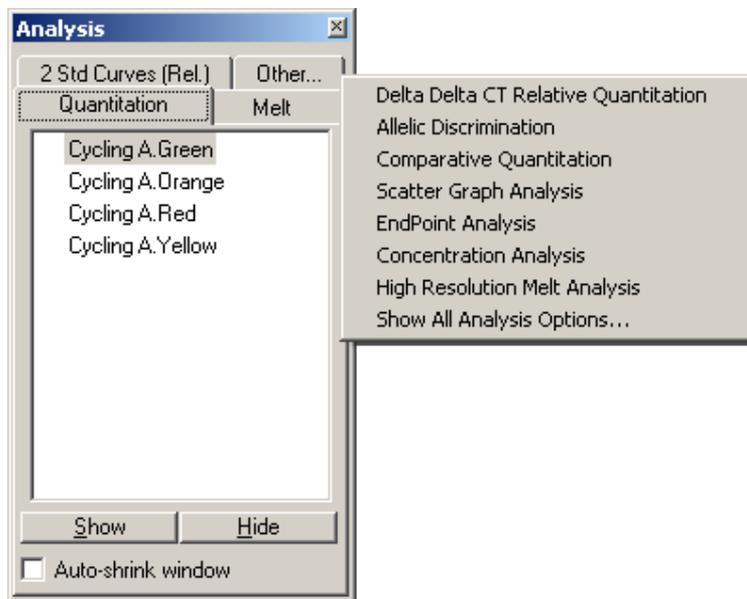


- 虚拟模式: 如果软件将在没有连接 Rotor-Gene Q MDx 的情况下使用, 选择此选项。软件具有所有功能。此模式对于目的验证, 数据分析和模板建立非常有帮助。
- 允许访问此设置屏幕: 如果安装过程中没有选中此选项, 就不能再访问此窗口。此安全措施防止用户更改设置。若要重新访问, 联系你的经销商。
- 端口: 选择正确的通信端口进行计算机和 Rotor-Gene Q MDx 之间的通信。
- 自动检测: 如果你不确定应该选择哪个端口, 点击“Auto-Detect (自动检测)”搜索所有可用的端口。

7.6 分析菜单

7.6.1 分析

点击“Analysis (分析)”，“Analysis (分析)”窗口弹出。此窗口可以创建新的分析并显示已有分析。利用标签选择分析方法。显示了可以使用选择的方法进行分析的一系列通道。相同通道中的多次分析运行可以单独进行分析，如果在“Edit Samples (编辑样本)”窗口中已将其设定为单独样本页。已经分析过的样本页在其附近有一个绿色的复选标记。这说明已经保存了此分析的阈值和标准化设置。要查看或分析一个通道，双击即可。具体的分析窗口就会出现。



自动缩小窗口： 选择“Auto-shrink window (自动缩小窗口)”，在窗口不使用时自动缩小。在窗口上移动光标再次扩大窗口。

规划工作区

每次开始一项新分析时，其窗口就会与屏幕上已有的窗口组合，实现最佳显示。如果显示的窗口很多，可能显得很繁杂。关掉不需要的窗口，然后点击工具栏上的“Arrange (排

列)”。窗口可以使用“Smart Tiling (智能分片)”法自动排列。也可以通过点击“Arrange (排列)”按钮附近的箭头选择其他排列方法。在分析名称上点击鼠标右键也可以提供其他选项。



显示: 此选项显示选择的分析。

隐藏: 此选项隐藏选择的分析。

删除分析...: 此选项完全删除选择的分析。这就意味着分析中建立的所有标准化设置或熔解储存都会丢失。

7.6.2 定量

在“Analysis (分析)”窗口中选择“Quantitation (定量)”标签，然后双击通道名称或选择通道，接着按下“Show (显示)”按钮打开目的通道。会出现三个窗口：主屏幕、标准曲线和结果。

报告

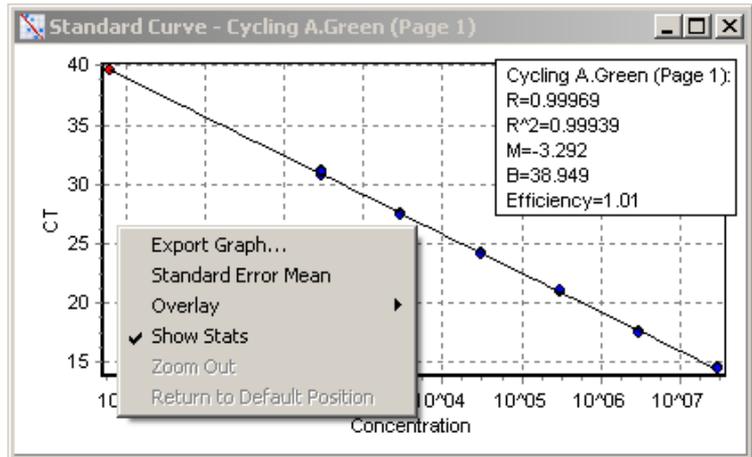
报告: “Reports (报告)”打开“Report Browser (报告浏览器)”窗口，能够产生一个目前分析的报告。会出现三个选项：标准报告、全部报告和简明报告。在“Preview (预览)”窗口中双击所需要的选项从而打开报告。

报告产生后，可以使用“Preview (预览)”窗口顶部的按钮，进行打印、保存或 e-mail 报告或导出到 Word。



标准曲线

标准曲线: 此按钮打开“Standard Curve (标准曲线)”窗口。默认情况下, 打开一个分析时, 此窗口也打开。如果关闭了窗口, 可以使用此命令再次打开。



因为在主窗口中点击或拖动阈值线, 阈值水平不断变化, 所以标准曲线上的数值是动态地重新计算的。

曲线中的蓝色圆点代表已定义的标准品, 红色圆点代表未知样品数据点。

注释: 如果重新定义标准品来重新计算标准曲线, 利用屏幕右侧的切换器把标准样本的可视性切换到关闭, 就会从标准曲线计算中将其删除。从图形中删除标准品来增加 R^2 的值是不科学的。不好的标准曲线说明样本可能本身扩增就不好, 因此应该包括在结果中。

效率: 此为运行的反应效率。关于此数值, 我们将在第 7-25 页详细讨论。

R² 值(相关系数 R² 或 R2 的值是与标准品形成一条标准曲线)的假设一致的数据百分比。如果 R2 较低，那么标准品不能很好的与绘出的标准曲线相匹配。这就意味着结果（即计算的浓度）可能不可靠。好的 R2 的值大约为 0.999。

注意：如果运行中标准品的数量减少，即使是不好的标准曲线也可以得出高的 R²。

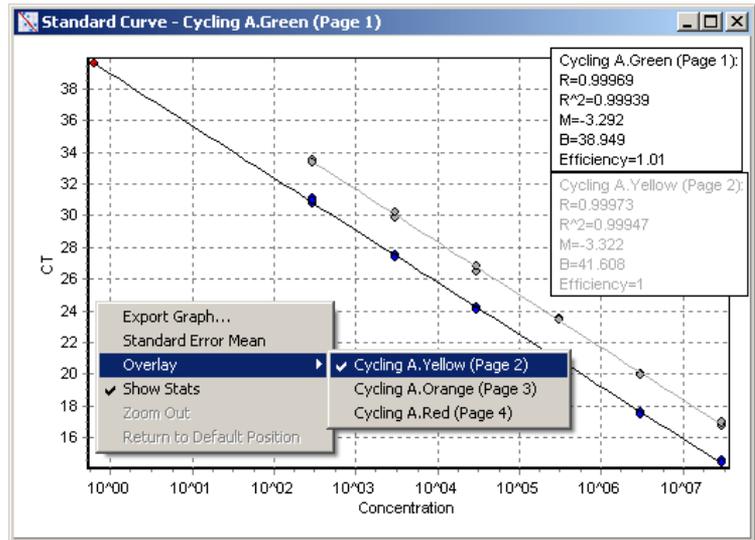
随着标准品数量的减少 R² 值会提高。要获得更准确的结果可靠性指示，参考计算所得浓度的置信区间。

R 值(相关系数的平方根)： R 值是 R² 值的平方根。通常 R² 值更能代表相关性。

M 和 B： 根据公式 $y=Mx+B$ ，标准曲线的斜率 (M) 和截矩 (B) 由软件自动计算，并显示在 “Standard Curve (标准曲线)” 窗口中

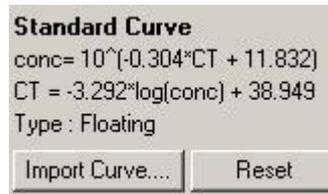
导出图形...： 在标准曲线上点击鼠标右键显示导出图形选项（见第 8.4 节）

叠加： 在一个运行中进行多重定量运行时，可将多条标准曲线同时显示在一个窗口内。这样便于从图形中观察不同阈值之间的差异。下面的屏幕截图中显示了此功能。



标准曲线计算

“ $\text{conc} = \dots * C_T + \dots$ ”和“ $C_T = \dots$ ”是用于联系 C_T 值和浓度的方程的两个版本。出版物中，“ $C_T = \dots$ ”这种格式最常用。标准曲线可以是“Floating (浮动)”或“Fixed (固定)”的。如果类型为“Floating (浮动)”，每次主窗口中阈值移动时，就会计算标准曲线的最佳方程。如果类型为“Fixed (固定)”，因为方程是从另一个运行导入的，所以不会发生变化。



导入标准曲线

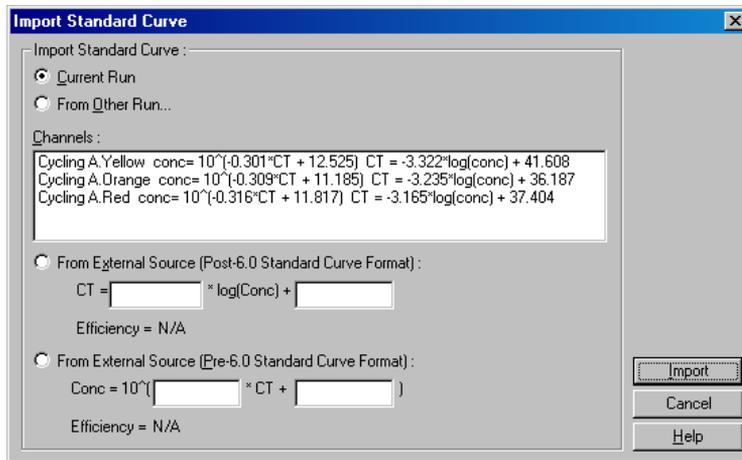
当一次运行中没有可用的标准曲线，而且两次运行的反应率没有变化，导入标准曲线可以对浓度进行估计。点击“Import Curve (导入标准曲线)”可以从另外一个通道或从另外一次运行导入标准曲线。

如果需要可以调整标准曲线。调整标准曲线是指仅来源的标准曲线效率被导入到目前运行中。是否需要调整标准曲线，取决于使用的化学物质。

要调整标准曲线，使用浓度已知的新运行中的参考品。要定义参考品需要把样本类型设定为“Standard (标准品)”并在“Edit Samples (编辑样本)”窗口中输入浓度值。相同参考品可以做多次重复以提高这种方法的准确度。注意不能定义一个以上的参考浓度或标准品。例如，可以设置 3 个 1000 拷贝数的重复参考品，但是同一次运行中不能设置一个 1000 拷贝数的参考品，而另外再设置一个 100 份拷贝数的参考品。

一旦标准曲线被导入，其类型就会变为“Fixed (固定)”。点击“Reset (重设)”把标准曲线的类型改回为“Floating (浮动)”。

下面给出了“Import Standard Curve (导入标准曲线)”窗口的一个屏幕截图。



使用此窗口，可以从目前运行中分析的另外一个通道或从其他运行导入标准曲线。

当前运行： 此选项被选中时，就会列出对当前运行的其他通道进行的定量分析，并且会给出相应的标准曲线。

从其他运行…: 选中此选项，就会弹出一个对话框，从对话框中可以选择需要打开的运行文件。如果运行已经进行了定量分析，就会列出每个被分析的通道的标准曲线。

注意: 定量分析设定必须已经保存在运行文件中。

通道: 此选项可以列出被分析的通道及其标准曲线方程。

从外源导入: 此区域中，可以直接输入 M 和 B 值。如果数值来自外源例如：Excel 电子表格，此选项是非常有用的。

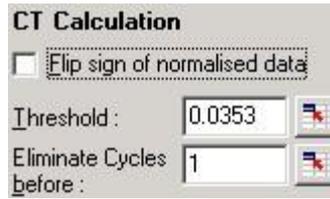
C_T 值计算

反转原始数据: 一些化学物质产生的荧光信号呈指数递减而非递增。可以使用“Quantitation (定量)”对这些数据进行分析，但是“Invert Raw Data (反转原始数据)”复选框必须选中。对于所有其他定量分析，不能选中此框。



C_T 值计算: C_T 值指扩增曲线与检测阈值相交处对应的循环数。设定阈值线并计算每个样本曲线的交叉点，就可以得出每个样本的 C_T 值。

阈值: 要设定阈值，点击图标（以红色箭头网格线表示），然后在图形上点住鼠标上下拖动直至到达理想水平，或直接输入一个对数值。还可以使用“Auto-Find Threshold (自动寻找阈值)”来自动检测阈值。手动设置阈值时，必须设定在运行的指数期，明显高于背景水平以避免噪音，并低于下一次循环中的信号平台期开始。



清除之前的循环：

设置时，点击图标（以红色箭头网格线表示），在图形上点住并拖动阈值线到右侧。这样可以清除低循环数的阈值。

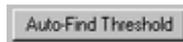
注意：当初始循环时有噪音信号，可应用这一操作。例如，样本混合效应产生的噪音。

自动寻找阈值：

此功能将在选择的图形区域寻找阈值设定，对于给定浓度的样本能够获得最佳的估计值。你也可通过在出现的文本框中输入上下缘改变选择的区域。

对于大多数的定量分析，默认区域是合理的。

扫描一系列的阈值水平从而获得与基于定为标准品的样本的标准曲线的最佳匹配（即 R 值最接近 1.0）。



结果

此选项打开“Quantitation Results(定量结果)”窗口。在默认状态下，当打开一个分析时该窗口自动打开。如果窗口关闭，可以使用此命令重新打开。

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)														
Analysis	No.	Color	Name	Type	Cl	Cl Comment	Given Conc.	Calc Conc	% Var	Rep. Cl	Rep. Cl Std	Rep. Cl (95% Cl)	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. (95% Cl)
Cycling A.Green (Page 1)	1	Red	10e8	Standard		3.73	1.00E+08	7.17E+07	-28.1%	3.73		0.00 [1.73, 3.74]	7.17E+07	[1.17E+07, 4.29E+08]
Cycling A.Green (Page 1)	2	Red	10e8	Standard		3.74	1.00E+08	7.17E+07	-28.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	3	Red	10e8	Standard		3.74	1.00E+08	7.16E+07	-28.4%					
Cycling A.Green (Page 1)	4	Red	10e7	Standard		6.11	1.00E+07	1.44E+07	-44.0%	6.06		0.06 [5.91, 6.21]	1.49E+07	[3.29E+06, 6.73E+07]
Cycling A.Green (Page 1)	5	Red	10e7	Standard		6.08	1.00E+07	1.47E+07	-46.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	6	Red	10e7	Standard		5.99	1.00E+07	1.56E+07	-55.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	7	Green	10e6	Standard		10.43	1.00E+06	7.72E+05	-22.8%	10.38		0.09 [10.15, 10.60]	8.00E+05	[2.62E+05, 2.44E+06]
Cycling A.Green (Page 1)	8	Green	10e6	Standard		10.27	1.00E+06	9.58E+05	-14.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	9	Green	10e6	Standard		10.43	1.00E+06	7.71E+05	-22.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	10	Green	10e5	Standard		13.49	1.00E+05	9.68E+04	-3.2%	13.65		0.13 [13.31, 13.98]	8.74E+04	[2.96E+04, 2.58E+05]
Cycling A.Green (Page 1)	11	Green	10e5	Standard		13.75	1.00E+05	8.13E+04	-18.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	12	Green	10e5	Standard		13.69	1.00E+05	9.48E+04	-15.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	13	Blue	10e4	Standard		15.66	1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46		0.25 [14.84, 16.08]	2.56E+04	[7.82E+03, 8.36E+04]
Cycling A.Green (Page 1)	14	Blue	10e4	Standard		15.54	1.00E+04	2.42E+04	141.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	15	Blue	10e4	Standard		15.18	1.00E+04	3.09E+04	208.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	16	Black	10e3	Standard		21.96	1.00E+03	4.71E+02	-52.9%	21.09		0.24 [20.49, 21.69]	5.65E+02	[8.13E+01, 3.50E+03]
Cycling A.Green (Page 1)	17	Black	10e3	Standard		20.89	1.00E+03	6.47E+02	-36.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	18	Black	10e3	Standard		21.02	1.00E+03	5.94E+02	-40.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	19	Black	10e2	Standard			NEG (Multi Cl)	1.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1)	20	Black	10e2	Standard		23.98	1.00E+02	7.99E+01	-20.1%					
Cycling A.Green (Page 1)	21	Black	10e2	Standard			NEG (Multi Cl)	1.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1)	22	Blue	NTC	NTC			NEG (NTC)							
Cycling A.Green (Page 1)	23	Blue	NTC	NTC			NEG (NTC)							
Cycling A.Green (Page 1)	24	Blue	NTC	NTC			NEG (NTC)							

在“Quantitation Results(定量结果)”窗口中，运行的结果总结在一个表格中。点击鼠标右键并选择“Export to Excel(导出到 Excel)”把表格导出到 Excel。Excel 会自动打开。若要把数据复制到已有的电子表格中，选择“Copy (复制)”选项，打开电子表格，然后选择“Paste (粘贴)”。

“Quantitation Results (定量结果)”窗口中包含以下内容：

分析	目前的数据集（采集通道和样本页）。
编号	样本编号。
颜色	定义的单独的样本图颜色。
类型	定义的样本类型。
C _T	定义的 C _T 值。

C_T 注释	<p>C_T测定的自动注释，前提是排除了 C_T值。可能会使用以下标记：</p> <p>NEG (Multi Ct): 阈值至少穿过荧光曲线两次（两次相交）。无法得出清晰的 C_T值。</p> <p>NEG (NTC): 总的荧光不符合通过“异常排除”菜单（见下文）的“NTC 阈值”功能定义的条件。例如，荧光曲线与指定的阈值相交，但是整体的斜率增长很小，这就表示未进行温度控制和且未指定 C_T值。</p> <p>NEG (R.Eff): 整体荧光增长不符合通过“异常排除”菜单（见下文）的“反应效率阈值”功能定义的条件。不具有特定反应效率的样本将会被排除，且不会指定 C_T值。仅在相应的函数启用时，才会显示此标记。</p>
%Var:	计算浓度与已知浓度之间的百分比差异。 $\%Var = Abs(\text{计算的}/\text{给定的} - 1)$
Rep. Ct:	与该样本有相同名称的所有样本的平均 C _T 值。
Rep. Ct Std. Dev.:	与该样本有相同名称的所有样本的 C _T 值的标准偏差。
Rep. Ct 95% C.I.:	一个 C _T 值的范围，在统计学上代表 95%的 CT 值变化。这是一种保守的统计测量，可以用作质量测量。通过重复运行更多次或减小重复样本之前的差异可以缩小此范围。
Rep. Calc. Conc:	所有有相同名称的样本的计算浓度。 注意： 这并不是计算浓度的简单的平均数，而是一个几何平均数，由于实时扩增的指数性质，这在数学上是更合理的平均数。

Rep. Calc. Conc. 95% C.I.: 一个浓度范围，表示单个样本的 95% 的变化以及它所依据的线性回归模型。对于该方法的说明是，如果运行以相同量的偏差进行重复，则 95% 的情况下在该范围内。这是一个保守的估计，由于实时分析的固有偏差，这个范围会非常大。如果运行中标准品的浓度与未知样本的浓度不同、重复次数较少，或有显著差异，那么这个范围就会比较大。

重要：这种计算方法报告的偏差与 Rotor-Gene Q MDx 无关，而是实时扩增的指数过程所固有的。在区块基础式循环器上进行相似的检测，由于区块基础式系统较差的温度均一性，将会产生更大的偏差。如果要比较循环器，我们建议比较 C_t 值的标准偏差。

注意：有关置信区间的更详细信息，请见附录 B。

注意：除颜色、名称、 C_t 和 C_t 注释外，均可在窗口上点击右键，然后选择或取消选择列名来显示或隐藏每一列。

No.	Ct	Name	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var
1	3x10 ⁸	Analysis		300.000.000,	324.345.068,	8,1%
2	3x10 ⁸	✓ No.		300.000.000,	301.264.230,	0,4%
3	3x10 ⁸	✓ Color		300.000.000,	308.453.920,	2,8%
4	3x10 ⁸	✓ Name		300.000.000,	298.576.301,	0,5%
5	3x10 ⁷	Type		30.000.000,	27.524.578,	8,3%
6	3x10 ⁷	✓ Ct		30.000.000,	26.405.444,	12,0%
7	3x10 ⁷	✓ Ct Comment		30.000.000,	28.701.296,	4,3%
8	3x10 ⁷	✓ Given Conc (Copies)		30.000.000,	23.847.613,	20,5%
9	3x10 ⁶	✓ Calc Conc (Copies)		3.000.000,	3.392.142,	13,1%
10	3x10 ⁶	✓ % Var		3.000.000,	3.170.880,	5,7%
11	3x10 ⁶	✓ Rep. Ct		3.000.000,	3.130.752,	4,4%
12	3x10 ⁶	✓ Rep. Ct Std. Dev.		3.000.000,	3.166.396,	5,5%
13	3x10 ⁵	✓ Rep. Ct (95% CI)		300.000,	321.913,	7,3%
14	3x10 ⁵	Rep. Calc. Conc.		300.000,	305.744,	1,9%
15	3x10 ⁵	Rep. Calc. Conc. (95% CI)		300.000,	312.045,	4,0%
16	3x10 ⁵			300.000,	324.696,	8,2%
17	3x10 ⁴	19,47		30.000,	32.420,	8,1%
18	3x10 ⁴	19,59		30.000,	29.872,	0,4%
19	3x10 ⁴	19,53		30.000,	31.102,	3,7%
20	3x10 ⁴	19,52		30.000,	31.301,	4,3%
21	3x10 ³	22,93		3.000,	2.850,	5,0%
22	3x10 ³	22,96		3.000,	2.793,	6,9%
23	3x10 ³	22,94		3.000,	2.825,	5,8%
24	3x10 ³	22,91		3.000,	2.888,	3,7%
25	3x10 ²	26,03		300,	322,	7,5%
26	3x10 ²	26,11		300,	305,	1,6%
27	3x10 ²	26,26		300,	275,	8,5%
28	3x10 ²	26,18		300,	291,	3,1%

“AutoStat(自动开始)”功能可以自动计算目标样本的平均值、标准偏差以及最大和最小值，使计算更加简便。用鼠标左键拖动选择目标结果，并且数据将会显示在屏幕右侧的表格中。

以下屏幕截图中，对几个样本的浓度进行了分析。

Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var
14.42	30000000	28255064	5.8%
14.59	30000000	25142920	16.2%
14.40	30000000	28730050	4.2%
17.44	3000000	3422624	14.1%
17.58	3000000	3103391	3.4%
17.42	3000000	3467111	15.6%
20.99	300000	285353	4.9%
20.92	300000	298898	0.4%
21.04	300000	275802	8.1%
24.20	30000	30286	1.0%

Statistics

Maximum : 28730050
 Minimum : 25142920
 Count : 3

Mean : 27328521
 Std. Dev : 1.07537
 (Orders of Mag.)

Copy

重要：“AutoStat(自动开始)”功能是前后相关的，也就是说，如果可能，仅产生有用的信息。

例如：

- 它不能从一组选定的计算浓度数据中给出 95% 的置信区间，因为这里同样需要考虑到回归模型。
- 报告的计算浓度是以“Orders of Magnitude (数量级)”给出的，而非绝对值。这是一个百分比偏差。例如，1.07537 代表一个 7.54% 的偏差(278,974 - 322,611) = (300,000/1.07537 - 300,000*1.07537)。报告一个绝对值对于标准曲线来说根本没有意义。可以在最低浓度时报告一个偏差值以生成一个可感知的低误差（±3 拷贝），或在高浓度时报告一个偏差值（±3,000,000 拷贝）。基于这个原因，报告“Orders of Magnitude (数量级)”的标准偏差。
- 对于计算的浓度，使用的是几何平均值而非数学平均值。这是因为实时 PCR 的指数特性。例如，一个两倍的稀释，1，2，8 和 16 个拷贝，平均值应该是 4 个拷贝，因为这是稀释系列的中间值。然而算术平均值是 6.75。几何平均值是 $(1*2*8*16)^{(1/4)}=4$ 个拷贝。关于几何平均值的更多信息，参见 <http://mathworld.wolfram.com/GeometricMean.html>。

动态管子标准化

“Dynamic Tube (动态管子)”选项是默认的，用来决定每个样本在扩增开始前的平均背景。

标准品的标准化简单地选取前 5 个循环并用作每个样本背景水平的指示。样本的所有数据点都除以该值以进行数据的标准化。这种方法可能对一些样本是不合适的，因为这些样本的前五个循环并不能反应开始扩增前的背景水平。相反，动态管子标准化使用二阶导数来确定每个样本的起始循环点，背景水平取从第一个循环到该循环的平均背景。这种方法给出了最准确的定量结果。

注意对于一些数据集，扩增开始前的循环期间背景荧光是 not 一致的。这种情况下可能需要点击“Dynamic Tube (动态管子)”取消选择动态管子标准化，因为它将会产生精密度较差的定量结果。

噪音斜率校正

理想情况下，扩增前样本的背景荧光 (FI) 应该始终保持不变。但是，有时候因为使用的化学物质 FI 会在几个循环中出

现逐渐增加或降低。这样就会产生倾斜的噪音水平。噪音斜率校正使用最适线来测定平均的噪音水平并对该线进行标准化。如果样本基线有明显倾斜，点击“Slope Correct (斜率校正)”按钮，选择此选项可以通过重复改进数据。起始点 (C_T) 前如果观察到原始数据背景向上或向下倾斜，噪音斜率校正可以改进数据。

如果斜率不稳定或者基线的初始循环信号相对于其他曲线出现明显的增加或下降，则 Noise Slope Correction (噪音斜率校正) 会造成某些不需要的效果，例如阴性对照曲线与阈值交叉，这是由于大致接近作为最佳拟合线的基线以及原始数据标准化造成的。因此，此功能并不必然能够改善数据质量，如果原始数据曲线斜率不稳定，请勿使用。

起始点调整

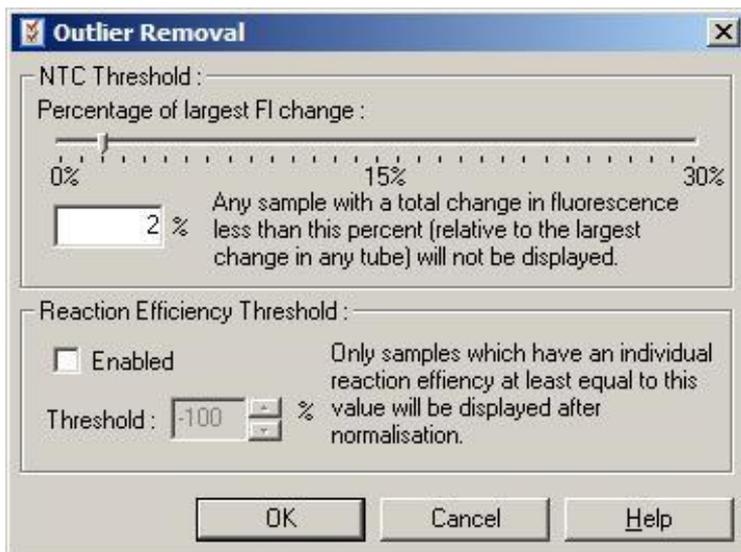
起始点调整算法可用于定义标准化基线的最短长度。为应用起始点调整功能，必须定义两个参数。如果起始点通过“动态管子”计算出 (小于第一个参数)，则第二个参数将作为起始点。起始点调整功能仅可结合“动态管子”标准化功能使用。

忽略第一个

运行的前几个循环的荧光信号可能不能代表运行的剩余部分。因此忽略前几个循环可能获得较好的结果。最多可以忽略前 10 个循环。但是，如果第一个循环看起来和以后的循环相似，取消选择“Ignore First (忽略第一个)”能够获得较好的结果，因为标准算法中将会包括更多数据。

异常值消除

为了区分荧光中较小的变化和无模板对照 (NTCs) 中的真实反应，提供了 2 种方法：“NTC Treshold (NTC 阈值)”和“Reaction Efficiency Threshold (反应效率阈值)”。“NTC Treshold (NTC 阈值)”推荐用于大多数的应用。使用的方法应该经过验证。



NTC 阈值： 此选项可以从分析中排除导致曲线轻微上扬的样本或 NTCs。所有变化低于“NTC Threshold (NTC 阈值)”的样本都不会报告。

该百分比与任一管子中最大的最大值变化有关。例如，如果一个样本的起始背景信号为 2FI 并上升到 47FI，那么 45FI 代表 100%。

如果“NTC Threshold (NTC 阈值)”为 10%，则任何一个信号低于 4.5FI 的样本将被视为噪音。

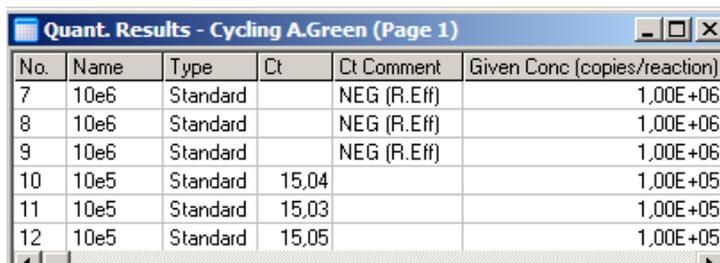
反应效率阈值： “Reaction Efficiency Threshold (反应效率阈值)”是另外一种从分析中排除噪音的方法。

这种标准算法采用比较定量中使用的反应效率估计技术（见第 7.6.6 节）。排除没有达到至少此水平的反应效率的所有样本。0% 的水平说明，指数期间没有反应发生。100% 说明指数期间发生了全部有效的反应。负百分比说明指数期间，荧光信号下降。

目前的研究不能得出区分真实反应与污染或其他效应所需要的效率的精确水平。因此，我们推荐适当地使用此功能，假设出现真实反应的任何样本都会出现一些可见的指数期，并出现荧光信号的上升。此值设定高于0%将会排除一些无效样本，而非易感知的光增加，但是如果设定为低于0%，将会显示指数期间荧光下降的样本，而这些样本是明显应该被排除的。

注意：如果因为使用这些技术导致数据被排除，将会对“**Quantitation Results (定量结果)**”窗口中 **C_T** 值作出标记以说明排除。

下图中样本 7、8 和 9 因为“Reaction EfficiencyTreshold (反应效率阈值)”被排除。



No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/reaction)
7	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
8	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
9	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
10	10e5	Standard	15,04		1,00E+05
11	10e5	Standard	15,03		1,00E+05
12	10e5	Standard	15,05		1,00E+05

斜率、扩增、反应效率

利用以下计算，反应的斜率 (M) (“Standard Curve (标准曲线)”窗口中显示) 可应用于测定指数扩增和反应效率：

$$\text{指数扩增} = 10^{(-1/M)}$$

$$\text{反应效率} = [10^{(-1/M)}] - 1$$

M 的最佳值、指数扩增和反应效率分别为 -3.322、2 和 1。反应效率显示在报告 (在全部和标准报告中，见 7-13 页) 和“Standard Curve (标准曲线)”窗口中。

斜率值以 C_T 值的变化除以对数输入值的变化 (比如拷贝数) 来计算。100%的扩增效率意味着经过每一个循环扩增产物加倍，相应的 M 值是 -3.322，扩增因数是 2，反应效率是 1

假定 M 值为 -3.322，计算如下：

指数扩增: $10^{(-1/-3.322)} = 2$

反应效率 $[10^{(-1/-3.322)}] - 1 = 1$

另外一个例子: M 值为 3.8 说明反应的指数扩增大约为 1.83, 反应效率为 0.83 (或 83%)。

偏移量

在描述两个变量之间关系的公式中, 偏移量用字母 B 表示($y = Mx + B$)。偏移量有时候也指截距。B 值表示 CT 在给定浓度为 1 时的值。将浓度 1 代入以下公式即得:

$$C_T = \log(1) * M + B$$

$$C_T = 0 * M + B$$

结果为 $C_T = B$

运行之间截距会出现变化, 与斜率相比是不太稳定的。因此, 通常对斜率进行分析而不是对截距进行分析。

主窗口

主窗口显示一个对数单位上的扩增点数。

点击窗口底部的“linear Scale (线性标尺)”将对数标尺换成线性标尺, 反之亦然。这两种标尺间变换仅改变图形的显示, 不改变计算。这可通过右键点击图形并选择“Show pinpointer (显示 pinpointer)”而使用 pinpointer 工具证实。使用对数标尺, 在图形上较小的数值更明显, 而线性标尺更容易看到整个反应。

注意: 由于 Rotor-Gene Q MDx 在运行期间不断地获取数据, 扩增点随之进行实时更新。数据的这种实时监测使用户可以在曲线显示指数增长时尽快看到结果。可以得出初步结论并对下一个运行做出决定。

定量分析模板

定量分析模板使用户可以导出标准化和阈值设置到单一的 *.qut 文件中。此文件可以被导入并重新应用于其他实验。更多详情, 参见 8.1 节。



7.6.3 双标准曲线

用标准化基因进行相对基因表达分析时，可以采用双标准曲线法。

该方法建立在每个基因的标准曲线上。根据标准曲线对每个基因的浓度进行定量。然后用标准化基因（通常是指看家基因）对目的基因的表达进行标准化。

样本设定中正确指定标准品和重复样本非常重要（见第 6.1.4 节）。特别是每个分析中相应样本必须有相同名称。在多重反应中，目的基因和标准化基因的管子位置是相同的，一组样本定义就足够。如果利用单一通道（即使用相同荧光在单独管子中进行反应）进行标准化基因的相对分析，应该创建两个样本页。第一个应该用目的基因的样本名称标记管子位置，其它位置不命名。第二个应该用标准化基因的样本名称标记管子位置。然后软件根据各自的名称对两个分析的样本进行匹配。

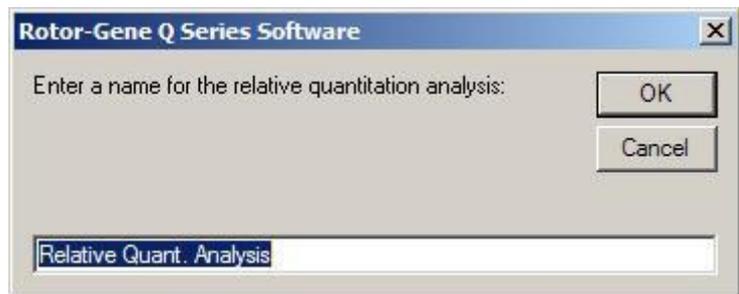
使用双标准曲线法的表达分析

可以首先利用定量分析对每个基因的数据进行分析。否则，将会利用“Autofind Treshold (自动寻找阈值)”工具自动测定每个基因的结果。

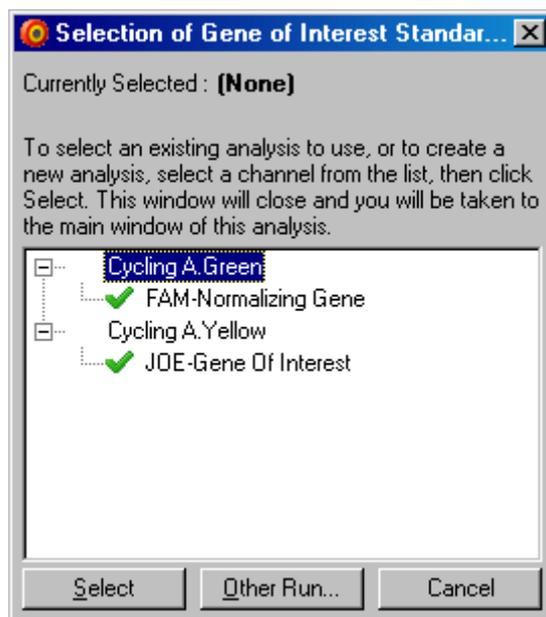
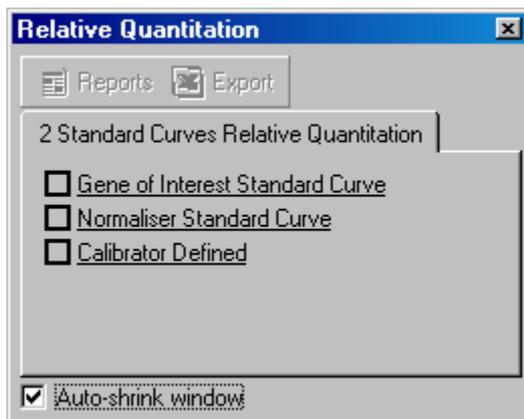
1. 从“Analysis (分析)”窗口，选择“2 Std Curve (双标准曲线) (Rel.)”标签。点击“New Analysis (新分析)...”



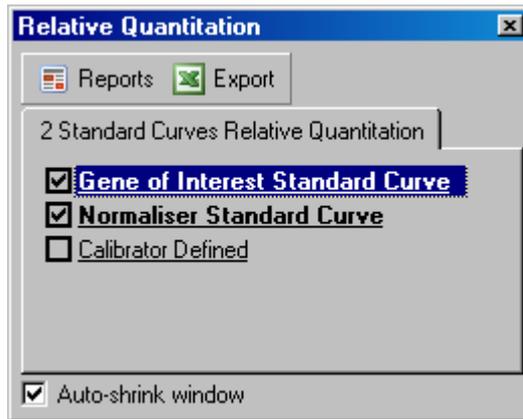
2. 输入分析的名称。



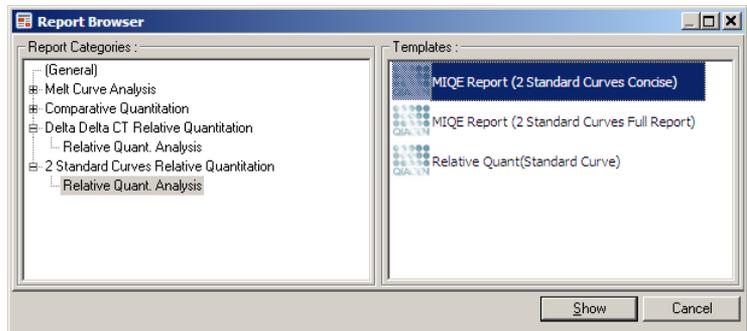
3. 指定用于标准化基因分析和目的基因分析的样本页。例如，点击“Gene of Interest Standard Curve (目的基因标准曲线)”弹出“Selection of Gene of Interest Standard (选择目的基因标准品)…”窗口，选择目的基因被测定的样本页。标准化基因重复此操作。可以任意定义校准品。如果选择此选项，校准品的浓度被指定为 1，所有其他样本的浓度都相对此样本的浓度计算而得。



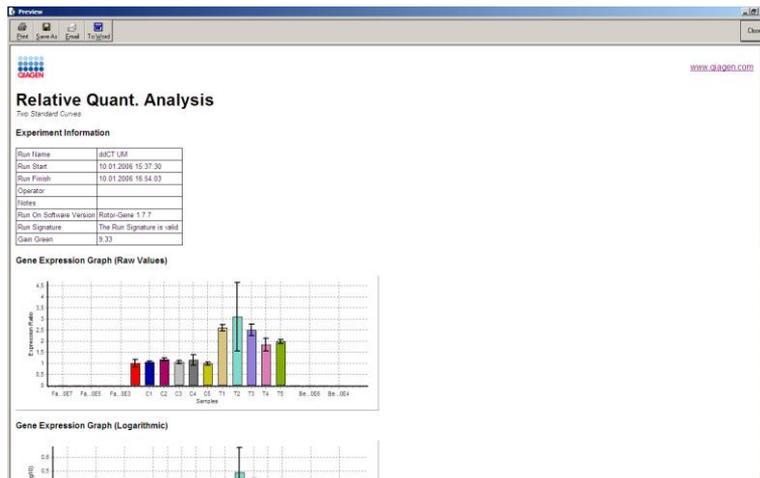
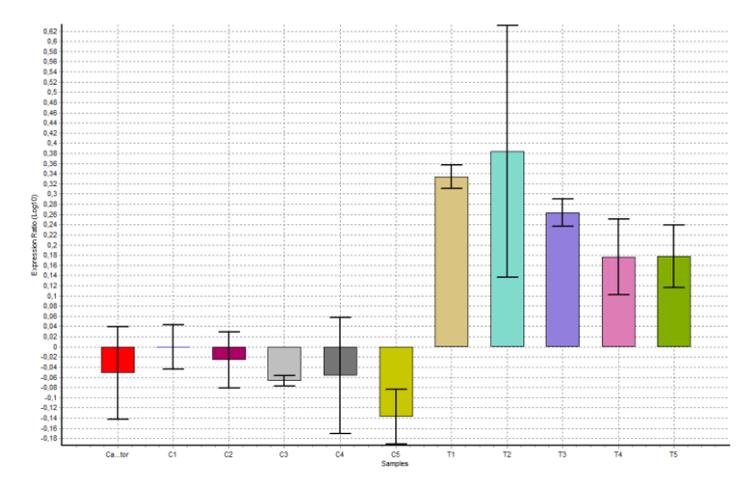
选择完成后，此选项被选中，将会在下面显示一个复选标记。



4. 点击“Reports (报告)”按钮显示“Report Browser (报告浏览器)”。从列表中选择相应分析。点击“Show (显示)”按钮显示相对定量报告。“Export (导出)”选项把结果导出到一个新的 Excel 电子表格中。如果校准品包括在内，计算的结果为相对于校准样本的值，校准样本的指定值为 1。



5. 显示了从标准曲线读出的目标基因(GOI Conc.)和标准化基因(Norm. Conc)的浓度，以及相对浓度(Relative Conc.)。结果可以保存为 Word 文件。



6. 通过以下公式，可以依据 GOI 和标准化程序的标准偏差计算系数的标准偏差，进而得出相对最小和相对最大值：

$$CV_{relconc} = \sqrt{CV_{GOI}^2 + CV_{Norm}^2}$$

其中：

$$cv = \frac{s}{X} = \frac{stddev}{meanvalue}$$

7.6.4 Delta delta C_T 相对定量

Delta delta C_T法可以进行相对基因表达分析。此方法由 Livak

和 Schmittgen (2001)*发现。

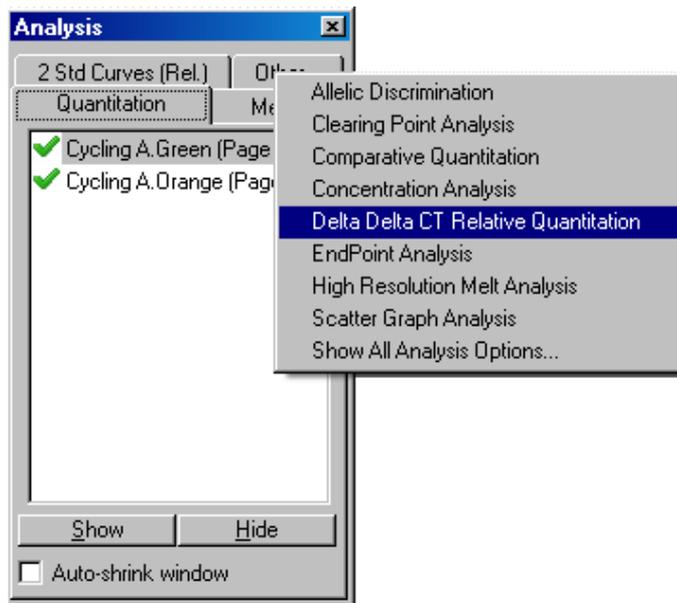
此方法不需要在每次运行中包括标准曲线。每个样本首先通过与标准化基因的比较对添加的模板数量进行标准化。这些标准化数值和一个校准品处理比较进行进一步的标准化。

校准品可以是以下样本，例如野生型、未处理的对照品或零时样本。

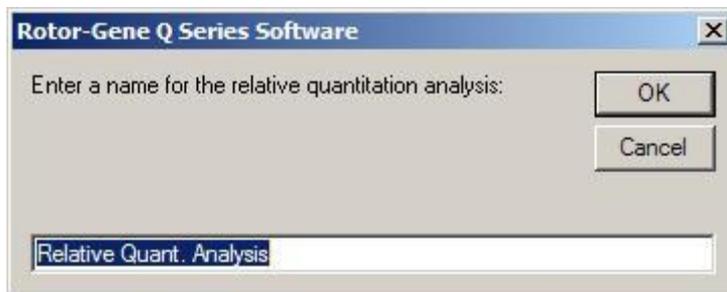
目标基因和标准化基因的扩增效率相同是非常重要的，并且根据 Livak 和 Schmittgen 的指导原则对此进行验证。

在“Edit Samples (编辑样本)”窗口中正确地定义样本名称是非常重要的，每个组分的定量分析中相同样本的标记应该相同。

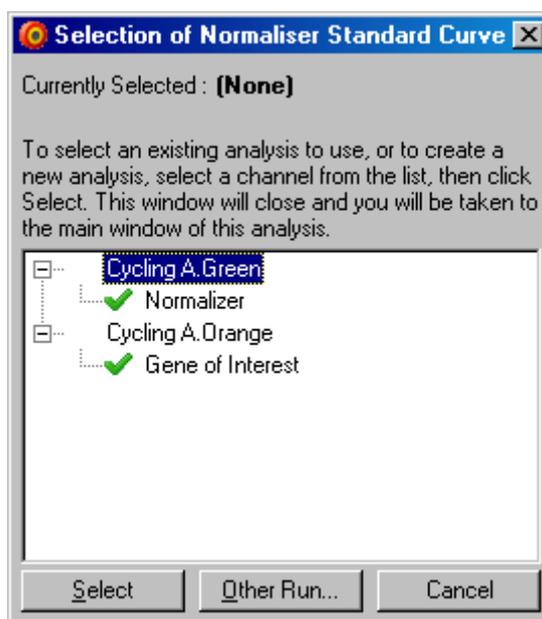
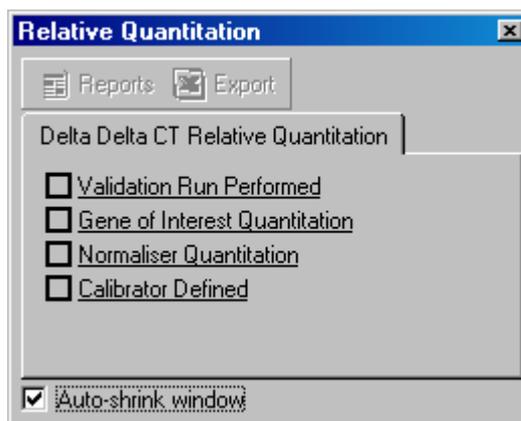
1. 使用“Quantitation (定量)”分析数据。如果已经进行了验证，就不需要再运行标准曲线。
2. 从“Analysis (分析)”窗口的“Other (其他)”标签，选择“Delta Delta CT Relative Quantitation (Delta Delta CT 相对定量)”，选择“New Analysis (新分析)”。



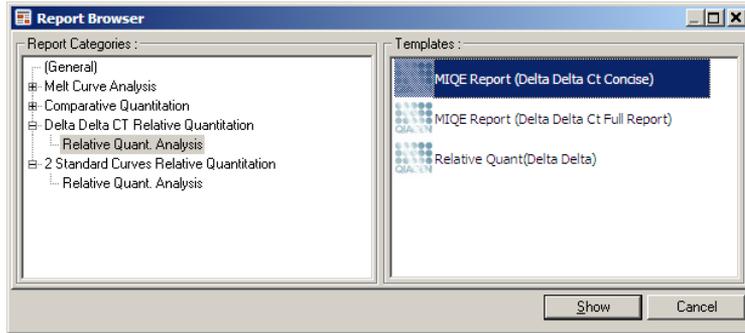
3. 输入分析名称。



4. 必须选中“Validation Run Performed (验证运行已完成)”进行分析。定义已分析过的目标基因和标准化基因的样本页。



5. 点击“Reports (报告)”按钮，显示“Report Browser (报告浏览器)”。从列表中选择相应的分析名称。点击“Show (显示)”按钮，显示相对定量报告。“Export (导出)”选项把结果导出到一个新的 Excel 电子表格。如果校准品包括在内，计算的结果为相对于校准样本的值，校准样本的指定值为 1。.



下面给出了此分析结果的举例。显示了目标基因的 CT 值 (GOI CT)、标准化基因的 CT 值(Norm. CT)、Delta CT、Delta Delta CT 和相对浓度(Relative Conc.)。表达是相对于校准样本，指定的相对表达值为 1。

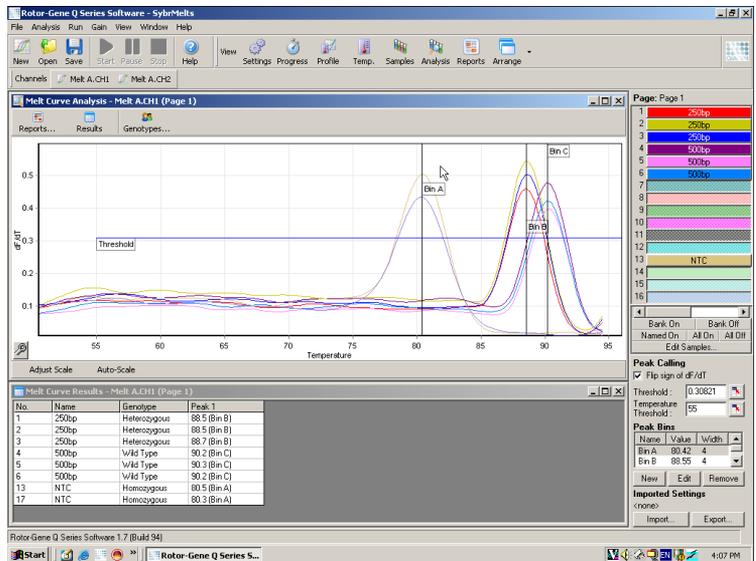
有关相对最小值和相对最大值计算求导的更多信息，请参阅 Litvak and Schmittgen (2001)。*

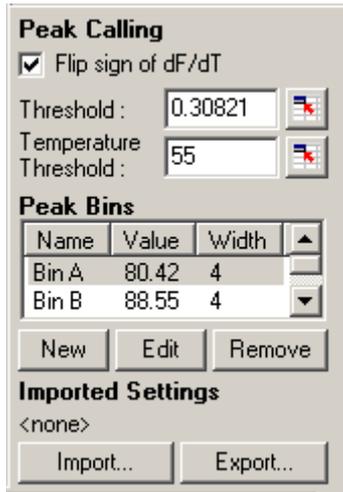
C	Replicate Name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Rel Min	Rel Max	Calibrator
	Dilution 8		28.37						
	Dilution 7	37.61	28.39	9.22	4.40	0.04728	0.04128	0.05414	
	Dilution 6	35.72	28.28	7.44	2.62	0.16228	0.14904	0.17669	
	Dilution 5	35.04	28.24	6.80	1.98	0.25292	0.11715	0.54605	
	Dilution 4	32.94	28.12	4.82	0.00	1.00000	0.69432	1.44025	Yes
	Dilution 3	31.66	28.23	3.43	-1.38	2.60825	2.16257	3.14579	
	Dilution 2	30.05	28.02	2.03	-2.79	6.92153	6.49040	7.38130	
	Dilution 1	28.61	27.92	0.69	-4.12	17.41896	16.47839	18.41322	
	QS 0.1 IU/μl		28.11						
	0.316 IU/μl	37.62	28.10	9.51	4.70	0.03857	0.03633	0.04094	
	1 IU/μl	36.84	28.15	8.69	3.88	0.06805	0.04415	0.10489	
	3.16 IU/μl	34.45	28.05	6.40	1.59	0.33305	0.28206	0.39325	
	QS4	32.67	28.29	4.38	-0.43	1.34925	1.09820	1.65770	
	QS3	30.07	27.98	2.09	-2.73	6.61982	6.18888	7.08076	
	QS2	26.88	27.64	-0.76	-5.57	47.61474	45.02202	50.35677	
	QS1	24.07	27.10	-3.03	-7.85	230.60440	208.45384	255.10870	

7.6.5 熔解曲线分析

熔解曲线分析用于分析经过平滑处理后的原始数据导数。该方法最常见的应用为基因型分析或等位基因区分。曲线上的各个峰被分组到不同的库中，低于阈值的峰被排除。可以通过“Genotypes (基因分型)”命令将不同的峰值库定义成特定的基因型。

运行结束时，对于一些化学物质可以添加一个熔解步骤以观察扩增产物分离的动力学情况。随着样本的温度呈线性增长，每个样本的荧光值被记录下来。下面是一个典型的熔解曲线分析图。





dF/dT 的翻转符号: 定义峰之前, 先确定 dF/dT 符号是否进行了正确的数据设定以给出阳性峰。

定义峰: 熔解曲线分析中, 可以使用不同方法定义并报告峰值。一种方法是自动找出每个样本的所有峰值, 另外一种方法是把峰值分配到峰库中, 此方法对基因分型很有用。

峰库用于定义预期会出现峰值的区域。熔解曲线分析软件根据曲线中的实际峰值, 把峰值分组到峰库组。如果需要可以对峰库进行编辑。

任何在峰库定义范围内的峰值都会被分配到峰库中。如果同时出现与峰值接近的 2 个峰库, 峰值将会被分配到最接近的一个峰库。

注意: 不能目视把峰库放到估计的峰值位置。

把峰库设置在大约的目标区域, 然后使用结果表中实际报告的数值获得更准确的结果。

- 峰库:** 要定义一个峰库，点击“New Bin (新库)”按钮，然后在图形上点住以定义峰库的中心。
- 要添加另外一个峰库，重复此过程。使用“Remove (删除)”按钮，删除峰库。
- 阈值:** 要设定阈值（y 轴），点击图标，然后在图形上点住并拖动阈值线到预定水平。
- 温度阈值:** 要设定温度阈值（X 轴），点击图标，然后在图形上点住并拖动阈值线到右侧。这样可以清除较低温度的阈值线。
- 注意:** 低温度信号中有噪音时，此功能很有用。

报告

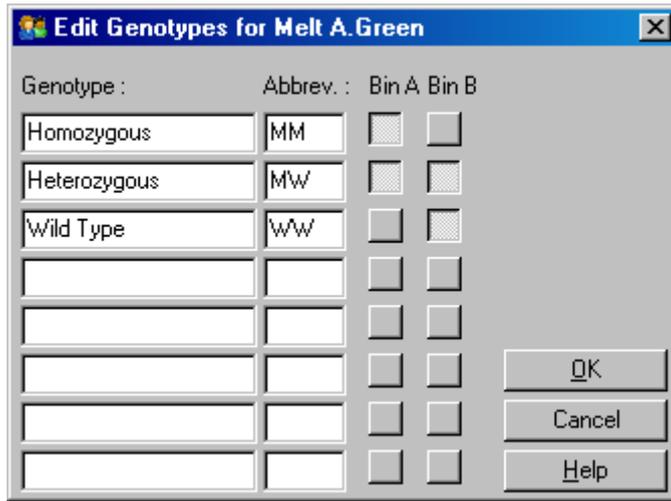
此选项打开“Report Browser (报告浏览器)”，可以选择需要预览的报告。可以根据目前选择的通道生成报告，或生成多通道基因分型报告。

结果

此选项显示“Melt Curve Results (溶解曲线结果)”窗口，窗口中显示样本峰值。

基因型

点击“Genotypes (基因型)…” ，然后选择基因型，如下所示。



此窗口中可以把基因型与峰库中的峰值相对应。默认的基因型设置如图所示，杂合子的样本有两个峰，纯合子的样本的峰在第一个库中，野生型样本的峰在第二个库中。可以在每个基因型名称边上的框中输入缩写。打印多通道基因分析报告时使用此方法，以便可以同时直观地读取多通道的结果。

对于多通道分析，每个通道的基因型都必需进行设定。比如在双通道的淬火 FRET 分析运行中，野生型和杂合型基因型预期在各自通道中，必须设定每个通道的峰库参数。然后结果将在多通道报告中给出。

熔解分析模板

熔解分析模板允许用户把标准化、阈值、基因型和峰值设定导出到一个单独的*.met 文件中。此文件可以被导入并重新应用于其他实验。更多详细信息参见第 8.1 节。



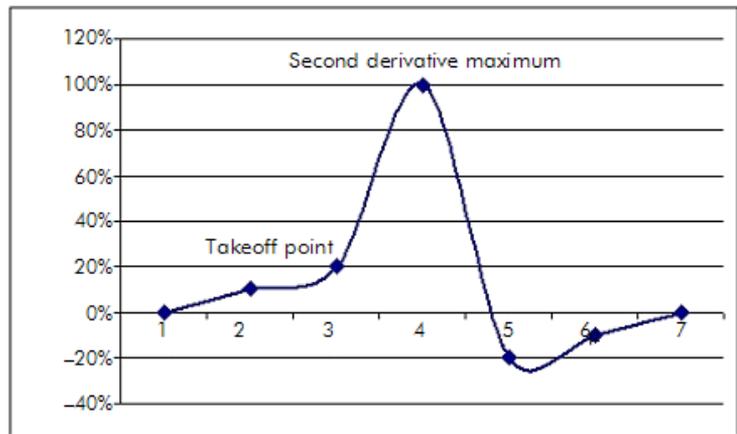
7.6.6 比较定量

比较定量在标准曲线不可用的情况下，在一次运行中对样本和对照样本的相对表达进行比较。此方法常用在微阵列分析中。Warton 和同事(2004)*提供了此技术的一个举例。

1. 要进行分析，在“Analysis (分析)”窗口中选择“Other (其他)”，然后选择“Comparative quantitation (比较定量)”。在通道上双击进行分析。
2. 使用切换器下面屏幕上右手边的下拉菜单选择一个对照样本。
3. 结果自动计算并显示在图形下面的“Comparative Quantitation Results (比较定量结果)”窗口中。

“Comparatitation Quantitation Results (比较定量结果)”窗口的第一列显示样本编号和名称。“Takeoff (起始点)”一列给出样本的起始点。扩增点的二阶导数产生的峰值对应反应中荧光增加的最大比率。起始点定义为二阶导数在最大水平20%时的循环，并且说明噪音的结束和向指数期的过渡。

此图显示了扩增点的二阶导数，显示了二阶导数峰值的相对位置和起始点。



“Amplification (扩增)”栏提供了样本的效率。100%的高效反应产生的每个样本的扩增值为2，这说明每个循环中扩增子的加倍。原始数据中，在指数期信号应该加倍。例如，循环12时信号为50个荧光单位，然后在循环13时为51个荧光单位，在循环14应该增加到53个荧光单位。对每个样

本的所有扩增值取平均值产生切换器下方屏幕右侧显示的扩增值。每个样本所估计的扩增值之间的差异越大，置信区间也将越大（表示为±符号后的数值）。置信区间（用于较大样本数量（N））给出 68.3% 的概率即样本的实际扩增值在此范围内（1 标准偏差）的概率。±区间加倍，获得较大数量 N 的 95.4% 的置信区间。

校准品重复

delta delta C_T 方法中，需要校准品样本，并且测量是相对此校准品样本的值。因为如果多个样本位置有相同名称，将会使用这些样本的起始点的平均值，因此可以对校准品的重复进行分析。为了正确地利用此功能，确保重复有相同的名称。



平均扩增值将用于计算样本表达量增减的多少，例如，有较低扩增值的样本将会比有较高扩增值的样本需要更长时间来达到特定的绝对拷贝数。“Comparative Quantitation Results (比较定量结果)”窗口的“Rep. Conc.”栏提供相对浓度。与校准品样本相比，每个样本的相对浓度是根据起始点和反应效率进行计算的。数值以科学计数法表示。

注意：“Average Amplification (平均扩增值)”中显示的到“±”右侧的数值代表去掉异常扩增值后平均扩增值的标准偏差。如果此数值较大，那么总的计算的浓度值中可能有较大误差。

相对浓度由软件按照以下方法计算：

1. 从二阶导数峰值计算出每个样本的起始点。
2. 计算出原始数据在起始点后 4 个循环的平均增长值，并作为样本的扩增值。
3. 将异常扩增值作为背景荧光中的噪音删除。
4. 计算剩余扩增值的平均值，作为平均扩增值。
5. 计算每个校准品重复的平均起始点。

6. 计算样本的相对浓度作为扩增值[^]（校准品起始点一样本起始点）。
7. 结果在“Comparative Quantitation Results (比较定量结果)”窗口的“Rep. Conc.”列中以科学计数法表示。

7.6.7 等位基因区分

等位基因区分使用基因型样本的 2 个或以上通道的实时动力学数据。要进行此分析，在“Analysis (分析)”窗口中选择“Other(其他)”，然后选择“Allelic Discrimination (等位基因区分)”。进行等位基因区分时，在一个通道上双击进行分析是不够的，因为此分析是同时使用多个通道进行的。要进行此分析要么压住 CTRL 并点击以突出显示需要分析的每个通道，要么在这些通道上拖动鼠标指针。一旦所需分析的通道突出显示之后，点击“Show (显示)”。此列表将会更新以在一行中显示所有通道，并在通道旁边显示复选标记。这说明这些通道将会用于一次分析。要删除一个或更多这些通道，在分析上点击右键并选择“Remove Analysis (删除分析)…”。然后那些通道可以被包括在另外的等位基因区分分析中。一个通道一次仅能在一个分析中使用。

报告: 此选项打开“Allelic Discrimination Analysis (等位基因区分分析)”报告以供预览。

结果: 此选项显示“Allelic Discrimination Results (等位基因区分结果)”窗口。默认情况下，分析首次显示时，此窗口也会打开。

标准化选项: 有很多选项可用以优化原始数据标准化：

- 动态管子(动态管子标准化)
- 斜率校正 (噪音斜率校正)
- 忽略前 X 次循环 (起始循环中的噪音校正)
- 起始点调整

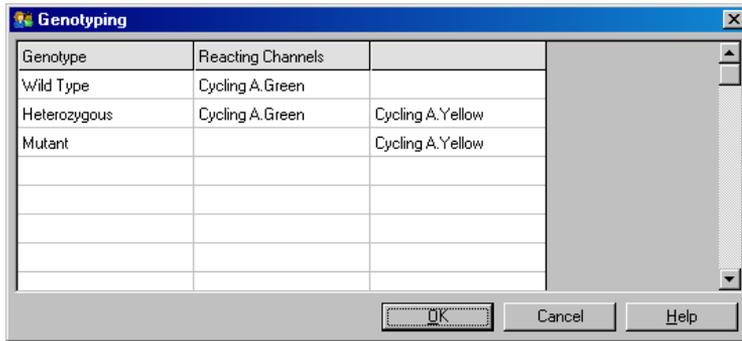
更多详细信息，参见 7-25 页。

阈值区分 在此文本框中输入数值以定位区分阈值。所有通过此阈值的曲线都被认为是基因分型样本。点击每个文本框右侧的图标，然后拖动图形上的阈值以目视设定这些数值。



基因型： 此选项打开“**Genotyping (基因分型)**”窗口，用于定义每个通道中检测的基因型。此窗口可以使基因型被分配到通道中以进行等位基因区分分析。

以下举例中，如果通道循环 A.绿色和循环 A.黄色中读数与阈值交叉，则样本为杂合子。



等位基因分析模板： 等位基因分析模板可以将标准化、阈值和基因型设定导出到单独的一个*.alt 文件中。此文件可以被导入并重新应用到其他实验中，更多详情参见第 8.1 节。



7.6.8 散点图分析

散点图分析可以根据两个通道扩增点的相对表达进行基因分型。与等位基因区分不同，基因型是根据散点图定义的区域而不是根据单一的阈值确定的。要进行此分析，在“Analysis

(分析)”窗口中选择“Other (其他)”然后选择“Scatter Graph Analysis (散点图分析)”。

进行散点图分析时，双击通道进行分析是不够的，因为此分析需要同时使用 2 个通道。要进行此分析，要么压住 SHIFT 键并点击使通道突出显示从而进行分析，要么用鼠标指针在通道上拖动。一旦所需要的通道突出显示后，点击“Show (显示)”。

此列表将会更新以在一行显示所有通道，通道旁边会显示复选标记。这说明这些通道都会用于一次分析。要删除一个或更多通道，在分析上点击右键并选择“Remove Analysis (删除分析)”。然后这些通道可以包括在其他散点图分析中。一个通道一次仅能用于一个分析。

报告： 此选项打开“Scatter Analysis (散点图分析)”报告以供预览。

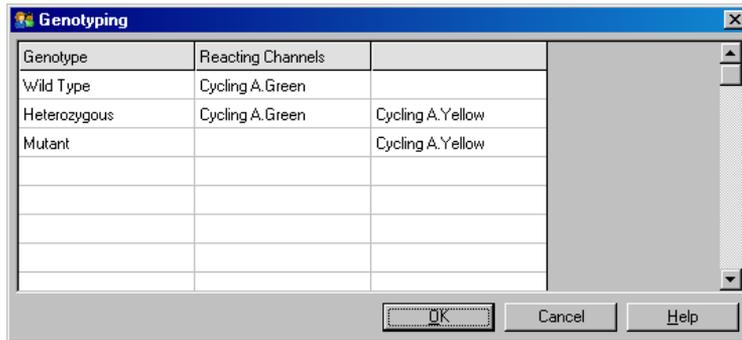
结果： 此选项显示“Scatter Analysis Results (散点图分析结果)”窗口。每个样本的基因型由用户在散点图上定义的区域决定。

标准化选项： 有很多选项可用于优化进行原始数据点标准化的方法：

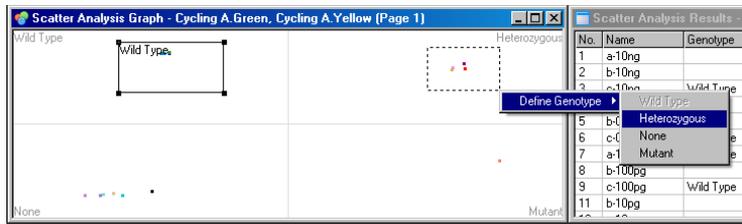
- 动态管子(动态管子标准化)
- 斜率校正 (噪音斜率校正)
- 忽略前 X 次循环 (起始循环中噪音的校正)
- 起始点调整

更多详细信息，参见 7-25 页。

基因型…： 此选项打开“Genotyping (基因分型)”窗口，用于定义每个通道检测的基因型。此窗口中，可以根据样本起反应的通道分配基因型。选择的通道将用于标记散点图的转角，并且会指导用户定义散点图的区域。



散点图：
散点图显示两个被选通道的相对表达。对显示进行标准化以反映每个通道的倍数变化差异，并用 log 来强化样本间的表达差异。
要进行基因分型，用户需要在图形上点击并拖动来定义区域。用户所选中的区域以其在“Genotyping (基因分型)”窗口中对基因型的定义进行标记。



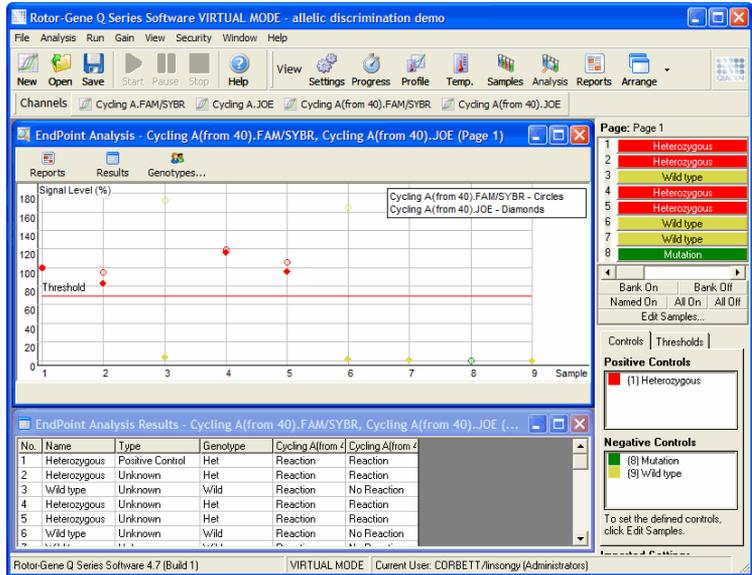
散点图分析模板：
散点图分析模板能够使基因型和区域设定被导出到一个单独的*.sct 文件。此文件可以被导入并重新应用于其他实验。更多详情参见第 8.1 节。



7.6.9 终点分析

终点分析可以在运行结束时区分扩增的和未扩增的样本。结果是定性结果（阳性/阴性）而非定量结果。

以下屏幕截图给出了终点分析。



终点分析与等位基因区分相似，结果是定性的，且对于不同通道的反应可以给予一定可互换的命名。而终点分析法与等位基因区分的不同在于只能进行一次读数，而不是每个样本的每个循环都读数。这意味着用户必需确定阳性和阴性对照以帮助完成分析。为了获得原始数据，对照每个通道的已知阳性和阴性对照品对信号水平进行标准化。然后用户选择一个百分数的信号水平作为阈值。

终点分析中使用的术语

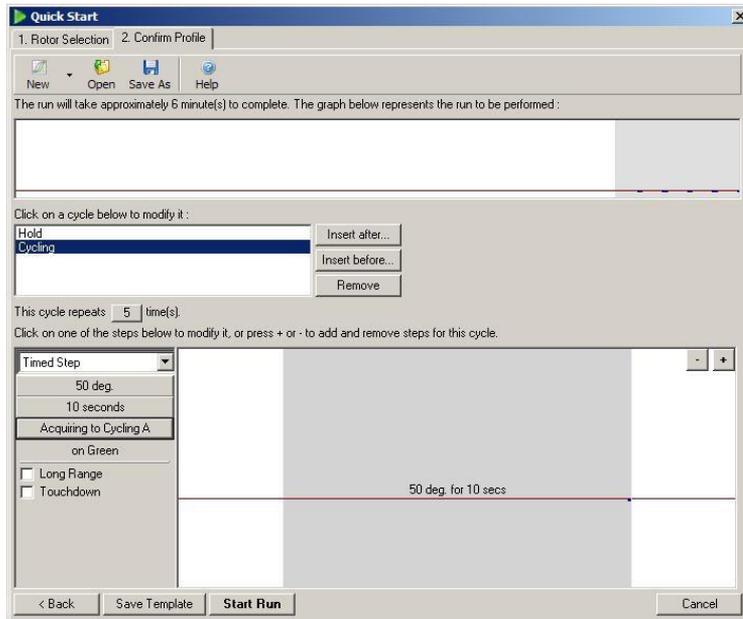
终点分析中使用的一些术语，下表给出了解释。

阳性对照： 这是一个已知可以扩增的样本。

阴性对照： 这是一个已知不会扩增的样本。代表典型的背景噪音。

- 阈值：** 阈值是一个高于阳性（扩增）样本的信号水平。每次运行用户必须对此进行调整。
- 信号水平：** 标准化的荧光信号的百分数，因此阳性对照的最高信号为 100%，阴性对照的最低信号为 0%。
- 基因型：** 不同通道中反应的不同排列的解释。例如，基因型“**heterozygous (杂合子)**”可以被分配给在绿色和黄色通道中反应的样本。基因型还可应用于报告内部对照品的反应结果。例如，结果可以报告为“**inhibited (抑制)**”、“**positive (阳性)**”或“**negative (阴性)**”，这取决于特定通道中是否发生了反应。

流程组合



要进行终点分析，设置流程，50°C 保持数分钟，然后 1 步循环（50°C 10 秒钟），在要求的通道上获得。如上所示，重复次数设置为 5。这些次数仅是一个指导，对于您的特定应

用可能有变化。流程中重复的次数越多，进行分析的可用信息也就越多。分析将会对所有读数自动取平均值实现每个样本一个结果。没有要求特定的重复次数。除非要求非常高的准确度水平，否则一般重复 5 次就足够了。

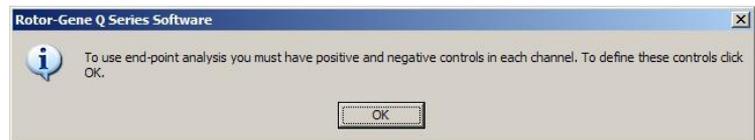
分析

可以同时很多通道上进行终点分析。若要建立一个新分析，点击“Endpoint (终点)”标签，用鼠标指针拖动选择通道，然后点击“Show (显示)”。



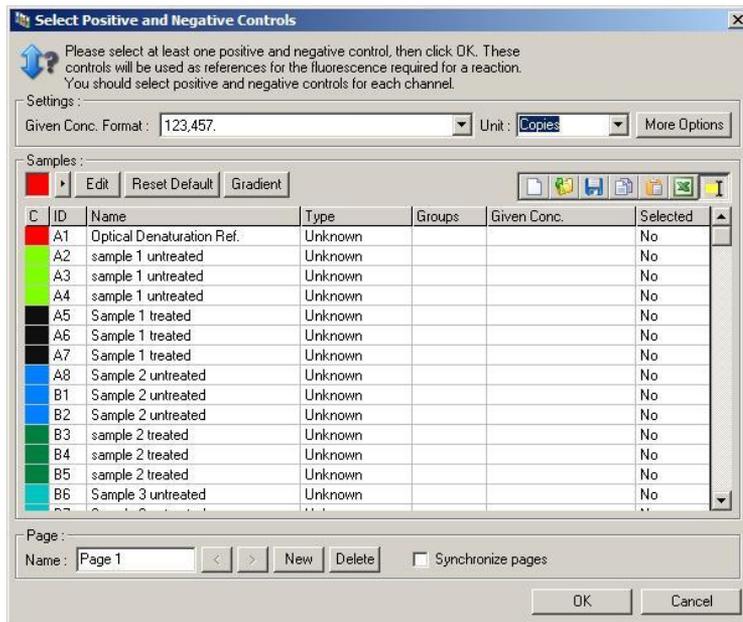
定义对照

第一次打开终点分析时，如果还没有定义阳性和阴性对照，将会显示以下信息。



点击“OK(确定)”，出现“Edit Samples (编辑样本)”窗口，可以定义阳性和阴性对照。要把样本定义为阳性或阴性对照，点击样本类型单元格，然后从下拉菜单中选择相应的对照类型。

注意：要进行分析，必须使用主窗口右手边的切换器把对照切换为“on(打开)”。



此窗口的功能与“Edit Samples (编辑样本)”窗口的功能一样（见 6.1.4 节）。

标准化

终点分析数据的标准化范围包括 0-100%范围内的所有信号水平。如果分析多个通道并且标准品没有多路复用，必须至少选择一个阳性对照和一个阴性对照，或选择更多对照。如果有阳性对照可能不会扩增的风险，必须运行一个以上的阳性和阴性对照。

1. 对于每一个通道，所有阳性对照都会进行分析，并且有最高荧光的一个将会设为 100%。这说明运行两个对照时，如果一个阳性对照没有扩增并不会影响运行。

2. 所有阴性对照都会进行分析，并且有最低荧光水平的一个将会设为 0%。
3. 相对最高阳性对照和最低阴性对照，按比例排列其余样本的原始荧光数值。

例如：

样本	类型	荧光
1	阳性对照	56.3
2	阳性对照	53.0
3	阴性对照	4.5
4	阴性对照 I	4.3
5	样本	48.1
6	样本	6.4

这个运行是成功的，因为两个阳性对照和两个阴性对照之间互相接近，且在样本荧光值的范围外。

下面是标准化的结果：

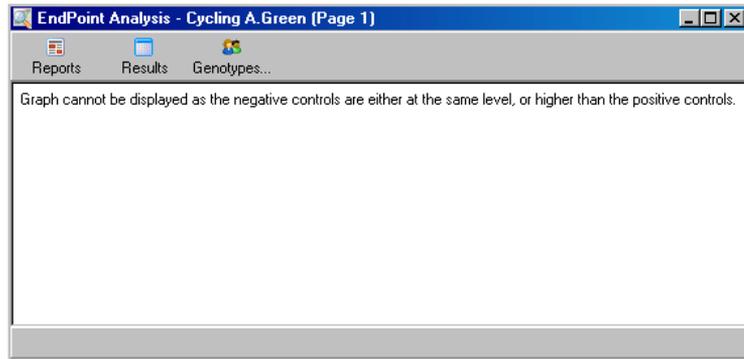
样本	类型	表达(%)
1	阳性对照	100.0
2	阳性对照	93.7
3	阴性对照	0.4
4	阴性对照	0.0
5	样本	84.2
6	样本	4.0

样本 1 是有最高荧光的阳性对照，因此设为 100%。其他阳性对照的荧光水平稍低。样本 4 是最低的阴性对照，设为 0%。现在很清楚，样本 5 可能出现了扩增，而样本 6 很可能没有扩增。

注意：取决于选择的阳性和阴性对照，有可能得到高于 100%或低于 0%的表达水平。高于 100%的结果说明样本的表达超过阳性对照。低于 0%的结果说明样本的扩增低于阴性

对照的扩增。因为此分析用于定性，因此这些结果不是关注的重。

如果阴性对照产生了高于阳性对照的荧光水平，说明样本设置错误，并且将出现以下信息。



多通道中的标准化

可以对多通道进行信号数据分析，但是样本设置更加复杂。终点分析是假定多通道的，因此每管仅能有一个管位。目前还不能对在一个通道里是阳性对照，在另一个通道里是阴性对照的样本位置设定进行分析。

虽然“**Edit Samples (编辑样本)**”窗口中对每个管位仅给出一个样本定义，但是每个通道的标准化是独立进行的。

如果管位在至少一个通道中为阳性对照，应该在“**Edit Samples (编辑样本)**”窗口的“**Type (类型)**”一列中设置为阳性对照，否则，其类型应该为“**Sample (样本)**”。这也适用于阴性对照。

例如，如果样本在绿色通道中为阳性对照，而在黄色通道中不是阳性对照，样本还是应该定义为阳性对照。因为每个通道中使用最高的阳性对照，所以如果黄色通道中至少一个阳性对照扩增，就忽略作为绿色通道对照的样本定义。

阈值

阈值用于测定每个通道中反应所需的百分比表达水平。一旦定义了阳性和阴性对照，所有通道都会被标准化到相同的刻度 0-100%。因此，仅需要一个阈值，即使是分析多个通道。

点击并拖动阈值线到 0-100 的区域。阈值线两侧的阈值都不应该太接近样本，因为这说明运行不是决定性的。如果定义扩增或未扩增的样本间的差异仅为几个百分数，这意味着如果重复反应，样本可能出现在阈值的另外一侧。

基因型

此选项打开“Genotyping (基因分型)”窗口，用于定义每个通道中检测的基因型。



此窗口允许基因型被分配到通道。上面的举例中，如果循环 A.绿色和循环 A.黄色通道中的读数与阈值交叉，则样本为杂合子。

终点分析模板

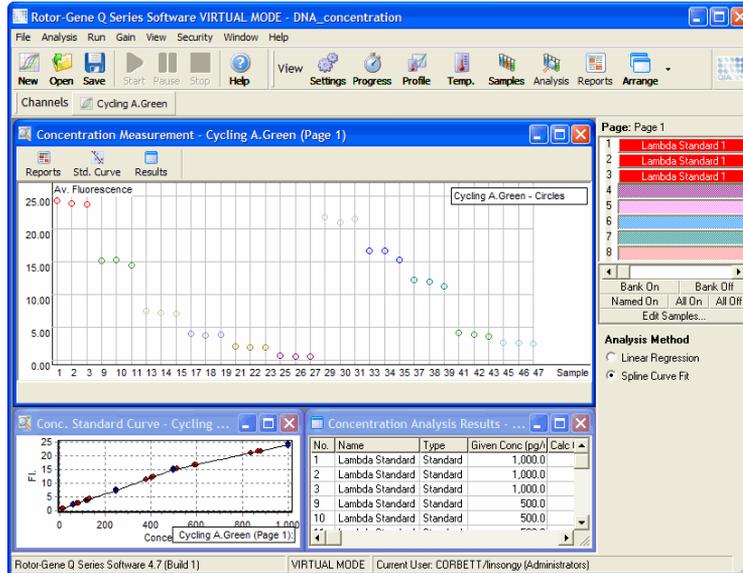
终点分析模板允许用户把基因型和阈值设置导出到单独的*.ent 文件中。此文件可以被导入并重新应用于其他实验。更多详情参见第 8.1 节。



7.6.10 浓度分析

浓度分析允许 Rotor-Gene Q MDx 用于测量 DNA 浓度或获得荧光计读数。

以下屏幕截图显示了此分析。



准备一次运行

若要进行浓度分析，首先要准备荧光标准品和样本，最好为三份。

标准品的准备

标准曲线用于从每个待测样本中测定 DNA 的浓度。

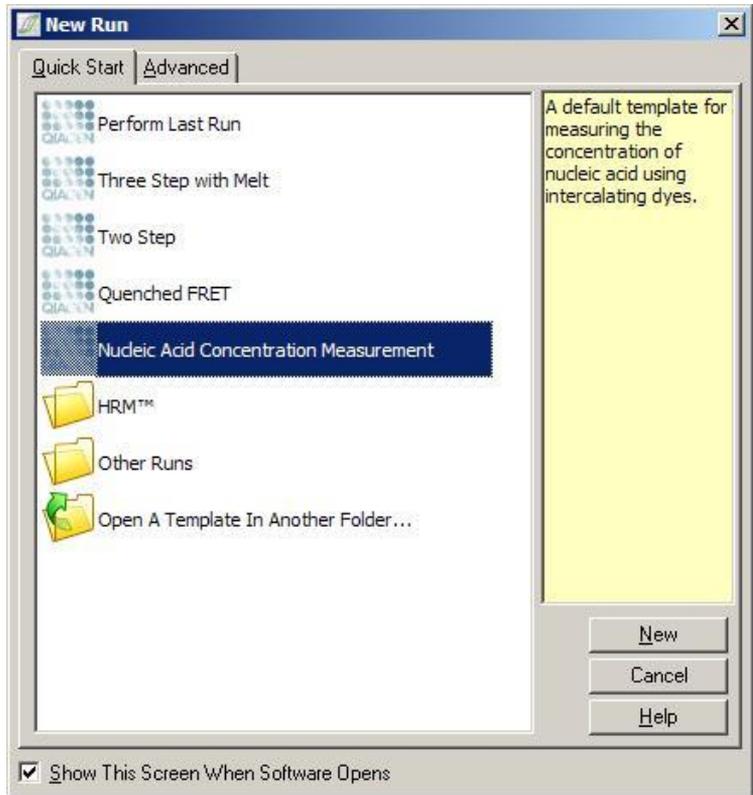
用于标准曲线的 DNA 应该与待测样本的 DNA 类型相似。应该使用紫外分光光度法测定至少一个 DNA 样本的浓度，并且此样本应该用作标准品。最少应该使用 3 个标准品（重复）。荧光检测中使用的 DNA 标准品仅在 1 - 100 ng/μl 范围内呈线性，这非常重要。在这个范围内，如果 DNA 的浓度减半，荧光读数也应该减半。由于化学物质的非线性，此范围外的任何浓度的置信区间可能很宽。

待测 DNA 的类型

已经观察到了不同 DNA 类型（例如，基因组 DNA 与质粒 DNA 相比）测量之间的差异。因此只有类型相似的 DNA 才能一起测量，并且测量基因组 DNA 时应该避免使用质粒 DNA 作为标准品。

运行设置

若要开始运行，从快速启动向导选择“Nucleic Acid Concentration Measurement (核酸浓度测量)”。



注意：确保阳性对照（例如高浓度标准品）在管位 **1** 运行。如果没有阳性对照，软件不能优化增益设定实现最大灵敏度。每次运行前将会提示您。

分析

浓度分析通过联系荧光水平与浓度值进行。有两种分析模式可用。应该选择的最佳分析取决于化学物质和应用。

“Linear Regression (线性回归)”在假设线性关系的前提下对数据进行分析，并且在产生的线性模型基础上估计未知数值。此方法通过从线性模型检查读数的偏差来测定测量误差。

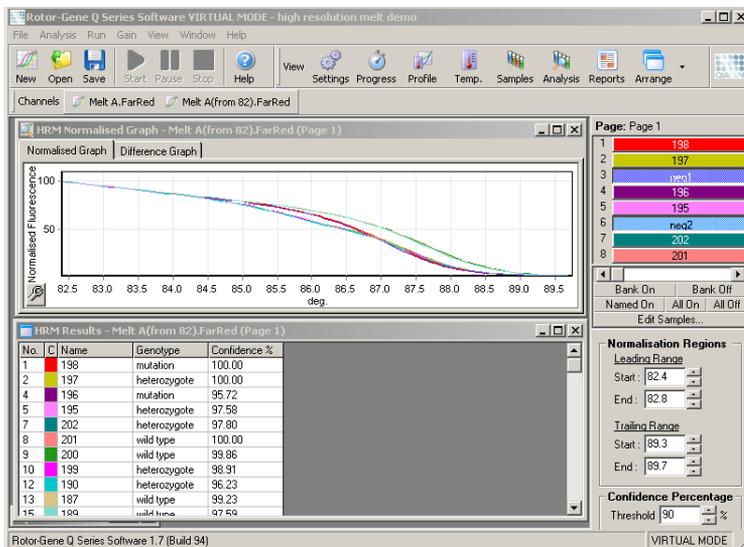
差。如果浓度读数呈线性，这是最适用的分析方法，因为它为用户提供统计学的方差分析(ANOVA)。

“Spline Curve Fit (样条曲线拟合)”假定仅浓度数值随荧光增强而增加。此方法能够更准确地估计非线性数据，但是不能提供 ANOVA，因为此方法不是假设线性模型。

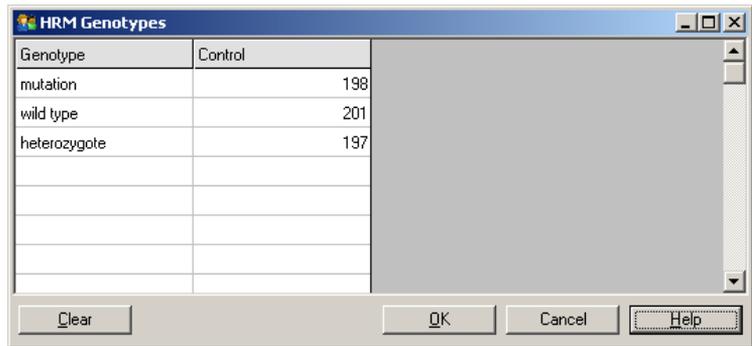
7.6.11 高分辨率熔解分析

高分辨率熔解 (HRM) 分析根据序列长度、GC 含量和互补性对样本进行描述。HRM 分析应用在基因分型中，例如基因突变的分析或单核苷酸多态性 (SNPs) 的分析，还应用于实验胚胎学，用于 DNA 甲基化状态分析。与其他方法相比，HRM 分析提供准确的结果并且节约探针和标记费用。

若要进行分析，在“Analysis (分析)”窗口中选择“Other (其他)”，然后选择“高分辨率熔解分析 (高分辨率熔解分析)”。双击通道进行分析。通过对所有起始和结束荧光值取平均值，然后使每个样本的终点与平均值一致，对来自原始通道的熔解曲线进行标准化。



点击“Genotypes (基因型)”进行样本的自动寻找。输入基因型的名称然后输入用作阳性对照的样本的编号自动寻找未知样本。



关于 HRM 分析的更多信息，参见第 11 节。

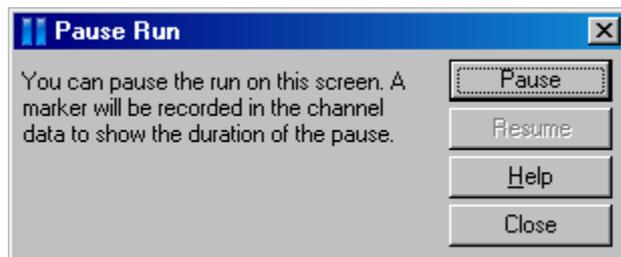
7.7 运行菜单

7.7.1 开始运行

此选项用目前的增益设置启动定义的温度流程。开始运行前，会出现“Profile Run Confirmation (流程运行确定)”窗口。显示温度流程和每个通道的增益设定的图示。

7.7.2 暂停运行

此选项可以使运行暂停和恢复。暂停和恢复会严重影响一次运行的结果。因此，结果中的标记会说明运行曾被暂停以及暂停的时间。在“Run Settings (运行设置)”窗口的信息标签中还会出现一个信息（见第**错误!未找到引用源。**节）。



<p>警告</p> 	<p>热表面 [W18] 当暂停运行时，Rotor-Gene Q MDx 不会完全冷却至室温。 处理仪器中的转子或任何管子前需要特别小心。</p>
---	--

7.7.3 停止运行

如果选中此选项，将出现确认运行应该被停止的提示。

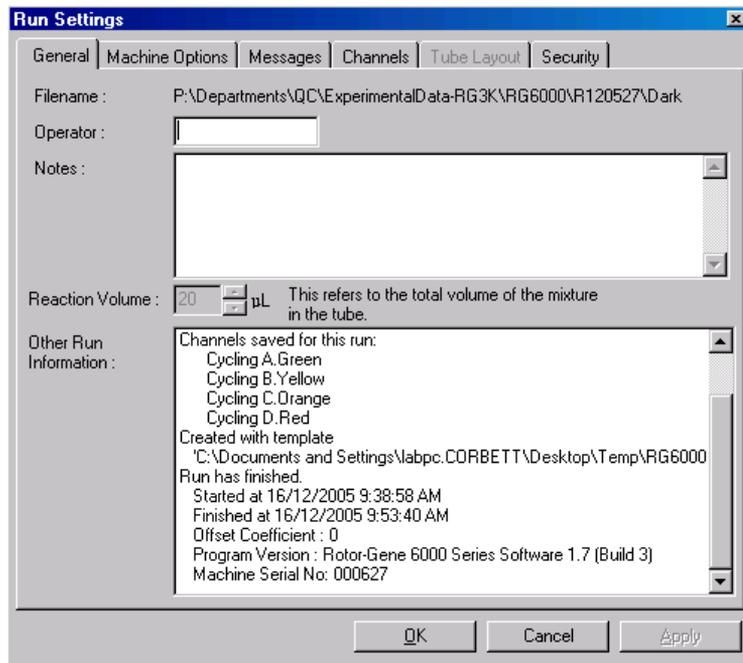
7.8 查看菜单

7.8.1 运行设置

总则

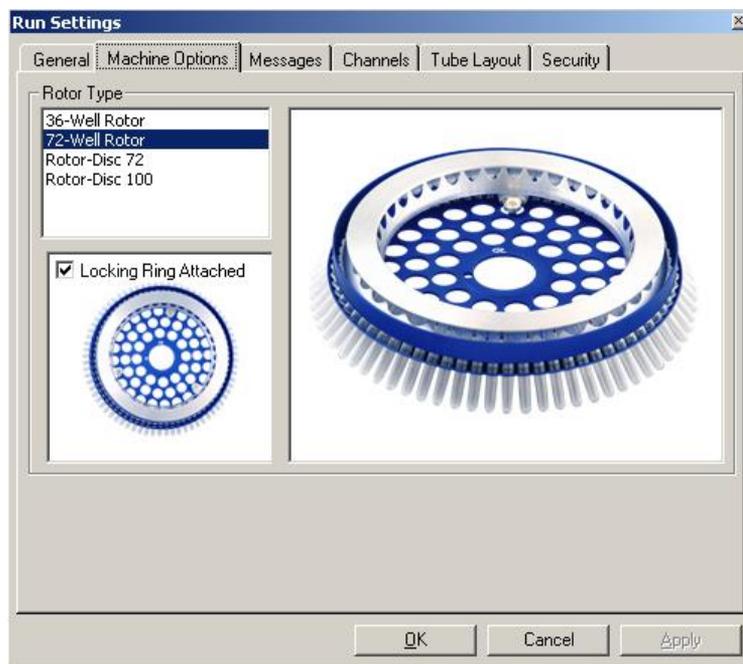
此窗口可以进行运行信息的设置，包括运行文件名、分析日期、操作人员和任何相关注意。

除了流程，此窗口包含构成运行所需的所有信息。运行结束后，此窗口中显示以下信息：使用的循环器、增益设定、通道数量以及开始/结束时间。



仪器选项

此标签显示 Rotor-Gene Q MDx 仪器的设置信息。



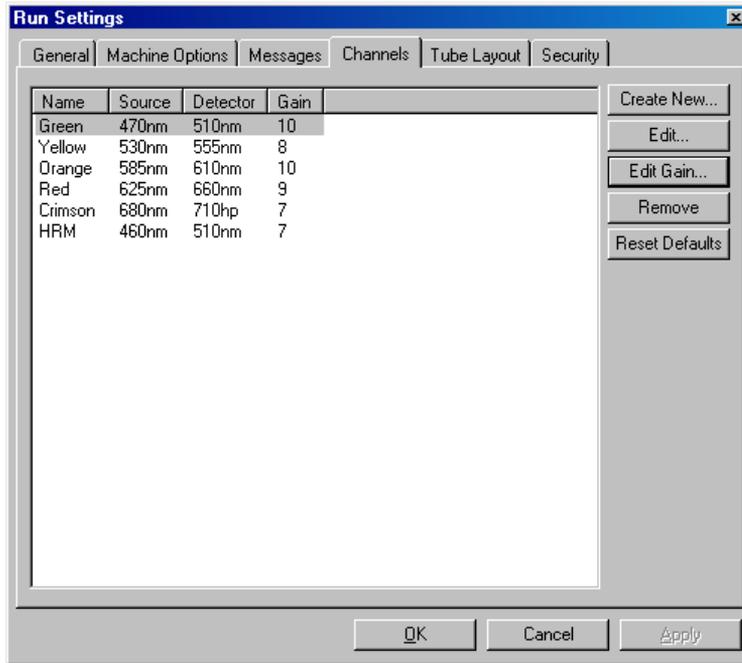
转子应该根据 Rotor-Gene Q MDx 目前所安装的进行设置。如果打开一个已有的运行，此设定将会反映循环器中当时安装的转子。

信息

此标签显示的信息在用户对功能进行修改时显示，例如一次运行中暂停循环器或跳过几个循环。此标签还显示运行期间接收到的警告。如果结果为非预期值，应该检查此标签。

通道

如果设定一个新运行，通道标签显示可用通道的目前设置。如果查看一个已有的运行，显示的信息代表运行进行时的通道设置。如果运行破坏了通道设置，可以点击“Reset Defaults (重设默认)”恢复默认通道。



- 名称： 显示通道的名称。
- 光源： 显示 LED 光源的激发波长。
- 检测器： 显示检测波长及滤镜类型。（nm=带宽，hp=高通）
- 增益： 显示特定通道的增益值。
- 新建…： 这一功能允许建立一个新的通道。点击”**Create New (新建)…**” 打开一个窗口，在该窗口中输入新的名称、光源和检测滤镜。可以在每个窗口边上的下拉框里选择滤镜。
- 通道： 4 通道混合检测的标准通道为绿色，黄色，橙色和红色通道

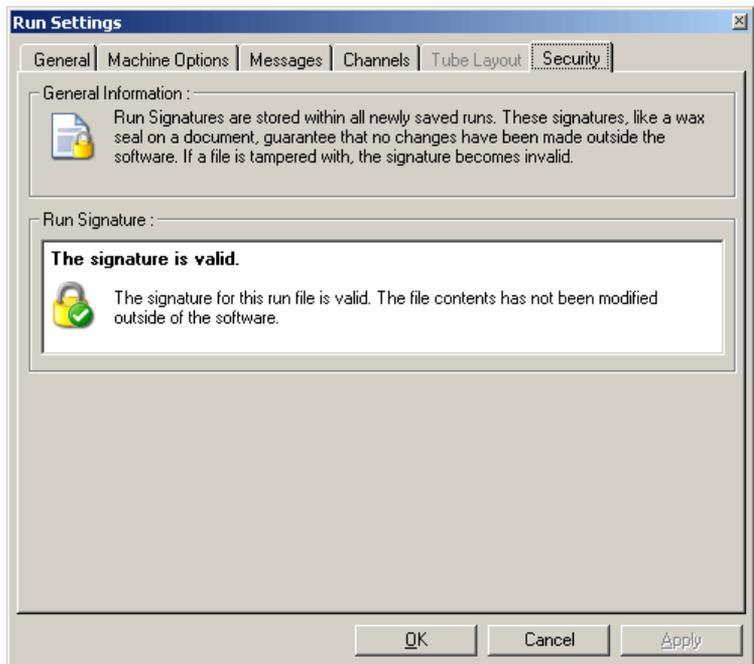
管子布局

如果使用 72 孔转子，可以按照与 9x8 孔板标记接近的方式排列样本。默认情况下，管子布局标签允许按顺序（即 1、2、3...）标记样本。这就是说样本按照其在 Rotor-Gene Q MDx 的位置顺序连续地被标记。样本还可以被标记为 1A、1B、1C 等。如果使用多道移液器建立样本，此选项会非常有用。

安全性

安全性标签显示关于运行签名的信息。运行签名是一个不可逆键，每次文件被更改时，此键再生。如果*.rex 文件的任一部分在软件外被修改，签名和文件就不能再匹配。检查签名可以确认原始数据没有在外部应用中被修改，文件没有被篡改并且温度图是有效的。签名还可以保护不受例如文件系统错误的影响。

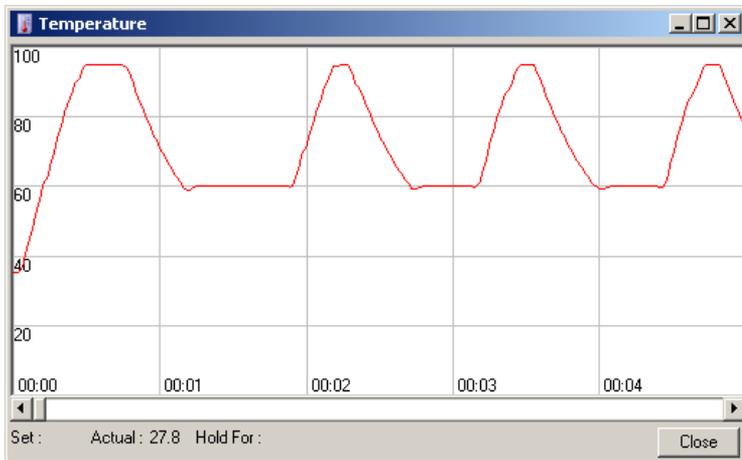
注意：如果*.rex 文件被 E-mail，加密程序会使签名无效。为了避免这种情况，e-mail 前先对文件进行压缩。



7.8.2 温度图

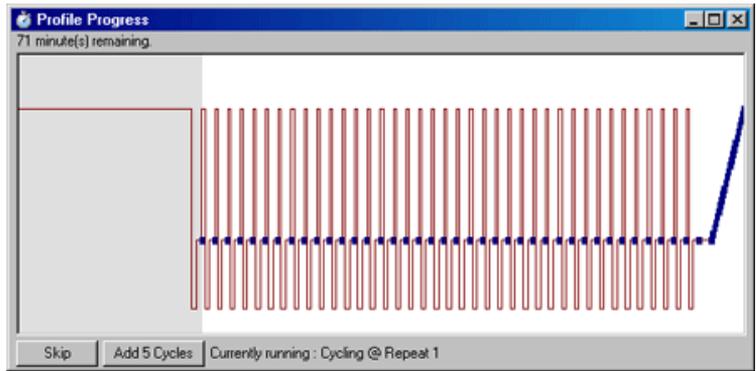
从“View (查看)”菜单选择“Temperature Graph (温度图)”，或在“Temp. (温度)”按钮上点击，弹出“Temperature (温度)”窗口。

此图显示一次运行期间样本的温度。随着运行的进行，会显示程序每一步骤的“Set (设定)”、“Actual (实际)”和“Hold (保温)”时间。对于已有运行，“Temperature (温度)”窗口显示运行期间的温度历史。垂直刻度代表温度，水平刻度代表时间。使用滚动条在“Temperature (温度)”窗口上前后滚动。



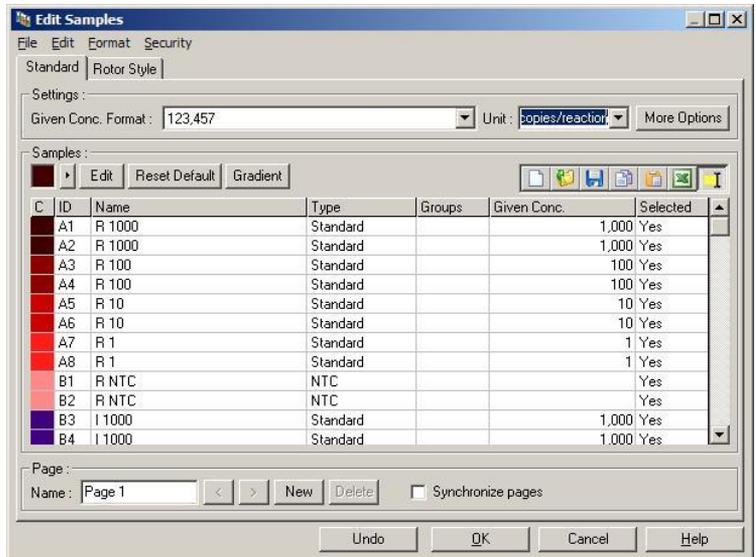
7.8.3 流程进程

从“View (查看)”菜单选择“Profile Progress (流程进程)”，或在“Progress (进程)”按钮上点击，弹出“Profile Progress (流程进程)”窗口。此窗口显示与运行相关的热流程的图示。进行运行时，窗口的阴影部分反映已经完成的循环数。还有一项可以估计需要多长时间来完成运行的选项。



跳过: “Skip (跳过)” 允许流程的任何步骤被跳过
 添加 5 个循环: “Add 5 Cycles (添加 5 个循环)” 向目前的循环步骤添加 5 次重复

7.8.4 编辑样本



点击“Samples (样本)”按钮，弹出“Edit Samples (编辑样本)”窗口。还可以通过在屏幕右侧的样本列表中点击右键进入此“Edit Samples(编辑样本)”窗口。此窗口与向导中

“Edit Samples(编辑样本)”窗口的功能相同，只是工具栏功能在文件和编辑菜单也可以使用。

窗口的顶部出现四个菜单：文件、编辑、格式和安全性。文件菜单用于创建新的（空白）“Edit Samples(编辑样本)”窗口，打开已有的样本模板或保存样本名称作为将来使用的模板。这些模板文件的扩展名为*.smp。编辑菜单可以对众列进行复制和粘贴。安全性菜单能够锁定样本定义。



这一下拉菜单可供你选择适当格式的程度显示。浓度自动以你当前选择的位置给定格式。



这一下拉菜单用于设定检测的测量单位。



按钮

重要性

线型:

你可以编辑线型，以使图形在黑白打印机上更易区分。你也可以通过修改线型强调某些线。要运用该项功能，点击编辑按钮边上的右箭头号。



按住“Edit (编辑)”将打开颜色选择器。在对管子进行标色时可以同时选中多列。



点击”Reset Default (重设默认)”可以将所有的颜色框都恢复到默认的颜色值。



“Gradient (梯度)”功能可以在选中的第一个和最后一个颜色之间生成颜色梯度。在一组样本设置中可以定义多个颜色梯度



按钮 重要性



“New (新建)”图标在准备数据输入时清除“Edit Samples (编辑样本)”窗口的内容



“Open (打开)”图标可打开一个对话框，你可以选择导入一个 Rotor-Gene Q MDx 文件。

注意：打开窗口中的样本数量必须与导入的文件相匹配



“Save (保存)”图标可打开一个对话框，可以保存输入了名称和文件夹的目前样本定义的副本。



“Copy (复制)”图标可复制选中的单元格。



“Paste (粘贴)”图标可将通过复制命令选中的的单元格粘贴到网格中相应的位置。



“Excel”图标可打开一个对话框，提示输入文件名和样本信息保存的文件夹。点击“Save (保存)”后 Excel 文件自动打开。



“Append/Overwrite (添加/覆盖)”图标可用在“编辑样本”窗口中改变单元格的编辑。如果选择覆盖，编辑时现有数据会被覆盖。如果选择添加，编辑时新数据添加到已有数据的末尾。

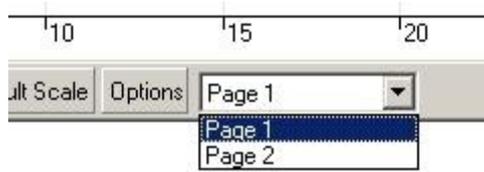
样本类型样本可以是下表列出的多种类型定义中的一种。

:

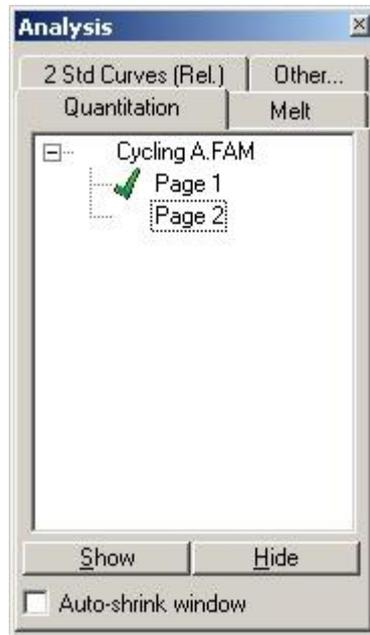
样本类型	说明
None	该位置没有样本
NTC	无模板对照
Negative Control	阴性对照
Positive Control	阳性对照
Unknown	将要分析的未知样本
Standard	用于绘制标准曲线，计算未知样本浓度的样本
Calibrator (RQ)	校准品的指定值为 1，并且所有其他样本的浓度都是对照此样本计算的

页： 此功能允许用户在相同运行中有不同的样本定义和不同实验。这对于在不同通道中分析不同产物是非常有用的。使用箭头按钮在样本页之间移动。使用“New (新建)”和“Delete (删除)”按钮创建和删除样本页。相同通道可以有多个样本定义，从而在不需要多路复用的情况下运行多个标准曲线。仅需要在各自的样本页上定义目标样本及其相关的标准曲线。然后可以使用一组定义独立地对单一通道进行分析。样本页可以标记为“Page 1 (第 1 页)”、“Page 2 (第 2 页)”等，或者给予任何名称(例如，“Housekeeper (看家)”)。该名称会出现在报告中。

查看原始数据时，可以使用“Options (选项)”按钮旁边的下拉菜单选中显示数据的样本定义。



进行在“Analysis (分析)”窗口中选中的分析时使用的样本页（见第 7.6.1 节）。



指定浓度: 此选项显示每个标准品的浓度。单位可以定义为小数或对数。如果标准品为一个稀释系列，仅需要输入前 2 个标准品。按 ENTER 键，程序自动在系列中添加下一个稀释度。

线型: 编辑线型，以使图形在黑白打印机上更易区分。可以通过修改线型强调某些线。要运用该项功能，点击“Edit (编辑)”按钮边上的右箭头。



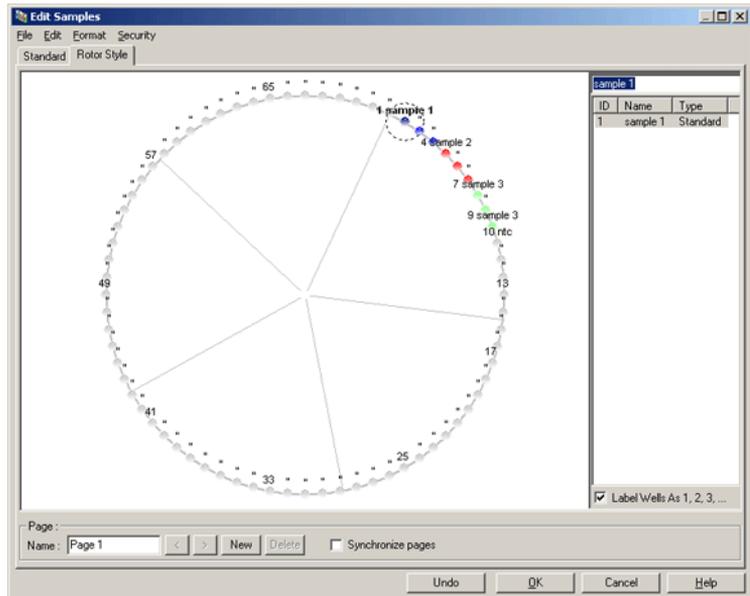
工具栏将会显示默认线型“Solid (实线)”。线型可以修改为“Dashed (虚线)”、“Dotted (点状线)”、“Hairline (细线)”、“Thin (细)”或“Thick (粗)”。完成后，点击左箭头返回编辑，重设默认，并梯度查看。



- 多行输入：** 如果一次需要在多行中输入相同信息，选中所有行，然后开始输入。信息将会自动输入到每行中。此功能也适用于选择样本类型、选择颜色或输入浓度。
- 样本类型热键：** 要快速选择样本类型，输入样本名称的首字母。例如，要设定 5 个样本为无模板对照，在样本类型一栏将其选中，然后按 N 实现 NTC。所有样本将会转换为 NTC。
- 保存，重新使用：** 完整的样本描述可以另存为样本文件 (*.smp)，并载入到有相同样本设置的未来运行中。

转子类型

“Edit Samples (编辑样本)”窗口中的这个标签提供另外一种输入样本名称的方法。在转子图形上点击并拖动鼠标指针选择重复。窗口右侧的列表将会更新。可以输入样本名称，并且将会为目前选择设置相同的名称。软件与识别复制一样识别此功能。

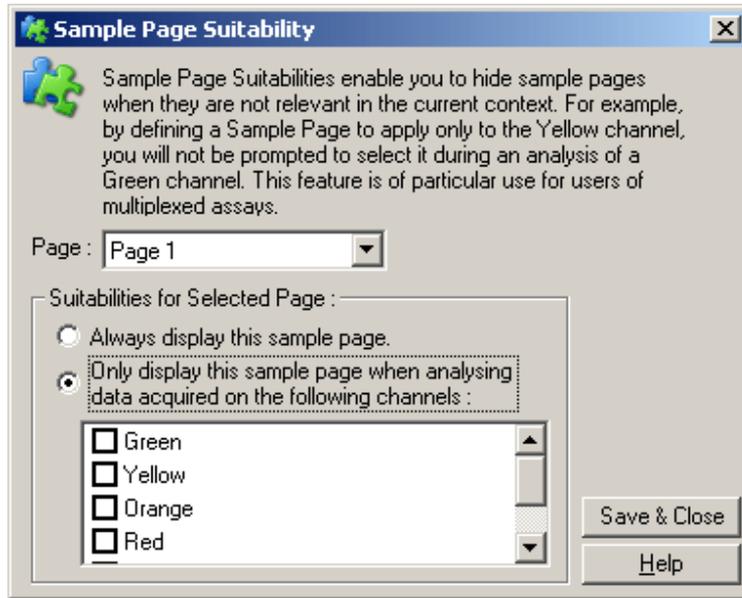


“Rotor Style (转子类型)” 标签提供“Standard (标准品)” 标签的删减版本，并且是为想要快速设置样本名称和颜色的用户设计的。一些设置不能在此标签中定义，例如是否样本代表标准品或每个标准品的已知浓度。如果需要定义这些设置，应该使用标准品标签。

样本页适用性

若要使用“Sample Page Suitability (样本页适用性)” 窗口，在“Edit Samples (编辑样本)” 窗口中点击“More options (更多选项)”，然后点击“Define Suitabilities (定义适用性)”。 “Sample Page Suitability(样本页适用性)” 窗口允许用户进行样本页与通道的匹配。例如，目标基因的样本页可能用于绿色通道，看家基因的样本页可能用于黄色通道。此举例中，建立样本页适用性减少了可用分析选项的数量，仅包括那些特定分析的相关选项。

如下所示为“Sample Page Suitability(样本页适用性)”窗口。

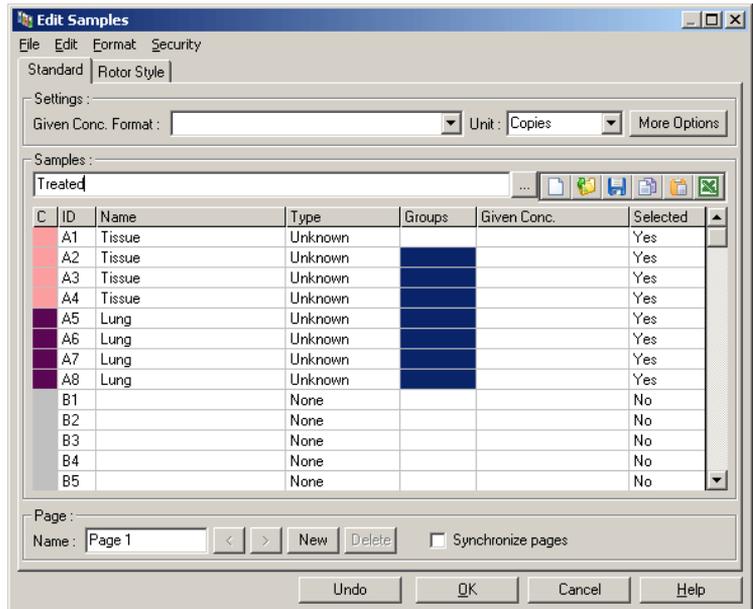


注意：建立一个分析时，创建所有样本页和样本页适用性，然后将其另存为模板。这样就减少了每次运行需要设置的数量。

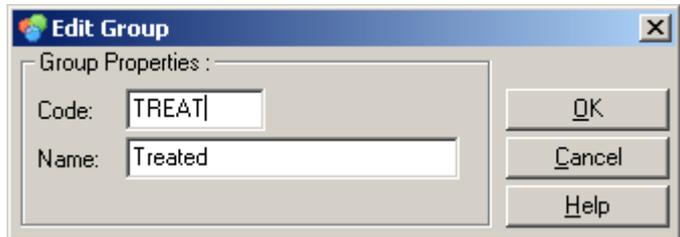
组

样本组允许对随意收集的样本计算统计数据。重复中样本必须有相同名称，与此不同，样本组中样本可以有任意名称、可以放在转子的任意位置、并且可以属于多个组。

1. 要定义一个组，在样本旁边输入组的全名然后按 ENTER 键。



2. 出现“Edit Group (编辑组)”窗口。

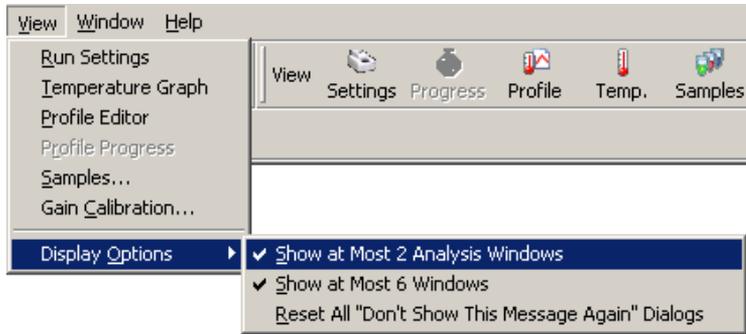


3. 定义一个合适的缩写，然后点击“OK (确定)”。现在缩写就可应用于建立组。任分析中，组的总计结果，例如平均值和 95%置信区间自动计算。

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.82				18.75	0.17	[18.48, 19.02]	
A2	Tissue	Unknown	18.75							
A3	Tissue	Unknown	18.92							
A4	Tissue	Unknown	18.52							
A5	Lung	Unknown	18.73				18.70	0.09	[18.55, 18.85]	
A6	Lung	Unknown	18.62							
A7	Lung	Unknown	18.81							
A8	Lung	Unknown	18.63							
A1-A8	Treated	Group					18.72	0.13	[18.62, 18.83]	

7.8.5 显示选项

如下给出了显示选项菜单。



最多显示两个分析窗口： 如果选中此选项，一次最多显示两个分析窗口。如果打开多个窗口，可能影响可读性。选中此选项关闭第一次的分析窗口并用最后打开的窗口替换。如果不选中此选项，可以显示 2 个以上的分析窗口。

最多显示 6 个窗口： 为了提高可读性，新窗口打开时，软件删除不使用的窗口。此选项是默认的，因为它可以保持 Rotor-Gene Q 软件的屏幕整洁。如果需要一次显示 6 个以上的窗口，取消选中此选项。

重设所有“Don't Show This Message Again (不再显示此信息)”对话框 如果选择此选项，软件将会重新显示所有选中“Don't Show This Message Again (不再显示此信息)”复选框的对话框。其中包括以前设置为不再显示的关于可疑设置的信息。

此选项可能对不熟悉 Rotor-Gene Q MDx 或 Rotor-Gene Q 软件的新用户非常有用。

7.9 安全性菜单

Rotor-Gene Q 软件包括可以使软件安全运行的功能。正确设置时，Rotor-Gene Q 软件可以确保以下几点：

- 使用 Rotor-Gene Q MDx 或分析软件仅限于用户组。

- 记录运行文件的修改。
- 检测未授权的修改（签名）。
- 记录用于运行的模板
- 保护样本名称

与 **Windows** 安全功能相整合

为了提供高度的可靠性，Rotor-Gene Q 软件内部并不对安全性进行管理。账户、组和密码都使用 Windows 自带的安全模式（Windows 安全）进行管理。整合后允许使用与网络文件和程序相同的密码来控制 Rotor-Gene Q 软件从而来减少管理。

例如在大的机构，因为集中的安全模式，网络管理员可以方便将已离职用户的名删除。因此，根据最佳实践，安全地安装 Rotor-Gene Q 软件首先涉及到 Windows 安全角色的设置。

前提

要使用安全功能，必须使用 Windows XP 或 Windows 7 Professional。Windows XP 或 Windows 7 Home 版不能使用安全功能，因为它没有软件使用的细粒度访问模型。软件必须安装“Force authentication through Windows domain (通过 Windows 域名进行强制身份验证)”选项。

注意：如果登录到 Linux Samba 域，安全性菜单不会出现。必须有本地登录或 Windows 服务器才能使用安全功能。

7.9.1 **Windows XP** 安全功能配置

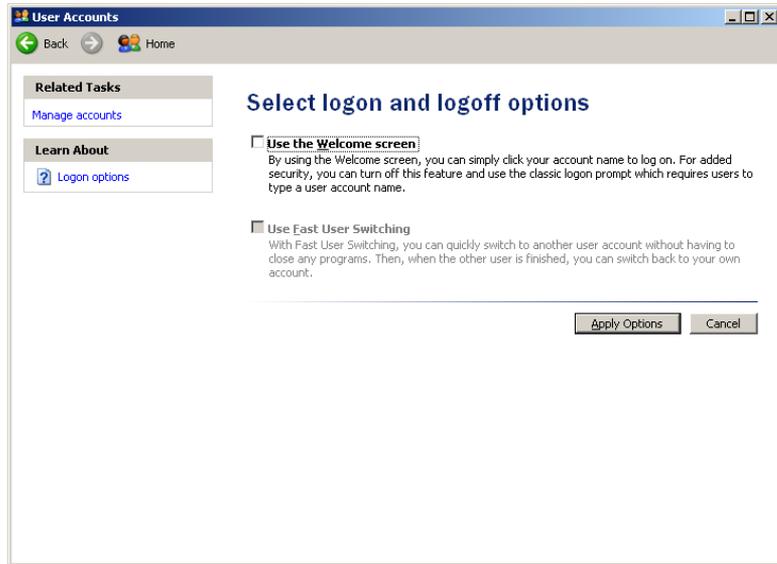
本节描述了如何安装系统以安全地运行 Rotor-Gene Q 软件。

要使用安全功能，软件必须安装“Force authentication through Windows domain (通过 Windows 域名进行强制身份验证)”选项。要求在你的权限范围内的 Windows 区域安装软件，这对于提供可靠性保障和安全功能是必需的。

禁用简单登录

更安全的 Windows 登录方式是禁止通过“欢迎界面”简单地登录。如要将登陆界面更改为经典的登录提示页面，可遵照下述说明操作。

1. 点击“开始”按钮，选择“设置”，然后选择“控制面板”，之后进入“用户账户”。
2. 在对话框中选择“更改用户登录/注销方式”。
3. 在下一窗口，禁用“使用欢迎界面”选项，然后点击“应用选项”。



在管理员帐户下运行

大多数用户在计算机的管理员帐户下运行软件而不设密码。虽然这样比较方便，但这样便无法确定到底谁在使用计算机。这会降低可靠性并使 Rotor-Gene 的许多安全措施无法激发。作为管理员运行时，所有的软件功能都是激发的。因此，以管理员身份运行，确保不需要安全功能的用户访问所有的软件功能。

新建用户帐户

用于每个使用软件的用户建立用户账户。每个用户可重复下列操作直至建立所有帐户。

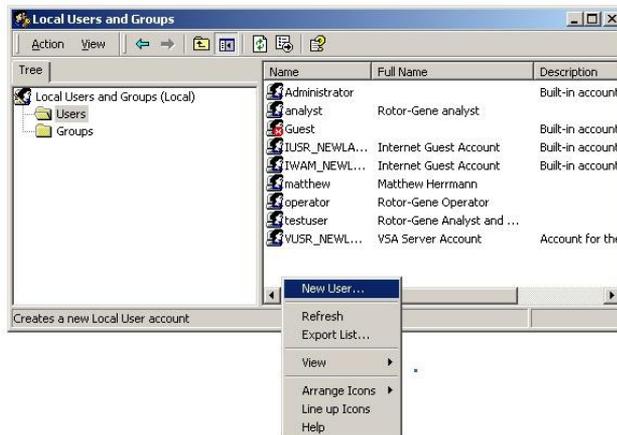
1. 要建立一个新用户，选择“Start/Settings/Control panel (开始/设置/控制面板)”。
2. 双击“Users and Passwords (用户和密码)”。



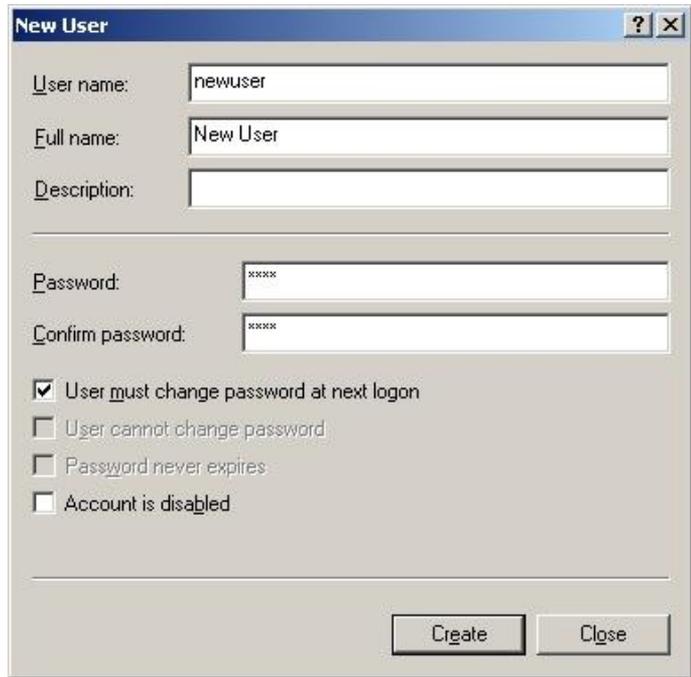
3. 点击“Advanced (高级)”标签，然后点击“高级”按钮。



4. 在出现的窗口中，选择“Users (用户)”文件夹，在右手边的窗口中点击右键并选择“New User (新用户)”。



5. 输入用户名和密码。默认情况下，创建的用户有正常访问权限。也就是说用户可以运行软件，但是不能安装新程序或改变系统设置。



The image shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: xxxx
- Confirm password: xxxx
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Create, Close

6. 点击“Create (创建)”,可以以用户的身份登录。

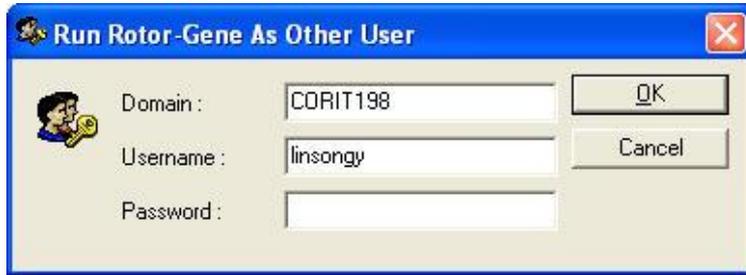
分配每个用户的角色

现在你应该为每个用户分配一个角色。权限分为以下几类：

- Rotor-Gene Q 操作人员-可以运行但是不能生成报告或进行分析
- Rotor-Gene Q 分析员-可以分析运行数据并生成报告，但是不能进行新运行
- Rotor-Gene Q 操作人员和分析员-有以上两种角色的功能
- 管理员-可为样本名称解锁并进行分析员和操作人员的所有操作
- 无-拒绝访问软件

分配角色：

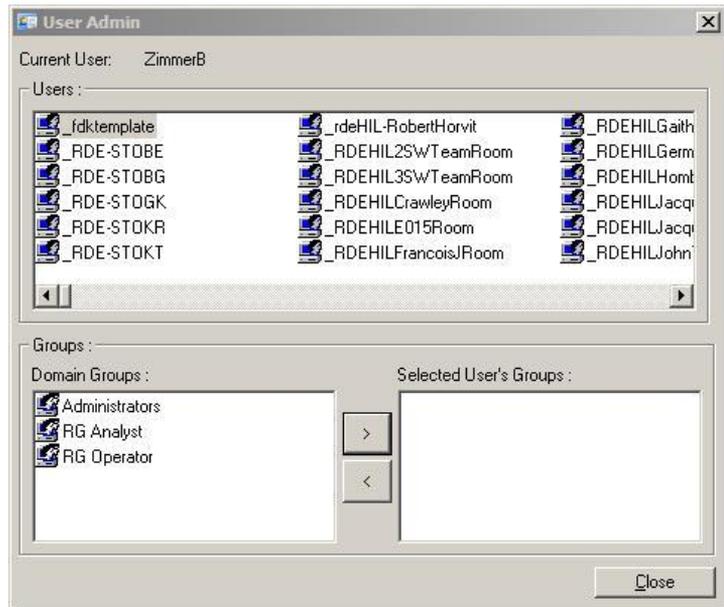
1. 以管理员身份登录 Windows，或使用“Rotor-Gene Q Software Login (Rotor-Gene Q 软件登录)”图标打开软件并登录。



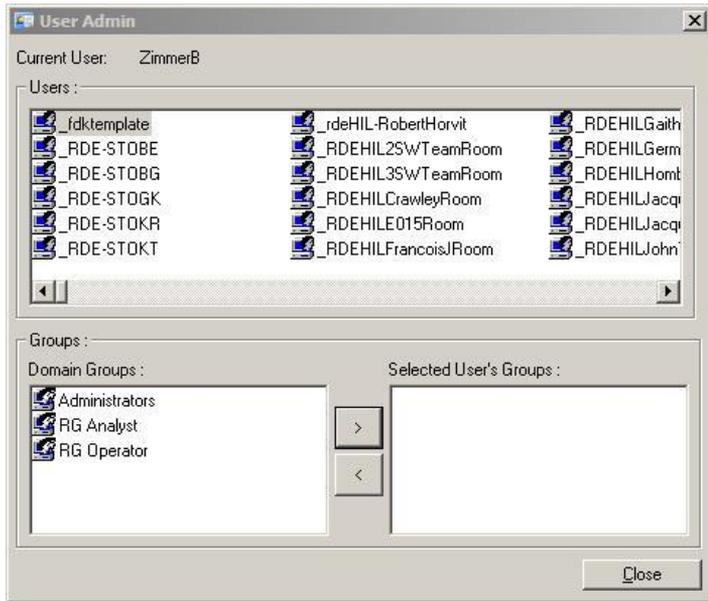
2. 一旦软件打开，点击“Security (安全性)”菜单。第一次访问“安全性”菜单时，Rotor-Gene Q 系列软件会配置一个系统组以控制对软件的访问。



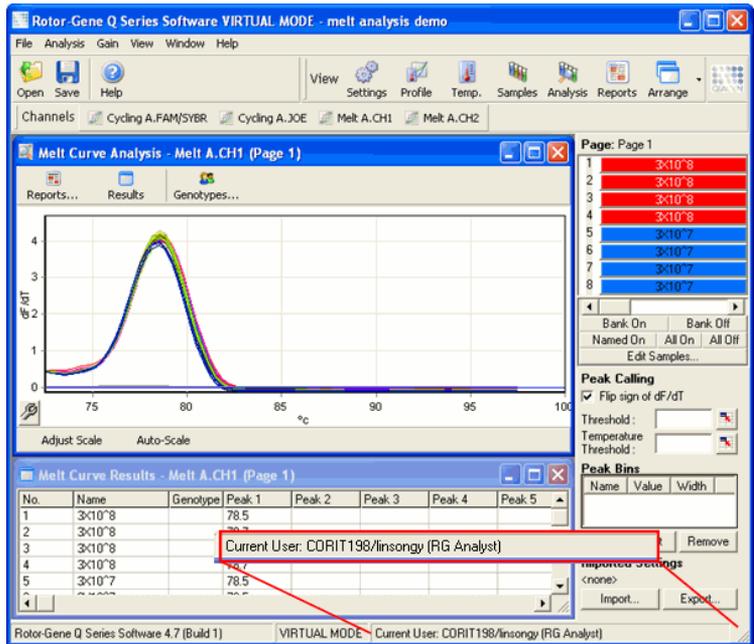
3. 点击“**Yes (是)**”，“User Admin (用户管理员)”窗口出现。面板的最上一栏显示计算机的所有用户。一些账户是系统使用的账户，因此会不太熟悉。下面显示指定的用户组。



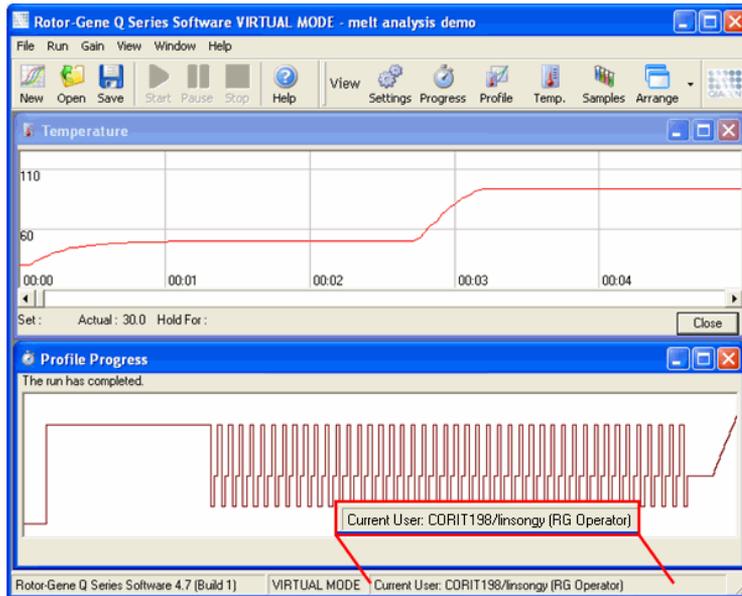
4. 要将一组分配给用户，从列表中选择用户名。底部面板将会更新，如果用户没有指定的组，就不能启动软件。下面的例子中，我们通过选择左手边的组将用户“linsongy”分配到RG分析员组中，然后点击“>”按钮。可以通过选中组，然后点击“<”按钮删除组。



5. 现在以用户的身份登录。作为 RG 分析员，运行菜单和“Profile (流程)”按钮不可用。但是，可以打开已有的文件并分析，如下屏幕截图所示。状态条说明用户“linsongy”是一个 RG 分析员。



- 再以管理员的身份登录，RG 操作人员的权力可以分配给“linsongy”并且可以重新启动软件。这时，分析菜单和“Reports (报告)”按钮会消失，并且运行菜单被激发。
- 状态条显示用户“linsongy”属于 RG 操作人员组。



8. 如果以管理员的身份登录并从用户“linsongy”删除所有组，“linsongy”打开软件时就会出现以下信息。



7.9.2 Windows 7 配置

本节描述了如何安装系统以安全地运行 Rotor-Gene Q 软件。

要使用安全功能，软件必须安装“Force authentication through Windows domain (通过 Windows 域名进行强制身份验证)”选项。要求在你的权限范围内的 Windows 区域安装软件，这对于提供可靠性保障和安全功能是必需的。

在管理员帐户下运行

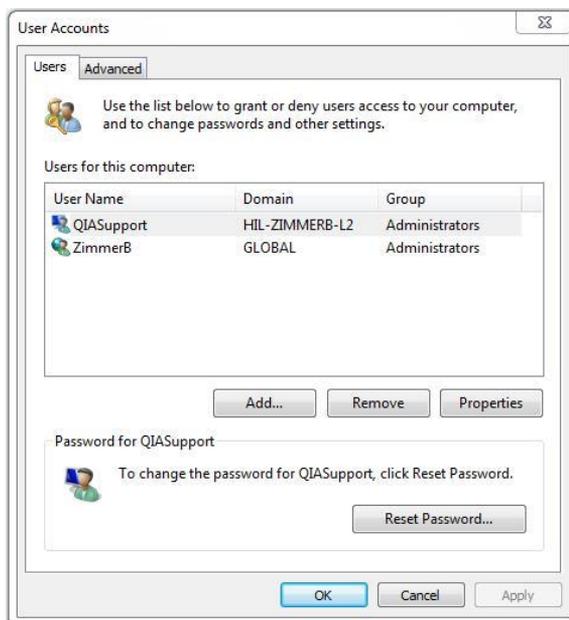
大多数用户在计算机的管理员帐户下运行软件而不设密码。虽然这样比较方便，但这样便无法确定到底谁在使用计算机。这会降低可靠性并使 Rotor-Gene 的许多安全措施无法激

发。作为管理员运行时，所有的软件功能都是激发的。因此，以管理员身份运行，确保不需要安全功能的用户访问所有的软件功能。

新建用户帐户

用于每个使用软件的用户建立用户账户。每个用户可重复下列操作直至建立所有帐户。

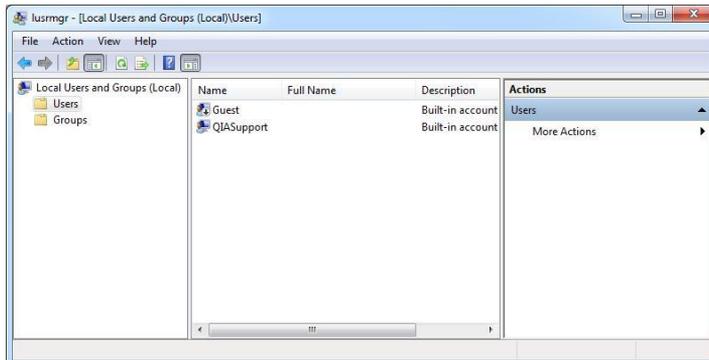
1. 要建立一个新用户，选择“Start/Settings/Control panel (开始/设置/控制面板)”。
2. 双击“Users and Passwords (用户和密码)”。



3. 点击“Advanced (高级)”标签，然后点击“高级”按钮。



4. 在出现的窗口中，选择“Users (用户)”文件夹，在右手边的窗口中点击右键并选择“New User (新用户)”。



5. 输入用户名和密码。默认情况下，创建的用户有正常访问权限。也就是说用户可以运行软件，但是不能安装新程序或改变系统设置。



The image shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: (masked with dots)
- Confirm password: (masked with dots)
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Help, Create, Close

6. 点击“Create (创建)”,可以以用户的身份登录。

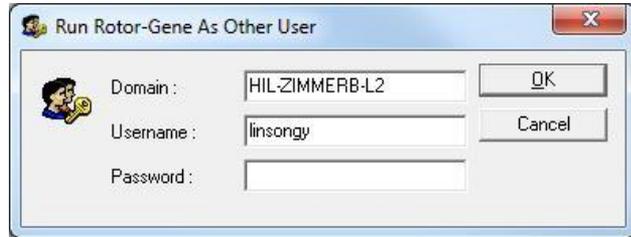
分配每个用户的角色

现在你应该为每个用户分配一个角色。权限分为以下几类：

- Rotor-Gene Q 操作人员-可以运行但是不能生成报告或进行分析
- Rotor-Gene Q 分析员-可以分析运行数据并生成报告，但是不能进行新运行
- Rotor-Gene Q 操作人员和分析员-有以上两种角色的功能
- 管理员-可为样本名称解锁并进行分析员和操作人员的所有操作
- 无-拒绝访问软件 Rotor-Gene Q 操作人员-可以运行但是不能生成报告或进行分析
- Rotor-Gene Q 分析员-可以分析运行数据并生成报告，但是不能进行新运行
- Rotor-Gene Q 操作人员和分析员-有以上两种角色的功能
- 管理员-可为样本名称解锁并进行分析员和操作人员的所有操作
- 无-拒绝访问软件

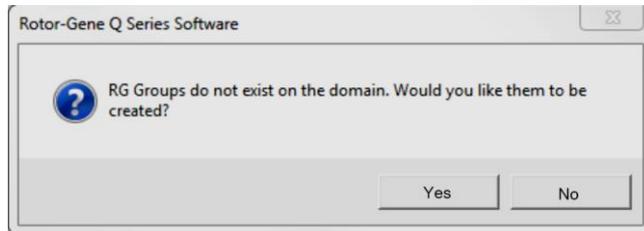
分配角色：

1. 以管理员身份登录 Windows，或使用“Rotor-Gene Q Software Login (Rotor-Gene Q 软件登录)”图标打开软件并登录。

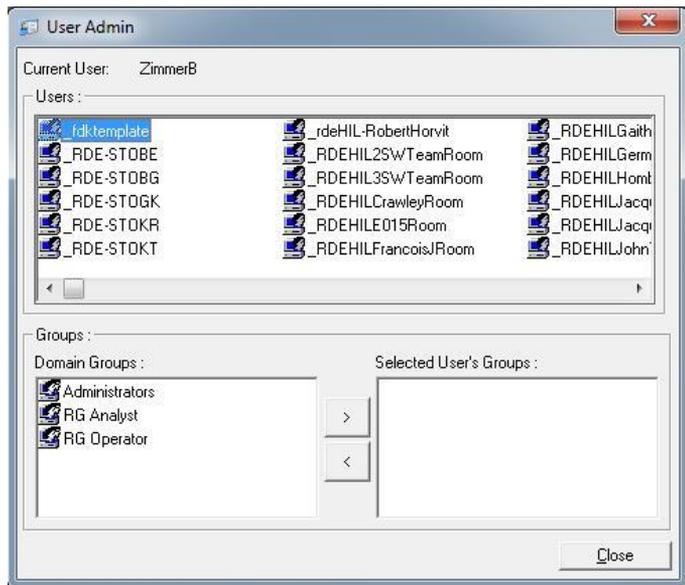


注：为采用 Rotor-Gene Q 软件创建 RG 组，必须在管理员权限下运行软件。您可右键点击桌面图标，在弹出菜单中选择“以管理员身份运行”来启用这一设置。

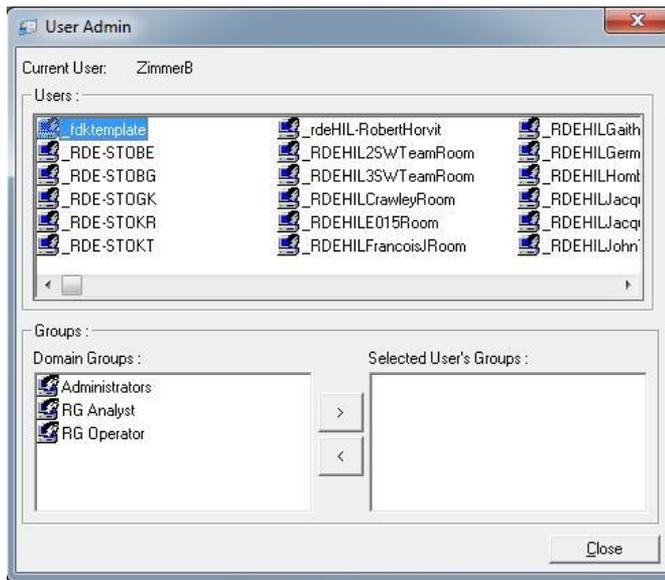
2. 一旦软件打开，点击“Security (安全性)”菜单。第一次访问“安全性”菜单时，Rotor-Gene Q 软件会配置一个系统组以控制对软件的访问。



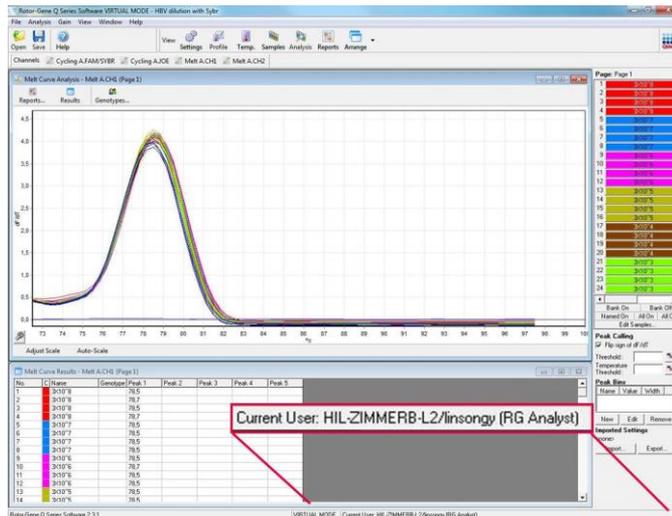
3. 点击“**Yes (是)**”，“User Admin (用户管理员)”窗口出现。面板的最上一栏显示计算机的所有用户。一些账户是系统使用的账户，因此会不太熟悉。下面显示指定的用户组。



- 要将一组分配给用户，从列表中选择用户名。底部面板将会更新，如果用户没有指定的组，就不能启动软件。下面的例子中，我们通过选择左手边的组将用户“linsongy”分配到RG分析员组中，然后点击“>”按钮。可以通过选中组，然后点击“<”按钮删除组。

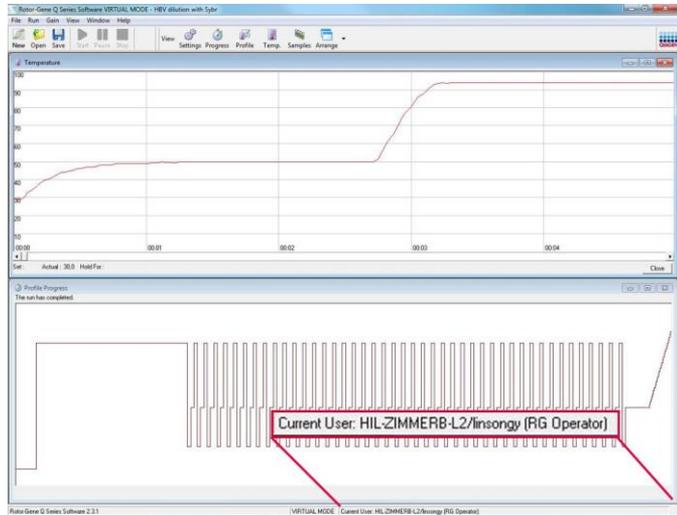


5. 现在以用户的身份登录。作为 RG 分析员，运行菜单和“Profile (流程)”按钮不可用。但是，可以打开已有的文件并分析，如下屏幕截图所示。状态条说明用户“linsongy”是一个 RG 分析员。

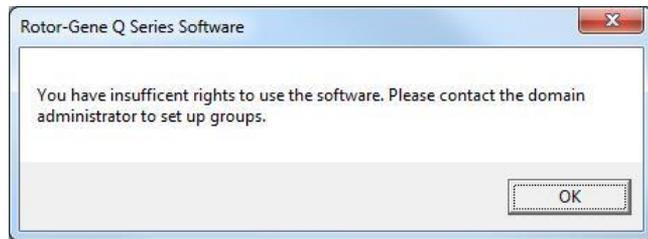


6. 再以管理员的身份登录，RG 操作人员的权力可以分配给“linsongy”并且可以重新启动软件。这时，分析菜单和

“Reports (报告)”按钮会消失，并且运行菜单被激发。状态条显示用户“linsongy”属于RG操作人员组。



7. 如果以管理员的身份登录并从用户“linsongy”删除所有组，“linsongy”打开软件时就会出现以下信息。



7.9.3

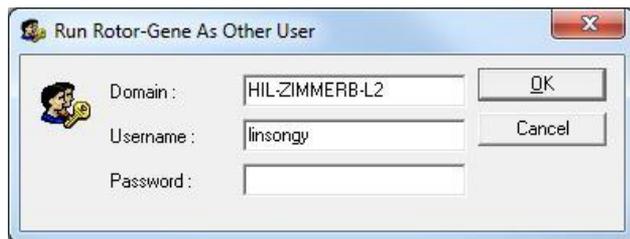
相同计算机上运行多个用户

操作多用户计算机上的 Rotor-Gene Q 软件，可以创建一组没有使用 Rotor-Gene Q 软件权限的用户账户。用此账户登录 Windows，其他用户就不能匿名访问 Rotor-Gene Q MDx。

1. 使用“Rotor-Gene Q Software Login (Rotor-Gene Q 软件登录)”图标，用户可以打开他们在 Rotor-Gene Q 软件上的用户账户。



2. 在出现的框中输入用户名和密码

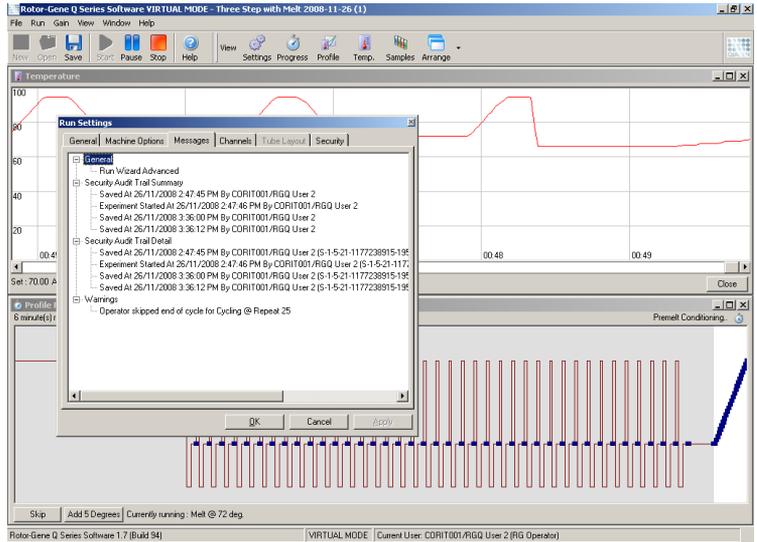


3. Domain (域名)可以是您登录的计算机或本地网络的名称。联系网络管理员以确定输入的域名。
注意：登录后，该用户可以使用所有用户文件。每个用户可以把文件保存到自己的区域。这样可以实现高水平的安全保护。
注意：每个用户在其运行完成后应该退出登录，防止其他用户以他们的名字进行操作。

7.9.4

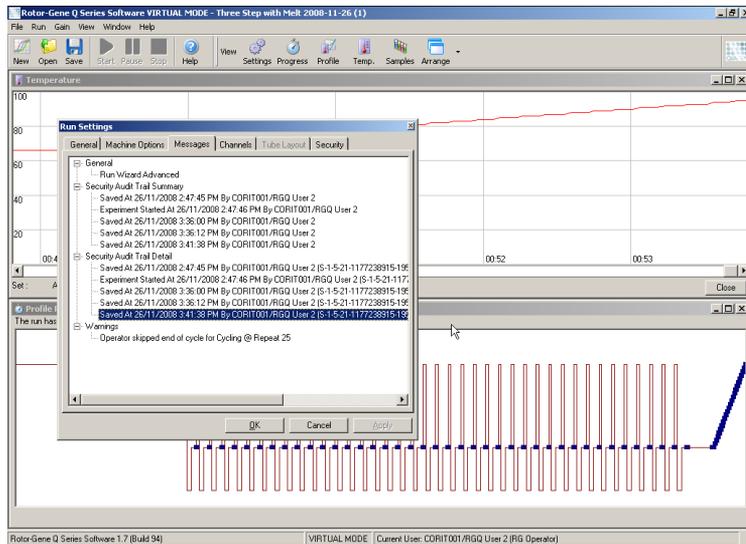
稽查跟踪

每次用户保存一个文件时，他们的详细信息就会被记录在“Messages (信息)” 标签下面的“Run Settings (运行设置)” 中作为安全稽查跟踪摘要和安全稽查跟踪细节。



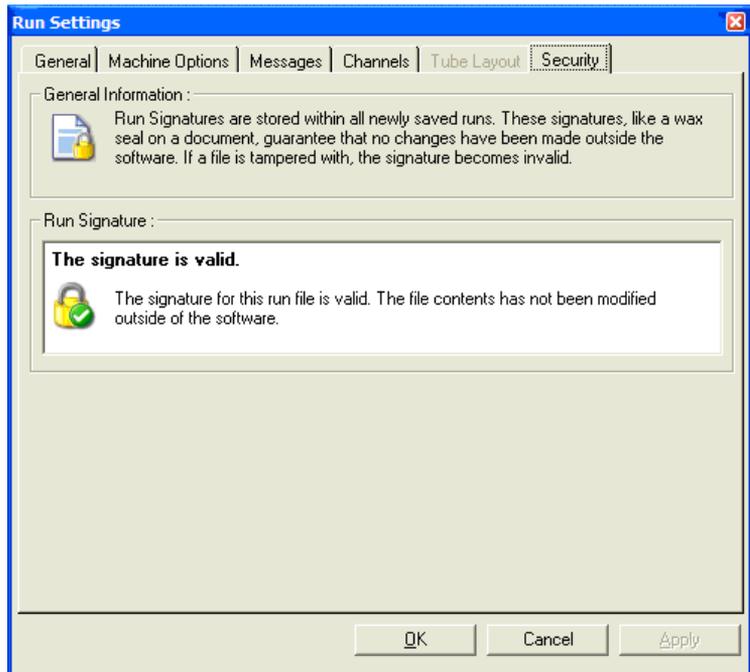
此功能可应用于监测谁对文件内容进行过修改。安全稽查跟踪细节包括更多详细信息例如用户的唯一身份标识。此标识对于防止用户在其他计算机上创建相同名称的账户以模仿另外一个用户非常重要。这种情况下，用户名是相同的，但是账户 ID 是不同的。

下方给出了账户 CORIT001/RGQ 用户 2 的标识 S-1-5-21-1177238915-195 的详细信息。

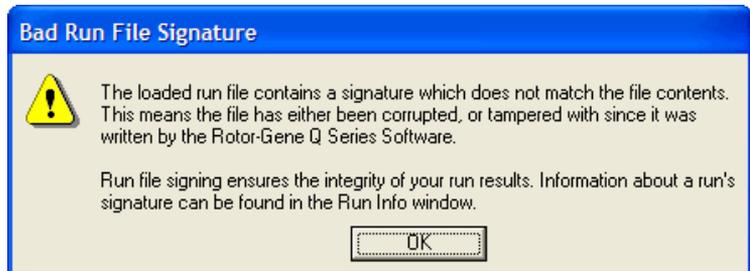


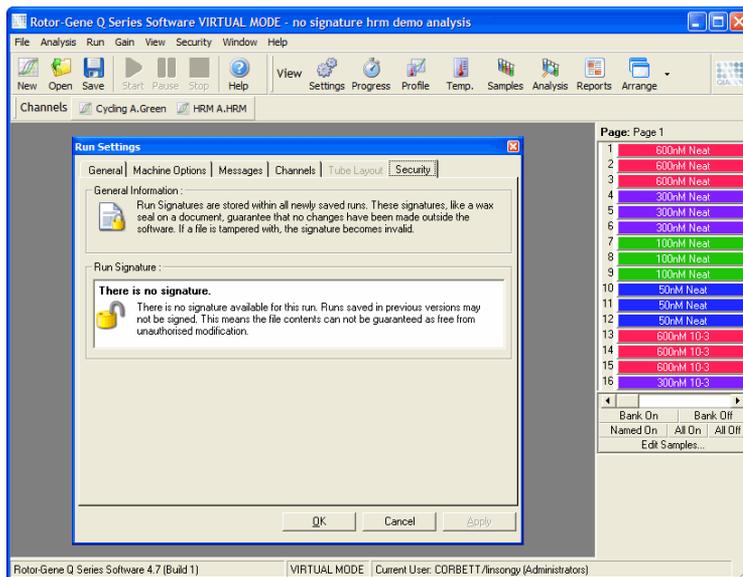
7.9.5 运行签名

稽查跟踪保存在 Rotor-Gene Q 的运行文件中。为了避免对这些文件进行任何不希望的修改，应该将其保存在一个安全的仅指定的 Windows 账户可以访问的位置。但是，如果文件被保存在共享区域，运行签名可以提供额外的安全保护。屏幕截图显示了有运行签名的文件在运行设置中的“Security (安全性)”标签。



运行签名是每次文件保存和连接至文件内容时生成的一个长字。例如，此文件的签名为 517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081。如果在记事本中打开文件并做编辑（例如，运行日期改为 3 天前），重新打开文件时会出现以下信息。





注意：如果 **E-mail** 文件，加密过程会使签名无效，为了避免这种情况出现，**e-mail** 前先压缩文件。

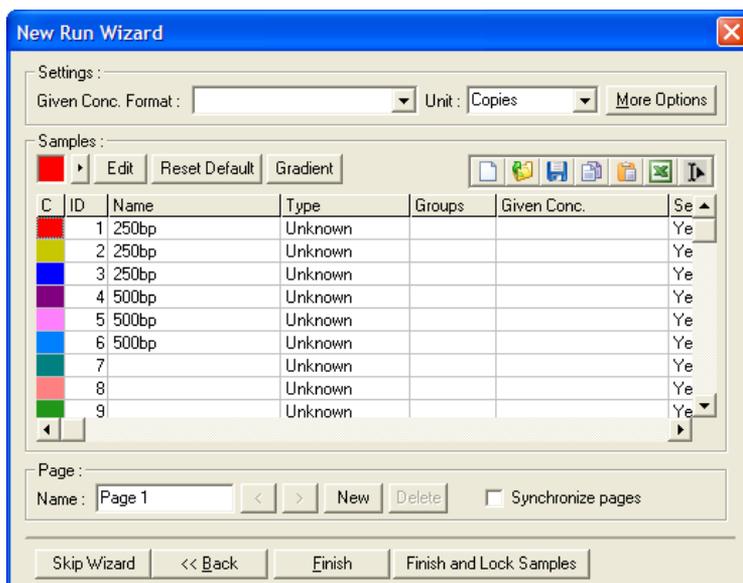
7.9.6

样本锁定

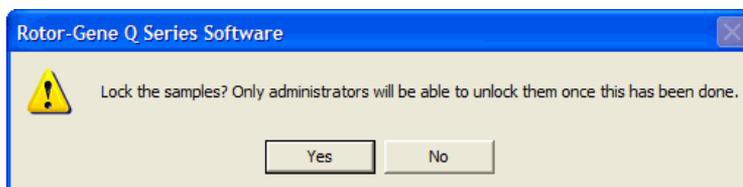
用户开始一项运行时，确保样本名称不被有意或无意地更改非常重要。因此，Rotor-Gene Q 软件提供了样本锁定功能。样本名称可以被任一用户锁定，但是只有管理员才能解锁。如果用户以管理员模式使用计算机，此功能没有太大用途。要使用此选项，计算机必须按照以前小节中所述进行安全地配置。

注意：如果想要锁定样本，不能以管理员的身份运行软件。使用 **RG** 操作人员和 **RG** 分析员组创建一个账户，并保持管理员密码保密。这样用户就需要管理员的授权才能解锁文件。

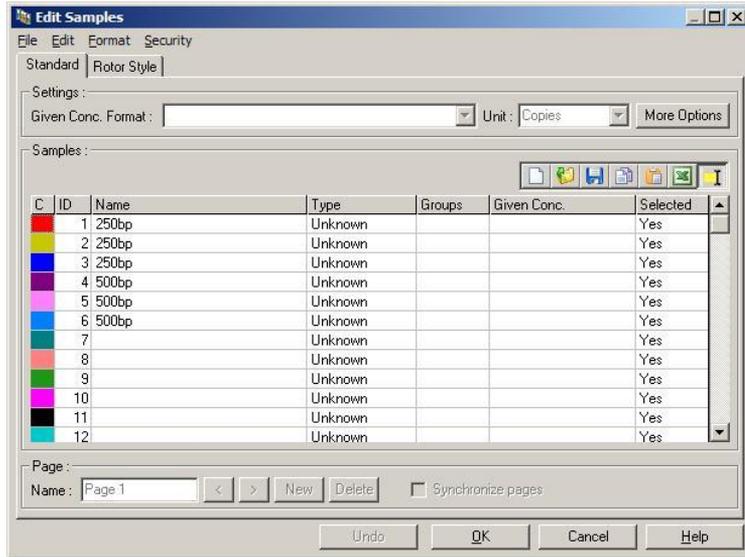
使用高级向导时，点击“**Finish and Lock Samples (完成并锁定样本)**”可以在开始运行前对样本锁定。



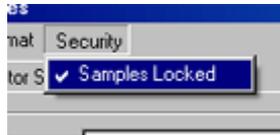
将出现以下警告，点击“**Yes (是)**”确认。



一旦样本被锁定，就不能在“**Edit Samples (编辑样本)**”窗口中对样本进行编辑。



还可以在“编辑样本”窗口中对样本锁定或解锁。但是，一旦样本被锁定，仅管理员才能解锁。



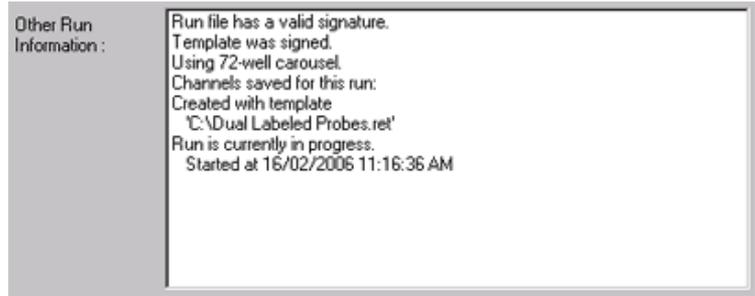
未经授权对文件所做的任何更改都会导致运行签名无效。

7.9.7

锁定的模板

目前用户不能使用 Rotor-Gene Q 软件创建只读模板文件。然而，如果需要，可以作为一项要求来规定所有运行都使用一个特定的模板文件。为了确保此模板的只读性，该模板可以保存在用户不能修改数据的网络驱动器上。当模板在网络驱动器上处于被保护状态时，用户仍可以运行和修改自己的流程。

Rotor-Gene Q 软件保存运行的模板文件名称，从而追踪使用过的模板。通过点击“Settings (设置)”按钮，显示“Run Settings (运行设置)”窗口可以访问此信息。模板信息保存在“Other Run Information(其他运行信息)”中。



7.10 增益菜单

点击增益菜单查看目前运行的“Gain Settings (增益设置)”。此选项在运行前设定指定通道的增益。增益设置保留最后运行的设置。如果运行还没有开始或者在起始循环中，可以对这些进行修改。使用每个文本编辑框旁边的上/下箭头修改字段，然后点击“OK (确定)”。

初始循环中可以对增益进行更改。合适的通道中将会有一条绘制的红线来显示增益更改的位置。增益更改前的循环将会从分析排除。

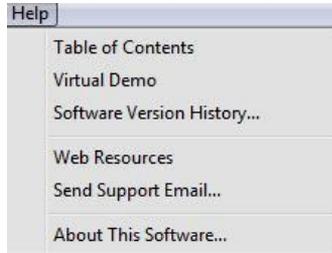


7.11 窗口菜单

这一菜单允许对窗口进行垂直排列或水平排列或层叠排列。点击“Arrange (排列)”按钮右侧的箭头可以访问更多关于窗口排列的选项。

7.12 帮助功能

使用 **Help**（帮助）按钮或 **Help**（帮助）菜单时，会打款以下下拉菜单。



- | | |
|--|---|
| Table of Contents（目录） | 此选项可访问 Help （帮助）功能 |
| Virtual Demo（虚拟演示） | 此选项链接到 QIAGEN 网站页面，上面提供有该软件的交互演示。 |
| Software Version History...（软件版本记录...） | 此选项给出了自上一次安装的版本软件起新添加的功能简述。 |
| Web Resources（网页资源） | 此选项可以在新的浏览器窗口打开 QIAGEN 网站页面，其中显示有 Rotor Gene Q MDx 仪器以及相应试剂相关的有价值的最新信息。 |
| About This Software...（关于本软件） | 此选项可以提供与仪器相关的信息、 Rotor-Gene Q MDx 序列号以及软件版本号。 |

7.12.1 发送支持 **E-MAIL**

帮助菜单中的发送支持 **Email** 选项允许你向 **QIAGEN** 发送包括一次运行的所有相关信息的支持 **Email**。“**Save As** (另存为)”选项将会保存所有信息到一个文件，你可以拷贝该文件到光盘中或者如果你没有权限访问运行 **Rotor-Gene Q MDx** 的计算机上的 **E-mail**，可以通过网络访问。

如果您首次通过 Rotor-Gene Q MDx 选配（视国家而定）的便携式计算机使用支持 E-mail 功能，则必须进行 E-mail 设置。

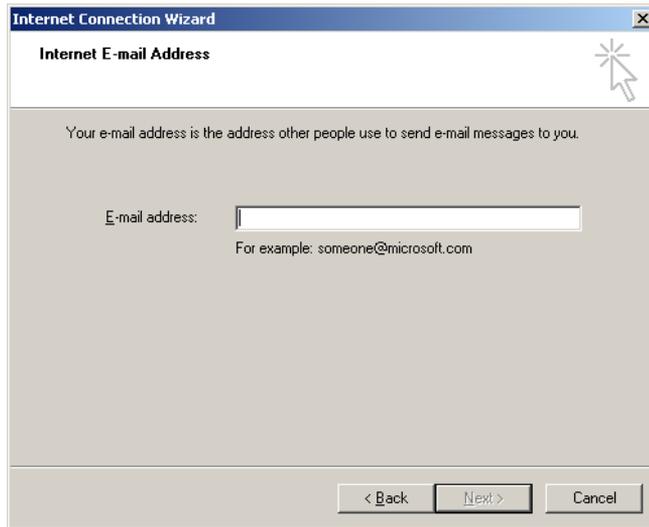
注：您可以请求自己公司的 IT 管理员来完成这些设置。

配置 E-mail 设置

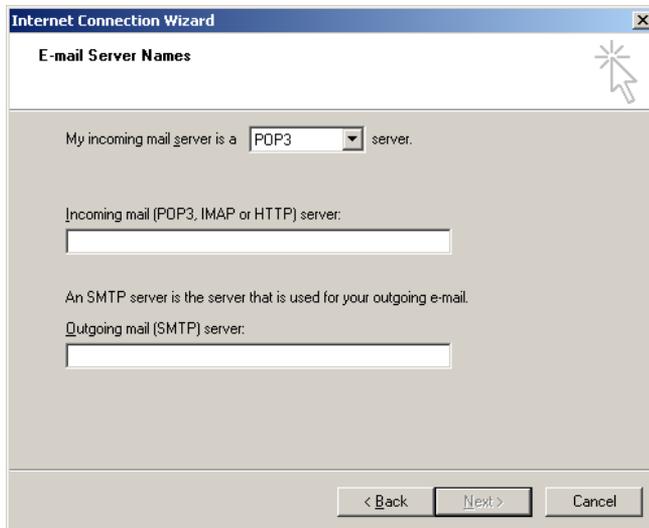
勾选“Send Support Email...”（发送支持 Email...）选项。随即将打开以下窗口。



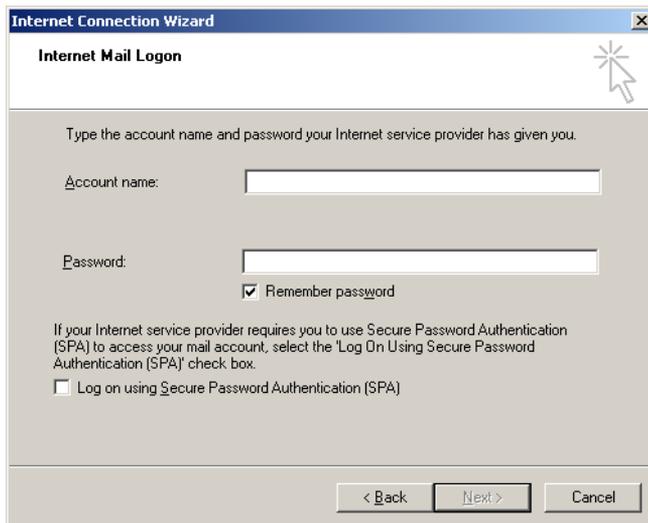
1. 输入您的姓名并单击“Next（下一步）”。随即打开“Internet E-mail Address”（Internet E-mail 地址）窗口。



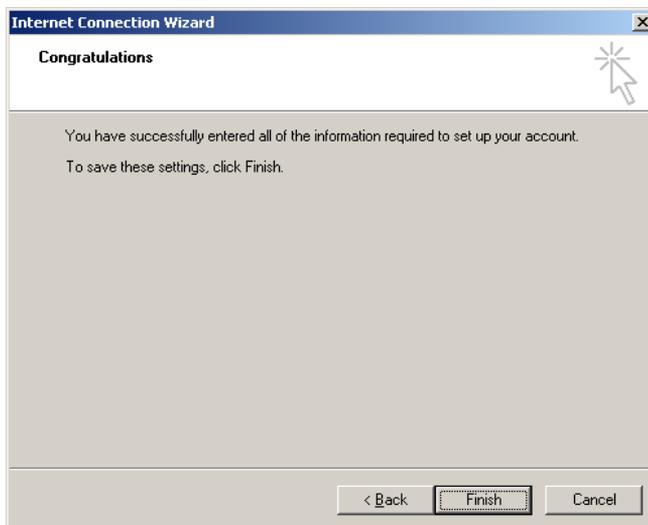
2. 输入您的 E-mail 地址，并单击“Next（下一步）”。随即打开“E-mail Server Names”（E mail 服务器名称）窗口。



3. 选择邮箱服务器的接收邮件类型并指定接收和发送 E-mail 的服务器名称。然后单击“Next（下一步）”，随即打开“Internet Mail Logon”（Internet 邮箱登陆）窗口。



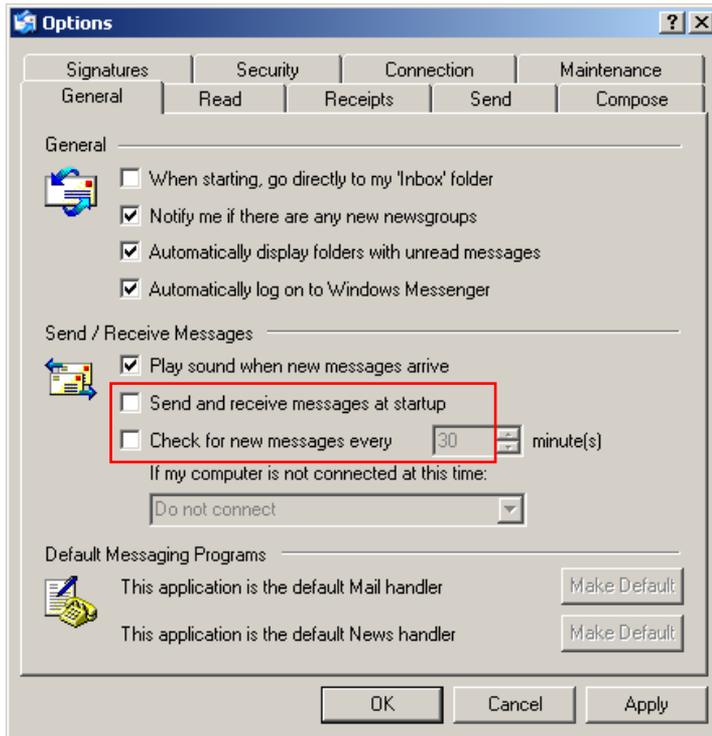
4. 如果您的服务器使用安全密码验证，则输入您的 E-mail 账户名和密码。然后点击“Next（下一步）”，随即打开“Congratulations（配置）”窗口。



5. 点击“Finish（完成）”确认完成 E-mail 账户设置。

Outlook 设置

1. 从开始菜单打开“Outlook Express”（Start, All programs, Outlook Express（开始-所有程序- Outlook Express））
2. 选择 Tools（工具）-Options（选项），随即打开如下的窗口。



重要： 为避免在 PCR 运行期间检索邮件，请禁用“Send/Receive Messages（发送/接收信息）”界面上的默认条目。

3. 禁用“Send and receive messages at startup”（启动时发送和接收信息）。
4. 禁用“Check for new messages every 30 minutes”（每 30 分钟检查是否有信息）。
5. 点击“OK”确认更改。

8 其它功能

8.1 分析模板

某些分析需要使用者规定阈值、标准化设置和基因型设置。通常这些设置在多个试验中频繁得到再次使用。

分析模板使得使用者可以保存和再次使用这些设置。这减少了再次输入设置，降低了出现错误的风险。

定量分析、熔解、等位基因区分、散点图分析和终点分析支持分析模板。这些分析允许使用者导出分析所特有的模板（例如，定量分析允许导出和输入含有定量设置的*.qut 文件）。

输入或导出分析模板后，将显示模板的文件名，便于将来参考。



8.2 打开第二次运行

进行运行时，可能会打开和分析之前已进行的运行。多个功能，比如“New (新建)”或“Start Run (开始运行)”按钮在第二次运行窗口中未激发。第一次运行结束后，可以从第一次运行窗口进行新的运行。

8.3 调整标尺选项

为了访问“Adjust Scale (调整标尺)”，请点击主窗口底部的“Adjust Scale (调整标尺)…”或右键点击图形，在显示的菜单上选择“Adjust Scale (调整标尺)…”。可以在显示的窗口内手动输入标尺。



为了访问“Auto-Scale (自动调整标尺)”，请点击主窗口底部的“Auto-Scale (自动调整标尺)…”，或右键点击图形，在显示的菜单上选择“Auto-Scale (自动调整标尺)…”。“Auto-Scale (自动调整标尺)”试图使标尺匹配数据中的最大和最小读数。

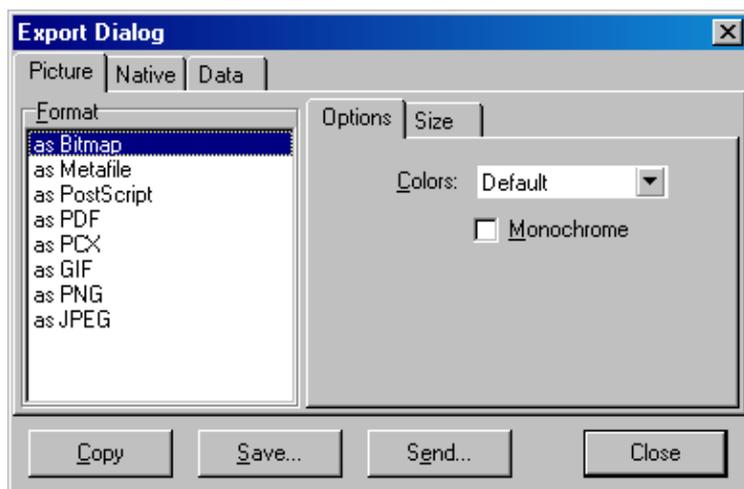
为了访问“Default Scale (默认标尺)”，请点击主窗口底部的“Default Scale (默认标尺)…”，或右键点击图形，在显示的菜单上选择“Default Scale (默认标尺)…”。“Default Scale (默认标尺)”将重新设置标尺，显示为0到100个荧光单位。

8.4 输出图

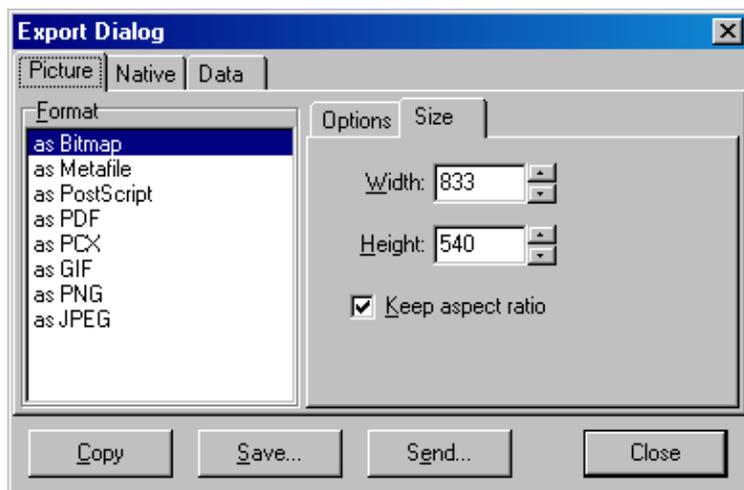
图像导出

下列步骤描述了如何保存图像。

1. 右键点击图像，在显示的菜单上选择“Export (导出)”。
2. 出现“Export Dialog (导出对话)”窗口。从“Format (格式)”列表选择理想的格式。



3. 选择“Size (尺寸)”选项卡，规定理想的尺寸。



4. 在“Keep aspect ratio (保持长宽比)”复选框中打勾，从而在调整图像尺寸时使其保持正确的比例。
5. 点击“Save (保存)”，在显示的对话框中选择文件名和保存位置。

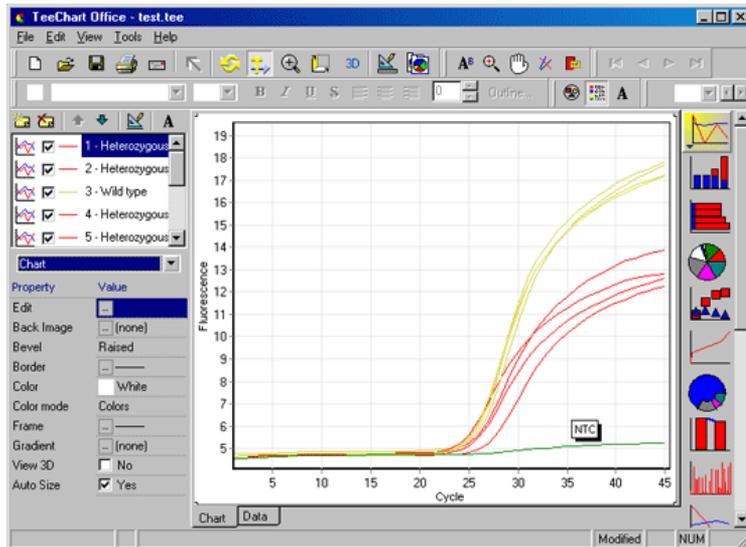
如果需要高分辨率的图像，我们推荐增加图像的尺寸，直至符合您的要求，或保存图像为元文件 (*.emf, *.wmf)。这是一种基于向量的格式，可以在比如 Adobe® Illustrator® 等软件中打开，允许使用者创建任何分辨率的图像。

原始格式导出

Rotor-Gene Q 软件中的图像使用 Steema 软件公司开发的第三方 TeeChart[®]组件。为了保存原始格式的图像，请在“Export Dialog (导出对话)”窗口中选择“Native (原始)”选项卡（见前面的截屏），然后点击“Save (保存)”。原始格式是标准 TeeChart 文件格式。这允许使用者使用 Steema 软件公司开发的 TeeChart Office 软件。TeeChart Office 软件可免费获得，做为 Rotor-Gene Q 软件包的一部分安装。为了访问软件，请点击桌面上的 TeeChart 按钮。

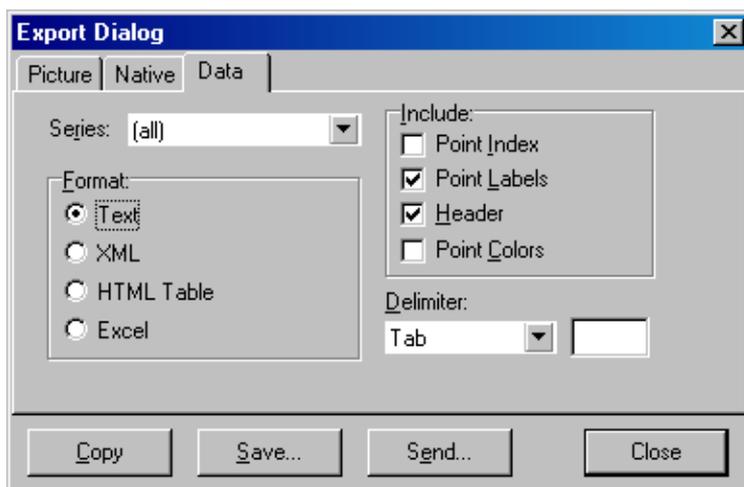


TeeChart Office 软件可以处理导出的图像，包括更改曲线颜色，增加注解，更改字体，调整数据点。



数据导出

为了导出各种格式的数据，请选择“Export Dialog (导出对话)”窗口中的“Data (数据)”选项卡。导出的文件包含图像中使用的原始数据点。



也可通过选择“File(文件)”菜单下的“Save As(保存为)”导出原始数据和分析数据（见章节 7.5）。

8.5

扳手按钮

扳手按钮位于主窗口底部左侧。点击扳手按钮可以访问多个选项。这些选项也可以通过右键点击图像进行访问。



调整标尺，自动 参见章节 8.3。
调整标尺，恢复
至默认标尺：

- 导出…: 以各种格式保存图像（见章节 8.4）。
- 将图表复制至剪贴板: 将图像复制到剪贴板。
- 在 TeeChart Office 软件中编辑: 在 TeeChart Office 软件中直接打开图像进行编辑（见章节 8.4）。
- 打印: 打印图像。
- 数字滤波器…: 修改目前在图像上选择的数字滤波器。数字滤波器使用数据滑动窗口使数据变光滑。



- 显示指针: 打开可精确调整鼠标指针位置的窗口。
- 分组: 对名称相同的样本进行分组。这在满转子运行时有用。选择本选项不会影响计算值。

8.6 选择面积选项

通过点击并按住鼠标左键，拖拉鼠标指针，可选择图像区域。

将显示下列选项。



仅选择这些样本 不选择所选择区域之外的样本。
:

不选择这些样本 不选择所选择区域之内的所有样本。
:

放大: 放大图像所选择区域。点击“Default Scale (默认标尺)”按钮，进行缩小。

此页留空。

9 保养程序

维护 Rotor-Gene Q MDx 的工作性能很简单。通过确保位于发射源和检测源之间的晶体干净维持光学性能。用乙醇或异丙醇*沾湿的棉棍尖端轻拭晶体就可保持晶体清洁。

注意：依据使用方法，一月至少清洁晶体一次。同时擦拭转子仓室。

保持工作台区域清洁，远离灰尘和纸张。**Rotor-Gene Q MDx** 的空气入口位于底部，比如纸和灰尘等疏松物质可能损坏性能。



为了避免灰尘沉积，不使用时应盖上 Rotor-Gene Q MDx。

如果转子室受到污染，可以用 0.1% (v/v) 漂白剂溶液*浸湿（不是滴落）的不含棉绒纸的布擦拭表面进行清洁。用 PCR 级水浸湿的不含棉绒纸的布擦拭转子室，从而去除残留的漂白剂。

此页留空。

* 使用化学品时，始终穿戴合适的实验服、一次性手套和护目镜。更多信息，请参考产品供应商提供的有关安全数据表（SDS）。

10 光学温度验证

光学温度验证（OTV）是验证 Rotor-Gene Q MDx 中管内温度的方法。在经过认证的实验室，验证管内温度是重要程序。使用 Rotor-Disc OTV 试剂盒进行 OTV（见附录 C）。在下文，我们仅简要介绍一下 OTV 原则。OTV 程序的具体性能将会在 Rotor-Gene Q MDx 软件中加以阐释。如需了解有关 OTV 操作程序的更详细说明（包括故障排除指南），请参阅 Rotor-Disc OTV 手册。

10.1 OTV 原则

OTV 使用 3 种热致变色液体结晶（TLC）* 的光学特征为绝对温度参考。加热时，TLCs 在非常精确的温度（50 ° C，75 ° C 和 90 ° C）下从不透明变为透明。TLCs 自身不会产生荧光。

因此，它需要与可产生荧光的插入物一同覆盖激发源，从而其转变点可被 Rotor-Gene Q MDx 光学系统检测到。低于转变温度的 TLC 不透明，可反射光线。某些反射的光线散射进入检测器，从而增加了荧光。管内温度达到 TLC 转变温度时，TLC 变成透明，光线可通过样本，而不是被反射到检测器，从而导致荧光减少。荧光的变化用于测定每种 TLC 的精确转变温度。比较转变温度与 OTV Rotor-Disc 厂家校准文件中报告的温度，从而验证 Rotor-Gene Q MDx 是否符合温度规格。

10.2 Rotor-Disc OTV 试剂盒组件

运行 OTV 需要下列组件：

- 一个 Rotor-Disc OTV 试剂盒，包括：
 - 密封的 Rotor-Disc 72 OTV 转子（包含 TLCs）
 - 荧光散射板插入物（对于 Rotor-Gene 3000，该插入物为黑色，对于 Rotor-Gene 6000 和 Rotor-Gene Q MDx，该插入物为白色）

* 使用化学品时，始终穿戴合适的实验服、一次性手套和护目镜。更多信息，请参考产品供应商提供的有关安全数据表（SDS）。

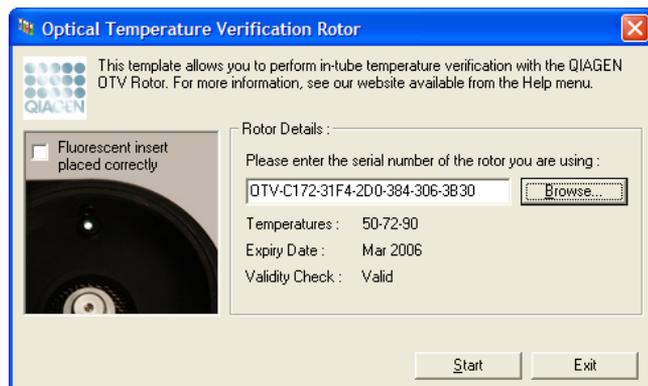
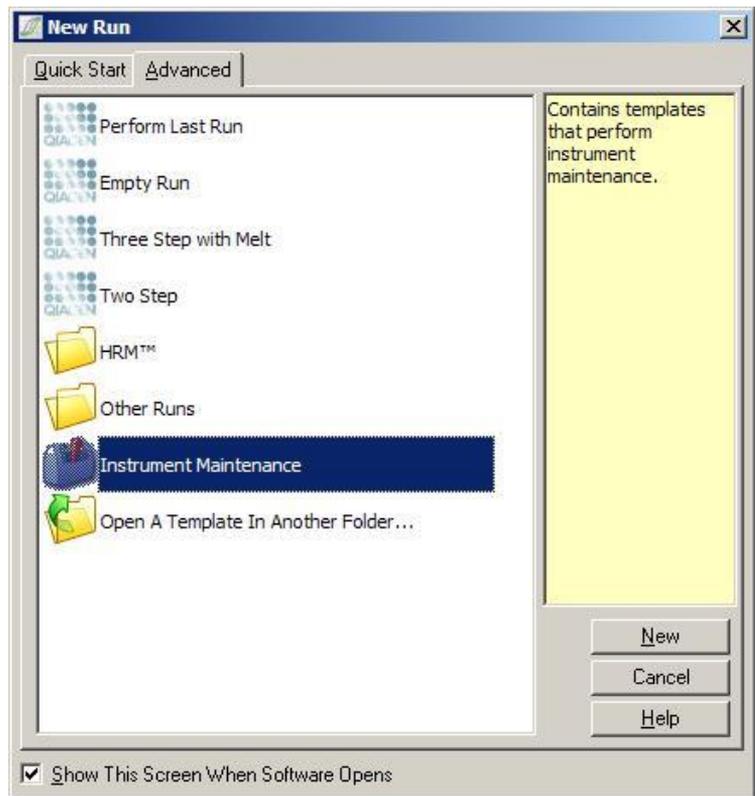
- 含有下列文件的 CD：OTV Rotor 序列号和有效期文件 (*.txt)；OTV 测试模板文件 (*.ret)；产品单 (*.pdf)；厂家校准文件 (*.rex)
- 产品单
- 1.7 或更高版 Rotor-Gene 系列软件，包含容易使用的 OTV Rotor 指南
- Rotor-Disc 72 转子
- Rotor-Disc 72 锁定环

10.3 运行 OTV

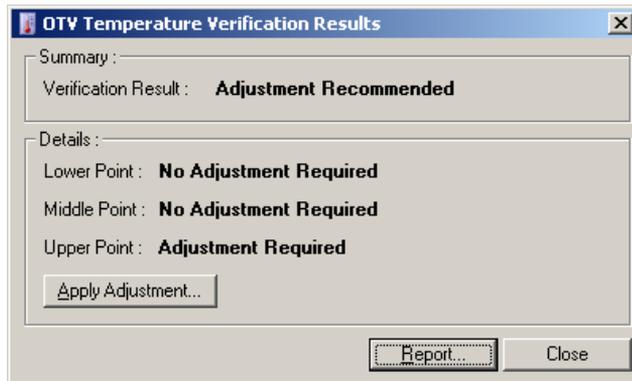
1. 将荧光插入物放在位于 Rotor-Gene Q MDx 仓室底部的发射镜上，
2. 将 OTV Rotor-Disc 插入 Rotor-Disc 72 转子中。使用 Rotor-Disc 72 锁定环固定。组装后放入 Rotor-Gene Q MDx 中的正确位置。盖上 Rotor-Gene Q MDx 盖。



3. 通过选择“New Run (新运行)”窗口中的“Advanced (高级)”选项卡，访问高级向导。在高级向导中，点击“Instrument maintenance (仪器维护)”，然后点击“OTV”。向导提示输入序列号，OTV Rotor-Disc 标签上可发现本数字，或通过点击“Browse (浏览)”并选择 CD 上提供的.otv 文件获得本数字。一旦输入本数字，点击“Start (开始)”。



4. 然后软件提示要求运行的文件名。然后开始运行。
5. 运行进行一系列熔解，从而确定 Rotor-Gene Q MDx 的热特性。

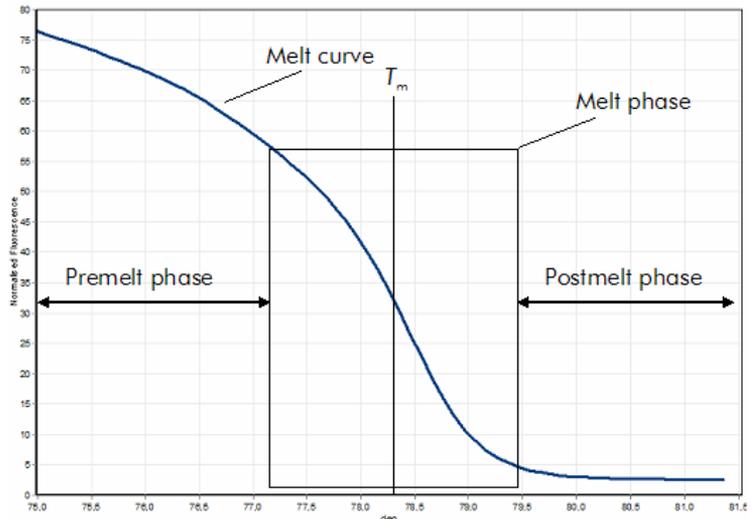


6. 运行结束后，软件提示 Rotor-Gene Q MDx 是否符合规格。
7. 如果需要调整，那么使用者应该点击“Apply Adjust (进行调整)”。这将提示使用者进行验证运行。完成验证运行后，无须进行调整。如果需要进一步调整，那么请联系经销商。
8. 如果 Rotor-Gene Q MDx 符合规格，那么就审核并打印运行报告。

此页留空。

高分辨率熔解分析

高分辨率熔解 (HRM) 分析是一种基于 DNA 熔解分析的新技术。根据 DNA 样本随着温度升高从双链 DNA (dsDNA) 转变成单链 DNA (ssDNA) 的熔解行为, HRM 可确定 DNA 样本的特征 (见下图)。HRM 仪以极高的光学和热力学精度收集荧光信号, 从而具备多种应用的可能性。



典型的 HRM 图。该熔解曲线显示了从最初熔解前期高荧光、熔解期荧光减少、至熔解后期荧光基线的转变过程。荧光随着由双链 DNA 熔解至单链 DNA 过程中 DNA 嵌入染料的脱落而减弱。熔解期中点, 也就是荧光变化率最大时, 定义为所分析 DNA 的熔解温度(T_m)。

在进行 HRM 分析之前, 目标序列必须要扩增至高拷贝数。通常是在存在 dsDNA 嵌入荧光染料时进行 PCR 扩增。染料不会与 ssDNA 结合, 但可嵌入 dsDNA, 嵌入后就可产生强荧光。

荧光的变化可用于测定 PCR 中 DNA 浓度的增加, 然后通过 HRM 直接测量热诱导的 DNA 熔解。在 HRM 中, 由于样本刚开始为 dsDNA, 因此最初的荧光很强。随着温度升高, DNA 熔解成单链, 荧光减少。观测到的熔解行为是特定 DNA 样本的特征。

使用 HRM, Rotor-Gene Q MDx 可以根据序列长度、GC 含量和 DNA 序列互补性确定样本特征。HRM 可应用于基因分型, 比如分析插入 / 删除或单核苷酸多态性 (SNPs), 或筛查未知的基因突变。它也应用于实验胚胎学, 检测和分析 DNA 甲基化状态。它也可应用于以野生型

序列为背景，定量检测少量变异 DNA，灵敏度接近 5%。这可应用于例如体细胞获得性变异或 CpG 岛甲基化状态改变的研究。

Rotor-Gene Q MDx 仪器中的 HRM 促使了多种应用，包括：

- 识别候选患者的患病基因
- 关联研究（比较病例和对照，基因型和表型）
- 测定人群或亚族中的等位基因流行率
- SNP 筛查和验证
- 筛查杂合子丢失
- DNA 指纹分析
- 鉴定单倍型区域
- DNA 甲基化分析
- DNA 基因定位
- 物种鉴别
- 发现变异
- 测定体细胞获得性变异率
- HLA 分型

HRM 比基于探针的基因分型更简单和节省费用，与传统的方法不同，HRM 是密闭管系统，可防止 PCR 产品受到污染。结果与传统方法比如 SSCP，DHPLC，RFLP 和 DNA 序列*分析相似。

11.1 仪器操作

Rotor-Gene Q MDx 提供了下列 HRM 所需要的实时和热-光学能力。

- 高强度照明
- 高灵敏度光学检测
- 快速数据获取
- 微调控制的样本温度
- 极小的样本间热和光学变异

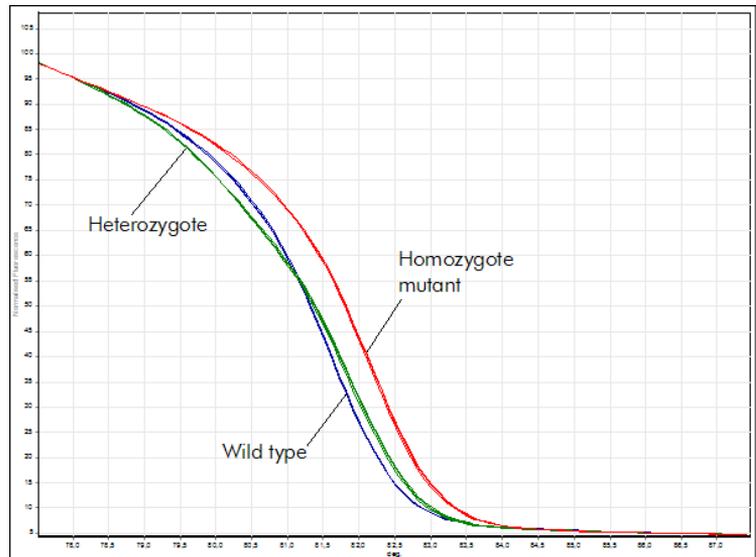
11.2 化学

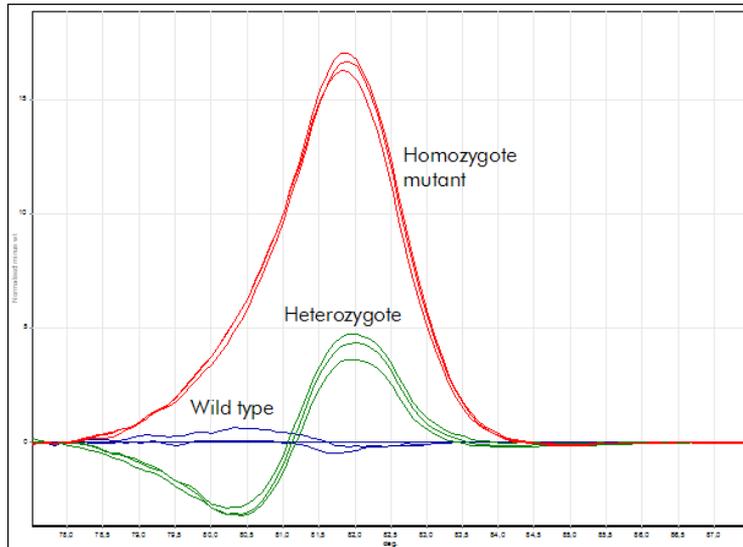
对于使用 HRM 进行 SNPs 和变异分析，QIAGEN 提供 Type-it® HRM PCR 试剂盒，对于使用 HRM 进行甲基化分析，提供 EpiTect® HRM PCR 试剂盒（很快就可获得）。两个试剂盒都含有第三代嵌入荧光染料 EvaGreen。试剂盒联合了优化的 HRM 缓冲液和 HotStarTaq® Plus，从而避免非特异性扩增，提供可靠的结果。

注意：所有 QIAGEN HRM 试剂盒和试剂均指明专用于 Rotor-Gene Q 仪器，仅适用于相应 QIAGEN 试剂盒手册之中描述的应用。

11.3 SNP 基因分型举例

在所示范例中，用于区分纯合野生型、纯合突变型和人体 SNP rs60031276 杂合型的 HRM 分析中需使用 Type-it HRM PCR 试剂盒。对于技术细节，请参考 *Type-it HRM PCR 手册*。



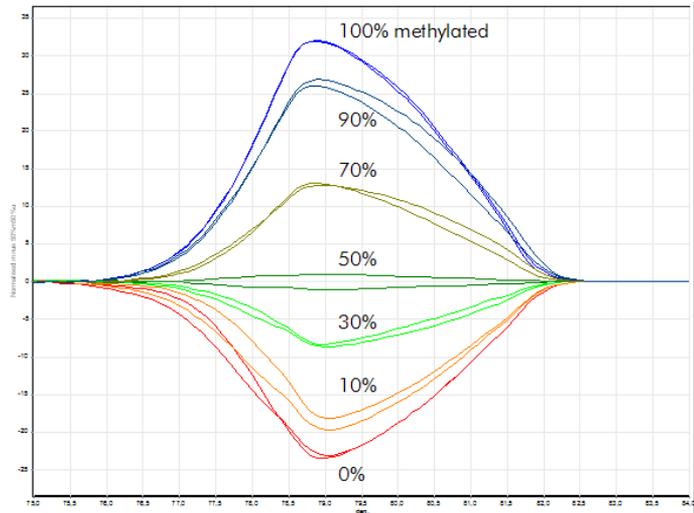
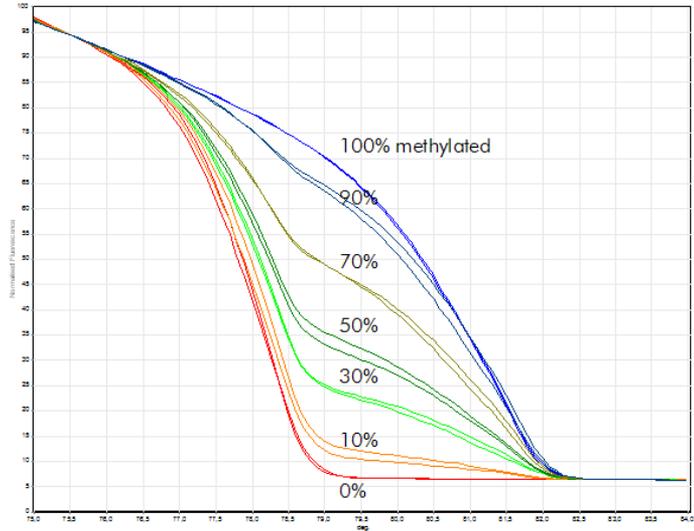


No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	■	AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	■	unknown	homo AA	99,49
24	■	unknown	homo AA	99,76
28	■	AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	■	unknown	hetero AG	99,49
30	■	unknown	hetero AG	98,47
34	■	GG Human SNP rs60031276	homo GG	100,00
35	■	unknown	homo GG	98,80
36	■	unknown	homo GG	99,53

通过 HRM 进行 SNP 基因分型。使用 10 ng 不同基因型的基因组 DNA 以及 Type-it HRM 试剂盒（很快就可获得），在 Rotor-Gene Q 中，分析 PPP1R14B 基因（蛋白质磷酸酶 1，调节（抑制剂）亚基 14B）中人体 SNP rs60031276（A 被 G 替代）。纯合野生型（AA）、纯合突变型（GG）和杂合型（AG）样本显示为标准熔解曲线和与野生型样本相比的标准化的差异曲线。Rotor-Gene Q 软件对未知样本分配基因

11.4 甲基化分析举例

在所示范例中，EpiTect HRM PCR 试剂盒用于 HRM 分析，以区分甲基化和非甲基化 DNA 的各种比值。技术细节，请参考 *EpiTect HRM PCR 手册*。



通过 HRM 进行定量甲基化分析。使用 EpiTect HRM 试剂盒（很快就可获得），在 Rotor-Gene Q 上通过 HRM 甲基化分析，以分析并区分各

种比值的甲基化和非甲基化 DNA-APC（结肠腺瘤息肉病）。 一条标准熔解曲线， 标准化为 50%甲基化样本的不同曲线。

11.5 成功进行 HRM 分析的指南

成功进行 HRM 分析非常依赖于所研究的特定序列。特定序列基序，比如发夹环或其他二级结构，显著高或低 GC 含量的局部区域，或重复序列均可影响结局。另外，使用来自于 QIAGEN 的标准化试剂盒和优化方案可克服许多潜在的挑战。下文中详细列出了某些有助于确保成功的简单指南。

分析小 DNA 片段

分析不超过大约 250 bp 的片段。更大的产物可以得到成功分析，但通常分辨率更低。这是因为，例如，单碱基突变对 100bp 扩增子熔解行为的影响比对 500 bp 扩增子熔解行为的影响更大。

确保 PCR 只含有特异产物

样本受到 PCR 后人为产物比如引物二聚体或非特异产物污染，可能使 HRM 结果难以判断。来自于 QIAGEN 的 HRM 分析用试剂盒可以确保最高的特异性，无需优化。

使用足够的扩增前模板

在故障排除 HRM 分析中，实时 PCR 数据分析非常有用。扩增曲线的 CT（阈值周期）应该小于等于 30 个周期。由于 PCR 人为产物，晚于此时间后扩增的产物（由于低起始模板数或模板降解）通常可导致易变的 HRM 结果。

标准化的模板浓度

加入反应中的模板数应该一致。对起始浓度进行标准化，从而使所有的扩增曲线彼此处于 3 个 C_T 值内。这可以确保输入浓度处于 10 倍范围内。

检查异常的扩增曲线

在运行 HRM 之前，仔细检查扩增曲线数据，寻找异常的扩增曲线形态。与其他反应相比，曲线的对数-线性期不陡峭，出现锯齿形，或达到低信号平台，则表明扩增不佳或荧光信号太低（例如，如果引物浓度太低时可出现此情形）。反应抑

制剂或不正确的反应体系配置可以导致反应不佳。这些样本得到的 HRM 数据无确定结果，或分辨率低。为了避免不可靠的结果，我们推荐在样本准备和 HRM 分析中使用 QIAGEN 试剂盒。

保持扩增后样本浓度相近

DNA 片段的浓度影响其熔解温度 (T_m)。考虑到此原因，样本 DNA 浓度必须尽可能保持相近。分析 PCR 产物时，确保每个反应已经扩增至平台期。在平台期，不管起始量如何，所有反应将扩增至类似程度。然而，请注意，由于例如不一致的测定设置（比如引物浓度太低），相同扩增量下，不良的反应可能未达到平台期。

确保样本间的一致性

所有样本的体积必须相同，并含有相同浓度的染料。DNA 熔解行为受反应混合物中盐的影响，因此所有样本中缓冲液、Mg 和其他盐的浓度尽可能一致非常重要。同样，仅使用相同制造商生产的相同反应管子，避免由于塑料厚度和自发荧光特性引起的变化。

允许对熔解前期和熔解后期收集足够的

数据
在所观察的 T_m 附近大约 10 摄氏度范围内收集 HRM 数据点（见图 11-1）。这可为有效的曲线标准化提供足够的基线数据点，并导致重复性更高，更容易判断数据。

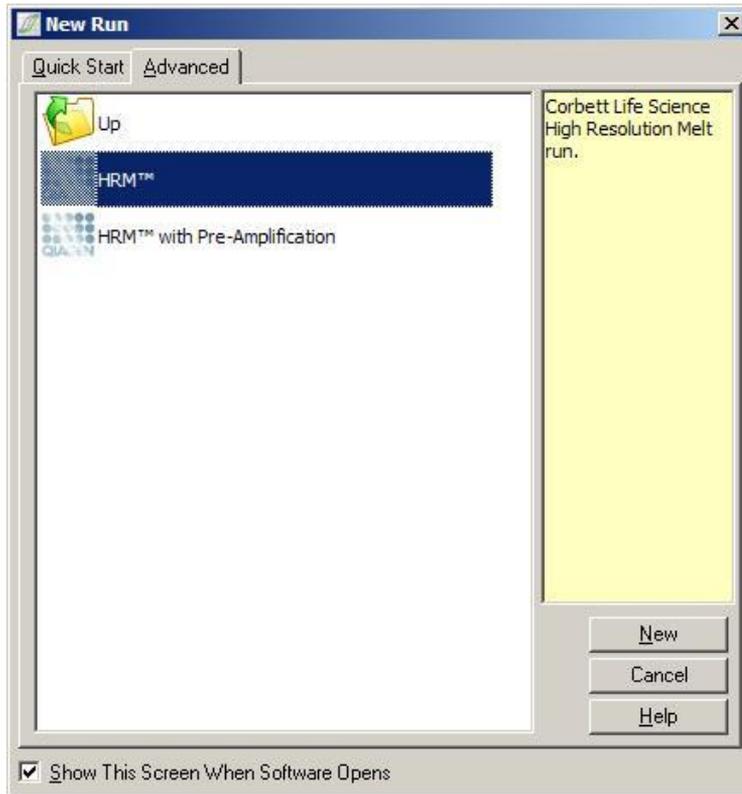
11.6 样本准备

纯化和保存中应该避免样本降解。避免过量的抑制剂，比如残留的乙醇。为了改善 HRM 结果，我们建议样本间所使用的模板数一致。推荐采用分光光度分析测定 DNA 浓度和纯度。我们推荐在样本准备中使用 QIAGEN 试剂盒。

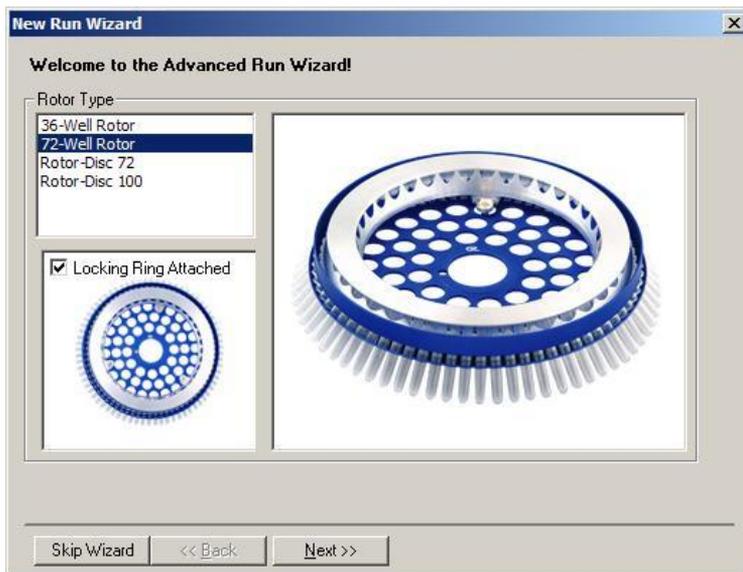
注意：在 260 nm，一个吸光度单位等同于 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ DNA。纯 DNA 在 260 nm 与 280 nm 处的比值将显示为 1.8。

11.7 软件安装

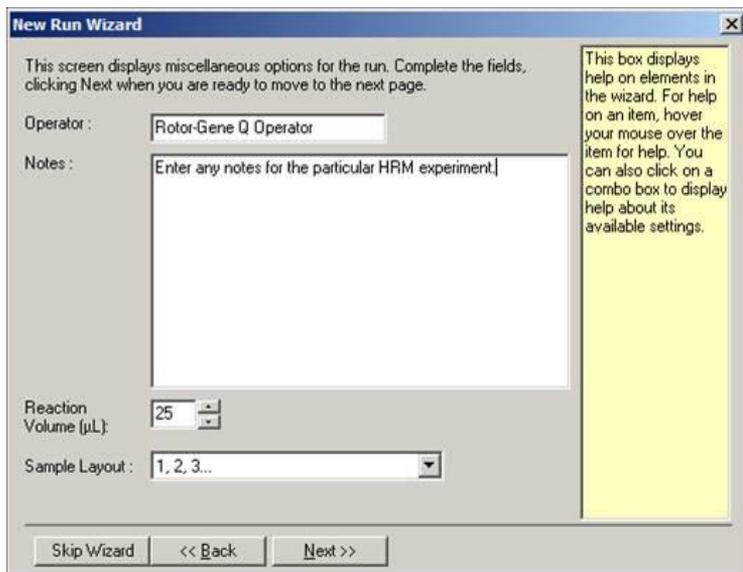
1. 通过从文件菜单选择“New (新建)…”打开新的运行文件。在高级向导中，选择“HRM”。



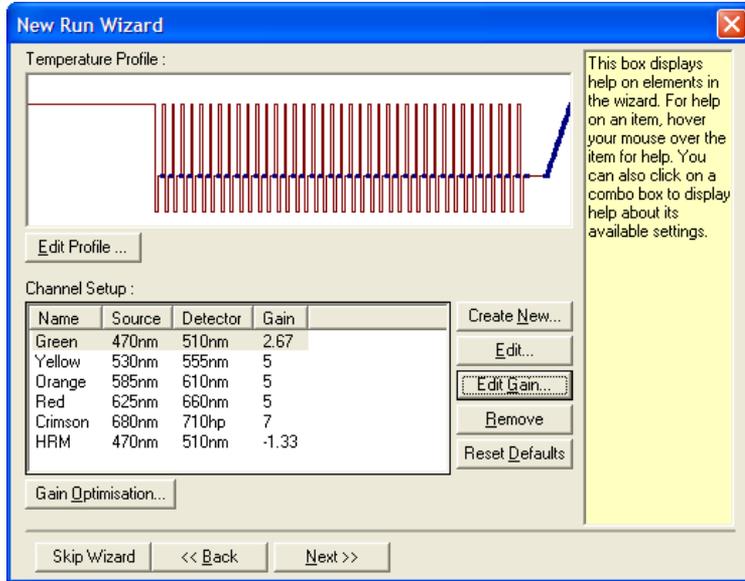
2. 设置转子类型（举例中使用 72 孔转子）。在进入下一步之前，确保已正确放置锁定环，在“Locking Ring Attached (添加锁定环)”复选框中打勾。



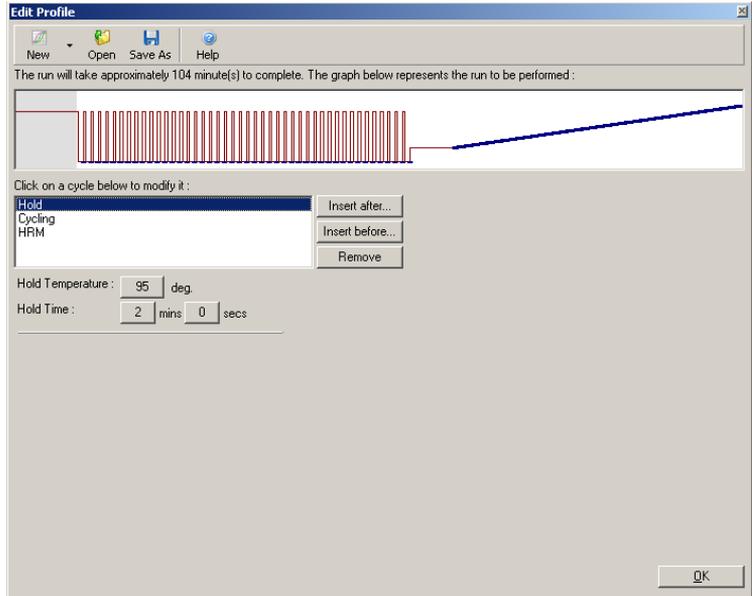
3. 设置运行细节。输入操作者姓名（可选择），添加有关实验的任何注释（可选择）。选择反应体积（必需）和预期的样本布局。



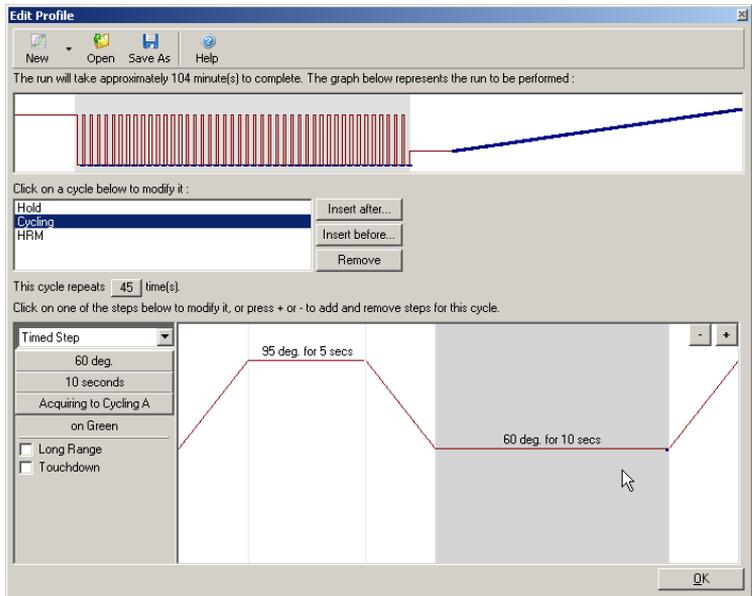
4. 点击“Edit Profile (编辑步骤)...”按钮，修改反应时间和温度。



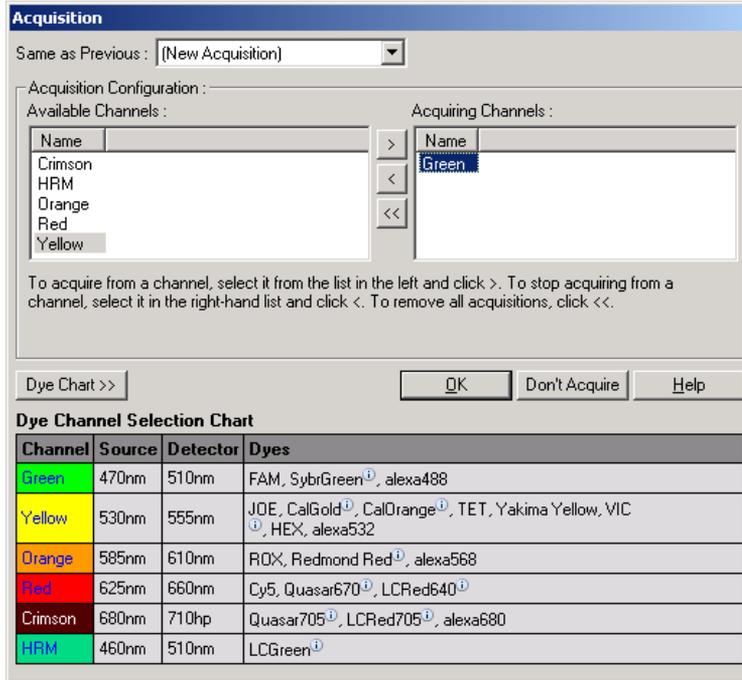
5. 设置合适的初始保温时间。该时间与所使用 DNA 聚合酶的类型有关。Type-it HRM PCR 试剂盒和 EpiTect HRM PCR 试剂盒需要 5 分钟的活化时间。默认的活化时间为 10 分钟。



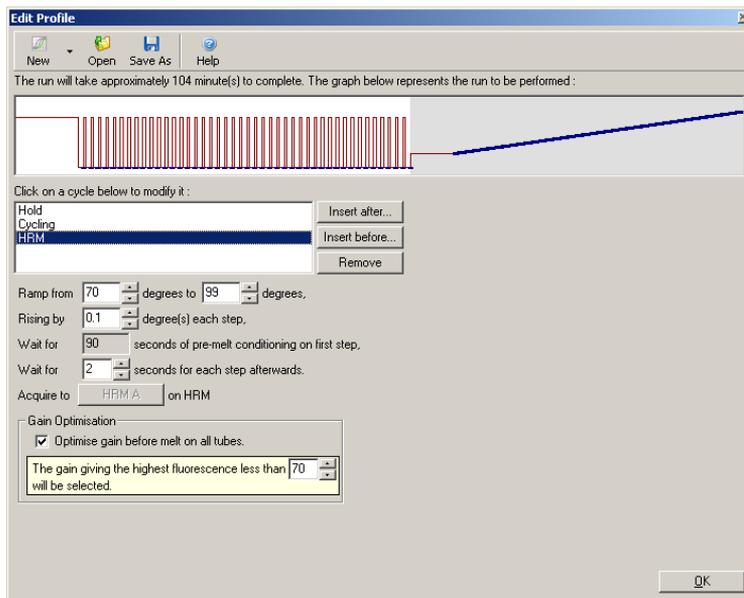
6. 修改适合扩增子的循环数。



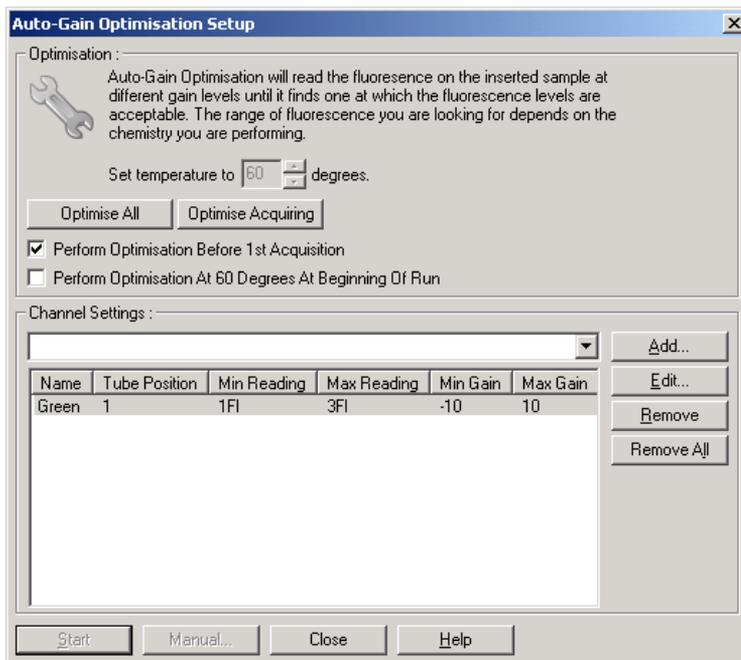
7. 确保将获得荧光数据。退火步骤结束时，数据从绿色通道获取。



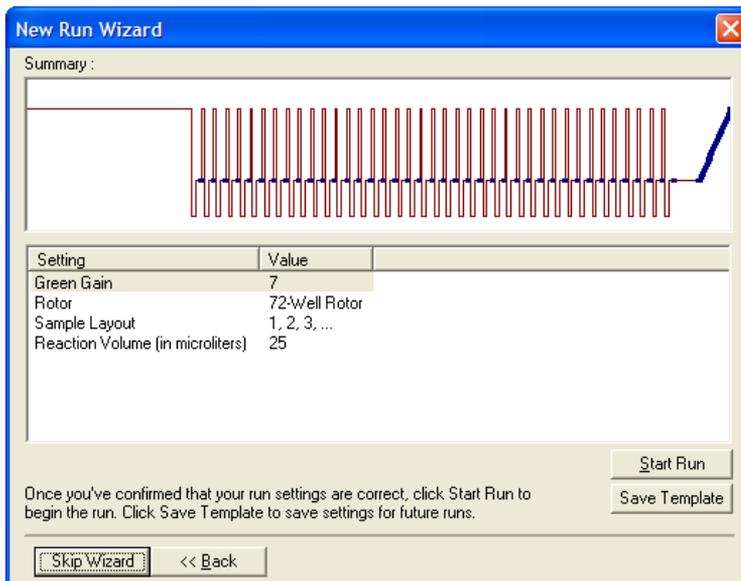
- 设置 HRM 运行条件。修改条件以匹配扩增子。对于实验的首次设置，允许较广的熔解温度范围。使用理论 T_m 为合适范围的向导。一旦您确定产物将在何温度时熔解，缩小熔解温度范围至不超过 10 摄氏度。确保开始熔解发生于首次熔解转变之前 5 摄氏度。每一步默认的温度梯度为 0.1 摄氏度，并在此温度维持 2 秒。每一步最小温度梯度改变为 0.05 摄氏度，并在此温度维持 1 秒。数据自动获取自 HRM 通道。默认进行自动增益优化。软件将搜索最佳增益设置，从而在 100 的标尺下，最高荧光值不超过 70。
注意：这可以增加至最大值 100。



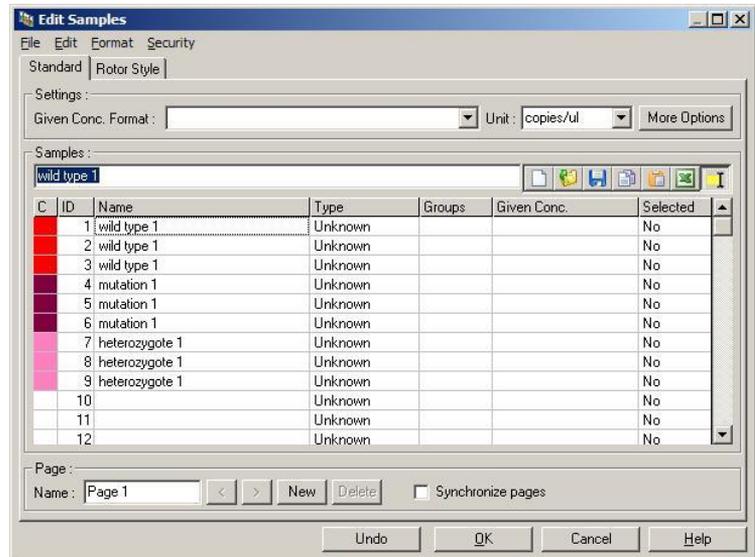
9. 可选择：设置自动增益优化。这仅适用于实时扩增步骤，为绿色通道进行设置。点击“**Optimize Acquiring (获得优化)**”按钮（仅优化运行中使用的那些通道）。最好在恰好进行首次获取步骤之前进行优化，因此在“**Perform Optimization Before First Acquisition (首次获取之前进行优化)**”复选框中打勾。嵌入染料的推荐背景荧光范围为 1-3 个荧光单位之间。如需更改此设置，请点击通道名称，在列表中进行选择，然后点击“**Edit (编辑)**”按钮。



10. 通过点击“Start Run (开始运行)”开始运行，将运行文件保存到您的电脑中。



11. 编辑样本名称（可选择）。可在运行中或运行后编辑样本名称。



11.8 实时 PCR 数据分析

在进行 HRM 数据分析之前进行实时 PCR 数据分析是有益的。实时 PCR 数据可突出不良的测定。由于分析质量差的 PCR 产物将导致差的 HRM 结果，因此识别并在之后的 HRM 分析中滤过这些极端值将大大改善 HRM 分析的整体有效性。我们推荐根据下列步骤分析定量实时 PCR 数据。

1. 使用“Analysis (分析)”窗口的“Quantitation (定量分析)”选项分析实时数据。如果任何 C_T 值大于等于 30，那么相应的反应就考虑为扩增太慢。这些样本在分析中必须要得到怀疑，或作为极端值不参加分析。晚期扩增通常是由于起始模板数太少和 / 或高水平的样本降解。
2. 评估终点荧光水平。如果任何扩增曲线中的终点荧光低于数据集中的大多数曲线，那么就在分析中省略该样本，即使 C_T 值小于 30。低终点荧光提示染料量不正确，反应成分不正确（比如引物）或抑制剂作用。
3. 使用“Analysis (分析)”窗口中的“Comparative Quantitation (比较定量)”，获得每个样本的反应效率。

如果效率不近似于实验中其他反应，或低于大约 1.4，那么就以极端值省略该反应。



比较定量结果。 反应效率以小于 2 的数字显示在“Amplification (扩增)”列中 (2 = 100%效率)。

注意： 如果您怀疑存在引物二聚体或非特异性产物，那么使用“Analysis (分析)”窗口中的“Melt (熔解)”选项绘制衍生曲线，从而评价反应。确保有单个峰值，指示单个产物。如果可能，进行凝胶电泳，从而检查是否是单一扩增产物。如果存在多种产物，那么就on应该重复该反应，或再次优化。

11.9 HRM 数据分析

HRM 分析可以目视和自动分配基因型。结果可以视为标准熔解曲线或差异曲线。根据曲线移位 (对于纯合型) 和曲线形态变化 (对于杂合型)，标准曲线提供不同基因型的基本表现。

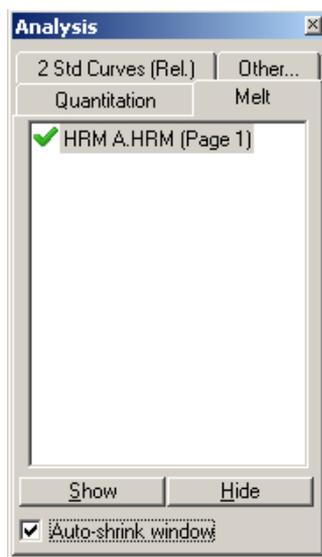
差异曲线有助于目视判读。它们显示每个温度转变时样本与选定对照的荧光差异。差异曲线提供了熔解曲线转变之间差异的其他视角。

注意： 首个衍生熔解曲线分析 (“Analysis (分析)”窗口中标准 “Melt (熔解)” 选项使用) 考虑为不适合进行 HRM 分析。

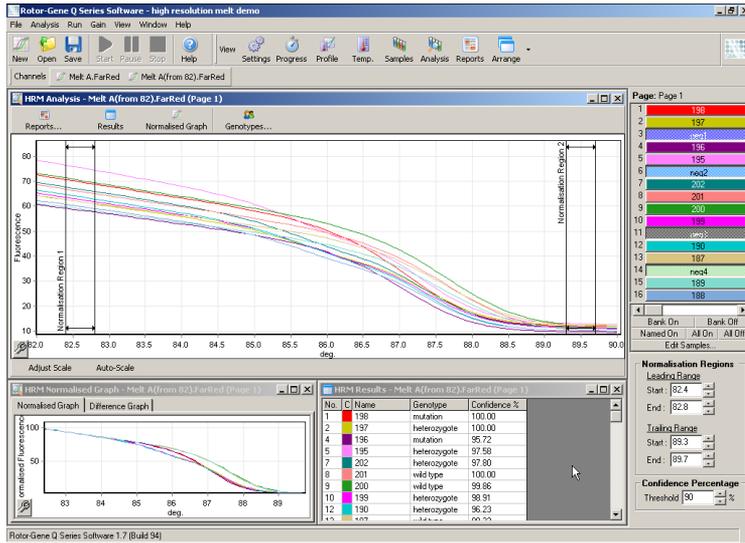
这是因为，数据的任何衍生增加了人为噪音，使得数据判断更加困难。

下列步骤描述了使用 Rotor-Gene Q 软件分析 HRM 结果。

1. 选择“Analysis (分析)”窗口中的“HRM”选项。

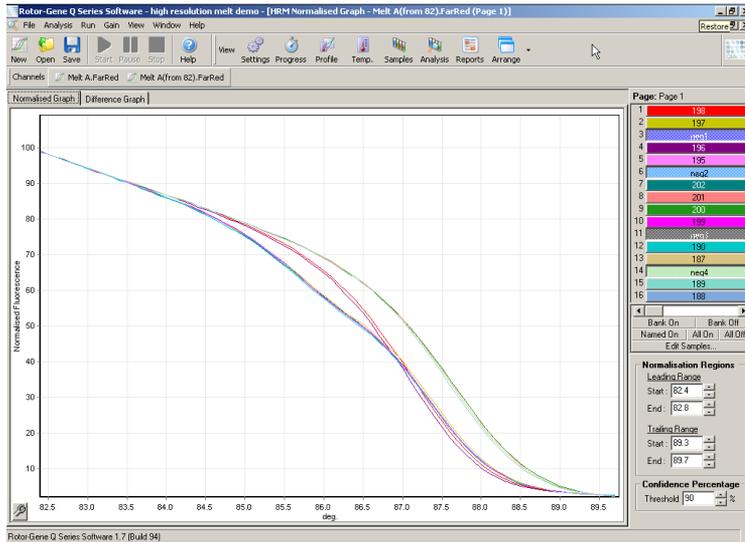


2. 窗口显示原始数据、标准图像和结果。原始数据窗口允许调整标准化区域。标准化允许在相同的起始和终末荧光信号水平比较所有曲线，从而辅助判读和分析。每个区域提供两个光标，默认为曲线的两端。对于熔解曲线的起始（区域 1）和终末（区域 2），区域内的数据点用于荧光的标准化（仅 y 轴）。忽略超出设置区域的数据。调整区域，从而包含熔解前期和熔解后期典型基线数据。扩展区域（通过点击和拖拉），以允许软件调整基线的斜率。为了确保有效的曲线标准化，请避免将标准化区域扩展到熔解期。

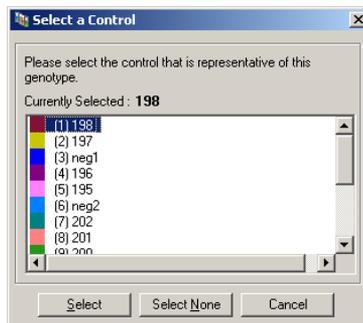
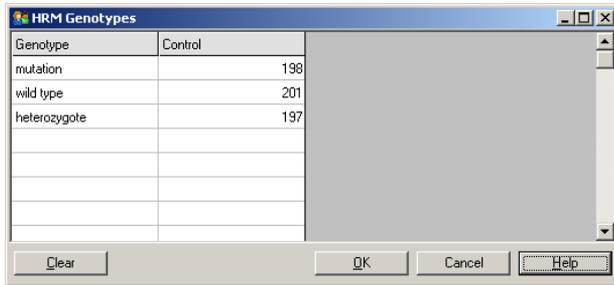


注意：我们建议，只有避免熔解曲线区域时您才可移动光标。向熔解期转化态移动光标会影响扣除曲线和可信度百分比。

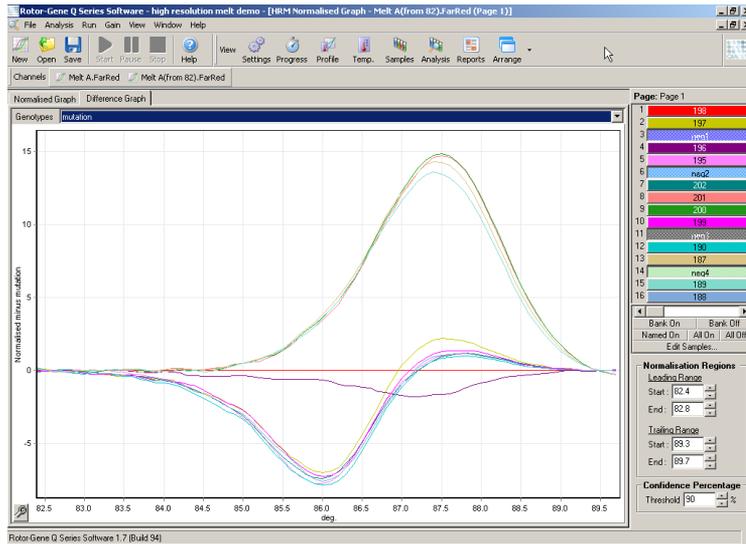
3. 编辑样本名称（可选择）。可在运行中或运行后编辑样本名称。



4. 评估终点荧光水平。如果任何扩增曲线中的终点荧光低于数据集中的大多数曲线，那么就在分析中省略该样本，即使 C_T 值小于 30。低终点荧光提示染料量不正确，反应成分量不正确（比如引物）或抑制剂作用。



5. 通过选择“Difference Graph (差异图像)”选项卡观察差异曲线。然后使用窗口顶部的下拉菜单选择您希望与所有其他样本比较的基因型。如举例所示，所有样本曲线减去所有样本的平均曲线得到结果标记为“Mutation 1 (突变 1)”。



6. 在“Results (结果)”窗口中，软件将自动分配基因型。可信度值做为自动分配结果的完整性检验被提供。可以编辑阈值，超过阈值就自动分配。低于所设置阈值的样本标记为需密切关注或再次检测的变异。

No.	C	Name	Genotype	Confidence %
1	198	mutation	100.00	
2	197	heterozygote	100.00	
4	196	mutation	95.72	
5	195	heterozygote	97.58	
7	202	heterozygote	97.80	
8	201	wild type	100.00	
9	200	wild type	99.86	
10	199	heterozygote	98.91	
12	190	heterozygote	96.23	
13	187	wild type	99.23	
15	189	wild type	97.59	

Normalisation Regions

Leading Range
 Start: 82.4
 End: 82.8

Trailing Range
 Start: 83.3
 End: 83.7

Confidence Percentage
 Threshold: 90 %

12 故障排除

12.1 日志档案

软件在日志档案储存库保留每次运行的原始记录，以及诊断信息。通过使用帮助，发送支持电子邮件选项，您可以通过电子邮件将所有需要的诊断信息发送到 QIAGEN 技术部门（见章节 7.12.1）。

为节省磁盘空间，仅保存最近 60 个运行的日志档案。随新运行日志档案的创建，旧运行日志档案将被覆盖。

12.2 HRM 故障排除

意见和建议

不能运行 HRM

Rotor-Gene Q MDx 模型中未预装 HRM 联系当地 QIAGEN 代理。

未获得 HRM 数据安装不正确

安装不正确

检查滤器设置。

检查转子类型是否正确。

检查是否使用了正确的试剂。

检查是否正确设置反应。

运行一个阳性对照实验（即，已知可以提供结果的检测）。

意见和建议

曲线呈锯齿状

扩增差或无扩增

检查是否使用了正确的方案和试剂。我们推荐使用 QIAGEN 试剂盒进行 HRM 分析。

检查是否正确设置反应。

检查循环条件。

检查模板的起始质量和数量。我们推荐采用 QIAGEN 试剂盒进行样本准备。

扩增或熔解曲线达到饱和

增益太高

使用自动增益优化（见第**错误!未定义书签。**页）。

可信度百分比发生变化

通过点击和拖拉移动标准化区域

如果需要避开熔解曲线部分，仅移动标准化区域。

极端值显示在数据中

不一致的反应设置

检查是否使用了正确的试剂。

样本中存在抑制剂

检查所使用的管子是否一致。

模板太少或出现降解

检查所有样本使用相同的主要混合物。

检查模板的起始质量和数量。

12.3 一般仪器故障

错误信息

意见和建议

不能打开串行端口
COMx

如果不能通过设置 COM 端口使软件与仪器连通，此故障发生在软件启动时。普遍由有故障的电缆，松散的电缆，有故障的串行端口，有故障的 USB 端口，USB 驱动问题，或 USB 串行转换器驱动问题引发。

重连或取代电缆。重新安装合适的驱动。在“Virtual Mode(虚拟模式)”中打开软件，并从“File (文件)”菜单中选择“Setup/Auto-Detect button(安装/自动检测按钮)”重新设置 COM 端口配置。

仓室盖开启

当软件检测到运行过程中仓室盖开启时，即会发生此错误。

无法继续运行；运行期间仓室盖开启。请重置机器，然后重启软件。

重置机器并重启软件。

仓室盖开启

当用户试图在仪器外盖开启的情况下启动运行时，即会发生此错误。

仪器仓室盖开启。请合上外盖，然后单击 **Continue**（继续）。

请合上仪器仓室盖，然后单击“**Continue**（继续）”。

通信损坏

当从仪器接收到的数据不符合预期的模式时，即会发生此错误。

需要由 **QIAGEN** 现场服务专员进一步调查，以便诊断仪器问题。

请联系您当地的经销商或者 **QIAGEN** 技术服务部门。

通信失序

当从机器接收到的数据顺序有误时，即会发生此错误。

仪器从机器上接收到了无序的数据。

需要由 **QIAGEN** 现场服务专员进一步调查，以便诊断仪器问题。

请联系您当地的经销商或者 **QIAGEN** 技术服务部门。

错误信息	意见和建议
通信协议错误 此次运行出现了通信协议错误。	当在固件中配置的通信协议与预期的协议不一致时，即会发生此错误。 需要由 QIAGEN 现场服务专员进一步调查，以便诊断通讯协议或仪器问题。
检测到马达卡死、机器停止。	当 Rotor-Gene Q MDx 在寒冷气候条件交付后立即使用时，即会发生此错误。 此时，请在开启仪器之前至少等待 1 小时，以便仪器适应室温条件。 如果这一问题仍然存在，请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。
致命性硬件故障 仪器检测到致命的硬件故障。在您的经销商检修完机器之前，请勿擅自重新使用机器。	当软件检测到致命的硬件故障并激活了安全防护程序关闭机器时，即会发生此错误。 请立即关闭仪器并联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。
机器错误 由于发生了无法恢复的机器错误，此次运行停止。如果再次出现此问题，请联系您当地的经销商，并附上支持存档文件。	当软件检测到机器上存在不可恢复的错误时，即会发生此错误。软件已停止运行。 可试着再次运行。如果问题仍然存在，则请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门，并附上一个支持存档文件。

错误信息

意见和建议

机器插头断开

仪器无反应，同时显示消息 <ERROR

MESSAGE >。此为不可恢复的故障，请重置仪器然后重启软件。

此故障发生在运行间断后仪器与软件不能连通时。通常由仪器故障引发或由于过度通过电脑运行而导致信息包丢失。

与软件相关的普遍原因包括密集型处理器任务，如本地防病毒保护或防病毒定期扫描，无线卡，或红外卡。

废弃或卸载相关密集型处理器软件/任务。

重置仪器然后重启软件。

依然存在，请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

机器插头断开

此仪器未连接到您计算机上的 <PORT NAME>。请将串行电缆重新连接到计算机后部，然后单击 Continue（继续）。

当仪器的串行或 USB 通信丢失时，即会发生此错误。

请将串行电缆重新连接到计算机后部，然后单击“Continue（继续）”按钮。

对像变量或带模块变量未设置

若默认实验模板文件已经损坏，此故障发生在软件启动时。如果软件/电脑关闭时未正确退出，例如，发生停电，此情况可能出现。

删除文件“C:\Program Files\Rotor-Gene 6000 Software\Templates\normal.ret”，再重新启动软件。

转子转速故障

设置转子速度时超时。

当软件尝试设置转子速度，但却未能在超时时间内设置目标速度时，即会发生此错误。

需要由 QIAGEN 现场服务专员进一步调查，以便诊断仪器问题。

请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

错误信息

意见和建议

在用的串行端口

此串行端口正被另一应用程序使用。请关闭通信或同步软件等应用程序，然后重试。

当软件试图连接到配置的机器 COM 端口，但此端口正被另一软件使用时，即会发生此错误。

请关闭通信或同步软件等应用程序，然后重试。

停机超时

仪器超出了预期的停机时间。请重置机器，然后重启软件。

当软件发出了关闭仪器的命令，而机器在预期的计时宽限期之后仍在继续发送数据时，即会发生此错误。

请重置机器，然后重启软件。

温度保护功能激活

仪器检测到仓室温度已超过安全水平。仪器进入自我保护模式。请关闭仪器，如果问题仍然存在，请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

当软件检测到仓室温度已超过安全水平，从而触发安全防护程序时，即会发生此错误。

请立即关闭仪器，然后联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

热敏电阻开启

仪器检测到热敏电阻开启，为了避免机器损坏，已将其关闭。如果此问题再次发生，请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

当软件检测到热敏电阻开启因而无法读取温度时，即会发生此错误；软件随后会触发安全防护程序以便关闭机器。

请立即关闭仪器，然后联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

发生了不可恢复的错误

由于出现了不可恢复的机器错误，此次运行被迫停止。如果此问题再次发生，请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门，并附上支持存档文件。

在运行过程中，当软件尝试完所有的措施恢复都未成功时，即会发生此错误。

需要由 QIAGEN 现场服务专员进一步调查，以便诊断仪器问题。

请联系您当地的经销商或 QIAGEN 技术服务部门。

12.4 Rotor-Gene Q 软件消息

以下为一份在软硬件工作过程中可能出现在 Rotor-Gene 软件内的使用、警告和其他消息列表。此类消息的任一部分都是可变的，即在方框之中给出的典型错误的描述（例如，< ERROR DESCRIPTION >）。

消息文本

一般消息

- 1 此页面已存在一个原始通道。如果您希望重新创建页面，必须先通过 Options（选项）按钮删除该原始通道，然后重试。
- 2 发生了严重的问题，需要重启软件。在您点击 OK 确认后，将会保存您当前的工作，同时仪器将随之关闭（如果条件允许）。如果这一问题仍然持续，请联系您当地的经销商。
- 3 无法删除此页面。系统之中至少应保留一个样本页面。
- 4 无法将仪器连接到串行端口<COMPORT>。请检查仪器插头是否正确插入计算机后部，然后重试。
- 5 无法打开串行端口<COMPORT>连接仪器。请检查您是否打开了任何通讯软件，关闭之后然后重试。
- 6 无法保存运行，因为表中的部分数据无效。请检查数据条目，然后重试。
- 7 无法保存文件。请确认有足够的磁盘空间，且未出现错误。
- 8 无法启动 E-mail 应用程序。请确认您的计算机之中已正确安装了此类应用程序。
- 9 运行期间出现错误：<ERROR DESCRIPTION>。运行仍可继续，但会在 Run Info（运行信息）的消息选项卡中记录一条消息。
- 10 未检测到仪器。请确认您已正确连接了仪器，同时确认仪器已开启。
- 11 由于上一次出错，目前记录功能被禁用。在软件完成重启之前，无法浏览存档的记录。

消息文本

- 12 由于荧光水平过低，所有样本并未全部标准化。
 - 13 只有采用的转子与当前运行相同，相应的运行才会被导入。
 - 14 请注意，当前运行的记录文件在其完成之前不可用。
 - 15 请输入有效的重复次数。该数值应大于 0。
 - 16 在更新记录数据时出现问题。记录功能已被停用，但在下一次运行是会重新启用。
 - 17 运行文件签名可确保您的运行结果的完整性。有关运行签名的信息请见 **Run Info**（运行信息）窗口。
 - 18 样本 ID 已被锁定。无法粘贴覆盖锁定的样本。
 - 19 此计算机上尚未安装 TeeChart Office、请重装 Rotor-Gene 软件。
 - 20 未选定此仪器配置的 COM 端口。您必须选择一个 COM 端口。
 - 21 载入的运行文件还有与文件内容不匹配的签名。这就表示该文件要么损坏，要么在 Rotor-Gene 软件写入后受到篡改。
 - 22 载入的运行文件无签名。此文件所含的内容无法得到担保。
 - 23 机器序列号无效。序列号必须为 6 位数长度。
 - 24 机器将会被冷却到<TEMPERATURE>度。如此时打开机器，仓室和表面仍然非常热。如果要接触任何表面和管子，请格外小心操作，同时佩戴上防护手套。
 - 25 您的计算机的地区设置存在冲突。请确保您的货币和数字的小数点占位符格式相匹配。
 - 26 在欢迎界面输入的序列号<SERIAL NUMBER1>与存储在所连接的机器<SERIAL NUMBER2>之中的序列号不匹配。计算机序列号现已更新，以与所连接的机器相匹配。
 - 27 通信线路板通信出现问题。您必须重启计算机，然后重试。
 - 28 在尝试与仪器通信时出现超时。请检查插头是否正确插入。
 - 29 此功能不可在虚拟模式下使用。
-

消息文本

-
- 30 此流程文件在最新版本的 Rotor-Gene 软件中创建。某些方面可能未正确载入。
- 31 此运行文件在最新版本的 Rotor-Gene 软件中创建。运行的某些方面可能未正确载入。
- 32 此样本文件在最新版本的 Rotor-Gene 软件中创建。某些方面可能未正确载入。
- 33 此软件将会对机器进行基本的模拟，可供培训和演示用途使用。您可以通过 **File**（文件）菜单访问 **Setup**（设置）界面，禁用此设置。
- 34
- 此模板在最新版本的 Rotor-Gene 软件中创建。模板某些方面可能未正确载入。
- 35 无法载入此样本文件，因为管子布局不匹配。请在启动运行前载入这些样本。
- 36 无法开启与机器间的通信，因为另一应用程序正在使用 `<COMPORT>`。请确认的确没有任何应用程序正在使用同一串行端口，然后重试
- 37 在尝试载入文件时出现了不可恢复的错误。未能载入文件。
- 38 运行进行过程中，无法停止程序。
- 39 您不具有使用此软件的足够权限。请联系您的域名管理员，请求其设置分组。
- 40 您已对导出样品进行了定量分析。
- 41 您必须选择一个 COM 端口才能继续。
- 42 您的运行无法保存到默认的路径下。请在以下窗口中，选择另一位置保存您的运行。
- 43 已保存您的设置。您可点击 **OK** 关闭软件。
- 44 您必须先选择一个转子才能继续。
- 45 在勾选确认已安装锁定环的复选框之前，您无法启动运行。
-

消息文本

自动增益调整消息

- 46 手动增益调整采用您在流程之中定义的通道。由于您未在自己的流程之中定义任何采集点，故您无法进行手动增益调整。
- 47 未保存您输入的温度，因为其已经超出了机器的工作温度范围。请输入有效的温度。

编辑器消息

- 48 请输入一个有效的组代码。组代码必须为至多 5 字符长度，且不含空格和逗号。
- 49 请输入一个有效的组名称。组名称不得含有逗号，也不得留空。

光学变性校准消息

- 50 校准失败，无法设置光学变性点。请输入想要保持的有效的的时间数 (s)，该数值应为正值。
- 51 在光学校准变性期间，无法检测熔解峰。这可能时由于选择校准的管子有误，或者针对此样品采用了不当的化学法、此时，应运行一个计时的步骤流程。

OTV 消息

- 52 为执行此运行，您必须输入一个有效的 OTV 序列号。
- 53 此温度验证文件已损坏。倾泻在并重装 Rotor-Gene 软件，修复此错误。
- 54 此运行文件签名有误，无法显示结果。
- 55 在勾选确认荧光接头已安装就位的复选框之前，您无法启动运行。
- 56 此转子已过期，请您联系您当地的经销商获取替换件。

安全性菜单消息

- 57 无法打开 Windows 的用户/组管理程序。
 - 58 无法创建组。
 - 59 无法修改内置帐户的访问权限。
-

消息文本

分析菜单

- 60 您仅选择了一条通道进行分析。如需选择多条通道，如需选择多个通道，可在分析选择窗口内拖动您想要显示的通道周围的矩形框。
- 61 您仅选择了多条通道进行分析。此分析技术仅允许进行单通道分析。

浓度测量消息

- 62 **Concentration Measurement**（浓度测量）可在第一个转子的位置进行自动增益优化。请确保您在第一个转子位置具有最高的浓度标准。

终点法分析消息

- 63 如要采用终点法分析，您必须为各个通道配备阳性和阴性对照。如需定义此类对照，请单击 **OK**。
- 64 您尚未定义任何阳性对照。您必须为自己分析的通道定义阳性对照。
- 65 您尚未定义任何阴性对照。您必须为自己分析的通道定义阴性对照。
- 66 您尚未定义任何 **NTC** 对照。您必须为各组定义 **NTC** 对照。

HRM 分析消息

- 67 基因型<**GENOTYPE NAME**> 尚无确定的控件。
- 68 不允许复制基因型组合。
- 69 此仪器不支持高分辨率熔解曲线。请联系您当地的经销商了解更多信息。

甲基化分析消息

- 70 定位峰库之前，无法确定基因型。请先确定所有峰库，然后重试。
 - 71 您必须输入<**GENOTYPE NAME**>基因型的简写。
-

消息文本

散点分析消息

- 72 散点分析需要恰好选择 2 条通道。如需选择多条通道，可在分析选择窗口内拖动您想要显示的通道周围的矩形框，然后在按住 **SHIF** 键的同时圈住通道。

定量分析消息

- 73 自动检索阈值功能要求您至少确定 2 个选定的标准品。为完成此项设置，您需要右键单击样本列表，然后选择“**Edit Samples...**（编辑样本...）”

此页留空。

13**术语**

术语	描述
采集	采集是指收集荧光数据。从通道进行的每次采集（荧光数据集）以未分析的数据显示在软件“ Raw channel (原始通道) ”窗口中。可使用“ Analysis (分析) ”菜单中的选项分析本数据。
峰库	在熔解分析中，峰库设置用于定义熔解峰预期出现的区域。可根据特定峰库或峰库结合区域中熔解峰的出现确定基因型。
CE-IVD	符合欧洲体外诊断医疗器械指令 98/79/EC。
通道	一个通道包括含有激发滤光片的发光二极管（LED）以及配对的发射滤光片。LED 和激发滤光片在特定波长下激发样本。样本发射的荧光通过发射滤光片，然后被光电倍增管检测。
增益	Rotor-Gene Q MDx 使用光电倍增管收集荧光光子，并转化成电子信号。增益是用于确定光电倍增管灵敏度的设置。如果增益设置太高，那么信号就过饱和。如果增益设置太低，那么就不可能区分信号与背景噪音。
增益优化	增益优化是动态调整增益设置，从而选择适当设置使信号检测达到最佳的过程。
载物块	载物块是在反应体系构建中固定管子或 Rotor-Disc 等可进行不同形式应用的铝块。Rotor-Disc 载物块也用于 Rotor-Disc 热密封器，从而对 Rotor-Disc 进行热密封。
锁定环	锁定环是固定于转子上的金属圈，用于防止管子和盖子在 Rotor-Gene Q MDx 的操作过程中变松。盖子和管子变松可能对仪器造成损害。
转子	金属转子在 Rotor-Gene Q MDx 中固定管子或 Rotor-Disc。它使得样本能够在仪器仓室内旋转，确保样本与光学系统对齐。锁定环安全固定转子。
Rotor-Disc	Rotor-Disc 是垂直放置的反应孔圆板。Rotor-Disc 样式包括 72 和 100 个反应两种。使用 Rotor-Disc 热密封膜和 Rotor-Disc 热密封器密封 Rotor-Disc。

附录 A

技术数据

QIAGEN 保留在任何时间修改规格的权利。

环境条件

运行条件

电源	100 - 240 V AC, 50-60 Hz, 520 VA (峰值) (国家特异性设置) 功率消耗 60 VA (备用) 电源的电压波动不得超过理论供给电压的 10%。
保险丝	F5A 250 V 保险丝
热损耗 / 热负荷	平均: 0.183kW (632 BTU / 小时) 峰值: 0.458kW (1578 BTU / 小时)
超额电压范畴	II
空气温度	18 - 30°C (64 - 86°F)
相对湿度	10 - 75% (无冷凝)
海拔	最高 2000 m (6500 ft.)
操作位置	仅供室内使用
污染水平	2
环境分类	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

附录 A

运输条件

空气温度	- 25° C 到 60° C (- 13° F 到 140° F) ， 位于制造商的包装内
相对湿度	最大为 75% (无冷凝)
环境分类	2K2 (IEC 60721-3-2)

储存条件

空气温度	15° C-30° C (59° F 到 86° F) ， 于制造商包装内
相对湿度	最大 75% (无冷凝)
环境分类	1K2 (IEC 60721-3-1)

机械数据和硬件特征

尺寸	宽： 370 mm (14.6 in.) 高： 27.5 cm (10.8 in.) 深 (无电缆)： 420 mm (16.5 in.) 深 (门打开)： 538 mm (21.2 in.)
重量	12.5 kg (27.6 lb.) 标准结构
容量	使用 Rotor-Disc 100， 每次最多运行 100 个样本
软件	Rotor-Gene Q 软件 (2.3.1 及以上版本)

热循环规格

描述	参数
温度范围	35°C - 99°C (95°F - 210.2°F) (循环应用为 50°C - 99°C)
温度准确度	±0.5°C (采用 Rotor-Disc OTV 流程校准后)
温度分辨率	±0.02°C (可编程最小增量)
温度均一性	±0.02°C

Optical specifications

描述	参数
激发光源	高能发光二极管
检测器	光电倍增管
采集时间	4 s

FCC 声明

“美国联邦通信委员会” (USFCC) (在 47 CRF 15. 105 部分) 宣布, 必须通知使用此产品的用户以下事实与情形。

“此设备符合 FCC 第 15 部分要求:
工作时满足以下两种条件: (1) 此设备不会造成有害的干扰;
(2) 此设备必须能够承受任何接收到的干扰, 包括可能造成意外操作的干扰。

“此 B 类数字设备符合加拿大 ICES-0003 标准。”

除非另行说明, 以下说明适用于本手册涵盖的产品。有关其他产品的说明包含在随附的文档之中。

注意: 此设备已进行过程测试, 结果证明其符合 FCC 规定第 15 部分规定的 B 类数字设备限制, 通知符合加拿大境内的所有应用要求。

适用于数字设备的干扰源设备标准 ICES-003。此类限制旨在针对居民区设施内的有害干扰, 提供合理的保护。此类设备产生、使用并可放射出无线射频能力, 如果不依照说明书正确安装和使用, 可能对无线电通讯造成有害的干扰。但是, 我们不能保证在特定的设施内不会发生干扰。如果此设备的确对无线电或电视信号接收造成有害干扰 (可通过开关设备来进行判定), 建议用户通过以下一项或多项措施去除干扰:

- 重新定向或放置接收天线
- 增大设备与接收装置之间的距离
- 将接收装置和此设备分别连接到不同的电路上

咨询经销商或者经验丰富的无线电/电视技术人员寻求帮助。

对于任何由于对设备进行未经授权的修改, 或者替换或安装非 QIAGEN GmbH Germany 指定的连接电缆或设备而造成的任何无线电/电视干扰, QIAGEN GmbH Germany 不予承担任何责任。用户应负责对由于此等未经授权的修改、替换或安装造成的干扰进行修复。

符合性声明

Declaration of Conformity

Name and address of the company

**QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
D-40724 Hilden
Germany**

We herewith declare that the product

Rotor-Gene Q MDxAccessories: **Rotor-Gene Heat Sealer**

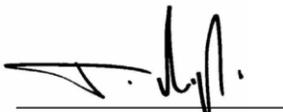
meets all applicable requirements of the European Directive on

In vitro diagnostic medical devices (IVDD) 98/79/EC

Classification

Other Device, Annex III

Hombrechtikon, 01 November 2010



Pit Muggli
Senior Director Quality & Compliance Automated Systems



Sample & Assay Technologies

废弃的电子电器设备（WEEE）

本章节提供了使用者处理废弃电子电器仪器的相关信息。

打叉的带轮子垃圾箱标志（见下文）表明本产品绝不能与其他废弃物一同处理。它必须运送至获得批准的处理机构，或在指定的采集点根据当地法规和法规进行再循环。

处理时单独收集和再循环废弃电子仪器有助于保护自然环境，确保利用保护人体健康和环境的方式对产品进行再循环。



QIAGEN 愿意应客户要求提供再循环服务，不够要额外收取一定的费用。在欧盟境内，依照特定的 WEEE 再循环规定，如果从 QIAGEN 购买替代产品，则 QIAGEN 能够免费对其 WEEE 标记的电子仪器进行再循环。

如果需要再循环电子仪器，那么请联系当地 QIAGEN 销售办公室，从而获得所需要的交还表格。提交表格后，QIAGEN 将联系您，或要求提供有关收集电子废弃仪器时间表的跟踪信息，或向您提供单独的报价。

此页留空。

附录 B

本附录更详细地描述了所使用的数据方法。

定量分析

用已知值对数浓度 (x) 和实验值 C_T 值 (y)，由简单的线性回归模型获得计算后的浓度。

标准的对数浓度和 C_T 值用于构建公式中的模型：

$$y = Mx + B$$

所计算浓度的置信区间

对于标准曲线上的新观察结果 x_0 的估计，我们使用下列置信区间 $100(1 - \alpha)\%$ 。

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

这是单个未知浓度的置信区间。

假设现在我们在 $x = x_0$ 时有 k 个更多的观察结果，我们将其平均值标记为 \bar{Y}_0 ，然后

$$\bar{Y}_0 \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_0, \frac{\sigma^2}{k})$$

自变量与上述相近

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

本公式确定了如何得到重复未知浓度的置信区间。

对于标准的估计，可以获得更高的置信区间：

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

本公式表明，由于 n 增加，对于所有估计，增加标准个体浓度的重复数将减少区间宽度。未知量增加大量重复后，可减少单个标准的不确定性。由于未知量并不构成线性模型的一部分，因此额外的重复减少了不确定性。

C_T 值的置信区间

我们假设重复 C_T 值中的误差符合线性和正态分布。

因本 t 置信区间。其中 μ 是重复 C_T 值的平均值 $(x_0 \dots x_{n-1})$ 。然后， C_T 值 μ 的 $100(1 - \alpha)\%$ 置信区间为：

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

在此感谢澳大利亚悉尼 NSW 大学数学系的 Peter Cook 先生，感谢他在验证数学运算方法提供的不可估量的帮助。

附录 C

Rotor-Gene Q MDx 产品、配件和耗材

产品	内容	编号
Rotor-Gene Q MDx 2plex	实时 PCR 循环控制装置，有 2 个通道（绿色和黄色），笔记本电脑，软件，配件，免部件和人力费用的 1 年保修	询问
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM	实时 PCR 循环控制装置和高分辨率熔解分析装置，有 2 个通道（绿色和黄色），加上 HRM 通道，笔记本电脑，软件，配件，免部件和人力费用的 1 年保修	询问
Rotor-Gene Q MDx 5plex	实时 PCR 循环控制装置，有 5 个通道（绿色，黄色，橙色，红色，深红色），笔记本电脑，软件，配件，免部件和人力费用的 1 年保修	询问
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	实时 PCR 循环控制装置和高分辨率熔解分析装置，有 5 个通道（绿色，黄色，橙色，红色，深红色），加上 HRM 通道，笔记本电脑，软件，配件，免部件和人力费用的 1 年保修	询问
Rotor-Gene Q MDx 6plex	实时 PCR 循环控制装置，有 6 个通道（蓝色，绿色，黄色，橙色，红色，深红色），笔记本电脑，软件，配件，免部件和人力费用的 1 年保修	询问

附录 C

产品	内容	编号
配件		
Rotor-Disc 100 启动试剂盒	试剂盒包括：2 个 Rotor-Disc 100 包，Rotor-Disc 热密封器，Rotor-Disc 热密封薄膜，Rotor-Disc 100 转子和锁定环，Rotor-Disc 100 载物块，Rotor-Disc 移液辅助装置	询问
Rotor-Disc 100 (30)	用于 3000 个反应的 30 个独立包装盘	981311
Rotor-Disc 100 (300)	用于 30000 个反应的 10 x 30 个独立包装盘	981313
Rotor-Disc 100 转子	用于在 Rotor-Gene Q 中固定 Rotor-Disc 100 盘；需要 Rotor-Disc 100 锁定环	9018895
Rotor-Disc 100 锁定环	用于在 Rotor-Disc 100 转子中锁定 Rotor-Disc 100	9018896
Rotor-Disc 100 载物块	用于在 Rotor-Disc 100 盘中手动和自动设置反应的铝块	9018909
Rotor-Disc 移液辅助装置	用于在 Rotor-Disc 载物块上手动设置反应中辅助标记孔	9018897
Rotor-Disc 热密封器	与 Rotor-Discs 一起使用时的热加封装置；需要 Rotor-Disc 72 或 100 载物块	9018898
Rotor-Disc 热密封薄膜（60）	用于密封 Rotor-Disc 100 或 Rotor-Disc 72 盘的 60 张薄膜	981601
Rotor-Disc 热密封薄膜（600）	用于密封 Rotor-Disc 100 或 Rotor-Disc 72 盘的 10 x 60 张薄膜	981604

产品	内容	编号
Rotor-Disc 72 启动试剂盒	试剂盒包括：3 个 Rotor-Disc 72 包，Rotor-Disc 热密封器，Rotor-Disc 热密封薄膜，Rotor-Disc 72 转子和锁定环，Rotor-Disc 72 载物块，Rotor-Disc 移液辅助装置	Inquire
Rotor-Disc 72 (24)	用于 1728 个反应的 24 个独立包装盘	981301
Rotor-Disc 72 (240)	用于 17280 个反应的 10 x 24 个独立包装盘	981303
Rotor-Disc 72 转子	用于在 Rotor-Gene Q 中固定 Rotor-Disc72 盘；需要 Rotor-Disc 72 锁定环	9018899
Rotor-Disc 72 锁定环	用于在 Rotor-Disc 72 转子中锁定 Rotor-Disc 72	9018900
Rotor-Disc 72 载物块	用于在 Rotor-Disc 72 盘中手动和自动设置反应的铝块	9018910
条状管和管帽，0.1 ml (250)	用于 1000 个反应的 250 条 4 个单管连一排的条状管和管帽	981103
条状管和管帽，0.1 ml (2500)	用于 10000 个反应的 10 x 250 条 4 个单管连一排的条状管和管帽	981106
72 孔转子	用于固定条状管和管帽，0.1 ml；需要 72 孔转子锁定环	9018903
72 孔转子锁定环	用于在 72 孔转子中锁定条状管和管帽，0.1 ml	9018904
72 x 0.1 ml 管子载物块	用单通道移液器在 72 x 0.1 ml 管中进行手动反应设置的铝块	9018901
72 x 0.1 ml 多通道载物块	用多通道移液器在 72 x 0.1 ml 管中进行手动反应设置的铝块	9018902

附录 C

产品	内容	编号
PCR 管, 0.2 ml (1000)	用于 1000 个反应的 1000 个薄壁管	981005
PCR 管, 0.2 ml (10000)	用于 10000 个反应的 10 x 1000 个薄壁管	981008
36 孔转子	用于固定 PCR 管, 0.2 ml; 需要 36 孔转子锁定环	9018907
36 孔转子锁定环	用于锁定 PCR 管, 0.2 ml, 位于 36 孔转子中	9018906
96 x 0.2 ml 管子载物块	使用 96 x 0.2 ml 管子, 在标准 8 x 12 阵列中, 用于手动反应设置的铝块	9018905
Rotor-Disc OTV 试剂盒	用于 Rotor-Gene 系统光学温度验证的试剂盒, 包括预装有热致变色液体结晶的 Rotor-Disc, 荧光插入物, 校准文件 CD; 需要 Rotor-Disc 72 转子和锁定环或 Rotor-Disc 72 启动试剂盒	981400
转子固定装置	将管子和 Rotor-Disc 装入转子的金属独立固定装置	9018908

有关可搭配 Rotor-Gene Q MDx 使用的最新的 QIAGEN 试剂盒的信息, 请参阅 www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx。

附录 D

责任条款

QIAGEN 无义务保修除其自身工作人员之外人员进行的修理或改动，除非公司已书面同意进行这些修理或改动。

本保单内的所有替换材料仅适用于原始保修期，不会超过原始保单中的原始有效期，除非公司官员有书面授权。读出仪器、接口仪器和相关软件仅在这些产品原始制造商提供的时间内获得保修。任何人员，包括 QIAGEN 代理，作出的与本保单中不一致或冲突的主张或保证均不能强加于公司，除非 QIAGEN 官员有书面批准。

此页留空。

索引

—A—

采集, 6-13
调整标尺, 7-2
高级向导, 6-6
等位基因区分, 7-43
稽查跟踪, 7-92
自动发现阈值, 7-18
AutoStat, 7-22

—C—

校准器重复, 7-42
警告, 1-1
通道, 3-4, 7-60
比较性定量分, 7-41
浓度分析, 7-53
 标准, 7-54
置信区间, 2
相关系数, 7-14
收获周, 7-2
C_T 计算, 7-17
C_T 注释, 7-20
周期工作, 6-12

—D—

默认标尺, 7-2
 $\Delta \Delta C_T$ 相对定量分析, 7-33
检测参数, 3-4
动态管子标准化, 7-23

—E—

编辑曲线窗口, 6-4, 6-10
编辑样本窗口, 6-6, 6-27, 7-64
 转子类型, 7-69
效率, 7-13, 7-26

空运行, 6-7
终点分析, 7-47
 对照, 7-49
激发参数, 1-4
错误消息, 12-3
激发参数 3-4
指数式扩增, 7-26
导出
 数据, 8-5
 图像, 8-2
 原始格式, 8-4
 至 LinReg, 7-8

—F—

检测荧光团, 3-4

—G—

增益优化, 6-20
 手动, 6-24
增益设置, 7-98
基因型
 等位基因鉴别, 7-44
 终点分析, 7-48, 7-53
 熔解曲线分析, 7-39
 散点图分析, 7-45
组, 7-71

—H—

固定, 6-10
HRM
 高级向导, 6-8
 分析, 7-56, 11-1, 11-17
 周期, 6-16
 向导, 11-6
 试剂盒, 11-2
 甲基化分析, 11-5

Index

快速启动向导, 6-3
实时 PCR, 11-16
样本准备, 11-8
SNP 基因分型, 11-3
软件, 11-8
故障排除, 12-1
杂交, 6-15

—I—

首次忽略, 7-24, 7-45
安装, 4-1
 接地要求, 4-2
 硬件, 4-4
 PC 要求, 4-2
 电源要求, 4-2
 场地要求, 4-1
 软件, 4-5
预期使用, 2-2

—L—

LinReg
 导出至, 7-8
载物块, 5-4
锁定
 样本, 7-95
 模板, 7-97
锁定环
 36 孔转子, 5-1
日志存档, 12-1

—M—

机器选项, 7-59
维护, 9-1
 高级向导, 6-8
熔解, 6-15
熔解曲线分析, 7-37
 峰库, 7-39
 峰, 7-38
熔解曲线结果窗口, 7-39
菜单
 分析, 7-11

显示选项, 7-73
文件, 7-5
增益, 7-98
帮助, 7-99
运行, 7-57
安全, 7-73
视图, 7-58
窗口, 7-99
信息, 7-60

—N—

噪音斜率校正, 7-24
标准化, 7-2
 动态管子, 7-23
 终点法分析, 7-50
核酸浓度测量, 6-3, 7-53

—O—

操作
 条件, 1-4, 1
 硬件, 5-1
 软件, 6-1
光学变性周期工作, 6-16
光学系统, 3-2
光学温度验证, 10-1
OTV, 10-1
异常排除, 7-24
Outlook, 7-103

—P—

页面, 7-3, 7-4, 7-67
进行末次运行, 6-2, 6-7
端口, 4-8, 7-10
引物二聚体, 11-17
曲线进展, 7-63

—Q—

定量分析, 7-12, 1
定量分析结果窗口, 7-18
淬火 FRET, 6-2

入门向导, 6-1

—R—

原始通道, 7-1

反应设置, 5-4

报告浏览器窗口, 7-9, 7-12, 7-39

转子

36 孔, 5-1

选择, 6-4, 6-8

规格 5-4

类型, 5-1

Rotor-Disc

热密封, 5-8

设置, 5-8

Rotor-Disc OTV 试剂盒, 10-1

运行

新建, 7-6

打开, 7-6

暂停, 7-57

保存, 7-6

设置, 7-58

签名, 7-93

启动, 7-57

停止, 7-58

—S—

安全性

生物学, 1-4

化学, 1-5

电气, 1-3

热危害, 1-7

维护, 1-7

机械危害, 1-6

正确使用, 1-1

转子, 1-6

样本, 1-4

有毒烟雾, 1-5

废物处理, 1-6

样本页适合性窗口, 7-70

样本类型, 7-66

调整标尺, 8-1

散点图分析, 7-44

安全性, 7-62, 7-73

配置 Win7, 7-83

配置 XP, 7-74

登录 XP, 7-75

序列号, 4-8

设置窗口, 7-9

斜率, 7-26

软件

错误消息, 12-9

更新, 4-11

版本, 4-9

扳手按钮, 8-5

规格

硬件, 2

光学, 3

标准曲线, 7-13

计算, 7 7-15

导出, 7-14

公式, 7-14, 7-27

导入, 7-15

覆盖, 7-14

双标准曲线法, 7-28

保存, 2

适合性, 7-70

支持, 7-100

图标, 1-9

—T—

起始点调整, 7-24

技术帮助, 2-1

TeeChart Office, 8-4, 8-6

温度图, 7-63

模板

增加高级向导, 6-8

增加快速启动向导, 7-44, 8-1

终点法分析, 7-53, 8-1

熔解分析, 7-40, 8-1

定量分析, 7-27, 8-1

散点图分析, 7-46, 8-1

热性能, 3-1

三步熔解, 6-2, 6-7

切换器, 7-3

Index

工具栏, 7-1

运输, 2

故障排除, 12-1

HRM, 12-1

Rotor-Gene Q MDx, 12-3

管子部署, 7-62

双标准曲线法, 7-28

两步法, 6-2, 6-7

—U—

打开包装, 4-3

用户

Win7 分配角色, 7-86

XP 分配角色, 7-78

Win7 创建账户, 7-84

XP 创建账户, 7-75

多个账户, 7-90

—V—

版本, 2-1

虚拟模式, 4-8, 7-10

—W—

警告, 1-1

废物处理, 1-6

扳手按钮, 8-5

产品名称：实时荧光定量 PCR 分析仪

型号：Rotor-Gene Q MDx

注册人：QIAGEN GmbH 凯杰德国

住所：QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germany

联系方式：400-880-0325

www.qiagen.com

承产单位：Plexus Manufacturing Sdn Bhd

住所及生产地址：Plot 87, Lebuhraya Kampung Jawa, 11900 Bayan Lepas, Penang, Malaysia

代理人及售后服务机构：凯杰企业管理（上海）有限公司

住所：中国（上海）自由贸易试验区达尔文路 88 号 20 号楼

联系方式：800-988-0325

生产日期：见外包装

使用期限：产品预期使用寿命为 5 年。

本产品使用期限是根据模拟实际操作的方法确定的，在使用过程中，用户应当按照产品说明书的要求对产品进行维护、保养和维修。在维护、保养或维修后，经确认仍能保持基本安全性和有效性的产品，可以正常使用。

医疗器械注册证编号/产品技术要求编号：国械注进 20163222943

说明书编制和修订日期：2021 年 6 月 24 日
