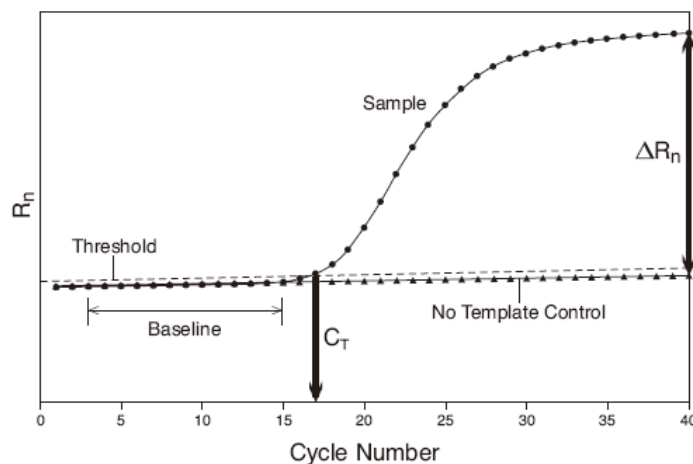
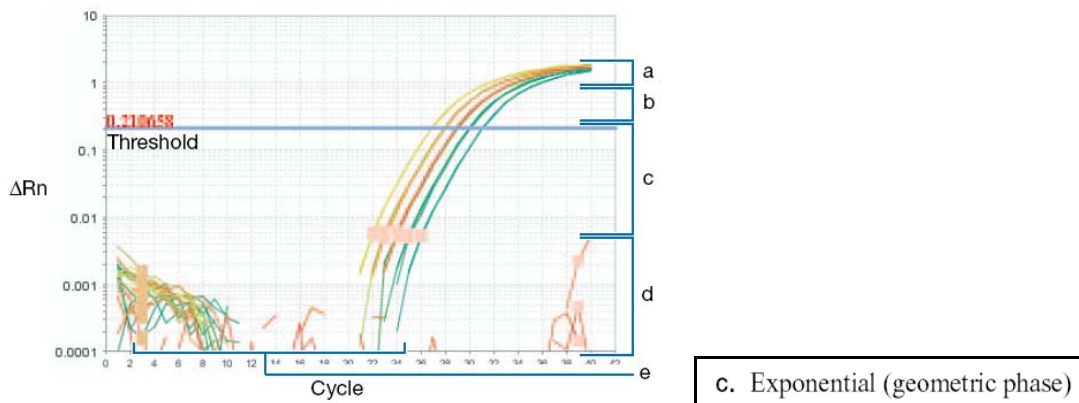


1. StepOne軟體若未開啟，快速點選  或從 **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software > StepOne Software v2.0** 開啟軟體，點選主畫面上的  開啟欲分析的檔案。
2. 如要重新編輯實驗或樣品設定，可從左邊畫面的 **Experiment Menu** 下的  進行實驗盤的編輯。
3. 按下  利用軟體內設條件進行初步分析並檢視分析結果。在右方View Plate Layout視窗可點任一well或點plate左上角來全選所有樣品，左方則會出現相對應樣品的圖形。在一般反應完成後，電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。
4. 檢視Amplification Plot  結果時，請先將Plot Type選擇成  $\Delta R_n$  vs Cycle

Plot Type:  $\Delta R_n$  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)。




5. 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 Threshold:  和Baseline區間


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


6. 進行絕對定量實驗時，請檢視Standard Curve  結果，利用Target:  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 **View Well Table** 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前面的Omit功能來刪除。




8. 進行相對定量實驗時，請檢視Gene Expression  結果，可以利用Plot Type、Graph Type或Orientation    選擇圖形表示方

式，同時可點選右方 **View Technical Replicates** View Technical Replicates來檢視重複樣品平均值的計算結果。

9. 檢視Multicomponent Plot  結果時，選擇以Dye分類呈現  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。

10. 檢視Raw Data  結果時，可拖曳圖形下方的cycle數以觀察五個濾鏡收集訊號的情況，並確認收集的螢光沒有錯誤，下表顯示每個濾鏡收集的螢光種類。

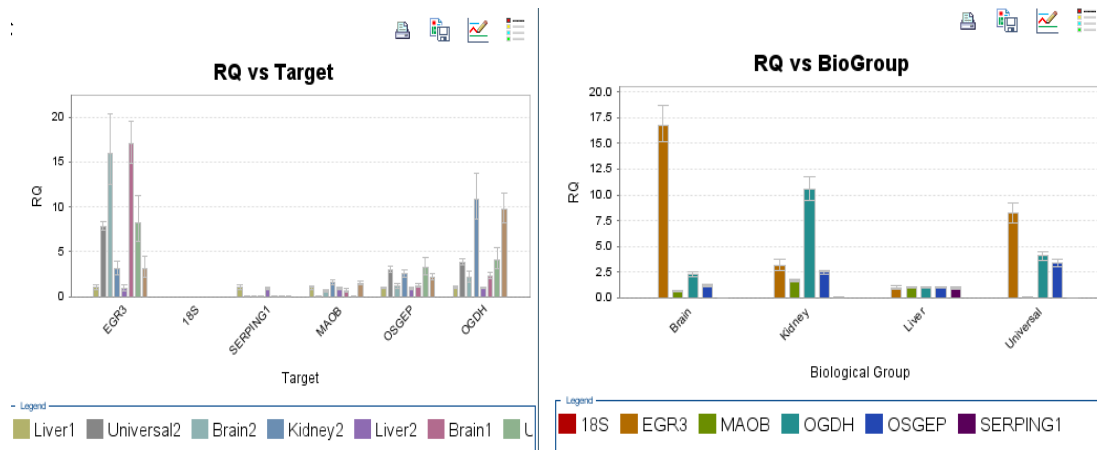
Filter	1	2	3	4	5
Dye	<ul style="list-style-type: none"> <li>FAM™ dye</li> <li>SYBR® Green dye</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>JOE™ dye</li> <li>VIC® dye</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TAMRA™ dye</li> <li>NED™ dye</li> <li>Cy3® dye</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ROX™ dye</li> <li>Texas Red® dye</li> </ul>	Cy5® dye

11. 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。
12. 若點選Multiple Plots View  可以同時檢視上述幾種圖形。
13. 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，可直接按圖形右上方  存成JEPG檔案格式。

## 相對定量研究分析(Gene Expression Study)

若想要同時針對多個樣品盤進行相對定量研究Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) Study分析，可以用主畫面上的**Create Study**的功能。

- StepOne軟體若未開啟，快速點選  或從**Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software > StepOne Software v2.0** 開啟軟體，點選主畫面上的**Create Study** ，即進入相對定量研究分析。
- 在**Setup**下的**Study Properties**  **Study Properties** 視窗中輸入研究名稱、研究註解或使用者名稱，點選**Add Experiment(s)**  加入想要同時分析的Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )檔案，欲加入的樣品盤必須有共同的Endogenous controls以及相同的上機條件(反應步驟、cycle數、樣品體積和上機模式)，樣品盤加入後在Setup Experiments表格中點選任一樣品盤即可在右方同步檢視此樣品盤的設定。
- 在**Setup**下的**Define Replicates**  **Define Replicates** 視窗中點選**Add Biological Group** ，輸入Biological Group名稱與註解，並在**Select Plate**  **Select Plate: Comparative Ct Example.eds** 選擇欲設定的樣品盤，框選Plate上要加到此biological group的technical replicate wells並點 ，再按OK即完成Biological Group設定。此設定也可在每個樣品盤的**Setup/Plate Setup**視窗中各自編輯，當Biological Group編輯完成時即可進行分析。
- 點選左邊**Analysis**  **Analysis** 視窗，當超過一個以上的樣品盤加入時軟體即自動分析，可點選**Analysis Settings**  來更改分析的設定。
- 檢視相對定量圖形  **Gene Expression** 時，可選擇RQ vs Target 或RQ vs BioGroup 按照基因或biological group來排列圖形，在Graph Type  **Graph Type: Log10** 中選擇以Log10或Linear表示，另外也可選擇Orientation  **Orientation: Vertical Bars** 橫向或直向的柱狀圖。



6. 點選右方的Replicate Results Data，可分別檢視 **Technical Replicates** 和

**Biological Replicates** 的計算結果：

- 點選 **Technical Replicates** 的表格，可觀察每個樣品技術性重複所得的平均 Ct、 $\Delta$ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct 及 RQ 數值，如用滑鼠拉選特定樣品時，則可在下方的 **Well Results Data** 中觀察到在各個 Experiment 樣品盤中，每個獨立 well 所偵測的基因名稱及 Ct、 $\Delta$ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct 及 RQ 數值。

- 點選 **Biological Replicates** 的表格，則可觀察到在每個 Biological group 中所偵測基因的平均 Ct、 $\Delta$ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct 及 RQ 數值，如用滑鼠點選特定 Biological Group，則可從 **Biological Replicate Details** 觀察到此特定組別中每個樣品所偵測基因的平均

Ct、 $\Delta$ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct 及 RQ 數值。而在下方的 **Well Results Data** 則顯示每個獨立 well 所偵測的基因名稱及 Ct、 $\Delta$ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct 及 RQ 數值。

7. **Compare Settings** 是可用來比較利用不同的分析參數所計算出來的結果差異。可從 “Current Analysis Setting” 或 “Comparison Analysis Setting” 按下 “Edit”，分別給予不同的設定值（例如：更改 threshold 的數值），按下分析後觀察是否會影響到相對定量的趨勢。

