

LightCycler[®] 480实时荧光定量PCR系统

操作快速指南 V 2.0



目录

说明及版本历史

1. 基本界面及图标

1.1. Overview 界面

1.2. New Experiment 界面

1.3. Navigator 界面

2. PCR 及结果分析

2.1. 开机

2.2. 运行一次 PCR 实验

2.2.1. PCR 程序的设定

2.2.2. 样本的编辑

2.2.3. 程序的运行

2.3. 实验结果的分析

2.3.1. 绝对定量分析

2.3.2. 相对定量分析

2.3.3. 基因分型分析

2.3.4. Tm calling

2.4. 结果报告

3. 数据管理及模块化操作

3.1. 历史数据的处理

3.2. 应用 Template 和 Macros 简化实验流程

4. 用户管理

5. 日常维护

6. Troubleshooting

说明

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

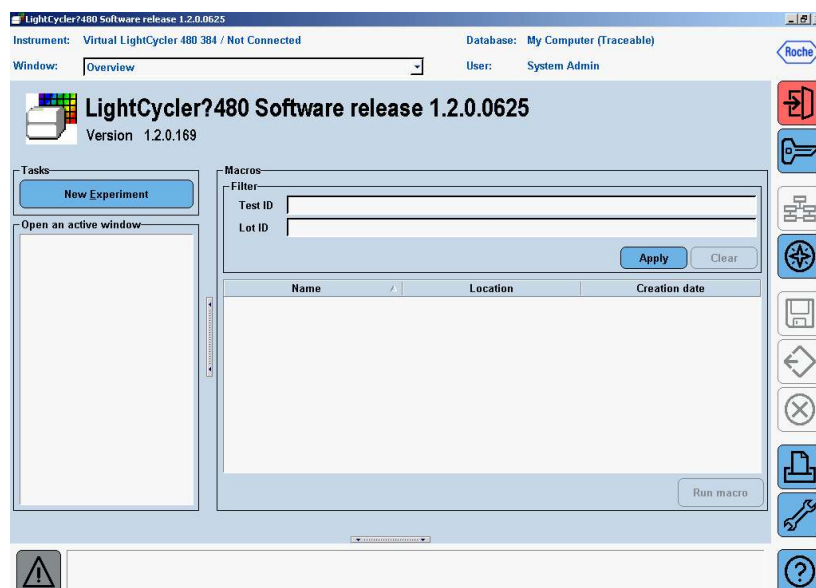
版本历史

版本号	修订时间
1.0	2007-3-27
2.0	2007-8-22

第一部分 基本界面及图标

概述:

一、Overview 界面



Exit: 关闭 LC480 软件



Log off: 从目前使用的数据库中退出并可登陆其他的数据库



Overview: 点击该图标进入“Overview”界面



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



Save: 点击该图标进行保存



Export: 导出当前打开的文件



Close: 关闭当前打开的文件



Print: 打印当前打开的窗口

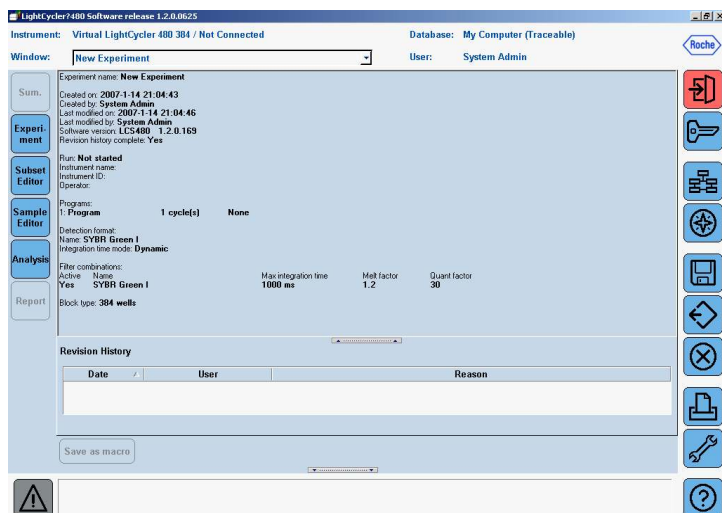


Tools: 打开“Tools”界面，可进行密码修改，建立和编辑用户，系统设置，查看数据库状态、仪器状态、滤光片组合等操作



Help: 查看软件版本，操作说明书等

二、New Experiment 界面



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



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



Subset Editor: 点击该模块后可进行子集的编辑



Sample Editor: 点击后进行样品信息的编辑

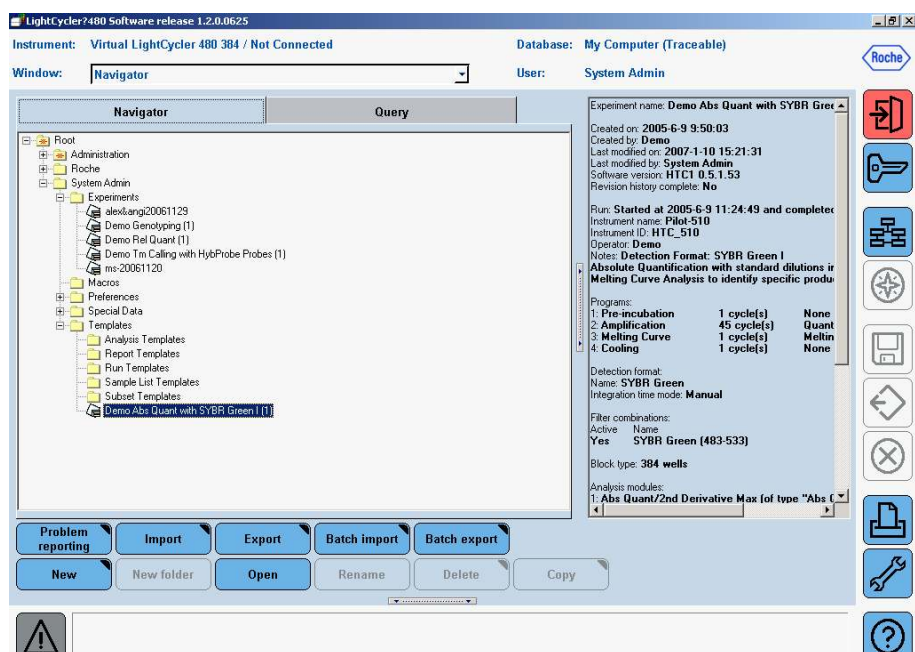


Analysis Module: 点击进行结果分析或查看已保存的分析结果



Report Module: 选择需要的内容以报告的形式给出结果

三、Navigator 界面




-  **Problem reporting**
-  **Import:** 导入一个文件
-  **Export:** 导出一个文件
-  **Batch Import:** 导入一批数据
-  **Batch Export:** 导出一批数据
-  **New:** 新建一个实验或文件夹
-  **New Folder:** 新建一个文件夹
-  **Open:** 打开一个文件
-  **Rename:** 重命名
-  **Delete:** 删除选中的目标
-  **Copy:** 拷贝选中的目标

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

第二部分 PCR 及结果分析

一、 开机

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

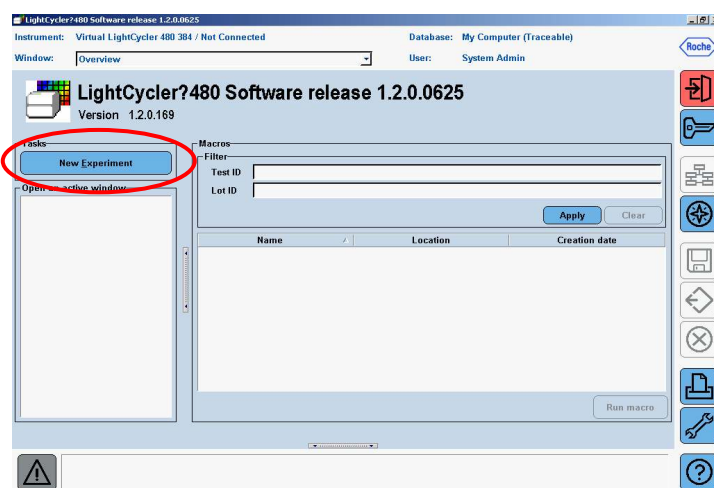
(四) 双击图标, 打开 LightCycler 480 软件, 输入用户名、密码后登陆。

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

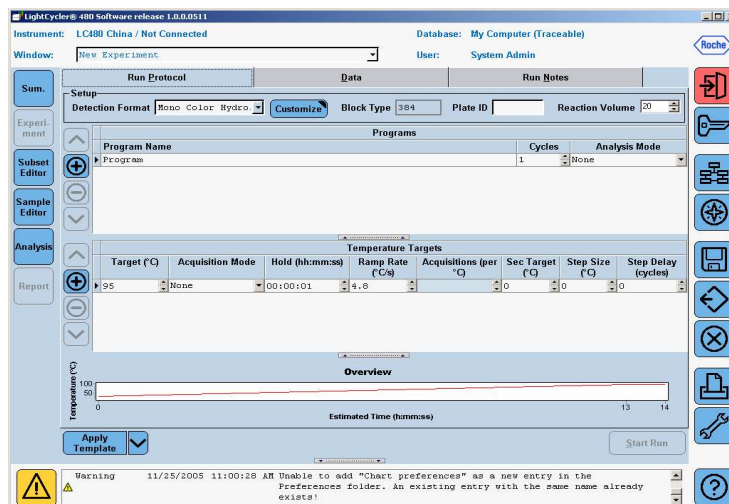
二、 运行一次 PCR 实验

(一) PCR 程序的设定

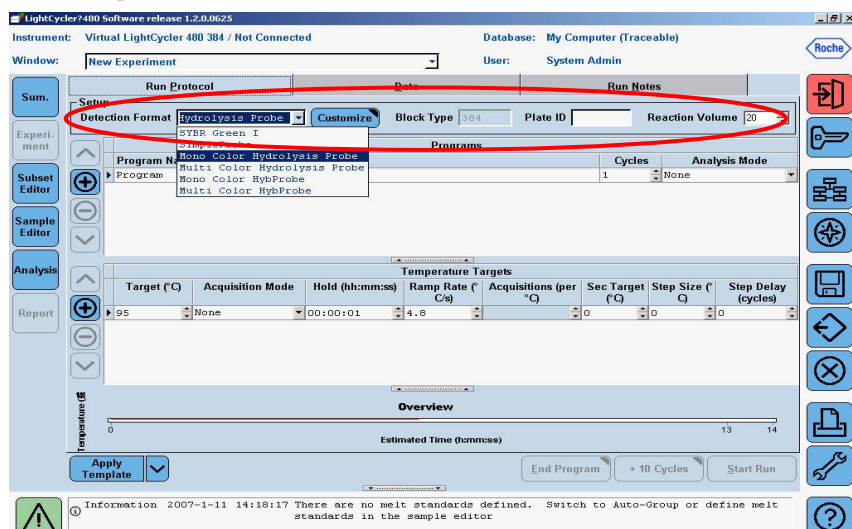
- 1、 打开软件后, 自动进入如下界面



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



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



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

3.2 ‘Customizes’模块中选择合适的滤片组合

3.3 选择合适的模块

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

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

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

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

Ramp Rate ($^{\circ}$ C/s)	Heating up	Cooling down
96-well block:	1.0 – 4.4 $^{\circ}$ C/s	1.0 – 2.2 $^{\circ}$ C/s
384-well block:	1.0 – 4.8 $^{\circ}$ C/s	1.0 – 2.5 $^{\circ}$ C/s

设定降温速率时的注意事项:

96模块:

目标温度在 50 $^{\circ}$ C及以上，变温速率为 2.2 $^{\circ}$ C/s. 目标温度低于50 $^{\circ}$ C，变温速率为1.5 $^{\circ}$ C/s!

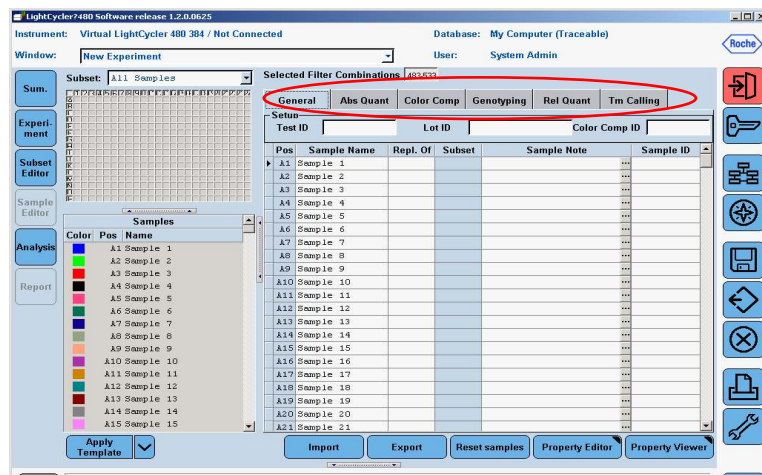
384模块:

目标温度在 50 $^{\circ}$ C及以上，变温速率为 2.5 $^{\circ}$ C/s. 目标温度低于50 $^{\circ}$ C，变温速率为2.0 $^{\circ}$ C/s!

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

(二) 样本的编辑

1、点击“Sample Editor”模块



2、点击“General”样品列表，可输入样品的基本信息。

3、选择以将要进行的分析命名的样品列表，输入相应的样品信息。

Sample Type:

Abs Quant: unknown, standard

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

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

Color comp: water, 选定的检测通道

4、点击“Subset Editor”可进行子集编辑

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

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



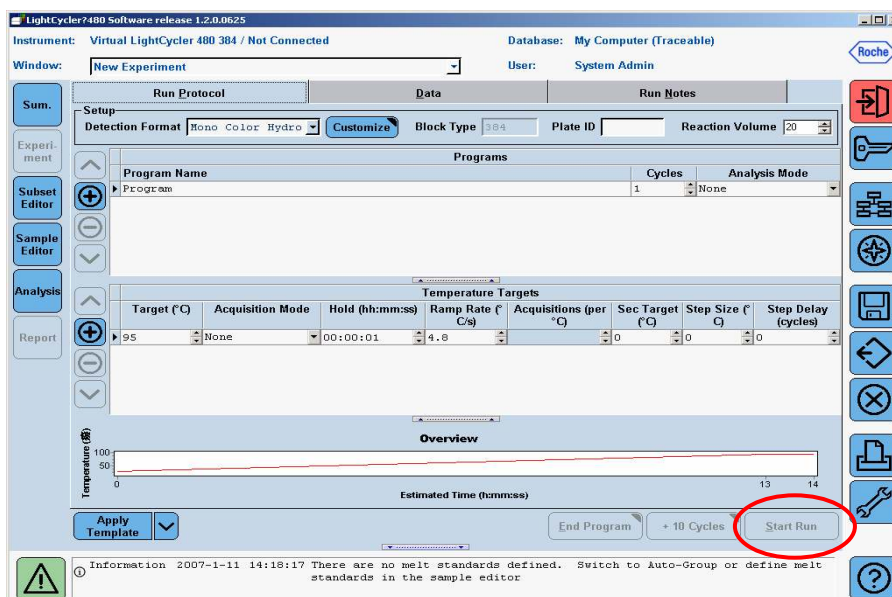
Note: * 编辑时可用 Ctrl C 和 Ctrl V 进行复制和粘贴

* 可使用“Property Editor”功能进行子集样品信息的快速编辑。

* 样品信息的编辑可在程序运行前，运行中或结束后进行

(三) 程序的运行

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

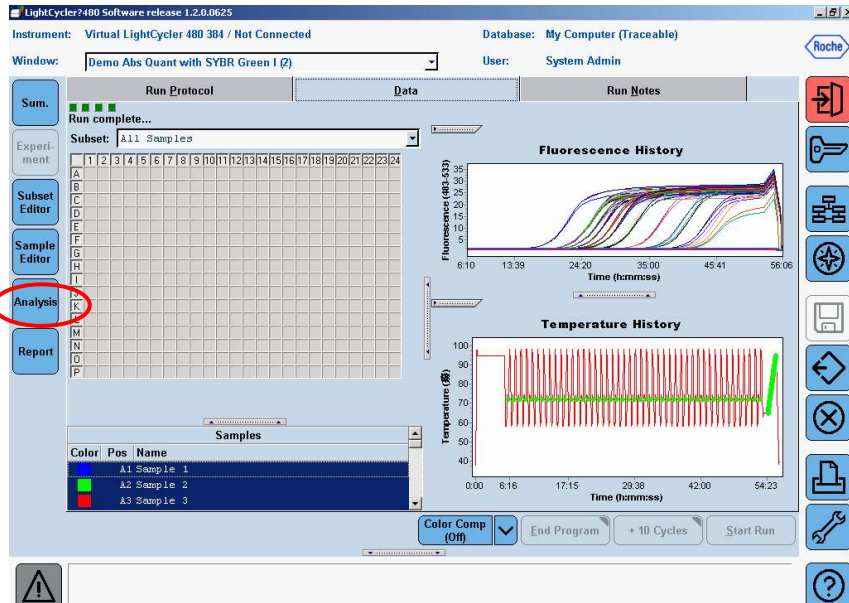


- 3、结果保存窗口自动跳出，输入文件名并选择一个合适的路径保存。
- 4、自动进入程序运行界面。

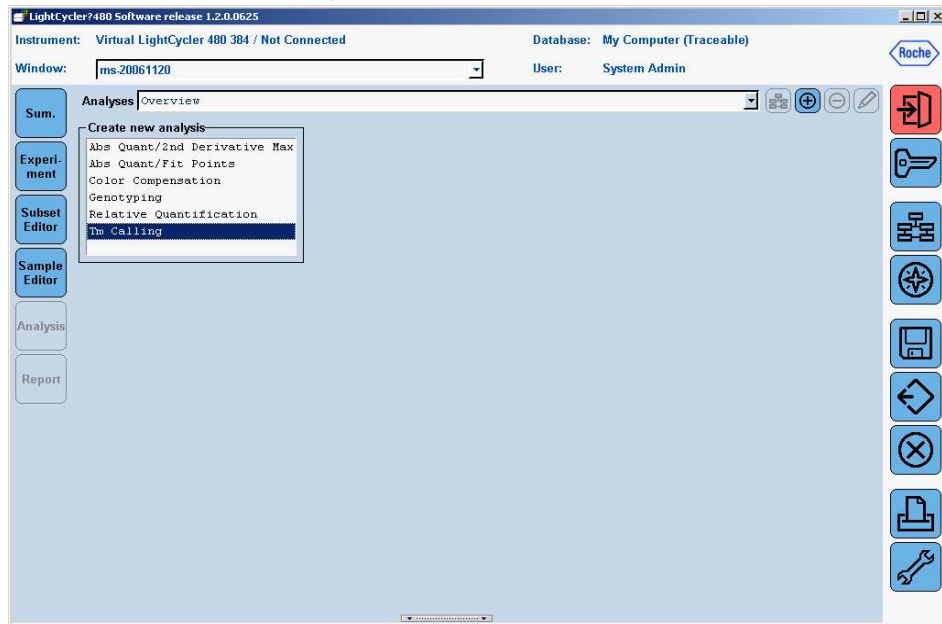
Note: 程序运行过程中可随时中止当前的 program 进入下一个 program，或者以 10 的倍次增加循环数。

三、 实验结果的分析

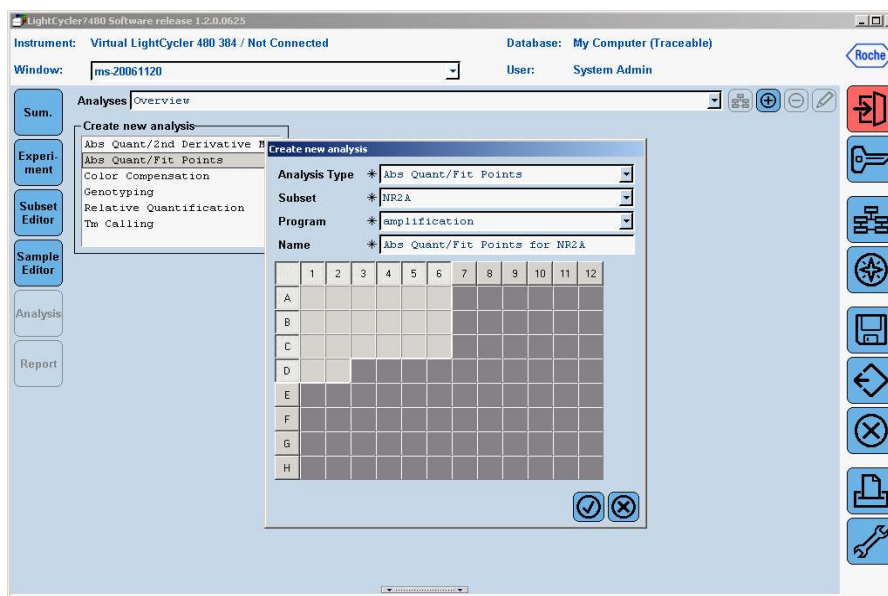
- 1、点击左侧“Analysis”模块



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



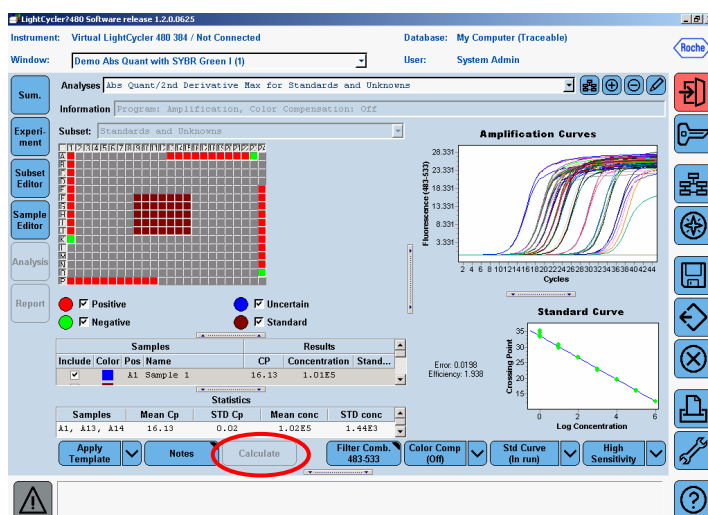
- 3、在跳出的对话框中从各下拉框中分别选定分析的范围、分析模式和分析的程序，并可命名该分析。



4、分析：

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

点击“Calculate”查看结果



4.2 绝对定量分析：手动法（Fit Points）

4.2.1 选定分析范围。默认为第一个至最后一个循环

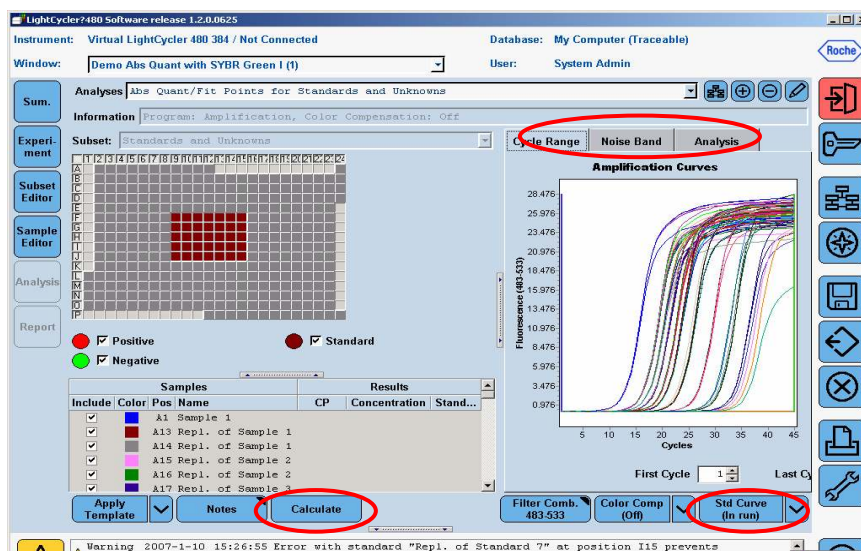
4.2.2 点击“Noise Band”，调整噪音线位置，推荐采用“Noiseband(Fluro)”

方法以上下移动噪音线位置的方式调整，调整时遵循以下四条原则：

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

4.2.3 点击“Analysis”进行结果分析

4.2.4 点击“Calculate”进行 Cp 值及标准曲线计算。



4.3 相对定量分析

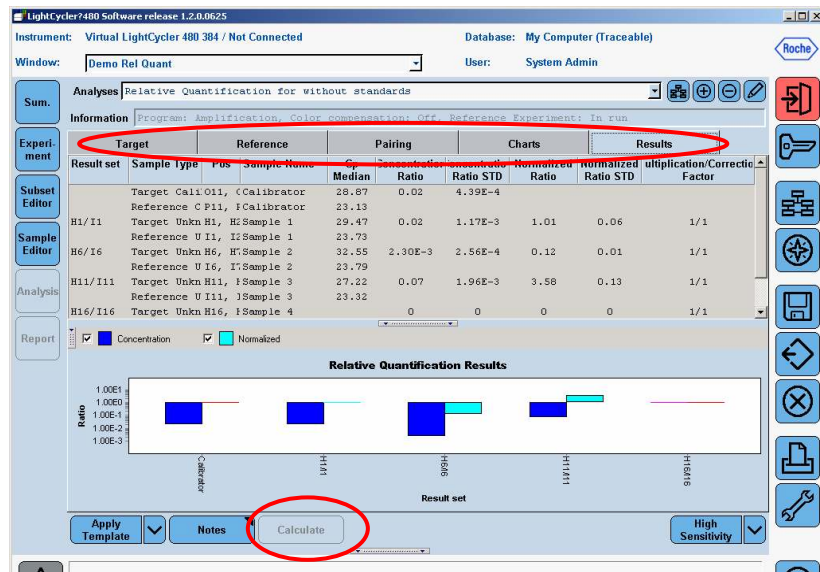
4.3.1 在跳出的对话框中选择合适的选项：

推荐在 Auto Pair 选择框前打勾

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

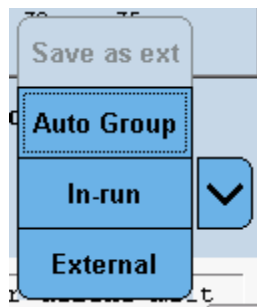
4.3.3 结果图中默认扩增效率为“2”；如果要进行效率校准的相对定量分析，并且 relative standard 包含在本实验中，点击“Calculate”进行标准曲线的计算。

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



4.4 基因分型分析

4.4.1 根据实际情况，选择 Standards



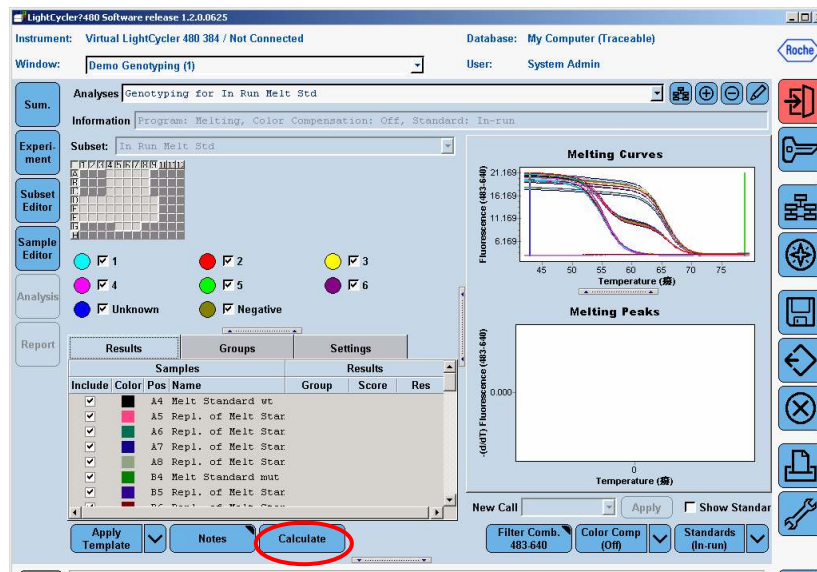
Save as ext: 将本次实验的标准曲线存为外标准曲线

Auto Group: 自动分组

In-run : 标准品包含在本次实验中

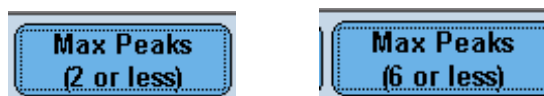
External : 调用外标准曲线

4.4.2 点击 'Calculate' 进行结果计算

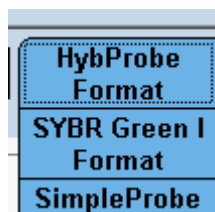


4.5 Tm calling

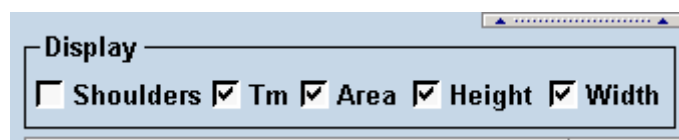
4.5.1 确认熔解曲线峰的数目



4.5.2 选择所用的检测模式



4.5.3 点击“Calculate”进行结果计算，并通过选择下述各项查看各熔解峰的详细情况




四、结果报告

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

第三部分 数据管理及模块化操作

一、历史数据的处理

(一) 查看

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

(二) 数据的导入和导出

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

二、应用 Template 和 Macros 简化实验流程


(一) Template

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

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


(二) Macros

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

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

第四部分 用户管理

一、建立新的帐号

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

第五部分 日常维护

仪器外壳，热循环模块及热盖可用 70% 的酒精清洁。

Notes: 务必在切断电源，关机状态下进行清洁工作。

第六部分 Troubleshooting

可能出现的系统信息及出错代码信息请参考如下列表：

一、系统提示信息

System Message	Type	Possible Cause	Corrective Action
Timed out while waiting for large enough buffer to resume consuming!	Warning	Instrument disconnected / power off during a run.	Reconnect / restart instrument
An error occurred during the run! The run will now be aborted	Warning	Instrument disconnected / power off during a run	Reconnect / restart instrument
Experiment New Experiment contains no acquisitions	Warning	The run does not contain acquisitions	Select an analysis mode and an acquisition type.
Please activate an instrument before setting up a new run	Warning	There is no default instrument defined.	Click on "Open Tools", goto Instruments and set an instrument as default.
Dispatcher Exception: Attempted to connect instrument xxxxx to a different instrument (yyyyy) on port HTC on 192.168.95.41. Please choose the correct instrument in the software, connect to a different instrument/ port, or create a new instrument if this is a new instrument (hasn't been connected before)!	Warning	The instrument connected to the IP address has changed.	Click on "Open Tools", goto Instruments and create a new instrument, and set it as default.
Failed to open log file C:\Program Files\Roche\LightCycler480\Bin\Logs\Instr_XXXXXX000.log. A connected instrument is already using the log file!	Warning	The instrument is already connected	-
Cannot find a user with the login name "xy"	Warning	User does not exist in database.	Click on "Open Tools" and check user settings under "Users and Groups". Define user as appropriate.
The supplied password does not match user xy!	Warning	Wrong password entered.	Check password entered!

System Message	Type	Possible Cause	Corrective Action
The application was unable to abort the run in a timely manner, please save the experiment to recover any data acquired this far. The application may not behave as expected until restarted!	Error	Hardware or software error in the instrument.	Save the experiment and restart LightCycler® 480 Software.
An error occurred during the run! The run will now be aborted	Error	Hardware or software error in the instrument.	If instrument's status LED is RED, restart instrument.

二、软件报错代码信息

Error No	System Message	Type	Possible Cause	Corrective Action
16	Restart instrument, inform Roche service	Error	Communication Error with Block Cycler Controller.	Restart instrument.
26	Restart instrument, inform Roche service	Error	Communication Error with Detection Controller.	Restart instrument.
36	Restart instrument, inform Roche service	Error	Communication Error with Raw Data controller 3.	Restart instrument.
46	Restart instrument, inform Roche service	Error	Communication Error with Detection Controller 3.	Restart instrument.
11001	Command not allowed	Error	The command send to the instrument cannot be executed at this time.	a) check MWP, try command again b) after error: restart LightCycler® Software and recover data from instrument c) restart instrument
10006	Wrong instrument type connected	Error	The software is not connected to a Light-Cycler® 480 Instrument or the instrument EEPROM is defect.	Check if you are connected to the correct instrument. Contact Roche technical service if it is the case.
100100010	Restart instrument, inform Roche service	Error	Block Cycler Controller Board removed or not properly connected.	Check Block Cycler Controller Board.
100100020	Restart instrument, inform Roche service	Error	Detection Control Motors Controller Board removed or not properly connected.	Check Detection Control Motors Controller Board.
100100040	Restart instrument, inform Roche service	Error	Detection Control Controller Board removed or not properly connected.	Check Detection Control Controller Board.

Error No	System Message	Type	Possible Cause	Corrective Action
100100050	Restart instrument, inform Roche service	Error	Data Reduction Controller Board removed or not properly connected.	Check Data Reduction Controller Board.
100100080	Restart instrument, inform Roche service	Error	Controller Firmware is older as expected.	Restart instrument.
100100100	Restart instrument, inform Roche service	Error	Indicator Board defect or unplugged.	Check Indicator Board.
100600120	Command not allowed	Warning	Command cannot be executed due to a previous error.	If instrument status LED is RED, restart instrument. If instrument status LED is GREEN, check multiwell plate and repeat command.
100600130	Command not allowed	Warning	Command cannot be executed due to a previous error.	If instrument status LED is RED, restart instrument. If instrument status LED is GREEN, check multiwell plate and repeat command.
100800100		Warning Error	Block cyler and cover are not compatible. Block cyler EEPROM defect.	Check thermal block cyler and block cyler cover. Check EEPROM cable.
101100100		Warning	Wrong MWP orientation. MWP was loaded during initialization.	Check multiwell plate.
101100110		Warning	Multiwell plate and block cyler are not compatible.	Check multiwell plate and thermal block cyler type.
101400130		Error	Door is open. Micro switch defect.	Close door. Check Micro switch.

三、硬件报错代码信息

Error No.	System Message	Type	Possible Cause	Corrective Action
210259098	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Block temperature out of range.	Check block cycler. Check settings for ramp rate (°C/s).
210259120	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Electronic rack temperature over 90°C.	
210260004	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Cover Heater on failed.	Check block cycler cover.
230257122	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	LB Ex Filter Wheel defect	Check Filter Wheel.
230258124	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Motor Ex Filter Wheel defect	Check Filter Wheel.
230513130	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Xenon Lamp defect.	Check Xenon lamp.
240117060	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Camera temperature too high.	Check camera. Check environmental temperature.
310000096	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	No block cycler inserted. Sensor data are not available.	Check Block, Block Connection.
310000099	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	No block cycler cover or not recognized.	Check block cycler cover heater.
310000107	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error		Check block cycler.
310000108		Asynch-Error	Block cycler temperature sensor defect.	Check block cycler.
310000112	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	No block cycler inserted. Sensor data are not available.	Check block cycler and block connection.
310000115	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	No block inserted Sensor data are not available.	Check block cycler and block connection.
310000118	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Electronic Rack temperature sensor unplugged or defect	Check Electronic Rack temperature sensor.
310000145	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Fuse F5 defect.	Check fuse F5.
310000146	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Fuse F4 defect.	Check fuse F4.
310000147	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Fuse F3 defect.	Check fuse F3.
310000148	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Fuse F2 defect.	Check fuse F2.

Error No.	System Message	Type	Possible Cause	Corrective Action
340000050	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Camera FireWire cable unplugged. Camera Datacable unplugged. Ex Motor or LB on Optics unit defect. Electronic Rack Fan defect.	Check Camera. Check Optics module. Check Electronic Rack Fan.
340000060	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Camera temperature too high.	Check camera. Check environmental temperature.
340000067	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Cover Markers not found.	Check block cyclor cover and camera.
340000080	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Optics cable unplugged. LB Em Filter Wheel defect. Block cyclor cover markers not found. The Reference Channel EEPROM is not programmed.	Check Xenon lamp. Check Optics module. Check Filter Parameters.
500100850	Restart Instrument, inform Roche service	Error	Appears in combination with 230513130 (Xenon Lamp defect).	Check Xenon lamp.
500500420	Restart Instrument, inform Roche service	Error	No open channel Found TL-Slave 1.	Check instrument connection.

注意:未尽处请参考随仪器附赠英文版说明书。



罗氏诊断产品（上海）有限公司
应用科学部/分子诊断部
中国 上海 200031