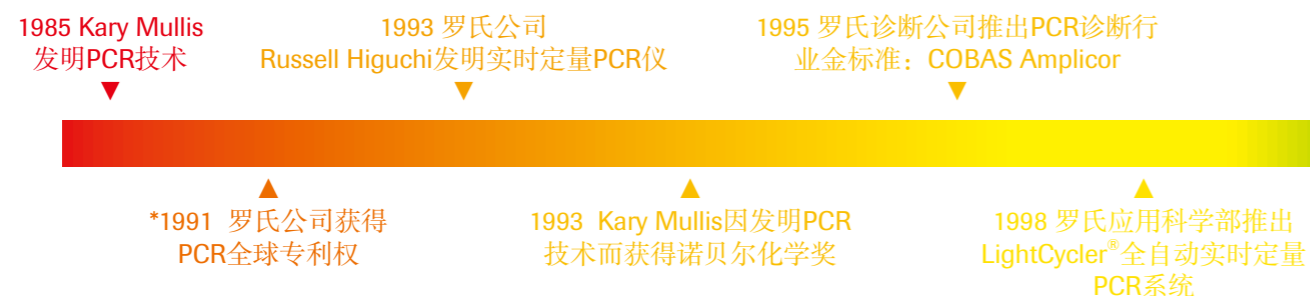


LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR仪

具备出色的分辨率、重复性及高速度，可广泛应用于科研、临床诊断、食品安全



高分辨率

轻松区分1000与2000拷贝浓度差异

高灵敏度

可检测单拷贝基因

动力学范围广

可同时检测到1—10¹⁰个拷贝DNA

高重复性

重复性高, CV<0.15%

高速

40分钟完成40个PCR循环(384孔板)

技术领先

采用Therma-Base™热循环技术(专利号US Patent No.5161609)、导热性能好的银质热循环模块和先进的光学检测系统, 彻底消除边缘效应, 保持稳定优质的检测结果, 且整个过程中无需使用ROX等内参染料, 有效节约成本

全能

分析模式多样, 绝对定量、相对定量、基因分型(溶解曲线法及终点法)、高分辨率溶解曲线分析, 同时适用市面上主流的检测模式(染料检测、水解探针(TaqMan®探针)、杂交探针、简单探针等)

开放式平台

可使用市面上绝大多数常见荧光染料以及第三方提供的8连管、96孔板和384孔板

灵活

可互换的96孔、384孔加热模块, 用户可自行更换, 无需工程师到场

自动化平台

配以LIMS系统及自动进样机械臂, 可实现远程操作及全自动化运行



LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR仪——温控系统

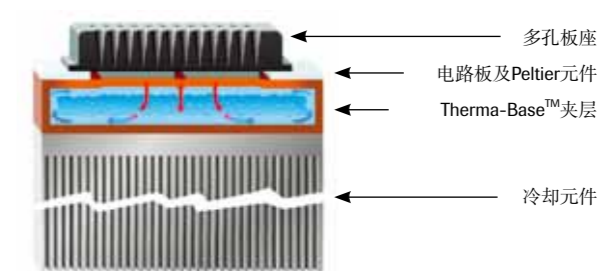
独具匠心的PCR热循环模块设计

2005 LightCycler®全球装机突破5000台, 成为全球销量成绩斐然的单型号实时定量PCR系统

2008 全新升级型号, LightCycler® 480 II正式上市

2011 精巧时尚型LightCycler Nano实时定量PCR系统

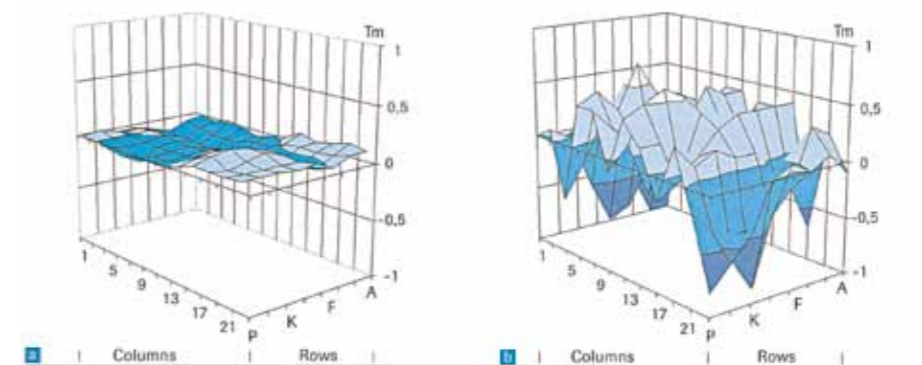
加热模块和冷却元件之间引入的高效热平衡技术(Therma-Base™), 同时使用导热性能出色的银质材质, 使LightCycler® 480 II的温控系统获得了技术性的进步。通过降低热扩散阻尼, LightCycler® 480 II热循环模块能够提供优势的孔间温度均一性, 无论是对不同的检测模式, 不同的实时荧光定量PCR应用, 还是快速PCR流程, 都可以获得良好的数据均一性。



LightCycler® 480 II热循环模块的核心优势:

- 采用导热性能出色的银质材质, 孔间温度均一性可达±0.1℃;
- 快速、高准确度的温度调控;
- 40个循环<40分钟(384孔板)

▲ 图1: LightCycler® 480 II热循环模块横截面图。Therma-Base™是一个内壁布满灯芯状毛细管结构的腔体, 以有效增大接触表面积。通过一系列实时的冷凝和蒸发效应, Therma-Base™高效地传递热量, 从而实现整板优秀的温度均一性。



▲ 图2: LightCycler® 480 II在50℃时的温度均一性: a) LightCycler® 480 II系统, b) 另一实时荧光定量PCR系统。使用Tm值重现性很高的标记寡核苷酸作为检测物, 用于衡量多孔板上的温度均一性。以寡核苷酸预期Tm值为0, 对所有384个孔内实际测得Tm值与预期Tm值的差异作图。数据显示LightCycler® 480 II热循环模块具有高度的孔间温度均一性(见图2a), 与之相比, 普通热循环模块孔间温差则较大(图2b)。

*1991年罗氏公司将PCR专利从Centus公司购入。专利号为US Patent No.4683195, 4683202, 4800159, 4965188, 5008182。

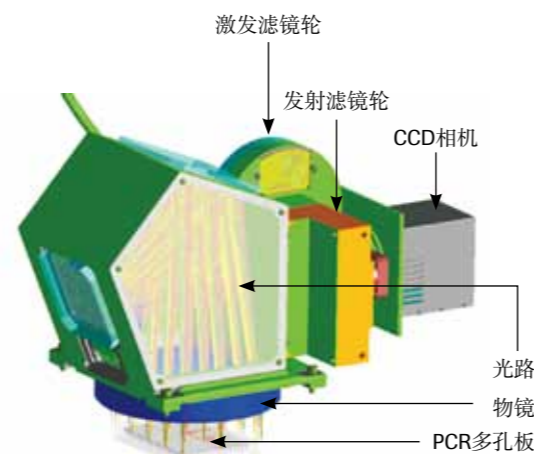
LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR仪——光学系统

出色的光学系统

出色的光学系统

LightCycler® 480 系统现已将激发光源升级至非凡的宽光谱、高强度白色固态光源，激发光强度与上一代光源完全相同，除此之外，更具有节能、高效、寿命长、无需维护、无污染、耐震动、不易损坏、瞬时启动和快响应等诸多优点。

通过激发波长和发射波长的任意组合，LightCycler® 480 II系统对常见的荧光染料完全兼容，可用于目前所有的实时荧光定量PCR实验。



▲图 3: LightCycler® 480 II检测单元横截面图。采用了精心设计的五角棱镜光学结构，光学元件及焦距的巧妙组合确保了整板信号激发的特异性与数据收集的一致性，从而消除了边缘效应。

LightCycler® 480 II光学系统的核心优势:

- 灵活地选择荧光染料及检测模式
- 针对Taqman终点法基因分型特别优化
- 整板数据的高准确度捕获
- 强大的多重PCR能力

▼表 1: 染料与检测模式概览。LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统采用了宽光谱、高强度的白色固态光源，其发射波长范围广泛覆盖整个可见光区域，激发光滤镜与发射光滤镜任意组合可获得多达19种检测模式，能够使用所有定量PCR和高分辨率熔解曲线研究的荧光染料。

检测模式	水解探针(R)	染料法	水解探针 (R), HybProbe探针 (D), SimpleProbe探针 (R)	水解探针 (R), HybProbe 探针 (A)			
染料 (举例)	LC Cyan 500 Fluo 3	SYBR Green I ResoLight EvaGreen LC Green	Cy3 Cy3.5 Fluorescein FAM TET	HEX JOE VIC Yellow555	TAMRA LC Red610 ROX Texas Red SYPRO Ruby SYPRO Orange	LC Red640 Alexa Fluor 633 Snarf 1 Acid Fuchsin	Cy5 Cy5.5 LC Red670 LC Red705

说明: 报告基团(Reporter): R; 供体基团(Donor): D; 受体基团(Acceptor): A。

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR仪——分析系统

软件性能优秀，适用于高通量应用中追求灵活的数据处理及分析

基于优秀的LightCycler®软件算法，新版的LightCycler® 480 II软件可进行高准确度、自动化的数据分析，迄今为止发表文章超过25,000篇以上。软件还提供了许多新的性能，让用户能够轻松、省时地处理高通量的实验数据。右键导出任意的分析图表和数据，以通用格式(JPG, GIF, TXT等)，真正所见即所得。同时，可选配多板分析功能，平行比较批间的实验数据。

LightCycler® 480 II软件的设计宗旨是为用户量身定做。支持绝对定量、熔解曲线分析、相对定量和自动基因分型等功能。

定量算法包括:

绝对定量

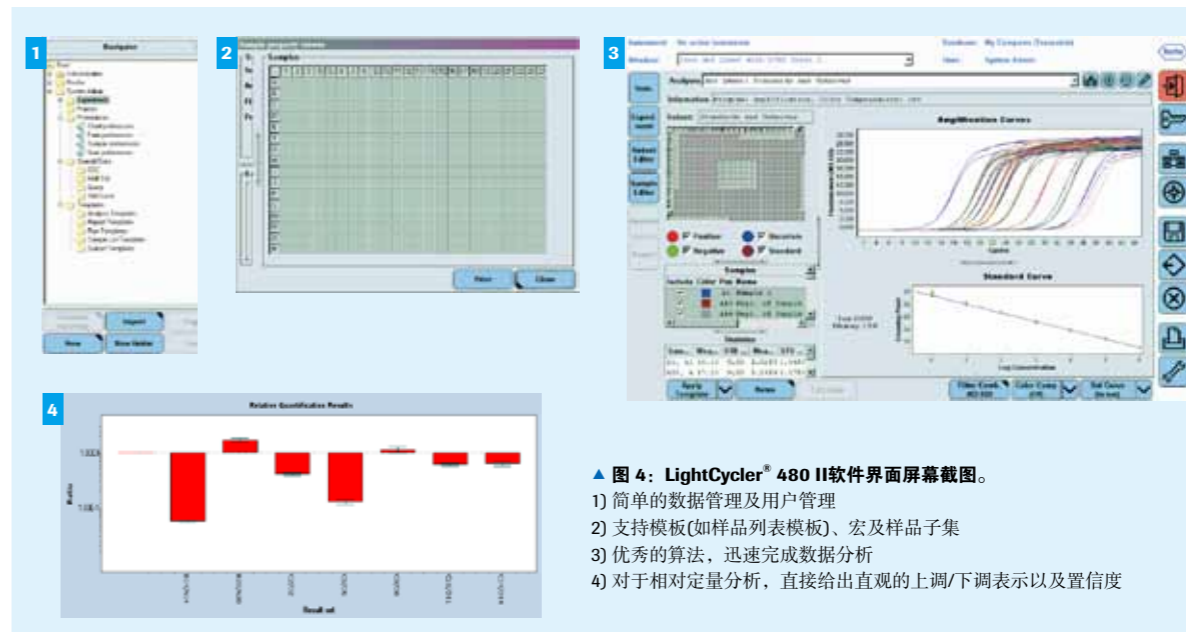
- 最大二阶导数法或基线法，以非线性标准曲线进行

相对定量

- 罗氏拥有的扩增效率校正 E -method 法(专利号US Patent No.6691041, 7125691)，采用产物的实际扩增效率数值计算定量结果，有效校正目标基因和内参基因因实际上不同的扩增效率，符合MIQE Guidelines标准
- 假定扩增效率=2的相对定量方法
- 导入标准曲线进行效率校正的相对定量方法



*MIQE Guideline: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

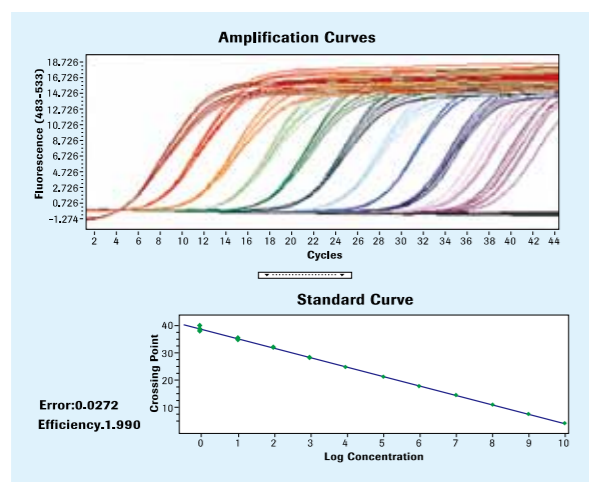


▲图 4: LightCycler® 480 II软件界面屏幕截图。

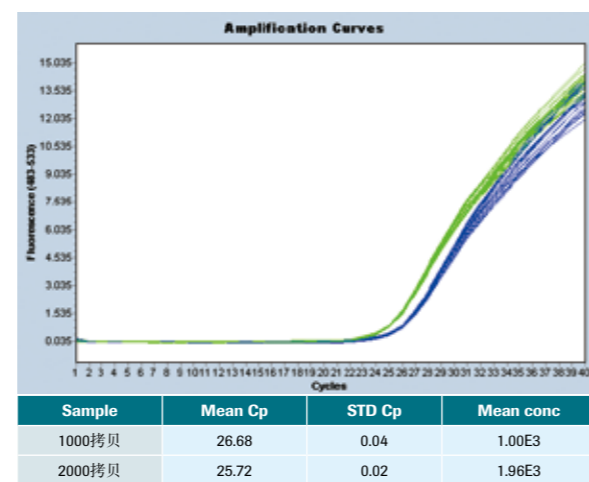
- 1) 简单的数据管理及用户管理
- 2) 支持模板(如样品列表模板)、宏及样品子集
- 3) 优秀的算法，迅速完成数据分析
- 4) 对于相对定量分析，直接给出直观的上调/下调表示以及置信度

LightCycler® 480 II 荧光实时定量PCR仪

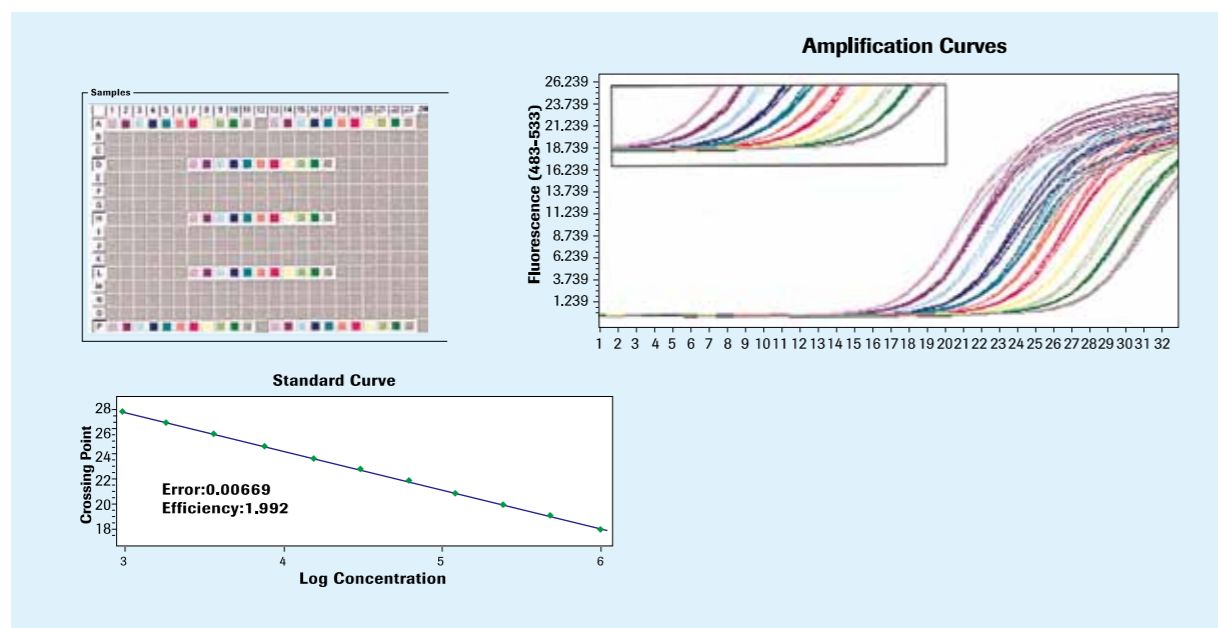
多达11个数量级的动力学范围



▲ 图 5: LightCycler® 480 II 系统的线性范围。质粒DNA以10倍梯度稀释, 每个浓度9个重复。用LightCycler® 480 II Probes Master和UPL探针进行检测。结果显示LightCycler® 480 II具有宽广的动力学范围(10 log区间)和高重复性的Cp值。



▲ 图 6: LightCycler® 480 II 系统的高分辨率: 进行1000和2000个拷贝的模板区分, 实验结果显示2种模板分界明显, Δ Cp值和理论值完全一致且标准差小于0.05。



▲ 图 7: LightCycler® 480 II 系统对2倍浓度差异样品的区分。病毒核酸以2倍梯度稀释, 每个梯度7个重复, 用LightCycler® 480 II SYBR Green I Master进行扩增, 样本分布方式如图, 结果显示LightCycler® 480 II系统具有优秀的分辨率, 灵敏度, 重复性和数据的均一性(CV< 0.15%)。

LightCycler® 480 II 实时荧光定量PCR系统

兼容自动化工作站, 数据管理稳定优质

自动化的工作站

LightCycler® 480 II系统能够通过LightCycler® 480 LIMS/Bar-Code软件模块无缝地整合到电脑控制设备或自动化实验流程中。该模块便于LightCycler® 480 II系统与实验室信息管理系统(LIMS)双向信息交流。而且, LIMS/Bar-Code模块能控制系统装载进程、PCR运行及数据分析, 从而使LightCycler® 480 II系统整合到完全自动化的实验室流程中。LightCycler® 480 LIMS/Bar-Code模块的条码功能还可以通过内置的条码扫描器识别LightCycler® 480 II多孔板上的条码。

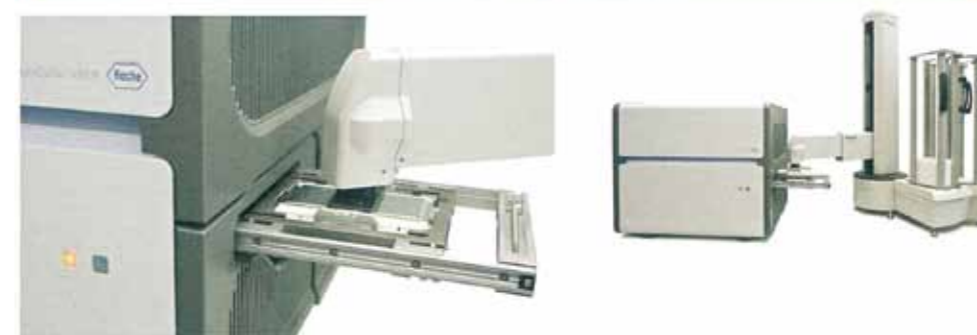
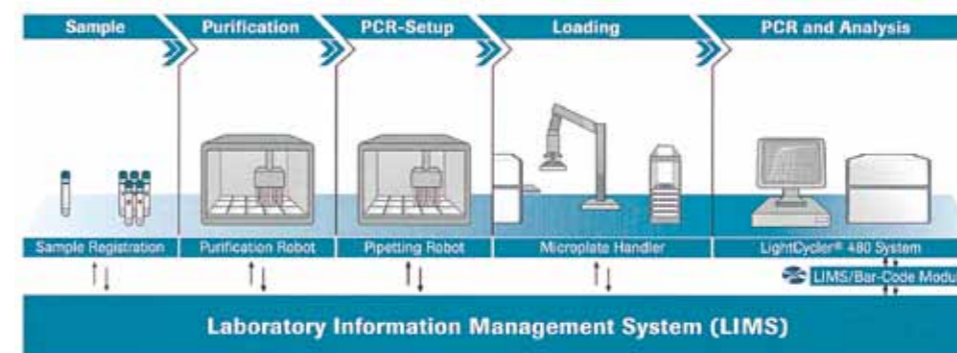
可靠的数据管理

LightCycler® 480 II系统支持21 CFR 第11部分条款, 满足通用规范性的数据管理要件。

LightCycler® 480 II系统增强流程管理及数据管理的能力:

- 实现真正的自动化流程
- 现代化的软件设计思路, 可与LIMS连接
- 兼容性符合数据管理要求(21 CFR 第11部分)

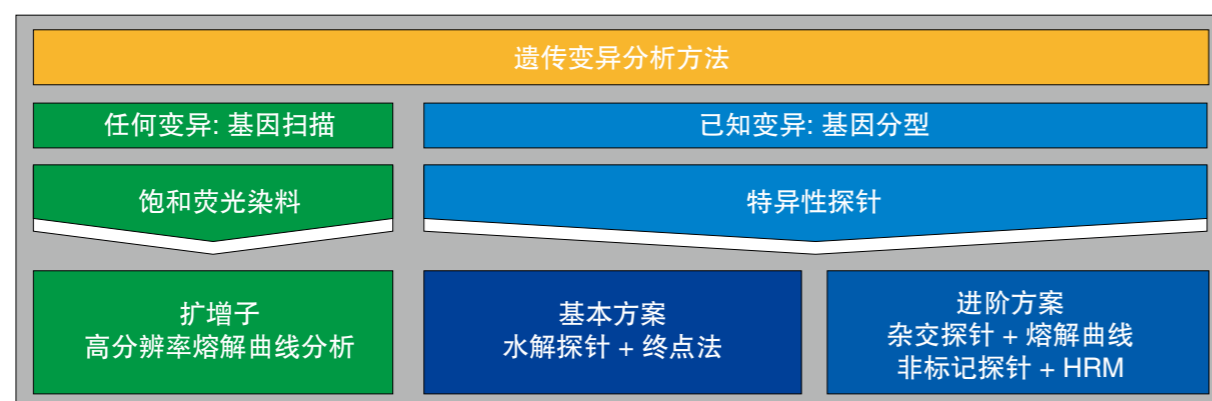
▼ 图 8: LightCycler® 480 II与自动化实验室流程整合示意图。



▲ 图 9: LightCycler® 480 II系统自动化装板过程。

LightCycler® 480 II 基因分型解决方案

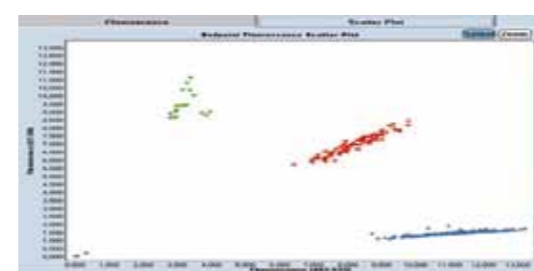
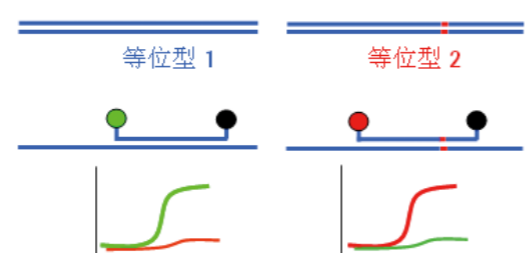
可靠的熔解曲线法，还是方便的终点法，一直是基因分型方法选择的难题，如今LightCycler® 480 II让鱼和熊掌可以兼得！



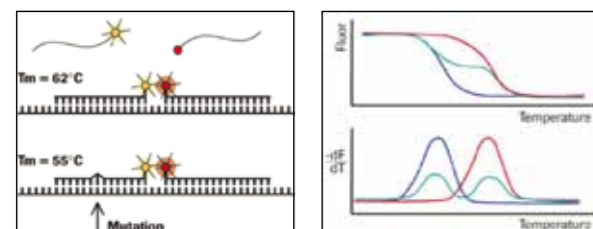
遗传变异是造成生物个体差异的根本原因，遗传变异研究对于遗传学、医学、农学、进化生物学、生物安全和食品安全等领域的重要性早已为人所公认。

LightCycler® 480 II作为新一代实时定量PCR系统的代表，通过硬件、软件和相关试剂的整合优化，可实现所有利用实时定量PCR进行遗传变异检测的方法。其中最典型的可分为两类，1、对已知变异进行检测的特异性探针法；2、对未知变异进行检测的高分辨率熔解曲线法。

单核苷酸多态现象(SNP)是自然界最多的一种遗传变异现象，超过90%的生物个体差异是由SNP造成的。近年来SNP的检测和鉴定(SNP分型)已经成为遗传学研究的一项关键技术。对于已知SNP位点的识别，LightCycler® 480 II系统提供了利用TaqMan探针(水解探针)通过终点法进行SNP分型，和利用杂交探针通过熔解曲线法进行SNP分型两种选择。



▲图10: 利用水解探针通过终点法进行SNP分型，不同荧光标记的探针对应不同的等位基因型，在延伸结束后测定荧光强度。

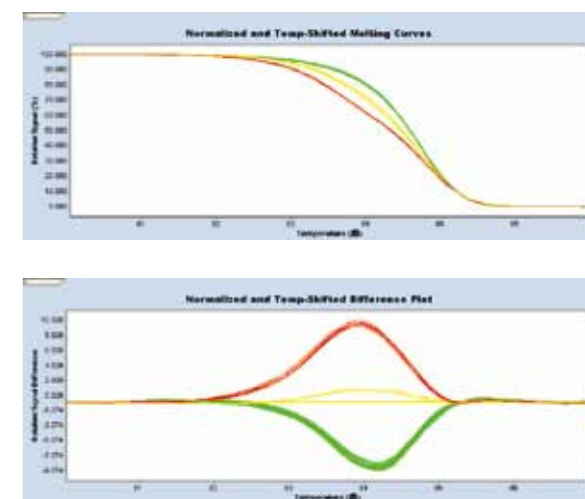


▲图11: 利用杂交探针通过熔解曲线法进行SNP分型，野生型纯合子(红色)、突变型纯合子(深蓝色)和杂合子(浅蓝色)表现出不同的峰值。

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统高分辨率熔解曲线分析

HRM方法可大幅降低基因分型难度和成本，使LightCycler® 480 II完全成为了一台全功能的遗传分析系统，不仅仅是定量PCR！

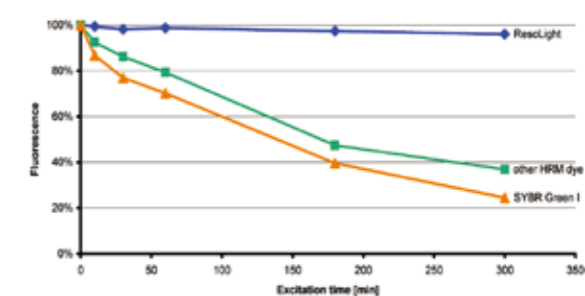
高分辨率熔解曲线(High-Resolution Melt, HRM)是一种用于突变扫描和基因分型的遗传学分析方法。HRM能够直接用染料而非标记探针准确地区分单碱基突变所带来的温度差异，这对实时定量PCR系统提出了前所未有的要求。LightCycler® 480 II在加热模块和冷却元件之间引入的高效热平衡技术(Therma-Base™)使温控系统的热均匀性获得了技术性的进步。同时其精巧的光学系统设计通过光学元件及焦距的巧妙组合确保了整板信号激发的特异性与数据收集的一致性，从而消除了边缘效应。为开展高分辨率熔解曲线分析的研究者提供了一个理想的硬件平台。



▲图12: 通过对仪器生成的高分辨率熔解数据进行归一化和温度平移处理(上图)，结合可由用户选择的差异显示图(下图)，可以非常客观地判断一批样本中不同的基因型的数量。

同时，其优势的软件算法通过对熔解曲线归一化处理及平移，能够在不改变曲线相对位置的前提下，凸显差异，以相当高的分辨率区分不同碱基变异的差别。

再结合罗氏应用科学部开发的DNA双链饱和和结合染料：ResoLight®，借助其高强度、高信噪比、耐淬灭、在饱和结合浓度下对PCR无抑制效应等出色性能，完全可以保障您在这一高端应用领域获得满意的成果！



▲图13: ResoLight®染料具有比SYBR Green I为代表的非饱和染料高得多的光学稳定性，能够在自然光线照射下长期保持很高的荧光强度。

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统高分辨率熔解曲线分析

出色的定量PCR硬件、分析软件和试剂，方能成就高准确度的高分辨率熔解曲线分析

高分辨率熔解曲线分析应用：

- 发现新的SNP位点
- 已知SNP的检测分析
- 单倍型分析
- 杂合性丧失的筛查
- 种群中的等位优势分析
- 分类学物种鉴定
- DNA遗传作图 (发现携带高度可变座位的个体)
- 潜在易感基因的鉴别
- DNA甲基化分析
- RNA编辑

■ **未知突变位点筛查**——由于其对DNA Tm值变化的高度敏感性，HRM可以直接通过染料检测扩增子上的未知单碱基突变，无需借助荧光基团标记的探针(图14A)，如发现靶基因扩增产物中是否存在SNP或其它突变。

■ **已知单碱基突变**——可以通过非标记的探针进行相比筛查未知突变位点的HRM法，同样不需要标记探针，极大地降低了实验设计、探针合成及操作的成本和复杂度(图14B)。同时还可同在一次试验中结合以上两种方法(图14C)，获得更多的序列信息。该方法简单、准确度高，可通过初筛迅速从大量样品中获得突变个体，从而将测序成本降低至原有的数百分之一。

图14A

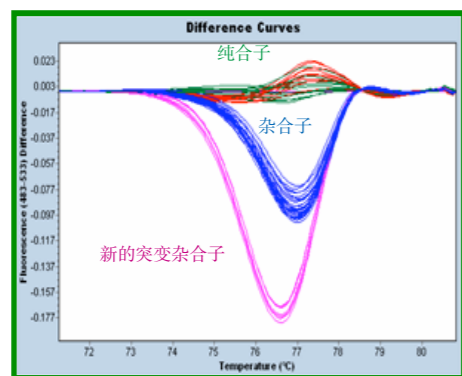


图14B

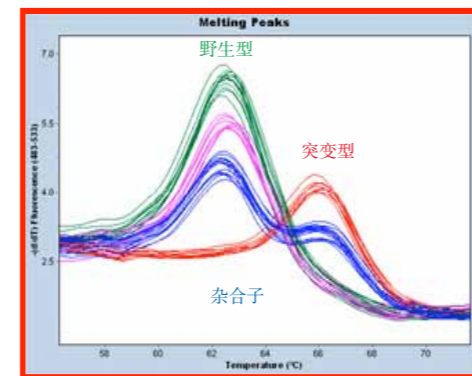


图14C

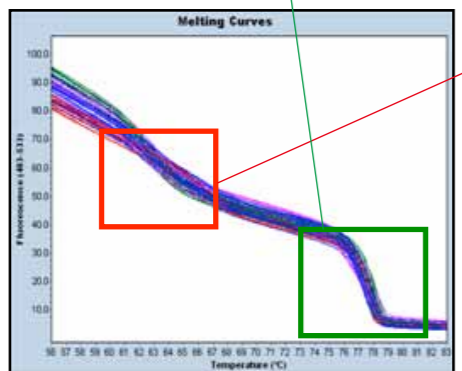


图14: 高分辨率熔解曲线分析(HRM)不仅能够以非标记探针检测已知突变(图B)，还能直接对扩增子上的未知突变进行检测(图A)，同时还可同在一次试验中结合以上两种方法(图C)，获得更多的序列信息。

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统高分辨率熔解曲线分析

为DNA甲基化现象和疾病研究提供可靠平台

甲基化研究对于了解基因的调控模式以及疾病的分子生物学机制具有重要意义：发育、肿瘤发生、基因印迹、X染色体失活及相关遗传性疾病等。结合甲基化比例已知的标准样本，HRM方法可用于定量检测未知样品中该基因的甲基化程度(图15)。此外还可通过类似的方法对未知样品中特定基因型的丰度和表达水平进行准确度高的测定(图16)。

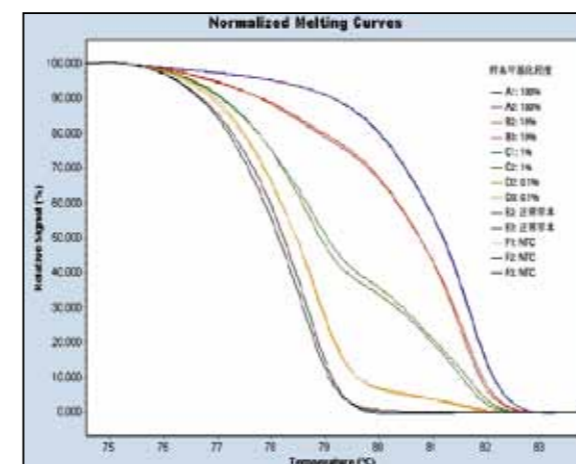


图15: 甲基化的定量分析 通过HRM，结合标准样本(C1,C2)，可对未知样品中甲基化的程度进行准确测定。图中熔解曲线位置越高，则样品中甲基化比例越高。

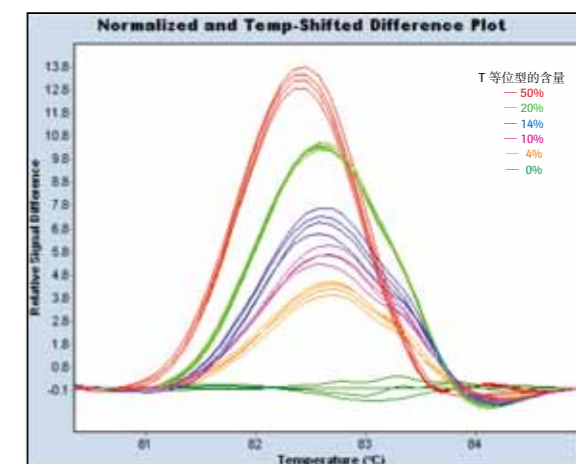


图16: 突变含量的定量分析 通过HRM，结合标准样本，可对未知样品中特定基因型的丰度或表达水平进行准确测定。图中突变水平和熔解曲线峰值成正比。

肿瘤中某些基因的DNA甲基化状态的变化通过其生物学特征反映出来。因此，评估DNA甲基化的快速高通量方法对研究者和临床医生都非常有价值。可通过甲基化敏感性高分辨熔解分析(MS-HRM)测定法对两种已知的经过启动子(FANCE和MGMT)甲基化的DNA修复基因的检测性能。如图显示MS-HRM测定法是快速高通量研究DNA甲基化的可靠检测平台。

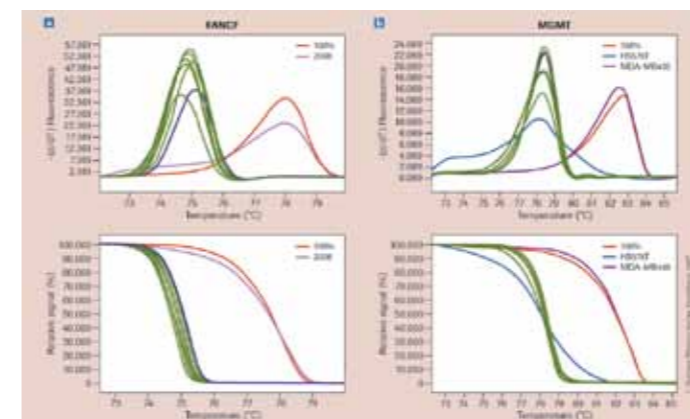


图17: (a)FANCE MS-HRM测定法显示卵巢癌细胞株2008中存在DNA甲基化。(b)MGMT MS-HRM测定法显示乳腺癌细胞株MDA-MB435和HS578T中存在甲基化。

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统试剂及检测

Universal ProbeLibrary通用探针库

只需要165个预制探针就完成上百万种实时定量PCR实验，对整个转录组进行高效研究。整套探针易于冰箱存储，让您的实时定量PCR检测可灵活自在地进行。

■ **用户个性化检测设计。** 免费易用的在线UPL实验设计中心(www.universalprobelibrary.com)，弹指间即可完成对特定靶基因的定量检测探针和引物设计。

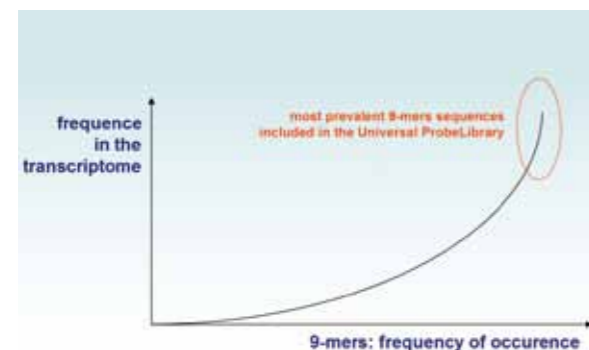
■ **以染料法的成本获得探针法的特异性。** 尤其适合对多个基因表达水平的研究。(例如对芯片检测结果的验证)。

■ **简易的标准化实验方案。** UPL探针适用于所有能够检测荧光素、FITC、FAM及SYBR Green I的实时定量PCR仪器。

■ **优秀的剪接突变和基因家族鉴定功能。**

■ **LightCycler® 555 Yellow 5' 端标记UPL管家基因内参试剂盒，**可轻松获得高分辨率双色基因表达实验结果。

UPL的165个探针选自转录组中高频出现的8-和9-碱基序列，确保可以覆盖任一的一个转录组的全部转录子。



▲ 图 18: UPL探针针对转录组中高频出现的8-和9-碱基序列设计



UPL探针仅8到9个核苷酸长，且含有Locked Nucleic Acids(LNA)。LNA是一类核糖2、4位羟基缩合形成氧桥的核酸类似物，这一特殊构象的核糖能够促进碱基堆积及核糖预组织效应从而提高其热稳定性，使仅不到10个核苷酸长度的探针Tm值有显著的提高，方便进行水解探针法的定量检测。并且，含有LNA的UPL探针能够辨别其他核酸探针无法区分的单碱基错配，从而轻松保证您基因表达检测的专一性要求。

模式生物	Species	方法数量	覆盖率
Human	<i>Homo sapiens</i>	>639 500	99%
Mouse	<i>Mus musculus</i>	>509 500	99%
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	>364 000	98%
Primates	<i>Pan troglodytes</i>	>519 500	96%
Drosophila	<i>Drosophila melanogaster</i>	>253 500	99%
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	>199 000	98%
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	>134 000	95%
Maize	<i>Zea mays</i>	> 61 500	94%
Rice	<i>Oryza sativa</i>	>898 500	98%
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	>630 000	98%
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 42 000	95%
Total		>5 000 000	

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统试剂及检测

RealTime ready 专用预制检测板

这一系列的专用预制探针组合是用于多种qPCR检测的即用预制微孔板，可直接用于检测大量特定信号通路、代谢途径或特定功能相关的基因表达情况。为方便使用，已预装于LightCycler® 96-/384-孔板中，每一平板都含有目标特异的引物以及Universal ProbeLibrary探针。您所需添加的只有预混酶液、水以及样本cDNA，就可以获得类似于低密度芯片的分析功能，整个过程更加直观、简便。如果您有已知需要检测的基因，罗氏还支持为您在线定制专属的预制检测板，最大程度地节省您宝贵的时间。

除了信号通路、代谢途径或特定功能相关的目标基因，每一预制平板上也包含了逆转录产物特异的对照以及内参基因用于简化分析实验数据。

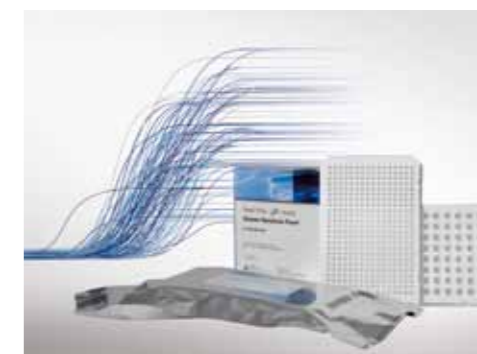
RealTime ready Focus Panel

■ **获得完整的基因表达水平数据。** 用于相关基因表达分析的预制微孔板使您能够无需设计及整合单个检测就能够完成这类复杂的分析。

■ **严格的性能检测。** RealTime ready Focus Panels专用预制探针组合库全部经过质控cDNA芯片检测(MAQC)。

RealTime ready Custom Panel

从我们为您预备的信号通路、代谢途径或特定功能专用预制探针组合库中自由选择组合，即可用于LightCycler® 480 II检测分析。您可用于免费的RealTime ready 在线配置工具上，选择单个人类相关靶基因的检测方法或进行定制型多孔检测板的自由配置。

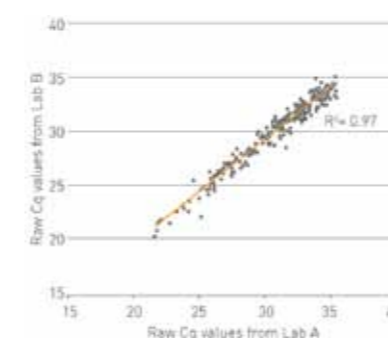


microRNA Ready-to-Use PCR panels V2.0*

■ **高灵敏度—**无需预扩增，仅需40ng总RNA即可检测多达742种microRNA。

■ **低RNA样本需求—**血清、血浆、FFPE(福尔马林固定、石蜡包埋)和LCM(激光捕获显微切割技术)均为理想样本。

■ **性能可信—**经验证的优化LNA Tm增强引物能辨别高度相似的microRNA的成熟体和前体(见下图)。



两种即用型qPCR预制板能检测包含miRBase 13.0中的共742个microRNA。其中针对人类的预制板 I 包含375个引物组，用于扩增人类普遍高表达并被文献大量引用显示在疾病中差异表达的高优先级microRNA。人类的预制板 II 包含367个引物组，用于扩增低优先级microRNA。欲了解每组预制板上的详细引物组排列，请访问<http://www.exiqon.com/mirna-pcr-panels>。

左图显示为即用型microRNA预制板呈现出优异的数据相关性-相同的心脏和肝脏总RNA样本在microRNA即用型PCR预制板上反应，实验在两处不同的地方进行，用不同的LightCycler® 480实时PCR仪器，由不同的实验人员操作。图中显示Cq值小于35的microRNA信号点的平均Cq值相关性(实验进行3次平行重复，共取Cq值297个数据)。

* 该产品由Exiqon公司为LightCycler® 480系统开发，销售和售后服务由Exiqon公司提供，如需咨询请访问<http://www.exiqon.com>。

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR系统试剂

优化的预混反应液、即配即用

针对快速PCR专门设计的高灵敏试剂

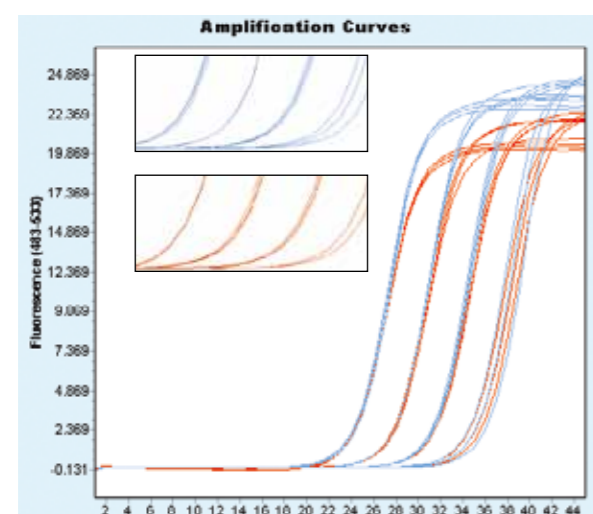
LightCycler® 480 预混反应液采用热启动酶，即便是进行快速PCR，仍能保证很高的灵敏性。而且，在室温条件下，预混反应液仍能长时间保持稳定。现在罗氏能够提供染料模式、探针模式定量及基因分型专用的三类特定试剂。(见表 2)。

▼ 表2：预混反应液的性质及其应用领域。

试剂	预混反应液 (浓度)	酶类型	5'-3'外切 酶活性	快速PCR 性能	防止残留 污染*	应用	模式
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	2 ×	热启动酶	-	+	+	定性/定量	SYBR Green I
LightCycler® 480 Probe Master	2 ×	热启动酶	+	+	+	定性/定量	水解探针 UPL探针 HybProbe探针 SimpleProbe探针
LightCycler® 480 Genotyping Master	5 ×	热启动酶	-	+	+	分型	HybProbe探针 SimpleProbe探针
LightCycler® 480 HRM Master	2 ×	热启动酶	-	+	+	分型/突变 检测	SYBR Green I

a) LightCycler® 480 试剂中含有dUTP，以便UNG(尿嘧啶DNA糖基化酶)去除残留模板。

- 非序列特异性DNA检测
- 序列特异性DNA检测



LightCycler® 480试剂的核心优势：

- 预混反应液，即混即用，优秀的灵敏度
- 室温下稳定，满足高通量自动化的要求

◀ 图 19：LightCycler® 480 SYBR Green I Master试剂的稳定性。人类DNA目标序列按10倍梯度稀释(10,000 - 10拷贝/孔，3次重复)，PCR反应配置完成后，立即上机反应(相应结果曲线为蓝色)，或在自动上样装置中放置24小时后再上机反应(相应结果曲线为红色)。两种样本的扩增曲线及相应Cp值说明这种热启动酶预混反应液的性能不会被延长的放置时间所影响。

订购信息

LightCycler® 480 II实时荧光定量PCR仪器及相关产品

产品名	目录号	产品中文名称
LightCycler® 480 II Instrument, 96-well block	05 015 278 001	实时定量PCR仪，含银质96孔热循环模块
LightCycler® 480 II Instrument, 384-well block	05 015 243 001	实时定量PCR仪，含银质384孔热循环模块
LightCycler® 480 Block Kit 96, silver	05 015 219 001	实时定量PCR仪银质96孔热循环模块
LightCycler® 480 Block Kit 384, silver	05 015 197 001	实时定量PCR仪银质384孔热循环模块
LightCycler® 480 Bar-Code Scanner	04 710 606 001	手持式条码扫描仪
LightCycler® 480 Basic Software 1.5.1	06 653 316 001	定量PCR仪软件光盘及操作手册
LightCycler® 480 Gene Scanning Software	06 652 751 001	高分辨率溶解曲线分析软件光盘及操作手册
LightCycler® 480 LIMS Interface Module	05 066 310 001	实验室管理系统接口模块光盘及操作手册
LightCycler® 480 Multiple Plate Analysis Software	05 075 122 001	多板统计分析软件光盘及操作手册
LightCycler® Probe Design Software 2.0	04 342 054 001	探针引物设计软件光盘及操作手册
LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis probes	04 991 885 001	一步法实时定量RT-PCR反应预混液
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	04 909 631 001	高分辨率溶解曲线分析反应预混液
LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 5 x 1 ml	04 707 516 001	SYBR Green I反应预混液
LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 10 x 5 ml	04 887 352 001	SYBR Green I反应预混液
LightCycler® 480 Probes Master, 5 x 1 ml	04 707 494 001	探针法定量PCR反应预混液
LightCycler® 480 Probes Master, 10 x 5 ml	04 887 301 001	探针法定量PCR反应预混液
LightCycler® 480 Probes Master, 1x 50 ml	04 902 343 001	探针法定量PCR反应预混液
LightCycler® 480 Genotyping Master	04 707 524 001	基因分型反应预混液
LightCycler® 480 Control Kit	04 710 924 001	原厂对照试剂盒
SimpleProbe 519 Labeling Reagent	04 687 132 001	简单探针标记试剂
LightCycler® 480 CYAN 500 Labeling Reagent	04 764 153 001	CYAN 500染料标记试剂
LightCycler® 480 ResoLight Dye, 1 ml	04 909 640 001	DNA双链饱和结合染料

*注册证号: 国食药监械(进)字 2009 第3402689号

*生产企业: 德国罗氏诊断有限公司

*生产地: 瑞士

您是否已经确定最适合您 LightCycler® 480 II 应用方案的试剂?

您纯化的是 DNA还是RNA?

DNA

RNA

制备您的实时定量PCR模板DNA:

手工纯化:

• High Pure PCR Template Preparation Kit 适用于培养细胞、组织、全血、酵母及细菌样本	Cat. No: 11796828001 (100次纯化)
• High Pure Viral Nucleic Acid Kit 适用于血清、血浆及全血样本	Cat. No: 11858874001 (100次纯化)
• High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit 适用于血清、血浆及全血样本	Cat. No: 11754777001 (50次纯化)
• High Pure Plasmid Isolation Kit 适用于质粒DNA抽提	Cat. No: 05114403001 (40次纯化)

欲了解更多手工纯化试剂盒及不同包装详情, 请访问 www.roche-applied-science.com/napure

自动化纯化:

• MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit 适用于血清、血浆及全血样本	Cat. No: 03038505001 (192次纯化)
---	-------------------------------

欲了解更多自动化纯化试剂盒及不同包装详情, 请访问 www.magnapure.com

制备您的实时定量PCR模板RNA:

手工纯化:

• High Pure RNA Isolation Kit 适用于培养细胞、全血、酵母及细菌样本	Cat. No: 11828665001 (50次纯化)
• High Pure RNA Tissue Kit 适用于组织样本	Cat. No: 12033674001 (50次纯化)
• High Pure Viral RNA Kit 适用于血清、血浆及其他体液样本	Cat. No: 11858882001 (100次纯化)

自动化纯化:

• MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I 适用于全血、血细胞及培养细胞样本	Cat. No: 03004015001 (192次纯化)
--	-------------------------------

细胞制备:

• RealTime Ready Cell Lysis Kit 用于省时、高效的细胞样本裂解	Cat. No: 05943523001 (500次反应)
---	-------------------------------

您选择的检测模式是:

您的逆转录PCR是一步法还是两步法?

无序列特异性检测

SYBR Green I

• LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Cat. No: 04707516001 (500次反应)
• LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Cat. No: 04887352001 (5000次反应)
– 适用于定性、定量及通过熔解曲线分析进行的产物鉴定	– 预混 2x 浓度热启动反应液
– 扩增子长度: 长达750bp, 最适≤500 bp	– 室温下可稳定存放24小时, 4°C可稳定存放4周, 而不改变PCR反应效率
– 灵敏度及重复性高	– 总反应时间约 45 分钟 (40个循环) + 5 分钟熔解曲线 (可选)
– MgCl ₂ 浓度无需优化	

高分辨率熔解曲线

• LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	Cat. No: 04909631001 (500次反应)
– 通过筛选基因扩增片段, 寻找SNP、杂合性、甲基化等遗传变异	– 专为高度特异的目标序列扩增而优化
– 包含高分辨率熔解染料ResoLight®	– 预混 2x 浓度热启动反应液
– 特别适合与LightCycler® 480基因扫描软件结合使用	– dNTP 混合液使用dUTP替代dTTP, 以防残留污染
– 扩增子长度: 长达500bp, 最适≤300 bp	– 总反应时间约 75 分钟 (45个循环)

序列特异性检测

有熔解曲线分析

HybProbes, SimpleProbes等无需5'-3'外切酶活性的探针

• LightCycler® 480 Genotyping Master	Cat. No: 04707524001 (384次反应)
– 适用于单重或多重基因分型	– 室温下可稳定存放24小时, 4°C可稳定存放4周, 而不改变PCR反应效率
– 扩增子长度: 长达750bp, 单重检测最适100-300 bp, 多重检测最适 ≤350 bp,	– 无5'-3'核酸外切酶活性
– 灵敏度及重复性高	– dNTP 混合液使用dUTP替代dTTP, 以防残留污染
– MgCl ₂ 浓度无需优化	– 总反应时间约 50 分钟 (40个循环)
– 预混 5x 浓度热启动反应液	

无熔解曲线分析

水解探针 (TaqMan、UPL) 等需要5'-3'外切酶活性的探针

• LightCycler® 480 Probes Master	Cat. No: 04707494001 (500次反应)
• LightCycler® 480 Probes Master	Cat. No: 04887301001 (5000次反应, 10 x 5 ml)
• LightCycler® 480 Probes Master	Cat. No: 04902343001 (5000次反应, 1 x 50 ml)
– 适用于序列特异性的DNA检测, 包括定性、定量及终点法基因分型	– 室温下可稳定存放24小时, 4°C可稳定存放4周, 而不改变PCR反应效率
– 扩增子长度: 长达1000bp, 最适500 bp	– 具备5'-3'核酸外切酶活性
– 灵敏度及重复性高	– dNTP 混合液使用dUTP替代dTTP, 以防残留污染
– MgCl ₂ 浓度无需优化	– 总反应时间约 40 分钟 (40个循环)
– 预混 2x 浓度热启动反应液	

两步法 RT-PCR

一步法 RT-PCR

cDNA合成 / 逆转录

• Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Cat. No: 05081955001 (50次反应)
• Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit*	Cat. No: 05091284001 (100次反应)
– 7倍于普通反转录酶的保真度	Cat. No: 05081963001 (200次反应)
– 预混试剂盒, 可对包括高GC含量模板在内的所有目标RNA进行高效逆转录	Cat. No: 05081955001 (高保真, 50次反应)
– 同一反应体系中的罕见及常见RNA分子均能以线性转录, 出色呈现基因表达结果	Cat. No: 05091284001 (高保真, 100次反应)
– 经过LightCycler® 480系统试剂盒功能测试	Cat. No: 05081963001 (高保真, 200次反应)
– 可用多种引物, 包括oligo (dT) ₁₈ 、随机引物六聚体以及序列特异性引物	
*为高保真cDNA合成试剂盒	
• Transcriptor Reverse Transcriptase	Cat. No: 03531317001 (25次反应)
– 进行高效RNA逆转录所需的酶及缓冲液	Cat. No: 03531295001 (50次反应)
	Cat. No: 03531287001 (200次反应)

探针模式: 水解探针 (TaqMan及UPL)

• LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes	Cat. No: 04991558001 (500 reactions)
– 包含活化剂 (Mn(OAc) ₂) 以获得令人满意的扩增特异性及效率。	– 预混 2.7x 浓度热启动反应液, 内含Tth DNA聚合酶
– 包含促进剂溶液以帮助扩增困难序列 (如高GC含量)	– dNTP 混合液使用dUTP替代dTTP, 以防残留污染
– 扩增子长度: 长达500bp	– 总反应时间约 40 分钟 (45个循环)
– 一次实验中可分析3-4种目标RNA序列	
– MgCl ₂ 浓度无需优化	

通用探针库 Universal ProbeLibrary (水解探针)

– 简单、灵活、快速的基因表达分析工具	
– 超过2,000,000种成熟的检测方案可供选择, 让您可以用探针法轻松定量任何转录物	
– 探针选择和方案设计易如反掌	Cat. No: 05114403001 (40次纯化)
– 有这种性价比超高的替代方案, 不再需要昂贵、麻烦的定制检测方案	
• Universal ProbeLibrary Set, Human	Cat. No: 04683633001 (1套90个探针)
• Universal ProbeLibrary Set, 其他模式生物	目录号码请访问 www.universalprobelibrary.com , Product List

RealTime ready Focus / Custom Panels 专用预制探针组合库 (水解探针)

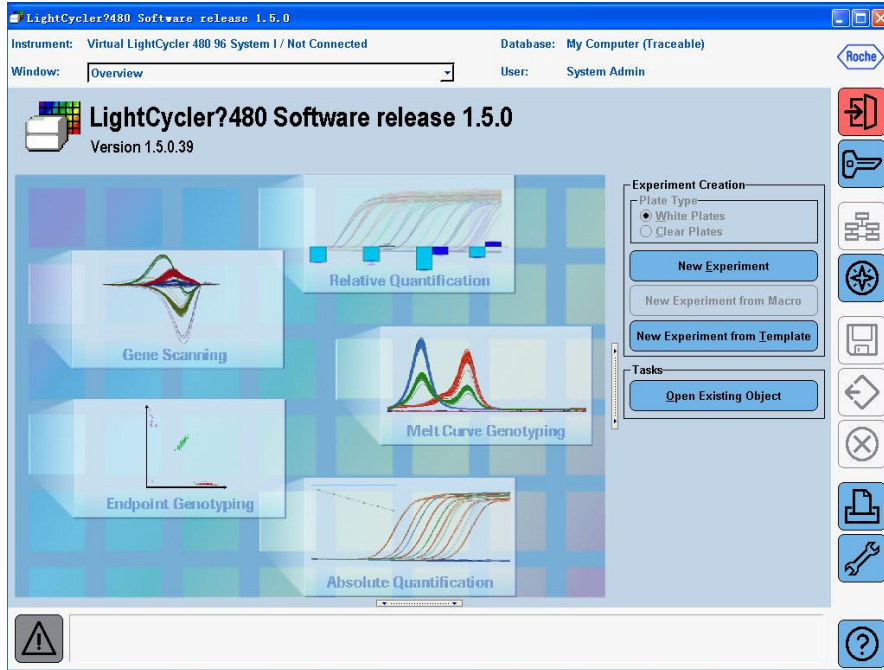
– 用于多种qPCR检测的即用预制微孔板, 可直接用于检测特定信号通路、代谢途径相关的基因表达情况。	
– 为目标方便使用, 已预装于LightCycler 480的96-/384-孔板中, 每一平板都含有目标特异的引物以及 Universal ProbeLibrary探针。方便客户选择预制好的多孔检测板, 或者自行设计定制个性化组合多孔检测。	
– 只需预混酶液、水以及样本cDNA, 就可以获得类似于低密度芯片的分析功能, 整个过程直观、简便。	
可选择的探针组合库包括Human Apoptosis, ABC Transporter, Nuclear Receptor, Cell Cycle, GPCR Panel等	每个组合各包含一定数量的待检基因, 看家基因和对照。具体目录号码和信息请访问 http://www.roche-applied-science.com/sis/realtimeready/











LightCycler480 Software 1.5 软件操作（中文版）

第一部分 基本界面及图标

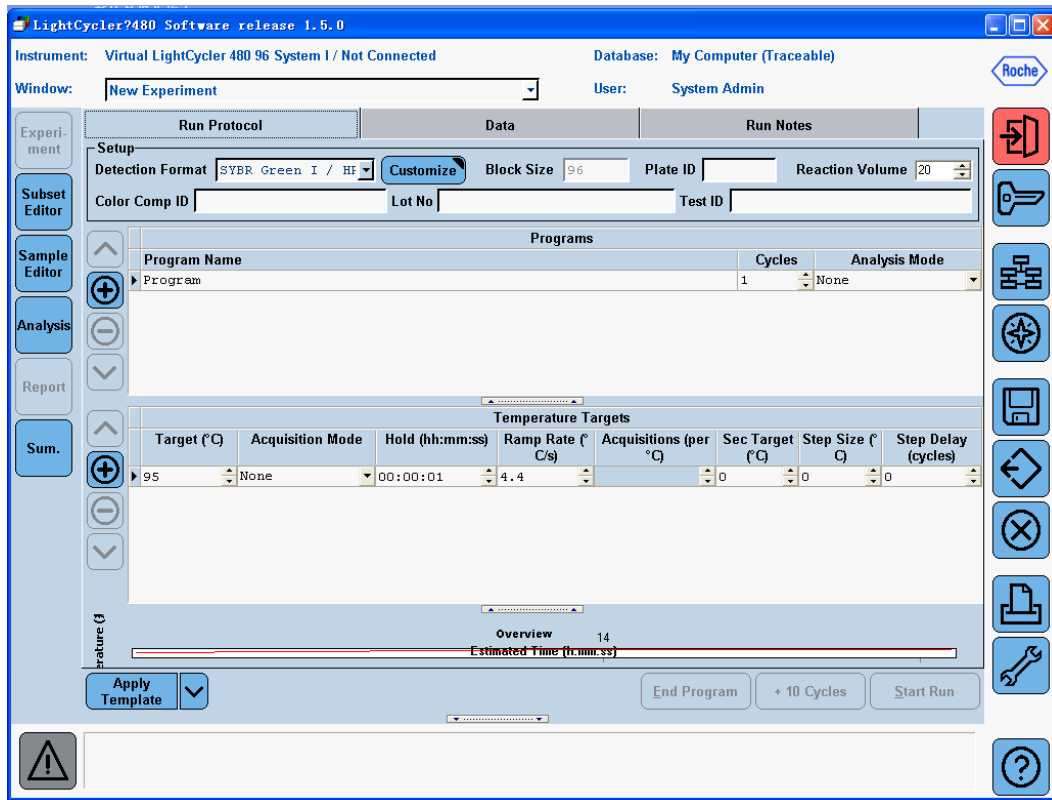
概述：

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



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

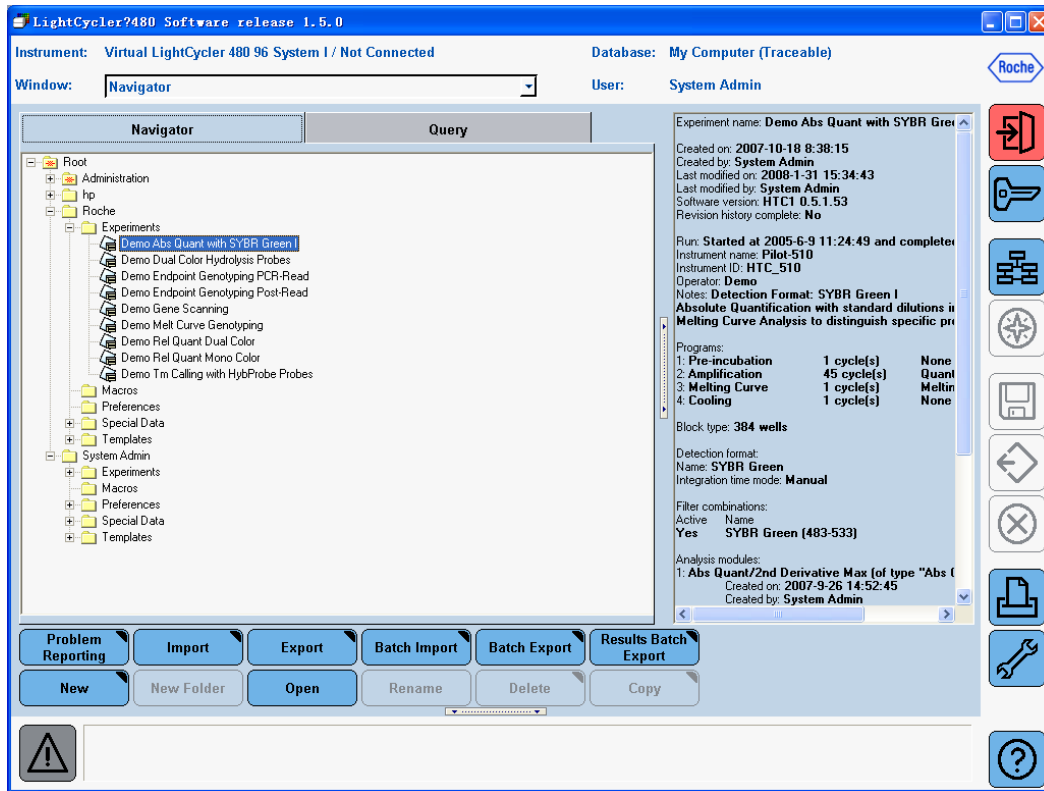


Report Module: 选择需要的内容以报告的形式给出结果



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

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。

软件操作

一. 打开软件


打开电脑，Windows 操作系统的用户名为 operator，密码为 LC480（区分大小写），电脑操作系统启动完毕，检查电脑右下角是否有  图标。如果没有，点击桌面“Exor4 for XDMS_R”快捷方式文件。然后右键点击  图标，左键点击“Show”一栏，如最后一句话显示“Exor 4 server is running”表示数据库加载成功。如果显示“Exor 4 failed to start”则表示数据库没有加载上，关闭该窗口，右键点击  图标，选“Shutdown”一栏，退出数据库，重新点击桌面“Exor4 for XDMS_T”文件，加载数据库。


然后点击桌面“LightCycler480 Software”快捷方式文件，运行该软件。输入用户名和密码。用户名默认为 admin（管理者权限），密码为 LightCycler480（区分大小写），如用户已经建立新用户名，则可以按照新用户名登录。

二. 用户管理

为了实验结果的有效管理，可以建立不同级别的用户。

如：标准用户（Standard User）、专业用户（Expert User）、管理者（Local Administrator）。一般实验室建议建立专业用户（Expert User）用户名，然后以该用户名登录软件进行实验操作。

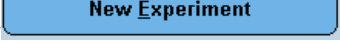
建立新用户操作：打开 LightCycler480 操作软件，点击右侧  按钮打开“Tools”工具栏，选择“User Access/Users and Groups”选项。在右边窗口中点击“New User”键，在右边“Enter the user’s full name”一栏中填写用户的全名，在“Enter the name the user wants to log in as”一栏填写用户登录名，在“Enter the user’s password”一栏中输入密码（密码须含有 6 个以上字母，1 个以上数字，其中有至少一个字母大写），在“Confirm the password”一栏中重新输入一次密码，加以确认，在“Select the user’s role”一栏中选择用户级别，然后点击右下方“Close”按钮加以确认。

在  “Tools”工具栏中的“System Settings”界面中可以设置各用户级的权限，以及密码的时效。

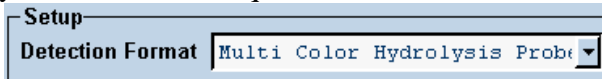
三. 仪器自检

每次开机时，仪器会自动进行初始化自检程序。自检通过，仪器左侧指示灯变绿。如放置了样本，仪器右侧指示灯变绿。在自检时，不能放置反应板，否则自检无法通过。

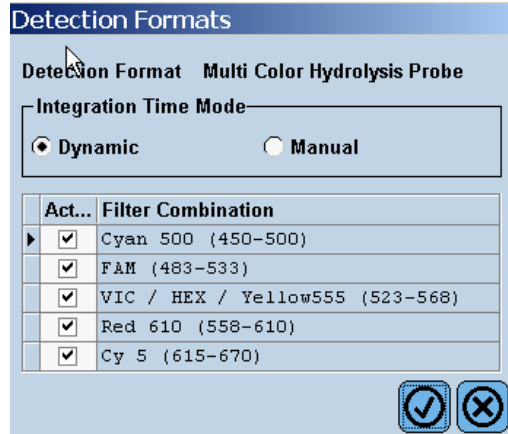
四. 建立实验程序


打开 LightCycler480 操作软件，成功登录后点击  按钮，进入 New Experiment/Run Protocol 程序设置界面。在“Detection Format”一栏中选择所使

用的荧光检测技术，可选择各类探针和染料，如常见的 SYBR Green I 染料、Mono Color Hydrolysis Probe 单色 TaqMan 水解探针、Multi Color Hydrolysis Probe 多色 TaqMan 水解探针。







在进行多色荧光 PCR 实验时，须点击  按钮选择用户所采用的荧光检测通道，点击“√”确认。



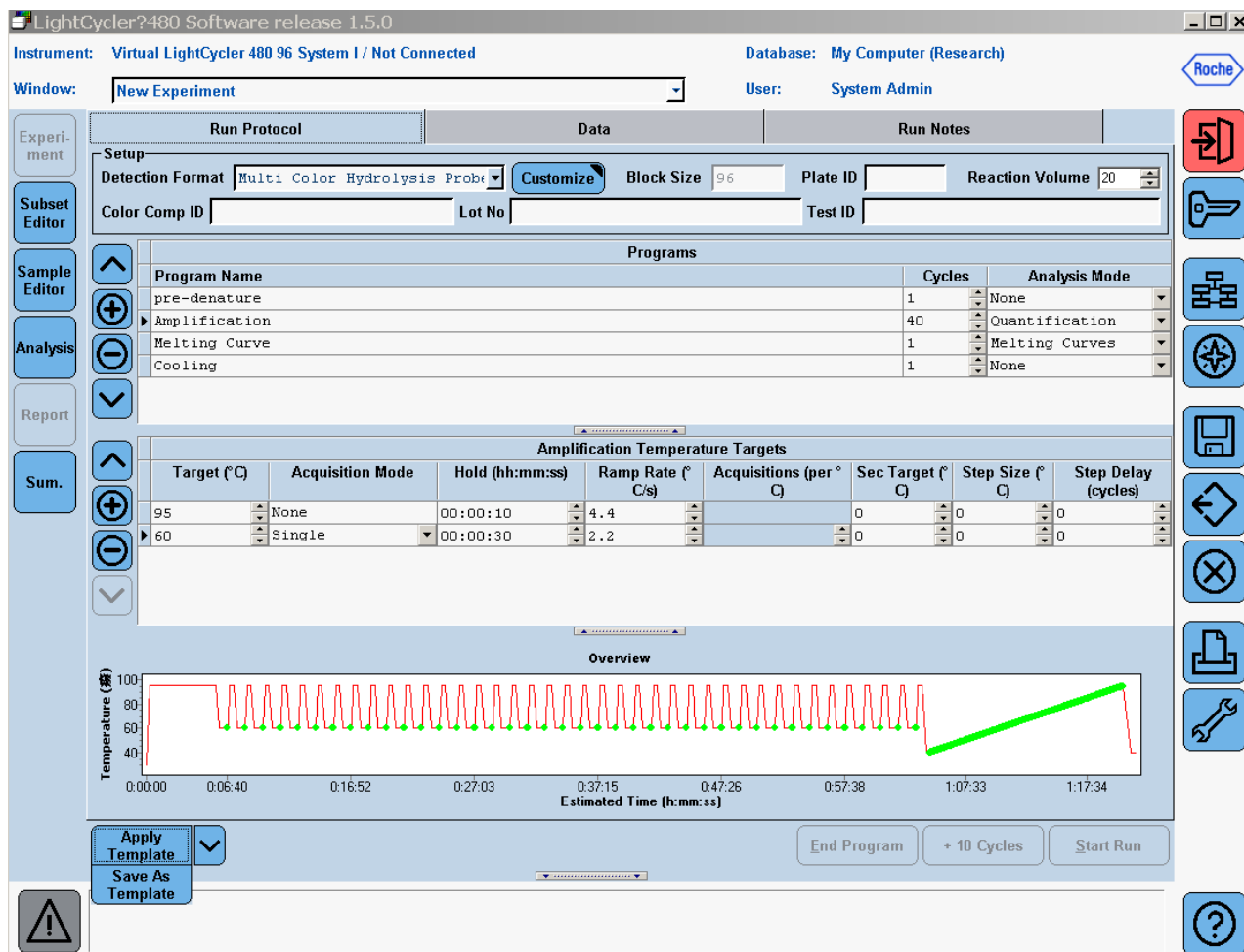
在  一栏中填写反应体积。

在“Programs”界面中设置实验程序：在“Program Name”下方命名程序，“Cycles”一栏内填写该程序的循环数，在“Analysis Mode”一栏选择该程序的分析模式。定量分析选择“Quantification”，溶解曲线分析选择“Melting Curves”，颜色补偿实验选择“Color Compensation”。


而后在“Temperature Targets”界面内设置所指定程序的内容，在“Target(°C)”处填写目标温度，“Acquisition Mode”处选择信号采集方式，“Hold”一栏填写该温度所持续的时间，“Ramp Rate(°C/s)”处填写升降温速率（注：如目标温度为 50°C 以下时，为了减少硬件的损耗，必须将降温速率调至 1.5°C/s 以下）。如一个程序有多个步

骤，则在 Temperature Targets 界面的左侧处点击 ，增加步骤；也可点击上下箭头   调整各步骤的先后顺序。如一个实验中有多个程序，也可在“Programs”界面左侧点击 ，增加程序，也可点击上下箭头调整各程序的先后顺序。

实验程度设置完成后，在下方“Overview”界面内会自动生成温度随时间变化的温控曲线，以及估计的运行时间，绿色点表示采集荧光信号的温度和时间点。可以依照该图检查一下程度设置是否正确。








设置好的实验程序可以保存成模板文件，下次使用同样的实验程序时可以调用。具

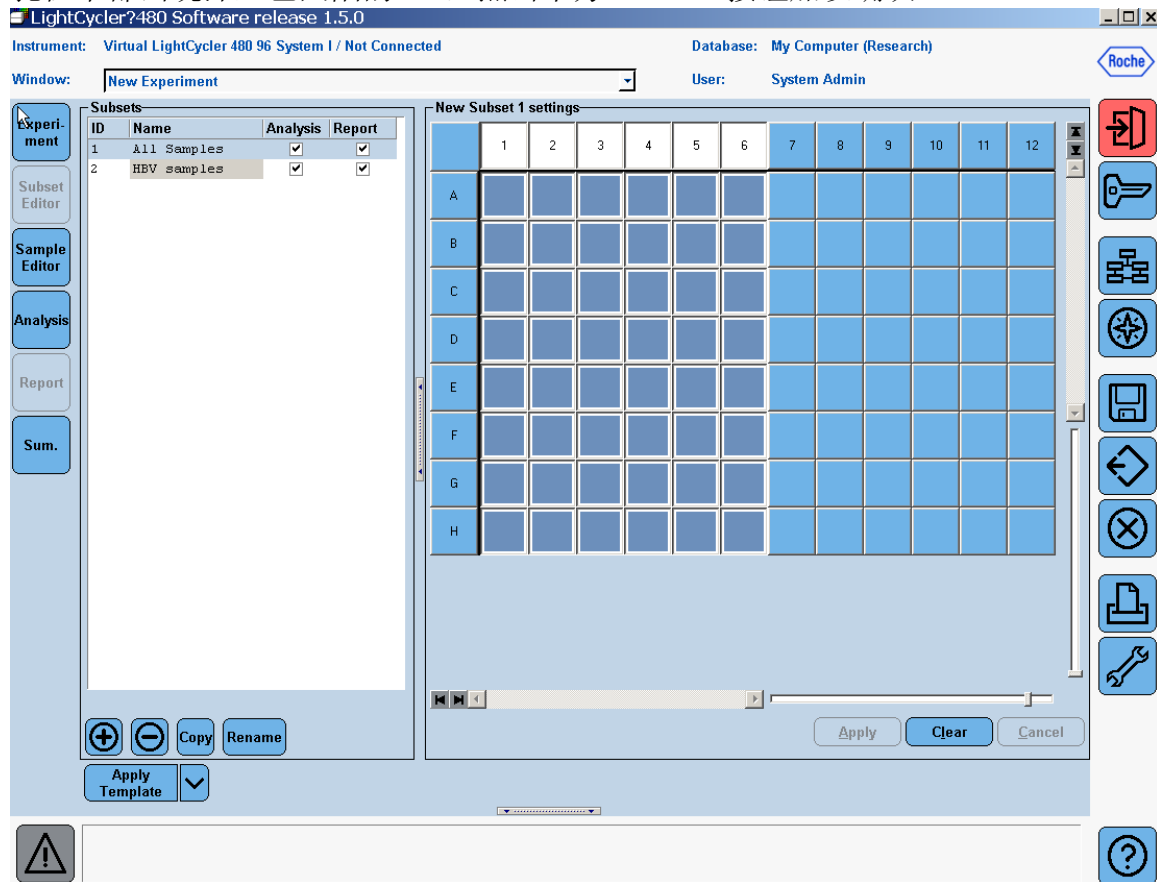
体操作如下：点击  按钮右侧的下拉箭头，选中“Save As Template”选项，系统默认将实验程序模板文件保存在所登录的用户名下“Templates”目录中，用户可将其存放在其下的子目录“Run Templates”下，填写该程序模板文件的名称，点击“√”按钮即完成保存。调用模板程序时可点击“Apply Template”按钮，从目录树中选定所要调用的模板，点击“√”按钮确认。

五. 样本设置

1、样本亚组编辑：LightCycler480 软件拥有一个独特的样本编辑管理功能——亚组编辑（Subset Editor），即将反应板上所有的样本根据用户需要分成亚组，对亚组进行独立地分析定量。具体操作如下：


在“New Experiment”界面中，点击左侧  按钮，进入 Subset 设置界面，点击  按钮新建亚组，并给其命名。点击  按钮可复制所选定的亚组，点击  按钮可更改所选定亚组的名称，点击“Delete”按钮可删除所选定的亚组。设置亚组：在 Subsets 界

面中选定要设置的亚组名，在右边反应板孔位处选定该亚组所包含的孔位，使所选定的孔位中都出现深蓝色凹陷的，点击下方 **Apply** 按钮加以确认。

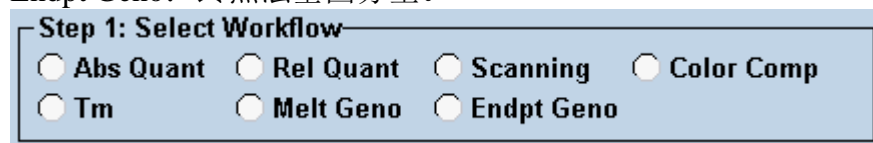


设置亚组可以在一块反应板上实现多个检测项目的实验，前提是这些检测项目的实验运行程序都一致（这在使用 TaqMan 水解探针时比较容易实现），由于各检测项目均有各自的质控对照，因而，设定亚组可以单独对各检测项目进行分析。

2. 样本属性编辑

点击 New Experiment 界面左侧  按钮设置样本信息。在“Workflow”一栏在选择实验方案：

Abs Quant: 绝对定量或定性分析； Rel Quant: 相对定量； Scanning: 基因扫描；
Color Comp: 颜色补偿； Tm: 熔解温度检测； Melt Geno: 熔解曲线法基因分型；
Endpt Geno: 终点法基因分型。



在 Select Samples/Subset 选项选定待编辑的样本亚组：

Step 2: Select Samples

Subset:

在界面右方编辑各样本的名称属性等：

Pos: 样本在 96 孔板或 384 孔板上的座标位置； Repl Of: 重复样本设置；

Sample Name: 样本名称； Quantification Sample Type: 定量样本类型； Concentration: 浓度； Target Name: 检测类型。

Select Filter Combinations

483-533 558-610

Abs Quant

Units

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration	Target Name
A1	Blue		STD1	Standard	1.00E2	HBV
A2	Red		STD2	Standard	1.00E3	HBV
B1	Blue		STD3	Standard	1.00E4	HBV
B2	Red		STD4	Standard	1.00E5	HBV
C1	Blue		NC	Negative Control		HBV
C2	Red		Positive	Positive Control		HBV
D1	Blue	D1	Sample1	Unknown		HBV
D2	Red	D1	Sample1	Unknown		HBV
E1	Blue	E1	Sample2	Unknown		HBV
E2	Red	E1	Sample2	Unknown		HBV
F1	Blue	F1	Sample3	Unknown		HBV
F2	Red	F1	Sample3	Unknown		HBV
G1	Blue	G1	Sample4	Unknown		HBV
G2	Red	G1	Sample4	Unknown		HBV
H1	Blue	H1	Sample5	Unknown		HBV
H2	Red	H1	Sample5	Unknown		HBV

在进行绝对定量检测实验时，参与实验的样本有标准品（一般 4 至 5 个）、阴性对照、阳性对照、未知样本。各样本的名称可参考以上“Sample Name”中的命名习惯（STD 表示标准品、NC 表示阴性对照、Positive 表示阳性对照、Sample 表示待检测的未知样本），也可以自行编辑。

在“Quantification Sample Type”一栏内需要对各样本的类型进行明确地编辑（标准品选 Standard 类型、阴性对照选 Negative Control 类型、阳性对照选 Positive Control 类型、未知样本选 Unknown 类型），此外标准品系已知浓度的阳性样本，其设定为 Standard 类型后还需在 Concentration 一栏中对各标准品分别设定其相应的浓度，以及在 Abs Quant/Units 填写框中填写相应的浓度单位，如 copies、pg 等。

在 Target Name 一栏中可以填写该检测实验所要检测的指标，如乙肝病毒、禽流感病毒、沙门氏菌等。

如在实验中需要设置重复样本的，可在 Repl Of 一栏中填写该样本其所重复的样本的座标号（注意，只能填写座标号，不能填写样本名）。

如进行的是多色荧光 PCR 检测实验，则在 Select Filter Combinations 一栏中选定各检测通道，分别进行样本编辑。

在进行定性检测实验时，参与实验的样本有阴性对照、阳性对照、未知样本。设置相应较简单，可参考以下设置

Select Filter Combinations

483-533 558-610


Abs Quant

Units

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration	Target Name
A1			Sample1	Unknown		AIV
A2			Sample2	Unknown		AIV
B1			Sample3	Unknown		AIV
B2			Sample4	Unknown		AIV
C1			Sample5	Unknown		AIV
C2			Sample6	Unknown		AIV
D1			Sample7	Unknown		AIV
D2			Sample8	Unknown		AIV
E1			Sample7	Unknown		AIV
E2			Sample8	Unknown		AIV
F1			Sample9	Unknown		AIV
F2			Sample10	Unknown		AIV
G1			Sample11	Unknown		AIV
G2			Sample12	Unknown		AIV
H1			+	Positive Control		AIV
H2			-	Negative Contr		AIV




六. 运行实验

实验程序和样本均设置完毕后，即可运行实验，具体操作：进入“New

Experiment”界面，点击左侧  按钮，如反应板已经放入仪器，仪器主机正面右侧的 LED 灯会由桔黄色变为绿色，软件界面右下边的这时点击“**Start Run**”按钮，软件界面跳出一对话框提示用户给该实验文件命名，以保存实验结果。一般建设用户以时间命名，以方便日后查找实验结果，如 20080816-HBV-1，20080817-AIV-2 等。命名后点击确认键，仪器就开始运行了，在运行过程中可观察到温度和荧光信号的变化曲线。如进行多重荧光 PCR 实验，可在荧光历史“Fluorescence History”界面内上的下拉菜单中切换不同的检测通道，以分别观察其扩增情况。

在实验运行过程中，用户可以根据需要，点击“+10 Cycles”按钮增加正在运行的程序10个循环，也可以点击“End Program”按钮终止正在运行的子程序，直接进入下一个子程序。

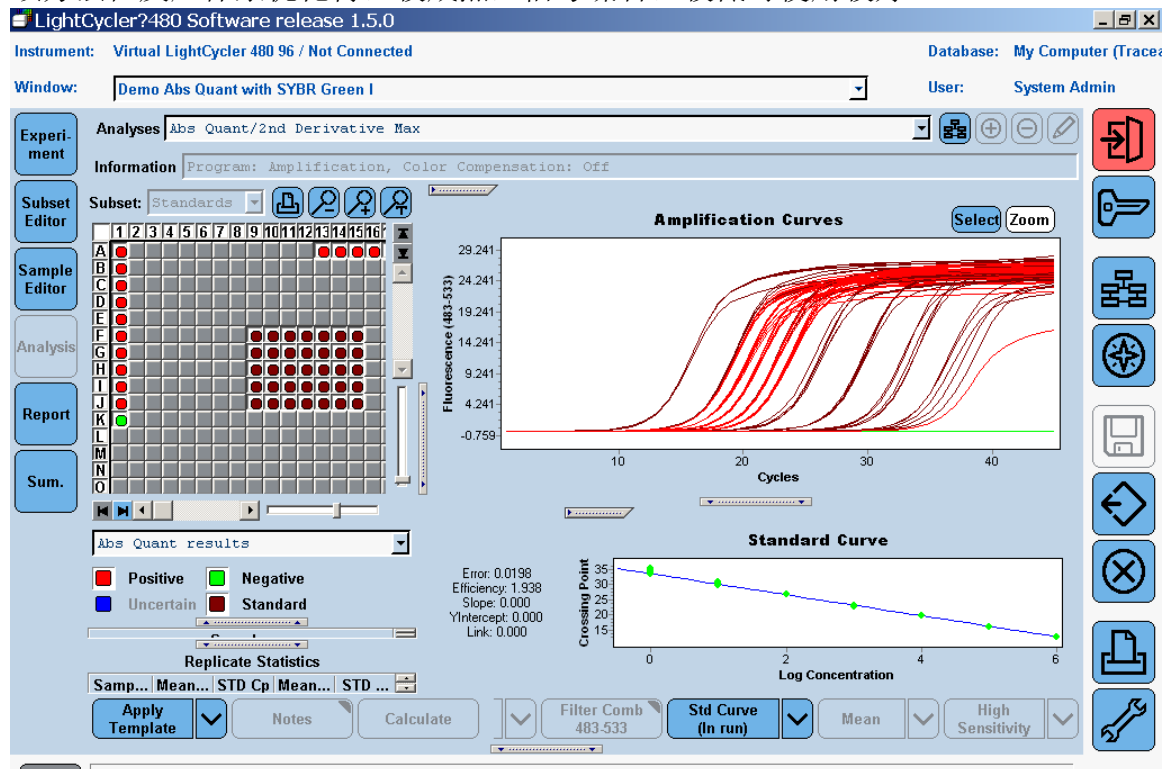
七. 数据分析（定性和定量）

实验运行完毕后，点击界面左侧的  按钮分析数据。或者打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定之前已完成的实验文件，点击下方“Open”按钮，或双击文件名打开实验文件，点击左侧  按钮，进入分析界面。

在“Create new analysis”窗口内显示了可使用的分析方法，在“Open existing analysis”窗口内显示已经进行分析的结果内容。

要进行定性和定量分析可以选择 Abs Quant 分析功能，其有两种分析模式， 2^{nd} Derivative Max 二阶最大求导法和 Fit Points 点拟合法。选定分析功能类型后会跳出对话框，用户可以自行选择分析类型、选择要分析的亚组（Subset），以及命名分析结果（Name）。点击“√”按钮确认。

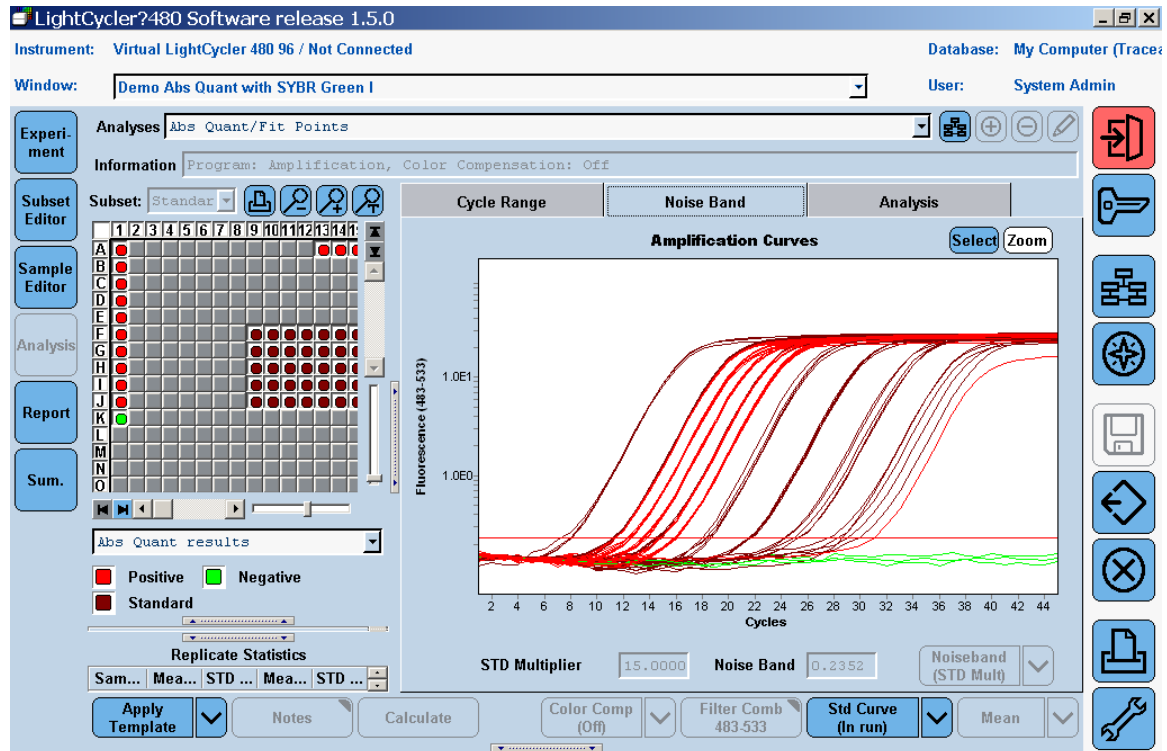
在 Analysis 界面中选择 Abs Quant / 2^{nd} Derivative Max，点击“Calculate”按钮，生成 Cp 值，如实验中有标准品，则同时生成标准曲线，并且计算出各未知样本的浓度值。该方法在反应体系优化得比较成熟，信号噪音比较低时使用较好。



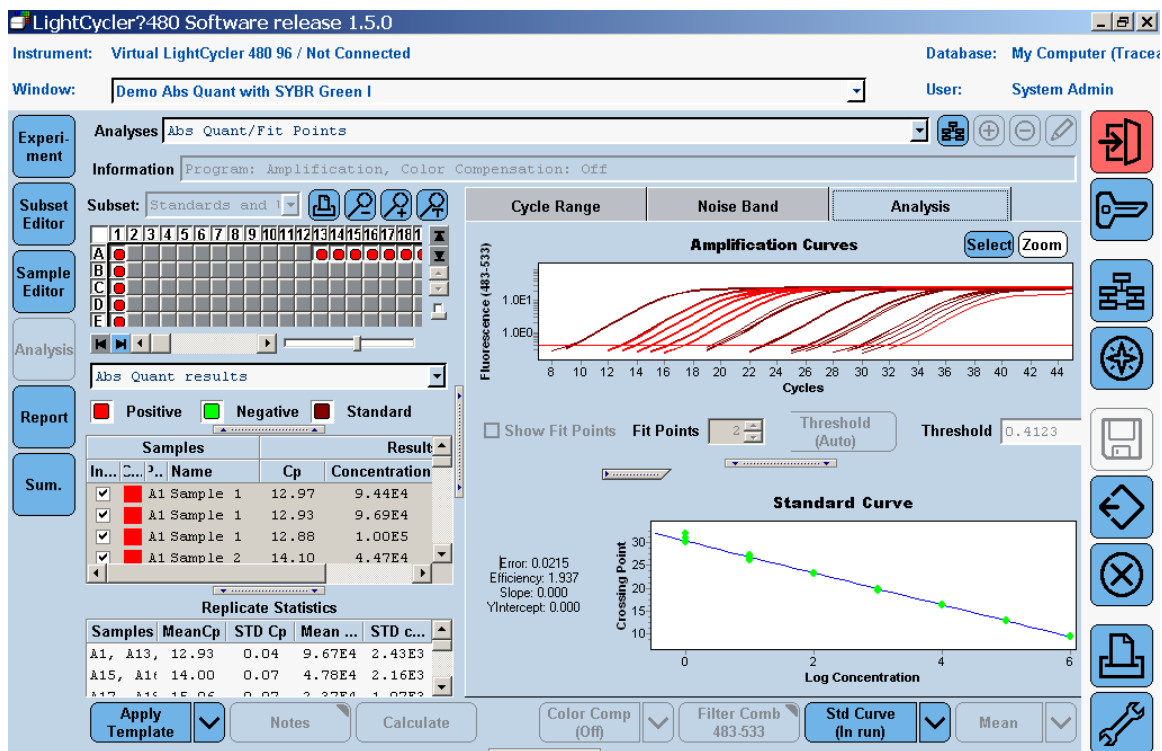
有时从原始荧光曲线能观察到有个别样本的曲线不正常，信号噪音比较高，则可选用 Fit Points 点拟合法加以人工调整。具体操作如下：


在 Analysis 界面中选择 Abs Quant / Fit Points，在“Cycle Range”中 First Cycle 和 Last Cycle 两栏分别设置分析数据的起始和终止循环数。选定具体数据后，软件只分析该区间内的实验曲线。“Background”一栏设置荧光信号本底的区域，一般将荧光值呈 S 形曲线增长前趋于水平的循环区域作为背景本底区。

点击“Noise Band”按钮，上下移动红色的噪音本底线来消除个别样本由于信号噪音较高而对结果造成的影响。一般将红线置于尽可能低，但又要足以盖过阴性线和曲线不平的噪音线，与荧光信号曲线交于线性增长区。软件只分析红色噪音本底线上方的曲线数据，所以要确保其上方无曲折不平的噪音信号。




点击“Analysis”按钮，再点击“Threshold”按钮，使用显示“Auto”字样，然后点击下方 **Calculate** 按钮，生成各样本的 CP 值。若是定量分析，则会生成各标准曲线，以及各样本的浓度值。




点击软件右侧的  图标，将分析结果保存入实验文件，或在目录树中另找保存位置。

在进行多色荧光 PCR 实验时，同时使用相邻两个检测通道进行检测需要通过颜色补偿功能来校正相邻通道的荧光信号干扰，详见颜色补偿一章。


八. 报告生成





打开一个分析完结果的文件，或者刚分析完结果并贮存后，点击左侧工具栏中  按钮，进入结果报告的界面。可在“General”和“Detailed”两栏中选择实验报告所要包含的内容。“General”一栏中显示的选项为本次实验结果均需要显示的报告参数；“Detailed”一栏则显示本次实验多次分析中所要的报告参数的明细。点击“Generate”按钮，生成报告预览。点击右上方“PDF”按钮可将报告保存为*.pdf 文件。


报告显示所包括的内容可以保存成模板文件，同类报告要求的实验可以调用相同的报告模板。在“General”和“Detailed”两栏中选定了内容后点击下方  按钮右侧的下拉箭头，点击“Save As Template”将其保存至 Templates/Report Templates 目录下，点击“√”按钮确认。调用报告模板时点击“Apply Template”按钮，选定模板文件，点击“√”按钮确认。


九. 数据导出与导入

该软件所产生的实验数据均保存在其自带的数据库中，从 Windows 操作系统中无法找到其实验数据的文件。这样可以很好地保护实验文件不被误删和窃取。如用户希望将实验结果备份保存，可以将数据从数据库中导出生成可见的文件，保存于其它电脑中或本电脑的其它目录下。同时，也可以将实验文件导入数据库查看文件内容或对文件进行分析。

导出单个实验文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定实验文件，点击下方  按钮，选择保存文件的目录位置，点击“Save”按钮将文件导出。

导出整个文件夹中所有文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定要导出文件所在的文件夹，点击  按钮，在“Select Folders”一栏中选定保存预导出文件的目录，点击  按钮，将所要导出的文件目录均选至右侧对话框，点击  进入“Target”界面，点击“Browse”按钮选定导出的文件所要存放的目录，点击“Next”按钮进入“Options”界面，去除不需要导出的文件前的“√”，用户也可设定导出文件的限制。点击“Next”按钮，进入“Start”界面，点击“Next”按钮，软件显示文件导出的过程和状态，完成后进入“Done”界面，显示导出文件的报告。点击“Done”按钮确认。

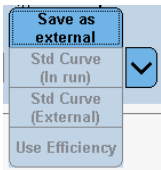
导入单个文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定实验文件，点击下方“Import”按钮，选定所要导入的文件，点击“Open”按钮，即导入该文件。

导入整个文件夹中所有文件的方法：打开 LightCycler480 软件，成功登录后点击右侧  图标，进入 Navigator 导航界面，在目录树内选定实验文件，点击下方“Batch Import”按钮，进入“Source”界面，点击“Add”按钮选定待导入的文件所在的文件夹，点击“Next”按钮，进入“Target”界面，选定放置导入文件的文件夹，点击“Next”按钮进入“Start”界面，点击“Next”按钮，进入“Status”界面，开始导入文件，最后进入“Done”界面，生成导入文件报告，点击“Done”确认。

十. 单点定标

同一种同一批号的试剂盒以相同的反应程序进行多轮定量检测实验时，无须每次都做四至五个标准品来作标准曲线。第一轮检测实验成功完成后，可以将该实验产生的标准曲线保存下来，下一轮检测实验时，只需选与第一轮实验对应的一种浓度的标准品参与实验即可。在分析数据时可以调用第一轮的标准曲线进行定量。

标准曲线的保存：使用四至五个标准品以及多个未知样本进行检测实验后，分析数据，最终得到数据结果后，点击标准曲线下方“Std Curve (In run)”右侧下拉箭头



，选中“Save as external”选项。命名标准曲线，并将其保存于 Special Data\Std Curve 文件夹下，点击“√”按钮确认。

已有标准曲线的调用：在使用单点定标的检测实验中，所选用的一个标准品仍然定义为“Standard”类型，并且其浓度在已有的标准曲线浓度范围之内。在分析数据时，一开始无标准曲线生成，点击“Standard Curve(In Run)”按钮右侧下拉箭头，选中“Std Curve(external)”选项，双击所要调用的标准曲线文件，点击“Calculate”按钮，即可调用先前实验中的标准曲线进行本次实验的定量分析。


注意：保存标准曲线文件时所采用的分析模式必须与调用标准曲线时的分析模式一致才能成功调用标准曲线。

十一. 相对定量实验设计和分析

进行相对定量实验时要注意，一般而言，每个样本均做三个重复，以得到标准误的数据，进行相对定量实验时样本编辑最关键，样本编辑正确了，分析数据完全可以一键完成。

1、相似相对定量

所谓相似相对定量是指默认看家基因和靶基因这两对引物的 PCR 扩增效率均为 2.00 时进行的相对定量的算法，其主要是以 C_p 值的差值来推算浓度的差异。PCR 手册规定，靶基因和看家基因这两对引物的 PCR 扩增效率差异不超过 0.1 的情况下，可进行相似相对定量计算，看一下某基因 mRNA 水平表达量变化的趋势，如果其扩增效率差异超过 0.1，则不能使用相似相对定量算法（否则在很多期刊发文章时会被要求补实验或重新做定量实验）。出现这种情况时，方法一：重新设计引物，优化反应体系，使扩增效率差异小于 0.1；方法二：采用准确相对定量算法，见下第 2。

进行相似相对定量时，可同时设定多个靶基因跟同一个看家基因进行比较。如下图：三个样本，分别用一个看家基因 Reference Gene，两个不同靶基因 Target A 和 Target B 进行相对定量。在建立了含有所有本次实验中检测样本孔位的 Subset 后，点击  按钮，在 Rel Quant 相对定量界面内设置样本信息。

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentration	Target Name	Efficiency
A1	Blue	A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene	2.00
A2	Red	A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene	2.00
A3	Green	A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene	2.00
A4	Magenta	A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A5	Grey	A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A6	Yellow	A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A7	Brown	A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A8	Cyan	A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A9	DarkGreen	A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene	2.00
A10	Orange	A10	NC	Ref Negative		Reference Gene	2.00
A11	Purple	A10	NC	Ref Negative		Reference Gene	2.00
A12	Olive	A10	NC	Ref Negative		Reference Gene	2.00
B1	Blue	B1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene A	2.00
B2	Red	B1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene A	2.00
B3	Green	B1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene A	2.00
B4	Magenta	B4	Sample2	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B5	Grey	B4	Sample2	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B6	Yellow	B4	Sample2	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B7	Brown	B7	Sample3	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B8	Cyan	B7	Sample3	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B9	DarkGreen	B7	Sample3	Target Unknown		Target Gene A	2.00
B10	Orange	B10	NC	Target Negative		Target Gene A	2.00
B11	Purple	B10	NC	Target Negative		Target Gene A	2.00
B12	Olive	B10	NC	Target Negative		Target Gene A	2.00
C1	Blue	C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B	2.00
C2	Red	C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B	2.00
C3	Green	C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B	2.00
C4	Magenta	C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C5	Grey	C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C6	Yellow	C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C7	Brown	C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C8	Cyan	C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C9	DarkGreen	C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B	2.00
C10	Orange	C10	NC	Target Negative		Target Gene B	2.00
C11	Purple	C10	NC	Target Negative		Target Gene B	2.00
C12	Olive	C10	NC	Target Negative		Target Gene B	2.00

在 Repl of 一栏中填写其所要重复试验的样本的座标号，如在 A2 和 A3 位进行 A1 位样本的两次重复试验，则在 A2 和 A3 位的 Repl of 一栏填写 A1 即可。



在 Sample Name 一栏填写样本名，注意，只要是加同一模板的反应孔位，均给其命名为相同的样本名。例如 A1、B1、C1 孔位，虽然是用不同的引物分别扩增不同的基因，但所加的样本模板是相同的，所以在 Sample Name 一栏中填写相同的样本名，可以用键盘“Ctrl+C”复制 Reference Gene 的样本名，然后用键盘“Ctrl+V”粘贴至 Target Gene A 和 Target Gene B 的样本名中，以确保所命名一致。另外，一定要设置阴性对照实验组，即其它反应体系均不变，只是不加 PCR 模板的质控，一般命名为 NC 或 NTC (No Template Control)

在 Sample Type 一栏中分别选择各样本的不同类型。看家基因的检测孔位均选择带有 Reference 的类型，靶基因的检测孔位均选择带有 Target 的类型，如上图。其中将 Sample1 的类型选为 Calibrator 即标准样本，在相对定量计算时，其它样本均与该标准样本进行比较，以得到基因表达量更多或更少的数据。一般可以将实验中的空白对照样本选为标准样本，例如用不同的药物 A、B、C 处理一批细胞，其它有一批细胞是正常培

养，没有处理的，则没有用药物处理的细胞可设为标准样本 **Calibrator**，其它用药组样本均与该样本进行比较。而这些处理组的样本类型均可以选定为 **Unkown**，检测看家基因的孔位类型选为 **Reference Unknown**，检测靶基因的孔位类型选为 **Target Unknown**。阴性对照样本可根据其所用引物的不同选定类型为 **Reference Negative** 和 **Target Negative**。

在 **Target Name** 一栏中填写检测的基因名，如以 **B-actin** 作为看家基因的话，在所有看家基因样本的 **Target Name** 一栏均填写 **B-actin**；而靶基因以此类推，如上图。

Efficiency 默认为 2.00。将以上样本编辑完成后，设置 **PCR** 反应程序，即可运行仪器，进行实验。

实验结束后，可点击左侧的  按钮，进入分析界面，选择 **Relative Quantification** 分析数据，点击  按钮即可生成相对定量的数据。

注意，如果阴性对照 **Negative** 样本产生了扩增曲线，软件会判定该实验失败，采用 **SYBR Green I** 进行实验时，由于不可避免地产生一些非特异扩增和引物二聚体现象，往往会导致软件无法计算出结果，这个时候可以将阴性对照样本的类型改为 **Target Unknown** 或 **Reference Unkown** 来看一下实验的分析结果。但出现阴性对照样本产生阳性扩增曲线的现象时，一定要进行 **Tm Calling** 分析，看一下熔解曲线峰，以进一步分析所造成的原因。如果其熔解曲线与 **PCR** 目标扩增产物峰的 **Tm** 值一致，即试剂被阳性 **PCR** 扩增片段污染，所得定量结果不准确，要解决该污染问题后重新进行实验；如果阴性样本的熔解曲线峰与 **PCR** 目标扩增产物峰的 **Tm** 值不一致，则有可能是引物二聚体或非特异扩增产物的原因，其同样影响定量结果，要想办法优化实验排除其影响。

另外，如果 **Calibrator** 标准样本的看家基因和靶基因无扩增的话，也会导致软件无法计算出结果。



2、准确相对定量

所谓准确相对定量是指采用 **PCR** 扩增效率校正的相对定量算法，其将看家基因和靶基因的 **PCR** 扩增效率的具体值计算出来后参与至定量计算中去，因而其结果更能够体现实际的情况。

其设置大致与相似相对定量相同，只是样本类型处多了标准品，如下：


Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Combined Sample and Target Type	Concentration	Target Name
A1	Blue	A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A2	Red	A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A3	Green	A1	Sample1	Ref PosCalibrator		Reference Gene
A4	Magenta	A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A5	Grey	A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A6	Yellow	A4	Sample2	Ref Unknown		Reference Gene
A7	Brown	A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene
A8	Cyan	A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene
A9	DarkGreen	A7	Sample3	Ref Unknown		Reference Gene
A10	Orange	A10	STD1	Ref Standard	1.00E0	Reference Gene
A11	Purple	A10	STD1	Ref Standard	1.00E0	Reference Gene
A12	Olive	A10	STD1	Ref Standard	1.00E0	Reference Gene
B1	Blue	B1	STD2	Ref Standard	1.00E1	Reference Gene
B2	Red	B1	STD2	Ref Standard	1.00E1	Reference Gene
B3	Green	B1	STD2	Ref Standard	1.00E1	Reference Gene
B4	Magenta	B4	STD3	Ref Standard	1.00E3	Reference Gene
B5	Grey	B4	STD3	Ref Standard	1.00E3	Reference Gene
B6	Yellow	B4	STD3	Ref Standard	1.00E3	Reference Gene
B7	Brown	B7	STD4	Ref Standard	1.00E4	Reference Gene
B8	Cyan	B7	STD4	Ref Standard	1.00E4	Reference Gene
B9	DarkGreen	B7	STD4	Ref Standard	1.00E4	Reference Gene
B10	Orange	B10	NC	Ref Negative		Reference Gene
B11	Purple	B10	NC	Ref Negative		Reference Gene
B12	Olive	B10	NC	Ref Negative		Reference Gene
C1	Blue	C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B
C2	Red	C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B
C3	Green	C1	Sample1	Target PosCalibrator		Target Gene B
C4	Magenta	C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B
C5	Grey	C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B
C6	Yellow	C4	Sample2	Target Unknown		Target Gene B
C7	Brown	C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B
C8	Cyan	C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B
C9	DarkGreen	C7	Sample3	Target Unknown		Target Gene B
C10	Orange	C10	STD1	Target Standard	1.00E0	Target Gene B
C11	Purple	C10	STD1	Target Standard	1.00E0	Target Gene B
C12	Olive	C10	STD1	Target Standard	1.00E0	Target Gene B
D1	Blue	D1	STD2	Target Standard	1.00E1	Target Gene B
D2	Red	D1	STD2	Target Standard	1.00E1	Target Gene B
D3	Green	D1	STD2	Target Standard	1.00E1	Target Gene B
D4	Magenta	D4	STD3	Target Standard	1.00E3	Target Gene B
D5	Grey	D4	STD3	Target Standard	1.00E3	Target Gene B
D6	Yellow	D4	STD3	Target Standard	1.00E3	Target Gene B

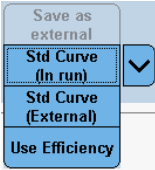
样本检测中增加了 STD1、STD2、STD3、STD4 四个“标准品”，其在看家基因检测中的样本类型为 Ref Standard，在靶基因检测中的样本类型为 Target Standard，在 Concentration 一栏中分别填写这些“标准品”的浓度（这些浓度不是准确的浓度，这些标准品的浓度也是未知的，可以仍选一个样本，进行十倍梯度稀释，分别用看家基因和靶基因的引物对这些稀释产生的模板进行扩增，而对这些在 Concentration 中填写的浓度只要体现出这些样本的十倍浓度差即可，即 1、10、100、1000 或 1、0.1、0.01、0.001 等）。软件可以通过这些“标准品”作出标准曲线，计算得到相应引物的 PCR 扩增效率。

实验结束后同样点击软件界面左侧的  按钮，进入分析界面，选择 Relative Quantification 分析数据，点击  按钮即可生成相对定量的数据。

注意，所选用的“标准品”如有几个低浓度的无扩增，会影响标准曲线的生成，导致软件无法生成数据，因而尽可能选用起始浓度较高样本进行梯度稀释。

也可以在相似相对定量实验以后，选用起始浓度最高的样本进行梯度稀释，计算出 PCR 的扩增效率，然后将该标准曲线保存（在标准曲线下方点击“Std Curve (In

run)”右侧的下拉箭头  选择 Save as external 即可保存），打开新一轮相似相对

定量的实验结果，在分析界面中点击  “Std Curve (In run)”图标右侧的下拉箭头，选择“Std Curve (External)”调用已保存的标准曲线，以使得各引物的扩增效率参与相对定量计算。这样可避免重复实验。