

WAVEMAKER™ Software Version 4.1.44 Manual

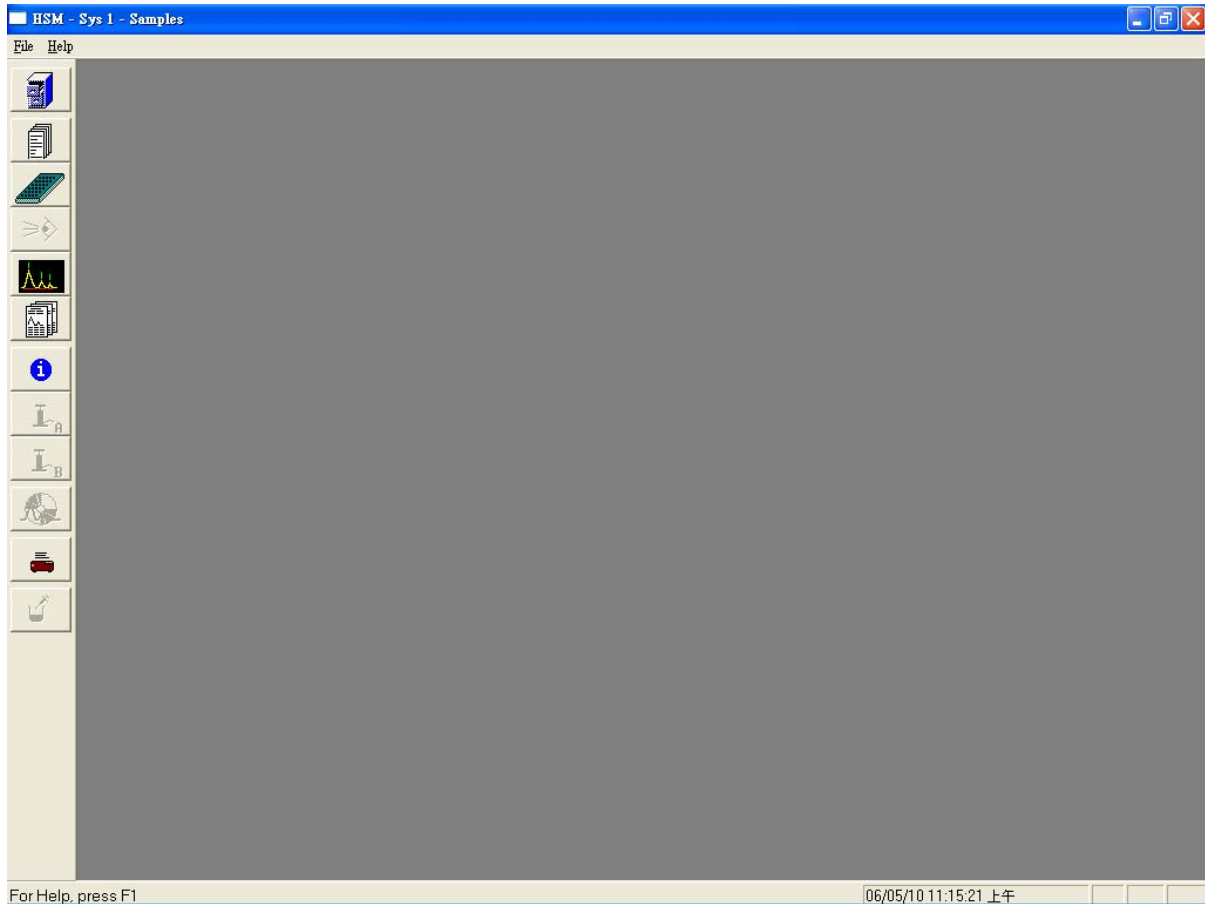
一. Installation


Requirements: Windows NT Version 4.0 , WAVEMAKER Software Version 4.1.44 。

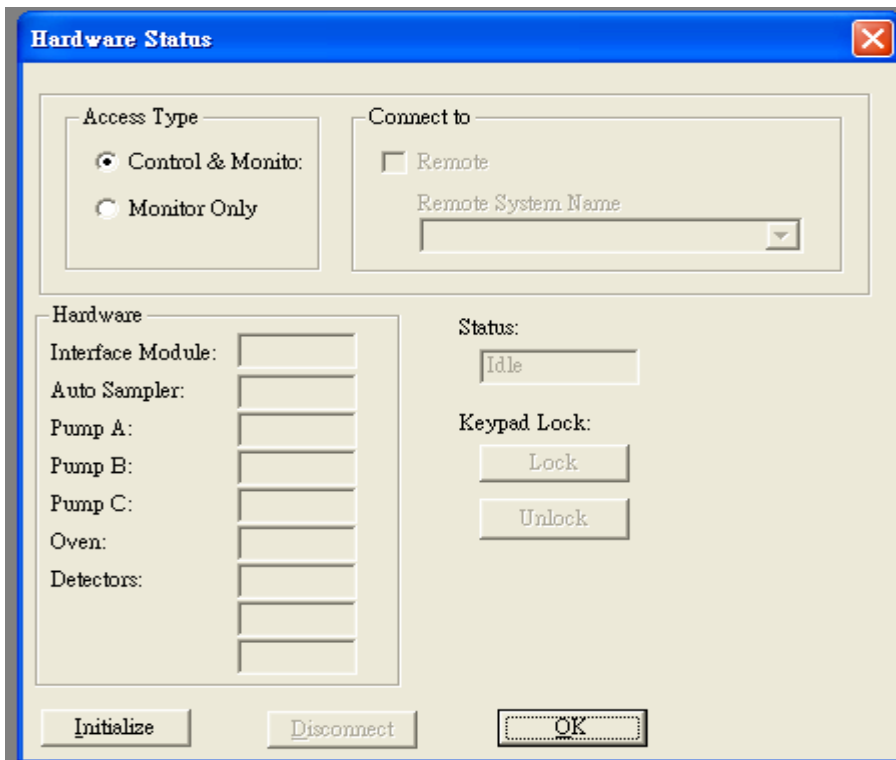
WAVEMaker Version 4.1.44 為一張光碟片，先安裝 D-7000 HSM administration，再安裝 D-7000 HSM，之後使用 Setup.exe 進行 WAVEMAKER 安裝程序，輸入 User Name 及 Serial Number 之後將重新開機。首次啟動時請放入原版光碟片。

二. Getting Started

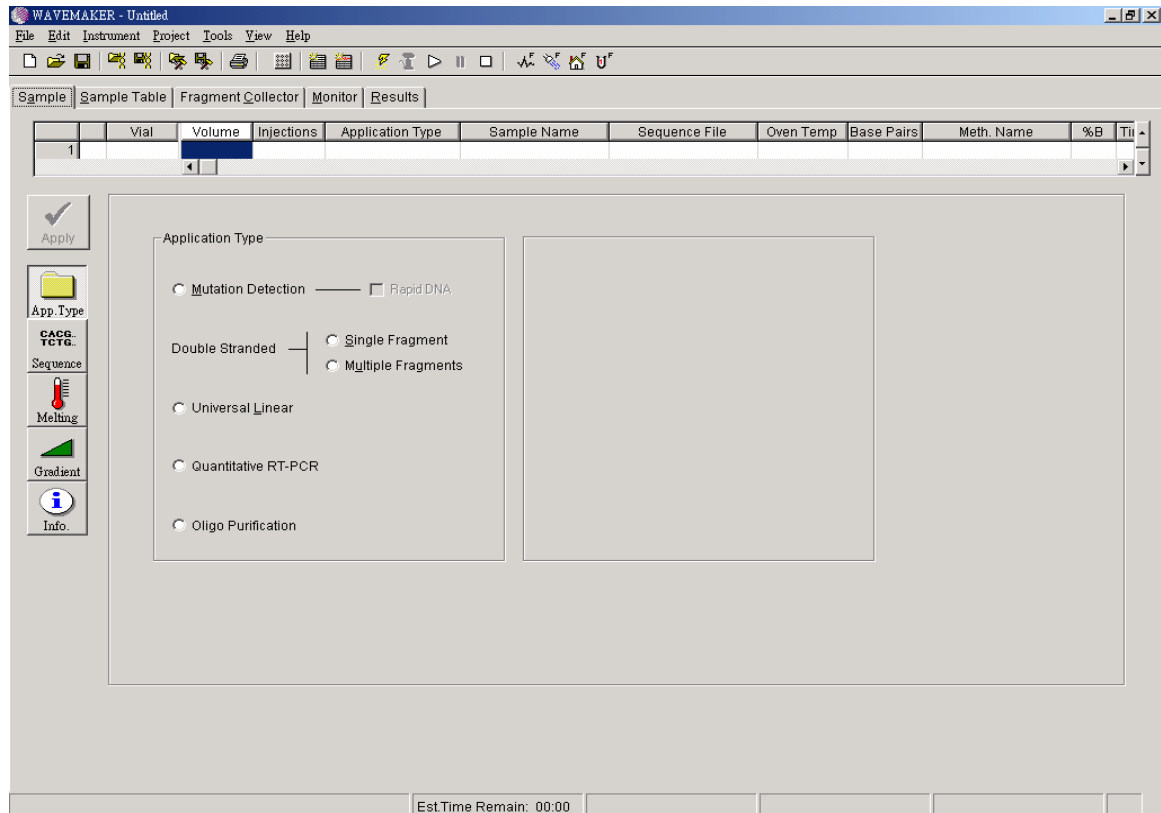
先點選 Transgenomic WAVE 檔案夾中 D 7000 HSM，開啟後如下圖：



在左側 Main Tool Bar 中，點選  後，進入下方畫面按下 **initialize** 進行連線，完成後按 **OK** 即可。關閉 D-7000 HSM 視窗，避免系統認為有雙重控制軟體。



開啟 WAVEMaker Software 進入 WAVEMaker 後畫面如下：



三. Perform the Universal Linear Gradient/Column Calibration Application

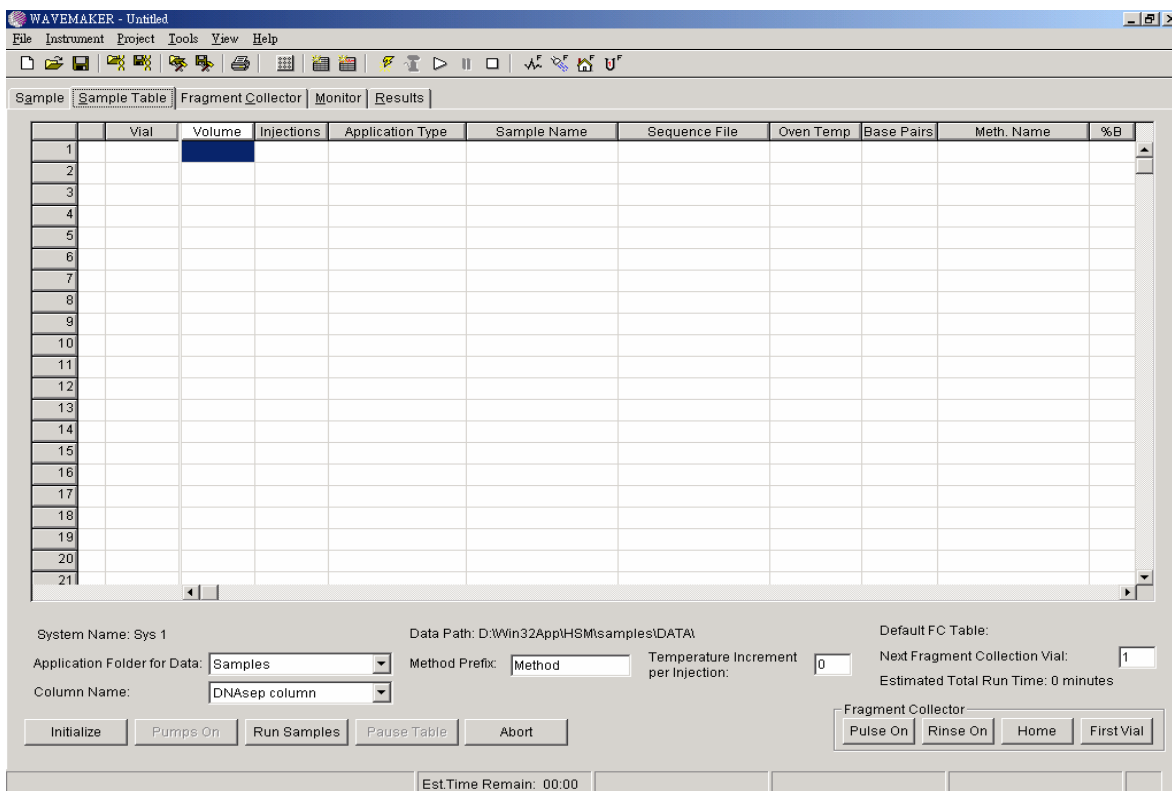
由於此項軟體的預測準確性與儀器的穩定度及 DNasep Cartridge 的品質有很大的關係，因此於下列情形下需即時進行校正：

1. After installing a new cartridge。
2. If samples are consistently eluting early or late。

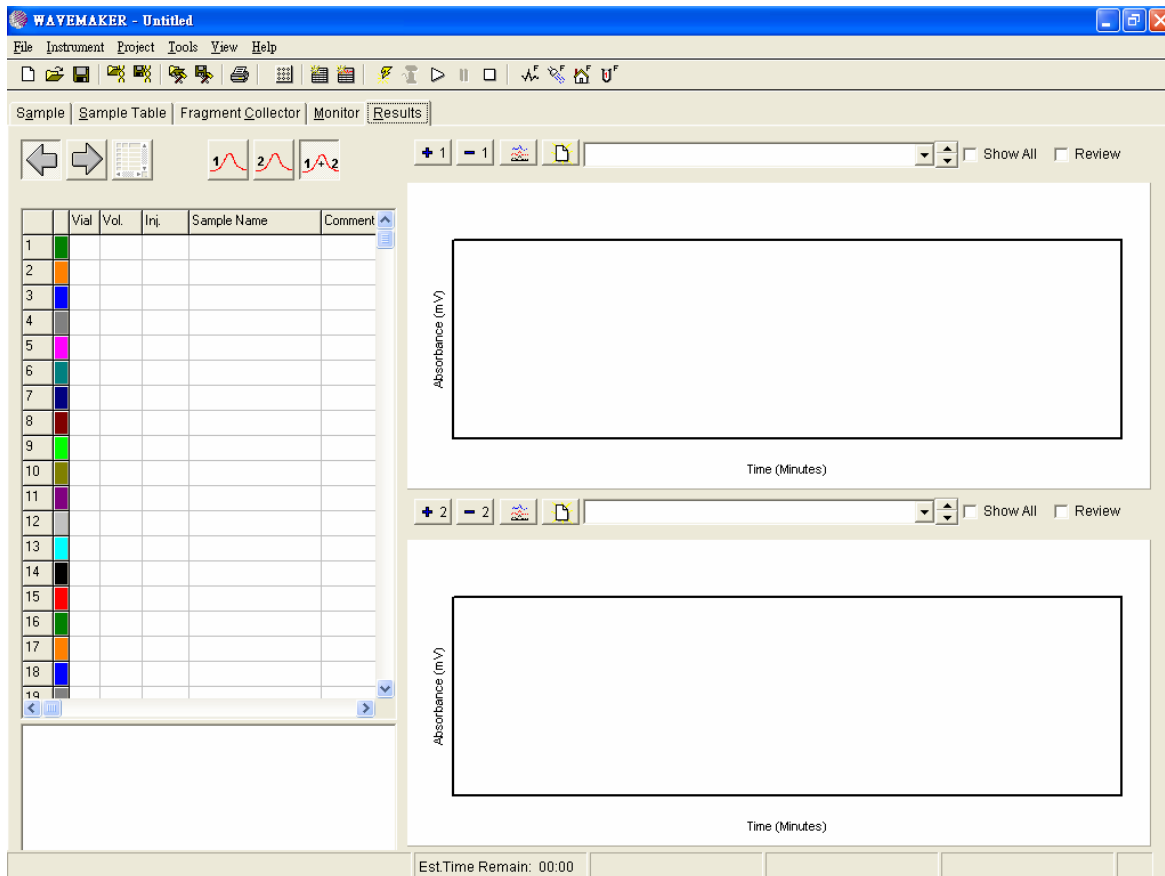
建議每次程式啟動後皆輸入校正值。

A. 校正值取得：

1. 使用確認過之 DNA molecular weight markers。
Transgenomic Sizing Standard (pUC18 HaeIII digest fragment)
2. 在主螢幕之下選擇 **Sample** page 的 **Application Type** page。
3. 選擇 **Universal linear** 選項，軟體會自動設定所需條件。
4. 在上方 Navigator bar 內填入所要抽取之樣品位置 (**Vial Number**) 及抽取量 (**Volume**)，樣品名稱 (**Sample Name**)，其它欄位程式會自行給定，不需修改。
5. 進入 **Sample Table** page，在 Application Folder for Data 欄中選擇 Data 要儲存的位置。

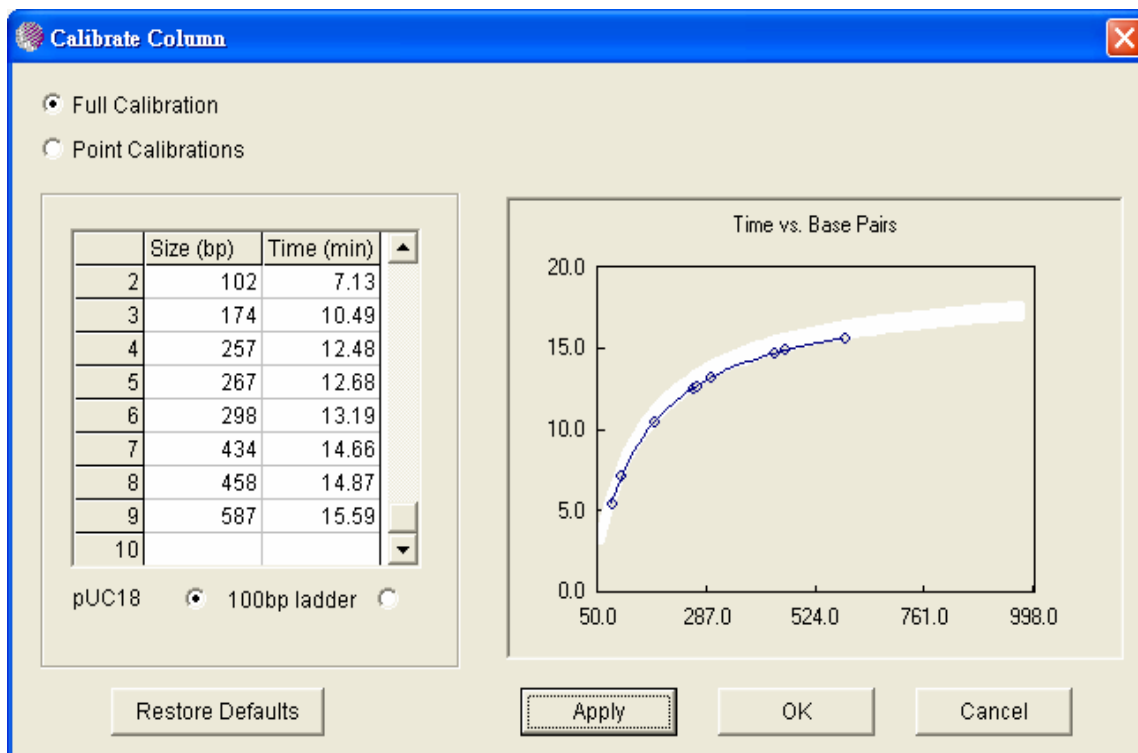


6. 選擇 **Run Sample**，結果將顯示在 Results page。點選 **Toggle chat** 可顯示數據。



B. 校正值輸入：

1. 取得校正值後，從螢幕上方的 Menu 選項，選 **Instrument/ Calibrate**。

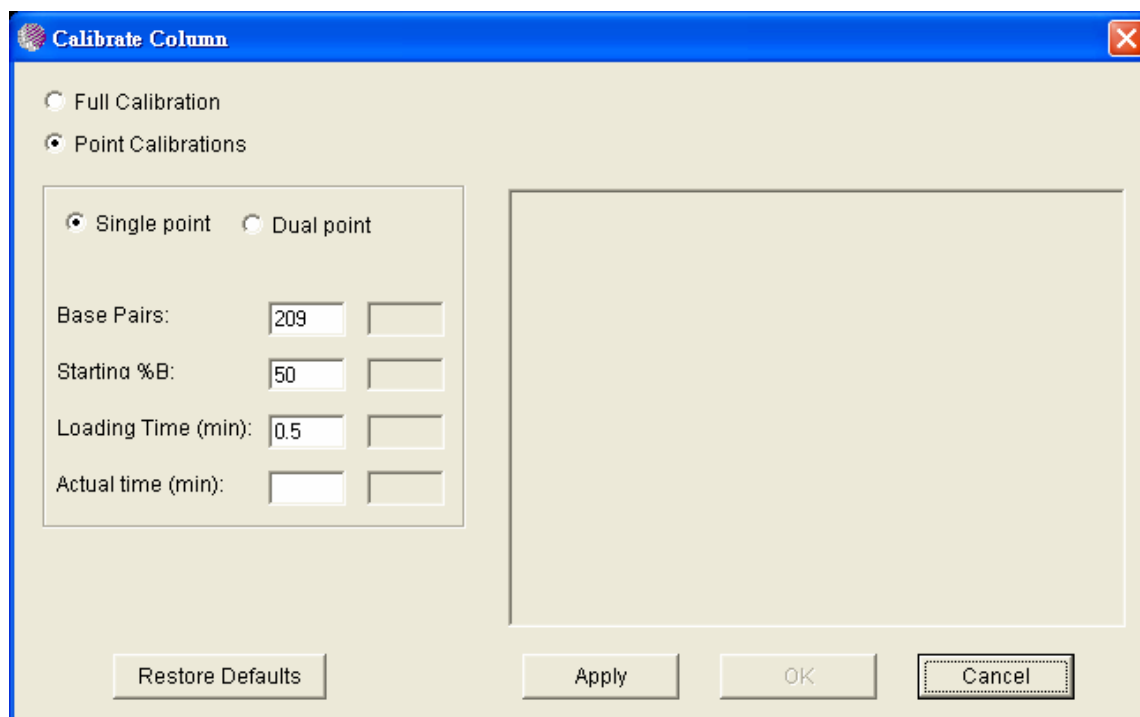


2. 點選 Full Calibration，pUC18 選項。
3. 輸入與 Fragment size 相對應的 corresponding retention time。
4. 按 **Apply** 鍵，此時其校正值將儲存並用於實驗 Gradient 設定。本程式能記憶數值，但再次進入本視窗時，無論是否取得新的校正值，請務必輸入一組數值，否則數值將回復成出廠的預設值，影響結果。

C. Single/ Dual Point Calibration

利用 1~2 個已知長度 DNA 片段進行儀器的 Single Point 校正，步驟如下：

1. 進入 WAVEMaker 後選擇 Sample page 的 Application Type page。
2. 選擇 **Universal liner** 選項，軟體會自動設定所需條件。
3. 在上方 Navigator bar 內填入所要抽取之樣品位置(Vial Number)及抽取量(Volume)，樣品名稱(Sample Name)，此時其它欄位程式會自行給定，不需修改。
4. 進入 Sample Table page，在 Application Folder For Data 欄中確認 Data 所要儲存的位置，選擇 **Run Sample**，結果將顯示在 Results page。
5. 完成分析後，從螢幕上方的 Menu 選項，選 **Instrument/ Calibrate**。



6. 進入後選擇 **Point Calibration** 項目，點選 **Single Point**。
7. 輸入 DNA 片段長度，起始時 BufferB 的比例，Sample 注入的時間，並鍵入 Peak 出現的實際時間後，按 **Apply**。
8. 選擇 **OK** 儲存數值，或選擇 **Restore Defaults** 恢復成原始設定值。

若有兩個 DNA 片段，且長度相差超過 50%，可進行儀器的 Dual Point 校正。步驟如下：

1. 重覆上述 step 1~2。
2. 放進第二個 standard 後，在 Sample Page 上方 Navigator bar 內填入第二個 standard

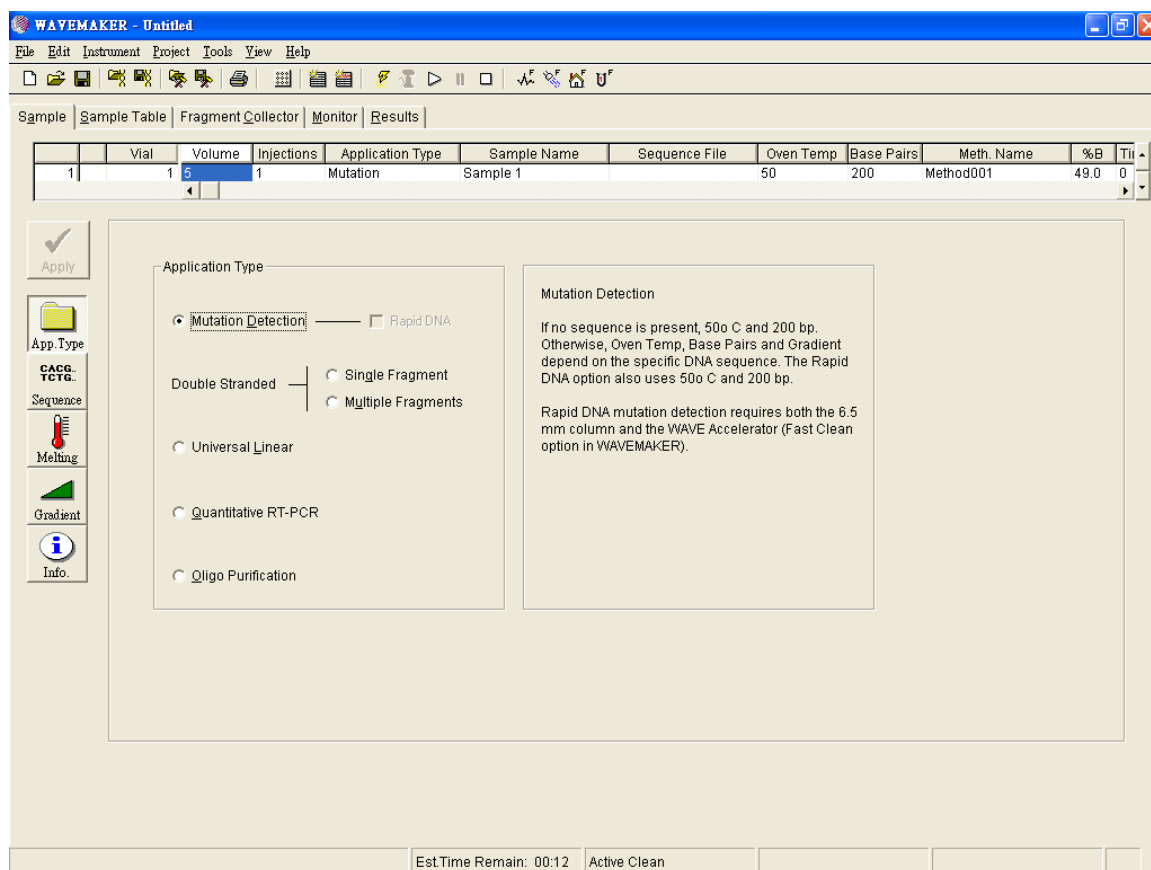
的位置(Vial Number)及抽取量(Volume)，樣品名稱(Sample Name)，此時其它欄位程式會自行給定，不需修改。

3. 重覆上述 step 4~5。
4. 進入後選擇 **Point Calibration** 項目，點選 **Dual Point**。
5. 重覆上述 step 7~8。

四. Mutation Detection

A. 設定溫度檢測：

1. 進入 WAVEMaker 後選擇 **Sample** page 的 Application Type page。
2. 選擇 **Mutation Detection** 選項，此時上方 Navigator bar 將顯示預設之 method setting。



3. 點選 Sequence Page，鍵入已知之 DNA 序列或載入儲存的資料，按 **Apply**。

WAVE MAKER - Untitled

File Edit Instrument Project Tools View Help

Sample Table Fragment Collector Monitor Results

Vial	Volume	Injections	Application Type	Sample Name	Sequence File	Oven Temp	Base Pairs	Meth. Name	%B	TI
1	1.5	1	Mutation	Sample 1	Dys271	56.0	209	Method001	49.0	0

Sequence:

```
AGGCACCTGGTCAGAATGAAGTGAATGGCACACAGGACAAGTCAGACCCAGGAAGTCCAGTAACATGGGAGAAAGACGGAAGGAGTCTAAAATTCAGGGCTCCCTTGGGCTCCCTGTTTAAAAATGTAGGTTTTATTATATATTTTCATTGTTAACAAAAGTCATGAGATCTGTGGAGGATAAAGGGGGAGCTGTATTTCCATT
```

Base-Pairs: 209
Tm: 56.0
Cursor at:
%GC: 43.06

Fragment Description:

Select a sequence file Est.Time Remain: 00:12 Active Clean

4. 點選 Gradient Page 可顯示設定條件下的 gradient，可利用 Gradient Parameters 欄中各項設定進行調整。

WAVE MAKER - Untitled

File Edit Instrument Project Tools View Help

Sample Table Fragment Collector Monitor Results

Vial	Injections	Application Type	Sample Name	Sequence File	Oven Temp	Base Pairs	Meth. Name	%B	Time Shift
1	1	Mutation	Sample 1	Dys271	56.0	209	Method001	51.0	0

Time: 2.3 %A 52.9 %B 47.1 %C 0.0

Display: %B

Time View: At pump At Detector

Run Time (min): 8.8 Pump Flow Rate: 0.9

Gradient Parameters

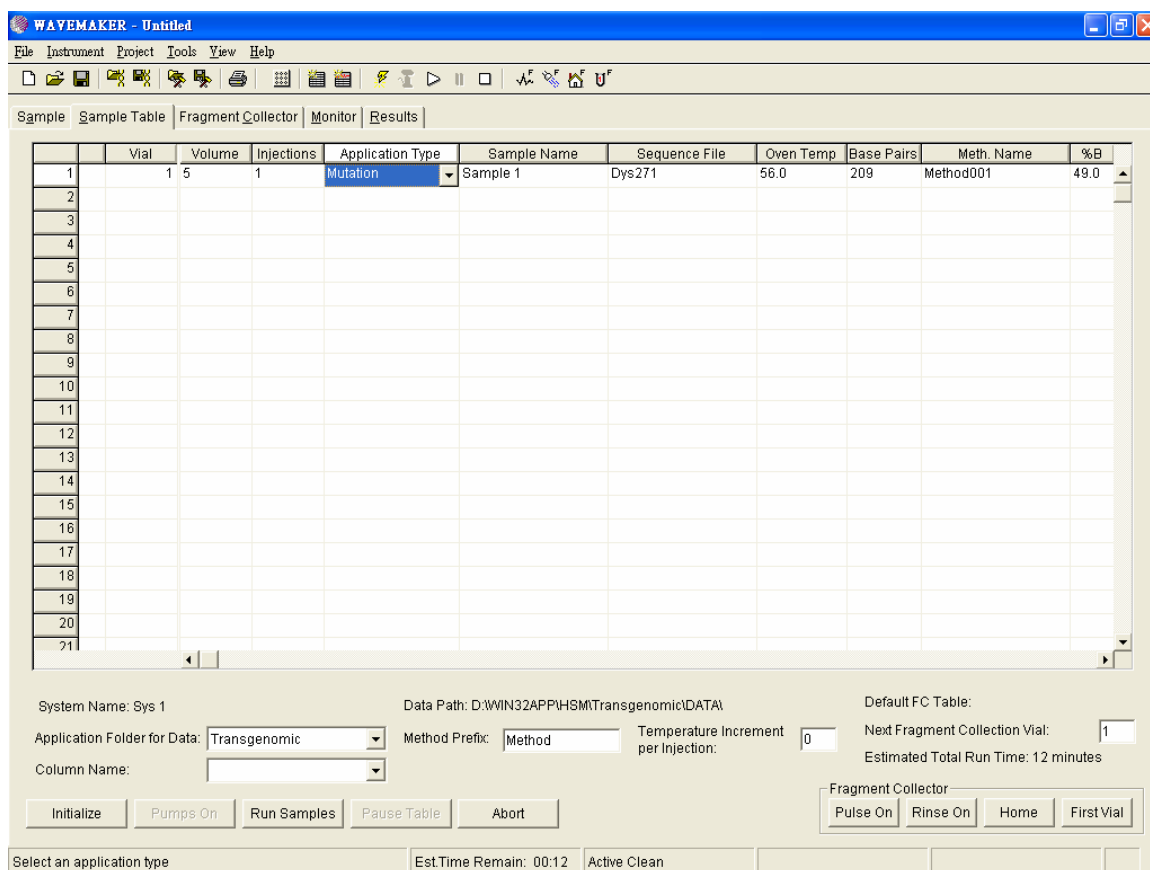
Slope (%B per min): 2.0 Gradient Duration: 4.5 min.
Caution Level: Normal Clean Duration: 0.5 min.
Drop for Loading: 5 %B Equilibration Duration: 0.9 min.
Loading Duration: 0.5 min.

Gradient Table

Step	Time	% A	% B
Loading	0.0	54	46
Start Gradient	0.5	49	51
Stop Gradient	5.0	40	60
Start Clean	5.1	0	100
Stop Clean	5.6	0	100
Start Equilibrate	5.7	54	46
Stop Equilibrate	6.6	54	46

Select an application type Est.Time Remain: 00:12

5. 在 Autosampler 上，依 Vial Position 1 ~ 96，放上 Sample。
6. 進入 **Sample Table** page，於 **Application Folder** 欄中確認 Data 要儲存的位置。



7. 在 Table 上填入 sample 位置(Vial Number)、抽取量(Volume)、注入次數(Injections)、樣品名稱(Sample Name)、Oven 溫度及 Time shift。
8. 以螢幕上方 File 中的 **Save Project As** 儲存 Project。
9. 按下 Sample Table page 的 **Run Sample**，結果將顯示在 **Results** page。

B. 梯度溫度檢測 Temperature Titration :

1. 重覆 Mutation Detection 的步驟 1~6.
2. 在 Table 上填入 sample 位置(Vial Number)，抽取量(Volume)，樣品名稱(Sample Name)。
3. 依下列方式修改 **Sample Table** Page，以進行 Temperature Titration。
 - a. 設定 **Temperature Increment per Injection**。例如設為“1”
 - b. 修改 Sample Table 上該 Sample 的 Oven 溫度。例如: Temperature Titration 為 55± 2°C，則 Table 上 Oven Temp 需鍵入 53°C。
 - c. Injections 次數鍵入”5”，則會執行 53, 54, 55, 56, 57°C 五次。
 - d. 以螢幕上方 File 中的 **Save Project As** 儲存 Project。
 - e. 按下 Sample Table page 的 **Run Sample**，結果將顯示在 Results page。

五. Double Stranded DNA Sizing Analysis

A. Single fragment

1. 選擇 Sample page 的 Application Type page。
2. 點選 **Double-Stranded –single Fragment**。
3. 在上方 Navigator bar 的 Base Pair 空格中填入 DNA Fragment 長度。
4. 選擇 Gradient Page 顯示設定條件下的 gradient，可利用 Gradient Parameters 欄中各項設定進行調整。確認後按下 **Apply** 鍵。
5. 進入 Sample Table page，於 Application Folder 欄中確認 Data 要儲存的位置。
6. 在 Table 內輸入 sample 位置(Vial Number)，抽取量(Volume)，注入次數(Injections)，樣品名稱(Sample Name)。Oven 溫度預設為 50°C，可變更。
7. 由螢幕上方 Menu 的 **Project/ Project options** 選項內設定各次檢驗之間的時間間隔。
8. 以螢幕上方 File 中的 **Save Project As** 儲存 Project。
9. 按下 Sample Table page 的 **Run Sample**，結果將顯示在 Results page。

B. Multiple Fragments

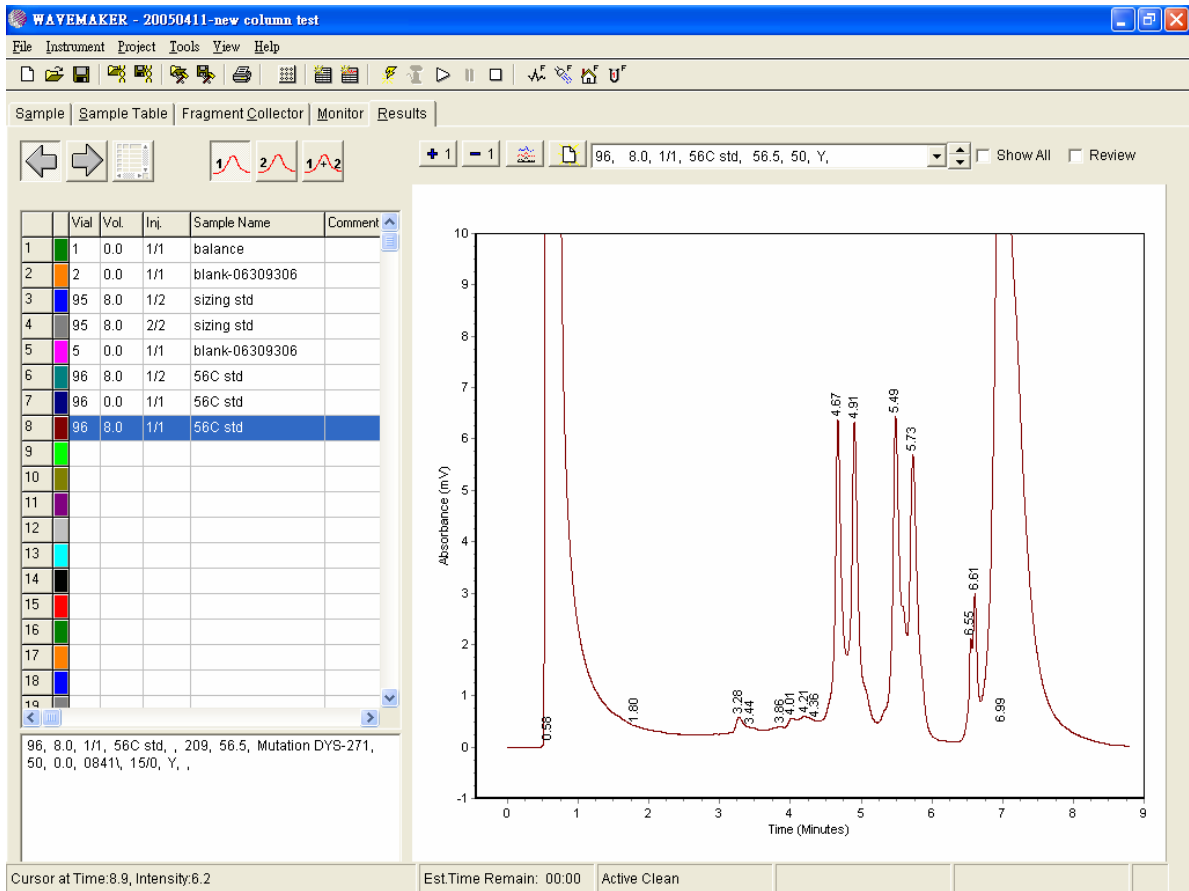
1. 選擇 **Sample** page 的 Application Type page。
2. 點選 **Double-Stranded –multiple Fragments**。
3. 選擇 Gradient page，在 Gradient Parameters 輸入 fragment 的數目，長度範圍及各項調整。確認後按下 **Apply** 鍵。
4. 重覆 Single Fragment 步驟 5~9。

六. Perform Quantitative RT-PCR

1. 在螢幕上方 Menu 的 **Project/ Project options** 選項，點選 **Analysis tab**。
2. 調整視窗顯示時段及 Detector channel, Area ratio 的上下限。
3. 選擇 Sample page 的 Application Type page。
4. 選擇 **Quantitative RT-PCR**，此時上方 Navigator bar 將顯示預設之 method setting。
5. 輸入 Sample PCR 產物長度，Standard PCR 產物長度，Standard 的 copy number 及設定 Q-RT-PCR Group，按下 **Apply**。
6. 進入 Sample Table page，於 Application Folder 欄中確認 Data 要儲存的位置。
7. 在 Table 內輸入 sample 位置(Vial Number)，抽取量(Volume)，注入次數(Injections)，樣品名稱(Sample Name)。Oven 溫度預設為 50°C。至少準備五個不同 Standard copy number 之 sample 以取得標準曲線。
8. 以螢幕上方 File 中的 **Save Project As** 儲存 Project。
9. 按下 Sample Table page 的 **Run Sample**，結果將顯示在 Results page。
10. 將相關 Sample 設定為相同的 Group 後，可利用 Project 的 **Q-RT-PCR** 選項，依 Competitive 或 Non-competitive 方式計算出迴歸曲線加以分析。

七. Result Report/ Analysis

Result data 可於實驗中同步獲得，或以 **File/Open Project** 載入過去的資料。Data 顯示於 Result Page 的 Result Table。



A. Viewing Results

- 顯示單次資料: 點選該 Sample Row，點選 **+1**，**+2** 鍵選擇顯示於何視窗。
- 顯示多筆資料: 連續點選所需 Sample Row，或按住 **Ctrl** 點選要共同顯示的 Sample Row，點選 **+1**，**+2** 或 **Send to subset** 顯示於指定視窗，點選 **Show all** 使各資料重疊顯示。
- 利用左鍵拖拉圖形視窗，右鍵可進行座標軸設定及顯示設定。另外於 Result Table 視窗按下右鍵可進行 data 顯示的設定。
- 利用視窗上方 **Toggle chart and the peak summary** 鍵切換圖形及數據資料。
- 利用 **Review** 鍵可快速篩選各 Sample Row。

B. Print Result

以 **File/ Print Reports** 選項進行列印。視窗中可選擇列印各類型 Report。

C. Export Graphics

可於各視窗以右鍵選擇 **Copy data** 或 **Copy Metafile** 將資料暫存於剪貼簿中，再到其他應用程式中貼上。

亦可以 **Export** 選項，選擇適當檔案類型直接輸出檔案。