

# 天隆 Gentier 48R 基线阈值设置

- 一、结果判断之扩增曲线介绍。
- 1、一条完整的阳性扩增曲线

分成基线期、指数期、线性期、平台期(图1)。



图1、正常阳性扩增曲线

(1) 基线期, 扩增产物量少, 信号被背景信号掩盖;

- (2) 指数期, PCR 原料充足, 产物以 2<sup>n</sup>指数增长;
- (3) 线性期, 原料部分消耗后, 产物增长速度下降;
- (4) 平台期, 原料接近耗尽, 产物增长速度极慢甚至完全不增长。

# 实际扩增过程中可能出现以下几种情况:

(1) 同时出现基线期、指数期、线性期、平台期,曲线呈"水平--指数增长--直线增长--水平"(图 4b),

(2) **还未到达平台期实验已结束,只出现基线期、指数期、线性期,曲线呈**"水平--指数增长--直线增长"(**图 3b**),

(3) 还未到达线性期实验已结束,只出现基线期、指数期,曲线呈基线期、指数期"水平--指数 增长"。

# 2、正常阴性或者空白对照扩增曲线



#### 图 2、正常阴性或者空白对照扩增曲线

**扩增曲线的形状**应该是水平的,或者曲线信号有少量缓慢增长(**图2**),曲线在增长过程没有明显拐角。

# 二、为什么会出现异常扩增曲线

天隆 Gentier 48R 在 PCR 管侧壁检测荧光信号,因此,管壁内侧细微的气泡都会对荧光信号造成干扰。一些细微的气泡牢固地粘在管壁,较难去除,涡旋震荡或者手指轻弹后离心才能去除。实验操作者未进行以上步骤或其他操作原因导致气泡去除不彻底会影响荧光信号检测,进而导致扩增

#### 第1页共3页



曲线异常。

### 以下是我司部分实验结果数据:

1、检测试剂盒为我司生产的:对虾传染性皮下及造血组织坏死症病毒(IHHNV)核酸检测试 剂盒(冻干型/PCR-荧光探针法)、对虾血细胞虹彩病毒(SHIV)核酸检测试剂盒(冻干型 PCR-荧 光探针法)。

2、实验操作试剂加入完全按照说明书进行,其中一组在放入天隆 Gentier 48R 前未进行任何处理(图 3a、图 4a),一组在放入天隆 Gentier 48R 前进行漩涡震荡并且 12,000rpm 离心 20s(图 3b、图 4b),最终的扩增曲线图如下:









图 3b. IHHNV 上机前漩涡震荡并且 12,000rpm 离心 20s。



图 4a. SHIV 上机前不处理。

图 4b.SHIV 上机前漩涡震荡并且 12,000rpm 离心 20s。

图 3a、图 4a 是上机前不处理的实验结果图,可以看出扩增曲线在基线期(即曲线正常扩增抬头前数个循环)信号异常,而非正常的水平直线;图 3b 和图 4b 是上机前漩涡震荡并且 12,000rpm 离心 20s 的实验结果图,可以看出扩增曲线信号正常,基线期信号稳定(如图 4b),或信号波动极小,不对软件判读造成影响(如图 3b)。

三、扩增曲线与结果判读

天隆 Gentier 48R 配套的软件可以根据扩增曲线自动设置基线、阈值参数, 假若扩增曲线不正常, 软件会得出错误的 CT 值, 对最终结果造成影响。

图 5a、图 5b、图 5c 是扩增曲线基线期异常的几种不同情况,图 5a、图 5b 软件默认的基线起 点是第三个循环,在此之后数个循环内曲线仍未恢复至正常水平,数值在大幅降低或升高,从而影 响软件分析。图 5c 中出现的第三个循环之前的小幅波动,不影响软件分析。







图 5a.扩增曲线基线大幅向下波动。

图 5b.扩增曲线基线大幅向上波动。

图 5c.扩增曲线基线小幅向下波动。



四、扩增曲线基线期异常情况下,如何手动设置基线阈值 以下以两例示范如何手动设置阈值: 范例一:



图 6. 范例一异常扩增曲线

图 6 中曲线基线期第 1-5 循环数据异常,需要手动设置基线,确认需要设置的孔是 H3 孔,在分

析页面进行设置,点击分析设	: <mark>네.</mark> 네. Ц. 又置 <sup>分析设置</sup> ,	点击手动基线	● 手动基线	曲线从第19个循环开
始抬头,在"手动基线"选项下方	方设置基线结束	循环,设置值要小	于 19,这里设置	且成 18 <sup>18</sup> ,
曲线 1-5 循环异常,基线起始循环要大于 5,这里设置成 6 6 6 ,点击确定。				
范例二:		20 25 30 35	40	

#### 图 7.范例二异常扩增曲线

图 7 中曲线基线期第 1-11 循环数据异常,需要手动设置基线,确认需要设置的孔是 B3 孔,在