

BIO-RAD
CFX Opus



—— 正茂生技 ——

qPCR 基礎操作課程

產品專員：蔡鼎諾 (Tim)



課程大綱



01

PCR 原理介紹

02

qPCR 基礎介紹

03

qPCR 注意事項

04

qPCR 上機要點

何謂 PCR

何謂 PCR - 聚合酶連鎖反應？

「DNA 聚合酶 (DNA polymerase)」在一對高特異性的

「引子 (Primers)」引導下，短時間內於試管內 (In Vitro)

或體外「大量複製 DNA 序列」的分子生物學技術

DNA 結構

基礎原理

基本元素

操作流程

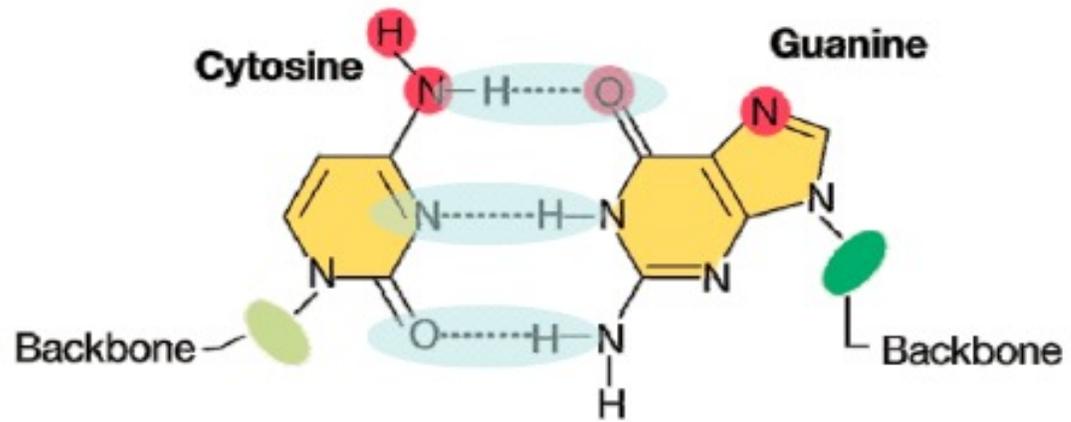
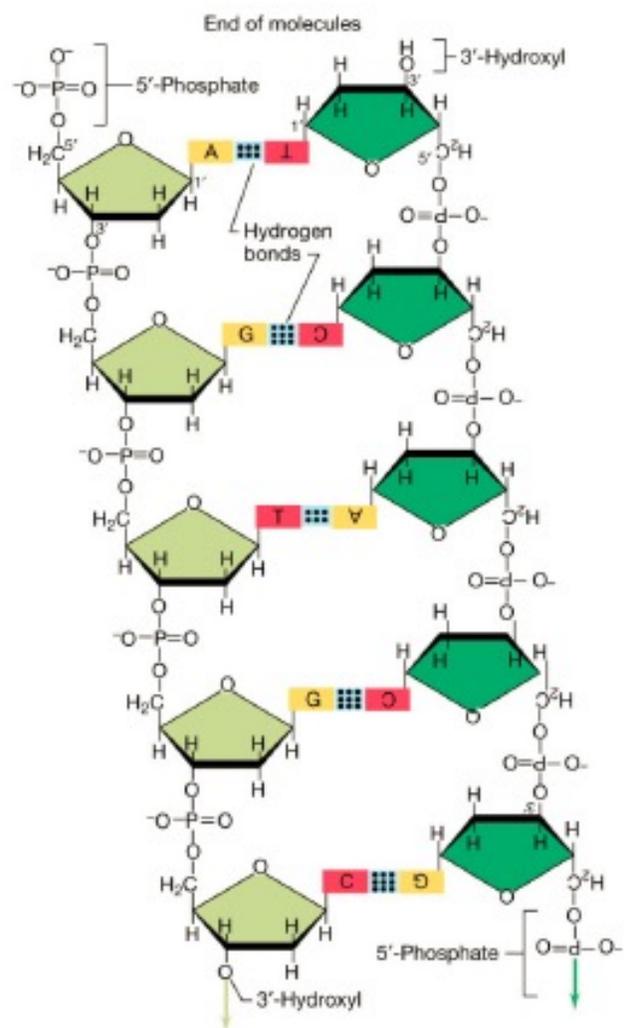
何謂 PCR

DNA 結構

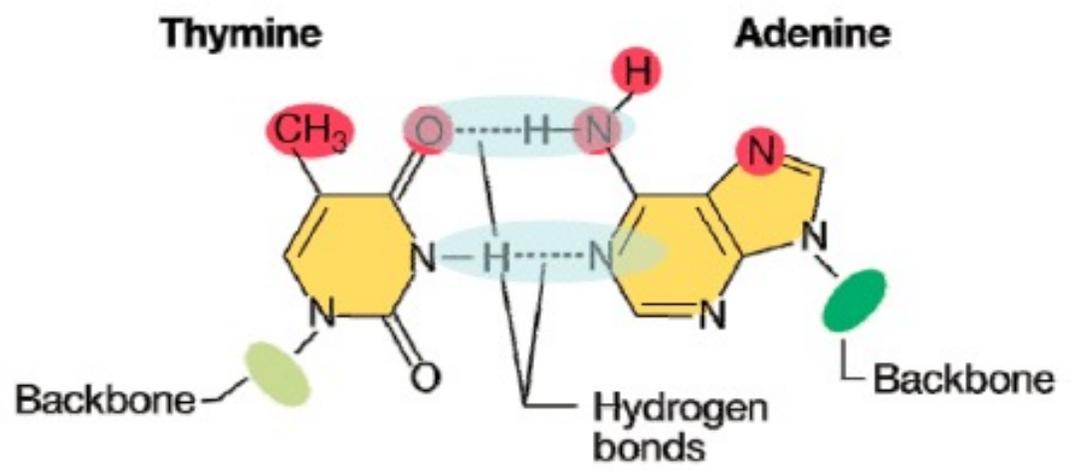
基礎原理

基本元素

操作流程



GC pair > AT pair



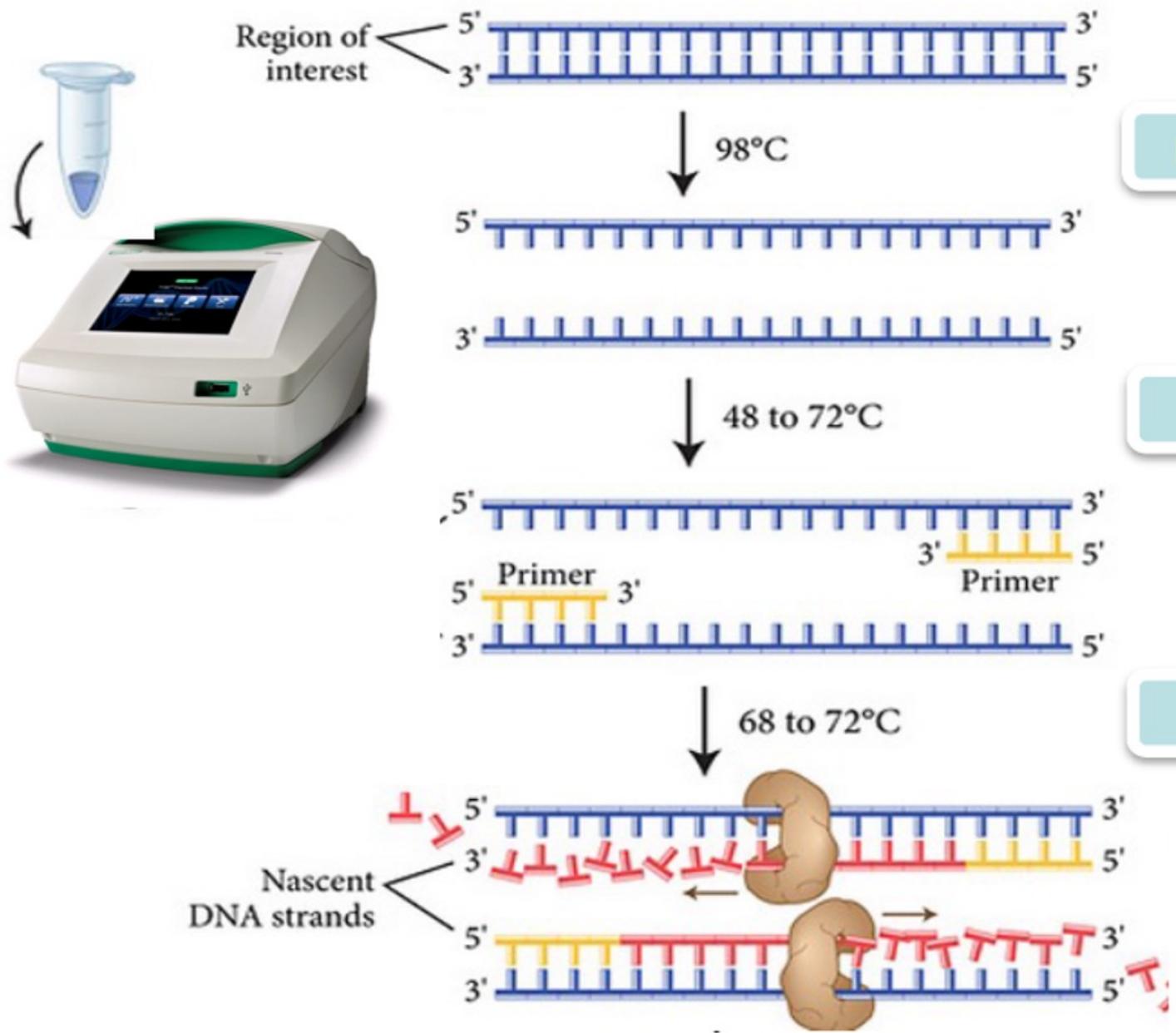
何謂 PCR

DNA 結構

基礎原理

基本元素

操作流程



Denaturation

Annealing

Extension

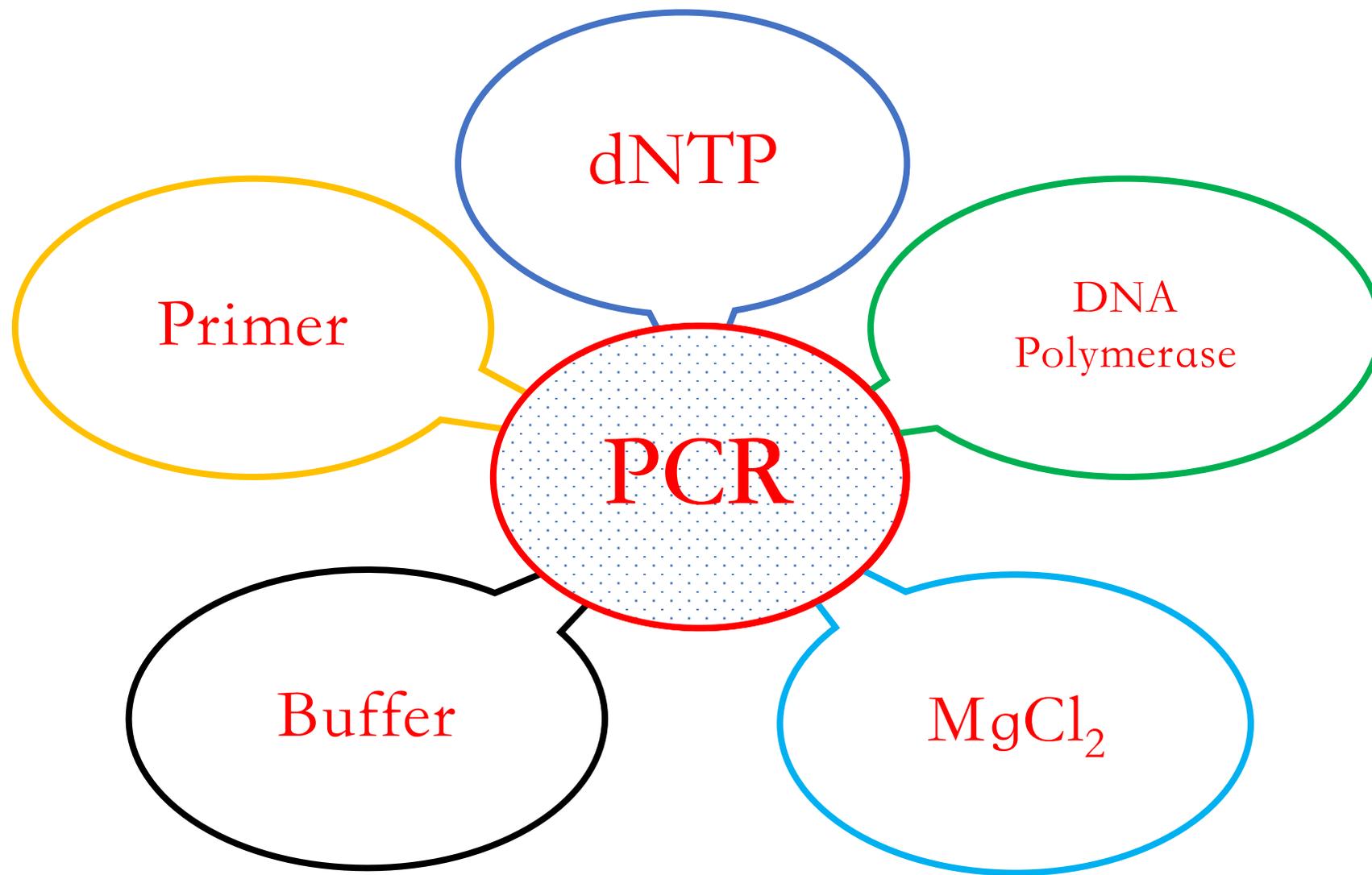
何謂 PCR

DNA 結構

基礎原理

基本元素

操作流程



何謂 PCR

DNA 結構

基礎原理

基本元素

操作流程

- ✓ **DNA模板** (template)：含有需要擴增的 DNA 片斷，雙股經高溫解離成單股 DNA，作為 PCR 反應的模版。
- ✓ **引子** (primer)：包括了前置引子 (forward primer) 和反置引子 (reverse primer)，決定了需要擴增的**起始**和**終止**位置。
- ✓ **DNA聚合酶** (polymerase)：複製需要擴增的區域。能將核酸原料 (dNTPs) 依照 DNA 模板密碼，正確地一個一個地加上去，而合成新的一股基因片段。

何謂 PCR

DNA 結構

基礎原理

基本元素

操作流程

- ✓ 去氧單核苷酸 (dNTP)：用於構造新的互補鏈「dATP、dGTP、dCTP、dTTP」。
- ✓ 氯化鎂 ($MgCl_2$)：可提供「**鎂**」離子作為聚合酶的**輔因子**，輔助聚合酶作用。
- ✓ 緩衝體系 (Buffer)：提供適合聚合酶行使功能的化學環境，主要是由 Tris、KCl 所調配成的緩衝液，pH 約 8.4。

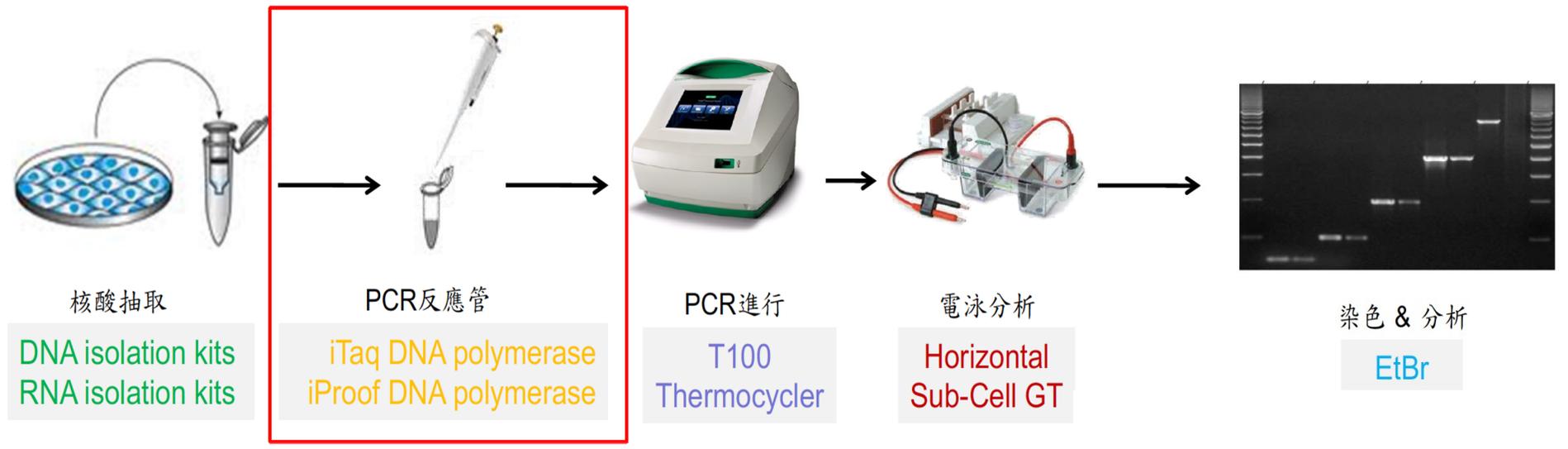
何謂 PCR

DNA 結構

基礎原理

基本元素

操作流程





2022 

— q P C R 篇 —



何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

C_T 值定義

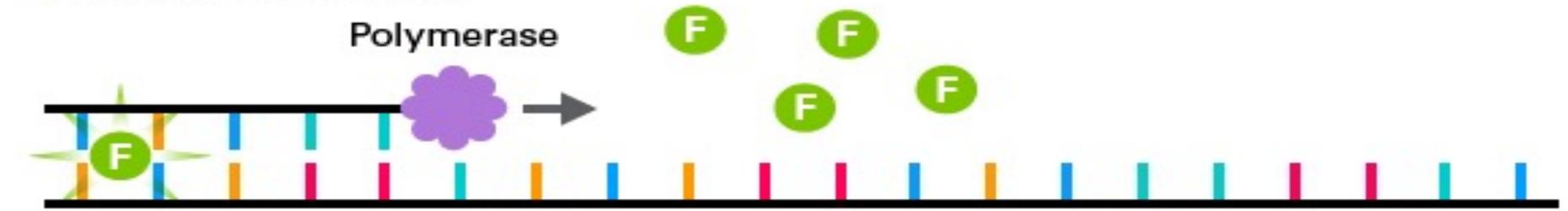
螢光染劑法

螢光探針法

1 Heat denaturation



2 Primer annealing



3 Extension



PCR V.S. qPCR



何謂 qPCR

流程比較

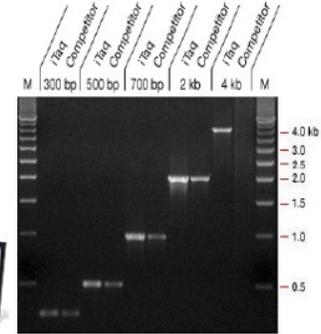
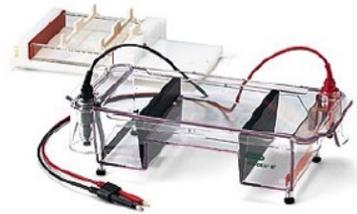
基礎原理

C_T值定義

螢光染劑法

螢光探針法

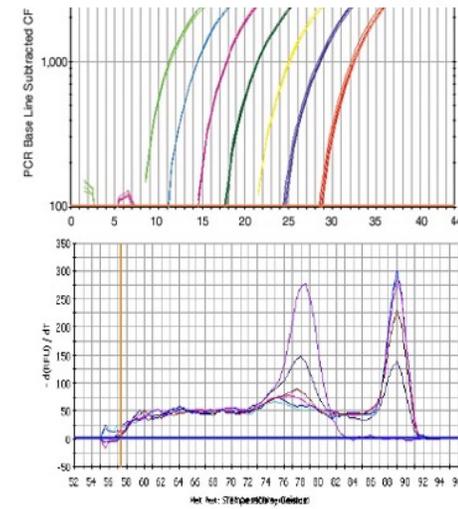
- +Taq
- +dNTP
- +MgCl₂
- +H₂O
- +Buffer
- +Template
- +Primer
- (On ice)



- End point
- Fuzzy data
- Labor intensive

3hrs (1.5 hrs labor)

- +2x Master Mix
- +H₂O
- +Template
- +Primer
- (Room Temp)



- Online monitoring
- More sensitive
- Automated

<1 hrs (20 min labor)

何謂 qPCR

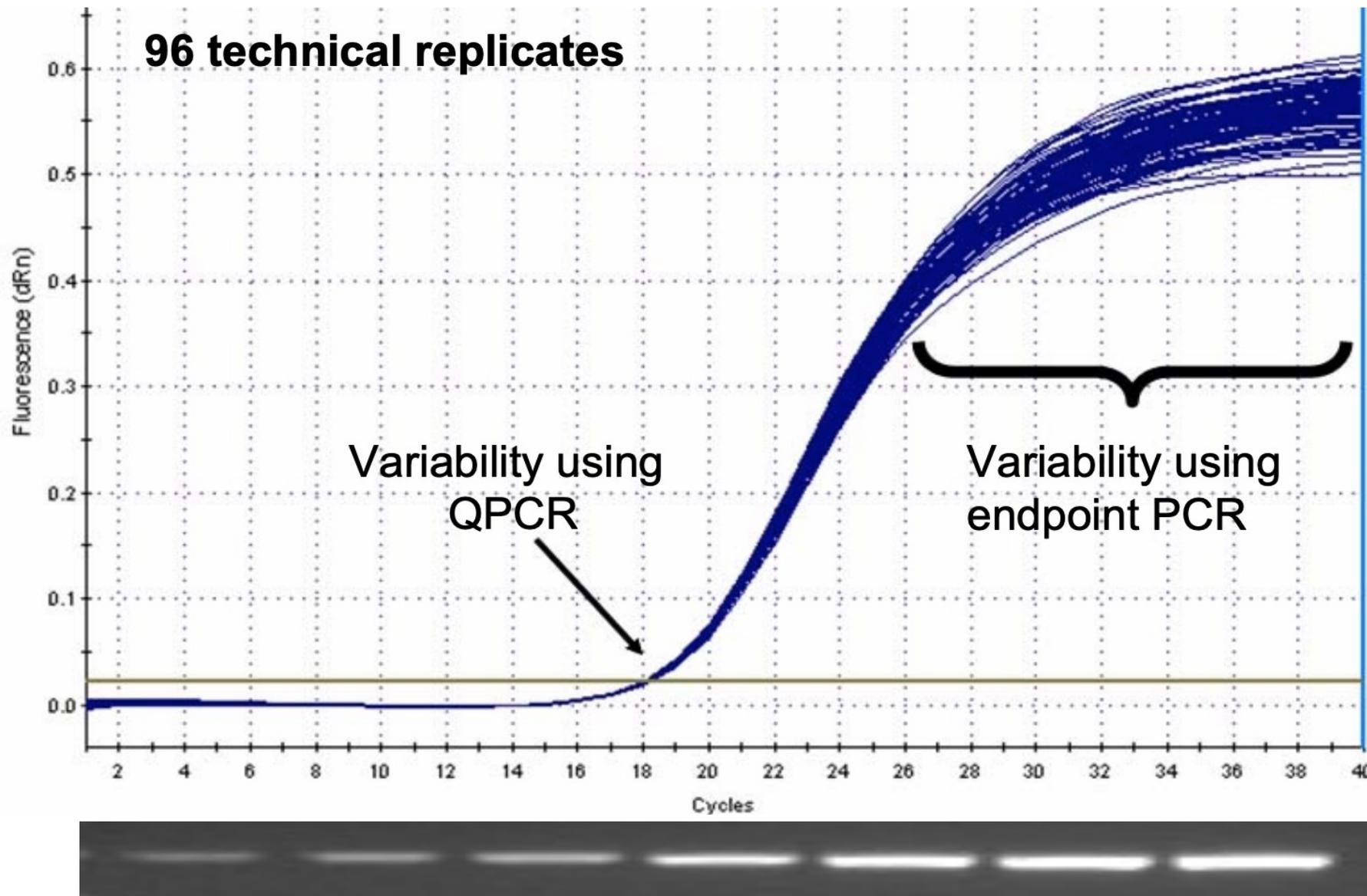
流程比較

基礎原理

C_T 值定義

螢光染劑法

螢光探針法



何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

C_T 值定義

螢光染劑法

螢光探針法

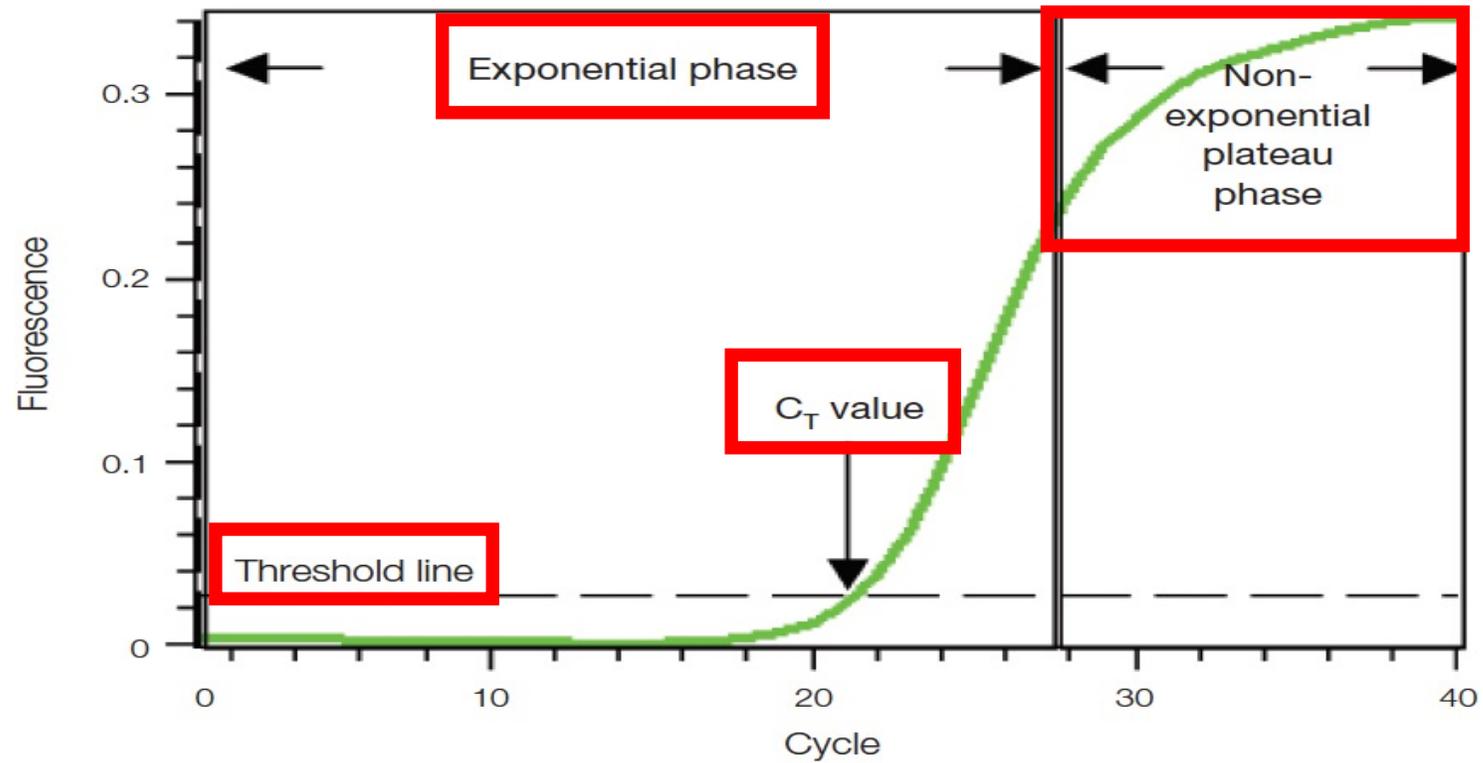


Fig. 1.1. Amplification plot. Baseline-subtracted fluorescence is shown.

- ✓ **閾值線 (Threshold line)**：在 PCR 運行開始時，PCR 產量很低，這會產生非常微弱的螢光數值（**螢光背景**）。
- ✓ **指數期 (Exponential phase)**：每個循環的產物量會以2的倍數（**線性**）成長。此時，「**C_T**」可用於此階段並定義為「**定量標準**」。
- ✓ **非指數期 (Non-exponential Plateau phase)**：一旦所有試劑（例如：核苷酸）在 PCR 反應中消耗殆盡，擴增反應最終將被減慢並達到平穩狀態（**Plateau**）。

何謂 qPCR

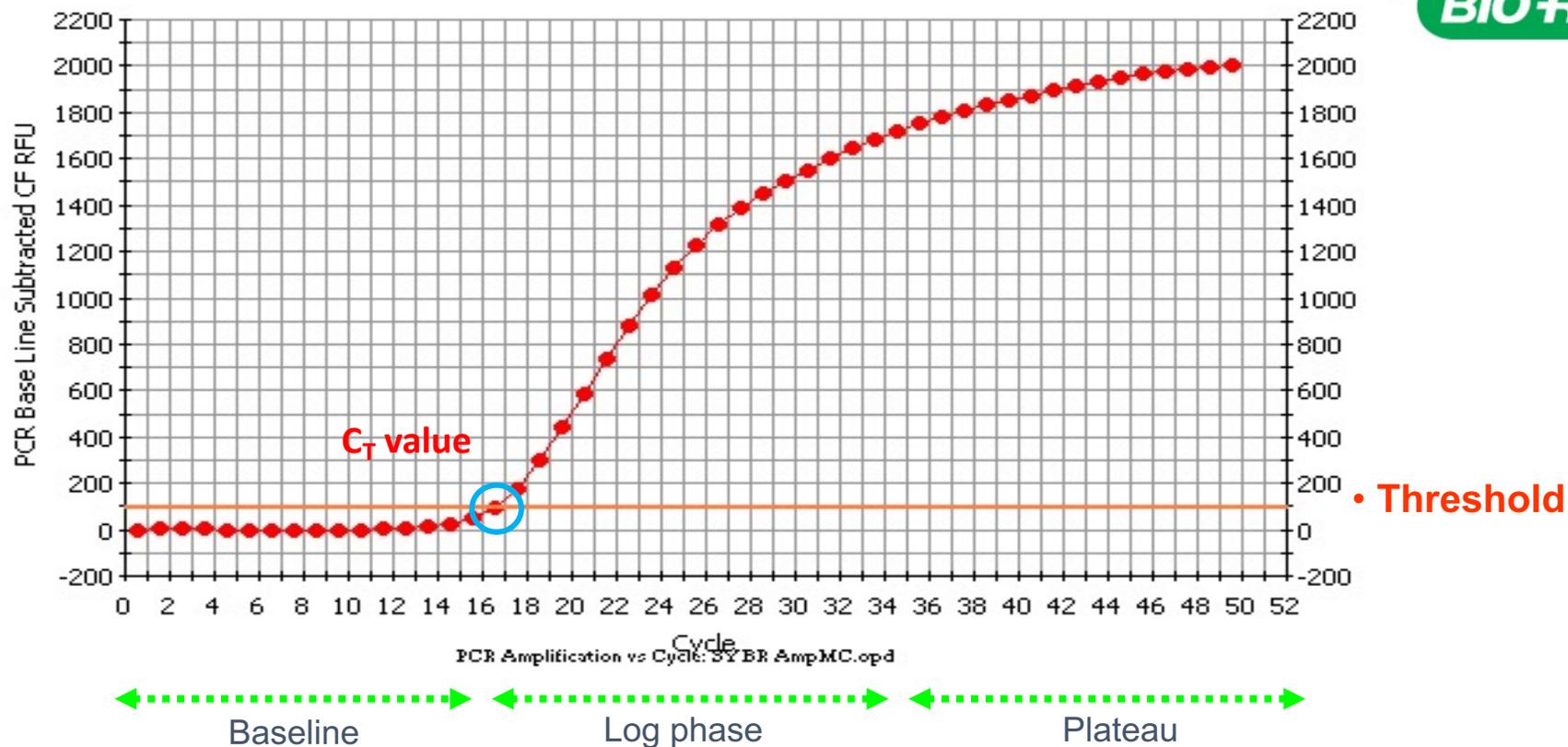
流程比較

基礎原理

C_T 值定義

螢光染劑法

螢光探針法



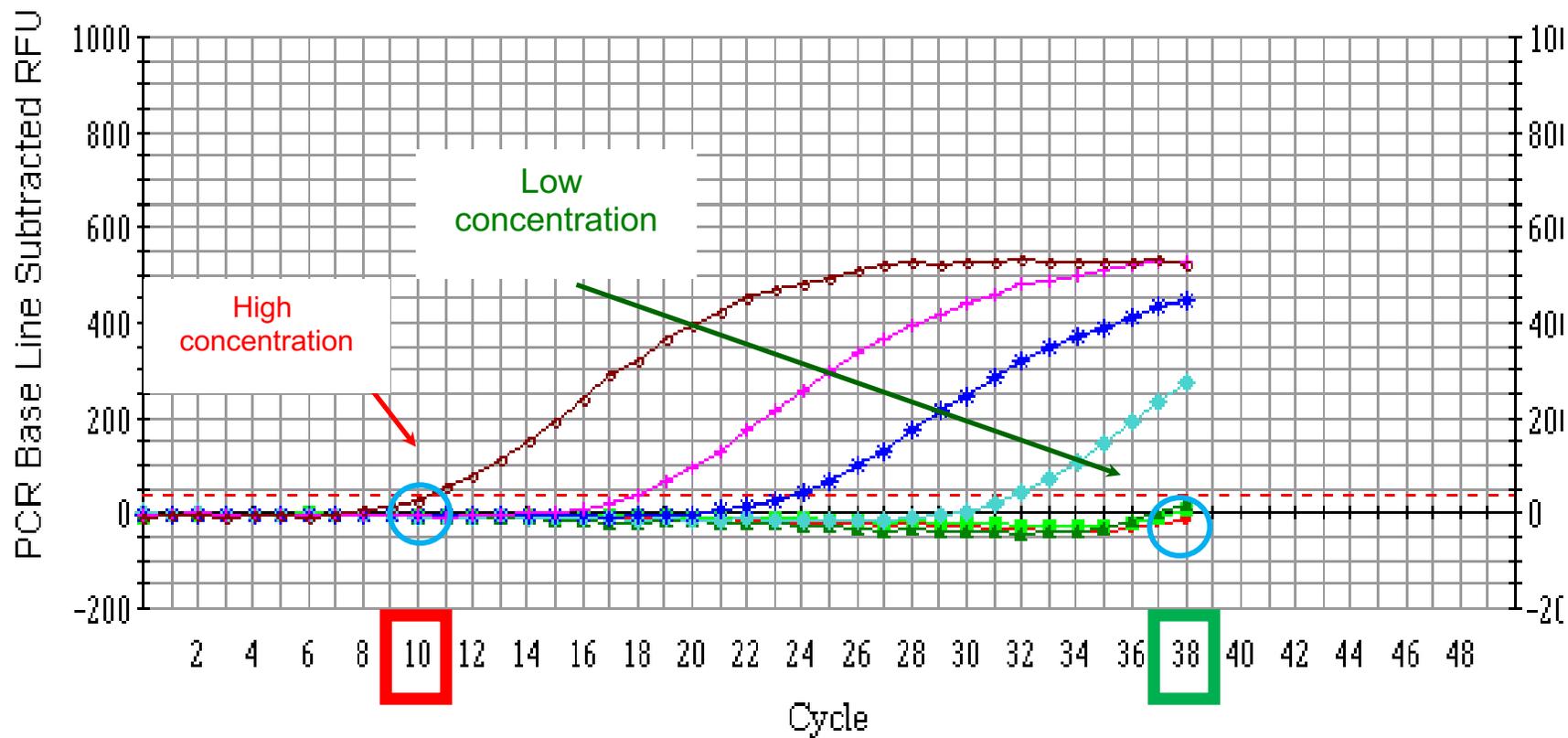
- ✓ **閾值 (Threshold)** : 機器「扣除基本螢光背景值」後，螢光開始被系統偵測到的**起始數值**。
- ✓ 在循環中螢光訊號的強度達到預先設定的「**閾值**」時，此時的「**循環數**」稱為 **C_T (threshold cycle)** 值或 **C_q (quantification cycle)** 值。

何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

C_T 值定義



➤ C_T (threshold cycle) 值與「起始濃度」呈現**反比**。

螢光染劑法

螢光探針法

DNA binding dye – SYBR Green I

BIO-RAD

何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

C_T 值定義

螢光染劑法

螢光探針法

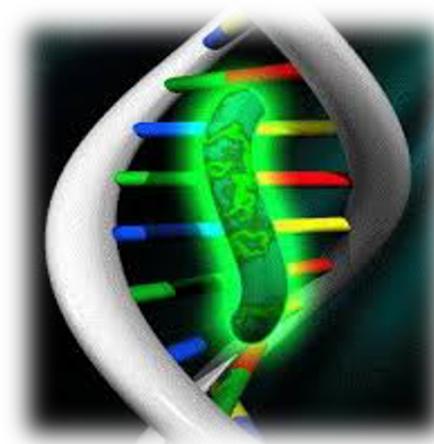
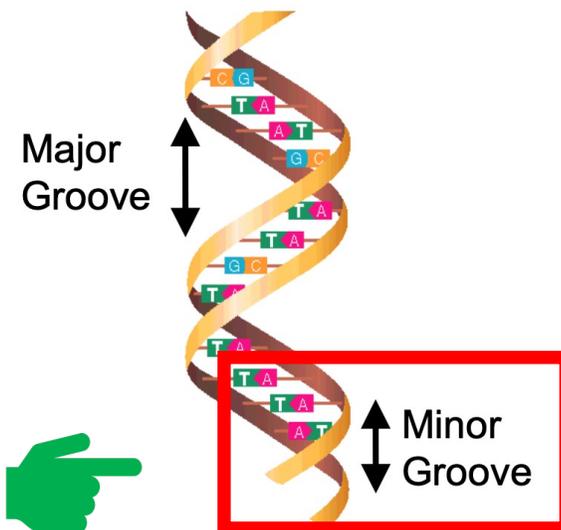
1 Heat denaturation



2 Primer annealing



3 Extension



1. 利用螢光物質嵌入「**dsDNA**」，
2. 隨著 cycle 數增加產物變多，嵌入**雙股**產物的 **DNA binding dye** 也會越多。
3. 每個 cycle 能偵測的螢光量也會隨之增加。

DNA binding dye – SYBR Green I

BIO-RAD

何謂 qPCR

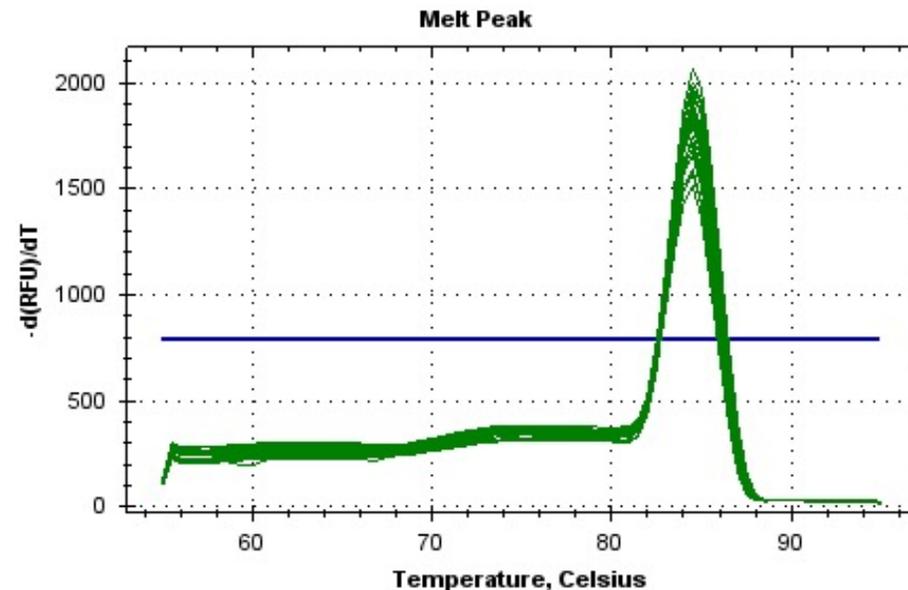
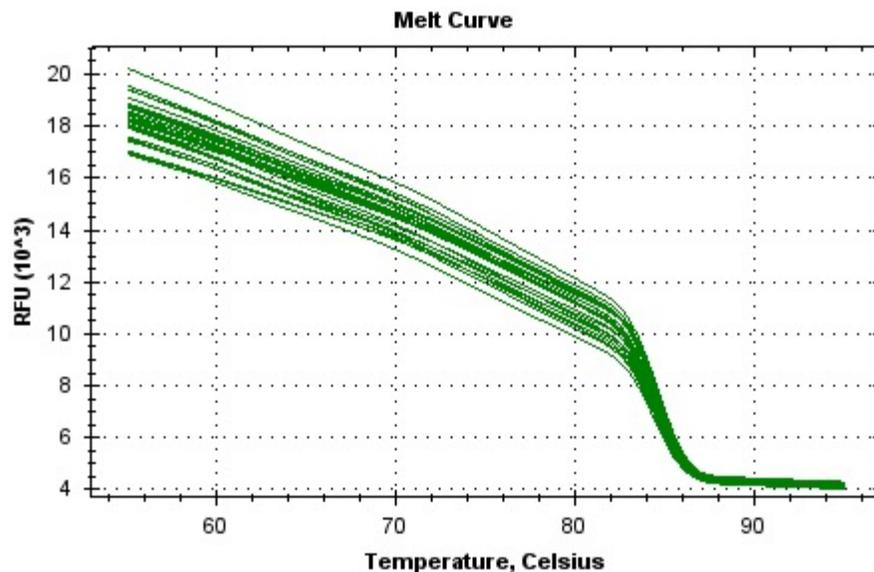
流程比較

基礎原理

C_T 值定義

螢光染劑法

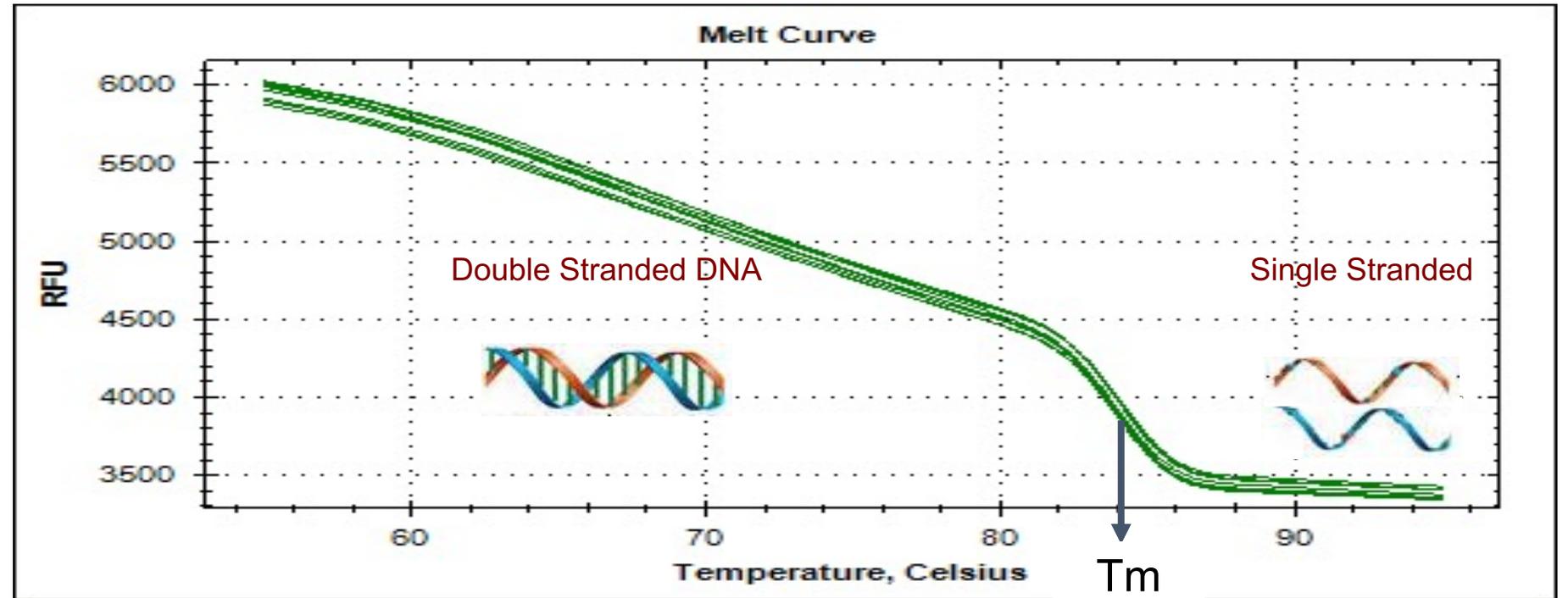
螢光探針法



在進行 SYBR Green PCR 實驗時，該如何確認 PCR 產物的專一性？

1. 方式：利用 DNA **T_m值** 的特性來進行判斷。
2. 分析方法：
 - ① Melt Curve (左上)
 - ② Melt Peak (右上)

Melting Curve – T_m值



T_m值：Total DNA 雙螺旋結構打開 50%時的溫度稱為熔解溫度 (T_m)。

- ① DNA 中「**G-C 含量**」越高，T_m 值越高，成正比關係。
- ② 若只有**單一產物**，理論上「**T_m值**」**溫度均相同**。
- ③ 若當有**第二組**半解離溫度出現時，表示可能含有「**不專一性**」產物或是「**primer-dimer**」形成，均會造成 **C_T 值**的誤判。

何謂 qPCR

流程比較

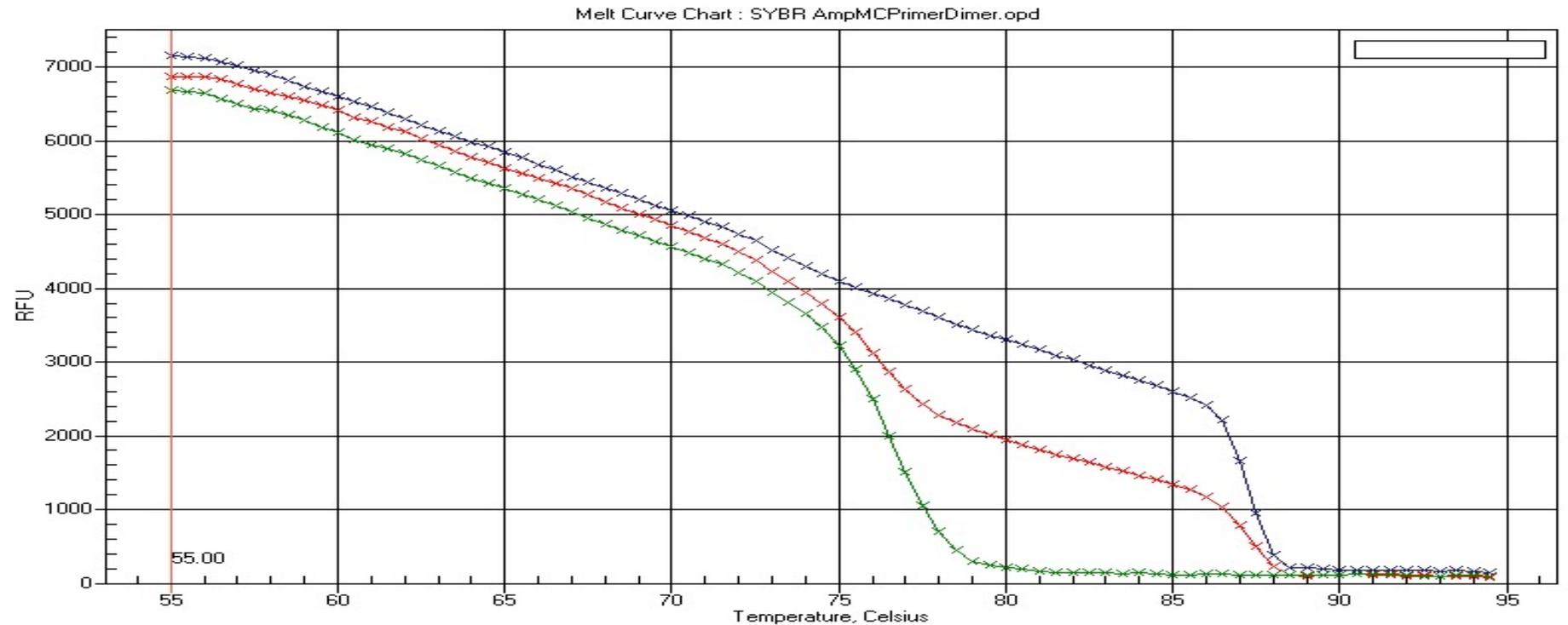
基礎原理

C_T值定義

螢光染劑法

螢光探針法

Melting Curve – T_m值



T_m值：Total DNA 雙螺旋結構打開 50%時的溫度稱為熔解溫度 (T_m)。

- ① DNA 中「**G-C 含量**」越高，T_m 值越高，成正比關係。
- ② 若只有**單一產物**，理論上「**T_m值**」**溫度均相同**。
- ③ 若當有**第二組**半解離溫度出現時，表示可能含有「**不專一性**」產物或是「**primer-dimer**」形成，均會造成 **C_T 值**的誤判。

何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

C_T值定義

螢光染劑法

螢光探針法

Melting Peak – T_m值

何謂 qPCR

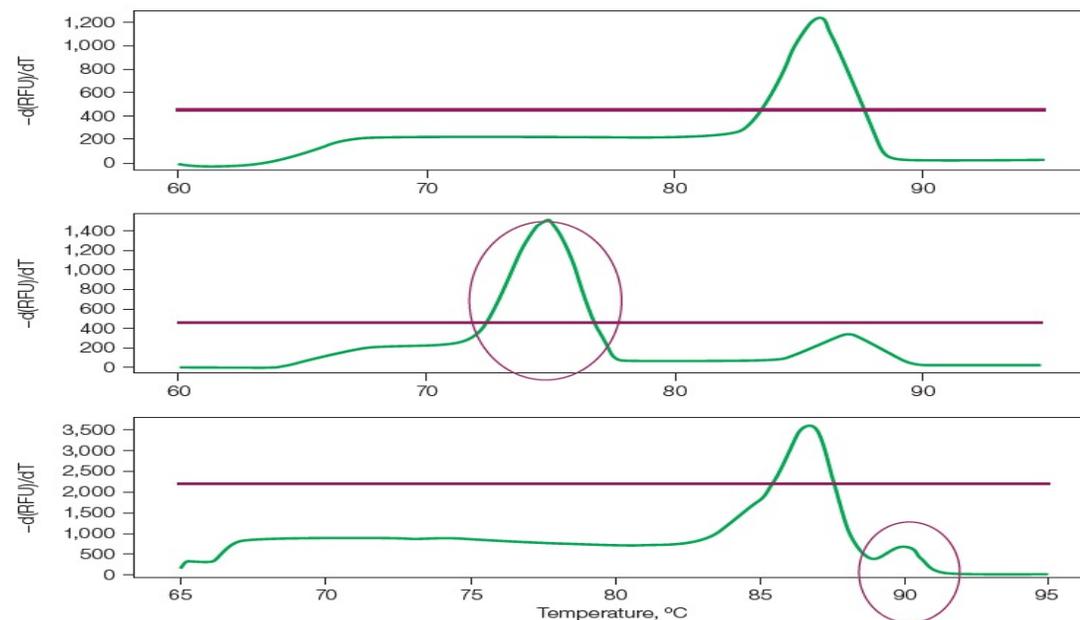
流程比較

基礎原理

C_T值定義

螢光染劑法

螢光探針法



Target Product



Primer-dimers



Mispriming

Fig. 6. Melt curve profiles. A, a single well-defined peak indicates a single specific product. B, two or more peaks indicate poor specificity. A typical primer-dimer (in red) is due to excess final primer concentrations. Primer-dimers typically amplify in the mid-70°C range. C, two or more peaks indicate poor specificity. A typical mispriming (in red) is shown.

T_m值：Total DNA 雙螺旋結構 打開 50%時的溫度 稱為 **熔解溫度 (T_m)**。

- ① DNA 中「**G-C 含量**」越高，T_m 值越高，成正比關係。
- ② 若只有**單一產物**，理論上「**T_m值**」**溫度均相同**。
- ③ 若當有**第二組**半解離溫度出現時，表示可能含有「**不專一性**」產物或是「**primer-dimer**」形成，均會造成 **C_T 值**的誤判。

Melting Peak – Tm值

何謂 qPCR

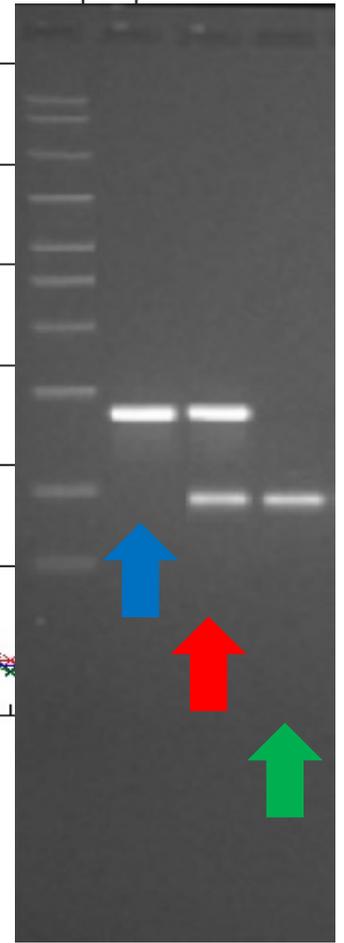
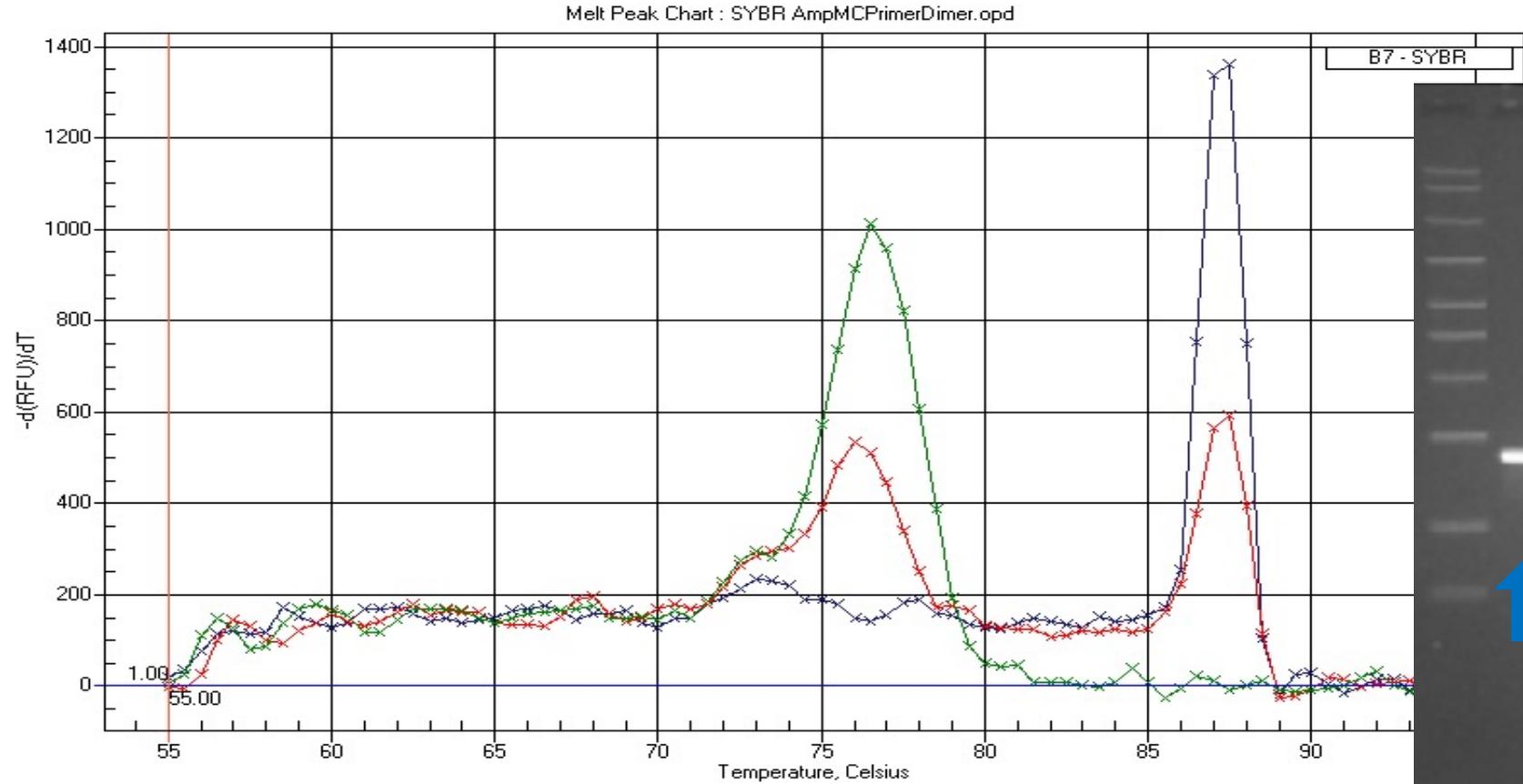
流程比較

基礎原理

C_T值定義

螢光染劑法

螢光探針法



Hydrolysis probe – TaqMan probe

何謂 qPCR

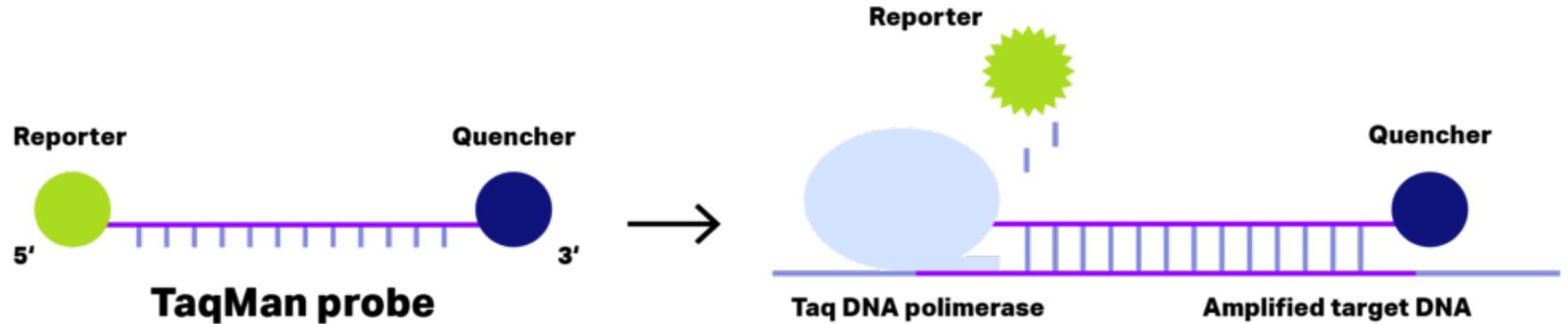
流程比較

基礎原理

 C_T 值定義

螢光染劑法

螢光探針法



TaqMan probe，在探針 (probe) 兩端分別標定上不同 螢光物質

- ① 當 DNA 進行複製時，探針會被切割水解，讓兩個螢光物質分開，因此能偵測到螢光。
- ② 具有較好的專一性，且可以藉由不同的螢光波長及探針的配合，對於同一樣本同時進行 多目標偵測 (Multiplex detection)

Hydrolysis probe – TaqMan probe

何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

 C_T 值定義

螢光染劑法

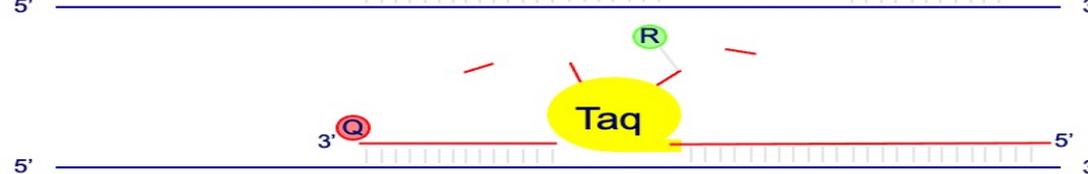
螢光探針法

Extension Step

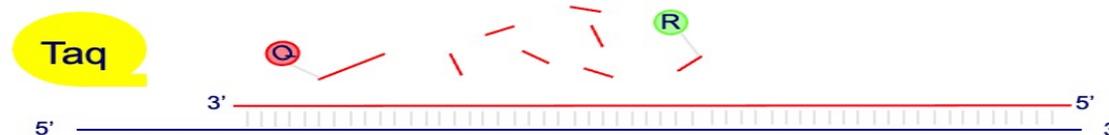
1. Strand Displacement



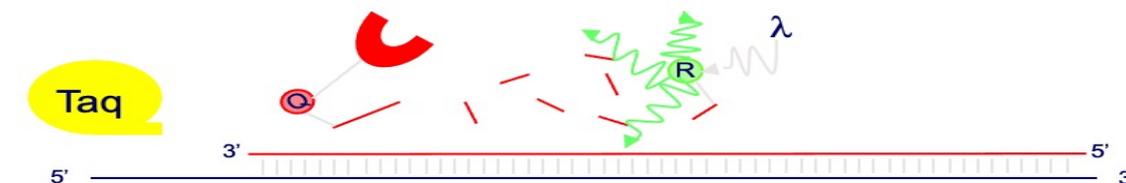
2. Cleavage



3. Polymerization Complete



4. Detection



TaqMan probe，在探針 (probe) 兩端分別標定上不同 螢光物質

- ① 當 DNA 進行複製時，探針會被切割水解，讓兩個螢光物質分開，因此能偵測到螢光。
- ② 具有較好的專一性，且可以藉由不同的螢光波長及探針的配合，對於同一樣本同時進行 多目標偵測 (Multiplex detection)

染劑法 VS 探針法

何謂 qPCR

流程比較

基礎原理

C_T 值定義

螢光染劑法

螢光探針法

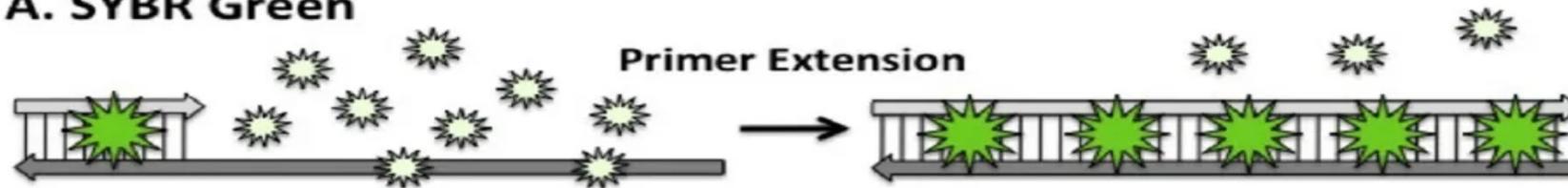
➤ SYBR Green I Dye

- ① **Singleplex** (單基因表現)
- ② Non-specific (不具專一性)
- ③ 結合位：dsDNA
- ④ 敏感度：中 (10-100 copies)
- ⑤ 需避免 **Primer-dimer** 形成
- ⑥ 價格便宜

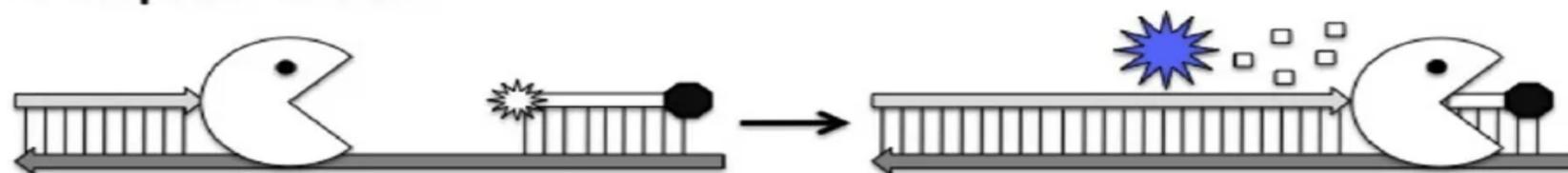
➤ TaqMan Probe

- ① **Multiplex** (兩種含以上基因表現)
- ② **Highly Specific** (高度專一性)
- ③ 結合位：probe 設計 專一區域
- ④ 敏感度：高 (1-10 copies)
- ⑤ 需預先設計專一螢光 Probe (小於 30 bp)
- ⑥ 價格較昂貴

A. SYBR Green



B. TaqMan Probe





2022 

—— 應 用 篇 ——



標準曲線

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

- 線性標準曲線： $R^2 > 0.980$
- 高擴增效率： $\text{PCR Efficiency} > 90 - 110\%$
- 擴增效率計算公式：
 - ① Amplification efficiency, $E = 10^{-1/\text{slope}}$
 - ② $\% \text{ Efficiency} = (E-1) \times 100\%$
- 當 $E < 90\%$ 時：可能含有 PCR 抑制物。
- 當 $E > 110\%$ 時：可能有 **Pipetting error** 或是 **primer-dimer** 產生。

標準曲線

實驗要點

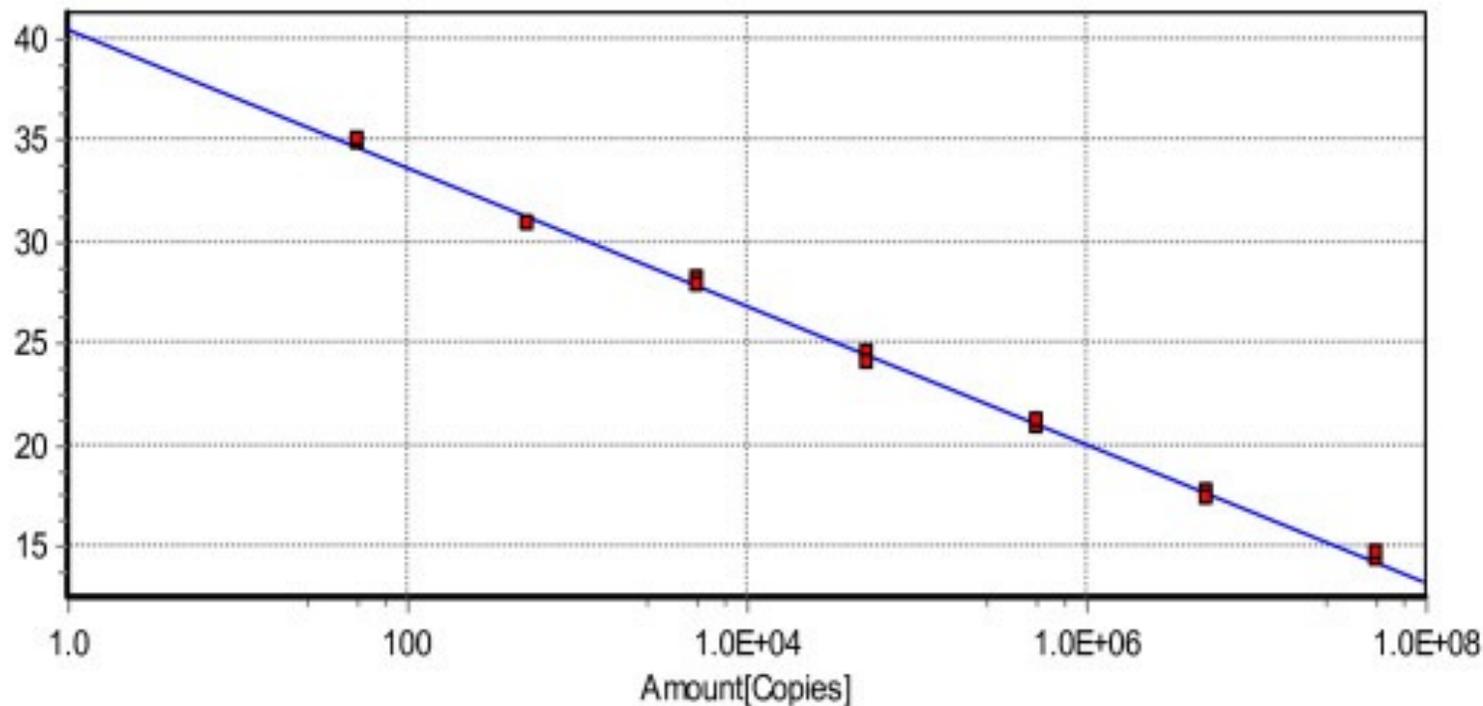
絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項



Slope: -3.395

Y-Intercept: 40.47

Efficiency: 0.97

R²: 0.998

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

✓ 絕對定量，即針對樣本作**絕對量化**。

✓ 先利用標準品作標準曲線，再以**C_T 值**比較樣本與標準品的相對關係呈現的實驗結果（**內插法**）。

✓ 依據標準品的不同，通常以常用單位形式作為表示如下：

- ① 濃度：ng/ml、μg/ml
- ② 計量單位 ng、pg、copy number

✓ 絕對定量注意要點：標準曲線的**斜率**與**相關係數(R²)**

- ① 斜率範圍：「**3.0 ~ -3.6**」，（對應 PCR efficiency 為**90%~110%**）
- ② 相關係數：「**R² > 0.980**」，越接近 1 越好。

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

1

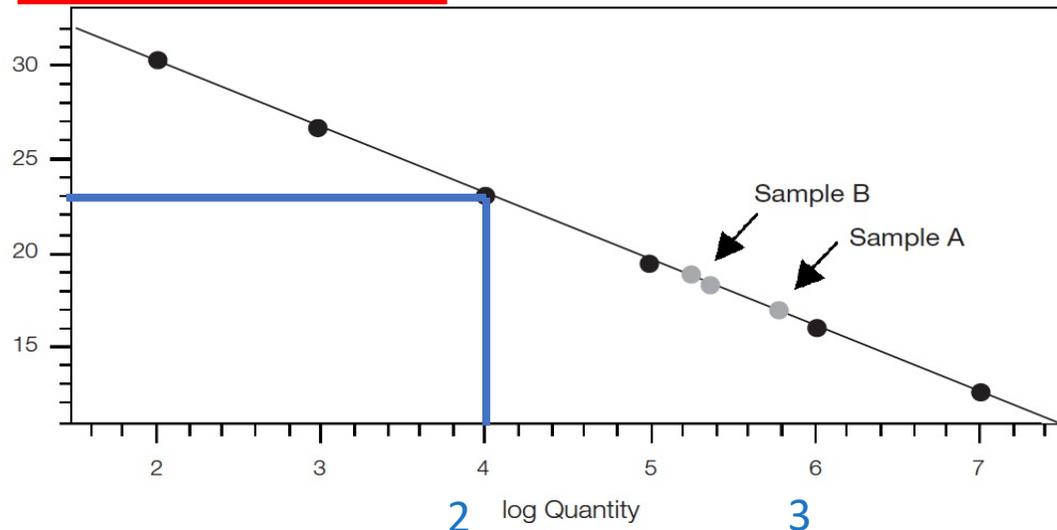


$$y = mx + b$$

$$y = -3.50x + 37.20; r^2 = 0.999$$



C_T



2

log Quantity

3

Sample	Replicate	C _T	Copies
A	1	18.61	204,577
A	2	18.41	234,115
A	3	18.87	172,300
Average			203,664 ± 30,917
B	1	17.06	569,789
B	2	17.07	563,823
B	3	17.00	591,173
Average			574,928 ± 14,381



▶ $\Delta\Delta C_T$ (Livak)

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

	Reference	Target
Tissue #1 (Control):	21	22
Tissue #2 (Test) :	20	24
<hr/>		
1 st Delta	ΔC_T #1:	22-21 = 1
	ΔC_T #2:	24-20 = 4
<hr/>		
2 nd Delta	$\Delta\Delta C_T$:	1-4 = -3
<hr/>		
Fold induction =		$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(-3)} = 8$

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

✓ 基因表現

- ① 藥物作用
- ② 癌症指標
- ③ 基因調控 (siRNA/miRNA)
- ④ 基因治療
- ⑤ 微陣列基因晶片檢測 (Microarray)
- ⑥ GMO 基改食品檢測

✓ 病原菌偵測

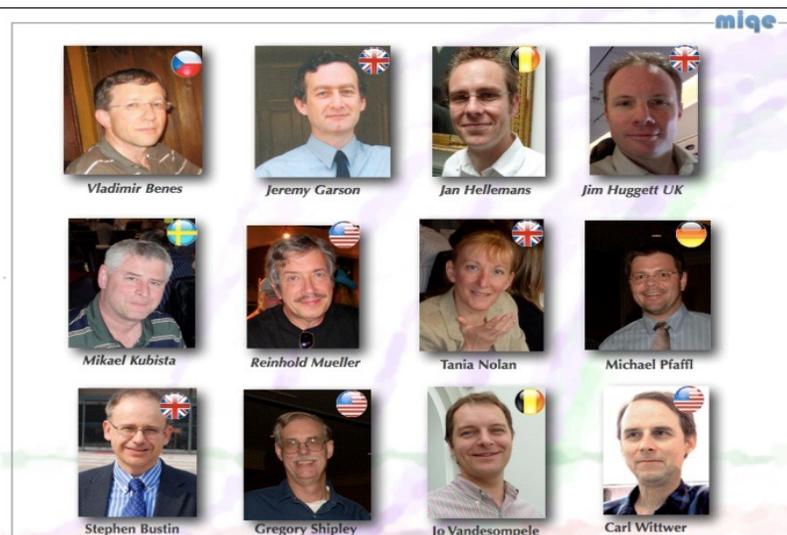
- ① 多重病原菌追蹤與偵測 (Multiplex)
- ② 大量檢體篩選
- ③ 同步分析定性 / 定量
- ④ 藥物治療成效監控

✓ SNP 基因分型

- ① 可以快速檢測、評估已知位點的單核苷酸多態性
- ② 作為藥物設計使用
- ③ 可用於遺傳疾病檢測使用

The MIQE Guidelines:
Minimum Information for Publication of Quantitative
Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
 Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
 Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}



實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

實驗要點

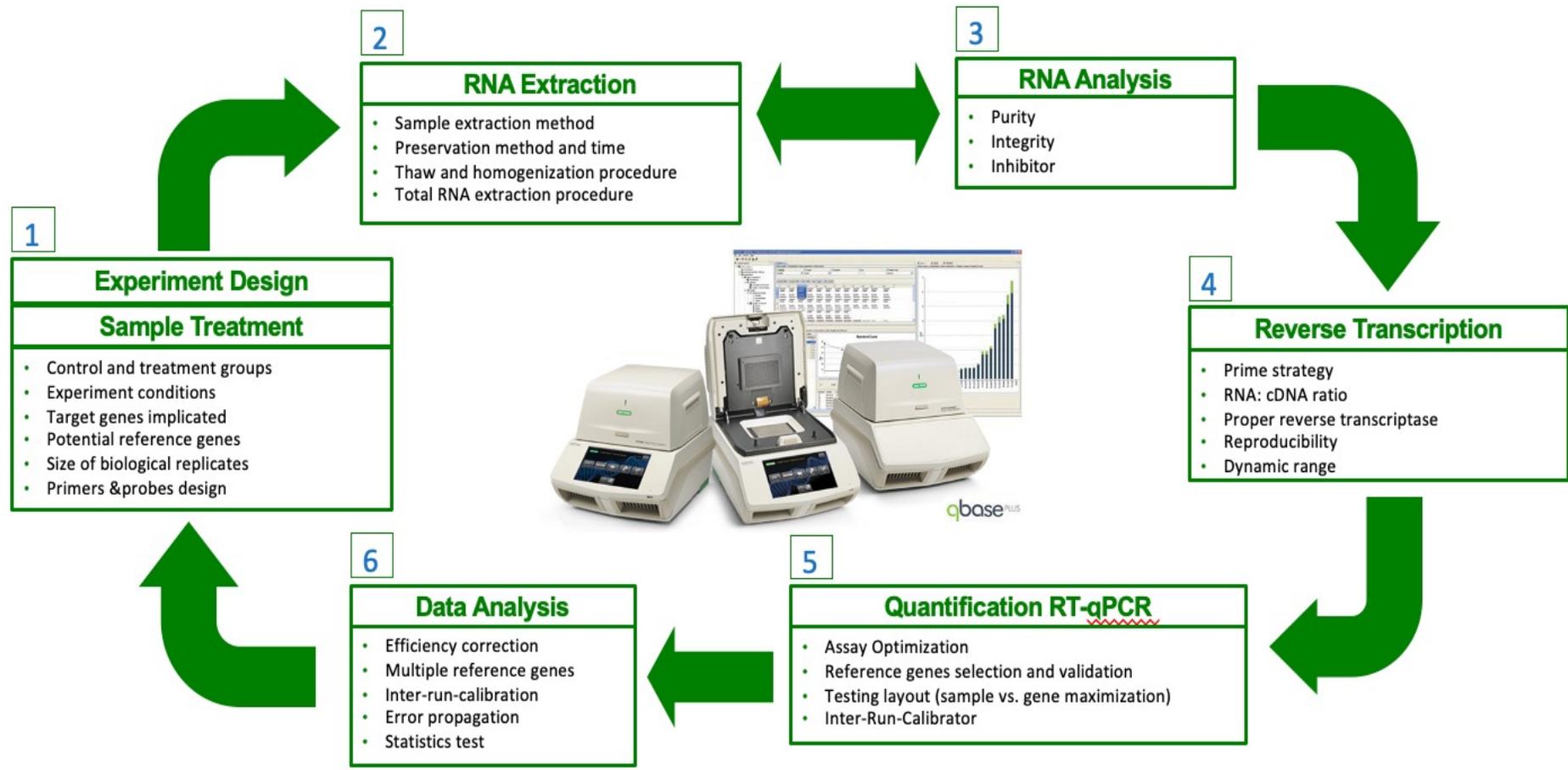
絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項



實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

1

檢核項目	重要性	說明
EXPERIMENTAL DESIGN		
Definition of experimental and control groups	E	敘述實驗設計組別、樣本數以及執行的實驗室等
Number within each group	E	
Assay carried out by core lab or investigator's lab?	D	
Acknowledgement of authors' contributions	D	
SAMPLE		
Description	E	敘述樣本來源(例如組織或細胞)、細胞數(量)、處理方式(多少時間內完成)、保存環境(溫度)
Volume/mass of sample processed	D	
Microdissection or macrodissection	E	
Processing procedure	E	
If frozen - how and how quickly?	E	
If fixed - with what, how quickly?	E	
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE samples)	E	

4

REVERSE TRANSCRIPTION		
Complete reaction conditions	E	敘述反轉錄反應條件
Amount of RNA and reaction volume	E	RNA 量與反應體積
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	Primer 種類(廠牌)和濃度
Reverse transcriptase and concentration	E	反轉錄酵素(廠牌)和濃度
Temperature and time	E	溫度/時間/cycle 數
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	試劑廠牌和型號
Cqs with and without RT	D	RT 試劑測試
Storage conditions of cDNA	D	記錄保存條件

2 3

NUCLEIC ACID EXTRACTION		
Procedure and/or instrumentation	E	提供萃取的方法或儀器
Name of kit and details of any modifications	E	提供 Kit 的名稱/型號/批號/廠牌
Source of additional reagents used	D	是否有額外添加的試劑，有則註明型號廠牌
Details of DNase or RNase treatment	E	敘述對 DNase (for RNA 實驗) or RNase (for DNA 實驗) 的處理
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	以尚未進行反轉錄的 RNA 樣本進行 qPCR，確認是否有產物
Nucleic acid quantification	E	核酸定量:使用的儀器廠牌/方法，OD260/OD280 比值，
Instrument and method	E	計算濃度和總量
Purity (A260/A280)	D	確認 RNA 品質:
Yield	D	求 RIN/RQI 值 ¹ ，跑膠確認 RNA 是否降解以及測試
RNA integrity method/instrument	E	樣品內是否有抑制物質(效應) ²
RIN/RQI or Cq of 3' and 5' transcripts	E	
Electrophoresis traces	D	
Inhibition testing (Cq dilutions, spike or other)	E	

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

qPCR TARGET INFORMATION		
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	於同一試管做多基因定量才需要確定該項目
Sequence accession number	E	先以資料庫或軟體確定基因序列、比對、二級結構分析、Primer 對應於 exon 位置等資訊
Location of amplicon	D	
Amplicon length	E	
<i>In silico</i> specificity screen (BLAST, etc)	E	
Pseudogenes, retropseudogenes or other homologs?	D	
Sequence alignment	D	
Secondary structure analysis of amplicon	D	
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	
What splice variants are targeted?	E	

qPCR OLIGONUCLEOTIDES		
Primer sequences	E	Primer 或 Probe 合成的序列、廠商、純化方法等
RTPrimerDB Identification Number	D	
Probe sequences	D ³	
Location and identity of any modifications	E	
Manufacturer of oligonucleotides	D	
Purification method	D	

qPCR PROTOCOL		
Complete reaction conditions	E	敘述定量 PCR 實驗反應條件
Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E	cDNA 量與反應體積
Primer, (probe), Mg ⁺⁺ and dNTP concentrations	E	Primer、鎂離子濃度、聚合酶濃度、緩衝液組成、其他添加物等
Polymerase identity and concentration	E	
Buffer/kit identity and manufacturer	E	
Exact chemical constitution of the buffer	D	
Additives (SYBR Green I, DMSO, etc.)	E	
Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D	分析盤(管)廠牌和型號
Complete thermocycling parameters	E	反應條件(溫度/時間/cycles)
Reaction setup (manual/robotic)	D	反應設定
Manufacturer of qPCR instrument	E	儀器廠牌機型

qPCR VALIDATION		
Evidence of optimisation (from gradients)	D	是否有測試 annealing 溫度梯度
Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E	確認反應專一性
For SYBR Green I, Cq of the NTC	E	是否 NTC 控制組有產物
Standard curves with slope and y-intercept	E	建立標準曲線 ⁴ :由斜率推算 PCR 效率、計算信賴區間與標準差以及 r ²
PCR efficiency calculated from slope	E	
Confidence interval for PCR efficiency or standard error	D	
r ² of standard curve	E	
Linear dynamic range	E	求得線性關係範圍 ⁵ : 計算信賴區間、最低極限時的 Cq 變異數以及是否確認 LOD 偵測極限
Cq variation at lower limit	E	
Confidence intervals throughout range	D	
Evidence for limit of detection	E	
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	於同一試管做多基因定量計算效率和偵測極限

DATA ANALYSIS		
qPCR analysis program (source, version)	E	分析程式/工具(版本)、分析方法 (threshold 或 regression)以及敘述樣本盤排列方式等
Cq method determination	E	
Outlier identification and disposition	E	
Results of NTCs	E	NTC 控制組是否有產物
Justification of number and choice of reference genes	E	Reference gene 的數目和選擇
Description of normalisation method	E	敘述標準化方法
Number and concordance of biological replicates	D	生物樣本數
Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates	E	單一生物樣本在儀器偵測的 n 值
Repeatability (intra-assay variation)	E	計算重複性、再現性、使用何種統計方法、統計軟體(版本)
Reproducibility (inter-assay variation, %CV)	D	
Power analysis	D	
Statistical methods for result significance	E	
Software (source, version)	E	
Cq or raw data submission using RDML	D	以 RDML 格式提供原始數據

實驗要點

絕對定量

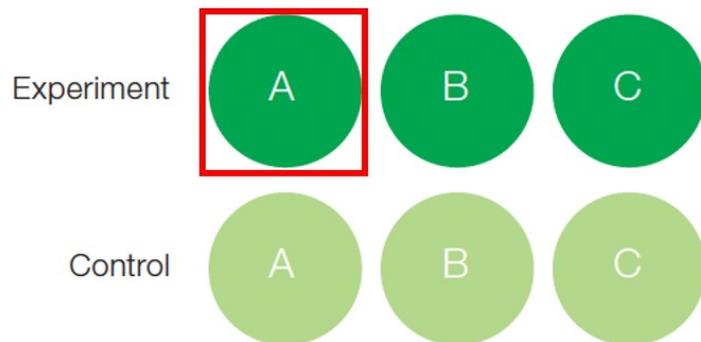
相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

Biological Replicates



Technical Replicates

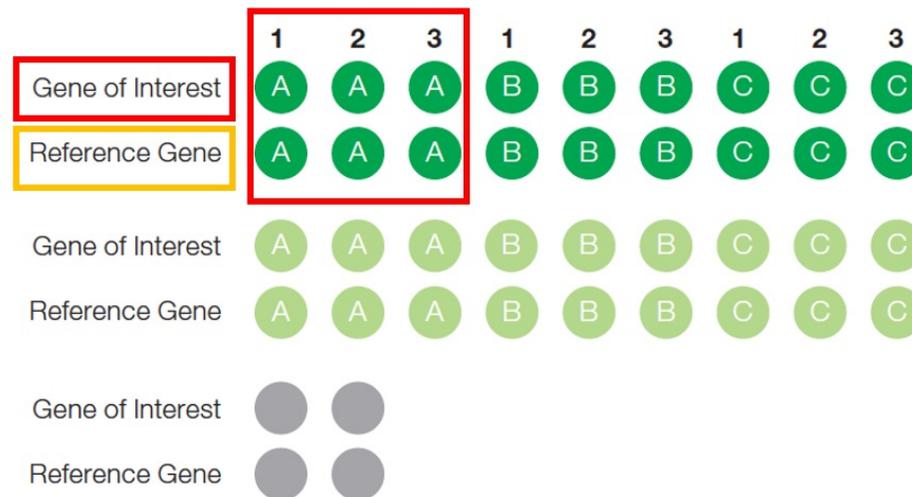


Fig. 6. Experimental replicates. All experiments should be designed with a combination of biological and technical replicates. This illustrates a simple experiment with triplicate biological samples from control (■) and treatment/experimental (■) conditions. For each biological sample, three technical replicates are recommended for the gene of interest as well as for the reference gene(s). This results in a total of at least 36 samples plus the duplicate NTC (■) for a total of >40 wells.

常見的「PCR抑制物」

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項



Sample	Assay
Bile salts	Cholic acid Deoxycholic acid
Polysaccharides	Polygalacturonic acid
Lipids	Cholesterol hydrochloride
Algae	Alginic acid
Clay	Montmorillonite
Blood	Heparin Hematin EDTA Serum
Soil	Humic acid
Textile	Indigo
Wine	Tannic acid
Plants	Cellulose Pectin (for fiber control)
Hair, tissues	Melanin
Bones, teeth	CaCl ₂

Sample	Assay
Cell lysates	MEM+FBS PBS Trypsin
Sample preparation	NaAc NaCl EtOH Isopropanol TRIzol InstaGene Matrix
Miscellaneous	Green tea Chocolate Dust SDS DMSO DTT
Body fluids	Spermidine Urea

★紅色：來自「樣品」

★綠色：來自配製「試劑 / 溶液」

擴增片段 (Amplicon)

實驗要點

絕對定量

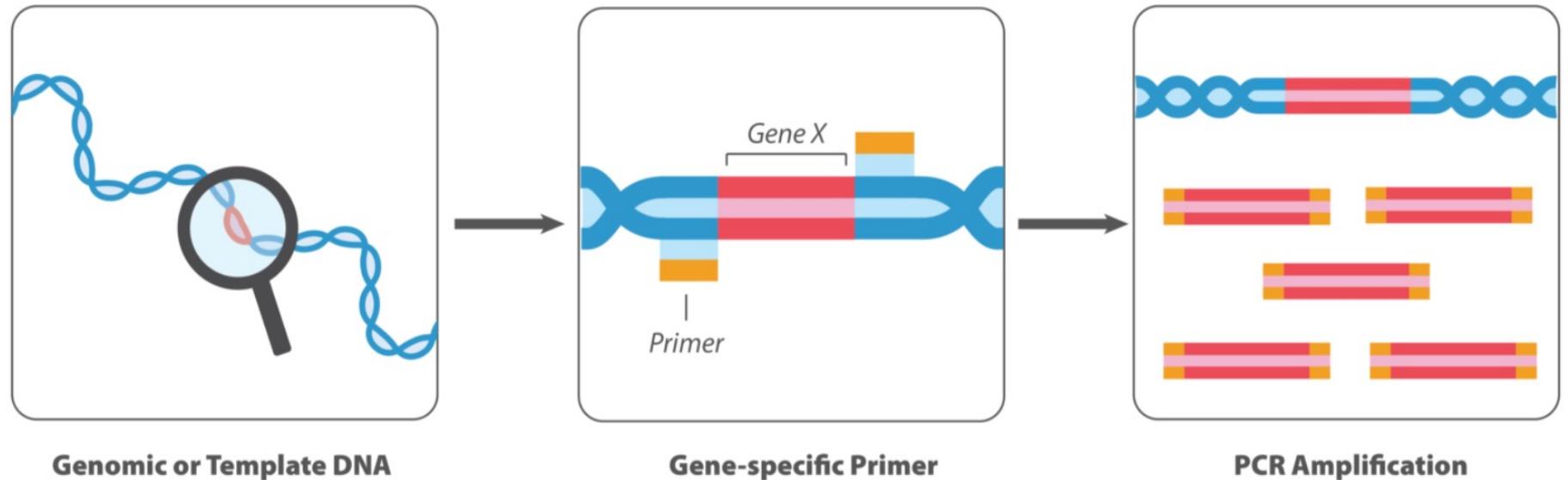
相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

1. 建議長度：75 - 200bp
2. 標的片段：需避免可能產生 2級結構 的區域
3. 避免重複：防止 4個 含以上相同核苷酸連續重複
4. CG 佔比：40 - 60%



引子設計 (Primer)

實驗要點

絕對定量

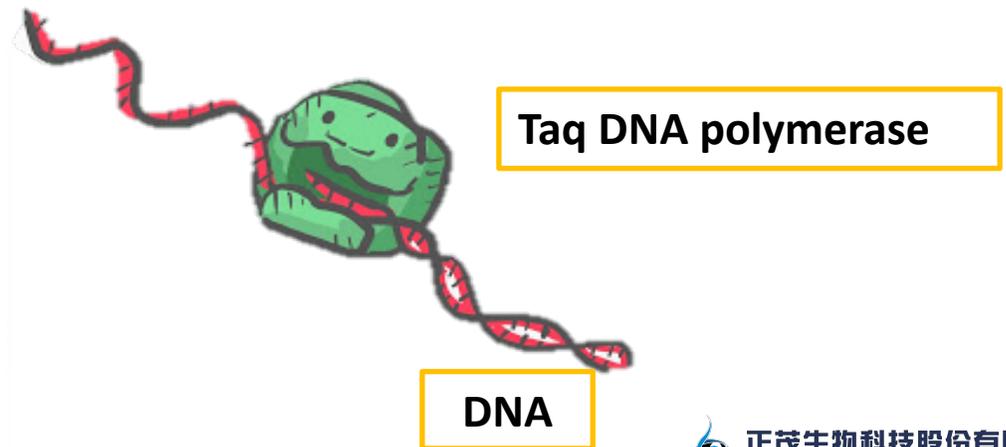
相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

1. 建議長度：**18 - 25bp**
2. 引子片段：需避免可能產生**2級結構**的區域
3. 避免重複：防止**3個**含以上核苷酸 G 或 C 連續重複
4. CG 佔比：40 - 60%
5. Tm值：50 - 65°C，公式： $T_m = 4^{\circ}\text{C} (G + C) + 2^{\circ}\text{C} (A + T)$
6. 引子兩端：forward 與 reverse 序列**不可互補**，以免產生「**Primer-dimer**」



(q)PCR - 試劑使用建議

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項



名稱	SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	iTaq Universal SYBR Green Supermix	iQ SYBR Green Supermix
添加	Sso7d 融合蛋白 (專利)	無	無
Cq偵測 敏感度	● ● ● ● ●	● ● ● ●	● ●
不易擴增 的樣品	● ● ● ● ●	● ● ●	● ●
專一性	● ● ● ● ●	● ● ● ●	●

(q)PCR - 試劑使用建議



實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項



對應 PCR
抑制物能力



無

對應模式

標準 / 快速

標準 / 快速

標準

時間節省



單循環

20 - 45 s

17 - 35 s

40 - 75 s

cDNA

熱起動：30 s

熱起動：30 s

熱起動：3 min

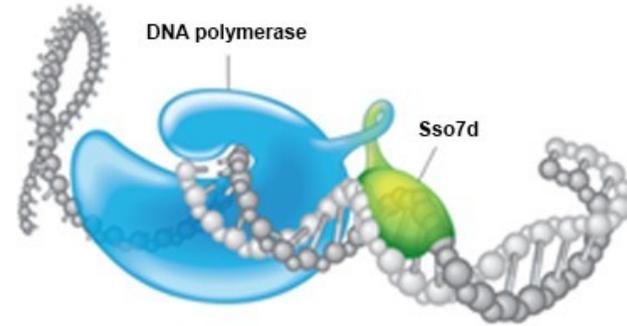
適用儀器

任何廠牌

任何廠牌

限制：BIORAD

(q)PCR - 試劑使用建議



「Sso7d」 酵素檔案

1. 來源：*Sulfolobus solfataricus* (硫磺礦硫化葉菌) - 7 kD 蛋白質
2. 功能：
 - ✓ 可穩定「聚合酶-模版」複合物的穩定性。
 - ✓ 相較於傳統 iTaq 聚合酶大幅增加反應速率 / 減少實驗反應時間。
 - ✓ 「GC-rich (> 60%)」 or 「2級結構」大量發生區域進行高效率擴增。
 - ✓ 適用對象：超過「250bp」長片段 / 「含有大量PCR抑制物」干擾之樣品。
 - ✓ 範例：Blood spot、Cell lysate、Crude extraction、FFPE (石蠟包埋組織)、植物體提取物等。

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

MIQE 準則

注意事項

(q)PCR - 產線支援

實驗要點

絕對定量

相對定量

應用方式

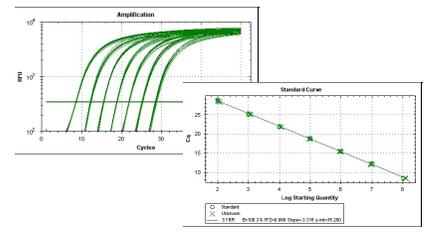
MIQE 準則

注意事項

PCR



CFX Manager Software



(q)PCR Reagents



Real-Time PCR (qPCR)



(q)PCR consumables



Automation options





2022 

—— 操 作 篇 ——



系統介面 - 正面

BIO-RAD

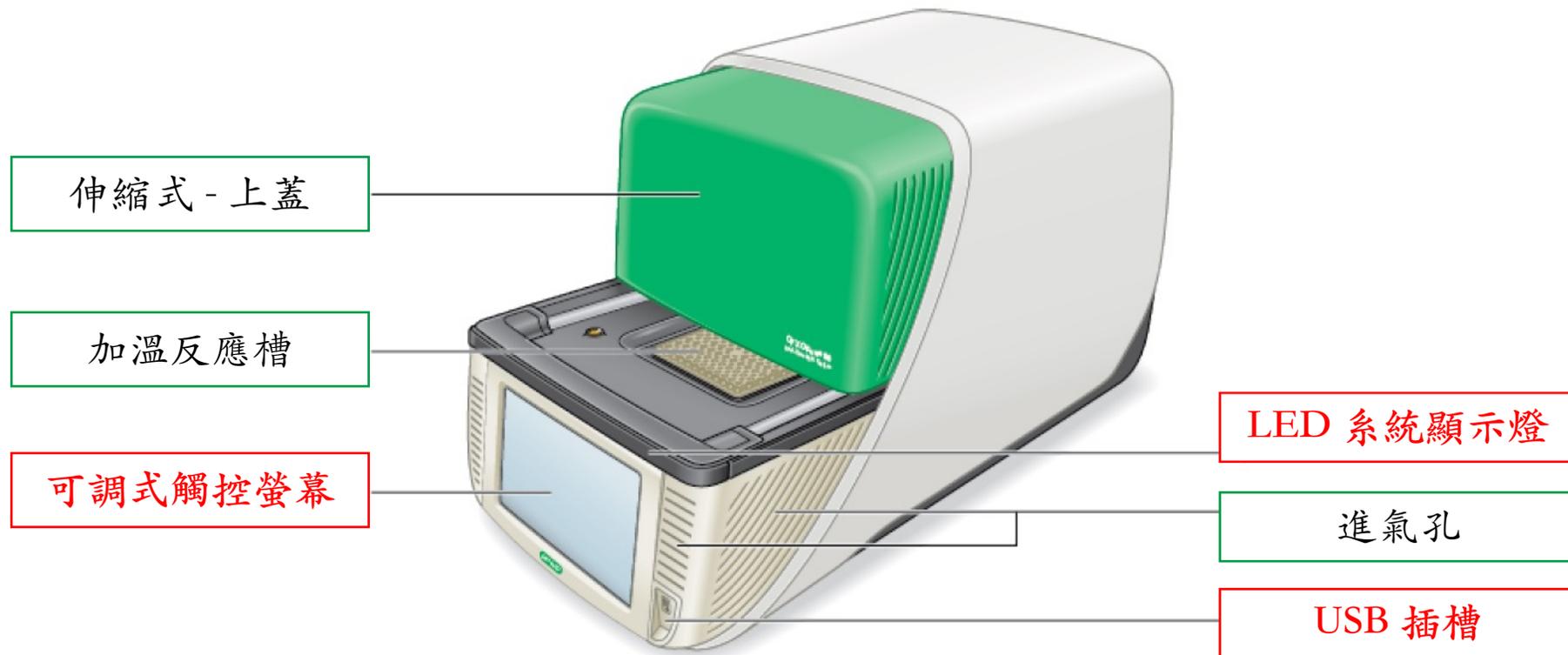
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



開關機 - 背面

外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

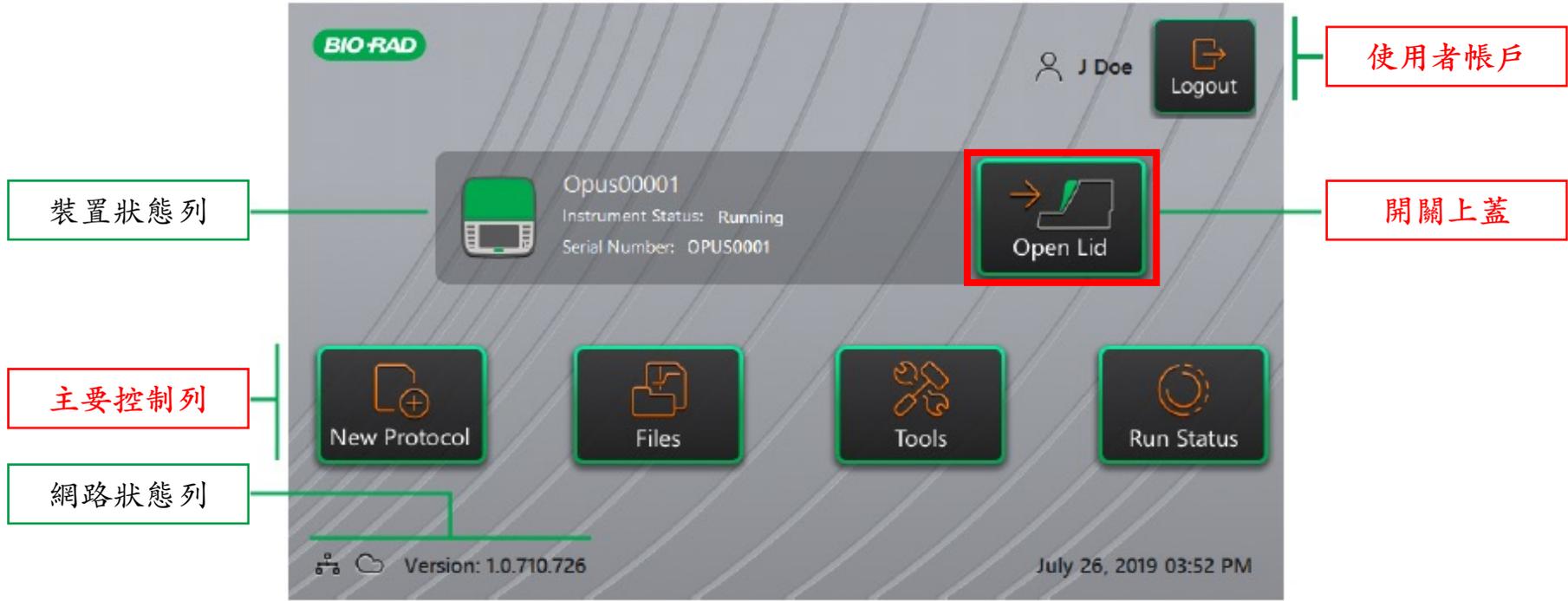
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

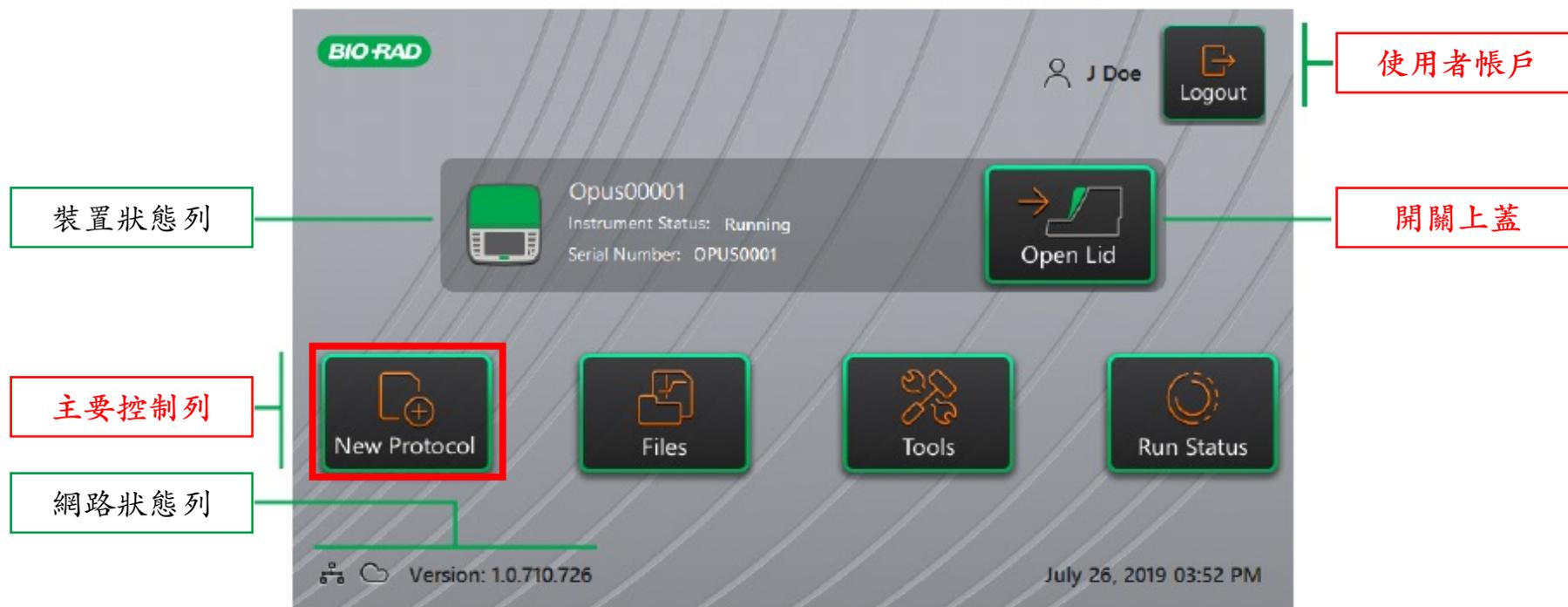
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

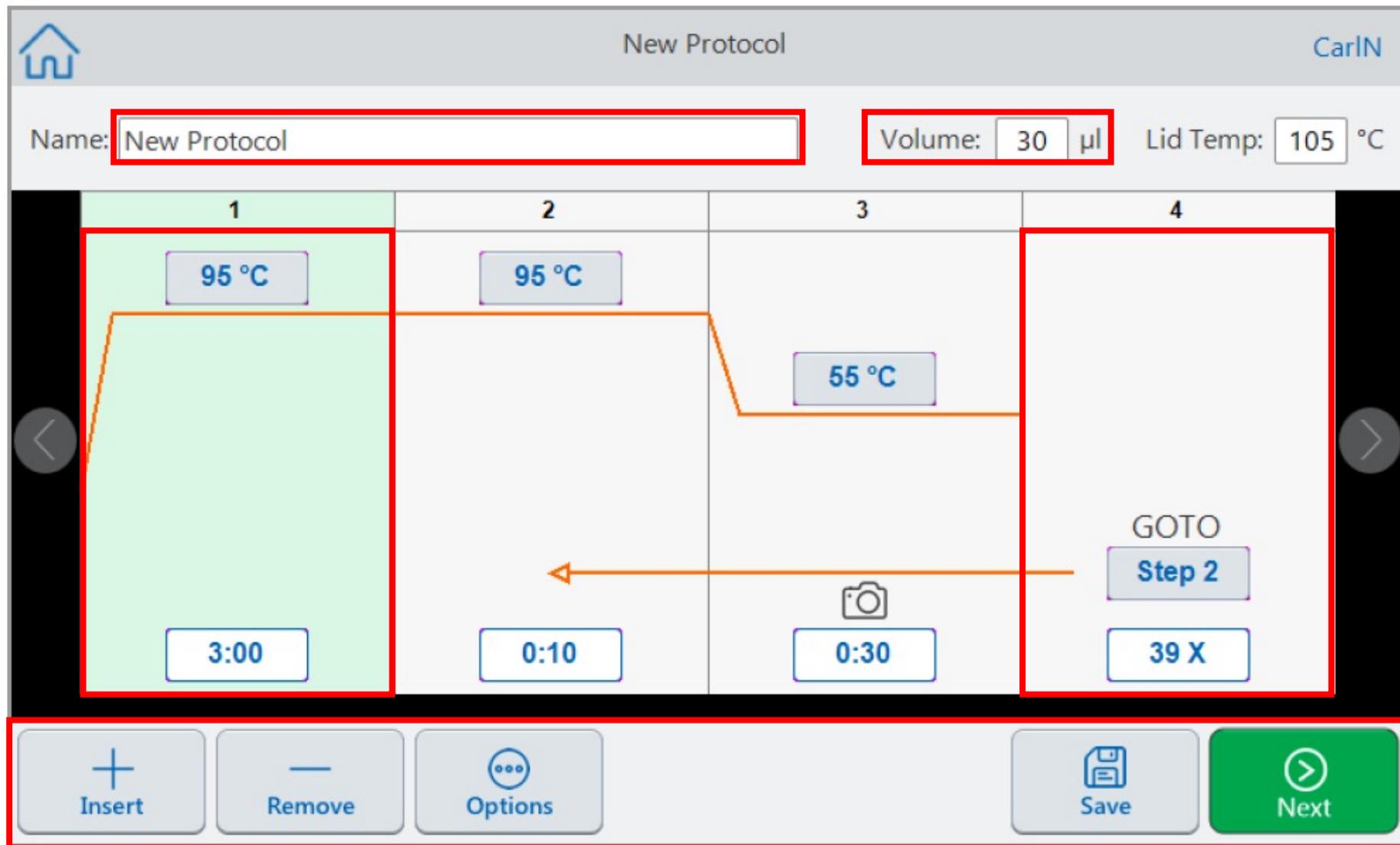
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

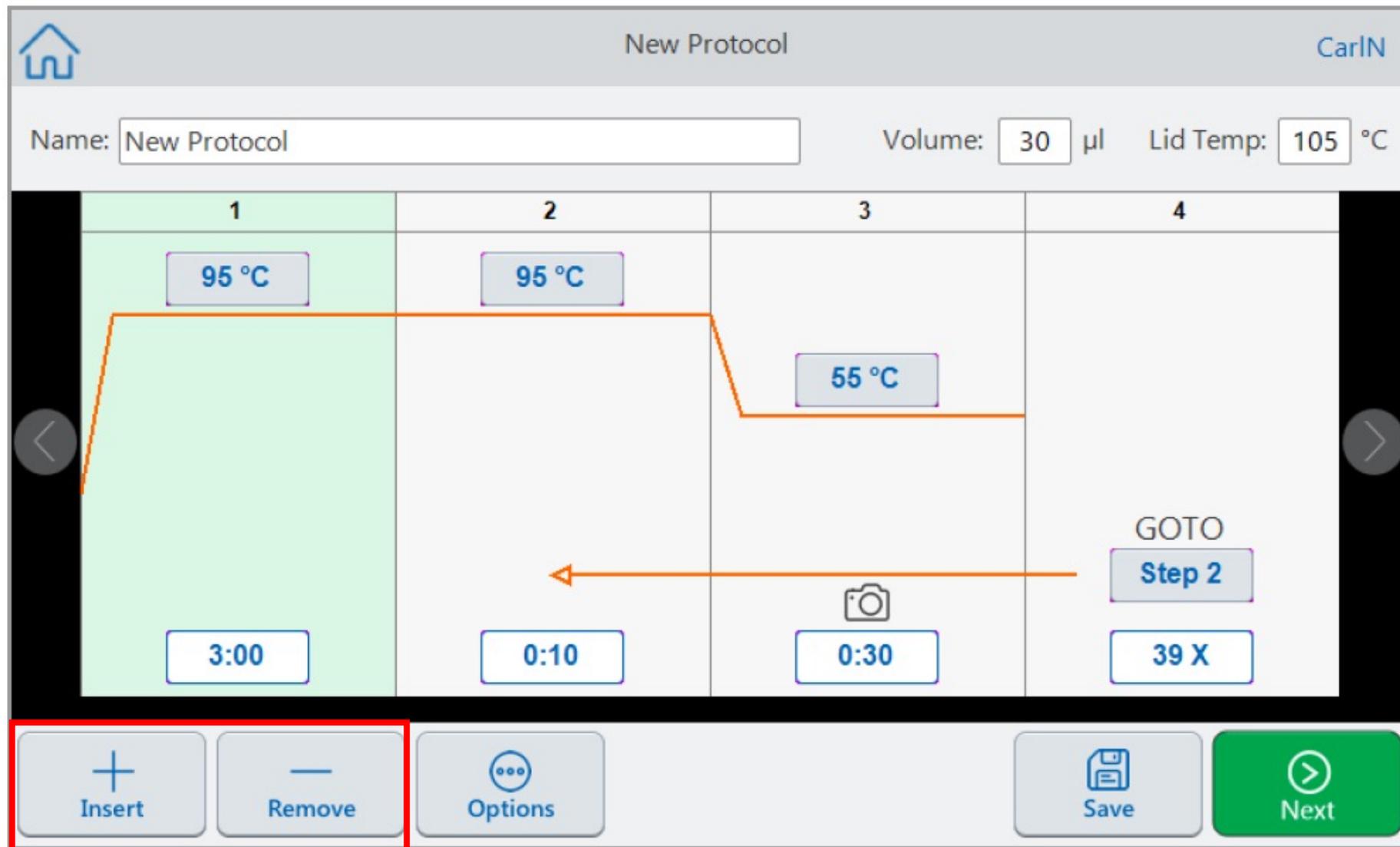
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



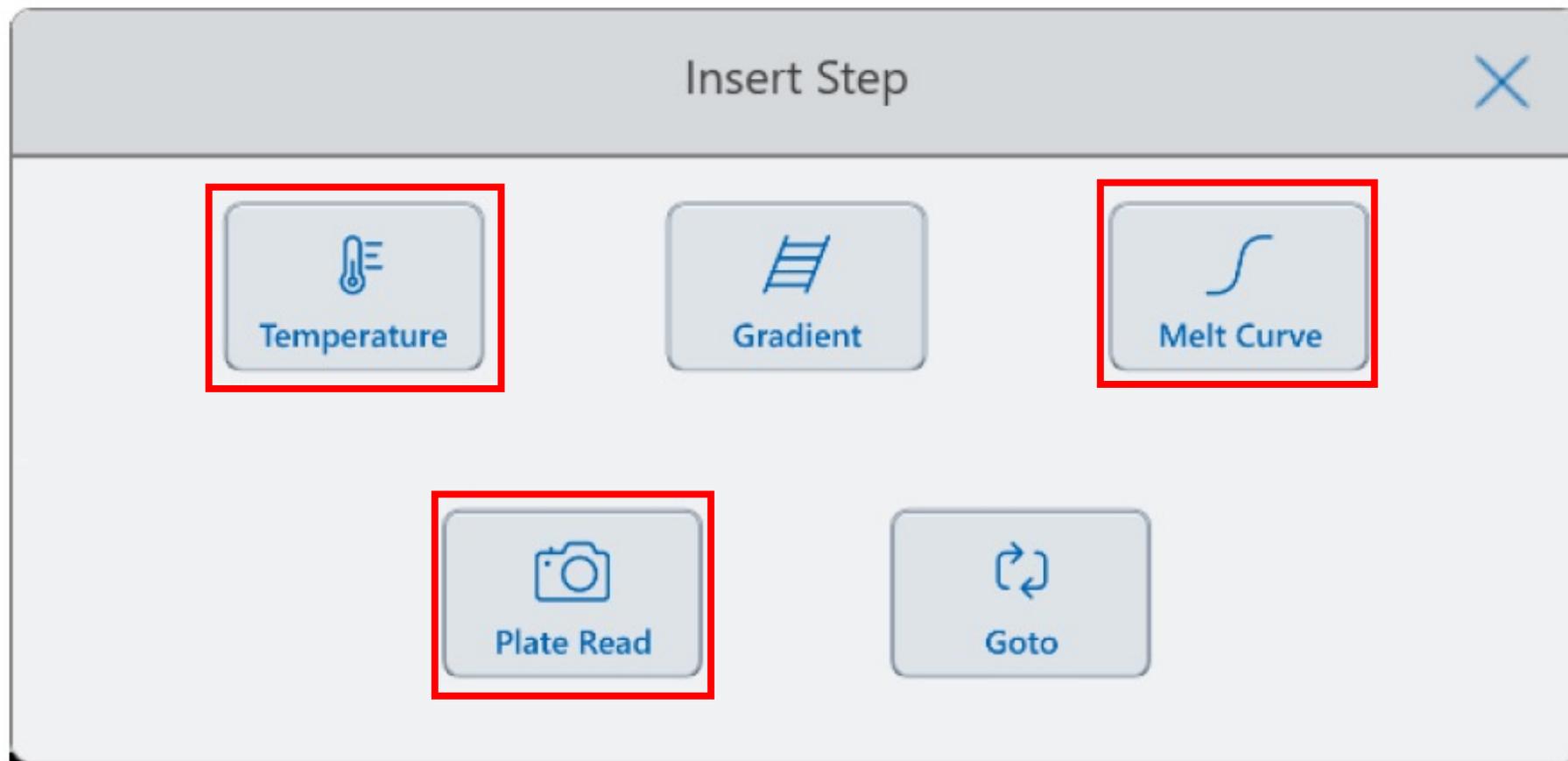
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

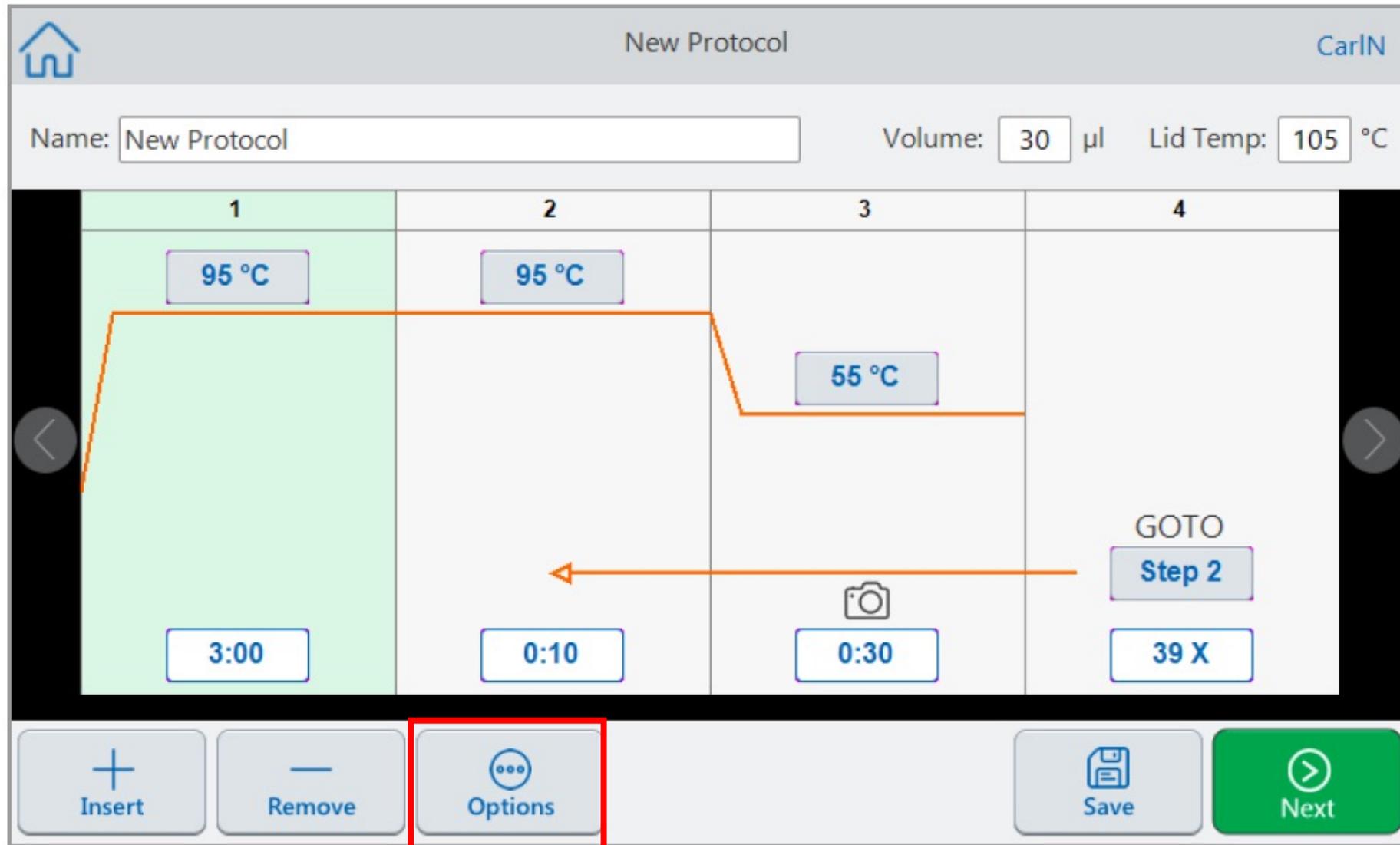
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用

Step Options

Temperature: °C Gradient (°C):

Time: HH:MM:SS

Ramp Rate: °C/s

Increment: °C/cycle

Extend: s/cycle

Beep:

Plate Read:

OK

外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用

Step Options

Temperature: Gradient (°C):

Time: HH:MM:SS

Ramp Rate: °C/s ↕

Increment: °C/cycle 🌡️+

Extend: s/cycle 🕒+

Beep: 🔊

Plate Read: 📷

A	100
B	99.8
C	99.2
D	98.2
E	97.1
F	96.2
G	95.5
H	95

OK

操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

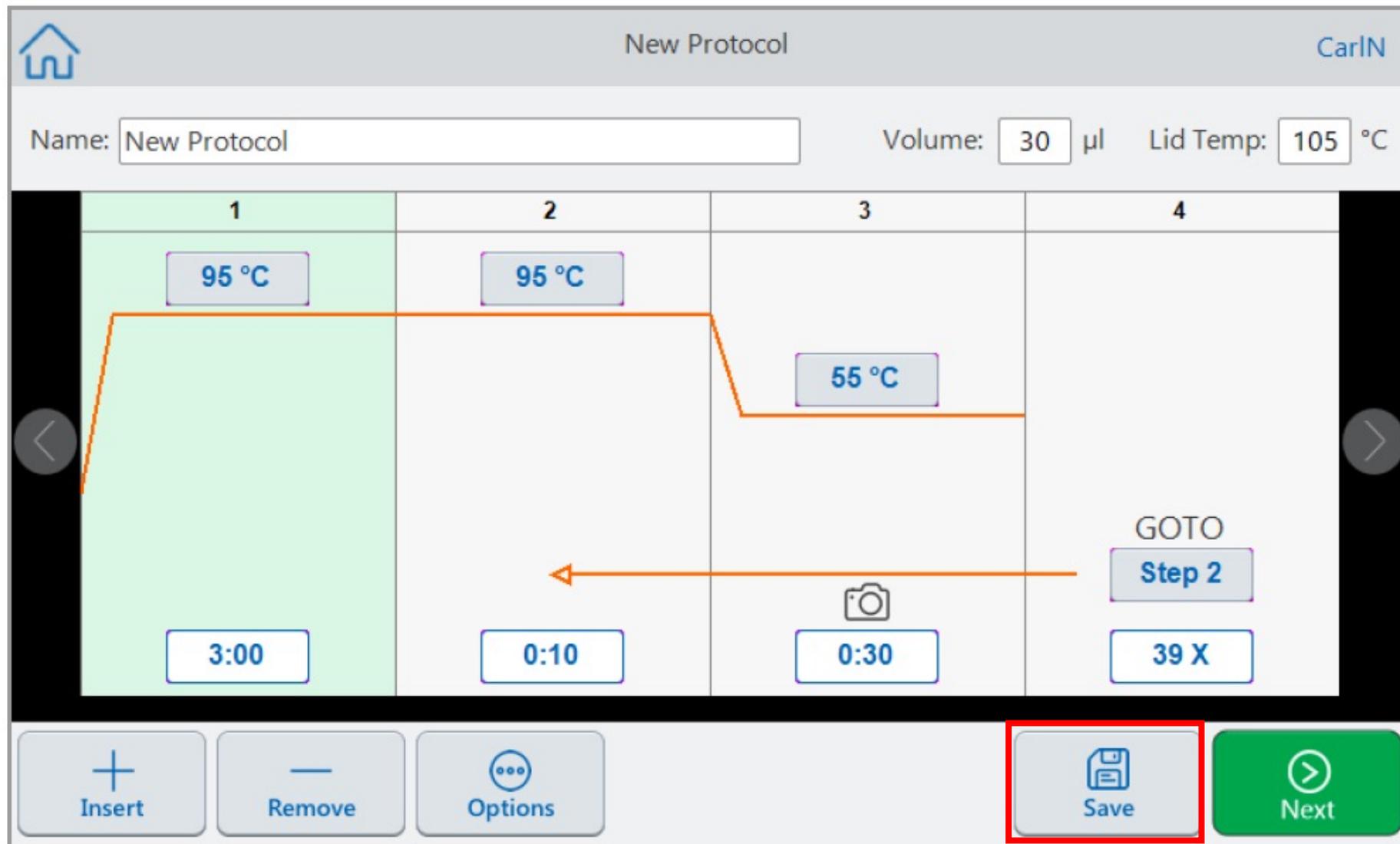
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

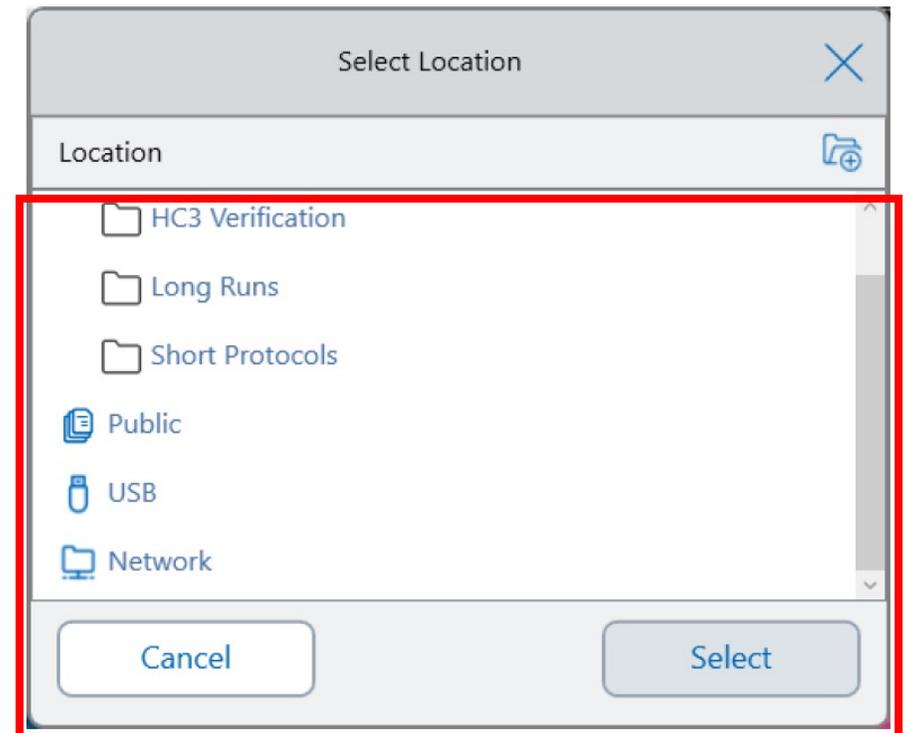
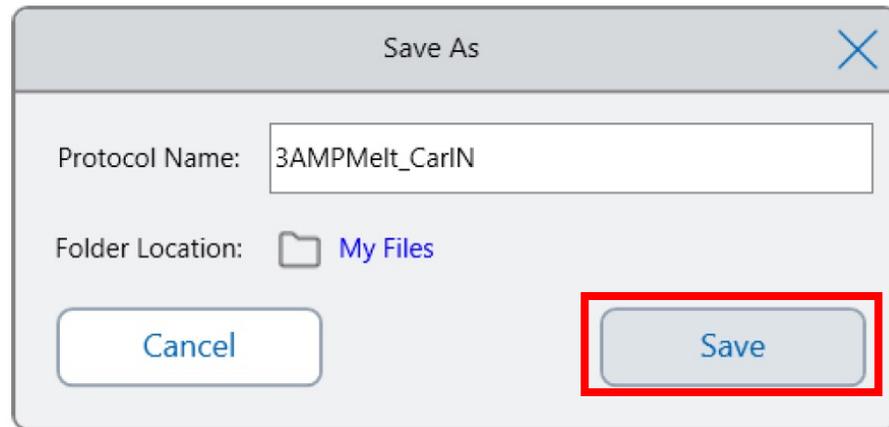
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

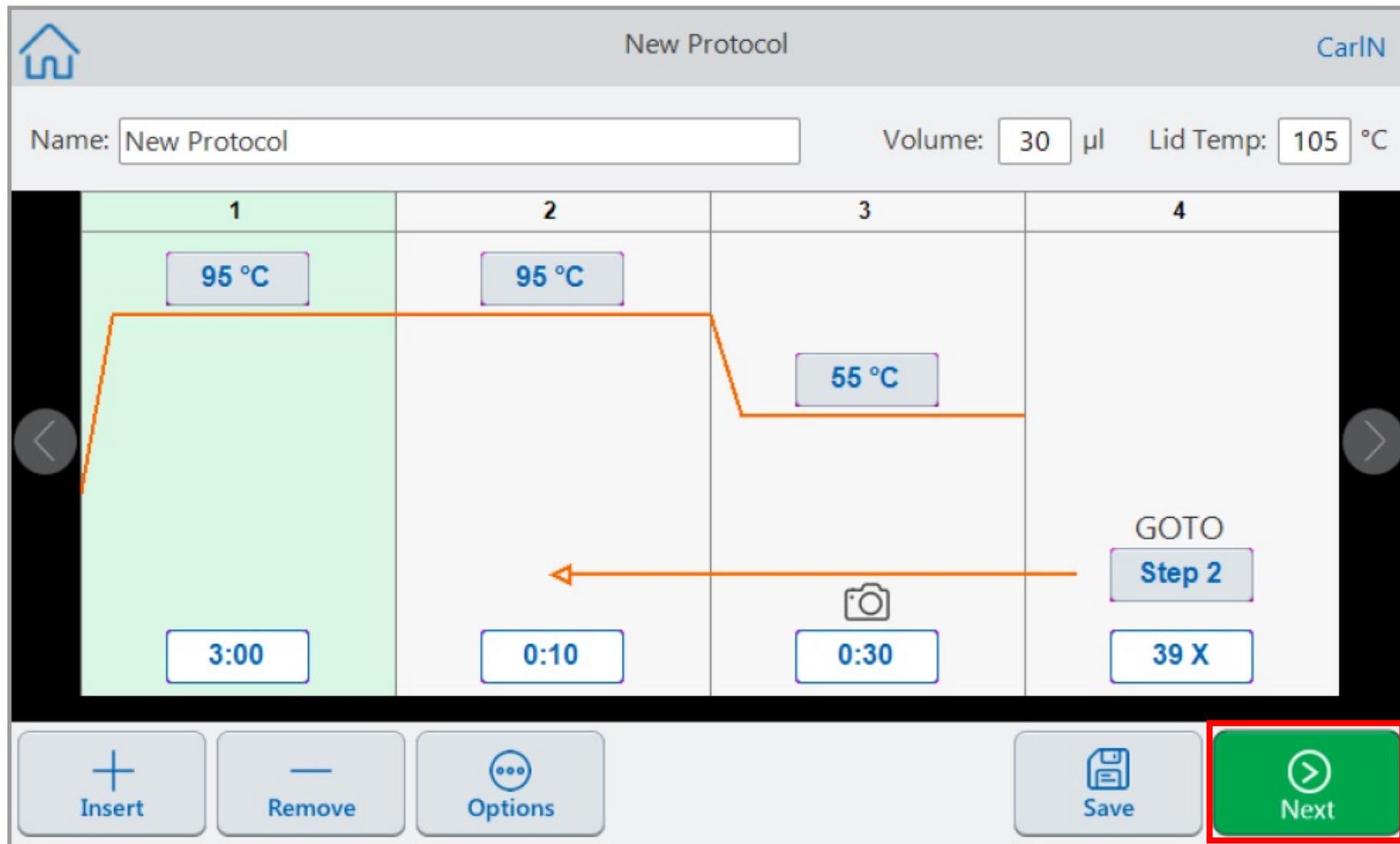
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用

Run Setup CARLN

Back

Name: 3AMPmelt_CarLN Volume: 30 µl Lid Temp: 105 °C

Scan Mode: SYBR/FAM All Channels FRET

Plate ID:

Run File Name: 3AMPmelt_CarLN_20191117_131432_OPUS0001_CARLN

Save Location:  CARLN\...\CarLN

Notification:   cnavar@celltech.com

Open Lid 

操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

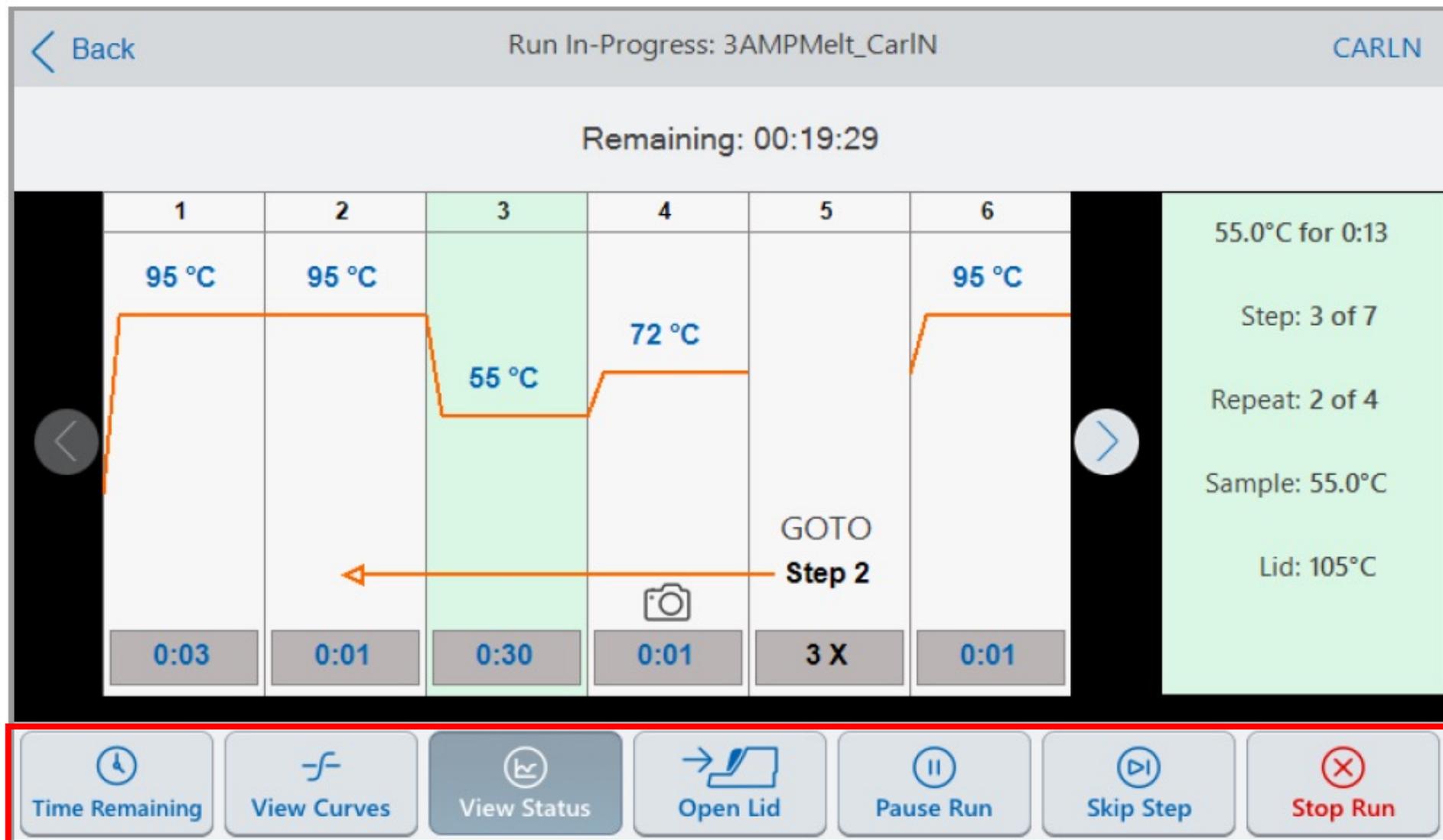
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

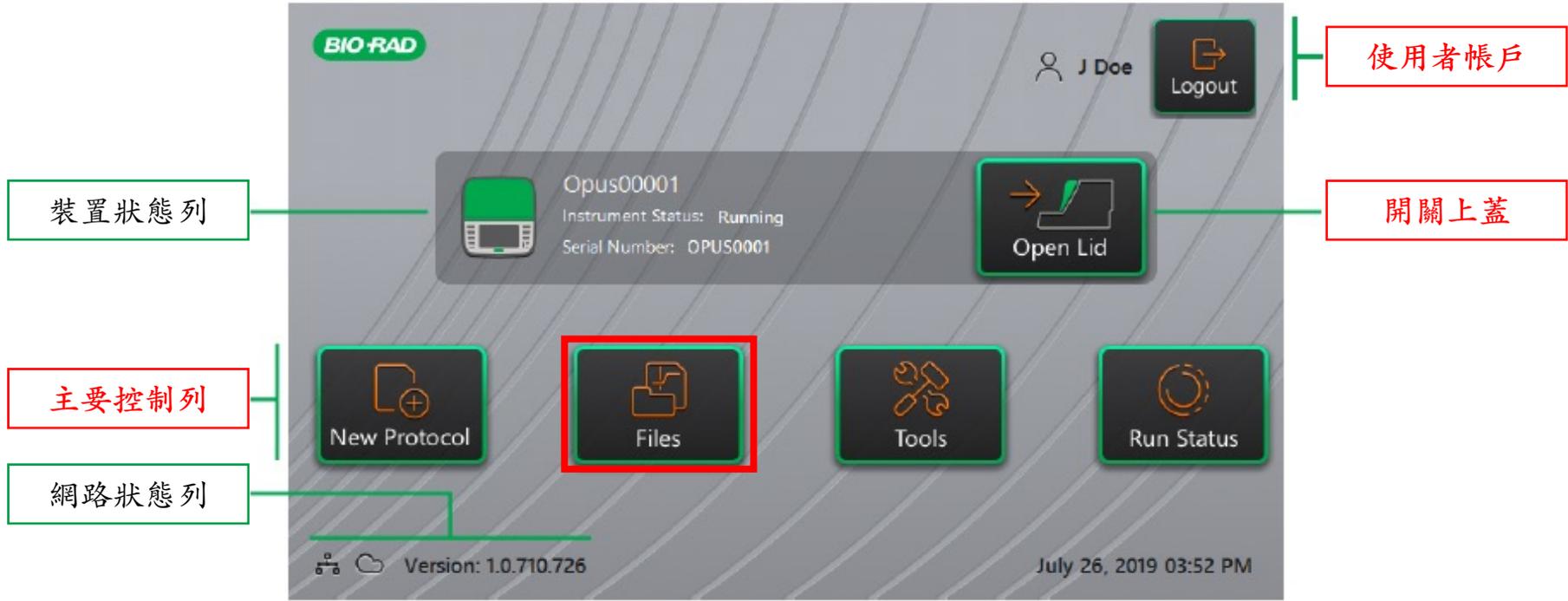
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

BIO-RAD

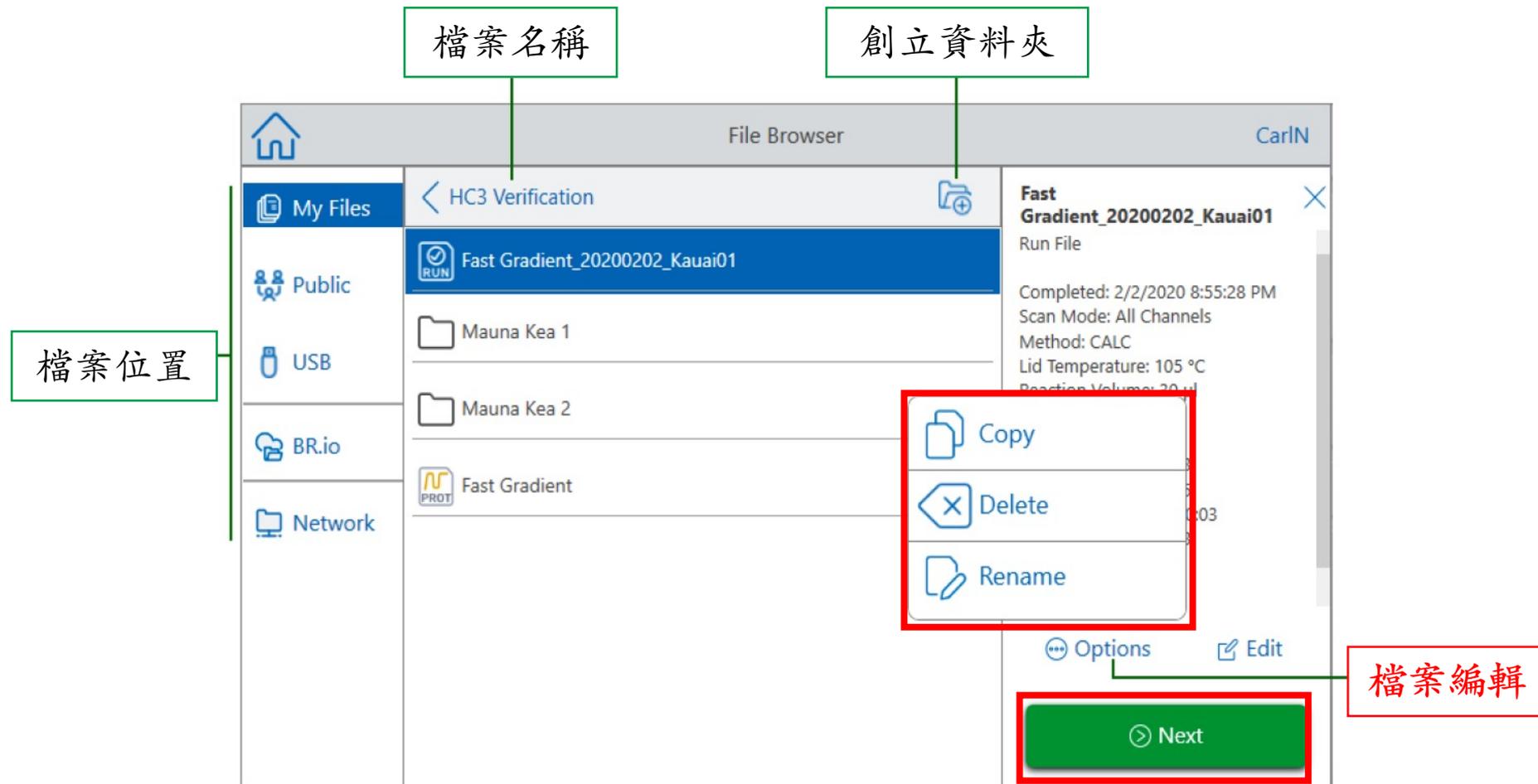
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



操作介面 - 觸控面板

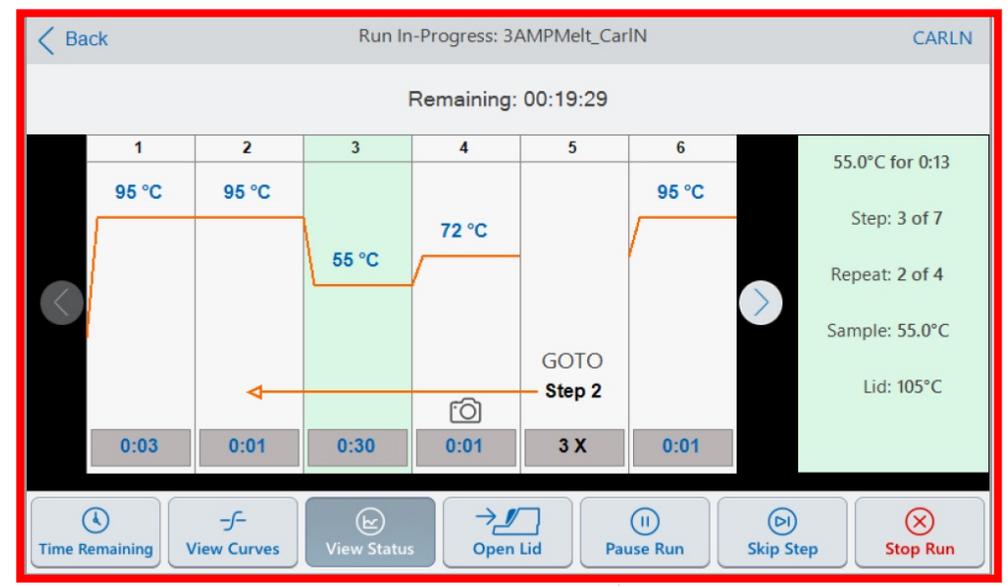
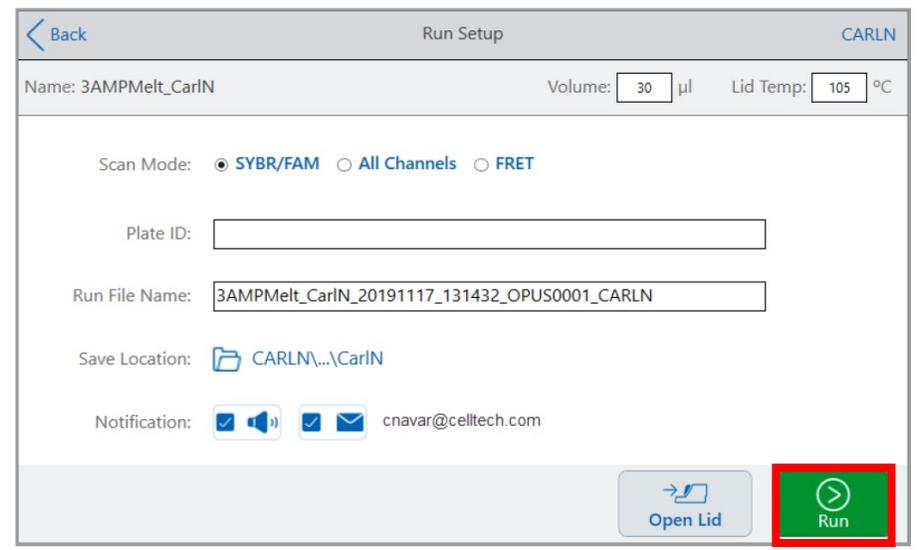
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



使用規格 - 八連排

外觀簡介

硬體啟動

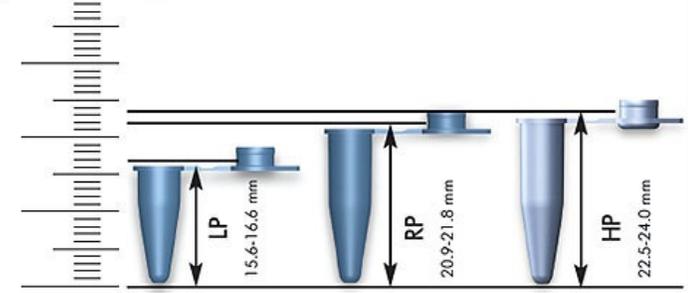
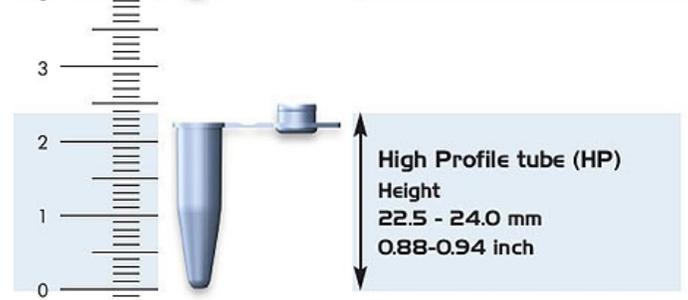
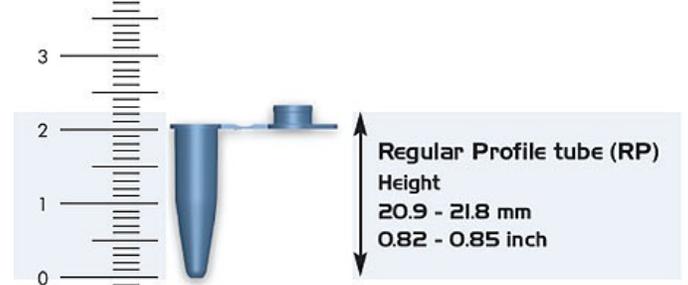
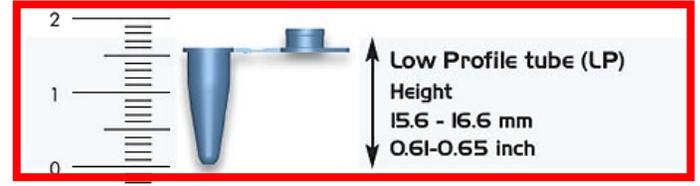
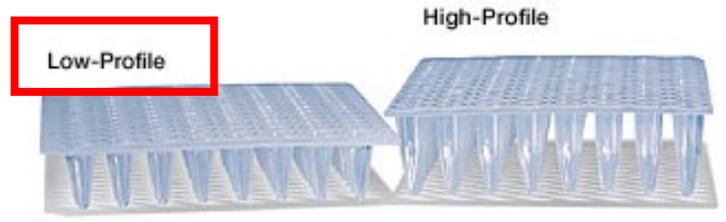
耗材使用

軟體上機

光學應用



Low - Profile Only !!



使用規格 - 八連排

外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

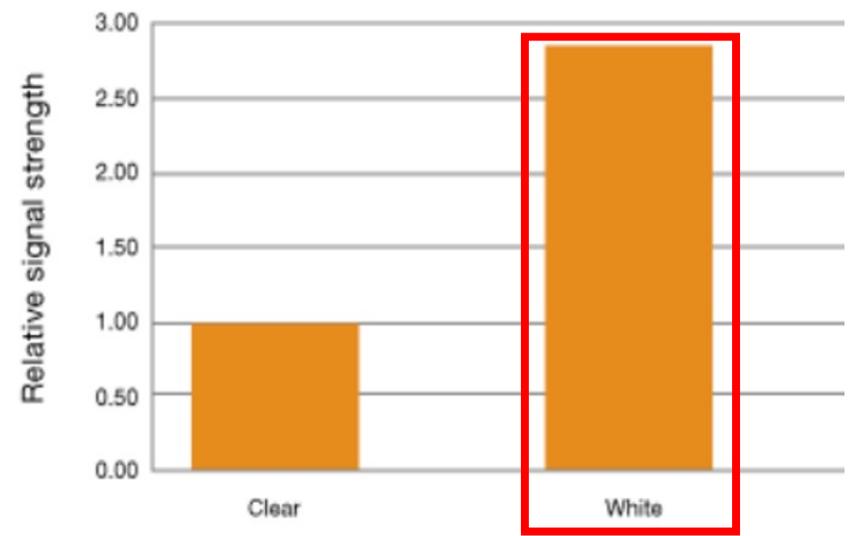
軟體上機

光學應用



Low - Profile Only !!

Well Color Effect on Signal Strength



使用方式 - 96孔盤 / 八連排

BIO-RAD

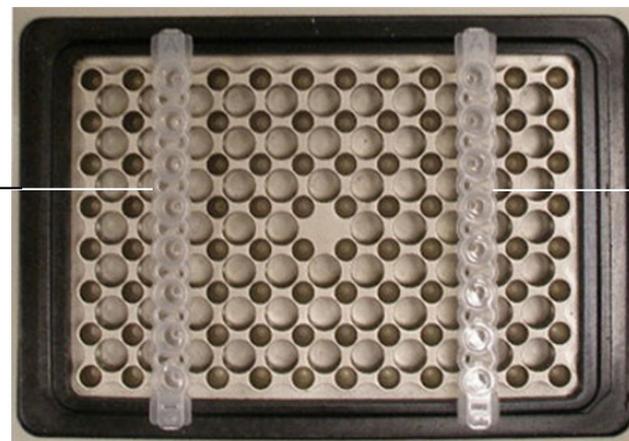
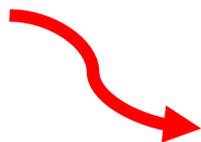
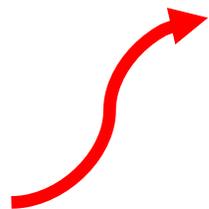
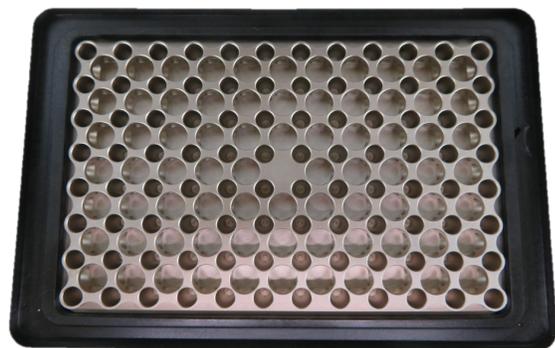
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



Filled tube strip

Tube strip for balance

軟體啟動 - 介面操作

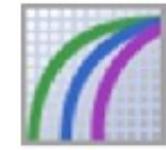
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



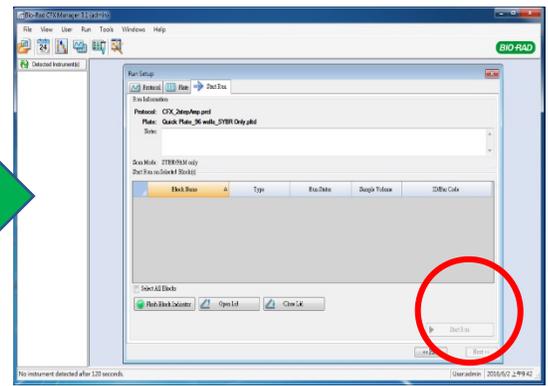
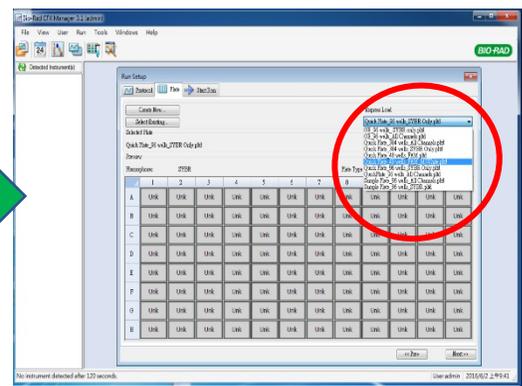
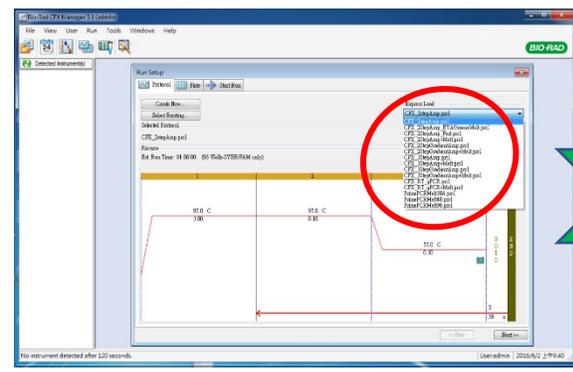
BIO RAD CFX Maestro



Protocol

Plate

Start Run



軟體啟動 - 介面操作

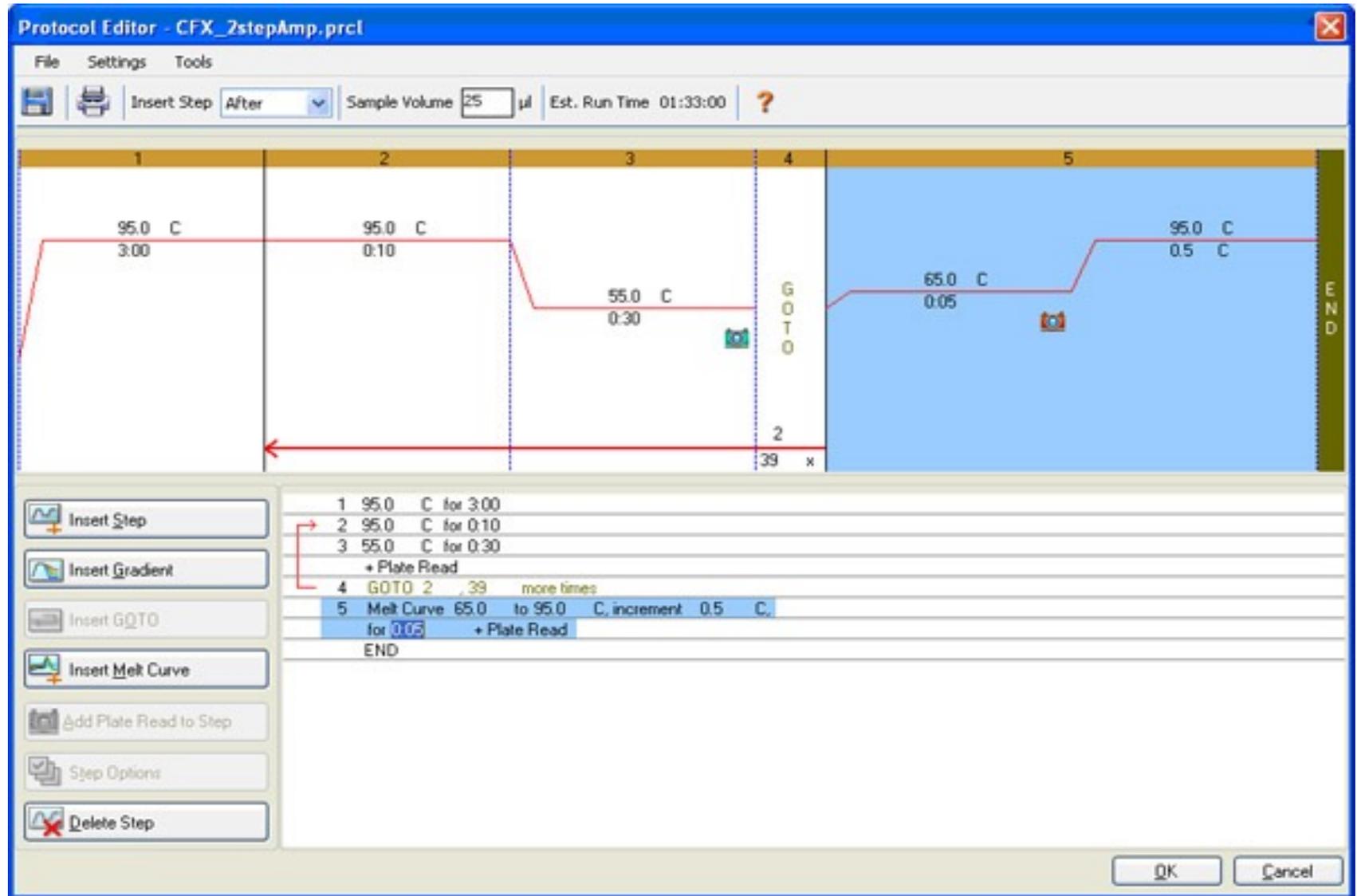
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



軟體啟動 - 介面操作

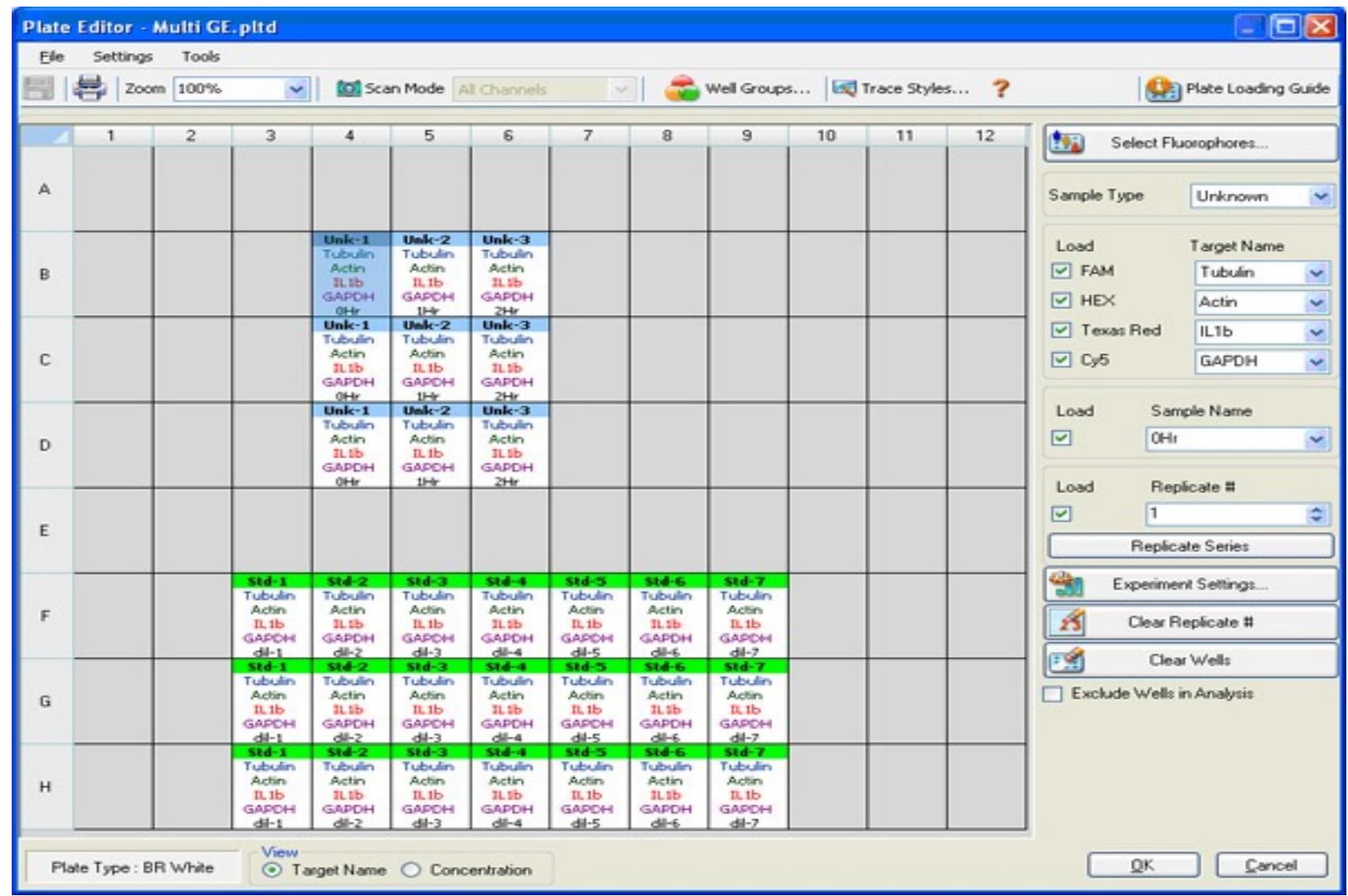
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



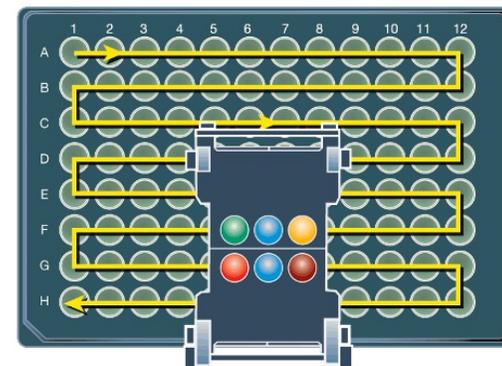
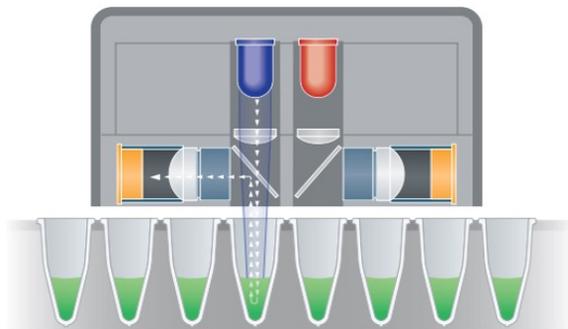
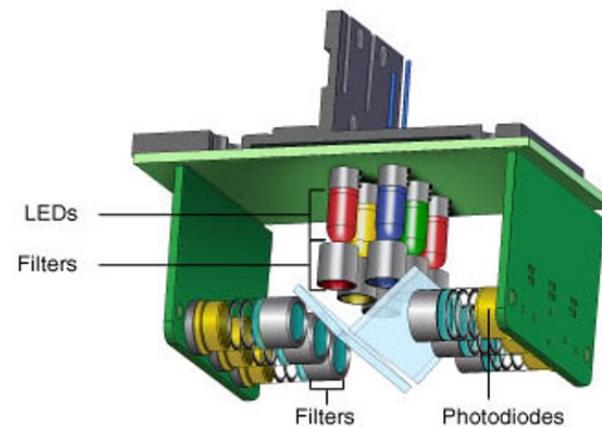
外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機

光學應用



光學設計 - 優點

BIO-RAD

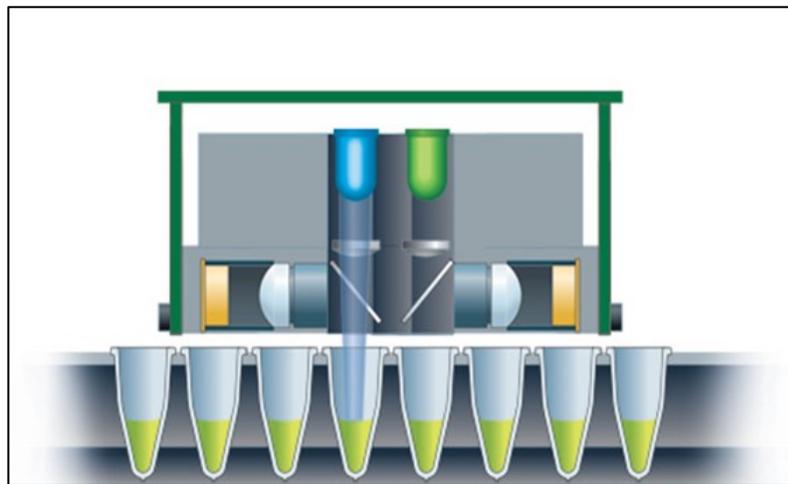
外觀簡介

硬體啟動

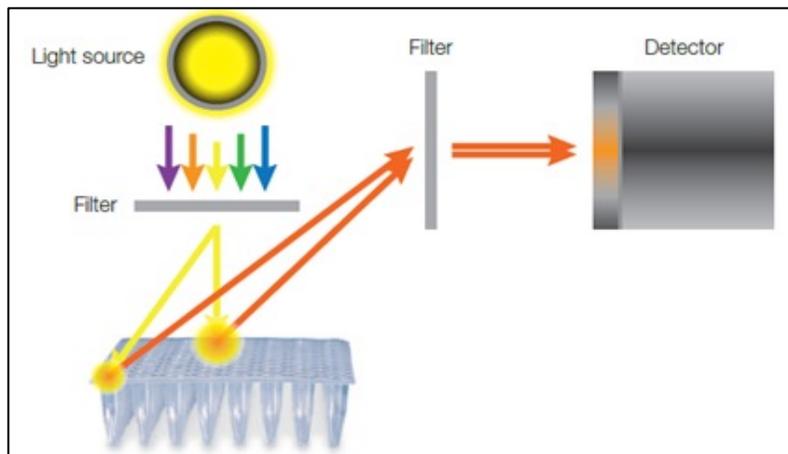
耗材使用

軟體上機

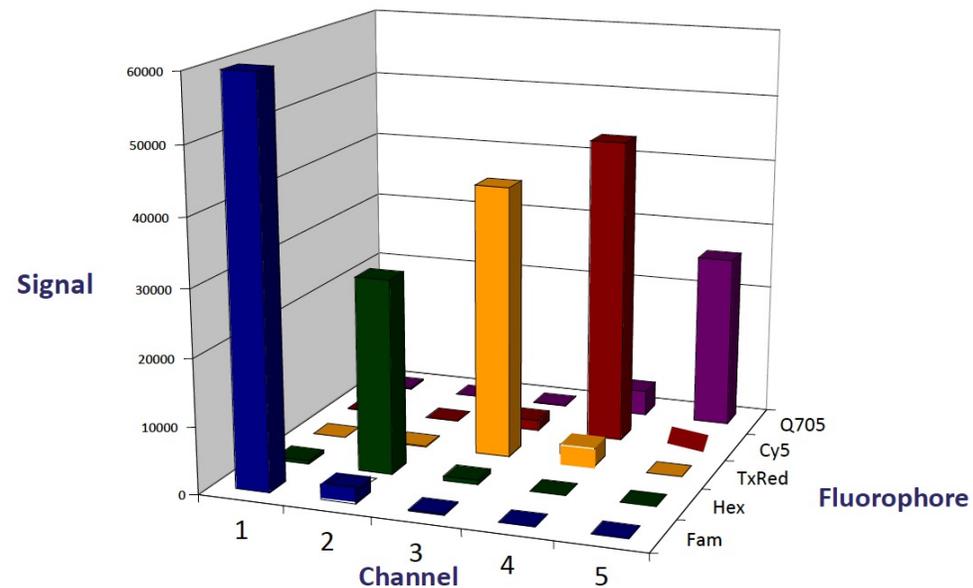
光學應用



BIO-RAD



他牌



垂直光路：「免定期 (ROX) 校正」光學模組

螢光訊號：「高強度」 / 「高專一性」

光源：「LED」壽命長 / 即開即用 (無需暖機)

光學設計 - 染劑與波段

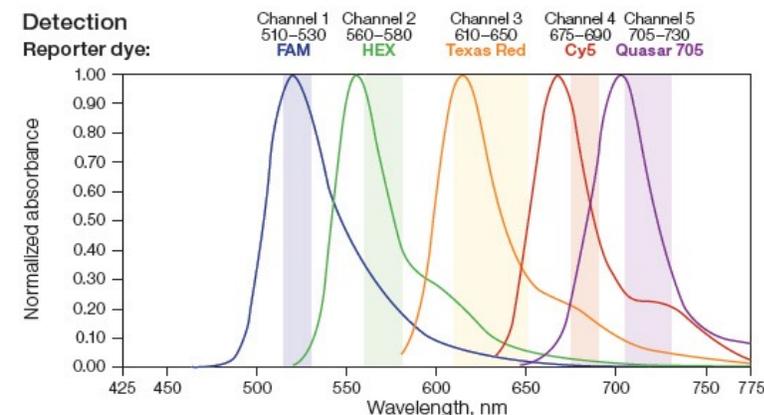
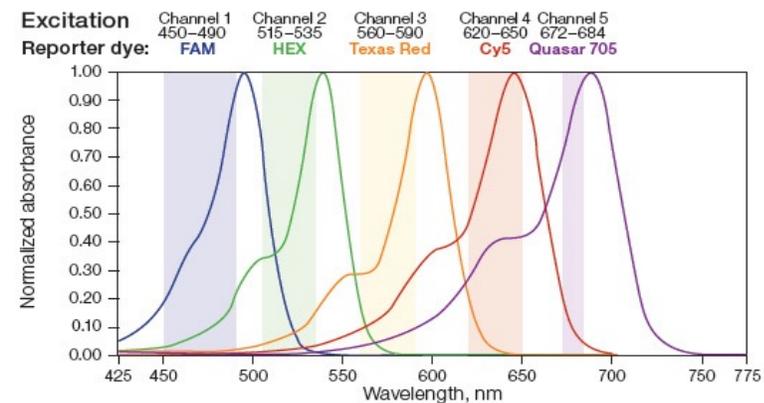


外觀簡介

硬體啟動

耗材使用

軟體上機



Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Calibrated Fluorophores
1	450-490	515-530	FAM™, SYBR Green I™, EvaGreen™
2	515-535	560-580	VIC®, HEX™, TET™, Cal Gold 540™
3	560-590	610-650	ROX™, Texas Red®, Cal Red 610™
4	620-650	675-690	Cy5, Quasar 670™
5	672-684	705-730	Quasar 705™
6	450-490	560-580	Accommodates FRET Chemistry

光學應用

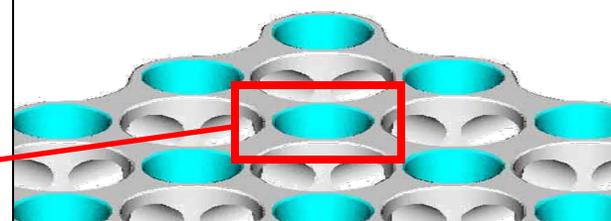
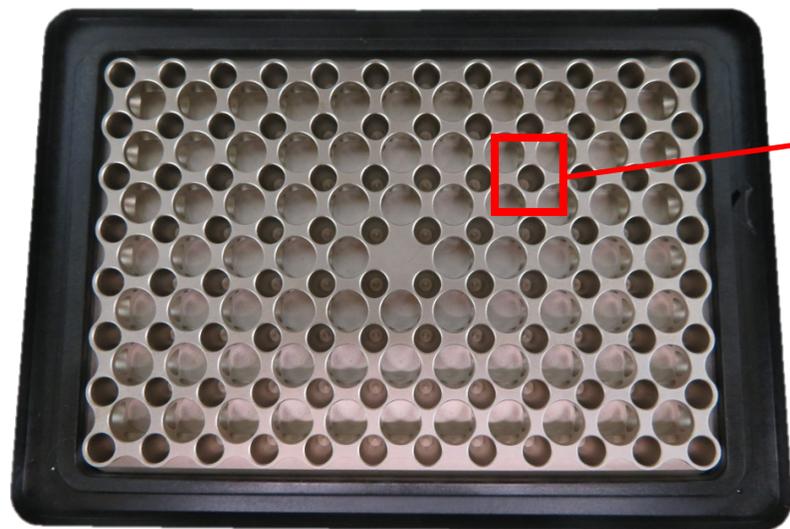


2022 

—— 補 充 篇 ——



反應模組



導熱均勻 + 快速升溫

Max ramp rate	5°C / sec
Temp Accuracy	± 0.2°C
Temp Uniformity	± 0.3°C

控溫精準 + 數據精確

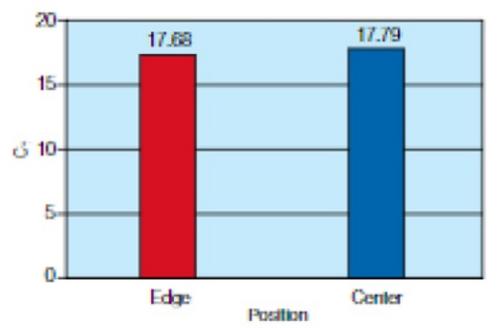
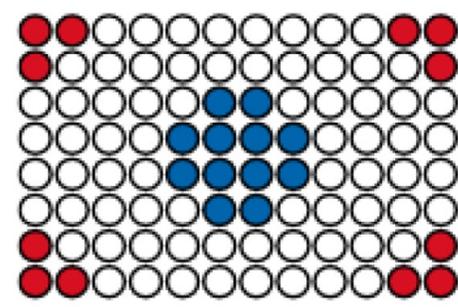
反應模組：蜂巢式簍空設計



溫度梯度

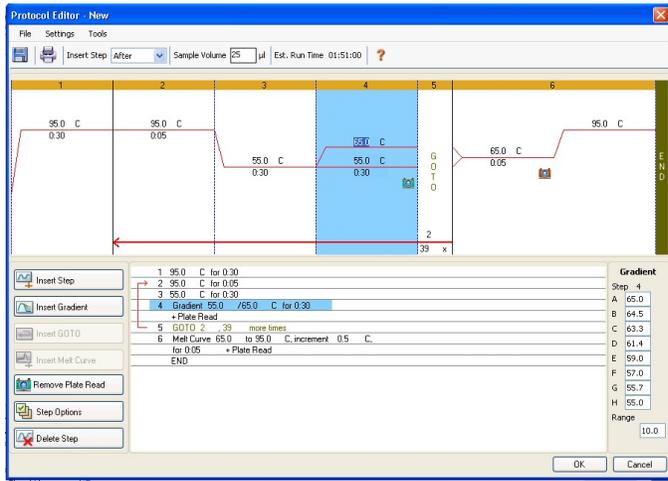
梯度應用

Uniformity ↑



超水準的「均一性」，放在任何位置都能安心實驗

反應模組



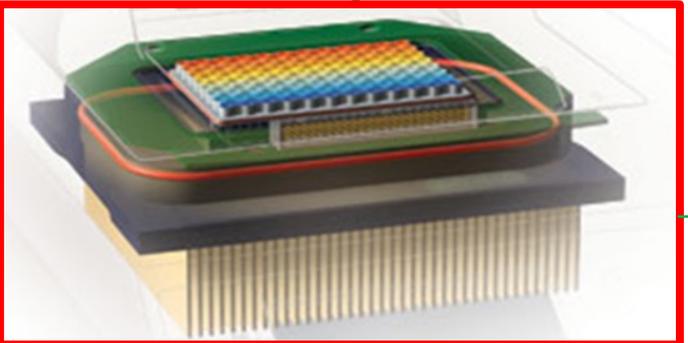
圖像式介面：方便操作與設定

溫度梯度

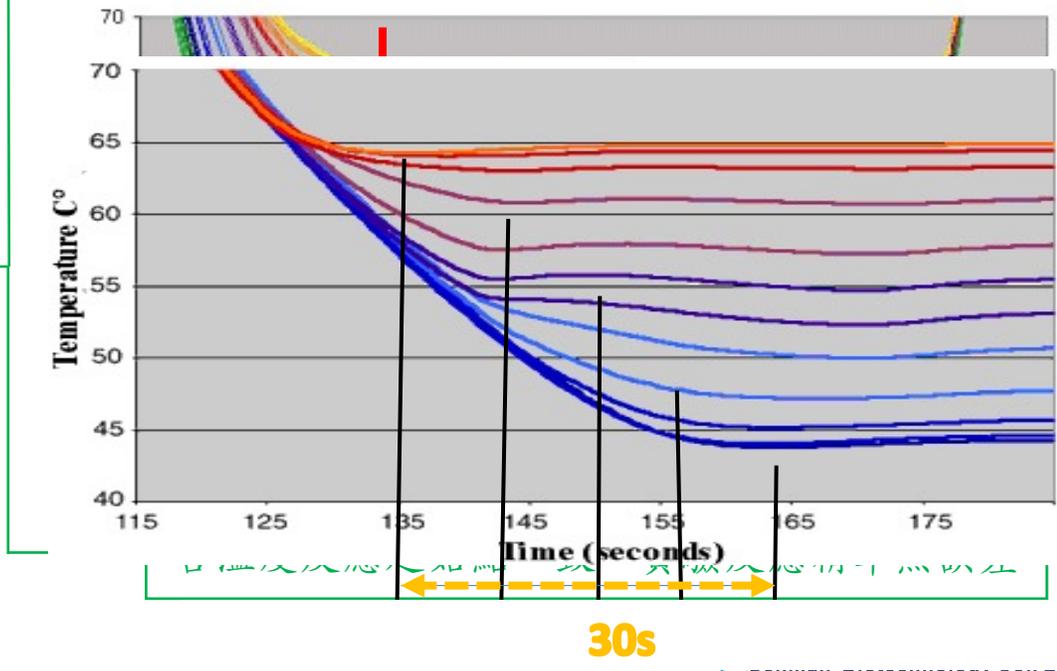
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	70.0	Unk											
B	69.5	Unk											
C	68.4	Unk											
D	66.4	Unk											
E	64.0	Unk											
F	62.0	Unk											
G	60.7	Unk											
H	60.0	Unk											

溫度梯度設定：「1 - 24°C」

梯度應用



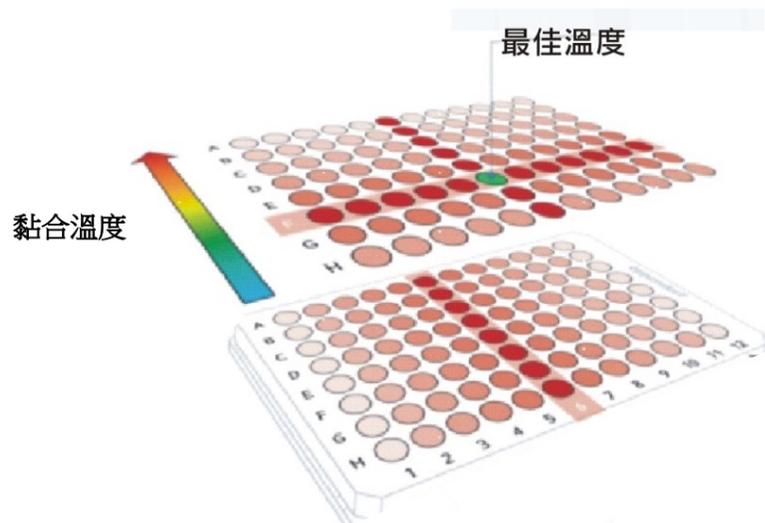
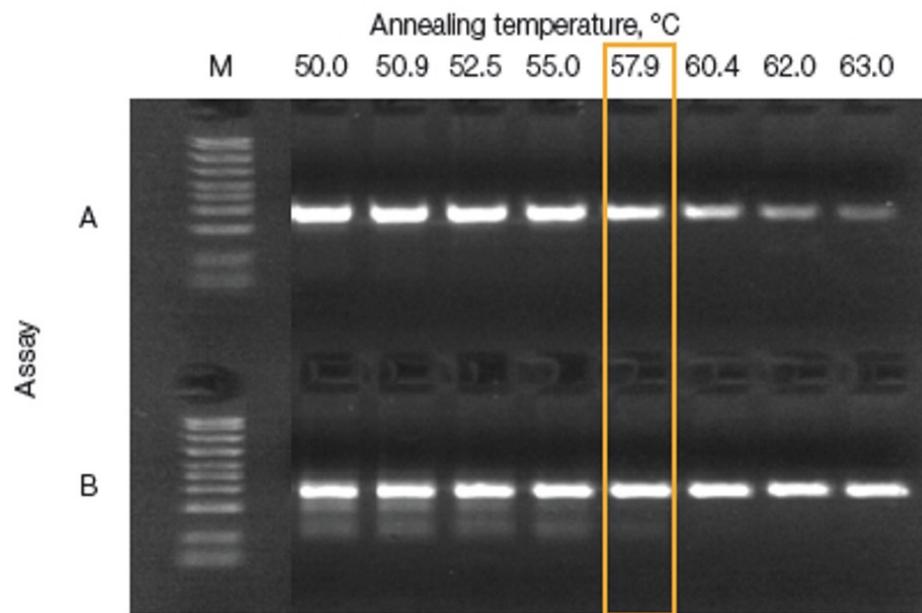
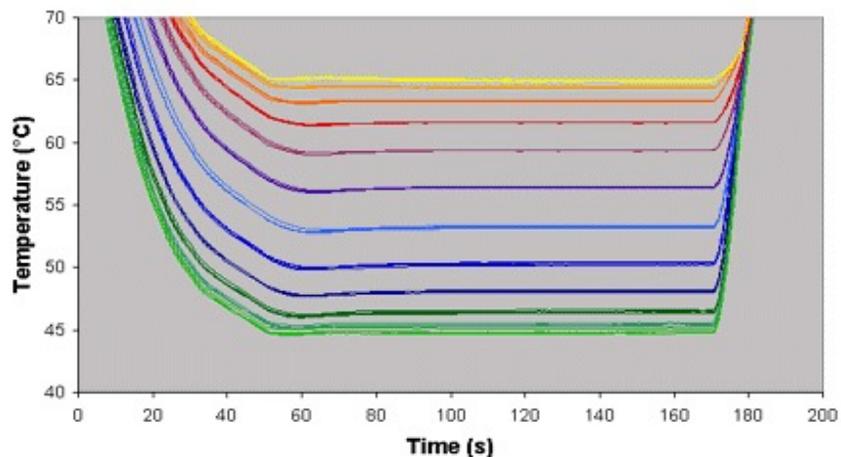
加熱/冷卻方式：晶片控溫 (Peltier)



反應模組

溫度梯度

梯度應用



透過「**溫度梯度**」優化可產生更好的結果和特異性。結果說明測定 A 和 B 可在 **57.9°C** 的黏合溫度 (**Annealing Temp.**) 下運行在同一加熱板上。溫度越高，測試 A 中的產物越少，而在測試 B 中，較低溫度會產生非特定產物。M，DNA marker。



正茂生物科技股份有限公司
Genmall Biotechnology Co., Ltd.

BIO-RAD

Thank You!

