

# LightCycler<sup>®</sup> 480实时荧光定量PCR系统

快速操作指南 V 2.2



## 目录

### 说明及版本历史

#### 1. 基本界面及图标

##### 1.1. Overview 界面

##### 1.2. New Experiment 界面

##### 1.3. Navigator 界面

#### 2. PCR 及结果分析

##### 2.1. 开机

##### 2.2. 运行一次 PCR 实验

###### 2.2.1. PCR 程序的设定

###### 2.2.2. 样本的编辑

###### 2.2.3. 程序的运行

##### 2.3. 实验结果的分析

###### 2.3.1. 绝对定量分析

###### 2.3.2. 相对定量分析

###### 2.3.3. 基因分型分析

###### 2.3.4. Tm calling

##### 2.4. 结果报告

#### 3. 数据管理及模块化操作

##### 3.1. 历史数据的处理

##### 3.2. 应用 Template 和 Macros 简化实验流程

#### 4. 用户管理

#### 5. 日常维护

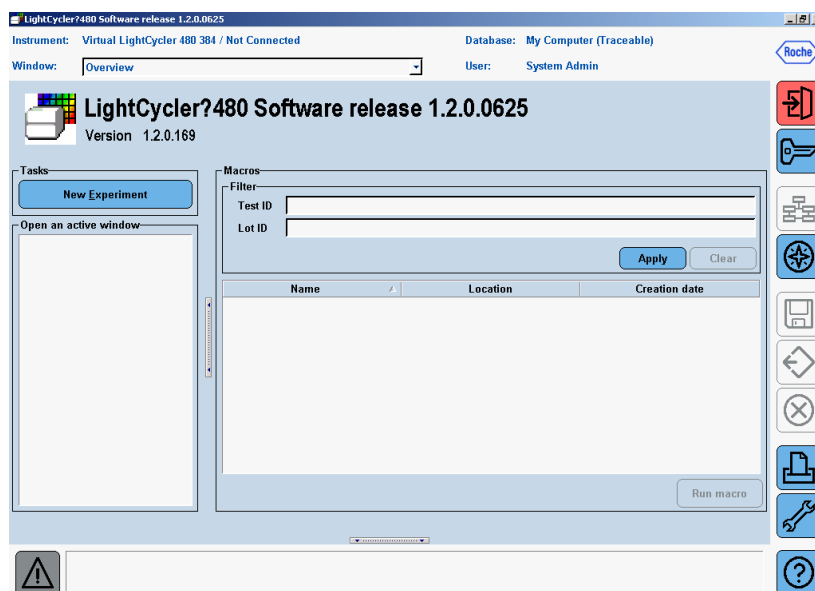
## 说明

本指南用于简要说明 LightCycler® 480 系统软件的界面及操作要点，对初学者了解系统软件有所帮助。但荧光定量 PCR 是一个相对较为复杂和精确的定量方法，要求使用者对仪器、软件和实验设计有比较系统深入的了解，方能对实验的设计、操作及分析运用自如。因此请各位使用者在初步了解本软件的操作要点后，尽快通过完整的操作手册，熟悉系统相关软件和实验设计、分析。

## 第一部分 基本界面及图标

概述:

### 一、Overview 界面



**Exit:** 关闭 LC480 软件



**Log off:** 从目前使用的数据库中退出并可登陆其他的数据库



**Overview:** 点击该图标进入“Overview”界面



**Navigator:** 点击该图标进入“Navigator”界面，可进行数据的导入导出等操作。



**Save:** 点击该图标进行保存



**Export:** 导出当前打开的文件



**Close:** 关闭当前打开的文件



**Print:** 打印当前打开的窗口

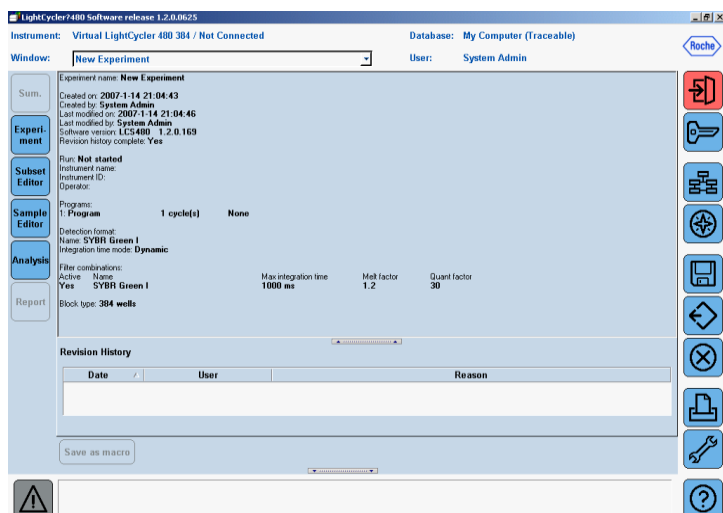


**Tools:** 打开“Tools”界面，可进行密码修改，建立和编辑用户，系统设置，查看数据库状态、仪器状态、滤光片组合等操作



**Help:** 查看软件版本，操作说明书等

## 二、New Experiment 界面



**Summary Module:** 查看实验的总体概况，包括实验名称，所用的程序，检测模式，滤光片组合等。概况的内容由系统自动生成



**Run Module:** 编辑、运行或查看 PCR 程序及查看 PCR 实时数据



**Subset Editor:** 点击该模块后可进行子集的编辑



**Sample Editor:** 点击后进行样品信息的编辑

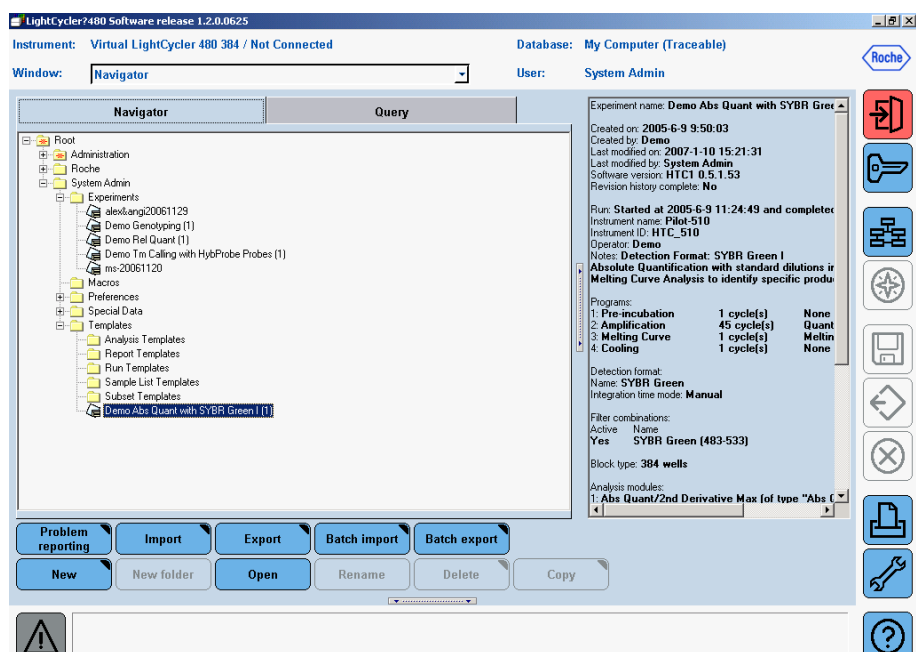













**Analysis Module:** 点击进行结果分析或查看已保存的分析结果



**Report Module:** 选择需要的内容以报告的形式给出结果

## 三、Navigator 界面




- 
**Problem Reporting:** 生产供罗氏技术人员诊断的错误报告，内含当前实验对应的 .ixo 文件和软件日志等必要信息
- 
**Import:** 导入一个文件
- 
**Export:** 导出一个文件
- 
**Batch Import:** 导入一批数据
- 
**Batch Export:** 导出一批数据
- 
**New:** 新建一个实验或文件夹
- 
**New Folder:** 新建一个文件夹
- 
**Open:** 打开一个文件
- 
**Rename:** 重命名
- 
**Delete:** 删除选中的目标
- 
**Copy:** 拷贝选中的目标

**Note:** 所有上述图标在深蓝色时为激活状态，灰色时为灭活状态也就是不可用状态。各图标的功能在不同状态下以颜色来区分是否具备。

## 第二部分 PCR 及结果分析

### 一、 开机

- (一) 打开 LightCycler 480 仪器
- (二) 打开电脑
- (三) 登陆 Windows XP

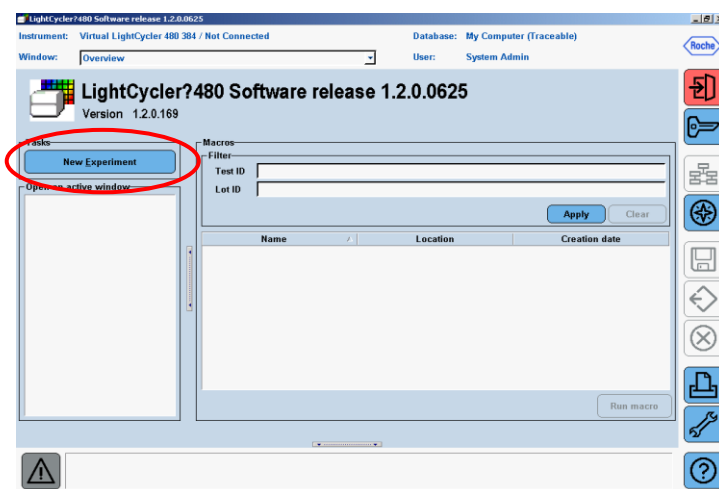
(四) 双击图标, 打开 LightCycler 480 软件, 输入用户名、密码后登陆。

*Note: 打开 480 仪器后, 将有一个仪器自动初始化的过程: Sample Loader 自动出来一次, 并复位。*

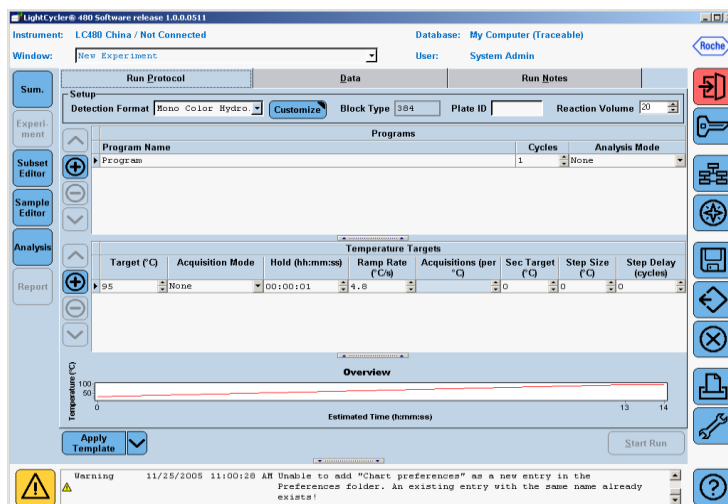
### 二、 运行一次 PCR 实验

- (一) PCR 程序的设定

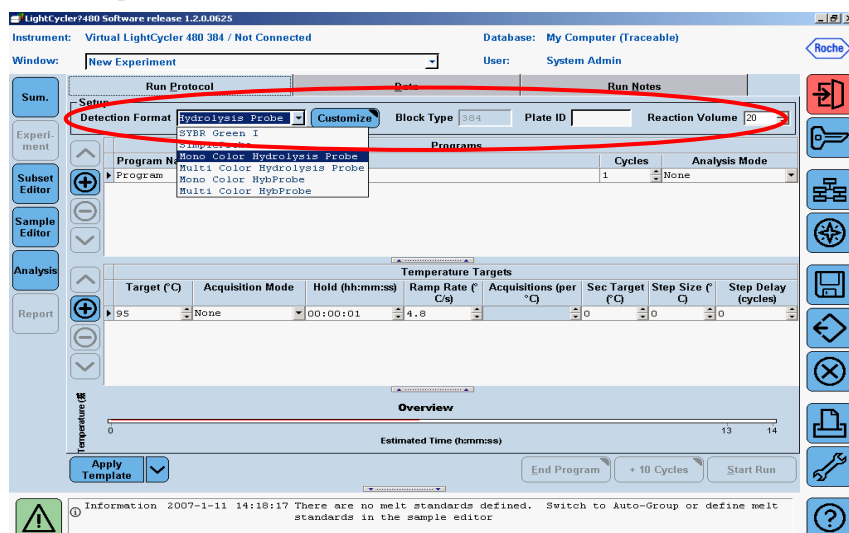
- 1、 打开软件后, 自动进入如下界面



- 2、 点击软件主界面中的“New Experiment”，进入程序设定界面



- 3、根据实验所用的检测模式选择“Detection Format”，“Block Type”，“Plate ID,(optional)”和“Reaction Volume”



- 3.1 从 Detection Format 的下拉框中选择分析模式: SYBR Green I; SimpleProbe; Mono Color Hydrolysis Probe; Multi Color Hydrolysis Probe; Mono Color HybProbe; Multi Color HybProbe

3.2 ‘Customizes’模块中选择合适的滤片组合

3.3 选择合适的模块

3.4 Plate ID: Optional, 可以手工输入或通过扫描仪扫描

3.5 输入反应体积: 96模块 10 – 100 µl; 384模块 5 – 20 µl

- 4、定义 PCR 程序中的每个步骤 (Program Name) 及循环数(Cycles)和分析模式 (Analysis Mode)。利用“+”和“-”增加或删除步骤。

- 5、设定每个步骤的温度, 时间, 变温速率及信号获取模式。利用“+”和“-”增加或删除步骤。

Ramp Rate (°C/s)	Heating up	Cooling down
96-well block:	1.0 – 4.4°C/s	1.0 – 2.2°C/s
384-well block:	1.0 – 4.8°C/s	1.0 – 2.5°C/s



设定降温速率时的注意事项:

96模块:

目标温度在 50°C及以上, 变温速率为 2.2°C/s. 目标温度低于50°C, 变温速率为1.5°C/s!

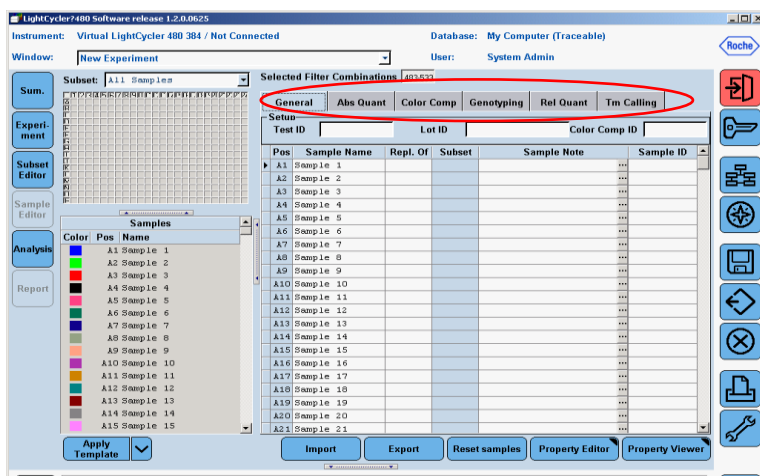
384模块:

目标温度在 50°C及以上, 变温速率为 2.5°C/s. 目标温度低于50°C, 变温速率为2.0°C/s!

*Note:* 屏幕下方的 Overview 一栏中, 将同步出现温度变化的曲线, 并以绿色圆点标识荧光的获取位置。

## (二) 样本的编辑

### 1、点击“Sample Editor”模块



2、点击“General”样品列表, 可输入样品的基本信息。

3、选择以将要进行的分析命名的样品列表, 输入相应的样品信息。

Sample Type:

Abs Quant: unknown, standard

Genotyping: unknown, Positive control, Negative control, Melting Standard

Rel Quant: target unknown, target calibrator, target standard, target negative, reference unknown, reference calibrator, reference standard, reference negative

Color comp: water, 选定的检测通道

4、点击“Subset Editor”可进行子集编辑

4.1 点击‘New’, 命名一个子集, 拖动鼠标选定区域后点击‘Apply’确认;取消选定区域时, 先点击“Clear”再点击“Apply”完成。

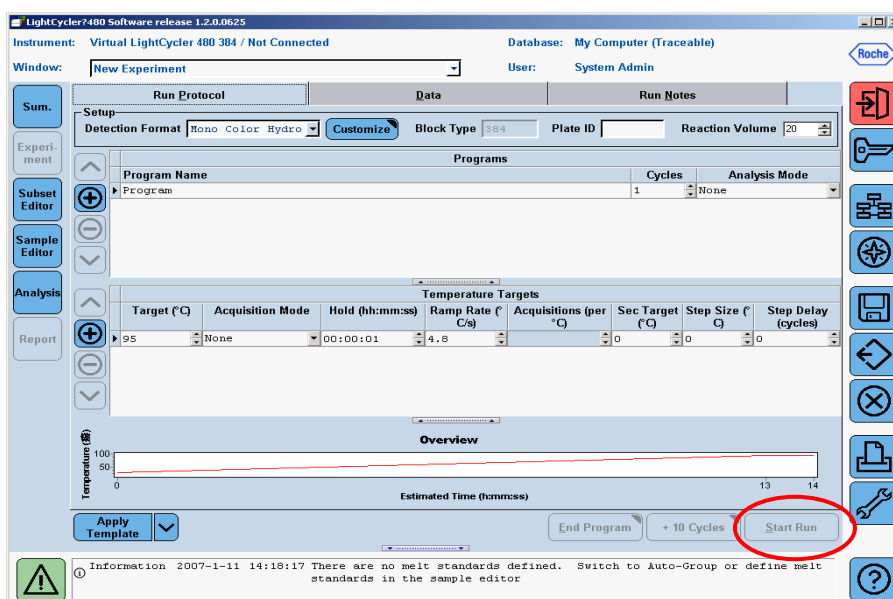
4.2 使用 ‘Copy’、‘Rename’、‘Delete’ 模块复制，重命名或删除一个子集。



- Note:
- \* 编辑时可用 Ctrl C 和 Ctrl V 进行复制和粘贴
  - \* 可使用 “Property Editor” 功能进行子集样品信息的快速编辑。
  - \* 样品信息的编辑可在程序运行前，运行中或结束后进行

### (三) 程序的运行

- 1、点击 “Experiment” 模块，回到程序设定界面。
- 2、如果已经加载样本，则窗口右下方的 “Start Run” 为可点击状态，点击即开始运行。若未加载样本，则该模块显示为灰色，只有在加载样本后才变成激活状态。

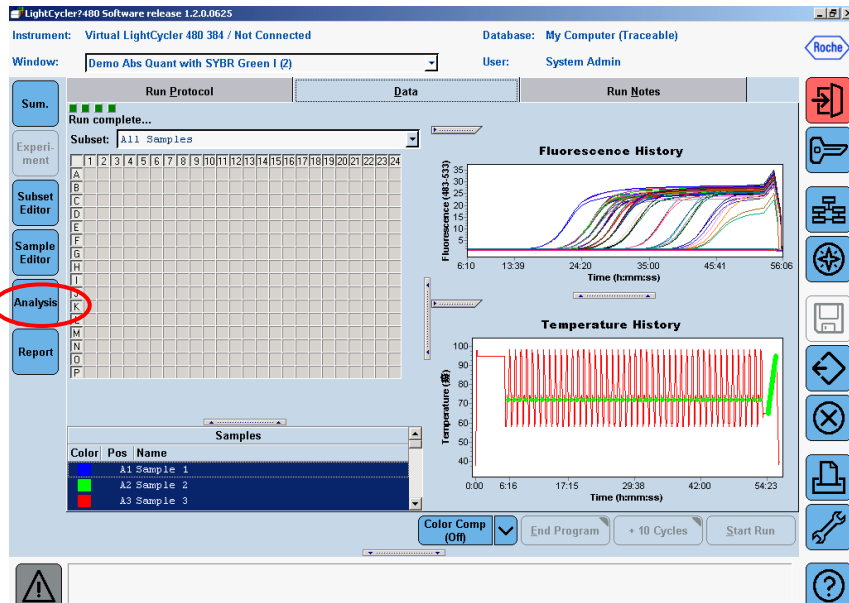


- 3、结果保存窗口自动跳出，输入文件名并选择一个合适的路径保存。
- 4、自动进入程序运行界面。

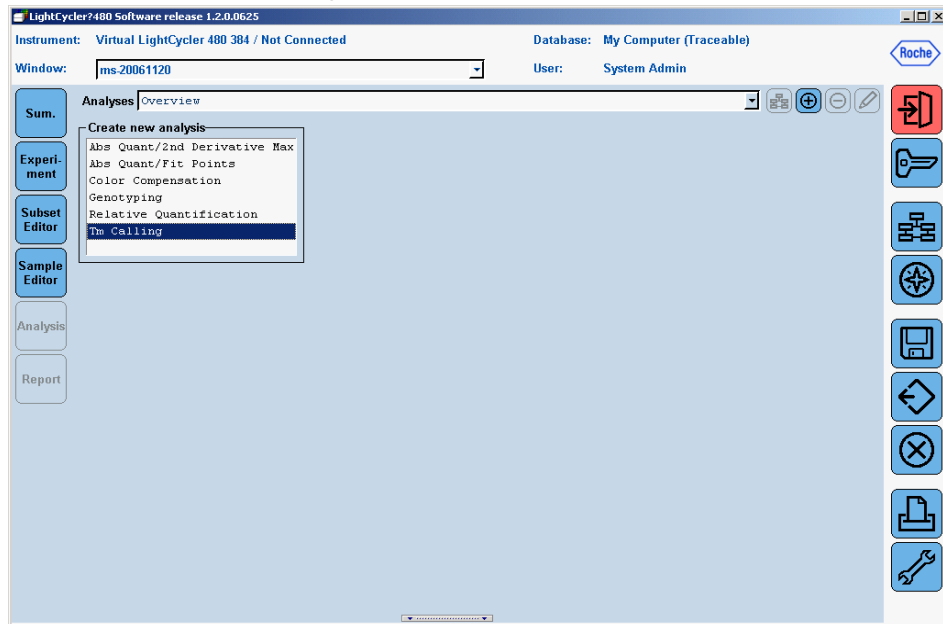
Note: 程序运行过程中可随时中止当前的 program 进入下一个 program，或者以 10 的倍次增加循环数。

## 三、实验结果的分析

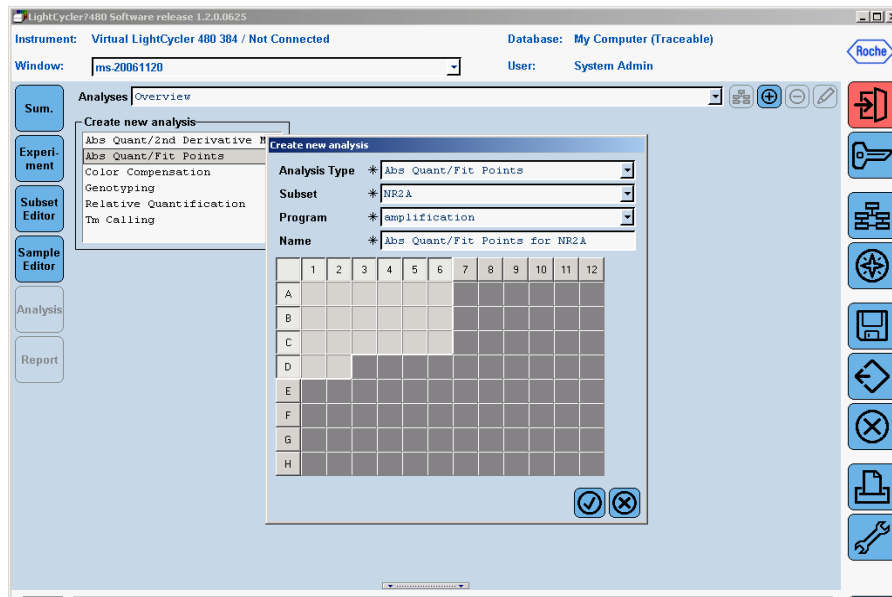
- 1、点击左侧 “Analysis” 模块



- 2、在“Creat new analysis”下拉框中选择分析的类型并双击：Abs Quant/2<sup>nd</sup> Derivative Max, Abs Quant/ Fit Points, Color Compensation、Genotyping, Relative Quantification 或 Tm Calling



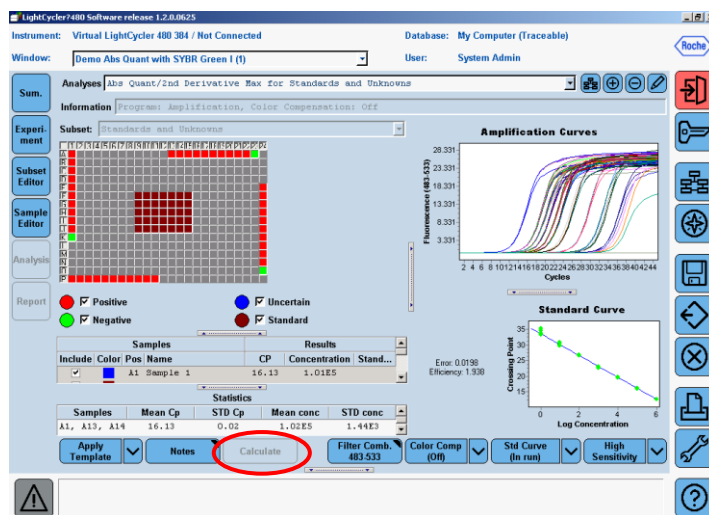
- 3、在跳出的对话框中从各下拉框中分别选定分析的范围、分析模式和分析的程序，并可命名该分析。



4、分析：

4.1 绝对定量分析：自动法（2<sup>nd</sup> Derivative Maximum 二次最大导数法）

点击“Calculate”查看结果



4.2 绝对定量分析：手动法（Fit Points）

4.2.1 选定分析范围。默认为第一个至最后一个循环

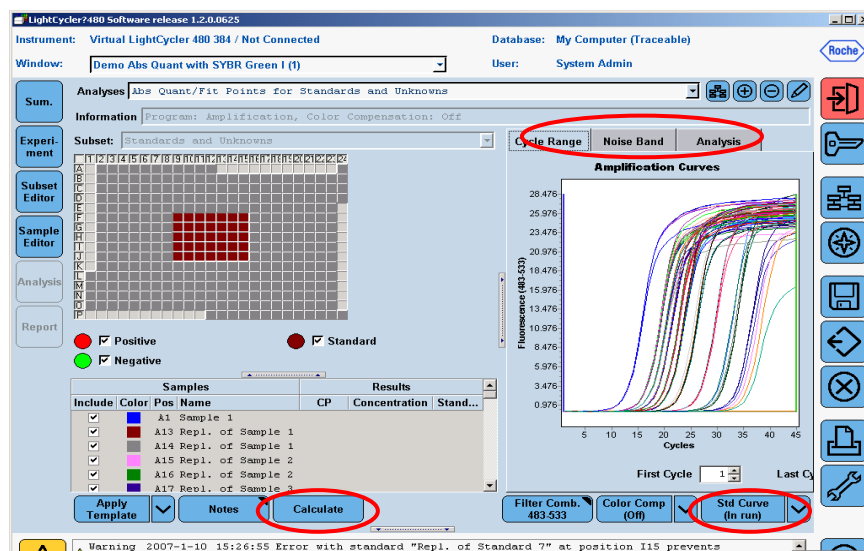
4.2.2 点击“Noise Band”，调整噪音线位置，推荐采用“Noiseband(Fluro)”

方法以上下移动噪音线位置的方式调整，调整时遵循以下四条原则：

(1) 在阴性线之上；(2) 与所有曲线相交；(3) 相交在平滑区；(4) 符合上述三条原则的情况下，噪音线的位置尽可能地低

4.2.3 点击“Analysis”进行结果分析

4.2.4 点击“Calculate”进行 Cp 值及标准曲线计算。



### 4.3 相对定量分析

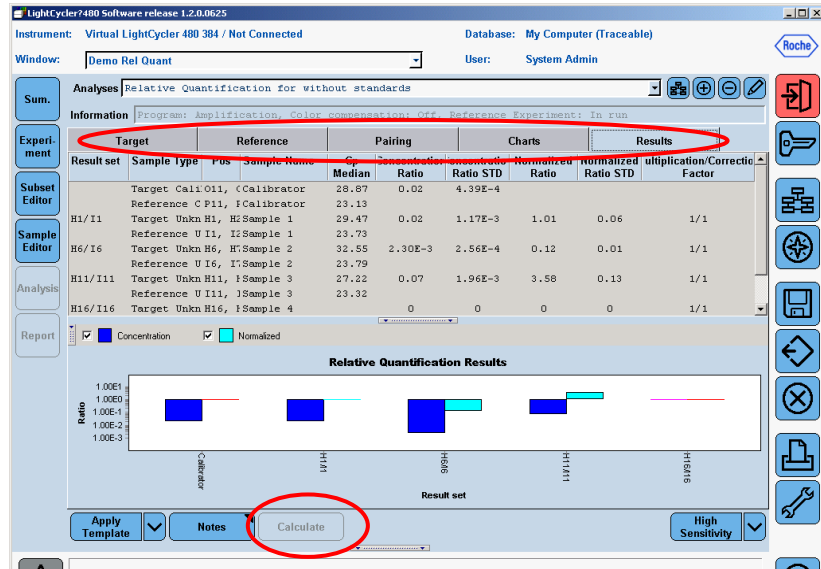
4.3.1 在跳出的对话框中选择合适的选项：

推荐在 Auto Pair 选择框前打勾

4.3.2 如果是在同一 RUN 中包含有 Reference，则直接进入后一的界面；如果 Reference 和 Target 不在同一块板上运行，则调用外部 Reference 数据后进入后一界面。

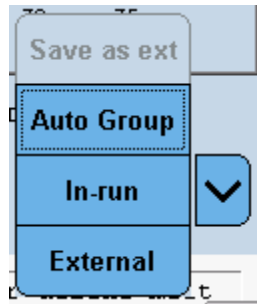
4.3.3 结果图中默认扩增效率为“2”；如果要进行效率校准的相对定量分析，并且 relative standard 包含在本实验中，点击“Calculate”进行标准曲线的计算。

4.3.4 可分别点击‘Target’、‘Reference’、‘Paring’、‘Charts’和‘Result’模块查看目标基因，参考基因，配对（如果在 4.3.1 中没有选择 Auto Pair，则在此模块中进行手动配对），图表和最后相对定量的结果。（notes: 点击‘Result’、‘Paring’或‘Charts’模块中任意一个‘Calculate’就可得到计算结果）



#### 4.4 基因分型分析

##### 4.4.1 根据实际情况，选择 Standards



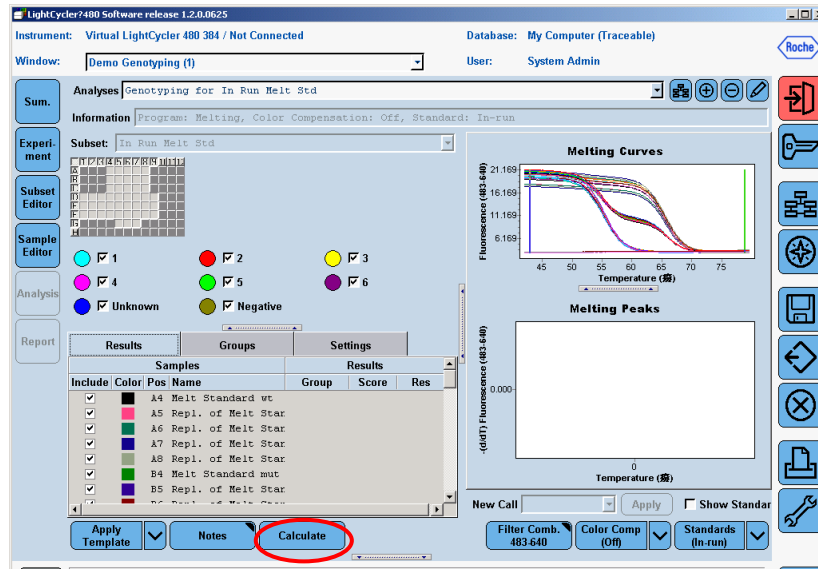
Save as ext: 将本次实验的标准曲线存为外标准曲线

Auto Group: 自动分组

In-run : 标准品包含在本次实验中

External : 调用外标准曲线

##### 4.4.2 点击 'Calculate' 进行结果计算

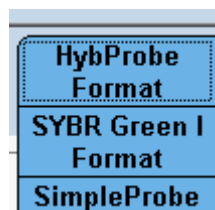


#### 4.5 Tm calling

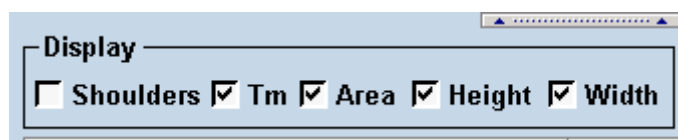
##### 4.5.1 确认熔解曲线峰的数目



##### 4.5.2 选择所用的检测模式



##### 4.5.3 点击“Calculate”进行结果计算，并通过选择下述各项查看各熔解峰的具体情况



#### 四、结果报告

- 保存实验数据后，在链接有打印机的情况下，“Report”模块变成激活状态
- 点击“Report”
- 在树形 folder 中选择报告所需的内容
- 点击“Generate”产生报告并打印

## 第三部分 数据管理及模块化操作

### 一、历史数据的处理

#### (一) 查看



- 选择窗口右侧的“Navigator”
- 树形 folder 中选择需要打开的文件名
- 双击或点击下方的“Open”打开文件

#### (二) 数据的导入和导出

- 选择窗口右侧的“Navigator”
- 利用窗口下方的“Import”、“Export”、“Batch import”、“Batch export”分别完成单个文件的导入、导出及多个文件的同时导入、导出。

## 二、应用 Template 和 Macros 简化实验流程

### (一) Template

“Analysis”，“Report”，“Experiment”，“Sample Editor”及“Subset Editor”界面的左下方，有一“Apply Template”的模块，点击其下拉框，出现“Save As Template”模块，点击该模块，跳出一个保存路径的对话框，输入文件名、选择合适的路径并确认，则相应界面的 Template 成功保存。

应用某一 Template，则点击“Apply Template”，在跳出的对话框中选择相应的文件名并确认即可。


### (二) Macros

“Sum”界面中点击“Save as macro”，跳出的对话框中输入文件名，选择合适的路径并确认。

应用某一 Macros，则点击“Overview”，选择所需的 Macros 文件并点击“Run macros”

## 第四部分 用户管理

### 一、建立新的帐号

- (一) 点击“Tools”
- (二) 点击 User Access 文件夹中的 Users and Groups
- (三) 点击“New”增加用户，并设定用户名、密码并选择用户等级

## 第五部分 日常维护

仪器外壳，热循环模块及热盖可用 70% 的酒精清洁。

Notes: 务必在切断电源，关机状态下进行清洁工作。

注意: 未尽处请参考随仪器附赠英文版说明书。







[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)



罗氏诊断产品（上海）有限公司

应用科学部/分子诊断部

中国 上海 200031