

- Step One軟體若未開啟，快速點選  或從 **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne > StepOne v2.0** 開啟軟體，點選主畫面上的  開啟欲分析的檔案。

- 如要重新編輯實驗或樣品設定，可從左邊畫面的 **Experiment Menu** 下的  進行實驗盤的編輯。

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

- 檢視Amplification Plot  結果時，請先將Plot Type選擇成  $\Delta Rn$  vs Cycle

Plot Type:  $\Delta Rn$  vs Cycle。欲檢視Baseline設定，將Graph Type選擇以Linear方式表示

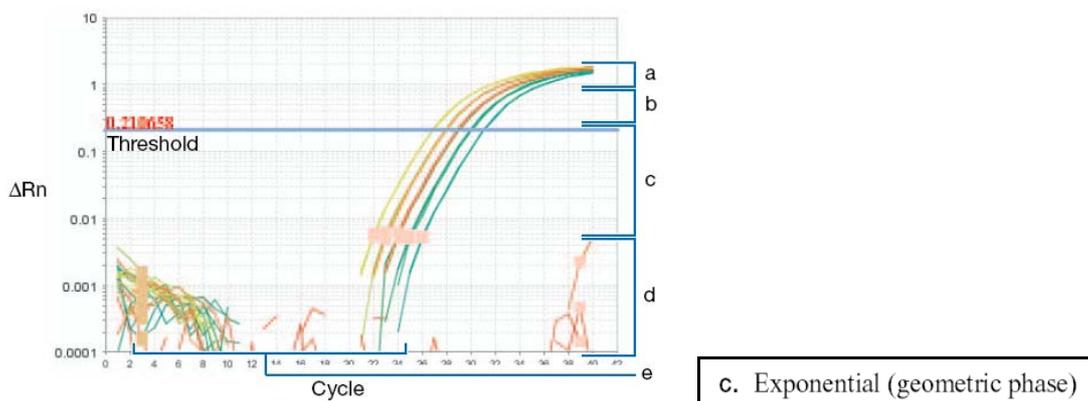
Graph Type: Linear，並於擴增曲線圖下方勾選顯示Baseline設定，檢查Baseline起

始與結束位置是否正確。欲檢視Threshold設定時，選擇Graph Type以Log方式

表示 Graph Type: Log，並於擴增曲線圖下方勾選顯示Threshold設定，利用Target

選項 Target: RNase P 可檢視不同基因的結果，請確認每個Target的Threshold位

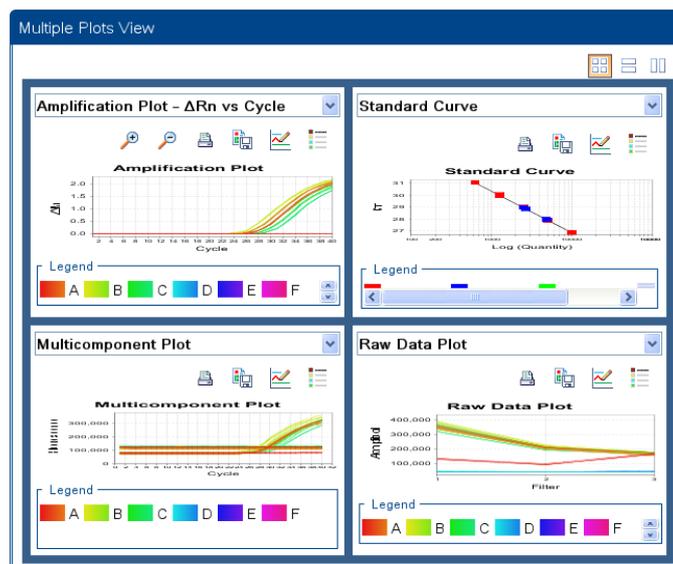
置是否設定於Exponential (geometric) phase中(如下圖所示)。



- 若欲更改分析的設定，點 **Analysis Settings**，將  Use Default Settings 和  Automatic Threshold 的選擇勾勾點掉，並輸入欲更改的Threshold  和Baseline區間

Baseline Start Cycle:  End Cycle: ，按下 **Apply Analysis Settings** 然後重新分析 **Reanalyse**。

6. 檢視Standard Curve  結果時，利用Target選項 Target: RNase P  可以檢視不同基因的標準曲線，請確認所有待測檢體均落在標準品的濃度區間中，標準曲線的Slope代表PCR反應效率，若越接近-3.3代表PCR反應效率達到100%。  
R<sup>2</sup>數值代表每個資料點與迴歸曲線接近的程度，應該>0.99以上。
7. 若欲檢視計算結果，點選圖形右方的  視窗，利用Group By下拉式選單  可選擇Well Table以C<sub>T</sub>，Replicate或Flag分組的排列方式。若發現有outlier可利用每個well後面的Omit功能來刪除。
8. 檢視Multicomponent Plot  結果時，選擇以Dye分類呈現 Plot Color Dye  可以觀察到每個well中不同螢光在反應過程的變化情形，也可檢查NTC well是否有污染狀況。反應過程中，ROX螢光訊號應該保持穩定不變。
9. 檢視Raw Data  結果時，可拖曳圖形下方的cycle數以觀察3個Filter收集訊號的情況，並確認收集的螢光沒有錯誤（1號濾鏡收集FAM和SYBR Green dye，2號濾鏡收集VIC和JOE dye，3號濾鏡收集ROX dye）。
10. 檢視QC Summary  報告，可以快速瀏覽此次反應是否有哪些well出現異常狀況，若Flagged Wells次數>0，請直接查詢下方可能的失敗原因。
11. 若點選Multiple Plots View  可以同時檢視上述幾種圖形。



12. 分析完的數據結果可以利用功能列上的 **File/Export**，來轉成Excel檔案格式。若欲存取任一圖形結果，可直接按滑鼠右鍵，選擇 **Save As** 存成JEPG檔案格式。