

LightCycler®

คู่มือการใช้งานเครื่อง LightCycler® 480

โปรแกรม รุ่น 1.5

สิงหาคม 2562

สารบัญ		9
I	ข้อมูลเอกสาร.....	9
	ประวัติการแก้ไข.....	9
	ประกาศฉบับ.....	9
	การอบรม.....	9
	รูปถ่าย.....	9
	การรับประกัน.....	9
	ลิขสิทธิ์.....	10
	ข้อมูลใบอนุญาต.....	10
	แหล่งข้อมูล และโปรแกรมการค้า.....	10
	เครื่องหมายการค้า.....	10
	ข้อเสนอแนะ.....	10
II	การรับรอง.....	11
III	ข้อมูลการติดต่อ.....	12
IV	สารบัญของกลุ่มการใช้งานฉบับนี้.....	12
V	วัตถุประสงค์.....	12
VI	แบบแผนการใช้งานคู่มือการใช้.....	13
VII	การตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ เวอร์ชัน 5.0.....	15
VIII	คำเตือน และข้อควรระวัง.....	15
IX	การกำจัดเครื่องมือ.....	19
ภาพรวม		23
1	การแนะนำ.....	23
2	คุณสมบัติ.....	24
2.1	ฮาร์ดแวร์.....	24
2.2	ซอฟต์แวร์.....	24
3	รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่อง LightCycler® 480.....	26
3.1	ทั่วไป.....	26
3.2	พารามิเตอร์ด้านสิ่งแวดล้อม.....	26
3.3	การเชื่อมต่อ.....	27
3.4	ความจุตัวอย่าง.....	27
3.5	การขนส่ง.....	27
3.6	ระบบควบคุม.....	27
4	รายละเอียดคุณลักษณะของระบบการตรวจนับสัญญาณ.....	28
4.1	ระบบกระตุ้น.....	28
4.2	ระบบตรวจรับ.....	28
4.3	ระบบกรองแสง.....	29
4.3.1	ชุดระบบกรองแสงของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I.....	29
4.3.2	ชุดระบบกรองแสงของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II.....	29
5	รายละเอียดคุณลักษณะของเทอร์โมบล็อกไซเคิลอร์.....	30
6	รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่องอ่านบาร์โค้ดสำหรับมัลติเวลเพลท.....	31
7	รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมือถือ.....	32

B	คำอธิบายระบบ	35
1	บรรจุกัมพจน์ของระบบ.....	35
2	การติดตั้ง	36
2.1	ความต้องการในการติดตั้ง	36
2.2	ความต้องการด้านพื้นที่และกำลังไฟฟ้า.....	37
2.3	ความต้องการด้านสิ่งแวดล้อม.....	39
2.4	การติดตั้งเครื่อง LightCycler® 480	40
3	คำอธิบายระบบ.....	44
3.1	คำอธิบายเครื่อง LightCycler® 480	44
3.2	คำอธิบายระบบบล็อก โซลิดอร์.....	48
3.3	คำอธิบายระบบการตรวจวัดสัญญาณ.....	51
3.4	คำอธิบายช่องวัดสัญญาณ.....	53
3.4.1	ชุดกรองแสงของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I	53
3.4.2	ชุดกรองแสงของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II	54
3.5	อุปกรณ์ใช้ครั้งเดียวของเครื่อง LightCycler® 480	55
3.6	น้ำยาสำหรับเครื่อง LightCycler® 480	58
3.7	อุปกรณ์เพิ่มเติม	59
3.8	รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง LightCycler® 480	60
3.8.1	ภาพรวม.....	60
3.8.2	การติดตามปฏิกิริยาฟลูออโรสเซนส์ SYBR Green I Dye.....	62
3.8.3	การติดตามปฏิกิริยาฟลูออโรสเซนส์ LightCycler® 480 ResoLight Dye.....	63
3.8.4	การติดตามปฏิกิริยาฟลูออโรสเซนส์ Hydrolysis Probes	64
3.8.5	การติดตามปฏิกิริยาฟลูออโรสเซนส์ HybProbe Probes	66
3.8.6	การวิเคราะห์ในท้ายปฏิกิริยา SimpleProbe Probes	68
C	การปฏิบัติงาน	71
1	คำแนะนำ.....	71
2	การเริ่มต้นระบบ	72
3	การเตรียมและการเริ่มต้นการใช้งานเครื่อง LightCycler® 480	73
4	การเปลี่ยนเทอร์มอล บล็อก โซลิดอร์ ของเครื่อง LightCycler® 480.....	76
D	โปรแกรมการใช้งานเครื่อง LightCycler® 480	81
	การใช้งานขั้นพื้นฐานของโปรแกรม	86
1	ภาพรวมของโปรแกรม LightCycler® 480	86
1.1	การเข้าใช้งานทั่วไปของโปรแกรม LightCycler® 480	87
1.2	การเริ่มต้นการใช้งานโปรแกรม LightCycler® 480	88
1.3	ทำความเข้าใจกับหน้าต่างหลักโปรแกรม LightCycler® 480	90
1.4	การเลือกและคุณสมบัติการนำทาง.....	96
1.4.1	เนวิเกเตอร์.....	96
1.4.2	แถบสถานะ.....	100
1.4.3	การเลือกตัวอย่าง	104
1.4.4	ตารางตัวอย่าง.....	107
1.5	การส่งออกและนำเข้าไฟล์ข้อมูล.....	108
1.5.1	การส่งออกไฟล์ข้อมูลและการผลการทดลองจากโปรแกรม LightCycler® 480	111
1.5.2	การส่งออกไฟล์ข้อมูลพร้อมกันหลายไฟล์.....	112
1.5.3	การนำเข้าไฟล์ข้อมูลที่ละไฟล์.....	115
1.5.4	การนำเข้าไฟล์ข้อมูลพร้อมกันหลายไฟล์.....	116

2	การสร้างโปรแกรมและการทำการทดลอง	119
2.1	การสร้างโปรแกรมการทดลอง.....	119
2.1.1	การตั้งค่ารูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ.....	122
2.1.2	การกำหนดโปรแกรมและอุณหภูมิเป้าหมาย.....	124
2.1.3	การสร้างการแสดงผลแบบออนไลน์.....	127
2.1.4	การเพิ่มความถี่เพิ่มเติมในการทดลอง	128
2.2	การทำการทดลอง.....	128
2.3	การใส่ข้อมูลตัวอย่าง.....	131
2.3.1	หน้าต่างการแก้ไขข้อมูลตัวอย่าง.....	131
2.3.2	แถบการแก้ไขตัวอย่าง.....	133
2.3.3	การกำหนดค่าคุณสมบัติตัวอย่างในการแก้ไขตัวอย่าง	134
2.3.4	การใส่ข้อมูลตัวอย่าง.....	135
3	ภาพรวมของการวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	143
3.1	ภาพรวมของขั้นตอนการวิเคราะห์	144
3.2	การใช้หน้าต่างการวิเคราะห์	146
3.2.1	การเลือกช่องสัญญาณและการเซตสัญญาณ.....	147
3.2.2	การทำงานกับตัวอย่างในการวิเคราะห์.....	148
3.2.3	การทำงานกับกราฟในหน้าต่างการวิเคราะห์.....	149
3.2.4	การใส่ข้อมูลเพิ่มเติมในการวิเคราะห์.....	150
3.2.5	การลบหรือการตั้งชื่อการวิเคราะห์ใหม่.....	150
3.3	การส่งออกข้อมูลผลการวิเคราะห์	151
การใช้งานโปรแกรม		156
4	การหาปริมาณสารพันธุกรรม.....	156
4.1	ภาพรวม	156
4.2	การวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง.....	157
4.2.1	ทำความเข้าใจค่า crossing point ของตัวอย่าง	158
4.2.2	ทำความเข้าใจบทบาทของเส้นค่ามาตรฐาน	158
4.2.3	การให้เส้นค่ามาตรฐาน.....	160
4.2.4	การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Second Derivative Maximum	163
4.2.5	การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Fit Points	166
4.2.6	การดูผลการทดลอง	172
4.3	การวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์	175
4.3.1	ภาพรวม	175
4.3.2	การทดลองชนิดเดี่ยว หรือ สองสี	178
4.3.3	หลักการของการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์.....	179
4.3.4	การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ด้วยเทคนิคพื้นฐาน.....	181
4.3.5	การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ด้วยเทคนิคขั้นก้าวหน้า.....	183
4.3.6	วิธีการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์	189
4.3.7	การดูผลการทดลอง	194
4.3.8	การจัดตัวอย่างและการสร้างชุดผลข้อมูล.....	195
4.3.9	เส้นค่ามาตรฐานจากภายนอก	198
4.3.10	ข้อมูลเพิ่มเติม.....	199
5	การวิเคราะห์ค่า T_m	202
5.1	การใช้ลักษณะ Melting Curve ในการบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอและจีโนไทป์	202
5.1.1	การกำหนดโปรแกรมการ Melt	202
5.1.2	เนื้อหาการวิเคราะห์อุณหภูมิ Melting.....	203
5.2	วิธีการวิเคราะห์ T_m Calling.....	204
6	การวิเคราะห์จีโนไทป์.....	212
6.1	ภาพรวม.....	212
6.2	การวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง.....	213
6.2.1	ภาพรวม.....	213
6.2.2	หลักการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง.....	215
6.2.3	วิธีการทดลองจีโนไทป์แบบปลายทาง.....	215
6.2.4	วิธีการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง.....	221
6.2.5	ฟังก์ชันเพิ่มเติม.....	227

6.3	การวิเคราะห์ในไทป์ด้วย Melting Curve	228
6.3.1	ภาพรวม.....	228
6.3.2	หลักการวิเคราะห์ในไทป์ด้วย Melting Curve.....	230
6.3.3	วิธีการทดลองการวิเคราะห์ในไทป์ด้วย Melting Curve	231
6.3.4	ฟังก์ชันเพิ่มเติม.....	241
7	โปรแกรม Gene Scanning	243
7.1	การทำงานของ Gene Scanning กับระบบ LightCycler® 480	243
7.1.1	High Resolution Melting	244
7.1.2	ส่วนประกอบของการทำงานของ Gene Scanning กับระบบ LightCycler® 480	246
7.1.3	ข้อได้เปรียบของเทคนิค High Resolution Melting	250
7.2	การเตรียมการทดลอง Gene Scanning กับระบบ LightCycler® 480	251
7.2.1	การออกแบบการทดลอง Gene Scanning.....	251
7.2.2	ชนิดของตัวอย่าง.....	252
7.2.3	ไพรเมอร์ พืชีอาร์.....	253
7.2.4	น้ำยาสกัด พืชีอาร์	253
7.2.5	พืชีอาร์ พารามิเตอร์.....	254
7.2.6	การตรวจวัดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่รวดเร็ว.....	256
7.3	วิธีการวิเคราะห์ Gene Scanning.....	256
7.4	ฟังก์ชันเพิ่มเติม.....	267
7.4.1	แม่แบบการทดลอง Gene Scanning.....	267
7.4.2	ผลของตัวควบคุม.....	268
การทำงานของโปรแกรมชนิดก้าวหน้า		270
8	การวิเคราะห์การขยายสัญญาณดี.....	270
8.1	วิธีการทดลองการขยายสัญญาณดี.....	271
8.2	วิธีใช้โปรแกรมขยายสัญญาณดี.....	278
9	การทำงานกับแม่แบบการทดลองและมาโคร	279
9.1	การสร้างและการใช้งานแม่แบบ.....	279
9.2	การสร้างและการใช้งานมาโคร	284
10	การทำงานกับกลุ่มย่อยตัวอย่าง.....	288
11	การทำงานกับแผนภูมิ.....	291
11.1	การพิมพ์ภาพ การส่งออกข้อมูลและสำเนาข้อมูลแผนภูมิ.....	291
11.2	การขยายและกวดมองรายละเอียดของแผนภูมิ.....	295
12	การทำงานกับตาราง.....	297
13	การสร้างการรายงาน.....	299
14	การทำงานกับการตั้งค่า.....	303
14.1	การใช้การตั้งค่าแผนภูมิ	303
14.1.1	การระบุหัวข้อแผนภูมิและสไตล์การติดฉลาก.....	305
14.1.2	ระบุเนื้อหาของแผนภูมิฟลูออเรสเซนซ์	305
14.1.3	การระบุรูปร่างแผนภูมิกราฟเส้นมาตรฐาน	307
14.1.4	การระบุเนื้อหาและรูปร่างของแผนภูมิอุณหภูมิ.....	308
14.1.5	การเขียนทับข้อมูลการตั้งค่าเริ่มต้นของแผนภูมิ.....	308
14.1.6	การสร้างการตั้งค่าแผนภูมิแยกการและใช้เป็นค่าเริ่มต้น.....	311
14.2	การใช้การตั้งค่าตัวอย่าง	312
14.3	การระบุการตั้งค่าผู้ใช้งาน	314
15	เครื่องมือในการจัดการ.....	315
15.1	การจัดการการเข้าใช้งานของผู้ใช้	316
15.1.1	ทำความเข้าใจบัญชีผู้ใช้งาน	316
15.1.2	ทำความเข้าใจกลุ่ม	316
15.1.3	ทำความเข้าใจบทบาท.....	317
15.1.4	สิทธิพิเศษสำหรับบทบาทผู้ใช้งานระดับมาตรฐาน.....	317
15.1.5	สิทธิพิเศษสำหรับบทบาทผู้ใช้งานระดับชำนาญ.....	318

15.1.6	สิทธิพิเศษสำหรับบทบาทผู้ดูแลระบบ.....	319
15.1.7	การเข้าใช้งานของผู้ใช้งาน	320
15.1.8	การจัดการผู้ใช้งาน กลุ่ม และ บทบาท.....	326
15.1.9	การทำงานกับบทบาท.....	329
15.2	การรายงานการตั้งค่า.....	331
15.3	บันทึกข้อผิดพลาด.....	332
15.4	ฐานข้อมูล.....	333
15.4.1	รุ่นที่ศูนย์ควบคุมกลับได้และรุ่นที่ศูนย์ควบคุมวิจัย.....	333
15.4.2	คำแนะนำสำหรับการสำรอง การล้าง และการกระชับฐานข้อมูลของ LightCycler® 480	334
15.4.3	เครื่องมือฐานข้อมูล CompactIB.....	338
15.4.4	การจัดการอย่างไรกับฐานข้อมูลจากโปรแกรมรุ่น 1.3 หรือต่ำกว่า.....	340
15.4.5	การจัดการอย่างไรกับไฟล์ข้อมูลจากโปรแกรมรุ่น 1.3 หรือต่ำกว่า.....	340
15.5	ตัวเครื่อง	341
15.6	รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	345
15.7	การตั้งค่าชนิดของเพลท.....	348
16	เครื่องมือการวินิจฉัย.....	349
16.1	การรายงานปัญหาของตัวเครื่อง.....	349
16.2	บันทึกข้อผิดพลาด.....	350
16.3	การทดสอบระบบด้วยตัวเครื่องเอง.....	350
17	การติดตั้งและการบำรุงรักษาโปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480	351
17.1	การติดตั้งโปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480	352
17.2	การเริ่มต้นใช้โปรแกรม LightCycler® 480 และเชื่อมต่อกับตัวเครื่อง.....	358
17.3	การบันทึกฐานข้อมูลที่มีอยู่และติดตั้งฐานข้อมูลอื่นเพิ่ม.....	361
17.4	การเข้าสู่ฐานข้อมูลอื่น.....	366
17.5	การแทนที่ฐานข้อมูลที่มีอยู่ด้วยฐานข้อมูลชื่อเดียวกัน.....	368
17.6	การตั้งค่าเครือข่ายลูกข่าย/เซิร์ฟเวอร์	369
17.7	การลบโปรแกรม LightCycler® 480	371
E การบำรุงรักษา		375
1	การบำรุงรักษาทั่วไป.....	375
2	คำแนะนำในการทำความสะอาด.....	375
2.1	การทำความสะอาดทั่วไป	375
2.2	การบำรุงรักษาเชิงป้องกัน.....	375
3	การเปลี่ยนหลอดไฟซินอน.....	376
4	การเปลี่ยนแผ่นกรองอากาศ.....	380
5	การเปลี่ยนฟิวส์	382
F ภาคผนวก		391
1	การแก้ไขปัญหา.....	391
1.1	ข้อความในกล่องข้อความของโปรแกรม LightCycler® 480	392
1.2	ข้อความโปรแกรมควบคุมเครื่อง.....	393
1.3	ข้อผิดพลาดจากเครื่อง.....	395
1.4	การบริการระยะไกลจากโรซ.....	397
2	ข้อมูลการสั่งซื้อ	398
3	ภาคผนวก	399



อารัมภบท

I ข้อมูลเอกสาร

1 ประวัติการแก้ไข

รุ่นคู่มือการใช้งาน	รุ่นโปรแกรม	วันที่ทบทวนใหม่	ข้อมูลการเปลี่ยนแปลง
1.0	1.0	กันยายน 2548	รุ่นแรก
2.0	1.2	มิถุนายน 2549	โปรแกรมรุ่นใหม่
3.0	1.5	กุมภาพันธ์ 2551	โปรแกรมรุ่นใหม่
4.0	1.5	กุมภาพันธ์ 2561	เดตการรับรอง รวมภาคผนวก 1-4 คดข้อมูลด้านความปลอดภัย
5.0	1.5	สิงหาคม 2562	เดต วินโดว์ 10 ,รวม โปรแกรม Gene Scanning

2 ประกาศฉบับ

คู่มือการใช้งานเครื่อง LightCycler® 480, โปรแกรมรุ่น 1.5 ใช้กับระบบ LightCycler® 480 ด้วยโปรแกรมรุ่น 1.5.1, ร่วมกันกับชุดน้ำยาเฉพาะของ LightCycler® 480

ทางผู้เขียนได้ใช้ความละเอียดรอบคอบในการเขียนคู่มือฉบับนี้ให้มีความถูกต้องอย่างที่สุด อย่างไรก็ตามผู้ผลิตเครื่องนี้อาจมีการอัปเดตข้อมูลได้อีก ซึ่งอาจทำให้มีรุ่นของเอกสารเพิ่มเติมได้ในอนาคต

3 การอบรม

ไม่ควรใช้งานเครื่องหรือทำการบำรุงรักษาเครื่องหากยังไม่ได้รับการอบรมจากบริษัท Roche Diagnostics. ไม่ควรกระทำการใด ที่ไม่ได้กล่าวไว้ในคู่มือนี้ ให้เป็นความรับผิดชอบของตัวแทนบริการของบริษัทจะดีกว่า

4 รูปถ่าย

ภาพหน้าจอและภาพเครื่องในเอกสารนี้ใช้สำหรับเพื่อเป็นภาพประกอบเท่านั้น ข้อมูลจากภาพเช่น การทดสอบ, ผลการทดสอบ, หรือชื่อต่าง ต้องไม่นำไปใช้ในการทำการปฏิบัติการจริงในห้องทดลอง

5 การรับประกัน

การรับประกันจะสิ้นสุดลงทันทีหากลูกค้ามีการปรับแต่งเครื่อง สำหรับเงื่อนไขการรับประกันโปรดติดต่อตัวแทนจำหน่ายของท่าน หน้าที่รับผิดชอบโปรแกรมตามรุ่นที่บริษัทแจ้งมาอย่างสม่ำเสมอ

6 ลิขสิทธิ์

© 2548–อัปเดต 2562, Roche Diagnostics GmbH. สงวนลิขสิทธิ์

7 ข้อมูลใบอนุญาต

โปรแกรม ระบบเครื่อง LightCycler® 480 ถูกควบคุมด้วยกฎหมายสัญญา, กฎหมายลิขสิทธิ์, และ สนธิสัญญาระหว่างประเทศ

The LightCycler® 480 System ได้รับใบอนุญาตผู้ใช้งานระหว่าง F. Hoffmann-La Roche Ltd.และผู้ถือใบอนุญาต, และเฉพาะผู้ที่ได้รับอนุญาตถึงมีสิทธิ์เข้าถึงโปรแกรมการใช้งานสำหรับผู้ที่ไม่ได้รับอนุญาต หากมีการใช้งานและเผยแพร่ จะมีความผิดทั้งทางแพ่งและอาญา

8 แหล่งข้อมูลและโปรแกรมการค้า

ระบบ LightCycler® 480 จะประกอบไปด้วยแหล่งข้อมูลและโปรแกรมการค้า ซึ่งข้อมูลทั้งหมดได้ถูกเก็บรวบรวมไว้ในโฟลเดอร์ “License\” หรือข้อมูลในโฟลเดอร์ “C:/Program Files (x86)/Roche/LightCycler480/License/” on the LightCycler® 480 Control Unit. ข้อมูลเพิ่มเติมสามารถดูได้ที่เอกสารและฉลาก

9 เครื่องหมายการค้า

เครื่องหมายการค้าตามรายการดังนี้:

LIGHTCYCLER, HYBPROBE, FASTSTART, and RESOLIGHT เป็นเครื่องหมายการค้าของ Roche

10 ข้อเสนอแนะ

ทุกความพยายามในการเขียนคู่มือนี้สนับสนุนการใช้งานของเครื่อง หากมีข้อเสนอแนะเพิ่มเติม สามารถติดต่อตัวแทนจำหน่ายของ Roche

II การรับรอง

ระบบเครื่อง LightCycler® 480 ได้รับการรับรองดังนี้:

ข้อกำหนด 2014/30/EU of the European Parliament and Council วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2557 เกี่ยวกับความเหมาะสมของการให้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

ข้อกำหนด 2014/30/EU of the European Parliament and Council วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2557 เกี่ยวกับการออกแบบอุปกรณ์ไฟฟ้าให้ใช้ในแรงดันไฟฟ้าที่กำหนด

ข้อกำหนด 2011/65/EU of the European Parliament and Council วันที่ 8 มิถุนายน 2554 เกี่ยวกับข้อห้ามใช้วัตถุอันตรายในอุปกรณ์เครื่องใช้ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์

การปฏิบัติตามข้อกำหนดมีให้โดยวิธีการประกาศความสอดคล้อง

สัญลักษณ์ด้านล่างแสดงข้อปฏิบัติตาม:



เป็นไปตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป



ออกให้โดยบริษัท Underwriters Laboratories, Inc. (UL) สำหรับแคนาดาและสหรัฐอเมริกา

**Equipment de
Laboratoire/
Laboratory
Equipment**

“Laboratory Equipment” เป็นการบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ที่แสดงบนชนิดเพลท

ข้อกำหนด 21 CFR Part 11

โปรแกรม LightCycler® 480 ใช้ฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับได้ ซึ่งออกแบบมาให้เหมาะกับการทำงานตามมาตรฐานข้อกำหนด FDA's 21 CFR Part 11

โปรแกรมเป็นไปตามข้อกำหนดสำหรับการควบคุมอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ (ส่วนย่อย B) เนื่องจากโปรแกรม LightCycler® 480 ไม่มีคุณสมบัติหลายขั้นตอนอิเล็กทรอนิกส์ จึงไม่จำเป็นต้องอยู่ในข้อกำหนด (ส่วนย่อย C)



[#] ข้อกำหนดฉบับเต็มของ *part 11 compliance* สำหรับโปรแกรม LightCycler® 480 จะต้องถูกจัดตั้งที่ผู้ใช้และขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการติดตั้งและการจัดตั้งของหน่วยงานนั้น

III ที่อยู่สำหรับการติดต่อ



ผู้ผลิต

Roche Diagnostics International Ltd.
Forrenstrasse 2
6343 Rotkreuz
Switzerland

ตัวแทนจำหน่าย

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany

ตัวแทนจำหน่ายในสหรัฐ

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, Indiana
USA
Made in Switzerland

IV เนื้อหาของคู่มือการใช้งาน

คู่มือการใช้งานนี้บรรยายการใช้งานระบบ LightCycler® 480 ซึ่งประกอบไปด้วยหัวข้อดังนี้:

Chapter A ภาพรวมที่แสดงคำแนะนำสั้นๆ ในการใช้งานของเครื่อง LightCycler® 480 และอธิบายรายละเอียดคุณลักษณะของระบบ

Chapter B คำอธิบายระบบซึ่งจะมีคำแนะนำการติดตั้งเครื่อง LightCycler® 480 และอธิบายส่วนประกอบพร้อมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้กับเครื่อง สำหรับบทนี้จะให้คำอธิบายสั้นๆ เกี่ยวกับรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง LightCycler® 480

Chapter C การปฏิบัติงาน อธิบายวิธีการใช้งานเครื่อง LightCycler® 480

Chapter D โปรแกรม LightCycler® 480 ซึ่งจะอธิบายการสร้างโปรแกรม LightCycler® 480 สำหรับการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

Chapter E การบำรุงรักษาเครื่อง ซึ่งอธิบายการบำรุงรักษาและขั้นตอนการดูแลเครื่อง LightCycler® 480

Chapter F ภาคผนวก จะมีข้อมูลการแก้ไขปัญหาและข้อมูลข้อผิดพลาดสำหรับเครื่อง LightCycler® 480 การสั่งซื้อและดัชนี

V วัตถุประสงค์การใช้งาน

เครื่อง LightCycler® 480 ใช้สำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่มีความรวดเร็วและแม่นยำสูง ร่วมกับระบบการตรวจวัดสัญญาณแบบในสภาพจริงออนไลน์ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายเป็นจำนวนจริงหรือเชิงสัมพัทธ์ได้ และยังสามารถวิเคราะห์ ผลตกกันซ์ พีซีอาร์ ด้วยเทคนิคจำเพาะอย่าง Melting Curve ได้

เครื่อง LightCycler® 480 มีวัตถุประสงค์ให้ใช้ในการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และใช้โดยผู้เชี่ยวชาญเทคนิคในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษากาการใช้งานเครื่องอย่างเป็นอย่างดี เครื่องไม่มีวัตถุประสงค์ทางการวินิจฉัย

VI สัญญาที่ใช้ในคู่มือ

สัญญาข้อความ

เพื่อแสดงข้อมูลที่อ่านเข้าใจ ขอนุญาตข้อความในคู่มือจะประกอบด้วย

จำนวนตัวเลข	ลำดับขั้นตอนในการทำงานจะต้องเรียงตามลำดับที่กำหนด
ตัวอักษรเรียงสีฟ้า	บ่งชี้ไปที่บทอื่นๆ ในคู่มือการใช้งานเพื่ออ้างอิง
ตัวอักษรเอียง	อธิบายวิธีการดำเนินต่อเมื่อการใช้โปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480

สัญลักษณ์ที่ใช้ในการตีพิมพ์

ในคู่มือนี้ สัญลักษณ์จะใช้เป็นสัญลักษณ์มองเห็นได้:

สัญลักษณ์	ความหมาย	คำอธิบาย
	คำเตือน	สัญลักษณ์บ่งบอกว่าหากไม่ทำตามข้อกำหนดจะทำให้ได้รับบาดเจ็บทางร่างกายหรือเสียชีวิต หรือทำให้เครื่องเสียหาย
	พื้นผิวสัมผัสร้อน	สัญลักษณ์ที่ติดไว้กับพื้นผิวเครื่องที่มีโอกาสร้อนได้
	อันตรายทางชีวภาพ	สัญลักษณ์ที่บอกให้พึงระวังเมื่อทำงานกับวัตถุที่มีโอกาสเกิดอันตรายต่อการติดเชื้อกับร่างกาย
	คำเตือน: ระวังมือได้รับอันตราย	เตือนมือทำงานเข้าใกล้ส่วนของเครื่องที่มีการเคลื่อนที่
	ข้อความสำคัญ	เป็นข้อความที่จะทำให้การทำงานประสบความสำเร็จ
	ข้อมูล	เป็นข้อความเพิ่มเติมเกี่ยวกับหัวข้อในปัจจุบันที่กำลังกล่าวถึง
		ขั้นตอนต่อเนื่องในหน้าถัดไป
		จบการทำงาน

สัญลักษณ์ที่ใช้บนผลิตภัณฑ์

สัญลักษณ์	ความหมาย	คำอธิบาย
	โรงงานผลิตเครื่องมือ	แสดงบนป้ายเครื่อง
	ซีอี มาร์ค	แสดงความสอดคล้องกับข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องสำหรับเครื่อง
	ซียูแอล มาร์ค	แสดงบนป้ายเครื่อง
	จำนวนรายการ การค้าระหว่างประเทศ	แสดงบนป้ายเครื่อง
	อ้างอิงคู่มือการใช้งาน	แสดงบนป้ายเครื่อง
	พื้นผิวสัมผัสร้อน	1. บริเวณขอบของที่ใส่มัลติเวลเพลท 2. บริเวณพื้นผิวของแผ่นฝาครอบบล็อกไซเคิลอร์ 3. บริเวณพื้นผิวของตัวบล็อกไซเคิลอร์ 4. บริเวณหลอดไฟซินอน
	อันตรายทางชีวภาพ	บริเวณขอบของที่ใส่มัลติเวลเพลท
	คำเตือน: ระวังมือได้รับอันตราย	บริเวณด้านในคั้วเครื่อง
	WEEE	อุปกรณ์ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์นี้ถูกควบคุมด้วยข้อกำหนด สหภาพยุโรป WEEE ที่แสดงว่าห้ามทิ้งอุปกรณ์เป็นขยะทั่วไป

ตัวย่อ

มีรายการตัวย่อดังนี้:

ตัวย่อ	คำอธิบาย
ANSI	American National Standards Institute
EN	European Standard
IEC	International Electrical Commission
ISO	International Organization for Standardization
LIS	Laboratory Information System
n/a	not applicable
PCR	Polymerase Chain Reaction
QC	Quality Control
SD	Standard Deviation
SN	Serial Number
UL	Underwriters Laboratories Inc.
WEEE	Waste Electrical and Electronic Equipment

VII สิ่งที่เกิดขึ้นใหม่ในการพิมพ์รุ่นที่ 5.0

ข้อมูลเพิ่มเติมในการวิเคราะห์ด้วย Gene Scanning การทำให้ทันสมัยด้วยการใช้ระบบปฏิบัติการ Windows 10

VIII คำเตือนและข้อควรระวัง

เครื่อง LightCycler® 480 จะต้องถูกใช้โดยผู้ที่ได้รับการอบรมและชำนาญ ซึ่งจำเป็นต้องทำตามคำแนะนำในการติดตั้งเครื่องและการใช้งานของเครื่อง และต้องแน่ใจว่าผู้ใช้งานเครื่องสามารถเข้าถึงข้อมูลความปลอดภัยในการใช้งาน



เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายจากการบาดเจ็บหรือเสียหายรุนแรงให้อ่านคู่มือหัวข้อคำเตือนและข้อควรระวังนี้ก่อนเริ่มต้นการใช้งานเครื่อง

- ▶ ใส่ใจกับทุกข้อมูลความปลอดภัย
- ▶ ทำตามคำแนะนำอย่างเคร่งครัด

ไม่ควรกระทำการใช้งานหรือบำรุงรักษาเครื่องใดๆ หากยังไม่ได้รับการอบรมจากพนักงานโรช หากมีการใช้งานที่ไม่ได้ระบุไว้ในคู่มือนี้ ให้การใช้งานลักษณะนั้นเป็นหน้าที่ของพนักงานโรชที่ได้รับการอบรม

ความปลอดภัยในโลกไซเบอร์และข้อมูลความเป็นส่วนตัวของเครื่องที่ติดตั้งที่ผู้ใช้ ให้เป็นการรับผิดชอบร่วมกันระหว่างผู้ใช้กับโรช ซึ่งโรชจะให้ข้อมูลที่ได้รับการป้องกันเพียงพอที่จะให้ผู้ใช้มีความเป็นส่วนตัว ซึ่งได้แก่หัวข้อดังนี้

การควบคุมการเข้าใช้งาน

- ▶ การเข้าใช้งานทางกายภาพและการใช้ระบบเทคโนโลยีสารสนเทศทั้งหมดเช่น การประมวลผลวิเคราะห์ข้อมูล ระบบคอมพิวเตอร์ สายไฟ อุปกรณ์เชื่อมต่อของเครือข่าย จะต้องเคร่งครัดในการใช้งานเสมอ

การใช้งานการจัดการผู้ใช้โปรแกรม LightCycler® 480:

- ▶ ไม่ควรใช้ข้อมูลผู้ใช้งานเดียวกันสำหรับทุกคนในห้องปฏิบัติการ
- ▶ ควรใช้บัญชีผู้ใช้งานแยกแต่ละคนในห้องปฏิบัติการด้วยระดับการเข้าถึงที่เหมาะสม
- ▶ ควรล็อกบัญชีผู้ใช้งานที่ไม่ได้ใช้ (เช่น เมื่อเลิกใช้งาน)

ความปลอดภัยทางเครือข่าย

- ▶ ผู้ใช้จะต้องรับผิดชอบความปลอดภัยทางเครือข่าย โดยให้ปลอดภัยจากโปรแกรมที่เป็นอันตรายและการโจมตีทางข้อมูล เช่น ควรมีมาตรการใช้ ไฟร์วอลล์ เพื่อแยกระบบจากเครือข่ายที่ไม่ปลอดภัย และให้แน่ใจว่าการเชื่อมต่อเครือข่ายไม่มีรหัสเกี่ยวข้องกับไวรัสคอมพิวเตอร์
- ▶ ระบบเครือข่ายในห้องปฏิบัติการและระบบเทคโนโลยีสารสนเทศทั้งหมดต้องปลอดภัยจากผู้ใช้งานที่ไม่ได้รับสิทธิ์ให้เข้าถึง โปรแกรมอันตราย และการโจมตีทางโลกไซเบอร์
- ▶ ทุกอุปกรณ์และการบริการด้านเทคโนโลยีสารสนเทศในห้องปฏิบัติการต้องปลอดภัยจากโปรแกรมอันตรายและผู้ที่ไม่ได้รับอนุญาตให้เข้าใช้งาน
- ▶ ความปลอดภัยทางเครือข่ายสูงซึ่งจะต้องป้องกันการเปลี่ยนทิศทางและการดักฟังได้

การถ่ายโอนข้อมูลและการนำเข้าข้อมูลไปยังการวิเคราะห์

- ▶ การเขียนข้อมูลของผู้ป่วยลงในช่องคำเพิ่มเติมเป็นการละเมิดสิทธิส่วนบุคคลที่ควบคุมด้วยกฎหมาย ดังนั้นห้ามเขียนข้อมูลที่อ่อนไหวต่อผู้ป่วยลงในช่องคำเพิ่มเติมหากมีการบังคับใช้กฎหมายในประเทศผู้ใช้งาน

ความปลอดภัยในการจัดเก็บ

ข้อมูล

- ▶ ข้อมูลสำรองและคลังเก็บเอกสารสำคัญที่ส่งออกไปจากการวิเคราะห์จะต้องถูกจัดเก็บให้ปลอดภัย และป้องกันการเข้าถึงได้ของผู้ที่ไม่ได้รับอนุญาต
- ▶ การเข้าถึงข้อมูลสำรองและคลังเก็บเอกสารสำคัญจะอนุญาตสำหรับผู้ที่ได้รับอนุญาตเท่านั้น
- ▶ ต้องแน่ใจว่าข้อมูลสำรองและเอกสารสำคัญไม่ถูกนำออกจากที่เก็บที่ปลอดภัย (เช่น ไม่ควรมำข้อมูลออกนอกห้องปฏิบัติการ)

การรับรู้ความเป็นส่วนตัวและความปลอดภัยในโลกไซเบอร์

เบอรั

- ▶ ทำการอบรมพนักงานให้รับรู้เรื่องความปลอดภัยและความเป็นส่วนตัวของข้อมูลโดยให้สอดคล้องกับข้อกำหนดที่ใช้
- ▶ หากพบว่าการวิเคราะห์มีกิจกรรมน่าสงสัยให้รายงานต่อตัวแทนโรซันที
- ▶ ปรับปรุงโปรแกรมให้เป็นเวอร์ชันล่าสุดโดยคนของโรซันทีให้ทันสมัยเสมอ

ความต้องการในการจัดการ



เครื่อง *LightCycler® 480* เป็นเครื่องคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งมีโอกาสเกิดไฟฟ้าช็อต หรือ การบาดเจ็บทางกายได้ หากผู้ใช้งานไม่ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งานเครื่อง

- ▶ ทำตามคำแนะนำความปลอดภัยของการใช้เครื่องที่ติดไว้ที่เครื่อง
- ▶ สังเกตข้อควรระวังทั่วไปในด้านความปลอดภัยจากการใช้อุปกรณ์ไฟฟ้า
- ▶ ห้ามสัมผัสส่วนที่มีกระแสไฟฟ้าขณะเครื่อง *LightCycler® 480* เชื่อมต่อกับระบบไฟฟ้าหลัก
- ▶ ห้ามสัมผัสสวิตช์หรือสายไฟขณะมือเปิด
- ▶ ห้ามเปิดโครงเครื่อง *LightCycler® 480* ขณะเครื่องเชื่อมต่อกับไฟฟ้าอยู่
- ▶ ห้ามทำความสะอาดเครื่องโดยไม่ปิดสวิตช์หลังเครื่องหรือถอดปลั๊กไฟออก
- ▶ ผู้ใช้สามารถเปลี่ยนฟิวส์หรือหลอดไฟซินอนได้ หากทำตามคู่มือ การปรับแต่งอุปกรณ์เล็กน้อยอื่น ๆ จะไม่ได้รับอนุญาต หากมีการทำการเปลี่ยนแปลง การรับประกันเครื่อง *LightCycler® 480* ถือว่าสิ้นสุดสิ้นในขณะ
- ▶ เฉพาะผู้ให้บริการที่ได้รับอนุญาตที่จะทำการบริการซ่อมแซมเครื่องได้เท่านั้น
- ▶ ต้องสวมแว่นตา ถุงมือ ทุกครั้งที่ทำการสัมผัสกับวัตถุมีพิษ วัตถุกัดกร่อนได้ หรือวัตถุที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้
- ▶ ผลิตภัณฑ์นี้มีองค์ประกอบภายในที่มีสารที่ต่อระบบประสาท มีตะกั่วที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.1% w/w ภายใต้ข้อกำหนด REACH ซึ่งการทำงานกับเครื่องนี้จะไม่สัมผัสโดยตรงกับสารดังกล่าวหากทำตามคำแนะนำคู่มือการใช้งาน



ห้ามเปิดส่วนของบล็อกไซเคลอร์ขณะเครื่องทำงานเพื่อหลีกเลี่ยงการบาดเจ็บ อุปกรณ์มีส่วนของเครื่องกลอยู่ภายในบล็อกไซเคลอร์

การบาดเจ็บและการติดเชื้อจากส่วนมีคม ขอบไม่เรียบ และ/หรือการเคลื่อนที่ของอุปกรณ์ในตัวเครื่องอาจเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการปฏิบัติตามกฎของมาตรฐานการปฏิบัติการจะช่วยลดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์เหล่านี้ได้ การสวมอุปกรณ์ป้องกันจะช่วยลดความเสี่ยงจากการบาดเจ็บได้ โดยเฉพาะส่วนที่เข้าถึงยากของเครื่องเมื่อทำความสะอาดเครื่อง และอุปกรณ์ป้องกันที่ใช้ควรเหมาะสม (เช่น ถุงมือ, แว่นตา, เสื้อคลุม, และรองเท้า)



แม้ว่าจะทำงานกับสารพันธุกรรมที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ให้ระมัดระวังว่ากำลังทำงานกับวัตถุนตรายทางชีวภาพ ซึ่งจะต้องจัดการและกำจัดสารนั้นตามคำแนะนำความปลอดภัยที่กำหนดขึ้นท้องถิ่น

▶ หากมีสารหกเลอะให้รีบทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้อทันทีเพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่กระจายการปนเปื้อนไปสู่คนหรืออุปกรณ์อื่น

▶ โปรดทำตามคำแนะนำในส่วนการบำรุงรักษาเครื่อง *LightCycler® 480*



ที่รองรับมัลติเวลเพลท, เทอร์มอล บล็อก ไซเคลอร์, แผ่นฝาครอบบล็อก ไซเคลอร์ และหลอดไฟซินอน จะร้อนขณะเครื่องทำงาน

ข้อควรระวังทั่วไป



ระบบ *LightCycler® 480* ควบคุมด้วยโปรแกรมที่สามารถให้ผู้ใช้เชื่อมต่อกับเครือข่ายได้ ดังนั้นการเชื่อมต่อกับเครือข่ายอื่น มีโอกาสที่จะเกิดผลเสียต่อผลิตภัณฑ์ได้ เช่น การติดเชื้อคอมพิวเตอร์ (viruses, Trojan horses, etc.) หรือการเข้าถึงได้จากบุคคลที่สามที่ไม่ได้รับอนุญาต (เช่น การบุกรุกจากผู้โจร) โรจึงแนะนำให้มีการป้องกันอย่างดี

ผลิตภัณฑ์นี้ไม่แนะนำให้ใช้การเชื่อมต่อกับเครือข่ายอื่นหากไม่มีระบบป้องกัน และไม่ให้กระทำแม้เป็นรายครั้ง โรจะไม่รับผิดชอบหากผู้ใช้ไม่คำนึงถึงส่วนนี้ ทุกเครื่องที่เชื่อมต่อกับเครือข่าย จะมีระบบป้องกันของโรไฟร์วอลล์ โดยข้อมูลเพิ่มเติมสามารถติดต่อพนักงานตัวแทนโรได้

หากผู้ใช้เชื่อมต่อเครือข่ายโดยไม่มีระบบป้องกันไฟร์วอลล์ ทางโรจะไม่รับผิดชอบต่อปัญหาที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อเครือข่าย ในกรณีที่ทำงานลักษณะเครื่องแยกเดี่ยว แต่ควบคุมด้วยส่วนสารสนเทศอื่นที่ไม่ใช่อุปกรณ์จากโร (เช่น ติดตั้งกับเครื่องคอมพิวเตอร์อื่น) โรก็จะไม่รับผิดชอบต่อปัญหาอันเกิดจากการใช้การเชื่อมต่อลักษณะนี้ด้วยเช่นกัน โรจะรับผิดชอบกรณีที่มีการใช้งานโปรแกรมภายใต้ข้อกำหนดและการได้รับใบอนุญาต หรือการซื้อข้อตกลงการใช้งานจากโร



เพื่อปรับปรุงระบบความปลอดภัยของโร การติดตั้งระบบป้องกันไฟร์วอลล์จำเป็นต้องทำทุกครึ่งปีนับจากวันที่ประกาศ โดยใช้ระบบไฟร์วอลล์จากโร รายละเอียดเพิ่มเติมให้ติดต่อตัวแทนโรท้องถิ่น



ส่วนควบคุมเครื่อง *LightCycler® 480* เป็นส่วนหนึ่งของระบบเครื่อง หากมีการติดตั้งโปรแกรมอื่นลงไปในส่วนควบคุม ส่วนควบคุมนี้มีความเสี่ยงต่อการขัดขวางการทำงานของโปรแกรมควบคุมการทำงาน ควรมีการติดตั้งระบบป้องกันไวรัสคอมพิวเตอร์เพื่อเช็ทุกครั้งที่มีการเชื่อมต่อส่วนควบคุมกับอุปกรณ์หรือโปรแกรมอื่น

- ▶ ส่วนควบคุมเครื่องจะใช้ควบคุมเครื่อง *LightCycler® 480* แบบ 1 ต่อ 1
- ▶ ให้แน่ใจว่าส่วนสวิตช์หลักเข้าถึงได้แบบอิสระ
- ▶ การจัดวางที่ไม่ถูกต้องจะส่งผลต่อการทดลองที่ไม่ถูกต้องและทำให้อุปกรณ์เครื่องเสียหายได้ ควรทำตามคำแนะนำการติดตั้งเครื่อง การเคลื่อนย้ายเครื่องจะต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญจากโรงงาน
- ▶ ประกายไฟฟ้าสามารถทำให้เกิดการระเบิดได้ ควรเก็บวัตถุที่มีโอกาสทำให้เกิดการระเบิดออกจากเครื่อง (เช่น แก๊สสลบ) หากมีสปาร์กของเหลวลงบนอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์จะเกิด ไฟฟ้าลัดวงจรได้ซึ่งเป็นสาเหตุของไฟไหม้ได้
- ▶ ควรปิดฝาเครื่องขณะเครื่องต่อกับระบบไฟฟ้าหลัก และไม่สปรอยะไรตรงบริเวณใกล้เครื่อง ขณะทำการดับเพลิงควรถอดปลั๊กเครื่องออก
- ▶ ห้ามจัดการเครื่อง

ระบบความปลอดภัยไฟฟ้า



เครื่อง *LightCycler® 480* ถูกออกแบบตามมาตรฐานการป้องกันระดับ 1 (IEC) แกนเครื่องและโครงสร้างเครื่องต่อกับสาย เพื่อป้องกันอันตรายจากกระแสไฟฟ้าช็อต ควรทำการเชื่อมต่อเครื่องกับระบบสามสายที่มีกราวด์ สำหรับกำลังไฟฟ้าที่ 230 โวลต์ หากไม่มีระบบรองรับกราวด์ ต้องให้ช่างไฟฟ้าติดตั้งระบบรองรับกราวด์ ตามมาตรฐานของท้องถิ่น หากไม่มีระบบกราวด์ไม่ว่าจะภายในหรือภายนอกตัวเครื่อง จะก่อให้เกิดอันตรายอย่างยิ่ง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ผู้ใช้ไม่ควรพยายามแก้ไขหรือจงใจทำลายระบบความปลอดภัยของเครื่อง หากสายไฟมีการแตกหัก ขาดลู่ หรือเสียหาย ให้รีบทำการเปลี่ยนใหม่ทันทีด้วยสายไฟขนาดเดียวกับของเริ่มต้นที่โรชให้มา



ถ้าเตือนควรปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัดการใช้งานเครื่องและอุปกรณ์ผิดวิธีจะทำให้เกิดอันตรายตามมาได้ภายหลัง

IX การกำจัดทิ้งของเครื่องมือ

คำแนะนำการกำจัดทิ้ง

ทุกผลิตภัณฑ์ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ควรทิ้งแยกจากขยะทั่วไป การกำจัดทิ้งที่เหมาะสมจะป้องกันผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพมนุษย์



เครื่องควรจัดเป็นขยะอันตรายทางชีวภาพ การจัดการการปนเปื้อน (นั่นคือ การรวมกระบวนการทำความสะอาด การฆ่าเชื้อ การทำให้ปราศจากเชื้อ) จำเป็นต้องทำก่อนการนำมาใช้ใหม่ หรือก่อนทิ้ง ข้อมูลเพิ่มเติมควรทำตามคำแนะนำท้องถิ่น



ก่อนกำจัดทิ้งให้ลบข้อมูลในเครื่องออก ส่วนประกอบของส่วนควบคุมเช่น คอมพิวเตอร์ จอแสดงผล คีย์บอร์ด ควรทำเครื่องหมายกากบาทถึงขยะตามข้อกำหนดของ *European Directive 2012/19/EU of the European Parliament and of the Council of 4 July 2012 on waste electrical and electronic equipment (WEEE)* อุปกรณ์เหล่านี้จะต้องถูกนำไปกำจัดด้วยหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายโดยรัฐบาลหรือที่เกี่ยวข้อง

ข้อกำจัด

ทั้งนี้ส่วนของระบบควบคุมจะมีการปนเปื้อนหรือไม่ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของห้องปฏิบัติการ หากมีการปนเปื้อนให้ทำการฆ่าเชื้อแบบเดียวกับเครื่อง



ภาพรวม



Chapter A • ภาพรวม

คำแนะนำสั้นๆ ในการใช้งานของเครื่อง
LightCycler® 480 และคำอธิบายรายละเอียด

A	ภาพรวม	
1	คำนำ.....	23
2	คุณสมบัติ.....	24
2.1	เครื่อง.....	24
2.2	โปรแกรม	24
3	รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่อง LightCycler® 480	26
3.1	ทั่วไป	26
3.2	พารามิเตอร์ด้านสิ่งแวดล้อม	26
3.3	การเชื่อมต่อ.....	27
3.4	ความจุตัวอย่าง.....	27
3.5	การขนส่ง.....	27
3.6	ระบบควบคุม.....	27
4	รายละเอียดคุณลักษณะของระบบตรวจจับสัญญาณ.....	28
4.1	ระบบกระตุ้น.....	28
4.2	ระบบตรวจรับ.....	28
4.3	ระบบกรองแสง.....	29
4.3.1	ชุด ระบบกรองแสงของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I	29
4.3.2	ชุด ระบบกรองแสงของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II	29
5	รายละเอียดคุณลักษณะของเทอร์มอลบล็อกไฮเคลอร์	30
6	รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่องอ่านบาร์โค้ดสำหรับมัลติเวลเพลท.....	31
7	รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมือจับ.....	32



ภาพรวม

1 คำนำ

ระบบ LightCycler® 480 รองรับการทำงานพีซีอาร์ชนิดเรียลไทม์ ออนไลน์ สำหรับตัวอย่างขนาด 96 หรือ 384 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ thermal block ที่ทำการติดตั้งกับเครื่อง

หลังจากเครื่องทำการติดตามสัญญาณการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมมาได้แล้ว จะทำการวิเคราะห์ ยกตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยการหาปริมาณ ซึ่งจุดเด่นของระบบอนุกรมที่มีควมสม่ำเสมอสูง ทำให้ได้ผลที่รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง

ระบบตรวจจับสัญญาณมีช่วงสัญญาณกว้าง ซึ่งสามารถรองรับชนิดของสีทั้งแบบจำเพาะกับลำดับเบส เช่น โพรบชนิด HybProbe probes หรือ hydrolysis probes และสีที่ไม่จำเพาะกับลำดับเบส เช่น SYBR Green I

โปรแกรม LightCycler® 480 มีคุณสมบัติที่ดีในการใช้งานที่ทำให้ง่ายต่อการโปรแกรม รวดเร็ว และยังมีฟังก์ชันซับซ้อนที่ช่วยในการวิเคราะห์หรือรับกับงานบางอย่างที่ต้องใช้ความซับซ้อน เช่น

- ▶ การวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ Relative Quantification ด้วยการใช้ Basic Relative Quantification analysis mode หรือจะวิเคราะห์ขั้นสูงก็มีฟังก์ชันรองรับด้วย Advanced Relative Quantification analysis mode เป็นต้น
- ▶ การวิเคราะห์จีโนไทป์ชนิด Endpoint Genotyping ด้วย hydrolysis probes หรือการวิเคราะห์การกลายพันธุ์แบบ SNP ด้วยวิธี Melting Curve Genotyping method เป็นต้น
- ▶ สามารถวิเคราะห์หา hetero-duplex จากตัวอย่างดีเอ็นเอได้ ด้วยการใช้การวิเคราะห์ Gene Scanning Module ซึ่งออกแบบการทดลองด้วยการใช้ High Resolution Melting ร่วมกับการใช้สาร ResoLight Dye โปรแกรมจะวิเคราะห์จัดกลุ่มตัวอย่างให้อยู่เป็นกลุ่มเดียวกันหากมีลักษณะค่าอุณหภูมิจำเพาะเหมือนกัน ทำให้จำแนกจีโนไทป์ของตัวอย่างได้

หากต้องการใช้งานลักษณะ LIMS System ผู้ใช้สามารถเพิ่มโปรแกรมให้รองรับ LIMS Module ได้

สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมด้านการใช้งาน โปรแกรม กรุณาศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของโปรแกรม

LightCycler®

480



2 คุณสมบัติ

2.1 เครื่อง

ส่วนประกอบ

LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit (96-/384-well) ตัวบล็อกรวมเป็น ชนิดซิลเวอร์รวมฝาครอบ

LightCycler® 480 Optical Unit (5 ช่องกระตุ้นการเรืองแสง, และ 6 ช่องรับการเรืองแสง)

Light Emitting Diode, LED (ทดแทนการใช้หลอดชนิดซีนอน)

2.2 โปรแกรม

คุณสมบัติทั่วไปของโปรแกรม LightCycler® 480 รุ่น 1.5

คุณสมบัติทั่วไป

ฟังก์ชัน	คุณสมบัติ
พื้นฐาน	ปรับปรุงความสามารถโดยรวม
	มีระบบนำทางให้ง่ายต่อการใช้งานประจำวัน
	พัฒนาการจัดการข้อมูลในทุกส่วน
	ง่ายต่อการเปิดดูข้อมูลการทดลองเดิม หรือสร้างการทดลองใหม่ และสามารถให้แมโคร หรือ คัดแบบผ่านหน้าจอภาพรวม
	มีความยืดหยุ่นของการทำงานในรูปแบบตาราง
	ขยายและเลือกดูกราฟข้อมูลได้หลายกราฟพร้อมกัน
	มีฟังก์ชันการส่งออกข้อมูลเป็นชุดข้อมูลใหญ่ ไม่ต้องทีละข้อมูล
	ช่วงกว้างการวิเคราะห์ชนิด melting curve analysis เริ่มตั้งแต่ +20 °C
การแก้ไขข้อผิดพลาด	สามารถดูข้อมูลแบบภาพเพลทหรือแบบตารางข้อมูลก็ได้ ทุกการวิเคราะห์
	แสดงผลได้หลายคุณสมบัติ
	แก้ไขข้อมูลได้สะดวกรวดเร็ว (เช่น การตั้งค่ามาตรฐาน)
	พิมพ์ภาพเพลทตัวอย่างได้เพื่อง่ายต่อการปิด
	เลือกภาพพร้อมกัน หรือซูมได้ ในทุกหลุมบนเพลท
ฟังก์ชัน มาโคร	แสดงข้อมูลสรุปของแบบมาโคร
	สามารถเช็คเลขบาร์โค้ดเพลทเดิม และใส่เลขบาร์โค้ดได้ (ทางเลือก) ก่อนเริ่มการทำงานแบบมาโคร
	นำเข้าข้อผิดพลาดและโน้ตได้ระหว่างทำงานแบบมาโคร
	ยกเลิกการทำงานแบบมาโคร



รูปแบบการวิเคราะห์

รูปแบบ	คุณสมบัติ
การวิเคราะห์ Endpoint Genotyping	รวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิด SNP ง่ายต่อรูปแบบการแปลผล (เช่น การพล็อตกราฟแบบจุด การดูกราฟการเพิ่มปริมาณ)
การวิเคราะห์ Relative Quantification	จับคู่ได้หลายชิ้นอ้างอิง และหลายคู่ระหว่างชิ้นเป้าหมายกับชิ้นอ้างอิง แสดงค่าทางสถิติได้ทั้งสองค่า คือ ค่าเฉลี่ยและ ค่ากลาง แสดงรายละเอียดข้อมูลของเส้นมาตรฐาน มีการวิเคราะห์ 2 ลักษณะ สำหรับพื้นฐาน และขั้นสูง คือ Basic Relative Quantification วิเคราะห์ข้อมูลบนพื้นฐานวิธี $\Delta\Delta C_T$ -Method ซึ่งบอกค่าพารามิเตอร์ต่างๆ Advanced Relative Quantification วิเคราะห์ข้อมูลเชิงซับซ้อนขึ้นด้วยการเพิ่มค่าพารามิเตอร์เพิ่มเติม ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์
การวิเคราะห์ Gene Scanning	ใช้เทคนิค High Resolution Melting เพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรม จัดกลุ่มอัตโนมัติสำหรับตัวแปรทางพันธุกรรมใหม่ๆ เนื่องจากมีความไวสูง ตรวจจับตัวแปรชนิดเปลี่ยนลำดับเบสเดี่ยวได้แม่นยำ

เครื่องมือการจัดการผู้ใช้งานและการวินิจฉัยปัญหาโปรแกรม

ฟังก์ชัน	คุณสมบัติ
ฐานข้อมูล	ติดตั้งฐานข้อมูลในลักษณะตรวจสอบกลับได้ และตรวจสอบกลับไม่ได้
การจัดการลำดับผู้ใช้งาน	จัดบทบาท เป็น Admin, Expert และ Standard user
เครื่อง	การเช็คเครื่องอัตโนมัติ
บันทึกข้อผิดพลาด	จัดส่งออกข้อมูลการทำงานและข้อผิดพลาด



3 รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่อง LightCycler® 480

รายละเอียดคุณลักษณะด้านล่างนี้เหมือนกันทั้งของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I และเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II.



เครื่อง LightCycler® 480 Instrument รองรับ ทั้งชนิดบล็อกไซเคิลอร์ 96- หรือ 384-well format:

LightCycler® 480 Instrument II, 96-wells	Cat. No. 05 015 278 001
LightCycler® 480 Instrument II, 384-wells	Cat. No. 05 015 243 001

3.1 ทั่วไป

ขนาด	57.4 × 58.8 × 49.7 cm (ก × ข × ส)
น้ำหนักรวม	65 kg รวมส่วนควบคุมเครื่อง
น้ำหนักเครื่อง	55 kg
แหล่งพลังงาน/การใช้ไฟฟ้า	200-240 Vac (+10%/-15%) 50/60 Hz (+/- 2 Hz) 1.5kVA
ระดับเสียง	< 60 dB (A)
ระดับการป้องกัน	I
การติดตั้ง/แรงดันไฟฟ้า	II
การปล่อยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า	Class B
ความร้อนที่ปล่อยระหว่างการทำงาน(ค่าเฉลี่ย)	~4000 Btu/h or 4200 kJ/h
ความร้อนเมื่อเครื่องไม่ได้ทำงาน	~850 Btu/h or 900 kJ/h

3.2 พารามิเตอร์ด้านสิ่งแวดล้อม

อุณหภูมิสำหรับกักเก็บ/การจัดเก็บ/การบรรจุ	-25°C to +60°C
ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างการขนส่ง/การจัดเก็บ/การบรรจุ	10% to 95%, ไม่มีการควบแน่น
อุณหภูมิขณะใช้งานเครื่อง	+15°C to +32°C
ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างการใช้งานเครื่อง	Max. 80% at +32°C, ไม่มีการควบแน่น Min. 30% at +15°C to +32°C
ระดับความสูง/แรงกดอากาศระหว่างการใช้งานเครื่อง	0 — 2000 m เหนือระดับน้ำทะเล 80 — 106 kPa

3.3 การเชื่อมต่อ

เครื่อง LightCycler® 480 Instrument มีการเชื่อมต่อได้กับ:

การเชื่อมต่อ	อุปกรณ์
LAN 10/100 Base T	เชื่อมต่อกับระบบควบคุมเพื่อควบคุมการทำงานและส่งถ่ายข้อมูล

3.4 ความจุตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างต่อรัน	96 or 384
ปริมาตรตัวอย่าง	▶ 96-well thermal block cycler: 10 — 100 µl ▶ 384-well thermal block cycler: 5 — 20 µl ปริมาตรปฏิกิริยาสามารถลงได้ถึง 3 µl แต่ควรหยดน้ำมันเคลือบ

3.5 การขนส่ง

เครื่อง LightCycler® 480 Instrument ขนส่งผ่านการบรรจุในพาเลทที่เป็นสไตรโฟม แล้วทำการห่อหุ้มด้วยกล่องกระดาษอีกรอบ



หีบห่อการบรรจุเครื่องจะต้องไม่ถูกเปิดระหว่างการขนส่งและหากพบความเสียหายระหว่างการขนส่งให้รายงานต่อบริษัททันที ก่อนที่จะทำการยอมรับเครื่อง



ใช้บรรจุภัณฑ์ดั้งเดิมของเครื่องในการขนย้ายเครื่องเท่านั้น

3.6 ระบบควบคุม

ระบบควบคุมจะถูกจัดส่งมาพร้อมกับเครื่อง LightCycler® 480



หากมีแผนงานในส่วนที่ต้องใช้ระบบ LIMS ระบบควบคุมเครื่องจะต้องมีการติดตั้งเพิ่มเติมเพื่อให้ใช้งานลักษณะนี้ได้ ดังนั้นทางผู้ใช้งานจะต้องติดต่อกับตัวแทนโรคเพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับระบบควบคุม สำหรับรองรับการเชื่อมต่อในลักษณะดังกล่าวเป็นกรณีไป

4 รายละเอียดคุณลักษณะของระบบตรวจจับสัญญาณ

4.1 ระบบกระตุ้น

ซีนอน

ชนิด	หลอดไฟซีนอน
วัตต์	100 W
อายุการใช้งาน	> 500 h

แอลอีดี

ชนิด	หลอดไฟแอลอีดีแสงขาว
วัตต์	10 W
อายุการใช้งาน	> 10,000 h

4.2 ระบบตรวจรับ

ชนิด	กล้องโมโนโครม ซีซีดี
ความละเอียด	1024 × 1344 pixel
เวลาการบูรณาการ	10 ms to 10 s
การเลือกเวลาการบูรณาการ	ไดนามิกส์ หรือ แมนนวล
ความไว	< 0.2 nmol/l fluorescein, typically 0.1 nmol/l (20 µl reaction volume)
ความสม่ำเสมอ	CV ≤ 0.15%
สัญญาณข้ามหลุมต่อหลุม	< 0.2% optically < 0.02% with software correction

4.3 ระบบกรองแสง

สำหรับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument มีชุดระบบกรองแสง 2 รุ่น:

- ▶ ชุดระบบกรองแสงของเครื่องรุ่น LightCycler® 480 Instrument I
- ▶ ชุดระบบกรองแสงของเครื่องรุ่น LightCycler® 480 Instrument II

4.3.1 ชุดระบบกรองแสงของเครื่องรุ่น LightCycler® 480 Instrument I

ความยาวคลื่นช่วงกระตุ้น (nm)	Bandpass	Band Width (BW)
	450 nm	30 nm
	483 nm	35 nm
	523 nm	20 nm
	558 nm	30 nm
	615 nm	30 nm
ความยาวคลื่นช่วงรับ (nm)	500 nm	20 nm
	533 nm	20 nm
	568 nm	20 nm
	610 nm	20 nm
	640 nm	20 nm
	670 nm	20 nm

4.3.2 ชุดระบบกรองแสงของเครื่องรุ่น LightCycler® 480 Instrument II

ความยาวคลื่นช่วงกระตุ้น (nm)	Bandpass	Band Width (BW)
	440 nm	35 nm
	465 nm	25 nm
	498 nm	40 nm
	533 nm	25 nm
	618 nm	35 nm
ความยาวคลื่นช่วงรับ (nm)	488 nm	20 nm
	510 nm	20 nm
	580 nm	20 nm
	610 nm	20 nm
	640 nm	20 nm
	660 nm	95 nm (long pass)



5 รายละเอียดคุณลักษณะของเทอร์มอด บล็อก ไซเคลอร์

มี 2 ชนิดสำหรับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument:

- ▶ LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit 96 Silver
- ▶ LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit 384 Silver

การควบคุมอุณหภูมิ	ใช้ระบบ peltier ทั้งการเพิ่มและลดอุณหภูมิ
ช่วงอุณหภูมิ	+37 to +99°C +20°C สำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Melting Curve analysis
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	96-well block: 4.4°C/s 384-well block: 4.8°C/s
อัตราการลดอุณหภูมิ	96-well block: 2.2°C/s 384-well block: 2.5°C/s

6 รายละเอียดคุณลักษณะเครื่องอ่านบาร์โค้ด สำหรับ มัลติเวล เพลท



เครื่องอ่านบาร์โค้ดสำหรับ มัลติเวล เพลท เป็นส่วนเพิ่มจากเครื่องมาตรฐาน ใช้สำหรับการอ่านข้อมูลชื่อเพลทที่ทวนสอบกลับได้ ก่อนทำการใส่เพลทลงเครื่อง ให้ใช้สแกนบาร์โค้ดที่อยู่กับเพลท

รองรับชนิดบาร์โค้ด	▶ Code 39 (250 — 500 μm; Code with Checkdigit, min. code length = 2) ▶ Code 2 of 5 (250 — 500 μm; Code with Check-digit, min. code length = 2) ▶ Code 128 (250 — 500 μm; min. code length = 2)
ขนาดเส้นบาร์โค้ดที่รองรับ	68.0 × 6.5 mm





7 รายละเอียดคุณลักษณะของเครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมือถือ

ผู้ใช้สามารถซื้อเครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมือถือมาต่อเพิ่ม สำหรับการอ่านบาร์โค้ดได้ โดยการเชื่อมต่อผ่านทางช่อง USB ทั้งนี้ควรติดต่อด้านจำหน่ายโรชก่อน

ข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับเครื่องอ่านบาร์โค้ดที่แนะนำ

เพื่อให้การอ่านบาร์โค้ดได้ประสิทธิภาพจากเครื่องอ่านบาร์โค้ด แนะนำให้ภาพพิมพ์บาร์โค้ดเป็นลักษณะ:

A) Roche แนะนำสำหรับบาร์โค้ดที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าดังนี้

- ▶ ภาพพิมพ์บาร์โค้ดควรคมชัด (สีดำบนพื้นหลังขาว)
- ▶ พื้นหลังควรเป็นสีขาวทึบ (ไม่โปร่งแสง, ไม่มีลวดลาย, ไม่มีสี), ไม่อยู่บนกระดาษสะท้อนแสง
- ▶ เชื่อกว่าขอบคมและเส้นชัดเจน บนรหัสบาร์โค้ด (ไม่มีเส้นฟอยๆ)
- ▶ ช่วงที่ไม่มีเส้นบาร์โค้ด ควรชัด (เป็นสีขาวอยู่ทางซ้าย หรือขวาของรหัสบาร์โค้ด)
- ▶ เส้นรหัสบาร์โค้ดควรคมชัดแม้จะโคนนิ้ว หรือเล็บ ควรไม่เป็นรอย หรือเลอะเลือน แม้ว่าจะโคนน้ำมัน, น้ำขาน้ำเชื้อ หรือสารเหลวอื่นๆ

B) การอ่านคุณภาพบาร์โค้ดด้วยเครื่องอ่านมาตรฐาน

การใช้เครื่องวัดคุณภาพของบาร์โค้ดสามารถหาเครื่องวัดได้หลากหลาย ซึ่งแนะนำให้ใช้เครื่องที่ได้มาตรฐาน ISO/IEC 15416 standard which corresponds with the former US standard ANSI X3, 182-1990.

Roche แนะนำ ISO/IEC grade 3.5 to 4.0 (ANSI A) or ISO/IEC grade 2.5 to <3.5 (ANSI B) สำหรับเครื่องอ่านบาร์โค้ดที่ได้มาตรฐาน

คำอธิบายระบบ



B

Chapter B • คำอธิบายระบบ

คำแนะนำสำหรับการติดตั้งเครื่อง
LightCycler® 480 และคำอธิบาย
ส่วนประกอบระบบพร้อมอุปกรณ์ที่ใช้ร่วมกัน

B	คำอธิบายระบบ	
1	บรรจุก่อนใช้ของระบบ	35
2	การติดตั้ง.....	36
2.1	ความต้องการในการติดตั้ง	36
2.2	ความต้องการด้านพื้นที่และกำลังไฟฟ้า	37
2.3	ความต้องการด้านสิ่งแวดล้อม	39
2.4	การติดตั้งเครื่อง LightCycler® 480	40
3	คำอธิบายระบบ.....	44
3.1	คำอธิบายเครื่อง LightCycler® 480	44
3.2	คำอธิบายระบบบล็อก ไซเคิลอร์	48
3.3	คำอธิบายระบบตรวจวัดสัญญาณ.....	51
3.4	คำอธิบายช่องวัดสัญญาณ	53
3.4.1	ชุดกรองแสงของ LightCycler® 480 Instrument I	53
3.4.2	ชุดกรองแสงของ LightCycler® 480 Instrument II.....	54
3.5	อุปกรณ์ใช้ครั้งเดียวสำหรับเครื่อง LightCycler® 480	55
3.6	น้ำยาสำหรับเครื่อง LightCycler® 480	58
3.7	อุปกรณ์เพิ่มเติม	59
3.8	รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง LightCycler® 480.....	60
3.8.1	ภาพรวม.....	60
3.8.2	การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสีชนิด SYBR Green I	62
3.8.3	การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสีชนิด LightCycler® 480 ResoLight Dye	63
3.8.4	การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสีชนิด Hydrolysis Probes	64
3.8.5	การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสีชนิด HybProbe Probes	66
3.8.6	การวิเคราะห์โนทัยป์ด้วยสีชนิด SimpleProbe Probes	68

คำอธิบายระบบ

1 บรรจุภัณฑ์ของระบบ

รายละเอียดในตารางด้านล่างคือส่วนประกอบที่มาพร้อมกับเครื่อง ควรเช็คตามรายการในตารางเพื่อความถูกต้อง



หลังจากเปิดกล่อง ตรวจสอบความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นจากการขนส่ง หากพบว่ามีรายการใดขาดหายหรือเสียหาย ให้รายงานกับตัวแทนจำหน่ายโรช

จำนวน	รายการ
1	เครื่อง LightCycler® 480 Instrument, 96-wells หรือ เครื่อง LightCycler® 480 Instrument, 384-wells
1	ส่วนควบคุมเครื่อง (รวมจอแสดงผล)
1	สาย LAN (3 เมตร)
4	แผ่นกรองอากาศ
1	อุปกรณ์สำหรับใช้ปิดแผ่นฟอยล์
1	ฝาครอบเลนส์
10	ฟิวส์ขนาด 5×20 3.15AT 250V ULR/IEC
10	ฟิวส์ขนาด 5×20 8AT 250V ULR/IEC
10	ฟิวส์ขนาด 5×20 T 10A H 250V ULR/IEC
10	ฟิวส์ขนาด 5×20 16AT 250V ULR/IEC
1	แผ่นรองเมาส์
1	กล่องอุปกรณ์อื่นๆ



โปรแกรม *LightCycler® 480* รุ่น *1.5.1*, คู่มือและใบอนุญาตจะบันทึกอยู่ในส่วนควบคุมเครื่องภายใต้โฟลเดอร์

`"C:\Program Files\Roche\LightCycler480_InstallPacks\"`.

สายไฟของเครื่อง และของส่วนควบคุมเครื่องรวมทั้งจอแสดงผลนั้นจะต้องขนส่งแยกต่างหาก ดังนั้นให้ติดต่อตัวแทนจำหน่ายโรช

2 การติดตั้ง

2.1 ความต้องการในการติดตั้ง

- ▶ วางเครื่อง LightCycler® 480 บนพื้นได้ระดับในลักษณะตั้งขึ้น
 - ▶ ไม่ควรวางเครื่อง LightCycler® 480 ใกล้กับเครื่องที่ทำให้เกิดการสั่นสะเทือน เครื่องที่ปล่อยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือเครื่องที่มีการเหนี่ยวนำสูง (เช่น ตู้เย็น เครื่องปั่นเหวี่ยง หรือเครื่องผสม เป็นต้น)
 - ▶ เครื่องที่เชื่อมต่อกับเครื่อง LightCycler® 480 จะต้องได้รับมาตรฐาน IEC 950 (UL 1950)
 - ▶ ปลั๊กไฟที่ใช้กับระบบเครื่อง LightCycler® 480 (เครื่อง, ส่วนควบคุม, จอแสดงผล) ควรมีไฟฟ้าเฟสเดียวกัน เพื่อป้องกันการกระชากเมื่อเปิด หรือป้องกันสัญญาณรบกวนจากปัจจัยอื่นๆ หรือระบบจ่ายกระแสไฟฟ้าเอง
 - ▶ ใช้สายไฟและสาย LAN ที่มาพร้อมกับเครื่องเท่านั้น
-  มีการยกเลิกชุดสายไฟที่มากับระบบเครื่องของ โรช

เนื่องจากแต่ละประเทศมีมาตรฐานแตกต่างกัน ชุดสายไฟจึงไม่ได้จัดมาพร้อมกับระบบเครื่อง ดังนั้นติดต่อบริษัทประจำถิ่นเพื่อสนับสนุนชนิดของสายไฟ

ก่อนนำสายไฟมาใช้ ควรเช็ชนิดของสายไฟให้ถูกต้องตรงกับความต้องการของเครื่องด้วยดังนี้

วัตถุ	ชนิด/รุ่นของสายไฟ(ความยาวสูงสุด 3 m/12 ft)	เครื่องหมายของความสอดคล้อง
สายไฟชนิดกลุ่มยุโรป	ปลั๊ก 3 ขาชนิด CEE VII หรือ เทียบเท่า รองรับไฟฟ้าที่ 16 A/250 V พร้อมสาย H05VV-F3G with min. 1.50 mm ² และข้อต่อสายชนิด IEC-60320 C19 rated for min. 16 A/250 V	ได้รับมาตรฐาน ENEC or VDE or <HAR>, or เทียบเท่า  C19
สายไฟชนิดกลุ่มอเมริกา	ปลั๊ก 3 ขาชนิด NEMA or เทียบเท่า รองรับไฟฟ้าที่ 20 A/125 V or 20 A/250 V พร้อมสาย SJT with min. 12 AWG and และข้อต่อสายชนิด IEC-60320 C19 rated for min. 20 A/125 V or 20 A/250 V	ได้รับมาตรฐาน UL, CSA, หรือเทียบเท่า  C19

- ▶ ห้ามวางเครื่องบริเวณที่มีแสงแดดส่องโดยตรง หรือใกล้กับเครื่องแผ่รังสี หรือเครื่องกำเนิดความร้อน
- ▶ ห้ามวางเครื่องหนักๆทับด้านบนของเครื่อง

2.2 ความต้องการด้านพื้นที่และกำลังไฟฟ้า

จัดวางเครื่องให้เหมาะสมตามความต้องการของเครื่องในคุณสมบัติด้านล่างนี้

ขนาด	เครื่องมีขนาด กว้าง 57.4 ซม. ยาว 58.8 ซม. และสูง 49.7 ซม.
การรองรับน้ำหนัก	65 กิโลกรัมรวมส่วนควบคุม
น้ำหนัก	เฉพาะตัวเครื่อง LightCycler® 480หนักประมาณ 55 กก.
กำลังไฟฟ้า	▶ ใช้ไฟฟ้า 200 — 240 โวลต์ (50/60 เฮิร์ต) ▶ เครื่องสามารถต่อกับไฟฟ้าชนิดเฟสเดียว หรือเฟสคู่ได้ ▶ ใช้ระบบกราวด์ การไม่มีระบบกราวด์ จะก่อให้เกิดอันตราย ไม่ว่าจะเป็นภายในระบบ หรือภายนอก ระบบ   ไม่ควรใช้งานเครื่องในสภาวะที่มีการปรับแต่งหรือเจตนาไม่ใช้ระบบกราวด์ ▶ เครื่อง LightCycler® 480 ใช้ไฟฟ้าสูงสุดที่ 1500 VA ส่วนควบคุมจะใช้ ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 500 VA  ขึ้นอยู่กับคุณภาพกระแสไฟฟ้า การติดตั้งเครื่องสำรองไฟ (UPS) อาจจำเป็นในกรณี ที่ระบบไฟฟ้าไม่เสถียร เครื่องสำรองไฟ ไม่ได้มาพร้อมกับระบบเครื่อง ดังนั้นหาก ต้องการติดตั้งเพิ่มให้ติดต่อตัวแทนประจำถิ่น โดยแนะนำให้เลือกชนิด “Online / Direct Mode”.

B

การระบายอากาศ

สำหรับระบบระบายอากาศ ไม่มีความต้องการพิเศษ แต่ควรมั่นใจว่า:

- ▶ ช่องระบายอากาศเข้า บริเวณอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ (1) ไม่ถูกปิดกั้น ช่องนี้จะอยู่ทางด้านมุมบนซ้ายของด้านหลังเครื่อง ควรจัดวางเครื่องให้ห่างจากผนังอย่างน้อย 4 ซม. เพื่อให้การระบายอากาศดี
- ▶ ช่องระบายอากาศออก (2) ของ thermal block cycler จะต้องไม่ถูกปิดกั้น ซึ่งจะอยู่บริเวณมุมล่างขวาของด้านหลังเครื่อง และมุมล่างซ้ายของด้านซ้ายเครื่อง

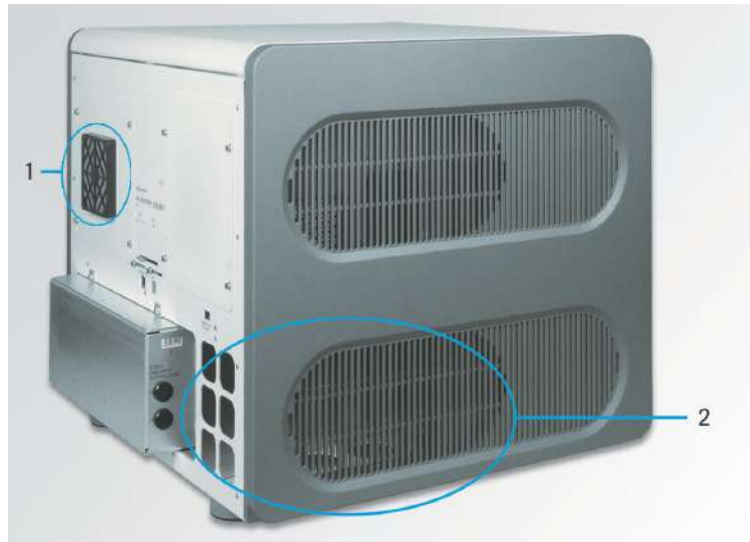


Figure 1 ช่องระบายอากาศเข้า (1) และ ออก (2) ด้านหลังและด้านซ้ายของเครื่อง

- ▶ ช่องระบายอากาศเข้าของ thermal block cycler (3) และช่องระบายอากาศเข้าของกล่องไฟ (4) จะต้องไม่ถูกปิดกั้น ซึ่งจะอยู่บริเวณด้านล่างขวาของเครื่อง



Figure 2 ช่องระบายอากาศเข้าทางด้านล่างขวาของเครื่อง

การเข้าถึง

- ▶ ควรวางเครื่องให้ด้านหลังเครื่องห่างจากผนังประมาณ 4 ซม. เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าถึงระบบพัดลมกรองอากาศของระบบไฟและแผงวงจร
- ▶ ควรวางเครื่องให้มีพื้นที่ด้านข้างขวามากน้อย 40 ซม. เพื่อให้ง่ายต่อการดูแล block cyclus แผงวงจร และการใส่เพลทเข้า ออก
- ▶ ควรวางเครื่องให้มีพื้นที่ด้านข้างซ้ายประมาณ 20 ซม. เพื่อให้สะดวกต่อการนำฝาครอบเครื่องใส่ทางด้านข้าง
- ▶ ควรวางเครื่องให้มีพื้นที่ด้านบนเครื่องประมาณ 5 ซม. เพื่อให้การยกฝาเครื่องขึ้นสะดวก

2.3 ความต้องการด้านสิ่งแวดล้อม

เครื่อง LightCycler® 480 ถูกออกแบบมาให้ใช้งานได้อย่างปลอดภัย ภายใต้ข้อกำหนดมาตรฐานของ CE และ UL ที่อุณหภูมิห้องระหว่างอุณหภูมิ +15°C และ +32°C, ความชื้นสัมพัทธ์ ระหว่าง 30% และ 80% (ไม่มีการควบแน่น) และที่ระดับความสูง 2000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (850 – 1050 hP) สภาพบรรยากาศที่ระดับมลพิษ ระดับ II



สภาพสิ่งแวดล้อมที่ไม่อยู่ตามเกณฑ์กำหนดอาจส่งผลทำให้การทดลองล้มเหลวหรือไม่ถูกต้อง



เก็บรักษาเครื่องในที่แห้ง ความชื้นจะส่งผลทำให้เครื่องเสียได้

B

2.4 การติดตั้งเครื่อง LightCycler® 480

เครื่องควรถูกขนส่งไปยังสถานที่ที่ต้องการติดตั้งในลักษณะที่ยังไม่เปิดบรรจุภัณฑ์ การเปิดบรรจุภัณฑ์และการติดตั้งจะต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญจากบริษัทเท่านั้น

► การเปิดบรรจุภัณฑ์:



หากตรวจพบความเสียหายเกิดขึ้นเมื่อเปิดบรรจุภัณฑ์ ให้รายงานความเสียหายนั้นกับตัวแทนจำหน่าย
โรช



ยกเครื่อง LightCycler® 480 ออกจากกล่องโดยจับด้านข้างเครื่องทั้งด้านซ้ายและขวาพร้อมกัน วางลงบนโต๊ะที่สามารถรับน้ำหนักได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด



ในการยกเครื่องขึ้น ให้จับบริเวณด้านใต้ฐานเครื่องซึ่งจะมีขา 4 ขาด้านล่างจะได้ถนัดต่อการยกเครื่องและควรใช้คนยกอย่างน้อย 2 คนขึ้นไปเนื่องจากเครื่องมีน้ำหนักมาก



Figure 3 ภาพแสดงด้านล่างฐานเครื่อง ที่มีขาให้จับขณะยกเครื่อง

ควรจัดตั้งเครื่องให้มีพื้นที่โดยรอบเครื่องเพียงพอ เพื่อให้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ไม่ร้อน และให้แน่ใจว่าไม่มีวัตถุใดไปปิดกั้นด้านหลังเครื่อง หรือใต้ฐานเครื่อง (รายละเอียดเพิ่มเติม สามารถดูได้ที่ส่วนข้อมูลความต้องการด้านพื้นที่และกำลังไฟฟ้า)



หากมีระยะห่างรอบตัวเครื่องไม่เพียงพอ จะทำให้เครื่องได้รับความเสียหายได้จากสภาวะความร้อนเกิน

▶ นำอุปกรณ์ล็อกเครื่องเพื่อการขนส่งออกจากเครื่อง:

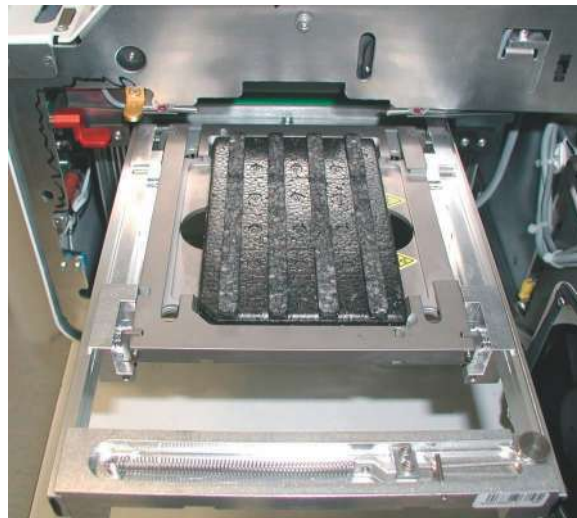
อุปกรณ์ล็อกเครื่องเพื่อการขนส่งจะเป็นแผ่นโพลีไวนิลสำหรับวางเฟลท เพื่อป้องกันความเสียหายขณะขนส่ง



นำอุปกรณ์ล็อกเครื่องระหว่างขนส่งนี้ออกจากเครื่องก่อนที่จะทำการเปิดเครื่อง มิเช่นนั้นประตูของส่วนบล็อกไซเคิลอร์ จะล็อก และส่วนสำหรับใส่เฟลทเข้าออกจะปิดตาย เนื่องจากการเคลื่อนที่ของมอเตอร์แบบผิดปกติ



ในการนำอุปกรณ์ล็อกเครื่องระหว่างขนส่งออกนั้น ให้เปิดประตูตรงส่วนบล็อกไซเคิลอร์ แล้วค่อยๆ ดึงที่ใส่เฟลทออก จากนั้นนำแผ่นโพลีไวนิลแล้วทำการดันที่ใส่เฟลทกลับเข้าที่เดิม



ห้ามทิ้งอุปกรณ์ล็อกเครื่องระหว่างขนส่งนี้ไป หลังจากเอาออกจากเครื่องแล้ว เนื่องจากสามารถเก็บไว้ใช้ต่อในกรณีที่มีการเคลื่อนย้ายเครื่องไปติดตั้งใหม่ ควรเก็บอุปกรณ์รวมไว้กับอุปกรณ์อื่นๆ ในกล่องสำหรับเก็บอุปกรณ์



กดคันโยกสีแดง เพื่อดึง เทอร์มอล บล็อกไซเคิลอร์ ออกมา แล้วนำเฟลทที่วางบน บล็อกไซเคิลอร์ ออกด้วย จากนั้นให้นำ บล็อกใส่กลับเข้าไปในเครื่อง แล้วปิดประตู

B

- ▶ เชื่อมต่อสายไฟ: เครื่อง LightCycler 480 ใช้กำลังไฟฟ้า 200-240 โวลต์ ให้ต่อสายไฟเข้ากับช่องหลักสำหรับปลั๊กไฟ ซึ่งแผงวงจรไฟฟ้าทั้งหมดจะอยู่ทางด้านล่างของเครื่องทางด้านหลัง ดังรูป



Figure 4 ตำแหน่งสวิตช์เปิดหลัก และช่องหลักสำหรับปลั๊กไฟ

- ⚠ ห้ามจับสายไฟขณะมือเปียก และไม่ควรถอดสายไฟขณะที่เครื่องเปิดอยู่ หากพบว่าสายไฟชำรุดเสียหาย หรือหลวม ควรเปลี่ยนทันที และควรต่อระบบกราวด์เสมอ
- ▶ เปิดบรรจุภัณฑ์ของส่วนควบคุมเครื่อง LightCycler® 480 (ได้แก่ คอมพิวเตอร์, คีย์บอร์ด, เมาส์, และจอแสดงผล)
- ▶ วางส่วนควบคุมเครื่องข้างๆกับเครื่อง LightCycler® 480 แล้วทำการเชื่อมต่อ
- 🔍 แนะนำให้วางส่วนควบคุมเครื่องไว้ทางด้านซ้ายของเครื่อง LightCycler® 480 เนื่องจากทางด้านขวาของเครื่องจะต้องทำการเปิดส่วนที่นำเข้าออกเพลทในการทำการทดลอง
- ⚠ ทำตามคำแนะนำข้อควรระวังในการเชื่อมต่อสายไฟตามข้อมูลด้านบน

- ▶ เชื่อมต่อสายเครือข่าย LAN ตรงจุดเชื่อมต่อ LAN ซึ่งอยู่ตรงกลางด้านหลังเครื่อง โดยให้ต่อสายตรงตำแหน่ง DATASTATION



ควรใช้สาย LAN ที่ให้มาพร้อมกับเครื่อง ซึ่งความยาวของสายไม่ควรยาวเกิน 3 เมตร

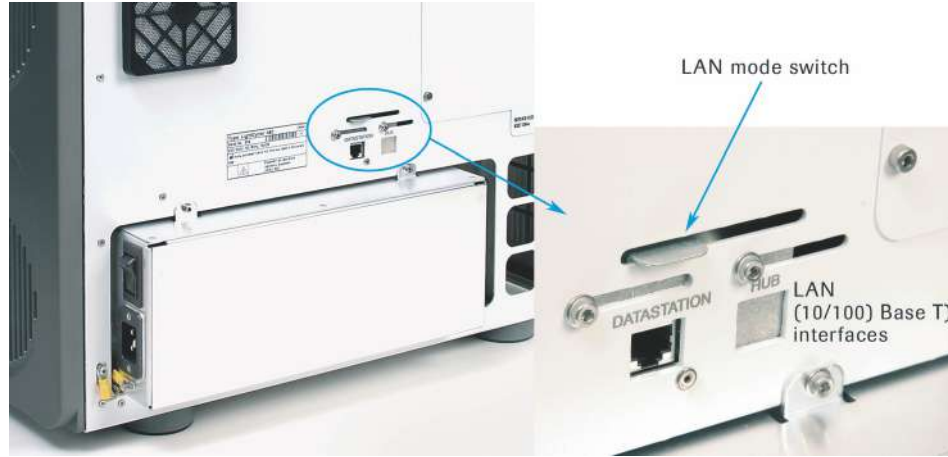


Figure 5 จุดเชื่อมต่อ LAN ซึ่งอยู่ด้านหลังเครื่อง



ไม่ควรเชื่อมต่อสายเครือข่าย ตรงจุดเชื่อมต่อ LAN ที่ชื่อว่า HUB



ส่วนควบคุมที่มาพร้อมกับเครื่อง LightCycler® 480 จะมีจุดเชื่อมต่อ LAN 2 จุด แนะนำให้ใช้ช่อง RJ45 port ที่อยู่บนเมนบอร์ดเชื่อมต่อกับเครื่อง LightCycler® 480 ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อแบบโดยตรง

- ▶ (ทางเลือก) เชื่อมต่อเครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมือจับกับส่วนควบคุมเครื่อง โดยผ่านทางจุดเชื่อมต่อชนิด USB

- ▶ เชื่อมต่อเมาส์ คีย์บอร์ด จอแสดงผล และ เครื่องพิมพ์ เข้าทางด้านหลังของเครื่องคอมพิวเตอร์



เครื่องพิมพ์ไม่ได้ให้มาพร้อมด้วยกับระบบเครื่อง LightCycler® 480

3 คำอธิบายระบบ

3.1 คำอธิบายเครื่อง LightCycler® 480

เครื่อง LightCycler® 480 เป็นเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงที่ทำงานอย่างรวดเร็ว และแสดงผลผ่านหน้าจอแบบออนไลน์ ในการตรวจวัดสารพันธุกรรมจะใช้ฟลูออเรสเซนซ์จับกับดีเอ็นเอ สายคู่ หรือสปีฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดฉลาก อยู่กับสายนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะกับดีเอ็นเอ เป้าหมาย ลักษณะงานทั้งสองประเภทจะใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ในขณะที่ทำการเพิ่มจำนวน และทำการวิเคราะห์หลังทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ ในแง่ของการวิเคราะห์ลักษณะจำเพาะของผลิตภัณฑ์ หรือวิเคราะห์การกลายพันธุ์ชนิด SNP ด้วยโปรแกรมการวิเคราะห์ Melting Curve Analysis เครื่องยังสามารถเลือกช่องกรองแสงได้หลายช่องสัญญาณพร้อมกัน สำหรับการทำการปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมากกว่า 1 เป้าหมายพร้อมกัน หรือที่เรียกว่า มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (รายละเอียดเพิ่มเติม ดูข้อมูลได้ในส่วนของรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง)

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง LightCycler® 480 มีดังนี้:

- ▶ บล็อก ไซเคิลอร์ ประกอบไปด้วยเทอร์มอด บล็อก ไซเคิลอร์ ที่ควบคุมอุณหภูมิ พร้อมแผ่นฝาครอบ (มี 2 รุ่น: สำหรับ 96- or 384-มัลติเวล พีซีอาร์ เพลท) ระบบระบายอากาศ, ส่วนใส่มัลติเวลเพลท และส่วนอ่านรหัสบาร์โค้ดจากมัลติเวลเพลท
- ▶ ส่วนตรวจวัดสัญญาณ ประกอบไปด้วย
 - ▶ หลอดไฟ, เป็นกล่องหลอดซินอนสำหรับการกระตุ้นแสง
 - ▶ ระบบสัญญาณแสง จะมีส่วนนำแสง, ชุดกรองแสงทั้งชนิดช่วงกระตุ้นแสงและช่วงรับแสง และกล้องชนิด ซีซีดี
- ▶ สำหรับเครื่อง LightCycler® 480 ที่ใช้หลอดไฟ แอลอีดี ส่วนนำแสงจะไม่มีเนื่องจากสัญญาณแสงจะตรงเข้าสู่ระบบการตรวจวัดสัญญาณแสงตรง

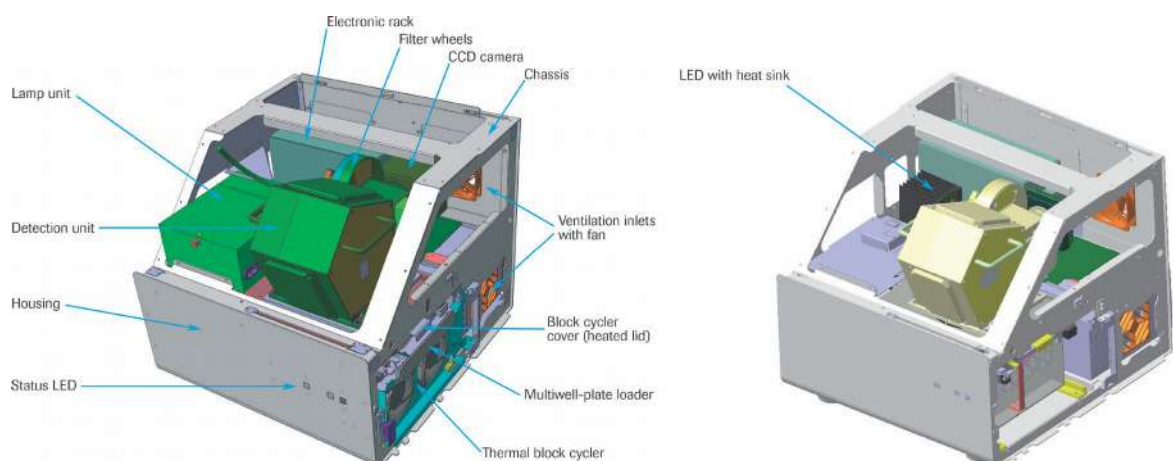


Figure 6 ภาพแสดงส่วนประกอบหลักของเครื่อง LightCycler® 480

ซ้าย: LightCycler® 480 กับหลอดไฟซินอน

ขวา: LightCycler® 480 กับหลอดแอลอีดี

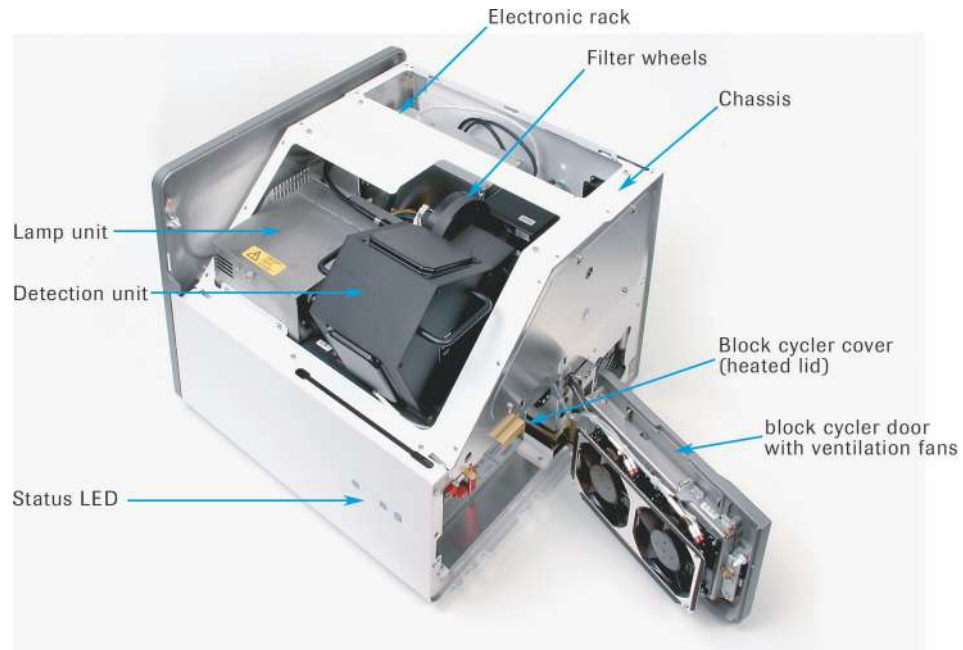


Figure 7 ภาพส่วนประกอบหลักเครื่อง LightCycler® 480 (ถอดฝาครอบเครื่อง)

ด้านหน้าเครื่อง LightCycler® 480 มีไฟแสดงสถานะเครื่องอยู่ 2 จุด และมีปุ่มกดสำหรับเลื่อนเพลทเข้าและออกจากเครื่อง ต่อจากไฟแสดงสถานะ ฝาครอบเครื่องสามารถยกออกและผลักไปทางด้านขวาได้ กรณีที่ต้องการเปลี่ยนหลอดไฟชนิดอื่น



Figure 8 ภาพด้านหน้าเครื่อง LightCycler® 480

ด้านขวาของตัวเครื่องจะเป็นส่วนสำหรับใส่หลอดดีเวลเพลท และส่วนเข้าถึงเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ การใส่



Figure 9 มุมมองด้านขวาของเครื่อง



Figure 10 มุมมองของส่วนที่ใช้สำหรับการนำดีเวลเพลทออก



Figure 11 เปิดประตูบล็อก ไซเคิลอร์ เพื่อให้เห็นการใส่ เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ และ แผ่นฝาครอบบล็อก

ด้านหลังของเครื่อง LightCycler® 480 จะมีส่วนของแหล่งจ่ายไฟฟ้าหลักของเครื่อง และสวิตช์หลัก ระบบเชื่อมต่อกับ LAN และส่วนเชื่อมต่อกับส่วนควบคุม มีระบบระบายอากาศเข้าและออก ที่อยู่ด้านหลังเครื่องเช่นกัน



Figure 12 มุมมองด้านหลังเครื่อง LightCycler® 480

โปรแกรม LightCycler® 480 เป็นส่วนภายในระบบเครื่อง ซึ่งใช้ควบคุมการทำงานในขั้นตอน พีซีอาร์ และทำการวิเคราะห์ ซึ่งรายละเอียดเพิ่มเติมให้ดูได้ในส่วนของคำอธิบายโปรแกรม เครื่อง

เครื่อง LightCycler® 480 ถูกออกแบบมาให้ใช้งานร่วมกันกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ และใช้งานกับอุปกรณ์ประเภทใช้ครั้งเดียว

3.2 คำอธิบายสำหรับบล็อกไซเคิลอร์

มีเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ 2 ชนิดที่ใช้กับเครื่อง LightCycler® 480

- ▶ LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit Silver for 96-multiwell plates
 - ▶ LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit Silver for 384-multiwell plates
- ทั้งสองชนิดของบล็อก ไซเคิลอร์ ประกอบไปด้วย

- ▶ เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์, ซึ่งมีแท่นสำหรับรองรับ มัลติเวลเพลท, ระบบทำอุณหภูมิชนิด Peltier, สารไหลTherma-Base, อุปกรณ์ทำความเย็น และจุดเชื่อมต่ออิเล็กทรอนิกส์
- ▶ แผ่นฝาครอบ บล็อกไซเคิลอร์
- ▶ ส่วนใส่ มัลติเวลเพลท
- ▶ ส่วนตรวจวัดสัญญาณเพลท
- ▶ เครื่องอ่านรหัสบาร์โค้ดจากมัลติเวลเพลท
- ▶ ประตูปบล็อก ไซเคิลอร์ พร้อมพัดลม

เทอร์มอลบล็อกไซเคิลอร์ และแผ่นฝาครอบบล็อก มี 2 รุ่น

- ▶ สำหรับ 96-multiwell plates
- ▶ สำหรับ 384-multiwell plates

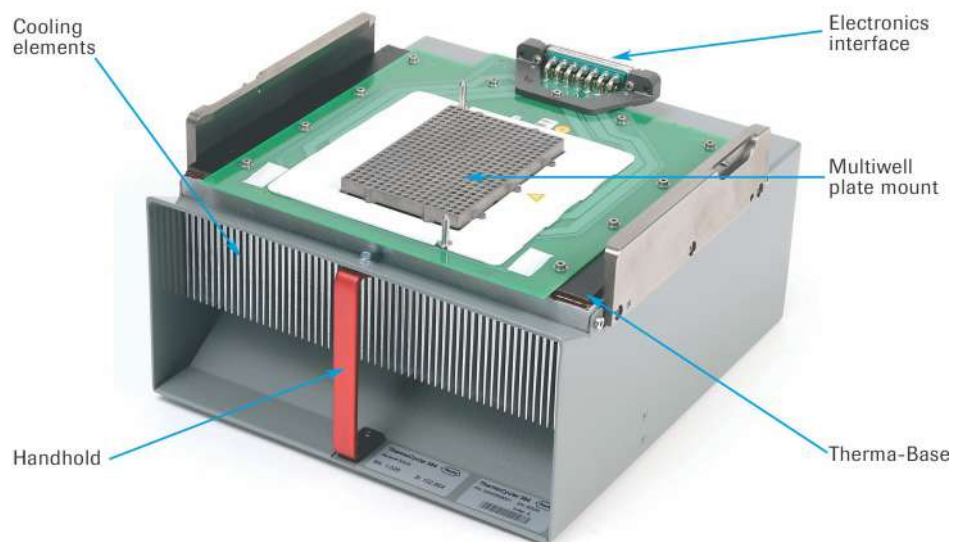


Figure 13 เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ ของเครื่อง LightCycler® 480 Instrument (รุ่น384-multiwell PCR plate)

ในแต่ละรุ่นของเทอร์มอด บล็อก ไชเคลอร์ จะมีแผ่นฝาครอบที่ตรงกับรุ่นบล็อก ซึ่งแผ่นฝาครอบนี้จะมีจำนวนรูรับสัญญาณแสงตามรุ่นทั้งแบบ 96 และ 384 รู ซึ่งใช้ในการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ในสภาวะปิด ในระหว่างที่เครื่องทำงานแผ่นฝาครอบนี้จะปิดทับเพลทอปฏิกิริยาและทำความร้อนที่ $+100^{\circ}\text{C}$ ทำให้ปฏิกิริยาในหลุมทดลองไม่มีการระเหยไป ดังนั้นไม่จำเป็นต้องหยดน้ำมันคลุมปฏิกิริยาในหลุมทดลองอีก

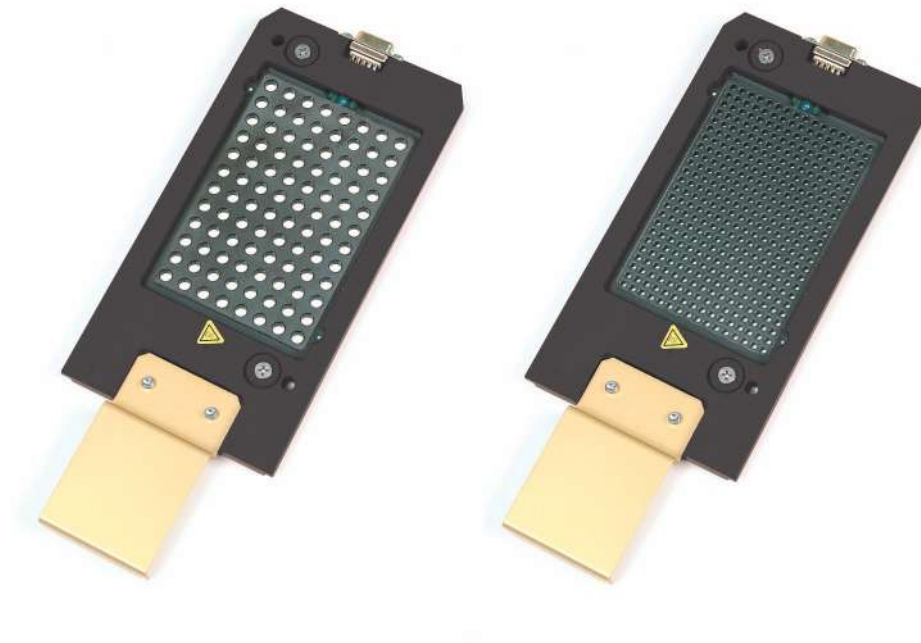


Figure 14 มุมมองด้านบนของแผ่นฝาครอบชนิด 96-well (ซ้าย) and 384-well (ขวา)

เทอร์มอด บล็อก ไชเคลอร์ ถูกควบคุมด้วยระบบ Peltier 6 อันเมื่อทำงานร่วมกับระบบกระจายความร้อนชนิด Thermo-Base จะทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ เสร็จในเวลาอันรวดเร็วไม่เกิน 40 นาที (384-multiwell plate) ตัวระบบกระจายความร้อน Thermo-Base จะช่วยทำให้อุณหภูมิความร้อนกระจายสม่ำเสมอมากกว่าเครื่องพีซีอาร์ทั่วไป

ตัวบล็อก ไชเคลอร์ สามารถเปลี่ยนได้ง่าย โดยการเปิดประตูด้านขวาของเครื่อง ตัวบล็อกไชเคลอร์และแผ่นฝาครอบจะถูกใส่ไว้ในกล่อง ดังนั้นหากต้องการเปลี่ยน สามารถทำได้ง่ายเพียงใช้เวลาไม่กี่นาที

ในการลดอุณหภูมิของเทอร์มอดบล็อกไชเคลอร์ ในขณะที่งานจะอาศัยพัดลมประสิทธิภาพสูง 2 ตัว ที่อยู่ด้านข้างขวาของเครื่อง โดยจะนำพาอากาศผ่านเข้าเครื่องและส่งออกไ้ทางด้านหลังขวาของตัวเครื่อง

B

เมื่อ เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ ได้ทำการติดตั้งเข้าไปในเครื่องแล้ว ผู้ใช้งานจะเพียงแค่ทำการใส่เพลทปฏิกิริยาเข้า และนำออก เมื่อต้องการเท่านั้น ด้วยการกดปุ่มหน้าเครื่อง เพลทที่ใช้กับเครื่องในการตรวจวัดสัญญาณ จะเป็นเพลทชนิดสีขาวขึ้น และควรเลือกชนิดจำนวนหลุมเพลทให้ถูกต้องกับชนิดของบล็อก ไซเคิลอร์



หากใช้เพลทชนิดใสต้องการทำการปิดเซนเซอร์ ด้วยการเลือกฟังก์ชัน *Clear Plates* ในโปรแกรมก่อนเริ่มการทำงาน

ยิ่งไปกว่านั้น ระบบอ่านรหัสบาร์โค้ดของมัลติเวลเพลท จะทำการจำแนกข้อมูลชื่อเพลทได้อย่างอัตโนมัติแล้วส่งข้อมูลไปยังโปรแกรมของเครื่อง LightCycler® 480 เพลทปฏิกิริยาจะถูกปรับให้หลุมแต่ละหลุมตรงกับแท่นรองเพลทของเครื่อง และระบบตรวจวัดสัญญาณก็จะปรับให้ช่องหลุมปฏิกิริยาผ่านแผ่นฝาครอบบล็อกออกมาได้ตรงแม่นยำ ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้มีความถูกต้องสูง

เครื่อง LightCycler® 480 สามารถเชื่อมต่อกับระบบ LIMS ผ่านจุดเชื่อมต่อ ซึ่งจะทำได้ทั้งการควบคุมการใส่เพลทเข้าและออกจากเครื่องได้แบบอัตโนมัติ และยังสามารถใช้ฟังก์ชันมาโครได้ ทำให้สถานะการทดลอง การอ่านรหัสบาร์โค้ดของเพลท หรือผลการทดลองต่างๆสามารถดูผ่านระบบ LIMS ได้

เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ทั้งสองรุ่น มีแยกขายเป็นอะไหล่โดยจะมาพร้อมแผ่นฝาครอบบล็อก

LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit (96-well) Silver	Cat. No. 05 015 219 001
LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit (384-well) Silver	Cat. No. 05 015 197 001

3.3 คำอธิบายของระบบการตรวจวัดสัญญาณ

ระบบตรวจวัดสัญญาณประกอบด้วย 2 ส่วนหลักดังนี้:

- ▶ ระบบตรวจวัดสัญญาณ ประกอบไปด้วยชุดเลนส์กรองแสงช่วงกระตุ้นแสงและช่วงรับแสง และมีช่องอ้างอิงที่ใช้ตรวจตามความเข้มแสงของแหล่งกำเนิดแสง และกระจกรับแสงให้กระจายไปยังมัลติเวลเพลท
- ▶ กล้องซีซีดี ที่ปรับสำหรับส่วนตรวจวัดสัญญาณ

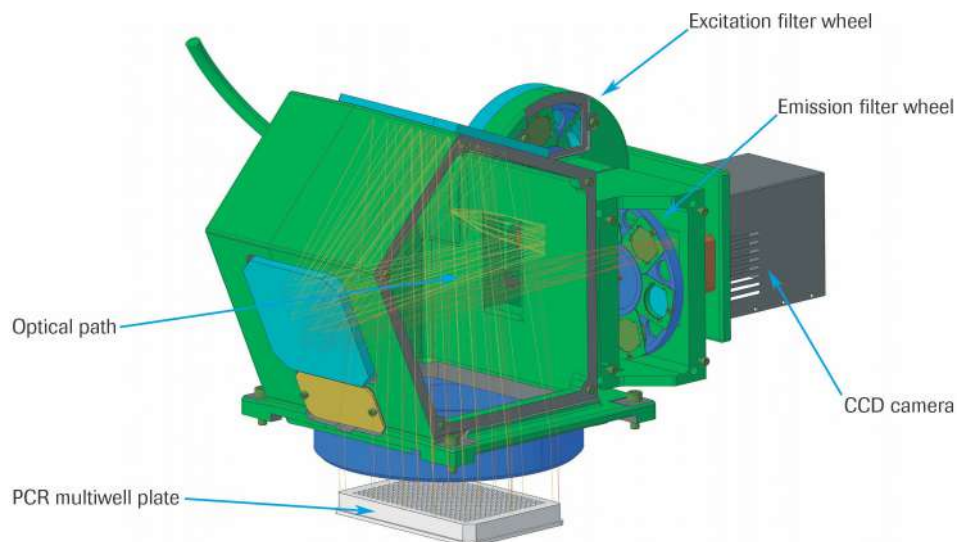


Figure 15 ภาพแสดงระบบตรวจวัดสัญญาณของ LightCycler® 480

เครื่อง LightCycler® 480 ใช้หลอดไฟซินอน หรือหลอดไฟแอลอีดีแสงขาว เป็นแหล่งกำเนิดแสงช่วงกระตุ้นแสง ซึ่งให้ความยาวคลื่นช่วงกว้างมากพอสำหรับการเลือกใช้ชนิดสีฟลูออเรสเซนส์ได้หลายชนิด

หลอดไฟซินอน

หลอดซินอนจะใช้เวลาประมาณ 2 นาทีในการทำให้เกิดภาวะเสถียร หลอดจะดับอัตโนมัติหากเครื่องไม่ทำงานเกิน 10 นาที การทำงานลักษณะนี้จะทำให้ไม่ต้องมีการอุ่นเครื่องบ่อยๆ หากต้องใช้งานต่อเนื่อง หลอดซินอนมีอายุการใช้งานอย่างน้อย 500 ชั่วโมง หากมีการใช้งานเครื่องไปมากกว่า 1000 ชั่วโมง อาจมีโอกาที่จะทำให้หลอดไฟระเบิด ดังนั้นเครื่องจะมีการเตือนให้มีการเปลี่ยนหลอดไฟ หากถึงกำหนด

ความเข้มแสงจะถูกวัดอัตโนมัติด้วยเครื่อง และจะแจ้งผู้ใช้เมื่อความเข้มแสงต่ำกว่ากำหนด เพื่อให้มั่นใจว่าการกระตุ้นสัญญาณได้ประสิทธิภาพสูงเสมอหลอดซินอนสามารถเปลี่ยนได้ด้วยผู้ใช้เองซึ่งรายละเอียดการเปลี่ยนสามารถดูได้ในส่วนการบำรุงรักษาเครื่อง

หลอดไฟแสงขาวชนิด แอลอีดี

หลอดไฟแสงขาว แอลอีดี มีช่วงกระตุ้นเช่นเดียวกันกับหลอดซินอน ซึ่งจะติดตั้งไว้ตรงกล่องความร้อน อายุการใช้งานเฉลี่ยอยู่ที่ >10,000 ชั่วโมง ดังนั้นไม่จำเป็นต้องทำการเปลี่ยนหลอด

แสงที่ออกมาจากหลอดซินอนจะผ่านไปที่ส่วนตรวจวัดสัญญาณผ่านส่วนนำแสง ซึ่งจะให้สัญญาณแสงได้สม่ำเสมอและเปลี่ยนเป็นรูปแบบที่เหมาะสมกับเพลทพีซีอาร์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นสฟลูออเรสเซนส์สามารถเลือกผ่านชุดกรองแสงได้ ซึ่งมีให้เลือกได้ 5 ช่องในวงล้อกรองแสง โดยวงล้อจะควบคุมด้วยมอเตอร์ที่นี้วงล้อมีทั้งหมด 6 ช่อง ช่องที่ 6 จะเป็นภาพมืดสำหรับการตัดสัญญาณแสง ซึ่งจะถูกบันทึกภาพมืดทุกครั้งที่มีการเปิดเครื่อง

สำหรับหลอดไฟแสงขาวแอลอีดี สัญญาณจะเข้าโดยตรงสู่ส่วนตรวจวัดสัญญาณ โดยไม่ต้องมีส่วนนำแสง

หลังจากที่ผ่านชุดกรองแสงช่วงกระตุ้นแสง สัญญาณแสงจะไปยังเพลทพีซีอาร์ผ่านเลนส์ขนาดใหญ่ ทำให้แสงกระจายไปถึงขอบเพลท ระบบเลนส์จะปรับลำแสง ทำให้ทุกหลุมปฏิกิริยาในเพลทได้แสงของแสงเหมือนกันที่ 2° ในขณะที่เดิวก่อนสัญญาณแสงที่ปล่อยออกมาจากสฟลูออโรฟอร์ที่ถูกกระตุ้นในปฏิกิริยา จะผ่านขึ้นสู่ระบบเลนส์แบบแนวตั้ง ทำให้มั่นใจได้ว่าจะไม่มีผลกระทบของเงาและไม่มีการบิดเบือนหรือการเปลี่ยนไปของสัญญาณ โดยเฉพาะหลุมที่อยู่บริเวณขอบเพลท เมื่อเทียบกับหลุมบริเวณกลางเพลท ทำให้สัญญาณแสงที่ได้รับสม่ำเสมอทั่วกันทั้งเพลท ยิ่งกว่านั้น ยังมีระบบการแก้ไขตัดสัญญาณให้ถูกต้องด้วยระบบการตรวจวัดสัญญาณเพิ่มเติมในโปรแกรมเพื่อความถูกต้องและความไวสัญญาณสูง

สัญญาณแสงที่เปล่งออกมาจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะเข้าสู่ระบบเลนส์แล้วไปยังชุดกรองแสงชนิดรับแสง สัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะถูกเก็บโดยกล้องซีซีดี ที่ความละเอียดสูง 1024×1344 พิกเซล และส่วนชิปบันทึกข้อมูลกล้อง จะถูกควบคุมอุณหภูมิให้ไม่มีความร้อนมากระทบต่อกล้อง เพื่อลดสัญญาณรบกวน ระยะเวลาในการจับสัญญาณสามารถเลือกได้เป็นแบบไดนามิกส์ หรือ แมนนวล ซึ่งควบคุมโดยโปรแกรมการใช้งานเครื่อง ก่อนที่สัญญาณจะถูกส่งไปยังโปรแกรมการวิเคราะห์ จะมีการปรับสัญญาณข้อมูลเพื่อให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้นด้วย

ในขณะที่สัญญาณฟลูออเรสเซนส์เปล่งออกมาจากเพลทพีซีอาร์ ช่องสัญญาณอ้างอิงจะมีการวัดความเข้มของแหล่งกำเนิดแสง เพื่อนำมาชดเชยการผันผวนของสัญญาณ การวัดนี้จะทำให้ค่าความเหี่ยของสัญญาณต่ำ เมื่อทำการทดสอบภายในครั้งเดียวกัน หรือคนละครั้งกันก็ตาม



เนื่องจากชุดกรองแสงทั้งช่วงกระตุ้นและช่วงรับอยู่ในวงล้อ จึงทำให้การวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์พร้อมกันหลายสีไม่สามารถทำได้เลยทันที ต้องทำการวัดสัญญาณทีละสี โดยใช้เวลาในการเปลี่ยนชุดกรองแสงประมาณ 0.65 วินาที การเลือกชุดกรองแสงช่วงกระตุ้นแสง และช่วงรับแสง ก็ต้องทำการกำหนดไว้ก่อนเริ่มการทำงานเพราะการผสมชุดกรองแสงทั้งสองช่วงนั้น จะต้องทำตามความเหมาะสมความสามารถของเครื่อง

3.4 คำอธิบายของช่องตรวจรับสัญญาณ

หัวช่องตัวกรองชนิดกระตุ้นแสง และหัวช่องตัวกรองชนิดรับแสงสัญญาณ สามารถเลือกเข้าคู่กันเพื่อที่จะได้ช่วงกระตุ้นแสงและช่วงรับแสงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เหมาะสมได้

การจับคู่ตัวกรองชนิดกระตุ้นแสงและชนิดรับแสง สามารถนำไปใช้ได้กับการตรวจรับสัญญาณแบบสีเดียวหรือหลายสีก็ได้ ซึ่งสามารถกำหนดด้วยโปรแกรม LightCycler® 480 (เช่น “Multi Color HybProbe” ทำการตรวจวัดสัญญาณสี Red 610, Red 640 และ Cy5)



เครื่อง LightCycler® 480 สามารถตรวจวัดสัญญาณสีมากกว่า 1 สีพร้อมกันได้ซึ่งช่องสัญญาณที่จะเลือกใช้นั้นขึ้นอยู่กับฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ในกรณีที่เป็นการตรวจวัดสัญญาณจากหลายสี สัญญาณที่ได้อาจแทรกเข้าช่องสัญญาณเดียวกันได้ ซึ่งเรียกว่าเกิดสัญญาณข้ามช่อง จึงจำเป็นต้องทำการตัดสัญญาณข้ามช่องออกด้วยเทคนิคการทำ “Color Compensation”



สำหรับงานที่ใช้หลายสีด้วยสปีประเภท Hydrolysis Probe จะแนะนำให้ทำการติดสปีบั้งพลังงาน quencher ซึ่งเป็นสปีฟลูออเรสเซนซ์ที่บั้งพลังงานสีรายงานไว้ก่อนการเกิดปฏิกิริยา รายละเอียดเพิ่มเติมสามารถดูข้อมูลได้ที่หัวข้อการติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วย hydrolysis Probes

3.4.1 ระบบชุดกรองแสง LightCycler® 480 Instrument I

ตารางแสดงการจับคู่กันของชุดกรองแสงชนิดช่วงกระตุ้นและช่วงรับแสง ที่แนะนำสำหรับสปีฟลูออเรสเซนซ์ในงานประเภทต่างๆ กับเครื่อง LightCycler 480 I:

ชนิดสี	ช่วงกระตุ้น	ช่วงรับแสง	รูปแบบของการวัดสัญญาณ
LightCycler® Cyan 500	450	500	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน)
SYBR Green I	483	533	SYBR Green I
Fluorescein (Fluos / FAM)	483	533	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน) HybProbe Probes (ตัวให้สัญญาณ) SimpleProbe Probes
VIC / HEX / Yellow555 / Joe	523	568	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน) HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)
LightCycler® Red 610	558 483	610 610	Hvdrolvsis Probes (ตัวรายงาน) HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)
LightCycler® Red 640	483	640	HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)
Cy5	615 483	670 670	Hvdrolvsis Probes (ตัวรายงาน) HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)



จากตารางด้านบน สีในตารางสามารถใช้ได้กับช่วงคลื่นกระตุ้นแสงและช่วงคลื่นรับแสงด้วยเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I

3.4.2 ระบบชุดกรองแสง LightCycler® 480 Instrument II

ตารางแสดงการจับคู่กันของชุดกรองแสงชนิดช่วงกระตุ้นและช่วงรับแสง ที่
แนะนำสำหรับสียฟลูออเรสเซนส์ในงานประเภทต่างๆ กับเครื่อง LightCycler 480 II:

ชนิดสี	ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง	รูปแบบการวัดสัญญาณ
LightCycler® Cyan 500	440	488	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน)
SYBR Green I	465	510	SYBR Green I
Fluorescein (Fluos / FAM)	465	510	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน) HybProbe Probes (ตัวให้สัญญาณ) SimpleProbe Probes
	498	580	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน, ใช้ ร่วมกับสี Cyan 500)
VIC / HEX / Yellow555 / Joe	533	580	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน)
LightCycler® Red 610	533	610	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน)
	498	610	HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)
LightCycler® Red 640	498	640	HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)
Cy5 / Cy 5.5	618	660	Hydrolysis Probes (ตัวรายงาน)
	498	660	HybProbe Probes (ตัวรับสัญญาณ)



จากตารางด้านบน สีในตารางสามารถใช้ได้กับช่วงคลื่นกระตุ้นแสงและช่วงคลื่นรับแสงด้วยเครื่อง
LightCycler® 480 Instrument II

3.5 อุปกรณ์ใช้ครั้งเดียวของเครื่อง LightCycler® 480

ชนิดของพีซีอาร์ มัลติเวลเพลทที่ออกแบบมาสำหรับเครื่อง LightCycler® 480 ได้แก่ชนิด:

- ▶ LightCycler® 480 Multiwell Plates 96/384, สีใส
- ▶ LightCycler® 480 Multiwell Plates 96/384, สีขาวขุ่น

รูปทรงและวัสดุของเพลทจะถูกออกแบบมาให้เหมาะสมกับการถ่ายเทความร้อนและดีที่สุดสำหรับการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะพีซีอาร์ ในเวลาอันรวดเร็ว ชนิดของเพลทนี้จะไม่เกิดการเรืองแสงทำให้ลดสัญญาณรบกวนในปฏิกิริยาไปได้ เพลทจะมาพร้อมกับแผ่นฟอยล์สำหรับปิดเพลท ซึ่งต้องใช้ร่วมกันเสมอ

❗ ใช้เพลทชนิดที่แนะนำให้ใช้กับเครื่อง *LightCycler® 480* เท่านั้น เนื่องจากตัวบล็อก โซเคลอร์ ถูกออกแบบมาให้ตรวจวัดสัญญาณจากเพลทชนิดสีขาวขุ่น หากต้องการใช้เพลทสีใส ให้ทำการปิดระบบเซนเซอร์เครื่องด้วยการเลือก *clear plate option* แทนในการใช้งานโปรแกรมควบคุมการทำงานก่อนเริ่มการทำงาน

❗ รูปแบบการวัดสัญญาณที่แนะนำสำหรับเพลทสีใสคือ *hydrolysis probes and SYBR Green I*.

🔍 มัลติเวลเพลททุกชนิด จะมีปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่มตามด้านยาวของเพลท สำหรับไว้ให้เครื่องจับเพลทอัตโนมัติตรวจจับได้

🔍 มัลติเวลเพลทจะมีแถบรหัสบาร์โค้ด (*Code 128, 8 characters*) ด้านข้างของเพลทตำแหน่งแถว A ซึ่งจะจำแนกชื่อเพลทได้ด้วยเครื่องอ่านรหัสบาร์โค้ด



Figure 16 LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 สีขาวขุ่น (ซ้าย) และ สีใส (ขวา)



Figure 17 LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 สีขาวขุ่น (ซ้าย) และ สีใส (ขวา)



ก่อนทำการใส่เพลทเข้าเครื่อง ให้แน่ใจว่าได้ทำการปิดแผ่นฟอยล์ที่แนะนำเรียบร้อยแล้ว (*LightCycler480 Sealing Foil*) การปิดแผ่นฟอยล์นี้สำคัญมากที่จะช่วยให้ไม่เกิดการระเหยของน้ำยาในปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง นอกจากนั้นแผ่นฟอยล์ชนิดนี้ได้ผ่านการทำลายเอนไซม์ชนิด *DNase* และ *RNase* ในกระบวนการผลิต และก่อนนำเพลทเข้าเครื่องควรทำการปั่นเหวี่ยงเพลทเพื่อให้ น้ำยาหลงสู่กันหลุมเพลทเสมอ



Figure 18 LightCycler 480 Sealing Foil

นอกจากนั้นเครื่องมีถาดสำหรับรองรับแถบหลอดชนิด 8-Tube Strip ซึ่งแนะนำให้ใช้หากต้องการใช้แถบหลอดประเภทนี้ ตัวถาดสำหรับรองรับแถบหลอดสามารถใช้ได้กับเครื่อง LightCycler 480 ทั้งสองรุ่น แต่เป็นระบบ 96-well เท่านั้น

- ▶ LightCycler® 8-Tube Strips (ขาวขุ่น) (Cat. No. 06 612 601 001)
- ▶ LightCycler® 8-Tube Strips (สีใส) (Cat. No. 06 327 672 001)



Figure 19 LightCycler® 8-Tube Strip Adapter Plate (Cat. No. 06612598001)

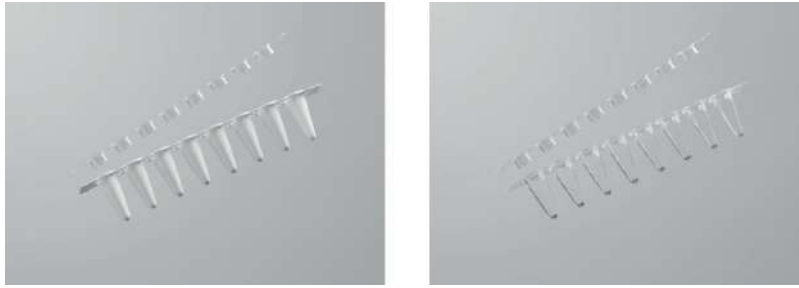


Figure 20 LightCycler® 8-Tube Strips (สีขาวขุ่นและสีใส)

-  ปิดฝาแถบหลอดให้สนิทด้วยการกดฝาปิดให้แน่น เพื่อป้องกันการระเหยของปฏิกิริยาในหลอดทดลอง และควรวางแถบหลอดให้สมมาตรบนถาดรอง เนื่องจากหากวางไม่สมมาตรฝาปิดบล็อกไซเคิลอร์จะมีแรงกดไม่เท่ากันทำให้เครื่องเกิดความเสียหายได้
-  ต้องทำการปั่นเหวี่ยงแถบหลอดที่ปิดฝาแล้วเสมอก่อนใส่เข้าเครื่อง และให้มั่นใจว่าสวมถุงมือทุกครั้งที่ใช้ปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและรอยนิ้วมือบนฝาหลอด ซึ่งจะส่งผลต่อการทดสอบที่ผิดปกติได้
-  ทั้ง LightCycler® 480 มัลติเวลเพลทและ LightCycler® 8-Tube Strips ถูกออกแบบมาให้ใช้ครั้งเดียว ห้ามใช้ซ้ำเนื่องจากจะส่งผลให้การทดสอบไม่น่าเชื่อถือ
-  การใช้แถบหลอดประเภทอื่น ที่ไม่ได้แนะนำจะนำไปสู่การทำให้เครื่องเสียหายได้ และลดอายุการใช้งานของเทอร์โมล บล็อก

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	50 plates with 50 sealing foils	Cat. No. 04 729 692 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	50 plates with 50 sealing foils	Cat. No. 04 729 749 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, clear	50 plates with 50 sealing foils	Cat. No. 05 102 413 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, clear	50 plates with 50 sealing foils	Cat. No. 05 102 430 001
LightCycler® 480 Sealing Foil	1 × 50 foils	Cat. No. 04 729 757 001
LightCycler® 8-Tube Strip Adapter Plate	1 piece, adapter plate The adapter plate can be used multiple times	Cat. No. 06 612 598 001
LightCycler® 8-Tube Strips (clear)	10 x 12 clear strips and caps	Cat. No. 06 327 672 001
LightCycler® 8-Tube Strips (white)	10 x 12 white strips and clear caps	Cat. No. 06 612 601 001

3.6 ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ LightCycler® 480

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมให้สภาพจริงนี้จะมีกรอบแบบน้ำยาทั่วไปที่สามารถนำไปใช้ได้กับทุกปฏิกิริยาในงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่อง LightCycler 480 ไม่ว่าจะเป็นการจำแนกสารพันธุกรรม การหาปริมาณสารพันธุกรรม การตรวจเงินไทป์ น้ำยาส่วนผสมนี้จะถูกออกแบบให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ทำให้ปฏิกิริยาเสร็จสิ้นในเวลาอันรวดเร็ว และรองรับกับสปีฟลูออเรสเซนซ์ชนิดต่างๆ ดังนั้นแนะนำให้ใช้น้ำยาส่วนผสมสำเร็จรูปจากบริษัทที่พัฒนามาให้ใช้คู่กับเครื่องเสมอ และไม่ควรใช้น้ำยาส่วนผสมสำเร็จรูปข้ามรุ่นกัน นั่นคือไม่ควรใช้น้ำยา LightCycler 480 กับเครื่อง LightCycler 2.0/1.5

การเลือกใช้อินไซม์และสารละลายบัฟเฟอร์ควรเลือกให้เหมาะกับงานด้านต่างๆ ดังนี้

- ▶ LightCycler® EvoScript RNA SYBR® Green I Master เหมาะกับงาน one-step RT-qPCR ที่ต้องการความไว ความจำเพาะสูง เช่นงานการตรวจการแสดงออกของยีน
- ▶ LightCycler® EvoScript RNA Probes Master เหมาะสำหรับงาน one-step RT-qPCR ที่ต้องการความไวความจำเพาะสูง และใช้สัณฐาน Hydrolysis Probes กับงานการตรวจการแสดงออกของยีน
- ▶ LightCycler® Multiplex RNA Virus Master ใช้กับงาน one-step RT-qPCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอของไวรัสหลายๆชนิดพร้อมกัน และมีตัวควบคุมภายในระบบ
- ▶ RealTime ready RNA Virus Master ใช้ในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอไวรัสที่ต้องการความไว ความจำเพาะสูง
- ▶ LightCycler® Multiplex DNA Master ใช้กับงานการหาปริมาณสารพันธุกรรมหลายเป้าหมายพร้อมกัน ซึ่งใช้ได้กับเครื่องทั้งรุ่น LightCycler® 480 หรือรุ่น LightCycler® 96
- ▶ LightCycler® 480 High Resolution Melting Master ใช้กับงานการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่จำเพาะด้วยเทคนิค HRM โดยมาพร้อมกับสัณฐาน Resolight
- ▶ LightCycler® 480 SYBR Green I Master ใช้กับงานที่ต้องการลดการเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง
- ▶ LightCycler® 480 Probes Master เหมาะกับการใช้สัณฐาน Hydrolysis Probe และการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ น้ำยาจะต้องใช้กับการทำงานลักษณะ hot-start PCR assays ในงานการหาปริมาณสารพันธุกรรมและการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง
- ▶ LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes ใช้กับปฏิกิริยาแบบ hot-start ในงาน one-step RT-PCR และใช้ร่วมกับสัณฐาน hydrolysis probes ในรูปแบบการวัดสัญญาณ
- ▶ LightCycler® 480 Genotyping Master เหมาะกับงานการวิเคราะห์ Melting Curve ด้วยสัณฐาน HybProbe หรือ SimpleProbe probes.
- ▶ RNA Process Control Kit ใช้ในการติดตามกระบวนการทำงานตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสจากสิ่งส่งตรวจด้วยขั้นตอนการทำ RT-qPCR.
- ▶ DNA Process Control Kit ใช้สำหรับการติดตามกระบวนการทำงานการตรวจหาสารพันธุกรรมจากเชื้อก่อโรคในสิ่งส่งตรวจด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

น้ำยาสำเร็จรูปนี้ถูกออกแบบมาให้พร้อมใช้ ผู้ใช้เพียงแค่นำสารพันธุกรรมเริ่มต้น ไพรเมอร์และโพรบ ลงไปในปฏิกิริยา (ยกเว้นการใช้ SYBR Green I หรือ ResoLight ไม่ต้องใช้โพรบ) สารพันธุกรรมเริ่มต้นสามารถเป็น ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ หรือ cDNA ก็ได้ นอกจากนั้นชุดน้ำยา LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes เหมาะกับการใช้งานกับตัวอย่างคราวละมากๆ อีกทั้งน้ำยาทุกตัวสามารถเสถียรได้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อเหมาะกับการใช้งานร่วมกับระบบเครื่องใส่น้ำยาอัตโนมัติในงานที่ตรวจคราวละมากๆ

น้ำยาแต่ละชนิดจะทำการปรับค่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มาให้พร้อมใช้ ซึ่งเหมาะกับทุกสภาพความเข้มข้นของไพรเมอร์ ไม่จำเป็นต้องปรับเพิ่ม ยกเว้นน้ำยา LightCycler® 480 High Resolution Melting Master ซึ่งจะมีหลอด $MgCl_2$ แยกมาให้ต่างหากสำหรับการปรับเพิ่ม

ส่วนผสมน้ำยาสำเร็จรูปของ LightCycler® 480 จะมีเอนไซม์ที่ต้องใช้ร่วมกับวิธี hot-start จึงทำให้ผลการทดสอบมีความไว ความจำเพาะสูง ทั้งยังได้ปริมาณสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะไม่ทำงานที่อุณหภูมิต่ำกว่า $+75^{\circ}C$ ดังนั้นการเกิดการจับกันเองแล้วต่อสายของไพรเมอร์จะไม่เกิดขึ้น รวมทั้งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ไม่จำเพาะก็จะไม่เกิดด้วย การทำงานของเอนไซม์จะเริ่มเมื่อเครื่องเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปสูงถึง $+95^{\circ}C$ ซึ่งจะเป็นการไปกำจัดตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออกจากเอนไซม์

ทุกน้ำยาสำเร็จรูปของ LightCycler® 480 จะมีสาร dNTP ผสมอยู่ และใช้ UTP แทน dTTP ดังนั้นสามารถประยุกต์ใช้เอนไซม์ชนิด Uracil-DNA N-Glycosylase (UNG) สำหรับการกำจัดกาปนเปื้อนจากการทำปฏิกิริยาครั้งก่อนหน้าได้

3.7 รายการอุปกรณ์เพิ่มเติม

รายการอุปกรณ์เพิ่มเติมที่ต้องการสำหรับการใช้งานการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงด้วยเครื่อง LightCycler® 480 System

- ▶ เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับเพลทพร้อมอุปกรณ์ถ่วงสมดุลน้ำหนัก
- ▶ ทิปชนิดมีตัวกรอง และไม่มีเอนไซม์ nuclease ปนเปื้อน
- ▶ ปิเปต
- ▶ หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว สำหรับการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.8 รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง LightCycler® 480

3.8.1 ภาพรวม

เครื่อง LightCycler® 480 ใช้สียฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในระหว่างการทำปฏิกิริยาและหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเช่นในการวิเคราะห์ Melting Curve ทั้งนี้ปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะแปรผันตรงกับปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น จึงเหมาะที่จะนำข้อมูลคำนวณหาสารพันธุกรรมเริ่มต้นในปฏิกิริยา ซึ่งการใช้สียจะสามารถใช้ได้ทั้งกรณีจำเพาะและไม่จำเพาะต่อลำดับสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ เป้าหมายสำหรับสัญญาณสียฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดหลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยการหาค่า Melting Curve นั้นจะใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะจำเพาะผลิตภัณฑ์ หรือวิเคราะห์จีโนไทป์ เนื่องจากเครื่อง LightCycler® 480 สามารถรองรับสียได้หลายรูปแบบในการวิเคราะห์ประเภทต่างๆ อีกทั้งชุดกรองแสงยังกว้างครอบคลุมสัญญาณสียฟลูออเรสเซนซ์หลายชนิด

► รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณแบบไม่จำเพาะต่อ

ลำดับเบสดีเอ็นเอ เป้าหมาย

เป็นสียฟลูออเรสเซนซ์ที่จับได้กับดีเอ็นเอ สายคู่ทุกชนิด โดยไม่จำเพาะต่อลำดับเบส ได้แก่ SYBR Green I

► รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณแบบจำเพาะต่อลำดับ

เบสดีเอ็นเอเป้าหมาย

เป็นสียที่ติดอยู่กับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อลำดับเบสดีเอ็นเอเป้าหมาย เช่น

- Single-labeled probes (SimpleProbe chemistry)
- Hybridization probes (HybProbe chemistry)
- Hydrolysis probes (5'-nuclease assay)



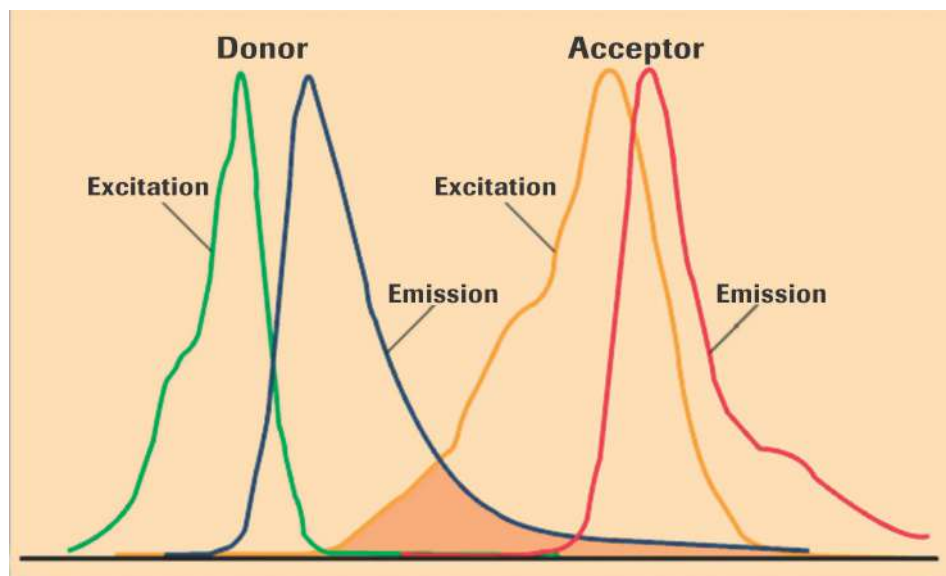
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณอื่นๆ สามารถใช้ร่วมกับเครื่อง LightCycler® 480 เช่นกัน เช่น *Bi-Probes (iFRET-Probes)* *Molecular Beacons* และ *Scorpions* อย่างไรก็ตาม สียฟลูออเรสเซนซ์ที่นำมาใช้ควรจะต้องเหมาะสมกับระบบการรองรับแสงของเครื่อง

LightCycler® 480

HybProbe และ Hydrolysis Probe จะอาศัยการถ่ายเทพลังงานจากสารฟลูออเรสเซนต์ตัวให้ไปยังสารฟลูออเรสเซนต์ตัวรับที่อยู่ติดกัน (FRET)

ด้านล่างอธิบายสภาวะสำหรับการเกิด FRET:

- ▶ โมเลกุลตัวให้และตัวรับพลังงานต้องอยู่ใกล้กัน
- ▶ คลื่นความถี่ของช่วงกระตุ้นสำหรับตัวรับพลังงานจะต้องซ้อนทับกับคลื่นความถี่ของการปล่อยพลังงานจากตัวให้
- ▶ ขั้วพันธะของตัวให้และตัวรับพลังงานควรจะชนกัน



สีของตัวให้พลังงานจะถูกกระตุ้นด้วยช่วงกรองแสงในเครื่อง LightCycler® 480 ซึ่งต้องกำหนดให้ความยาวคลื่นช่วงกระตุ้นเหมาะสมกับสี (เช่น 483 nm สำหรับฟลูออเรสซิน) ความยาวคลื่นช่วงกระตุ้นนี้จะทำให้โมเลกุลอิเล็กตรอนของตัวให้เปลี่ยนสถานะพลังงานไปในระดับที่สูงขึ้นและไม่เสถียร จากนั้นพลังงานจะถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อให้เสถียร ดังนี้

- ▶ ปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวกว่าเดิม
- ▶ ถ่ายพลังงานให้กับตัวรับพลังงาน (เช่น LightCycler® Red 640) เมื่อถูกถ่ายเทพลังงานไปแล้วอิเล็กตรอนจะกลับสู่สภาวะปกติ ซึ่งการถ่ายเทพลังงานให้กับตัวรับ ตัวให้เองก็จะไม่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้อีก

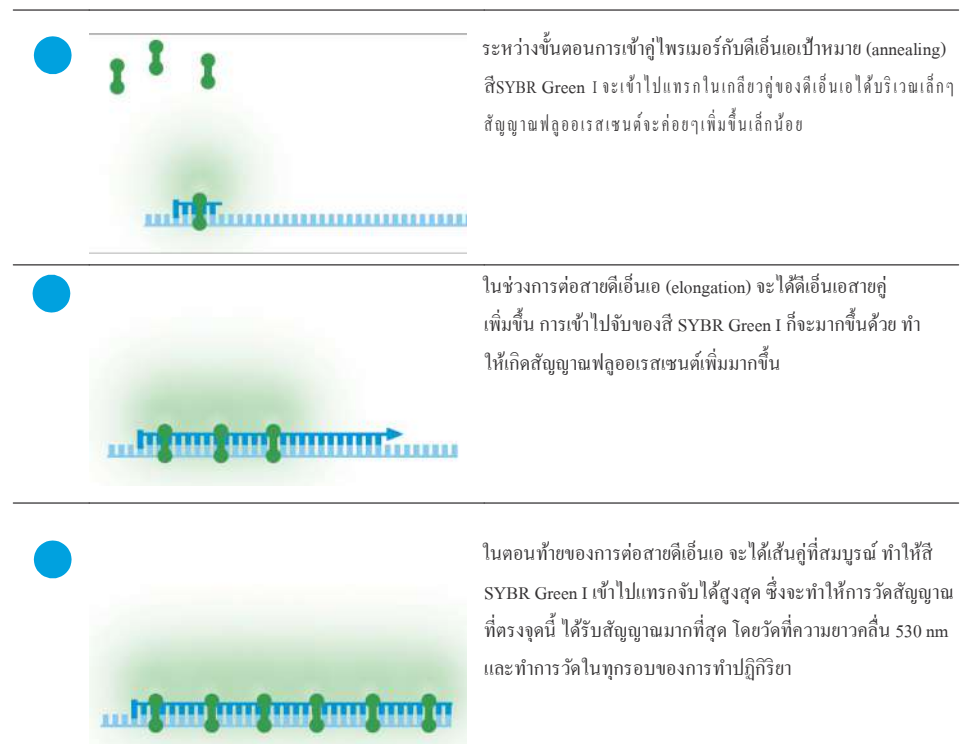
กระบวนการถ่ายเทพลังงาน FRET สามารถเกิดได้หลายรูปแบบ สำหรับ Hydrolysis Probe จะอาศัยหลักการดับพลังงานแสงฟลูออเรสเซนต์ของตัวให้ ตัวรับจะทำหน้าที่เป็น quencher ส่วน HybProbe จะใช้หลักการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของตัวรับพลังงานแทน

B

3.8.2 การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสี SYBR Green I

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้ด้วยสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ชนิด SYBR Green I ซึ่งสีจะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ ส่วนโมเลกุลสีที่จับไม่ได้กับเกลียวดีเอ็นเอจะมีอยู่น้อยมาก การแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอเกลียวคู่จะทำให้รูปร่างของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปยังผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น 100 เท่า (การวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 530 nm) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากสี SYBR Green I จะแปรผันตรงกับจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา เนื่องจากสี SYBR Green I มีความเสถียรสูงจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอแบบหาปริมาณ

ขั้นตอนพื้นฐานในการตรวจวัดสัญญาณสี SYBR Green I



เนื่องจากสี SYBR Green I สามารถจับได้กับดีเอ็นเอสายคู่ทุกชนิด ดังนั้นหากมีดีเอ็นเอสายคู่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ไม่ได้มาจากดีเอ็นเอเป้าหมาย ก็จะสามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ แม้กระทั่งการจับกันเองของไพรเมอร์ก็สามารถพบสัญญาณ ซึ่งทำให้ผลการวัดปริมาณสารพันธุกรรมในปฏิกิริยาเกิดความไม่จริงใจได้

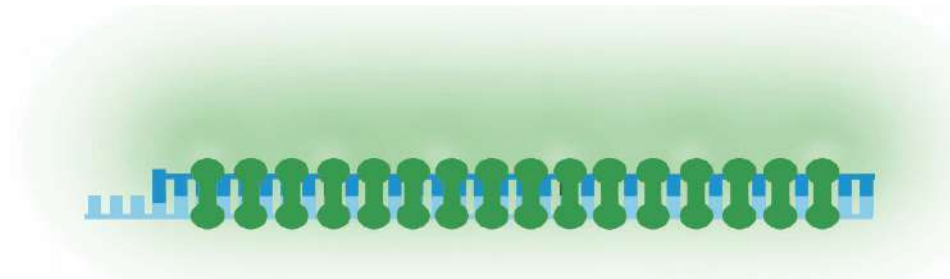
เพื่อให้แน่ใจว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นของดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างแท้จริง การวิเคราะห์หาค่าจำเพาะชนิด T_m จึงจำเป็น โดยการใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ Melting Curve ซึ่งค่าความจำเพาะนี้เป็นการวัดอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวครึ่งหนึ่ง และค่านี้จำเพาะไปในแต่ละชนิดของดีเอ็นเอ โดยที่ค่านี้จะขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ GC และความยาวสายของดีเอ็นเอ

เครื่อง LightCycler® 480 จะค่อยๆ ทำอุณหภูมิให้สูงขึ้น พร้อมกับทำการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากสี SYBR Green I เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดีเอ็นเอสายคู่จะแยกออก ทำให้สัญญาณค่อยๆ ลดลงจากการที่โมเลกุลสีหลุดออก เมื่อถึงจุดจำเพาะ T_m ของชิ้นดีเอ็นเอนั้น จะทำให้สัญญาณลดลงแบบทันที การติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ตรงส่วนนี้ก็จะถูกนำมาคำนวณพล็อตกราฟด้วยสมการ (dF/dT) เพื่อให้ได้ค่าสูงสุดของยอดกราฟ (melting peak) ซึ่งบ่งบอกถึงค่า T_m ของผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอนั้น

หากมีสารพันธุกรรมชนิดเดียวในปฏิกิริยา การวิเคราะห์ Melting Curve จะได้ค่า T_m 1 ค่า แต่ถ้ามีการเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ หรือสารพันธุกรรมที่ไม่จำเพาะต่อเป้าหมาย จะมีค่านี้ได้มากกว่า 1 ค่า การตรวจเช็คค่า T_m ของสารพันธุกรรมนี้สามารถจำแนกสารพันธุกรรมที่มีขนาดความยาวต่างกันได้ โดยอ้างอิงการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส

3.8.3 การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสี LightCycler® 480 ResoLight

สี LightCycler® 480 ResoLight Dye เป็นสีกลุ่มใหม่ที่มีความอึดตัว สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ชนิด heteroduplex ได้ดี โดยปกติสีกลุ่มนี้ไม่ว่าจะเป็นสี SYBR Green I หรือ สี ResoLight จะไม่เป็นพิษต่อเอนไซม์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นสูงของสี จะไม่มีผลต่อปฏิกิริยา แต่จะช่วยให้เกิดการอึดตัวสมบูรณ์ (วัดสัญญาณด้วยช่องวัดสัญญาณ SYBR Green I)



การใช้สีประเภท HRM แนะนำเป็นอย่างยิ่งกับงานที่ต้องการหาค่า melting curve จากสารพันธุกรรมดีเอ็นเอสายคู่ เนื่องจากสามารถทำการวัดปริมาณสารพันธุกรรมควบคู่ไปกับการวิเคราะห์อุณหภูมิได้ ในงาน HRM เมื่อสายดีเอ็นเอแยกออกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวในระหว่างการทำการกระบวนการเพิ่มอุณหภูมินี้ การที่โมเลกุลสีที่หลุดออกจากสายดีเอ็นเอแล้วจะกลับเข้าไปแทรกอีก มีโอกาสน้อยมาก ดังนั้นความสม่ำเสมอของสัญญาณจะดีมาก จะได้กราฟค่าอุณหภูมิ T_m ที่คมชัดมาก ได้ผลการทดสอบที่คงที่ตลอด

B

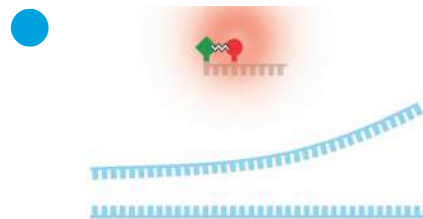
3.8.4 การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธี Hydrolysis Probes

Hydrolysis probe เรียกอีกชื่อว่า 5'-nuclease assays เนื่องจากโพรบทางปลาย 3' ถูกติดฟอสเฟต จึงจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทางด้านปลาย 5' ระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ โพรบนี้จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ โดยโพรบจะติดสีฟลูออเรสเซนซ์ 2 ชนิดคือ ตัวรายงานและตัวดับสัญญาณไว้ใกล้ๆกัน ปกติตัวรายงานจะไม่เปล่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เนื่องจากถูกดับไว้ (FRET) ระหว่างปฏิกิริยาพีซีอาร์ เอนไซม์ต่อสายดีเอ็นเอจะใช้ฟังก์ชัน 5'-nuclease ในการย่อยสลายโพรบ ตัวรายงานจึงเป็นอิสระจากตัวดับ ทำให้สามารถเปล่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้

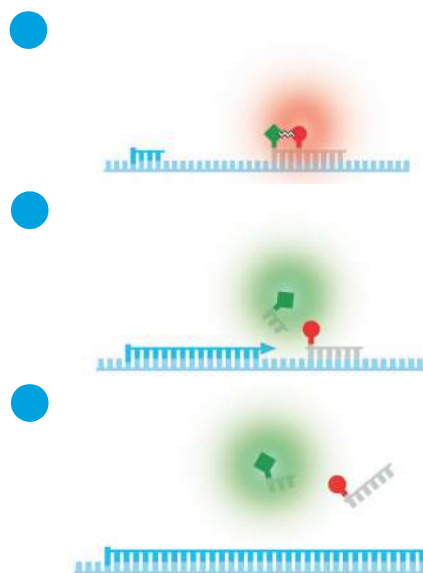
เครื่อง LightCycler® 480 สามารถตรวจวัดสัญญาณจากโพรบที่ติดสีรายงานได้หลายชนิดเช่น LightCycler® Cyan 500, FAM, HEX, LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, หรือ Cy5. และสามารถตรวจวัดสัญญาณแบบสีเดียวหรือหลายสีพร้อมกันได้



หากมีการใช้ *hydrolysis probe* แบบหลายสีพร้อมกันแนะนำให้ใช้ตัวดับสัญญาณเป็นชนิด *BHQ-2* (ช่วงคลื่น 550 – 650 nm) ในทางกลับกันการใช้สียับชนิด *DABCYL* (ช่วงคลื่น 380 – 530 nm) ควรใช้กับตัวรายงานชนิด *LightCycler® Cyan 500, FAM, or HEX*



Hydrolysis probe จะมีโมเลกุลสีฟลูออเรสเซนซ์ 2 ชนิดอยู่ใกล้ชิดกัน ซึ่งสีที่เป็นตัวดับจะกดสัญญาณสีตัวรายงาน ปลายด้าน 3' ของโพรบจะถูกเติมฟอสเฟต ดังนั้นจะไม่สามารถถูกต่อสายได้ขณะทำปฏิกิริยาพีซีอาร์



ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทั้งไพรเมอร์และโพรบจะเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ

เมื่อเอนไซม์ DNA polymerase ต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์มาชนกับโพรบ เอนไซม์จะใช้ความสามารถด้าน 5'-nuclease ในการย่อยโพรบออก ทำให้การต่อสายทำต่อไปได้

เมื่อโพรบถูกย่อย สีตัวรายงานจะไม่ถูกดับอีกต่อไป ทำให้ส่งสัญญาณไปยังช่องตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง LightCycler 480 ได้ การเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากโพรบนี้จะแปรผันตรงกับสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา เช่นเดียวกับวิธี SYBR Green I การตรวจวัดสัญญาณจะทำได้ในขั้นตอนนี้ Elongation



ในรูปแบบการใช้ *Hydrolysis Probe* จะไม่สามารถทำการวิเคราะห์ชนิด *Melting Curve* ได้เนื่องจากโพรบถูกย่อยไประหว่างปฏิกิริยาพีซีอาร์ หากต้องการทำการวิเคราะห์ชนิดตรวจหาจีโนไทป์ จะใช้เป็นการวิเคราะห์แบบ *EndPoint Genotyping* แทน



หากจะให้เกิดการย่อยโพรบที่สมบูรณ์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ควรเลือกใช้โพรบที่มีค่า *T_m* สูงกว่าไพรเมอร์เล็กน้อย เพื่อให้มั่นใจว่าโพรบได้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนที่ไพรเมอร์จะเข้ามาจับได้และทำการต่อสายดีเอ็นเอลำดับถัดไป



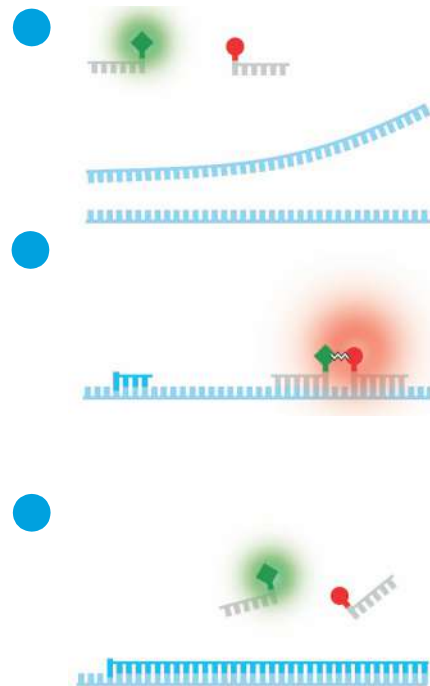
หลักการตั้งโปรแกรมพีซีอาร์ สำหรับโพรบประเภทนี้ ใช้โปรแกรมได้ทั้งแบบ 2-step และ 3-step ซึ่งควรใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ สูงกว่าปกติ เพื่อจะช่วยทำให้การจับกันของโพรบกับดีเอ็นเอเป้าหมายเสถียร ก่อนเกิดการย่อยโพรบในขั้นตอนการต่อสายดีเอ็นเอ นอกจากนั้น ควรกำหนดให้สายพันธุ์กรรมเป้าหมายยาวไม่เกิน 150 bp เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรมอย่างจำเพาะแล้ว และหากใช้โปรแกรม 2-step ให้กำหนดค่าอุณหภูมิ *annealing* และ *elongation* อยู่ที่ $+60^{\circ}$

3.8.5 การติดตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยสี HybProbe Probes

สำหรับรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณจากสี HybProbe จะมีการออกแบบโพรบที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 เส้น โดยที่แต่ละเส้นติดสีฟลูออเรสเซนต์ 2 ชนิดต่างกัน และออกแบบให้โพรบทั้งสองเส้นมาจับจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายแบบต่อกัน หัวต่อหาง เพื่อให้สีที่ติดอยู่กับโพรบทั้งสองเส้นอยู่ชิดกัน สีตัวแรกจะรับบทบาทเป็นผู้ให้ เช่นสีฟลูออเรสเซนต์ (ช่วงความยาวคลื่น 483 nm) ในขณะที่สีอีกตัวจะทำหน้าที่เป็นตัวรับ เช่นสี LightCycler® Red 640 โดยรับพลังงานจากสีตัวให้ที่ปล่อยออกมา เมื่อถูกกระตุ้นสีตัวรับจะเปล่งสัญญาณออกมาอีกความยาวคลื่น จำนวนของสัญญาณจากตัวรับจะแปรผันตรงกับปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์



เครื่อง LightCycler® 480 สามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากสีตัวรับได้หลายชนิดเช่น LightCycler® Red 610, LightCycler® Red 640, หรือ Cy5 และสามารถวัดสัญญาณสีเขียวหรือหลายสีพร้อมกัน ส่วนสีตัวให้พลังงานแนะนำเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ (FLUOS) อย่างไรก็ตามการใช้คู่สี FLUOS-HEX ไม่แนะนำเนื่องจากพลังงานแถบคลื่นสีทั้งสองใกล้เคียงกันเกินไป



จากรูปภาพ โพรบชนิดผู้ให้จะติดสีฟลูออเรสเซนต์ ที่ปลาย 3' ในขณะที่โพรบชนิดผู้รับจะติดสี LC Red ที่ปลาย 5' (ตัวผู้รับด้านปลาย 3' จะติดฟอสเฟต) ในขณะที่ควมชิดกันของผู้ให้และผู้รับสามารถสลับกันได้ ในขั้นตอนแรกของการทำพีซีอาร์ โพรบทั้งสองชนิดจะยังไม่เกิดสัญญาณใดๆ เนื่องจากอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะถ่ายเทพลังงานให้กันได้

ในขั้นตอน annealing โพรบทั้งสองชนิดจะมาอยู่ใกล้กันได้ด้วยความจำเพาะกับลำดับเบสในดีเอ็นเอเป้าหมาย ในลักษณะหัวต่อหาง ตัวผู้ให้จะรับพลังงานจากแหล่งกำเนิดแสงของเครื่อง แล้วจะปล่อยพลังงานไปกระตุ้นสีของผู้รับ ผู้รับจะถูกกระตุ้นสัญญาณและปล่อยพลังงานออกมาที่อีกความยาวคลื่นหนึ่ง ซึ่งขั้นนี้จะสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้สูงที่สุด

หลังจากขั้นตอน annealing อุณหภูมิจะสูงขึ้น เพื่อเข้าสู่กระบวนการต่อไป ทำให้โพรบทั้งสองชนิดแยกออกจาก ดีเอ็นเอ เป้าหมาย โพรบทั้งสองชนิดก็จะไม่สามารถถ่ายเทพลังงานให้กันได้อีกต่อไป ด้วยระยะที่ห่างเกินที่จะเกิดการถ่ายเทพะเภท FRET

การใช้รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณด้วย HybProbe เหมาะกับงานทั้งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างจำเพาะ และการตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดเบสเดียว (SNP detection) ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า T_m ของโพรบ จะทำให้โพรบทั้งชนิดผู้ให้และผู้รับมาอยู่ใกล้กัน ก่อให้เกิดการถ่ายเทพลังงานแบบ FRET และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงค่า T_m ของโพรบ การเกิดการถ่ายเทพลังงานจะสิ้นสุดลง อุณหภูมิที่ทำให้โพรบชนิดผู้รับแยกออก และสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์หยุดลง จะขึ้นกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย หากดีเอ็นเอเป้าหมายมีการกลายพันธุ์ชนิด SNP จะพบว่าอุณหภูมิที่แยกโพรบออกจะต่ำกว่ากรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายไม่มีการกลายพันธุ์เลย



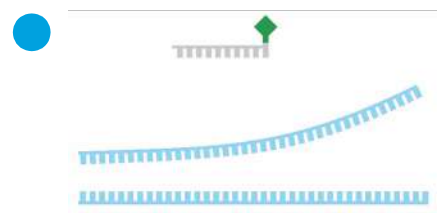
3.8.6 การวิเคราะห์หีนไทป์ด้วยสียชนิด SimpleProbe Probes

โพรบชนิด SimpleProbe เป็นลักษณะของโพรบที่อาศัยการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเช่นกัน แต่ต่างจากโพรบชนิด HybProbe คือเป็นโพรบเส้นเดียวคติดสฟลูออเรสเซนต์ หากโพรบชนิด SimpleProbe นี้ไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้ว จะทำให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้นหลายเท่าเมื่อเทียบกับสถานะที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย หากเป็นการตรวจวัดการกลายพันธุ์ชนิด SNP โพรบมักจะออกแบบให้สามารถจับได้กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีการกลายพันธุ์ไป ซึ่งหลักการการทำงานของโพรบลักษณะนี้จะไม่ใช้หลักการของการถ่ายเทพลังงาน FRET เลย

โดยปกติ โพรบชนิด SimpleProbe จะถูกออกแบบให้จับได้อย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มี การกลายพันธุ์ SNP เมื่อมีการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย สัญญาณฟลูออเรสเซนต์จะสูงกว่าการ ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย หลายเท่า ดังนั้นจึงนิยมที่จะใช้โพรบชนิดนี้ ไปวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอ ในลักษณะที่มี หรือไม่มี การกลายพันธุ์ หรือแบบลูกผสม เพราะสามารถทราบได้ภายในการตรวจวัดสัญญาณคราวเดียวกัน

โพรบชนิด SimpleProbe สามารถคติดสฟลูออเรสเซนต์ได้ทั้งที่ปลายด้าน 3' หรือ 5' หรือภายในสายของโพรบ ก็ได้ ในสถานะที่ยังไม่ได้จับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย สัญญาณฟลูออเรสเซนต์จะถูกควบงไว้ด้วยตัวควบงพลังงาน แต่เมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้ว สัญญาณของตัวควบงพลังงานจะลดลง ทำให้ตัวรายงานเปล่งแสงสัญญาณได้มากขึ้น แม้ว่าขณะที่โพรบที่ยังไม่ได้เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จะมีสัญญาณให้ตรวจวัดได้ แต่อยู่ในระดับต่ำๆ

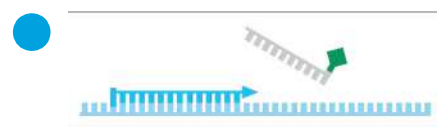
ในการศึกษา การกลายพันธุ์ประเภท SNP นั้น เครื่อง LightCycler® 480 สามารถติดตามพฤติกรรมเกิดการแยกจากสายดีเอ็นเอเป้าหมายของ SimpleProbe โดยวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ หากการจับกันของ SimpleProbe กับดีเอ็นเอเป้าหมายเสถียรมาก อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการแยกจากกันจะสูงกว่า กรณีที่ SimpleProbe จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีการกลายพันธุ์แบบ SNP เพราะการจับกับเป้าหมายที่กลายพันธุ์ไปนั้น จะมีความเสถียรต่ำกว่ามาก



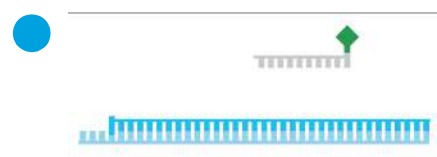
ในขั้นตอนการเกิด denaturation โพรบจะยังไม่เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จะอยู่ในระดับต่ำๆ ที่ 530 nm.



ในขั้นตอนการ annealing โพรบจะเข้าจับได้กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้ลดการควบงพลังงานลง และมีการเปล่งสัญญาณแสงที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง LightCycler 480 ดังนั้นขั้นตอนนี้จะได้รับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงสุด



ในขั้นตอนการ elongation โพรบจะถูกผลักรอกไปจากดีเอ็นเอเป้าหมาย



เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอน elongation ดีเอ็นเอเป้าหมายมีการต่อลำดับเบสจนครบสายพันธุกรรม ทำให้โพรบหลุดออกจากเป้าหมาย ซึ่งโพรบก็จะถูกควบงพลังงานอีกครั้ง

การปฏิบัติงาน

C

Chapter C • การปฏิบัติงาน

คำอธิบายขั้นตอนการปฏิบัติงานกับเครื่อง
LightCycler® 480

C	การปฏิบัติงาน	
1	คำแนะนำ.....	71
2	การเริ่มต้นระบบ	72
3	การเตรียมและเริ่มต้นใช้งานเครื่อง LightCycler® 480	73
4	การเปลี่ยนเทอร์มอล บล็อก ไซเคลอร์ LightCycler® 480	76



การปฏิบัติงาน

1 คำแนะนำ

ก่อนเริ่มการปฏิบัติงานให้ทบทวนภาพรวมและโปรแกรมเครื่อง *LightCycler® 480* เพื่อที่จะได้ทราบองค์ประกอบของเครื่องและคุ้นเคยกับ โปรแกรมการทำงานเครื่อง

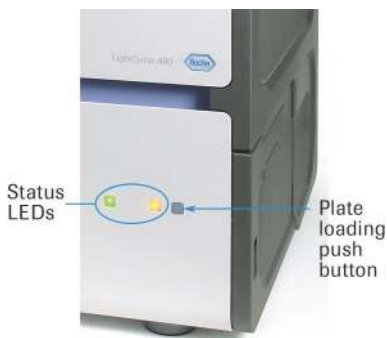


2 การเริ่มต้นระบบ

1



สวิตช์เปิด-ปิดเครื่องอยู่ทางด้านหลังเครื่อง ซึ่งอยู่ทางซ้ายของ
กล่องกำลังไฟฟ้าเครื่อง ใช้สำหรับเปิด-ปิดเครื่อง



ไฟแอลอีดี แสดงสถานะ ซึ่งอยู่ด้านหน้าเครื่อง
LightCycler® 480

ระหว่างการทำงานของเครื่อง สถานะไฟ แอลอีดี สามารถ
เกิดได้หลายรูปแบบดังตาราง

สีของไฟด้านซ้าย	สีของไฟด้านขวา	สถานะปั้งซ์
ส้ม (กระพริบ)	ส้ม (กระพริบ)	เครื่องกำลังเริ่มการทำงาน
เขียว	ส้ม	เครื่องเปิดอยู่ และพร้อมใช้งาน แต่ยังไม่ได้อัดเพลท
เขียว	ส้ม (กระพริบ)	กำลัง ำ เพล ท
เขียว	เขียว	เครื่องเปิดอยู่และพร้อมใช้งาน และได้อัดเพลทเรียบร้อยแล้ว
เขียว (กระพริบ)	เขียว (กระพริบ)	เครื่องทำงานอยู่

2

ปิดส่วนควบคุมเครื่อง LightCycler® 480

3

เข้าดูหน้าต่างโปรแกรมการใช้งานเครื่อง LightCycler® 480

4

เริ่มโปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480 Software

LightCycler® 480



- 1



และใช้หลอดผสมน้ำยาแบบทึบแสง เพื่อป้องกันสปีลโอเวอร์เซนต์ในปฏิกิริยาเสื่อมจากแสงในห้อง

-



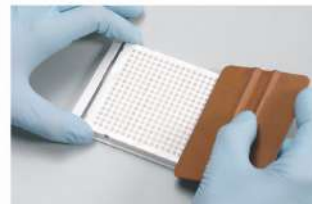
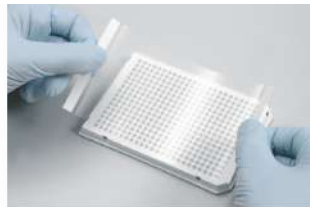
- 4



5

ปิดเพลตด้วยแผ่นฟอยล์:

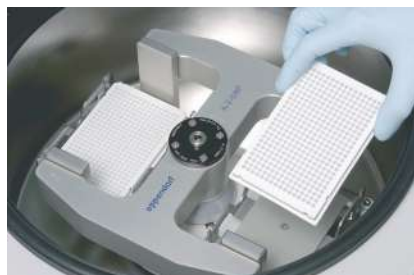
- ▶ ลอกแผ่นฟอยล์ออกจากกระดามัน โดยไม่สัมผัสด้านที่เป็นแก้ว และพยายามจับเฉพาะขอบนอกของแผ่นฟอยล์
- ▶ ทาบลงบนเพลตโดยให้ด้านที่มีแก้ววางลงบนเพลต
- ! แผ่นฟอยล์นี้จะติดแน่นด้วยแรงกด
- ▶ ใช้แผ่นช่วยรีดเพลต รีดฟอยล์ให้ติดกับเพลต โดยทำ 2 ทิศทางด้วยแรงกดและความเร็วเท่าๆกัน
- ▶ ใช้มุมของแผ่นช่วยรีดเพลต รีดบริเวณระหว่างหลุมซ้ำเพื่อความติดแน่น
- ▶ ถีกส่วนเกินของแผ่นฟอยล์ที่ปลายทั้งสองด้านออก
- ! ให้มั่นใจว่าจะฉีกส่วนเกินออก ไม่ยกแผ่นฟอยล์ขึ้นจากเพลต



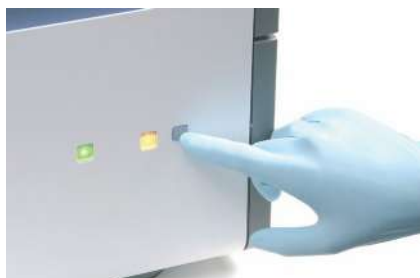
- ! การปิดแผ่นฟอยล์สำคัญมากในการป้องกันการระเหยไปของปฏิกิริยา
- ! การปิดแผ่นฟอยล์ควรใช้แผ่นช่วยรีดเพลต รีดซ้ำหลายๆครั้ง โดยเฉพาะบริเวณขอบๆเพลต

6

นำมัดติเวลเพลตที่ปิดฟอยล์แล้วไปทำการปั่นเหวี่ยง โดยเลือกใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีช่องใส่เพลตที่เหมาะสม ควรมีการบาลานซ์ด้วยการใช้อุปกรณ์หรือเพลตอีกอัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ $1,500 \times g$ เป็นเวลา 2 นาที หากพบว่ายังมีฟองอากาศอยู่ในหลุมปฏิกิริยาให้ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบ



- 7 ▶ ในการนำเพลทใส่เข้าเครื่องLightCycler480 ให้กดปุ่มหน้าเครื่องที่ต่อจากไฟแสดงสถานะ



- ▶ ที่ใส่เพลทเข้าเครื่องจะเลื่อนออกมาทางด้านขวาของเครื่อง



- 8 วางมัลติเวลเพลทลงบนที่ใส่เพลทที่เลื่อนออกมาจากเครื่อง โดยให้หันปลายเพลทด้านเรียบเข้าสู่ตัวเครื่อง ส่วนปลายเพลทขอบตัดจะหันออกจากเครื่องดังรูป



- 9 กดปุ่มหน้าเครื่องอีกครั้งเพื่อเลื่อนเพลทเข้าสู่เครื่อง และเครื่องเริ่มทำงาน

- 10 เมื่อเครื่องทำงานเสร็จให้กดปุ่มหน้าเครื่องเพื่อนำเพลทออกจากตัวเครื่อง



ที่ใส่เพลทนี้อาจจะร้อนจากการทำงานเสร็จใหม่ๆ ดังนั้นควรปล่อยให้เย็นสักพัก อย่างน้อย 20 นาทีหลังเครื่องทำงานเสร็จ และควรมีการ โปรแกรมเครื่องให้มีขั้นตอนการปรับอุณหภูมิมาที่ 40 องศาหลังเสร็จปฏิกิริยาพีซีอาร์เสมอ

ข้อควรระวัง หากมัลติเวลเพลทอยู่ในเครื่องนานก่อนจะเริ่มการทดสอบ เพลทอาจจะถูกทำให้ร้อนได้ที่อุณหภูมิ $+60$ to $+80^{\circ}\text{C}$ เนื่องจากแผ่นฝาครอบบล็อกทำงาน (heat lid) และน่าจะยังมีความร้อนอยู่แม้ว่าจะตั้งโปรแกรมให้ลดอุณหภูมิลงมาที่ $+40^{\circ}\text{C}$ หลังทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

4 การเปลี่ยนเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลของเครื่อง

LightCycler® 480

เครื่อง LightCycler® 480 จะมีเทอร์มอล บล็อก ไซเคิล 2 รุ่น สำหรับมัลติเวลเพลท ชนิด 96-wells และ สำหรับมัลติเวลเพลทชนิด 384-wells

ซึ่งทั้ง 2 รุ่นจะมีเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอีก 2 ประเภท ได้แก่

- ▶ LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit Silver
- ▶ LightCycler® 480 Thermal Block Cycler Unit Aluminum

เทอร์มอล บล็อก ไซเคิล ทั้งประเภท สามารถใช้ได้กับเครื่อง ทั้งรุ่น LightCycler® 480 Instrument I และ II

ผู้ใช้งานสามารถที่จะมีเทอร์มอลบล็อก ไซเคิลได้ทั้ง 2 รุ่น ไม่ว่าจะป็นรุ่น 96 หรือ 384 เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานกับเพลทแต่ละชนิดซึ่งการเปลี่ยนเทอร์มอลบล็อก ไซเคิล สามารถทำได้ด้วยตนเอง โดยดูรายละเอียดเพิ่มเติมในขั้นตอนการเปลี่ยนในลำดับถัดไป



ควรปิดเครื่อง LightCycler 480 ก่อนทำการเปลี่ยนเทอร์มอลบล็อก ไซเคิล เสมอ



ก่อนทำการเปลี่ยนเทอร์มอล บล็อก ไซเคิล ควรปิดเครื่องและทิ้งระยะสักพักให้เครื่องเย็นลง อย่างน้อย 20 นาที ทั้งนี้การตั้งโปรแกรมให้ลดอุณหภูมิลงหลังจากเสร็จปฏิบัติการ ก็เป็นสิ่งที่ควรต้องกระทำ

1

เทอร์มอล บล็อก ไซเคิล จะถูกจัดส่งมาในกล่องเก็บรักษาอย่างดี เพื่อป้องกันการเสียหายระหว่างขนส่ง โดยในกล่อง ตัวเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลจะมาพร้อมกันกับแผ่นฝาครอบบล็อก (cover) โดยจะถูกจัดเก็บไว้ภายในอุปกรณ์การนำใส่บล็อกอีกที



- 2 เปิดฝาล่องเก็บรักษาเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์ แล้วจับตรงก้านสีแดงเพื่อดึงชุด เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์

Retainer used to store the disassembled block cycler cover



Upper half of the loading device. Help is used to take up the currently installed thermal block cycler after disassembling

- ชุดเทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์จะมีบรรจุภัณฑ์คลุมอยู่ ซึ่งที่คลุมนี้จะมี 2 ส่วนประกบกันอยู่ให้นำส่วนบนออก แล้วใช้ส่วนล่างเป็นอุปกรณ์ช่วยในการนำชุดบล็อกใส่เข้าเครื่อง

- 3 เปิดประตูฝาด้านข้างขวาของเครื่องออก โดย

- ▶ ยกคลิปสีดำขึ้น (1) และหมุนคลิปตามเข็มนาฬิกา (2)



- ▶ ในขณะที่ยกคลิปแล้วบิดหมุน ให้ดึงประตูออก

- ⚠ สามารถทำการเปิดประตูเครื่องด้านข้างนี้เมื่อทำการปิดเครื่องแล้วเท่านั้น



- 4 นำส่วนบนของชุดครอบบล็อกออก แล้วกลับบล็อกตั้งขึ้น นำไปวางต่อกับข้างเครื่องดังรูป โดยให้รอยบากของชุดครอบตรงกับเครื่องเพื่อให้บล็อกสามารถใส่เข้าไปในเครื่องได้ตำแหน่งถูกต้อง



- 5 กดคันโยกสีแดงด้านมุมบนซ้ายของบล็อก ไซเคิลอร์ลง เพื่อเปิดช่องที่จะใส่บล็อกให้หลวม แล้วจับที่ก้านจับบล็อก ไซเคิลอร์ เพื่อดึงบล็อกออกจากเครื่อง

Press this lever to release the block cycler

Block cycler handheld

Block cycler cover



- เมื่อดึงบล็อกออกแล้ว ให้ย้ายบล็อกไปใส่ในชุดครอบบล็อก

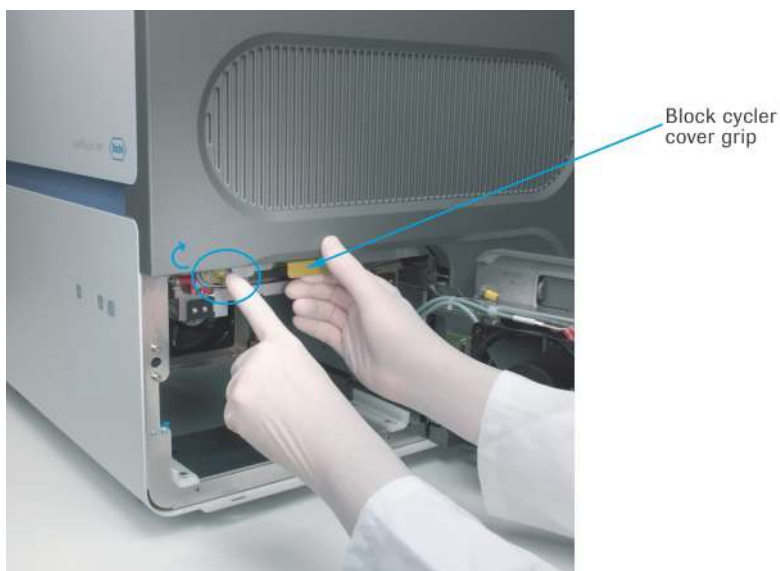


- ชุดครอบบล็อกควรวางไว้ข้างเครื่องเพื่อรองรับบล็อกที่ถอดออก



- 6 ถอดแผ่นฝาครอบบล็อก ไซเคลอร์ (heat lid) ออกด้วยหลังจากนำบล็อก ไซเคลอร์ออกจากเครื่อง

- ▶ กดคันโยกสีทองเล็กๆตรงมุมบนไปทางซ้าย เพื่อนำแผ่นฝาครอบบล็อกออก ดังรูป



- ▶ เมื่อปลดล็อกได้แล้ว การนำแผ่นฝาครอบบล็อกออก ด้วยการค่อยๆดึงออกดังรูป



- ▶ นำแผ่นฝาครอบบล็อกไปเก็บในถุงใส่ที่มาจากพร้อมกับชุดคลุมบล็อก



- 7 การนำบล็อก ไซเคลอร์ อันใหม่ ใส่กลับเข้าเครื่อง สามารถทำได้ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วนั้น โดยให้ทำย้อนกลับดังนี้

- ▶ เริ่มจากการใส่แผ่นฝาครอบบล็อกก่อน โดยการดันคัน โยกลีทองไปทางซ้าย แล้วค่อยๆ ดันแผ่นฝาครอบบล็อกใส่กลับเข้าเครื่อง



- ▶ ใส่บล็อก ไซเคลอร์ อันใหม่ กลับเข้าไปในเครื่องตามข้อ 5 และ 4 ตามลำดับ
 - ▶ หลังจากใส่บล็อก ไซเคลอร์ไปแล้ว ให้ปิดประตูด้านข้างเครื่อง โดยหมุนคลิปดำและกดกลับเข้าที่เดิม
- 🔍 เมื่อทำการเปิดเครื่อง *LightCycler® 480* ตัวเทอร์มอล บล็อก ไซเคลอร์ อันใหม่จะถูกตรวจพบได้โดยอัตโนมัติด้วยโปรแกรมการควบคุมการทำงานของเครื่อง ผู้ใช้งานไม่ต้องทำการสอบเทียบอุปกรณ์ใดๆ อีกครั้ง

โปรแกรมการใช้งาน LightCycler® 480 รุ่น 1.5



D

Chapter D • โปรแกรมการใช้งาน LightCycler® 480

คำแนะนำสำหรับการใช้งานโปรแกรม
LightCycler® 480 ในการทำงานเรียลไทม์พีซีอาร์
และการวิเคราะห์ข้อมูล

D โปรแกรมการใช้งาน LightCycler® 480

การใช้งานขั้นพื้นฐานของโปรแกรม

1	ภาพรวมของโปรแกรม LightCycler® 480	86
1.1	การเข้าใช้งานด้านต่างๆของโปรแกรม LightCycler® 480	87
1.2	เริ่มต้นการใช้งานโปรแกรม LightCycler® 480	88
1.3	ทำความเข้าใจหน้าต่างหลักโปรแกรม LightCycler® 480	90
1.4	การเลือกและคุณสมบัติของการนำทาง.....	96
1.4.1	เนวิเกเตอร์.....	96
1.4.2	แถบคำถาม.....	100
1.4.3	การเลือกตัวอย่าง	104
1.4.4	ตารางตัวอย่าง	107
1.5	การส่งออกและนำเข้า	108
1.5.1	การส่งออกแต่ละข้อมูลในโปรแกรม LightCycler® 480 และข้อมูลดิบการทดลอง	111
1.5.2	การส่งออกหลายไฟล์พร้อมกัน	112
1.5.3	การนำเข้าแต่ละไฟล์.....	115
1.5.4	การนำเข้าหลายไฟล์พร้อมกัน.....	116
2	การสร้างโปรแกรมและการใช้งานสำหรับการทดลอง	119
2.1	การสร้างโปรแกรมการทดลอง.....	119
2.1.1	การตั้งรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ.....	122
2.1.2	การกำหนดโปรแกรมและอุณหภูมิของเป้าหมาย	124
2.1.3	การปรับแต่งการแสดงผลข้อมูลออนไลน์	127
2.1.4	การเพิ่มโน้ตการทำงาน	128
2.2	การทำงานการทดลอง.....	128
2.3	การใส่ข้อมูลตัวอย่าง.....	131
2.3.1	หน้าต่างการแก้ไขตัวอย่าง.....	131
2.3.2	แถบทำงานในการแก้ไขตัวอย่าง	133
2.3.3	การกำหนดค่าคุณสมบัติการแก้ไขตัวอย่าง	134
2.3.4	การใส่ข้อมูลตัวอย่าง.....	135
3	ภาพรวมการวิเคราะห์การทดลอง.....	143
3.1	ภาพรวมขั้นตอนการวิเคราะห์	144
3.2	การใช้น้ำต่างการวิเคราะห์.....	146
3.2.1	เลือกรูปแบบการผสมชุดกรองแสงและการชดเชยสัญญาณสี	147
3.2.2	การทำงานกับตัวอย่างในการวิเคราะห์	148
3.2.3	การทำงานกับแผนภูมิในหน้าต่างการวิเคราะห์	149
3.2.4	การเพิ่มโน้ตการวิเคราะห์.....	150
3.2.5	การลบและการแก้ไขข้อมูลการวิเคราะห์.....	150
3.3	การส่งออกข้อมูลผลการวิเคราะห์	151

การใช้งานโปรแกรมด้านต่างๆ

4	การหาปริมาณสารพันธุกรรม.....	156
4.1	ภาพรวม.....	156
4.2	การวิเคราะห์หาปริมาณจำนวนจริง.....	157
4.2.1	ทำความเข้าใจค่า Crossing Points ของตัวอย่าง.....	158
4.2.2	ทำความเข้าใจบทบาทของเส้นมาตรฐาน	158
4.2.3	การทำเส้นมาตรฐาน	160
4.2.4	การวิเคราะห์หาปริมาณจำนวนจริงด้วยวิธี Second Derivative Maximum Method	163
4.2.5	การวิเคราะห์หาปริมาณจำนวนจริงด้วยวิธี Fit Points Method	166
4.2.6	การคูณผล	172
4.3	การวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์.....	175
4.3.1	ภาพรวม.....	175
4.3.2	การทดลองเดี่ยวหรือสองสี.....	178
4.3.3	หลักการของการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์.....	179
4.3.4	ขั้นตอนพื้นฐานของการทดลองหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์.....	181
4.3.5	ขั้นตอนแบบก้าวหน้าของการทดลองหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์.....	183
4.3.6	ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์.....	189

4.3.7	การคูณผล	194
4.3.8	การเข้าสู่ตัวอย่างและการสร้างกลุ่มผลการทดลอง	195
4.3.9	เส้นค่ามาตรฐานจากภายนอก	198
4.3.10	ข้อมูลเสริม	199
5	การวิเคราะห์ค่า Tm	202
5.1	การใช้ลักษณะ Melting Curve ในการบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอและจีโนไทป์	202
5.1.1	การกำหนดโปรแกรมการ Melt	202
5.1.2	เนื้อหาการวิเคราะห์อุณหภูมิ Melting	203
5.2	วิธีการวิเคราะห์ Tm Calling	204
6	การวิเคราะห์จีโนไทป์	212
6.1	ภาพรวม	212
6.2	การวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง	213
6.2.1	ภาพรวม	213
6.2.2	หลักการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง	215
6.2.3	วิธีการทดลองจีโนไทป์แบบปลายทาง	215
6.2.4	วิธีการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง	221
6.2.5	ฟังก์ชันเพิ่มเติม	227
6.3	การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วย Melting Curve	228
6.3.1	ภาพรวม	228
6.3.2	หลักการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วย Melting Curve	230
6.3.3	วิธีการทดลองการหาจีโนไทป์ด้วย Melting Curve	231
6.3.4	ฟังก์ชันเพิ่มเติม	241
7	โปรแกรม Gene Scanning	243
7.1	การทำงาน Gene Scanning กับระบบ LightCycler® 480	243
7.1.1	High Resolution Melting	244
7.1.2	ส่วนประกอบของการทำงาน Gene Scanning กับระบบ LightCycler® 480	246
7.1.3	ข้อได้เปรียบของเทคนิค High Resolution Melting	250
7.2	การเตรียมการทดลอง Gene Scanning กับระบบ LightCycler® 480	251
7.2.1	การออกแบบการทดลอง Gene Scanning	251
7.2.2	ชนิดของตัวอย่าง	252
7.2.3	ไพรเมอร์ ฟิชอาร์	253
7.2.4	น้ำยาล้างสำหรับ ฟิชอาร์	253
7.2.5	ฟิชอาร์ พาวเวอร์เตอร์	254
7.2.6	การตรวจวัดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่รวดเร็ว	256
7.3	วิธีการวิเคราะห์ Gene Scanning	256
7.4	ฟังก์ชันเพิ่มเติม	267
7.4.1	แม่แบบการทดลอง Gene Scanning	267
7.4.2	ผลของตัวควบคุม	268

การทำงานของโปรแกรมชนิดก้าวหน้า

8	การวิเคราะห์การขยายสัญญาณดีเอ็นเอ	270
8.1	วิธีการทดลองการขยายสัญญาณดีเอ็นเอ	271
8.2	วิธีการใช้งานการขยายสัญญาณดีเอ็นเอ	278
9	การทำงานกับแม่แบบการทดลองและมาโคร	279
9.1	การสร้างและการใช้งานแม่แบบ	279
9.2	การสร้างและการใช้งานมาโคร	284
10	การทำงานกับกลุ่มย่อยตัวอย่าง	288
11	การทำงานกับแผนภูมิ	291
11.1	การพิมพ์ภาพ การส่งออกข้อมูลและสำเนาข้อมูลแผนภูมิ	291
11.2	การขยายและกวาดมองรายละเอียดของแผนภูมิ	295
12	การทำงานกับตาราง	297
13	การสร้างการรายงาน	299



14	การทำงานกับการตั้งค่า.....	303
14.1	การใช้การตั้งค่าแผนภูมิ.....	303
14.1.1	การระบุหัวข้อแผนภูมิและสไตล์การติดฉลาก.....	305
14.1.2	ระบุเนื้อหาของแผนภูมิฟลูออเรสเซนซ์.....	305
14.1.3	การระบุรูปร่างแผนภูมิกราฟเส้นมาตรฐาน.....	307
14.1.4	การระบุเนื้อหาและรูปร่างของแผนภูมิจุดรวม.....	308
14.1.5	การเขียนทับข้อมูลการตั้งค่าเริ่มต้นของแผนภูมิ.....	308
14.1.6	การสร้างการตั้งค่าแผนภูมิแยกการและใช้เป็นค่าเริ่มต้น.....	311
14.2	การใช้การตั้งค่าตัวอย่าง.....	312
14.3	การระบุการตั้งค่าผู้ใช้งาน.....	314
15	เครื่องมือในการจัดการ.....	315
15.1	การจัดการการเข้าใช้งานของผู้ใช้.....	316
15.1.1	ทำความเข้าใจบัญชีผู้ใช้งาน.....	316
15.1.2	ทำความเข้าใจกลุ่ม.....	316
15.1.3	ทำความเข้าใจบทบาท.....	317
15.1.4	สิทธิ์พิเศษสำหรับบทบาทผู้ใช้งานระดับมาตรฐาน.....	317
15.1.5	สิทธิ์พิเศษสำหรับบทบาทผู้ใช้งานระดับชำนาญ.....	318
15.1.6	สิทธิ์พิเศษสำหรับบทบาทผู้ดูแลระบบ.....	319
15.1.7	การเข้าใช้งานของผู้ใช้งาน.....	320
15.1.8	การจัดการผู้ใช้งาน กลุ่ม และ บทบาท.....	326
15.1.9	การทำงานกับบทบาท.....	329
15.2	การรายงานการตั้งค่า.....	331
15.3	บันทึกข้อผิดพลาด.....	332
15.4	ฐานข้อมูล.....	333
15.4.1	ฐานข้อมูลที่สนับสนุนได้และฐานข้อมูลควิซ.....	333
15.4.2	คำแนะนำสำหรับการสำรอง การล้าง และการกระชับฐานข้อมูลของ LightCycler® 480	334
15.4.3	เครื่องมือฐานข้อมูล CompactIB.....	338
15.4.4	การจัดการอย่างไรกับฐานข้อมูลจากโปรแกรมรุ่น 1.3 หรือต่ำกว่า.....	340
15.4.5	การจัดการอย่างไรกับไฟล์ข้อมูลจากโปรแกรมรุ่น 1.3 หรือต่ำกว่า.....	340
15.5	ตัวเครื่อง	341
15.6	รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ.....	345
15.7	การตั้งค่าชนิดของเพลท.....	348
16	เครื่องมือการวินิจฉัย.....	349
16.1	การรายงานปัญหาของตัวเครื่อง.....	349
16.2	บันทึกข้อผิดพลาด.....	350
16.3	การทดสอบระบบด้วยตัวเครื่องเอง.....	350
17	การติดตั้งและการบำรุงรักษาโปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480	351
17.1	การติดตั้งโปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480	352
17.2	การเริ่มต้นใช้โปรแกรม LightCycler® 480 และเชื่อมต่อกับตัวเครื่อง.....	358
17.3	การบันทึกฐานข้อมูลที่มีอยู่และติดตั้งฐานข้อมูลอื่นเพิ่ม.....	361
17.4	การเข้าสู่ฐานข้อมูลอื่น.....	366
17.5	การแทนที่ฐานข้อมูลที่มีอยู่ด้วยฐานข้อมูลชื่อเดียวกัน.....	368
17.6	การตั้งค่าเครือข่ายลูกค้า/เซิร์ฟเวอร์	369
17.7	การลบโปรแกรม LightCycler® 480.....	371





การใช้งานขั้นพื้นฐานของโปรแกรม

คำแนะนำทั่วไปเกี่ยวกับคุณลักษณะของโปรแกรมและการสร้างโปรแกรมการทำงานและวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองด้วยระบบ LightCycler 480



การใช้งานขั้นพื้นฐานของโปรแกรม

1 ภาพรวมของโปรแกรม LightCycler® 480

โปรแกรม LightCycler® 480 ควบคุมการทำงานของเครื่องผ่านขั้นตอนที่ผู้ใช้กำหนด ข้อมูลดิบที่ได้จากการติดตามการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมในแง่ต่างๆ ได้แก่

- ▶ การคำนวณ Crossing point (Cp) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแบบจำนวนจริงและแบบเชิงสัมพัทธ์ ด้วยการใช้โปรแกรม Absolute Quantification หรือ Relative Quantification
- ▶ การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยโปรแกรม Tm Calling หรือ Genotyping

โปรแกรม LightCycler® 480 จะประกอบไปด้วยการใช้งาน ฐานข้อมูล ฐานข้อมูลเฉพาะ “Exor4”

ทุกส่วนในโปรแกรมจะถูกติดตั้งไว้กับส่วนควบคุมของเครื่อง LightCycler® 480 แต่ละฟังก์ชันการใช้งาน ฐานข้อมูล และอื่นๆ จะแยกอิสระได้ ตามจำนวนผู้ใช้งาน ซึ่งการติดตั้งปลายทางการจัดเก็บข้อมูล ฐานข้อมูล และไฟล์ต่างๆ จะถูกทำในขั้นตอนการติดตั้งเครื่อง



ทางเลือก สำหรับโปรแกรมรุ่น 1.5 นี้จะอนุญาตให้มีการเข้าถึงโปรแกรมผ่านระบบเครือข่าย ดังนั้น ผู้ใช้หลายคนสามารถเข้าถึงฐานข้อมูลเดียวกันได้ รายละเอียดเพิ่มเติมอยู่ในส่วนการจัดตั้งผู้ใช้และเครือข่าย

ทุกข้อมูลจากระบบ LightCycler® 480 จะถูกจัดเก็บในฐานข้อมูลเพื่อรับประกันความปลอดภัยของข้อมูล การเปลี่ยนแปลงแก้ไขข้อมูลดิบจะทำได้ การวิเคราะห์ แก้ไขข้อมูลจะทำได้ผ่านโปรแกรมการวิเคราะห์เท่านั้น



โปรแกรม LightCycler® 480 จะมีฐานข้อมูลทั้งชนิดตรวจสอบย้อนกลับได้ หรือฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับไม่ได้ในงานวิจัย

ในส่วนฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับได้ หากมีการเปลี่ยนแปลงแก้ไขอะไร จะต้องมีการแจ้งเหตุผลยืนยันจากผู้ใช้ ซึ่งจะไม่อนุญาตการทดลองที่มีการแก้ไขชื่อ หรือลบชื่อออก การทดลองจะสามารถทำสำเนาได้ แต่หากแก้ไขชื่อแม่แบบการทดลอง หรือโฟลเดอร์ หรือลบแม่แบบการทดลอง หรือลบโฟลเดอร์ว่าง สามารถทำได้

ในฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับไม่ได้ในงานวิจัย ผู้ใช้สามารถแก้ไขชื่อ ทำสำเนา หรือลบการทดลอง หรืออื่นๆที่เกี่ยวข้องได้

ส่วนคำอธิบายนี้จะเป็นการอธิบายทั่วไปของโปรแกรม LightCycler® 480 ซึ่งจะอธิบายส่วนที่ปรากฏอยู่บนหน้าจอโปรแกรม โดยจะประกอบไปด้วยหัวข้อดังนี้

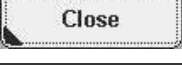
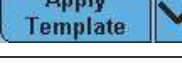
- ▶ การเริ่มการใช้งานโปรแกรม
- ▶ หน้าจอหลัก
- ▶ การเข้าใช้งานด้านต่างๆ
- ▶ การส่งออกและนำเข้าไฟล์ข้อมูลและอื่นๆ

1.1 การเข้าใช้งานด้านต่างๆ ทั่วไปของโปรแกรม LightCycler® 480

ในการเข้าใช้งานโปรแกรมจะพบสัญลักษณ์ต่างหน้าจอโปรแกรมดังนี้:

ปุ่ม	การทำงาน
	ยืนยันการเข้าหรือการทำงานเพื่อไปสู่หน้าถัดไป ลักษณะเช่นเดียวกับการกดปุ่ม <Enter>
	ยกเลิกการเข้าหรือการทำงาน เช่นเดียวกับการกดปุ่ม <Esc>
	เพิ่มรายการหรือวัตถุ
	กำจัดรายการหรือวัตถุ
	แก้ไขรายการหรือวัตถุ
	ออกจากโปรแกรม LightCycler® 480

ยิ่งไปกว่านั้น การออกแบบของปุ่มทั่วไปจะบอกฟังก์ชันการใช้งานไว้ ยกตัวอย่างตามตารางด้านล่าง

ปุ่ม	การทำเครื่องหมาย	พฤติกรรม
	สามเหลี่ยมสีดำมุมล่างซ้าย	เสร็จสิ้นการใช้งานและปิดหน้าต่างหรือกรอบข้อความ
	สามเหลี่ยมสีดำมุมบนขวา	เปิดกล่องข้อความลำดับต่อไป
	ไม่มีสามเหลี่ยมสีดำ	ทำงานเฉพาะในหน้าต่างปัจจุบัน
	พื้นหลังสีขาว, ขอบด้านในเป็นเส้นประ	ปุ่มถูกเลือก
	ปุ่มที่มีลูกศรชี้ลงอยู่ด้านข้าง	บ่งชี้ว่ามีให้เลือกการใช้งานหลายอย่าง



สามารถนำมาใส่ไปชี้ที่ปุ่มเพื่อให้แสดงคำอธิบายการใช้งานของปุ่มต่างๆ ได้ รวมทั้งแสดงการเข้าถึงอย่างรวดเร็วด้วยคีย์บอร์ด (หากมี)

D

1.2 เริ่มต้นใช้งานโปรแกรม LightCycler® 480

ทำตามขั้นตอนด้านล่างในการเริ่มและเข้าสู่โปรแกรม

- ❗ ควรใช้โปรแกรม *LightCycler® 480* กับหน้าจอที่มีความละเอียดที่ $1280 \times 1024 \text{ pixels}$ หรือสูงกว่า แม้ว่าโปรแกรมจะใช้ได้กับความละเอียดหน้าจอต่ำสุดที่ 1024×768 แต่บางปุ่มการใช้งานจะซ้อนทับ และการเข้าถึงบางคุณสมบัติจะจะเป็นไปไม่ได้

เริ่มการใช้โปรแกรม **LightCycler® 480** :

1. ดับเบิลคลิก ที่ไอคอนโปรแกรม LightCycler® 480 บนหน้าจอ

2. จะมีกล่องข้อความ *Login* ให้ใส่ชื่อ พาสเวิร์ด

- พาสเวิร์ดเริ่มแรกของผู้ใช้ admin คือ *LightCycler480*.

3. ในช่อง *Log on to* จะแสดงฐานข้อมูลบนเครื่องที่ใช้ล่าสุด ซึ่งเป็นค่าเริ่มต้น

- หากต้องการเลือกฐานข้อมูลอื่น ให้กดเลือกตรงปุ่ม *Options* ซึ่งจะแสดงฐานข้อมูลอื่นๆ ที่สามารถเลือกได้ ให้เลือกจากในรายการแสดงนั้น

Name	Location
XDMS_U	localhost:20481
Remote DB	10.127.65.190:20481
XDMS_T	localhost:20482

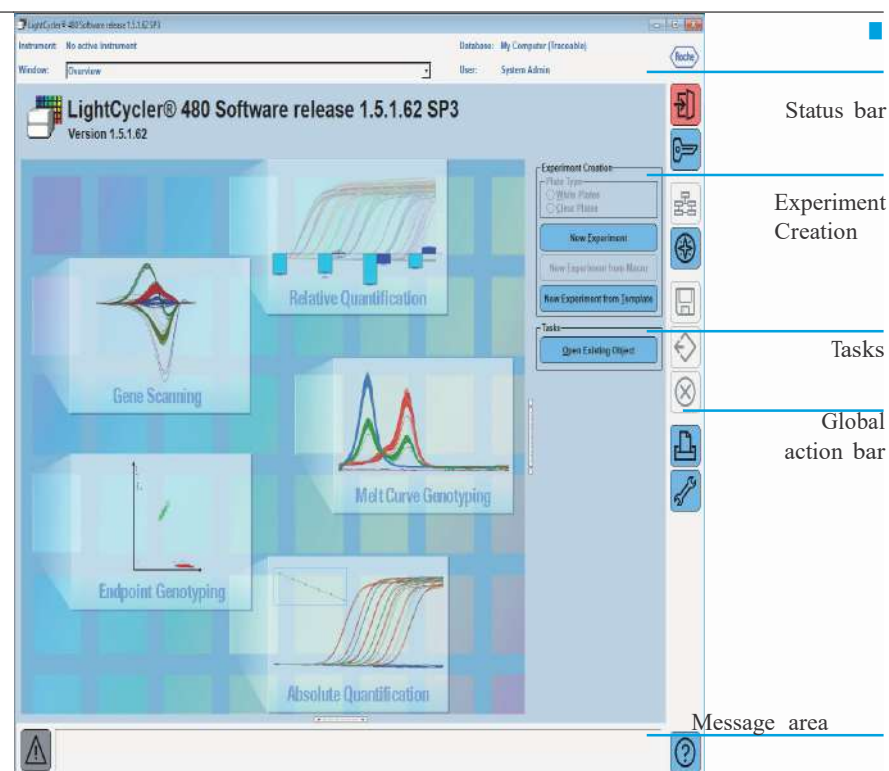


4 คลิก เพื่อเข้าสู่การลือกกิน

โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างภาพรวมของ LightCycler® 480 Software ซึ่งจะมี *Status bar*, *Experiment Creation* และ *Tasks* ด้านขวา และ *Global action bar* ถัดไป

เริ่มจากหน้าต่าง *Overview window* สามารถที่จะ

- ▶ สร้างการทดลองใหม่
- ▶ สร้างการทดลองจากมาโครหรือแม่แบบ
- ▶ เปิดข้อมูลที่มีอยู่
- ▶ สลับไปหน้าจอเมนูอื่นเช่น *Navigator* หรือ *Tools*



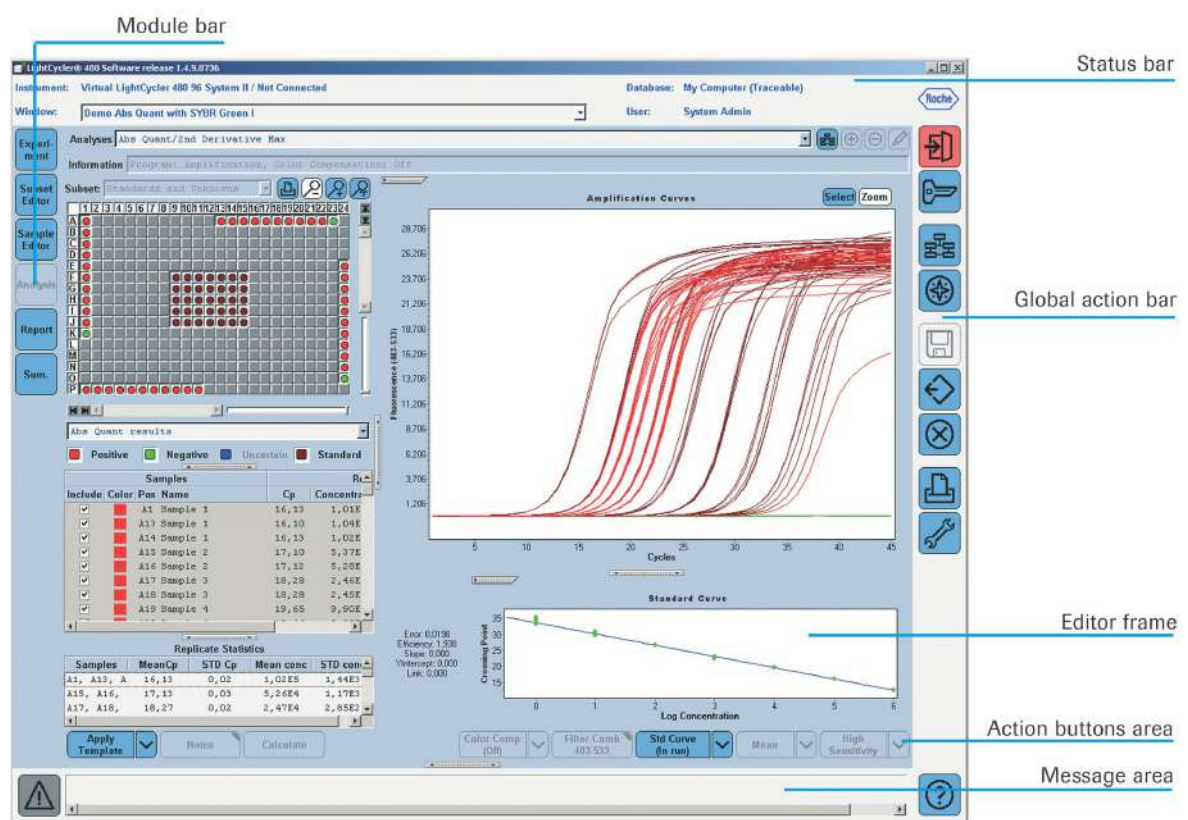
บริเวณ	การทำงาน
<i>Status bar</i>	แสดงเกี่ยวกับงานปัจจุบัน สามารถสลับไปมาระหว่างงานที่เปิดอยู่กับที่อยู่ในลิสต์รายการในหน้าต่างอื่น เมื่อเริ่ม โปรแกรมจะเป็นหน้าต่างภาพรวม ซึ่งสามารถเพิ่มรายการได้ขณะทำงาน
<i>Experiment Creation</i>	คลิกปุ่มสร้างการทดลองใหม่และเปิดการทำงานในโหมด Run (รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ที่ ขั้นตอนการสร้างโปรแกรมการทดลอง) เลือกชนิดเพลทให้ถูกต้องหากใช้เพลททั้งสองชนิด (สไลด์และขาวขุ่น) ดูรายละเอียดเพิ่มในส่วนเครื่องได้
<i>Tasks</i>	คลิก <i>Open Existing Object</i> เพื่อเปิดงานที่มีอยู่ในฐานข้อมูล
<i>Global action bar</i>	การเข้าถึงปุ่มใน <i>Global action bar</i> ขึ้นอยู่กับหน้าต่างที่เปิดใช้งาน (ดูเพิ่มเติมได้ใน Understanding the LightCycler® 480 Software Main Window)
<i>Message Area</i>	แสดงข้อความที่เกิดข้อผิดพลาด หรือ คำเตือนต่างๆ

D

1.3 ทำความเข้าใจกับหน้าต่างหลักของโปรแกรม LightCycler® 480

รูปภาพด้านล่างแสดงหน้าต่างหลักของโปรแกรม ยกตัวอย่างเป็นการวิเคราะห์ *Absolute Quantification Analysis* ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้กับทุกการใช้งาน หน้าต่างหลักจะประกอบไปด้วย

- Status bar
- Module bar
- Global action bar
- Editor frame
- Message area



Status Bar

ส่วนนี้จะแสดงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานปัจจุบัน และอนุญาตให้เลือกการทำงานของงานอื่นร่วมกับที่เปิดอยู่

Instrument:	LC480_S / Connected	Database:	My Computer (Traceable)
Window:	New Experiment	User:	System Admin

ข้อความ	คำอธิบาย
Instrument	แสดงชื่อและสถานะของเครื่องที่เชื่อมต่ออยู่ ซึ่งอาจแสดงข้อความอื่นๆเช่น ไม่เชื่อมต่อเชื่อมต่ออยู่ กำลังเริ่ม สแตนด์บาย(มีเพลาท) สแตนด์บาย(ไม่มีเพลาท) กำลังทำงาน หรือมีข้อผิดพลาด
Window	แสดงรายการเมนูของหน้าต่างที่เปิดอยู่ ใช้เมนูเพื่อสลับหน้าต่างไปมาได้
Database	แสดงชื่อและชนิดของฐานข้อมูลที่เชื่อมต่ออยู่
User	แสดงชื่อของผู้ใช้งานที่เข้าสู่ระบบในปัจจุบัน

Global Action Bar

แสดงอยู่ทางด้านขวาของหน้าจอ และมีปุ่มเลือกสำหรับการทำงานทั่วไปของโปรแกรม รายละเอียดแต่ละปุ่มแสดงตามตารางด้านล่าง

ปุ่ม	การทำงาน
	<i>Exit:</i> สำหรับกดออกจากการทำงาน
	<i>Log Off:</i> สำหรับออกจากระบบข้อมูลปัจจุบันแล้วเข้าสู่ระบบข้อมูลใหม่
	คลิกปุ่มนี้เพื่อดูมุมมองภาพรวม
	คลิกปุ่มนี้เพื่อแสดงมุมมองแบบเนวิเกเตอร์ รายละเอียดเพิ่มเติมสามารถดูได้ในส่วน Selection and Navigation Features
	<i>Save:</i> สำหรับการบันทึกข้อมูล
	<i>Export:</i> ปุ่มสำหรับการส่งออกข้อมูลงานที่เปิดอยู่ไปยังอีกที่ รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน Exporting and Importing
	<i>Close:</i> ปุ่มสำหรับปิดงานที่เปิดอยู่
	<i>Print:</i> ปุ่มสำหรับการพิมพ์งานที่เปิดอยู่
	<i>Tools:</i> ปุ่มสำหรับเปิดหน้าต่างเครื่องมือในการเปลี่ยนพารามิเตอร์ สร้าง แก้ไขบัญชีผู้ใช้งาน กลุ่มบทบาทผู้ใช้งาน แก้ไขตั้งค่าระบบ ดูสถานะของฐานข้อมูล และข้อมูลผิดพลาด จัดการข้อมูลของเครื่อง ดูเครื่องทำการเชื่อมต่อ กำหนดช่องสัญญาณ หรือเลือกผสมช่องสัญญาณ รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน Administrative Tools

Module Bar

แสดงอยู่ทางด้านซ้ายของหน้าจอ มีทั้งหมด 6 ปุ่ม รายละเอียดดังนี้

ปุ่ม	การทำงาน
	กดปุ่มนี้เพื่อเปิดการทำงานทดลอง โดยมีรายละเอียดของวิธีการ แผนภูมิ ข้อมูลการทดลอง โน้ต ที่ทำการเพิ่มไว้ขณะทำการทดลอง วิธีการตั้งโปรแกรมการทดลอง อธิบายเพิ่มเติมไว้ในส่วน <i>Programming and Running an Experiment</i> .
	กดปุ่มนี้สำหรับการแก้ไขจัดกลุ่มตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ผลและรายงาน รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน <i>Working with Subsets</i> .
	กดปุ่มนี้สำหรับใส่ข้อมูลรายละเอียดตัวอย่าง ซึ่งเพิ่มเติมสามารถดูได้ในส่วน <i>Entering Sample Information</i> .
	กดปุ่มนี้สำหรับเปิดดูการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง หากยังไม่มีการวิเคราะห์ใดเปิดอยู่ จะนำไปที่หน้าต่างภาพรวม ซึ่งจะเลือกสร้างการวิเคราะห์ใหม่ หรือเปิดดูงานวิเคราะห์อื่นที่ทำไปแล้วก็ได้ หากมีการสร้างการวิเคราะห์ใหม่ รายการจะไปเพิ่มอยู่ ทำให้สามารถเลือกเปิดดูแต่ละงานได้ โดยอันที่เปิดดูล่าสุดจะอยู่ในหน้าแรกของหน้าต่าง
	กดปุ่มนี้สำหรับการเลือกการรายงานผล โดยกำหนดรูปแบบข้อมูลที่จะรายงานได้ หรือสั่งพิมพ์ได้  ต้องทำการบันทึกข้อมูลก่อน ปุ่มนี้ถึงจะพร้อมให้กดสั่งงานได้
	กดปุ่มนี้สำหรับการดูข้อมูลแบบสรุปของงานนั้น ซึ่งจะมีข้อมูลทุกประเภทของการทดลองเช่น ชื่อวันที่ ผู้ใช้งาน และการเลือกช่องสัญญาณ แสดงข้อมูลประวัติ และสามารถสร้างการทดลองให้เป็นแม่แบบ ชนิด มาโคร ได้

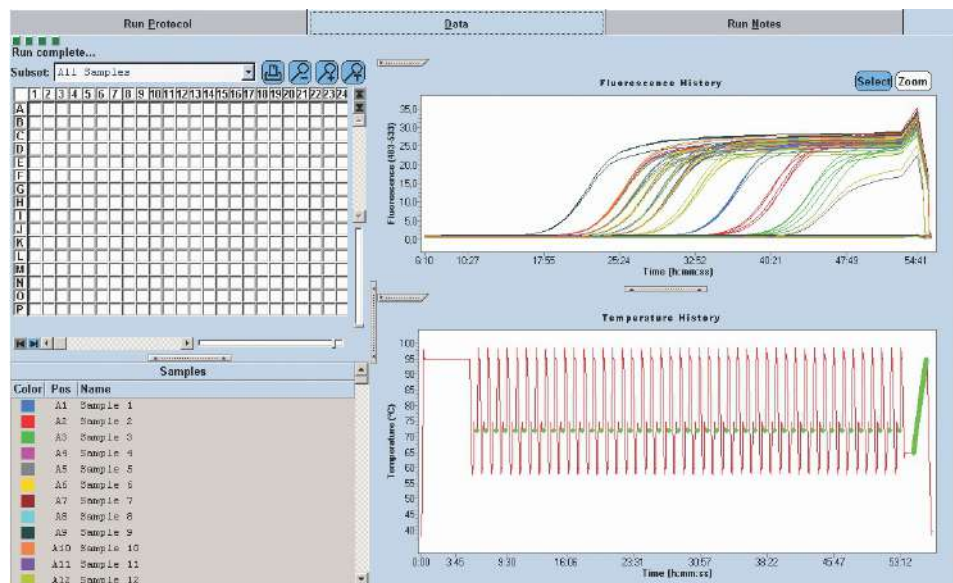
D

การใช้งาน Module bar

คลิกที่ไอคอนเพื่อเปิดการทดลอง นำมาส์ไปชี้ที่ไอคอนแล้วจะแสดงคำอธิบายฟังก์ชันการทำงานไอคอนนั้น

กรอบการแก้ไข

เป็นส่วนบริเวณตรงกลางหน้าต่างภาพด้านล่าง บริเวณนี้จะมีหลายส่วนข้อมูล แต่ละส่วนสามารถปรับขนาดได้โดยการลากแถบแบ่งส่วนงาน () ตรงขอบระหว่างส่วนต่างๆ ซึ่งจะซ่อนข้อมูลตรงส่วนนั้นหรือคลิกอีกครั้งเพื่อกลับมาแสดงข้อมูลส่วนดังกล่าว



การปรับขนาดหน้าต่างของแต่ละส่วน

การซ่อนหรือแสดงข้อมูลแต่ละส่วน :

- ▶ คลิกเลือกแถบแยกข้อมูล () บริเวณขอบแต่ละส่วน
- ▶ คลิกที่เดิมอีกครั้งหากต้องการให้กลับมาแสดงข้อมูลส่วนนั้นอีก

การปรับขนาดพื้นที่:

- ▶ วางเคอร์เซอร์ตรงบริเวณรอยต่อของข้อมูลแต่ละส่วน จนกระทั่งเคอร์เซอร์เปลี่ยนเป็นรูปลูกศรทั้งสองด้าน
- ▶ คลิกและลากขอบไปยังบริเวณที่ต้องการ



Action Button Area

บริเวณนี้จะเรียกว่าปุ่มสำหรับการทำงาน ซึ่งจะมีหลายปุ่มให้เลือกใช้กับงานที่ทำการเปิดดูอยู่ เช่น หากเปิดหน้าต่างเนวิกเตอร์ ปุ่มการทำงานจะแสดงดังรูปนี้



Message Area

บริเวณแสดงข้อความสถานะ ข้อผิดพลาด และคำเตือนต่างๆ



ข้อความจะประกอบไปด้วยดังนี้:

- ▶ สัญลักษณ์คำเตือนทางด้านซ้าย  ซึ่งมีหลายสีแล้วแต่ความรุนแรงดังนี้:
 - ▶ สีเทา = ข้อความปกติ
 - ▶ สีเหลือง = คำเตือน
 - ▶ สีแดง = เป็นการเตือนภัย
- ▶ ข้อความตรงกลาง ซึ่งจะมีข้อมูลชนิด วันที่ และเวลาของข้อความ ข้อความบรรยาย
 - ▶ คลิกขวาที่ข้อความเพื่อที่จะเปิดเมนูบริบทที่สอดคล้องกัน
 - ▶ เลือก *Show log* ในเมนูเพื่อแสดงไฟล์บันทึกและเปิดบันทึกข้อผิดพลาดนั้น (*Error Log*)
 - ▶ เลือก *Clear selected Messages* เพื่อลบข้อความที่เลือก
 - ▶ เลือก *Clear Messages* เพื่อลบข้อความทั้งหมด
 - ▶ คลิกที่ข้อความและเลือก *Details* ในเมนูเพื่อแสดงข้อมูลรายละเอียด
- ▶ กดปุ่ม  เพื่อที่จะเปิดคู่มือการใช้งานของเครื่อง LightCycler® 480 ในโฟลเดอร์การติดตั้ง และแสดงรุ่นของโปรแกรม ข้อมูลลิขสิทธิ์ของโปรแกรม

1.4 การเลือกและคุณสมบัติของการนำทาง

ส่วนนี้จะอธิบายการเลือกงาน, navigation และ query ของโปรแกรม

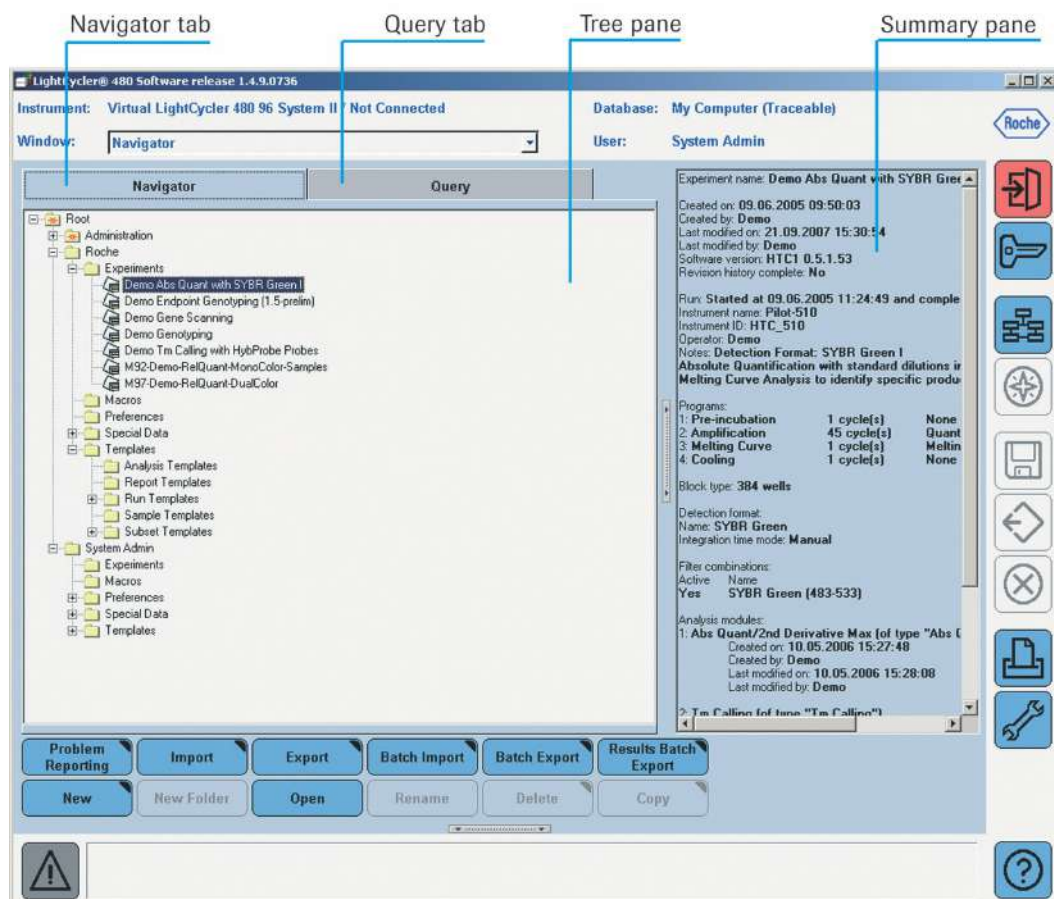
- ▶ Navigator
- ▶ Query
- ▶ Sample Selector and Sample Table

1.4.1 The Navigator

หน้าต่างนี้จะทำให้เกิดการเข้าสู่รายการที่จัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลโปรแกรม รวมทั้งการทดลอง บัญชีผู้ใช้งาน เครื่อง มาโคร และอื่นๆ ซึ่งจะอนุญาตให้เปิดการทดลองและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ทุกรายการในส่วนเนวิเกเตอร์ จะจัดอยู่ในรูปแบบของโครงสร้างต้นไม้ และจัดเรียงตามตัวอักษรภายในโฟลเดอร์ ผู้ใช้สามารถย่อ-ขยาย โฟลเดอร์ หรือไฮไลต์งานที่ต้องการได้ นอกจากนี้ยังสามารถเลือกกดแถบ Query เพื่อหางานจำเพาะที่ต้องการในฐานข้อมูลโปรแกรมได้

หน้าต่าง Navigator มีโครงสร้างอยู่ 4 บริเวณดังนี้

- ▶ Tree pane
- ▶ Object summary pane
- ▶ Navigator controls
- ▶ Query tab



Tree Pane

เป็นบริเวณที่จะแสดงข้อมูลในลักษณะลำดับชั้น ข้อมูลที่ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล ส่วนบนสุดของข้อมูลจะเป็น “Root” เสมอ การทำงานของหน้าต่างนี้จะคล้ายกับ Windows Explorer

หน้าต่างนี้มักจะแสดงโฟลเดอร์เริ่มต้นและงานดังนี้:

- ▶ โฟลเดอร์ผู้ใช้งาน (รวมทั้งโฟลเดอร์ *System Admin* และแต่ละผู้ใช้งาน) แต่ละโฟลเดอร์จะมีโฟลเดอร์ย่อยเริ่มต้น เช่น โฟลเดอร์การทดลอง
- ▶ โฟลเดอร์ *Roche* ซึ่งจะมีโฟลเดอร์ย่อยเป็นการทดลอง แม่แบบ มาโคร จากโรชเอง ผู้ใช้งานทุกคนสามารถมีสิทธิ์นำไปใช้ได้เมื่อเข้าสู่โปรแกรมได้



ในโฟลเดอร์ *Roche* มีข้อมูลงานที่เป็นประโยชน์พื้นฐานดังนี้:

- ▶ การทดลองสารคดี ในโฟลเดอร์ย่อย *Experiments*
- ▶ แม่แบบสารคดีการรันในโฟลเดอร์ย่อย *Templates* ซึ่งจะมีข้อมูลการกำหนดกลุ่มตัวอย่าง ให้นำไปใช้ได้ทั้งเครื่องรุ่น *LightCycler® 480 Instrument I* or *LightCycler® 480 Instrument II*
- ▶ งาน *Color Compensation* มีข้อมูลสารคดีการทำ *melting curve* สำหรับการวิเคราะห์จีโนมไทป์ในโฟลเดอร์ข้อมูล *Special Data folder*

ในการจะปรับแต่งแก้ไขข้อมูลจากโฟลเดอร์ *Roche* ให้ทำการทำสำเนาข้อมูลก่อน ด้วยการส่งออกและนำเข้าไปในโฟลเดอร์ของผู้ใช้งานเอง

- ▶ โฟลเดอร์การจัดการ จะมีข้อมูลสำหรับกลุ่มผู้ใช้งาน บทบาท บัญชีผู้ใช้ และนโยบายความปลอดภัย

ในการจะแสดงหรือซ่อนรายการในโฟลเดอร์ ให้ดับเบิลคลิกที่ชื่อโฟลเดอร์ หรือกด (+) หรือลบ (-) sign การคลิกขวาที่งานที่เลือก ในหน้าต่างแสดงโครงสร้างจะมีเมนูต่างๆ ให้เลือกใช้



Navigator จะทำงานคล้ายคลึงกับ *Windows Explorer* แต่จะแสดงข้อมูลที่เก็บในฐานข้อมูล โปรแกรมไม่ใช่จากระบบปฏิบัติการวินโดวส์

Summary Pane

หน้านี้จะแสดงข้อมูลสรุปของการทดลองอ้างอิงที่เลือกดูในปัจจุบันเป็นการทดลองหรือแมโคร



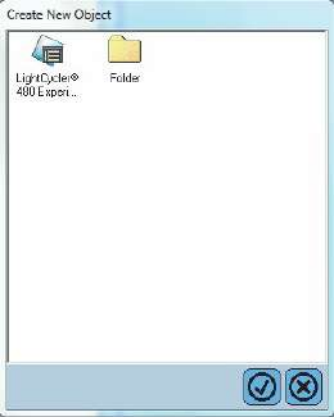
Navigator Controls

ปุ่มควบคุมการทำงานของหน้าต่างเนวิเกเตอร์ร่วมกับหน้าต่าง *Tree* จะช่วยในการส่งออกและนำเข้าของงานที่ต้องการจากฐานข้อมูลโปรแกรม



ปุ่มการควบคุมการทำงานจะขึ้นอยู่กับบทบาทผู้ใช้งานและฐานข้อมูลที่เข้าสู่โปรแกรม หากเป็นฐานข้อมูลเชิงวิจัย จะสามารถแก้ไขชื่อ ลบ หรือทำสำเนาได้ ในขณะที่เป็นฐานข้อมูลแบบสอบย้อนกลับได้จะทำได้ไม่ได้ จะทำได้เพียงกับแม่แบบเท่านั้น

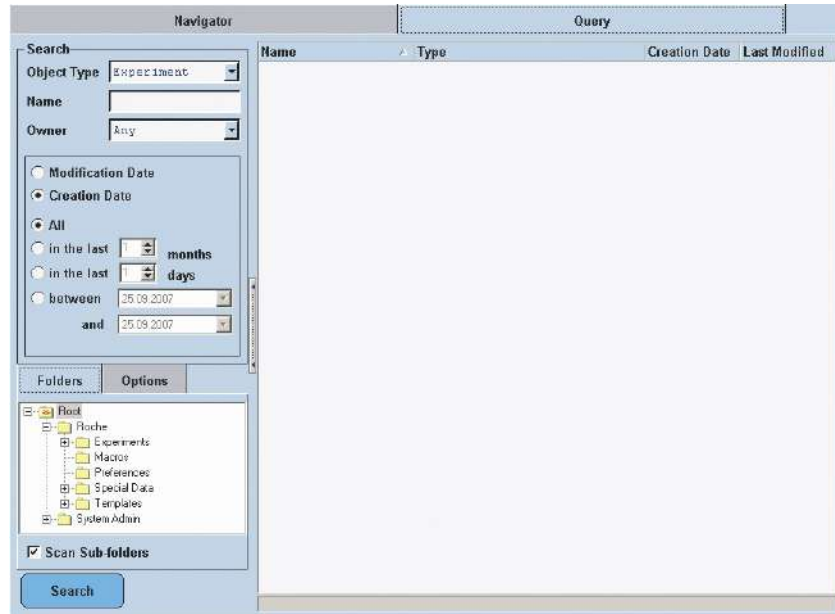
ปุ่ม	การทำงาน
Problem Reporting	เลือกปุ่มนี้เพื่อที่จะบันทึกการทดลองพร้อมกับบันทึกเหตุการณ์เครื่อง บรรยายโน้ตผู้ใช้นั้นไฟล์รายงาน (*.ipr) ไฟล์นี้จะถูกนำส่งตัวแทนโรค เพื่อทำการแก้ไขต่อไป รายละเอียดเพิ่มเติม ในส่วน <i>Diagnostic Tools</i>
Import	เลือกปุ่มนี้เพื่อทำการนำเข้าไฟล์ข้อมูลที่ต้องการจากแหล่งข้อมูลที่กำหนดรองรับไฟล์ดังต่อไปนี้: ▶ ATF files: “ATF” เป็นไฟล์ข้อมูลที่รวมข้อมูลต่างๆเช่น .abt (โปรแกรมและข้อมูลตัวอย่าง), .tem (อุณหภูมิ), and .flo (ข้อมูลฟลูออเรสเซนซ์) ไฟล์ชนิดนี้จะมาจากเครื่องในรุ่น 3.5.3 หรือรุ่นต่ำกว่า ▶ Object files: XML (*.ixo) ไฟล์งานการทดลองทั้งหมด
Export	เลือกปุ่มนี้เพื่อทำการส่งออกข้อมูลไปยังปลายทางที่กำหนด รวมทั้งสามารถตั้งชื่อไฟล์ได้ ข้อมูลงานสามารถส่งออกในรูปแบบ .ixo file (มีข้อมูลการทดลองและข้อมูลเครื่อง) หรือรูปแบบ XML file
Batch Import	เลือกปุ่มนี้สำหรับการนำเข้าข้อมูลทั้งหมดในไดเรกทอรีในครั้งเดียวกัน รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน <i>Exporting and Importing</i>
Batch Export	เลือกปุ่มนี้สำหรับการส่งออกข้อมูลทั้งหมดในไดเรกทอรีในครั้งเดียวกัน รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน <i>Exporting and Importing</i>
Results Batch Export	เลือกปุ่มนี้เพื่อทำการส่งออกข้อมูลพร้อมการวิเคราะห์ทุกผลการทดลองภายในครั้งเดียวในรูปแบบของกลุ่มไฟล์เดอร์ และไฟล์เดอร์ย่อย รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน <i>Exporting and Importing</i>

ปุ่ม	การทำงาน
	เลือกปุ่ม <i>Create New Object</i> เพื่อสร้างงานใหม่ตามต้องการ โดยขึ้นอยู่กับบทบาทของผู้ใช้  สามารถดับเบิลคลิกที่ไอคอนที่ต้องการ หรือกดเลือกไอคอนนั้นแล้วกดปุ่ม 
	เลือกปุ่มนี้หากต้องการสร้างโฟลเดอร์ใหม่
	เลือกปุ่มนี้หากต้องการเปิดงานที่เลือกใน <i>Editor frame</i>
	เลือกปุ่มนี้เพื่อแก้ไขชื่อของไฟล์งานที่เลือก
	เลือกปุ่มนี้เพื่อที่จะลบงานออกจากรายข้อมูล
	เลือกปุ่มนี้เพื่อที่จะทำสำเนางานที่ต้องการ สามารถสำเนาจากโฟลเดอร์ผู้ใช้คนอื่นมาซึ่งของตัวเองได้โดยขึ้นอยู่กับข้อจำกัดบทบาทผู้ใช้ หากสำเนาแล้วจะสามารถจัดการข้อมูลได้ทุกชนิดตามข้อจำกัดบทบาทผู้ใช้ การทำสำเนาจากผู้ใช้งานอื่น: ▶ เลือกงานที่ต้องการใน <i>Navigator</i> เลือก <i>Copy</i> ▶ เลือกโฟลเดอร์ปลายทาง ตั้งชื่อใหม่ที่ต้องการ จากนั้นกด 

D

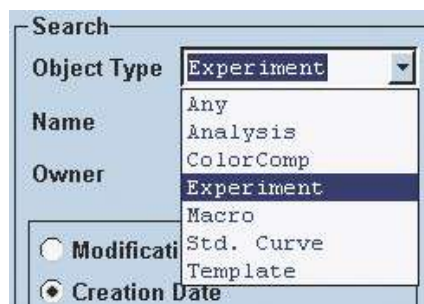
1.4.2 The Query Tab

โปรแกรม LightCycler® 480 จะมีเครื่องมือการเรียกดูการทดลองหรืองานอื่นที่เก็บอยู่ในฐานข้อมูลโปรแกรม ซึ่งจะเข้าไปใช้งานได้ผ่าน Navigator ในส่วนของ *Query* tab



การสร้างและดำเนินการใช้งาน :

- 1 เลือก *Query* tab ในหน้าต่าง *Navigator*
- 2 ในกล่องชนิดข้อมูล เลือกชนิดข้อมูลที่ต้องการเรียกดู:



- 3 (ทางเลือก) เลือกชื่อข้อมูลที่ต้องการเรียกดูถ้าทราบชื่อข้อมูล



สามารถใช้สัญลักษณ์ "*" ในการค้นหา



4 เลือกวันที่แก้ไขหรือ สร้างใหม่ เพื่อจะใช้ในการค้นหา

วันที่แก้ไขหรือสร้างใหม่ จะอนุญาตให้เลือกได้แบบใดแบบหนึ่ง เลือกทั้งสองอย่างพร้อมกันไม่ได้ เลือกช่วงวันที่ต้องการค้นหา สามารถระบุเดือน หรือวันก่อนปัจจุบันหรือเลือกวันในอดีตได้

5 สามารถเลือกโฟลเดอร์เป้าหมายจากแถบโฟลเดอร์ แล้วเช็คเลือกตรงช่อง Scan Sub-folders เพื่อที่จะหาข้อมูลจากโฟลเดอร์ย่อย



D



ไฟล์บางชนิด สามารถกดเลือกแถบทางเลือกได้

ชนิดของข้อมูล

ทางเลือกการค้นห้

Experiment

Analysis

รายการชนิดการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับ การติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480

Color Comp/
Std. Curve



7 กดปุ่มค้นหา ผลการสืบค้นจะแสดงออกมาในลักษณะดังนี้

Name	Type	Creation Date	Last Modified
Demo Endpoint Genotyping (1.5-prelim)	HTCExperiment	28.08.2007	21.09.2007
M97-Demo-RelQuant-DualColor	HTCExperiment	24.08.2007	21.09.2007
M92-Demo-RelQuant-MonoColor-Samples	HTCExperiment	14.08.2007	21.09.2007
Demo Aka Quant with SYBR Green I	HTCExperiment	09.06.2005	21.09.2007
Demo Genotyping	HTCExperiment	17.01.2006	21.09.2007
Demo The Calling with HybProbe Probes	HTCExperiment	20.07.2005	21.09.2007
Demo Gene Scanning	HTCExperiment	10.01.2007	21.09.2007

7 Object(s) returned from query.

ในการผลข้อมูลการค้นหาคะประกอบไปด้วย:

- ▶ ชื่อข้อมูล
- ▶ ชนิดของข้อมูล
- ▶ วันที่ถูกสร้างขึ้น
- ▶ วันที่มีการปรับปรุงล่าสุด

สามารถเลือกดูข้อมูลจากน้อยไปมาก หรือมากไปน้อยได้ โดยคลิกตรงคอลัมน์ หากเลือกไปที่ข้อมูลใดรายละเอียดจะแสดงไว้ที่ Status bar ด้านล่าง หากเป็นข้อมูลการทดลอง หรือมาโคร รายละเอียดจะแสดงในหน้าสรุปแทน



หากมีข้อความข้อผิดพลาดแสดงขึ้นมา แสดงว่าต้องทำการอัปเดตโปรแกรมและฐานข้อมูล โดยดูรายละเอียดในส่วนการ *updating the database* ใน *Administrative Tools*

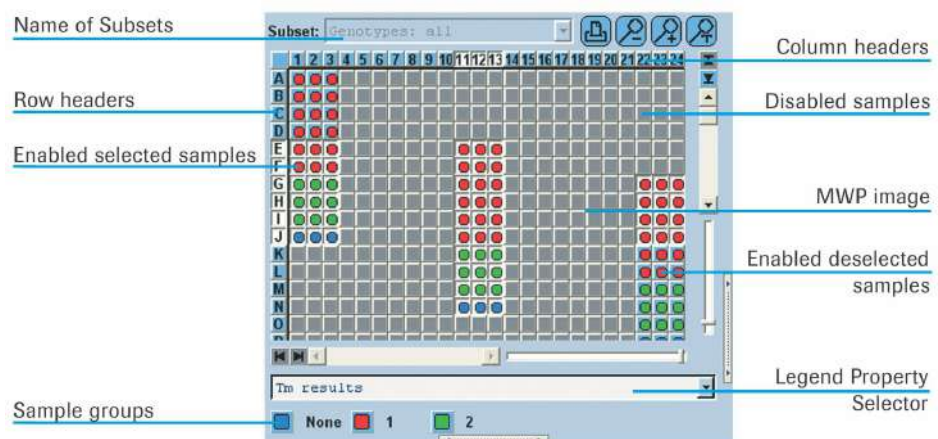
8 การปิดดูข้อมูลให้ทำการดับเบิลคลิกที่ชื่อข้อมูล

1.4.3 การเลือกตัวอย่าง

การเลือกตัวอย่างและตารางตัวอย่าง จะแสดงในหลายหน้าต่างในการใช้งานโปรแกรม การเลือกตัวอย่างจะรวมภาพมัลติเวลเพลทกับหลุมที่เลือกและคุณสมบัติที่แสดงในกลุ่มตัวอย่างด้วย ภาพเพลทจะใช้ในการเลือกตัวอย่างซึ่งอาจจะมีหรือไม่มีประวัติ และอาจปรากฏร่วมกับตารางตัวอย่างหรือไม่ก็ได้

จุดเชื่อมต่อที่เกี่ยวข้องกับการเลือกตัวอย่าง:

จุดเชื่อมต่อ	รายการที่จะมีการเลือกตัวอย่าง
Data Display tab in the Run module	ภาพมัลติเวลเพลท
Subset Editor	ภาพมัลติเวลเพลท
Report module	ภาพมัลติเวลเพลท
Sample Editor	ภาพมัลติเวลเพลทพร้อมประวัติและคุณสมบัติ
Analysis screens	ภาพมัลติเวลเพลทพร้อมประวัติ คุณสมบัติ และตารางตัวอย่าง



การเลือกและยกเลิกการเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างในภาพเพลทสามารถเลือกใช้หรือไม่เลือกใช้ได้ โดยการสร้างกลุ่มย่อยตัวอย่าง ตัวอย่างที่ไม่ถูกเลือกจะแสดงสีเทาซึ่งจะไม่มีข้อมูลตัวอย่างหรือกดเลือกไม่ได้ ตัวอย่างที่ไม่ถูกเลือกมาอยู่ในกลุ่มย่อยจะไม่สามารถเปิดดูข้อมูลใดๆได้ กลุ่มตัวอย่างที่มีประวัติจะขึ้นกับรูปแบบการวิเคราะห์ด้วย



แนะนำให้ใช้ประโยชน์จากการสร้างกลุ่มย่อยตัวอย่าง และคัดหลุมว่างออกในการวิเคราะห์

เมื่อเลือกตัวอย่างใด ตัวอย่างนั้นจะกดเลือกหรือยกเลิกการกดเลือกได้ ตัวอย่างที่ถูกเลือกจะแสดงเป็นพื้นหลังสีขาว หากยกเลิกการเลือกภาพจะแสดงเป็นพื้นหลังสีฟ้าอ่อน เฉพาะตัวอย่างที่ถูกเลือกที่จะสามารถเห็นได้ในผลการทดลอง และกราฟการวิเคราะห์.

สามารถเลือกสถานะของตัวอย่างที่เลือกใช้งานในภาพเพลทได้ดังนี้:

- ▶ คลิกเลือกตัวอย่าง
 - กดปุ่ม <Ctrl> และคลิกตัวอย่างที่เลือกเพื่อจะยกเลิกการเลือก
 - ▶ หากใช้ภาพเพลทและกลุ่มย่อยร่วมกัน ให้ใช้กลุ่มย่อยเฉพาะตัวอย่างที่ถูกเลือกในกลุ่มย่อยนั้น และเลือกมันแบบอัตโนมัติ
 - ▶ คลิกและลากคลุมหลุมที่ยกเลิกการเลือกเพื่อเลือกในส่วนที่คลุม
 - กดปุ่ม <Ctrl> และคลิกพร้อมลากคลุมหลุมที่เลือกเพื่อที่จะยกเลิกการเลือกนั้น
 - ▶ คลิกเลือกที่หัวแถวหรือคอลัมน์เพื่อเลือกทั้งแถวหรือทั้งคอลัมน์นั้น
 - กดปุ่ม <Ctrl> และคลิกที่หัวแถวหรือคอลัมน์นั้นเพื่อยกเลิกการเลือกทั้งแถวหรือทั้งคอลัมน์
 - ▶ การแสดงตารางตัวอย่างจะสอดคล้องกันกับตัวอย่างที่กดเลือกทั้งแถวหรือคอลัมน์
 - ▶ คลิกที่สี่เหลี่ยมตรงมุมบนซ้ายของภาพเพลทเพื่อที่จะสลับเป็นการเลือกทั้งเพลท
 - ▶ หากตัวอย่างที่เลือกมีประวัติ ให้คลิกที่ *Legend Property Selector* เพื่อเลือกประวัติให้แสดง ในทางเลือกที่ให้เลือกจะมีให้แสดงประวัติหรือไม่ขึ้นอยู่กับบริบท
 - ▶ คลิกที่สี่เหลี่ยมในประวัติเพื่อสลับเป็นสถานะที่เลือก
-  การเลือกไอคอนประวัติจะพร้อมไปด้วยกับการเลือกภาพเพลท และจะปรากฏให้เห็นหากกลุ่มตัวอย่างถูกเลือกในภาพเพลท หากไม่มีการกดเลือกกลุ่มตัวอย่างก็จะไม่แสดงให้เห็น
- ▶ ดับเบิลคลิกไอคอนประวัติเพื่อเลือกทุกรายการในกลุ่มและยกเลิกการเลือกรายการที่ไม่อยู่ในกลุ่ม
 - ▶ ในการเพิ่มหรือลบหลุมจากการเลือกให้กดปุ่ม <Ctrl> และเลือกหลุม แถว หรือคอลัมน์ และลากสี่เหลี่ยมผืนผ้าคลุม

การเลื่อนภาพเพลท

ภาพเพลทจะมีแถบให้เลื่อนขึ้นลงด้านแนวนอนและแนวตั้ง เพื่อให้เห็นภาพเพลททุกส่วน เมื่อทำการเลื่อนหัวแถวและคอลัมน์จะยังคงอยู่ที่เดิม

การย่อ-ขยาย

สามารถทำการย่อขยายภาพเพลทได้ดังนี้:

- ▶ ใช้ปุ่มซูม
- ▶ ใช้แถบด้านข้าง
- ▶ ทำการลากขอบของคอลัมน์ หรือแถว เองตามต้องการ



ภาพเพลทจะมีปุ่มซูมดังนี้:

ปุ่ม	การทำงาน
	ปุ่มเลือกแสดงเพลททั้งเพลทโดยที่แต่ละหลุมจะขยายใหญ่ได้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้
	ปุ่มเลือกแสดงหลุมที่กำหนดเลือกให้มีขนาดใหญ่ที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้
	ปุ่มเลือกเพื่อแสดงขนาดหลุมให้ใหญ่พอที่จะเห็นข้อความแต่ละหลุมได้

ภาพเพลทจะมีแถบด้านข้าง 2 แถบสำหรับการขยายทั้งด้านแนวนอนและแนวตั้ง:

- ▶ แถบแนวนอนหากเลื่อนไปทางขวาสุด จะทำให้เห็นภาพเพลทเป็นคอลัมน์เดี่ยว (ขยายสูงสุด)
- ▶ แถบแนวนอนหากเลื่อนไปทางซ้ายสุดจะทำให้เห็นภาพเพลททุกคอลัมน์ (ขยายน้อยสุด)
- ▶ แถบแนวตั้งหากเลื่อนไปด้านบนสุดจะทำให้เห็นภาพเพลทเป็นแถวเดี่ยว (ขยายมากที่สุด)
- ▶ แถบแนวตั้งหากเลื่อนลงมาด้านล่างสุดจะทำให้เห็นภาพเพลททุกแถว (ขยายน้อยสุด)

นอกจากการใช้ปุ่ม ใช้แถบ ในการย่อ-ขยาย ยังสามารถใช้การลากกำหนดเองโดยคลิกที่ขอบด้านขวาของคอลัมน์หรือด้านล่างของแถวเพื่อย่อ-ขยาย

การพิมพ์ภาพเพลท

การพิมพ์ภาพเพลทสามารถกดปุ่ม *Print*



ภาพพิมพ์เพลทจะอยู่ภายในหน้าต่างเดียวกัน

ข้อมูลที่แสดงในภาพเพลท

ขึ้นอยู่กับบริบท ภาพเพลทสามารถแสดงข้อมูลได้ดังต่อไปนี้:

- ▶ แต่ละหลุมจะบ่งบอกคุณสมบัติด้วยสีกำกับ
- ▶ สีกำกับในแต่ละหลุมจะปรากฏข้อมูลตัวอย่างที่สามารถมองเห็นได้พร้อมภาพเพลท
- ▶ หากภาพเพลทขยายใหญ่มากพอจะเห็นข้อมูลดังนี้
 - ▶ ภาพจะแสดงคุณสมบัติตัวอย่างที่ด้านขวาของสีกำกับเป็นข้อมูลแถวแรก
 - ▶ แถวรองลงมาจะมีหรือไม่มีสีกำกับ ถ้ามีสีกำกับจะไม่มีคุณสมบัติแจ้งไว้
 - ▶ ข้อมูลของแถวรองลงมาจะแจ้งไว้ในบริบท



ข้อมูลที่แสดงในภาพเพลทไม่สามารถแก้ไขได้

1.4.4 ตารางตัวอย่าง

การเลือกตัวอย่างและตารางตัวอย่างแสดงในหน้าต่างหลายชนิดซึ่งส่วนมากเกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ในโปรแกรม ตัวอย่างที่เลือกจะแสดงสอดคล้องกับการวิเคราะห์ หรือสามารถรวมเข้า แยกออกจากการวิเคราะห์ได้

ตารางตัวอย่างจะแสดงกลุ่มตัวอย่างสอดคล้องกับภาพเฟลทและสีที่แทนตัวอย่างในการวิเคราะห์ ควรใช้ตารางตัวอย่างเลือกแสดงตัวอย่างในงานวิเคราะห์ โดยกำหนดการรวมเข้าหรือแยกออกของตัวอย่างในการวิเคราะห์



สีที่แทนตัวอย่างในตารางตัวอย่างจะตรงกันกับสีตัวอย่างในกราฟการวิเคราะห์ และสีตัวอย่างในภาพเฟลท

เฉพาะตัวอย่างที่ถูกเลือกในการเลือกตัวอย่างจะแสดงในตารางตัวอย่าง ข้อมูลอื่นๆ จะถูกเพิ่มเติมในตารางตัวอย่างโดยกำหนดจากบริบทของหน้าจอ เช่น หน้าจอแสดงผลจะมีค่า Cp และความเข้มข้นหากเป็นการหาปริมาณ หากมีจำนวนตัวอย่างมากจะมีแถบเลื่อนดูตัวอย่างด้านข้าง

Samples			Results			
Include	Color	Pos Name	Cp	Concentration	Standard	Status
☒		G15 Standard 7	33,72	8,99E-1	1,00E0	
☒		H15 Standard 7	35,25	3,26E-1	1,00E0	
☒		I15 Standard 7	34,54	5,22E-1	1,00E0	
☒		J15 Standard 7	33,45	1,08E0	1,00E0	
☒		A23 no template contr				
☒		K1 no template contr				
☒		Q24 no template contr				
☒		P11 no template contr	35,17	3,44E-1		

Selected samples

Deselected samples

การเลือกและยกเลิกการเลือกตัวอย่าง

สามารถเลือกดูที่ตัวอย่างหรือทั้งหมดในตารางตัวอย่างได้ในการวิเคราะห์ แต่ไม่สามารถแก้ไขข้อมูลที่แสดงไว้ ตัวอย่างที่ถูกเลือกจะถูกไฮไลต์

ในการเพิ่มหรือลบตัวอย่างที่เลือกในตารางตัวอย่างสามารถทำได้ด้วยการใช้การคลิก shift-click และ ctrl-click

การรวมเข้า หรือ แยกออก ตัวอย่าง

ตัวอย่างสามารถรวมเข้าหรือแยกออกจากการวิเคราะห์ได้ โดยหากต้องรวมเข้าให้เลือก *Include* ทางด้านซ้ายของตาราง การเปลี่ยนการเลือกของ include สามารถทำได้โดยดับเบิ้ลคลิก หรือกด <Space> การใช้ *Include* จะเหมาะกับการคำนวณหาค่ามาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณจริงเป็นต้น



หากมีการเปลี่ยนแปลงการคัดเลือกรวมเข้าตัวอย่าง ให้ทำการกดวิเคราะห์ใหม่อีกครั้งเสมอ

D

การเรียงลำดับตัวอย่างในตาราง

สามารถเรียงลำดับตัวอย่างโดยการคลิกที่หัวคอลัมน์ เพื่อสลับไปมาระหว่างจากมากไปน้อยหรือน้อยไปมาก

ในการเรียงลำดับตัวอย่างด้วยตำแหน่งหลุมตัวอย่าง ไม่ว่าจะป็นแถวคอลัมน์ หรือแถวแถวให้คลิกที่ *Pos column*

การส่งออกข้อมูลตัวอย่าง

สามารถส่งออกข้อมูลตัวอย่างในตารางตัวอย่างได้ด้วยการคลิกที่ปุ่ม *Export Table* จากนั้นกำหนดชื่อใหม่ แล้วกดบันทึก

1.5 การส่งออกและนำเข้าข้อมูล

ในการดูข้อมูลการทดลองของเครื่อง ข้อมูลจะต้องอยู่ในโปรแกรมฐานข้อมูลหากไม่เช่นนั้นต้องมีการนำข้อมูลมาก่อน สามารถเปลี่ยนแปลงการตั้งค่า การคำนวณโดยที่ยังไม่บันทึกลงในฐานข้อมูลในข้อมูลที่ทำกรนำเข้าได้ แต่หากปิดข้อมูลไปโดยที่ไม่ได้บันทึกการเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงนั้นก็จะสูญหายไป

การนำเข้าข้อมูลจะไม่ลบข้อมูลจากที่เดิม เป็นเพียงการทำสำเนาข้อมูลมายังฐานข้อมูลโปรแกรม

▶ หากต้องการย้ายข้อมูลการทดลองในโปรแกรมจากฐานข้อมูลเดิมไปอีกที่ เช่น ไปไว้ที่ฮาร์ดไดรฟ์ของเครื่อง ให้นำเข้าไฟล์ข้อมูลไปยังฐานข้อมูลนั้น

▶ ต้องการดูและวิเคราะห์ข้อมูลการทดลองจากโปรแกรม LightCycler® รุ่น 4.x.



หากทำการติดตั้งโปรแกรมการใช้งาน *LightCycler 480* ลงบนเครื่องคอมพิวเตอร์ในออฟฟิศ ให้ตั้งค่าภาษาเป็น **English dots and comma settings** เพื่อให้การอ่านค่า *Cp* เป็นจุดทศนิยม ไม่ใช่ komma

การนำเข้าไฟล์ข้อมูล

ใช้ปุ่ม *Import* ในเนวิเกเตอร์ จะ ได้

▶ ATF: ไฟล์การทดลองจากโปรแกรม LightCycler® รุ่น 3.5.3 หรือก่อนหน้า สามารถนำเข้าไฟล์ FLO ทั้งใดเร็คทอรีภายในครั้งเดียวด้วยการใช้ การนำเข้าแบบกลุ่มใหญ่ (การนำเข้าไฟล์ FLO จะได้ไฟล์ชนิด ABT และ TEM มาพร้อมด้วยอัตโนมัติ)



ข้อมูลดิบที่นำเข้าด้วยไฟล์ชนิด *ATF* จะได้รูปแบบการตรวจวัดรูปแบบ “ATF” ซึ่งจะอ้างอิงช่วงกระตุ้นที่ 470 nm และช่วงรับแสง 6 ช่องที่ 530, 555, 610, 640, 670, และ 710 หากข้อมูลที่นำเข้าอยู่ในรูปแบบการตรวจวัดแบบต่อเนื่อง ค่าที่กำหนดสำหรับการรับสัญญาณแสงจะถูกตั้งไว้ที่ 5 ส่วนการตั้งค่าอื่นจะไม่สนใจ

- ▶ IXO: เป็นไฟล์การทดลองจากโปรแกรม LightCycler® 480 และ LightCycler® รุ่น 4.x โดยสามารถนำเข้าทุกไฟล์การทดลองจากโคเรกทอรีเดียวกันได้ด้วยการนำเข้าแบบกลุ่มใหญ่



เมื่อนำเข้าไฟล์ชนิด IXO จากโปรแกรม LightCycler® รุ่น 4.x, เฉพาะข้อมูลดิบที่จะมาอยู่ในฐานข้อมูลส่วนอื่นๆจะไม่ถูกนำเข้า



ไฟล์ IXO ที่ไม่มีผลรวมจะไม่ถูกนำเข้าและจะมีข้อความข้อผิดพลาด



ในการนำเข้าไฟล์การทดลอง ข้อมูลกลุ่มตัวอย่างย่อยจะมาพร้อมด้วยอัตโนมัติ

การส่งออกไฟล์และข้อมูลดิบของการทดลอง

หากต้องการเก็บไฟล์นอกฐานข้อมูลโปรแกรม หรือ ซ้ายโอนไฟล์ระหว่างฐานข้อมูล จะต้องทำการส่งออกไฟล์ข้อมูล การส่งออกไฟล์จะไม่ลบข้อมูลเดิมแต่เป็นการสำเนาไฟล์ไปยังปลายทางใหม่ที่กำหนด การส่งออกไฟล์จะเป็นในรูปแบบ .ixo แต่สามารถส่งออกในรูปแบบอื่นเช่น XML format



ไฟล์ IXO จากโปรแกรม LightCycler® 480 ไม่สามารถนำเข้าสู่โปรแกรม LightCycler® Software 4.x.

สามารถส่งออกข้อมูลดังนี้:

- ▶ ค่ากำหนดเริ่มต้นผู้ใช้และค่ากำหนดของแผนภูมิและตัวอย่าง
- ▶ การทดลองจากระบบ LightCycler® 480
- ▶ ค่าเส้นมาตรฐาน melting curve
- ▶ ข้อมูลเส้นมาตรฐาน
- ▶ แม่แบบ
- ▶
- ▶ ไฟล์ข้อมูลการชดเชยสัญญาณ
- ▶ บันทึกการทำงานและข้อผิดพลาดของเครื่อง LightCycler 480



การทดลองสามารถส่งออกข้อมูลไปในรูปแบบของข้อความได้ (Experiment Text File)

D

รูปแบบข้อความของการทดลอง

รูปแบบข้อความของการทดลองจะเป็นลักษณะคั่นด้วยแถบ ประกอบด้วย:

- ▶ บรรทัดแรกจะเป็นชื่อการทดลอง
- ▶ บรรทัดที่สองจะเป็นหัวคอลัมน์

ไฟล์ข้อมูลจะประกอบไปด้วย:

- ▶ ตำแหน่งตัวอย่าง
- ▶ ชื่อตัวอย่าง
- ▶ จำนวนโปรแกรม
- ▶ จำนวนส่วนงาน
- ▶ จำนวนรอบ
- ▶ เวลาในการวัดสัญญาณ
- ▶ อุณหภูมิในการวัดสัญญาณ
- ▶ ข้อมูลฟลูออเรสเซนซ์แต่ละช่องสัญญาณ



ข้อมูลสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในรูปแบบข้อความ จะแสดงในแผนภูมิในโปรแกรม เช่น เวลารวมและค่าอ้างอิง

ศึกษาส่วนข้อมูลด้านล่างในการนำเข้าและส่งออกไฟล์ข้อมูล

- ▶ ไฟล์ข้อมูลเดียวจาก LightCycler® 480 ศึกษาใน [Exporting Individual Light- Cycler® 480 Software Objects and Experiment Raw Data and Importing Individual Files](#)
- ▶ ไฟล์ข้อมูลกลุ่มจากไคเร็คทอรี LightCycler® 480 (batch import or export) [Exporting Multiple Files Simultaneously and Importing Multiple Files Simultaneously](#)

การส่งออกข้อมูลการวิเคราะห์

เช่นเดียวกันสามารถส่งออกข้อมูลการวิเคราะห์ผลในรูปแบบของกลุ่มไฟล์เตอร์และไฟล์เตอร์ย่อยได้ ศึกษาในส่วน [Exporting Analysis Results](#)

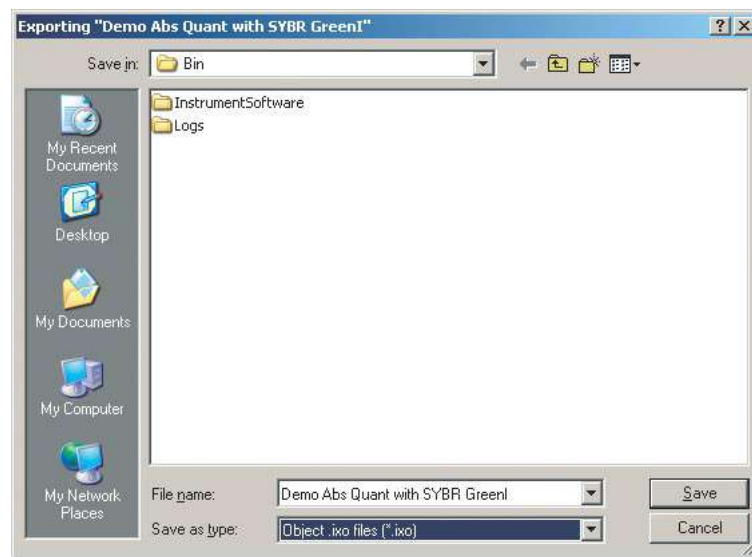
การส่งออกแผนภูมิและตาราง

การส่งออกแผนภูมิและตารางทำได้เช่นกัน โดยศึกษาเพิ่มเติมในส่วน [Working with Charts and Working with Tables](#)

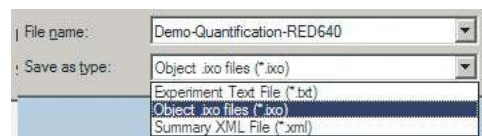
1.5.1 การส่งออกไฟล์ข้อมูลและข้อมูลการทดลองไฟล์เดียวของโปรแกรม LightCycler® 480

สามารถส่งออกผ่านหน้าต่าง *Navigator* หรือเมื่อเปิดหน้าต่างหลักของโปรแกรม LightCycler® 480

- 1 ใช้ทางเลือกดังนี้ในการส่งออกข้อมูลจากโปรแกรม LightCycler® 480:
 - ▶ เลือกข้อมูลใน *Navigator*
 - ▶ เปิดในหน้าต่างหลัก
- 2 เมื่อทำงานกับหน้าต่าง *Navigator* กดเลือกปุ่ม 
 - ▶ หากใช้หน้าต่างหลักให้กดเลือก 
- 3 หน้าต่างจะเปิดกล่องข้อความขึ้นมา ให้เลือกกำหนดปลายทางที่ต้องการส่งไฟล์ออก



- 4 ส่วนช่อง *Save as type* ให้เลือกกำหนดชนิดของนามสกุลไฟล์ที่ต้องการ (*.ixo, *.txt, or *.xml):



- หากไม่ใช้นามสกุลที่กำหนด คือ *.ixo to *.txt, or *.xml, ไฟล์ข้อมูลจะนำเข้าสู่โปรแกรมไม่ได้

- 5 กำหนดชื่อไฟล์ และคลิกบันทึก โดยเริ่มต้นชื่อการทดลองจะเป็นชื่อไฟล์

D

1.5.2 การส่งออกไฟล์ข้อมูลหลายไฟล์พร้อมกัน

โปรแกรมจะมีเครื่องมือในการส่งออกไฟล์ข้อมูลทีละหลายๆไฟล์พร้อมกัน เรียกว่า batch tool ซึ่งทำตามขั้นตอนด้านล่าง



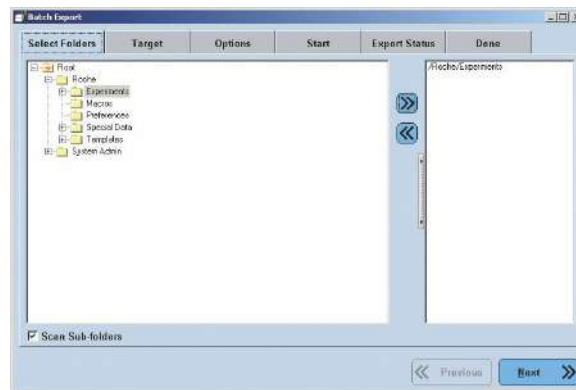
การส่งออกหลายไฟล์พร้อมกันจะทำได้ใน *Navigator*



การส่งออกหลายไฟล์พร้อมกันจะใช้ตัวช่วยสร้าง โดยสามารถทำไปทีละขั้นตอนโดยกดปุ่มต่อไปเรื่อยๆ ปุ่มนี้จะกดได้ก็ต่อเมื่อใส่ข้อมูลที่ต้องการไว้ในแถบปัจจุบันเรียบร้อยแล้ว

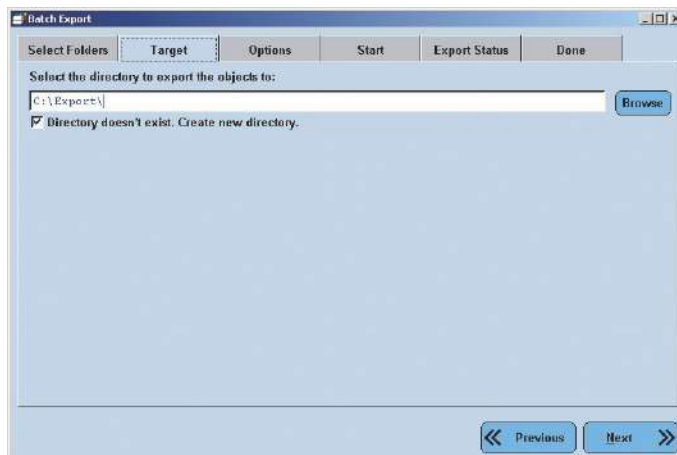
1

คลิกเลือก *Batch Export* เพื่อให้หน้าต่างช่วยสร้างแสดงขึ้น ในแถบ *Select Folders* ให้เลือกโฟลเดอร์ที่ต้องการส่งออกด้านซ้ายแล้ว กดที่  เพื่อให้โฟลเดอร์ที่เลือกไปอยู่ด้านขวา หากต้องการลบโฟลเดอร์ด้านขวาให้กด  เลือกช่อง *Scan Sub-folders* เพื่อรวม โฟลเดอร์ย่อยทั้งหมด



2

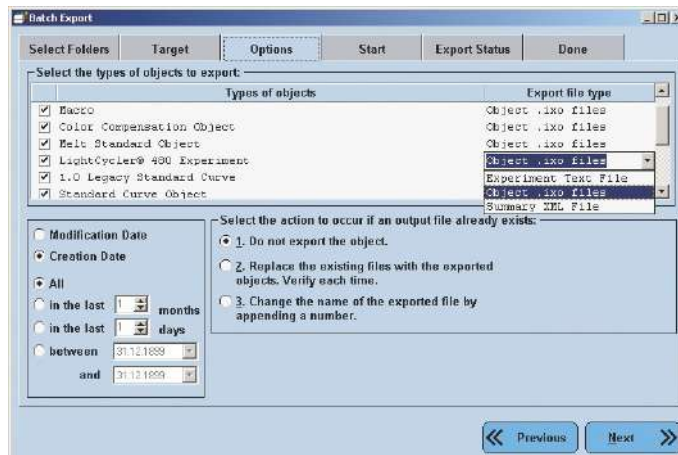
บนแถบ *Target* ให้เลือกกำหนดปลายทางโดยเลือกปุ่ม *Browse* หากไม่มีได้เรีกทอรู้ปลายทางสามารถพิมพ์เองได้ในช่อง แล้วเลือกเครื่องหมายถูกหน้าข้อความด้านล่างช่อง เพื่อให้สร้างปลายทางใหม่ตามกำหนด





ส่วนแถบ *Options* สามารถกำหนดทางเลือกการส่งออกได้หลายแบบ

- ▶ เลือกชนิดไฟล์ที่จะส่งออกจากโฟลเดอร์
สามารถกำหนดเลือกชนิดไฟล์ส่งออกได้ทุกชนิดหรือบางชนิดได้แล้วแต่การกำหนด
- ▶ สามารถระบุไฟล์ส่งออกตามชนิดของไฟล์ได้ ซึ่งสามารถเลือกจากโปรแกรม โดยเริ่มต้นการส่งออกจะเป็นไฟล์ชนิด *.ixo file*
- ▶ สามารถกำหนดไฟล์ส่งออกตามวันที่สร้างหรือแก้ไขได้ โดยช่วงวันที่ระบุจะกำหนดได้ดังนี้
 - ▶ ทั้งหมด
 - ▶ ในช่วง n เดือนที่ผ่านมา
 - ▶ ในช่วง n วันที่ผ่านมา
 - ▶ ระบุช่วงวันที่
- ▶ หากชื่อไฟล์ที่ส่งออกซ้ำกับชื่อไฟล์ที่มีอยู่ที่ปลายทางแล้ว ให้เลือกทำได้ดังนี้:
 - ▶ ไม่ส่งออก
 - ▶ แทนที่ไฟล์นั้นเมื่อได้รับคำยืนยัน
 - ▶ บันทึกเป็นไฟล์ใหม่โดยเพิ่มจำนวนเลขไปที่ท้ายชื่อ
- ▶ ระบุว่าต้องการลบข้อมูลหลังจากส่งออกสำเร็จหรือไม่
- ▶ ระบุว่าโฟลเดอร์ว่างจะลบออกหรือไม่
- ▶ ทางเลือก 2 อันหลังใช้ได้กับกรณีฐานข้อมูลด้านงานวิจัย

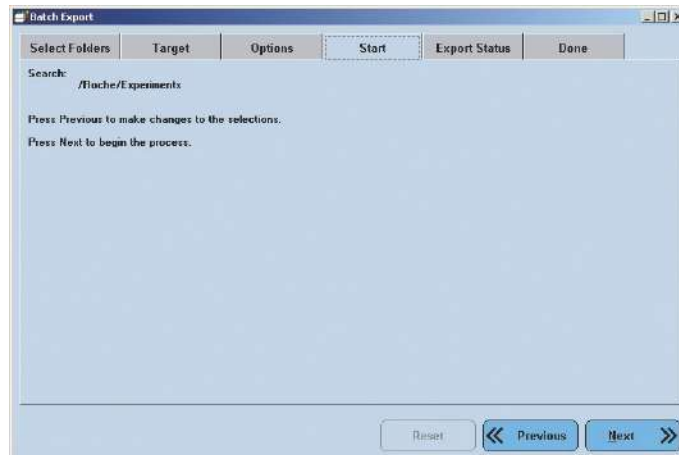


D

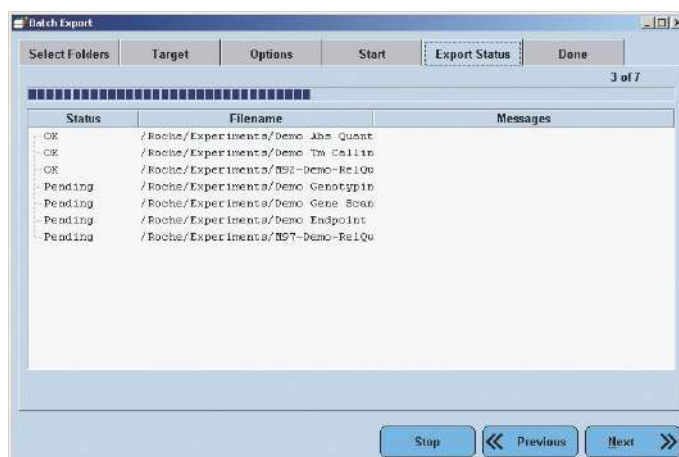


4 ในแถบ *Start* สามารถทบทวนการตั้งค่า และเริ่มขั้นตอนการส่งออก

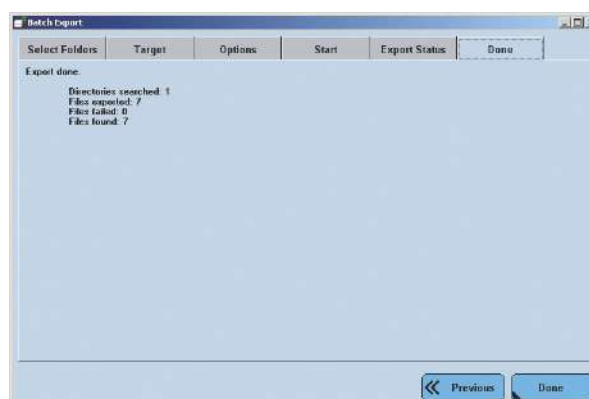
ปุ่ม *Reset* จะมีให้เลือกได้หลังจากการส่งออกเสร็จสิ้นเท่านั้น การกด *Reset* เป็นการใช้อัตราตั้งค่าเก่าที่เคยทำการส่งออกมาทำซ้ำ



5 ในแถบ *Status* สามารถดูสถานะการส่งออกได้ ขณะทำการส่งออกปุ่ม *Stop* จะใช้งานได้ ซึ่งสามารถคลิกหาต้องการหยุดการส่งออก

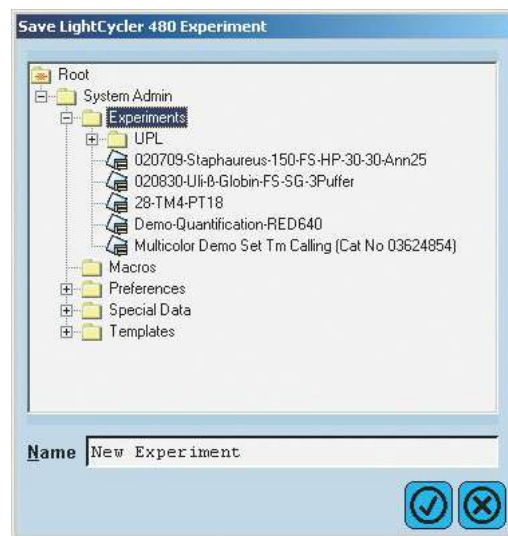


6 ในแถบ *Done* แสดงข้อมูลสรุปของการส่งออก กดเลือก *Done* เมื่อเสร็จ



1.5.3 การนำเข้าข้อมูลที่ละไฟล์

- 1 จาก Navigator กดเลือก *Import*, และเลือกชนิดของไฟล์ที่ต้องการนำเข้า:
 - ▶ สำหรับโปรแกรม LightCycler® 3.5.3 files (FLO, ABT, TEM files), เลือก *ATF Files*
 - ▶ สำหรับโปรแกรม LightCycler® 480 หรือ LightCycler® 4.x files, เลือก *Object .ixo Files*
- 2 ค้นหาและเลือกไฟล์ที่ต้องการแล้วคลิก *Open* ซึ่งไฟล์จะเปิดในหน้าต่างหลัก
 - ▶ หากต้องการเลือกหลายไฟล์พร้อมกันให้กด <Ctrl> ขณะที่เลือกชื่อไฟล์
- 3 ในการบันทึกไฟล์นำเข้าในฐานข้อมูลโปรแกรม LightCycler® 480 ให้กดปุ่ม *Save* กำหนดปลายทางที่ต้องการบันทึกภายใต้ชื่อใหม่ แล้วกด ☒



- ▶ หากนำเข้าไฟล์การทดลองจากโปรแกรม LightCycler® 4.x ที่การทดลองมีการชดเชยสัญญาณสี ให้ทำการนำเข้าไฟล์การชดเชยสัญญาณสีมาด้วย และทำการสร้างเป็นการชดเชยสัญญาณสีไฟล์ใหม่

D

1.5.4 การนำเข้าหลายไฟล์พร้อมกัน

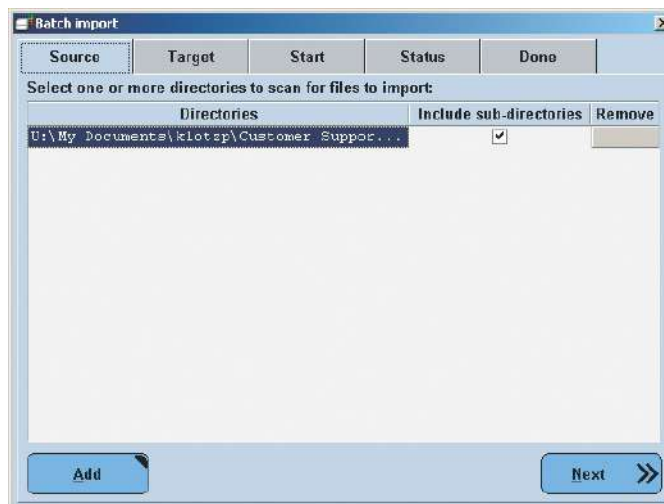
โปรแกรม LightCycler® 480 มีเครื่องมือสำหรับการนำเข้าไฟล์หลายไฟล์พร้อมกัน

- ❗ การนำเข้าไฟล์หลายไฟล์พร้อมกันด้วยโปรแกรม *LightCycler® 3.5.3 (ATF) files*, ไคลเรคทอรีจะต้องมีไฟล์ชนิด *ABT and TEM* ไฟล์ชนิด *FLO* ไม่สามารถนำเข้าได้
- ❗ การนำเข้าหลายไฟล์พร้อมกันต้องทำใน *Navigator*
- 🔍 การนำเข้าหลายไฟล์พร้อมกันจะใช้ตัวช่วยสร้างโดยสามารถทำไปทีละขั้นตอนโดยกดปุ่มต่อไปเรื่อยๆ ปุ่มนี้จะกดได้ก็ต่อเมื่อใส่ข้อมูลที่ต้องการไว้ในแถบปัจจุบันเรียบร้อยแล้ว

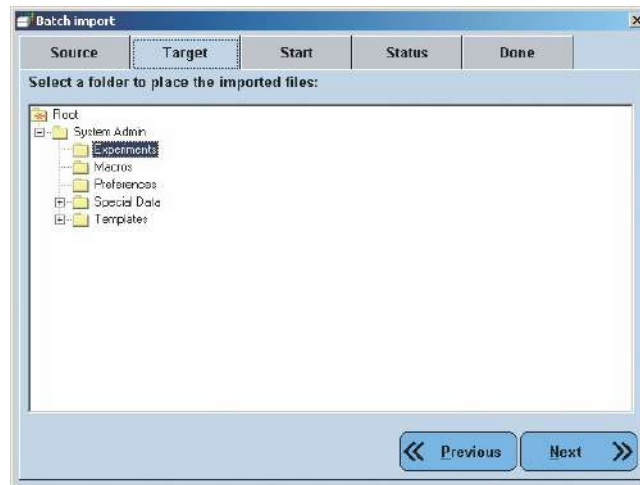
ทำตามคำแนะนำด้านล่างเพื่อทำการนำเข้าไฟล์การทดลอง

- 1 ในส่วน Navigator controls เลือก *Batch Import* หน้าต่างตัวช่วยสร้างจะปรากฏขึ้น

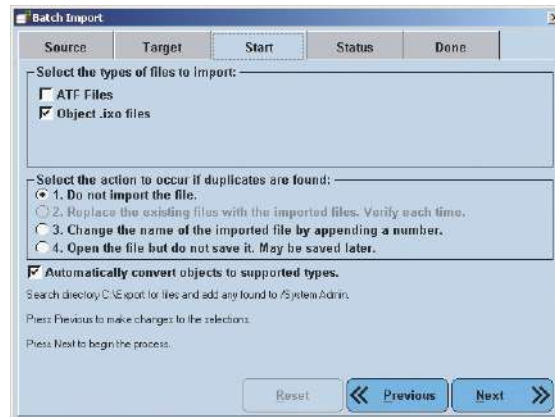
ในแถบ *Source* เลือกกำหนดไคลเรคทอรีที่ต้องการนำเข้าด้วยการกดปุ่ม *Add* และเลือกกดเครื่องหมายถูกที่ *Include sub-directories* เพื่อให้รวมข้อมูลย่อยในไคลเรคทอรีนั้น คลิกที่ *Remove* หากต้องการลบออกจากรายการ



- 2 ในแถบ *Target* ให้เลือกไดเรกทอรีปลายทางในฐานะข้อมูล



- 3 ในแถบ *Start* สามารถกำหนดทางเลือกการนำเข้าและเริ่มต้นการนำเข้า



D

มีทางเลือกดังต่อไปนี้

- ▶ เลือกนำเข้าไฟล์ชนิด ATF หรือ IXO (หรือผสม) จากไดเรกทอรี
- ▶ หากไฟล์ที่ต้องการนำเข้ามีชื่ออยู่แล้วที่ปลายทางที่กำหนด ให้เลือกทางเลือกได้ดังนี้
 - ▶ ไม่ทำการนำเข้า
 - ▶ แทนที่ไฟล์ที่มีอยู่เมื่อได้รับคำยืนยัน
 - ▶ เปลี่ยนชื่อไฟล์โดยการเติมตัวเลขต่อท้ายชื่อไฟล์
 - ▶ เปิดไฟล์แบบที่ยังไม่ทำการบันทึก การบันทึกจะทำโดยผู้ใช้

🔍 ทางเลือกแทนที่ไฟล์เมื่อได้รับคำยืนยันจะอนุญาตเฉพาะฐานข้อมูลวิจัย

- ▶ เลือกกำหนดชนิดของไฟล์ว่าจะแปลงอัตโนมัติหรือไม่
- ▶ กดปุ่ม *Next* เพื่อเริ่มขั้นตอนการนำเข้า
- ▶ ปุ่ม *Reset* ในแถบ *Start* จะกดได้เมื่อการนำเข้าเสร็จสิ้น การกดปุ่ม *Reset* จะเป็นการใช้การตั้งค่าควรวก่อนหน้าในการนำเข้า ซึ่งจะให้นำเข้าซ้ำอีกรอบหรือยกเลิก



-
- 4 บนแถบ *Status* สามารถเลือกดูสถานะของการนำเข้าได้ ขณะการนำเข้ากำลังทำงาน ปุ่ม *Stop* จะมีให้กดเลือกได้ในกรณีที่ต้องการยกเลิกการนำเข้านั้น
 - 5 บนแถบ *Done* จะแสดงข้อมูลสรุปการนำเข้าหลายไฟล์พร้อมกัน กดเลือก *Done* เพื่อปิดหน้าต่างช่วยสร้าง
-



D

2 การสร้างโปรแกรมและการทำการทดลอง

โปรแกรม LightCycler® 480 ควบคุมการทำงานของเครื่อง LightCycler® 480 ผ่านวิธีการทดลองที่สร้างขึ้น จะเป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบการทำงาน และพารามิเตอร์ต่างๆ ในขณะที่ทำการทดลอง โปรแกรมการทดลองจะเป็นตัวเก็บข้อมูลอุณหภูมิและสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากเครื่อง แล้วแสดงให้เห็นได้ในแถบข้อมูล หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองข้อมูลจะถูกบันทึกอัตโนมัติ

ส่วนนี้จะอธิบายขั้นตอนการทำงานของ:

- ▶ การสร้างโปรแกรมการทดลอง
- ▶ การทำการทดลอง
- ▶ การใส่ข้อมูลตัวอย่าง

2.1 การสร้างโปรแกรมการทดลอง

การสร้างโปรแกรมการทดลองจะเป็นการกำหนดจำนวนรอบการทำงานอุณหภูมิขึ้นและลงด้วยเทอร์มอด บล็อก ไซเคิลอร์ และกำหนดข้อมูลทั่วไป ในการสร้างโปรแกรมการทดลอง ผู้ใช้จะต้องอยู่ในระดับ Expert user หรือ Administrator ซึ่งในรายละเอียดสามารถดูเพิ่มเติมได้ในส่วน [Managing User Access](#)



สามารถสร้างโปรแกรมการทดลองได้จากโปรแกรม *LightCycler 480* เมื่อทำการเชื่อมต่อกับเครื่อง หรือไม่เชื่อมต่อก็ได้ หากไม่ได้เชื่อมต่อกับเครื่อง ให้กำหนดเครื่องเสมือนในโปรแกรมเป็นค่าเริ่มต้นแทนก่อนในการสร้างโปรแกรมการทดลอง ขณะที่สร้างโปรแกรมการทดลอง ไม่จำเป็นต้องเชื่อมต่อกับเครื่องได้ (รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน [Administrative Tools](#))



วิธีการทำ PCR ที่เคยใช้กับเครื่อง *LightCycler® Carousel-Based System (LightCycler® 1.5 and 2.0 Instruments)* สามารถถ่ายโอนมาใช้กับเครื่อง *LightCycler® 480* ได้ โดยปฏิบัติตามนี้:

- ▶ ห้ามตั้งค่าเวลาการทดลองที่ 0 วินาที!
 - ▶ หากต้องการกำหนดเวลาต่ำกว่า 10 วินาที จะต้องใช้พารามิเตอร์ที่จำเพาะค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่เคยใช้กับวิธีการทดลองในการทำพีซีอาร์ปกติทั่วไป สามารถนำมาใช้กับเครื่อง *LightCycler 480* ได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนอะไร
- โน้ต: การลดเวลาการทำงานแต่ละขั้นลง และเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสามารถทำได้

ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ ในการสร้างโปรแกรมการทดลอง

การสร้างโปรแกรมการทดลองใหม่:

- 1 ในขั้นแรกให้กำหนดทางเลือกใดทางเลือกหนึ่งดังนี้:
 - ▶ คลิก *New Experiment* ตรงส่วนการสร้างโปรแกรมในหน้าต่างภาพรวม
 - ▶ คลิก *New Experiment from Template* ตรงส่วนการสร้างโปรแกรมในหน้าต่างภาพรวม โดยเลือกแม่แบบการทำงานให้เหมาะสม สามารถเลือกกลุ่มย่อยตัวอย่าง หรือการแก้ไขตัวอย่าง เมื่อเลือกได้แล้วให้คลิก ☒ ข้อมูลเพิ่มเติมดูได้ในส่วน [Working with Templates and Macros](#)
 - ▶ คลิก *New Experiment from Macro* ตรงส่วนการสร้างโปรแกรมในหน้าต่างภาพรวม โดยเลือกมาโครที่ต้องการใช้ให้เหมาะสม จากนั้นคลิก ☒ ข้อมูลเพิ่มเติมดูได้ในส่วน [Working with Templates and Macros](#)
 - ▶ กลับไปที่หน้าต่าง *Navigator* แล้วคลิก *New* เพื่อเลือกเครื่อง LightCycler® 480 สำหรับการทดลอง จากนั้น คลิก ☒

- 2 ในส่วน *Setup* ของ แถบ *Run Protocol* ให้กำหนดค่าพารามิเตอร์ดังนี้:

รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ

ขนาดบล็อก (กำหนดโดยเครื่อง เป็นการแสดงข้อมูลเท่านั้น)

ชื่อเพลท

ปริมาตรปฏิกิริยา

ชื่อการตรวจวัดสัญญาณสี (ทางเลือก)

เลขลือตน้ำยา (ทางเลือก)

ชื่อทดสอบ (ทางเลือก)

- 3 เลือกรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณจากรายการที่มีในเมนู หรือจะกำหนดเองโดยใช้ทางเลือกการ customize (เพิ่มเติมดูได้ในส่วน [Setting Detection Formats](#))

- 4 ใส่ชื่อเพลทลงในช่อง *Plate ID* ซึ่งจะพิมพ์หรือใช้เครื่องสแกนบาร์โค้ดเพลทก็ได้ หากเปิดการใช้งานการอ่านบาร์โค้ด เครื่องจะอ่านรหัสจากเพลทอัตโนมัติ เมื่อทำการใส่เพลทเข้าเครื่อง LightCycler® 480

-  หากใส่ชื่อเพลทโดยการพิมพ์ลงไปในช่วง *Plate ID* เครื่องจะอ่านรหัสบาร์โค้ดของเพลทอัตโนมัติ ถ้าข้อมูลไม่ตรงกัน เครื่องจะทำการแทนที่ด้วยบาร์โค้ดที่อ่านได้จากเครื่อง ให้ทำการยืนยัน หากผู้ใช้ปฏิเสธ เครื่องจะไม่เริ่มการทำงาน ทั้งนี้สามารถเลือกใช้หรือไม่ใช้การอ่านบาร์โค้ดอัตโนมัติของเครื่องได้ โดยดูรายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน [Instruments](#)



5 เลือกปริมาตรปฏิกิริยาเป็นหน่วยไมโครลิตรดังนี้

- ▶ 96-well thermal block cycler: 10 – 100 ไมโครลิตร
- ▶ 384-well thermal block cycler: 5 – 20 ไมโครลิตร

⚠ เป็นไปได้หากจะใช้ปริมาตรต่ำถึง 3 ไมโครลิตร แต่ไม่แนะนำเนื่องจากมีความเสี่ยงต่อการระเหยของน้ำยาและจะทำให้การทดลองล้มเหลว หากต้องการใช้ปริมาตร < 5 ไมโครลิตรให้หยดน้ำมันคลุมหน้าปฏิกิริยา ในเพลทชนิด 384 หลุม ปริมาตรที่กำหนดไม่มีผลต่อการขึ้นลงของอุณหภูมิ แต่มีผลต่อการวัดสัญญาณ ซึ่งวิธีมีการวัดสัญญาณจะปรับตามปริมาตร หากกำหนดผิดจะมีผลต่อสัญญาณรบกวน แต่ไม่มีผลทำให้การทดลองล้มเหลว ส่วนเพลทชนิด 96 หลุม ความแตกต่างระหว่างปริมาตรกำหนดกับปริมาตรจริงจะมีผลต่อการควบคุมอุณหภูมิทำให้เกิดผลต่อการทดลองมากกว่า

6

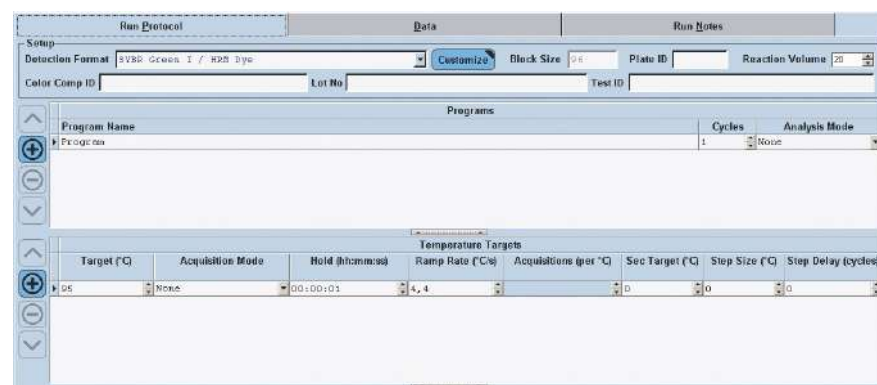
การใส่ข้อมูลด้านล่างนี้จะเป็นทางเลือกซึ่งหากเป็นชื่อไฟล์การซดเซสชันฐานสี่ต้องเช็คให้แน่ใจว่าตรงกับที่ต้องการใช้หรือไม่

สามารถทำการแก้ไขข้อมูลด้านล่างนี้ ก่อน ขณะ หรือหลังทำการทดลองก็ได้

- ▶ ใส่ชื่อไฟล์การซดเซสชันฐานสี่ในช่อง Color Comp ID ให้ตรงกับที่ต้องการจะใช้
- ▶ ในช่อง Lot No ให้ใส่เลขล็อตน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง
- ▶ ในช่อง Test ID ให้ใส่เลขการทดสอบ ที่ใช้ในการทดลอง

7

ในส่วน *Programs* และ *Temperature Targets* ให้คลิก  เพื่อเพิ่มโปรแกรมหรืออุณหภูมิเป้าหมายที่ต้องการกำหนดในขั้นตอนการทดลอง แต่ละโปรแกรมที่เพิ่มให้ตั้งชื่อ กำหนดจำนวนรอบ และวิธีการวิเคราะห์



8

ในทางกลับกัน สามารถเลือกแม่แบบได้ดังนี้

- ▶ คลิก *Apply Template* เพื่อแสดงกล่องข้อมูล *Apply Template*
- ▶ เลือกแม่แบบจากในรายการและคลิก 

แม่แบบจะถูกนำไปใช้ในการทดลองอันใหม่ การแก้ไขพารามิเตอร์โปรแกรมการทดลอง และอุณหภูมิเป้าหมายจำเป็นต้องทำ

9

(ทางเลือก) ในแถบ *Module* ให้คลิก *Subset Editor* เพื่อที่จะกำหนดกลุ่มย่อยของตัวอย่าง รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน [Working with Subsets](#)



การกำหนดกลุ่มย่อยของตัวอย่างสามารถทำได้ขณะทำการทดลอง หรือหลังจากการทดลองเสร็จสิ้นแล้ว ไม่จำเป็นต้องทำการทดลองเริ่มก็ได้



10 (ทางเลือก) ในแถบ *Module* คลิก *Sample Editor* เพื่อกำหนดข้อมูลตัวอย่าง

11 เตรียมเพลทและใส่เข้าเครื่องตามที่อธิบายไว้ในส่วนการปฏิบัติงาน

12 คลิก *Start Run*.

ปุ่ม *Start Run* จะพร้อมสำหรับการใช้งานต่อเมื่อทำการใส่เพลทเข้าเครื่องแล้ว

13 ข้อความบันทึกการทดลองจะปรากฏให้ใส่ชื่อการทดลองและกดบันทึกตามโฟลเดอร์ปลายทางที่ต้องการ หากใช้เพลทชนิดใส จะมีข้อความเตือนว่าระบบเซนเซอร์เพลทปิดอยู่ ให้ทำการตรวจเช็คและกำหนดในโปรแกรม

2.1.1 การตั้งค่ารูปแบบการวัดสัญญาณ

การตั้งค่าการวัดสัญญาณจะต้องเหมาะกับการทดลอง เมื่อเลือก คลิก *Customize* ในพื้นที่การตั้งค่าตรงแถบ *Run Protocol* จะปรากฏกล่องรูปแบบการวัดสัญญาณมาให้กำหนด การเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดกับเฉพาะงานการทดลองปัจจุบันเท่านั้น

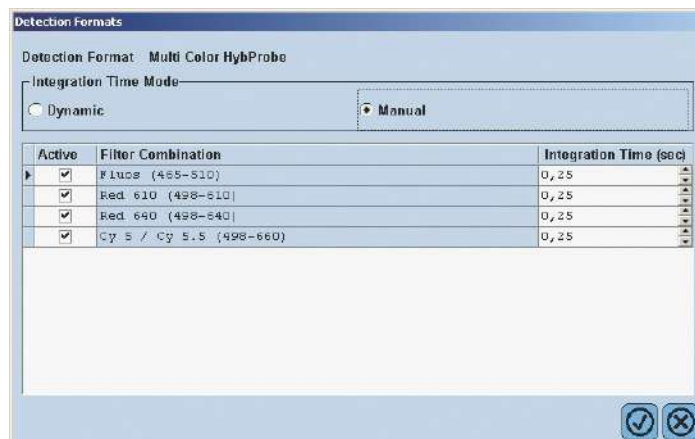
! ไม่สามารถเปลี่ยนหรือกำหนดการวัดสัญญาณภาพหลังจากเริ่มการทดลองไปแล้ว หากเริ่มการทำงานด้วยรูปแบบการวัดสัญญาณที่ไม่เหมาะสมกับการทดลองนั้น จะส่งผลให้การทดลองล้มเหลวสูญหายเนื่องจากไม่มีข้อมูลจากการทดลอง

การกำหนดรูปแบบการวัดสัญญาณ:

1 ในบริเวณ *Setup* เลือกรูปแบบการวัดสัญญาณจากรายการเมนู

2 ในการเปลี่ยนแปลงการตั้งค่าการวัดสัญญาณที่มีให้เลือกให้คลิก *Customize*

รูปแบบการวัดสัญญาณจะมีดังนี้





การเลือกเวลาในการจับสัญญาณ:

▶ ไดนามิกส์ : ไม่ต้องใส่ข้อมูลเพิ่มเติมใดๆ



ในรูปแบบนี้ โปรแกรมจะใช้ปัจจัยการแยกสายดีเอ็นเอและการหาปริมาณเพื่อกำหนดการจับคู่ของกรองแสงต่อการคาดการณ์สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์บนพื้นฐานค่าเริ่มต้นของปฏิกิริยา



ค่าสูงสุดของการรับสัญญาณในรูปแบบนี้จะเป็นที่ 1 วินาทีสำหรับ *Hydrolysis Probe* และ 2 วินาทีสำหรับ *HybProbe and SimpleProbe Probes* การกำหนดนี้จะให้สัญญาณเพียงพอในเวลาที่เหมาะสม ดังนั้นเวลาทั้งหมดในการวัดสัญญาณจะขึ้นอยู่กับจำนวนช่องกรองแสงที่จับคู่กันเช่น *4-color Hydrolysis probe* จะใช้เวลา 4 วินาทีต่อการวัดสัญญาณ หากเลือกรูปแบบไดนามิกส์ เวลาในการวัดสัญญาณครั้งแรกจะมากกว่าปกติ เพราะ โปรแกรมต้องการการคำนวณเพิ่มเติมเพื่อให้ได้เวลาที่เหมาะสมซึ่งอ้างอิงค่าสัญญาณเริ่มแรก

▶ แมนนวล : กำหนดเวลาสำหรับการจับคู่ของสัญญาณกรองแสง โดยกำหนดเป็นวินาที ในช่วง 0.01-10 วินาที เวลาการจับสัญญาณกำหนดได้จากเวลาของกล้อง CCD



เลือกจับคู่ของสัญญาณตามรูปแบบการวัดสัญญาณ โดยเริ่มต้นจากล่างข้อมูลการจับคู่เริ่มต้นก่อน



ยกตัวอย่างหากเลือกการทำงานแบบ *Multicolor HybProbe detection format* ซึ่งมี 4 ช่องสัญญาณให้เลือก แต่หากต้องการใช้เพียง 2 สีเช่นสี *Red 610- and Red 640-labeled probes* ให้ยกเลิกสีชนิด *Fluos and Cy5* ออก แม้ว่าการตั้งค่าตามการเริ่มต้นจะไม่เป็นอันตรายต่อการทดลองอะไร แต่การมีช่องสัญญาณที่ไม่ได้ใช้จะทำให้เวลาในการจับสัญญาณเกินจำเป็น



ช่องกรองแสง *Fluos* ใน *Multicolor HybProbe detection* จะใช้กับการทำการทดลองการขยายสัญญาณสีเท่านั้น



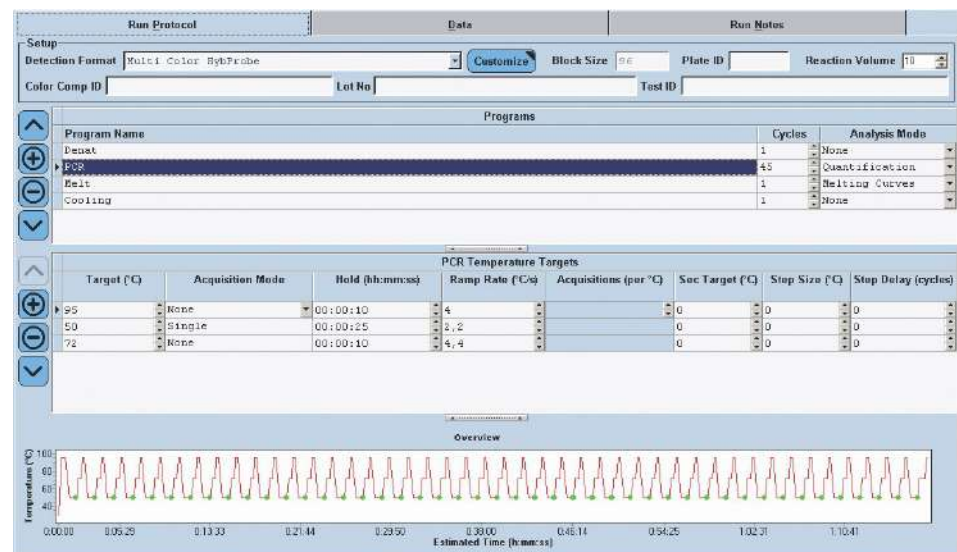
คลิก apply กับช่องสัญญาณกรองแสงที่กำหนดในการทดลอง



2.1.2 การกำหนดโปรแกรมและอุณหภูมิเป้าหมาย

แต่ละการทดลองจะมีมากกว่า 1 โปรแกรม แต่ละโปรแกรมจะมีหลายรอบการทำงาน ใน 1 โปรแกรมจะมี 1 หรือมากกว่า 1 อุณหภูมิเป้าหมาย อุณหภูมิเป้าหมายคืออุณหภูมิที่เครื่องต้องทำให้ถึง รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในขั้นนั้น ความเร็วในการทำอุณหภูมิ และพารามิเตอร์อื่นๆ สามารถกำหนดได้ในแถบ *Run Protocol* ของการทดลอง

ตัวอย่างด้านล่างจะประกอบไปด้วย 4 โปรแกรม: Denat, PCR, Melt and Cooling หากเลือกไปที่โปรแกรม PCR (45 รอบ) ตารางแสดงรายละเอียดจะปรากฏอัตโนมัติ ซึ่งมีค่า อุณหภูมิเป้าหมายที่กำหนด



วิธีการกำหนดโปรแกรมและอุณหภูมิเป้าหมาย

- 1 ในส่วนโปรแกรมของแถบวิธีการทดลอง คลิก เพื่อเพิ่มโปรแกรมใหม่
ค่าเริ่มต้นจะเป็นชื่อ “Program” เกิดขึ้น ซึ่งจะมีอุณหภูมิเป้าหมายเริ่มต้นไว้เช่นกัน
 สามารถเพิ่มโปรแกรมได้ถึง 99 โปรแกรม



- 2 แก้ไขค่าเริ่มต้น ตรงพารามิเตอร์ต่างๆ คลิก <Tab> ในคีย์บอร์ด เพื่อไปยังคอลัมน์ถัดไป (หากทำผิดพลาด สามารถกด  เพื่อลบโปรแกรมและเริ่มใหม่ได้)

พารามิเตอร์	คำอธิบาย/คำแนะนำ	ค่าที่ปรากฏ
Program Name	ตั้งชื่อโปรแกรมโดยคลิกที่ชื่อโปรแกรมและใส่ข้อมูลใหม่	ใช้ตัวอักษรใดก็ได้
Cycles	จำนวนซ้ำที่ต้องการให้โปรแกรมทำ สามารถกำหนดค่าได้จากการเลือกถูกระหว่างขึ้น-ลง	1 — 99
Analysis Mode	ชนิดของการวิเคราะห์ สามารถเลือกได้จากเมนูในรายการ	None: ไม่มีการวิเคราะห์
	ในการวิเคราะห์กำหนดค่าพารามิเตอร์ได้ภายใต้อุณหภูมิที่กำหนด เช่น การหาปริมาณสารพันธุกรรม การเลือกเป็นแบบวัดสัญญาณต่อเนื่องไม่ได้	Quantification: การวิเคราะห์ปริมาณสารพันธุกรรม Melting curves: การวิเคราะห์ melting curve Color Compensation: การวิเคราะห์การชดเชยสัญญาณสี

- 3 ในส่วนการกำหนดอุณหภูมิ ให้แก้ไขค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

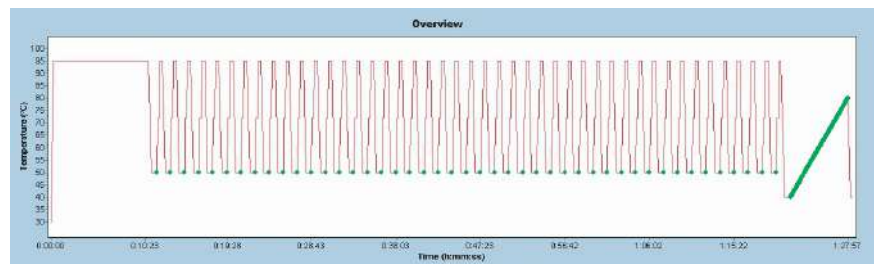
พารามิเตอร์	คำอธิบาย/คำแนะนำ	ค่าที่ปรากฏ
Target	กำหนดอุณหภูมิที่ต้องการ	+37°C to +99°C, ค่าเริ่มต้น +95°C สำหรับ Melting Curve analysis:
Acquisition Mode	ความถี่ของการวัดสัญญาณสามารถเลือกชนิดของความถี่ในการวัดได้จากเมนู	None: ไม่วัดสัญญาณ Single: วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ 1 ครั้งเมื่อสิ้นสุดรอบการทำงาน และวัดถูกรอบ Continuous: วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ตลอดเวลา ใช้มากในการทำงาน melting curve หรือการวิเคราะห์การชดเชยสัญญาณสี
Hold	เวลาที่ค้างไว้ที่อุณหภูมิที่กำหนดในรูปแบบ ชั่วโมง:นาที:วินาที	00:00:01 — 12:00:00



พารามิเตอร์	คำอธิบาย/คำแนะนำ	ค่าที่ปรากฏ
Ramp Rate (°C/s)	อัตราการทำอุณหภูมิขึ้น-ลง ไปยังอุณหภูมิเป้าหมาย  ค่าสูงสุดของอัตราการทำอุณหภูมิขึ้นกับชนิดของบล็อก	▶ อัตราการขึ้น: 96-well block: 1.0 — 4.4°C/s 384-well block: 1.0 — 4.8°C/s ▶ อัตราการลง: 96-well block: 1.0 — 2.2°C/s 384-well block: 1.0 — 2.5°C/s
Acquisitions (per °C)	จำนวนข้อมูลการวัดสัญญาณและการได้รับต่อองศา จะมีเฉพาะช่องข้อมูลนี้  เพื่อที่จะได้ข้อมูลต่อองศา เซลเช็ชส ในการวิเคราะห์ <i>melting curve</i> จะไม่คำนึงถึงช่องกรองแสง ถ้ากำหนดให้เป็น การเก็บสัญญาณต่อองศา ไม่ใช่ องศาต่อวินาที	1 to 100, ค่าเริ่มต้น 5 การกำหนดค่าที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์ขึ้นอยู่ กับแต่ละการทดลองซึ่ง สามารถกำหนดได้ในช่วง 1-10 ต่อองศา สำหรับ HRM แนะนำ เป็น 25 ต่อองศา เพื่อจะ พอดีความละเอียดในการวิเคราะห์ Gene Scanning
Sec Target (°C)	อุณหภูมิที่สองของเป้าหมาย ในรอบสุดท้ายของโปรแกรม ให้ใส่ค่าอุณหภูมิที่ช่องนี้หากต้องการ	ค่าเริ่มต้น: 0°C (ไม่มีอุณหภูมิที่สองของเป้าหมาย) ช่วงกำหนด: +37°C to +99°C
Step Size (°C)	จำนวนองศาที่จะปรับจากอุณหภูมิแรกไปยังอุณหภูมิที่สอง	ค่าเริ่มต้น: 0°C (ไม่มี) ช่วงที่กำหนด: 0.1°C to 20°C
Step Delay (cycles)	จำนวนรอบที่ต้องการให้ทำการเริ่มงาน หากมีการกำหนด step size	ค่าเริ่มต้น: 0 (เริ่มจากรอบแรก) ช่วงกำหนด: 0 — 99



4. คลิก  เพื่อเพิ่มอุณหภูมิเป้าหมายจากโปรแกรมปัจจุบัน และใส่ค่าพารามิเตอร์ ทำซ้ำหากต้องการกำหนดเพิ่มในโปรแกรมที่ตั้งค่าอยู่
 -  สามารถเพิ่มได้สูงสุดถึง 99 อุณหภูมิเป้าหมาย
5. ทำซ้ำขั้นที่ 1-4 เพื่อสร้างโปรแกรมและอุณหภูมิเป้าหมาย
 -  หากต้องการเปลี่ยนแปลงลำดับของโปรแกรมหรืออุณหภูมิเป้าหมายให้กด  หรือ  เพื่อย้ายขั้นตอน หากต้องการลบรายการออกให้กด 
 -  ในโปรแกรมท้ายสุดควรเป็นการทำอุณหภูมิที่ $+40^{\circ}\text{C}$ และค้างไว้ 30 วินาที เพื่อให้หน้าแปลตออกได้สะดวก
6. สามารถเลือกดูภาพรวมของโปรแกรมในลักษณะกราฟได้ โดยเช็คจากกราฟว่าการทดลองแสดงอุณหภูมิ ตรงกับที่กำหนดหรือไม่



-  ระยะเวลาที่แสดงจะเป็นการประเมินคร่าวๆ ไม่ใช่เวลาในการทดสอบจริงที่ใช้ในการทำงาน แต่จะใกล้เคียง
- 7. คลิก  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึก โดยเลือกปลายทางที่จะบันทึกวิธีการทดลองนี้ กำหนดชื่อและคลิก 

2.1.3 การปรับแต่งการแสดงผลข้อมูลออนไลน์

ขณะทำการทดลอง ข้อมูลจะแสดงผ่านหน้าจอในรูปแบบกราฟในแถบข้อมูล ซึ่งมี 3 ลักษณะ:

- ▶ Fluorescence History: แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างในช่องกรองแสงที่เลือกต่อเวลา
- ▶ Temperature History: แสดงอุณหภูมิและการเก็บสัญญาณขณะทำการทดลอง
- ▶ Exposure History: แสดงเวลาสะสมต่อจำนวนการเก็บสัญญาณ

สามารถเปลี่ยนชนิดข้อมูลกราฟและปรับแต่งการแสดงผลได้

-  สามารถปรับแต่งเปลี่ยนการแสดงผลข้อมูลออนไลน์ขณะทำการทดลองได้

วิธีการปรับแต่งการแสดงผลข้อมูลออนไลน์:

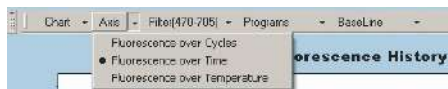
- 1 ในหน้าต่าง *Run* เลือกแถบ *Data* และคลิก  เหนือกราฟที่ต้องการปรับแต่ง ทางเลือกกราฟจะปรากฏขึ้น มีเมนูกราฟ กราฟฟลูออเรสเซนซ์จะมีทางเลือกเพิ่ม

- 2 เพื่อเปลี่ยนชนิดของกราฟให้เลือกได้ใน เมนู *Chart* ดังนี้:

- ▶ Fluorescence History: แสดงฟลูออเรสเซนซ์ต่อเวลา ต่อรอบที่ หรือต่ออุณหภูมิ
- ▶ Temperature History: แสดงอุณหภูมิต่อเวลา
- ▶ Exposure History: แสดงเวลาสะสมต่อจำนวนการเก็บสัญญาณ

- 3 ในการปรับแต่งทางเลือกการแสดงผลใน *Fluorescence History*:

เลือกชนิดแกน (แกน X แสดงชนิดข้อมูล), การจับคู่ช่องสัญญาณ และ โปรแกรมที่มีข้อมูลที่ต้องการดูรายละเอียด นอกจากนั้นสามารถดูด้วยการเลือกหรือยกเลิกการเลือกการลบเส้นฐาน



2.1.4 การเพิ่มโน้ตการทำการทดลอง

การเพิ่มความคิดเห็นในการทดลองลงในแถบ *Run Notes*

2.2 การทำการทดลอง

หลังจากกำหนดค่าพารามิเตอร์ (โปรแกรมและอุณหภูมิเป้าหมาย) และกราฟออนไลน์ เครื่องก็พร้อมสำหรับการทำงาน

วิธีเริ่มการทดลอง:

- 1 เตรียมเครื่อง LightCycler® 480 ตามคำแนะนำในการปฏิบัติการ

- 2 ใส่เพลทเข้าเครื่อง LightCycler® 480 ตามคำแนะนำในการปฏิบัติการ

- 3 คลิก *Start Run* ในหน้าต่าง *Run Protocol* หรือ แถบ *Data*



จะเริ่มการทดลองได้เมื่อทำการเชื่อมต่อเครื่องกับโปรแกรมเครื่อง และทำการใส่เพลทเข้าเครื่องเรียบร้อยแล้ว

- 4 จะต้องทำการบันทึกการทดลองโดยใช้ชื่อการทดลองและกำหนดเลขทางของข้อมูลที่ต้องการบันทึก



หากไม่ทำการบันทึก จะไม่สามารถเริ่มการทดลองได้

- 5 สถานะแถบข้อมูล จะบ่งบอกสถานะการดำเนินการทดลอง



- 6 เมื่อขณะทำการทดลอง ตรงส่วนของข้อความจะแสดงข้อมูล ค่าเตือน และข้อผิดพลาดระหว่างการทำงาน ข้อมูลผลการทดลองจะแสดงในกราฟแถบข้อมูล

- 7 ในการดูข้อมูลผลการทดลอง ของแต่ละตัวอย่าง ให้คลิกตัวอย่างในตารางตัวอย่าง *Sample Editor* หรือ *Sample Table* ทำการแก้ไขตัวอย่างได้ และหากต้องการปรับแต่ง การตั้งค่ากราฟ ระหว่างการทดลองกำลังดำเนินการก็สามารถทำได้เช่นกัน [Customizing the Online Data Display](#).



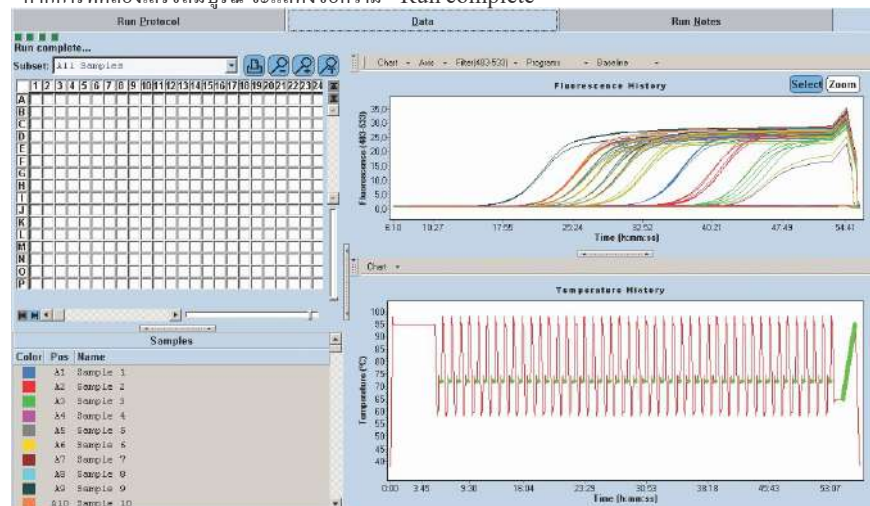
- 8 (ทางเลือก) สามารถเลือกใช้ไฟล์การชดเชยสัญญาณหลังจากทำการทดลอง โดยเลือกปิดหรือเปิดปุ่ม *Color Comp*

Color Comp (Off)	ไม่มีไฟล์การชดเชยสัญญาณให้เลือกปุ่มนี้หากไม่ใช้การชดเชยสัญญาณ
In Use	หากเลือกจะมีรายการไฟล์ชดเชยสัญญาณจาก selected color compensation ให้เลือกใช้ไฟล์ที่ต้องการข้างหลังชื่อไฟล์จะวิ่งแสดงช่องสัญญาณที่จับคู่ในการทำการวิเคราะห์การชดเชยสัญญาณ
In Database	ให้เลือกใช้การชดเชยสัญญาณจากรายการ <i>Available Color Compensations</i> แต่ละไฟล์จะแสดงชื่อ วันที่ ช่องคู่สัญญาณที่ทำการชดเชยสัญญาณ

- 9 (ทางเลือก) ในการปรับหรือหยุดการทำงานระหว่างทดลอง:

- ▶ คลิก *End Program* เพื่อหยุดการทำงานในโปรแกรมนั้น แล้วทำโปรแกรมถัดไป
- ! ให้แน่ใจว่าหากทำการหยุดแล้ว จะได้ข้อมูลสมบูรณ์และทำการวิเคราะห์ให้ได้
- ▶ คลิก + 10 Cycles เพื่อเพิ่มจำนวนรอบอีก 10 รอบในการทำโปรแกรมปัจจุบัน
- ▶ คลิก *Abort Run* เพื่อยกเลิกการทำงาน (ปุ่ม *Abort Run* button จะขึ้นมาแทนที่ปุ่ม *Start Run* ในระหว่างการทำงาน)
- ! การขึ้นอัน *Abort Run* จะยกเลิกการทำงานทันที ทำให้ผลไม่สมบูรณ์ เช่นกันกับการยกเลิกจากการที่เครื่องหรือโปรแกรมมีปัญหา การวิเคราะห์ข้อมูลก็จะไม่สามารถทำได้ และไม่มีทางนำข้อมูลการทำงานกลับมาได้

- 10 หากการทดลองเสร็จสมบูรณ์ จะแสดงข้อความ “Run complete”



- 11 คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module* และใส่ข้อมูลตัวอย่าง

- สามารถแก้ไข ใส่ข้อมูลตัวอย่างก่อน หรือ ระหว่าง หรือหลังจากทำการทดลองเสร็จสมบูรณ์ก็ได้ แต่แนะนำให้ใส่ข้อมูลก่อนการทำงานจะดีกว่า



ในระหว่างการทำงาน การเก็บข้อมูลจำเป็นต้องใช้ความจำของเครื่องจึงแนะนำให้ไม่มีการใช้งานในส่วนควบคุมระหว่างการทดลอง ทำการขอโปรแกรมในขณะที่ทำ *High Resolution Melting* และการทดลองที่ใช้เฟลทชนิด 384-well จะช่วยให้การถ่ายโอนข้อมูลเร็วขึ้น

หากการทำงานเสร็จสมบูรณ์โดยไม่มีข้อผิดพลาด การบันทึกจะอัตโนมัติในฐานข้อมูลและสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม

แม้ว่าจะไม่มีการจัดเก็บข้อมูลอัตโนมัติ โปรแกรม LightCycler® 480 รุ่น 1.5.1 จะบันทึก 10 การทดลองล่าสุดในโฟลเดอร์

► C:\ProgramData\Roche\LightCycler480\Backup\

ไฟล์การทดลองจะถูกบันทึกเป็นนามสกุล*.ixo และสามารถนำเข้าสู่โปรแกรม LightCycler® 480



หากการเชื่อมต่อระหว่างเครื่องกับโปรแกรมมีปัญหาระหว่างการทำการทดลอง โปรแกรมจะเก็บข้อมูลอัตโนมัติหลังจากที่การเชื่อมต่อกลับมาเป็นปกติ โดยที่ต้องไม่เกิน 7 นาที หากเกินจะไม่สามารถเก็บข้อมูลได้และค่าเตือนจะแจ้งเตือนมา หากข้อมูลนั้นยังคงอยู่ในเครื่อง จะสามารถกู้คืนได้อัตโนมัติเมื่อเข้าสู่ระบบในครั้งต่อไป แต่หากไม่พบข้อมูลที่เกี่ยวข้องอยู่ในฐานข้อมูล โปรแกรมจะให้ยืนยันการลบข้อมูลนั้น

2.3 การใส่ข้อมูลตัวอย่าง

ใช้ *Sample Editor* ในโปรแกรม เพื่อบันทึกข้อมูลตัวอย่าง สามารถใส่ข้อมูลตัวอย่างทั้งก่อน ขณะ หรือหลังการทดลองเสร็จสิ้นก็ได้



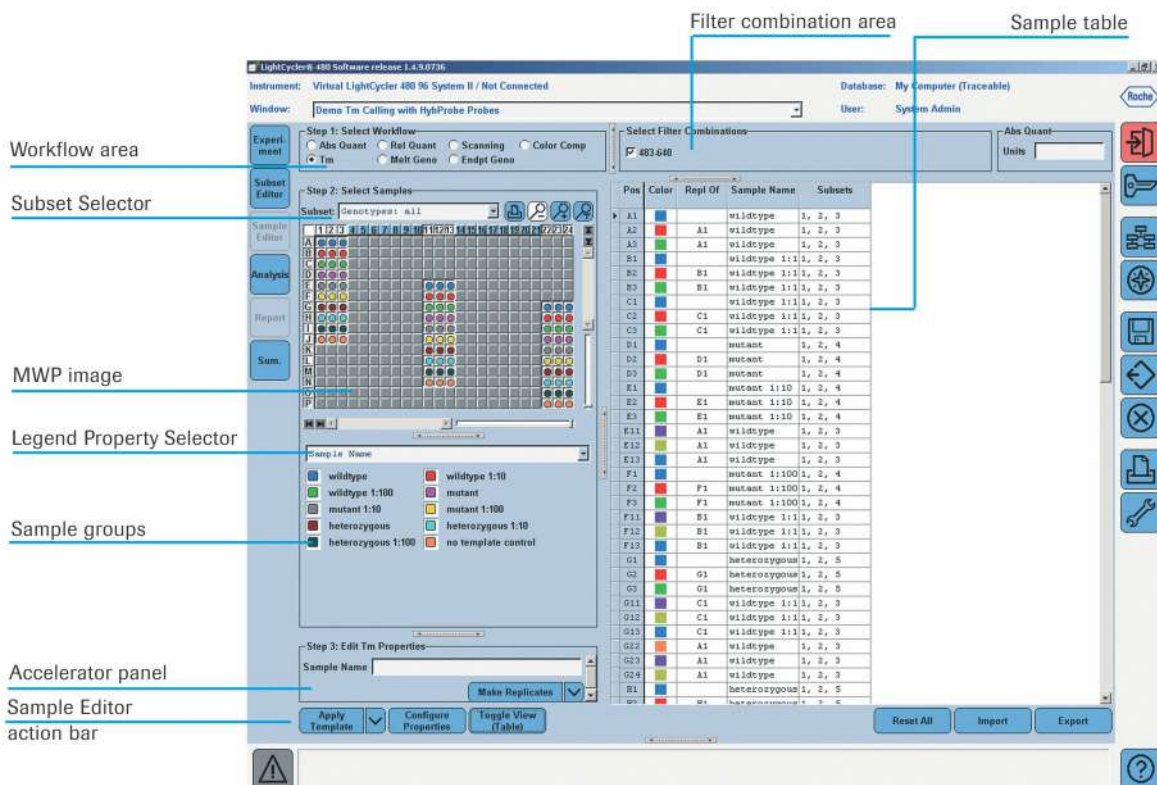
ช่องที่แก้ไขได้ จะเป็นสีขาว ส่วนช่องที่แก้ไขไม่ได้จะเป็นสีฟ้า เฉพาะชื่อที่ไม่ใช่การซ้ำที่แก้ไขได้



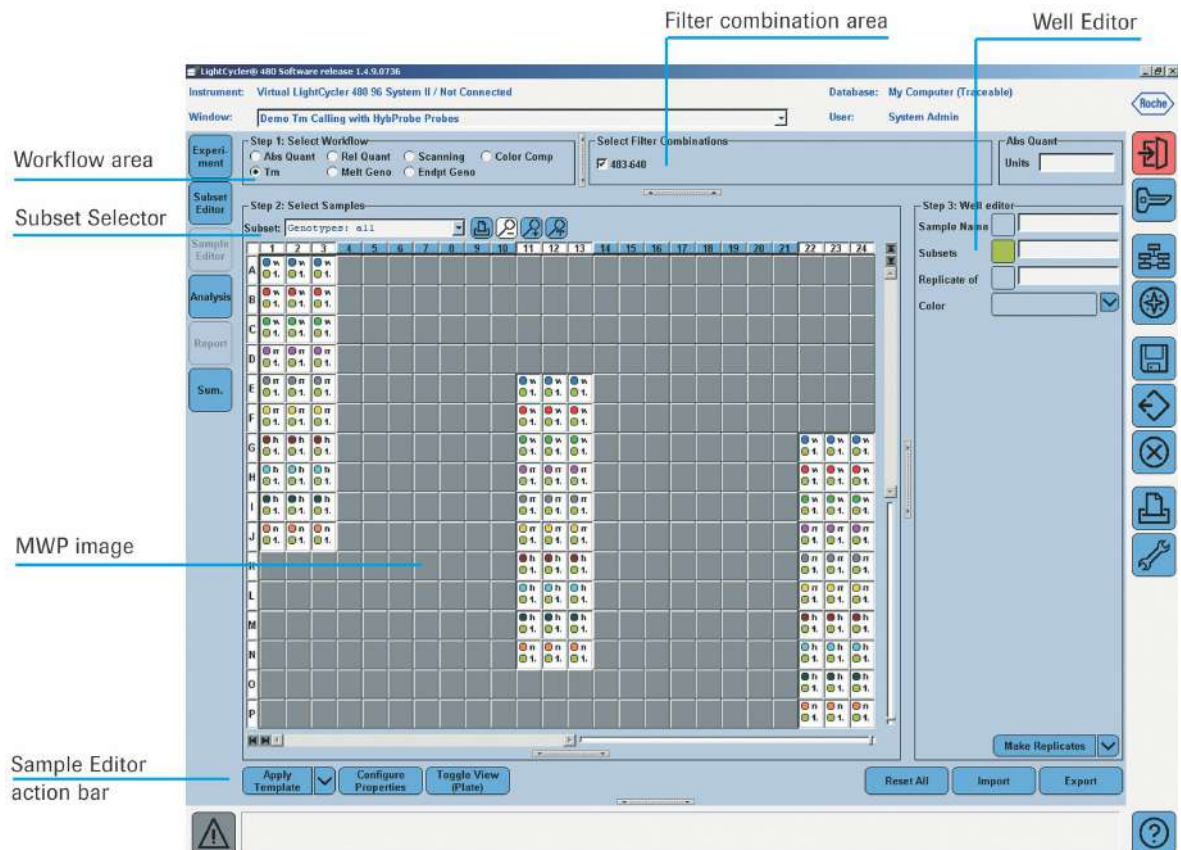
ตัวอย่างที่เป็นการซ้ำ จะอัตโนมัติเป็นชื่อ “Repl. of S,” โดยที่ “S” คือชื่อตัวอย่าง ทุกข้อมูลของตัวอย่างจะถูกเขียนซ้ำอัตโนมัติหากเป็นตัวอย่างที่ซ้ำ

2.3.1 หน้าต่างการแก้ไขตัวอย่าง

เปิดหน้าต่าง *Sample Editor* ในแถบ *Module* ซึ่งค่าเริ่มต้นตารางจะเป็นดังภาพ



เลือกปุ่ม *Toggle View* เพื่อจะแสดงภาพเป็นเพลท *Plate View*



2.3.2 แลบบการแก้ไขตัวอย่าง

แลบบการแก้ไขตัวอย่างจะมีปุ่มดังนี้:

ปุ่ม	การทำงาน
	เลือก <i>Apply Template</i> และเลือกแม่แบบจากรายการ จากนั้นคลิก  แม่แบบการทดลองจะถูกบันทึกในการทดลองใหม่ เลือก <i>Save As Template</i> เพื่อบันทึกไปยังโฟลเดอร์ที่ต้องการ แล้วใส่ชื่อในช่อง <i>Name</i> จากนั้น 
	เลือก <i>Configure Properties</i> ในการเพิ่มหรือลบคุณสมบัติตัวอย่างจากตาราง <i>Table</i> หรือ <i>Plate View</i> แล้วกด  ข้อมูลเพิ่มเติมดูได้ในส่วน <i>Configuring Sample Editor Properties</i>.
 	กดเลือก 2 ปุ่มนี้เพื่อสลับมุมมองไปมาระหว่างการมองแบบตารางและภาพเพลท 
	เลือก <i>Reset All</i> เพื่อให้ค่าต่างๆของตัวอย่างกลับสู่ค่าเริ่มต้น
	เลือก <i>Import</i> เพื่อเปิดหาข้อมูลตัวอย่างในการที่จะนำเข้าสู่โปรแกรม รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน <i>Importing and Exporting Sample Information</i>.
	เลือก <i>Export</i> เพื่อนำข้อมูลตัวอย่างส่งออกไปยังปลายทางที่ต้องการ รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน <i>Importing and Exporting Sample Information</i>.
  	แต่ละการทำงานจะมีฟังก์ชันปุ่ม <i>Replicates</i> ให้เลือก 3 ลักษณะ ดังนี้: ▶ เลือก <i>Make Replicates</i> เพื่อสร้างกลุ่มตัวอย่างซ้ำด้วยการเลือกปัจจุบัน ใช้ข้อมูลตัวอย่างแรกเป็นแม่แบบ ▶ เลือก <i>Auto Replicate</i> เพื่อสร้างตัวอย่างทั้งหมดซ้ำ โดยที่มีคุณสมบัติเหมือนกันหมด แม้กระทั่งช่องสัญญาณ ▶ เลือก <i>Clear Replicates</i> เพื่อดำล้างข้อมูลก่อน <i>Repl Of</i> เมื่อดำล้างข้อมูลไปแล้วจะไม่มีการรักษาข้อมูลซ้ำนั้นไว้

D

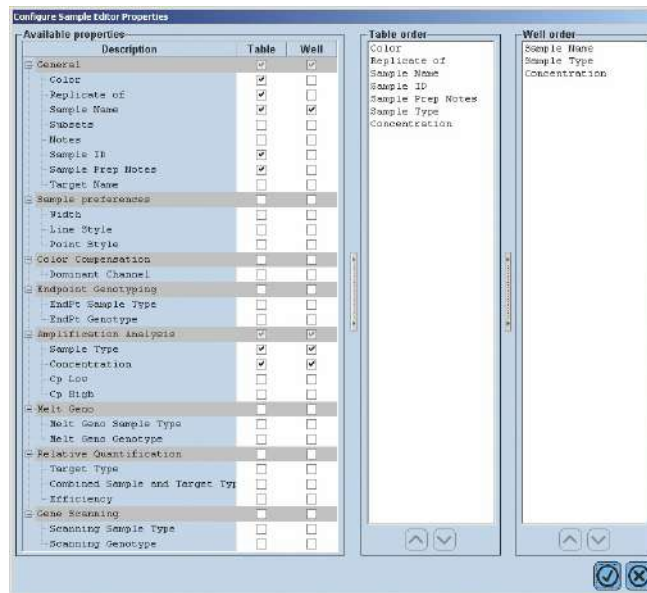
2.3.3 การกำหนดค่าคุณสมบัติการแก้ไขตัวอย่าง

การกำหนดค่าคุณสมบัติจะสามารถแก้ไขตัวอย่างได้ตามต้องการดังนี้

- ▶ เลือกคุณสมบัติที่จะแสดงตัวอย่างในมุมมองตารางหรือภาพเพลท
- ▶ เลือกลำดับของคุณสมบัติที่จะแสดงในมุมมองตารางหรือภาพเพลท

วิธีการกำหนดค่าคุณสมบัติตัวอย่าง:

- 1 ในแถบ *Sample Editor* เลือก *Configure Properties* ซึ่งจะแสดงดังภาพ



- 2 ในรายการคุณสมบัติ สามารถเลือกหรือยกเลิกการเลือกที่แสดงในตารางหรือภาพเพลทได้ คุณสมบัติที่เลือกจะแสดงตามลำดับสอดคล้องกับลำดับในตารางหรือหลุมตัวอย่าง

- 3 (ทางเลือก) เลือกคุณสมบัติใน *Table order* หรือ *Well order* และกด  หรือ  เพื่อเปลี่ยนแปลงลำดับ

- 4 คลิก  เพื่อปิด *Configure Sample Editor Properties* คุณสมบัติที่เลือกไว้จะแสดงในตารางหรือภาพเพลท



คุณสมบัติที่เลือกจะถูกบันทึกไว้ในการทดลอง

2.3.4 การใส่ข้อมูลตัวอย่าง

วิธีการใส่ข้อมูล:

1 ในแถบ *Module* คลิก *Sample Editor*

2 เลือกการทำงานให้สอดคล้องกับการทดลองที่ต้องการ



เมื่อเลือกการทำงานแล้วโปรแกรมจะอัตโนมัติสร้างตารางหรือเพลทตามรูปแบบที่เลือกงานอัตโนมัติ รวมถึงคุณสมบัติต่างๆด้วย หากมีการเลือกการทำงานรูปแบบใหม่เพิ่ม ข้อมูลคุณสมบัติของการทำงานรูปแบบใหม่ก็จะปรากฏ และรูปแบบเดิมก็ยังคงอยู่ ไม่ถูกลบออกไป

3 กำหนดแก้ไขตัวอย่างตามความต้องการได้ดังนี้:

- ▶ เลือกการจับคู่ช่องสัญญาณที่จะใช้ในการทดลองใน *Select Filter Combination*
- ▶ ในส่วน *Subset* เลือกกำหนดกลุ่มตัวอย่างย่อยที่จะแสดง หรือเลือกตัวอย่างทั้งหมดก็ได้
- ▶ คลิกที่ปุ่ม *toggle* ในแถบ *Sample Editor* เพื่อเปลี่ยนมุมมองเป็นตารางหรือภาพเพลท
- ▶ ทั้งในมุมมองตารางหรือภาพเพลท ให้เลือก *Legend Property Selector* เพื่อเลือกแสดงคุณสมบัติ โดยขึ้นกับรูปแบบการทำงานที่เลือก
- ▶ คลิกปุ่ม *Configure Properties* ในแถบ *Sample Editor* แล้วทำการเพิ่ม หรือ ลบ คุณสมบัติเข้าหรือออกจากตารางหรือภาพเพลท แล้วคลิก

4 เลือกตัวอย่างที่ต้องการแก้ไขใน *Sample Selector* รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน

Selecting and Deselecting Samples



5 การใส่ข้อมูลทั่วไปของแต่ละตัวอย่าง สามารถใส่ข้อมูลได้ดังนี้

- ▶ ในรูปแบบมุมมองตาราง สามารถอ่านรายละเอียดเพิ่มเติมได้ในส่วน [Entering Data in Table View](#)
- ▶ ในรูปแบบมุมมองภาพเพลท สามารถอ่านรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่ [Entering Data in Plate View](#)

คุณสมบัติ	คำอธิบาย	ค่าที่ปรากฏ
Sample Name	ชื่อของตัวอย่าง	ตัวอักษรทั่วไป สามารถเคาะวรรค (สูงสุด 25 ตัวอักษร)
Repl Of	ตำแหน่งของตัวอย่างที่ต้องการให้ทำซ้ำ	ตำแหน่งของตัวอย่างที่ต้องการให้มีการทำซ้ำ เช่น A5
Subsets	จำนวนของกลุ่มย่อยของตัวอย่าง	แสดงเท่านั้น
Notes	ข้อมูลเพิ่มเติมของตัวอย่าง	ตัวอักษร
Sample ID	ชื่อของชนิดตัวอย่างหรือตัวอย่าง	ตัวอักษรทั่วไป สามารถเคาะวรรค (สูงสุด 11 ตัวอักษร)
Sample Prep Notes	ข้อมูลของการเตรียมตัวอย่างก่อน หน้านี้สามารถใส่ลงช่องนี้ได้	ตัวอักษร เลขกลุ่ม+ รหัส เช่น E1004

6 ใส่ชื่อเฉพาะคุณสมบัติตัวอย่างตามการทำงานที่เลือก รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน คำอธิบายการใช้การวิเคราะห์เฉพาะ

7 (ทางเลือก) คลิกปุ่ม *Replicates* เพื่อทำการสร้างการทำซ้ำตัวอย่าง

- ▶ *Make Replicates* สร้างกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการทำซ้ำ โดยมีตัวอย่างปัจจุบันเป็นแม่แบบ
- ▶ *Auto Replicate* สร้างตัวอย่างทั้งหมดที่เลือกทำซ้ำ โดยให้มีคุณสมบัติและการเลือกช่องสัญญาณเหมือนกันทุกประการ
- ▶ *Clear Replicates* ล้างข้อมูลการทำซ้ำของคอลัมน์ที่เลือก *Repl Of* และเมื่อล้างไปแล้ว ตัวอย่างจะยังคงคุณสมบัติว่ามีการทำซ้ำอยู่

 ตัวอย่างอาจจะแตกต่างไปหากไม่ได้เลือกช่องสัญญาณ ซึ่งบางครั้งอาจทำให้เกิดความสับสนกับการใช้งานชนิด *Auto Replicate*

8 (ทางเลือก) หากต้องการเริ่มใหม่แต่แรกอีกรอบ ให้คลิก *Reset Samples* การกดรีเซ็ต จะทำให้ข้อมูลตัวอย่างทั้งหมดกลับสู่ค่าเริ่มต้นรวมทั้งค่าเฉพาะในการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างด้วย

9 เมื่อเสร็จสิ้น ให้คลิก ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกข้อมูลตัวอย่าง

10 หากต้องการพิมพ์ข้อมูลตัวอย่างที่ใส่ ให้คลิก ในส่วนภาพเพลท

การใส่ข้อมูลในมุมมองตาราง

มีหลายทางเลือกในการใส่ข้อมูลในมุมมองแบบตาราง

▶ การใส่ข้อมูลโดยตรงไปที่ช่องของตาราง:

- ▶ คลิกไปที่แต่ละช่องแล้วใส่ข้อมูล
- ▶ เลือกกำหนดช่องที่ต้องการ แล้วทำสำเนาไปยังช่องอื่นๆที่ต้องการในตาราง
- ▶ เลือกกำหนดช่องที่ต้องการ แล้วทำสำเนาไปยังโปรแกรมอื่นเช่น Microsoft Excel
- ▶ เลือกกำหนดช่องที่ต้องการ แล้วพิมพ์ค่าต่างๆจากนั้นกด <Enter>

ข้อมูลเพิ่มเติมสามารถดูได้ในส่วน *Working with Tables*

▶ การใส่ข้อมูลโดยใช้ Accelerator:

ระบบจะแสดงฟังก์ชัน Accelerator ให้ใช้งานตามแต่ลักษณะงานที่เลือก ในบางงานเท่านั้นที่จะมีหน้าต่างนี้ให้เลือกใช้ ขึ้นอยู่กับงานที่ต้องการวิเคราะห์

1 เลือกตัวอย่างที่ต้องการแก้ไขในภาพเพลท ซึ่งข้อมูลในหลุมที่เลือกจะแสดงในหน้าต่าง Accelerator:

- ▶ หากเป็นค่าที่เหมือนกันทุกตัวอย่าง ค่านั้นจะแสดงให้เห็นในช่อง Accelerator
- ▶ หากค่าที่ไม่เหมือนกันในตัวอย่างหลุมที่เลือก จะไม่แสดงให้เห็น

2 การแก้ไขค่าต่างๆในหน้าต่าง Accelerator

ค่าต่างๆจะถูกใส่ไปในทุกหลุมที่ทำการเลือก



หากเลือก 1 หลุม รายละเอียดในหลุมนั้นจะแสดงในช่อง Accelerator จากนั้นสามารถแก้ไขค่าข้อมูลในหลุมที่เลือกได้

การใส่ข้อมูลในมุมมองเพลท

ในมุมมองภาพเพลทสามารถใส่ข้อมูลใน Well Editor

1 คลิกที่ Toggle View (Table) เพื่อเปลี่ยนมุมมองไปยังภาพเพลท

2 กำหนดคุณสมบัติที่แสดงใน Well Editor

3 เลือกตัวอย่างที่ต้องการแก้ไขในมุมมองภาพเพลท โดยข้อมูลที่เลือกจะแสดงให้เห็นใน Well Editor:

- ▶ หากค่าเหมือนกันหมดทุกหลุมที่เลือก ค่านั้นจะแสดงให้เห็นในช่อง Well Editor
- ▶ หากค่าแต่ละหลุมไม่เหมือนกัน จะไม่แสดงให้เห็น

4 การแก้ไขค่าในช่อง Well Editor

ค่านั้นจะใส่เข้าไปยังทุกหลุมตัวอย่างที่เลือก



หากเลือกเพียงหลุมเดียว ค่าที่แสดงของหลุมนั้นจะแสดงในช่อง Well Editor ซึ่งสามารถแก้ไขค่าได้

D

การนำเข้าและส่งออกข้อมูลตัวอย่าง

ในฟังก์ชัน *Sample Editor* สามารถนำเข้าข้อมูลตัวอย่างมาให้เห็นได้ทั้งในมุมมองแบบตารางหรือแบบเพลท และแต่ละไฟล์ที่นำเข้าข้อมูลสามารถสร้างจากโปรแกรมทั่วไปเช่น Microsoft Excel ได้

เพื่อให้การนำเข้าข้อมูลอัตโนมัติด้วยโปรแกรมต้องแน่ใจว่าข้อมูลตัวอย่างมีคุณสมบัติดังนี้:

- ▶ แต่ละบรรทัดของข้อมูลจะต้องสัมพันธ์กันกับแต่ละหลุมตัวอย่าง ขณะที่แต่ละคอลัมน์ก็ต้องสัมพันธ์กับคอลัมน์ในแถบ *Sample Editor*
- ▶ แต่ละแถวของข้อมูลนำเข้าจะต้องมีตำแหน่งของตัวอย่าง หากไม่มีตำแหน่งของตัวอย่างหรือตำแหน่งปรากฏไม่มีจริง จะไม่สามารถนำเข้าข้อมูลได้อีกทั้งปุ่ม OK จะไม่ทำงาน
- ▶ คอลัมน์ชนิด “sample position” (‘Pos’ and ‘Repl. Of’ columns) จะต้องมีความหมายของแถวและคอลัมน์เป็นตัวอักษรและจำนวนเต็ม (เช่น A1, B2, etc.) แถวและคอลัมน์ต้องมีอยู่ในเค้าโครงภาพเพลท หากไม่มี ข้อมูลบรรทัดนั้นจะไม่นำเข้า และเกิดข้อผิดพลาดในรายงานสถานะ
- ▶ คอลัมน์ชนิด “Filter Combination” (‘Filt. Comb.’ and ‘Dominant Channel’ columns) จะต้องมีความหมายของรูปแบบการวัดสัญญาณ หากไม่มีข้อมูลจะไม่สามารถนำเข้าข้อมูลได้และเกิดข้อผิดพลาดในรายงานสถานะ
- ▶ คอลัมน์ชนิดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณและวิเคราะห์จีโนไทป์ จะต้องสอดคล้องกับคอลัมน์ใน *Sample Editor* (เช่น การวิเคราะห์ Absolute Quantification มีตัว “Unknown” และ “Standard”) หากไม่มีข้อมูลจะไม่สามารถนำเข้าข้อมูลได้และเกิดข้อผิดพลาดในรายงานสถานะ
- ▶ หากมีบรรทัดที่เริ่มต้นด้วยสัญลักษณ์ “#” จะถูกจัดเป็นบรรทัดของข้อความเพิ่มเติมและจะไม่สามารถใช้งานได้ การใส่สัญลักษณ์นี้ต้องอยู่ในเครื่องหมายคำพูด
- ▶ ข้อความที่มีอักขระตัวกัน หรือวรรค จะต้องใส่เครื่องหมายคำพูดซ้อนสองชั้น
- ▶ ไฟล์ข้อมูลนำเข้าจะต้องมีจำนวนคอลัมน์เหมือนกันในแต่ละแถว แม้ว่าจะเป็นคอลัมน์ว่าง หากจำนวนคอลัมน์ไม่ตรงกัน จะไม่สามารถนำเข้าไฟล์ได้และเกิดข้อผิดพลาดในรายงานสถานะ

การนำเข้าข้อมูลสามารถทำได้ทั้งชนิดมีแถวส่วนหัวหรือไม่มีก็ตาม โดยกำหนดกับโปรแกรม หากกดยกเลือกช่องมีแถวส่วนหัว แถวแรกของข้อมูลจะเป็นแถวส่วนหัว หากไม่กดยกเลือกช่อง แถวแรกของข้อมูลจะเป็นข้อมูลแรก

ข้อมูลส่วนหัวแถวจะขึ้นด้วยแถบ และควรต้องมีค่าสำคัญที่จะสื่อสารกับโปรแกรม หากค่าสำคัญไม่ตรงกันกับความคาดหวังของโปรแกรม โปรแกรมจะกำหนดให้ข้อมูลนั้นไปอยู่ในคอลัมน์เป้าหมายแทน ตารางด้านล่างแสดงค่าสำคัญของหัวคอลัมน์ที่สื่อได้กับโปรแกรมในช่องของข้อมูลต่างๆใน *Sample Editor*

Category	Column Header	Field in Sample Editor
General	General:Pos	Pos
	General:Repl. Of	Repl. Of
	General:Sample Name	Sample Name
	General:Filt. Comb.	Filter Combination
	General:Sample Note	Notes
	General:Sample ID	Sample ID
	General:Sample Prep Notes	Sample Prep Notes
	General:Target Name	Target Name
Sample preferences	Sample Preferences:Color	Color
	Sample Preferences:Width	Width
	Sample Preferences:Line Style	Line Style
	Sample Preferences:Point Style	Point Style
Color Compensation	Color Comp:Dominant Channel	Dominant Channel
Endpoint Genotyping	Endpt. Geno:Sample Type	EndPt Sample Type
	Endpt. Geno:Genotype	EndPt Genotype
Amplification Analysis	Abs Quant:Sample Type	Quantification Sample Type
	Abs Quant:Concentration	Concentration
	Abs Quant:Cp Low	Cp Low
	Abs Quant:Cp High	Cp High
Melt Geno	Melt Geno:Sample Type	Melt Geno Sample Type
	Melt Geno:Genotype	Melt Geno Genotype
Relative Quantification	Rel Quant:Target Type	Target Type
	Rel Quant:Combined Sample/Target type	Combined Sample and Target type
	Rel Quant:Efficiency	Efficiency
Gene Scanning	Gene Scanning:Sample Type	Scanning Sample Type
	Gene Scanning:Genotype	Scanning Genotype

หากข้อมูลที่น่าสนใจมีหลุมข้อมูลว่าง จะไม่กระทบกับข้อมูลปัจจุบันที่อยู่ใน *Sample Editor*

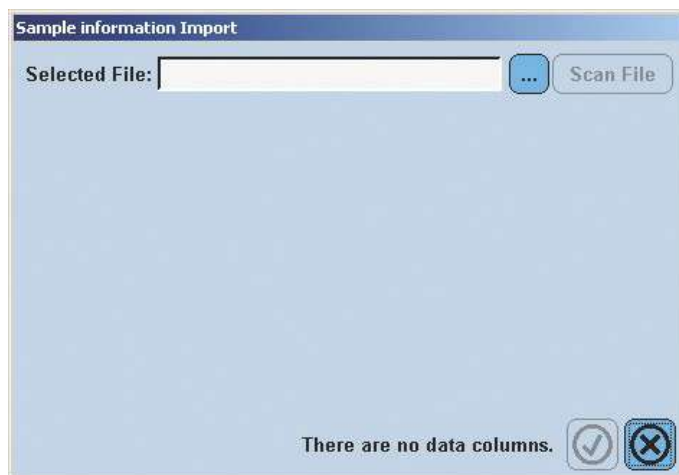
D

การทำซ้ำสามารถนำเข้าข้อมูลได้ด้วยการเลือกหลายตำแหน่งแล้วค้นด้วยช่องว่าง รายการตัวอย่างแรกจะเป็นแม่แบบ ส่วนที่เหลือจะเป็นการทำซ้ำ หากคอลัมน์ 'Repl. Of' รวมอยู่กับการนำเข้า ข้อมูลอื่นขกเว้นตำแหน่งตัวอย่าง ควรจะเว้นว่าง หากข้อมูลที่ซ้ำไม่เว้นว่าง การนำเข้าจะไม่สำเร็จและมีคำเตือนในสถานะ การรายงาน

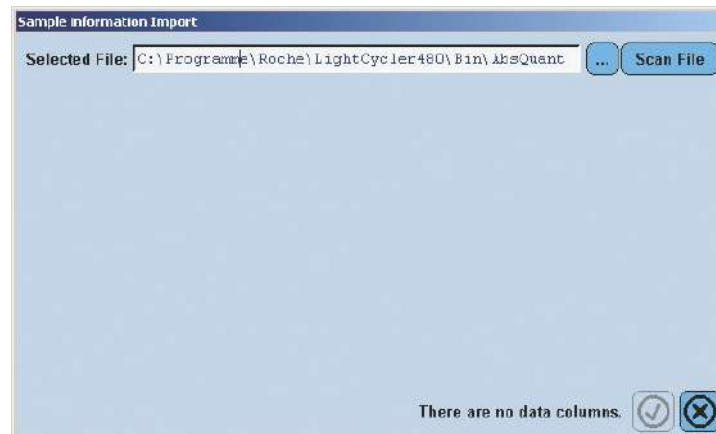
- ▶ หากเลือกเครื่องหมายถูกหน้าข้อความ *Create replicates from duplicate sample names?* ตัวอย่างที่มีชื่อเดียวกันจะถูกจัดเป็นการทำซ้ำ
 - ▶ หากเลือกเครื่องหมายถูกหน้าข้อความ *Create replicates from duplicate sample names?* และมีข้อมูลอื่นๆอยู่ด้วย โดยไม่เว้นว่างข้อมูล ข้อมูลนั้นจะไม่ถูกนำเข้า
-  ทางที่ง่ายในการนำเข้าข้อมูล คือการส่งออกข้อมูลจากหน้าต่าง *Sample Editor* ของการทดลอง ปัจจุบันแล้วใช้การทดลองนี้เป็นแม่แบบ

วิธีการนำเข้าข้อมูลตัวอย่าง:

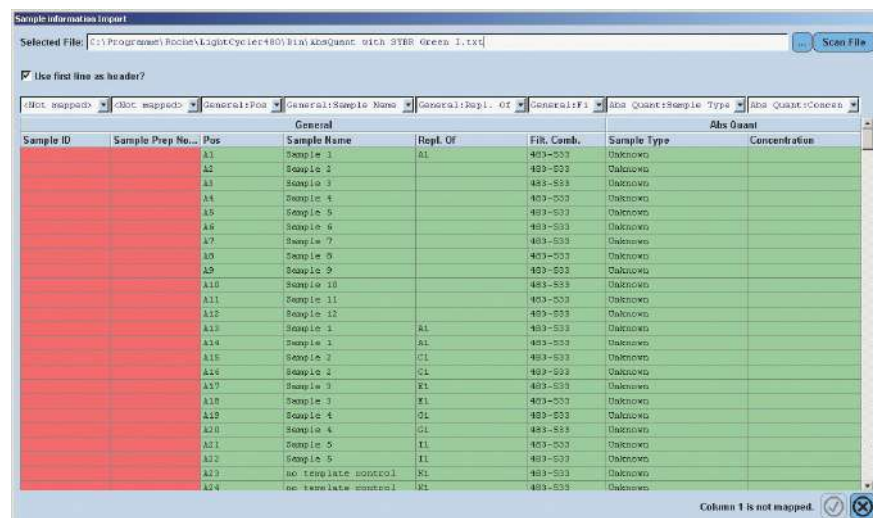
- 1 คลิกปุ่ม *Import* เพื่อเลือกไฟล์ข้อมูล โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างด้านล่าง



- 2 คลิกปุ่ม  เพื่อเลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการ



จากนั้นเลือกปุ่ม *Scan File* เครื่องจะแสดงหน้าต่างด้านล่าง แล้วให้กำหนดว่าจะใส่เครื่องหมายถูกหน้าข้อความ *Use first line as header?* หรือไม่

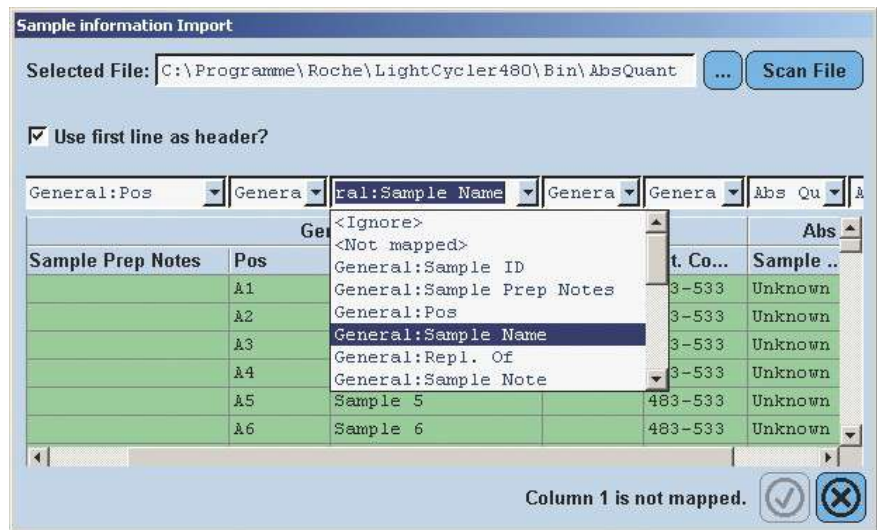


- 3 หากเลือกเครื่องหมายถูกหน้าข้อความ *Use first line as header?* บรรทัดแรกจะเป็นส่วนหัวข้อมูล จากนั้นกดเลือก *Scan File* อีกครั้ง

- 4 เลือก *Create replicates from duplicate sample names?* หากต้องการให้ชื่อตัวอย่างเดียวกันเป็นการทำซ้ำข้อมูล



- 5 ในส่วนข้อมูลส่วนหัว สามารถเลือกดูคอลัมน์ตามรายการส่วนหัวได้ ดังภาพ



- ! ข้อมูลคอลัมน์ที่นำเข้าจะถูกกำหนดตามการแก้ไขตัวอย่าง หากมีการแก้ไขใหม่ใน โปรแกรมการแก้ไขตัวอย่าง ข้อมูลที่นำเข้ามาแล้วจะไม่เปลี่ยน และจะถูกกำหนดว่าไม่สอดคล้องกัน
- 🔍 สามารถเลือกกด "<Ignore>" ในช่องคอลัมน์ได้ ซึ่งข้อมูลนั้นจะไม่ถูกนำเข้ามา และจะทำเครื่องหมายสีเหลืองไว้ในมุมมองตาราง

- 6 คลิก เพื่อยอมรับข้อมูล จากนั้นข้อมูลจะถูกนำเข้าสู่ Sample Editor

วิธีการส่งออกข้อมูลตัวอย่าง:

- 1 กดเลือกปุ่ม *Export* โปรแกรมจะแสดงกล่องข้อความในการเลือกไฟล์
- 2 กำหนดชื่อไฟล์แล้วกดบันทึก *Save*
- 3 ข้อมูล *Sample Editor* จะถูกส่งออกในรูปแบบข้อความ

3 ภาพรวมของการวิเคราะห์ผลการทดลอง

โปรแกรม LightCycler® 480 มีฟังก์ชันในการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยสามารถเพิ่มการวิเคราะห์ได้มากกว่าหนึ่งประเภทได้จากการใช้การทดลองเดิมมาทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์มีหลายรูปแบบดังนี้:

- ▶ การหาปริมาณ
 - ▶ การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง ซึ่งสามารถหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายได้เป็นจำนวนจริง
 - ▶ การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ เป็นการปริมาณเปรียบเทียบความแตกต่างของสารพันธุกรรม 2 เป้าหมาย ในตัวอย่างเดียวกัน โดยแสดงเป็นอัตราส่วนความสัมพัทธ์
- ▶ จีโนไทป์
 - ▶ Endpoint Genotyping เป็นการวิเคราะห์หาจีโนไทป์จากกราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา
 - ▶ Melting Curve Genotyping เป็นการวิเคราะห์จีโนไทป์จากกราฟของการทำ melting curve หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์
- ▶ การหาค่า Tm ซึ่งเป็นอุณหภูมิจำเพาะและขอดกราฟของสารพันธุกรรมเป้าหมาย
- ▶ การทำการหาค่าสัญญาณ ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้กับงานที่วิเคราะห์หลายสีพร้อมกัน เพื่อคัดสัญญาณที่มีการซ้อนทับกันระหว่างช่องสัญญาณ
- ▶ วิเคราะห์โครงสร้างชนิดลูกผสม ด้วยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ชนิด Gene Scanning ร่วมกับการใช้สีจำเพาะชนิด LightCycler® 480 ResoLight Dye

ส่วนนี้อธิบายขั้นตอนทั่วไปที่ต้องกระทำการในการทำการวิเคราะห์ สำหรับรายละเอียดจะอธิบายเพิ่มเติมในแต่ละการวิเคราะห์ในลำดับถัดไป



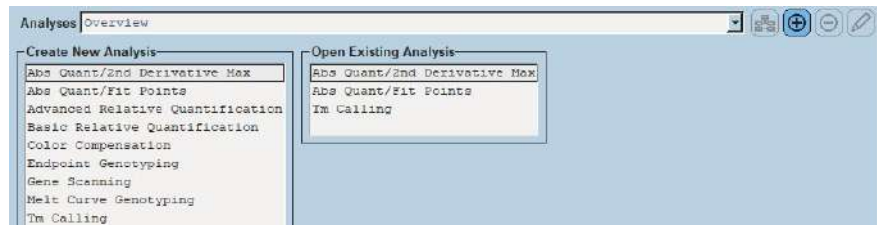
3.1 ภาพรวมขั้นตอนการวิเคราะห์

ขั้นตอนโดยทั่วไปสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลจะแสดงด้านล่าง ซึ่งข้อมูลจำเพาะสำหรับการวิเคราะห์แต่ละชนิดจะอธิบายไว้ในอีกส่วนหนึ่ง

วิธีการวิเคราะห์:

- 1 เปิดไฟล์การทดลองที่ต้องการวิเคราะห์ในหน้าต่างหลักของโปรแกรม LightCycler® 480
- 2 ในแถบ *Module* คลิก *Sample Editor* หากยังไม่ได้ใส่ข้อมูลตัวอย่างให้ใส่ข้อมูลก่อน
- 3 ใส่ข้อมูลจำเพาะตัวอย่างตามการวิเคราะห์ รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน [Entering Sample Information](#)
- 4 คลิก *Analysis* ในแถบ *Module* หน้าต่างภาพรวมจะปรากฏ *Analysis Overview*

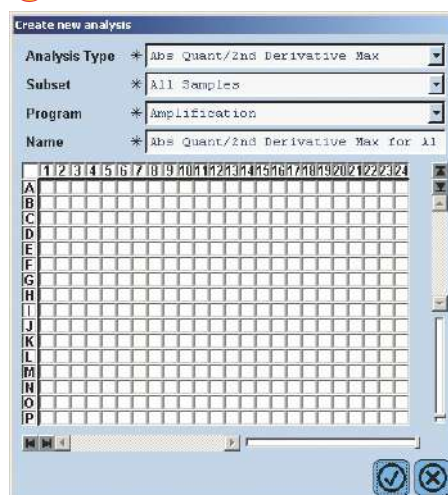
ในหน้าต่างภาพรวมนี้ จะมีรายการ *Create New Analysis list* และ *Open Existing Analysis list* (หากการวิเคราะห์ถูกกำหนดมาก่อน)



- 5 เลือกชนิดของการวิเคราะห์ในรายการ *Create New Analysis*

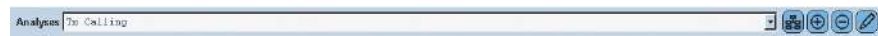
กำหนดชนิดของการวิเคราะห์อีกครั้ง และเลือกกลุ่มตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ เลือกโปรแกรมจากการทดลองที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรายการ *Program* จากนั้นตั้งชื่อการวิเคราะห์ (ค่าเริ่มต้นของชื่อการวิเคราะห์คือ “analysis type for subset name”) คลิก

ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างได้หลังจากสร้างการวิเคราะห์ด้วยกลุ่มตัวอย่าง



- 6 ในหน้าต่าง *Analysis* ให้ใส่หรือปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้
- ▶ ใช้ *Color Compensation* ในการเปิดหรือปิดการใช้งานไฟล์ *Color Compensation*
 - ▶ ใช้ปุ่ม *Filter Comb* เพื่อเลือกช่องสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ต้องการวิเคราะห์
รายละเอียดเพิ่มเติมได้ในส่วน [Selecting Filter Combination and Color Compensation](#)
 - ▶ คลิกเลือก *Apply Template* เพื่อจะเลือกแม่แบบการทดลองในรายการ จากนั้นคลิก  แม่แบบการทดลองจะปรากฏในการทดลองใหม่ รายละเอียดเพิ่มเติมใน [Working with Templates and Macros](#)
 - ▶ เลือกทางเลือกให้จำเพาะการวิเคราะห์ โดยดูในส่วนถัดไป
-  หากทำการเปลี่ยนข้อมูลตัวอย่างใน *Sample Editor* (ขกเว้นข้อมูลชื่อตัวอย่าง โหนด หรือ ชื่อเป้าหมาย) ให้ทำการวิเคราะห์ใหม่อีกครั้งหลังเปลี่ยนข้อมูล ผลการทดลองจะปรับตามค่าของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลง โดยกดปุ่ม *Calculate*

- 7 สามารถทำการวิเคราะห์ได้มากกว่าหนึ่งการวิเคราะห์ โดยการคลิกที่  ในส่วนแถบเครื่องมือ *Analysis*



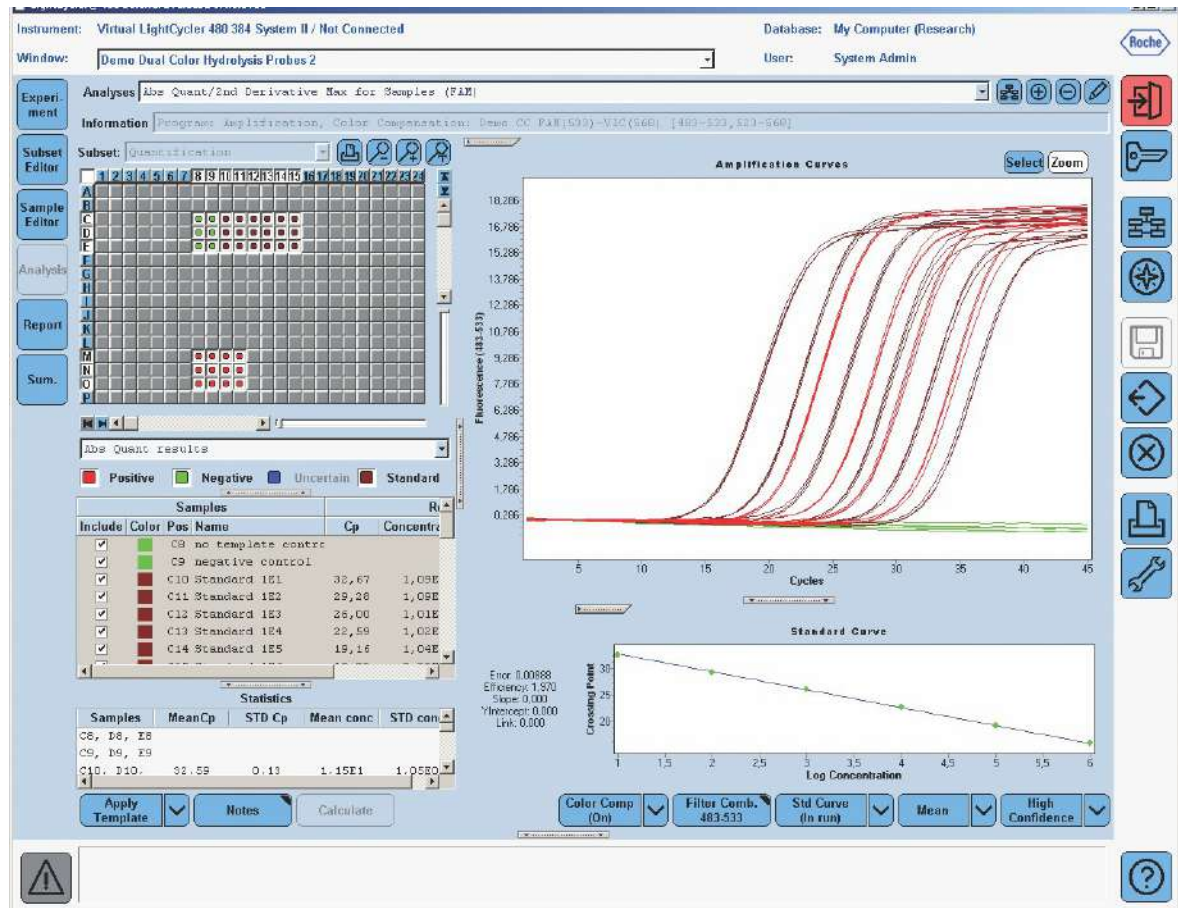
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 — 6 เพื่อเพิ่มการวิเคราะห์

- 8 คลิกที่  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกการวิเคราะห์ไว้รวมกับการทดลองนั้น สำหรับข้อมูลทั่วไปในหน้าต่างการวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมได้ในส่วน [Using the Analysis Window](#)

D

3.2 การใช้หน้าต่างการวิเคราะห์

รูปด้านล่างแสดงภาพทั่วไปของการวิเคราะห์ ในกรณีนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณจริง จะมีแถบเครื่องมือการวิเคราะห์ทางด้านบน ปุ่มการทำงาน *Action* ทางด้านล่าง ส่วนซ้ายมือเป็นตัวอย่าง ทางด้านขวามือจะเป็นกราฟแสดงการวิเคราะห์ต่างๆ

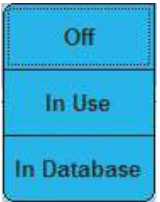


3.2.1 การเลือกจับคู่ของสัญญาณและการชดเชยสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์

ในการวิเคราะห์ ต้องกำหนดช่องสัญญาณสีที่จะทำการวิเคราะห์ และใช้การชดเชยสัญญาณสี หากจำเป็น

ใช้ปุ่มสำหรับการวิเคราะห์ลักษณะต่างๆ (หากเป็นการวิเคราะห์ *Im Calling* และ *Color Compensation* จะมีปุ่มการวิเคราะห์แตกต่างกันไป ซึ่งดูรายละเอียดได้ในลำดับถัดไป)

สามารถใช้ปุ่มต่างๆดังนี้:

Filter Combination 	ใช้ปุ่ม <i>Filter Comb</i> เพื่อเลือกช่องสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ในการวิเคราะห์ ช่องสัญญาณสีแสดงดังภาพ  เมื่อเลือกช่องสัญญาณสีตามรายการแล้ว จะแสดงให้เห็นช่องสัญญาณที่เลือก						
Color Compensation 	ใช้ปุ่มการชดเชยสัญญาณสี ในการเลือกใช้หรือไม่ใช้ โดยมีรายละเอียดดังนี้ <table border="1"> <tr> <td>Off</td><td>เลือกปุ่มนี้หากไม่ต้องการใช้การชดเชยสัญญาณสี</td></tr> <tr> <td>In Use</td><td>หากเลือกปุ่มนี้จะเป็นการเลือกใช้การชดเชยสัญญาณสีจากไฟล์ในรายการ โดยสามารถเลือกให้เหมาะกับงาน ดูคู่มือสัญญาณได้จากในวงเล็บ</td></tr> <tr> <td>In Database</td><td>จะเป็นการเลือกใช้ไฟล์การชดเชยสัญญาณสีจากฐานข้อมูล โดยมีทุกข้อมูลของไฟล์ชนิดนี้ รวมทั้งเลขเครื่องที่ทำกรารัน การเลือกจับคู่ของสัญญาณ โดยจะมีชื่อบอกถึงข้อมูลรายละเอียดเหล่านั้น</td></tr> </table>	Off	เลือกปุ่มนี้หากไม่ต้องการใช้การชดเชยสัญญาณสี	In Use	หากเลือกปุ่มนี้จะเป็นการเลือกใช้การชดเชยสัญญาณสีจากไฟล์ในรายการ โดยสามารถเลือกให้เหมาะกับงาน ดูคู่มือสัญญาณได้จากในวงเล็บ	In Database	จะเป็นการเลือกใช้ไฟล์การชดเชยสัญญาณสีจากฐานข้อมูล โดยมีทุกข้อมูลของไฟล์ชนิดนี้ รวมทั้งเลขเครื่องที่ทำกรารัน การเลือกจับคู่ของสัญญาณ โดยจะมีชื่อบอกถึงข้อมูลรายละเอียดเหล่านั้น
Off	เลือกปุ่มนี้หากไม่ต้องการใช้การชดเชยสัญญาณสี						
In Use	หากเลือกปุ่มนี้จะเป็นการเลือกใช้การชดเชยสัญญาณสีจากไฟล์ในรายการ โดยสามารถเลือกให้เหมาะกับงาน ดูคู่มือสัญญาณได้จากในวงเล็บ						
In Database	จะเป็นการเลือกใช้ไฟล์การชดเชยสัญญาณสีจากฐานข้อมูล โดยมีทุกข้อมูลของไฟล์ชนิดนี้ รวมทั้งเลขเครื่องที่ทำกรารัน การเลือกจับคู่ของสัญญาณ โดยจะมีชื่อบอกถึงข้อมูลรายละเอียดเหล่านั้น						



อาจจะมีปุ่มอื่นเพิ่มเติม ขึ้นอยู่กับการวิเคราะห์

3.2.2 การทำงานกับตัวอย่างในการวิเคราะห์

ทุกการวิเคราะห์ข้อมูล จะแสดงตัวอย่างอยู่ทางด้านซ้าย หลังจากการวิเคราะห์เสร็จสิ้น ผลการวิเคราะห์จะอยู่ทางด้านขวาของชื่อตัวอย่าง นอกจากนั้น ยังแสดงข้อมูลกราฟของตัวอย่างด้วย รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน *Sample Selector* and *Sample Table*

การเลือกตัวอย่างเพื่อรวมเข้ากับการวิเคราะห์

เลือกเครื่องหมายถูกต่อจากชื่อตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยค่าเริ่มต้นทุกตัวอย่างจะมีเครื่องหมายถูกก่อนการวิเคราะห์ ให้ดับเบิลคลิกที่ตัวอย่างหากต้องการยกเลิกการเลือกตัวอย่าง หรือจะเลือกใหม่อีกครั้ง สามารถเลือกหลายตัวอย่างได้โดยทำไฮไลต์ครอบตัวอย่างพร้อมการกด <Space> และสามารถสลับการทำเครื่องหมายเปิดหรือปิดการเลือกตัวอย่างได้

การเลือกตัวอย่างเพื่อที่จะมองในรูปแบบกราฟ

ตัวอย่างจะถูกกำหนดโดยสี หากต้องการมองหาตัวอย่างจำเพาะให้ไปดูที่สีในรายการตัวอย่าง แล้วมาดูสีในกราฟ นอกจากนั้นการใช้เมาส์ชี้ไปที่เส้นกราฟ จะแสดงข้อความบอกว่าเป็นตัวอย่างชื่ออะไรได้ ตัวอย่างดังภาพ:



หากเลือกตัวอย่างในตารางตัวอย่าง กราฟที่แสดงจะเป็นตัวอย่างที่เลือก โดยค่าเริ่มต้น ทุกตัวอย่างจะแสดงให้เห็นในกราฟข้อมูลการวิเคราะห์เมื่อเปิดหน้าต่างการวิเคราะห์

วิธีการเลือกตัวอย่าง:

- ▶ ถ้าจะเลือกตัวอย่าง ให้ไฮไลต์เลือกชื่อตัวอย่างในรายการตัวอย่าง
- ▶ ถ้าจะเลือกหลายตัวอย่างพร้อมกันกดปุ่ม <Ctrl> พร้อมกับชื่อตัวอย่างที่ต้องการเลือก
- ▶ ถ้าจะเลือกเป็นกลุ่มตัวอย่าง ให้กดเลือกตัวอย่างแรกก่อน จากนั้นกดปุ่ม <Shift> แล้วกดเลือกตัวอย่างสุดท้ายในกลุ่มที่ต้องการ
- ▶ ถ้าจะเลือกตัวอย่างทั้งหมดกด <Ctrl-A>

กราฟการวิเคราะห์จะแสดงใหม่ทุกครั้งที่เลือกตัวอย่าง

การทำสำเนาข้อมูลตัวอย่าง

เมื่อทำการวิเคราะห์เสร็จ สามารถทำสำเนาชื่อตัวอย่างและผลการทดลองได้ โดยสำเนาจากหน้าต่างการวิเคราะห์ไปยังโปรแกรมอื่นก็ได้

วิธีการทำสำเนาข้อมูลตัวอย่าง

- ▶ เลือก 1 หรือมากกว่าของแถวตัวอย่างที่ต้องการทำสำเนา กด <Ctrl-C>
- ▶ เปิดโปรแกรมที่ต้องการจะนำไปวางเช่น Microsoft Excel แล้วกด <Ctrl-V>

การเรียงลำดับตัวอย่างในตาราง

สามารถเรียงลำดับตัวอย่างได้โดยคลิกที่หัวคอลัมน์ จากนั้น คลิกหลายครั้ง เพื่อสลับการเรียงลำดับไปมาระหว่างจำนวนไม่มาก หรือมากไปน้อย

การเรียงลำดับด้วยการใช้ตำแหน่งกลุ่มตัวอย่างสามารถทำได้ทั้งตามคอลัมน์ หรือตามแถว ให้คลิกที่หัวของ *Pos* column

การส่งออกข้อมูลตัวอย่าง

สามารถส่งออกข้อมูลตัวอย่างไปยังโปรแกรมอื่นเช่น Microsoft Excel โดยการคลิกขวาที่ตารางข้อมูล แล้วเลือก *Export Table* กำหนดชื่อไฟล์และคลิกบันทึก

3.2.3 การจัดการกราฟในหน้าต่างการวิเคราะห์ข้อมูล

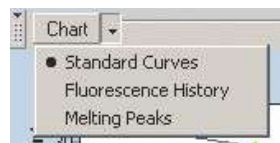
กราฟการวิเคราะห์จะแสดงอยู่ทางด้านขวาของหน้าต่างการวิเคราะห์ข้อมูล ด้านล่างจะแสดงสรุปการทำงานกับกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์

การเลือกแสดงกราฟ

วิธีเลือกกราฟให้แสดงในหน้าต่างการวิเคราะห์:

1. คลิก  เนื้อกราฟที่ต้องการเปลี่ยน จะมีเครื่องมือทางเลือกกราฟให้กดเลือกแสดง

2. เพื่อจะเปลี่ยนการมองกราฟให้กดเลือกจากเมนู *Chart*



3. เพื่อที่จะปรับการแสดงผลกราฟให้เลือกทางเลือกจากเครื่องมือของกราฟ

การย่อ ขยาย กราฟ

ในการดูภาพของกราฟ ให้กดปุ่ม *Zoom* จากนั้นวางเคอร์เซอร์ตรงด้านซ้ายของบริเวณที่ต้องการขยาย แล้วลากเมาส์ไปทางด้านล่างขวาเพื่อขยายเป็นลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้า หากต้องการกลับสู่ขนาดเดิม ให้คลิกและลากเมาส์ไปทางด้านบนซ้าย

การเลือกตัวอย่าง

ในการเลือกตัวอย่างจากกราฟโดยตรงให้กดปุ่ม *Select* แล้วเลือกกราฟหรือจุดบนกราฟด้วยการลากเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า

การพิมพ์ภาพ การส่งออก และการคัดลอกกราฟข้อมูล

ในหน้าต่าง *Analysis* ให้คลิกขวาตรงส่วนกรอบของกราฟ แล้วเลือกการทำงานที่ต้องการจากเมนู ซึ่งสามารถจะพิมพ์ภาพ ทำการส่งออก หรือทำสำเนา ก็ได้ รายละเอียดเพิ่มเติมดูใน [Working with Charts](#)

3.2.4 การเพิ่มข้อความโน้ตในการวิเคราะห์

สามารถใส่โน้ตในการวิเคราะห์ดังนี้

- 1 ทำการเปิดหน้าต่าง *Analysis Notes* โดยคลิกปุ่ม *Notes* ในแถบ Action
- 2 ใส่ข้อความโน้ตการวิเคราะห์ คลิกที่  ในการเพิ่มโน้ต
- 3 คลิกที่  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกโน้ตในการทดลอง

3.2.5 การลบหรือการตั้งชื่อใหม่ของการวิเคราะห์

หากเป็นผู้ใช้งานระดับ Expert User หรือ Local Administrator สามารถทำการลบหรือตั้งชื่อการวิเคราะห์ใหม่ได้ ดูรายละเอียดผู้ใช้งานได้ในส่วน [Managing User Access](#)

วิธีการวิเคราะห์ออกจากการทดลอง:

- 1 เลือกการวิเคราะห์จากแถบ *Analyses*
- 2 คลิกที่ปุ่ม *Remove Item*  ในเครื่องมือ *Analysis*
- 3 จะมีข้อความให้ยืนยันการลบ

กดเลือก  เพื่อลบการวิเคราะห์

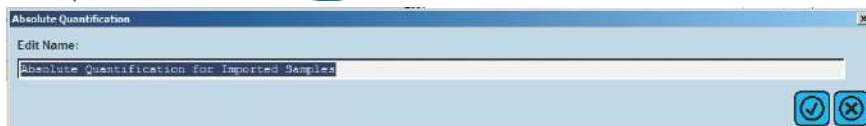
กดเลือก  เพื่อบันทึกการทดลองที่ไม่มีการวิเคราะห์

วิธีการตั้งชื่อการวิเคราะห์ใหม่:

กดตั้งชื่อการวิเคราะห์ใหม่ให้ตรงกับงานการวิเคราะห์ จะมีประโยชน์หากมีกวิเคราะห์มากกว่าการวิเคราะห์

- 1 เลือกการวิเคราะห์ในแถบ *Analyses*

- 2 คลิกที่ปุ่ม *Rename Item* 



- 3 ใส่ชื่อการวิเคราะห์ชื่อใหม่ แล้วคลิก 

 ชื่อจะต้องไม่ซ้ำกันในฐานข้อมูล

3.3 การส่งออกข้อมูลผลการวิเคราะห์

โปรแกรม LightCycler® 480 จะมีเครื่องมือในการส่งออกที่หลายไฟล์ครั้งเดียว ซึ่งจะส่งออกได้เป็นไฟล์เดอร์พร้อมไฟล์เดอร์ย่อย

ในการส่งออกผลการวิเคราะห์แบบกลุ่มนี้จะทำให้ทุกผลการทดลองของชนิดการวิเคราะห์ที่เลือก จากการทดลองทั้งหมดในไฟล์เดอร์หรือไฟล์เดอร์ย่อยพร้อมในเวลาเดียวกัน ผลที่ส่งออกไปจะเป็นลักษณะไฟล์มีแถบค้น



การส่งออกข้อมูลการวิเคราะห์แบบกลุ่มไฟล์จะทำในหน้าต่าง *Navigator*

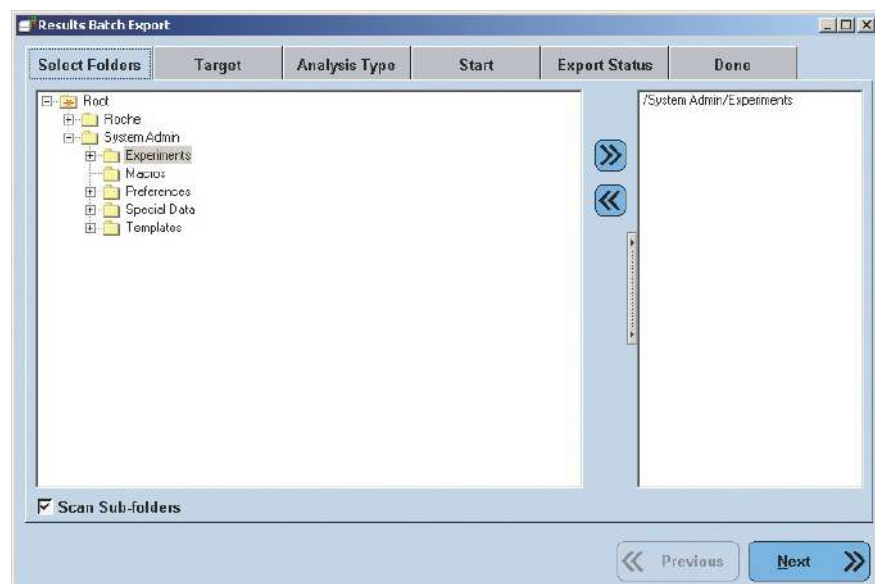


การส่งออกข้อมูลแบบกลุ่มไฟล์จะมีตัวช่วยสร้าง ในการทำงานของหน้าต่างตัวช่วยสร้างจะทำการคลิกปุ่มที่สอดคล้องกัน โดยปุ่ม *Next* จะมีให้เมื่อทำการใส่ข้อมูลในหน้าปัจจุบันครบถ้วน

1

คลิกที่ปุ่ม *Result Batch Export* ในหน้าต่างเนวิเกเตอร์

ในแถบ *Select Folders* ของหน้าต่างตัวช่วยสร้าง เลือกไฟล์เดอร์ที่ต้องการส่งออกข้อมูลในรายการที่มี ทำเครื่องหมายถูกที่หน้าช่อง *Scan Sub-folders* เพื่อที่จะรวมไฟล์เดอร์ย่อยไปด้วย



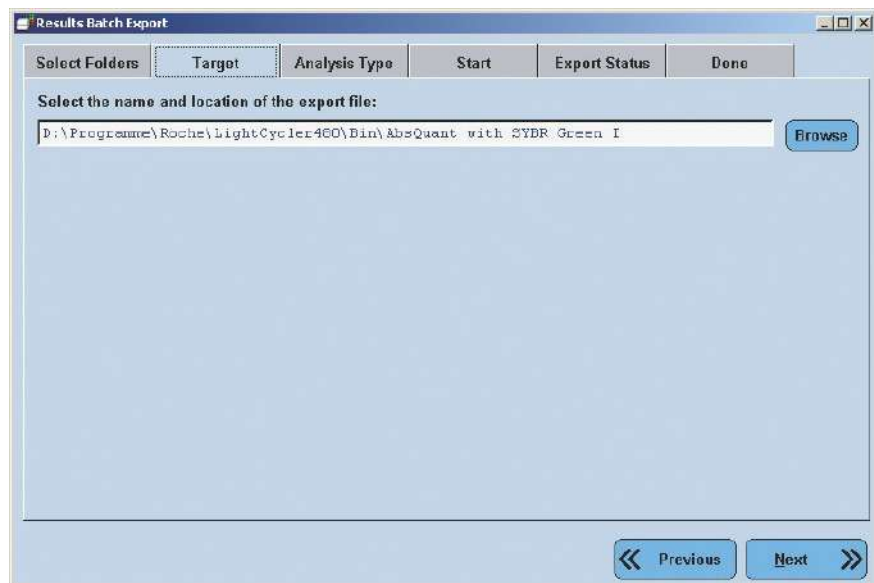
D

3

2

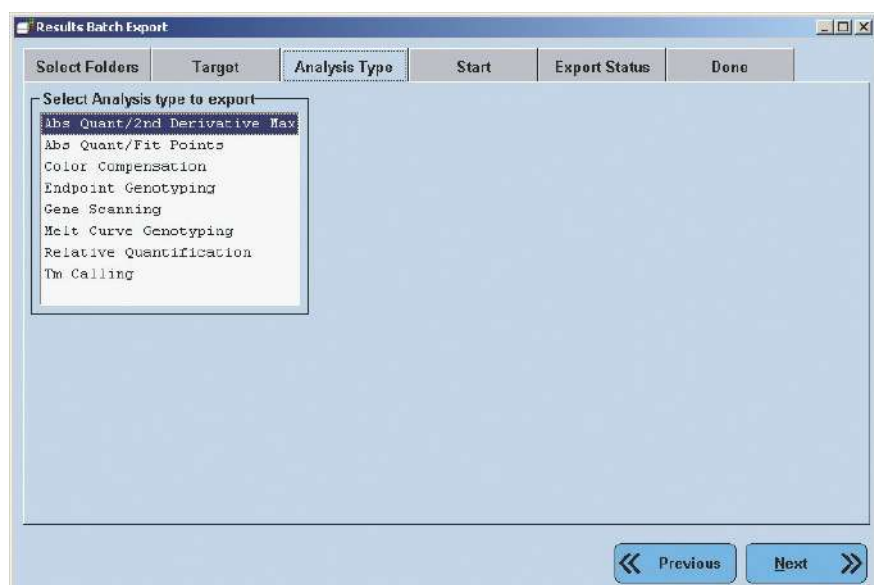
ในแถบ *Target* เลือกปลายทางที่จะให้ข้อมูลส่งออกไป พร้อมกำหนดชื่อ

คลิกที่ปุ่ม *Browse* เพื่อที่จะเลือกกำหนดที่อยู่ของข้อมูลปลายทาง หากที่อยู่ปลายทางนั้นมีข้อมูลชื่อเดียวกันอยู่ ตัวช่วยสร้างจะถามเพื่อป้องกันการเขียนข้อมูลทับข้อมูลเดิม

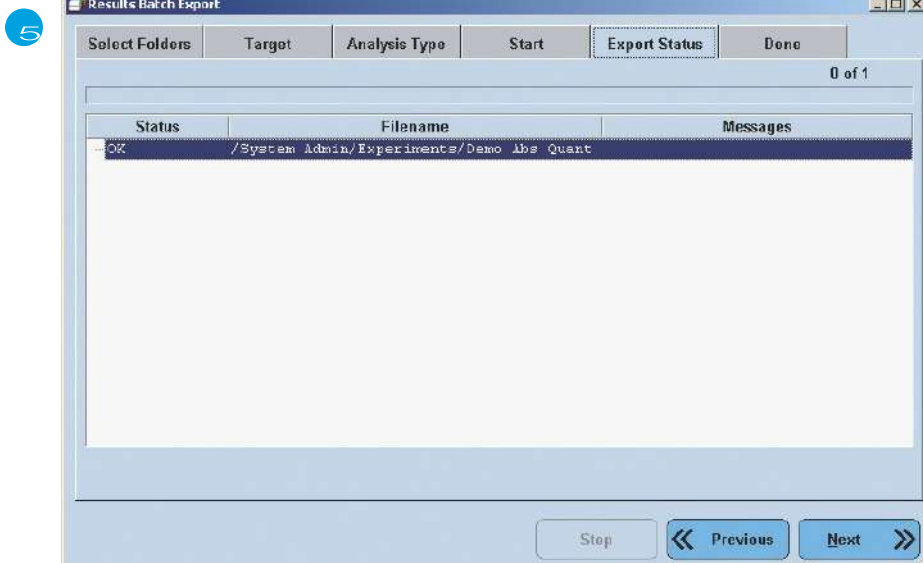
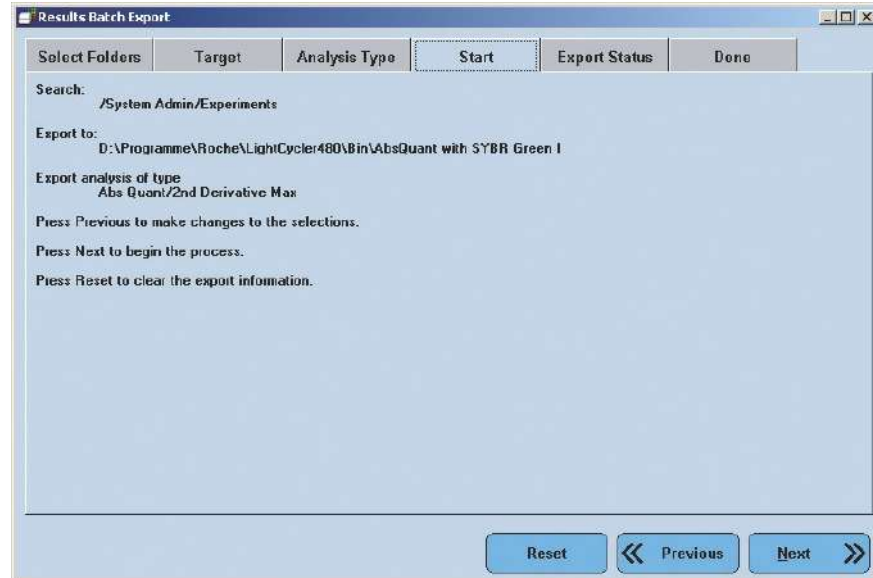


3

ในแถบ *Analysis Type* เลือกชนิดของการวิเคราะห์ที่จะส่งออกข้อมูล



- 4 ในแถบ *Start* ให้ทำการทบทวนข้อมูลที่ต้องการส่งออก และทำการเริ่มการส่งออกได้ในหน้านี้
- ปุ่ม *Reset* ในแถบ *Start* จะสามารถกดได้เมื่อทำการส่งออกสมบูรณ์แล้ว
- คลิกที่ปุ่ม *Reset* เพื่อล้างข้อมูลเป็น ก่อนการส่งออก ดังนั้น สามารถส่งออกซ้ำได้



- 6 แถบ *Done* จะแสดงให้เห็นในหน้าสรุป ให้คลิกเพื่อปิดตัวช่วยสร้าง

D





โปรแกรมการใช้งาน

อธิบายวิธีการหาปริมาณต่างๆ และการวิเคราะห์จีโนม

โปรแกรมการใช้งาน

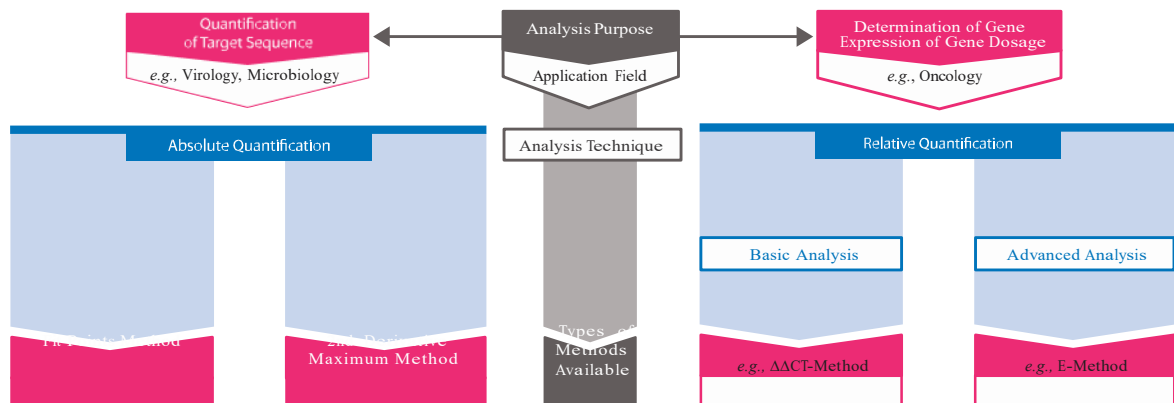
4

4 การหาปริมาณ

4.1 ภาพรวม

มีหลายวิธีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนในการทำงานการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง แต่ละวิธีขึ้นอยู่กับ ความต้องการ ความซับซ้อน ความน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามวิธีหลักในการวิเคราะห์อยู่ 2 เทคนิค คือ การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงกับการหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ จะเลือกเทคนิคใดขึ้นกับความซับซ้อนของการวิเคราะห์และรูปแบบของผลที่ปรารถนา

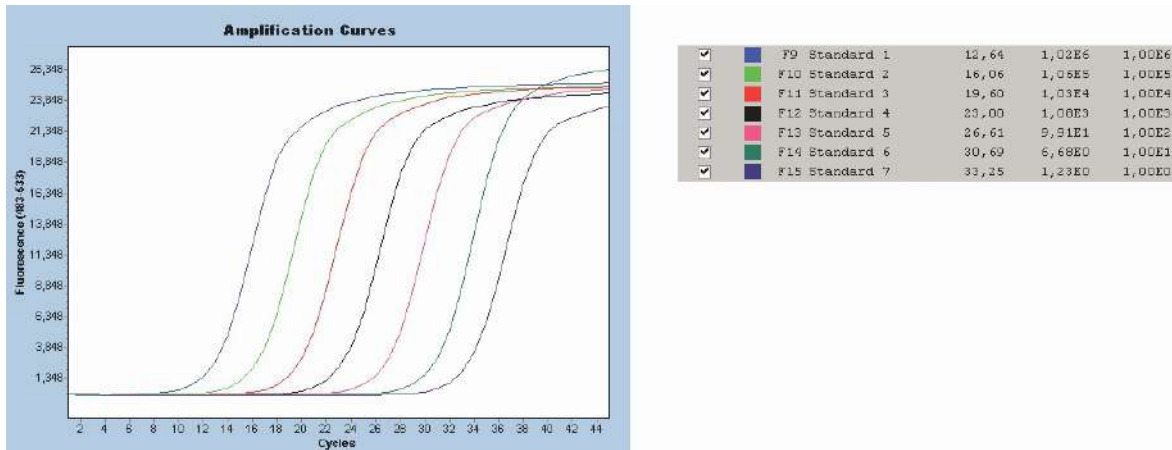
- ▶ การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง สามารถให้ทำการหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายได้ในค่าจำนวนจริง เช่น หาปริมาณไวรัส เป็นหน่วย copies/ml ซึ่งใช้กันมากในงานทางไวรัสวิทยาและชีววิทยาโมเลกุล
- ▶ การหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ จะเปรียบเทียบระดับของสารพันธุกรรมเป้าหมาย 2 ชนิดที่แตกต่างกัน ในตัวอย่างเดียวกัน เช่น ยีนเป้าหมายต่อยีนอื่นๆ และแสดงผลเป็นค่าอัตราส่วนของเป้าหมายนั้น



4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริง

การวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริงสามารถทำได้ในทุกการทดลอง ที่มีกราฟการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยนำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เฉพาะส่วนที่อยู่ในช่วงตั้งชันของกราฟ(log-linear phase) มาคำนวณ ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรม ภาพด้านล่างแสดงการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง LightCycler® 480 ในปฏิบัติวิยาจะประกอบไปด้วย 3 ส่วน: ช่วงเริ่มต้น, ช่วงกราฟชันสูง (log-linear) และช่วงท้ายเป็นระยะราบ

กราฟในช่วงต้นจะเป็นสัญญาณที่ต่ำๆ ซึ่งช่วงนี้จะสิ้นสุดลงหากปฏิบัติวิยามีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เหนือกว่าสัญญาณพื้นฐาน แล้วเข้าสู่ช่วงกราฟตั้งชัน จากการสะสมสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เหนือกว่าพื้นฐาน สุดท้ายปฏิบัติวิยา จะมีประสิทธิภาพต่ำลงจากการหมดพลังงานแล้วเข้าสู่ระยะราบ



การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพดีเยี่ยมจะมีค่าประสิทธิภาพอยู่ที่ 2 (นั่นคือทุกรอบของปฏิบัติวิยาจะมีการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า) อธิบายได้ดังสมการ:

$$(1) T_n = T_0 \times 2^n$$

ในการทดลองในสภาพจริงมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงาน ดังนั้น การคำนวณการเพิ่มปริมาณจะแม่นยำมากขึ้นหากใช้สมการ:

$$(2) T_n = T_0 \times E^n$$

เมื่อ T_n เป็นจำนวนโมเลกุลเป้าหมายที่รอบที่ n , T_0 เป็นจุดเริ่มต้นของโมเลกุลเป้าหมาย n เป็นจำนวนรอบของการเพิ่มปริมาณ และ E เป็นค่าประสิทธิภาพ

จากกราฟด้านบนแต่ละปฏิบัติวิยาจะมีสัญญาณเหนือพื้นฐานได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนสารพันธุกรรมเป้าหมายเริ่มต้น จุดที่สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ยกขึ้นเหนือพื้นฐานจะเรียกว่าค่า “crossing point (Cp)” หรือ “quantification cycle (Cq)” ของตัวอย่าง

สำหรับการหาปริมาณเป็นจำนวนจริง การทำการเจือจางเป็นลำดับเพื่อกำหนดค่าเส้นมาตรฐานจะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมเริ่มต้น เมื่อทำการเพิ่มปริมาณผ่านเครื่องไปพร้อมกับปฏิบัติวิยาของตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น จุด crossing points ของทั้งค่ามาตรฐานและตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าจะนำมาใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารพันธุกรรมเป้าหมายได้



โปรแกรม LightCycler® 480 จะมี 2 วิธีในการคำนวณหาปริมาณเป็นจำนวนจริงดังนี้:

- ▶ the Second Derivative Maximum method
- ▶ the Fit Points method

ทั้งสองวิธีจะใช้เส้นค่ามาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะใช้การหาค่า crossing point ที่แตกต่างกัน

4.2.1 ทำความเข้าใจกับค่า Crossing Points

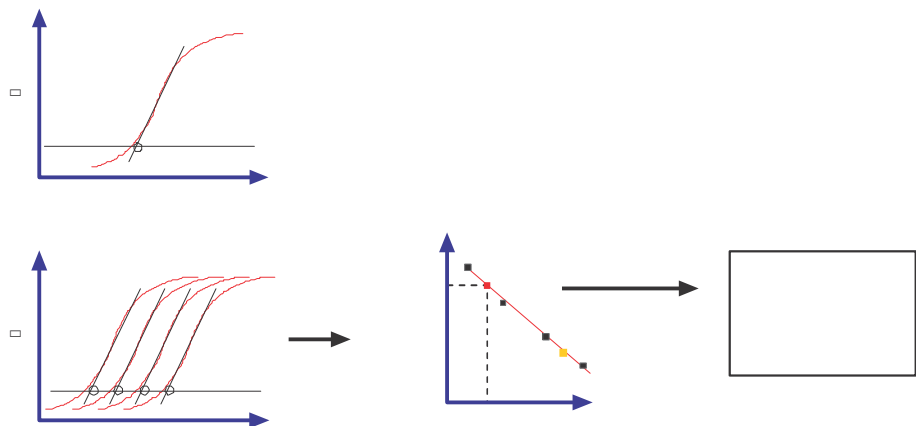
ในปฏิบัติการการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จำนวนรอบที่ตัวอย่างนั้นมีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากกว่าค่าพื้นฐานจะเรียกจุดนั้นว่า “crossing point (Cp)” หรือ “quantification cycle (Cq)” ที่ค่า Cp จะเป็นจุดที่เครื่องมือมองเห็นปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้น โดยปกติเครื่องมือจะเห็นได้ต่อเมื่อก่อนเกินกว่าการตรวจวัดได้ของเครื่องมือ ซึ่งที่จุด Cp, จะพบโมเลกุลประมาณ 10^{11} to 10^{12}

ค่า Cp ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นของตัวอย่าง หากตัวอย่างมีความเข้มข้นเริ่มต้นน้อยก็ต้องใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณมากกว่าถึงจุด Cp เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่า การที่จะนำค่า Cp มาคำนวณในการหาปริมาณได้อย่างไรขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์

4.2.2 ทำความเข้าใจบทบาทของเส้นมาตรฐาน

ในการหาปริมาณเป็นจำนวนจริง เส้นมาตรฐานจะใช้กำหนดค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง ในการทำเส้นมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างมาตรฐานจะพล็อตกับค่า Cps โดยแกน X จะแทนค่า log ของค่าความเข้มข้นเริ่มต้นตัวอย่างมาตรฐาน ส่วนแกน Y จะเป็นค่า Cp หน่วยเป็นรอบ

สำหรับการคำนวณแบบวิธี Fit Points analysis เส้นมาตรฐานคือการถดถอยเชิงเส้นของข้อมูลที่พล็อต สำหรับการคำนวณแบบวิธี Second Derivative Maximum analysis โปรแกรมจะอัตโนมัติในการคำนวณทั้งลักษณะการถดถอยเชิงเส้น และการถดถอยแบบไม่เชิงเส้น เพื่อให้เกิดความแม่นยำข้อมูลในช่วงจำกัดของการตรวจวัดสัญญาณ



เส้นมาตรฐานปกติจะใช้อย่างน้อย 5 ค่าตัวอย่างมาตรฐาน ในลักษณะเจือจางเป็นลำดับ และค่าความเข้มข้นของมาตรฐานควรอยู่ในช่วงที่ต้องการวัดความเข้มข้นของตัวอย่าง



ในโปรแกรม *LightCycler® 480* จะต้องมีค่ามาตรฐานอย่างน้อย 3 ค่าที่แตกต่างกัน ไม่เช่นนั้นเครื่องจะไม่คำนวณค่ามาตรฐานให้

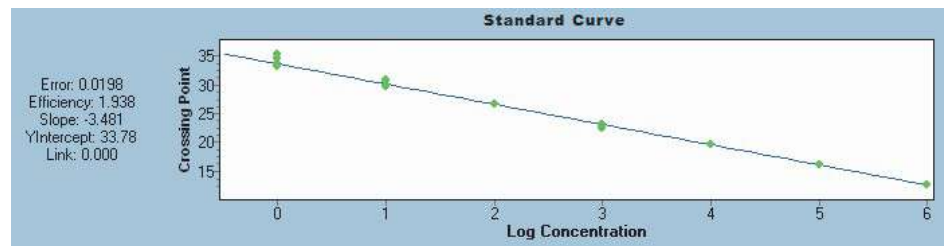
ความชันของเส้นมาตรฐานจะแสดงถึงจลนพลศาสตร์ของการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจะบอกได้ว่าการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายเกิดได้เร็วเพียงใดในแต่ละรอบของการทำงาน ความชันจะแสดงถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ โดยค่าที่สมบูรณ์แบบจะเท่ากับ “2” เนื่องจากมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นสองเท่าในแต่ละรอบของปฏิกิริยา

(จากสมการ 1: $T_n = T_0 \times 2$)

ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาคำนวณได้จากสูตร: $E = 10^{-1/\text{slope}}$

(slope = -3.3 → E = 2).

โปรแกรม *LightCycler® 480* จะคำนวณค่าประสิทธิภาพอัตโนมัติ แสดงไว้ในหน้าต่างการวิเคราะห์ ในสถานะจริงประสิทธิภาพมักจะต่ำกว่า 2 ยกตัวอย่างภาพด้านล่าง ประสิทธิภาพจะเป็น 1.938



ค่า *Error* จะแสดงอยู่ทางด้านซ้ายของค่าเส้นมาตรฐาน เป็นค่าที่วัดความถูกต้องของการหาปริมาณด้วยการใช้เส้นมาตรฐานนี้ โดยค่าที่ยอมรับได้ควร < 0.2

ค่า *YIntercept* แสดง ค่า crossing point สำหรับ log ของความเข้มข้นที่ 0 (=1)

สำหรับการคำนวณแบบวิธี Second Derivative Maximum analysis ค่า *Link* จะแสดงอยู่ทางด้านซ้ายของเส้นมาตรฐาน แสดงถึงรูปร่างของเส้นมาตรฐาน โดยค่าที่ 0.000 หมายถึงเส้นมาตรฐานเป็นไปตามการถดถอยเชิงเส้น แต่หากค่า > 0.000 จะแสดงถึงจุดเปลี่ยนหรือความเข้มข้นที่อยู่ระหว่างเชิงเส้นและไม่เชิงเส้นของเส้นมาตรฐานนั้น

ในการบ่งบอกถึงค่า crossing point ของตัวอย่างที่อยู่ในเส้นมาตรฐาน โปรแกรมจะคำนวณ ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารพันธุกรรมตัวอย่างนั้นให้อัตโนมัติ



ไม่ควรใช้การคำนวณความเข้มข้นจากเส้นค่ามาตรฐานที่เป็นลักษณะการคาดการณ์เอา โดยเฉพาะมาจากเส้นมาตรฐานแบบไม่เชิงเส้น



ค่า *Cp* จากเส้นมาตรฐานจะนำไปใช้ในการคำนวณกลับของค่า *Cp* ตัวอย่าง ซึ่งการคำนวณแบบนี้ค่าประสิทธิภาพของตัวอย่างมาตรฐานกับตัวอย่างต้องเท่ากัน หากใช้ตัวอย่างมาตรฐานเดียวกันค่าประสิทธิภาพมักจะเป็นค่าเดียวกัน

4.2.3 การให้เส้นมาตรฐาน

การให้เส้นมาตรฐานของการคำนวณหาปริมาณเป็นจำนวนจริงควรเลือกทำตามดังนี้

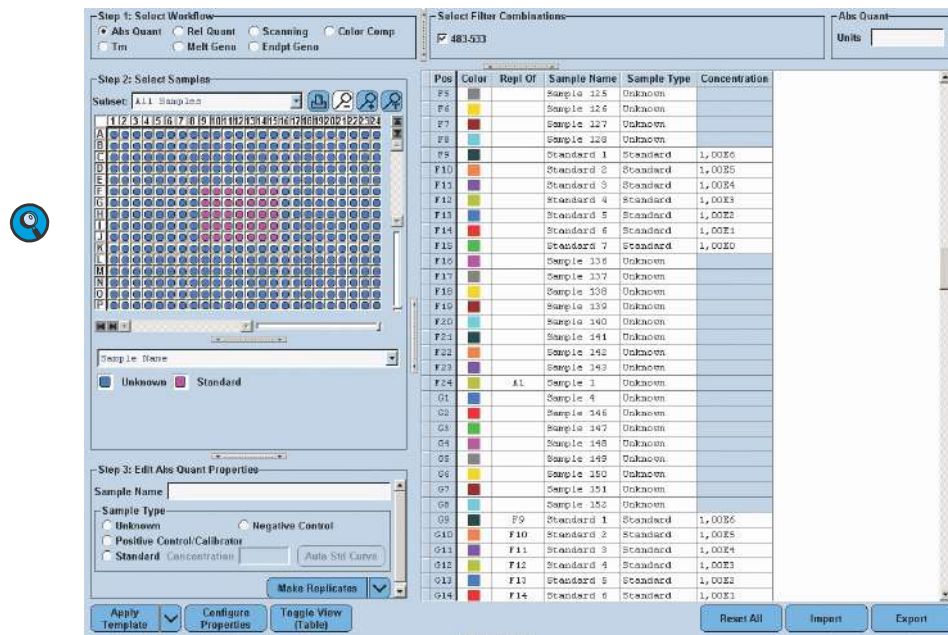
- ▶ รวมเส้นมาตรฐานในการทดลอง: ตัวอย่างมาตรฐานทุกการเจือจางได้ทำปฏิกิริยาแยกหลุมกัน แต่ทำไปพร้อมกับการทดลองตัวอย่างในการทดลองเดียวกัน เส้นค่ามาตรฐานจะเป็นลักษณะ “in-run”
- ▶ ใช้เส้นค่ามาตรฐานที่บันทึกไว้ (จะเรียกว่าเส้นมาตรฐานจากภายนอก) เส้นมาตรฐานจากภายนอกนี้สามารถนำมาใช้กับการทดลองที่ไม่มีเส้นค่ามาตรฐาน เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณ ซึ่งจะใช้ได้กับการทดลองที่มีค่าพารามิเตอร์เหมือนกัน
- ❗ อย่างน้อย 1 ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นจะต้องถูกรวมอยู่ในการทดลอง ซึ่งจะถูกกำหนดคล้ายเป็นค่ามาตรฐานที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงเส้นค่ามาตรฐานที่จะนำเข้ามาใช้จากภายนอก รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ การวิเคราะห์ การชดเชยสัญญาณสี (ถ้ามี) ที่ทำการใช้ในการทดลองจะต้องเหมือนกันกับที่ใช้ในการทดลองเส้นค่ามาตรฐานที่นำเข้ามาใช้
- ❗ สำหรับการให้เส้นค่ามาตรฐานจากภายนอก ปฏิบัติวิธีที่ซื่อสัตย์มีความสม่ำเสมอ และสภาพการทำปฏิกิริยาควรคงที่ทุกการทดลอง แนะนำให้การสร้างเส้นมาตรฐานควรมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาที่เสถียร และใช้ตัวอย่างมาตรฐานซ้ำโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำๆ รวมทั้งแนะนำให้มีการใช้ตัวอย่างที่เคยทำการวิเคราะห์หาปริมาณไปแล้ว มาทำร่วมด้วยทุกการทดลองเพื่อทวนสอบค่าความสม่ำเสมอของการทำงาน

วิธีบันทึกเส้นค่ามาตรฐาน:

- 1 ทำการทดลองที่มีค่ามาตรฐาน หรือใช้การทดลองที่มีอยู่ที่มีรวมเส้นค่ามาตรฐานที่ต้องการใช้
 - ❗ การทดลองที่มีเส้นมาตรฐานจะต้องมีพารามิเตอร์ และสภาพการทดลองเหมือนกันกับการทดลองที่จะนำเส้นมาตรฐานมาใช้ รวมทั้งรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ การวิเคราะห์ หรือ การชดเชยสัญญาณสี (สำหรับการทดลองหลายสี)
 - 🔍 สามารถสร้างเส้นมาตรฐานได้หลายไฟล์จากการทดลองเดียวกัน โดยกำหนดให้อ่านสัญญาณจากต่างช่องกัน หรือใช้การวิเคราะห์ที่แตกต่างกันในแต่ละครั้งที่บันทึกเส้นค่ามาตรฐาน
- 2 เพิ่มการวิเคราะห์ชนิดการหาปริมาณเป็นจำนวนจริงไปในการทดลอง



- 3 คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module* และเลือกการทำงานเป็น *Abs Quant*



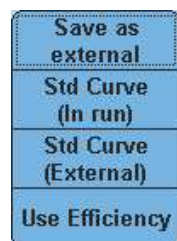
- 4 เลือก *Standard* เป็นชนิดของตัวอย่างในตัวอย่างที่เป็นค่ามาตรฐาน เพื่อใส่ค่าความเข้มข้น

รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน *Entering Sample Information*

- 5 ในส่วนการวิเคราะห์ สามารถเลือกการวิเคราะห์แบบ *Abs Quant/2nd Derivative Max* หรือแบบ *Abs Quant/Fit Points analysis* เลือกเครื่องมือหมายถูกหน้าช่องตัวอย่างมาตรฐานที่ต้องการไปคำนวณ

- 6 คลิกปุ่ม *Calculate*

- 7 ในส่วนปุ่ม *Standards* multi-select ให้กดเลือก *Save as external*



- 8 โปรแกรมจะนำทางไปอัตโนมัติยังปลายทาง โฟลเดอร์ย่อย *User folder – Special Data – Std Curve*

เพื่อที่จะทำการบันทึกค่าเส้นมาตรฐาน จากนั้นให้นำหน้และคลิกที่



สามารถนำเส้นค่ามาตรฐานนี้ไปใช้กับการคำนวณหาปริมาณการทดลองอื่นได้ โดยที่ต้องมีค่าพารามิเตอร์เดียวกันกับการทดลองที่สร้างเส้นค่ามาตรฐานนี้

วิธีใช้เส้นค่ามาตรฐานจากภายนอก:

- 1 ทำการทดลองที่มีค่ามาตรฐาน หรือใช้การทดลองที่มีอยู่ที่มีเส้นค่ามาตรฐานที่ต้องการใช้
! ค่าตัวอย่างมาตรฐานควรอยู่ในช่วงเส้นค่ามาตรฐานที่นำเข้ามาใช้

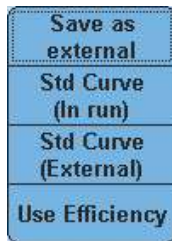
- 2 เพิ่มการวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงไปในการทดลอง

- 3 ในส่วน *Sample Editor* เลือกการทำงานเป็น *Abs Quant*

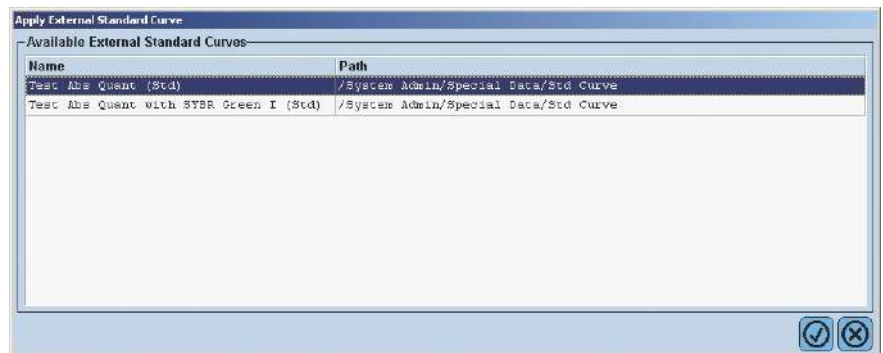
- 4 เลือกชนิดตัวอย่างเป็น *Standard* เพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นของค่ามาตรฐาน

รายละเอียดข้อมูลเพิ่มเติมดูได้ที่ [Entering Sample Information](#)

- 5 ในปุ่ม *Standards multi-select* กดเลือก *Std Curve (External)*

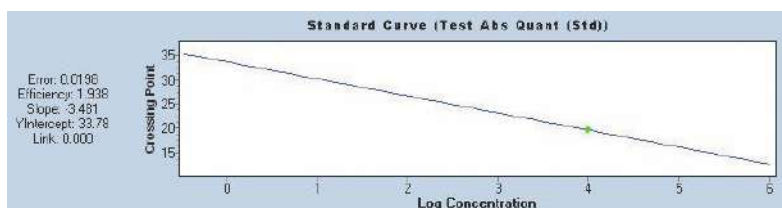


- 6 จะปรากฏหน้าต่าง *Apply External Standard Curve* ให้เลือกไฟล์เส้นค่ามาตรฐานที่ต้องการ:



- 7 ในการวิเคราะห์ให้กดเลือกตัวอย่างที่เป็นค่ามาตรฐานในรายการตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ จากนั้นคลิก *Calculate*

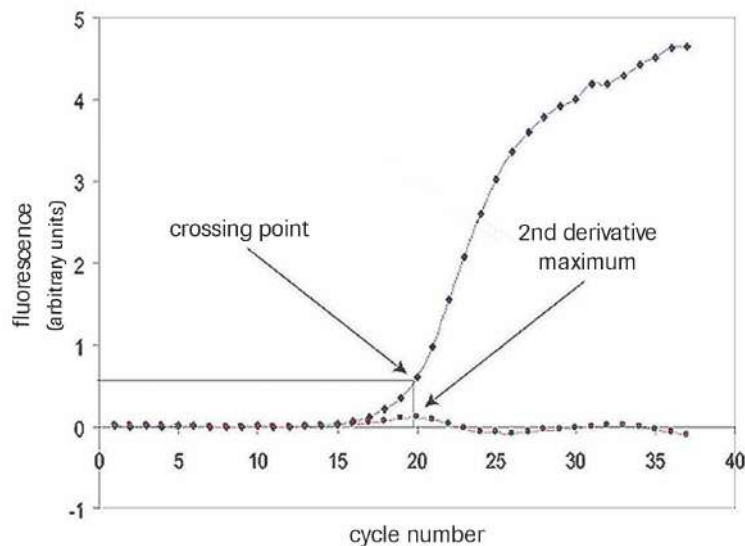
- 8 ในเส้นค่ามาตรฐาน จะแสดงตัวอย่างมาตรฐานที่กดเลือกเพียงตัวอย่างเดียวดังภาพ และชื่อของเส้นค่ามาตรฐานจะแสดงไว้ที่หัวกราฟ



4.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธีการคำนวณ Second

Derivative Maximum

วิธีการคำนวณ Second Derivative Maximum จะกำหนดค่า C_p ของตัวอย่างจากจุดที่กราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขึ้นสู่ส่วนชัน จุดนี้จะตรงกับค่าสูงสุดของอนุพันธ์อันดับสองของกราฟ ข้อได้เปรียบของวิธีการคำนวณนี้คือ ผู้ใช้ไม่ต้องทำการคำนวณเอง เป็นโปรแกรมคำนวณให้อัตโนมัติ เพียงบอกโปรแกรมถึงตัวอย่างมาตรฐานที่กำหนด



- 
 วิธี *Second Derivative Maximum* จะใช้พื้นฐานจากความจริงที่ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มได้สูงในช่วงที่ชันของกราฟ การเพิ่มสัญญาณจะช้าลงหากเข้าสู่ระยะราบตอนท้ายปฏิกิริยา ดังนั้นจำนวนรอบที่อนุพันธ์อันดับสองจะเป็นจุดสูงสุดจะเป็นช่วงกลางของกราฟช่วงตั้งชัน
- 
 เนื่องจากวิธี *Second Derivative Maximum* ขึ้นกับการเพิ่มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงตั้งชัน อัตราเร่งจนพลศาสตร์ช้าๆ ในกราฟการเพิ่มปริมาณจะต้องถูกติดตาม และปรับให้การทำงานคืออยู่เสมอ
- 
 ด้วยวิธี *Second Derivative Maximum* สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่จุด C_p ของแต่ละตัวอย่างจะแตกต่างกัน ไม่เหมือนกับการคำนวณด้วยเกณฑ์ที่ใช้ระดับฟลูออเรสเซนซ์เดียวกัน การคำนวณนี้จะคำนึงถึงลักษณะของกราฟที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการบ่งบอกค่าความเข้มข้น มากกว่าการใช้ปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์บ่งบอก และค่า C_p จะต้องเป็นจุดอัตราเร่งสูงสุดแม้ว่าระดับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะแตกต่างกัน
- 
 วิธี *Second Derivative Maximum* จะแก้ไขสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์พื้นหลังอัตโนมัติ โดยคำนวณจากการลบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ค่าเฉลี่ยในรอบที่ 2-6 ออก

ในการจัดการกับกราฟที่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ซับซ้อน โปรแกรมจะจัดการเฉพาะเฉพาะรอบออก เช่น สัญญาณรบกวน ในระยะเชิงเส้น สัญญาณรบกวนในระยะราบ นอกจากนั้นจะไม่มีค่า crossing point แสดงหากกราฟมีพื้นหลังรบกวนหรือกราฟยังไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ถึงเกณฑ์ที่กำหนด

การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Second Derivative Maximum มี 2 อัลกอริทึมที่แตกต่างกัน โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะกราฟและสัญญาณพื้นหลังดังนี้

► High Confidence

เป็นอัลกอริทึมที่จะใช้ในการคำนวณค่า Cps ให้มีความน่าเชื่อถือสูง โดยปกติค่า Cps จะคำนวณจากตัวอย่างที่มีกราฟขึ้นสูงชัดเจน และมีค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนสูง อัตราเสี่ยงที่จะได้ผลบวกปลอมจะมีต่ำมาก การคำนวณลักษณะนี้เหมาะกับการทดลองที่จะมีการใช้ไฟลัการชดเชยสัญญาณสีด้วย

► High Sensitivity

เป็นอัลกอริทึมที่จะคำนวณค่า crossing points ให้จากกราฟที่แม้ว่าจะมีสัญญาณต่ำและสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนต่ำ ดังนั้นหากมีเป้าหมายเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจวัดได้ ข้อดีของวิธีนี้คือเสี่ยงต่อการได้ผลบวกปลอม



อัลกอริทึม *High Sensitivity* จะเป็นค่าเริ่มต้นของการคำนวณแบบหาปริมาณเป็นจำนวนจริงในโปรแกรม *LightCycler® 480* รุ่นก่อน 1.2.

วิธีการหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยการคำนวณแบบวิธี Second Derivative

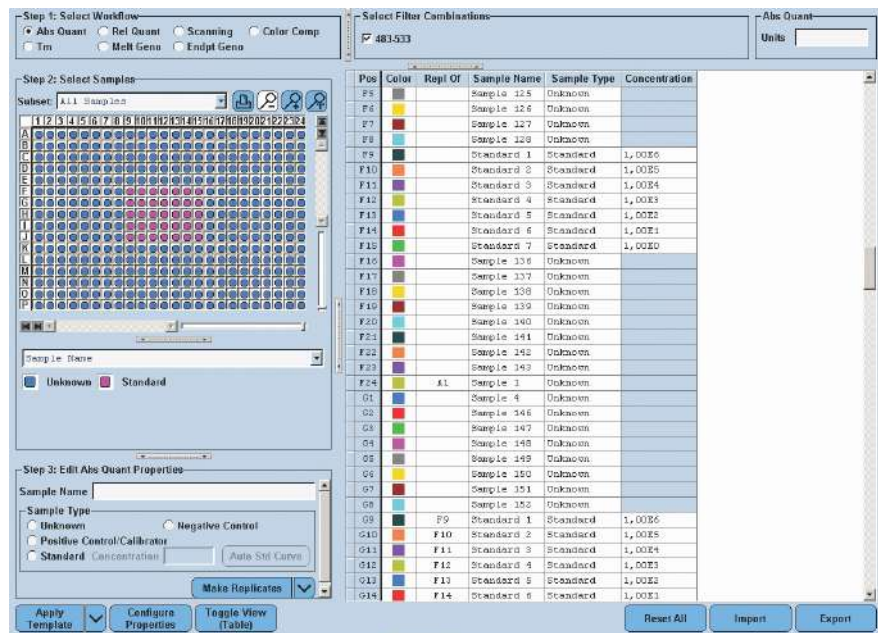
Maximum method:



สร้างและทำการทดลองการหาปริมาณ หรือเปิดการทดลองที่มีอยู่



คลิกที่ *Sample Editor* ในแถบ *Module* และเลือกการทำงาน แบบ *Abs Quant*.



3 กำหนดคุณสมบัติของตัวอย่าง

รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน *Entering Sample Information*

โปรแกรมจะใช้พารามิเตอร์ด้านล่างนี้ในการคำนวณ:

พารามิเตอร์	คำอธิบาย
ชนิดตัวอย่าง	เลือกชนิดของตัวอย่างในรายการ : ▶ Unknown ▶ Standard
ความเข้มข้น	ใส่ค่าความเข้มข้นกับตัวอย่างที่เป็นชนิด “Standard”  หน่วยของค่าความเข้มข้นจะกำหนดได้ในช่อง <i>unit</i> (เช่น “copies”)  หากไม่ใส่หน่วยของค่าความเข้มข้นการคำนวณเส้นมาตรฐานจะไม่เกิดขึ้น

4 คลิก *Analysis* ในแถบ *Module*

จากรายการ *Create New Analysis* ให้เลือก *Abs Quant/2nd Derivative Max* หน้าต่าง *Create new analysis* จะปรากฏ ให้เลือกวิเคราะห์กลุ่มย่อยด้วยการหาปริมาณ ซึ่งปกติจะเป็นค่าเริ่มต้นอยู่แล้ว จากนั้นคลิก 

- 6 ▶ หากเป็นการทดลองหลายสิพร้อมกัน คลิกที่ปุ่ม *Filter Comb* เพื่อเปิดหน้าต่าง *Filter Combination* กำหนดช่องสัญญาณที่ต้องการวิเคราะห์
- ▶ ใช้ปุ่ม *Color Comp multi-select* เพื่อเปิด หรือ ปิด ไฟล์การชดเชยสัญญาณสี

- 7 ▶ หากต้องการรวมเส้นมาตรฐานในการทดลองให้เลือกเครื่องหมายถูกหน้าตัวอย่างที่เป็นค่ามาตรฐานในแต่ละค่าด้วย (หากต้องการยกเลิกการเลือกให้ดับเบิลคลิก) เลือกปุ่ม *Std Curve (In Run)*
- ▶ หากไม่ต้องการรวมเส้นมาตรฐานในการทดลองให้เลือกปุ่ม *Std Curve (External)* แล้วเลือกหาเส้นมาตรฐานที่ต้องการเลือกนำมาใช้ คลิก 
-  เส้นมาตรฐานจากภายนอกที่นำมาใช้จะต้องมาจากการทดลองที่มีรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณเหมือนกันรวมทั้งการเลือกช่องสัญญาณ การใช้การชดเชยสัญญาณสีด้วย แต่สามารถมาจากเครื่องที่ใช้ชนิดบิลด์ต่างกันก็ได้ หากต้องการใช้เส้นมาตรฐานจากภายนอกจะต้องมีการกำหนดหนึ่งตัวอย่างมาตรฐานในการทดลองนั้นก่อนเป็นค่าอ้างอิง โปรแกรมจะคำนวณความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างจากค่า *crossing point* ที่สัมพันธ์กับเส้นมาตรฐาน

8 โดยค่าเริ่มต้น ทุกตัวอย่างจะถูกคำนวณผล หากต้องการลบตัวอย่างใดออกให้ดับเบิลคลิกที่หน้าตัวอย่างเพื่อนำเครื่องหมายถูกออก แล้วกด <Space> คลิก *Calculate*

9 ในการเห็นภาพกราฟการเพิ่มปริมาณของตัวอย่างหนึ่งหรือมากกว่า ให้ใส่ไอส์ที่ตัวอย่างในตารางผลการทดลอง

10 ในการดูผลการทดลองให้คลิกและลากขอบซ้ายของกราฟไปทางขวา ผลการทดลองจะรวมส่วนของตัวอย่างที่มีคุณสมบัติตัวอย่าง และการเลือกใช้ช่องสัญญาณ ตารางตัวอย่าง ค่าทางสถิติกรณีซ้ำ

D

4.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Fit Points

Method

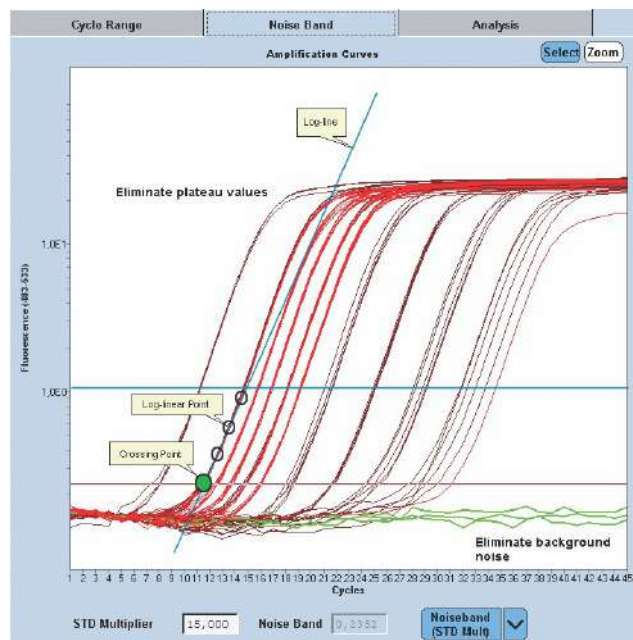
เทคนิค Fit Points จะเป็นการกำจัดความไม่เหมือนกันของสัญญาณรบกวนพื้นหลัง ด้วยการตัดสัญญาณแนวอน แยกส่วนระยะราบออกด้วยการใส่จำนวนของระบบเชิงเส้น จากนั้นกำหนดส่วนตั้งชันของกราฟ ค่าระหว่างระบบเชิงเส้นกับพื้นหลังจะถูกกำหนดเป็น crossing points โปรแกรม LightCycler® 480 จะคำนวณค่า crossing point ของตัวอย่างมาตรฐานเพื่อกำหนดเป็นเส้นมาตรฐานในการใช้คำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง



การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี *Fit Points method* สามารถกำหนดสัญญาณรบกวนและเส้นระดับแนวอนเพื่อได้ค่า *crossing point* ดังนั้นหากต้องการกำหนดวิธีนี้เป็นลักษณะอัตโนมัติเหมือนการคำนวณแบบ *Second Derivative Maximum* ค่าต่างๆจะต้องถูกกำหนดเช่น ช่วงรอบรอบที่เป็นพื้นหลัง สัญญาณรบกวน ค่าความเบี่ยงเบนเส้นมาตรฐาน เส้นตัดสัญญาณแนวอนจำนวนจุด *Fit Points*) ซึ่งสามารถบันทึกไว้เป็นแม่แบบได้ หรือเป็นลักษณะไฟล์ โครก็ได้

การกำหนดสัญญาณรบกวน

ตำแหน่งที่กำหนดควรต่ำมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยไม่รวมสัญญาณพื้นหลัง แต่ต้องสูงพอที่จะผ่านกราฟของตัวอย่างทุกตัวตรงส่วนของกราฟตั้งชันแต่ละตัวอย่าง กราฟด้านล่างแสดงระดับที่เหมาะสม และใช้เป็นแบบอย่างในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้



การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Fit Points method สามารถกำหนดสัญญาณรบกวนได้ 3 ทางเลือกที่แตกต่างกันดังนี้:

- ▶ Noiseband (Auto): ทางเลือกนี้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณรบกวนพื้นหลังของทุกตัวอย่างจะถูกคำนวณ ค่าสัญญาณรบกวนจะถูกกำหนดที่ 12 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- ▶ Noiseband (STD Mult): ทางเลือกนี้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณพื้นหลังของทุกตัวอย่างจะนำมาคำนวณ ผู้ใช้สามารถกำหนดตัวคูณสำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานพื้นหลัง
- ▶ Noiseband (Fluoresc): ให้กำหนดค่าสัญญาณรบกวนได้เอง

การกำหนด Fit Points

จำนวนข้อมูลที่อยู่บนเส้นกราฟส่วนตั้งชันจะแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่างขึ้นกับความเข้มข้น ซึ่งอยู่ในช่วงค่าที่ 2 ในความเข้มข้นต่ำถึง 4 ในความเข้มข้นสูง การรวมข้อมูลในส่วนระยะราบไปด้วยจะทำให้เกิดผลเสียต่อผลการทดลอง ดังนั้นการกำหนดค่าไว้ที่ 2 จึงเหมาะสมกว่า

การปรับค่าเกณฑ์

เมื่อตัดค่าสัญญาณพื้นหลังออก การคำนวณค่าส่วนตั้งชันของกราฟจะถูกกำหนดด้วยเส้นเกณฑ์ที่ลากตัดผ่านส่วนตั้งชันกราฟการเพิ่มปริมาณแต่ละตัวอย่าง การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Fit Points จะอนุญาตให้มีการตั้งค่าเกณฑ์อัตโนมัติ:

- ▶ หากการทดลองมีค่ามาตรฐาน เส้นเกณฑ์จะช่วยลดข้อผิดพลาดให้เกิดขึ้นน้อยที่สุด
- ▶ หากการทดลองไม่มีค่ามาตรฐาน สัญญาณรบกวน จะถูกใช้เป็นตัวกำหนดเส้นเกณฑ์

ส่วนมากการใช้เส้นเกณฑ์อัตโนมัติจะให้ผลดี ในบางกรณีหากต้องการลดค่าผิดพลาดของเส้นมาตรฐานสามารถลากเส้นเกณฑ์ขึ้นหรือลงเพื่อปรับให้เหมาะสม

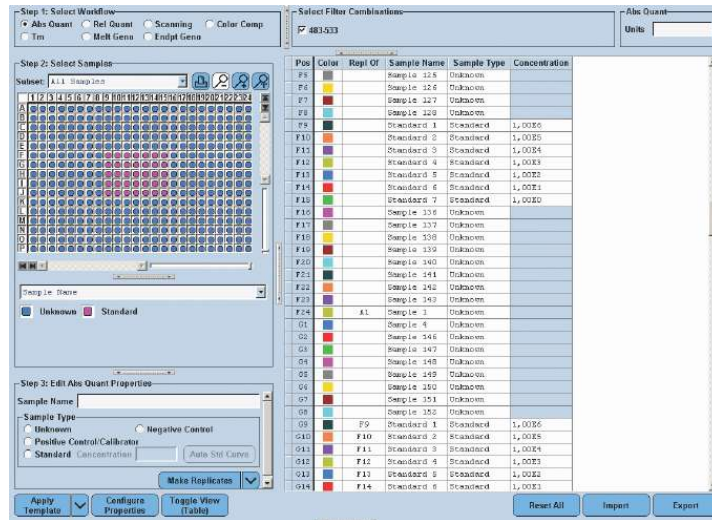


เมื่อคำนวณกราฟส่วนตั้งชัน ทุกระดับของเส้นเกณฑ์จะให้ผลที่เหมาะสมกับเส้นมาตรฐาน หากมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นจะทำให้เส้นเกณฑ์ออกจากจุดข้อมูลไปมาก ถ้าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เป็นสัดส่วนกับจำนวนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ดังนั้นทุกตัวอย่างจะมีเส้นเกณฑ์เดียวกัน



วิธีการทดลองหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยเทคนิค Fit Points method:

- 1 สร้างและทำการทดลองหาปริมาณ หรือเปิดการทดลองที่มีอยู่
- 2 คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module* แล้วเลือกการทำงานเป็น *Abs Quant*



- 3 กำหนดคุณสมบัติตัวอย่าง
รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน *Entering Sample Information*

โปรแกรมจะใช้ค่าพารามิเตอร์ในการคำนวณดังนี้:

พารามิเตอร์	คำอธิบาย
ชนิดของตัวอย่าง	เลือกชนิดของตัวอย่างจากรายการที่มีให้: ► Unknown ► Standard
ความเข้มข้น	ใส่ค่าความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างที่กำหนดเป็น “Standard”  ใส่หน่วยค่าความเข้มข้น ในช่อง <i>Unit</i> เหนือตารางตัวอย่าง (เช่น “copies”)  หากไม่ใส่หน่วยค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง โปรแกรมจะไม่คำนวณเส้นค่ามาตรฐานให้

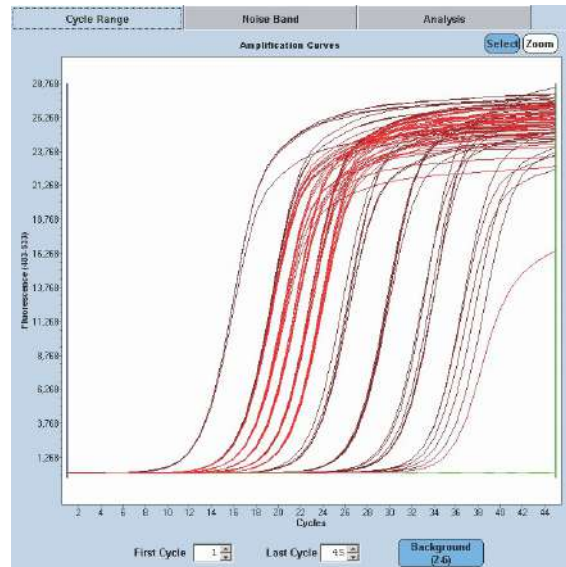
- 4 คลิก *Analysis* ในแถบ *Module*
- 5 จากระายการ *Create New Analysis* ให้เลือก *Abs Quant/Fit Points* ในหน้าต่าง *Create New Analysis* ให้เลือกวิเคราะห์กลุ่มย่อยและโปรแกรมการหาปริมาณในการทดลอง (โดยปกติจะมีการทดลองการหาปริมาณเพียงหนึ่งการทดลองเป็นค่าเริ่มต้น) คลิก 

 ขึ้นอยู่กับการสร้างการวิเคราะห์โปรแกรมจะอัตโนมัติกำหนดค่าเริ่มต้นสัญญาณรบกวนและเส้นเกณฑ์ ดังนั้นขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับต่อไปเป็นทางเลือกเท่านั้น

- 6
 - หากเป็นการทดลองหลายสีพร้อมกันให้คลิกปุ่ม *Filter Comb* เพื่อเปิดหน้าต่าง *Filter Combination* แล้วเลือกช่องสัญญาณที่ต้องการวิเคราะห์
 - ใช้ปุ่ม *Color Comp* multi-select เพื่อเปิดหรือปิดไฟลัการชดเชยสัญญาณสี



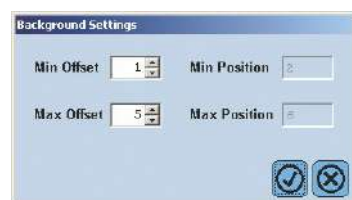
- 7 ในแถบ *Cycle Range* สามารถเลือกการแก้ไขพื้นฐานฟลูออเรสเซนซ์ของกราฟการเพิ่มปริมาณต่อจำนวนรอบการทำงาน โดยค่าเริ่มต้นจำนวนรอบจะกำหนดจากโปรแกรมการทดลอง ตามรอบแรกและรอบสุดท้าย แต่สามารถกำหนดใหม่ได้ ด้วยการใช้นิ้วชี้ซ้ายชี้ขวา กำหนดรอบแรก สีเขียวกำหนดรอบสุดท้าย หรือจะใส่เป็นตัวเลขในช่องด้านล่างก็ได้ การใช้ฟังก์ชันนี้จะช่วยกำจัดรอบการทำงานแรกๆ ที่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ไม่ปกติออกได้



- 8 ค่าตัวเลขที่ได้ในช่องรอบด้านล่างกราฟจะสัมพันธ์กับเส้นสีที่กำหนดในภาพกราฟ

- 9 คลิกปุ่ม *Background* เพื่อจะกำหนดค่าพื้นหลังเอง

ช่วงที่ให้ไว้จะเป็นค่าชดเชยต่อค่าสัญญาณรอบแรก การแก้ไขสัญญาณพื้นหลัง จะคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของแต่ละกราฟฟลูออเรสเซนซ์ ระหว่าง *Min Position* และ *Max Position* (เช่นถ้ารอบแรกเป็นรอบที่ 1 และ *Min/Max Offset* ถูกกำหนดที่ 1/5 ดังนั้นสัญญาณพื้นหลังเฉลี่ยจะถูกคำนวณจากรอบที่ 2 ถึง 6 แต่หากรอบแรกเป็นรอบที่ 4 สัญญาณพื้นหลังเฉลี่ยจะถูกคำนวณจากรอบที่ 5 ถึง 9) ค่าเฉลี่ยพื้นหลังจะถูกลบจากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ไม่ถูกต้องในแต่ละกราฟ

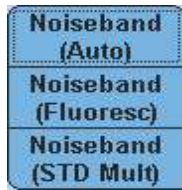


- 10 หากใช้เส้นสีในภาพกราฟในการกำหนดช่วงรอบที่ใช้ในการคำนวณ สัญญาณพื้นหลังจะปรับทันทีและแสดงการคำนวณใหม่ให้เห็นในภาพกราฟ
- 11 ทุกการวิเคราะห์จะใช้ค่า *Cp* หรือการใช้ *melting curve* ดังนั้นจุดเริ่มต้นจะเป็นอิสระต่อกัน ยกเว้น *Fit Points* ดังนั้นในการกำหนดค่า ไม่ควรเป็นเลข 0 หรือเลขติดลบ เนื่องจากขั้นต่อไปจะเป็นการกำหนดค่าสัญญาณรบกวน ซึ่งโปรแกรมจะแสดงค่าแกน Y เป็น *log* และหากคำนวณค่า *log of 0* หรือค่าติดลบก็จะเป็นไปไม่ได้

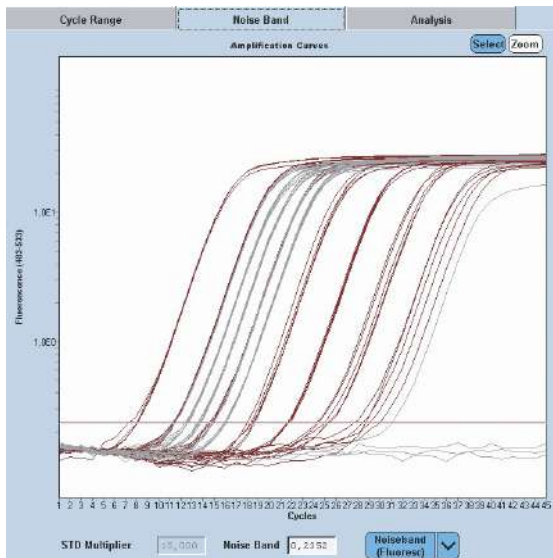


- 9 ในแถบ *Noise Band* สามารถกำจัดสัญญาณรบกวนของตัวอย่างได้ คลิกที่ปุ่ม

Noiseband multi-select เพื่อกำหนดดังนี้:



- ▶ Noiseband (Auto): ตั้งค่าสัญญาณรบกวนที่ 12 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (*Std Dev Multiplier*) และ *Noise Band* เป็นค่าที่อ่านอย่างเดียวไม่สามารถแก้ไขได้ เป็นการตั้งค่าเริ่มต้น
- ▶ Noiseband (Fluoresc): สามารถลดเส้นรบกวนเพื่อกำจัดสัญญาณรบกวนหรือใส่ค่าตัวเลขในช่องได้ (ถ้า *Std Dev Multiplier* เป็นค่าจำนวนจะแสดงให้เห็นแต่แก้ไขไม่ได้)
- ▶ Noiseband (STD Mult): กำหนดสัญญาณรบกวนต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณรบกวนหลายค่าได้ (ถ้า *Noise Band* เป็นค่าจำนวนและแสดงให้เห็นแต่แก้ไขไม่ได้)



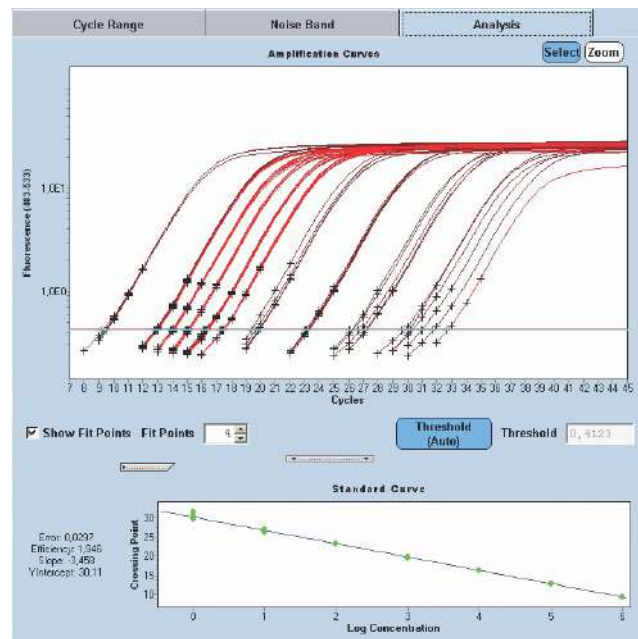
- 10 ในแถบ *Analysis* กำหนดจำนวนข้อมูล (*Fit Points*) ที่ใช้ในการให้กราฟแบบเชิงเส้นของตัวอย่าง

- 11 กำหนดเส้นเกณฑ์ของตัวอย่างดังนี้:

- ▶ เลือก Threshold (Auto) เพื่อให้โปรแกรม LightCycler® 480 ปรับอัตโนมัติ ซึ่งเป็นค่าเริ่มต้นของการกำหนดไว้
- ▶ เลือก Threshold (Manual) โดยการใช้เมาส์ชี้ไปที่เส้นเกณฑ์แล้วลากเมาส์เพื่อเลื่อนเส้นขึ้นหรือลง หรือทำการใส่ค่าเส้นเกณฑ์ในช่องได้โดยตรง

- ▶ สามารถสลับระหว่างวิธี *Auto* และ *Manual* โดยกดที่ปุ่ม *Threshold*
- ▶ หากลากเส้นเกณฑ์ โปรแกรมจะอัตโนมัติเปลี่ยนไปสู่โหมด *Manual*





12

▶ หากต้องการรวมเส้นมาตรฐานในการทดลองให้เลือกเครื่องหมายถูกหน้าตัวอย่างที่เป็นค่ามาตรฐานในแต่ละค่าด้วย (หากต้องการยกเลิกการเลือกให้ดับเบิลคลิก) เลือกปุ่ม *Std Curve (In Run)*

▶ หากไม่ต้องการรวมเส้นมาตรฐานในการทดลองให้เลือกปุ่ม *Std Curve (External)* แล้วเลือกหาเส้นมาตรฐานที่ต้องการเลือกนำมาเข้าใช้ คลิก

เส้นมาตรฐานจากภายนอกที่นำมาใช้จะต้องมาจากการทดลองที่มีรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณเหมือนกันรวมทั้งการเลือกช่องสัญญาณ การใช้การชดเชยสัญญาณได้ด้วย แต่สามารถมาจากเครื่องที่ใช้ชนิดบล็อกล่างกันได้ หากต้องการใช้เส้นมาตรฐานจากภายนอกจะต้องมีการกำหนดหนึ่งตัวอย่างมาตรฐานในการทดลองนั้นก่อนเป็นค่าอ้างอิง โปรแกรมจะคำนวณความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างจากค่า *crossing point* ที่สัมพันธ์กับเส้นมาตรฐาน

13

คลิกที่ปุ่ม *Calculate* เพื่อคำนวณและแสดงค่า *Cp* หากมีค่ามาตรฐานก็จะคำนวณด้วย

14

โดยค่าเริ่มต้น ทุกตัวอย่างจะถูกคำนวณ หากต้องการยกเลิกการเลือกตัวอย่างให้ทำเครื่องหมายถูกต่อจากชื่อตัวอย่างแล้วกด <Space> คลิก *Calculate*

15

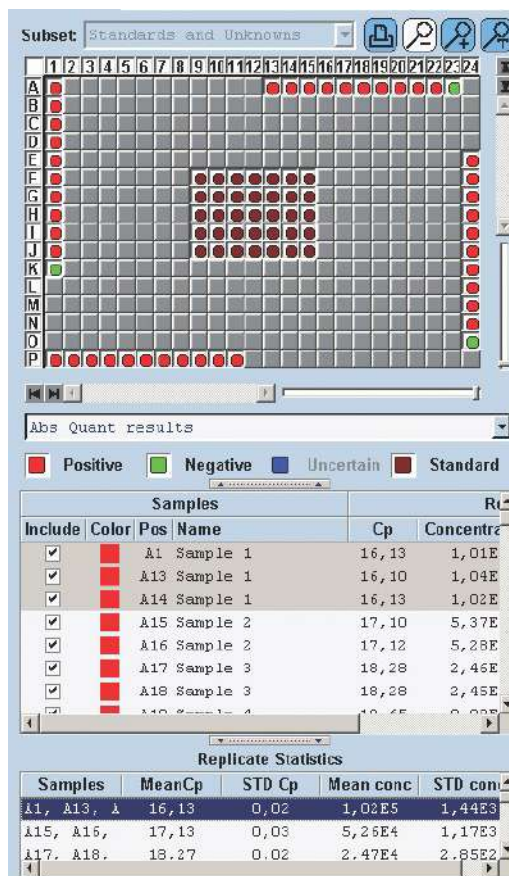
หากต้องการดูกราฟการเพิ่มปริมาณหนึ่งตัวอย่างหรือมากกว่าให้ไฮไลท์ที่ชื่อตัวอย่างในตารางตัวอย่าง หากต้องการดูค่า *Fit Points* ให้ทำเครื่องหมายถูกที่ช่อง *Show Fit Points*

4.2.6 การดูผลการวิเคราะห์

- ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริงจะแสดง ตัวอย่างพร้อมทั้งคุณสมบัติตัวอย่างที่เลือก ตารางแสดงผล ตารางค่าสถิติ หากมีการทำซ้ำ

เลือก *Legend Property Selector* เพื่อแสดงสีแทนผลการทดลอง สีแทนชนิดตัวอย่าง สีแทนคุณสมบัติตัวอย่าง หรือสีแทนการทำซ้ำ เลือกปุ่ม *Legend Property* เพื่อแสดงตัวอย่างพร้อมคุณสมบัติในภาพเพลท ในตารางผล และในกราฟ

หากเลือก *Abs Quant results* ในส่วน *Legend Property Selector* ตารางแสดงผลจะมีดังนี้ มีปุ่ม *Legend Property* ให้เลือกใช้ โดยขึ้นอยู่กับผลที่ได้ เช่น แสดงเป็น Positive, Negative, Uncertain, and Standard



เลือกเครื่องหมายถูกหน้าช่อง *Positive*, *Negative*, *Uncertain*, และ *Standard* เพื่อกำหนดชนิดของผลให้ตรงกันในส่วน *Sample Selector* และไฮไลต์ในสีที่แสดงในคุณสมบัติ



ผลการทดลอง	คำอธิบาย
Cp	ค่า crossing point ของตัวอย่าง ข้อมูลเพิ่มเติมแสดงในคอลัมน์สถานะ ในตารางตัวอย่างเป็นสีเหลือง ค่าช่วงที่น่าเชื่อถือของเส้นมาตรฐานกำหนดโดยความเข้มข้นสูงสุดและต่ำสุด หากค่าความเข้มข้นของตัวอย่างมากกว่าจุดสูงสุดของค่ามาตรฐานหรือน้อยกว่าค่าต่ำสุดของค่ามาตรฐาน จะถูกพิจารณาว่าอยู่นอกค่ามาตรฐานและรายงานในคอลัมน์สถานะ
Concentration	ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จะมาจากค่า crossing point ที่ตกในเส้นมาตรฐานแล้วเทียบเป็นค่าความเข้มข้น <i>Unit</i> ถูกกำหนดให้ไว้ (เช่น “copies”)
Standard	เป็นค่าที่กำหนดในส่วน <i>Abs Quant</i> ของการแก้ไขตัวอย่าง
Status	รหัสและคำอธิบายของสถานะ ในคอลัมน์จะมีรหัสดังนี้ ? ผลไม่แน่นอน < Early Cp (5 รอบแรก) มีความไม่แน่นอนสูง > Late Cp (5 รอบสุดท้าย) มีความไม่แน่นอนสูง E คือความเข้มข้นที่คาดการณ์ในเส้นมาตรฐาน หากตัวอย่างมีหลายรหัส สถานะก็จะแสดงทุกรหัสและคำอธิบายโดยการใช้อักษรย่อ

2 ผลต่อไปนี้จะอยู่ต่อท้ายในตารางแสดงผลหากในการทดลองมีการทำซ้ำ

ค่าสถิติ	คำอธิบาย
Samples	จำนวนตัวอย่างที่ทำซ้ำ
Mean/Median Cp	ค่าเฉลี่ยหรือค่ากลางของ crossing points สำหรับตัวอย่าง
STD Cp	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ crossing points
Mean/Median conc	ค่าเฉลี่ยหรือค่ากลางของความเข้มข้น สำหรับตัวอย่าง
STD conc	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น



ตัวอย่างที่ให้ผลลบจะไม่นำมาคำนวณค่าทางสถิติ

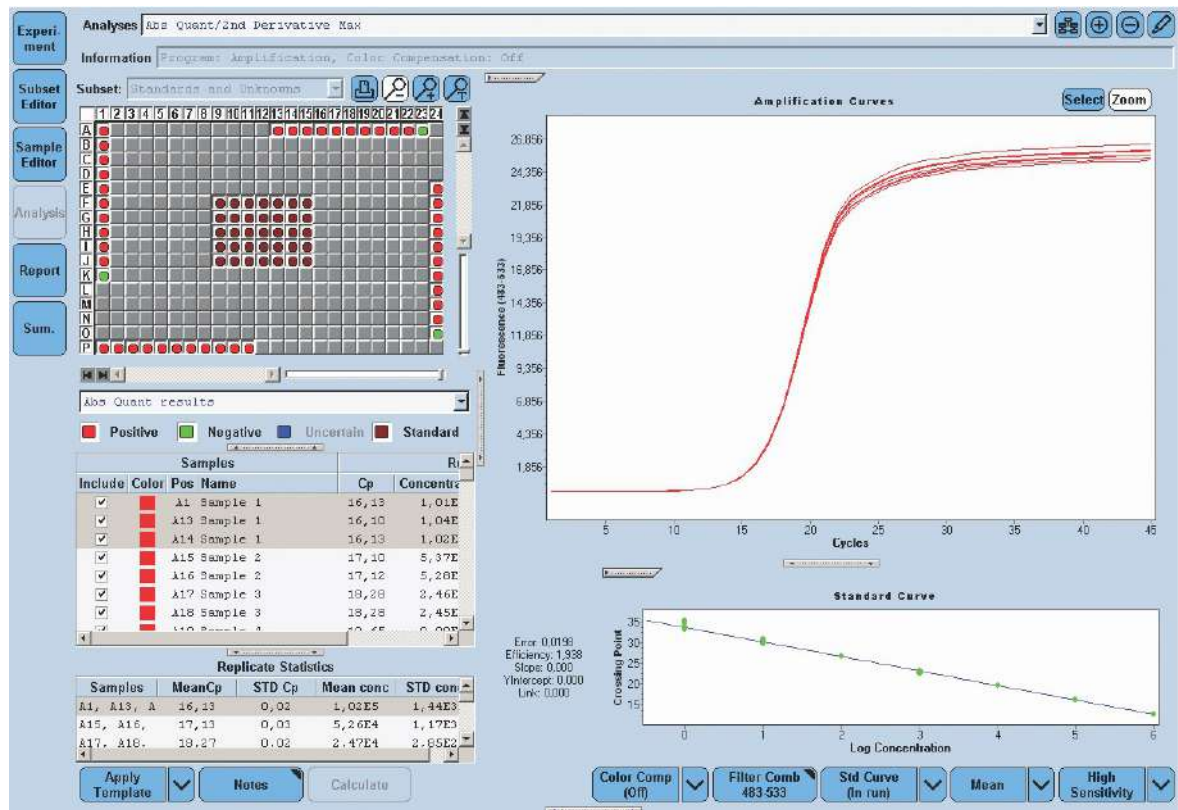


หากเลือกค่าการทำซ้ำในตารางสถิติ กราฟของทุกตัวอย่างในการทำซ้ำจะแสดงให้เห็นในกราฟที่เชื่อมโยงกัน

D

ตัวอย่างการหาปริมาณเป็นจำนวนจริงด้วยวิธี Second Derivative Maximum แสดงไว้ด้านล่าง ผลจะคำนวณจากทุกตัวอย่าง กราฟการเพิ่มปริมาณแสดงสำหรับตัวอย่างที่ไฮไลท์ เส้นค่ามาตรฐานจะแสดงจากตัวอย่างที่ทำ การกำหนดเลือกเป็นค่ามาตรฐานในการแก้ไขตัวอย่าง

การวิเคราะห์มี 2 กราฟ โดยค่าเริ่มต้นกราฟที่ภาพบนจะแสดงกราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ส่วนกราฟด้านล่างจะแสดงกราฟเส้นค่ามาตรฐาน รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน [Using the Analysis Window](#)



4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์

4.3.1 ภาพรวม

การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์เป็นการเปรียบเทียบระดับของสารพันธุกรรมเป้าหมายสองชนิดที่แตกต่างกันในตัวอย่างเดียวกัน (เช่น ยีนที่สนใจกับยีนอื่นๆ) และแสดงผลเป็นค่าสัดส่วนต่อยีนเป้าหมาย วัตถุประสงค์ของการเปรียบเทียบกับยีนที่สองมักจะเป็นยีนอ้างอิงที่พบการแสดงออกด้วยจำนวนที่คงที่เป็นปกติในทุกสภาวะ ยีนอ้างอิงจะทราบกันดีว่าใช้เป็นตัวควบคุมภายใน เพื่อใช้ในการทำให้การเปรียบเทียบเหมือนกันระหว่างแต่ละตัวอย่าง การวิเคราะห์ลักษณะนี้เป็นประโยชน์อย่างมาก เช่น กับงานวิจัยทางมะเร็งวิทยา

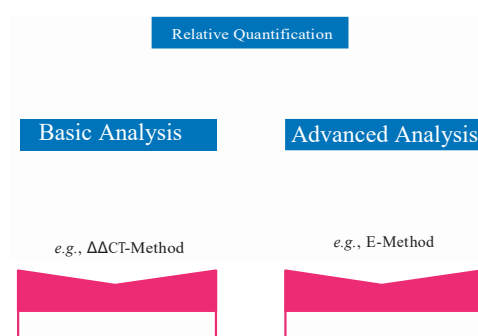
การศึกษาการแสดงออกของยีน จะอธิบายการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่อเวลา (เช่น การแสดงออกของยีนเปลี่ยนไปเล็กน้อยเพียงใดเมื่อมีการดำเนินของโรคหรือการรักษา) ต่อจุดเริ่มต้น (เช่น เมื่อไม่มีโรค หรือไม่ได้รับการรักษา) การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ทำให้ผู้ใช้งานสามารถเปรียบเทียบพฤติกรรมการแสดงออกของยีนเป้าหมายภายใต้สภาวะอย่างน้อย 2 สภาวะ (เช่น การปลอดโรค / เป็นโรคหรือ ไม่ได้รับการรักษา / ได้รับการรักษา) การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการอธิบายการแสดงออกของยีนและควบคุมยีน

ด้วยการหาค่าความเข้มข้นของยีนเป้าหมายด้วยความเข้มข้นของยีนอ้างอิงในตัวอย่างเดียวกัน จะเป็นวิธีที่ช่วยแก้ไขให้ค่าความแตกต่างในด้านคุณภาพและปริมาณของตัวอย่างเนื่องจาก:

- ▶ ความหลากหลายของปริมาณตัวอย่างเริ่มต้น
- ▶ ความหลากหลายของการได้มาซึ่งสารพันธุกรรม
- ▶ การย่อยสลายไปของอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างส่งตรวจ
- ▶ ความแตกต่างในคุณภาพของตัวอย่างหรือคุณภาพสารพันธุกรรม
- ▶ ความหลากหลายของการใส่ตัวอย่างหรือการปิดหลอด
- ▶ ความหลากหลายของประสิทธิภาพการสังเคราะห์ cDNA

การวิเคราะห์ในการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์

โปรแกรม LightCycler 480® มีการวิเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะสำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ ดังนี้: การวิเคราะห์พื้นฐาน และ การวิเคราะห์ขั้นสูง



- การวิเคราะห์ขั้นพื้นฐาน เป็นการวิเคราะห์หาค่าโดยคลิกเพียง 1 ครั้ง การคำนวณจะใช้วิธี $\Delta\Delta C_T$ -Method รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน *Performing a Basic Relative Quantification Experiment*
- การวิเคราะห์ขั้นสูง เป็นการวิเคราะห์ที่มีการปรับค่าต่างๆ ได้ตามที่ใช้ต้องการ โดยใช้โปรแกรมที่ซับซ้อน ซึ่งจะเหมาะกับการวิเคราะห์ในงานวิจัย รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วนของ *Performing an Advanced Relative Quantification Experiment*



โรชาไดแอกโนสติกส์ จะใช้วิธี E-Method (Efficiency Method) ที่เป็นโปรแกรมการวิเคราะห์ขั้นสูง ในการวิเคราะห์ผลที่ได้ข้อมูลการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ได้นำเชื่อถือ

	วิธีพื้นฐาน (e.g., $\Delta\Delta C_T$ -Method)	วิธีขั้นสูง (e.g., E-Method)
ชนิดตัวอย่าง	ขึ้นเป้าหมาย (1 / มากกว่า) ขึ้นอ้างอิง (1 / มากกว่า)	ขึ้นเป้าหมาย (1 / มากกว่า) ขึ้นอ้างอิง (1 / มากกว่า)
ตัวสอบเทียบ	ตัวสอบเทียบปฏิกิริยา และ/หรือ ตัวสอบเทียบการศึกษา	ตัวสอบเทียบปฏิกิริยา และ/หรือ ตัวสอบเทียบการศึกษา
ค่ามาตรฐาน (ขึ้นเป้าหมาย/ขึ้นอ้างอิง)	-	ค่ามาตรฐาน
ประสิทธิภาพ	2 / $\neq$ 2 (เชิงเส้น)	2 / $\neq$ 2 (เชิงเส้น/ไม่เชิงเส้น)
การวิเคราะห์ค่า C_p	วิธี Fit Points	► วิธี Second Derivative Maximum ► วิธี Fit Points

การปรับแก้ประสิทธิภาพของพีซีอาร์

ความน่าเชื่อถือของการหาปริมาณด้วยวิธีเชิงสัมพัทธ์จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ การเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์จะใช้เอ็นไซม์เป็นตัวหลัก ดังนั้นอาจมีการให้คุณภาพการทำงานที่ไม่คงที่ได้ แต่ในการคำนวณจะแทนค่าประสิทธิภาพเพียง 1 ค่าที่สูงสุดคือ $E=2$ ซึ่งหมายความว่าจำนวนโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบเป็นสองเท่าเสมอ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะขึ้นกับหลายปัจจัยในการที่จะทำให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด เช่น ปัจจัยด้านการเตรียมตัวอย่าง การสกัดสารพันธุกรรม การเตรียมก่อนพีซีอาร์ เป็นต้น ดังนั้นส่วนมากปฏิกิริยาพีซีอาร์จะมีประสิทธิภาพเกิดขึ้นจริงน้อยกว่า 2

สำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์จะเป็นการเปรียบเทียบกันระหว่างปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ปฏิกิริยา (จากขึ้นเป้าหมาย และจากขึ้นอ้างอิง) ดังนั้นประสิทธิภาพของปฏิกิริยาทั้งสองมีโอกาสที่จะไม่เท่ากัน การวิเคราะห์จึงอาจจะไม่แม่นยำมาก และในปฏิกิริยาเดียวกันเอง ตั้งแต่เริ่มปฏิกิริยาจนจบ ประสิทธิภาพก็อาจจะไม่เท่ากันได้ ซึ่งจะทำการคำนวณเชิงเส้นเป็นไปได้อย่าง ซึ่งอธิบายด้วยสูตรดังนี้

$$N_n = N_0 \times E^{2n}$$

(ซึ่ง N หมายถึง จำนวนโมเลกุล N_0 จำนวนโมเลกุลเริ่มต้น n คือจำนวนรอบ และ E คือค่าประสิทธิภาพ)

เนื่องจากประสิทธิภาพสะท้อนถึงความแม่นยำของปฏิกิริยา ดังนั้นในการเลือกเทคนิคการคำนวณการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ต้องนำมาคำนวณด้วย



แนะนำให้มีการแก้ไขประสิทธิภาพพีซีอาร์สำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ด้วยดังนี้

- ▶ ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพไม่ถึง 2
- ▶ ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพไม่คงที่

หากมีการใช้การแก้ไขประสิทธิภาพ การผิดพลาดในการคำนวณระหว่างยีนเป้าหมายกับยีนอ้างอิงจะลดลงมาก

การแก้ไขประสิทธิภาพการหาปริมาณจะทำให้อัตโนมัติด้วยโปรแกรม LightCycler 480 โดยอ้างอิงจากเส้นค่ามาตรฐานที่มีค่าประสิทธิภาพของทั้งยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง

เส้นค่ามาตรฐานอาจถูกกำหนดแล้วนำไปใช้ในครั้งต่อไป หรือสามารถใช้พร้อมกับการทดลองครั้งเดียวกันได้ ร่วมกับการวิเคราะห์ค่า C_p ของยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง

เนื่องจากในหลักการได้ใช้ตัวสอบเทียบในการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ เส้นค่ามาตรฐานจึงไม่จำเป็นต้องเป็นจำนวนจริง อาจเป็นเพียงแค่ลำดับการเจือจางตัวอย่างมาตรฐานได้ทั้งของยีนเป้าหมาย และยีนอ้างอิง (เช่น 1:10, 1:100, ...) แนะนำให้ทำการทดลองสร้างเส้นค่ามาตรฐานที่จะใช้ในการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์นี้ โดยทำการทดลองของยีนเป้าหมาย 15 ตัวอย่าง ยีนอ้างอิงอีก 15 ตัวอย่าง และให้ครอบคลุมความเข้มข้นอย่างน้อย 4 ลำดับของการเจือจางด้วยการใช้สารพันธุกรรมปกติ เช่น total RNA หรือ genomic DNA

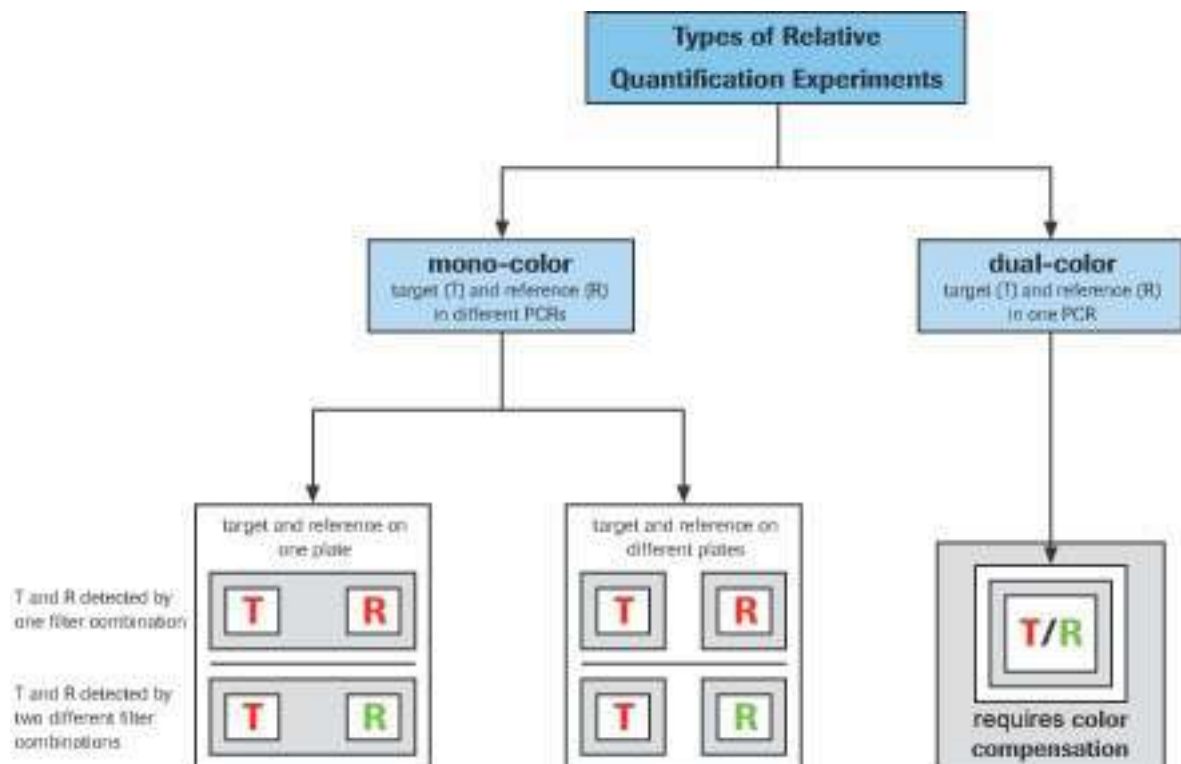
ในหลักการหากการเจือจางสารพันธุกรรมทุกอันดับมีประสิทธิภาพเป็นเนื้อเดียวกัน มีประสิทธิภาพการทำพีซีอาร์เท่ากันแต่ละตัวอย่างโดยทั่วไปสามารถนำไปใช้สร้างค่าเส้นค่ามาตรฐานสำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ได้

D

4.3.2 การทดลองสีเดียว หรือ สองสี

ก่อนจะทำการทดลองหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ ต้องตัดสินใจเลือกการทดลองก่อนว่าควรเป็นลักษณะสีเดียวหรือสองสี

- ▶ ในการทดลองสีเดียว ขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิงจะแยกหลุมการทดลองกัน ซึ่งมี 2 ทางเลือกดังนี้
 - ▶ ทั้งขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิงจะทำการทดลองไปพร้อมกันในหลอดเดียวกัน ในกรณีนี้จะเรียกว่า “In-Run”
 - ▶ ขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิงจะทำการทดลองแยกกันคนละหลอด ในกรณีนี้จะเรียกว่า “External”
- ▶ ไม่จำเป็นที่ทั้งขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิงจะต้องใช้การตรวจวัดสัญญาณช่องเดียวกัน
- ▶ สำหรับการทดลองหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ที่ใช้ขึ้นอ้างอิงภายนอก ให้ใช้การกำหนดการทดลองเป็นแบบสีเดียวในการตั้งค่าการทดลอง
- ▶ ในการทดลองสองสี ขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิงจะทำปฏิกิริยาอยู่ภายในหลุมการทดลองเดียวกัน แต่จะใช้การตรวจวัดสัญญาณสีกันคนละชนิด ด้วย 2 ช่องสัญญาณ ในกรณีนี้จำเป็นต้องใช้การชดเชยสัญญาณสี



4.3.3 หลักการการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์

การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์จะเปรียบเทียบ 2 สัดส่วน:

- ▶ สัดส่วนของลำดับสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเป้าหมายต่อดีเอ็นเออ้างอิงในตัวอย่างที่ไม่ทราบ
- ▶ สัดส่วนของลำดับสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเป้าหมายต่อดีเอ็นเออ้างอิงในตัวอย่างมาตรฐาน ซึ่งเรียกว่า ตัวสอบเทียบ

ซินเป้าหมาย คือสารพันธุกรรมที่สนใจ (อาร์เอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอ) ซินอ้างอิงคือ สารพันธุกรรมที่พบได้ในปริมาณคงที่ในทุกตัวอย่าง และถูกใช้เป็นตัวควบคุมภายใน ซินอ้างอิงจะใช้สอบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างตรวจได้ ตัวสอบเทียบ ปกติจะเป็นตัวอย่างชนิดบวกที่มีสัดส่วนคงที่ระหว่างซินเป้าหมายกับซินอ้างอิง และใช้เป็นตัวปรับเทียบกับทุกตัวอย่างในการทดลอง และสามารถให้ค่าการปรับเทียบที่คงที่ได้ระหว่างการทดลองแต่ละครั้งด้วย



ในขณะที่ตัวสอบเทียบจะช่วยปรับแก้ความแตกต่างของความไวการวัดสัญญาณระหว่างซินเป้าหมายและซินอ้างอิงจากการจับของโพรบ ประสิทธิภาพการเกิด FRET หรือค่าสัมประสิทธิ์การสูญเสียพลังงาน แต่จะไม่ปรับแก้ความแตกต่างของประสิทธิภาพฟิชอร์ ระหว่างซินเป้าหมายและซินอ้างอิง

ผลจะแสดงเป็นสัดส่วนการเปรียบเทียบ นั่นคือสัดส่วน (1)หารด้วยสัดส่วน (2)

$$\text{Normalized Ratio} = \left(\frac{\text{conc. target}}{\text{conc. reference}} \right)_{\text{sample}} : \left(\frac{\text{conc. target}}{\text{conc. reference}} \right)_{\text{calibrator}}$$

การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์สามารถทำได้กับการทดลองที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และสามารถใช้ได้ทั้งชนิดสีเดียวหรือสองสีในการทดลองนั้น

หลักการหาปริมาณอยู่บนข้อสันนิษฐานที่ว่า ที่รอบ crossing point เดียวกันจะให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากันในทุกตัวอย่างที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายชนิดเดียวกัน ซึ่งความเข้มข้นของดีเอ็นเอเครื่องจะต้องวัดได้เหนือสัญญาณพื้นหลัง แต่ละตัวอย่างจะมีรอบ crossing point ต่างกัน ได้ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารพันธุกรรมในตัวอย่างนั้น เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จะแตกต่างกันไปโดยขึ้นกับจำนวนรอบหลังจากที่ตัวอย่างนั้นถึงค่า crossing point จนจบการทำงาน

ในการวิเคราะห์จะใช้ค่า crossing point (แสดงเป็นจำนวนรอบ) ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา จำนวนรอบของการทำงานจนจบ และค่าอื่นๆ ในการที่จะบ่งบอกว่าปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้องเพิ่มเป็นเท่าใด เมื่อเสร็จปฏิกิริยา การวิเคราะห์จะคำนวณเพื่อเปรียบเทียบตัวอย่างแล้วได้เป็นค่าสัดส่วน ค่าสัดส่วนสุดท้ายจะถูกนำไปสอบเทียบ การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์นี้จะต้องกำหนดค่าประสิทธิภาพฟิชอร์และค่า crossing point ไม่จำเป็นต้องได้เป็นค่าจำนวนจริงในการหาปริมาณ ดังนั้นผลการวิเคราะห์ก็จะไม่ได้มาเป็นจำนวนจริง รวมทั้งการคำนวณสัดส่วนการสอบเทียบไม่จำเป็นต้องใช้เส้นค่ามาตรฐานในแต่ละการทดลอง



ข้อกำหนดเบื้องต้นพื้นฐานของความแม่นยำในการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์:

- ▶ หากใช้ค่ามาตรฐาน ประสิทธิภาพของค่ามาตรฐานและตัวอย่างจะต้องเท่ากัน
- ▶ ประสิทธิภาพฟิชอร์ของซินเป้าหมายและซินอ้างอิงจะต้องไม่เปลี่ยนไปในแต่ละตัวอย่าง
- ▶ ซินอ้างอิงจะไม่ถูกควบคุมในระบบที่อยู่ภายใต้การสืบค้น

ในทางเทคนิคค่าพหุคูณข้างต้นไม่ควรจะใช้คำนวณในส่วนถัดไป

D

คำแนะนำในการใช้การวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์

คุณสมบัติ	คำอธิบาย	ค่าที่ปรากฏ
ชื่อตัวอย่าง	ชื่อของตัวอย่างที่สนใจ หากมีขึ้นเป้าหมาย/ขึ้นอ้างอิง หลายขึ้น ชื่อตัวอย่าง จะแสดงเป็นกลุ่มที่เข้าคู่กัน	ตัวอักษร (≤ 25 ตัว) ค่าเริ่มต้น “ชื่อ ###”, เมื่อ ### คือเลขเครื่อง
ขึ้นเป้าหมาย	ชื่อของขึ้นเป้าหมาย ซึ่งแตกต่างจากชื่อตัวอย่าง เช่น “ขึ้นI” เป็นขึ้นนี้ สำหรับทุกตัวอย่าง สำหรับตัวมาตรฐาน ตัวสอบ เทียบ และโพรบสำหรับตัวอย่างชนิดลบ	ตัวอักษร (≤ 25 ตัว) ค่าเริ่มต้นเป็นว่าง
ชนิดของตัวอย่าง (จำเป็น)	ชนิดของตัวอย่าง	▶ ไม่ทราบ ▶ ตัวควบคุมชนิดบวก/ตัวสอบเทียบ ▶ ตัวควบคุมชนิดลบ ▶ ค่ามาตรฐาน
ชนิดของขึ้นเป้าหมาย (จำเป็น)	ชนิดของขึ้นเป้าหมาย	▶ เป้าหมาย ▶ อ้างอิง ▶ ไม่กำหนด ไม่กำหนด จะไม่ถูกนำมาวิเคราะห์ ในโปรแกรม



ในการทดลองที่ใช้ช่องสัญญาณต่างกัน จะต้องเช็คให้ถูกต้องว่าได้เลือกกำหนดช่องสัญญาณตรง
ข้อมูลตัวอย่างตรงกัน

การเข้าสู่อัตโนมัติ

โปรแกรม LightCycler 480® จะจัดสรรเป้าหมายและอ้างอิงตามกฎดังนี้:

ชื่อเดียวกันสำหรับขึ้น เป้าหมาย และขึ้น อ้างอิง	ชื่อขึ้นเป้าหมาย	การเข้าสู่อัตโนมัติ
- (ค่าเริ่มต้น)	- (ค่าเริ่มต้น)	ตามกฎของรูป ซึ่งทำตามแผนการปิด (เช่น แลว คอลัมน์ บล็อก)
+	+	ทำตามค่ากำหนดในการใส่ข้อมูลตัวอย่าง
+	-	ไม่มีการเข้าสู่อัตโนมัติ
-	+	ไม่มีการเข้าสู่อัตโนมัติ

4.3.4 การทำการทดลองสำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์แบบพื้นฐาน

การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์แบบพื้นฐานจะใช้หลักการ $\Delta\Delta CT$ -Method ซึ่งมีการกำหนดดังนี้

- ▶ ใช้การคำนวณ Cp แบบ Fit Points
- ▶ กำหนดค่าประสิทธิภาพไว้ก่อน (ไม่ต้องมีค่ามาตรฐาน)
- ▶ ใช้การคำนวณแบบ *In-Run*
- ▶ ทุกตัวอย่างจะเข้าสู่ตามกฎเข้าคู่ หากมีการกำหนดชื่ออื่นเป้าหมาย/ชิ้นอ้างอิงหลายชื่อ (ข้อมูลเพิ่มเติมใน *Pairing Rules for multiple target/reference genes*)
- ▶ เพิ่มเพลท (การสร้างกลุ่มย่อยตัวอย่างจะไม่ถูกนำมาวิเคราะห์)

ในการทดลองที่จะใช้คำนวณการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ด้วยขั้นพื้นฐานจะต้องมี

- ▶ ยีนเป้าหมายของตัวอย่าง
- ▶ ยีนอ้างอิงของตัวอย่าง
- ▶ ตัวสอบเทียบ (ทางเลือก)
- ▶ ตัวควบคุมชนิดลบ (ทางเลือก)

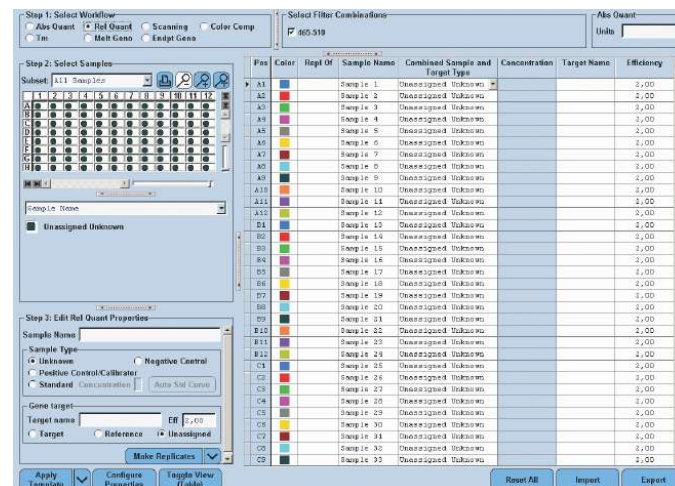
วิธีการทำการทดลองหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ด้วยขั้นพื้นฐาน:

1

ทำการทดลองเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

2

คลิกที่ *Sample Editor* ในแถบ *Module* และเลือกการทำงานเป็น *Rel Quant*



3

กำหนดคุณสมบัติตัวอย่าง

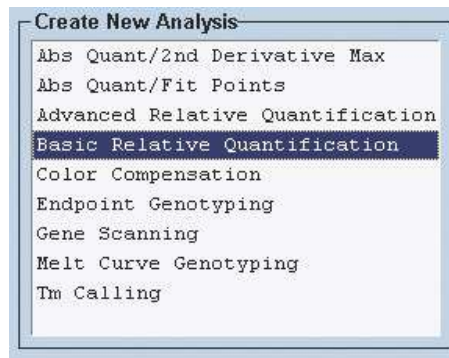
รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน *Entering Sample Information* และโปรแกรมการใช้ พารามิเตอร์ที่จะกำหนดสำหรับการคำนวณให้ดูเพิ่มเติมได้ในส่วน *Identifiers Used by Relative Quantification Analysis*

4

การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ด้วยขั้นพื้นฐานมักจะใช้การทดลองเพิ่มเพลทสำหรับการวิเคราะห์ หากมีชนิดของตัวอย่างตำแหน่งที่ไม่ได้ใช้ให้กำหนดเป็น *Unassigned*

5 คลิก Analysis ในแถบ Module

จะปรากฏหน้าต่าง Create New Analysis ให้กดเลือก Basic Relative Quantification



6 หน้าต่าง Relative Quantification analysis

จะปรากฏและทำการคำนวณอัตโนมัติ



ในการกำหนดการตั้งค่าสัญญาณรบกวนทำได้ในส่วน [Viewing the Results](#)



หากต้องการแก้ไขการตั้งค่าที่กำหนดมา

Performing an Advanced

ให้ทำการวิเคราะห์ด้วยขั้นสูง

Relative Quantification

(ดูรายละเอียดได้ที่

Experiment)

4.3.5 การทำการทดลองหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ด้วยวิธีขั้นสูง

สำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ด้วยวิธีขั้นสูง นอกจากจะได้สัดส่วนมาแล้วยังสามารถปรับปรุงการคำนวณได้ด้วยการที่มีการใช้สิ่งต่างๆ เช่น

- ▶ การหาค่า C_p ด้วยวิธี Fit Points หรือ Second Derivative Maximum
- ▶ การวิเคราะห์อ้างอิงทาง *In-Run* references หรือ *External Reference*
- ▶ กฎการเข้าสู่สำหรับหลายๆ ขึ้นเป้าหมาย/ขึ้นอ้างอิง
- ▶ การใช้ค่ามาตรฐาน
- ▶ การใช้การสร้างกลุ่มตัวอย่างย่อย



การวิเคราะห์สารพันธุกรรมลักษณะนี้ไม่เพียงแต่ใช้กับงานการแสดงผลของขึ้น ยังใช้กับการศึกษา ระดับอื่นเอ เช่น ระดับขึ้น ในกรณีนี้จะใช้ขึ้นโมเลกุลเดียวในการอ้างอิง และกำหนดให้อยู่บน โครโมโซมเดียวกันกับขึ้นเป้าหมายที่สนใจ

การทดลองการหาปริมาณเชิงสัมพันธ์แบบขั้นสูงประกอบด้วย

- ▶ ขึ้นเป้าหมายและอ้างอิงของตัวอย่าง
- ▶ ขึ้นเป้าหมายและอ้างอิงของตัวอย่างมาตรฐาน (ทางเลือก)
- ▶ ขึ้นเป้าหมายและอ้างอิงของตัวสอบเทียบ (ทางเลือก)
- ▶ ขึ้นเป้าหมายและอ้างอิงของตัวอย่างควบคุมชนิดลบ (ทางเลือก)

ค่าอ้างอิงสามารถตรวจในการทดลองที่แยกกันได้

วิธีการทำการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพันธ์:

ก่อนเริ่มการวิเคราะห์ต้องกำหนดประสิทธิภาพการทำงานของขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิง หากไม่ต้องการใช้ค่าที่เท่ากับ 2 ให้ทำตามดังนี้

- ▶ ให้หาค่ามาตรฐานเชิงสัมพันธ์ไปในการทดลองเพื่อให้ได้เส้นค่ามาตรฐาน
- ▶ นำเข้าข้อมูลค่ามาตรฐานเชิงสัมพันธ์จากภายนอก



หากใช้ค่ามาตรฐานในการทดลองเดียวกัน ค่าที่กำหนดไว้เองในข้อมูลตัวอย่างจะถูกเขียนทับ

1

ทำการทดลอง รวมค่าอ้างอิงจากภายนอกด้วยหากจำเป็น

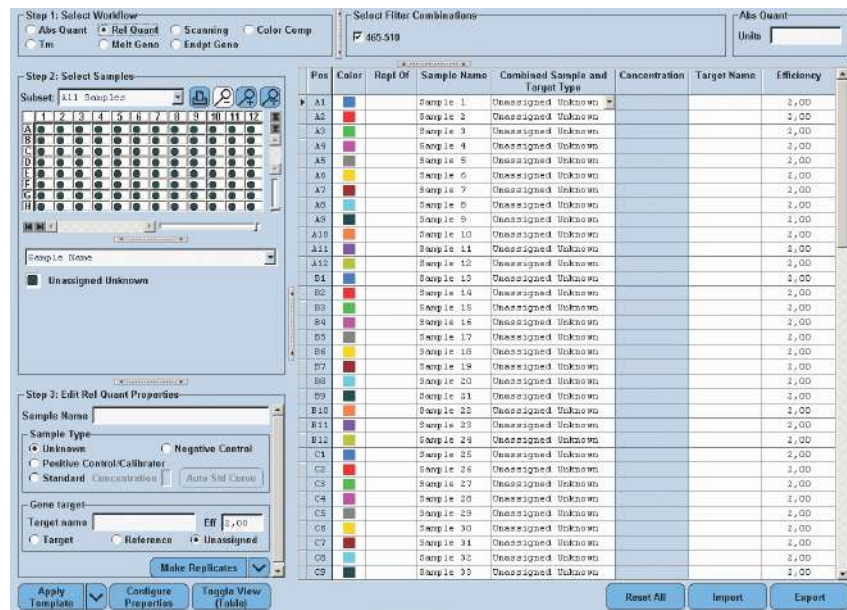
2

(ทางเลือก) กำหนดกลุ่มย่อยตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ หากไม่กำหนด โปรแกรมจะวิเคราะห์ทั้งเพลทและให้ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่ข้อมูลเป็นตัวอย่างชนิดลบ สำหรับโปรแกรม 1.5.0 การสร้างกลุ่มย่อยตัวอย่างเมื่อทำการวิเคราะห์แบบซ้ำไปซ้ำมา (แถวต่อแถว) จะช่วยให้การเข้าสู่ตัวอย่างด้วยเทคนิคขึ้นก๊วหน้ำนี้ประสบความสำเร็จ



D

3 คลิกที่ *Sample Editor* ในแถบ *Module* แล้วเลือกการทำงานเป็น *Rel Quant*



4 กำหนดคุณสมบัติของตัวอย่าง

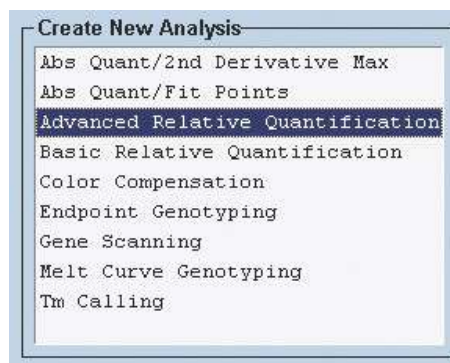
รายละเอียดแสดงใน *Entering Sample Information*

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์แบบขึ้นกึ่งน้ำหนักจะมีการกำหนดค่าดังนี้

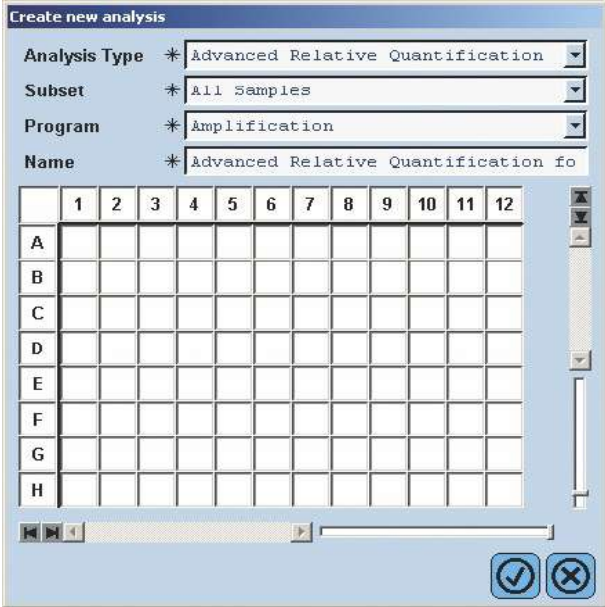
คุณสมบัติ	คำอธิบาย	ค่าที่ปรากฏ
ความเข้มข้น (ทางเลือก)	ความเข้มข้นของตัวอย่างมาตรฐาน จะมีให้ใช้ได้เฉพาะตัวมาตรฐาน	ค่าความเข้มข้น
ประสิทธิภาพ	ประสิทธิภาพฟิชอร์ของเป้าหมาย ถ้ามีค่าความเข้มข้นของอินเป้าหมายในการทดลอง โปรแกรมจะใช้ประสิทธิภาพจากการคำนวณเป็นค่าเริ่มต้น	ค่าตัวเลข: $1 < \text{ประสิทธิภาพ} < 3$ ค่าเริ่มต้นคือ 2.00

5 คลิก *Analysis* ในแถบ *Module*

หน้าต่าง *Create New Analysis* จะแสดงให้เลือก *Advanced Relative Quantification*



- 6 หน้าต่าง *Create New Analysis* จะเปิดแล้วเลือกการวิเคราะห์กลุ่มย่อยและโปรแกรมการทดลองจากรายการ (ปกติใช้ *Amplification*) หากต้องการเปลี่ยนชื่อการวิเคราะห์ให้ทำได้ (ชื่อเริ่มต้นคือ “analysis type สำหรับ subset name”) คลิกที่ 



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

▶▶▶

D

7 หน้าต่างต่อมาจะเปิดขึ้น ให้กำหนดดังนี้

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

OK Cancel

Abs Quant Type

เลือกชนิดของการวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงที่ทำในแต่ละชิ้นเป้าหมาย

Subordinate Abs Quant Analysis

แต่ละการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพันธ์จะขึ้นอยู่กับ 2 หรือมากกว่าการวิเคราะห์ดังนี้

เลือกว่าโปรแกรมทำการจำแนกชิ้นเป้าหมายที่แตกต่างกันอย่างไร:

- ▶ *Create by Target Name:* โปรแกรมจำแนกชิ้นเป้าหมายด้วยชื่อของชิ้นเป้าหมายที่ถูกใส่ไว้ในขั้นตอนที่ 4
- ▶ *Create by Filter Combination:* โปรแกรมจำแนกชิ้นเป้าหมายด้วยการใช้การจับคู่ช่องสัญญาณที่กำหนดไว้ขั้นตอนที่ 4



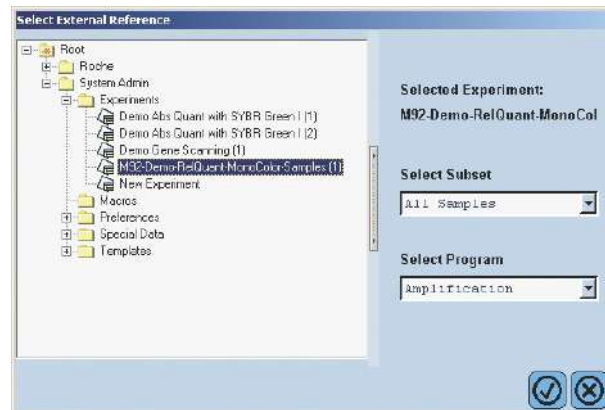
การวิเคราะห์ยีนอ้างอิง

เลือกตำแหน่งของยีนอ้างอิง:

- ▶ *Create In-Run*: ตัวอย่างอ้างอิงรวมอยู่ในการทดลอง
- ▶ *Select External*: ตัวอย่างอ้างอิงถูกเก็บไว้ในการทดลองแยกกัน



- ▶ คลิกที่ *Select reference experiment* เพื่อเลือกการทดลองจากภายนอก
- ▶ โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างด้านล่าง ให้เลือกการทดลองที่ต้องการแล้วคลิก



- ▶ ตัวอย่างอ้างอิงจากกลุ่มตัวอย่างที่เลือกจะนำเข้าสู่การทดลองปัจจุบัน ข้อมูลหลังการนำเข้าไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ หากมีการเปลี่ยนแปลง โปรแกรมจะไม่สามารถมองเห็นได้ จำเป็นต้องสร้างการวิเคราะห์ใหม่เพื่อนำเข้าข้อมูลที่เปลี่ยนแปลงนั้น

กฎการเข้าคู่ของยีนเป้าหมาย/ยีนอ้างอิง หลายตัวอย่าง

เลือกผลที่สร้างการจับคู่แบบอัตโนมัติของ ยีนเป้าหมาย/ยีนอ้างอิง

เช่น ยีนเป้าหมาย: T1, T2; ยีนอ้างอิง: R1, R2

- ▶ *One to One*:
หนึ่งยีนเป้าหมายต่อหนึ่งยีนอ้างอิงตาม ตาราง การ ปิ เป ด
เช่น T1|R1, T2|R2
- ▶ *All to All*:
แต่ละยีนเป้าหมายจับคู่กับแต่ละยีนอ้างอิง
เช่น T1|R1, T1|R2, T2|R1, T2|R2
- ▶ *All to Mean*:
จับคู่แต่ละยีนเป้าหมายต่อยีนอ้างอิงทั้งหมด ค่าเฉลี่ยของผลการคำนวณสัดส่วนดังนี้
เช่น $T1/R(all) = (T1/R1 \times T1/R2)^{1/2}$ and $T2/R(all) = (T2/R1 \times T2/R2)^{1/2}$
- ▶ *Mean to All*:
จับคู่ทุกยีนเป้าหมายกับแต่ละยีนอ้างอิง ค่าเฉลี่ยของผลการคำนวณสัดส่วนดังนี้
เช่น $T(all)/R1 = (T1/R1 \times T2/R1)^{1/2}$ and $T(all)/R2 = (T1/R2 \times T2/R2)^{1/2}$

รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน *Pairing Samples and Creating Result Sets*



D

คำเริ่มต้นของการตั้งค่าเส้นมาตรฐาน

ทางเลือกนี้ไม่เกี่ยวข้องหากมีการใช้ค่ามาตรฐานภายในสำหรับทุกอินเป้าหมาย

หากไม่มีตัวมาตรฐานภายในสำหรับอินเป้าหมายให้ทำการเลือกดังนี้

- ▶ *Always use Efficiency*: ค่าประสิทธิภาพพีซีอาร์ที่กำหนดไว้ในการใส่ข้อมูลตัวอย่างจะถูกนำมาใช้
- ▶ *Allow External Standards with Matching Target Name*: โปรแกรมจะค้นหาจากฐานข้อมูลสำหรับค่าเส้นมาตรฐานที่สร้างจากชื่ออินเป้าหมายเดียวกันและคำนวณประสิทธิภาพพีซีอาร์ที่แน่นอน



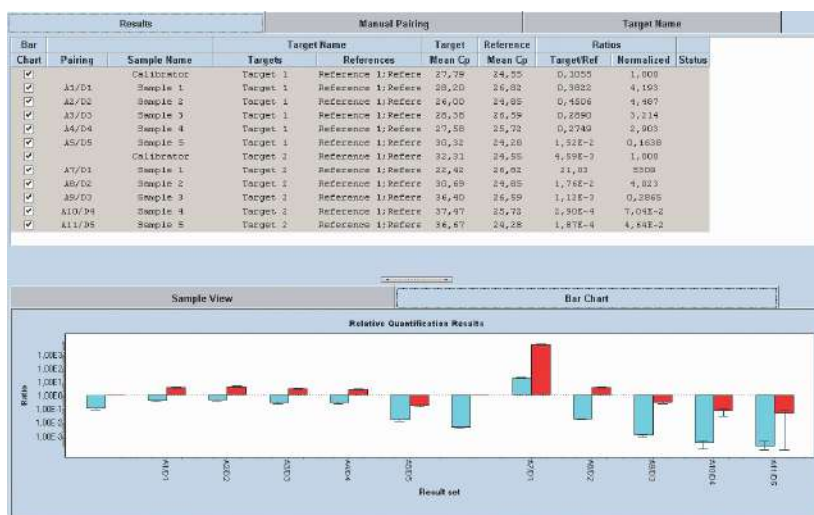
การตั้งค่าที่ทำในหน้าต่าง *Create new analysis* ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้หลังจากการวิเคราะห์ถูกสร้างขึ้น หากต้องการแก้ไขการตั้งค่าใหม่จำเป็นต้องสร้างการวิเคราะห์ขึ้นมาใหม่

8

คลิก

9

หน้าต่าง *Relative Quantification Analysis* จะเปิดขึ้นดังภาพ



4.3.6 การทำการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์

ทุกทางเลือกนั้น โปรแกรมจะกำหนดมาให้อยู่แล้วอัตโนมัติ หากไม่ต้องการเปลี่ยนแปลงการตั้งค่าใด ให้คลิกที่ปุ่ม *Calculate* แล้วดูในส่วนผล

วิธีการแสดงและแก้ไขการวิเคราะห์:

1 แถบ *Results* จะแสดงเป็นค่าเริ่มต้น



โดยเริ่มต้น การจับคู่แบบ *Manual Pairing* จะมีให้เลือกใช้ในการวิเคราะห์ขั้นก้าวหน้าแต่จะไม่มีในขั้นพื้นฐาน ในการวิเคราะห์ทั้งสองรูปแบบ สามารถกำหนดการเลือกหรือยกเลิกการเลือกการจับคู่แบบ *Manual Pairing* ได้

หากการทดลองแบบหลายสีจำเป็นต้องมีการใช้การชดเชยสัญญาณสี ก็สามารถใช้การชดเชยสัญญาณสีได้

คลิกที่แถบ *Target Name* tab เพื่อจะดูการตั้งค่าที่สัมพันธ์กันกับสีเป้าหมาย

Results		Manual Pairing		Target Name
Target Name	Filter Combination	Standard/Efficiency	E Efficiency Value	
Target 1	485-S10	Efficiency	2.00	
Target 2	485-S10	Efficiency	2.00	
Reference 1	485-S10	Efficiency	2.00	
Reference 2	485-S10	Efficiency	2.00	



D



หากต้องการเปลี่ยนการตั้งค่าทั่วไปให้คลิกที่ปุ่ม *Settings*

หน้าต่าง *Rel Quant Settings* จะเปิดขึ้นดังนี้

Ratios

เป็นการเลือกให้แสดงผลข้อมูลสัดส่วนในตาราง *Results* และกราฟแท่ง ข้อผิดพลาดจากสัดส่วนจะแสดงในรูปแบบของกราฟแท่งเสมอ

Results Table

เป็นการเลือกแสดงชนิดของผลข้อมูลในตารางแสดงผล

Manual Pair Editing

เลือกสำหรับการจับคู่ด้วย วิธี *Manual Pairing*

Median/Mean Setting

เลือกกำหนดค่าเฉลี่ยในรูปแบบที่ต้องการ:

- ▶ ค่าเฉลี่ย: คำนวณทางคณิตศาสตร์ให้ได้ค่าเฉลี่ยที่แน่นอน
- ▶ ค่ากลาง: ใช้ค่ากลางของชุดข้อมูล วิธีนี้จะชดเชยเป็นค่ากลางทางสถิติ (มีค่าที่สูงมากหรือต่ำมาก)

Logarithmic/Linear Bar Chart

เลือกวิธีที่จะกำหนดหน่วยวัดของกราฟแท่ง:

- ▶ Linear: เลือกกรณีที่ผลการทดลองครอบคลุม 1-2 ลำดับความสำคัญข้อมูล หรือแสดงข้อมูลเป็นลักษณะแปรผันตรง
- ▶ Logarithmic: เลือกกรณีที่ผลการทดลองครอบคลุมลำดับความสำคัญข้อมูลหลายลำดับ

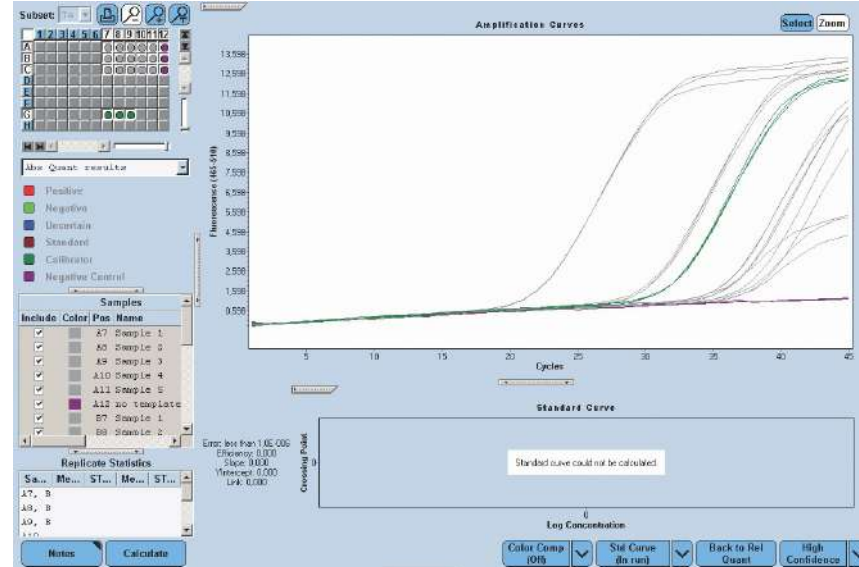




หากต้องการเปลี่ยนแปลงทางเลือกที่เกี่ยวกับขึ้นเป้าหมาย

- ▶ สามารถเลือกตัวอย่างนั้นจากตารางตัวอย่างในแถบ *Sample View* (หลังจากเสร็จสิ้นการวิเคราะห์)
- ▶ หรือเลือกแถบ *Target Name* แล้วเลือกการวิเคราะห์ย่อยลงมา

ซึ่งจะมีปุ่ม *Show Abs Quant* ให้เลือกใช้



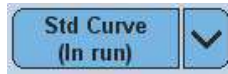
โปรแกรมจะแสดงการวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงของขึ้นเป้าหมายเป็นรายการย่อยลงมา หากต้องการดูผลการวิเคราะห์ให้คลิกที่ปุ่ม *Calculate*



แหล่งข้อมูลของค่ามาตรฐานเป็นเป้าหมาย

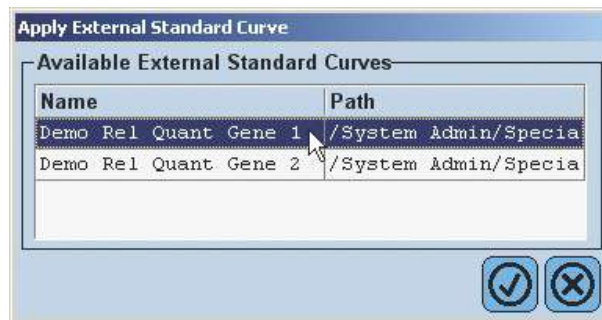
ในการตั้งค่าเส้นมาตรฐานของการวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริงข้อสังเกตและนำมาใช้ในการหาประสิทธิภาพที่เชื่อถือได้ให้ใช้ปุ่ม

Standard Curve multi-select



เลือกกำหนดทางเลือกได้ดังนี้:

- ▶ *Save as External*: บันทึกข้อมูลเส้นค่ามาตรฐานไว้สำหรับการทดลองอื่น
- ▶ *Std Curve (In Run)*: เส้นค่ามาตรฐานถูกคำนวณจากลำดับการเจือจางในการทดลองปัจจุบัน
- ▶ *Std Curve (External)*: เส้นค่ามาตรฐานถูกนำเข้าจากฐานข้อมูล โดยมีหน้าต่างให้เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการดังภาพ



การทดลองจะต้องมีค่ามาตรฐานของยีนเป้าหมายอย่างน้อย 1 ค่า เพื่อบอกความเข้มข้น และผู้ใช้งานต้องมีสิทธิ์การเข้าถึงเส้นค่ามาตรฐานได้



- ▶ *Set Efficiency*: เส้นค่ามาตรฐานถูกคำนวณจากการใช้ค่าประสิทธิภาพที่กำหนดไว้ในข้อมูลตัวอย่าง



ค่าประสิทธิภาพจะถูกกำหนดได้ทั้งในกรณีไม่มีค่ามาตรฐานยีนเป้าหมายในการทดลอง หรือมี 1 ค่าก็ได้ ความเข้มข้นของยีนเป้าหมายจะคำนวณเมื่อมีค่ามาตรฐานของยีนเป้าหมายอย่างน้อย 1 ค่าในการทดลอง เพื่อบอกค่าความเข้มข้น

การยกเลิกการเลือกตัวอย่าง

เพื่อที่จะยกเลิกการเลือกตัวอย่าง ให้ดับเบิลคลิกที่ช่องหน้าตัวอย่างในตาราง *Results*

Samples				Results		
Include	Color	Pos	Name	Cp	Concentration	Standard Status
☒			G4 Standard		1,00E2	
☐			H2 S1			
☐			H3 S1			
☒			H4 S1			
☒			J2 S2			
☒			J3 S2			

ทางเลือกวิธี Fit Point

การตั้งค่านี้จะทำได้กับการวิเคราะห์ที่ใช้วิธี *Fit Points* ในการทำงานแบบ *Abs Quant Type*

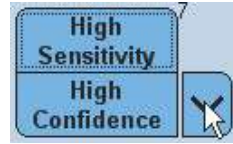
วิธีเปลี่ยนการตั้งค่าการตรวจหาค่า Cp

- ▶ แถบ *Cycle Range*
- ▶ แถบ *Noise Band*
- ▶ แถบ *Analysis*



ทางเลือกวิธี Second Derivative

การตั้งค่านี้จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่ใช้ *2nd Derivative Max* ในการวิเคราะห์ *Abs Quant Type* ในการเปลี่ยนการตั้งค่าการตรวจวัดค่า *Cp* ให้ใช้ปุ่ม multi-select



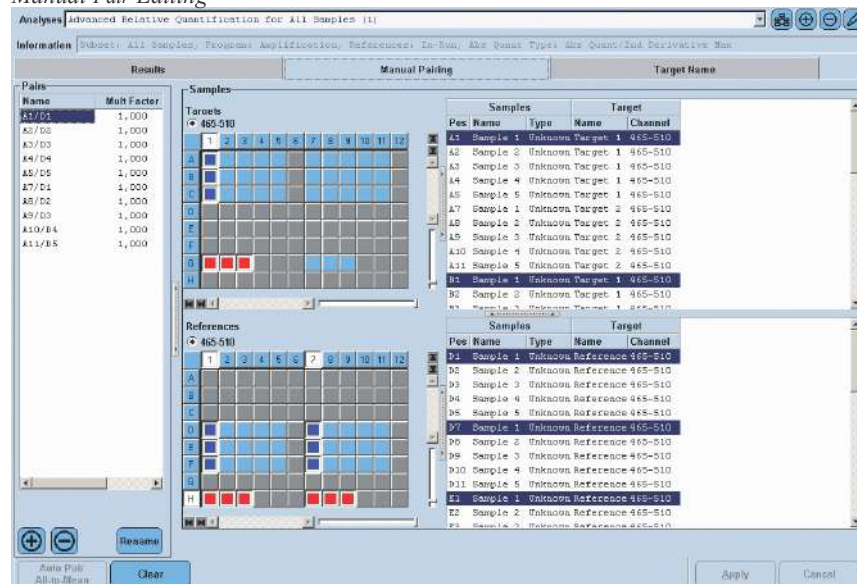
4

เลือกย้อนกลับไปหน้า *RelQuant* เพื่อที่จะไปยังหน้าจอ *Relative Quantification Analysis*

5

หากต้องการเปลี่ยนแปลงการตั้งค่าที่เกี่ยวกับการจับ ขึ้นเป้าหมาย/ขึ้นอ้างอิง *target|reference* ให้เลือกแถบ *Manual Pairing*

หากแถบ *Manual Pairing* ไม่สามารถกดได้ ให้คลิกปุ่ม *Settings* แล้วเลือกทางเลือก *Enable Manual Pair Editing*



โปรแกรมจะแสดงการจับคู่อัตโนมัติ ซึ่งสามารถ

- ▶ แก้ไขการจับคู่
(หากต้องการเปลี่ยนชื่อการจับคู่ให้คลิกที่รายการคู่แล้วพิมพ์ชื่อใหม่)
- ▶ ระบุการปัจจัยการแก้ไขและปัจจัยการคูณ

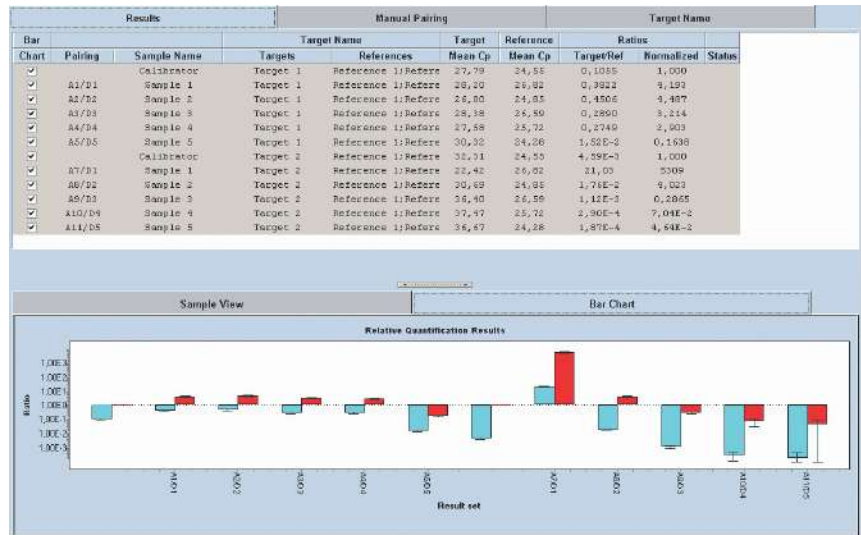
6

คลิก *Calculate*

4.3.7 การดูผลการทดลอง

วิธีดูผลการทดลองในแถบแสดงผล:

- 1 เลือกแถบ *Results* เพื่อดูรายละเอียดของผลการทดลองสำหรับแต่ละชุดข้อมูล



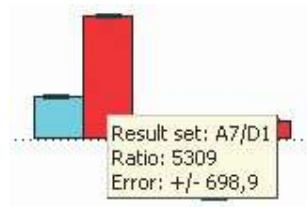
- 2 ตารางแสดงผลจะแสดงหนึ่งแถวของข้อมูลต่อไปนี้สำหรับแต่ละชุดข้อมูลที่จับคู่กัน และแต่ละชุดของตัวเปรียบเทียบ

- ▶ Bar chart: ชุดผลการทดลองแสดงในรูปแบบกราฟแท่ง หากต้องการลบชุดข้อมูลผลจากกราฟแท่ง ให้คลิกเลือกการเลือกชุดข้อมูลด้วยการดับเบิลคลิก
- ▶ Pairing: ชื่อของชุดผลข้อมูล (เว้นว่างสำหรับตัวสอบเทียบ) ใช้แถบ *Manual Pairing* ในการแก้ไขชื่อการจับคู่
- ▶ Sample Name: ชื่อตัวอย่างในชุดข้อมูลที่กำหนดจากการใส่ข้อมูลตัวอย่าง (ปกติจะเป็นเพียงหนึ่งตัวอย่าง แต่ manual pairing สามารถกำหนดมากกว่าหลายตัวอย่างได้)
- ▶ Target Name: ชื่อของอินเป้าหมายในชุดข้อมูลผลการทดลอง
- ▶ Target Mean/Median Cp: crossing point ของอินเป้าหมาย
- ▶ Reference Mean/Median Cp: crossing point ของอินอ้างอิง
- ▶ Error of the Cp (ไม่แสดงค่าเริ่มต้น): ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำ
- ▶ Ratio Target/Ref: สัดส่วนความเข้มข้นของอินเป้าหมายต่ออินอ้างอิงในชุดข้อมูล
- ▶ Target/Ref Ratio Error (ไม่แสดงค่าเริ่มต้น): ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการจับคู่อินเป้าหมาย/อินอ้างอิงของตัวอย่างที่ทำซ้ำ
- ▶ Ratio Normalized: สัดส่วนความเข้มข้นของอินเป้าหมายต่ออินอ้างอิงในชุดข้อมูลผลซึ่งเทียบกับตัวสอบเทียบ
- ▶ Normalized Ratio Error (ไม่แสดงค่าเริ่มต้น): ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอินเป้าหมาย/อินอ้างอิง/ตัวสอบเทียบ ในตัวอย่างซ้ำ
- ▶ Status: ข้อความพิเศษที่เกี่ยวข้องกับชุดผลข้อมูล



3 กราฟแท่งแสดงแต่ละชุดข้อมูลของการจับคู่และแต่ละตัวสอบเทียบในตารางข้อมูลผลการทดลอง

- ▶ ความสูงของกราฟแท่งซ้ายจะแสดงสัดส่วนของยีนเป้าหมาย/ยีนอ้างอิง ด้านขวาแสดงกราฟของการปรับเทียบ
- ▶ แต่ละแท่งจะแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานทางสถิติซึ่งเป็นช่วงที่มีค่าผิดพลาดเป็นเส้นปิดบนกราฟ หากนำเมาส์ไปชี้ที่แท่งกราฟจะแสดงข้อมูลรายละเอียด:



4.3.8 การจับคู่ตัวอย่างและการสร้างชุดผลข้อมูล

การจับคู่อัตโนมัติ

โปรแกรมจะสร้างผลของชุดข้อมูลอัตโนมัติซึ่งประกอบด้วย

- ▶ เป้าหมาย
- ▶ อ้างอิง
- ▶ ตัวปรับเทียบ (ทางเลือก)

ชุดผลข้อมูลจะแสดงที่แถบ *Manual Pairing* การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์จะจับคู่อัตโนมัติระหว่างยีนเป้าหมายกับยีนอ้างอิง

- ▶ ยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิงที่มีชื่อตัวอย่างเดียวกันจะถูกจับคู่กัน
- ▶ ยีนเป้าหมายและตัวปรับเทียบที่มีชื่อเป้าหมายเดียวกันจะถูกจับคู่กัน ตัวปรับเทียบจะถูกใช้หากทุกยีนเป้าหมายสามารถจับคู่กับตัวปรับเทียบได้
- ▶ หากไม่มีชื่อเป้าหมายและชื่อตัวอย่างไม่ตรงกัน โปรแกรมจะพยายามสร้างชุดข้อมูลผลตามแบบแผนที่จดจำได้ ถ้าตำแหน่งของตัวอย่างของเป้าหมายตรงกันกับตำแหน่งของตัวอย่างอ้างอิง การจับคู่เป้าหมายกับอ้างอิงจะเกิดขึ้น

หลังจากบ่งชี้เป้าหมายและอ้างอิงได้แล้ว โปรแกรมจะใช้กฎการจับคู่ตามด้านล่าง ตัวอย่างจะแสดงเป็นเป้าหมาย: T1, T2 และอ้างอิง: R1, R2

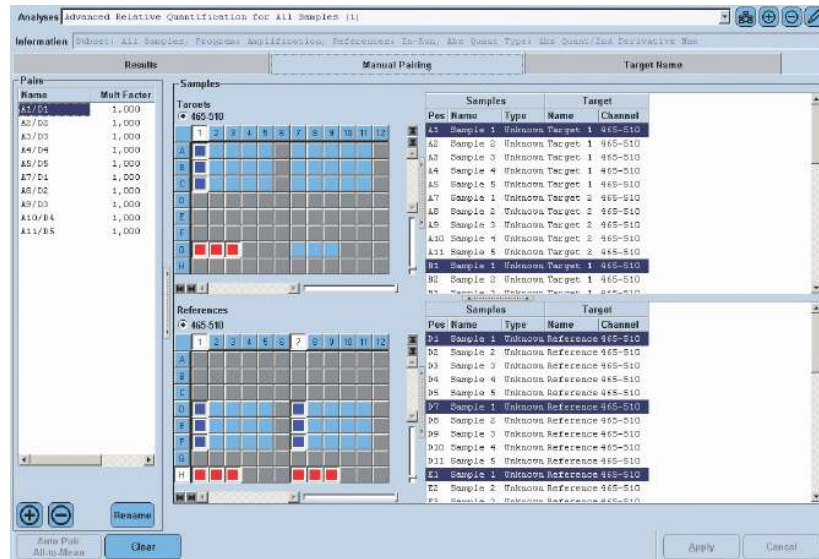
- ▶ *One to One*: หนึ่งเป้าหมายถูกจับคู่กับหนึ่งอ้างอิงตามรูปแบบการเปิด เช่น T1|R1, T2|R2
- ▶ *All to All*: แต่ละเป้าหมายจับคู่กับแต่ละอ้างอิง เช่น T1|R1, T1|R2, T2|R1, T2|R2
- ▶ *All to Mean*: จับคู่แต่ละเป้าหมายกับทุกอ้างอิง ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของสัดส่วนผลถูกคำนวณดังนี้ เช่น $T1/R(all) = (T1/R1 \times T1/R2)^{1/2}$ และ $T2/R(all) = (T2/R1 \times T2/R2)^{1/2}$
- ▶ *Mean to All*: จับคู่ทุกเป้าหมายกับแต่ละอ้างอิง ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของสัดส่วนผลถูกคำนวณดังนี้ เช่น $T(all)/R1 = (T1/R1 \times T2/R1)^{1/2}$ และ $T(all)/R2 = (T1/R2 \times T2/R2)^{1/2}$

การจับคู่แบบกำหนดเอง

ใช้แถบ *Manual Pairing* เพื่อกำหนดชุดข้อมูลผลการทดลอง ซึ่งสามารถระบุการแก้ไขการคูณปัจจัยต่างๆ

การจับคู่ตัวอย่างและสร้างชุดข้อมูลผลการทดลอง:

- 1 ในแถบ *Manual Pairing* จะแสดงตัวอย่างเป็น 2 ส่วน: ส่วนบนเป็นตัวอย่างเป้าหมาย ส่วนล่างเป็นตัวอย่างอ้างอิง เฉพาะตัวอย่างที่ไม่ทราบและตัวเปรียบเทียบที่อยู่ในกลุ่มย่อยที่มีให้ใช้งาน จะสามารถเลือกใช้ได้ ตัวอย่างอื่นจะเลือกไม่ได้



ปุ่ม *Auto Pair* จะคลิกได้หากยังไม่ได้มีชุดข้อมูลผลการทดลองกำหนดไว้

2

วิธีสร้างชุดข้อมูลผลการทดลองให้ทำดังนี้:

- ▶ คลิกปุ่ม **+** ในรายการ *Pairs* เพื่อเพิ่มในชุดข้อมูล *Result*
 - ▶ เลือกเป้าหมายตัวอย่างที่ไม่ทราบ (ในกลุ่มตัวอย่างส่วนบน) และอ้างอิงตัวอย่างที่ไม่ทราบ (ในกลุ่มตัวอย่างส่วนล่าง) เพื่อทำการจับคู่
 - ▶ หากต้องการเพิ่มตัวเปรียบเทียบ กดค้างที่ปุ่ม **<Ctrl>** และเลือกตัวเปรียบเทียบเป้าหมาย (ในกลุ่มตัวอย่างส่วนบน) และตัวเปรียบเทียบอ้างอิง (ในกลุ่มตัวอย่างส่วนล่าง)
 - ▶ คลิก *Apply*
- ชุดข้อมูลผลการทดลองจะปรากฏในรายการ *Pairs* ซึ่งจะแสดงชื่อผลการทดลองอัตโนมัติ โดยคำเริ่มต้นเป็น "Pairing ###", เมื่อ ### หมายถึงตัวเลข ตำแหน่งการจับคู่ที่แสดงไว้
- ▶ หากต้องการแก้ไขชื่อผลการทดลอง ให้คลิกที่ชื่อในรายการ *Pairs* แล้วพิมพ์ชื่อใหม่

3

หากต้องการใช้ค่าแก้ไขกับชุดข้อมูลผลการทดลอง ให้ทำดังนี้

- ▶ หากมีตัวเปรียบเทียบมากกว่า 1 (เป้าหมายและอ้างอิง) ให้แก้ไขค่า *Correction Factor* ในรายการ *Pairs* ค่าแก้ไขจะใช้ในการปรับเทียบผลเพื่อดู สอดคล้องที่สุด ของการไม่คงที่ของตัวเปรียบเทียบ สัดส่วนของการปรับเทียบจะหารด้วยค่าปัจจัยแก้ไข



ชุดการปรับเทียบใหม่ทุกชุดควรมีการสอบเทียบกับชุดปรับเทียบแม่แบบ



4 หากต้องการใช้ปัจจัยตัวคูณ กับชุดข้อมูลผลการทดลอง ให้ทำดังนี้

- ▶ แก้ไขปัจจัยตัวคูณในรายการ *Pairs*

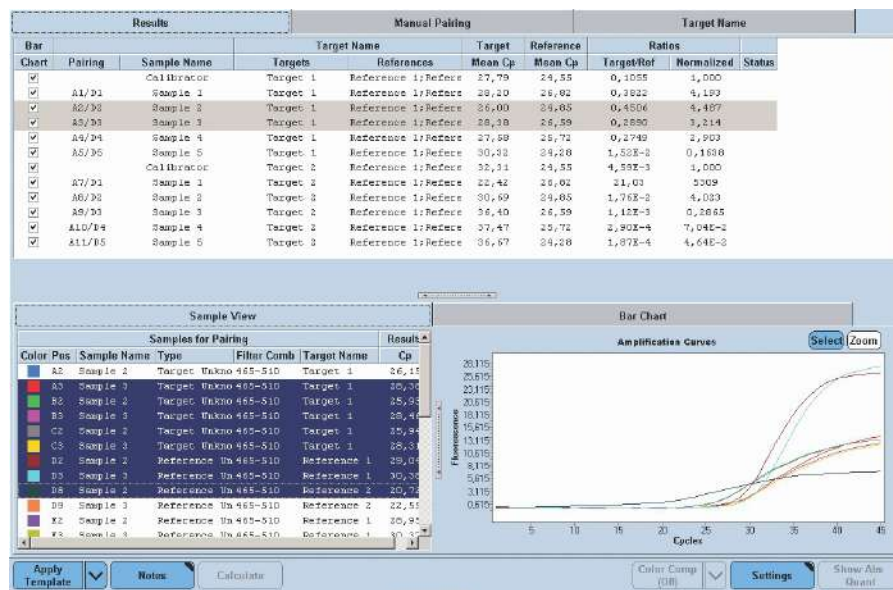
ปัจจัยตัวคูณใช้ปรับค่าสัดส่วนสัมพันธการปรับเทียบของตัวปรับเทียบสุดท้ายให้เหมาะสม สัดส่วนการปรับเทียบจะคูณด้วยปัจจัยตัวคูณ ดังนั้นปัจจัยตัวคูณเป็นเพียงตัวคูณเพื่อให้ผลการทดลองอ่านง่ายและแปลผลได้ง่ายขึ้น

5 สร้างชุดข้อมูลผลตามต้องการ โดยคลิกที่ *Calculate*

วิธีแสดงผลกราฟการเพิ่มจำนวนของตัวอย่างในชุดข้อมูล:

- ▶ เลือกแถบ *Results* ชุดผลข้อมูลจะแสดงให้เห็นในคอลัมน์ *Pairing*
- ▶ เลือกแถบ *Sample View*
- ▶ ในตารางแสดงผลให้เลือกคู่ที่จะดูผลใน *Sample View*
- ▶ ใน *Sample View* เลือกตำแหน่งที่ต้องการแสดงในกราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ถ้ามีเพียงชื่อเป้าหมาย 1 ชื่อถูกเลือกในรายการ *Sample View* ปุ่ม *Show Abs Quant* จะมีให้กดเลือกได้



4.3.9 เส้นมาตรฐานจากภายนอก

ในการสร้างเส้นมาตรฐานให้พิจารณาช่วงความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

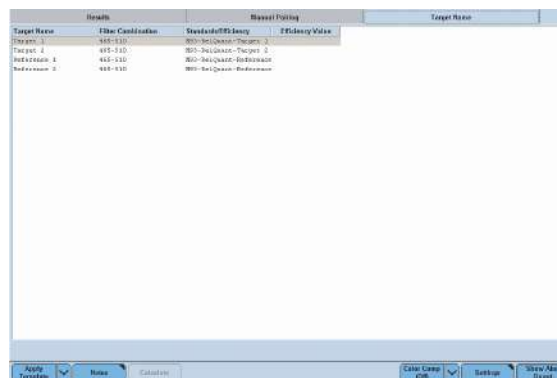
- ▶ สร้างค่าความเข้มข้นค่ามาตรฐานให้ครอบคลุมอย่างน้อย 3-5 ลำดับในช่วงความเข้มข้นที่ตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์
- ▶ สำหรับการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ ไม่จำเป็นต้องได้ค่าความเข้มข้นหรือค่าจำนวนโมเลกุลเป็นจำนวนจริง เลือกตัวรับเทียบที่สัมพันธ์กับค่ามาตรฐาน เช่น การเจือจางเป็นลำดับ mRNA หรือ cRNA
- ▶ ใช้การเจือจางขั้นต่ำ 4-5 ลำดับ (เช่น 1:10 dilutions)
- ▶ ใช้จำนวนซ้ำอย่างน้อย 3-6 ซ้ำของแต่ละค่ามาตรฐานเพื่อให้ได้ค่าทางสถิติที่ดี

หากมีการใช้เส้นค่ามาตรฐานจากภายนอกกับการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์กับกลุ่มย่อย ชื่อเป้าหมายจะต้องถูกกำหนดสำหรับค่ามาตรฐานและการวิเคราะห์จะต้องตรงกัน

วิธีสร้างเส้นค่ามาตรฐาน:

- 1 ทำการทดลองเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีการใช้ค่ามาตรฐานสัมพันธ์สำหรับทั้งขึ้นเป้าหมายและขึ้นอ้างอิง ใช้วิธีการทดลองเดียวกันสร้างการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์
- 2 ใส่ความเข้มข้นสำหรับการเจือจางค่ามาตรฐานของขึ้นเป้าหมาย (T) และขึ้นอ้างอิง (R)
- 3 สร้างการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ขึ้นก้าวหน้า
หน้าต่างการวิเคราะห์จะแสดงให้เห็นในแถบ *Results*
- 4 คลิกปุ่ม *Calculate* เพื่อคำนวณค่ามาตรฐาน

คลิกที่แถบ *Target Name* และเลือกขึ้นเป้าหมาย

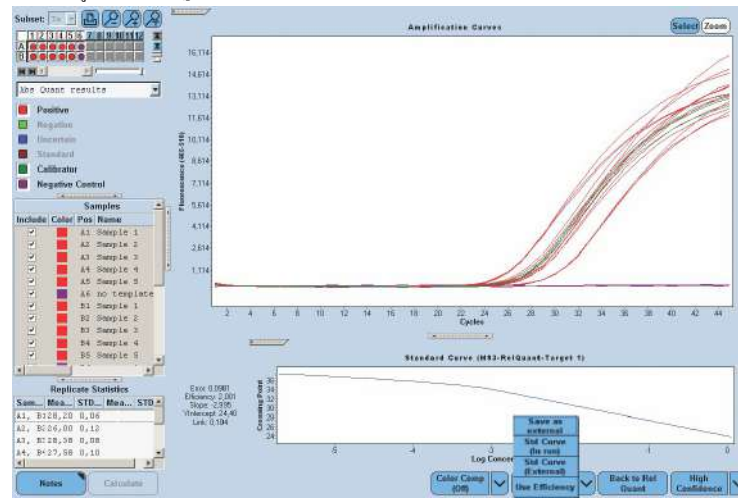


คลิกปุ่ม *Show Abs Quant*



5 หน้าต่างการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นจำนวนจริงจะแสดง

สามารถดูเส้นค่ามาตรฐานได้



คลิกบันทึกเส้นค่ามาตรฐาน แบบ *Save as external*

6 ขณะนี้จะได้เส้นค่ามาตรฐานบันทึกเรียบร้อยแล้ว

กำหนดชื่อของเส้นค่ามาตรฐาน คลิก *OK* เพื่อบันทึกในไดเรกทอรี *StdCurve*

4.3.10 ข้อมูลเพิ่มเติม

การวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้อง

ด้านล่างเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ถูกต้องและต้องทำการแก้ไขจำนวนใหม่อีกครั้ง

- ▶ การเปลี่ยนเส้นค่ามาตรฐานของยีนเป้าหมายหรือยีนอ้างอิง หรือประสิทธิภาพ
- ▶ การเลือก/การยกเลิกการเลือกตัวอย่างที่จะรวมในการคำนวณ
- ▶ การเปลี่ยนชนิดของตัวอย่าง (สร้างค่ามาตรฐานใหม่ หรือ ลบออก)
- ▶ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของค่ามาตรฐาน
- ▶ การเปลี่ยนแหล่งข้อมูลของค่าประสิทธิภาพ (เส้นค่ามาตรฐานภายนอก, เส้นค่ามาตรฐานภายใน, หรือ ประสิทธิภาพ = 2)
- ▶ การเพิ่มหรือการลบการจับคู่
- ▶ การเปลี่ยนปัจจัยการแก้ไขหรือปัจจัยการคูณ
- ▶ การเปลี่ยนสถานการณ์ชดเชยสัญญาณสี (เปิด/ปิด/ไฟล์ที่เลือกใช้)
- ▶ การใช้แม่แบบ
- ▶ การเปลี่ยนช่องสัญญาณสีของยีนเป้าหมายหรือยีนอ้างอิง

การปรับปรุงการทดลองภายนอกหลังจากนำข้อมูลไม่กระทบกับการทำให้การวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง

แม่แบบการวิเคราะห์หาปริมาณเชิงสัมพัทธ์

แม่แบบการวิเคราะห์จะดังต่อไปนี้:

▶ ช่องสัญญาณของยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง



หากมีการใช้แม่แบบการวิเคราะห์กับยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง โดยที่ไม่กำหนดช่องสัญญาณในแม่แบบ จะมีข้อความขึ้นเตือนและไม่สามารถใช้แม่แบบการวิเคราะห์นั้นได้

▶ ข้อมูลจับคู่ยีนเป้าหมายยีนอ้างอิงตัวรับเทียบ (โดยตำแหน่ง)



หากข้อมูลคุณสมบัติตัวอย่างของการจับคู่ในแม่แบบไม่เหมือนกับการทดลองปัจจุบัน แม่แบบจะไม่สามารถใช้ได้

▶ ตัวอย่างเป้าหมายและอ้างอิงสำหรับกลุ่มย่อย



เมื่อใช้แม่แบบการวิเคราะห์ โปรแกรมจะตรวจสอบว่าในการทดลองปัจจุบันมีกลุ่มย่อยตัวอย่างด้วยชื่อเดียวกัน ตำแหน่งเดียวกันกับกลุ่มย่อยในแม่แบบหรือไม่

▶ หากการทดลองปัจจุบันไม่มีกลุ่มย่อยด้วยชื่อเดียวกัน โปรแกรมจะสร้างกลุ่มย่อยให้

▶ หากการทดลองปัจจุบันมีกลุ่มย่อยที่มีชื่อตัวอย่างเดียวกัน แต่ผู้กั้นคนละตำแหน่งกับในกลุ่มย่อยของแม่แบบ แม่แบบการวิเคราะห์จะไม่สามารถใช้ได้

▶ รายการการวิเคราะห์ย่อยสำหรับแต่ละชื่อเป้าหมาย หรือ ช่องสัญญาณ

▶ ชนิดของเป้าหมาย



หากมีการใช้แม่แบบ โปรแกรมจะทำการเปรียบเทียบชื่อเป้าหมายที่กำหนดในการทดลองปัจจุบันกับชื่อเป้าหมายในแม่แบบ

▶ หากชื่อเป้าหมายในการทดลองปัจจุบันเป็นชนิดที่แตกต่างกับในแม่แบบ จะไม่สามารถใช้แม่แบบได้ และจะแสดงข้อความข้อผิดพลาด

▶ หากชื่อเป้าหมายในการทดลองปัจจุบันไม่พบในแม่แบบ จะไม่สามารถใช้แม่แบบได้ และจะแสดงข้อความข้อผิดพลาด

▶ ชนิดของตัวอย่างสำหรับการจับคู่



เมื่อมีการใช้แม่แบบ โปรแกรมจะเช็คว่ามีตำแหน่งใดที่มีชนิดตัวอย่างไม่ตรงกันกับที่กำหนดในการทดลองปัจจุบัน สำหรับการจับคู่ในแม่แบบ หากพบว่ามี จะไม่สามารถใช้แม่แบบได้ และแสดงข้อความข้อผิดพลาด

▶ ข้อมูลเส้นมาตรฐานของยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง เส้นค่ามาตรฐานภายนอกจะถูกลบทิ้งไว้ในแม่แบบ

▶ การชดเชยสัญญาณสี ไฟล์จะถูกลบทิ้งไว้ในแม่แบบ

▶ แสดงการตั้งค่าทั้งหมด

▶ บังคับแก้ไขและบังคับคูณ

▶ การรวม/การยกเลิกการรวมการตั้งค่าสำหรับการจับคู่ในกราฟแท่ง

▶ กฎการจับคู่อัตโนมัติ

▶ การจับคู่ Manual



หากแม่แบบไม่มีการเลือกใช้การจับคู่ *manual* จะไม่มีคู่จากแม่แบบแสดงเมื่อใช้แม่แบบ การจับคู่อัตโนมัติจะทำการจับคู่จากแม่แบบถูกใช้ แต่หากแม่แบบมีการจับคู่ *manual* ให้เลือกใช้ การจับคู่จะถูกเก็บไว้ในแม่แบบและสามารถเพิ่มการจับคู่ได้ในแม่แบบเมื่อใช้แม่แบบนั้น

- ▶ ชนิดการวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริง (Fit Points หรือ Second Derivative Maximum method)
- ▶ การทดลองอ้างอิงจากภายนอก
- 🔍 หากแม่แบบใช้การทดลองอ้างอิงจากภายนอกโปรแกรมจะมีหน้าต่างให้เลือกการทดลอง โปรแกรมการทำงาน กลุ่มตัวอย่างย่อย หากไม่ทำการเลือก แม่แบบนั้นจะไม่ถูกนำไปใช้

หลักการผลของการทดลอง

โปรแกรมการวิเคราะห์ของ LightCycler480 มีการควบคุมระบบของการวิเคราะห์ โดยใช้หลัก Control concept ในการจะบอกว่าตัวอย่างที่ได้นั้นเป็น valid, invalid หรือ uncertain ก็ตาม ซึ่งทั้งหมดจะแสดงในตารางดังนี้

Targets/References	Calibrators	Concentration Ratio	Normalized Ratio
Positive/Positive	Positive	Ratio	Ratio
	Negative or Uncertain	Ratio	Invalid
Positive/Uncertain, Uncertain/Positive, Uncertain/Uncertain	Positive	Ratio	Ratio
	Negative or Uncertain	Ratio	Invalid
Negative/Positive	Positive	Zero	Zero
	Negative or Uncertain	Zero	Invalid
Negative/Uncertain	Positive	Zero	Zero
	Negative or Uncertain	Zero	Invalid
Positive/Negative, Uncertain/Negative, Negative/Negative	All	Invalid	Invalid
Any Invalid (unknown, reference or calibrator)	-	Invalid	Invalid
Failed standard curve	-	Invalid	Invalid

- 🔍 จากตาราง หากตัว Calibrator ที่ทำซ้ำ นั้นมีผลเป็นบวกทั้งหมด โปรแกรมจะมีการคำนวณค่า Normalize ratio ของความเข้มข้นให้ทั้งหมด
- และหากมีตัว Calibrator ที่ทำซ้ำกันนั้น มีเพียง 1 ค่าที่ไม่ให้ผลบวก ที่ไม่สามารถคำนวณความเข้มข้นได้ โปรแกรมจะให้ค่าเป็น invalid ในทันที ซึ่งโปรแกรมจะแสดงโชว์เป็นแถบสีเหลืองในตารางของผลการวิเคราะห์ เพื่อแสดงสถานะให้ทราบ

สถานะที่แสดงในตารางผลการวิเคราะห์มีความหมายดังนี้

C : Target/Reference ratio uncertain

N : Normalized ratio uncertain

T : Uncertain target Cp

R : Uncertain reference Cp

E : Extrapolated standard curve

D

5 การวิเคราะห์ค่า Tm

ในหัวข้อนี้จะอธิบายถึง การใช้ Tm Calling ในการวิเคราะห์หรือจำแนก ลักษณะพันธุกรรมของตัวอย่าง

5.1 การใช้ Melting curve ในการทำนายและจำแนกตัวอย่างดีเอ็นเอ และ ลักษณะทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ

อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสาย DNA ออกเป็นสายเดี่ยว แต่ละชนิดนั้นมีค่าไม่เท่ากัน และมีความหลากหลายค่อนข้างมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ สายของ DNA, ความยาวของ DNA, และปริมาณเบส GC ในสายของ DNA อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น DNA ที่มีความยาวเท่ากัน แต่มีปริมาณของเบส GC แตกต่างกัน ก็ส่งผลทำให้ค่า Melting temperature แตกต่างกันเช่นกัน หรือแม้แต่มียาลดับเบสแตกต่างกันในสายของ DNA เพียง 1 คู่ก็ส่งผลทำให้ค่า Melting temperature แตกต่างกันได้เช่นกัน ดังนั้นการใช้หลักการนี้ในการจำแนกความแตกต่างของสาย DNA มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของ ได้ DNA เป็นอย่างดี ยกตัวอย่างเช่น ลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่เป็น DNA แบบดั้งเดิม wild type มักจะมีอุณหภูมิที่สูงกว่า สายของ DNA ที่มีความต่างหรือลำดับเบสที่ผิดไปจากแบบดั้งเดิม mismatch ซึ่งตัว ที่ใช้จับจะต้อง probe ใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าในการแยกสายของ DNA

ซึ่งวัตถุประสงค์ในการหลักในการจำแนกลำดับสายของสารพันธุกรรมที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างคือการ ใช้ Melting temperature นั่นเอง

สำหรับการวิเคราะห์โดย Melting temperature โดยใช้เครื่อง LightCycler480 ขณะที่เครื่องมีการทำอุณหภูมิที่สูงขึ้น การลดลงของ Fluorescence จะลดลง ซึ่งเกิดจากการที่ DNA สายคู่มีการคลายเกลียวและ สียฟลูออเรสเซนส์ SYBR I หรือ ResoLight Dye มีการปล่อยแสงออกจาก DNA สายคู่ที่มีการคลายเกลียว

สำหรับโปรแกรมการวิเคราะห์ Tm calling ของเครื่อง LightCycler480 นั้น จะคำนวณค่า Tm, แสดงลักษณะ melting peak, ความสูงของ peak, รวมถึงความกว้างของฐาน peak เพื่อที่จะใช้สำหรับการจำแนก ลักษณะความแตกต่างของสารพันธุกรรม

5.1.1 การกำหนด Melt Program

ในการวิเคราะห์ นั้น สามารถทำได้โดยการเพิ่มโปรแกรมการทำ melting temperaturemelting เข้าไปในขั้นตอนของการตั้งโปรแกรม การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งโปรแกรมการทำ melting temperature นั้น มีทั้งสิ้น 3 ขั้นตอนดังนี้

- ▶ ขั้นตอนของการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อเป็นการแยกสาย DNA
- ▶ เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาให้ต่ำกว่าอุณหภูมิของการ annealing
- ▶ ตัวอย่าง DNA จะค่อยๆถูกทำให้ร้อนโดยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ ขณะที่ทำการวัดปริมาณ ฟลูออเรสเซนส์ที่ค่อยๆเพิ่มขึ้น จากการที่ DNA ค่อยๆคลายตัว

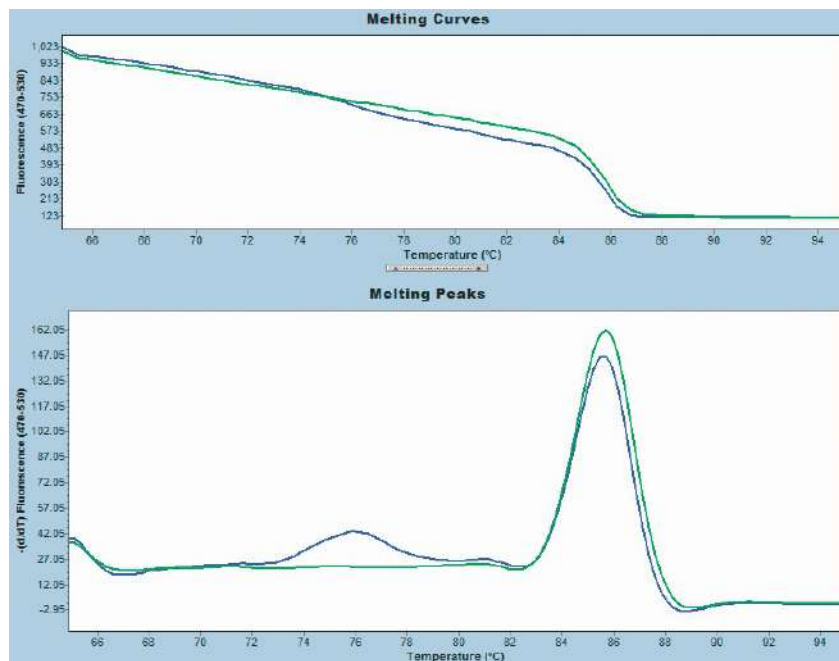


สามารถใช้อุณหภูมิการทำงานที่ +20 to +95°C ซึ่งตัวอย่างควรมีที่อุณหภูมิ +20°C ช่วงสั้นๆ (<15 min) สำหรับ melting curves ที่เริ่มที่ +20°C, ให้ลดอุณหภูมิตัวอย่างลงมาด้วยอัตราเร่งที่ 2.2°C/s (for LightCycler® 480 Block Kit 96), หรือ 2.5°C/s (for LightCycler® 480 Block Kit 384) และค้างไว้ประมาณ 30–60 วินาที
ค่าต่ำสุดที่กำหนดในโปรแกรม melting curve คือ 17°C สำหรับงานการหาค่า Tm, จีโนไทป์, การตรวจหาสายพันธุ์

5.1.2 เนื้อหาการวิเคราะห์ อุณหภูมิค่า Melting

การวิเคราะห์แบบ Melting temperature analysis นั้นเป็นการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบเฉพาะเจาะจง โดยค่าที่ได้เกิดจากการวัดค่าอุณหภูมิที่ทำให้ DNA คลายเกลียวออกเป็นครึ่งหนึ่งของสาย DNA โดยการวิเคราะห์จะแสดงผลออกมาในรูปแบบของกราฟความสัมพันธ์ของ สฟลูออเรสเซนซ์ และอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป และนอกจากนี้การวิเคราะห์ยังแสดงกราฟของ Melting peak ที่เป็นการสร้างกราฟความสัมพันธ์ของสฟลูออเรสเซนซ์ที่ตกลงเป็นครึ่งหนึ่งของสาย DNA ออกมาเป็น peak อีกด้วย

จากกราฟแสดง Melting curve และ melting peak จากการทำ melting curve analysis โดยใช้ SYBR Green I ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นถึงการการวิเคราะห์แบบ melting curve analysis นั้นมาใช้ในการจำแนก PCR product ได้อย่างไร



กราฟแสดงให้เห็นทราบว่า DNA product ทั้งสองชนิดนี้มี peak ที่สูงชัดเจน มีค่า Tm เท่ากับ 86°C สำหรับกราฟสีฟ้ามี peak ขนาดเล็กเพิ่มขึ้นมา โดยเห็นได้จาก peak เดี่ยวๆ ที่ Tm 77°C ซึ่งนั่นคือ product ที่ไม่มีความจำเพาะ เช่น primer-dimer เป็นต้น

5.2 การทำการวิเคราะห์ค่า Tm

สามารถทำการวิเคราะห์การหาค่า Tm ได้ในทุกการทดลองโดยการเพิ่มโปรแกรม melting เข้าไปในโปรแกรมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อสั่งงานโปรแกรม และขณะที่เครื่องทำการ melting นั้น ปริมาณของสารฟลูออเรสเซนส์ก็จะค่อยๆลดลง ตามค่าอุณหภูมิที่สูงขึ้น ซึ่งค่าของฟลูออเรสเซนส์ที่ลดลงนั้น จะมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของ DNA

- ▶ ยกตัวอย่างการทำ Melting analysis โดยใช้ SYBR Green I หรือ ResoLight Dye จะมีการตรวจตามสีที่มีการลดลง ในขณะที่เครื่องมีการเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น เพื่อดูค่าที่ อุณหภูมิที่ทำให้ DNA คลายเกลียว ออกเป็นครั้งแรก ที่ความยาวคลื่น 530 nm
- ▶ ในกรณีที่ใช้ Hybridization probe การจับกันของ DNA ที่สนใจ กับ probe ในปฏิกิริยาที่เรียกว่า FRET นั้นเป็นการวัดปริมาณสัญญาณที่เกิดขึ้น และหลังจากนั้นจะเป็นการ ตรวจตามค่า Tm จากปริมาณ สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ลดลง ตามการคลายตัวของ DNA เป้าหมายกับ probe
- ▶ ในกรณีของ Single-labeled probe สัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะถูกปลดปล่อยจากส่วนที่เป็น Reporter dye ในขณะที่ probe จับอยู่กับ DNA เป้าหมาย และในทำนองเดียวกันค่า จะได้จากการคลายตัวที่จุดๆ Tm เป้าหมายซึ่งทั้งหมดนี้ที่กล่าวมาโปรแกรมจะแสดง ลักษณะกราฟฟลา DNA และ probe หนึ่ง ระหว่างรตก ลงของสีฟลูออเรสเซนส์ และ Melting peak ของ DNA เป้าหมายแต่ละชนิดอย่างชัดเจน



หลังจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในปฏิกิริยา *hydrolysis probe PCR assay*, โพรบ ทุกตัว จะ ถูก ย่อย ไป ดังนั้น การ ทำการ วิเคราะห์ *Melting Curve* จะทำไม่ได้

กราฟการวิเคราะห์จะแสดงเป็นลักษณะสัญญาณสีฟลูออเรสเซนส์ที่ลดลง จากนั้นโปรแกรมจะแสดงเป็นกราฟการทำอนุพันธ์ลบครั้งแรก ซึ่งได้เป็นพีคที่แสดงค่าอุณหภูมิ melting ทำให้ง่ายต่อการแยกแยะอุณหภูมิที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยในตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจะแสดงกราฟอุณหภูมิ melting ของแต่ละตัวอย่างรวมทั้งพื้นที่ใต้กราฟด้วย

โปรแกรมการวิเคราะห์ค่า Tm จะทำอัตโนมัติเพื่อหาพีคและพื้นที่ใต้กราฟ แต่อย่างไรก็ดี สามารถเลือกกำหนดค่าเหล่านี้เองด้วยผู้ใช้ก็ได้

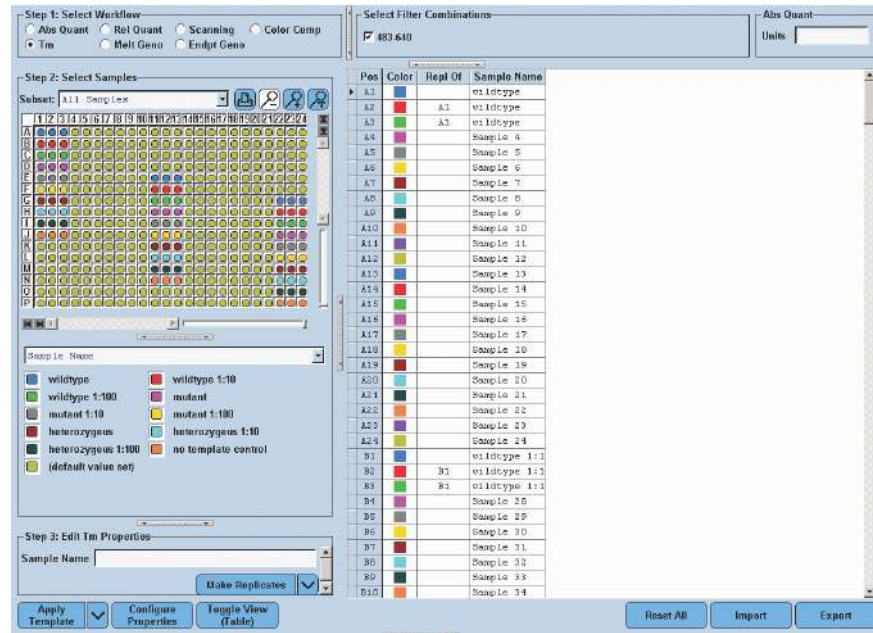


ข้อควรระวังสำหรับการตั้งค่าโปรแกรมอุณหภูมิสำหรับการทำ melting program คือ ควรกำหนดตั้งอุณหภูมิสำหรับการทำ Melting อย่างน้อยสูงกว่าอุณหภูมิที่เป็นค่า Tm ของตัวอย่างประมาณ 7°C และ กำหนดอุณหภูมิสุดท้ายที่ทำงานต่ำกว่าค่า Tm ของตัวอย่างไปประมาณ 3 °C และ ค่าต่ำสุดที่กำหนด ในโปรแกรม *melting curve* คือ 17°C สำหรับงานการหาค่า Tm, จีโนไทป์ และการชดเชยสัญญาณสี

D

การวิเคราะห์ค่า Tm แบบอัตโนมัติ:

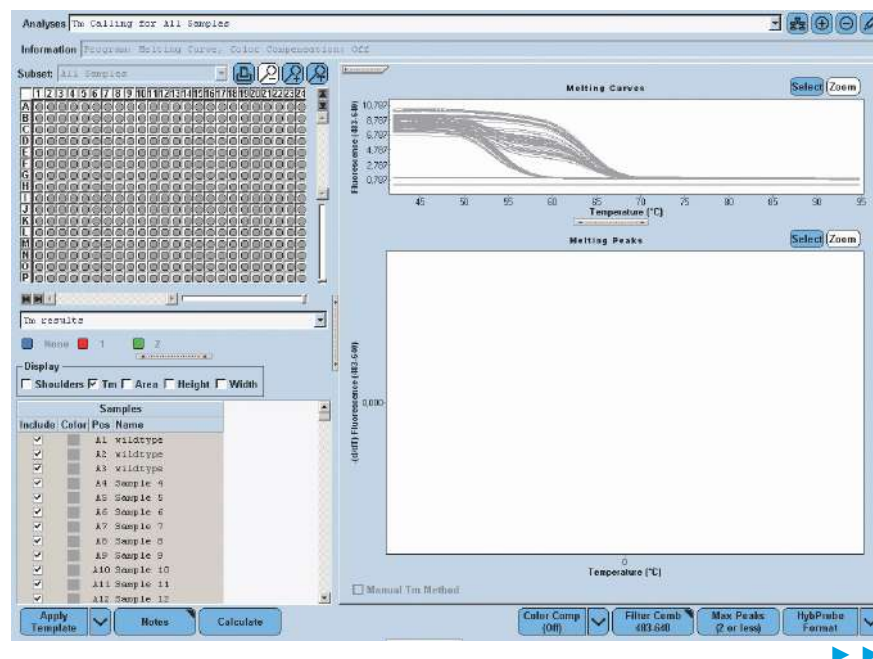
- 1 ทำการตั้งค่าโปรแกรม ที่ต้องการจากนั้นจึงสั่งการให้เครื่องทำงานตามโปรแกรม หรือเปิดโปรแกรมที่ถูกตั้งค่าไว้แล้ว ที่มี melt program
- 2 คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module* แล้วเลือกการทำงาน workflow Tm



สำหรับการวิเคราะห์ค่า Tm Calling ไม่ต้องกำหนดคุณสมบัติตรง *Sample Editor*

- 3 คลิกที่ *Analysis* ในแถบ *Module*

- 4 จาก *Create New Analysis* เลือก Tm Calling จะแสดงหน้าต่าง *Create New Analysis* จากนั้นเลือก subset ที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วคลิก ☒ หน้าต่าง *Analysis* จะเปิดขึ้น

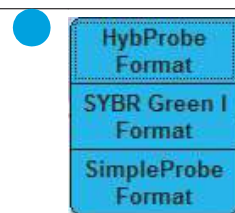


- 5 ในกรณีที่มีการทดสอบหรือใช้สัฟลูออเรสเซนซ์หลายสีพร้อมกัน สามารถเลือกไปที่ filter combination เพื่อที่จะเลือก ใช้ ให้เหมาะสมกับสิ่งที่เราต้องการที่จะวิเคราะห์ filter ได้



ทำการเลือกจำนวนของพีค ที่ต้องการดู ระหว่าง Max Peaks (2 or less) หรือ Max Peaks (6 or less) หากเลือก Max Peaks (2 or less) คือให้แสดงจำนวนพีคแบบปกติ หรือถ้ามี peak หลายๆพีค ให้คลิกเลือกไปที่ Max Peaks (6 or less)

- หากทำงานด้วยสัฟลูออเรสเซนซ์แบบ SYBR Green I Format (ลำดับต่อไป) แนะนำให้เลือก Max Peaks (2 or less) เท่านั้น
- แนะนำว่า ค่า melting peaks ควรมีความต่างอย่างน้อย ΔT_m of $4^\circ C$ เพื่อจะได้เห็นภาพชัด



จากนั้นเลือกไปที่ Detection format ซึ่งสามารถเลือกได้ทั้งหมด 3 ชนิดคือ HybProbe, SYBR Green I, และ SimpleProbe

- เลือกกำหนดรูปแบบที่เปลี่ยนไปจะเปลี่ยนการคำนวณตามความต้องการของรูปแบบสัญญาณนั้น

- 8 โดยค่าเริ่มต้นทุกๆตัวอย่างจะถูกคำนวณหากไม่ต้องการให้คำนวณตัวอย่างใดๆ สามารถที่จะคลิกเพื่อเอาตัวอย่างนั้นๆออกได้โดยการดับเบิ้ลคลิกที่ check box ซึ่งอยู่ถัดจากชื่อตัวอย่างเพื่อยกเลิกการเลือก กดปุ่ม <Space>

- 9 คลิกที่ปุ่ม Calculate เพื่อให้การวิเคราะห์ค่า Tm Calling สมบูรณ์

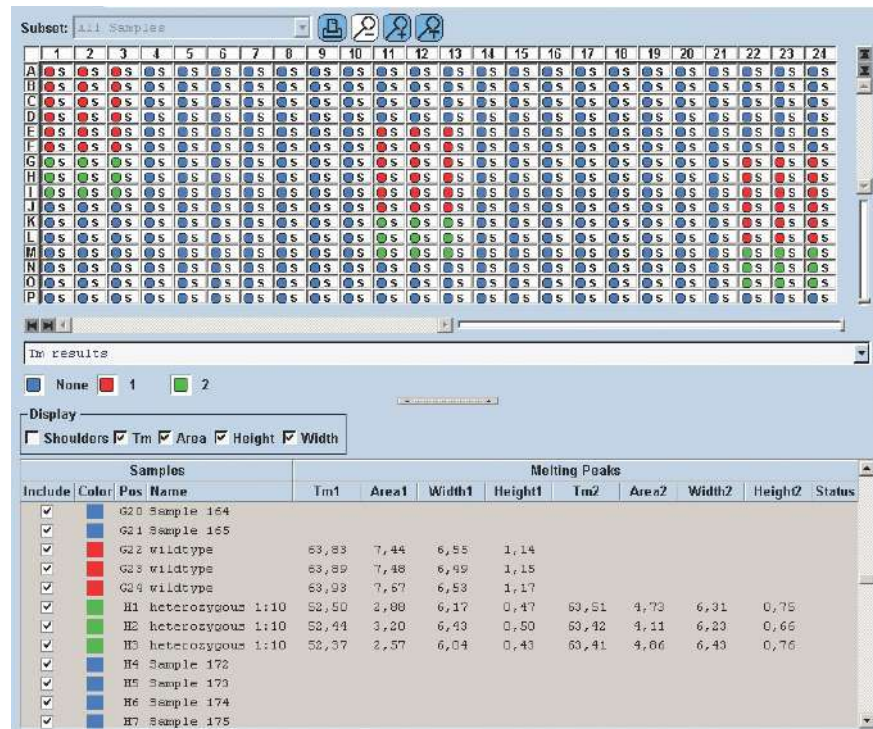
- 10 หากต้องการดูผลการวิเคราะห์ให้ทำการคลิกจาก ขอบทางด้านซ้าย ไปยังด้านขวาเพื่อที่จะให้โปรแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ ซึ่งจะรวมผลของ Sample Selector พร้อมคุณสมบัติและตารางตัวอย่าง Sample Table



เลือกกำหนดค่าที่ต้องการให้แสดงในผล Results ได้ตรงช่องบริเวณ Display

ใช้ Legend Property Selector เพื่อที่จะเลือกแสดงผลของตัวอย่างตามสี ชนิดของตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถเลือกที่จะให้แสดงตัวอย่างที่ทำซ้ำ เลือกสีใน Legend Property Selector เพื่อแสดงตัวอย่างตามค่าที่กำหนดได้ โดยสามารถให้แสดงได้ทั้งในส่วนของการเพลท ภาพกราฟ หรือตาราง

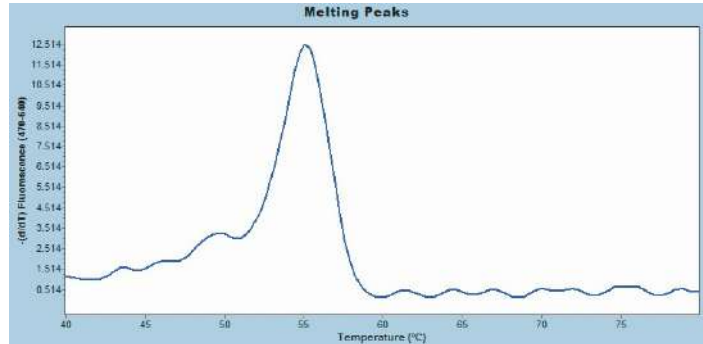
หากเลือกแสดงผล Tm results ใน Legend Property Selector การแสดงผลขึ้นกับผลนั้นโดยตรง เช่น จำนวนพีคที่ได้ ตารางแสดงผลค่า Tm แสดงดังนี้



ผลแสดง	คำอธิบาย
Tm1	ค่าอุณหภูมิ melting พีคแรกในตัวอย่าง
Area1	พื้นที่ใต้กราฟพีคแรก
Width1	ความกว้างของพีคแรก
Height1	ความสูงของพีคแรก
Tm2	ค่าอุณหภูมิ melting พีคที่สองในตัวอย่าง (หากมี)
Area2	พื้นที่ใต้กราฟพีคที่สอง
Width2	ความกว้างของพีคที่สอง
Height2	ความสูงของพีคที่สอง



- แต่ถ้าหากในการทดลองครั้งนั้นๆ มีหลายพีค ซึ่งเกิดจากการตั้งค่าที่ถูกต้องและสมบูรณ์ กราฟก็จะแสดงหลายๆ พีคได้ (จำนวน Peaks สูงสุดคือ 6 หรือน้อยกว่า)
- และหากพีค นั้นๆ มีการแสดงของไหล่กราฟ (Shoulder) และอยากให้เห็นไหล่กราฟ (Shoulder) ให้ชัดเจนมากขึ้น สามารถที่จะคลิกเลือกไหล่กราฟ (Shoulder) หรือไม่ให้แสดงไหล่กราฟ (Shoulder) ได้ ตรงบริเวณของพีค ได้เช่นกัน จากรูป มีไหล่กราฟ (Shoulder) อยู่ตรงบริเวณ Tm 50°C เป็นต้น



- 12 หากเลือกไปที่ Shoulder จะปรากฏผลดังตารางดังภาพ

Shoulders deselected

The screenshot shows the 'Display' settings with 'Shoulders' unchecked. The table below shows only one set of peak data.

Samples				Melting Peaks			
Include	Color	Pos	Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
☒	Blue	30/30/2.75	mtBg/10e	55.13	3.95	12.56	12.34

Shoulders selected

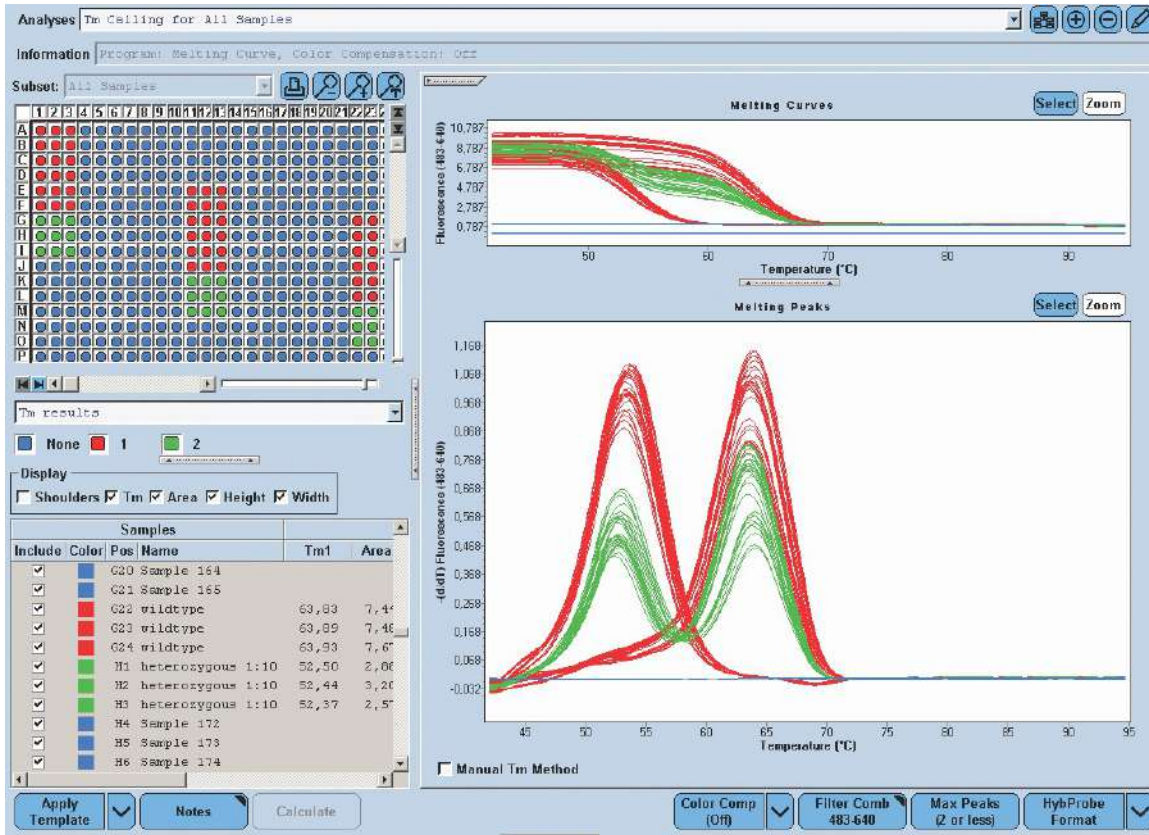
The screenshot shows the 'Display' settings with 'Shoulders' checked. The table below shows two sets of peak data.

Samples				Melting Peaks							
Include	Color	Pos	Name	Tm1	Area1	Width1	Height1	Tm2	Area2	Width2	Height2
☒	Blue	30/30/2.75	mtBg/10e	50.35	5.91	13.27	2.25	55.13	3.95	12.56	12.34

พีคที่มีลักษณะเป็นไหล่จะแสดงไว้ในคอลัมน์แรก ในขณะที่พีคหลักจะแสดงในคอลัมน์ที่สอง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเรียงตามลำดับของอุณหภูมิที่พบแบบอัตโนมัติ

- การวิเคราะห์จะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ melting curve และ melting peak หากต้องการดูวิธีการวิเคราะห์แบบละเอียด ให้ไปที่ [Using the Analysis Window](#)

ยกตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์ HybProbe assay ดังแสดงในรูปด้านล่าง ผลการวิเคราะห์ที่ได้เป็นการแสดงค่าของตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์ เส้นกราฟของตัวอย่างแสดงเป็นเส้นที่มีสี ตัวอย่างที่แสดงมี 2 melting peak ซึ่งแต่ละ Peak มีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม



D

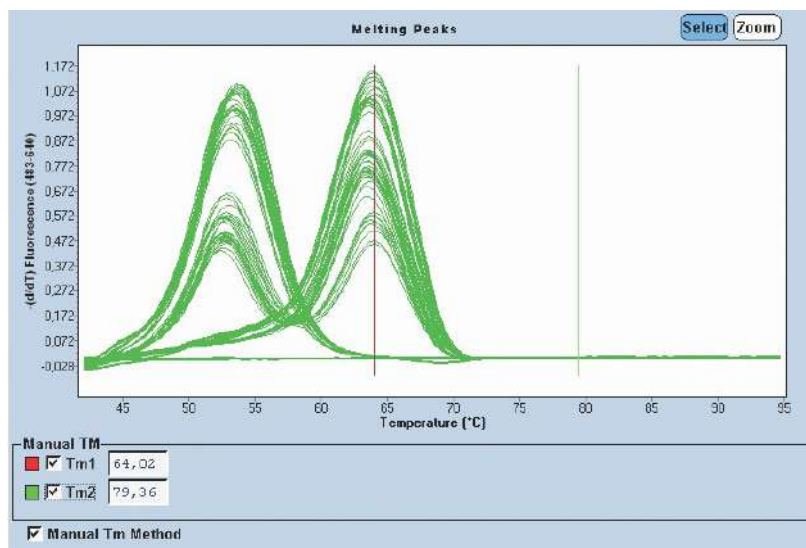
การวิเคราะห์ Tm Calling แบบ manual:

- 1 ทำการสร้างโปรแกรมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือเลือกจากการทดลองที่เคยทำไปแล้ว ซึ่งประกอบไปด้วย melting program จากนั้นให้ทำโปรแกรมวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ การหาค่า Tm แบบทำเองนั้นจะสามารถทำได้เมื่อมีการวิเคราะห์ค่าโดยโปรแกรมแล้ว

- 2 ทำการเลือกตัวอย่าง ที่ต้องการวิเคราะห์แบบ manual จากรายการตัวอย่าง

- 3 เลือกเครื่องหมายถูกหน้าช่อง Manual Tm Method

ค่าของ Tm จะมีหลายค่าเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับ Max peak ที่ตั้งค่าไว้ ซึ่ง Tm หลายๆค่าจะแสดงที่ได้ของ melting

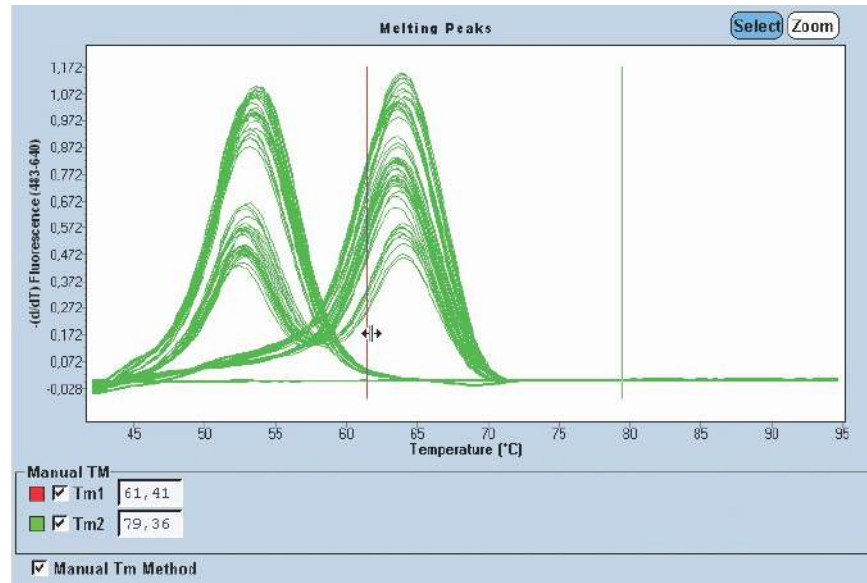


- 4 เส้นบ่งชี้ค่า Tm จะแสดงอัตโนมัติ หากมีการเลือกแสดงตัวอย่างหลายตัวอย่าง เส้นบ่งชี้ค่าจะแสดงค่าจากตัวอย่างแรกๆที่เลือก

- 4 จากนั้นทำการคลิกไปที่ Tm แต่ละตัวเพื่อให้แสดงค่าแบบ manual และสีของเส้นกราฟก็จะแสดงเป็นสีตามทีเลือกในช่อง Tm checkbox



หากต้องการเปลี่ยนค่า Tm ให้เอาเคอร์เซอร์ไปวางที่เส้นแสดง จากนั้น melting peak เคอร์เซอร์จะเปลี่ยนเป็นสัญลักษณ์ลูกศรสองหัวดังภาพ ให้คลิกและลากเส้นนั้นไปยังค่า Tm ที่ต้องการ



ค่า Tm จะแสดงในช่องด้านข้างช่องที่มีเครื่องหมายถูก พื้นที่ใต้กราฟ ความกว้าง ความสูง จะเป็นไปตามการคำนวณหลังจากเลือกซึ่งแสดงในรายการตัวอย่าง

- 🔍 ค่าที่ทำการเลือกกำหนดแบบ *manual* จะแสดงเครื่องหมายคอกจันไว้ในตารางตัวอย่าง และรายงาน ซึ่งสถานะคอลัมน์ในตารางตัวอย่างจะมีพื้นหลังเป็นสีเหลือง แสดงข้อความ
*-Manually edited
- 🔍 เป็นไปได้ที่จะให้แสดงค่า Tm ทั้งแบบอัตโนมัติ และแบบที่กำหนดเอง *manual* ในการวิเคราะห์เดียวกัน แต่ไม่ใช่ตัวอย่างเดียวกัน
- 🔍 ในขณะที่ทำการแก้ไขค่า Tm แบบกำหนดเอง จะไม่สามารถเปลี่ยนการแสดงผลที่เป็น *Shoulders*

- 🔍 หากต้องการได้ค่า Tm ที่โปรแกรมคำนวณแบบอัตโนมัติกลับคืน ให้ทำการยกเลิกการเลือก Tm Manual Method และคลิกไปที่ปุ่ม Max Peaks จำนวน 2 ครั้งจากนั้น กดเลือกที่ปุ่ม Calculate

D

6 การวิเคราะห์จีโนไทป์

6.1 ภาพรวม

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) โดยปกติแล้วมนุษย์เรานั้นจะมี พันธุกรรมที่มีความแตกต่างกันอยู่ประมาณร้อยละ 90 ซึ่งบริเวณที่ต่างกันนี้เราเรียกย่อว่า SNP ซึ่งระยะหลังๆมานี้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านให้ความสำคัญและศึกษาบริเวณนี้กันเป็นอย่างมากโยมีการใช้เทคโนโลยี ต่างๆเข้ามาใช้ในการศึกษากันอย่างแพร่หลาย

สำหรับ LightCycler 480 นั้นสามารถที่จะศึกษา SNP ได้ด้วยเช่นกัน โดยแบ่งเป็น 2 วิธีการหลักๆดังนี้:

- ▶ Endpoint Genotyping analysis
- ▶ Melting Curve Genotyping analysis

ทั้งสองวิธีการนี้ แตกต่างกันที่เลือกใช้ตัวตรวจตามชนิดใด รวมไปถึงการเก็บสัญญาณที่เลือกใช้ เช่น ความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม สามารถที่จะจำแนกออกจากกันได้โดยอาศัยการวัดสัญญาณสุดท้ายของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (End Point Analysis) หรือดูการเปลี่ยนไปของลักษณะรูปร่างของกราฟ Melting curve หลังจากสิ้นสุดการทำ PCR (Melting Curve Analysis)

Endpoint Genotyping Analysis

เป็นการวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากการสิ้นสุดปฏิกิริยา Real time PCR โดยทำการวัดค่าแสงฟลูออเรสเซนส์จากความแตกต่างของสีที่ติด Hydrolysis Probe 2 สี ซึ่งวิธีการนี้ค่อนข้างที่จะง่ายในการจำแนก ความแตกต่างของสารพันธุกรรม 2 ชนิดออกจากกัน เนื่องจากการใช้หรือการออกแบบ ค่อนข้างง่ายและสามารถแยกได้อย่างชัดเจน

DNA เป้าหมายหลายๆตัวสามารถที่จะออกแบบ primers probe set และเลือกใช้น้ำยาให้เหมาะสมกับเครื่อง LightCycler 480 ได้อย่างง่าย และสามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม End Point Genotyping

Melting Curve Genotyping Analysis

การวิเคราะห์ค่า Melting Curve ที่ได้จากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากโพรบชนิด hybridization probes (HybProbe และ SimpleProbe) จะให้ข้อมูลที่ติดกับการศึกษาวิเคราะห์ SNPs ที่ทราบมาก่อนอยู่แล้ว และไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปซึ่งอาจถือว่าเป็นข้อจำกัดในการศึกษาการกลายพันธุ์ชนิดนี้ได้เช่นกัน

สำหรับวิธีการนี้เป็นการตรวจตามสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากการทำ Melting Curve Analysis โดยใช้ Hybridization Probe และหรือ พันธุกรรมวิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์หลังจากที่มีการเพิ่มจำนวนสาร Simple Probe เสร็จเรียบร้อยแล้ว จากนั้นจึงเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของสารพันธุกรรม โดยดูความแตกต่างของลักษณะ Peak ที่เกิดขึ้น ซึ่งวิธีการนี้มีความละเอียดมากกว่าการใช้ End point genotyping เนื่องจากสามารถที่จะดูลักษณะและความต่างของ สิ่งที่ต้องการตรวจตาม ซึ่งจะแสดงออกมาจากลักษณะของ Peak ที่เกิดขึ้นอย่างละเอียดอีกด้วย



ในการตรวจหา SNPs ที่ไม่ทราบมาก่อน สามารถใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LightCycler® 480 Gene Scanning Module ร่วมกับ น้ำยา LightCycler® 480 High Resolution Melting Master reagent

การวิเคราะห์เกิดจากการวัดสัญญาณแสงเพียงชนิดเดียวที่ติดอยู่กับ Probe หรือสามารถศึกษาตำแหน่ง SNP หลายๆตำแหน่ง โดยการออกแบบ หลายๆตำแหน่งโดยใช้ SNP ที่ติดสีต่างกันก็ได้ หรือนอกจากนี้ยังสามารถตรวจหา Probe Probe เพียงชนิดเดียวที่สามารถอ่านผลครอบคลุมตำแหน่งต่างๆเหล่านั้น และแยกตำแหน่ง SNP โดยการใช้การวิเคราะห์แบบ melting Peak ได้

6.2 การวิเคราะห์ Endpoint Genotyping

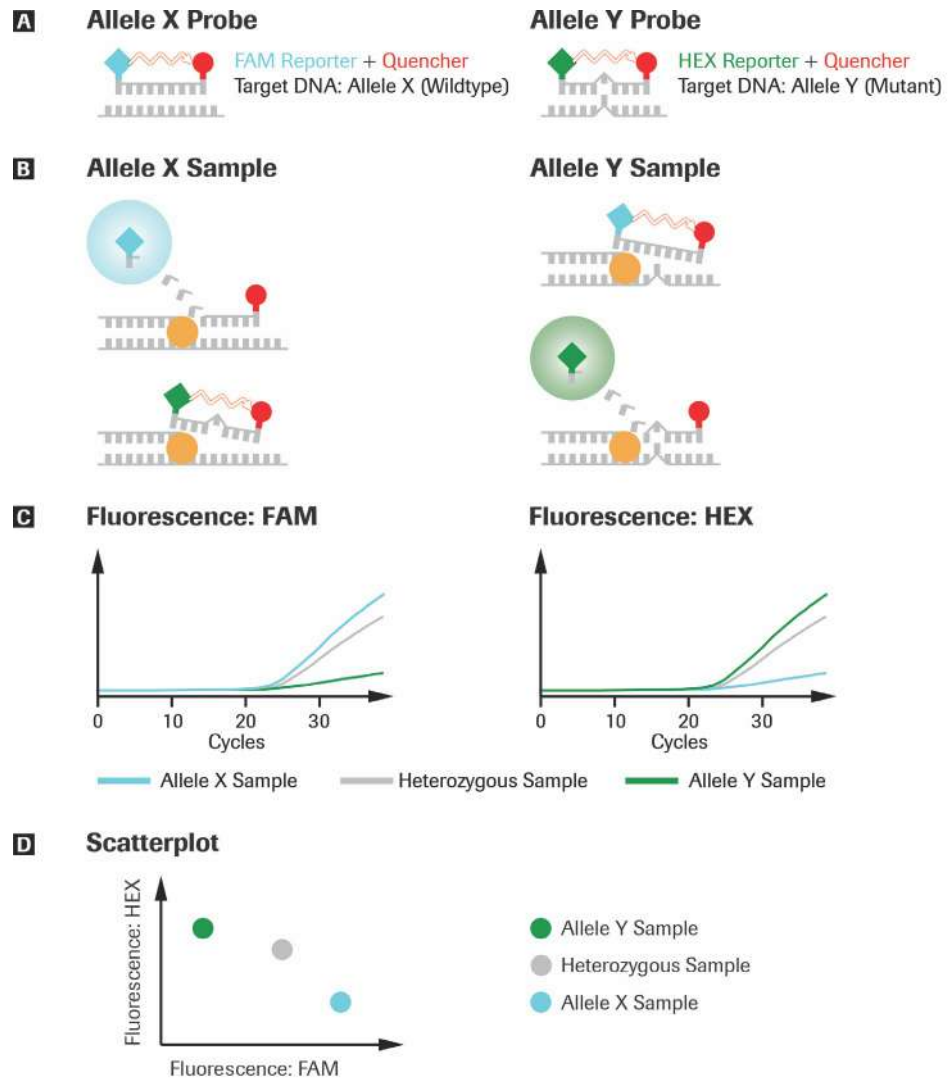
6.2.1 ภาพรวม

การวิเคราะห์จีโนไทป์แบบ Endpoint Genotyping เป็นการออกแบบ Probe ที่สามารถจับกับ DNA เป้าหมาย ซึ่งเป้าหมายคือทั้งชนิดปกติ Wild type และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ไป Mutation ซึ่ง Probe ทั้งสองตัวนี้จะมีการติดสีฟลูออเรสเซนส์ที่ต่างกัน โดยการวิเคราะห์นั้นจะวัดค่าความเข้มแสงที่ถูกตรวจจับได้หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา Real time PCR แล้ว โดยค่าความเข้มแสงที่เกิดขึ้นสามารถแปลผลออกมาในรูปแบบ Scatter plot ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์ผล โยจะมีการจัดแบ่งกลุ่มของ Wild type และ Mutation ให้อย่างชัดเจน

Endpoint Genotyping Analysis มีการใช้ Hydrolysis Probe 2 เส้น โดยแต่ละเส้นจะติดสีฟลูออเรสเซนส์ 2 ซึ่ง FRET แต่ละเส้นจะใช้หลักการ Probe โดยการเปล่งแสงของ Reporter dye และ r dyeQuenche ตำแหน่งที่จะเกิดขึ้นในขั้นตอนElongation ในขณะที่ Probe ถูกตัดขาดออกจากกันสามารถดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่

Detection Formats for the LightCycler® 480 Instrument

D



ตัวอย่าง End point Genotyping ที่มีการออกแบบให้มีความต่างกันของสีตัวรายงาน (Reporter Dye)

A: โพรบชนิดที่จำเพาะต่อลำดับเบสโดยมีการติดสีตัวรายงานที่ต่างกัน

B: ในช่วงของ elongation phase เฉพาะโพรบที่สามารถจับกับเป้าหมายได้จะถูกตัดขาด แยกให้สีตัวรายงาน (reporter dye) ขาดออกจากสีตัวดับ (quencher)

C: สีตัวรายงานจะไม่ถูกดับจึงเปล่งงานอีกต่อไป จึงสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ได้

D: กราฟ scatterplot แสดงความเข้มของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนส์สุดท้าย ของทุกตัวอย่างทำให้ง่ายต่อการแยกแยะ สัญญาณความเข้มสูงของ Allele X Probe จะอยู่ด้านขวา, สัญญาณความเข้มสูงของ Allele Y Probe จะอยู่ด้านบน, สัญญาณความเข้มสูงของทั้งสองโพรบจะอยู่ด้านบนขวา ซึ่งจะเรียกตัวอย่างลักษณะนี้ว่า heterozygous

โปรแกรมวิเคราะห์ LightCycler® 480 Endpoint Genotyping จะแปลผลจีโนไทป์แบบอัตโนมัติ ซึ่งจะแสดงเป็น สีในมุมมองเพลท สอดคล้องกับข้อมูลในตาราง ซึ่งแต่ละตัวอย่าง ในตารางแสดงผลจะมีบอกลักษณะจีโนไทป์พร้อมทั้งค่าที่ได้

6.2.2 หลักการของ Endpoint Genotyping

โดยหลักการแล้วโปรแกรมของ LightCycler480 จะทำการจัดกลุ่มของ ฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเหมือนกันอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และจะทำการแยกกลุ่มที่มีความต่างให้เป็นลักษณะทางพันธุกรรมอีกแบบ หรือเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบ โดยมีการจำแนกชนิดตัวอย่างดังนี้

- ▶ Unknown: ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ
- ▶ Standard (ทางเลือก): โปรแกรมจะอ้างอิงข้อมูลจากกลุ่ม standards ที่กำหนดในการที่จะแปลผลตัวอย่างที่ไม่ทราบจีโนไทป์มาก่อน โดยอ้างอิงชื่อจากกลุ่ม standards ที่กำหนดไว้ โดยทั่วไป standards จะเป็นตัวควบคุมชนิดบวก (positive controls) หากพบค่าตัว standard ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่ำและแยกไม่ออกจากสัญญาณของตัวควบคุมชนิดลบ (negatives) โปรแกรมจะมีข้อความเตือน และหากไม่ได้กำหนดค่า standards ไว้ โปรแกรมจะจัดกลุ่มตัวอย่างเองอัตโนมัติ
- ▶ Negative control (ทางเลือก): หากตัวอย่างชนิด negative control มีสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่แยกออกไม่ได้จากสัญญาณของตัวอย่างจริง โปรแกรมจะมีข้อความเตือน

หลังจากที่โปรแกรมอ่านชนิดจีโนไทป์แล้ว สามารถแก้ไขตัวอย่างที่เลือกได้ ถ้าการแปลผลจีโนไทป์เปลี่ยนไปตัวอย่งนั้นจะมีข้อความ “manually edited”

การทดลอง Endpoint Genotyping จะเป็นการใช้หลายสัญญาณ จึงมีเรื่องของการเกิดสัญญาณข้ามช่อง ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้ฟลักซ์สัญญาณสีมาร่วมในการวิเคราะห์ แต่อย่างไรก็ดี การวิเคราะห์ Endpoint Genotyping ไม่มีความจำเป็นต้องใช้ฟลักซ์สัญญาณสีเพราะการจัดกลุ่มค่อนข้างชัดเจน มักจะไม่ค่อยมีสัญญาณข้ามช่อง

6.2.3 การทำการทดลองชนิด Endpoint Genotyping

การวิเคราะห์ Endpoint Genotyping มีให้เลือกใช้เป็น 2 ลักษณะ:

- ▶ PCR Read: โดยปกติแล้ว การทำ End Point Genotype จะประกอบไปด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการวัดสัญญาณแสงในช่วงที่สิ้นสุดการเพิ่มจำนวน ซึ่งจะแสดงผลออกมาในรูปของ Amplification curve และ Scatter Plot
- ▶ Pre/Post Read: ในกรณีที่การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่ไม่ได้ใช้เครื่อง Real time PCR ในการเพิ่มจำนวน สามารถที่จะวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ End point ด้วยโปรแกรมแบบสั้นได้ short program (Post Read)

อีกทางเลือก สามารถใช้ short program ในการทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบนเทอร์มอล บล็อกไซเคิลก่อนได้ (Pre Read) ซึ่งจะเป็นการช่วยแก้ไขสัญญาณพื้นหลังเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การทำงาน Endpoint Genotyping ด้วย PCR Read:

- 1 การตั้งค่าโปรแกรม End Point Genotyping ที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และวัดปริมาณแสงในขั้นตอนสุดท้าย (หากต้องการทำ End Point Genotyping ที่ปราศจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ให้ไปดูที่หัวข้อ *To perform Endpoint Genotyping with Pre/Post Read*) และหากต้องการทำ Standard curve หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ หรือสิ่งที่ผู้ทำงานต้องการประยุกต์นำไปใช้:

- ▶ Auto group analysis: ไม่มีการใช้ Standard Genotype ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้
- ▶ In-run standards: ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้มีการใช้ genotype standards

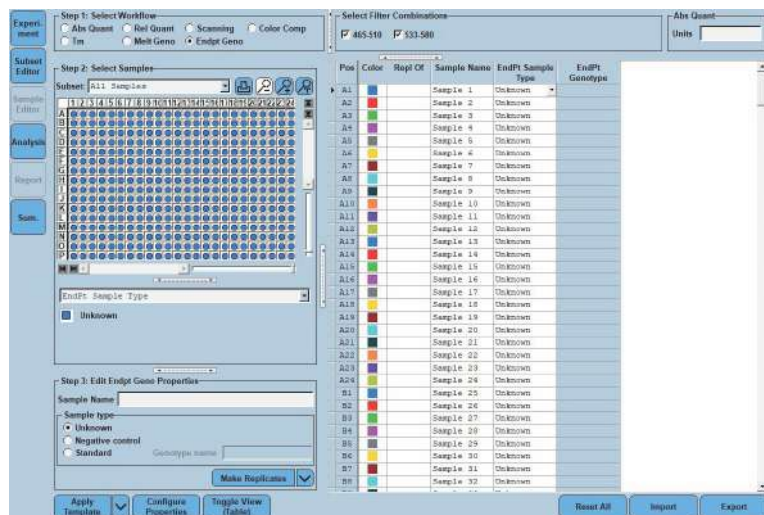
สามารถรวมตัวควบคุมดังนี้:

- ▶ Positive control: ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้มีการใช้ genotype standard และยังเป็นตัวแทนของ positive controls ด้วยเช่นกัน
- ▶ Negative control: คือ Reagent mix ที่ไม่มีการเติม DNA template เข้าไป

(ทางเลือก) กำหนดกลุ่มตัวอย่างย่อยสำหรับการวิเคราะห์ได้ โดยดูส่วน *Working with Subsets* หากไม่ได้กำหนดโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์เองอัตโนมัติ และให้ตัวอย่างที่ไม่ได้กำหนดอะไรเป็นผลลบ

- 2 คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module*

- 3 เลือกกำหนด workflow *Endpt Geno*



- 4 กำหนดคุณสมบัติตัวอย่าง

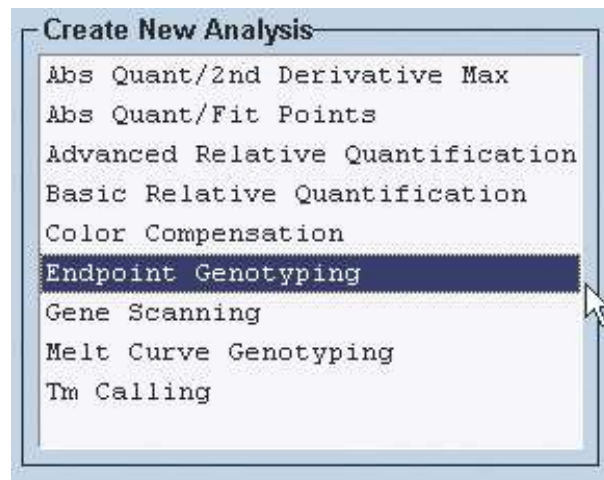
รายละเอียดเพิ่มเติมการกำหนด *Sample Editor* ดูใน *Entering Sample Information*
โปรแกรมใช้ค่าพารามิเตอร์ในการคำนวณดังนี้:

ชื่อคอลัมน์	คำอธิบาย	ค่าที่ปรากฏ
Endpt Sample Type	ชนิดของตัวอย่าง	▶ Unknown ▶ Negative Control ▶ Standard
Endpt Genotype	ลักษณะของจีโนไทป์ ช่องนี้จะมิให้ใส่ค่าหากเป็น <i>Standard</i>	ใส่ตัวอักษร (≤ 25 ตัวอักษร)



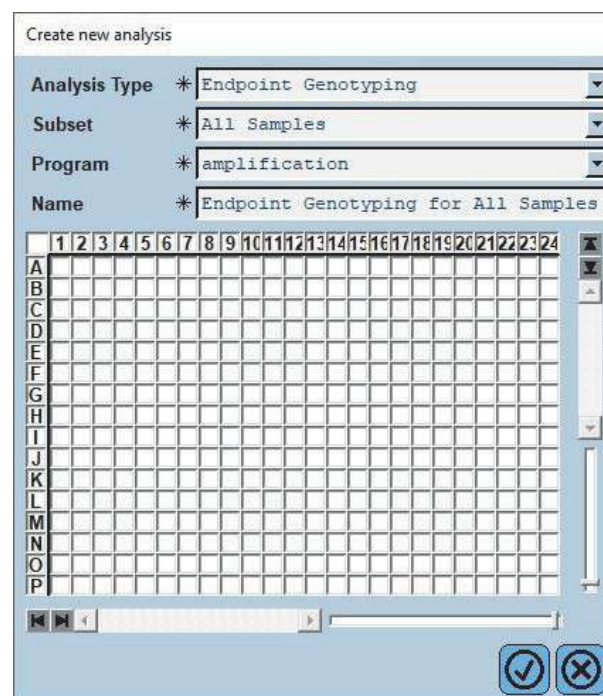
5. คลิก *Analysis* ในแถบ *Module*

ในหน้าต่าง *Create New Analysis* ให้เลือก *Endpoint Genotyping*



6. หน้าต่าง *Create new analysis* จะเปิดขึ้นให้เลือกวิเคราะห์กลุ่มย่อยและ โปรแกรมการทดลองจากรายการ *Program* (เป็นโปรแกรม *PCR* ปกติ) สามารถกำหนดชื่อการวิเคราะห์ใหม่ได้ (ค่าเริ่มต้นชื่อคือ “analysis type สำหรับ subset name”)

กดเลือก ☒



D



7 หน้าต่าง *Create new analysis* จะเปิดขึ้น

ให้ทำการเลือก Filter combination ตามชนิดของ ลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการตรวจวัดเช่น

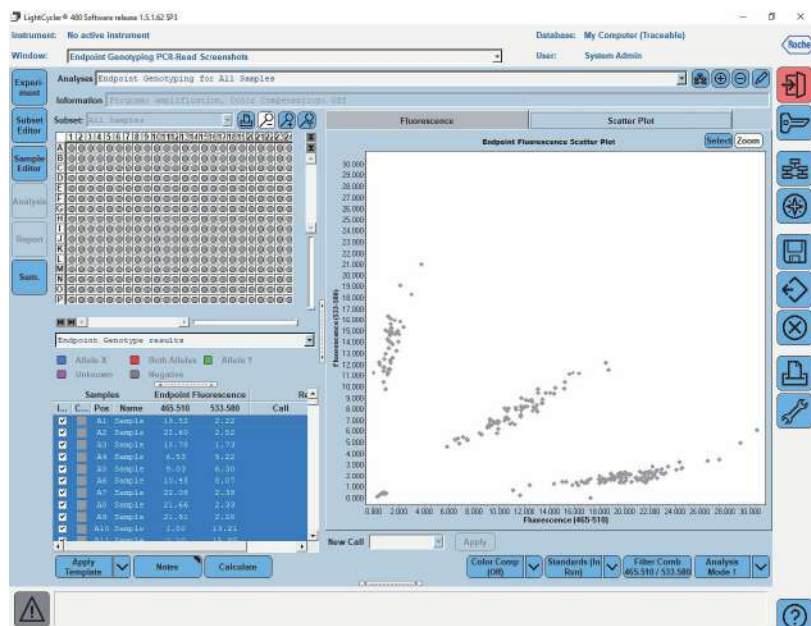
▶ สำหรับ Allele X ให้อยู่ในแกน X ของกราฟ scatter plot

▶ สำหรับ ให้อยู่ในแกน Allele YY ของกราฟ scatter plot

(หากทำการวิเคราะห์แบบไม่มีโปรแกรมการเพิ่มจำนวน ให้เพิ่มการทดลองเพื่อล้างค่าเส้นฐาน โดยเลือกกำหนดทางเลือก

Use external experiment for background correction สามารถอ้างอิงได้ในส่วน [To perform Endpoint Genotyping with Pre/Post Read](#)

8 หน้าต่าง *Genotyping Analysis* เปิดขึ้น



9 ทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนในส่วนของ *Performing an Endpoint Genotyping Analysis*

การทำงาน Endpoint Genotyping ด้วย Pre/Post Read:

โปรแกรม LightCycler® 480 Endpoint Genotyping จะทำการตรวจวัดสัญญาณแสงจากสปีดออร์บเซนส์ ทั้งสองสี หลังจากมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้ว จากนั้นจะทำการ Plot กราฟ Scatter plot นอกจากนี้ยังมีทางเลือกสำหรับการทำ End Point Genotype คือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากเครื่องอื่นที่ไม่ใช่ Real Time PCR โดยทำการอ่านค่าสีก่อนที่จะเริ่มทำ PCR เพื่อโปรแกรมจะทำการเก็บเป็นค่าแสงเริ่มต้น และจะมาใช้คำนวณร่วมกับค่าแสงที่วัดได้หลังทำ PCR

สามารถใช้โปรแกรมแบบสั้น (post-PCR measurement) ในการนำเข้ามาใช้จากภายนอกเพื่อหาค่าแสงเริ่มต้นในการวิเคราะห์

การทำงานเป็นลักษณะเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในการทำงานส่วน *To perform Endpoint Genotyping with PCR Read* มีบางส่วนที่ต้องทำตามขั้นตอนดังนี้:

- 1 ปกติเราจะทำการตั้งค่าโปรแกรมสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพียงแค่โปรแกรมเดียว แต่ถ้าหากเราต้องการทำการวัดค่าแสงแบบที่กล่าวมาข้างต้น ให้ทำการเพิ่มขั้นตอนขึ้นมาอีก 1 หรือ 2 ขั้นตอน

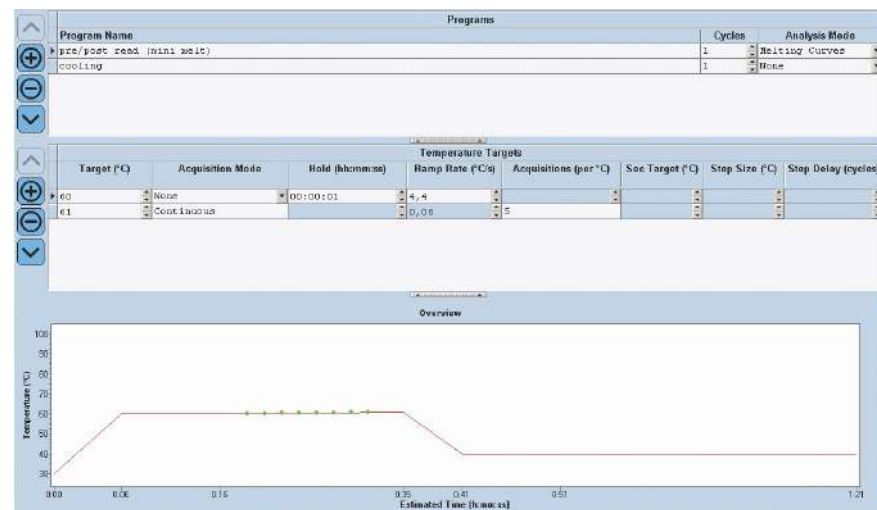
- ▶ (Optional) หากต้องการเพิ่มการวัดค่าแสงก่อนเริ่มทำ ต้องทำการตั้งค่าให้มีการเก็บค่า PCR แสงเพิ่มขึ้นมา 1 จุด
- ▶ สำหรับ Post PCR ก็ให้ทำเช่นกันคือ เพิ่มการเก็บค่าแสงขึ้นมามาก 1

โดยใช้โปรแกรมการวัดค่าแสงเดียวกัน ซึ่งการตั้งค่าเช่นนี้ สามารถทำการเลือกโปรแกรม End-Point Genotype Pre-Post PCR ดังภาพ

- 🔍 แนะนำให้ใช้การทดลองแม่แบบของโรซ “Endpoint Genotyping (Pre-Post Read)” สำหรับทั้ง *pre-PCR experiment* และ *the post-PCR experiment*

ตัวอย่าง:

แม่แบบการทดลองของโรซ *Endpoint Genotyping (Pre-Post Read)*

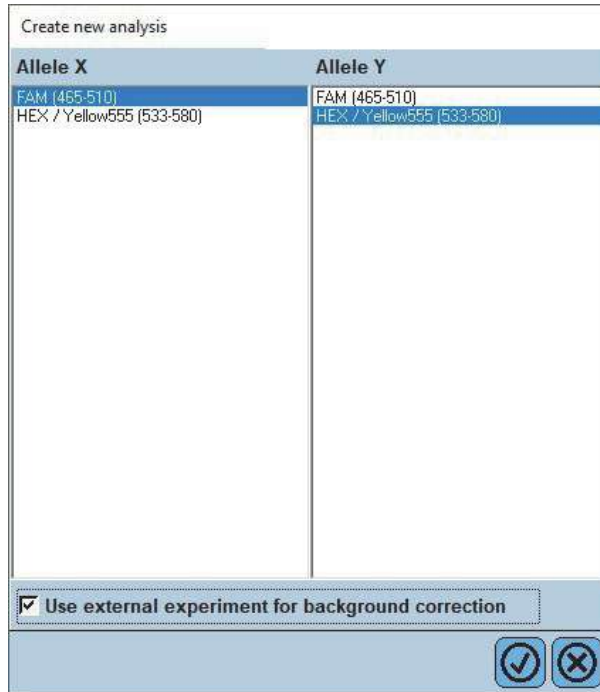


- 2 จากนั้นทำการใส่ตัวอย่าง ในขั้นตอน Post-PCR ซึ่งได้อธิบายในหัวข้อ

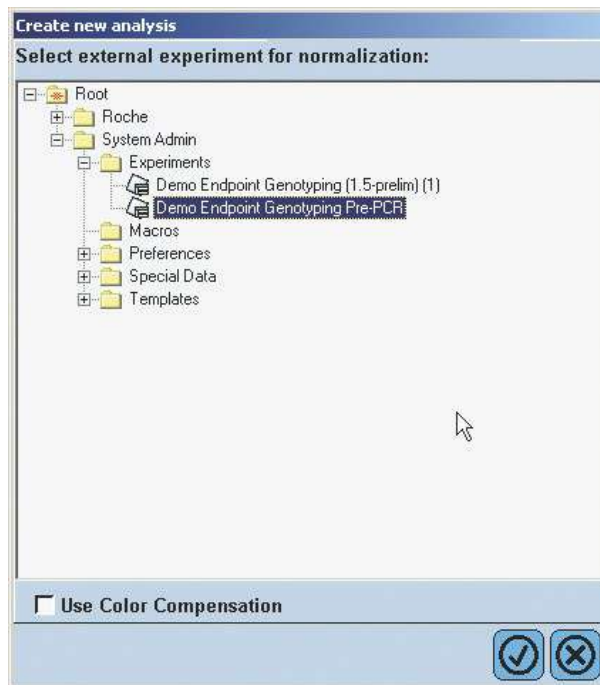
To perform an Endpoint Genotyping experiment with PCR Read



- 3 จากนั้นทำการสร้าง END-Point Genotype Analysis และถ้าหากมีการใช้ Pre-PCR Read จากการวัดค่าในตอนแรกก่อนการเริ่มต้นการทำ PCR ให้ทำการคลิกเครื่องหมายถูกไปที่ ช่องด้านล่างสุด *Use external experiment for background correction* ดังภาพ



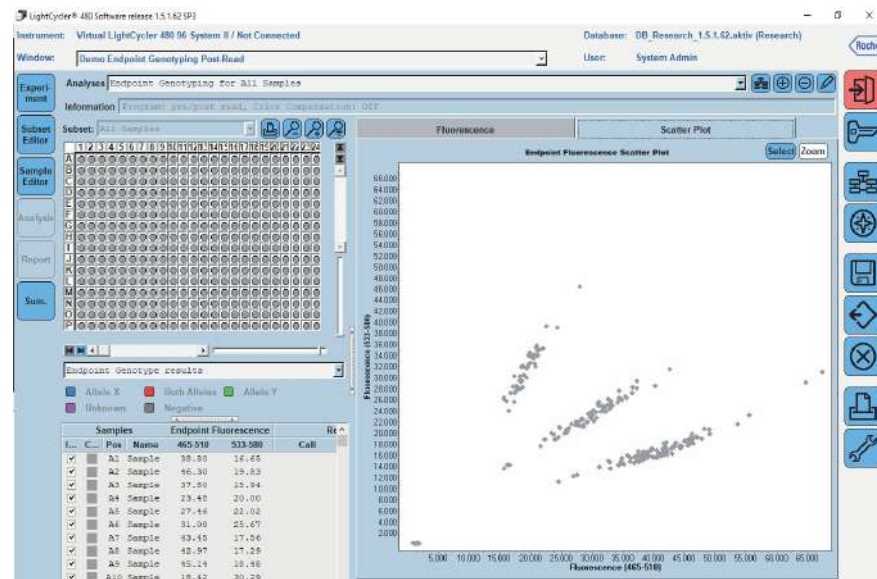
- 4 จากนั้นทำการเลือกไปที่ Pre-Read Experiment ซึ่งอยู่ใน *Navigator Window*



- 🔍 ไฟล์การชดเชยสัญญาณสี ไม่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ *Endpoint Genotyping* เนื่องจากการแปลผลจะค่อนข้างแยกชัดและไม่มีสัญญาณข้ามช่อง



หน้าต่าง Genotyping Analysis จะถูกเปิดขึ้น

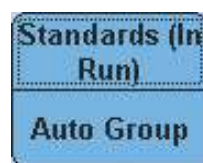


ทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนอธิบายในส่วน *Performing an Endpoint Genotyping Analysis*

6.2.4 การวิเคราะห์ Endpoint Genotyping

วิธีการวิเคราะห์ Endpoint Genotyping:

- 1 ใช้ *Standards (In Run)* ที่ปุ่ม Multi Select เพื่อเลือกกลุ่มที่ต้องการจะวิเคราะห์



Standards (In Run)	ในกรณีที่ต้องการจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีการใช้ ตัวอย่างที่เป็น Standard ในการ Run ครั้งนั้น หากตัวอย่างถูกกำหนดเป็น <i>standard</i> อยู่แล้วในข้อมูลตัวอย่าง ทางเลือกนี้จะ
Auto Group	เป็นการให้โปรแกรมจัดกลุ่มแบบอัตโนมัติ หากตัวอย่างไม่ได้กำหนดเป็น <i>standard</i> ไว้ในข้อมูลตัวอย่าง ทางเลือกนี้จะปรากฏให้เป็นค่าเริ่มต้นเมื่อสร้างการวิเคราะห์



- 2 เป็นทางเลือก ในกรณีที่ต้องการเปลี่ยน Filter ให้สอดคล้องกับการทดลองที่กำหนด ในการทำงานวิเคราะห์จีโนไทป์



(ทางเลือก) ปกติไม่จำเป็นในการใช้ Color Compensation เพื่อป้องกันสัญญาณข้ามช่อง สามารถที่จะเลือกปิด ตรง Color Compensation



- 3 เลือกใช้ Analysis Mode ตรง ปุ่ม multi-select เพื่อกำหนดให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ ทำการตั้งค่าไว้ โดยปกติแล้วการตั้งค่าที่ถูกต้องจะทำให้การวิเคราะห์นั้นถูกต้องตามไปด้วย หากทำการวิเคราะห์แล้ว ไม่สามารถที่จะจำแนกกลุ่มได้ ให้ทำการใช้หรือตั้งค่าตรงปุ่ม 2 ปุ่ม ด้านล่าง



- 4 ในหน้าต่าง Results ของการวิเคราะห์ สามารถที่จะคลิกเอาตัวอย่างที่เราไม่ต้องการวิเคราะห์ ออกไปได้

- 5 คลิกปุ่ม Calculate

จากนั้น โปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ผล โดยจะจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรม และตามสี และชื่อที่ทำการตั้งค่าไว้ โดยจะจัดกลุ่มให้แบบอัตโนมัติ

- ▶ Allele X: เป็นกลุ่มตัวอย่าง ที่ถูกให้จัดกลุ่มใน Filter combination ให้เป็น Allele X
- ▶ Both Alleles: เป็นกลุ่มตัวอย่างที่แสดงสีของฟลูออเรสเซนซ์ออกมาทั้งสองช่อง
- ▶ Allele Y: เป็นกลุ่มตัวอย่าง ที่ถูกให้จัดกลุ่มใน Filter combination ให้เป็น Allele Y
- ▶ Negative: ตัวอย่างที่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ในปริมาณที่น้อยมาก ๆ หรือไม่มีเลขจะจัดอยู่ในกลุ่มนี้

หากมีการกำหนดลักษณะจีโนไทป์ของกลุ่ม standard ในข้อมูลตัวอย่าง Sample Editor การจัดกลุ่มจะอ้างอิงข้อมูลนั้น



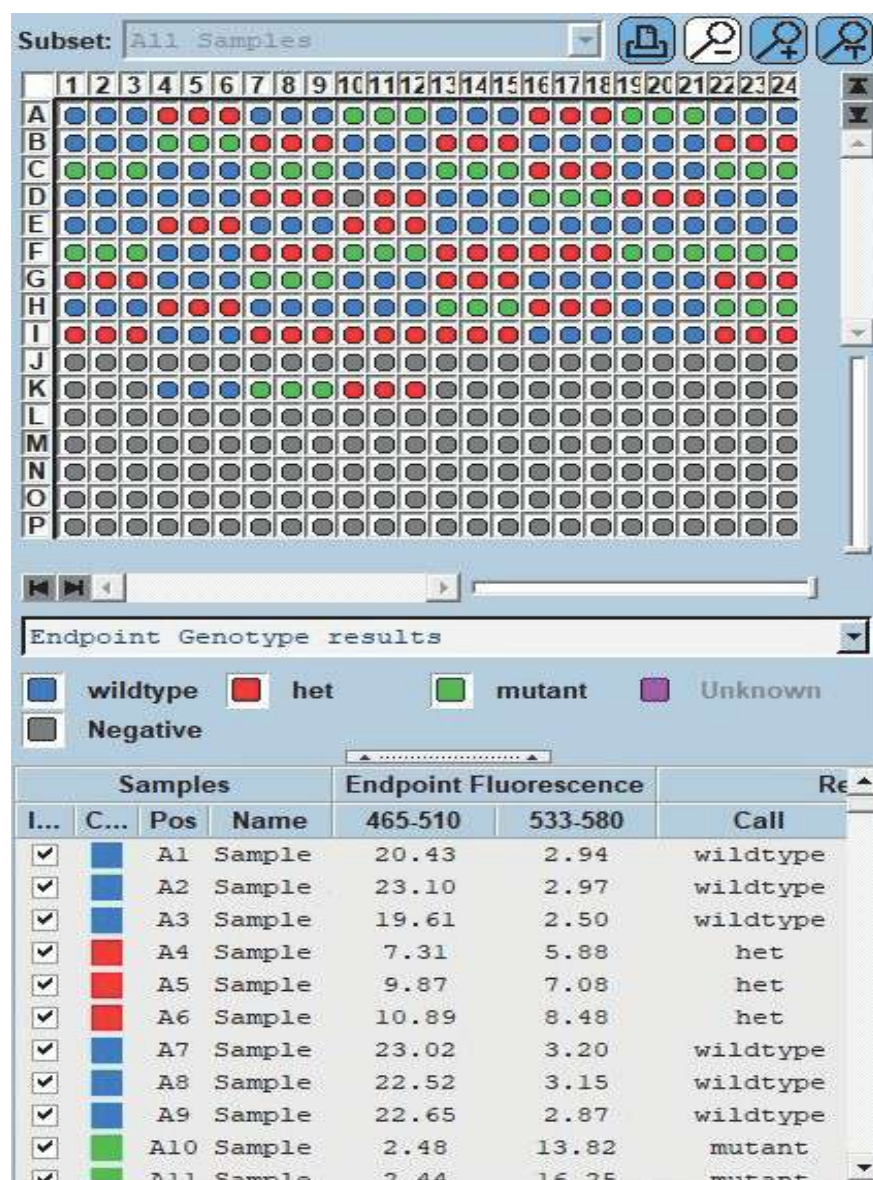
D

เมื่อทำการคำนวณวิเคราะห์เสร็จสิ้น ผลจะแสดงในรูปแบบของภาพเฟลทและตารางผลข้อมูล

ผลการวิเคราะห์แบบ Endpoint Genotyping จะรวม *Sample Selector* พร้อมทั้งคุณสมบัติต่างๆ *Legend PropertySelector* และ *Legend Property* และ ตารางแสดงผล *Results*

ใช้คุณสมบัติ *Legend PropertySelector* เพื่อแสดงผลเป็นสีต่างๆ ตามชนิดตัวอย่าง ตามคุณสมบัติ หรือการทำซ้ำ ใช้ปุ่ม *Legend Property* เพื่อเลือกแสดงตัวอย่างพร้อมค่าคุณสมบัติในภาพเฟลท หรือผลตารางข้อมูลในกราฟแผนภูมิ

สามารถใช้ *Legend Property Selector* เพื่อเลือก *Legend Property* ที่ต้องการแสดง ซึ่งผลของ *Endpoint Genotype* การเลือกช่องกรองแสง *Selector Filter* ภาพเฟลท และ ตารางแสดงผล แสดงตัวอย่างดังภาพด้านล่างนี้



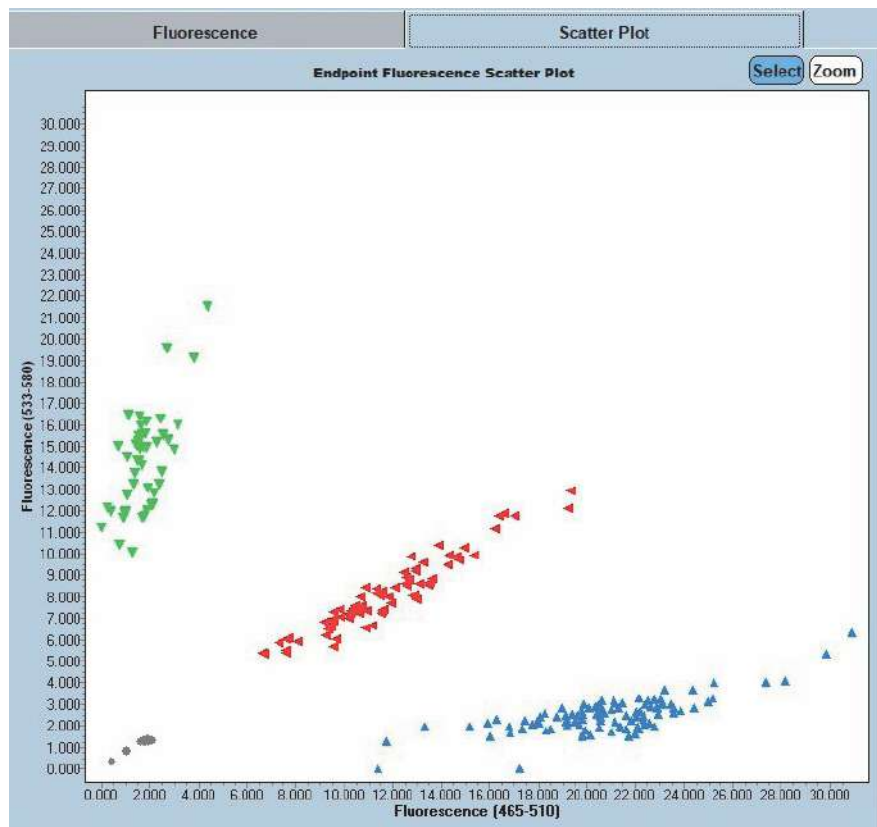
ผลการวิเคราะห์ประกอบด้วย:

- ▶ Endpoint Fluorescence: คือการวิเคราะห์ จะวิเคราะห์จากทั้ง 2 filter
- ▶ Call: คือการแสดงผลของจีโนไทป์
- ▶ Score: คะแนนของตัวอย่าง มีค่าโดยแสดงจุดทศนิยมถึง 2 ตำแหน่ง
- ▶ Status: หากการอ่านผลเปลี่ยนไป สถานะของผลจะถูกแจ้งเป็น “manually edited”

ข้อมูลเพิ่มเติมในส่วนภาพเพลทและตารางแสดงผลให้ดูได้ที่ [Using the Analysis windows](#)



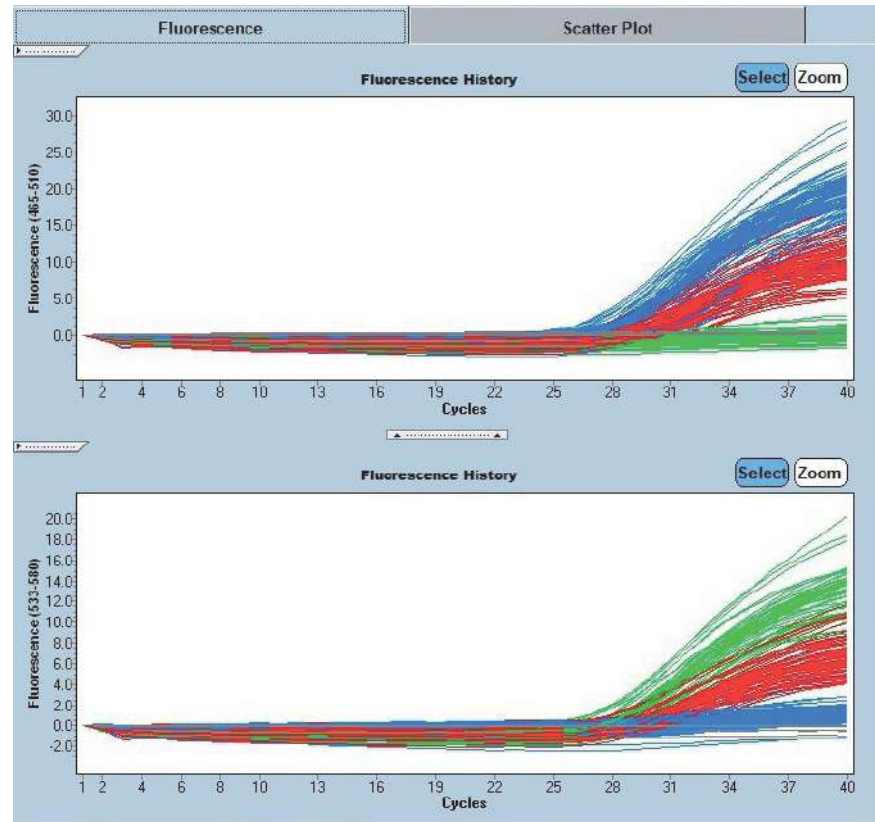
การแสดงผลการวิเคราะห์จีโนไทป์เป็นแผนภูมิกราฟจุด:



แสดงภาพกราฟ *Scatter Plot* ที่ทำการพล็อตสัญญาณแสงความเข้มสุดท้าย จากกราฟ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่าแสงของ Allele X สูง จะเบนไปทางด้านขวา ส่วนที่มีความเข้มแสงของ Allele Y สูงจะเกาะกลุ่ม และเบนไปทางด้านบน



โดยค่าเริ่มต้น แถบ *Fluorescence* จะแสดงค่ามาตรฐาน standard *Fluorescence History*
รายละเอียดเพิ่มเติมสามารถดูได้ที่ส่วน *Working with Charts*



๘ บันทึกผลการวิเคราะห์โดยกดปุ่ม *Save*

สร้างการรายงานผล โดยการกดปุ่ม *Report* (รายละเอียดดูในส่วน *Generating Reports*)

๙ อย่างน้อยควรใช้ตัวอย่างจำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อความน่าเชื่อถือของผล สำหรับกลุ่มตัวอย่าง *positives* จะใช้มากขึ้นเท่าใดขึ้นกับการที่กราฟมีมุมแยกออกจากกันเป็นกลุ่มที่ชัดเจนหรือไม่

D

การเปลี่ยนการแปลผลจีโนไทป์:

สามารถเปลี่ยนการอ่านผลได้ด้วยทางเลือก *New Call*

หากมีการใช้ค่ากลุ่มมาตรฐานในการทดลอง (*In-Run Standards*) จะไม่สามารถเปลี่ยนการแปลผลของค่ามาตรฐานและตัวควบคุมชนิดลบได้ หากยังมีการเปลี่ยนค่า โปรแกรมจะมีข้อความเตือนว่าไม่สามารถเปลี่ยนค่ามาตรฐานและตัวควบคุมชนิดลบได้ในการทดลองนี้ และให้เลือกว่าจะทำงานต่อหรือไม่ หากทำงานต่อการเปลี่ยนแปลงจะทำให้เฉพาะกับตัวอย่างเท่านั้น หากเลือกไม่ทำงานต่อ การเปลี่ยนแปลงจะถูกยกเลิกทั้งหมด

- 1 เลือกตัวอย่างที่ต้องการเปลี่ยน (รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วน *Working with Samples in the Analysis*) ทุกตัวอย่างจะถูกเลือกเป็นค่าเริ่มต้น

- 2 จากเมนูรายการ *New Call* เลือกกำหนดค่าที่ต้องการแปลผลใหม่



คลิกที่ปุ่ม *Apply*

หากต้องการย้อนกลับไปเป็นการอ่านค่าเริ่มต้นที่โปรแกรมแปลผลให้ ให้เลือก 'เป็น *Auto Call*

- 3 ทุกการเปลี่ยนแปลงการแปลผลใหม่จะถูกกำหนดว่า "*manually edited*"

- 4 ควรใช้จำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 12 ตัวอย่างเสมอ เพื่อให้มีผลมีความน่าเชื่อถือ หลังจากทำการวิเคราะห์เสร็จ ควรตรวจทานความถูกต้องการอ่านจีโนไทป์ด้วย หากมีตัวอย่างที่ไม่ถูกต้องให้แก้ไขแบบทำเอง

D

6.2.5 ฟังก์ชันเพิ่มเติม

แม่แบบ Endpoint Genotyping

แม่แบบการวิเคราะห์หีโนไทป์จะประกอบไปด้วย:

- ▶ การเลือกช่องกรองแสง (Filter combination)
- ▶ การตั้งค่าการชดเชยสัญญาณ (off or current)
- ▶ ตั้งค่ากลุ่มย่อยและโปรแกรม



เมื่อมีการใช้แม่แบบ โปรแกรมจะตรวจสอบว่ามีกลุ่มย่อยที่มีชื่อตัวอย่างและตำแหน่งบนเพลทตรงกับทดลองปัจจุบันหรือไม่

- ▶ หากพบว่าการทดลองปัจจุบันไม่มีกลุ่มย่อยตัวอย่างที่ชื่อตัวอย่างตรงกับแม่แบบ โปรแกรมจะสร้างให้อัตโนมติ
- ▶ หากพบว่าการทดลองปัจจุบันมีกลุ่มย่อยที่ชื่อตัวอย่างตรงกับแม่แบบ แต่ตำแหน่งบนเพลทไม่ตรงกัน แม่แบบจะไม่นำมาใช้
- ▶ ชื่อการวิเคราะห์
- ▶ ค่ามาตรฐาน Standards (in-run or auto group)
- ▶ โหนดการวิเคราะห์
- ▶ การแก้ไขสัญญาณพื้นหลัง



หากมีการใช้แม่แบบร่วมกับการทดลองแก้ไขสัญญาณจากภายนอก โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างให้เลือกการทดลองดังกล่าว *Pre Read experiment*

หลักการผลของตัวควบคุม

โปรแกรม LightCycler® 480 Endpoint Genotyping จะมีหลักการในการคำนวณว่าตัวอย่างใดจะผ่าน หรือไม่ผ่าน ดังนี้ ซึ่งหลักการจะใช้ในกรณี *In Run Standards* และ ไม่ได้ใช้กับการวิเคราะห์แบบ *Auto Group*

- ▶ Negative Controls
 - ▶ หากตัวอย่างที่เป็น Negative control มีการแสดงค่าที่เป็น Negative แสดงว่า Control ประสบความสำเร็จ
 - ▶ หากมีบางตัวอย่างที่เป็น Negative control แต่ไม่แสดงผล Negative นั้นแสดงว่า Control ล้มเหลว
 - ▶ หากมีตัวอย่าง Negative Control ล้มเหลว โปรแกรมจะไม่รายงานผลเลข และจะแจ้งว่าตัวอย่างควบคุมชนิดลบไม่ผ่าน พร้อมทั้งแจ้งว่าเป็นตัวอย่างใด
- ▶ Standards (ทำหน้าที่เป็น positive controls)
 - ▶ หากทุกตัวอย่างของ Standards นั้นให้ผลบวก แสดงว่าประสบความสำเร็จ
 - ▶ หากมีตัวอย่าง Positive Control บางตัวอย่างไม่ให้ผลบวก โปรแกรมจะไม่รายงานผลเลข และจะแจ้งว่าตัวอย่างควบคุมชนิดบวกไม่ผ่าน พร้อมทั้งแจ้งว่าเป็นตัวอย่างใด
 - ▶ หาก Standard ที่มีชื่อต่างกัน แต่ให้ผลการทดลองเหมือนกัน โปรแกรมจะขึ้นว่าการทดลองล้มเหลว
 - ▶ หาก Standard ที่มีชื่อเดียวกัน แต่ให้ผลการทดลองต่างกัน โปรแกรมจะขึ้นว่าการทดลองล้มเหลว

D

6.3 การวิเคราะห์ จีโนไทป์ด้วย Melting Curve

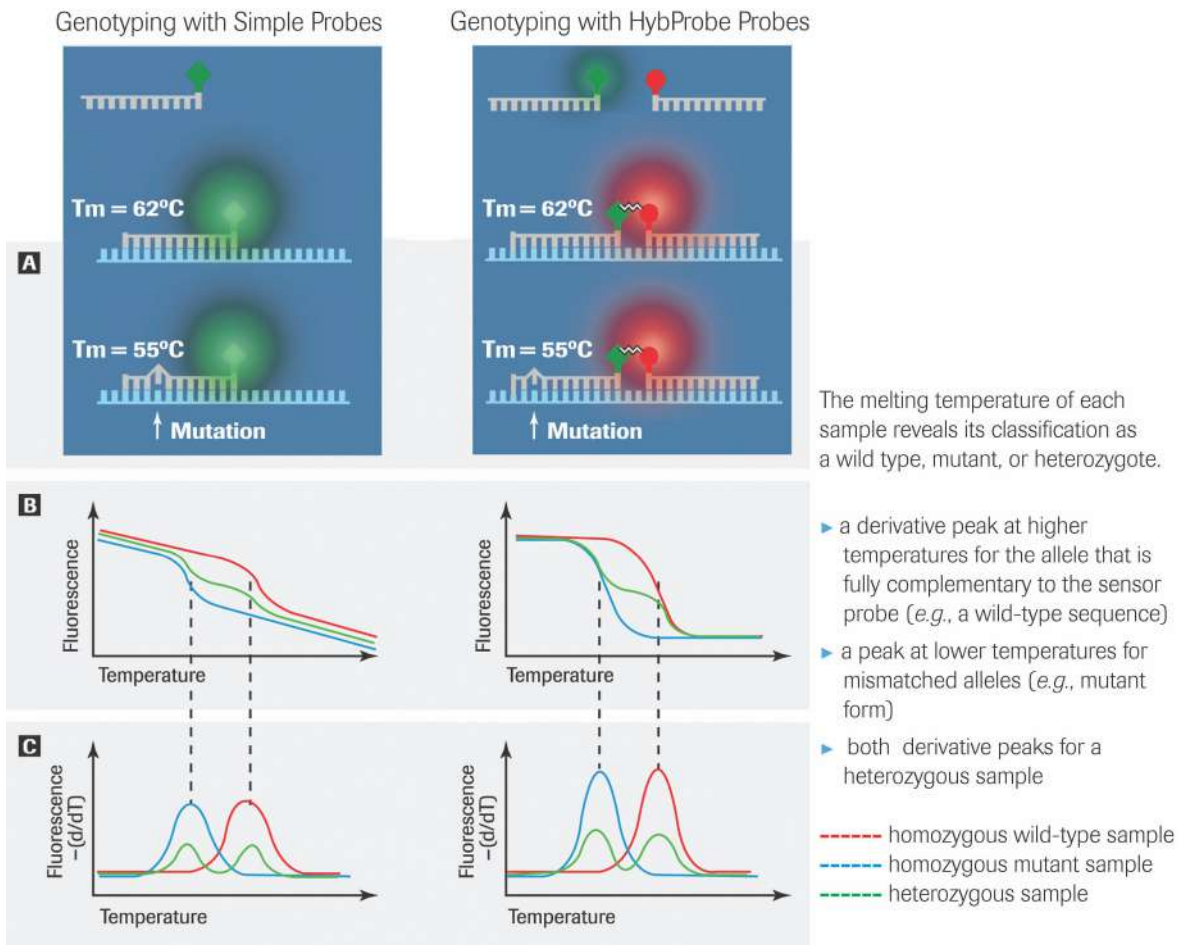
6.3.1 ภาพรวม

หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้ว มีการวิเคราะห์ที่เรียกว่า Melting curve Analysis ซึ่งเป็นการใช้อุณหภูมิเพื่อที่จะแยกสาย DNA ให้ออกเป็นครึ่งหนึ่งของสาย DNA อุณหภูมินั้นเรียกว่า Melting temperature ซึ่ง DNA แต่ละสายนั้นจะมีค่า T_m แตกต่างกัน และมีค่าเฉพาะของ DNA สายนั้นๆ

สำหรับการวิเคราะห์ Melting Curve Genotype นั้น Probe จะเข้าไปจับกับ DNA เป้าหมายและทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หลังจากนั้นจะมีการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ PCR Product มีการคลายเกลียว พร้อมกับระดับของสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงตามการคลายเกลียว ดังนั้นเมื่อทำการออกแบบ Probe ให้มีการ Mismatch กับ DNA เป้าหมายเพียงหนึ่งตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อทำ Melting Analysis ค่า T_m ของแต่ละ Sequence จึงมีความแตกต่างกัน

โดยปกติแล้วเมื่อทำการวิเคราะห์ Melting Curve Analysis นั้นโปรแกรมของ LightCycler 480 จะมีการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ โดยมีการแยกแยะระหว่าง Wildtype, Mutation, Homozygous และ Heterozygous ออกจากกัน

Probe ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างนี้ได้คือ Hybridization probe และ โดย Simple Probe Hybridization Probe นั้นออกแบบค่อนข้างง่าย และสามารถเลือกติดสีฟลูออเรสเซนซ์ได้ โดยการทำงานของ ในการตรวจตามสัญญาณแสง ส่วน FRET ชนิดนี้จะใช้หลักการ ProbeSimpleProbe นั้นหลักการคือ ออกแบบ เพียงเส้นเดียว และติดสีฟลูออเรสเซนซ์ และ Probeสีดับควับ Quencher dye



ภาพแสดงการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยโพรบชนิด SimpleProbe (ซ้าย) หรือ HybProbe probes (ขวา):

A: การไม่เสถียรของโพรบที่จับกับเป้าหมายที่ไม่เข้าคู่กัน เป็นสาเหตุให้ได้ค่า melting temperature (T_m) ลดลงอย่างชัดเจน

B: แสดง Melting curve

C: แสดงอนุพันธ์ของ melting peaks

โปรแกรม LightCycler® 480 Melting Curve Genotyping จะจัดกลุ่ม melting curves และอ่านผลของจีโนไทป์อัตโนมัติ อ้างอิงค่ามาตรฐานและเกณฑ์ หน้าต่างการวิเคราะห์โปรแกรม The LightCycler® 480 Melting Curve Genotyping จะแสดงกราฟของภาพเฟลทพร้อมสีกำกับจีโนไทป์ และข้อมูลในตารางให้สอดคล้องกัน แต่ตัวอย่างจะแสดงผลจีโนไทป์ในตาราง คะแนน และค่าความชัดเจน (resolution) (รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน [Principle of Melting Curve Genotyping Analysis](#))

6.3.2 หลักการของการวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping

โปรแกรม LightCycler® 480 Melting Curve Genotyping จะมีการจัดกลุ่มของตัวอย่างที่มีความเหมือนกันของลักษณะทางพันธุกรรมให้เป็นอัตโนมัติ โดยเทียบกับตัวอย่างที่เป็นค่ามาตรฐาน (Standard) โดยสามารถเลือกที่จะ import เข้ามาวิเคราะห์ได้หากมีการทดสอบ และบันทึกค่า Standard สำหรับ Genotype นั้นๆไว้แล้ว หรือสามารถเลือกที่จะ run ตัวอย่าง ไปพร้อมกับตัวอย่างในรอบนั้นได้เช่นกัน Standard

ข้อมูลดิบที่ได้จะแสดงในรูปของกราฟ Melting curve และ อุณหภูมิ โดยลักษณะกราฟจะแสดงในลักษณะที่ตกลงของฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อตัวอย่างเกิดการ Melting หรือการคลายตัว

ในการวิเคราะห์เพื่อที่จะแยกลักษณะทางพันธุกรรมนั้น โปรแกรมจะทำการแยกความแตกต่างของลักษณะกราฟที่มีการตกลงของฟลูออเรสเซนซ์ โดยจะทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่าง Standard โปรแกรมจะใช้ลักษณะกราฟของ Standard ในการวิเคราะห์ 3 แบบคือ:

- ▶ Software-defined melting standards (auto group analysis): โปรแกรมจะทำการมองตัวอย่างทั้งหมดพร้อมๆกันในครั้งเดียว และทำการจำแนกแยกกลุ่มของลักษณะทางพันธุกรรม ที่มีความเหมือนกันของ Melting peak โดยการคำนวณจะวัดค่ากลาง (Median) ของ Melting curve
- ▶ User-defined standard on plate (in-run melting standards): วิธีการนี้เป็นการ run ตัวอย่าง Standard ไปพร้อมกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยทำการระบุให้โปรแกรมรับรู้ตัวอย่างใดคือ Positive หรือ Standard และหากมีการระบุ Standard มากกว่า 1 ตัวอย่างแต่ใช้ชื่อเดียวกัน โปรแกรมจะทำการคำนวณค่ากลางของตัวอย่างทั้งสอง และจึงทำการจัดกลุ่ม
- ▶ Previously defined standard (external melting standards): นอกจากนี้โปรแกรมยังสามารถให้มีการนำเข้าค่าตัวอย่าง Standard เข้ามาใช้ในการวิเคราะห์จากภายนอกได้ ซึ่งวิธีการดึงข้อมูล Standard เข้ามาวิเคราะห์สามารถดูได้จากหัวข้อ [Tosave an external melting standard object](#)

โปรแกรม LightCycler® 480 Melting Curve Genotyping มีการจำแนกแยกตัวอย่างที่มีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมออกเป็น 2 ชนิด:

- ▶ Positives ซึ่งจะทำการจำแนกจีโนไทป์ตัวอย่างที่เป็นบวก และตัวอย่างซึ่งยังไม่ทราบ
- ▶ Negatives

สำหรับตัวอย่าง Positives โปรแกรมจะมีการนำลักษณะของกราฟที่ได้ไปเทียบกับ Standard โดยการคิดคำนวณจากค่า 2 ค่าที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างดังนี้

- ▶ ค่าแรก จะเป็นการวัดค่าคะแนน Score ของความเหมือนระหว่าง Melt curve ของตัวอย่างและ Standard หากมีความเหมือนกันทุกประการจะให้ค่าคะแนน Score เท่ากับ 1 และหากไม่มีความเหมือนหรือแตกต่างจาก standard ออกไปบ้าง โปรแกรมจะให้ค่าคะแนนเข้าใกล้ 0
- ▶ ค่าที่ 2 คือค่าความละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกัน (dissimilarity) โดยโปรแกรมจะวัดหรือดูความต่างระหว่างกราฟของตัวอย่างและ Standard ยกตัวอย่างเช่นหากตัวอย่างนั้นมีความเหมือนกับ Standard เพียงแค่ตัวเดียว การให้ค่าคะแนน Score ก็จะเท่ากับตัวอย่งนั้นๆ แต่หากความเหมือนนั้นค่อนข้างเหมือน Standard ของทั้ง 2 Standard โปรแกรมจะให้ค่าคะแนนเข้าใกล้ 0

ผู้ใช้งานสามารถที่จะให้ค่าคะแนน Score และค่าความชัดเจน (Resolution) ได้ด้วยตัวเองผ่านทางโปรแกรมการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามค่าคะแนน Score คือค่าความเหมือนเมื่อเทียบกับ Standard แต่ค่าความชัดเจน Resolution คือค่าความต่าง dissimilarity ซึ่งค่าทั่วไปโปรแกรมจะตั้งเป็นค่าอัตโนมัติไว้ที่ Values score เท่ากับ 0.7 ค่า เท่ากับ Resolution 0.1 และหากตัวอย่างใดมีค่าทั้งสองนี้แตกต่างออกไป โปรแกรมจะให้ค่าหรือทำนายตัวอย่างนั้นๆเป็น unknown ทันที

6.3.3 การทำการทดลองชนิด Melting Curve Genotyping

โดยปกติแล้วเราสามารถที่จะวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping ได้จากการทดสอบที่มีการตั้งค่าโปรแกรมการทำงานของเครื่อง ที่มีการตั้งค่า Melting curve ไว้โดยโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ลักษณะของ Melting curve เทียบกับ Standard จากนั้นจึงทำการจัดกลุ่มเพื่อให้ค่าจำกัดความตัวอย่างนั้นๆ โดยที่ Standard นั้นสามารถที่จะใส่ไปพร้อมกับการทดสอบนั้นๆ หรือสามารถที่จะนำเข้าข้อมูลมาวิเคราะห์ร่วมได้

หากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในตัวอย่างจะนำไปสู่การไม่เข้าคู่กันอย่างสมบูรณ์ของโพรบกับเป้าหมาย ดังนั้นที่อุณหภูมิต่ำกว่า โพรบจะหลุดออกจากดีเอ็นเอเป้าหมาย อุณหภูมิ melting temperature (ΔT_m) จะเคลื่อนไประหว่างการจับคู่ที่ปกติสมบูรณ์กับการที่เป้าหมายมีการกลายพันธุ์ไป ทำให้ได้ลักษณะสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่างออกไป ซึ่งบ่งบอกถึงการมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ความแตกต่างของอุณหภูมิ melting ขึ้นกับชนิดของการไม่เข้าคู่กัน ตำแหน่งของการไม่เข้าคู่กันในเส้นโพรบ และลำดับเบสที่อยู่ติดกันกับตำแหน่งที่ไม่เข้าคู่กัน

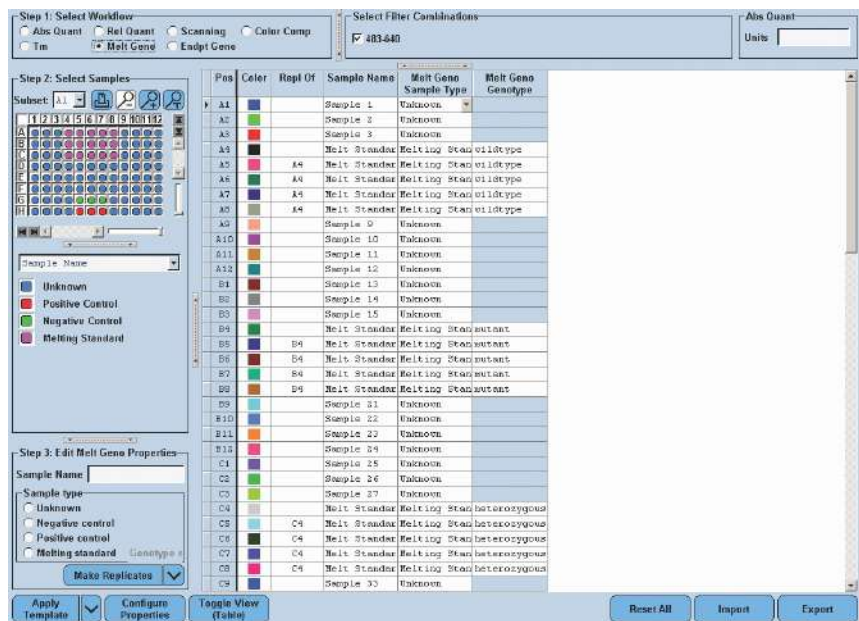
วิธีการทำการทดลองชนิด Melting Curve Genotyping:

1. ทำการทดลองที่มีโปรแกรมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและโปรแกรมการทำ melting curve
 - 2. จะต้องใช้อุณหภูมิอย่างน้อย 17 องศา ในการได้มาซึ่งข้อมูล เพื่อให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping analysis
- จะมีการรวมข้อมูลของค่ามาตรฐานและตัวควบคุมหรือไม่ขึ้น ขึ้นอยู่กับการวิเคราะห์ที่ต้องการ:
- ▶ Auto Group analysis: ไม่ต้องมีค่า melting standard และตัวควบคุม
 - ▶ In-run melting standards: ต้องมีค่าตัวอย่าง melting standard และตัวควบคุม (ทางเลือก)
 - ▶ External melting standards: ไม่ต้องมีค่าตัวอย่าง melting standard และรวมทางเลือก
- ในการใช้ตัวอย่างควบคุม



2

คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module* และเลือก workflow *Melt Geno*



3

กำหนดค่าจำกัดความของตัวอย่าง

รายละเอียดเพิ่มเติมในการใช้ *Sample Editor* สามารถดูได้ที่ส่วน [Entering Sample Information](#)

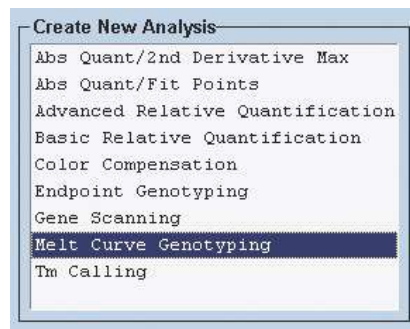
โปรแกรมจะใช้พารามิเตอร์ดังนี้ในการคำนวณ:

ชื่อคอลัมน์	คำอธิบาย	ค่าที่ปรากฏ
ชนิดของตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง <i>In-run</i> : จะต้องรวมค่า <i>Melting Standard</i> สำหรับทุกจีโนไทป์ ต้องกำหนดจีโนไทป์ของ <i>Positive Controls</i> และใช้ค่า <i>Melting Standard</i> นั้นสำหรับจีโนไทป์เดียวกัน	เลือกจากเมนูรายการ - Unknown - Positive Control - Negative Control - Melting Standard
จีโนไทป์	จีโนไทป์ของ melting standard หรือตัวอย่าง positive control ช่องข้อความนี้จะใช้ได้หากตัวอย่างเป็นชนิด <i>Melting Standard or Positive Control</i>	ตัวอักษร (≤ 25 ตัวอักษร)



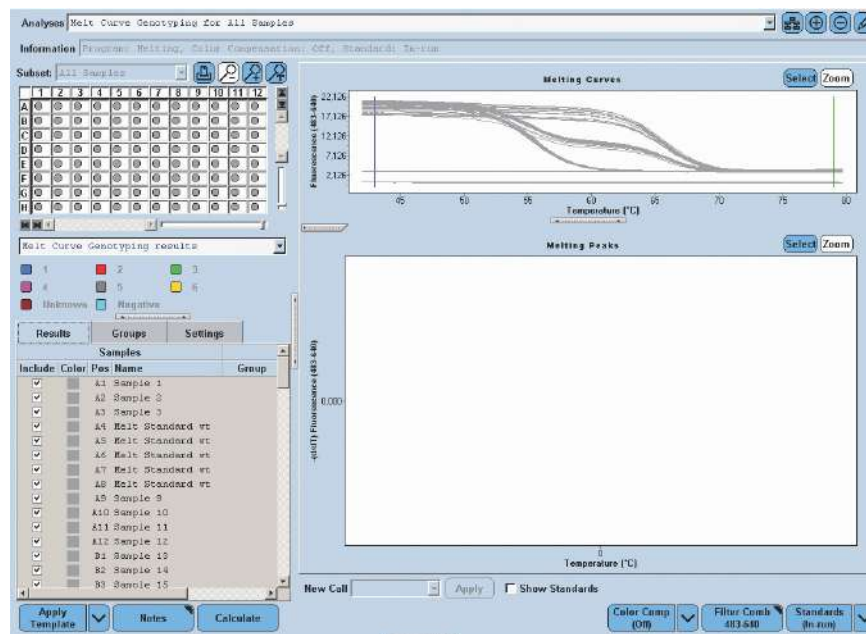
4. คลิก *Analysis* ในแถบ *Module* ซึ่งหน้าต่าง *Create New Analysis* จะปรากฏขึ้นให้เลือก

Melt Curve Genotyping



5. หน้าต่าง *Create new analysis* จะเปิดขึ้น ให้เลือกการวิเคราะห์กลุ่มย่อยและโปรแกรมการทดลองจากรายการ *Program list* (โดยปกติจะเป็น โปรแกรม *Melting Curve*) สามารถเปลี่ยนชื่อการวิเคราะห์ (ชื่อเริ่มต้นจะเป็น “analysis type for subset name”) จากนั้นคลิก

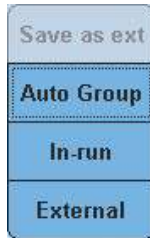
6. หน้าต่าง *Genotyping Analysis* จะเปิดขึ้น



D

วิธีการวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping:

- 1 หากเป็นการทดลองแบบ Multicolor ให้ใช้ปุ่ม *Filter Comb* เพื่อเลือก Filter ที่ใช้ในการตรวจ
- 2 เลือกใช้ *Color Compensation* multi-select เพื่อการเปิด หรือ ปิด โหมด Color Compensation
- 3 เลือกใช้ *Standards* multi-select เพื่อเลือกวิธีการที่ต้องการ:



Auto Group	ใช้การจัดกลุ่มอัตโนมัติโดยไม่มีตัวอย่างที่เป็น Standard ** หากในขั้นตอนการแก้ไขตัวอย่างไม่มีการกำหนดตัวอย่างให้เป็น Standard ตัวเลือกนี้จะเปิดใช้งานตามค่าเริ่มต้นหลังจากสร้างการวิเคราะห์
In-run	ใช้การจัดกลุ่มโดยใช้ตัวอย่างที่เป็น Standard รวมอยู่ในการทดสอบ ** หากในขั้นตอนการแก้ไขตัวอย่างมีการกำหนดตัวอย่างให้เป็น Standard ตัวเลือกนี้จะเปิดใช้งานตามค่าเริ่มต้นหลังจากสร้างการวิเคราะห์
External	ใช้การจัดกลุ่มโดยใช้ตัวอย่างที่เป็น Standard ที่บันทึกไว้จากที่อื่น ตัวเลือกนี้เพื่อนำเข้า Standard ภายนอกที่บันทึกไว้ก่อนหน้านี้ หน้าต่างนี้จะเปิดขึ้นเพื่อให้เลือก Standard ที่เหมาะสม จากฐานข้อมูลภายนอก: ต้องสร้าง Standard จากการทดลองภายนอก โดยใช้ filter combination และ Color Compensation data เดียวกันกับการทดสอบปัจจุบัน (ถ้ามี) นอกจากนี้ผู้ใช้ต้องมีสิทธิ์ใช้ Standard ในฐานข้อมูล หากมีการเปลี่ยน filter combination หรือ CC จะทำให้ Standard จากภายนอกที่จะนำมาใช้ไม่ถูกต้อง ซอฟต์แวร์จะถามว่าต้องการเลือก Standard จากภายนอกใหม่หรือไม่ หากคลิกตกลง หน้าต่างให้เลือก Standard ภายนอกจะเปิดขึ้น หากคุณเลือกไม่หรือยกเลิก จะเป็นการเลือกใช้โหมดการวิเคราะห์การในทดสอบ



เลือก 'Save as ext' หากต้องการบันทึกมาตรฐานการหลอมรวมในการทดลองเป็นวัตถุมาตรฐานการหลอมภายนอกเลือก 'Save as ext' เพื่อบันทึก Standard ในการทดลองไว้เป็น Standard ภายนอกเพื่อใช้กับการทดลองอื่นๆ ตัวเลือกนี้จะใช้งานได้หลังจากที่คำนวณการวิเคราะห์แล้วเท่านั้น



- 4 คลิกแถบ *Settings* ในตารางตัวอย่างเพื่อแก้ไขการตั้งค่าการวิเคราะห์:

- ▶ **Temperature Range (ช่วงอุณหภูมิ):** Auto Temperature Range เป็นตัวเลือกช่วงอุณหภูมิอัตโนมัติถูกเลือกไว้ตามค่าเริ่มต้น
 ในกรณีนี้ ซอฟต์แวร์จะตั้งค่าช่วงอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ แม้ว่าค่าแบบอัตโนมัติ แต่ยังสามารถตั้งค่าช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการคำนวณ Genotype แบบ manual ได้ด้วยการลากแถบเลื่อน อุณหภูมิต่ำสุด และ อุณหภูมิสูงสุด หรือแก้ไขกล่องข้อความ
 - ▶ *Minimum Temperature:* ตั้งอุณหภูมิที่จะเริ่มการวิเคราะห์ melting analysis.
 - ▶ *Maximum Temperature:* ตั้งอุณหภูมิที่การวิเคราะห์ melting analysis จะสิ้นสุดลง
- ▶ **Thresholds:** สามารถปรับ Score Threshold และ Resolution Threshold เพื่อเป็นการปรับผลของ genotyping
 ตัวอย่างเช่น สามารถเพิ่ม Score Threshold เพื่อต้องการให้ตัวอย่างตรงกับ Genotype standard มากขึ้น ก่อนที่จะทำ classified ให้ได้เป็น genotype นั้นๆ ทั้ง Score Threshold และ Resolution Threshold มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 โดยตัวเลขที่มากขึ้นแสดงถึงคะแนนหรือความละเอียดที่ต่ำกว่า นั่นคือ ถ้าคะแนนและความละเอียดของเส้นโค้งทั้งคู่เท่ากับ 1 แสดงว่าเส้นโค้งนั้นเหมือนกันกับ group's standard และแตกต่างอย่างมากกับ group's standard อื่นๆ ทั้งหมด ตัวอย่างที่มีคะแนนหรือค่าความละเอียดต่ำกว่าเกณฑ์ที่เกี่ยวข้องจะถูกจัดประเภทเป็น genotype ที่ "เป็น" Unknown"
 - ▶ สามารถใช้แถบเลื่อนหรือแก้ไขในกล่องข้อความเพื่อ ลดหรือเพิ่ม ค่าความเข้มงวด
- ▶ **Sensitivity: (ความไวของการทดสอบ):** พังค์ชันความไวของการทดสอบช่วยกำหนดค่าความไวของการทดสอบของ Melting peak ที่จัดกลุ่มเป็นกลุ่มจีโนไทป์ต่างๆ
 - ▶ *Normal* (ปกติ) เป็นการตั้งค่าเริ่มต้น : จะสามารถสร้างกลุ่มจีโนไทป์ได้สูงสุดหกกลุ่ม สามารถเลือก High หากต้องการตั้งค่าการแยกกลุ่ม Genotype ให้มากขึ้น
 - ▶ *High* (สูง) : จะสร้างกลุ่มจีโนไทป์ได้สูงสุดเก้ากลุ่ม
- ▶ ใช้ปุ่ม *Reset* หากต้องการให้ทุกค่าในช่องกลับสู่ค่าเริ่มต้น

- 5 บนแถบ *Results* ของตารางตัวอย่าง *Sample Table* สามารถกำหนดตัวอย่างที่ต้องการให้รวมเข้าหรือแยกออกจากการคำนวณได้

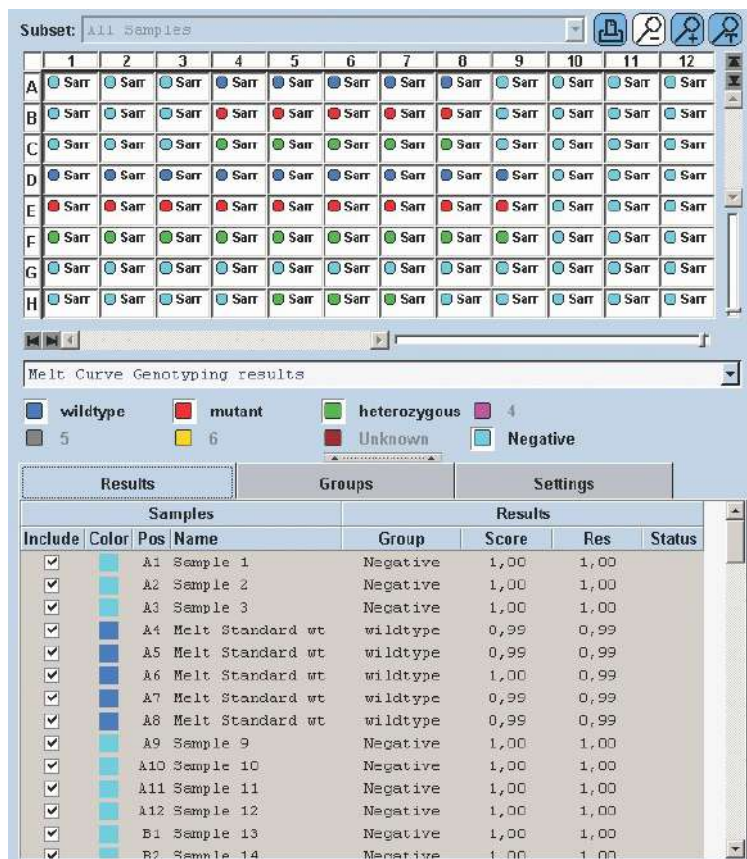


6 คลิกที่ปุ่ม Calculate

โปรแกรมจะคำนวณกลุ่มจีโนไทป์และกำหนดสีและชื่อให้กับแต่ละกลุ่ม

7 เมื่อการคำนวณเสร็จสิ้น ผลลัพธ์จะแสดงในรูปแบบ MWP และตาราง Results

ผลลัพธ์ของการวิเคราะห์ Melting Genotyping ประกอบไปด้วย Sample selector พร้อม Legend Property Selector และ ปุ่ม ตัวเลือกคุณสมบัติคำอธิบาย Legend Property คุณสมบัติคำอธิบายและตารางแสดงผลโดย Legend Property Selector แสดงสีตามผล ตามประเภทตัวเลือกคุณสมบัติคำอธิบาย ตัวอย่าง ตามการตั้งค่าตัวอย่าง หรือตามกลุ่มที่ทำการ Legend Property คุณสมบัติคำอธิบายแสดงตัวอย่าง ในรูปภาพ MWP ตารางแสดงผล และในแผนภูมิ หากคุณเลือกการแสดงผลของ Melt Curve Genotyping ภาพ MWP และตารางผลลัพธ์จะแสดงดังนี้



► Group (กลุ่ม) : ชื่อของกลุ่มจีโนไทป์ที่กำหนดตัวอย่าง

► ชื่อของกลุ่มจีโนไทป์ โปรแกรมจะตั้งชื่อโดยอัตโนมัติโดยจะตั้งชื่อด้วยหมายเลขตามลำดับ 1, 2 เป็นต้น ในขณะที่กลุ่มจีโนไทป์ในการทดสอบ และ standard จะถูกตั้งชื่อโดยใช้ชื่อจีโนไทป์จาก Sample editor หรือตาม standard จากภายนอก

► Score (คะแนน) : คะแนนของกลุ่มตัวอย่าง 0-1 พร้อมทศนิยม 2 ตำแหน่ง

► Res (ความละเอียด) : ความละเอียดของตัวอย่าง 0-1 พร้อมทศนิยม 2 ตำแหน่ง

► Status (สถานะ): สถานะสำหรับแก้ไขการอ่านค่าแบบ manual





ปุ่ม Legend Property แสดง

- ▶ 9 กลุ่มจีโนไทป์ ถ้าคุณเลือก high-sensitivity หรือ 6 กลุ่มจีโนไทป์ ถ้าคุณเลือก normal sensitivity
- ▶ กลุ่มจีโนไทป์ชนิดลบและที่ไม่ทราบ

แต่ละช่องจะมีเครื่องหมาย มีป้ายกำกับที่แสดงสีที่กำหนดให้กับแต่ละกลุ่ม และป้ายข้อความสำหรับจีโนไทป์หรือชื่อกลุ่ม

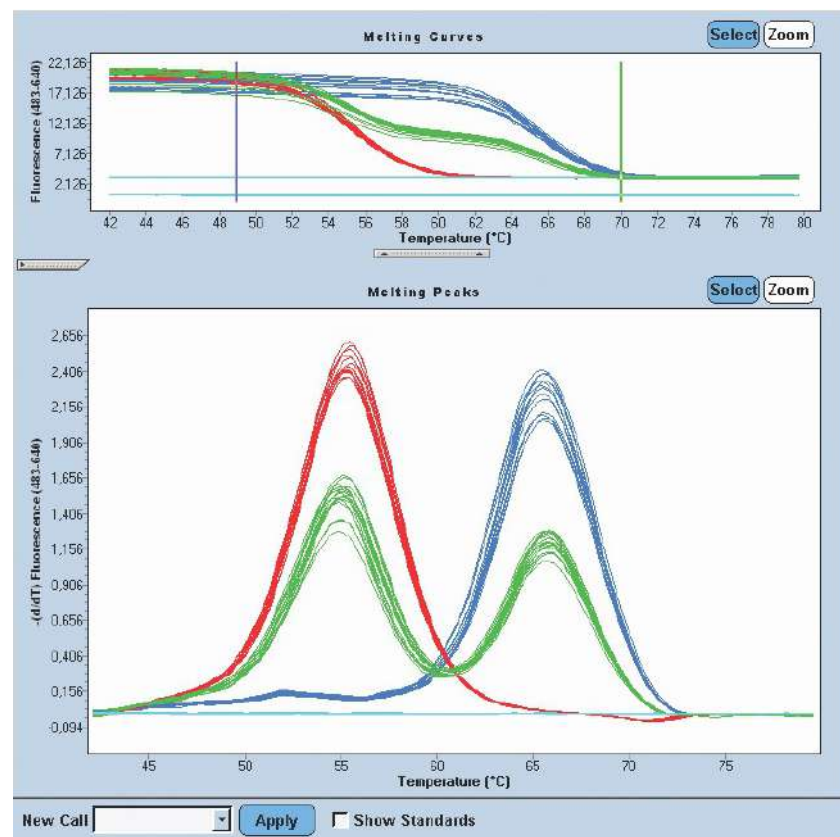


ช่องใส่เครื่องหมายจะถูกแสดงแม้ว่าจะไม่มีกลุ่มในข้อมูล

การคลิกช่องทำเครื่องหมายจะทำให้กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มนั้นที่ถูกเลือกใน Sample Selector และจะถูกเน้นด้วยสีที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มนั้น



การวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping แสดงแผนภูมิต่อไปนี้:



- ▶ Upper chart (แผนภูมิด้านบน): Melting Curves เป็นแผนภูมิค่าฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างเทียบกับอุณหภูมิ แผนภูมิแสดงจะแสดงเส้นกราฟของค่าฟลูออเรสเซนซ์ โต้ลงสำหรับตัวอย่างที่มีการ Melting
- แผนภูมิ Melting Curves จะแสดงเส้นแนวตั้งที่ระบุจุดเริ่มต้น (แถบสีเขียว) และจุดสิ้นสุด (แถบสีน้ำเงิน) ของช่วงอุณหภูมิที่เลือกสามารถเปลี่ยนอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดได้โดยการลากแถบ ซึ่งเทียบเท่ากับการเปลี่ยนค่าช่วงอุณหภูมิบนแถบ Setting



หากเลือก “Auto Temperature Range” แต่มีการลากแถบอุณหภูมิ ตัวเลือกนั้นจะไม่ถูกเลือกโดยอัตโนมัติ



- ▶ Lower chart (แผนภูมิด้านล่าง): แผนภูมิด้านล่างจะแสดง Melting Peaks โดยค่า melting temperature ของแต่ละตัวอย่างจะแสดงเป็นจุดสูงสุด



หากแผนภูมิด้านล่างแสดง Fluorescence History สามารถเลือกดูโปรแกรมอื่นได้ (amplification หรือ melt) และช่องกรองแสงใดก็ได้ รายละเอียดเพิ่มเติมสามารถดูได้ที่ส่วน [Using the Analysis Window](#)





เมื่อทำเครื่องหมายที่ช่อง Show Standards จะสามารถแสดงเส้นโค้งของ melting standards ในแผนภูมิ

6

การเปลี่ยนชื่อกลุ่มจีโนไทป์:

ในแถบ Groups ของตารางตัวอย่าง สามารถเปลี่ยนชื่อที่เกี่ยวข้องกับแต่ละจีโนไทป์ ได้



สามารถแก้ไขชื่อกลุ่มได้เฉพาะสำหรับกลุ่มที่สร้างโดยโหมดการวิเคราะห์แบบ Auto Group แต่ ที่เป็น Standard ทั้งแบบ internal และ external ไม่สามารถแก้ไขได้ และไม่สามารถเปลี่ยนชื่อของ Negative หรือ Unknown ได้



บนแถบ Groups ให้คลิกสองครั้งที่เพื่อใส่ชื่อกลุ่ม

Results	Groups	Settings
1	2	3
4	5	6
Unknown	Negative	



พิมพ์ชื่อใหม่ลงในช่อง ซึ่งจะถูกลำนำไปใช้กับตัวอย่างและตารางแสดงผล

Results	Groups	Settings
mutant	heterozygote	wildtype
4	5	6
Unknown	Negative	

D

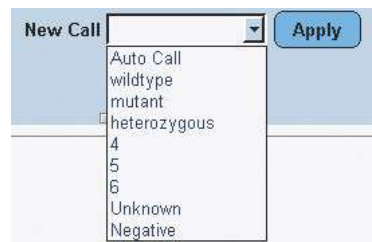
การเปลี่ยนการแปลผลจีโนไทป์:

การแปลผลจีโนไทป์แบบ Manual สามารถใช้ทางเลือก *New Call*

- 1 เลือกตัวอย่างที่ต้องการแปลผลจีโนไทป์ใหม่

รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ในส่วน *Working with Samples in the Analysis*

- 2 จากเมนูรายการ *New Call* ได้แผนภูมิ ให้เลือกชื่อกลุ่มจีโนไทป์ หรือกลุ่มที่เป็น
Unknown or Negative



- 3 คลิกที่ปุ่ม *Apply*

- 4 เมื่อเลือกกลุ่มจีโนไทป์ ในช่อง *New Call* และ คลิก *Apply* แล้ว ตัวอย่างทั้งหมดที่แสดงใน
แผนภูมิจะเป็นการแปลผลใหม่ ให้กดเลือก *Auto Call* จากเมนูรายการ *New Call* และคลิก
Apply จะสามารถทำให้การอ่านผลกลับมาเป็นแบบอัตโนมัติได้

การแปลผลที่สร้างขึ้นใหม่จะถูกทำเครื่องหมายในตารางแสดงผลและในรายงานโดยจะมี
สีพื้นหลังตรงสถานะคอลัมน์และตารางแสดงผลพร้อมข้อความ **-Manually edited*

ไม่สามารถทำการเปลี่ยนการแปลผล positive และ negative control ได้หากมีการใช้
Standard ที่ใช้ในการทดสอบจะไม่สามารถแก้ไขได้ หากต้องการแปลผล Standard ที่
ใช้ในการทดสอบ และ control ใหม่(ตัวควบคุม) โปรแกรมจะเตือนว่าไม่สามารถ
เปลี่ยนแปลงได้ และจะถามว่าต้องการดำเนินการต่อหรือไม่ หากเลือกดำเนินการต่อ
โปรแกรมจะเปลี่ยนตัวอย่างทั้งหมดให้เข้ากับ Standard ที่ใช้ในการทดสอบ และ
control () หากเลือกที่จะไม่ดำเนินการต่อก็จะถูกยกเลิก

D

การบันทึก Melting standard ภายนอกการทดสอบ:

Melting standard ประกอบด้วยข้อมูล melting curve ของ unknown Genotype สามารถสร้าง external melting standard จากการคำนวณวิเคราะห์ฮีโนไทป์ ซึ่งมี melting standard ภายนอกการทดสอบหรือสร้างโดยใช้โหมดการวิเคราะห์แบบ Auto Group



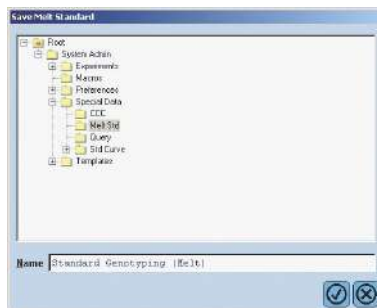
หากต้องการบันทึก External melting standard ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่าง melting standard ใน Sample editor เมื่อบันทึก External melting standard จากการวิเคราะห์แบบ Auto Group ค่ามัธยฐาน (median) ของแต่ละกลุ่มจะถูกบันทึกเป็น melting standard ตัวอย่างที่เลือกเป็น melting standard เฉพาะกลุ่มสามารถเห็นได้โดยเลือกที่ Show Standards



คลิกปุ่ม Standards multi-select แล้วเลือก Save as ext



ในหน้าต่าง Save Melt Standard ให้เลือกโฟลเดอร์เพื่อบันทึก Melt Standard โดยจะบันทึกลงในโฟลเดอร์ Melt Std เป็นค่าเริ่มต้น และในโฟลเดอร์ย่อย Special Data directory



6.3.4 ฟังก์ชันเพิ่มเติม

แม่แบบการวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping

แม่แบบการวิเคราะห์จีโนไทป์ ประกอบด้วยการตั้งค่าต่อไปนี้:

- ▶ การเลือกช่องกรองแสง (Filter combination)
- ▶ การตั้งค่า Color Compensation (ปิด หรือใช้ปัจจุบัน)
- ▶ การตั้งกลุ่มย่อยและโปรแกรม



กลุ่มย่อย และโปรแกรม เมื่อใช้แม่แบบการวิเคราะห์จีโนไทป์ โปรแกรมจะตรวจสอบว่าการทดสอบปัจจุบันประกอบด้วย กลุ่มย่อย ที่มีชื่อเดียวกันและตำแหน่งหลุมเดียวกันกับกลุ่มย่อยในแม่แบบหรือไม่

- ▶ หากการทดสอบปัจจุบัน ไม่มีกลุ่มย่อย ที่มีชื่อเดียวกัน โปรแกรมจะสร้าง กลุ่มย่อย นั้นขึ้นมา
- ▶ หากการทดสอบปัจจุบันมีกลุ่มย่อยที่มีชื่อเดียวกัน แต่ไม่ใช่ตำแหน่งหลุมเดียวกันกับกลุ่มย่อยในแม่แบบ แม่แบบนั้นจะไม่สามารถใช้ได้
- ▶ ชื่อการวิเคราะห์
- ▶ มาตรฐานของอุณหภูมิ Melt (auto group, in-run, or external)
- ▶ บันทึกการวิเคราะห์
- ▶ อุณหภูมิต่ำสุดสูงสุด/ และปรับการตั้งค่าอุณหภูมิให้เหมาะสม, เกณฑ์คะแนน, เกณฑ์ความละเอียด, และความไวของการทดสอบ

หลักการของตัวควบคุม

โปรแกรม LightCycler® 480 Genotyping ใช้แนวคิดของตัวควบคุมผลลัพธ์เพื่อประเมินว่าการวิเคราะห์ผ่านหรือไม่ผ่าน แนวคิดของตัวควบคุมผลลัพธ์จะใช้เฉพาะเมื่อใช้ internal หรือ external melting standards ไม่ได้ใช้กับโหมดการวิเคราะห์แบบ Auto Group

- ▶ Positive Controls (ตัวควบคุมเชิงบวก)
 - ▶ ถ้า Positive Controls (ตัวควบคุมเชิงบวก) แปลผลเป็นค่าบวกและตรงกับจีโนไทป์ที่กำหนด แสดงว่าตัวควบคุมสำเร็จ
 - ▶ หาก Positive Control แปลผลเป็นบวก แต่ไม่ตรงกับจีโนไทป์ที่กำหนด แสดงว่าตัวควบคุมล้มเหลว
 - ▶ หากตัวควบคุมเชิงบวก ถูกแปลผลเป็นค่าลบ แสดงว่าตัวควบคุมล้มเหลว
 - ▶ หากตัวควบคุมเชิงบวกล้มเหลว โปรแกรมจะไม่รายงานจีโนไทป์ และจะแจ้งให้ทราบว่าตัวควบคุมเชิงบวกล้มเหลว
- ▶ Negative Controls (ตัวควบคุมเชิงลบ)
 - ▶ หากตัวควบคุมเชิงลบ แปลผลเป็นลบ แสดงว่าตัวควบคุมสำเร็จ
 - ▶ หากตัวควบคุมเชิงลบ ไม่แสดงผลเป็นลบ แสดงว่าตัวควบคุมนั้นล้มเหลว
 - ▶ หากตัวควบคุมนั้นล้มเหลว โปรแกรมจะไม่รายงานจีโนไทป์ และจะแจ้งให้ทราบว่าตัวควบคุมเชิงลบล้มเหลว

D

- ▶ Melting Standards (มาตรฐานของอุณหภูมิ Melt)
- ▶ หากค่า Melting Standards ได้ไม่ได้รับการแปลผลว่าเป็นค่าบวก โปรแกรมจะไม่รายงานจีโนไทป์
- ▶ หาก Melting Standards สำหรับจีโนไทป์เดียวกันที่ไม่ถูกจัดกลุ่มเข้าด้วยกันตามฟังก์ชันการจัดกลุ่มแบบอัตโนมัติด้วยพารามิเตอร์ที่ผู้ใช้กำหนด โปรแกรมจะไม่รายงานจีโนไทป์
- ▶ หาก Melting Standards ของกลุ่มที่แตกต่างกัน แต่ถูกเรียกใช้ในกลุ่มเดียวกันโดยฟังก์ชันจัดกลุ่มแบบอัตโนมัติด้วยพารามิเตอร์ที่ผู้ใช้กำหนด โปรแกรมจะไม่รายงานจีโนไทป์
- ▶ หาก Melting Standard สัมเหลว โปรแกรมจะแจ้งให้ทราบว่า Melting Standard สัมเหลว

7 Gene Scanning

7.1 การวิเคราะห์ Gene Scanning ด้วยระบบ LightCycler® 480

เทคนิค Gene Scanning หรือ mutation scanning เป็นเทคนิคการตรวจจับการแปรผัน ในผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาจากชิ้นเป้าหมาย "Gene Scanning" อ้างอิงจาก "High Resolution Melting" ซึ่งเป็นวิธีการหลังจากจบขั้นตอน Polymerase Chain Reaction ช่วยให้นักวิจัยทางจีโนมวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์การผันแปรทางพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ หรือ เป็นทางเลือกในการจะหาลำดับสารพันธุกรรม High Resolution Melting มีความจำเพาะเจาะจงสูง ความไว และความแม่นยำที่สูงเป็นอย่างมากและต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ เช่น gel-based ตัวอย่างเช่น diploid genome จากบริเวณที่เหมือนกันในโครโมโซมของมารดาและบิดา เมื่อถูกเพิ่มปริมาณโดยวิธีการ PCR จะสามารถวิเคราะห์หาความเข้าคู่กันได้อย่างสมบูรณ์ เรียกว่า homoduplexes และการที่ไม่เข้าคู่กันจะเรียกว่า heteroduplexes

ในการทดลอง การทำ Gene Scanning ด้วย LightCycler® 480 System DNA ของตัวอย่างจะถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ LightCycler® 480 ResoLight Dye หลังจากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค real-time PCR จะทำ High Resolution Melting โดยใช้เครื่อง LightCycler® เครื่องเดียวกันและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LightCycler® 480 Gene Scanning เพื่อระบุการแปรผันของลำดับสารพันธุกรรม ดังนั้นกระบวนการคัดกรองการกลายพันธุ์ทั้งหมดสามารถทำได้ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 จนถึงการวิเคราะห์หลังขั้นการทำ PCR โดยไม่จำเป็นต้องมีอุปกรณ์แยกต่างหาก



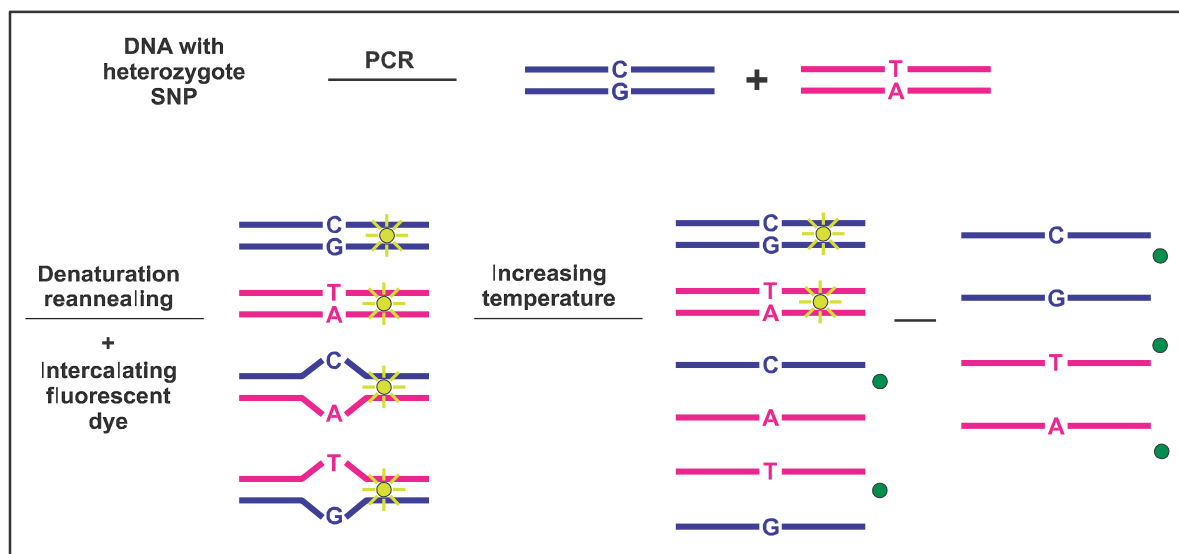
7.1.1 High Resolution Melting

เทคนิคสำคัญใน High Resolution Melting คือเทคนิคการทำให้ DNA แยกสายให้ได้เป็นอย่างดี หรือ melting ก่อนหน้านี้นี้ได้รับการยอมรับอย่างดี เช่น การหา T_m ของ DNA Hybrid เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ melting โดยเทคนิคนี้จะเพิ่มอุณหภูมิของตัวอย่างดีเอ็นเอ และบันทึกรายละเอียดการแยกสายออกจากกันของ DNA แบบสายคู่ dsDNA ไปเป็นแบบสายเดี่ยว ssDNA

ก่อนที่จะดำเนินการวิเคราะห์ High Resolution Melting สารพันธุกรรมลำดับเป้าหมายจะต้องมีจำนวนมาก ดังนั้นต้องมีการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมเป้าหมายโดยการทำปฏิกิริยา PCR ก่อนการทำ High Resolution Melting

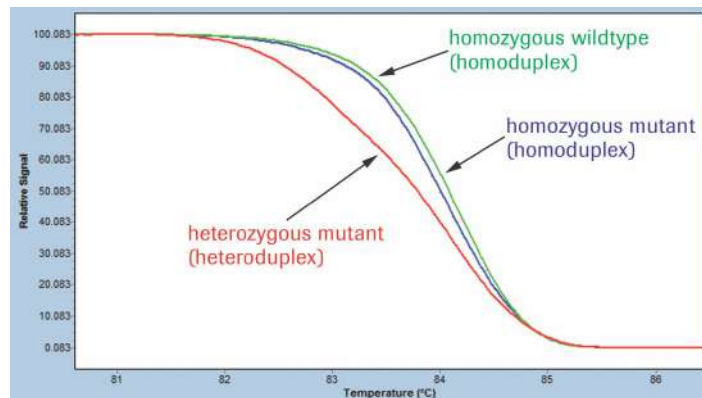
ทั้งสองขั้นตอนจะดำเนินการย้อมสีที่มีการเรืองแสงที่โดยจะจับกับ dsDNA เท่านั้น สีย้อมจะไม่ทำปฏิกิริยากับ ssDNA แต่จะเรืองแสงเมื่อจับกับ dsDNA การเรืองแสงนี้สามารถใช้เพื่อวัดความเข้มข้นของ DNA ในระหว่าง PCR และสามารถวัดการแยกตัวของ DNA ที่เกิดจากการเพิ่มความร้อนในระหว่างการทำ High Resolution Melting

สำหรับการตรวจจับการแปรผันของลำดับสารพันธุกรรม จะมีการวิเคราะห์ความแตกต่าง melting curve ของ amplicon โดย Heterozygote DNA จาก heteroduplexes จะมีการแยกออกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิต่ำกว่าและมีรูปร่างของ melting curve แตกต่างจาก DNA แบบ homozygote ซึ่งขึ้นอยู่กับลำดับของแต่ละสารพันธุกรรม homozygote ที่แตกต่างกันส่วนใหญ่จะให้เส้น melting curve ที่แตกต่างกันเช่นกัน



ในการทำ melting ในขั้นตอนแรกการสัณฐานฟลูออเรสเซนซ์ สูงเนื่องจากตัวอย่างเป็น dsDNA แต่สัญญาณ fluorescence จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและ DNA จะแยกสายออกเป็นสายเดี่ยว สังเกตว่า melting นั้นเป็นลักษณะเฉพาะของตัวอย่าง DNA

การกลายพันธุ์ใน PCR products ตรวจพบได้จากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้น melting curve เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างกลายพันธุ์กับตัวอย่างอ้างอิง wild type การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมองเห็นได้ ด้านล่างคือตัวอย่างการทดลองโดยใช้เครื่อง LightCycler® 480 และ LightCycler® 480 ResoLight Dye ที่ระบุตำแหน่งของ single nucleotide polymorphism หรือ SNP



รูปนี้แสดงให้เห็นว่าการทดลอง High Resolution Melting สามารถตรวจหาอัลลีลที่การแปรผันทั้งแบบ homozygous และ heterozygous ในตัวอย่างได้อย่างไร สามารถตรวจจับ homozygous variants ได้เนื่องจาก เส้นโค้งของ melting จะถูกแทนที่ตามแกนอุณหภูมิ แกน X ที่สัมพันธ์กับตัวอย่าง wild type และที่เป็น heterozygous variants จะมีเส้น โค้งของ melting ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนจากเส้น โค้งของ wild type



ในตัวอย่าง heterozygous รูปร่างของกราฟ melting จะเปลี่ยนไปเนื่องจากกราฟ melting ที่สังเกตได้นั้นเป็นส่วนประกอบของส่วนประกอบของทั้ง heteroduplex และ homoduplex โดยที่ heteroduplex ที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง ระหว่าง wildtype และ variant มีความเสถียรน้อยกว่า homoduplex ที่เกิดขึ้น และด้วยเหตุนี้ จึงแยกตัวออกจากกันได้ง่ายกว่า

7.1.2 ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำ Gene Scanning โดยใช้เครื่อง LightCycler® 480 System

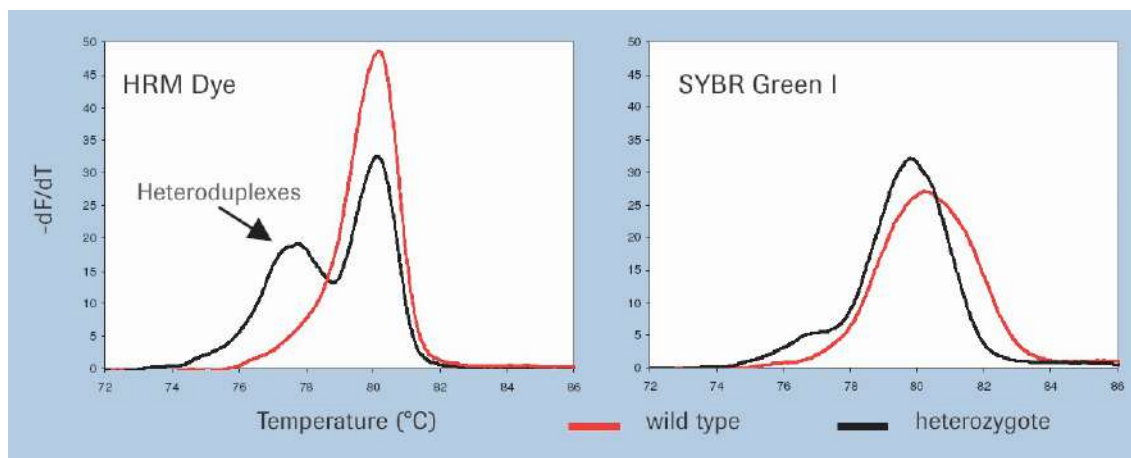
ในการทำ gene scanning เพื่อให้ได้การวิเคราะห์แบบ High Resolution Melting ต้ององค์ประกอบ 3 อย่าง คือ สีย้อมที่จับกับ DNA DNA-binding dye โปรแกรมการวิเคราะห์ และเครื่อง real-time PCR LightCycler® 480 ทั้งนี้ด้านล่างจะเป็นการอธิบายการทำงานร่วมกันพร้อมกับการใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ ชนิด LightCycler® 480 System Gene Scanning

สีย้อมชนิด LightCycler® 480 ResoLight

การวิเคราะห์แบบ High Resolution Melting นั้นใช้สีย้อมจับ dsDNA ที่ชื่อว่า LightCycler® 480 ResoLight Dye เป็นสีย้อมแบบใหม่ สีย้อมเฉพาะนี้สามารถตรวจจับ heteroduplexes ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำ PCR เช่น ถ้าตัวอย่างที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์เฉพาะโดยหลักการจับของสีชนิดนี้ไม่เหมือนกับสีย้อมชนิดอื่น ๆ เหมือนที่ใช้ใน real-time PCR เช่น SYBR Green I หรือ ethidium bromide

LightCycler® 480 ResoLight Dye ไม่เป็นพิษต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการ amplification ดังนั้นสีย้อมที่มีความเข้มข้นสูงจะไม่ส่งผลต่อปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้นสูงของสีเหล่านี้ทำให้จับกับตัวอย่าง dsDNA อัดตัวอย่างสมบูรณ์

ในการทดลอง melting ตัวอย่าง dsDNA ที่ย้อมด้วยสีที่มีความเข้มข้นสูง หากมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในการ melting จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าสัญญาณ fluorescence ของสี LightCycler® 480 ResoLight Dye ด้วยเช่นกัน



จากรายงานของ Wittwer et al (2003)¹⁾ เหตุการณ์นี้เกิดจากการที่สีไม่สามารถกระจายตัวได้เองจากส่วนที่ตีเอ็นเอถูกทำลายไปแล้วไปสู่ส่วนที่ยังไม่ถูกทำลาย และยิ่งไปกว่านั้นสีไม่สามารถแสดงคุณสมบัติได้หากตีเอ็นเอมีการคลายเกลียวที่อุณหภูมิสูงกว่า

ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และการหลอมละลายของ DNA ที่มีความเที่ยงตรงสูง จะเพิ่มความละเอียดของโปรไฟล์การ melting มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

¹⁾ Carl T. Wittwer, Gudrun H. Reed, Cameron N. Gundry, Joshua G. Vandersteen, and Robert J. Pryor (2003). High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. Clinical Chemistry 49, 853-860

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโหมด LightCycler® 480 Gene Scanning

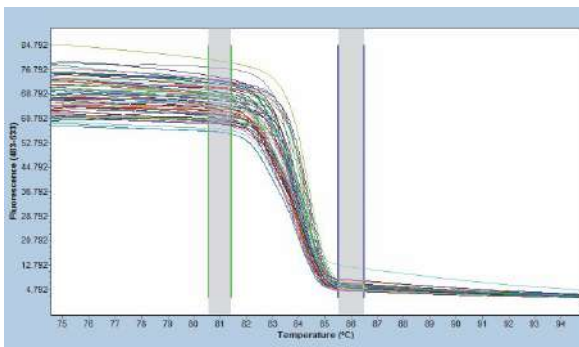
การใช้ LightCycler® 480 Gene Scanning ในการวิเคราะห์เส้นกราฟ High Resolution Melting เพื่อระบุการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้นกราฟ ซึ่งบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับสารพันธุกรรมใน PCR product



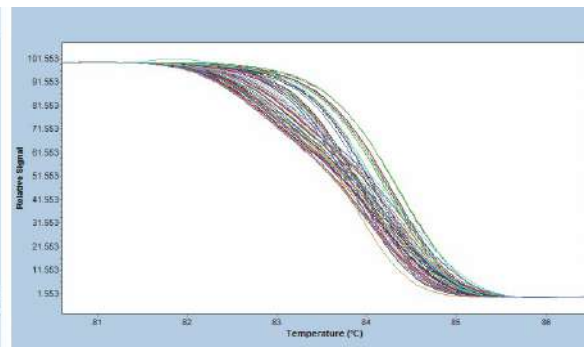
ความถูกต้องในการแปลผลการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับขอบเขตของอัลกอริทึมของโปรแกรม ซึ่งโปรแกรม LightCycler® 480 Gene Scanning Module มีการพัฒนามาเพื่อการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ High Resolution Melting curves

ขั้นตอนการทำ LightCycler® 480 Gene Scanning ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนพื้นฐาน

1. **การตรวจเชิงลบ** : LightCycler® 480 Gene Scanning ใช้ตัวกรองเชิงลบโดยอัตโนมัติเพื่อตรวจจับตัวอย่างเชิงลบ เช่น ตัวอย่างที่มีสัญญาณการเรืองแสงต่ำซึ่งไม่มีเส้นโค้งการ melting ที่เด่นชัด โปรแกรมยังช่วยให้สามารถระบุตัวอย่างเชิงลบ โดยการระบุโดยผู้ใช้งานเองได้ด้วยหากต้องการ
2. **การทำให้เป็นมาตรฐาน (Normalizing)** เส้นโค้งขั้นตอนที่สองในการวิเคราะห์คือการทำให้ข้อมูล raw melting curve เป็นปกติโดยการตั้งค่าสัญญาณก่อนการ melt สัญญาณ fluorescence เริ่มต้นและหลังการ melt สัญญาณ fluorescence สุดท้ายของตัวอย่างทั้งหมดให้เป็นค่าที่สม่ำเสมอ สัญญาณก่อนการ melt ถูกตั้งค่าอย่างสม่ำเสมอเป็นค่าสัมพัทธ์ 100% ในขณะที่สัญญาณหลังการ melt ถูกตั้งค่าเป็นค่าสัมพัทธ์ 0% การทำให้เป็นมาตรฐาน (Normalizing) สัญญาณ fluorescence เริ่มต้นและสุดท้ายในตัวอย่างทั้งหมดจะช่วยแปลผลและวิเคราะห์ผลการทดสอบ ในบางกรณี ตัวอย่างที่มี SNP แบบ homozygous อาจแตกต่างจากประเภท wild type โดยการแทนที่ของเส้นกราฟการ melting ซึ่งง่ายต่อการมองเห็นในการทำ normalized ข้อมูล



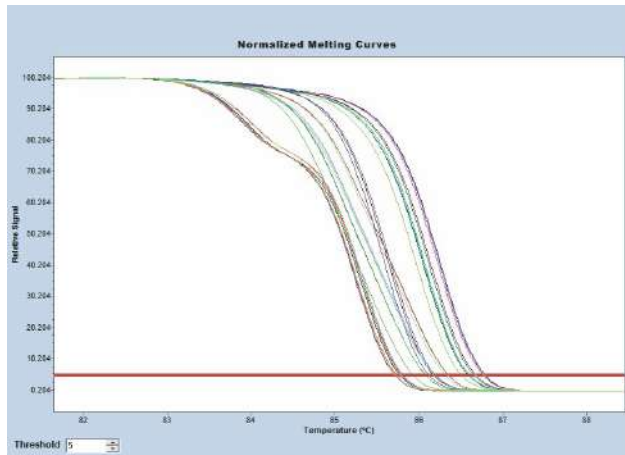
unnormalized melting curves



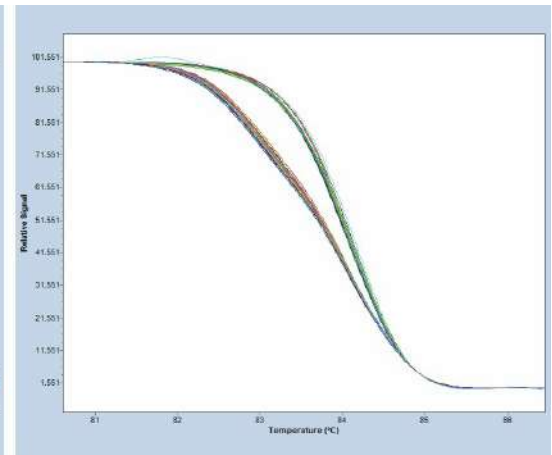
normalized melting curves

D

3. การเปลี่ยนอุณหภูมิ (Temperature shifting) ขั้นตอนต่อไปคือการเปลี่ยนแกนอุณหภูมิของเส้นกราฟ normalized melting curves ที่ปรับให้เป็นมาตรฐาน ณ จุดที่ DNA ที่มีเกลียวคู่ทั้งหมดถูกทำให้เสียธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ สำหรับสิ่งนี้ ซอฟต์แวร์จะใช้ Temp Shift Threshold เริ่มต้นที่ 5% กับข้อมูลทั้งหมดโดยอัตโนมัติ หากต้องการสามารถตั้งค่าเกณฑ์เป็นค่าอื่นได้ด้วยตนเอง ตัวอย่างที่มี SNP แบบ heterozygous สามารถแยกความแตกต่างจากประเภทของ wild type ได้อย่างง่ายดายด้วยรูปร่างที่แตกต่างกันของเส้นกราฟ melting curves

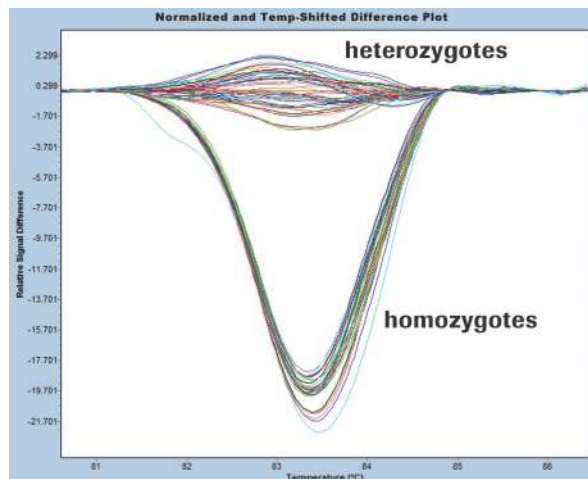


normalized melting curves



normalized, temp-shifted melting curves

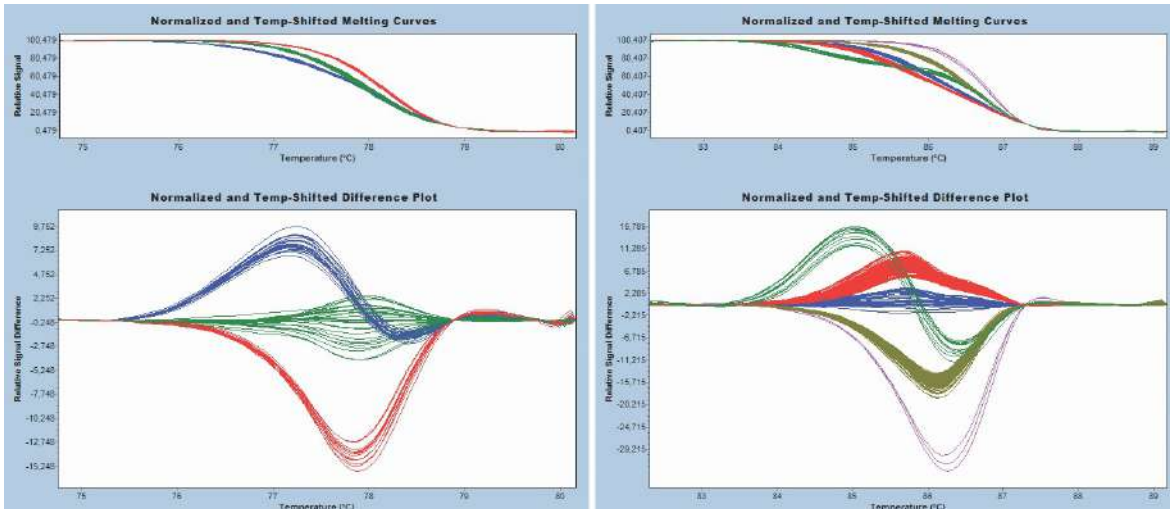
4. แผนภาพความแตกต่าง (Difference Plot): ขั้นตอนสุดท้ายคือการวิเคราะห์ความแตกต่างเพิ่มเติมในรูปร่างเส้นกราฟ melting curve โดยการแยกออกจากเส้นโค้งอ้างอิง base curve จึงสร้างแผนภาพความแตกต่างซึ่งช่วยจัดกลุ่มตัวอย่างโดยอัตโนมัติเป็นกลุ่มที่มีลักษณะของกราฟ melting curves ที่คล้ายกัน เช่น ที่มีจีโนไทป์เดียวกัน



รูปแบบการพล็อตกราฟของจีโนไทป์ homozygotes และ heterozygotes ขึ้นอยู่กับเส้นฐานอ้างอิงที่เลือกใช้ เช่น จากภาพด้านบน ตัวอย่างชนิด heterozygote ถูกเลือกเป็นเส้นอ้างอิง ทำให้ตัวอย่างชนิด homozygotes จะอยู่ด้านล่าง เนื่องจากอุณหภูมิการคลายเกลียวของ heterozygotes จะต่ำกว่าของ homozygotes แต่หากเลือก homozygote เป็นเส้นฐานอ้างอิง ตัวอย่างชนิด heterozygotes จะถูกพล็อตไปด้านบน

ตัวอย่างต่อไปนี้แสดงให้เห็นถึงการทำ gene scanning:

- ▶ สำหรับ single-nucleotide polymorphism (SNP) G→T ในยีน LPLH3 (163 bp amplicon) ส่งผลให้มีกลุ่มตัวแปรหลัก 3 กลุ่ม
- ▶ สำหรับการแปรผันของลำดับสารพันธุกรรมในยีน MBL2 (219 bp amplicon) ส่งผลให้มีกลุ่มตัวแปรหลัก 4 กลุ่มที่สอดคล้องกับ haplotypes ที่พบบ่อยที่สุด 4 กลุ่ม ที่อธิบายไว้สำหรับยีนนี้ และ 3 ตัวอย่างของตัวแปรทางพันธุกรรมเพิ่มเติม



เครื่อง LightCycler® 480

การวิเคราะห์ High Resolution Melting ของสารพันธุกรรม ต้องการเครื่องมือวิเคราะห์ที่สามารถตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของ fluorescence ได้แม้เพียงเล็กน้อย ในการ melting ของสาย DNA ที่เกิดจากอุณหภูมิ ในเครื่อง LightCycler® 480 ภาพของการ melting ของ DNA เช่น การเรืองแสง ถูกจับโดยกล้อง CCD ที่มีความไวสูงและขยายเพื่อเปิดเผยรายละเอียดเล็กน้อยในโปรไฟล์การ melting DNA โปรไฟล์เหล่านี้จะถูกเปรียบเทียบจากตัวอย่างหนึ่งไปอีกตัวอย่างหนึ่งเพื่อกำหนดความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง

ส่วนประกอบออปติกของเครื่อง LightCycler® ทำงานร่วมกับระบบควบคุมอุณหภูมิที่แม่นยำเพื่อสร้าง 480 ผลลัพธ์ที่ทำซ้ำได้สูงจากตัวอย่างหนึ่งไปยังอีกตัวอย่างหนึ่ง เนื่องจากตัวอย่างถูกเก็บไว้ใน multiwell plate, ระบบของ LightCycler® จึงจะสามารถวิเคราะห์ได้ ตัวอย่างจำนวนมากในการรันครั้ง 480

D

7.1.3 ข้อดีของเทคนิคการทำ High Resolution Melting

การวิเคราะห์ Melting curve ขึ้นอยู่กับการวัดทางกายภาพหลังปฏิกิริยา PCR ดังนั้นจึงมีข้อดีหลายประการมากกว่าวิธีการตรวจจับการกลายพันธุ์ที่ได้ข้อมูลจากการ amplification

- ▶ สามารถคัดกรองแอมพลิคอนของการผันแปรของ unknown sequence ด้วยวิธีที่มีความละเอียดสูงเพียงสี่เดือว โดยจำเป็นต้องกำหนดเป้าหมายด้วยไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง
- ▶ สามารถออกแบบการทดสอบจีโนมที่ปรับบนพื้นฐานของข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่น้อยได้
- ▶ โดยทั่วไปแต่ละปฏิกิริยาจะเปิดเผยข้อมูลได้มากขึ้น

นอกจากนี้ เทคนิค homogeneous High Resolution Melting สามารถประมวลผลตัวอย่างได้มากขึ้นอย่างสะดวกกว่าวิธีการแบบดั้งเดิมที่เป็น non-homogeneous (เช่น) dHPLC หรือ SSCP) ซึ่งจำเป็นต้องมีการคัดกรองผลิตภัณฑ์สำหรับลำดับสารพันธุกรรมที่มีการผันแปรหลังจากปฏิกิริยา PCR

การวิเคราะห์ High Resolution Melting ระบุการเปลี่ยนแปลงของ heterozygous single-base ใน PCR product ด้วยความไวและความจำเพาะที่เทียบเคียงหรือเหนือกว่าเทคนิคที่เป็นแบบ non-homogeneous สามารถตรวจจับการผันแปรได้โดยไม่คำนึงถึงตำแหน่งภายในแฟรกเมนต์

การระบุการเปลี่ยนแปลงลำดับสารพันธุกรรม homozygous นั้นยากกว่า วิธีตรวจจับการกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จากลำดับสารพันธุกรรมที่เป็น wild type sequences ในทางตรงกันข้าม High Resolution Melting สามารถตรวจจับการเปลี่ยนแปลงลำดับสารพันธุกรรมแบบ homozygous ในแอมพลิคอนหลายประเภท

7.2 การเตรียมการทดลอง LightCycler® 480 System Gene Scanning

7.2.1 การออกแบบการทดสอบ Gene Scanning

หลักเกณฑ์เหล่านี้จะช่วยให้การออกแบบการทดสอบ Gene Scanning ที่มีประสิทธิภาพ:

- ▶ ความยาวของไพรเมอร์ส่งผลต่อการ melting ของแอมพลิคอนที่มีความยาว 100 bp มากกว่าแอมพลิคอนที่ยาว 500 bp ดังนั้นแอมพลิคอนแบบสั้นจึงมีแนวโน้มที่จะแสดงผลของการเปลี่ยนแปลงลำดับของสารพันธุกรรมเล็กน้อย ดังนั้นจึงแนะนำให้เลือกไพรเมอร์ PCR ที่มีลำดับที่ค่อนข้างสั้น (100-250 bp)



ไพรเมอร์ควรมีอุณหภูมิ *anneal* ที่อุณหภูมิ 60°C

อย่างไรก็ตาม เป็นไปได้ที่จะกำหนดเป้าหมายลำดับของสารพันธุกรรมที่ยาวขึ้น สูงสุด (500 bp) แต่การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ก็มีความละเอียดต่ำกว่า นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว >250 bp มีแนวโน้มที่จะมี melting หลายโดเมนและสร้างเส้น melting curves ที่ซับซ้อน

- ▶ โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structures) อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนั้นจึงอาจเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบลักษณะการพับของทั้งไพรเมอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยโปรแกรมที่สามารถกำหนดโครงสร้างทุติยภูมิได้



ควรตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้ตั้ง folding temperature เท่ากับ annealing temperature ที่จะใช้สำหรับปฏิกิริยา เช่น 60°C

ค่า delta-G ต่ำบ่งชี้ถึงโครงสร้างทุติยภูมิในระดับสูง เส้นที่มีค่า delta-G สูงจะสร้างโครงสร้างทุติยภูมิน้อยกว่า จึงเป็นที่ยอมรับในปฏิกิริยาการ amplification เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด ค่า delta-G ควรสูงกว่า 1-

7.2.2 ตัวอย่างการทดสอบ

เนื่องจากการทดสอบ LightCycler® 480 System Gene Scanning เกี่ยวข้องกับการเปรียบเทียบโปรไฟล์การจากปฏิกิริยา melting PCR จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องลดความผันแปรระหว่างปฏิกิริยาต่อปฏิกิริยาให้เหลือน้อยที่สุด การกำหนดมาตรฐานของ DNA แม่แบบเป็นวิธีหนึ่งในการลดความแปรปรวนให้เหลือน้อยที่สุด ปฏิบัติตามคำแนะนำเหล่านี้เมื่อเตรียมหรือจัดการ DNA แม่แบบ:

- ▶ ใช้ขั้นตอนการสกัด และการจัดเก็บ DNA แม่แบบ ควรระวังการย่อยสลายตัว (degradation) และระวังขั้นตอนที่ทำให้เกิดสารยับยั้งปฏิกิริยาในปริมาณที่มากเกินไป เช่น เอทานอล

- ▶ หากจำเป็นต้องสกัด ให้ใช้ขั้นตอนการสกัดแบบเดียวกันเพื่อเตรียมตัวอย่างทั้งหมดที่จะวิเคราะห์ด้วยการทำ High Resolution Melting เพื่อช่วยลดความแตกต่างที่อาจเกิดจากส่วนประกอบของน้ำยาในบัฟเฟอร์ของขั้นตอนการสกัดที่แตกต่างกัน



สำหรับการสกัดสารพันธุกรรมที่ได้ผลสม่ำเสมอ แนะนำดังนี้:

- ▶ ไม่ว่าจะเป็นเครื่องระบบ MagNA Pure ร่วมกับการใช้น้ำยา MagNA Pure nucleic acid isolation kit (สำหรับการแยกสกัดแบบอัตโนมัติ) หรือ
- ▶ ชุดน้ำยา HighPure nucleic acid isolation kit (สำหรับการสกัดด้วยมือ)

รายละเอียดเพิ่มเติมสามารถดูได้ที่หน้าเว็บไซต์โรช <https://diagnostics.roche.com>

- ▶ ควรละลายตัวอย่าง DNA ทั้งหมดในบัฟเฟอร์เดียวกัน หาปริมาณโดยใช้สเปกโตรโฟโตเมทรี และปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากันด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน เพื่อส่งผลต่อการ melting ของ DNA ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์, Mg²⁺ และเกลืออื่นๆ ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะต้องเหมือนกันมากที่สุดสำหรับตัวอย่างทั้งหมด
- ▶ ใช้ DNA แม่แบบในปริมาณที่เท่ากันในแต่ละปฏิกิริยา ปริมาณที่แนะนำคือ 5 ถึง 30 นาโนกรัมของ DNA แม่แบบในปริมาตรปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ซึ่งควรมีค่า Cp ไม่เกิน 30 รอบ หากมีค่า Cp ที่สูงขึ้นเนื่องจาก DNA แม่แบบลดลงในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะทำให้ผลของการ High Resolution Melting มีความแปรผันเนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
- ▶ หากใช้ genomic DNA ที่เก็บมานาน ควรให้ทำ DNA บริสุทธิ์อีกครั้ง ก่อนที่จะใช้ในการทดลองการทำ Gene Scanning จะช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากการระเหิด ซึ่งมัก (การเปลี่ยนวัสดุแข็งเป็นก๊าซ) ส่งผลต่อการเกิดขึ้นในตัวอย่างดังกล่าว และรวมเอาเกลือเข้มข้นและวัสดุอื่นๆ ที่ amplification และการทำ High Resolution Melting

7.2.3 ไพร์เมอร์ PCR Primers

- ▶ ออกแบบไพร์เมอร์ PCR ที่มี annealing temperatures ประมาณ 60°C และสร้างแอมพลิคอนสั้น 100-250bp สามารถใช้ชุดโปรแกรม เช่น *Primer3*

ใช้ไพร์เมอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย HPLC

- ▶ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดไพร์เมอร์ น้อยกว่า) ไคเมอร์ โดยใช้ความเข้มข้นของไพร์เมอร์ที่ค่อนข้างต่ำ-300 nM) ในปฏิกิริยาการทดลอง
- ▶ ทดลองครั้งแรกกับปริมาณของไพร์เมอร์ และทดลองซ้ำด้วยการเจือจางไพร์เมอร์หลายๆความเข้มข้น เพิ่ม หรือ การลดความเข้มข้นในขั้นตอนละ 0.1 μ M หากได้ผลมีประสิทธิภาพดี อาจลองใช้ไพร์เมอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำลง หากไม่ได้ผลที่ดีควรลองเพิ่มไพร์เมอร์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น
- ▶ ไม่จำเป็นต้องใช้ไพร์เมอร์ที่มี GC สูง เพราะจะไม่ช่วยในงานการทำ High Resolution Melting
- ▶ BLAST ไพร์เมอร์เพื่อให้แน่ใจว่ามีความเฉพาะเจาะจงสำหรับสปีชีส์และยีนเป้าหมาย

7.2.4 หมายเหตุ PCR Reagents

แนะนำให้ใช้เทคนิค Hot-start PCR อย่างยิ่งสำหรับการทำ High Resolution Melting เนื่องจากจะหลีกเลี่ยงการเกิด non-specific amplification ที่จุดเริ่มต้นของปฏิกิริยา

Roche Diagnostics แนะนำ master mix สำหรับ hot start คือ LightCycler® 480 High Resolution Master ประกอบด้วย FastStart Taq DNA Polymerase และ LightCycler® 480 ResoLight Dye ในปฏิกิริยาประกอบด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มี $MgCl_2$ Master สามารถเข้ากันได้กับสารเติมแต่งเช่น DMSO ที่จะช่วย amplification ของลำดับสารพันธุกรรมที่อุดมด้วย GC

FastStart Taq DNA Polymerase เป็น recombinant Taq DNA polymerase ที่มีการดัดแปลงทางเคมี ทนความร้อนได้ จะไม่ทำงานถ้าอุณหภูมิสูงไม่ถึง 75°C เอนไซม์จะทำงานที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น เอนไซม์จะเริ่มทำงานอย่างสมบูรณ์โดยการกำจัด blocking groups ในระหว่างขั้นตอน (pre-incubation) 95°C, 5 นาที ก่อนเริ่มขั้นตอนอื่นๆ

สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 mM มาพร้อมกับ Master ช่วยให้คุณปรับความเข้มข้นของ Mg^{+2} ให้เหมาะสมได้อย่างง่ายดาย การกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้เกิดความจำเพาะและความทนทานของปฏิกิริยา PCR ควรใช้ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบ High Resolution Melting อาจใช้ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 3.5 ถึง 1.5mM ดังนั้นควรใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยาระหว่าง 3.5 และ 1.5mM (ในขั้นตอน 0.5mM) เมื่อทำการทดสอบใหม่ ตรวจสอบความจำเพาะของ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis



จำนวนของ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยาจะส่งผลต่อรูปร่างและค่า T_m ในกราฟของการคลายเกลียว ซึ่งพบว่าในสถานะที่มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่ำ จะแสดงค่าของอุณหภูมิ T_m ค่าเดียว แต่เมื่อในสถานะที่มีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ กลับพบมากกว่าหนึ่งค่า ในตัวอย่างเดียวกัน ดังนั้นจึงควรระวังและระลึกเสมอว่า หากใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ สูง ค่า T_m จะสูงกว่าปกติ



7.2.5 พารามิเตอร์ PCR

ขั้นตอนการ amplification ที่ดีจะส่งผลทำให้การทำ High Resolution Melting จะได้ผลดี LightCycler® 480 ResoLight Dye ซึ่เกาะกับ DNA สายคู่ในปฏิกิริยา การเกิด amplification product ที่เฉพาะเจาะจง amplification product ไม่เฉพาะเจาะจง และ ไพร์เมอร์-ไดเมอร์ ล้วนจับสื้อม่เท่ากัน ดังนั้นทั้งหมดนี้จึงส่งผลต่อโปรไฟล์ของ fluorescence และการ melting โดยรวมทั้งหมด

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมให้กำหนดในแต่ละขั้นตอนให้ดีที่สุด หากใช้ LightCycler® 480 High Resolution Master เพื่อสร้างการทดสอบ Gene Scanning สามารถใช้พารามิเตอร์ต่อไปนี้ในการทดลองเริ่มต้นได้

Setup				
Detection Format	SYBR Green I / HRM Dye			
Programs				
Program Name	Cycles			Analysis Mode
Pre-Denaturation	1			None
Amplification	45 ¹⁾			Quantification
High Resolution Melting	1			Melting Curves ⁶⁾
Cooling	1			None
Temperature Targets				
Target [°C]	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s) (96-well / 384-well)	Acquisitions (per °C)
Pre-Incubation				
95	None	00:10:00	4.4 / 4.8	-
Amplification				
95	None	00:00:10	4.4 / 4.8	-
primer dependent ²⁾	None	00:00:10	2.2 / 2.5	-
72	Single	00:00:10 - 00:00:20 ³⁾	4.4 / 4.8	
High Resolution Melting				
95	None	00:01:00	4.4 / 4.8	
40 ⁴⁾	None	00:01:00	2.2 / 2.5	
60 ⁵⁾	None	00:00:01	1	-
95 ⁵⁾	Continuous	-	-	25
Cooling				
40	None	00:00:10	2.2 / 2.5	-

ในกรณีที่ไมทราบอุณหภูมิ melting ของไพรเมอร์ที่ใช้ทำ PCR อย่างแน่นอนแนะนำให้ใช้โปรโตคอล touchdown PCR ซึ่งครอบคลุม ช่วงอุณหภูมิ annealing temperature ตั้งแต่ 65 ถึง 53°C สามารถแก้ไขอุณหภูมิเป้าหมายในโปรแกรมการ amplification ดังตารางด้านล่างนี้

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s) (96-well / 384-well)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.4 / 4.8	-	0	0	0
65	None	00:00:10	2.2 / 2.5	-	53	0.5	1
72	Single	00:00:10 - 00:00:20 ³⁾	4.4 / 4.8	-	0	0	0

1) จำนวนรอบ

จำนวนรอบ 45 รอบเหมาะสำหรับการตรวจส่วนใหญ่ หากการทดสอบได้รับการปรับให้เหมาะสมและมีเส้นกราฟของการ (แม้ว่าความเข้มข้นของเป้าหมายจะต่ำ) ที่สูงขึ้นและจุดตัดกันในช่วงต้น amplification 40 รอบ ควรจะเพียงพอ การลดจำนวนรอบจะลดเวลาที่ต้องใช้ในการทดสอบ

2) Annealing temperature

Annealing temperature เป็นพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อความจำเพาะและความทนทานของการ amplification มากที่สุด สำหรับการทดลองเริ่มต้นให้ตั้งค่าอุณหภูมิเป้าหมาย เช่น annealing temperature ของไพรเมอร์ควรต่ำกว่าค่า T_m ของไพรเมอร์ที่คำนวณไว้ 2°C ปริมาณของ PCR product เฉพาะเจาะจง การมีอยู่หรือไม่มีของ PCR product ที่ไม่ต้องการ และการมีหรือไม่มีของ PCR product ในการทดลองเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดในการปรับพารามิเตอร์นี้ให้เหมาะสม หากการ amplification ก่อให้เกิด PCR product ที่ไม่พึงประสงค์ ให้เพิ่ม annealing temperature หากการ amplification ไม่มีประสิทธิภาพ ให้ลด annealing temperature และหรือเพิ่มระยะเวลาของขั้นตอนการ amplification

3) Elongation time

การคำนวณเวลาการต่อสายยาวของ DNA เป้าหมายเฉพาะของคุณโดยหารความยาวของแอมพลิคอนด้วย 25 เช่น แอมพลิคอน 500 bp ต้องใช้เวลาในการต่อสายยาว 20 วินาที

4) Melting pre-hold step

ขั้นตอนเป็นการทำอุณหภูมิเพื่อช่วยให้แน่ใจว่า PCR product ทั้งหมด จับคู่กันใหม่และกระตุ้นการสร้าง heteroduplex

5) Melting interval

สถานะการ melting จริงขึ้นอยู่กับแอมพลิคอน สำหรับการทดลองเริ่มต้น ให้กำหนดช่วงการ melting ที่กว้าง เช่น จาก 60 ถึง 95°C เมื่อทราบตำแหน่งที่ PCR product ที่จะทำ melting แล้ว ให้ลดช่วงการ melting ลงเหลือประมาณ 25°C ตรวจสอบให้แน่ใจว่าโปรแกรม melting เริ่มต้นอย่างน้อย 10°C ก่อนและสิ้นสุดอย่างน้อย 10°C หลังจากค่า T_m ที่คาดไว้

6) Analysis mode

ไม่มีโหมดการวิเคราะห์พิเศษสำหรับการทดสอบ Gene Scanning การทดสอบ Gene Scanning จะดำเนินการในโหมดการวิเคราะห์

Melting

Curves

มาตรฐาน

7.2.6 การตรวจวัดสัญญาณรบกวนแบบรวดเร็วในการเพิ่มปริมาณ

เป้าหมายของการทดสอบ LightCycler® 480 System Gene Scanning คือการสร้าง PCR product ที่บริสุทธิ์ โดยไม่มีสิ่งอื่น ๆ ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เช่น การจับกันเองของไพรเมอร์ ซึ่งอาจทำให้ได้ผลลัพธ์ที่ผิดพลาดได้

บน LightCycler® 480 System สามารถระบุได้ว่า PCR product ใช้ไพรเมอร์ใดเมอร์หรือไม่ โดยเปรียบเทียบตัวอย่างกับ non-template control หลังจากการใช้ melting curve โดยดูจาก Melting Peaks plot ตัวอย่างที่เป็นลบ จะไม่แสดง fluorescence เทียบกับอุณหภูมิ สร้างโดย Tm Calling ของโปรแกรม LightCycler® 480 ถ้าเป็น no-template control จะไม่แสดง หากการทดลองเริ่มต้น no-template control แสดงฟลัก ควรปรับปรุงปฏิบัติให้เหมาะสมอีกครั้ง และทำการทดลองซ้ำ และตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย (เช่น โดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่) เจลอิเล็กโทรโฟเรติก



สามารถเข้าถึง Melting Peaks plot ได้โดยตรงจาก โปรแกรม LightCycler® 480 Gene Scanning Module โดยไม่จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ T_m Calling แยกต่างหาก

7.3 การวิเคราะห์ Gene Scanning

สามารถทำการวิเคราะห์ Gene Scanning โดยใช้ ใน melting curve LightCycler® 480 Gene Scanning ตัวอย่างที่เป็น heteroduplex จะมีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ LightCycler® 480 ResoLight หลังจากการ amplified ตัวอย่างโดย PCR และการทำ melting curve ซอฟต์แวร์จะวิเคราะห์รูปร่างของเส้นโค้งแต่ละเส้น และกลุ่มตัวอย่างที่มี melting curves ที่คล้ายกัน

สามารถรวม melting standards หรือจีโนมที่รู้จักเข้ากับทดลองได้ ในกรณีนี้ ซอฟต์แวร์จะเปรียบเทียบกราฟ melting curves ของตัวอย่างแต่ละรายการกับ melting standards ในการทดสอบ



หากไม่มีโปรแกรม LightCycler® 480 Gene Scanning Module ก็ยังสามารถดูผลผ่านโปรแกรม LightCycler® 480 ได้ แต่ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ Gene Scanning ได้

วิธีการทดลอง gene scanning:



1 ตั้งค่าการทดลองที่มีโปรแกรมการ amplification ขยาย เพื่อ amplify ตัวอย่างเป้าหมายและโปรแกรม melting curve เพื่อ melt ตัวอย่างการรวม melting standards ในการทดสอบขึ้นอยู่กับ โหมดการวิเคราะห์ที่ต้องการ:



▶ การจัดกลุ่มอัตโนมัติหรือการวิเคราะห์ทั่วไปไม่จำเป็นต้องมี : ตัวแปร/ melting standards



▶ melting standards ที่อยู่ในการทดสอบ: รวม melting standard ของตัวอย่าง

รวมตัวควบคุมต่างๆ (เช่น ตัวควบคุมชนิดลบ หรือไม่มีตัวอย่าง) ในการทดลองและกำหนดค่าตัวอย่างในการแก้ไขตัวอย่าง Sample Editor



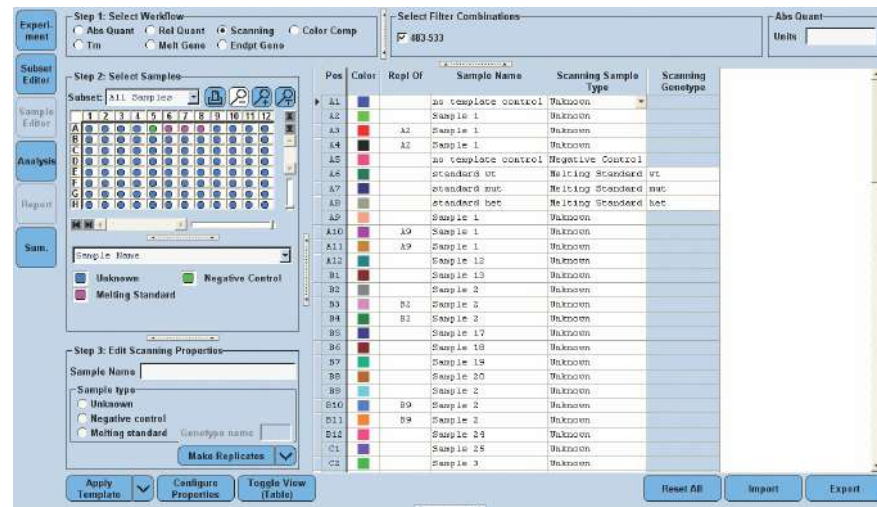
melting standard ที่อยู่ในการทดสอบจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมชนิดลบ



การที่จะรวมหรือไม่รวมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ให้สร้างกลุ่มย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ขึ้น ไม่ควรใช้ช่องเครื่องหมายถูกที่หน้าผลลัพธ์ เนื่องจากการเปลี่ยนจำนวนตัวอย่างจะมีผลต่อการคำนวณเป็นกลุ่ม



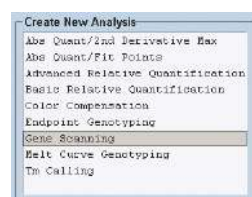
- 2 คลิก *Sample Editor* ในแถบ *Module* แล้วเลือกการทำงาน *Scanning* โปรแกรม *LightCycler® 480* จะอัตโนมัติกำหนดค่าตัวอย่างให้



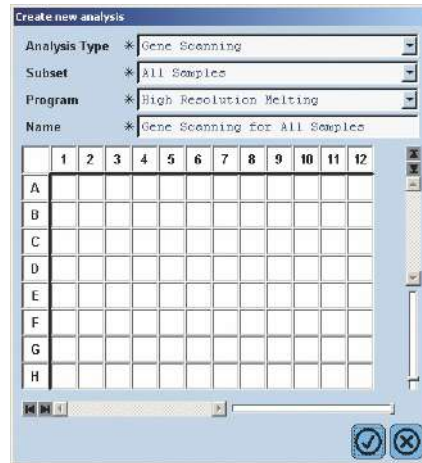
- 3 กำหนดคุณสมบัติของตัวอย่าง สำหรับข้อมูลโดยละเอียดเกี่ยวกับ *Sample Editor* โปรดดูที่ส่วนการป้อนข้อมูลตัวอย่าง ซอฟต์แวร์ใช้พารามิเตอร์ต่อไปนี้สำหรับการคำนวณ

ชื่อคอลัมน์	คำอธิบาย	ค่าที่ปรากฏ
ชื่อตัวอย่าง	ชื่อของตัวอย่าง	เป็นตัวอย่าง มีเว้นวรรคได้ (สูงสุด 25 ตัวอักษร)
ชนิดตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง หากต้องการใช้ “ <i>In-run Standards</i> ” ในทางเลือกกลุ่มต้องรวม <i>Melting Standard</i> ในจีโนไทป์ที่ต้องการตรวจ	เลือกจากเมนูรายการ: ▶ Unknown ▶ Negative Control ▶ Melting Standard
จีโนไทป์	จีโนไทป์ของค่ามาตรฐาน melt หรือตัวควบคุมชนิดบวก ช่องนี้จะใช้งานได้หากกำหนดชนิดตัวอย่างเป็น “ <i>Melting Standard</i> ”	เป็นตัวอย่าง (≤ 25 ตัวอักษร)

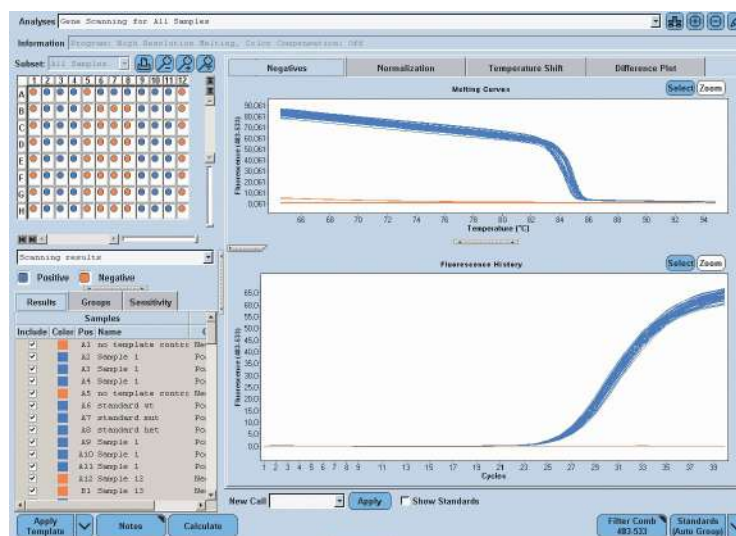
- 4 คลิก *Analysis* ในแถบ *Module* หน้าต่างรายการ *Create New Analysis* ให้เลือก *Gene Scanning*



- หน้าต่าง Create New Analysis เปิดขึ้น ให้เลือก Subset และโปรแกรมการทดลองจากรายการโปรแกรม โดยปกติจะเลือกโปรแกรม melting curve สามารถเปลี่ยนชื่อการวิเคราะห์ได้ โดยชื่อเริ่มต้นคือประเภทการวิเคราะห์สำหรับกลุ่มย่อย จากนั้นกด 



- หน้าต่างการวิเคราะห์ Gene Scanning จะเปิดขึ้น



วิธีการวิเคราะห์ Gene Scanning:

- 1 ใช้ปุ่มเลือกชนิด Standards และ เลือกโหมดการวิเคราะห์ ที่ต้องการ (วิธีการจัดกลุ่ม)

Auto Group
Comn/Vars
Standards (In Run)

Auto Group	ใช้ในกรณีที่ไม่มีความมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกัน หากในการกำหนดค่าตัวอย่างไม่มีการกำหนด <i>melting standard</i> โปรแกรมจะเลือกค่าเริ่มต้นหลังจากการวิเคราะห์ หากเลือกใช้โหมดนี้ โปรแกรมจะกำหนดค่าตัวอย่างตามกลุ่ม (โดยกำหนดให้ไม่เกิน 6 กลุ่มที่มีลักษณะรูปร่าง <i>melting curve</i> ต่างกัน); หากพบตัวอย่างใดไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ ตัวอย่างนั้นจะถูกจัดเป็น Unknown หรือ Negative กลุ่มที่ตั้งขึ้นอัตโนมัติจะมีชื่อเป็นตัวเลขเรียงกันไป (1, 2, เป็นต้น) ซึ่งบางกลุ่มอาจจะไม่มีตัวอย่างได้
Comn/Vars	ใช้ในกรณีที่ไม่มีความมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกัน หากเลือกใช้โหมดนี้ โปรแกรมจะจัดตัวอย่างเป็นกลุ่มที่เรียกว่า <i>Common group</i> ซึ่งตัวอย่างส่วนใหญ่จะอยู่กลุ่มนี้ โดยเลือกที่มีค่า <i>melting curve</i> เหมือนกัน และมีกลุ่มที่เรียกว่า <i>Variants group</i>, <i>Unknown group</i> หรือ <i>Negative group</i>
Standards (In Run)	ใช้ในกรณีที่มีตัวอย่างมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกัน หากมีการกำหนดตัวอย่างเป็น <i>melting standards</i> โปรแกรมจะเลือกโหมดนี้เองอัตโนมัติหลังจากวิเคราะห์เสร็จ กลุ่มจะขึ้นอยู่กับตัวอย่างมาตรฐานที่อยู่ในการทดลองเดียวกัน โดยจะสอดคล้องกับที่กำหนดไว้ในกำหนดค่าตัวอย่างใน <i>Sample Editor</i>

การยกเลิกการเลือก Negatives

ให้กดแถบ *Negatives* เพื่อยกเลิกตัวอย่างที่เป็นลบและนำออกจากการวิเคราะห์



แม้ว่าโปรแกรม *LightCycler® 480 Gene Scanning Module* จะมีการตรวจกรองตัวอย่างชนิดลบแบบอัตโนมัติ แต่อาจมีกรณีที่ไม่สามารถตรวจพบได้ ดังนั้นสามารถกำหนดได้เองเมื่อทำงานเสร็จ โดยการเลือกไปที่ *New Call* เพื่อที่จะกำหนดตัวอย่างลบให้อยู่ในกลุ่ม *Negatives group* (ดูด้านล่าง)



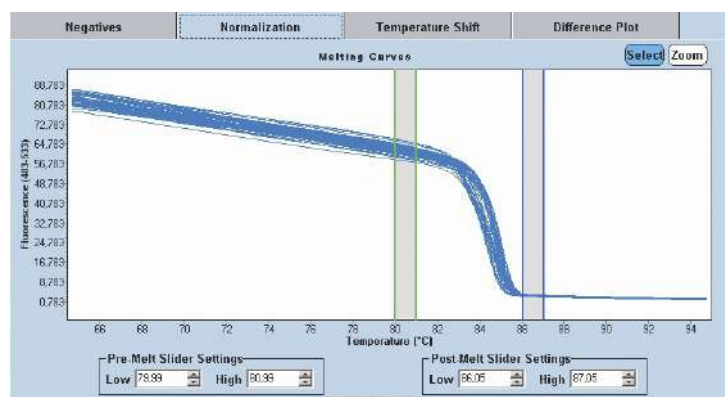
3 ► การทำให้เป็นมาตรฐาน (Normalization)

คลิกไปที่แถบ *Normalization* เพื่อที่จะทำเส้น melting curves ให้เป็นมาตรฐาน

ค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ที่ได้จากการทำ *High Resolution Melting* อาจจะแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของปริมาณตัวอย่างเริ่มต้นแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน ความต่างนี้สามารถกำหนดให้เกิดจีโนไทป์แตกต่างกันไปได้ ดังนั้นความทำให้ข้อมูลให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยการกำหนดช่วงของแต่ละตัวอย่างกราฟเป็นสองส่วน คือก่อนและหลังการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิช่วงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก นั่นคือกำหนดตรงช่วงที่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ 100% และ 0% (เส้นพื้นฐาน)

กราฟด้านบนซึ่งเป็นกราฟเส้นโค้ง *Melting Curves* ประกอบด้วยแถบเลื่อนแนวตั้ง 2 เส้น สามารถปรับเข้าได้ให้สอดคล้องกับอุณหภูมิต่ำและสูงก่อนการหลอม และอุณหภูมิต่ำและสูงหลังการ (สีเขียว) พื้นที่สีเทาระหว่างแถบเลื่อนหมายถึงพื้นที่ที่ใช้ในการทำให้เป็นมาตรฐาน (ฟ้าสี) หลอม) normalization(

ด้านล่างแผนภูมิ *Melting Curves* จะมีค่าที่สามารถตั้งค่าได้ : กลุ่มด้านซ้ายใช้เพื่อกำหนดช่วงอุณหภูมิ ก่อน melt ในขณะที่กลุ่มด้านขวาใช้เพื่อกำหนดช่วงอุณหภูมิหลังการ melt

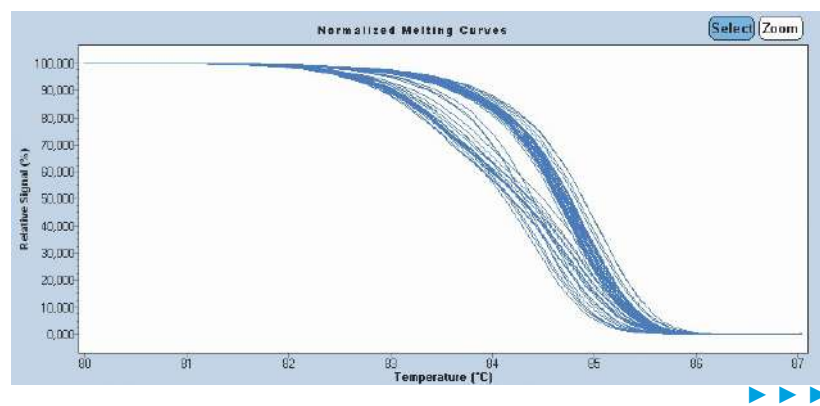


4

LightCycler® 480 Gene Scanning Module จะวางแผนเลื่อนอุณหภูมิโดยอัตโนมัติในบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการทำให้เป็นมาตรฐานและแสดงข้อมูลที่ให้เป็นมาตรฐานในกราฟด้านล่าง Normalized Melting Curves ตรวจสอบกราฟด้านล่างเพื่อให้แน่ใจว่าช่วงอุณหภูมิก่อน melt อยู่ในพื้นที่ที่มีการเรืองแสงพื้นหลังของทั้งหมด ตัวอย่างลดลงอย่างสม่ำเสมอแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเกิดขึ้น และวางช่วงอุณหภูมิหลังการ melt ไว้ในพื้นที่ที่มีการ melting เสร็จสมบูรณ์สำหรับตัวอย่างทั้งหมด

หากจำเป็น ให้ปรับการตั้งค่าอุณหภูมิโดยการลากตัวเลื่อนแนวตั้งบนกราฟด้านบน หรือโดยการเปลี่ยนค่าในช่องการตั้งค่าตัวเลื่อน สำหรับวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ ช่วงอุณหภูมิที่แนะนำระหว่างแถบเลื่อนแนวตั้งแต่ละชุดจะอยู่ที่ประมาณ 1°C

หากตั้งค่าช่วงอุณหภูมิก่อน melt และหลัง melt ถูกต้อง จะได้ normalized melting curves ที่มีพื้นที่เรียบก่อนและหลังการเปลี่ยนผ่านหลัก ไม่ควรมีเส้นโค้งโคจรเหนือเส้นบนหรือต่ำกว่าเส้นล่างมากนัก



D



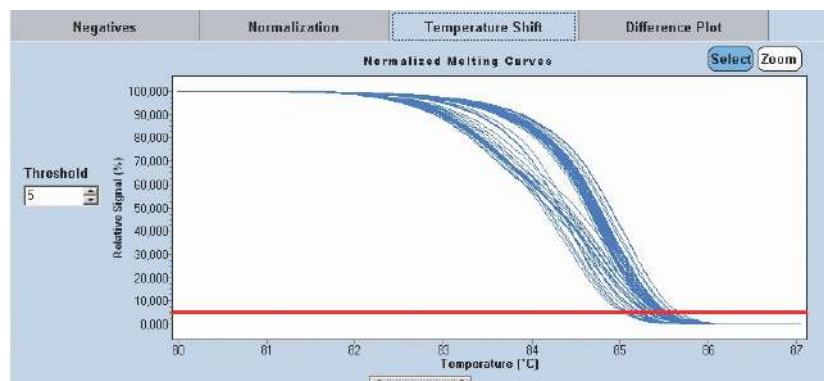
► การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ Temperature Shifting

คลิกที่แถบ *Temperature Shift* เพื่อรีเซ็ตแกนอุณหภูมิ แกน x ของmelting curves

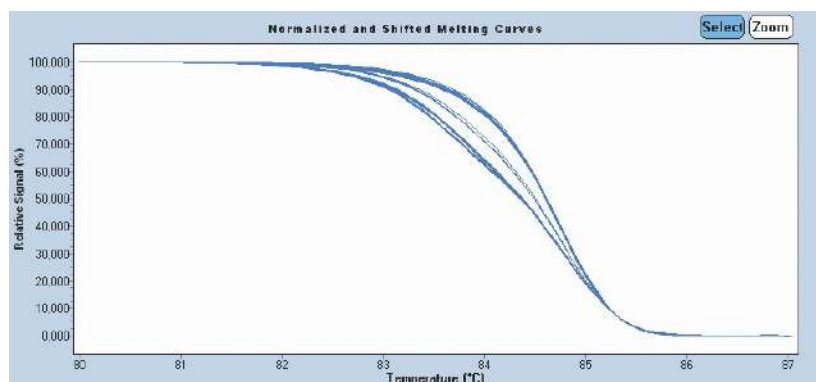


การกําลังค่าชดเชยอุณหภูมิระหว่างตัวอย่างจะช่วยทำให้อุณหภูมิ *melting* ของตัวอย่างชัดเจน แกนอุณหภูมิของแต่ละกราฟจะเลื่อนไปในช่วงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ต่ำ (ที่ปลายของ *homoduplex melting*) ซึ่งจะทำให้อุณหภูมิฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างชนิด *heteroduplexes* จะตกลงก่อน

การแสดงผลบนแถบ *Temperature Shift* ประกอบด้วยกราฟสองกราฟด้านบน : เหมือนกับกราฟ *Normalized Melting Curves* ที่แสดงบนแถบ *Normalization* กราฟด้านล่าง แสดงกราฟ *melting curves* ที่มีทั้งการปรับให้เป็นมาตรฐานและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ กราฟด้านบนมีแถบเลื่อนแนวนอนที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ทางซ้ายมือของกราฟจะเห็นฟิลด์ควบคุมซึ่งมีป้ายกำกับว่า *Threshold* ซึ่งสามารถใช้ตั้งค่าระดับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ด้วย



ค่าเริ่มต้นของระดับการเลื่อนอุณหภูมิคือ 5 สามารถเปลี่ยนค่าของการปรับเลื่อนอุณหภูมิได้ โดยการป้อนค่าในช่องควบคุมเกณฑ์หรือโดยการลากตัวเลื่อนแนวนอนบนกราฟด้านบน เลือกระดับการเลื่อนที่ทำให้เส้นโค้งสร้างกลุ่มที่แน่น โดยมีระยะห่างสูงสุดระหว่างกลุ่ม ดังที่ สำหรับแอปพลิเคชันส่วนใหญ่ ค่า (แสดงในภาพด้านล่างเริ่มต้นคือระดับ 5 จะให้ผลที่สามารถยอมรับได้



ในตารางผลลัพธ์สามารถเลือกยกเลิกตัวอย่างที่ไม่ต้องการให้รวมอยู่ในการวิเคราะห์ผล

คลิกที่ปุ่ม *Calculate* เพื่อวิเคราะห์ผลและกำหนดการจัดกลุ่ม

โปรแกรมจะกำหนดกลุ่ม Variant และกำหนดสีและชื่อให้กับแต่ละกลุ่ม พร้อมกัน (หรือจีโนไทป์)
ซอฟต์แวร์จะคำนวณแผนภาพผล *Normalized and Temperature Shifted Difference Plot*

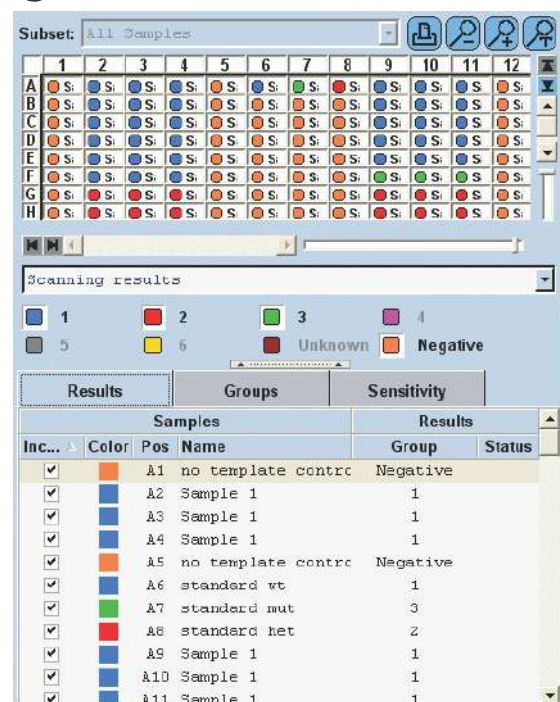
ผลของการวิเคราะห์ Gene Scanning ประกอบด้วย Gene Scanning พร้อมตัวเลือกคุณสมบัติ คำอธิบายแผนภูมิและปุ่มคุณสมบัติคำอธิบายแผนภูมิ และตารางผลลัพธ์ ใช้ตัวเลือกคุณสมบัติ คำอธิบายแผนภูมิเพื่อแสดงสีตามผลลัพธ์ ตามประเภทตัวอย่าง ตามการตั้งค่าตัวอย่าง หรือตามกลุ่มที่ ทำซ้ำ ใช้ปุ่มคุณสมบัติคำอธิบายสีเพื่อเลือกการแสดงผลตัวอย่างที่มีคุณสมบัติบางอย่างในรูปภาพ MWP ตารางผลลัพธ์ และในแผนภูมิ

หากเลือก *Scanning results* ในตัวเลือกคุณสมบัติ ตารางผลลัพธ์ของการวิเคราะห์การ Gene Scanning จะแสดงผลต่อไปนี้ ปุ่มคุณสมบัติคำอธิบายช่วยให้สามารถเลือกตัวอย่างโดยขึ้นอยู่กับกลุ่ม variant

▶ กลุ่มจีโนไทป์ 6 กลุ่ม หาก เคราะห์กลุ่มอัตโนมัติ หรือกลุ่มจีโนไทป์ 6 กลุ่ม หากเลือกโหมดการเลือกโหมดการวิเคราะห์ *Comm/Vars*

▶ กลุ่ม Negative และ กลุ่ม Unknown

ช่องเครื่องหมายถูกมักจะแสดงแม้ว่ากลุ่มที่สอดคล้องกันจะไม่พบก็ตาม



▶ Group: ชื่อของกลุ่มจีโนไทป์ที่กำหนดตัวอย่าง

▶ กลุ่ม Variant/Genotype ที่กำหนดโดยอัตโนมัติโดยซอฟต์แวร์จะได้รับหมายเลขตามลำดับ 1, 2, ฯลฯ ในขณะที่กลุ่มตาม melting Standards ในการรันจะได้รับชื่อที่สอดคล้องกับมาตรฐานที่เหมาะสม (กำหนดใน *Sample Editor*)

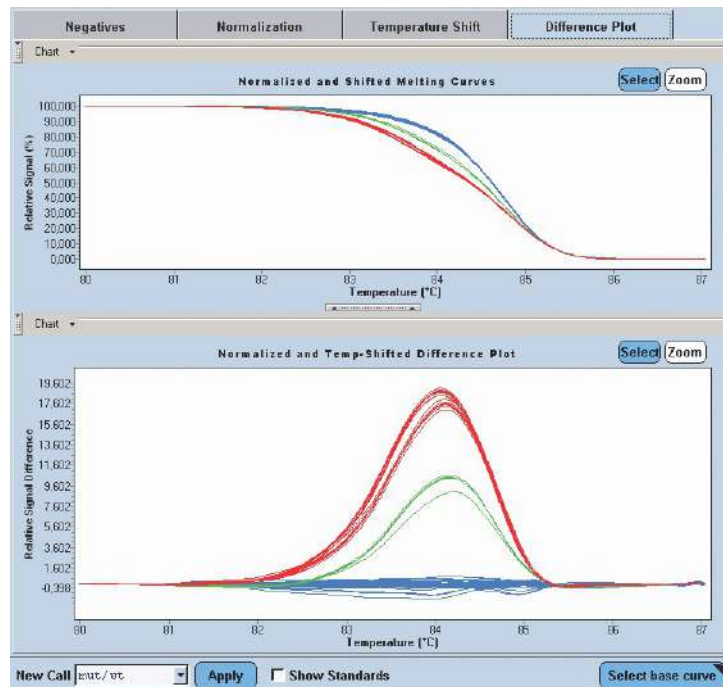




▶ แผนภูมิความแตกต่าง Difference Plot

คลิกที่แถบ *Difference Plot* ในส่วนแผนภูมิเพื่อดู

- ▶ การ *Normalized and Shifted Melting Curves* และ
- ▶ การ *Normalized and Temperature Shifted Difference Plot*:



แผนภาพความแตกต่างถูกกำหนดดังนี้:

- ▶ อันดับแรก โปรแกรมจะเลือกกลุ่มที่มีตัวอย่างมากที่สุด
- ▶ จากนั้นมาตรฐานของกลุ่มนั้น จะถูกกำหนดจีโนไทป์อ้างอิง ความแตกต่าง (เส้นโค้งฐาน) เทียบกับอุณหภูมิระหว่างค่าอ้างอิงและเส้นโค้งที่เหลือแต่ละเส้นจะถูกพล็อตออกมา

ด้วยการทำเครื่องหมายที่ช่อง *Show Standard* สามารถแสดงเส้นโค้งของ melting standards ในแผนภูมิได้อีกด้วย สิ่งเหล่านี้ปรากฏเป็นเส้นสีดำ



ในโหมด *Auto Group analysis mode*, ค่ากลางเส้นกราฟ ของกลุ่ม *variant/genotype* จะถูกกำหนดตามค่ามาตรฐานของกลุ่มนั้น

คลิก *Select base curve* เพื่อกำหนดเส้นโค้งอ้างอิงสำหรับกราฟผลต่างด้วยตนเอง ตามค่าเริ่มต้นมาตรฐานของ *Variant/Genotype* ที่ใหญ่ที่สุดจะถูกนำไปใช้เป็นเส้นโค้งพื้นฐาน

วิธีปรับแต่งการแสดงผลแผนภูมิความแตกต่าง:

- 1 ในแถบ *Difference Plot* ให้คลิกที่  เหนือแผนภูมิต้นบนหรือล่าง แถบเครื่องมือตัวเลือกของแผนภูมิจะแสดงขึ้น ซึ่งมีเมนูแผนภูมิ

- 2 หากต้องการเปลี่ยนประเภทแผนภูมิ ให้เลือกประเภทแผนภูมิใหม่จากเมนูแผนภูมิที่เกี่ยวข้อง

สำหรับแผนภูมิต้นบน มีตัวเลือกต่อไปนี้:



Melting Curves: สอดคล้องกับการแสดง Melting Curve ในแถบ Negatives กล่าวคือ แสดงเส้นโค้งที่ไม่ปกติและไม่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ

▶ Normalized Curves: แสดงเส้นโค้ง normalized melting curves

▶ Normalized and Temp-Shifted Curves: สอดคล้องกับแผนภูมิเส้นโค้งของ Normalized และ Shifted

Melting ในแถบ Temperature Shift

 การปรับให้เป็นมาตรฐานและการเลื่อน *melting curves* เป็นพื้นฐานการคำนวณการทำแผนภูมิความแตกต่าง

สำหรับแผนภูมิต้นล่าง มีตัวเลือกต่อไปนี้:



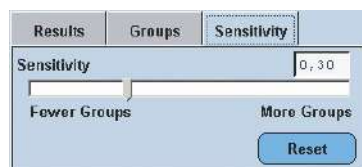
Melting Peaks: แสดงแผนภาพ Melting Peaks (ตัวอย่างที่เป็นผลลบเมื่อพล็อตค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เทียบกับอุณหภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับผลลัพธ์ของการวิเคราะห์ Tm Calling)

▶ Normalized and Temp-Shifted Difference Plot: แสดงแผนภาพของ : normalized และ temperature-shifted ดูตามขั้นตอนที่ 9 ด้านบน

วิธีเปลี่ยนการตั้งค่าความไว:

สามารถปรับค่าความไว (Sensitivity) เพื่อปรับแต่งผลการทำ Gene Scanning ฟังก์ชัน Sensitivity ช่วยให้คุณควบคุมความแรงครีของ melting curves ที่จัดประเภทเป็นกลุ่มต่างๆ โดยทั่วไป ค่า Sensitivity ที่สูงจะสร้างกลุ่มได้หลากหลายกว่าค่าที่ต่ำ

คลิกที่แถบ *Sensitivity* ในตาราง *Results* เพื่อปรับแต่งค่าการวิเคราะห์:



เลื่อนแถบ *Sensitivity* ไปทางซ้ายเพื่อลดความเข้มงวด หรือเลื่อนไปทางขวาเพื่อเพิ่มความเข้มงวด



ค่าเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์เบื้องต้นค่านี้ให้ความสมดุลที่เหมาะสมระหว่างการสร้างสิ่งที่ไม่รู้จักมากเกินไปและการสร้างการอ่านผลที่ผิดพลาด

การเปลี่ยนชื่อกลุ่ม:

สามารถทำการเปลี่ยนชื่อที่เกี่ยวข้องกับ Variation/กลุ่มของ Genotype ได้โดยกดไปที่ แถบ *Groups* ในตาราง *Result*



สามารถแก้ไขชื่อ Group สำหรับ Group ที่ถูกสร้างจากการวิเคราะห์แบบ Auto Group หรือสร้างจากการวิเคราะห์ *Comm/Vars* แต่ไม่สามารถการแก้ไขได้ สำหรับ การจัดกลุ่มที่ใช้ in-run melting standards นอกจากนี้ ไม่สามารถเปลี่ยนชื่อของกลุ่มสำหรับ Negative และ Unknown หรือจำนวนของกลุ่มที่แสดงตามรูปด้านล่าง



แถบ *Groups* ให้ดับเบิลคลิก บริเวณชื่อ Group ที่ต้องการแก้ไข

Results	Groups	Sensitivity
1	2	3
4	5	6
Unknown	Negative	



พิมพ์ชื่อใหม่ที่ต้องการลงในช่อง หลังจากการแก้ไข ชื่อใหม่จะถูกแสดงในตาราง *Sample Selector* และตาราง *Result* ทันที

Results	Groups	Sensitivity
mut/mut	wt/wt	mut/wt
4	5	6
Unknown	Negative	

การเปลี่ยนการกำหนดกลุ่มให้ variant/genotype ใหม่:

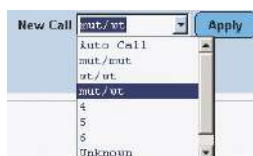
ถ้าคุณเชื่อว่า โปรแกรมจัดให้ตัวอย่างนั้นอยู่ในกลุ่มผิด คุณสามารถแก้ไขได้เองด้วยการจัดกลุ่มใหม่ โดยใช้ทางเลือก *New Call*



1 ตาราง *Result* กดเลือกตัวอย่างที่ต้องการแก้ไข สำหรับรายละเอียดดูที่ การทำงานกับตัวอย่างในการวิเคราะห์ *Working with Samples in the Analysis*



2 ได้กราฟ จะมี *New call* จากนั้นให้กดเลื่อนจาก drop-down list เพื่อเลือกกลุ่มใหม่ (genotype, Unknown, หรือ Negative) ให้ตัวอย่าง



3 คลิกเลือก *Apply*



-  การเลือก Genotype กลุ่มใหม่ จากกลุ่มต่างๆ ที่อยู่ใน drop-down list ของ *New Call* และคลิก *Apply* จะทำการเปลี่ยนแปลงกลุ่มของตัวอย่างที่เลือกซึ่งจะแสดงชื่อของกลุ่มใหม่ในกราฟเช่นกัน
การเลือก *Auto Call* จาก *New Call* และคลิก *Apply* จะทำให้ตัวอย่างที่เลือกกลับไปแสดงชื่อเดิมจากการกำหนดอัตโนมัติ
-  การกำหนดจัดกลุ่มใหม่เอง จะแสดงเครื่องหมายดอกจัน (*) ในตารางแสดงผลลัพธ์ และรายงาน
-  ไม่สามารถกำหนดกลุ่มใหม่ให้ Negative control ได้ หากมีการใช้ in-run melting standard ไม่สามารถกำหนดกลุ่มใหม่ได้ ถ้าพยายามที่จะ Apply การกำหนดกลุ่มใหม่จาก New call ของการทดสอบที่ใช้ in-run melting standard หรือ control โปรแกรมจะมีข้อความเตือนว่า การเลือกนี้มี in-run melting standard หรือ control ซึ่งไม่สามารถทำการเปลี่ยนแปลงแก้ไขได้ และถามว่าต้องการที่จะทำต่อ (Continue) หรือไม่ หากเลือกทำต่อ โปรแกรมจะทำการแก้ไขทุกตัวอย่าง ยกเว้น in-run melting standard และ controls แต่หากเลือกไม่ทำต่อ การเปลี่ยนแปลงแก้ไขจะถูกยกเลิก

7.4 ฟังก์ชันเพิ่มเติม

7.4.1 แม่แบบสำหรับ Gene Scanning

แม่แบบของการวิเคราะห์สำหรับ Gene Scanning ประกอบด้วย การตั้งค่า ดังต่อไปนี้:

- ▶ กลุ่มย่อยของตัวอย่าง และ โปรแกรม
-  หากเลือกแม่แบบ โปรแกรมจะกำหนดว่า การทดลองนี้ประกอบด้วยชุดย่อยของตัวอย่างนั้นมีชื่อตัวอย่าง และตำแหน่งหลุมเหมือนกันกับกลุ่มย่อยของตัวอย่างในแม่แบบ
 - ▶ ถ้าการทดลองนี้ ไม่มีกลุ่มย่อยของตัวอย่างที่มีชื่อตัวอย่างที่เหมือนกัน โปรแกรมจะสร้างกลุ่มย่อยของตัวอย่างใหม่
 - ▶ ถ้าการทดลองนี้ มีกลุ่มย่อยของตัวอย่างที่มีชื่อตัวอย่างที่เหมือนกัน แต่กลุ่มย่อยของตัวอย่างมีตำแหน่งหลุมไม่ตรงกับกลุ่มย่อยของตัวอย่างในแม่แบบ แม่แบบนี้ไม่สามารถใช้ได้ สามารถลบกลุ่มย่อยของตัวอย่างนี้ที่อยู่ในแม่แบบนี้ จากนั้นสามารถใช้แม่แบบได้
- ▶ การจับคู่ช่องกรองแสง
- ▶ ชื่อการวิเคราะห์
- ▶ การตั้งค่าการวิเคราะห์ (Auto Group, In-run Standards, or Common/Variants)
- ▶ บันทึกการวิเคราะห์
- ▶ การตั้งค่าอุณหภูมิ Pre-melt and post-melt
- ▶ การตั้งค่า Temperature shift
- ▶ การตั้งค่าความไว

D

7.4.2 ผลของตัวควบคุม

โปรแกรม LightCycler® 480 Gene Scanning Module ใช้ตัวควบคุม (Control) เป็นประจำเพื่อตรวจสอบว่าการวิเคราะห์นั้น ผ่าน หรือ ล้มเหลว การตรวจสอบผลตัวควบคุม (Control check) สามารถใช้ได้เฉพาะการทดสอบที่ประกอบด้วย in-run melting standards; ซึ่งไม่สามารถใช้ได้กับการทดสอบที่ใช้การวิเคราะห์แบบ Auto Group หรือ Comn/Vars

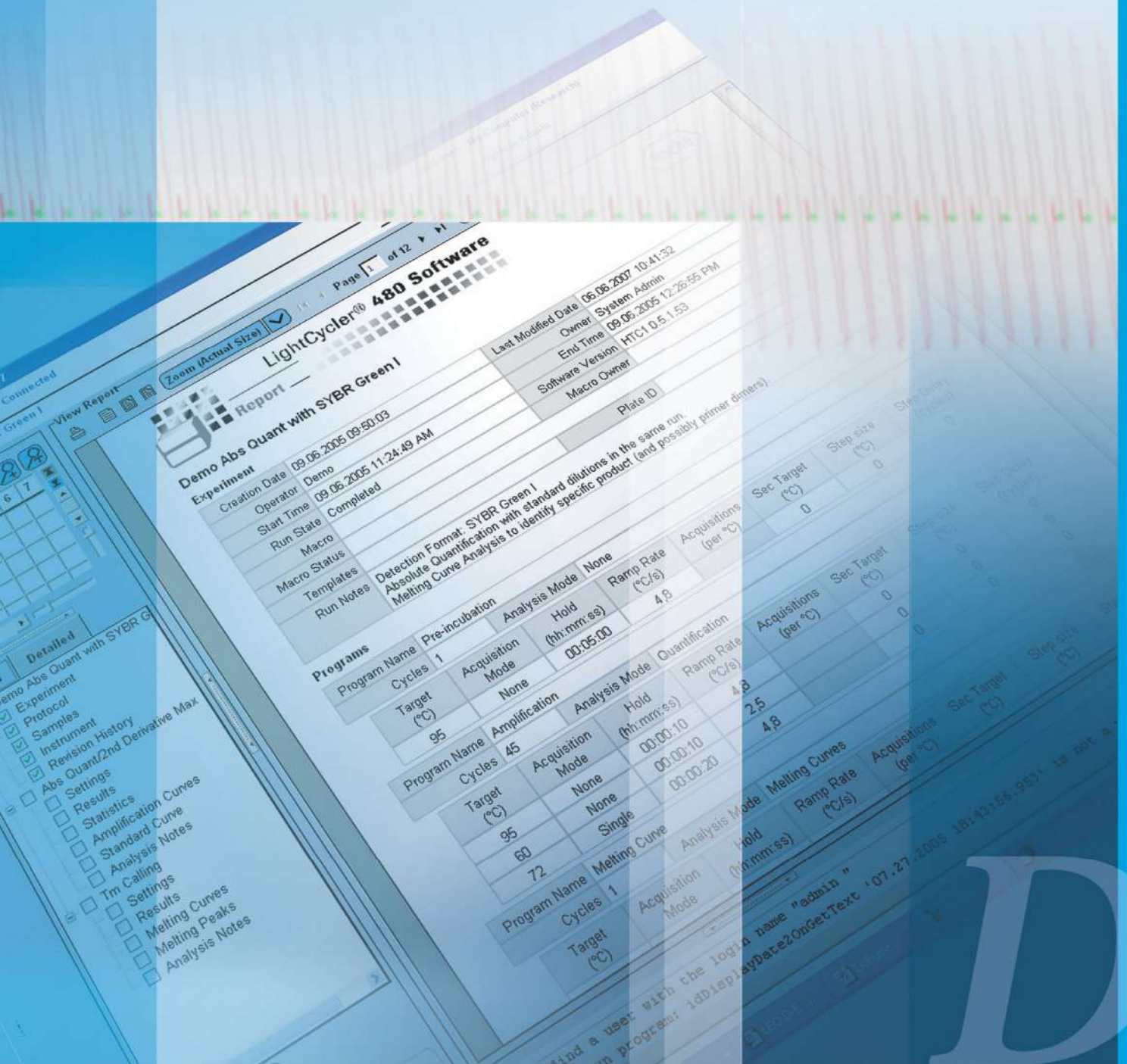
▶ ตัวควบคุมลบ (Negative Controls)

- ▶ ถ้าตัวควบคุมลบทุกตัว ให้ผลลบ การทดสอบนี้ผ่านการตรวจสอบการควบคุม
- ▶ ถ้ามีตัวควบคุมลบบางตัว ไม่ให้ผลลบ การทดสอบนี้ล้มเหลวจากการตรวจสอบการควบคุม
- ▶ ถ้ามีตัวควบคุมลบบางตัว ล้มเหลว โปรแกรมจะรายงาน ไม่มีผล (no results) และจะแจ้งผู้ใช้งานว่า ผลตรวจสอบผลตัวควบคุมลบล้มเหลว การแจ้งความข้อผิดพลาด บ่งชี้ถึงว่า การตรวจสอบผลตัวควบคุมล้มเหลว

▶ ตัวมาตรฐาน Melting

- ▶ ถ้าตัวมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกันทุกตัว ให้ผลบวก การทดสอบนี้ผ่านการตรวจสอบการควบคุม
- ▶ ถ้าตัวมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกันทุกตัวในกลุ่มเดียวกัน ถูกจับให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และที่อยู่คนละกลุ่มต่างกัน ก็ถูกจัดกลุ่มอยู่คนละกลุ่ม การทดสอบนี้ผ่านการตรวจสอบการควบคุม
- ▶ ถ้ามีตัวมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกัน 2 ตัวอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ไม่ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน การทดสอบนี้ล้มเหลวจากการตรวจสอบการควบคุม
- ▶ ถ้ามีตัวมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกัน 2 ตัวอยู่ต่างกลุ่มกัน แต่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน การทดสอบนี้ล้มเหลวจากการตรวจสอบการควบคุม
- ▶ ถ้ามีตัวมาตรฐาน melting ในการทดลองเดียวกันบางตัว ให้ผลลบ การทดสอบนี้ล้มเหลวจากการตรวจสอบการควบคุม





ฟังก์ชันโปรแกรมขั้นสูง

แนะนำการวิเคราะห์การชดเชยสัญญาณสีและอธิบายการใช้งานของเครื่องมือโปรแกรมขั้นสูง (เช่น แม่แบบและ มาโคร)

ฟังก์ชันโปรแกรมขั้นสูง

8 การวิเคราะห์การชดเชยสัญญาณสี (Color Compensation)

ระบบ LightCycler® 480 สามารถที่ตรวจวัดและวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้มากกว่า 1 สี ในแต่ละปฏิกิริยา (reaction) โดยวิธีนี้ ทำให้ลำดับเบสของเป้าหมาย ที่แตกต่างกัน สามารถตรวจวัดได้ใน 1 ปฏิกิริยา เนื่องจากมีการซ้อนทับของความยาวคลื่น ช่วงรับของสีฟลูออเรสเซนซ์ ช่องกรองแสง อาจจะได้รับสัญญาณจากสีที่ถูกตรวจวัดกับอีกช่องสัญญาณมาด้วย ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า การเกิดสัญญาณข้ามช่อง “crosstalk” แม้ว่าแต่ละช่องรับสัญญาณจะถูกปรับให้เหมาะสมกับความยาวคลื่นช่วงรับสูงสุดเฉพาะ ในปัจจุบัน สีฟลูออเรสเซนซ์ทุกสีที่มี จะมีความยาวคลื่นที่มีหางยาว (long “tails”) ซึ่งทำให้เกิดการซ้อนทับของความยาวคลื่น การเกิดลักษณะนี้ของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้เกิดการแปลผลของข้อมูลผิดพลาดได้ เพื่อที่จะการแก้ไขสัญญาณข้ามช่อง สามารถนำไฟล์การชดเชยสัญญาณสีไปใช้ได้ก่อนที่จะวิเคราะห์ข้อมูล หาก มีการเปิดใช้งานการชดเชยสัญญาณสี โปรแกรม LightCycler® 480 จะใช้ข้อมูลจากไฟล์เพื่อที่จะแก้ไขชดเชย สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์จากการเกิดสัญญาณข้ามช่อง



การชดเชยสัญญาณสีจำเป็นต้องใช้เฉพาะ เมื่อทำการทดลองที่ต้องการตรวจ 2 สีหรือมากกว่า 2 สีในใน 1 ปฏิกิริยา การชดเชยสัญญาณสีไม่จำเป็นต้องใช้ เมื่อทำการทดลองใช้เพียงสีเดียว

สามารถแก้ไขการซ้อนทับของความยาวคลื่น ตามที่อธิบายด้านบนโดยการนำไฟล์การชดเชยสัญญาณสี Color Compensation (CC) ไปใช้กับการทดลอง ระหว่างที่รัน Color Compensation ซึ่งจะสร้าง ไฟล์ CC เครื่อง LightCycler® 480 จะวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของแต่ละสี และจะสร้าง Color Compensation (CC) ที่มีความจำเพาะของเครื่อง หลังจากที่ใช้โปรแกรม LightCycler® 480 ใช้ CC object เพื่อที่จะกำหนดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของแต่ละช่องสัญญาณให้สีที่เหมาะสม ผลลัพธ์จะได้รับการตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์เพียง 1 สีในแต่ละช่องสัญญาณ



ไฟล์ CC สามารถถูกนำไปใช้ได้ เฉพาะการทดลองที่ถูกรันบนเครื่อง LightCycler® 480 เดียวกันกับเครื่องที่สร้างไฟล์นี้

ไฟล์การชดเชยสัญญาณสีทั่วไป

โปรแกรม LightCycler® 480 จะมีไฟล์การชดเชยสัญญาณสีมาให้ (universal CC objects) ซึ่งสามารถนำไปใช้กับการทดลองได้ สามารถหาได้ โดยไปที่โฟลเดอร์ Roche ในหน้าต่าง Navigator

► เครื่อง LightCycler® 480 Instruments II (ทั้งหลอดชนิดขึ้นอนและ แอลอีดี) สามารถนำไปใช้ได้กับการทดลอง 2 แบบ:

- การทดลองที่ใช้ hydrolysis probe 2 สี (Dual Color hydrolysis probe) คือ สี FAM และ สี VIC โดยใช้ filter combination 465-510 สำหรับ สี FAM และ 533-580 สำหรับ สี VIC
- การทดลองที่ใช้ UPL probe 2 สี (Dual Color UPL probe) คือ สี FAM และ สี Yellow 555 โดยใช้ filter combination 465-510 สำหรับ สี FAM และ 533-580 สำหรับ สี Yellow 555

สำหรับสี Dye combination อื่นๆ ทั้งหมด, LightCycler® 480 software ไม่มี Universal CC objects ให้ Dye combination อื่นๆ ที่ใช้กับเครื่อง LightCycler® 480 instrument II ผู้ใช้งานต้องสร้าง CC objects ที่มีความจำเพาะกับเครื่อง สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมให้ดูที่ [Performing a Color Compensation Experiment](#)

► เครื่อง LightCycler 480 Instruments I: ผู้ใช้งานต้องสร้าง CC objects ที่มีความจำเพาะกับเครื่อง สำหรับทุก filter และ Dye combination รวมถึง FAM/VIC และ FAM/Yellow 555

การใช้การชดเชยสัญญาณสี

สำหรับการใช้การชดเชยสัญญาณสี Color compensation จำเป็นต้องทำตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้:

- ▶ ถ้าไม่ต้องการใช้การชดเชยสัญญาณสีทั่วไป ให้รันการทดสอบการชดเชยสัญญาณสี (Color compensation experiment) ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 ที่ต้องการใช้ทำการทดสอบชนิดหลายสีพร้อมกัน สำหรับการทดลอง Color compensation จะรวบรวมข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการแก้ไขชดเชยสัญญาณสำหรับแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ไปทับซ้อนกัน สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมให้ดูที่ [Performing a Color compensation Experiment](#)
- ▶ นำข้อมูลที่ได้จาก Color compensation ไปใช้ เมื่อคุณทำการทดลองหรือเมื่อคุณวิเคราะห์การทดลอง สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมให้ดูที่ [To Apply Color compensation](#)

8.1 การทำการทดลองการชดเชยสัญญาณสี

อุณหภูมิ (Temperature profile) ที่ใช้ในโปรโตคอล Color compensation ประกอบด้วยโปรแกรม heating, cycling, temperature gradient และ cooling โปรแกรม cycling จะเหมือนกับที่ใช้กับ PCR ทั้งไปรวมถึงการอ่านสัญญาณ (data acquisition) แทนที่จะรันการทดลอง Color compensation แยก คุณสามารถรัน Color compensation reaction ไปพร้อมกับตัวอย่างทดสอบ ในกรณีนี้ ให้นำ Temperature profile ที่ใช้ในการทดลองมาใช้ แต่ให้เพิ่มโปรแกรม temperature gradient หรือ melting curve เสมอ

- ! สำหรับการรัน Color compensation ของ Hydrolysis probe มีความจำเป็นต้องทำ PCR จริง (Real PCR) เนื่องจากการตัดหรือย่อย (Cleavage) probe ด้วยเอนไซม์ Taq DNA Polymerase ระหว่างโปรแกรม Cycling ทำให้เกิดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์

ข้อมูลที่จำเป็นต้องใช้สำหรับ Color compensation ได้มาจากโปรแกรม temperature gradient โปรแกรมนี้หลังจากการแยกสายเดี่ยว (denaturation: +95°C), โปรโตคอลจะค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิจาก +40°C ไปถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ควรสูงกว่าอุณหภูมิที่แสงฟลูออเรสเซนซ์ถูกตรวจวัด ประมาณ 5 °C ระหว่างที่แสงฟลูออเรสเซนซ์ในโปรแกรม temperature gradient จะถูกตรวจวัดด้วยอัตรา 1 acquisition/°C ถ้าทำ Color compensation โดยใช้ HybProbe probe reaction ไปพร้อมกับตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ Tm calling โดยใช้โปรแกรม melting curve

- 🔍 Acquisition rate ที่เหมาะสม สำหรับ Melting curve analysis จะขึ้นอยู่กับแต่ละ assay ที่ใช้ และสามารถอยู่ในช่วง 1-5 acquisition/°C

หลังจากรัน Color compensation ซอร์ฟแวร์ LightCycler® 480 บันทึกข้อมูลที่ได้ออกจากการทดลองเป็น .ixo ซึ่งเป็นไฟล์ที่ได้จากการทดลองปกติ สำหรับข้อมูลเหล่านี้จะถูกใช้สำหรับ Color compensation คุณต้องทำการเปลี่ยนข้อมูลที่ได้ออกจากโปรแกรม temperature gradient หรือ melting curve ให้เป็น CC object และบันทึกแยกไว้

- 🔍 สำหรับทั้ง HybProbe probe และ hydrolysis probe นั้น การสร้างไฟล์การชดเชยสัญญาณสีหนึ่งไฟล์สำหรับการใช้กับสีหลายสีที่เข้าคู่กันก็เพียงพอ โดยไม่ขึ้นกับความจำเพาะของลำดับเบสของ probe ที่ใช้ แต่อย่างไรก็ตาม มีบางกรณีที่ไฟล์ CC ไม่สามารถใช้ได้ จำเป็นต้องสร้างไฟล์ CC ที่มีความจำเพาะกับการทำปฏิกิริยานั้น

- 🔍 จำเป็นต้องสร้างไฟล์ CC ใหม่ หลังจากที่ใช้เครื่อง LightCycler® 480 มีการเปลี่ยนระบบการตรวจวัดสัญญาณ ในกรณีที่เปลี่ยนหลอด Xenon ไม่จำเป็นต้องสร้างไฟล์ CC ใหม่ เนื่องจากการชดเชยสัญญาณสีไม่ขึ้นกับความเข้มของแสง หรือควรสร้างไฟล์ CC ใหม่ หลังจากเคลื่อนย้ายเครื่อง

D

ในบางการทดลองชนิด multicolor อาจสังเกตเห็นว่ากราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโค้งเข้าหา negative fluorescence ซึ่งเกิดจากการชดเชย ที่มากเกินไป (Overcompensation) เมื่อมีการนำ color compensation ที่ไม่เพียงพอมาใช้ หรือ เมื่อการวัดของรันเกิดการอึดตัว คุณก็จะสังเกตเห็นว่าเส้นกราฟสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอาจจะคิดว่าเป็น negative เป็นผลมาจากยังมีสัญญาณข้าม จากช่องสัญญาณที่อยู่ติดกัน ซึ่งสามารถเกิดจากการชดเชยสัญญาณที่ไม่เพียงพอ หากใช้การวิเคราะห์แบบ High Sensitive algorithm ของ Absolute Quantification-Second Derivative method อาจทำให้เกิดการอ่านผลเป็นผลบวกหลวง (false positive callings) ได้ สำหรับการทดลองแบบนี้ แนะนำอย่างสูงให้ใช้ แบบ High Confident algorithm หรือ Absolute Quantification-Fit point method สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมให้ดูที่ *how to improve insufficient Color Compensation*

การใช้สีที่ไม่ถูกต้องตรวจวัดในช่องสัญญาณที่อยู่ติดกัน Dye combinations ที่ใช้ใน dual-color hydrolysis probe บางคู่ ไม่จำเป็นต้องใช้ Color compensation (ดูตารางด้านล่าง)

LightCycler® 480 Instrument I	LightCycler® 480 Instrument
Cyan 500 (450-500) — Red 610 (558-610)	Cyan 500 (440-488) — Red 610 (533-610)
Cyan 500 (450-500) — Red 640 (558-640)	Cyan 500 (440-488) — Red 640 (618-660)
Cyan 500 (450-500) — Cy 5 (615-670)	Cyan 500 (440-488) — Cy 5 (618-660)
FAM (483-533) — Red 610 (558-610)	FAM (465-510) — Red 610 (533-610)
FAM (483-533) — Red 640 (558-640)	FAM (465-510) — Red 640 (618-660)
FAM (483-533) — Cy5 (615-670)	FAM (465-510) — Cy5 (618-660)
HEX / VIC (523-568) — Cy5 (615-670)	HEX / VIC (533-580) — Cy5 (618-660)

การใช้สีที่ตามตารางเหล่านี้ จะช่วยลดความยุ่งยากซับซ้อนของการทวนสอบปฏิกิริยาได้มาก

ยกตัวอย่างของการจับคู่สีสำหรับงานการใช้สี 2 สีหรือมากกว่า

เครื่อง LightCycler® 480 I, HybProbe probes:

ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง	สี	ความจำเป็นของไฟล์ CC
483	610 670	Fluos LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes
450	568 610 670	Cyan 500 Rhodamin 6G LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes

เครื่อง LightCycler® 480 I, hydrolysis probes:

ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง	สี	ความจำเป็นของไฟล์ CC
483 558	533 610	FAM LightCycler® Red 610	No
483 558 615	533 610 670	FAM LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes
450 483 523 558 615	500 533 568 610 670	Cyan 500 FAM VIC / HEX LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes

เครื่อง LightCycler® 480 II, HybProbe probes:

ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง	สี	ความจำเป็นของไฟล์ CC
498	610 660	Fluos LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes
440	580 610 660	Cyan 500 Rhodamin 6G LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes

เครื่อง LightCycler® 480 II, hydrolysis probes:

ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง	สี	ความจำเป็นของไฟล์ CC
465 533	510 580	FAM VIC / HEX	Yes, universal CC object
465 533	510 610	FAM LightCycler® Red 610	No
465 533 618	510 610 660	FAM LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes
440 498 533 618	488 580 610 660	Cyan 500 FAM LightCycler® Red 610 Cy 5	Yes

D

ในกรณีของ Color compensation ที่ไม่เพียงพอ (Insufficient Color compensation) จะทำให้เกิด overcompensation หรือ ยังคงมีการ crosstalk อยู่ให้ทำตามคำแนะนำต่อไปนี้

- ▶ ถ้าคุณไม่ต้องการเปลี่ยนสีที่ใช้ในปัจจุบัน ปรับความสูงแสงฟลูออเรสเซนซ์ของช่องสัญญาณที่ติดกันให้ใกล้เคียงหรือเท่ากัน ชนิดของสีเช่น ถ้าแสงฟลูออเรสเซนซ์ FAM วัดได้ที่ช่องสัญญาณ 533 เท่ากับ 40 units และแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสี VIC วัดได้ที่ช่องสัญญาณ 568 ได้เพียง 10 units ให้ลดปริมาณของ FAM ที่ทำให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้เหลือเพียง 10-20 units คำแนะนำนี้เกี่ยวข้องกับเฉพาะเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I ที่มี filter 533 และ 568

บันทึก: สีช่วงคลื่นสั้นมักจะให้การเปล่งสัญญาณแสงมากกว่าสีช่วงคลื่นที่ยาว

- ▶ สำหรับ assay ที่ใช้ hydrolysis probe หลายสี (multicolor hydrolysis probe assay) แนะนำอย่างสูงให้ใช้ quencher ชนิด non-fluorescent (เช่น โมเลกุลสีซึ่งสามารถกีดขวางแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ FRET reporter ได้) อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ไม่ปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์จากตัว quencher เอง Roche Diagnostics แนะนำให้ใช้ BHQ-2 สำหรับสี reporter ของทุก hydrolysis probe ซึ่งครอบคลุมงานสำหรับ Multicolor Hydrolysis Probe Detection Format สำหรับทางเลือกอื่น DABCYL ก็สามารถใช้ได้ มีประสิทธิภาพการ quenching ลดลงเล็กน้อย
- ▶ โดยทั่วไปสามารถใช้ความเข้มข้นของ hydrolysis หรือ HybProbe probe ในการทดลอง multi-color เหมือนกันกับที่ใช้การทดลองที่ใช้เพียงสีเดียว (monocolor experiment) ความเข้มข้นของแต่ละ hydrolysis probe คือ 0.05-0.2 μM หรือ ความเข้มข้นของ HybProbe probe ตัวรับ คือ 0.1-0.3 μM ความเข้มข้นของตัวให้ (FLOUS-labeled) HybProbe probes ควรอยู่ที่ 0.2 μM ขณะที่ความเข้มข้นรวมของ FLOUS-labeled donor HybProbe probes ไม่ควรเกิน 1.2 μM เตรียมผสมโพรบ ทุกเส้นของตัวให้ ชนิด HybProbe probes โดยใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน

ตรวจสอบคุณภาพของสี (dyes) และ Probes ที่ใช้ หากปริมาณของสีที่ไม่ถูกติดฉลาก (free unlabeled) สูง จะทำให้เกิดสัญญาณพื้นหลัง (background signal) สูง และจะส่งผลกระทบต่ออัตราส่วนสัญญาณ

ตรวจสอบคุณภาพของโพรบ แต่ส่วนน้อยมากที่โพรบที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นมาจะมีผลต่อการทำการตรวจสัญญาณ สามารถติดต่อตัวแทนที่ทำการสังเคราะห์โพรบได้ เช่น TIB MOLBIOL

- ▶ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง multicolor HybProbe assays มีการปรับปรุงพัฒนา color compensation โดยการสร้าง CC object ที่มีความจำเพาะกับ assay (assay-specific CC object) เช่น การทำ color compensation ที่ใช้ probe ที่มีลำดับเบสเหมือนกับที่ใช้ในการทดลอง
- ▶ โปรแกรม LightCycler® 480 ตรวจสอบทุกสีที่ใช้ว่ามี exposure time มากกว่า 40 ms หากใช้สีที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้สัญญาณสูงเกินช่วงเส้นตรง (linear range) ของกล้อง CCD ซึ่งหากเกิดกรณีนี้ ให้ปรับลดความเข้มข้นของสี probe ลง
- ▶ การสร้างไฟล์ CC ให้เตรียมปฏิบัติการตรวจสัญญาณอย่างน้อย 5 ซ้ำ
- ▶ สำหรับงานที่ต้องการหาปริมาณ โดยใช้ multi-color และจำเป็นต้องใช้การตรวจสัญญาณสี color compensation ให้ใช้การวิเคราะห์แบบ Absolute Quantification-Second Derivative method แบบ High Confident algorithm หรือ Absolute Quantification-Fit point method

วิธีการทดลองการชดเชยสัญญาณสี Color Compensation:

- 1 เตรียมปฏิกิริยา color compensation อย่างน้อย 5 ซ้ำ สำหรับแต่ละสปีฟลูออเรสเซนซ์ที่ต้องการใช้ในการทำรวมถึง Blank (เช่น buffer หรือ น้ำ) เตรียมปฏิกิริยาแบบสีเดียว (monocolor reaction: 1 สีต่อหลุม) ไม่ใช่ ปฏิกิริยาหลายสี multicolor reaction ที่ต้องการทำกับตัวอย่างตรวจ

- ▶ สำหรับการทดลอง HybProbe color compensation ไม่ใช่ HybProbe probe pairs (donor-acceptor probes) แต่ใช้ probe oligonucleotide แบบ individual เท่านั้น

Fluorescein-labeled probes

ความเข้มข้นสุดท้ายของ Fluorescein-labeled probe ในหลุม ควรจะอยู่ที่ 0.2-0.3 μM :
เตรียมผสม mix ทุกเส้นของ Fluorescein-labeled probe ที่ลำดับเบสต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน

Red dye-labeled probes

แต่ละ Red dye-labeled probe จำเป็นต้องรันแยกหลุม เนื่องจากไม่มี donor probe ความเข้มของสัญญาณของโพรบจะต่ำ ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบควรใช้อย่างน้อย 1 μM

- ▶ สำหรับการตั้งค่าและทำการทดลอง Hydrolysis color compensation การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplification reactions (เสร็จสมบูรณ์ตามขั้นตอนที่ใช้ แต่ละปฏิกิริยา ยกเว้น) blank) ควรจะประกอบเพียง hydrolysis probe 1 สีของที่จะใช้ในงาน multicolor hydrolysis probe assay ใช้ความเข้มข้นเหมือนกับกับการทดลอง

- ! การตั้งค่าและการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ hydrolysis probe จำเป็นต้องใช้การย่อยหรือตัด hydrolysis probe และปลดปล่อย report dye ออกจาก quencher มิฉะนั้นจะไม่มีแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่จำเป็นต้องใช้สำหรับ color compensation ถูกสร้างขึ้น

- ! สำหรับ blank (ตัวอย่างถูกตั้งชื่อ "Water" ใน Sample's Editor ของแถบ Color Comp(PCR mix (ไม่มี probe) สามารถใช้ได้





เปิดโปรแกรม LightCycler® 480 และใช้โปรแกรมเดียวกันกับที่มีการตั้งค่าต่างๆ สำหรับงาน

ทดลองหลายสี

- ▶ สร้างการทดลองการชดเชยสัญญาณสี Color Compensation ที่มีโปรแกรมการปรับความแตกต่างของอุณหภูมิดังนี้

Segment 1:

+95°C for 10 seconds at 4.8°C/sec (สำหรับ LightCycler® 480 Block Kit 384)

+95°C for 10 seconds at 4.4°C/sec (สำหรับ LightCycler® 480 Block Kit 96)

Segment 2:

+40°C for 30 seconds at 2.5°C/sec (สำหรับ LightCycler® 480 Block Kit 384)

+40°C for 30 seconds at 2.2°C/sec (สำหรับ LightCycler® 480 Block Kit 96)

Segment 3:

X°C ที่ 1-5 acquisition/°C, continuous;

X = experimental measurement temperature +5°C



ช่วงอุณหภูมิขั้นต่ำสำหรับการโปรแกรม melting curve analysis ต้องอยู่ที่ 17°C สำหรับ

Tm Calling, Genotyping หรือการชดเชยสีที่สำเร็จการวิเคราะห์



ใส่ข้อมูลต่อไปนี้ หากต้องการ:

Test ID: ตัวอักษรที่บ่งบอกถึงสีของ probe ที่ใช้สำหรับการทำการทดลอง

Lot No: ตัวอักษรที่บ่งบอกถึงส่วนผสมน้ำยาที่ใช้เตรียมสำหรับการทำการทดลอง

Color Comp ID: ตัวอักษรที่เกี่ยวข้องกับไฟล์ Color Compensation กับทำการทดลองที่ใช้ Color Compensation ID



เมื่อใส่ข้อมูลของ Color Comp ID, ไฟล์การชดเชยสัญญาณสี ต้องมีการเข้าคู่กันกับการ

ทดลองที่จะนำไฟล์นี้ไปใช้ หมายถึงเมื่อใช้ข้อมูล Color Comp ID ในการทำการทดลอง

จำเป็นต้องมีข้อมูล ID ให้ตรงกันกับที่ใส่ไว้ในไฟล์การชดเชยสัญญาณสี

โดยเฉพาะเวลาที่ใช้ระบบ LIMS



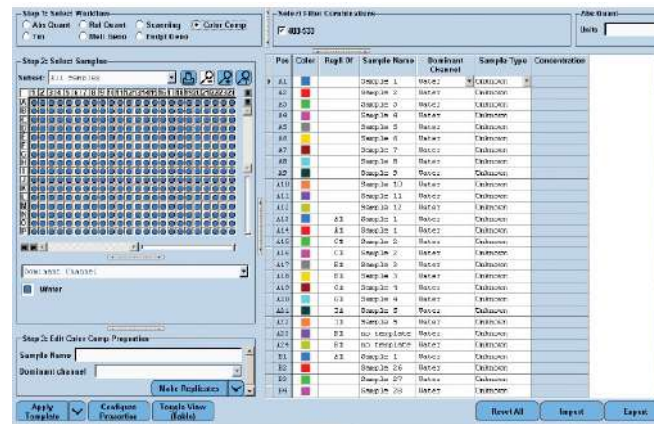
▶ สำหรับโปรแกรมการปรับความต่างของอุณหภูมิ ให้เลือก Color Compensation ในโหมดการวิเคราะห์



ถ้าใช้ Melting Curve analysis ในการรันตัวอย่างไปพร้อมกับการทำ Color Compensation สามารถวิเคราะห์ Color Compensation จากโปรแกรม Melting Curve ได้ แต่ไม่สามารถที่จะวิเคราะห์ Tm calling จากโปรแกรม Color Compensation ได้



3. คลิก Subset Editor ในแถบ Module จากนั้นสร้างกลุ่มย่อยของตัวอย่าง (subset) ที่มีเฉพาะหลุม
ที่ทำ color compensation คลิก Sample Editor ใน Module bar จากนั้น เลือก workflow Color
Comp

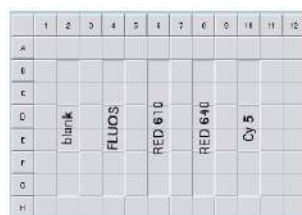


เลือกช่องเด่น (Dominant channel) ตามลำดับ สำหรับแต่ละตัวอย่าง

สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติม Sample Editor ให้ดูที่ [Entering Sample Information](#)
โปรแกรมจะใช้พารามิเตอร์เหล่านี้ สำหรับการคำนวณ

ชื่อคอลัมน์	ค่าที่ปรากฏ	คำอธิบาย
ช่องเด่น	ค่าที่แสดงจะอยู่ในรายการเลือกโดยขึ้นกับการทดลองนั้น	ช่องที่ใช้สำหรับสีในหลุมนี้ ควรเลือกช่องกรองแสงให้ เหมาะสมในแต่ละหลุม

4. ไปเปิด 20 µl ของแต่ละปฏิกิริยาที่เตรียมลงใน multiwell plate; การเซตโดยทั่วไป ตามรูปที่แสดงด้านล่าง:



ปิดเพลทโดยการซีลและปั่นเหวี่ยง ตามที่อธิบายใน [Preparing and Starting a LightCycler® 480 Instrument Run](#)

5. เมื่อเครื่องทำการทดลองเสร็จ คลิกที่ Analysis ในแถบ Module

6. จาก Create New Analysis list เลือก Color Compensation

ทุกตัวอย่างของ Color Compensation ต้องถูกนำไปวิเคราะห์พร้อมกัน โดยตั้งตัวอย่างเหล่านี้ให้อยู่ใน
subset เดียวกันหน้า Create New Analysis เลือก subset ที่ตั้งไว้ และโปรแกรมที่ใช้จะมีเพียงปกติ)
โปรแกรม (temperature gradient ซึ่งจะแสดงเป็นค่าเริ่มต้น) คลิก

7. คลิก Calculate ที่บริเวณ Action button เพื่อทำการวิเคราะห์ Color Compensation





คลิก Save CC Object โดยปกติ, CC Object จะถูกเก็บไว้ในโฟลเดอร์ CCC ซึ่งอยู่ในโฟลเดอร์ Special Data

ตอนนี้สามารถนำ Color Compensation data ไปใช้กับการทดสอบได้ สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติม อยู่ในด้านล่าง

8.2 การใช้งานการชดเชยสัญญาณสี

1

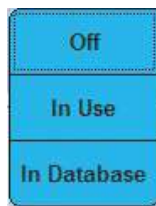
เลือก Filter combination ที่ต้องการแสดงและทำ Color Compensation โดยใช้ปุ่ม *Filter Comb*



2

▶ นำ Color Compensation ไปใช้ระหว่างที่เครื่องรันการทดสอบ คลิกลูกศรชี้ลงของปุ่ม , Color Comp จากนั้นเลือกระหว่าง In use หรือ In Database

▶ นำ Color Compensation ไปใช้กับการวิเคราะห์ กค ,Analysis module จากนั้น คลิกลูกศรชี้ลงของปุ่ม Color Comp จากนั้นเลือกระหว่าง In use หรือ In Database



Color Comp (Off)	ไม่มี Color compensation object ที่ถูกเลือกใช้ การเลือกใช้ Color Comp (Off) จะใช้ในกรณีที่ไม่ต้องการใช้ Color compensation
In Use	สามารถเลือกใช้ Color compensation object จาก Color compensation list โดยวิธีนี้จะแสดง CC object ทั้งหมดที่เขย่นำไปใช้ใน experiment Compensated filter combination จะแสดงในวงเล็บหลังของแคชชี และ CC object ในนี้ไม่สามารถลบได้
In Database	สามารถเลือกใช้ไฟล์ Color compensation จากรายการ Color compensation ทั้งหมดที่มีอยู่ สำหรับแต่ละไฟล์จะรวมชื่อ วันที่สร้าง ที่อยู่ของไฟล์และช่องกรองแสงที่ทำการชดเชยสัญญาณ

3

เลือกไฟล์ Color Compensation ที่ต้องการใช้ และคลิก OK



CC object สามารถถูกนำไปใช้ได้เฉพาะการทดลองที่ถูกรันบนเครื่อง LightCycler® 480 เดียวกันกับเครื่องที่สร้าง CC object



หลังจากเลือก CC object สำหรับการวิเคราะห์แล้ว ชื่อ ,object จะถูกเพิ่มลงในเมนู Color Compensation สำหรับการวิเคราะห์ทุกโมดูลของการทดสอบนี้

4

การทดสอบหรือการกราฟของวิเคราะห์ (analysis chart) จะถูกสร้างใหม่ สำหรับข้อมูลที่ผ่านมาการชดเชยสัญญาณ

หมายเหตุ ปุ่ม *Color Comp* จะแสดงสถานะว่า “(On)”

9 การใช้แม่แบบและมาโคร

แม่แบบ(Template)และมาโคร (Macros) เป็นวิธีที่สะดวกซึ่งเพิ่มความรวดเร็วในกระบวนการสร้างการทดลอง

แม่แบบ คือ รายการแยกเดี่ยวๆ เช่น วิธีการหรือ รายชื่อตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย ข้อมูลที่ต้องการนำไปใช้ , โดยแม่แบบที่แตกต่างกันมีดังนี้

- ▶ แม่แบบ การทดลอง (Run Template)
- ▶ แม่แบบ ตัวอย่าง (Sample Template)
- ▶ แม่แบบ กลุ่มย่อย (Subset Template)
- ▶ แม่แบบ รายงาน (Report Template)
- ▶ แม่แบบ การวิเคราะห์ (Analysis Templates)

มาโคร (Macros) คือ เซตหรือชุดของแม่แบบ ประกอบเป็นแต่ละส่วนของการทดลอง รวมไปถึงโปรแกรม (program: actual macros) ซึ่งจะเอาแม่แบบเหล่านี้ไปใช้และทำการทดลอง อัตโนมัติ

9.1 การสร้างและการใช้แม่แบบ

แม่แบบ เป็นวิธีที่สะดวกซึ่งเพิ่มความรวดเร็วในกระบวนการสร้างและวิเคราะห์ experiment แม่แบบ เป็น รายการแยกเดี่ยวๆ เช่น กลุ่มย่อยของตัวอย่างที่มีการกำหนดไว้ล่วงหน้า (predefined subset) หรือ ตาราง ตัวอย่าง (sample table) ซึ่งรวมไปถึงข้อมูลที่ต้องการใช้ในการทดสอบ (experiment) ไม่สามารถรีรัน โปรโตคอลของการทดสอบ (experiment protocol) ได้ แต่สามารถที่จะบันทึกโปรโตคอลจากการทดสอบที่มี (existing experiment) ได้ ให้เป็นแม่แบบและสามารถนำแม่แบบนี้ไปใช้กับการทดสอบที่สร้างขึ้นใหม่ได้ แม่แบบสำหรับ กลุ่มย่อย (subset) ตัวอย่าง (sample) รายงาน (report) และ การวิเคราะห์ สามารถนำไปใช้โดย ใช้วิธีเช่นเดียวกันกับแม่แบบโปรโตคอลที่กล่าวมาข้างต้น การใช้ฟังก์ชันของแม่แบบ สามารถที่จะบันทึกการ ตั้งค่าแม่แบบทั้งหมดที่สร้างจากหน้า Editor เป็น object ในฐานข้อมูล (database object) เรียกว่าไฟล์แม่แบบ (Template object) และสามารถนำแม่แบบเหล่านี้ไปใช้ได้



แม่แบบที่สร้างจาก block cycler ขนาด 384 หลุม (384-well block cycler) ไม่สามารถนำไปใช้กับการ ทดสอบที่ใช้จาก block cycler ขนาด 96 หลุม (96-well block cycler) และเช่นเดียวกับ block cycler ขนาด 96 หลุม

แม่แบบที่สร้างจาก LightCycler® 480 Instrument I ไม่สามารถนำไปใช้การทดสอบที่รันด้วยเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II และเช่นเดียวกับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II

แม่แบบสำหรับรายชื่อตัวอย่าง (sample list templates) แม่แบบการวิเคราะห์ (analysis template) และ แม่แบบรายงาน (report template) ที่สร้างด้วยโปรแกรม LightCycler® 480 รุ่นก่อนๆ จะไม่สามารถ นำไปใช้ได้กับโปรแกรม LightCycler® 480 รุ่น 1.5

D

ตารางด้านล่าง แสดงประเภทของไฟล์ (object) ที่สร้างและนำไปใช้เป็นแม่แบบได้

ชนิดไฟล์	พารามิเตอร์ที่รวมในแม่แบบ	ความคิดเห็น
Run (การทดลอง)	▶ โปรแกรมและอุณหภูมิที่ต้องการใช้ ▶ รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ ▶ การเลือกช่องกรองแสง ▶ เวลาในการตรวจวัดสัญญาณ ทั้งแบบอัตโนมัติและกำหนดเอง ▶ เลขล๊อต Lot ID ▶ เลขการทดสอบ Test ID ▶ เลขการทำการชดเชยสัญญาณ Color Compensation ID ▶ ปริมาตรปฏิกิริยา ▶ ชนิดของบล็อก ▶ ขนาดของบล็อก ▶ วันที่การทำงาน	โปรแกรม LightCycler 480 มาพร้อมกับตัวอย่างสถิติแม่แบบจำนวน 32 โปรแกรม ซึ่งเก็บอยู่ในโฟลเดอร์ Templates/RunTemplates
Subsets (กลุ่มย่อย)	▶ กลุ่มย่อยของตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ▶ กลุ่มย่อยของตัวอย่างสำหรับการรายงาน ▶ รายการกลุ่ม ▶ เลขกลุ่มย่อย subset ID ▶ ชื่อกลุ่มย่อย ▶ ขนาดบล็อก	แม่แบบกลุ่มย่อยไม่สามารถนำไปใช้ได้หลังจากการวิเคราะห์ผล โปรแกรม <i>LightCycler® 480</i> มีตัวอย่างแม่แบบอยู่ในโฟลเดอร์โฟลเดอร์ย่อย Templates/Subset Templates
Sample (ตัวอย่าง)	แม่แบบตัวอย่างประกอบด้วยขนาดบล็อก ช่องกรองแสงที่เปิดใช้ และรายชื่อตัวอย่าง สำหรับแต่ละตัวอย่าง แม่แบบจะมีคุณสมบัติตัวอย่างที่กำหนดไว้ทั้งหมด	การนำแม่แบบตัวอย่างไปใช้ การเลือกช่องกรองแสงที่อยู่ในแม่แบบจะต้องตรงกับช่องกรองแสงที่ใช้ในการทดลอง
Report (รายงาน)	รายงานแม่แบบ ประกอบไปด้วย ▶ ส่วนที่เลือกในการตั้งค่าหน้าแถบทั่วไป ▶ ส่วนที่เลือกในการตั้งค่าหน้าแถบรายละเอียด ▶ รายงานของกลุ่มย่อย ▶ รายงานของการตั้งค่า	หากในการทดลองมีไฟล์กำหนดอยู่น้อย ไฟล์ในแม่แบบจะถูกละทิ้ง แต่หากมีไฟล์กำหนดอยู่มาก ค่าเริ่มต้นจะถูกกำหนดใช้กับไฟล์ที่มีอยู่ ทั้งนี้ไม่รวมการตั้งค่าที่มองเห็นได้ เช่น เลขหน้า หรือข้อความขยาย
Quantificat. Analysis (การวิเคราะห์ปริมาณ)	▶ บันทึกข้อความ ▶ การกำหนดช่องสัญญาณ ▶ ไฟล์การชดเชยสัญญาณสี ▶ ค่าเส้นมาตรฐานจากภายนอก (เฉพาะการหาปริมาณเท่านั้น) ▶ การตั้งค่าแบบความไวสูง/ความจำเพาะสูง ▶ การตั้งค่าเฉลี่ย/ค่ากลาง	ไม่รวมตัวอย่างสถานะที่นำเข้าหรือแยกออก
Tm Analysis (การวิเคราะห์ค่า Tm)	▶ บันทึกข้อความ ▶ การกำหนดช่องสัญญาณ ▶ การตั้งค่าการชดเชยสัญญาณสี ▶ การตั้งค่า SYBR ▶ โหมดพีคยอดกราฟ (สองหรือหก) ▶ การแสดงช่องเครื่องหมายถูกหน้าบริเวณค่า Tm	▶ แม่แบบการวิเคราะห์ค่า Tm จะไม่รวมจำนวนพีคและสถานะของตัวอย่างที่นำเข้า หรือ แยก ออก จาก การ คำนวณ ▶ แม่แบบการวิเคราะห์ค่า Tm จะไม่สามารถบันทึกและนำไปใช้ได้กับการตั้งค่าชนิดกำหนดเอง

ชนิดไฟล์	พารามิเตอร์ที่รวมอยู่ในแม่แบบ
Genotype Analysis (การอ่านจีโนไทป์)	จีโนไทป์แบบ Endpoint: ▶ การกำหนดช่องสัญญาณ ▶ การตั้งค่าการชดเชยสัญญาณ ▶ กลุ่มย่อยและโปรแกรม ▶ ชื่อการวิเคราะห์และบันทึกข้อความ ▶ กลุ่มชนิด In-run/Auto เพิ่มเติมการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วย Melting Curve: ▶ ค่ามาตรฐาน Melt ▶ อุณหภูมิต่ำสุด/สูงสุด ▶ การกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสม ▶ คะแนนและเกณฑ์ความชัดเจน ▶ ความไว

เมื่อต้องการใช้งานแม่แบบหรือบันทึกไฟล์แม่แบบ ให้เปิดโปรแกรม LightCycler® 480 แล้วปุ่ม *Template* จะสามารถให้เลือกได้



ปุ่ม *Template* จะให้สามารถเลือก และนำไปใช้ กับไฟล์ object ที่เปิดอยู่และสามารถบันทึกไฟล์ object นี้เป็นแม่แบบได้

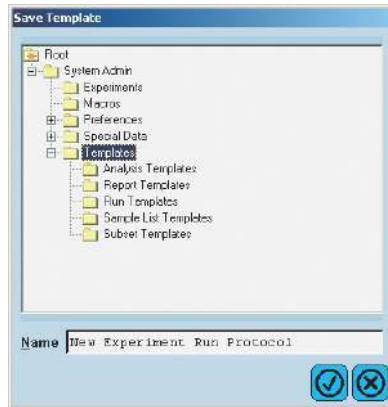


แม่แบบสามารถสร้างจากไฟล์ ที่มีอยู่เท่านั้นซึ่งกำลังเปิดใช้งานในโปรแกรม และไม่สามารถสร้างแม่แบบได้จาก ไฟล์ที่ไม่เปิดใช้งาน

D

วิธีการสร้างแม่แบบ:

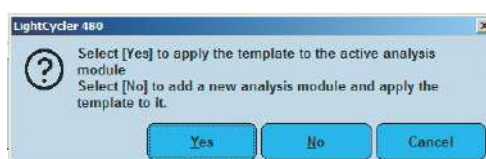
- 1 เปิดหรือสร้างไฟล์ที่ต้องการให้เป็นแม่แบบ
- 2 คลิก *Save as Template* เพื่อเปิดหน้าต่าง *Save Template*
- 3 เลือกที่อยู่ที่ต้องการให้บันทึกแม่แบบและกำหนดชื่อแม่แบบในช่อง *Name*
 ชื่อเริ่มต้นของแม่แบบ คือ ชื่อการทดสอบปัจจุบันและต่อท้ายด้วยชื่อที่ใช้ในการจัดเก็บ สำหรับการจัดเก็บเริ่มต้น ของแม่แบบทุกประเภท จะอยู่ที่โฟลเดอร์ *Template*



- 4 คลิก
- ผลลัพธ์: แม่แบบถูกบันทึกและหน้าต่างจะถูกปิดลง
- หลังจากแม่แบบถูกบันทึกในฐานข้อมูล สามารถแก้ไขได้เฉพาะชื่อแม่แบบและบันทึกข้อความเท่านั้น

การนำแม่แบบไปใช้งาน:

- 1 เปิดไฟล์ที่ต้องการนำไปใช้เป็นแม่แบบ
 - 2 คลิก *Apply Template* เพื่อเปิดหน้าต่าง *Apply Template* ซึ่งหน้าต่างจะแสดงรายชื่อแม่แบบทั้งหมดในรูปแบบการแยกย่อยเป็นแขนง
 - 3 ไฮไลต์แม่แบบที่ต้องการและคลิก หน้าต่างจะปิดลง และแม่แบบที่ต้องการจะเปิดขึ้นเพื่อให้ใช้งาน
- การที่จะเปิดใช้แม่แบบนั้น ขนาดบล็อกในแม่แบบต้องเหมือนกันกับ ขนาดบล็อกในการทดสอบ
- สามารถทำการแก้ไขเปลี่ยนแปลงไฟล์ได้ หลังจากนำแม่แบบมาใช้
- หากใช้แม่แบบไปยังหน้าการวิเคราะห์ผลซึ่งชนิดการวิเคราะห์ไม่เหมือนกัน หน้าการวิเคราะห์ใหม่ของการวิเคราะห์ที่เหมือนกันจะเปิดขึ้นอัตโนมัติ หากแม่แบบการวิเคราะห์มีชนิดการวิเคราะห์ ที่เหมือนกันกับหน้าวิเคราะห์อยู่แล้ว จะมีกล่องข้อความปรากฏและถามว่า ต้องการที่จะใช้แม่แบบ ที่หน้าการวิเคราะห์ปัจจุบันหรือสร้างหน้าการวิเคราะห์ใหม่:

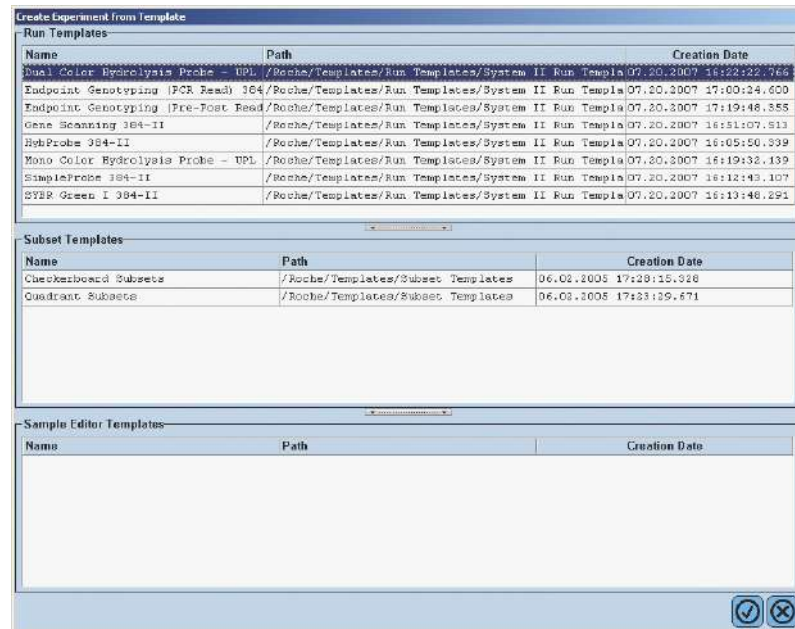


การสร้างการทดลองจากแม่แบบ:

1 คลิก *New Experiment from Template* ในหน้าต่าง *Overview*

2 หน้าต่าง *New Experiment from Template* จะแสดงดังภาพ

3 หน้า *New Experiment from template* จะแสดงเฉพาะรายชื่อของแม่แบบที่ตรงกับเครื่องที่เชื่อมต่อกับ โปรแกรม



4 (ทางเลือก) เลือกแม่แบบการทำงานจากที่เกี่ยวข้อง

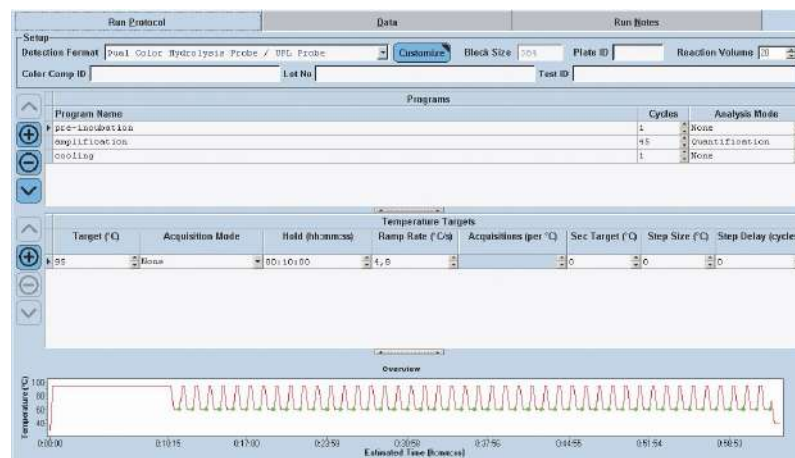
4 (ทางเลือก) เลือกแม่แบบกลุ่มย่อยที่เกี่ยวข้อง

5 (ทางเลือก) เลือกแม่แบบ *Sample Editor* ที่เกี่ยวข้อง

6 คลิก

ผลลัพธ์: Experiment จะถูกสร้างขึ้น และแม่แบบที่เลือกจากขั้นตอนที่ 3-5 จะถูกนำไปใช้

โปรแกรมการทำงานจะปรากฏดังภาพ



9.2 การสร้างและการทำงานของมาโคร

ในขณะที่แม่แบบ คือ รายการแยกเดี่ยวๆ เช่น โปรแกรมการทำงาน หรือ รายชื่อตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย ข้อมูลที่คุณต้องการนำไปใช้ มาโครคือ ชุดของแม่แบบ มาโครทำให้กระบวนการของการทดลองทั้งหมด เป็นไปอัตโนมัติ รวมถึงการตั้งโปรแกรมของการทดสอบ การใส่ข้อมูลของตัวอย่าง การทำงานการทดลอง การวิเคราะห์ผล และการสร้างใบรายงานผล สามารถใช้มาโคร เพื่อทำให้กระบวนการการทดลองและการวิเคราะห์การทดลอง จากเครื่อง LightCycler® 480 เป็นไปอย่างอัตโนมัติ



ฟังก์ชันการทำงานของมาโครจำเป็นต้องใช้เป็นพิเศษ เมื่อมีใช้งานโปรแกรม LightCycler® 480 ผ่านระบบ LIMS ลูกค้าใช้ LIMS สามารถรันเครื่อง LightCycler® 480 จากการสั่งงานระยะไกล (Remote) โดยใช้มาโครได้

อ่านหัวข้อต่อไป นี้ เพื่อเรียนรู้รายละเอียดเกี่ยวกับหัวข้อต่อไปนี้

- ▶ การสร้างมาโคร
- ▶ การเลือกและการทำงานของมาโคร

วิธีการสร้างการทดลองมาโคร:



เปิดหน้า *Summary* ของการทดลองที่ต้องการใช้เป็นพื้นฐานสำหรับมาโคร



คลิก *Save as macro* ในแถบ *Action* ของหน้า *Summary* เพื่อเปิดหน้าต่าง *Save macro*



เมื่อสร้างมาโครที่มีการใช้ไฟล์ชดเชยสัญญาณสี Color Compensation (CC) สามารถเลือกใช้ไฟล์ CC object ปัจจุบันใน มาโคร หรือเลือกใช้ขณะทำงานการทดลองมาโครก็ได้



หากคุณเลือก “Auto select Color Compensation” CC object เลือกให้อัตโนมัติจาก CC object ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดย CC object จะแสดงเมื่อ

- ▶ ไฟล์ CC object ที่สร้างจากเครื่อง
- ▶ ไฟล์ CC object ที่มีค่า Color Comp ID เดียวกันกับมาโคร (ถ้ามีการระบุ Color Comp ID)
- ▶ ไฟล์ CC object ที่เพิ่งสร้างล่าสุดซึ่งเข้าได้กับเงื่อนไขด้านบนทั้ง 2 ข้อ



ใส่ชื่อของมาโคร และค้นหาที่อยู่ ที่ต้องการจะบันทึก จากนั้น คลิก OK (ที่อยู่เริ่มต้น สำหรับบันทึกมาโคร คือ โฟลเดอร์ *Macros* ภายใต้โฟลเดอร์ของผู้ใช้ (System admin) ชื่อเริ่มต้นของมาโคร คือ “Macro” ตามด้วยชื่อการทดลอง แต่อย่างไรก็ตาม ผู้ใช้สามารถเปลี่ยนแปลงชื่อและที่เก็บบันทึกมาโคร



มาโครที่อยู่ในฐานข้อมูลที่ตรวจสอบย้อนกลับได้จะต้องมีชื่อเฉพาะ เมื่อเปิดมาโครที่ *Navigator* จะแสดงประวัติของมาโคร ยกเว้นมาโครที่เปิดอยู่ปัจจุบัน และบันทึกข้อความสามารถแก้ไขได้ในปัจจุบัน สำหรับรุ่นมาโครก่อนหน้านี้จะดูได้เพียงอย่างเดียว หากการทดลองทำจากมาโคร รายงานการทดลองจะมีรุ่นของมาโครที่ใช้ด้วย



เมื่อบันทึกมาโครในฐานข้อมูลตรวจสอบย้อนกลับได้แล้วนั้น สามารถแก้ไขบันทึกข้อความของมาโครได้ในส่วน *navigator*

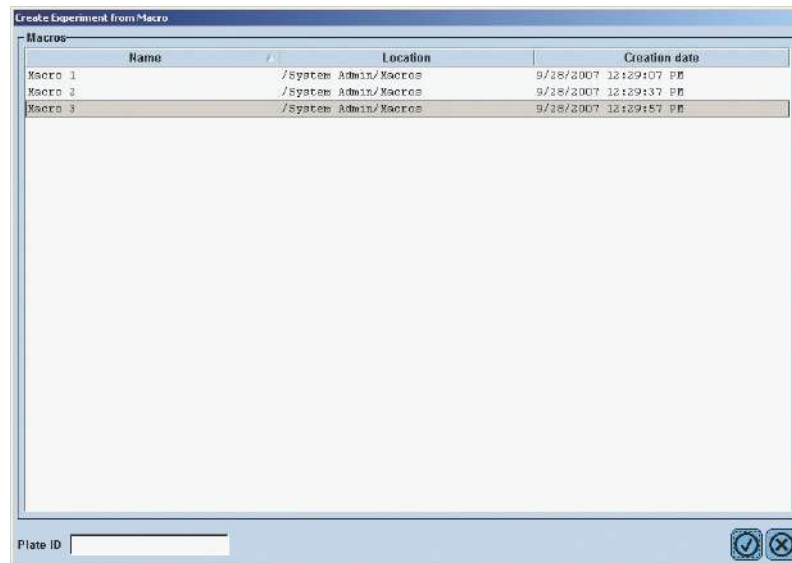
วิธีการทำการทดลองมาโคร:

1 เลือกหน้าต่าง *Overview*

2 คลิก *New Experiment from Macro* เพื่อเปิดหน้าต่างมาโคร

! ปุ่ม *New experiment from Macro* จะเปิดใช้งานได้ เมื่อโปรแกรม *LightCycler® 480* มีการเชื่อมต่อกับเครื่อง *LightCycler® 480* จริง และสถานะของเครื่องอยู่ในสถานะ *Standby* (ไม่มีเพลท) หรือ *Standby* (ใส่เพลท)

3 หน้า *Macro* รายชื่อของมาโครทั้งหมดที่แสดง คือ ผู้ใช้งานสามารถเลือกใช้งานมาโครได้และมาโครนั้นเข้าได้กับเครื่อง *LightCycler® 480* ที่มีสถานะพร้อมให้ใช้งาน



4 (ทางเลือก) ใส่ข้อมูลเลขเพลท *Plate ID* สำหรับการใช้นาโคร ในช่อง *Plate ID*

5 คลิก *Run macro*

โปรแกรมจะถามให้ใส่ชื่อและที่อยู่ของการทดลอง

6 โปรแกรม จะตรวจสอบว่าเครื่องอยู่ในสถานะพร้อมการทำงาน และ ใส่เพลท แล้วหรือยัง

ถ้าเครื่องอยู่ในสถานะที่ไม่พร้อมสำหรับการทำงาน จะมีข้อความขึ้นว่าให้ใส่เพลทลงในเครื่อง จากนั้นคลิกปุ่มยืนยัน
ถ้าเลข *Plate ID* ไม่เหมือนกัน มาโครจะไม่เริ่มทำงาน และข้อความแสดงว่าเลข *Plate ID* ไม่ตรงกัน



9
D

- เครื่องอยู่ในสถานะพร้อมสำหรับการทดลอง โปรแกรมจะเริ่มมาโคร และให้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ▶ สร้างและเปิดการทดลองใหม่
- ▶ ใช้แม่แบบการทดลอง แม่แบบกลุ่มย่อย และ แม่แบบการแก้ไขตัวอย่าง
- ▶ ให้ใส่ชื่อการทดลอง และบันทึกการทดลองก่อนเริ่มการทำงาน
- ▶ เริ่มการทำงาน

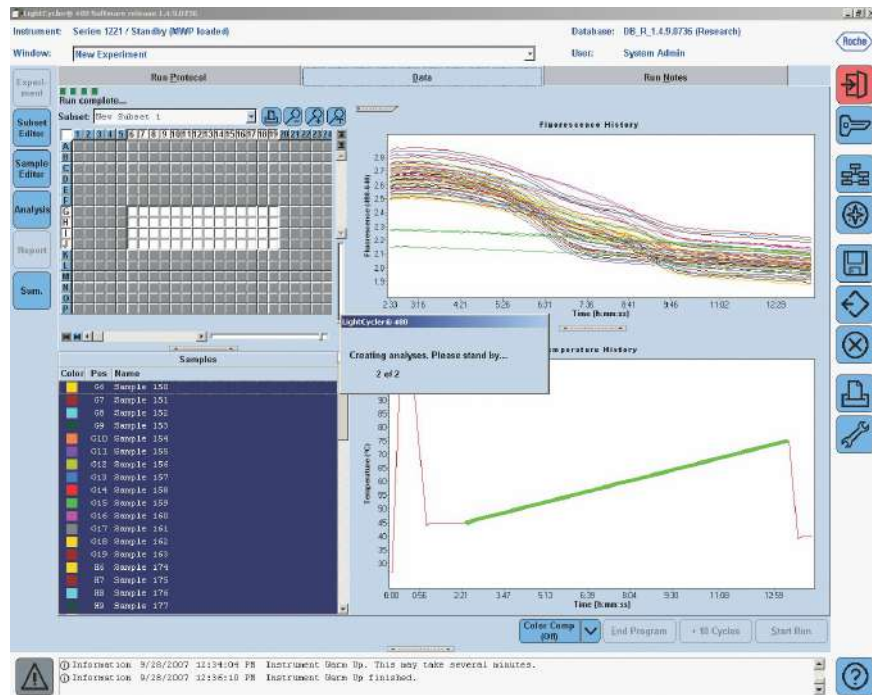
ระหว่างการทำงาน จะเข้าถึงข้อมูลการทดลองได้จำกัด ให้ใช้คุณสมบัติดังต่อไปนี้เพื่อเข้าถึงข้อมูล

- ▶ สามารถแก้ไขตัวอย่างและความคิดเห็นตัวอย่างจากหน้าต่างการแก้ไขตัวอย่าง
- ▶ ปุ่ม Import สามารถใช้งานได้ ไฟล์นำเข้า ประกอบด้วยข้อมูลชื่อตัวอย่างและบันทึกข้อความตัวอย่างในส่วนข้อมูลทั่วไป
- ▶ สามารถเข้าถึงหน้าจอต่อไปนี้ได้
 - ▶ สามารถดูหน้าต่าง Summary
 - ▶ สามารถดูหน้าต่างการทดลองและความถี่หน้าต่างการทดลองได้ โดยเข้าไปที่แถบ Data เลือกทางเลือกกราฟ
 - ▶ สามารถดูหน้าต่าง Subset Editor
 - ▶ สามารถยกเลิกการทำการทดลองได้ด้วยปุ่ม Abort Run
 - ▶ สามารถดูหน้าต่างการวิเคราะห์ Analysis
- ▶ ไม่สามารถเข้าถึงคุณสมบัติดังต่อไปนี้ได้
 - ▶ ไม่สามารถแก้ไขค่าต่างๆ ยกเว้นชื่อตัวอย่างและความคิดเห็นตัวอย่าง จากหน้าต่าง Sample Editor
 - ▶ ปุ่ม Configure Properties ไม่สามารถใช้ได้
 - ▶ ในหน้าต่าง Summary ไม่สามารถใช้ปุ่ม Save as Macro
 - ▶ การตั้งค่าทั้งหมดใน Subset Editor สามารถอ่านได้เท่านั้น
 - ▶ การตั้งค่าทั้งหมดและปุ่มในหน้าต่างการทดลองไม่สามารถใช้ได้ หรือให้อ่านได้เท่านั้น เช่นปุ่ม Color Comp บันทึกข้อความการทำงาน ปุ่ม End Program และปุ่ม Add 10 Cycles
 - ▶ ไม่สามารถเพิ่มการวิเคราะห์ระหว่างการทำการทดลองได้
 - ▶ สัญลักษณ์การรายงาน Report จะไม่เปิดใช้งาน
 - ▶ ปุ่ม Apply/Save template จะไม่สามารถใช้งานได้ในทุกหน้าต่าง



เมื่อเครื่องรันการทดสอบเสร็จ การทดลอง จะถูกบันทึกอัตโนมัติ หน้าโปรแกรมจะปรากฏหน้าต่างของ modal wait เพื่อแจ้งให้ผู้ใช้งานรอ ระหว่างที่รอ โปรแกรมจะทำงานเป็นขั้นตอนต่อไปนี้

▶ ใช้แม่แบบการวิเคราะห์ทั้งหมดและคำนวณแต่ละการวิเคราะห์ หน้าต่างการดำเนินการจะปรากฏขึ้น



▶ ถ้าคุณสร้างมาโครจากการทดลองที่มี color compensation จะมีข้อความถามว่าใช้ CC object หรือ ใช้ Smart color compensation ในกรณีที่ใช้ Smart color compensation นั้น ไฟล์ CC object ที่เกี่ยวข้องจะต้องเข้าเงื่อนไขดังต่อไปนี้

- ▶ ไฟล์ CC object จะต้องชัดเจนได้ทุกช่องสัญญาณ
- ▶ ไฟล์ CC object จะต้องใช้งานได้กับเครื่องที่กำลังทำงานอยู่
- ▶ ไฟล์ CC ID จะต้องตรงกันกับการทดลองเดิมที่ระบุใน Sample Editor
- ▶ ไฟล์ CC object จะต้องเหมาะสมกับรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ

▶ หากมาโคร มีแม่แบบสำหรับการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพันธ์ ซึ่งใช้เส้นมาตรฐานจากภายนอกหรือแม่แบบสำหรับการวิเคราะห์เอนโดพอยท์ Endpoint จะมีกล่องข้อความปรากฏ สำหรับการเลือกการทดลอง หากยกเลิกการเลือกจากกล่องข้อความ การวิเคราะห์จะไม่ถูกสร้างขึ้น

▶ ใช้งานแม่แบบการรายงาน

▶ โปรแกรมจะสร้างแบบอัตโนมัติ

▶ บันทึกการทดลอง

▶ หากใช้งานฐานข้อมูลชนิดตรวจสอบย้อนกลับได้ และได้แก้ไขข้อมูลระหว่างการทำงานการทดลอง โปรแกรมจะแสดงกล่องข้อความให้ใส่เหตุผลของการแก้ไขนั้น

▶ หากมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นระหว่างการวิเคราะห์หรือการคำนวณ กล่องข้อความจะปรากฏขึ้นทำการทำงานมาโคร แสดงทุกข้อผิดพลาดที่พบ

หลังจากทำการทดลองมาโครเสร็จ การทดลองที่บันทึกไว้ยังคงเปิดอยู่และหน้าต่างการวิเคราะห์ภาพรวมสามารถมองเห็นได้

10 การทำงานกับกลุ่มย่อย

วิธีมาตรฐานในการใช้โปรแกรม LightCycler® 480 คือ การวิเคราะห์ที่ทุกตัวอย่างในหลุมของมัลติเวลเพลทที่ซีอาร์ พร้อมกัน อีกทางเลือกหนึ่ง คุณสามารถกำหนดกลุ่มย่อยของตัวอย่างที่ต้องการใช้ สำหรับแยกการวิเคราะห์ของแต่ละกลุ่มย่อยตัวอย่าง การสร้างกลุ่มย่อยนี้มีประโยชน์มาก เช่น หากต้องการใช้แค่ส่วนหนึ่งของมัลติเวลเพลท เพื่อที่จะทดสอบการหาปริมาณของ ซีนเป้าหมาย และอีกส่วนหนึ่งของมัลติเวลเพลทเดียวกัน ในการใช้ทดสอบอื่นเป้าหมายที่ต่างกัน

สามารถกำหนดกลุ่มของตัวอย่าง (sample sets) ที่แตกต่างกันที่ใช้ สำหรับการใบรายงานผล (Report) ใบรายงานผล (Report) สามารถสร้างโดยยึดตามกลุ่มย่อยของตัวอย่างที่ต้องการให้อยู่ในใบรายงานผล (report subset) กลุ่มย่อยของตัวอย่าง สามารถกำหนดให้เป็นได้ทั้งกลุ่มย่อยของตัวอย่างที่ต้องการใช้ในการวิเคราะห์ (analysis subset) และต้องการให้อยู่ในใบรายงานผล (report subset) ใบรายงานผลสามารถมีกลุ่มของตัวอย่างที่แตกต่างจากตัวอย่างในกลุ่มย่อยที่อยู่ในการวิเคราะห์

ยกตัวอย่าง แต่ละคอลัมน์ของมัลติเวลเพลท สามารถใช้วิเคราะห์ SNP ที่แตกต่างกันได้ ในขณะที่แถวของเพลท เป็นตัวอย่างที่ แตกต่างกัน ในกรณีแต่ละคอลัมน์ของมัลติเวลเพลทคือ การวิเคราะห์กลุ่มย่อย และแถวของเพลท คือ รายงานกลุ่มย่อย



ตัวอย่างเดียวกัน สามารถกำหนดให้อยู่ในหลายกลุ่มย่อยของการวิเคราะห์กลุ่มย่อย หรือรายงานกลุ่มย่อย

Subset Editor ใช้สำหรับสร้าง แก้ไข และลบ กลุ่มย่อย การนำกลุ่มย่อย ไปใช้ ทำได้โดยคลิกการเมนูของกลุ่มย่อย ที่แถบ Data, Sample Editor, Analysis และ Report module



แนะนำอย่างสูงในการใช้จากกลุ่มย่อยและนำหลุมที่ว่างออกจากกลุ่มย่อย

ถ้าเริ่มต้นตัวอย่างกลุ่มย่อย จะถูกกำหนดทุกตัวอย่าง สำหรับการรายงานและการวิเคราะห์ซึ่ง กลุ่มย่อยทุกตัวอย่าง คือ รวมทุกหลุมในเพลทและไม่สามารถแก้ไขและลบได้

วิธีสร้างกลุ่มย่อย:

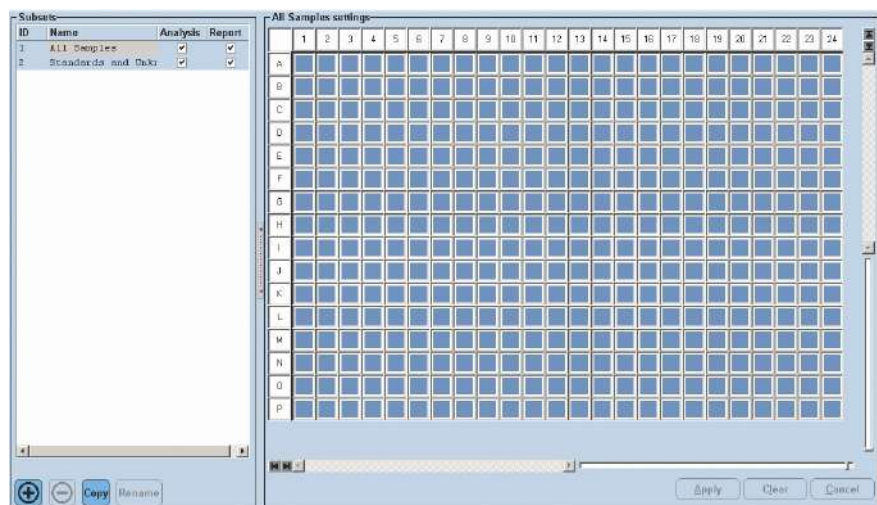
1



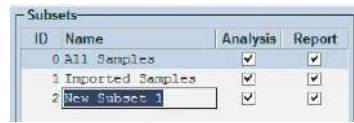
จำนวนสูงสุดของกลุ่มย่อยต่อการทดลองคือ 255 กลุ่มย่อย

2

คลิก Subset Editor ในแถบ Module หน้าต่าง Subsets จะ เปิด ขึ้น :



3. คลิก  เพื่อเปิดการสร้างแถวใหม่ของลิสต์รายชื่อกลุ่มย่อย หรือ คลิก Copy เพื่อสร้างกลุ่มย่อยใหม่จากที่กดเลือก

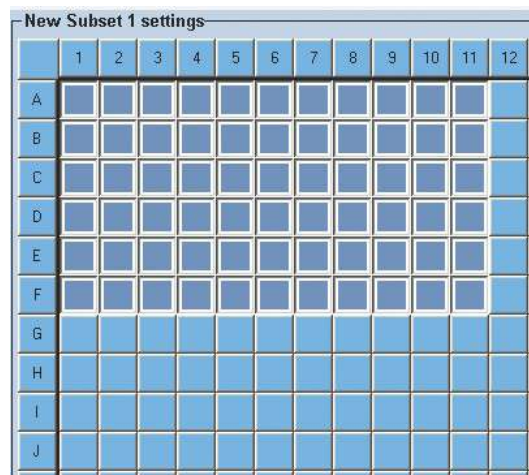


หมายเลข ID (ID number) จะถูกสร้างอัตโนมัติจากแถวใหม่ที่สร้างขึ้น “Analysis” และ “Report” จะถูกเลือกเป็นค่าเริ่มต้นของกลุ่มย่อย

4. กำหนดกลุ่มย่อยตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ▶ เลือกชนิดกลุ่มย่อย (Analysis, Report หรือทั้ง 2 ชนิดสำหรับ (กลุ่มย่อยใหม่)
- ▶ ใส่ชื่อกลุ่มย่อยที่ช่อง Name
- ▶  ชื่อของกลุ่มย่อยประกอบด้วยจำนวนตัวอักษรสูงสุดได้ไม่เกิน 25 ตัวอักษร และชื่อต้องไม่ซ้ำกันภายในการทดลองเดียวกัน

- ▶ ภาพเพลท เลือกตำแหน่งหลุม สำหรับตัวอย่างที่ต้องการให้อยู่ในกลุ่มย่อย กด <Ctrl> และคลิกตำแหน่งหลุมของตัวอย่างที่ต้องการ หรือคลิกที่คอลัมน์หรือแถว เพื่อเลือกคอลัมน์หรือแถวของตัวอย่าง อีกทางเลือกหนึ่งสามารถกด <Ctrl> และลากเมาส์ให้คลุมตำแหน่งหลุมของเพลทที่ต้องการ ระหว่างการคลุมเลือกตำแหน่งของหลุม หลุมที่ถูกเลือกจะแสดงเป็นสีน้ำเงินเข้ม



- ▶ คลิก Apply เพื่อที่จะเพิ่มหลุมที่เลือกให้อยู่ในกลุ่มย่อย
- ▶ คลิก Clear เพื่อยกเลิกการเลือก

5. เมื่อเสร็จสิ้น คลิก  บนแถบ Global action เพื่อบันทึกการทดลองที่มีการสร้างกลุ่มย่อยใหม่

-  กลุ่มย่อยเป็นสิ่งที่จำเพาะแต่ละการทดลอง สามารถแลกเปลี่ยนกลุ่มย่อยระหว่างการทดลองได้ โดยใช้ฟังก์ชันแม่แบบ

วิธีแก้ไขหรือเปลี่ยนชื่อกลุ่มย่อย:

1. เปิดการทดลองที่มีกลุ่มย่อยที่ต้องการแก้ไข
2. คลิกที่ Subset Editor ในแถบ Modules ซึ่งหน้าต่าง Subsets จะเปิดขึ้น
3. ในรายการชื่อของกลุ่มย่อย ให้คลิกไฮไลต์กลุ่มย่อยที่ต้องการแก้ไข



4 แก้ไขกลุ่มย่อยตามขั้นตอนต่อไปนี้:

- ▶ เลือกหรือลบชนิดกลุ่มย่อย (รายงาน การวิเคราะห์ หรือทั้งสอง)
- ▶ แก้ไขชื่อกลุ่มย่อย โดยคลิก *Rename* หรือคลิกที่ชื่อกลุ่มย่อยที่ต้องการ
- ▶ เลือกหรือยกเลิกการเลือกโดยใช้ปุ่ม *Control* กดค้างไว้พร้อมกับเลือกหลุมที่ต้องการแก้ไข โดยสีของหลุมที่เลือกจะแสดงกรอบสีฟ้า ส่วนหลุมที่ลบออกจะแสดงกรอบสีแดง
- ▶ คลิก *Apply* เพื่อขึ้นชั้นการเลือกหรือการยกเลิกการเลือก
- ▶ คลิก *Clear* เพื่อลบหลุมทั้งหมดที่เลือก
- ▶ คลิก *Cancel* เพื่อย้อนกลับการบันทึกล่าสุดของการแก้ไขกลุ่มย่อย
- ▶ คลิก  เพื่อลบกลุ่มย่อย



กลุ่มย่อยไม่สามารถแก้ไข เปลี่ยนชื่อ หรือลบ ถ้ากลุ่มย่อยนี้ถูกใช้ในการวิเคราะห์ผล กลุ่มย่อยที่ถูกบล็อก จะถูกไฮไลต์สีน้ำเงินที่รายการของกลุ่มย่อย

ID	Name	Analysis	Report
0	All Samples	☒	☒
1	28-CC-MC1	☒	☒
2	28-CC-MC2	☒	☒
3	28-CC-P2	☒	☒

← Editable
← Locked

5 เมื่อเสร็จสิ้น คลิกที่ ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกการทดลองที่มีการแก้ไขในกลุ่มย่อย

วิธีสร้างแม่แบบกลุ่มย่อย:

- 1 เปิดการทดลองที่มีกลุ่มย่อยที่ต้องการใช้เป็นแม่แบบ
- 2 คลิก *Subset Editor* ในแถบ *Modules* หน้าต่าง *Subsets* จะเปิดขึ้น
- 3 คลิกที่ปุ่ม *Save As Template* แล้วกล่อง *Save Template* จะเปิดขึ้นที่หน้าจอ
- 4 เลือกโฟลเดอร์และใส่ชื่อสำหรับแม่แบบใหม่เช่น ใช้โฟลเดอร์แม่แบบกลุ่มย่อยในการเก็บบันทึก เมื่อเสร็จสิ้นให้ขึ้นชั้นการบันทึกแม่แบบ

วิธีการนำแม่แบบกลุ่มย่อยไปใช้งาน:

- 1 เปิดการทดลองที่ต้องการนำแม่แบบกลุ่มย่อยมาใช้งาน
- 2 คลิก *Subset Editor* ในแถบ *Modules* หน้าต่าง *Subsets* จะเปิดขึ้น
- 3 เลือก *Apply Template* บนปุ่ม *Template* กล่องข้อความจะแสดงขึ้นที่หน้าจอ
- 4 ค้นหาและเลือกแม่แบบที่ต้องการใช้ และคลิก *Open*
กล่องข้อความจะปิดลง และกลุ่มย่อยจากแม่แบบที่เลือกจะถูกเพิ่มไปที่ *Subset Editor*



ตรวจสอบขนาดของบล็อกของแม่แบบกลุ่มย่อยว่าตรงกับที่ใช้ในการทดลองที่ต้องการใช้แม่แบบ

11 การทำงานกับแผนภูมิ

โปรแกรม LightCycler® 480 สร้างแผนภูมิกราฟหลายชนิดในระหว่างที่เครื่องกำลังทำการทดลอง และหลังจากการทดลองเสร็จสิ้น และรวมถึงแผนภูมิกราฟในส่วนของการวิเคราะห์ผล แผนภูมิกราฟทำให้คุณสามารถดูตามชนิดข้อมูล ดังต่อไปนี้

- ▶ เวลาในโปรแกรม จำนวนรอบอุณหภูมิ และการจับสัญญาณ
- ▶ ข้อมูลผลการทดลองที่ได้จากการทดลอง
- ▶ ข้อมูลและแผนภูมิกราฟจากการวิเคราะห์

สามารถพิมพ์แผนภูมิกราฟ ส่งออกแผนภูมิกราฟ ได้หลายนามสกุลของรูปภาพ คัดลอก และวางรูปแผนภูมิกราฟ สามารถทำการซูมขยายและการแพนได้ ทำให้สามารถเห็นรายละเอียดของแผนภูมิกราฟ รวมถึงเส้นชี้ขนาบได้ คลิกขวาที่แผนภูมิกราฟ จะเป็นการแสดงรายการตัวเลือกของกราฟได้ ตามตารางด้านล่าง

ทางเลือก	คำอธิบาย
Preferences	เปิดการแก้ไข <i>Chart Preferences</i> รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ที่ <i>Using Chart Preferences</i>
Print	เปิดกล่องข้อความ <i>Print</i> เพื่อทำการพิมพ์
Export Chart	เปิดกล่องข้อความ <i>Export</i> เพื่อส่งออกภาพแผนภูมิกราฟและข้อมูล
Copy to Clipboard	คัดลอกข้อมูลกราฟไปยังคลิปบอร์ด

11.1 การพิมพ์ ส่งออก และคัดลอกแผนภูมิกราฟ

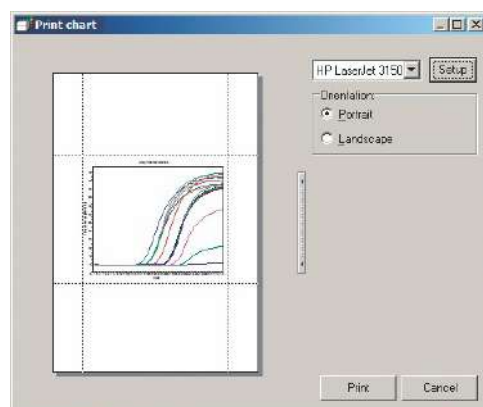
สามารถพิมพ์กราฟใดๆที่แสดงในโปรแกรม LightCycler® 480 ได้ และยังสามารถส่งออกแผนภูมิรูปภาพ และข้อมูลของกราฟแยกกันก็ได้ หรือคัดลอกและวางรูปภาพและข้อมูลของกราฟไปยังโปรแกรมอื่นได้

วิธีการพิมพ์แผนภูมิกราฟ:

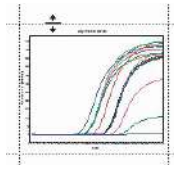
- 1 แสดงภาพแผนภูมิกราฟที่ต้องการพิมพ์

- 2 คลิกขวาที่ภายในกรอบของรูปภาพ และเลือก *Print* หน้าต่าง *Print chart* จะปรากฏขึ้น

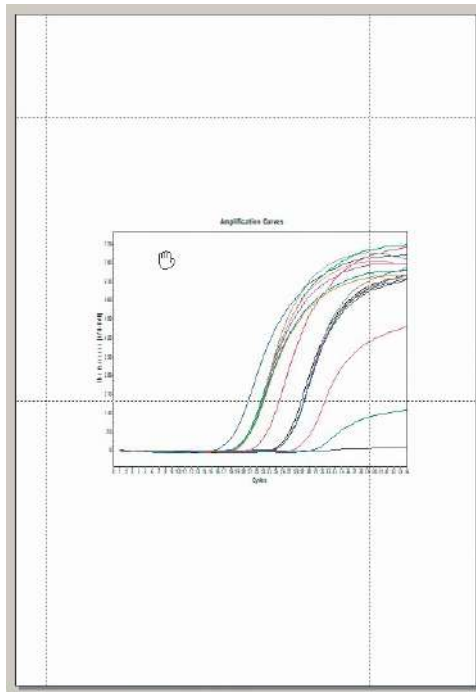
สามารถปรับขนาดหน้าต่างเพื่อให้ปรับระบะขอบของกราฟได้ง่ายขึ้น



- 3 การปรับระยะขอบของกราฟและขนาดของกราฟให้คลิกและลากเส้นระยะขอบของกราฟที่ล้อมรอบกราฟ



- 4 การเปลี่ยนตำแหน่งของรูปกราฟบนกระดาษ ให้ชี้เมาส์ไปที่รูปกราฟ จากนั้นเมาส์จะเปลี่ยนเป็นรูปมือ ให้คลิกและลากระยะขอบของกราฟไปยังตำแหน่งใหม่ที่ต้องการ จากนั้นปล่อยการคลิกเมาส์ด้านซ้าย รูปกราฟจะย้ายไปยังตำแหน่งใหม่



- 5 สามารถเลือกเครื่องพิมพ์ที่ต้องการจากเมนูรายการ ซึ่งรายการเครื่องพิมพ์ที่แสดงจะเป็นเครื่องที่ผ่านการติดตั้งผ่านระบบคอมพิวเตอร์

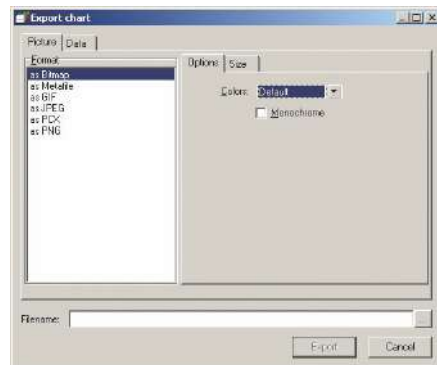


- 6 การเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆของเครื่องพิมพ์ ให้คลิก Setup จากนั้นหน้าต่างของ printer setup จะปรากฏ ให้ใส่ข้อมูลที่จำเป็น และคลิก OK

- 7 เลือกการวางแนวกระดาษ จาก (แนวตั้ง หรือ แนวนอน) Orientation และคลิก Print เพื่อขึ้นชั้น

วิธีส่งออกภาพแผนภูมิกราฟ:

- 1 แสดงภาพแผนภูมิกราฟที่ต้องการส่งออก
- 2 คลิกขวาภายในกรอบของรูปแผนภูมิกราฟและเลือก Export Chart จากนั้นหน้าต่าง Export Chart จะปรากฏขึ้น



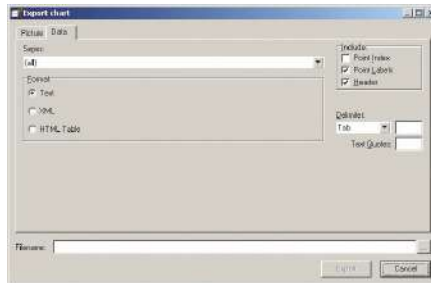
- 3 บนแถบ Picture ภายใต้ Format ให้เลือกนามสกุลของไฟล์รูปภาพที่ต้องการส่งออก
- 4 หากมีแถบ Options แสดงด้านขวา เลือก conversion option ตามต้องการ ซึ่งไม่ได้มีแสดงไว้ทุกนามสกุล ให้เลือกนามสกุลรูปภาพตามที่ต้องการ
- 5 การเปลี่ยนขนาดของรูปภาพที่ต้องการส่งออก คลิก Size และใส่ขนาดความกว้างและความยาวที่ต้องการ กด Keep aspect ratio ถ้าต้องการที่จะรักษาสัดส่วนของรูป



- 6 คลิกปุ่ม ... ทางด้านขวาของกล่อง Filename เพื่อที่จะเปิดกล่องข้อความ Select output file จากนั้นกดเลือกที่อยู่ที่ต้องการให้ภาพที่ส่งออกไปบันทึกไว้ ใส่ชื่อรูปภาพที่ต้องการแล้วกดบันทึก Save
- 7 คลิก Export เพื่อทำการส่งออกแผนภูมิกราฟ

การส่งออกข้อมูลกราฟจากโปรแกรม:

- 1 แสดงกราฟที่ต้องการนำข้อมูลส่งออก
- 2 คลิกขวาภายในกรอบของรูปภาพ และเลือก Export Chart จากนั้นหน้าต่าง Export Chart จะปรากฏ
- 3 เลือกแถบ Data



- 4 ในกล่อง Series เลือกข้อมูลที่ต้องการนำออก ชนิดของข้อมูลจะต่างกันไปขึ้นอยู่กับประเภทของกราฟ



- 5 ในกล่อง Include เลือก text labels ที่ต้องการนำออกไปพร้อมกับข้อมูล
- 6 ในกล่อง Format, เลือกสกุลไฟล์ของข้อมูลที่ต้องการ โดยสามารถสกุลไฟล์ได้ดังนี้: Text, XML และตาราง HTML
- 7 ถ้าเลือกข้อมูลสกุลไฟล์ เป็นข้อความ เลือก delimiter ในกล่อง Delimiter และสามารถเลือกได้ระหว่าง Space, Tab, Comma, Colon หรือ Custom delimiter โดยให้ใส่ Custom delimiter ที่ช่องขวาของกล่อง Delimiter
- 8 (ทางเลือก) ถ้าเลือกข้อมูลสกุลไฟล์ เป็นข้อความ สามารถกำหนดอักขระ (character) สำหรับ delimiting text characters ได้ อักขระในช่อง Text Quotes
- 9 คลิกปุ่ม  ที่ด้านขวาของ Filename box เพื่อที่จะเปิดกล่องข้อความของ Select output file
- 10 ค้นหาตำแหน่งที่จะบันทึกข้อมูลจากกราฟที่ต้องการส่งออก และใส่ชื่อรูปภาพ คลิก Select
- 11 คลิก Export เพื่อทำการส่งออกข้อมูล

วิธีการคัดลอกรูปภาพแผนภูมิกราฟและข้อมูลกราฟ:

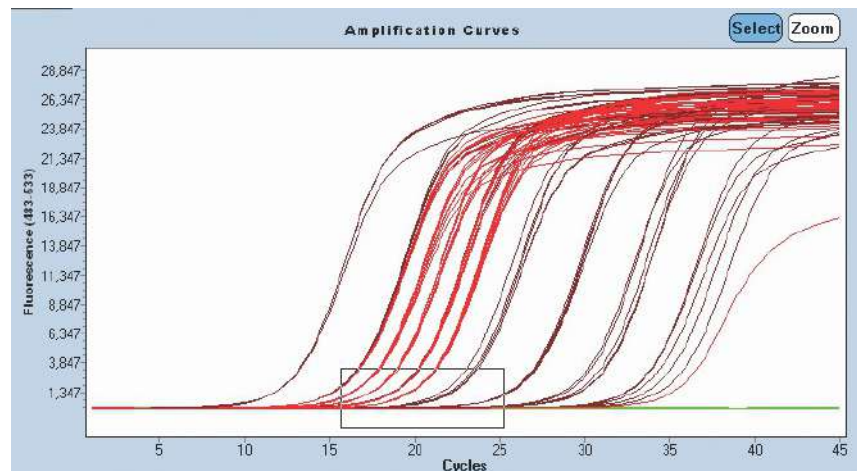
- 1 เลือกแสดงแผนภูมิกราฟที่ต้องการคัดลอก
- 2 คลิกขวาภายในขอบของรูปภาพ จากนั้นกดเลือก Copy to clipboard กราฟจะถูกบันทึกในไฟล์ bitmap และข้อมูลจะถูกบันทึกในรูปข้อความ
- 3 เพื่อวางภาพกราฟและเปิดแอปพลิเคชันกราฟิก เช่น Paint และกดปุ่ม <Ctrl-V>
- 4 เพื่อวางภาพกราฟ เปิดแอปพลิเคชันการแก้ไขข้อความ เช่น Notepad และ กดปุ่ม <Ctrl-V>

11.2 การขยายและการแพนเพื่อดูรายละเอียดของกราฟ

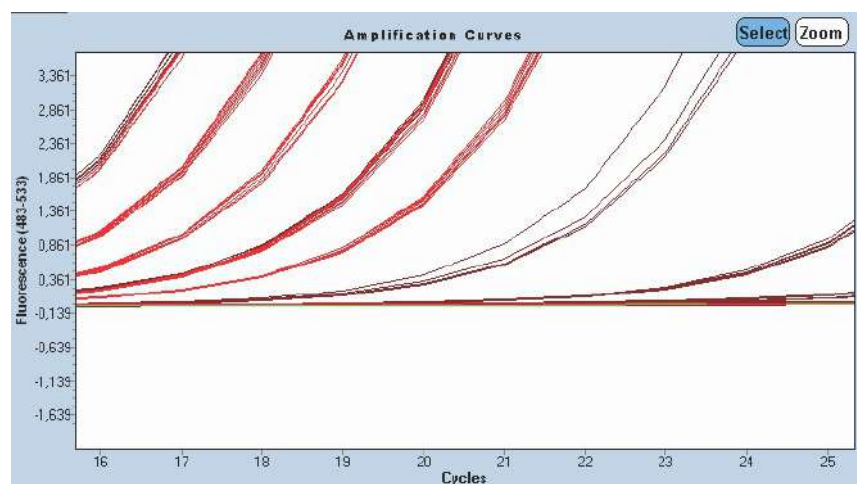
สามารถทำให้ขยายส่วนหนึ่งของกราฟใหญ่ขึ้น ได้มากเท่าที่ต้องการ เพื่อดูรายละเอียดสำคัญ

การขยายภาพ:

- 1 คลิกปุ่ม *Zoom*
- 2 วางเคอร์เซอร์ของเมาส์เหนือและด้านล่างของบริเวณของกราฟที่ต้องการขยาย
- 3 คลิกและลากเมาส์ลง ไปทางด้านขวา (พอยเตอร์ เปลี่ยนเป็นรูปสี่เหลี่ยม)



ปล่อยปุ่มเมาส์ เมื่อ Pointer เปลี่ยนเป็นรูปสี่เหลี่ยมครอบคลุมบริเวณของกราฟที่ต้องการขยาย
บริเวณที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมจะถูกขยายให้ใหญ่ขึ้น



- 4 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ตามต้องการจนเห็นรายละเอียดของกราฟที่ต้องการ
- 5 เพื่อที่จะทำให้กราฟกลับมาขนาดเท่าเดิม คลิกและลากเมาส์ขึ้นด้านบนไปทางซ้าย 1 ครั้ง

การซูมภาพ

หากต้องการเห็นส่วนของกราฟที่ไม่แสดงที่หน้าต่าง รับเมาส์ที่มีสาม ปุ่ม ให้ใช้ปุ่มกลางของเมาส์ คลิกที่กราฟ จากนั้นลากกราฟจนกระทั่งเห็นรายละเอียด แต่หากใช้เมาส์ 2 ปุ่ม ให้กดทั้ง 2 ปุ่มพร้อมกัน



สามารถใช้คุณสมบัติของเมาส์ โดยการกดสองปุ่มพร้อมกันซึ่งจะมีค่าเท่ากับการกดปุ่มกลางของเมาส์ ให้ดูรายละเอียดเพิ่มเติมจากผู้จัดการระบบหรืออ้างอิงถึงข้อแนะนำการใช้งานของอุปกรณ์ที่มาพร้อมกับเมาส์

12 การใช้ตาราง

โปรแกรม LightCycler® 480 มีการใช้ตารางที่มีรูปแบบที่แตกต่างกัน

ส่วนต่อไปนี้จะกล่าวถึงข้อมูลโดยทั่วไปที่สามารถนำไปใช้ได้กับตารางทุกรูปแบบ

นำข้อมูลจากตารางออกจากโปรแกรม:

- 1 คลิกขวา ที่ตาราง เช่น Sample table ที่หน้าต่างการวิเคราะห์
- 2 คลิก Export Table หน้าต่างของ Save Table data ปรากฏขึ้น
- 3 ใส่ file name และ location สำหรับตารางที่จะนำออกจากโปรแกรม
ถ้าตารางมีข้อมูลจากการทดลอง บรรทัดแรกของข้อมูลจะเป็นชื่อของรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ และตามด้วยช่องกรองแสงที่ใช้ บรรทัดแรกและบรรทัดที่สองจะมีชื่อหัวคอลัมน์ ข้อมูลตารางจะเป็นรูปแบบคั่นด้วยแถบ

การเรียงลำดับตารางจากคอลัมน์:

- 1 คลิกที่หัวคอลัมน์ของตาราง
คอลัมน์ที่เลือกจะเรียงลำดับจากน้อยไปมาก หรือมากไปน้อย

การเรียงลำดับข้อมูลตารางตัวอย่างด้วยแถวหรือคอลัมน์ของเพลท:

- 1 คลิกหัวข้อ Pos ของตารางตัวอย่าง
Pos column จะถูกจัดเรียงตามแถวหรือคอลัมน์ของเพลท

การเปลี่ยนความกว้างของตารางคอลัมน์:

- 1 ขยับเมาส์ไปยังเส้นขอบของตารางที่ต้องการเปลี่ยนความกว้าง
- 2 ถ้าเมาส์มีการเปลี่ยนเป็นสัญลักษณ์ลูกศรเลื่อนซ้ายขวาให้กดลากเมาส์ซ้ายจนได้ความกว้างคอลัมน์ที่ต้องการ-

การคัดลอกบางส่วนของตารางไปที่คลิปบอร์ด:

- 1 เลือกเซลล์จากตารางที่ต้องการคัดลอก โดยการคลิกและลาก หรือ <Shift> และคลิก
- 2 กด <Ctrl-C> คลิปบอร์ดจะมีเซลล์ที่เลือก
- 3 เปิดโปรแกรมที่ต้องการวางเซลล์ที่คัดลอก (MS Excel, WordPad) และกด <Ctrl-V>
เซลล์ที่คัดลอกจะปรากฏในโปรแกรมที่ต้องการ

การเลือกตัวอย่างใน Sample Editor โดยใช้ข้อมูลคลิปบอร์ด:

- 1 เปิดโปรแกรมที่ต้องการ เช่น *MS Excel* or *WordPad*
- 2 พิมพ์แต่ละตำแหน่งของตัวอย่างลงในแถวใหม่ เช่น A2, A3, B2, B3
- 3 หลังจากเลือกครบทุกแถวและคัดลอก โดยการกด <Ctrl-C>คลิปบอร์ดจะมีข้อมูลแถวที่เลือก
- 4 วางข้อมูลของตำแหน่งของตัวอย่าง เปิดซอฟต์แวร์ ,LightCycler® 480 และ กด <Ctrl-V>

13 การสร้างใบรายงานผล

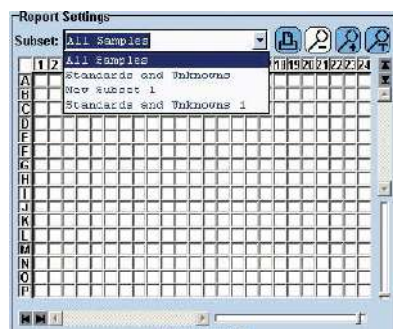
หลังจากทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบแล้ว สามารถสร้างใบรายงานผลการวิเคราะห์ที่ประกอบไปด้วยข้อมูลการทดสอบทั่วไป

(general experiment) และผลการวิเคราะห์ (analysis results) โดยสามารถเลือกสร้างใบรายงานผลตามรายละเอียดข้อมูลที่ต้องการได้ดังต่อไปนี้

- ▶ ข้อมูลสรุปการทดสอบ (Experiment summary information) เช่น ชื่อ, วันที่ทดสอบ, ผู้ทดสอบ เป็นต้น
 - ▶ โปรโตคอลการทดสอบ (Experiment protocol)
 - ▶ ข้อมูลตัวอย่าง (Sample information)
 - ▶ ข้อมูลเครื่อง (Instrument information)
 - ▶ ข้อมูล (Revision history)
 - ▶ ผลการวิเคราะห์การทดสอบและค่าการวิเคราะห์อื่นๆ (Analysis results and other analysis items) เช่น ค่าทางสถิติและการตั้งค่า
- ซึ่งขึ้นอยู่กับประเภทการวิเคราะห์ที่เลือกใช้

การสร้างและพิมพ์ใบรายงานผล:

- 1 เปิดการทดสอบซึ่งได้เลือกโหมดการวิเคราะห์ผลไว้แล้ว
- 2 กดปุ่ม *Report* จากแถบ *Module* จากนั้นจะปรากฏหน้าต่าง *Report*
- 3 ต้องกดบันทึกการทดสอบก่อนที่จะกดปุ่ม *Report*
- 3 เลือก *Subset* ของตัวอย่างที่ต้องการให้แสดงในใบรายงานผล จากช่อง *Subset list* ดังภาพ



โดยทั่วไป subset มาตรฐานจะถูกเลือกไว้เป็น *All Samples*



- 4 จากนั้นที่แถบ General และ Detailed แสดงรายการของรายละเอียดในรายงานผลให้สามารถเลือกหรือลบออกได้ รายการของในรายงานผลในส่วนของแถบ General ประกอบด้วย

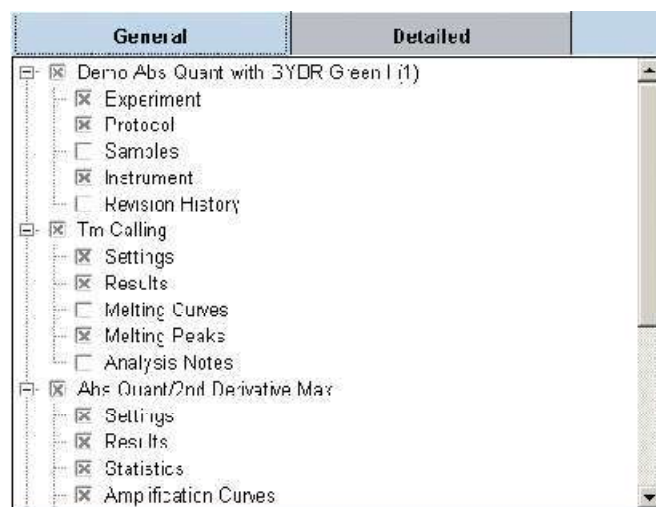
- ▶ ข้อมูลทั่วไป (General information section)
- ▶ ข้อมูลการวิเคราะห์ (Analysis sections)

รายการของในรายงานผลในส่วนของแถบ Detailed ประกอบด้วย

- ข้อมูลทั่วไป (General information section)
- ข้อมูลการวิเคราะห์ (Analysis sections)



ส่วนของการวิเคราะห์จะไม่รวมอยู่ในรายการหากไม่มีการเลือกอย่างน้อยหนึ่งตัวอย่างในการสร้างรายงาน



- 5 กดเลือกรายการตามหัวข้อ (items) ที่ต้องการ ถ้ากดเลือก Section item แล้วหัวข้อในส่วน subsections จะถูกเลือกทั้งหมดอย่างอัตโนมัติ



การเปลี่ยนแปลงที่ผ่านการตั้งค่าบนแถบ General จะเขียนทับข้อมูลปัจจุบันบนแถบ Detailed สำหรับการทำในส่วนเดียวกันหรือส่วนย่อย

- 6 การย้ายตำแหน่งของหัวข้อในรายงาน สามารถคลิ๊กแล้วลากรายการหัวข้อไปวางในตำแหน่งใหม่ในแถบ Detailed โดยสามารถลากทั้งส่วน Section item และส่วน subsections โดยที่รายการหัวข้อนั้นต้องอยู่ในหมวดหมู่เดียวกัน



อย่างไรก็ตามจะไม่สามารถเปลี่ยนลำดับของรายการหัวข้อในแถบ General ได้



ไม่สามารถลากรายการที่ไม่ได้เป็นส่วนของการรายงานนั้นๆมาใส่ตามต้องการได้ เช่นไม่สามารถลากผลของการทำ *melting temperature* มาใส่ในการวิเคราะห์หาปริมาณเป็นจำนวนจริงได้

- 7 กดบันทึก  ที่แถบ Global action โดยจะมีข้อความแจ้งให้ตั้งค่านามที่บันทึกครั้งนี้ไว้ใช้ครั้งต่อไปได้

- 8 หากบันทึกการตั้งค่าที่เปลี่ยนแปลงเรียบร้อยแล้ว และต้องการคืนค่าการตั้งค่าเริ่มต้น ให้คลิก “Default Settings” (การตั้งค่าเริ่มต้น) จากนั้นจึงปิดหน้าต่างรายงานแล้วเปิดใหม่อีกครั้ง การตั้งค่าเริ่มต้นจะถูกเรียกคืนมา



๑ กดสร้าง Generate เพื่อดูตัวอย่างใบรายงาน

View Report

Zoom (Fit Page) Page 1 of 8 PDF

LightCycler® 480 Software

Report

Demo Abs Quant with SYBR Green I (1)

Experiment

Creation Date	09.06.2005 09:50:03	Last Modified Date	25.09.2007 16:17:46
Operator	Demo	Owner	System Admin
Start Time	09.06.2005 11:24:46	End Time	09.06.2005 12:28:55
Run State	Completed	Software Version	HTC1 0.5.1.53
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates		Plate ID	
Test ID		Let ID	
Color Comp ID			
Run Notes	Detection Format: SYBR Green I Absolute Quantification with standard dilution in the same run. Melting Curve Analysis: to identify specific product (and possible primer dimers).		

Programs

Program Name: Pre-incubation

Cycles	1	Analysis Mode	None
Target (°C)	95	Acquisition Mode	None
Hold (hh:mm:ss)	00:05:00	Ramp Rate (°C/s)	4.0
Acquisitions (per °C)		Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0

Program Name: Amplification

Cycles	46	Analysis Mode	Quantification
Target (°C)	95	Acquisition Mode	None
Hold (hh:mm:ss)	00:00:10	Ramp Rate (°C/s)	4.0
Acquisitions (per °C)		Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0
Target (°C)	60	Acquisition Mode	None
Hold (hh:mm:ss)	00:00:10	Ramp Rate (°C/s)	2.0
Acquisitions (per °C)		Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0
Target (°C)	72	Acquisition Mode	Single
Hold (hh:mm:ss)	00:00:20	Ramp Rate (°C/s)	4.0
Acquisitions (per °C)		Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0

Program Name: Melting Curve

Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curve
Target (°C)	95	Acquisition Mode	None
Hold (hh:mm:ss)	00:00:10	Ramp Rate (°C/s)	4.0
Acquisitions (per °C)		Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0
Target (°C)	65	Acquisition Mode	None
Hold (hh:mm:ss)	00:01:00	Ramp Rate (°C/s)	2.0
Acquisitions (per °C)		Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0
Target (°C)	95	Acquisition Mode	Continuous
Hold (hh:mm:ss)		Ramp Rate (°C/s)	0
Acquisitions (per °C)	5	Seq Target (°C)	0
Step size (°C)	0	Step Delay (cycles)	0

Program Name: Cooling

Cycles	1	Analysis Mode	None

Demo Abs Quant with SYBR Green I (1) 27.09.2007 Page 1 of 8

13

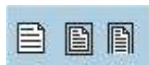
D

- ๑ สามารถซ่อนโลโก้ Roche ที่ปรากฏในรายงาน โดยใช้แท็บ Report Settings (การตั้งค่ารายงาน) ในหน้าต่างเครื่องมือ ดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่หัวข้อ [Administrative Tools](#)
- ๑ สำหรับการแสดงผลกราฟิก (graphic display) จะใช้สีตามการตั้งค่าของตัวอย่างที่กำหนดไว้ในหัวข้อ Sample Editor ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นสีที่แสดงในการวิเคราะห์ได้ เช่น ผลลัพธ์ ประเภทตัวอย่าง) สำหรับรายละเอียด (เช่น โปรดดูหัวข้อ [Entering Sample Information](#))
- ๑ คำอธิบายสำหรับแผนภูมิการวิเคราะห์ (Legends for analysis charts) มีจำกัด เส้นโค้งที่ 60 มากถึง โดยที่เส้นโค้งเพิ่มเติมอาจถูกแสดงในแผนภูมิ แต่จะไม่มีคำอธิบาย (แตกต่างกันประกอบ)
- ๑ ไม่สามารถสร้างรายงานที่มีสัญญาณการอ่านสีหลายรายการ (Displaying multiple dye signals) สำหรับตัวอย่างในรายการหรือตารางของการวิเคราะห์การทดสอบ

1๐ สามารถกดดูหน้าอื่นๆ ของใบรายงานผลได้ด้วยแถบ Page ดังภาพ:



- สามารถเลือกดูขนาดของใบรายงานได้จากแถบขนาดกระดาษ ตามภาพด้านล่าง



- ▶ ปุ่มแรก แสดงใบรายงานในรูปแบบที่พอดีกับขนาดสำหรับการพิมพ์
- ▶ ปุ่มที่สอง แสดงใบรายงานในรูปแบบที่ความกว้างและความยาวพอดีกับหน้ารายงานในหน้าต่าง
- ▶ ปุ่มที่สาม แสดงใบรายงานในรูปแบบที่ความกว้างพอดีกับหน้ารายงานในหน้าต่าง

หรือสามารถกด Zoom เพื่อขยายเข้า-ขยายออกได้หลายขนาดดังภาพ

Zoom (Fit Page)
25%
50%
75%
Actual Size
125%
150%
175%
200%
225%
250%
Fit Width
Fit Page

- สามารถสั่งพิมพ์ได้โดยกดปุ่มสัญลักษณ์เครื่องพิมพ์  ที่ตำแหน่งด้านบนของหน้าต่างของใบรายงาน

- สามารถบันทึกใบรายงานในรูปแบบไฟล์ pdf โดยกดปุ่ม PDF ที่แถบเครื่องมือ

14 การใช้งานการตั้งค่า

โปรแกรม LightCycler® 480 มีการตั้งค่าต่อไปนี้ที่จะสามารถใช้เพื่อปรับแต่งแผนภูมิและตัวอย่าง และตั้งค่าตัวเลือกเริ่มต้นต่างๆ ได้ดังนี้

- ▶ การตั้งค่าแผนภูมิ (Chart preferences) กำหนดลักษณะเริ่มต้นและเนื้อหาของแผนภูมิ
- ▶ การตั้งค่าตัวอย่าง (Sample preferences) กำหนดสีเริ่มต้นและลักษณะเส้นของตัวอย่างในแผนภูมิ
- ▶ การตั้งค่าผู้ใช้งาน (User preferences) กำหนดไดเลกทอรีนำเข้าและส่งออกริเริ่มต้นและการตั้งค่าอื่นๆ

รายการการตั้งค่าแผนภูมิและผู้ใช้จะอยู่ในโฟลเดอร์การตั้งค่า ซึ่งอยู่ในโฟลเดอร์ของผู้ใช้ ในส่วนของ LightCycler® 480 Software Navigator เมื่อเปิดรายการการตั้งค่า หน้าต่างการตั้งค่าจะถูกเปิดขึ้นในหน้าต่างหลัก สามารถมีรายการแผนภูมิได้หลายรายการ (multiple chart items) โดยแต่ละรายการมีการตั้งค่าต่างกัน สามารถระบุได้ว่ารายการใดจะเป็นค่าเริ่มต้น หากรายการการตั้งค่าแผนภูมิทั้งหมดถูกลบ โปรแกรม LightCycler® จะสร้างรายการการตั้งค่าเริ่มต้นใหม่ในครั้งต่อ 480 ไปที่เข้าสู่ระบบ

ในส่วนนี้เป็นการอธิบายถึงวิธีการดำเนินการต่อไปนี้

- ▶ ใช้การตั้งค่าแต่ละประเภท
- ▶ สร้าง instances ของรายการการกำหนดค่าตามความต้องการหลายรายการ และระบุเป็นค่าเริ่มต้นสำหรับประเภทของการกำหนดค่าตามความต้องการนั้นๆ

14.1 การใช้งานการตั้งค่าแผนภูมิ

บัญชีผู้ใช้มีรายการการตั้งค่าแผนภูมิ ซึ่งจะกำหนดลักษณะเริ่มต้นและเนื้อหาของแผนภูมิไว้แล้ว สามารถเปลี่ยนการตั้งค่าแผนภูมิเริ่มต้นได้ตามต้องการ สามารถบันทึกเวอร์ชันที่แก้ไขของรายการการกำหนดค่าตามความต้องการแผนภูมิและใช้การกำหนดค่าตามต้องการแทนค่าเริ่มต้น โดยสามารถมีรายการปรับแต่งแผนภูมิได้มากเท่าที่ต้องการ แต่ละผู้ใช้สามารถกำหนดคุณสมบัติที่แตกต่างกันสำหรับแผนภูมิได้

ข้อมูลเพิ่มเติมโปรดดูที่ส่วน “Creating a Separate Chart Preferences Item and Making It the Default” โดยสามารถแทนที่การตั้งค่าแผนภูมิปัจจุบันสำหรับแต่ละแผนภูมิ การวิเคราะห์ หรือการทดสอบ ข้อมูลเพิ่มเติมโปรดดูที่ส่วน Overriding Default Chart Preferences

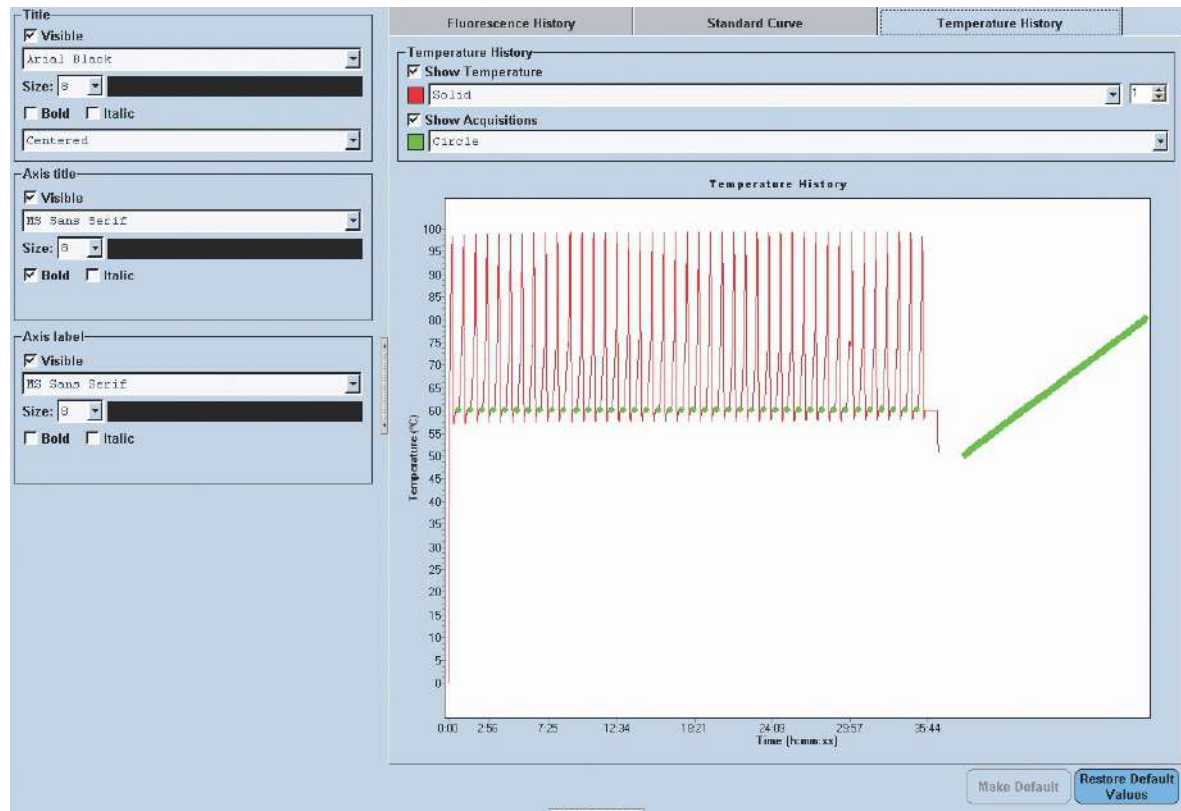


หากต้องการยกเลิกการเปลี่ยนแปลงแล้วกลับไปค่าก่อนหน้า สำหรับระดับที่ต้องการเมื่อใดให้กดที่

Restore default values

วิธีการตั้งค่าแผนภูมิแต่ละรายการ

- 1 เข้าสู่โฟลเดอร์ผู้ใช้งานใน LightCycler® 480 Software Navigator แล้วโฟลเดอร์ย่อย Preferences
- 2 ดับเบิลคลิกที่ Chart preferences จากนั้นหน้าต่างของ Chart preferences จะเปิดขึ้นในหน้าต่างหลักของซอฟต์แวร์
- 3 สามารถตั้งค่าการใช้งานตามต้องการดังนี้ โดยใช้หน้าต่าง Chart preferences
 - ▶ ส่วนหัวของแผนภูมิ และรูปแบบป้ายกำกับ โดยใช้แถบสามส่วนทางด้านซ้าย
 - ▶ เนื้อหา และลักษณะ ของประเภทของแผนภูมิ โดยใช้แถบทางด้านขวา



ไม่มีการตั้งค่าแผนภูมิ (chart preference settings) สำหรับแผนภูมิประวัติการเปิดรับแสง

14.1.1 การตั้งค่าส่วนหัวของแผนภูมิและรูปแบบป้ายกำกับ

- ▶ **Title:** ระบุชื่อแผนภูมิ
- ▶ **Axis title :** ระบุข้อความบอกลักษณะของแผนภูมิในส่วนได้แกน X และด้านซ้ายของแกน Y บนแผนภูมิ
- ▶ **Axis label :** ระบุลักษณะของการวัดบนแกน เช่น เวลาบนแกน X ของแผนภูมิสารเรืองแสง

การกำหนดชื่อและระบุลักษณะ:

- 1 ในส่วนที่เหมาะสม ให้เลือกหรือคลิกการเลือกช่องทำเครื่องหมายที่มองเห็นได้ เพื่อรวมหรือไม่รวมข้อความประเภทนี้ในแผนภูมิ
- 2 ระบุลักษณะข้อความดังนี้:
 - ▶ เลือกแบบอักษรจากรายการ (pull-down list) ในช่องแรก
 - ▶ เลือกแบบอักษรจากรายการ (pull-down list) ในช่องขนาดหรือกำหนดค่าที่ต้องการ
 - ▶ การเปลี่ยนสีอักษร ให้คลิกแถบสีทางด้านขวาของช่องขนาด เพื่อแสดงจานสี เลือกสีที่ต้องการ แล้วคลิก OK
 - ▶ การใช้อักษรตัวหนา หรือ ตัวเอียง ให้เลือก *Bold* or *Italic*
 - ▶ ในการจัดตำแหน่งชื่อแผนภูมิ ให้เลือกตำแหน่งจากรายการ pull-down list ในช่องสุดท้ายของ Title section ซิดขวา ซิดซ้าย หรือกึ่งกลาง

- 3 คลิกที่ ปุ่มบันทึก  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกการตั้งค่า

14.1.2 การระบุเนื้อหาของแผนภูมิ Fluorescence Charts

แถบ *Fluorescence* ของหน้าต่างการตั้งค่าแผนภูมิ (Chart preferences) จะควบคุมลักษณะเริ่มต้นของข้อมูลการเรืองแสง ซึ่งแสดงอยู่ใน Fluorescence History chart โดยที่ Fluorescence History chart จะแสดงบนแถบ Data ของ Experiment module

- ▶ ค่าเริ่มต้นของแกนสำหรับแผนภูมิ *Fluorescence History* ที่แสดงค่าการเรืองแสงเทียบกับเวลา รอบ หรืออุณหภูมิ
- ▶ ค่าเริ่มต้นของช่องสัญญาณสำหรับแผนภูมิแท่งการเรืองแสง *Current Fluorescence* ที่แสดงระดับการเรืองแสงสำหรับแต่ละตัวอย่างและแต่ละช่องสัญญาณ

แผนภูมิทั้งสองจะแสดงบนแถบ Online Data Display ของ Run module และบนแถบ Raw Data ของ Summary module

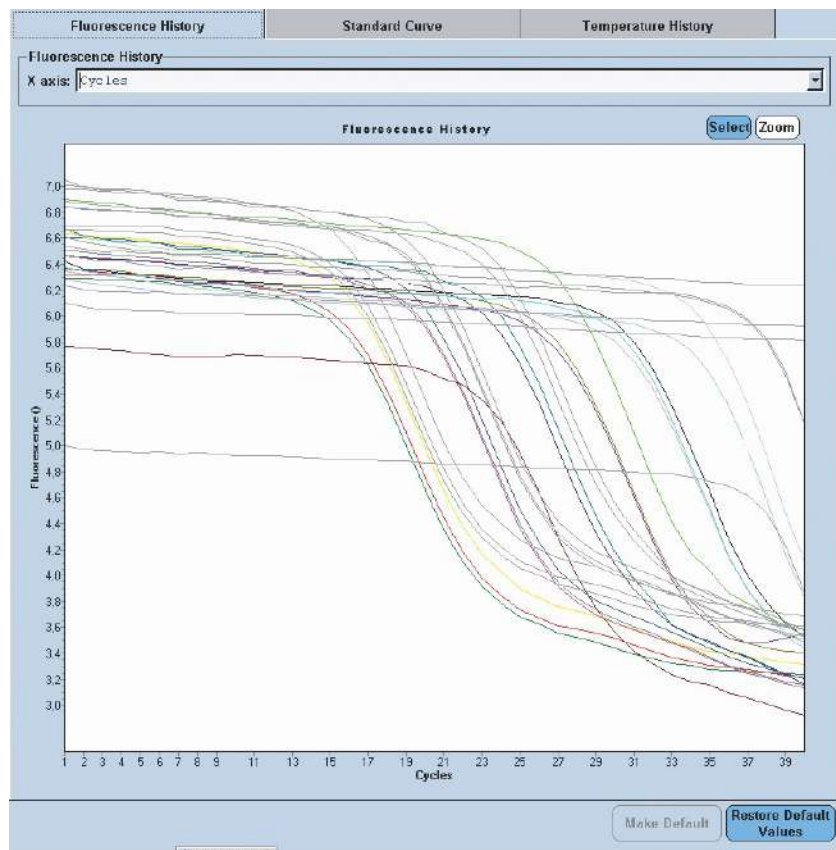
การระบุข้อมูลแผนภูมิการเรืองแสง

1

เลือกแถบ *Fluorescence History*

2

ในช่อง *Fluorescence History* ให้เลือกค่าของแกน X จากรายการ pull-down list (ได้แก่ Cycles, Time, Temperature)



คลิก  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกการตั้งค่า

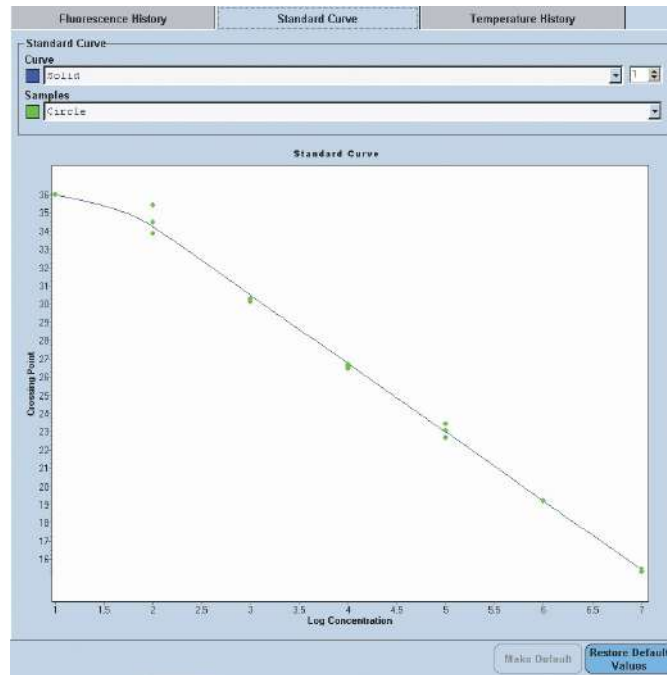
14.1.3 การระบุลักษณะที่ปรากฏของแผนภูมิ เส้นโค้งมาตรฐาน

แถบ *Standard Curve* ของหน้าต่าง *Chart preferences* จะควบคุมลักษณะที่ปรากฏของแผนภูมิ *Standard Curve* ในการวิเคราะห์แบบเชิงปริมาณ โดยสามารถระบุลักษณะที่ปรากฏของเส้น โค้งและจุดตัวอย่าง (sample points) ได้

การระบุลักษณะที่ปรากฏของเส้น โค้งและจุดตัวอย่าง:

1

เลือกแถบ *Standard Curve*



2

สามารถปรับการตั้งค่าเส้น โค้ง

- ▶ การระบุสีของเส้น ให้กดที่กล่องสี่เหลี่ยมด้าน Curve เพื่อแสดงงานสี เลือกสี แล้วคลิก *OK*
- ▶ การระบุรูปแบบของเส้น ให้เลือกรูปแบบจากรายการ pull-down list
- ▶ การระบุความกว้างของเส้น ให้เลือกหรือใส่ค่าที่ต้องการได้

3

สามารถปรับการตั้งค่าจุดแสดงตัวอย่างได้ดังนี้:

- ▶ การระบุสีของจุด ให้กดที่กล่องสี่เหลี่ยมด้าน *Samples* เพื่อดูงานสี เลือกสี แล้วจึงคลิก *OK*
- ▶ การระบุรูปแบบของจุด ให้เลือกรูปแบบจากรายการ pull-down list

4

คลิกบันทึก  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกการตั้งค่า

14.1.4 การระบุเนื้อหาและลักษณะของแผนภูมิอุณหภูมิ

แถบอุณหภูมิ (Temperature) ของหน้าต่างการตั้งค่าแผนภูมิ (Chart preferences) จะควบคุมลักษณะที่ปรากฏของแผนภูมิ Temperature History ซึ่งแสดงค่าอุณหภูมิที่อ่านได้และจุดค่าการรับแสงเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ แผนภูมิจะแสดงบนแถบ Run Protocol ซึ่งมีป้ายกำกับว่า Overview) และบนแถบข้อมูล (Data tab)

การระบุเนื้อหาและลักษณะของแผนภูมิอุณหภูมิ:



เลือกแถบ *Temperature History*



นำเข้าหรือนำออกค่าการอ่านอุณหภูมิ ให้เลือกหรือลบกล่องแสดงอุณหภูมิ *Show Temperature*



ลักษณะของเส้นอุณหภูมิตั้งบนแผนภูมิสามารถปรับได้ดังนี้

- ▶ การเลือกสีเส้น ให้กดที่กล่องสีได้ *Show Temperature* เพื่อดูตัวเลือก เลือกสีที่ต้องการ แล้วจึงกด *OK*
- ▶ การเลือกรูปแบบเส้น ให้เลือกรูปแบบจากรายการ pull-down list.
- ▶ การเลือกความกว้างของเส้น ให้ใส่ค่าหรือเลือกค่าที่ต้องการ



การเพิ่มหรือลบ fluorescence acquisition points ให้กดเลือกหรือลบกล่อง *Show Acquisitions* box



การระบุลักษณะของจุดรับ (acquisition points) บนแผนภูมิ

- ▶ การระบุสีจุด ให้กดที่กล่องสีได้ *Show Acquisitions* เพื่อดูตัวเลือก เลือกสีที่ต้องการ แล้วจึงกด *OK*
- ▶ การเลือกรูปแบบจุด ให้เลือกรูปแบบจากรายการ pull-down list



คลิกบันทึก  ในแถบ *Global action* เพื่อบันทึกการตั้งค่า

14.1.5 การแทนที่การตั้งค่าแผนภูมิเริ่มต้น

ในบางกรณีที่ต้องการแยกแผนภูมิเดี่ยว แยกการวิเคราะห์ หรือทดลองใช้การตั้งค่าแผนภูมิที่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นที่ระบุไว้ในรายการการตั้งค่าแผนภูมิ สามารถลบสำเนาการตั้งค่าเริ่มต้นในระดับต่อไปนี้

- ▶ แผนภูมิแต่ละรายการ
- ▶ แผนภูมิทั้งหมดภายในการวิเคราะห์
- ▶ แผนภูมิทั้งหมดภายในการทดสอบ

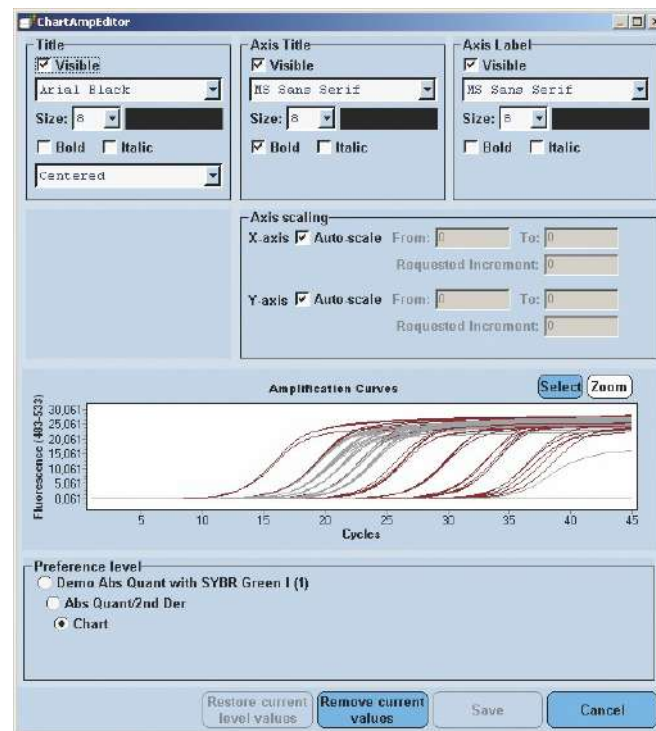
เมื่อระบุการตั้งค่าแบบกำหนดเองที่ระดับใดๆ ในสามระดับนี้ การตั้งค่าใหม่จะแทนที่ค่าเริ่มต้นสำหรับแผนภูมิในระดับนั้น

การแทนที่การตั้งค่าแผนภูมิ:

- 1 เปิด experiment และคลิกขวา ชาร์ตที่ต้องการปรับแต่ง
หากต้องการแทนที่การตั้งค่าสำหรับแผนภูมิทั้งหมดภายในการวิเคราะห์หรือภายในการทดสอบ ให้คลิกขวาที่แผนภูมิใดก็ได้ในการวิเคราะห์หรือการทดสอบ

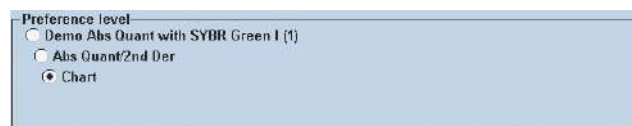
- 2 เลือก *Chart Preferences*

กล่องโต้ตอบ *ChartAmpEditor* จะเปิดขึ้น โดยมีตัวเลือกสำหรับประเภทแผนภูมิที่คล้ายกับในหน้าต่างการตั้งค่าแผนภูมิที่อธิบายไว้ข้างต้น อย่างไรก็ตาม กล่องโต้ตอบมีตัวเลือกเพิ่มเติมสำหรับการตั้งค่าแผนภูมิขนาดแกน X และ Y



- 3 ก่อนที่จะทำการเปลี่ยนแปลง ต้องเลือกระดับที่จะใช้การเปลี่ยนแปลงใน *Preference level* ในพื้นที่ระดับการตั้งค่า ให้เลือกอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้

- ▶ ชื่อการทดสอบเพื่อใช้การตั้งค่ากับแผนภูมิทั้งหมดในการทดสอบปัจจุบัน
- ▶ ชื่อการวิเคราะห์เพื่อจะปรับการตั้งค่ากับทุกชาร์ตในการวิเคราะห์ปัจจุบัน
- ▶ *Chart* ชาร์ตเพื่อปรับใช้การตั้งค่าสำหรับชาร์ตปัจจุบันเท่านั้น



- ! การตั้งค่าสามารถถูกบันทึกสำหรับเพียงหนึ่งระดับที่เวลานั้น ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงที่ระดับชาร์ต ให้เลือกระดับการวิเคราะห์และทำการเปลี่ยนแปลงแล้วจึงคลิก “Save” มิเพียงการเปลี่ยนแปลงสำหรับระดับการวิเคราะห์ถูกบันทึกเท่านั้น ยกตัวอย่างเช่น ถ้าเปลี่ยนสีหัวข้อเป็นสีฟ้าที่ระดับชาร์ตสำหรับ standard curve และบันทึกการตั้งค่า ส่วนลำดับต่อไปเปลี่ยนสีหัวข้อเป็นสีเขียวที่ระดับ experiment และบันทึกการตั้งค่า หัวข้อของ standard curve จะยังคงเป็นสีฟ้า จะไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว

- 4 การเปลี่ยนการตั้งค่าข้อความในหัวข้อ Title, Axis Title, and Axis Label boxes โปรดดูข้อมูลเพิ่มเติมในส่วน “การระบุหัวข้อชาร์ตและการกำกับรูปแบบ *Specifying Chart Heading and Label Styles*”



5 การเปลี่ยนการตั้งค่าเฉพาะของชาร์ต (ถ้ามี) ในกล่องด้านล่างส่วนของ Title การแสดงทางเลือกขึ้นอยู่กับประเภทของชาร์ต สำหรับบางประเภทของชาร์ตจะไม่มีค่าชาร์ตเฉพาะ

6 ในพื้นที่ Axis scaling สามารถเลือก Auto-scale หรือตั้งค่าช่วงของหน่วยสำหรับแกน X และ Y และขนาด

ถ้าต้องการตั้งค่าขนาดแกนด้วยตัวเอง ต้องกดคลิกออกจาก Auto-scale โดยกดคลิกเลือกในกล่องตรวจสอบที่เกี่ยวข้องกัน ดังนั้นต้องเติมค่าลงใน From, To และ Requested Increment

▶ ถ้าเลือก 0 เป็น increment size ขนาดที่เพิ่มขึ้นจะถูกกำหนดโดยอัตโนมัติ

▶ หากตั้งค่า increment size ที่ขนาดเล็กซึ่งกำกับซ้อนทับ การตั้งค่าถูกเพิกเฉยและขนาดที่เพิ่มขึ้นจะถูกกำหนดโดยอัตโนมัติ

7 ถ้าจะต้องยกเลิกการเปลี่ยนแปลงและทำซ้ำจากการตั้งค่าเดิมสำหรับเลือกระดับ แล้วคลิก Restore current level values

8 เมื่อตั้งค่าเสร็จแล้ว กดบันทึก Save

ตัวอย่างของการแทนที่การตั้งค่าแผนภูมิ:

1 คลิกขวาที่ชาร์ตการเพิ่มขยายปริมาณ (amplification curve chart) ในการวิเคราะห์แบบ Absolute Quantification analysis และเลือก Chart Preferences

2 ระดับชาร์ตถูกเลือกไว้ด้วยการตั้งค่ามาตรฐาน ให้คลิกออกจาก Auto-scale สำหรับแกน X ให้ตั้งค่าช่วงจาก 1 – 50 และคลิกปุ่ม Save เพื่อที่จะยืนยันการตั้งค่า

3 เปิด Chart Preferences ใหม่อีกครั้ง เลือกระดับ Abs Quant (analysis) แล้วคลิกออกจาก Auto-scale สำหรับแกน X แล้วตั้งค่าในช่วง 1 – 100 และบันทึกการตั้งค่า

ผล: แผนภูมิ Amplification Curve มีมาตราส่วนตั้งแต่ 1 ถึง 150 ช่วงมาตราส่วนสำหรับแผนภูมิอื่นๆ ทั้งหมดในการวิเคราะห์ เช่น แผนภูมิ Standard Curve จะเป็นคือ (1 ถึง 100)

4 เปิดการตั้งค่าแผนภูมิอีกครั้ง คลิก ลบค่าปัจจุบัน (ระดับแผนภูมิจะถูกเลือกตามค่าเริ่มต้น) (Remove Current Values) และบันทึกการตั้งค่า

ผล: แผนภูมิ Amplification Curve มีช่วงมาตราส่วนตั้งแต่ 1 ถึง 100

การตั้งค่าระดับแผนภูมิถูกลบออก ดังนั้นค่าสำหรับระดับด้านบน จึงถูก (ระดับการวิเคราะห์) นำมาใช้

5 เปิดการตั้งค่าแผนภูมิอีกครั้ง (ระดับแผนภูมิจะถูกเลือกตามค่าเริ่มต้น) และตั้งมาตราส่วนตั้งแต่ 1 ถึง 150 ให้คลิก Restore Current Level Values และปิดกล่องโต้ตอบ dialog box

ผล: แผนภูมิ Amplification Curve ยังคงมีช่วงมาตราส่วนตั้งแต่ 1 ถึง 100 เนื่องจากช่วงค่า 1 ถึง 150 ไม่ได้ถูกบันทึก เมื่อคลิก Restore Current Level Values แล้ว การบันทึกการตั้งค่าก่อนหน้านี้ที่ 1 ถึง 100 จะถูก

14.1.6 การสร้างรายการการตั้งค่าแผนภูมิแยกต่างหากและทำให้เป็นค่าเริ่มต้น

สามารถสร้างรายการการตั้งค่าแผนภูมิได้หลายรายการและระบุรายการที่จะใช้เป็นค่าเริ่มต้นได้ โดยสามารถเปลี่ยนการกำหนดค่าเริ่มต้นได้ตามต้องการ

การสร้างรายการการตั้งค่าแผนภูมิแยกต่างหากและทำให้เป็นค่าเริ่มต้น:



เข้าสู่โฟลเดอร์ซอฟต์แวร์ LightCycler® แล้วเลือก 480Navigator แล้วเปิดโฟลเดอร์ย่อย

Preferences subfolder



เลือกรายการเริ่มต้นสำหรับการตั้งค่าแผนภูมิและคัดลอกไปยังตำแหน่งที่ต้องการบันทึก แล้วตั้งชื่อสำหรับรายการการตั้งค่าใหม่ แล้วคลิก *Save*



เปิดรายการการตั้งค่าและแก้ไขการตั้งค่าตามที่อธิบายไว้ในส่วนก่อนหน้านี้



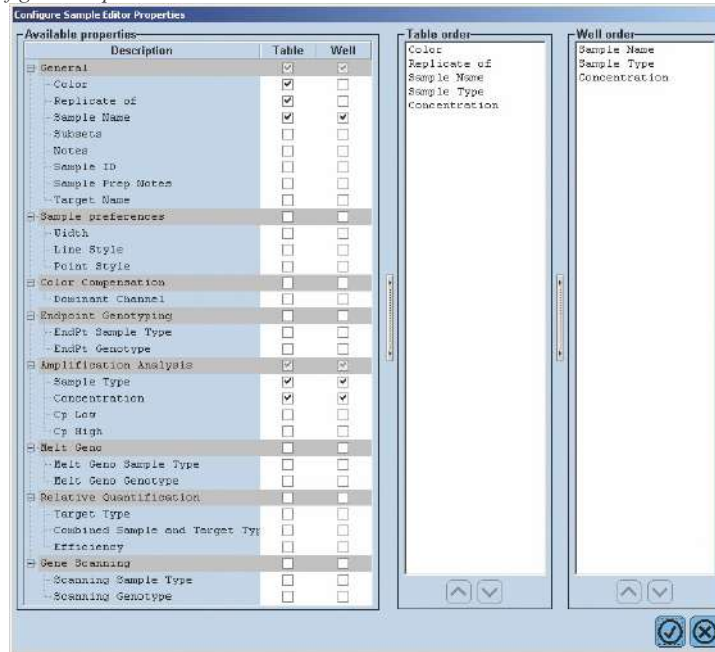
หากต้องการระบุรายการการกำหนดค่าตามที่ต้องการนี้เป็นค่าเริ่มต้น ให้คลิก *Make Default* ในหน้าต่างตัวแก้ไขค่ากำหนด *Preferences* editor pane

14.2 การใช้งานการตั้งค่าตัวอย่าง

สามารถแก้ไขลักษณะของเส้นและจุดของตัวอย่างสำหรับแผนภูมิของการทดสอบ ดังนี้

- 1 ในส่วนของแถบ *Sample Editor* ให้คลิก *Configure Properties* จะปรากฏหน้าต่าง

Configure Sample Editor



- 2 ในส่วน *Available properties* list, ให้คลิกเลือกหรือยกเลิกคุณสมบัติที่ต้องการในหมวดหมู่ของ

Sample Preferences ซึ่งจะปรากฏขึ้นในช่อง Table View และ/หรือ Plate View

- ▶ ความกว้าง
- ▶ รูปแบบเส้น
- ▶ รูปแบบจุด

การเลือกคุณสมบัติจะถูกแสดงอยู่ในรายการ Table order หรือ Well order

- 3 (ตัวเลือกเพิ่มเติม) เลือกคุณสมบัติในรายการ Table order หรือ Well order แล้วคลิกปุ่มสัญลักษณ์ขึ้นลง  หรือสัญลักษณ์ขึ้น  เพื่อเปลี่ยนลำดับของคุณสมบัติ

- 4 คลิกปุ่ม  สัญลักษณ์ถูกต้อง เพื่อปิดหน้าต่าง Configure Sample Editor Properties โดยที่คุณสมบัติถูกแสดงใน Table order หรือ Well order ตามที่ได้เลือกไว้

-  คุณสมบัตินี้จะถูกบันทึกไว้กับการทดลอง

สามารถปรับแก้ไขการตั้งค่าตัวอย่างสำหรับการทดสอบดังนี้:

- 1 การเปลี่ยนการตั้งค่าสำหรับตัวอย่าง ให้คลิกสี่เหลี่ยมสีที่อยู่ถัดจากชื่อตัวอย่างในรายการตัวอย่าง เพื่อเปิดจานสี จากนั้นเลือกสี แล้วคลิก OK

การเปลี่ยนนี้จะเป็นกับตัวอย่างที่เลือกทั้งหมด

- 2 หากต้องการเปลี่ยนชื่อตัวอย่างเริ่มต้น ให้คลิกชื่อตัวอย่างแล้วพิมพ์ชื่อใหม่ ชื่อตัวอย่างเริ่มต้นถูกนำไปใช้กับการทดสอบใหม่ การทดสอบที่มีอยู่แล้วจะไม่ได้รับผลกระทบ

- 3 หากต้องการเปลี่ยนลักษณะเส้นที่ใช้สำหรับตัวอย่าง ให้คลิกในคอลัมน์ลักษณะเส้น (Line Style) แล้วเลือกลักษณะใหม่จากรายการ pull-down ตัวอย่างเช่น สามารถเลือกเส้นประแทนเส้นทึบ



- 4 หากต้องการเปลี่ยนความกว้างของเส้น ให้คลิกในคอลัมน์ความกว้าง แล้วป้อนความกว้างใหม่

- 5 หากต้องการดูเส้นตัวอย่างของจุดวัด ให้คลิกในคอลัมน์ลักษณะจุด แล้วเลือกลักษณะจากรายการแบบ pull-down หากต้องการเส้นทึบ ให้ปล่อยPoint Style ไว้เป็น “Nothing”

- 6 คลิก บันทึก  ในแถบ Global action เพื่อบันทึกการตั้งค่า

- 7 หากต้องการดูแผนภูมิในหน้าต่างการวิเคราะห์พร้อมคุณสมบัติที่เกี่ยวข้อง ให้เลือกการตั้งค่า

Sample preferences' settings ใน Legend Property Selector

14.3 การระบุการตั้งค่าของผู้ใช้

การตั้งค่าผู้ใช้สามารถระบุได้ดังนี้

- ▶ ไคเร็กทอรีเริ่มต้นสำหรับการนำเข้าหรือส่งออกไฟล์โปรแกรม LightCycler® 480
- ▶ โฟลเดอร์ฐานข้อมูลเริ่มต้นของที่จะบันทึกการโปรแกรม LightCycler® 480 เช่น การทดลอง มาโคร และคำถาม
- ▶ แผนภูมิและการตั้งค่ารายการตัวอย่างที่จะเป็นค่าเริ่มต้นเมื่อมีหลายคุณสมบัติให้เลือก

วิธีการตั้งค่าผู้ใช้:

- 1 ในโฟลเดอร์ผู้ใช้งานของ LightCycler® 480 Software “Navigator” ให้เปิดโฟลเดอร์ย่อย “Preferences” และดับเบิลคลิก *User preferences*

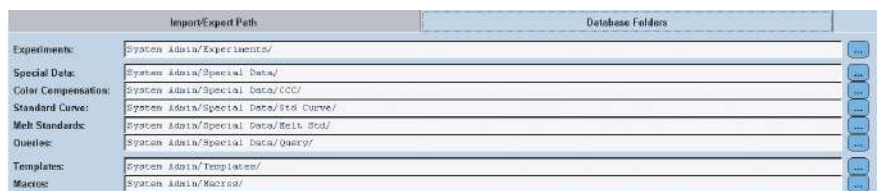
- 2 การระบุตำแหน่งที่ใช้เก็บไฟล์ import/export ให้เลือกแถบ *Import/Export Path*

ในแต่ละกล่อง ให้ระบุตำแหน่งที่ต้องการเก็บไฟล์บนคอมพิวเตอร์ หรือคลิกสัญลักษณ์ ... ด้านหลังกล่อง แล้วเลือกตำแหน่งบนคอมพิวเตอร์หรือเน็ตเวิร์คที่ต้องการเก็บ และคลิก *OK*



- 3 กรณีต้องการระบุโฟลเดอร์เริ่มต้น ให้เลือกแถบ *Database folder*

ในแต่ละกล่อง ให้ระบุตำแหน่งที่ต้องการเก็บไฟล์บนคอมพิวเตอร์ หรือคลิกสัญลักษณ์ ... ด้านหลังกล่อง แล้วเลือกตำแหน่งบนคอมพิวเตอร์หรือเน็ตเวิร์คที่ต้องการเก็บ และคลิก *OK*



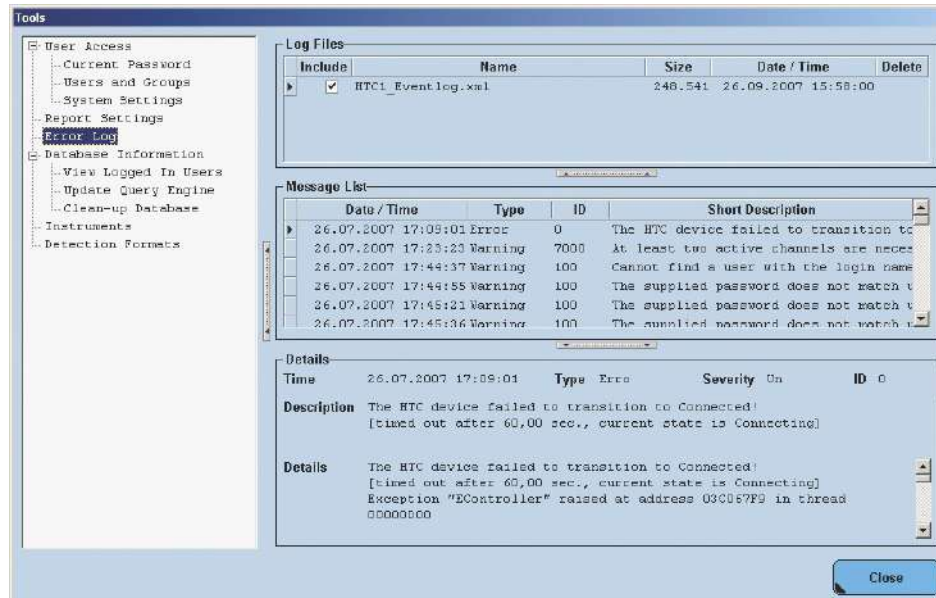
- 4 คลิกบันทึก  ที่ แถบ *Global action* เพื่อบันทึกการทดสอบด้วยการตั้งค่าใหม่



การตั้งค่านี้จะถูกปรับใช้ทุกครั้งถัดไปที่เปิดใช้งานการทดสอบ

15 เครื่องมือสำหรับการดูแลระบบ

เครื่องมือสำหรับการดูแลระบบสามารถเข้าถึงผ่าน *Tools* dialog. โดยเปิด *Tools* dialog โดยการคลิกที่ปุ่ม สัญลักษณ์รูปประแจ จะปรากฏกล่อง *Tools* ขึ้น จากนั้นให้สังเกตกล่องด้านซ้ายมือจะมีตัวเลือกให้แก้ไขทางด้านขวามือ



โดยสามารถจัดการได้ดังต่อไปนี้:

- ▶ *User Access*: การเข้าถึงซึ่งประกอบไปด้วยการจัดการรหัสผ่าน ผู้ใช้และกลุ่มบัญชีและการตั้งค่าทั่วไป
- ▶ *Report Settings*: กำหนดการตั้งค่าสำหรับใบรายงานผล
- ▶ *Error Log*: ดูบันทึกข้อผิดพลาด
- ▶ *Database Information*: ดูสถานะฐานข้อมูลและจัดการฐานข้อมูล
- ▶ *Instruments*: จัดการการตั้งค่าการเชื่อมต่อกับเครื่อง LightCycler® 480 เพื่อดูบันทึกการทำงานและดูการทดสอบ
- ▶ *Detection Formats*: กำหนดรูปแบบการตรวจจับสัญญาณ



การเข้าถึงเครื่องมือสำหรับการจัดการดูแลระบบนั้นจะขึ้นอยู่กับบทบาทของผู้ใช้

15.1 การจัดการการเข้าถึงผู้ใช้

หากต้องการใช้โปรแกรม LightCycler® 480 ต้องมีบัญชีผู้ใช้งานฐานข้อมูลโปรแกรม LightCycler® 480 โดยบัญชีผู้ใช้งานมีระดับการเข้าถึงโปรแกรมที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับบทบาทที่กำหนดให้กับบัญชีและกลุ่มที่เป็นเจ้าของบัญชี เนื้อหาส่วนนี้อธิบายถึงการใช้งานของบัญชีผู้ใช้งาน บทบาท และกลุ่ม และอธิบายวิธีการจัดการลักษณะเหล่านี้โดยใช้เครื่องมือการจัดการผู้ใช้ซอฟต์แวร์ LightCycler® 480 (User Management tool) และอธิบายถึงวิธีการเปลี่ยนรหัสผ่านผู้ใช้



บัญชีผู้ใช้งานต้องมีบทบาทผู้ดูแลระบบภายใน (Local Administrator role) เพื่อใช้เครื่องมือการเข้าถึงของผู้ใช้ User Access tool



การตั้งค่าผู้ดูแลระบบเพิ่มเติมเพื่อจัดการการเข้าถึงผู้ใช้และกลุ่มและเพื่อให้เข้าถึงหรือยกเลิกการเข้าถึงฐานข้อมูลได้

15.1.1 ทำความเข้าใจเกี่ยวกับบัญชีผู้ใช้งาน

บัญชีผู้ใช้งานให้การเข้าถึงซอฟต์แวร์ LightCycler® 480 โดยบัญชีผู้ใช้งานระบุชื่อล็อกอินและรหัสผ่านของผู้ใช้และกำหนดระดับการเข้าถึงซอฟต์แวร์ของผู้ใช้ เมื่อสร้างบัญชีผู้ใช้งาน จะต้องกำหนดบทบาทให้กับบัญชีนั้น โดยกำหนดงานที่ผู้ใช้สามารถดำเนินการได้ในการใช้ซอฟต์แวร์ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูหัวข้อ Understanding Roles นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มบัญชีผู้ใช้งานในกลุ่มตั้งแต่หนึ่งกลุ่มขึ้นไป ผู้ใช้ในกลุ่มเดียวกันมีสิทธิ์เข้าถึงสิทธิ์ที่เป็นของสมาชิกกลุ่ม สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในหัวข้อ Understanding Groups

แต่ละบัญชีผู้ใช้งานมีโฟลเดอร์ค่าเริ่มต้นในซอฟต์แวร์ LightCycler® โดยแต่ละโฟลเดอร์ไม่สามารถลบ 480 เปลี่ยนชื่อ หรือย้ายได้ อย่างไรก็ตาม แต่ละผู้ใช้งานสามารถสร้างโฟลเดอร์เพิ่มเติมภายใต้โฟลเดอร์ค่าเริ่มต้นได้

ผู้ใช้งานใช้ชื่อเรียกว่า admin (สำหรับผู้ดูแลระบบ) ถูกสร้างอย่างอัตโนมัติเมื่อซอฟต์แวร์ LightCycler® ถูก 480 ติดตั้ง ผู้ใช้งานที่เป็นผู้ดูแลไม่สามารถถูกแก้ไขใดๆได้

15.1.2 การทำความเข้าใจกลุ่ม

กลุ่มในที่นี้กล่าวถึงบัญชีของผู้ใช้งาน โดยสมาชิกของกลุ่มมีการเข้าถึงวัตถุประสงค์เดียวกันของสมาชิกแต่ละกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น สมาชิกกลุ่มสามารถเปิดการทดสอบใดๆ ของสมาชิกคนอื่นๆในกลุ่มได้

ผู้ใช้งานสามารถเข้าถึงมากกว่าหนึ่งกลุ่มได้ โดยผู้ใช้งานสามารถเข้าถึงวัตถุประสงค์งานของผู้ใช้งานอื่นได้เมื่อทั้งสองผู้ใช้งานต่างเป็นสมาชิกของอย่างน้อยหนึ่งกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น ถ้าผู้ใช้งาน Bob อยู่ในกลุ่ม A และ B ในขณะที่ผู้ใช้งาน Susan อยู่ในกลุ่ม B และ C แต่ระดับของการเข้าถึงจะถูกกำหนดตามบัญชีผู้ใช้งาน หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับกฎของผู้ใช้งาน โปรดดูในส่วนถัดไป





การตั้งค่ากลุ่มผู้ใช้งานจำเป็นสำหรับการที่มีหลายผู้ใช้ระดับเชี่ยวชาญที่ต้องการเข้าถึงฐานข้อมูลเดียวกันจากหลายส่วนควบคุมหรือการที่ส่วนควบคุมเชื่อมต่อกับระบบเครือข่าย หากผู้ใช้ต้องการแบ่งปันข้อมูลจากฐานข้อมูลซึ่งใช้ผ่านส่วนควบคุมจากหลายที่หรือผ่านระบบเครือข่าย ผู้ใช้นั้นจะต้องเป็นสมาชิกของกลุ่มก่อน รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน *Setting up a Client/Server Network*

15.1.3 การทำความเข้าใจบทบาท

แต่ละบัญชีผู้ใช้งานถูกกำหนดค่อหนึ่งกฎ แต่ละกฎจะอธิบายถึงสิทธิ์ของผู้ใช้งานนั้นๆ โดยมีทั้งหมด 3 บทบาท ดังนี้

- ▶ ผู้ใช้มาตรฐาน (standard user)
- ▶ ผู้ใช้เชี่ยวชาญ (expert user)
- ▶ ผู้ดูแลระบบ (local administrator)

บทบาทไม่สามารถสร้างหรือลบได้ แต่สามารถเปิดหรือปิดสิทธิ์การเข้าถึงบางอย่างสำหรับแต่ละบทบาทได้ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วน “Working with Roles” สามารถมี Standard Users, Expert Users และ Local Administrators ได้หลายคน



เป็นไปได้หากต้องการมีหลาย *Standard Users* *Expert Users* และ *Local Administrators*

15.1.4 สิทธิพิเศษของบทบาทผู้ใช้มาตรฐาน

ผู้ใช้งานมาตรฐาน (Standard Users) สามารถทำได้ดังต่อไปนี้:

- ▶ เปลี่ยนรหัสผ่านของพวกเขา
- ▶ ดูข้อมูลการทดลองและพิมพ์รายงาน
- ▶ ดูการทดลองและโฟลเดอร์ในส่วนเนวิเกเตอร์
- ▶ ใช้มาโคร macros
- ▶ นำเข้าและส่งออกข้อมูลในส่วนเนวิเกเตอร์
- ▶ รวมและไม่รวมตัวอย่างจากการวิเคราะห์หากเปิดใช้งานโดยผู้ดูแลระบบ
- ▶ ดูข้อมูลฐานข้อมูล
- ▶ ดูเครื่องมือวัดและเครื่องมือของแถบการเข้าสู่ระบบประวัติ
- ▶ แก้ไขบันทึกการทดสอบและบันทึกการวิเคราะห์
- ▶ แก้ไขชื่อตัวอย่าง
- ▶ ปรับแต่งการตั้งค่าสำหรับใบรายงาน

ผู้ใช้งานมาตรฐานไม่สามารถทำได้ต่อไปนี้:

- ▶ เปลี่ยนแปลงการทดลอง ยกเว้นตามที่ระบุไว้ด้านล่าง
- ▶ เปลี่ยนเครื่องมือการใช้งาน
- ▶ ดูรูปแบบการตรวจจับ (detection formats) และการตั้งค่ารายงานภายใต้ชุดเครื่องมือ
- ▶ บันทึกวัตถุประสงค์ macros หรือแม่แบบ

15.1.5 สิทธิพิเศษของบทบาทผู้ใช้ที่เชี่ยวชาญ

Expert Users สามารถทำสิ่งต่อไปนี้

- ▶ เปลี่ยนรหัสผ่านของพวกเขา
- ▶ ใช้โมดูลการเขียนโปรแกรม Run เพื่อสร้างและดำเนินการทดลอง รวมถึงกำลังติดตาม
 - ▶ ใช้ตัวแก้ไขตัวอย่าง (Sample Editor) ตัวแก้ไขคุณสมบัติ (Property Editor) และตัวแสดงคุณสมบัติ (Property Viewer)
 - ▶ ใช้ตัวแก้ไขกลุ่มย่อย (Subset Editor)
 - ▶ เพิ่มการวิเคราะห์ในการทดสอบและแก้ไขการตั้งค่าการวิเคราะห์ทั้งหมด
 - ▶ ใช้และสร้างแม่แบบ (templates) และมาโคร
- ▶ สร้างเส้นโค้งมาตรฐาน (standard curves) และวัตถุชุดเซต
- ▶ สร้าง experiment macros
- ▶ สร้าง objects อื่นๆ ทั้งหมด และการเปิด คัดลอก ดำเนินการ แก้ไข และการย้ายใดๆ สำหรับการทดลอง ซึ่งรวมถึงการแก้ไขข้อมูลตัวอย่าง การเพิ่มการวิเคราะห์ในการทดลอง การรวมถึงและการคัดลอก ตัวอย่างจากการวิเคราะห์ และการใช้แถบเครื่องมือการวิเคราะห์เพื่อเปลี่ยนการตั้งค่าการวิเคราะห์
- ▶ เปลี่ยนชื่อโฟลเดอร์และ objects ที่ไม่ใช่ค่าเริ่มต้น
- ▶ การเปิด คัดลอก และดำเนินการที่เป็นของ Local Administrator
- ▶ การเปิด คัดลอก และดำเนินการที่เป็นของ Expert Users รายอื่นที่เป็นสมาชิกของกลุ่มเดียวกัน
- ▶ ดูและคัดลอกการจากโฟลเดอร์ Roche
- ▶ ลบ objects ที่ไม่สามารถติดตามได้หากเปิดใช้งานโดย Local Administrator
- ▶ สร้างและดำเนินการค้นหา
- ▶ เปลี่ยนการตั้งค่ากำหนดต่างๆ
- ▶ จัดการรูปแบบการตรวจจับ (detection formats) เมื่อเปิดใช้งานโดย Local Administrator
- ▶ เข้าถึงกล่องเครื่องมือและการเพิ่มเครื่อง

Expert Users ไม่สามารถทำดังต่อไปนี้

- ▶ สร้าง ลบ ย้าย แก้ไข หรือเปลี่ยนชื่อ objects ที่เป็นของ Local Administrator หรือ Expert Users อื่นๆ
- ▶ ดูโฟลเดอร์หรือ objects ที่เป็นของ Expert Users ที่ไม่ได้เป็นสมาชิกของกลุ่มเดียวกัน
- ▶ ลบ ย้าย หรือเปลี่ยนชื่อโฟลเดอร์เริ่มต้น รวมถึงโฟลเดอร์ของตัวเอง

15.1.6 สิทธิพิเศษของบทบาทผู้ดูแลระบบ

Local Administrators สามารถทำได้ดังต่อไปนี้:

- ▶ ทุกสิ่งที่ Expert User สามารถทำได้
- ▶ ใช้โมดูลการเขียน Run programming เพื่อสร้างและดำเนินการการทดลอง
- ▶ สร้างและใช้เทมเพลตและ macros ที่มีอยู่เพื่อทำการทดลองและวิเคราะห์ผลลัพธ์
- ▶ สร้าง objects อื่นๆ ทั้งหมดและการเปิด คัดลอก ดำเนินการ แก้ไข ลบ และย้าย objects ใดๆ ของตนเอง สิทธิการแก้ไขรวมถึงการแก้ไขข้อมูลตัวอย่าง การเพิ่มการวิเคราะห์ในการทดลอง)และการใช้แถบเครื่องมือการวิเคราะห์เพื่อเปลี่ยนการตั้งค่าการวิเคราะห์ใดๆ)
- ▶ เปิด ดำเนินการ และคัดลอกรายการที่เป็นของ Local Administrator อื่นๆ
- ▶ เปิดรายการในโฟลเดอร์ Roche
- ▶ สร้างโฟลเดอร์ระบบที่เป็นของ Local Administrator แต่ผู้ใช้ทั้งหมดสามารถอ่านได้
- ▶ สร้าง เปิด คัดลอก ดำเนินการ แก้ไข ลบ และย้าย objects ในโฟลเดอร์ที่เป็นของ Expert Users หรือ Standard Users
- ▶ ใช้เครื่องมือ User Access เพื่อจัดการผู้ใช้งานและกลุ่ม สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูเพิ่มเติมในส่วน

Managing Users, Groups and Roles

- ▶ บำรุงรักษาฐานข้อมูล อัปเดต ทำดัชนีใหม่ และล้างข้อมูล
- ▶ เปิดใช้งานสิทธิการเข้าถึงต่อไปนี้สำหรับบทบาท
 - ▶ สำหรับ Roche Users: ความสามารถในการเข้าถึง objects ที่เป็นของ Local Administrator
 - ▶ สำหรับ Expert Users: ความสามารถในการลบ objects ที่ไม่สามารถติดตามได้ของผู้ใช้งานและแก้ไขรูปแบบการตรวจจับ

Local Administrators ไม่สามารถทำได้ดังต่อไปนี้:

- ▶ ลบหรือปิดใช้งานบัญชีผู้ดูแลระบบ admin
- ▶ แก้ไขหรือย้าย objects ในโฟลเดอร์ Roche
- ▶ ย้าย คัดลอก หรือแก้ไข objects ที่เป็นของ Local Administrator อื่น ตัวอย่างเช่น ผู้ดูแลระบบคนหนึ่งไม่สามารถคัดลอก objects ลงในโฟลเดอร์ของผู้ดูแลระบบรายอื่นได้
- ▶ Delete ลบ ย้าย คัดลอก หรือเปลี่ยนชื่อโฟลเดอร์เริ่มต้น รวมถึงโฟลเดอร์เริ่มต้นของตัวเอง



15.1.7 ผู้ใช้เข้าถึงไฟล์วัตถุประสงค์

สิทธิ์การเข้าถึง objects บางอย่าง ในฐานข้อมูล (การทดลอง โฟลเดอร์ แม่แบบ การกำหนดค่าตามความต้องการ) โปรแกรม LightCycler® 480 ถูกกำหนดโดยบทบาทของผู้ใช้งาน การเข้าถึง objects แต่ละประเภทถูกควบคุมโดยสิทธิ์เฉพาะ ตารางต่อไปนี้แสดงสิทธิ์การเข้าถึง objects ฐานข้อมูลของผู้ใช้งาน

สำหรับการทดลอง มี 6 ประเภทของสิทธิ์:

- ▶ การอ่าน (Read) – ดูการทดสอบในเนวิเกเตอร์ เปิดการทดสอบ และส่งออกการทดลองเป็นรูปแบบไฟล์
- ▶ การย้าย (Move) – ย้ายการทดสอบจากโฟลเดอร์หนึ่งไปอีกโฟลเดอร์หนึ่ง
- ▶ การปรับแก้ไข (Modify) – ทำการเปลี่ยนแปลงการทดสอบ
- ▶ การดำเนินการ (Execute) – ดำเนินการทดสอบกับเครื่องมือ
- ▶ เปลี่ยนชื่อ (Rename) — เปลี่ยนชื่อการทดสอบ
- ▶ ลบ (Delete)ลบการทดลองออกจากฐาน — ข้อมูล

Owner	Type of User	Can perform the following actions in ...	
		Traceable Database	Research Database
Admin	Experiment owner	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Administrator in same group	Read	Read, Delete
	Administrator not in group	Read	Read, Delete
	Expert user in same group	Read	Read
	Expert user not in group	Read	Read
	Standard user in same group	Read	Read
	Standard user not in group	Read	Read
Expert	Experiment Owner	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Administrator in same group	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Administrator not in group	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Expert user in sae group	Read, Modify, Execute	Read, Modify, Execute, Delete, Rename
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read	Read
	Standard user not in group	None	None

Owner	Type of User	Can perform the following actions in ...	
		Traceable Database	Research Database
Standard	Experiment Owner	Read, Move, Modify (Sample Names only)	Read, Move, Modify (Sample Names only), Rename
	Administrator in same group	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Administrator not in group	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Expert user in same group	Read, Move, Modify, Execute	Read, Move, Modify, Execute, Delete, Rename
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read	Read
	Standard user not in group	None	None



สำหรับโฟลเดอร์ มี 6 ประเภทของสิทธิ์การใช้งาน ดังนี้

- ▶ อ่าน (Read)— ดูโฟลเดอร์และข้อมูลในเนวิกเกเตอร์
- ▶ ลบ (Delete) — ลบโฟลเดอร์ว่าง
- ▶ คัดลอก (Copy) — ทำสำเนาของโฟลเดอร์ในตำแหน่งอื่น
- ▶ เขียน (Write) — บันทึกobjects ใหม่ไปยังโฟลเดอร์หรือสร้างโฟลเดอร์ย่อย
- ▶ ย้าย (Move) — ย้ายโฟลเดอร์จากโฟลเดอร์หลักหนึ่งไปยังอีกโฟลเดอร์หนึ่ง
- ▶ เปลี่ยนชื่อ (Rename)— เปลี่ยนชื่อโฟลเดอร์

Owner	Type of User	Can perform the following actions in ...	
		Traceable Database	Research Database
Admin	Folder Owner	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Delete, Copy	Read, Delete, Copy
	Administrator not in group	Read, Delete, Copy	Read, Delete, Copy
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	Read, Copy	Read, Copy
Expert	Folder Owner	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename
	Administrator not in group	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy, Write
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	None	None
Standard	Folder Owner	Read, Copy, Write, Move, Rename	Read, Copy, Write, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename
	Administrator not in group	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename
	Expert user in same group	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename	Read, Delete, Copy, Write, Move, Rename
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	None	None

สำหรับแม่แบบและ macros มี 6 ประเภทของสิทธิ์การใช้งานได้ ดังนี้:

- ▶ อ่าน (Read)— ดูและเปิดเนวิกเตอร์ส่วนนำทาง ใช้กับการทดลองและการส่งออกข้อมูล
- ▶ แก้ไข (Edit) – เปิดและแก้ไขบันทึกและประเภทแม่แบบ เท่านั้น
- ▶ ลบ (Delete) —ลบแม่แบบ
- ▶ คัดลอก (Copy) —ทำสำเนาของโฟลเดอร์ในตำแหน่งอื่น
- ▶ ย้าย (Move)— ย้ายแม่แบบ จากโฟลเดอร์หลักหนึ่งไปยังอีกโฟลเดอร์หนึ่ง
- ▶ เปลี่ยนชื่อ (Rename) — เปลี่ยนชื่อแม่แบบ

Owner	Type of User	Can perform the following actions in ...	
		Traceable Database	Research Database
Admin	Template/Macro owner	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Delete, Copy	Read, Delete, Copy
	Administrator not in group	Read, Delete, Copy	Read, Delete, Copy
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user in same group	Read	Read
	Standard user not in group	Read	Read
Expert	Template/Macro owner	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator not in group	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read	Read
	Standard user not in group	None	None
Standard	N/A (Standard user can only run macros and cannot create templates)		



สำหรับ Preference มี 6 ประเภทของสิทธิ์การใช้งานได้ ดังนี้:

- ▶ อ่าน (Read) — ดูเนวิเกเตอร์นำทาง
- ▶ แก้ไข (Edit) — เปิดและแก้ไขเนวิเกเตอร์นำทาง
- ▶ ลบ (Delete) — ลบ preference
- ▶ คัดลอก (Copy) — ทำสำเนาของ Preference ในตำแหน่งอื่น
- ▶ ย้าย (Move) ย้าย — Preference จากโฟลเดอร์หลักไปยังอีกโฟลเดอร์หนึ่ง
- ▶ เปลี่ยนชื่อ (Rename) — เปลี่ยนชื่อโฟลเดอร์ของ preference

Owner	Type of User	Can perform the following actions in ...	
		Traceable Database	Research Database
Admin	Preference owner	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Delete, Copy	Read, Delete, Copy
	Administrator not in group	Read, Delete, Copy	Read, Delete, Copy
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	Read, Copy	Read, Copy
Expert	Preference owner	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator not in group	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	None	None
Standard	Preference owner	Read, Edit, Copy, Move	Read, Edit, Copy, Move, Rename
	Administrator in same group	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Administrator not in group	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Expert user in same group	Read, Edit, Delete, Copy, Move	Read, Edit, Delete, Copy, Move, Rename
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	None	None

Standard objects ประกอบไปด้วย standard curves, melt standards, และ Color Compensation objects

สำหรับ standard object มี 5 ประเภทของสิทธิ์การใช้งานดังนี้

- ▶ อ่าน (Read) — ดูไฟล์เดอร์และเนื้อหาในส่วนเนวิกเตอร์นำทาง
- ▶ เปลี่ยนชื่อ (Rename) — เปลี่ยนชื่อ standard object
- ▶ ลบ (Delete) — ลบ standard object
- ▶ คัดลอก (Copy) — ทำสำเนาของ standard object ไปยังตำแหน่งอื่น
- ▶ ย้าย (Move) — ย้าย standard object จากไฟล์เดอร์หลักหนึ่งไปยังอีกไฟล์เดอร์หนึ่ง

Owner	Type of User	Can perform the following actions in ...	
		Traceable Database	Research Database
Admin	Standard object owner	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Administrator in same group	Read, Copy	Read, Delete, Copy
	Administrator not in group	Read, Copy	Read, Delete, Copy
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	Read, Copy	Read, Copy
Expert	Standard object owner	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Administrator in same group	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Administrator not in group	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Expert user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	None	None
Standard	Standard object owner	Read, Rename, Copy, Move	Read, Rename, Copy, Move
	Administrator in same group	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Administrator not in group	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Expert user in same group	Read, Copy, Move	Read, Rename, Delete, Copy, Move
	Expert user not in group	None	None
	Standard user in same group	Read, Copy	Read, Copy
	Standard user not in group	None	None

15.1.8 การจัดการผู้ใช้งาน กลุ่ม และบทบาท

เครื่องมือ User Access อนุญาตให้ทำได้ดังนี้:

- ▶ การสร้าง การปรับ เปิดหรือปิดบัญชีผู้ใช้
- ▶ กำหนดบทบาทให้กับบัญชีผู้ใช้และเปลี่ยนการกำหนดบทบาท:
 - ▶ ฐานข้อมูลวิจัย: แก้ไขบัญชีผู้ใช้และบทบาท
 - ▶ ฐานข้อมูลตรวจสอบย้อนกลับได้: แก้ไขรหัสผ่านผู้ใช้งาน
- ▶ สร้างหรือลบกลุ่มผู้ใช้และกำหนดผู้ใช้ให้กับกลุ่ม

บทบาทของ Local Administrator สามารถเข้าใช้งานในเครื่องมือ User Access

การเปิดเครื่องมือ User Access:

- ▶ จากเครื่องมือเนวิเกเตอร์นำทาง สามารถเปิด User Access และเลือก Users และ Groups ได้
- ▶ ในแถบ User ถูกเลือกไว้โดยค่าเริ่มต้น

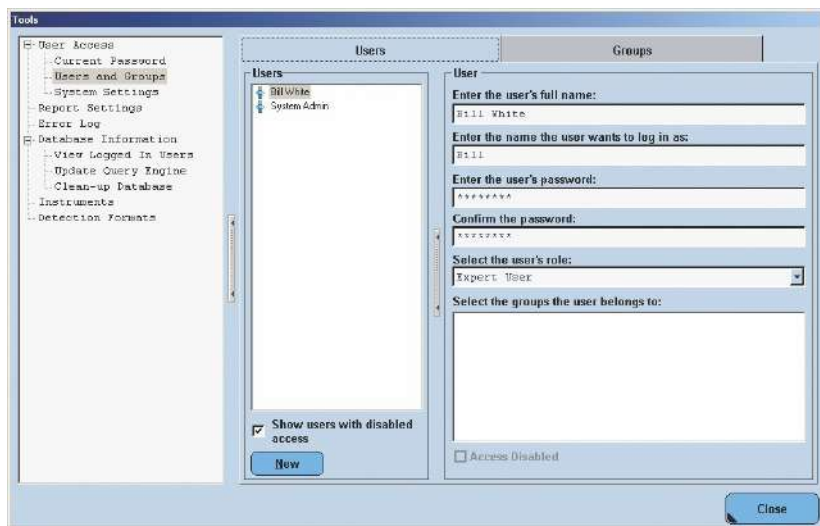
การทำงานกับผู้ใช้งาน



เมื่อทำงานกับฐานข้อมูลโปรแกรม LightCycler® 480 ที่ตรวจสอบย้อนกลับได้ บัญชีผู้ใช้จะไม่สามารถลบออกได้ มีเพียงปิดใช้งานเท่านั้น นอกจากนี้ ชื่อเดิม ชื่อล็อกอิน และบทบาทของผู้ใช้จะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้

การสร้างบัญชีลูกค้าใหม่:

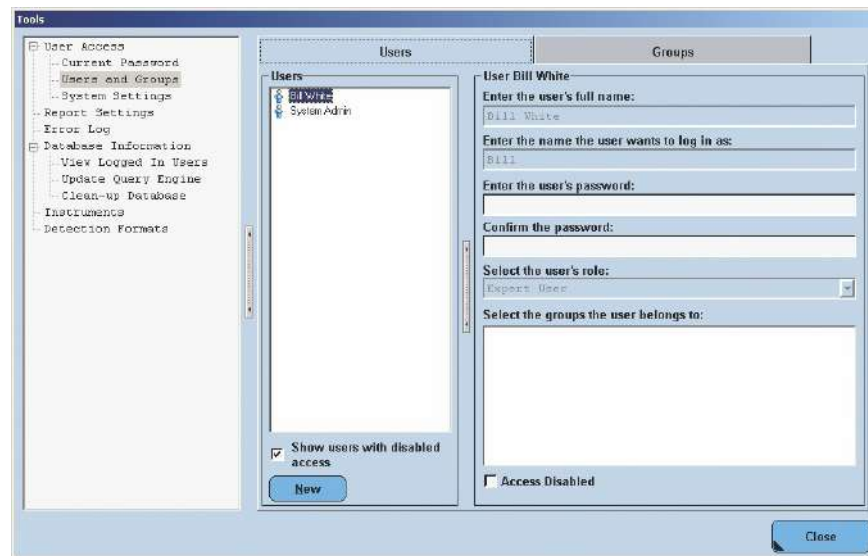
- 1 ในเครื่องมือ User Access ให้คลิก Users and Groups เลือกแถบผู้ใช้ หากยังไม่ได้เลือก)
- 2 คลิก New
- 3 ป้อนชื่อเดิม ชื่อล็อกอิน และรหัสผ่านของผู้ใช้ แล้วเลือกบทบาทสำหรับผู้ใช้งาน



- 4 ตรวจสอบแต่ละกลุ่มที่ควรเพิ่มผู้ใช้ หากไม่มีการสร้างกลุ่ม สามารถเพิ่มผู้ใช้เมื่อสร้างกลุ่ม
- 5 คลิก Close โฟลเดอร์เริ่มต้นสำหรับผู้ใช้ใหม่ถูกเพิ่มไปยังเนวิเกเตอร์นำทาง

การแก้ไข เปิดหรือปิดใช้งานบัญชีผู้ใช้:

- 1 ในเครื่องมือ *User Access* ให้คลิก *Users and Groups* เลือกแถบผู้ใช้ หากยังไม่ได้เลือก
- 2 เลือกชื่อผู้ใช้ในรายการผู้ใช้ ข้อมูลเกี่ยวกับผู้ใช้ที่เลือกจะปรากฏขึ้น



- 3 ในฐานะข้อมูลซึ่งตรวจสอบย้อนกลับได้ ข้อมูลเดียวที่สามารถเปลี่ยนได้คือรหัสผ่านและการเป็นสมาชิกกลุ่ม
- 4 หากต้องการปิดใช้งานบัญชีผู้ใช้ ให้เลือกทำเครื่องหมายในช่อง *Access Disabled* หากต้องการเปิดใช้งานบัญชีที่ปิดใช้งานไปแล้ว ให้กดยกเลิกในช่องทำเครื่องหมาย *Access Disabled* โดยไม่สามารถปิดใช้งาน *System Admin* account ได้
 - 5 เมื่อจบการทำงาน ให้คลิก *Close*

15

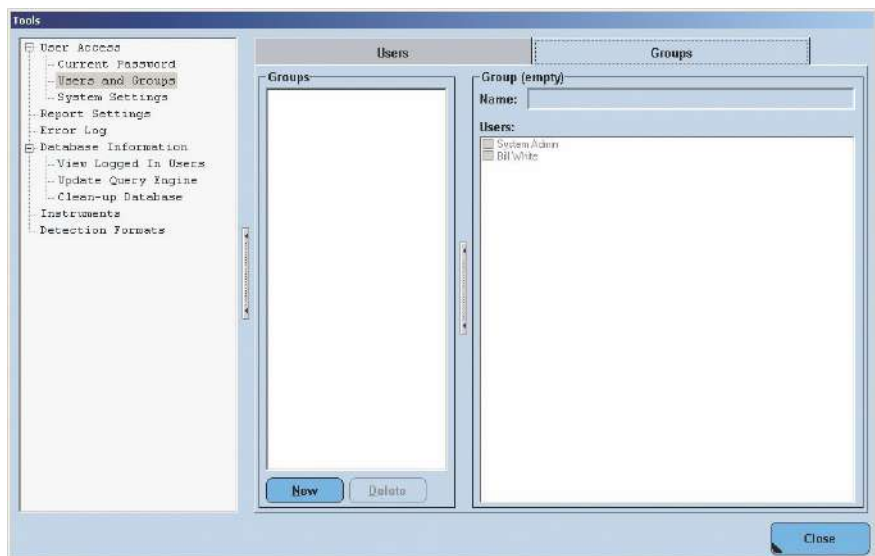
D

การทำงานกับกลุ่ม

- ❗ เมื่อทำงานกับฐานข้อมูลซอฟต์แวร์ LightCycler® 480 ที่ตรวจสอบย้อนกลับได้ audit trail บัญชีผู้ใช้ จะไม่สามารถลบออกได้ มีเพียงปิดใช้งานเท่านั้น นอกจากนี้ ชื่อเต็ม ชื่อสื่ออื่น และบทบาทของผู้ใช้ จะไม่สามารถเปลี่ยนแปลง
- 🔍 ทางเลือกอื่นนอกเหนือจากขั้นตอนที่อธิบายไว้ด้านล่าง สามารถเข้าถึงหน้าต่าง Group ได้โดยตรง โดยการคลิกสองครั้งที่ group object ในเนวิเกเตอร์นำทาง

การสร้างกลุ่มใหม่:

- 1 ในเครื่องมือ *User Access* ให้คลิก *Users and Groups* เลือกแถบ Groups (หากยังไม่ได้เลือก)



- 2 คลิก *New*
- 3 พิมพ์ชื่อสำหรับกลุ่มในกล่องชื่อ *Name* box
- 4 หากต้องการเพิ่มผู้ใช้ในกลุ่ม ให้ตรวจสอบชื่อผู้ใช้ที่ต้องการเพิ่ม
- 🔍 โดยสามารถสร้างกลุ่มโดยไม่มีการเพิ่มผู้ใช้งานได้
- 5 คลิกไอคอนกลุ่มว่างที่สร้างขึ้นในรายการ Groups เพื่อยืนยันข้อมูลที่ป้อน
- 6 หากไม่ได้เพิ่มผู้ใช้งานในกลุ่ม จะมีข้อความขอให้ยืนยันการบันทึกกลุ่มโดยไม่มีผู้ใช้ ให้คลิก *Yes*



กลุ่มถูกเพิ่มไปยังโฟลเดอร์ Groups ในเนวิเกเตอร์นำทาง

การแก้ไขกลุ่ม:

- 1 ในเครื่องมือ *User Access* ให้คลิก *Users and Groups* เลือกแถบ *Users*
- 2 เลือกชื่อกลุ่มจากรายการกลุ่ม *Groups list*
- 3 เปลี่ยนชื่อกลุ่มหรือเลือกและคัดลอกสมาชิกของกลุ่ม โดยสามารถแนะนำกลุ่มให้ผู้ใช้งานเมื่อแก้ไขบัญชีผู้ใช้งานได้ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วน *Managing Users, Groups, and Roles*
- 4 คลิกชื่อกลุ่มในรายการกลุ่มเพื่อขึ้นขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง

การลบกลุ่ม:

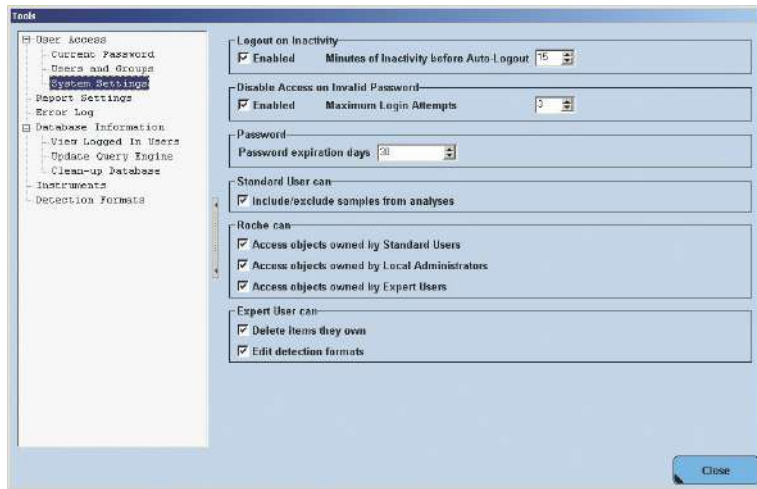
- 1 ในเครื่องมือ *User Access* ให้คลิก *Users and Groups* เลือกแถบ *Users*
- 2 เลือกชื่อกลุ่มจากรายการกลุ่ม *Groups list*
- 3 คลิก *Delete*
- 4 จะมีข้อความถามให้ขึ้นขั้นตอนการลบกลุ่ม ให้คลิก *Yes* จากนั้นกลุ่มจะถูกลบออกจากโฟลเดอร์กลุ่มในเนวิเกเตอร์นำทาง

15.1.9 การทำงานร่วมกับบทบาท

ไม่สามารถสร้างหรือลบบทบาทข้อบังคับ และไม่สามารถเปลี่ยนการกำหนดบทบาทของผู้ใช้ได้ โดยสามารถแก้ไขสิทธิ์การเข้าถึงบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับบทบาท *Expert user* และ *Roche user* ได้ ไม่สามารถแก้ไขสิทธิ์การเข้าถึงของบทบาท *Local Administrator* ได้ แต่ยังสามารถระบุระยะเวลาที่ไม่มีการใช้งานก่อนที่ผู้ใช้จะถูกให้ออกจากระบบโดยอัตโนมัติ ตลอดจนจำนวนครั้งสูงสุดในการเข้าสู่ระบบก่อนที่การเข้าถึงจะถูกปิดกั้นเมื่อป้อนรหัสผ่านไม่ถูกต้อง

การกำหนดเงื่อนไขสำหรับการเข้าถึงและแก้ไขสิทธิ์การเข้าถึงของบทบาท:

- 1 ในเครื่องมือ *User Access* ให้คลิก *System Settings* ตัวเลือกต่างๆ จะปรากฏขึ้นในบานหน้าต่างส่วนแก้ไข *Editor pane*:



โดยตัวเลือกต่างๆ มีนิยามดังต่อไปนี้

ชื่อตัวเลือก	คำอธิบาย
ออกจากระบบเมื่อไม่ใช้งาน	เมื่อเปิดใช้งาน จะทำให้ผู้ใช้ออกจากระบบโดยอัตโนมัติหลังจากไม่มีการใช้งานตามระยะเวลาที่กำหนด
นาฬิกาที่ไม่มีการใช้งาน	ระยะเวลาที่ไม่มีการใช้งาน 999 — 1) นาทีหลังจากนั้นจะออกจาก [ระบบโดยอัตโนมัติ]
ปิดการเข้าถึงด้วยรหัสผ่านที่ไม่ถูกต้อง	เมื่อเปิดใช้งาน บัญชีผู้ใช้จะถูกระงับหลังจากพยายามเข้าสู่ระบบไม่สำเร็จตามจำนวนที่กำหนด
ความพยายามเข้าสู่ระบบสูงสุด	ระบุจำนวนความพยายามในการเข้าสู่ระบบที่ไม่สำเร็จ ซึ่งจะทำ [5 — 1] ให้ออกจากระบบโดยอัตโนมัติ
วันหมดอายุของรหัสผ่าน	ระบุจำนวนวัน (1-99999) ก่อนที่รหัสผ่านจะหมดอายุ
ผู้ใช้มาตรฐานสามารถรวมไม่/รวมตัวอย่างจากการวิเคราะห์	เมื่อเลือก Standard Users จะสามารถรวมหรือคัดออกตัวอย่างจากการวิเคราะห์
Roche สามารถเข้าถึงวัตถุที่เป็นของผู้ใช้งานมาตรฐาน	เมื่อเลือก จะอนุญาตให้ผู้ใช้ Roche เข้าถึง objects ที่เป็นของ Standard users
Roche สามารถเข้าถึงวัตถุที่เป็นของ Local Administrators	เมื่อเลือกแล้ว จะอนุญาตให้ผู้ใช้ Roche เข้าถึง objects ที่เป็นของ Local Administrators
Roche สามารถเข้าถึงวัตถุที่เป็นของผู้ใช้ผู้เชี่ยวชาญ	เมื่อเลือก จะอนุญาตให้ผู้ใช้ Roche เข้าถึง objects ที่เป็นของ Expert Users
Expert User สามารถลบรายการของตนเองได้	เมื่อเลือกแล้ว จะอนุญาตให้ Expert User ลบ objects ของตนเองได้
Expert User สามารถแก้ไขรูปแบบการตรวจจับได้	เมื่อเลือกแล้ว จะอนุญาตให้ Expert User แก้ไขรูปแบบการตรวจจับได้



-
-  เลือกหรือยกเลิกการเลือกของตัวเลือกที่มี นอกจากนี้ สามารถตรวจสอบและปรับตามความต้องการได้
“นาฬิกาที่ไม่มีการใช้งานก่อนออกจากระบบอัตโนมัติ”
“ความพยายามเข้าสู่ระบบสูงสุด”
“วันหมดอายุของรหัสผ่าน”
-
-  เมื่อเสร็จสิ้นแล้ว ให้กด Close.
-

การเปลี่ยนรหัสผ่าน

เมื่อได้รับมอบหมายบัญชีบน โปรแกรม LightCycler® จะได้รับรหัสผ่านบัญชีเริ่มต้น 480 ซึ่งสามารถใช้เพื่อเข้าสู่โปรแกรม LightCycler® ซึ่งจะได้รับแจ้งให้เปลี่ยนรหัสผ่านเริ่มต้นเมื่อเข้าสู่ระบบ) ในครั้งแรก 480 โดยสามารถเปลี่ยนรหัสผ่านได้ทุกเมื่อที่ต้องการ (ครั้งแรก)

วิธีการเปลี่ยนรหัสผ่าน

- ▶ ในเครื่องมือ User Access ให้เลือก *Current Password*
 - ▶ ป้อนรหัสผ่านปัจจุบันลงในช่อง *Old Password*
 - ▶ ป้อนรหัสผ่านใหม่ลงในช่อง *New Password* และอีกครั้งในช่องยืนยัน *Confirm Password*
 - ▶ คลิก *Close*
-  เมื่อรายการในช่องรหัสผ่านใหม่ (New Password) และยืนยันรหัสผ่าน (Confirm Password) ไม่ตรงกัน ปุ่มปิดจะไม่ทำงาน
-  รหัสผ่านต้องมีอักขระอย่างน้อยหกตัว อักขระหนึ่งตัวต้องเป็นตัวเลขและอักขระหนึ่งตัวต้องเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ รหัสผ่านต้องตรงตามตัวพิมพ์เล็กและใหญ่ที่ระบุเท่านั้น โปรดจำรหัสผ่านหรือเก็บไว้ !
ในที่ปลอดภัย อย่าเปิดเผยรหัสผ่านกับผู้อื่น!

15.2 การตั้งค่าใบรายงาน

สามารถกำหนดได้ว่าโลโก้ Roche ควรปรากฏในรายงานหรือไม่

ในเครื่องมือการตั้งค่ารายงาน สามารถตั้งค่าลักษณะที่ปรากฏของโลโก้ Roche ในรายงานได้

- ▶ เลือกหรือยกเลิกการเลือกจากกล่องเครื่องหมายแสดงโลโก้ Roche (Show Roche Logo) เพื่อตั้งค่าลักษณะที่ปรากฏของโลโก้ Roche ให้เปิดหรือปิดได้

D

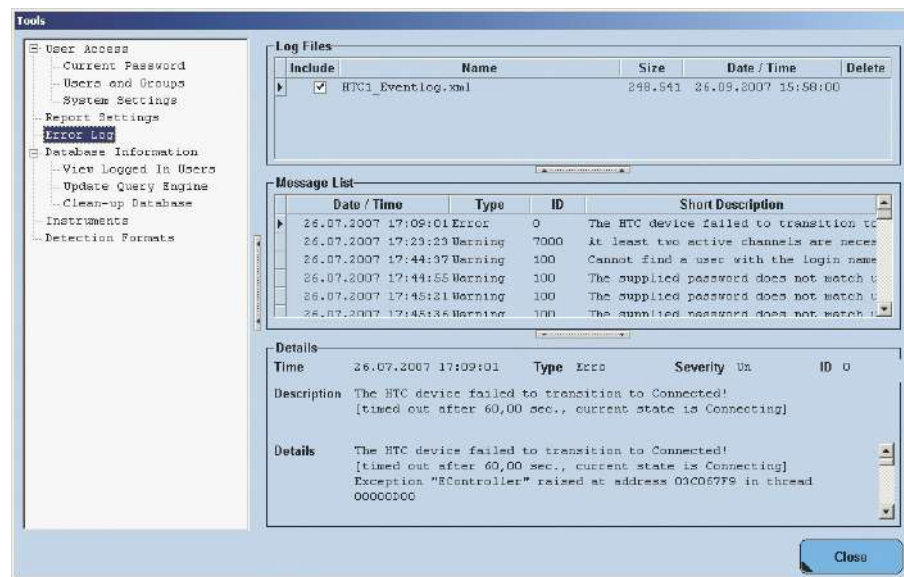
15.3 ข้อมูลการเกิดปัญหา

การบันทึกข้อมูลของปัญหาที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกสร้างขึ้น โดยซอฟต์แวร์ซึ่งจะแสดงในพื้นที่แสดงข้อความ สามารถดูข้อมูลเพิ่มเติมในหัวข้อ Understanding the LightCycler® 480 Software Main Window ซึ่งข้อมูลจะถูกสร้างออกมาเป็นไฟล์หลายๆไฟล์ สามารถจัดการได้โดย Error Log tool



ถ้าขนาดของไฟล์ข้อมูลเกินจำนวนที่สามารถเก็บได้ ไฟล์ใหม่ที่จะสร้างจะถูกเปิดโดยโปรแกรม

เมื่อเลือก Error Log tool ที่หน้าต่างส่วนค้นหาเปิดขึ้นจะแสดงไฟล์ Log ทั้งหมดพร้อมทั้งรายละเอียด ไฟล์ปัจจุบันจะถูกเลือกจากค่าเริ่มต้น



การแสดงผลข้อมูลการเกิดปัญหา:

- 1 เปิด Error Log Tool
- 2 คลิกเลือก Include ในรายการ Log Files เพื่อเลือกไฟล์ที่ต้องการแสดงผลข้อมูล
- 3 เลือกข้อความในรายการข้อความเพื่อแสดงรายละเอียดของข้อความ

การลบข้อมูลการเกิดปัญหา:

- 1 เปิด Error Log Tool
- 2 คลิกเลือก Delete ในรายการ Log Files เพื่อเลือกไฟล์ที่ต้องการลบข้อมูล



ไฟล์ที่เปิดใช้อยู่จะไม่สามารถลบได้

15.4 ข้อมูลของฐานข้อมูล

ที่หน้าต่างของฐานข้อมูลจะทำให้ผู้ใช้งานสามารถเข้าถึงข้อมูลดังนี้:

- ▶ แสดงหน้าต่างการใช้งานของฐานข้อมูลผู้ใช้
- ▶ ดูสถานะของฐานข้อมูล และสามารถอัปเดตข้อมูลได้
- ▶ สามารถส่งออกข้อมูลแบบชุด หรือลบรายการที่ส่งออก

แถบ	การใช้งาน
ดูข้อมูลของผู้ใช้	แสดงรายการผู้ใช้ล่าสุด
อัปเดตการใช้งาน	เป็นการอัปเดตข้อมูล กรณีที่ต้องมีการอัปเดต ปุ่ม Update จะปรากฏขึ้น ฐานข้อมูลจะมีการอัปเดตหากมีการอัปเดตโปรแกรม <i>LightCycler® 480</i> ปุ่ม <i>Reindex</i>: เมื่อฐานข้อมูลใหญ่ขึ้นการเข้าถึงจะช้าลง ควรใช้ฟังก์ชันนี้ในการจัดเรียงข้อมูลที่มีขนาดเพิ่มขึ้น ทำให้การเข้าถึงรวดเร็วขึ้น
การดูแลฐานข้อมูล	ในหัวข้อนี้จะมีฟังก์ชันที่สามารถใช้ได้จำนวน 2 หัวข้อได้แก่ ▶ การลบข้อมูลที่ไม่ต้องการ ▶ การสร้างฐานข้อมูลใหม่ด้วยโครงสร้างเดิม (เช่น users, groups, and folders) และเนื้อหาเดียวกับฐานข้อมูลปัจจุบัน จะคล้ายกับการส่งออกข้อมูลแบบที่หลายๆไฟล์ แต่หลายฐานข้อมูลสามารถส่งออกหรือลบออกได้ภายในครั้งเดียว



การดูข้อมูล Log ของผู้ใช้ สามารถทำได้โดยการใช้ Expert Users และ Local Administrators การลบข้อมูลจะทำได้เฉพาะ Local Administrators

15.4.1 ฐานข้อมูลตรวจสอบย้อนกลับได้และฐานข้อมูลเชิงวิจัย

ผู้ใช้งาน โปรแกรมสามารถใช้ข้อมูลเพื่อตรวจสอบ (audit trail) โดยใช้ฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับได้ หรือใช้ฐานข้อมูลแบบงานวิจัย

- ▶ เมื่อใช้ฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับได้ ผู้ใช้งานจำเป็นต้องยืนยันการเปลี่ยนแปลงของฐานข้อมูล และให้เหตุผลของการเปลี่ยนแปลง ฐานข้อมูลแบบนี้จะไม่สามารถแก้ไขชื่อ หรือ ลบ การทดสอบหรือที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลการทดสอบ เช่นการทำ การชดเชยสัญญาณได้
 - ▶ เมื่อใช้ฐานข้อมูลแบบงานวิจัย ผู้ใช้งานสามารถแก้ไขฐานข้อมูลโดยไม่ต้องยืนยันการเปลี่ยนแปลง
- เมื่อใช้ฐานข้อมูลแบบงานวิจัย สามารถแก้ไขชื่อ คัดลอก และลบการทดสอบได้



15.4.2 แนวทางการสำรองฐานข้อมูล LightCycler® 480 การ จัดระเบียบและการบีบอัดข้อมูล

ทำไมจึงต้องมีการจัดการฐานข้อมูล ให้มีระเบียบ และทำการสำรองฐานข้อมูลอย่างสม่ำเสมอ?

การสำรองฐานข้อมูล การจัดระเบียบและการบีบอัดข้อมูลนั้นเป็นสิ่งที่ควรทำเนื่องจากเป็นการป้องกันฐานข้อมูลที่มากเกินไป ถ้าฐานข้อมูลมีขนาดใหญ่จะส่งผลให้สูญเสียข้อมูลและเกิดการติดขัดของข้อมูล



สาเหตุหลักของข้อมูลเกิดขัดข้องมาจากปัญหาเรื่องการสูญเสียพลังงาน การปิดเครื่องส่วนควบคุมของ LightCycler® 480 ที่ไม่ควรทำ หรือการที่ส่วนเก็บข้อมูลหลักของเครื่องพื้นที่เต็ม

จริงๆแล้วไม่มีการจำกัดขนาดของฐานข้อมูลของระบบ LightCycler® 480 แต่ตามกฎหมายแล้ว ข้อมูลไม่ควรมีขนาดเกิน 4.5GB เนื่องจากหากเกินจะไม่สามารถสำรองข้อมูลลง DVD 1 แผ่น ได้



เพื่อป้องกันการสูญหายของข้อมูล ให้ใช้อุปกรณ์จัดเก็บข้อมูลเพิ่มเติม หรือ ใช้ D drive เพื่อใช้เป็นหน่วยเก็บข้อมูลสำรอง

ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถทำการสำรองข้อมูลแบบอัตโนมัติได้ แต่โปรแกรม LightCycler® 480 รุ่นจะบันทึก 1.5.1 ผลการทดสอบอัตโนมัติ 10 ผลการทดสอบล่าสุดจำนวน

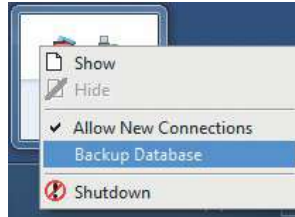
► C:\ProgramData\Roche\LightCycler480\Backup\

ไฟล์จะถูกบันทึกในนามสกุล *.ixo ชื่อ \$RUN\$xxxx.ixx และสามารถส่งออกข้อมูลสามารถดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้จากหัวข้อ Importing Individual Files

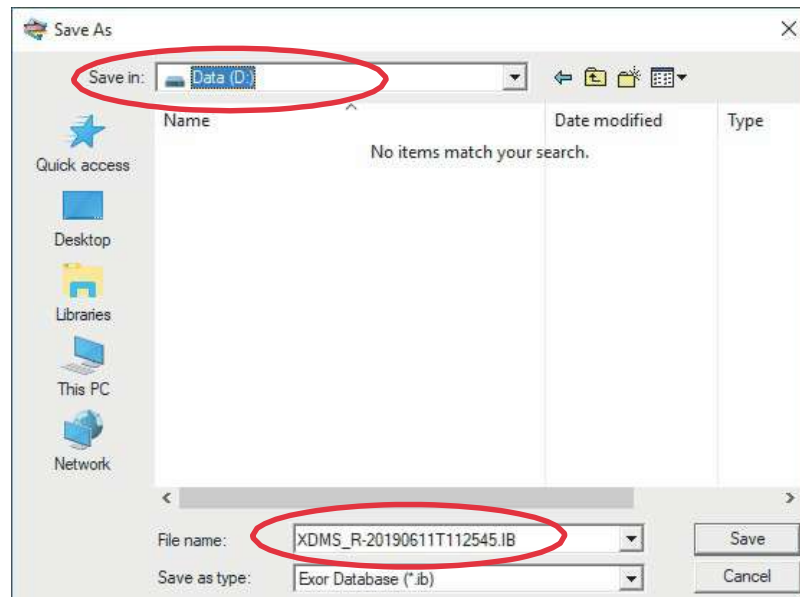
การสำรองฐานข้อมูล

การใช้ Exor4

- 1 ปิดโปรแกรม LightCycler® 4 80 และคลิกขวาที่ไอคอน Exor 4 ที่ฐานข้อมูลที่ต้องการสำรองข้อมูล
ในหน้าต่างแสดงแถบรายการ Exor 4 จะทำงาน
- 2 เลือก Backup Database ในหน้าต่างถัดไปเลือกกว่าต้องการบันทึกฐานข้อมูลที่ไฟล์เดสก์ท็อปใด



- 3 คลิก Save ฐานข้อมูลจะถูกบันทึกโดยอัตโนมัติรวมทั้งแสดงวันที่และเวลาที่ทำการบันทึก

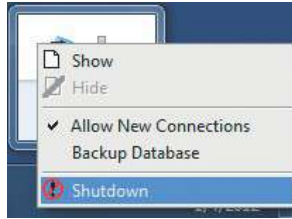


การสำรองข้อมูลโดยผู้ใช้

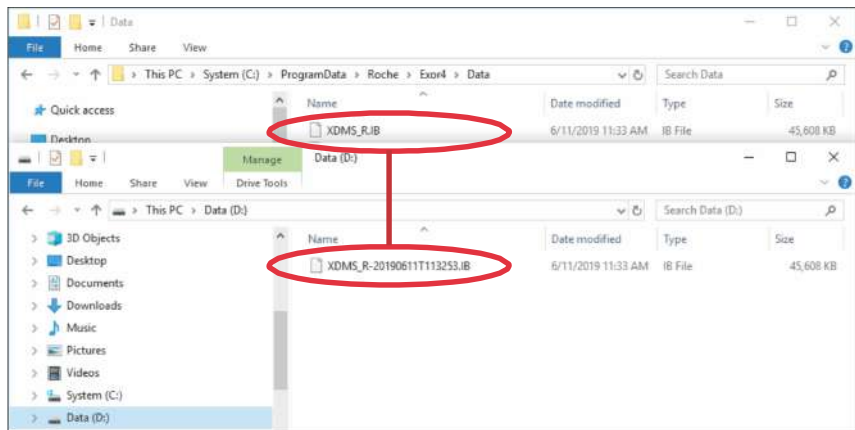
ฐานข้อมูลสามารถคัดลอกเพื่อนำข้อมูลไปหน่วยความจำสำหรับสำรองข้อมูลโดยผู้ใช้งานเองผ่านทาง Window Explorer ตำแหน่งของไฟล์คือ

C:\ProgramData\Roche\Exor4\Data

1. คลิกขวาเพื่อใช้งาน Exor4 ที่แถวรายการ และเปิดการทำงานของ Exor4



2. เปิด Window Explorer เพื่อเปิด "database file" และคัดลอกไฟล์ไปยังโฟลเดอร์สำหรับสำรอง "ข้อมูล" แนะนำให้สำรองข้อมูลในอีกไดรฟ์สำรองอีกอัน



- ! เพื่อการสำรองข้อมูลที่ดีกว่าแนะนำให้ใส่เวลาในชื่อไฟล์การสำรองข้อมูลด้วย

3. ก่อนจะเปิดโปรแกรม LightCycler® 480 ใหม่อีกครั้ง ให้ทำการเปิด Exor4 ใหม่ก่อน โดยการดับเบิลคลิกที่ไอคอนบนหน้าจอ

การดูแลฐานข้อมูล (สำหรับฐานข้อมูลเชิงวิจัยเท่านั้น)

การจัดการข้อมูลรวมกับการจัดการฐานข้อมูลด้วยเครื่องมือ CompactIB tool สามารถลดขนาดฐานข้อมูลได้ การทำการล้างข้อมูล Cleanup โดยการใช้ LightCycler® 480 Application Software ในเมนู Tools สามารถส่งออกข้อมูลในนามสกุล ixo-files จากฐานข้อมูลเพื่อสำรองข้อมูล



เข้าสู่โปรแกรม LightCycler® 480 โดยการใช้สิทธิ์ Admin



เปิดหน้าต่าง Tools/Clean-up Database ในโปรแกรม LightCycler® 480



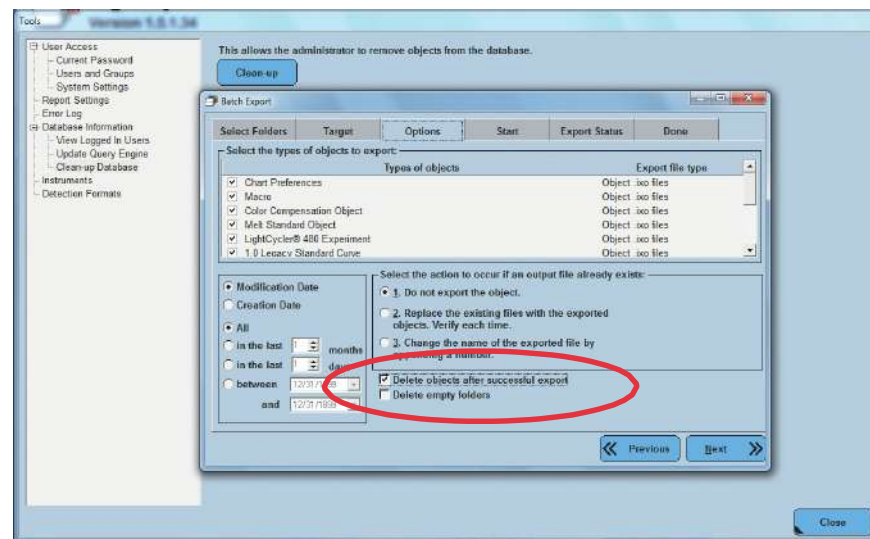
เลือกโฟลเดอร์ที่ต้องการ ส่งออก หรือ ล้างข้อมูล



เลือกไดเรกทอรีที่ต้องการ แนะนำให้สำรองข้อมูลในอีกไดรฟ์สำรองอีกอัน เช่น drive D



เลือกเครื่องหมายถูกที่หน้าช่อง **Delete objects after successful export**



ในโปรแกรม LightCycler® 480 รุ่น 1.5.1 สำหรับทางเลือก “Delete objects after successful export” จะไม่สามารถใช้งานได้เมื่อทำการใช้ฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับ



เริ่มการทำงานส่งออกหรือล้างข้อมูล (export/cleanup)

ข้อความสำคัญ : โปรแกรม LightCycler® 480 รุ่น 1.5.0 ในหัวข้อ Delete objects after successful export ฟังก์ชัน Cleanup Database tool สามารถใช้ได้กับทั้งฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับและงานวิจัย

การปฏิบัติตามกฎ 21 CEF part 11 จะสูญเสียไปหากใช้งานฟังก์ชัน Database Cleanup กับฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับ ดังนั้น ฟังก์ชัน Database Cleanup ควรนำไปใช้กับฐานข้อมูลแบบวิจัย เมื่อใช้งาน: LightCycler® 480 Software รุ่น 1.5.0

จำนวนฐานข้อมูลและจำนวน Exor 4 ของหน่วยควบคุม

ฐานข้อมูลสามารถมีได้ไม่จำกัด ซึ่งสามารถทำงานร่วมกับ Exor 4 ที่ถูกติดตั้งที่ LightCycler® 480 Control Unit โดย Exor 4 สามารถใช้งานได้สูงสุด 10 การทดสอบในเวลาเดียวกัน

อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้งาน Exor 4 มากกว่า การทดสอบพร้อมกัน กรณีที่ไม่ต้องการให้ 2Exor4 อัปเดตอัตโนมัติ ขณะใช้งาน

LightCycler® 480 Control Unit สามารถลบ shortcut จาก startup folder

15.4.3 เครื่องมือฐานข้อมูล CompactIB

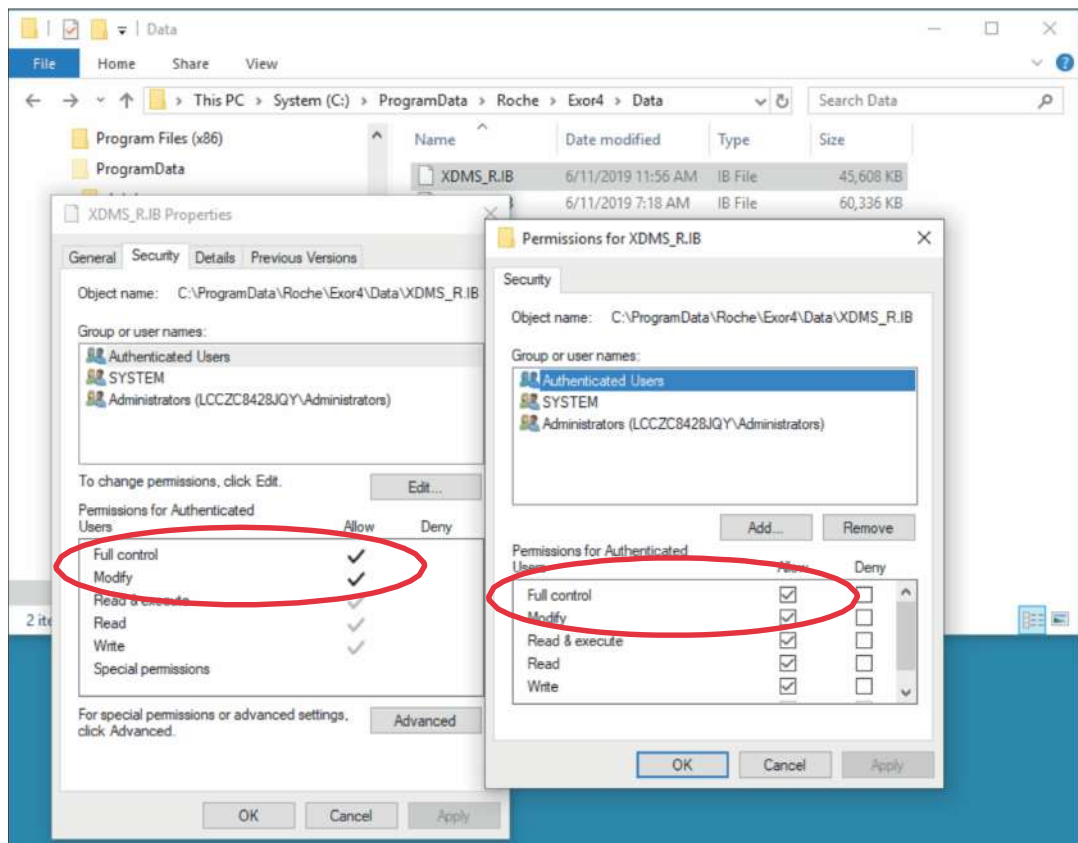
หลังจากลบไฟล์ ที่โปรแกรม LightCycler® 480 หรือ ส่งออกไฟล์จากฐานข้อมูลด้วยการลบหลังจากการส่งออกสำเร็จแล้ว ไฟล์เหล่านั้นจะถูกลบจากฐานข้อมูลแต่พื้นที่จัดเก็บจะไม่ลดลง เป็นสาเหตุให้ต้องมีการใช้เครื่องมือ CompactIB Tool มาช่วยในการลดขนาดส่วนเกินออกเพื่อให้ขนาดพื้นที่ฐานข้อมูลลดลงได้



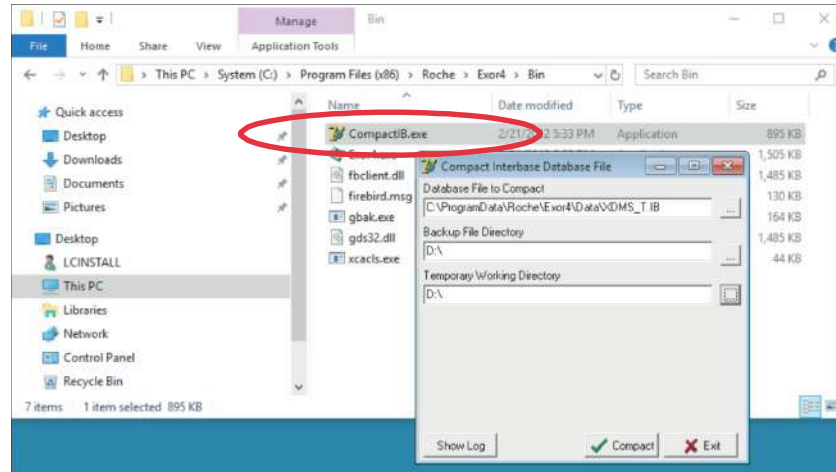
ให้สำรองข้อมูลก่อนทำการใช้เครื่องมือ Database CompactIB Tool!



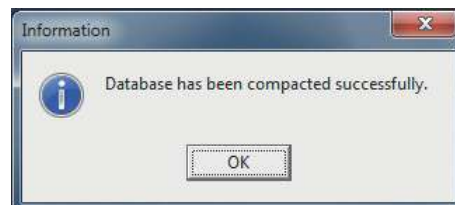
ไฟล์ฐานข้อมูลที่ต้องการบีบอัดจะต้องถูกเลือกเป็นชนิดให้ควบคุมด้านการตั้งค่าความปลอดภัยแบบเต็มรูปแบบ



- 1 ปิดโปรแกรม LightCycler® 480 และ Exor4 จากนั้นเริ่มการใช้งาน CompactIB.exe ไฟล์อยู่ในไดเรกทอรี
C:\Program Files\Roche\Exor4\Bin (operating system Windows 7, 32-bit), or C:\Program Files
(x86)\Roche\Exor4\Bin” (ระบบปฏิบัติการ Windows 10, 64-bit)



- 2 เริ่มกระบวนการทำงานของ CompactIB โดยคลิกที่ **Compact**
- 3 ขึ้นอยู่กับขนาดของฐานข้อมูล การลบพื้นที่ส่วนเกินของฐานข้อมูลอาจใช้เวลา ไม่ควรรบกวนขณะกำลังดำเนินการ
- 4 หน้าต่างจะปรากฏคั้งภาพ เมื่อขั้นตอนการทำงานของ **CompactIB** เสร็จสิ้น



- 5 จากข้อมูลหน้าต่างด้านบน ฐานข้อมูลถูกลดขนาดลงแล้ว ให้ทำการเริ่มโปรแกรม Exor4 และ LightCycler® 480 สำหรับการทำงานปกติได้

15.4.4 การจัดการฐานข้อมูลของโปรแกรมรุ่นหรือต่ำกว่า 1.3

ลักษณะบางอย่างที่สร้างจากโปรแกรมรุ่น 1.3 หรือต่ำกว่า จะไม่สามารถเปิดได้ในโปรแกรม เวอร์ชัน 1.5 เช่น

- ▶ เครื่องเสมือน LightCycler® 480 Instrument II แบบใหม่
- ▶ ไฟล์ชุดเซตสัญญาณสีทั่วไป Universal CC objects
- ▶ แม่แบบการทดลองของโรซ สำหรับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II และบางการใช้งานเช่น (Endpoint Genotyping and Scanning)
- ▶ การทดลองสาธิตแบบใหม่
- ▶ ช่องกรองแสงและระบบการตรวจวัดสัญญาณแบบใหม่

15.4.5 การจัดการไฟล์ต่างๆจากโปรแกรมรุ่นหรือต่ำกว่า 1.3

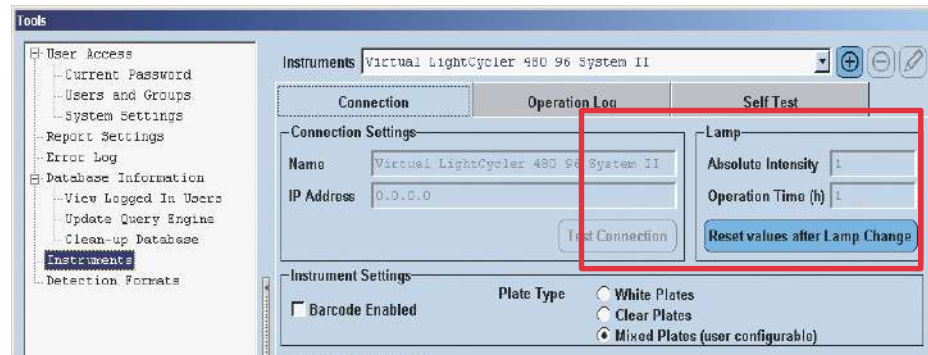
ลักษณะบางอย่างที่สร้างจากโปรแกรมรุ่น 1.3 หรือต่ำกว่า จะไม่สามารถเปิดได้ในโปรแกรม เวอร์ชัน 1.5 บางส่วนประกอบจะถูกลบและสร้างใหม่ในโปรแกรมรุ่น 1.5 เช่น

- ▶ มาโครจะไม่สามารถใช้ได้
- ▶ แม่แบบรายการตัวอย่าง แม่แบบการวิเคราะห์ และแม่แบบการรายงาน จะทำงานไม่ถูกต้อง
- ▶ ไฟล์เส้นค่ามาตรฐาน (Fit Points) จะไม่ทำงาน
- ▶ การเข้าคู่อัดโนมิติสำหรับการวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์จะไม่มีการสร้างขึ้น (ที่ไม่มีมีการแก้ไขข้อ ตัวอย่างใน Sample Editor) แต่การเข้าคู่นั้นมีอยู่ก่อนแล้วจะสามารถเปิดได้

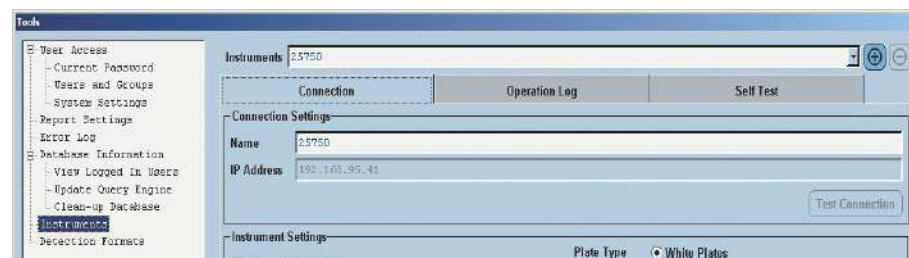
15.5 เครื่อง

หน้าต่าง *Instrument* จะสามารถให้ข้อมูลสำหรับเครื่องที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบันได้ และสามารถเปลี่ยนเครื่องที่ต้องการใช้งานและชนิดมัลติเวลเพลทได้

LightCycler® 480 Instrument II รุ่นที่ใช้หลอดไฟซินอน:



LightCycler® 480 Instrument II รุ่นที่ใช้หลอดไฟแอลอีดี:



หน้าต่าง *Instruments* จะมีปุ่มควบคุมการใช้งานและช่องใส่ข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้:

▶ **แถบการเชื่อมต่อ**

ชื่อ	คำอธิบาย
Instruments	เลือกเครื่องที่ต้องการดูรายละเอียด
Make Default	ตั้งค่าเครื่องที่เลือกเป็นเครื่องที่ใช้งาน
New 	สร้างเครื่องใหม่และกำหนดการเชื่อมต่อ
Delete	(ไม่ทำงาน) ไม่สามารถลบเครื่องออกได้
Edit 	(ไม่ทำงาน) ไม่สามารถแก้ไขเครื่องได้หากใช้ฐานข้อมูลตรวจสอบย้อนกลับ แต่แก้ไขชื่อเครื่องได้หากใช้ฐานข้อมูลวิจัย
Instrument Information	แสดงรายการดังนี้: ▶ เลขเครื่อง ขนาดบล็อกลูก และชนิดบล็อกลูก ▶ ข้อมูลเชิงเทคนิค ▶ ช่องกรองแสงช่วงกระตุ้นและช่วงรับ ▶ ข้อมูลรุ่นของโปรแกรมในเครื่อง



โดยค่าเริ่มต้น เครื่องเสมือน LightCycler® 480 (รุ่น 96 หรือ 384) จะถูกกำหนดโดยโปรแกรม LightCycler® 480 เครื่องเสมือน LightCycler® 480 จะใช้ในการตั้งโปรแกรมเมื่อไม่ได้เชื่อมต่อเครื่อง หากต้องการตั้งโปรแกรมการทดลองขณะเครื่องจริงไม่ได้ทำการเชื่อมต่อ ให้เลือกเครื่องเสมือนจากกล่องข้อความเครื่องมือมาทำการตั้งค่า

► การจัดการส่วนเชื่อมต่อ

ชื่อ	คำอธิบาย
Name	ชื่อของเครื่องที่ใช้งานอยู่
IP Address	IP address ของเครื่องที่เลือก
Test Connection	เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อของเครื่อง

► ส่วนของหลอดไฟ

ชื่อ	คำอธิบาย
Absolute Intensity	ความเข้มของหลอดไฟ นับค่าจากเครื่อง
Operation Time	จำนวนชั่วโมงการใช้งานของหลอดไฟร้อน อ่านจากเครื่อง
Reset values after Lamp Change	ตั้งค่าการใช้งานหลอดไฟเป็น 0 เลือกปุ่ม Reset Counter เมื่อทำการเปลี่ยนหลอดไฟใหม่เท่านั้น รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ที่ Exchanging the Xenon Lamp

► การตั้งค่าเครื่อง

ชื่อ	คำอธิบาย
Barcode enabled	เปิดการใช้งานการอ่านรหัสบาร์โค้ดของมัลติเวลเพลท
Plate Type	ชนิดของเพลทที่ใช้:  เพลทสีขาวขุ่น เพลทใส หรือผสมทั้งสองแบบ เลือกชนิดเพลทให้ถูกต้องก่อนการทดลอง หากเลือกแบบผสมทั้งสองแบบให้กำหนดชนิดเพลทที่หน้าต่าง ภาพรวมก่อนเริ่มการทำงาน รหัสบาร์โค้ดเพลทใสจะขึ้นต้นด้วย "C" (เช่น C2345678) รหัสบาร์โค้ดจะให้เช็คได้ว่าใช้เพลทชนิดใดในการทดลอง

► ส่วนข้อมูลของเครื่อง

ชื่อ	คำอธิบาย
Instrument ID	ชื่อเครื่องที่ทำการเชื่อมต่ออยู่
Block Size	ชนิดของบล็อก ไชเคิลอร์ที่ทำการติดตั้งในเครื่อง (96 หรือ 384)
Barcode Enabled	
Technical Information	รุ่นของโปรแกรมเฟิร์มแวร์สำหรับเครื่อง
Excitation Filters	รายการช่องกรองแสงช่วงกระตุ้นที่มีในเครื่อง
Emission Filters	รายการช่องกรองแสงช่วงรับที่มีในเครื่อง

► แลบบันทึกการปฏิบัติงาน

วิธีดูบันทึกการปฏิบัติงาน:

- 1 ในส่วน *Instrument* ของหน้าต่าง *Tools* ให้เลือกชื่อเครื่องจากรายการเครื่อง
- 2 เลือกแถบ *Operation Log*
- 3 หน้า *Operation Log* จะแสดงรายการทดลองที่ทำงานบนเครื่อง บันทึกจะแสดงข้อมูลพื้นฐานแต่ละการทดลองเช่น ชื่อการทดลอง ผู้ใช้งาน วันที่ทำการทดลอง และจำนวนตัวอย่าง (96 or 384)

Connection		Operation Log	
Name	User	Date	# of Samples
New HTCEExperiment	System Admin	23.06.2005 15:00:29	384
New HTCEExperiment	System Admin	23.06.2005 15:01:15	384
New Experiment	System Admin	28.06.2005 10:12:40	384
New Experiment	System Admin	28.06.2005 10:13:36	384

► แล็บการทดสอบตัวเอง

ชื่อ	คำอธิบาย
View Self Test	แสดงรายงานการทดสอบตัวเองของเครื่องล่าสุด: ► เลขเครื่อง ID ► สถานะโมดูล ► ผลการทดสอบตัวเอง ► รุ่นโปรแกรมของเครื่อง ► เลขของบล็อก ► ขนาดบล็อก ► ชนิดบล็อก
Print	พิมพ์รายงานการทดสอบตัวเองล่าสุดของเครื่อง
Save as PDF	บันทึกรายงานการทดสอบตัวเองล่าสุดของเครื่องในรูปแบบไฟล์ PDF

การระบุเครื่อง

การระบุชื่อเครื่อง LightCycler® 480 ให้ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้:

1. เปิดหน้าต่าง Tools โดยคลิกที่ปุ่ม 
2. จากส่วน *Navigator* ของหน้าต่าง *Tools* ให้เลือก *Instruments*
3. ถัดจากกล่องเครื่อง ให้กด 
4. ใส่ชื่อเครื่อง LightCycler® 480 แล้วคลิก *OK*
5. บนแถบ *Connection* ให้ใส่ IP address ของเครื่อง (ค่าเริ่มต้นคือ 192.168.95.41)
6. (ทางเลือก) คลิก *Test Connection* เพื่อทดสอบเลข IP address
7. คลิก *Make Default* เพื่อกำหนดให้เครื่องนี้เป็นค่าเริ่มต้น
8. คลิก *Close*

15.6 รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ

การตรวจจับสัญญาณสามารถทำได้ทั้งแบบสัญญาณเดียวหรือการผสมกันของช่องสัญญาณ (Excitation-Emission) แถบแสดง Detection Format เป็นหน้าต่าง เพื่อเลือกช่องสัญญาณสำหรับการตรวจจับสัญญาณให้ทำงาน เมื่อตั้งค่าโปรแกรมเป็นแบบการทดสอบใหม่ ผู้ใช้งานจะสามารถเลือกช่องสัญญาณสำหรับการตรวจจับสัญญาณได้ของสัญญาณที่ทำการทดสอบ กรณีที่เลือกมากกว่าหนึ่งช่องสัญญาณ สามารถเลือกได้ว่า จะใช้คู่สัญญาณไหนในการรับสัญญาณขณะที่ทำการทดสอบสามารถเลือกได้จาก Customize option สามารถดูข้อมูลเพิ่มเติมได้จากหัวข้อ) Programming and Running an Experiment)

ตารางแสดงรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณและช่องกรองแสงที่มีให้สำหรับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument I:

รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	ชื่อการผสมช่องสัญญาณ	ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง
SYBR Green I / HRM Dye	SYBR Green I / HRM Dye	483	533
SimpleProbe	SimpleProbe	483	533
Mono Color Hydrolysis Probe / UPL Probe	FAM	483	533
Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe	FAM	483	533
	VIC / HEX / Yellow555	523	568
Multi Color Hydrolysis Probe	Cyan 500	450	500
	FAM	483	533
	VIC / HEX / Yellow555	523	568
	Red 610	558	610
	Cy 5	615	670
Mono Color HybProbe	Red 640	483	640
Multi Color HybProbe	Fluos	483	533
	Red 610	483	610
	Red 640	483	640
	Cy 5	483	670

ตารางแสดงรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณและช่องกรองแสงที่มีให้สำหรับเครื่อง LightCycler® 480
Instrument II:

รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	ชื่อการผสมช่องสัญญาณ	ช่วงกระตุ้นแสง	ช่วงรับแสง
SYBR Green I / HRM Dye	SYBR Green I / HRM Dye	465	510
SimpleProbe	SimpleProbe	465	510
Mono Color Hydrolysis Probe / UPL Probe	FAM	465	510
Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe	FAM	465	510
	VIC / HEX / Yellow555	533	580
3 Color Hydrolysis Probe	FAM	465	510
	VIC / HEX / Yellow555	533	580
	Cy 5/Cy 5.5	618	660
4 Color Hydrolysis Probe	Cyan 500	440	488
	FAM	498	580
	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

! ช่องสัญญาณเริ่มต้นจะแก้ไขไม่ได้

ในแถบ Detection Format จะประกอบด้วยรายการ Detection Format, ส่วนกำหนดเลือกช่องกรองสัญญาณ Filter Combination Selection และ รายการการผสมช่องสัญญาณ Selected Filter Combination List

The screenshot displays the 'Detection Formats' window. On the left, a list of active detection formats is shown with checkboxes: SYBR Green I / HRM Dye, SimpleProbe, Mono Color Hydrolysis Probe / UPL Probe, Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe, 3 Color Hydrolysis Probe, 4 Color Hydrolysis Probe, Mono Color HybProbe, and Multi Color HybProbe. Below this list are buttons for 'New', 'Copy', 'Rename', and 'Delete'. On the right, the 'Filter Combination Selection' window is open, showing a grid for selecting emission filters (400, 510, 580, 610, 640, 660) for each excitation filter (440, 465, 498, 533, 618). A 'Clear' button is at the bottom right. Below the selection grid is the 'Selected Filter Combination List' table.

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
440	488	Cyan 500	1	10	1
498	580	FAM	1	10	2
533	610	Red 610	1	10	2
618	660	Cy 5 / Cy 1	10	2	

รายการ Detection Format จะใช้จัดการรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณซึ่งมีการใช้งานดังนี้

ชื่อ	การใช้งาน
Active	เลือกกล่อง <i>Active</i> เพื่อกำหนดรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณให้ตรงกับที่ใช้ในโปรแกรม
Name	คลิกที่ name เพื่อเปลี่ยนชื่อรูปแบบ
New	เลือกเพื่อเพิ่มรายการรูปแบบ การตรวจวัดสัญญาณใหม่
Copy	คัดลอกรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ
Rename	กระตุ่นรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณปัจจุบันเพื่อทำการตั้งชื่อใหม่
Delete	ลบรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณที่เลือกไว้



รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณที่เป็นสิ่งจางจะไม่สามารถแก้ไขได้ (เช่น ทุกรูปแบบภายใต้คำเริ่มต้นของโรซ)

สำหรับการเลือกช่องสัญญาณจาก Detection Format list ,Filter Combination Selection area จะแสดงตารางจะแสดงชื่อของ emission filters และ excitation filter ในช่อง checkbox คือช่องสัญญาณที่สามารถทำงานร่วมกันได้



ช่องสัญญาณที่สามารถทำงานร่วมกันได้จะมีค่าความยาวคลื่นช่วงรับลบกับค่าความยาวคลื่นช่วงกระตุ้น ≥ 40

รายละเอียดการจับคู่ช่องสัญญาณกรองแสงช่วงรับ-ช่วงกระตุ้น แสดงไว้ในส่วน *Selected Filter Combination List* ได้บริเวณการเลือก *Filter Combination*:

ชื่อ	คำอธิบาย
Excitation Filter	แสดงค่าช่วงกระตุ้นแสง
Emission Filter	แสดงค่าช่วงรับแสง
Name	ใส่ชื่อการจับคู่ช่องสัญญาณ
Melt Factor	ตัวคูณที่ใช้กับคู่ช่องสัญญาณสำหรับการวิเคราะห์ melt
Quant Factor	ตัวคูณที่ใช้กับคู่ช่องสัญญาณสำหรับการวิเคราะห์การหาปริมาณ แสดงจำนวนเท่าของสัญญาณจากช่วงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์พื้นหลังไปจนถึงช่วงสัญญาณราบ เมื่อเลือกโหมดเป็น การจับสัญญาณแบบไดนามิก
Maximum Integration Time	การรวมสัญญาณสูงสุด ที่ใช้ในการจับคู่ช่องสัญญาณ และใช้การจับสัญญาณแบบไดนามิก รายละเอียดเพิ่มเติมดูในส่วน <i>Running an Experiment</i>

วิธีกำหนดรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณสำหรับสียฟลูออเรสเซนซ์ใหม่:

- 1 เปิดเครื่องมือ *Detection Formats* แล้วคลิก *New*
- 2 ตั้งค่าช่องสัญญาณที่ต้องการใช้
- 3 ตั้งค่า *Quant Factor* ไปที่ “20” (เพื่อไม่ให้เกินช่วงไดนามิกของกล้อง) และตั้งค่า *Melt Factor* ไปที่ “1.2” (หากมีการใช้งาน *melting curve*)
ค่า *Melt Factor* ควรเป็นที่ “1.2” ถ้ามีการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างการหลอมละลาย แต่หากสัญญาณเพิ่มขึ้นขณะมีการหลอมละลาย (ซึ่งน่าจะไม่ใช่โปรบของโรช) ให้ตั้งค่าไปที่ “20”
- 4 เริ่มการทำงานและใช้ *Dynamic Integration Time Mode*
- 5 ในส่วน *Experiment* ให้วิเคราะห์ข้อมูลดิบในแถบข้อมูลด้วยการใช้ประวัติกราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้:
 - ▶ กำหนดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์พื้นหลังใน 5 รอบแรกและสัญญาณช่วงราบใน 5 รอบสุดท้าย
 - ▶ คำนวณค่าสูงสุดของไดนามิกฟลูออเรสเซนซ์โดย (= สัญญาณพื้นราบ/สัญญาณพื้นหลัง) และคูณ 1-2 (กรณีมีสัญญาณสูงในการทดลองภายหลัง) เพื่อจะได้ค่า *Quant Factor*
- 6 การจับสัญญาณสะสมต่อช่องสัญญาณหนึ่งๆ ให้กำหนดระหว่าง 10 msec — 10 sec ทุกรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณของโรชจะตั้งสูงสุด < 2 sec ควรใช้ค่านี้เป็นค่าเริ่มต้นเสมอ เว้นแต่มีสัญญาณรบกวนสูง ค่าการจับสัญญาณสะสมควรเพิ่มขึ้น

15.7 การตั้งค่าชนิดเพลท

เพลทที่สามารถใช้ได้มี แบบ คือ 2:

- ▶ เพลทขาวขุ่น
- ▶ เพลทใส
- ! ควรใช้เฉพาะมัลติเวลเพลท พีซีอาร์ที่แนะนำไว้ในคู่มือเท่านั้น
- ! การใช้เพลทใสจะใช้กรณีที่แนะนำเท่านั้น เช่น *hydrolysis probes* และ *SYBR Green I* การกำหนดชนิดเพลทใสจะทำให้การตรวจเช็คเพลทของเครื่องไม่ทำงาน รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ที่ [Description of the Detection Unit](#)

ผู้จัดการระบบจะต้องรับผิดชอบในการกำหนดชนิดเพลทให้เหมาะสม (ดูในส่วน [Connection tab](#)) หากมีการใช้เพลททั้งสองประเภทผสมกัน ผู้จัดการระบบจะต้องตั้งค่าในแถบการเชื่อมต่อ การเลือกตั้งค่า *Mixed Plates* จะทำให้ผู้ใช้สามารถใช้เพลทได้เมื่อทำการทดลองจริง

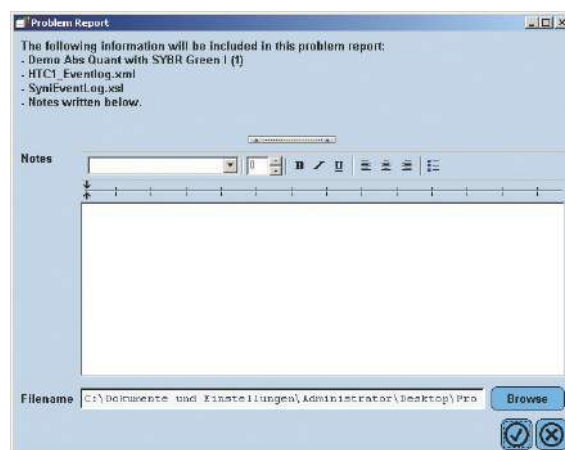
16 เครื่องมือในการวินิจฉัยเครื่อง

16.1 การรายงานปัญหาของเครื่อง

โปรแกรมเครื่อง LightCycler® 480 จะสามารถส่งออกรายงานของปัญหาได้ โดยจะใช้นามสกุล (*.ipr)

วิธีการส่งออกรายงาน:

- 1 เลือกงานที่ทำให้เกิดปัญหาในหน้าต่าง Navigator กดปุ่ม Problem Reporting ในแถบ Action Bar ให้เป็น
สามารถใช้งานได้
- 2 คลิกปุ่ม Problem Reporting
- 3 หน้าต่าง Problem report จะเปิดขึ้น



- 4 ใส่ข้อความเพิ่มเติมอธิบายปัญหาได้ที่ช่อง Notes
- 5 ในช่อง Filename ค่าเริ่มต้นชื่อและที่อยู่ไฟล์จะมีในรายการ ให้คลิก Browse หากต้องการเปลี่ยนที่อยู่
ไฟล์
- 6 ยืนยันการใส่ข้อมูลโดยการกดปุ่ม  และบันทึก Problem Report เป็นนามสกุล *.ipr
- 7 กรณีการรายงานปัญหาล้มเหลว แนะนำให้ปิดและเปิดใหม่สำหรับการทดลองที่มีปัญหานั้น

16.2 บันทึกข้อผิดพลาด

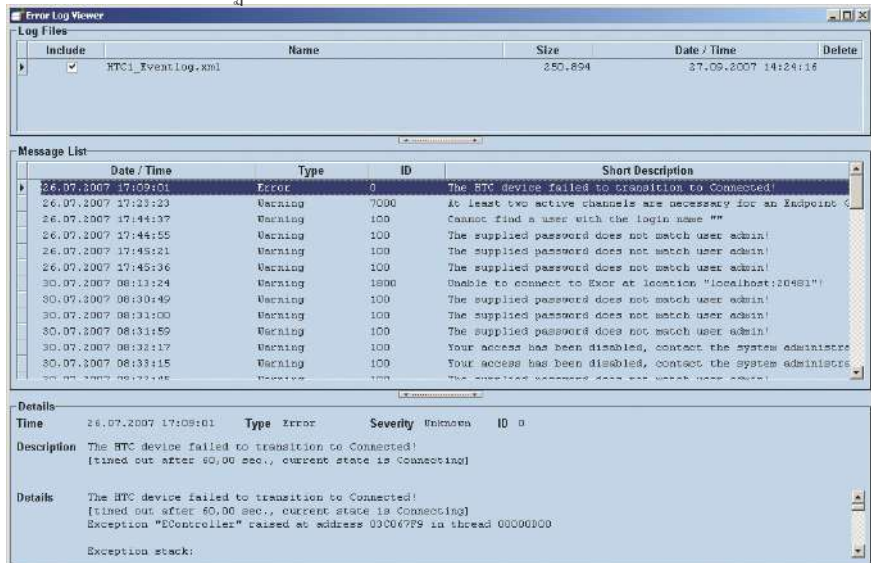
ข้อผิดพลาดต่างๆจะถูกสร้างขึ้นด้วยโปรแกรม จะแสดงข้อความต่างๆในพื้นที่ message area สามารถดูข้อมูลเพิ่มเติมได้ในหัวข้อ Understanding the LightCycler® 480 Software Main Window สามารถดูข้อมูลจาก Error Log tool

วิธีแสดงไฟล์บันทึกข้อผิดพลาด:

- 1 คลิกขวาที่ Message Area ที่ Overview Window

- 2 เลือก Show Log ใน Context Menu

หน้าต่างข้อผิดพลาดจะปรากฏขึ้น



- 3 คลิก Include ในช่องของ Log Files list สำหรับ Log files ที่จะปรากฏออกมาข้อความจะแสดงขึ้นที่ Message List area

- 4 เลือกข้อความจาก Message List area เพื่อแสดงรายละเอียด



สามารถส่งออกไฟล์ไปที่ C:\ProgramData\Roche\LightCycler480\Bin\Logs\

วิธีลบไฟล์ข้อผิดพลาด:

- 1 คลิกขวาที่ Message Area ของหน้าต่าง Overview

- 2 คลิก Show log ในรายการเมนู หน้าต่าง Error Log Viewer จะปรากฏขึ้น

- 3 คลิก Delete ในช่องรายการ Log Files สำหรับไฟล์ที่ต้องการลบ



ไฟล์บันทึกข้อผิดพลาดที่เปิดใช้งานอยู่จะไม่สามารถลบได้

16.3 การทดสอบตัวเองของเครื่อง

ในส่วน Instrument section ในแถบ Tools ผู้ใช้งานสามารถดูข้อมูล ทิมพ์ หรือบันทึก ข้อมูลการทำ Self Test สามารถดูข้อมูลในหัวข้อ Instruments

17 การติดตั้งและบำรุงรักษาโปรแกรม LightCycler® 480

โปรแกรม LightCycler® 480 จะประกอบด้วย การใช้งาน ฐานข้อมูล และฐานข้อมูลเซิร์ฟเวอร์ เรียก Exor 4 เพื่อใช้ในการสื่อสารกันระหว่างข้อมูล

อ่านและศึกษาหัวข้อต่อไปนี้:

- ▶ การติดตั้ง โปรแกรม LightCycler® 480
- ▶ การเริ่มการใช้โปรแกรม LightCycler® 480 และการเชื่อมต่อ
- ▶ การบันทึกฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้ว และการลงฐานข้อมูลเพิ่มเติม
- ▶ การเข้าใช้งานฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน
- ▶ การ แทนที่ฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้ว
- ▶ การจัดตั้งเครือข่ายลูกข่าย/เซิร์ฟเวอร์
- ▶ การลบโปรแกรม LightCycler® 480

สำหรับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument II โปรแกรม LightCycler® 480 Software รวมทั้ง traceable database (XDMS_T) และ Research database (XDMS_R) จะถูกติดตั้งเรียบร้อยแล้ว

- ▶ สามารถดูข้อมูลการใช้งาน LightCycler® 480 Software จากคอมพิวเตอร์ที่มากับเครื่องให้ดูหัวข้อ Starting the LightCycler® 480 Software and Connecting an Instrument
- ▶ สามารถดูข้อมูลการใช้งาน LightCycler® 480 Software จากคอมพิวเตอร์ที่ไม่ได้มากับเครื่องให้ดูหัวข้อ Installing LightCycler® 480 Software



โปรแกรม LightCycler® 480 สามารถติดตั้งไว้ก่อนที่คอมพิวเตอร์ควบคุม LightCycler® 480 ตามรูปแบบดังนี้:

- ▶ Roche control unit with operating system Windows XP (32-bit):
“C:\Program Files\Roche\LightCycler480”
- ▶ Roche control unit with operating system Windows 7 (32-bit):
“C:\Program Files\Roche\LightCycler480”
- ▶ Roche control unit with operating system Windows 10 (64-bit):
“C:\Program Files (x86)\Roche\LightCycler480”



17.1 การติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480

เครื่อง LightCycler® 480 ถูกควบคุมด้วยโปรแกรม LightCycler® 480 ที่อยู่ในคอมพิวเตอร์ที่ควบคุมเครื่อง โปรแกรมจะควบคุมการทำงานของเครื่องผ่านวิธีการทดลอง experiment protocol โปรแกรมจะถูกติดตั้งด้วยการแตกตัวของโปรแกรมการติดตั้งเอง ให้ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้



ดาวน์โหลดโปรแกรมรุ่นล่าสุดของ LightCycler® 480 Software 1.5 จาก

<https://diagnostics.roche.com>



โปรแกรมรุ่นเก่ากว่าก่อนหน้านี้ ควรลบออกก่อนทำการติดตั้งใหม่



การติดตั้งโปรแกรมกับเครื่องคอมพิวเตอร์อื่นๆคอมพิวเตอร์ควรมีคุณสมบัติดังนี้:

- ▶ ระบบ โพรเซสเซอร์อย่างน้อย Pentium 4 GHz and 3.2 GHz
- ▶ ความจำอย่างน้อย 2 GB RAM
- ▶ พื้นที่จัดเก็บข้อมูลอย่างน้อย 100 GB
- ▶ มี 2 การเชื่อมต่อ เครือข่าย (อย่างน้อย 10 Mbit/s)
- ▶ ระบบปฏิบัติการ Windows 7 or Windows 10 (32 bit or 64 bit) English Version
- ▶ ระบบ Graphics/Display min. 1280×1024 ความคมชัด
- ▶ CD-RW/DVD-R drive
- ▶ “System Locale” has to be set to “English (United States)” or any other variant of English

สำหรับระบบปฏิบัติการ Windows 7 ให้ไปที่:

Control Panel > Region and Language > Administrative > Change System Locale”

สำหรับระบบปฏิบัติการ Windows 10 ให้ไปที่:

Settings > Region > Additional date, time, & regional settings > Region

> (tab)Administrative > Change system locale



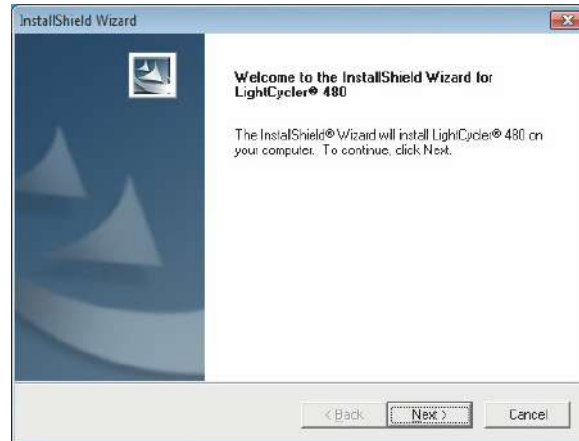
เส้นทางการติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480 สำหรับเครื่องคอมพิวเตอร์จะขึ้นกับชนิดดังนี้:

- ▶ For Windows 64-bit systems: “C:\Program Files (x86)\Roche\LightCycler480”
- ▶ For Windows 32-bit systems: “C:\Program Files\Roche\LightCycler480”

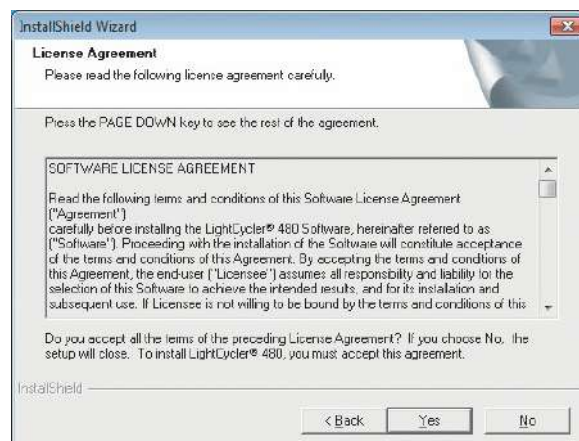
วิธีติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480 :

- 1 ตรวจสอบว่าผู้ใช้งานได้รับสิทธิ์เป็น administration ในการลงโปรแกรม

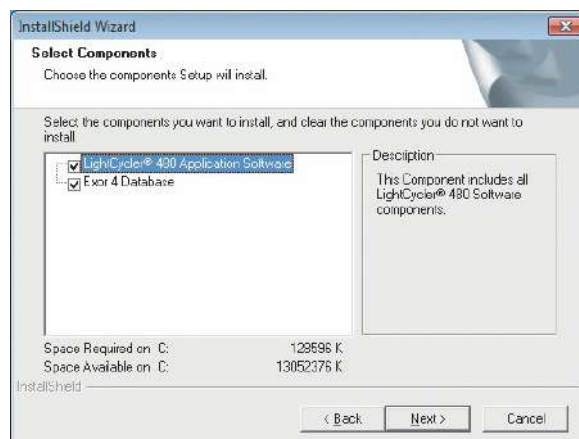
กดคลิก LightCycler480_Software_Setup.exe file จากหน้าจอ desktop และเริ่มการลงโปรแกรมโดยการดับเบิลคลิก เมื่อถึงหน้า The InstallShield wizard Welcome ให้คลิก Next



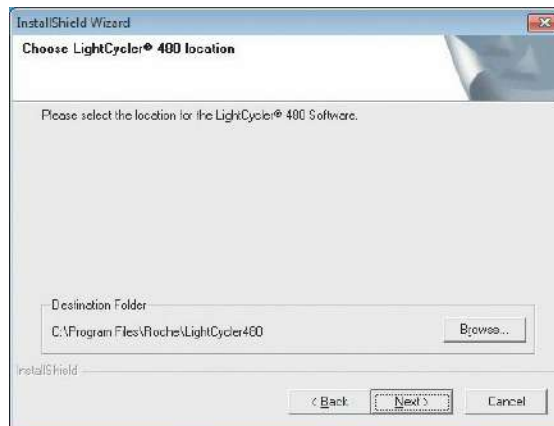
- 2 ให้เลือก agree จากนั้นคลิก Yes เพื่อเริ่มการลงโปรแกรม



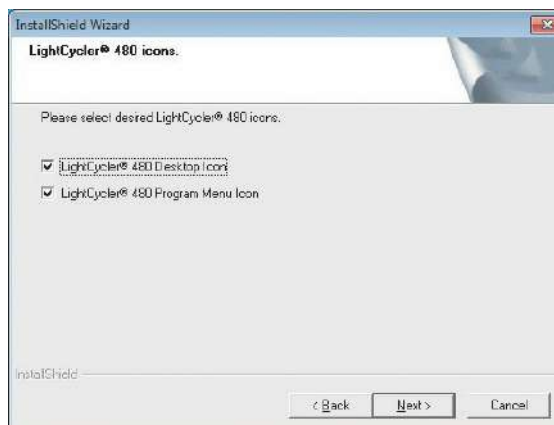
- 3 ในหน้าต่าง Select Components window ให้เลือกทั้ง Light Cycler® 480 Software และ Exor4 database จากนั้นเลือก Next



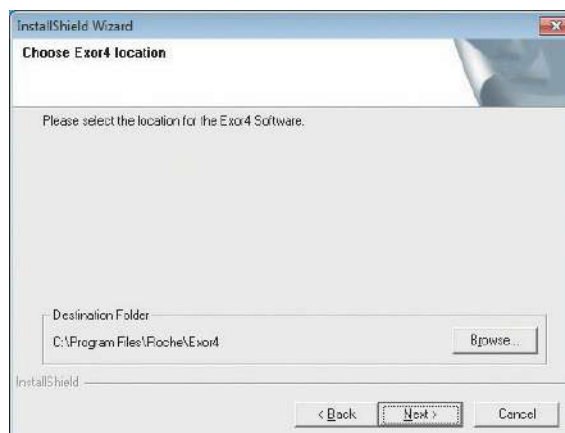
- เลือกตำแหน่งที่ติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480 โดยสามารถใช้การตั้งค่าเริ่มต้น หรือเลือกกำหนดใหม่เองได้ คลิก *Next*



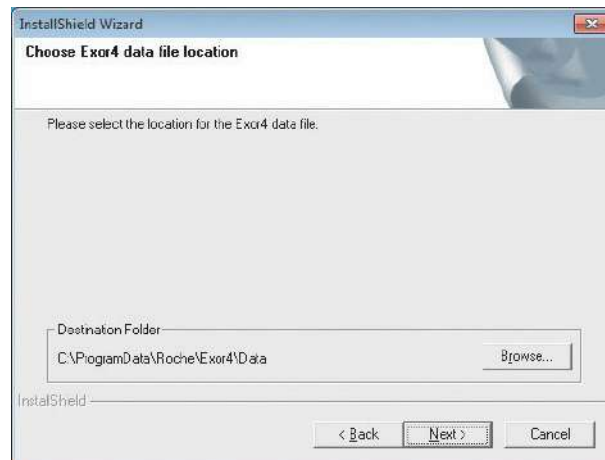
- หน้าต่าง *LightCycler® 480 icons* ให้เลือกกำหนดโปรแกรมที่ต้องการให้สร้างบนหน้าเดสก์ท็อป ยกเลิกการเลือกไอคอนที่ไม่ต้องการได้ แล้วคลิก *Next*



- 6 ในหน้าต่าง *Choose Exor4 location* ให้ใช้ค่าเริ่มต้นโปรแกรมในการติดตั้ง Exor4 หรือจะเลือกกำหนดเองสำหรับตำแหน่งการติดตั้งฐานข้อมูลนี้ได้ คลิก *Next*



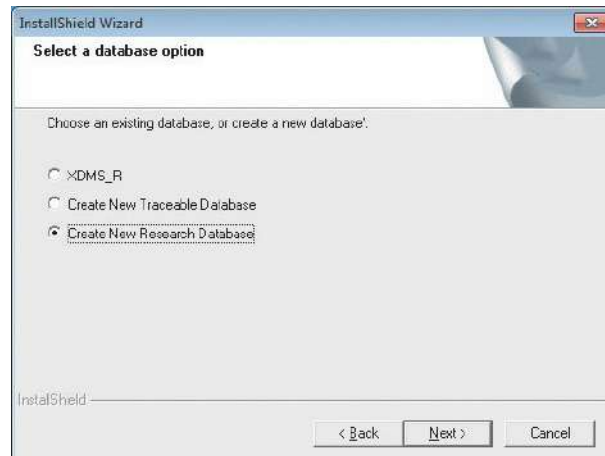
- 7 ในหน้าต่าง *Exor4 database file location* ให้เลือกค่าเริ่มต้นข้อมูลในการติดตั้งฐานข้อมูล หรือกำหนดตำแหน่งเองก็ได้ แล้วคลิก *Next*



- 8 เลือกรายการที่ต้องการติดตั้ง

- ▶ ฐานข้อมูลที่มีอยู่ (หากมี) จะปรากฏชื่อฐานข้อมูลที่มีอยู่
- ▶ ฐานข้อมูลตรวจสอบย้อนกลับได้อันใหม่
- ▶ ฐานข้อมูลวิจัยอันใหม่

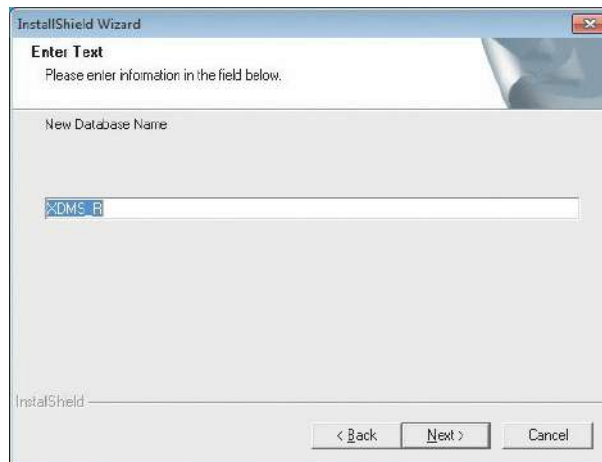
คลิก *Next*



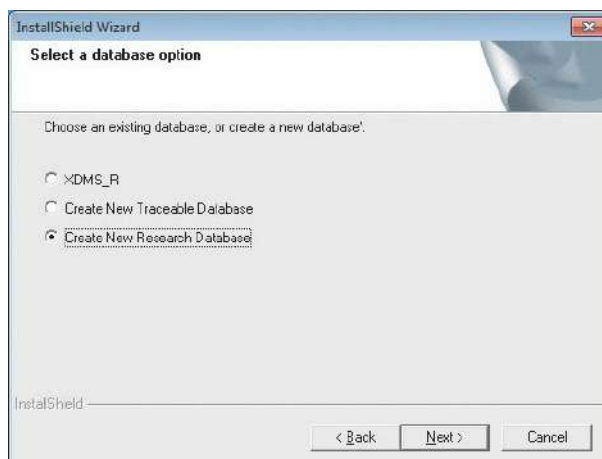
D



- ❶ กรณีที่ต้องการลงฐานข้อมูลใหม่ สามารถใส่ชื่อให้ฐานข้อมูลใหม่ จากนั้นคลิก *Next*



กรณีที่ชื่อถูกใช้งานแล้ว สามารถเลือกที่จะใช้ฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้วหรือสร้างใหม่ก็ได้ โดยที่ฐานข้อมูลเดิมยังคงอยู่



- ❷ ที่หน้าต่าง *Exor4 icons* ให้เลือกไอคอนที่ต้องการแสดงบนหน้าจอเดสก์ท็อป สามารถยกเลิกการเลือกไอคอนที่ไม่ต้องการได้ แต่ต้องเลือกอย่างน้อยหนึ่งไอคอนที่แสดง คลิก *Next*



ส่วนที่เลือกจะได้รับการติดตั้ง เมื่อขั้นตอนการติดตั้งเสร็จสมบูรณ์ หน้าต่าง Installation Complete จะปรากฏขึ้นให้เลือก *Yes, I want to restart my computer now* จากนั้นคลิก Finish



D

17.2 การเริ่มการใช้โปรแกรม LightCycler® 480 และการเชื่อมต่อกับเครื่อง

หัวข้อนี้จะอธิบายเกี่ยวกับการเริ่มใช้งานทั้ง Light Cycler® 480 Software และการเชื่อมต่อกับเครื่อง

1 หลังจากเริ่มการใช้งาน

- ▶ สำหรับระบบปฏิบัติการ Windows 7 รออนุญาตหน้าต่างให้ใส่รหัสผ่าน
- ▶ สำหรับระบบปฏิบัติการ Windows 10 ให้กดปุ่มใดก็ได้

ใส่ข้อมูลดังนี้

- ▶ **Login: operator**
- ▶ **Password: LC480**

คลิก OK

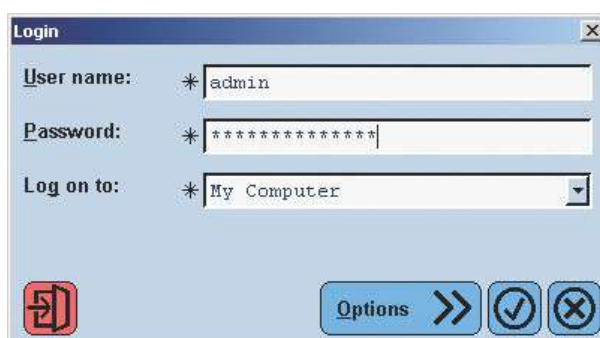
- ▶ หากใช้ระบบปฏิบัติการ Windows 10 จะมีการแจ้งเตือนให้เปลี่ยนรหัสผ่านตั้งแต่ครั้งแรกที่เปิดใช้งาน

2 เปิดเครื่อง LightCycler® 480

3 ดับเบิลคลิกไอคอนโปรแกรม LightCycler® 480 บนหน้าจอเดสก์ท็อป



4 เข้าสู่โปรแกรมด้วยผู้ใช้ "admin" และรหัสผ่าน "LightCycler480"



Log on to: ให้เลือกกำหนดฐานข้อมูลที่ต้องการเข้า ดูรายละเอียดเพิ่มเติมที่ [Logging onto Different Databases](#)

- ▶ โดยค่าเริ่มต้น จะมีฐานข้อมูล 2 แบบ คือแบบตรวจสอบย้อนกลับได้ กับแบบวิจัย ให้เลือกฐานข้อมูลที่ต้องการ



- 5 ▶ จะมีข้อความแจ้งเตือนให้เปลี่ยนรหัสผ่าน



- ▶ คลิก 
- ▶ ใส่รหัสผ่านปัจจุบันที่ใช้ในช่อง *Old Password*
- ▶ ใส่รหัสผ่านใหม่ในช่อง *New Password* และซ้ำอีกรอบเพื่อยืนยันในช่อง *Confirm Password*

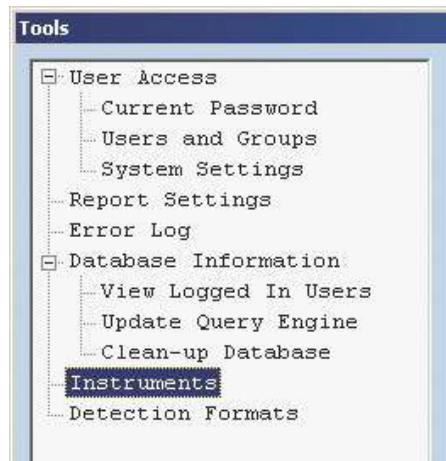
- ▶ คลิก 

-  หากรหัสผ่านใหม่ทั้งสองช่องไม่ตรงกัน ปุ่ม  จะไม่สามารถใช้งานได้

-  รหัสผ่านต้องมีอย่างน้อยหกตัวอักษร โดยมีตัวเลขอย่างน้อยหนึ่งตัว ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่อย่างน้อยหนึ่งตัว

- 6 ▶ เปิดหน้าต่าง *Tools* แล้วคลิก 

- 7 ▶ ในส่วน *Tools navigator* เลือก *Instruments*

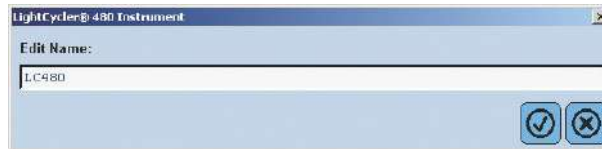


- ▶ หน้าต่าง *Instruments* จะปรากฏ



- 8 ▶ ถัดจากกล่องการเลือกเครื่อง ให้กด 
- ▶ ใส่ชื่อเครื่อง แล้วคลิก 

! ระวังการใช้ชื่อเดียวกันของเครื่อง LightCycler® 480 สำหรับฐานข้อมูลต่างกัน ซึ่งจะทำให้เครื่องที่ใช้งาน ได้ไม่ถูกกำหนดเป็นค่าเริ่มต้นหากเปลี่ยนฐานข้อมูล



- ▶ ในแถบ *Connection Settings* ให้ใส่ข้อมูล IP Address “192.168.95.41”

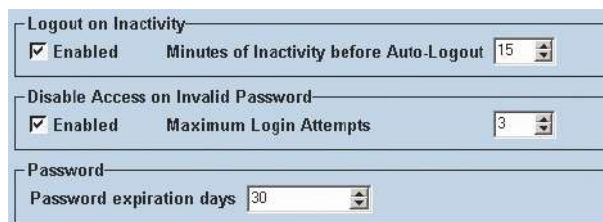


- ▶ คลิก *Test Connection* เพื่อทดสอบ IP address และตั้งค่าการเชื่อมต่อเครื่อง จะมีข้อความ “Test Connection succeeded” ปรากฏขึ้น ให้คลิก 
- ▶ คลิกปุ่ม *Make default*
- ▶ ปิดหน้าต่าง *Tools*

🔍 ในทางกลับกันหากไม่ต้องการเชื่อมต่อเครื่องจริง ให้เลือกเครื่องเสมือนหนึ่งในสี่ของที่มี (ได้ทั้งแบบ 96-หรือ 384- well format) และทำเป็นค่าเริ่มต้น

- 9 ▶ เปิดหน้าต่าง *Tools* อีกครั้ง แล้วกดเลือก *Instruments*
- ▶ ตรวจสอบเลขเครื่องปรากฏอยู่ในช่อง *Instrument ID* หากมี แสดงว่าเชื่อมต่อถูกต้อง

- 10 ▶ ในหน้า *Tool* ให้เลือก *System settings* หน้าต่างจะปรากฏขึ้น



- ▶ การตั้งค่า *Maximum Login Attempts* และ *Password expiration days* เปลี่ยนให้เหมาะสมได้
- ปิดหน้าต่าง *Tools*

- 11 ▶ คลิกปุ่ม *Exit*  เพื่อออกจากโปรแกรม LightCycler® 480

17.3 การบันทึกฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้ว และการลงฐานข้อมูลเพิ่มเติม

บันทึกฐานข้อมูลเพื่อทำการสำรองข้อมูล การบันทึกต้องตรวจสอบขนาดของฐานข้อมูลต้องไม่เกิน 700 MB ของแผ่น CD หรือ 4.5GB สำหรับ DVD:



ข้อควรระวังสำหรับขนาดของข้อมูลการทดลองในฐานข้อมูลแบบตรวจสอบย้อนกลับ ที่มีขนาดใหญ่ หากเปรียบเทียบกับโปรแกรมรุ่นเก่า เพื่อเป็นการช่วยให้การวิเคราะห์ข้อมูลเร็วขึ้น ไฟล์ของการทดลองควรเช็คจากประวัติการทดลองเพื่อให้ไฟล์การทดลองที่ถูกจัดเก็บมีขนาดไม่เกิน 10 MB

เมื่อตรวจเช็คอยู่เสมอ จะต้องจัดเก็บสำรองข้อมูลจากฐานข้อมูลด้วยจะเป็นประโยชน์ ในการคัดลอกฐานข้อมูล ควรเช็คให้ขนาดไม่เกิน 4.5 GB เพื่อจะได้บันทึกในแผ่น DVD ได้

วิธีเช็คขนาดฐานข้อมูล:



ใน Windows Explorer เลือก C:\ProgramData\Roche\Exor4\Data (ตำแหน่งข้อมูลอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ การกำหนดไว้แต่แรก ดูข้อมูลเพิ่มเติมได้ที่ [Installing LightCycler® 480 Software](#))



คลิกขวาที่ฐานข้อมูลที่ต้องการ (*.IB) จากเมนู เลือก Properties และอ่านขนาดจากรายการเมนู



หากต้องการบีบอัดไฟล์ฐานข้อมูล (เช่น ขนาดเกิน 700 MB (CD) หรือเกิน 4.5 GB ที่จะได้ DVD) ให้ใช้เครื่องมือ CompactIB

การบีบอัดไฟล์ฐานข้อมูล:



ปิดการใช้งานฐานข้อมูล โดยการคลิกขวาที่ Exor 4 และเลือก Shutdown



เลือกฐานข้อมูลที่ต้องการบีบอัด C:\ProgramData\Roche\Exor4\Data ดูข้อมูลเพิ่มเติมในหัวข้อ [Installing LightCycler® 480 Software](#)



คลิกขวาที่ฐานข้อมูลที่ต้องการบีบอัด เลือก Properties และเลือก Security คลิก Allow สำหรับ Full control และ Modify คลิก OK



ใน Start Menu ให้เลือก Programs/Roche/CompactIB



หน้าต่าง Compact Interbase Database File จะปรากฏขึ้น ในกล่อง Database File to Compact ใส่ไดเรกทอรีของฐานข้อมูล หรือคลิก  เพื่อเลือกที่อยู่ แล้วคลิก Open



คลิก Compact เพื่อเริ่มการทำงาน



การบันทึกไฟล์ฐานข้อมูล:

- 1 ปิดการทำงานของฐานข้อมูลทั้งหมด โดยคลิกขวาที่ Exor 4 และเลือก Shutdown
- 2 บันทึกฐานข้อมูล (*.IB) บนแผ่นซีดี โดยใช้โปรแกรมการบันทึกในคอมพิวเตอร์ช่วย

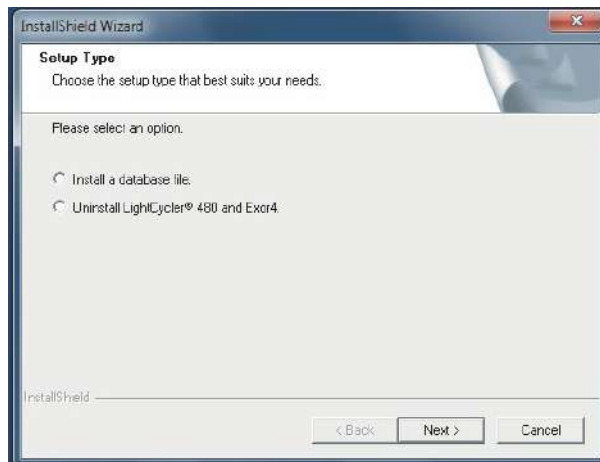
การติดตั้งฐานข้อมูลเพิ่มเติม:

ถ้าโปรแกรม LightCycler® 480 ติดตั้งไว้ในคอมพิวเตอร์เรียบร้อยแล้ว สามารถใช้โปรแกรมในการติดตั้งฐานข้อมูลเพิ่มเติมได้

- เมื่อติดตั้งฐานข้อมูลเพิ่ม ตำแหน่งของ Exor4 และไฟล์ฐานข้อมูลจะต้องไม่เปลี่ยนแปลง ตำแหน่งหลักควรมีตำแหน่งเดียว แล้วฐานข้อมูลย่อยจะต้องอยู่ที่เดียวกัน

- 1 ปิดทุกฐานข้อมูลที่กำลังทำงานอยู่ โดยการคลิกขวาที่ไอคอน Exor4 จากนั้นเลือก Shutdown
- 2 คัดลอกไฟล์ LightCycler480_Software_Setup.exe ไปที่หน้าเดสก์ท็อป แล้วเริ่มการติดตั้งโดยดับเบิลคลิก

- 3 หน้าต่าง Setup Type จะปรากฏขึ้น ให้เลือก Install a database file และคลิก Next



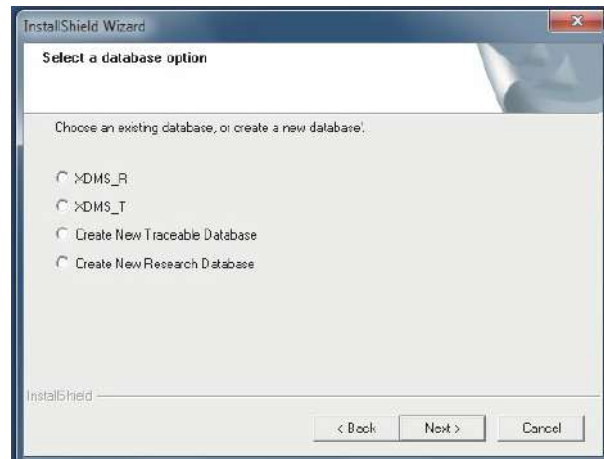


เลือกกำหนดสิ่งที่ต้องการติดตั้ง

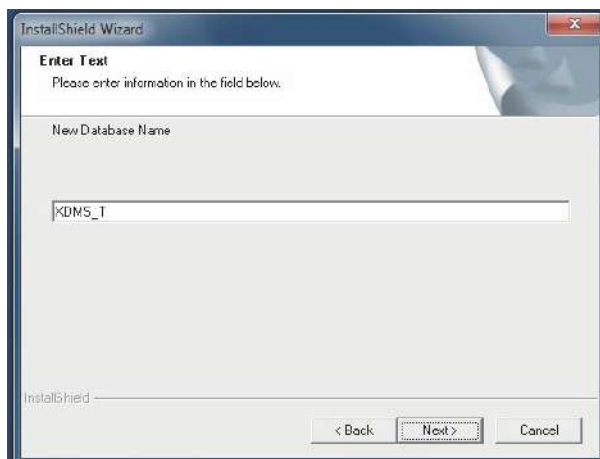
- ▶ ฐานข้อมูลตรวจสอบย้อนกลับอันใหม่
- ▶ ฐานข้อมูลวิจัยอันใหม่
- ▶ ฐานข้อมูลที่มีอยู่ (หากมี) ชื่อของฐานข้อมูลที่มีอยู่จะปรากฏ รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้ที่

ส่วน *Database information*

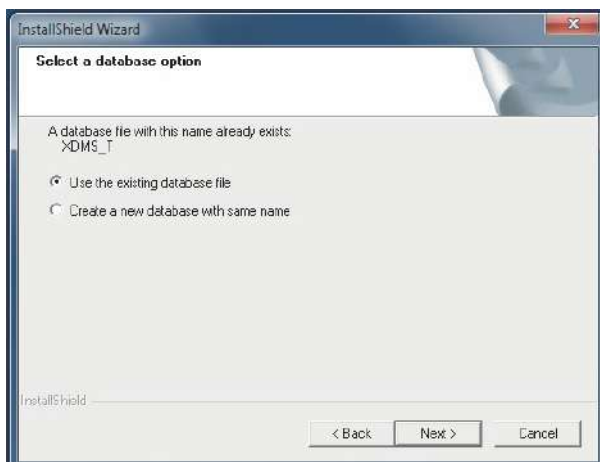
คลิก *Next*



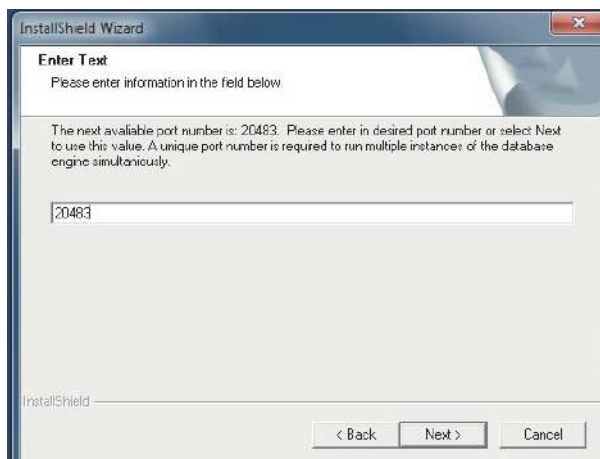
- โปรแกรมจะให้ใส่ชื่อฐานข้อมูลอันใหม่ ใส่ชื่อแล้วคลิก *Next*



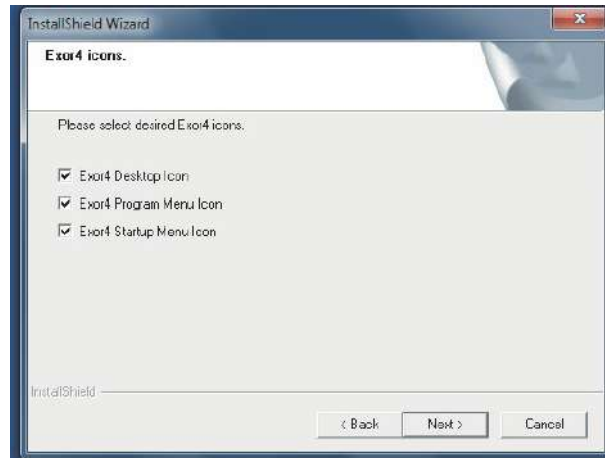
หากใส่ชื่อที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล โปรแกรมจะถามให้เลือกว่าจะใช้ฐานข้อมูลเดิม หรือสร้างฐานข้อมูลใหม่ ด้วยชื่อเดิม ซึ่งฐานข้อมูลเดิมจะยังคงอยู่



- โปรแกรมจะให้ใส่เลข port number ของฐานข้อมูล ให้เลือกใช้ค่าเริ่มต้นที่มี หรือกำหนดเลข port number ใหม่ จากนั้น คลิก *Next*



- 7 กดเลือกที่อยู่สำหรับ program icons โดยมีที่สามารถเลือกได้ดังรูปด้านล่าง สามารถกดยกเลิกการเลือก หากไม่ต้องการ location นั้น หลังจากนั้นกด *Next*



- 8 จะปรากฏข้อความว่า การติดตั้งเสร็จแล้วดังรูป หลังจากนั้นกด *Finish*



- 9 ในขั้นตอนการติดตั้งนั้นจะปรากฏไอคอน  บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ ก่อนที่จะมีการล๊อคอินเข้าฐานข้อมูลจำเป็นต้องเริ่มการใช้งานโปรแกรมที่ติดตั้งล่าสุดด้วยการดับเบิ้ลคลิกที่ไอคอนนั้นบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ หรือการ reboot ระบบใหม่
- 10 ก่อนเริ่มการทดสอบด้วยโปรแกรมที่ติดตั้งใหม่ จำเป็นต้องกำหนดอุปกรณ์ทดสอบก่อน ศึกษารายละเอียดในหัวข้อ [Defining an Instrument](#)
- 11 ล๊อคอินเข้าสู่เครื่องมือเพื่อติดตั้งและแก้ไขผู้ใช้งาน ศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ [See section Administrative Tools](#)

D

17.4 การเข้าสู่ระบบฐานข้อมูลที่แตกต่างออกไป

สามารถล็อกอินเข้าสู่ database ที่เพิ่มเติมเข้าไปใหม่ได้โดยการกดเลือก previously included database ในเมนู

Log on to

1. ดับเบิลคลิกที่ โปรแกรมไอคอน LightCycler® 480 เพื่อเปิดโปรแกรม
2. กล่องข้อความจะเปิดขึ้น คลิกที่ *Options* เพื่อเปิดรายการเซิร์ฟเวอร์ที่รู้จัก



3. คลิก หน้าต่าง *Database Properties* จะปรากฏขึ้น

4. ใส่ชื่อฐานข้อมูลและตำแหน่งที่อยู่ไฟล์

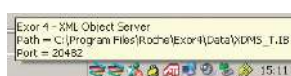
- ▶ หาก database นั้นเก็บอยู่ใน location เดียวกับโปรแกรม LightCycler® 480 ให้ใส่ location ชื่อ "localhost" ตามด้วยเครื่องหมาย colon (:) และ port number ของ database นั้นๆ
- ▶ กรณี location ของ database นั้นอยู่บน remote computer ให้ใส่ IP address หรือ network name ของ remote computer นั้น ตามด้วยเครื่องหมาย colon (:) และ port number ของ database นั้นๆ (เช่น 10.127.65.190:20482)

- ▶ กรณี remote computer รับ IP address แบบอัตโนมัติ ให้ระบุชื่อคอมพิวเตอร์แทน IP address

กดเลือก



- ▶ เพื่อหา port number ของ database ให้นำ cursor ชีวามบนไอคอน/Exor4 ในถาดเครื่องมือด้านล่าง จากนั้นจะปรากฏข้อมูลและ port number ตามรูปด้านล่าง





ฐานข้อมูลดังกล่าวจะอยู่ใน *List of known Database* ซึ่งสามารถเลือก database ที่ต้องการได้
 ก่อ้งข้อความ

Log on to



การล็อกอินเข้าโปรแกรมหลังติดตั้งฐานข้อมูล ใหม่แล้ว สามารถระบุชื่อผู้ใช้และรหัสผ่านเบื้องต้น
 เป็น “admin” และ “LightCycler480” ตามลำดับ



หากต้องการลบ ฐานข้อมูล ออกจาก List of known Database ให้กดเลือก ฐานข้อมูล ที่
 ต้องการลบ จากนั้นกด แต่หากต้องการเปลี่ยนชื่อหรือ ตำแหน่งของ database ให้กดเลือก



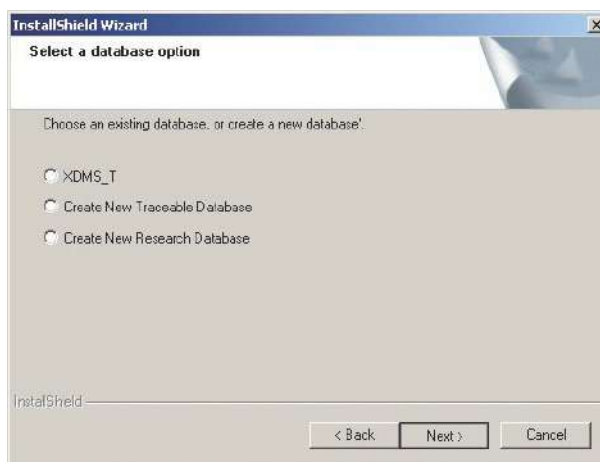
D

17.5 การแทนที่ไฟล์ฐานข้อมูลเดิมด้วยฐานข้อมูลที่มีชื่อเดียวกัน

การแทนที่ไฟล์ฐานข้อมูล เดิมด้วยชื่อไฟล์เดียวกัน เช่น ไฟล์ชื่อ LightCycler® 480 Software ไม่จำเป็นต้องเพิ่ม Exor4 service ใดๆ

วิธีแทนที่ไฟล์ฐานข้อมูลเดิมด้วยฐานข้อมูลที่มีชื่อเดียวกัน:

1. ออกจากโปรแกรม LightCycler® 480
2. กดปิดระบบ ฐานข้อมูล นั้น โดยการคลิกขวาที่ไอคอน Exor4 และกด *Shutdown*
3. คัดลอกไฟล์ ฐานข้อมูลที่จะติดตั้ง (เช่น จาก CD) ไปสู่ไดเรกทอรีฐานข้อมูล



ควรตั้งชื่อฐานข้อมูลเหมือนเดิมกับที่ลบไป ไม่ควรเปลี่ยนชื่อหากไม่จำเป็น

4. เริ่มการใช้งาน Exor4 service โดยกดดับเบิลคลิก ที่ไอคอนบนหน้าจอคอมพิวเตอร์
- เริ่มใช้งานโปรแกรม LightCycler® 480



ชื่อผู้ใช้งานและรหัสผ่านจะถูกบันทึกในฐานข้อมูล ไม่ใช่โปรแกรม
กรณีที่มีการแทนที่ ฐานข้อมูลใหม่จากฐานข้อมูลเดิมที่ติดตั้งจากโปรแกรม
LightCycler® 480 ให้ใช้ชื่อผู้ใช้งานและรหัสผ่านเป็น “admin” และ
“LightCycler480”



เพื่อที่จะเข้าสู่ระบบไปนำฐานข้อมูลออกมา ให้ใส่ชื่อผู้ใช้งานและรหัสผ่านสำหรับฐานข้อมูลนั้น

17.6 การติดตั้งเครือข่าย Client/Server

การรองรับระบบเครือข่ายและระบบ LIMS

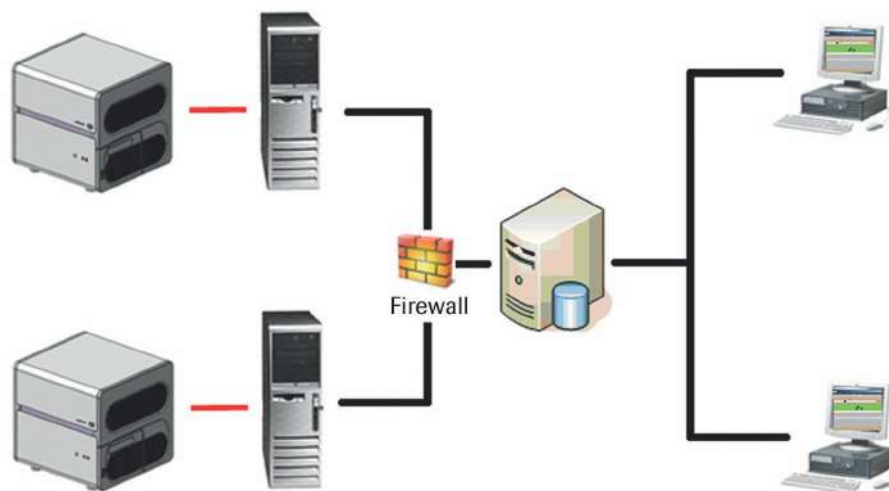
ระบบเครือข่าย และ LIMS ของเครื่อง LightCycler® 480 รองรับความสามารถในการเชื่อมต่อ 2 ลักษณะซึ่งทำให้เครื่องสามารถเชื่อมต่อกับเครือข่ายห้องปฏิบัติการและรวมไปถึงระบบการทำงานอัตโนมัติต่างๆ

การรองรับเครือข่ายมีคุณสมบัติที่จะแชร์ข้อมูลระหว่างส่วนควบคุมกับคอมพิวเตอร์อื่นๆ ผู้สามารถใช้โปรแกรม LightCycler® 480 ผ่านเครือข่าย ในการบันทึกข้อมูลตัวอย่าง จากการเข้าใช้แบบทางไกลได้

การรองรับระบบ LIMS เป็นการรวมการเชื่อมต่อระบบ LightCycler® 480 กับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการได้ ทำให้ผู้ใช้ประหยัดเวลาการทำงาน โดยสามารถควบคุมเครื่องผ่านทางไกลได้ ในการส่งงานเครื่องด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ รวมทั้งการทำงานของเครื่องร่วมกับเครื่องแขนกลต่างๆ ในการทำงานแบบปริมาณมากๆ เช่น การใส่เพลตด้วยแขนกลอัตโนมัติเป็นต้น

การรองรับเครือข่าย

ระบบ เครือข่าย นี้สามารถเชื่อมต่อข้อมูลการทดสอบกับระบบ และคอมพิวเตอร์อื่นๆ ซึ่งรวมถึงคอมพิวเตอร์แบบเชื่อมต่อทางไกล ได้ ข้อมูลจะมีการเก็บไว้ในระบบ server และสามารถเชื่อมต่อหรือส่งข้อมูลผ่านคอมพิวเตอร์ที่มีในระบบ ดังรูป

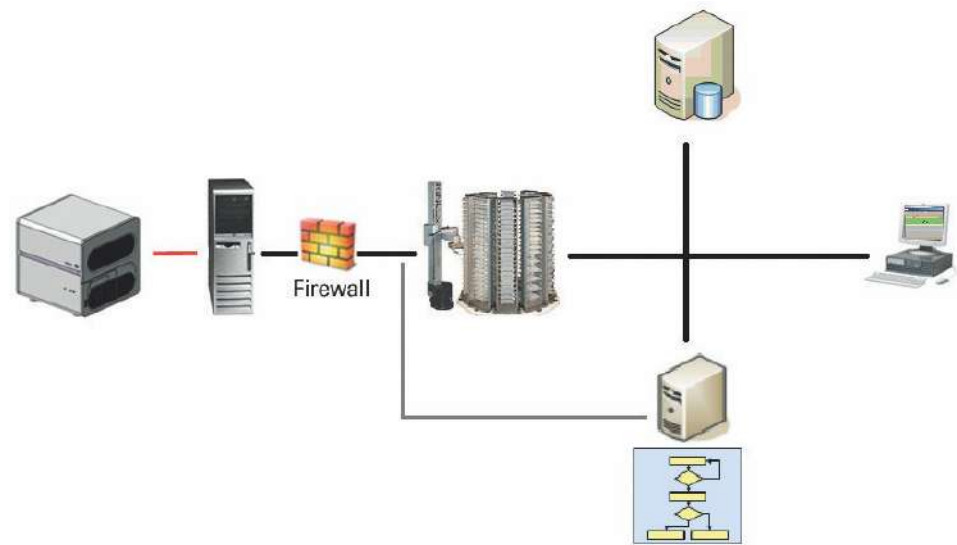


ระบบ network นี้ต้องการอุปกรณ์ต่างๆดังนี้

- ▶ เครื่อง LightCycler® 480
- ▶ ส่วนควบคุมเครื่องพร้อมโปรแกรมของ LightCycler® 480
- ▶ ฐานข้อมูลและเซิร์ฟเวอร์
- ▶ คอมพิวเตอร์ของลูกค้าพร้อมโปรแกรม LightCycler® 480

กรณีใช้งานระบบ LIMS จำเป็นต้องเพิ่ม LightCycler® 480 LIMS interface module โดยติดตั้งแทนที่โปรแกรม LightCycler 480 ระบบ LIMS นี้ สามารถเขียนโปรแกรมการทำงานของเครื่องผ่าน command line ได้เช่น การเปิด ปิดเครื่อง เริ่มการทดสอบ และบันทึกข้อมูล เป็นต้น

โปรแกรมพัฒนาให้สามารถใช้งานง่ายขึ้น ด้วยให้เครื่อง LightCycler® 480 และแชนกलทำงานร่วมกัน ในการทำการทดลองจากเพลทที่เรียงไว้เป็นแถวๆ ยกตัวอย่างกรณีที่มีการใช้เครื่อง LightCycler 480 หนึ่งเครื่องหรือมากกว่า ทำงานกับเครื่องแชนกลหีบเพลท หนึ่งเซิร์ฟเวอร์ หนึ่งเครื่องที่กำหนดงาน และหนึ่งหรือ หลายๆ คอมพิวเตอร์ (ตามแผนภาพด้านล่าง)



ผู้ใช้งานทางเทคโนโลยีสารสนเทศ หรือบริษัทที่เกี่ยวข้อง สามารถพัฒนาโปรแกรมกำหนดตารางงานให้กับคอมพิวเตอร์ที่ควบคุมสั่งงาน แบบอัตโนมัติ เพื่อให้ทำงานซ้ำๆ เพื่อประหยัดเวลาบุคลากร

ในส่วนนี้ โปรแกรมจะทำการส่งจากระยะไกล เพื่อควบคุมให้เครื่องมีการเปิดประตูเครื่อง ทำการใส่เพลทเข้าเครื่องร่วมกับแขนกล จากนั้นปิดประตูเครื่อง LightCycler® 480 แล้วเริ่มกำหนดการทดลองที่จะใช้ ทำการบันทึกข้อมูลการทดลอง ผ่านระบบเซิร์ฟเวอร์ด้วยการเข้าใช้งานจากระยะไกล

เพื่อจัดระบบจะต้องมีอุปกรณ์ดังนี้:

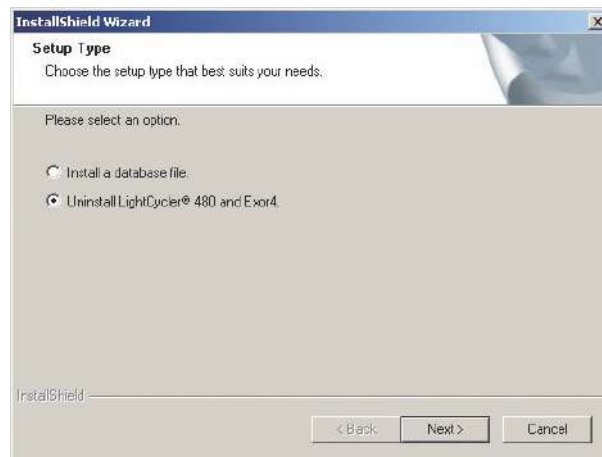
- ▶ เครื่อง LightCycler® 480
- ▶ ส่วนควบคุมเครื่องพร้อมโปรแกรม LightCycler® 480 และ LightCycler® 480 LIMS Interface Module (LIMS Server software)
- ▶ ฐานข้อมูลและเซิร์ฟเวอร์
- ▶ เครื่องแขนกลสำหรับนำเพลทใส่เข้าและออกจากเครื่อง
- ▶ Scheduler: ประกอบด้วยคอมพิวเตอร์ LIMS พร้อม LightCycler® 480 LIMS Interface Module (โปรแกรม LIMS และโปรแกรม LIMS Application)
- ▶ คอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรม LightCycler® 480

17.7 การลบโปรแกรม LightCycler® 480

ทำตามขั้นตอนดังนี้ในการยกเลิกการติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480

วิธียกเลิกการติดตั้งโปรแกรม LightCycler® 480:

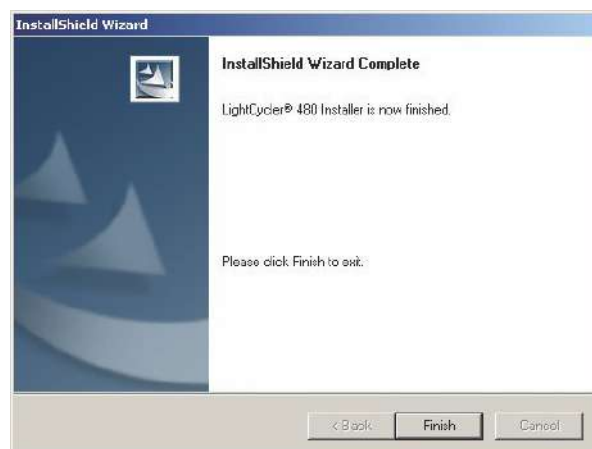
- 1 กดปิดโปรแกรม โดยการคลิกขวาที่ไอคอน Exor4 และกดปุ่ม *Shutdown*
- 2 คัดลอกไฟล์ LightCycler480_Software_Software_Setup.exe ไปที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ และกด start โดย
การกด double click จะปรากฏหน้าต่าง The Setup Type ขึ้นมา จากนั้นกด *Uninstall LightCycler® 480 and Exor4*



- 3 จากนั้นกด *OK* เพื่อลบโปรแกรม



- 4 จากนั้นจะปรากฏหน้าต่าง *InstallShield Wizard* ขึ้นมา กดปุ่ม *Finish* เพื่อออกจากโปรแกรม



D

A large, blue, stylized letter 'D' with a slight shadow, positioned on the left side of the page.

การบำรุงรักษา

E

Chapter E • การบำรุงรักษา

อธิบายขั้นตอนการบำรุงรักษาที่จำเป็นของเครื่อง
LightCycler® 480

E	การบำรุงรักษา	
1	การบำรุงรักษาทั่วไป	375
2	คำแนะนำ การทำความสะอาด	375
2.1	การทำความสะอาดทั่วไป	375
2.2	การบำรุงรักษาเชิงป้องกัน	375
3	การเปลี่ยนหลอดไฟซินอน	376
4	การเปลี่ยนแผ่นกรองระบายอากาศ	380
5	การเปลี่ยนฟิวส์	382



การบำรุงรักษา

1 การบำรุงรักษาทั่วไป

เครื่อง LightCycler® 480 มีการบำรุงรักษาฟรี

2 คำแนะนำการทำความสะอาด



ก่อนการทำความสะอาด ต้องปิดเครื่องและถอดปลั๊กทุกครั้ง



ระวังไม่ให้มีน้ำหกโดน thermal Block cycler, ส่วนประกอบของ block cycler, ส่วนประกอบภายใน



กรณีที่เชื้อที่ทำการทดสอบนั้นเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน หรือสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องปฏิบัติงานด้วยหลักปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการ

2.1 การทำความสะอาดทั่วไป

การทำความสะอาดเครื่อง LightCycler® 480 และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องนั้นไม่จำเป็นมากนัก แต่หากจำเป็นต้องทำความสะอาด ฝาครอบเครื่อง เทอร์มอล บล็อก ไซเคลอร์ และแผ่นปิดบล็อก ไซเคลอร์ ให้ใช้น้ำยาทำความสะอาดแบบอ่อน หรือโซเอธานอล 70%

การทำความสะอาดบล็อก ไซเคลอร์ของเครื่อง LightCycler® 480 : ให้เปิดสารเอธานอล 70% หรือสารไอโซโพรพานอล ปริมาตร 20 µl (สำหรับบล็อก 384-well) หรือปริมาตร 125 µl (สำหรับบล็อก 96-well) ลงในแต่ละหลุม ทั้งไว้ประมาณ 15 นาที ด้วยการเปิดขึ้นลงหลายรอบ จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดออก ปล่อยให้บล็อก ไซเคลอร์แห้งสนิท ก่อนที่จะใช้งานครั้งต่อไป การทำตามคำแนะนำดังกล่าวจะหลีกเลี่ยงการเกิดความเสียหายต่อบล็อก ไซเคลอร์

2.2 การบำรุงรักษาเชิงป้องกัน

ควรตรวจสอบพื้นที่รอบเครื่อง LightCycler® 480 เป็นประจำ เพื่อให้มั่นใจว่ามีอากาศไหลเวียนสะดวก ไม่มีสิ่งของหรืออุปกรณ์ขวางทางหมุนเวียนของลม สามารถพิจารณาตำแหน่งวางเครื่องมือที่เหมาะสมได้ใน

หัวข้อ [Installation](#)



3 การเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน

ความเข้มของแสงจากหลอดไฟซีนอน ที่เพียงพอจำเป็นต้องอ้างอิงในการตรวจสอบฟลูออเรสเซนซ์ ในระหว่างการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิด Real-Time PCR และการวิเคราะห์ melting curve ดังนั้นควรมีความเข้มแสงของหลอดไฟซีนอน ให้เพียงพอเสมอ โดยความเข้มต่ำสุดที่ให้พิจารณาเปลี่ยนหลอดใหม่คือค่าความเข้มต่ำกว่า 2000 units หรือ 4500 units ขึ้นกับประเภทของการใช้งานการตรวจวัดสัญญาณ หรือมีการใช้งานเครื่องไปแล้วกว่า 1000 ชั่วโมง จำเป็นต้องพิจารณาเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน

การเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน ควรติดต่อเจ้าหน้าที่จาก Roche เพื่อทำการเปลี่ยนหลอดไฟ

นอกจากนี้ไม่แนะนำให้ทำการเปลี่ยนหลอดชนิด LED สำหรับเครื่องที่ใช้หลอดประเภท LED หากพบการชำรุดเสียหายของหลอดประเภทนี้ให้ติดต่อเจ้าหน้าที่ตัวแทน Roche



ใช้หลอดไฟซีนอนสำหรับเปลี่ยนจาก Roche เท่านั้น
(Cat. No. 04 686 136 001)



ห้ามเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน โดยไม่ปิดเครื่องและถอดปลั๊กไฟ



หลังปิดเครื่องและถอดปลั๊ก ควรรออย่างน้อย 20 นาทีก่อนการเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน ใหม่ เพื่อให้อุณหภูมิเครื่องและหลอดไฟเย็นลง เนื่องจากความร้อนดังกล่าวสามารถทำลายผิวหนังได้



ในพื้นที่ที่อุณหภูมิเย็นหรือต่ำมาก จะมีแรงดันในหลอดไฟสูงเกือบ 20 บาร์ ดังนั้นจำเป็นต้องสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลในขณะที่ทำงาน เช่น แวนตา เสื้อแจ็คเก็ต เป็นต้น



ห้ามทิ้งรอยนิ้วมือ หรือร่องรอยใดๆจากการจับหลอดไฟ



ส่วนประกอบของหลอดไฟซีนอน ไม่มีส่วนประกอบของสารที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นสามารถทิ้งได้ตามหลักการทิ้งหลอดไฟทั่วไป หากยังไม่ถึงวันที่ จำเป็นต้องหุ้มหรือจัดเก็บให้มิดชิด

ขั้นตอนการเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน ดังนี้

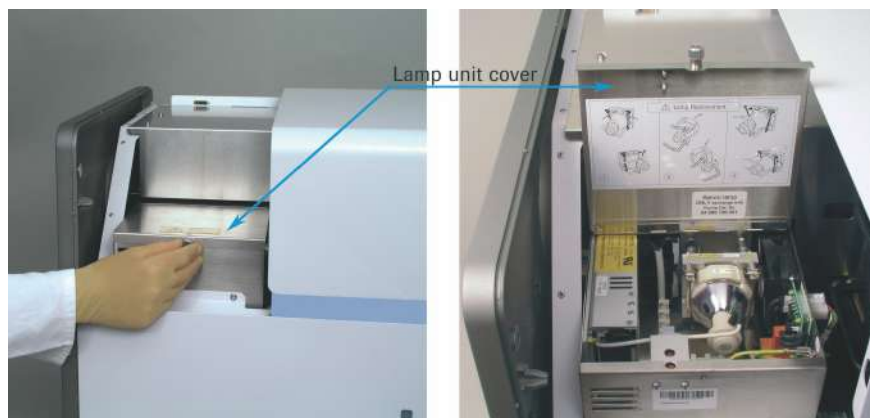
- 1 แยกช่องด้านขวาของเครื่องออก



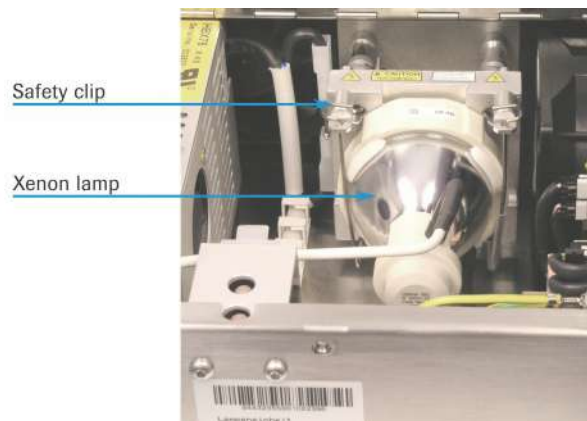
- 2 เลื่อนฝาครอบเครื่องไปทางด้านขวา จะสามารถมองเห็น lamp unit ได้ง่าย



- 3 ขันน็อตตามรูป เพื่อเปิด และนำส่วน lamp unit cover ที่ยึดกันออก



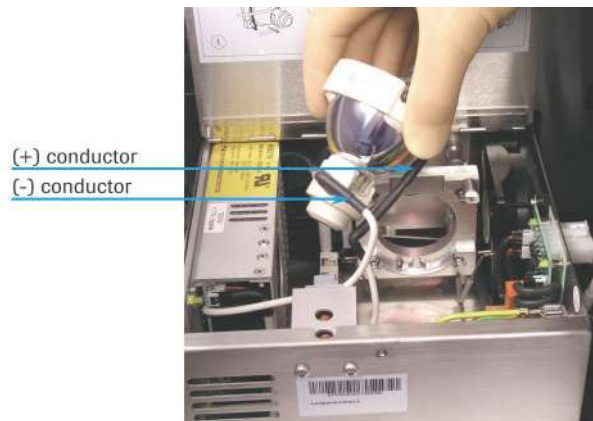
- 4 หลอดไฟซีนอน จะถูกยึดด้วย คลิป (clip) ให้ขันน็อตออก เพื่อยก clip ขึ้น



E

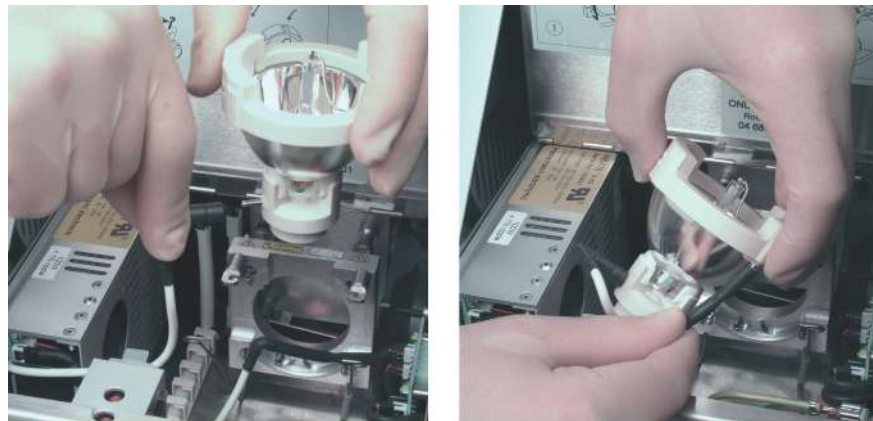


ขกหลอดไฟซีนอนเดิมออกจากตัวยึด และนำตัวนำ (conductors) ออก



ติดตั้งหลอดไฟซีนอนหลอดใหม่เข้าไป เริ่มแรกให้ต่อตัวนำขั้วลบก่อน (—) conductor จากนั้นค่อยเป็นขั้วบวก

(+) conductor



ทำการติดตั้งให้สมบูรณ์ด้วยการใส่กลับเข้าไปที่ตัวยึด ให้แน่ใจว่าขั้วลบของตัวนำ (—) conductor ชี้นั้นด้านบน ทำตามขั้นตอนที่ 4 to 1 ด้านบนเพื่อย้อนวิธีที่ใส่หลอดกลับคืน



หลังจากเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน แล้ว ทำการรีเซ็ตการนับจำนวนชั่วโมงในเครื่อง

LightCycler® 480 รายละเอียดการรีเซ็ตดูในหัวข้อ [Administrative Tools](#)

โปรแกรม *LightCycler® 480* จะอ่านและบันทึกความเข้มแสงของหลอด xenon อัตโนมัติ จากค่าเริ่มต้นของหลอดที่เปลี่ยนใหม่ ระหว่างใช้งาน หากความเข้มแสงต่ำกว่า 2000 units or 4500 units เครื่องจะเตือนให้เปลี่ยนหลอด หรือชั่วโมงการทำงานถึงหรือมากกว่า 1000 ชั่วโมง

การปรับเทียบเครื่องใหม่ ไม่จำเป็นต้องทำเมื่อทำการเปลี่ยนหลอดไฟซีนอน



4 การเปลี่ยนแผ่นกรองระบายอากาศ

แผงวงจรอิเล็กทรอนิกส์ของเครื่อง LightCycler® 480 จะเย็นลงจากการระบายอากาศ ระบบระบายอากาศ 2 ส่วนของเครื่อง จะอยู่ที่มุมล่างขวของด้านขวาของเครื่อง (ด้านขวาของกล่องบล็อก ไซเคิลอร์) และ ด้าน หลัง เครื่อง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากฝุ่นเข้าไปในตัวเครื่องระบบระบายอากาศนี้จะมีแผ่นกรองฝุ่นอยู่



ควรทำการเปลี่ยนแผ่นกรองนี้ทุกปี สามารถสั่งซื้อได้ด้วยรหัสสินค้า (Cat. No. 04 686 128 001)

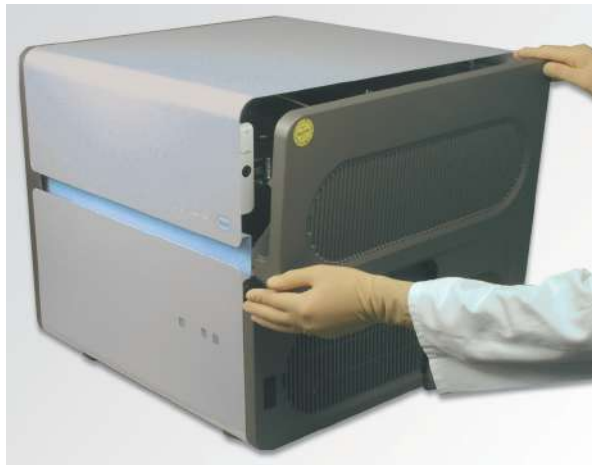


โดยปกติมีแผ่นกรองนี้ จำนวน 4 ชิ้นที่มาพร้อมเครื่อง LightCycler® 480

ขั้นตอนการเปลี่ยนแผ่นกรอง ดังนี้

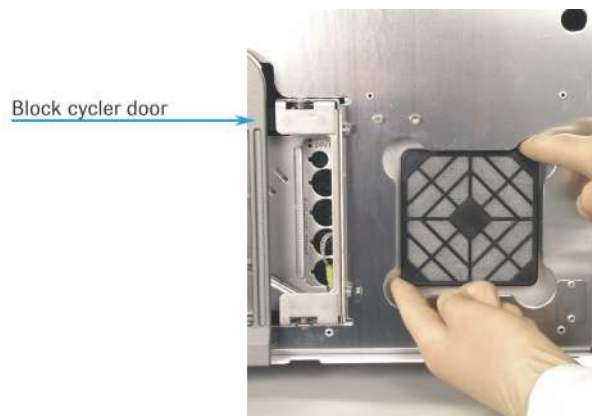
1

เปิดช่องด้านขวาของเครื่องออกเพื่อเข้าถึงระบบระบายอากาศด้านข้าง



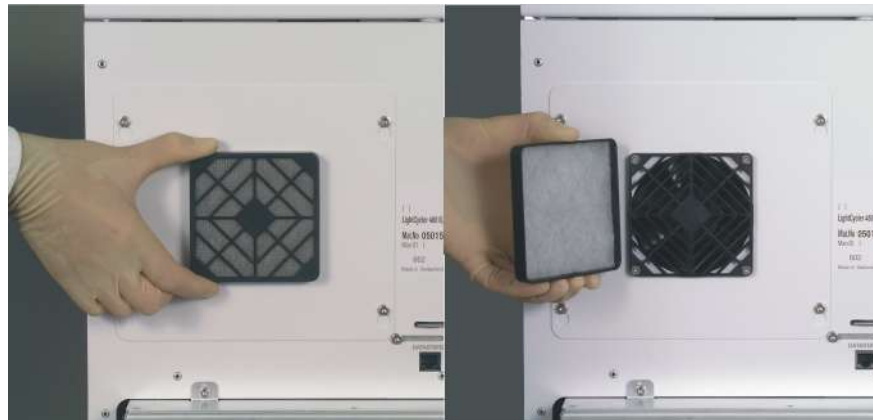
2

นำรอบแผ่นกรองออกดังภาพ

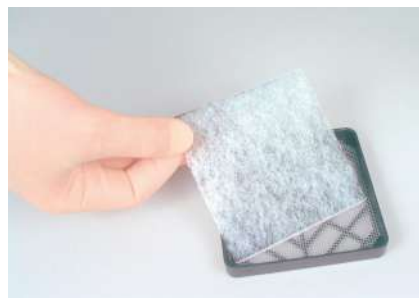




เช่นเดียวกัน ให้นำกรอบแผ่นกรองทางด้านหลังเครื่องออกด้วยด้ามภาพ



ดึงแผ่นกรองเก่าออกจากกรอบ แล้วใส่แผ่นกรองชิ้นใหม่เข้าไปในกรอบเดิม



ทำการเปลี่ยนแผ่นกรองให้ครบทุกส่วน แล้วประกอบฝาเครื่องกลับดังเดิม

E

5 การเปลี่ยนฟิวส์

เครื่อง LightCycler® 480 ประกอบด้วยฟิวส์ 8 ชนิด โดยจำเป็นต้องเปลี่ยนเมื่อมีการเสียหาย ในแพ็คเกจเครื่องเบื้องต้นนั้นจะมีฟิวส์จำนวน 10 ชิ้นในแต่ละประเภทมาให้

ตารางแสดงประเภทและตำแหน่งของฟิวส์ที่ใช้กับเครื่อง LightCycler® 480 Instrument:

ชนิด	ตำแหน่ง	Labeling	Amperage Voltage	Consumer Load
ฟิวส์ Primary				
High-breaking capacity (T 10A H / 250V)	ด้านซ้ายของกล่องไฟ (เมื่อหันหน้าเข้าหาเครื่อง), อยู่ด้านนอกตัวเครื่อง	FUSES LINE INPUT 2 × T10A H / 250V	2 × T10A / 250V	กระแสไฟเข้า ตู้เครื่อง
				



E

ชนิด	ตำแหน่ง	Labeling	Amperage Voltage	Consumer Load
ฟิวส์ Secondary				
High- or low-breaking capacity	ด้านขวาของกล่องไฟ, ภายในตัวเครื่อง ในการเข้าถึงฟิวส์ <i>secondary F1 – F5</i>, ให้เปิดฝาด้านขวาของเครื่อง !  	F1	T3.15 A / 250V	ระบบตรวจวัดสัญญาณ
		F2	T8 A / 250V	บัสสวิตช์เซลล์
		F3, F4, F5	T16A / 250V	เทอร์มอล บัสสวิตช์ เซลล์ ส่วนเพล เทียร์

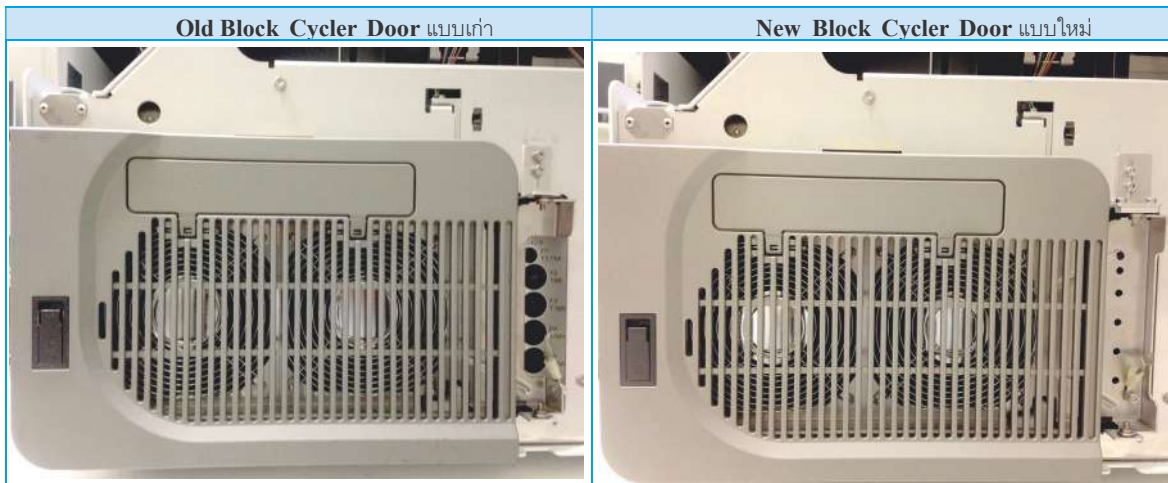


E

ชนิด	ตำแหน่ง	Labeling	Amperage Voltage	Consumer Load
ฟิวส์ Secondary				
	 ฟิวส์ secondary F1 – F5 แต่ละตัวจะมีไฟ LED ซึ่งใช้แสดงสถานะความสมบูรณ์ หากฟิวส์มีการเสียหาย ไฟ LED จะดับ			
ฟิวส์หลอดซีนอน				
	อยู่ภายในตัวเครื่อง ด้านขวาของหลอดไฟซีนอนเหนือช่องไฟหลอดซีนอน  เพื่อที่จะเปลี่ยนฟิวส์หลอดซีนอน ต้องเอาฝาครอบเครื่องออก		2 × T2.5AH /250V	หลอดไฟซีนอน

เครื่องที่มีเลขหลังเครื่องต่อไปนี้จะมียูนิคัลของประตูบล็อก ไซเคิลเป็นแบบใหม่

- ▶ LightCycler® 480 II, 96 Block Cycler with SN 30682 หรือสูงกว่า
- ▶ LightCycler® 480 II, 384 Block Cycler with SN 6190 หรือสูงกว่า



เมื่อเปิดเครื่อง ให้ตรวจสอบฟิวส์ว่าติดตั้งดีหรือไม่โดยดูจากไฟ LED ที่สว่างขึ้น หากมีการเสียหายของฟิวส์ไฟ LED จะดับ

- ❗ การใช้งานที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบและเกิดไฟไหม้ได้
 - ▶ ก่อนนำฟิวส์ออก ให้ปิดเครื่องและถอดปลั๊กไฟ
 - ▶ เปลี่ยนฟิวส์ตามขนาดและชนิดที่กำหนดเท่านั้น

ขั้นตอนการเปลี่ยนฟิวส์ **F1 to F5**:

- 1 เปิดฝาด้านขวาของเครื่องเพื่อเปลี่ยนฟิวส์ F1 to F5
- 2 เปิดประตูบล็อก ไซเคิลประมาณ 45° องศา เพื่อให้เข้าถึงฟิวส์



การเปลี่ยนฟิวส์ชนิด **primary or secondary:**

- 1 ใช้ไขควงขันฝาครอบฟิวส์ออก



- 2 ดึงฝาครอบที่ติดกับฟิวส์ออกมาทั้งหมด



- 3 เปลี่ยนฟิวส์ตัวใหม่แทนที่เสียหาย แล้วใส่กลับเข้าไปที่เดิม

- 4 ใช้ไขควงขันให้แน่น



การเปลี่ยนฟิวส์หลอดไฟซีนอน:

- 1 นำฝาครอบเครื่องออก
- 2 ฟิวส์หลอดไฟซีนอนจะอยู่เหนือช่องไฟหลอดไฟซีนอน



- 3 ใช้คีมปลายแหลมหนีบด้านข้างขาซ้ายของที่ยึดฟิวส์ แล้วดึงทั้งชุดฟิวส์ออกจากช่อง



- 4 เปลี่ยนฟิวส์อันใหม่แทนที่อันเก่าที่เสียหาย แล้วใส่กลับเข้าไปที่ตัวยึดฟิวส์ตามเดิม
- 5 ประกอบฝาเครื่องเข้าที่เดิม

E



E

ภาคผนวก

F

Chapter F • ภาคผนวก

กรณีศึกษา, คำนี และข้อมูลการ

สั่งซื้อสินค้า

F	ภาคผนวก	
1	การแก้ไขปัญหา	391
1.1	ข้อความในช่องข้อความของโปรแกรม LightCycler® 480	392
1.2	ข้อความโปรแกรมควบคุมการทำงานของเครื่อง	393
1.3	ข้อผิดพลาดของฮาร์ดแวร์	395
1.4	การบริการการเข้าถึงเครื่องจากภายนอก.....	397
2	ข้อมูลการสั่งซื้อสินค้า	398
3	ดัชนี	399



ภาคผนวก

1 การแก้ไขปัญหา

ทุกการทดสอบและข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นจะถูกบันทึกไว้ในเครื่อง LightCycler® 480 โดยจะบันทึกไว้ใน diagnostic tool (problem reporting) สามารถศึกษาเพิ่มเติมได้ในเนื้อหาส่วน โปรแกรมในหัวข้อ diagnostic tools

รายการหรือข้อผิดพลาดที่พบได้บ่อยๆ ดังตารางข้างล่าง โดยระบุสาเหตุและการแก้ไขเบื้องต้น หากไม่สามารถแก้ไขได้ หรือต้องการความช่วยเหลือเพิ่มเติมสามารถติดต่อบริษัทผู้แทนการขายและบริการ



ข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่มีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นนั้น ควรทวนสอบข้อมูลให้ดีขึ้น หากมีข้อสงสัยในข้อมูลการทดลองครั้งนั้น แนะนำให้ทำการทดลองนั้น

F

1.1 ข้อความในช่องข้อความของโปรแกรม LightCycler® 480

ข้อความระบบ	ชนิด	สาเหตุที่เป็นไปได้	การแก้ไข
Timed out while waiting for large enough buffer to resume consuming!	Warning	เครื่องไม่เชื่อมต่อไฟดับขณะที่ทำการทดสอบ	ทำการเชื่อมต่อเครื่อง ทำการ/restart เครื่อง
An error occurred during the run! The run will now be aborted	Warning	เครื่องไม่เชื่อมต่อไฟดับขณะที่ทำการทดสอบ	ทำการเชื่อมต่อเครื่อง ทำการ/restart เครื่อง
Experiment New Experiment contains no acquisitions	Warning	ทำการทดสอบโดยไม่มีการวัดสัญญาณ	เลือก analysis mode และ acquisition type
Please activate an instrument before setting up a new run	Warning	ไม่ได้กำหนดเครื่องเป็นค่าเริ่มต้น	กดปุ่ม “open tools” เลือก instrument และสร้างใหม่โดยตั้งให้เครื่องที่ใช้เป็นค่าเริ่มต้น
Dispatcher Exception: Attempted to connect instrument xxxxxx to a different instrument (yyyyyy) 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	เครื่องเชื่อมต่อกับ IP address ที่มีการเปลี่ยนไป	กดปุ่ม “open tools” เลือก instrument และสร้าง new instrument จากนั้นตั้งให้เป็นค่าเริ่มต้น
For Windows XP: 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	เครื่องมีการเชื่อมต่อเรียบร้อยแล้ว	-
For Windows 7 and 10: Failed to open log file “C:\ProgramData\Roche\LightCycler480\Bin\Logs\Instr_ xxxxxx000.log. A connected instrument is already using the log file!			
Cannot find a user with the login name “xy”	Warning	ไม่ปรากฏผู้ใช้ในฐานข้อมูล	กดปุ่ม “open tools” กดเลือก “User and Group” และตั้งผู้ใช้งาน
The supplied password does not match user xy!	Warning	ใส่รหัสผ่านผิด	ตรวจสอบรหัสผ่าน
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	ฮาร์ดแวร์หรือซอฟต์แวร์มีความผิดปกติ/ เกิดข้อผิดพลาด	กดบันทึกและเปิดโปรแกรม LightCycler® 480 ใหม่
An error occurred during the run! The run will now be aborted	Error	ฮาร์ดแวร์หรือซอฟต์แวร์มีความผิดปกติ/ เกิดข้อผิดพลาด	หากไฟ LED แสดงสถานะบนเครื่องปรากฏสีแดง ให้กด restart เครื่อง



1.2 ข้อความจากโปรแกรมการควบคุมเครื่อง

เลขข้อผิดพลาด	ข้อความระบบ	ชนิด	สาเหตุที่เป็นไปได้	การแก้ไข
16	Restart instrument, inform Roche service	Error	เกิดข้อผิดพลาดในการเชื่อมต่อ กับ block cycler controller	กด restart เครื่อง
26	Restart instrument, inform Roche service	Error	เกิดข้อผิดพลาดในการเชื่อมต่อ กับ detection controller	กด restart เครื่อง
36	Restart instrument, inform Roche service	Error	เกิดข้อผิดพลาดในการเชื่อมต่อ กับ raw data controller	กด restart เครื่อง
46	Restart instrument, inform Roche service	Error	เกิดข้อผิดพลาดในการเชื่อมต่อ กับ Detection Controller 3	กด restart เครื่อง
11001	Command not allowed	Error	คำสั่งที่ส่งไปที่เครื่องนั้นไม่สามารถดำเนินการได้	a) ตรวจสอบเฟลทและส่งคำสั่งอีกครั้ง b) หลังข้อผิดพลาดให้ restart เครื่องและนำข้อมูลกลับคืน c) กด restart เครื่อง
10006	Wrong instrument type connected	Error	โปรแกรมไม่เชื่อมต่อกับเครื่องหรือ EEPROM มีปัญหา	ตรวจสอบว่าเชื่อมต่อเครื่องถูกต้องหรือติดต่อเจ้าหน้าที่ของ Roche
100100010	Restart instrument, inform Roche service	Error	มีการถอด block cycles controller board ออก หรือมีการเชื่อมต่อไม่ดี	ตรวจสอบ Block Cycler Controller Board.
100100020	Restart instrument, inform Roche service	Error	มีการถอด Detection Control Motors Controller Board ออก หรือมีการเชื่อมต่อไม่ดี	ตรวจสอบ Detection Control Motors Controller Board.
100100040	Restart instrument, inform Roche service	Error	มีการถอด Detection Control Controller Board ออกหรือมีการเชื่อมต่อไม่ดี	ตรวจสอบ Detection Control Controller Board.
100100050	Restart instrument, inform Roche service	Error	มีการถอด Data Reduction Controller Board ออกหรือมีการเชื่อมต่อไม่ดี	ตรวจสอบ Data Reduction Controller Board.
100100080	Restart instrument, inform Roche service	Error	Controller Firmware เก่ากว่าที่กำหนด	กด restart เครื่อง
100100100	Restart instrument, inform Roche service	Error	Indicator Board เสียหรือไม่ได้เสียบปลั๊กไฟ	ตรวจสอบ Indicator Board.
100600120	Command not allowed	Warning	ไม่สามารถดำเนินการคำสั่งได้เนื่องจากข้อผิดพลาดก่อนหน้านี้	หากไฟ LED แสดงสถานะเครื่องปรากฏสีแดง ให้กด restart เครื่อง หากปรากฏเป็นสีเขียว ให้ตรวจสอบเฟลททดสอบ และกดคำสั่งนั้นซ้ำ
100600130	Command not allowed	Warning	ไม่สามารถดำเนินการคำสั่งได้เนื่องจากข้อผิดพลาดก่อนหน้านี้	หากไฟ LED แสดงสถานะเครื่องปรากฏสีแดง ให้กด restart เครื่อง หากปรากฏเป็นสีเขียว ให้ตรวจสอบเฟลททดสอบ และกดคำสั่งนั้นซ้ำ



เลขข้อผิดพลาด	ข้อความระบบ	ชนิด	สาเหตุที่เป็นไปได้	การแก้ไข
100800100		Warning Error	Block cyclor และฝาปิดไม่เหมาะสม หรือเข้าคู่กัน หรือปัญหาEEPROM เสีย	ตรวจสอบ thermal block cyclor และ block cyclor cover ตรวจสอบ สาย EEPROM
101100100		Warning	วางเพลตผิดทิศทาง หรือทำการใส่ เพลตขณะเครื่องกำลังเริ่มทำงาน	ตรวจสอบเพลต
101100110		Warning	เพลตและ block cyclor ไม่เข้า คู่กันหรือเหมาะสมกัน	ตรวจสอบชนิดเพลตและ block cyclor
101400130		Error	ประตูเครื่องเปิดอยู่ สวิตช์เครื่องเสีย	ปิดประตูเครื่อง ตรวจสอบ สวิตช์เครื่อง

1.3 ข้อผิดพลาดฮาร์ดแวร์

เลขข้อผิดพลาด	ข้อความระบบ	ชนิด	สาเหตุที่เป็นไปได้	การแก้ไข
210259098	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	อุณหภูมิของ block ไม่อยู่ในช่วงที่กำหนด	ตรวจสอบ block cycler หรือ ตรวจสอบการตั้งค่า ramp rate (°C/s)
210259120	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	อุณหภูมิของ electronic rack สูงเกิน 90 °C	
210260004	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Cover heater ไม่ทำงาน	ตรวจสอบ block cycler cover
220257060	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Init light barrier X-Axis ไม่ทำงาน	ตรวจสอบการ Loading
220257060	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Init LB X-Axis ไม่ทำงาน	ตรวจสอบการ Loading
220272069	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	คำสั่งการใส่เพลทไม่ทำงาน	ตรวจสอบการ Loading
220272759	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	คำสั่งการใส่เพลทไม่ทำงาน	ตรวจสอบการ Loading
220274056	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Motor Z- or X-Axis ไม่เชื่อมต่อ	ตรวจสอบการ Loading
220274059	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	การใส่เพลทถูกขัดขวาง	ตรวจสอบการ Loading
220513059	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Init light barrier Z-Axis เสีย	ตรวจสอบการ Loading
220513060	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Init light barrier Z-Axis เสีย	ตรวจสอบการ Loading
224257400	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	ระบบเซนเซอร์เพลทเสีย	ตรวจสอบเซนเซอร์เพลท
230257122	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	LB Ex Filter Wheel เสีย	ตรวจสอบ Filter Wheel
230258124	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	Motor Ex Filter Wheel เสีย	ตรวจสอบ Filter Wheel
230513130	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	หลอดไฟซีนอนเสีย	ตรวจสอบหลอดไฟซีนอน
240117060	Restart Instrument, inform Roche service	Synch-Error	อุณหภูมิของกล้องสูงเกินไป	ตรวจสอบกล้อง และอุณหภูมิภายนอก
310000095	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ไม่ได้ใส่ block	ตรวจสอบ Block
310000096	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ไม่ได้ใส่ block cycler หรือเซนเซอร์ block ไม่ทำงาน	ตรวจสอบ Block การเชื่อมต่อของ Block
310000097	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ระบบเซนเซอร์ Block ชั่ว ค	ตรวจสอบ Block
310000099	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ไม่มีการปิด ฝาปิด/block cycler	ตรวจสอบ block cycler cover heater
310000104	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	Block รูปร่างหรือรูปทรงผิดปกติไป	ตรวจสอบ Block



เลขข้อผิดพลาด	ข้อความระบบ	ชนิด	สาเหตุที่เป็นไปได้	การแก้ไข
310000107	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error		ตรวจสอบ block cycler.
310000108	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	เซนเซอร์อุณหภูมิ Block cycler เสีย	ตรวจสอบ block cycler.
310000112	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ไม่ได้ใส่ block cycler หรือ Sensor data ไม่ทำงาน	ตรวจสอบ block cycler และการเชื่อมต่อ
310000115	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ไม่ได้ใส่ block หรือ Sensor data ไม่ทำงาน	ตรวจสอบ block cycler และการเชื่อมต่อ
310000118	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	เซนเซอร์อุณหภูมิของ Electronic Rack ไม่เชื่อมต่อหรือไม่ทำงาน	Check Electronic Rack temperature sensor.
310000145	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ฟิวส์ F5 เสีย	ตรวจสอบฟิวส์ F5.
310000146	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ฟิวส์ F4 เสีย	ตรวจสอบฟิวส์ F4.
310000147	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ฟิวส์ F3 เสีย	ตรวจสอบฟิวส์ F3.
310000148	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ฟิวส์ F2 เสีย	ตรวจสอบฟิวส์ F2.
340000050	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	สาย FireWire ของกล้องไม่ได้เสียบ สาย data ของกล้องไม่ได้เสียบ Ex Motor หรือ LB on Optics unit เสีย พัดลมของ Electronic Rack เสีย	ตรวจสอบกล้อง ตรวจสอบระบบ Optics ตรวจสอบพัดลม Electronic Rack
340000060	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	อุณหภูมิของกล้องสูงเกินไป	ตรวจสอบกล้องและอุณหภูมิภายนอก
340000067	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	ไม่พบ Cover Markers	ตรวจสอบ block cycler cover และกล้อง
340000080	Restart Instrument, inform Roche service	Asynch-Error	สาย Optics ไม่ได้เสียบ LB Em Filter Wheel เสีย ไม่พบ Block cycler cover markers ช่องอ้างอิง EEPROM ไม่มีโปรแกรมคำสั่ง	ตรวจสอบหลอดไฟซีนอน ตรวจสอบ Optics module ตรวจสอบระบบกรอง
500100850	Restart Instrument, inform Roche service	Error	ปรากฏร่วมกับข้อผิดพลาด 230513130 (หลอดไฟซีนอนเสีย)	ตรวจสอบหลอดไฟซีนอน
500500420	Restart Instrument, inform Roche service	Error	ไม่พบช่องเปิดชนิด TL-Slave 1	ตรวจสอบการเชื่อมต่อเครื่อง

1.4 การบริการผ่านระบบระยะไกลของโรช

โรชให้บริการผ่านระบบระยะไกลในการดูแลช่วยเหลือ ติดต่อเจ้าหน้าที่ตัวแทนเพื่อได้รับข้อมูลส่วนนี้



2 ข้อมูลการสั่งซื้อสินค้า

ด้านล่างเป็นข้อมูลรายการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีขายทั่วโลก หากต้องการทำการสั่งซื้อสินค้า ให้ติดต่อตัวแทนจำหน่ายโรช

โรชจะมีรายการน้ำยาและระบบสำหรับด้านวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เพื่อภาพรวมของสินค้าและการแนะนำ ให้เข้าชมเว็บไซต์ได้ที่ <https://diagnostics.roche.com/>

Instruments		
LightCycler® 480 Instrument II, 96-well	1 instrument with control unit and accessories	05 015 278 001
LightCycler® 480 Instrument II, 384-well	1 instrument with control unit and accessories	05 015 243 001
Software		
LightCycler® 480 Software, Version 1.5	software package including LightCycler® 480 Gene Scanning Module	available online
LightCycler® 480 LIMS Interface Module	software package	available online
Accessories		
LightCycler® 480 Block Kit 96 Silver	96-well thermal block cycler unit, including block cycler cover, storage box and loading device	05 015 219 001
LightCycler® 480 Block Kit 384 Silver	384-well thermal block cycler unit, including block cycler cover, storage box and loading device	05 015 197 001
LightCycler® 8-Tube Strip Adapter Plate	1 piece, adapter plate	06 612 598 001
Spare Parts (Contact your Roche Service representative)		
LightCycler® 480 Ventilation Dust Filter	4 filters	04 686 128 001
LightCycler® 480 Xenon Lamp (Only required for first generation LightCycler® 480 Instruments with a Xenon Lamp as excitation light source)	1 lamp	04 686 136 001
LightCycler® 480 Sealing Foil Applicator	1 piece, applicator	04 900 383 001
Disposables		
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	50 plates with 50 sealing foils	04 729 692 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	50 plates with 50 sealing foils	04 729 749 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, clear	50 plates with 50 sealing foils	05 102 413 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, clear	50 plates with 50 sealing foils	05 102 430 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, 4 bar codes	50 plates without sealing foils	05 220 319 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white, 4 bar codes	50 plates without sealing foils	05 217 555 001
LightCycler® 480 Sealing Foil	1 x 50 foils	04 729 757 001
LightCycler® 8-Tube Strips (clear)	10 x 12 clear strips and caps	06 327 672 001
LightCycler® 8-Tube Strips (white)	10x 12 white strips and clear caps	06 612 601 001

3 ดัชนี

คำดัชนี	หน้า
การปฏิบัติตามกฎ 21 CFR Part 11	11
การยกเลิกการทำงาน	129
การวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง	157
วิธีการทำ	158
การใช้วิธี Fit Points	166
การใช้วิธี Second Derivative Maximum	164
การคูณ.....	172
การทดลองหาปริมาณเป็นจำนวนจริง	
การใช้วิธี Fit Points	168
การเก็บข้อมูลสัญญาณ	
การเก็บข้อมูลสัญญาณ (ต่อ °C).....	126
การเพิ่ม	
ไนต์การวิเคราะห์	150
การปรับแต่ง	
ระดับเกณฑ์	167
โฟลเดอร์ผู้จัดการระบบ	97
เครื่องมือสำหรับการจัดการ	
ภาพรวม	315
ผู้จัดการระบบ	
บทบาทของผู้จัดการระบบ	319
หมวดการวิเคราะห์ขั้นสูง	176
บล็อก 'ไฮเคเลอร์' แบบอะลูมิเนียม	
กราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบปลายทาง	
การวิเคราะห์	212
การวิเคราะห์	
วิธีการ	144
การลบออก	150
การตั้งชื่อใหม่	150
หมวดการวิเคราะห์	143
ไนต์การวิเคราะห์	
การเพิ่ม	150
ผลการวิเคราะห์	
การส่งออก	151
ขั้นตอนการวิเคราะห์	
ภาพรวม	144
การวิเคราะห์กลุ่มย่อย	288
หน้าด่างการวิเคราะห์	146



การประยุกต์ใช้	
การชดเชยสัญญาณสี่	278
แม่แบบกลุ่มย่อย	290
แม่แบบ	133, 282
ไฟล์ ATF	98
การนำเข้า	108
การเข้าสู่อัตโนมัติ	
การวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์	180
ช่วงการแก้ไขสัญญาณพื้นหลัง	
การตั้งค่า	169
หมวดการวิเคราะห์ขั้นพื้นฐาน	176
การส่งออกข้อมูลครั้งละหลายไฟล์	112
การนำเข้าข้อมูลครั้งละหลายไฟล์	116
แผ่นฝาปิดครอบบล็อก ไชเคลอร์	46, 49, 76
ประตูบล็อก ไชเคลอร์	48
อุปกรณ์นำใส่บล็อก ไชเคลอร์	76
บล็อก ไชเคลอร์	44, 48
ตัวบล็อก	
เครื่อง LightCycler® 480	44
กล่อง ซีซีดี	44, 52
การเปลี่ยน	
การอ่านจีโนไทป์	226, 239
การตั้งค่าความไว	265
การอ่านตัวจีโนไทป์	266
แผนภูมิ	
การทำสำเนา	294
การแสดงผล	149
การส่งออก	293
ประวัติการรับสัมผัส	127
ประวัติสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	127
เมนู	149
ภาพรวม	291
การกดมอง	296
คุณสมบัติ	291, 303
การพิมพ์	291
ประวัติจุดข้อมูล	127
ชนิด	127
ชนิดของข้อมูล	291
การซูม	149, 295
ข้อมูลแผนภูมิ	
การส่งออก	294
หัวข้อแผนภูมิ	
การระบุ	305
รูปแบบการเลเบลแผนภูมิ	
การระบุ	305



คุณสมบัติแผนภูมิ	
การเขียนทับค่าเริ่มต้น	308
การเขียนทับ ยกตัวอย่าง	310
รายการคุณสมบัติแผนภูมิ	
การสร้าง	311
การทำให้เป็นค่าเริ่มต้น	311
การเปิด	303
การทำความสะดวก	375
การชดเชยสัญญาณสี่	115, 143, 145, 164
การประยุกต์ใช้	278
ไม่เพียงพอ	274
การเลือก	147
การใช้งาน	271
การวิเคราะห์การชดเชยสัญญาณสี่	
ภาพรวม	270
ไฟล์การชดเชยสัญญาณสี่ (CC)	270
การนำไปใช้	129
การทดลองการชดเชยสัญญาณสี่	
วิธีการ	271
การทำงาน	275
การกำหนดค่า	
คุณสมบัติการแก้ไขตัวอย่าง	134
การเชื่อมต่อ	
เครื่อง LightCycler® 480 กับโปรแกรม	358
ส่วนควบคุม	
เครื่อง LightCycler® 480	27
ส่วนทำความเย็น	
การทำสำเนา	
ตัวอย่างข้อมูล	148
ส่วนของที่คลิปปัด	297
การสร้าง	
การทดลองจากแม่แบบ	283
ไฟล์ใหม่	99
ชุดผลข้อมูล	195
กลุ่มย่อย	288
แม่แบบกลุ่มย่อย	290
แม่แบบ	282
Crossing point (Cp)	
ของตัวอย่าง	158
สัญญาณข้ามช่อง	
สัญญาณข้ามช่องที่คงเหลือ	
คำแนะนำ	274
การปรับแต่ง	
แผนภูมิ	303
การแสดงกราฟในรูปแบบต่างๆ	265
การแสดงผลข้อมูลออนไลน์	128
รายงาน	299
ตัวอย่าง	303



Cy5.....	53, 54
สีตัวรายงาน	64
จำนวนรอบ	125
ฐานข้อมูล	
การตรวจสอบขนาด	361
การทำความสะอาด	337
การติดตั้งฐานข้อมูลเพิ่มเติม.....	361
การออกจากการใช้งาน	92
การเข้าใช้งานต่างฐานข้อมูล	366
การเข้าถึงฐานข้อมูลจากภายนอก	366
ฐานข้อมูลงานวิจัย	333
การบันทึกฐานข้อมูลที่มีอยู่	361
ฐานข้อมูลที่ตรวจสอบย้อนกลับได้	333
การอัปเดต.....	333
ไฟล์ฐานข้อมูล	
การบีบอัด	361
การแทนที่ไฟล์ฐานข้อมูลด้วยชื่อเดียวกัน	368, 369
การบันทึก	362
การจัดการฐานข้อมูล	
โปรแกรมรุ่น 1.3 หรือก่อนหน้า.....	340
หน้าต่างข้อมูลของฐานข้อมูล	333
รายการฐานข้อมูล	
การนำทาง	96
การกำหนด	
เครื่อง	344
โปรแกรมการละลาย	202
โปรแกรม	124
อุณหภูมิเป้าหมาย.....	124
การยกเลิกการเลือก	
ตัวอย่าง	104, 107
การออกแบบ	
ปฏิกิริยา Gene Scanning.....	251
พีซีอาร์ โพรโทคอล	251
การตรวจวัด	
การรวบรวมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	256
ช่องการวัดสัญญาณ	53
ชุดกรองแสง LightCycler® 480 Instrument I	53
ชุดกรองแสง LightCycler® 480 Instrument II	54
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	345
การกำหนดสีฟลูออเรสเซนซ์ใหม่	348
ภาพรวม	60
การตั้งค่า	122
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	
ชุดกรองแสง LightCycler® 480 Instrument I	345
ชุดกรองแสง LightCycler® 480 Instrument II	346
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณที่รองรับ	
กัวดิทซ์ค่าTm	204



ระบบการตรวจวัดสัญญาณ	44, 51
ชุดกรองแสง	29
รายละเอียดคุณลักษณะ	28
การตรวจวัดสัญญาณ	
ระบบตรวจวัดสัญญาณ	28
การกำหนด	
Fit Points	167
พารามิเตอร์พีซีอาร์	254
เครื่องมือการวินิจฉัย	349
การแสดง	
แผนภูมิ	149
อุปกรณ์ใช้ครั้งเดียว	55
การทดลองแบบสองสี	178
แผ่นกรองฝุ่น	47
การเปลี่ยน	380
การเข้าคู่ช่องสี	
ด้วยไฟการขยายสัญญาณสี	270
ช่องกรองแสงช่วงรับ	52, 53
จีโนไทป์แบบปลายทาง	
วิธีการทำด้วยการอ่านพีซีอาร์	216
วิธีการทำด้วยการอ่านก่อนหลัง	219
คอนเซ็ปต์ผลของตัวควบคุม	227
แม่แบบ	227
การวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง	212
แผนภูมิ	224
ภาพรวม	213
วิธีการทำ	221
ผลการทดลอง	223
ตัวอย่างที่สนับสนุน	215
การทดลองการหาจีโนไทป์แบบปลายทาง	
หมวดการวัด	215
การใส่ข้อมูล	
ข้อมูลตัวอย่าง	135
การใส่ข้อมูล	
ในมุมมองแบบเขต	137
ในมุมมองแบบตาราง	137
พารามิเตอร์ด้านสิ่งแวดล้อม	
เครื่อง LightCycler® 480	26
ความต้องการด้านสิ่งแวดล้อม	39
อุปกรณ์	
ความต้องการเพิ่มเติม	59
บันทึกข้อผิดพลาด	332, 350
การลบไฟล์	332, 350
ข้อผิดพลาด	
ข้อผิดพลาดของฮาร์ดแวร์	395



การเปลี่ยน	
เทอร์มอล บล็อก ไสเคลอร์	76
ช่วงกระตุ้น	
ระบบการตรวจวัดสัญญาณ	28
การจับคู่ช่องกรองแสงช่วงกระตุ้น-ช่วงรับ	
LightCycler® 480 Instrument I	53
LightCycler® 480 Instrument II	54
ชุดกรองแสงช่วงกระตุ้น	52, 53
ควมยาวคลื่น	29
แหล่งแสงช่วงกระตุ้น	51
การแยกออก	
ตัวอย่าง	107
การออกจากโปรแกรม	92
การทดลอง	
การสร้างจากแม่แบบ	283
การสร้างโปรแกรม	120
ชนิดของภาชนะ	320
การทดลองชนิดมาโคร	
การสร้าง	284
การทำงาน	285
ข้อมูลดิบการทดลอง	
การส่งออก	109
การทำการทดลอง	
การเริ่มต้น	128
ไฟล์ข้อความการทดลอง	110
การส่งออก	92
การวิเคราะห์ผล	151
การส่งออกที่หลายข้อมูล	98, 112, 333
แผนภูมิ	293
ข้อมูลแผนภูมิ	294
ไดเรกทอรี	314
ข้อมูลดิบของการทดลอง	109, 111
แต่ละไฟล์โปรแกรม LightCycler® 480	111
รายงานปัญหาของเครื่อง	349
ไฟล์หลายๆไฟล์	112
ไฟล์	109
ข้อมูลไฟล์	98
ข้อมูลการแก้ไขตัวอย่าง	142
ข้อมูลตัวอย่าง	108, 138, 149
ดัชนีข้อมูล	297
ไฟล์คำมาตรฐานการละลายจากภายนอก	
การบันทึก	240
เส้นคำมาตรฐานจากภายนอก	
การแสดงข้อมูล	198
การใช้	162
FAM	53, 54
สัณฐานวิทยา	64



ไฟล์	
การนำเข้า	108, 115
IXO	98
ชุดกรองแสง	
ช่วงกระตุ้น	52
ชุดกรองแสง	29
การเข้าสู่ชุดกรองแสง	
การเลือก	147
การเข้าสู่ชุดกรองแสง	
LightCycler® 480 Instrument I	53
LightCycler® 480 Instrument II	54
การจัดชุดกรองแสงสำหรับรูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	
การเลือก	123
ระบบชุดกรองแสง	
LightCycler® 480 Instrument I	
LightCycler® 480 Instrument II	
Fit Points	
การกำหนด	167
วิธี Fit Points	
วิธีการวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง	166
วิธีการทดลองการหาปริมาณเป็นจำนวนจริง	168
สีฟลูออเรสเซนซ์	53, 54
แผนภูมิกราฟฟลูออเรสเซนซ์	
การระบุเนื้อหา	305
การระบุข้อมูล	306
Fluorescence resonance energy transfer (FRET)	61, 228
สารเรืองแสง	53, 54
โฟลเดอร์	
ชนิดของการอนุญาต	322
FRET (fluorescence energy transfer)	61, 228
ฟิวส์	382
การเปลี่ยน	386
การเปลี่ยนฟิวส์ของหลอดไฟขึ้นอน	387
แหล่งจัดตั้ง	382
ชนิด	382
การแสดง	
การรายงาน	299
Gene Scanning	243
High Resolution Melting	244
การควบคุมผล	268
แม่แบบ	267
การวิเคราะห์จีโนมไทย	
แม่แบบ	281
การเรียกจีโนมไทย	
การเปลี่ยน	226, 239



กลุ่มเงินไทยปี	
การตั้งชื่อใหม่	238
เงินไทยปี	67, 143
แถบ Global action	92
วิธีการรวมกลุ่ม	
การวิเคราะห์เงินไทยปีด้วย Melting Curve	234
เครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมือจับ	32
การวิเคราะห์ แสฟโฟลไทยปี	212
ข้อผิดพลาดของฮาร์ดแวร์	395
ฝาปิดควบคุมความร้อน	48
เทคโนโลยีการถ่ายเทความร้อน	49
อัลกอริทึมความเชื่อมั่นสูง	164
อัลกอริทึมความไวสูง	164
HybProbe probes	53, 54
การติดตามพีซีอาร์	66
Hydrolysis probes	53, 54
การติดตามพีซีอาร์	64
การนำเข้าข้อมูล	
การนำเข้าที่ละหลายไฟล์	98, 116
ไฟล์ข้อมูล	98
ไฟล์	108, 115
ไฟล์หลายไฟล์	116
ข้อมูลการแก้ไขตัวอย่าง	140
ข้อมูลตัวอย่าง	138
การรวบรวม	
ตัวอย่าง	107
พาสเวิร์ดเริ่มต้น	88
การใส่	
เทอร์มอลบล็อกไฮเคลอร์อันใหม่	80
การติดตั้ง	
ฐานข้อมูลเพิ่มเติม	362
เครื่อง LightCycler® 480 Instrument II	40
โปรแกรม LightCycler® 480	352
ความต้องการในการติดตั้ง	
เครื่อง LightCycler® 480	36
เครื่อง	91
การกำหนดค่า	344
เครื่องเสมือน	119
การรายงานปัญหาของเครื่อง	349
การส่งออก	349
หน้าต่างเครื่อง	341
หมวดการรวบรวมเวลา	
การตั้งค่า	123



การเชื่อมต่อต่างๆ	
เครื่อง LightCycler® 480	27
ไฟล์ I/O	98
การนำเข้า	109
ระบบหล่อไฟ	44, 51
การเชื่อมต่อ LAN	47
LightCycler® 480 Genotyping Master	58
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	58
เครื่อง LightCycler® 480	
การเชื่อมกับโปรแกรม	358
การนำเข้าครอซออก	45
คำอธิบาย	44
ความต้องการในการติดตั้ง	36
คำชี้แจงสิทธิ์การใช้งาน	
บล็อกของเครื่องตัวหลัก	44
รายละเอียดคุณลักษณะ	26
เครื่อง LightCycler® 480 Instrument I	
ชุดกรองแสง	29
ระบบชุดกรองแสงของ LightCycler® 480 Instrument I	
ช่องสัญญาณในการตรวจวัด	53
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	346
เครื่อง LightCycler® 480 Instrument II	
คุณสมบัติใหม่	24
ชุดกรองแสง	29
ระบบชุดกรองแสงของ LightCycler® 480 Instrument II	
ช่องสัญญาณในการตรวจวัด	54
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ	346
ส่วนผสมน้ำยาหลักของเครื่อง LightCycler® 480	58
การทำงานกับเครื่อง LightCycler® 480	
การจัดเตรียม	73
การเริ่ม	73
LightCycler® 480 Multiwell Plate	57
LightCycler® 480 Probes Master	58
LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes	58
โปรแกรม LightCycler® 480	
ข้อกำหนด 21 CFR Part 11	
ส่วนประกอบ	86
การติดตั้ง	353
ฟังก์ชันใหม่	24
ภาพรวม	86
การลบออก	371
การเริ่มต้น	88, 358
โปรแกรมหน้าต่างหลักของ LightCycler® 480	
พื้นที่	90



นํ้ายาลักษณ์ LightCycler® 480 SYBR Green I Master	58
ระบบ LightCycler® 480	
ความสอดคล้อง	11
LightCycler® Cyan 500.....	53, 54
สําคัญงาน	64
LightCycler® Red 610.....	53, 54
สําคัญงาน	64
LightCycler® Red 640.....	53, 54
สําคัญงาน	64
LIMS.....	27, 284
การเชื่อมต่อ LIMS	50
อุปกรณ์ช่วยในการใส่สําคัญ	49, 76
การออกจากระบบ	92
มาโคร	279, 284
การสร้างการทดลองชนิดมาโคร	284
มาโครโร	285
การทำทดลองด้วย มาโคร	285
ชนิดของกฎเกณฑ์.....	323
สวิตช์หลัก	72
การบำรุงรักษา	375
คู่มือ	
โครงสร้าง.....	
สัญลักษณ์.....	13
กฏเกณฑ์.....	13
คำเตือนและข้อควรระวัง.....	15
ส่วนผสมหลัก	
เครื่อง LightCycler® 480	58
นํ้ายาลักษณ์	
เครื่อง LightCycler® 480	58
การวิเคราะห์ด้วย Melting Curve	202
หลังจากการทำให้เย็นด้วย SYBR Green I	62
การหาจีโนมด้วย Melting Curve	
การจัดกลุ่มตัวอย่าง	230
ชนิดของตัวอย่าง/การขยาย.....	230
การวิเคราะห์จีโนมด้วย Melting Curve	212
แผนภูมิ	237
การแสดงข้อมูลดิบ	230
วิธีการรวมกลุ่ม	234
ภาพรวม	228
วิธีการ	234
การแยกค่าของตัวอย่าง	230
คอนเซ็ปต์ของตัวควบคุม	241
ผลการทดลอง	236
คะแนน	230
แม่แบบ	241
การใช้ค่ามาตรฐานการละลาย	230

การทดลองสำหรับหาจีโนไทป์ด้วย Melting Curve	
วิธีการ	231
แผนภูมิกราฟการละลาย	203
แผนภูมิยอดกราฟการละลาย	203, 210
คำมาตรฐานการละลาย	
การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วย Melting Curve	230
การวิเคราะห์อุณหภูมิการละลาย	
เนื้อหา	203
โปรแกรมการละลาย	
การกำหนด	202
บริเวณข้อความ	
อะไหล่	95
ข้อความ	392
ข้อความโปรแกรมควบคุมเครื่อง	393
การปรับแต่ง	
กลุ่มย่อย	289
แถบโมดูล	93
การติดตามพีซีอาร์	
ด้วย HybProbe probes.....	66
ด้วย hydrolysis probes	64
ด้วย SYBR Green I	62
การทดลองหลายสี	178
หลายสี	52, 53, 272
จีโนไทป์แบบปลายทาง	215
การตรวจวัดสัญญาณชนิดหลายสี	64, 66
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณหลายสี ของ HybProbe	123
มัลติเวลเพลท	55
การใส่เข้า	50, 75
การนำออก	50
การปิดเพลท	74
เครื่องอ่านบาร์โค้ดมัลติเวลเพลท	48, 50
รายละเอียดคุณลักษณะ	31
การใส่มัลติเวลเพลท	45, 46, 48
ภาพมัลติเวลเพลท (MWP).....	105
ข้อมูลที่แสดง.....	106
การพิมพ์.....	106
การซูมเข้า/ออก	105
ชนิดมัลติเวลเพลท	
การจัดตั้ง	348
การนำทาง	
รายการฐานข้อมูล	96
เครือข่าย	
ลูกค้า/เซิร์ฟเวอร์	369
การจัดตั้งลูกค้า/เครือข่ายเซิร์ฟเวอร์	369



สายเคเบิลสาย	43
ฟังก์ชันใหม่	
ระบบ LightCycler® 480	24
สัญญาณรบกวน	
การจัดตั้ง	166, 170
วัตถุ	
การสั้ว	99
การส่งออก	92, 109
ไฟล์วัตถุ	98
การจัดการไฟล์	
โปรแกรมรุ่น 1.3 หรือก่อนหน้า	340
ชนิดไฟล์	
เหมาะสมสำหรับแม่แบบ	280
การแสดงข้อมูลออนไลน์	
การปรับแต่ง	128
การเปิด	
การตั้งค่ารายการแผนภูมิ	303
บันทึกการปฏิบัติการ	349
การดู	343
ระบบเลนส์	44, 51
ข้อมูลการสั่งซื้อสินค้า	398
การชดเชยที่มากเกินไป	
คำแนะนำ	274
การเข้าคู่มืออย่าง	195
แพน	
แผนภูมิ	296
พาสเวิร์ด	
การเปลี่ยน	331
วันหมดอายุ	330
พาสเวิร์ดเริ่มต้น	88
ประสิทธิภาพ พีซีอาร์	159, 160
การแก้ไขประสิทธิภาพ พีซีอาร์	176
การอ่าน พีซีอาร์	215
ข้อมูลกราฟ	
การจัดเรียง	208
องค์ประกอบเซลล์เดียว	49
วิธีการ	
การทดลองการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ขั้นก้าวหน้า	183
การวิเคราะห์	144
การทดลองการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ขั้นพื้นฐาน	181
การทดลองการชดเชยสัญญาณสี่	271
การวิเคราะห์จีโนมไทยแบบปลายทาง	221



การวิเคราะห์หาจีโนไทป์แบบปลายทางด้วยการอ่านพีซีอาร์	216
การวิเคราะห์หาจีโนไทป์แบบปลายทางด้วยการอ่านค่าก่อน/หลัง	219
การวิเคราะห์ Gene Scanning	259
การทดลอง Gene Scanning	256
การวิเคราะห์ค่า Tm ด้วยตนเอง	210
การวิเคราะห์จีโนไทป์ Melting Curve	234
การทดลองหาจีโนไทป์ Melting Curve	231
การวิเคราะห์ค่า Tm	204
การอนุญาต	
ไฟล์เฉพาะ	320
การตรวจวัดเพลท	50,348
มุมมองเพลท	
การใส่ข้อมูล	137
กล่องไฟ	47
สายไฟ	42
ความต้องการด้านกำลังไฟฟ้า	
เครื่อง LightCycler® 480	37
การตั้งค่า	
ชนิดของการอนุญาต	324
การตั้งค่า	
การตั้งค่าแผนภูมิ	291, 303
โฟลเดอร์	303
ภาพรวม	303
การตั้งค่าตัวอย่าง	312
การตั้งค่าของผู้ใช้	314
การเตรียม	
การทดลอง Gene Scanning	251
วัสดุตัวอย่าง	252
การอ่านก่อน/หลัง	215
การพิมพ์	
แผนภูมิ	291
ภาพผลลัพธ์เพลท (MWP)	106
รายงาน	302
รายงานปัญหา	98, 349
โปรแกรม	
การกำหนดการทดลอง	124
การจบการทดลอง	129
การทดลองใหม่	120
การแสดง	
เส้นมาตรฐาน	160
การหาปริมาณ	143
การวิเคราะห์การหาปริมาณ	
แม่แบบ	280
คำถาม	
การสร้าง	333
การดำเนินการ	100
แถบคำถาม	100



ช่วง	
ของปริมาณปฏิบัติการ	121
น้ำยา	58
การวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์	
รูปแบบการวิเคราะห์ขั้นก้าวหน้า	176
รูปแบบการวิเคราะห์	175
การเข้าสู่ชุดโมเดล	180
การวิเคราะห์ขั้นพื้นฐาน	176
การแก้ไขภายใต้การวิเคราะห์	189
ตัวระบุ	180
ไม่ถูกต้อง	199
ภาพรวม	175
หลักการ	179
คอนเซ็ปต์ของตัวควบคุม	201
แม่แบบ	200
การดูผลภายใต้การวิเคราะห์	189
การดูผลการทดลอง	194
การทดลองการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์	
ชนิด	178
การทดลองการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (ขั้นก้าวหน้า)	
วิธีการ	183
การทดลองการหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์ (ขั้นพื้นฐาน)	
วิธีการ	181
การลบออก	
การวิเคราะห์จากการทดลอง	150
โปรแกรม LightCycler® 480	371
เทอร์มอลบล็อก ไสเคลอร์	77
การตั้งชื่อใหม่	
การวิเคราะห์	150
กลุ่มจีโนไทป์	238, 266
กลุ่มย่อย	289
การรายงาน	280
การปรับแต่ง	299
การแสดงผล	299
การพิมพ์	302
การจัดตั้ง	331
แม่แบบ	280
การรายงานกลุ่มย่อย	288
การตั้งค่าใหม่	
แกมมา	262
ความละเอียด	
การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วย Melting Curve	230
คอนเซ็ปต์ผลของตัวควบคุม	
การวิเคราะห์จีโนไทป์แบบปลายทาง	227
การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วย Melting Curve	241
การวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพัทธ์	201

ชุดข้อมูล	
การส้าง.....	195
การดูกราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตัวอย่าง	197
ไฟล์เดอริช	97
การทำงาน	
การยกเลิกการทำงาน	129
การทดลองการขยายสัญญาณสี	275
แม่แบบ	280
โมดูลการทำงาน	93
การเปิด	93
การรองรับตัวอย่าง	
เครื่อง LightCycler® 480	27
การแก้ไขตัวอย่าง	131
ข้อมูลการแก้ไขตัวอย่าง	
การส่งออก	142
การนำเข้า	140
คุณสมบัติการแก้ไขตัวอย่าง	
การกำหนดค่า.....	134
ข้อมูลตัวอย่าง	
การสำเนา	148
การใส่ข้อมูล.....	135
การส่งออก	138, 149
การนำเข้า	138
จุดตัวอย่าง	
การระบุรูปร่าง	307
การตั้งค่าตัวอย่าง	303
การปรับแต่งสำหรับการทดลอง.....	313
การใช้.....	312
ตัวอย่าง	
การเข้าสู่อัตโนมัติ	195
การยกเลิกการเลือก	104, 107
การแยกออก	107
การรวมเข้า	107
การเข้าสู่ด้วยมือ.....	196
การเลือก	104, 107, 148
การเลือกด้วยข้อมูลคลิปบอร์ด.....	298
การดูกราฟการเพิ่มจำนวน.....	197
ตารางตัวอย่าง.....	107
การจัดเรียง.....	108
ข้อมูลตารางตัวอย่าง	
การส่งออก.....	108
แม่แบบตัวอย่าง	280
การบันทึก	
ไฟล์ค่ามาตรฐานการละลายจากภายนอก.....	240
เส้นค่ามาตรฐาน	160



การให้คะแนนตัวอย่าง	
การวิเคราะห์ Melting Curve Genotyping.....	230
ผ่านฟิล์มปิดหลอด.....	56
วิธี Second Derivative Maximum.....	163
การวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง.....	164
การเลือก	
การหาค่าสัญญาณดี.....	147
การเข้าสู่ช่องกรองแสง.....	147
ตัวอย่าง.....	104, 107, 148
ตัวอย่างด้วยข้อมูลบนคลิปบอร์ด.....	298
ตัวอย่างจากแผนภูมิ.....	149
การเลือกตัวอย่าง	
ชื่อเฉพาะ.....	148
ชื่อภาพแผนภูมิ.....	148
การทดสอบตัวเอง.....	350
ปฏิกิริยาการจับของไพรเมอร์ที่ไม่ขึ้นกับการจำเพาะต่อลำดับเบส.....	60
การตรวจวัดตัวอย่างจำเพาะกับลำดับเบส	
ในการหาปริมาณสารพันธุกรรม.....	67
ปฏิกิริยาการจับอย่างจำเพาะกับลำดับเบสของไพรเมอร์.....	60
การจัดตั้ง	
รูปแบบการตรวจวัดสัญญาณ.....	122
สัญญาณรบกวน.....	166
การขนส่ง	
เครื่อง LightCycler® 480.....	27
ซิลเวอร์ เทอร์มอล บล็อก ไสเคลอร์.....	
รายละเอียดคุณลักษณะ.....	
SimpleProbe Probes.....	53, 54, 68
การวิเคราะห์ความหลากหลายของการกลายพันธุ์แบบลำดับเบสเดียว (SNP).....	212
วิธีทำ.....	212
การหาการกลายพันธุ์ไปเพียงลำดับเบสเดียว (SNP).....	67
การเรียงลำดับ	
ตารางตัวอย่าง.....	108
ดัชนี.....	297
ความต้องการด้านพื้นที่	
เครื่อง LightCycler® 480.....	37
รายละเอียดคุณลักษณะ	
ส่วนตรวจวัดสัญญาณ.....	28
เครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดมีจอจับ.....	32
เครื่อง LightCycler® 480.....	26
เครื่องอ่านบาร์โค้ดชนิดดีเวลอปต์.....	31
เทอร์มอล บล็อก ไสเคลอร์.....	30
การระบุ	
หัวข้อแผนภูมิ.....	305
รูปแบบการเลเบลแผนภูมิ.....	305



เส้นค่ามาตรฐาน.....	158
การสร้าง.....	198
ภายนอก.....	160
การแสดงข้อมูล.....	160
การบันทึก.....	160
ความชัน.....	159
กราฟเส้นค่ามาตรฐาน	
การระบุรูปร่าง.....	307
ไฟล์มาตรฐาน	
ชนิดของข้อมูล.....	325
การเริ่มทำงาน	
การทำการทดลอง.....	128
โปรแกรม LightCycler® 480.....	88, 358
การเริ่มต้น.....	72
แถบสถานะ.....	91
สถานะไฟแอลซีดี.....	45, 72
กลุ่มย่อย.....	97, 299
การสร้าง.....	288
ค่าเริ่มต้นของตัวอย่างกลุ่มย่อย.....	288
การปรับแต่ง.....	289
ภาพรวม.....	288
การเปลี่ยนชื่อใหม่.....	289
แม่แบบ.....	280
แม่แบบกลุ่มย่อย	
การประยุกต์ใช้.....	290
การสร้าง.....	290
SYBR Green I.....	53, 54, 60, 62
ข้อความของระบบ.....	391
บรรทัดของระบบ	
ส่วนประกอบ.....	35
การเริ่มต้นระบบ.....	72
คอลัมน์ตราช	
การเปลี่ยนความกว้าง.....	297
ข้อมูลตราช	
การส่งออก.....	297
การเรียงลำดับ.....	297
เว็บบท	
การทำสำเนาฉบับคลิปปอร์ด.....	297
มุมมองตราช	
การใส่ข้อมูล.....	137
เมนูข้อมูล	
การระบุรูปร่าง.....	308
การระบุเนื้อหา.....	308
ข้อมูลหมายเหตุ	
การกำหนด.....	124



แม่แบบ

การประยุกต์ใช้	133, 282
การสร้าง	282
การสร้างแม่แบบกลุ่มย่อย	290
การวิเคราะห์จีโนม	281
ภาพรวม	279
การวิเคราะห์การหาปริมาณ	280
การรายงาน	280
การทำงาน	280
ตัวอย่าง	280
กลุ่มย่อย	280
การวิเคราะห์ Tm	280
ชนิด	279
ชนิดของการอนุญาต	323

พื้นฐานการทำอุณหภูมิ

เทคโนโลยีการถ่ายเทความร้อน	49
เทอร์มอล บล็อก ไซเคิลอร์	44, 48, 76
ความแตกต่างของรุ่น	76
การเปลี่ยน	76
การใส่ชิ้นใหม่เข้า	80
การนำออก	77
รายละเอียดคุณลักษณะ	

ระดับเกณฑ์

การปรับ	167

เส้นระดับเกณฑ์	167

การอ่านค่า Tm	143, 202

การวิเคราะห์ค่า Tm

ระบบอัตโนมัติ	205
การกระทำ	204
การทำงานด้วยระบบมือ	210
ผลการทดลอง	202
แม่แบบ	280

อุปกรณ์ใช้เลือกหรือสำหรับการย้าย	41

เกณฑ์ข้อปฏิบัติ	391

การยกเลิกการติดตั้ง

โปรแกรม LightCycler® 480	371

ไฟล์การขออนุญาตเผยแพร่ (CC)	270

การใช้

เส้นค่ามาตรฐานจากภายนอก	162

ผู้ใช้	91

บัญชี	316
บทบาทผู้ใช้ระดับเชี่ยวชาญ	318
กลุ่ม	316
การจัดการ	326
บทบาท	317
บทบาทผู้ใช้มาตรฐาน	317

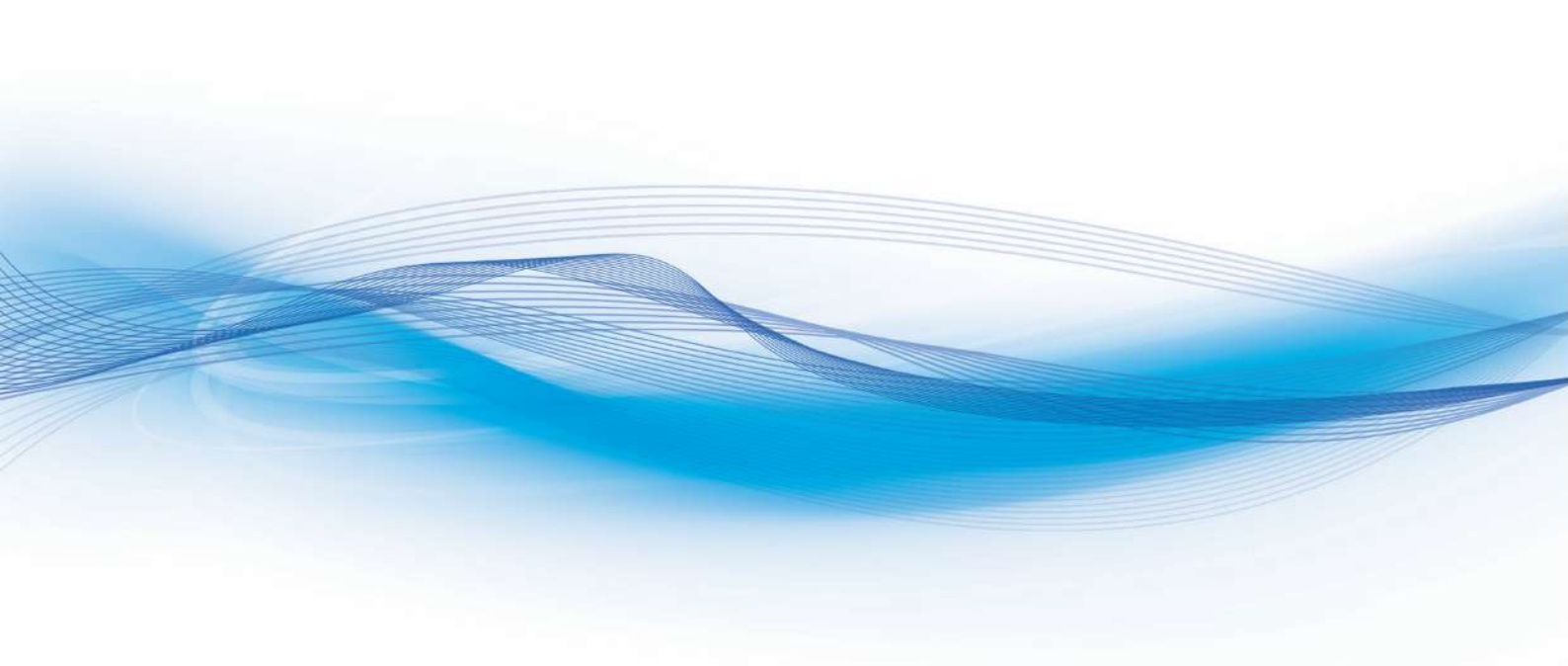
การเข้าถึงของผู้ใช้

การจัดการ	316
การตั้งค่าการทำงาน	329
ผู้เข้าถึง	320



เครื่องมือสำหรับการเข้าถึงของผู้ใช้	
การเปิด	326
บัญชีผู้ใช้งาน	
การสร้างบัญชีผู้ใช้งานใหม่	326
การยกเลิกการใช้งาน	327
โฟลเดอร์ผู้ใช้	97
กลุ่มผู้ใช้	
การสร้าง	328
การลบ	329
การแก้ไข	329
การจัดการ	326
ระบบการเข้าใช้งานของผู้ใช้	87
ชื่อผู้ใช้	88
คุณสมบัติผู้ใช้	303,314
รายละเอียดคุณลักษณะ	314
บทบาทผู้ใช้งาน	
การจัดการ	326
สิทธิ์ในการเข้าปรับเปลี่ยน	329
ระบบขยายทศ	38,47
แผ่นออกาท	
การเปลี่ยน	380
ความต้องการสำหรับระบบขยายทศ	38
VIC / HEX / Yellow555	53,54
สีตัวรายงาน	64
การแสดงผลการทดลอง	
การวิเคราะห์การหาปริมาณเป็นจำนวนจริง	172
การวิเคราะห์การหาปริมาณเชิงสัมพันธ์	194
ระบบเสมือน LightCycler® 480	119
ส่วนหน้าต่าง	
การปรับขนาด	94
หลอดไฟซินฮอน	376
การเปลี่ยนฟิวส์	387
ฟิวส์	384
ชุมเข้า/ออก	
แผนภูมิ	149,295
ภาพจำลองเดลเทท (MWP)	105





Published by

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

© 2019 Roche Diagnostics.
All rights reserved.

05152062001*0819