

LightCycler[®]480 Software v1.5

中文操作說明

羅氏醫學儀器公司 / 生命科學部門

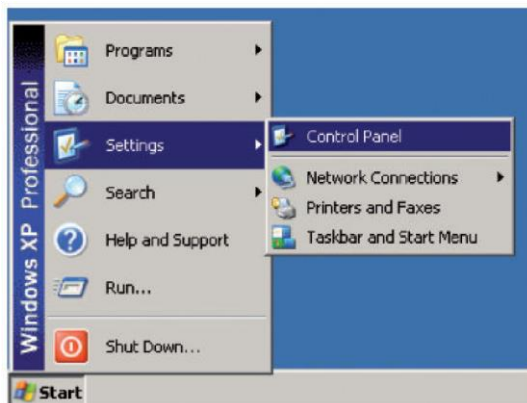
目錄

一、啟動機器與軟體	3
二、軟體設定 --- 開啟新實驗	12
三、樣品編輯	19
四、結果分析	22
絕對定量	23
相對定量	27
Endpoint 基因分型	32
Melt Curve 基因分型	34
Tm 分析	37
五、報告	38
六、資料轉移至其他電腦(資料輸出與輸入)	39
七、右側功能鍵說明	40

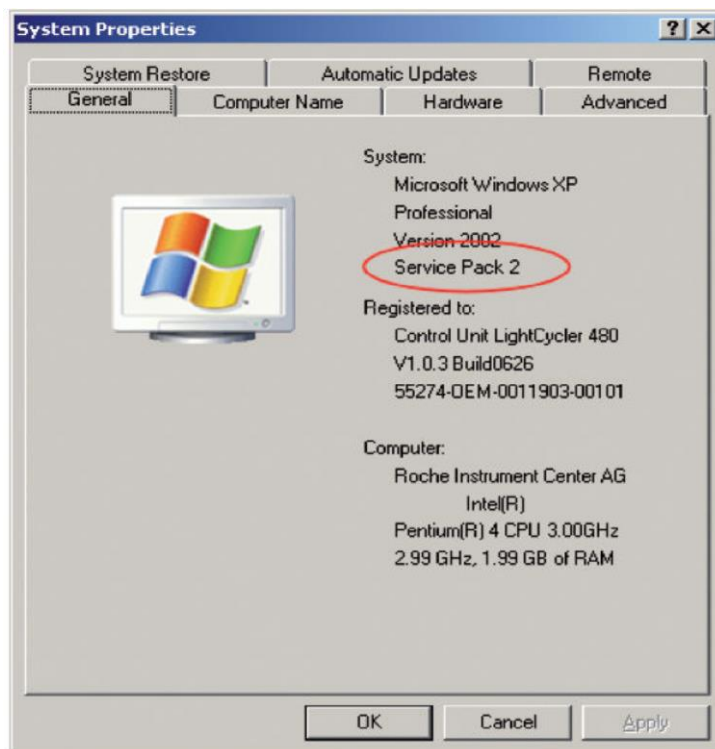
一．安裝軟體 (LightCycler 480 Software 1.5.0)

• 安裝需求

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

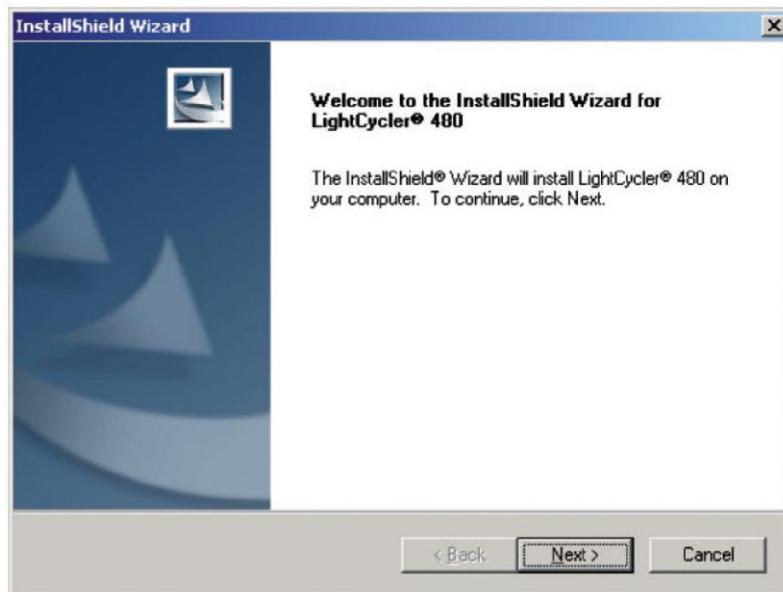


3. 點選系統

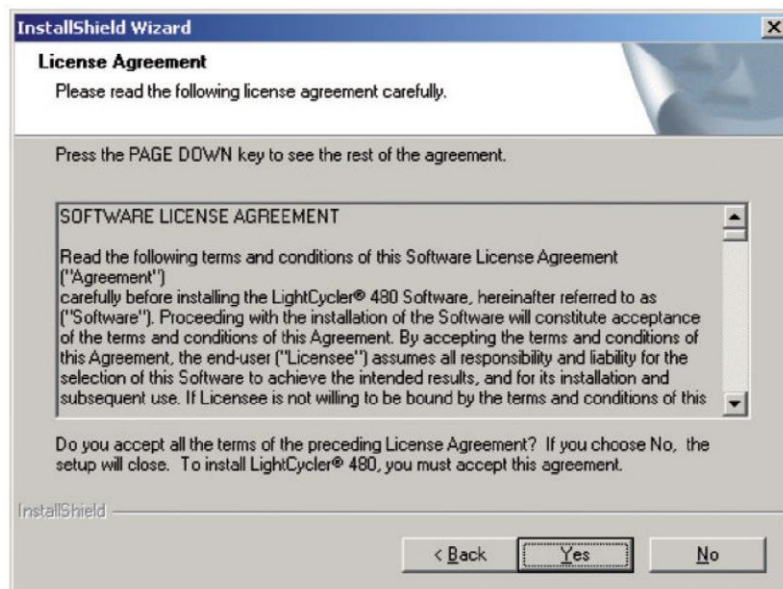


- 安裝軟體

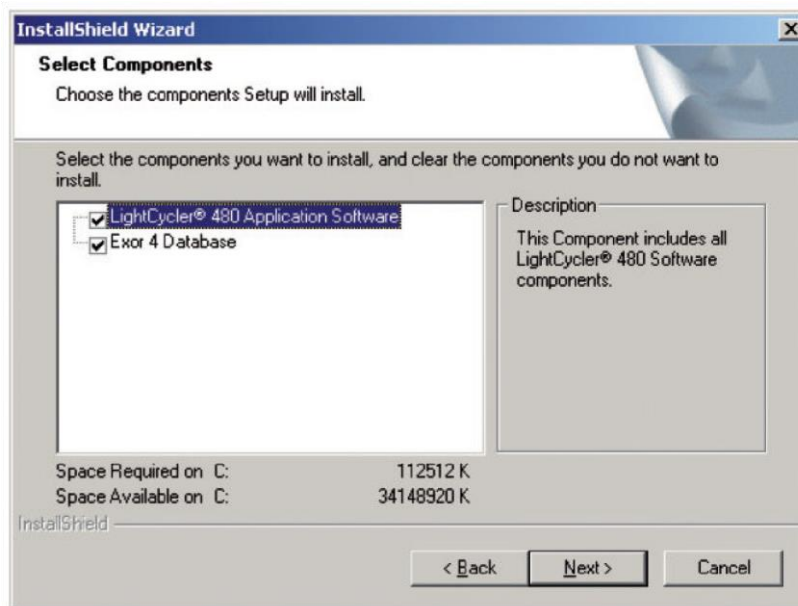
1. 插入 LightCycler 480 Software 光碟，自動啟動安裝。(若無法自動啟動，請自行進入光碟，點選 LightCycler480_Software_Setup.exe。
2. 安裝精靈會自動跳出，點選“Next”。



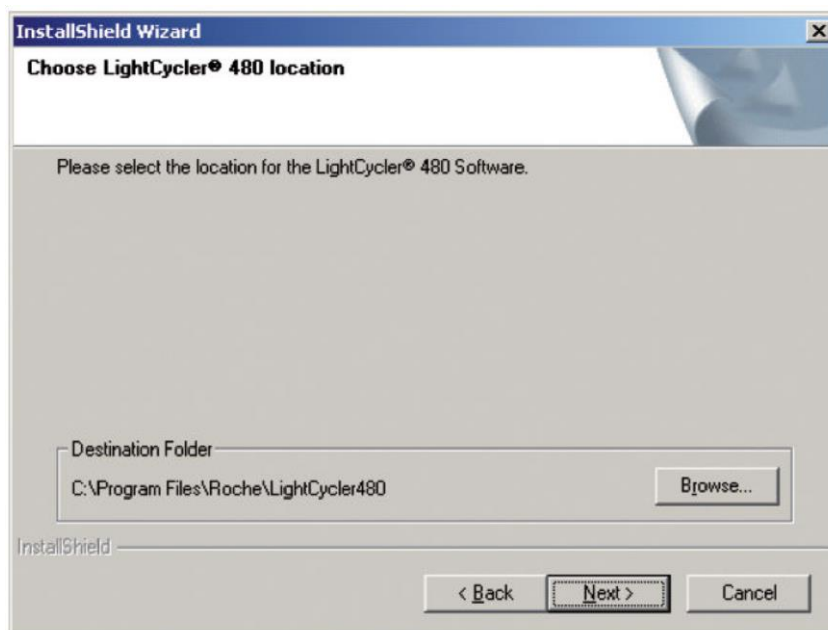
3. License Agreement 自動跳出，點選“Next”。



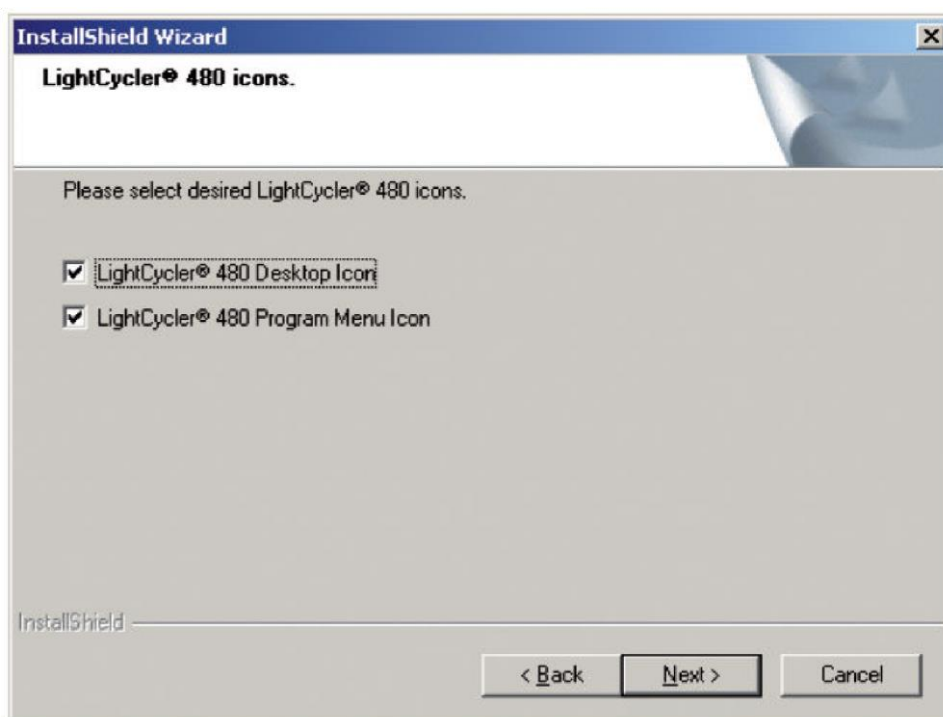
4. 點選“Next”。



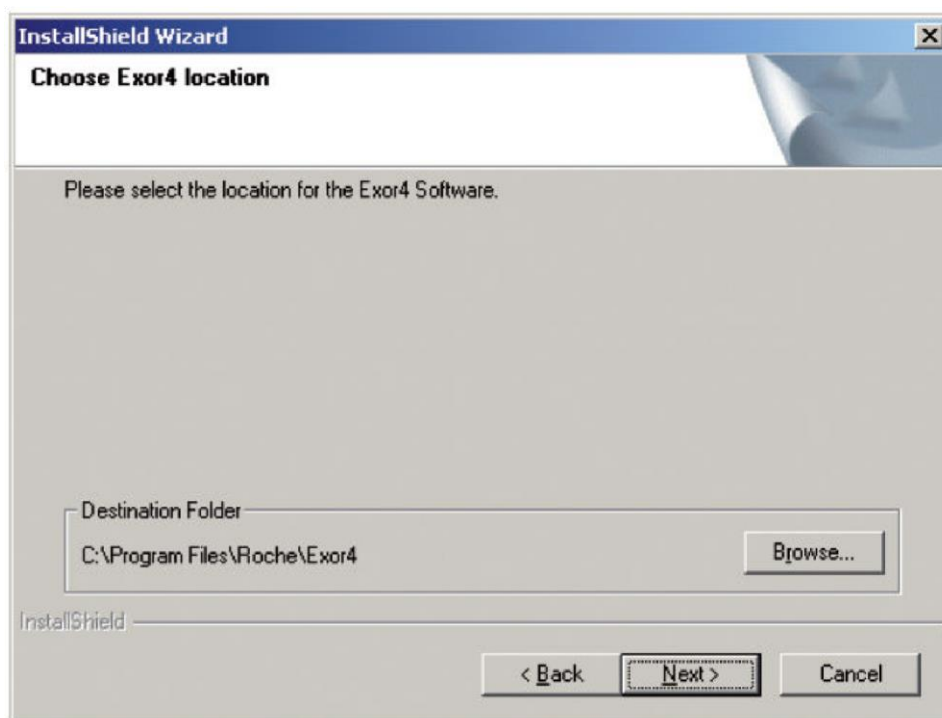
5. 選擇軟體安裝位置，點選“Next”。



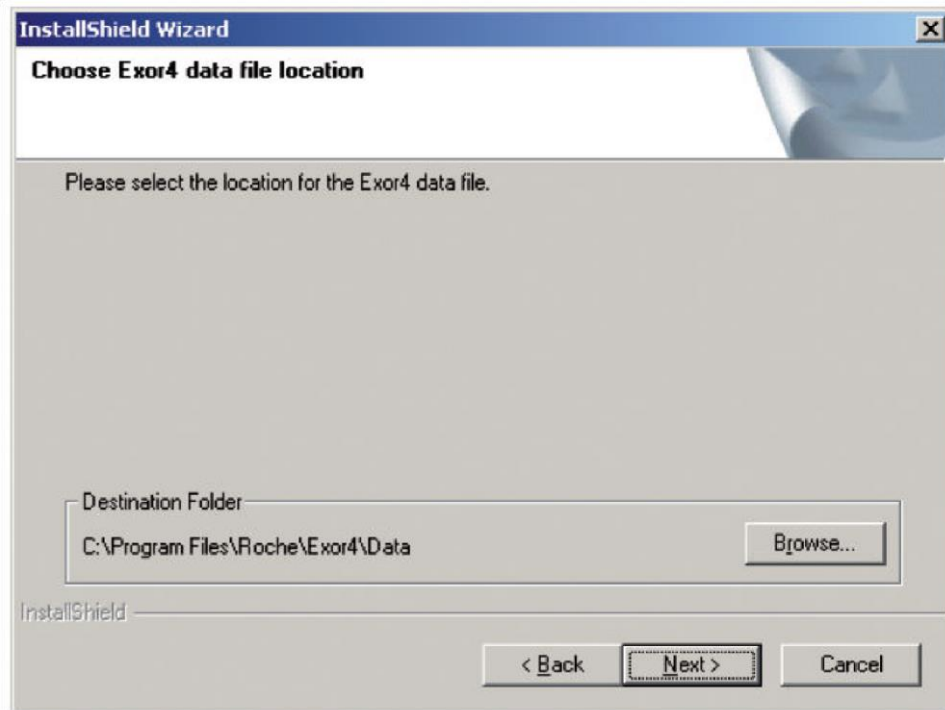
6. 點選“Next”。



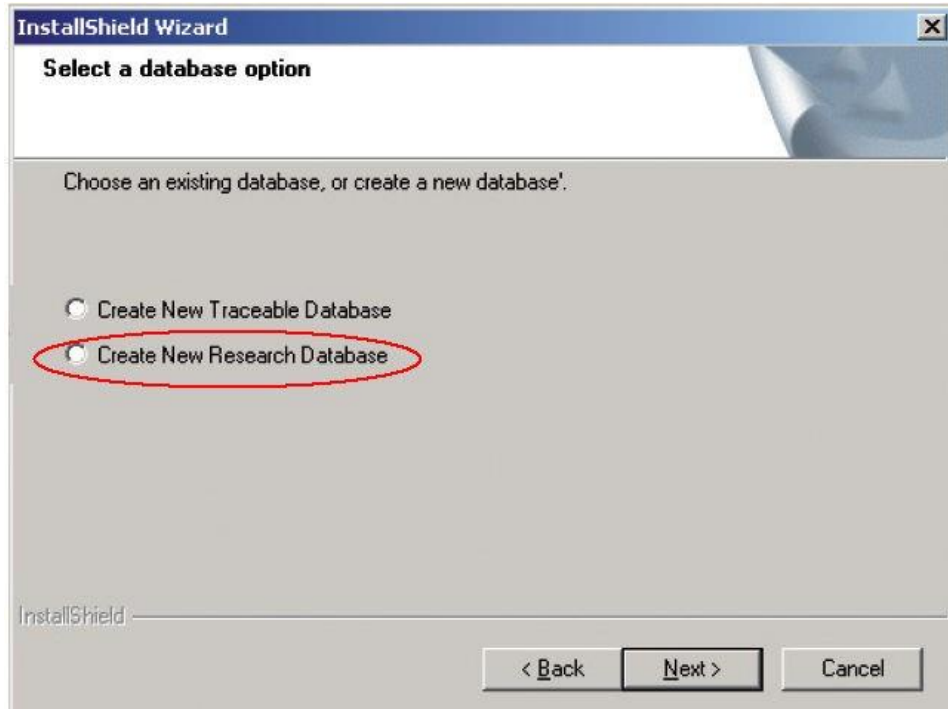
7. 選擇 Exor4 安裝位置，點選“Next”。



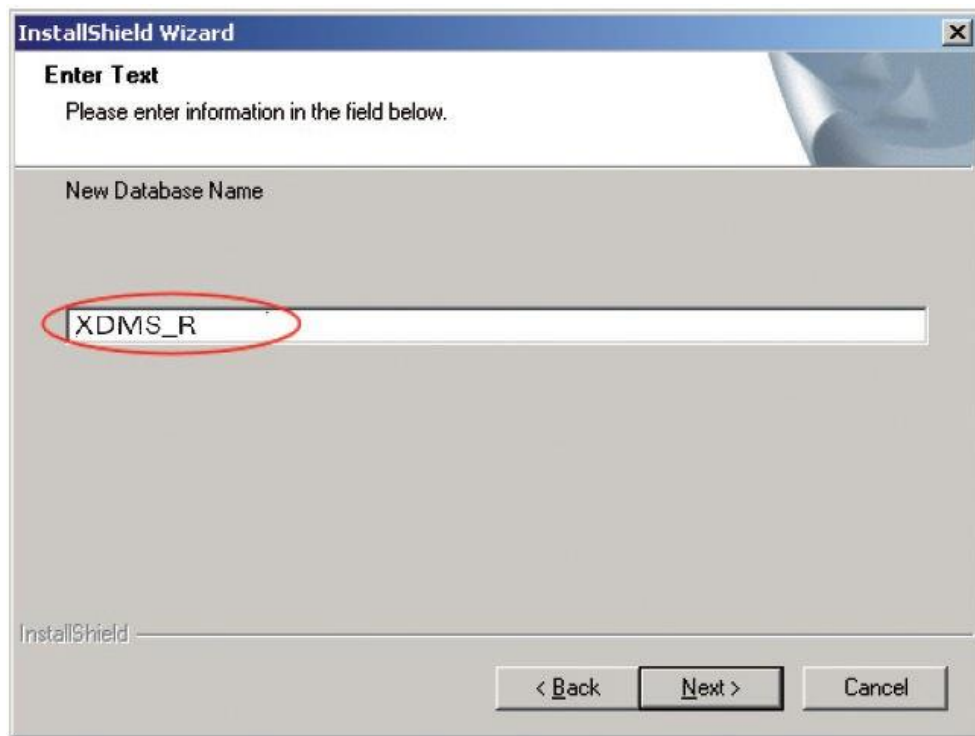
8. 選擇資料庫安裝位置，點選“Next”。



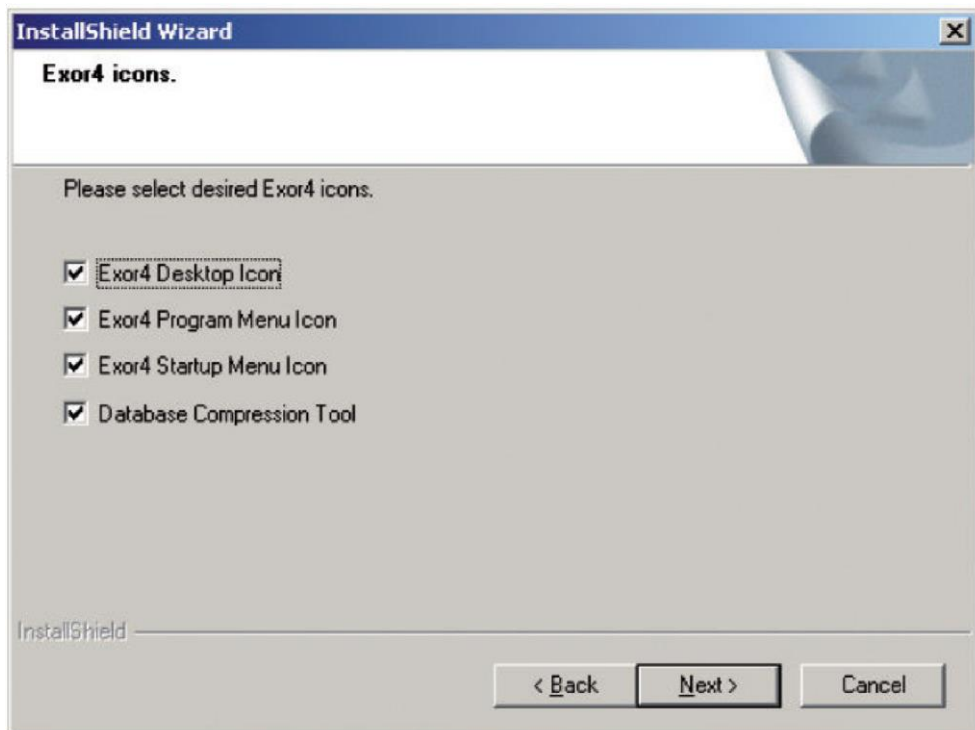
9. 選擇 “Create New Research Database”



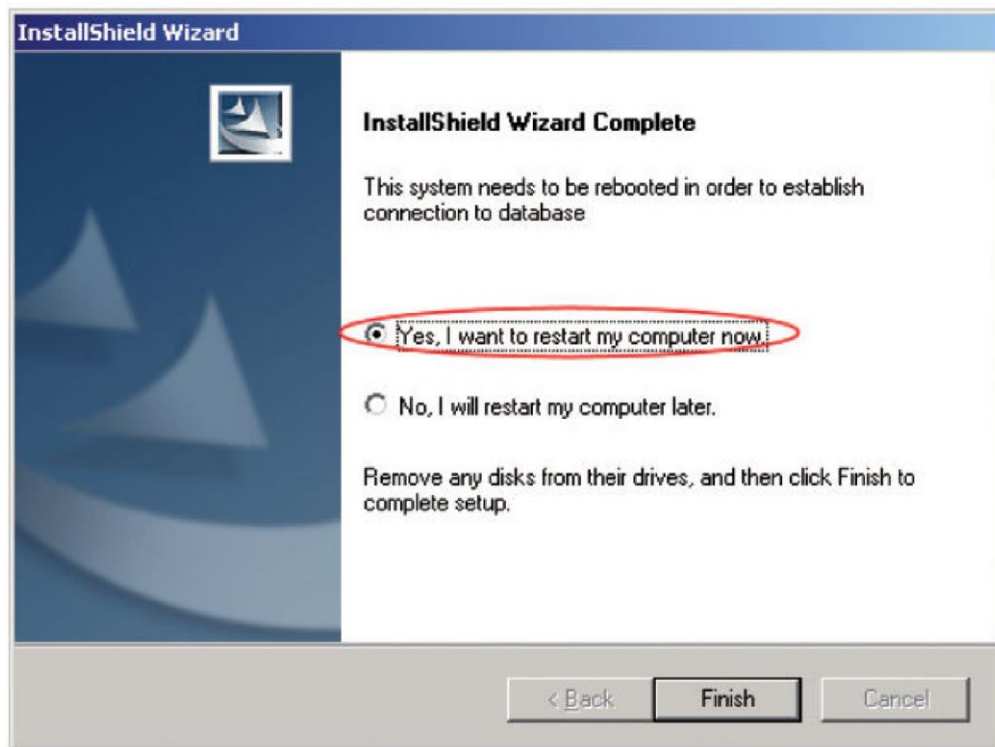
10. 將此資料庫命名為 “XDMS_R”



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，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。



二. 啟動機器與軟體

- 啟動機器

1. 機器主開關位於機器右後方。



2. 機器正 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)，表示機器已經啟動完成。

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	機器啟動完成，96/384 孔盤還未放入
綠	橘 *閃爍*	96/384 孔盤正在放入中
綠	綠	機器啟動完成，96/384 孔盤已經放入
綠 *閃爍*	綠 *閃爍*	實驗進行中

3. 按壓機器正上方唯一的按鈕，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。



- 啟動軟體

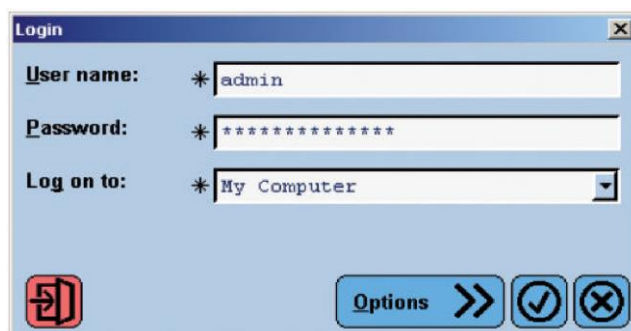
1. 開啟電腦，並以正確的使用者名稱與密碼登入 Windows。

User name: OPERATOR

Password: LC480



2. 開啟 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):

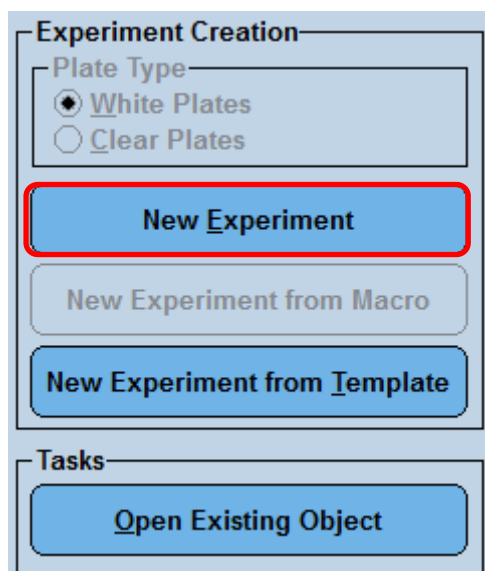
User name: admin

Password: LightCycler480

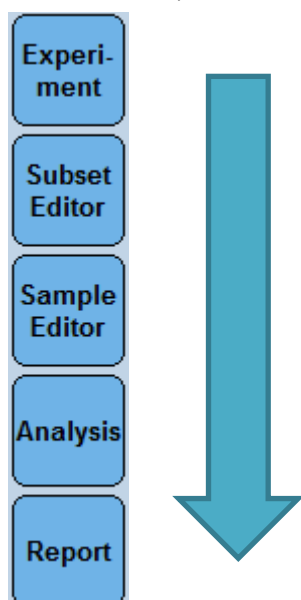
二．軟體設定-- 開啟新實驗

• 設定新實驗

1. 軟體開啟後，會進入主畫 。點選“**New Experiment**”。



2. 接著會跳出一個新視窗並且在左側會看到多個分頁，如下：
設定上只需要由上到下，一個一個進行設定即可。



Experiment

Experiment :

設定 PCR condition、detection format 及 reaction volume，畫面如下：

LightCycler 480 Software release 1.5.0

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System I / Not Connected Database: 20484 (Research)

Window: New Experiment User: System Admin

Step 1 Run Protocol Data Run Notes **Step 2**

Setup

Detection Format SYBR Green I / HRM Dye Customize Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 20

Color Comp ID Lot No Test ID

Step 3 Programs

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Program	1	None

Step 4 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	00:00:01	4.4	0	0	0	0

Step 5

Overview

Temperature (°C)

Estimated Time (h:mm:ss)

Apply Template

End Program + 10 Cycles Start Run

Step 1. 在實驗設定上方，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

Step 2. 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。

Step 3. 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』。

Step 4. 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

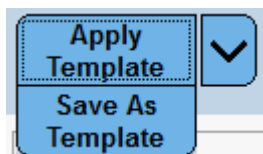
- 點選各個 program 即可設定詳細溫度變化步驟，請根據產品說明書來設定，利用『+』與『-』增加或刪除步驟。需要設定的參數包含 Target (°C) 目標溫度，Acquisition Mode (螢光偵測模式)，Hold (hh:mm:ss) 停留時間。Ramp Rate (°C/s) 為升降溫速度，範圍如下：

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

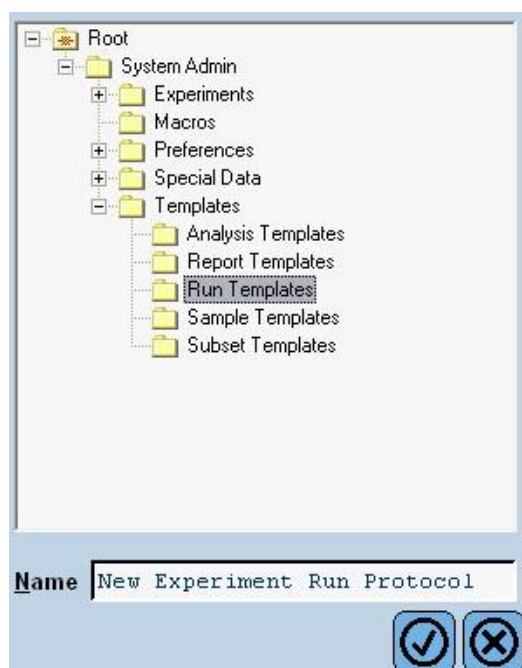
若設定溫度低於 50°C，請把 Ramp Rate 調整成 1.5°C/s (96 well) 或 2.0°C/s (384 well)。

Step 5. 將實驗步驟儲存成『Template』以便下次進行套用。

點選左下角“√”再點擊“Save As Template”如下圖：



接著利用此步驟儲存起來且軟體會自動帶到 Template 的資料夾，請選擇子目錄“Run Template”並命名後點擊“√”以儲存。



建議存於 Run Template 資料夾中，方便管理。

將此實驗步驟命名。

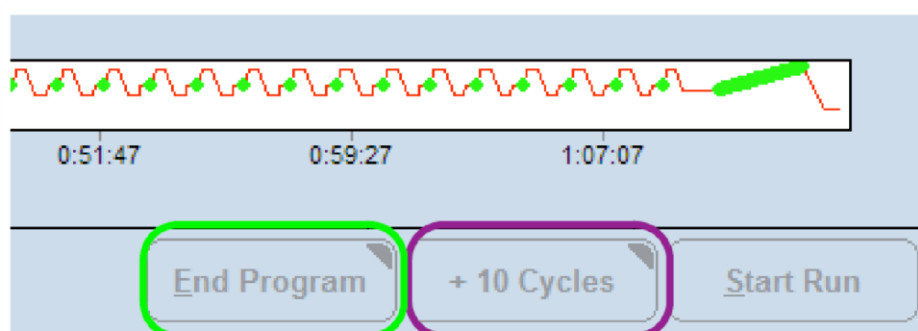
• 套用 Template

1. 在建立了 New Experiment 後，直接點選視窗左下角 “Apply Template”，選擇欲套用之 template 即可。



2. 設定完成後將 96 或 384 孔盤放入，點選 “Start Run”。
3. 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。

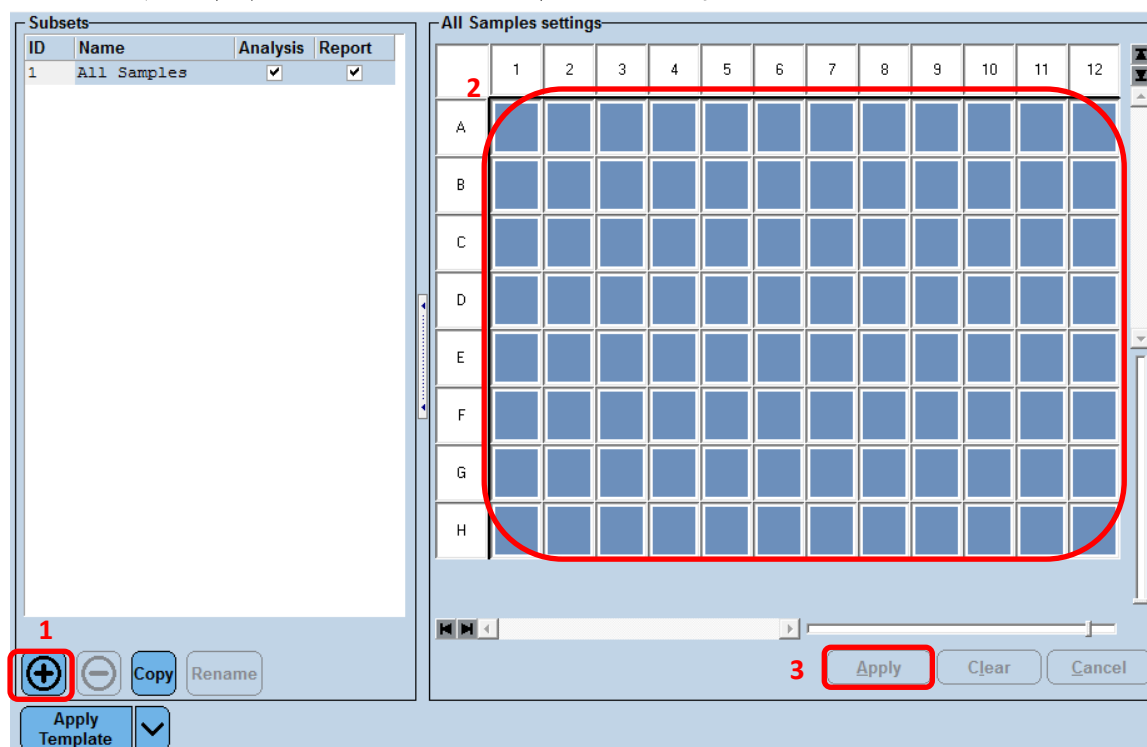
❖ 實驗進行中會進入另一個 Data 視窗，視窗下方按鈕功能如下：



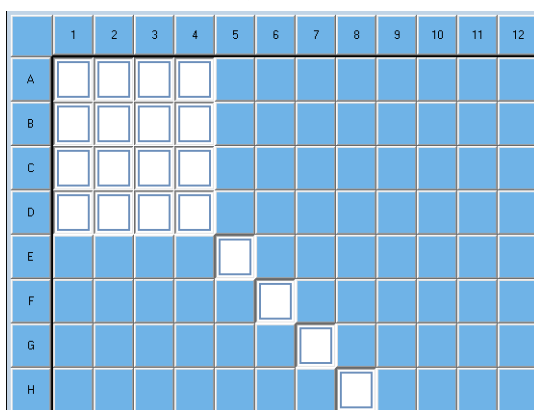
- ✓ **End Program**：結束此 Program, 進入下一個 Program。
- ✓ **+ 10 Cycles**：即時增加循環數目。
- ✓ **Abort Run**：馬上結束此實驗，請注意，若按此鍵，則此次實驗的結果將不儲存。

Subset Editor

編輯分析群組：設定您欲分析的區間，畫面如下：



1. 點選『+』新增新的群組，並將其命名。
2. 圈選右側欲分析的 well，圈選後會呈白色實心，如下圖：



3. 最後點擊 Apply 即可。

Sample Editor

樣品編輯，畫面如下：

Step 1: Select Workflow

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

Step 2: Select Samples

Subset: All Samples    

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

Sample Name Sample Name

☐ (default value set)

Step 3: Edit Properties

Sample Name

Make Replicates 

Step 1. 點擊您欲進行的分析

Step 1: Select Workflow

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

Abs Quant：絕對定量

Rel Quant：相對定量

Scannig：HRM 相關實驗

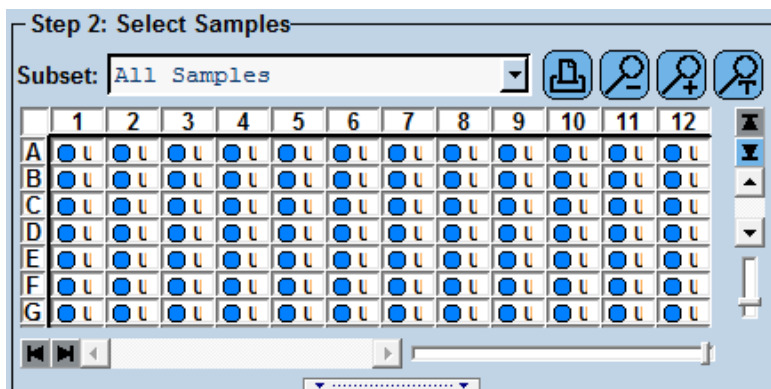
Tm：Tm 分析

Melt Geno：基因分型實驗(適合 Hyprobe & Simple Probe)

Endpt Geno：基因分型實驗(適合 TaqMan probe)

Step 2.

- (1) 選擇您欲分析的 Subset(預設值為 all sample)。
- (2) 在 96well 當中框選欲設定的 well。



Step 3. 絕對與相對定量因分析方法不同，需要填寫的欄位也有所不同，如下：

(1) Abs Quant :

- a. 填寫 sample name 並選擇 sample type.
- b. 若 sample type 選擇為 standard 時，需填寫濃度於右側欄位。

(2) Rel Quant :

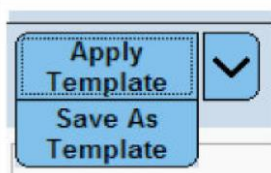
- a. 填寫 sample name 並選擇 sample type
- b. 填寫 Target name(如：基因名稱)及選擇此為 Target, Reference or Unassigned(不需要分析的基因)。
- c. 填入 PCR efficiency(預設值為 2)。

Step 4. 最後將整個區塊圈選起來後，點擊下方的“v”，如下圖：



接著再選擇 Auto Replicate，此時軟體會自動進行辨認將 sample name、sample type 及 target name 相同的 well 設定為 repeat.

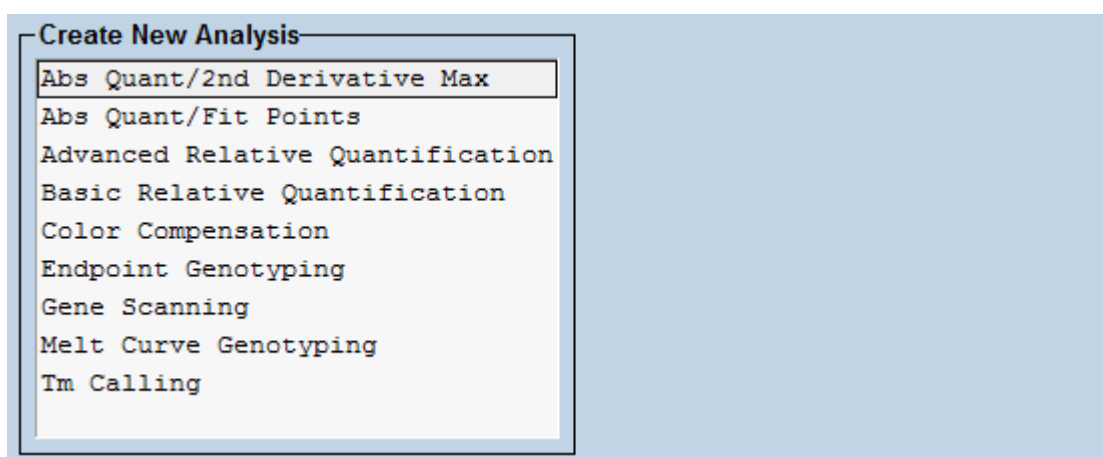
Step 5. 若想要將此樣品編輯儲存成 Template，可點選視窗左下角 “Save As Template” 即可，下次實驗時可點選 “Apply Template” 進行套用。



Analysis

選擇您欲分析的模式：

1. 首先您有可能會看到下列頁面：
 - (1) 左側的“**Create New Analysis**”代表此軟體能夠分析的功能有哪些。
 - (2) 右側的“**Open Existing Analysis**”為您目前已經作過的分析。所以如果您
是第一次進行分析，您會發現右側欄位是空白的，如下圖：



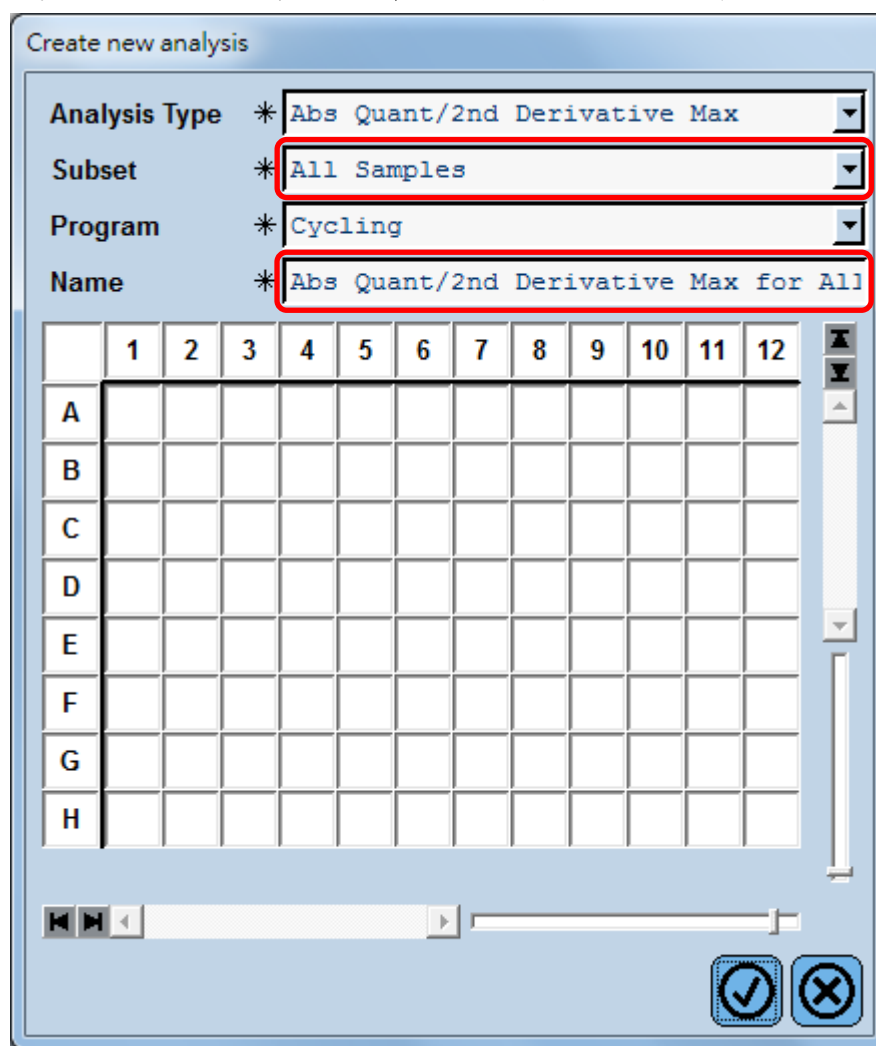
分析模式簡要說明：

分析模式	說明
Abs Quant / 2nd Derivative Max	絕對定量 (2 nd Max)
Abs Quant / Fit Points	絕對定量 (Fit Point)
Advanced Relative Quantification	進階相對定量 (2 nd Max or Fit Point)
Basic Relative Quantification	基礎相對定量 (Fit Point only)
Endpoint Genotyping	基因分型(適用於 TaqMan probe)
Melt Curve Genotyping	基因分型(適用於 Hyprobe)
Tm Calling	Tm 分析

2. 點擊 Create New Analysis 中您欲使用的分析方式：

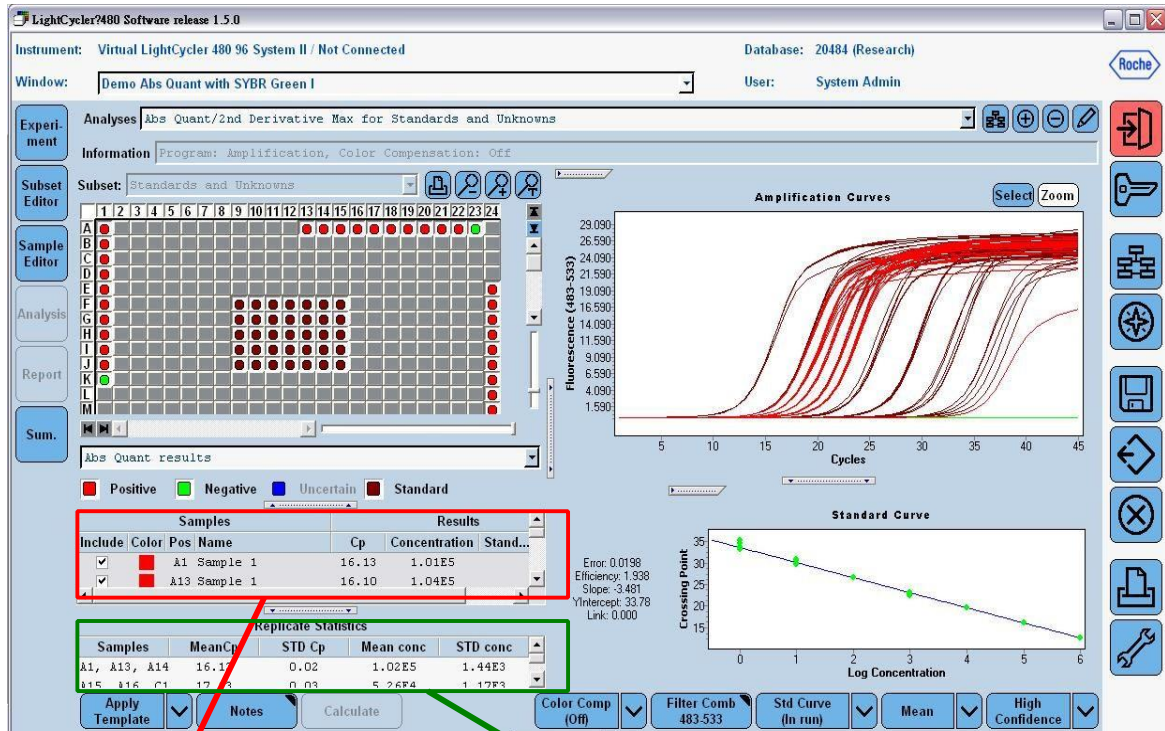
絕對定量 (Abs Quantification)

- (1) 點擊 Abs Quant / 2nd Derivative Max 後會出現一個新畫面，您只需要利用下拉式選單選擇您欲分析的 Subset。另外由於可以建立多個分析模式，因此您可給予此分析一個名稱以方便您辨認，如下列畫面。



- (2) 最後點擊下方“v”即可。

(3) 接著再跳出的新畫面中，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

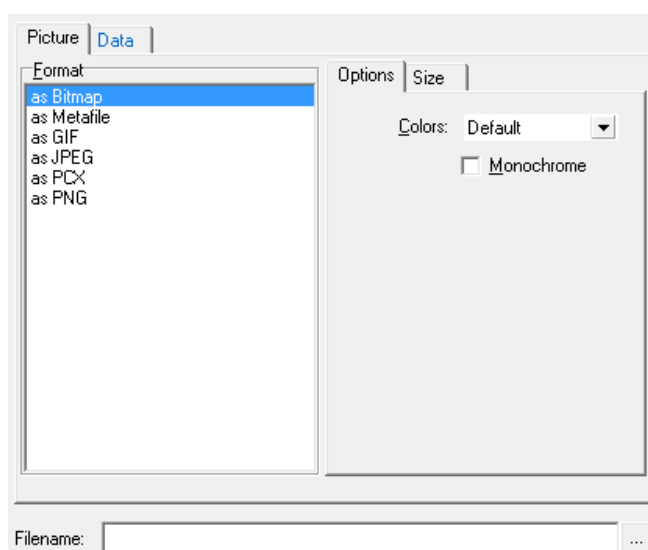
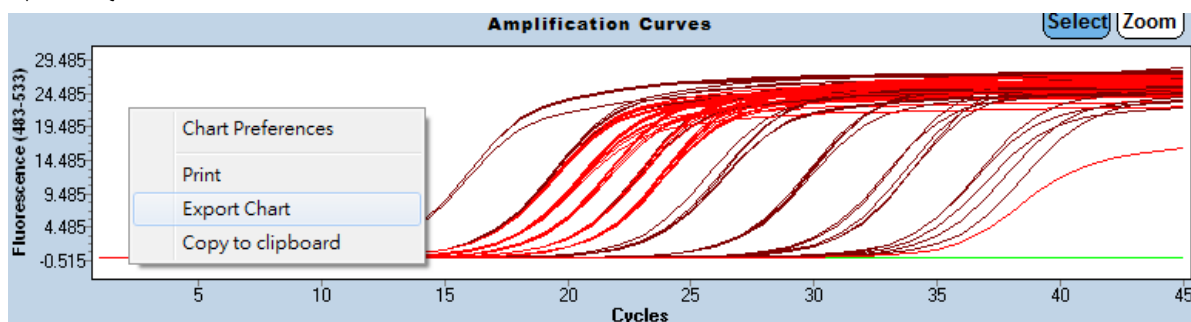
重複樣品平均後之 Cp 值與濃度, 並自動計算標準差

(4) 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 軟體開啟。

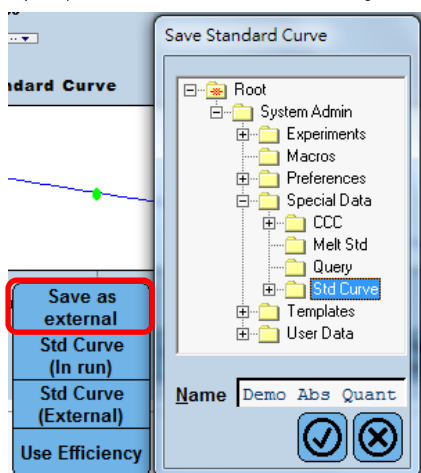
Include	Color	Pos	Name	Cp	Concentra
☒	Red	A1	Sample 1	16.13	1.01E
☒	Red	A13	Sample 1	16.10	1.04E
☒	Red	A14	Sample 1	16.13	1.02E
☒	Red	A15	Sample 2	17.23	5.26E

Export Table

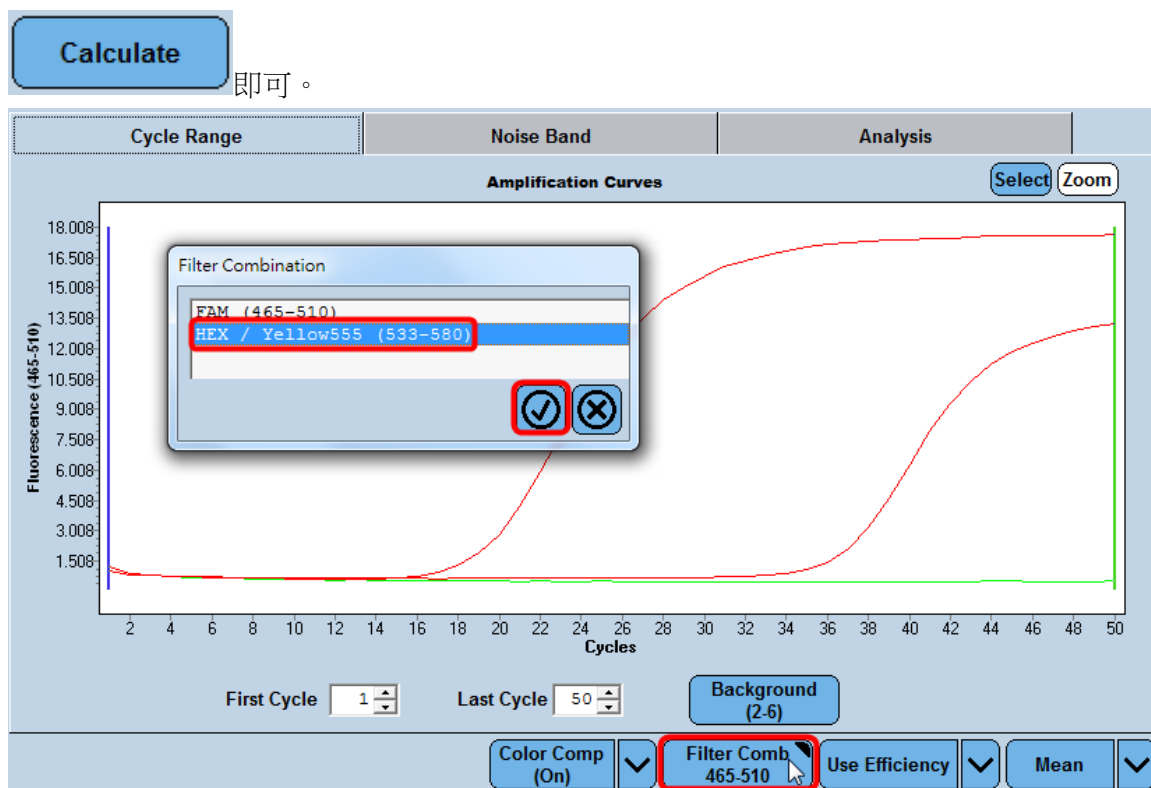
- (5) 圖形輸出: 在圖形上按滑鼠右鍵，點選“Export”即可輸出成各種圖形檔案格式。



- (6) 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。但在下一次的實驗當中至少要帶有一個 standard sample。



- (7) 若欲分析不同 channel 的 data，可點擊右下方 Filter Comb 並在跳出的視窗中點擊欲分析的 channel 及"✓"(如下圖)。接著再點擊 Calculate

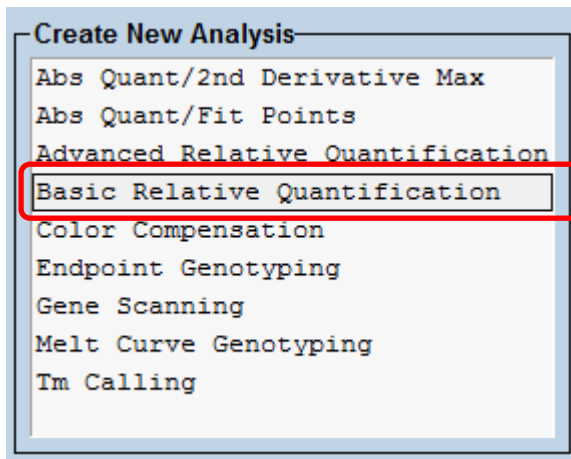


- (8) 若欲 exclude well，只需雙擊資料表格左側 include 欄位以取消勾勾，再點擊 Calculate，此時軟體會再重新計算結果，如下圖欄位：

Samples				Results	
Include	Color	Pos	Name	Cp	Concentration
☒	■	A1	Sample 1	16.13	1.01E
☒	■	A13	Sample 1	16.10	1.04E
☒	■	A14	Sample 1	16.13	1.02E
☒	■	A15	Sample 2	17.10	5.37E
☒	■	A16	Sample 2	17.12	5.28E
☒	■	A17	Sample 3	18.28	2.46E
☒	■	A18	Sample 3	18.28	2.45E
☒	■	A19	Sample 4	19.65	9.90E
☒	■	A20	Sample 4	19.66	9.85E

基礎相對定量 (Basic Relative Quantification)

1. 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”。
2. 點擊 Basic Relative Quantification，如下圖：



3. 接著軟體直接會進行全盤的分析並得到結果，請參考 p.30。

進階相對定量 (Advance 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 Advance Relative Quantification 後，一樣可利用下拉式選單選擇您欲分析的 Subset 及填寫易於辨認的分析 Name。最後再點擊下方“v”，如下圖：

Create new analysis

Analysis Type * Advanced Relative Quantification

Subset * All Samples

Program * amplification

Name * Advanced Relative Quantification for

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Navigation buttons: Previous, Next, First, Last, and a scrollbar.

Buttons: [Checkmark] [X]

2. 接下來選擇“Abs Quant/2nd Derivative Max 及”v”即可，如下圖：

Create new analysis

Abs Quant Type

☒ Abs Quant/2nd Derivative Max

Sensitivity

☐ High Sensitivity ☒ High Confidence

☐ Abs Quant/Fit Points

Subordinate Abs Quant Analysis

☒ Create by Target Name
- Create one analysis for each target name

☐ Create by Filter Combination
- Create one analysis for each filter combination

Reference Analysis

☒ Create In-Run ☐ Select External ...

Pairing Rule

☐ One To One ☐ All To All

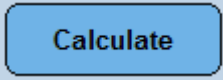
☒ All To Mean ☐ Mean To All

Default Standard Curve Settings

When there are no In-Run standards for a target name:

☒ always use efficiency

☐ allow external standards with matching target name

3. 在新畫面中點擊 ，接著就會有表格式的結果及圖形結果。

4. 表格式的結果如下：

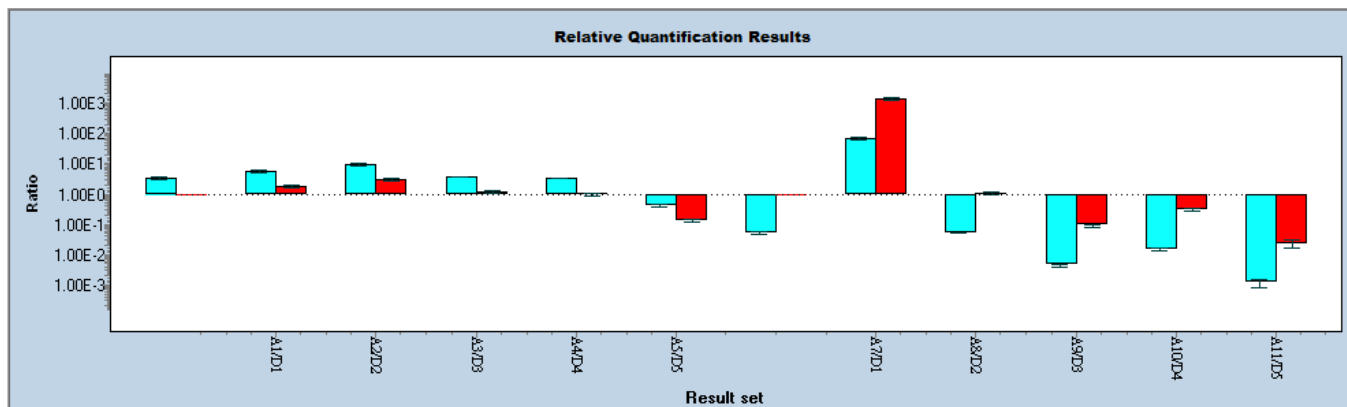
Bar			Target Name		Target	Reference	Ratios		
Chart	Pairing	Sample Name	Targets	References	Mean Cp	Mean Cp	Target/Ref	Normalized	Status
☒		calibrator	Target 1	Reference 1;Refere	22.43	24.14	3.266	1.000	
☒	A1/D1	sample 1	Target 1	Reference 1;Refere	23.76	26.31	5.859	1.794	
☒	A2/D2	sample 2	Target 1	Reference 1;Refere	21.34	24.58	9.490	2.906	
☒	A3/D3	sample 3	Target 1	Reference 1;Refere	24.30	26.18	3.675	1.125	
☒	A4/D4	sample 4	Target 1	Reference 1;Refere	23.56	25.27	3.267	1.000	
☒	A5/D5	sample 5	Target 1	Reference 1;Refere	25.11	23.90	0.4320	0.1323	
☒		calibrator	Target 2	Reference 1;Refere	28.49	24.14	4.91E-2	1.000	
☒	A7/D1	sample 1	Target 2	Reference 1;Refere	20.21	26.31	68.81	1402	

(1) Target/Reference ratio = $2^{-\Delta Cp}$

$$\Delta Cp = Cp(\text{target}) - Cp(\text{Reference})$$

(2) Normalized Ration = $2^{-\Delta\Delta Cp}$

5. 圖表結果如下：



(1) 紅色的 bar 為 Target/Reference Ratio。

(2) 水藍色的 bar 為 Normalized Ratio。

(3) 若您只欲顯示單種 bar，可點擊右下角的 **Settings** 後，依勾選您欲呈現的是 Ratio or Normalized Ratio，如下圖：

Ratios

☒ Display Target/Reference Ratio

☐ Display Normalized Ratio

☐ Show Ratio Errors

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

6. 若欲 exclude well，則先點擊 Target Name 分頁，再連續點擊欲 exclude 的基因，如下圖：

Results		Manual Pairing		Target Name
Target Name	Filter Combination	Standards/Efficiency	Efficiency Value	
Target 1	465-510	Efficiency	2.00	
Target 2	465-510	Efficiency	2.00	
Reference 1	465-510	Efficiency	2.00	
Reference 2	465-510	Efficiency	2.00	

7. 此時畫面會跳到與 AQ 相似的畫面，接著只需要與 AQ 一樣點擊欲 exclude 的 well，再按下方 Calculate。

Samples			
Include	Color	Pos	Name
☐		A1	sample 1
☒		A2	sample 2
☒		A3	sample 3
☒		A4	sample 4
☒		A5	sample 5
☒		A6	no template co
☒		B1	sample 1

Replicate Statistics				
Samp...	Mean...	STD Cp	Mean...	S
A1, B1,				
A2, B2,				

8. 最後點擊右下方的

Back to Rel
Quant

，即可回到相對定量的結果頁面。

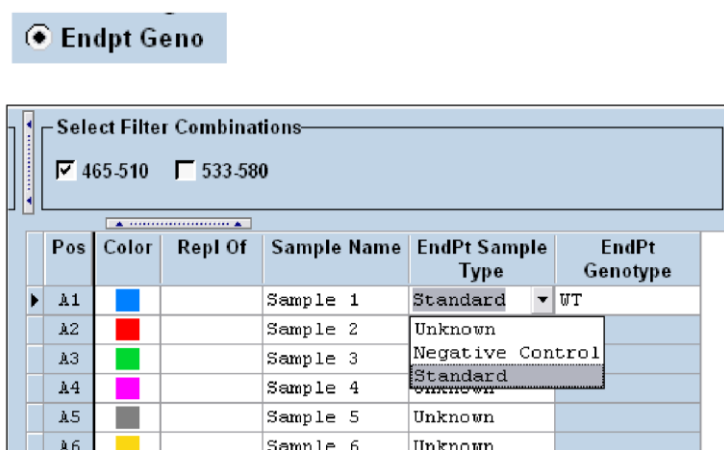
Endpoint 基因分型 (Endpoint Genotyping)

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。

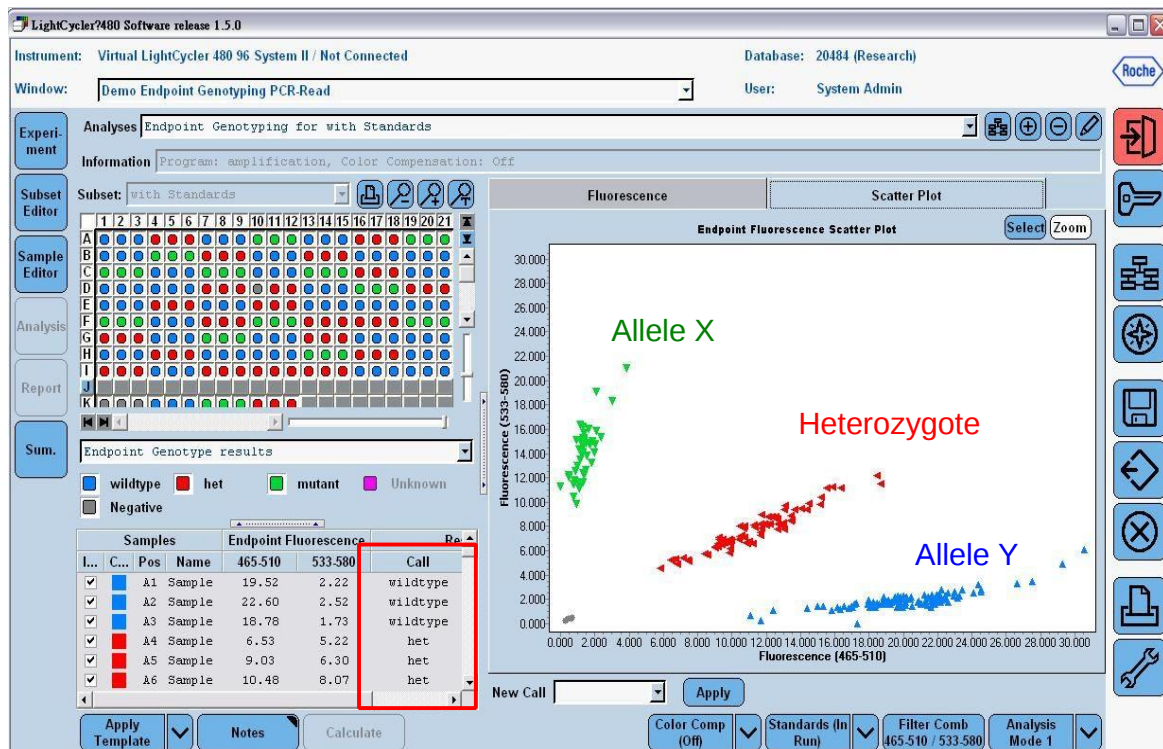
❖ 若有標準品，請在樣品編輯中編輯：



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。



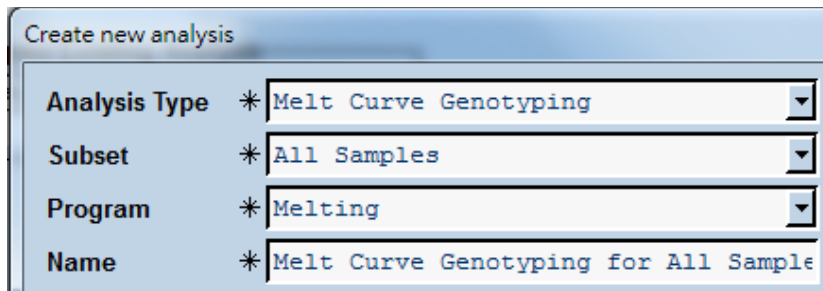
3. 若軟體自動輸出的結果不正確，可手動將正確的 Call 輸入 New Call 欄位中，點選“Apply”。

New Call

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)

1. 點擊左側“Create New Analysis”中的 Melt Curve Genotyping 之後，會出現下列畫面：



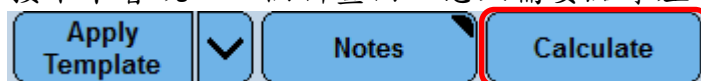
一共有 4 個選項：

- (1) Analysis type：即是您欲進行的分析模組，不需要改選。
 - (2) Subset：您可以選擇您欲分析的區塊，預設值是 All sample。
 - (3) Program：在整個 real time pcr 的過程中會有 amplification 及 melting。
若是作定量分析會選擇 Amplification，反之像您一樣是作 melt genotyping 則是選擇 melting。
 - (4) Name：就您新建的這個分析給予一個名稱，以利您辨認。
- 上述一般來說只會選 subset 及改 name，其他的不更改。

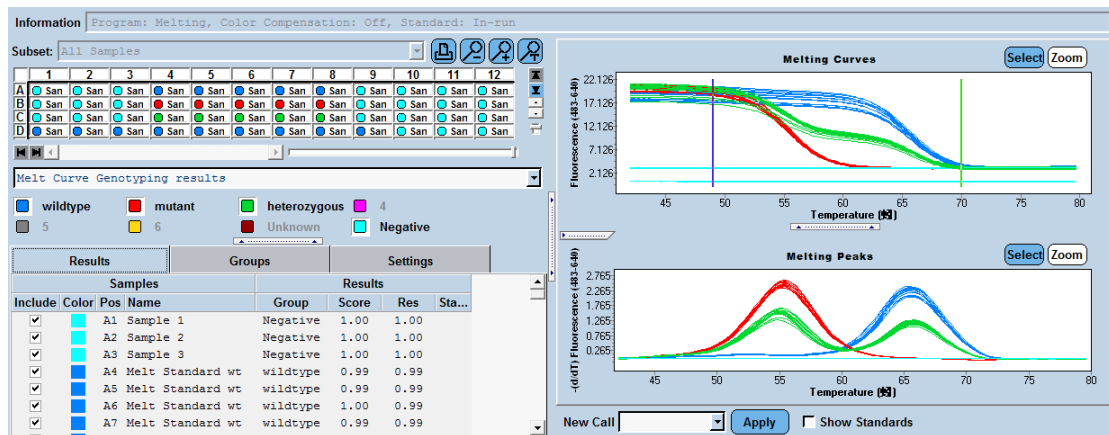


最後點擊  即可。

2. 接下來會跳入一個新畫面，您只需要點擊左下方的 Calculate



3. 接著您就會得到分群的結果，左側是表格式結果，右側是以圖形的方式呈現，如下圖：

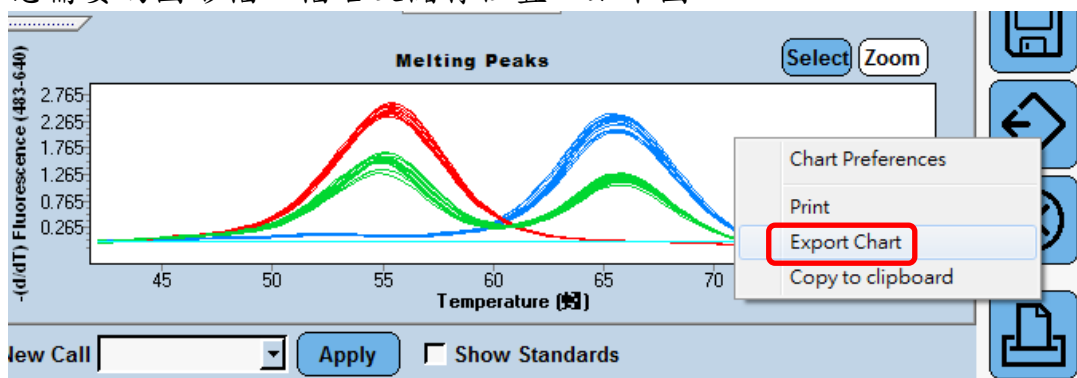


4. 若您需要將左側的表格輸出，您可在表格右側點擊右鍵並點選 Export Table，您可另存一個 txt 檔並可利用 excel 開啟則會得到 excel 表格。
如下圖：

Results				Groups		Settings	
Samples				Results			
Include	Color	Pos	Name	Group	Score	Res	Sta...
☒		A1	Sample 1	Negative	1.00	1.00	
☒		A2	Sample 2	Negative	1.00	1.00	
☒		A3	Sample 3	Negative	1.00	1.00	
☒		A4	Melt Standard wt	wildtype	0.99	0.99	
☒		A5	Melt Standard wt	wildtype	0.99	0.99	
☒		A6	Melt Standard wt	wildtype	1.00	0.99	
☒		A7	Melt Standard wt	wildtype	0.99	0.99	

Export Table

5. 若是需要輸出圖形則可於圖形處點擊右鍵後選擇 Export Chart，並選擇您需要的圖形檔、檔名及儲存位置，如下圖：



6. 視窗右下角可設定分類方式



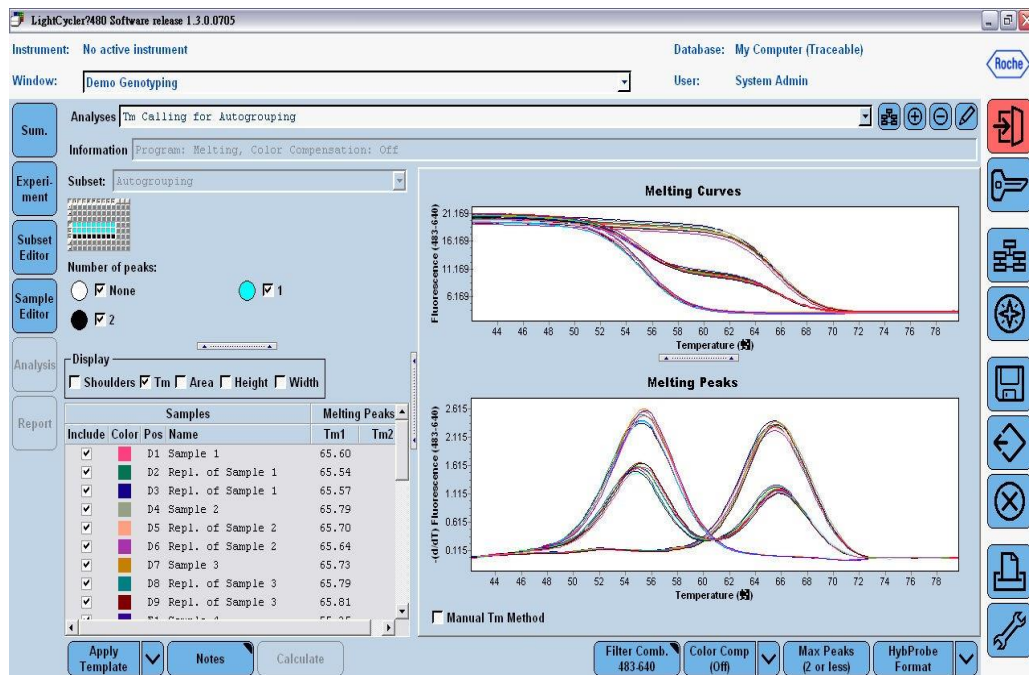
Auto Group：自動分組

In-run：標準品包含在本次實驗中

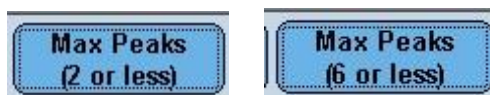
External：標準品在之前已儲存之實驗中

• Tm 分析 (Tm Calling)

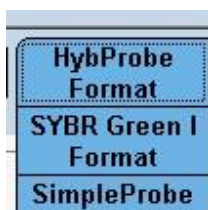
1. 進入 Tm 分析視窗



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。

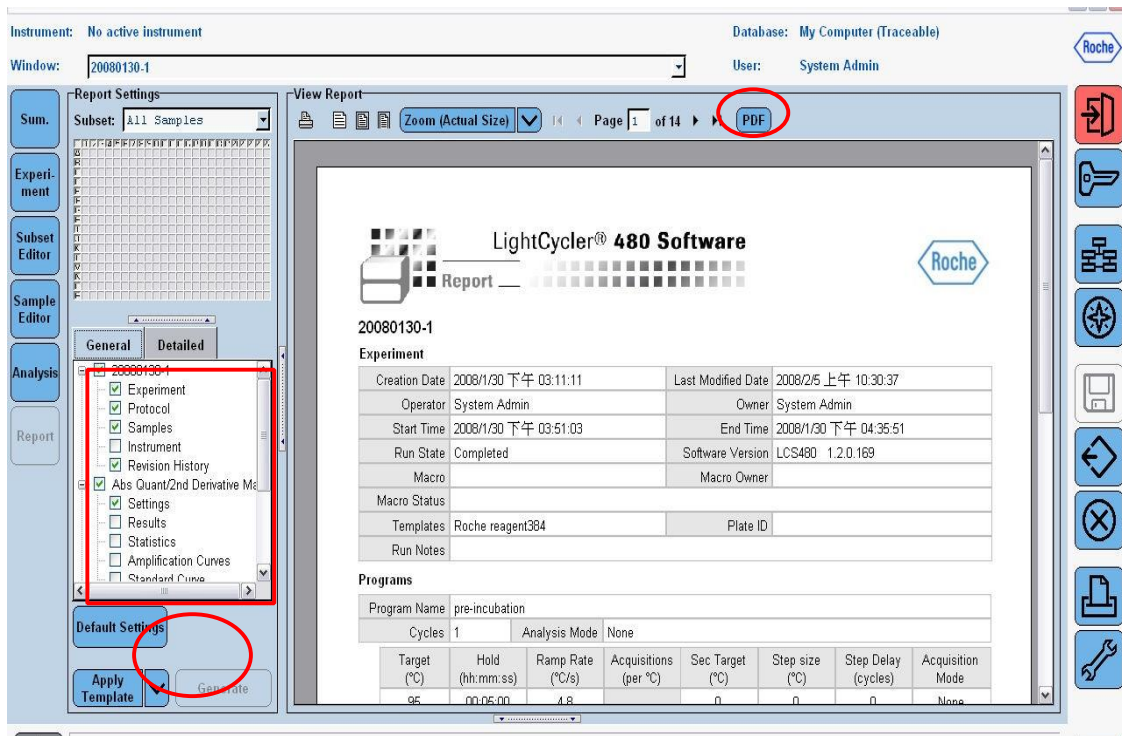


資料儲存



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。



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

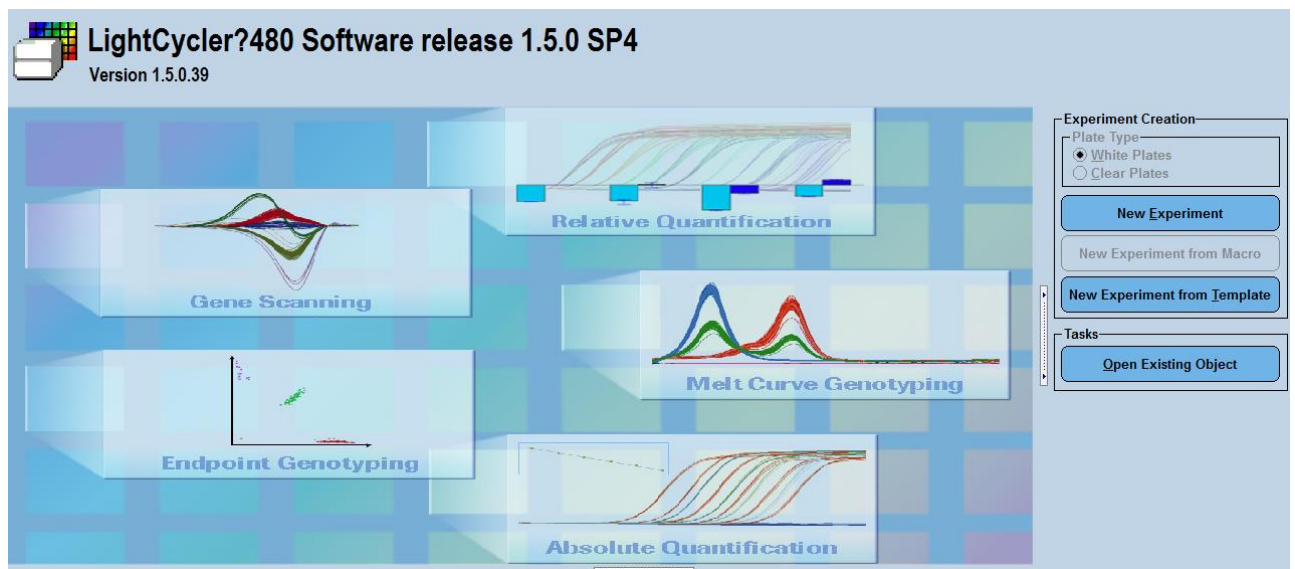
• 資料輸入

1. 分析電腦上開啟 LightCycler 480 軟體，登入後點選 
2. 點選 ，選取所要輸入的 .ixo 檔案並開啟，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・右側功能鍵說明：



回到首頁，點擊後會回到下列頁面：



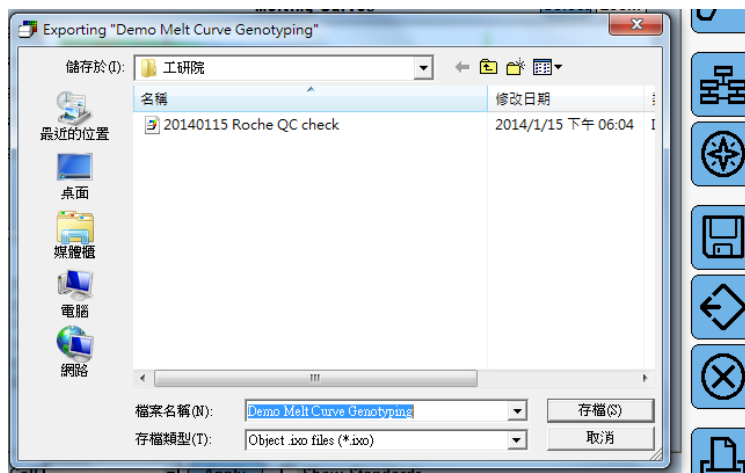
進入檔案總管：點擊後您會看到類似 windows 的檔案總管，您可對資料進行刪除、複製、輸出及輸入。



存檔的快捷鍵，您可於設定及分析完後點擊此鍵，下次開啟同一個檔案時就不需要再重新進行設定及分析。



輸出：若您需要將單個實驗檔輸出至其他電腦進行分析，您可先開啟您欲輸出的檔案後，點擊此鍵後軟體會要求您選擇儲存的位置，如下：



工具鍵：

可點選“User and Groups”點選
“New”即可新增使用者，並設定
使用者名稱、密碼與權限。