

Module 6 : 定量PCR仪日常维护

- 电脑及软件的维护
- 定量**PCR**仪主机的维护

专机专用

- 工程师现场安装时，会确认计算机是否合乎要求
- 请勿自行更换电脑
- 请勿自行安装其它第三方软件

预防电脑病毒

- 不使用与实验无关的移动存储器
- 使用U盘时，必须先把U盘在自己的电脑上格式化
- 最好使用专用的U盘

数据线的插拔

- 避免经常拔插连接计算机与定量**PCR**仪的数据线
- 必须在关闭电脑及主机的情况下才可以拔插数据线
- 删除多余的**USB**设备

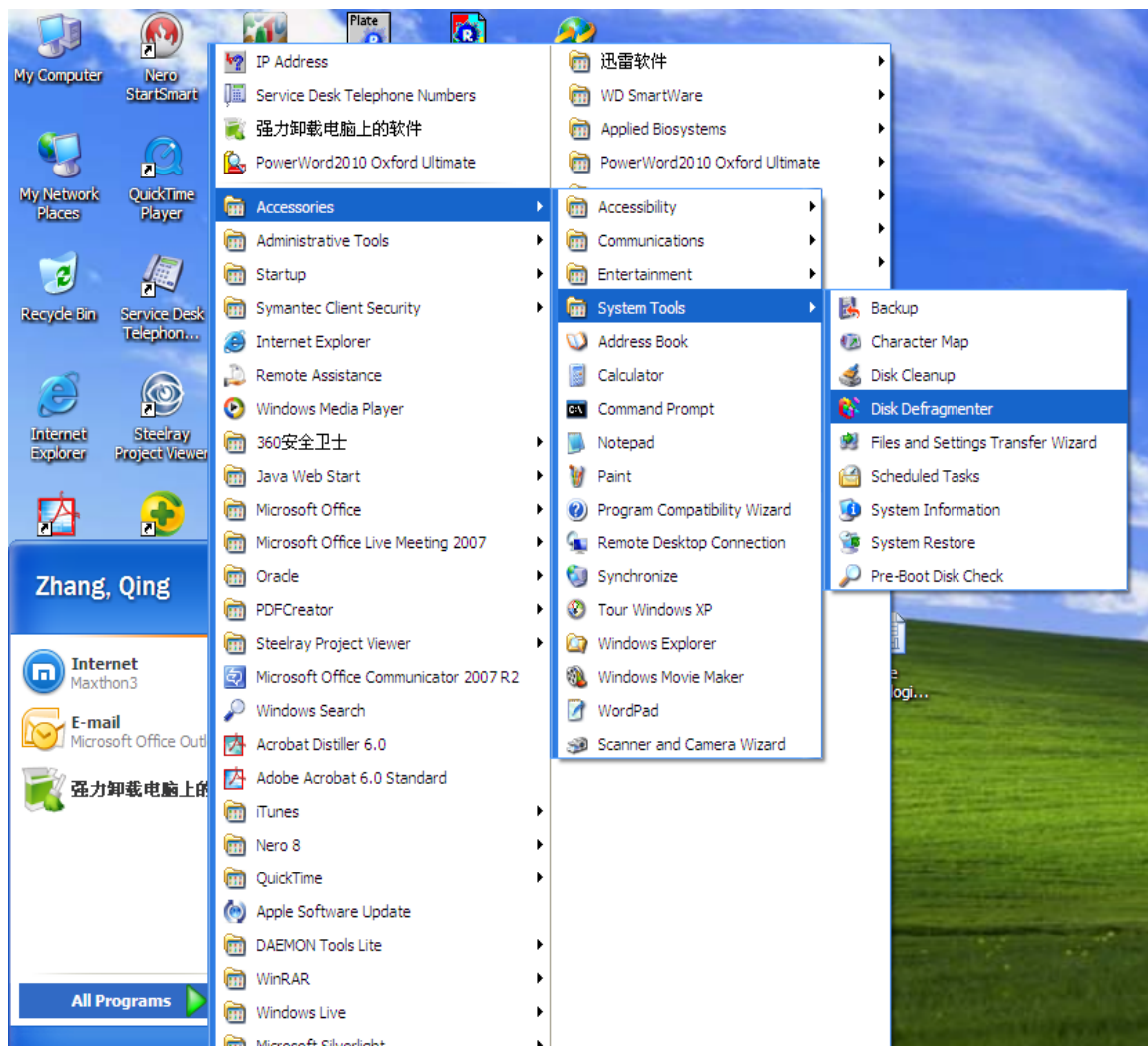
执行硬盘碎片整理程序

- 当运行实时定量 **PCR** 仪及使用软件分析实验结果时，计算机
会删除并创建若干文件，计算机硬盘的空闲空间会被分割成越
来越多的小块
- 当硬盘驱动器上文件以分解的碎片存储时，程序需要更长的时
间才能存取文件
- 碎片整理实用程序将一个文件分解开的多个碎片合并在一起，
并存储到硬盘的同一个位置，从而优化系统性能。

执行硬盘碎片整理程序

如何整理硬盘碎片？

- 在 **Windows** 桌面上，选择
Start >
All Programs>
Accessories >
System tools >
Disk Defragment
- 单击**Defragment now**



执行硬盘碎片整理程序

何时需要整理磁盘碎片？

- 建议每月执行一次或当碎片比例达到 **20%以上**时。

操作系统更新

何时执行 **Windows Service Pack** 更新？

- 除非美国应用生物系统公司代表通知您更新操作系统，否则请不要更新连接定量 **PCR** 仪的计算机的操作系统。新版本的 **Microsoft Windows** 操作系统可能与**SDS** 软件存在冲突，并导致仪器不能正常运行。如果您希望安装 **service pack**（更新包）以更新操作系统，应查看随 **SDS** 软件提供的版本说明，避免兼容性问题。

实验数据备份

- 建议经常定期进行
- 备份*.sds或*.eds文件：刻录光盘或转移数据到其它电脑

- 电脑及软件的维护
- 定量PCR仪主机的维护

实验室环境

- 电源：建议配置**UPS**（>1.5 KVA，电池供电**2**小时以上）或稳压器
- 通风：仪器的通风应该没有阻挡
- 温度：实验室应该配有空调，控温在**20-25°C**
- 湿度：控制相对湿度在**20-80%**
- 空间：易于操作，安全
- 空气洁净

电源开关

- 如果主机和计算机连续开机使用，每周应该进行一次关闭主机电源开关，关闭计算机，然后重新打开计算机和仪器电源开关的操作
- 注意正确的计算机和主机电源开关顺序

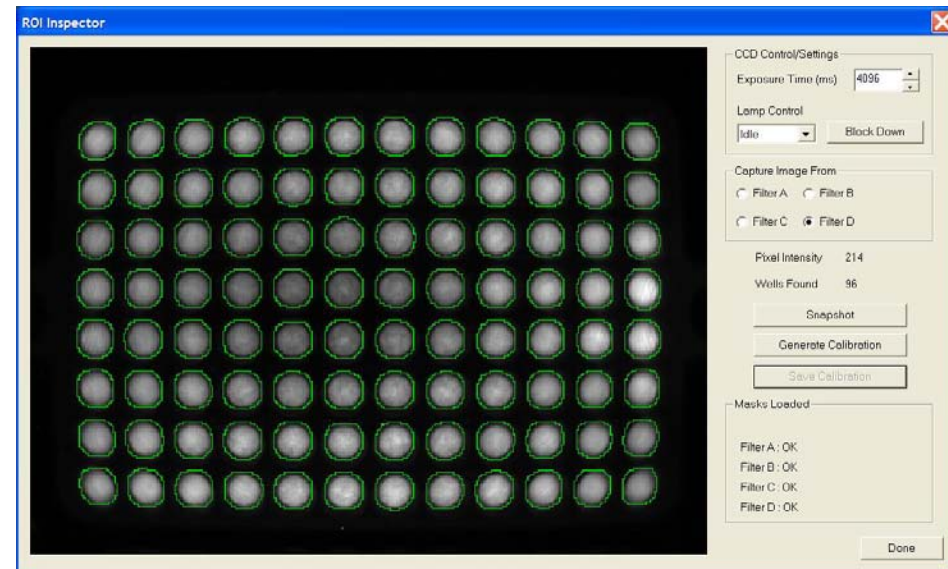
主机表面清洁

- 使用不脱毛的布块擦拭仪器表面
- 切勿使用有机溶剂清洁定量**PCR**仪

7300/7500定量PCR仪主机的维护- v1.4

ROI校正

- **ROI(Regions of Interest) 校正** 用于生成目标区数据。
- 校正期间生成的数据，允许 **SDS** 软件映射样本块 (**Block**) 上反应孔的位置，从而在仪器操作期间，使软件可判断出反应板上特定反应孔中荧光强度的增量。
- 由于定量 **PCR** 仪使用一组滤光片分离检测运行期间生成的荧光能量，所以必须为每个滤光片生成校正图像，以修正光学系统中的微小差异。



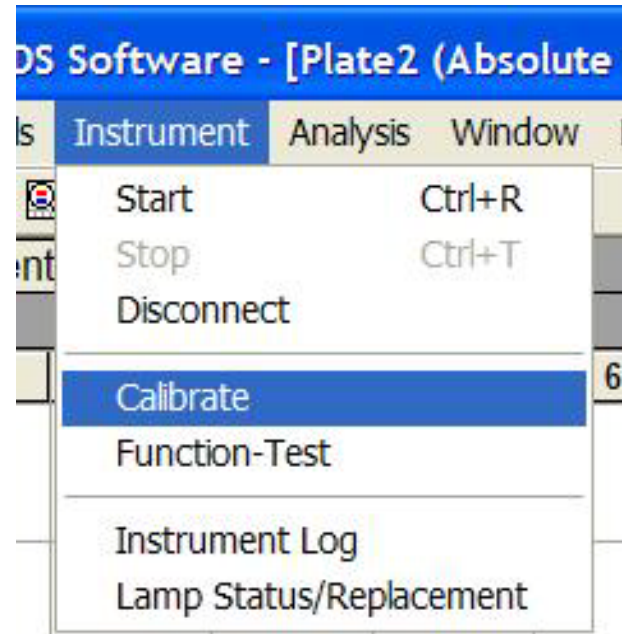
准备ROI校正

7300: 7300 ROI校正反应板

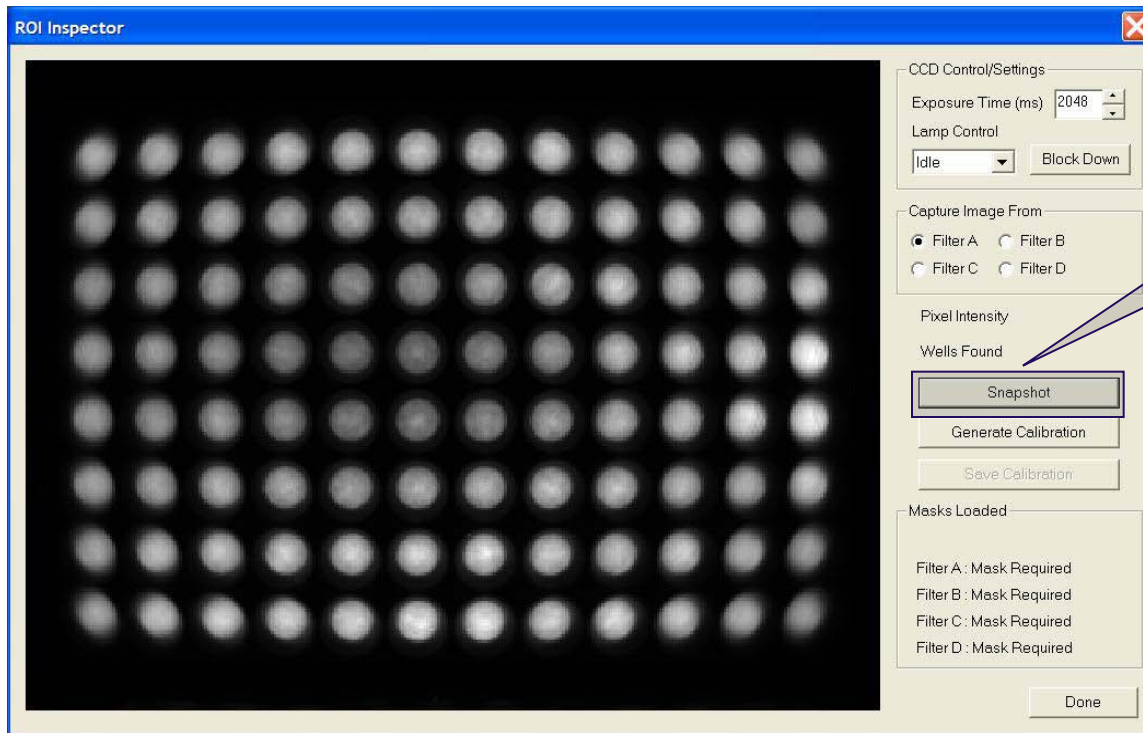
7500: 7500 ROI校正反应板



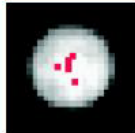
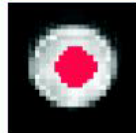
运行 ROI 校正



分析并产生 ROI 校正数据



Snapshot

未饱和	正常饱和	过饱和
		
良好	可接受	差

ROI 校正

- 建议每半年执行一次目标区（**ROI**）校正
- 如果怀疑仪器光路受到影响如搬动仪器，建议进行目标区（**ROI**）校正
- 执行目标区（**ROI**）校正使用目标区（**ROI**）校正板

背景校正

- 背景校正程序测量定量**PCR**仪的背景荧光强度
- 在运行校正程序期间，定量 **PCR** 仪在 **10** 分钟内连续地读取背景校正反应板的荧光强度，运行温度为 **60°C**
- 随后，**SDS** 软件计算运行期间所收集到的荧光强度的平均值，提取出结果并保存到校正文件中
- 软件在今后的分析中将自动调用此校正文件，从实验数据中扣除背景信号

运行背景校正

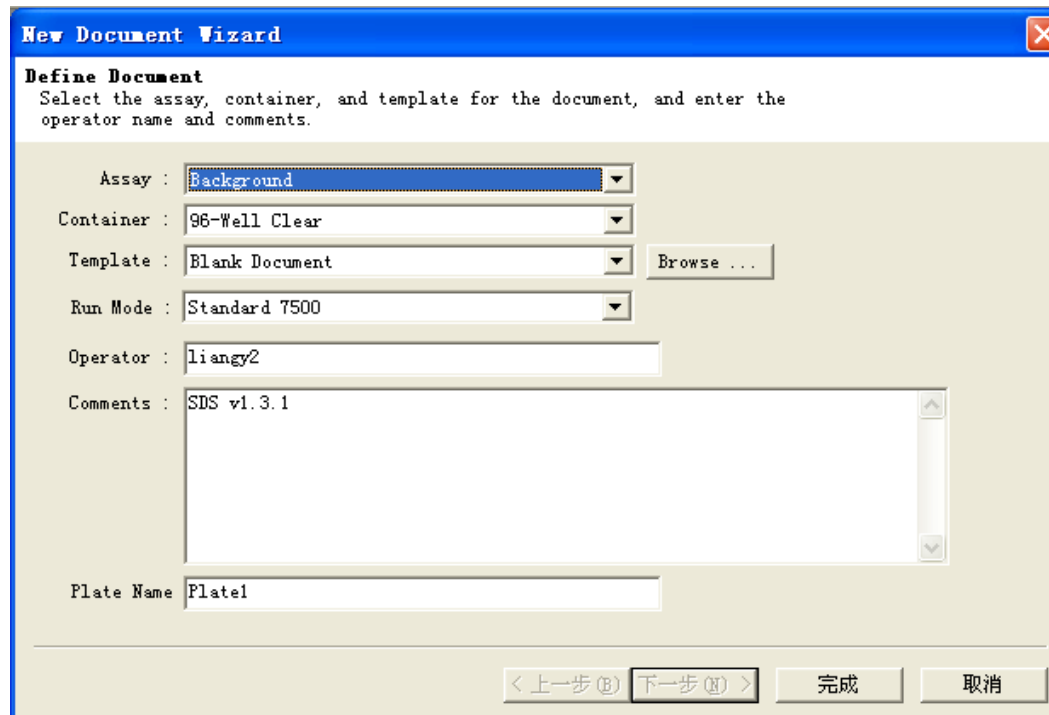
准备背景反应板：

- a. 光谱校正试剂盒（**Spectral calibration kit**）中的背景板（**Background plate**）
- b. 如果光谱校正套件中的背景反应板多次使用后不好了，您可自己创建一个背景反应板以执行背景校正。



运行背景校正

创建背景校正反应板文件



The image shows a 'New Document Wizard' dialog box with a blue title bar and a close button. The main area is titled 'Define Document' and contains instructions: 'Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.' Below this are several input fields: 'Assay' (dropdown menu with 'Background' selected), 'Container' (dropdown menu with '96-Well Clear' selected), 'Template' (dropdown menu with 'Blank Document' selected and a 'Browse ...' button next to it), 'Run Mode' (dropdown menu with 'Standard 7500' selected), 'Operator' (text field with 'liangy2' entered), and 'Comments' (text area with 'SDS v1.3.1' entered). At the bottom is a 'Plate Name' field with 'Platel' entered. The bottom of the dialog has four buttons: '< 上一步(B)' (disabled), '下一步(N) >' (active), '完成' (disabled), and '取消' (disabled).

New Document Wizard

Define Document
Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.

Assay : Background

Container : 96-Well Clear

Template : Blank Document

Run Mode : Standard 7500

Operator : liangy2

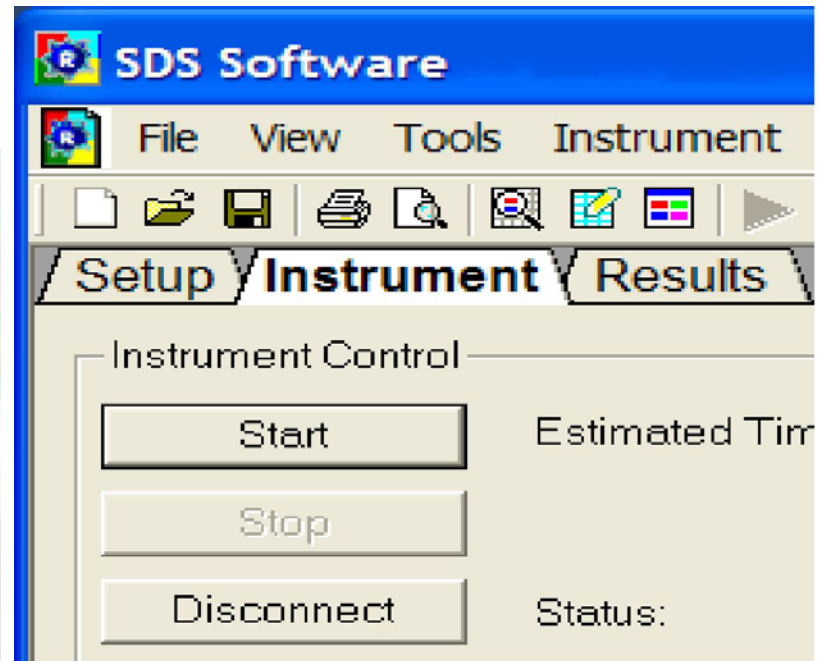
Comments : SDS v1.3.1

Plate Name : Platel

< 上一步(B) 下一步(N) > 完成 取消

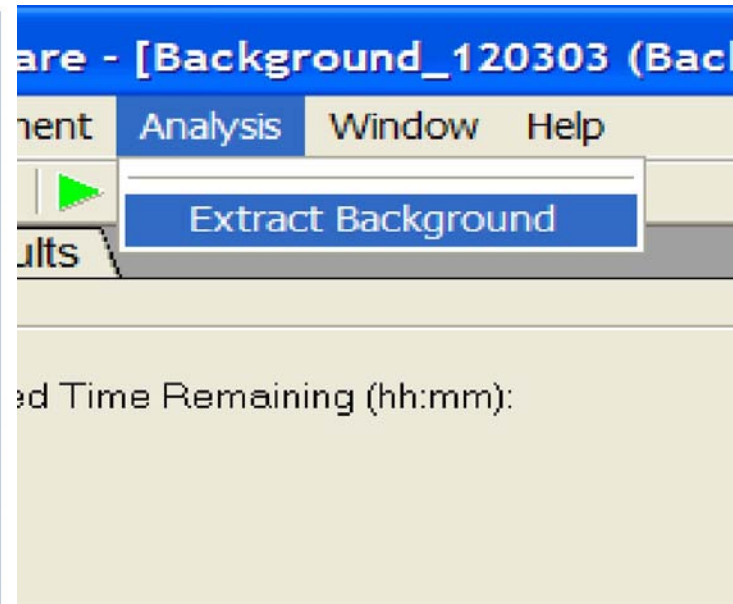
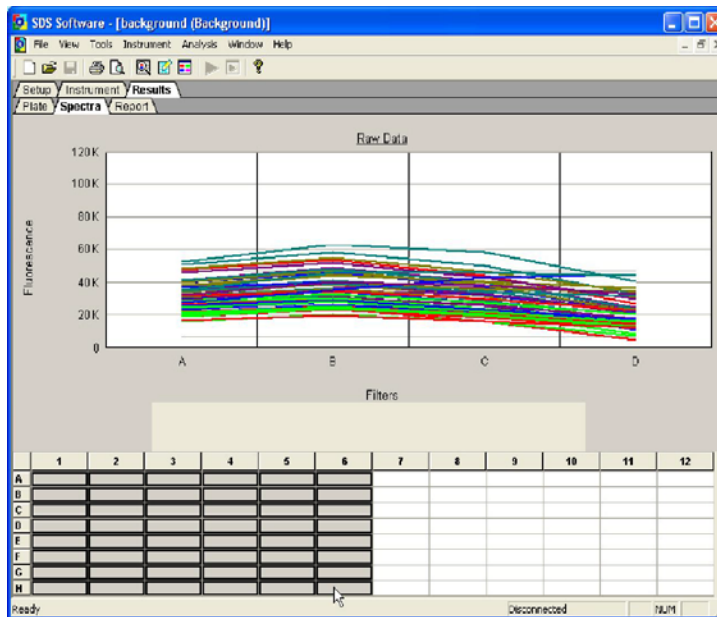
运行背景校正

运行背景反应板

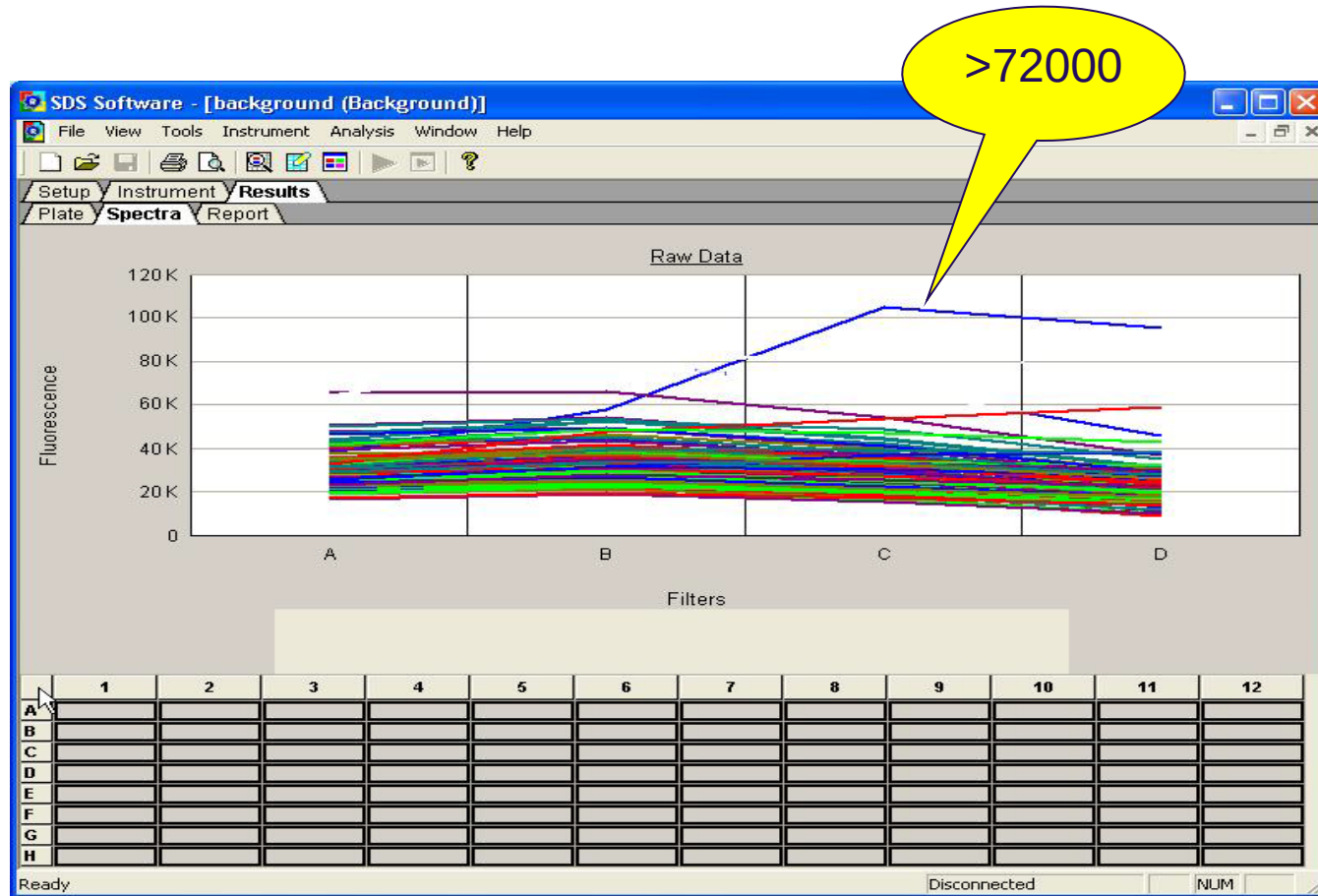


运行背景校正

分析背景数据



运行背景校正



如果背景信号大于72000，应该怎么做？

加热槽荧光污染的判断

- 执行背景校正，当背景荧光信号异常（强度超过**72000**或**7500**的滤光片**E**超过**90000**）时
- 实验中，连续出现不正常的偏高信号，并表明可能存在荧光物质污染时

清除热槽中的污染



7300/7500

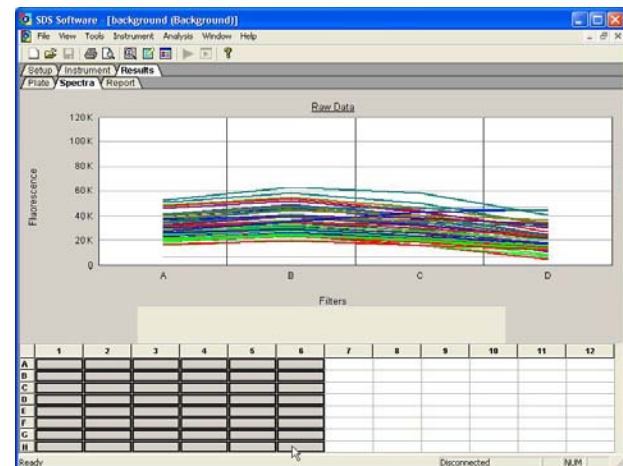
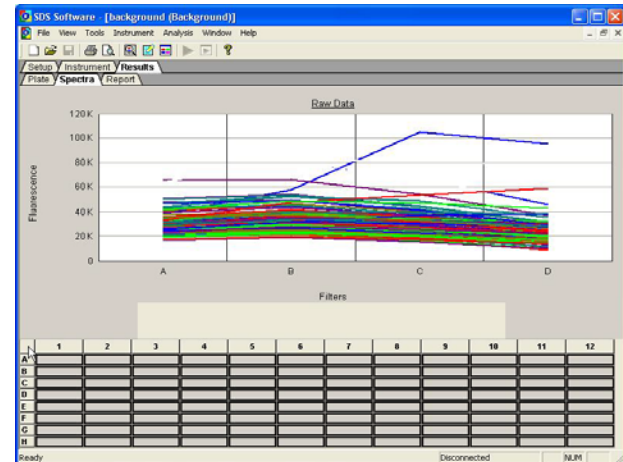
清除热槽中的污染

- 清洁样本块中污染的反应孔：
 - **a.** 用移液器吸取少量水或乙醇并滴入每个污染的反应孔中。
 - **b.** 吹打数次。
 - **c.** 将废液吸入废液杯中。
- 如未能有效清除污染物，重复以上步骤：
 - 乙醇三次，去离子水三次
- 确认反应孔中的残留液体完全干燥



确认已除去热槽中的荧光污染物

- 运行背景校正板
- 确认污染已除去
- 如未除去，重新清洁
- 使用最新的背景校正

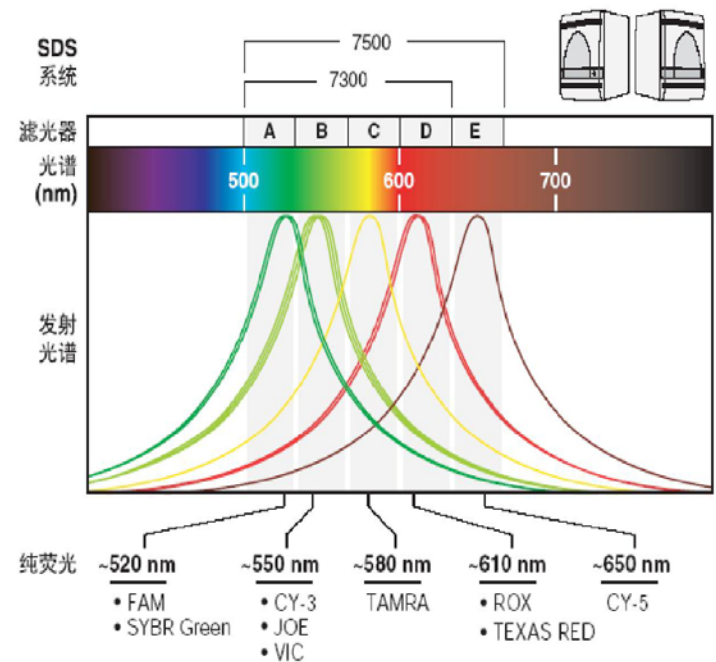


背景校正

- 建议每月执行一次背景校正
- 如果发现信号异常，建议立即进行背景校正
- 执行背景校正使用背景校正板

纯荧光校正

- 纯荧光校正根据一系列荧光标准品收集荧光数据
- 软件将不同纯荧光标准品的荧光信息分析并存储到程序中
- 每次实验运行中，**SDS** 软件接收原始光谱信号。软件将原始光谱与纯荧光文件中包含的纯荧光标准进行比较，以确定样本中使用的每一种荧光的光谱表现

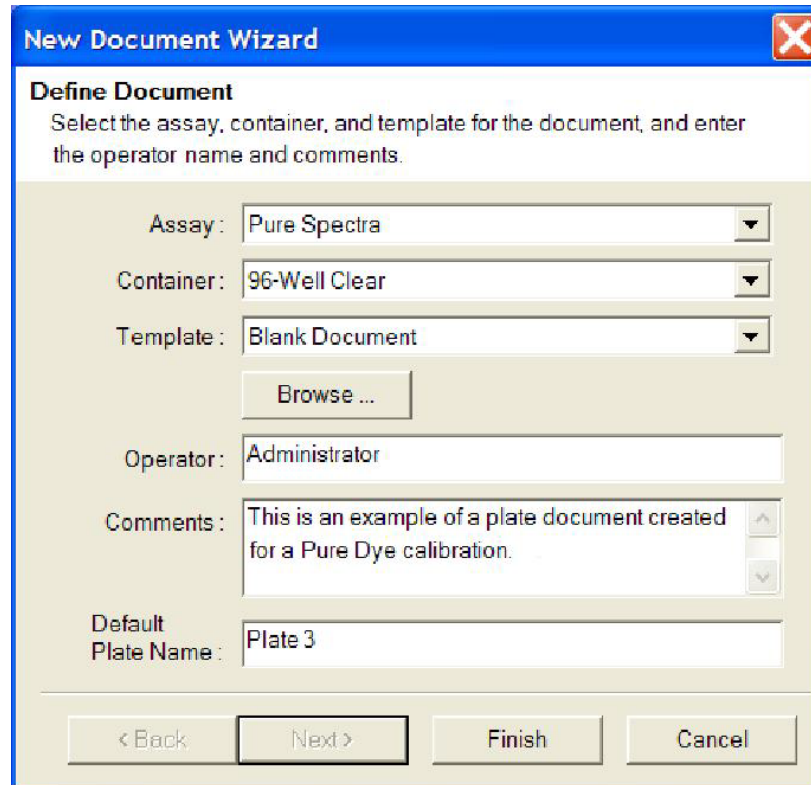


纯荧光校正

- 在每次执行纯荧光反应板之前，必须执行 **ROI** 校正和背景校正
- 使用纯荧光校正板



准备纯荧光反应板文件



The image shows a 'New Document Wizard' dialog box with a blue title bar and a red close button. The main area is titled 'Define Document' and contains instructions: 'Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.' Below this are several input fields: 'Assay' (Pure Spectra), 'Container' (96-Well Clear), and 'Template' (Blank Document), each with a dropdown arrow. A 'Browse ...' button is next to the Template field. The 'Operator' field contains 'Administrator'. The 'Comments' field contains 'This is an example of a plate document created for a Pure Dye calibration.' and has scroll arrows. The 'Default Plate Name' field contains 'Plate 3'. At the bottom are four buttons: '< Back', 'Next >', 'Finish', and 'Cancel'.

New Document Wizard

Define Document
Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.

Assay: Pure Spectra

Container: 96-Well Clear

Template: Blank Document

Browse ...

Operator: Administrator

Comments: This is an example of a plate document created for a Pure Dye calibration.

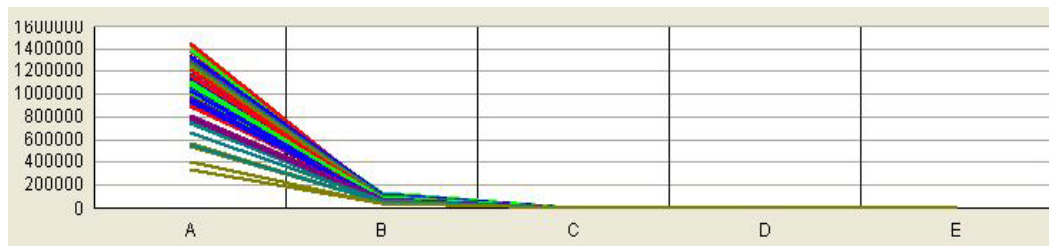
Default Plate Name: Plate 3

< Back Next > Finish Cancel

运行纯荧光反应板



分析纯荧光校正数据



纯荧光校正

- 建议每半年执行一次纯荧光校正
- 如果使用自定义的荧光，必须进行纯荧光校正
- 执行纯荧光校正使用纯荧光校正板

更换卤素灯

- 根据需要更换卤素灯
- 当您拿取卤素灯时，请戴上无粉手套

更换卤素灯



7300/7500

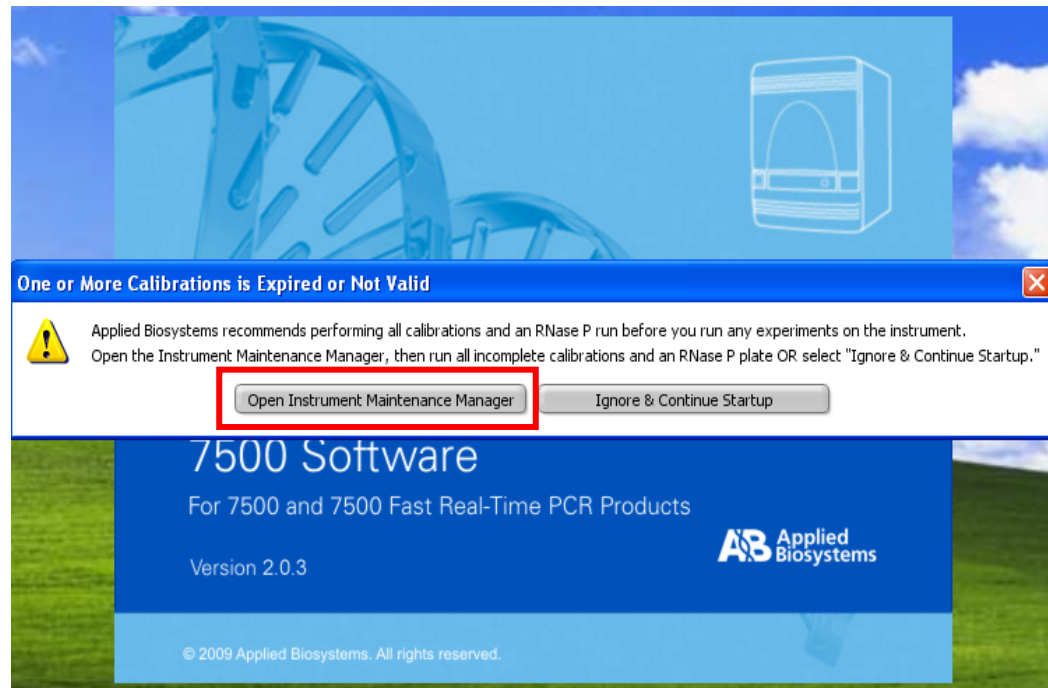
使用正确的支架

- **7300/7500可以使用：**
 - **96孔板**
 - **0.2ml光学反应管**
 - **0.2ml八联管**
- 如果你使用的是**0.2ml光学反应管或八联管**，请使用**光学平盖**

7500/7500 Fast定量PCR仪主机的维护-v2.0

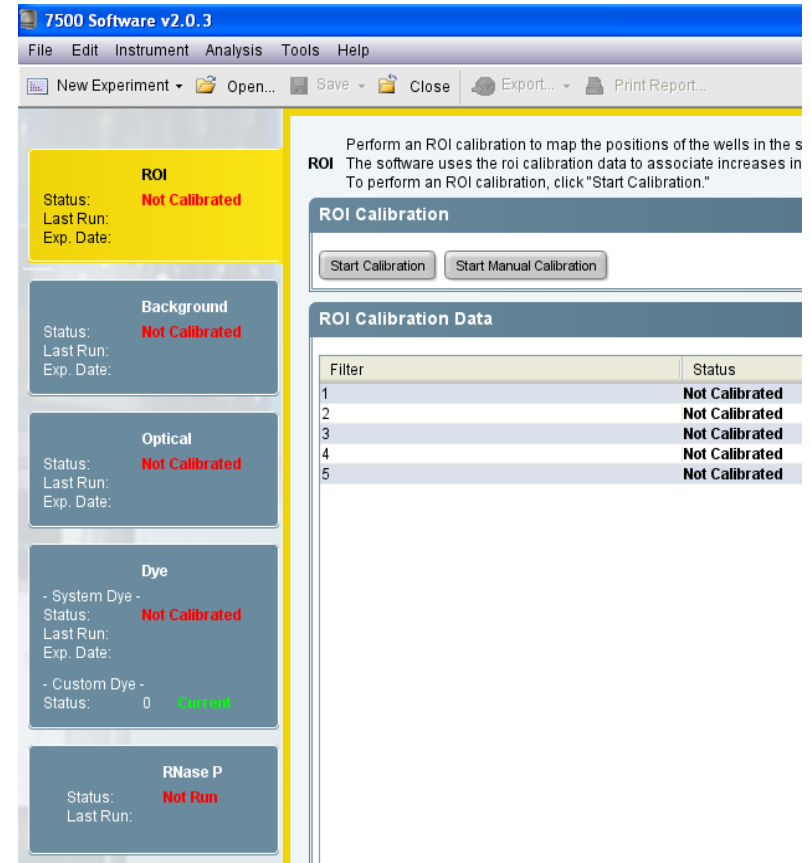
定量PCR仪主机的维护

- 在 Windows 桌面上，选择 Start > Programme files > Applied Biosystems > 7500 Software > 7500 Software v2.0
- 软件自动检测校正数据，如未校正或校正过期，会弹出提示对话框，点击Open Instrument Maintenance Manager，打开校正界面。



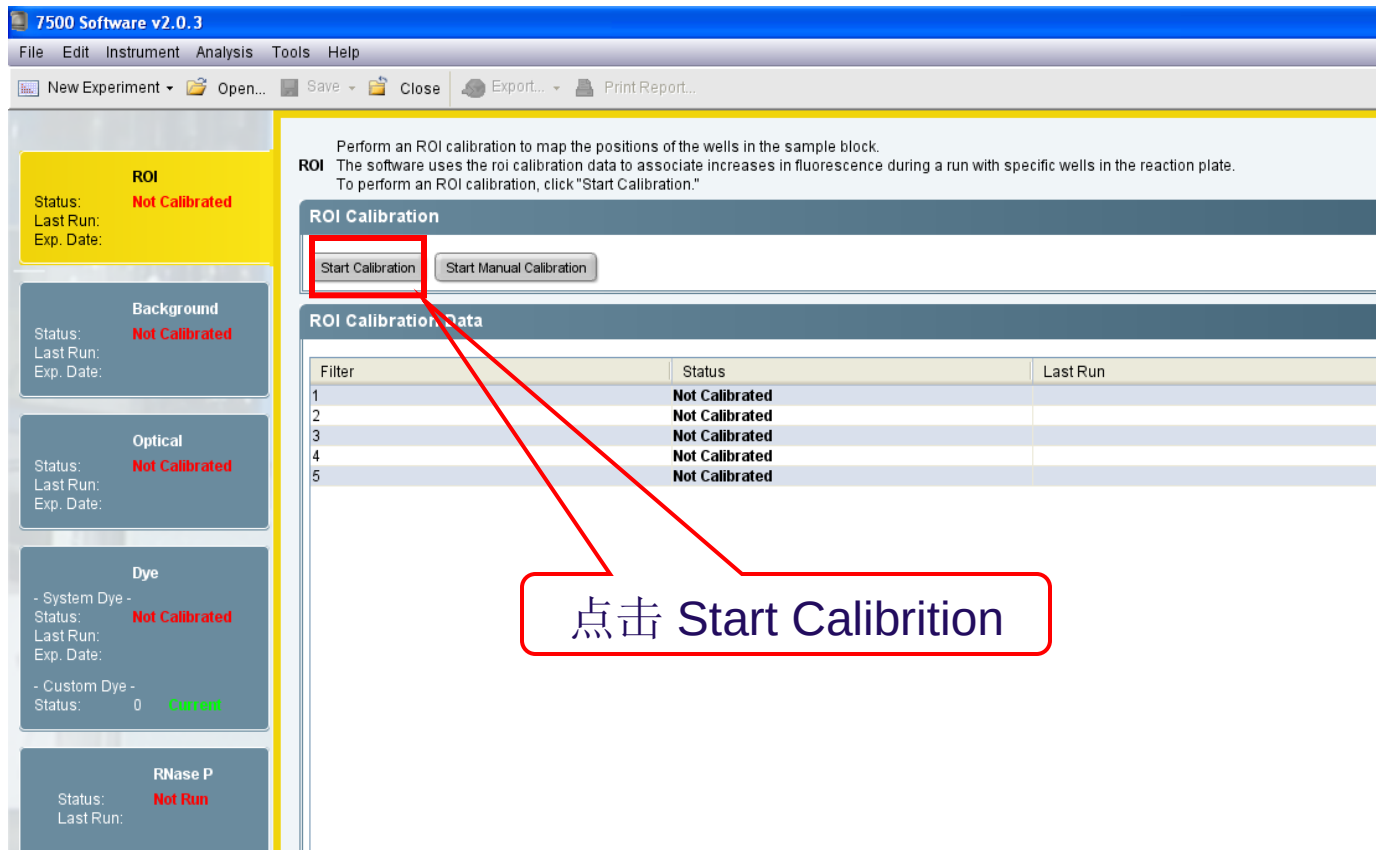
定量PCR仪主机的维护

- 在Instrument Maintenance Manager界面，依次完成如下校正：
 - ROI
 - Background
 - Optical
 - Dye
 - RNase P（可选）



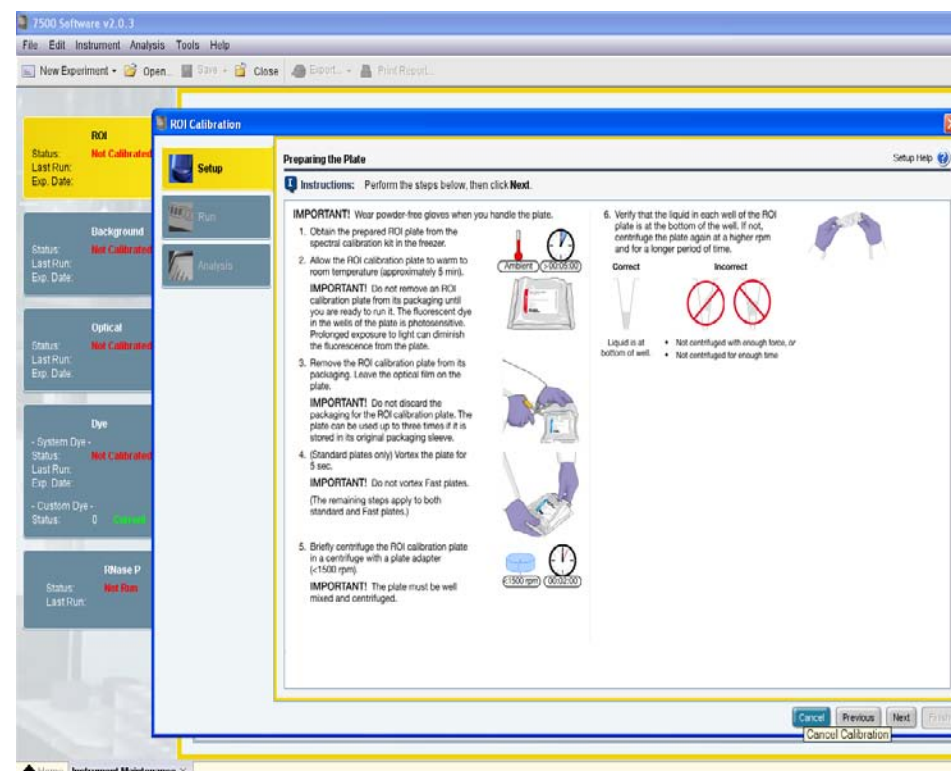
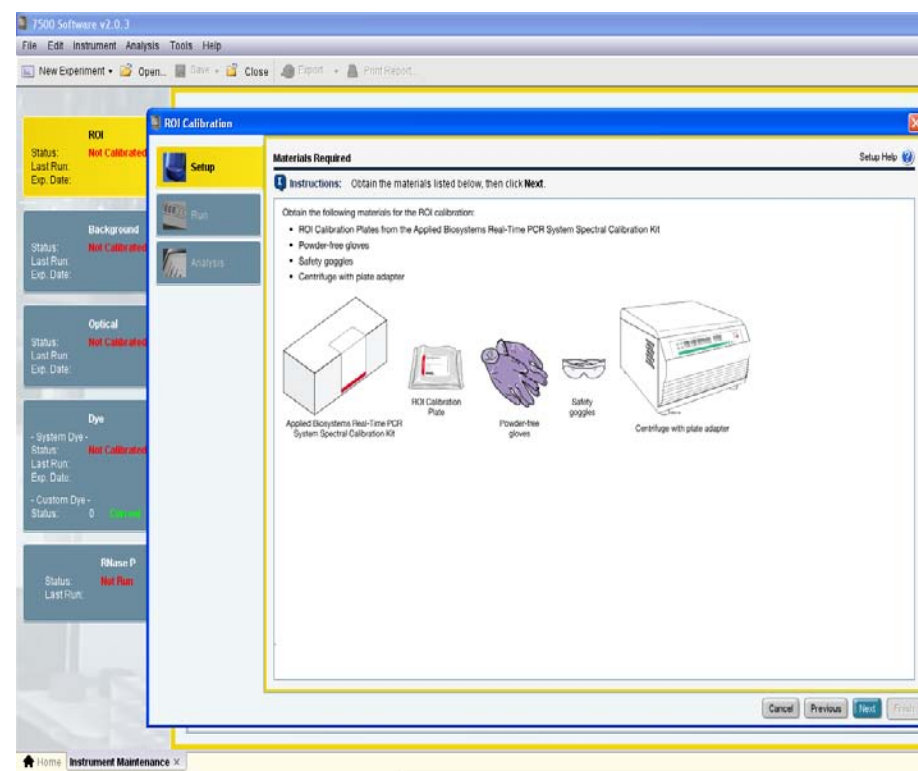
定量PCR仪主机的维护

- ROI校正



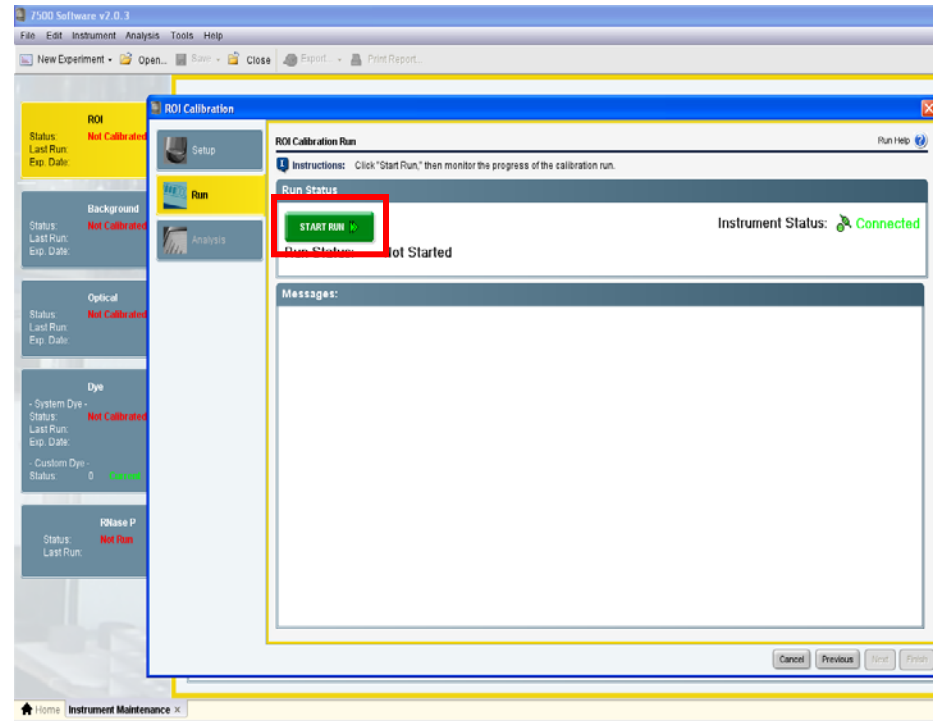
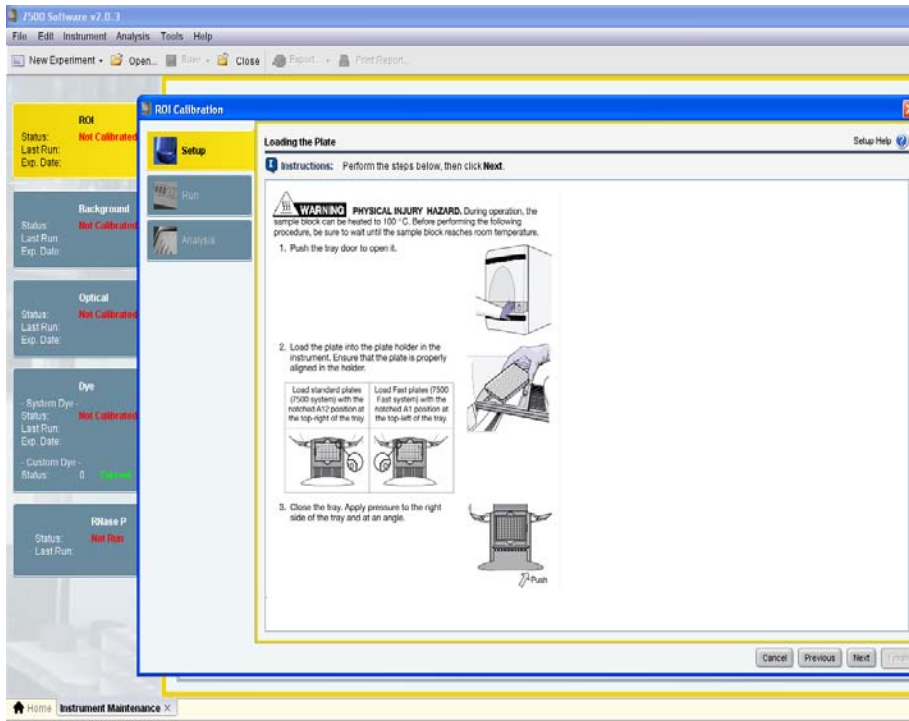
定量PCR仪主机的维护

- ROI校正：按照软件向导进行操作



定量PCR仪主机的维护

- ROI校正：按照软件向导进行操作



定量PCR仪主机的维护

- 完成ROI校正
 - 校正成功，则**Status**显示为**Current**。
 - 校正失败，则**Status**显示为**Failed**。

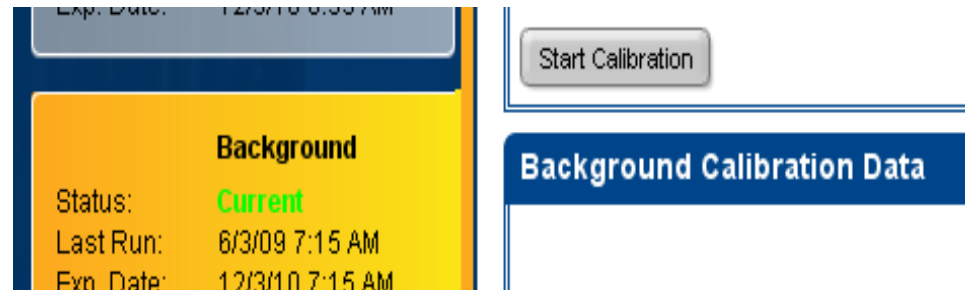
The screenshot displays the 7500 Software v2.0.3 interface. On the left sidebar, the 'ROI' status is highlighted in a yellow box, showing 'Status: Current' in green text, 'Last Run: 8/21/09 3:45 PM', and 'Exp. Date: 2/21/10 3:45 PM'. Below this, the 'Background' and 'Optical' sections both show 'Status: Not Calibrated' in red text. The main panel features a 'ROI Calibration' section with instructions and two buttons: 'Start Calibration' and 'Start Manual Calibration'. Below this is a 'ROI Calibration Data' table with five rows of data.

Filter	Status	Last Run	Expiration Date
1	Current	8/21/09 3:49 PM	2/21/10 3:49 PM
2	Current	8/21/09 3:48 PM	2/21/10 3:48 PM
3	Current	8/21/09 3:47 PM	2/21/10 3:47 PM
4	Current	8/21/09 3:46 PM	2/21/10 3:46 PM
5	Current	8/21/09 3:45 PM	2/21/10 3:45 PM

定量PCR仪主机的维护

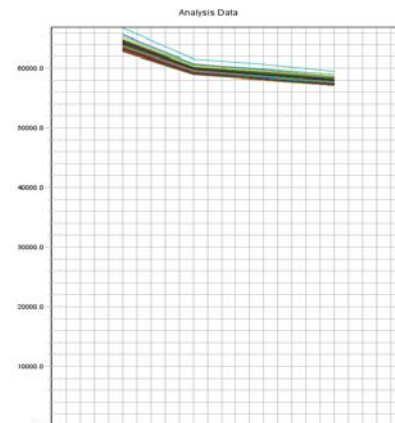
- **Background 背景校正:**

- 选择背景校正界面
- 点击**Start Calibration**
- 根据提示放入背景反应板
- 点击**Start Run**
- 察看背景校正结果



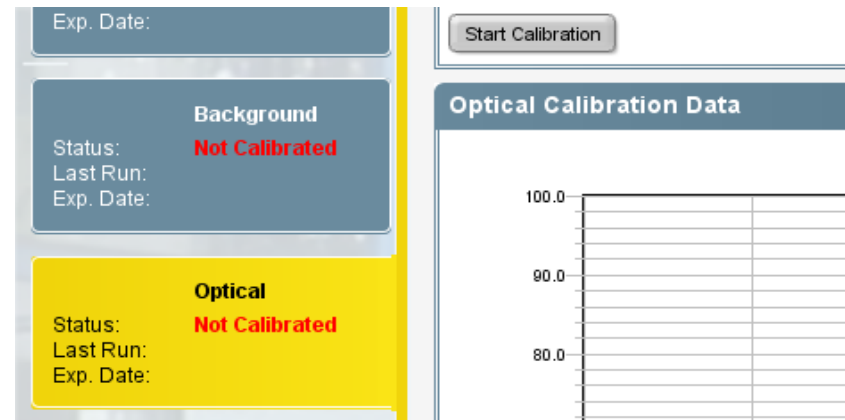
- **分析背景校正数据**

- 校正成功，则**Status**显示为**Current**。
- 校正失败，则**Status**显示为**Failed**。

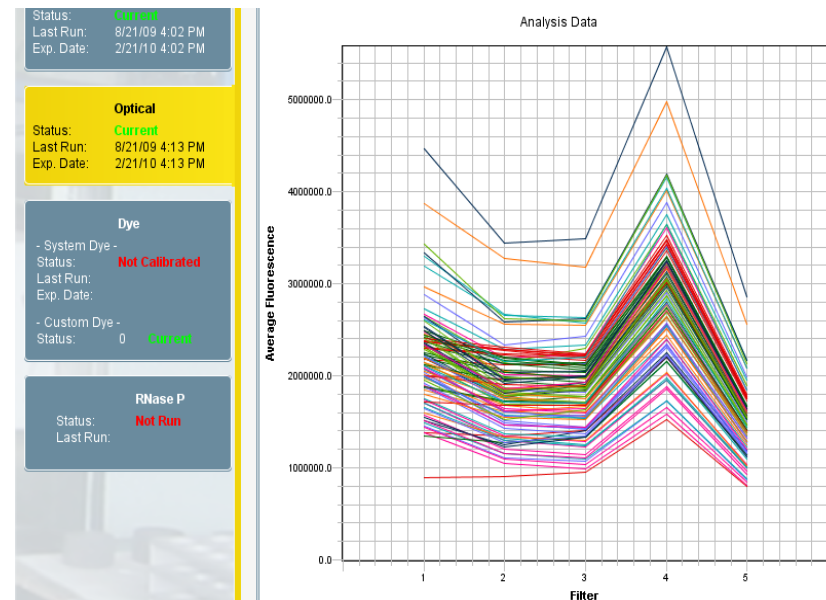


定量PCR仪主机的维护

- **Optical 光路校正:**
 - 选择Optical校正界面
 - 点击**Start Calibration**
 - 根据提示放入ROI反应板
 - 点击**Start Run**
 - 察看Optical校正结果

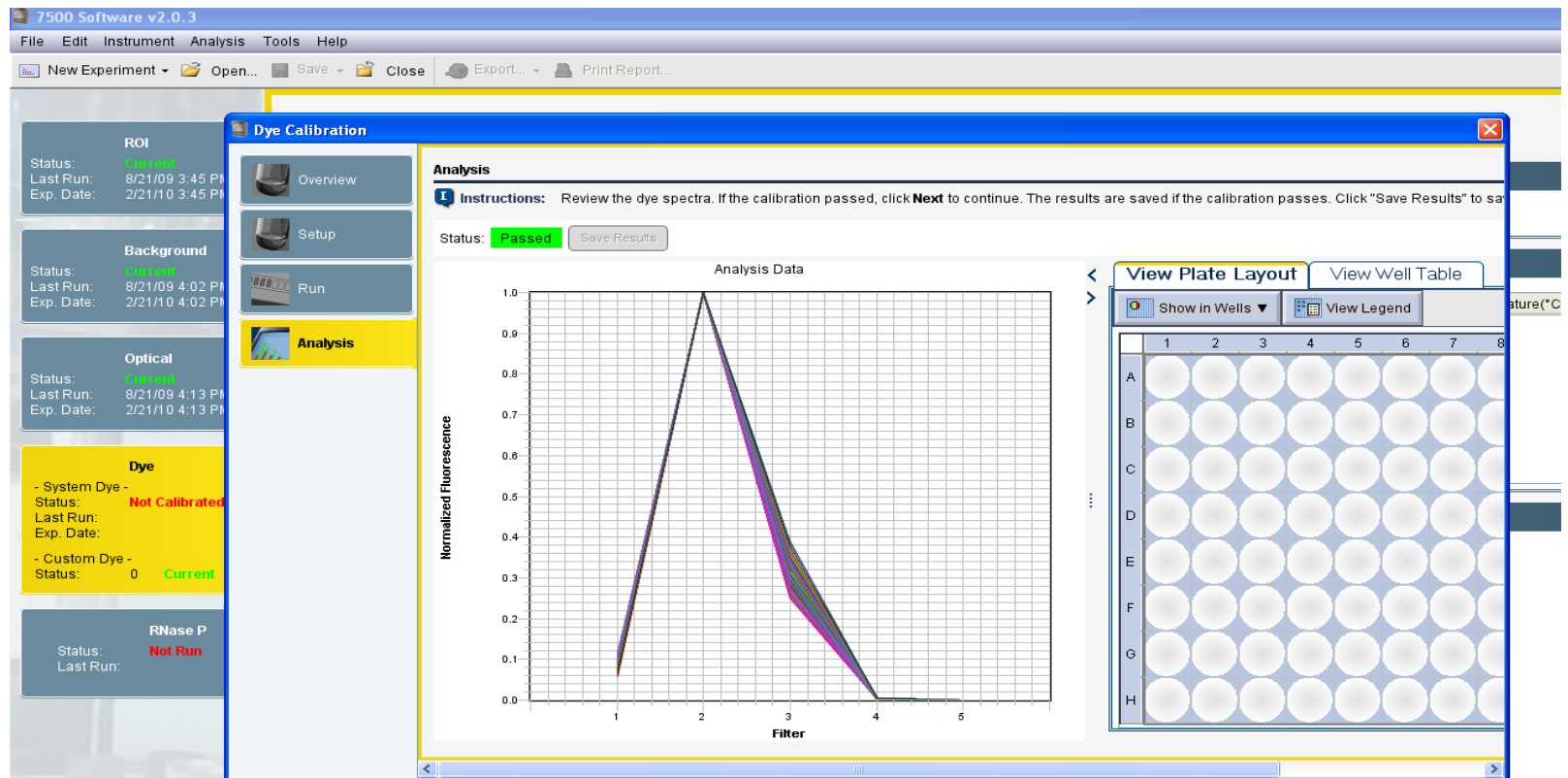


- **分析Optical校正数据**
 - 校正成功，则**Status**显示为**Current**。
 - 校正失败，则**Status**显示为**Failed**。

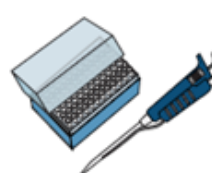
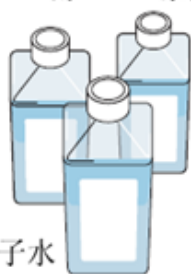
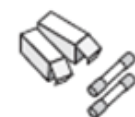


定量PCR仪主机的维护

- 纯荧光校正：
 - 选择**Dye** 校正界面
 - 点击**Start Run**，根据向导进行校正
 - 完成后软件判读结果是否能够通过



7300/7500定量PCR系统日常维护事项

注意事项	维护频率			备注	
	Weekly每周	Monthly每月	Semi-Annual每半年		
校正Calibration	所有实验及维护请使用无粉手套	Background Calibration Optical Calibration (7500Only)	ROI Calibration Background Calibration Optical Calibration (7500Only) Pure Spectra Calibration	校正试剂盒原包装-15℃~25℃保存可使用三次	
				7300	4349182
				7500	4349180(Kit I) 4351151(Kit II)
				7500 Fast	4360788(Kit I) 4362201(Kit II)
电脑与仪器	检查磁盘空间 归档备份实验数据.sds文件 重新启动仪器和电脑 使用不脱毛的软布擦拭仪器表面	 磁盘清理 Disk Cleanup  磁盘碎片整理 Disk Defragmenter	归档备份校正文件	切勿使用有机溶剂清洁仪器表面	
其他维护	更换卤素灯	去除Sample Block污染			
	 Halogen bulb (12V, 75W)	100µl移液器及枪头 乙醇 10%漂白水    去离子水 棉签或尼龙棒		 Fuses (2), 12.5A, 250V, 5 x 20 mm	
	搬动过仪器, 或调节过光路系统, 需要进行ROI, Background, Optical (7500Only), PureSpectra校正 根据需要升级Windows操作系统				

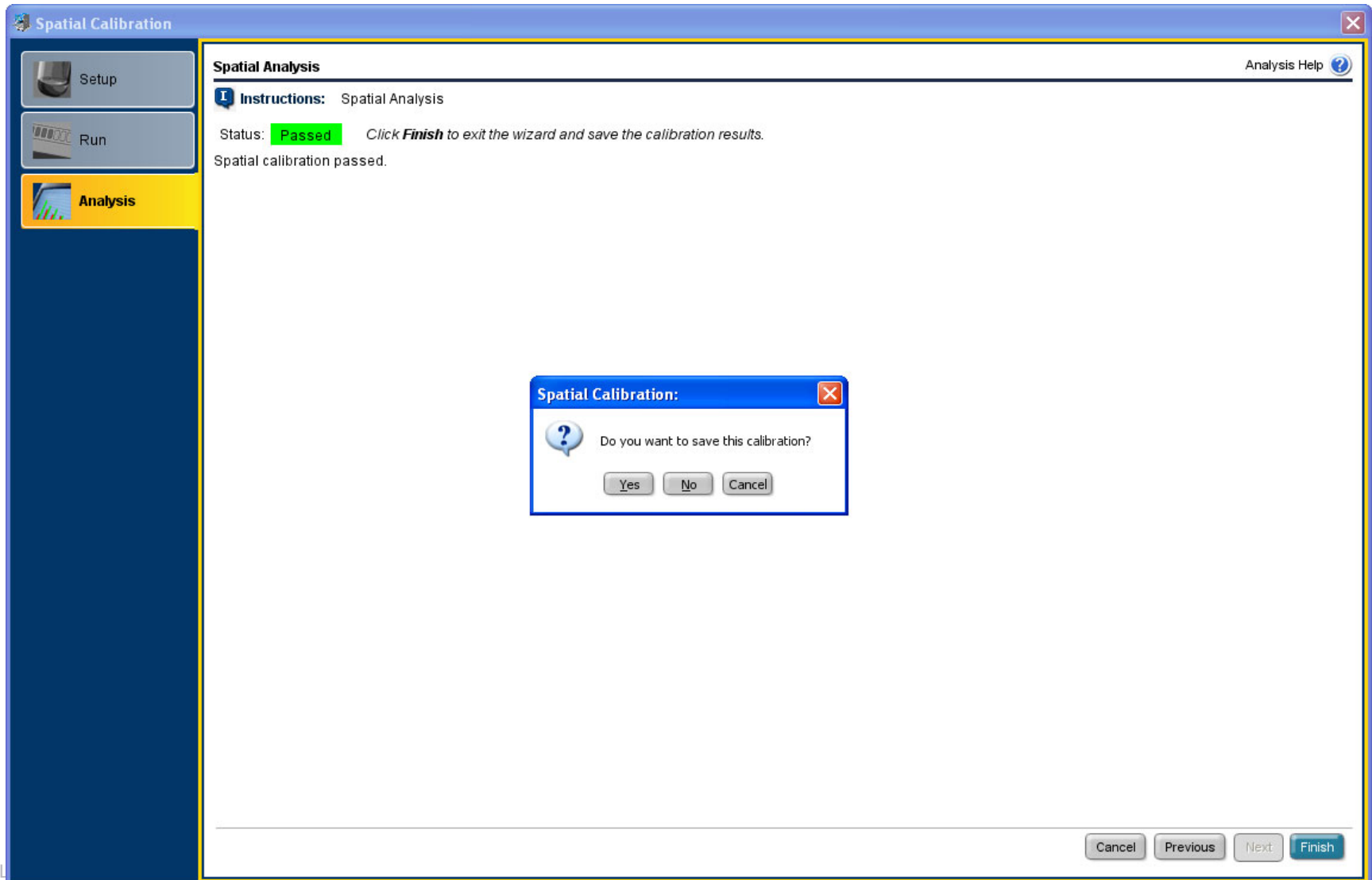
StepOne / StepOnePlus定量PCR主机维护

仪器的日常维护 – 空间校准

操作步骤

1. 将空间校准板放入仪器中，在 软件界面，依次选择**Instrument** → **Instrument Maintenance Manager**
2. 在弹出的新窗口，点击**Spatial**，再选择**Start Calibration**
3. 勾选**The background plate is loaded into the instrument**，选择**START RUN**，仪器开始进行空间校准
4. 数据分析，**Passed**代表通过校准，**Failed**代表失败。点击 “**Finish**”完成校准，并进行保存

仪器的日常维护 – 空间校准



仪器的日常维护 – 背景校准

操作步骤

1. 将背景反应板放入仪器中，在 软件界面，依次选择**Instrument** → **Instrument Maintenance Manager**
2. 在弹出的新窗口，点击**Background**，再选择**Start Calibration**
3. 勾选**The background plate is loaded into the instrument**，选择**START RUN**，仪器开始进行背景校正
4. 数据分析，**Passed**代表通过校准，**Failed**代表失败。点击“**Finish**”完成校准。如果**Failed**，需要清除污染。

仪器的日常维护 – 清除污染

操作步骤

1. 关闭电源，冷却 **15** 分钟
2. 打开扩增仪抽屉，向污染孔加入微量去离子水，吸出去离子水并用棉签擦拭壁，用不脱毛布块吸出剩余的去离子水
3. 执行背景校准，以确认是否清除污染物。若污染物依然存在，用 **95%乙醇溶液**清洗，步骤如上所述
4. 若污染物依然存在，用 **10% 漂白剂溶液**清洗，步骤如上
5. 用乙醇或漂白剂溶液清洗后，一定要用去离子水冲洗一遍

仪器的日常维护 – 清除污染

操作步骤



仪器的日常维护 – 染料校准

操作步骤

1. 将反应板1放入仪器中，在 软件界面，依次选择**Instrument → Instrument Maintenance Manager**
2. 在弹出的新窗口，点击**Dye**，再选择**System Dye Calibration**
3. 点击 **Start Calibration** ，在 **Setup** 界面，勾选 **Plate 1 (FAM dye, ROX dye, and Instrument Normalization) is loaded in the instrument**
4. 单击 **Next** ，在 **Run** 界面，单击 **Start Run** 开始染料校准
5. 根据提示，再将反应板2放入仪器，在 **Dye Calibration Setup** 向导中，选取 **Dye Plate 2 (VIC dye, JOE dye, and SYBR Green dye) is loaded in the instrument** ，单击 **Continue Calibration**
6. 数据分析，确认染料光谱是否正常

仪器的日常维护 – 染料校准

The screenshot displays the 'Dye Calibration' software window. On the left is a vertical sidebar with three buttons: 'Setup' (highlighted in yellow), 'Run', and 'Analysis'. The main area is titled 'System Dye Calibration Setup' and includes a 'Setup Help' link. It contains the following instructions:

Instructions: Locate the required materials, prepare plate 1, load plate 1 into the instrument, then click "Next."

1. Locate required materials:

- Spectral calibration plates from the spectral calibration kit: plate 1 (FAM™ dye, ROX™ dye, Instrument Normalization) and plate 2 (VIC® dye, JOET™ dye, SYBR® Green I dy...
- Powder-free gloves
- Safety goggles
- Centrifuge with plate adapter

2. Prepare plate 1:

[View Instructions](#)

3. Load plate 1 into the instrument:

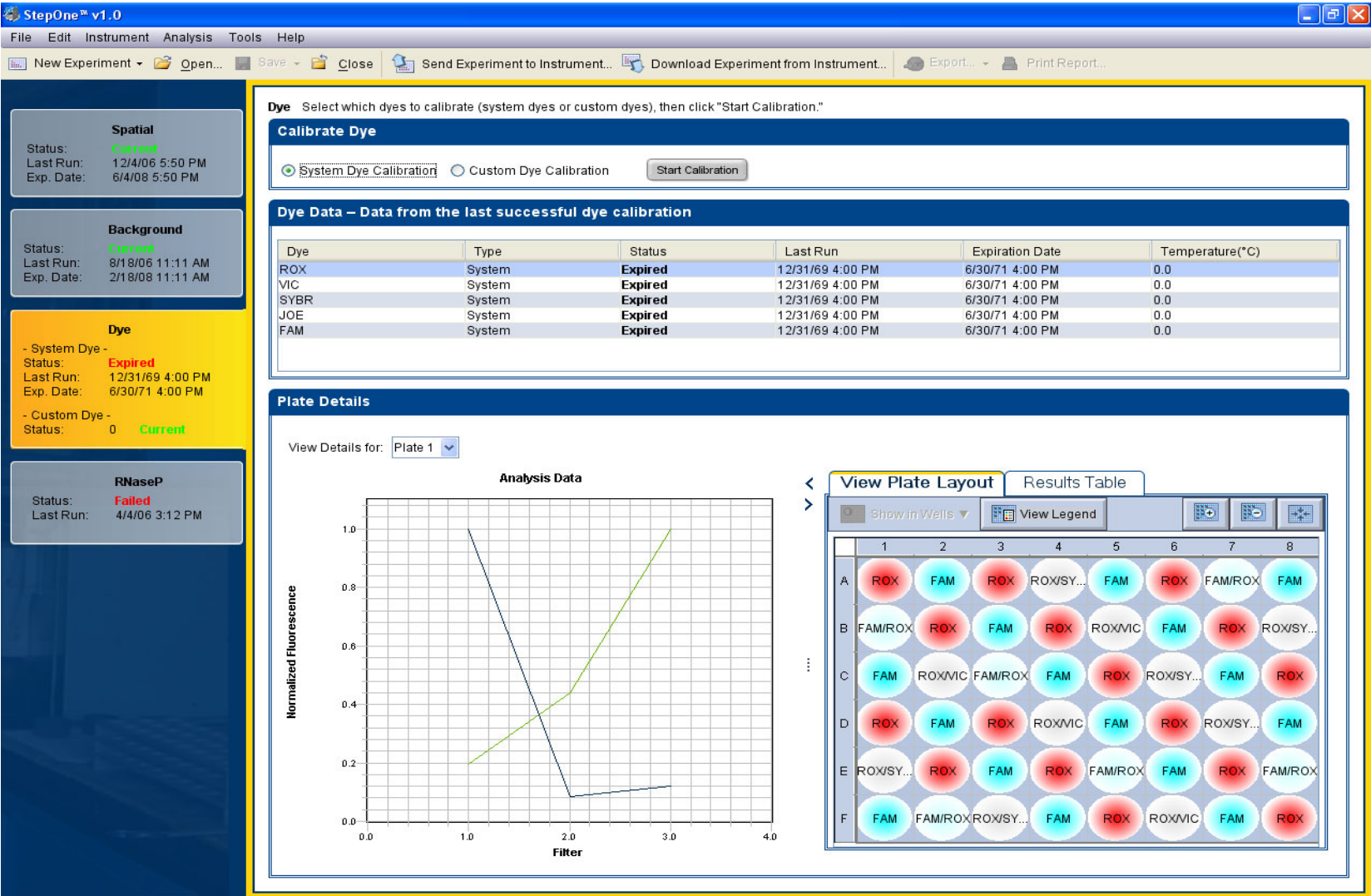
- a. Open the instrument drawer.
- b. Place the plate in the sample block with the A1 position at the back-left corner of the sample block.
- c. Close the instrument drawer carefully.

d. Select the checkbox to confirm plate 1 is loaded into the instrument:

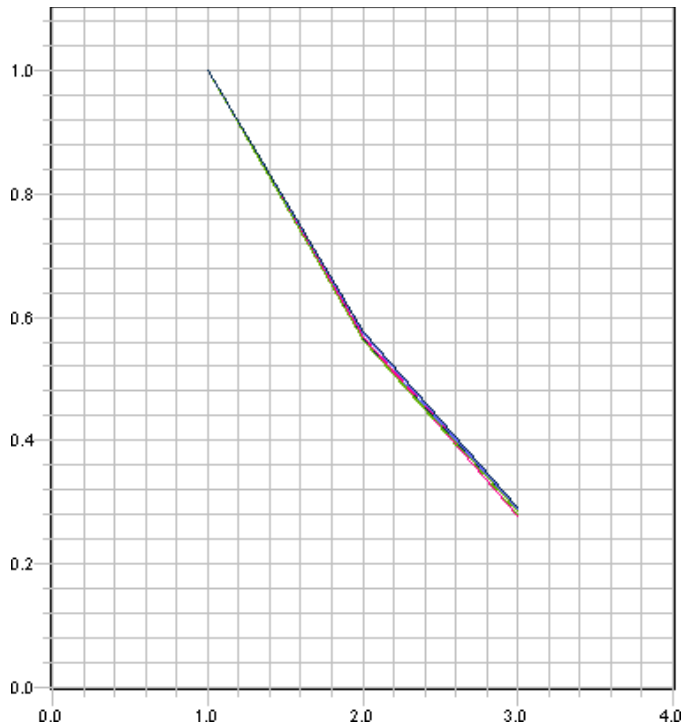
☒ Plate 1 (FAM dye, ROX dye, and Instrument Normalization) is loaded into the instrument.

At the bottom right, there are four buttons: 'Cancel', 'Previous', 'Next', and 'Finish'.

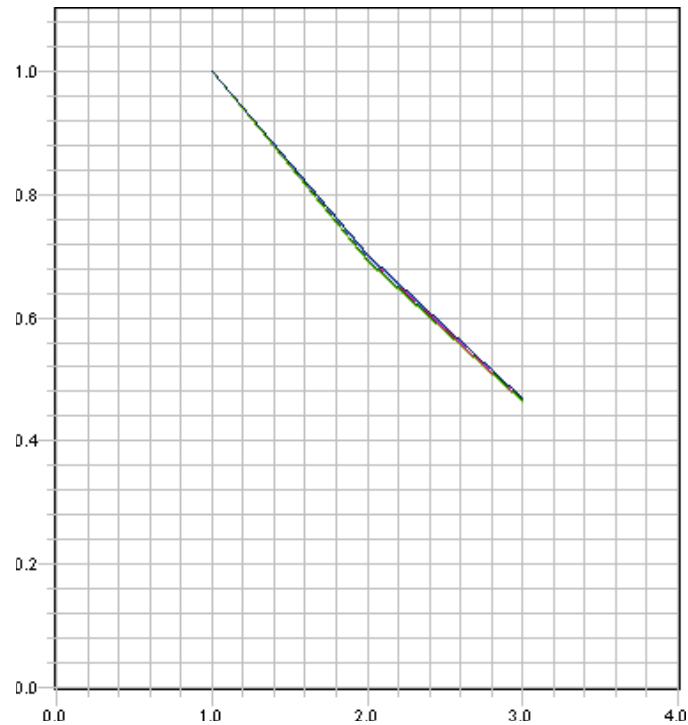
仪器的日常维护 – 染料校准



仪器的日常维护 – 染料校准



FAM



SYBR Green

StepOne 系列定量PCR系统日常维护事项

时间间隔	工作
每周	检查计算机磁盘空间；归档或备份您的实验文件 关闭控制StepOne™ 扩增仪的计算机，30秒后再次打开计算机电源 用不脱毛布块清洁StepOne™扩增仪的表面 整理计算机硬盘驱动器碎片
每月	执行背景校准
1.5年	执行空间校准 执行染料校准

7900定量PCR系统日常维护事项

时间间隔	工作
每星期	备份结果文件 背景校正
每 月	硬盘碎片整理
每半年	背景校正 纯荧光校正 验证实验
按需要	清除污染 更换模块 更换样品板支架 升级仪器软件 更新操作系统



Questions ?