



注册证号：国食药监械（进）
产品标准：YZB
生产企业：Roche Diagnostics Ltd.,
地 址：Forrentrasse CH-6343 Rotkreuz, Switzerland
联系电话：41-41 799 22 05

LightCycler® 480 实时荧光定量PCR仪操作说明书 软件版本1.5



| | | |
|--|----|---|
| | 前言 | 9 |
|--|----|---|

| | | |
|-----|--------------------------------|----|
| 一. | 修订史..... | 9 |
| 二. | 联系地址..... | 9 |
| 三. | 一致性申明..... | 10 |
| 四. | 保证..... | 10 |
| 五. | 商标..... | 10 |
| 六. | 用途..... | 12 |
| 七. | LightCycler® 480许可声明..... | 12 |
| 八. | 软件许可协议..... | 13 |
| 九. | 导言..... | 17 |
| 十. | LightCycler® 480仪器操作手册的用法..... | 17 |
| 十一. | 本手册习惯用法 | 18 |
| | 文字习惯用法..... | 18 |
| | 符号..... | 18 |
| 十二. | 警告和预防..... | 19 |
| | 操作要求..... | 20 |
| | 一般注意事项..... | 21 |
| | 用电安全..... | 22 |
| 十三. | 仪器处理..... | 23 |

| | | |
|---|----|----|
| A | 概述 | 24 |
|---|----|----|

| | | |
|-------|----------------------------|----|
| 1. | 介绍..... | 26 |
| 2. | LightCycler® 480仪器规格..... | 27 |
| 2.1 | 一般规格..... | 27 |
| 2.2 | 环境参数..... | 27 |
| 2.3 | 接口..... | 28 |
| 2.4 | 样本容量 | 28 |
| 2.5 | 运输..... | 28 |
| 2.6 | 计算机..... | 28 |
| 3. | 检测单位规格..... | 29 |
| 3.1 | 激发..... | 29 |
| 3.2 | 探测器 | 29 |
| 3.3 | 滤光片..... | 29 |
| 3.3.1 | LightCycler® 480 I滤光片..... | 29 |
| 3.3.2 | LightCycler® 480II滤光片..... | 29 |
| 4. | 温度温控模块控制器规格..... | 30 |
| 5. | 多孔板条形码扫描器规格..... | 31 |
| 6. | 手提式条形码扫描器规格. | 32 |

| | | |
|---|------|----|
| B | 系统描述 | 33 |
|---|------|----|

| | | |
|-------|------------------------------------|----|
| 1. | 系统包装 | 35 |
| 2. | 安装 | 36 |
| 2.1 | 安装要求..... | 36 |
| 2.2 | 空间和电源要求..... | 36 |
| 2.3 | 环境要求..... | 38 |
| 2.4 | LightCycler® 480 仪器安装 | 39 |
| 3. | 系统描述 | 43 |
| 3.1 | LightCycler® 480仪器描述..... | 43 |
| 3.2 | 温控模块单元描述..... | 47 |
| 3.3 | 检测单元描述..... | 50 |
| 3.4 | 检测通道描述..... | 52 |
| 3.4.1 | LightCycler® 480 I通道..... | 52 |
| 3.4.2 | LightCycler® 480II通道..... | 52 |
| 3.5 | LightCycler® 480仪器耗材..... | 54 |
| 3.6 | LightCycler® 480仪器PCR试剂 | 56 |
| 3.7 | 所需的额外设备..... | 57 |
| 3.8 | LightCycler® 480 仪器实时PCR检测格式 | 57 |
| 3.8.1 | 概述..... | 57 |
| 3.8.2 | 使用SYBR Green I监测PCR | 59 |
| 3.8.3 | 使用水解探针监测PCR | 61 |
| 3.8.4 | 使用HybProbe探针监测PCR..... | 63 |
| 3.8.5 | 使用SimpleProbe探针研究基因分型..... | 65 |

| | | |
|---|----|----|
| C | 操作 | 66 |
|---|----|----|

| | | |
|----|-----------------------------------|----|
| 1. | 介绍..... | 68 |
| 2. | 系统的启动..... | 69 |
| 3. | 准备和开始 LightCycler® 480 仪器的运转..... | 70 |
| 4. | 更换LightCycler® 480温控模块..... | 72 |

| | |
|--------|--|
| 基础软件功能 | |
|--------|--|

| | | |
|-------|--------------------------------------|-----|
| 1. | LightCycler® 480 基础软件总述..... | 81 |
| 1.1 | LightCycler® 480 基础软件的一般性用户界面通则..... | 82 |
| 1.2 | 启动 LightCycler® 480 的基础软件..... | 83 |
| 1.3 | 关于 LightCycler® 480 的基础软件的主窗口..... | 85 |
| 1.4 | 选择与浏览属性..... | 90 |
| 1.4.1 | 浏览器..... | 94 |
| 1.4.2 | 查询表..... | 94 |
| 1.4.3 | 样品选择器..... | 98 |
| 1.4.4 | 样品表..... | 101 |
| 1.5 | 导出与导入文件与对象..... | 102 |
| 1.5.1 | 导出单个的 LightCycler® 480 基础软件的对象..... | 103 |
| 1.5.2 | 同时导出多个实验文件..... | 104 |
| 1.5.3 | 导入单个文件..... | 106 |
| 1.5.4 | 同时导入多个文件..... | 107 |
| 2. | 实验的编程与运行..... | 110 |
| 2.1 | 实验的编程..... | 111 |
| 2.1.1 | 设定检测格式..... | 113 |
| 2.1.2 | 定义程序与目标温度..... | 114 |
| 2.1.3 | 定制在线数据显示..... | 118 |
| 2.2 | 运行实验..... | 119 |
| 2.3 | 输入样品信息..... | 121 |
| 2.3.1 | 样品编辑器窗口..... | 121 |
| 2.3.2 | 样品编辑器动作条..... | 122 |
| 2.3.3 | 配置样品编辑器属性..... | 123 |
| 2.3.4 | 输入样品信息..... | 124 |
| 3. | 实验性分析的总述..... | 130 |
| 3.1 | 分析步骤总述..... | 131 |
| 3.2 | 使用分析窗口..... | 133 |
| 3.2.1 | 选择滤光片组合与颜色补偿..... | 134 |
| 3.2.2 | 对样品进行分析..... | 135 |
| 3.2.3 | 在分析窗口中使用图表..... | 136 |
| 3.2.4 | 添加分析注解..... | 137 |
| 3.2.5 | 对分析进行删除或重新命名..... | 138 |
| 3.3 | 导出分析结果..... | 139 |

| | |
|------|--|
| 软件应用 | |
|------|--|

| | | |
|-------|-----------------------|-----|
| 4. | 定量..... | 142 |
| 4.1 | 概述..... | 142 |
| 4.2 | 绝对定量分析..... | 143 |
| 4.2.1 | 关于样品交叉阈值..... | 144 |
| 4.2.2 | 关于标准曲线的作用..... | 145 |
| 4.2.3 | 准备标准曲线..... | 146 |
| 4.2.4 | 用最大二阶导数法进行绝对定量分析..... | 149 |
| 4.2.5 | 用样点拟合法进行绝对定量分析..... | 152 |
| 4.2.6 | 查看结果..... | 158 |

| | | |
|--------|--------------------------|-----|
| 4.3 | 相对定量分析 | 161 |
| 4.3.1 | 概述 | 161 |
| 4.3.2 | 单色或双色实验 | 164 |
| 4.3.3 | 相对定量分析的原理 | 165 |
| 4.3.4 | 进行基本相对定量实验 | 167 |
| 4.3.5 | 进行高级相对定量实验 | 169 |
| 4.3.6 | 进行相对定量分析 | 175 |
| 4.3.7 | 查看结果 | 180 |
| 4.3.8 | 配对样品和生成结果集 | 181 |
| 4.3.9 | 外部标准曲线 | 184 |
| 4.3.10 | 补充信息 | 185 |
| 5. | 进行 T _m 熔解曲线分析 | 188 |
| 5.1 | 使用熔解曲线特征进行 DNA 产物和基因型的鉴定 | 188 |
| 5.1.1 | 定义熔解程序 | 188 |
| 5.1.2 | 熔解温度分析的内容 | 189 |
| 5.2 | 进行熔解温度调用分析 | 190 |
| 6. | 基因分型 | 198 |
| 6.1 | 概述 | 198 |
| 6.2 | 终点法基因分型分析 | 199 |
| 6.2.1 | 概述 | 199 |
| 6.2.2 | 终点法基因分型的原理 | 201 |
| 6.2.3 | 进行终点法基因分型实验 | 201 |
| 6.2.4 | 进行终点法基因分型分析 | 207 |
| 6.2.5 | 辅助功能 | 213 |
| 6.3 | 熔解曲线基因分型分析 | 214 |
| 6.3.1 | 概述 | 214 |
| 6.3.2 | 熔解曲线基因分型分析的原理 | 216 |
| 6.3.3 | 进行熔解曲线基因分型实验 | 217 |
| 6.3.4 | 辅助功能 | 227 |

| |
|---------------|
| 高级软件功能 |
|---------------|

| | | |
|--------|----------------------|-----|
| 7. | 进行颜色补偿分析 | 230 |
| 7.1 | 进行颜色补偿实验 | 231 |
| 7.2 | 使用颜色补偿 | 237 |
| 8. | 使用模板和宏工作 | 238 |
| 8.1 | 创建和使用模板 | 238 |
| 8.2 | 创建和使用宏 | 243 |
| 9. | 使用子集工作 | 247 |
| 10. | 使用图表工作 | 249 |
| 10.1 | 打印、导出与复制图表 | 250 |
| 10.2 | 变焦和变位以查看图表细节 | 254 |
| 11. | 使用表格工作 | 256 |
| 12. | 生成报告 | 258 |
| 13. | 使用选项“Preference”工作 | 262 |
| 13.1 | 使用图表选项 | 263 |
| 13.1.1 | 设定图表表头及标签类型 | 264 |
| 13.1.2 | 设定荧光图表的内容 | 265 |
| 13.1.3 | 设定标准曲线图表的外观 | 266 |
| 13.1.4 | 设定温度图表的内容与外观 | 267 |
| 13.1.5 | 覆盖默认的图表选项 | 267 |
| 13.1.6 | 创建单独的图表选项项目并将其作为默认项目 | 270 |
| 13.2 | 使用样品选项 | 271 |
| 13.3 | 设定用户选项 | 272 |
| 14. | 管理工具 | 273 |
| 14.1 | 管理用户访问 | 274 |
| 14.1.1 | 关于用户帐户 | 274 |
| 14.1.2 | 关于组 | 275 |
| 14.1.3 | 关于角色 | 275 |
| 14.1.4 | 一般用户的权限 | 276 |
| 14.1.5 | 高级用户角色的特权 | 276 |

| | | |
|---------|------------------------------|-----|
| 14.1.6 | 本地管理员的特权 | 277 |
| 14.1.7 | 用户访问对象 | 278 |
| 14.1.8 | 管理用户、组和角色 | 281 |
| 14.1.9 | 使用角色工作 | 286 |
| 14.1.10 | 修改您的密码 | 287 |
| 14.2 | 报告的设置 | 288 |
| 14.3 | 错误日志 | 289 |
| 14.4 | 数据库信息 | 290 |
| 14.4.1 | 跟踪型和研究型数据库 | 290 |
| 14.4.2 | 如何清空数据库 | 291 |
| 14.4.3 | 压缩数据库 | 293 |
| 14.4.4 | 如何处理来自 1.3 版或更早版本软件的数据库 | 293 |
| 14.4.5 | 如何处理来自 1.3 版或者更早版本软件的对象 | 294 |
| 14.5 | 仪器 | 295 |
| 14.6 | 检测格式 | 298 |
| 14.7 | 设置平板类型 | 301 |
| 15. | 诊断工具 | 302 |
| 15.1 | 仪器问题报告 | 302 |
| 15.2 | 错误日志 | 303 |
| 15.3 | 自我测试 | 303 |
| 16. | LightCycler® 480 的基础软件的安装与维护 | 304 |
| 16.1 | 安装 LightCycler® 480 的基础软件 | 305 |
| 16.2 | 启动 LightCycler® 480 软件和连接仪器 | 309 |
| 16.3 | 保存现有的数据库和安装其他数据库 | 312 |
| 16.4 | 登录到不同的数据库 | 316 |
| 16.5 | 用一个数据库文件替换一个已存在的同名数据库 | 317 |
| 16.6 | 建立客户机/服务器网络 | 318 |
| 16.7 | 删除 LightCycler® 480 的基础软件 | 322 |

| | | |
|--|----|-----|
| | 维护 | 323 |
|--|----|-----|

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 1. | 常规维护..... | 325 |
| 2. | 仪器清洁操作指南 | 325 |
| 2.1 | 常规清洁..... | 325 |
| 2.2 | 预防性维护..... | 325 |
| 3 | 更换氙灯..... | 326 |
| 4 | 更换风道灰尘过滤器..... | 330 |
| 5 | 更换保险丝 | 332 |

| | | |
|---|----|-----|
| F | 附录 | 337 |
|---|----|-----|

| | | |
|----|-----------|-----|
| 1. | 订购信息..... | 339 |
|----|-----------|-----|

前言

一、修订史

| 版本 | 时间 |
|-----|---------|
| 1.0 | 2005年1月 |
| 2.0 | 2006年6月 |
| 3.0 | 2008年2月 |

© 版权2008, Roche Diagnostics GmbH. 版权所有.

本手册信息可以在未经通知的情况下变更。未经罗氏诊断公司明确书面同意, 本手册所有内容不得以任何目的通过任何形式或任何方法(包括电子和机械手段)复制或传播。


有关本手册的问题和建议可以直接向以下地址或您的罗氏诊断公司代表提出。

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science Customer Support
Nonnenwald 2
82372 Penzberg, Germany



罗氏诊断已尽一切努力确保*LightCycler® 480*仪器操作手册付印时内容正确无误。

然而, 罗氏诊断仍有权未经通知即进行必要的修改, 以顺应其产品发展的需要。

二、联系地址

| | | |
|---|-------|---|
|  | 制造商 | Roche Instrument Center AG Forrenstrasse CH-6343Rotkreuz Switzerland |
| | 销售商 | Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Straße 116 D-68305 Mannheim Germany |
| | 美国销售商 | Roche Diagnostics 9115 Hague Road PO Box 50457 Indianapolis, IN 46250 USA |

三、一致性申明

| | |
|---|--|
|  | <p>本仪器符合欧盟关于“电磁兼容性的”理事会指令89/336/EEC和关于“低电压设备”的理事会指令73/23/EEC中规定的要求。以下标准适用： IEC/EN 61326（EMC）及IEC/EN 61010-1（安全性）</p> |
|  | <p>测量，控制和实验室用UL 61010-1电气设备；第一部分： 一般要求 CAN/CSA-C22.2 No. 61010-1 （第二版） —测量，控制和实验室用电气设备的安全性要求 第一部分： 一般要求</p> |

四、保证

有关保证条件的信息会在销售合同中详细说明。欲知更多详情，请与您的罗氏公司代表联系。

对本仪器任何未经授权的修改将导致担保和维修合同无效。

五、商标

LIGHTCYCLER, LC, HYBPROBE和SIMPLEPROBE是罗氏公司的注册商标。

PROBELIBRARY 是位于丹麦维比克（Vedbaek）市的Exiqon A/S公司注册商标。通用探针库（Universal ProbeLibrary）属于Exiqon A/S公司拥有的美国和其他专利应用。

SYBR 是位于美国俄勒冈州Eugene市的Molecular Probes, Inc.公司的商标。

FAM和HEX都是位于美国康涅狄格州Norwalk市的Applied Biosystems公司的商标。

其他品牌和产品名称分别为其各自持有者的商标。

六、 预定用途

LightCycler® 480仪器预定用于实施快速、准确的聚合酶链反应（PCR）以及实时、在线检测从而可对靶核酸进行绝对或相对量化，同时还可通过分析熔解曲线对扩增的核酸进行后PCR分析。

LightCycler® 480仪器预定用于一般实验室用途，而且必须由受过实验室技术方面的培训且学习过该仪器使用说明书的实验室专业人士专门操作。**LightCycler® 480仪器不能用于诊断过程。**

七、 LightCycler® 480仪器许可声明

LightCycler® 480 实时PCR系统是获得许可的温度循环反应器。其购买价格包含对豪夫迈·罗氏有限公司（“Roche”）拥有的美国专利号4683202，4683195 及 4965188的非美国同类产品的许可证前期费用部分，该费用包括聚合酶反应（PCR）过程，因而可使用该仪器执行PCR过程进行内部研发。该许可证中需支付定期使用费的专利部分可以从Applied Biosystems公司（美国应用生物系统公司）购买，也可以通过购买经授权的试剂而获得。该仪器还是一台经授权的温度循环反应器，可用于经Applied Biosystems公司授予应用许可证的用途。其与经授权的试剂一同使用时，根据此类试剂所附带的标签上的权利，该仪器还提供限制性的PCR许可。

购买该产品本身并不赋予购买者实施PCR过程的全部许可或权利。

LightCycler® 480 实时PCR系统是经许可的温度循环反应器，可用于美国专利号6814934及其非美国同类产品的相应申明，及美国专利号5038852、5656493、5333675中的其中一项或多项及其非美国同类产品的相应申明中提及的研究用途，这些专利均归Applera公司所有。任何其他专利声明中，如对设备、试剂、试剂盒以及如5' 核酸酶法的研究方法的声明，未进行任何明示、默示或禁止反悔形式的权利转移。该仪器只能用于研究。欲了解有关购买使用许可证（体外诊断除外）的更多信息，请联系Applied Biosystems公司的许可证发放主任，地址，850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA。

LightCycler® 480 系统中使用的部分软件经位于美国犹他州盐湖城的IdahoTechnology公司许可。

The LightCycler® 480仪器和LightCycler® 480基础软件属于美国专利5871908的组成部分并共同获得Evotec OAI AG公司的独家许可。

八、软件许可协议

在安装LightCycler® 480软件（后文中称“软件”）之前，请仔细阅读以下软件许可协议中的条款和条件（称“协议”）。实施软件安装意味着对该协议中条款和条件的接受。一经接受本协议条款和条件，终端用户（“被许可人”）将承担因选择该使用软件实现既定目标及其安装及后续使用所引发的所有全部责任和义务。如果被许可人不愿意受本协议中条款和条件约束，其应立即将软件包连同收据复印件归还到罗氏公司（“供应商”），并据此获得该软件退款。

1. 程序许可协议

被许可人将承担因选择使用该软件完成既定目标及其安装和后续使用所引发的所有责任和义务。软件受版权保护。

2. 软件许可的授予

如果被许可人同意持续遵守下文中的所有条款，供应商将授予被许可人根据本协议中条款及条件使用该软件的非独占及一次性使用许可。

被许可人可以：

a. 一次在三个工作站上使用该软件，此类工作站应以网络或其他配置形式由被许可人拥有、租借或以其他方式掌控。

b. 通过向其他方转让本协议权利而转让该软件，但其他方应书面同意接受本协议条款和条件。此外，被许可人必须确保版权声明保留在被转让的软件中。

被许可人不得：

a. 部分或全部使用该软件，除非本协议有明文规定。

b. 一次在三个以上工作站使用该软件。

c. 复制、销售、或以其他方式向其他方转让该软件或转让其在本协议中的权利的全部或部分，除非本协议有明文规定。

d. 租赁、分销，许可或再许可该软件。

e. 根据该软件编制衍生软件。

f. 修改、改编、转换、反向工程、反向编译或分解该软件。

供应商保留此处未明文赋予的所有权利，包括但不限于直接或通过附属公司、分销商和/或第三方销售该软件的权利

欲知更多详情，请联系您所在地的罗氏应用科学支持机构。您可登录以下网址查找联系信息：

www.rosche-applied-science.com.

3. 有限保证

软件以“现状”提供，且无任何形式的明示或暗示保证，包括但不限于适销性、特殊用途适宜性的暗示保证。如果软件经证实存在缺陷，被许可人应承担软件质量和性能方面的全部风险。被许可人承担软件所有必要的维修、修理或修改费用。但是，供应商保证，在自您收据复印件上注明的交付日起 90 天的正常使用期限内，装配该软件的程序媒介在材料和工艺上无缺陷。供应商不作其他明示或暗示的担保或保证。

4. 免责声明

上段规定的保证将取代在执行、交易、商业使用或其他过程中由法律规定的所有其他明示或暗示的保证。供应商及控制供应商、被供应商（“供应商附属公司”）控制或共同控制的任何实体特别声明拒绝作出包括但不限于以下任何形式的任何明示或暗示保证，这些保证包括但不限于，适销性、特定用途适宜性及非侵权性的暗示保证。供应商及供应商附属公司不作有关该软件或被许可人或任何第三方将从该软件取得的成果方面的任何声明或保证。被许可人承认除本协议特别明确规定的责任或保证外，其未曾要求供应商或供应商附属公司作出任何声明或保证。

5. 补救措施的限制

供应商的唯一责任及对被许可人的唯一补救措施应是：

- a. 将不符合供应商有限保证的程序媒介连同被许可人收据复印件退还供应商并更换该程序媒介。
- b. 如果供应商不能免费更换在材料和工艺上无缺陷的程序媒介，被许可人可将软件及被许可人向供应商开具的收据复印件退还供应商从而终止本协议，而被许可人的付款将被退回。

在任何情况下，对于直接或间接因该软件、本协议或本协议终止而引起或与此相关的被许可人或第三方可能发生或经历的任何特殊、间接、偶然以及继发性损失（包括但不限于亏损、数据或信息丢失、软件功能丧失、经营中断、商业信誉或声誉受损或停工成本），供应商或其任何下属机构（或其各自的官员、员工、顾问、律师或代理人）不承担任何责任，即使供应商或其下属机构已被告知此类损失的可能性且尽管出现了任何关键功能的运行故障。对于与本协议、或该软件相关或由此引发的任何原因及任何行为形式造成的损失，供应商及其下属机构（及其各自官员、员工、顾问、律师、及代理人）共同承担的全部责任应限于，由供应商自行决定更换该软件、或退还供应商或其附属机构从被许可人处收到的与该软件相关的款项。

6. 基本信息

除非本协议明确规定，被许可人不得再许可、转让、或转移部分或全部该许可或软件。应避免再许可、转让或转移本协议规定的任何权利、责任或义务的任何其他做法。

7. 知识产权

被许可人只拥有本协议第二部分中明确规定的对该软件的权利。与该软件相关的任何其他权利，包括但不限于所有权和专利权、版权、商标、商业秘密以及其他知识产权，应为供应商独家所有财产。被许可人不能从软件中删除提及版权、商标或其他所有权的任何内容、或覆盖或改动提及此类信息的任何内容。被许可人应采取一切合理措施以防止对该软件任何未经授权的使用、复制、销售或出版，或未经授权即为取得该软件提供渠道的任何做法。被许可人应补偿并使供应商免于因被许可人、被许可人违反本协议或被许可人以未经本协议授权的方式使用该软件而造成的任何与供应商侵权相关的任何损失、损害、索赔及开支（包括但不限于合理的法律费用）。

8. 期限和终止

本协议在终止之前始终有效。被许可人可随时采取任何形式破坏该软件和与该软件相关的文件从而终止本协议。如被许可人未能遵守本协议任何条款和条件，则本协议将自动终止，供应商无需发出通知。被许可人同意，供应商一经终止协议，其应将软件销毁。无论本协议以何种方式终止，被许可人拥有的软件全部使用权将随之失效。

9. 软件的输入，输出和使用

被许可人应全权负责确保遵守与其输入、输出或使用该软件的权利相关的法规。

10. 其他事项

如本协议任何条款被具有司法管辖权的法院宣布为无效或不可执行，其余条款仍将继续具有完全的效力和效应。

供应商未能行使本协议中的任何权利不应视为对其权利的放弃，包括但不限于其对今后违反行为的回应权。

只要打开并使用该软件，被许可人即承认其已阅读并理解本协议，并且同意遵守本协议条款和条件。被许可人还同意本协议是被许可人和供应商之间完全、唯一的协议陈述，并取代被许可人及供应商之间有关本协议主题事项的任何提议或以前达成的口头或书面协议及任何其他通报。

本协议中几个部分的标题只是为了便于参考，不应成为本协议的组成部分或者影响本协议的含义和解释。

11. 适用法律及司法管辖地

本协议受美国印地安那州法律管辖，并按该州法律释义，但不影响其任何法律原则的选择。各方同意联合国国际货物买卖合同公约不适用于本协议。

九、导言

在实施LightCycler® 480仪器操作前，仔细通读这本操作员手册非常重要。违反本手册中指示将可能产生安全风险。

十、LightCycler® 480仪器操作员手册用法

本操作员手册为操作LightCycler® 480仪器提供指导。它包括以下章节：

章节A 概述包括LightCycler® 480仪器操作模式简介以及对系统规格的说明。

章节B 系统说明包括对LightCycler® 480仪器安装的指导和该系统组件及耗材的说明。

章节C 操作说明LightCycler® 480仪器的操作程序。

章节D LightCycler® 480 基础软件包括LightCycler® 480仪器运行设置和数据分析方面的指导。

章节E 维护说明LightCycler® 480仪器所需的维护程序。

章节F 附录包含索引和订购信息。

十一、本手册习惯用法




文本习惯用法

为保持传输的信息一致并可存储，本手册使用下列文本习惯用法







| | |
|--------|------------------------------------|
| 编码的列表 | 操作方法的步骤必须按照列出的顺序实施 |
| 斜体，蓝色 | 指明应参考这一特殊章节 |
| 斜体 | 描述运行 LightCycler® 480 基础软件过程中的处理方法 |
| 星号 (*) | 表明罗氏应用科学提供此产品 |

符号

在本手册中，符号作为视觉信号用于指明重要事物。

| 符号 | 标题 | 描述 |
|---|------|---|
|  | 警告 | 此符号用于说明违反操作指导或程序可能导致躯体损伤甚至死亡，还可能损害仪器。请参考本操作员手册。 |
|  | 表面高温 | 此符号用于标明仪器表面可能存在的高温。 |
|  | 生物危害 | 此符号用于说明在使用可能传染的物质时，应保持一定的警惕。 |
|  | 重要提示 | 操作成功或产品使用的关键信息 |
|  | 信息提示 | 有关当前主题或操作方法的附注 |

仪器上出现的下列符号





| | | |
|---|---------|---|
|  | 设备制造商 | 位于仪器类型板上。 |
|  | CE 标志 | 位于仪器类型板上的 CE 标志表明符合指导委员会的相关要求。 |
|  | cUL 标志 | 位于仪器类型板上 |
|  | 请参考操作手册 | 位于仪器类型板上 |
|  | 表面高温 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 位于多孔板加载器边缘。 2. 位于温控模块盖表面。 3. 位于温控模块单元表面。 4. 位于氩光源部件上。 |
|  | 生物危害 | 位于多孔板加载器边缘。 |

十二、警示和注意事项









LightCycler 480仪器只能由经过培训、熟练掌握使用方法的人员使用。

必须仔细阅读并遵守下列LightCycler®480仪器的安装和操作所需的安全信息。请保证每一位使用LightCycler®480仪器的人员能够得到这些安全信息。



操作要求

| | |
|---|--|
|  | <p>LightCycler®480仪器属于机电产品。如果用户不遵守本手册中的使用说明使用仪器，有可能会发生触电或人身伤害。</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 遵守仪器上印有或随附的各项安全指导。 ▶ 遵守各项适用于电器设备的一般安全注意事项。 ▶ LightCycler® 480仪器连接电源时，禁止接触任何带电部件。 ▶ 不得用湿手接触开关和电源线。 ▶ LightCycler®480仪器连接电源时，禁止打开外壳。 ▶ 清洗仪器时，应关闭电源开关，断开电源线。 ▶ 用户可按照本操作手册描述的方法，更换保险丝和氙灯。不得进行任何电气方面的改动，否则仪器担保无效。 ▶ 只允许经授权的维修人员提供仪器所需的维修服务。 |
|  | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 运行时，禁止打开更换温控模块的小室。 ▶ 处理有毒、腐蚀性或传染性材料时，应始终佩戴防护眼罩和手套。 |
|  | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 尽管仪器所用的是高纯度核酸，但出于自身安全考虑，应视所有生物材料为有潜在传染性的材料。应根据当地的安全指导方针处理和处置这些材料。应立即用适当的消毒液消毒溢出物，以避免对实验室人员和设备造成污染。 ▶ 清洗LightCycler®480仪器请参考 维护 章节中的指导说明。 |
|  | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 仪器运行时，多孔板架、温控模块、温控模块盖以及氙灯处于高温状态。 |

一般注意事项

| | |
|--|---|
|  | LightCycler® 480仪器的控制个人计算机或其他运行LightCycler®480软件的计算机并非为在线使用而设计。连接网络会有感染病毒、蠕虫以及成为黑客攻击目标的风险。罗氏对用户连接到网络上所导致的任何损害不负责任。 |
|  | 微软Office办公自动化软件和诺顿杀毒软件经测试不会与LightCycler®480软件和软件模块相冲突。禁止在LightCycler®480仪器所用的控制/数据分析计算机中安装其他软件。否则会有与LightCycler® 480软件和软件模块发生冲突的风险，还可能影响结果的可靠性。 |
|  | 不提供杀毒软件。 因此，有必要采取预防措施确保LightCycler®480仪器的控制/数据分析计算机上所装的其他软件没有病毒。 |
|  | 不允许将两台LightCycler®480仪器连接到同一台计算机。 |
|  | 确保总开关随时处于易被操作的位置。 |
|  | 不正确的摆放会产生错误的结果，并且损伤仪器部件。请仔细遵循安装指导操作。仪器移动须有合格的罗氏维修人员实施。 |
|  | 电火花会产生爆炸的危险。请将潜在易燃或易爆性物质（如麻醉气体）远离仪器。液体喷洒到带电部件上会产生短路，引起火灾。仪器连接电源时，应将仪器盖紧闭，不要在仪器周围喷洒液体。灭火时，应将仪器与电源断开。 |
|  | 切勿随意拨弄仪器。 |

用电安全

| | |
|---|---|
|  | LightCycler® 480 仪器的设计符合 I 级保护 (IEC)。仪器的底板/外壳通过地线连接安全保护地 (PE)。为防止电击的危险, 仪器应直接连接合格的电源如 230 伏电线的三相接地插座。如果使用的是不能接地插座, 应根据当地电气规范让合格的电工更换正确 (PE) 的接地插座。任何电接地通路中断, 不管是在仪器内部或外部, 都会造成危险情况。任何情况下, 用户都不要试图修改或故意破坏仪器安全装置。如果电源线破裂、磨损或断开, 应立即更换罗氏诊断提供的相同部件。 |
|  | <i>对于互动和非推荐功能, 应注意警告。必须考虑到误操作发生的可能范围。应注意到可能发生的后果。</i> |

十三、仪器处理



该仪器应作为被生物污染的危险废弃物处理。在重新使用，回收再用或处置之前，需对仪器进行净化（即一个综合过程：包括清洗、消毒和/或杀菌）。

应根据当地规定和/或劳动法规处理该仪器。如需更多信息，请与当地罗氏技术支持人员联系。

概述



章节 A 概述

LightCycler® 480 仪器操作模式简介和系统规格描述

| A | 概述 | 24 |
|-------|----------------------------|----|
| 1. | 介绍..... | 26 |
| 2. | LightCycler® 480仪器规格..... | 27 |
| 2.1 | 一般规格..... | 27 |
| 2.2 | 环境参数..... | 27 |
| 2.3 | 接口..... | 28 |
| 2.4 | 样本容量 | 28 |
| 2.5 | 运输..... | 28 |
| 2.6 | 计算机..... | 28 |
| 3. | 检测单位规格..... | 29 |
| 3.1 | 激发..... | 29 |
| 3.2 | 探测器 | 29 |
| 3.3 | 滤光片..... | 29 |
| 3.3.1 | LightCycler® 480 I滤光片..... | 29 |
| 3.3.2 | LightCycler® 480II滤光片..... | 29 |
| 4. | 温度温控模块控制器规格..... | 30 |
| 5. | 多孔板条形码扫描器规格..... | 31 |
| 6. | 手提式条形码扫描器规格. | 32 |

概述

1. 介绍

LightCycler® 480系统能进行实时、在线的96或384个样本快速循环扩增PCR 反应(依赖安装的温控模块)。通过监测核酸扩增时的荧光,可对产生的结果定量检测和同时进行分析。光学检测系统利用不同的探针格式进行序列特异性检测,可完成多元PCR应用(例如, HybProbe探针、SimpleProbe 探针、水解探针,或其他探针格式;探针的荧光基团必须与LightCycler® 480仪器的激发和发射滤光片相匹配)。利用SYBR Green I染料可进行非序列依赖在线检测,结合熔解曲线分析可进行基因分型(单核酸多态性检测)(如果使用序列特异性荧光基团标记的探针,例如HybProbe 探针或SimpleProbe 探针)以及PCR产物鉴定(如果使用SYBR Green I染料)。有关方法和数据分析的详细情况请参考[LightCycler® 480 基础软件](#)章节。

2. LightCycler® 480 仪器规格

下文给出的是LightCycler® 480仪器规格概述

| | |
|---|---|
|  | LightCycler® 480 仪器配有一个温控模块单元，可容纳 96 孔或 384 孔格式的平板。 |
|---|---|

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| LightCycler®480 仪器, 96-孔 | Cat. No. 05 015 278 001 |
| LightCycler®480 仪器, 384-孔 | Cat. No. 05 015 243 001 |

2.1 一般规格

| | |
|---------|-----------------------------------|
| 体积 | 57.4 × 58.8 × 49.7 cm (W × D × H) |
| 重量 | 55 kg |
| 电力供应/消耗 | 200 - 240 Vac 50/60 Hz 1500 VA |
| 噪声级 | < 60 dB (A) |
| 防护级 | I |
| 安装/超额电压 | II |
| 电磁辐射 | B 级 |

2.2 环境参数

| | |
|-----------------|---|
| 运输/储存/包装允许的温度 | -25° C 至 +60° C |
| 运输/储存/包装允许的相对湿度 | 10% 至 95%，未浓缩 |
| 运行时允许的温度 | +15° C 至 +32° C |
| 运行时允许的相对湿度 | 最高 80%，在 32° C，未浓缩 最低 30%，15° C 至 +32° C |
| 运行时允许的高度/气压 | 海拔 0 - 2000 米 80 - 106 kPa |

2.3 接口

LightCycler® 480 仪器提供以下外部接口：



| 接口 | 设备 |
|-------------------|-------------------|
| IEEE1394 | CCD 相机接口（只用于维修） |
| PS/2 | 通过键盘插槽连接外置条形码扫描器 |
| LAN 10/100 Base T | 连接计算机，用于仪器控制和数据传输 |

2.4 样本容量

| | |
|----------|------------------------|
| 每次运行样本容量 | 96 或 384 |
| 样本体积 | ▶ 96孔温控模块： 10 - 100 µl |
| | ▶ 384孔温控模块： 3 - 20 µl |


2.5 运输

LightCycler® 480 仪器应装入纸板盒内的聚苯乙烯泡沫塑料容器中载运。

| | |
|--|---|
|  | 原始载运容器应密闭地运输到安装地点。交付时，请仔细检查容器。注意有形损坏的迹象，并将观察结果记录在随附的文件上。接收之前，有必要将对损伤情况的疑问报告给罗氏诊断及其运输代理商处。 |
|  | LightCycler®480 仪器运输和移位时，LightCycler®480 仪器只能使用原始包装。 |

2.6 计算机


配备齐全的控制/数据分析计算机随 LightCycler® 480 仪器一起交付。

| | |
|---|--|
|  | 只有在罗氏诊断维修工程师在客户处安装系统时，才能将 LightCycler® 480 仪器基础软件安装在控制/数据分析计算机上。 |
|---|--|

计算机符合下列的欧盟指令要求。

| | |
|---|------------------|
| ▶ | 低电压设备 73/23/EEC |
| ▶ | 电磁兼容性 89/336/EEC |

此外（美国用户），就电安全性和机械安全性而言，计算机经过美国保险商实验室公司（Underwriters Laboratories Inc.）检验。因此计算机标有 UL 和 CE 标志。

| | |
|---|--|
|  | 通过特殊软件（实验室信息管理系统，LIMS），可以通过远程控制访问计算机，还可以将计算机与其他系统结合，如自动化机器人平板加载系统。实现这些功能应安装和激活（先要获得合法的软件用户许可）LightCycler® 480 LIMS/条码模块。如需更多信息，请与罗氏公司代表联系。 |
|---|--|

3. 检测单元规格

3.1 激发

| | |
|------|------------------------------|
| 型号 | 氙灯 |
| 发光强度 | 10 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ |
| 瓦数 | 100 W |
| 寿命 | > 500 h |

3.2 检测器

| | |
|--------|---|
| 型号 | 冷单色 CCD 照相机 |
| 分辨率 | 1024 × 1344 像素 |
| 曝光时间 | 10 ms to 10 s |
| 曝光时间选择 | 自动或手动 |
| 灵敏度 | < 0.2 nmol/l 荧光素, 典型为 0.1 nmol/l (20 μl 反应容积) |
| 重复性 | CV \leq 0.15% |
| 孔间串扰 | 光学性 < 0.2% 软件纠正率 < 0.02% |

3.3 滤光片

3.3.1 LightCycler 480I 滤光片

| 激发波长 (nm) | 带通 | 半峰宽 |
|--------------|--------|-------|
| | 450 nm | 30 nm |
| | 483 nm | 35 nm |
| | 523 nm | 20 nm |
| | 558 nm | 30 nm |
| | 615 nm | 30 nm |
| 检测波长 (nm) | 500 nm | 20 nm |
| | 533 nm | 20 nm |
| | 568 nm | 20 nm |
| | 610 nm | 20 nm |
| | 640 nm | 20 nm |
| | 670 nm | 20 nm |



3.3.2 LightCycler 480II 滤光片

| 激发波长 (nm) | 带通 | 半峰宽 |
|--------------|--------|----------------|
| | 440 nm | 35 nm |
| | 465 nm | 25 nm |
| | 498 nm | 40 nm |
| | 533 nm | 25 nm |
| | 618 nm | 35 nm |
| 检测波长 (nm) | 488 nm | 20 nm |
| | 510 nm | 20 nm |
| | 580 nm | 20 nm |
| | 610 nm | 20 nm |
| | 640 nm | 20 nm |
| | 680 nm | 95 nm (低通滤波设计) |

4. 温控模块规格

| | |
|------|---|
| 温度控制 | 利用珀耳帖效应加热、冷却 |
| 温度范围 | 37 - 95° C |
| 加热速率 | 96 孔温控模块: 4.4 ° C/s 384 孔温控模块: 4.8 ° C/s |
| 冷却速率 | 96 孔温控模块: 2.2 ° C/s 384 孔温控模块: 2.5 ° C/s |

5. 多孔板条码扫描器规格

| | |
|---|--|
|  | 多孔板条码扫描器是温控模块单元的组成部分，用于 PCR 多孔板自动化鉴定和标识符跟踪。平板加载时扫描 LightCycler® 480 多孔板上的线性条码。 |
|  | 如使用多孔板条码扫描器，应获得具有合法用户许可的 LightCycler® 480LIMS/条码模块。详细信息请联系当地罗氏公司代表。 |

| | |
|----------|---|
| 所支持的条码类型 | ▶ 条码39 (250 - 500 μm; 有校验位的条码, 最小条码长度= 2) |
| | ▶ 条码 2 of 5 (250 - 500 μm; 有校验位的条码, 最小条码长度 = 2) |
| | ▶ 条码 128 (250 - 500 μm; 最小条码长度= 2) |
| 标签最大尺寸 | 68.0 × 6.5 mm |

6. 手提式条码扫描器规格

可购买手提式条码扫描器作为 LightCycler® 480 仪器的选择性附件。

| | |
|--------------------------|-------------------------|
| LightCycler® 480手提式条码扫描器 | Cat. No. 04 710 606 001 |
|--------------------------|-------------------------|

手提式条码扫描器通过键盘与控制/数据分析计算机连接。

利用手提式条码扫描器可将条码信息扫描至 LightCycler® 480 基础软件的文本输入区。

| | |
|---|---|
|  | <i>注意手提式条码扫描器型号可更改而无需通知。下面列出的规格适用于印刷本手册时所能提供的扫描器型号。</i> |
|---|---|

| |
|--|
| 接口 |
| 控制/数据分析计算机 AT & PS/2 型键盘插槽 |
| 支持的条码类型 |
| <ul style="list-style-type: none"> ▶ 条码 39 (250 - 500 μm; 有校验位的条码, 最小条码长度 = 2) ▶ 条码 5之2 (250 - 500 μm; 有校验位的条码, 最小条码长度= 2) ▶ 条码 128 (250 - 500 μm; 最小条码长度= 2) |

系统描述



B

章节 B 概述

LightCycler® 480 仪器安装说明和系统部件、耗材描述




| B | 系统描述 | 33 |
|-------|------------------------------|----|
| 1. | 系统包装 | 35 |
| 2. | 安装 | 36 |
| 2.1 | 安装要求 | 36 |
| 2.2 | 空间和电源要求 | 36 |
| 2.3 | 环境要求 | 38 |
| 2.4 | LightCycler® 480 仪器安装 | 39 |
| 3. | 系统描述 | 43 |
| 3.1 | LightCycler® 480仪器描述 | 43 |
| 3.2 | 温控模块单元描述 | 47 |
| 3.3 | 检测单元描述 | 50 |
| 3.4 | 检测通道描述 | 52 |
| 3.4.1 | LightCycler® 480 I通道 | 52 |
| 3.4.2 | LightCycler® 480II通道 | 52 |
| 3.5 | LightCycler® 480仪器耗材 | 54 |
| 3.6 | LightCycler® 480仪器PCR试剂 | 56 |
| 3.7 | 所需的额外设备 | 57 |
| 3.8 | LightCycler® 480 仪器实时PCR检测格式 | 57 |
| 3.8.1 | 概述 | 57 |
| 3.8.2 | 使用SYBR Green I监测PCR | 59 |
| 3.8.3 | 使用水解探针监测PCR | 61 |
| 3.8.4 | 使用HybProbe探针监测PCR | 63 |
| 3.8.5 | 使用SimpleProbe探针研究基因分型 | 65 |

系统描述

1. 系统包装

下表列出的是LightCycler® 480系统包内所有的组件。使用此清单核对所有组件是否齐全。


| | |
|---|---------------------------------------|
|  | 打开后，请检查运输途中发生的损伤。将所有外观损伤报告给当地的罗氏诊断代表。 |
|---|---------------------------------------|

| 数量 | 组件 |
|----|--|
| 1 | LightCycler® 480 仪器， 96-孔 或 LightCycler® 480 仪器， 384-孔 |
| 1 | LightCycler® 480 控制/数据分析计算机（包括显示器） |
| 1 | LightCycler® 480 附件包 |
| 1 | LightCycler® 480 操作员手册 |
| 1 | LightCycler® 480 基础软件 1.5 安装光盘 |
| 1 | 电源线（EU） |
| 1 | 电源线（US） |
| 1 | LAN 网线（3 米） |
| 1 | 氙反光灯 |
| 4 | 粉尘通风过滤器 |
| 1 | 密封薄膜敷料器 |
| 1 | 透镜防护帽 |
| 1 | CCD 相机防护帽 |
| 1 | 光导管防护帽 |
| 10 | 保险丝 5×20 1.6AT 250V ULR/IEC |
| 10 | 保险丝 5×20 3.15AT 250V ULR/IEC |
| 10 | 保险丝 5×20 8AT 250V ULR |
| 10 | 保险丝 5×20 T 10A H 250V ULR/IEC |
| 10 | 保险丝 5×20 16AT 250V ULR |

2. 安装




2.1 安装要求



| | |
|---|---|
| ▶ | LightCycler® 480仪器以直立位安放在水平面上。 |
| ▶ | LightCycler® 480仪器周围不能有产生震动，电磁干扰以及高感应性的设备（例如冰箱、离心机、调拌器等）。 |
| ▶ | 连接LightCycler® 480仪器的外围设备应符合IEC 950（UL 1950）标准 |
| ▶ | LightCycler® 480系统（仪器、计算机、显示器）使用的所有插座应是同相位的，这样能避免其他仪器或电流本身产生的开关接通高峰电流和电子噪声。 |
| ▶ | 只能使用系统包内提供的电缆和LAN连接设备。 |
| ▶ | 仪器不能直接暴露在阳光下，并且周围不能有散热器或加热设备。 |

| | |
|---|---|
|  | <i>LightCycler® 480 基础软件由罗氏诊断服务工程师安装。</i> |
|---|---|

2.2 空间和电力要求

安放LightCycler® 480仪器的场所应满足下列要求：



| | |
|---|--|
| 体积 | LightCycler® 480 仪器宽 57.4 cm，长 58.8 cm，高 49.7 cm。 |
| 重量 | LightCycler® 480 仪器重量在 55 kg 左右 |
| 电力 | ▶ LightCycler® 480 仪器运行电压为 200 - 240 V (50/60 Hz)，不能超过电源电流消耗能力。 |
| | ▶ 仪器连接的电源为单相或双相电源，不能超过电源电流消耗能力。 |
| | ▶ 对防护性接地没有特殊规定。 |
| |  断开接地电线，不管是仪器内部或外部的原因，或是接地连接中断，都会产生危险。 |
| |  在任何情况下不要试图修改或故意毁坏该系统的安全装置 |
| | ▶ LightCycler® 480 仪器使用的最高电流是 1500 VA. 计算机额外消耗 500 VA 左右。 |
|  | 由于局部电源电接地性质，要求配备一个不间断电源设备（UPS）。仪器不提供 UPS。建议用户与当地 UPS 供应商联系，购买与仪器用电要求规格一致的 UPS。仪器与 UPS 的连接应符合“在线/直接模式（Online / Direct Mode）”要求。 |

| | |
|-----------|---|
| 通风 | <p>除保证达到下列要求外，对通风没有其他特殊要求：</p> <ul style="list-style-type: none">▶ 不要堵塞电子格栅（1）（3）（4）通风入口。通风入口分别位于仪器背板左上角和右侧下部。通风入口与周围的墙壁、挡板或其他障碍物之间的水平间隔至少超过4厘米宽。▶ 不要堵塞温控模块通风出口（2）。通风出口位于仪器左侧下部。禁止在通风出口前面摆放任何物品。  <p>图 1：仪器背面和左侧的通风入口（1）和出口（2）。</p>  <p>图 2：仪器右侧的通风入口（3）和（4）</p> |
|-----------|---|

| | |
|----|--|
| 通道 | ▶ 仪器背面和墙壁之间的间隔建议为4cm宽，从而可以接触到电源风扇过滤器和电子格栅。 |
| | ▶ 仪器右侧必须有最少40厘米宽的无物品区，从而可以接触到温控模块单元和电子格栅风扇过滤器，以及保证多孔板安全地伸出和加载。 |
| | ▶ 仪器左面与周围须有 20 厘米宽的间距，从而可以接触到仪器侧面盖。 |
| | ▶ 仪器盖板上面须有5厘米高的间距，从而可以提起盖板。 |

2.3 环境要求

LightCycler® 480安全运行规格的设计符合CE和UL技术标准。此技术标准的环境条件为：周围空间温度在15° C和32° C之间，相对湿度在30%和80%之间（未压缩），高度在海拔2000米（850 - 1050 hP）。大气条件符合II级污染程度。

| | |
|---|--------------------------|
|  | 环境条件超过这些规格会导致故障或实验结果不正确的 |
|  | 保持仪器环境干燥。潮湿的环境会引起仪器故障。 |

2.4 LightCycler® 480 仪器的安装

原运输容器必须封闭地运到安装地点。只能由经授权的罗氏诊断维修人员打开和安装LightCycler® 480 仪器。在授权的罗氏诊断维修人员到达安装地点之前，客户无需采取任何举动。如果无法由罗氏诊断公司安装，请遵循下列步骤以成功安装仪器：




| | |
|---|---|
| ▶ | 打开仪器包装： |
|  | 仔细检查容器有无损伤。在接收仪器之前，将可能的损伤报告给当地的罗氏诊断办事处。 |
| ▶ | 仪器应直立地安放在工作台上。 |
|  | 搬运仪器时，应将手放在仪器的底部。仪器底板有四个内凹的搬运把手方便搬运。 |




图 4： 仪器底板搬运把手位置示意图。


仪器的左、右以及背面应留有足够的空间，以保证仪器电子组件能充分的冷却。（有关细节参看[空间和电源](#)章节）。应保证LightCycler® 480仪器的底部以及背面绝对无物（如纸、塑料薄膜等相关细节参看[空间和电源](#)章节）。

| | |
|---|------------------------|
|  | 如无适当的通风空间，会因过热而导致仪器损伤。 |
|---|------------------------|

▶ 取出运输锁紧装置:

运输锁紧装置是由泡沫材料制成的部件，插在多孔板加载器内，以防止多孔板加载器在运输过程中意外活动。

| | |
|---|--|
|  | 安装时,应在打开仪器开关之前取出运输锁紧装置. 否则因为传动器的运动而导致温控模块门卡住, 并且多孔板加载器也会被死锁。 |
|  | 取出运输锁紧装置时, 应先打开温控模块门然后用手拉出多孔板加载器。取出运输锁紧装置后, 再将多孔板加载器推回。  |
|  | 不要丢弃运输锁紧装置。将运输锁紧装置保存在附件箱内。 |
|  | 拉出温控模块, 取出安放在平板架上的多孔板。推回温控模块, 然后关上门。 |

| | |
|---|--|
| ▶ | <p>连接电缆：LightCycler® 480仪器使用单相电源。用提供的电缆连接仪器和电源。输入电路电源电压位于仪器的下背面。</p>  <p>图 5：仪器电源盒的电源开关、插座方位。</p> |
| 🔧 | <p>LightCycler® 480 仪器带有一根两米长，可拆卸的标准电源线。电源线有两种版本，一种用于北美，另一种用于欧洲。</p> |
| ⚠ | <p>不要用湿手接触电源线。仪器打开的时候，不要连接或断开电源线。如果电源线有破损，应立即更换合格的电源线。仪器应始终与接地墙插座连接。</p> |
| ▶ | <p>打开 LightCycler® 480 仪器控制/数据分析计算机组件（即计算机、键盘、鼠标和显示器）的包装。</p> |
| ▶ | <p>将控制/数据分析计算机组件放在 LightCycler® 480 仪器旁边，连接电源线。</p> |
| 🔧 | <p>建议把计算机放在 LightCycler® 480 仪器左边，这样可以便于连接位于仪器右面板的多孔板加载器和温控模块门，也便于连接所有计算机组件的电源插座。应使用多插座的电源插板。</p> |
| ⚠ | <p>确保计算机和显示器电源电压设置正确无误。</p> |
| ⚠ | <p>电缆的处理同样应遵循上面所述的预防措施。</p> |

| | |
|---|--|
| ▶ | 连接网线： LAN（10/100 Base T）接口和 LAN 模式开关位于仪器背板中间。 |
| ! | 应使用仪器提供的 LAN 网线。LAN 网线长度不能超过 3 米。 |



图 6：仪器背面的 LAN 接口 和 LAN 模式开关。

LightCycler® 480仪器可通过两种模式与计算机联系。通过设定LAN模式开关来确定所使用的模式：

| LANL 连接模式 | LAN 模式设定 | 所用的 LAN 接口 |
|--|----------|------------|
| 计算机 使用配备的 LAN 网线直接连接 LightCycler® 480 仪器和计算机（对等） | 左 | 左 |
| 接线器 通过集线器间接连接LightCycler® 480仪器和计算机。 | 右 | 右 |

| | |
|---|--|
| ▶ | 将网线插入相应的计算机背面的LAN（10/100 BT）接口 |
| ▶ | （可选择的）连接手提式条形码扫描器： 用Y-接口线连接数码扫描器和键盘。将紫色的键盘插头与Y-接口线上成对连接器中的一个连接。另一个Y-接口线连接器与计算机背面紫色接口相连。 |
| ▶ | 鼠标、显示器和打印机（可选择的）连接到计算机背面。连接器的形状设计成能保证连接定位准确。有关打印机和计算机连接的更多信息，请参考打印机附带的手册。连接器是颜色编码的，方便配对（鼠标=绿色，显示器=蓝色，打印机=紫色）。保证连接器的颜色与插座的颜色配对。 |
| ! | LightCycler® 480 系统包中不含有打印机。 |

3. 系统描述

3.1 LightCycler® 480仪器描述

LightCycler® 480 仪器是一种具有实时在线检测综合能力的快速热循环仪器。安装后能实施单相PCR，即同时扩增和检测靶核酸。通过加入双链DNA特异性荧光染料或荧光基团标记的序列特异性寡核苷酸探针检测靶核酸。这两种途径都能在扩增时测量PCR产物，以此作为定量PCR的基础。通过分析熔解曲线的方式分析PCR后得到的产物可用于PCR产物鉴定或基因突变检测（*β*单核苷酸多态性）。随意的组合5个激发滤光片和6个发射滤光片可在多元PCR检测中分析多种染料基团发出的信号。有关检测格式的详细资料参看 [LightCycler® 480系统实时PCR检测](#) 章节。

下列是LightCycler® 480仪器的主要标准部件

| | |
|---|---|
| ▶ | 温控模块单元 ，包括可交换温控模块以及温控模块盖（两种版本都配备：96- 或 384 多孔PCR板），通风口，多孔板加载器，多孔板条码扫描器 |
| ▶ | 检测单元 含有下列： |
| ▶ | 光源部件 ，氙激发灯。 |
| ▶ | 光学单元 ，包括液态光导管，发射和检测滤光片车轮，CCD 相机 |

所有组件装配在仪器底板上，由仪器外罩防护。

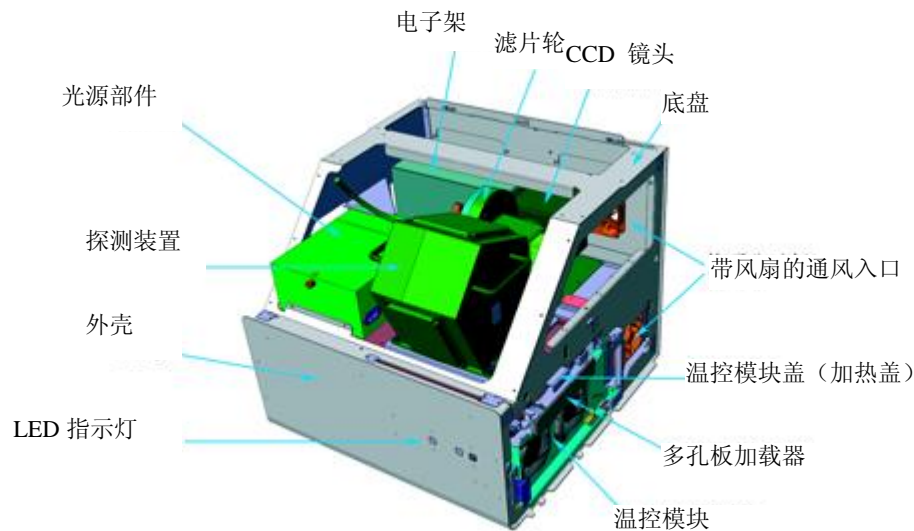


图7：显示LightCycler® 480仪器主要标准部件。

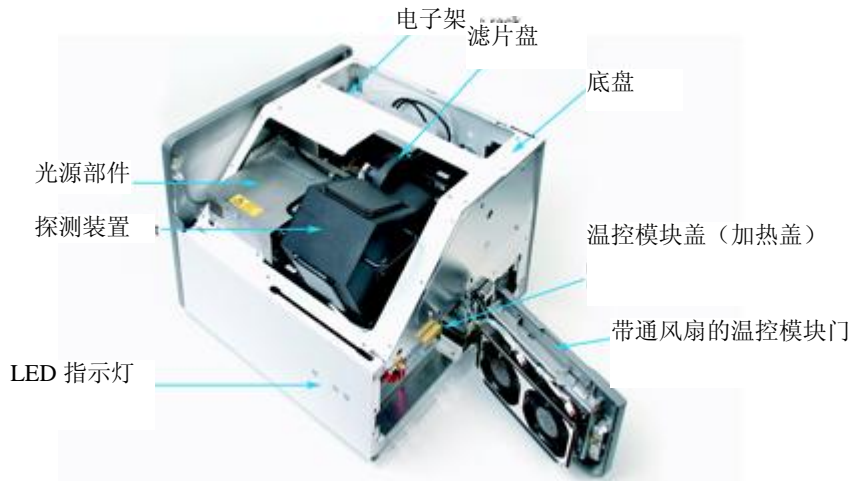


图 8: LightCycler® 480仪器主要标准部件 (仪器外盖移去)

LightCycler® 480仪器前方有两个LED指示灯，告知用户硬件的状态。多孔板加载器的开关按钮紧靠发光二极管。仪器外盖可提起，从前方移至右边，这样可以接触仪器组件。例如，提起外盖后可更换氙灯。（更换氙灯的细节，参看 [维护](#) 章节）

外盖



图 9: LightCycler® 480仪器正视图

仪器右侧提供 PCR 多孔板加载机械装置，还可在右侧通过温控模块门更换温控模块。按压仪器前面的按钮可使多孔板加载器伸缩。（要了解更多有关多孔板加载的信息，请参见 [LightCycler® 仪器 480 运行准备和启动](#) 章节）。如果同时使用两种版本的温控模块（即使用 96 孔 PCR 板温控模块和 384 孔板温控模块），可打开温控模块门更换温控模块和匹配的可加热温控模块盖。（要了解更多有关温控模块更换的信息，参见 [Light-Cycler® 480 温控模块更换](#) 章节）。

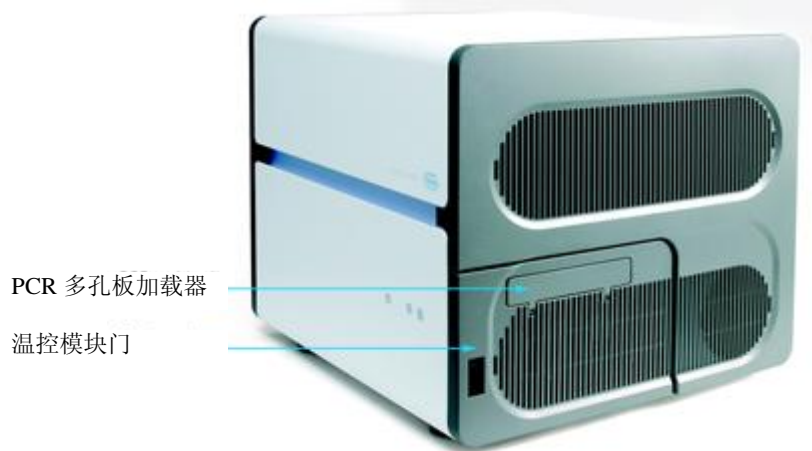


图 10： 仪器右侧视图。



图 11： 仪器多孔板加载器伸出视图。



图 12: 温控模块门开启, 插入温控模块和温控模块盖视图。

仪器背面有电源盒, 盒内是仪器电源、电源开关以及连接仪器与计算机所需的 LAN 接口。(仪器电源和 LAN 连接的更多细节, 参看 [安装](#) 章节)。通风入口 (用于仪器电子格栅; 配有一个粉尘滤光片) 和通风出口 (用于温控模块和电源盒) 位于仪器背面。



图 13: LightCycler® 480 仪器背面视图。

LightCycler® 480基础软件是系统的组成部分, 控制PCR进程 (包括检测) 和后续的数据分析与数据输出。([LightCycler® 480 基础软件](#) 章节详细描述了LightCycler® 480基础软件)

LightCycler® 480仪器的运行需要专为PCR设计的试剂盒。使用专用的LightCycler® 480试剂盒和LightCycler® 480处理物可获得仪器系统的最佳性能。

3.2 温控模块单元描述

温控模块单元包含以下主要组件：

| | |
|---|---|
| ▶ | 温控模块，含有多孔板架，珀耳帖效应元件，导热基架，冷却元件（散热片）和电子接口 |
| ▶ | 温控模块盖（可加热盖） |
| ▶ | 多孔板加载器 |
| ▶ | 多孔板检测器 |
| ▶ | 多孔板条形码扫描器 |
| ▶ | 带风扇的温控模块门 |

附有温控模块盖的温控模块有两种类型：
一种用于96孔多孔板，另一种用于384孔多孔板。

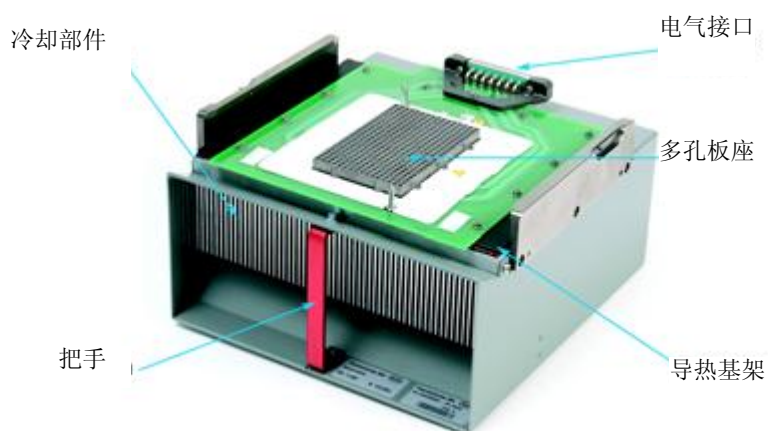


图 14： LightCycler® 480仪器的温控模块（384孔多孔PCR板）

温控模块每种类型都有匹配的温控模块盖。循环器盖上有 96 针孔或 384 针孔（针孔数取决于循环器类型）。循环扩增时，针孔可使检测单元通过密闭的循环器盖检测荧光基团。循环扩增时，将温控模块盖压在 PCR 多孔板上，加热至 100° C，这样在温度循环过程中使反应混合液蒸发作用最小化。因此无需用油或蜡封盖反应混合液。

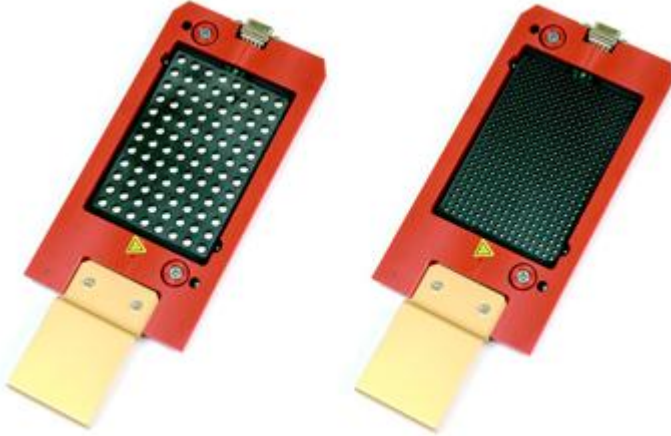


图 15： 96孔温控模块盖（左）和384孔温控模块盖（右）俯视图

温控模块由六个珀耳帖效应元件驱动，结合热传导改良技术（导热基架），可使 PCR 反应在 40 分钟内完成（384 孔多孔板）。导热基架是一种热均衡器，可将积聚的热负荷移动转移至表面区域，其效应超出常规循环器数倍。因此能降低所有组件的温度，保证热传导均匀。

通过仪器右侧面板的温控模块门，可以很容易地进行温控模块单元的更换。存储箱中存有包含温控模块盖的温控模块，并放置于装载架内。装载架可便于更换温控模块（有关更换温控模块的详细细节，参见 [LightCycler® 480 温控模块更换](#) 章节）。使用该设施，可在数分钟内完成温控模块的更换。

仪器右侧面板配有两个高效风扇，可降低温控模块运行时的温度。气流通过仪器引导，在右侧的背面排出。

适当的温控模块安装成功后，用户唯一的手动操作步骤是装载和移去PCR多孔板。多孔板加载器装载PCR多孔板后，将PCR多孔板移入温控模块单元，安放在温控模块的多孔板支架上。按压仪器前面的按钮可移入和移出加载器。内置平板检测器检查是否正确插入型号无误的白色多孔板（96孔或384孔）。



如果使用了透明多孔板，需要在软件中选中相应选项（*Clear Plates Option*）以禁用“平板ID扫描”功能

平板ID扫描后自动输入LightCycler® 480基础软件中。PCR多孔板在温控模块上校正方位，以确定反应孔恰好处在温控模块盖上的针孔之下。另外，检测单元可使用循环器盖上的荧光标志优化多孔板与循环器盖之间的相对位置。通过这种方法，检测单元可有效地检测荧光发射。

LightCycler® 480仪器也可经LightCycler® 480 LIMS/条码模块连接到LIMS系统，然后由LIMS系统控制多孔板加载器的开启和关闭，实现自动化加载。

两种版本的温控模块都可作为单独的附件使用（包括温控模块盖，储存箱和装载架）：

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| LightCycler® 480 96孔温控模块 | Cat. No. 05 015 219 001 |
| LightCycler® 480 384孔温控模块 | Cat. No. 05 015 197 001 |

3.3 检测单元描述

检测单元包含两个主要组件：

| | |
|---|---|
| ▶ | 光源部件 含有激发光源（氙反光灯） |
| ▶ | 光学单元 含有带有光管的液态光导管，发射滤光片轮，激发滤光片轮，带有相机光学系统的CCD相机 |

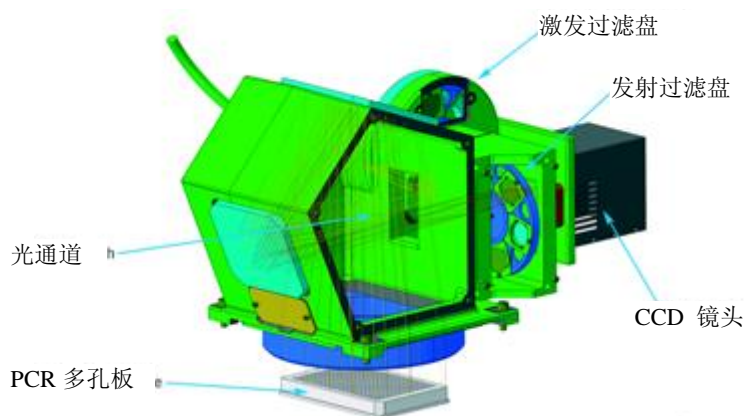


Figure 16: 图 16: LightCycler® 480检测单元图示概貌

LightCycler® 480仪器使用氙反光灯作为激发光源。氙反光灯发出的光的波长范围在430至 630nm之间，这样可使用不同种类的荧光基团。氙反光灯在达到最大强度之前需要两分钟左右的预热期。仪器处于休止状态30分钟后，氙灯会自动关闭。延迟自动关闭能保证初次运行后，短时间内的再次运行无需额外预热。氙灯的寿命为500小时左右。仪器能自动检测光强度，当强度下降至低于最小强度限度时，仪器将会通知用户，以保证足够的激发效率。更换氙灯无须通过罗氏维修工程师进行。（更换氙灯的细节参看 [维护](#) 章节）。

氙灯发射的光通过液态光导管进入光学单元。液态光导管末端的光管能产生均匀的照明，并将照明由圆形转换成矩形，以匹配PCR多孔板的形状。激发荧光基团的实际波长在扩增反应中由所选择的激发滤光片确定。激发滤光片位于旋转式滤光片轮中，由附有六个滤光片交换机的步进马达驱动。其中五个交换机配备激发滤光片（详细内容，参看 [检测单元规格章节](#)），而第六个交换机用于提取暗图。每次仪器重启，都会提取这样的暗图，用于LightCycler® 480仪器运行时所提取图片的校正。

通过激发滤光片后，氙灯光经大场透镜射到PCR多孔板上。大场透镜也可以有效地聚集多孔板侧孔来源的光线。光学模块调节光束，使之通过温控模块盖以相同精确的微角度（2°）照射PCR多孔板。以同样的方式，扩增反应时，荧光基团激发后产生的荧光进入光学模块，这样能保证（1）平板孔内无遮蔽效应，和（2）处在PCR多孔板边缘的孔与中央孔相比，发出的信号绝对无变形或变异，这样能使整个平板敏感度均匀。

PCR多孔板发射的荧光再次进入光学模块，然后由一个携带六个发射滤光片的次级滤光片引导（相关细节参看 [检测单元规格章节](#)）。最后，CCD相机检测荧光信号。相机中心有一冷却CCD芯片，分辨率为1024 × 1344像素。芯片温度控制在稳定的+10° C，可使产生的杂散电子最少。相应地，由杂散电子影响所产生的热噪声干扰也被最小化。CCD相机采集时间可以通过仪器软件手动和自动调节（即曝光时间由信号动力调节，以保证信号强度达到最适比）。测量结果传输到LightCycler® 480计算机和软件之前，仪器会自动进行进一步的结果校正和数据简化。

检测PCR多孔板发射的荧光信号的同时，参考通道也被检测。参考通道用于测量氙灯强度。氙灯强度值补偿可能发生的强度波动，而强度波动能影响荧光信号的强度。测量氙灯强度能保证检测内和检测间发生变异的可能性最低。



因为激发滤光片和发射滤光片安放在滤光片轮上，因此在多色测量中不能同时进行染色剂特异性荧光基团检测，而是一个接一个地测量检测“通道”。切换滤光片交换机所需时间少于0.65秒。LightCycler® 480实时PCR检测中所用的染料激发滤光片和发射滤光片推荐组合在LightCycler® 480基础软件中预先定义为“检测格式”。只有针对所选择的滤光片组合特异性的信号被检测，因此应保证始终使用合适的检测格式。

3.4 检测通道描述

五个激发滤光片和六个发射滤光片随意组合能使荧光基团得到最佳激发，并且荧光基团发射的信号能得到精确地测量。下表显示的是在实时 PCR 检测不同格式中所使用的激发—发射滤光片推荐组合：

3.4.1 LightCycler® 480 I 通道

| 荧光基团 | 激发滤光片 | 发射滤光片 | 检测格式 |
|-------------------------|-------|-------|--|
| LightCycler® Cyan 500 | 450 | 500 | 水解探针（报告子） |
| SYBR Green I | 483 | 533 | SYBR Green I |
| Fluorescein (Fluos/FAM) | 483 | 533 | 水解探针（报告子） HybProbe 探针(供体) SimpleProbe 探针 |
| HEX (VIC) | 523 | 568 | 水解探针（报告子） HybProbe 探针（受体） |
| LightCycler® Red 610 | 558 | 610 | 水解探针（报告子） HybProbe 探针（受体） |
| LightCycler® Red 640 | 558 | 640 | 水解探针（报告子） HybProbe 探针（受体） |
| Cy5 | 615 | 670 | 水解探针（报告子） HybProbe 探针（受体） |

3.4.2 LightCycler® 480II 通道

| 荧光基团 | 激发滤光片 | 发射滤光片 | 检测格式 |
|------------------------------------|------------|------------|---|
| LightCycler® Cyan 500 | 440 | 488 | 水解探针（报告基因） |
| SYBR Green I | 465 | 510 | SYBR Green I |
| Fluorescein (Fluos/FAM) | 465 | 510 | 水解探针（报告基因） HybProbe 探针(供体) SimpleProbe 探针 |
| VIC/HEX/Yellow555/Joe | 533 | 580 | 水解探针（报告基因） HybProbe 探针（受体） |
| LightCycler® Red 610 | 558 498 | 610 610 | 水解探针（报告基因） HybProbe 探针（受体） |
| LightCycler® Red 640 | 498 | 640 | HybProbe 探针（受体） |
| Cy5/Cy5.5/ LightCycler® Red 705 | 618 498 | 660 660 | 水解探针（报告基因） HybProbe 探针（受体） |

激发 - 发射滤光片配对可以一对一组合用在单色检测中，也可连续组合用于多色检测中。用户可以在 LightCycler® 480 软件中找到合适的预定义为检测格式的滤光片配对组合，用于单色或多色检测（例如，“多色 HybProbe” 检测格式组合了 Red 610, Red 640 and Cy5 滤光片配对）。并且，其他与滤光片波长对应的荧光染料也全部与 LightCycler® 480 兼容。要了解相关细节，参见 [检测格式](#) 章节。



LightCycler® 480 仪器能同时检测两种或更多染料发出的信号，这样能在一个单反应中获得更多的信息。分析通道的选择依赖实验中所用的荧光染料。在一个多色反应中，染料发射信号的波长会重叠，这样使得一个通道提取了多种染料发出的信号。这种所谓的串光能产生误导性数据。因此需要“颜色补偿”去纠正这种多色实验中通道之间的渗色过度。有关如何在 LightCycler® 480 仪器上颜色补偿的详细信息参见[颜色补偿分析](#)章节。



在多色水解探针检测中，强力推荐使用暗淬灭剂染料。（即染料分子能有效地淬灭荧光谐振能量传递报告染料发出的非自身荧光。（相关细节参看利用[水解探针监测PCR](#)章节）

3.5 LightCycler® 480 仪器耗材

LightCycler® 480仪器有专门设计的96孔和384孔格式的PCR多孔板。这些平板的优良构型和优化材质能保证最佳的热传导，良好的热传导是特殊PCR和快速循环率的必备条件。此外，这些平板产生的自发荧光非常微弱，这对于在检测中获得良好的信噪比有重要意义。多孔板都附有匹配的自粘性密封薄膜。

- ! 必须使用本手册推荐的PCR多孔板。LightCycler® 480仪器温控模块单元有一内置的平板类型检测器，它能检测、鉴别LightCycler® 480多孔板。其他品牌的多孔板有可能可以使用但并不保证。
- L 两种类型的多孔板在其长边每侧都有两个凹口，可让自动加载设备装卸平板。
- L 多孔板 A 排长边上携有一条条形码标签（编码 128，8 个字符）。这些条形码标签代表操作平板 ID，能被多孔板条形码扫描器识别。



图 17: LightCycler® 480 96 孔多孔板，白色（左），透明（右）



图 18: LightCycler® 480 384 孔多孔板，白色（左），透明（右）

| | | |
|------------------------------|-------------------|-------------------------|
| LightCycler® 480 96 孔多孔板，白色 | 带 50 个密封薄膜的 50 块板 | Cat. No. 04 729 692 001 |
| LightCycler® 480 384 孔多孔板，白色 | 带 50 个密封薄膜的 50 块板 | Cat. No. 04 729 749 001 |
| LightCycler® 480 96 孔多孔板，透明 | 带 50 个密封薄膜的 50 块板 | Cat. No. 05 102 413 001 |
| LightCycler® 480 384 孔多孔板，透明 | 带 50 个密封薄膜的 50 块板 | Cat. No. 05 102 430 001 |

- ! PCR多孔板装载入LightCycler® 480仪器之前，必须用自粘性密封薄膜正确地封口。平板封口对消除高温时产生的蒸发很重要。只能使用推荐的密封薄膜。
- L 密封薄膜也可单独获得。



图 19: LightCycler® 480 密封薄膜

| | | |
|-----------------------|----------|-------------------------|
| LightCycler® 480 密封薄膜 | 5 × 10 片 | Cat. No. 04 729 757 001 |
|-----------------------|----------|-------------------------|

3.6 LightCycler® 480 PCR 试剂盒

LightCycler® 480 PCR试剂盒是专门设计的，具有最高的特异性和灵敏度。

LightCycler® 480 PCR试剂盒有以下特征：

| | |
|---|------------------------|
| ▶ | 最小量的 PCR 优化 |
| ▶ | 提高了重复性和可信度 |
| ▶ | 提供热启动酶，有极好的灵敏度、特异性和耐用性 |
| ▶ | 酶激活时间短，可很快的获得结果 |
| ▶ | 试剂即开即用，提供极大的便利 |

| 试剂盒 | 应用 | 货号 |
|---|-------------------------------------|----------------|
| LightCycler® 480 High 高分辨率熔解曲线分析母液 | 基因突变扫描，非标记探针的基因分型 | 04 909 631 001 |
| LightCycler® 480 RNA水解探针母液 | 一步法RT-PCR用于基因表达分析和绝对/相对定量分析RNA | 04 991 885 001 |
| LightCycler® 480 SYBR Green I母液 1个试剂盒 (5 × 100次反应，每次20μ l) | 利用SYBR Green I检测格式分析熔解曲线，以鉴定qPCR和产物 | 04 707 516 001 |
| LightCycler® 480探针母液 1个试剂盒 (5 × 100次反应，每次20 μ l) | 使用水解探针格式和其他以探针为基础的检测格式进行qPCR | 04 707 494 001 |
| LightCycler® 480 基因分型母液 1个试剂盒 (4× 96次反应，每次20 μ l) | 通过分析熔解曲线进行qPCR和基因分型 | 04 707 524 001 |
| LightCycler® 480 仪器验证试剂盒 | 以标准的方法和预设的标准DNA样品验证仪器的性能 | 04 710 924 001 |

3.7 所需的额外设备

下列是 LightCycler® 480 系统实施实时 PCR 检测所需的额外设备：

| | |
|---|------------------------------|
| ▶ | 标准板式离心机，离心机转子有多孔板相配的连接管。 |
| ▶ | 已进行核酸酶灭活处理，不生成气溶胶的吸管头 |
| ▶ | 配有可丢弃、可更换吸管头的移液管 |
| ▶ | 移液器（Eppendorf），用于配制混合母液和稀释液。 |

3.8 LightCycler® 480仪器实时PCR检测格式

3.8.1 概述

LightCycler® 480仪器使用荧光染料在线、实时监测循环扩增阶段PCR产物的产生以及利用荧光染料在PCR后熔解曲线分析中分析PCR产物熔解。循环扩增阶段测量的荧光信号与PCR产物量相关，从而可以计算靶核酸的复制数量（可利用序列非依赖检测格式和序列特性格式）。PCR后熔解曲线分析阶段，荧光测量可用于PCR产物鉴定（序列非依赖检测格式）和基因分型（序列特性格式）。LightCycler® 480仪器有很高的灵活性，支持多种荧光分析格式，可使用广谱探针和染料：

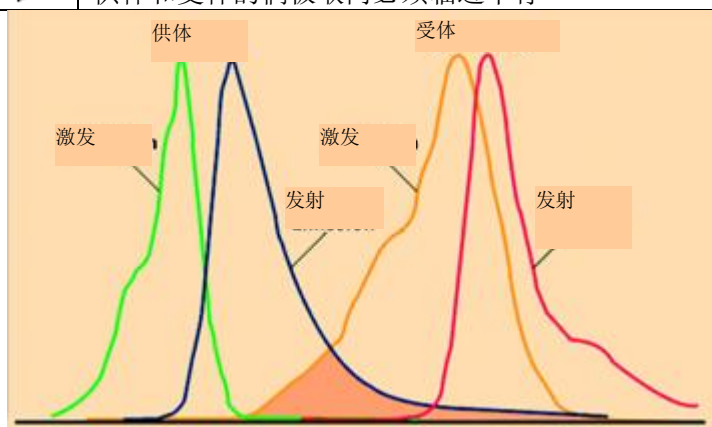
| | | | | | | | |
|---|--|---|----------------------|---|-------------------|---|-----------------|
| ▶ | 序列非依赖检测法 依靠能与所有双链DNA分子结合的荧光基团，与序列无关； 例如 SYBR Green I. | | | | | | |
| ▶ | 序列特异性探针结合检测法 依靠序列特异性寡核苷酸探针偶联荧光基团，探针能与靶PCR产物内的互补序列相结合 <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>▶</td> <td>单标记探针（SimpleProbe化学）</td> </tr> <tr> <td>▶</td> <td>杂交探针（HybProbe 化学）</td> </tr> <tr> <td>▶</td> <td>水解探针（5'-核酸酶测定法）</td> </tr> </table> | ▶ | 单标记探针（SimpleProbe化学） | ▶ | 杂交探针（HybProbe 化学） | ▶ | 水解探针（5'-核酸酶测定法） |
| ▶ | 单标记探针（SimpleProbe化学） | | | | | | |
| ▶ | 杂交探针（HybProbe 化学） | | | | | | |
| ▶ | 水解探针（5'-核酸酶测定法） | | | | | | |

| | |
|---|---|
|  | <i>LightCycler® 480 仪器上的实时 PCR 检测也可采用其他检测格式。例如，可采用的探针格式包括双标探针（iFRETProbes），分子信标和 Scorpions 探针。然而，分析中使用的所有荧光染料有必要与 LightCycler® 480 仪器的光学单元兼容。</i> |
|---|---|

HybProbe 探针化学法和水解探针化学法利用的是荧光共振能量转移 (FRET) 原理, 此原理的基础是荧光基团 (供体) 能量传输到另一个临近的荧光基团 (受体)。

下列是FRET发生的主要条件:

| | |
|---|-----------------------|
| ▶ | 供体分子和受体分子之间必须相互靠近 |
| ▶ | 受体的激发光谱与供体荧光发射光谱必须有重叠 |
| ▶ | 供体和受体的偶极取向必须临近平行 |



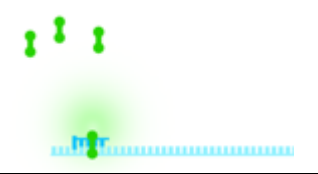
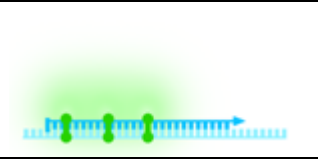
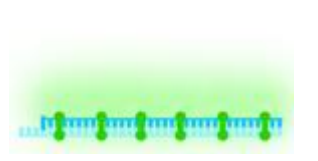
供体染料由LightCycler® 480仪器光源通过选择匹配染料最大吸收波长的激发滤光片而激发 (例如选择465 nm波长激发滤光片用于激发荧光素)。此波长激发供体内一定数量的电子从基级跃入较高的能量级位。此能量由下列释放:

| | |
|---|---|
| ▶ | 发射出具有不同的、更长波长的荧光 |
| ▶ | 传输能量传输至受体染料 (如LightCycler® Red 640)。能量释放时, 电子恢复到基级水平。供体将能量传输至受体分子使自身荧光淬灭。 |

FRET法可以以不同的形式在PCR中用于产生序列特异性信号。水解探针化学法的基础是淬灭供体染料的荧光 (供体染料因此被称为淬灭剂), 而HybProbe化学法利用受体染料发射荧光。

3.8.2 用SYBR Green I染料监测PCR

检测PCR 产物的产生可以通过测量SYBR Green I荧光信号实现。SYBR Green I可嵌入双链DNA螺旋环中。溶液中未结合的染料发射的荧光非常微弱；但是，一旦与DNA结合后，由于构象的改变，其荧光（530 nm测量）就会显著增强。因此，在PCR的过程中，SYBR Green I荧光的增加是与产生的双链DNA呈正比。由于SYBR Green I染料本身性质非常稳定，因此可以选择为测量总DNA数量的试剂。下列是在LightCycler® 480系统实时PCR中，使用SYBR Green I染料检测DNA的基本步骤：


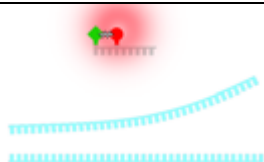
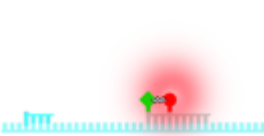

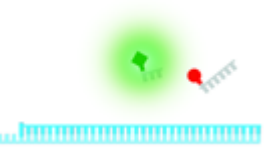
| | | |
|----------|---|--|
| 1 |  | 退火时，PCR 引物与靶DNA杂交，在双链DNA上形成一些小的区域。SYBR Green I染料嵌入这些区域：荧光信号轻度增强。 |
| 2 |  | 在延伸阶段，形成更多的双链DNA，并且更多的SYBR Green I染料与之嵌和：荧光信号增强。 |
| 3 |  | 延伸阶段末期，所有DNA变成双链DNA，此时嵌入的SYBR Green I染料也达到最多。在每次延伸阶段末期因测量荧光（530 nm）。 |





由于SYBR Green I染料能和所有的双链DNA结合，因此SYBR Green I 检测格式不能区分不同的双链DNA种类。特异性产物、非特异性产物以及引物二聚体都能同样地被检测到。所有双链PCR人工产物都会强化信号强度，导致靶序列浓度检测过高。确定是否所需的PCR产物已经扩增可以在完成PCR后通过熔解曲线分析而实现。通过熔解曲线分析以鉴定PCR产物的基础是每一种特殊的双链DNA分子有其自身特征性的熔解温度 T_m ，达到这个温度时，一半的DNA为双链，另一半为熔解状态，即单链。确定双链DNA热稳定性最重要的因素是DNA分子的长度和GC含量。在分析熔解曲线时，反应混合物缓慢加热至95° C，在这样情况下达到混合物内PCR产物的 T_m 温度时，能引起双链DNA熔解以及相应的SYBR Green I荧光急剧减少。LightCycler® 480仪器持续地监测超过 T_m 温度后的荧光转变。使用LightCycler® 480基础软件分析熔解曲线时，这些数据以熔解曲线图的方式显示出来（荧光[F]对温度[T]）。从熔解曲线的回折点上能估计出反应中PCR产物的 T_m 温度。但是使用LightCycler® 480基础软件 T_m 调集分析模式绘制出衍生熔解曲线（ $-dF/dT$ ），能更为容易地辨别出 T_m 温度。衍生熔解曲线的峰中心对应于回折点。如果PCR只产生一个扩增子，那么熔解曲线分析将只能显示一个熔解峰。如果存在引物二聚体或其他非特异性产物，他们以附加熔解峰的形式显示出来。因此验证PCR产物的 T_m 温度可以与分析凝胶电泳产物的长度相比较。

3.8.3 使用水解探针监测PCR

单链3'-非延伸性（已磷酸化处理）探针用于检测特异性靶DNA序列的增加，因此水解探针测定法技术上可描述为同源性5'-核酸酶测定法。单链3'-非延伸性探针在扩增时可被剪切。这种单链探针含有两个指示染料，为一个荧光报告基因和一个淬灭剂，这两个指示物相互之间的距离很近。探针完整无缺时，淬灭剂染料与报告基因染料之间的距离很近，能充分地抑制报告基因荧光信号的发射（荧光淬灭通过FRET产生）。PCR过程中，聚合酶5'-核酸酶剪切水解探针，使报告基因和淬灭剂分开。被剪切的探针上的报告基因不再被淬灭，激发后发射出荧光信号。


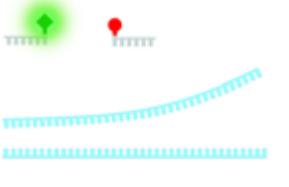
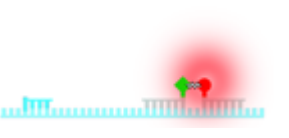
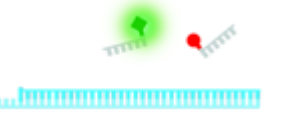
LightCycler® 480仪器能检测出标记有报告染料的水解探针，如LightCycler® Cyan 500、FAM、HEX、LightCycler® Red 610、LightCycler® Red 640 或 Cy5。水解探针可单独或联合使用，这样能进行单色或多色检测。

| | | |
|---|---|---|
|  | <p>对于多色水解探针测定法，强烈推荐使用暗淬灭剂染料（即染料分子能有效的淬灭 FRET 报告基因染料发出的荧光，且自身不会发射荧光）。对于上表列出的水解探针报告基因染料，罗氏应用科学推荐使用BHQ-2（淬灭光谱范围在550nm至650 nm之间）。另一种选择为DABCYL（淬灭范围为 380 - 530 nm之间），也可作为备选用于淬灭 LightCycler® Cyan 500, FAM或 HEX。</p> | |
| 1 |  | <p>水解探针携带两个距离很近的荧光染料，淬灭剂染料抑制报告基因荧光信号释放。由于探针3'端被磷酸化，因此PCR过程中探针不能延伸扩增。</p> |
| 2 |  | <p>PCR退火阶段，引物和探针与靶序列特异性地结合复性。</p> |
| 3 |  | <p>DNA多聚酶延伸至引物时，与探针接触。然后多聚酶利用其固有的5'-核酸酶活性剪切探针，使探针片段与靶序列分离，从而能继续聚合新的扩增子。</p> |
| 4 |  | <p>被剪切的探针中的报告基因染料不再被淬灭，因此能发射出荧光，被LightCycler® 480仪器检测器检测到。所以报告基因染料荧光增强强度与释放出的报告基因染料分子集聚数量是直接相关的（这样可以间接地与PCR产物数量相关联）。和SYBR Green I法相似，可在延伸阶段检测报告基因染料的荧光信号。</p> |

| | |
|---|--|
|  | 水解探针格式中，荧光信号的产生并不依赖于探针的杂交状态，而是依赖探针的消化作用，因此无法进行熔解曲线分析。所以这种测定法对于基因分型需要另外的实验途径。 |
|  | 要形成正确的可消化杂交复合物，水解探针必须在引物延伸之前与靶序列结合复性。探针的 T_m 温度只能略高于PCR 引物的 T_m 温度，这样能形成稳定的杂交复合物。 |
|  | 水解探针测定法有两种基本的PCR操作程序。两步法和三步法PCR操作程序都会得到合适的实验结果。扩增溶液中的 $MgCl_2$ 有必要保持较高的浓度，这样能保证水解探针杂交稳定，使得水解过程可靠。扩增子长度应短小（不超过150bp），并且在两步法PCR操作程序时，退火和延伸的温度应在 $60^\circ C$ 左右。 |
|  | LightCycler® 480仪器与LightCycler® 480探针母液共同使用，能完全与Universal ProbeLibrary通用探针库中的前165个双标记（5'末端标记荧光素/FAM，3'前端标记暗淬灭染料）实时PCR探针相兼容，可用于基因表达分析。这类应用既可以使用单探针，也可以选用Universal ProbeLibrary通用探针库中90种已被验证的探针。每组生物特异性Universal ProbeLibrary通用探针库至少能覆盖某一生物体所有转录子中的95%至99%。（当前使用的Universal ProbeLibrary通用探针库组可用于人类、灵长类、小鼠、大鼠、秀丽隐杆线虫、拟南芥菜和果蝇的检测）。要了解更多信息，请访问网站： http://www.universalprobelibrary.com 。 |

3.8.4 使用HybProbe探针监测PCR

HybProbe 探针检测格式中，有两个专门设计、序列特异性的寡核苷酸探针以头对尾排列的方式与扩增的DNA片段上的靶序列杂交。这两种探针称之为供体和受体，都标有不同的荧光染料，从而使两种不同的染料紧密接近。供体染料（如荧光素）由合适的激发滤光片（465 nm）激发。当两种染料相互靠近时，供体染料释放出的能量激发受体染料（如LightCycler® Red 640），受体染料此时附着于第二个HybProbe探针和寡核苷酸杂交复合物上。受体染料激发后发射出不同波长的荧光，其荧光量与PCR产生的靶DNA数量成正比。

| | | |
|---|---|---|
|  | <p><i>LightCycler® 480仪器能检测标记受体染料LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, 或Cy5的HybProbe探针。这些被标记的HybProbe探针既可单独使用，也可联合使用在单色或多色检测中。荧光素（FLUOS）用作供体染料。注意供体-受体复合物FLUOS-HEX不适合使用在这种检测格式中，因为这两种染料的光谱彼此之间非常接近。</i></p> | |
| <p style="text-align: center;">1</p> |  | <p>举例说明，HybProbe供体探针3'端标记有荧光素，而HybProbe受体探针5'端标记有LightCycler® Red染料（受体探针3'端同样被磷酸化，以阻止延伸）。（注意这种设置也能颠倒过来：受体探针在3'端标记而供体探针在5'端标记）。杂交不会发生在PCR变性阶段。由于未结合的探针之间的距离能阻止两个染料间的能量传输，因此在这个阶段检测不到受体染料的荧光。</p> |
| <p style="text-align: center;">2</p> |  | <p>退火阶段，两个探针以头对尾排列的方式与扩增的DNA片端杂交。供体染料受到仪器光源的激发，释放出能量。能量不是以荧光的方式发射出来，而是激发受体染料。受体染料发射的荧光在每次退火阶段末期强度最高，应在这个时候检测荧光。</p> |
| <p style="text-align: center;">3</p> |  | <p>退火后，温度上升，当处于延伸期时，HybProbe探针分离移位。此步骤的末期，PCR产物为双链，移位的HybProbe探针再次分解，从而允许FRET发生。</p> |

HybProbe检测格式适合于序列特异性qPCR检测和基因分型（单核苷酸多态性检测，SNP）。利用HybProbe探针检测SNP是以熔解曲线分析为基础的。温度低于寡核苷酸的 T_m 温度时，HybProbe探针配对与互补模板结合，导致锚定探针与感应探针紧密靠近，产生FRET。随着温度上升，探针在其对应的 T_m 温度时熔解，不再产生FRET。熔解与荧光信号强度下降同时发生。感应探针熔解的温度依赖探针的基本序列。因此，如果模板的感应探针结合区存在一个SNP，结合的复合物会不稳定，其熔解温度低于正确配对的复合物。

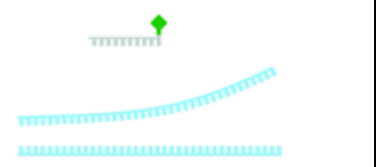
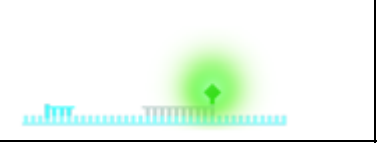
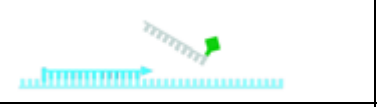

3.8.5 使用SimpleProbe探针研究基因分型

SimpleProbe探针是一类特殊类型的杂交探针。这些探针有一个重要方面不同于HybProbe探针。这种探针测定法无需联合使用两个探针，它只需要单个探针。这种单个探针可以和含有所寻找的SNP的靶序列特异性结合杂交。一旦杂交后，SimpleProbe探针发射出的荧光信号强度超过未杂交时所发射的荧光强度。因此，SimpleProbe探针的荧光变化只依赖于杂交状态。SimpleProbe检测格式的原理基础不是FRET理论。

典型的SimpleProbe探针设计成可以和含有所寻找的SNP的靶序列特异性结合杂交。一旦和靶序列杂交后，SimpleProbe探针发射出的荧光信号强度超过未杂交时所发射的荧光强度。因此，SimpleProbe探针的荧光变化只依赖于杂交状态。SimpleProbe探针检测格式对于SNP基因分型和变异检测是一种极好的工具，因为这种检测格式只使用一个短小的探针就可以很容易地鉴定野生体、变异体以及杂合体样本。

SimpleProbe探针可以在其两个末端或内部标记其他试剂（如标记SimpleProbe 519 Labeling Reagent试剂*）。如果溶液中的SimpleProbe未和其他物质结合，其报告基因染料发射的荧光会被一个特殊的非荧光淬灭剂淬灭。当探针和靶序列杂交后，淬灭效应降低，报告基因染料被LightCycler® 480仪器通道激活后，发射出荧光。但是，即使探针未杂交，仍可在530nm检测到背景荧光，导致信噪比降低。

在SNP分析中，LightCycler® 480仪器监测SimpleProbe探针熔解行为。通过测量荧光，仪器能检测到探针-靶序列杂交复合物随着温度的升高而熔解。SimpleProbe探针与靶序列之间的杂交作用越稳定，熔解温度也就越高。如SNP等序列变异会削弱SimpleProbe探针结合的稳定性。

| | | |
|---|---|---|
| 1 |  | 变性阶段不会发生杂交，因此在530 nm只检测到微弱的荧光。 |
| 2 |  | 退火阶段，探针与扩增的DNA片段结合杂交，不再被淬灭荧光。荧光素受到Light-Cycler® 480仪器光源激发后发射出绿色荧光。荧光应在每次退火末期达到最强，此时才能测量其强度。 |
| 3 |  | 接下来的延伸阶段，SimpleProbe从靶序列上脱离移位。 |
| 4 |  | 延伸阶段末期，PCR产物为双链，SimpleProbe探针呈脱离状态。 |

操作

C

第三章 操作
为您讲解 LightCycler® 480 仪器的
操作步骤

| | | |
|----|-----------------------------------|----|
| 1. | 介绍..... | 68 |
| 2. | 系统的启动..... | 69 |
| 3. | 准备和开始 LightCycler® 480 仪器的运转..... | 70 |
| 4. | 更换LightCycler® 480温控模块..... | 72 |

操作

1. 介绍

在开始操作前，请先回顾 [概述](#) 和 [LightCycler® 480 基础软件](#) 这两个章节，这样可以确保您能识别和确认 LightCycler® 480 仪器的各个部件，并对软件有一个基本的了解。

2. 系统的启动



主开关位于仪器后面的电源箱的左侧，按 I 以启动 LightCycler® 480 仪器。




在 LightCycler® 480 仪器的前面有两个状态指示灯。





仪器运行过程中可能出现的指示灯显示模式及其含义：

| 左侧指示灯颜色 | 右侧指示灯颜色 | 含义 |
|---------|---------|-------------------------|
| 橙色（闪动） | 橙色（闪动） | 仪器正在进行初始化。 |
| 绿色 | 橙色 | 仪器已经启动，并处于待机状态，尚无多孔板载入。 |
| 绿色 | 橙色（闪动） | 正在加载多孔板。 |
| 绿色 | 绿色 | 仪器已经启动，并处于待机状态，多孔板已经载入。 |
| 绿色（闪动） | 绿色（闪动） | 仪器正在运行中。 |



- 2# 打开控制/数据分析计算机。
- 3# 启动操作系统 Windows XP。
- 4# 打开 LightCycler® 480 的基础软件。关于 LightCycler® 480 的基础软件的使用方法，请参考 [LightCycler® 480 的基础软件](#) 一章。

3. 准备和开始 LightCycler® 480 仪器的运行


 下文中所描述的为典型的样品的操作步骤。其他方法（例如：使用经含有DNA模板的通用试剂）也是可行的。

-  对实验设计进行编程，定义样品的数量、名称等。
如需详细的指导，请参考“[LightCycler® 480的基础软件](#)”一章。
-  在一个1.5毫升或0.5毫升的反应管中加中除了DNA模板之外包含所有其他反应试剂的通用试剂。
 请按照LightCycler® 480的使用指南中关于试剂盒的步骤进行操作。反应体积务必与特定的多孔板型号保持一致。使用暗反应试管以防止环境光对反应管中荧光染料产生漂白作用。
-  使用微量加样器将反应混和体系加入到LightCycler® 480的多孔板中。
当处理大批量的样品时，使用自动化的机械微量加样器或平行微量加样器（8头或16头）会大大提高您的工作效率。



-  将DNA模板加入到各个孔中。
-  使用LightCycler® 480密封薄膜对板进行正确的密封。使用您的手或者刮器（例如：随仪器一起提供给您的密封薄膜刮板）将薄膜牢牢地压在板的表面。



 对板进行密封是非常重要的，因为这样可以避免高温下反应液体的蒸发。

- 6 将多孔板放入标准的板式离心机中，离心机中应安装有配套转接器的转子。在板的对侧施加合适的平衡力（例如：另一块多孔板）。以 $1500\times g$ 的速度离心两分钟。检查孔中是否有气泡，如果需要的话可以再进行一次离心。



- 7 ▶为了将准备好的多孔板加载入LightCycler® 480仪器中，请按下仪器前面的按钮开关（位于仪器状态指示灯的旁边）。



- ▶这时多孔板加载器会从仪器的右侧弹出。




- 8 将多孔板放入加载器的加载框中，注意应使其平滑边缘对着仪器的方向放入。（有斜角的较短的板边缘远离仪器。）



- 9 再次按下多孔板加载按钮开关，这时已经插入多孔板的加载器会弹回到仪器内。现在您就可以开始运行实验了。

- 10 当运行结束后，再次打开多孔板加载器以取出PCR多孔板。

 当运行刚刚结束时，多孔板加载器的温度将非常高，足以引起急性烫伤。因此请等待一段时间以使其可以冷却下来。或在您的LightCycler® 480仪器的RUN流程中包含有一个最终冷却至 40°C 的步骤。

4. 更换LightCycler® 480的温控模块

LightCycler® 480仪器可使用两种类型的温控模块，一种是使用LightCycler® 480 96孔多孔板的温控模块，另一种则是使用384孔多孔板的温控模块，您可以同时购买两种模块作为可替换零件。如果您同时拥有了两种模块，则您可以根据使用要求来进行手工更换。下文中将为您讲解如何更换循环器。

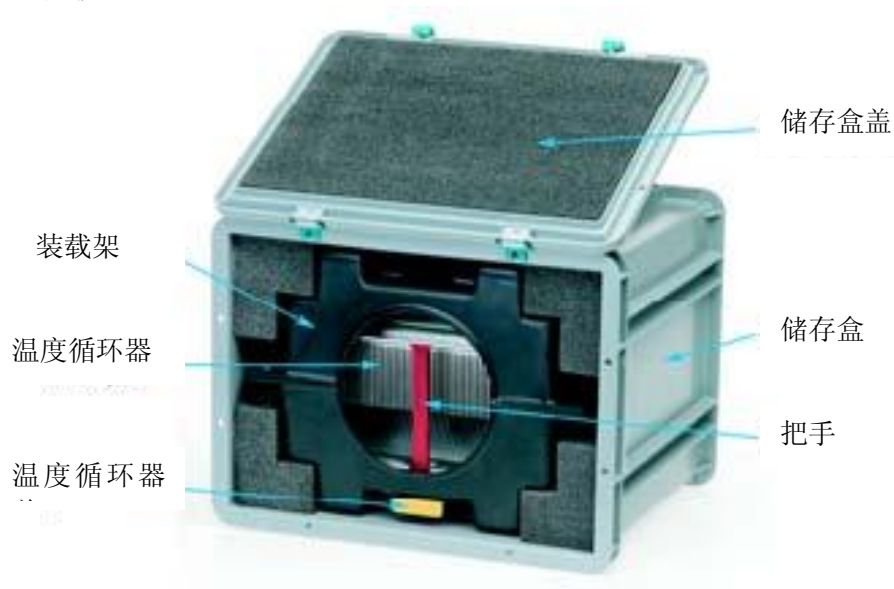


当您准备进行温控模块的更换时，请务必关闭LightCycler® 480仪器。



在更换温控模块之前，您应该在LightCycler® 480运行结束之后等待一段时间(大约20分钟)以使温控模块以及温控模块盖有足够的时间冷却下来。在运行刚刚结束时，温控模块以及温控模块盖的温度相当高，足以导致烫伤。建议在您的LightCycler® 480仪器的操作流程中包含有一个最终冷却至40°C的步骤。

1 LightCycler® 480的温控模块存放在一储存箱中提供给您，该盒可以在运输过程中保护温控模块使之免于损坏。储存箱中有温控模块以及置于温控模块装载架中的温控模块盖。



- 2 打开储存箱盖，握住温控模块的手柄，将温控模块与装载架一起从储存箱中取出。

用来放置拆下后的温控模块盖的固位器



装载架上半部分，放置拆卸后的温控模块

3 装载架包括两个独立的部分：在更换温控模块时，上半部分用来放置更换下来的温控模块（见下图），而下面一半则是一个固位器，它用来放置更换下来的温控模块盖。

- 3 从仪器右侧面板的部位打开温控模块门。
▶ 将位于右面板的提钮向上提起（1），然后按顺时针方向扭动（2）。



- ▶ 保持提钮处于提起后的位置，即可打开后面的温控模块门。

! 仅可在仪器已关闭的状态下打开此门。



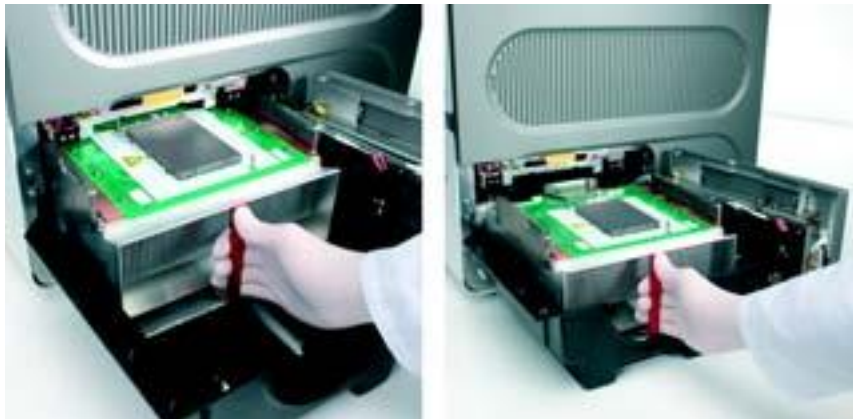
4. 取下装载架的上面部分，并将其倒置过来，使其开放侧正对着仪器，放置于已经打开的温控模块室的前方。



- 5# ▶ 按下温控模块室左侧上方红色标记的杠杆，握住温控模块的把手。用拇指顶住仪器的机箱施加力量将温控模块取出。



- ▶ 将温控模块从温控模块室中取出，放到提供给您您的装载架上。



- ▶ 将放入装载架的温控模块放到一边。

6 温控模块取出后，温控模块盖也必须取出。

▶ 将位于温控模块释放杠杆和温控模块盖之间的小的金色杠杆向左推，握住温控模块盖的手柄，即可将温控模块盖松开。



温控模块把手

▶ 温控模块盖被松开后，就可以很容易地将温控模块盖从室中取出。



▶ 将取下的温控模块盖放入提供给您的装载架的底部的固位器中。


7 使用与以上步骤相反的顺序将新的温控模块安装到空的温控模块室中。

▶ 插入温控模块盖：将位于温控模块释放杠杆与温控模块盖之间的小的金色杠杆推向右侧，将温控模块盖推入位于温控模块室上方的托架中。



▶ 插入温控模块：按照与以上描述相反的顺序进行步骤 5 与步骤 4 的操作即可插入温控模块。

▶ 最后，当您把温控模块推入温控模块室中后，请关上温控模块门，按下门夹以确保其已严密关闭。

 当您再次使用 *LightCycler® 480* 仪器时，仪器会使用 *LightCycler® 480* 基础软件自动检测新的温控模块并对其进行确认。



LightCycler® 480

基础软件

软件版本: 1.5

第四章 LightCycler® 480 的基础软件

本章主要为您提供LightCycler® 480 仪器的运行及数据分析等进行编程所需的信息。

| 基础软件功能 | | |
|--------|---------------------------------|-----|
| 1. | LightCycler® 480 基础软件总述 | 81 |
| 1.1 | LightCycler® 480 基础软件的一般性用户界面通则 | 82 |
| 1.2 | 启动 LightCycler® 480 的基础软件 | 83 |
| 1.3 | 关于 LightCycler® 480 的基础软件的主窗口 | 85 |
| 1.4 | 选择与浏览属性 | 90 |
| 1.4.1 | 浏览器 | 94 |
| 1.4.2 | 查询表 | 94 |
| 1.4.3 | 样品选择器 | 98 |
| 1.4.4 | 样品表 | 101 |
| 1.5 | 导出与导入文件与对象 | 102 |
| 1.5.1 | 导出单个的 LightCycler® 480 基础软件的对象 | 103 |
| 1.5.2 | 同时导出多个实验文件 | 104 |
| 1.5.3 | 导入单个文件 | 106 |
| 1.5.4 | 同时导入多个文件 | 107 |
| 2. | 实验的编程与运行 | 110 |
| 2.1 | 实验的编程 | 111 |
| 2.1.1 | 设定检测格式 | 113 |
| 2.1.2 | 定义程序与目标温度 | 114 |
| 2.1.3 | 定制在线数据显示 | 118 |
| 2.2 | 运行实验 | 119 |
| 2.3 | 输入样品信息 | 121 |
| 2.3.1 | 样品编辑器窗口 | 121 |
| 2.3.2 | 样品编辑器动作条 | 122 |
| 2.3.3 | 配置样品编辑器属性 | 123 |
| 2.3.4 | 输入样品信息 | 124 |
| 3. | 实验性分析的总述 | 130 |
| 3.1 | 分析步骤总述 | 131 |
| 3.2 | 使用分析窗口 | 133 |
| 3.2.1 | 选择滤光片组合与颜色补偿 | 134 |
| 3.2.2 | 对样品进行分析 | 135 |
| 3.2.3 | 在分析窗口中使用图表 | 136 |
| 3.2.4 | 添加分析注解 | 137 |
| 3.2.5 | 对分析进行删除或重新命名 | 138 |
| 3.3 | 导出分析结果 | 139 |
| 软件应用 | | |
| 4. | 定量 | 142 |
| 4.1 | 概述 | 142 |
| 4.2 | 绝对定量分析 | 143 |
| 4.2.1 | 关于样品交叉阈值 | 144 |
| 4.2.2 | 关于标准曲线的作用 | 145 |
| 4.2.3 | 准备标准曲线 | 146 |
| 4.2.4 | 用最大二阶导数法进行绝对定量分析 | 149 |
| 4.2.5 | 用样点拟合法进行绝对定量分析 | 152 |
| 4.2.6 | 查看结果 | 158 |

| | | |
|--------|--------------------------|-----|
| 4.3 | 相对定量分析 | 161 |
| 4.3.1 | 概述 | 161 |
| 4.3.2 | 单色或双色实验 | 164 |
| 4.3.3 | 相对定量分析的原理 | 165 |
| 4.3.4 | 进行基本相对定量实验 | 167 |
| 4.3.5 | 进行高级相对定量实验 | 169 |
| 4.3.6 | 进行相对定量分析 | 175 |
| 4.3.7 | 查看结果 | 180 |
| 4.3.8 | 配对样品和生成结果集 | 181 |
| 4.3.9 | 外部标准曲线 | 184 |
| 4.3.10 | 补充信息 | 185 |
| 5. | 进行 T _m 熔解曲线分析 | 188 |
| 5.1 | 使用熔解曲线特征进行 DNA 产物和基因型的鉴定 | 188 |
| 5.1.1 | 定义熔解程序 | 188 |
| 5.1.2 | 熔解温度分析的内容 | 189 |
| 5.2 | 进行熔解温度调用分析 | 190 |
| 6. | 基因分型 | 198 |
| 6.1 | 概述 | 198 |
| 6.2 | 终点法基因分型分析 | 199 |
| 6.2.1 | 概述 | 199 |
| 6.2.2 | 终点法基因分型的原理 | 201 |
| 6.2.3 | 进行终点法基因分型实验 | 201 |
| 6.2.4 | 进行终点法基因分型分析 | 207 |
| 6.2.5 | 辅助功能 | 213 |
| 6.3 | 熔解曲线基因分型分析 | 214 |
| 6.3.1 | 概述 | 214 |
| 6.3.2 | 熔解曲线基因分型分析的原理 | 216 |
| 6.3.3 | 进行熔解曲线基因分型实验 | 217 |
| 6.3.4 | 辅助功能 | 227 |

| |
|---------------|
| 高级软件功能 |
|---------------|

| | | |
|--------|----------------------|-----|
| 7. | 进行颜色补偿分析 | 230 |
| 7.1 | 进行颜色补偿实验 | 231 |
| 7.2 | 使用颜色补偿 | 237 |
| 8. | 使用模板和宏工作 | 238 |
| 8.1 | 创建和使用模板 | 238 |
| 8.2 | 创建和使用宏 | 243 |
| 9. | 使用子集工作 | 247 |
| 10. | 使用图表工作 | 249 |
| 10.1 | 打印、导出与复制图表 | 250 |
| 10.2 | 变焦和变位以查看图表细节 | 254 |
| 11. | 使用表格工作 | 256 |
| 12. | 生成报告 | 258 |
| 13. | 使用选项“Preference”工作 | 262 |
| 13.1 | 使用图表选项 | 263 |
| 13.1.1 | 设定图表表头及标签类型 | 264 |
| 13.1.2 | 设定荧光图表的内容 | 265 |
| 13.1.3 | 设定标准曲线图表的外观 | 266 |
| 13.1.4 | 设定温度图表的内容与外观 | 267 |
| 13.1.5 | 覆盖默认的图表选项 | 267 |
| 13.1.6 | 创建单独的图表选项项目并将其作为默认项目 | 270 |
| 13.2 | 使用样品选项 | 271 |
| 13.3 | 设定用户选项 | 272 |
| 14. | 管理工具 | 273 |
| 14.1 | 管理用户访问 | 274 |
| 14.1.1 | 关于用户帐户 | 274 |
| 14.1.2 | 关于组 | 275 |
| 14.1.3 | 关于角色 | 275 |
| 14.1.4 | 一般用户的权限 | 276 |
| 14.1.5 | 高级用户角色的特权 | 276 |

| | | |
|---------|------------------------------|-----|
| 14.1.6 | 本地管理员的特权 | 277 |
| 14.1.7 | 用户访问对象 | 278 |
| 14.1.8 | 管理用户、组和角色 | 281 |
| 14.1.9 | 使用角色工作 | 286 |
| 14.1.10 | 修改您的密码 | 287 |
| 14.2 | 报告的设置 | 288 |
| 14.3 | 错误日志 | 289 |
| 14.4 | 数据库信息 | 290 |
| 14.4.1 | 跟踪型和研究型数据库 | 290 |
| 14.4.2 | 如何清空数据库 | 291 |
| 14.4.3 | 压缩数据库 | 293 |
| 14.4.4 | 如何处理来自 1.3 版或更早版本软件的数据库 | 293 |
| 14.4.5 | 如何处理来自 1.3 版或者更早版本软件的对象 | 294 |
| 14.5 | 仪器 | 295 |
| 14.6 | 检测格式 | 298 |
| 14.7 | 设置平板类型 | 301 |
| 15. | 诊断工具 | 302 |
| 15.1 | 仪器问题报告 | 302 |
| 15.2 | 错误日志 | 303 |
| 15.3 | 自我测试 | 303 |
| 16. | LightCycler® 480 的基础软件的安装与维护 | 304 |
| 16.1 | 安装 LightCycler® 480 的基础软件 | 305 |
| 16.2 | 启动 LightCycler® 480 软件和连接仪器 | 309 |
| 16.3 | 保存现有的数据库和安装其他数据库 | 312 |
| 16.4 | 登录到不同的数据库 | 316 |
| 16.5 | 用一个数据库文件替换一个已存在的同名数据库 | 317 |
| 16.6 | 建立客户机/服务器网络 | 318 |
| 16.7 | 删除 LightCycler® 480 的基础软件 | 322 |

软件

1. LightCycler® 480 基础软件总述

LightCycler® 480 的基础软件根据您在实验方案中提供的信息来对 LightCycler® 480 仪器进行操作。LightCycler® 480 的基础软件包括 LightCycler® 480 的基础软件应用程序、含有审计记录的数据库、以及一个数据库对象服务器（称为” Exor4”），它可以与数据库进行数据交换。软件应安装在本地配置中。

在这一配置中，所有的软件均安装在已与 LightCycler® 480 仪器接通的 LightCycler® 480 计算机内。每种配置（仪器及其连接的计算机）均使用其自身的数据库及其自己的特定用户帐户，并作为一个独立的系统进行工作。数据库引擎及数据库文件的位置及目标文件夹通常在安装过程中就已经设定完毕。

LightCycler® 480 系统收集到的所有数据均保存在数据库中以保证数据及数据完整性的安全。您无法对储存好的数据进行操作，也不能对原始数据进行访问。数据的分析和编辑只能通过 LightCycler® 480 的基础软件才能完成。如果您想在 LightCycler® 480 的基础软件中查看实验的相关信息，则实验文件必须首先储存到 LightCycler® 480 的基础软件的数据库中才行。







本节的内容为您提供 LightCycler® 480 的基础软件的一个总体的介绍。同时，本节还描述了在软件显示屏幕中可能用到的所有的用户界面元素软件模块。本节中主要包括以下几个主题：

- ▶ 启动 LightCycler® 480 的基础软件
- ▶ 关于主窗口
- ▶ 用户界面通则
- ▶ 导出与导入文件与对象

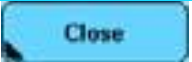




LightCycler® 480 基础软件的一般性用户界面通则


1.1 LightCycler® 480 基础软件的一般性用户界面通则

LightCycler® 480 基础软件的用户界面使用了一些有特定功能的基本元素（例如：按钮等），您几乎可以在软件的每一个屏幕显示内容中看到和用到这些基本元素。

| 按钮 | 功能 |
|--|---|
|  | 对一次输入或一个动作的确认。点击此按钮后软件会向下进行到一个新屏显，对话框或步骤。它的作用与按下 <Enter> 键是等同的。 |
|  | 对一次输入或一个动作的否认。点击此按钮后软件将关闭当前的屏幕显示内容或对话框。相当于按下 <Esc> 键。 |
|  | 增加一个项目或对象。 |
|  | 删除一个项目或对象。 |
|  | 编辑一个项目或对象。 |
|  | 退出 LightCycler® 480 基础软件。 |

另外，软件的一般按钮设计通则还在各个按钮之后使用特定的按钮指示符进行了定义。下面的表格中解释了针对按钮指示符的通则：

| 按钮 | 标记 | 行为 |
|---|--------------|----------------|
|  | 左下角有黑色三角。 | 完成动作并关闭窗口或对话框。 |
|  | 右上角的黑色三角。 | 打开下一级对话框。 |
|  | 无黑色三角。 | 在当前窗口中执行特定的动作。 |
|  | 白色背景，周圈有点围绕。 | 按钮被选定。 |
|  | 按钮与下拉箭头一起出现。 | 表明这是一个多选按钮。 |


 将鼠标箭头指到一个图标或按钮的上方时，软件就会为您显示关于该图标或按钮功能的描述及其键盘快捷键（如果有快捷键的话）。

1.2 启动 LightCycler® 480 的基础软件

按照以下的步骤启动和登录到 LightCycler® 480 的基础软件

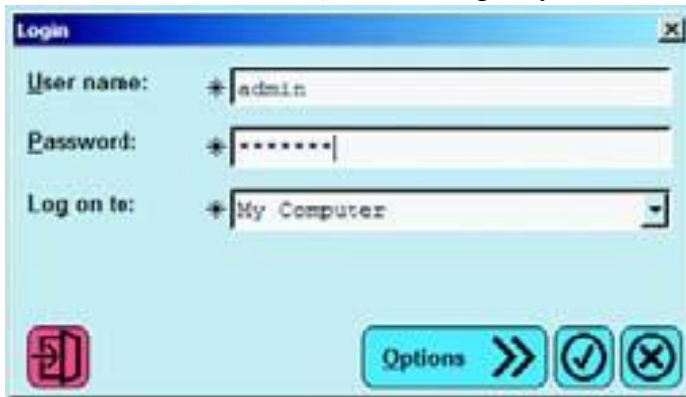
! 请使用具有 1280 × 1024 像素或更高的分辨率的屏幕运行 LightCycler® 480 的基础软件。注意：软件在 1024×768 的像素下也可以运行，但是软件的某些功能在这一低分辨率下会受到影响（例如：某些按钮会重叠到一起）。

如何启动 LightCycler® 480 的基础软件：

1 双击您桌面上的 LightCycler® 480 基础软件图标 。

2 在登录对话框中，输入您的用户名和密码。

! 用户 *admin* 的初始密码是 *LightCycler480*（注意大小写）。



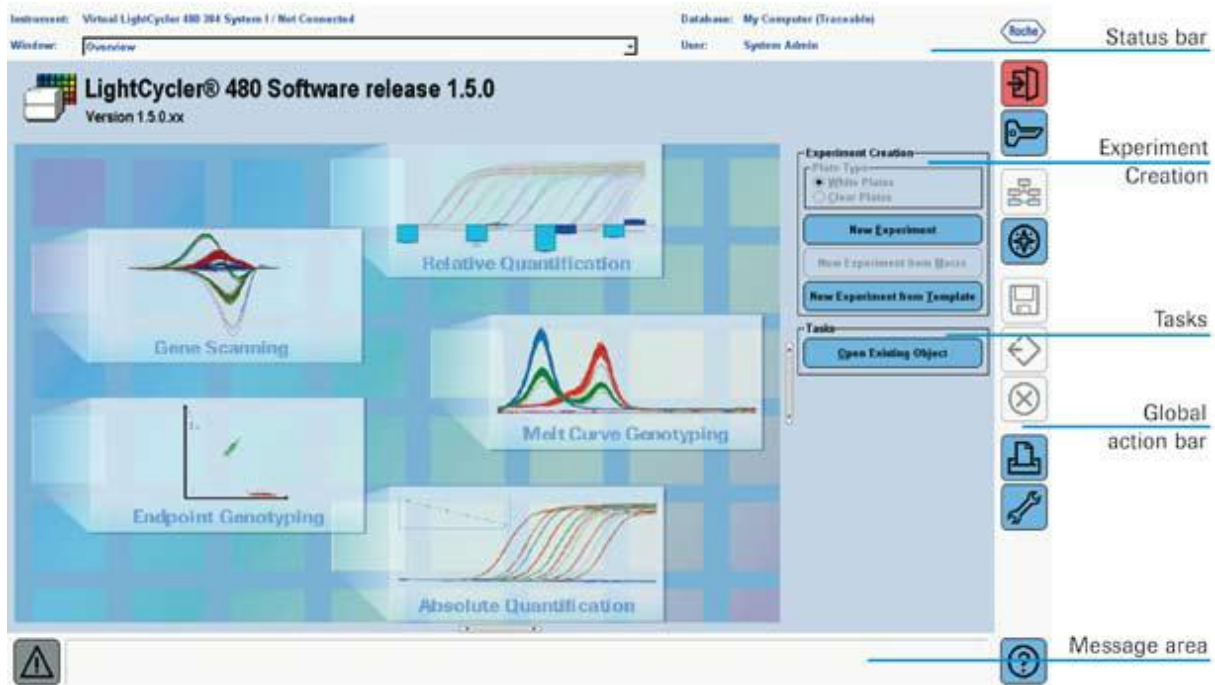
3 在“登录到”这一选项中，上次所使用的数据库会做为默认值显示出来。

! 如果目前已有几个数据库并且您想登录到与当前默认者不同的数据库时，按下“选择”按钮即可进行更换。这时登录窗会弹出，并将您可以选择的数据库名称全部列出。在列出的名单中选择您所需要的数据库。



4# 按下  按钮继续登录过程。

这时，屏幕上将显示出 LightCycler® 480 的基础软件的总述窗口，其中包括有三个部分：位于左侧的是“任务和打开一个激活的窗口”，中间的是“宏”窗口，而位于右侧的则是“一般动作”窗口。从“总述”窗口开始，您可以创建一个新的实验，打开一个宏，或者跳转到例如“浏览器”和“工具选择”等的软件模块中。



| 区域 | 功能 |
|-----------|--|
| 任务 | 点击“新的实验”以打开“运行”模块。如需关于“运行”模块的更多信息，请参考“实验编程”一节中相关内容。 |
| 打开一个激活的窗口 | 通过点击“打开一个激活的窗口”您可以在打开的窗口之间进行跳转。当开始运行软件时，这一区域是空的。在操作的过程中激活的软件窗口的名称会被加入到该区域。 |
| 宏 | 从列表中选择一个宏并启动它，或者输入一个测试标识符和/或批号标识符以找到与数据库对应的宏。 |
| 一般动作栏 | “一般动作”栏中可供选择的按钮的多少取决于当前已经打开的激活的窗口。如需要更多信息，请参考“关于 LightCycler® 480 基础软件的主窗口”一节。 |

1.3 关于 LightCycler® 480 的基础软件的主窗口

下面的图片显示出了 LightCycler® 480 基础软件的主窗口（作为示例，为您显示了一个“绝对定量分析”窗口，但是下文中的描述对所有的窗口均有效）主窗口中包含了以下几个区域，这些区域在下文中进行介绍：

- ▶ 状态条
- ▶ 模块条
- ▶ 一般动作条
- ▶ 编辑框
- ▶ 信息区域



状态条










这一区域显示的是当前激活的对象的相关信息，您可以从当前打开的对象的列表中选择对象进行查看。



| 区域 | 功能 |
|-----|--|
| 仪器 | 显示已连接的仪器的名称和状态。仪器的状态可能是以下情况之一：未连接的，连接的，初始化中，待机（多孔板已经加载），待机（无多孔板），运行中，错误。显示一个下拉菜单，其中列出了当前打开的窗口。 |
| 窗口 | 使用这一菜单你就可以选择所需的窗口。显示您所连接的数据库的名称和类型。显示当前登录到数据库的用户名称。 |
| 数据库 | |
| 用户 | |




一般动作条





“一般动作条”位于屏幕的右侧，此条中包含的按钮对于一般的软件功能均适用。该条中可选择的项目决定于当前打开的激活窗口（的数量和内容）。下面列出了与这些按钮有关的功能：

| 按钮 | 功能 |
|---|--|
|  | 退出： 点击此按钮以退出应用程序。 |
|  | 登出： 点击此按钮您就可以退出当前数据库，这样就可以登录到其他数据库了。 |
|  | 点击此按钮可以跳转到“总述”窗口 |
|  | 点击此按钮就可以显示“浏览器”窗口。关于浏览器的详细信息，请参考“ 选择与浏览特性 ”一节。 |
|  | 保存： 点击此按钮可以保存对当前对象所做的修改。 |
|  | 导出： 点击此按钮可以将当前对象导出形成一个文件。关于导出的详细信息，请参考“ 导出与导入文件和对象 ”一节。 |
|  | 关闭： 点击这一按钮可以关闭所选择的对象。 |
|  | 打印： 点击这一按钮可打印出当前屏幕的显示内容。 |
|  | 工具： 点击这一按钮可以打开“工具”窗口，在该窗口中，您可以更改您的密码，创建和编辑用户、组和角色，编辑系统设置，查看数据库状态，管理仪器信息，还可以定义您想选择的滤光片组合。关于“工具”对话框的详细信息，请参考“ 管理工具 ”一节。 |

模块条

“模块条”显示于屏幕的左侧，含有六个固定按钮。下表列出了这些按钮相关的功能：

| 按钮 | 功能 |
|---|---|
|  | 点击这一窗口可以打开实验的“总结”模块。该模块包含了与实验有关的信息（例如名称，日期以及所有者和滤光片组合），并显示更改日志，您还可以通过它将一个实验存储为一个宏。 |
|  | 点击这一图标打开“运行”模块，该模块包含了实验方案的细节，实验数据的图表，以及由运行实验的人员输入的注解。关于如何编程和运行实验的方法在“ 编程与运行实验 ”一节中有详细的解释。 |
|  | 点击这一图标打开“子集编辑器”，通过该编辑器您可以对样品分组到各子集，从而对其进行分析及报告。关于如何创建和编辑子集的内容在“ 使用子集工作 ”一节中有详细的解释。 |

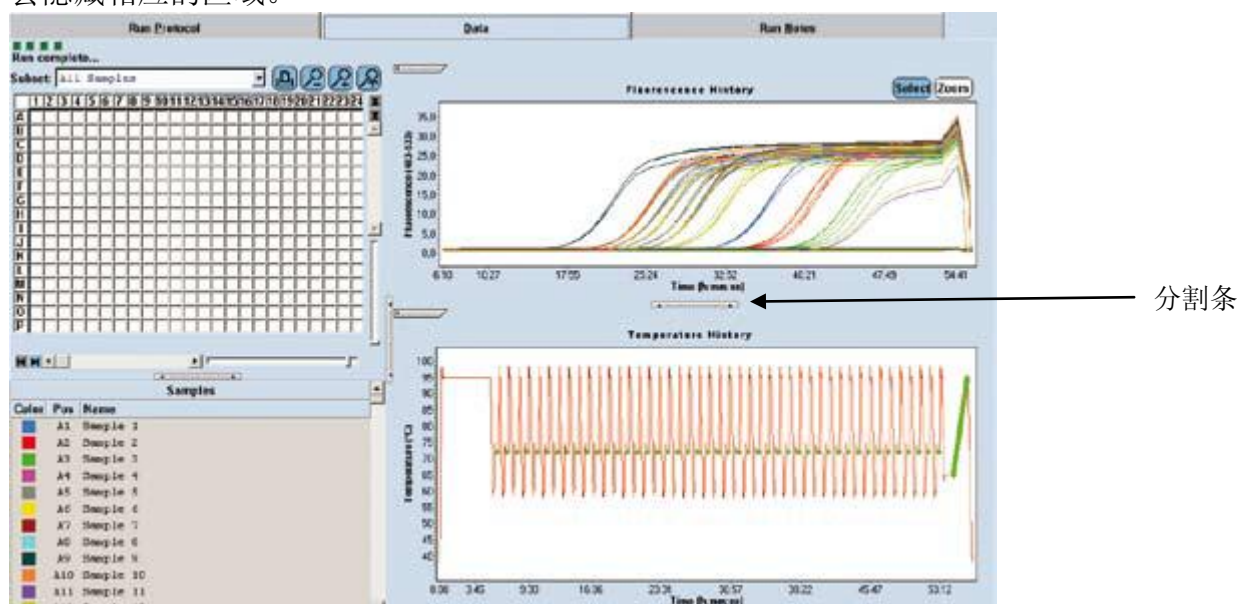
| | |
|---|--|
|  | <p>点击这一图标打开“样品编辑器”，它可以对实验所需要的样品信息进行定义。关于如何输入和编辑样品信息的内容在“输入样品信息”一节中有详细的解释。</p> |
|  | <p>点击这一图标打开“分析”模块。如果当前尚无分析被打开，则点击后打开“分析总述”窗口。在这里您可以创建一个新的分析，也可以打开一个已存在的分析。每一个为实验新创建的分析都会被加入到分析列表中，并且可以在分析模块中的相应下拉菜单中进行选择。如果已经有一个分析被打开，则相应的分析窗口会成为当前窗口，您就可以直接对其进行操作了。关于如何进行分析的内容，在“实验分析总述”，“进行绝对定量分析”，“进行熔解曲线分析”以及“进行颜色补偿分析”等章节中有详细的叙述。</p> |
|  | <p>点击这一图标打开“报告”模块，此模块使您可以定义报告的内容，而且可以对报告进行查看和打印。</p> <p> 您必须首先将一个实验保存下来，这样该按钮才可以被激活。</p> |

如何使用模块条：

点击图标打开相应的实验模块，也可以使用与该图标相应的键盘快捷键 <Ctrl-Shift-n>，n 在这里表示从上开始计数时图标所在位置对应的数字。例如，在图标列表中，“实验”图标总是位于图标列表的第 2 位，因此打开“实验”模块时对应的键盘快捷键就是 <Ctrl-Shift-2>。（将鼠标箭头指向图标时，在图标旁边就会显示出关于该图标功能的一个简单叙述。）


编辑框

此框是模块显示的中央区。编辑框通常包含几个部分（请参考下面图中的示例），这些部分可以单独进行调整。您可以通过拖动两个部分之间的、位于边缘的分隔条来隐藏或显示相应的部分。分隔条上的箭头告诉您编辑框的哪一部分将会被调整。点击分隔条将会隐藏相应的区域。



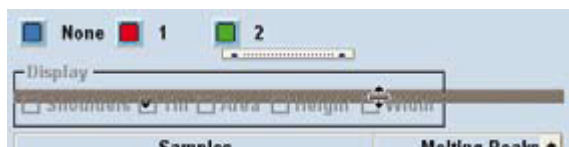
调整窗口区段的大小:

如何隐藏或显示某一部分:

- ▶ 点击边上的分隔条 。
- ▶ 再次点击分隔条重新显示这一部分。

如何调整某一区域大小:

- ▶ 将鼠标箭头指向该区域的边缘直到其箭头变成一个双箭头。
- ▶ 点击并拖动边缘直到您所需要的位置为止。



动作按钮区域

动作按钮区域为您显示出了与当前活动的窗口相对应的可用按钮，可用按钮的数目和类型决定于您当前已经打开的活动窗口（例如：下图所显示的“动作按钮”区域就是打开“资源管理器”窗口时情况）。




信息区域

信息区域为您显示状态信息、出错信息或警告信息等。




信息区域包含以下部分:

位于左侧的报警图标 

▶ 该图标的颜色将根据警报的严重程度而发生变化:

- ▶ 绿色=普通
- ▶ 黄色=警告
- ▶ 红色=报警状态

▶ 位于中央的文本区域: 文本区域显示诸多信息，例如信息的类型、日期和时间，还显示出信息文本。双击一个信息条目即可以显示其详细信息。

► “打开关于框”按钮。点击这一按钮将打开程序的“关于”框，该框中包含有在 LightCycler® 480 仪器操作指南的在线版本的链接，并显示出软件的版本号以及软件的版权信息。

1.4 选择与浏览属性

这一部分描述的 LightCycler® 480 的基础软件的目标选择，浏览以及查询等元素。

- ▶ 浏览器
- ▶ 查询
- ▶ 样品选择与样品表

1.4.1 浏览器

浏览器主要是为您提供到达存储在 LightCycler® 480 数据库中的各个项目的路径：包括实验，用户帐户、工具、宏等项目在内。您可以通过浏览器打开某个实验及该实验相关的项目（例如：选项、宏、特殊数据等）。浏览器中的所有项目均以树状结构（与 Windows 浏览器相似）组织在一起，并在其文件夹中按字母顺序进行了分类。您可以打开或合上文件夹目录，也可以选择您需要的工作对象。另外，您可以使用“查询”表中输入需查找的参数，这样就可以在数据库中查找特定的 LightCycler® 480 软件对象了。

浏览器窗口分为四个区域：

- ▶ 树状窗格
- ▶ 对象总结窗格
- ▶ 浏览器控制窗格
- ▶ 查询表



树状窗格

浏览器树状窗格显示的是当前激活的数据库的一个等级树状结构。树的最高一级对象称为“根”。树的使用方式与 Windows 浏览器的使用方式相似。

浏览器树状窗格中总是包含有以下默认的文件夹和对象：

- ▶ 用户文件夹（包括系统管理员文件夹和为各个用户帐户所设立的文件夹。每个用户文件夹中还包括一些默认的子文件夹，例如为实验设立的文件夹。
- ▶ 罗氏文件夹中存放的是来自罗氏的实验、模板和宏等，所有 LightCycler® 480 仪器的软件用户均可以访问此文件夹。



罗氏文件夹中包括了一些非常有用的标准对象：

- ▶ 在实验文件夹中包含有三个演示实验（使用 SYBR Green I 进行绝对定量，双色水解探针，使用 Hybprobe 探针进行熔解温度调用）；
 - ▶ 在模板“子文件夹”中包含有四个演示运行模板；
 - ▶ 一个颜色补偿对象。
- ▶ 如果您想对罗氏对象进行修改，那么您必须首先将其拷贝到您自己的用户文件夹内。管理文件夹中包含的是对用户组、用户角色、用户帐户以及安全条例等对象。如果您想显示或隐藏一个文件夹，双击文件夹名称或点击文件夹旁边的加号（+）或减号（-）图标即可。



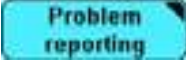


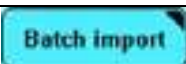

罗氏浏览器与您计算机上的 Windows 浏览器在各个方面上是相似的，但并非完全一样。罗氏浏览器以一种数据库的形式储存数据，并不使用 Windows 浏览器那样的文件系统。





总结窗格

如果当前选择的对象是一实验的话，那么浏览器的“总结窗格”显示的将是实验的总结数据。

浏览器控制

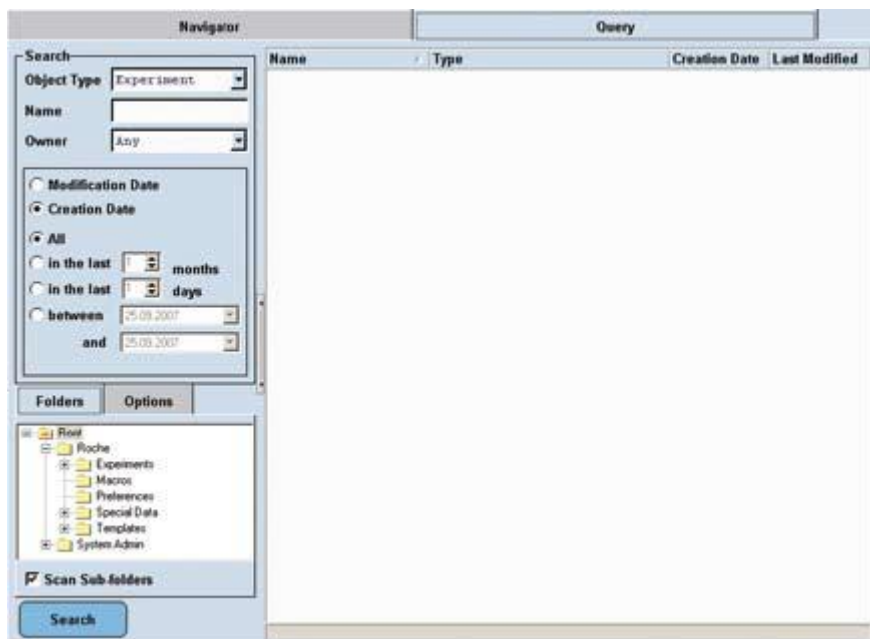
通过配合使用树状窗格，您就可以通过使用浏览器对数据库的对象进行工作，并可以将对象导入或导出。

| 按钮 | 功能 |
|---|--|
|  | 点击此按钮后打开的是一个对话框，通过此框，您可以将一个实验对象与一个工具的事件日志以及（可选的）用户关于此事件的描述性记录一起保存成一个文件（文件名为*.ipr）。您可以将该文件发送给罗氏应用科学的技术服务部，从而寻求技术支持。如需更多信息，请参考“ 诊断工具 ”一节。 |
|  | 点击此按钮打开的是一个标准的窗口文件浏览器，通过此浏览器，您可以导入所选择的数据文件类型以及将其导入到指定的位置。以下文件类型均可导入： <ul style="list-style-type: none"> ▶ATF 文件：“ATF”是一套文件的缩写，包括.abt（程序与样品数据）、.tem（温度数据），以及.flo（荧光数据）等文件。这三种文件是每一个实验中都会用到。ATF 文件源于版本为 3.5.3 或更低的版本的 LightCycler® 480 软件。 ▶对象文件：LightCycler® 480ML（可扩展标记语言，*.ixo）对象文件。 |
|  | 点击此按钮打开一个标准窗口浏览器，通过该浏览器，您可以选择选择对象数据导出的位置及设定导出对象的名称。对象数据导出的文件通常是一个选定对象的以.ixx 为扩展名的文件（该文件中包括实验及其相关信息）。 |
|  | 点击此按钮打开一个批量导入指导窗口，通过它您可以从一个指定的目录下把所有的实验一次性地全部导入。如需关于批量导入的更多信息，请参考“ 导出与导入文件和对象 ”一节。 |
|  | 点击此按钮打开一个批量导出指导窗口，通过它您可以从一个指定的目录下把所有的实验一次性地全部导出。如需关于批量导出的更多信息，请参考“ 导出与导入文件和对象 ”一节。 |

| | |
|--------------------------|---|
| <p>New</p> | <p>点击此按钮打开一个“创建新对象”对话框，此对话框中包含有您有权创建的各种对象对应的图标。框中显示的图标的数量的多少取决于用户的角色。</p>  <p>您可以双击一个图标以创建该图标对应的一个新的对象。如果选定该图标再单击单击之，也可以达到同样效果。</p> <p> 您可以通过罗氏文本格式文件对对象添加注解并在 <i>LightCycler® 480</i> 数据库中进行保存。</p> |
| <p>New folder</p> | <p>点击此按钮将会在当前的文件夹树状结构中创建一个新的文件夹对象。</p> |
| <p>Open</p> | <p>点击此按钮将会在 <i>编辑框</i> 中打开选定的对象。</p> |
| <p>Rename</p> | <p>点击此按钮将在目录树结构中激活相应的文件名，这样您就可以重新对其进行命名。</p> |
| <p>Delete</p> | <p>点击此按钮删除选定的对象（即：将相应的对象从数据库中删除）。</p> <p> 默认情况下，<i>LightCycler® 480</i> 的基础软件中安装有带审计记录的数据库。您无法从审计记录数据库中删除实验对象。</p> |
| <p>Copy</p> | <p>点击此按钮将对选定的对象进行复制从而对其创建一个拷贝。您可以将其他用户文件夹中的项目拷贝到您自己的文件夹或子文件夹中。（然而，由于您自身的用户角色限制，可能使得您从其他用户文件夹中拷贝过来的某些项目无法使用。）一旦项目复制到您自己的文件夹，它就成为您自己的一个项目，在必要情况下您可以对其进行修改（可修改的项目也取决于您的用户角色）。</p> <p> 默认情况下，<i>LightCycler® 480</i> 的基础软件中安装有带有审计记录的数据库。您无法从审计记录数据库中复制实验对象。</p> <p>如何从其他用户的文件夹中复制一个项目：1. 在浏览器中用右键单击您希望复制的项目，然后选择“复制”。这时一个小的 <i>浏览器</i> 对话框会被打开。2. 选择目标文件夹，输入您希望使用的新名称，然后点击 <i>OK</i>。</p> |

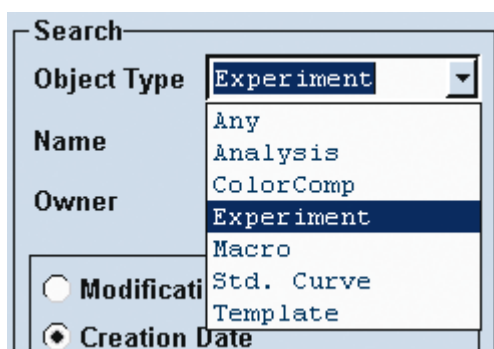
1.4.2 查询表

LightCycler® 480 的基础软件中包含有查询工具,您可以使用该工具找到 LightCycler® 480 的基础软件数据库中存储的实验或其他对象。您可以通过浏览器的“查询”表来使用查询工具。



如何进行查询的创建和执行:


- 1# 在“浏览器”窗口中选择“查询”表。
- 2# 在“目标类型”选择框中,选择希望找到的对象类型:



3# (可选) 输入准备查找的项目名称,如果您知道项目的所有者的话,那么也请同时输入。

4# 您可以使用通配符“*”来寻找任何字符串。

4# 选择“修改日期或创建日期”来指定您在查询中想使用的日期。

 修改日期和创建日期只能二选一（即：您可以在二者中选择一个，但不能同时选中二者）。

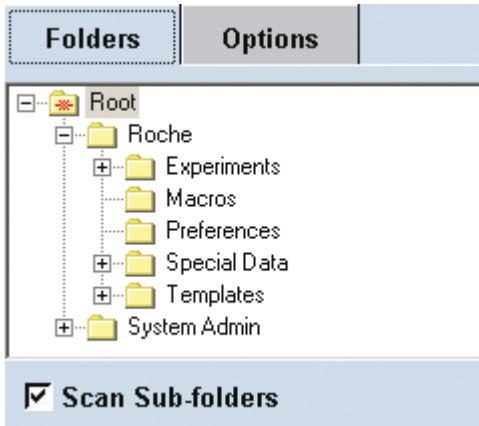
为搜索选择一个日期范围。您可以指定当前日期之前的月或日的数字，也可以选择在过去某时间中的起止时间。



The image shows a date selection dialog box with the following options:

- Modification Date
- Creation Date
- All
- in the last months
- in the last days
- between and

5 对于任何可用的对象类型，你也可以从“文件夹”中选择一个目标文件夹。选择“扫描子文件夹”，这样软件将搜索该目录下的所有子文件夹。



The image shows a folder selection dialog box with the following structure:

- Folders** | **Options**
- Root
 - Roche
 - Experiments
 - Macros
 - Preferences
 - Special Data
 - Templates
 - System Admin

Scan Sub-folders

6# 对于某些对象类型，您可以从“选择”表中选择其他搜索选项（从而更好地进行查询）：

| Object Type | Search Options |
|---------------------------|---|
| Experiment | <p>Folders Options</p> <p>Experiment Search</p> <p>Sample Name <input type="text"/></p> <p>Instrument Name <input type="text" value="Any"/></p> <p>CC Name <input type="text"/></p> <p>Std. Curve Name <input type="text"/></p> <p>Macro Name <input type="text"/></p> |
| Analysis | <p>Folders Options</p> <p>Analysis Search</p> <p>Type <input type="text" value="Abs Quant/2nd Der"/></p> <ul style="list-style-type: none">Abs Quant/2nd DerAbs Quant/Fit PtsColor CompEndpoint Genotyping <p>The list of available analysis types depends on the installed LightCycler® 480 Software modules.</p> |
| Color Comp/ Std. Curve | <p>Folders Options</p> <p>Std. Curve Search</p> <p>Instrument Name <input type="text"/></p> <ul style="list-style-type: none">anyVirtual LightCycler 480 96 System IVirtual LightCycler 480 384 System IVirtual LightCycler 480 96 System II |

7 点击 search 按钮。查询标准右边的窗体显示结果。

| Name | Type | Creation Date | Last Modified |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Demo Endpoint Genotyping (1.5-prelim) | HTCExperiment | 28.08.2007 | 21.09.2007 |
| H97-Demo-RelQuant-DualColor | HTCExperiment | 24.08.2007 | 21.09.2007 |
| H92-Demo-RelQuant-MonoColor-Samples | HTCExperiment | 14.08.2007 | 21.09.2007 |
| Demo Abs Quant with SYBR Green I | HTCExperiment | 09.06.2005 | 21.09.2007 |
| Demo Genotyping | HTCExperiment | 17.01.2006 | 21.09.2007 |
| Demo Tm Calling with HybProbe Probes | HTCExperiment | 20.07.2005 | 21.09.2007 |
| Demo Gene Scanning | HTCExperiment | 10.01.2007 | 21.09.2007 |


7 Object(s) returned from query.

搜索结果中包括以下项目：

- ▶ 对象名称
- ▶ 对象类型
- ▶ 对象创建日期
- ▶ 对象修改日期

▶ 您可以通过点击相应显示条目上方的名称从而选择以升序或降序的方式对搜索结果重新进行排列。

▶ 当您在列表中选择一个对象后，在结果窗格底部的状态条中将会显示出该对象的完整路径。

 如果有出错信息提示您查询引擎需要升级的话，则您必须对数据库进行升级（之后才能正常进行查询）。如果您拥有本地管理员特权，请参考“管理工具”一节中“升级数据库”的相应信息 或者您也可以与系统管理员进行联系以咨询相关内容。

8 如果要打开一个对象，双击对象名称即可。

1.4.3 样品选择器

在LightCycler®480软件的很多窗口上均显示有“样品选择器与样品表”（例如：在与分析有联系的很多窗口中）。“样品选择器”包括一个有可选择孔的多孔板（MWP）图像和在需要时显示可选择样品组的图例。多孔板图像可用于选择样品，或用作直观显示。当用作选择样品时，它可以伴有或不伴有图例，也可以伴有或不伴有“样品表”。要了解有关“样品表”的更多信息，请见下一节。

使用这些元素的界面为：

| 界面 | 样品选择器的组成 |
|-------------------|------------------------------|
| 在“运行”模块中的“数据显示”标签 | 多孔板图像 |
| 子集编辑器 | 多孔板图像 |
| “报告”模块 | 多孔板图像 |
| 样品编辑器 | 伴有“图例”和“图例属性选择器”的多孔板图像 |
| 分析屏幕 | 伴有“图例”、“图例属性选择器”和“样品表”的多孔板图像 |



选择和取消选定样品

可以通过在“子集”组合框中选择子集，来启用或禁用多孔板图像中的“样品”。禁用的样品为暗灰色，点击时无反应，也不显示信息。多孔板中的样品，如不属于选作分析的子集，则默认为禁用，不能改变。图例中生效的样品组取决于分析类型。

在启用时，样品可以被选定或取消选定。选中的样品显示为白色背景、按下去的按钮。未选样品的按钮显示为淡蓝色背景、未按下去的按钮。只有选中的样品被显示于“结果”表中以及相应的分析图表中。

您可以按以下步骤在多孔板图像中设置启用样品的选择状态：

- ▶ 点击样品，选中。

按住<Ctrl>键，并点击选中的样品，即可取消选定。

- ▶ 如果多孔板图像和“子集”组合框一起使用，那么选择子集只能启用子集中的样品，并自动选中这些样品。

- ▶ 点击并在未选的孔上拖曳，即可选定拖曳区域的全部孔。

按住<Ctrl>键，点击并在选中的孔上拖曳，即可取消选定拖曳区域的全部孔。

- ▶ 点击行或列表头，选中相应的行或列。

按住<Ctrl>键，点击行或列表头，即可取消选定相应的行或列。

样品表的显示对应于样品选择器中行或列的选择。

- ▶ 点击多孔板图像左上角的方块，切换整个板的选择状态。

- ▶ 如果图例包括在“样品选择器”中，您可以使用“图例属性选择器”来选择显示何种图例选项。“图例属性选择器”组合框中提供的选项取决于工作背景。

- ▶ 点击图例中的彩色图标，切换相应孔的选择状态。



图例图标的选择与多孔板图像中的选择同步。如果组中的全部成员都在多孔板图像中被选中，那么图例图标显示为选中。如有任何组中成员未被勾选，它将不会显示为选中。

- ▶ 双击图例图标，选中相应组中的全部项目，取消选定不在组里的全部项目。

- ▶ 要向选中项目中添加孔或从中删除孔，请按住<Ctrl>键并点击一个孔、行、列，或点击并拖曳一个矩形区域。

滚动多孔板图像




多孔板图像包括横向和纵向的滚动条，使您可以滚动图像，看到其任何部分。滚动时，列和行的表头保持固定。

放大和缩小

您可以有几种方法来放大或缩小多孔板图像：

- ▶ 用缩放按钮
- ▶ 用滑动条
- ▶ 通过拖动列或行的边缘来手工设置

多孔板图像提供以下缩放按钮：

| 按钮 | 功能 |
|---|------------------------------|
|  | 点击该按钮，显示完整的多孔板，并且其中每个孔都达到最大。 |
|  | 点击该按钮，显示选中的孔，并且其中每个孔都达到最大。 |
|  | 点击该按钮，使孔显示得足够大，可以看到孔中的全部文字。 |

多孔板图像提供2个滑动条，用于横向或纵向放大：

- ▶ 横向滑块位于最右侧（最小显示）时，多孔板图像显示单列。
- ▶ 横向滑块位于最左侧（最大显示）时，多孔板图像显示全部栏。
- ▶ 纵向滑块位于最顶部（最大显示）时，多孔板图像显示单行。
- ▶ 纵向滑块位于最底部（最小显示）时，多孔板图像显示全部行。

用按钮或滑块缩放时，您都可以通过拖动列的右边或行的底边来手工设置横向或纵向显示比例。全部列/行的新大小通过选中的列或行来计算。

打印多孔板图像

多孔板图像提供“打印”按钮，使您能打印图像的可见部分。



按单页的大小打印。

多孔板图像中提供的信息

根据工作内容，多孔板图像可显示以下信息：


- ▶ 每个孔含有一个图例属性的彩色图标。
- ▶ 每个孔的彩色图标显示一个提示框，框中包括在多孔板图像中可见的样品信息区域。这些区域是否具有标签取决于工作内容。
- ▶ 如果多孔板图像放大到足够大，孔中的全部文字都能被看见，那么
 - ▶ 图像显示彩色图标右侧的图例属性为信息的第一行。
 - ▶ 以后的行可以包含或不包含彩色图标。如果含有彩色图标，以后的图标也没有图例。
 - ▶ 每个单元格的以后行中的信息由工作内容确定。



多孔板图像单元格中显示的信息不能被编辑。

1.4.4 样品表

样品表显示的是多孔板图片中样品相对应的孔的情况，分析图表中样品的颜色（该颜色决定于您在样品选项所做的定义）也同时显示出来。您可以使用样品表选择在分析图表中要显示的样品，或者在分析中加入/去除一个样品。

 样品表中的样品颜色与图表或数据显示中的颜色是一致的，而与多孔板图片中的颜色无关。多孔板图片中的颜色指的是否样品选择器图例中样品组的颜色。

只有样品选择器中可用的和被选定的样品才会在样品表中显示出来。其他信息（位于附加列中）也可以被加入到样品表中，这取决于其所在的模块（例如：定量分析中的交叉阈值和浓度结果）。如果样品数量过多以至于一个屏幕无法完全显示出来时，系统会自动添加一个滚动条。

| Samples | | | Results | | | |
|-------------------------------------|-------|-----------------------|---------|---------------|----------|--------|
| Include | Color | Pos Name | Cp | Concentration | Standard | Status |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | G15 Standard 7 | 33,72 | 8,99E-1 | 1,00E0 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | H15 Standard 7 | 35,25 | 3,16E-1 | 1,00E0 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | I15 Standard 7 | 34,54 | 5,22E-1 | 1,00E0 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | J15 Standard 7 | 33,45 | 1,08E0 | 1,00E0 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | A23 no template contr | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | K1 no template contr | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | O24 no template contr | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | P11 no template contr | 35,17 | 3,44E-1 | | |

你可以在样品表中选择显示出来的任意一个样品使之在分析图表中出现，但样品信息以及样品分类的顺序是无法改变的。选定的样品均会高亮显示。

如果您想在样品表中加入或去掉某些样品，使用标准窗口的 shift-click 及 ctrl-click 操作即可。

另外，样品也可以被加入到分析中，当然也可以从其中将某样品去掉。如果想加入某样品，选中表左侧的“添加”框。“添加”框的状态可通过双击或按空格键来进行切换。通过“添加”选项，您可以完成数种操作，例如您可以通过它设定在绝对定量分析过程中计算标准曲线所采用的标准。

 当您改变了一个样品的添加状态后，您必须对该分析重新进行计算。

1.5 导出与导入文件和对象

如果您想在 LightCycler® 480 的基础软件中查看实验的相关信息，则必须首先将实验文件储存到 LightCycler® 480 的基础软件的数据库中。因此，如果实验目前还存储在硬盘上或者其他数据存储介质上时，您必须将文件导入到 LightCycler® 480 的基础软件的数据库中。

导入一个文件时，该文件的源文件并不会随着导入操作而被删除；它只是将文件复制到数据库中，从而使您可以在 LightCycler® 480 的基础软件中看到文件中包含的信息。例如，您需要在下面这些情况下导入文件：

- ▶ 如果您想把 LightCycler® 480 的基础软件中的一个实验从一个数据库移动到另一个数据库中，您必须将文件从原来的数据库导出到一个新的位置（例如您的硬盘），然后把文件导入到第二个数据库中。
- ▶ 如果您想使用 LightCycler® 480 的软件查看或者分析实验文件。

使用导入浏览器的控制按钮，您可以导入以下文件：

- ▶ **ATF**：是从 LightCycler® 480 软件的 3.5.3 版本或更新的版本导出的实验文件；您还可以使用下述的批量导入工具一次性地把某个文件夹内的全部 FLO 文件导入。（导入 FLO 文件自动地会将相应的 ABT 和 TEM 文件同时导入。）



从 ATF 文件中导入的原始数据将自动和“ATF”检测格式相关联。这种格式将被映射成一个激发 (470) 和 6 个发射滤光片（分别称为 530, 555, 610, 640, 670 和 710）。如果导入的原始数据是使用连续模式环境生成的，则系统不会对其进行转换。每摄氏度的采集数目将会被设置成一个“5”的固定值。其他模式环境将会被忽略。

- ▶ **IX0**：是从 LightCycler® 软件的 4.0/4.05 版本或 LightCycler® 480 的基础软件中导出的实验文件；您可以使用下述的批量导入工具一次性地把某个文件夹内的全部 IX0 文件导入。



当您从 LightCycler® 软件的 4.0 或 4.05 版本中导入 IX0 文件时，只有原始数据会被导入到 LightCycler® 480 的数据库中。其他任何包含于 IX0 文件（例如：分析）的对象都不会被导入。



不具有校验的 IX0 文件不能被导入，当您试图进行这样的操作时，系统将会产生一个出错信息。



对于导入的实验，通常会自动地有一个“导入样品”子集被生成。

如果需要在 LightCycler® 480 的基础软件数据库以外存储实验对象或模板，或者在数据库之间移动对象，则您必须导出 LightCycler® 480 的基础软件的文件。导出文件时并不会移走数据库中的对象，而是把文件复制成 LightCycler® 480 XML 格式然后把它存储在您指定的位置。导出的文件均以 .ixo 为文件扩展名。另外，您可以把 LightCycler® 480 基础软件的图表数据以原始数据格式进行存储。



LightCycler® 480 基础软件中导出的 IX0 文件无法导入到 LightCycler® 的 4.05 版本软件中。


下文主要是帮助您理解如何进行单个地或成批的文件的导入和导出（即批导入或批导出）LightCycler® 480 的文件。


1.5.1 导出单个的 LightCycler® 480 基础软件的对象：

从浏览器或者打开的 LightCycler® 480 基础软件的主窗口中均可进行单个的 LightCycler® 480 基础软件对象或数据的导出。

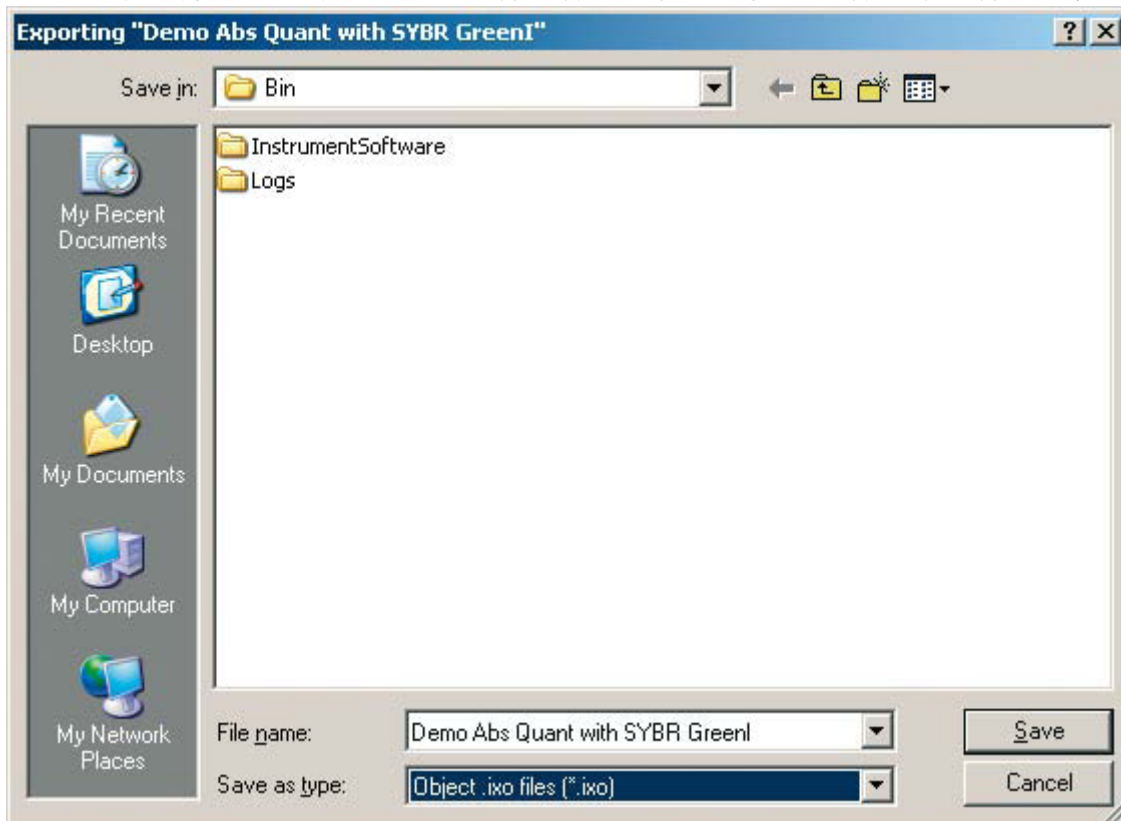
1# 下述的两种方法都可以对 LightCycler® 480 的对象进行导出：

- ▶ 在“浏览器”中进行选择对象
- ▶ 在主窗口中将其打开。

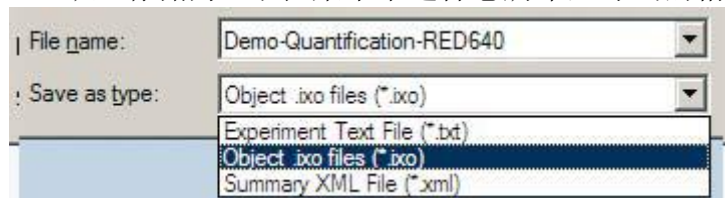
2# ▶ 当使用浏览器进行工作时，点击  按钮。

- ▶ 使用主窗口工作时，点击  按钮。

3# 这时系统将为您打开 Windows 文件选择对话框。浏览以选择一个文件导出位置。




4 从“存储为”下拉菜单中选择您所希望导出的格式（可以用*.ixo 或者*.ltp 格式）：





5 输入一个文件名，点击“保存”。

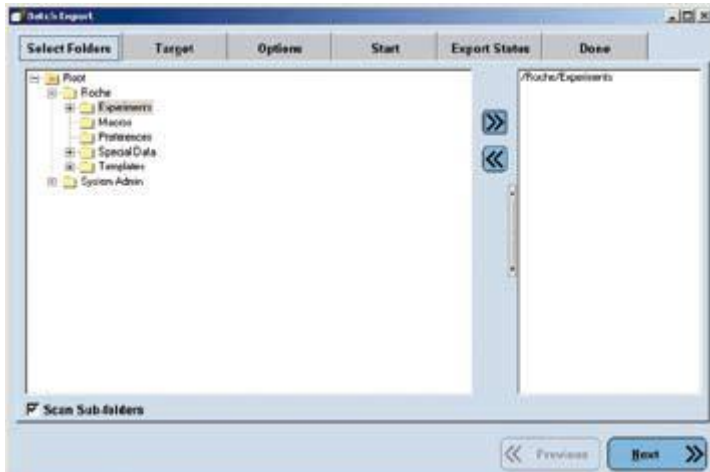
1.5.2 同时导出多个实验文件

LightCycler® 480 的基础软件中包含有一个批量导出工具，通过此工具您可以将一个目录下的所有实验文件一次性全部导出。按照以下操作可将一个目录下的所有实验文件全部导出：

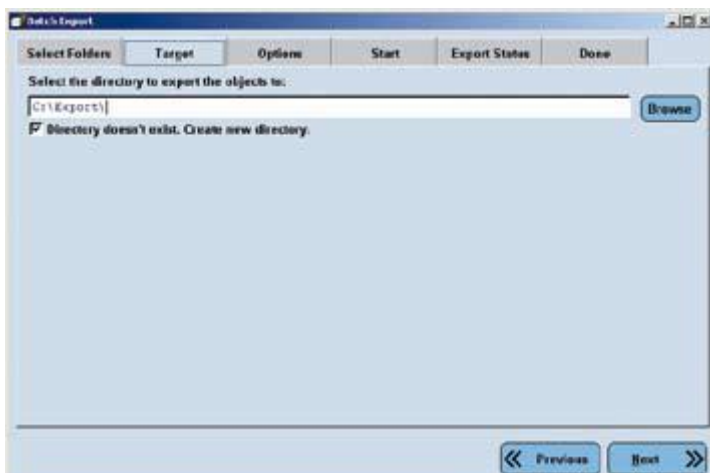
 只有使用资源管理器才可以进行批量导出。

 系统使用一个向导帮助您完成批量导出。您可以点击相应的按钮从而自由选择退回一步或向前一步进行操作。注意：只有当您完成当前选项卡要求的设定之后，才可以进行下一步。

1# 点击浏览器控制按钮 。这时系统将为您打开批量导出向导窗口。在该窗口的“源文件”表中，您可以从当前已经打开的数据库选择一个源文件夹。选中“扫描子文件夹”选项，这样选定路径的所有子文件夹均会被扫描。

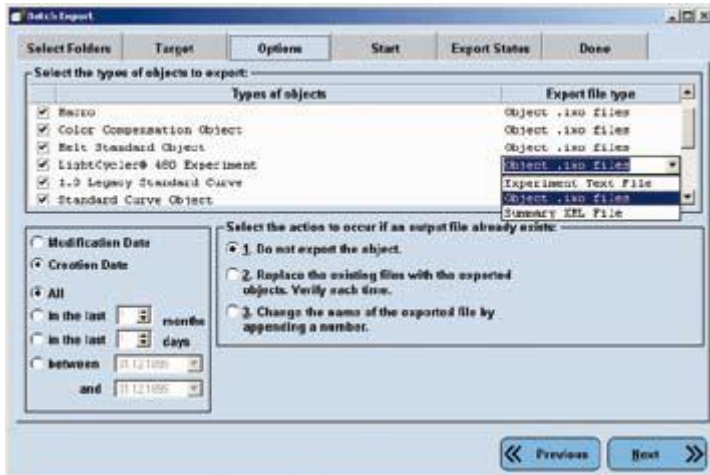


2# 在“目标”表下，选择一个目标目录。点击浏览按钮选择一个目标文件夹。或者您也可以在输入区域中直接输入目标目录的路径。如果指定的目录并不存在，则请点击输入区域下方的框，系统将为您创建之。



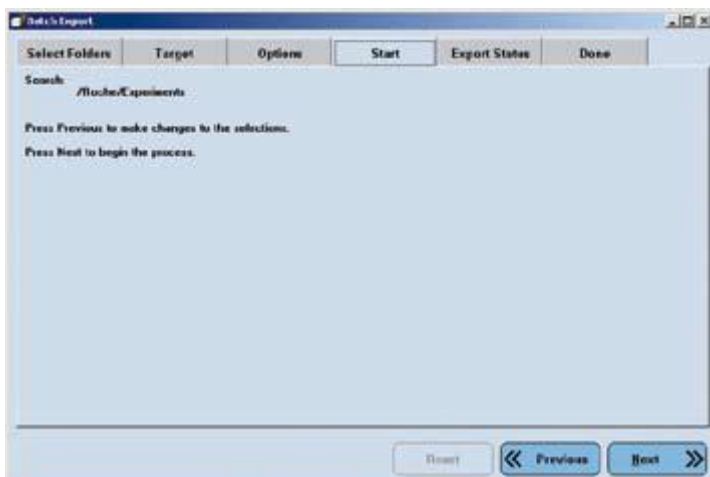
3# 在“选择”表中，您可以设定不同的导出选择。

- ▶ 选择您从文件夹中导出的对象的类型（可以是一种或多种）。
- ▶ 使用指定的创建日期或修改日期，这样可以对导出的对象加以选择和限定。日期范围的设定可以使用下列方式中的任何一种：
 - ▶ 所有的
 - ▶ 在过去 n 个月里
 - ▶ 在过去 n 年里
 - ▶ 用户自行设定一个起止日期
- ▶ 如果一个与将导出的对象同名的文件已经存在时，则系统将提供如下动作供您选择：
 - ▶ 不要导出
 - ▶ 用户确认的情况下，替换掉一个已经存在的文件
 - ▶ 在文件名后面加上一个数字并作为一个新文件保存

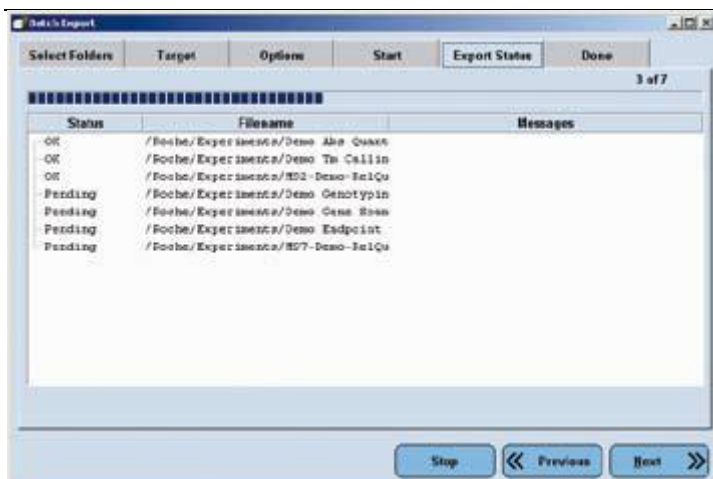


4 在“开始”表中，您可以查看您的设置并开始导出过程。

“开始”表上的“重新设置”按钮只有当一次导出完成后才会重新处于激活状态。点击重新设置按钮，这样就可以对上一次导出的结果重新设置从而重复进行导出。



5 在“导出状态”表中，您可以查看导出过程的状态。当导出正在进行中时，“停止”按钮是激活的。您可以点击“停止”按钮以中止导出过程。




6# 系统将在“完成”表中为您显示出批量输出结果的总结。点击“完成”按钮退出向导模式。



1.5.3 导入单个文件

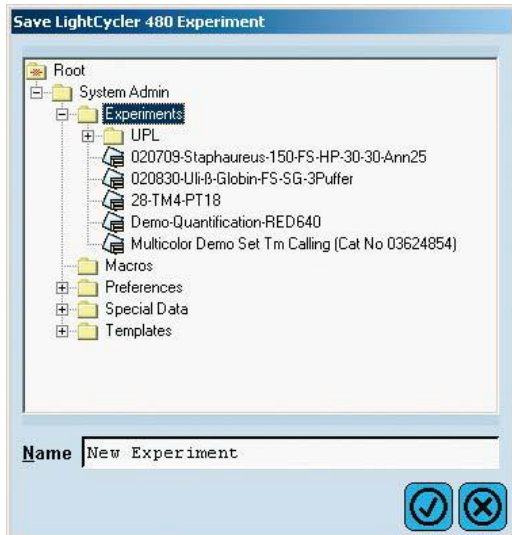
1# 在资源管理器控制面板上选择“导入”，选择您想导入的文件类型：
▶ 对于 FOL、ATB 和 TEM 文件，请选择“ATF 文件”。
▶ 对于 LightCycler® 480 或 LightCycler® 4.0/4.05 版本的文件，请选择“对象为 *ix0* 文件”。


2# 找到并选定您需要的文件，点击“打开”。这时文件会被导入并在主窗口中打开

 如果您想选择多个文件进行导入，则请点击文件名时同时按下键盘的 <Ctrl> 键。

3# 如果将导入的文件做为 LightCycler® 480 的数据库中的对象来保存，点击“保存”按钮。在数据库中浏览到您希望的位置并对对象进行保存，并键入一个新的对


象名称，然后单击 *OK*。





 如果您要导入 *LightCycler® 4.0/4.05* 软件的实验中包含有颜色补偿数据，则您需要将相应文件的颜色补偿实验单独导入并且生成一个新的颜色补偿对象。

1.5.4 同时导入多个文件



LightCycler® 480 的基础软件中包含有一个批量导入工具，通过此工具您可以一次性地将一个目录下的所有实验文件全部导入。

 在进行 *FLO* 文件的批量导入时，要求相应目录下必须包含有与每个 *FLO* 文件相对应的 *ABT* 和 *TEM* 文件，否则无法此 *FLO* 文件是无法导入的。

 只有使用资源管理器才可以进行批量导入。

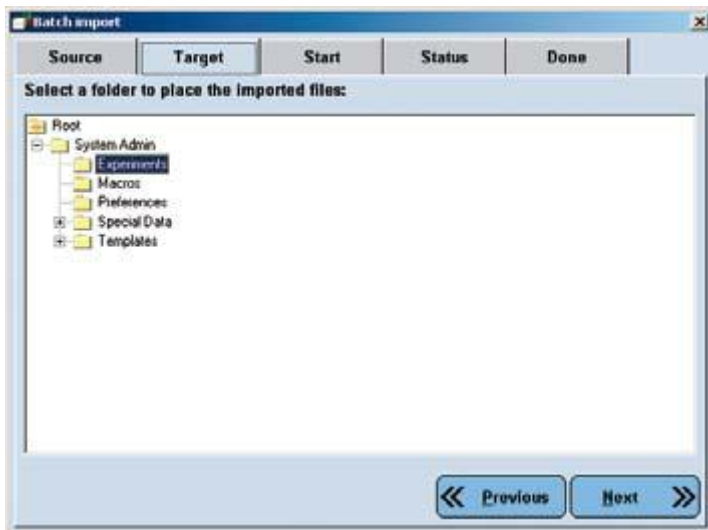
 系统使用向导模式帮助您完成批量导入。您可以点击相应的按钮从而自由选择向导模式退回一步或向前一步进行操作。注意：只有当您当前表要求的设定完成之后，才可以继续进行下一步。

按照以下步骤进行操作，您就可以一次性地导入一个目录下的全部实验文件。如果需要的话，还可以多次对其进行多次导入。

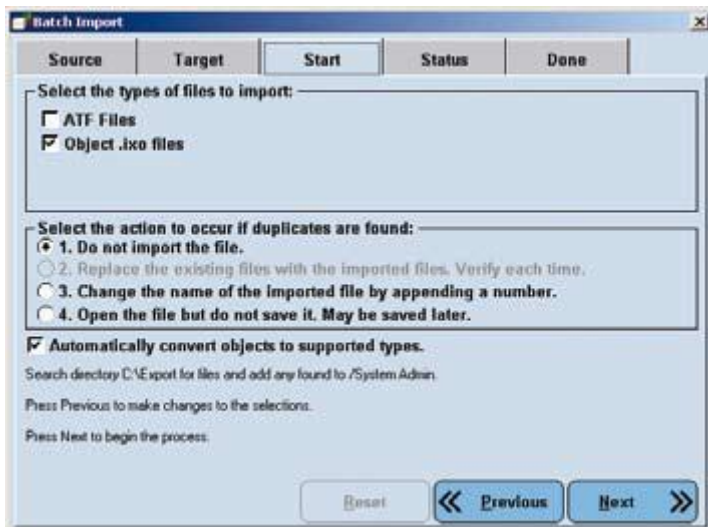
 1# 点击资源浏览器控制按钮 。这时系统将为您打开“批量导入”向导。在导入向导的“源文件”表中选择源文件夹。如果要源文件夹加入到列表中，点击“添加”按钮。选中“扫描子文件夹”选择框，这样源文件夹中的所有子文件夹均会被加入到导入过程中。点击“删除”，这样可以从目录文件列表中删除目录项目。



2 在“目标”表中，使用位置选择器从当前打开的数据库中选择一个目标目录。



3# 在“开始”表中，您可以设定不同的导入选项并开始导入过程。




以下是您可以进行的选择：


- ▶ 选择是否从目录下选择导入 ATF 或 IX0 文件（或它们的任意组合）。
- ▶ 如果一个与将导出的对象同名的文件已经存在时，系统将执行由您指定的动作。


可供您选择的动作包括：

- ▶ 不要导出
- ▶ 经用户确认，替换掉一个已经存在的文件
- ▶ 在文件名的后面加上一个数字从而将文件以一个新名称进行保存

点击“下一步”开始导入过程。

 在“开始”表中的“重新设置”按钮只有当一次导入完成后才会重新处于激活状态。通过点击“重新设置”按钮，您就可以对上一次导入的结果重新设置从而重复进行导入。

 在“状态”表中，您可以查看导入过程的状态。当导入正在进行中时，“停止”按钮是激活的。您可以点击“停止”按钮从而中止导入过程。

 导入完成后，“完成”表中将会显示出批量导入结果的总结。点击“完成”按钮退出向导模式。

2. 实验的编程与运行


LightCycler® 480 的基础软件根据您在实验方案中提供的信息来对 LightCycler® 480 仪器进行操作。在一个实验运行的过程中，实验方案设定了仪器温度、保持时间、执行循环的次数以及其他参数。当实验正在进行时，软件可以从仪器中收集温度及荧光数据并将其显示在“数据显示”表中。实验完成时，您可以保存实验数据，并使用 LightCycler® 480 的基础软件的分析模块对结果进行分析。

本节主要阐述如何进行下述操作：

- ▶对实验进行编程
- ▶运行实验
- ▶定义检测格式


2.1 实验的编程

对实验的编程主要包括以下内容：对仪器将执行的加热和冷却的循环次数进行定义，并提供一般性的方案信息。如果您想建立一个实验方案，则您的用户帐户必须具有高级用户或本地管理员角色。如果您需要关于每种用户所具有特权的更多信息，请参考“管理用户访问”一节中相关内容。

 只有当 LightCycler® 480 的基础软件中安装了仪器之后，您才可以对实验进行编程。LightCycler® 480 的基础软件提供两种虚拟的 LightCycler® 480 仪器（96 版本或 384 版本），通过它您可以在离线模式下进行编程。如果真实仪器并未连接而您又需要对一个实验进行编程时，则应在仪器对话框中选择两种虚拟仪器中的一种并将其设为默认仪器。当您对一个实验进行编程时，可以不实际连接一个仪器（而使用虚拟仪器）。

请按照以下一般步骤对实验进行编程。在每个一般操作步骤的后面均附有详细的信息。

如何对一个新实验进行编程：

1# 在总述窗口的任务区域中点击“新实验”，或转到资源管理器窗口并点“新的”。选定 LightCycler® 480 仪器的新实验的相应图标并点击。


2# 在“编程”表的“创建”区域中设定以下创建新实验所需的参数：



- ▶ 检测格式
- ▶ 温控模块类型（取决于激活的仪器，只进行显示而不能选择）
- ▶ 板的标识符（可选）
- ▶ 反应体积


3# 从下拉菜单中选择检测格式，您还可以通过使用“定制”选择框对所选的检测格式进行修改。如需更多信息，请参考“设定检测格式”一节。


4# 在“多孔板标识符”区域中输入一个 PCR 多孔板的标识符，您可以使用键盘输入，也可以使用手持式条形码扫描仪进行输入。如果您已经安装并激活了可选用的 LIMS/条形码模块（实验室信息管理系统），则在仪器载入多孔板时，板的标识符可以通过 LightCycler® 480 仪器内嵌的条形码扫描仪自动获取。

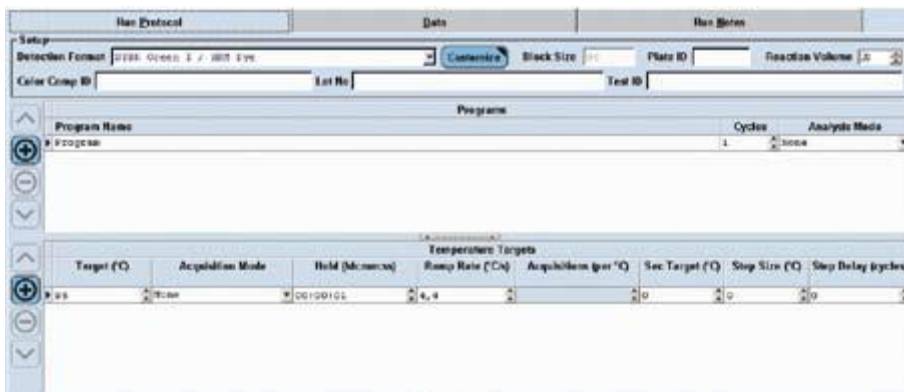
 如果您已经用键盘输入了一块板的标识符到“多孔板标识符”区域，而国际条形码扫描仪读出的多孔板条形码与您输入的不一致，此时软件会提醒您对输入的标识符进行替换（即以条形码为准）。如果您选择“否”，则无法开始实验。

5# 选择一个以微升为单位的反应体积。反应体积的范围决定于您所安装的温控模块的类型。


- ▶ 96 孔温控模块：10-100 微升
- ▶ 384 孔温控模块：5-20 微升

 您可以使用的最小反应体系的体积为 3 微升。但是，我们建议您不要使用这样小的反应体积，因为蒸发的原因，这种反应体积很容易导致实验的失败。如果您确实需要使用这么小的反应体积，应注意确保实验过程中反应体系避免蒸发（例如：使用矿物油进行覆盖）。

6# 在“编程”与“目标温度”区段中，点击“添加”按钮，这样您就可以随意添加您实验方案中所需要的其他程序或目标温度（第一个程序往往以默认的方式提供）。在每一个程序列中指定了程序的名称、循环次数、分析模式等（如需更多信息，请参考“[设定程序与目标温度](#)”一节中的相关内容）。




7 或者，您也可以通过以下方式使用实验的模板：

- a) 点击“使用模板”以显示“使用模板”对话框。
- b) 从列表中选择模板，然后点击对号.

这时该模板的设定内容就可以应用到新的实验方案中了。如果需要，您还可以修改创建参数，实验程序以及目标温度等。

8#（可选）在“模块”栏中，点击“子集编辑器”以定义样品信息。如需详细信息，请参考“[样品编辑器](#)”一节中的相关内容。

9（可选）在“模块”栏中，点击“子集编辑器”以定义样品子集。如需详细信息，请参考“[使用子集工作](#)”一节。

 在运行之前，您无需对样品和子集信息进行定义。您可以根据需要，在运行过程之中或之后定义这些信息。

10 准备多孔板并将其载入到仪器之中（参考“[操作](#)”中的相关内容）。

11 点击“开始运行”。

 只有当多孔板已经被载入到仪器之中后，“开始运行”按钮才会被激活。

12# 这时系统将为您打开“保存实验”对话框。为实验输入一个名称，并选择一个保存它的文件夹。

2.1.1 设定检测格式

通过设定检测格式，您可以选择适合您实验的滤光片组合方式。

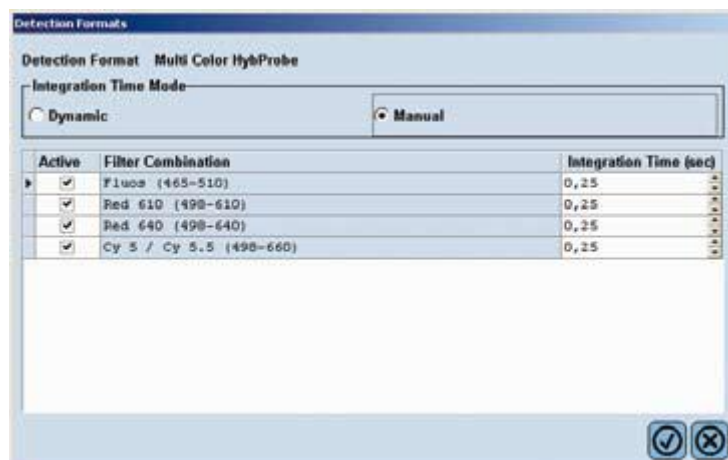
当您点击“程序”表的“创建”区域中的“定制”按钮后，“检测格式”对话框就会显示出来。通过该对话框，您可以对可用的检测格式进行设置上的修改。您在此处进行的修改只会应用到当前实验中。

! 当实验已经开始运行后，您就无法改变或定制检测格式了。如果在您的实验中您使用了一种并不合适的检测格式，则会因为仪器无法收集到有用的数据导致最后运行失败。

如何设定检测格式：

1# 在“创建”区域，从下拉菜单中选择一种检测格式。如需检测格式设定方面的更多信息，请参考“管理工具”一节。

2# 如果您想修改检测格式的设置，请点击“定制”。这时系统将为您打开“检测格式”对话框。



3# 选择一种曝光时间模式：

▶ 动态模式：不再需要任何输入

! 在这种模式下，LightCycler® 480 的基础软件使用对“滤光片组合”中定义的“熔解和定量因子”通过对开始反应中的初始值来自动计算最终的荧光强度。这个计算出来的最终荧光强度将被用来设定最佳曝光时间。（如需更多信息，请参考“管理工具”一节中的相关内容。）

▶ 手动方式：对每一种滤光片组合均需设定一个曝光时间值。手动设置的曝光时间使用秒为单位，时间范围为 0.01 至 10 秒。

4# 为选定的检测格式选择滤光片组合。默认情况下，所有的滤光片组合均被选定。如果需要的话，您可以清空相应选择框以去掉某一滤光片组合。

! 例如，如果您选择包括四种滤光片组合的“多色 Hybprobe 探针检测格式”，但是又只希望使用红色 610-和红色-640 标记的探针来运行实验，那么把“Fluor”和“Cy5”滤光片组合去掉即可。尽管使用默认设定对实验本身不会有什么不妥，但使用默认的滤光片组合时，因为其中会有一些并不需要的检测，因而会使得测量时间不必要地延长。

! 只有在进行颜色补偿实验时，才会用到多色 Hybprobe 探针检测格式中的荧光滤

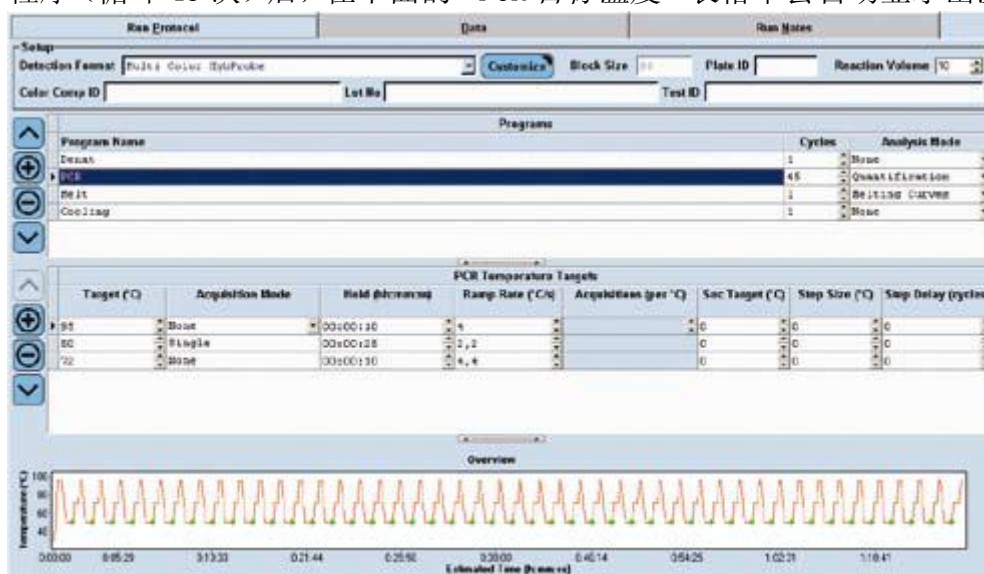
光片组合。

5# 点击确认，这样选定的滤光片组合方式就会应用到您的实验当中了。
对实验进行编程


2.1.2 定义程序与目标温度


每个实验方案都由一个或多个程序组成。每个程序也可被多个循环所使用。每个程序中包含有一个或多个目标温度。目标温度指定了实验所需达到的温度值、温度持续的时间、在多长时间到达该温度等参数。您可以在“程序”表中的“运行”模块中定义程序及其目标温度。


下面的例子包括了四个程序：变性、PCR、熔解和冷却。当在“程序”表格中选择了PCR程序（循环45次）后，在下面的“PCR目标温度”表格中会自动显示出温度的各个参数。




如何定义程序与目标温度：

1# 在“程序”表中的“程序”区段中，点击加号添加一个新的程序。这时一个名称为“程序”的默认程序会被添加上去，该程序中包含有一个默认的目标温度。




 您可以添加多达 99 个程序。


2# 对下列程序参数的默认值进行编辑，点击键盘上的<Tab>键可以使当前编辑从一列跳转到下一列。（如果您在此过程中错误地输入了某值，点击减号即可删除这一程序，然后重新开始即可。）

| 参数 | 描述/含义 | 有效值 |
|------|--|--|
| 程序名称 | 程序的名称。点击“程序名称”框，为程序输入一个新的名称。 | 任何数字字符串。 |
| 循环 | 程序中将对程序进行重复运行的次数。您可以直接输入一个数值，也可以点击上翻下翻箭头进行选择。 | 1-99次循环 |
| 分析模式 | 对该程序期望使用的分析。请您从下拉列表中选择一种分析模式。  分析模式确定了在目标温度中哪种参数可以被选择。（例如：如果您选择的定量分析模式，则您无法选用“连接采集”模式了。 | 无： 不准备进行分析。 定量： 准备进行定量分析。 熔解曲线： 准备进行熔解曲线分析。 颜色补偿： 准备进行颜色补偿分析。 |

3# 在“目标温度”区域中，对第一个目标温度的以下几个温度参数默认值进行编辑。




| 参数 | 描述/含义 | 有效值 |
|------|-------------------------------------|--|
| 目标 | 目标温度/目标温度。请输入一温度值。 | 37° C 至 99° C，默认情况下使用的温度为 95° C。 |
| 采集模式 | 使用哪种模式对荧光数据进行采集。请在下拉列表中选择一种采集模式。 | 无： 不进行荧光数据的采集。 单个： 在每个循环中每一温度结束时采集一次荧光数据，这种模式是定量分析时使用的典型设置。 连续： 连续采集荧光数据，这种模式是进行熔解曲线分析或颜色补偿分析时使用的典型设置。 |
| 保持 | 目标温度的保持时间（使用“小时：分钟：秒”的模式）。请输入一保持时间。 | 00: 00: 00 - 12: 00: 00 |


| 参数 | 描述/含义 | 有效值 |
|-------------|---|--|
| 速率 (摄氏度/秒) | <p>仪器加热或冷却到目标温度时的速率。请输入一速率值。</p> <p> 最大速率取决于您仪器上所安装的温控模块的类型。</p> | <p>▶加热速率：1.0 - 4.8 ° C/s。</p> <p>▶冷却速率：1.0 - 2.5 ° C/s。</p> <p> 如果您想将样品冷却到低于 50 摄氏度的目标温度时，请使用等于或低于 2.0° C/s 的速率。</p> |
| 采集数 (每摄氏度) | <p>每摄氏度中测量数据的次数。仅在“连续”采集模式中才需进行此项设定。</p> | <p>1 至 100，默认值为 5。</p> <p> 对于熔解曲线分析的每一次检测而言，其最优采集频率需要根据经验进行设定，这一范围通常是 1 次/° C—5 次/° C。</p> |
| 第二目标温度(摄氏度) | <p>第二目标温度是程序的最后一个循环要达到的温度。使用这一设置，您可以在扩增反应的过程中改变某部分的目标温度。请输入一温度值。</p> | <p>默认：0° C (即不设置第二目标温度)。有效范围：37° C - 99° C。</p> |
| 步进值 (摄氏度) | <p>欲达到第二目标温度时，每一个循环要改变的温度数。请输入一步进值。</p> | <p>默认：0° C (无步进，用于不设置第二目标温度的情况)。有效值：0.1° C - 20° C。</p> |
| 步进延迟数 (循环) | <p>步进值第一次使用前将进行的循环次数。</p> | <p>默认：0 (第一个循环即开始步进)。有效值：0 - 99</p> |

4# 点击加号在当前程序中添加另一个目标温度，并输入参数数值。在当前程序中重复设定您所需要的多个目标温度。

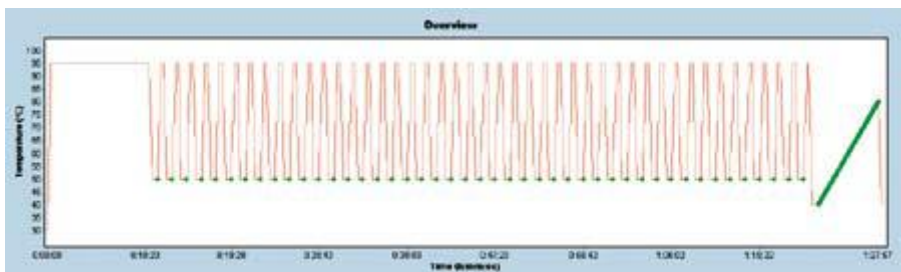
 您可以添加多达 99 个目标温度。


5# 重复进行步骤 1 到步骤 4，您就可以添加多个程序以及它们各自的目标温度。



 如果需要对程度和目标温度重新排序，您可以点击您想重排的项目，然后点击上箭头或下箭头即可在列表中调整项目的位置。

 如果您想取消一个项目，选定这个项目，然后点击减号符号即可。

6# 通过总述可查看实验的图解，您所设定的实验方案可完整地在该图中表示出来。通过查看这一图形，您可以确认所设定的实验方案是否满足您所需要的时间以及温度循环，并且可以直接在图形中对程序和温度进行修改。



 图中省略了时间值。

7# 点击“一般动作”条中的保存符号以保存实验方案。浏览并找到您所需要的保存实验方案的位置，输入方案名称，然后点击对号符号即可。

2.1.3 定制在线数据显示

当实验运行时，仪器所收集的数据将在“运行”模块中的“数据”表中以表格的形式显示出来。可供使用的表格类型共有三种：


- ▶ 荧光史表：对特定样品使用特定滤光片所获得的荧光强度对时间变化所作的图表
- ▶ 温度史表：实验运行过程中温度和数据采集点
- ▶ 曝光时间史表：以曝光时间对采集次数所作的图表。

您可以改变当前表格的类型，还可以对其显示方式进行调整。



当实验正在运行中时，您可以对在线数据显示方式进行定制。

如何定制在线数据显示：

在“运行”模块中选择“数据”表，并点击您想修改的表格的上方的  符号。这时系统会为您显示表格的选择工具，工具中含有一个表格菜单。荧光表格中含有一些额外的选项可供您选择。

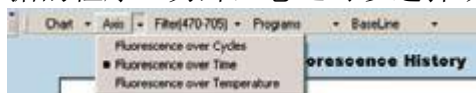
2 如果您要改变表格类型，则请从“表格”菜单中选择一种新的表格类型：

- ▶ 荧光史表：以荧光对时间，循环或温度的方式进行数据显示
- ▶ 温度史表：以温度对时间的方式进行数据显示
- ▶ 曝光时间史表：以曝光时间对采集数的方式进行显示



如何调整“荧光史表”表格的显示方式：

▶ 选择轴类型（即数据以 X 轴进行表示的类型）、滤光片组合以及包含有您想查看的数据的程序。另外，您还可以选择或去掉基线减除。




2.2 运行实验


当您已经定义好了创建参数（程序以及目标温度）以及在线数据显示表格后，您就可以随时开始运行 LightCycler® 480 仪器进行实验了。

如何开始运行实验：

- 1 按照 “操作” 一章中的相关内容对 LightCycler® 480 仪器的实验运行进行准备。
- 2# 按照 “操作” 一章中的相关内容将多孔板载入到 LightCycler® 480 仪器中。
- 3# 点击 “运行实验方案” 表中的 “开始运行”。

 只有当仪器已经正确连接时您才可以开始运行一个实验。只有当多孔板已经被载入到仪器之中后，“开始运行”按钮才会被激活。

- 4# 系统会提示您对实验进行保存。为实验输入名称后浏览到您所希望保存该实验的位置。

 如果您关闭了“保存”对话框（即未对实验进行保存），则仪器无法开始运行实验。

- 5# 实验开始运行后，系统将显示一个状态条，通过它您可以了解实验运行的进程。



- 6# 在实验运行的过程中，“信息”区域会不断地显示诸如运行进程或在运行中出现的错误等信息，而实验中获得样品数据也会显示在“数据”表的表格中。

如果您想查看某特定的样品，则请在样品列表中选择（一个或多个样品），系统将会为您显示之。如果需要的话，您还可以在实验运行的过程当中对显示表格设定进行调整。如需更多信息，请参考 “定制在线数据显示” 一节中的相关内容。

- 8# （可选）您可以在实验运行结束之后对对象加以颜色补偿。使用“颜色补偿”多选按钮即可打开或关闭颜色补偿，或者选择您所希望的颜色补偿对象。

| | |
|--------|---|
| 关闭颜色补偿 | 未选定颜色补偿分析对象。 如果您不希望使用颜色补偿的话，请选择此项。 |
| 在使用中 | 您可以通过该按钮从“选择的颜色补偿”列表选择一个对象。 该列表中显示了所有选定的（即前面已经应用的）颜色补偿对象，在每个对象名称后的括号内均会列出经过补偿的滤光片组合。 |
| 在数据库中 | 您可以通过“可用的颜色补偿”列表选择一个对象，该列表中显示出所有可用于颜色补偿的对象。列表中包括了每一个对象的名称、创建日期、所在路径及可用于补偿的滤光片组合。 |

9# (可选) 运行过程中如何调整或停止程序:

点击“结束程序”即可停止当前程序而继续执行实验方案中的下一步程序。

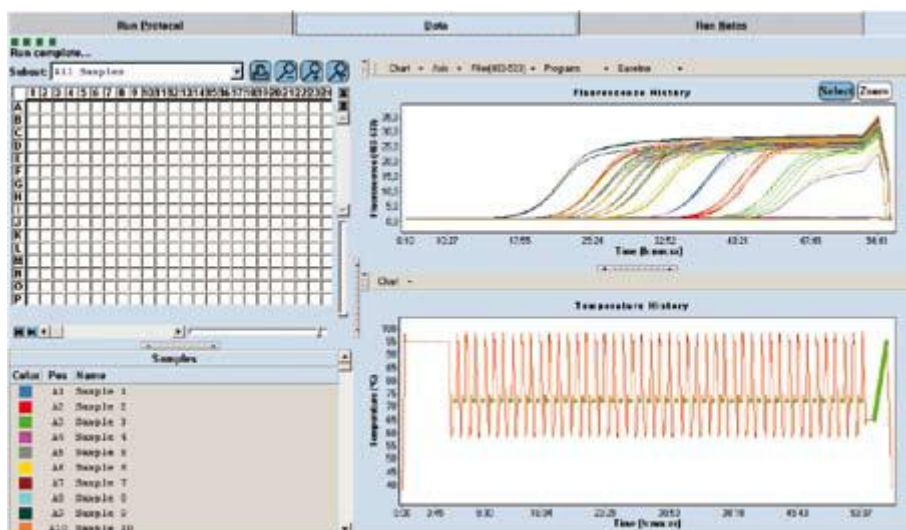
! 进行了该操作, 即意味着对数据完整性的确认, 这样就可以对其进行了。

点击“增加 10 个循环”即可以对当前程序增加 10 个循环。

点击“退出运行”即可结束该实验的运行。(在实验运行过程中, 原“开始运行”按钮会被“退出运行”按钮所代替。)

! 如果点击了“退出运行”按钮, 则系统无法获得完整的数据, 进而也无法进行对其进行了。

10# 当实验完成时, 系统将弹出状态信息提示您“运行完成”。



11 如果需要的话, 您可以从模块条中点击“样品编辑器”按钮打开样品编辑器从而对样品信息加以补充。如需更多信息, 请参考“输入样品信息”一节中的相关内容。


! 在实验开始前、进行中或者结束后的任意时间, 您都可以对样品信息进行输入或修改。我们推荐您在实验运行开始前就完整地输入样品的信息。

! 在运行过程中, 当前实验的一些临时备份文件会被存储到用户的文件系统中。如果运行过程结束且数据库的数据均已被正常存储, 则这些临时备份文件将被(系统自动)删除。如果应用程序与仪器的联系被暂时中断, 则软件能自动地在连接恢复后从仪器中下载所需的数据。该连接临时中断时间的最大值为 7 分钟。如果连接中断时间超过了该最大值, 则系统会认为实验被中止并产生一个警告信息。如果备份文件和仪器数据仍存在, 则在您下次登录到系统或者开始一次新的运行时, 软件在找到相应的原实验文件的情况下, 仍然会对其数据进行自动恢复。如果软件无法找到相应的实验, 则系统会提示您确认对备份文件和数据进行的删除操作。

2.3 输入样品信息

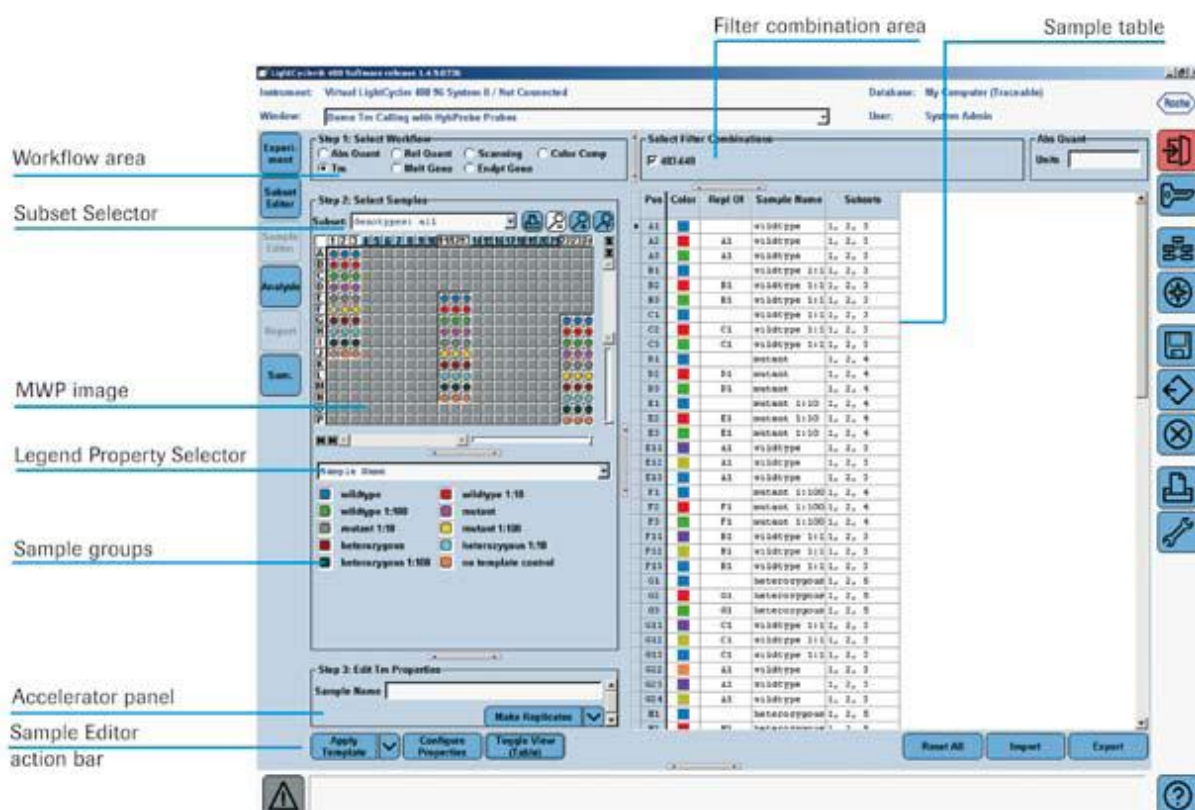
使用 LightCycler® 480 软件“样品编辑器”来记录实验中样本的相关信息。您可以在实验开始前、进行中或完成后人工输入样品信息。创建一个新的实验时，“样本编辑器”数据还可以从空位分隔格式的文本文件中导入。

 可编辑区域以白色显示，而不可编辑区域则以淡蓝色显示。只有非复制条目才可以被编辑。

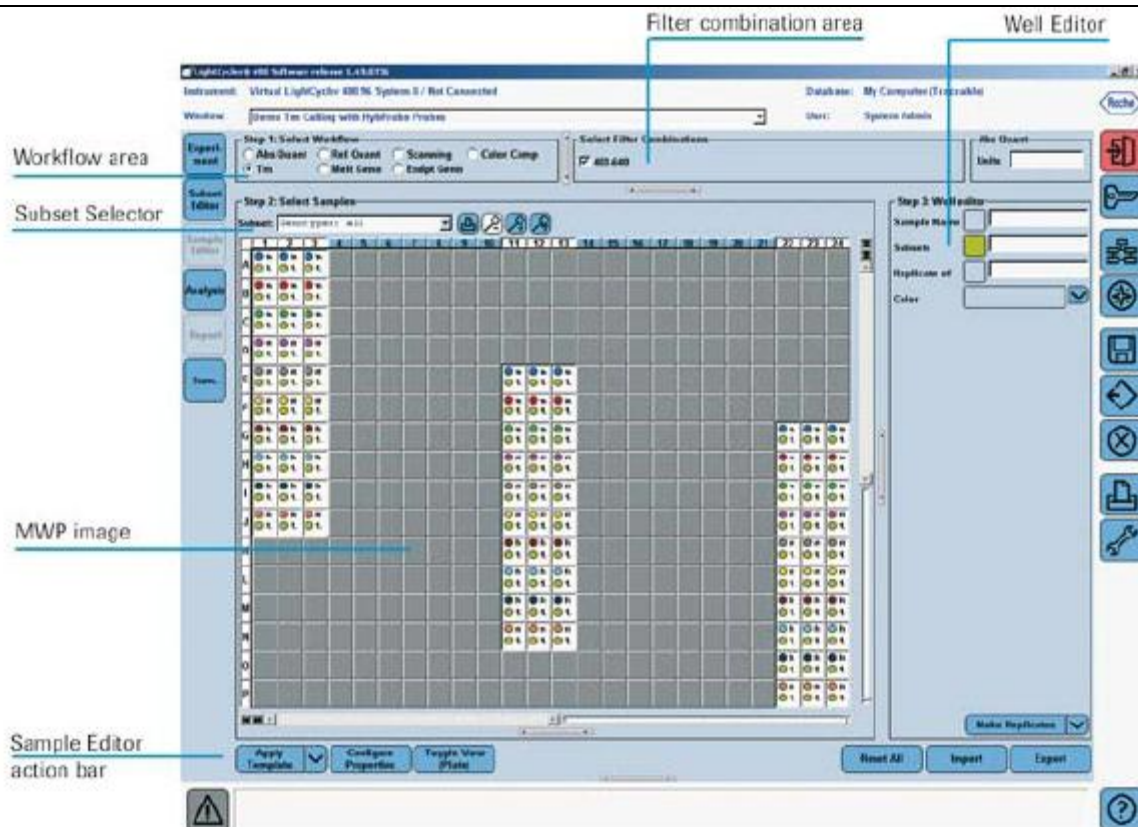
 每个样品的复本会被自动命名为“Repl. of S”，其中“S”代表源样品的名称。样品复本的分析标签中所有信息都将复制于源样品。

2.3.1 样品编辑器窗口

在“模块”条中，点击“样品编辑器”，即可打开“样品编辑器”窗口。默认显示“样品编辑器”窗口的“表格视图”。



点击“动作”按钮区的“开关视图”按钮将显示转换为“板视图”。



2.3.2 样品编辑器动作条

“样品编辑器” “动作” 条包括以下按钮：

| 按钮 | 功能 |
|-------------------------|---|
| “应用模板” | 点击“应用模板”，显示“应用模板”对话框。从列表中选一个“模板”并点击☑。模板设置应用于新的实验方案。 |
| “另存为模板” | 点击“另存为模板”，显示“模板”对话框。选择保存模板的位置并在“名称”区输入名称。点击☑。 |
| “配置属性” | 点击“配置属性”，打开“配置样品编辑器属性”对话框。在“表格”或“板视图”中添加或删除属性，并点击☑。要了解更多信息，请见“配置样品编辑器属性”一节。 |
| “开关视图（表格）” “开关视图（板）” | 点击该按钮，在“样品编辑器”的“表格”和“板视图”之间切换。 |
| “全部重置” | 点击“全部重置”，将样品信息全部重置为默认值，并将任何与分析特异相关的“样品编辑器”区重置为其默认值。 |
| “导入” | 点击“导入”，打开“样品信息导入”对话框，浏览寻找导入数据文件。要了解详细信息，请见“导入和导出样品信息”一节。 |
| “导出” | 点击“导出”，打开文件选择对话框。浏览寻找保存位置并输入导出文件的名称。“样品编辑”数据导出为空格分隔的文本文件。要了解详细信息，请见“导入和导出样品信息”一节。 |

| | |
|-------------------------------------|---|
| <p>“制作复本” “自动复制” “清除复本”</p> | <p>每个工作流程包括一个多项选择按钮“复本”，有三个选项：</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 点击“制作复本”，用第一个样品作为母样品创建当前选择的复本组。 ▶ 点击“自动复制”，创建选中的所有样品的复本，这些样品具有在所有滤光片组合方面相同的所有属性。 ▶ 点击“清除复本”，清除所选的“Repl Of”。当样品被清除时，仍保留其作为复本所具有的属性。 |
|-------------------------------------|---|

2.3.3 配置样品编辑器属性

“配置样品编辑器属性”对话框使您可以根据您的需要定制“样品编辑器”窗口。



- ▶ 选中要在“表格视图”的“样品表”中或“板视图”的“孔编辑器”中显示的属性。
- ▶ 选中“表格”或“板视图”中属性的顺序。


要配置“样品编辑器”属性：


- 1 在“样品编辑器”“动作”条中点击“配置属性”。显示“配置样品编辑器属性”对话框。



- 2 在“现有属性”列表中选中要在“表格视图”和/或“板视图”中显示的属性，或取消选定。选中的属性以相应的“表格顺序”或“孔顺序”列表显示。

- 3 (可选) 在“表格顺序”或“孔顺序”列表选择一个属性，点击  或  按钮以改变属性的顺序。

- 4 点击 ，关闭“配置样品编辑器属性”对话框。属性将根据您的选择显示于“表格”或“板视图”中。

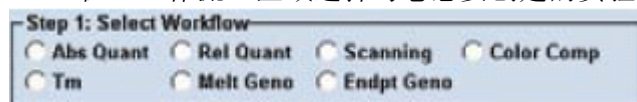
 属性的选择随实验一起保存。

2.3.4 输入样品信息

要输入样品信息：

1 在“模块”条中，点击“样品编辑器”。“样品编辑器”即打开。

2 在“ workflow ”区域选择与您想要创建的实验相应的工作流。



选中工作流时，LightCycler® 480自动重新配置“表格”或“板视图”。相应的属性被自动添加到“样品表格”和“孔编辑器”。改变选中的工作流时，加速器被重新配置。“表格”和“孔编辑器”将新工作流的所有默认属性都添加到已显示的过去工作流属性，这表示不删除任何属性。

3 根据您的需要定制“样品编辑器”窗口：

- ▶ 在“选择滤光片组合”区域选择实验中使用的滤光片组合。
- ▶ 在“子集”框中，选择一个预先确定的样品子集来显示，或选择“全部样品”以显示多孔板上的所有样品。要了解有关确定子集的更多信息，请见“使用子集”一节。
- ▶ 点击“样品编辑器”“动作”条中的开关按钮，在“表格”和“板视图”之间切换。
- ▶ 在“表格视图”和“板视图”中，使用“图例属性选择器”来选择“图例”中和“表格视图孔编辑器”或“板视图孔编辑器”中显示的选项。“图例属性选择器”中提供的选项取决于工作流。
- ▶ 在“样品编辑”“动作”条中点击“配置属性”按钮，打开“配置样品编辑器属性”对话框。在“表格”或“板视图”中添加或删除属性，并点击 。要了解更多信息，请见“配置样品编辑器属性”一节。

4 在样品选择器中选中样品进行编辑。要了解有关选中样品的信息，请见对于有关选中和取消选定样品一节。






5 输入每个样品的一般信息。可以输入数据

- ▶ 在“表格视图”中，见“在表格视图中输入数据”一节，或
- ▶ 在“板视图”中，见“在板视图中输入数据”一节。

| 样品名称 | 样品的名称 | 字母数字字符；允许有空格（最多25个字符） |
|---------|-----------------------|--|
| Repl Of | 当样品为复本时，原始样品的位置号 | 另一个未标明为复本的样品号码（您不能为一个复本创建复本）。输入位置号，例如，“A5” |
| 子集 | 样品所属的子集号 | 仅供显示 |
| 注释 | 任何关于样品的追加信息 | 字母数字字符 |
| 样品ID号： | 样品类型或样品材料的ID号 | 字母数字字符；允许有空格（最多11个字符） |
| 样品制备注释 | 原有样品制备的标记信息可以添加到这个区域。 | 字母数字字符 批ID号 + 标记码，例如： E1004 |

6 根据您在“ workflow ”区域选择的工作流，输入相应的样品属性。要了解关于属性的详细信息，请参见描述特定分析方法的章节。

- 7 (可选) 点击“复本”按钮，为所有选中的样品创建复本。
 - ▶ “制作复本”，创建当前选择的复本组，用第一个样品作为母样品。
 - ▶ “自动复制”，创建所选择的所有样品的复本，这些样品具有在所有滤光片组合方面相同的所有属性。
 - ▶ “清除复本”，清除所选的“Repl Of”列。当样品被清除时，仍保留其作为复本所具有的属性。
-  样品可能在未选中的滤光片组合方面有所不同。如果您使用“自动复制”的话，这一点可能引起混淆。
- 8 (可选) 如果您需要再来一遍，点击“重置样品”。“重置样品”，将样品信息全部重置为默认值，并将任何与分析特异相关的样品编辑器标签重置为其默认值。
- 9 结束时，在“总动作条”中点击 以保存实验的样品信息。
- 10 要打印出您的样品加载，请在多孔板图像区点击。

在表格视图中输入数据

要在“表格视图”中输入数据，您有不同的选择。

- ▶ 在表格的单元格中直接输入数据：
 - ▶ 在单个单元格中点击，并编辑数值。
 - ▶ 选中一组单元格，复制并粘贴表格其他部分选中的内容。
 - ▶ 选中一组单元格，复制并粘贴数据表程序（如 Microsoft Excel）中选中的内容。
 - ▶ 选中一组单元格，输入数值，按<Enter>键。

要了解有关使用表格的更多信息，请见“使用表格”一节。

- ▶ 使用“加速器”面板输入数据：
系统根据选中的工作流显示“加速器”面板。要了解有关“加速器”面板的分析相关区域，请参见相应的分析描述。

- 1 选择您想要在中孔板图像中编辑的样品。所选孔的数据显示于“加速器”面板中：
 - ▶ 如果一个数值在全部所选孔中都一样，那么该值将显示于“加速器”面板区域。
 - ▶ 如果一个数值在所选孔中不同，那么不显示数值。

- 2 在“加速器”面板区域编辑数值。
该数值被应用于全部所选孔。

-  如果您选择单个孔，那么该孔的内容将被显示于“加速器”面板区域。您现在可以编辑孔的数值。

在板视图中输入数据

在“板视图”中，您在“孔编辑器”中输入数据。

- 1 点击“开关视图（表格）”按钮，切换到“板视图”。
- 2 按“配置样品编辑器属性”一节所述，配置要在“孔编辑器”中显示的属性。
- 3 选择您想要在中孔板图像中编辑的样品。所选孔的数据显示于“孔编辑器”中：
 - ▶ 如果一个数值在全部所选孔中都一样，那么该值将显示于“孔编辑器”区域。
 - ▶ 如果一个数值在所选孔中不同，那么不显示数值。
- 4 在“孔编辑器”区域编辑数值。

该数值被应用于全部所选孔。



如果您选择单个孔，那么该孔的内容将被显示于“孔编辑器”区域。您现在可以编辑孔的数值。

导入和导出样品信息

“样品编辑器”提供导入功能，可以从空格分隔的文件将数据读取到“样品编辑器”中，包括“表格”或“板视图”中。这些导入数据文件可以用普通的数据表程序（例如 Microsoft Excel）创建。

为了可有效用于自动导入，包含样品信息的数据文件必须具有特定的属性：

- ▶ 导入数据文件中的每一行必须与一个孔位置相关，而输入数据中的每一列必须与一个“样品编辑器”标签中的一个数据栏相关。
- ▶ 导入数据文件的每一行都必须包含样品的位置。如果没有样品位置列，或样品位置列中有无效条目，那么该文件不能被导入，“OK”按钮不会被激活。
- ▶ “样品位置”类型的列（“Pos”和“Repl. Of”列）必须包含一行和一列由单个字母和整数组成的位置值（形式为 A1、B2 等）。行和列必须存在于当前的 MTP 布局中。如果有任何位置无效，那么该文件该行中的数据将不能被导入，并将在状态报告中记录一个错误。
- ▶ “滤光片组合”类型的列（“Filt. Comb.”和“Dominant Channel”列）必须包含 XXX-YYY 格式的字符串，这里 XXX 和 YYY 是实验中检测格式的波长。如果有任何行中的值无效，那么该文件该行中的数据将不能被导入，并且该错误将被记录在状态报告中。
- ▶ 用于定量和基因型分析的“样品类型”列必须符合“样品编辑器”中相应列所选列表中的数值（例如，对于绝对定量，该列为“未知”和“标准”）。如果有任何行中的值无效，那么该区域中的数据将不能被导入，并且该错误将被记录在状态报告中。
- ▶ 如果文件中任何一行以“#”字符开始，那么它将被认为是注释行，并将被忽视。如果第一个区域的第一个字符包含“#”，那么该区域需要被书写在引号里。
- ▶ 如果任何区域的文本包含定界字符（制表符或逗号）或空格，那么该文本必须被书写在双引号里。
- ▶ 导入的文件每一列必须包含相同数量的列，即使是空白列。如果有任何行中出现的列数不正确，那么该文件将不能被导入，并且该错误将被记录在状态报告中。

无论有或没有标题行的导入数据文件都能被支持。您可以用标题行选择框来指定当前文件是否具有标题行。如果勾选，那么文件中的第一行将被用作标题行。如果不勾选，那么文件中的第一行将被用作数据。如果扫描文件时，程序正确识别第一行中的所有列标题，那么软件将自动勾选标题行复选框。否则，标题行复选框将为不勾选。

标题行中的信息必须为空格分隔，并且与文件的其余部分一致。标题行中的关键词必须与软件能理解的关键词设置相一致。如果一个或多个列中的关键词与软件的预设不匹配，那么软件将提醒您将数据分配到其目标列中。下表给出了列标题中支持的关键词总览，以及“样品编辑器”表中各自区域的相关性：

| 类别 | 列标题 | 样品编辑器中的区域 |
|---------|----------------|-------------|
| 一般 | 一般：颜色 | 颜色 |
| | 一般：复本 | Repl Of |
| | 一般：样品名称 | 样品名称 |
| | 一般：子集 | 子集 |
| | 一般：注释 | 注释 |
| | 一般：样品ID号 | 样品ID号 |
| | 一般：样品制备注释 | 样品制备注释 |
| | 一般：目标名称 | 目标名称 |
| 样品选项 | 样品选项：宽度 | 宽度 |
| | 样品选项：线型 | 线型 |
| | 样品选项：点型 | 点型 |
| 颜色补偿 | 颜色补偿：主通道 | 主通道 |
| 终点法基因分型 | 终点法基因分型：样品类型 | 终点法样品类型 |
| | 终点法基因分型：终点法基因型 | 终点法基因型 |
| | 绝对定量：样品类型 | 定量样品类型 |
| 扩增分析 | 绝对定量：浓度 | 浓度 |
| | 绝对定量：Cp Low | Cp Low |
| | 绝对定量：Cp High | Cp High |
| | 绝对定量：Cp High | Cp High |
| 溶解法基因分型 | 溶解法基因分型：样品类型 | 溶解法基因分型样品类型 |
| | 溶解法基因分型：基因型 | 溶解法基因分型基因型 |
| 相对定量 | 相对定量：目标类型 | 目标类型 |
| | 相对定量：联合样品和目标类型 | 联合样品和目标类型 |
| 基因扫描 | 相对定量：效率 | 效率 |
| | 基因扫描：扫描样品类型 | 扫描样品类型 |
| | 基因扫描：扫描样品类型 | 扫描样品类型 |
| | 基因扫描：扫描基因型 | 扫描基因型 |

如果导入数据文件包含空白单元格，将不会改变已经存在于“样品编辑器”中的数据。

复本只能通过在一个普通样品位置单元格中指定多个位置（空格作为分隔）来导入。单元格中列出的第一个样品位置为复本组的母样品。如果包括“Repl. Of”列，并且为样品设置一个值，那么除位置列以外的其他数据都应为空。指定位置将被设置为“Repl. Of”列中位置的复本。如果数据不为空，数据将不能被导入，并将在状态报告中显示一个警告。

▶ 如果勾选“是否从备份样品名称创建复本？”选择框，那么共享导入文件中同一个样品名的样品将被设置为复本。

▶ 如果勾选“是否从备份样品名称创建复本？”选择框，并且除样品名称以外的数据都不为空，那么非空数据将不被导入。

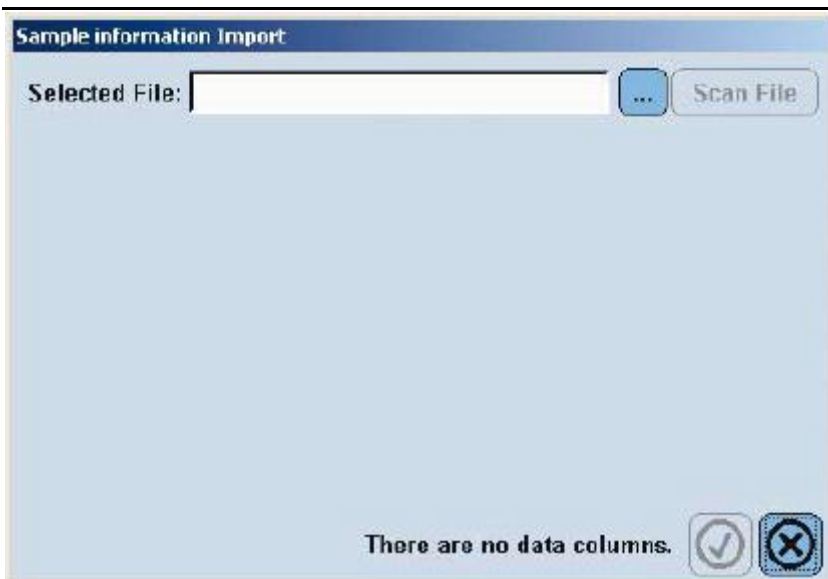


创建兼容的导入数据文件最容易的方法是导出已有实验的“样品编辑器”数据，并用这个文件作为模板。


要导入样品编辑器数据：



1 点击“导入”按钮，浏览寻找导入数据文件。软件显示文件选择和预览对话框。

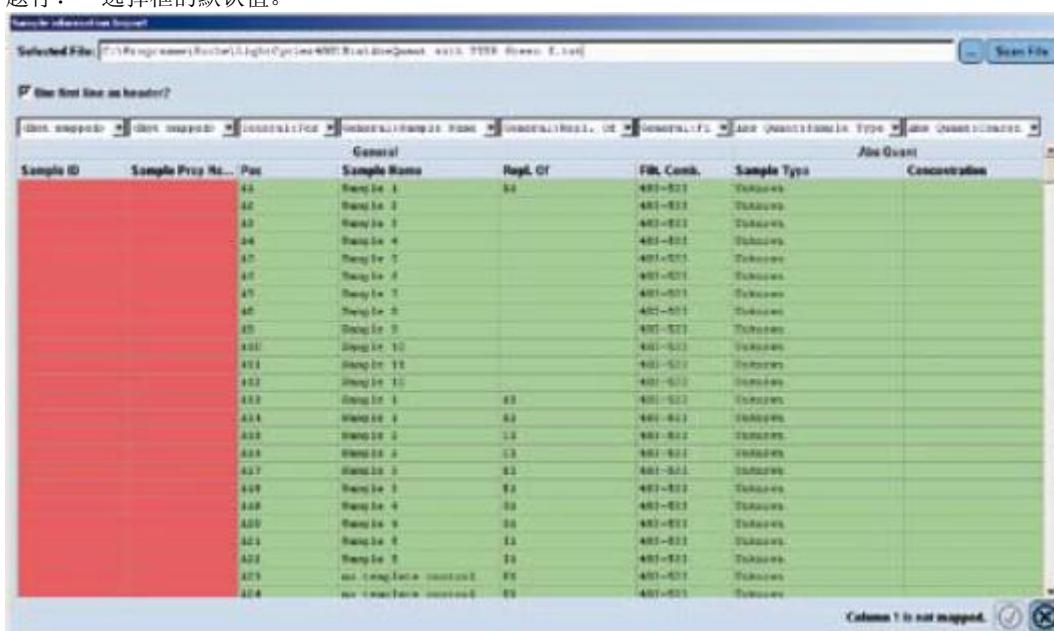


145

2 点击  按钮，导航至导入数据文件。



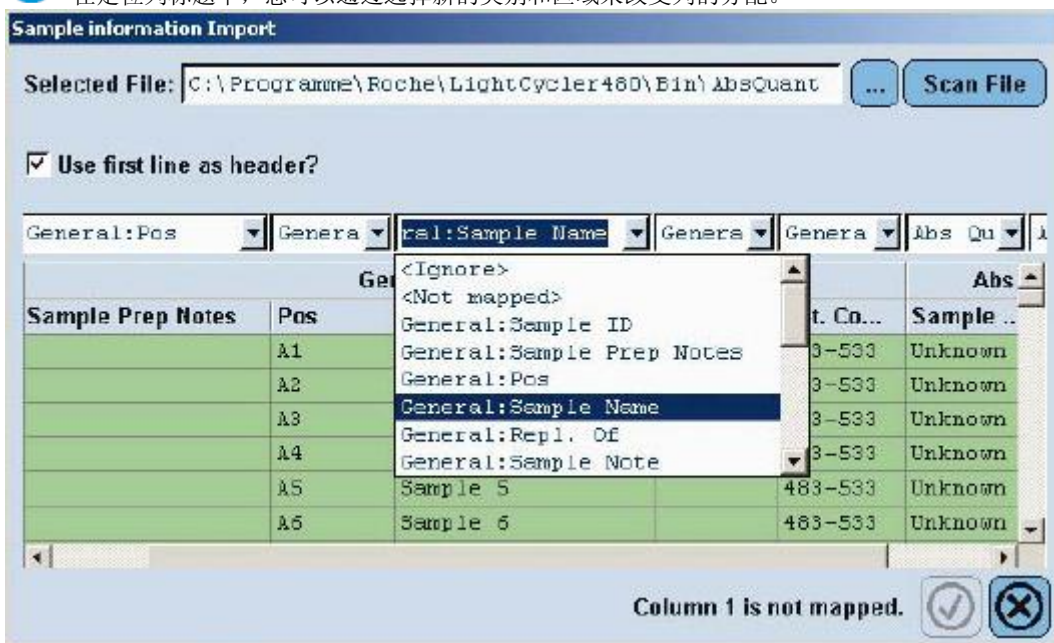
当您选中一个文件时，点击“扫描文件”按钮。软件将更新预览，显示自动列分配并设置“是否使用第一行作为标题行？”选择框的默认值。



- 3 如果导入文件的第一行被用作标题行，那么勾选“是否使用第一行作为标题行”选择框。选择“扫描文件”重新扫描文件。
- 4 如果要把共享导入文件中同一个样品名的样品设置为复本，那么应勾选“是否从备份样品名称创建复本？”选择框。



- 5 在定位列标题中，您可以通过选择新的类别和区域来改变列的分配。



! “样品编辑器”中的每一列只能分配给一个导入文件列。如果“样品编辑器”被再分配给不同的导入文件列，那么原有的导入文件列将成为未分配，并被标记为未定位。

您可以在列定位区域中选择“<忽略>”值。当一个列被定为为“忽略”时，该列将不能被导入，并将在预览表中被标记为黄色。

- 6 点击 ，接受列分配。数据被导入到“样品编辑器”中。

要导出样品编辑器数据：

- 1 选择“导出”按钮。软件显示文件选择对话框。
- 2 输入文件名，点击“保存”。
- 3 “样品编辑器”数据导出为空格分隔的文本文件。

3 实验性分析的总述

LightCycler® 480软件包括多种分析模块，这些模块可以用来对实验得到的结果以不同的方式进行分析。为了分析实验，您必须在实验运行结束后为其添加一个或多个分析模块。

软件中有如下几种可用的分析模块：

- ▶ 定量
 - ▶ 绝对定量使您能对单个目标序列进行定量分析，并将最终结果以绝对数值形式表示。
 - ▶ 相对定量比较单个样品中两个不同目标序列的水平，并将最终结果以这些目标的比值表示。
- ▶ 基因分型
 - ▶ 终点法基因分型从扩增曲线的终点信号强度推导基因分型信息。
 - ▶ 熔解曲线法基因分型从PCR后建立的熔解曲线形状推导基因分型信息。
- ▶ *T_m*值计算是计算目标DNA的熔解温度和溶解峰。
- ▶ 颜色补偿产生颜色补偿数据，这些数据可用于多色实验或分析来补偿荧光通道之间的重叠。
- ▶ 附加的软件模块“基因扫描”通过分析LightCycler 480高分辨率熔解染料存在时产生的实验数据，来测定样品中的异源双链核酸分子结构。



没有LightCycler 480基因扫描软件，您还是能在LightCycler 480软件中查看任何基因扫描实验。但是，您不能进行基因扫描分析。

本节解释了进行任一分析所需要采取的一般步骤，并展示了如何使用分析窗口的技巧。以后的章节将对如何进行每种类型的分析进行详细解释。

3.1 分析步骤总述

下面首先首先为您阐述的是添加分析模块以及进行分析的一般性步骤。对于每种分析而言，这些一般性步骤都是一样的。每种分析类型中还有一些参数设定时的特定步骤，这些步骤都在各种类型分析的相应章节中另外叙述。

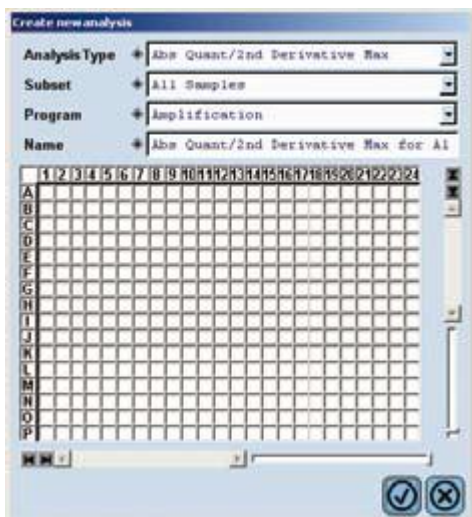
如何进行分析：

- 1# 在 LightCycler® 480 基础软件的主窗口中打开您想分析的实验。
- 2 在“模块”条中，点击“样品编辑器。”如果您还没有为实验输入一般性样品信息，请先选择“一般”表，然后选择实验中所使用的滤光片组合并输入确认样品的信息。
- 3 在“样品编辑器”中选择“特定分析”表，并输入进行分析的样品信息。在“特定分析”表中，每种样品的位置都包括一系列相应的一种滤光片的相关信息。例如，如果您选择了三种滤光片组合，则在特定分析表中每个样品的位置上都会有三列相关信息。您可以在每列滤光片组合中为其输入样品信息。在每个特定分析表中，您可以输入的信息决定于分析的类型。如需更多信息，请参考“输入样品信息”一节中的相关内容。
- 4 在 LightCycler® 480 基础软件的“模块”条上点击“分析”。这时系统会为您打开“分析总述”窗口。分析总述窗口中显示的有“创建新分析”列表和“打开已创建的分析”列表（如果已经有分析被创建的话）。



5# 从“创建新的分析”列表中选择一种分析类型。这时系统为您打开“创建新的分析”对话框。在这里，您可以再次对分析类型进行定义并选择一个分析子集。如果您的实验方案中包括有数个可用于所选分析类型的程序，则请在“程序”列表选择一个您需要的程序。您还可以根据需要改变分析的名称(默认的名称是“analysis type for subset name”“子集的分析类型名称”)。点击 *OK*。

! 当子集已经被用于创建分析后，您就不能再对分析子集进行修改了。



6# 输入或修改分析参数，然后点击“计算”。如需更多信息，请参考各种分析的相应章节。

! 如果您在运行分析后改变了样品编辑器中设定的(除样品名称、样品注解或目标名称之外)信息，则必须使用样品编辑器中的新值重新对分析进行计算。在这种情况下，“分析”按钮会被重新激活。

7# 对于每个实验，您可以添加一种或多种分析，包括对同一样品分析类型的多次引用：在“分析”工具栏中点击“加号”按钮。

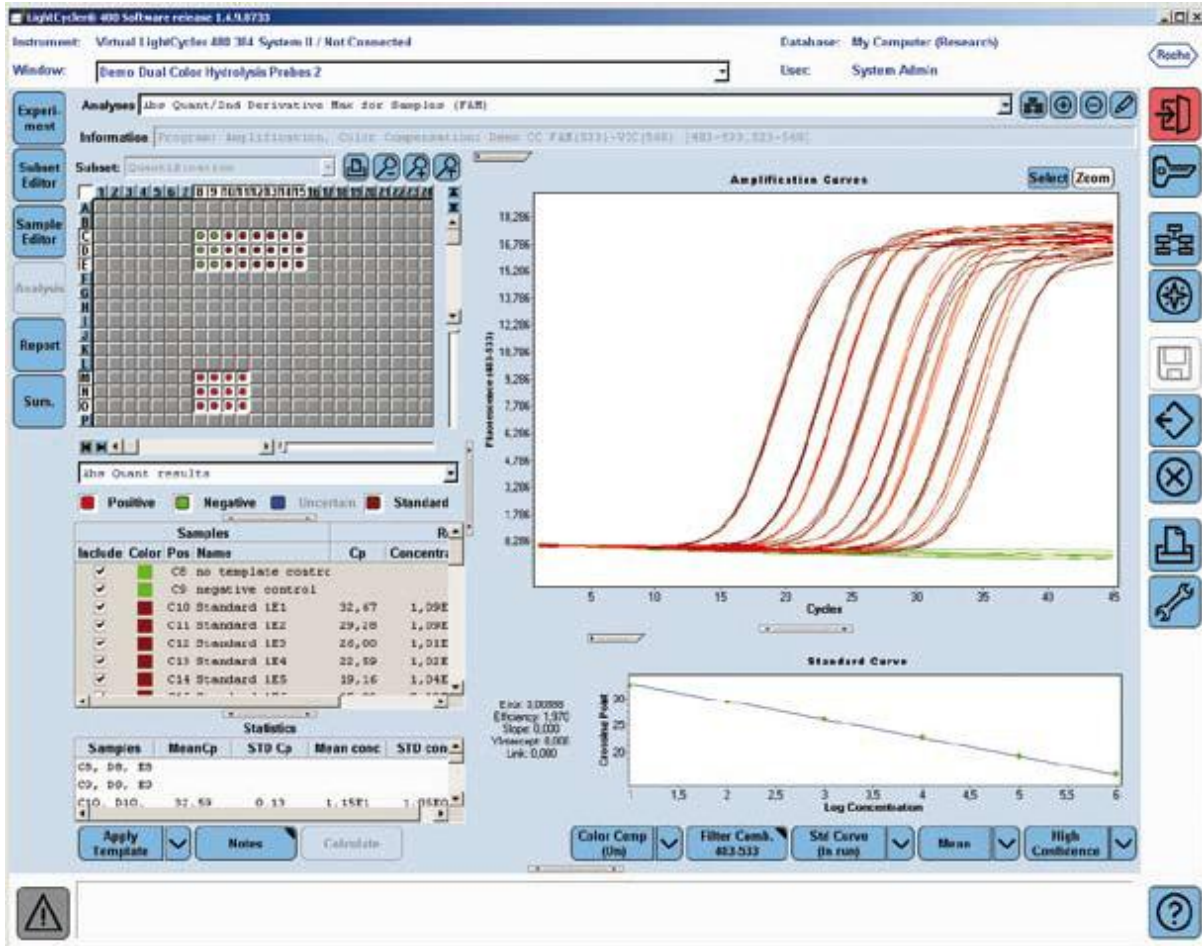


重复步骤 3 至步骤可以添加更多的分析模块。

8# 点击“一般动作”栏中的“保存”，这样分析结果就会做为实验的一部分而被保存下来。请阅读下一节中关于分析窗口的一般性信息。

3.2 使用分析窗口

下图为您显示了一个典型的分析窗口（此处为绝对定量分析的窗口）。分析工具条位于上方，而分析的“操作”按钮则位于窗口下方，实验样品的列表位于左侧，分析表则位于右侧。

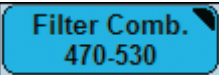
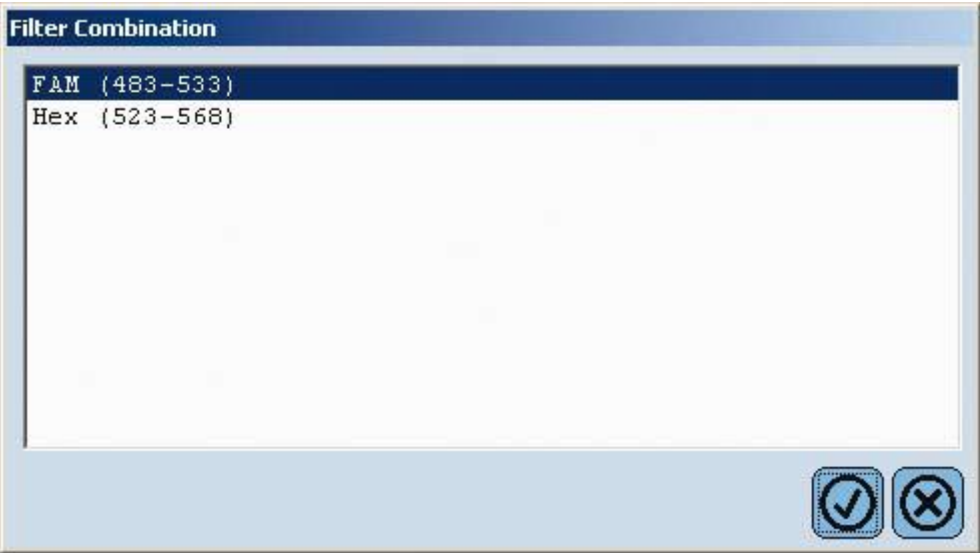


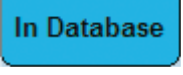



3.2.1 选择滤光片组合与颜色补偿

为了对结果进行分析，您必须指定所需要的滤光片组合，如果需要的话还应使用颜色补偿。

使用如下所示分析的“动作按钮”以做出必要的选择。（“熔解温度调用”模块与颜色补偿模块稍有不同，请参考这些模块的相关内容以获取更多信息。

按照以下方式使用各个按钮：

| | | | | | | | | |
|---|--|--|----|-------------------------|------|---|-------|---|
| <p>滤光片组合</p>  | <p>使用“滤光片组合”按钮选择您希望用于分析的荧光通道。这时系统会为您打开实验中相关的滤光片组合列表：</p>  <p>从列表中选择一种滤光片组合后，该按钮将为您显示选定的滤光片组合。</p> | | | | | | | |
| <p>颜色补偿</p>    | <p>►使用“颜色补偿”多选按钮即可打开或关闭颜色补偿，或者选择您希望使用的颜色补偿对象：</p> <table border="1" data-bbox="538 1498 1552 2200"> <tr> <td data-bbox="538 1498 735 1554">关闭</td> <td data-bbox="735 1498 1552 1554">如果您不希望使用颜色补偿的话，请选择“关闭”。</td> </tr> <tr> <td data-bbox="538 1554 735 2035">在使用中</td> <td data-bbox="735 1554 1552 2035"> <p>您可以通过该按钮从“选择的颜色补偿”对话框中选择一个对象。</p> <p>该对话框中显示了所有选定的（即前面已经应用的）颜色补偿对象。在每个对象名称后的括号内均会列出经过补偿的滤光片组合。</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="538 2035 735 2200">在数据库中</td> <td data-bbox="735 2035 1552 2200"> <p>您可以通过“可用的颜色补偿”对话框选择一个对象。该对话框显示了数据库中与仪器序列号及选择的滤光片组合匹配的、可用的颜色补偿对象。对于每一个对象，列表中均显示出其名称及路径。</p> </td> </tr> </table> | | 关闭 | 如果您不希望使用颜色补偿的话，请选择“关闭”。 | 在使用中 | <p>您可以通过该按钮从“选择的颜色补偿”对话框中选择一个对象。</p> <p>该对话框中显示了所有选定的（即前面已经应用的）颜色补偿对象。在每个对象名称后的括号内均会列出经过补偿的滤光片组合。</p> | 在数据库中 | <p>您可以通过“可用的颜色补偿”对话框选择一个对象。该对话框显示了数据库中与仪器序列号及选择的滤光片组合匹配的、可用的颜色补偿对象。对于每一个对象，列表中均显示出其名称及路径。</p> |
| 关闭 | 如果您不希望使用颜色补偿的话，请选择“关闭”。 | | | | | | | |
| 在使用中 | <p>您可以通过该按钮从“选择的颜色补偿”对话框中选择一个对象。</p> <p>该对话框中显示了所有选定的（即前面已经应用的）颜色补偿对象。在每个对象名称后的括号内均会列出经过补偿的滤光片组合。</p> | | | | | | | |
| 在数据库中 | <p>您可以通过“可用的颜色补偿”对话框选择一个对象。该对话框显示了数据库中与仪器序列号及选择的滤光片组合匹配的、可用的颜色补偿对象。对于每一个对象，列表中均显示出其名称及路径。</p> | | | | | | | |

 颜色补偿应用于使用“滤光片组合”按钮选择的滤光片组合。如需更多信息，请参考“进行颜色补偿分析”一节中相关内容。

 当分析类型与上述典型类型不同时，窗口中还可能显示其他按钮。

3.2.2 对样品进行分析

在分析模块窗口的左侧通常会显示一样品列表。当分析运算结束后，样品的分析结果将会显示在样品名称右侧的列中。分析模块中同时显示样品数据表格。如需详细信息，请参考“样品选择器与样品表”一节中相关内容。

如何选择样品对其进行结果计算：

选择样品名称后面的选择框以显示样品的分析结果。默认情况下，所有的样品在分析开始时均会被选中。双击某样品的选择框，这样可以对其进行选定或不选定。如果您想同时选择或不选择一组样品，则请选择样品范围然后按下键盘上的空格<Space>键。这样就可以同时在所有的选定样品选择框中进行选择与不选择的切换。

在表中选择样品进行查看：

各样品均用一定的颜色进行表示。如果您想在图表中找到某样品，首先在样品列表中找到其颜色，然后在图表中找到该颜色。或者，您也可以把鼠标指针放到图表中某条线上，这时在线的旁边会自动出现一个包含有该线表示的样品的名称的注解。



如果您在图表选定了某样品的名称，则选定样品的数据将会显示在分析图表中。默认情况下，当您打开一个分析窗口时，所有的样品均是被选定的。

对样品表排序

您可以点击列标题来对“样品表”排序。多次点击标题，可以在降序和升序之间切换。

要按孔位对表格进行排序分类——按多孔板列或按行——点击“Pos”列的标题。

导出样品信息


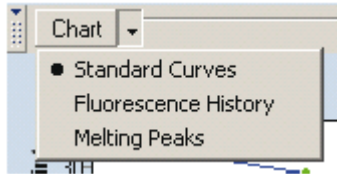
您可以将“样品表”数据导出为空格定位的文本文件，以便在普通数据表程序（例如Microsoft Excel）中进一步使用。要导出“样品表”数据，用鼠标右键点击表区域并选择“导出表格”。一个文件选择对话框会被打开。输入文件名，点击“保存”。

3.2.3 在分析窗口中使用图表

分析图总是显示于“分析”窗口的右侧。下节给出了在“分析”窗口中使用图表的摘要信息。要了解详细信息，请见“使用图表”一节。

选择要显示的图表

要选择要在“分析”窗口中显示的图标：

- 1 在您想要改变的图表上方点击 。将会显示图表的选项工具栏，包括一个图表菜单。不同的图表包含特定的附加选项。
- 2 要改变图表类型，请在“图表”菜单中选择新图表类型。
- 3 要更改图表的显示选项，请在图表的选项工具栏中选择相应的选项。

放大和缩小

要缩放一个分析图的视图，请点击“缩放”按钮，并将光标置于您要放大区域的左上方。点击并向右下拖曳鼠标指针。鼠标指针画出一个矩形。矩形内的区域扩大到覆盖窗口。要将图表恢复到原始大小，请点击并向左上拖曳鼠标指针。（只要一次操作就能恢复图表。）

选择样品



要从图表中直接选择样品，请点击“选择”按钮并通过画出一个矩形来选中图表上的曲线或点。相应的样品在“样品选择器”中被选中。

打印，导出与复制图表

要导出、打印或复制显示于“分析”窗口的图表，请用鼠标右键在图表边界内点击并选择在有关菜单中选择相应的操作。要了解详细信息，请见“使用图表”一节。

3.2.4 添加分析注解

您可以为分析添加分析注解。

- 1 要打开“分析注解”窗口，请点击“动作”条的“注解”按钮。
- 2 输入您的分析注解，并点击，为分析添加您的注解。
- 3 在“总动作”条中点击，将注解与实验一起保存。

3.2.5 对分析进行删除或重新命名


如果您的用户帐户有高级用户或本地管理员角色的话，您就可以从实验中删除一个分析或对分析进行重新命名。而且，您可以对存储于其他用户实验中的分析进行删除或重命名操作（这取决于您的用户帐户所具有的访问特权）。关于访问特权的更多信息，请参考“管理用户帐户”一节。

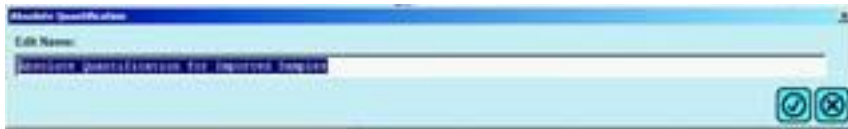
如何从实验中删除一个分析：

- 1# 从“分析”栏中选择一个分析。
- 2# 点击分析工具栏中的“删除项目”按钮。
- 3# 这时系统会请您对此操作进行确认。
- 4# 点击“*Yes*”即可删除您选定的分析。
点击“*保存*”则会直接对实验进行保存，而分析则被删除了。

如何对分析进行重新命名：

您可以对实验中的分析进行重新命名。如果您对一个实验进行了多次相同类型的分析，那么对这些重新命名将帮助您（更容易地对其进行识别）。

- 1# 从“分析”栏选择一个分析。
- 2# 点击分析工具栏中的“对项目重新命名”按钮。这时系统会为您打“编辑名称”对话框：





- 3# 输入一个新名称，然后点击 *OK*。
- !** 您输入的名称在数据库必须是唯一的。

3.3 导出分析结果

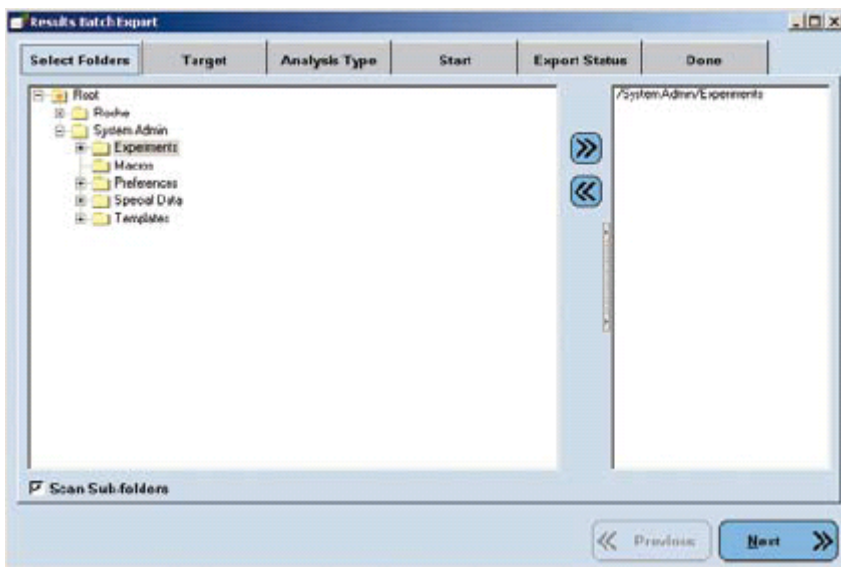
LightCycler 480软件包括批量导出工具，使您可以用分析批量结果向导来导出从一组文件夹及其全部子文件夹中的实验得到的全部分析结果。请按以下说明导出实验分析。

结果批量导出的方法能同时导出从一组选中文件夹中的实验及其全部子文件夹中的实验得到的选中分析类型的全部结果。结果导出为单个以空格分隔的文本文件。

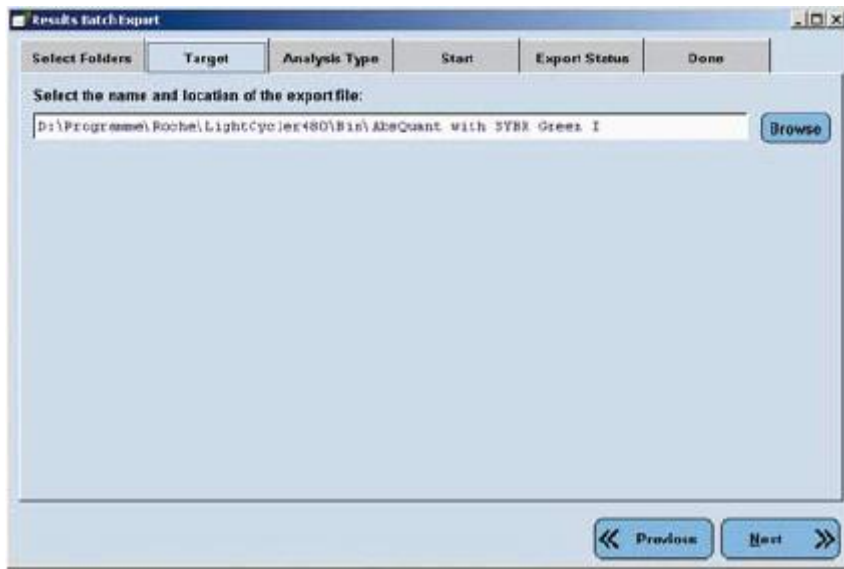
 分析结果批量导出只能从“导航器”中进行。

 分析结果批量导出采用向导进行。您可以通过点击相应的按钮，从向导中的一个步骤转移到上一步或下一步。注意：只有当您提供了当前标签所需的设置时，“下一步”按钮才能生效。

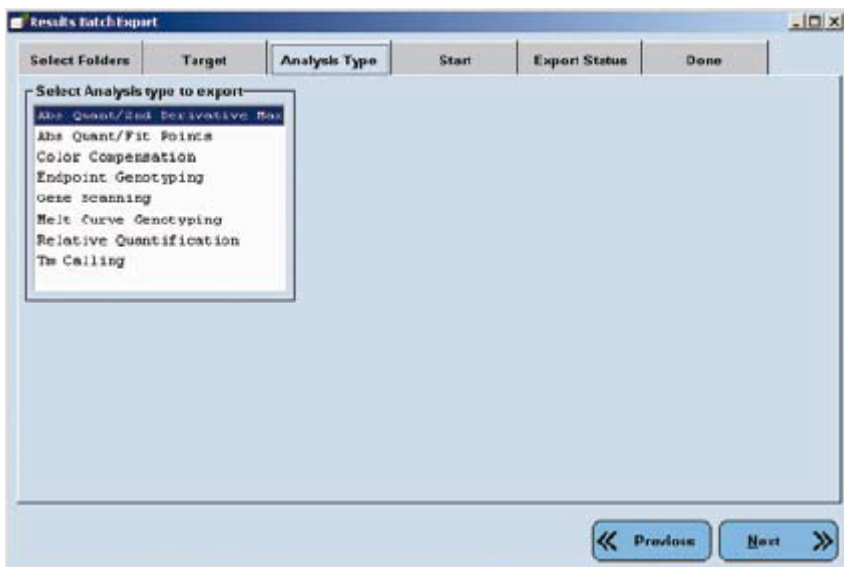
1 点击“结果批量导出”导航器控制按钮。“批量导出”向导即打开。在向导的“选择文件夹”标签上，在“可用的文件夹”列表中选择源文件夹，将其添加到“选中的文件夹”列表。勾选“扫描子文件夹”选项以包括源文件夹中的全部子文件夹。



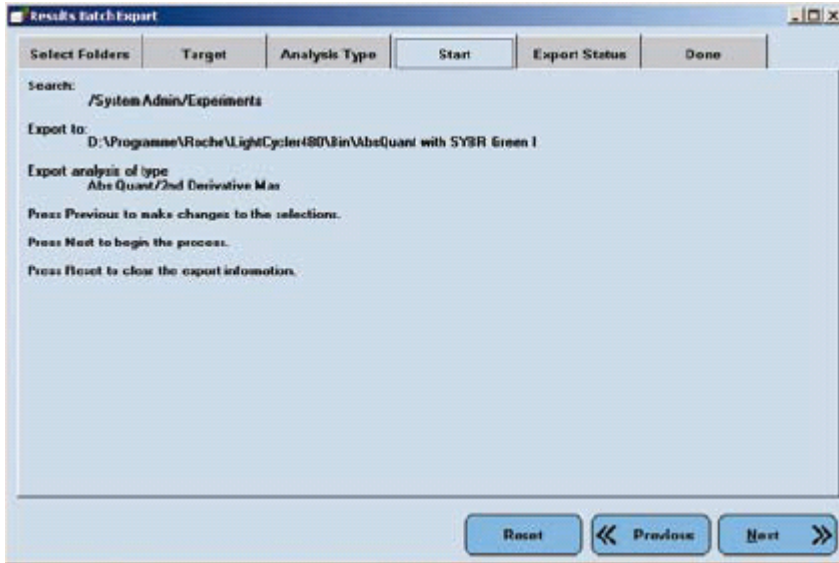
- 2 在“目标”标签上，选择目的目录和输出文件的名称。
点击“浏览”按钮，浏览寻找目的目录。或者，在输入区域中直接输入目的目录的路径。如果指定的输出文件已经存在，向导将会请您在覆盖原有文件前进行确认。



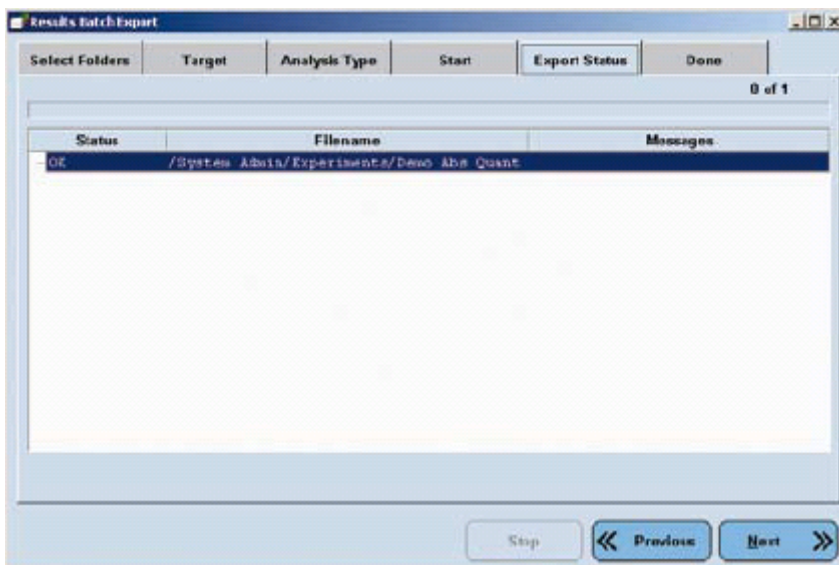
- 3 在“分析类型”标签上，选择要导出的文件类型。



- 4 在“开始”标签上，您可以检查您的设置，并开始导出过程。
- 5 “开始”标签上的“重置”按钮只有在一次导出完成后才会被激活。点击“重置”按钮将会重置前次导出的结果，以便重复导出。



- 5 在“状态”标签上，您可以查看导出过程的状态。当导出在进行中的时候，“停止”按钮处于激活状态。您可以通过点击“停止”按钮来终止导出。



- 6 “完成”标签显示批量导出的摘要信息。点击“完成”按钮，关闭向导。

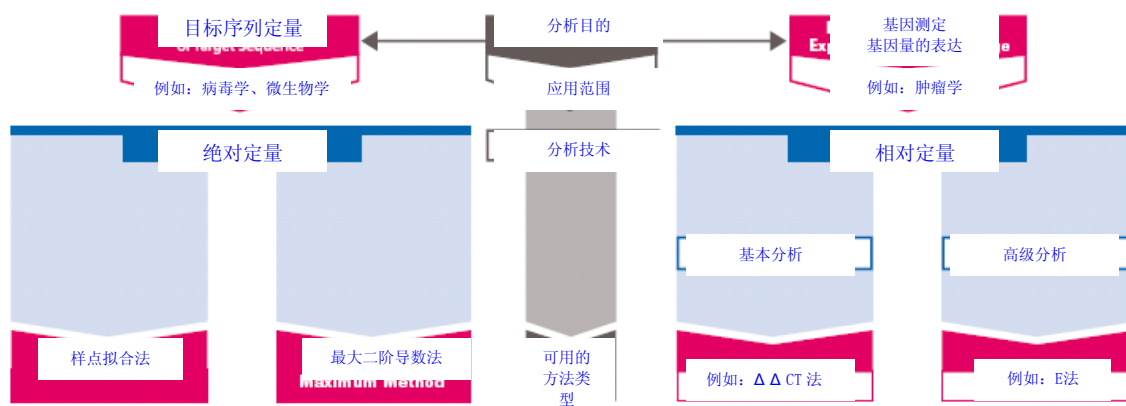
软件应用

4 定量

4.1 概述

有许多类型和亚类的方法可以通过实时PCR对基因表达进行定量分析。这些方法中的每一种都因其要求、复杂性及可靠性而各有特点。但是，还是有可能根据两个主要的分析技术对这些方法进行分组：绝对和相对定量（见下图）。您必须选择的方法取决于您的分析的复杂性以及最终结果所要求的格式：

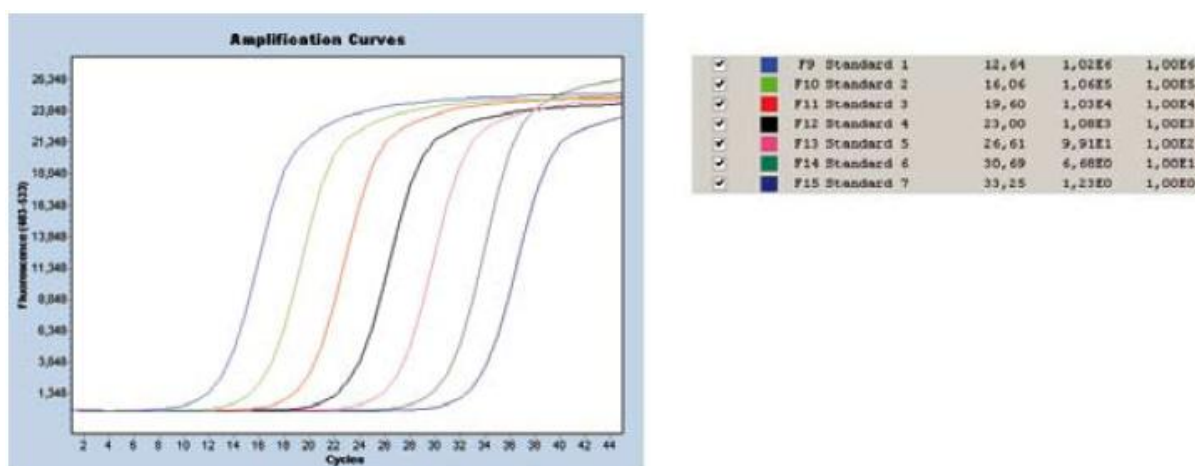
- ▶ **绝对定量**使您能对单个目标序列进行定量分析，并将最终结果以绝对数值形式表示（例如：病毒符合——拷贝/ml）。这种分析一般用于病毒学和微生物学这样的研究领域。
- ▶ **相对定量**比较单个样品中的两个不同目标序列（例如：所研究的目标基因（GOI）和另一个基因），并以这些目标的比值来表示最终结果。



4.2 绝对定量分析

凡是具有扩增程序的任一实验均可用于绝对定量分析。利用PCR的实时在线监测，绝对定量分析模块只考虑从定量数据分析的PCR扩增过程中指数式增长的对数线性期内所测得的荧光值。

下图显示LightCycler® 480仪器上进行的典型定量实验。反应曲线包括3个期：初始滞后期，指数式增长期（对数线性）期和最终的平台期。初始滞后期或背景期一直持续到PCR产物的信号强度大于检测系统的荧光背景强度时才结束。对数增长期则开始于大量产物积聚并且其强度强于背景，持续至反应进入平台期前以及反应效率下降为止。



当扩增效率为2（即：每个PCR产物在每个循环内复制1次）时，在对数线性期内，理想的扩增反应可以用以下方程来描述：

$$(1) T_n = T_0 \times 2^n$$

但是，实时PCR实验受许多因素影响，因此效率并不符合理想情况。这样，对PCR扩增更精确的描述为：

$$(2) T_n = T_0 \times E^n$$

T_n 是第 n 循环时目标分子的数量， T_0 是目标分子的初始数， n 是扩增循环数， E 是扩增效率。

如您在上图中所见，每个反应中上升到大于背景强度的第一个循环取决于反应开始时的目标分子数量。在某点时，样品荧光强度升高到大于背景荧光强度，则该点被称为样品的“交叉阈值（ C_p ）”。

对于绝对定量分析，以预先确定的已知浓度对外参照进行连续稀释的方法被用于创建标准曲线。在LightCycler® 480仪器的同一次运行中，标准稀释物在独立的孔中被扩增。标准和未知样品的交叉阈值被用于测定目标DNA的浓度。

LightCycler® 480软件提供了两种进行绝对定量分析的方法：

- ▶ 最大二阶导数法
- ▶ 样点拟合法

两种方法都使用标准曲线来计算未知样品浓度，但测定样品交叉阈值的方式不同。

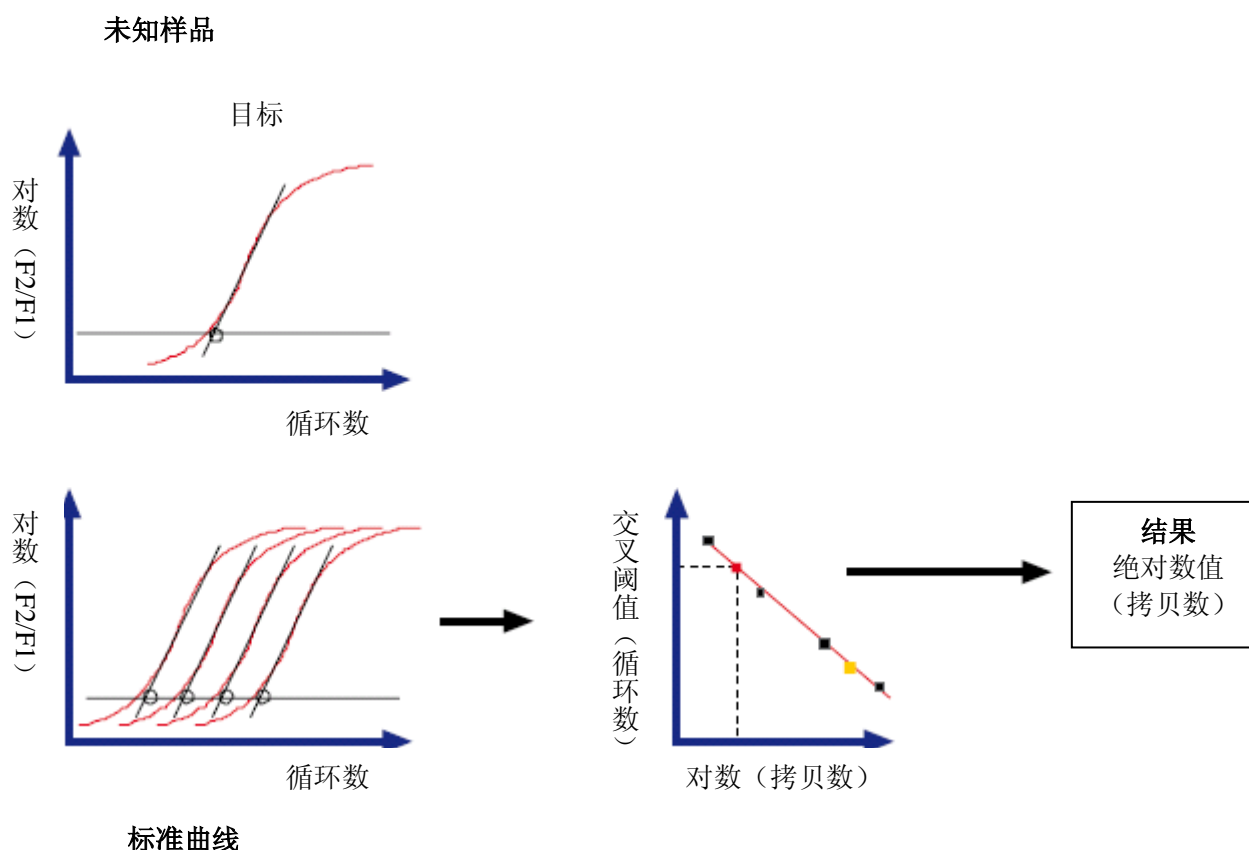
4.2.1 关于样品交叉阈值

在一个扩增反应中，如果在某循环内样品的荧光强度升高到大于背景荧光强度，则称此循环的数值为样品的交叉阈值。交叉阈值可以理解为扩增的产物第一次被看到的点。如果想看到PCR产物，则产物分子的数量必须大于反应的可测范围下限（对于交叉阈值而言，产物分子数量要达到 10^{11} 至 10^{12} 这样一个水平）。

样品的交叉阈值取决于样品中DNA的初始浓度。如果目标DNA的初始浓度较低，则需要较多的扩增循环才能达到交叉阈值。反之，如果样品中DNA初始浓度比较高，则需要较少的循环即可到达其交叉阈值。交叉阈值数值如何用于定量分析取决于分析类型。

4.2.2 关于标准曲线的作用

在绝对定量分析中，标准曲线用来测定未知样品的浓度。在标准曲线中，使用标准样品的浓度值对样品的交叉阈值进行绘图。其X轴代表初始目标浓度的对数值，而Y轴则表示循环中的交叉阈值。在用样点拟合分析法时，标准曲线是通过这些描记数据点的线性回归线，而用最大二阶导数分析法时，标准曲线是非线性（多项式的）回归线。



典型情况下至少需要五个样品才能完成一条标准曲线的绘制，而且这五个样品的浓度应该是系列稀释的。标准曲线中所使用的浓度应该位于目标浓度的预期范围之内。

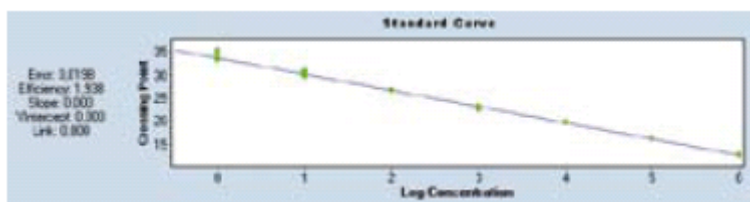


在LightCycler® 480软件中您必须在不同浓度确定至少3个标准样品。否则，计算不出标准曲线。

标准曲线的“斜率”描述的是PCR扩增的动力学。它表示随着扩增循环次数的增加，可以预计目标核酸(NA)数量将以多快的速度增加。标准曲线的斜率也被称为扩增反应的“效率”。理想情况下，扩增反应的标准曲线的斜率应该为“2”，这是因为目标NA的数量在每个扩增循环后应增加一倍（根据上述方程1： $T_n = T_0 \times 2^n$ ）。

使用以下公式可以很容易地换算出PCR效率： $E = 10^{-1/\text{斜率}}$ 。（例如：斜率 = -3.3 → E = 2）。

LightCycler® 480软件能自动地计算出扩增效率并将其显示在分析窗口中。实际情况中，反应的效率通常是小于2的。下面例子中的反应的扩增效率为1.975。



结果中给出的“误差”值（用于拟合线性回归时的单个数据点的平均方差）列于标准曲线的左侧，它代表根据标准曲线进行的定量结果的准确性（可以接受的误差值应小于0.2）。

通过测定未知样品的交叉阈值位于标准曲线的哪一位置，软件就可以计算出样品中目标DNA的初始浓度。





软件使用标准情况得到的交叉阈值数据把未知样品的交叉阈值数据转换为浓度值。只有当标准曲线的扩增效率及样品的扩增效率完全相同时，这些转换才是有效的。如果您使用了相同的标准曲线，那么您就可以很容易地得到相同的扩增效率。

4.2.3 准备标准曲线


您可以选择以下方法之一准备标准曲线：


- ▶ 在实验中加入外参照：在LightCycler® 480仪器同一次运行中，标准稀释样品在独立的孔中被扩增。外参照物用来计算“批间”标准曲线。
- ▶ 使用以前保存的标准曲线（称为外部标准曲线）。外部标准曲线可以被导入到尚无标准曲线的实验中，从而使这些实验能够进行定量分析。当多次运行中要对同一参数进行分析时，用这种方法尤其合适。


 在每个实验中必须要使用一个已经浓度的样品（或该样品的复制品）。该样品可以称为标准品，而且其浓度应该位于导入的标准曲线范围之内。该次运行的检测格式、分析类型、颜色补偿数据（如有）必须要与导入的标准曲线（制作时）所使用的条件保持一致。


 为了使外部标准曲线能有效使用，PCR扩增情况应容易重复，而且反应条件对所有的实验必须保持连贯。我们建议进行运行试验以保证PCR效率的稳定性，使用复制样品（尤其是低浓度的）来创建标准曲线。而且，在每次分析运行的过程中，应包含一个以前曾经过量的样品，以确认计算出的数值是可复现的。

如何保存标准曲线：

 进行一次扩增实验，该实验中包括您要使用的标准曲线。或者，您也可以使用现有的实验，该实验中包括您要使用的标准曲线。

 这个包括标准曲线的实验所使用的参数和条件必须与标准曲线将要应用的实验是一致的，包括相同的检测格式、浓度单位、分析模式以及颜色补偿数据（对于多色实验而言）。

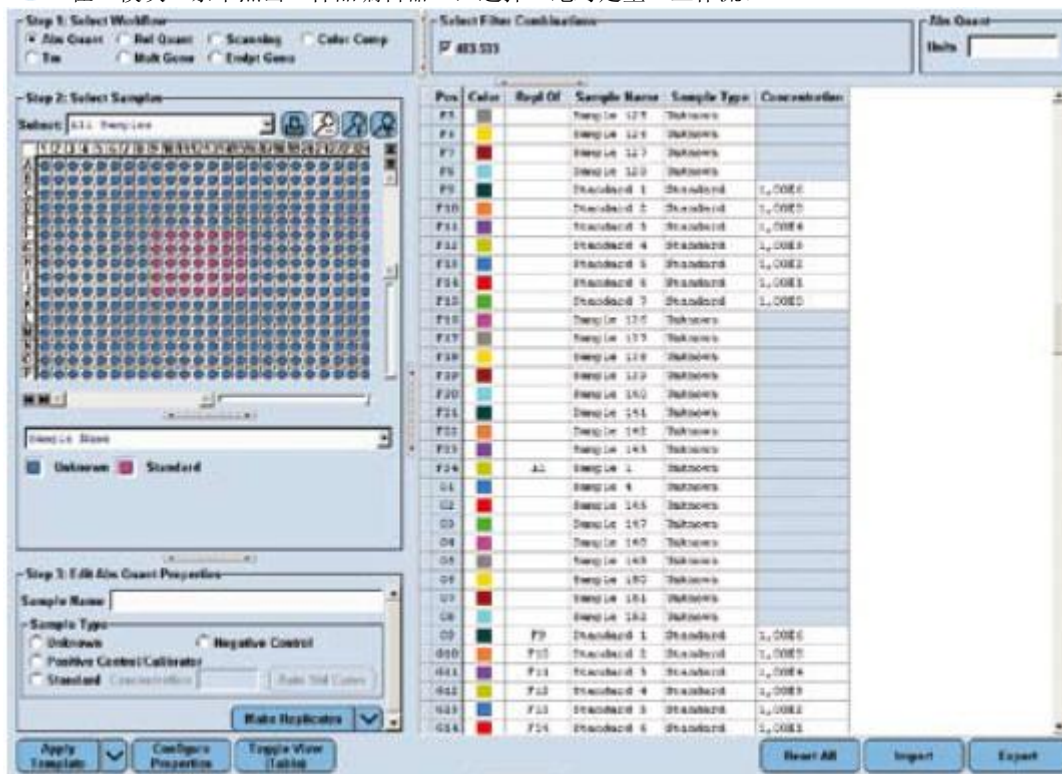
 您可以从一个实验中，通过每次您保存标准曲线时选择不同的信号通道或分析模式，从而创建多个标准曲线文件。

 为实验添加一个“绝对定量”分析模块。



165

- 3 在“模块”条中点击“样品编辑器”，选择“绝对定量”工作流。

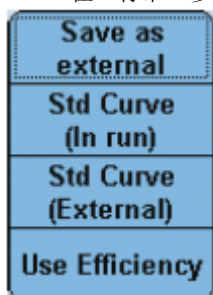


- 4 选择“标准”作为每个标准样品的样品类型，并指定标准浓度。
要了解有关“样品编辑器”的详细信息，请见“输入样品信息”一节。

- 5 在分析模块中，进行“绝对定量/最大二阶导数法”或“绝对定量/样点拟合法”。勾选您想要在标准曲线中使用的标准样品的选择框。有关进行“绝对定量”分析的详细信息请见下一节。

- 6 点击“计算”。

- 7 在“标准”多项选择按钮上，选择“另存为外部参照”。



- 8 导航至要保存曲线的位置，输入文件名，点击 。

您可以将保存的外部标准曲线用于其他定量分析中，前提仍然是所进行的实验与制作标准曲线所用的实验条件保持一致。

如何使用外部标准曲线：

1 运行包含标准曲线的扩增实验或使用包括标准曲线的现有实验。

! 标准样品的浓度应位于导入的标准曲线的范围之内。

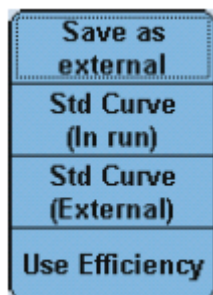
2 为实验添加一个“绝对定量”分析模块。

3 在“样品编辑器”中选择“绝对定量” workflow。

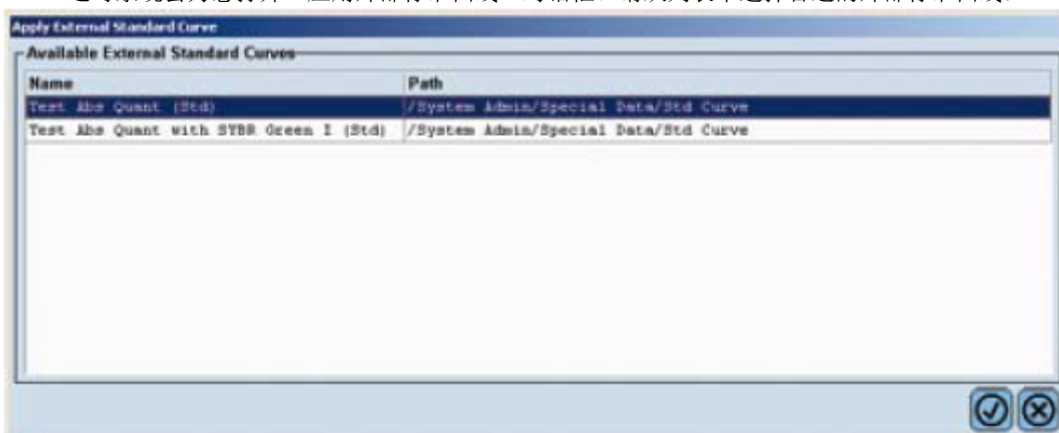
4 选择“标准”作为每个标准样品的样品类型，并指定标准浓度。

要了解有关“样品编辑器”的详细信息，请见“输入样品信息”一节。

5 在“标准”多项选择按钮上，选择“标准曲线（外部）”。

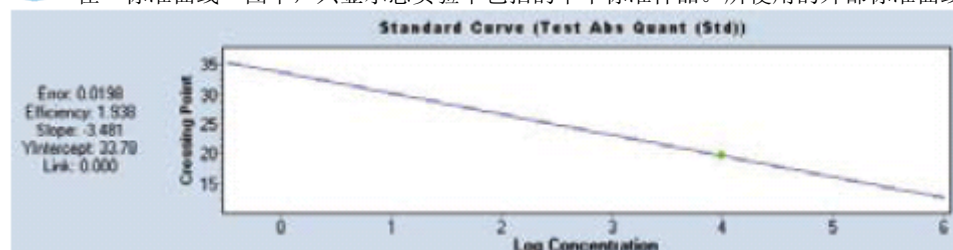


6 这时系统会为您打开“应用外部标准曲线”对话框。请从列表中选择合适的外部标准曲线：



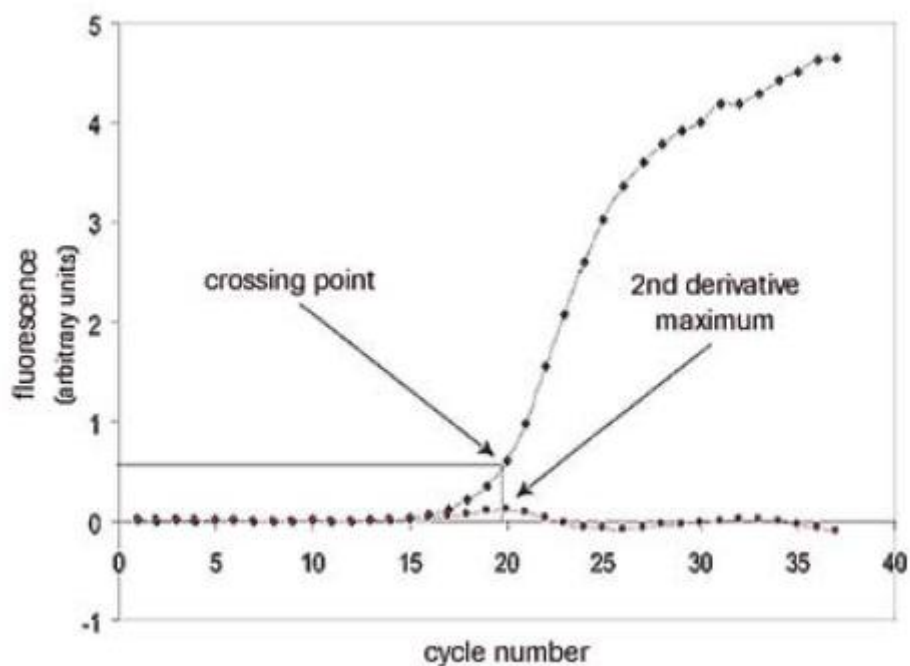
7 在分析模块中，在“样品”列表中选择标准样品的选择框，然后执行分析。点击“计算”。

8 在“标准曲线”图中，只显示您实验中包括的单个标准样品。所使用的外部标准曲线的名称显示于图表上方。



4.2.4 用最大二阶导数法进行绝对定量分析

最大二阶导数法以样品的荧光曲线突然急剧上升的那一点作为交叉阈值。这一转变点对应于扩增曲线的二阶导数的最大值。因此，这一方法称为“最大二阶导数法”。使用这一方法的优点是它不需要用户进行过多的输入。您只需要指定实验的标准曲线的类型（运行内或外部），软件就会自动进行计算。



最大二阶导数法是基于这样的事实，即荧光信号在反应的指数式增长期是持续增强的。而当反应进入平台期后荧光信号的加速度就开始下降了。因此，二阶导数位于其最大值时的循环总是处于反应的对数线性部分的中间。



当使用最大二阶导数法时，对于不同的样品而言，其交叉阈值的荧光强度通常并不相同。与基于阈值的计算方法（在相同的荧光强度值对样品进行比较）不同，这种方法不认为具有相同荧光强度的样品一定具有相同的DNA浓度。相反地，这种方法认为扩增曲线的图形更能说明PCR产物的浓度，而且认为交叉阈值位于最大加速的位置，即使不同曲线的荧光强度并不相同。



最大二阶导数法通过计算第2至第6循环的算术平均值，并从荧光值中减去这个平均值，从而自动对背景荧光进行校正。

如果要处理复杂的荧光数据曲线，软件会考虑到诸如曲线对数-线性期中的波峰、噪声平台、以及曲线仍未到达平台期等的影响和伪象。另外，除非当曲线已经到达相当强度的荧光值时，对于显示缓慢增加或减少的背景荧光曲线或噪声背景曲线，是不会有交叉阈值被显示出来的。

绝对定量——最大二阶导数法分析模块提供两种不同的算法，这两种算法在数据的线型，尤其是背景信号的处理方式方面不同：

► 高置信度

高置信度算法被优化用于寻找高度可靠的交叉阈值，即：通常对于明显上升及高信噪比的样品调用交叉阈值。因此而明显地减少了交叉阈值调用假阳性的风险。高置信度算法应被用于所有需要颜色补偿的实验。

► 高敏感度

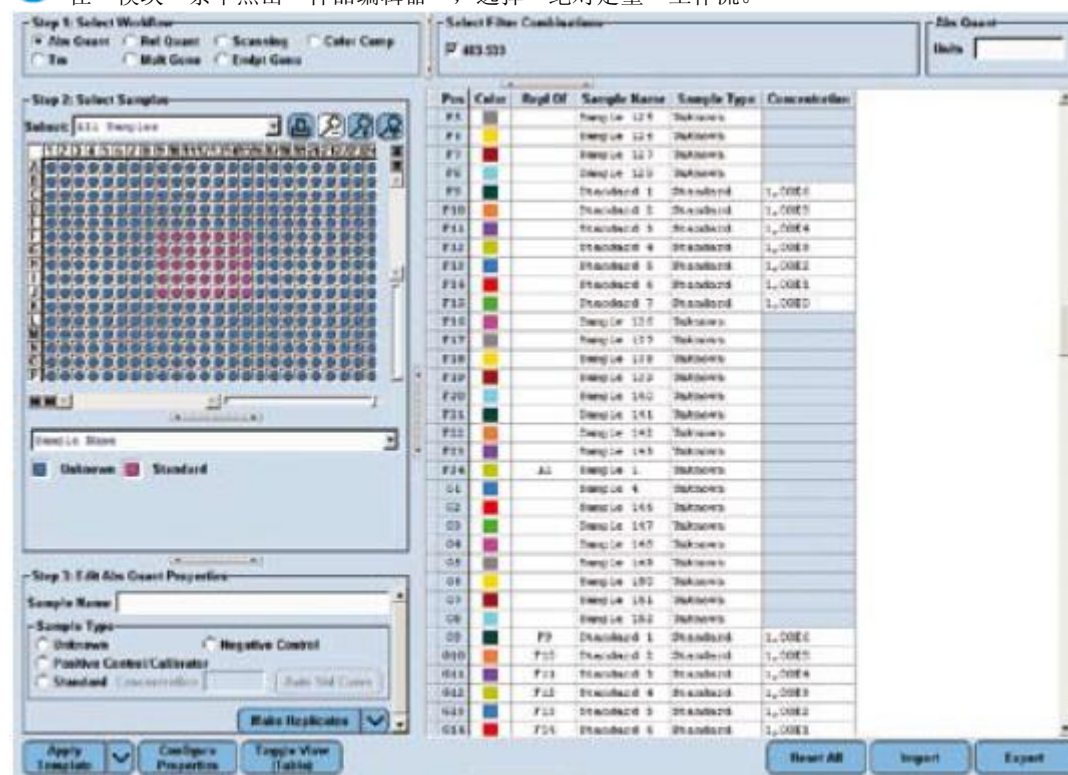
高敏感度算法即使对于荧光上升不显著以及因此信噪比较低的数据曲线，也检测交叉阈值。因此它适合于所有需要高敏感度的分析，如检测低拷贝和单拷贝的目标。这种算法的缺陷是有一定交叉阈值调用假阳性的风险。因此对高敏感度分析的结果始终应予以仔细检查。



高敏感度算法相当于LightCycler® 480软件1.2以前版本中的默认绝对定量方法。

如何用最大二阶导数法进行绝对定量分析：

- 1 创建并运行定量实验或打开原有的实验。
- 2 在“模块”条中点击“样品编辑器”，选择“绝对定量” workflow。



- 3** 确定样品的属性。
要了解有关“样品编辑器”的详细信息，请见“输入样品信息”一节。
软件使用以下参数进行计算：

| 参数 | 说明 |
|------|---|
| 样品类型 | 从列表中选择样品类型： ▶ 未知 ▶ 标准 |
| 浓度 | 输入“标准”类型样品的浓度。  浓度值的单位由“样品表”上“单位”区域中的项目确定（例如：“拷贝”）。  如果您不输入浓度值，就不能计算标准曲线。 |

- 4** 在“模块”条中点击“分析”。
- 5** 从“创建新分析”列表中，选择“绝对定量/最大二阶导数法”。在“创建新分析”对话框中，选择实验中的分析子集和定量程序（一般只有一个默认选中的定量程序）。点击.
- 6** ▶如果这是一个多色实验，请点击“滤光片组合”按钮，打开“滤光片组合”对话框。选择您想要分析的目标所用的滤光片组合。
▶使用“颜色补偿”多项选择按钮来打开或关闭“颜色补偿”，并选择“颜色补偿”对象。
- 7** ▶如果您在实验中包括标准参照，请勾选您想要在标准曲线中包括的每个标准旁边的选择框。（双击选择框来选中或清除。）在“动作”按钮区选择“标准曲线（运行内）”。
▶如果您在实验中未包括标准参照，请在“动作”按钮区选择“标准曲线（外部）”。找到并选择您想要使用的标准曲线，点击.
-  外部标准曲线必须来自与当前实验具有相同检测格式、滤光片组合以及颜色补偿色设置的实验。外部曲线和当前实验可以在不同的温控模块类型（96，384）上生成。如果您想要使用外部标准，那么您必须在新实验中包括标准浓度之一作为参照。根据每个样品与标准曲线相关的交叉阈值，软件为样品列表中的每个样品计算浓度。
- 8** 默认情况下，结果计算中包括所有样品；如要从结果计算中删除样品，请双击样品名称旁的选择框以清除选择框或按<Space>键。点击“计算”。
- 9** 如要查看一个或多个样品的扩增曲线，请在结果表中突出显示样品名称。
- 10** 如要查看分析结果，点击并将图表部分的左边界向右拖曳，以显示全部结果数据。结果包括带有“图例属性选择器”的“样品选择器”和“选择器过滤器”、“样品表”和“统计表”（只有当实验有样品复本时才有）。

4.2.5 用样点拟合法进行绝对定量分析

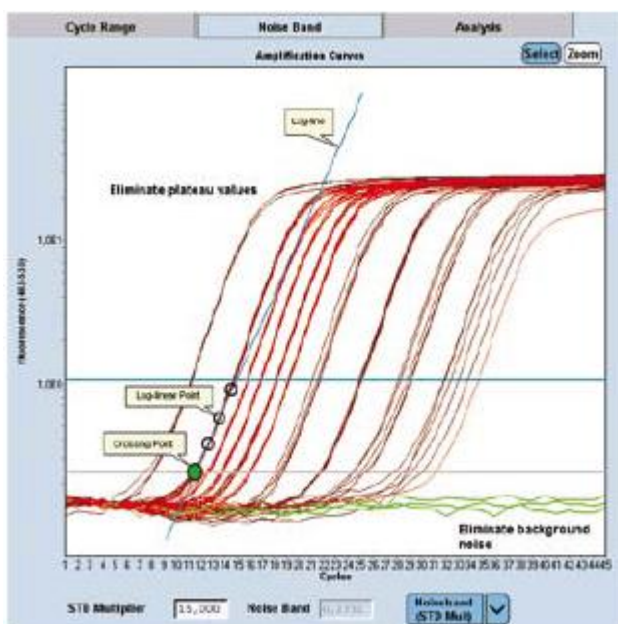
样点拟合法 (Fit Point) 需要用户丢弃不提供信息的横向噪声频带背景噪声, 通过输入对数线性点的数值来排除平台值, 然后将对数线与扩增曲线的指数增长部分进行拟合。对数线与横向阈值线的交点确定了交叉阈值。LightCycler®480软件用计算出的标准样品交叉阈值来生成交叉阈值对样品浓度的标准曲线。



绝对定量——样点拟合法分析模块可以使您通过自动算法设置噪声频带和阈值线。因此, 如同使用最大二阶导数法一样, 以完全自动的方式而不需要任何用户输入, 根据样点拟合法进行绝对定量分析是可能的。因为所有拟合点特异相关的参数 (循环范围设置、背景循环范围设置、噪声频带设置、标准差倍数、阈值设置和拟合点数) 都能保存在模板中, 所以用宏来自动进行样点拟合分析是可能的。

设置噪声频带

噪声频带的最佳位置应尽可能低, 不包括任何背景噪声, 而又应有必需的高度, 能明确地与所有样品曲线在对数线性期交叉。下图显示噪声频带可接受水平的范围, 还有对扩增曲线指数式增长部分进行拟合的对数线、对数线性点, 以及一条扩增曲线的示例性交叉阈值。



绝对定量——样点拟合法分析模块使您能用三种选项设置噪声频带：

- ▶ 噪声频带（自动）：用这个选项，计算所有样品背景信号（噪声）的标准差。然后设置噪声频带为该标准差的12倍。
- ▶ 噪声频带（标准差倍数）：用这个选项，计算所有样品背景信号的标准差。然后用户可以确定背景标准差的倍数。
- ▶ 噪声频带（Fluor）：让您手工设置噪声频带。

确定拟合点

对于不同样品，对扩增曲线进行的指数式增长部分进行拟合的对数线上的数据数量也不相同。在一个数据集内，对数线性循环数可以为低浓度范围的2到高浓度范围的4。在这种情况下，我们建议选择最低值，2个拟合点。纳入平台期数据点的作用不如排除一个对数线性点。因此，拟合点数的默认设置为2。

调整阈值

背景噪声去除后，为每条扩增曲线计算对数线，然后外推阈值线。绝对定量——样点拟合法分析模块使您可以自动设置阈值线：

- ▶ 如果实验包括标准参照，那么用最小错误计算来确定阈值线。
- ▶ 如果实验不包括标准参照，那么将噪声频带用作阈值线。

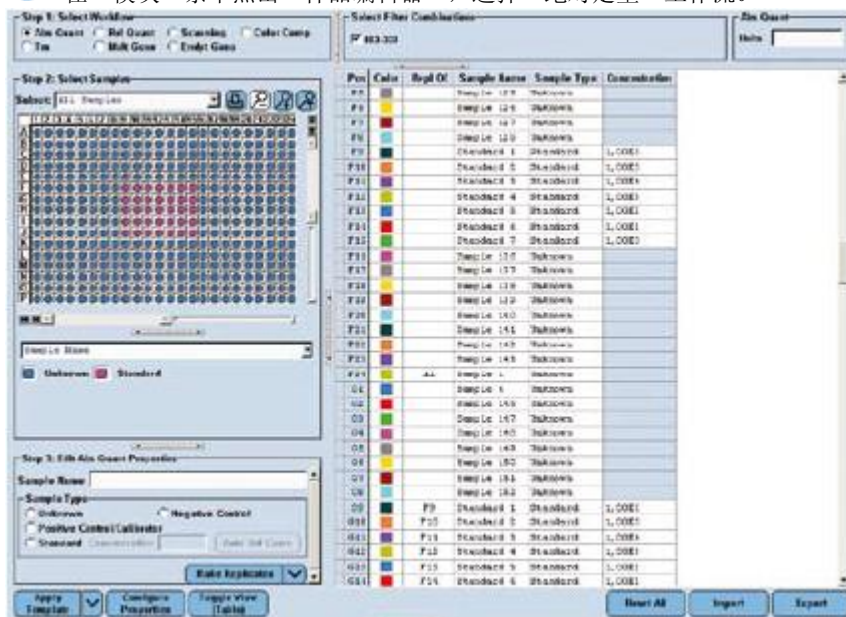
在大多数情况下，自动阈值线功能能获得满意的结果。有时，您可以略通过手工对阈值线进行上下调整来改善标准曲线误差值。





计算对数线后，任何阈值位置都将获得适合的标准曲线。仅有外推误差可能会有不良影响，因为阈值会远离数据点。如果荧光信号与特殊PCR产物的量成比例，那么唯一有用的是所有样品具有相同的阈值。



如何用样点拟合法进行绝对定量实验:

- 1 创建并运行定量实验或打开原有的实验。
- 2 在“模块”条中点击“样品编辑器”，选择“绝对定量” workflow。



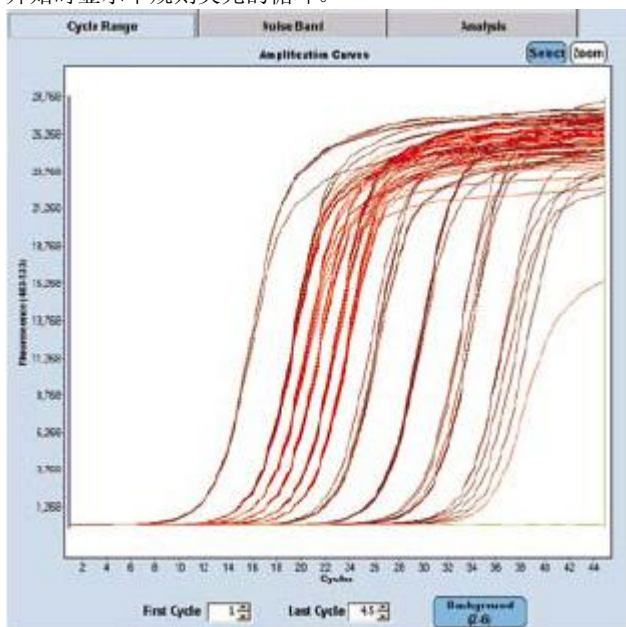
- 3 确定样品的属性。
要了解有关“样品编辑器”的详细信息，请见“输入样品信息”一节。软件使用以下参数进行计算：

| 参数 | 说明 |
|------|---|
| 样品类型 | 从列表中选择样品类型： ▶ 未知 ▶ 标准 |
| 浓度 | 输入“标准”类型样品的浓度。  浓度值的单位由“样品表”上“单位”区域中的项目确定（例如：“拷贝”）。  如果您不输入浓度值，就不能计算标准曲线。 |

- 4 在“模块”条中点击“分析”。
- 5 从“创建新分析列表”中选择“绝对定量/样点拟合法”。在“创建新分析”对话框中，选择实验中的分析子集和定量程序（一般只有一个默认选中的定量程序）。点击。
-  在分析模块创建时，软件将自动计算默认的噪声频带和阈值设置。一直到第12步的所有分析步骤都是可选的。
- 6 ▶ 如果这是一个多色实验，请点击“滤光片组合”按钮，打开“滤光片组合”对话框。选择您想要分析的目标所用的滤光片组合。
▶ 使用“颜色补偿”多项选择按钮来打开或关闭“颜色补偿”，并选择“颜色补偿”对象。

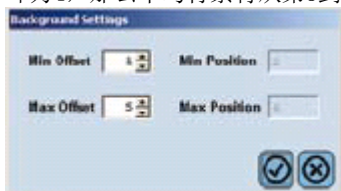


7 在“循环范围”标签上，您可以在扩增程序中循环的全程查看基线校正的扩增曲线荧光。默认情况下，循环范围是指实验的第一个和最后一个循环。通过鼠标拖动纵向滑块（蓝色滑块=第一循环；绿色滑块=最后循环）或在相应输入框中输入第一和最后循环，您可以改变用于计算的循环范围。用这个选项可以排除一些循环，例如在反应开始时显示不规则荧光的循环。



8 您在输入框中输入的值与图中的纵向滑块是同步的。

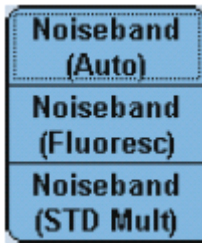
8 点击“背景”按钮，手工输入背景校正范围。该范围被指定为在循环范围下抵消第一循环的值。在“背景”按钮上确定“最小位置”和“最大位置”，计算两者之间曲线的平均（算术平均）荧光强度，对每条曲线进行“背景”校正。（即：如果第一循环为1，最小/最大抵消设置为1/5，那么平均背景将从第2到6循环计算。如果第一循环为4，那么平均背景将从第5到9循环计算。）平均背景将从每条曲线的未校正荧光值中减去。



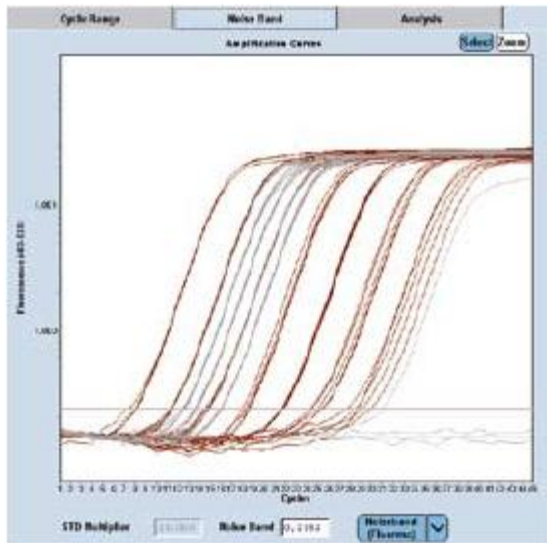
8 如果您移动纵向滑块来改变用于计算的循环范围，图中的曲线将立即按其背景校正值调整，并在图中重新显示。



- 9 在“噪声频带”标签上，您可以从样品中清除噪声。 点击“噪声频带”多项选择按钮，按以下任何方式设置噪声频带：



- ▶ 噪声频带（自动）：将噪声频带自动设置为噪声标准差的12倍（“标准差倍数”和“噪声频带”框含只读数值）。这是默认设置。
- ▶ 噪声频带（Fluor）：您可以拖动横向噪声频带条来排除噪声，或在输入框中输入噪声频带的数值（“标准差倍数”值据此计算并显示为只读值）。
- ▶ 噪声频带（标准差倍数）：将噪声频带设置为噪声标准差的倍数（“噪声频带”值据此计算，并显示为只读值）。



- 10 在“分析”标签上确定用于生成样品对数线性曲线的数据点（拟合点）。

- 11 按以下任何一种方法确定样品的阈值：

- ▶ 选择阈值（自动），让LightCycler®480软件自动调整阈值。这是默认设置。
- ▶ 选择阈值（手工），用鼠标指针向上或向下拖动阈值，或在阈值输入框中输入阈值。

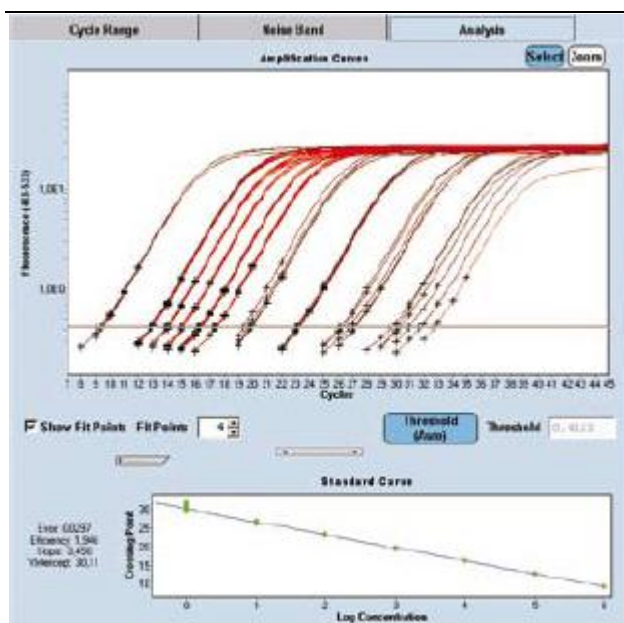



您可以通过点击“阈值”按钮在自动或手工法之间切换。




如果您拖动阈值线，那么软件将自动将阈值模式设置为手工。





- 12** ▶ 如果您在实验中包括标准参照，请在您想要包括在标准曲线中的每个标准旁的选择框中勾选（双击该框以选中或清除）。在“动作”按钮区选择“标准曲线（运行内）”。
▶ 如果您在实验中未包括标准参照，请在“动作”按钮区选择“标准曲线（外部）”。找到并选择您想要使用的标准曲线，点击 。

 外部标准曲线必须来自与当前实验具有相同检测格式、滤光片组合以及颜色补偿设置的实验。此外，您不能使用最大二阶导数法进行的绝对定量分析或相对定量分析生成的标准曲线。外部标准曲线和当前实验可以在不同的温控模块类型（96, 384）上生成。如果您想要使用外部标准，那么您必须在新实验中包含标准浓度之一作为参照。根据每个样品与标准曲线相关的交叉阈值，软件为样品列表中的每个样品计算浓度。

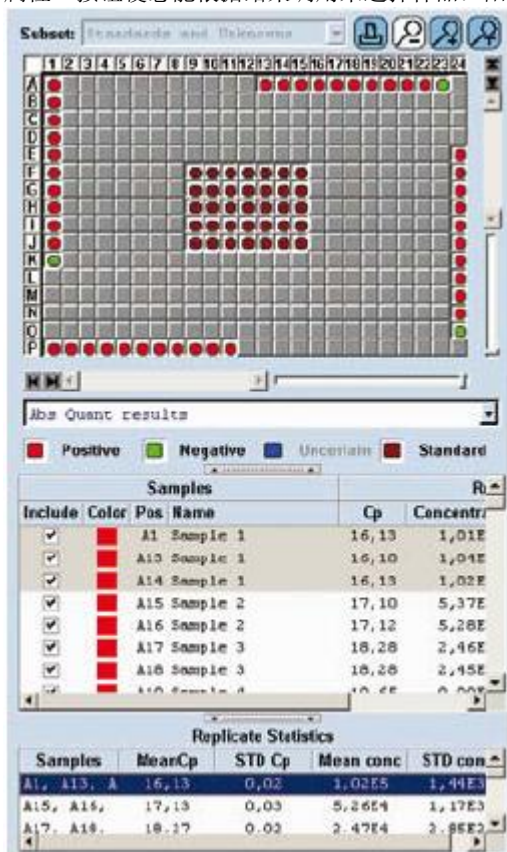
- 13** 点击“计算”按钮来计算并显示交叉阈值值，并且，如果存在标准数据的话，计算浓度。
- 14** 默认情况下，结果计算中包括所有样品；如要从结果计算中删除样品，请双击样品名称旁的选择框以清除选择框或按<Space>键。点击“计算”。
- 15** 如要查看一个或多个样品的扩增曲线，请在样品列表中突出显示样品名称。要查看拟合点，请勾选“显示拟合点”框。

4.2.6 查看结果

1 绝对定量分析结果包括带有“图例属性选择器”和“图例属性”按钮的“样品选择器”、“结果”表和“统计”表（只有当实验有样品复本时才有）。


用“图例属性选择器”，按结果、按样品类型、按样品选项或按复本组，来显示颜色。用有颜色的“图例属性”按钮来选择具有某些属性的样品在多孔板图像、“结果”表和图中的显示。


如果您在“图例属性选择器”中选择“绝对定量结果”，那么绝对定量分析的“结果表”将显示以下结果。“图例属性”按钮使您能根据结果调用来选择样品：阳性、阴性、不确定、标准。



勾选“阳性”、“阴性”、“不确定”、“标准”选择框来选择样品选择器具有相应结果类型的孔，并以图例中所显示的颜色把它们突出显示。




| 结果 | 说明 |
|------|--|
| 交叉阈值 | 样品的交叉阈值。  括号中显示的浓度值表示不确定的值。标准曲线的可靠范围是指最高和最低范围的浓度。如果计算出的样品浓度值高于最高标准或低于最低标准，那么这个值被认为超出标准曲线范围，并在状态栏中显示。 |
| 浓度 | 根据落在交叉阈值对浓度标准曲线上的交叉阈值位置计算出的样品浓度。 单位定义为在“样品编辑器”上“绝对定量”部分的“单位”区域中的输入单位（例如：“拷贝”）。 |
| 标准 | 该值在“样品编辑器”的“绝对定量”部分中指定。 |
| 状态 | 状态的符号码和说明。该栏包括相应的提示框。可能有以下代码： ? 检测器代码不确定 < 早期交叉阈值调用（前五个循环）具有较高的不确定性 > 晚期交叉阈值调用（最后五个循环）具有较高的不确定性 E 标准曲线中的外推浓度 如果样品具有多个代码（即：样品为不确定且为外推），那么状态区域将全部代码和全部文本说明（由逗号分隔）。 |

 在实验有复本时，以下组结果和统计量附于“结果”表：

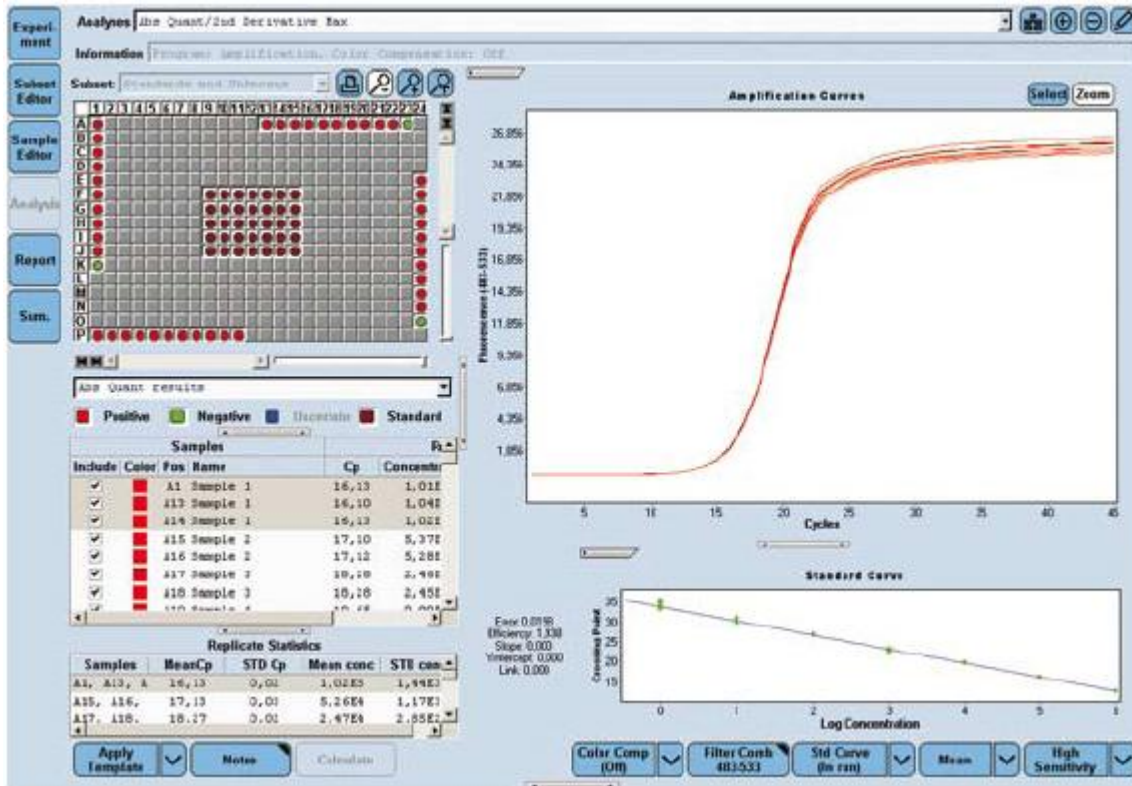
| 统计量 | 说明 |
|------------|-------------------|
| 样品 | 复本组中的样品数。 |
| 平均/中位数交叉阈值 | 组中样品交叉阈值的平均/中位数值。 |
| 交叉阈值标准差 | 交叉阈值标准差。 |
| 平均/中位数浓度 | 组中样品浓度的平均/中位数值。 |
| 浓度标准差 | 浓度的标准差。 |

 统计计算中排除阴性样品。

 如果您选择“统计”表中的复本组，那么复本组中的全部样品曲线都将显示于相关图中。

例如：用最大二阶导数法进行的绝对定量分析显示如下。计算实验中所有样品的结果。突出显示样品的扩增曲线得到显示。从被勾选并在“样品编辑器”中被标为标准的样品中生成标准曲线。

分析包括两个图。在默认情况下，上图显示扩增曲线，下图显示标准曲线。“分析”窗口的详细说明请见“使用分析窗口”一节。



4.3 相对定量分析

4.3.1 概述

相对定量比较单个样品中的两个不同目标序列（例如：所研究的目标基因（GOI）和另一个基因），并以这些目标的比值来表示最终结果。出于比较的目的，第二个基因是参照基因，在所有试验条件下以恒定拷贝数出现。这个参照基因，也被称为内源性对照，为样品间差异的标准化提供了基础。这种分析在诸如肿瘤学研究中是有用的。

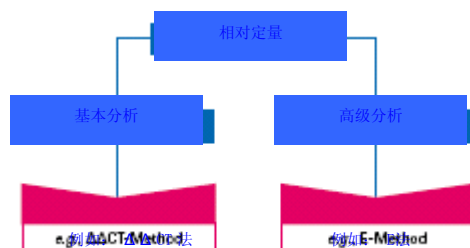
基因表达研究通常试图测定：相对于确定的起点（例如：无病状态或未治疗状态），目标基因随时间而改变其表达特性的方式（例如：在疾病或治疗过程中，基因表达发生了多少改变）。由于相对定量使用户可以易于比较目标基因在至少两种状态（例如：无病/有病或未治疗/治疗）下的表达行为，相对定量是测定基因表达和基因量的最佳方法。

通过将每个样品中目标基因的浓度除以同一样品中参照基因的浓度，该方法能对样品因以下原因引起的质量和数量差异进行校正：

- ▶ 初始样品量的不同
- ▶ 核酸复原的不同
- ▶ 样品材料RNA降解可能
- ▶ 标本和/或核酸质量的差异
- ▶ 样品加载/移液误差的不同
- ▶ cDNA合成效率的不同

相对定量分析中的分析模式

新的LightCycler 480®软件为相对定量方法提供两种不同的分析模式：基本和高级分析。



▶ **基本分析**模式只需一次点击即可生成结果，从而提供了自动、易用的模式。该方法基于目前广泛使用的 $\Delta\Delta$ CT法。详细信息请见“基本相对定量实验”一节。

▶ **高级分析**模式是一种灵活性强的手工模式，为要求最苛刻的研究项目提供了复杂的软件算法和性能卓越的工具。详细信息请见“高级相对定量实验”一节。



罗氏诊断公司提供了E法（效率法），该方法显示了许多富有很高价值的可能解决方案中的一种，这些解决方案可用高级分析来生成可靠的结果。该方法的特点在于它的优越的、合乎科学的属性。

| | 基本法（例如： $\Delta\Delta$ CT法） | 高级分析（例如：E法） |
|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 样品类型 | 目标（一个/许多） 参照（一个/许多） | 目标（一个/许多） 参照（一个/许多） |
| 校正品 | 分析校正品和/或研究校正品 ¹ | 分析校正品和/或研究校正品 |
| 标准 (目标/选项) | - | 标准 |
| 效率 | 2/≠2（线性） | 2/≠2（线性/非线性） |
| 交叉阈值分析 | 样点拟合法 | ▶ 最大二阶导数法 ▶ 样点拟合法 |

¹LightCycler 480®多板分析软件将提供选项来确定参照实验（研究校正品），可用于其他实验的标化。

PCR效率校正

所有定量实时PCR应用的可靠性都取决于PCR的质量，因此所有相对定量计算的可靠性也取决于此。

PCR扩增是由酶促作用推动的。像每个酶促过程一样，给定的PCR可能在质量方面有所不同。为了计算的目的，PCR的综合质量可以表示为单个数字：PCR的“效率”（E）。最高质量的PCR的运行效率为2（E = 2）。这是指每个PCR循环中，目标分子的数量增加一倍。

PCR取决于许多因素。为了使PCR达到最高效率，影响其过程的每一个因素（例如：样品制备、核酸（NA）纯化、前PCR步骤）都必须处于最佳状态。因此，大多数PCR的运行效率小于2（E < 2）。

记住：相对定量分析包括两个PCR的比较（例如：同一样品中目标基因和参照基因的扩增）。但是，两个不同的PCR不一定具有相同的效率。在此情况下，根据对这些PCR进行比较后得出的分析可能不完全准确。此外，在整个过程中不是所有的扩增反应都具有相同的效率。他们可能不遵循公式 $N_n = N_0 \times E^{2n}$ （N是指生成的拷贝数， N_0 是初始的拷贝数，n是循环数，E是效率）所描述的线性回归。

因为这些效率的考虑会影响分析的准确度，所以您在为给定的实验系统选择最佳相对定量方法时必须考虑这些因素。



在以下情况下，建议您应用PCR效率校正来进行相对定量：

- ▶ 您的PCR分析的运行效率不是为2的最佳状态
- ▶ 您的PCR分析的运行效率不恒定。

只有通过应用PCR效率校正，由目标和参照基因扩增中的差异引起的计算误差才会显著减少。

LightCycler®480相对定量软件自动进行的效率校正定量是根据描述目标和参照基因PCR效率的相对标准曲线进行的。这些标准曲线可以一次测定后保存为外部标准曲线以用于每次分析，也可以在分析运行中通过目标和参照基因的交叉阈值测定。

由于校正品标化相对定量的原理，不必知道相对标准参照的确切拷贝数。只需输入所用标准参照的相对稀释梯度（1:10、1:100，...）；目标基因和参照基因各需要一个稀释品系列。我们建议您采用如15个目标标准样品和另15个参照标准样品（涵盖4个数量级的动态范围），来进行LightCycler® 480系统运行。稀释品系列应采用典型的核酸，例如来自校正品的总RNA或基因组DNA来完成。原则上，与典型样品具有相同PCR效率的任何核酸稀释品都能用于创建相对标准曲线。

4.3.2 单色或双色实验

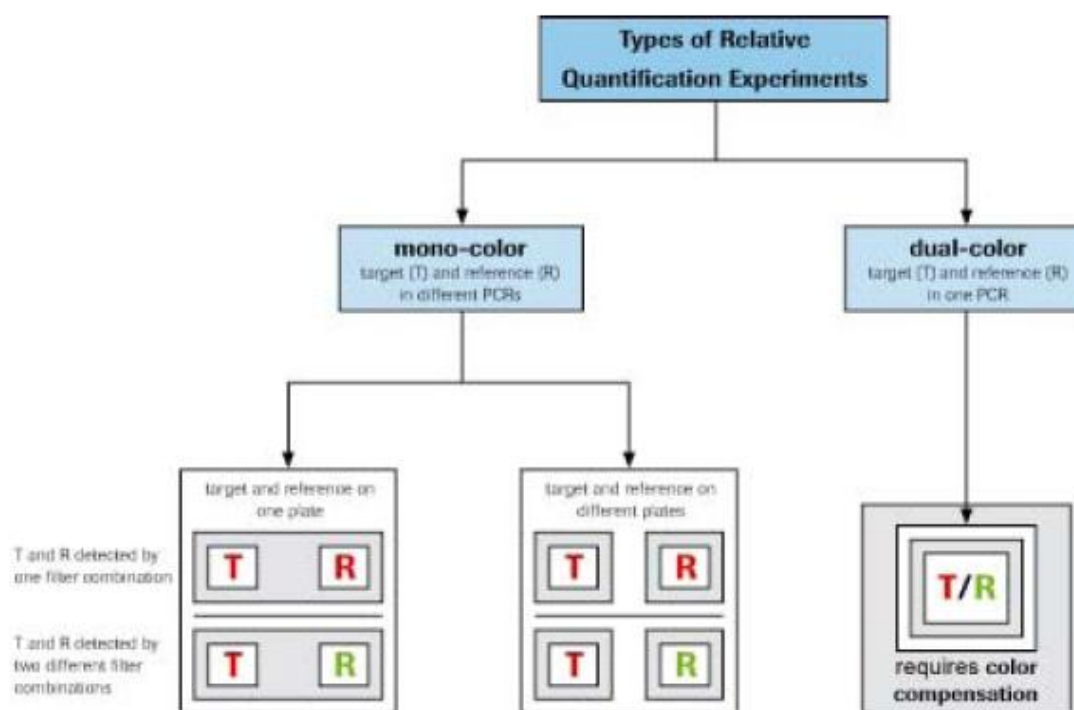
在您进行相对定量分析之前，您必须决定是否想要运行单色或双色实验：

- ▶ 在单色实验中，目标和参照样品在各自独立的反应中扩增。对于单色实验来说，您有两个不同的选项来处理参照样品：
- ▶ 目标和参照样品在同一个多孔板中扩增。在这种情况下，使用“运行内”“参照样品位置选项”（见下）。
- ▶ 目标和参照样品在各自独立的多孔板中扩增。在这种情况下，使用“外部”“参照样品位置选项”（见下）。



目标和参照不必用同一个滤光片组合来检测。

- ▶ 在双色实验中，目标和参照样品在同一个反应中扩增，这需要两个不同的滤光片组合来检测。这个设置要求应用颜色补偿（一些特殊的滤光片联合除外；详情请见“进行颜色补偿分析”一节）。




4.3.3 相对定量分析的原理

相对定量分析比较两个比值：

- ▶ 位置样品中目标DNA序列与参照DNA序列的比值，以及
- ▶ 被称为“校正品”的标准样品中这两种序列的比值。

“目标”是要分析的核酸（特定的RNA或DNA序列），而“参照”是在所有样品中以恒定拷贝数出现并充当内源性对照的核酸。参照用于样品之间差异的标化。“校正品”一般是目标与参照基因之比为稳定比值的阳性样品，用于标化一次运行中的所有样品，此外还提供LightCycler® 480系统几次运行之间的恒定校正点。

 虽然校正品能对因探针退火、FRET效率或染料消光系数差异引起的目标和参照之间检测灵敏度的差异进行校正，但是不能对目标和参照基因之间PCR效率的差异进行校正！

结果以标化比值表示，即比值（1）除以比值（2）。：

标化比 = (目标浓度/参照浓度)_{样品} : (目标浓度/参照浓度)_{校正品}

具有扩增程序和适当样品类型的实验可以进行相对定量分析。单色实验或双色实验可以进行相对定量分析。

相对定量分析是基于以下设想：一个样品交叉阈值的浓度与每个含相同目标DNA的样品一样。这是LightCycler® 480仪器在背景噪声之上检测信号所必需的DNA浓度。

根据样品中DNA的初始浓度，每个样品达到交叉阈值可能需要不同的循环数。根据样品达到交叉阈值后完成的循环数，每个样品在实验结束时的DNA浓度可能不同。

该分析使用样品的交叉阈值（以循环数表示）、反应效率、完成的循环数，以及其他值来测定扩增结束时每个样品增加的DNA浓度。该分析运用这些计算来比较样品，并生成比值。校正品标化相对定量获得的最终比值只是PCR效率和所测得交叉阈值的函数。它不需要知道检测阈的绝对拷贝数，因此该分析不测定样品中的实际DNA浓度。校正品标化比值的计算不需要每个LightCycler® 480运行中的标准曲线。



 相对定量准确度的基本前提是：

- ▶ 如果使用标准参照，那么相对标准参照和未知样品的扩增效率相同。
- ▶ 目标和参照PCR的效率在各样品之间并无不同
- ▶ 在所研究的系统中，参照基因不被调控

为了确定上述参数，软件使用下节所述的项目。

相对定量分析使用的标识符

相对定量分析使用以下标识符：

| 属性 | 说明 | 有效值 |
|----------|--|--|
| 样品名称 | 所分析材料的名称。如果使用多个目标/参照，采用样品名称来识别配对分组。 | 字母数字字符 (≤25字符) 默认值为“样品####”，其中####为序号 |
| 目标名称 | 目标基因的名称  该区域中的“目标”一词不同于“样品类型”的“目标”。 例如：“基因1”指所有样品、标准参照、校正品、和阴性品的探针基因1 | 字母数字字符 (≤25字符) 默认值为空 |
| 样品类型(必需) | 样品的类型 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 未知 ▶ 阳性对照/校正品 ▶ 阴性对照 ▶ 标准 |
| 目标类型(必需) | 目标的类型 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 目标 ▶ 参照 ▶ 未分配  所有相对定量计算都排除未分配目标 |

 如果您用不同滤光片组合进行实验，请确保您输入样品信息时选择适当的滤光片组合。

自动配对

LightCycler 480®软件根据以下规则分配目标和参照：

| 目标和参照具有相同的样品名称 | 目标名称 | 自动配对 |
|----------------|--------|--------------------------|
| - (默认) | - (默认) | 根据与移液图相应的形状规则 (例如：行、列、块) |
| + | + | 根据样品编辑器中的定义 |
| + | - | 无自动配对可能 |
| - | + | 无自动配对可能 |

4.3.4 进行基本相对定量实验

基本相对定量方法是基于 $\Delta\Delta$ CT法。因此总是使用以下设置：

- ▶ 用于交叉阈值计算的拟合点
- ▶ 预先确定的效率（不需要标准）
- ▶ 用于计算的“运行内”参照
- ▶ 如果确定多个目标/参照名称的话，那么采用“全部对平均”作为配对规则（如要了解更多信息，请见“多个目标/参照基因的配对规则”）
- ▶ 全板（分析中不考虑子集）

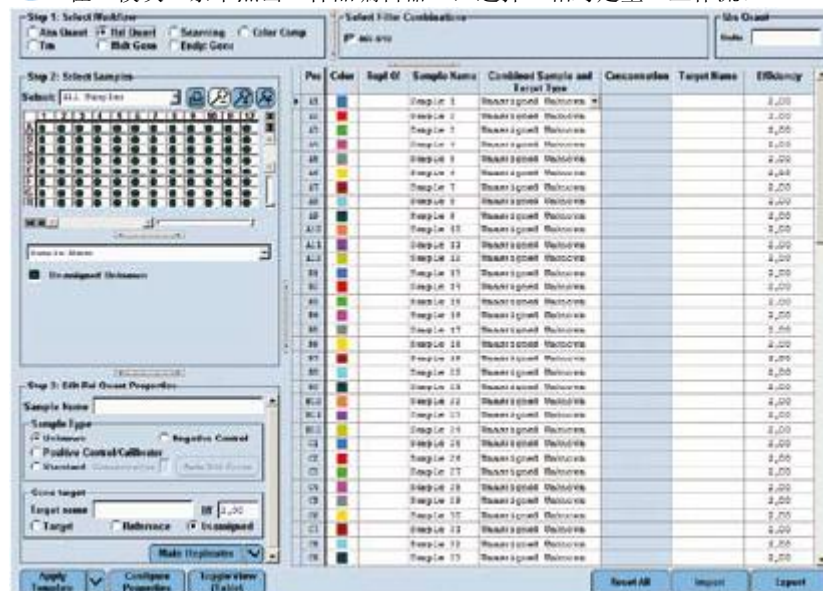
基本相对定量实验是一个包括以下内容的扩增实验：

- ▶ 未知目标
- ▶ 未知参照
- ▶ 校正品（可选）
- ▶ 阴性品（可选）

如何进行基本相对定量实验：

1 进行一个扩增实验。

2 在“模块”条中点击“样品编辑器”，选择“相对定量” workflow。



3 确定样品的属性。

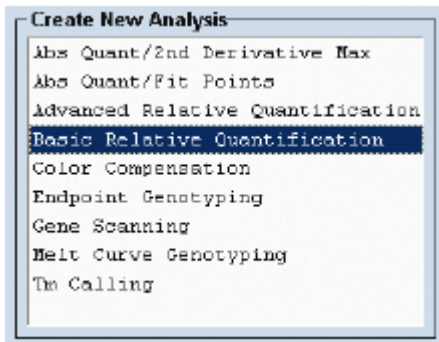
要了解有关“样品编辑器”的详细信息，请见“输入样品信息”一节。

软件使用“相对定量分析使用的标识符”一节中确定的参数进行计算。

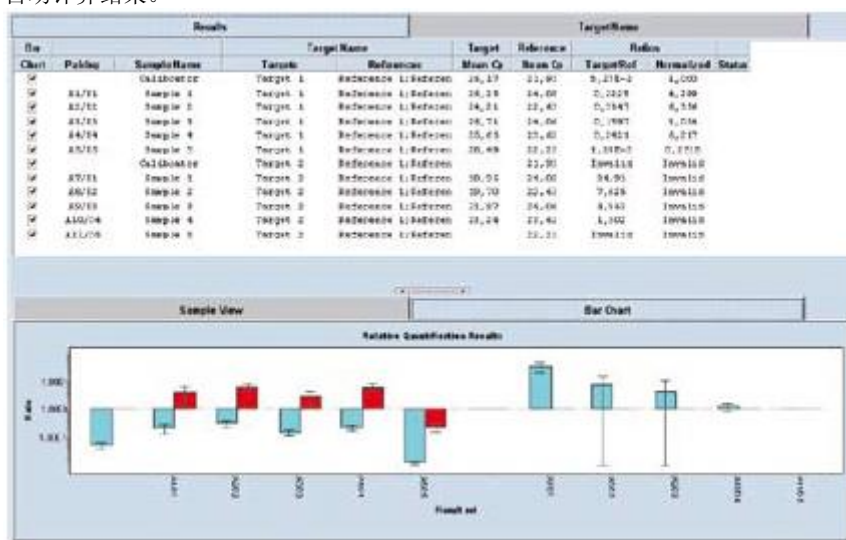
4 由于基本相对定量总是使用全板进行分析，您必须确保未使用位置的目标类型始终为“未分配”。



- 5 在“模块”条中点击“分析”。
在“创建新分析”对话框中，选择“基本相对定量”。



- 6 打开“相对定量分析”屏幕。
自动计算结果。



如要查看噪声频段设置，请按“查看结果”一节所述继续进行。

- 如果您想要改变预先确定的设置，您可以进行高级相对定量分析（见“进行高级相对定量实验”一节）。

4.3.5 进行高级相对定量实验

高级相对定量方法不但可以使您可以测定相对比值——它还可以通过启用以下项目来扩展和提高这个概念：

- ▶ 通过样点拟合法或最大二阶导数法来进行交叉阈值调用
- ▶ 通过“运行内”参照或“外部参照”实验来进行参照分析
- ▶ 多个目标/参照基因的配对规则
- ▶ 标准的使用
- ▶ 子集的使用



这类定量分析不仅适用于基因表达分析，还可用于DNA水平的研究，例如，基因量数值的测定。在这种情况下，在同一个样品材料中使用单拷贝基因作为参照。优先选择位于要测定的目标序列相同染色体上的单拷贝基因。

高级相对定量实验包含

- ▶ 未知目标和参照
- ▶ 标准目标和参照（可选）
- ▶ 校正品目标和参照（可选）
- ▶ 阴性品目标和参照（可选）

参照可在单独的实验中测定。

如何进行高级相对定量实验：

在您进行高级相对定量分析之前，您必须决定如何设定目标和参照的效率值。如果您不想使用效率 $E = 2$ 或预先确定的效率值，那么您有以下两个选项：

- ▶ 包括当前实验中的现行标准以生成相对标准曲线
- ▶ 导入外部相对标准曲线



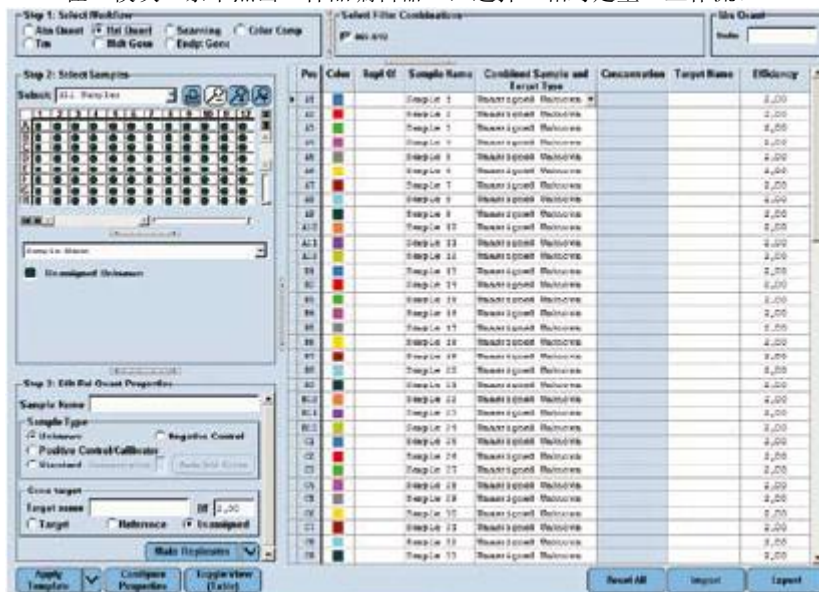
如果确定了“运行内”标准，那么这些标准将否决“样品编辑器”中确定的所有效率值。

1 进行一个扩增实验。
必要时包括一个外部参照实验。

2 （可选）确定将要分析的子集：详细内容请参见“使用子集”一节。如果未确定子集，那么软件将分析整个板，并自动将空的样品位置识别为阴性。



3 在“模块”条中点击“样品编辑器”，选择“相对定量” workflow。




4 确定样品的属性。

要了解有关“样品编辑器”的详细信息，请见“输入样品信息”一节。

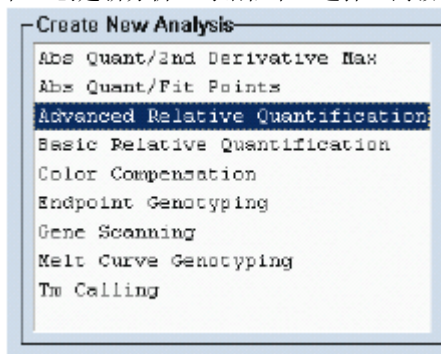
软件使用“相对定量分析使用的标识符”一节中确定的参数进行计算。


在高级相对定量分析中，软件还另外使用以下参数：

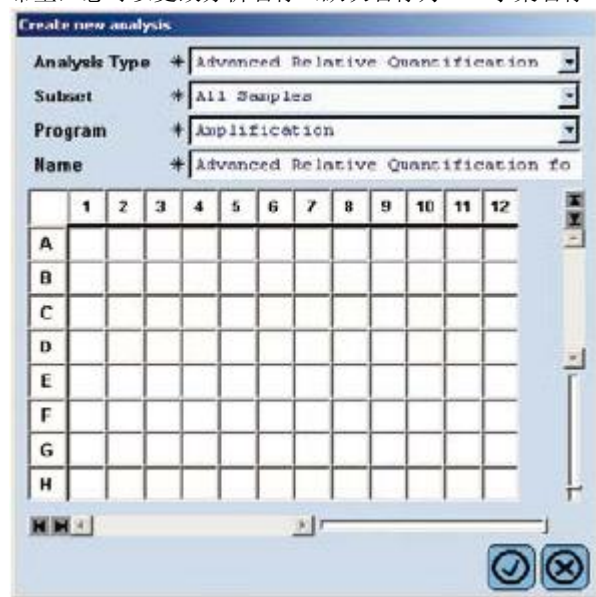
| 属性 | 说明 | 有效值 |
|------------|--|-------------------------------|
| 浓度 (可选) | 标准样品的浓度。  该区域只有在样品类型为“标准”时才会被激活。 | 浓度值 |
| 效率 | 目标的PCR效率 如果可以使用目标基因的系列稀释品，软件将使用默认值和在此输入的值来计算确切的PCR效率。 | 数值： 1 < 效率 < 3 默认值为2.00 |

5 在“模块”条中点击“分析”。

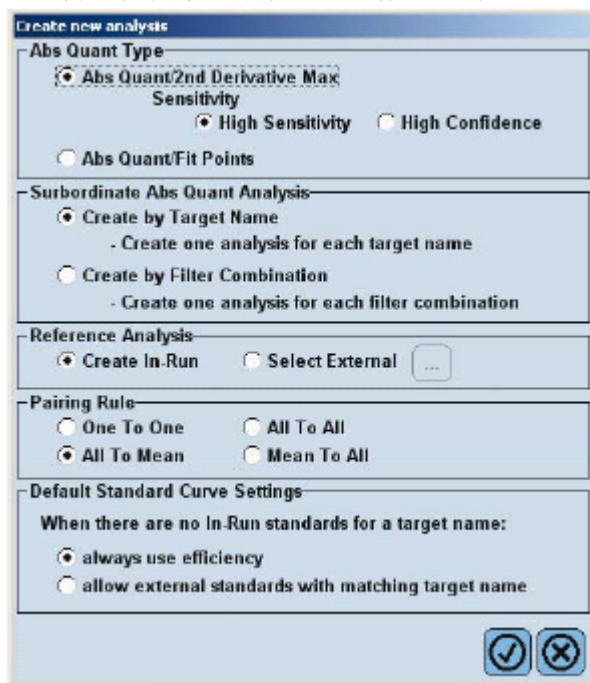
在“创建新分析”对话框中，选择“高级相对定量”。



6 打开“创建新分析”对话框。从“程序列表”中选择分析子集和实验程序（通常是“扩增”程序）。如果您希望，您可以更改分析名称（默认名称为“‘子集名称’的‘分析类型’”）。点击.



7 另一个对话框会打开，让您选择以下选项。



绝对定量类型

选择要对每个目标基因进行的次级绝对定量分析类型。要了解更多信息，请参阅“绝对定量分析”一节。

次级绝对定量分析

每个相对定量分析是基于两个或更多的次级绝对定量分析。

选择软件如何识别不同的目标基因：

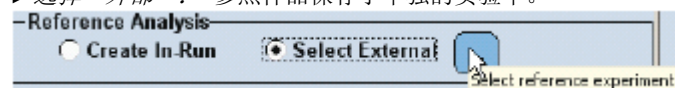
- ▶ **按目标名称创建：**软件通过第4步输入的目标名称来识别目标基因。
- ▶ **按滤光片组合创建：**软件通过第4步中使用的滤光片组合来识别目标基因。




参照分析

选择参照样品的位置：

- ▶ 创建“运行内”： 实验中包括参照样品。
- ▶ 选择“外部”： 参照样品保存于单独的实验中。



- ▶ 点击“选择参照实验”来选择单独的实验。
- ▶ 软件显示文件选择对话框。 选择外部实验并点击 .



然后所选子集的参照样品被导入到当前实验中。 参照数据导入后不能更改。 如果您在将外部参照实验导入到相对定量分析之后对其进行更改，那么软件将不会认识。 您必须创建新的相对定量分析以更改参照数据。

多个目标/参照基因的配对规则

选择从目标/参照配对中自动生成的结果，

例如： 目标： T1, T2； 参照： R1, R2

▶ 一对一：

根据移液图， 一个目标与一个参照配对，

例如： T1|R1, T2|R2

▶ 全部对全部：

每个目标与每个参照配对，

例如： T1|R1, T1|R2, T2|R1, T2|R2

▶ 全部对平均：

将每个目标与全部参照进行配对。 计算结果比值的几何平均数，

例如： $T1/R(全部) = (T1/R1 \times T1/R2)^{1/2}$ and $T2/R(全部) = (T2/R1 \times T2/R2)^{1/2}$

▶ 平均对全部：

将全部目标与每个参照进行配对。 计算结果比值的几何平均数，

例如： $T(全部)/R1 = (T1/R1 \times T2/R1)^{1/2}$ and $T(全部)/R2 = (T1/R2 \times T2/R2)^{1/2}$

如要了解更多信息，请参阅“配对样品和生成结果集”一节。



默认标准曲线设置

如果内部参照对每个目标都可用的话，那么该选项无相关性。 如果内部参照对目标不可用的话，那么您可以选择

- ▶ **总是使用效率：** 将使用“样品编辑器”中输入的PCR效率。
 - ▶ **允许与目标名称相符的外部标准：** 软降搜索数据库中同样目标名称的标准曲线，计算确切的PCR效率。
- 要了解更多信息，请参阅“外部标准曲线”一节。



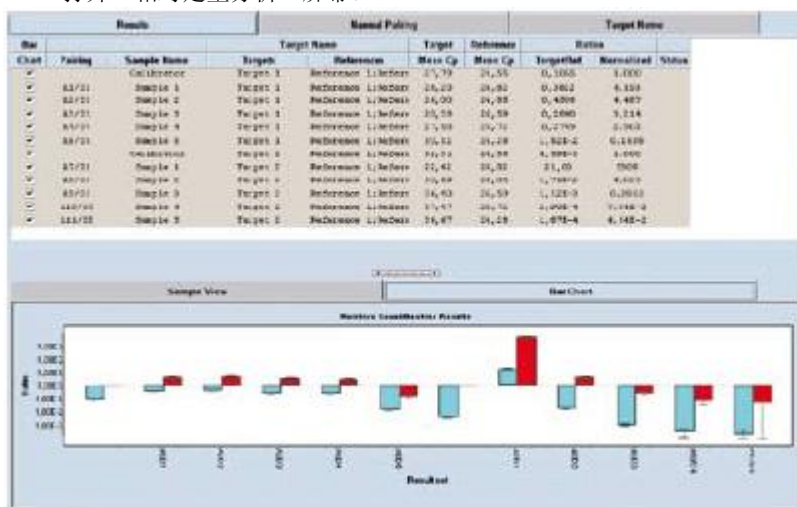
分析创建后，您在“创建新分析”对话框中所作的设置不能更改。 如果您想要应用不同的设置，您必须创建一个新分析。

8

点击

9

打开“相对定量分析”屏幕。



4.3.6 进行相对定量分析

软件自动预置所有选项。如果您不想更改任何设置，那么您可以只点击“计算”按钮，并按“查看结果”一节所述继续进行。

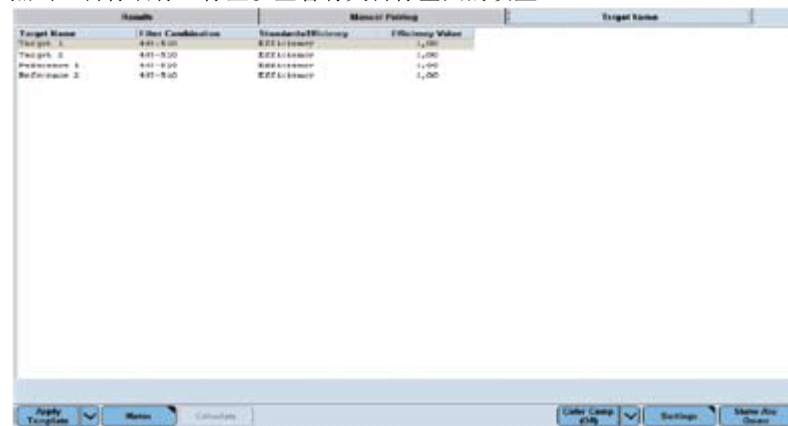
如何查看并编辑次级分析：

1 默认显示“结果”标签。

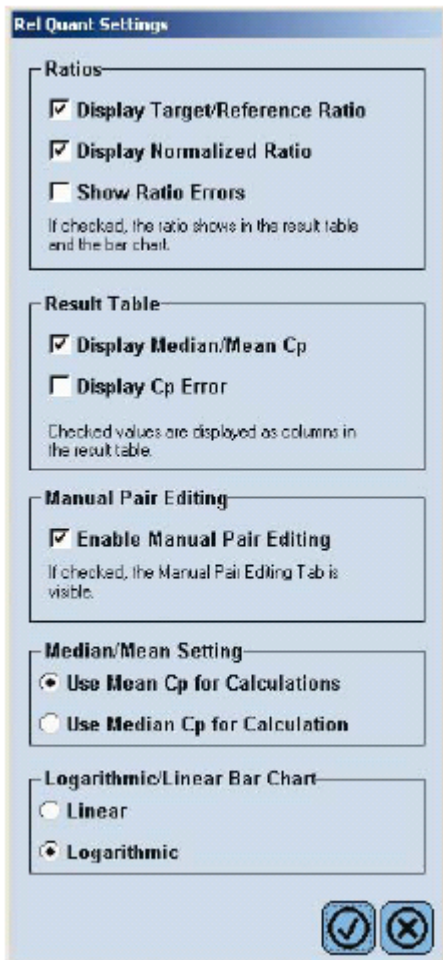
2 在默认情况下，“手工配对”标签在高级相对定量分析中为启用，在“基本相对定量分析”中为禁用。在两种分析类型中，您都可以在相对定量设置窗口中启用/禁用“手工配对”标签（见第2步）。

必要时可以对多色实验应用颜色补偿对象。要了解更多信息，请见“应用颜色补偿”一节。

点击“目标名称”标签以查看有关目标基因的设置。



- 2 如果您想要更改任何一般设置，请点击“设置”按钮。
“相对定量设置”对话框打开，出现以下选项：



比值

勾选您想要在“结果”表和直方图中显示的结果。

比值误差总是显示于直方图中。

结果表

勾选您想要在“结果”表中显示的结果。

手工配对编辑

勾选该选项以启用“手工配对”标签。

中位数/平均数设置

选择您更想要的求中等水平方法：

- ▶ 平均数：计算数学上确切的平均数。
- ▶ 中位数：使用一组数值中的中间值。这个方法可以补偿统计上的极端值（单个极高或极低值）。

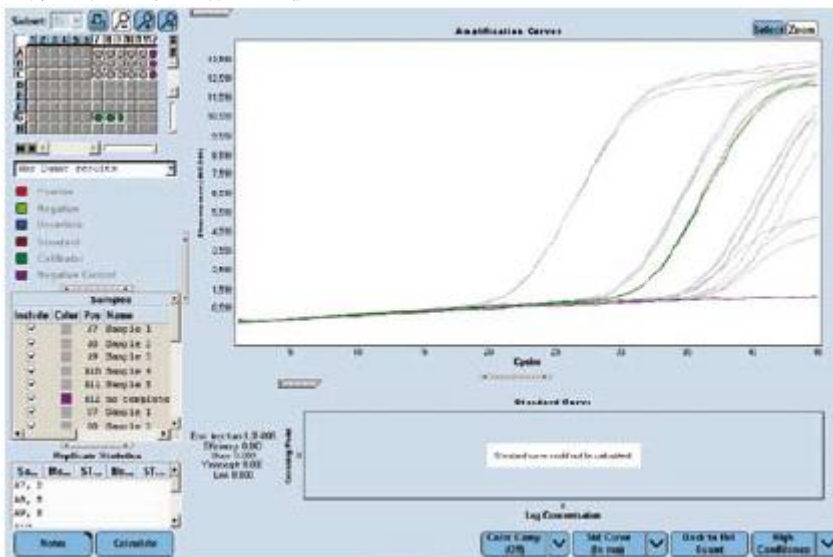
对数/线性直方图

选择您更想要的按比例绘制直方图方法：

- ▶ 线性：如果结果只涵盖一个或两个数量级，或应为按直接比例显示，那么应选择该选项。
- ▶ 对数：如果结果涵盖多个数量级，那么应选择该选项。



- 3** 如果您想要更改与目标基因有关的任何选项，
- ▶ 请在“样品视图”标签中选择单个样品（只能在计算分析以后），
 - ▶ 或选择“目标名称”标签，然后选择相应的次级分析。
- 这将启用“显示绝对定量”按钮。

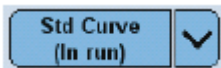


软件显示所选目标基因的次级绝对定量分析。如果您想要检查分析的结果，请在任何时候点击“计算”按钮。



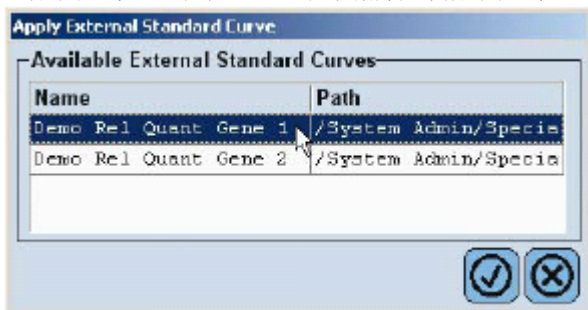
目标标准的来源

如要设置次级绝对定量分析及PCR效率计算所使用的标准曲线来源，请使用“标准曲线”多项选择按钮。



选择以下选项之一：

- ▶ 另存为“外部”：保存计算出的标准曲线以便用于其他实验。
- ▶ 标准曲线（“运行内”）：标准曲线由当前实验中的稀释品系列计算得到。
- ▶ 标准曲线（“外部”）：从数据库加载标准曲线。对话框打开，让您选择适当的外部标准曲线：



您的实验可能包括用于指定浓度目标基因的一个标准。您必须具有使用该曲线的用户权限。

- ▶ 设置效率：标准曲线是由“样品编辑器”中指定的效率计算出。



效率应用于没有或有一个给定浓度的“运行内”标准被指定给目标基因时。只有当有一个给定浓度的“运行内”标准被指定给目标基因时，才计算目标基因样品的浓度。

取消选定样品

要将样品从分析中删除，请在“结果”表中双击样品的选择框：

| Samples | | | | Results | | |
|-------------------------------------|-------|-----|-------------|---------|---------------|-----------------|
| Include | Color | Pos | Name | Cp | Concentration | Standard Status |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Red | | G4 Standard | | | 1.00E2 |
| <input type="checkbox"/> | | | E2 S1 | | | |
| <input type="checkbox"/> | | | E3 S1 | | | |
| <input type="checkbox"/> | | | E4 S1 | | | |
| <input type="checkbox"/> | | | J2 S2 | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | | | J3 S2 | | | |

样点拟合法选项

只有分析创建时将“样点拟合”选为“绝对定量类型”，这些设置才能有用。

要更改交叉阈值检测的设置，请使用

- ▶ “循环范围”标签
- ▶ “噪声频带”标签
- ▶ “分析”标签

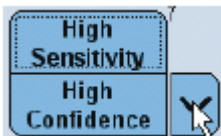
要了解更多信息，请参阅“绝对定量分析”一节。



二次导数法选项

只有分析创建时将“最大二阶导数”选为“绝对定量类型”，这些设置才能有用。

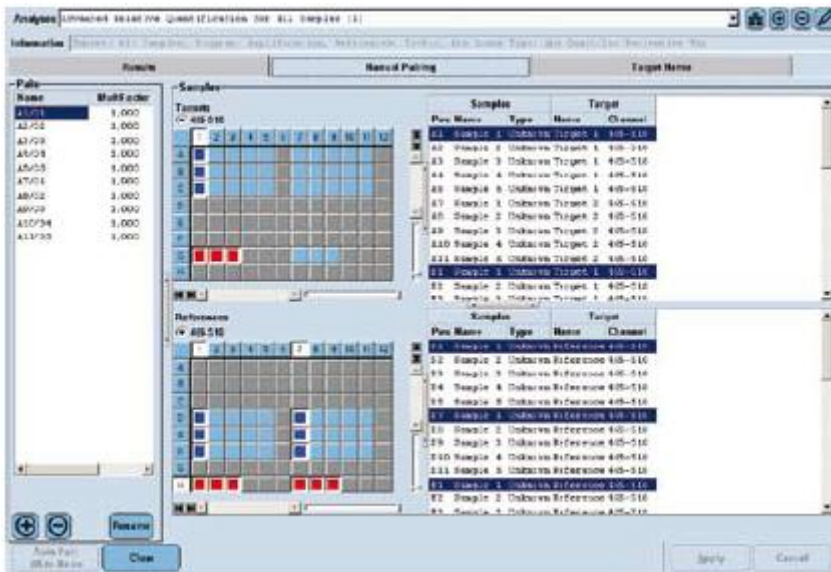
要更改交叉阈值检测的设置，请使用多项选择按钮：



要了解更多信息，请参阅“绝对定量分析”一节。

4 点击“后退到相对定量”，以回到“相对定量分析”屏幕。

5 如果您想要更改有关目标|参照配对的任何设置，请选择“手工配对”标签。如果“手工配对”标签不可用，请点击“设置”按钮并勾选“启用手工配对编辑”选项（见上）。



软件显示自动生成的配对。

您可以

- ▶ 编辑配对
- ▶ 指定校正和倍增系数

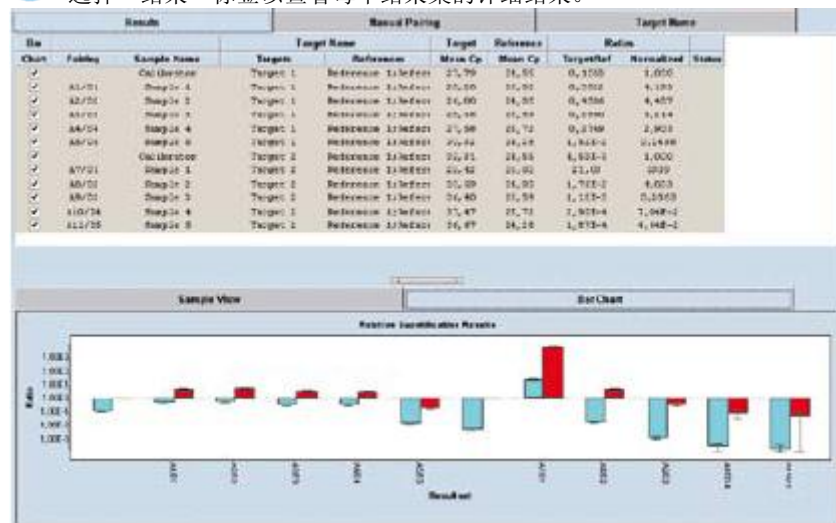
要了解更多信息，请参阅“配对样品和生成结果集”一节。

6 点击“计算”。

4.3.7 查看结果

如何在结果标签上查看结果：

- 1 选择“结果”标签以查看每个结果集的详细结果。



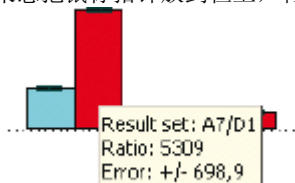
- 2 “结果表”在一行中显示每对结果集和每个校正品集的以下信息：
 - ▶ 直方图：选中的结果集显示于“直方图”中。如果您想要从直方图中删除一个结果集，请通过双击选择框以取消选定。
 - ▶ 配对：结果集的名称（校正品为空）。
 - ▶ 样品名称：在“样品编辑器”中指定的结果集中的样品名称。（通常是一个样品名称；手工配对也运行多个样品名称。）
 - ▶ 目标名称：结果集中目标基因的名称
 - ▶ 目标平均/中位数交叉阈值：目标的交叉阈值。
 - ▶ 参照平均/中位数交叉阈值：参照的交叉阈值。
 - ▶ 交叉阈值的误差（默认不显示）：样品复本的标准差。
 - ▶ 目标/参照比：该结果集中目标与参照的浓度比。
 - ▶ 目标/参照比误差（默认不显示）：样品复本的所有目标/参照组合的标准差。
 - ▶ 标化比：该结果集中的目标和参照的浓度比，用该结果集的校正品标化。
 - ▶ 标化比误差（默认不显示）：样品复本的所有目标/参照/校正品组合的标准差。
 - ▶ 状态：任何有关结果集的专门信息。



3 “直方图”显示“结果表”中选中的每对结果集和每个校正品的一组条形图：

- ▶ 左侧条形的高度显示结果集的目标/参照比；右侧显示标准化。
- ▶ 每个条形用顶端线来显示结果数值的统计学标准差，表示误差范围。

如果您把鼠标指针放到栏上，将显示更详细的数据：



4.3.8 配对样品和生成结果集

自动配对

软件自动生成“结果集”。这包括：

- ▶ 一个目标
- ▶ 一个参照
- ▶ 一个校正品（可选）

“结果集”显示于“手工配对”标签上。相对定量模块应用以下规则来对目标和参照样品进行自动配对：

- ▶ “样品名称”相符的目标与参照配对。
- ▶ 目标基因与具有相符“目标名称”的校正品配对。只有每个目标基因都能与校正品配对时，才使用校正品。
- ▶ 如果未指定“目标名称”和相同的“样品名称”，软件将尝试基于模式识别来识别“结果集”。如果目标的样品位置形状与参照的样品位置形状相符，那么这些目标和参照配对。

在目标和参照识别后，软件提供以下配对规则。例如：目标为T1, T2；参照为R1, R2

- ▶ **一对一：** 根据移液图，一个目标与一个参照配对，

例如： T1|R1, T2|R2

- ▶ **全部对全部：** 每个目标与每个参照配对，

例如： T1|R1, T1|R2, T2|R1, T2|R2

- ▶ **全部对平均：** 将每个目标与全部参照进行配对。计算结果比值的几何平均数，

例如： $T1/R(全部) = (T1/R1 \times T1/R2)^{1/2}$ and $T2/R(全部) = (T2/R1 \times T2/R2)^{1/2}$

- ▶ **平均对全部：** 将全部目标与每个参照进行配对。计算结果比值的几何平均数，

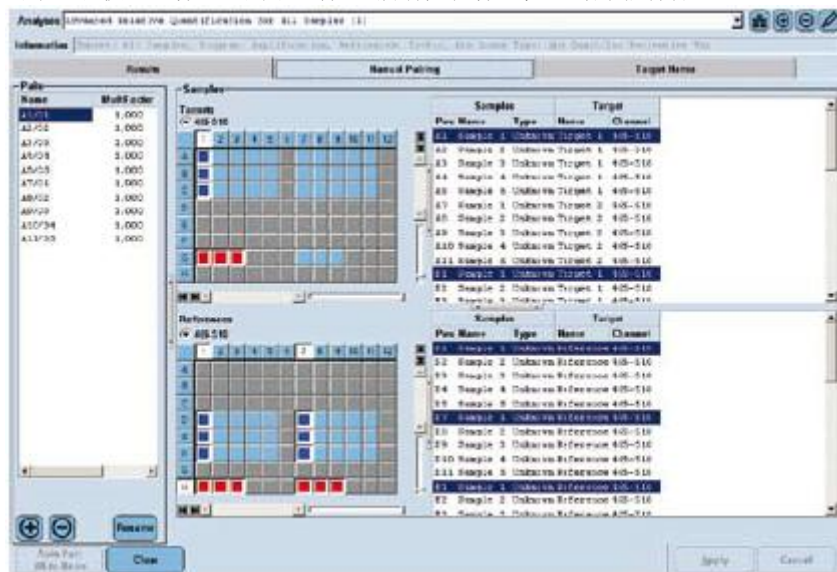
例如： $T(全部)/R1 = (T1/R1 \times T2/R1)^{1/2}$ and $T(全部)/R2 = (T1/R2 \times T2/R2)^{1/2}$

手工配对

使用“手工配对”标签来手工指定“结果集”。您可以进一步指定结果集的校正和倍增系数。

如何手工配对样品并生成结果集：

1 “手工配对”标签显示两个“样品选择器”：上方者用于目标样品，下方者用于参照样品。只有活动子集中的未知和校正品样品可用于选择。所有其他样品位置均为非活动。



2 只有无指定“结果集”时，才启用“自动配对”按钮。

2 要创建新“结果集”，请进行以下步骤：

- ▶ 点击“配对”列表中的“+”按钮来添加新“结果集”。
- ▶ 选择配对的未知目标（在上方的样品选择器中）与未知参照（在下方的样品选择器中）。
- ▶ 如果您想要添加校正品，请按住<Ctrl>键，并点击目标校正品（在上方的样品选择器中）和参照校正品（在下方的样品选择器中）。
- ▶ 点击“应用”。

新的“结果集”被添加到“配对”列表中。系统自动为“结果集”分配默认名称“配对###”，###为序号。显示配对位置。

- ▶ 如果您想要重新命名新的“结果集”，请点击“配对”列表中的名称，并输入一个新名称。

3 如果您想要将一个校正系数应用到“结果集”，请进行以下步骤：

- ▶ 如果只有一个目标校正品和一个参照校正品，请点击“校正系数”按钮。
- ▶ 如果有多于一个目标校正品或参照校正品，请在“配对”列表中选择“校正系数”。

校正系数用来对校正品的批间偏差进行结果标准化。标准化比除以校正系数。

! 应用“母”校正品对每一批新的校正品进行验证。



- 4** 如果您想要将一个倍增系数应用到“结果集”，请进行以下步骤：
- ▶ 如果只有一个目标校正品和一个参照校正品，请点击“倍增系数”按钮。
 - ▶ 如果有多于一个目标校正品或参照校正品，请在“配对”列表中选择“倍增系数”。
- 倍增系数用来将最终的校正品标化相对比值调整为合理值。标化比乘以倍增系数。因此，倍增系数只具有“装饰”功能，使结果易于读取和分析。
- 5** 根据需要创建更多“结果集”。
- 点击“计算”。

如何在结果集中查看样品的扩增曲线：

- ▶ 选择“结果”标签。“结果集”显示于“配对”栏中。
- ▶ 选择“样品视图”标签。
- ▶ 在“结果”表中选择要在“样品视图”中显示的配对。
- ▶ 在“样品视图”中选择要在“扩增曲线”图中显示的位置。

6 只要在“样品视图”列表中选中一个目标名称，“显示绝对定量”按钮即启用。



4.3.9 外部标准曲线

为了创建统计学上有效的标准曲线，应考虑待分析样品的浓度范围以及所要求的标准差：

- ▶ 包括在待分析样品范围中涵盖至少3-5个数量级的标准浓度。
- ▶ 对于相对定量分析，不需要知道稀释标准品的拷贝数/浓度。选择校正品将启动相对标准品的使用，例如：mRNA或cRNA的稀释品系列。
- ▶ 使用至少4-5个稀释梯度（例如：1:10稀释品）。
- ▶ 每个标准品使用3-6个复本，以确保获得统计学上有效的结果。

如果在后继的相对定量分析中自动应用外部标准，那么为标准指定的目标名称和在相对定量分析中所指定者必须相符。

如何生成外部标准曲线：

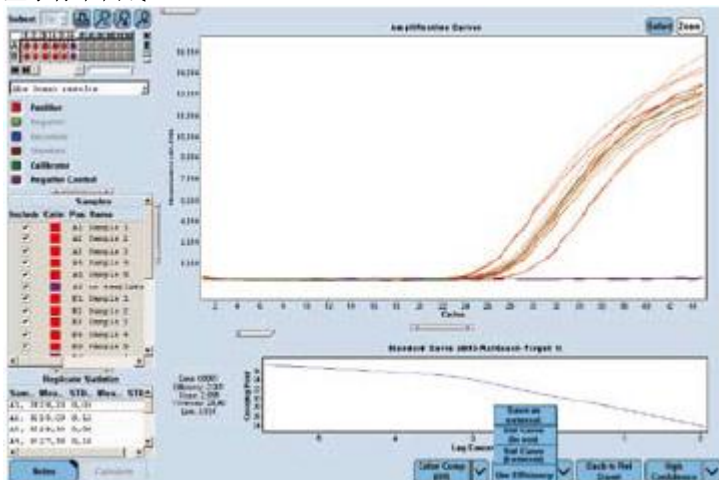
- 1 进行一个扩增实验，其中包含您的目标和参照基因的相对标准（见“进行高级相对定量实验”一节）。所用的实验方案与您将用于相对定量实验的相同。
- 2 在“样品编辑器”中输入目标（T）和参照（R）标准的稀释梯度浓度。
- 3 创建新的“高级相对定量分析”（见“进行高级相对定量实验”一节，第3-7步）。“相对定量分析”屏幕打开，显示“结果”标签。
- 4 点击“计算”按钮，计算标准曲线。
点击“目标名称”标签，选择目标基因。



点击“显示绝对定量”按钮。



- 5 次级绝对定量分析打开。
显示标准曲线。



点击标准曲线多项选择按钮，选择“另存为外部”。


- 6 现在您可以将标准曲线保存为外部标准曲线。
给外部标准曲线取一个有意义的名字，点击“OK”，将其保存在“标准曲线”目录中。

4.3.10 补充信息

分析无效

以下改变会使分析无效，并要求对分析进行重新计算：


- ▶ 改变目标或参照标准曲线或效率
- ▶ 勾选/取消勾选包括于计算中的样品
- ▶ 改变样品类型（创建新标准或删除标准）
- ▶ 改变标准浓度
- ▶ 改变效率值的来源（外部标准曲线、内部标准曲线，或效率 = 2）
- ▶ 添加或删除配对集
- ▶ 改变校正或倍增系数
- ▶ 改变颜色补偿状态（开/关/选定对象）
- ▶ 应用模板
- ▶ 改变当前选定的目标或参照通道

 在实验引入以后再更新外部参照实验，既不会使分析更新，也不会使分析无效。

相对定量模板

相对定量分析模板包含以下设置：

- ▶ 目标和参照的滤光片组合

 如果您想要将模板应用到一个未使用模板中指定目标或参照滤光片组合的实验，将会出现警告信息，并且模板将不会被应用。

- ▶ 目标/参照/校正品配对信息（按位置）

 如果模板的配对信息与当前实验中使用的样品属性不一致，模板将不会被应用。

- ▶ 目标和参照实验子集

 当应用模板时，软件会检查当前实验是否包含相同名称的子集，以及与模板中的子集相同的孔位。

- ▶ 如果当前实验不包含相同名称的子集，软件将创建子集。
- ▶ 如果当前实验包含相同名称的子集，但与模板中子集的孔位不同，模板将不会被应用。

- ▶ 每个目标名称或滤光片组合的次级分析列表


- ▶ 目标类型

 当应用模板时，软件会比较当前实验中指定的目标名称与模板中指定的目标名称。

- ▶ 如果当前实验中指定的任何目标名称与模板中不是同一类型，那么模板将不会被应用，并将显示错误信息。

- ▶ 如果当前实验中指定的任何目标名称与在模板中未被指定，那么模板将不会被应用，并将显示错误信息。

- ▶ 配对的样品类型

 当应用模板时，软件会检查当前实验中是否有任何位置对于模板中的配对来说不属于正确的类型。在这种情况下，模板将不会被应用，并将显示错误信息。

- ▶ 目标和参照的标准曲线信息。外部标准曲线与模板一起保存。

- ▶ 颜色补偿。颜色补偿对象与模板一起保存。


- ▶ 所有显示设置

- ▶ 校正和倍增系数

- ▶ 直方图中配对的纳入/排除设置


- ▶ 自动配对规则

- ▶ 手工配对

 如果模板禁用手工配对，那么当应用模板时，将不会从模板加载配对。模板应用后运行自动配对。如果模板启用手工配对，那么配对将被保存在模板中，当应用模板时，从模板中添加。

- ▶ 绝对定量分析类型（样点拟合法或最大二阶导数法）

- ▶ 外部参照实验

 如果模板使用外部参照实验，那么软件将打开对话框，您可以在这里选择参照实验、程序和子集。如果您取消这个对话框，那么模板将不能被应用。

结果对照概念

LightCycler®480相对定量软件应用对照概念来评估结果是否有效、不确定，或无效。不确定的结果值显示于括号内，而“无效”值或无值则显示为无效结果。

有关可能的结果状态，请见下表。括号显示“结果”表中的状态栏将包含相应信息。

| 目标/参照 | 校正品 | 浓度比 | 标化比 |
|-------------------------------|--------|------|------|
| 阳性/阳性 | 阳性 | 比值 | 比值 |
| | 阴性或不确定 | 比值 | 无效 |
| 阳性/不确定， 不确定/阳性， 不确定/不确定 | 阳性 | [比值] | [比值] |
| | 阴性或不确定 | [比值] | 无效 |
| 阴性/阳性 | 阳性 | 零 | 零 |
| | 阴性或不确定 | 零 | 无效 |
| 阴性/不确定 | 阳性 | [零] | [零] |
| | 阴性或不确定 | [零] | 无效 |
| 阳性/阴性， 不确定/阴性， 阴性/阴性 | 所有 | 无效 | 无效 |
| 任何无效 (未知，参照或校正 品) | - | 无效 | 无效 |
| 不合格的标准曲线 | - | 无效 | 无效 |



如果结果集中所有选中的校正品复本都为阳性，则计算标化浓度比。
如果结果集中至少1个选中的校正品复本不为阳性，则标化浓度比无效。
如果标化浓度比无效，且样品浓度比有括号，那么标化浓度比也显示于括号内。

5. 进行 T_m 熔解曲线分析

本章节为您阐述如何使用熔解曲线特征对样品进行 DNA 产物和基因型的鉴定。

5.1 使用熔解曲线特征进行 DNA 产物和基因型的鉴定

DNA 双链在受热后将在一定的温度下熔解或溶解，随着 DNA 链的序列不同、链长度不同以及链中 GC 的含量不同，这一温度变化很大。例如，对于链长度相同但链中 GC/AT 比例不同的两种 DNA 分子，或者链的长度及 GC 含量都相同，但 GC 在链中分布不同的两种 DNA 分子，这一温度都是不同的。而且，两种 DNA 分子中存在碱基错配时，也会导致熔解温度的下降。这种效应对于短的 DNA 杂交体而言则更明显，因此，也就成为我们根据熔解温度进行基因型分析的理论基础。一个精确配对（例如野生型-特异性）的探针比与含有一个碱基突变的目标序列配对的探针的熔解温度要高一些。

熔解曲线分析的目的就是要测定目标 DNA 的特征性熔解温度，从而根据该熔解温度来确认产物的基因型。

如果要分析样品的熔解温度特征，则当 LightCycler® 480 仪器的温控模块温度稳定升高时必须对样品的荧光进行监测。因为温度升高时，样品的荧光强度将衰减。对于双链 DNA 特异性染料 SYBR Green I 而言，这种降低主要是因为 DNA 双链的解聚导致了 SYBR Green I 染色分子从链上脱离而造成的。对于单链标记探针及杂交探针，这种降低主要是因为目标-探针杂交体的解聚从而导致报告染料的淬灭或者染料分子在空间上的分散。这两种结果都会导致荧光强度的下降。

LightCycler® 480 仪器的熔解温度调用分析软件模块将对每种样品的熔解温度、熔解峰、高度、宽度以及熔解峰下面积等进行计算。使用熔解温度调用分析确认 DNA 产物或目标-探针杂交体的特征性熔解过程。

5.1.1 定义一熔解程序

在任何一个包含有熔解程序的实验中均可进行熔解温度分析。通常在目标 DNA 扩增结束后再运行熔解程序。典型的熔解程序包括以下三个部分：

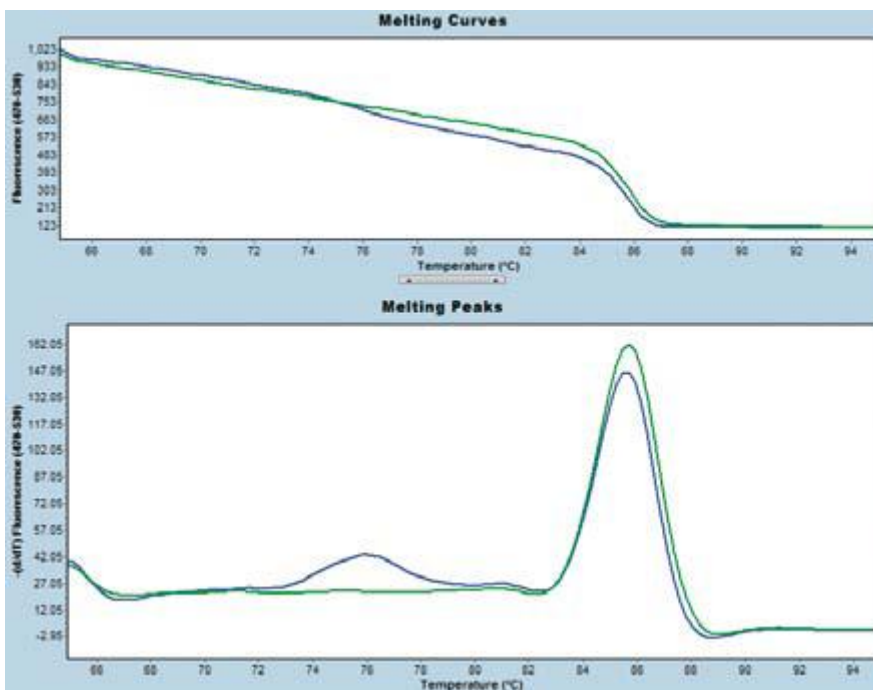
- ▶ 迅速对样品进行加热至一定温度，该温度应足以使所有 DNA 分析变性（即熔解）。
- ▶ 样品被冷却到目标 DNA 复性温度以下。
- ▶ 对样品进行缓慢加热，同时测量目标 DNA 熔解时样品的荧光强度。

5.1.2 熔解温度分析的内容

熔解温度分析中使用熔解程序中获得的荧光测量值来计算每种样品的熔解温度。样品的熔解温度（即 T_m ）的定义是：DNA 分子中有一半已经熔解或者一半的探针已经从其目标 DNA 上脱落下来。

该分析将为您显示出荧光强度对温度的熔解曲线图表。这些图表中显示出随着样品的熔解，样品的荧光强度也在不断地下降。同时该分析还将显示出熔解峰图表，其描绘的是样品荧光曲线的第一个负导数。在此图表中，每个样品的熔解温度均以一个峰的形式表示出来。将熔解温度以峰的形式表示出来，可以使您更容易的分辩出每种样品的特征性熔解过程以及各种样品之间的区别。

下图为您展示了一个熔解温度曲线图表以及一个熔解峰图表，它们是一个 SYBR Green I 实验中的熔解温度分析中的一部分，这里将其作为例子解释熔解温度分析如何用于 DNA 产物的鉴定。



所分析的两个样品均显示出其DNA产物具有一明显而尖锐的峰，其熔解温度为86° C，这个峰就代表所期望的PCR产物。蓝色样品还具有一个弱而宽的峰，该峰熔解温度为77° C，这说明该反应中含有诸如引物二聚体之类的非特异性副产物。

5.2 进行熔解温度调用分析

您可以在任何一个包含有熔解程序的实验中进行熔解调用分析。在熔解程序中，当温度稳定升高以对 DNA 进行熔解或使探针从目标链上游离下来时，仪器始终会对样品荧光强度的下降进行连续监测。

在熔解期间，荧光强度的下降在不同的检测格式中其原因也是不同的：

▶ 对于 SYBR Green I 染料而言，其荧光强度的降低主要是因为 DNA 双链的解聚导致了 SYBR Green I 染色分子从链上脱离下来。这是因为 SYBR Green I 只有在与双链 DNA 结合后才会产生 530 纳米下产生荧光，随着熔解的进行和 SYBR Green I 染料分子的脱离，在该波长下的荧光强度会相应地急剧下降。其熔解温度（即 T_m ）的定义是 DNA 分子一半为双链，一半为单链时的温度点。

▶ 对于杂合探针，目标分子-探针杂合体的分离导致激光共振能量传输（FRET）配偶体在空间上的分离，从而导致在特定温度下报告染料的荧光强度的下降。其熔解温度（即 T_m ）的定义是一半探针从其目标 DNA 分子上脱落下来时的温度点。

▶ 对于单链标记探针而言，当探针与其目标序列杂交时报告染料才会发出荧光。当探针在水中自由漂浮时其荧光就湮灭了。其熔解温度（即 T_m ）的定义同样是指一半探针从其目标 DNA 分子上脱落下来时的温度点。

 在水解性探针的 PCR 测定中，当扩增完成后，所有的探针都将被消化掉。因此，无法对其进行熔解曲线分析。

分析将显示样品的熔解曲线图表，曲线中显示荧光强度处于下降的趋势。软件还可以做出熔解曲线的第一负导数，其中显示出样品达到熔解峰时的熔解温度。当样品熔解温度以峰的形式显示时，这时您可以更容易的分辩出各样品熔解特征中的细微差别。

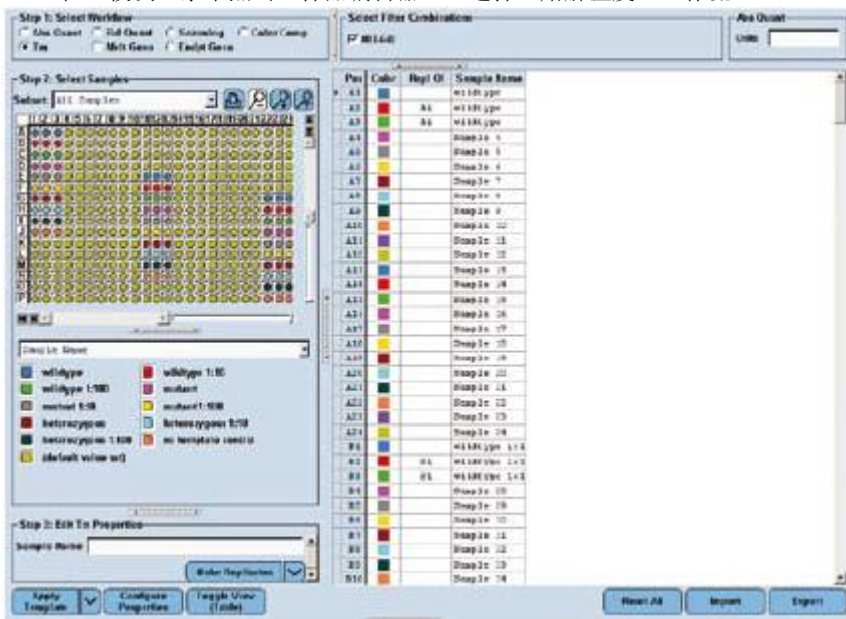
分析结果数据包括每个样品的熔解温度及其峰下面积。

熔解温度调用分析使用自动的运算法则计算出峰面积及熔解温度。另外，您也可以用手工的方法计算出熔解温度以及峰面积。


 自动熔解调用运算法则要求您启动和结束熔解程序的温度要比期望的熔解温度要低 $7^{\circ}C$ 和高 $3^{\circ}C$ 。

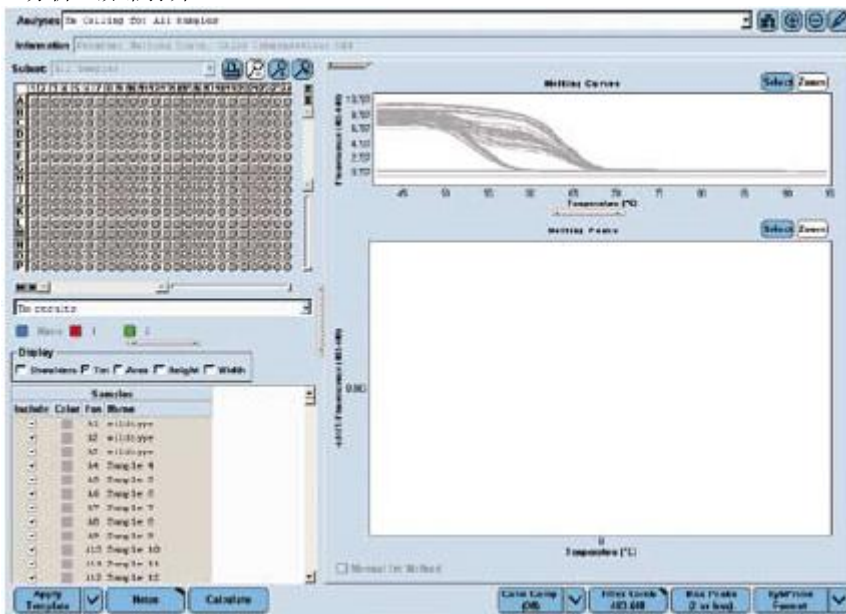
如何进行自动熔解温度调用分析:

- 1 创建并运行实验，或打开包括熔解程序的原有实验。
- 2 在“模块”条中点击“样品编辑器”，选择“熔解温度” workflow。

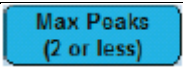
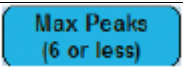



对于熔解温度调用分析来说，不需要在“样品编辑器”中编辑属性。


- 3 在“模块”条中点击“分析”。
- 4 从“创建新分析”列表中选择“熔解温度调用”。在“创建新分析”对话框中，选择实验中的分析子集和程序（一般只有一个默认选中的程序）。点击  “分析”屏幕打开。

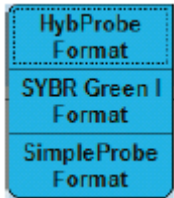



5 如果这是一个多色实验，请点击“滤光片组合”按钮，打开“滤光片组合”对话框。选择您想要分析的目标所用的滤光片组合。使用“颜色补偿”多项选择按钮来打开或关闭颜色补偿，并选择颜色补偿对象。

6   决定您预期的熔解峰的最小数。您可以在最多峰（2或小于2）或最多峰（6或小于6）之间选择。对典型的基因型实验来说，选择2或小于2。对许多峰的曲线来说，选择6或小于6。在“动作按钮”区点击“最多峰”，在两个选项之间切换。

 当使用SYBR GREEN I格式（见下一步）时，建议您只应用最多峰（2或小于2）。

 我们建议熔解峰具有最小4° C的 ΔT_m ，以达到良好分辨率。

7  从“格式”多项选择按钮中选择您的实验中使用的检测格式。您可以在“HybProbe格式”、“SYBR GREEN I格式”和“简单探针格式”之间选择。点击箭头向下的按钮并做出选择。

 选择一个格式选项会改变按检测化学特殊需求进行的分析算法。

8 默认情况下，结果计算中包括所有样品；如要从结果计算中删除样品，请双击样品名称旁的选择框以清除选择框或按<Space>键。

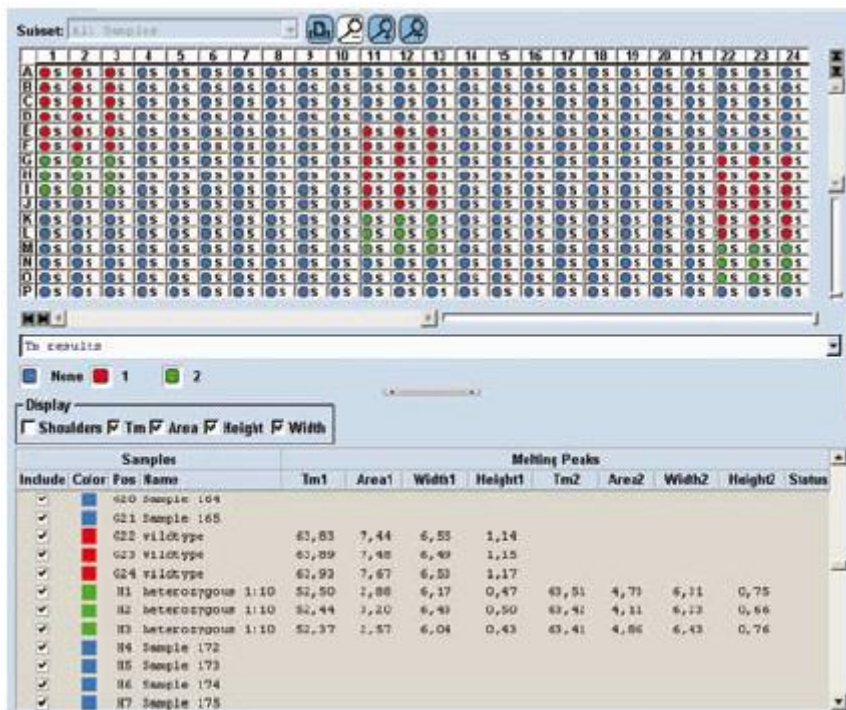
9 点击“计算”以完成熔解温度调用分析。

10 如要查看分析结果，点击并将图表部分的左边界向右拖曳，以显示全部结果数据。结果包括有图例的“样品选择器”和“样品表”。



11

- ▶ 使用“结果”表“显示”区的选择框来选择您想要在表中显示何种结果类型。
 - ▶ 用“图例属性选择器”，按结果、按样品类型、按样品选项或按复本组，来显示颜色。用有颜色的“图例属性”按钮来选择具有某些属性的样品在多孔板图像、“结果”表和图中的显示。
- 如果您选择“图例属性选择器”中的“熔解温度结果”，那么选择取决于结果调用，即发现的峰数。熔解温度调用分析的“结果”表显示以下结果：



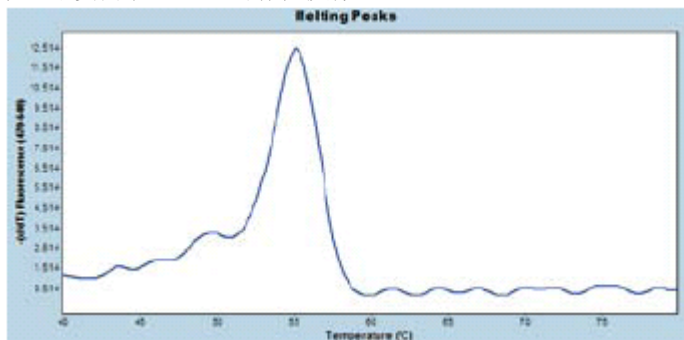
| 结果 | 说明 |
|-------|-------------------|
| 熔解温度1 | 样品中第一个峰的熔解温度。 |
| 面积1 | 第一个峰下的面积。 |
| 宽度1 | 第一个峰的宽度。 |
| 高度1 | 第一个峰的高度。 |
| 熔解温度2 | 样品第二个峰（如果有）的熔解温度。 |
| 面积2 | 第二个峰下的面积。 |
| 宽度2 | 第二个峰的宽度。 |
| 高度2 | 第二个峰的高度。 |



如果还有其他峰，并且选择了相应的设置，那么结果显示其为熔解温度3、面积3等（只有最多峰（6或小于6）模式中。）


有时在峰的一侧可以看到波肩。如果您想看这些波肩峰的结果数据，请从显示区选择“波肩”。如要隐藏，则取消选定“波肩”。

在以下实例中，50°C时存在波肩。



12 这个波肩的结果数据只有在选中“波肩”时才显示：

取消选定波肩



| Samples | | Melting Peaks | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|---------------|-------|---------|--------|---------|------|-------|--------|---------|
| Include | Color | Peak Name | Trn1 | Area1 | Width1 | Height1 | Trn2 | Area2 | Width2 | Height2 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Blue | A1 | 50.15 | 2.75e08 | 1.0e | 12.21 | | | | |

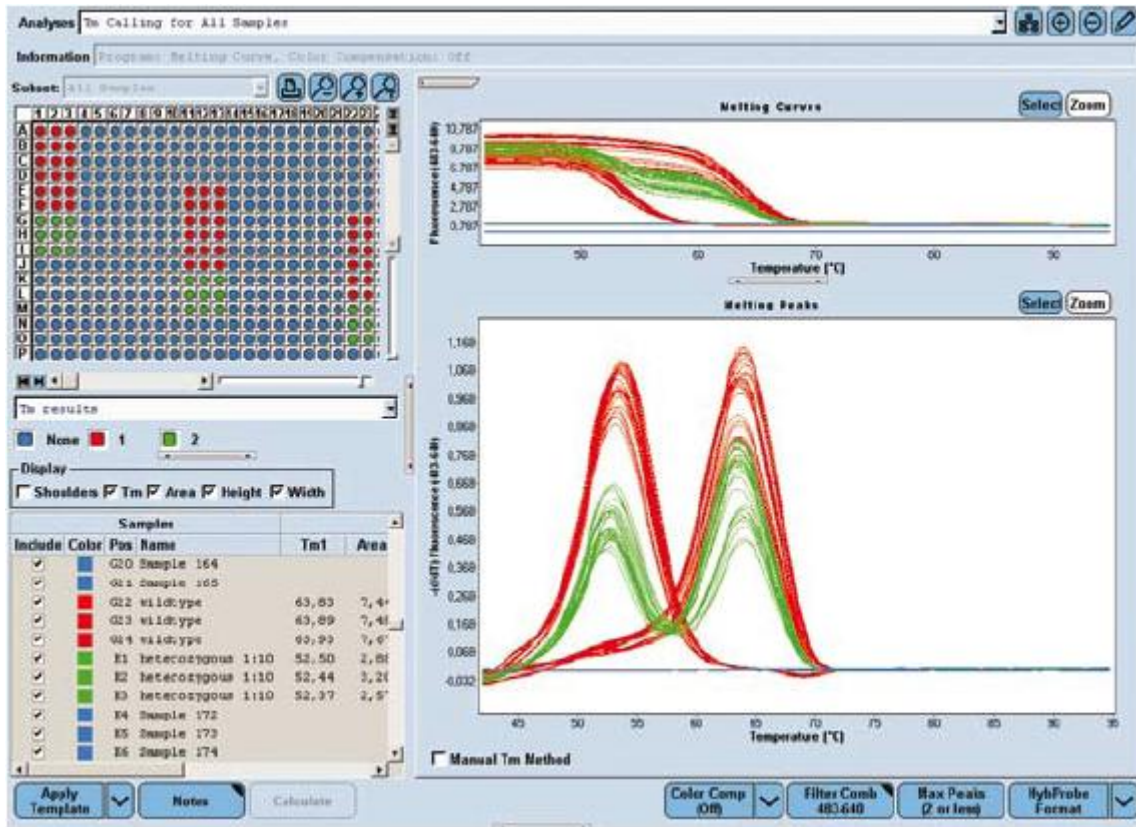
| Samples | | Melting Peaks | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|---------------|-------|-------|--------|---------|-------|-------|--------|---------|
| Include | Color | Peak Name | Trn1 | Area1 | Width1 | Height1 | Trn2 | Area2 | Width2 | Height2 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Blue | A1 | 50.05 | 5.92 | 10.27 | 2.05 | 50.15 | 1.45 | 62.06 | 12.04 |

选中波肩

注意：波肩的数据现在显示于第一个峰的列中，而主峰的数据则显示于第二个峰的列中。这是因为峰的数据是根据熔解温度按升序自动排序。

13 分析包括两个图。在默认情况下，上方的图显示熔解曲线。下方的图总是显示熔解峰的图。“分析”窗口的详细说明请见“使用分析窗口”一节。

举例来说，HybProbe分析的熔解温度调用分析显示如下。计算实验中所有样品的结果。突出显示样品的样品曲线得到显示。 样品有两个溶解峰，每个峰代表目标基因的不同基因型。



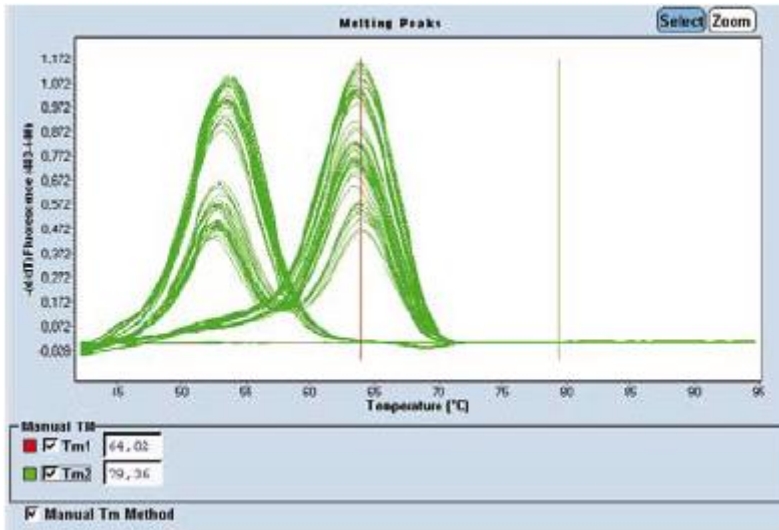
如何进行手工熔解温度调用分析：

- 1 创建并运行实验，或打开包括熔解程序的原有实验。进行自动熔解温度调用分析。
 - 2 只有在熔解温度调用分析计算以后，手工熔解温度法才会被激活。
-

- 2 从样品列表中选择个或多个样品，来编辑其计算出的熔解峰。
-

- 3 选择“手工熔解温度法”选择框。

根据“最多峰”设置，在“熔解峰”图下显示2个或6个选择框。

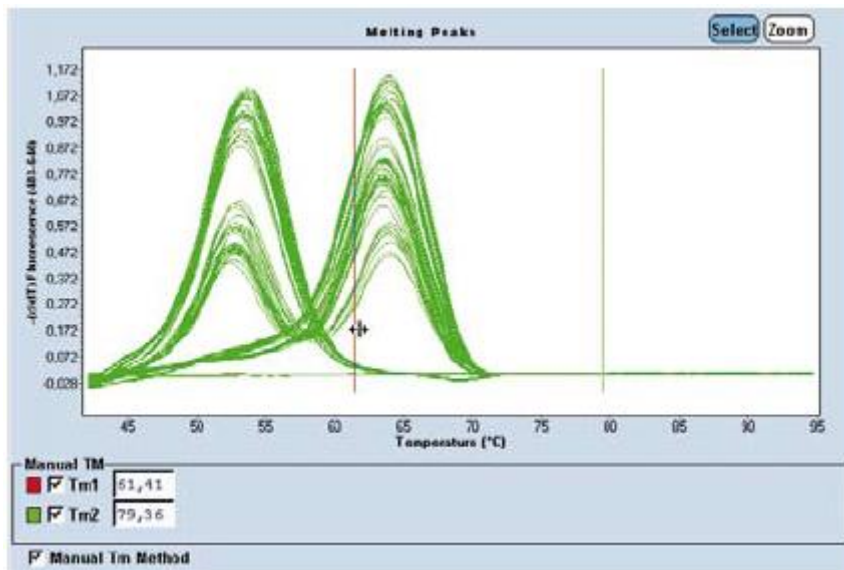


- 4 指示线位于自动计算的熔解温度值旁。如果样品列表中有多个样品为突出显示，那么所选中的样品列表中第一个样品的指示线将被显示。
-

- 4 点击熔解温度选择框以显示手工熔解温度指示线和熔解温度区域。指示线的颜色与选中的熔解温度选择框相符。
-



要更改熔解温度值，请将光标放在纵向熔解温度指示线上。光标变为一个双端箭头。点击并拖曳该线到所要的熔解温度值。



熔解温度值显示于熔解温度选择框右侧的熔解温度区域。重新计算相应熔解温度的面积、高度和宽度，这些重新计算的结果显示于该样品的样品列表中。

- ④ 在样品表中，用星号指示手工编辑的熔解温度。
- ④ 同一个分析（不是同一个样品）中可以同时具有自动生成和手工生成的熔解温度值。
- ④ 在手工熔解温度编辑期间，不能改变“显示波肩”的显示。

5 要恢复原来的（自动计算的）熔解温度值，请取消选定“手工熔解温度法”，并点击“最多峰”按钮两次，然后点击“计算”。

6 基因分型

6.1 概述

单核苷酸多态性 (SNPs) 是占个体间所有差异 90% 以上的最丰富的遗传变异形式。近年来, SNP 的基因分型已成为基因研究的一项关键技术。

在 LightCycler® 480 系统上, 提供两种不同的 SNP 分析方法:

- ▶ 终点法基因分型分析
- ▶ 熔解曲线基因分型分析

根据所用的化学法 (探针类型和格式)、仪器运行和数据采集模式, 可以从扩增曲线的终点法信号强度 (终点法分析) 或者在 PCR (熔解曲线分析) 后建立的熔解曲线的外形中推断出基因分型信息。

终点法基因分型分析

通常, 通过使用两个通道内的两个具有不同指示染料的水解探针 (每个等位基因一个探针) 采集荧光信号来进行扩增曲线终点法分析。终点法基因分型提供一种容易使用且能够运行的方法以便针对简单的实验设置分析具有孔特征区域内的单个 SNP, 且预期无不确定的变化。

对于多个目标, 提供现成的可商用初给器和探针, 这些初给器和探针可以在相同的标准条件下并行运行。它们可以容易地与使用终点法基因分型软件模块分析的 LightCycler® 480 试剂以及得到的结果相结合。

熔解曲线基因分型分析

使用荧光混合探针 (杂交探针和单标记探针) 获得的熔解曲线提供大量一有限、恒定组已知 SNP 循环分析研究下序列的相关信息。

由于在 PCR 后产生信号和分析, 因此不影响 PCR 效率 (比如, 当 DNA 数量或纯度存在问题时), 从而使该方法比终点法分析更有效。熔解曲线分析还可以处理探针下方被调查区域内存在的未预期到的其他 SNP。这些其他的 SNP 将导致熔解曲线的形状出现变化, 而不会干扰检测性能, 分析软件将能够识别这种情况以便进行更为精密的调查。



为了筛选不确定的 SNP, 提供 LightCycler® 480 基因扫描软件和 LightCycler® 480 高分辨率熔解预混液。

只根据每个轨迹线的一个通道内的采集数据进行分析, 从而允许在为每个 SNP 选择一种不同的颜色条件下并行研究多路检测中的多个 SNP。还可以设计杂交探针以便涵盖一个探针下的多个 SNP, 从而允许进行单模标本分析。

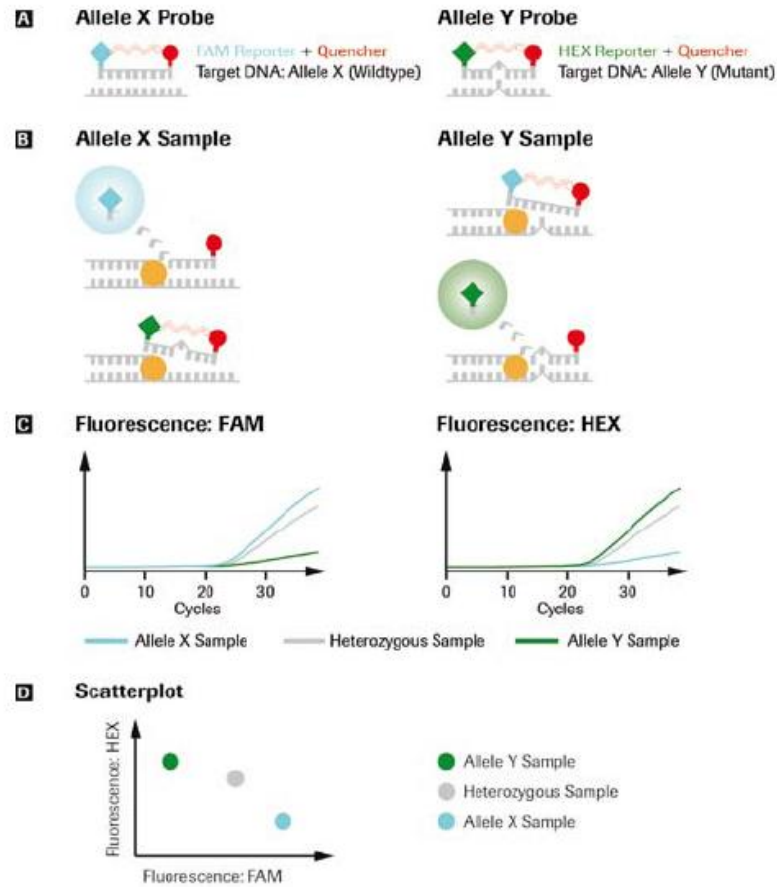
6.2 终点法基因分型分析

6.2.1 概述

终点法基因分型分析使用两个特定序列的针对野生体和变异体目标 DNA 进行设计且使用不同染料指示的探针。在 PCR 后，软件通过测量两种染料的强度分布确定基因分型。

可以在分散绘图上易于理解地可视化相关的染料强度，从而简化野生体、杂合变异体或纯变异体样品之间的辨别。LightCycler® 480 基因分型软件随后自动对样品分组并根据两种染料的强度分布区分基因分型。

终点法基因分型检测使用水解探针。每个探针含有两个指示染料，为一个荧光报告基因和一个淬灭剂，这两个指示物相互之间的距离很接近。探针完整无缺时，淬灭剂染料与报告基因染料之间的距离很接近，能充分地抑制通过 FRET 过程产生的报告基因荧光信号的发射。在延伸阶段，剪切水解探针，使报告基因和淬灭剂分开。被剪切的探针上的报告基因不再被淬灭，激发后发射出荧光信号。关于检测格式的更多信息，请参见“LightCycler® 480 仪器的检测格式”章节。



带各种报告染料的终点法基因分型的图示：

A: 带各种报告基因染料的特定序列探针。

B: 在延伸阶段，只剪切配合探针，使报告基因染料和淬灭剂分开。

C: 被剪切的报告基因染料不再被淬灭并发射出荧光信号。

D: 该分散绘图显示多个样品的最终荧光强度，从而便于进行辨别：高强度的 Allele X 探针放置在右侧，高强度的 Allele Y 探针放置在上侧，而高强度的 Allele X 和 Allele Y 探针放置在右上方，这些都标记杂合体样品。

LightCycler® 480 终点法基因分型分析软件对近似的样品进行分组并自动区分基因分型。该软件显示带具有颜色代码的基因分型和对应数据表的多孔板的图示。对于每个样品，该表显示被区分的基因分型和划线。

6.2.2 终点法基因分型的原理

LightCycler® 480 终点法基因分型软件将具有相似荧光的样品分成一组并将每个组确定为基因分型或阴性。支持以下样品的类型：

- ▶ 不确定：待分析的样品
- ▶ 标准（可选）：软件使用基因分型标准对标准四周的不确定样品进行分组并在标准的名称后对基因分型命名。将所有标准用作阳性质控：如果有任何标准样品发出不能与阴性质控样品区分的荧光信号，则软件显示警告。如果未定义标准，软件将自动对样品分组。
- ▶ 阴性质控（可选）：如果有任何阴性质控样品发出不能与被计算样品区分的荧光信号，则软件显示警告。

在软件已调用基因分型后，可以针对所选的样品进行编辑。如果更改该计算，结果的状态变为“手工编辑”。

终点法基因分型实验总是多色实验，因此易受颜色色度亮度干扰的影响。您可以通过在分析中包含颜色补偿对象，抑制颜色色度亮度干扰效应。然而，通常终点法基因分型分析不需要颜色补偿，因为分组算法极为稳定不受颜色色度亮度干扰的影响。

6.2.3 进行终点法基因分型实验

在终点法基因分型分析中，可以使用两种测量模式：

- ▶ PCR 读取：终点法基因分型实验还包含一次运行中的扩增。扩增曲线的终点法荧光数值采用背景校正并且在分散绘图中分析两个通道的荧光数值。
- ▶ 前置/后置读取：如果使用非实时温控模块仪执行扩增反应，则通过使用短程序（后置读取）测定最终的终点法荧光。

在温控模块仪上执行扩增之前，还可以随意运行该短程序（前置读取）。这允许在终点法基因分型分析过程中进行荧光值的背景校正以便给出更精确的数值。

进行带 PCR 读取的终点法基因分型：

1 进行含扩增程序的实验。（如果您希望进行不带扩增测量的终点法基因分型实验，请参见“进行带前置/后置读取的终点法基因分型”章节。）您是否需要在您的实验中包含标准，取决于您希望使用的分析模式：

- ▶ 自动组分析：不需要基因分型标准。
- ▶ 内部运行标准：包含基因分型标准。

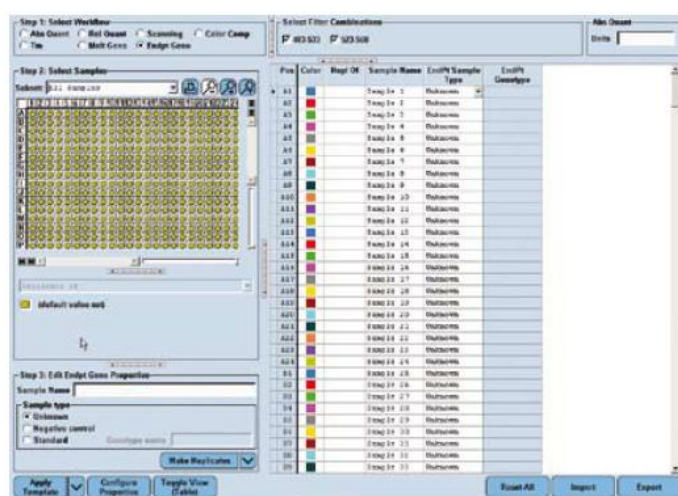
您可以选择包含质控样品：

- ▶ 阳性质控：包含基因分型标准。将所有基因分型标准用作阳性质控。
- ▶ 阴性质控：包含您的试剂混合液且不带 DNA 模板。

（可选）定义待分析的子集：关于详细信息，请参见“使用子集”章节。如果未定义子集，软件将分析整个板并自动将空的样品位置标识为阴性。

2 点击“模块”栏中的“样品编辑器”。

3 选择工作流程“终点法基因分型”。

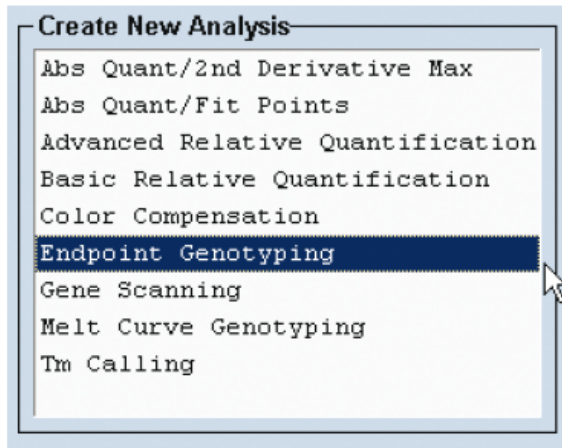



4 定义样品的属性。
关于“样品编辑器”上的详细信息，请参见“输入样品信息”章节。
软件使用以下参数进行计算：

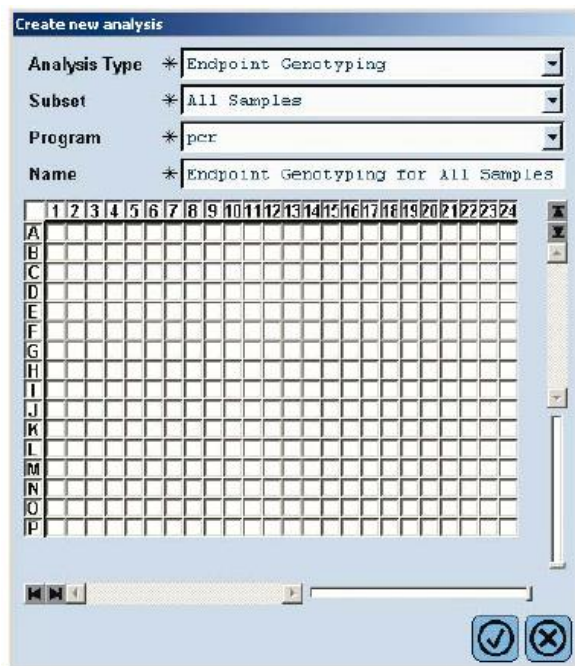
| 列名称 | 说明 | 有效值 |
|---------|--------------------------------|---|
| 终点法样品类型 | 样品的类型 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 不确定 ▶ 阴性质控 ▶ 标准 |
| 终点法基因分型 | 标准的基因分型 只有当样品类型为标准时，该字段才激活。 | 字母数字型数值（≤25 个字符） |



- 5 点击“模块”栏中的“分析”。
在“创建新分析”对话框中，选择“终点法基因分型”。

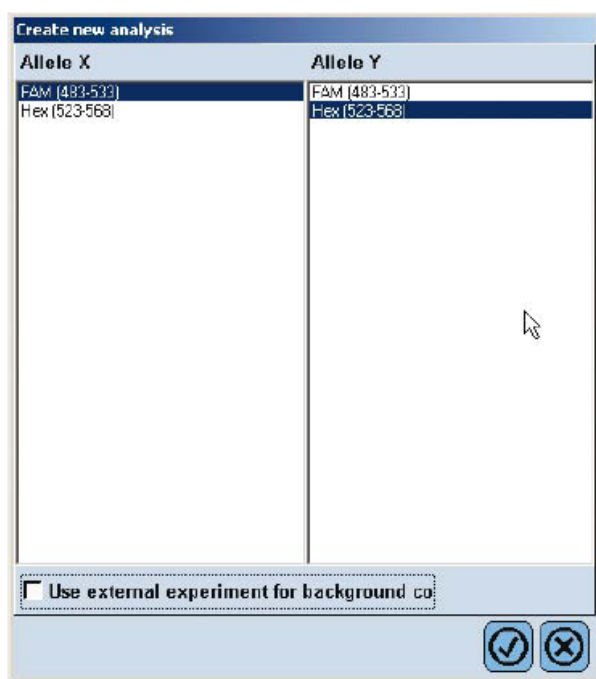


- 6 “创建新分析”对话框打开。从“程序”列表中选择分析子集和实验程序（通常，这是 PCR 程序）。如果您想，您可以更改分析名称（默认名称为“子集名称对应的分析类型”）。点击 。



7

“创建新分析”对话框打开。



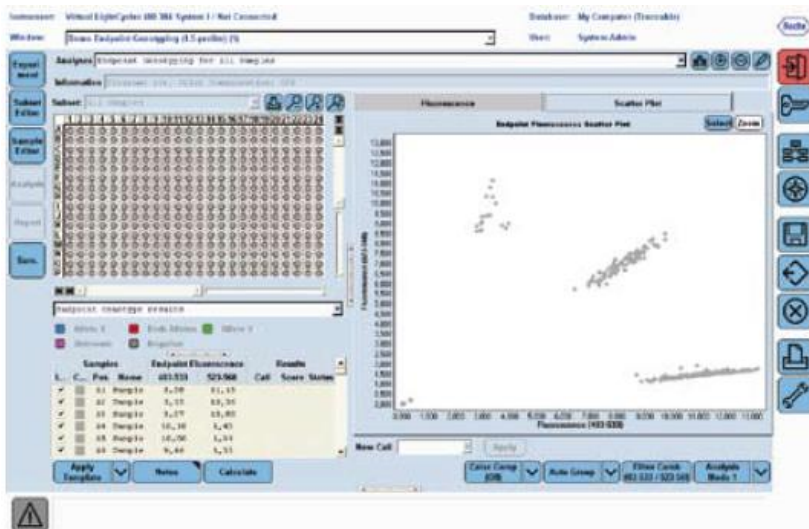
选择将用于基因分型的滤光片组合：

- ▶ 在“Allele X:”列表中，选择用于分散绘图 x 轴的滤光片组合。
- ▶ 在“Allele Y:”列表中，选择用于分散绘图 y 轴的滤光片组合。

（如果您正在分析不带扩增程序的实验，您可以通过选择选项“使用外部实验进行背景校正”针对基线减除添加实验。关于详细信息，请参见“进行带前置/后置读取的终点法基因分型”章节。）

8

“基因分型分析”屏幕打开。



9

按照“进行终点法基因分型分析”章节中所述，继续执行分析。

进行带前置/后置读取的终点法基因分型：

LightCycler® 480 终点法基因分型软件在扩增后根据双色荧光测量测定样品的基因分型。使用该选项，可以在非实时仪器上运行 PCR 用于特高吞吐量应用。在用于基线减除的 PCR（可选）之前和用于分析的 PCR 之后，软件都需要进行一次测量。

使用一个简短的终点法测量程序（PCR 后置测量）和（可选）导入用于基线减除且包含一次 PCR 前置测量的外部实验。

工作流程基本上与“进行带 PCR 读取的终点法基因分型”章节中的说明相同。应用以下更改：

1 创建一个或两个实验，而不是创建一个带扩增程序的实验：

▶（可选）至少包含一次采集的 PCR 前置实验。

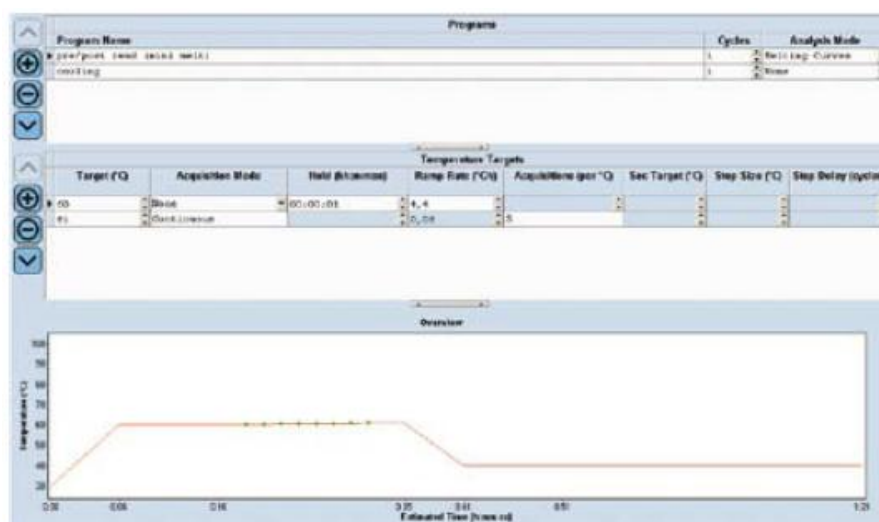
▶ 至少包含一次采集的 PCR 后置实验。

对于这两种情况，使用相同的程序（请参见以下实例）。

 我们推荐您针对 PCR 前置实验和 PCR 后置实验使用罗氏运行模板“终点法基因分型（前置-后置读取）”。

实例：

罗氏运行模板终点法基因分型（前置-后置读取）

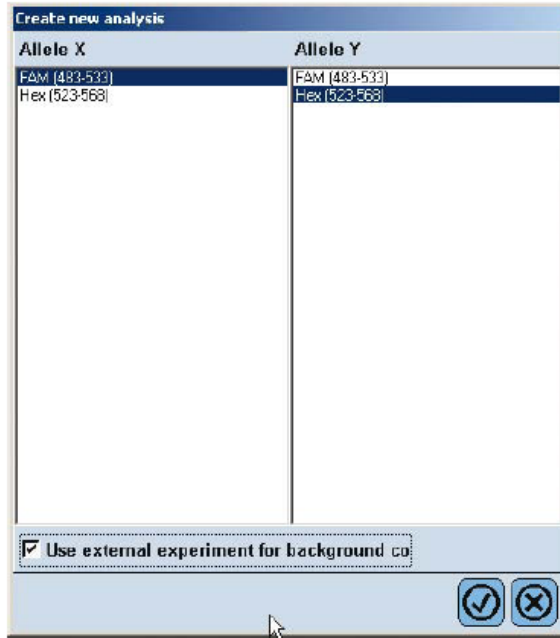


2 按照“进行带 PCR 读取的终点法基因分型实验”章节中所述，定义 PCR 后置实验中的子集和样品。



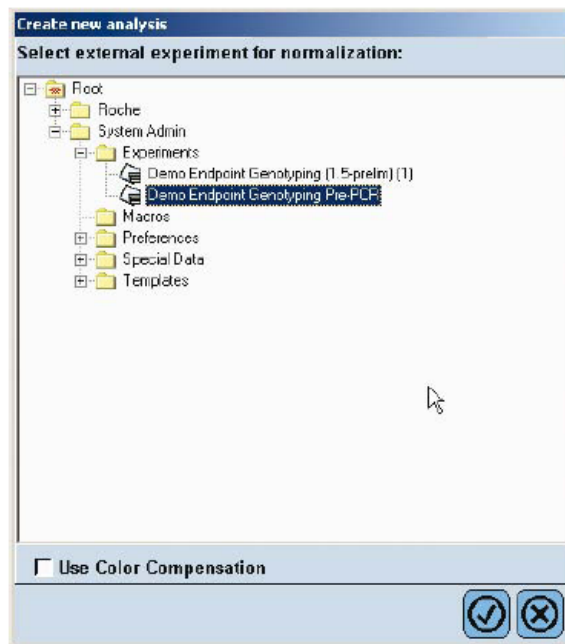
3

创建新的终点法基因分型分析。如果进行前置读取实验，检查“使用外部实验进行背景校正”。



4

选择“导航器窗口”中的前置读取实验。

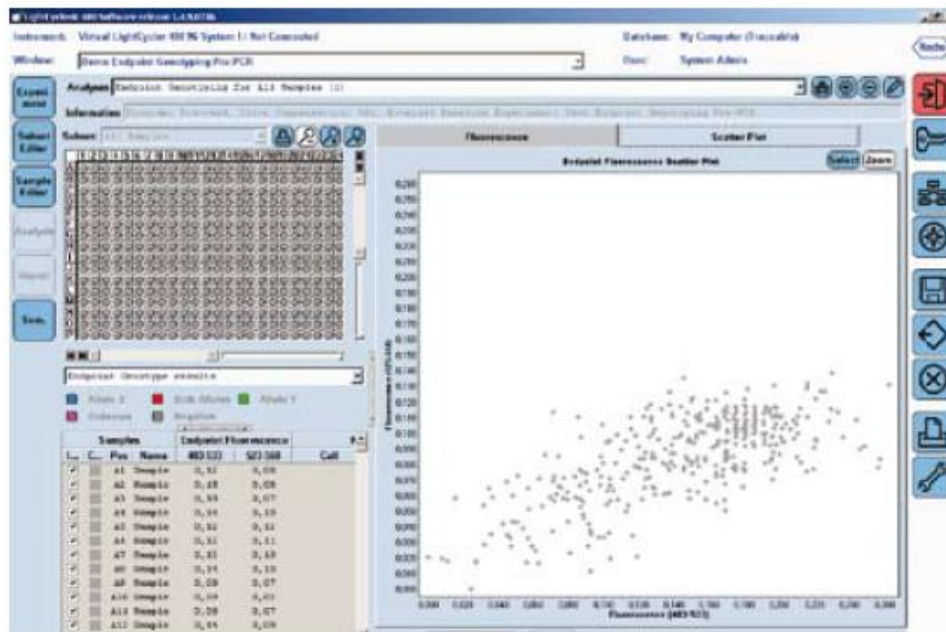


对于终点法基因分型分析，通常不必进行颜色补偿，因为算法稳定且不受颜色色度亮度干扰的影响。



5

“基因分型分析” 屏幕打开。



6

按照“进行终点法基因分型分析” 章节中所述，继续执行分析。



6.2.4 进行终点法基因分型分析

进行终点法基因分型分析：

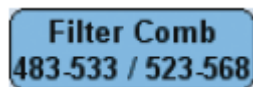
1

使用“标准（内部运行）” 多选按钮选择您希望使用的分组方法。

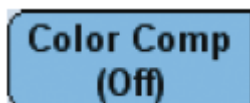


| | |
|--------------|--|
| 标准 (内部运行) | 使用运行中包含的基因分型标准样品实施分组。  如果在“样品编辑器”中将样品定义为标准，默认情况下，在创建分析之后激活该选项。 |
| 自动组 | 实施自动分组。  如果未在“样品编辑器”中将样品定义为标准，默认情况下，在创建分析之后激活该选项。 |

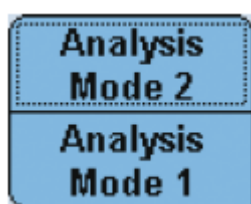
- 2 (可选)“滤光片组合”按钮显示所选的用于基因分型的滤光片组合。点击该按钮更改将用于基因分型的滤光片组合。



(可选)对于终点法基因分型分析，通常不必进行颜色补偿，因为算法稳定且不受颜色色度亮度干扰的影响。



- 3 使用“分析模式”多选按钮选择相应的分析算法设置。
在大多数情况下，两种设置都将导致正确的分组。如果未正确分隔各组（取决于所用的PCR化学反应和分析参数），测试两种设置是否具有最优结果。



- 4 在“样品表”的“结果”选项卡上，排除您不希望包含在结果计算中的所有样品。

- 5 点击“计算”按钮。
软件计算基因分型组并为每个组分配一个颜色和名称。
由软件自动计算的基因分型组采用以下命名方式：

- ▶ Allele X: 样品发出最大的荧光信号且带有针对 Allele X 选择的滤光片组合
- ▶ 两种 Allele: 样品发出强烈的荧光信号且带有两种滤光片组合
- ▶ Allele Y: 样品发出最大的荧光信号且带有针对 Allele Y 选择的滤光片组合
- ▶ 阴性: 样品发出微弱的或者不发出荧光信号

如果在“样品编辑器”中定义基因分型标准，则在标准后对组命名。



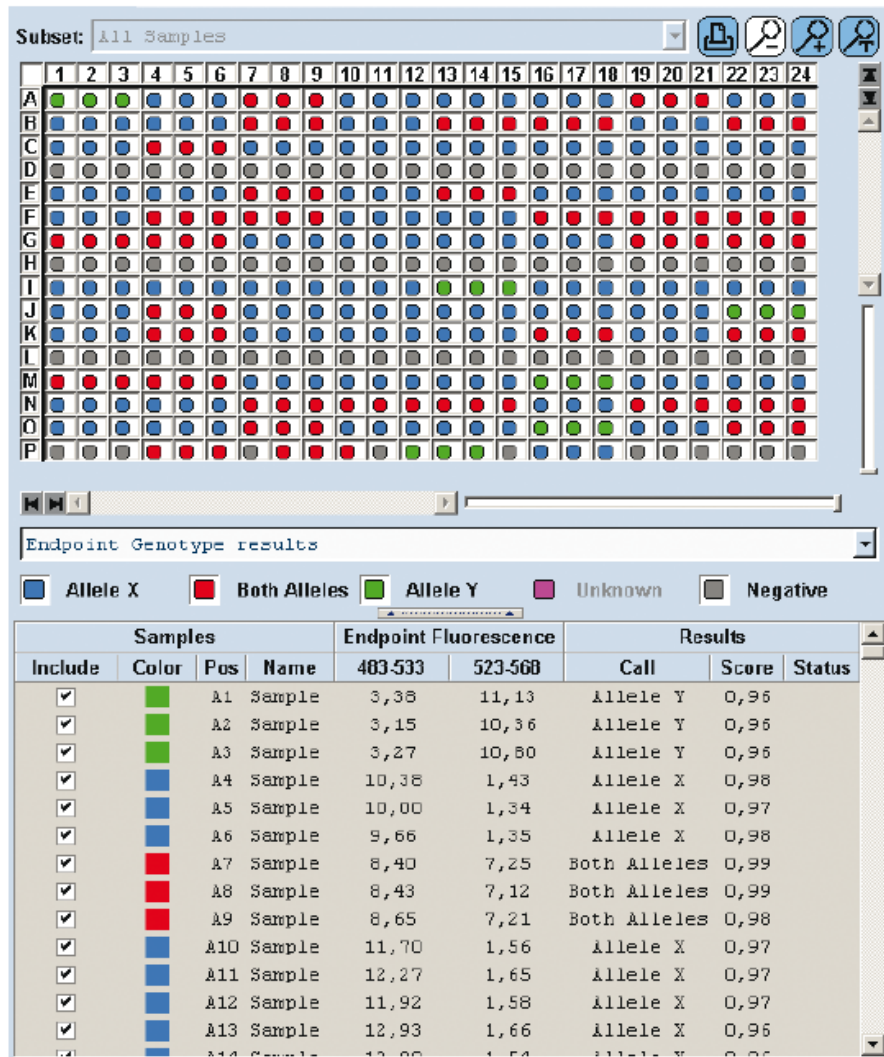
6

当完成计算时，将在多孔板图像和“结果”表中显示结果。

终点法基因分型分析的结果包括“带图例属性选择器和图例属性按钮的样品选择器”和“结果”表。

使用“图例属性选择器”按照结果、样品类型、样品偏好或复制组显示颜色。使用带颜色的“图例属性”按钮选择在多孔板图像、“结果”表和图表中显示具有某些属性的样品。

您可以使用“图例属性选择器”选择显示哪些“图例属性”按钮。如果您选择“终点法基因分型”结果，将如下显示“选择器滤光片”多孔板图像和“结果”表：



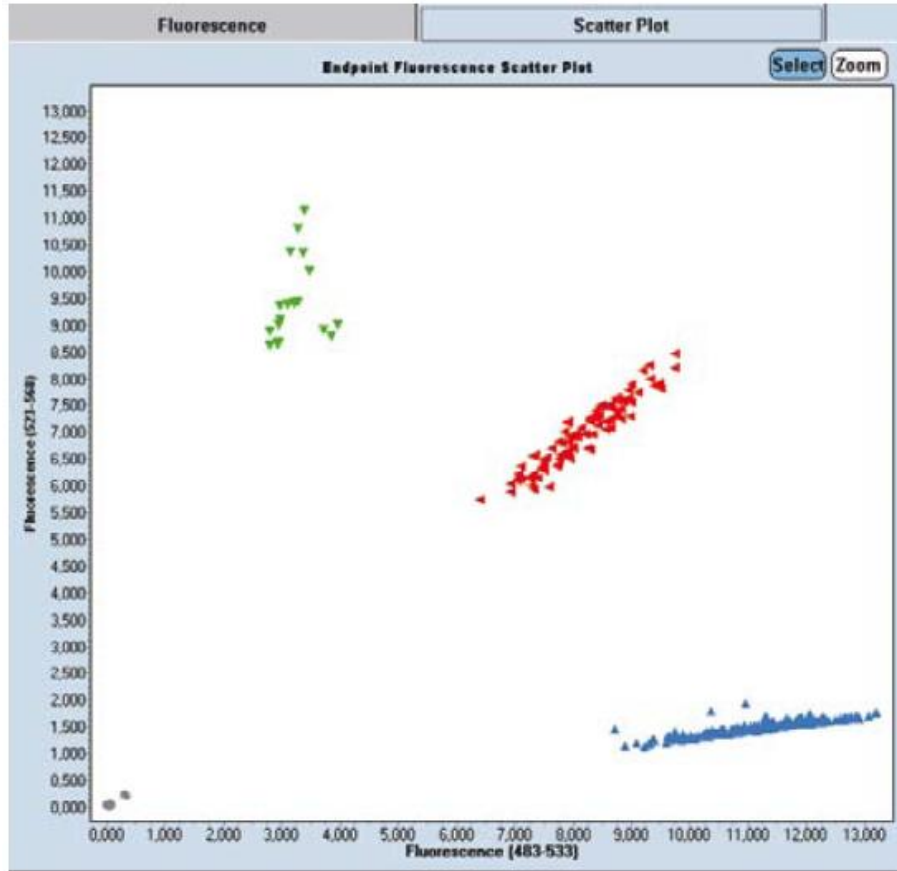
结果包括：

- ▶ 终点法荧光：用于两种滤光片组合（两个小数位）的终点法荧光测量
- ▶ 计算：基因分型分析的结果
- ▶ 划线：样品的划线（0-1，带两个小数位）
- ▶ 状态：如果更改计算，结果的状态切换为“手工编辑”。

关于多孔板图像和“结果”表的详细信息，请参见“使用分析窗口”章节。

7

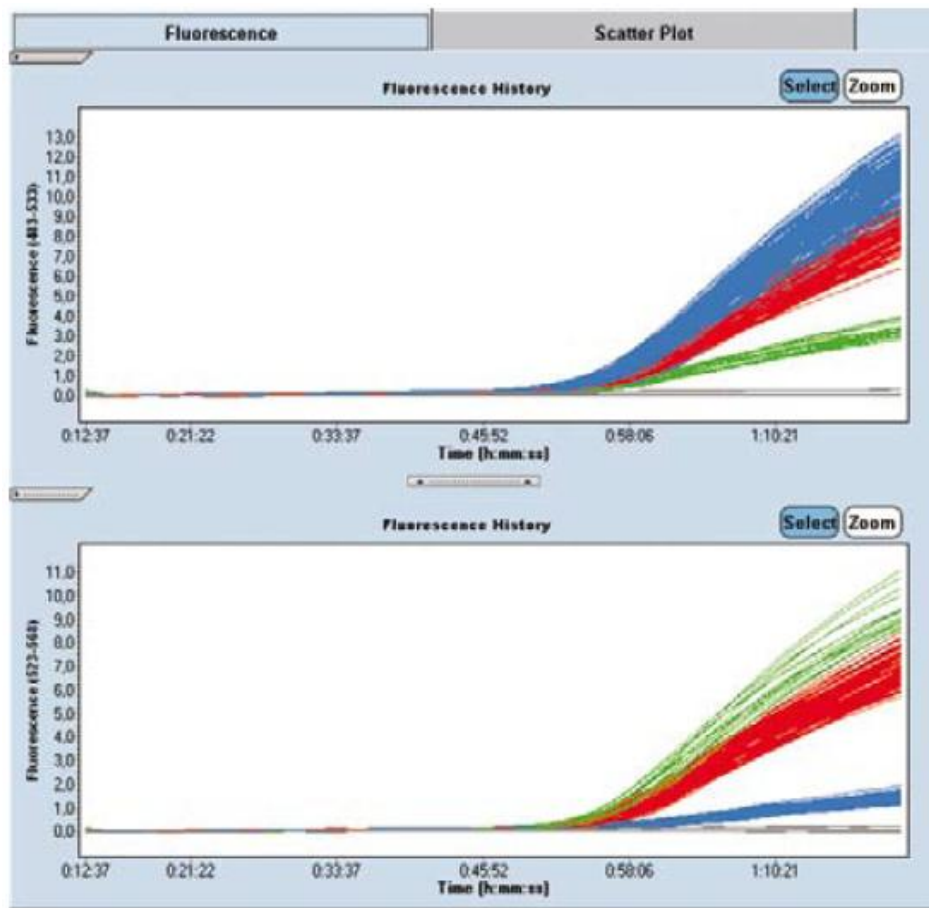
基因分型分析显示以下图表：



“分散绘图”显示终端荧光强度。每个样品显示为一个标记。将“Allele X”滤光片组合中的高强度放置在右侧，而将“Allele Y”滤光片组合中的高强度放置在上侧。



在默认情况下，“荧光”选项卡显示标准的“荧光历史记录”。
关于图表上的详细信息，请参见“使用图表”章节。



8

通过点击“保存”按钮，保存分析。
通过点击“报告”按钮，创建报告。（请参见“创建报告”章节。）

更改基因分型计算：

您可以使用“新计算”选项手工更改任何基因分型。

如果您使用内部运行标准分组，您不能更改标准或阴性质控的计算。如果您尝试将新计算应用于包含已用标准或控制的选择，软件将警告您该选择包含不能更改的标准或控制，并询问您是否希望继续。如果您选择继续，软件将对除内部运行标准和控制以外的所有样品应用更改。如果您选择不继续，将取消该操作。


1 选择待更改的样品（关于详细信息，请参见“在分析中处理样品”章节）。默认选择所有样品。

2 从图表区域下方的“新计算”下拉列表中，选择新计算。



点击“应用”按钮。

如果您希望将样品返回自动计算的计算，将基因分型更改为“自动计算”。

 对所有已更改的计算标记“手工编辑”状态。

6.2.5 辅助功能

终点法基因分型模板

基因分型分析模板包含以下设置：

- ▶ 滤光片组合
- ▶ 颜色补偿设置（关闭或运行）
- ▶ 子集和程序



如果使用模板，软件将检查当前实验是否包含与模板中子集具有相同名称和相同孔位置的子集。

- ▶ 如果当前实验不包含具有相同名称的子集，则软件将创建该子集。
- ▶ 如果当前实验包含具有相同名称的子集，但该子集不包含与模板中子集相同的孔位置，则不能使用该模板。

- ▶ 分析名称
- ▶ 标准（内部运行或自动组）
- ▶ 分析注释
- ▶ 背景校正实验
- ▶ 外部基线设置



如果使用带外部基线实验的模板，软件将显示一个对话框，在该对话框中您可以选择基线实验。

结果控制概念

LightCycler® 480 终点法基因分型软件使用控制概念评估分析是否成功或失败。

结果控制概念只在内部运行标准的分组模式下使用。它不适用于“自动组”分析模式。

- ▶ 阴性质控
 - ▶ 如果所有阴性质控计算为负，则控制成功。
 - ▶ 如果有任何阴性质控计算为非负，则控制失败。
 - ▶ 如果有任何阴性质控失败，则软件将报告无结果并将告知您阴性质控已失败。软件将告知您哪个阴性质控失败。
- ▶ 标准（充当阳性质控）
 - ▶ 如果所有标准计算为正，则控制成功。
 - ▶ 如果有任何标准计算为非正，则控制失败并且软件将报告无结果。软件将告知您哪个标准失败。
 - ▶ 如果具有不同名称的标准有相同的计算，则控制失败。
 - ▶ 如果具有相同名称的标准有不同的计算，则控制失败。

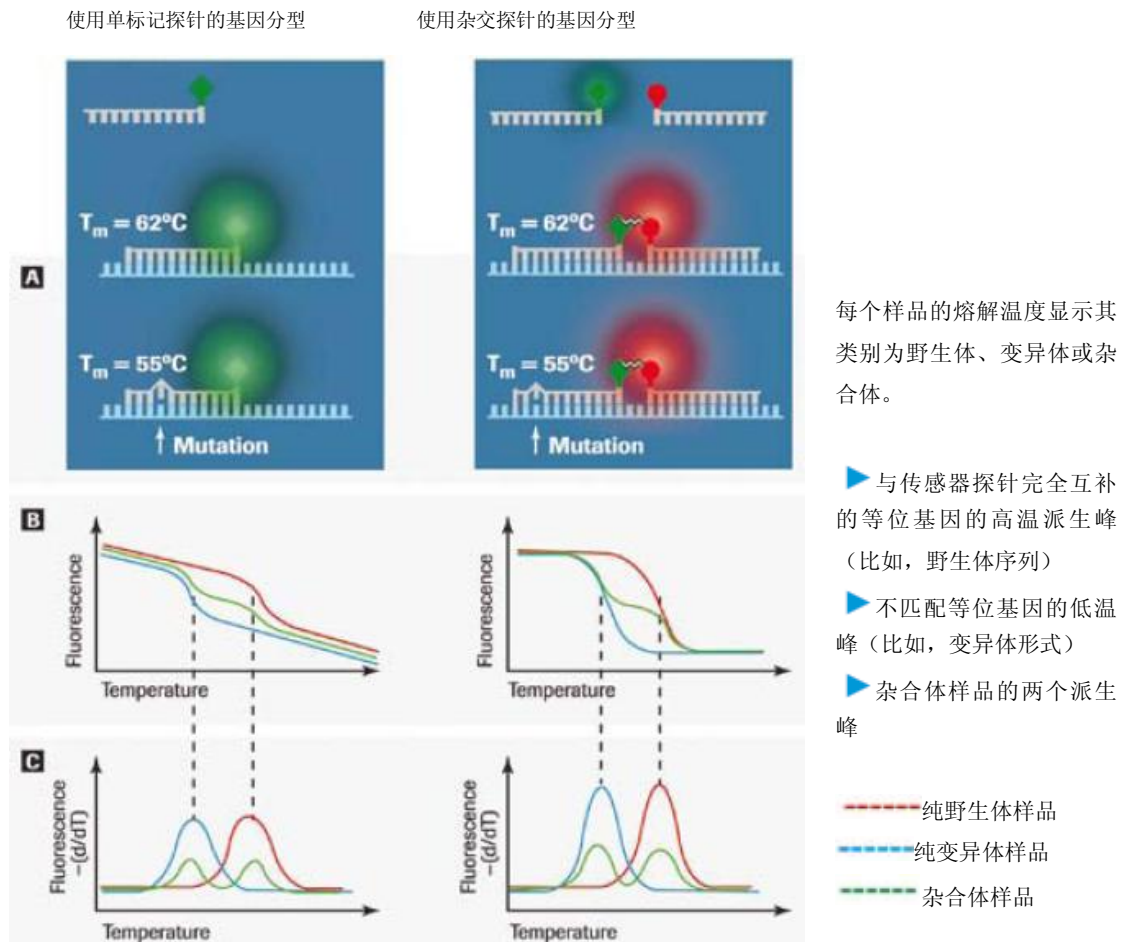
6.3 熔解曲线基因分型分析

6.3.1 概述

在执行 PCR 后，熔解曲线分析查看两串 DNA 双螺旋分子分离或熔解时的温度。该温度极大地取决于 DNA 双螺旋分子的序列、长度和 GC 含量。对于熔解曲线基因分型实验，将与目标 DNA 杂交的特定序列的探针添加到 PCR 中并允许探针退火至反应物。随后，通过缓慢加热扩增子探针异源双链核酸分子和测量探针从扩增子熔掉时产生的荧光强度变化量，生成熔解曲线。即便是有染料指示的探针和扩增子（比如，SNP）之间的一个不匹配，也会显示显著降低的溶解温度。因此，包含失稳不匹配的探针扩增子异源双链核酸分子的熔解温度低于受到精确匹配的目标 DNA 束缚的探针。

通过获取一阶负导数，可以方便地可视化和比较异源双链核酸分子的熔解轮廓，从而简化野生体、杂合体、变异体或纯变异体样品之间的辨别。LightCycler® 480 熔解曲线基因分型软件自动根据熔解曲线形状中的差异区分基因分型。

对于熔解曲线分析的基因分型，提供两种不同的探针化学法：杂交探针和单标记探针（关于探针化学法的更多详细信息，请参见“LightCycler® 480 仪器的检测格式”章节）。杂交探针易于设计并且制造精良。它们采用基于从一个荧光分子（比如，FLUOS）到另一个荧光分子（比如，LightCycler® Red 640）的能量传输的荧光共振能量传输或 FRET 原理。两个分子受到两个分离的寡聚核苷酸探针的束缚。该传输只发生在两个探针退火至邻近的目标 DNA 时，只要探针一熔解，该传输将取消。单标记探针只包含一个携带相互直接连接的荧光染料和淬灭剂的寡聚核苷酸。由于它们的构造，在溶液中淬灭荧光但在绑定目标序列后又激活。使用这两种探针形式，LightCycler® 480 软件监测后置 PCR 熔解步骤中的荧光强度下降情况。



单标记探针（左）或杂交探针（右）变更检测的图示：

- A: 失稳不匹配导致熔解温度 (T_m) 显著降低
- B: 熔解曲线
- C: 派生的熔解峰

随后, LightCycler® 480 熔解曲线基因分型软件对近似的熔解曲线进行分组并根据提供的标准和阈值自动计算基因分型。LightCycler® 480 熔解曲线基因分型软件分析屏幕显示带具有颜色代码的基因分型 and 对应数据表的多孔板的图示。对于每个样品, 该表显示计算的基因分型、划线和分辨率 (关于更多信息, 请参见“熔解曲线基因分型分析的原理”章节)。

6.3.2 熔解曲线基因分型分析的原理

LightCycler® 480 熔解曲线基因分型软件对具有近似熔解曲线的样品进行分组并将每个组确定为一个基因分型。如果需要，您可以导入已知基因分型的熔解曲线（外部熔解标准）并将其与样品熔解曲线进行比较，或者您可以在实验中包含熔解标准（内部运行熔解标准）。

将分析的原始数据显示为样品荧光值与温度的熔解曲线图。该图显示样品熔解时样品的荧光下降曲线。显示内容还包含绘制样品荧光一阶负导数曲线的图。在该图中，每个样品的熔解温度显示为峰值。将熔解温度显示为峰值更容易区分每个样品的特征熔解轮廓和辨别样品之间的差异。

为了确定基因分型，软件分析所有熔解曲线的形状。它将每个熔解曲线与标准作比较，随后做出“划分”（即将熔解曲线分成基因分型组）。软件可以使用三种熔解标准：

- ▶ 软件定义的熔解标准（自动组分析）：软件采用算法扫描所有样品并根据熔解曲线的近似程度对其进行分组。随后，软件计算每个组有代表性的中间熔解曲线；这将成为该组的熔解标准。
- ▶ 板上的用户自定义标准（内部运行熔解标准）：该选项允许您在实验中包含一个或多个以前已进行基因分型的样品。随后，您可以指定一个样品作为该特定基因分型的标准。如果包含多个具有相同基因分型的熔解标准的样品，则根据所有这些样品计算中间熔解曲线并将其作为标准。
- ▶ 以前定义的标准（外部熔解标准）：您可以从熔解曲线基因分型分析中创建外部熔解标准对象，并将其导入以后的运行中。在“保存外部熔解标准对象”章节中，说明了如何创建外部熔解标准。

LightCycler® 480 熔解曲线基因分型软件使用基因分型阴性滤光片划分两类样品组或计算：

- ▶ 阳性（分成基因分型或者不确定）
- ▶ 阴性

对于阳性，软件随后比较各个样品的熔解曲线与标准熔解曲线。从而产生两个数值用于描述怎样接近的各个样品曲线可以用近似曲线进行划分。

- ▶ 第一个值为划线。样品的划线测量样品和与该样品最近似的标准的熔解曲线之间的相似程度。如果样品和标准的熔解曲线相同，则该样品的划线为 1。如果样品的熔解曲线与任何标准的熔解曲线都不近似，则该样品的划线几乎为 0。
- ▶ 第二个值为分辨率。样品的分辨率测量样品的熔解曲线与第二个最近似标准的熔解曲线之间的不相似程度。如果样品的熔解曲线只与一个标准的熔解曲线近似，则该样品的分辨率几乎等于该样品的划线。换句话说，如果样品的熔解曲线非常近似于两个标准的熔解曲线，则该样品的分辨率几乎为 0。

您可以在软件中指定划线和分辨率的严格度阈值。划线的阈值定义样品与最匹配的熔解标准之间所需的相似程度，而分辨率阈值定义样品与第二个最匹配熔解标准之间所需的不相似程度。划线阈值和分辨率阈值的默认值分别为 0.7 和 0.1。

如果样品的划线和分辨率值达到指定的阈值，将样品分配到基因分型组。如果样品的划线或分辨率值低于指定的阈值，则称该样品为“不确定”。

6.3.3 进行熔解曲线基因分型实验

您可以在任何包含熔解曲线程序的实验中进行熔解曲线基因分型分析。熔解曲线基因分型软件通过分析所有样品的熔解曲线的形状并对具有近似形状的曲线进行分组来确定不确定样品的基因分型。将每个组的中间曲线定义为该组的基因分型标准。软件将各个样品的熔解曲线与标准基因分型曲线进行比较。

您还可以在实验中包含已知基因分型的标准或者导入包含标准的对象。在这些情况下，软件将各个样品的熔解曲线与指定标准进行比较。

突变的存在将引入不匹配，该不匹配会降低探针顺序熔解所处的温度。正常等位基因探针匹配与突变的等位基因探针不匹配之间的熔解温度变化量 (ΔT_m) 产生不同的荧光曲线，这些曲线指示突变的存在。熔解温度差异取决于不匹配的类型、探针序列中的不匹配位置以及与该不匹配最邻近的碱基对。

进行熔解曲线基因分型实验：

1

进行包含扩增程序和熔解曲线程序的实验。



在实验中必须至少有 15 度的熔解温度数据，以便创建熔解曲线基因分型分析。

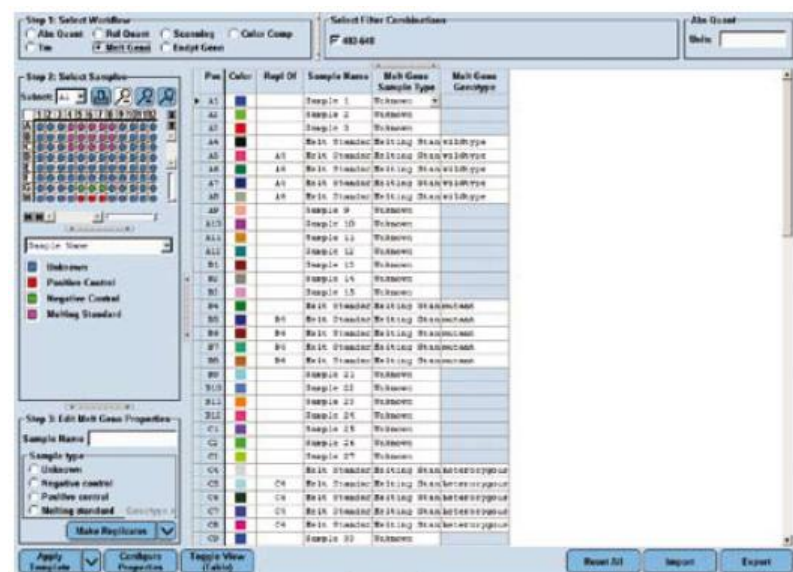
您是否需要在您的实验中包含熔解标准和质控样品，取决于您希望使用的分析模式：

- ▶ 自动组分析：不需要熔解标准和质控样品
- ▶ 内部运行熔解标准：包含熔解标准和（可选）质控样品
- ▶ 外部熔解标准：不需要熔解标准样品，但包含可选的质控样品



2

点击“模块”栏中的“样品编辑器”，并选择工作流程“熔解基因分型”。









3

定义样品的属性。

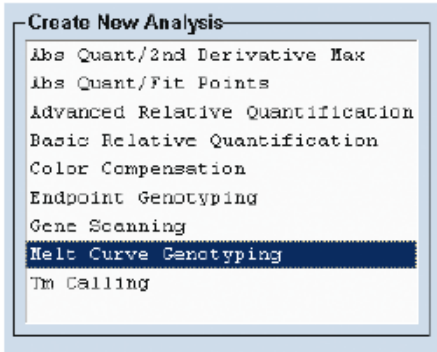
关于“样品编辑器”的详细信息，请参见“输入样品信息”章节。


软件使用以下参数进行计算：

| 列名称 | 说明 | 有效值 |
|------|---|--|
| 样品类型 | <p>样品的类型</p> <p> 内部运行：您需要针对您希望检测的任何基因分型包含一个熔解标准。</p> <p> 您必须注释带基因分型的阳性质控并且阳性质控只能和具有相同基因分型的熔解标准一起使用。</p> | <p>从下拉列表中选择：</p> <ul style="list-style-type: none">  不确定  阳性质控  阴性质控  熔解标准 |
| 基因分型 | <p>熔解标准或阳性质控样品的基因分型。</p> <p> 该字段只有在样品类型为熔解标准或阳性质控时才激活。</p> | <p>字母数字型数值（≤25 个字符）</p> |

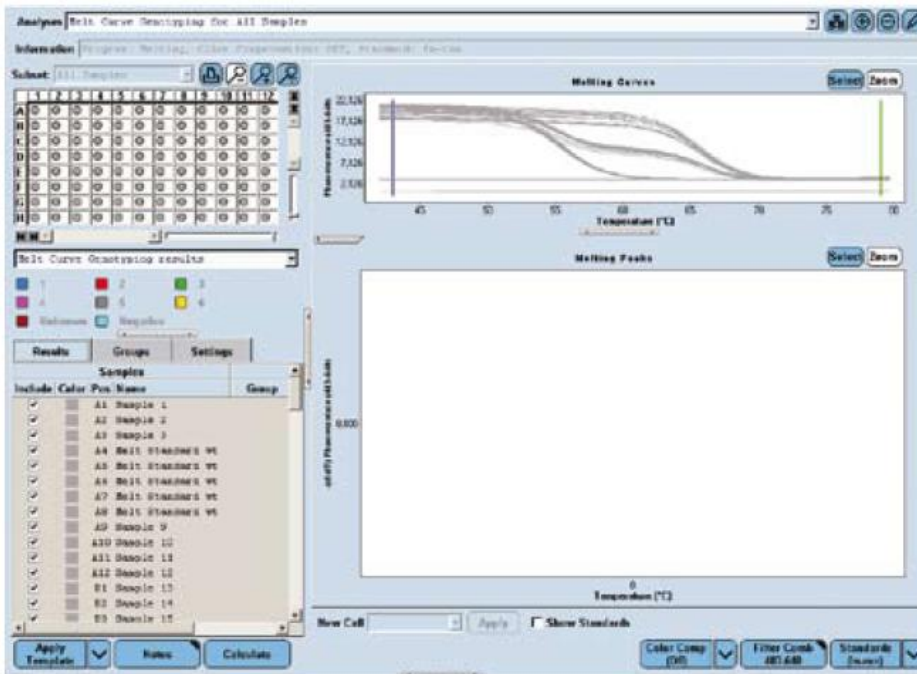


- 4 点击“模块”栏中的“分析”。在“创建新分析”对话框中，选择“熔解曲线基因分型”。



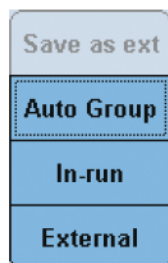
- 5 “创建新分析”对话框打开。从“程序”列表中选择分析子集和实验程序（该程序通常是“熔解曲线”程序）。如果您想，您可以更改分析名称（默认名称为“子集名称对应的分析类型”）。点击 .



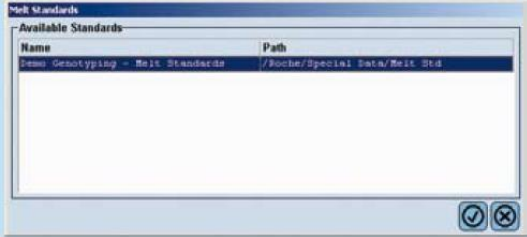

- 6 “基因分型分析”屏幕打开。




进行熔解曲线基因分型分析：

- 1 如果这是多色实验，使用“滤光片组合”按钮选择用于检测目标的滤光片组合。
- 2 使用“颜色补偿”多选择按钮打开或关闭颜色补偿并选择颜色补偿对象。
- 3 使用“标准”多选择按钮选择您希望使用的分组方法：



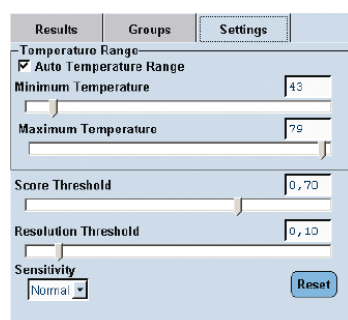
| | |
|------|---|
| 分组 | 实施无熔解标准样品的自动分组。  如果在样品编辑器中无样品被定义为熔解标准，则默认在创建分析后激活该选项。 |
| 内部运行 | 实施使用运行中包含的熔解标准样品的分组。  如果在样品编辑器中有样品被定义为熔解标准，则默认在创建分析后激活该选项。 |
| 外部 | 实施使用由另一次运行保存的熔解标准的分组。使用该选项导入以前保存的外部熔解标准对象。将打开一个对话框，允许您从数据库中选择合适的外部熔解标准对象：   必须已从与当前实验具有相同滤光片组合和颜色补偿数据（若有）的实验中创建外部熔解标准对象。此外，您还必须具有使用该对象的用户权限。如果在您的数据库无合适的熔解标准对象可用，将出现警告信息。 如果您更改了滤光片组合或 CC 状态并且该更改使当前的外部熔解标准对象无效，则软件将询问您是否希望选择新的外部熔解标准。如果您点击 OK，将打开外部熔解标准选择对话框。如果您选择 No 或取消该对话框，将使用自动分组分析模式。 |

 如果您想将实验中包含的熔解标准保存为和其他实验一起使用的外部熔解标准对象，则选择“另存为外部熔解标准对象”。只有在您计算分析之后，该选项才激活。



4

点击“样品表”中的“设置”选项卡，以更改分析设置：



▶ **温度范围：**默认选择“自动温度范围”选项。在这种情况下，软件将自动设定温度范围。虽然推荐您使用该自动选项，但是您也可以通过拖动“最低温度”和“最高温度”滚动条或者编辑文本框手工设定用于计算基因分型计算的温度范围（比如，如果您希望从分析中排除熔解曲线起点或终点处的实验人为因素）。

▶ **最低温度：**设置熔解分析起始温度。

▶ **最高温度：**设置熔解分析结束温度。

▶ **阈值：**您可以调节“划线阈值”和“分辨率阈值”以改进基因分型结果。比如，您可以增大划线阈值以便在能够将样品划分为该基因分型之前要求这些样品更紧密地匹配基因分型标准。两个阈值（划线和分辨率）所具有的数值都介于0和1之间，数字越大表示划线或分辨率越高。也就是说，如果曲线的划线和分辨率都等于1，则曲线将等同于其组的标准且与其他所有标准完全不同。如果某个样品具有的划线或分辨率值低于其各阈值，则将该样品划分为“不确定”基因分型。

▶ 您可以使用滑动条或编辑文本框，以减小或者增大严格程度。



划线阈值和分辨率阈值的默认值分别为0.7和0.1（初始分析时推荐使用）。这些数值在产生过多不确定的计算和做出可能错误的计算之间提供合理的平衡。当您增大阈值时，您将增大将良好熔解称为不确定的可能性。当您减小阈值时，您将增大错误地将明显不同的熔解曲线包含到基因分型组中的可能性。无论如何，务必使所执行的特定检测的阈值达到最优。

▶ **灵敏度：**“灵敏度”功能允许您改变将熔解峰划分到不同的基因分型组中时所用的灵敏度。

▶ “正常”为默认设置：它最多生成六个基因分型组。如果您不满意“正常”设置的精度并且希望将熔解峰分成更多的组，选择“高”。

▶ “高”对应于将熔解峰分组时所用的更高的灵敏度。

“高”最多生成九个基因分型组。

▶ 使用“复位”按钮将所有字段恢复至默认值。

5

在“样品表”的“结果”选项卡上，排除您不希望包含在结果计算中的所有样品。

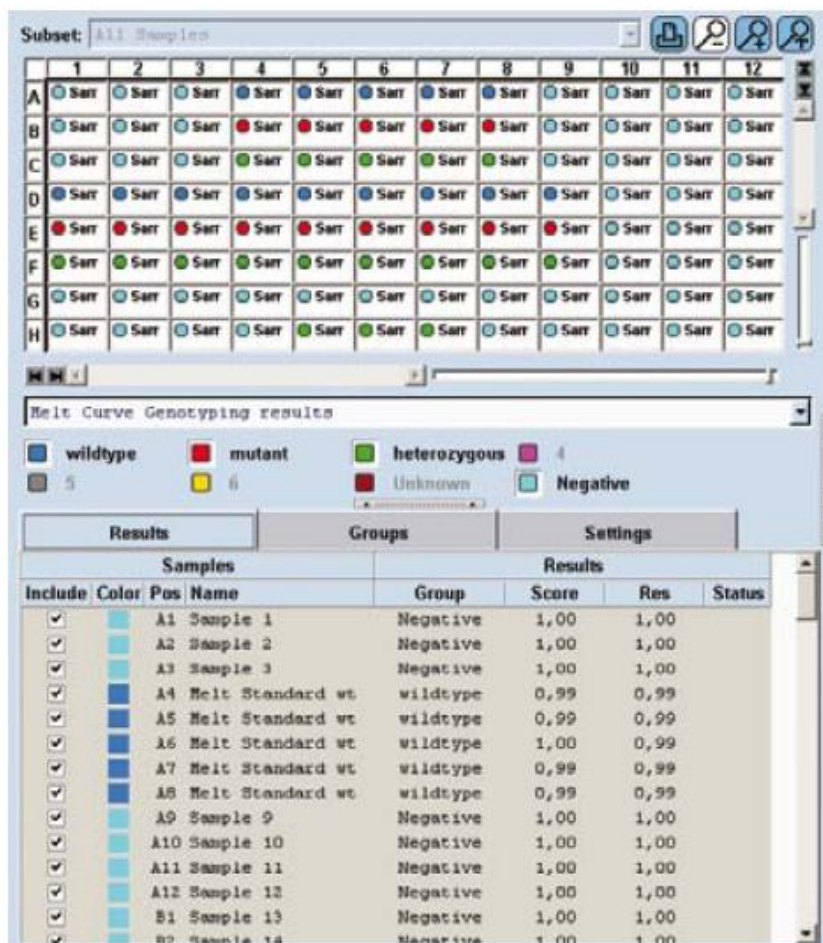


6 点击“计算”按钮。
软件计算基因分型组并为每个组分配一个颜色和名称。

7 当计算完成时，将在多孔板图像和“结果”表中显示结果。
熔解曲线基因分型分析的结果包括“带图例属性选择器和图例属性按钮的样品选择器”和“结果”表。

使用“图例属性选择器”按照结果、样品类型、样品偏好或复制组显示颜色。使用带颜色的“图例属性”按钮在多孔板图像、“结果”表和图表中显示具有某些属性的样品。

如果您选择“熔解曲线基因分型结果”，将如下显示多孔板图像和“结果”表：



▶ 组：指定该样品的基因分型组的名称

由软件自动计算的基因分型组使用连续的数字（1、2 等）命名，而基于内部运行或导入的熔解标准的组使用来自样品编辑器或外部标准的基因分型名称命名。

▶ 划线：样品的划线（0-1，带两个小数位）

▶ 分辨率：样品的分辨率（0-1，带两个小数位）

▶ 状态：手工编辑计算的状态

8

“图例属性”按钮显示。

▶ 9个基因分型组（如果您选择高灵敏度）或6个基因分型组（如果您选择正常灵敏度）。

▶ 负和不确定基因分型组

每个选择框有一个显示为该组分配的颜色标签和一个用于基因分型或组名称的文字标签。

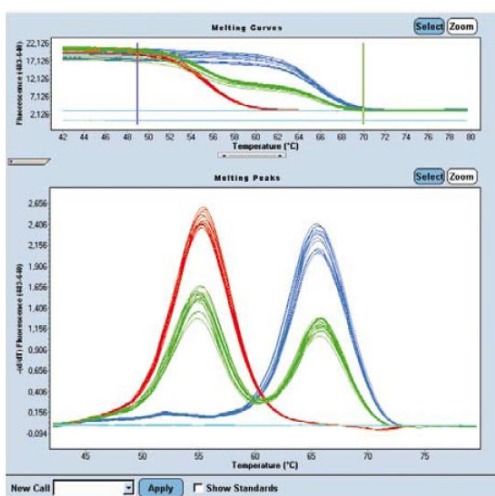


即便未在数据中找到组，也将显示这些选择框。

点击一个选择框将导致在“样品选择器”中选择与该组相关的孔并且使用与该组相关的颜色高亮显示这些孔。

9

熔解曲线基因分型分析显示以下图表：



▶ 上方图表：“熔解曲线”，绘制了样品荧光与温度。该图表显示当样品熔解时样品的荧光下降曲线。

“熔解曲线”图表显示指示所选温度范围起点（蓝色条纹）和终点（绿色条纹）的垂直条纹。您可以通过拖动滚动条来更改最低和最高温度。这等同于更改“设置”选项卡上的“温度范围”值。



如果选择“自动温度范围”选项并且您拖动温度条，该选项将自动取消选择。

▶ 下方图表：默认情况下，下方图表显示“熔解峰”，该图表绘制样品荧光曲线的一阶负导数。在该图表中，每个样品的熔解温度显示为峰值。



如果下方图表显示荧光历史记录图表，您可以查看任何程序（扩增或熔解）和任何滤光片组合。

关于“分析”窗口的详细说明，请参见“使用分析窗口”章节。



10

通过检查“显示标准”方框，您可以在图表中显示熔解标准的曲线。

重命名基因分型组：

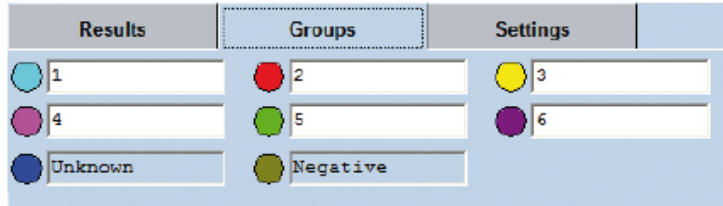
在“样品表”的“组”选项卡上，您可以更改每个基因分型相关的名称。



您能够编辑通过自动组分析模式生成的组的组名称，但是不能编辑基于内部或外部熔解标准生成的组的组名称。您不能更改显示的负或不确定的组名称或者组方框中的数字。

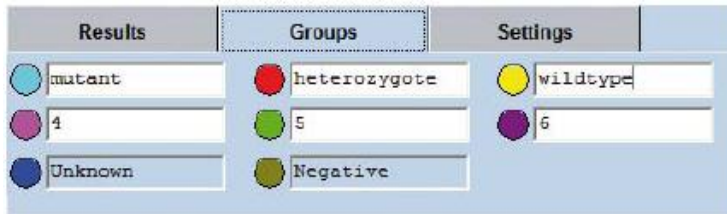
1

在“组”选项卡上，双击组名称字段。



2

在字段中键入新名称。新名称将立即应用于样品选择器和结果表。

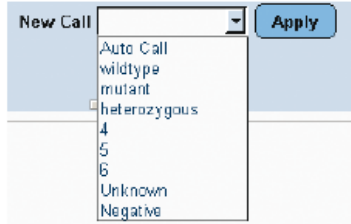


更改基因分型计算：

如果您认为软件未正确计算样品，您可以使用“新计算”选项手工更改基因分型。


- 1 选择待更改的样品。
关于“结果”表的说明，请参见“在分析仪中处理样品”章节。
-


- 2 从图表区域下方的“新计算”下拉列表中，选择一个基因分型组名称或不确定或负。



- 3 点击“应用”按钮。
-

- 4 从“新计算”列表选择一个基因分型组并点击“应用”，将图表中当前显示的所有样品切换到该新计算中。
从“新计算”列表中选择“自动计算”并点击“应用”，将导致图表中当前显示的所有样品返回到其自动计算的计算中。

 在结果表和报告中标记所有手工更改的计算。结果表中的状态列具有彩色背景并且显示文字“*-手工编辑”。

 您不能编辑阳性质控或阴性质控的计算。当选择内部运行时，您不能编辑内部运行的计算。如果您尝试将新计算应用于包含内部运行标准或控制的选择，软件将警告您该选择包含不能更改的内部运行标准或控制并询问您是否希望继续。如果您选择继续，软件将对除内部运行标准和控制以外的所有样品应用更改。如果您选择不继续，将取消操作。

保存外部熔解标准对象：

熔解标准对象由已知基因分型的熔解曲线数据组成。您可以从包含内部运行熔解标准或者通过“自动组”分析模式产生的任何计算基因分型分析中创建外部熔解标准对象。



为了保存外部熔解标准对象，不必在样品编辑器中定义熔解标准样品。如果通过自动组分析保存了熔解标准，则将每个组的中间样品保存为熔解标准。可以通过选择显示标准选择框可视化被选择为组特定熔解标准的样品。

1 点击“标准”多选按钮并选择“另存为外部熔解标准”。

2 在“保存熔解标准”对话框中，选择保存对象的目的地。默认位置是“特殊数据”目录中的“熔解标准”文件夹。



6.3.4 辅助功能

熔解曲线基因分型分析模板

基因分型分析模板包含以下设置：

- ▶ 滤光片组合
- ▶ 颜色补偿设置（关闭或运行）
- ▶ 子集和程序



如果使用模板，软件将检查当前实验是否包含与模板中的子集具有相同名称和相同孔位置的子集。

- ▶ 如果当前实验不包含具有相同名称的子集，则软件将创建该子集。
- ▶ 如果当前实验包含具有相同名称的子集，但该子集不包含与模板中子集相同的孔位置，则不能使用该模板。

- ▶ 分析名称
- ▶ 熔解标准（自动组、内部运行或外部）
- ▶ 分析注释
- ▶ 最低/最高温度和最优温度设置、划线阈值、分辨率阈值和灵敏度

结果控制概念

LightCycler® 480 基因分型软件使用控制概念评估分析成功或者失败。只有使用内部或外部熔解标准时，才使用结果控制概念；它不适用于“自动组”分析模式。

- ▶ 阳性质控
 - ▶ 如果所有阳性质控计算为正并且所有阳性质控都匹配其指定的基因分型，则控制成功。
 - ▶ 如果有任何阳性质控计算为正但该阳性质控不匹配其指定的基因分型，则控制失败。
 - ▶ 如果有任何阳性质控计算为负，则控制失败。
 - ▶ 如果有任何阳性质控失败，软件将报告无基因分型并且将告知您阳性质控已失败。
- ▶ 阴性质控
 - ▶ 如果所有阴性质控计算为负，则控制成功。
 - ▶ 如果有任何阴性质控计算为非负，则控制失败。
 - ▶ 如果有任何阴性质控失败，软件将报告无基因分型并且将告知您阴性质控已失败。

▶ 熔解标准

- ▶ 如果算法计算任何熔解标准为非正，则软件将报告无基因分型。
- ▶ 如果未使用带用户自定义参数的自动分组功能将同一个基因分型的熔解标准进行分组，则软件将报告无基因分型。
- ▶ 如果使用带用户自定义参数的自动分组功能将不同组的熔解标准在同一组中计算，则软件将报告无基因分型。
- ▶ 如果有任何熔解标准失败，则软件将告知您有一个熔解标准失败。




高级软件功能

颜色补偿分析
进行颜色补偿实验

高级软件功能

7. 进行颜色补偿分析

LightCycler® 480 系统能够同时测定和分析每个反应中的多个荧光信号。通过这种方式，它可以在同一个反应中同时测定多个目标序列。因为染色之间的发射谱之间有重叠，一个滤光片组合会把某个用于其他通道的信息也提取出来，这种现象称为“串扰”。虽然在设计该仪器时，每个发射滤光片均已针对特定的最大发射进行了优化，但目前可用的所有荧光染料的发射谱均有长的“拖尾”，从而导致了波谱间重叠现象的发生。荧光信号的杂散将导致获得的数据无法进行解释。我们采取了在数据分析前进行颜色补偿的措施来纠正这种串扰。当颜色补偿激活时，LightCycler® 480 基础软件的使用从所谓的颜色补偿对象中获取的数据对荧光串扰进行补偿。

 *颜色补偿只能用于一种情况：即您在运行一个实验时期望在一个反应中检测两个或多个不同的染料（产生的荧光）。当实验仅使用一种染料时，则没有必要进行颜色补偿。*


这是因为在单色检测时，您可以通过校准仪器而很容易地校正其波谱重叠现象。在校正运行过程中，LightCycler® 480 仪器将测量每种染料的荧光强度并产生针对仪器的特异性颜色补偿对象。以后，LightCycler® 480 基础软件会自动使用这一所谓的颜色补偿对象对每个通道中相应的染料的荧光强度进行校正。最后得到的净结果就是对每个通道中单一染料的检测结果。

 *颜色补偿对象只能在产生该补偿的同一台 LightCycler® 480 仪器上的实验中使用。*


颜色补偿分析
进行颜色补偿实验

7.1 进行颜色补偿实验


在颜色补偿方案中使用的温度特征通常包括加热、循环、温度梯度及冷却等程序。循环程序在包括数据收集在内等方面与典型的 PCR 很相似。如果不运行单色补偿实验，您也可以运行与您的实验样品平行的颜色补偿反应。在这种情况下，使用适当的 PCR 实验方案，但一定要在其中加入温度梯度或者熔解曲线程序。


 在水解探针颜色补偿实验运行中，必须进行一次真正的 PCR 过程，这是因为只有在循环中探针才会被 Taq DNA 多聚酶水解掉从而产生荧光信号。


进行颜色补偿时所需要的数据是从温度梯度程序中获得的。在这一程序中，在经过快速的变性（95°C）后，样品温度会慢慢地从 40°C 上升到一个比实验运行期间测量荧光信息所需的温度大约高 5°C 的终末温度。在这个温度梯度中，仪器将会对荧光信号以 1 次/°C 的频率进行测量。如果您运行与实验样品平行的杂交探针颜色补偿反应，您可以在以后的 T_m 计算分析中使用熔解曲线程序。

 对于每一个检测而言，您需要根据经验对熔解曲线分析的最优数据采集频率进行设定，这一频率范围通常是 1 次采集/°C 到 5 次采集/°C。

进行颜色补偿运行后，LightCycler® 480 软件将其产生的数据作为一个普通的实验文件进行保存。对于这些将用颜色补偿的数据，您必须首先将这种温度梯度或熔解曲线程序的数据转换成颜色补偿对象，并将其单独进行保存。

 对于杂交探针和水解探针而言，即使不考虑您实验中所用的特定探针顺序，它们也足以针对每种染料组合产生一个颜色补偿对象。尽管如此，在某些观察到颜色补偿不足的情况下，可以通过创建一个项目特定的颜色补偿对象改善这种情况。

 您只需在更换您仪器的光学模块后，创建一个新的颜色补偿对象。在更换氙气灯或移动仪器后，不必创建新的颜色补偿对象，因为颜色补偿与光强度无关。

 在一些多色检测中，比如使用标记 FAM-和 VIC/HEX-的水解探针的检测，当使用的颜色补偿不足时，您可以遵守由过度补偿产生的负面影响放大曲线；您还可以遵守扩增曲线，也就是您会预计到的也由颜色补偿不足导致的来自邻近信道的残余色度亮度干扰产生的负面影响。如果您使用绝对定量—最大二阶导数法的高灵敏度算法，这可能导致错误的正值计算。因此，对于这些检测，强烈推荐您使用高置信算法或者使用绝对定量—固定点法。关于如何改善颜色补偿不足的详细信息，请参见以下章节。

更可取的是，使用在邻近信道内未检测到的染料。双色水解探针检测中使用的一些染料组合甚至完全不需要颜色补偿。这些染料组合是：

| LightCycler® 480 I 仪器 | LightCycler® 480II 仪器 |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Cyan 500 (450-500) -Red 610 (558-610) | Cyan 500 (440-488) -Red 610 (533-610) |
| Cyan 500 (450-500) -Red 640 (558-640) | Cyan 500 (440-488) -Red 640 (618-660) |
| Cyan 500 (450-500) -Cy 5 (615-670) | Cyan 500 (440-488) -Cy 5 (618-660) |
| FAM (483-533) -Red 610 (558-610) | FAM (456-510) -Red 610 (533-610) |
| FAM (483-533) -Red 640 (558-640) | FAM (456-510) -Red 640 (618-660) |
| FAM (483-533) -Cy5 (615-670) | FAM (456-510) -Cy5 (618-660) |
| HEX / VIC (523-568) -Cy5 (615-670) | HEX / VIC (533-580) -Cy5 (618-660) |

使用这些染料组合将显著降低检测验证的复杂性。

双色或多色应用可用染料组合的实例

LightCycler® 480 I 仪器，杂交探针：

| 激发滤光片 | 检测滤光片 | 染料 | 需要颜色补偿对象 |
|-------|-------------------|---|----------|
| 483 | 610 670 | FAM LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |
| 450 | 568 610 670 | Cyan 500 Rhodamin 6G LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |

LightCycler® 480 I 仪器，水解探针：

| 激发滤光片 | 检测滤光片 | 染料 | 需要颜色补偿对象 |
|---------------------------------|---------------------------------|--|----------|
| 483 558 | 533 610 | FAM LightCycler® Red 610 | 否 |
| 483 558 615 | 533 610 670 | FAM LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |
| 450 483 523 558 615 | 500 533 568 610 670 | Cyan 500 FAM VIC / HEX LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |

颜色补偿分析
进行颜色补偿实验

LightCycler® 480II 仪器，杂交探针：

| 激发滤光片 | 检测滤光片 | 染料 | 需要颜色补偿对象 |
|-------|-------------------|---|----------|
| 498 | 610 660 | FAM LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |
| 440 | 580 610 660 | Cyan 500 Rhodamin 6G LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |

LightCycler® 480II 仪器，水解探针：

| 激发滤光片 | 检测滤光片 | 染料 | 需要颜色补偿对象 |
|--------------------------|--------------------------|---|------------|
| 465 533 | 510 580 | FAM VIC / HEX | 是，通用颜色补偿对象 |
| 465 533 | 510 610 | FAM LightCycler® Red 610 | 否 |
| 465 533 618 | 510 610 660 | FAM LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |
| 440 498 533 618 | 488 580 610 660 | Cyan 500 FAM LightCycler® Red 610 Cy 5 | 是 |

如果颜色补偿不足导致过度补偿或者残余色度亮度干扰，我们推荐采取以下措施：

▶ 如果您不希望更改您当前的染料标签：将邻近信道的荧光高度调节至相等的水平（比如，如果在信道 533 中测得的 FAM 最大荧光为 40 个单位而信道 568 中测得的 VIC 荧光仅为 10 个单位，则将 FAM 数量降低至 10 到 20 个单位）。

注意：短波长染料通常比长波长染料具有更大的荧光发射能力。

▶ 对于多色水解探针测定法，强烈推荐使用暗淬灭剂染料（即染料分子能有效的淬灭 FRET 报告基因染料发出的荧光，且自身不会发射荧光）。对于多色水解探针测定格式中涵盖的所有水解探针报告基因染料，罗氏应用科学推荐使用 BHQ-2。另一种选择是可以使用淬灭效率略低的 DABCYL。

▶ 通常，您可以在多色实验中使用与单色实验相同的水解或杂交探针浓度。也就是，对于各水解探针为 0.05 - 0.2µ M，或者对于杂交受体探针为 0.1 - 0.3µ M。杂交供体（标记有荧光素）探针的浓度应为 0.2µ M，而混合液中标记有荧光素的杂交供体探针的总浓度不应超过 1.2µ M。制备将在您的检测中使用的所有杂交供体探针等克分子的混合液。

检查您使用的染料和探针的质量。大量未用的无标签染料可能产生会影响颜色补偿的高强度背景信号。

检查您的探针设计。在很少几种情况下，探针的合成和修改方式可能对颜色补偿产生影响。关于其他信息（比如，TIB MOLBIOL: www.tib-molbiol.com），请联系您的寡聚核苷酸许可供应商。



▶ 尤其对于多色杂交检测，通过在颜色补偿运行中创建一个检测特定的颜色补偿对象，该颜色补偿运行使用的探针就是您将在实验中使用的探针，有可能改善颜色补偿。

▶ 在 LightCycler® 480 软件中，检查使用的所有染料所具有的曝光时间是否超过 40ms。当使用过高的染料浓度时，可能出现信号超出 CCD 相机线性范围的情况。如果出现这种情况，可降低相应探针的浓度。

▶ 对于颜色补偿对象的产生，最少准备 5 个重复的颜色补偿反应。

▶ 对于需要颜色补偿的定量分析多色实验，可使用结合高置信算法的绝对定量—最大二阶导数分析法或者绝对定量—固定点分析法。不推荐使用结合高灵敏度算法的绝对定量—最大二阶导数分析法。

如何运行颜色补偿实验：

| | |
|---|---|
| 1 | <p>对于您将在实验中需要补偿的每种荧光染料，您需要在实验中准备至少 5 个重复的颜色补偿反应，另外还应包括一个空白反应（即：使用您将在实验中使用的样品进行单色反应，而非多色反应）。</p> <p>▶ 对于杂交探针的颜色补偿实验中，请勿使用杂交探针对（供体-受体探针），而是只使用单独的探针寡聚核苷酸。 制备精制的 PCR 混合液。</p> <p>▶ 对于水解探针颜色补偿实验，应根据您的实验方案创建和运行完整的扩增反应。每个反应（除空白反应外）应该包括您将用于多色水解探针检测的水解探针中的一种。使用的水解探针浓度应与您将在实验中所用的浓度相同。</p> <p> 创建和运行使用水解探针的扩增反应要求对水解探针进行裂解从而将报告染料从淬灭剂中释放出来。否则，颜色补偿所需的荧光信号就无法产生。</p> <p> 对于空白对照（“样品编辑器的“颜色补偿”选项卡”上称为“水”的样品），可以使用精制的 PCR 混合液，但是应省略探针。</p> |
|---|---|

2

打开 LightCycler® 480 软件并使用与您准备在多色实验中使用的相同的程序设置。

▶ 创建一个具有如下区段的温度梯度程序的颜色补偿实验：

区段 1：以 4.8°C/秒的速度瞬间将温度升到 95°C。

区段 2：以 2.5°C/s 秒的速度将温度调节到 40°C 并持续 30 秒。

区段 3：以每 X°C 作一次采集的频率瞬间采集数据，使用连续采集方式；其中，X 代表实验中的测量温度+5°C。

▶ 需要时，输入以下信息：

测试标识符：确认用于颜色补偿实验的探针组合的字符串。

批号标识符：确认用于颜色补偿实验的反应体系的字符串。

颜色补偿标识符：将颜色补偿对象与具有相同颜色补偿标识符的实验相关联的字符串。



当输入颜色补偿标识符时，只有具有匹配标识符的颜色补偿对象才能在实验中使用。

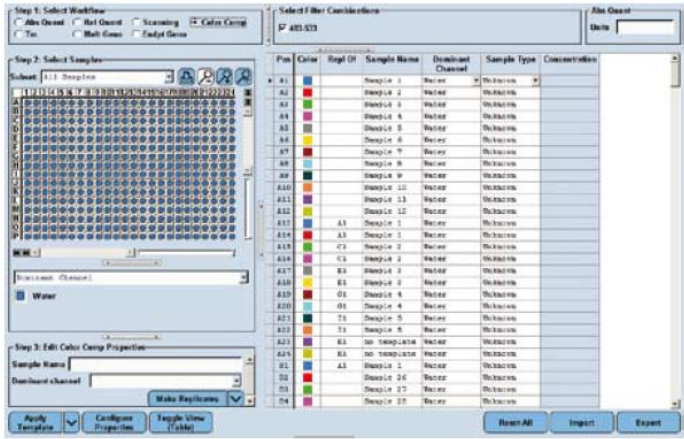


当输入颜色补偿标识符时，只有具有匹配标识符的颜色补偿对象才能在实验中使用。

尤其是当使用 LightCycler® 480 实验室信息管理系统/条形码模块时，这一标识符值对于与宏配合使用的颜色补偿对象的正确确认非常方便。如果您使用“智能选择颜色补偿”选项来对一宏进行保存，则可以在开始通过实验室信息管理系统远程启动宏时提交颜色补偿对象的标识符而选择适当的颜色补偿对象。

▶ 对于温度梯度程序，选择“分析模式”区域中的“颜色补偿”。

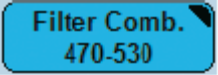
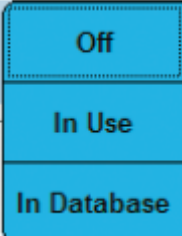



如果在同一次运行中在多孔板的平行孔中进行“熔解曲线”分析，可选择“分析模式”区域中的“熔解曲线”。可以通过熔解曲线程序进行颜色补偿分析，但是不能反过来通过颜色补偿程序进行 T_m 值计算分析。

| <p>3</p> | <p>点击“模块”栏中的“样品编辑器”并选择工作流程“颜色补偿”。</p>  <p>定义样品的属性。 关于“样品编辑器”上的详细信息，请参见“输入样品信息”章节。 软件使用以下参数进行计算：</p> <table border="1" data-bbox="469 734 1414 815"> <thead> <tr> <th>列名称</th> <th>有效值</th> <th>描述</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>主要信道</td> <td>根据实验，在下拉列表表中显示可能的数值。</td> <td>在该孔中使用的染料的信道。 为每个附加孔选择合适的滤光片组合。</td> </tr> </tbody> </table> | 列名称 | 有效值 | 描述 | 主要信道 | 根据实验，在下拉列表表中显示可能的数值。 | 在该孔中使用的染料的信道。 为每个附加孔选择合适的滤光片组合。 |
|-----------------|---|------------------------------------|-----|----|------|----------------------|------------------------------------|
| 列名称 | 有效值 | 描述 | | | | | |
| 主要信道 | 根据实验，在下拉列表表中显示可能的数值。 | 在该孔中使用的染料的信道。 为每个附加孔选择合适的滤光片组合。 | | | | | |
| <p>4</p> | <p>将反应体系加入到多孔板中，比如，一个典型设置可能如下所示。</p>  | | | | | | |
| <p>5</p> | <p>当实验完成后，点击“模块”栏中的“分析”。</p> | | | | | | |
| <p>6</p> | <p>从“创建新的分析”列表中，选择“颜色补偿”。 在“创建新的分析”对话框中，选择要分析的样品子集以及实验中使用的程序（通常情况下只有一个默认选择的程序）。点击 。</p> | | | | | | |
| <p>7</p> | <p>点击“动作按钮”区域的“计算”，这样就可以进行颜色补偿分析了。</p> | | | | | | |
| <p>8</p> | <p>点击“保存颜色补偿对象”。默认情况下，将选择您“特殊数据”文件夹中的 CCC 文件夹作为保存位置。</p> | | | | | | |

现在您就可以将颜色补偿数据运用到其他实验中了。如需更多信息，请参见下面的章节。

7.2 使用颜色补偿

| | |
|----------|--|
| <p>1</p> | <p>首先，通过使用“滤光片组合”按钮选择您希望显示和补偿的滤光片组合。</p>  |
| <p>2</p> | <p>▶ 为了在实验运行过程中使用颜色补偿，请点击下拉的“颜色补偿”按钮。从“使用中”或“数据库中”两选项中进行选择。</p> <p>▶ 为了将颜色补偿应用于分析，则应添加分析模块，然后点击下拉按钮。从“使用中”或“数据库中”两选项中进行选择。</p>  |
| <p>3</p> | <p>选择您希望使用的颜色补偿对象，然后点击 OK。</p>  <p>当您为某分析选定一个对象后，该对象的名称就被加入到该实验的所有分析模块的颜色补偿菜单中。</p> |
| <p>4</p> | <p>实验或分析图表将使用补偿后的数据重新进行绘图。注意现在“颜色补偿”按钮标签显示的为“开”。</p> |

8. 使用模板和宏工作

模板与宏为您提供创建实验的便捷途径，可以大大加快您的工作速度。

模板是以单个项目为基础的，例如一个实验方案或者包含您需要使用信息的样品列表。各种模板包括：


- ▶ 运行模板
- ▶ 样品模板
- ▶ 子集模板
- ▶ 报告模板
- ▶ 分析模板

宏则是模板的集合：每个宏都针对实验的一个部分，与程序（实际上也是宏）一起自动地使用模板并运行实验。

本节为您讲述如何创建和使用模板与宏。

8.1 创建和使用模板

模板为您提供创建和分析实验的便捷途径，从而大大加快您的工作速度。模板是以单个项目为基础的，例如已经定义好的子集或者包含您希望在实验中使用的所有信息的样品列表。您无法重新运行某实验方案，但您可以从已有的实验中将实验方案做为模板保存下来，并将该模板应用到一个新的实验中去。您可以用同样的方式使用子集、样品、报告以及分析的模板。通过使用模板功能，您可以将“编辑”框中所做的所有设置全部做为模板对象保存于数据库中，以后您就可以将这些设置应用于不同的但匹配的数据库对象。这样您就可以使用模板来保存和使用选项以替代当前的用户选项。

 *使用 384 多孔板温控模块类型创建的模板不能用于 96 孔温控模块类型的实验中，反之亦然。*

使用 LightCycler® 480 I 仪器产生的模板不能用于使用 LightCycler® 480II 仪器运行的实验中，反之亦然。

使用以前发布的 LightCycler® 480 软件创建的样品列表模板、分析模板和报告模板不能在 1.5 版本的 LightCycler® 480 软件中使用。

使用模板和宏工作
创建和使用模板

关于可以保存和使用模板的对象类型，请参见下表：

| 对象类型 | 模板中包括的参数 | 注意事项 |
|-------------------|--|--|
| 运行 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 程序与目标温度 ▶ 检测格式 ▶ 选定的滤光片组合 (在定制窗口中) ▶ 整合时间模式与整合时间(如果选择了手动模式的话) ▶ 批号 ▶ 测试标识符 ▶ 颜色补偿号 ▶ 反应体积 ▶ 阻断类型 ▶ 阻断尺寸 ▶ 运行 | <p> LightCycler® 480 软件中带有32个演示运行模板(安装于模板/运行模板中的罗氏文件夹)。</p> |
| 子集 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 可用于分析的子集 ▶ 报告中可用的子集 ▶ 所含孔的列表 ▶ 子集标识符 ▶ 子集名称 ▶ 阻断尺寸 | <p> 当已经用于产生分析后，子集模板即不能再使用。</p> <p> LightCycler® 480 软件中带有两个演示子集模板(棋盘和四分仪；位于模板/子集模板中的罗氏文件夹)。</p> |
| 样品 | <p>样品模板中包括阻断尺寸、激活的滤光片组合以及一个样品列表。对于每个样品而言，模板中包括所有选择的样品属性。</p> | <p> 如果您想使用某样品模板，则模板中的滤光片组合必须与实验中的滤光片组合相一致。</p> |
| 报告 | <p>报告模板中包括：</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ “一般”表中的区段选择设置 ▶ “细节”表中的次级区段详细要求 ▶ 报告子集 ▶ 报告设置 | <p> 如果实验中的对象很少，模板中的对象将丢弃。如果实验中包含多个对象，默认值将应用于剩余的对象。</p> <p> 不要在模板中加入任何可视元素的设置，例如页码或当前放大倍数等。</p> |
| 定量分析 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 注解 ▶ 滤光片组合 ▶ 颜色补偿对象 ▶ 外部参照物曲线(仅对于定量模式) ▶ 高灵敏度/高置信设置 ▶ 均值/中值设置 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 不包括样品的选择/未选状态。 |
| T _m 分析 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 注解 ▶ 滤光片组合 ▶ 颜色补偿设置 ▶ SYBR设置 ▶ 峰模式(双模式或六模式) ▶ 显示用于T_m区域的选择框 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ T_m值计算分析模板不包括峰数滤光片状态，也不包括样品的选择/未选状态。 ▶ T_m值计算分析模板不能通过手动T_m方法设置来保存和应用。 |

| 对象类型 | 模板中包括的参数 | 注意事项 |
|--------|---|------|
| 基因分型分析 | 终点法基因分型： <ul style="list-style-type: none"> ▶ 滤光片组合 ▶ 颜色补偿设置 ▶ 子集和程序 ▶ 分析名称和注解 ▶ 外部基线设置 ▶ 内部运行/自动组 熔解曲线基因分型补充： <ul style="list-style-type: none"> ▶ 熔解标准 ▶ 最低/最高温度 ▶ 最优温度设置 ▶ 划线和分辨率阈值 ▶ 灵敏度 | |

如果一个对象可以作为模板使用或保存，那么在 LightCycler® 480 软件中该对象是打开的，“模板”按钮也是激活的。




通过使用“模板”按钮，您可以对当前打开的对象选择和应用一个模板，从而将当前打开的对象也保存为一个模板。

! 模板只能从软件中打开并激活的已有对象中创建。您无法从一个未打开及未激活的对象中创建模板。

使用模板和宏工作 创建和使用模板


- 1 打开或者创建将被用作模板的对象。
- 2 点击“作为模板保存”按钮打开“保存模板”对话框。
- 3 选择保存模板的位置，并在“名称”区域为模板输入一个名称。


 默认的模板名称就是当前实验的名称，后面通常再加上对象类型。所有模板的默认的保存位置是当前用户的选项设置中的模板文件夹。



- 4 点击 。

结果：模板被保存下来，对话框被关闭。

 当一个模板已经被保存到数据库后，您只能编辑（从资源管理器中）模板对象的模板名称以及该模板的注解。
如何使用模板：

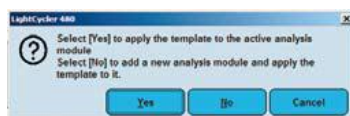
- 1 打开您希望使用模板的对象。
- 2 点击“使用模板”以打开“使用模板”对话框。在对话框中会显示包括您能使用的所有模板的列表。
- 3 在列表选择一个模板，然后点击 。这时对话框将关闭，而该模板将应用于已打开的对象。

 在使用任何模板的时候，一定要确保模板中的阻断尺寸与实验中将使用的阻断尺寸一致。

 当一个模板已经应用于一个对象后，您仍然可以对该对象进行手动的修改。

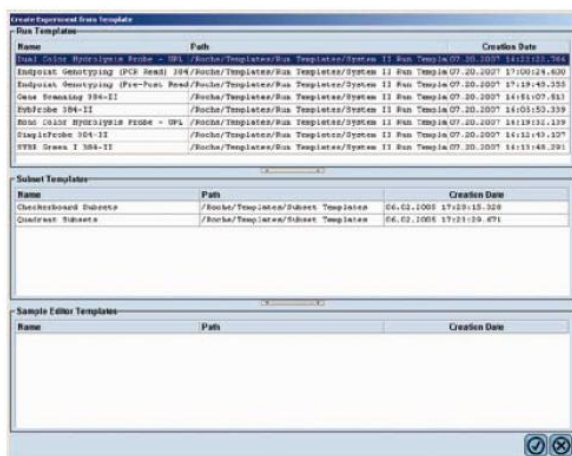
 如果您用于分析的模板与模板的分析类型不匹配，则系统会为您自动打开一个与类型相符的新的分析屏幕。


如果使用的分析模板与分析本身类型相符，则系统将显示一个对话框询问您希望将模板应用于当前分析或者创建一个新的分析：



如何通过模板创建实验：

- 1 点击“总述”窗口中的“通过模板新建实验”。
- 2 显示“通过模板新建实验”窗口。
- 3 “通过模板新建实验”窗口只显示与连接仪器相匹配的模板。



- 3 (可选) 从相关集合中选择一个运行模板。
- 4 (可选) 从相关集合中选择一个子集模板。
- 5 (可选) 从相关集合中选择一个样品编辑器模板。
- 6 点击 .

结果：创建实验。通过步骤 3-5 选择的模板将使用。显示“运行实验方案”。



8.2 创建和使用宏

模板是以单个项目为基础的，例如实验方案或包括您希望在另一个实验中使用的包括样品全部信息的样品表，而宏则是模板的集合。宏使得包括设置实验方案、输入样品信息、运行实验、进行分析以及产生报告等实验运行的整个过程全部自动化。您可以创建一个实验宏从而实现 LightCycler®480 实验运行和分析过程的完全自动化。

 当您通过实验室信息管理系统接口操作 LightCycler® 480 软件时尤其需要宏功能：使用实验室信息管理系统接口的客户端可以通过开启宏而远程操纵 LightCycler® 480 仪器的运行。

请阅读本节了解下列主题的更多相关信息：

- ▶ 创建实验宏
- ▶ 选择并运行实验宏

如何创建实验宏：


- 1 打开您准备用于创建宏的实验的“总结”框。
- 2 在“总结”框的“动作”栏中点击“作为宏保存”，这时系统会为您打开“保存宏”对话框。
- 3 当您从使用颜色补偿（CC）的实验中创建宏时，您可以选择是否将当前正在使用的颜色补偿对象集成到宏中或者是否在运行宏时自动选择颜色补偿对象。




如果您选择“自动选择颜色补偿”选项，将从数据库中可用的颜色补偿对象中自动选择一个颜色补偿对象。选择筛选条件为：

- ▶ 使用同一个仪器产生的颜色补偿对象
- ▶ 具有与宏相同颜色补偿标识符的颜色补偿对象（如果指定颜色补偿标识符）
- ▶ 最近创建的匹配上述两个条件的颜色补偿对象。

- 4 为宏输入一个名称并为其选择一个保存位置，然后点击 *OK*。（宏默认的保存位置是用户的“宏”文件夹，而宏的默认名称是“宏”以及后面的实验名称。当然，您也可以设定一个新的名称及保存位置。）


 可跟踪数据库中的宏必须有唯一的名称。当您使用与已有宏相同的名称保存宏时，将创建该宏的新版本并且老的版本将不会删除。在资源管理器中打开宏时，资源管理器将显示版本历史。只有当前版本的宏才能执行，并且只能编辑当前版本的注解。通过点击当前版本修订历史中的版本，可以在只读模式下查看宏以前的版本。当通过宏运行实验时，实验报告将包括该宏的版本。

 一旦您已经在可跟踪的数据库中保存了宏，那么您只能在资源管理器中编辑已保存宏对象的宏名称和注解。

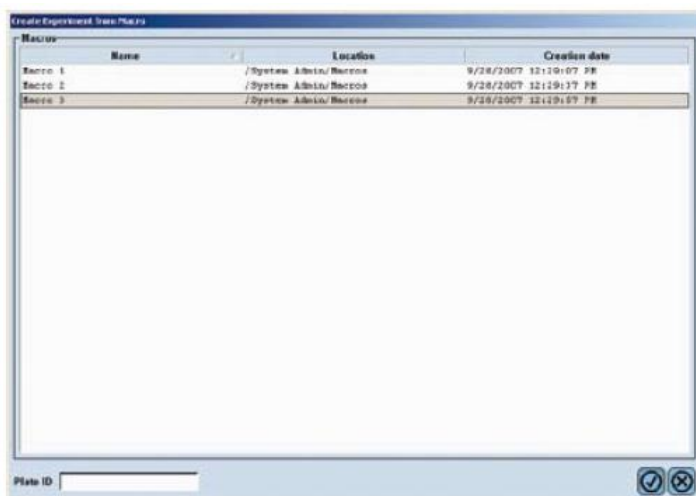
如何运行实验宏：

1 选择“总述”窗口。

2 点击“通过宏新建实验”打开宏对话框。

 只有当 *LightCycler*® 480 软件与实际仪器连接时，“通过宏新建实验”按钮才是激活的，并且仪器状态为“待机（无 MWP）”或者“待机（已装载 MWP）”。

3 在“宏”区域内，显示用户有权执行并且匹配已激活仪器的所有宏的列表。从该列表中选择一个宏。



4 (可选) 在“板标识符”区域中输入用于宏运行的“板标识符”。

5 点击“运行宏”。
软件将询问您实验的名称和位置。

6 软件检查仪器是否就绪以及板是否装载。
如果仪器未就绪，将要求您将板插入仪器并且点击确认按钮。
如果输入“板标识符”并且启用“条形码”，软件检查“板标识符”。如果“板标识符”不匹配，将不会启动宏并且打开一个信息框，告知“板标识符不匹配”。

使用模板和宏工作 创建和使用宏

7 如果仪器就绪，软件启动宏并执行以下步骤：

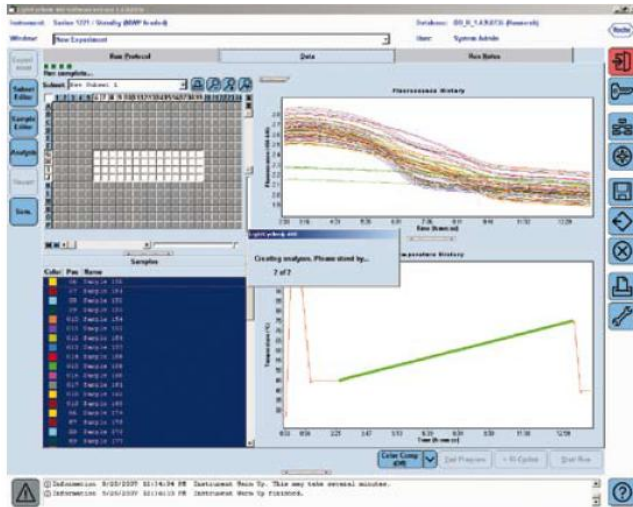
- ▶ 创建并打开新实验。
- ▶ 使用运行模板、子集模板和“样品编辑器”模板。
- ▶ 要求您在启动运行之前，对实验命名并保存实验。
- ▶ 启动运行。

在运行过程中，您仅限于访问实验数据。您可以使用以下功能：

- ▶ 您可以在“样品编辑器”中编辑样品名称和样品注释。
- ▶ 启用“导入”按钮。导入文件只能包含一般目录中样品名称和样品注解的数值。
- ▶ 您可以访问以下屏幕：
 - ▶ 您可以查看“总结”屏幕。
 - ▶ 您可以查看“实验”屏幕和“数据”表上的运行进度。您可以在图表中选择选项。
 - ▶ 您可以查看“子集编辑器”。
 - ▶ 您可以使用“中断运行”按钮中断运行。
 - ▶ 您可以查看“分析”屏幕。
- ▶ 您不能使用以下功能：
 - ▶ 您不能在“样品编辑器”中编辑除样品名称和样品注释以外的任何其他数值。
 - ▶ “配置属性”按钮禁用。
 - ▶ 在“总结”屏幕中，“作为宏保存”按钮禁用。
 - ▶ “子集编辑器”中的所有设置为只读。
 - ▶ “实验”屏幕中的所有设置和按钮禁用或者为只读，包括“颜色补偿”按钮、“运行注解”、“终止程序”按钮和“添加 10 个周期”按钮。
 - ▶ 在运行期间，您不能添加分析。
 - ▶ “报告”屏幕图标未激活。
 - ▶ 所有屏幕中的“使用/保存模板”按钮禁用。

8 当运行完成时，将自动保存实验。出现“等待”模式对话框。在该等待期间，软件执行以下步骤：

▶ 使用所有分析模板并计算每个分析。出现进度条。




▶ 如果您通过使用颜色补偿的实验创建宏，将询问您是否集成颜色补偿对象或者使用智能颜色补偿。

如果使用智能颜色补偿，相关的颜色补偿对象必须满足以下要求：


- ▶ 颜色补偿对象必须补偿所有可能的滤光片组合
- ▶ 颜色补偿对象必须对于当前已激活的仪器有效。
- ▶ 颜色补偿对象标识符必须匹配“样品编辑器”中指定的原始实验。
- ▶ 颜色补偿对象必须具有兼容的检测格式。


▶ 如果宏包含使用外部参考实验的相对定量分析模板或者终点法基因分型模板，将出现实验选择对话框。如果您取消该选择对话框，将不创建分析。

▶ 使用所有的报告模板。

 不自动产生报告。

▶ 保存实验。

 如果您正在操作可跟踪的数据库并且您在运行过程中已做出编辑，软件将显示对话框以便于您输入更改的原因。

 如果在分析创建或计算过程中出现任何错误，在宏运行结束时将出现对话框，显示遇到的所有错误。

9 在宏完成后，已保存的实验仍打开并且显示分析总述屏幕。

9. 使用子集工作

LightCycler® 480 软件的标准使用方式是同时对 PCR 多孔板上的所有样品进行分析。但是，您也可以定义样品子集，从而使软件只对特定子集中的样品进行分析。这一点非常有用，例如，通过使用子集，您就可以将多孔板的一部分用于目标基因的定量分析，而将同一个多孔板的另一部分针对一个不同的目标进行测试。

您也可以定义不同的样品子集，这样在结果（报告中就只显示指定的子集中）样品的数据了。报告也是基于选择的子集进行的；同一个子集可以同时定义成分析子集和报告基因菜单。在这种情况下，分析子集与报告基因菜单中包括的就是相同的样品了。当然，在报告中包括的样品子集也可与用于分析的样品子集不同。

例如，多孔板中的每一列可以用来分析不同的 SNP，而板中的每一行则可以代表不同的样品。在这种情况下，对于每一列而言可以使用一个分析子集，而每一行则可以使用一个报告基因菜单。

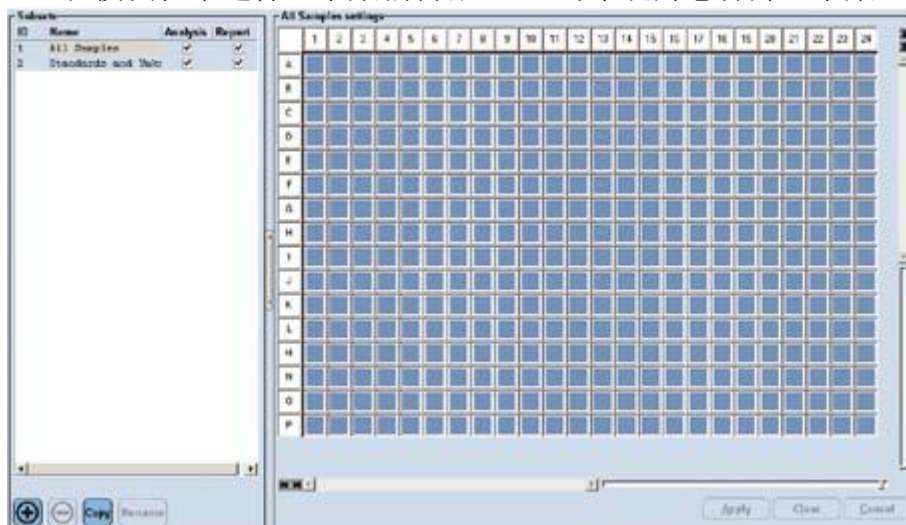
 相同的样品可以分配到两种类型（分析或报告）的多个子集中。

您可以使用“子集编辑器”来创建，修改和删除子集。您可以通过“数据”表、子集编辑器、分析模块及报告模块中的子集下拉列表来选择子集。

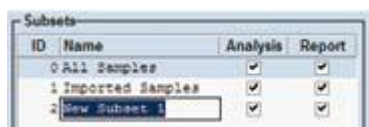
如何创建子集：

1 打开您希望定义子集的实验（或者创建一个新的实验）。

2 从模块栏中选择“子集编辑器”。这时系统为您打开“子集”窗口：




3 点击“新的”以激活子集列表中的一个新行或者点击“复制”以对当前正在使用的子集进行复制。



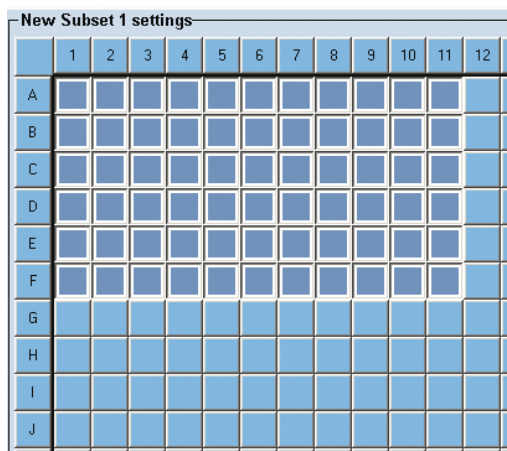
这时系统将自动为新行指定一个标识符。默认情况下，子集的类型为“分析”和“报告”。“名称”列是自动选择的，标识符号码则显示在“样品编辑器”中。

4# 按如下方式对子集进行定义：

- ▶ 为新的子集选择子集类型（报告，分析，或二者皆选）。
- ▶ 为该子集输入名称。


 子集的名称最多可使用 25 个字符。

- ▶ 在多孔板图像中，选择您想将其包括在子集中的样品。点击单个孔的位置以将其选入样品（子集），或者点击列或行按钮以选择某列或某行的全部样品。您还可以将鼠标指针拖动一定区域，这样该区域包括的全部样品就会被同时选入子集了。在拖动鼠标过程中，选定的孔将以蓝黑色显示。



- ▶ 点击“应用”将选定的孔添加到子集中。
- ▶ 点击“清除”以取消您刚才所做的选择。

5# 选择完成后，点击“一般动作”区域的“保存”按钮对含有新的子集的实验进行保存。

 子集具有实验特异性。通过使用模板功能，您可以将一个子集使用于不同的实验中。

如何对子集进行修改或重新命名：


1# 打开包含您希望修改的子集的实验。

2# 从模块栏中选择“子集编辑器”。这时系统为您打开“子集”窗口。

3# 在子集列表中，选择您希望进行修改的子集。

4# 按如下方式对子集进行修改：

- ▶ 如果需要的话，您可以将子集的类型进行选定或去除（报告，分析，或二者皆选）。
- ▶ 如果您需要修改子集名称的话，请点“重新命名”或直接点击子集的名称。
- ▶ 点击多孔板中孔的位置并点击“使用”以将其添加到子集中或从子集中去掉（点击后会将添加到子集或从子集中去掉取决于它们在此之前已经被选定或未被选定）。
- ▶ 点击“清除”可以将多孔板中所有的孔全部从子集中清除。
- ▶ 点击“删除”则可以将一个子集删除。

 如果一个子集已经运用于分析中，那么您就无法再对其进行修改，重新命名或删除了。在样品列表中，锁定的子集以高亮度进行显示。

| ID | Name | Analysis | Report | |
|----|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|
| 0 | All Samples | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 1 | 28-CC-SC1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | ← Editable |
| 2 | 28-CC-SC2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | ← Locked |
| 3 | 28-CC-F2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |

5 完成后，点击“一般动作”区域的“保存”按钮对含有修改过的子集的实验进行保存。

10. 使用图表工作

在实验运行期间或完成之后，LightCycler® 480 基础软件将产生多种图表，它们是实验分析的一部分。通过图表，您可以查看下列类型的信息：

- ▶ 程序时间、温度循环以及数据采集点。
- ▶ 从一个实验中采集的数据。
- ▶ 按分析模块列出的图表以显示信息与结果。

您可以打印图表，也可以将其导出成各种图形格式，以及对图表图象及数据进行复制和粘贴等操作。图表具有变焦与变位功能，因此您可以对图表中的细节进行放大以便查看，也可以将图表左右移动。用鼠标右键点击图表即可显示部分或全部可用的图表操作菜单。一般情况地，该菜单提供下列选项：

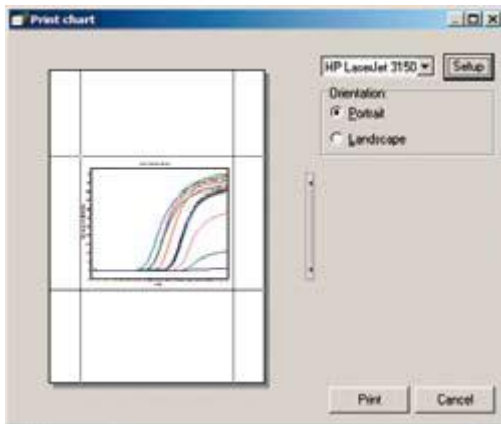
| 选项 | 描述： |
|--------|--|
| 样品选项 | 为您打开图表 选项编辑器。如需更多信息，请参考“覆盖默认的图表选项”一节中相关内容。为您打开样品选项编辑器。如需更多信息，请参考“覆盖默认的图表选项”一节中相关内容。” 打开资源管理器，以使用户可以选择一种样品选项。如需更多信息，请参考“使用样品选项”一节中的相关内容。打开“保存”对话框，以使用户可以将当前实验中的样品设置作为一个样品选项对象进行保存。从当前默认的样品选项对象中恢复样品设置。打开“打印”对话框以使用户可以打印图表。打开“导出”对话框以使用户可以将某图表的图形数据导出。将图表数据复制到粘贴板。 在当前图表中显示图例。 |
| 样品选项 | |
| 载入样品选项 | |
| 保存样品选项 | |
| 清除样品选项 | |
| 打印 | |
| 导出 | |
| 复制到粘贴板 | |
| 显示图例 | |

10.1 打印、导出与复制图表

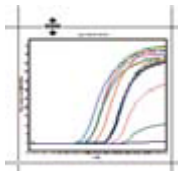
您可以打印 LightCycler® 480 基础软件中任何一个图表。您也可以将图表图形或数据单独导出或将图形和数据单独复制并粘贴到其他程序中。

如何打印图表：

- 1# 显示您希望打印的图表。
- 2# 在图表界限内点击鼠标右键，然后选择“打印”。这时系统会为您打开“创建”窗口。



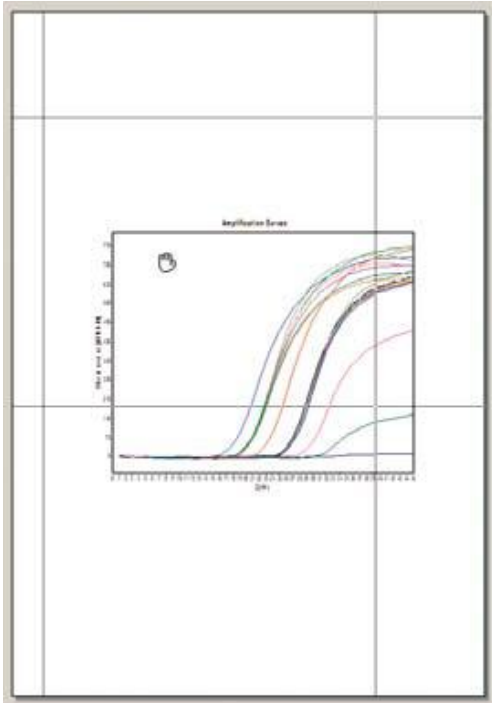
- 3# 如果您想更改图形边界从而改变其大小的话，请点击围绕图形边界的灰色边线并拖动之。注意：这时鼠标箭头的形状将发生改变以便提示您可以对边线进行拖动操作了。



- 您可以调整对话框的大小以便更容易地调整图形边线。

1

- 4 如果您想改变图形在页面上的位置，可以将鼠标指针定位于图形上方。这时鼠标箭头会变成一个手的形状。点击并将图形边线拖动到新的位置。松开鼠标左键，这样图形就被移动到新位置了。



- 5 如果需要的话，您还可以从下拉列表中选择一台打印机。该下拉列表显示的内容取决于在您连接到系统的打印机（的数量和型号）。默认情况下的打印机是 Windows 打印机。



- 6 如果您想改变打印机配置选项，请点击“创建”。这时系统为您打开标准的打印机创建对话框。在对话框中输入必要的信息，然后点击 *OK*。选择打印纸定位（横向或纵向），然后点击“打印”。

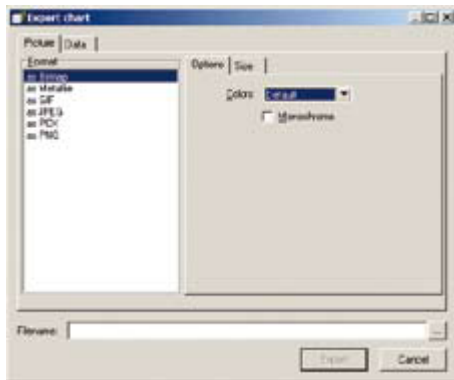
如何导出—幅图表图形：

1# 显示您希望导出的图表。

1

2# 在图表界限内点击鼠标右键，然后选择“导出”。这时系统为您打开“导出”对话框。

2




3# 在“图画”表的“格式”下方，选择您导出图表所要用的图形格式。

4# 如果在（右侧）有“选项”表的话，您可以对这些选项进行适当选择。如果有表显示的话，其选项内容也会随着您选择的图形格式的不同而有所变化。

5# 如果您想改变导出的图形的大小，请点击“大小”表，然后输入新的高度值和宽度值。如果您想保持图表的比例的话，请选中“保持外观的比例”。

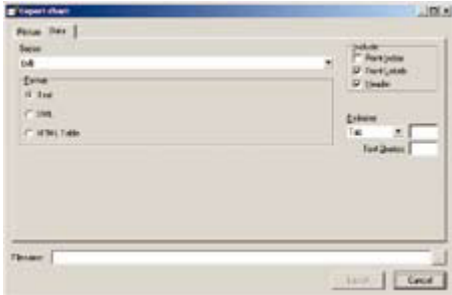


6# 点击  按钮（在文件名称右侧），打开“选择输出文件”对话框。浏览到您希望保存导出的图表图形的位置，为该图形输入名称，然后点击“保存”。

7# 点击“导出”以完成对图表的导出。


如何导出图表数据：

- 1# 显示包括您希望进行数据导出的图表。
- 2# 在图表界限内点击鼠标右键，然后选择“导出”。这时系统为您打开“导出”对话框。
- 3# 选择“数据”表。



- 4# 在“系列”对话框，选择您希望导出的数据项目，其中可供选择的项目随着图表类型的不同而有相应变化。



- 5# 在“包括”对话框中，选择与数据一起导出的文本标签。
- 6# 在“格式”框中，选择您导出数据时所希望使用的格式。您可以选择的格式包括：纯文本文件，XML 文件，以及 HTML 表。
- 7# 如果您选择文本作为导出格式，则应在“分隔符”对话框中选择一种分隔符。可供选择的分隔符有空格、制表符、逗号或者定制某种分隔符。在“分隔符”对话框中输入您定制的分隔符。
- 8# 点击  按钮（在文件名称右侧），打开“选择输出文件”对话框。
- 9# 浏览到您希望保存导出的图表数据的位置，为该数据文件输入名称，然后点击“保存”。
- 10# 点击“导出”以完成数据的导出。

如何复制图表图形或图表数据

- 1# 显示您希望复制的图表。
- 2# 在图表界限内点击鼠标右键，然后选择“复制到粘贴板”。这时图表会以点图保存，而数据则以文本保存。
- 3# 对图表图形进行粘贴时，应先打开图片应用程序（例如画板），然后按下键盘的 <Ctrl-V> 即可。
- 4# 对图表数据进行粘贴时，应先打开一文本编辑程序（例如便笺程序），然后按下键盘的 <Ctrl-V> 即可。

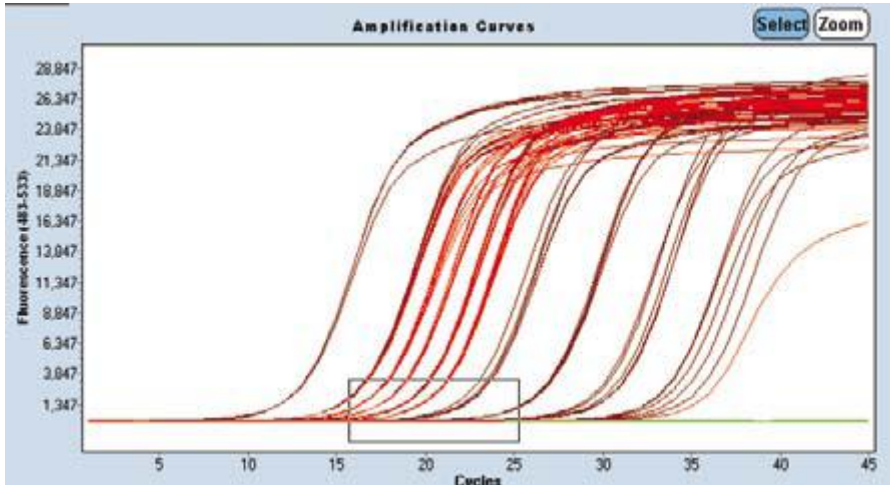
10.2 变焦和变位以查看图表细节

您可以对图表的一部分进行任意倍数的放大，从而查看重要的细节信息。如果您使用的是三按键的鼠标，则可以将图表向任何方向移动从而查看那些位于窗口外的内容。请按照如下步骤以对图表细节进行放大（变焦）或者对图表进行移动（变位）。

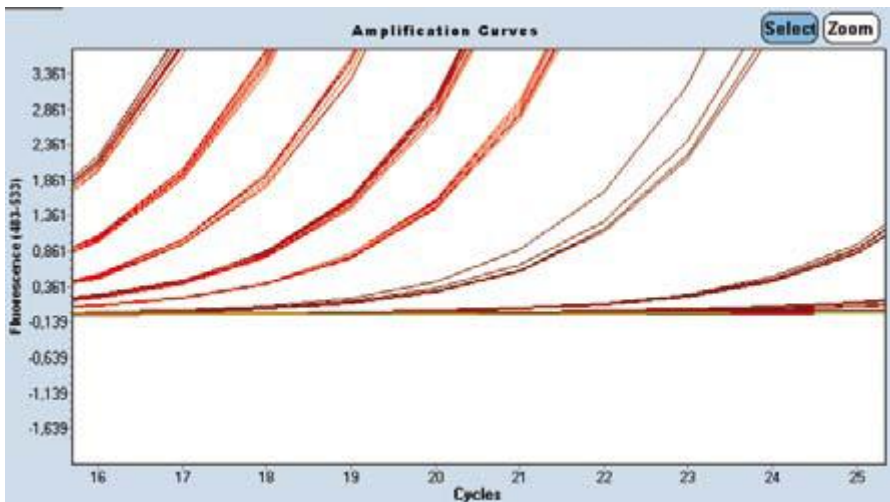
如何调整大小（变焦）：

- 1# 将鼠标指针放到您想放大的图表区域的左上方。
- 2# 点击并将鼠标指针向右、向下拖动。（这时鼠标指针变成矩形）

1



当矩形框覆盖了你想要放大的区域。松开鼠标，矩形框里的区域被放大填满工作窗格。



- 3# 必要时重复步骤 2，直到您将图表细节放大到所希望的倍数为止。
- 4# 如果想将图表恢复到原来大小，点击并将鼠标指针向上、向左拖动即可。（仅当您需要将图表恢复成原大小时才需要执行这一操作。）

4

如何移动图表位置（变位）：

如果您想查看目前没有显示在窗口内的图表区域时，可以使用鼠标的中间键对图表进行操作。用其对图表进行拖动，直到您想看的图表区域显示到窗口内为止。



您可以对双键鼠标进行设置，例如设置成同时点击两个键时产生等同于点击三键鼠标中间键的效果。进行这种设置时，请向系统管理员请教或者参考您鼠标的仪器驱动指南。

11 使用表格工作

LightCycler® 480 软件使用具有各种布局的表格。

在本文档的相应章节中说明了各种表格的操作。本节为您提供适用于所有表格的一般信息。

如何导出表格数据：

| | |
|----------|---|
| 1 | 在表格区域点击鼠标右键，比如，“分析”屏幕中的“样品”表。 |
| 2 | 选择“导出表格”。将打开“保存表格数据”窗口。 |
| 3 | 输入表格导出的文件名和位置并确认。 如果表格包含实验信息，则导出文件的第一行将包含检测格式的名称和实验相应的滤光片。第一或第二行包含文件的列文件头。表格的数据行为分隔的选项卡。 |

如何按照列对表格排序：

| | |
|----------|------------------------------|
| 1 | 点击表格的列表头。 将按照升序或降序对相关列排序。 |
|----------|------------------------------|

如何按照板行或板列对样品表数据排序：

| | |
|----------|---|
| 1 | 点击样品表的“位置”表头。 “位置”列将按照板行或板列对“位置”列排序。 |
|----------|---|

如何更改表格列的宽度：

| | |
|----------|--|
| 1 | 将鼠标指针移动至您想更改的表格头边框上。 |
| 2 | 如果光标变成带左右箭头的列，通过按下鼠标左键拖动鼠标直到该列具有理想的宽度。 |

如何将表格区复制到剪贴板：

| | |
|----------|---|
| 1 | 为了从表格中选择您想复制的单元，点击并拖动鼠标或者按下<Shift>并点击鼠标。 |
| 2 | 按下<Ctrl-C>。 剪贴板将包含所选的单元。 |
| 3 | 启动您的目标应用程序（MS Excel、WordPad）并按下<Ctrl-V>。 复制的表格单元将出现在您的应用程序中。 |

使用表格工作

如何在“样品编辑器”中按照剪贴板数据选择样品：

| | |
|---|---|
| 1 | 启动应用程序，比如，MS Excel 或 WordPad。 |
| 2 | 在新行中键入每个样品位置，比如，A2、A3、B2、B3。 |
| 3 | 在完成后，选择所有行并通过按下<Ctrl-C>对其复制。 剪贴板将包含所选的行。 |
| 4 | 为了粘贴样品位置数据，转至 LightCycler® 480 软件窗口并按下<Ctrl-V>。 |

12. 生成报告

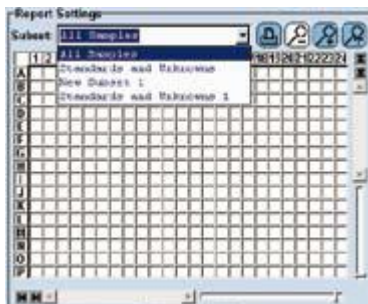
当您对实验分析完毕后，系统可以产生为您生成一份包括实验一般信息及分析结果的分析报告。您可以对下列内容进行选择从而对报告进行定制：

- ▶ 实验总结信息（例如名称和日期等）
- ▶ 实验方案
- ▶ 样品信息
- ▶ 仪器信息
- ▶ 修改史表
- ▶ 分析结果及其他分析项目，例如统计学项目与设置等（您实际可以选择的项目取决于分析的类型）

您可以指定在报告中以及打印时这些项目的先后顺序。

如何生成和打印一份报告：

- 1 打开包括一个或多个分析模块的实验或者保存您当前打开的实验。
- 2 点击“模块”栏中的“报告”按钮。这时系统将在工作框中为您打开“报告”窗口。窗口左侧有“报告设置”供您选择。
- 3 您必须首先将一个实验保存下来，这样报告按钮才可以被激活。
- 3 首先从“子集”列表中选择报告基因菜单：




- 3 您只能从报告基因菜单中选择子集，而不能从分析子集中进行选择。

4 “一般”和“详细”表中提供了可供选择的报告项目列表，其中一些是默认情况下就选定的。列表中这些项目的顺序与报告中项目的顺序是一致的。

“一般”表中报告部分的列表通常包括下列内容：

- ▶ 标记有实验名称的一般性信息部分
- ▶ 选定子集中样品中所做的各种类型分析的分析部分

 在选定的报告基因菜单中，必须至少有一个样品已经进行过分析，否则在列表中不会有分析部分。

在“详细”表中报告部分的列表通常包括下列内容：

- ▶ 标记有实验名称的一般性信息
- ▶ 子集中的样品已经做过的分析的分析部分；如果在这些样品上已经多次进行同种类型的分析的话，则会有多个属于同种类型的分析部分。




5 在列表中进行项目选择，以在报告中包括之或去除之。如果您选择了一个部分，则该部分下的所有分项目就自动地被全部选择了。

 注意：如果您在“一般”表中对设置进行了修改，则在“详细”表中的相同部分或分项目就同时被修改了。

6 如果您想对某项目在报告中的位置进行调整，则在“详细”表中对该项目点击并将其拖动到列表中新的位置即可。报告的项目及分项目均可以进行拖动。

 您无法在“一般”表中对项目的顺序进行更改。

 系统不允许将一个项目拖动到与其无隶属关系的类别中。例如，您无法将实验结果从熔解温度分析拖动到绝对定量分析中。

7 点击“一般动作”栏中的“保存”按钮，从而将改变后的报告设置与实验一起保存起来。这时系统会要求您输入修改注解。下次当您生成报告时，使用的就是这些修改后的报告设置了。

8+ 如果您保存了修改后的设置后又希望恢复其默认设置，则应点击“默认设置”。关闭“报告”窗口并重新打开它。这样默认设置就被恢复了。

9# 点击“生成”以查看报告：

View Report

Zoom (Fit Page) Page 1 of 8 PDF

LightCycler[®] 480 Software

Report

Demo Abs Quant with SYBR Green I (1)

Experiment

| | | | |
|---------------|--|--------------------|---------------------|
| Creation Date | 09.06.2005 09:50:03 | Last Modified Date | 25.09.2007 16:17:45 |
| Operator | Demo | Owner | System Admin |
| Start Time | 09.06.2005 11:24:49 | End Time | 09.06.2005 12:26:55 |
| Run State | Completed | Software Version | HTC1 0.5.1.53 |
| Macro | | Macro Owner | |
| Macro Status | | | |
| Templates | | Plate ID | |
| Test ID | | Lot ID | |
| Color Comp ID | | | |
| Run Notes | Detection Format SYBR Green I Absolute Quantification with standard dilutions in the same run. Melting Curve Analysis to identify specific product (and possibly primer dimers). | | |

Programs

Program Name Pre-incubation

| | | | | | | | |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| Cycles | 1 | Analysis Mode | None | | | | |
| Target (°C) | Acquisition Mode | Hold (hh:mm:ss) | Ramp Rate (°C/s) | Acquisitions (per °C) | Sec Target (°C) | Step size (°C) | Step Delay (cycles) |
| 95 | None | 00:05:00 | 4,8 | | 0 | 0 | 0 |

Program Name Amplification

| | | | | | | | |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| Cycles | 45 | Analysis Mode | Quantification | | | | |
| Target (°C) | Acquisition Mode | Hold (hh:mm:ss) | Ramp Rate (°C/s) | Acquisitions (per °C) | Sec Target (°C) | Step size (°C) | Step Delay (cycles) |
| 95 | None | 00:00:10 | 4,8 | | 0 | 0 | 0 |
| 80 | None | 00:00:10 | 2,5 | | 0 | 0 | 0 |
| 72 | Single | 00:00:20 | 4,8 | | 0 | 0 | 0 |

Program Name Melting Curve

| | | | | | | | |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| Cycles | 1 | Analysis Mode | Melting Curves | | | | |
| Target (°C) | Acquisition Mode | Hold (hh:mm:ss) | Ramp Rate (°C/s) | Acquisitions (per °C) | Sec Target (°C) | Step size (°C) | Step Delay (cycles) |
| 95 | None | 00:00:10 | 4,8 | | 0 | 0 | 0 |
| 65 | None | 00:01:00 | 2,5 | | 0 | 0 | 0 |
| 95 | Continuous | | | 5 | 0 | 0 | 0 |

Program Name Cooling

| | | | |
|--------|---|---------------|------|
| Cycles | 1 | Analysis Mode | None |
|--------|---|---------------|------|

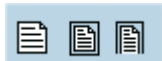
Demo Abs Quant with SYBR Green I (1) 27.09.2007 Page 1 of 8

10# 您可以使用“工具”窗口中的“报告设置”表以在生成的报告中不显示罗氏图标。(如需详细信息，请参考“管理工具”一节中的相关内容。)

10# 如果想查看报告的其他页，请使用页码前进或后退操作按钮：




11# 如果您想改变报告在窗口中显示的尺寸，则请点击以下按钮之一：



- ▶ 第一个按钮的功能是按照打印尺寸显示报告。
- ▶ 第二个按钮的功能是使整个报告页面与窗口相适应。
- ▶ 第三个按钮的功能是使报告页面的宽度与窗口相适应。

或选择

| |
|-----------------|
| Zoom (Fit Page) |
| 25% |
| 50% |
| 75% |
| Actual Size |
| 125% |
| 150% |
| 175% |
| 200% |
| 225% |
| 250% |
| Fit Width |
| Fit Page |

12 如果需要打印报告，请点击位于报告窗口最上方的打印机图标 。


13. 使用选项“Preference”工作

LightCycler® 480 基础软件为您提供了如下的选项，通过这些选项您就可以对图表和样品等进行定制并设定不同的默认选项：

- ▶ 图表选项决定了您的图表的默认显示方式与内容。
- ▶ 样品选项决定在“样品编辑器”中的默认样品名称以及图表中样品的默认颜色与线条类型。
- ▶ 用户选项决定默认的导入与导出目录及其他设置。

选项项目位于 LightCycler® 480 基础软件资料管理器的用户文件夹的选项文件夹。当您打开一个选项项目时，系统将在主窗口中为您打开一个窗口，通过此窗口您就可以对选项进行设置了。

您可以对多个图表及样品各自进行不同的设置。您也可以指定将哪个项目做为默认值。

 表单选项中包含的是关于上一屏幕设定的信息，它是无法被编辑的。

如果一个特定类型（例如图表）的全部选项项目都被删除了，那么下次您登录时 LightCycler® 480 基础软件将为其创建新的默认选项项目。

本节主要阐述如何进行下述操作：

- ▶ 每种类型选项的使用
- ▶ 创建数个选项实例，并将其中一个设置为该选项类型的默认值

13.1 使用图表选项

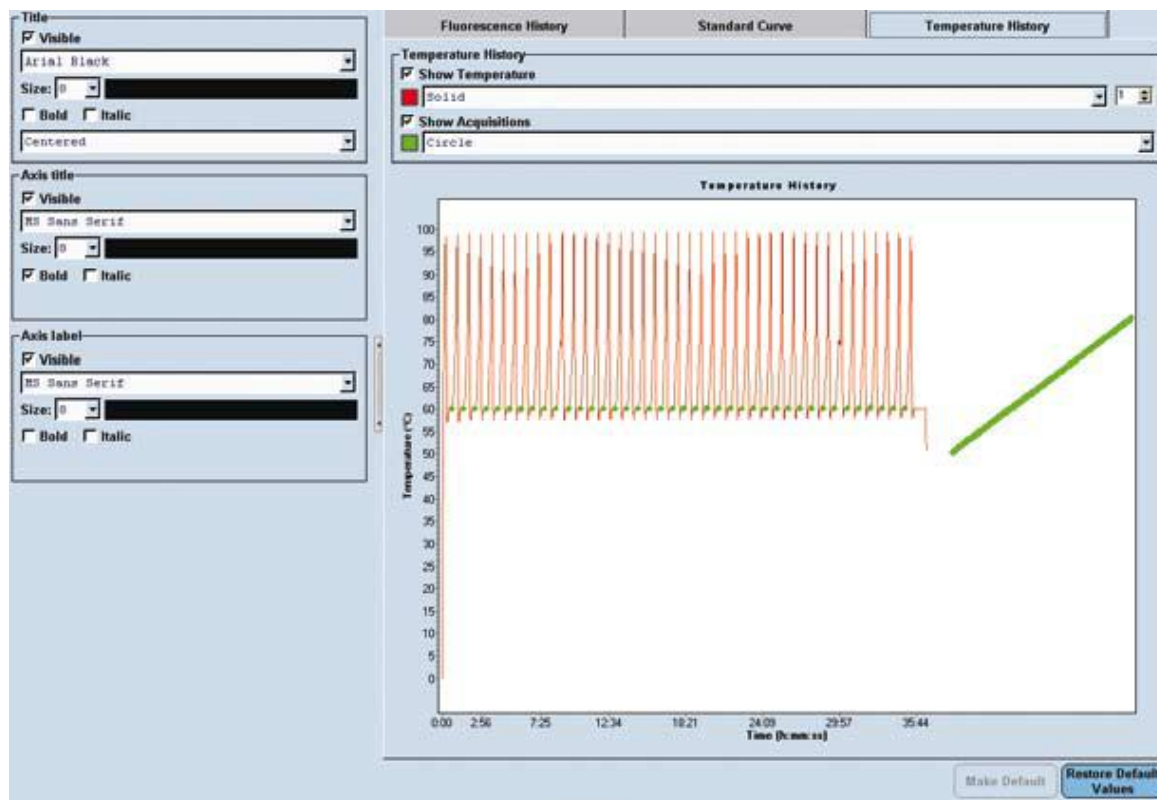
您的用户帐户包含有图表选项项目，这些项目决定了您的图表的默认显示方式及内容。如果需要，您可以修改图表的默认设置。


您也可以将一个图表选项项目修改后的版本使用新名称加以保存，并将其作为默认值使用。您可以随意地创建不同的图表选项项目，每个项目都可以为您的图表定义一种特定的外观及感觉。如需更多信息，请参考“[创建一个单独的选项项目并将其设置为默认](#)”一节中相关内容。您可以覆盖单独的图表、分析或者实验当前图表选项；如需更多信息，请参考“[覆盖默认的样品选项](#)”一节中相关内容。

 当您想取消所做的修改并将其恢复为初始值时，只需点击“恢复默认值”即可。

如何打开图表选项项目：

- 1# 从 LightCycler® 480 基础软件的资料管理器中，打开您用户文件夹下的“选项”子文件夹。
- 2# 双击图表选项。这时系统在主窗口中为您打开“图表选项”窗口。
- 3# 通过“图表选项”窗口，您可以定制图表的如下设置：
 - ▶ 图表表头及标记类型（使用左边的三个区段）。
 - ▶ 指定类型图表中显示的内容及外观（使用右边的表）。



 曝光时间史表中没有图表选项。

13.1.1 设定图表表头及标签类型

使用窗口中如下三个选择框对图表表头及标签进行修改：

- | | |
|------------|-------------------------------|
| <i>标题</i> | 设定图表标题的外观。 |
| <i>轴标题</i> | 设定图表的 X 轴下方及 Y 轴左方文本外观。 |
| <i>轴标签</i> | 设定轴上测量值（例如荧光图表中 X 轴上的时间点）的外观。 |

除了标题部分中包括一个有关标题位置的选项外，这三个部分的其他格式选项是一样的。

如何设定表头与标签类型：

1# 选择或去掉“*可视化*”选择框以在图表中包括或去掉这一类型的文本。

2# 按如下方式设定文本外观：

- ▶ 在第一个选择框的下拉列表中选择字体。
- ▶ 从“大小”选择框的下拉列表中选择字号，也可以直接输入一字号数值。
- ▶ 如果您想改变文本颜色，请点击“大小”选择框右边的颜色条以显示颜色调色板。请从调色板中选择您需要的颜色，然后点击 OK。
- ▶ 如果想要粗体的或斜体的文本，请点击“粗体”或“斜体”选择框（或同时选择二者）。
- ▶ （仅对于标题而言）如果您想对图表标题进行定位，请在最后一个选择框的下拉列表中为其选择一个位置（左，右或中间）。

3# 点击“*一般动作*”栏中的“*保存*”按钮以对您的设置进行保存。

13.1.2 设定荧光图表的内容

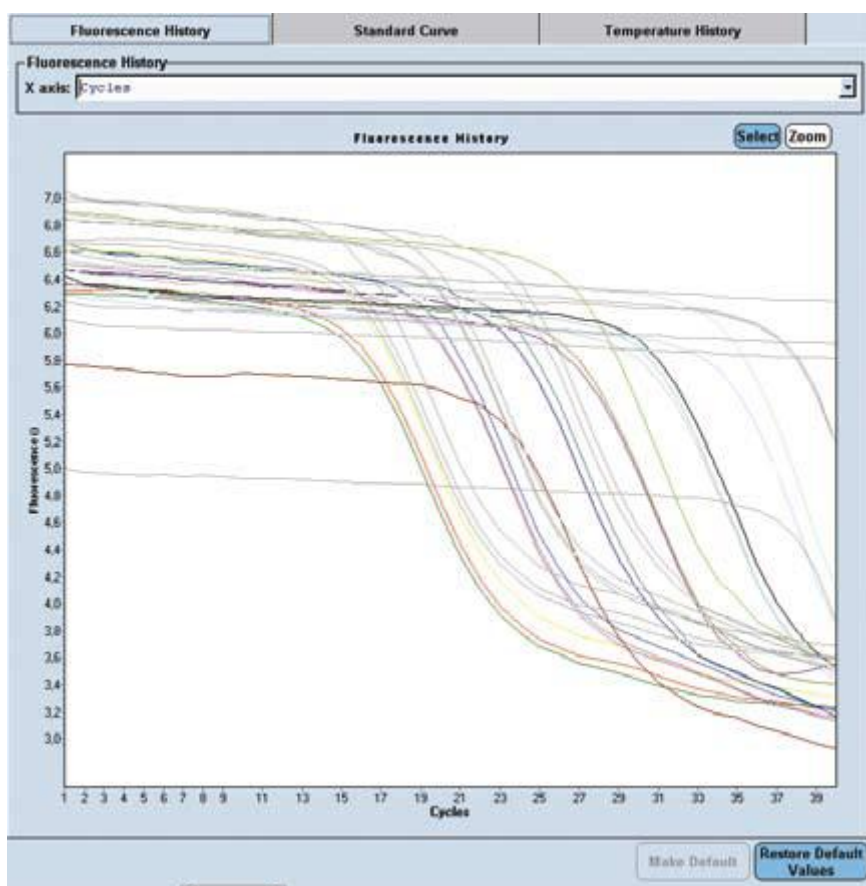
通过图表窗口的荧光表，您可以控制在荧光史表中的荧光数据的默认显示外观。荧光史表显示于实验模块的数据表中。

- ▶ 荧光史表的默认轴数据是以荧光强度对时间、循环或温度制图。
- ▶ “当前荧光”栏中的默认信道图表显示每种样品及每个信道在特定采集点的荧光强度

两个图表均显示于“运行”模块的“在线数据显示”表以及“总结”模块的“原始数据”表中。

如何设定荧光图表信息：

- 1# 选择“荧光”表（如果尚未选择的话）。
- 2# 在荧光史表选择框中，从下拉列表中为 X 轴选择一数值。



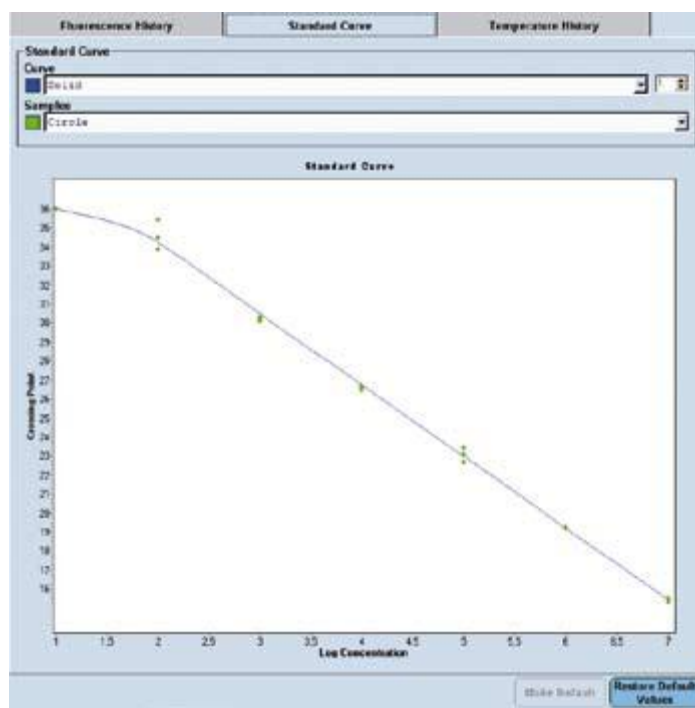
- 3# 点击“一般动作”栏中的“保存”按钮以对您的设置进行保存。

13.1.3 设定标准曲线图表的外观

用户可以通过“图表选项”窗口的“标准曲线”表来调整定量分析时的标准曲线图表的外观。您可以指定曲线的外观以及作曲线时所用的样品点的外观。

如何设定标准曲线与样品点的外观：

1# 选择“标准曲线”表。



2# 您可以使用如下方式对曲线的外观进行修改：

- ▶ 如要指定线条颜色，请点击“曲线”下的“颜色选择”框以显示颜色调色板，从中选择一种颜色，然后点击 *OK*。
- ▶ 如要指定线条类型，请从下拉列表中选择一种类型。
- ▶ 如要指定线条宽度，输入或直接选择线条宽度值。

3# 您可以使用如下方式对样品点的外观进行修改：

- ▶ 如要指定点的颜色，请点击“样品”下面的颜色框以显示颜色调色板，从中选择一种颜色，然后点击 *OK*。
- ▶ 如要指定点的类型，请从下拉列表中选择一种类型。

4# 点击“一般动作”栏中的“保存”按钮以对您的设置进行保存。

13.1.4 设定温度图表的内容与外观

用户可以通过“**图表选项**”窗口中的“**温度**”表来控制温度史表（它主要显示温度读数以及荧光采集点）的外观。该图表显示于“**运行实验方案**”表（以“**总述**”为标记）以及“**数据**”表中。

如何设定温度图表的内容与外观：

- 1# 选择“**温度**”表。
- 2# 如果要在其中显示或/不显示温度读数，选定或去掉“**显示温度**”框即可。
- 3# 该图表中的温度线的外观可通过如下方式进行调整：
 - ▶ 如要指定**线条颜色**，请点击“**显示温度**”下的颜色框以打开颜色调色板，从中选择一种颜色，然后点击 *OK*。
 - ▶ 如要指定**线条类型**，请从下拉列表中选择一种类型。
 - ▶ 如要指定**线条宽度**，输入或直接选择线条宽度值。
- 4# 如果要在其中显示/不显示荧光采集点，选定或去掉“**显示采集点**”框即可。
- 5# 如何设定图表中采集点的外观：
 - ▶ 如要指定点的颜色，请点击“**显示采集点**”下的颜色框以打开颜色调色板，从中选择一种颜色，然后点击 *OK*。
 - ▶ 如要指定点的类型，请从下拉列表中选择一种类型。
- 6 点击“**一般动作**”栏中的“**保存**”按钮以对您的设置进行保存。

13.1.5 覆盖默认的图表选项

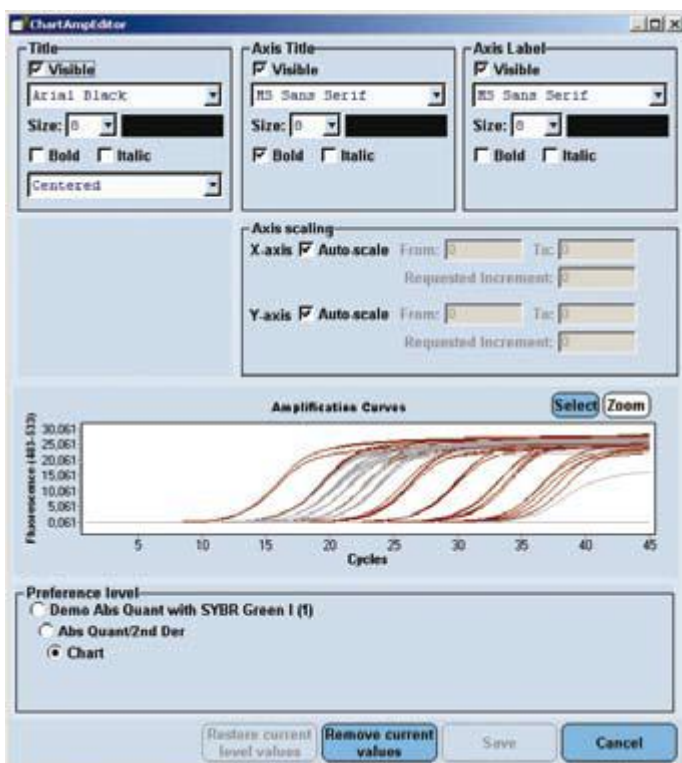
某些情况下，您可能需要使用与您在图表选项项目中设置的默认值不同的图表、分析或实验。您可以在以下几个层次上对默认设置进行覆盖：

- ▶ 单个图表
- ▶ 某分析中的所有图表
- ▶ 某实验中的所有图表

当您在这三个层次中任何一个层次中设定了定制设置的话，那么新的设置将覆盖同一层次上的图表的默认值。

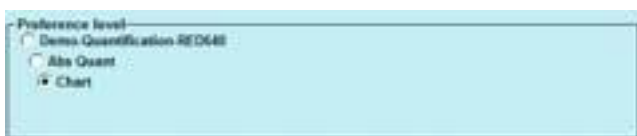
如何覆盖图表选项：

- 1 打开实验，右键点击您希望修改的图表。如果您要覆盖一个分析内的或一个实验内的全部选项，可以在分析内或实验内点击任意一个图表。
- 2# 选择图表选项 打开“**图表选项**”对话框，框中包括关于**图表**的类型等**选项**（与上文讨论的图表选项相似）。但是，在此对话框中包括多一个关于设定图表的 X 轴和 Y 轴刻度的选项。



3# 当进行准备进行任何修改时，您必须首先选定在哪一个层次上进行修改。
在“选项层次”区域，从如下选项中选择：

- ▶ 使用设置的实验名称以使当前实验的所有图表均使用新设置
- ▶ 使用分析的名称以使当前分析中的所有图表均使用新设置（当进行这种选择时，您必须首先从分析图表中打开了相应菜单）
- ▶ 进行图表设置，这时新的设置只用于当前图表



! 每次只能对一个层次的设置进行保存。这就是说，当您在图表层次对设置进行了修改，然后又选择了分析层次做了更多修改然后点击“保存”，最后将只有分析层次中所做的修改会被保存下来。在高一级层次所做的设置不会覆盖保存在低一级层次的设置。例如，如果您在图表层次将某标准曲线标题的颜色修改成了蓝色并且保存了设置，然后您又在实验层次将标题颜色修改成了绿色并保存了设置，这时标准曲线的颜色仍将为蓝色，它不会变成绿色。

4# 如果需要的话，用户也可以对图表标题的、坐标轴标题的以及坐标轴标签的文本的颜色设置进行修改。如需更多信息，请参考“设定图表表头及标签类型”一节中相关内容。

5 在“标题”区段下方的图表-特异性设置选项框中进行修改。该选项随着图表的类型不同而有所不同。某些类型的图表没有图表特异性设置。

6 在坐标轴尺度区域，设定 X 轴、Y 轴以及轴标度的增量大小。
▶ 如果您将增加量的值选择为 0，则系统将自动决定增加量的值。

►如果您设置的增加幅度太小以至于标签互相重叠，则系统将忽略您设置的增加幅度值并自动对其进行设置。

7 当您想取消所做的修改并将其恢复为初始值时，只需点击“*恢复当前层次值*”即可。

8# 完成后，点击“*保存*”。

覆盖图表选项的例子：

1# 从“*绝对定量分析*”模块中以右键点击扩增曲线图表并选择“*图表选项*”。

2# 默认情况下选择的是图表层次；去掉“*自动-标度*”选项，并将标度范围设置为 1 至 50，然后对该设置进行保存。

3 重新打开图表选项，选择绝对定量分析层次，去掉“*自动-标度*”选项，并将标度范围设置为 1 至 100，然后对该设置进行保存。结果：现在扩增曲线图表的标度范围是 1 至 50。分析模块中所有其他图表（例如：*标准曲线图表*）的标度范围则为 1 至 100。

4 重新打开图表选项（默认情况下的选择的为图表层次），点击“*取消当前值*”，然后保存设置。结果：现在*扩增曲线图表*的标度范围是 1 至 100。对图表层次所做的设置已经被取消，因此使用其上一个层次（分析层次）的设置值。

5 重新打开图表选项（默认情况下选择的是*图表层次*），并将标度范围设置为 1 至 150，点击“*恢复当前层次值*”，然后关闭对话框。结果：扩增曲线图表的标度范围仍为 1 至 100，因为刚才的操作中并未对 1 至 150 的设置进行保存。当您点击“*恢复当前层次值*”后，系统就将该值恢复为您上一次所保存的设置（1 至 100）。

13.1.6 创建单独的图表选项项目并将其作为默认项目

您可以创建多个图表选项项目并指定其中一个项目用作默认项目。只要需要，您可以随时更改默认的指定项目。如果您删除某个图表选项项目的所有实例，软件将在您下一次登录时创建新的默认项目。这些设置为应用默认设置。

创建单独的图表选项项目并将其作为默认项目：

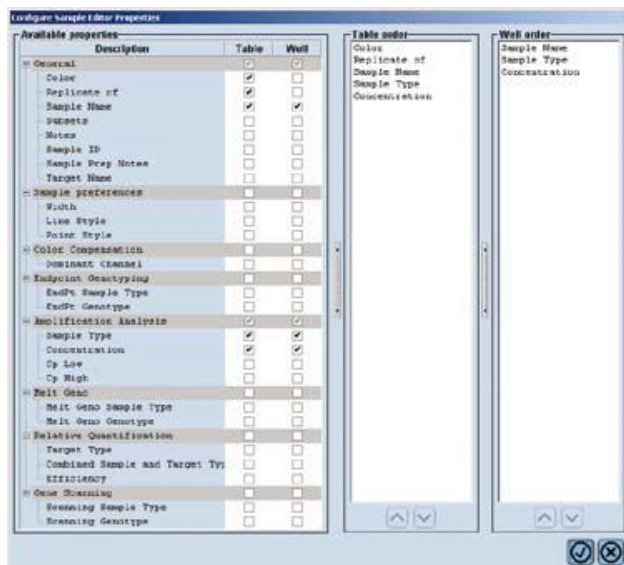
- 1 在 LightCycler® 480 软件“导航条”内您的用户文件夹中，打开“选项”子文件夹。
- 2 针对“图表选项”选择默认项目并复制该项目：导航至某个位置以保存该项目，为新的选项项目输入名称并点击“保存”。
- 3 按照前面章节中所述，打开选项项目并修改选项。
- 4 为了将该选项项目指定为默认项目，点击“选项编辑器”窗格内的“作为默认值”。



13.2 使用样品选项

您可以调整 LightCycler® 480 基础软件图表中的样品的线条及点的外观：

- 1 从 LightCycler® 480 基础软件的资料管理器中您的用户文件夹中，打开“选项”子文件夹，然后双击样品选项。这时系统将在工作框架为您打开“样品选项”窗口。



- 2 如果您想将某个样品加入到图表中或从中去除，请点击“显示”选择框中的相应样品。

修改样品默认选项

- 1 如果您想改变某样品的默认颜色，请点击样品列表中样品名称旁边的颜色框以打开颜色调色板，在板中选择一种颜色，然后点击 *OK*。结果：您选择的颜色将出现在 LightCycler® 480 基础软件分析结果中样品名称的旁边，而且图表中的样品线条与点均以此颜色进行表示了。

- 2 如果您想更改默认样品名称，请点击样品名称，然后为其输入一个新名称。这一默认样品名称将应用于新的实验；已有实验的默认样品名称并不因此而改变。

- 3 如果您想修改样品的线条类型，请点击“线条类型”列，然后从下拉列表中选择一种新的线条类型。
例如，您可以选择“虚线”从而替换掉实线。



- 4 如果您想修改样品线条宽度，请点击“宽度”列，并输入一宽度值。
- 5 如果您更喜欢用连续的测量值点来表示出样品的线条，请点击“点模式”列，并从下拉列表中选择一种类型。（如果您更喜欢使用实线，则应将“点模式”设置成“Nothing”。）
- 6 点击“一般动作”栏中的“保存”按钮以对您所做的设置进行保存。
- 7 当您想取消所做的修改并将其恢复为初始值时，只需点击“恢复默认值”即可。


13.3 设定用户选项

用户选项主要设定下列内容：

- ▶ 导入和导出 LightCycler® 480 基础软件文件时的默认文件夹。
- ▶ 保存 LightCycler® 480 基础软件项目（例如：实验、宏和查询等）的默认数据库文件夹。
- ▶ 当选项有多个版本可供使用时，请指定将哪一个图表选项或样品选项作为默认。

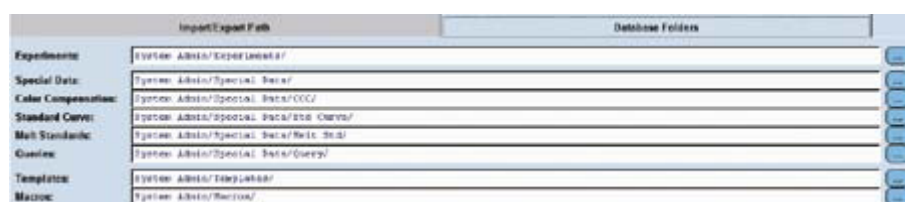
如何设定用户选项：

1# 从 LightCycler® 480 基础软件的资料管理器中您的用户文件夹中，打开“选项”子文件夹，然后双击“用户选项”。

2 如果需要指定导入/导出文件夹，则应选择“文件夹”表（如果当前尚未选定的话）。在资源管理器的在每个框中输入相应文件夹位置的路径或者直接点击  按钮并浏览到计算机或网络上的相应位置，然后点击 *OK*



3# 如果您要指定默认文件夹，请选择“文件夹”表。在资源管理器的每个框中输入相应文件夹位置的路径或者直接点击“浏览”按钮并浏览到计算机或网络上的相应位置。选择您需要的文件夹，然后点击 *OK*。




4# 如果您想指定某选项作为默认，请选择“选项”表。

在每个框中，选择选项项目并将其指定为该选项类型的默认。

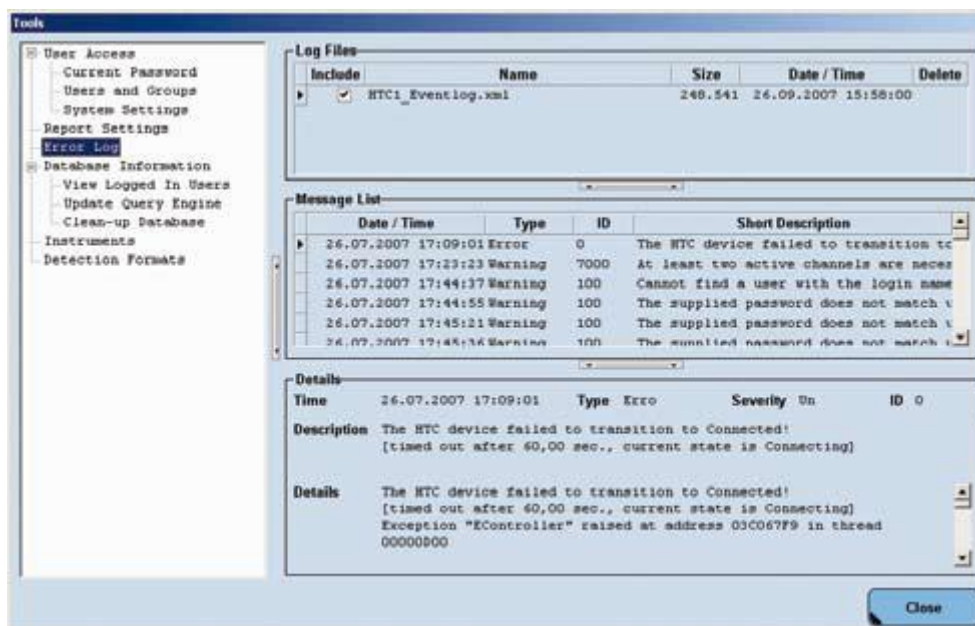


5# 完成后，点击“一般动作”区域的“保存”按钮对含有新设置的实验进行保存。

 当下一次您打开某实验时，使用的就是这些新设置了。


14. 管理工具

您可以通过“工具”对话框使用管理工具。通过这些工具，您可以执行以下操作：



- ▶ 管理用户访问，包括管理用户密码、用户与用户组帐户以及一般性系统设置。
- ▶ 对报告的设置进行定义
- ▶ 查看数据库状态及管理数据库
- ▶ 管理与 LightCycler® 480 仪器连接时的设置及查看操作日志
- ▶ 定义检测格式

 对管理工具模块的访问权限决定于您的用户角色。

点击  按钮以打开“工具”对话框。在工具对话框的左侧有一资源管理器，其中列出了可供选择的操作，右侧则为一编辑器。

14.1 管理用户访问

如果想使用 LightCycler® 480 基础软件，您必须在 LightCycler® 480 基础软件的数据库中拥有一个用户帐户。不同的用户帐户所拥有的对软件的访问权限是不同的，它决定于管理员所赋与某帐户及其所属用户组的角色。

本节内容为您解释用户帐户，角色及组的功能，并为您解释如果使用 LightCycler® 480 基础软件的用户管理工具对其进行管理。本节还将为您解释如果更改用户密码。如果您负责创建和修改用户帐户，或者您希望理解您帐户所具有的特权时，请详细阅读本节内容。如果您需要更改密码，请阅读本节中关于密码的内容。

 *如果要使用户访问工具，则您自己的用户帐户必须具有本地管理员角色。*

14.1.1 关于用户帐户

只有当您拥有用户帐户时，您才可以访问 LightCycler® 480 基础软件。用户帐户指定了用户登录时的用户名和密码，并定义用户对软件访问时的权限层次。

当您创建一个新的用户帐户时，您必须赋与它一定角色。角色决定了用户使用该软件时可以使用的操作。如需更多信息，请参考“关于角色”一节中相关内容。您可以将同一个用户帐户加入到一个或多个用户组中。同一组中的用户可以访问属于该组的全部对象。如需更多信息，请参考“关于角色”一节中相关内容。

每个用户帐户均在 LightCycler® 480 基础软件的资源管理器中拥有一个以用户完整登录名为标记的默认文件夹，文件夹下通常还有几个默认的子文件夹。

用户的默认文件夹和子文件夹是无法被删除、重新命名或改变位置的。但是，每个用户可以在自己的默认文件夹下添加新的子文件夹。

当 LightCycler® 480 基础软件安装时，系统会自动创建一个称为“admin”（系统管理员）的用户帐户。用户 admin 拥有本地管理员角色，并可以用来创建其他用户帐户。您无法对 admin 帐户进行编辑或禁用之。当用户帐户被创建后，它就即不能被编辑，也不能被删除了。但是本地管理员拥有是否将某用户帐户失活的权限。失活的用户不再拥有任何角色，也不能被分配到用户组中。

14.1.2 关于组

组是多个用户帐户的集合。同一个组中的成员可以访问属于该组任何成员的所有对象。例如，组中的成员可以打开同一组中另一位成员的任何一个实验。

同一个用户可以属于一个或多个组。如果两个用户隶属于同一个组（不管他们在其他组中关系如何），那么其中一个用户就可以访问另一个用户的对象。例如，如果用户鲍勃属于 A 组和 B 组，而用户苏珊属于 B 组和 C 组，那么因为鲍勃和苏珊都属于 B 组，因而他们可以互相访问对方的对象。一位用户能够访问另一位对象的层次则决定于本地管理员赋与该用户的角色。如需关于用户角色的更多信息，请参考下一节的相关内容。

14.1.3 关于角色

每个用户帐户均拥有且只拥有一种角色，而用户的角色决定了用户的特权。在 LightCycler® 480 基础软件中，一共有三类角色。

- ▶ 一般用户（Standard User）
- ▶ 高级用户（Expert User）
- ▶ 本地管理员（Local Administrator）

角色本身是无法创建或删除的，但对于每种角色而言，其中的一些访问特权可以进行启用或者禁用。如需更多信息，请参考“使用角色工作”一节中相关内容。



在 LightCycler® 480 基础软件中，可以拥有多位高级用户和多位本地管理员。

14.1.4 一般用户的权限

一般用户可以执行以下操作

- ▶ 修改他们的密码
- ▶ 查看实验数据和报告
- ▶ 在导航模式下查看实验数据目录
- ▶ 使用宏操作
- ▶ 导入导出数据
- ▶ 查看数据库信息
- ▶ 查看仪器设置和登入历史记录
- ▶ 编辑实验注解

一般用户**无权**进行如下操作：

- ▶ 修改实验设置
- ▶ 修改仪器设置
- ▶ 修改报告模板
- ▶ 保存宏和模板

14.1.5 高级用户角色的特权

高级用户可以进行如下操作：

- ▶ 修改他们的密码
- ▶ 使用“运行编程模块”以创建和执行实验（包括如下项目）：
 - ▶ 使用样品编辑器，属性编辑器，以及属性查看器
 - ▶ 使用子集编辑器
 - ▶ 对某实验添加分析并对所有分析的设置进行编辑
 - ▶ 创建和使用模板
- ▶ 创建其他所有的对象及打开、复制、运行、修改及移动任何对象；对于实验而言，这包括了修改样品信息、样品计数（运行开始前）、为实验添加分析，向分析中添加或从分析中去除样品，使用分析工具栏以改变分析设置中的任何项目
- ▶ 在拥有本地管理员授权的情况下，还可以删除对象及非默认文件夹（仅当文件夹中不含任何对象时才可以进行此操作）
- ▶ 对非默认文件夹及对象进行重新命名
- ▶ 打开、复制和执行本地管理员的对象
- ▶ 打开、复制和执行同一组中高级用户的对象
- ▶ 在罗氏文件夹中查看和复制项目
- ▶ 创建和执行查询
- ▶ 修改选项设置
- ▶ 当拥有管理权授权是时，可管理检测格式
- ▶ 访问仪器工具及添加仪器

高级用户**无权**进行如下操作：

- ▶ 对本地管理员或其他高级的对象进行创建、删除、移动、修改或重新命名等
- ▶ 查看非同组的高级用户的文件夹或对象
- ▶ 对实验对象（包括高级用户自己的实验对象）进行复制、删除或重新命名
- ▶ 对默认文件夹（包括高级用户自己的默认文件夹）进行删除、移动、复制或重新命名

14.1.6 本地管理员的特权

本地管理员可以进行如下操作：

- ▶ 使用运行编程模块以创建和执行实验
- ▶ 创建和使用已有的模板和宏以执行实验及分析结果
- ▶ 创建所有其他对象及打开、复制、执行、修改、删除及移动他们的对象（修改权包括修改样品信息、为实验添加分析、使用分析工具栏以改变任何分析设置）
- ▶ 打开、执行和复制属于其他本地管理员的项目
- ▶ 打开罗氏文件夹中的项目
- ▶ 创建系统文件夹，此类文件夹归本地管理员所有，但所有的用户均可阅读其内容
- ▶ 创建、打开、复制、执行、修改、删除或移动属于高级用户的文件夹中的对象
- ▶ 使用用户访问工具以管理用户及组；如需更多信息，请参考“*管理用户、组和角色*”一节中相关内容。
- ▶ 维护数据库（升级、重新索引和清空）
- ▶ 为角色激活下列访问特权：
 - ▶ 对于罗氏用户：使之有权访问属于本地管理员的对象
 - ▶ 为高级用户：使之有权删除用户的非可追踪的对象及编辑检测格式

本地管理员**无权**进行如下操作：

- ▶ 修改或移动罗氏文件夹中的对象
- ▶ 移动、删除或修改其他本地管理员的对象；例如，一位本地管理员无权将对象复制到另一位本地管理员的文件夹中。
- ▶ 对默认文件夹（包括本地管理员自己的默认文件夹）进行删除、移动、复制或重新命名

14.1.7 用户访问对象

对 LightCycler® 480 数据库中的对象（实验，文件夹，模板，选项）等的访问权限是由用户角色所决定的。对每种对象的访问都是由特定类型的允许权规定的。下表中列出了用户对数据库对象的访问权限：

对于**实验**而言，总共有四种允许权：

- ▶ 阅读—查看资源管理器中的实验，打开实验，将实验导出为文件
- ▶ 移动—将实验从一个文件夹移动到另一个文件夹
- ▶ 修改—对实验进行改动
- ▶ 运行—在仪器上运行实验

| 所有者 | 用户类型 | 权限 |
|------------|-------------|-------------|
| 本地管理员+高级用户 | 实验拥有者 | 阅读，移动，修改，运行 |
| 本地管理员 | 同一组中的管理员 | 阅读 |
| | 不同一组的管理员 | 阅读 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读 |
| | 不在同一组中的高级用户 | 阅读 |
| 高级用户 | 同一组中的管理员 | 阅读，移动，修改，运行 |
| | 不同一组的管理员 | 阅读，移动，修改，运行 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读 |
| | 不同组中的高级用户 | 无 |

对于**文件夹**而言，总共有六种允许权：

- ▶ 阅读—在资源管理器中查看文件夹及其内容
- ▶ 删除—删除空的文件夹
- ▶ 复制—从另一个位置中复制某文件夹（复制文件夹结构但并不复制其对象）
- ▶ 写入—在文件夹中保存一个新的对象或者创建子文件夹
- ▶ 移动—将文件夹从一个位置移动到另一个位置
- ▶ 重新命名—改变文件夹的名称

| 所有者 | 用户类型 | 权限 |
|------------|-----------|---------------------|
| 本地管理员+高级用户 | 文件夹所有者 | 阅读，删除，复制，写入，移动，重新命名 |
| 本地管理员 | 同一组中的管理员 | 阅读，删除，复制 |
| | 不同一组的管理员 | 阅读，删除，复制 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| | 不同组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| 高级用户 | 同一组中的管理员 | 阅读，删除，复制，写入，移动，重新命名 |
| | 不同组的管理员 | 阅读，删除，复制，写入，移动，重新命名 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| | 不同组中的高级用户 | 无 |

对于**模板**而言，总共有六种允许权：

- ▶ 阅读—在资源管理器中查看和打开对象，运用到实验，以及导出
- ▶ 编辑—只能打开和编辑注解及模板类型
- ▶ 删除—删除模板
- ▶ 复制—对模板进行复制并将其保存在指定位置
- ▶ 移动—将文件夹从一个位置移动到另一个位置
- ▶ 重新命名—改变文件夹的名称

| 所有者 | 用户类型 | 权限 |
|------------|-----------|---------------------|
| 本地管理员+高级用户 | 模板所有者 | 阅读，编辑，删除，复制，移动，重新命名 |
| 本地管理员 | 同一组中的管理员 | 阅读，删除，复制 |
| | 不同一组的管理员 | 阅读，删除，复制 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| | 不同组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| 高级用户 | 同一组中的管理员 | 阅读，编辑，删除，复制，移动，重新命名 |
| | 不同组的管理员 | 阅读，编辑，删除，复制，移动，重新命名 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| | 不同组中的高级用户 | 无 |

对于**选项**而言，总共有五种允许权：

- ▶ 阅读—在资源管理器中进行查看
- ▶ 编辑—在资源管理器中打开和编辑
- ▶ 删除—删除选项
- ▶ 复制—对选项进行复制并将其保存在指定位置
- ▶ 移动—将选项从一个高一级文件夹中移动到另一个高一级文件夹

| 所有者 | 用户类型 | 权限 |
|------------|-----------|-----------------|
| 本地管理员+高级用户 | 选项所有者 | 阅读，编辑，删除，复制，移动， |
| 本地管理员 | 同一组中的管理员 | 阅读，删除，复制 |
| | 不同组的管理员 | 阅读，删除，复制 |
| | 同一组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| | 不同组中的高级用户 | 阅读，复制 |
| 高级用户 | 同一组中的管理员 | 阅读，编辑，删除，复制，移动， |
| | 不同组的管理员 | 阅读，编辑，删除，复制，移动， |
| | 同一组中的高级用户 | 无 |
| | 不同组中的高级用户 | 无 |

14.1.8 管理用户、组和角色

通过用户访问工具，您可以执行以下操作：

- ▶ 对用户帐户进行创建，修改，启用或禁用等操作
- ▶ 为用户帐户赋权或改变其可用权限（您无法创建、修改或删除角色）
- ▶ 创建或删除用户组并将用户分配到某组

如果要使用户访问工具，则您必须拥有本地管理员角色。

如何打开用户访问工具：

- ▶ 从“工具”资源管理器中，打开“用户访问”及“用户和组”。
- ▶ “用户”表是按默认设置选定的。

使用用户工作



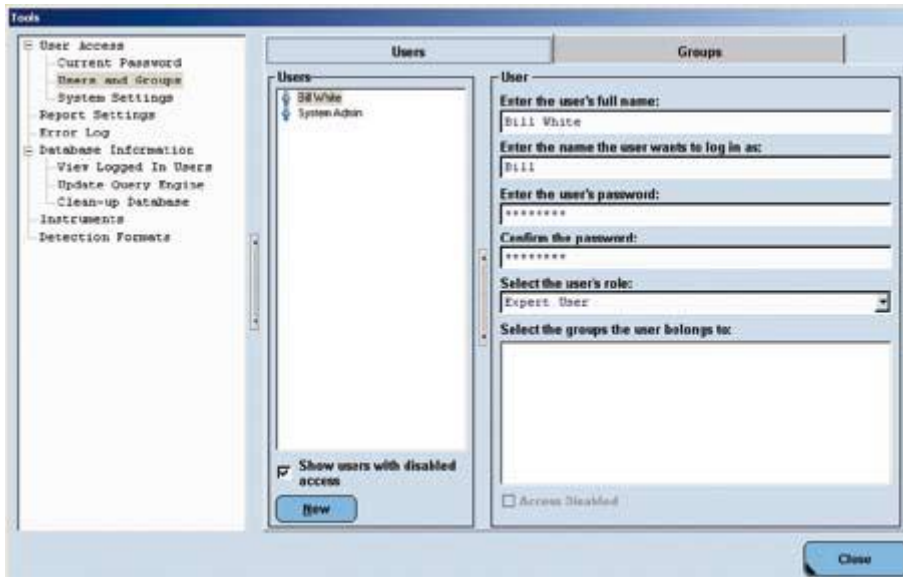
当您使用的是可追踪的（即带审计记录的）数据库进行工作时，则用户帐户不能被删除，只能被禁用。另外，用户的完整名称，登录名称和角色也是无法改变的。



作为上述步骤的替代方法，您可以直接在资源管理器中双击用户对象以访问用户窗口。

如何创建新的用户帐户：

- 1# 在“用户访问工具”中，点击“用户和组”。选择“用户”表（如果尚未选择的话）。
- 2# 点击“新建”。
- 3# 输入完整的用户名，登录名及密码，并为该用户选择角色。



- 4# 在已有的组中为该用户选择一个组。如果尚未创建任何组，则您可以在创建组时再将用户加入到组中。

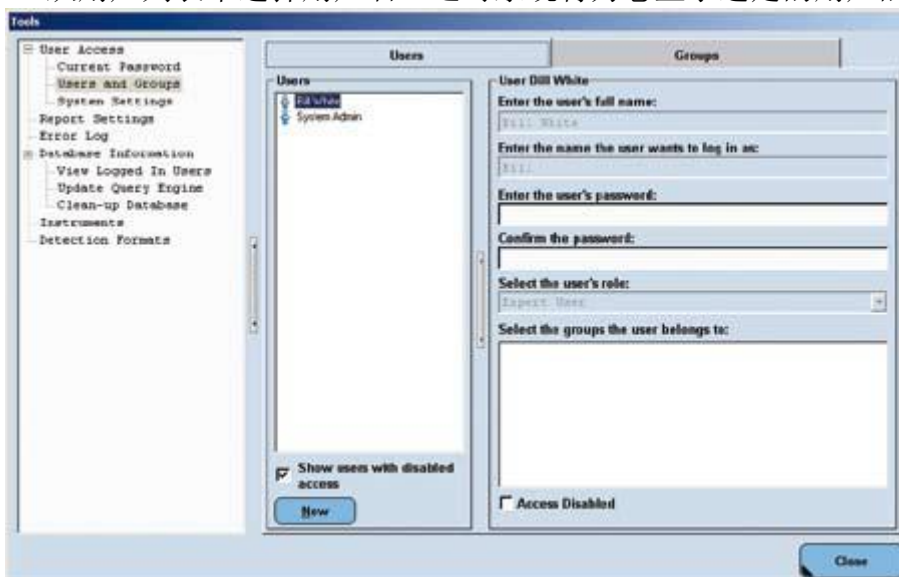
- 5# 点击“用户”列表中的用户名以确认您输入的内容。

结果：在资源管理器中生成该新用户的默认文件夹，而用户名称也加入到资源管理器的\管理\用户文件夹中的用户列表里。

如何编辑、启用或禁用某用户帐户

1# 在“用户访问工具”中，点击“用户和组”。选择“用户”表（如果尚未选择的话）。
1

2# 从用户列表中选择用户名。这时系统将为您显示选定的用户的信息。2



▶ 3# 这些信息中您可进行改变的内容仅限于用户的密码和组员资格。

▶ 4# 如果您想禁用该用户帐户，则应选择“禁止访问”选择框；如果想重新激活某禁用的帐户，将“禁止访问”选择框去掉即可。
需要注意的是您无法禁用系统管理员帐户。

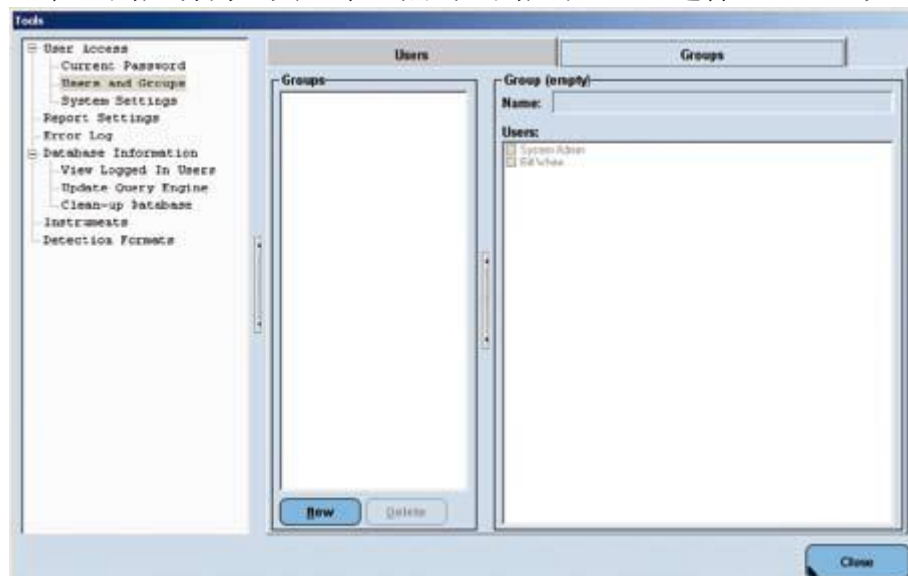
5# 完成后，点击“关闭”。

如何创建一个新的组：

! 当您使用的是可追踪的（即带审计记录的）数据库进行工作时，则用户帐户不能被删除，只能被禁用。另外，用户的完整名称，登录名称和角色也是无法改变的。

! 作为上述步骤的替代方法，您可以直接在资源管理器中双击组对象以访问组的窗口。

1 在“用户访问工具”中，点击“用户和组”。选择“组”。（如果尚未选择的话）。



2 点击“新建”。

3 在“组的名称”框中为组输入一个名称。

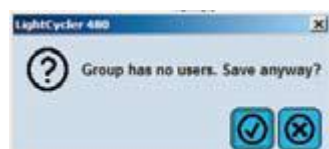
4 如果要在组中添加用户，首先点击您希望添加的用户。



! 您也可以在创建组时不添加任何用户。

5 点击“组”列表中的空白组的图标以确认您的操作。

6 如果您没有在组中添加任何用户，则系统会问您是否保存没有用户的组。点击 *Yes*。



结果： 系统将在资源管理器的“组”文件夹中添加这个组。

如何对组进行编辑：

- 1# 在“用户访问工具”中，点击“用户和组”。选择“用户”表（如果尚未选择的话）。
1
- 2# 从组的列表中选择组名。
- 3# 更改组的名称或将某些用户加入组中或从组中去除。您也可以在编辑用户帐户时将用户指定到某组中。如需更多信息，请参考“管理用户，组和角色”一节中相关内容。
- 4# 在“组”列表中点击组名以确认您所做的修改。

如何对组进行删除：

- 1# 在“用户访问工具”中，点击“用户和组”。选择“用户”表（如果尚未选择的话）。
- 2# 从组的列表中选择组名。
- 3# 点击“删除”。
- 4# 这时系统会出现提示信息请您确认对该组的删除。点击 *Yes*。



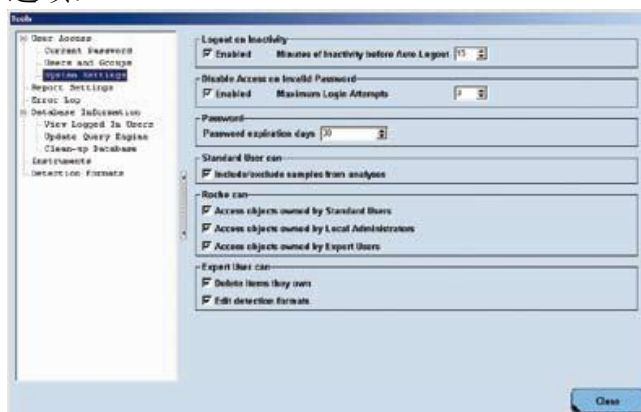
结果：系统将在资源管理器的“组”文件夹中删除这个组。

14.1.9 使用角色工作

您无法对角色进行创建或删除，您也无法修改指定给一位用户的角色。您可以修改与高级用户及罗氏用户角色相关联的访问权限，也无法修改本地管理员角色的访问权限。您还可以设定用户自动登出之前的无活动时间（即该用户帐户多长时间无活动后系统自动将其登出）以及用户输入错误密码后其访问被禁用之前的最大登录尝试次数。


如何设定访问条件及修改用户的访问权限：

1 在“用户访问工具”中，点击“系统设置”。这时系统将在编辑框中为您显示可用的选项：



以下是供您选择的项目：

| 名称 | 描述 |
|------------------|---|
| 允许自动登出 | 当选定该选项时，系统将在设定的无活动时间到达后自动使用该用户登出。 |
| 无活动时间 | 无活动的时间值（1-100 分钟），当指定时间到达后，系统将会对用户进行自动登出。 |
| 禁用访问 | 当选定该项时，则用户在进行最大次数尝试登录并失败后，该用户帐户将被 DISABLE。 |
| 最大登录尝试次数 | 设定最大登录尝试次数（1-5 次），如果某用户使用该用户名在进行最大次数的尝试后仍未能成功登录，则会使该用户自动登出。 |
| 启用密码效期 | 当选定该选项时，则密码会在指定的天数后失效。 |
| 密码效期 | 指定密码失效的天数（可在 1 - 100000 天之间选择）。 |
| 罗氏用户可以访问本地管理员的对象 | 当选定该项时，则罗氏用户被授予访问本地管理员的对象的权限。 |
| 罗氏用户可以访问高级用户的对象 | 当选定该项时，则罗氏用户被授予访问高级用户的对象的权限。 |
| 高级用户可以删除自己的项目 | 当选定该项时，则高级用户有权删除他们自己的对象。 |
| 高级用户可以编辑检测格式 | 当选定该项时，则高级用户有权编辑检测格式。 |

 选择或去掉某些可用的操作。


 完成后，点击“关闭”。


14.1.10 修改您的密码

当您被授予 LightCycler® 480 基础软件的用户帐户后，您将得到一个初始密码，该密码供您在第一次登录 LightCycler® 480 基础软件时使用（当您第一次登录到软件后，系统将提示您修改您的初始密码）。您可以在任何时候修改您的密码。

如何修改您的密码：

- ▶ 在“用户访问”工具中，选择“当前密码”。
- ▶ 在“旧密码”区域输入您的当前密码。
- ▶ 在“新密码”区域输入新的密码，并在“确认密码”区域再次输入您的新密码。
- ▶ 点击 *OK*。

 当您在“新密码”区域和“确认密码”区域输入的密码不同时，则 *OK* 按键不会被激活。

 密码应包含至少六位字符，其中至少一个字符必须是数字，另外至少一个字符必须是大写的。密码是区分大小写的！请牢记密码并将其记录在一个安全的地方！请勿与他人共享您的密码！

14.2 报告的设置

您可以设定是否在报告上显示罗氏的标识。

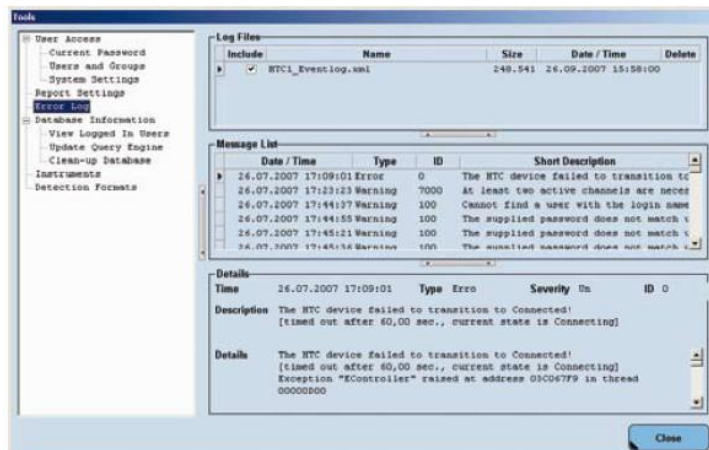
14.3 错误日志

由软件产生的所有错误显示在信息区域中，请参见“理解 LightCycler® 480 软件主窗口”章节。所有软件错误信息记录在多个日志文件中，可以使用“错误日志”工具查询这些日志文件。



如果错误日志的文件大小超过限制，软件将打开新文件。

在选择“错误日志”工具之后，将显示带有可用日志文件、信息列表和所选错误信息细节的浏览器窗口。默认选择当前的文件。



如何显示错误日志文件：

| | |
|----------|---|
| 1 | 打开“错误日志”工具。 |
| 2 | 针对显示的错误日志文件，点击“日志文件”列表中的“包含”选择框。对应的信息将显示在“信息列表”区域内。 |
| 3 | 选择“信息列表”区域中的一条信息，以显示该信息的细节。 |

如何删除错误日志文件：

| | |
|----------|-----------------------------------|
| 1 | 打开“错误日志”工具。 |
| 2 | 针对待删除的错误日志文件，点击“日志文件”列表中的“删除”选择框。 |





不能删除当前使用的错误日志文件。

14.4 数据库信息

通过“数据库信息”窗口您可以进行以下操作：

- ▶ 显示登录当前数据库的用户
- ▶ 显示数据库引擎的状态；如果引擎过期的话，则您可以对其进行升级
- ▶ 进行批量导出操作，并选择性地删除导出的对象

| 表 | 用途 |
|---------|---|
| 查看登录的用户 | 为您显示当前已经登录到软件的用户列表。 |
| 升级查询引擎 | <p>为您显示数据库查询引擎的状态。如果系统要求您升级数据库时，“升级”按钮就会自动激活。</p> <p> 当您将LightCycler® 480基础软件升级到新版本后，可能需要对数据库进行升级。重新索引按钮：当数据库的容量增加后，则您的访问数据所需要的时间也会有所增加。请使用重新索引功能以使您数据库中的数据保存最佳的组织方式，这样可以尽量减少您访问数据时所需要等待的时间。</p> |
| 清空数据库 | <p>为您提供生成一个数据库的空白拷贝的操作。当您需创建一个与当前数据库有相同的结构（即：用户、组及文件夹等）及基本内容的新数据库时，这一操作将非常有用。</p> <p> 数据库的清空操作与批量导出是相似的，二者的不同点在于在进行清空操作时，相应数据库中的多个对象不仅被导出，而且将被删除。</p> |

 尽管高级用户和本地管理员都可以访问已登录用户和查询引擎，但只有本地管理员可以访问“清空”操作。

14.4.1 跟踪型和研究型数据库

LightCycler® 480 基础软件提供两种数据库类型，跟踪型和研究型

- ▶ 跟踪型数据库记录所有实验操作，任何更改需要提交理由，实验数据无法更改、复制或删除，但可以重命名或删除宏以及空目录。
- ▶ 研究型数据库记录没有上述限制，可以任意更改、复制或删除数据，并且无需提交理由。

14.4.2 如何清空数据库

1# 关闭 LightCycler® 480 基础软件及 Exor4。右键点击 Windows 工具栏中的 Exor 图标，然后点击“关闭”，即可将 Exor 关闭。

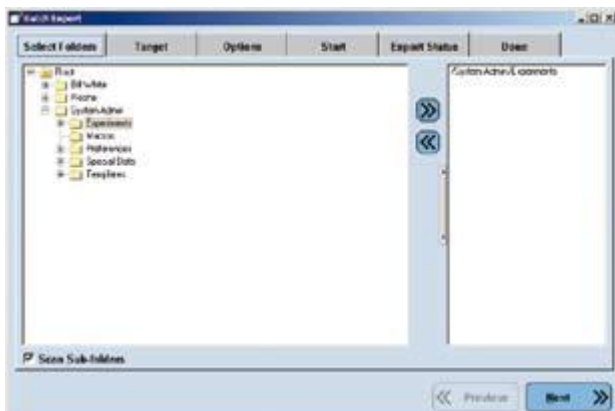


2# 在 Windows 浏览器中，打开数据库所在的目录（C:\Program Files\Roche\Exor4\Data）并复制 XDMS_T.IB file 文件。

3# 再次启动 Exor4 和 LightCycler® 480 基础软件。

4# 打开“工具”窗口，选择“数据库信息”及“清空”选项。
结果：系统将为您打开“清空”向导。

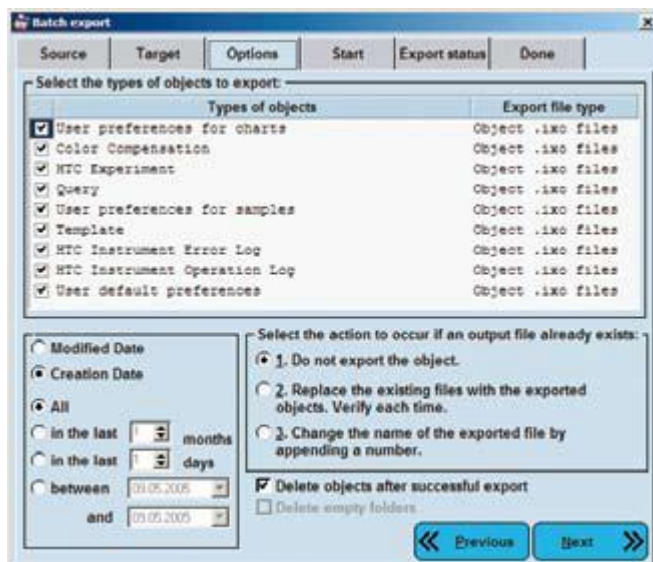
5 首先选择（将要清空的源文件夹）。如果您希望清空整个数据库，请点击“根目录”。点击“扫描子文件夹”选择框，这样所有的子文件夹都将全部包括在操作内。



6 点击您希望将数据库对象导出的目标目录。



7# 在“操作”表中，选择您希望导出并从其当前安装位置删除的数据库类型。


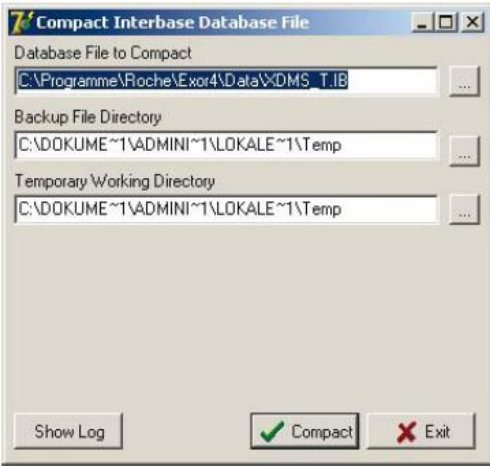


所有其他的操作与“批量导出”向导中的是一样的。（如需详细信息，请参考位于“导出与导入文件和对象”章节中“同时导出多个实验文件”一节中相关内容。

8# 根据向导的提示继续向下进行直到完成数据库的清空。

14.4.3 压缩数据库

为了压缩数据库，LightCycler® 480 软件提供“CompactIB”工具。“CompactIB”工具只压缩数据库中的数据结
构；并不删除任何数据库对象。

| | |
|----------|--|
| <p>1</p> | <p>通过从 Windows 开始菜单的“罗氏”程序组中选择条目，启动“CompactIB”工具。</p>  <p>将显示“Compact Interbase 数据库文件”对话框。</p>  |
| <p>2</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 选择您想压缩的数据库。 ▶ 选择“备份文件”和“临时工作文件夹”。 |
| <p>3</p> | <p>点击“压缩”。</p> |

14.4.4 如何处理来自 1.3 版或更早版本软件的数据库

虽然 1.5 版软件完全向后兼容，但是在使用 1.3 版或更早版本软件创建的数据库中，有些其他的功能不可用。

- ▶ 新的 LightCycler® 480 仪器虚拟仪器程序
- ▶ 通用颜色补偿对象
- ▶ LightCycler® 480 仪器和有些应用程序（终点法基因分型和扫描）所用的罗氏运行模板
- ▶ 新的演示实验
- ▶ 新的滤光片组合和测定格式

14.4.5 如何处理来自 1.3 版或者更早版本软件的对象

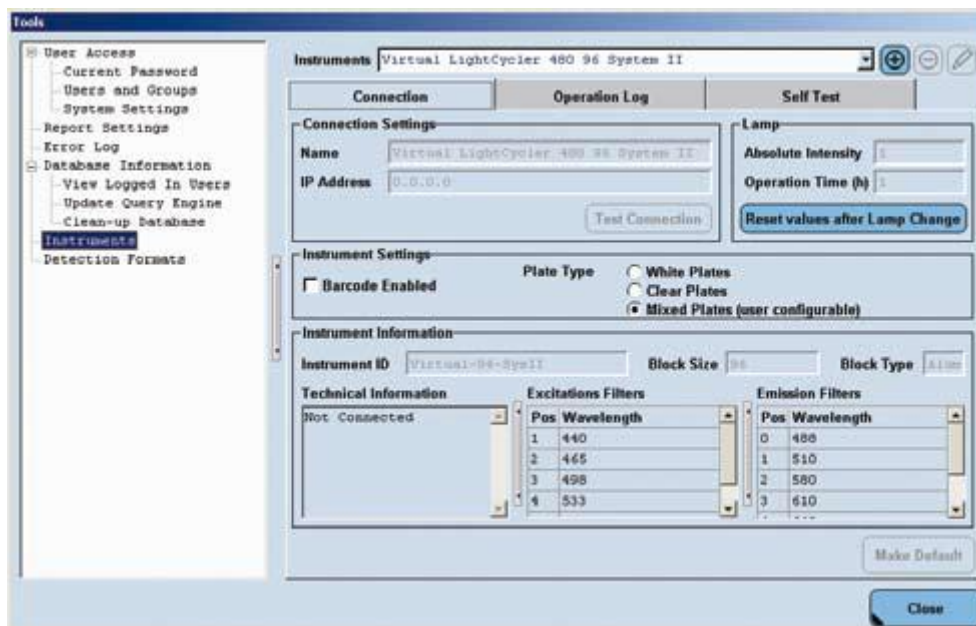
有些来自 1.3 版或更早版本软件的对象不能和 1.5 版软件一起工作。

应删除这些对象并使用软件 V1.5 重新创建这些对象：

- ▶ 不工作的宏
- ▶ 不正确工作的样品列表模板、分析模板和报告模板
- ▶ 不工作的标准曲线对象（固定点）
- ▶ 不产生任何偶对（不在“样品编辑器”中编辑样品名称）的相对定量中的自动配对，但是保留已有的偶对。




14.5 仪器


通过“仪器”窗口您可以查看当前激活的仪器并可以更换激活的仪器。



“仪器”窗口有如下控制元素及输入区域：

► “连接”表

| 名称 | 描述 |
|--|---|
| 仪器 | 选择仪器以进行查看 |
| 设为默认值 | 将选定的仪器设定为活动的仪器 |
| 升级信息 | 阅读仪器的信息及对仪器升级的信息 |
| 新建  | 新建一个仪器对象并且在连接设置区域进行激活。 |
| 删除  | (非活动性) 您无法删除仪器对象。 |
| 编辑  | (非活动性) 您无法对仪器对象进行编辑。 |
| 仪器信息 | 显示如下仪器信息： 仪器标识符与温控模块类型 版本信息 激发与发射滤光片 |

 默认情况下，在 LightCycler® 480 基础软件中安装有两个虚拟的 LightCycler® 480 仪器（96 版本或 384 版本）。只有安装虚拟的 LightCycler® 480 仪器后，您才可以在 LightCycler® 480 基础软件离线的环境下对其进行操作，因为只有当 LightCycler® 480 基础软件中安装有仪器时您才可以对其进行编程。如果物理仪器并未连接，而您需要对一个实验进行编程时，则应在仪器对话框中选择两种虚拟仪器中的一种并将其设为默认仪器。如需相关细节，请参考以下“仪器”一节中的相关内容。


► 连接设置区域

| 名称 | 描述 |
|------|----------------|
| 仪器名称 | 当前选择的仪器的名称 |
| 地址 | IP 地址或选定的仪器的名称 |
| 测试连接 | 打开与选定的仪器已有的连接 |

► 仪器信息区域

| 名称 | 描述 |
|--------|-----------------------------|
| 仪器标识符 | 所连接的仪器的序列号 |
| 温控模块类型 | 在已连接的仪器中安装的温控模块类型（96 或 384） |
| 可用条形码 | 允许使用内置的条形码扫描器以读取多孔板的标识符。 |
| 技术信息 | 当前仪器固件的版本 |
| 激发滤光片 | 在当前仪器中可供使用的激发滤光片的列表 |
| 发射滤光片 | 在当前仪器中可供使用的发射滤光片的列表 |

► 氙灯区域

| 名称 | 描述 |
|--------|--|
| 灯亮度 | 从仪器中读出的以百分数表示的灯的亮度 |
| 操作时间 | 从仪器中读出的氙灯已工作的总时间（以小时表示） |
| 重新设置数值 | <p>将灯亮度设置为其初始值，并将操作时间设置为 0。</p> <p> 仅当您更换氙灯时才允许通过“重新设置计数器”按钮将这些数值进行重新设定（如需详细信息，请参考“更换氙灯”一节中相关内容）。计数器经重新设置后，仪器将读取和保存灯亮度作为开始时亮度值。在操作过程中，仪器会将此值与实际灯亮度值进行比较以确认灯亮度丢失值。当灯亮度达到其开始时亮度的 50% 时，仪器会将此信息通知您。如果您没有对仪器更换新灯而直接按下了“重新设置数值”按钮，则可以会导致仪器保存一个错误的开始时亮度值。</p> |

► 操作日志



如何查看操作日志：

- 1# 在“工具”窗口的“仪器”区段中从“仪器”列表中选择仪器名称。
- 2# 选择“操作日志”表。
- 3# 在“操作日志”中将为您显示该仪器中运行列表。日志中将显示每次运行的基本信息，例如运行的名称、用户、日期以及样品数量（96 或 384）。

| Connection | | Operation Log | |
|-------------------|--------------|---------------------|--------------|
| Name | User | Date | # of Samples |
| New HTCEXperiment | System Admin | 23.06.2005 15:00:29 | 384 |
| New HTCEXperiment | System Admin | 23.06.2005 15:01:15 | 384 |
| New Experiment | System Admin | 28.06.2005 10:12:40 | 384 |
| New Experiment | System Admin | 28.06.2005 10:13:36 | 384 |

12.4.1 定义仪器

如果您想对 LightCycler® 480 仪器进行定义，请按照如下步骤进行操作：

- 1# 点击  按钮以打开“工具”对话框。
- 2# 从“工具”对话框的“资源管理器”中选择“仪器”。
- 3# 点击仪器选项旁边的加号 。
- 4# 为 LightCycler® 480 仪器输入一个名称然后点击 *OK*。
- 5# 在“连接”表中输入 IP 地址“192.168.95.41”。
- 6# （可选）点击“测试连接”以对该 IP 地址进行测试。
- 7# 点击“升级”信息。
- 8# 点击“设为默认”以将该仪器设置为您的默认仪器。
- 9# 点击“关闭”。

14.6 检测格式

检测格式定义一个或多个激发-发射滤光片组合。您可以通过“检测格式”表以定义检测格式并且指定哪种检测格式是激活的（即：在实验中可供选择的）。当对一个新的实验进行编程时，您可以从已经定义好的“检测格式”表中选择运行中将使用的检测格式。如果某检测格式中包括一止不一种滤光片对，您可以使用“定制”选项以决定在运行中运用哪种组合方式（如需详细信息，请参考“实验的编辑与运行”一节中相关内容。

以下是可用的默认检测格式：

LightCycler® 480 仪器 I 型

| 检测格式 | 滤光片组合名称 | 激发滤光片 | 发射滤光片 |
|----------------|----------------|-------|-------|
| SYBR Green I | SYBR Green I | 483 | 533 |
| SimpleProbe 探针 | SimpleProbe 探针 | 483 | 533 |
| 单色水解探针 | FAM | 483 | 533 |
| 多色水解探针 | Cyan 500 | 450 | 500 |
| | FAM | 483 | 533 |
| | Hex | 523 | 568 |
| | Red 610 | 558 | 610 |
| | Cy5 | 615 | 670 |
| 单色 HybProbe 探针 | Red 640 | 483 | 640 |
| 多色 HybProbe 探针 | Fluos | 483 | 533 |
| | Red 610 | 483 | 610 |
| | Red 640 | 483 | 640 |
| | Cy5 | 483 | 670 |

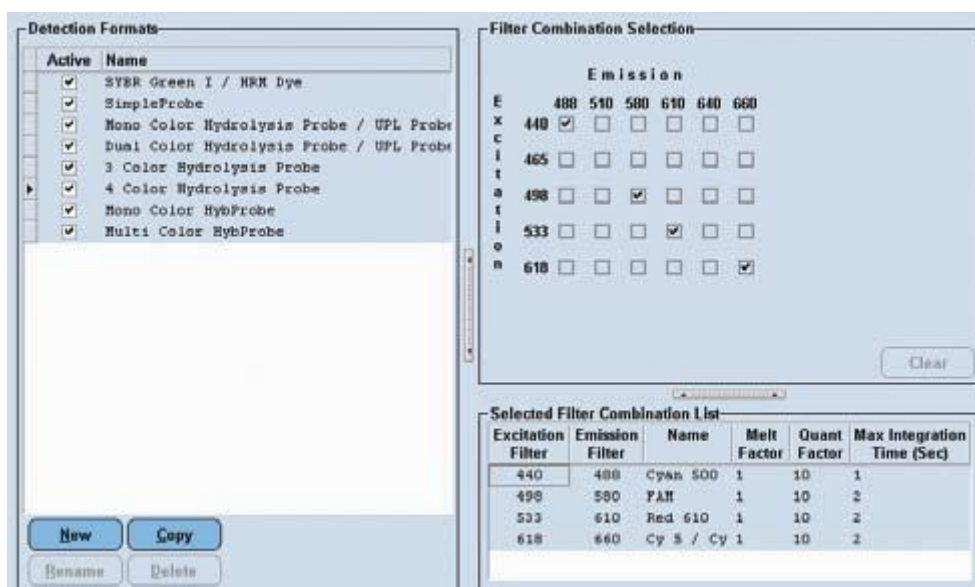
LightCycler® 480 仪器 II 型

| 检测格式 | 滤光片组合名称 | 激发滤光片 | 发射滤光片 |
|------------------------|-------------------|-------|-------|
| SYBR Green I /HRM Dyes | SYBR Green I | 465 | 510 |
| SimpleProbe 探针 | SimpleProbe 探针 | 465 | 510 |
| 单色水解探针/UPL 探针 | FAM | 465 | 510 |
| 双色水解探针/UPL 探针 | FAM | 465 | 510 |
| | VIC/HEX/Yellow555 | 533 | 580 |
| 三色水解探针 | FAM | 465 | 510 |
| | VIC/HEX/Yellow555 | 533 | 580 |
| | Cy5/Cy5.5 | 618 | 660 |
| 四色水解探针 | Cyan 500 | 440 | 488 |
| | FAM | 498 | 580 |

| | | | |
|--------|-----------|-----|-----|
| | Red 610 | 533 | 610 |
| | Cy5/Cy5.5 | 618 | 660 |
| 单色杂交探针 | Red 640 | 498 | 640 |
| 多色杂交探针 | Fluos | 465 | 510 |
| | Red 610 | 498 | 610 |
| | Red 640 | 498 | 640 |
| | Cy5/Cy5.5 | 498 | 660 |

❗ 默认的检测格式是不允许编辑的。

“检测格式”表中包括“检测格式”列表、“滤光片组合选择”区域、以及“滤光片组合列表”。




您可以通过“检测格式”列表来管理检测格式。它具有以下管理功能：

| 名称 | 用途 |
|------|--------------------------------|
| 激活 | 选择“激活”可以使用软件中相应行中的检测格式处于可用的状态。 |
| 名称 | 点击某检测格式的名称条目后您就可以对其名称进行修改。 |
| 新的 | 激活“检测格式”列表下一个可用行以输入新名称和新的格式。 |
| 复制 | 复制选定的检测格式。 |
| 重新命名 | 激活当前选择的检测格式名称以对其重新命名。 |
| 删除 | 删除当前选定的检测格式。 |

🔒 在“检测格式”列表中以阴影表示的检测格式无法进行编辑（例如：所有罗氏的默认检测格式）。

对于“检测格式列表”中被选定的检测格式而言，“滤光片组合”选择区域中将显示发射和激发滤光片的名称，在每一种可能的组合旁边还有一选择框。点击发射-激发组合选择框，以将其包括在当前选择的检测格式中。

 有效的（即可选择的）滤光片组合指那些发射波长减去激发波长大于或等于 40 的组合。

关于选定的发射-激发滤光片组合的细节显示于“滤光片组合”选择区域下方的“选定的滤光片组合列表”中：

| | |
|--------|---|
| 名称 | 描述 |
| 激发滤光片 | 显示激发滤光片值 |
| 发射滤光片 | 显示发射滤光片值 |
| 名称 | 为滤光片对（即发射滤光片与激发滤光片）输入一个名称 |
| 熔解系数 | 用选定的滤光片对进行熔解分析时所使用的系数（当在“定制检测格式”对话框中选择的是动态曝光时间模式时）。 |
| 定量系数 | 当使用选定的滤光片对进行定量分析时所使用的系数。定量系数代表从初始背景荧光强度到平台期（当在“定制检测格式”对话框中选择的是动态曝光时间模式时）。 |
| 最大曝光时间 | 当您在“定制检测格式”对话框中选择的是动态曝光时间模式时可用于该选定的滤光片对的最大的曝光时间。（如需更多信息，请参考“运行实验”一节中相关内容。 |

14.7 设置平板类型

LightCycler® 480 仪器有两种类型的多孔板可用：

▶ 白色板

▶ 透明板



只使用本操作说明书中推荐的 PCR 多孔板。



只使用具有推荐形式、水解探针和 SYBR Green I 的透明多孔板。设置透明板选项将禁用温控模块单元中内置的板探测器。关于细节，请参见“探测单元的说明”章节。

本地管理员负责正确设置使用的多孔板（请参见“连接凸耳”章节）。如果使用两种类型的板执行实验，本地管理员必须确保“连接凸耳”中的这个设置。只有“混合板”设置使用户能够针对实际的实验配置使用的板。

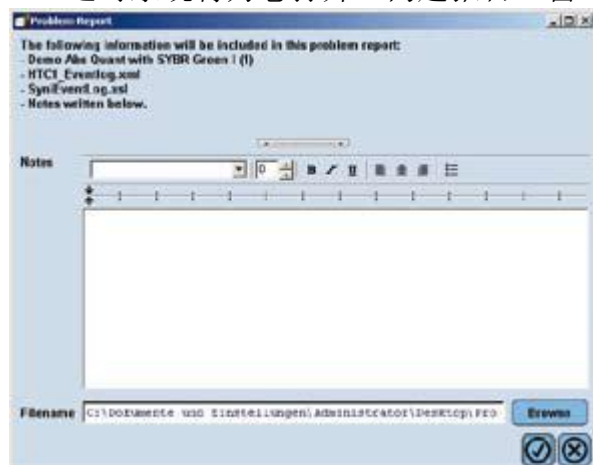
15. 诊断工具

15.1 仪器问题报告

LightCycler® 480 基础软件中使用“*仪器问题报告*”作为诊断工具，从而监控和报告 LightCycler® 480 仪器的运行情况。当仪器出现问题时，您可以导出一份“*仪器问题报告*”（文件名为*.ipr）并将其递交给您的（技术）支持代表。“*仪器问题报告*”中包含有一份错误日志、一份操作日志以及产生该实验数据的源实验的相关信息。

如何导出仪器问题报告：

- 1# 从“*资源管理器*”窗口中选择一实验对象。
- 2# 在“*资源管理器*”的“*动作*”栏中，点击“*问题报告*”按钮。
- 3# 这时系统将为您打开“*问题报告*”窗口。

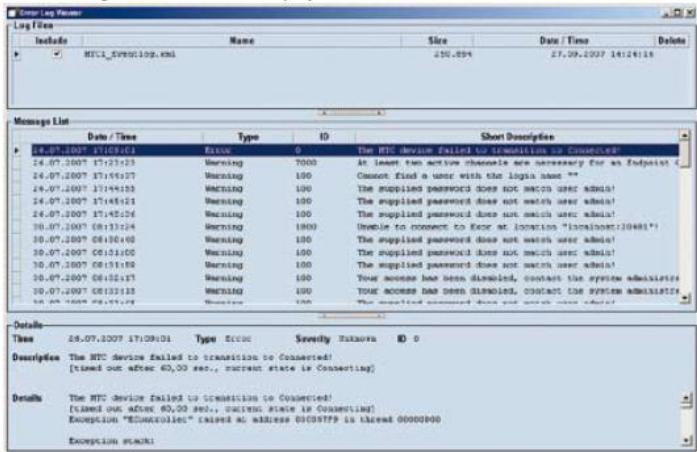


- 4# 在“*注解*”区域内输入描述该问题的其他注解性文字。
- 5# 在“*文件名称*”区域中会列出默认的文件保存位置及文件名称。如果您不想使用默认的文件保存位置或名称，请点击“*浏览*”。
- 6# 输入完毕（新的文件保存位置和文件名称）后，点击 *OK* 按钮并将问题报告保存为 *.ipr 文件。

15.2 错误日志

信息区域中显示所有由软件产生的错误，请参见“理解 LightCycler® 480 软件主窗口”章节。所有软件错误信息记录在多个日志文件中，可以使用错误日志工具查询这些日志文件。

为了显示错误日志文件：

| | |
|----------|--|
| 1 | 在“总述”窗口的“信息区域”中点击鼠标右键。 |
| 2 | 点击右键菜单中的“显示日志”。 将显示“错误日志查看器”窗口。  |
| 3 | 针对待显示的错误日志文件，点击“日志文件”列表中的“包含”选择框。 在“信息列表”区域中显示相应的信息。 |
| 4 | 选择“信息列表”区域中的一条信息，以显示该信息的细节。 |

为了删除错误日志文件：

| | |
|----------|------------------------------------|
| 1 | 在“总述”窗口的“信息区域”中点击鼠标右键。 |
| 2 | 点击右键菜单中的“显示日志”。 将显示“错误日志查看器”窗口。 |
| 3 | 针对待删除的错误日志文件，点击“日志文件”列表中的“删除”选择框。 |



不能删除当前正在使用的错误日志文件。

15.3 自我测试

在“工具”窗口的“仪器”章节中，您可以查看、打印或保存仪器最近的“自我测试”信息。关于说明，请参见“仪器”章节。

16. LightCycler® 480 的基础软件的安装与维护

LightCycler® 480 基础软件包括应用程序、一个数据库以及一个数据库对象服务器（称为“Exor4”，它将在软件使用过程中与数据库进行通信）。请按照如下所示的步骤将 LightCycler® 480 基础软件安装到您的计算机中。

本节将对下列主题进行详细说明：

- ▶ 安装 LightCycler® 480 的基础软件。
- ▶ 保存已有的数据库并安装新的数据库。
- ▶ 删除 LightCycler® 480 基础软件。

对于 LightCycler® 480II 型仪器的控制计算机，基础软件在到货时已经被安装，并带有跟踪型和研究型数据库文件各一个。




在安装完整的 LightCycler® 480 系统的过程中，通常由一个罗氏服务工程师为您安装 LightCycler® 480 基础软件。

16.1 安装 LightCycler® 480 的基础软件。

LightCycler® 480 仪器是通过 LightCycler® 480 基础软件来操纵的，该软件被加载到与仪器相连接的数据库工作站内。LightCycler® 480 的基本软件根据您在实验方案中提供的信息来对 LightCycler® 480 仪器进行操作。软件的安装则是通过一自解压安装程序来进行的。请按照以下步骤将软件安装到您的本地工作站。


如何安装 LightCycler® 480 的基础软件：

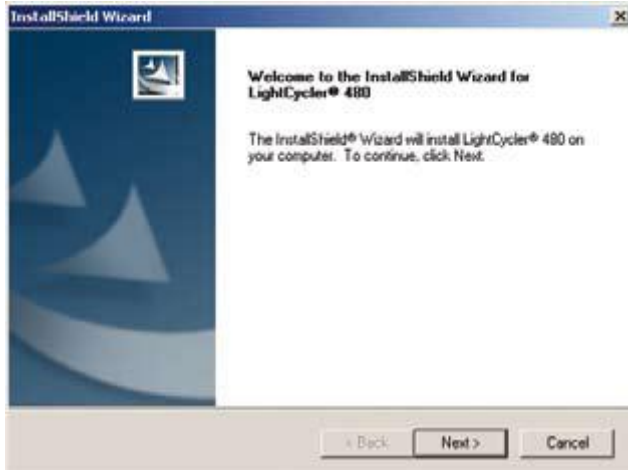
如果您第一次安装 LightCycler® 480 基础软件时要将其安装在一台与 LightCycler® 480 仪器一起提供给您的已经过认证的计算机，则请按以下步骤进行安装：


 对操作系统进行的任何未经授权的改动都可能导致您无法正常使用我们对产品所做出的保证及服务。

为保证软件稳定运行，如果需要安装在非罗氏提供的计算机上，其配置必须至少满足下列要求：

- ▶ Pentium 4 or equivalent, 3.2 GHz
- ▶ 2 GB RAM
- ▶ 40 GB 硬盘
- ▶ Network card
- ▶ Windows XP Professional, 英文版
- ▶ 显卡支持分辨率1280×1024
- ▶ CD-RW/DVD-R drive

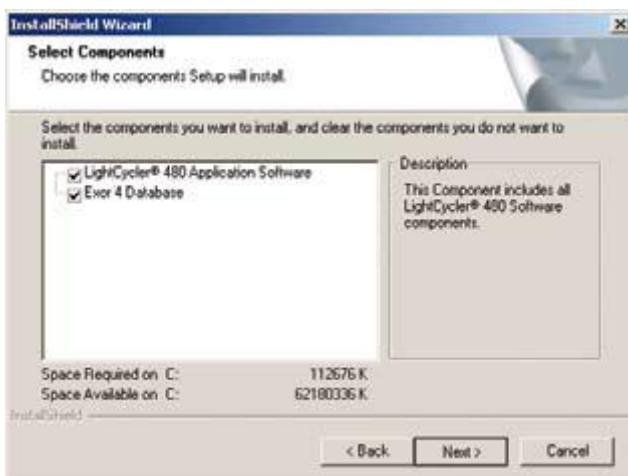
 在计算机光驱中插入 LightCycler® 480 基本软件的安装光盘。如果安装没有自动开始，则应双击 LightCycler480 文件夹中的 Software 子文件夹中的 Setup.exe 文件图标。安装过程中将对相关文件进行移动和解压缩，并且为您准备好安装向导。之后系统将为您打开“安装向导欢迎您”的窗口，请点击窗口中的“下一步”。



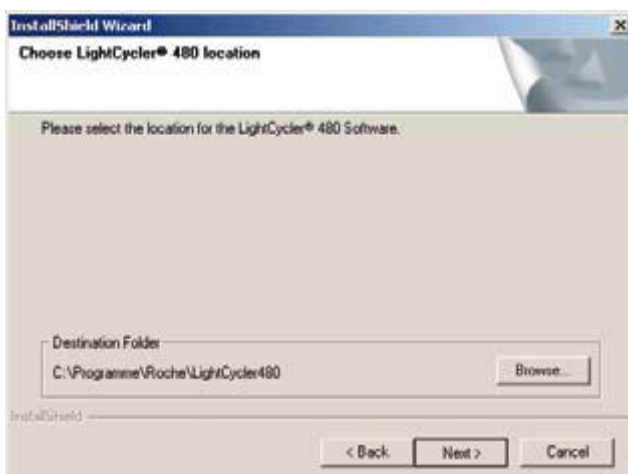
 系统提示您同意授权条款。点击 Yes。



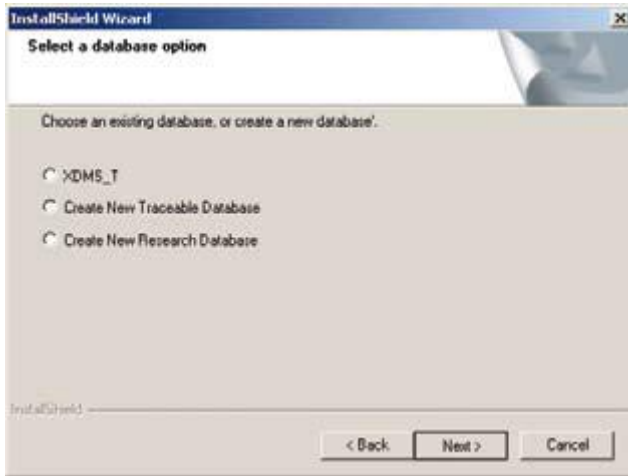
3# 在“数据库引擎位置”窗口中，您可以使用默认设置安装 Exor4 服务器，也可以为数据库引擎浏览和选择一个新的位置。设置完成后请点击“下一步”。



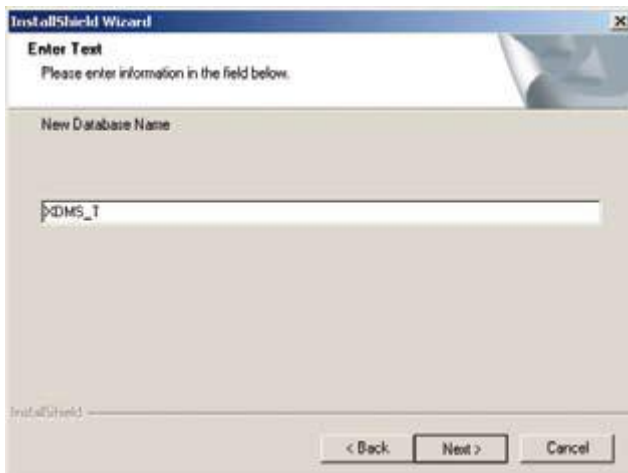
4 在“数据库文件位置”窗口中，您可以使用默认设置安装数据库，也可以为数据库文件浏览和选择一个新的位置。点击“下一步”。



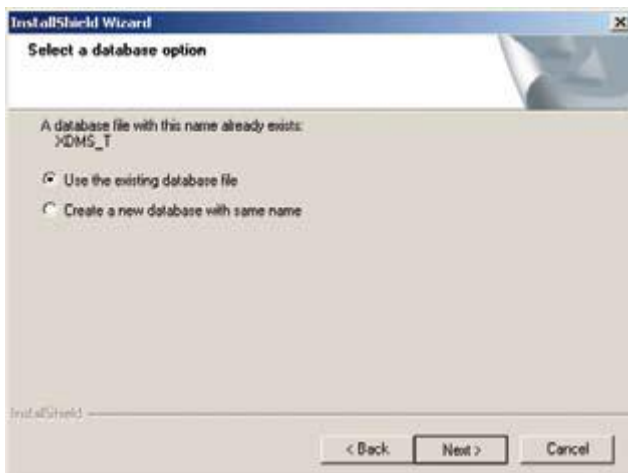
安装过程中将产生一个数据库。数据库分为“带有审计记录的可追踪的-Traceable”和“不可追踪的-Research”两种，在安装过程中可以选择。审计记录是安全的、由计算机产生的时间戳，它独立地记录数据，时间和操作员名称及条目和动作产生、修改或删除的电子记录。记录的更改不应该影响以前记录的信息。



5# 软件提示您为新数据库进行命名。为数据库输入一个名称或者选择使用默认名称，然后单击“下一步”。



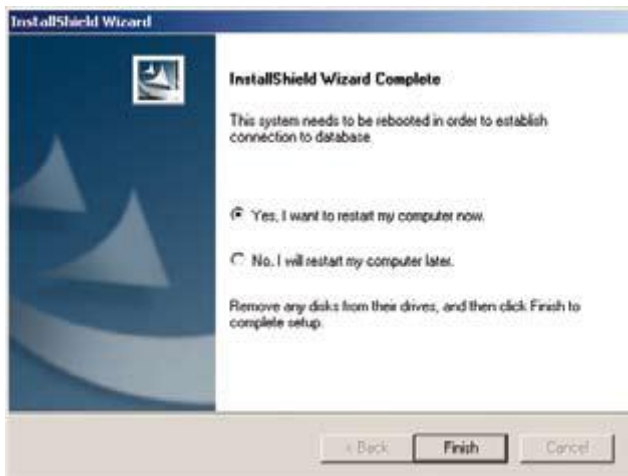
6# 您也可以选择计算机内已有的数据库文件



7# 为程序图标选择位置。您现在所指定的位置就是将来您可以启动 LightCycler® 480 基础软件的位置（点击这些图标即可启动该软件）。去掉您不需要的图标位置，并单击“下一步”。



8# 这时系统将显示“安装完毕”窗口，表明安装已经完成了。您可以在安装完成后即刻重新启动计算机以建立与数据库的连接，也可以选择以后再重新启动。点击“完成”。



16.2 启动 LightCycler® 480 软件和连接仪器

本节说明如何首次启动 LightCycler® 480 软件以及如何将 LightCycler® 480 仪器连接软件。

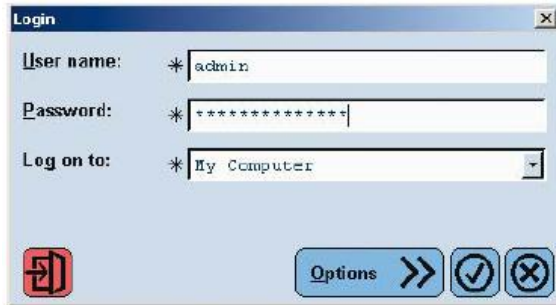
-
- 1 在重启后，等待直到出现密码窗口。
输入登录名和密码：
▶ 登录：operator
▶ 密码：LC480
点击 OK。
-

- 2 打开 LightCycler® 480 仪器。
-


- 3 双击 Windows 桌面上的 LightCycler® 480 软件图标。



-
- 4 使用“admin”用户名和初始密码“LightCycler480”登录软件。

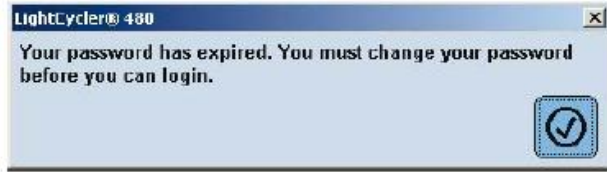







登录：选择您希望登录的数据库。关于详细信息，请参见“登录不同的数据库”章节。


 默认预先安装 2 个数据库：一个可跟踪数据库和一个不可跟踪（研究型）数据库。请选择您希望登录的数据库。



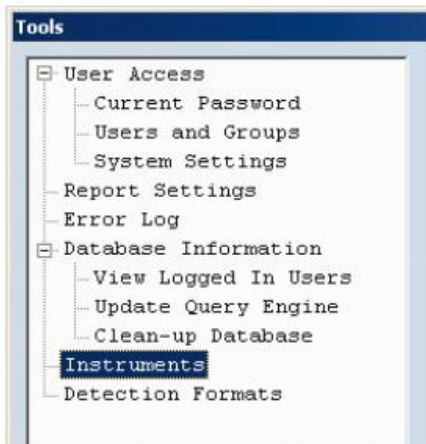
- 5 ▶ 出现一条信息，告诉您此时必须更改密码。



- ▶ 点击 
- ▶ 在“旧密码”字段中输入您当前的密码。
- ▶ 在“新密码”字段中输入新的密码并在“确认密码”字段中再次输入新密码。
- ▶ 点击 
-  当“新密码”字段和“确认密码”字段中的输入不匹配时， 按钮不会激活。
-  密码必须至少包含六个字符；一个字符必须是数字而一个字符必须是大写字母。密码区分大小写！记住密码或者将其保存在安全的位置。

- 6 ▶ 通过点击  按钮，打开“工具”窗口。


- 7 ▶ 在“工具”导航条中，选择“仪器”。





- ▶ 将出现“仪器”窗口。

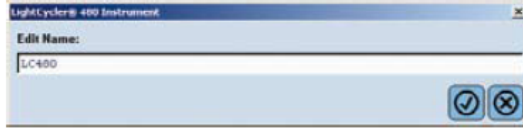


8

▶ 转到仪器选择框，点击 。


▶ 为 LightCycler® 480 仪器输入一个名称，随后点击 。

 记住当操作多个数据库时，对于同一个 LightCycler® 480 仪器，您应使用相同的名称。否则，当更改数据库时，不再将激活的仪器设定为默认值。



▶ 在“连接设置”选项卡中，输入 IP 地址“192.168.95.41”。



▶ 点击“测试连接”以测试该 IP 地址并和仪器建立连接。将出现信息“测试连接成功”。点击 。

▶ 点击“作为默认值”按钮。

▶ 关闭“工具”窗口。

 作为选择，如果您不希望将 LightCycler® 480 软件连接实际的仪器，可选择四种虚拟仪器中的任何一种（针对 96-或 384-孔格式）并将其作为默认值。

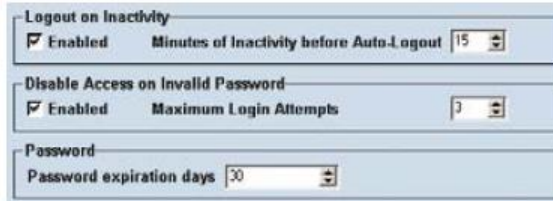
9

▶ 再次打开“工具”对话框，随后选择“仪器”。

▶ 检查“仪器识别号”字段中的仪器序列号是否可见。如果可见，则仪器正确安装。


10

在“工具”导航条中，选择“系统设置”。将出现系统设置窗口。




▶ 如果“最大登录尝试次数”和“密码有效期”设置不合适，可进行更改。
关闭“工具”窗口。

11

▶ 点击“退出”按钮  退出 LightCycler® 480 软件。

16.3 保存现有的数据库和安装其他数据库


出于备份目的，应常规性地保存您数据库的拷贝。在保存数据库之前，根据您的系统确保数据库的大小等于（或者小于）700MB，即一张 CD 的容量或者 4.5GB，即一张 DVD。为了检查您数据库的大小，如下进行操作：

 记住相对于软件 1.3 版或更早的版本，本版本的可跟踪数据库中实验的大小和整个可跟踪数据库的大小有所增大。这是因为运行完成后将自动执行的预计算（为了加速后续的分析计算）保存在每个实验的修订历史记录中。从而，可跟踪数据库中的实验大小可能超过 10MB。


因此，推荐定期检查数据库的大小并且在必要时保存该数据库的拷贝。当保存为可移动的 DVD 时，确保数据库的大小不超过 4.5GB。

检查数据库大小：

- 1 在 Windows 资源管理器中，选择 C:\Program Files\Roche\Exor4\Data。（数据库的位置对应于安装过程中的设置；根据您在数据库文件安装过程中的输入，该位置可能有所变化。同时，参见“安装 LightCycler® 480 软件”章节。）
- 2 使用右键单击您希望检查的数据库 (*.IB)。从菜单中，选择“属性”并从相应的菜单项中读取大小。

 如果您需要压缩数据库文件（比如，如果数据库大小超出 700MB (CD) 或 4.5GB (相应的 DVD)），您可以使用 CompactIB 工具。

压缩数据库文件

- 1 通过使用右键单击系统托盘中的 Exor4 图标并选择关闭，关闭所有正在运行的数据库引擎。
- 2 在 Windows 资源管理器中，在 C:\Program Files\Roche\Exor4\Data 文件夹下选择您希望压缩的数据库。（数据库的位置对应于安装过程中的设置；根据您在数据库文件安装过程中的输入，该位置可能有所变化。同时，参见“安装 LightCycler® 480 软件”章节。）
- 3 使用右键单击您希望压缩的数据库。从菜单中，选择“属性”并选择“安全”选项卡。选中“允许完全控制”方框和“针对所有现有组或用户名名称修改”方框。点击 OK。
- 4 在“开始”菜单中，选择“程序/Roche/CompactIB”。
- 5 将打开“压缩 Interbase 数据库文件”窗口。在待压缩的数据库文件方框中，输入该数据库所在目录或者点击  以导航至某个位置，并点击“打开”。
- 6 点击“压缩”以启动压缩过程。

保存数据库文件：

- 1 通过使用右键单击系统托盘中的 Exor4 图标并选择“关闭”关闭 Exor4。
- 2 通过使用您计算机上的 CD 刻录软件，将数据库 (*.IB) 保存到 CD 上。

安装其他数据库:

如果 LightCycler® 480 软件已安装在您的计算机上，您可以使用 LightCycler® 480 软件安装程序安装其他数据库：



当安装其他数据库时，不能更改 Exor4 位置和数据库文件位置。只能有一个位置用于 Exor4，并且后续的数据库文件必须与原先安装的数据库位于同一个位置。

1

通过使用右键点击系统托盘内的 Exor4 图标并选择“关闭”，关闭所有正在运行的数据库引擎。

2

插入 LightCycler®480 软件 CD。如果安装未自动启动，双击 LightCycler480_Software_Setup.exe。

3

将显示“安装类型”窗口。选择“安装数据库文件”并点击“下一步”。

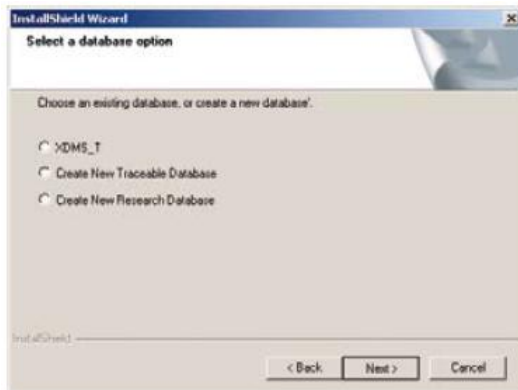


4

选择你是否希望安装

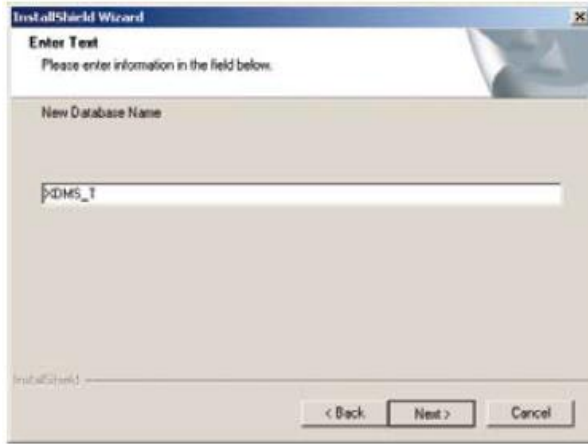
- ▶ 可跟踪的新数据库
- ▶ 研究型新数据库
- ▶ 现有的数据库（若存在）。显示现有数据库的名称。

关于可跟踪和研究型数据库的详细信息，请参见“数据库信息”章节。点击“下一步”。

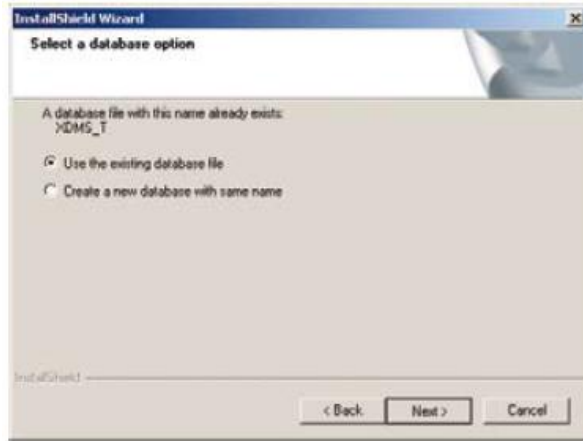


5

软件提示您对新数据库命名。输入数据库名并点击“下一步”。

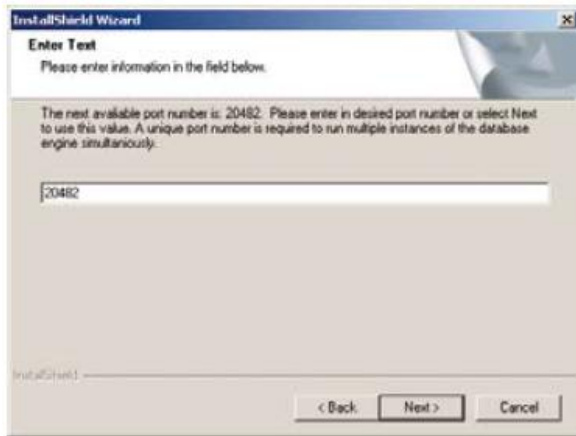


如果输入的数据库名已存在，您可以选择是否使用现有的数据库或者用相同的数据库名创建新的数据库。现有的数据库将保留。

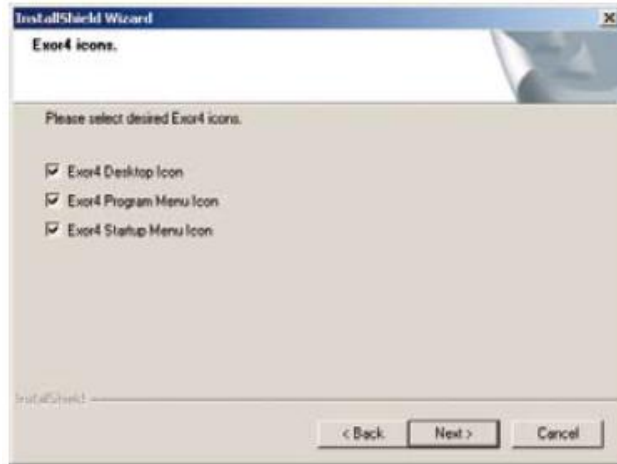


6

软件提示您为数据库输入端口号。使用默认值或者输入唯一的端口号并点击“下一步”。





- 7 为程序图标选择位置。这些位置是可以启动 LightCycler® 480 软件的位置。取消选择您不需要的图标位置，并点击“下一步”。



- 8 信息声明维护完成。点击“完成”。



-  安装过程在您的桌面上安装了另一个 Exor4 图标 。在您可以登录新的数据库之前，您必须通过双击您桌面上的这个图标或者重启系统来启动新安装的 Exor4 服务。


-  在使用新安装的数据库定义实验之前，您需要先定义仪器。关于细节，请参见“定义仪器”

16.4 登录到不同的数据库

您可以通过在“登录到”下拉菜单中选择新安装的数据库，从而登录之。

- 1# 双击 LightCycler® 480 基础软件图标以启动 LightCycler® 480 基础软件。
- 2# 这时系统将为您打开“登录”对话框。点击“选择”以显示已知的对象服务器列表。



- 3 点击加号图标。这时系统将为您打开“数据库属性”窗口。
- 4 为数据库输入名称及其位置。该位置通常由单词“localhost”与用于整合的数据库的端口号码一起组成，二者之间以逗号分隔。点击 OK。





- 如果您想确认某数据库的端口号码，则应将鼠标指向系统托盘中的 Exor4 图标，并读取对象服务器属性（如下所示）。



- 5# 数据库包含于“已知数据库列表”中，并且可以在“登录到”选择框中进行选择。新安装数据库的默认密码是 LightCycler480。



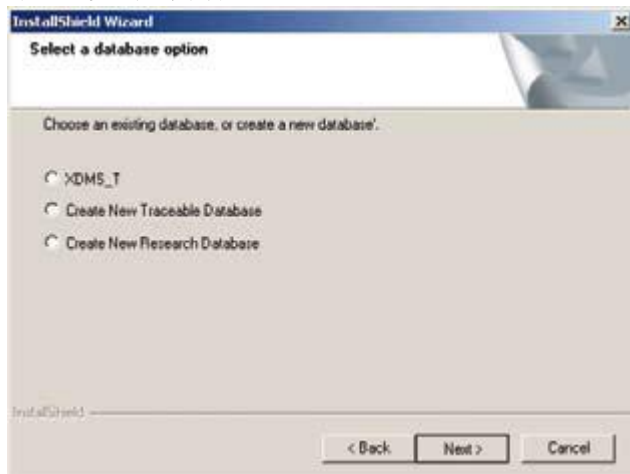
在“*已知数据库列表*”中选择一数据库并点击减号以去掉它。
点击图标以对数据库进行重新命名或改变其位置。



16.5 用一个数据库文件替换一个已存在的同名数据库

您可以使用一个与已有的数据库同名的数据库对原数据库进行替换（例如：在重新安装 LightCycler® 480 基础软件后）。在执行此任务时，没有必要再添加 Exor4 服务。

如何用一个数据库文件替换一个已存在的同名数据库：

- 1+ 退出 LightCycler® 480 基础软件。
- 2+ 右键点击系统托盘中的 Exor4 图标并选择“关闭”以关闭与将替换掉的数据库相对应的数据库引擎。
- 3+ 在 Windows 浏览器中，选择 C: \Program Files\Roche\Exor4\Data 中选择您将替换掉的数据库（数据库的位置随您安装时设置的不同而不同；它随着您安装数据库文件时输入的数据库位置的不同而改变）。您可在“*安装 LightCycler® 480 基础软件*”一节中参考相关内容。



- 4+ 以鼠标右键点击您希望进行替换的数据库。在菜单中选择“属性”和“安全”表。检查和确认“允许”框中为“完全控制”和“修改”。现在您就可以删除数据库或将其以另一个名称进行保存了。
- 5+ 复制您准备进行恢复（例如：从 CD 光盘中）的数据库文件到数据库所在的路径。
 **数据库的名称必须与删除的数据库的名称完全一致。必要时您可以对数据库进行重新命名。**
- 6+ 禁用数据库的访问权限的“完全控制”和“修改”。如果您从 CD 光盘中恢复了数据库，右键点击数据库文件并清除“一般”表中的“属性”菜单中的“只读”框。
- 7+ 双击您桌面上的 Exor4 图标以启动 Exor4 服务。
- 8+ 启动 LightCycler® 480 的基础软件。
 **如果您想登录到恢复的数据库，则您必须输入该数据库的用户名及密码。**

16.6 建立客户机/服务器网络

LightCycler® 480 软件提供网络功能。这使您能够将应用程序连接远程计算机上的 LightCycler® 480 数据库。还能够主动建立从不同用户到单个远程数据库的多个连接。相应地，可以建立 LightCycler® 480 客户机/服务器网络，该网络将最多 5 个 LightCycler® 480 控制单元和数据工作站（即，个人计算机不连接 LightCycler® 480 仪器但是安装了用于数据分析的 LightCycler® 480 软件）连接一个 LightCycler® 480 数据库服务器。



您还可以在不安装共享远程数据库服务器的条件下建立 LightCycler® 480 应用程序网络，以便能够在多个 LightCycler® 480 控制单元和数据工作站之间方便地进行数据交换。



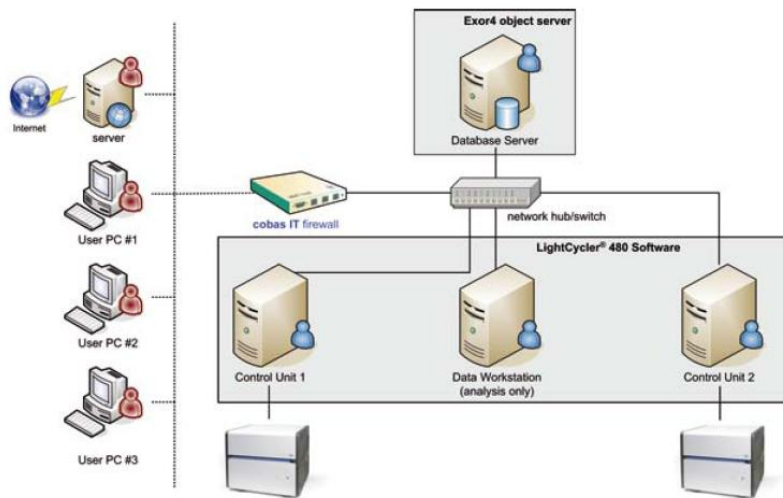
在通过还连接无保护的外部网络的网络将 LightCycler®480 控制单元和数据工作站连接远程数据库服务器之前，您应仔细阅读并理解“一般预防措施”中关于 LightCycler® 480 系统联网的免责声明。

以下给出建立这样一个网络解决方案的原理选项的总述。注意，也有可能存在这些实例配置的组合。



符号  表示罗氏计算机系统，而符号  表示由用户提供的非罗氏计算机系统。

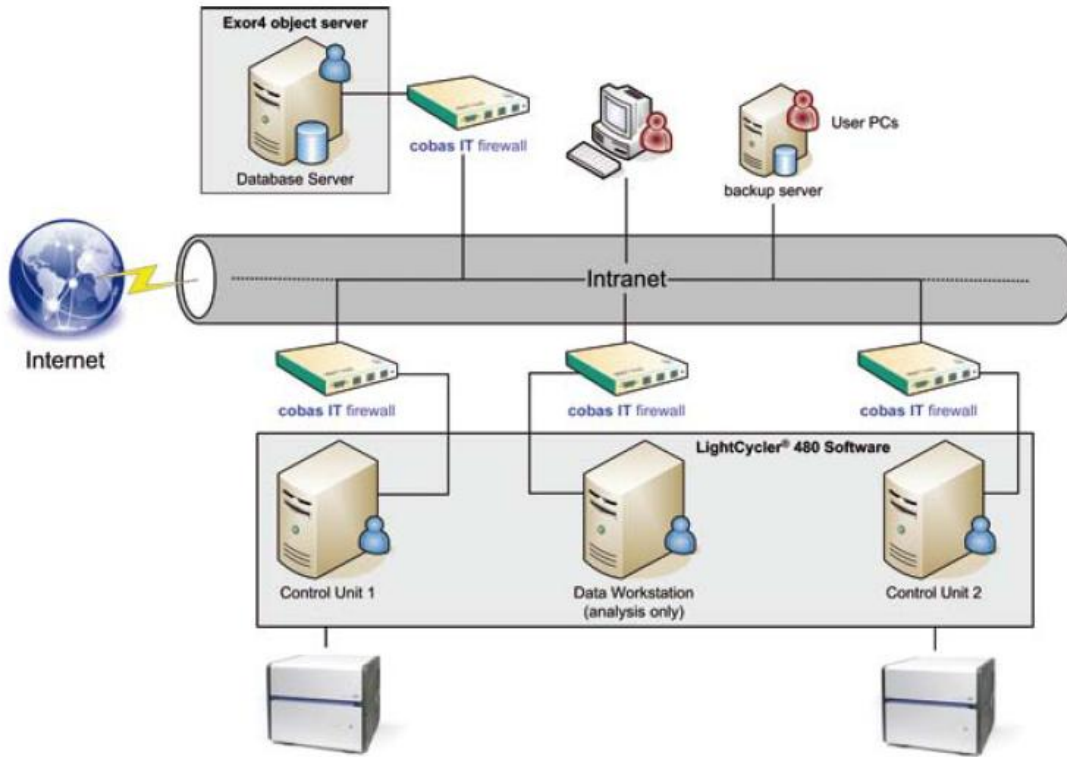
1. 由罗氏计算机系统上的 LightCycler®480 应用程序组成的子网只连接无保护的外部网络（比如，实验室网络或企业内部网络）。LightCycler®480 子网可以包括 LightCycler® 480 仪器与其控制单元、数据工作站和/或数据库服务器的任意组合。为了保护 LightCycler® 480 子网免受任何潜在威胁（比如，网络承载攻击）的影响，必须使用 cobas IT 防火墙控制往返于 LightCycler® 480 子网的网络流量。



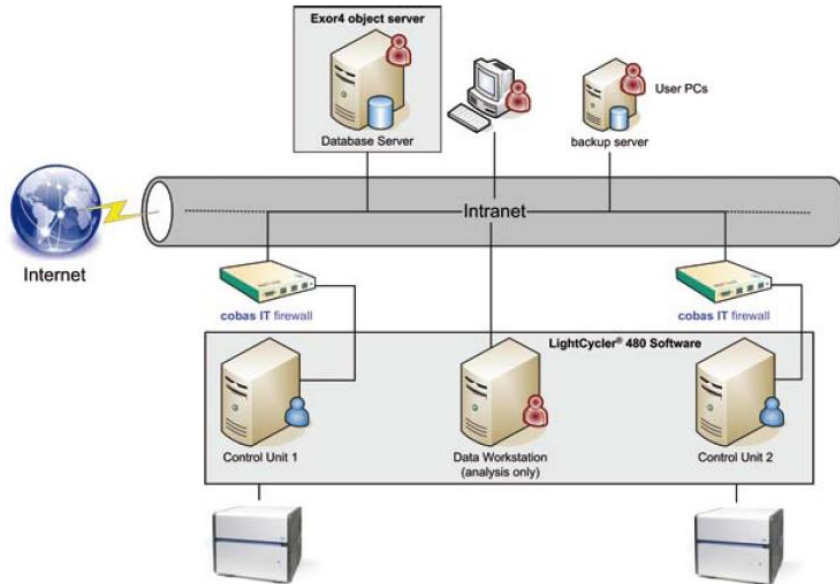


LightCycler® 480 子网还可以作为一个隔离且与外部网络无连接的本地网络进行运行。在这种情况下，无需安装连接其他网络或互联网连接的路由器。

2. 所有 LightCycler® 480 应用程序（控制单元和数据工作站上的 LightCycler® 480 软件和远程数据库服务器上的 Exor4 对象服务器软件）安装在直接连接外部无保护网络（比如，实验室网络或企业内部网络）的罗氏计算机系统上。在这种情况下，必须使用 cobas IT 防火墙单独保护每个 LightCycler® 480 应用程序。另外，通过在数据库服务器和 LightCycler® 480 应用程序之间建立虚拟私有网络（VPN），来保证两者之间通信的安全性。



3. 有些 LightCycler® 480 应用程序（数据工作站上的 LightCycler® 480 软件和/或远程数据库服务器上的 Exor4 对象服务器软件）安装在非罗氏提供的计算机系统上。这些非罗氏提供的系统和 LightCycler® 480 控制单元直接连接外部无保护的网路（比如，实验室网络或企业内部网络）。在这种情况下，必须使用 cobas IT 防火墙单独保护每个 LightCycler® 480 控制单元。非罗氏提供的系统的保护必须由用户保证。



当建立 LightCycler® 480 客户机/服务器网络解决方案时，应遵守以下一般条件和限制：



如果存在疑问，请联系您当地熟知这些规则的罗氏服务工程师。

▶ 必须与远程数据库服务器上的 LightCycler® 480 数据库安装在一起的 Exor4 对象服务器软件，与 Microsoft Windows XP Professional（service pack 2）和 Microsoft Server 2003 兼容。



尽管如此，由于罗氏还未验证 Exor4 对象服务器软件与 Microsoft Server 2003 协同工作的功能性，因为 Microsoft Server 2003 只能安装在非罗氏提供的计算机系统上，因此罗氏不能支持这种配置。



除了远程数据库，还可以使用控制单元上的本地数据库。如果您启动控制单元上的 LightCycler® 480 软件，您可以选择您想登录的那个数据库（本地或者远程）。

▶ 在所有控制单元和数据工作站上，必须安装相同版本的 LightCycler® 480 软件。



数据库服务器上只安装了 Exor4 对象服务器和 LightCycler® 480 数据库。

- ▶ 必须将每个 LightCycler® 480 仪器连接单独的控制单元。
- ▶ 当用户登录 Windows 时，LightCycler® 480 数据库服务器必须稳定运行。Exor4 对象服务器必须开机并运行。
- ▶ 出于安全原因，所有用户必须登录远程数据库的不同帐号。
- ▶ 远程数据库的活动连接数不应超过 5。
- ▶ 对于每种类型（96 孔或 384 孔），远程数据库上仅限使用 1 台虚拟仪器。
- ▶ 必须在 LightCycler® 480 仪器控制单元或者 LightCycler® 480 数据工作站上单独的本地数据库中定义模板和宏。
- ▶ 如果在 LightCycler® 480 运行过程中仪器控制单元和数据库服务器之间的网络连接会丢失，应从控制单元上的 LightCycler® 480 软件中将实验数据导出并导入远程数据库。
- ▶ 在 LightCycler® 480 运行过程中数据库服务器关机可能导致数据库出现不确定的状态，从而可能造成数据丢失。

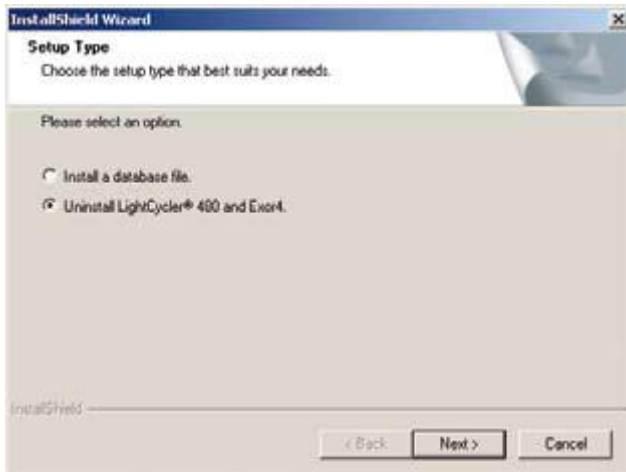
16.7 删除 LightCycler® 480 的基础软件

请按照如下所示的步骤从您的计算机中删除 LightCycler® 480 基础软件。

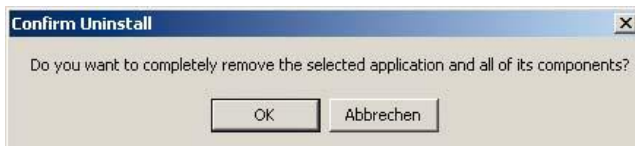
如何删除 LightCycler® 480 基础软件：

1+ 右键点击系统托盘中的 Exor4 图标并选择“关闭”以关闭所有正在运行的数据库引擎。

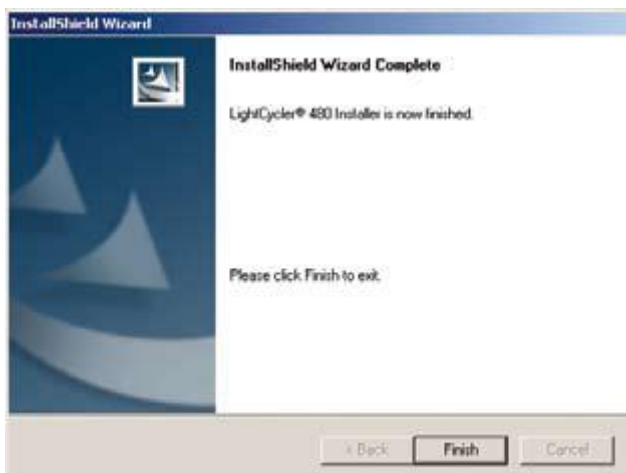
2+ 在计算机光驱中插入 LightCycler® 480 基础软件的光盘。如果安装过程没有自动启动，则请双击 LightCycler480 文件夹下 Software 子文件夹中的 Setup.exe 文件图标。这时系统将为您打开“安装类型”窗口。选择“删除 LightCycler® 480 基础软件”。



3+ 系统提示您对删除进行确认。点击 OK。



4+ 这时系统会给出提示信息告诉您维护已经完成了。点击“完成”。



Maintenance

E

第五章 LightCycler® 480 的维护

本章主要为您提供LightCycler® 480 仪器的常规维护方法

| | |
|----|-----|
| 维护 | 323 |
|----|-----|

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 1. | 常规维护..... | 325 |
| 2. | 仪器清洁操作指南 | 325 |
| 2.1 | 常规清洁..... | 325 |
| 2.2 | 预防性维护..... | 325 |
| 3 | 更换氙灯..... | 326 |
| 4 | 更换风道灰尘过滤器..... | 330 |
| 5 | 更换保险丝 | 332 |

维 护

1、常规维护

LightCycler® 480仪器的常规维护不需要专属的工具即可进行。

2、仪器清洁操作指南



切勿在没有切断LightCycler® 480仪器电源时进行仪器清洗或拆卸仪器电缆。



不要将液体倾倒在温控模块、循环板部件间隔区或仪器的内部。



在对任何有潜在性生物危害的样品进行处理及操作时，都应采取普遍适用的安全防护措施。如液体样品溢出，则应迅速取用适当的消毒剂进行消毒，以避免污染物散播至实验室人员或污染仪器。应当遵循当地的生物安全指导来完成对污染材料的处理及处置。

2.1 常规清洁







用温和的清洁剂清洁LightCycler® 480仪器的外壳、温控模块以及温控模块盖。必要时可用70%的乙醇对仪器的外壳、温控模块以及温控模块盖进行消毒。

2.2 预防性维护

应定期检查LightCycler® 480仪器周围区域的情况，以确保仪器周围空气可自由流通，并确保其周围没有书本、纸张或其它物品妨碍空气流通。详细情参阅本手册“[安装](#)”一节。

3. 更换氙灯

对于实时定量PCR荧光信号的观测及溶解曲线的分析来说，足够亮的氙气激发灯是得到最佳观察效果的必需条件。因此，LightCycler® 480仪器自动且持续的检测氙灯的亮度。如果灯的亮度低于初始亮度的50%，LightCycler® 480仪器的基础软件就会自动报警，提示需要调换氙灯。氙灯作为可调换的零部件可直接从罗氏公司获取，也可从零售商处购买。具体情况请联系当地罗氏公司代理。

-  使用的氙灯必须沿用以下型号：LightCycler® 480 (Cat. No. 04 686 136 001)
-  切勿在未关闭仪器的电源及拆离电缆的情况下更换氙灯。否则会有触电的危险，且氙灯强光源照射会引起眼睛损伤。
-  请务必在LightCycler® 480仪器运行后等待一段时间（大约20分钟）再更换氙灯，使得机器有足够的时间冷却。在仪器刚刚停止运转时的氙灯非常热，能导致直接的灼伤。
-  在氙灯处于冷却的状态时，具有一定的灯内高压（大约20巴）。在仪器运转时，灯内部的压力大约是其冷却状态时的3倍。氙灯爆炸的可能性很小，但并不排除这个可能。因此，在对氙灯进行操作时始终需要使用防护装或防护帽等装备。在安装氙灯时如去除了防护装或防护帽等装备，也需要始终采用下列防护措施：戴上护目镜、戴上手套及保护好您的颈部（例如，在颈部围一条厚围巾）等。在拆卸氙灯时也需要做好同样的防护措施。
-  不要将指纹、油脂、涂料或其它类似物留在灯泡上。在使用氙灯之前，用异丙醇或乙醇或其它合适的无残留制剂，将上述污痕去除干净。
-  由于氙灯不含有任何对周围环境有害的物质，因此其不受特殊的废弃物处理规章制度的制约。旧的氙灯泡在处理掉之前，应将其储存于不易被接触到的防护服或防护帽中。在有条件的地方，氙灯泡应该通过特殊的废弃物处理公司来进行处置。如果上述办法不能实现，那么应穿上防护服，将氙灯泡完全包绕在皮革制品或厚的衣物中后使用合适的工具打碎灯泡，同时需要打碎放电管，并除去灯泡碎片。

下面的图示详细讲解了怎样更换氙灯。

- 1 移开右侧的嵌板。



- 2 现在你能够很容易的将仪器的盖子移到右边，暴露出氙灯装置。

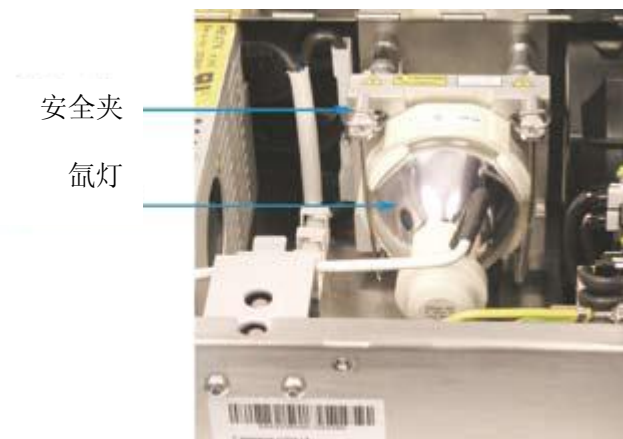
氙气灯装置



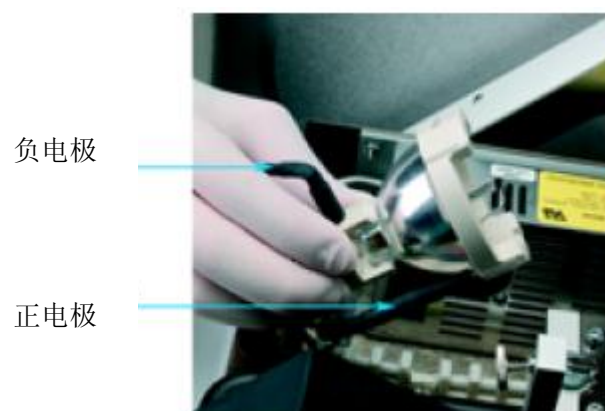
- 3 如果您想更换氙灯，则必须先去除氙灯的盖子。盖子被螺丝钉所固定。旋松螺丝，并打开盖子。



- 4 氙灯被一个夹子所固定，这个夹子本身有一个螺丝钉起到固定的作用。放松并打开夹子。




- 5 将氙灯提起并使之脱离夹子，并将两个导电极取出。



- 6 将新的氙灯装上。首先连接上（-）电极，然后再连接上（+）电极。





- 7 将新的氙灯灯泡重新用夹子夹住后完成对其的安装，并确认（-）极导体指向上方。按照以上4到1的相反步骤。

- 8  当您更换氙灯后，请一定将位于仪器窗口的LightCycler® 480仪器基础软件中工具框中（详细请见[管理工具部分](#)）的氙灯计数器重置。仪器将进行读数，并储存灯泡的亮度值，将其作为灯泡亮度的初始数据。在操作过程中，仪器将储存的亮度初始数据与灯泡实际亮度相比较，并藉此测定灯泡亮度损失的数值。如果灯的亮度低于初始亮度的50%，LightCycler® 480仪器的基础软件就会自动报警，提示您需要调换氙灯。

4. 更换风道灰尘过滤器

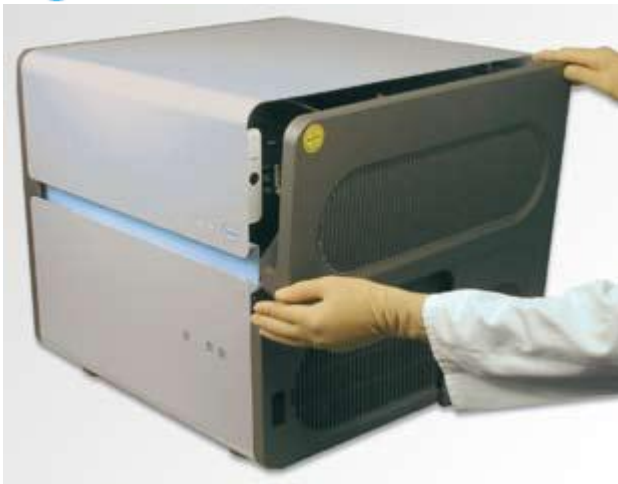
LightCycler® 480仪器的电子支架是依靠通风冷却的。两个通风口位于仪器右侧的右下方角落（恰好毗邻于循环板间隔区），并处于仪器的背面。为了避免仪器内部被灰尘颗粒污染，这些通风口都附带有灰尘过滤装置。

 每年应定时更换灰尘过滤器。

 在LightCycler® 480仪器包装内附有4个可更换的灰尘过滤器。

下面的图表详细讲解了怎样更换通风用灰尘过滤器。

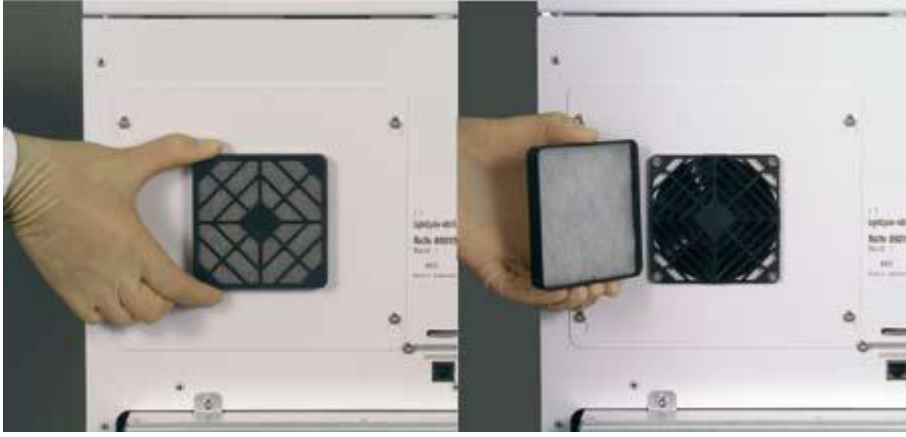
1 为了更换侧面的通风口，请先移除仪器右侧的嵌板。



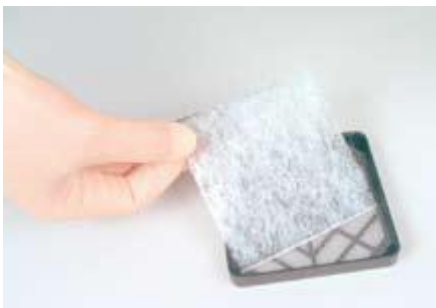
2 移开风道灰尘过滤器的支架。



- 3 用同样的方式，从仪器背面的通风口处将灰尘过滤器的支架移开。



- 4 从每一个架子上将旧的灰尘过滤器取下来，并插入新的灰尘过滤器。






- 5 将每一个灰尘过滤器的架子重新放回到通风口处。并将仪器右侧的嵌板重新安装好。



5. 更换保险丝

LightCycler® 480仪器包括8种类型的保险丝。保险丝烧断后用户必需对其进行更换。在LightCycler® 480仪器的包装内,每一种类型的保险丝都附有10根相同的备用保险丝。

下面的列表对LightCycler® 480仪器中使用到的保险丝的类型及其所处的位置做了一个概述:

| 型 号 | 位 置 | 标 签 | 安 培 / 伏 特 | 用 户 负 载 |
|--|---------------------------|---|-----------------------|------------|
| 主保险丝 | | | | |
| 高断流容量 (T 10A H / 250V) | 位于仪器外部, 电源箱左侧 (从仪器正前方观察时) | FUSES LINE INPUT 2 × T10A H / 250V | 2 × T10A / 250V | 仪器电缆 输入 |
|  | | | | |

| 型号 | 位置 | 标签 | 安培/伏特 | 用户负载 |
|--|--|--|----------------|------------------|
| 次保险丝 | | | | |
| 高或低断流容量 | 位于仪器内部，电源箱右侧，必须将  仪器右侧嵌板移开才能接近次保险丝 | F1 | T3.15 A / 250V | 检测组件 |
| | | F2 | T8 A / 250V | 循环板组件 |
| | | F3, F4, F5 | T16A / 250V | 温控模块组件—Peltier元件 |
|  | |  每一个F1—F5次保险丝都有一个发光二级管，该二级发光管可以作为保险丝是否在正常工作的判断依据。如果保险丝熔化，则发光二极管将熄灭。 | | |

| 型号 | 位置 | 标签 | 安培/伏特 | 用户负载 |
|-------|---|----|------------------|------|
| 氙灯保险丝 | | | | |
| | <p>位于仪器内部，氙灯组件的右侧，灯的主插座上方。</p>  <p> 如果您想更换氙灯的保险丝，则需首先移开仪器的盖板。</p> | | 2 × T1.6A / 250V | 氙灯 |

如何更换主保险丝及次保险丝：

- 1 用螺丝起子将保险丝孔盖旋松：



- 2 将保险丝同保险丝盖一起从保险丝孔中取出。



- 3 将熔断的保险丝用后备保险丝替代后将其重新放置入保险丝孔中。
- 4 将保险丝盖重新旋紧。

更换氙灯的保险丝：

- 1 移开仪器的盖板。
- 2 氙灯的保险丝位于氙灯模块的主插座的上方。



- 3 用钳子用力压住保险丝内部固定器左右两侧的夹子即可将保险丝固定器从保险丝孔中拉出。



- 4 将熔断的保险丝用后备保险丝替代后将其重新放置入保险丝孔中
- 5 将仪器盖板重新安装到原位并盖好。



附录

第 6 章 - 附录
索引和订购信息

| | | |
|----|-----------|-----|
| 1. | 订购信息..... | 339 |
|----|-----------|-----|

附录

1. 订购信息

罗氏应用科学提供一系列的试剂和系统，用于生命科学研究。要全面了解相关产品和手册，请访问我们的主页 <http://www.roche-applied-science.com> 以及以下网站：

- ▶ LightCycler® 480 系统
<http://www.roche-applied-science.com/LightCycler480>
- ▶ 用于自动核酸分离的MagNA Pure System 系列：
<http://www.maganapure.com>
- ▶ DNA & RNA 制备 – 核酸净化多功能工具：
<http://www.roche-applied-science.com/napure>

| | | |
|--------------------------------|--------------------------|----------------|
| 仪器 | | |
| LightCycler® 480II 仪器 (96-孔) | 一台仪器配一个控制/数据分析计算机及相关附件 | 05 015 278 001 |
| LightCycler® 480II 仪器 (384-孔) | 一台仪器配一个控制/数据分析计算机及相关附件 | 05 015 243 001 |
| 软件 | | |
| LightCycler® 480 基础软件 1.5 | 1 个软件包 | 04 994 884 001 |
| LightCycler® 480 LIMS 模块 | 1 个软件包 | 05 066 310 001 |
| LightCycler® 480 基因扫描软件 | 1 个软件包 | 05 103 908 001 |
| LightCycler® 480 多板分析软件 | 1 个软件包 | 05 075 122 001 |
| 附件 | | |
| LightCycler® 480 Block Kit 96 | 96-孔温控模块，含温控模块盖、存储盒和装载架 | 05 015 219 001 |
| LightCycler® 480 Block Kit 384 | 384-孔温控模块，含温控模块盖、存储盒和装载架 | 05 015 197 001 |
| 配件 | | |
| 灰尘过滤器 | 4个 | 04 686 128 001 |
| 氙灯 | 1个 | 04 686 136 001 |

| | | |
|--|---------------------------|----------------------------------|
| 丢弃件 | | |
| LightCycler® 480 多孔板 96 白色 | 带50片密封薄膜的50块板 | 04 729 692 001 |
| LightCycler® 480 多孔板 384 白色 | 带50片密封薄膜的50块板 | 04 729 749 001 |
| LightCycler® 480 多孔板 96 透明 | 带50片密封薄膜的50块板 | 05 102 413 001 |
| LightCycler® 480 多孔板 384 透明 | 带50片密封薄膜的50块板 | 05 102 430 001 |
| LightCycler® 480 密封薄膜 | 5 x 10 箔片 | 04 729 757 001 |
| PCR 试剂 | | |
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | 1 盒 (5 x 100 反应, 每个20 µl) | 04 707 516 001 |
| LightCycler® 480 Probes Master | 1 盒 (5 x 100 反应, 每个20 µl) | 04 707 494 001 |
| LightCycler® 480 Genotyping Master | 1 盒 (4 x 96 反应, 每个20 µl) | 04 707 524 001 |
| LightCycler® 480 Control Kit | 3 次对照实验 | 04 710 924 001 |
| 标签试剂 | | |
| SimpleProbe 519标签试剂 | 100 µmol | 04 687 132 001 |
| LightCycler® Fluorescein CPG | 1 g 5 管 | 03 138 178 001 03 113 906 001 |
| LightCycler® Red 640-N-hydroxysuccinimide ester | 1 瓶 | 12 015 161 001 |
| LightCycler® Red 610-N-hydroxysuccinimide ester | 1 瓶 | 03 561 488 001 |



Published by

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

© 2008 Roche Diagnostics GmbH
All rights reserved.

05152062001 0208