

# 基因扩增实验室常见仪器设备的 使用和维护

张 瑞

2018. 04



1

加样器



2

实时荧光PCR仪



3

实时荧光PCR举例



4

离心机

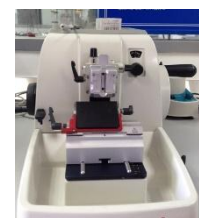


5

生物安全柜

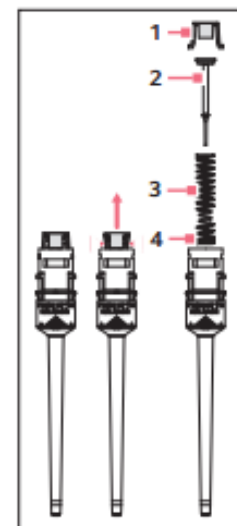
6

切片机

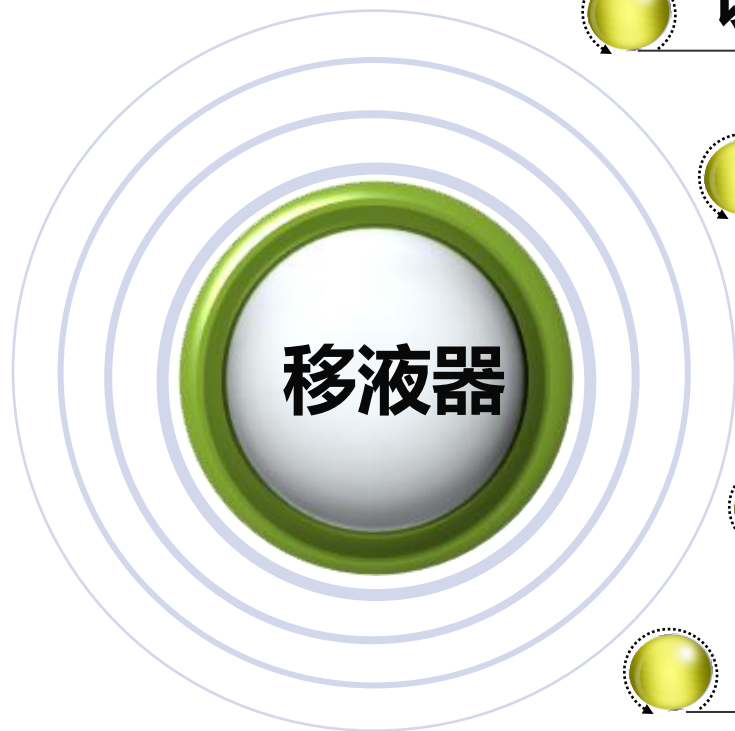


# 加样器

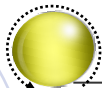




# 操作过程



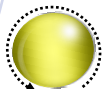
设定容量值



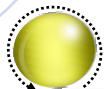
安装移液头



预洗移液头



吸液



排液

视频演示



# 设定容量值

P2	P10	P20	P100	P200
<div>1</div> <div>2</div> <div>5</div>	<div>0</div> <div>7</div> <div>5</div>	<div>1</div> <div>2</div> <div>5</div>	<div>0</div> <div>7</div> <div>5</div>	<div>1</div> <div>2</div> <div>5</div>
1.25μ l	7.5μ l	12.5μ l	75μ l	125μ l

同样读数为050 ,

最大量程为20 μL的加样器——5 μL ;

最大量程为100 μL的加样器——50 μL ;

最大量程为1000 μL的加样器——500 μL。



# 设定容量值



从大值调节到小值



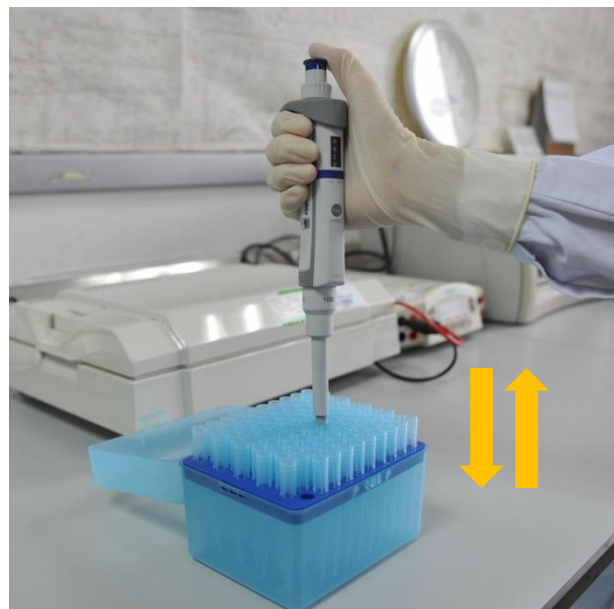
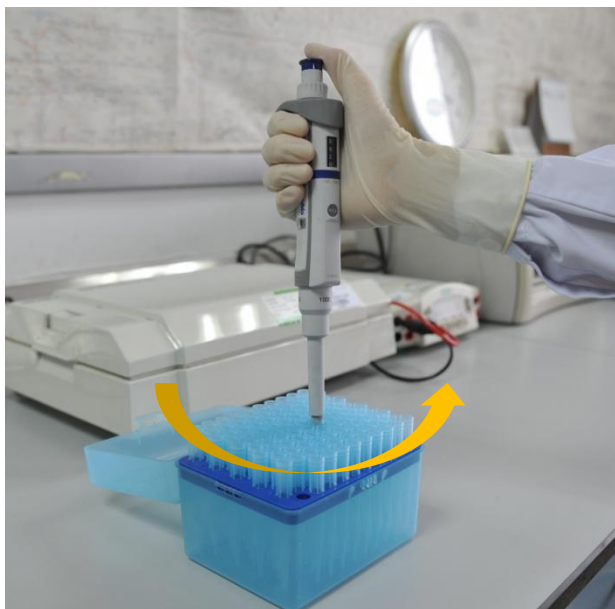
从小值调节到大值

**注意!! :**

调节前，加样器读数处于最大量程或最小量程时，如果向错误方向调节，马上会超出量程，损害加样器的精度。



# 安装移液头



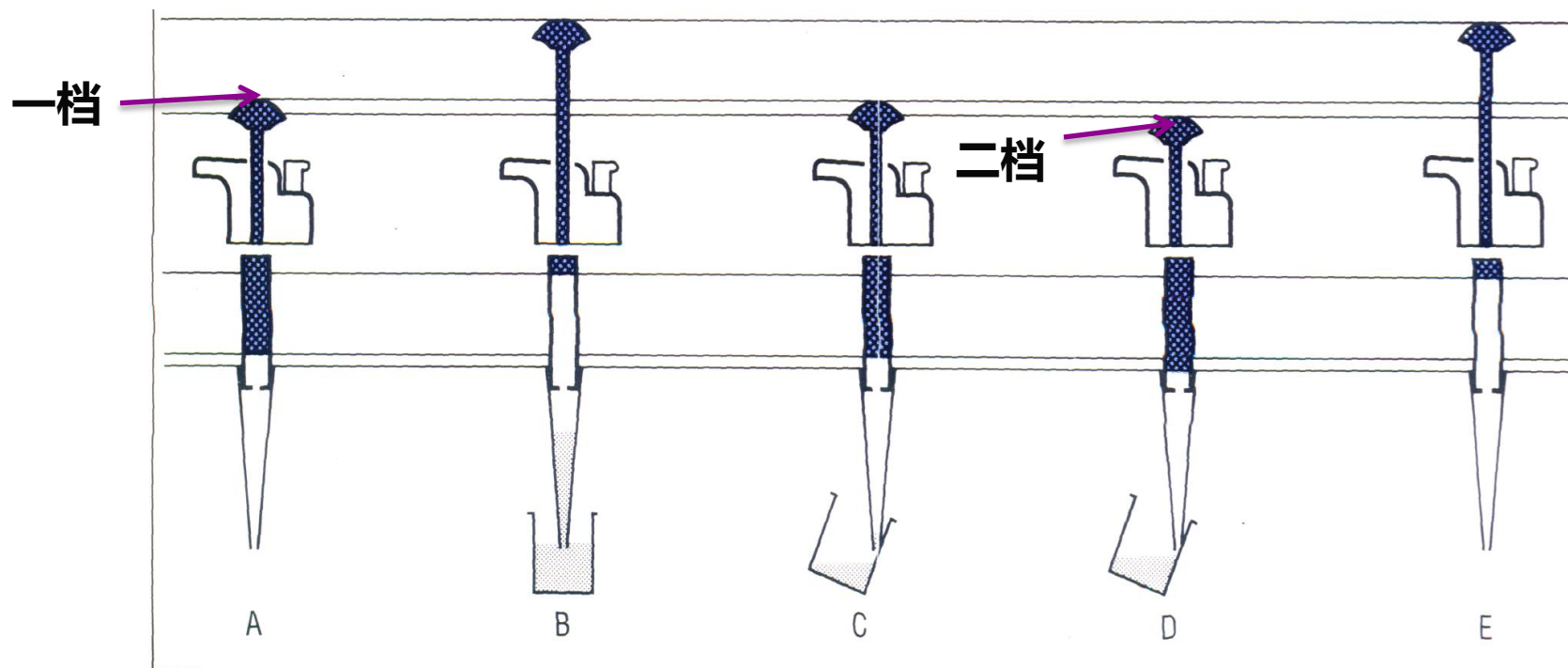
**正确的安装方法：**把套筒顶端插入吸液头，在轻轻用力下压时，把移液器按逆时针方向旋转，使吸头压紧使之与套筒间无空气间隙。

不可用力过猛，更不要采取剥吸液头的方式来进行安装，对加样器（弹簧等零件）造成损伤。





# 加样器的使用



# 吸液和放液

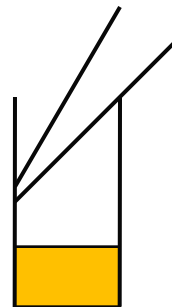
- ❖ 垂直吸液
- ❖ 吸头尖端需浸入液面 3mm下
- ❖ 慢吸慢放
- ❖ 放液将吸头口贴到容器内壁并保持10 ~ 40°倾斜

P2和P10  
P20和P100  
P200和P1000

≤1mm  
2-3mm  
2-4mm



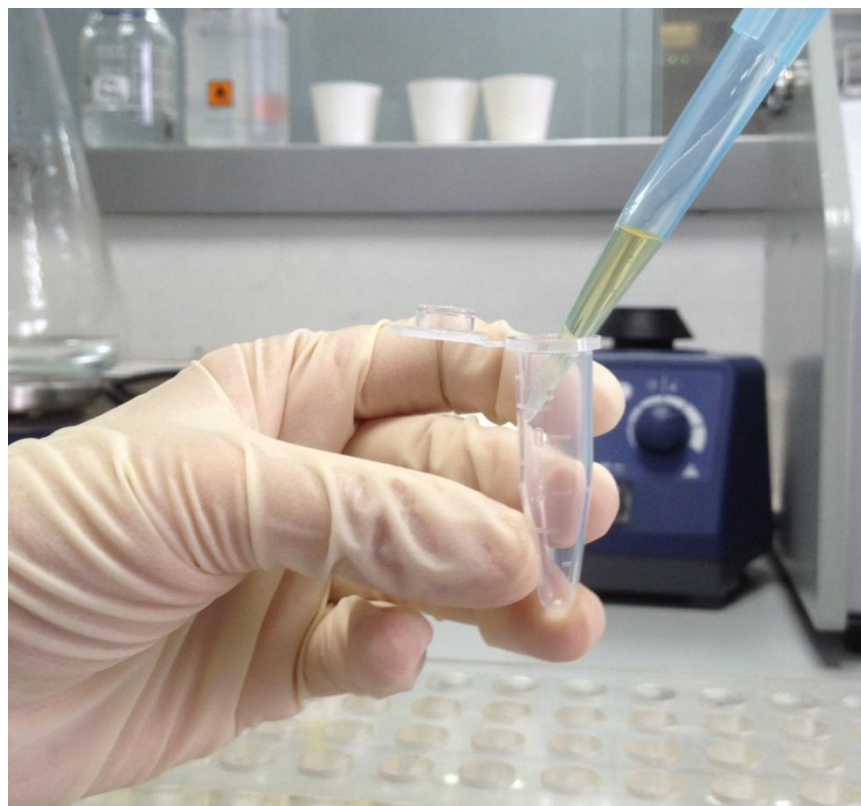
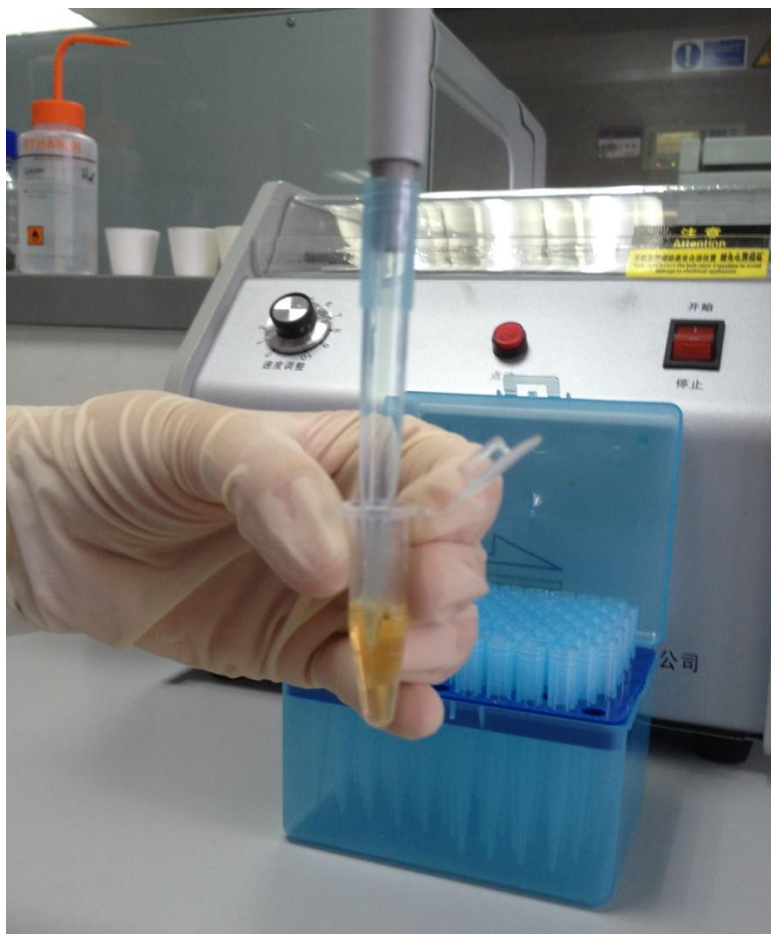
一档



一档  
二档



# 吸液和放液



# 预洗移液头

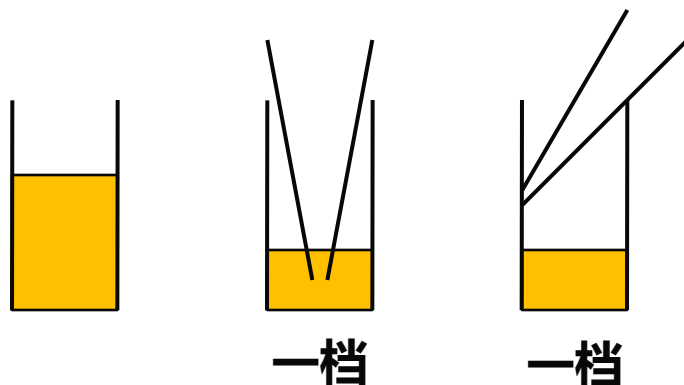
- ❖ 当装上一个新吸头（或改变吸取的容量值）时应预洗吸头，先吸入一次液样并将之排回原容器中。
- ❖ 预洗新吸头能有效提高移液的精确度和重现性。这是因为第一次吸取的液体会在吸头内壁形成液膜，导致计量误差。而同一吸头在连续操作时液膜相对保持不变，故第二次吸液时误差即可消除。



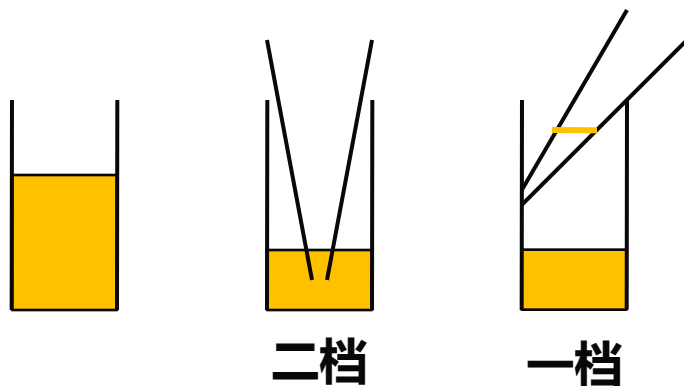
# 正向吸液和反向吸液

❖ 反向吸液：适用于粘稠液体和易挥发液体

## 正向吸液



## 反向吸液



# 移液器的维护



**不用时，建议调至最大量程，让弹簧恢复原形，延长使用寿命。**



# 移液器的清洁

## 按照厂家的要求进行



**内外部清洁：**肥皂液、洗洁精或60%异丙醇；

**（移液器拆装的视频演示）**

**高压/紫外线灭菌：**可灭菌加样器；

**移液器上DNA污染的去除：**主要成分为0.1NHCL、NaCl等的液体95℃浸泡30分钟。

**清洁完毕后，用蒸馏水冲洗干净，烘干或完全晾干！**

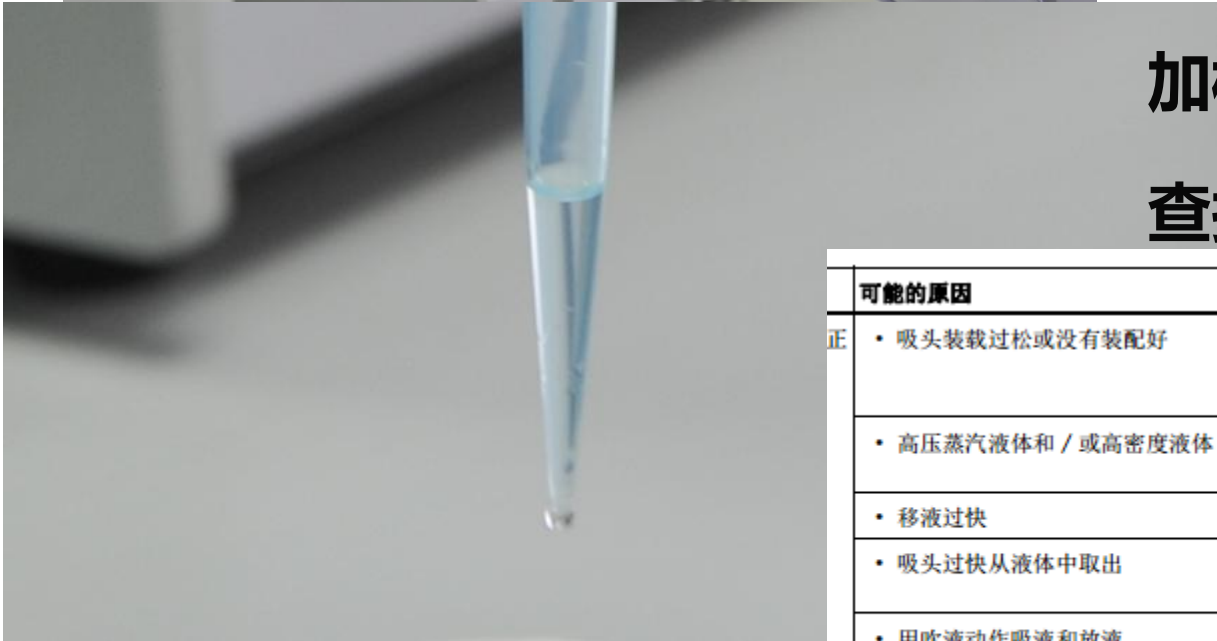




# 移液器的维护——泄漏的验证



垂直保持15s，如加样器吸头上出现液滴，则说明加样器有泄漏存在，需要查找故障原因。



	可能的原因	解决方法
正	• 吸头装载过松或没有装配好	▶ 上紧吸头，使用 epT.I.P.S. 吸头。对于 5 mL 和 10 mL epDualfilter T.I.P.S. 双滤芯吸头，取出移液器中保护滤芯后进行作业
	• 高压蒸汽液体和 / 或高密度液体	▶ 多次浸润吸头，将移液器调节为适用移取此液体
	• 移液过快	▶ 慢慢地按下操作按键
	• 吸头过快从液体中取出	▶ 吸液后经过短暂停顿（大约 3 秒钟），将吸头慢慢从液体中取出
	• 用吹液动作吸液和放液	▶ 正确地重复移液操作
	• 弄脏或损坏活塞	▶ 清洁活塞，略微涂抹润滑和 / 或更换
	• 吸嘴损坏	▶ 更换下半部分或者通道





# 吸量准确性的验证

## ——某厂家的技术参数

型号	容量 ( $\mu$ L)	不准确度(%)	不精密度(%)
P10	最小 0.5	$\pm 5.0$	$\leq 2.8$
	1	$\pm 2.5$	$\leq 1.8$
	最大 10	$\pm 1.0$	$\leq 0.4$
P20	最小 2	$\pm 5.0$	$\leq 1.5$
	最大 20	$\pm 1.0$	$\leq 0.3$
P100	最小 10	$\pm 3.0$	$\leq 1.0$
	最大 100	$\pm 0.8$	$\leq 0.2$
P200	最小 20	$\pm 2.5$	$\leq 0.7$
	最大 200	$\pm 0.6$	$\leq 0.2$
P1000	最小 100	$\pm 3.0$	$\leq 0.6$
	最大 1000	$\pm 0.6$	$\leq 0.2$



# 吸量准确性的验证

## 校准环境和用具要求：

- ❖ **室 温**：20~25℃，测定中波动范围不大于 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。
- ❖ **电子天平**：放置于无尘和震动影响的台面上，房间尽可能有空调。称量时，为保证天平内的湿度（相对湿度60-90%），天平内应放置一装有10 ml蒸馏水的小烧杯。

**0.001mg分析天平？如校准1ul以上的量程。**

- ❖ **小烧杯**：5~10 ml体积。
- ❖ **测定液体**：温度为20~25℃的去气双蒸水。
- ❖ **选定校准体积**：
  - 拟校准体积；
  - 加样器标定体积的中间体积；
  - 最小可调体积（不小于拟校准体积的10%）。
  - 如为固定体积加样器，则只有一种校准体积。



# 校准步骤：

- ❖ 将加样器调至拟校准体积，选择合适的吸头；
- ❖ 调节好天平；
- ❖ 来回吸吹蒸馏水3次，以使吸头湿润，用纱布拭干吸头
- ❖ 垂直握住加样器，将吸头浸入液面2~3 mm处，缓慢（1~3秒）一致地吸取蒸馏水；
- ❖ 将吸头离开液面，靠在管壁，去掉吸头外部的液体；将加样器以30°角放入称量烧杯中，缓慢一致地将加样器压至第一档，等待1~3秒，再压至第二档，使吸头里的液体完全排出；
- ❖ 记录称量值；
- ❖ 擦干吸头外面；
- ❖ 按上述步骤称量10次；
- ❖ 取10次测定值的均值作为最后加样器吸取的蒸馏水重量，按附表所列蒸馏水Z因子计算体积。按校准结果调节加样器。



# 校准要求

**至少每半年校准一次；**

**“定量、可调移液器试行检定规程JJG 646-90，2006，移液器”**

**三个点：移液器的最大量程、50%量程和10%量程。**



# 三个要点

**清洁！**

**定期校准！**

**建立维护和操作SOP！**

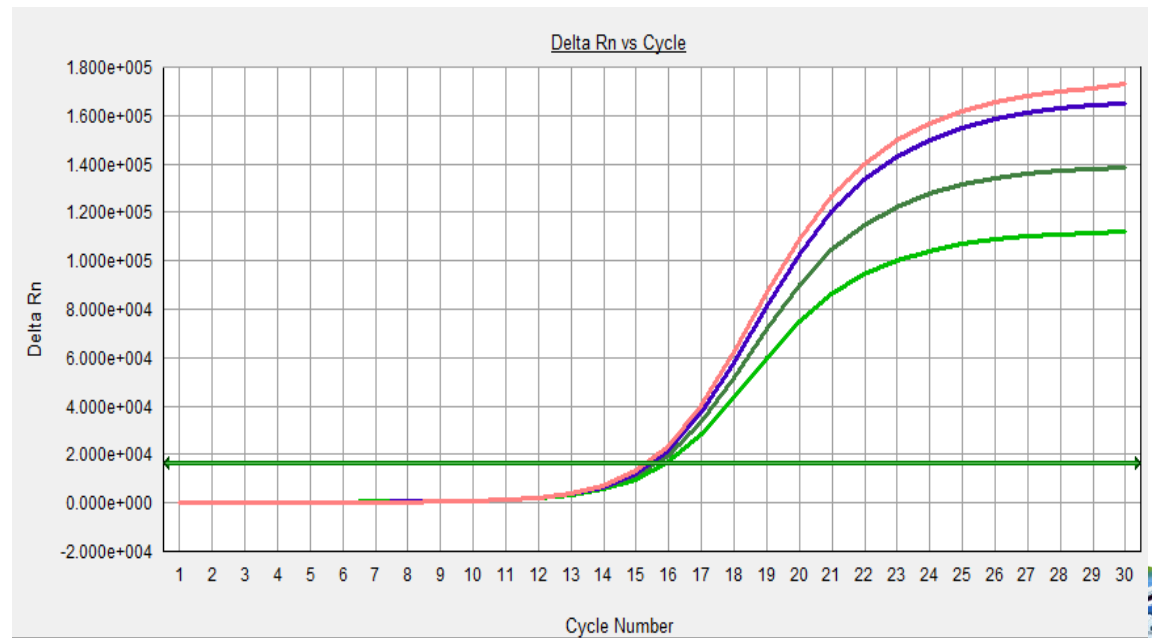


# 实时荧光PCR仪



# 定量测定

HBV DNA定量;  
HCV RNA定量。



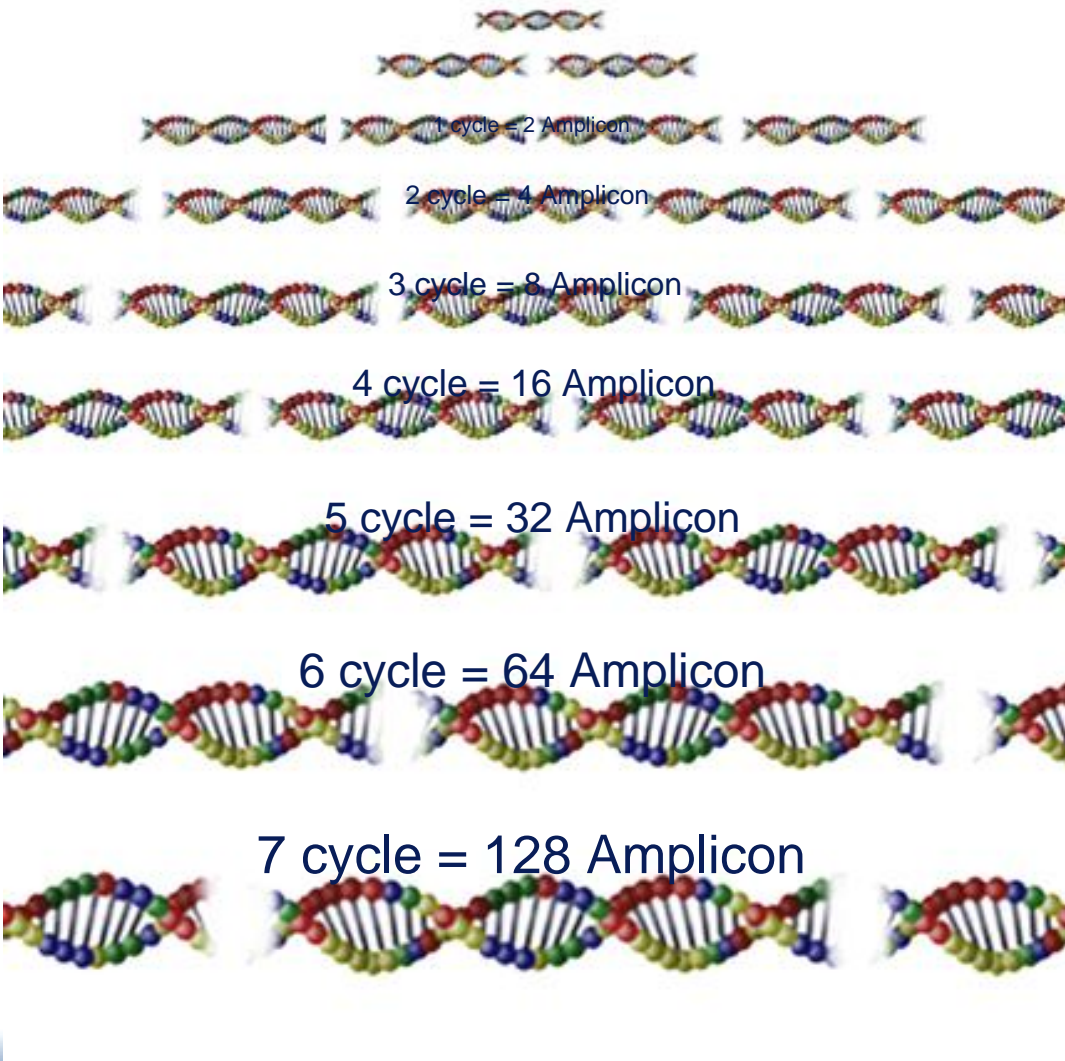
# 定性测定

- ❖ 用于血液病毒筛检 (HBV, HCV, HIV)
- ❖ 病毒基因分型及突变检测 (HPV分型)
- ❖ 细菌、支原体、衣原体等微生物的检测 (TB、CT、NG)
- ❖ 基因突变 (EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA)
- ❖ 基因多态性检测 (药物代谢)
- ❖ 产前筛查 (21\13\18非整倍体)



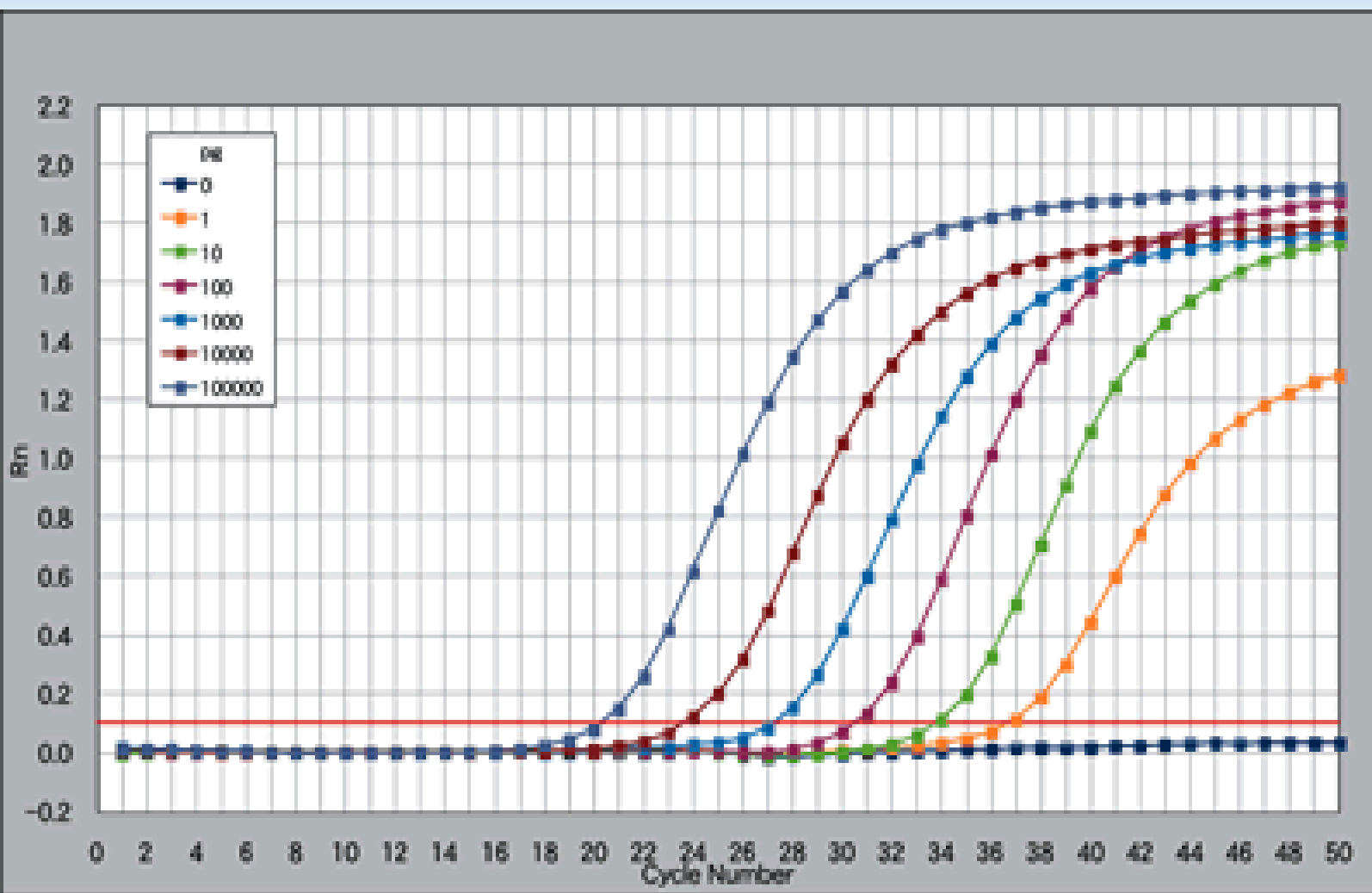


# 30次循环后靶序列扩增的数量



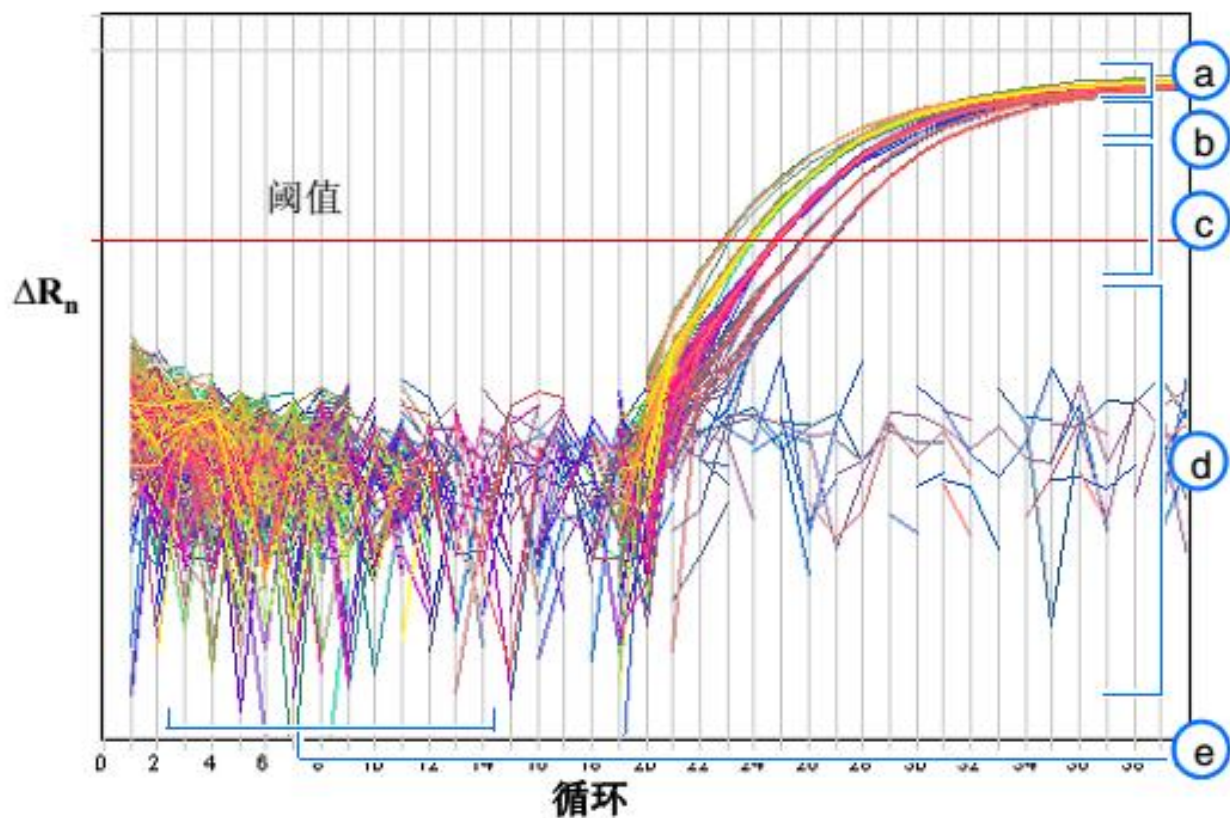
No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824





线性基线期  
指数期初期  
指数期  
平台期





a: 平台期  
b: 指数期  
c: 指数期初期  
d: 背景  
e: 基线

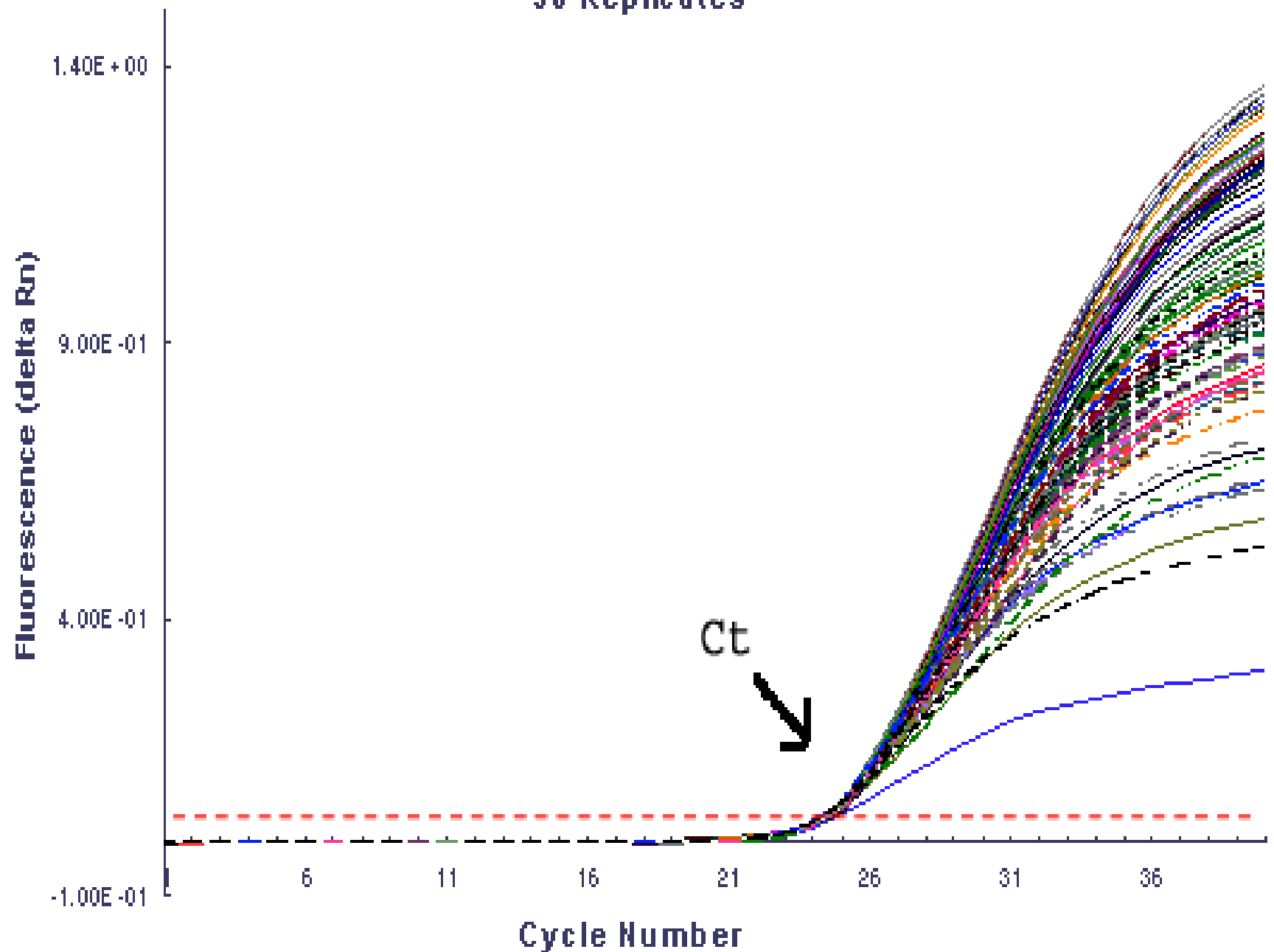
**基线:** PCR反应起始阶段，扩增产物很少，产生的荧光信号很低。基线荧光信号可根据此阶段产生的荧光信号来计算。

**阈值:** 基线信号的10倍标准差。

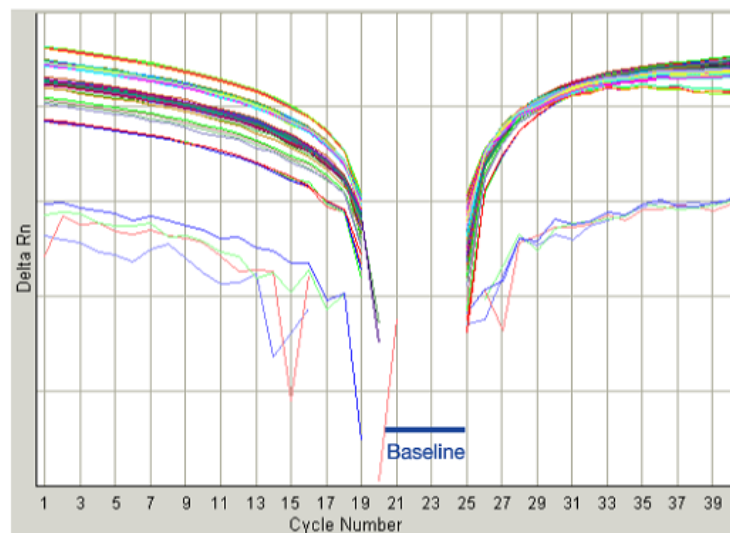
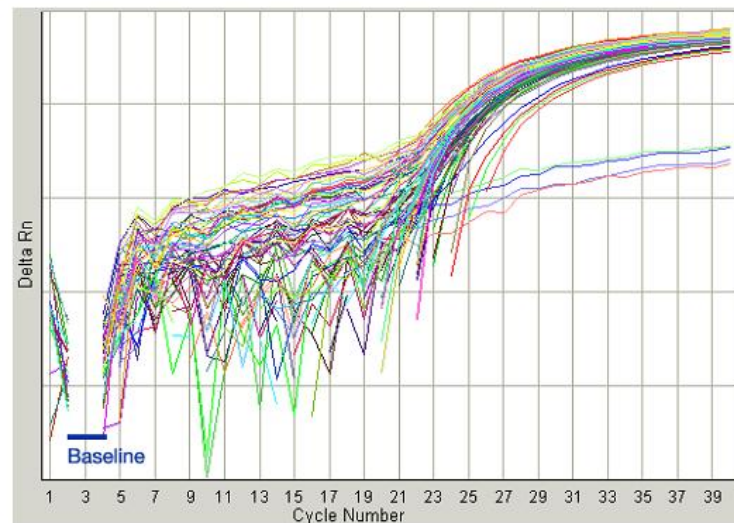
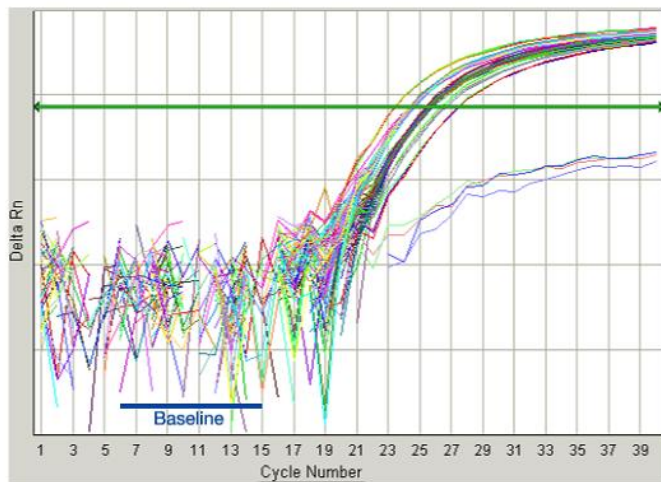
**Ct:** 扩增过程中荧光信号强度超过阈值的循环数。



# 96 Replicates

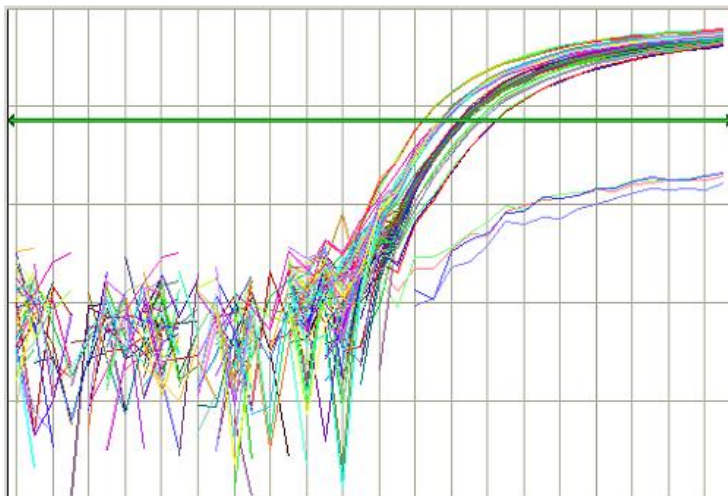


# 基线的设置

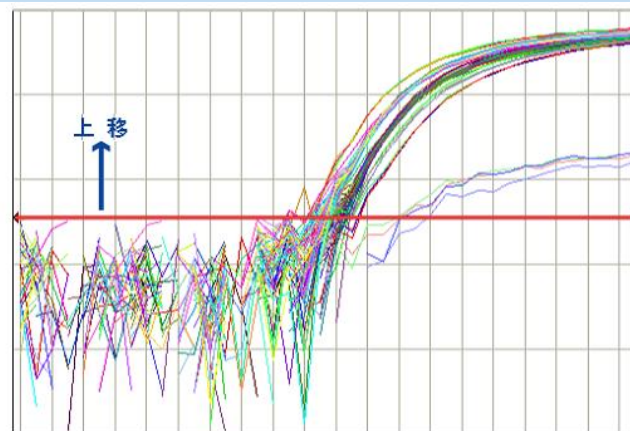




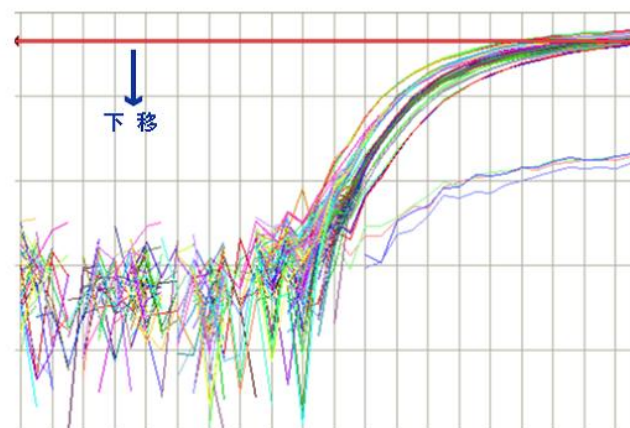
# 阈值的设置



Instrument Results									
Spectra		Component		Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation	
Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
1-1	RNase P	Unknown	25.51	0.040	4788.97	4732.19	128.616		
1-1	RNase P	Unknown	25.57	0.040	4581.29	4732.19	128.616		
1-1	RNase P	Unknown	25.48	0.040	4877.24	4732.19	128.616		
1-1	RNase P	Unknown	25.54	0.040	4681.28	4732.19	128.616		



Instrument Results									
Spectra		Component		Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation	
Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
1-1	RNase P	Unknown	20.27	0.576	8146.32	4586.23	2677.676		
1-1	RNase P	Unknown	21.57	0.576	2171.80	4586.23	2677.676		
1-1	RNase P	Unknown	20.73	0.576	5097.34	4586.23	2677.676		
1-1	RNase P	Unknown	21.28	0.576	2929.45	4586.23	2677.676		



Instrument Results									
Spectra		Component		Amplification Plot		Standard Curve		Dissociation	
Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
1-1	RNase P	Unknown	38.24	0.481	4325.50	5015.28	683.698		
1-1	RNase P	Unknown	37.81	0.481	4867.56	5015.28	683.698		
1-1	RNase P	Unknown	37.08	0.481	5960.34	5015.28	683.698		
1-1	RNase P	Unknown	37.78	0.481	4907.72	5015.28	683.698		



# 基本计算公式的推导

$$Y_n = X (1+E)^n \quad (1)$$

其中， $Y_n$  为第 $n$ 个循环后扩增产物的量， $X$ 为原模板数， $E$ 为扩增效率， $n$ 为扩增循环数。

在扩增达到阈值线时，此时， $n = C_t$ ，于是，扩增产物的量为：

$$Y_{C_t} = X (1+E)^{C_t} \quad (2)$$

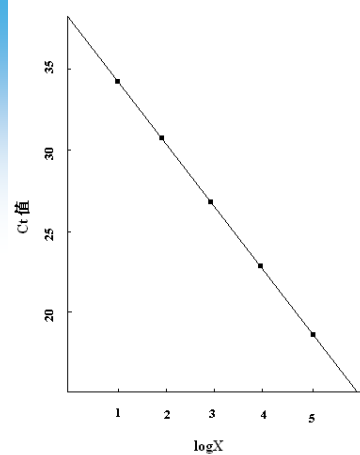
$Y_{C_t}$  为荧光信号达到阈值强度时扩增产物的量。在阈值线设定以后，它就是一个常数。（2）式两边同时取对数，得：

$$\text{Log } Y_{C_t} = \text{Log } X (1+E)^{C_t} \quad (3)$$

$$\text{亦即：} \text{Log } Y_{C_t} = \text{Log } X + C_t \times \text{Log } (1+E) \quad (4)$$



# 纵坐标为Ct值横坐标为起始拷贝数时的数学模型



$$\text{Log} X = -Ct \times \text{Log} (1+E) + \text{Log} Y_{Ct} \quad (5)$$

可变换为：

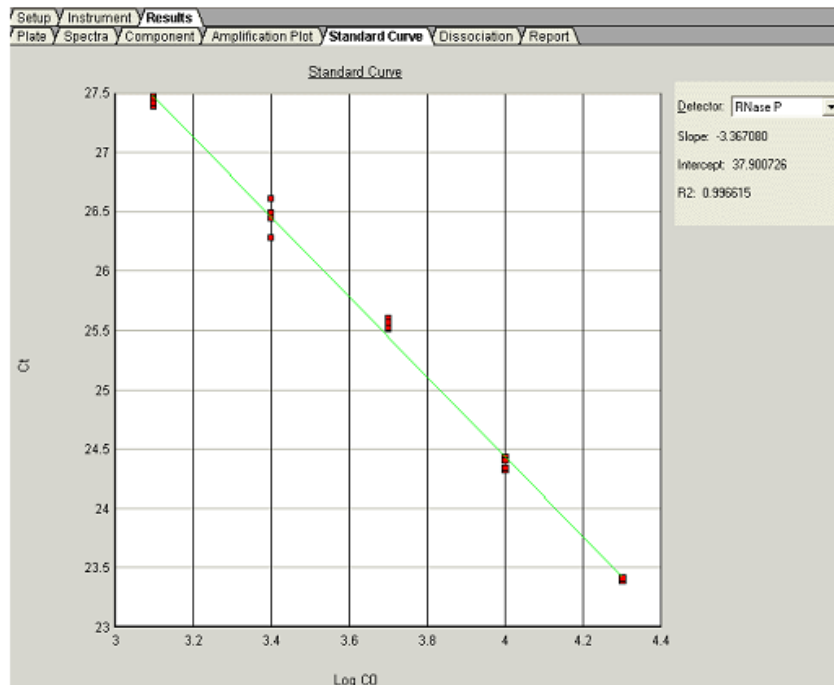
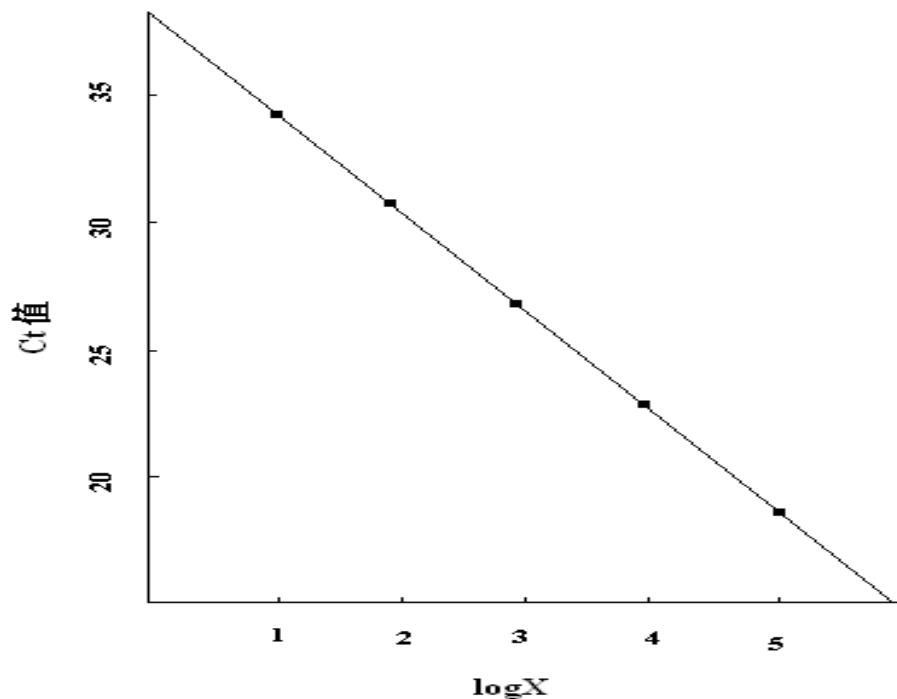
$$Ct = (-1/\log(1+E)) \text{Log} X + \text{Log} Y_{Ct} / \log(1+E) \quad (7)$$

- $A = -1/\log(1+E)$ ,  $B = \text{Log} Y_{Ct} / \log(1+E)$
- 如果扩增效率为1 (100%) , 则  
斜率  $A = -1/\log 2 = -3.32$
- 如果扩增效率为0.5 (100%) , 则  
斜率  $A = -1/\log 1.5 = -5.68$





# 纵坐标为Ct值横坐标为起始拷贝数时的数学模型

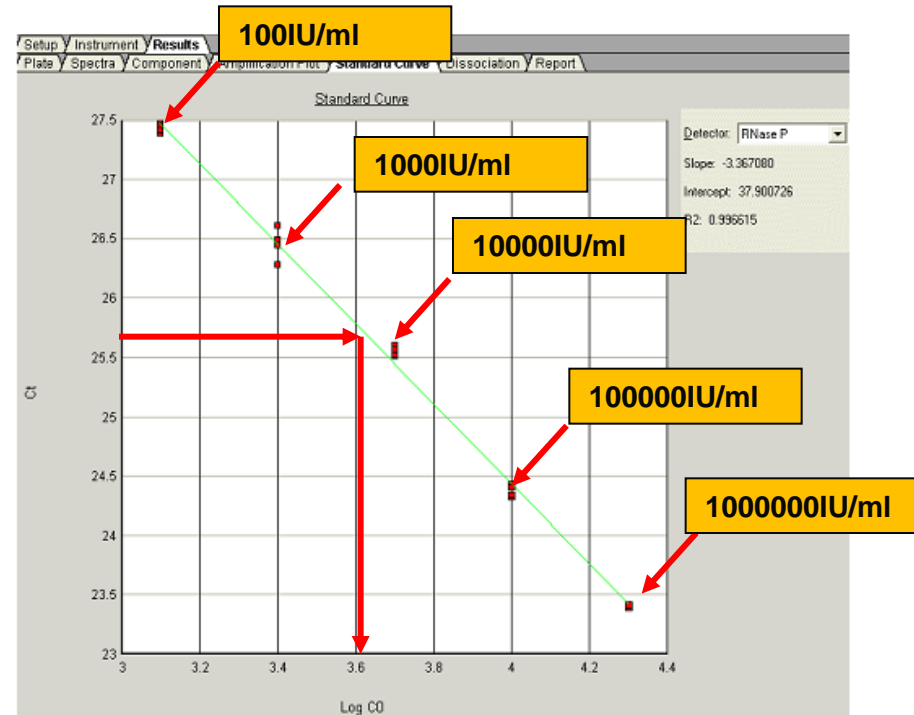


# 纵坐标为Ct值横坐标为起始拷贝数时的数学模型

- ❖ 此种计算模式下，斜率A必 $\leq -3.32$ 。
- ❖ 截距B则为原始模板趋向于0亦阴性标本检测的Ct值，因此，一个实时荧光PCR，如果设定的扩增循环数为40，则其截距B即应 $\geq 40$ 。

$$Ct = A \log X + B$$

$R^2$



# 拷贝数/ml IU /ml ?

拷贝数/ml : 厂家采用分光光度法自测

IU /ml : 国际标准

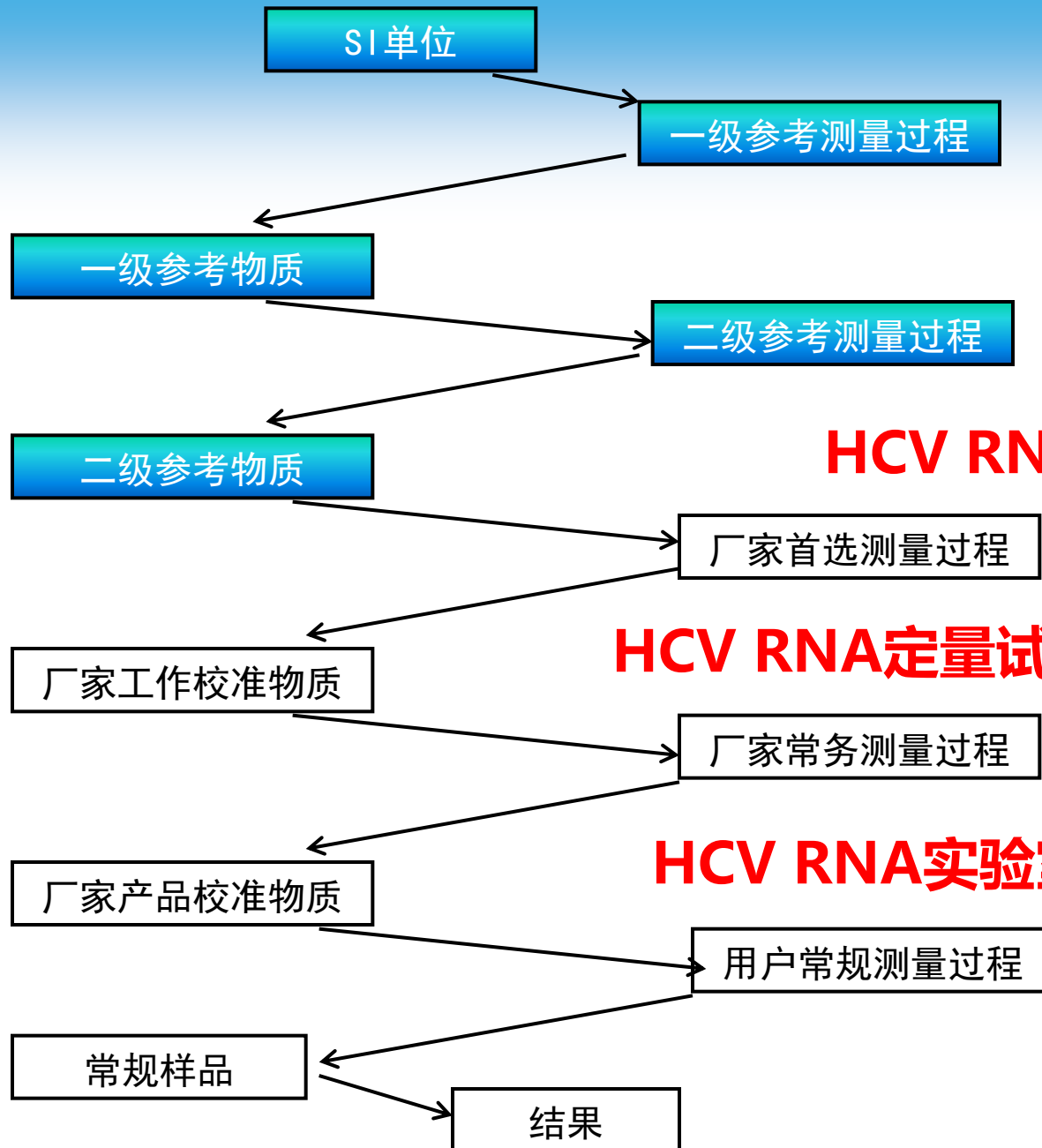
HCV RNA一代国际标准

HCV RNA二代国际标准

HCV RNA三代国际标准

HCV RNA四代国际标准





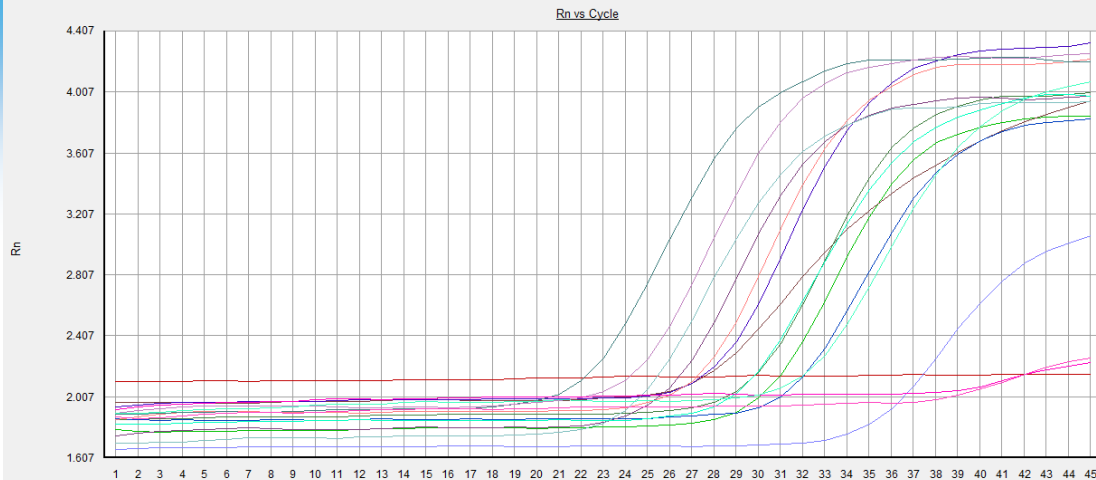
**HCV RNA标准物质**

**HCV RNA定量试剂厂家研发**

**HCV RNA实验室日常检测**



# HBV DNA 定量举例



Analysis Settings

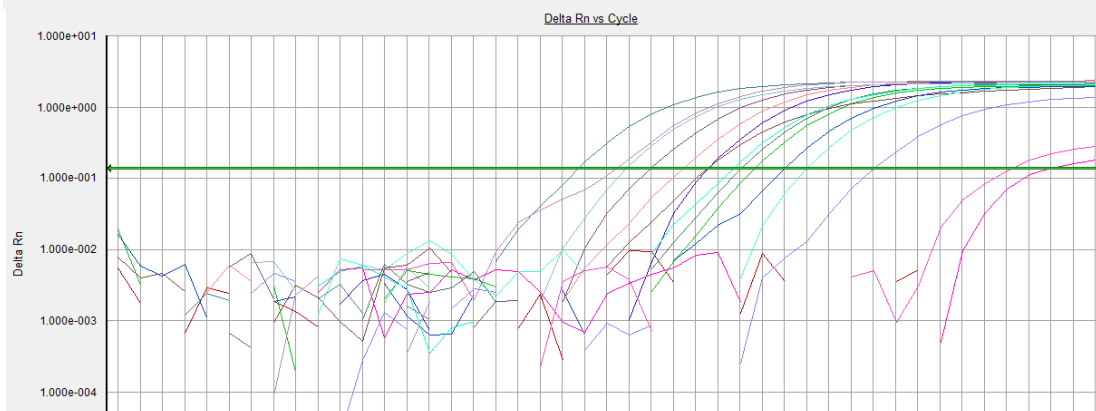
☐ Auto Ct  
☒ Manual Ct

Threshold:

☐ Auto Baseline  
☒ Manual Baseline

Start   
End

Analyze  
Help



Analysis Settings

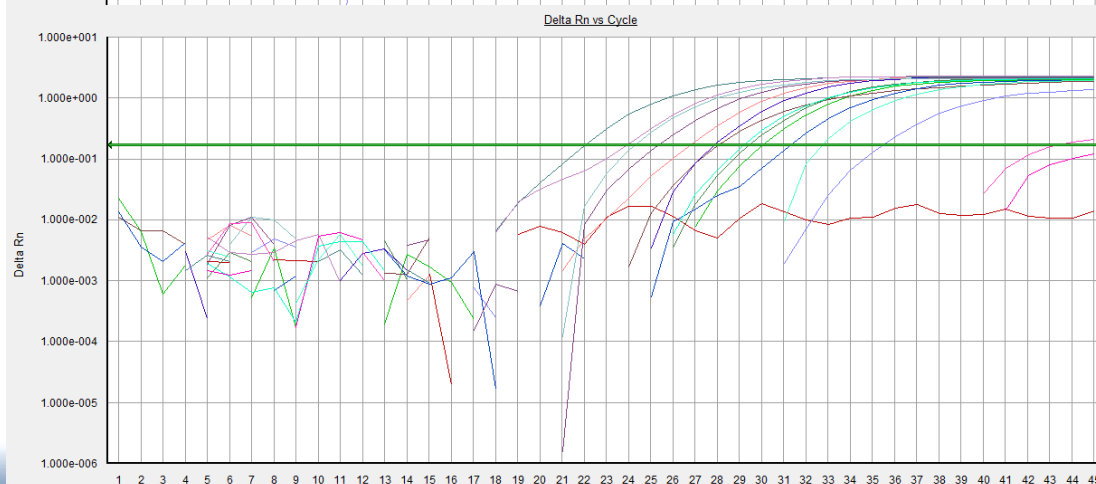
☐ Auto Ct  
☒ Manual Ct

Threshold:

☒ Auto Baseline  
☐ Manual Baseline

Start   
End

Analyze  
Help



Analysis Settings

☐ Auto Ct  
☒ Manual Ct

Threshold:

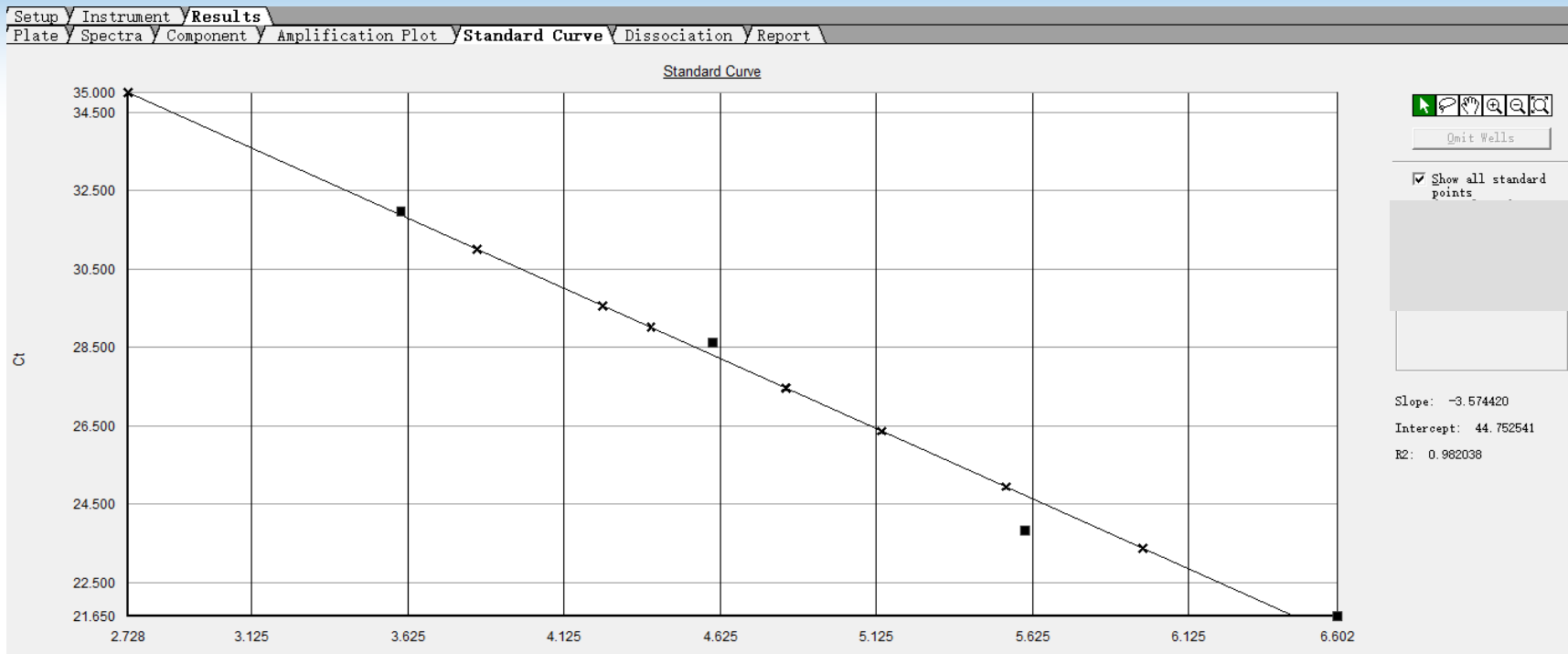
☐ Auto Baseline  
☒ Manual Baseline

Start   
End

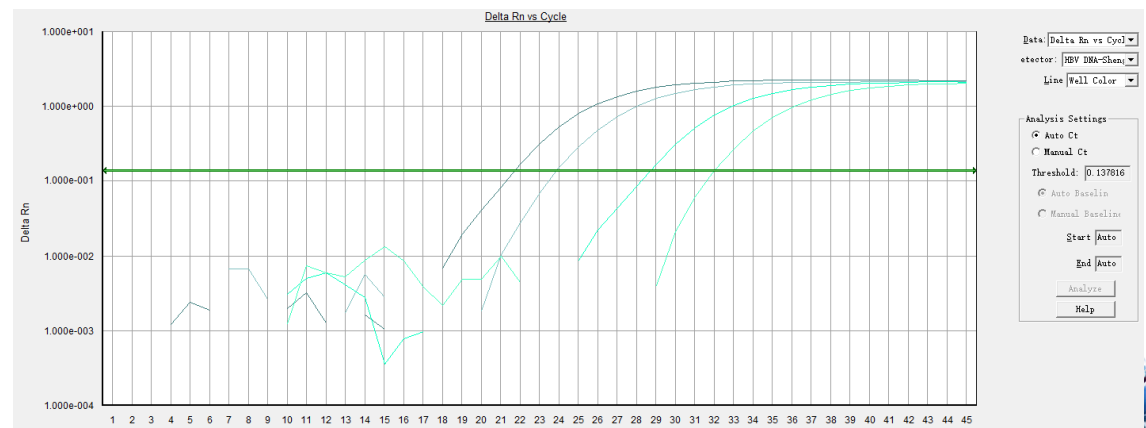
Analyze  
Help

定值结果（对数值）  
相差<0.05

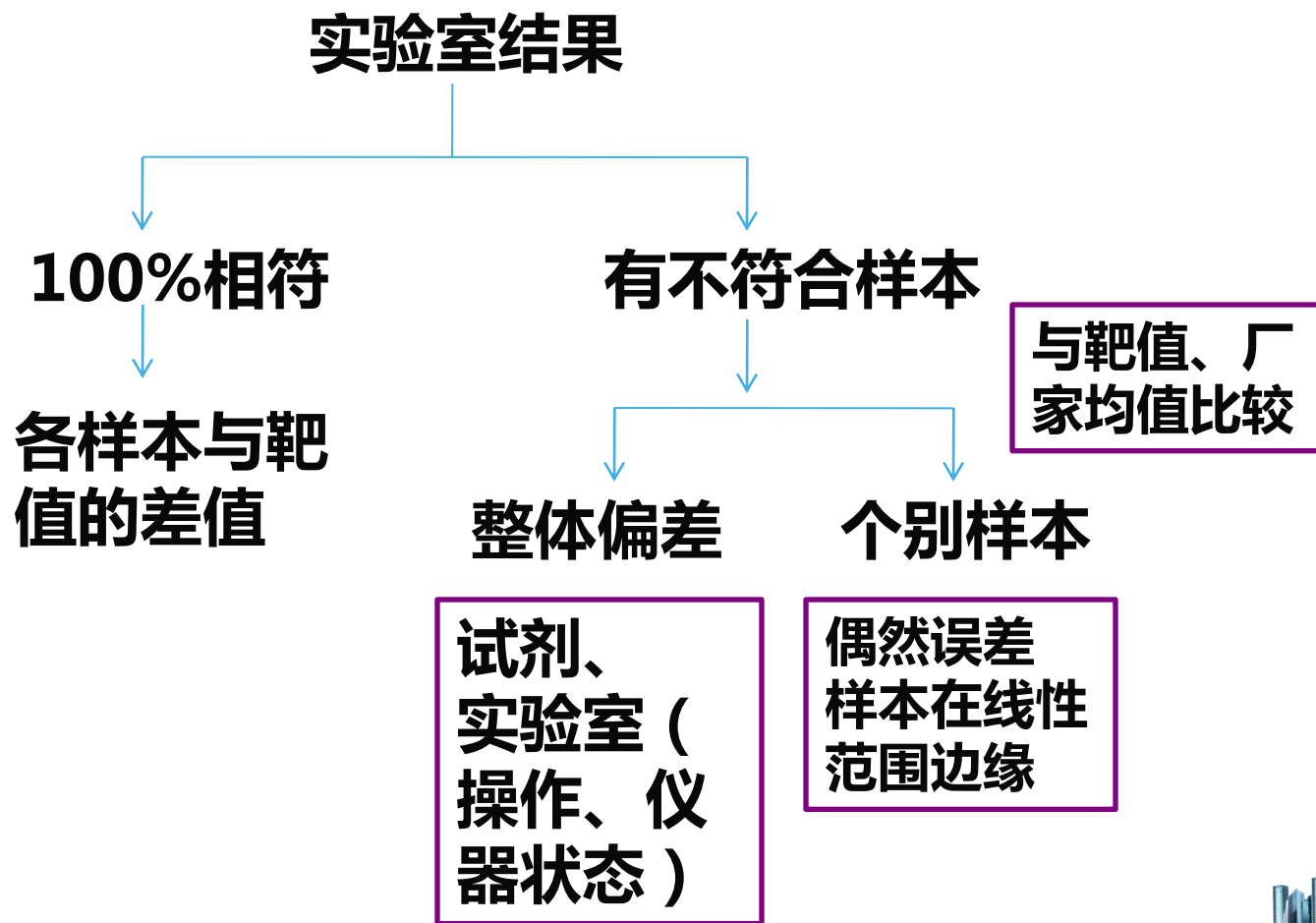




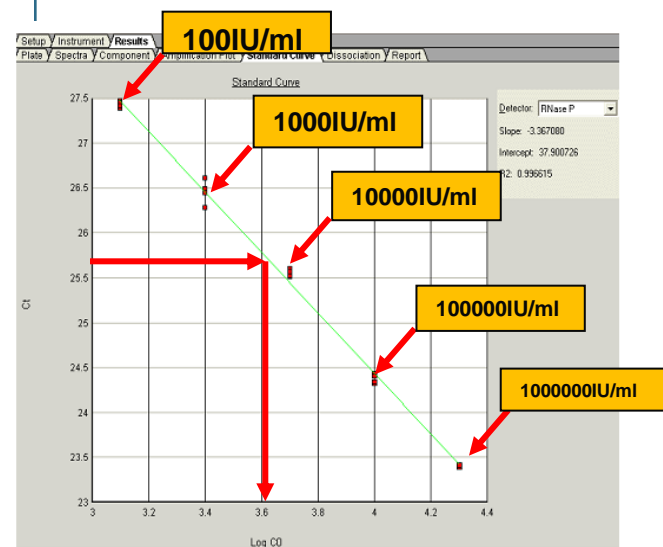
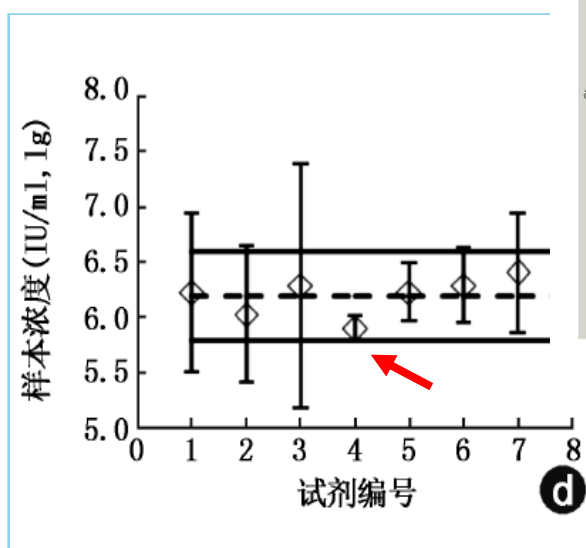
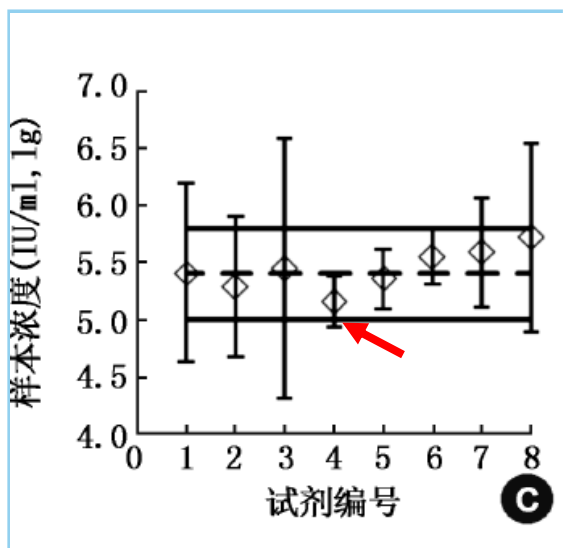
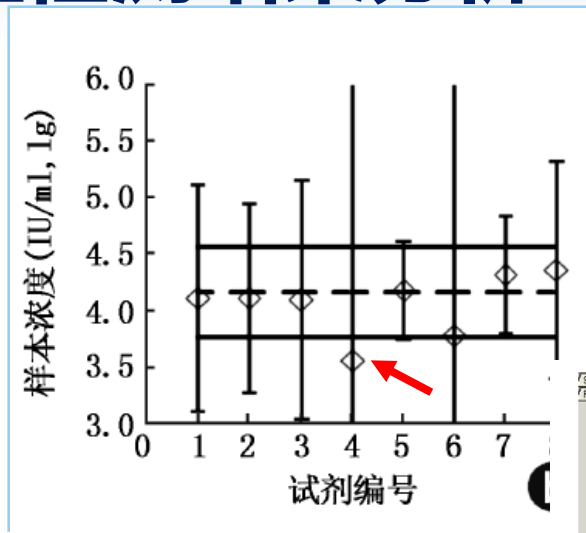
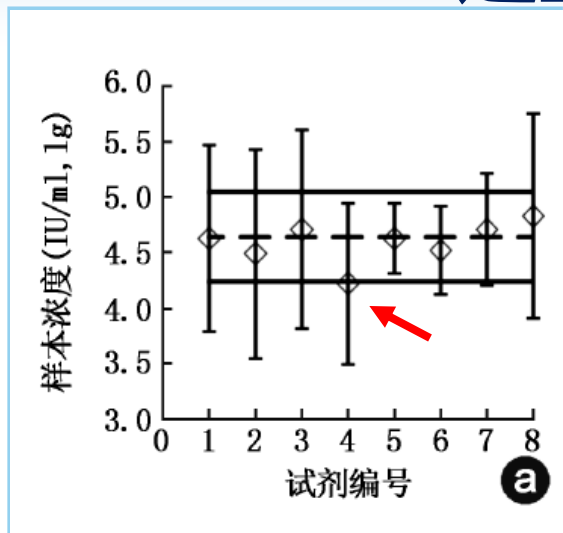
**Slope: -0.3574420;**  
**Intercept:44.752541;**  
**R2=0.982038**



# 各实验室检测结果

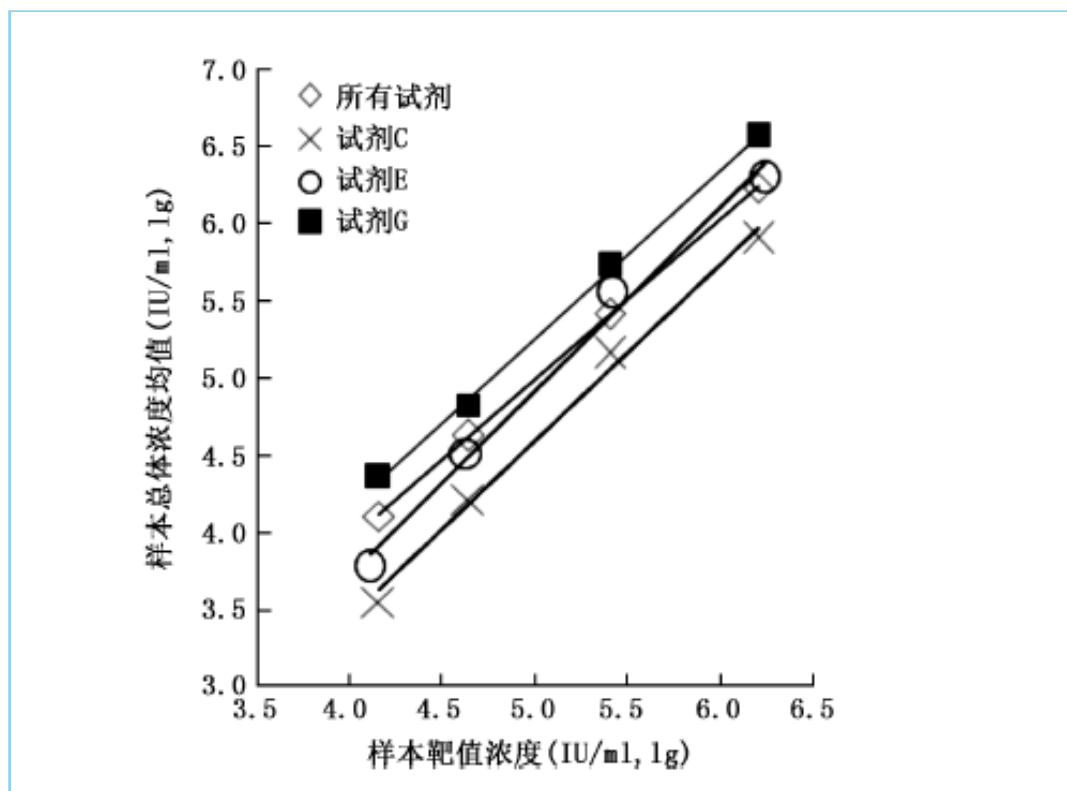


# HCV RNA定量检测结果分析

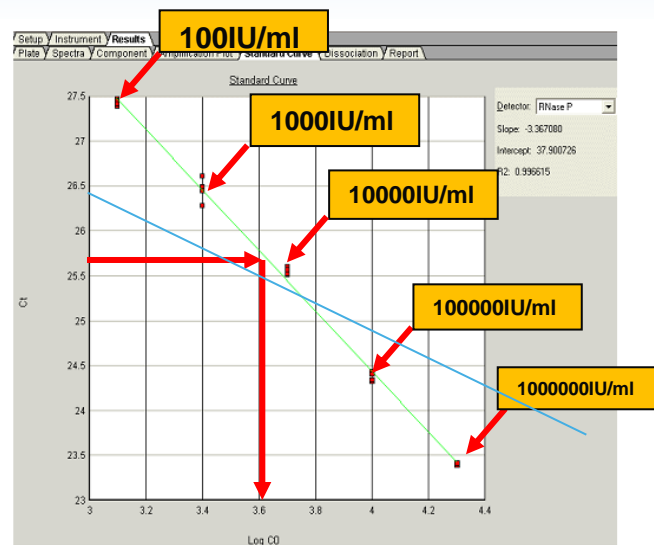
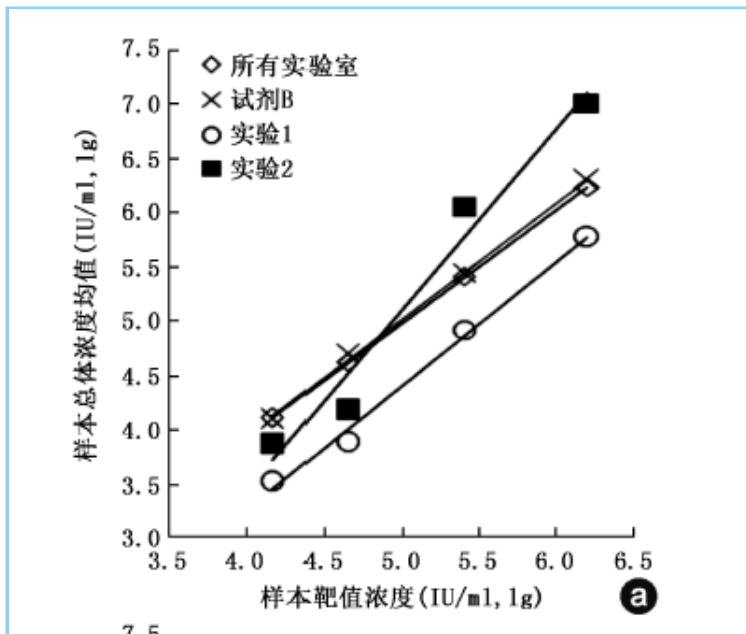




# 总体结果和3种试剂检测均值与靶值的相关性曲线



# 不合格参评实验室结果分析-例



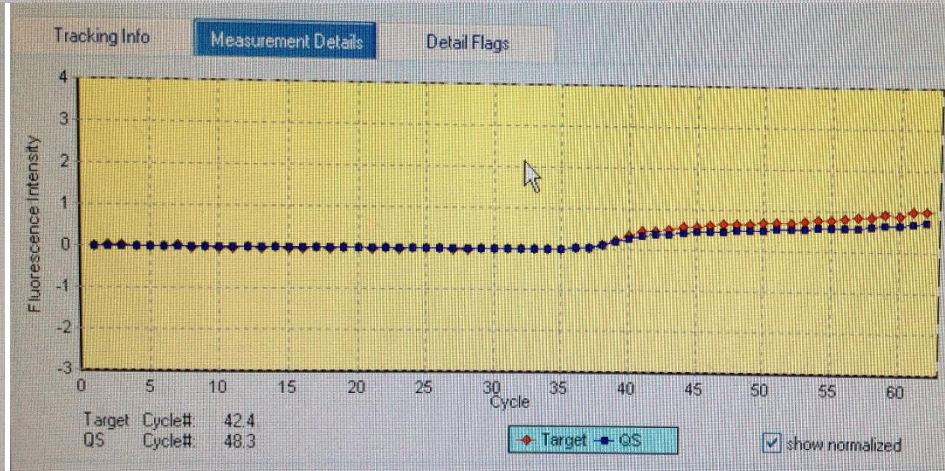
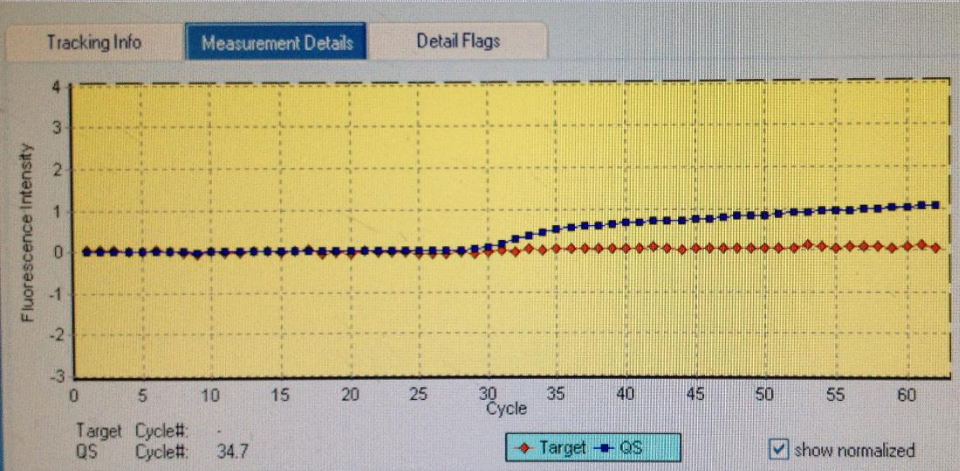
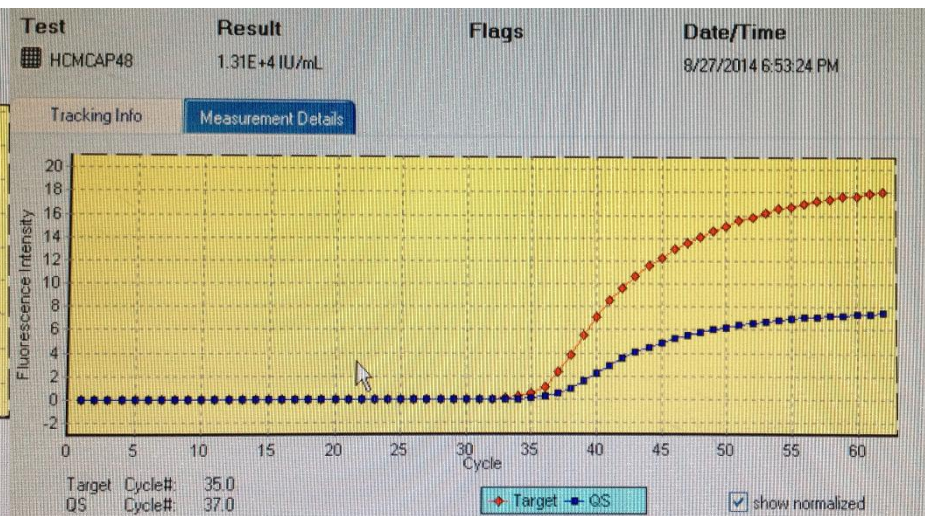
**系统误差：**设备校准、加样器或操作过程中RNA降解；  
**随机误差：**重复检测

	1211	1212	1213	1214	PT成绩
所有实验室	4.63	4.11	5.41	6.23	
试剂B	4.71	4.09	5.45	6.29	
实验室1	3.88	3.52	4.92	5.76	20
实验室2	4.18	3.86	6.05	7.01	40





# 有内标的实时荧光PCR测定的抑制物存在的判断





名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
19-DeI	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
L858R	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
T790M	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
20-Ins	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
G719X	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
S768I	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
L861Q	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC
外控	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	样品9	样品10	STD	NTC

待测样品外控的FAM信号应该升起，若为石蜡切片样品，则其Ct值在15-21之间；若为非石蜡切片样品，则Ct值应在13-19之间。

外控Ct值	可能原因	解决方法
石蜡包埋组织样品，Ct < 15 非石蜡切片样品，Ct < 13	加入DNA过量	稀释DNA
石蜡包埋组织样品，Ct > 21 非石蜡切片样品，Ct > 19	DNA含有抑制剂 DNA加入量不够	稀释或重新提取DNA 增加DNA用量

5. 待测样品内控HEX (VIC) 应升起。可按如下情况判断：

- 1) HEX有信号，FAM无信号——质控通过
- 2) HEX无信号，FAM有信号——质控通过
- 3) 任何一管HEX，FAM均无信号——质控不通过（该样品数据无效）

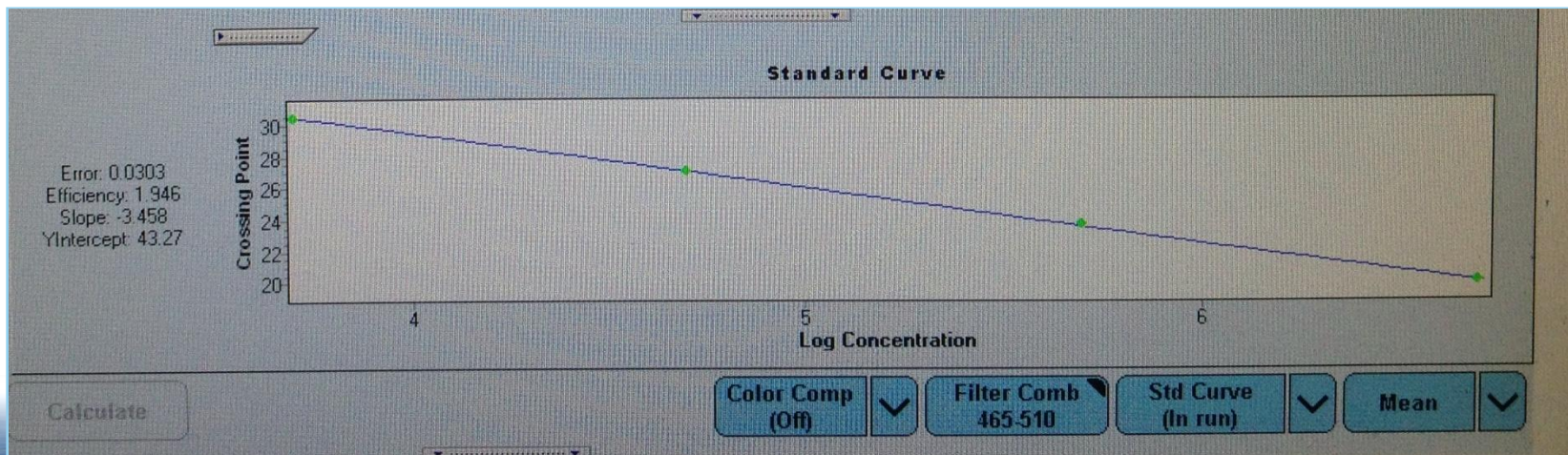
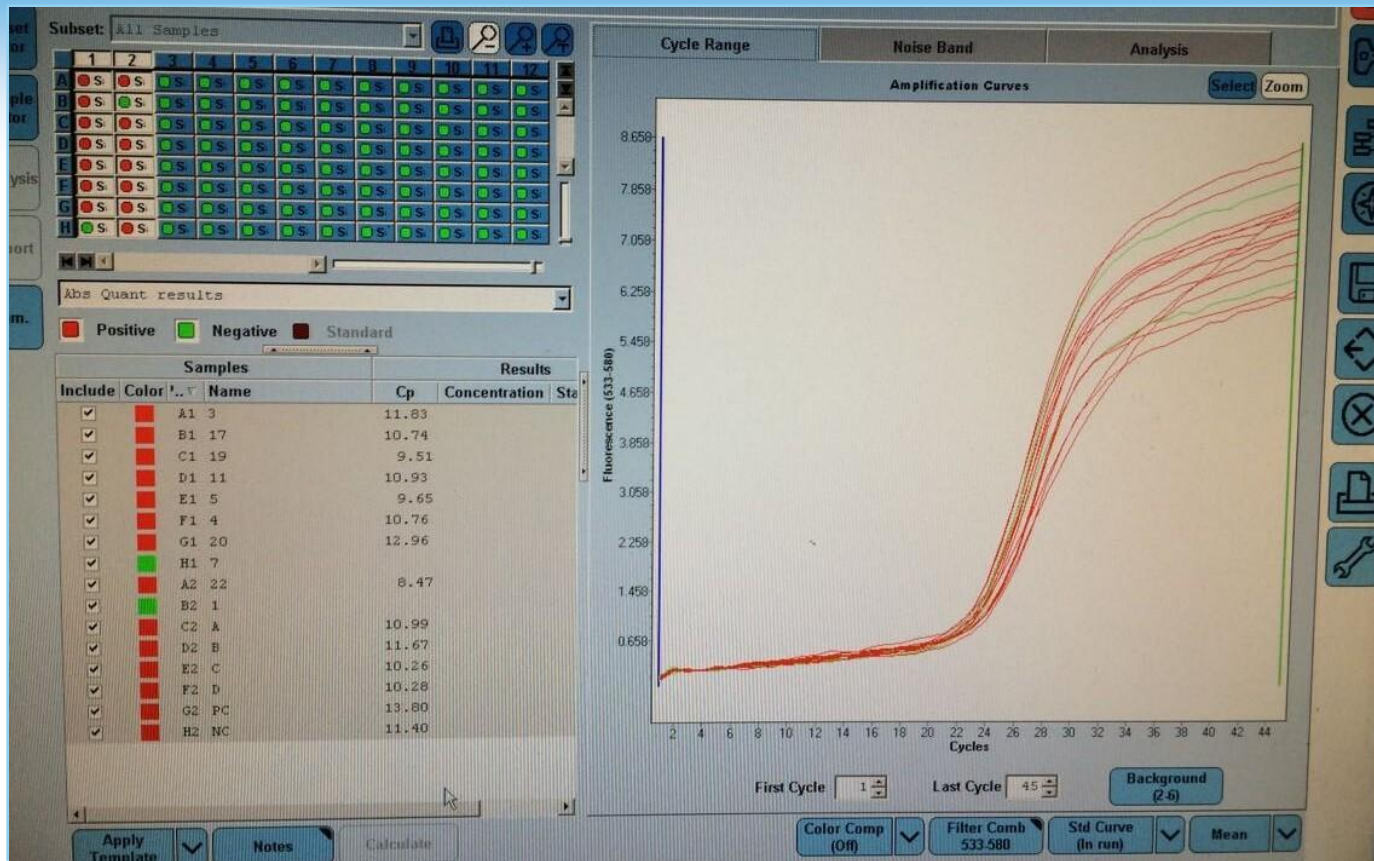
可能原因	解决方法
样品DNA中存在PCR抑制剂	稀释或重新提取DNA
DNA加入量不够	增加DNA用量
加样时漏加DNA	重新检测

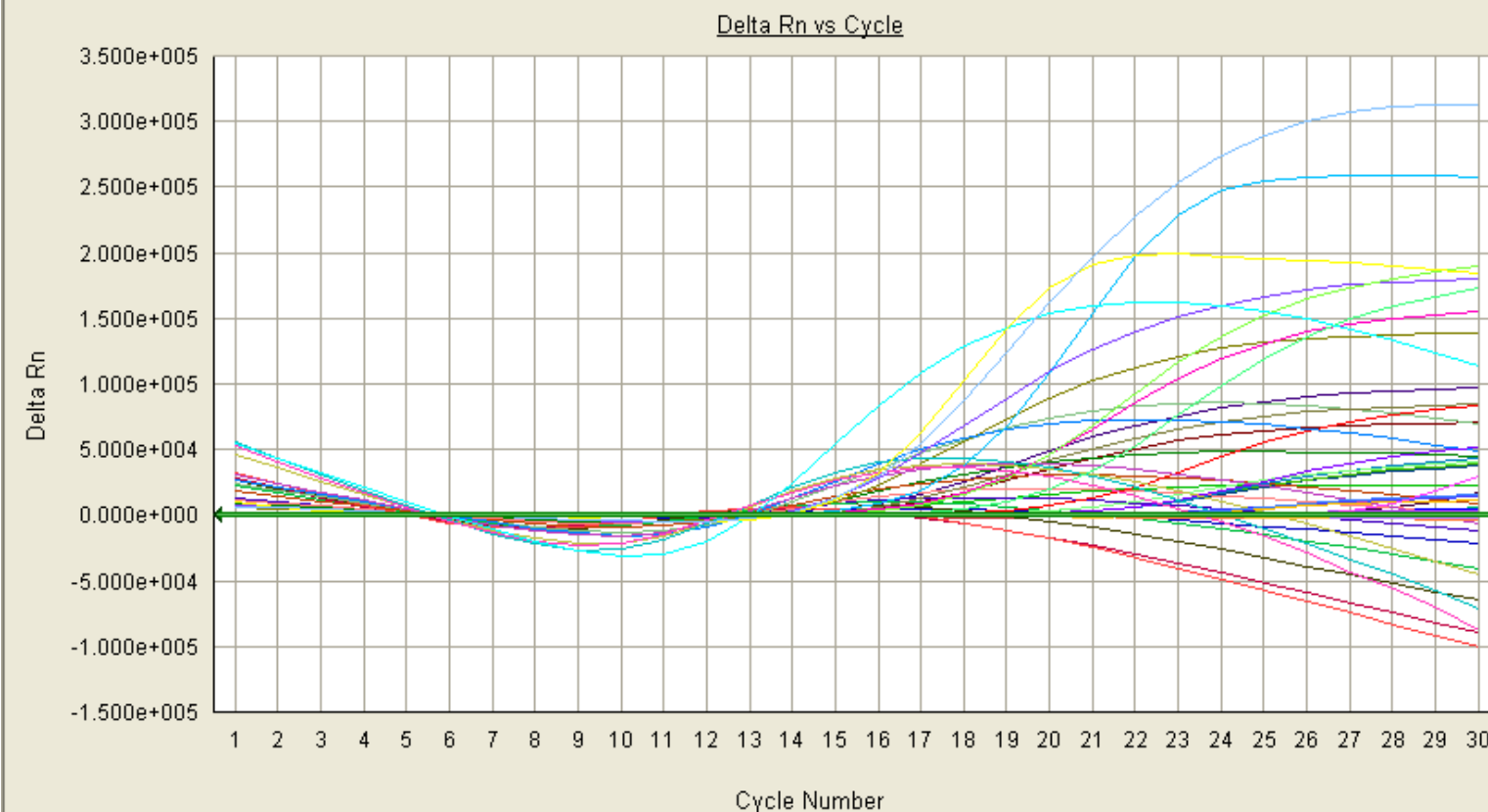
表6 交叉信号阈值表\*

突变DNA	交叉反应管的阈值						
	12-2-A	12-2-C	12-2-T	12-1-A	12-1-C	12-1-T	13-2-A
12-2-A	-	-	-	-	-	-	-
12-2-C	-	-	-	-	11.12	10.95	-
12-2-T	-	-	-	-	-	11.98	-
12-1-A	-	-	-	-	9.7	10.97	-
12-1-C	-	-	-	-	-	5.58	-
12-1-T	-	-	-	-	12.09	-	-
13-2-A	-	-	-	-	-	-	-

备注：“-”表示无交叉反应。

\*根据人工合成标准品的实验数据获得





Data: Delta Rn vs Cyc]

Detector: All

Line Well Color

Analysis Settings

☐ Auto Ct

☒ Manual Ct

Threshold: 0.2

☐ Auto Baseline

☒ Manual Baseline

Start 3

End 15

Analyze

Help

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

# 组成

## PCR仪

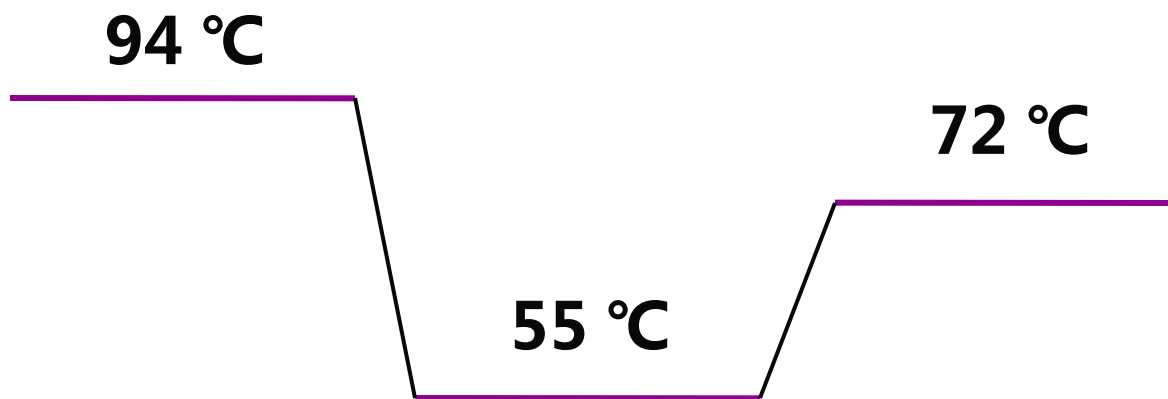
## 荧光检测系统

## 计算机及软件系统





# PCR反应



**ABI7500**

**LC480**

温度均一性： $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$

$\pm 0.35\text{ }^{\circ}\text{C}$

升降温速度： $1.6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$

升 $4.8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ；降 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$

升降温方式：半导体

半导体



# 荧光光度计原理

LED灯  
卤钨灯  
氙灯

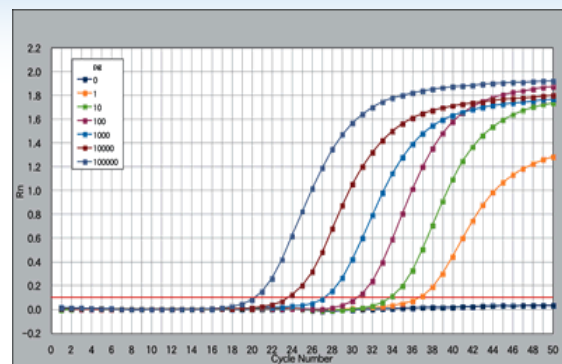
光源

激发滤光片

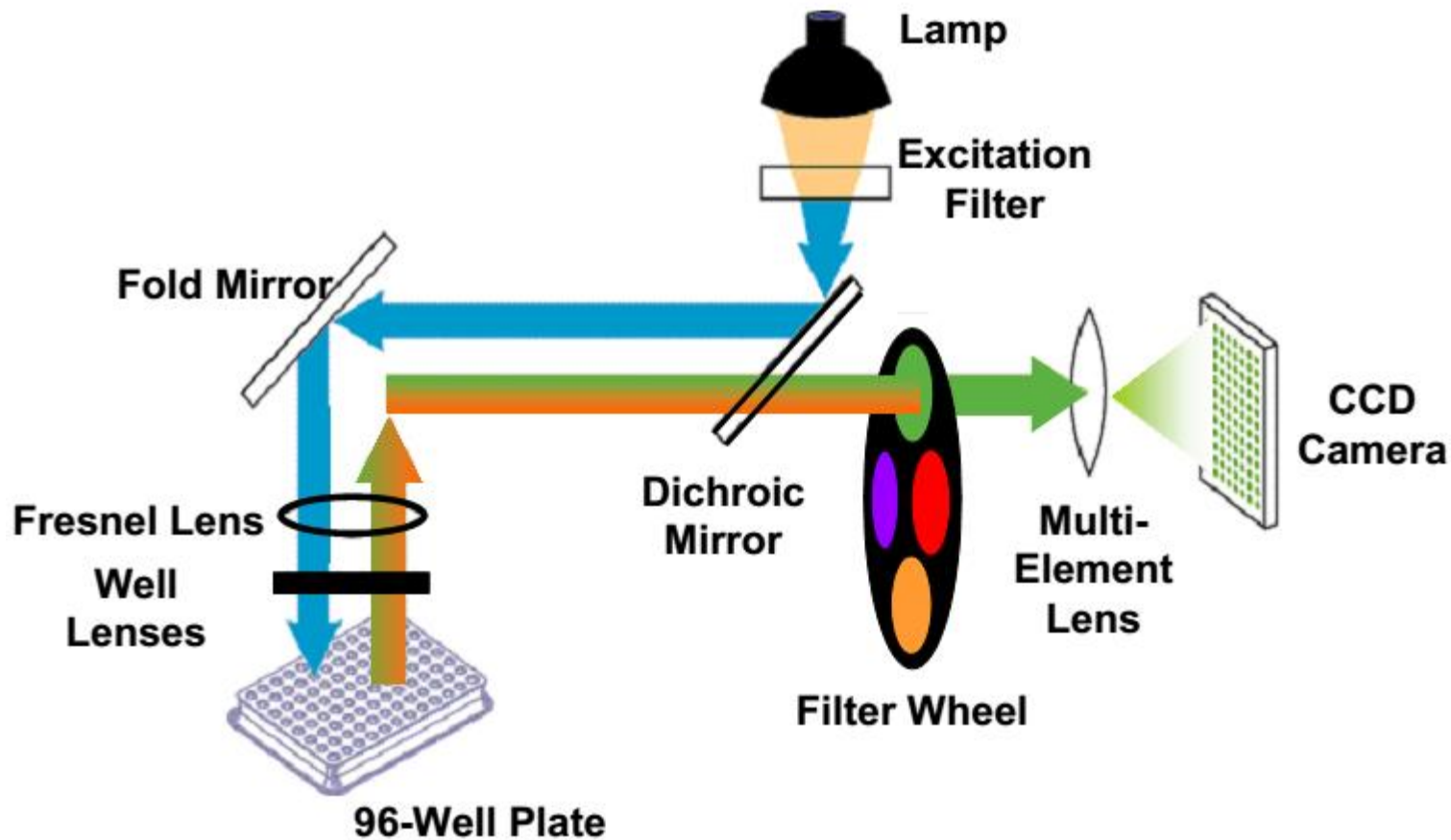
样品

发射滤光片

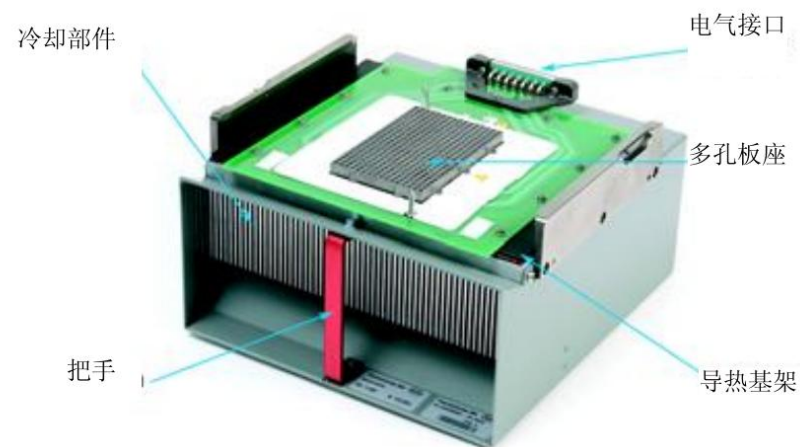
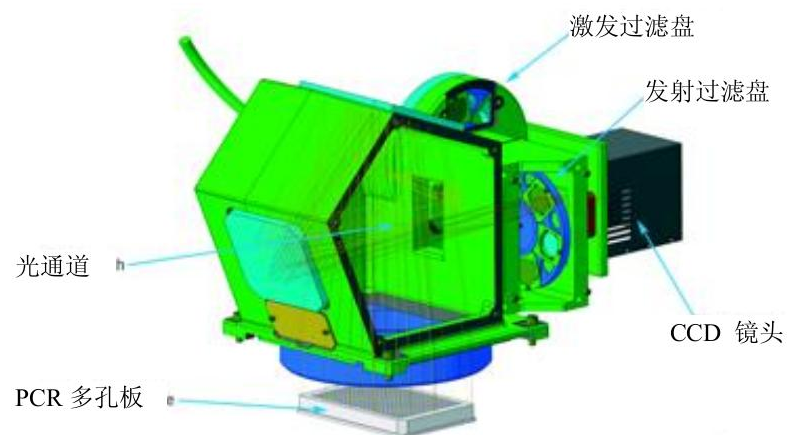
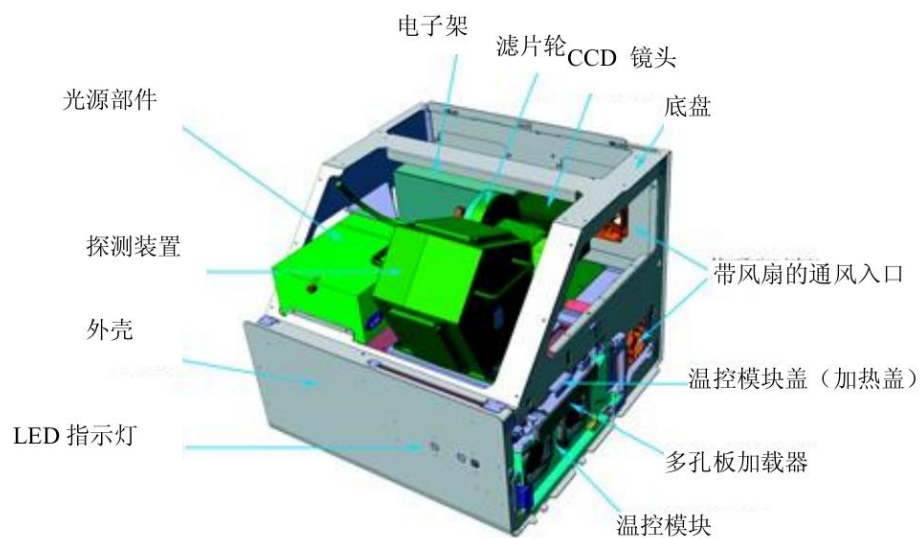
检测器



# ABI7500



# LC480



# 荧光染料的激发和发射波长

荧光素名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)
FAM	492	518
VIC	538	552
SYBR Green I	497	520



# 实时荧光PCR仪参数举例1

通道：单通道

可用染料：FAM , SYBR Green I

激发光波长：450-495nm

发射光波长：515-545nm

灵敏度：检测<5nM的荧光素

检测范围： $10^0$ — $10^8$ 拷贝

容量：96样品

均一性： $\pm 0.4$  °C

升降温速率：最高3 °C/s

温度梯度：有

荧光素名称	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
FAM	492	518
VIC	538	552
SYBR Green I	497	520



# 实时荧光PCR仪参数举例2

通道：双通道

可用染料：FAM , SYBR Green I

激发光波长：470-505nm

发射光波长：523-543nm ; 540-700nm

灵敏度：检测<5nM的荧光素

检测范围： $10^0$  — $10^{10}$ 拷贝

容量：96样品

均一性： $\pm 0.4$  °C

升降温速率：最高3 °C/s

温度梯度：有

荧光素名称	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
FAM	492	518
VIC	538	552
SYBR Green I	497	520



The LightCycler® 480 Instrument uses a Xenon reflector lamp as excitation light source. The lamp emits light in a broad wavelength range from 430 to 630 nm, making it possible to use various different fluorophores. The lamp requires a pre-warming phase of approximately 10 minutes. The lamp is shut off automatically after 10 minutes. This delay ensures that no additional pre-warming is needed

Fluorophore	Excitation Filter	Emission Filter
LightCycler® Cyan 500	440	488
SYBR Green I	465	510
Fluorescein (Fluos / FAM)	465	510
	498	580
VIC / HEX / Yellow555 / Joe	533	580
LightCycler® Red 610	533	610
	498	610
LightCycler® Red 640	498	640
Cy5 / Cy 5.5 / LightCycler® Red 705	618	660
	498	660

<b>Temperature control</b>	Peltier-based heating and cooling
<b>Temperature range</b>	37 – 95°C 20°C starting temperature to perform specific Melting Curve analysis if required
<b>Heating rate</b>	96-well block: 4.4°C/s 384-well block: 4.8°C/s
<b>Cooling rate</b>	96-well block: 2.2°C/s 384-well block: 2.5°C/s



# ABI7500和LC480参数比较

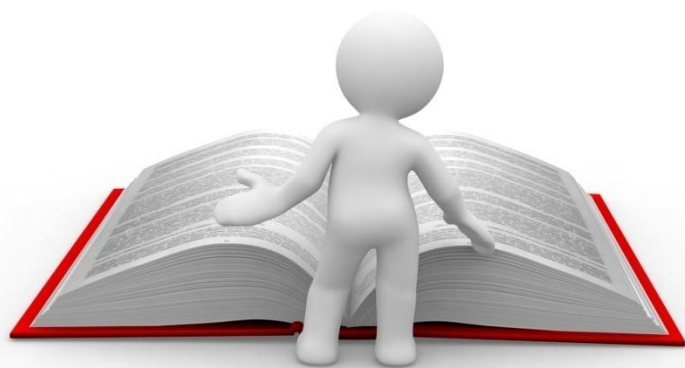
	ABI7500	LC480
光源	卤钨灯	氙灯
通道	5通道，其中一个为校正染料通道	5通道
检测器	冷CCD	CCD（CCD易有边缘效应，需加入校正染料）
滤光系统	5个激发光滤光片和5个发射光滤光片	5个激发光滤光片和5个检测端滤光片
样品通量	96	96
激发光范围	400-660nm	430-630nm
检测光范围	500-660nm	430-630nm



# 仪器维护

参照厂家说明书；

建立本实验室的维护SOP和记录



昵图网 www.nipic.com 37, 三三三三

HCN20090923145100975469



# ABI 7500维护SOP举例

目的： 保证 ABI7500 的正常使用。

维护方法：

- 开机前应检查电路是否正常。
- 定期检测光路系统。
- 每月对样品槽清洗一次： 用 95%乙醇加满样品槽，浸泡 15min，吸干；重复 3 次。用吹风机或加热功能烘干。
- 定期请工程师进行维护。

注意事项：

- 记好操作记录。
- 非本室人员使用该仪器，需在本室人员的指导下操作。关机前，应由本室人员检查仪器是否正常方可关机。操作人员和本室人员同时签字。
- 不可自行挪动仪器，不可自行拆开仪器间接口。
- 只能使用 0.2ml 薄壁管扩增，其它类型反应管的高度不可超过此管。
- 不可使用用记号笔做标记的反应管扩增。

本操作程序变更程序：如果本操作程序使用者在实际工作中发现其存在问题，则应向科室负责人提出，科室负责人则召集所有与本程序有关的人员讨论，以决定是否需要变更。

相关文件： 仪器使用说明书。



# 仪器维护/校准SOP的问题

- ❖ **责任人不明确**：计量部门？厂家？实验室工作人员？
- ❖ **没有具体的校准方法或步骤**：厂家提供、咨询计量部门、行业标准
- ❖ **没有校准合格的判断标准**：仪器设备说明书、咨询厂家、行业标准
- ❖ **没有维护和校准周期**

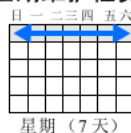


# 仪器维护

# A

## 建议维护计划

### 每星期维护任务

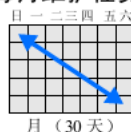


为确保您的 7300/7500 PCR 仪发挥最佳性能，每星期应执行以下维护任务：

- 归档或备份 SDS 反应板文件（参阅第 90 页）
- 关闭并打开计算机和仪器电源开关（关闭电源开关，然后重新打开计算机和仪器电源开关）
- 使用不脱毛的布块擦拭仪器表面

**重要！**切勿使用有机溶剂清洁 7300/7500 PCR 仪。

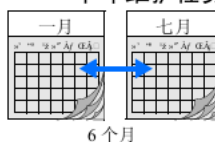
### 每月维护任务



为确保您的 7300/7500 PCR 仪发挥最佳性能，每月应执行以下维护任务：

- 执行背景校正（参阅第 39 页）
- 执行计算机硬盘碎片整理程序（参阅第 94 页）

### 半年维护任务



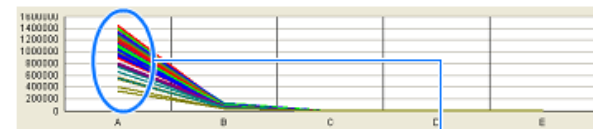
为确保您的 7300/7500 PCR 仪发挥最佳性能，每 6 个月应执行以下维护任务：

- 执行纯荧光校正（参阅第 57 页）
- 执行目标区 (ROI) 校正（参阅第 27 页）
- 访问美国应用生物系统公司网站并更新 SDS 软件（参阅第 102 页）

### 其它维护任务

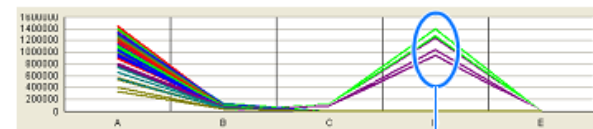
需要时执行以下维护任务，以解决遇到的问题：

- 去除样本块中的污染物（参阅第 91 页）
- 移动 7300/7500 PCR 仪（参阅第 95 页）
- 更换卤素灯（参阅第 96 页）
- 更换仪器保险丝（参阅第 99 页）
- 更新 Microsoft Windows 操作系统（参阅第 101 页）



可接受光谱

同一波长的光谱峰值而且没有明显偏离



不可接受光谱

几个不同波长的光谱峰值或根本不一致的光谱峰值



# 维护的主要方面

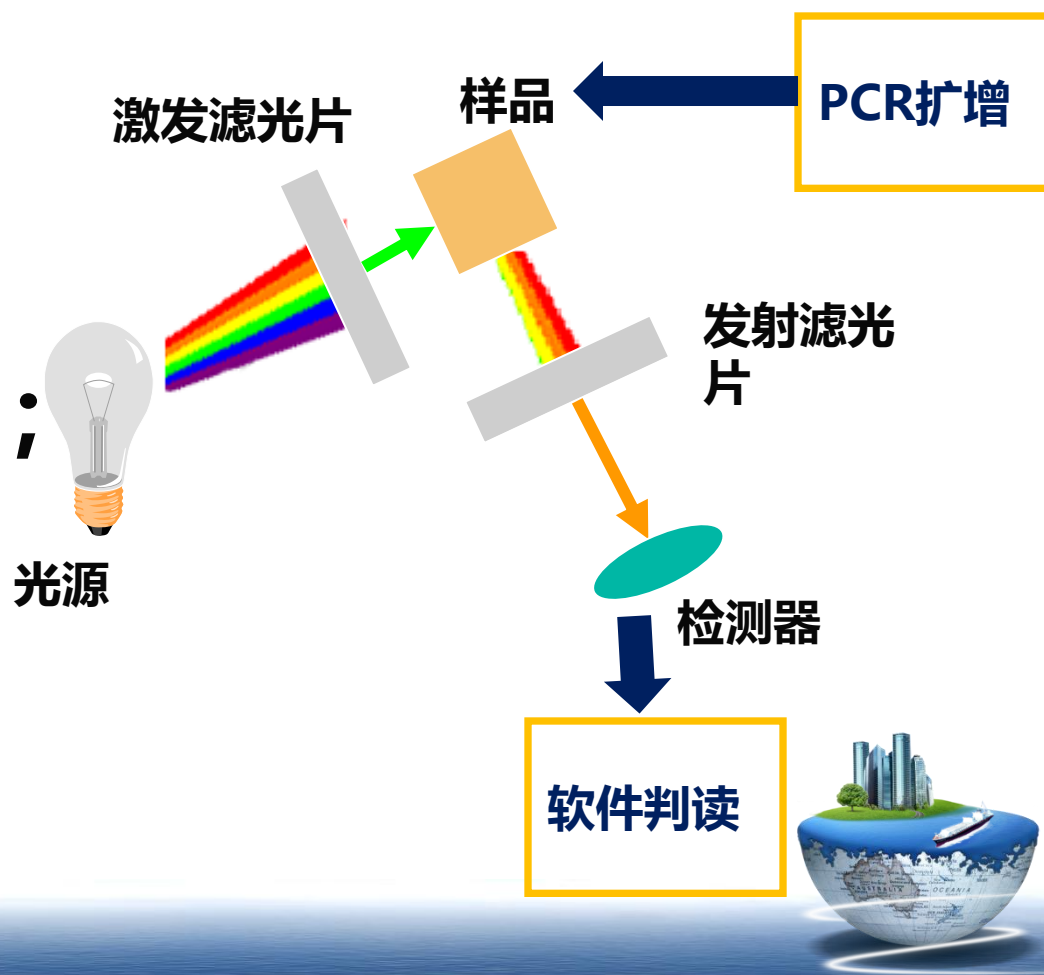
仪器的清洁（表面清洁、样本孔的清洁）；

背景校正；

荧光校正；

灯、保险丝的更换；

文件备份。





# ABI 7500维护SOP举例

表 4-3 7500 实时定量 PCR 仪日常维护的 SOP

XXXXX Center for		SOP No. XXXXX
Clinical Laboratories		共 X 页
Applied Biosystems 7500 实时定量 PCR 仪的维护		
目的	此 SOP 旨在规范 Applied Biosystems 7500 PCR 仪日常维护的方法及频率	
范围	此 SOP 适用于已通过适当培训的 XX 实验操作人员。	
设备与材料	<ul style="list-style-type: none"><li>● 去离子水</li><li>● 无粉手套</li><li>● 棉花或尼龙拭子和不脱毛布块</li><li>● 95%乙醇溶液</li><li>● 10%次氯酸钠溶液</li><li>● 加样器吸头</li><li>● Applied Biosystems 7500 PCR 仪光谱校正套件</li><li>● 背景反应板</li><li>● 安全防护目镜</li><li>● 配备反应板转接器的离心机</li></ul>	
	周维护	
1	归档或备份 SDS 反应板文件 <ul style="list-style-type: none"><li>● 使用数据压缩程序将 7500 PCR 仪生成的 SDS 文件压缩并归档于 XX 盘 XX 目录下 XX 文件夹。</li></ul>	
2	关闭并打开计算机和仪器电源开关 <ul style="list-style-type: none"><li>● 关闭电源开关，然后重新打开计算机和仪器电源开关</li></ul>	
3	使用不脱毛的布块擦拭仪器表面 <ul style="list-style-type: none"><li>● 勿使用有机溶剂清洁 7500 PCR 仪</li></ul>	
	月维护	
1	执行背景校正 <ul style="list-style-type: none"><li>● 操作人员带上无粉手套</li><li>● 从冰箱中取出光谱校正套件，并从套件内取出预先准备好的背景反应板。</li><li>● 将光谱校正套件放回冰箱。</li><li>● 平衡背景反应板至室温。</li><li>● 将背景反应板置入带有反应板转接器的离心机短暂离心</li></ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 确保背景反应板每个孔中的 PCR 缓冲液均位于反应孔底部。如果不是，再次离心。</li> <li>● 创建反应板文件。</li> <li>● New Document</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> Assay 选择 Background Conrainer 选择 96-Well Clear Template 选择 Blank Document Operator 中输入操作人员姓名 Comments 中输入反应板条码 Default Plate Name 中输入 Background MMDDYY(月日年)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 保存文件。</li> <li>● 将背景反应板装入反应板架。</li> <li>● 在 SDS 软件中，选择 Instrument 选项卡，单击 Start 开始运行。</li> <li>● 当程序运行完毕，单击 OK，取出背景反应板。</li> <li>● 将背景反应板放入包装袋，并装回光谱校正套件。</li> <li>● 在 SDS 软件中，选择 Analysis，然后选择 Extract Background。</li> <li>● 背景提取完成，单击 OK。</li> <li>● 在反应板文件中，选择 Results 选项卡，然后选择 Spectra 选项卡。</li> <li>● 选择反应板文件的所有反应孔。</li> <li>● 查看原始数据中是否有超过 72,000 荧光标准单位（FSU）的异常光谱峰值，如果有，则说明背景反应板或样本块中含有污染物。（选择反应板文件中一块连续的较小区域，找出包含污染物的反应孔位置。）</li> <li>● 关闭软件，完成背景校正。</li> <li>● 执行附加荧光校正。</li> </ul>
	2 执行计算机硬盘碎片整理程序 <ul style="list-style-type: none"> <li>● 鼠标右键单击本地磁盘，选择属性。</li> <li>● 进入工具选项卡，在碎片整理选项中点击开始整理。</li> </ul>
3	清洁样本块 <ul style="list-style-type: none"> <li>● 关闭 7500 PCR 仪电源开关，并拔下电源插头，让仪器冷却 15 分钟。</li> <li>● 将薄型螺丝刀插入检查门边缘处的键销孔内，打开检查门。</li> <li>● 将受热的护盖门移到仪器的背面。</li> </ul>



# ABI 7500维护SOP举例

## ABI 7500 PCR 扩增仪维护记录

仪器编号： 275007117

时间： 年 月

日维护项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1. 归档或备份实验数据 (.sds 文件)																															
2. 关闭仪器电源和计算机 开关，然后重新打开																															
3. 用不脱毛的软布擦拭仪 器表面（严禁用有机溶剂）																															
操作者签名（缩写）																															

月维护项目	日期	操作者签名	半年维护项目	日期	操作者签名
1. 执行背景校正			1. 执行纯荧光校正		
2. 执行计算机硬盘碎片整理			2. 执行目标区 (ROI) 校正		

其他维护项目（按需）	日期	工程师签名	审核人签名			
1. 去除样本块中的污染物						
2. 更换卤素灯						
3. 更换仪器保险丝						



# 测序仪



# 3500DX的维护记录

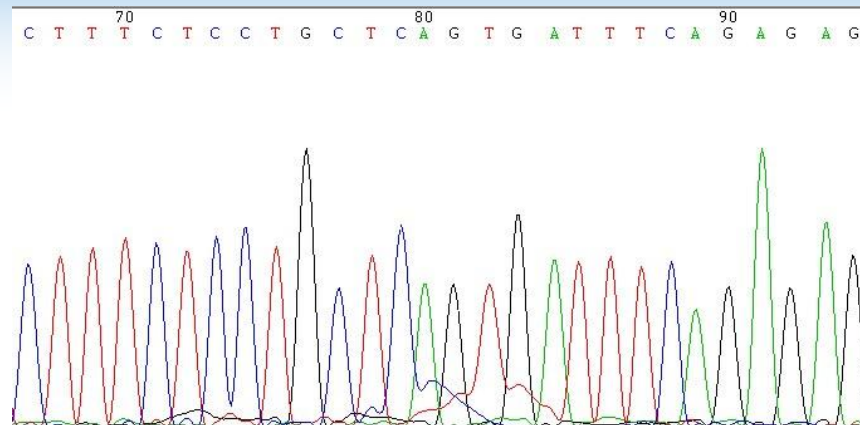
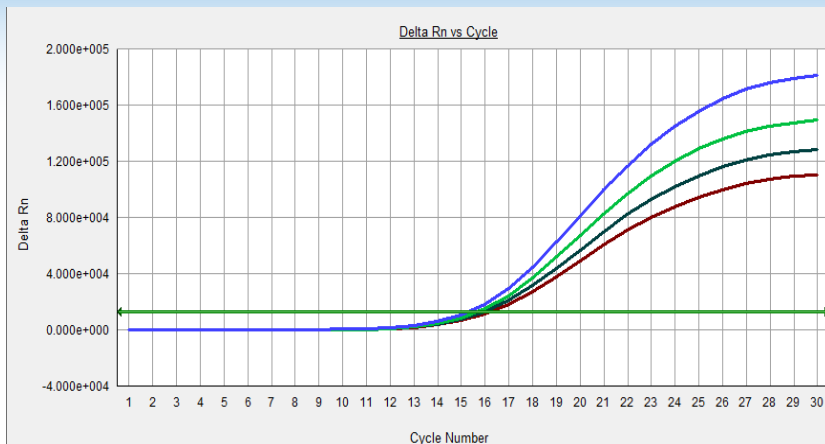


## 3500 DX Genetic Analyzer 维护记录

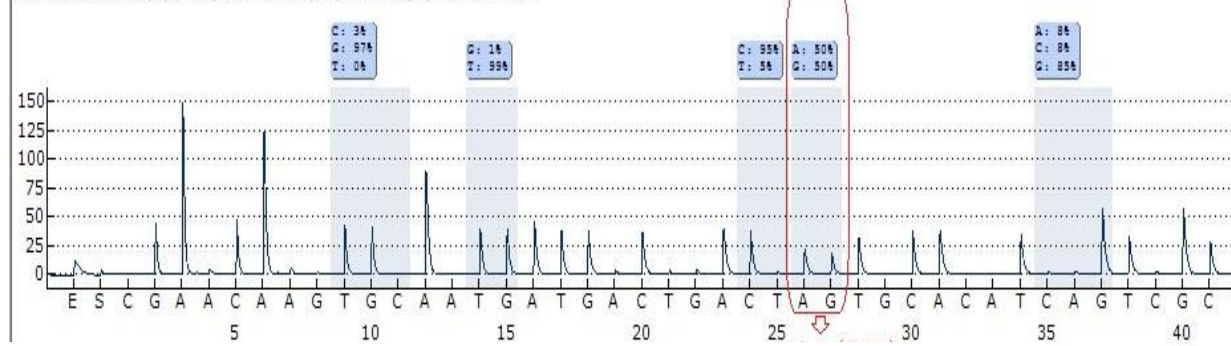
仪器编号: 275007117  
时间: 年 月

日维护项目	日期																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1.运行前检查block有无气泡																															
2.毛细管两端是否浸泡在缓冲液中																															
3.Septer 使用后用超纯水润洗后晾干待用																															
4.清洁仪器表面																															
操作者签名（缩写）																															
周维护项目	第一周			第二周			第三周			第四周			月维护项目			日期			操作者签名												
1.更换阴、阳极缓冲液													清洗 pump block																		
2.清洗水密封													按需维护项目			日期			操作者签名												
3.更换 POP7 胶（按需要）													1. 更换毛细管																		
4.向毛细管内灌 1~2 次胶													2. 空间定位																		
操作者签名													3. 光谱校准																		

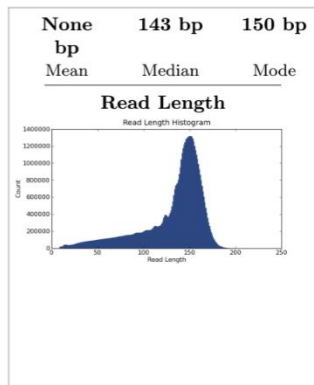
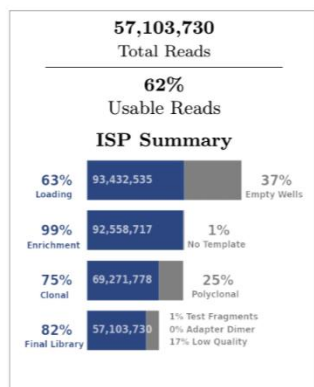
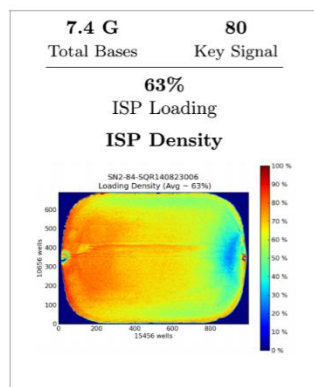




A5 GAAACAAATG/T/CAAT/GGATGCAC/TA/GTCATG/A/CGTGGCTGG



## Run Summary



42	43	44	53	66	73	83	MM4	编号
6	11	16	18	31	33	35	39	16
45	51	52	56	58	59	68	PC	HPV







# 三个要点

**清洁！**

**定期校准！**

**建立维护和操作SOP！**





# 离心机

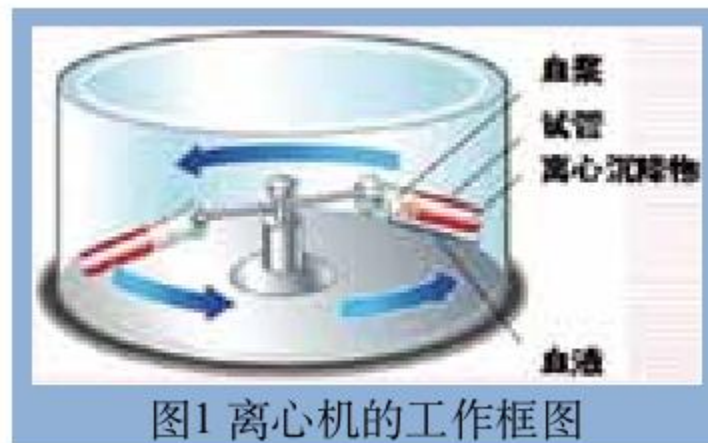


# 工作原理

离心机对旋转颗粒进行沉降分离的物理学基础是通过离心力对旋转颗粒的作用。

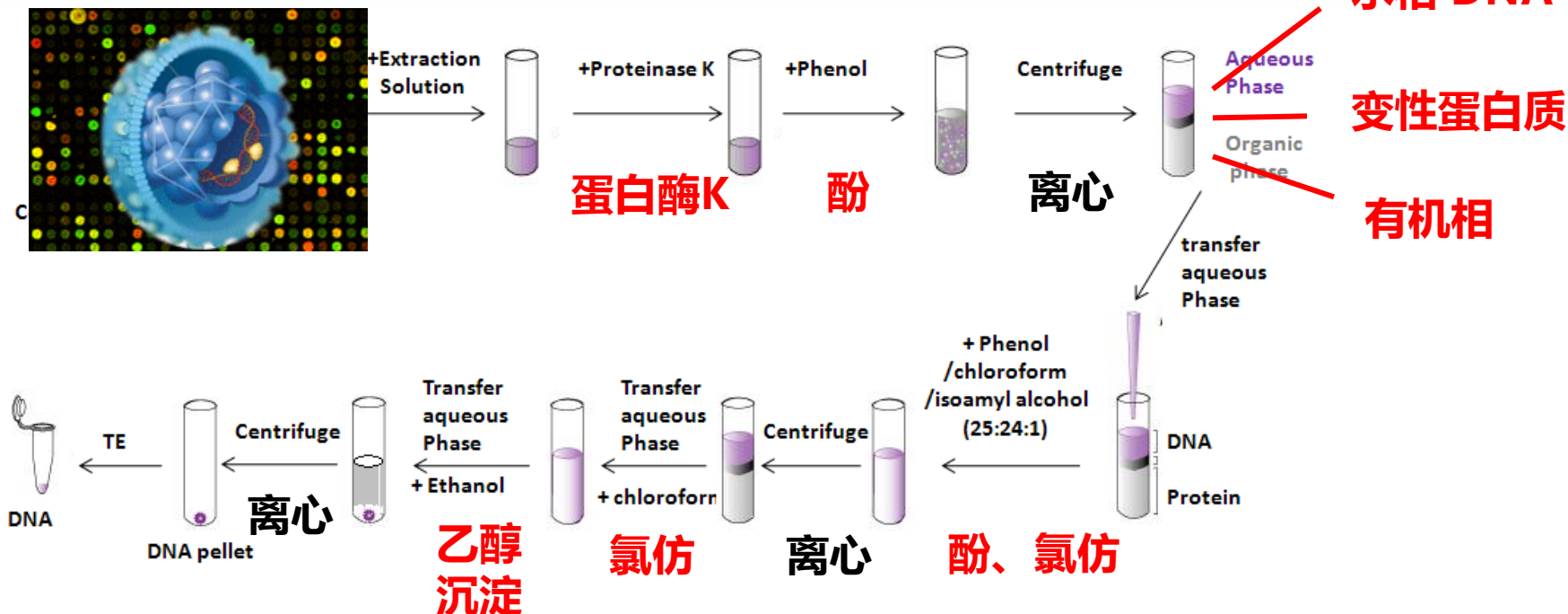
当将样品放入离心机转头的离心管内，离心机驱动时，样品液就随离心管做匀速圆周运动，于是就产生了一个向外的离心力。

旋转区域的半径越大和旋转的速度越快，则离心力越大，颗粒沉降亦越快。



# 工作原理

密度排序：  
水 < 变性蛋白质 < 有机相

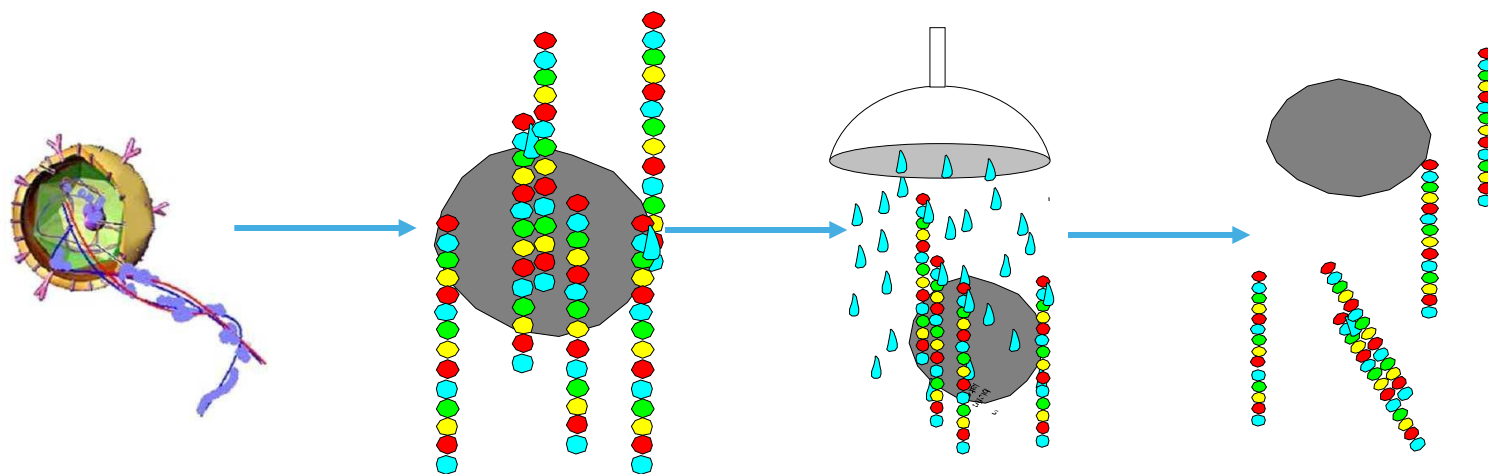
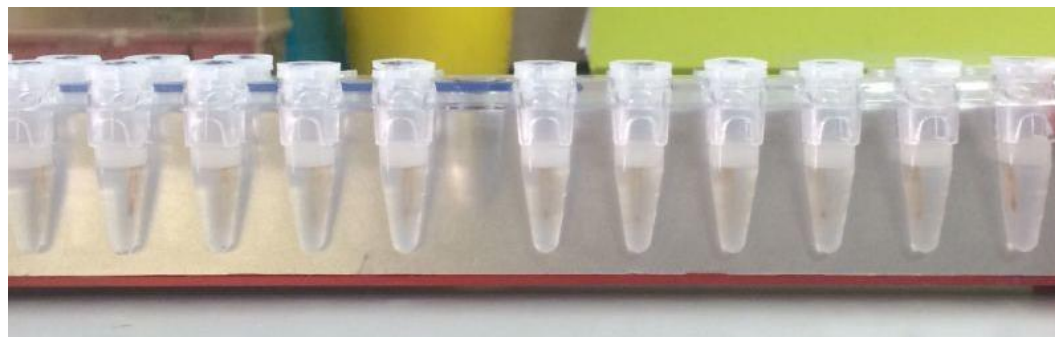


由于不同颗粒的质量、密度、大小及形状等彼此各不相同，在同一固定大小的离心场中沉降速度也就不相同，颗粒沉降的顺序由颗粒密度的大小所决定，密度越大越先沉降，由此便可以得到相互间的分离。如密度低于水，则会浮在液体的上面。



# 常用的核酸提取方法

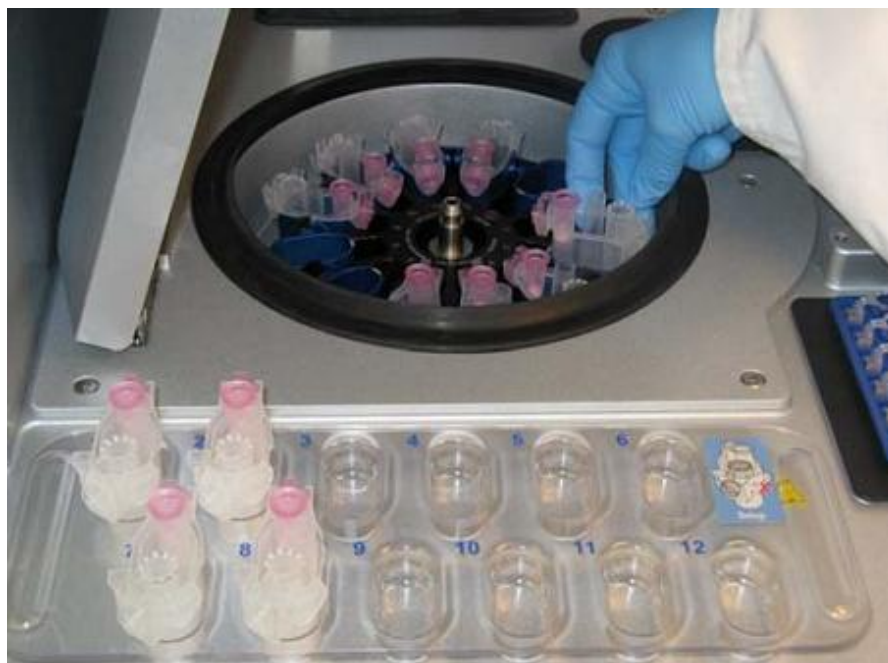
- ❖ 煮沸法
- ❖ 磁珠法
- ❖ 柱提法



❖ 煮沸法

❖ 磁珠法

❖ 柱提法





# 分类

温度：常温离心机

冷冻离心机





# 分类

外形：台式离心机      落地式离心机



# 分类

转速：

**低速离心机** <8000rpm

血液或细胞制备、蛋白质和酶沉淀物的分离；

**高速离心机** 8000 ~ 30000rpm

分离病毒、细菌、细胞核、细胞膜、线粒体以及DNA制备；

**超速离心机** 30000 ~ 80000 rpm

**超高速离心机** > 80000 rpm

分子量测定、蛋白质结构及其聚集状态分析和化合物纯度  
检定



# rpm/rcf?

**rpm:转/分钟**

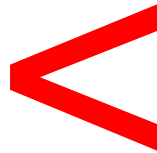
**rcf : 相对离心力**



# rpm/rcf?

离心半径不同，相同的rpm，产生不同的离心力

$$F = m\omega^2 r$$



# rcf:相对离心力

$$R_{cf} = F/P \text{ (重力)}$$

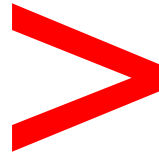
$$= m\omega^2 r / mg$$

$$= 11.18 \times r(\text{离心半径}) \times (\text{转速}/1000)^2$$

如转子速度为5,000 rpm，旋转半径为4cm时，  
相对离心力RCF值约为1,100 g。



Q:要实现相同的rcf,哪一台离心机的rpm（每分钟转速）更高？



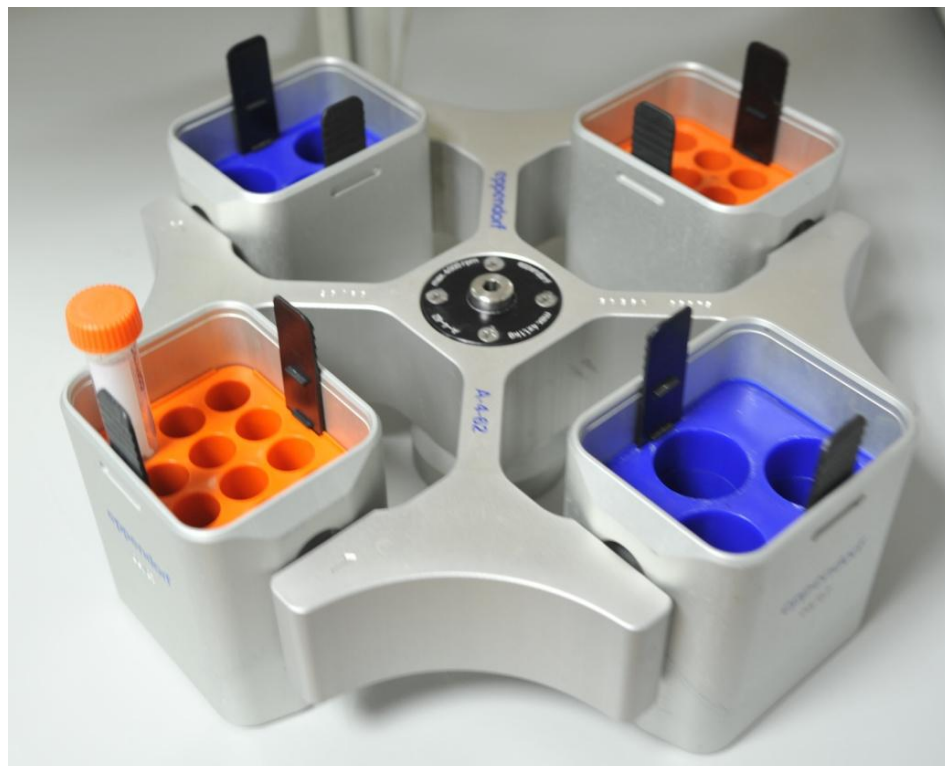


# 转子

## 角转子



## 水平转子



# 转子

离心机的核心部件

离心机：主机+转子

主轴与转子的配合：

转子拆装方便

最高转速  
12000rpm



# 角转子

可保持固定的角速度离心。

转速较高。

离心后沉淀位于管底的斜面。

必须加盖。



# 角转子

**气密性转子**：密闭转子内存放生物性物质如细菌等的试管意外破裂，运行时确保气溶胶和其它危险性样品未从密闭转子内泄漏。

**可高压灭菌。**





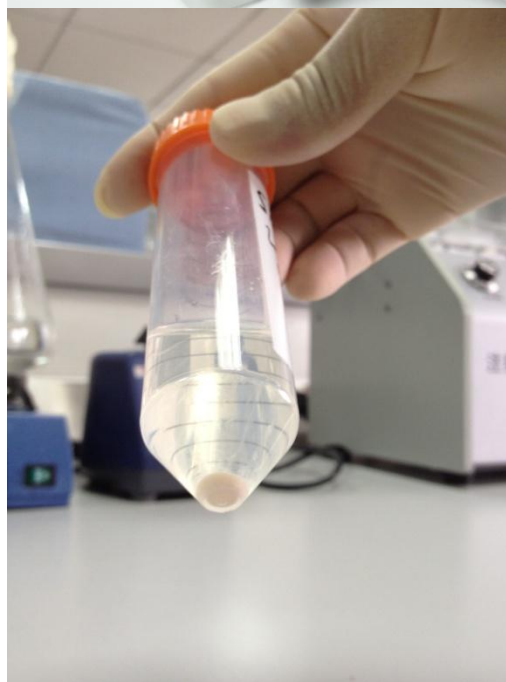
# 水平转子

2个或4个吊篮

不如角转子稳固，转速较低。

当超过600rpm时，离心管达到水平位置。

离心后沉淀沉降在管底。



最高转速  
4000rpm



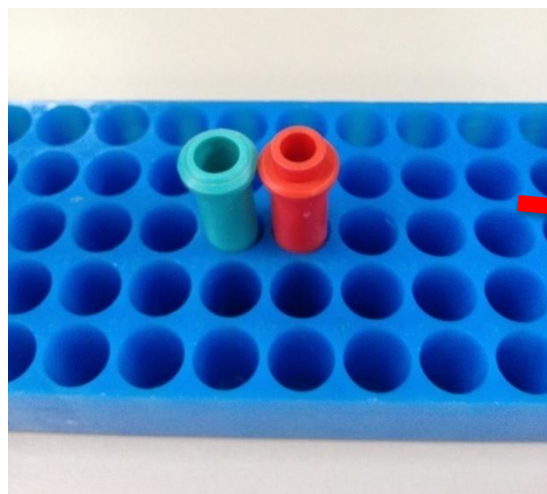
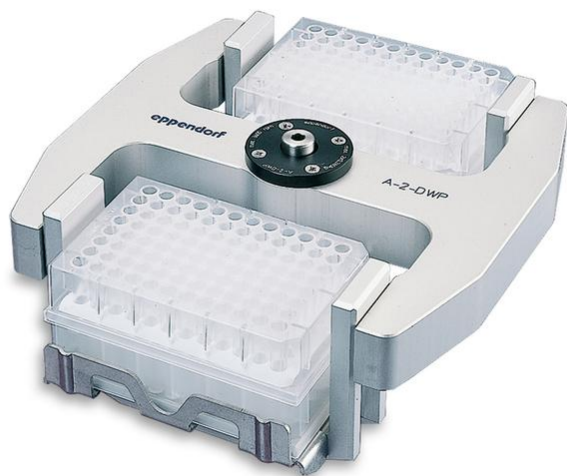
# 鼓型转子

在**较大的相对离心力**下  
进行水平离心。  
离心后沉淀沉降在**管底**。

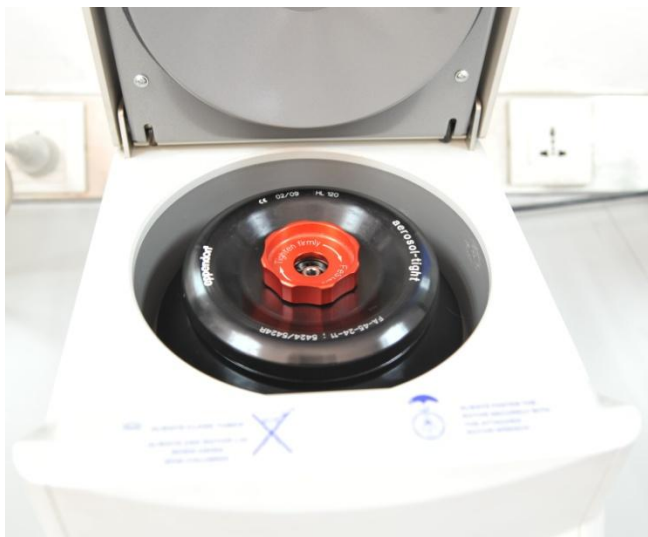




# 吊篮和适配器



# 需要了解的离心机参数



**转子：**最高转速（rpm）、最大相对离心力（rcf）、离心半径（cm）

**转子盖：**气密性？可高压灭菌？

**适配器：**可放置容器的尺寸(直径和长度)，0.2ml/0.5ml/1.5ml.....

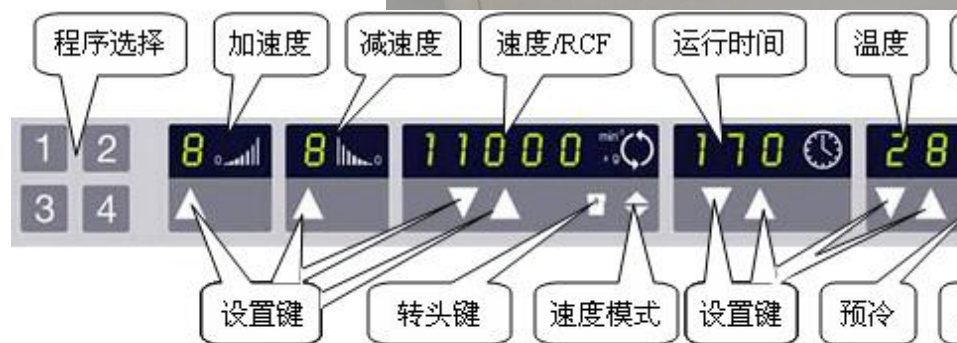
**吊篮：**可承受的最大重量？可高压灭菌？

**温度控制范围：**-9℃—40℃ 冷冻？

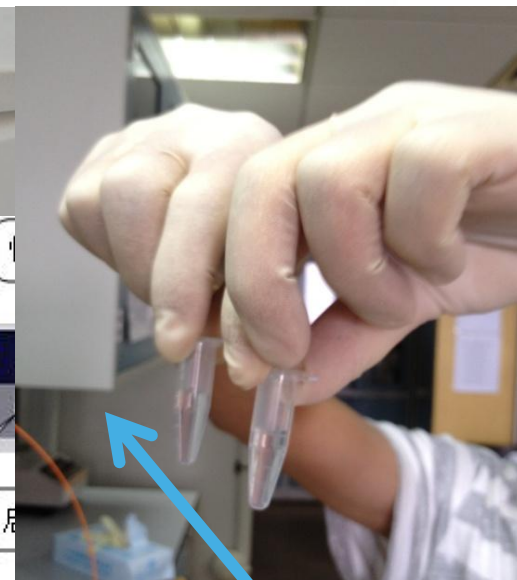


# 使用方法

阅读使用说明书



离心机控制面板及功能



**启动**

**清洁！平衡至室温后，盖上机盖！**



# 操作注意事项

## 离心机的放置和运行环境：

在离心机投入使用前，或移动过位置以及长时间离心后，必须进行离心机水平调整，否则会引起转头运转严重不平衡（**水平放置**）；

距墙10cm以上，并保持良好的通风环境，免受热源和太阳光线的直接照射，室内温度不宜超过30℃，否则会影响冷冻离心机制冷效果。



# 操作注意事项

**离心管：**

**材质：玻璃、塑料？**

**需能够承受相应的离心力并大小合适**

**平衡：1.5ml EP管，目测即可；大型离心机上需**

**天平称量！**

**平衡非常重要！**





# 操作注意事项

## 转子：

按照厂家要求更换；

转速的确认；

转子盖盖紧；

如果转头或盖子有可见的腐蚀或磨损的痕迹，则应立即停止使用；

如果发生转子盖难以盖上或者难以将转子锁定在离心机上的情况，不要再使用该转子。





# 操作注意事项

**使用过程中：**

**不要人为地打开离心机盖子，任何时候不可开盖使用离心机（自动锁）**

**紧急开盖：**离心机发生剧烈振动

**需切断电源，待转头停转后，再开盖！**

**而不是按下“停止键”！**



# 操作注意事项

**使用完毕：**

**清洁！**

**冷冻离心机不使用时，关闭电源，打开舱门，使湿气可以蒸发。**



# 维护和保养

转头应定期清洗和消毒。擦拭离心机腔时动作要轻，以免损坏机腔内温度感应器（**使用厂家推荐的消毒剂，不要使用次氯酸钠！**）。

可以用高压消毒的转头，应在清洗后，121℃消毒20分钟，转头务必平放，并不受挤压，以免变形。

每次操作完毕；应作好使用情况记录，并定期对机器各项性能进行检修。

离心过程中若发现异常现象，应立即关闭电源，报请有关技术人员检修。



# 三个要点

**平衡！**

**清洁！**

**建立维护和操作SOP!**



# 生物安全柜



# 生物安全柜

是一种负压过滤排风柜。

在生物安全实验室里，操作危害性生物样本过程中，利用负压过滤技术，保护操作人员、样本和环境。





# 原理及结构



柜内循环的空气，  
经送风过滤器过滤  
后，洁净，可保护  
样本。

气幕和柜内的负  
压可以阻止气溶  
胶外泄。

污染空气经排风过  
滤器排出柜外，以  
保护环境。

安全柜内的所有生物污  
染部位均处于负压状态  
或者被负压通道和负压  
通风系统环绕。



生物安全柜侧视图



# 生物安全柜的分级

级别	型别	吸入口风速	循环空气比例	保护对象
I		$\geq 0.40$ m/s		操作者、环境
II	A1	$\geq 0.38$ m/s	70	操作者、环境、样本
	A2	$\geq 0.50$ m/s	70	
	B1	$\geq 0.50$ m/s	30	
	B2	$\geq 0.50$ m/s	0	
III		$\geq 0.70$ m/s	0	首先是操作者，有时兼顾样本





生物安全柜

超净工作台



通风橱



# 三种设备比较

设备名称	气流方向	HAPA/位置	保护对象	操作对象
生物安全柜	由外向内	有/出风口	操作者样本环境	感染性材料
超净工作台	由内向外	有/进风口	实验样本	无感染性材料
通风橱	由外向内	无	操作者	挥发性有害物

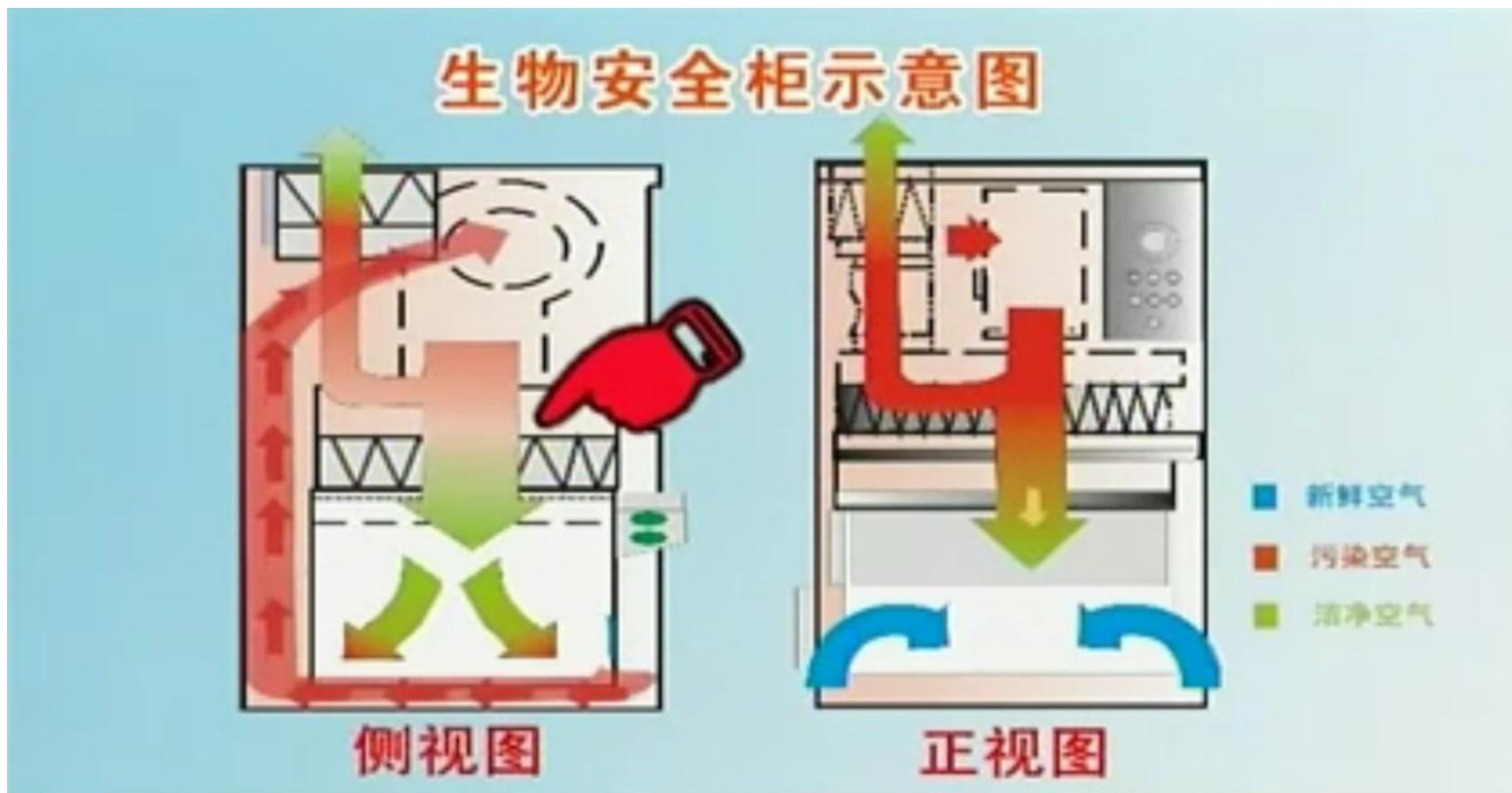


# II 级生物安全柜

设备名称	工作区循环风比例	外排空气去向	保护对象
A1	70%	室内	偏低
A2	70%	室外或室内	高
B1	30%	室外	高
B2	0	室外	很高



# 以A2为例生物安全柜原理示意





# 生物安全柜的安装

**安装和维修需由有资质的专业技术人员进行；**  
**避免操作口正对门、窗或安装在人员必经的**  
**通道处（气流稳定）；**  
**如有定向气流，安装在出风口处；**  
**如安全柜气流排到室外，应有防止气流倒灌**  
**的装置。**



# 生物安全柜物品的摆放原则

干净的物品

被污染的  
操作区域

废弃物



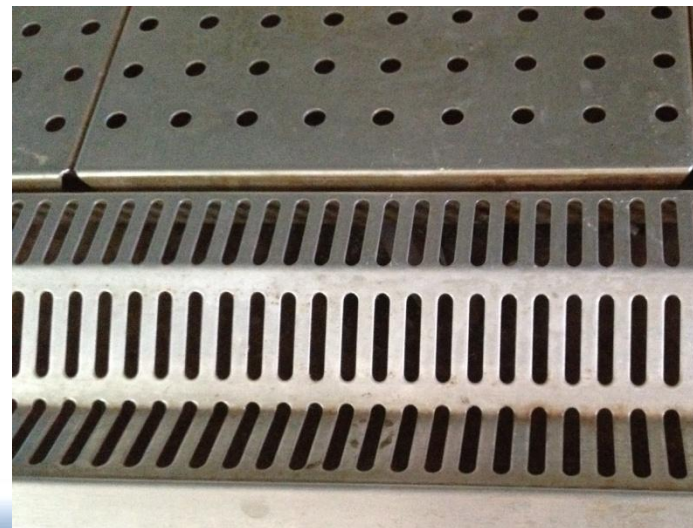
# 生物安全柜操作注意事项

- ❖ 座椅的高度保证脸部在工作窗口之上；
- ❖ 先运转生物安全柜5-10分钟；
- ❖ 污染物品需经处理后再拿出安全柜。
- ❖ 需定期进行性能检测。长期不用、搬动、维修后都需进行性能检测合格后方能使用。



# 生物安全柜操作注意事项

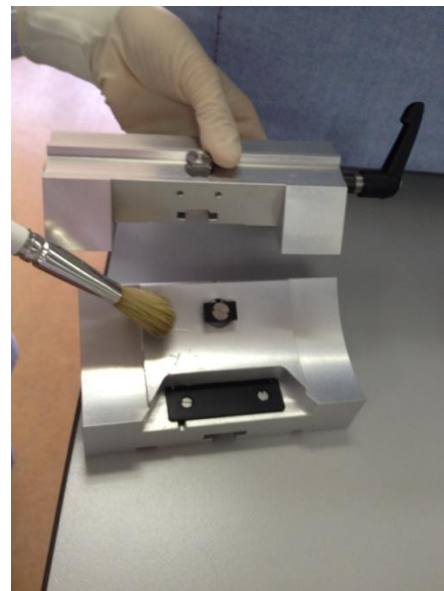
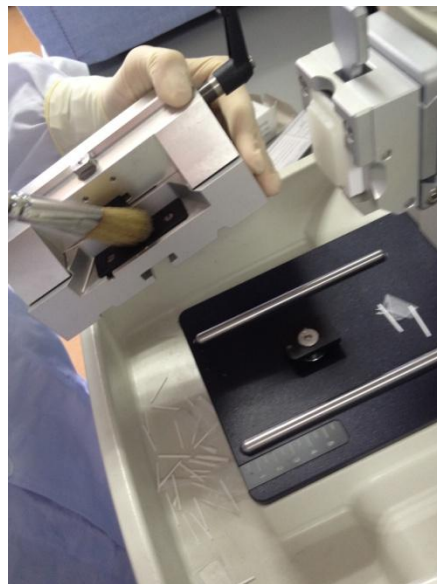
- ❖ 生物安全柜仅防范气溶胶引起操作者感染危险。
- ❖ 操作过程中严禁物品等遮盖进气隔栅，破坏气流平衡。
- ❖ 生物安全柜内禁止使用酒精灯。



# 切片机







更换刀片!







**Thank You !**