

# **LightCycler<sup>®</sup> 480 Software v1.5.0**

## **中文操作說明**

**羅氏醫學儀器公司 / 應用科學部門**

**November 2008**

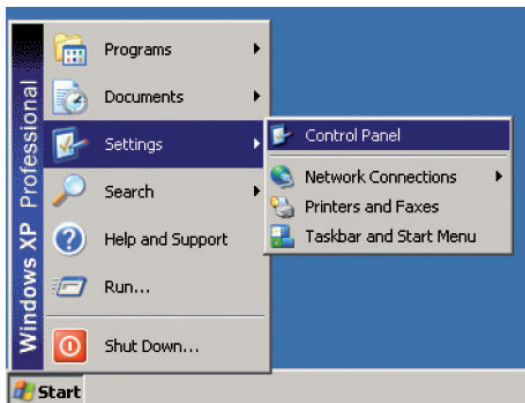
## 目錄

一. 啓動機器與軟體	3
二. 軟體設定 --- 開啓新實驗	5
三. 樣品編輯	9
四. 結果分析	12
五. 報告	18
六. 資料轉移至其他電腦(資料輸出與輸入)	19
七. 使用者管理	19

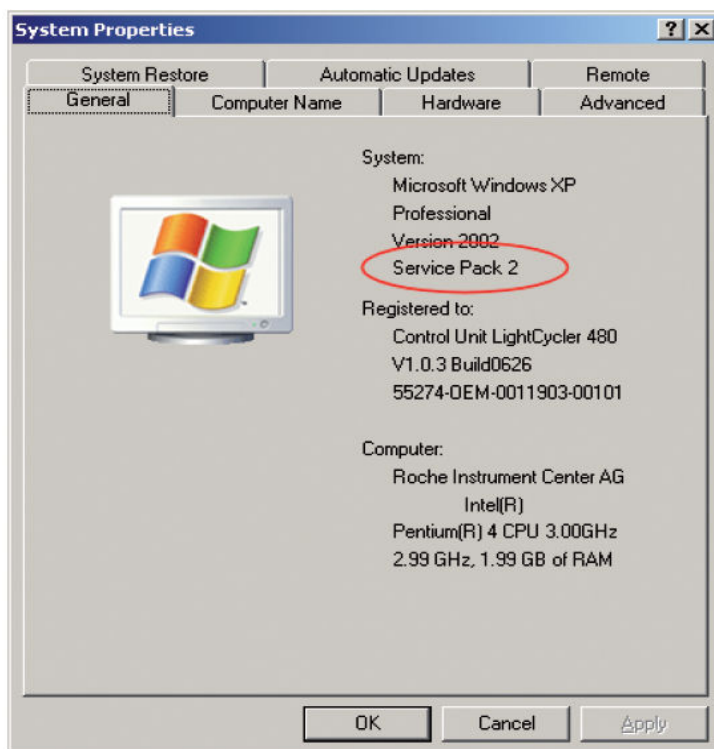
## 一．安裝軟體 (LightCycler 480 Software 1.5.0)

### • 安裝需求

1. 確認電腦 Windows 版本是否為 Windows XP Service Pack 2 (SP2)。
2. 開始 → 控制台

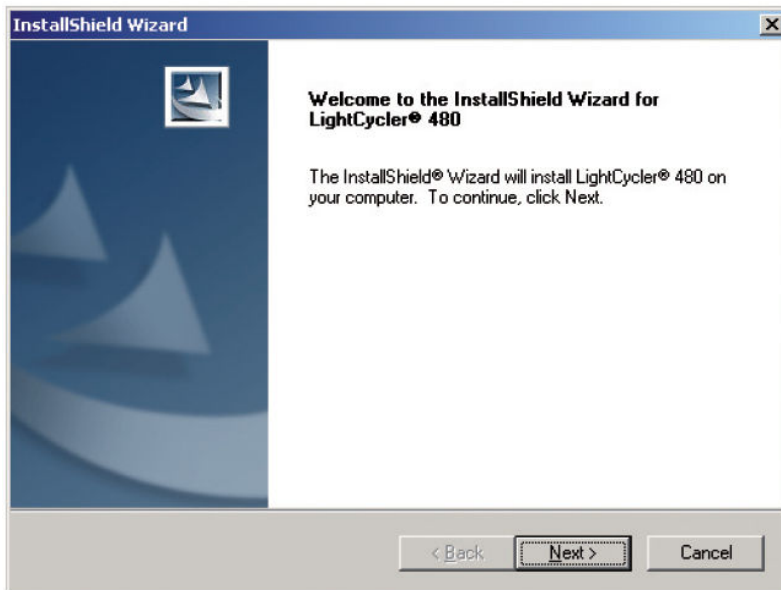


3. 點選系統

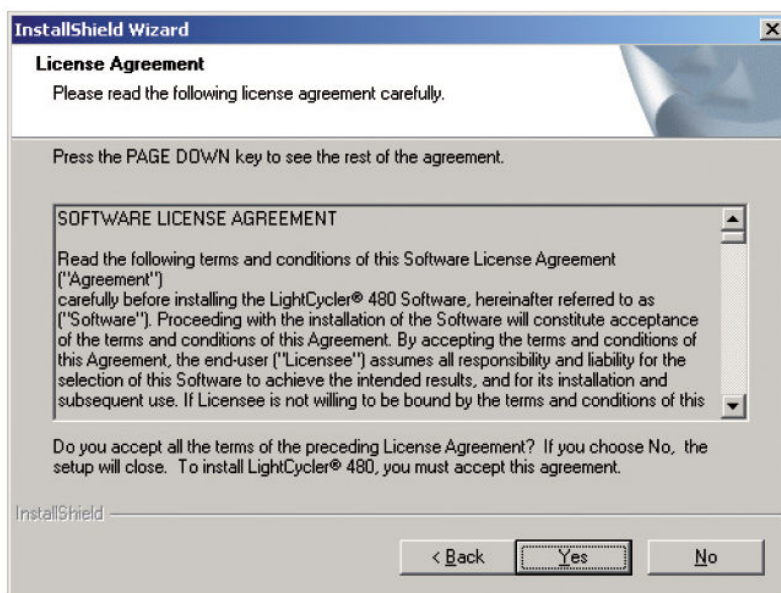


- 安裝軟體

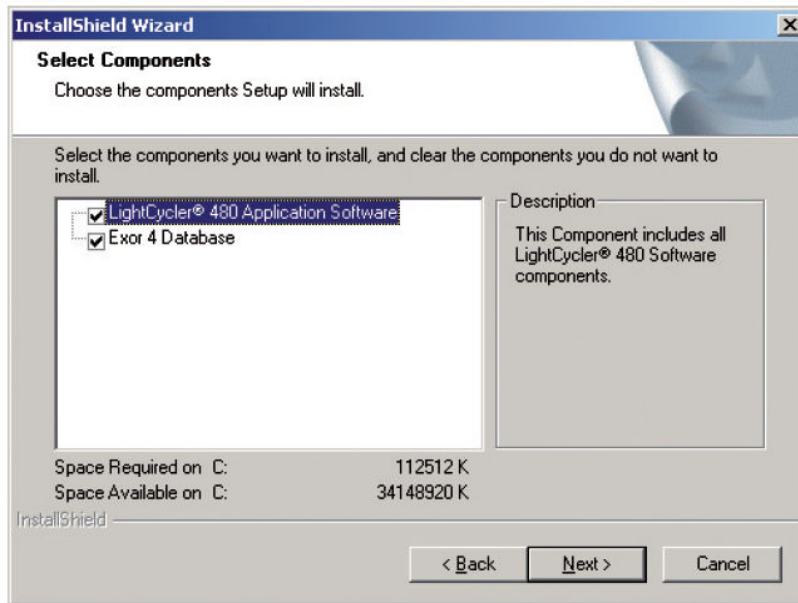
1. 插入 LightCycler 480 Software 光碟，自動啓動安裝。(若無法自動啓動，請自行進入光碟，點選 LightCycler480\_Software\_Setup.exe。
2. 安裝精靈會自動跳出，點選“Next”。



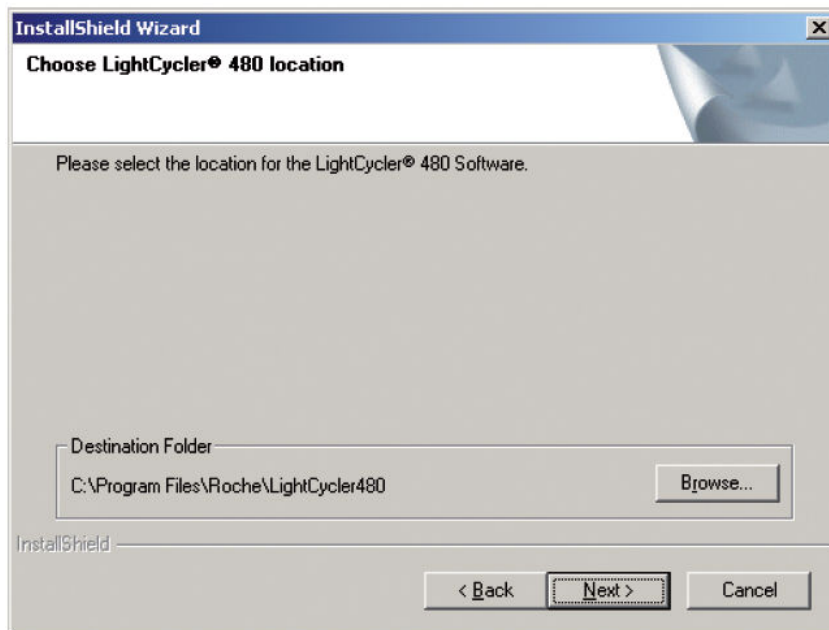
3. License Agreement 自動跳出，點選“Next”。



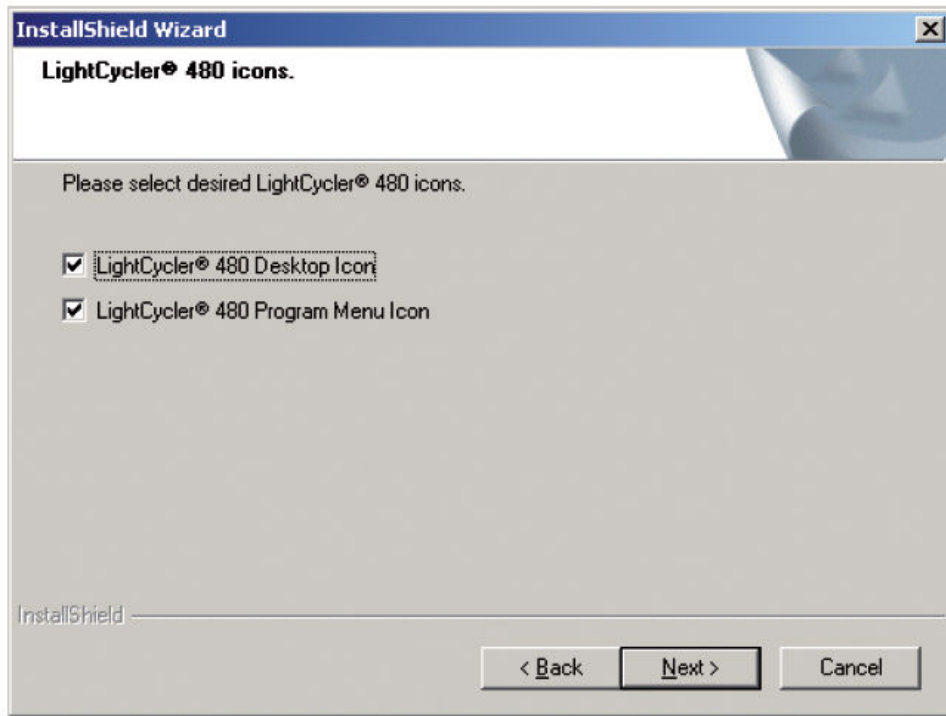
4. 點選“Next”。



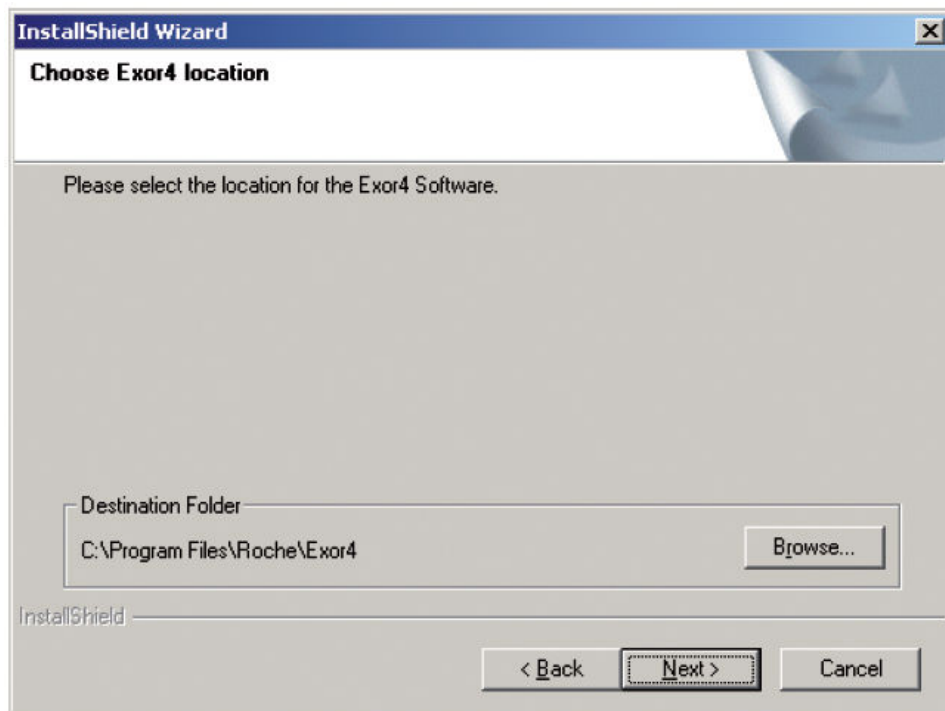
5. 選擇軟體安裝位置，點選“Next”。



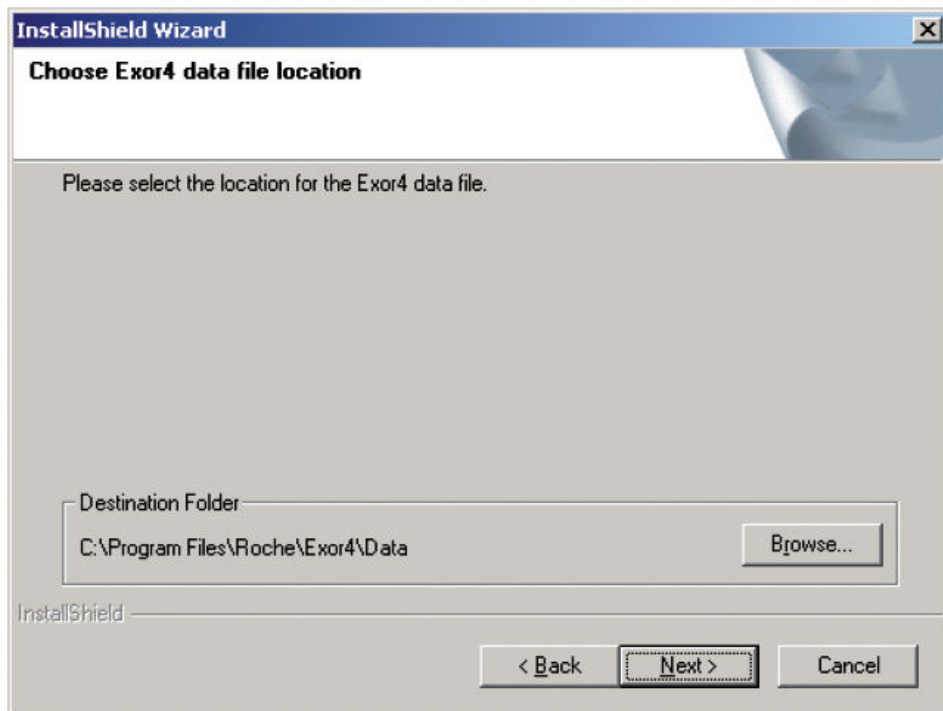
6. 點選“Next”。



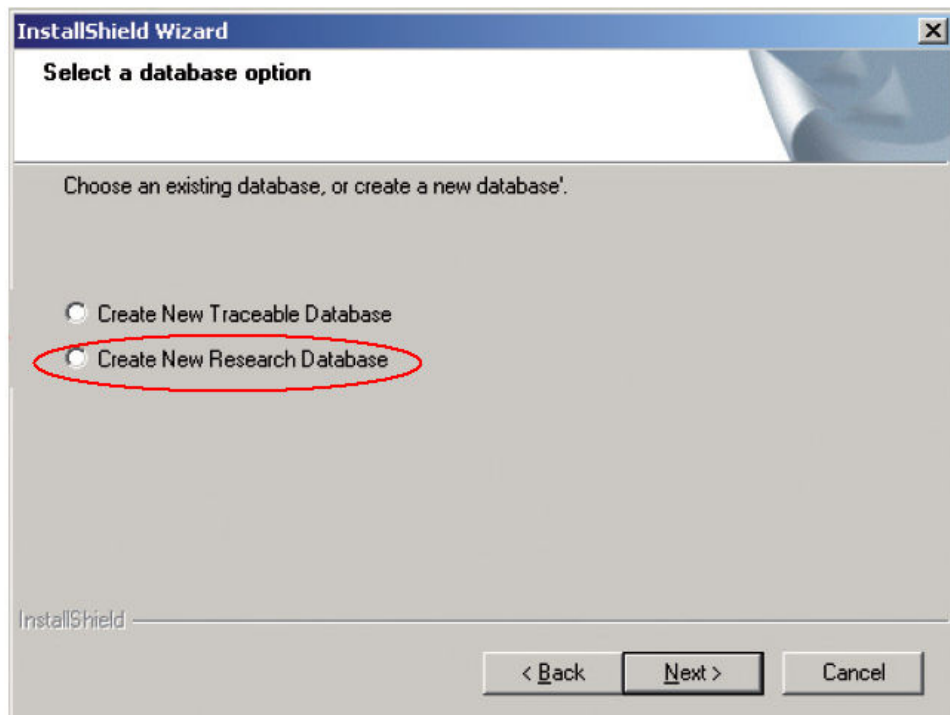
7. 選擇 Exor4 安裝位置，點選“Next”。



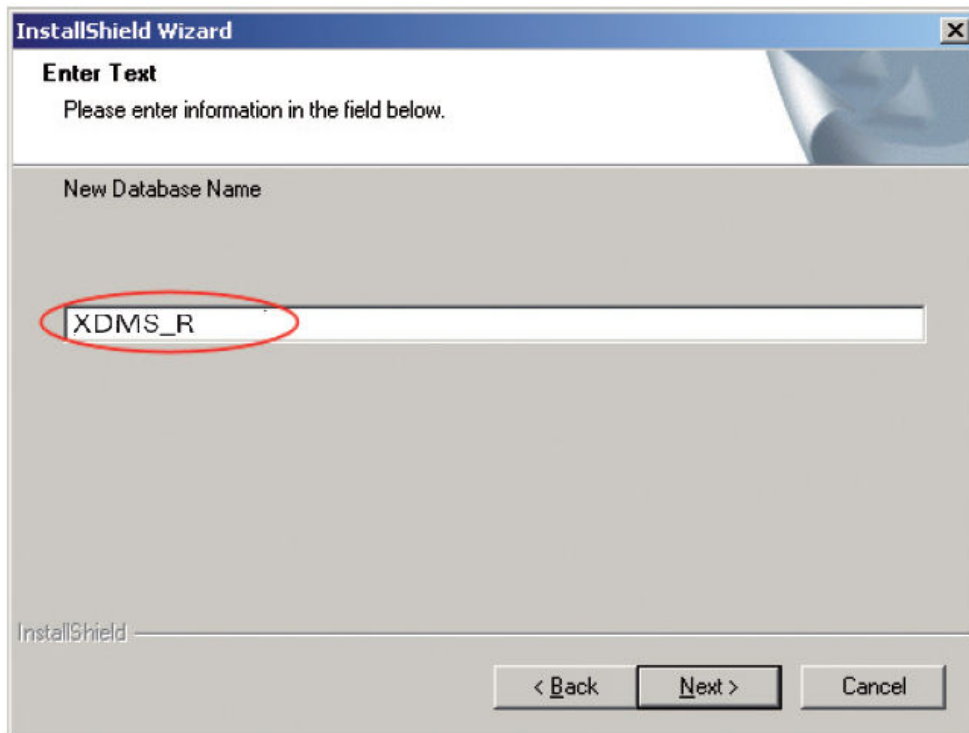
8. 選擇資料庫安裝位置，點選“Next”。



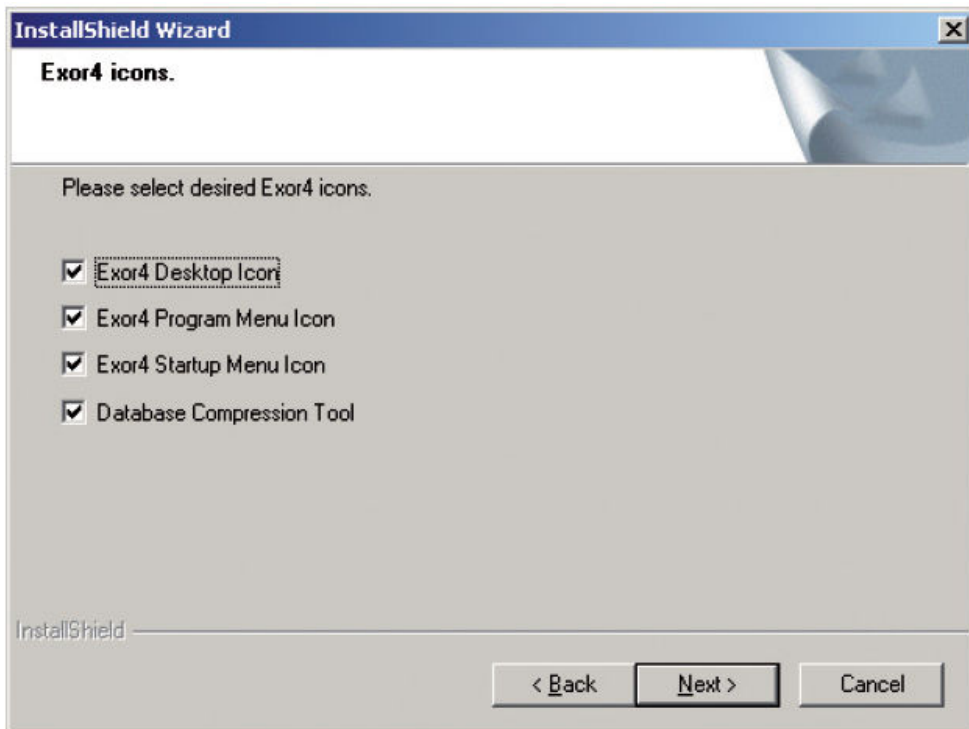
9. 選擇“Create New Research Database”



10. 將此資料庫命名為“XDMS\_R”

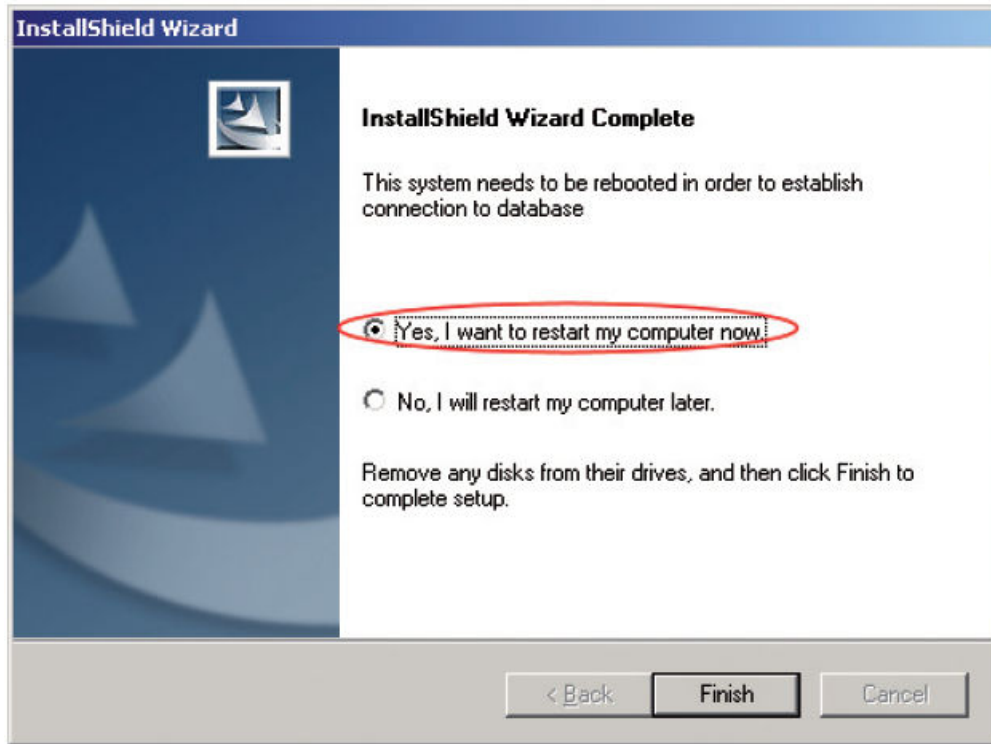


11. 點選“Next”。





12. 完成安裝，請重開機。



13. 軟體圖示應出現在電腦桌面，若安裝在個人電腦，有時無法自動顯示，請由 C:\Program Files\Roche\LightCycler480\Bin 中選取檔案“HTC1.exe”，將捷徑建立於桌面。



## 二. 啓動機器與軟體

### • 啓動機器

1. 機器主開關位於機器右後方。



2. 機器正面兩個警示燈代表機器狀態。待警示燈 (右) 由閃爍橘色燈轉變成穩定橘色燈，警示燈 (左) 由橘色轉變成綠色 (約三分半鐘)，表示機器已經啓動完成。

左警示燈	右警示燈	機器狀態
橘 *閃爍*	橘 *閃爍*	正在初始化
綠	橘	機器啓動完成 96/384 孔盤還未放入
綠	橘 *閃爍*	96/384 孔盤正在放入中
綠	綠	機器啓動完成 96/384 孔盤已經放入
綠 *閃爍*	綠 *閃爍*	實驗進行中

3. 按壓機器正面上唯一的按鈕，放入已經封膜完成之 96 或 384 孔盤。放置完成後，左右兩警示燈都呈現綠色。

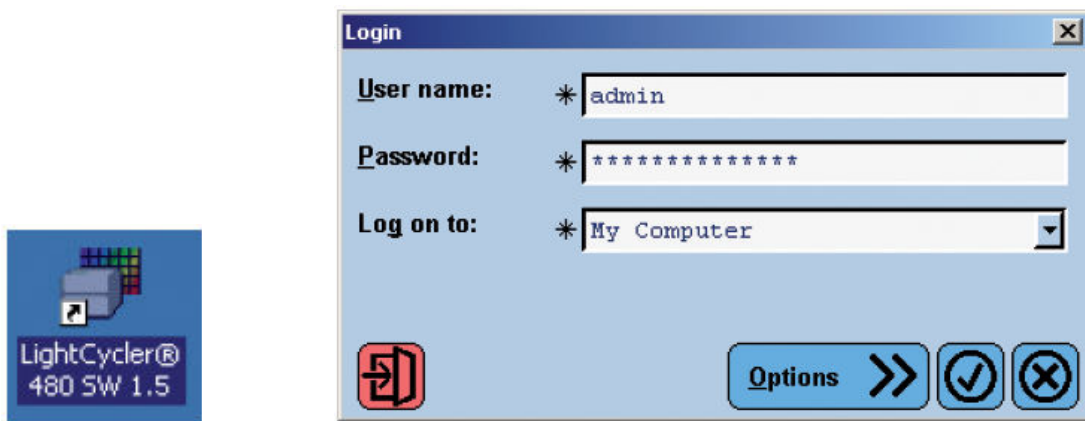


- 啓動軟體

1. 開啓電腦，並以正確的使用者名稱與密碼登入 Windows。

User name: OPERATOR  
Password: LC480

2. 開啓 LightCycler 480 軟體，並輸入正確的使用者與密碼。



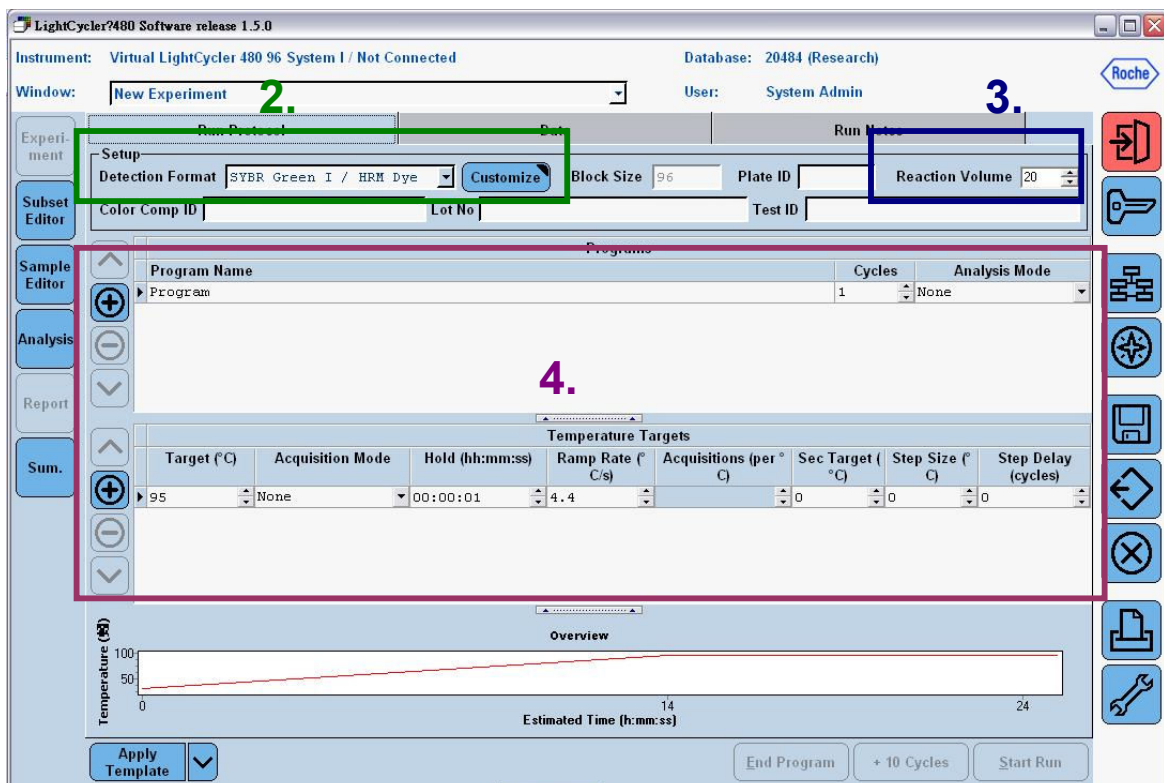
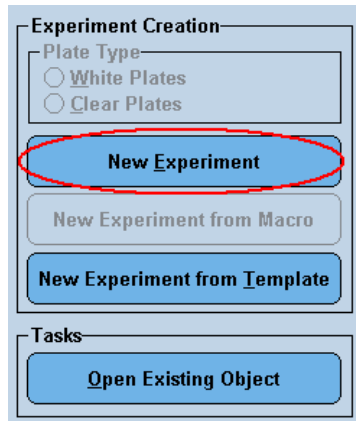
若是第一次登入，請輸入預設值 (請注意大小寫):

**User name: admin**  
**Password: LightCycler480**

## 二 · 軟體設定-- 開啓新實驗

### • 設定新實驗

1. 軟體開啓後，會進入主畫面。點選“**New Experiment**”。



2. 在實驗設定畫面上方，先選擇適當的 Detection Format。選項包含：

Detection Format	Filter Combination Name	Excitation Filter	Emission Filter
SYBR/ HRM dye	SYBR Green I	465	510
Simple Probe	Simple Probe	465	510
Mono Color Hydrolysis Probe/ UPL Probe	FAM	465	510
Dual Color Hydrolysis Probe/ UPL Probe	FAM	465	510
	VIC/ HEX/ Yellow 555	533	580
3 Color Hydrolysis Probe	FAM	465	510
	VIC/ HEX/ Yellow 555	533	580
	Cy 5/ Cy 5.5	618	660
4 Color Hydrolysis Probe	Cyan 500	440	448
	FAM	465	510
	Red 610	533	610
	Cy 5/ Cy 5.5	618	660
Mono Color HybProbe	Red 640	498	640
Multi Color HybProbe	Fluos	465	510
	Red 610	498	610
	Red 640	498	640
	Cy 5/ Cy 5.5	498	660

3. 輸入反應體積: 96 孔盤體積範圍為 10-100 ul，而 384 孔盤體積範圍為 5-20 ul。

## 4. 設定實驗步驟 (Program)

Programs			
Program Name	Cycles	Analysis Mode	
Pre-incubation	1	None	
Amplification	45	Quantification	
Melting Curve	1	Melting Curves	
Cooling	1	None	

- 設定 program，包含有 Pre-incubation, Amplification (PCR), Melting curve (optional) 與 Cooling。利用『+』與『-』增加或刪除步驟。
- 設定循環數目 (Cycle) 與分析模式 (Analysis Mode)。通常 Amplification (PCR) program 設定成『Quantification』，而 Melting Curve program 設定成『Melting Curve』。

## 5. 設定詳細溫度變化 (依照不同實驗方法與設計而有所不同)

Programs							
Program Name	Cycles	Analysis Mode					
Pre-incubation	1	None					
Amplification	45	Quantification					
Melting Curve	1	Melting Curves					
Cooling	1	None					

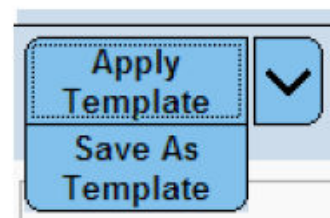
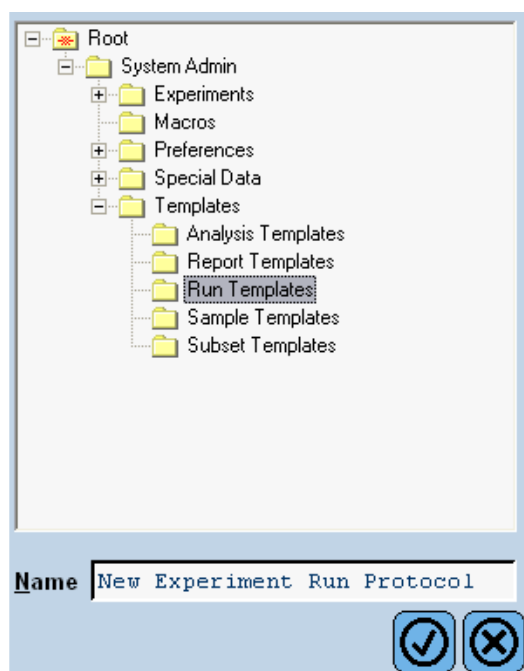
Amplification Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.4		0	0	0
60	None	00:00:10	2.2		0	0	0
72	Single	00:00:10	4.4		0	0	0

- 點選各個 program 即可設定詳細溫度變化步驟，請根據產品說明書來設定，利用『+』與『-』增加或刪除步驟。需要設定的參數包含 Target (°C) 目標溫度，Acquisition Mode (螢光偵測模式)，Hold (hh:mm:ss) 停留時間。Ramp Rate (°C/s) 為升降溫速度，範圍如下：

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

- ❖ 若設定溫度低於 50°C，請把 Ramp Rate 調整成 1.5°C/s (96 well) 或 2.0°C/s (384 well)。

- 將實驗步驟儲存成『Template』以便下次進行套用。點選左下角“Save As Template”即可把此步驟儲存起來。



建議存於 Run Template 資料夾中，方便管理。

將此實驗步驟命名。

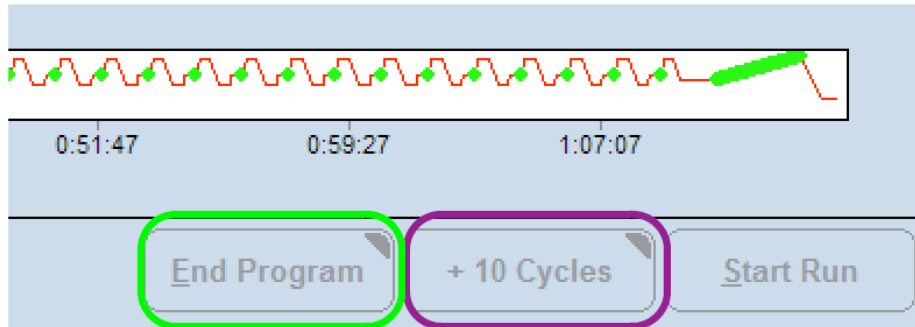
## ● 套用已設定之實驗

- 直接點選視窗左下角“Apply Template”，選擇欲套用之實驗步驟即可。



- 設定完成後將 96 或 384 孔盤放入，點選“**Start Run**”。
- 跳出檔案儲存視窗，請輸入欲儲存之檔案名稱後，即開始進行實驗。

❖ 實驗進行中會進入另一個 Data 視窗，視窗下方按鍵功能如下：



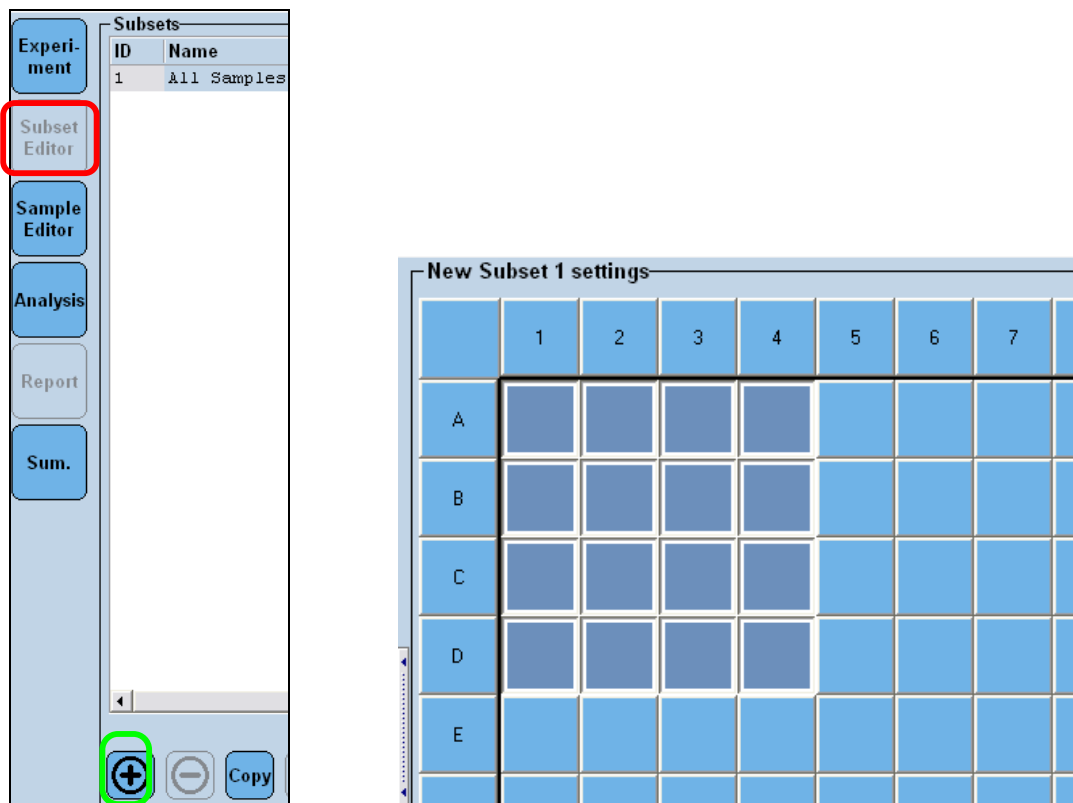
- ✓ **End Program** : 結束此 Program, 進入下一個 Program。
- ✓ **+ 10 Cycles** : 即時增加循環數目。
- ✓ **Abort Run**: 馬上結束此實驗，請注意，若按此鍵，則此次實驗的結果將不儲存。



### 三．樣品編輯

#### ● 將樣品分群

1. 點選視窗左邊的“**Subset Editor**”。
2. 點選『+』新增新的群組，並將其命名。
3. 利用滑鼠選取此群組之樣品位置，點選視窗右下角“**Apply**”，此時被選取的樣品位置會呈現實心的藍色，如下圖。



4. 以此方式依序將所有樣品群組編輯完畢。

## • 編輯樣品名稱

1. 點選視窗左邊的“**Sample Editor**”。
2. 輸入每個位置之樣品名稱 (Sample Name)與重複 (Repl. Of)。

Pos	Color	Repl Of	Sample Name
A1	Blue		Sample 1
A2	Red		Sample 1
A3	Green		Sample 3
A4	Magenta		Sample 4
A5	Grey		Sample 5
A6	Yellow		Sample 6
A7	Brown		Sample 7
A8	Cyan	A8	Treat
A9	Dark Green	A8	Treat
A10	Orange		Sample 10
A11	Purple		Sample 11
A12	Olive		Sample 12

3. 若要更快速輸入，可直接在左邊的圖上點選欲編輯之樣品位置：

Pos	Color	Repl Of	Sample Name
A1	Blue		Sample 1
A2	Red		Sample 1
A3	Green		Sample 3

❖ 在編輯過程中，可利用『Ctrl』+『C』複製文字，『Ctrl』+『V』貼上文字。

4. 根據實驗之目的，選擇分析模式，編輯 Abs Quant (絕對定量)，Rel Quant (相對定量) 計算所需要的樣品定義。

Step 1: Select Workflow

Abs Quant   
  Rel Quant   
  Scanning   
  Color Comp  
 Tm   
  Melt Geno   
  Endpt Geno

絕對定量 (Abs Quant) :

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration
A1	Blue		Sample 1	Unknown	
A2	Red		Sample 1	Unknown	
A3	Green		Sample 3	Unknown	
A4	Magenta		Sample 4	Unknown	
A5	Grey		Sample 5	Positive Control/Calibrator	
A6	Yellow		Sample 6	Negative Control Standard	

樣品名稱

『Unknown』:未知濃度樣品  
『Standard』:已知濃度標準品

若為已知濃度標準品，請輸入濃度

相對定量 (Rel Quant) :

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentration	Target Name	Efficiency
A1	Blue		Sample 1	Unassigned Unknown			2.00
A2	Red		Sample 2	Unassigned Unknown			2.00
A3	Green		Sample 3	Unassigned Unknown			2.00
A4	Magenta		Sample 4	Unassigned Unknown			2.00
A5	Grey		Sample 5	Target Unknown			2.00
A6	Yellow		Sample 6	Target PosCalibrator			2.00
A7	Brown		Sample 7	Target Negative			2.00
B1	Blue		Sample 13	Target Standard			2.00
B2	Red		Sample 14	Ref Unknown			2.00
B3	Green		Sample 15	Ref PosCalibrator			2.00
B4	Magenta		Sample 16	Ref Negative			2.00
B5	Grey		Sample 17	Ref Standard			2.00
B6	Yellow		Sample 18	Unassigned Unknown			2.00
B7	Brown		Sample 19	Unassigned PosCal			2.00
				Unassigned Neg			2.00
				Unassigned Std			2.00

『Target』:目標基因  
『Reference』:參考基因  
『Unassigned』:不需分析的樣品

『PosCalibrator』:Control 樣品  
『Standard』:已知濃度的樣品  
『Unknown』:未知濃度的樣品

PCR 效率

若為已知濃度標準品，請輸入濃度

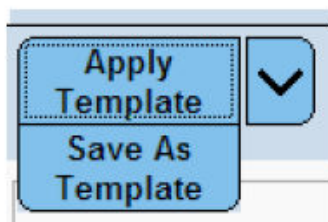
❖ 其他分析模式之分頁在此不贅述，請自行參考 LightCycler 480 Instrument Operator’s Manual。

5. 軟體亦提供 Plate 編輯方式，按照步驟 (Step 1, 2, 3) 編輯。

The screenshot shows the software interface for editing a sample. It is divided into three main sections:

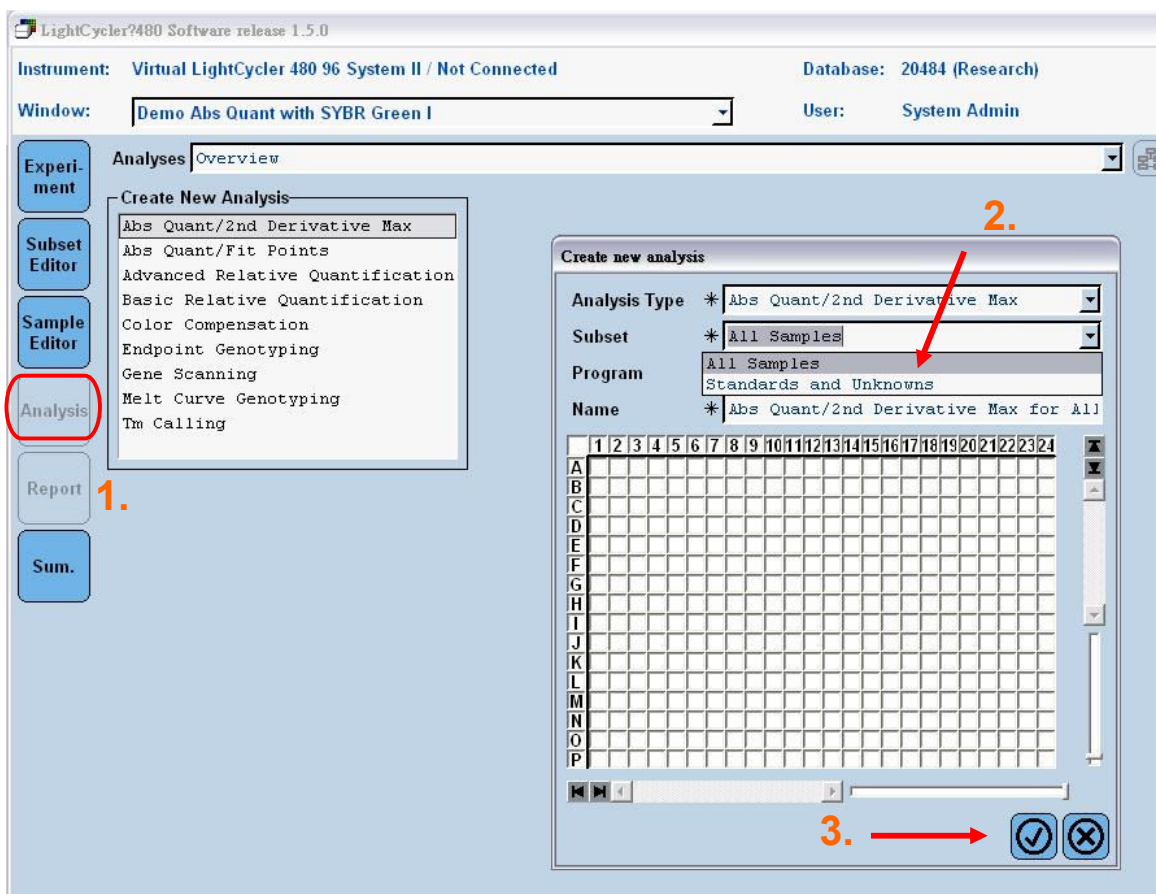
- Step 1: Select Workflow:** Contains radio buttons for 'Abs Quant', 'Rel Quant' (selected), 'Scanning', 'Color Comp', 'Tm', 'Melt Geno', and 'Endpt Geno'. A label '分析模式' (Analysis Mode) points to this section.
- Step 2: Select Samples:** Features a 'Subset' dropdown set to 'All Samples', a grid of 12 columns and 6 rows (A-F) with 'U' in each cell, and various icons for selection. A label '選取樣品' (Select Sample) points to this section.
- Step 3: Edit Rel Quant Properties:** Includes fields for 'Sample Name', 'Sample Type' (Unknown, Negative Control, Positive Control/Calibrator, Standard), 'Gene target' (Target, Reference, Unassigned), and 'Eff' (2.00). A 'Make Replicates' button is at the bottom. A label '編輯樣品名稱與定義樣品' (Edit sample name and define sample) points to the Sample Name and Type fields, and another label '編輯基因名稱與 PCR 效率' (Edit gene name and PCR efficiency) points to the Gene target and Eff fields.

6. 若想要將此樣品編輯儲存成 Template，可點選視窗左下角“**Save As Template**”即可，下次實驗時可點選“**Apply Template**”進行套用。



## 四．結果分析

- 點選左邊的“**Analysis**”，選取分析模式，並選擇所需分析之群組，如下圖：



### 分析模式

### 說明

**Abs Quant / 2nd Derivative Max**

絕對定量 (自動法)

**Abs Quant / Fit Points**

絕對定量 (手動法)

**Advanced Relative Quantification**

進階相對定量

**Basic Relative Quantification**

基礎相對定量

Color Compensation

色差校正 (多色實驗校正用)

Endpoint Genotyping

基因分型 (適用於 TaqMan Probe 之基因分型實驗)

Melt Curve Genotyping

基因分型 (適用於 HybProbe 之基因分型實驗)

Gene Scanning

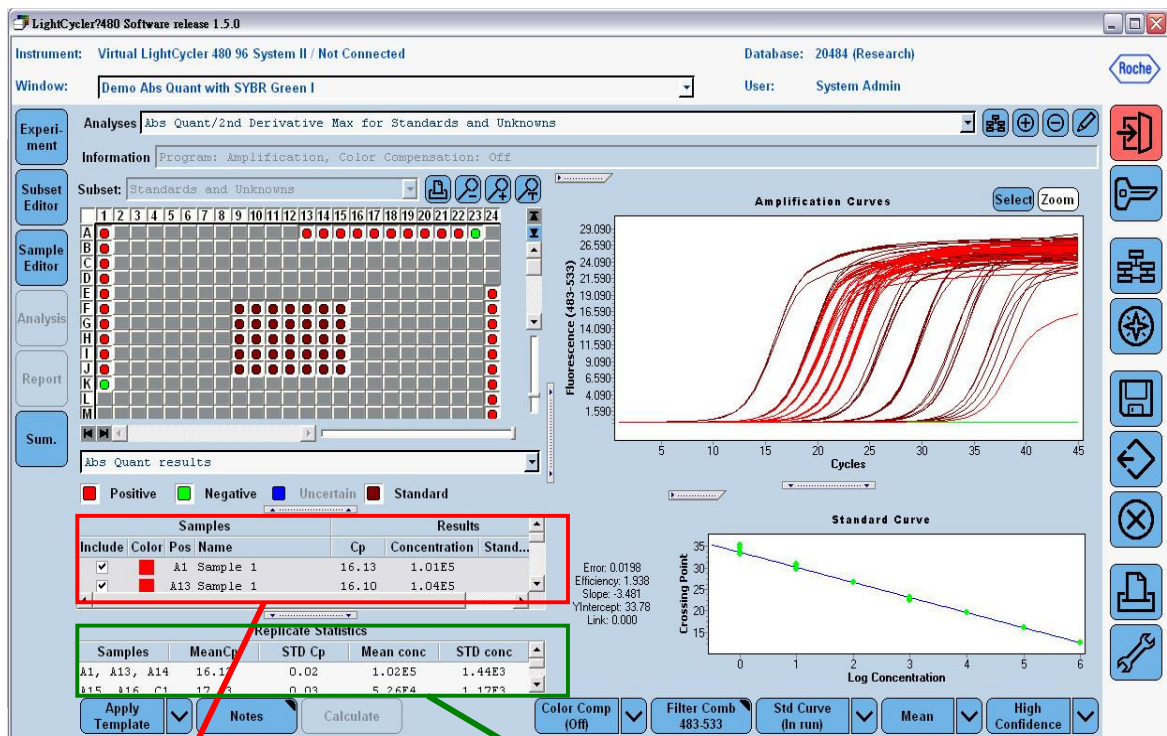
基因掃描 (適用於 High Resolution Melting Curve, HRM 分析)

Tm Calling

Tm 分析

- 絕對定量 (Absolute Quantification)

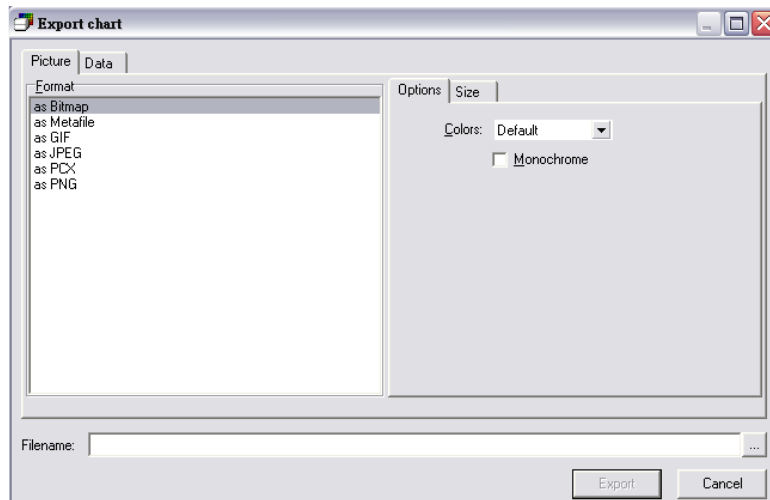
1. 點選下方的“**Calculate**”即可得到樣品之 Cp 與標準曲線。



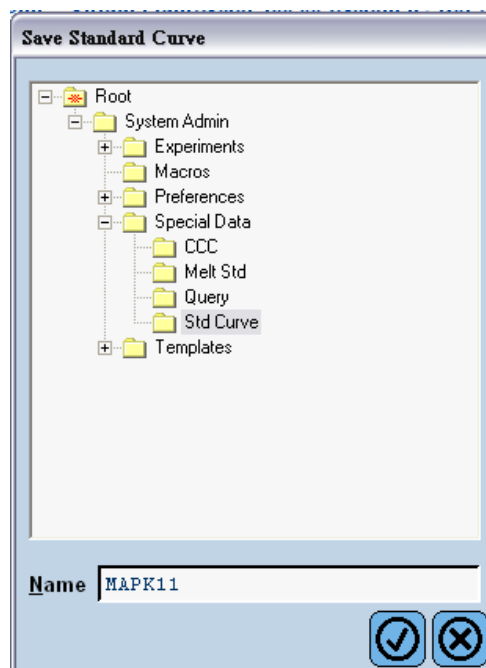
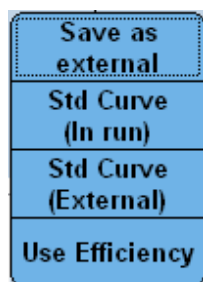
各個樣品之 Cp 值與濃度

重複樣品平均後之 Cp 值與濃度, 並自動計算標準差

2. 數值之資料輸出: 在數值分析表上按滑鼠右鍵，點選“**Export**”即可輸出成 .txt 檔案格式。可直接以 Microsoft Excel 軟體開啓。
3. 圖形輸出: 在圖形上按滑鼠右鍵，點選“**Export**”即可輸出成各種圖形檔案格式。



4. 標準曲線儲存: 點選視窗下方 Std Curve 之“**Save as external**”，輸入適合檔名後即可儲存在 Std Curve 資料夾中。

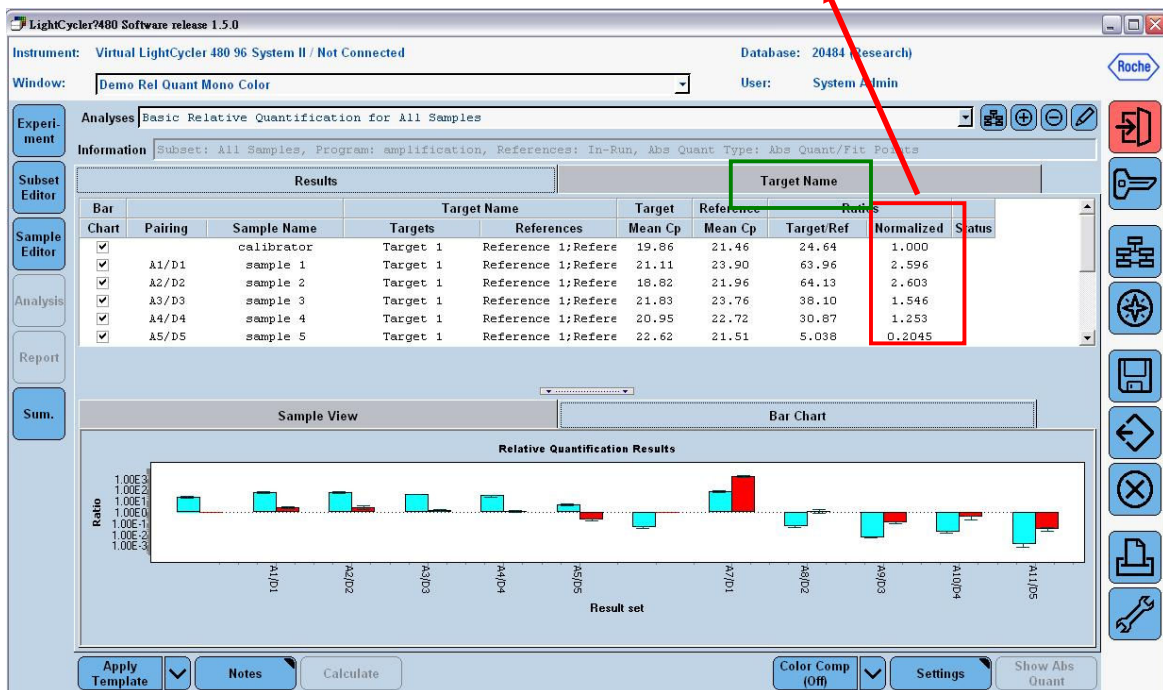


● 基礎相對定量 (Basic Relative Quantification)

❖ 由於基礎相對定量模式是針對全盤分析，請檢查樣品編輯，將不需分析的樣品定義為“Unassigned”。

1. 在選擇基礎相對定量分析後，即得到結果：

相對定量 Normalized 結果



2. 點選 Target Name 分頁可得到 PCR 效率資訊：

Results			Target Name
Target Name	Filter Combination	Standards Efficiency	Efficiency Value
Target 1	465-510	Efficiency	1.80
Target 2	465-510	Efficiency	2.00
Reference 1	465-510	Efficiency	2.00
Reference 2	465-510	Efficiency	2.00

更改 PCR 效率方法:

- ❖ Sample Editor 樣品編輯，編輯 Efficiency 欄位。
- ❖ 雙擊 Target Name 中的基因名稱後，右下角 Use Efficiency 改為 Std Curve (External) 套用已存取之標準曲線。



3. 點選“Settings”可依照所需，更改設定：

**Ratios**

- Display Target/Reference Ratio
- Display Normalized Ratio
- Show Ratio Errors

If checked, the ratio shows in the result table and the bar chart.

**Result Table**

- Display Median/Mean Cp
- Display Cp Error

Checked values are displayed as columns in the result table.

**Manual Pair Editing**

- Enable Manual Pair Editing

If checked, the Manual Pair Editing Tab is visible.

**Median/Mean Setting**

- Use Mean Cp for Calculations
- Use Median Cp for Calculation

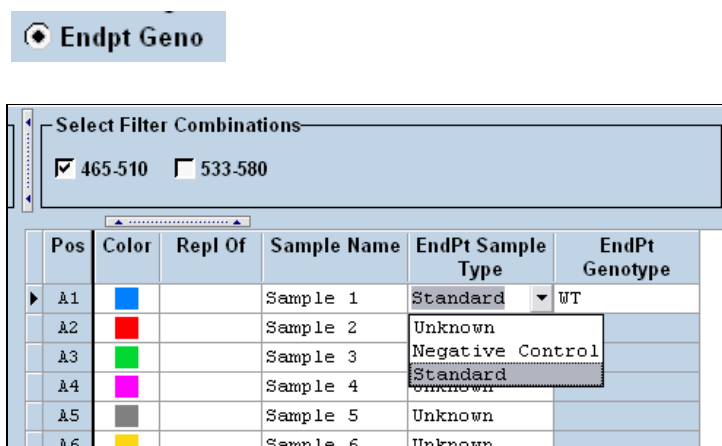
**Logarithmic/Linear Bar Chart**

- Linear
- Logarithmic

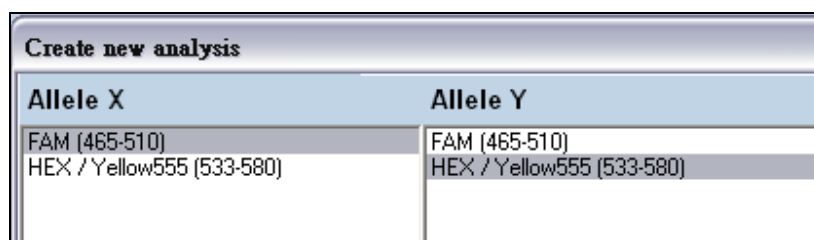
4. 數值和圖形輸出與絕對定量相同。(請參考絕對定量)

## • Endpoint 基因分型 (Endpoint Genotyping)

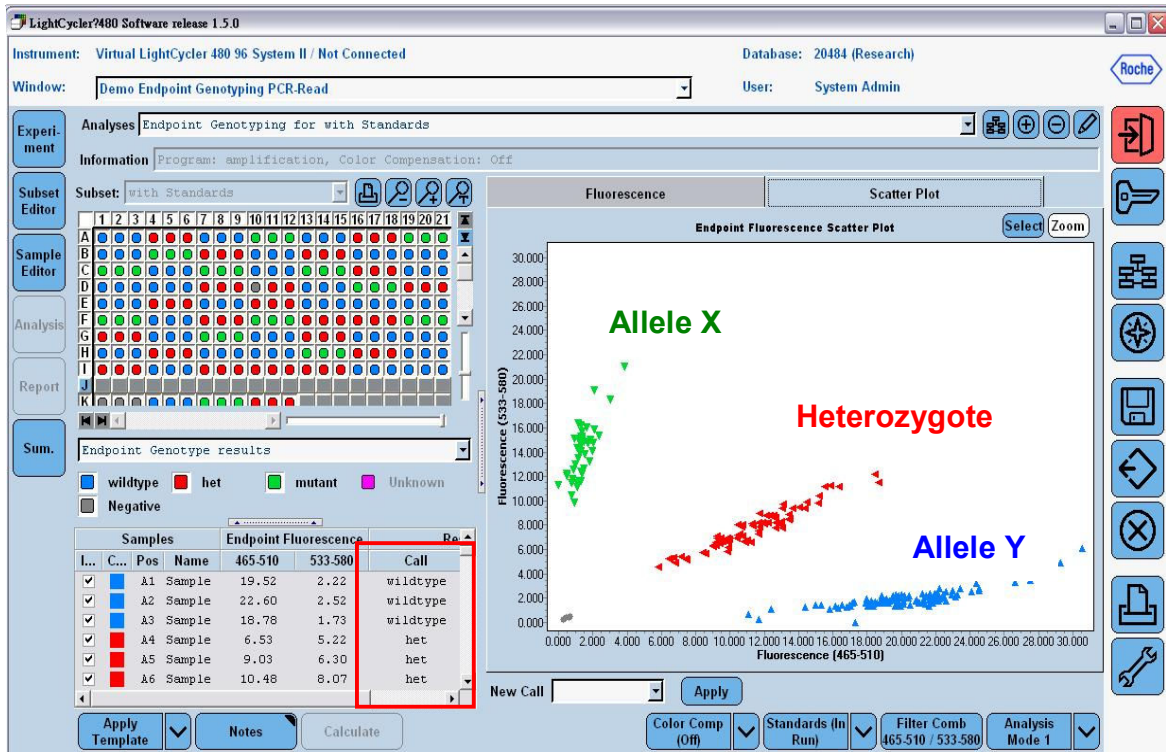
- ❖ Endpoint 基因分型是利用雙色的 TaqMan Probe 進行雙色的實驗，建議在實驗中加入已知基因型之標準品，以確認實驗的正確性。
- ❖ LightCycler 480 System I：若使用的 TaqMan Probe 標誌 FAM (510 nm) 與 HEX/VIC (580 nm) 之外的螢光，分析時需要經過色差校正。
- ❖ LightCycler 480 System II：不論使用何種螢光，分析都需經過色差校正。
- ❖ 若有標準品，請在樣品編輯中編輯：



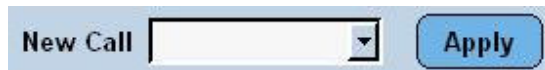
1. 選擇 Endpoint 基因分型，定義 Allele X 與 Y 的螢光波長。



2. 點選“Calculate”即可得到結果。

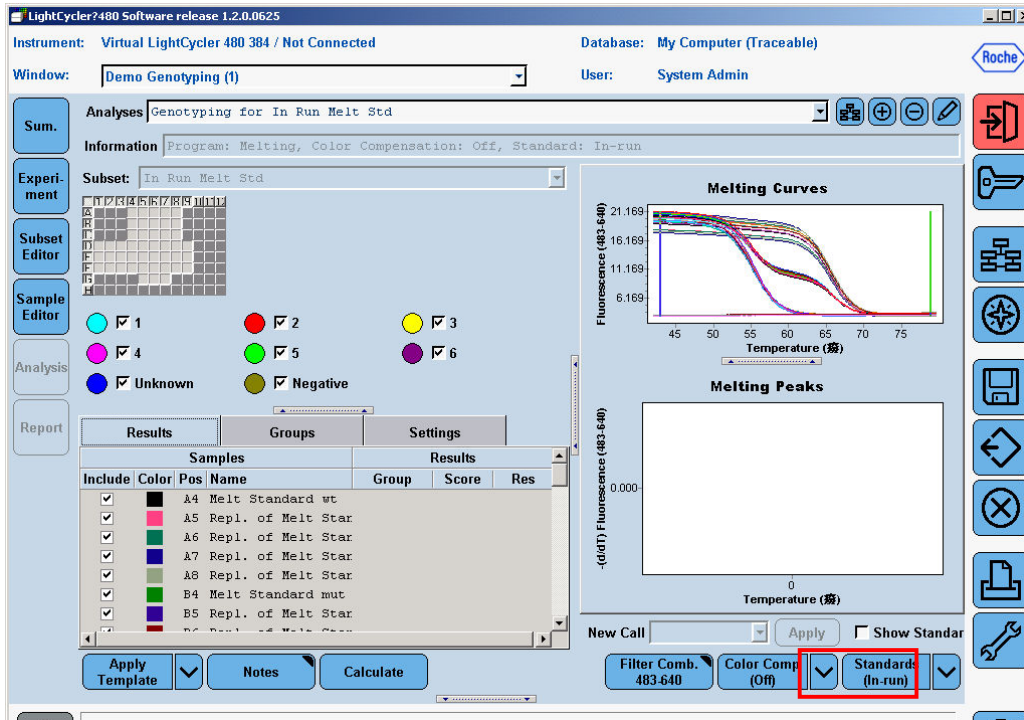


3. 若軟體自動輸出的結果不正確，可手動將正確的 Call 輸入 New Call 欄位中，點選“Apply”。

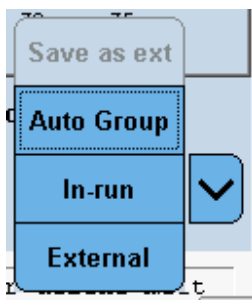


4. 數值和圖形輸出與絕對定量相同。(請參考絕對定量)

## ● Melt Curve 基因分型 (Melt Curve Genotyping)



5. 視窗右下角可設定分類方式



- ❖ **Auto Group** : 自動分組
- ❖ **In-run** : 標準品包含在本次實驗中
- ❖ **External** : 標準品在之前已儲存之實驗中

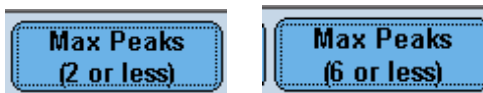
6. 點選“**Calculate**”即可得到分型結果。

## • Tm 分析 (Tm Calling)

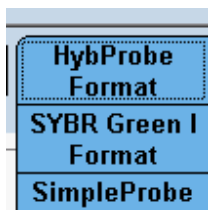
### 1. 進入 Tm 分析視窗



### 2. 確認波峰數目



### 3. 選擇檢測模式



4. 點選“**Calculate**”即可得到每個樣品之 Tm 值。

## 五 · 報告 (Report)

1. 將分析後結果儲存後即可點選報告鍵。



資料儲存



報告

2. 勾選想要呈現的報告內容。
3. 點選“**Generate**”即可產生報告。
4. 點選“**PDF**”即可將此報告儲存成 .pdf 檔案格式。

The screenshot shows the software interface with the following elements:

- Report Settings:** A list of items to include in the report, with a red box around the list and the 'Default Settings' button below it.
 

Item	Checked
Experiment	<input checked="" type="checkbox"/>
Protocol	<input checked="" type="checkbox"/>
Samples	<input checked="" type="checkbox"/>
Instrument	<input checked="" type="checkbox"/>
Revision History	<input checked="" type="checkbox"/>
Abs Quant/2nd Derivative Me	<input checked="" type="checkbox"/>
Settings	<input checked="" type="checkbox"/>
Results	<input type="checkbox"/>
Statistics	<input type="checkbox"/>
Amplification Curves	<input type="checkbox"/>
Standard Curve	<input type="checkbox"/>
- View Report:** A window showing report details and a table of parameters. The 'PDF' button is circled in red.
 

Experiment	
Creation Date	2008/1/30 下午 03:11:11
Last Modified Date	2008/2/5 上午 10:30:37
Operator	System Admin
Owner	System Admin
Start Time	2008/1/30 下午 03:51:03
End Time	2008/1/30 下午 04:35:51
Run State	Completed
Software Version	LCS480 1.2.0.169
Macro	Macro Owner
Macro Status	
Templates	Roche reagent384
Plate ID	
Run Notes	




Programs							
Program Name pre-incubation							
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:05:00	4.8		0	0	0	None

## 六· 資料轉移至其他電腦 (資料輸出與輸入)

### • 資料輸出

1. 點選  (navigator)
2. 點選所要輸出的實驗檔案，點選  即可將檔案輸出成 .ixO 檔案
3. 將此 ixO 檔案以光碟或隨身碟存到另一電腦

### • 資料輸入

1. 分析電腦上開啓 LightCycler 480 軟體，登入後點選 
2. 點選 ，選取所要輸入的 .ixO 檔案並開啓，即可開始進行實驗資料分析
3. 點選  將此實驗檔案儲存至資料庫中

## 七· 使用者管理

5. 點選右方工具鍵。 
6. 點選“**User and Groups**”。
7. 點選“**New**”即可新增使用者，並設定使用者名稱、密碼與權限。