The LightCycler® 480 Software Version 1.5 及以上版本。

01

启动机器与软件

开机前请注意检查:电源连接正常、环境温度保持在 15℃-32℃、湿度: 30-80% 无冷凝水;样本加载模块周围无阻挡。

主机在启动过程中,位于前面板上的两个状态指示灯会随启动进程闪烁及改变状态,下图显示为仪器已经启动,并处于待机状态,尚无多孔板载入:



软件左上角的仪器状态将显示为: Standby (no MWP):

Instrument:	LC480/Standby (no MWP)	Database:	My Computer (Research)
Window:	Overview	• User:	System Admin
ð	LightCycler®480 Software reversion 1.5.1.62	elease 1.5.1.62	

如果仪器和软件启动后,仪器前面板上的状态指示灯正常,但软件左上角的仪器 状态显示为:Not Connected,说明仪器和电脑链接异常,可通过以下操作进行 恢复。

首先点击软件右下角的 Open Tools 功能键:



在打开的窗口左侧选择 Instruments 选项;接着点击右侧界面仪器名称的下拉框,选中一台非虚拟(Virtual 开头)的仪器,如 LC480;再点击 Test Connection 进行 仪器和软件的连接,连接成功后确认;最后选择界面右下方的 Make Default 按钮 完成连接操作。

User Access Current Password Users and Groups System Settings Report Settings Error Log	Instruments USIO CVirtual LightCycl Connection Virtual LightCycl Virtual LightCycl	er 480 96 System I er 480 96 System II er 480 384 System II ar 480 384 System I		(2). D 0(
Database Information	ID Address Data and an			cation Time Int
-View Logged In Users Undate Query Engine	192,160,95,11	0-	Ope	ration time (n)
Clean-un Databare		(3) Test Co	Res	et values after Lamp Change
	-Instrument Information-	Black	Clear Plates Mixed Plates (user	configurable)
	Technical Information	Excitations Filters	Emissi	Ion Filters
	Not Connected	Pos Wavelength	Pos V	Wavelength
				(4) Make Default

02 仪器耗材选择和使用

.....

LightCycler[®] 480 提供配套 96 孔板和八连管耗材,使用八联管时请使用罗氏配套的适配器,建议对称放置八连管,如下图所示。



LightCycler[®] 480 使用 0.1ml 矮管耗材,在使用不合格的第三方耗材时,可能会由于材质以及和仪器加热模块的贴合性差异造成结果一致性的差异。

03

实验程序设置

为了快速准确地进行实验程序的设置,建议采用以下步骤: 首先在软件的开始界面选择正确的耗材类型,白板/管选择 White Plates,透明板 /管选择 Clear Plates。

接着选择"New Experiment from Template(从模板开始新的实验)"。



在弹出的界面中选择模板并点击对号进行程序的加载,可以根据需要对加载后的 程序进行修改。

Run Templates											
Name		Path	Creat	ion Date							
Dual Color Hydrolysis Probe - JPL	Probe 96-11	/Roche/Templates/Run Templates/System 11 07.20.2007 16:33:									
Endpoint Genotyping (PCR Read) 96-	II	/Roche/Templates/Run Templ	lates/System I	1 07.20.2007	17:08:06.71						
Endpoint Genetyping (Pre-Post Read) 96-II	/Roche/Templates/Run Templ	lates/System I	1 07.20.2007	17:13:51.39						
Gene Sconning 96-II		/Roche/Templates/Run Templ	lates/System T	1 07.20.2007	16:44:38.87						
HohErobe 95-IT		/Rocke/Templetes/Run Temp	stee/Sustem T	1 07 18 2000	15-44-17 21						
Mone Color Byürclysis Preze - UPL	Probe 96-II	/Rothe/Templates/Run Templ	lates/System I	1 07.20.2007	16:32:53.57						
Samplercope Foria		verse renyeases and renge									
SYBR Green I 36-11		/Roche/Templates/Run Templ	latea/System I	1 07.20.2007	15:51:55.50						
		*									
Subset Templates				Teation Date							
Subset Templates	Path			Creation Date							
Subset Templates Name Checkerboard Subset Information	Path /Expert/1	emplates/Subset Templates	C1.09.20C8 1	Creation Date 7:11:02.466							
Subset Templates Name Checkerboard Subset Information Guadrants Subset Information	Path /Expert/1 /Expert/1	emplates/Subset Templates emplates/Subset Templates	C1.09.20CB 1 C1.09.20CB 1	Creation Date 7:11:02.466 7:05:10.534							
Subset Templates- Name Checkerboard Subset Information Guadrants Subset Information	Path /Expert/1 /Expert/1	emplates/Subset Templates emplates/Subset Templates	C1.09.20CB 1 C1.09.20CB 1	Creation Date 7:11:02.466 7:05:10.534							
Subset Templates- Name Checkerboard Subset Information Guadrants Subset Information	Path /Expert/T /Expert/T	emplates/Subset Templates emplotes/Subset Templates	C1.09.20C8 1	Creation Date 7:11:02.466 7:05:10.934							
Subset Templates- Name Checkerboard Subset Information Guadrants Subset Information Sample Editor Templates-	Path /Expert/T /Expert/T	emplates/Subset Templates emplotes/Subset Templates	C1.09.20C8 1	Creation Date 7:11:02.466 7:05:10.534							
Subset Templates- Name Checkerboard Subset Information Guadrantzi Subset Information Sample Editor Templates- Name	Path /Expert/T /Expert/T	empletes/Subset Templetes empletes/Subset Templetes empletes/Subset Templetes	C1.09.20C8 1	Creation Date 7:11:02.466 7:05:10.534 Creation Date							
Subset Templates- Name Checkerboard Subset Information Guadrantzi Subset Information Sample Editor Templates- Name RelQuant xy Sample Information	Path /Expert/T /Expert/T Path /Expert/T	emplates/Sample Templates	C1.09.20C8 1 01.09.20C8 1 01.09.20C8 1	Creation Date 7:11:02.466 7:05:10.534 Creation Date 7:05:55.624							

修改后的模板可以保存后供以后实验使用:在实验程序设置界面(下图所示), 点击左下角 Apply Template 右侧的下拉框,选择 "Save As Template",再选择保 存路径(默认为 Templates 文件夹),编辑模板名称后点击打勾选项。



原始数据显示

将扩增曲线图的横坐标单位从 Time 转换为 Cycles。点击图上方 Axis 右侧的下拉框,选择 Fluorescence over Cycles 即可。



实验结果分析

(1) 当个别分隔界面显示不全时,可以通过点击并拖拉下图中箭头所指的图标来 扩大和缩小相应界面;也可以通过双击这个图标使界面最大化。

Step 2: Select Samples		۰° ۵	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentrati *
Subset New Subset 1		A1		A1	1	Ref Unknown 🔹	
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12		51		71	L	Ref Unknown	
		C1		AI	1	Sef Unknown	1
		D1		D1	1	Target Unknown	
		E1		D1	1	Target Usknown	
		F1		D1	1	Target Unknown	
		G1		G1	nto	Ref Unknown	
		111	-/	81	ntc	Target Unknown	
HHA I		A2		12	2	Ref Unknown	
·		82		A2	2	Ref Unknown	
Replicate of		9		A2	2	Ref Unknown	
_		02		D2	2	Target Unknown	
Cannot have more than 12 colors.	L	E2		D2	2	Target Unknown	
		F2		D2	2	Target Unknown	
		62		G1	nto	Ref Unknown	
Step 3: Edit Rel Quant Properties	1	H2		H1	ntc	Target Unknown	
Sample Name		C5		C\$	51	Ref Standard	1.00E4
and the second of the second sec		D5		C5	S1	Ref Standard	1.00E4 _
Sample Type		E5		CS	31	Ref Standard	1.00E4
C Unknown Negative Control		C6		C6	52	Ref Standard	1.00E3
Positive Control/Calibrator		D6		C6	52	Ref Standard	1.00E3
Standard Concentration Auto Sto Curve		E.E		C6	52	Ref Standard	1.00E3
Gene tweet		C7		C7	53	Ref Standard	1.00E2
Gene anger		D7		C7	53	Ref Standard	1.00E2
Target name Eff 2.00		£7		C7	\$3	Ref Standard	1.00E2
CTarget CReference Citesestance		C8		C8	54	Ref Standard	1.00E1
make replicates		Bđ		CS	54	Ref Standard	1.00E1
Auto Replicate 🗸		FR		CR.	84	Ref Standard	1,0081
Apply Configu					Reset	All import	Export

(2) 绝对定量中标准曲线的保存和调用:

【保存】:

在 Analysis 界面,点击 Srd Curve(In Run)右边的下拉框,选择 Save as external。



在弹出的窗口中依次选择文件夹 Special Data /Std Curve,进行标准曲线的命名,最后点击打勾选项保存。



【调用】:

检测待测样本目的基因浓度时,如果当次实验未制作该基因的标准曲线,需要调用之前保存的标准曲线,则需要在当次实验中包括一个已知浓度的标准品,并进行正确命名,用于标准曲线的定标。如下图所示的标准品为浓度 103 Copy 的 3 个重复,紫红色显示 F12、G12、H12,待测样是蓝色所示 A1、B2、C1。

Window:	Demo Abs Quant with SYBR Green I	K r	Sele	ct Filte	r Combina	لے itions	User:	System Adn
Experi- ment	Abs Quant C Rel Quant C Scanning C Color Comp Tm C Melt Geno C Endpt Geno		₽ 4	83-533				
Subset Editor	Step 2 Select Samples		Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration
L	abset New Subset 1		F12		F12	Standard 4	Standard *	1.00E9
Samp	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1112 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		G12		F12	Standard 4	Standard	1.00E3
Contor			H12		F12	Standard 9	Standard	1.00E3
Report								
	Step 3: Edit Abs Quant Properties Sample Name Standard 4 Sample Type C Unknown C Negative Control Positive Control/Calibrator Standard Concentration 1.00E3 Auto Std Curve Make Replicates	F.						
	Apply Configure Toggle View (Table)	-						Reset All

在 Analysis 界面,点击 Std Curve(In Run)右边的下拉框,选择 Std Curve(external) 在弹出的窗口中选择之前保存的标准曲线即可。

06

数据处理

在 Analysis 界面同时显示扩增和熔解曲线:点击扩增曲线图的左下方的图标,再 点击出现的 Chart 功能键右侧的下拉框,选择 Melting Peaks 即可将默认的 Standard Curves 图像更换为熔解曲线图。







在数据分析结束后,若需要将实验结果生成报告,需要首先点击分析界面右侧的保存键, 报告键才可激活成蓝色,点击告键后进行报告的生成。



(2) 报告中扩增曲线颜色的更改。





Demo Abs Quant with SYBR Green I

Experiment

Creation Date	2017/11/30 20:10:29	Last Modified Date	2018/1/17 16:45:18	
Operator	Demo	Owner	System Admin	
Start Time	2005/6/9 11:24:49	End Time	2005/6/9 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 stand Melting Curve Analysis to distingu	dard dilutions in the same run lish specific product from prirr	ner dimers.	

Abs Quant/2nd Derivative Max for New Subset 1 (Abs Quant/2nd Derivative Max)

- 000 - 027 - 2281 - 2494	5 - 0.004 - 0.004 4 - 0.537 - 1.05 4 - 23.296 - 23.50 2 - 25.006 - 24.99	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	090.001 96 - 14.133 47 - 24.601 71 - 25.192	- 0.015 - 17.721 - 24.637 - 25.284	- 0.018 - 0. - 20.217 - 21. - 24.741 - 24.	062 - 0.13 492 - 22.25 821 - 24.89	6 3 3
25.80 9 23.309								_
20.809		A1.	1					
18.309			/					
15.809			/					
13.309		\	/					
10.809			1					
8.309			-/					
3 309			7					
0.809			6					
1				5.0		22		

如上图的报告所示, 扩增曲线图中的曲线 A1 为系统默认的红色, 如果需要将其 更改成其它颜色, 需要在 Sample Editor 界面中, 用鼠标左键点击样本编辑表格 中 A1 的颜色显示位置, 即可对其进行颜色的编辑, 如蓝色。

[]	Ê.		1	0				
Editor	Step 2: Select Samples		Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Con
	Subset: All T L 24	+	A1		A1	Sample 1	Unknown 💌	
Sample	1234567891011121:		A2			Sample 2	Unknown	
Editor			A3			Sample 3	Unknown	
			A4			Sample 4	Unknown	
Analysis			AS		1	Sample 5	Unknown	
	EGGGGGGGGGGGG		A 6			Sample 6	Unknown	
\equiv			74			Sample 7	Unknown	
Report	HODOOOOOOOO		84			Sample 8	Unknown	
			A9			Sample 9	Unknown	

再次生成报告后,对应报告中的扩增曲线 A1 将出现相应的蓝色,如下图所示。 Amplification Curves

-	0.005	-	0.00	4	-	0.002	-	0.01	-	-0.008	-	-0.008	-	-0.009	-	-0.001	-	0.015	-	0.018	- 0.	062	-	0.136
-	0.274	-	0.53	7	-	1.052	-	1.995	-	3.63	-	6.301	-	9.96	-	14 133	-	17.721	-	20.217	- 21	492	-	22.253
-	22.814	-	23.29	6	-	23.599	-	23,958	-	24.131	-	24.318	-	24.47	-	24.601	-	24.687	-	24.741	- 24.	821	-	24.893
-	24,942	-	25.00	6	-1	24.997		25.09	-	25.13	-	25.136	-	25.171	-	25.192	-	25.284						



实验数据的导出方式

(1) 直接导出图或分析结果的数值,如 Cp、Ratios 等。 图形保存:



数据保存:

将鼠标放入表格中,单击鼠标右键,选择 Export Chart -

Window:	Demo	Rel Quant I	Mono Color	
Experi-	Analyse	Basic Rel	l Quant	
ment	Informati	on Subset	: All Samples, Prog	ram: amplificatio
Subset			R	lesults
Editor	Bar			Targe
Camala	Chart	Pairing	Sample Name	Targets
Editor	~		calibrator	Target 1
	~	A1/D1	sample 1	Target 1
	~	A2/D2	sample 2	Target 1
Analysis	v	A3/13	Furged Table	Tirget 1
	~	A4/D4	Export rable	Target 1
	~	A5/D5	sample 5	larget 1
Report	~		calibrator	Target 2
	~	A7/D1	sample 1	Target 2
	~	A8/D2	sample 2	Target 2
Sum.	~	A9/D3	sample 3	Target 2
	~	A10/D4	sample 4	Target 2

(2) 整个实验文件(.ixo)导出:

对于当前打开的数据文件,只需要选择软件界面右侧的导出键 Export the selected object to a file,选择保存路径,确认保存即可。

对于数据库中未打开的实验数据的保存,点击软件界面右侧 Navigator,在出现的数据库 界面中选择所要导出的文件,再点击下方的 Export 键可将数据输出成 .ixo 文件。



仪器故障记录

在重新启动仪器以前,注意记录每一个出现的报警窗口及提示。

10

仪器维护

(1) 定期检查并备份数据库,以保证数据的安全。查找路径:对于 XP 系统 C:\Program Files\Roche\Exor4\Data; 或 Win7 系统

C:\ProgramData\Roche\Exor4\Data。检查数据库(*.IB)的大小,并进行备份:单个数据库大小不能超过存储器的容量:如保存于 CD,数据库大小不能大于 700 MB;如 DVD,不能大于 4.5GB。

(2) 进风口灰尘过滤器 (dust filter) 的更换: 建议每三个月查看一次灰尘过滤器, 步骤如下:

• 卸下仪器右侧的挡板,露出进风口;



• 卸下进风口处的通风防尘过滤器;



• 以相同的方式,从仪器后部进风口处取下防尘过滤器;



• 从每个防尘过滤器上取下使用过的滤网,插入新的滤网;



• 将更新后的防尘过滤器重新装回相应的进风口槽。