

Rotor-Gene® Q MDx Uživatelský manuál



1065453CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

Trademarks

QIAGEN®, QIAgility™, *artus*®, EpiTect®, HotStarTaq®, HRM®, Rotor-Gene®, Rotor-Disc™, *therascreen*®, Type-it® (QIAGEN Group); Alexa Fluor®, Marina Blue®, SYBR®, SYTO®, Texas Red® (Molecular Probes, Inc.); BLAST® (US National Library of Medicine); CAL Fluor® (Biosearch Technologies, Inc.); Core™, Intel® (Intel Corporation); Cy® (GE Healthcare); EvaGreen® (Biotium, Inc.); FAM®, JOE™, ROX™, TET™, VIC® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); LC Green® (Idaho Technology, Inc.); LightCycler® (Roche Group); Microsoft®, Windows®, Excel® (Microsoft Corporation); Quasar® (Biosearch Technologies, Inc.); Yakima Yellow® (Nanogen, Inc.).

TeeChartOffice: Copyright 2001–2002 by David Berneda. All Rights Reserved.

For applicable countries:

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license to one or more of U.S. Patent Nos. 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; 7,273,749; 7,160,998; U.S. Patent Application Nos. 2003-0224434 and 2006-0019253, and PCT Patent Application No. WO 2007/035806, and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH, and/or Roche Diagnostics GmbH for human or animal in-vitro diagnostics only. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, for any reagent or kit, or under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party. This product may be operated only with authorized reagents such as fully licensed QIAGEN kits and assays. For information on purchasing licenses for in-vitro diagnostics applications or reagents, please contact Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

For applicable countries:

This real-time thermal cycler is licensed under U.S. Patent No. 6,814,934 and corresponding claims in any foreign counterpart patent thereof owned by Applied Biosystems LLC, in all fields, including research and development, all applied fields, and human and animal in-vitro diagnostics. No rights are conveyed expressly, by implication or estoppel to any patents on real-time methods, including but not limited to 5' nuclease assays, or to any patent claiming a reagent or kit. For further information on purchasing additional rights, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

The EpiTect HRM PCR Kit is developed, designed, and sold for research purposes only. It is not to be used for human diagnostic or drug purposes or to be administered to humans. All due care and attention should be exercised in the handling of many of the materials described in this text.

The purchase of this product [Type-it HRM PCR Kit] includes a limited, non-transferable license under U.S. patent No. 5,871,908 and all continuations and divisional, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics application with authorized reagents with regard to Melting Curve Analysis. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party.

Purchase of this product [HotStarTaq DNA Polymerase] is not accompanied by a license under patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. No rights to real-time PCR or to any primers, probes or pathogens are conveyed expressly, by implication or by estoppel.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.



For HRM versions only: Hi-Res Melting™ Mark under license from Idaho Technology, Inc for applicable countries.

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

Obsah

1	Bezpečnostní informace	1-1
1.1	Správné používání	1-1
1.2	Elektrické zabezpečení	1-3
1.3	Prostředí	1-4
1.4	Biologická bezpečnost	1-4
1.5	Chemikálie	1-5
1.6	Likvidace odpadu	1-5
1.7	Mechanická rizika	1-5
1.8	Riziko přehřátí	1-7
1.9	Údržba	1-7
1.10	Symbyly na přístroji Rotor – Gene Q MDx	1-8
2	Úvod	2-1
2.1	O této uživatelské příručce	2-1
2.2	Obecné informace	2-1
2.2.1	Technická pomoc	2-1
2.2.2	Programové prohlášení	2-2
2.2.3	Označování verzí	2-2
2.3	Rotor-Gene Q MDx je určen pro následující úkony	2-2
3	Všeobecný popis	3-1
3.1	Termální výkon	3-1
3.2	Optický systém	3-3
4	Instalační postup	4-1
4.1	Požadavky na umístění	4-1
4.2	Připojení střídavého proudu	4-2
4.3	Požadavky pro počítač	4-2
4.4	Vybalení přístroje Rotor-Gene Q MDx	4-3
4.5	Přídavná zařízení	4-4
4.6	Instalace hardwaru	4-5
4.7	Instalace softwaru	4-6
4.8	Softwarová verze	4-9

4.9	Další software na počítačích spojených s přístrojem Rotor-Gene Q4-10	
4.9.1	Antivirové snímače	4-10
4.9.2	Systémové nástroje	4-11
4.9.3	Aktualizace operačního systému	4-11
4.10	Aktualizace softwaru	4-11
5	Provozní postupy - Hardware	5-1
5.1	Typy rotorů	5-1
5.2	Nastavení reakce	5-4
5.3	Nastavení reakce v Rotor-Discích	5-6
6	Provozní postupy — Software	6-1
6.1	Quick Start Wizard	6-1
6.1.1	Volba rotoru	6-2
6.1.2	Nastavení profilu	6-3
6.1.3	Uložení běhu	6-4
6.1.4	Popis vzorku	6-5
6.2	Advanced Wizard	6-5
6.2.1	New Run Wizard - Okno 1	6-7
6.2.2	New Run Wizard - Okno 2	6-8
6.2.3	New Run Wizard - Okno 3	6-9
6.2.4	Editování profilu	6-10
6.2.5	New Run Wizard - okno 4	6-27
6.2.6	New Run Wizard - okno 5	6-27
7	Analýza – uživatelské rozhraní	7-1
7.1	Pracovní plocha	7-1
7.2	Ovládací lišta	7-1
7.3	Zobrazení fluorescenčních kanálů	7-1
7.4	Přepínání vzorků	7-3
7.5	Menu Soubory (File)	7-5
7.5.1	Nový (New)	7-5
7.5.2	Otevření a uložení (Open and Save)	7-6
7.5.3	Reporty	7-8
7.5.4	Nastavení (Setup)	7-8

7.6	Menu Analýza	7-9
7.6.1	Analýza	7-9
7.6.2	Kvantitativní analýza	7-11
7.6.3	Dvě standardní křivky (Two standard curve)	7-27
7.6.4	Relativní kvantitace Delta Delta C _T (Delta delta C _T relative quantitation)	7-31
7.6.5	Analýza křivky tání (Melt curve analysis)	7-34
7.6.6	Komparativní kvantifikace (Comparative quantitation)	7-37
7.6.7	Alelická diskriminace (Allelic discrimination)	7-40
7.6.8	Analýza bodového (rozptylového) grafu (Scatter graph analysis)	7-41
7.6.9	Analýza Endpoint	7-43
7.6.10	Analýza koncentrace	7-51
7.6.11	Analýza tání s vysokým rozlišením HRM	7-53
7.7	Menu Běh (Run)	7-54
7.7.1	Začátek běhu (Start Run)	7-54
7.7.2	Pozastavení běhu (Pause Run)	7-54
7.7.3	Zastavení běhu (Stop Run)	7-54
7.8	Náhled menu	7-54
7.8.1	Nastavení běhu (Run Settings)	7-54
7.8.2	Graf teploty (Temperature Graph)	7-58
7.8.3	Progress v profilu (Profile Progress)	7-59
7.8.4	Editovat vzorky (Edit Samples)	7-60
7.8.5	Možnosti displeje (Display options)	7-67
7.9	Menu zabezpečení (Security Menu)	7-68
7.9.1	Konfigurace (Configuration)	7-69
7.9.2	Používání stejného počítače více uživateli	7-76
7.9.3	Auditorské záznamy	7-77
7.9.4	Signatury běhu (Run Signatures)	7-79
7.9.5	Uzamčení vzorků (Sample Locking)	7-80
7.9.6	Uzamčené šablony	7-82
7.10	Menu Gain	7-83
7.11	Menu Okno (Window)	7-83
7.12	Menu Pomoc (Help)	7-84
7.12.1	Poslání emailu pro podporu (Support)	7-84

8	Další funkce	8-1
8.1	Šablony pro analýzy (Analysis templates)	8-1
8.2	Otevření druhého běhu	8-1
8.3	Možnosti stupnic (Scaling Options)	8-1
8.4	Exportování grafů	8-2
8.5	Ikona Klíč	8-5
8.6	Možnosti volby oblasti	8-6
9	Postupy údržby	9-1
10	Optická verifikace teploty	10-1
10.1	Princip OTV	10-1
10.2	Komponenty sady Rotoru-Gene MDx	10-1
10.3	Postup OTV	10-2
11	Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM)	11-1
11.1	Schopnosti přístroje	11-2
11.2	Chemikálie	11-3
11.3	Genotypovací příklad SNP	11-3
11.4	Příklad metylační analýzy	11-5
11.5	Pokyny pro úspěšnou analýzu HRM	11-7
11.6	Příprava vzorků	11-8
11.7	Nastavení softwaru	11-8
11.8	Analýza dat PCR v reálném čase	11-15
11.9	Analýza dat HRM	11-16
12	Řešení problémů	12-1
12.1	Archív záznamu	12-1
12.2	Řešení problémů	12-1
12.3	Obecné chyby přístroje	12-3
12.4	Zprávy softwaru Rotor-Gene Q	12-9
13	Slovník použitých termínů	13-1
	Příloha A	A-1
	Technická data	A-1
	Environmentální podmínky	A-1


Provozní podmínky	1
Přepravní podmínky	1
Skladovací podmínky	2
Mechanická data a vlastnosti hardwaru	2
Prohlášení FCC	3
 Příloha B	
Kvantifikace	13-1
Intervaly spolehlivosti pro vypočítané koncentrace	13-1
Intervaly spolehlivosti pro hodnoty C_T	13-2
 Příloha C	
Výrobek Rotor Gene MDx, příslušenství a spotřební zboží	C-1
 Příloha D	
Klauzule o zodpovědnosti	D-1
 Rejstřík	 Rejstřík-1

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

1 Bezpečnostní informace


Před tím, než začnete používat Rotor-Gene Q je nezbytné, abyste si přečetli uživatelskou příručku a obzvláště věnovali pozornost bezpečnostním informacím. Instrukce a bezpečnostní informace obsažené v uživatelské příručce musí být dodržovány kvůli zajištění bezpečného provozu přístroje a jeho udržení ve spolehlivém stavu.

V příručce se objevují bezpečnostní informace následujících typů.


<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Pojem VAROVÁNÍ se objevuje, aby vás varoval před situacemi, které mohou vyústit ve zranění vás nebo dalších osob. Detaily o této situaci jsou uvedeny v kolonce, jako je tato.</p>
	<p>Pojem UPOZORNĚNÍ se objevuje, aby vás informoval o situaci, která může vyústit v poškození přístroje nebo jiného zařízení. Detaily o této situaci jsou uvedeny v kolonce, jako je tato.</p>


Rady v této příručce slouží jako podpůrné pokyny. Nemají za úkol nahradit obvyklé požadavky na bezpečnost platné v dané zemi.


1.1 Správné používání

<p>„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“</p> 	<p>Riziko osobního zranění a materiálních škod ^[W1] Nesprávné používání přístroje Rotor-Gene Q MDx může způsobit zranění osob nebo poškození přístroje. S přístrojem Rotor-Gene Q MDx může manipulovat jen kvalifikovaný, řádně vyškolený, personál. Opravy přístroje Rotor-Gene Q MDx musí být prováděny výhradně odborníky servisního oddělení firmy QIAGEN.</p>
---	---


Údržbu provádějte, jak je uvedeno v Sekci 9. Za nutné opravy, které vzniknou nesprávnou údržbou, si společnost QIAGEN účtuje poplatky.


<p>„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“</p> 	<p>Riziko osobního zranění a materiálních škod ^[W2] Rotor-Gene Q MDx je těžký přístroj. Abyste se vyhnuli osobnímu zranění nebo poškození přístroje, buďte opatrní, když ho zdviháte.</p>
---	--


„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“ 	Riziko osobního zranění a materiálních škod [W3] Nepokoušejte se pohybovat přístrojem Rotor-Gene Q MDx, zatímco je v chodu.
--	---


„UPOZORNĚNÍ“ 	Poškození přístroje [C1] Vyhýbejte se vylití vody nebo chemikálií na přístroj Rotor-Gene Q MDx. Na škody způsobené rozlitím vody nebo chemikálií se nevztahuje záruka.
--	--


Poznámka: V případě nutnosti vypněte přístroj Rotor-Gene Q MDx vypínačem na zadní straně přístroje a odpojte napájecí kabel od zdroje energie.

„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“ 	Riziko osobního zranění a materiálních škod [W4] Nepokoušejte se otevřít víko v průběhu experimentu, nebo když se Rotor-Gene Q MDx točí. V opačném případě, pokud překonáte zámek víka a sáhnete dovnitř, riskujete kontakt s částmi, které jsou horké, pod proudem nebo se pohybují vysokou rychlostí, a můžete si přivodit zranění nebo poškodit přístroj.
---	--

„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“ 	Riziko osobního zranění a materiálních škod [W5] Pokud potřebujete experiment rychle zastavit, vypněte přívod elektřiny do přístroje, a pak otevřete víko. Nechte komoru zchladnout, než sáhnete dovnitř. Jinak riskujete zranění způsobené kontaktem s částmi, které jsou horké.
--	---

„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“ 	Riziko osobního zranění a materiálních škod [W6] Pokud bude zařízení využíváno způsobem, který výrobce neuvádí, ochrana, kterou zařízení skýtá, může být omezená.
--	---


„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“ 	Riziko osobního zranění a materiálních škod [W7] Uvolněný papír pod přístrojem Rotor-Gene Q MDx brání ochlazování přístroje. Doporučujeme, aby v prostoru pod přístrojem byly odstraněny všechny nepatřičné předměty.
--	---

„UPOZORNĚNÍ“ 	Poškození přístroje [C2] Vždy používejte zamykací kroužek na rotoru. Ten brání tomu, aby čepičky odlétly ze zkumavek. Pokud by čepičky vylétly v průběhu experimentu, mohly by poškodit komoru.
--	---

Pokud se dotknete přístroje Rotor-Gene Q MDx během experimentu a jste nabití statickou elektřinou, může v krajních případech dojít k resetování přístroje Rotor-Gene Q MDx. Nicméně software přístroj Rotor-Gene Q MDx opět nastartuje a bude pokračovat v experimentu.

1.2 Elektrické zabezpečení

Odpojte kabel přívodu elektrické energie od zdroje před tím, než přikročíte k opravám.

<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Riziko zásahu elektrickým proudem [W8]</p> <p>Jakékoli porušení ochranného vodiče (uzemnění) uvnitř nebo vně přístroje nebo odpojení zásuvky ochranného vodiče pravděpodobně způsobí, že přístroj bude nebezpečný. Záměrné odpojení je zakázáno.</p> <p>Smrtelné napětí uvnitř přístroje.</p> <p>Když je přístroj připojen ke zdroji energie, je možné, že zásuvky budou pod proudem, a pokud otevřete kryty nebo vyjmete některé části, je pravděpodobné, že tím tyto části odkryjete.</p>
---	---


Abyste zajistili uspokojivé a bezpečné fungování přístroje Rotor-Gene Q MDx, držte se následujících pokynů:

- Napájecí kabel musí být připojen ke zdroji elektřiny, který má ochranný vodič (uzemnění).
 - Neupravujte ani nenahrazujte vnitřní součástky přístroje.
- Nemanipulujte s přístrojem, pokud jsou odejmuty jakékoli kryty nebo části.

Pokud se uvnitř přístroje vylila nějaká tekutina, vypněte přístroj, odpojte ho od zdroje energie a kontaktujte technické služby společnosti QIAGEN.



Pokud se přístroj stane elektricky nebezpečným, zajistěte, aby s ním nikdo nemanipuloval, a kontaktujte technické služby společnosti QIAGEN. Přístroj může být elektricky nebezpečný, když:

- Se zdá, že přístroj nebo kabel ke zdroji napětí je poškozený.
- Byl přístroj uložen v nepříznivých podmínkách příliš dlouhou dobu.
- Byl přístroj vystaven náročným přepravním podmínkám.

<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Elektrické riziko [W9]</p> <p>Přístroj má štítek s informacemi o elektrické shodě, kde je uvedeno jak napětí a frekvence zdroje energie, tak hodnoty pojistek. S přístrojem by se mělo manipulovat jen za těchto podmínek.</p>
---	---

1.3 Prostředí

Operační podmínky


<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Výbušná atmosféra [W10]</p> <p>Rotor-Gene Q MDx není navržen pro fungování ve výbušné atmosféře.</p>
<p>"UPOZORNĚNÍ"</p> 	<p>Poškození přístroje [C3]</p> <p>Přímé sluneční světlo může způsobit vyblednutí některých částí přístroje a způsobit poškození plastových dílů. Rotor-Gene Q MDx musí být umístěn mimo přímé sluneční světlo.</p>

1.4 Biologická bezpečnost


Se vzorky a činidly obsahující materiály z biologických zdrojů by mělo být nakládáno jako s potenciálně infekčními. Využívejte bezpečnostní laboratorní postupy, které jsou uvedeny v publikacích, jako je *Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biozdravotnických laboratořích*, HHS (www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm).

Vzorky

Vzorky mohou obsahovat infekční činitele. Měli byste mít na vědomí zdravotní rizika, která tyto činitele představují, a měli byste tyto vzorky používat, uchovávat a odstraňovat podle příslušných bezpečnostních regulí.

<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Vzorky obsahující infekční činitele [W11]</p> <p>Některé vzorky, které se používají s tímto přístrojem, mohou obsahovat infekční činitele. Nakládejte s takovými vzorky s největší opatrností a v souladu s požadovanými bezpečnostními regulemi. Vždy noste bezpečnostní brýle, dvoje rukavice a laboratorní plášť. Zodpovědná osoba (např. vedoucí laboratoře) musí provést nezbytná předběžná opatření, aby zajistil, že okolní prostředí bude bezpečné a ti, kteří budou s přístrojem manipulovat, jsou vhodně vyškoleni a nevystavují se riskantním úrovním infekčních činitelů, jak je definováno v příslušných bezpečnostních listech (MSDSs) nebo dokumentech OSHA, * ACGIH,[†] nebo COSHH[‡]. Odvětrávání výparů a odstranění odpadu musí být v souladu se všemi národními, státními a místními zdravotnickými a bezpečnostními regulemi a zákony.</p>
---	---

1.5 Chemikálie

<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Nebezpečné chemikálie [W12]</p> <p>Některé chemikálie, které se používají s tímto přístrojem, mohou být nebezpečné nebo se nebezpečnými stanou po dokončení protokolárního běhu.</p> <p>Vždy noste bezpečnostní brýle, rukavice a laboratorní plášť.</p> <p>Zodpovědná osoba (např. vedoucí laboratoře) musí provést nezbytná předběžná opatření, aby zajistil, že okolní prostředí bude bezpečné a ti, kteří budou s přístrojem manipulovat, jsou vhodně vyškoleni a nevystavují se riskantním úrovním toxických látek (chemických nebo biologických), jak je definováno v příslušných bezpečnostních listech (MSDSs) nebo dokumentech OSHA, * ACGIH,[†] nebo COSHH[‡].</p> <p>Odvětrávání výparů a odstranění odpadu musí být v souladu se všemi národními, státními a místními zdravotnickými a bezpečnostními regulemi a zákony.</p>
---	---

* OSHA: Úřad pro zdraví a bezpečnost práce (Spojené státy Americké).

[†] ACGIH: Americké sdružení vládních průmyslových hygieniků (Spojené státy Americké).

[‡] COSHH: Úřad pro zdraví nebezpečné látky (Spojené království)

Toxické výpary


Pokud pracujete s těkavými rozpouštědly nebo toxickými látkami, musíte mít dostačující laboratorní odvětrávací systém, abyste odvětrali výpary, které mohou vzniknout.


1.6 Likvidace odpadu

Použitý spotřební materiál a plastové výrobky mohou obsahovat nebezpečné chemikálie nebo infekční činitele. Takovéto odpady musí být řádně sebrány a odstraněny v souladu s místními bezpečnostními regulemi.


1.7 Mechanická rizika


Víko přístroje Rotor-Gene Q MDx musí zůstat zavřené po celou dobu fungování přístroje.


<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Pohyblivé části [W13]</p> <p>Abyste se vyhnuli kontaktu s pohyblivými částmi během chodu přístroje Rotor-Gene Q MDx, je nutné, aby se s přístrojem manipulovalo, když je víko zavřené.</p>
---	---


„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“ 	Riziko osobního a materiálního poškození [W14] Otevírejte a zavírejte víko přístroje Rotor-Gene Q MDx opatrně, abyste se vyhnuli zachycení prstů nebo oblečení.
--	---


Rotor

„UPOZORNĚNÍ“ 	Poškození přístroje [C4] Ujistěte se, že jsou rotor a zamykací kroužek správně nainstalovány. Pokud rotor nebo zamykací kroužek vykazují známky mechanického poškození nebo koroze, nepoužívejte Rotor-Gene Q MDx, a kontaktujte technické služby QIAGEN.
--	---


„UPOZORNĚNÍ“ 	Poškození přístroje [C5] Přístroj Rotor-Gene Q MDx nesmí být používán, pokud je víko rozbité nebo pokud je zámek víka poškozený. Ujistěte se, že rotor i zamykací kroužek jsou instalovány správně. Používejte pouze takové rotory, zamykací kroužky a spotřební materiál, které jsou navrženy pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx. Na poškození způsobené jinými požitvatinami se nevztahuje záruka.
--	---


„UPOZORNĚNÍ“ 	Poškození přístroje [C6] Pokud se přístroj Rotor-Gene Q MDx spustí ihned poté, co byl dopraven, ve studených podmínkách, mechanické části se mohou zablokovat. Umožněte přístroji, aby se aklimatizoval na teplotu v místnosti alespoň hodinu předtím, než přístroj zapnete
--	---

„VAROVÁNÍ“ 	Pohyblivé části [W15] V případě poruchy způsobené chybou napájení, vytáhněte napájecí kabel a počkejte 10 minut, než se pokusíte ručně otevřít víko.
--	--

„VAROVÁNÍ“ 	Riziko přehřátí [W16] K zajištění patřičného odvětrávání udržujte minimální prostor 10 cm po obou stranách a od zadní části přístroje Rotor-Gene Q MDx. Škvíry a otvory, které zajišťují ventilaci přístroje, nesmí být zakryty.
--	--


1.8 Riziko přehřátí


<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Horký povrch [W17]</p> <p>Komora přístroje Rotor-Gene Q MDx může dosáhnout teplot nad 120°C (248°F). Vyhněte se kontaktu s ním, když je horký.</p>
---	---


<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Horký povrch [W18]</p> <p>Když pozastavujete běh, přístroj Rotor-Gene Q MDx se úplně neochladí na teplotu v místnosti. Buďte opatrní, než přistoupíte k manipulaci s rotorem nebo jakýmkoli trubicemi v přístroji.</p>
---	---


1.9 Údržba

Údržbu provádějte, jak je uvedeno v sekci 9. Společnost QIAGEN si účtuje poplatky za opravy, které jsou způsobeny nesprávnou údržbou.






<p>„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“</p> 	<p>Riziko osobního zranění a materiálního poškození [W19]</p> <p>Provádějte jen takovou údržbu, která je uvedena v této příručce.</p>
---	---


<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Riziko vznícení [W20]</p> <p>Když čistíte přístroj Rotor-Gene Q MDx desinfekcí založenou na alkoholu, nechte víko otevřené, aby mohly unikát vznětlivé výpary. Přístroj Rotor-Gene Q MDx čistěte jen tehdy, když komora vychladla.</p>
---	---

<p>„VAROVÁNÍ/ UPOZORNĚNÍ“</p> 	<p>Riziko elektrického šoku [W21]</p> <p>Nerozebírejte přístroj Rotor-Gene Q MDx.</p>
---	---

<p>„UPOZORNĚNÍ“</p> 	<p>Poškození obalu přístroje [C7]</p> <p>Nikdy nečistěte obal přístroje alkoholem nebo prostředky založenými na alkoholu. Alkohol by tento obal poškodil. K vyčištění obalu používejte jen destilovanou vodu.</p>
---	---

1.10 Symboly na přístroji Rotor – Gene Q MDx

Symbol	Umístění	Význam
	Blízko komory pro vzorky, objeví se, když je otevřené víko	Tepelné riziko – teplota komory může dosáhnout teplot nad 120°C (248°F)
	Na zadní straně přístroje	Podívejte se na návod k použití
	Typový štítek na zadní straně přístroje	CE označení pro Evropský soulad
	Typový štítek na zadní straně přístroje	In vitro diagnostické zdravotnické zařízení
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Značka CSA pro Kanadu a USA
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Legální výrobce
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Značka WEEE pro Evropu
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Zkratka FCC pro Federální komisi pro komunikace Spojených států
	Typový štítek na zadní straně přístroje	C-fajfka pro Austrálii (identifikační číslo dodavatele N17965/N15128)

Symbol	Umístění	Význam
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Zkratka RoHS pro Čínu (omezení použití určitých nebezpečných látek v elektrickém a elektronickém zařízení)

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

2 Úvod

Děkujeme vám, že jste si vybrali přístroj Rotor-Gene Q. Jsme přesvědčeni, že se stane nepostradatelným vybavením vaší laboratoře.

Před tím, než začnete používat Rotor-Gene Q je nezbytné, abyste si přečetli uživatelskou příručku a obzvláště věnovali pozornost bezpečnostním informacím. Instrukce a bezpečnostní informace obsažené v uživatelské příručce musí být dodržovány kvůli zajištění bezpečného provozu přístroje a jeho udržení ve spolehlivém stavu.

2.1 O této uživatelské příručce

Tato uživatelská příručka poskytuje informace o Rotoru-Gene Q MDx v následujících kapitolách:

1. Bezpečnostní informace
2. Úvod
3. Všeobecný popis
4. Instalační postupy
5. Provozní postupy — Hardware
6. Provozní postupy — Software
7. Analýza uživatelského rozhraní
8. Další funkce
9. Postupy údržby
10. Optické ověření teploty
11. Analýza tání s vysokým rozlišením
12. Odstranění poruch
13. Slovník

Dodatky dále obsahují:

- Technická data
- Matematické metody
- Doplnky Rotoru-Gene Q
- Prohlášení o odpovědnosti

2.2 Obecné informace

2.2.1 Technická pomoc

Firma QIAGEN klade maximální důraz na kvalitu a dostupnost technické podpory. Naše oddělení technických služeb zaměstnává zkušené vědce s extenzivními praktickými a teoretickými zkušenostmi v molekulární biologii a v používání výrobků firmy QIAGEN. Pokud máte jakékoli otázky nebo pokud máte jakékoli potíže s přístrojem Rotor-Gene Q MDx nebo jakýmkoli výrobky od naší firmy, neváhejte prosím kontaktovat naši firmu.

Zákazníci firmy QIAGEN představují hlavní zdroj informací týkajících se pokročilého a specializovaného použití našich výrobků. Tyto informace pomáhají ostatním vědcům a také výzkumníkům v naší firmě. Z tohoto důvodu vítáme vaše připomínky a návrhy týkající se výkonnosti našich výrobků nebo nových aplikací a metod.

Pro technickou pomoc a více informací zavolejte prosím oddělení technických služeb firmy QIAGEN nebo vašeho lokálního distributora „viz zadní strana obalu“.

Poslední informace o přístroji Rotor-Gene Q MDx najdete na webových stránkách www.qiagen.com/goto/RGQ-MDx.

2.2.2 Programové prohlášení

Firma QIAGEN neustále vylepšuje své výrobky, jakmile se objeví nové techniky a komponenty. Firma QIAGEN si vyhrazuje právo kdykoli změnit specifikace podle svého uvážení.

Za účelem vydávání potřebné a správné dokumentace vítáme vaše komentáře týkající se této uživatelské příručky. Kontaktujte prosím technické služby firmy QIAGEN.

2.2.3 Označování verzí

Tento dokument je *Uživatelská příručka pro Rotor-Gene MDx*, verze 1.0, revize R1 pro přístroj Rotor-Gene Q MDx používající softwarovou verzi Rotor G Q 2.0.2 nebo vyšší.

2.3 Rotor-Gene Q MDx je určen pro následující úkony

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je navržen pro vykonávání termálního cyklování v reálném čase, detekci a kvantifikaci za použití polymerázové řetězové reakce (PCR) v klinických aplikacích.

Rotor-Gene Q MDx je určen pro používání pouze v kombinaci se sadami QIAGEN určenými pro použití s přístroji Rotor-Gene Q pro aplikace popsané v příslušných manuálech sad QIAGEN.

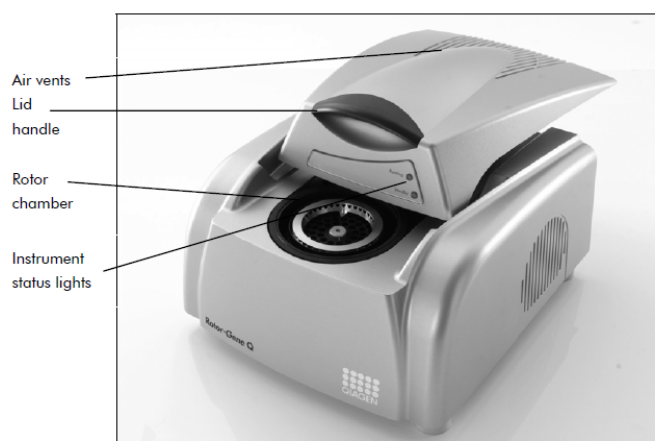
Přístroj Rotor-Gene Q MDx je určen pro in vitro diagnostiku v Evropě.

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je určen pouze pro profesionální uživatele, jako jsou technici a lékaři vyškolení v technikách molekulární biologie a v provozování přístroje Rotor-Gene Q MDx.

3 Všeobecný popis

Rotor-Gene Q MDx je inovativní přístroj, který umožňuje provádět polymerázovou řetězovou reakci (PCR), PCR analýzu koncového bodu s vysokou přesností a v reálném čase a HRM analýzu tání s vysokým rozlišením. Tento přístroj je také vhodný k analýze genové exprese, genotypování, detekci patogenů a k mnoha dalším oblastem výzkumu.

Výkonný a uživatelsky orientovaný software nabízí jednoduchost pro začátečníky, ale stejně tak může sloužit jako otevřená výzkumná základna pro pokročilé uživatele.



Popis: Větrací otvory, Držadlo krytu, Komora s rotorem, Kontrolky ukazující stav přístroje.

3.1 Termální výkon

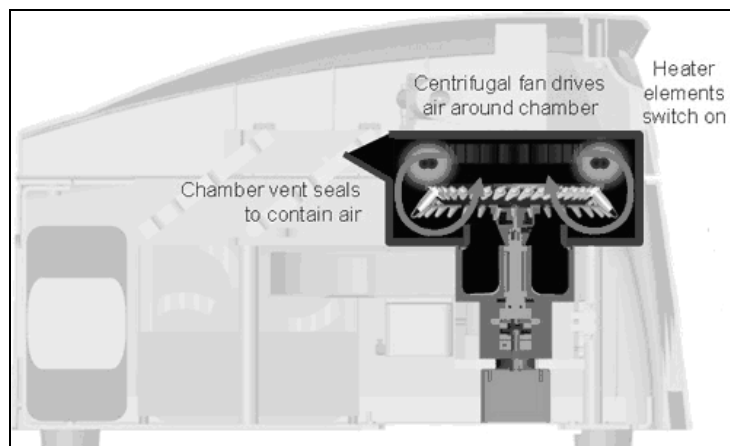
Rotor-Gene Q MDx používá důmyslné ohřívání a chlazení, která pomáhají dosahovat nejlepších reakčních podmínek. Jedinečný rotační tvar umožňuje ideální teplotní a optickou uniformitu mezi vzorky, což je kritické pro přesnou a spolehlivou analýzu.

Vzorky kontinuálně rotují při 400 ot. /min během jednoho běhu.

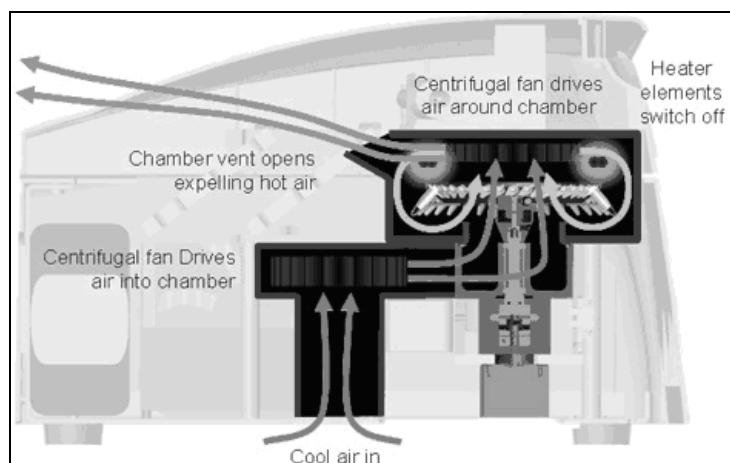
Odstřeďování zabraňuje kondenzaci a odstraňuje vzduchové bubliny, ale nepeletuje („nehruďkuje“) DNA. Vzorky také nemusí být před během odstředěny.

Vzorky jsou ohřívány a ochlazovány v malé vzduchové peci. Ohřívání se provádí nikl-chromovým tělesem umístěným v krytu přístroje. Komora je chlazená pomocí větracích otvorů na horní části komory, zatímco okolní vzduch je vháněn do jeho báze.

Topení



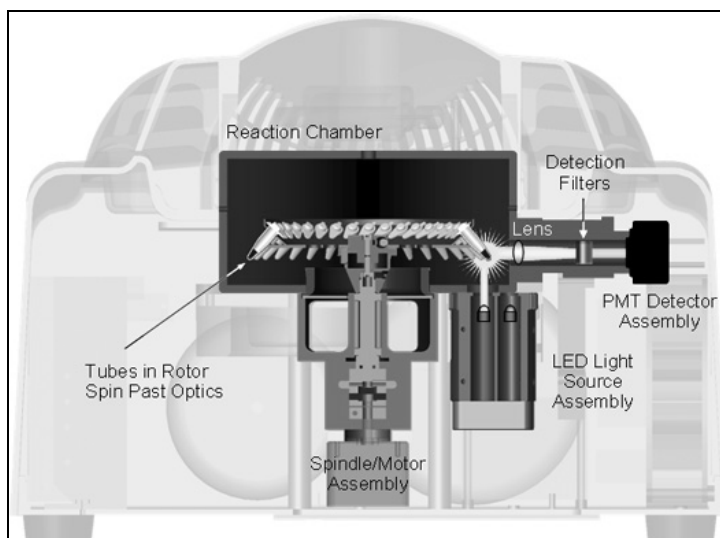
Chlazení



Ilustrace topného a chladicího systému.

3.2 Optický systém

Jelikož má přístroj k dispozici 6 excitačních zdrojů a 6 detekčních filtrů kombinovaných s krátkými fixovanými optickými dráhami, Rotor-Gene Q MDx může být použit pro širokou škálu reakcí. Zajišťuje minimální fluorescenční variabilitu mezi vzorky a eliminuje potřebu pro kalibraci a úpravy. Vzorky jsou excitovány ze dna komory pomocí LED diody (diody emitující světlo). Energie je přenášena skrz tenké stěny v bázi zkumavky. Emitovaná fluorescence prochází skrz emisní filtry na straně komory a tam je sbírána fotonásobičem. Stabilní optické dráhy zajišťují konsistentní excitaci u každého vzorku, což znamená, že není nutné použití pasivního referenčního barviva, jako je např. ROX.



Ilustrace optického systému.

Kanály, které jsou k dispozici

Kanál	Excitace (nm) Excitace	Detekce (nm)	Příklady detekovaných fluoroforů
Modrá	365±20	460±20	Mořská modř [®] , Edans Bothell Blue, Alexa Fluor [®] 350, AMCA-X, ATTO 390
Zelená	470±10	510±5	FAM [®] , SYBR [®] Green I, Fluorescein, EvaGreen [®] , Alexa Fluor 488
Žlutá	530±5	557±5	JOE [™] , VIC [®] , HEX, TET [™] , CAL Fluor [®] Gold 540, Yakima Yellow [®]
Oranžová	585±5	610±5	ROX [™] , CAL Fluor Red 610, Cy [®] 3.5, Texas Red [®] , Alexa Fluor 568
Červená	625±10	660±10	Cy5, Quasar [®] 670, LightCycler [®] Red640, Alexa Fluor 633
Karmínová	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
High resolution melt (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO [®] 9, LC Green [®] , LC Green Plus+, EvaGreen

Poznámka: Sady QIAGEN určené pro použití s přístroji Rotor-Gene Q MDx jsou optimalizované určitými barevnými kombinacemi. Více informací naleznete v příslušných manuálech.

4 Instalační postup


4.1 Požadavky na umístění


Přístroje Rotor-Gene Q MDx musí být umístěny mimo přímé sluneční světlo, daleko od zdrojů tepla a zdrojů vibrací a elektrické interference. Provozní podmínky (teplota a vlhkost) najdete v příloze A. Přístroj by neměl být umístěn v oblasti s nadměrným průvanem, nadměrnou vlhkostí nebo prašností. Přístroj by neměl být vystaven velkým teplotním výkyvům.

Rozměry a váhu přístrojů Rotor-Gene Q MDx najdete v příloze A. Má dostatek prostoru pro přídatná zařízení. Další informace o specifických požadavcích na pracovní prostor kontaktujte prosím technické služby firmy QIAGEN.

Poznámka: Je velmi důležité, aby přístroj Rotor-Gene Q MDx byl umístěn na stabilním povrchu, který je rovný a prost vibrací. Provozní podmínky najdete v příloze A.

Přístroj Rotor-Gene Q MDx musí být umístěn přibližně 1,5 m (59 palců) od patřičně uzemněné elektrické zásuvky.

<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Výbušné prostředí [W10]</p> <p>Přístroj Rotor-Gene Q MDx není navržen pro výbušné prostředí.</p>
---	---

<p>„VAROVÁNÍ“</p> 	<p>Riziko přehřátí [W16]</p> <p>Abyste zajistil správnou ventilaci, udržujte minimální prostor 10 cm (3,94 palce) mezi zadní stranou přístroje Rotor-Gene Q MDx a stěnou.</p> <p>Větrací otvory přístroje Rotor-Gene Q MDx nesmí být zakryty.</p>
---	---

4.2 Připojení střídavého proudu

Příkon

Rotor-Gene Q MDx pracuje na:

- 100–240 V AC at 50–60Hz, 520 VA (špička)

Ujistěte se, zda rating napětí rotoru je slučitelný se střídavým napětím, které je dostupné v místě instalace.

Kolísání napětí hlavního zdroje nesmí překročit 10% nominálního zdrojového napětí.

Požadavky pro uzemnění

QIAGEN doporučuje, aby byl Rotor-Gene Q MDx řádně uzemněn kvůli bezpečnosti obsluhujícího personálu. Přístroj je vybaven 3vodičovým střídavým napájecím kabelem, který uzemňuje přístroj, pokud je připojen k vhodnému zdroji střídavého proudu. Chcete-li zachovat správnou ochranu přístroje, nenapájejte přístroj ze zásuvky střídavého napětí, která nemá uzemnění.

Instalace napájecí šňůry

Zapojte jeden konec napájecí šňůry do zásuvky umístěné na zadní straně přístroje Rotor-Gene Q MDx a druhý konec do elektrické zásuvky.

4.3 Požadavky pro počítač

Notebook, který je dodáván společně s Rotor-Gene Q MDx, splňuje požadavky softwaru Rotor-Gene Q, které jsou uvedeny detailně v následující tabulce.

Systémové požadavky počítače

Popis	Minimální požadavky
Operační systém	Microsoft® Windows® XP Profesionální verze
Procesor	Intel® Core™ 2 Duo T5500 1.66GHz nebo více
Hlavní paměť	1 GB RAM
Místo na pevném disku	10 GB HDD
Grafika	Adaptér a obrazovka minimálně 1200x800 pixelů
Rozhraní	Sériový port RS-232 nebo port USB

4.4

Vybalení přístroje Rotor-Gene Q MDx

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je dodáván se všemi nutnými komponenty pro nastavení a provoz. Kontejner také obsahuje seznam všech součástí.

Poznámka: Přesvědčte se, že zásilka obsahuje všechny komponenty uvedené v seznamu.

Poznámka: Přesvědčte se, že dodaný přístroj a jeho součásti nebyly poškozeny během přepravy.

Krabice s příslušenstvím se nachází v horní části pěnového balení. Tato krabice obsahuje:

- Instalační průvodce (v anglickém jazyce; překlady jsou k dispozici na disketě s manuály)
- CD (software)
- CD (manuály)
- Úložný stojánek na zkumavky 96 x 0,2ml
- Úložný stojánek na zkumavky 72 x 0,1ml
- Držák rotoru (za účelem bezpečnosti při dopravě je rozmontován)
- 36-jamkový rotor (má červenou barvu)
- Uzamykací kroužek 36-jamkového rotoru

Následující prvky jsou zabaleny po stranách pěnového balení:

- Sériový kabel RS-232 a USB
- Sada mezinárodních napájecích kabelů
- Zkumavky PCR, 0,2 ml (1000)
- Mikrozukumavky a čepičky, 0,1 ml (1000)

Po vyjmutí všech komponentů z krabice vyjměte pěnu na vrchní části přístroje Rotor-Gene Q MDx. Opatrně vyjměte Rotor-Gene Q MDx a sejměte plastický kryt. Otevřete poklop jeho posunutím dozadu, čímž se dostanete k reakční komoře.

Následující prvky jsou instalovány uvnitř Rotoru-Gene Q MDx:

- 72-jamkový rotor (má modrou barvu)
- Uzamykací kroužek 72-jamkového rotoru

Balení může obsahovat přenosný počítač, pokud byl součástí vaší objednávky.

Po rozbalení přístroje Rotor-Gene Q MDx pokračujte v instalaci podle následujících pokynů.


4.5 Přídavná zařízení

Rotory a přídavná zařízení mohou být objednána zvlášť.

Podrobnosti najdete v příloze C.

4.6 Instalace hardwaru

Když jste rozbalili přístroj Rotor – Gene Q MDx, následujte instalační postup popsaný níže:

<p>"UPOZORNĚNÍ"</p> 	<p>Poškození přístroje [C6]</p> <p>Pokud byste zapnuli přístroj Rotor-Gene Q MDx okamžitě po jeho dodání, v chladných oblastech může dojít k zablokování některých jeho součástí.</p> <p>Nechte přístroj aklimatizovat na pokojovou teplotu nejméně hodinu před jeho zapnutím.</p>
--	--

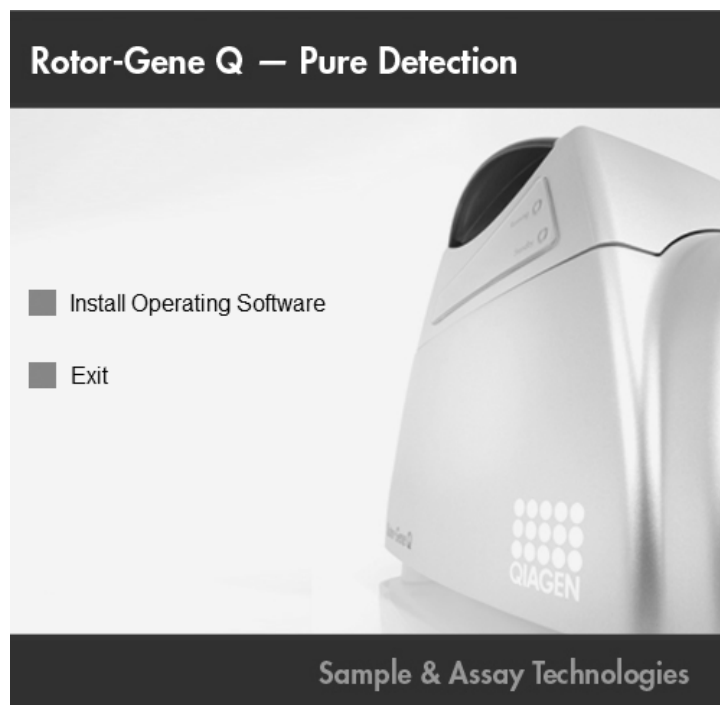
1. Umístěte Rotor-Gene Q MDx.
2. Ujistěte se, že za přístrojem je dostatek místa na plné otevření krytu.
3. Přesvědčte se, že vypínač na zadní straně instrumentu je snadno přístupný.
4. Neblokujte zadní část instrumentu. Přesvědčte se, že napájecí šňůra může být lehce odpojena, kdyby bylo nutné odpojit elektrický proud od přístroje.
5. Připojte kabel USB nebo sériový kabel RS-232 na patřičné porty na zadní části počítače.
6. Připojte USB nebo sériový kabel RS232 na zadní část Rotor-Gene Q MDx.
7. Nyní zapojte Rotor-Gene Q MDx do elektrické sítě. Zapojte jeden konec napájecí šňůry do zásuvky umístěné v zadní části Rotor-Gene Q MDx a druhý konec zapojte do zdroje střídavého proudu.



Poznámka: Připojujte počítač k Rotoru-Gene Q MDx pouze kabely USB a sériové kabely dodané s přístrojem. Nepoužívejte jiné kabely.

4.7 Instalace softwaru

1. Vložte disketu CD (software), která byla dodána s přístrojem a vložte ji do CD mechaniky počítače.
2. Zvolte “Instalace operačního softwaru” v okénku, které se objeví
Poznámka: Následujte prosím instrukce v příručce Průvodce Instalací Rotoru-Gene Q MDx, která byla dodána s přístrojem a která vás bude provádět následujícími kroky instalace softwaru.



3. Poté, co jste instalovali software, zapněte Rotor-Gene Q MDx vypínačem umístěným na levé straně zadní části posunutím do pozice “I”. Modré světlo “standby” na přední straně Rotoru-Gene Q MDx, což indikuje, že přístroj je připraven k použití.



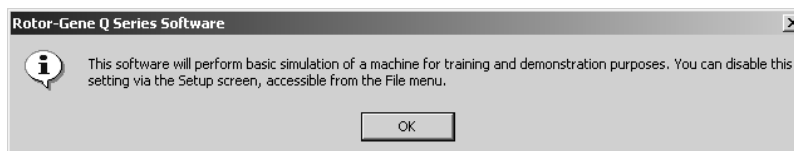
4. Dvakrát klikněte na ikonku “Rotor-Gene Q” na ploše, čímž software spustíte.



5. Při prvním použití softwaru se objeví okénku “vítejte”, ale při následujících aktualizacích softwaru se již objevovat nebude.



Sériové číslo přístroje:	Zadejte sériové číslo (sedm číslic), které najdete na zadní části Rotoru–Gene Q MDx.
Port:	Zvolte kabel USB nebo sériový kabel. Zvolte patřičný komunikační port nebo klikněte na tlačítko „automatická detekce“.
Automatická detekce:	Když používáte tuto možnost, patřičný USB nebo sériový port bude automaticky detekován a ukázán v rozbalovacím menu „port“.
Provoz ve virtuálním režimu (pro potřeby předvádění):	<p>Zatržení tohoto políčka umožňuje instalaci softwaru Rotoru–Gene Q na počítač, který není spojen s Rotorem–Gene Q MDx. Software je plně funkční a může simulovat provoz.</p> <p>Poznámka: pokud je toto políčko zatrženo a Rotoru–Gene Q MDx je zapojen do počítače, objeví se před začátkem spuštění následující zpráva: „chystáte se spustit přístroj ve virtuálním režimu“. Pro spuštění přístroje ve skutečném provozu musíte změnit nastavení v okénku „Nastavení“ (viz sekce 7.5.4).</p>
Začátek:	Když jste vložili všechny informace, klikněte na „Začátek“. Vyčkejte ukončení inicializace, což může trvat několik vteřin. Pokud byl zvolen virtuální režim, objeví se následující zpráva:

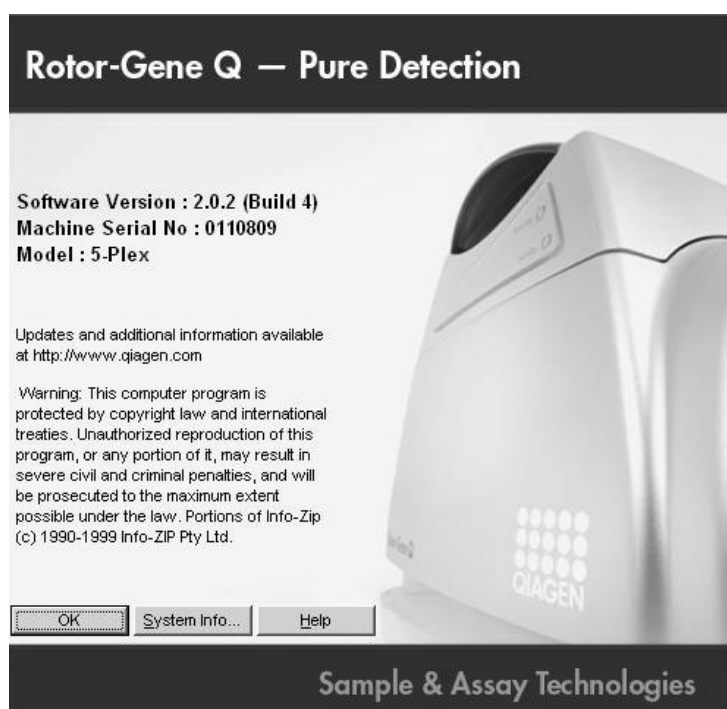


Pokud není zatrženo políčko „Provoz ve virtuálním režimu“, software se inicializuje a otevře automaticky.

Výstup z programu: Kliknutím na toto tlačítko opustíte program.

4.8 Softwarová verze

Vývoj softwaru Rotoru-Gene Q neustále pokračuje. Pokud chcete zjistit aktuální číslo vaší verze, klikněte na „Pomoc“ a potom „O tomto softwaru...“.



Softwarová verze: 2.0.2 (typ4)

Sériové číslo přístroje: 0110809

Model: 5plex

Aktualizace a další informace najdete na <http://www.qiagen.com>

Varování: Tento počítačový program je chráněn autorskými právy a mezinárodními dohodami. Nezákonná reprodukce tohoto programu nebo kterékoliv jeho části může vyústit ve vážné civilní a trestní postihy a bude stíhán v maximálním rozsahu, který povoluje zákon.

Toto okno zobrazuje obecné informace o tomto softwaru, včetně verze, sériového čísla a modelu přístroje

Software může být zdarma kopírován pro použití v rámci organizace, která vlastní Rotor-Gene Q. Software však nesmí být kopírován a rozšiřován ostatním stranám vně takové organizace.

4.9 Další software na počítačích spojených s přístrojem Rotor-Gene Q

Software Rotoru-Gene Q řídí časově kritické procesy během PCR postupů a procesů sběru dat. Z tohoto důvodu je důležité zajistit, aby ostatní procesy nepoužívaly ve větší míře systémové zdroje a tím zpomalovaly software Rotoru-Gene Q. Je zvláště důležité věnovat péči bodům, které jsou níže uvedeny.

Správci systému musí pamatovat na to, že každá modifikace může mít vliv na systémové zdroje.

4.9.1 Antivirové snímače

Existuje nebezpečí, že když jakýkoliv počítač vyměňuje data s jinými počítači, může se do jeho systému dostat virus. Software Rotoru-Gene Q je primárně instalován v prostředí, ve kterém existují postupy, které minimalizují tuto hrozbu. Tyto postupy většinou vyžadují použití patřičného antivirového programu. Díky přítomnosti velkého množství antivirových programů, které jsou k dispozici, nemůže firma Qiagen předpovídat všechny účinky na software Rotoru-Gene Q, když je takový program aktivní během analýzy. Abyste dosáhli konzistentních výsledků, správci systému by měli během provozu zajistit následující:

- Přístup k souboru není zachycen antivirovým programem.
- Nejsou aktualizovány virové databáze.
- Soubory nejsou skenovány.

Důrazně doporučujeme zablokovat antivirový program během shromažďování dat PCR v reálném čase. Důležité úkony antivirového programu popsané výše mohou být bezpečně provedeny bez rizika ovlivnění výkonu přístroje pouze v situaci, kdy software Rotoru-Gene Q neběží.

4.9.2 Systémové nástroje

Mnoho systémových nástrojů využívá významné systémové zdroje i v případě nulové systémové interakce. Typické příklady takových nástrojů jsou:

- Indexování souborů, které probíhá na pozadí úkonů u mnoha současných kancelářských aplikací.
- Defragmentace disku, která často využívá další úkony v pozadí.
- Každý softwarový program, který na internetu vyhledává aktualizace.
- Nástroje dálkového monitorování a managementu.

Mějte prosím na paměti, že díky dynamickému pokroku ve světě IT nemusí být tento seznam úplný a že mohou být k dispozici nástroje, které nejsou v této době ještě známy. Je důležité, aby správce systému zajistil, že žádný podobný nástroj není během procesu PCR aktivní.

4.9.3 Aktualizace operačního systému

Důrazně doporučujeme vypnout všechny automatické aktualizace operačního systému v počítači, který je používán pro sběr dat Rotoru-Gene Q. Naše firma pečlivě monitoruje aktualizace, které jsou k dispozici, a upozorňuje své zákazníky, kdykoliv považujeme aktualizaci za bezpečnou a důležitou.

4.10 Aktualizace softwaru

Aktualizace jsou k dispozici na webových stránkách firmy QIAGEN-[www.qiagen.com /goto/RGQ-MDx](http://www.qiagen.com/goto/RGQ-MDx), které jsou přístupné také v menu „Pomoc“ v tomto softwaru. Pokud chcete stáhnout tento software, musíte se registrovat on-line.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

5 Provozní postupy - Hardware

Tato kapitola popisuje provoz Rotoru-Gene Q MDx.

5.1 Typy rotorů

Nejdříve si zvolte typ zkumavky a rotoru, které chcete použít. Přístroj má k dispozici 4 rotory pro různé druhy zkumavek.

Poznámka: 36-jamkový a 72-jamkový rotor jsou dodávány spolu s instrumentem, jako příslušenství.

DŮLEŽITÉ: U jedné série použijte identické zkumavky. Nemíchejte rozdílné typy zkumavek ani zkumavky od různých výrobců, neboť by to mohlo ovlivnit optickou uniformitu. Doporučujeme používat zkumavky od firmy QIAGEN, které jsou speciálně navrženy pro použití s Rotor-Gene Q (viz příloha C). Zkumavky od jiných výrobců mohou vykazovat autofluorescenci, což může ovlivnit spolehlivost výsledků. Navíc se mohou zkumavky od jiných výrobců lišit délkou a tloušťkou, což by mohlo způsobit vychýlení z osy optické dráhy Rotoru-Genu Q a následně negativně ovlivnit reakci ve zkumavce. Firma QIAGEN si vyhrazuje právo odmítnout technickou podporu pro problémy zaviněné použitím plastových materiálů, které nejsou dodávány firmou QIAGEN.

Důležité: Použití plastových materiálů na přístroji Rotor-Gene Q MDx, které nejsou certifikovány firmou QIAGEN, může zrušit záruku.

36-jamkový rotor

36-well rotor má červenou barvu. Tento rotor a 36-well Locking Ring umožňují použití PCR zkumavek 0,2 ml s plochými víčky. Tyto zkumavky nemusí mít opticky průhledné víčka, protože Rotor-Gene Q čte fluorescenci ze dna zkumavky místo z její horní části.

Je také možné použít konické zkumavky.



72-jamkový rotor

72-well rotor má modrou barvu. Tento rotor a 72-well Locking Ring se používají se stripy po 4 o 0,1 ml s víčky, které mohou být používány pro objemy nízké až 10 µl. Čepičky poskytují bezpečné a spolehlivé těsnění.



Rotor-Disk 72 rotor

Rotor rotorového disku 72 má šedou barvu. Tento rotor a Locking Ring se používá s Rotor-Diskem 72. Rotor-Disk 72 je kroužek se 72 jamkami. K utěsnění Rotor-Disku 72 se používá průhledný polymerový film (fólie), která je teplem natavena na jeho vrchní část. Tato fólie díky rychlé aplikaci zabraňuje kontaminaci tím, že poskytuje pevné, trvanlivé a neporušitelné utěsnění. Pro více informací o Rotor-Disku 72 se podívejte do sekce 5.3.



Rotor-Disku 100 rotor

Rotor Rotor-Disku 100 má zlatou barvu. Rotor Disk 100 a jeho Locking Ring je používán s Rotor-Diskem 100. Rotor-Disk 100 je kroužek se 100 jamkami. Rotor-Disk 100 je rotační ekvivalent destičky 96-jamkového formátu s přidanými čtyřmi referenčními jamkami.

Umožňuje integraci Rotor-Genu Q s 96-jamkovými laboratorními postupy. Přebytečné jamky mohou být použity pro více vzorků a kontrolní nebo orientační reakce bez toho, aby zabíraly pozice v 96-jamkovém procesu. Pro bezproblémovou kompatibilitu s 96-jamkovými procedurami používají jamky Rotor-Disk 100 96-jamkové konvenční značení, tedy A1-A12 až H1-H12. Čtyři přebývající referenční jamky jsou označeny R1 – R4. Více informací o Rotor-Disku 100 viz sekce 5.3.

**Specifikace rotorů**

Typy rotorů	Kapacita jamky	Počet vzorků	Typ zkumavky	Doporučený reakční objem
36-well Rotor	200 µl	36	PCR zkumavky, 0,2 ml	20–50 µl
72-well Rotor	100 µl	72	Stripy po 4 s víčky, 0.1 ml	10–50 µl
Rotor-Disc 72 rotor	100 µl	72	Rotor-Disc 72	20–25 µl
Rotor-Disc 100 rotor	30 µl	100	Rotor-Disc 100	15–25 µl

Poznámka: 36-well rotor a 72-well rotor pro Rotor-Gene Q nemohou být použity s instrumenty Rotor-Gene 3000, protože nejsou opticky osově kompatibilní. S instrumenty Rotor-Gene 3000 používejte prosím staré 36-poziční a 72-poziční rotory.

Poznámka: Stripy o 0,1 ml mohou být používány i pro objemy reakce malé až 5 µl s použitím vrstvičky (overlay) viz QIAGEN Vapor-Lock PCR.

5.2 Nastavení reakce

DŮLEŽITÉ: Při každém běhu je nutné používat adekvátní kontroly, aby byla zajištěna spolehlivost výsledků.

Reakce se připravují v chladícím (loading) bloku a to 96 x 0,2 ml (pro PCR zkumavky 0,2 ml), nebo v chladícím bloku 72 x 0,1 ml (pro stripy s víčky po 0,1 ml) a nebo bloku na 72 x 0,1 ml pro multikanálové pipety (pro stripy s víčky po 0,1ml), dále také v bloku k Rotor-Disku 72 (pro Rotor-Disk 72) nebo bloku k Rotor-Disku 100 (pro Rotor-Disk 100).

Všechny chladicí bloky jsou vyrobeny z hliníku a mohou být předem nachlazeny.

Do chladicího bloku na 72 zkumavek 0,1 ml (na obrázku) se vejde 18 stripů (po 4) o 0,1 ml a také až 8 zkumavek 0,5 ml, které mohou být použity k přípravě pracovního (master) mixu a dále až 16 zkumavek 0,2 ml, které mohou být použity k přípravě standardních křivek.

Níže popsaná procedura popisuje přípravu reakce pro 72-jamkový rotor. Stejný postup může být použit pro reakční sestavu při použití 36-jamkového rotoru a jeho příslušenství.

1. Umístěte stripy (zkumavky) do chladicího bloku a rozpipetujte reakční komponenty.



2. Pevně umístěte víčka na stripy a vizuálně se přesvědčte, že jsou dobře utěsněna.



3. Vložte stripy do 72-jamkového rotoru a přesvědčte se, že každá zkumavka dobře sedí ve svém otvoru. Vzorky nebudou optimálně zarovnané nad detektorem, pokud nebudou správně umístěny v rotoru. Toto by mohlo způsobit snížení získaného fluorescenčního signálu a citlivosti detekce. Držák na rotor, který umožňuje snadné vkládání zkumavek, je dodáván spolu s přístrojem.



DŮLEŽITÉ: Pro dosažení maximální teplotní uniformity musí každá pozice v rotoru obsahovat zkumavku. Zaplnění všech pozic v rotoru zajišťuje stejnoměrné proudění vzduchu ke každé zkumavce. Mějte připravenou zásobu prázdných uzavřených zkumavek, které Vám budou k dispozici k zaplnění všech volných pozic.

4. Vložte Locking Ring pro 72-well rotor do 72-jamkového rotoru vtačením 3 vodících kolíčků skrz vnější otvory rotoru.

Locking Ring zajišťuje, že víčka zůstanou na zkumavkách během procesu.



5. Nyní vložte celou sestavu do komory Rotor-Gene Q tak, že ji zacvaknete do pozice dle kolíčku (trnu) na centrální části rotoru. Když chcete sestavu vyndat, jednoduše zmáčkněte centrální část rotoru a sestavu vytáhněte.



6. Zavřete kryt a nastavte profil běhu za pomoci softwaru Rotor-Gene Q.

5.3 Nastavení reakce v Rotor-Discích

Rotor-Disc 72 a Rotor-Disc 100 se skládají ze 72, respektive 100 jamek, umístěných v jednom plastovém kroužku.

Rotor-Disc 72 a Rotor-Disc 100 nepoužívají víčka. Místo nich se používá tepelná těsnicí fólie. (Rotor-Disc Heat Sealing Film), která je aplikována na horní část a tím je, díky vlastnostem fólie, zabráněno kontaminaci.

Tepelné utěsnění Rotor-Disců se provádí podle postupu popsaného níže.

DŮLEŽITÉ: Přečtěte si prosím návod dodávaný s přístrojem na tepelné utěsňování (zátavování) - Rotor-Disc Heat Sealer, než začnete následující proceduru.

1. Zapněte Rotor-Disc Heat Sealer pomocí vypínače, který je umístěn na zadní levé straně. Tlačítko je červeně iluminováno. Trvá asi 10 minut, než Rotor-Disc Heat Sealer dosáhne provozní teploty; toto je signalizováno rozsvícením zeleného tlačítka „Ready“ (připraven).

Poznámka: Jakmile je Rotor-Disc Heat Sealer připraven, je možno ho nechat průběžně zapnutý.

2. Vložte Rotor-Disc do jeho chladicího (loading) bloku, tak aby první jamka byla na označení dírkou.
3. Napipetujte reagenty do Rotor-Discu manuálním pipetováním nebo pomocí automatického pipetovacího systému QIAgility™.



4. Vyjměte střední část jedné vrstvy těsnícího filmu Rotor-Discu tak, že ho přehnete v polovině, prolisovány střední díl a opatrně odtrhněte.
5. Umístěte film na Rotor-Disc ve správné pozici podle nápisu „SIDE UP“ (nahoru). Přesvědčte se, že štítek „SIDE UP“ je umístěn ve spodní části chladicího (loading) bloku Rotor-Discu. Střední otvor filmu by měl lehce sklouznout přes cylindr loading bloku Rotor-Discu a na jeho vrchol.



6. Zasuňte celý blok do letovačky Rotor-Disc Heat Sealeru za pomoci naváděcích kolejniček na straně loading bloku Rotor-Discu. Přesvědčte se, že loading blok Rotor-Discu je kompletně zasunut.



7. Pro aktivaci těsnícího mechanismu nejdříve zatlačte na modrou anodizovanou příčku na horní části letovačky Heat Sealer a potom zatlačte zpátky na černou záklonku.



8. Když byl těsnící mechanismus spuštěn, rozsvítí se oranžové světlo „Utěšňování“. Pokud není loading blok Rotor-Discu ve správné pozici, ozve se varovný signál.
9. Když je těsnění dokončeno, ozve se pípnutí a rozsvítí se oranžové světlo „Ready“. Zatlačte na modrou anodizovanou příčku, čímž zvednete a uzamknete těsnící mechanismus zpět do své původní pozice. Nepokračujte v utěšňování déle, než je naznačeno pípnutím nebo by mohlo dojít k poškození Rotor-Discu.
10. Vysuňte loading blok Rotor-Discu z Rotor-Disc Heat Sealeru. Nechte film ochladnout po dobu přibližně 10 vteřin a potom jemně odstraňte přebytečný film.

11. Vyjměte Rotor-Disc z loading bloku Rotor-Discu. Vložte Rotor-Disc do rotoru za pomoci naváděcího zoubku pro správné umístění.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

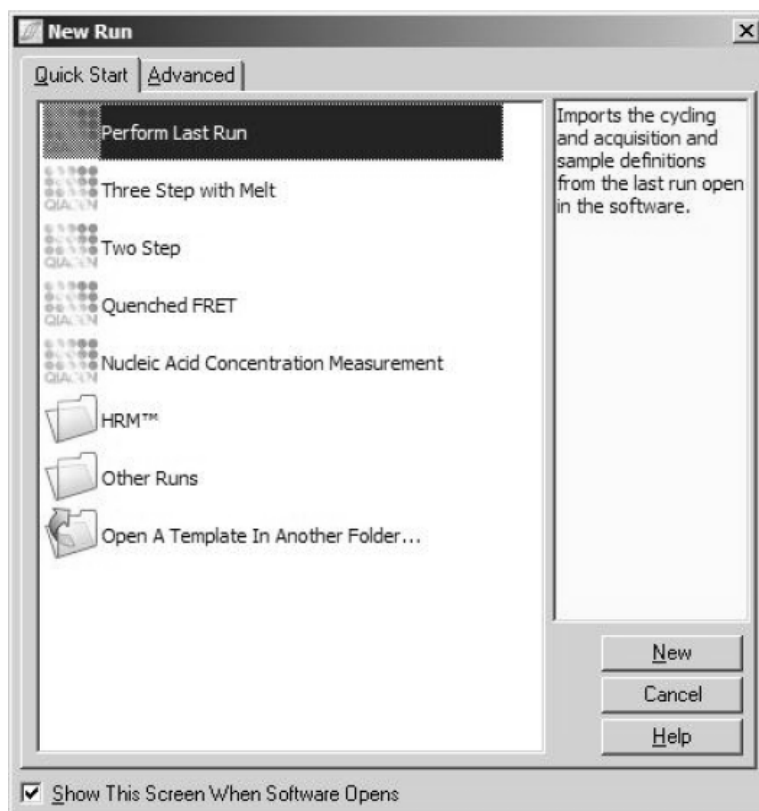
6 Provozní postupy — Software

Nové běhy mohou být nastaveny pomocí Quick Start Wizardu nebo Advanced Wizardu, což jsou programy, které se objeví při spuštění softwaru. Quick Start Wizard je navržen tak, aby umožnil uživateli začít pracovat, jak nejrychleji je to možné. Advanced Wizard poskytuje více možností, jako například konfiguraci Gain Optimisation (optimalizace výnosu) a nastavení objemu. Wizard obsahuje mnoho šablon s výchozími cyklovacími podmínkami a vstupními kanály. Pokud chcete změnit typ wizardu, zvolte příslušné tlačítko ve vrchní části okna „New Run“.

6.1 Quick Start Wizard

Quick Start Wizard umožňuje uživateli začít pracovat tak rychle, jak jen to je možné. Uživatel si může zvolit ze sady běžně užívaných šablon a zadat minimální parametry nutné pro začátek práce. Quick Start wizard automaticky počítá s tím, že reakční objem je 25 µl. Pro jiné objemy reakcí používejte Advanced wizard (kapitola 6.2).

Jako první krok si zvolte požadovanou šablonu tak, že dvakrát kliknete na šablonu ze seznamu v okně „New Run“.



Perform Last Run:	Tato možnost používá cyklování, čtení (fluorescence) dat a popis vzorků z posledního běhu otevřeného v softwaru.
Three Step with Melt:	Toto je tříkrokový cyklovací profil s křivkou tání a se čtením dat v zeleném (green) kanálu.
Two Step:	Toto je dvoukrokový cyklovací profil s daty získanými ze zeleného, žlutého, oranžového a červeného kanálu. (green, yellow, orange, red)
Quenched FRET:	Toto je tříkrokový cyklovací profil s křivkou tání. Na rozdíl od Three step with Melt je čtení fluorescence (dat) na konci annealing kroku.
Nucleic Acid Concentration Measurement:	Toto je výchozí šablona pro měření koncentrace nukleové kyseliny za pomoci interkalační barvičky.
HRM:	Tato složka obsahuje high resolution melt profily (tání s vysokým rozlišením).
Další běhy:	Tato složka obsahuje další profily.

Cyklovací a akviziční profily pro všechny šablony mohou být obměněny pomocí wizaru.

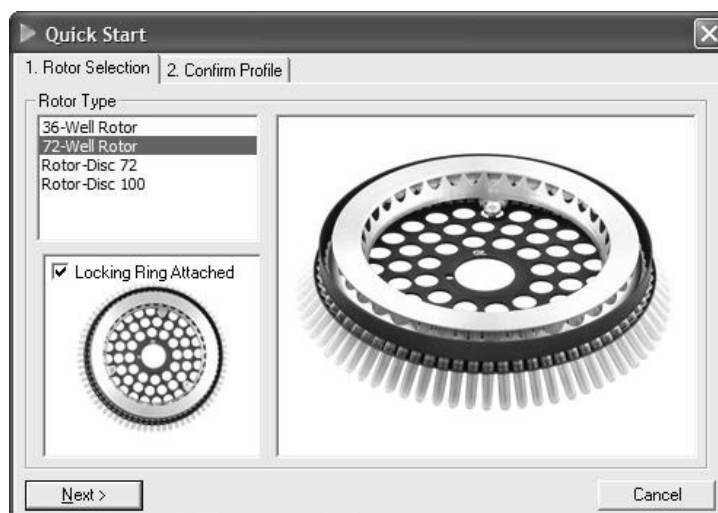
Poznámka: Šablony (templáty) teplotních profilů definovaných uživatelem mohou být přidány do seznamu šablon v Quick Start Wizard kopírováním nebo uložením jako soubor s příponou *.ret do **C:\Program Files\Rotor-Gene Q\Software\Templates\Quick Start Templates**. Po zkopírování souboru do této složky se šablona objeví jako ikona v seznamu. Pokud chcete mít vlastní ikonu pro vaši šablonu, vytvořte obraz *.ico se stejným jménem souboru jako měla šablona.

Příbuzné šablony (templáty) si můžete uložit do podsložek. Toto umožňuje organizaci šablon, což může být užitečné, například, když několik uživatelů používá stejný přístroj.

6.1.1 Volba rotoru

V příštím okně zvolte ze seznamu typ rotoru.

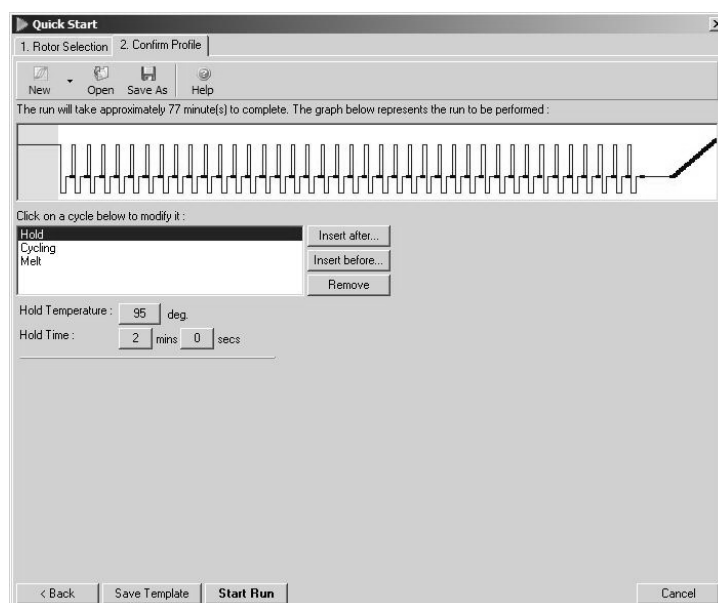
Zatrhnete „Locking Ring Attached (Vložen)“ a kliknete „Next (Další)“.



6.1.2 Nastavení profilu

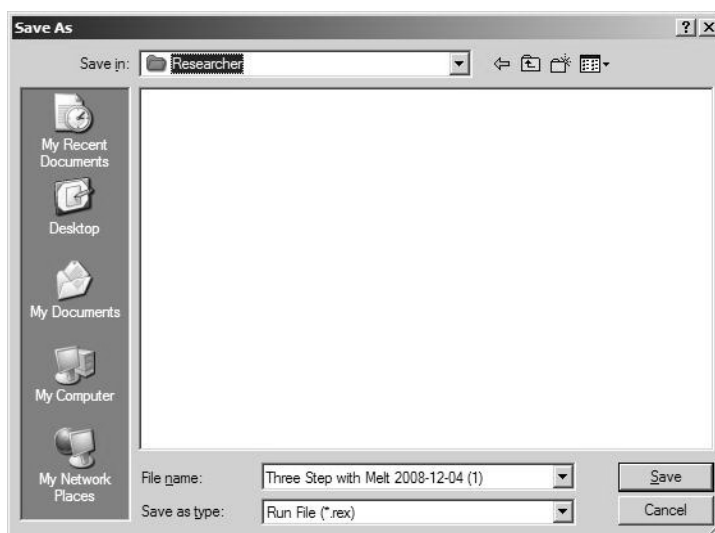
Cyklovací podmínky a vstupní kanály pro sběr dat zvolených šablon jsou importovány. Mohou být obměněny v okně „Edit Profile/Úprava profilu“ (viz kapitola 6.2.4).

Pro zahájení běhu stiskněte tlačítko „Start Run“. Je také možné uložit šablonu před začátkem běhu zmáčknutím „Save Template/Uložit šablonu“.



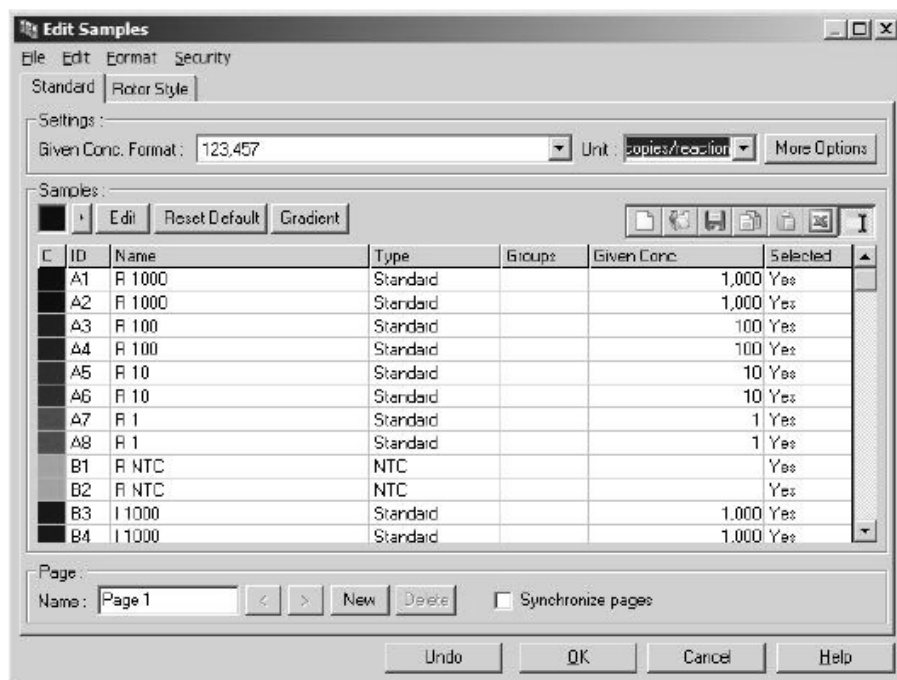
6.1.3 Uložení běhu

Když kliknete na tlačítko „Start Run“, objeví se okno „Save As Uložit jako...“. Běh může být uložen v místě podle přání uživatele. Soubor dostane automaticky jméno, které se skládá z použité šablony a data běhu. Pořadové číslo (1, 2, atd.) je také obsaženo v názvu souboru, aby bylo umožněno automatické pojmenovávání různých běhů, které byly provedeny s použitím stejné šablony.



6.1.4 Popis vzorku

Jakmile byl běh zahájen, okno „Edit Samples Editovat vzorky“ umožní vzorky definovat a popsat.

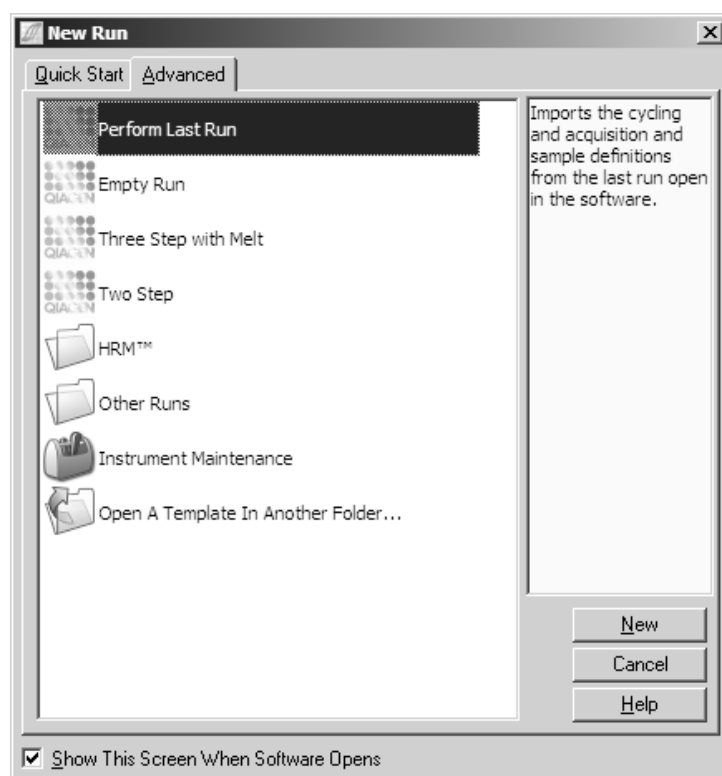


Okno „Edit Sample“ se objeví po spuštění běhu, takže uživatel může využít tohoto času na vložení jmen vzorků. Bližší informace o nastavení a popisu vzorků v okně „Edit Sample“ najdete v kapitole 7.8.4.

6.2 Advanced Wizard

Advanced Wizard poskytuje možnosti, které nejsou k dispozici v Quick Start Wizard, jako je například konfigurace optimalizace gainu (citlivosti k fluorescenci).

Když chcete použít Advanced Wizard, zvolte šablonu dvojitým kliknutím na jméno šablony v seznamu, který naleznete v liště „Advanced“ v okně „New Run“.



Možnosti složek nabídnuté v tomto okně jsou podobné jako ty poskytované Quick Start Wizard (kapitola 6.1.).

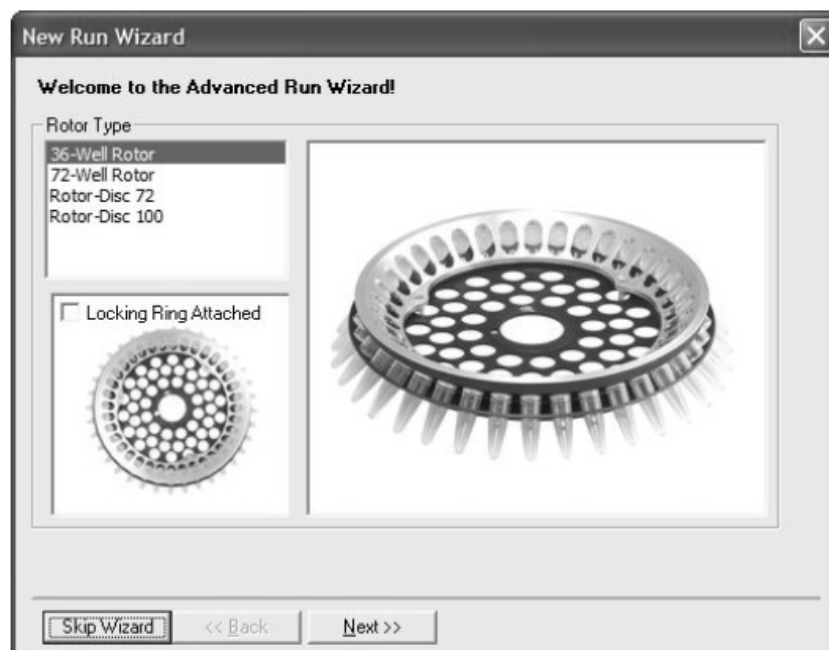
Perform Last Run:	Tato možnost používá cyklování, čtení (fluorescence) dat a popis vzorků z posledního běhu otevřeného v softwaru.
Empty Run:	Toto je „prázdný“ běh, který umožňuje uživateli definovat všechny parametry profilu. Čili nic není přednastaveno.
Three Step with Melt:	Toto je tříkrokový cyklovací profil s křivkou tání a se čtením dat v zeleném (green) kanálu.
Two Step:	Toto je dvoukrokový cyklovací profil s daty získanými ze zeleného, žlutého, oranžového a červeného kanálu. (green, yellow, orange, red)
HRM:	Tato složka obsahuje dva high resolution melt profily (tání s vysokým rozlišením).
Other runs:	Tato složka obsahuje další profily.
Instrument Maintenance:	Zde jsou obsaženy šablony používané během Optické verifikace teploty (OTV). Více informací najdete v kapitole 10. Tato šablona je uzamčena, aby bylo zajištěno, že tento profil vždy funguje správně.

Poznámka: Šablony definované uživatelem mohou být přidány do seznamu šablon v Advance Start Wizard kopírováním nebo uložením jako soubor s příponou *.ret do **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates**. Po zkopírování souboru do této složky se šablona objeví jako ikona v seznamu.

6.2.1 New Run Wizard - Okno 1

V příštím okně vyberte ze seznamu typ rotoru.

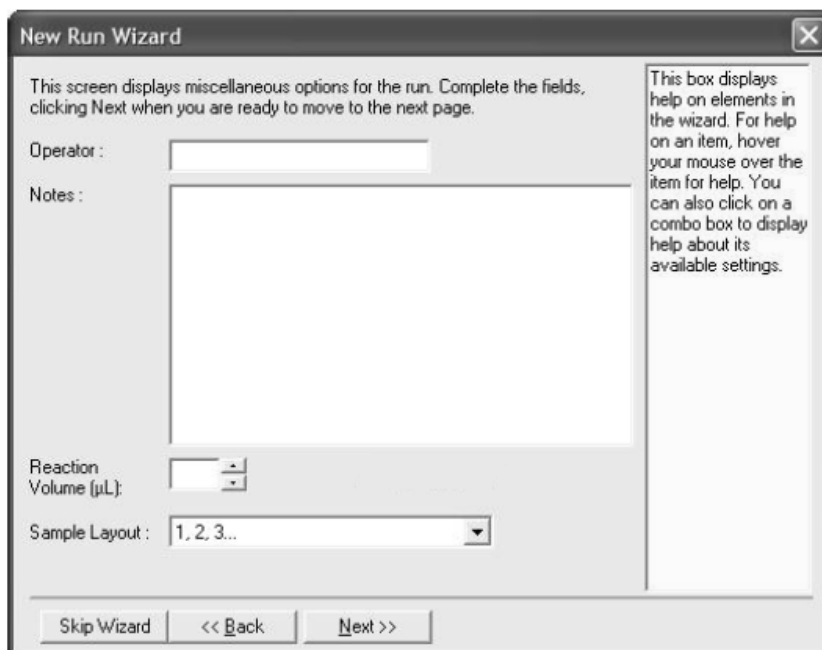
Zatrhnete „Locking Ring Attached, Vložen“ a kliknete „Next, Další“ pro pokračování.



6.2.2 New Run Wizard - Okno 2

V tomto okně lze vložit jméno uživatele a poznámky o běhu. Také je nutné vložit objem reakce.

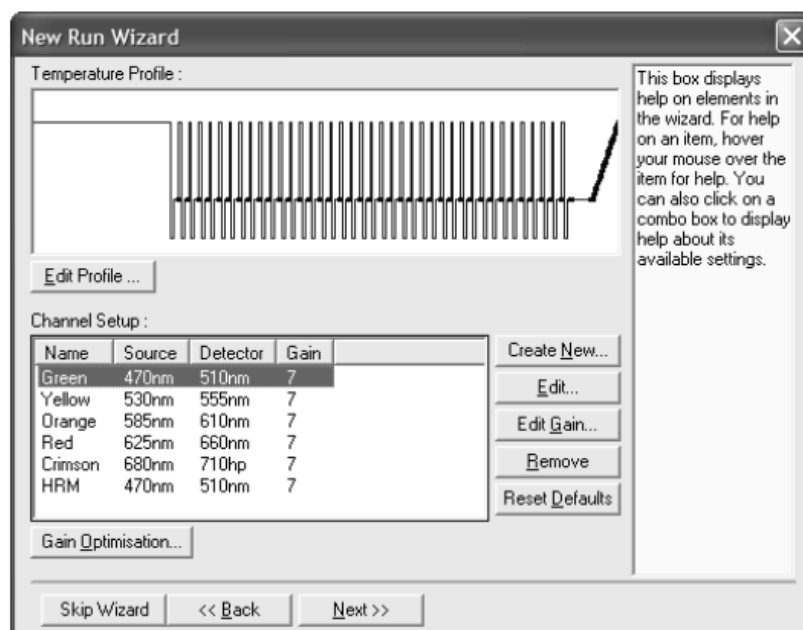
Pokud byl v okně 1 vybrán 72-well rotor, jsou k dispozici tři možnosti rozložení vzorků v rozbalovacím menu. „1,2,3...“ jsou výchozí volby. Většina uživatelů volí tuto možnost. „1A, 1B, 1C...“ by mělo být zvoleno, když jsou vzorky pipetovány v sousedících 0,1 ml stripech osmikanálovou pipetou. Také si můžete zvolit rozložení „A1, A2, A3...“.



6.2.3 New Run Wizard - Okno 3

V tomto okně může být modifikován „Temperature Profile, Teplotní profil“ a „Channel Setup, Nastavení kanálu“. Když kliknete na tlačítko „Editovat profil“, objeví se okno „Edit profile, Editovat profil“, kde je umožněna změna cyklovacích podmínek a volba kanálů (Kapitola 6.2.4).

Po nastavení profilu klikněte na tlačítko „Gain Optimisation/Nastavení citlivosti k fluorescenci...“, čímž se toto okno objeví (viz strana 6-21).



6.2.4 Editování profilu

Okno „Edit Profile, Editování profilu“ umožňuje nastavení cyklovacích podmínek a čtecích kanálů. Úvodní profil, který se ukáže, je založen na šabloně, která byla vybrána při nastavení běhu (viz kapitola 6 -1). Profil je grafický znázorněn. Seznam kroků profilu se objeví pod grafem a obsahuje možnosti: Hold (Držet) (kapitola 6-11), Cyklování (kapitola 6-12), Melt (Tání) (kapitola 6-15) nebo HRM, pokud je přístroj vybaven kanálem HRM (kapitola 6-16).

Každý krok profilu může být editována kliknutím na příslušnou oblast v grafickém znázornění nebo na název v seznamu. Poté můžete měnit nastavení, které se vám objeví.

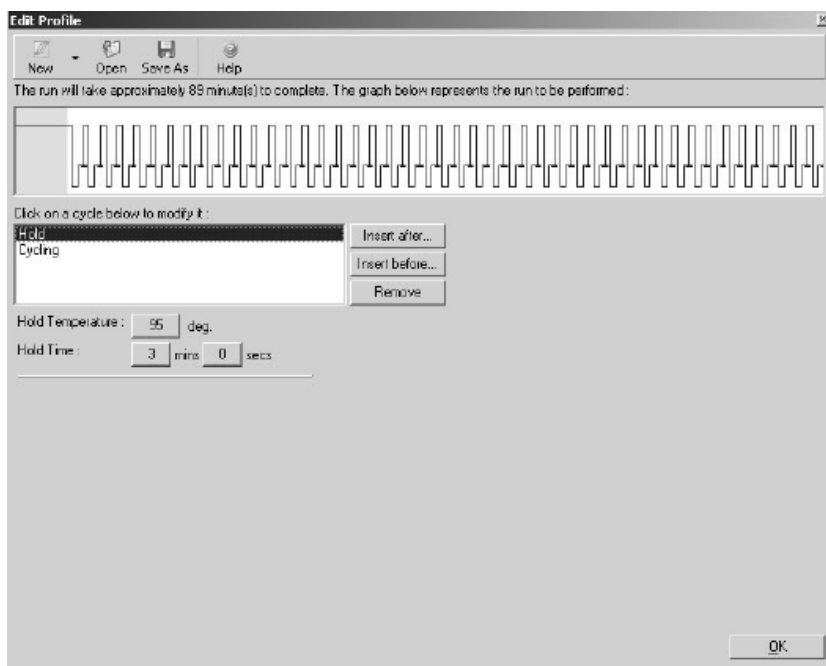
Insert after,
Vložte po...: Tato volba umožňuje přidat nový cyklus po zvoleném cyklu.

Insert before,
Vložte před...: Tato volba umožňuje přidat nový cyklus před zvolený cyklus.

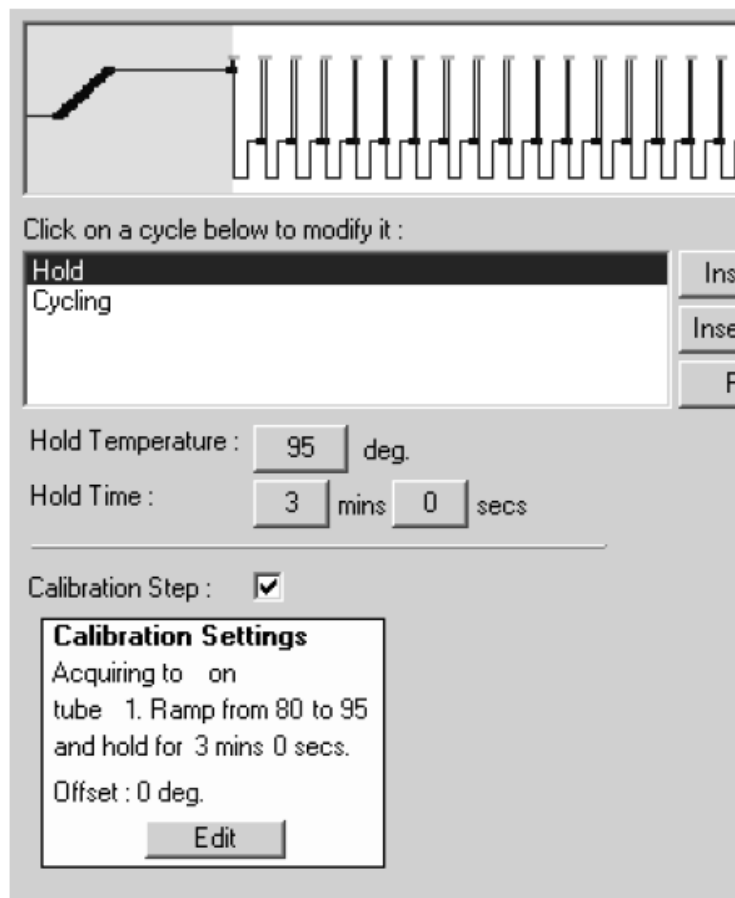
Remove,
Vymout: Touto volbou odstraníte zvolený cyklus z profilu.

Hold - Držení

Tato volba přikazuje Rotor-Genu Q, aby zůstal v určené teplotě po určitou dobu. Pokud chcete změnit teplotu, klikněte na tlačítko „Hold Temperature, Držet teplotu“ a buď napište zvolenou hodnotu teploty nebo použijte posuvnou lištu. Když chcete změnit dobu retence, klikněte na „Hold time“ (čas retence), a dále na tlačítka „mins“ a „secs“ pro nastavení minut a vteřin.



Při provádění optického denaturačního cyklování může být retence použita jako kalibrační krok. V tomto případě se kalibrační tání provádí před krokem Retence. Toto je také výchozí nastavení, které však může být změněno, pokud si to uživatel přeje.



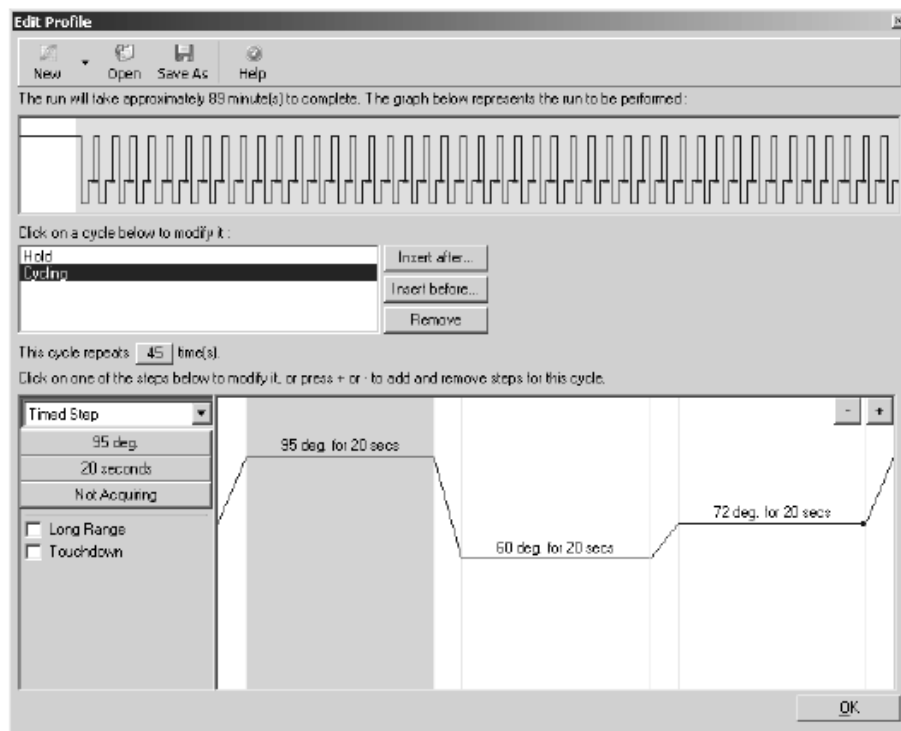
Pro více informací o optickém denaturačním cyklování najdete na straně 6-16.

Cycling - Cyklování

Cyklování opakuje teplotní a časové kroky definované uživatelem v určitých počtech. Počet opakování se nastaví použitím tlačítka „This cycle repeats X time(s), Cyklus se opakuje X-krát“.

Jednotlivý cyklus je zobrazen na displeji graficky (tak, jak je to ukázáno na obrázku níže). Každý krok cyklu může být upraven. Teplota může být změněna potažením teplotní čáry v grafu nahoru nebo dolů. Trvání kroku může být změněno potažením teplotní hranice v grafu doleva či doprava. Nebo je také možné na krok kliknout a použít tlačítka na teplotu a čas v levé části grafu.

Kroky mohou být přidány nebo odebrány z cyklu pomocí tlačítek „+“ a „-“ v horním pravém rohu grafu.

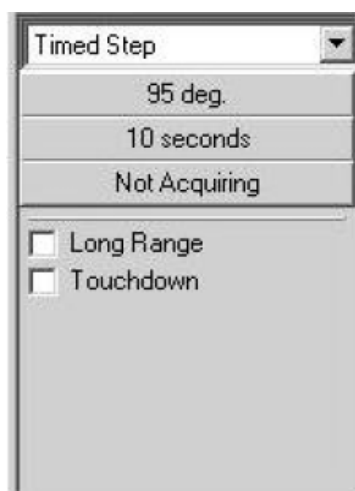


Long Range: Zatržení tohoto políčka zvýší čas retence (Hold) zvoleného kroku o jednu vteřinu s každým novým cyklem.

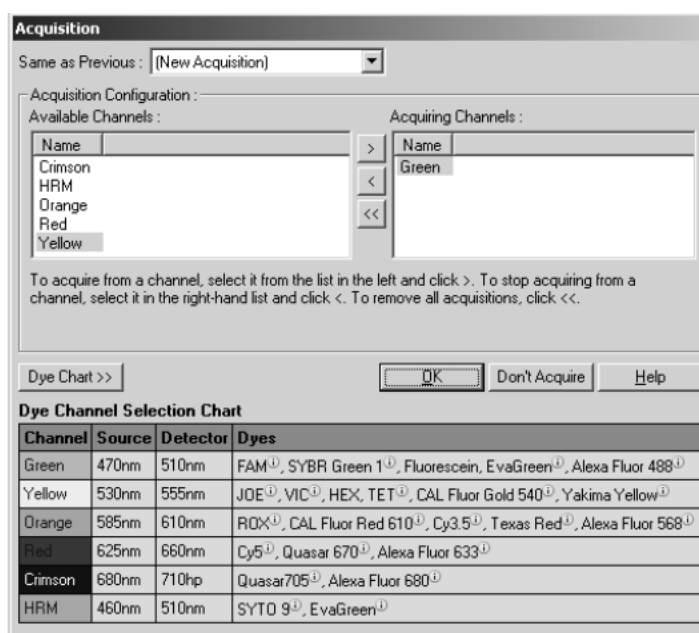
Touchdown: Zatržení tohoto políčka sníží teplotu o určený počet stupňů po specifický počet počátečních cyklů. Toto je potom vyznačeno na displeji.


Akvizice - sběr fluorescencenčních dat v kanálech



Data mohou být sbírána na jakémkoliv kanálu na jakémkoliv kroku. Abychom nastavili kanál na akvizici dat, klikneme na tlačítko „Not Acquiring“ (nepřijímá) (pokud už byl kanál nastaven přijímat v tomto kroku, potom jsou čtecí kanály uvedeny zde).



Po kliknutí na tlačítko „Not Acquiring“ (nepřijímá) se objeví okno Akvizice.



Pro nastavení kanálu na příjem, zvolte kanál a přesuňte ho z „Available Channels, kanálu, které jsou k dispozici“ do „Acquiring Channels, přijímacích kanálů“ za pomoci tlačítka . Zvolený kanál je možno odstranit ze seznamu

„Acquiring Channels“ za použití tlačítka . Tlačítko  odstraní všechny kanály ze seznamu „Acquiring Channels“. Kliknutím na tlačítko „Don't Acquire“ také vyjmete všechny akvizice z tohoto kroku.

Pokud je v profilu zahrnuta více než jedna cyklovací sekvence, získaná data mohou být přiřazena k datům získaným v předešlých cyklováních. Použijte rozbalovací menu „Same as Previous „Stejně jako minule“ pro selekci cyklického kroku, do kterého by měla být data doplněna.

Tabulka „Dye Channel Selection Chart“ pomáhá uživateli v rozhodnutí, který kanál je vhodný pro barvičku, kterou má v úmyslu používat. Fluorescenční barvičky uvedené v tabulce jsou ty, které jsou běžně používány a nepředstavují omezení tohoto přístroje.

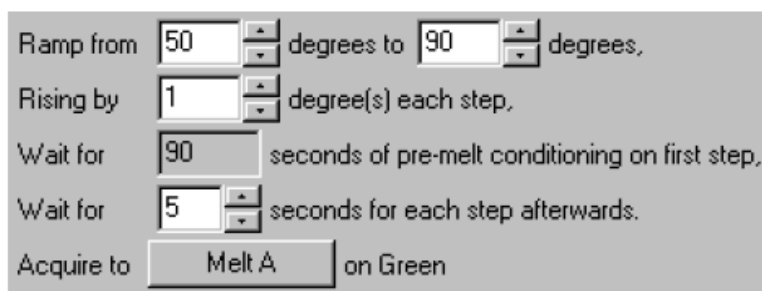
Akviziční možnosti popsané výše se také vztahují ke krokům „Melt, Tání“, pouze není možné doplnit akviziční data za použití „Same as Previous „Stejně jako předchozí“ menu.

Melt -Tání a hybridizace

Tání je v rozsahu mezi dvěma teplotami, od nižší do vyšší teploty. Povolенý rozsah teplot je 35 – 99° C.

Když chceme nastavit Melt,Tání, specifikujeme počáteční teplotu, koncovou teplotu, teplotní inkrementy, délku doby retence při první akviziční teplotě než je Tání spuštěno, dobu každého inkrementu a akviziční kanály.

Tání je generováno mezi dvěma teplotami. Když je počáteční teplota vyšší než konečná teplota, název tohoto kroku se změní na „Hybridisation, hybridizaci“. Možnost „Acquiring To“ se nastaví na Melt A na displeji zobrazeném níže, může být změněna kliknutím na tlačítko. Objeví se okno „Acquisition, Akvizice“ a mohou být navoleny kanály.



Ramp from 50 degrees to 90 degrees,
Rising by 1 degree(s) each step,
Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step,
Wait for 5 seconds for each step afterwards.
Acquire to Melt A on Green

Když provádíme standardní tání, teplota se zvyšuje o 1°C a čeká se 5 vteřin před každou akvizicí. Rotor-Gene Q může být konfigurován na tání v přírůstcích 0,02°C. Minimální retence mezi teplotními kroky se liší podle počtu stupňů mezi každým krokem.

High Resolution Melt (HRM)

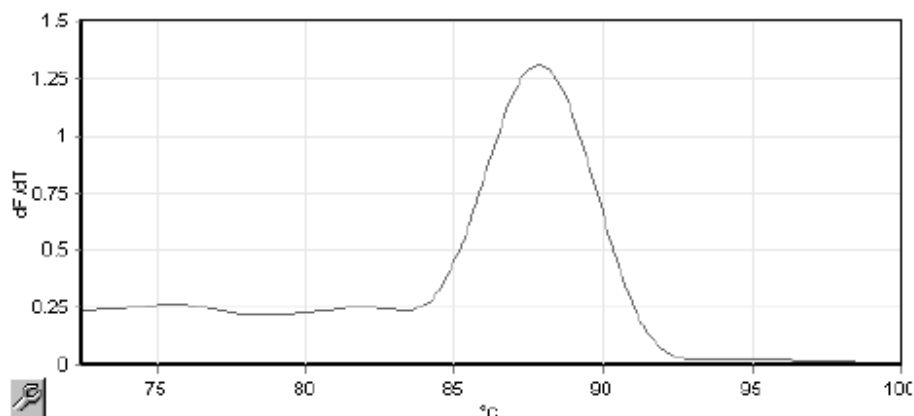
Analýza HRM je založena na separaci (disociaci) vzorků dvouřetězcové DNA. Tato metoda je podobná klasické analýze křivky tání, ale poskytuje mnohem více informací a má užití pro širší škálu aplikací. Zobrazí rozlišení vzorků, lišících se podle sekvence, délky, obsahu GC nebo komplementarity řetězců a to až ke změnám v jednotlivých párech.

Analýza HRM může být prováděna pouze na přístrojích, které mají instalováno HRM hardware a software. Data jsou získávána za použití speciálního HRM kanálu a detektorů. Analýza HRM také zahrnuje možnost provést Optimalizaci Gainu těsně před tím, než začne tání. Po provedení mohou být HRM data analyzována pomocí HRM softwaru (kapitola 11).

Optické denaturační cyklování

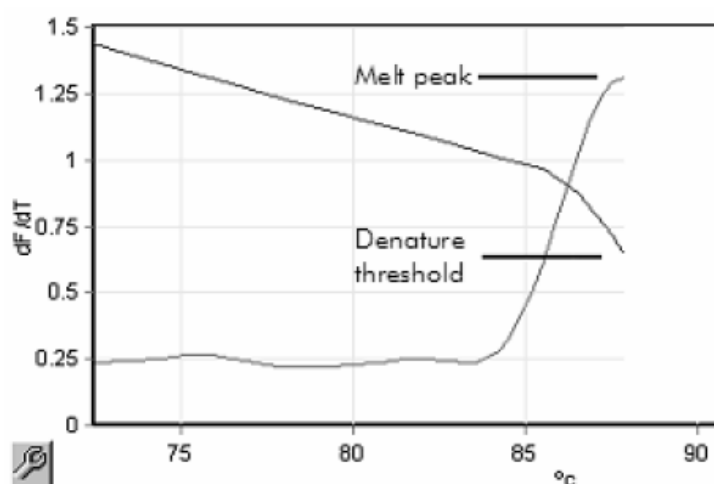
Optické denaturační cyklování je velmi slibná technika proveditelná na Rotoru-Gene Q, která umožňuje analýzu tání v reálném čase za účelem zjištění vrcholu tání referenčního vzorku. Toto indikuje denaturaci PCR produktů s větší přesností než pomocí nastavení určité denaturační teploty pro čas retence (Hold). Tato technika spočívá v umístění referenční zkumavky s produktem PCR do pozice pro zkumavku 1 na rotoru. Referenční zkumavka

také musí obsahovat detekční chemikálie, které umožňují detekci separace řetězců. Při zahřívání na počáteční denaturační teplotu je tání prováděno na zeleném (Green) kanálu mezi 80°C - 95°C , což je výchozí nastavení. Parametry počátečního tání mohou být upraveny uživatelem. Z těchto dat je vytvořena křivka tání a automaticky analyzována.



cyklování přístroj zahřeje tak rychle, jak je to jen možné a data jsou získávána kontinuálně. Jakmile referenční zkumavka dosáhla fluorescenční úrovně denaturačního prahu, přístroj je okamžitě zchlazen a přechází k příštím naprogramovanému kroku ve svém cyklu. Vrchol není vypočítán při cyklování. Místo toho je fluorescenční hladina porovnávána k vrcholu tání a toto určuje denaturační práh.

V následujícím grafu jsou zakreslena původní „raw“ fluorescenční data a první derivativy. Ukazuje se zde vztah mezi denaturačním prahem a vrcholem tání získaným během kalibrace.



Pro provedení optického denaturačního cyklování budete potřebovat:

- Předamplifikovaný PCR produkt umístěný v pozici 1 na rotoru. Tento vzorek by měl obsahovat stejný produkt PCR jako zkoumané vzorky a detekční chemikálie pro monitorování disociace PCR produktu.
- Optický denaturovaný profil. Buď může být vytvořen nový profil nebo může být upraven profil existující (viz detaily níže).

Optický denaturační cyklus vypadá takřka stejně jako jiné cykly. Hlavní rozdíl tkví v tom, že krok tání (melt) je automaticky vložen na začátku profilu a v ostrém profilu denaturačního kroku během cyklování. Optický denaturační cyklus nevyžaduje definované retenční časy, jelikož disociace produktů je monitorována při každém cyklu.

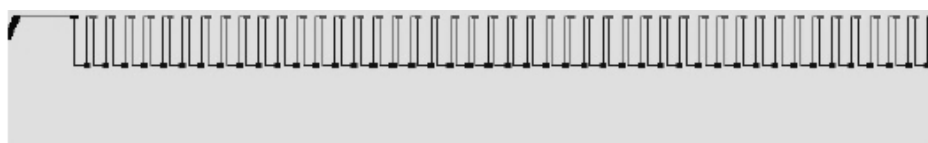
Pro provedení této techniky jsou nutné následující informace:

- Prvotní denaturační teplota. Toto je stejná teplota jako Denaturační krok ve standardním cyklovacím profilu.
- Pozice zkumavky se vzorkem PCR, který vyprodukuje křivku tání v zeleném (Green) kanálu.
- Profil optického denaturačního cyklování musí být definován.


Vytvořte nový optický denaturační cyklus následujícím způsobem:

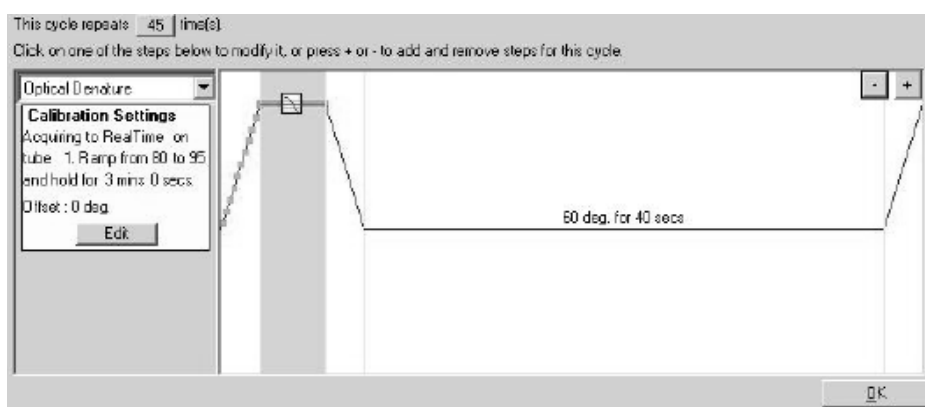
1. Otevřete okno „Edit Profile, Editace profilu“. Potom klikněte „New, Nový“. V okně, které se objeví, klikněte na tlačítko „Insert after, Vložte po“ a zvolte „New Cycling, Nové cyklování“ z menu.

Pak zvolte teplotu kliknutím na graf. V rozevíracím menu změňte „Timed Step, Časovaný krok“ na „Optical Denature, Optická denaturace“. Objeví se výchozí profil obsahující denaturační krok a optický denaturační cyklus.

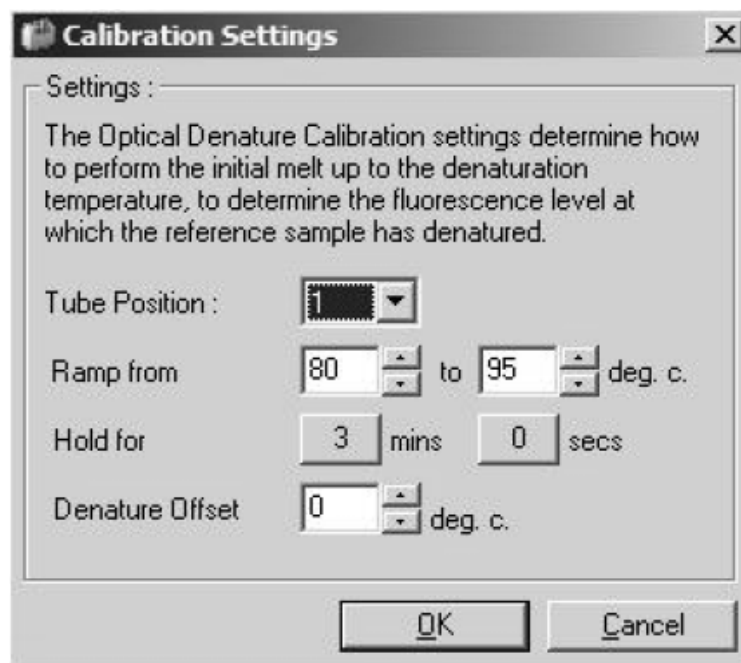


Členěná oblast na začátku běhu představuje kalibrační proces. Zelené tečky představují akvizice, přijaté během zahřívacích cyklů. Modré tečky představují akvizice na konci chladicího procesu při 60°C. Všimněte si, že zatímco profil ukazuje každý krok se stejnou denaturační teplotou, toto nemusí být pravda. Pokud vzorek vyžaduje trochu delší čas k tání ke konci běhu, optický denaturační proces na tání počká podle fluorescenčních dat a nikoliv podle času. Z tohoto důvodu se může teplotní stopa lišit u každého cyklu.

2. Klikněte na první polovinu grafu s optickým denaturačním symbolem . Na levé straně obrazovky se objeví informace „Calibration Settings, Kalibrační nastavení“.



3. Informace „Calibration Setting, Kalibrační nastavení“ jsou většinou správné. Pokud je nutné je upravit, klikněte na „Edit, Editovat“. Objeví se okno „Kalibrační nastavení“.



Calibration Settings

Settings :

The Optical Denature Calibration settings determine how to perform the initial melt up to the denaturation temperature, to determine the fluorescence level at which the reference sample has denatured.

Tube Position : 1

Ramp from 80 to 95 deg. c.

Hold for 3 mins 0 secs

Denature Offset 0 deg. c.

OK Cancel

4. Přesvědčte se, že:

- Zkumavka indikovaná ve „Tube Position, Zkumavkové pozici“ obsahuje „referenční“ PCR produkt, který vykáže vrchol tání v zeleném (Green) kanálu.
- Poslední teplota v rozsahu nespálí vzorek, ale bude dostatečně vysoká, aby dovolila tání.
- Retenční čas (Hold) je dostatečný pro denaturaci vzorku.
- Denaturační offset je správně nastaven. Výchozí hodnota 0°C je vhodná pro většinu tání. Vzorky s velmi ostrými přechody mohou vyžadovat denaturační offset mezi -0,5°C do -2°C podle přání uživatele, aby bylo zajištěno, že přechod je detekován.

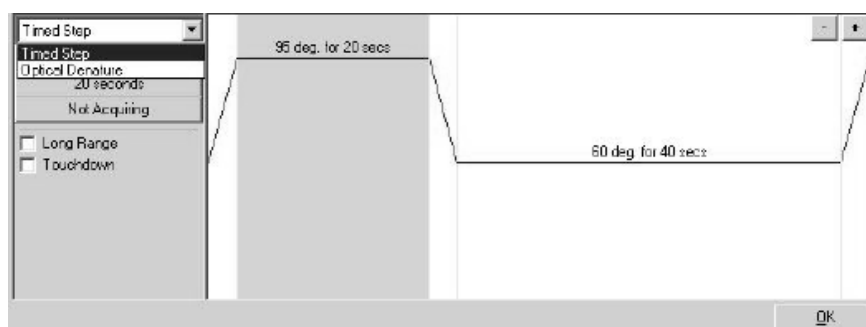
Můžete také definovat denaturační krok zavedením nového retenčního (Hold) kroku. Klikněte na „Insert before, Vložte před“ a zvolte „New Hold at Temperature, Nová retence při teplotě...“ z menu. Objeví se kalibrační nastavení.


Hold Temperature : 95 deg.
Hold Time : 3 mins 0 secs
Calibration Step : ☒
Calibration Settings
Acquiring to RealTime on tube 1. Ramp from 80 to 95 and hold for 3 mins 0 secs.
Offset : 0 deg.
Edit

Kalibrační nastavení je synchronizováno s denaturačními nastaveními, takže změna v retenčním čase denaturačního kroku automaticky nahrazuje kalibrační denaturační čas. To je z toho důvodu, že kalibrační proces a denaturace jsou v optickém denaturačním cyklování ekvivalentní.

Změna existujícího kroku na použití optického denaturačního cyklování

Pokud chcete změnit existující denaturační krok v cyklovací sekvenci, zvolte cyklus v seznamu okna „Edit profile, Editace profilu“. Potom vyberte denaturační krok kliknutím na grafickém zobrazení.



Klikněte na rozbalovací menu a zvolte „Optical Denature, Optická denaturace“. Teplota a retenční čas jsou vyjmuty a objeví se ikona „Optická denaturace“ .

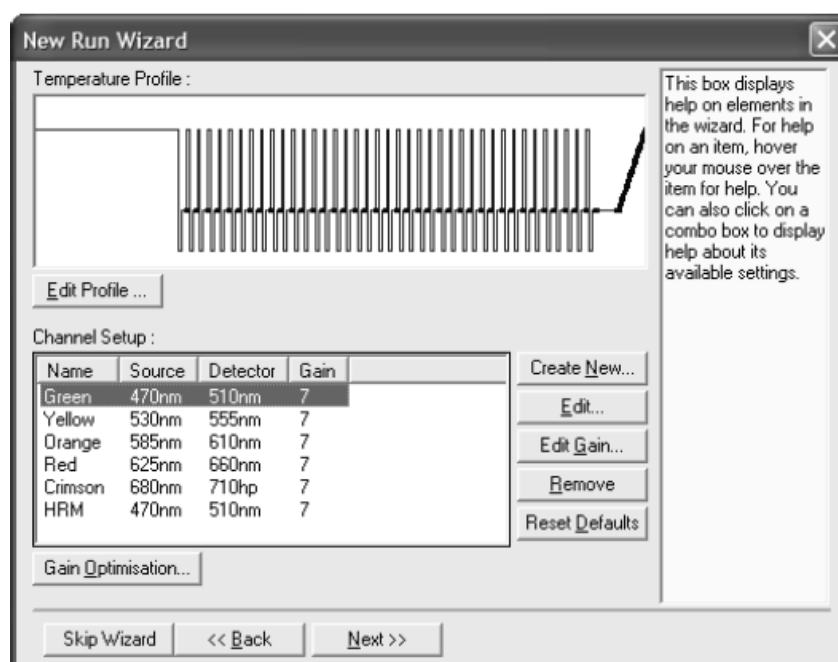
Optimalizace Gainu

Když nastavujeme úplně nový běh, je výhodné použít funkci „Gain Optimisation, Optimalizace Gainu“. Toto umožňuje optimalizovat gain při nastavení, které poskytne požadovanou škálu počátečních fluorescencí při nastavené teplotě (většinou teplotě, při které dochází k akvizici dat) v každém kanálu. Účel optimalizace gainu je se ujistit, že všechna data jsou sesbírána v rozmezí dynamického rozsahu detektorů. Když je gain příliš nízký, signál bude ztracen v šumu pozadí. Když je příliš vysoký, všechna data budou mimo škálu (=100% fluorescence).

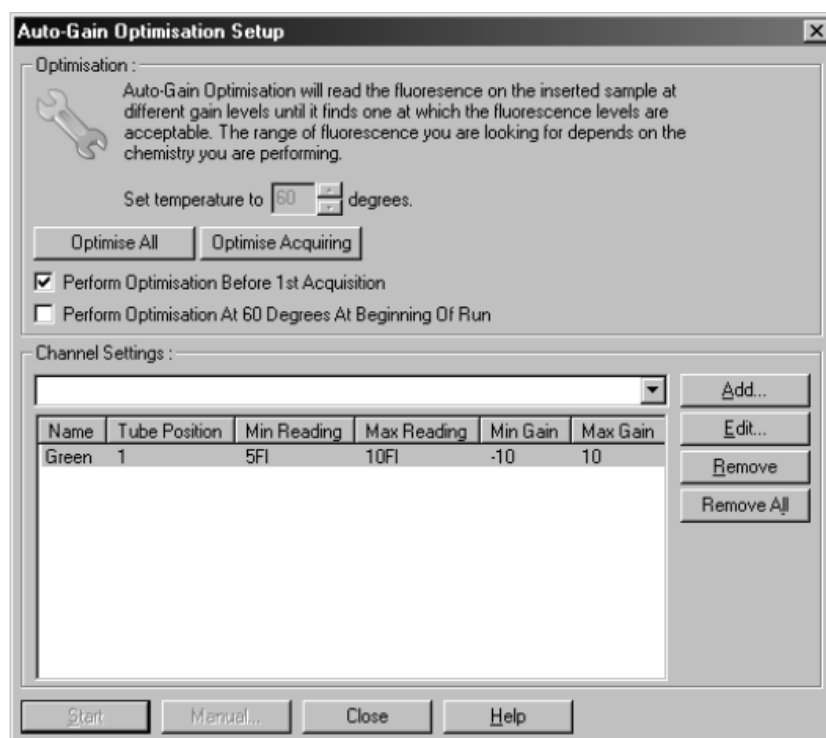
Rozsah gainu pro každý kanál je -10 až 10, kde -10 je nejméně senzitivní hodnota a 10 nejcitlivější.

Když provádíte reakce poprvé, doporučujeme připravit si testovací vzorek obsahující všechny reakční komponenty. Umístěte testovací vzorek do Rotor-Gene Q a použijte optimalizaci gainu k určení nejlepšího nastavení rozmezí gainu. Pokud gain zvolený optimalizací gainu přinese slabý signál, potom by „Target Sample Range, Cílový rozsah vzorku“ měl být zvýšen. Pokud dostanete přesaturovaný signál, Target Sample Range by měl být snížen.

Optimalizaci gainu provedete kliknutím na tlačítko „Gain Optimisation, Optimalizace Gainu“ v New Run Wizard okno 3 (v kapitole 6.2.3).



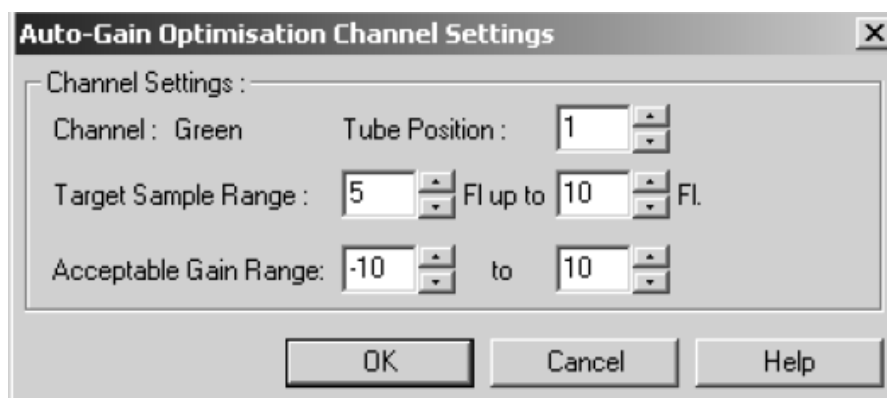
Objeví se okno s „Auto-Gain Optimisation Setup, Automatickým nastavením gainů“. Toto okno umožňuje optimalizaci automatickou úpravou nastavení gainů, dokud výsledky pro všechny zvolené kanály nevyjdou v daném rozmezí.



Set temperature to: Před sběrem dat, bude RotorGene Q zahřán nebo ochlazen na tuto specifickou teplotu. Jako výchozí je nastavena akviziční teplota .

Optimise All/Optimise Acquiring: „Optimise All“ se bude snažit optimalizovat všechny kanály známé softwaru. „Optimise Acquiring“ bude optimalizovat pouze kanály, které jsou použity v teplotním profilu definovaném v daném běhu (cyklování a tání).

Perform Optimisation Before 1st Acquisition:	Zatržení tohoto boxu provede optimalizaci gainu při prvním cyklu, ve kterém dojde k akvizici dat. Tento krok je doporučen pro Auto-Gain Optimisation.
Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run:	Zatržení tohoto políčka spustí optimalizaci gainu těsně před začátkem běhu. Rotor-Gene Q je zahřát na specifickou teplotu, je provedena optimalizace gainu a cyklování začíná při prvním kroku, což je většinou denaturační krok. Tato volba může být vybrána, pokud optimalizace gainu během procesu spotřebuje příliš mnoho času na prvním kroku. Většinou se preferuje „Perform Optimisation Before 1st Acquisition, Provádění optimalizace před první akvizicí“, protože optimalizace gainu je provedena tak blízko podmínkám běhu, jak je to jenom možné.
Channel Settings:	Toto rozbalovací menu umožňuje přidání kanálů. Vyberte si kanál, který chcete přidat a klikněte „Add“ (přidat).
Edit...:	Tato možnost otevírá okno, ve kterém je možné nastavit „Target Sample Range, Cílový rozsah vzorku“. „Target Sample Range“ je rozsah úvodní fluorescence, který by měl být nastaven pro vzorek ve specifikované zkumavce. Automatická optimalizace gainů čte každý kanál za použití nastavení gainu v rozsahu specifikovaném v „Acceptable Gain Range, Přijatelném rozsahu gainu“. Vybere první nastavení gainu, které splní fluorescenční požadavky „Target Sample Range“. V příkladu uvedeném níže vyhledá automatická optimalizace nastavení gainu mezi -10 až 10, která vykazuje hodnotu mezi 5 až 10 FI ve zkumavce 1. Obecně platí, že pro interkalační barviva je vhodný Target Sample Range 1 až 3 FI, zatímco pro proby je vhodnější rozsah 5 až 10 FI.



Remove/
Remove All: „Remove, Odstranit“ odstraní označený kanál.
„Remove all, Odstranit vše“ odstraní všechny kanály.

Start: „Start“ začne optimalizaci gainu. Je zvolen gain, který vyhovuje úrovni fluorescenčního signálu uvnitř specifického rozsahu. Pokud fluorescence vychází mimo specifikované rozhraní, gain je nastaven na nejbližší možnou hodnotu.

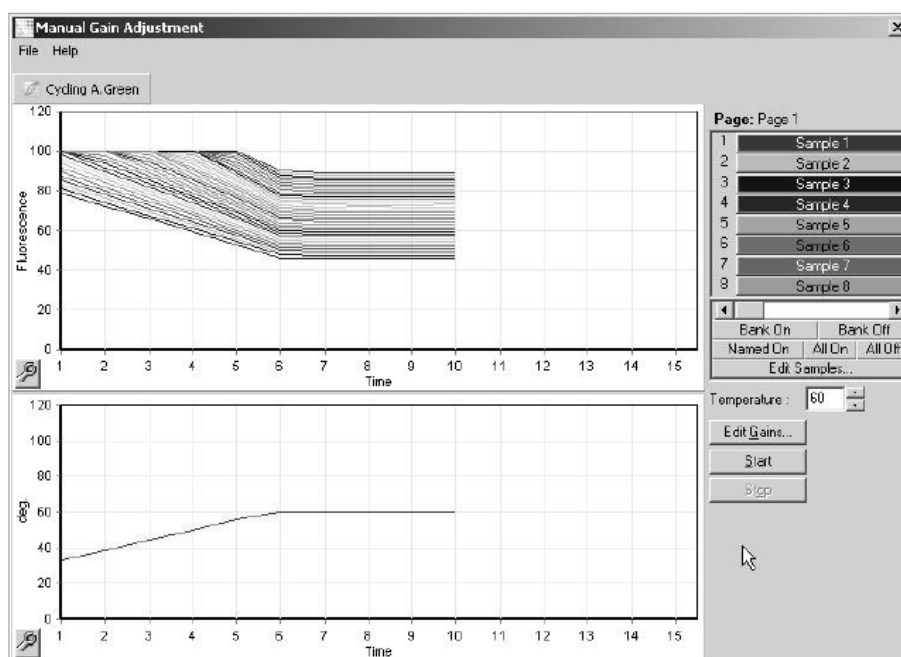
Manual: Tato funkce otevírá okno „Manual Gain Adjustment, Manuální úpravy gainu“ (viz strana 6-26).

Changing Gain During a Run: Pokud byl gain na začátku běhu příliš vysoký nebo příliš nízký, může být změněn během prvních deseti cyklů. Vertikální čára se objeví tam, kde byl gain změněn. Cykly před změnou jsou vyřazeny z analýzy.

Poznámka: Optimalizace gainu může zvolit nastavení, které nevyhovuje specifickému rozsahu. Toto může být způsobeno změnami ve fluorescenci po prvním „Hold“ kroku, ale výsledek optimalizace gainu poskytuje dobrou indikaci fluorescenční hladiny, na které běh začne.

Manuální úprava gainu

Klikněte na „Manual Gain Adjustment, Manuální úpravu gainu“ v okně „Auto-Gain Optimisation Setup, Automatická optimalizace gainu“. Objeví se okno „Manual Gain Adjustment“. V tomto okně jsou výsledky fluorescence při kterékoliv teplotě v reálném čase. Toto je používáno, když není znám původ vzorku, a musí být gain určen, aby byl zajištěn dostatečný signál pro detekci.



odebrány nebo přidány na displej pomocí tlačítek vpravo. Tlačítka se skládají z barevných kolonek, z nichž každá odpovídá vzorku na displeji. Vzorky s výrazně barevnými kolonkami jsou na displeji, zatímco vzorky se zašlými barvami se neukazují. Vzorky mohou být zapnuty nebo vypnuty kliknutím na patřičnou kolonku nebo potažením kurzorem myši přes několik kolonek současně.

Doporučujeme provádět manuální úpravu gainu následovně

1. V okně „Manual Gain Adjustment“ upravte teplotu na akviziční teplotu vyžadovanou pro ten který běh.

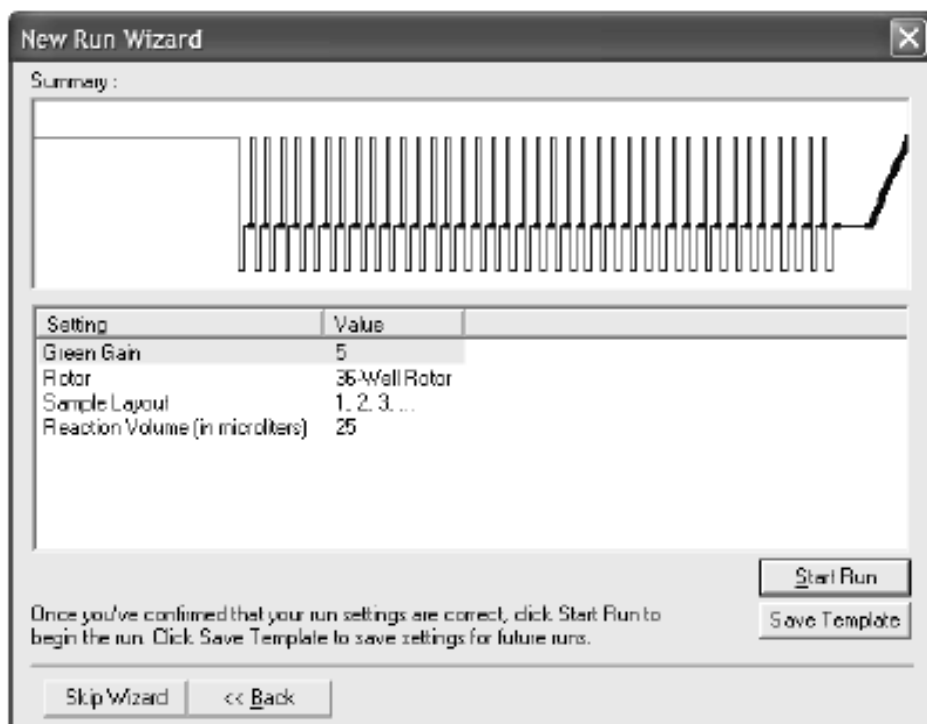
Poznámka: Teplotu nelze upravit, když je Rotor-Gene Q v provozu. Aby se změny provedené v teplotě objevily, je třeba přístroj restartovat.

2. Klikněte na „Start“. Běh začne. Teplota Rotoru-Gene Q je upravena na teplotu specifikovanou v okně. Grafy v okně začnou ukazovat data.
3. Počkejte, až se teplota stabilizuje.
4. Zaregistrujte krajní bod fluorescenční (FI) hodnoty.
5. Když hodnota FI není na požadované úrovni, klikněte na „Edit Gains..., Editovat gain“ a upravte podle potřeby. Tento proces nemusí být okamžitý, protože Rotor-Gene Q potřebuje asi 4 vteřiny na zaznamenání každého bodu v každém kanálu a během tohoto času je uživatelské rozhraní deaktivováno.

6. Opakujte tento postup, dokud FI není na požadované úrovni.
7. Klikněte na „Stop“. Pokud běh stále sbírá data, když je tlačítko „Stop“ zmáčknuto, Rotor-Gene Q nejdříve ukončí sběr dat a potom zastaví. Tento proces může trvat až 5 vteřin pro každý sběrný kanál.

6.2.5 New Run Wizard - okno 4

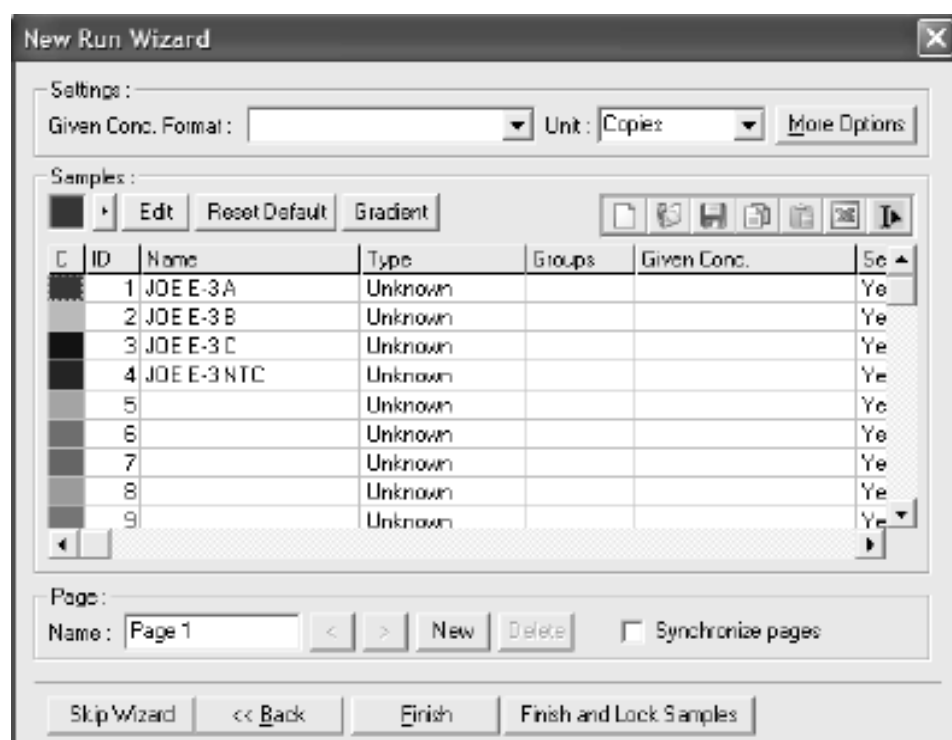
Toto okno poskytuje přehled o běhu. Zkontrolujte parametry a když jsou správné, klikněte „Start Run, Začít běh“. Budete vyzváni k zadání názvu souboru. Můžete také uložit nastavení běhu jako šablonu pro budoucí běhy použitím tlačítka „Save Template, Uložit šablonu“.



6.2.6 New Run Wizard - okno 5

V tomto okně můžete vložit typy a popisy vzorků zatímco běh probíhá. Funkce tohoto okna je stejná jako okna „Edit Samples, Editovat vzorky“ (strana 7-60). Informace o vzorcích může být vložena také až po tom, co běh skončil.

Tlačítko „Finish and Lock Samples button, Ukončete a uzamkněte vzorky“ uzavře obrazovku a zabráni změnám v názvech vzorků. Více informací o tomto a dalších bezpečnostních prvcích najdete v menu zabezpečení (kapitola 7-68).

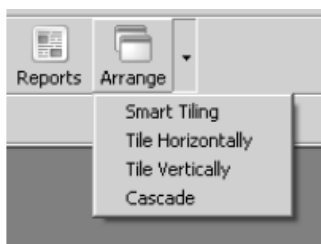


7 Analýza – uživatelské rozhraní

Tato kapitola popisuje uživatelské rozhraní softwaru Rotor-Gene Q.

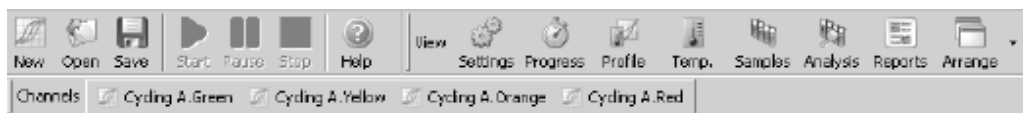
7.1 Pracovní plocha

Pracovní plocha je na pozadí hlavního okna. V této oblasti mohou být otevřeny panely s „raw“ hrubými daty i s výsledky analýz. Pokud je otevřeno několik oken současně, mohou být uspořádána kliknutím na tlačítko „Arrange“ na ovládací liště. Několik možností uspořádání je k dispozici a mohou být zvolena kliknutím na šipku vedle tlačítka „Arrange“.



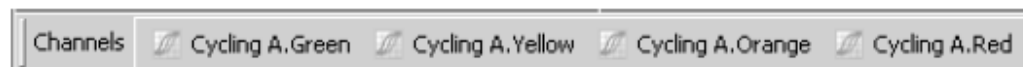
7.2 Ovládací lišta

Tato tlačítka jsou zkratky k často používaným funkcím. Tyto funkce mohou také být zpřístupněny z rozbalovacích menu.



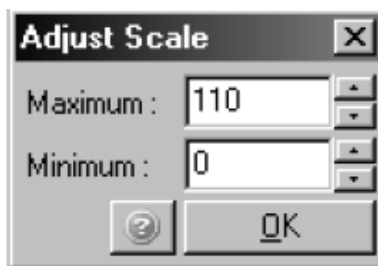
7.3 Zobrazení fluorescenčních kanálů

Klikněte na tato tlačítka, pokud chcete vidět „raw“ (neanalyzovaná) surová data z příslušných fluorescenčních kanálů z běhu.



Když se díváte na tato data, máte k dispozici několik možností změnit jejich prezentaci. „Raw“ surová data mohou být transformována pro vytvoření různých typů analýz.

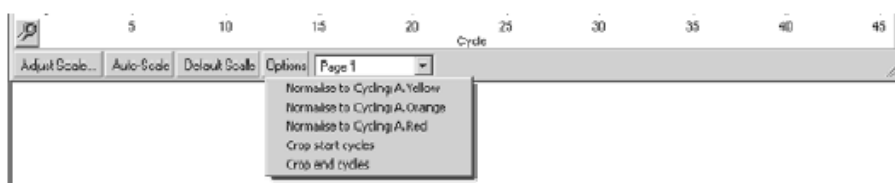
Adjust Scale: Klikněte pravým tlačítkem myši na příslušné okno „Adjust Scale“ pro úpravu stupnice. Objeví se okno, ve které může být stupnice upravena.



Autoscale: „Automatická stupnice“ přizpůsobí stupnici maximálním a minimálním hodnotám získaných dat.

Default Scale: „Výchozí stupnice“ resetuje stupnici na hodnoty od 0 do 100 fluorescenčních jednotek.

Spanner/wrench icon: Viz sekce 8.5 pro více informací.



Options: Zde se na rozbalovacím menu ukážou možnosti pro transformaci surových dat.

Normalise to ...: Toto umožňuje normalizaci amplifikačních dat s daty z pasivních referenčních barviv, jako například ROX, získaných v jiném kanálu.

Crop start cycles:	Toto tvoří novou sadu kanálových dat, ve kterých jsou některé první cykly odstraněny. Toto je užitečné v případě, kdy počáteční cykly vykazují velké skoky fluorescence, které se mohou objevit při používání některé chemie.
Crop end cycles:	Tato funkce tvoří novou sadu kanálových dat, ve kterých byly odstraněny některé koncové cykly.
Page 1:	Toto označuje stránku, která je v současné době zvolena pro zobrazení surových dat. Okno „Edit Sample, Editovat vzorek“ umožňuje tvorbu různých definicí vzorků. Například mohou být sledována data s různou tloušťkou čar, popisky vzorku a jiných možností nastavení. Toto je zvláště užitečné, když se provádí analýza pomocí relativní kvantifikace v jednom kanálu, protože uživatel může lehce přepínat mezi vzorky se sledovaným a housekeeping genem.

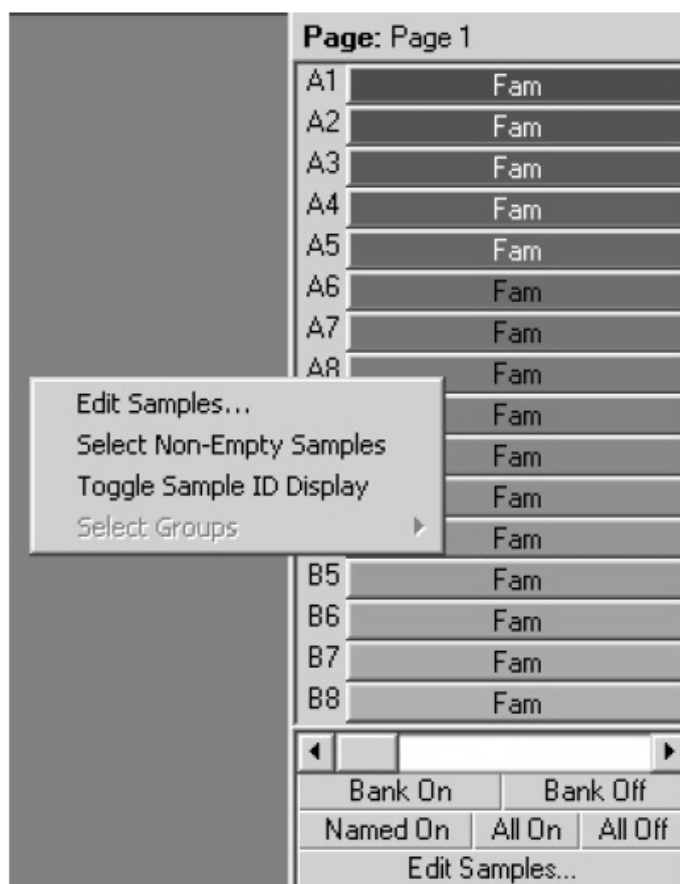
7.4 Přepínání vzorků

Na pravé straně hlavního okna je přepínač, který obsahuje popis vzorku. Sestává z barevných kolonek, z nichž každá odpovídá vzorku na displeji. Přepínač se používá na volbu vzorků, které lze sledovat na displeji. Vzorky s jasně zbarvenými kolonkami jsou znázorněny, zatímco vzorky se zašlými barvami se neukazují. Vzorky mohou být přepínány kliknutím na kolonku nebo potažením kurzoru myši přes několik kolonek najednou. Tlačítka „Bank On“ a „Bank Off“ zobrazují, respektive schovávají, všechny vzorky, které jsou současně na seznamu viditelné. Další skupina vzorků může být zobrazena pomocí posuvné lišty.

Poznámka: Počet znázorněných vzorků je dynamický a závisí na prostoru, který je v okně k dispozici.

Kliknutím na tlačítko „Named On“ se objeví pouze vzorky, které byly pojmenovány. Toto je rychlý způsob, jak si prohlédnout pouze relevantní vzorky. Kliknutím na „All On“ nebo „All Off“ získáte zobrazení všech, respektive žádných, vzorků v rotoru. Když zmáčknete tlačítko „Edit Samples...“, otevře se okno „Edit Samples“, kde lze editovat jména, typy a standardní koncentrace vzorků (viz kapitola 7.8.4).

Přepínací lišta je znázorněna níže. Další možnosti se objeví po kliknutí pravým tlačítkem myši na tlačítko.



Page:

Tato kolonka na vrcholu přepínací lišty indikuje stranu, která je právě na displeji. Stránky umožňují různé nezávislé analýzy ze sady dat jednoho kanálu. Můžete například vytvořit dvě standardní křivky v zeleném kanálu a vygenerovat nezávislé zprávy. Více informací o nastavení stránek pro vzorky najdete v kapitole 7.8.4

Toggle Sample ID Display

Pokud je používán 72-jamkový rotor, vzorky jsou zobrazeny ve formátu A1 až A8, B1 až B8, atd. Možnost „Toggle Sample ID Display“ umožňuje uživateli přepnout do numerického pořadí vzorků (1 – 72).

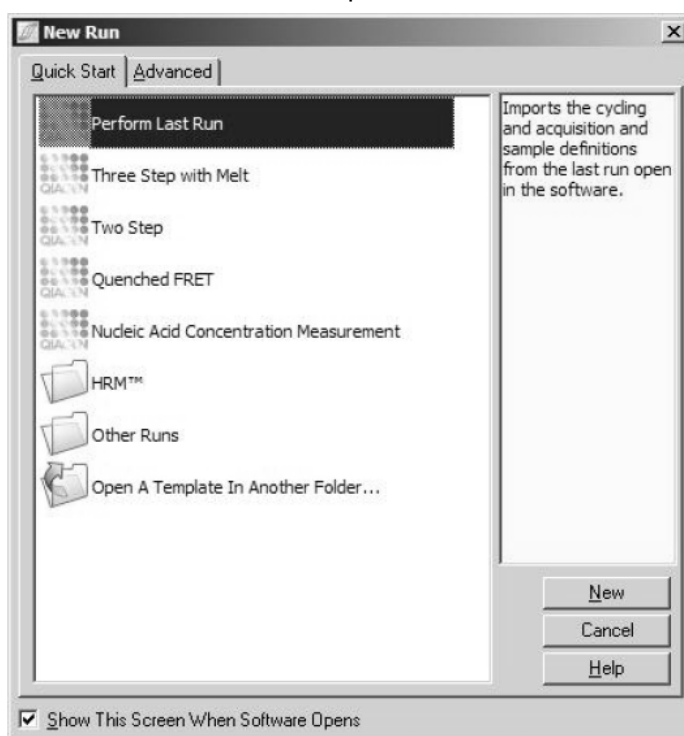
Select Non-Empty Samples Tato možnost vyřazuje veškeré vzorky, které mají „Type“ specifikovaný jako „None, Žádný“ v okně „Edit Samples“. Toto zajišťuje, že jsou zobrazeny pouze vzorky relevantní pro analýzu.

Select Groups: Pokud jste definovali skupiny (Groups), je možné zapínat a vypínat vzorky ve skupinách na displeji (switch on/off). Skupiny jsou libovolné sbírky vzorků, které umožňují pokročilé zpracování statistických výsledků. Mohou být například definovány skupiny vzorků léčených a neléčených pacientů. Skupiny mohou být nastaveny v okně „Edit Samples“.

7.5 Menu Soubory (File)

7.5.1 Nový (New)

Po volbě „File“, potom „New“ a potom „New Run“ se objeví okno. Toto okno zobrazuje běžně užívané šablony organizované pod tlačítka „Quick Start“ and „Advanced“. Jakmile je šablona zvolena, wizard vás provede nastavením a umožní modifikace nastavení a profilu.



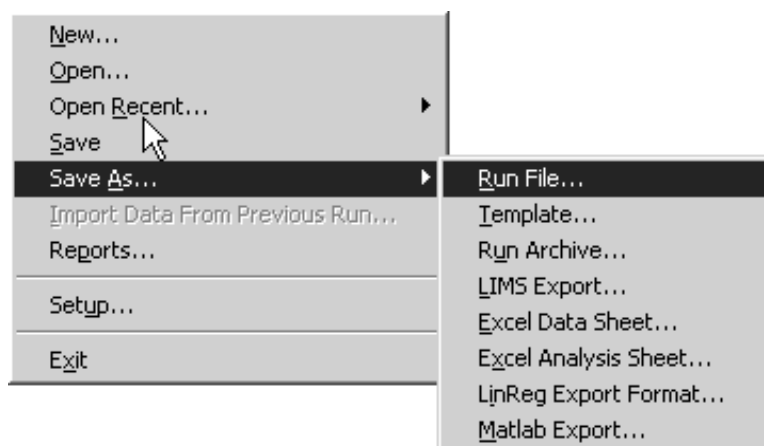
Více informací o šablonách najdete v kapitole 6.1 a 6.2.

Nový běh (New Run)

New...:	Zahajuje nastavení běhu při použití zvolené šablony.
Cancel:	Zavře okno.
Help:	Otevře online pomoc.
Show This Screen When Software Opens:	Zatržení tohoto políčka způsobí, že okno „New Run, Nový běh“ je zobrazeno při spuštění softwaru.

7.5.2 Otevření a uložení (Open and Save)

Open...:	Otevře dříve uložený Rotor-Gene Q soubor (*.rex) nebo archiv běhů Rotor-Gene Q (soubor *.rea).
Open Recent...:	Obsahuje poslední 4 soubory, které byly otevřeny nebo uloženy.
Save:	Uloží veškeré změny, které byly udělány v souboru běhu.



Save As...:	Použijte tuto funkci pro uložení souborů běhu nebo dat v různých formátech. Seznam možností je níže.
Run File...:	Uloží kopii souboru. Uživatel může změnit jméno a uložit umístění. Toto je výchozí formát.

Template...:	Uloží nastavení profilu a s ním spojená nastavení, ale nikoli data běhu. Složka může být použita pro zahájení budoucích běhů.
Run Archive...:	Uloží kompaktnější formát souboru. Ukládejte soubor v tomto formátu před tím, než ho posíláte emailem. Toto redukuje čas vyžadovaný na poslání souboru a zajišťuje, že soubory nejsou poškozeny emailovými klienty.
Export LIMS:	Uloží analýzu ve formátu kompatibilním s LIMS podle požadavků uživatele. Pro více informací prosím kontaktujte technické služby QIAGENu.
Excel Data Sheet...:	Exportuje všechna surová data z fluorescenčních kanálů do tabulky Excel. Pouze vybrané vzorky jsou exportovány.
Excel Analysis Sheet...:	Exportuje analýzu současného běhu do tabulky Excel.
LinReg Export Format...:	Exportuje všechna surová kanálová data do formátu, který může být čten softwarem LinReg (analytický nástroj na efficiency). Více detailů o exportu LinReg najdete níže.
Matlab Export...:	Exportuje data do formátu, který je srozumitelný pro vědecký software Matlab (nebo jeho open-source ekvivalent Octave). Toto se může hodit pro metody výzkumu.

Export do LinReg

LinReg je nástroj vyvinutý C. Ramakersem a kolektivem*. LinReg je k dispozici na požádání na: <http://LinRegPCR.nl>.

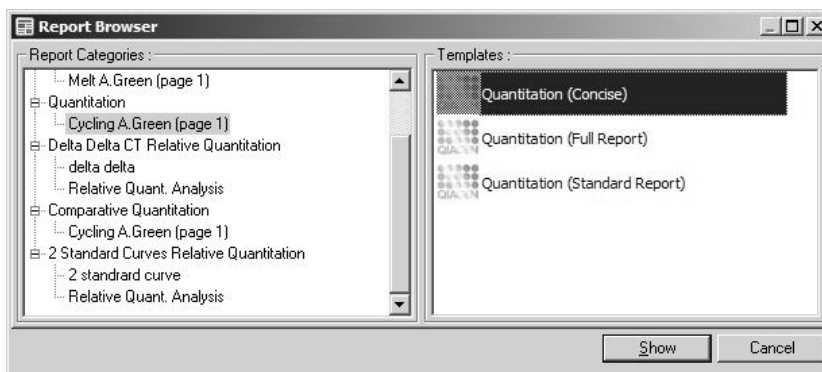
Software Rotor-Gene Q umožňuje uživateli exportovat surová data ve formátu, který potom může být importován nástrojem LinReg za účelem analýzy.

* Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., a Moorman, A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (Bezodhadová kvantitativní analýza polymerázové řetězové reakce v reálném čase). (PCR) data. Neurosci. Lett. 339, 62.

1. Otevřete soubor Rotor-Gene Q, který obsahuje surová data běhu.
2. Exportujte data do formátu LinReg zvolením „Save As...” a potom “LinReg Export Format...”.
3. Microsoft Excel automaticky zobrazí exportovaná surová data.
4. Spustíte nástroj LinReg.
5. LinReg vás vyzve, abyste zvolili rozsah buněk, kde jsou surová data umístěna. Tento nástroj může analyzovat najednou pouze data z jednoho kanálu, takže je třeba zvolit patřičnou oblast v tabulce Excel.

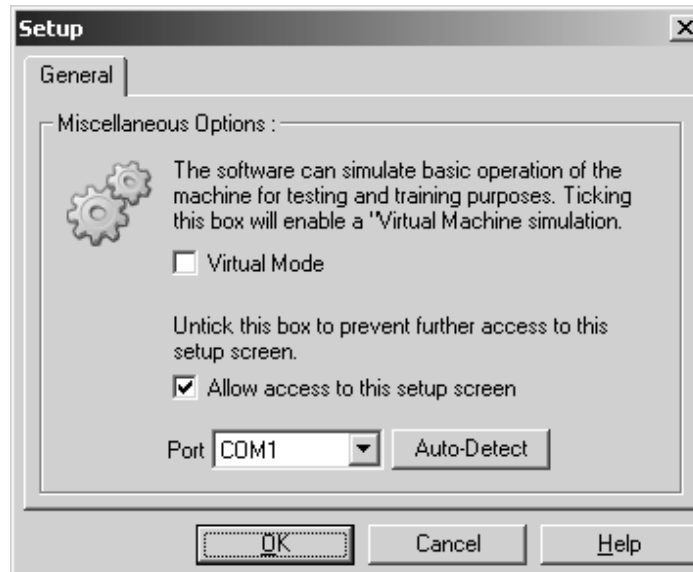
7.5.3 Reporty

Po zvolení „Reports“ se otevře okno „Report Browser“. Pokud již data byla analyzována, zpráva o této analýze může být zobrazena z okna „Report Browser“. Je možné zvolit několik různých typů zpráv s výsledky s různými stupni detailů.



7.5.4 Nastavení (Setup)

Počáteční nastavení Rotoru-Gene Q by mělo být provedeno během instalace. Tato možnost vám však umožňuje změnit nastavení zapojení Rotoru-Gene Q, pokud si to přejete udělat po instalaci.



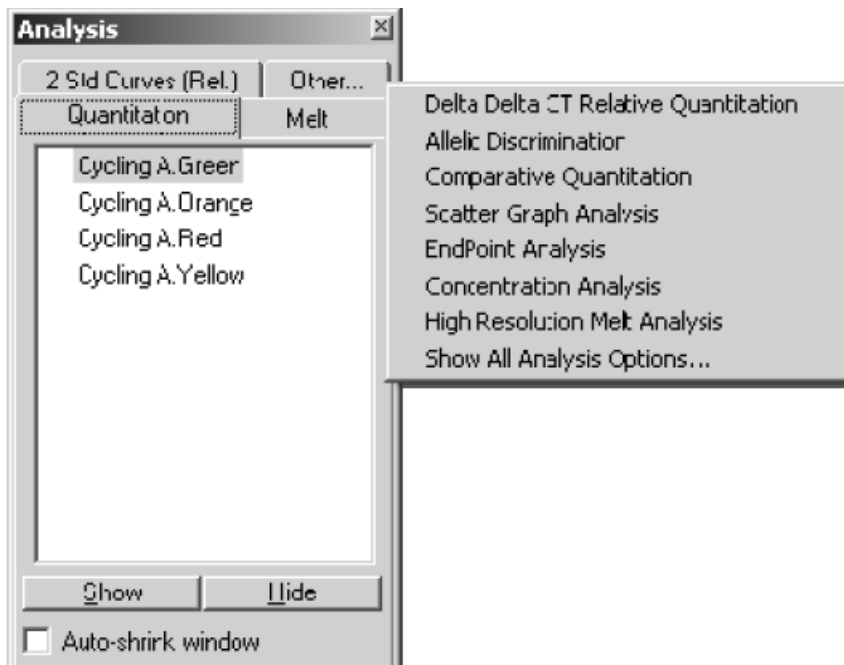
- | | |
|------------------------------------|---|
| Virtual Mode: | Zvolte tuto možnost, pokud bude software používán bez připojení Rotoru-Gene Q. Software si zachovává všechny funkce. Tento režim je vhodný pro účely předvádění, datové analýzy a nastavení šablon. |
| Allow access to this setup screen: | Pokud není tato volba zatržena během nastavení, přístup do tohoto okna již není možný. Tento bezpečnostní prvek zabraňuje uživatelům změnit nastavení. Pokud si přejete znovu získat přístup, kontaktujte svého distributora. |
| Port: | Zvolte správný komunikační port, který umožní komunikaci mezi počítačem a Rotorem-Gene Q. |
| Automatická detekce: | Pokud si nejste jistí, který port zvolit, klikněte na „Auto-Detect“ pro vyhledání všech portů, které jsou k dispozici. |

7.6 Menu Analýza

7.6.1 Analýza

Po kliknutí na tlačítko „Analysis“ se objeví okno. Toto okno umožňuje vytvoření nových analýz a zobrazení existujících analýz. Analytická metoda se volí pomocí tlačítek. Objeví se seznam kanálů, které mohou být analyzovány touto zvolenou metodou. Různé testovací běhy na stejném

kanálu mohou být analyzovány nezávisle za předpokladu, že byly nastaveny jako samostatné stránky v okně „Edit Samples“.



Auto-shrink
window:

Tato volba zmenší okno, když se zrovna nepoužívá. Posunutím kurzoru myši na toto okno ho opět zvětší do původní velikosti.

Organizace pracovní plochy

Pokaždé, když začneme novou analýzu, jsou její okna uspořádána tak, aby se vešla vedle těch, která již na obrazovce jsou. Pokud je na obrazovce příliš mnoho oken, může být obrazovka nepřehledná. Zavřete okna, která nepotřebujete a potom klikněte na tlačítko „Arrange“ v nástrojové liště. Okna jsou automaticky uspořádána podle metody „Smart Tiling, Chytré uspořádání“. Můžete si také zvolit jinou metodu uspořádání kliknutím na šipku vedle tlačítka „Arrange“. Kliknutím pravého tlačítka myši na jméno analýzy také získáte další možnosti.



Show:	Ukáže zvolenou analýzu.
Hide:	Schová zvolenou analýzu.
Remove Analysis...:	Kompletně odstraní zvolenou analýzu. To znamená, že veškeré normalizační nastavení a sestavy tání budou ztraceny.

7.6.2 Kvantitativní analýza

Zvolte tlačítko „Quantitation“ v okně „Analysis“ a potom dvakrát klikněte na jméno kanálu nebo zvolte kanál a potom klikněte na tlačítko „Show“ pro otevření požadovaného kanálu.

Objeví se 3 okna: Hlavní obrazovka, Standardní křivka a Výsledky.

Reporty (Výsledky)

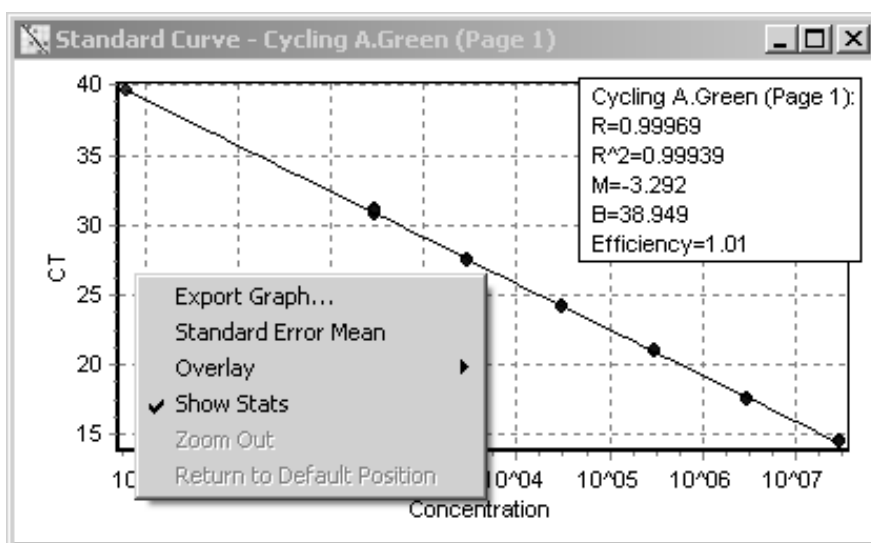
Reports: Tlačítko „Reports“ otevře okno „Report Browser“, kde je možné vygenerovat zprávu o současné analýze. Jsou nabídnuty 3 možnosti: standardní zpráva, plná zpráva a stručná zpráva. Dvakrát klikněte na požadovanou možnost a otevře se vám zpráva v okně „Preview, Náhled“.

Poté, co byla zpráva vygenerována, tlačítka na horní části okna „Preview“ mohou být použita na tisknutí, uložení nebo poslání zprávy emailem nebo na export do MS Word.



Standardní křivka

Std. Curve: Toto tlačítko otevře okno „Standard Curve“. Jako výchozí volba se toto okno otevře, když je otevřena „Analýza“. Když ho zavřete, může být znovu otevřeno pomocí tohoto příkazu.



Hodnoty pro standardní křivku jsou dynamicky přepočítávány s tím, jak se mění úroveň prahu (thresholdu) klikáním a tažením prahové čáry v hlavním okně.

Modré tečky na křivce představují vzorky, které byly definovány jako standardní a červené tečky představují datové body neznámých vzorků.

Poznámka: Když předefinujete standardy pro výpočet standardní křivky, přepínáním standardního vzorku pomocí přepínací lišty na pravé straně ho odstraní z výpočtu křivky. Vyjmutí standardů z grafu pro zvýšení hodnoty R^2 nemá vědeckou validitu. Selhání standardu je indikací, že vzorky také mohly selhat; a proto by měl být zahrnut do výsledků.

Efficiency: Toto je účinnost PCR reakcí v běhu. Tato hodnota je pojednána detailně na straně 7-26.

R^2 value (correlation coefficient): Hodnota R^2 neboli R^2 představuje procento dat, které jsou konsistentní s hypotézou, že standardy tvoří standardní křivku.

Když je hodnota R^2 nízká, potom standardy nezapadnou lehce do ideální křivky. To znamená, že výsledky (například vypočítané koncentrace) nemusí být spolehlivé. Dobrá hodnota R^2 je přibližně 0,999.

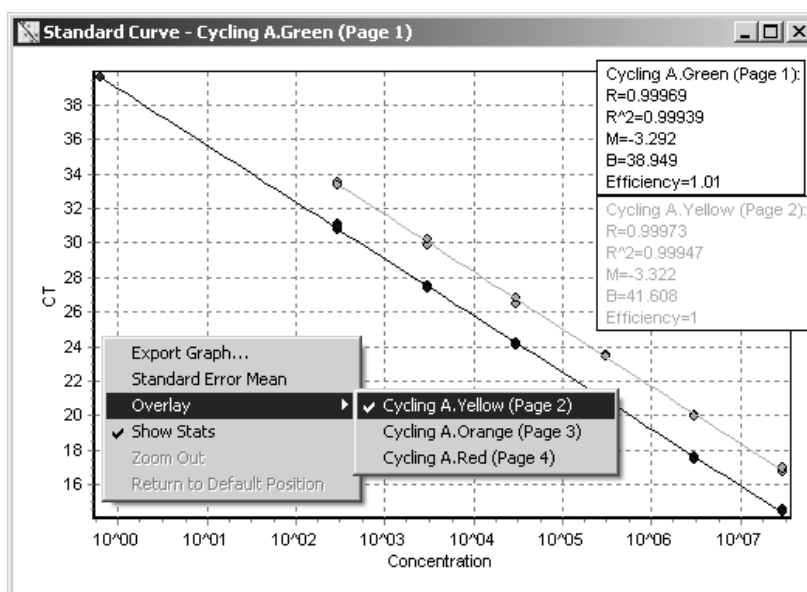
Poznámka: Je možné dosáhnout vysokou hodnotu R^2 i u slabé standardní křivky, pokud běh obsahoval nedostatečný počet standardů. Hodnota R^2 se zlepšuje s tím, jak se počet standardů snižuje. Pro přesnější indikaci spolehlivosti výsledků používejte jako vodítko intervaly spolehlivosti vypočítaných koncentrací.

R value (square root of correlation coefficient): Hodnota R je odmocnina hodnoty R^2 . Obecně je hodnota R^2 užitečnější pro určení korelace.

M and B: Sklon (Slope) (M) a průsečík (Intercept) (B) standardní křivky jsou automaticky vypočítány podle rovnice $y = Mx + B$, a jejich hodnoty jsou ukázány v okně „Standard Curve“.

Export Graph...: Kliknutím pravým tlačítkem myši na standardní křivku zobrazí možnost exportovat graf (viz kapitola 8.4).

Overlay: Pokud bylo provedeno více kvantitativních analýz v jednom běhu, je možné standardní křivky zobrazit přes sebe ve stejném okně. Toto je užitečné pro grafické zobrazení rozdílů mezi různými prahy. Tato funkce je zobrazena na obrázku níže.



Výpočet standardní křivky

“conc = ...* CT +...” a „CT T =...” jsou 2 verze této rovnice používané pro srovnání hodnot CT a koncentrací. V publikacích je nejčastěji používán vzorec “CT = ...”. Standardní křivka může být buď „Floating, Pohyblivá” anebo „Fixed, Fixovaná”. Pokud je „Pohyblivá”, optimální rovnice pro standardní křivku je vypočítávána pokaždé, když je v hlavním okně posunut threshold. Pokud je „Zafixována”, rovnice se nemění, protože byla importována z jiného běhu.

Standard Curve
 conc= 10[^](-0.304*CT + 11.832)
 CT = -3.292*log(conc) + 38.949
 Type : Floating
 Import Curve.... Reset

Import křivky

Importování standardní křivky umožňuje odhad koncentrací, když není k dispozici standardní křivka v určitém běhu a účinnost PCR reakce se mezi dvěma běhy nezměnila. Křivky mohou být

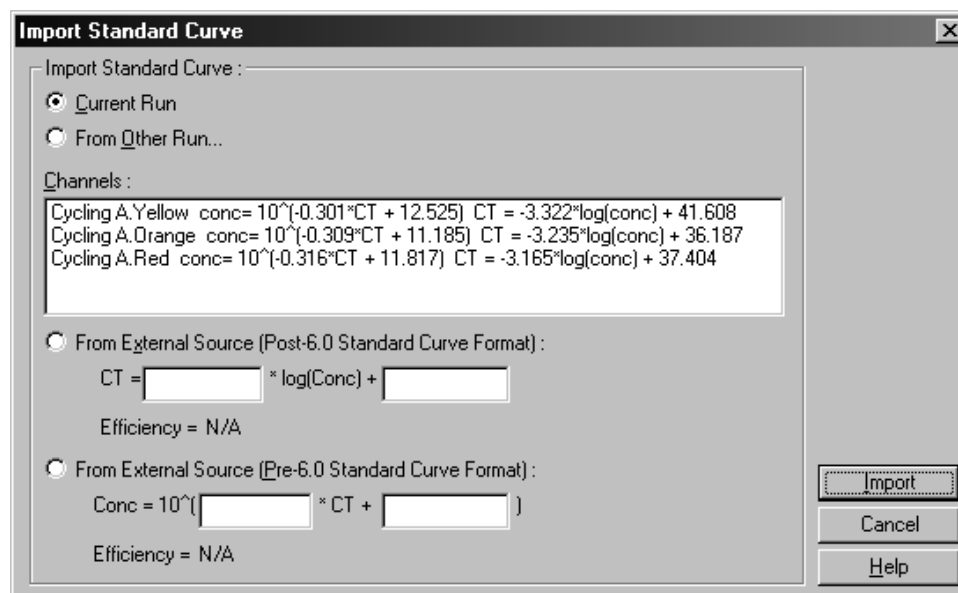
importovány z jednoho kanálu do druhého kliknutím na „Import Curve“.

Je možné standardní křivku upravit, pokud je třeba. Úprava standardní křivky znamená, že pouze účinnost zdroje standardní křivky je importována do současného běhu. Zda má nebo nemá standardní křivka být upravena, záleží na použitých chemikáliích.

Pro úpravu standardní křivky použijte odkaz v novém běhu se známou koncentrací. Definujte referenční standard nastavením typu vzorku na „Standard“ a vložte hodnotu koncentrace v okně „Edit Samples“. Více kopií stejného standardu může být vloženo pro vylepšení přesnosti. Není ovšem možné definovat více než jeden odkaz na koncentraci nebo standard. Je tedy například možné mít 3 standardy (triplikát) o 1000 kopiích, ale není možné mít jeden standard o koncentraci 1000 kopií a další o 100 kopiích v jednom běhu.

Jakmile byla standardní křivka importována, typ křivky se změní na „Fixed, Zafixovanou“. Klikněte „Reset“ pro změnu standardní křivky zpět na „Floating, Pohyblivou“.

Obrazovka s oknem „Import Standard Curve“ je zobrazena níže.



Toto okno slouží pro import standardní křivky z jiného kanálu analyzované v současném běhu nebo z jiného běhu.

Current Run: Když je zvolena tato možnost, kvantitativní analýza na jiných kanálech z tohoto běhu je uvedena s odpovídajícími standardními křivkami.

From Other Run...: Zvolení této možnosti zobrazí dialog, ze kterého může být zvolen a otevřen soubor jiného běhu. Pokud byla kvantitativní analýza vykonána pro tento běh, standardní křivky jsou uvedeny pro každý analyzovaný kanál.

Poznámka: Nastavení kvantitativní analýzy musí být uloženo v souboru běhu.

Channels: Seznam analyzovaných kanálů a jejich rovnic pro standardní křivky.

From External Source: V této oblasti mohou být vloženy hodnoty M a B. Toto je užitečné v případech, kde hodnoty pochází z externího zdroje, jako například z tabulky Excelu.

Výpočet CT

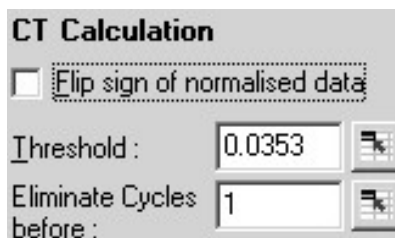
Invert raw data: Některé chemikálie produkují fluorescenční signál, který se exponenciálně snižuje, místo, aby se zvyšoval. Tato data je možné analyzovat použitím kvantifikační analýzy, ale je třeba zaškrtnout políčko „Invert Raw Data“. Pro všechny ostatní kvantitativní analýzy zůstává toto políčko nezaškrtnuté.



C_T Calculation: Hodnota C_T je číslo cyklu, ve kterém amplifikační křivka protíná práh detekce (threshold). Nastavením prahu a výpočtu průsečíku každé křivky je určena hodnota C_T pro každý vzorek.

Threshold: Abyste nastavili threshold, klikněte na ikonu (mřížka s červenou šipkou), potom klikněte a podržte tlačítko a v grafu potáhněte čáru na požadovanou úroveň. Můžete také zadat hodnotu logaritmu. Můžete také použít automatickou funkci „Auto-Find

Threshold“. Když nastavujete práh manuálně, musíte ho nastavit do exponenciální fáze běhu výrazně nad úroveň doprovodného šumu a pod signálem plateau fáze v dalších cyklech.



Eliminate Cycles before:

Pro nastavení klikněte na ikonu (mřížka s červenou šipkou), potom klikněte a držte graf a táhněte čáru doprava. Tímto je eliminován práh pro nízké hodnoty cyklu.

Poznámka: Toto je vhodné při výskytu šumu během počátečních cyklů, například kvůli nepromíchání vzorků.

Auto-Find Threshold:

Tato funkce prohlíží zvolenou oblast grafu a hledá nastavení prahu, které by vykazalo optimální odhady daných koncentrací. Zvolená oblast může být změněna vložím nových horních a dolních limitů do políčka, které se objeví.

Horní a dolní limity jsou vhodné pro většinu analýz. Rozsah úrovní prahů je sledován za účelem nalezení nejlepšího přiřazení standardní křivky podle vzorků, které byly definovány jako standardní (například, kde hodnota R je nejbližší 1,0).



Výsledky

Okno „Quantitation Results“ je otevřeno jako výchozí okno na obrazovce analýza. Když ho zavřete, může být znovu otevřeno pomocí tohoto příkazu.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)													
Analysis	No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc	Calc Conc	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Std	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc. (95% CI)
Cycling A.Green (Page 1)	1		10e8	Standard	3.73		1.00E+08	7.19E+07	28.1%	3.73	0.00	[3.73, 3.74]	7.17E+07 [1.17E+07, 4.39E+08]
Cycling A.Green (Page 1)	2		10e8	Standard	3.74		1.00E+08	7.17E+07	28.3%				
Cycling A.Green (Page 1)	3		10e8	Standard	3.74		1.00E+08	7.16E+07	28.4%				
Cycling A.Green (Page 1)	4		10e7	Standard	6.11		1.00E+07	1.44E+07	44.0%	6.06	0.06	[5.91, 6.21]	1.49E+07 [3.29E+06, 6.73E+07]
Cycling A.Green (Page 1)	5		10e7	Standard	6.08		1.00E+07	1.47E+07	46.6%				
Cycling A.Green (Page 1)	6		10e7	Standard	5.99		1.00E+07	1.56E+07	55.9%				
Cycling A.Green (Page 1)	7		10e6	Standard	10.43		1.00E+06	7.72E+05	22.8%	10.38	0.09	[10.15, 10.60]	8.00E+05 [2.62E+05, 2.44E+06]
Cycling A.Green (Page 1)	8		10e6	Standard	10.27		1.00E+06	8.58E+05	14.2%				
Cycling A.Green (Page 1)	9		10e6	Standard	10.43		1.00E+06	7.71E+05	22.9%				
Cycling A.Green (Page 1)	10		10e5	Standard	13.49		1.00E+05	9.68E+04	3.2%	13.65	0.13	[13.31, 13.98]	8.74E+04 [2.96E+04, 2.58E+05]
Cycling A.Green (Page 1)	11		10e5	Standard	13.75		1.00E+05	8.13E+04	18.7%				
Cycling A.Green (Page 1)	12		10e5	Standard	13.69		1.00E+05	8.48E+04	15.2%				
Cycling A.Green (Page 1)	13		10e4	Standard	15.66		1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46	0.25	[14.84, 16.08]	2.56E+04 [7.82E+03, 8.36E+04]
Cycling A.Green (Page 1)	14		10e4	Standard	15.54		1.00E+04	2.42E+04	141.7%				
Cycling A.Green (Page 1)	15		10e4	Standard	15.18		1.00E+04	3.08E+04	208.8%				
Cycling A.Green (Page 1)	16		10e3	Standard	21.36		1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24	[20.49, 21.69]	5.65E+02 [9.13E+01, 3.50E+03]
Cycling A.Green (Page 1)	17		10e3	Standard	20.89		1.00E+03	6.47E+02	35.3%				
Cycling A.Green (Page 1)	18		10e3	Standard	21.02		1.00E+03	5.94E+02	40.6%				
Cycling A.Green (Page 1)	19		10e2	Standard		NEG (Multi Ct)	1.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1)	20		10e2	Standard	23.98		1.00E+02	7.99E+01	20.1%				
Cycling A.Green (Page 1)	21		10e2	Standard		NEG (Multi Ct)	1.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1)	22		NTC	NTC		NEG (NTC)							
Cycling A.Green (Page 1)	23		NTC	NTC		NEG (NTC)							
Cycling A.Green (Page 1)	24		NTC	NTC		NEG (NTC)							

V okně „Quantitation Results“ jsou shrnuty výsledky běhu v tabulce. Kliknutím na pravé tlačítko myši a zvolením „Export to Excel“ je tabulka exportována do Excelu. Excel se otevře automaticky. Pro kopírování dat do existující tabulky zvolte „Copy“, otevřete tabulku a zvolte „Paste“.

Okno „Quantitation Results“ obsahuje následující sloupce:

Analysis	Aktuální data (název akvizičního kanálu a stránky s popisem vzorku)
No	Číslo vzorku.
Colour	Definování barev k označení jednotlivých vzorku.
Type	Definování typu vzorku.
Ct	Určená hodnota Ct.
Ct Comment	Automatická anotace CT determinace, jestliže CT hodnoty jsou vyloučeny. Jsou možná následující označení:

NEG (Multi Ct): Překročení prahu fluorescenční křivky nejméně dvakrát (double intersect). Jednoznačnou hodnotu CT není možné určit.

NEG (NTC): Celkový nárůst fluorescence nesplňuje podmínky definované v „NTC threshold“ funkci v menu „Outlier Removal“ (viz níže). Například fluorescenční křivka se protíná s limitní hranicí, ale celkově menší sklon naznačuje, že non-template kontrola a CT value nebyly dány.

NEG (R.Eff): Celkový nárůst fluorescence nesplňuje podmínky definované v „Reaction efficiency threshold“ funkci v menu „Outlier Removal“ (viz níže). Vzorky, které nemají určitou reakční účinnost jsou vyřazeny a CT hodnota není udána. Toto označení se pouze ukazuje, jestliže je

odpovídající funkce umožněna.

% Var:	Procentuální variace mezi vypočítanou a známou koncentrací. $\%Var = Abs (Vypočítaná/Daná-1)$
Rep. CT:	Průměrná CT všech vzorků se stejným jménem jako tento vzorek
Rep. C _T Std. Dev.:	Standardní odchylka hodnoty CT všech vzorků se stejným jménem jako tento vzorek.
Rep. CT 95% C. I.:	Rozsah CT, který statisticky představuje 95 % variace hodnoty CT. Toto je konzervativní statistické měření, které může být použito jako měření kvality. Tento rozsah může být zúžen tím, že použijeme více replikátů nebo zmenšením variace v replikách.
Rep. Calc.Conc:	Vypočítaná koncentrace všech vzorků se stejným jménem. Poznámka: Toto není prostý průměr vypočítaných koncentrací. Je to geometrický průměr, což je matematicky vhodnější hodnota díky exponenciálnímu charakteru amplifikace reálném čase.
Rep. Calc. Conc.95% C. I.:	Rozsah koncentrací, který obsahuje 95 % variací individuálního vzorku stejně jako model založený na lineární regresí. Interpretace této hodnoty je taková, že se jedná o rozsah koncentrací, které jsou očekávány v 95% případů, kdyby tento běh byl vykonáván opakovaně se stejnou hodnotou variace. Toto je konzervativní odhad a rozsah může být docela velký díky variaci vlastní analýzy v reálném čase. Tento rozsah může být velký, když jsou standardy zpracovávány s použitím koncentrací lišících se od neznámých vzorků, když je použit malý počet replik nebo když je hodnota variace značná.

DŮLEŽITÉ: Variace získané tímto měřením jsou vlastní exponenciálnímu procesu amplifikace v reálném čase a nejsou způsobeny Rotorem-Gene Q. Podobné testy založené na cyklerech s blokem

vykazují větší variace díky nižší tepelné uniformitě těchto systémů. Pokud si přejete srovnávat cykly, doporučujeme srovnávat standardní odchylku hodnoty CT.

Více informací naleznete také v Appendixu B

Poznámka: Každý sloupek může být ukázán nebo schován kliknutím pravým tlačítkem myši na okno a následnou selekcí nebo deselekci jména sloupce.

The screenshot shows a window titled "Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)". It contains a table with columns: No., Name, Type, Ct, Ct Comment, Given Conc, and Calc Conc. A right-click context menu is open over the table, listing various columns with checkboxes. The table data is as follows:

No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc	Calc Conc
1	10e8	Standard				
2	10e8	Standard				
3	10e8	Standard				
4	10e7	Standard		NEG		
5	10e7	Standard		NEG		
6	10e7	Standard		NEG		
7	10e6	Standard	11,46			
8	10e6	Standard	11,39			
9	10e6	Standard	11,40			
10	10e5	Standard	15,04			
11	10e5	Standard	15,03			
12	10e5	Standard	15,05			
13	10e4	Standard	18,26			
14	10e4	Standard	18,45			
15	10e4	Standard	18,29			
16	10e3	Standard	22,35			
17	10e3	Standard	22,17		1,00E+03	1,02E+03
18	10e3	Standard	22,31		1,00E+03	9,41E+02
19	10e2	Standard	26,01		1,00E+02	8,92E+01
20	10e2	Standard	25,72		1,00E+02	1,07E+02
21	10e2	Standard	25,94		1,00E+02	9,33E+01

The context menu is titled "Analysis" and contains the following items (all checked):

- No.
- Colour
- Name
- Type
- Ct
- Ct Comment
- Given Conc (copies/reaction)
- Calc Conc (copies/reaction)
- % Var
- Rep. Ct
- Rep. Ct Std. Dev.
- Rep. Ct (95% CI)
- Rep. Calc. Conc.
- Rep. Calc. Conc. (95% CI)

Důležité: Abychom zajistili přesnost zpráv a jejich zpětné vyhledávání a když je hodnota Ct automaticky vyloučena, kolonka „Ct Comment“ by neměla nikdy být skryta. Kolonka „Ct Comment“ musí být manuálně aktivována po první instalaci softwaru anebo v případě, že předchozí uživatel tuto kolonku deaktivoval.

Pro usnadnění práce lze použít funkci „AutoStat“, která automaticky počítá průměr, standardní odchylku a minimální a maximální hodnoty zkoumaných vzorků. Zvolte požadované výsledky potažením levého tlačítka na myši a hodnoty se zobrazí v tabulce na pravé straně obrazovky.

V následujícím screenshotu jsou analyzovány koncentrace několika vzorků.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)					Statistics	
Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var		Maximum :	28730050
14.42	30000000	28255064	5.8%		Minimum :	25142920
14.59	30000000	25142920	16.2%		Count :	3
14.40	30000000	28730050	4.2%		Mean :	27328521
17.44	3000000	3422624	14.1%		Std. Dev :	1.07537
17.58	3000000	3103391	3.4%		(Orders of Mag.)	
17.42	3000000	3467111	15.6%			
20.99	300000	285353	4.9%			
20.92	300000	298898	0.4%			
21.04	300000	275802	8.1%			
24.20	30000	30286	1.0%			

DŮLEŽITÉ: Funkce „AutoStat“ je naprogramovaná s ohledem na obsah. To znamená, že tam, kde to je možné, tak generuje pouze informace, které vyhodnotí jako užitečné.

Například:

- Není možné získat interval spolehlivosti 95 % ze sady vybraných vypočítaných koncentrací, protože musí také být brán v úvahu regresivní model.
- Není možné získat interval spolehlivosti 95 % ze sady vybraných vypočítaných koncentrací, protože musí také být brán v úvahu regresivní model.
- Pro vypočítané koncentrace je uvedena standardní odchylka „Orders of Magnitude, Pořadí významu“, nikoli tedy absolutní hodnoty. Toto je procentuální variace. Například tedy hodnota 1,07537 představuje variaci 7,54 % $(278\,974 - 322\,611) = (300\,000/1,07537 - 300\,000 \cdot 1,07537)$. Vykazovat absolutní hodnoty nemá u standardní křivky žádný smysl. Hodnota by mohla být vykazována u nejnižší koncentrace, aby budila dojem malé chyby (± 3 kopie) nebo u vysoké koncentrace ($\pm 3\,000\,000$ kopií). Z tohoto důvodu je vykazována standardní odchylka „Pořadí významu“.
- U vypočítaných koncentrací je použit geometrický průměr místo aritmetického průměru. Toto je kvůli exponenciálnímu charakteru PCR v reálném čase. Například, v případě dvojité diluce s 1, 2, 8 a 16 kopiemi by byl průměr 4 kopie, protože to je střed diluční série. Avšak aritmetický průměr je 6,75. Geometrický průměr je $(1 \cdot 2 \cdot 8 \cdot 16)^{(1/4)} = 4$ kopie. Více informací o geometrickém průměru najdete na <http://mathworld.wolfram.com/GeometricMean.html>.

Dynamická normalizace ve zkumavce

Volba „Dynamic Tube“ je výchozí hodnotou a používá se na určení průměrného fluorescenčního backgroundu (pozadí) v každém vzorku těsně před tím, než je spuštěna amplifikace.

Standardní normalizace jednoduše trvá prvních pět cyklů a tyto potom použije jako indikátor hladiny pozadí každého vzorku. Všechny datové body vzorku jsou potom rozděleny pomocí této hodnoty k normalizaci dat. Toto může být nepřesné, protože u některých vzorků nemusí být hodnota pozadí prvních pěti cyklů indikativní o hladině pozadí těsně před amplifikací. Na rozdíl od toho, dynamická normalizace ve zkumavce používá druhý derivativ každého vzorku k určení základního bodu pro každý vzorek. Hladina pozadí je potom zprůměrována od cyklu 1 až do tohoto základního čísla cyklu pro každý vzorek. Tímto způsobem jsou získány nejpřesnější kvantitativní výsledky.

Všimněte si prosím, že u některých datových sad není fluorescenční pozadí konsistentní během cyklů před začátkem amplifikace. V těchto případech může být nutné deselektovat dynamickou normalizaci ve zkumavce kliknutím na „Dynamic Tube“, jelikož bychom mohli dostat méně přesnou kvantitativní analýzu.

Korekce sklonu šumu (Noise slope correction)

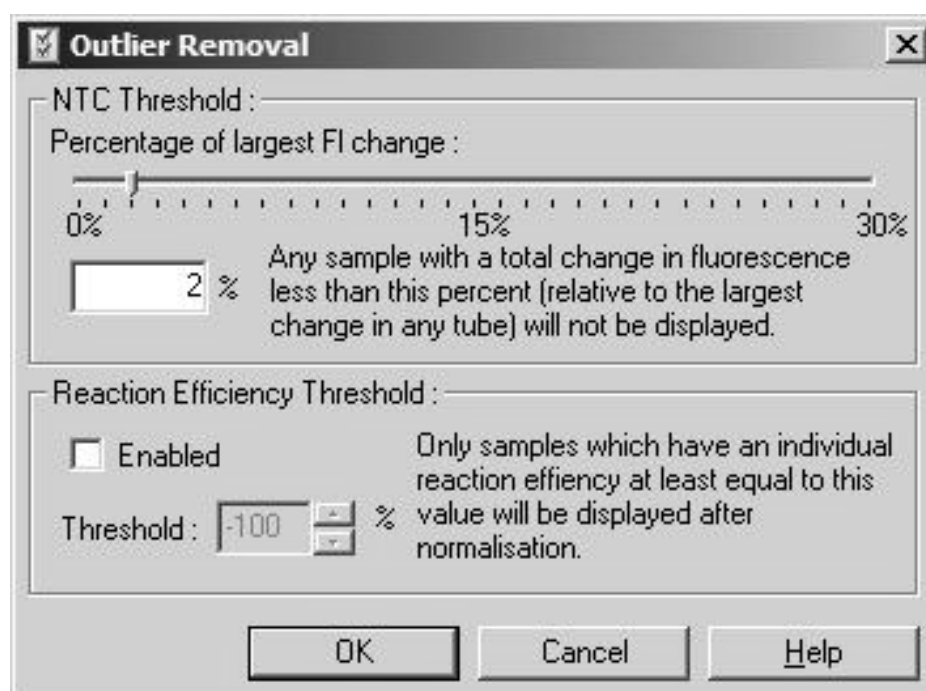
Bylo by ideální, kdyby pozadí (šum, background) fluorescence (FI) vzorku zůstala konstantní před amplifikací. Ale někdy FI vykáže postupné zvyšování nebo snižování během několika cyklů následkem působení použitých chemikálií. Toto vytváří zkreslenou hladinu šumu. Korekce sklonu šumu používá nejlépe se hodící křivku k určení hladiny šumu místo průměru a normalizuje k této křivce. Zvolení této možnosti kliknutím na tlačítko „Slope Correct“ může vylepšit data z replikátů, pokud jsou základní čáry vzorků zjevně nakloněné. Korekce sklonu šumu vylepšuje data v případech, kdy se pozadí surových dat kloní nahoru nebo dolů před základním bodem (CT).

Ignorovat začátek (Ignore First)

Fluorescenční signál z několika prvních cyklů běhu se nemusí shodovat se zbytkem běhu. Z tohoto důvodu může být dosaženo lepších výsledků, když je několik prvních cyklů ignorováno. Může být ignorováno až 10 cyklů. Avšak když počáteční cykly vypadají podobně jako cykly následující, je lepších výsledků dosaženo deselekci „Ignore First“, protože normalizační algoritmus bude mít větší množství dat ke zpracování.

Odstranění krajních (odlehých) hodnot (Outlier Removal)

Abychom odlišili malé změny ve fluorescenci a skutečné reakce ve vzorcích bez templátu (NTC – no template controls), jsou poskytována dvě měření: „NTC Threshold“ a „Reaction Efficiency Threshold“. Pro většinu aplikací se doporučuje „NTC Threshold“. Použitý způsob by měl být ověřen.



NTC Threshold: Umožňuje odstranit z analýzy vzorky nebo NTC, které mají lehkou odchylku směrem nahoru. Žádné vzorky se změnou pod „NTC Threshold“ nebudou vyhodnoceny. Budou označeny „NEG (NTC)“ a poznačeny v „CT Comment“ sloupci. Procento je relativní k největší maximální změně ve zkumavce. Například, když jeden vzorek začal na pozadí 2 FI a zvýšil se na 47 FI, potom 45 FI představuje 100%. „NTC Threshold“ 10% bude považovat každý vzorek menší než 4,5 FI za šum.

Reaction Efficiency Threshold: „Reaction Efficiency Threshold“ je alternativní metoda vyřazení šumu z analýzy. Normalizační algoritmus používá techniku odhadu reakční efektivity používanou v komparativní kvantitativní analýze (viz kapitola 7.6.6). Všechny vzorky, které nemají reakční efektivity alespoň na této úrovni, jsou vyřazeny. Budou označeny „NEG (R.Eff)“ a poznačeny v „CT Comment“ sloupci.

Hladina 0 % znamená, že během exponenciální fáze nedošlo k žádným reakcím. Hodnota 100% naopak indikuje, že během exponenciální fáze došlo k úplně efektivní reakci. Negativní hodnoty znamenají, že během exponenciální fáze fluorescenční signál klesal.

Současný výzkum je nejednotný v otázce přesných hladit efektivity potřebných k rozlišení skutečných reakcí od kontaminace a ostatních vlivů. Z tohoto důvodu doporučujeme používání této funkce s mírou. Musíme mít na paměti, že každý vzorek ze skutečnou reakcí bude vykazovat jistou viditelnou exponenciální fázi s určitým zvýšením fluorescence. Nastavení této hodnoty na víc než 0% vyřadí některé vzorky s neefektivním, ale zaznamenaným zvýšením ve fluorescenci, zatímco nastavení pod 0 % zobrazí vzorky, u kterých fluorescence klesla během exponenciální fáze a které by určitě měly být vyřazeny.

Poznámka: Pokud je hodnota vyřazena díky aktivaci jedné z těchto technik, potom u hodnoty CT v okně „Quantitation Results“ nebudou vyznačeny. Současně se v kolonce „Ct Comment“ objeví upozornění (vlaječka) indikující přítomnost tohoto vyřazení. Z tohoto důvodu je tedy nutné, abyste se přesvědčili, že kolonka „Ct Comment“ se v každém případě zobrazí.

V ilustraci uvedené níže byly vyřazeny vzorky 7,8 a 9 z důvodu „Reaction Efficiency Threshold“

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)					
No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/reaction)
7	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
8	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
9	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
10	10e5	Standard	15,04		1,00E+05
11	10e5	Standard	15,03		1,00E+05
12	10e5	Standard	15,05		1,00E+05

Sklon, amplifikace, reakční účinnost (Slope, amplification, reaction efficiency)

Sklon (slope) (M) reakce (zobrazen v okně „Standard Curve“) může být použit k určení exponenciální amplifikace a efektivity reakce použitím následujících výpočtů:

Exponenciální amplifikace = $10(-1/M)$

Reakční efektivita = $[10(-1/M)] - 1$

Optimální hodnoty pro M, exponenciální amplifikaci a reakční efektivitu jsou – 3,322, 2 a 1. Reakční efektivita je zobrazena v reportu o výsledcích (v úplné a v standardní zprávě, viz strana 7-12) a v okně „Standard Curve“.

Sklon je vypočítán jako změna v CT vydělená změnou v log ke vstupu (například číslem kopie). Hodnota 100% efektivní amplifikace znamená zdvojnásobení amplifikačního produktu v každém cyklu, což vyústí v hodnotu veličiny M – 3,322, amplifikačního faktoru 2 a reakční efektivitu 1.

Při hodnotě M – 3,322 výpočty vypadají následovně:

Exponenciální amplifikace: $10(-1/-3.322) = 2$

Reakční efektivita: $[10(-1/-3.322)] - 1 = 1$

Alternativní příklad: hodnota M 3,8 znamená, že reakce má exponenciální amplifikaci zhruba 1,83 a reakční efektivitu 0,83 (neboli 83%).

Offset

V rovnici popisující vztah mezi dvěma proměnnými je offset vyjádřen písmenem B ($y = Mx + B$). Offset se také nazývá průsečík. B představuje CT pro danou koncentraci jedné jednotky. Substitucí 1 do vzorce koncentrace dostáváme:

$$CT = \log(1) * M + B$$

$$CT = 0 * M + B$$

Výsledek je $CT = B$

Průsečík (intercept) se může měnit od běhu k běhu a je méně stabilním měřením než gradient. Z tohoto důvodu je gradient analyzován častěji než průsečík.

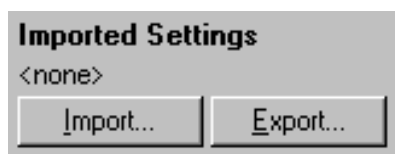
Hlavní okno (Main Window)

Hlavní okno zobrazuje amplifikační graf na logaritmické škále. Kliknutím na tlačítko “Linear Scale” ve spodní části okna změníte graf, ale nikoliv výpočty. Toto si můžete ověřit kliknutím pravým tlačítkem myši na graf a výběrem volby “Pinpointer”. Na logaritmické škále jsou malé hodnoty viditelnější, kdežto lineární škála umožňuje širší pohled na celou reakci.

Poznámka: Amplifikační graf se aktualizuje v reálném čase s tím, jak Rotor-Gene Q aktivně získává data během činnosti. Toto monitorování dat v reálném čase umožňuje uživateli vidět výsledky hned, jak křivky ukážou exponenciální vývoj. Toto umožňuje učinit předběžné závěry a rozhodnutí pro příští běh.

Kvantitativní analýza šablon (Quantitation analysis templates)

Kvantitativní analýza šablon umožňuje uživateli exportovat normalizační a prahová nastavení do jediného souboru *.qut. Tento soubor může být importován a znovu aplikován v dalších experimentech. Více detailů najdete v kapitole 8.1.



7.6.3

Dvě standardní křivky (Two standard curve)

Analýza relativní genové exprese, která používá normalizované geny, může být provedena použitím metody dvou standardních křivek.

Tato metoda vyžaduje standardní křivku pro každý gen. Koncentrace pro každý gen je kvantifikována podle své standardní křivky. Exprese zkoumaného genu je potom normalizována s normalizačním genem (často referenční/ housekeeping gen). Je důležité, aby standardní a replikované vzorky byly správně navrženy během nastavení vzorku (viz kapitola 6.1.4). Zvláště je důležité, aby korespondující vzorky měly v každé analýze stejné jméno. V multiplexních reakcích, kde pozice zkoumaného genu a normalizačního genu ve zkumavce jsou stejné, je jedna sada definic vzorků dostačující. Při provádění relativní analýzy s normalizačním genem při použití jediného kanálu (například, když reakce probíhají v oddělených zkumavkách při použití stejného fluoroforu) by měly být vytvořeny dvě stránky vzorků. První by měla označit pozici ve zkumavce jménem vzorku pro zkoumaný gen a druhá pozice by měla zůstat nepojmenovaná. Druhá potom bude označena pozicí použitou pro normalizační gen. Software potom spojí vzorky z těchto dvou analýz na základě jejich jmen.

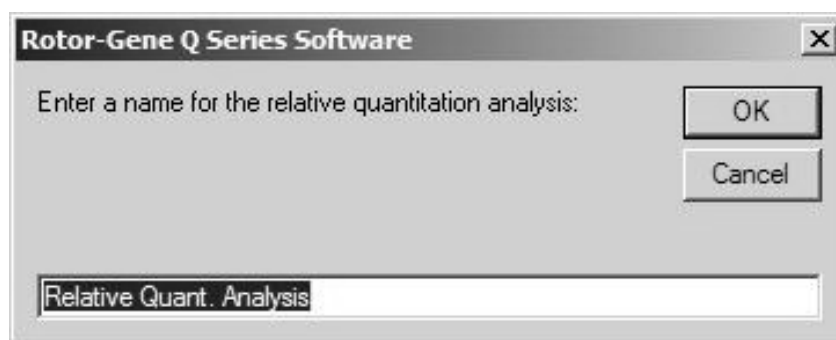
Analýza exprese za použití metody dvou standardních křivek

Data mohou být analyzována pro každý gen za použití kvantitativní analýzy. Jinak budou výsledky pro každý gen automaticky stanoveny nástrojem „Autofind Threshold“.

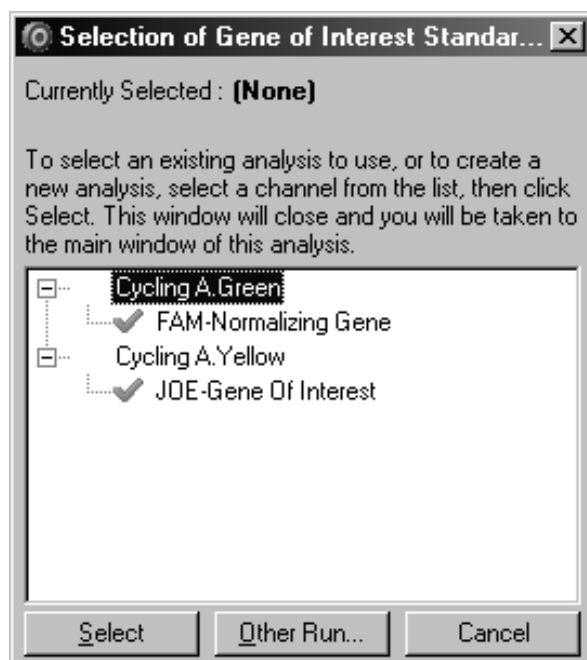
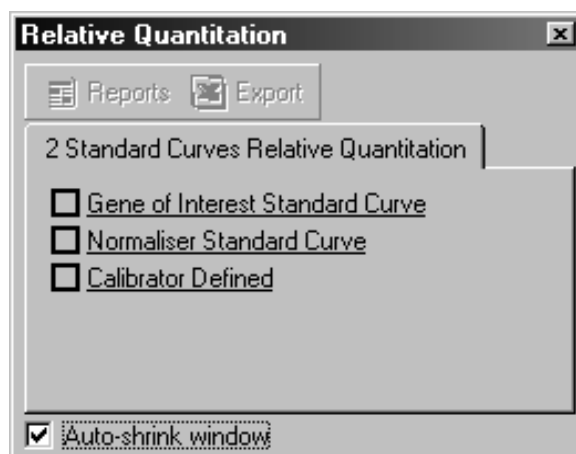
1. V okně „Analysis“ zvolte „2 Std Curve (Rel.)“. Klikněte „New Analysis...“



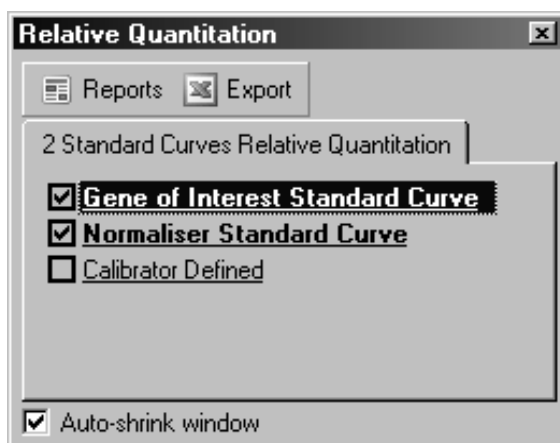
2. Zadejte jméno analýzy



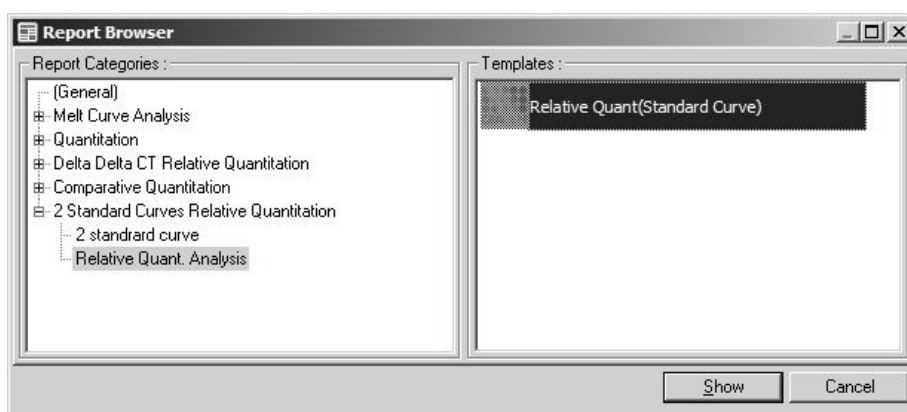
3. Určete stránky (Page) použité pro normalizační genovou analýzu a analýzu zkoumaného genu. Například kliknutí na „Gene of Interest Standard Curve“ zobrazí okno „Selection of Gene of Interest Standard...“. Zvolte stránku, kde byl zkoumaný gen kvantifikován. Tento postup opakujte pro normalizační gen. Je také možné definovat kalibrátor. Pokud je tato možnost zvolena, kalibrátoru je přiřazena hodnota 1 a všechny ostatní koncentrace vzorku jsou vypočítány relativně k tomuto vzorku.



Po ukončení těchto voleb budou možnosti zatrženy tak, jak je zobrazeno na ilustraci níže.



4. Klikněte na tlačítko „Reports“, čímž se zobrazí „Report Browser“. Ze seznamu zvolte analýzu se správným jménem. Klikněte na tlačítko „Show“, což zobrazí zprávu o relativní kvantifikaci. Volba „Export“ exportuje výsledky do nové tabulky Excelu. Pokud byl zahrnut kalibrátor, výsledky jsou vypočítány relativně ke kalibračnímu vzorku, jemuž byla přiřazena hodnota 1.



5. Jsou zobrazeny koncentrace odvozené ze standardních křivek pro zkoumaný gen (GOI Conc.), koncentrace normalizačního genu (Norm.Conc.) a relativní koncentrace (Relative Conc.). Výsledky mohou být uloženy v souboru MS Word.

Preview								Close																																																									
Print	Save As	Email	To Word																																																														
<table><thead><tr><th>Colour</th><th>Replicate Name</th><th>GOI Conc.</th><th>GOI Count</th><th>Norm. Conc.</th><th>Norm. Count</th><th>Relative Conc.</th><th>Calibrator</th></tr></thead><tbody><tr><td>000086</td><td>1,288</td><td>3</td><td>1,311</td><td>3</td><td>1.00</td><td>Yes</td><td></td></tr><tr><td>976356</td><td>634</td><td>3</td><td>637</td><td>3</td><td>1.01</td><td></td><td></td></tr><tr><td>381912</td><td>321</td><td>3</td><td>311</td><td>3</td><td>1.05</td><td></td><td></td></tr><tr><td>568152</td><td>158</td><td>3</td><td>158</td><td>3</td><td>1.02</td><td></td><td></td></tr><tr><td>784719</td><td>82</td><td>3</td><td>80</td><td>3</td><td>1.04</td><td></td><td></td></tr><tr><td>134414</td><td>40</td><td>3</td><td>41</td><td>3</td><td>0.99</td><td></td><td></td></tr></tbody></table>								Colour	Replicate Name	GOI Conc.	GOI Count	Norm. Conc.	Norm. Count	Relative Conc.	Calibrator	000086	1,288	3	1,311	3	1.00	Yes		976356	634	3	637	3	1.01			381912	321	3	311	3	1.05			568152	158	3	158	3	1.02			784719	82	3	80	3	1.04			134414	40	3	41	3	0.99				
Colour	Replicate Name	GOI Conc.	GOI Count	Norm. Conc.	Norm. Count	Relative Conc.	Calibrator																																																										
000086	1,288	3	1,311	3	1.00	Yes																																																											
976356	634	3	637	3	1.01																																																												
381912	321	3	311	3	1.05																																																												
568152	158	3	158	3	1.02																																																												
784719	82	3	80	3	1.04																																																												
134414	40	3	41	3	0.99																																																												

7.6.4 Relativní kvantitace Delta Delta C_T (Delta delta C_T relative quantitation)

Metoda Delta Delta CT umožňuje analýzu relativní genové exprese. Ta byla popsána Livakem a Schmittgenem*.

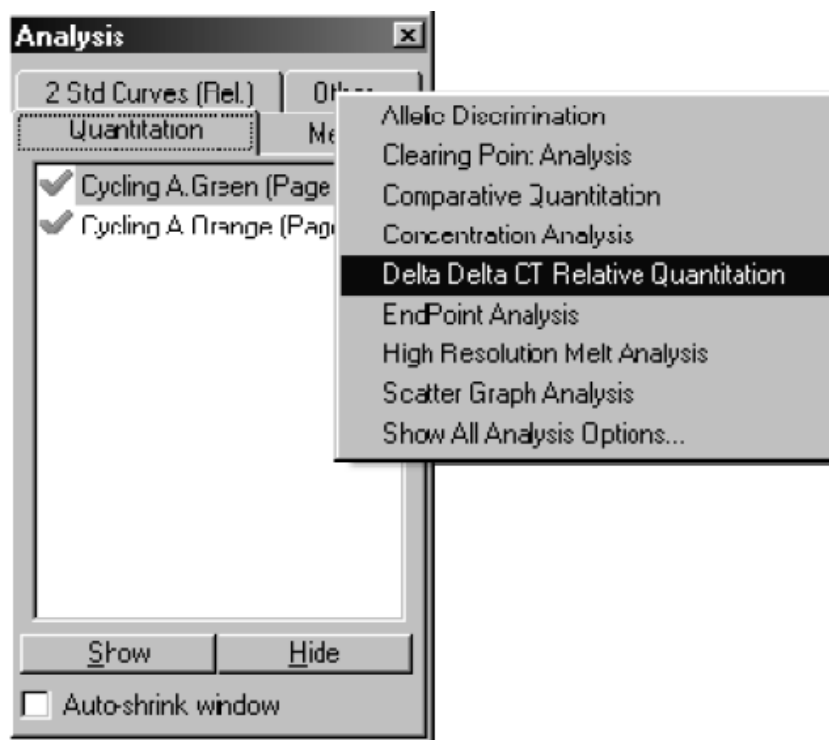
Tato metoda nevyžaduje zahrnutí standardní křivky v každém běhu. Každý vzorek je normalizován pro množství templátu přidané po srovnání s normalizačním genem. Tyto normalizační hodnoty jsou dále normalizovány relativně ke kalibrátoru. Kalibrátorem může být například wild-type (přirozený/divoký typ), untreated control (neupravený kontrolní vzorek) nebo time-zero vzorek (vzorek v nulovém čase).

Je nezbytné, aby amplifikační efektivity zkoumaných genů a normalizačních genů byly identické a že toto je potvrzeno podle instrukcí Livaka a Schmittgena.

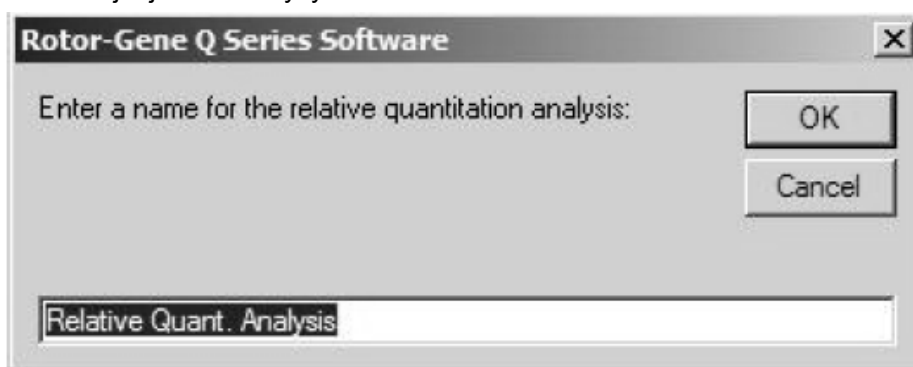
Je také důležité, aby jména vzorků byla správně definována v okně „Edit Samples“ a stejné vzorky označeny identicky v každé zvolené kvantitativní analýze.

1. Analyzujte data pomocí „Quantitation“. Není nutné provádět standardní křivku poté, co byla provedena validace.
2. V okně „Analysis“ zvolte „Other“ a potom „Delta Delta C_T Relative Quantitation“. Zvolte „New Analysis“.

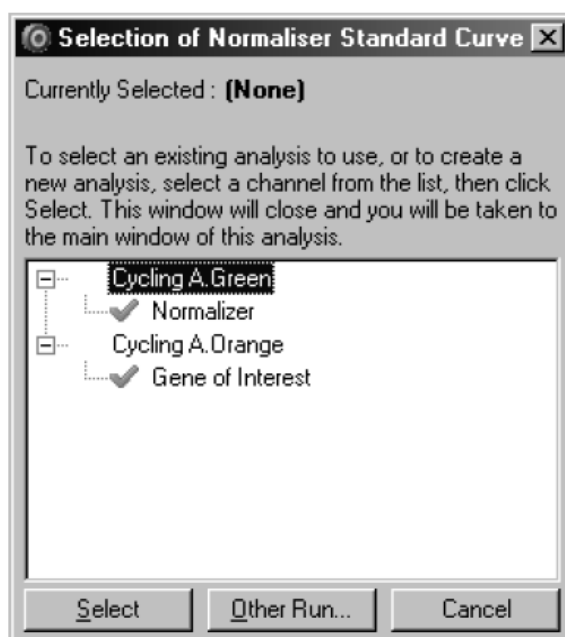
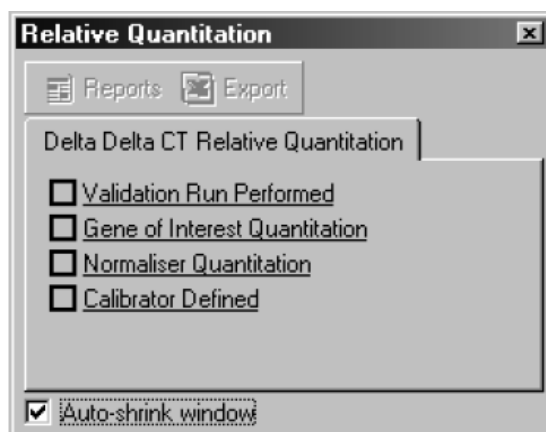
* Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method (Analýza relativní genové exprese za použití kvantitativní analýzy PCR v reálném čase a metody Delta Delta Ct). *Methods* **25**, 402.



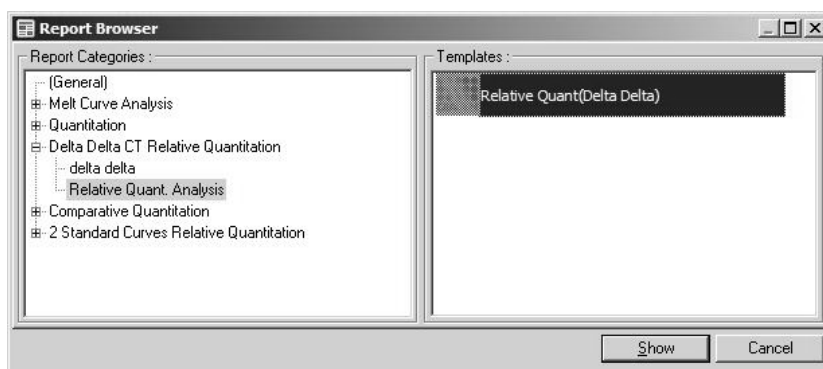
3. Zadejte jméno analýzy.



4. Políčko „Validation Run Performed“ musí být zatrženo, aby analýza mohla pokračovat. Definujte stránky, kde bude analyzován zkoumaný gen a normalizační gen.



5. Klikněte tlačítko „Reports“, ukáže se „Report Browser“. Ze seznamu zvolte analýzu s požadovaným jménem. Klikněte tlačítko „Show“, čímž se zobrazí zpráva o relativní kvantifikaci. Volba „Export“ exportuje výsledky do nové tabulky Excelu. Pokud byl použit kalibrátor, výsledky jsou relativní ke vzorku kalibrátoru, jehož hodnota byla stanovena na 1.



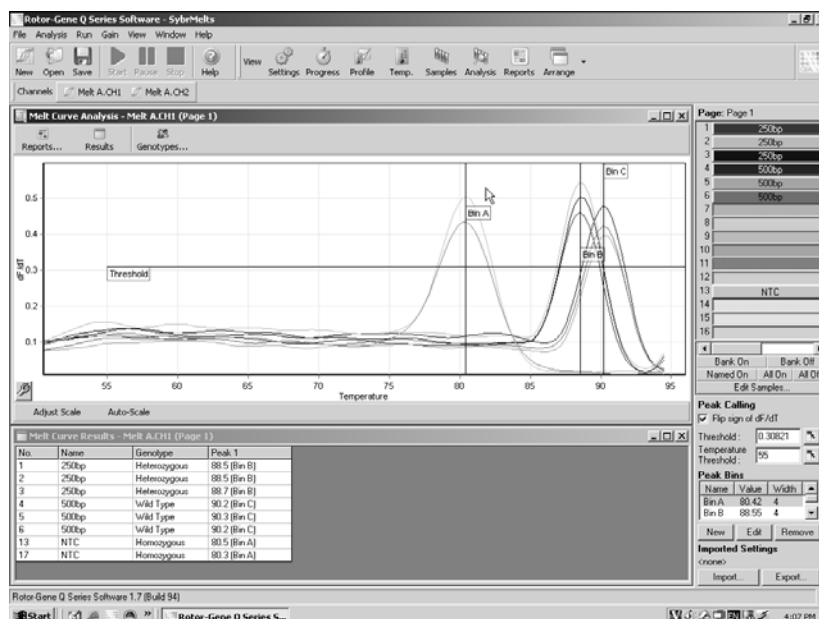
Příklad výsledků z této analýzy je ukázán níže. Zobrazí se hodnoty CT pro zkoumaný gen (GOI CT), hodnoty CT pro normalizační gen(Norm.CT), Delta CT, Delta Delta CT a relativní koncentrace (Relative Conc.). Expres je relativní ke kalibračnímu vzorku, který má přiřazenu relativní expresi 1.

Colour	Replicate Name	GOI CT	GOI Count	Norm. CT	Norm. Count	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Calibrator
	000086	22.19	3	19.51	3	2.68	0.00	1.00	Yes
	976356	23.28	3	20.55	3	2.72	0.04	0.97	
	381912	24.30	3	21.56	3	2.74	0.06	0.96	
	568152	25.25	3	22.61	3	2.64	-0.04	1.03	
	784719	26.27	3	23.58	3	2.69	0.01	0.99	
	134414	27.31	3	24.66	3	2.65	-0.03	1.02	

7.6.5 Analýza křivky tání (Melt curve analysis)

Analýza křivky tání analyzuje derivativ surových dat po jejich „uhlazení“. Tato analýza se běžně používá pro genotypování a alelickou diskriminaci. Vrcholky křivek jsou sdruženy do binů a všechny vrcholy (peaky) pod prahem (threshold) jsou vyřazeny. Biny jsou následně mapovány do genotypů pomocí příkazů „Genotypes“.

Po skončení běhu může být u některé užití chemie přidán další krok „Melt, tání“ pro vizualizaci disociace amplifikovaných produktů. Teplota je lineárně zvýšená a fluorescence každého vzorku je zaznamenána. Typická křivka analýzy tání je zobrazena níže.



Peak Calling

☒ Flip sign of dF/dT

Threshold: 0.30821

Temperature Threshold: 55

Peak Bins

Name	Value	Width
Bin A	80.42	4
Bin B	88.55	4

New Edit Remove

Imported Settings

<none>

Import... Export...

Flip sign of dF/dT: Před definicí vrcholu se přesvědčte, že označení dF/dT je správně nastaveno pro získání pozitivních peaků.

Defining peaks: V analýze křivky tání mohou vrcholy být definovány a reportovány různými metodami. Jedna je automaticky označit všechny vrcholy v každém vzorku. Další je seskupit vrcholy do binů, což je výhodné při genotypování.

Biny definují oblast, kde očekáváme, že se vrcholy objeví. Software pro analýzu křivky tání seskupuje clustry peaků do skupin binů, na základě skutečných

hodnot vrcholů v křivce. Biny mohou být editovány, pokud je to vyžadováno.


Každý vrchol, který se nachází uvnitř definovaného rozsahu binu, bude přiřazen do tohoto binu. Pokud jsou dva biny blízko sebe, potom bude vrchol přiřazen k nejbližšímu binu.

Poznámka: Biny by neměly být vizuálně umístěny tak, aby odhadovaly pozice vrcholů. Nastavte biny v přibližné oblasti zkoumání, protože potom jsou vlastní hodnoty výsledků v tabulce mnohem přesnější.


Peak Bins:

Bin definujeme tak, že klikneme na tlačítko „New Bin“, potom klikneme a držíme graf pro definici středu binu. Pro přidání dalšího binu proces opakujeme. Pro odstranění binu zmáčkněte tlačítko „Remove“.

Threshold:

Pro nastavení prahu (osa y) klikněte na ikonu , potom klikněte a držte graf a potáhněte prahovou křivku na požadovanou úroveň.

Temperature Threshold:

Nastavte práh teploty (osa x), klikněte na ikonu , potom klikněte a držte graf a potáhněte prahovou křivku doprava. Toto eliminuje prahovou linku pro nižší teploty.

Poznámka: Toto je užitečné, když signál vykazuje šum při nízkých teplotách.

Reporty

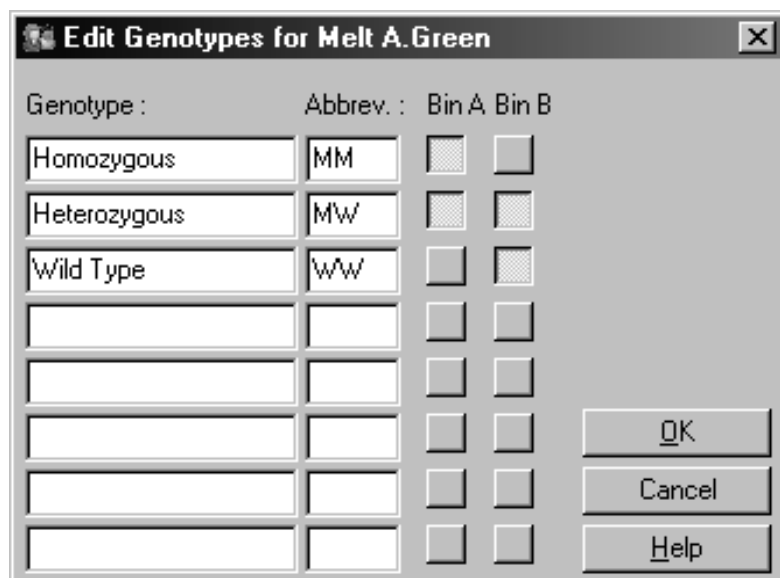
Zde se otevře „Report Browser“, kde je možno zvolit zprávu s výsledky, kterou si chceme prohlédnout. Zpráva může být generována na základě právě zvoleného kanálu nebo může být vytvořena zpráva o multikanálovém genotypování.

Výsledky

Zde se objeví okno „Melt Curve Results“, kde jsou zobrazeny vrcholy (peaky) vzorku.

Genotypy

Klikněte „Genotypes...“ a proveďte volbu podle obrázku níže.

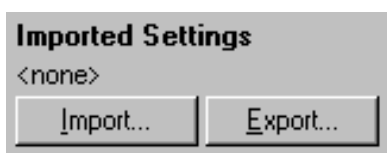


Toto okno umožňuje přiřadit genotypy podle výskytu vrcholů v binech. Výchozí konfigurace genotypů je zobrazena screenshotu. V této ilustraci má heterozygotní vzorek dva vrcholy, homozygotní vzorek má vrchol v prvním binu a divoký typ (wild type) má vrchol v druhém binu. Do políčka vedle jména každého genotypu lze napsat zkratku. Toto se používá při tisku multikanálových genotypových zpráv s výsledky, aby bylo možné lehce číst všechny vzorky z více kanálů.

U multiplexní analýzy musí být genotypy nastaveny pro každý kanál. Pokud například probíhá dvojkanálová Quenched FRET analýza, kde divoký typ a heterozygotní genotyp jsou očekávány v jednom kanálu, binové parametry musí být nastaveny pro každý kanál. Výsledky budou potom zobrazeny v multiplexní zprávě.

Šablony analýzy tání (Melt analysis templates)

Šablony analýzy tání umožňují uživateli exportovat normalizaci, prahy, genotypy a nastavení binů (normalization, threshold, genotype and bin settings) do jediného souboru *.met. Tato složka může být importována a znovu aplikována v dalších experimentech. Více podrobností najdete v kapitole 8.1.



7.6.6 Komparativní kvantifikace (Comparative quantitation)

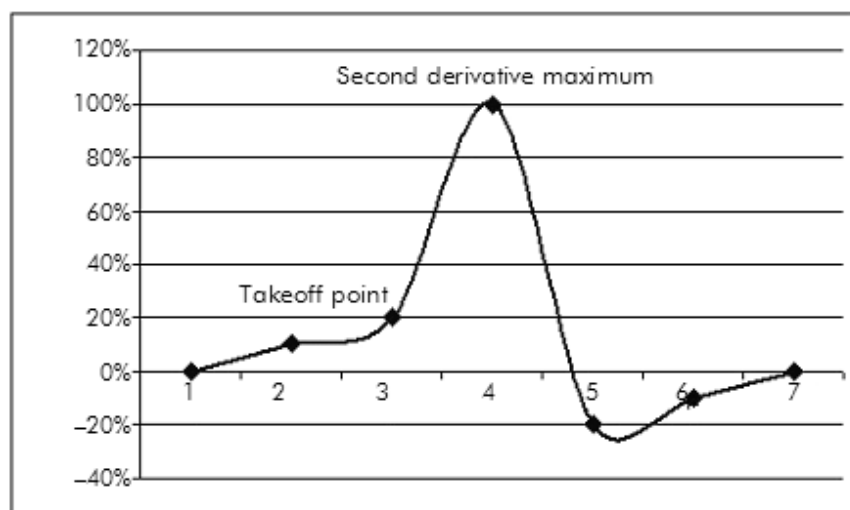
Komparativní kvantifikace srovnává relativní expresi vzorků s kontrolním vzorkem v běhu, když standardní křivka není k dispozici. Toto se často

používá v microarray analýze. Warton a kolektiv (2004)* nabízí příklad této techniky.

1. Tuto analýzu provedeme tak, že zvolíme „Other“ a potom „Comparative quantitation“ v okně „Analysis“. Dvakrát klikněte na kanál, který chcete analyzovat.
2. Zvolte kontrolní vzorek za pomoci rozbalovacího menu na pravé straně obrazovky pod přepínací lištou.
3. Výsledky jsou automaticky vypočítány a zobrazeny v okně „Comparative Quantitation Results“ pod grafem.

První sloupek v okně „Comparative Quantitation Results“ zobrazuje číslo a jméno vzorku. Sloupec „Takeoff“ zobrazuje počáteční bod vzorku. Druhá derivace amplifikace produkuje vrcholy korespondující s maximální mírou nárůstu fluorescence v reakci. Počáteční bod (Takeoff) je definován jako cyklus, při kterém je druhá derivace na 20% maximální hladiny a indikuje konec šumu a přechod do exponenciální fáze.

Graf ukazuje druhou derivaci amplifikace a také relativní pozice druhého derivativního vrcholu a takeoff bodu.



Kolona „Amplification“ zobrazuje efektivitu vzorku. 100% ní efektivita reakce by znamenala amplifikační hodnotu 2 pro každý vzorek, což znamená, že amplikon se zdvojnásobil v každém cyklu. U surových dat by se signál zdvojnásobil v exponenciální fázi. Kdyby tedy byl signál 50 fluorescenčních jednotek v cyklu 12 a 51 fluorescenčních jednotek v cyklu 13, měl by se zvýšit na 53 fluorescenčních jednotek v cyklu 14. Všechny hodnoty amplifikace pro každý vzorek jsou zprůměrovány tak, aby produkovaly amplifikační hodnotu, která je zobrazena na pravé straně obrazovky pod přepínací lištou. Čím větší je variace mezi odhadovanými amplifikačními

* Warton, K., Foster, N. C., Gold, W. A., and Stanley, K. K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells (Nový kmen genů vyvolaný akutním zánětem endoteliálních buněk). *Gene* **342**, 85.

hodnotami každého vzorku, tím větší je interval spolehlivosti (označen hodnotou uvedenou za symbolem \pm). Interval spolehlivosti pro velký počet vzorků (N) vykazuje pravděpodobnost 68,3%, že skutečná amplifikace vzorků leží v této v tomto rozsahu (standardní odchylka 1). Když zdvojnásobíme interval \pm , dosáhneme pro velká N interval spolehlivosti 95,4%.

Replikáty kalibračního vzorku (Calibrator Replicate)

Stejně jako u metody Delta Delta CT je vyžadován kalibrační vzorek a měření jsou relativní k tomuto kalibračnímu vzorku. Replikáty kalibrátoru mohou být analyzovány, jelikož se používají počáteční body těchto vzorků, když pozice různých vzorků mají stejné jméno. Aby byl tento postup použit správně, přesvědčte se, že replikáty mají identická jména.



Pro výpočet exprese se používá průměrná amplifikace. Například u vzorku s nízkou hodnotou amplifikace bude trvat dosažení jistého počtu absolutních kopií déle, než u vzorku s vyšší amplifikační hodnotou. Kolonka „Rep.Conc.“ v okně „Comparative Quantitation Results“ zobrazuje relativní koncentrace. Relativní koncentrace každého vzorku přirovnaná ke kalibračnímu vzorku je vypočítána na základě počátečního bodu (Takeoff) a reakční efektivity. Toto je vyjádřeno vědeckými symboly.

Poznámka: Hodnota zobrazená v „Average Amplification, Průměrné amplifikaci“ napravo od symbolů \pm představuje standardní odchylku od průměrné amplifikace po odstranění okrajových amplifikačních hodnot.

Pokud je hodnota velká, potom je pravděpodobné, že v celkovém výpočtu hodnot koncentrací je velká chyba.

Relativní koncentrace jsou vypočítány softwarem tímto způsobem:

1. Počáteční bod (Takeoff) každého vzorku je vypočítán podle vrcholu druhé derivace.
2. Je vypočítáno průměrné zvýšení v surových datech čtyř cyklů po počátečním bodu. Toto je amplifikační hodnota pro vzorek.
3. Okrajové amplifikace jsou odstraněny z důvodu odstranění šumu fluorescence pozadí.
4. Zbýlé amplifikace jsou zprůměrovány. Toto je průměrná amplifikace.
5. Průměrný počáteční bod je vypočítán pro každý kalibrační replikát.
6. Relativní koncentrace vzorku je vypočítána jako amplifikace A (kalibrační Takeoff – Takeoff vzorku).

7. Výsledek je zobrazen vědeckými symboly v kolonce „Rep.Conc.“ v okně „Comparative Quantitation Results“.

7.6.7

Alelická diskriminace (Allelic discrimination)

Alelická diskriminace používá kinetická data v reálném čase ze dvou či více kanálů genotypových vzorků. Tuto analýzu provedeme následovně: Zvolte „Other“ a potom „Allelic Discrimination“ v okně „Analysis“.

Když provádíme alelickou diskriminaci, nestačí pro analýzu dvakrát kliknout na jeden kanál, protože analýza je prováděna na mnoha kanálech simultánně. Z tohoto důvodu buď zmáčkněte CTRL a kliknutím zvýrazněte kanály, který chcete analyzovat nebo táhněte kurzorem myši přes tyto kanály. Když byly všechny požadované kanály zvýrazněny, klikněte „Show“. Seznam bude aktualizován a zobrazí všechny kanály v řadě a ty budou mít znaménko. To znamená, že všechny tyto kanály budou použity v jedné analýze. Pokud chcete odstranit jeden nebo více z těchto kanálů, klikněte pravou myší na analýzu a zvolte „Remove Analysis...“. Tyto kanály potom mohou být zahrnuty do jiné alelické diskriminační analýzy. Jeden kanál může být použit pouze v jedné analýze současně.

Reports: Otevře náhled zprávy „Allelic Discrimination Analysis“.

Results: Ukáže okno „Allelic Discrimination Results“. Toto okno se otevře automaticky při prvním otevření analýzy.

Normalization options: Pro optimalizaci normalizace surových dat se nabízí řada možností.

- Dynamic Tube (dynamická normalizace ve zkumavce).
- Slope Correct (korekce sklonu šumu).
- Ignore First x cycles (korekce šumu v úvodních cyklech).

Více detailů najdete na straně 7-22.

Discrimination Threshold: Do těchto políček vložte hodnoty pro stanovení pozice diskriminačního prahu. Všechny křivky procházející tímto prahem jsou považovány za genotypovací vzorky. Klikněte na ikonu napravo od každého textového políčka, potom potáhněte práh na grafu pro vizuální stanovení těchto hodnot.



Discrimination Threshold

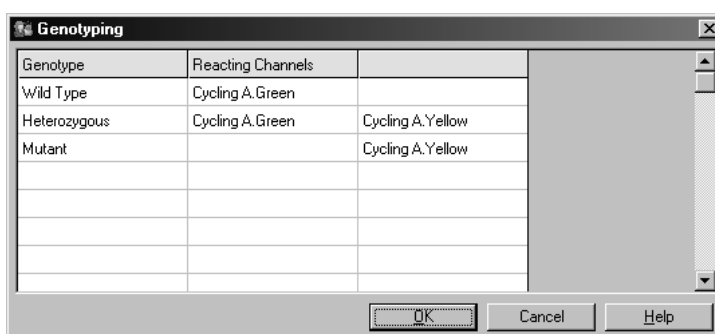
Threshold: 0.05902

Eliminate Cycles before: 1

Genotypes:

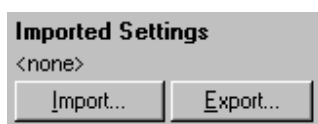
Otevře okno „Genotyping“, které se používá na definování genotypu detekovaného v každém kanálu. Toto okno umožňuje přiřazení genotypů kanálům pro alelickou diskriminační analýzu.

Na níže uvedeném příkladě je vzorek heterozygotní, když výsledky v kanále cyklování A. Green a cyklování A. Yellow protnou práh.



Allelic analysis templates::

Složky alelické analýzy umožňují export normalizace, prahu a nastavení genotypu do jediného souboru *.alt. Tento soubor může být importován a znovu použit v dalších experimentech. Více podrobností najdete v kapitole 8.1.



7.6.8 Analýza bodového (rozptylového) grafu (Scatter graph analysis)

Analýza bodového grafu umožňuje genotypování založené na relativní expresi amplifikačních bodů dvou kanálů. Na rozdíl od alelické diskriminace je genotyp posouzen na základě oblastí definovaných z bodového grafu místo na základě jediného prahu.

Tuto analýzu provedeme selekcí „Other“ a volbou „Scatter Graph Analysis“ v okně „Analysis“.

Když provádíme analýzu bodového grafu, nestačí pro analýzu dvakrát kliknout na jeden kanál, protože analýza je prováděna na mnoha kanálech simultánně. Z tohoto důvodu buď zmáčkněte CTRL a kliknutím zvýrazněte

kanály, který chcete analyzovat nebo táhněte kurzorem myši přes tyto kanály. Když byly všechny požadované kanály zvýrazněny, klikněte „Show“.

Seznam bude aktualizován, a zobrazí všechny kanály v řadě a ty budou mít znaménko. To znamená, že všechny tyto kanály budou použity v jedné analýze. Pokud chcete odstranit jeden nebo více z těchto kanálů, klikněte pravou myší na analýzu a zvolte „Remove Analysis...“. Tyto kanály potom mohou být zahrnuty do jiné analýzy bodového grafu. Jeden kanál může být použit pouze v jedné analýze současně.

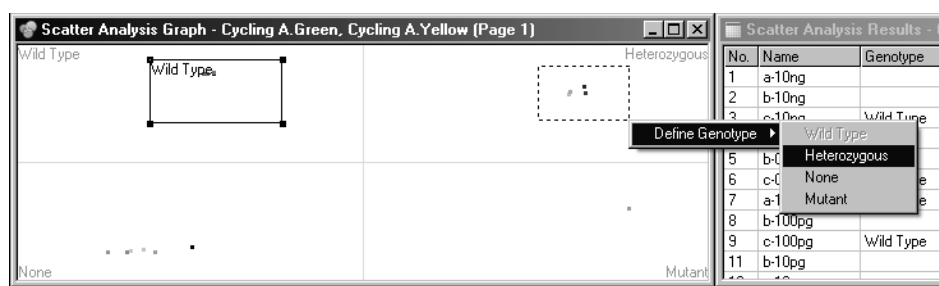
- Reports:** Otevře náhled zprávy „Scatter Analysis“.
- Results:** Ukáže okno „Scatter Analysis Results“. Genotyp pro každý vzorek je určen oblastí definovanou uživatelem bodového grafu.
- Normalization options:** Pro optimalizaci normalizace surových dat se nabízí řada možností.
- ☐ Dynamic Tube (dynamická normalizace ve zkumavce))
 - ☐ Slope Correct (korekce sklonu šumu)
 - ☐ Ignore First x cycles (korekce šumu v úvodních cyklech)
- Více detailů najdete na straně 7 – 25.
- Genotypes...:** Otevře okno „Genotyping“, které se používá pro definování genotypů detekovaných v každém kanálu. V tomto okně je možné přiřadit genotypům kanály, ve kterých vzorek reaguje. Zvolené kanály budou použity na označení rohů bodového grafu a budou sloužit uživateli jako vodítko k oblasti bodového grafu, ve které by oblasti měly být definovány.



Scatter Graph:

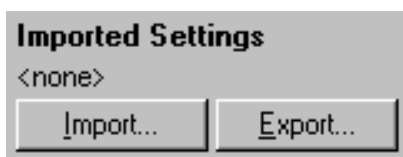
Bodový graf zobrazuje relativní exprese dvou vybraných kanálů. Displej je normalizován tak, aby byly brány v úvahu různé násobky růstu v každém kanálu, a zvýrazňuje rozdíly v expresi mezi vzorky.

Při genotypování uživatel definuje oblasti kliknutím a potažením sekce grafu. Volba může být označena na základě genotypů konfigurovaných v okně „Genotyping“.



Scatter graph analysis templates:

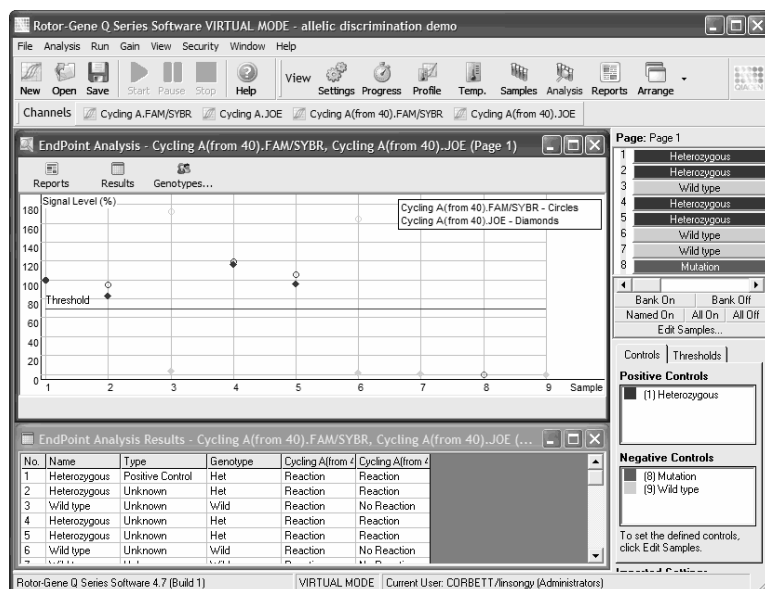
Šablona analýzy bodového grafu umožňuje export genotypu a nastavení oblastí do jednoho souboru *.sct. Tento soubor může být importován a znovu použit v dalších experimentech. Více podrobností najdete v kapitole 8.1.



7.6.9 Analýza Endpoint

Analýza „Endpoint“ umožňuje diskriminaci mezi amplifikovanými a neamplifikovanými vzorky na konci běhu. Výsledky jsou kvalitativní (pozitivní/negativní), nikoli kvantitativní.

Screenshot analýzy end point je uveden níže.



Analýza endpoint je podobná alelické diskriminaci v tom, že výsledky jsou kvalitativní a že jména mohou být přiřazena k jistým permutacím reakcí u různých kanálů. Ale na rozdíl od alelické diskriminace je u analýzy koncových bodů k dispozici pouze jeden výsledek, který používá údaje z jednotlivých cyklů pro každý vzorek. To znamená, že uživatel musí definovat pozitivní a negativní kontrolní vzorky pro provedení analýzy. Pro surová data jsou hladiny signálu normalizovány relativně ke známým pozitivním a negativním kontrolním vzorkům pro každý kanál. Uživatel potom zvolí procento hladiny signálu jako práh.

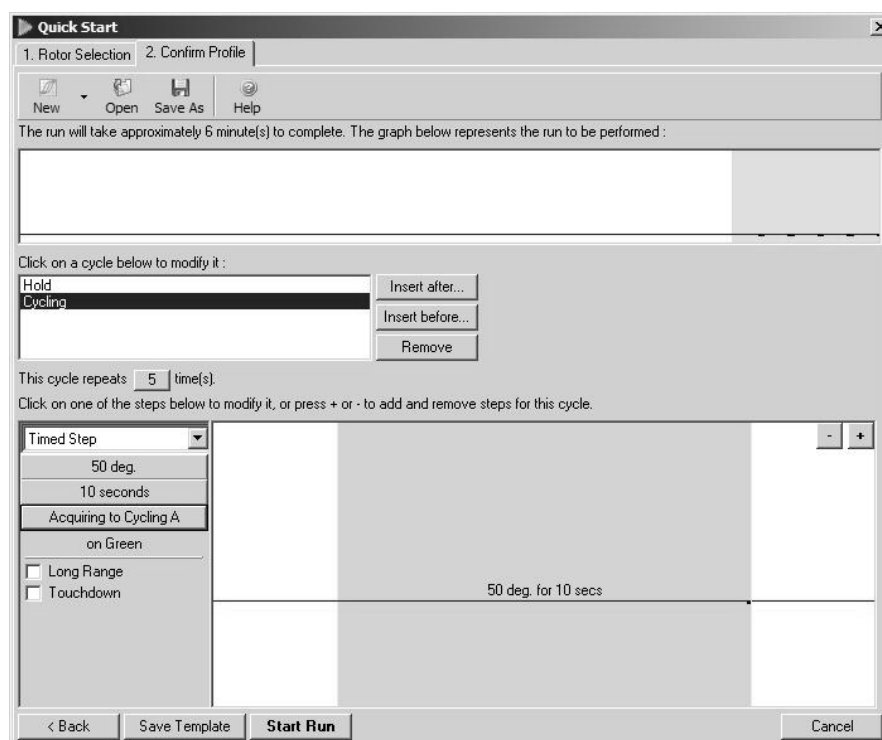
Termíny používané v analýze koncových bodů.

Některé termíny používané v analýze koncových bodů jsou vysvětleny níže.

- Positive control:** Toto je vzorek, o kterém se ví, že amplifikuje.
- Negative control:** Toto je vzorek, o kterém se ví, že neamplifikuje. Přestavuje tedy typický signál pozadí.
- Threshold:** Práh je úroveň signálu, nad kterým je vzorek definován jako pozitivní (amplifikovaný). Toto nastavení musí uživatel upravit pro každý běh.
- Signal level:** Procento fluorescenčního signálu normalizovaného tak, že nejvyšší signál pozitivního kontrolního vzorku je 100% a nejnižší signál negativního kontrolního vzorku je 0%.
- Genotype:** Interpretace různých obměn reakcí v různých kanálech. Například heterozygotní genotyp může být přiřazen ke vzorkům, které v obou kanálech zeleném i žlutém měly signál. Tento genotyp také může být použit k reportování výsledků reakcí s interními

kontrolními vzorky. Například: výsledky mohou být reportovány jako „inhibován“, „pozitivní“ nebo „negativní“ podle toho, jestli reakce byla v jistých kanálech zaznamenána nebo ne.

Konfigurace profilu



Provedení analýzy endpoint:

Proved'te profil při teplotě 50 °C po několik minut, potom cyklovací krok s krokem 1 (50 °C po 10 vteřin) na požadovaném kanálu. Nastavte počet opakování na počet 5, viz ilustrace výše. Uvedené časy jsou pouze ilustrační a mohou se lišit podle příslušné aplikace. Čím více je v profilu opakování, tím více je k dispozici informací pro provedení analýzy. Analýza bude automaticky průměrovat všechny údaje, aby dosáhla jediné hodnoty pro každý vzorek. Není vyžadován žádný specifický počet opakování. Pokud není vyžadován vysoký stupeň přesnosti, 5 opakování většinou postačí.

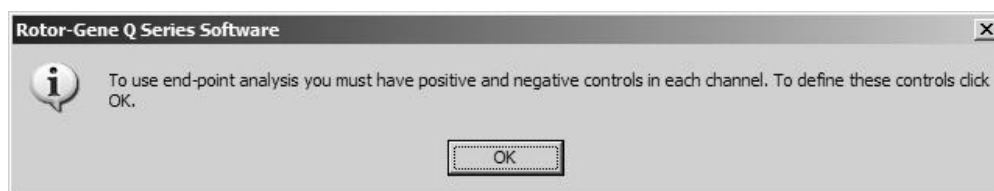
Analýza

Analýza endpoint může být provedena na několika kanálech současně. Novou analýzu zahájíme kliknutím na tlačítko „Endpoint“, zvolíme kanály potažením kurzoru myši a klikneme „Show“.



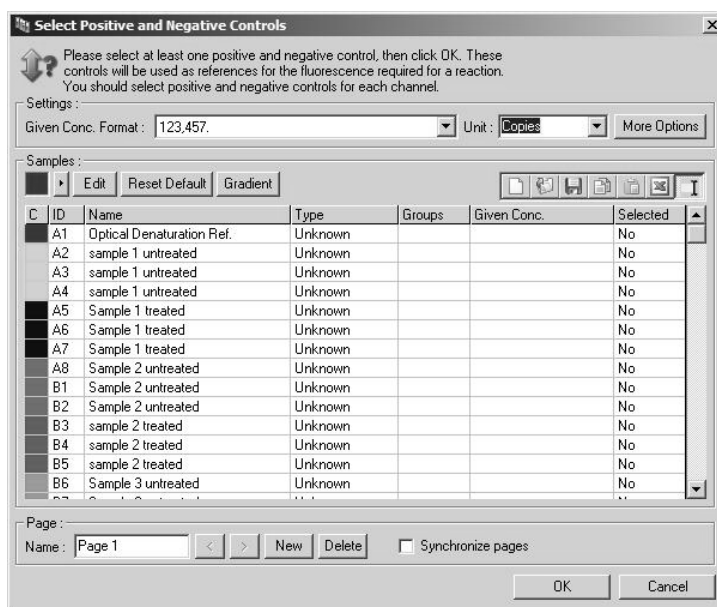
Definice kontrolních vzorků

Když poprvé otevřete analýzu endpoint, objeví se následující zpráva, pokud pozitivní a negativní vzorky nebyly definovány.



Klikněte „OK“. Objeví se okno „Edit sample“ umožňující definování pozitivních a negativních kontrolních vzorků. Kontrolní vzorek definujeme jako pozitivní nebo negativní kliknutím na příslušný typ v rozbalovacím menu.

Poznámka: Kontrolní vzorky musí být zapnuty pomocí přepínací lišty na pravé straně hlavního okna, abychom mohli analýzu vykonat.



Tato obrazovka funguje stejně jako okno „Edit sample“ (kapitola 6.1.4).

Normalizace

Normalizace dat analýzy koncových bodů zařadí všechny signální hladiny do rozsahu od 0 do 100%. Alespoň jeden pozitivní a jeden negativní kontrolní vzorek musí být zvolen; nebo více, když analyzujeme více kanálů a standardy nejsou multiplexovány. Více než jeden pozitivní a jeden negativní kontrolní vzorek by měly být zpracovány, pokud existuje riziko, že pozitivní kontrolní vzorek nebude amplifikován.

1. Všechny pozitivní kontrolní vzorky jsou analyzovány pro každý kanál a vzorek s nejvyšší fluorescencí je nastaven jako 100%. To znamená, že když začleníme duplikátní kontrolní vzorky, pozitivní kontrolní vzorek může selhat, aniž by ovlivnil běh.
2. Všechny negativní kontrolní vzorky jsou analyzovány a vzorek s nejnižší fluorescencí je nastaven jako 0%.
3. Naměřené fluorescenční hodnoty zbývajících vzorků jsou seřazeny v poměru k nejvyššímu pozitivnímu a nejnižšímu negativnímu kontrolnímu vzorku.

Například:

Vzorek	Typ	Fluorescence
1	Pozitivní kontrolní vzorek	56,3
2	Pozitivní kontrolní vzorek	53,0
3	Negativní kontrolní vzorek	4,5
4	Negativní kontrolní vzorek	4,3
5	Vzorek	48,1
6	Vzorek	6,4

Běh byl úspěšný, když dva pozitivní a dva negativní kontrolní vzorky jsou blízko sebe a jsou mimo fluorescenční hodnoty vzorku.

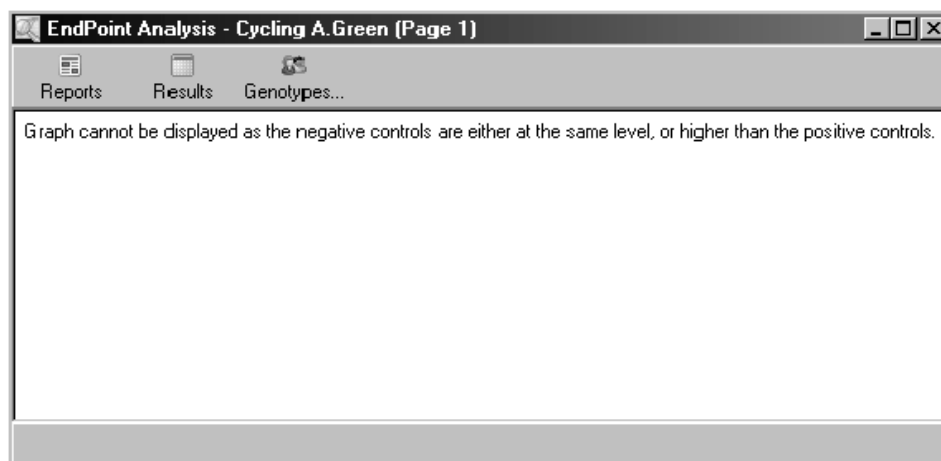
Normalizované hodnoty jsou:

Vzorek	Typ	Expres (%)
1	Pozitivní kontrolní vzorek	100,0
2	Pozitivní kontrolní vzorek	93,7
3	Negativní kontrolní vzorek	0,4
4	Negativní kontrolní vzorek	0,0
5	Vzorek	84,2
6	Vzorek	4,0

Vzorek č. 1 byl pozitivní kontrolní vzorek s nevyšší fluorescencí, takže byl nastaven jako 100%. Druhý pozitivní kontrolní vzorek byl o něco nižší. Nejnižší negativní kontrolní vzorek č. 4 byl nastaven na 0%. Je tedy nyní zřejmé, že vzorek 5 byl amplifikován, zatímco vzorek č. 6 pravděpodobně amplifikován nebyl.

Poznámka: Je možné dosáhnout vyšších hladit exprese než 100% a nižších než 0% podle toho, jaké pozitivní a negativní kontrolní vzorky byly zvoleny. Výsledky vyšší než 100% mohou znamenat, že vzorek má vyšší expresi než pozitivní kontrolní vzorek. Výsledky nižší než 0% může znamenat, že vzorek má menší pravděpodobnost amplifikace než vzorek kontrolní. Jelikož tato analýza je kvalitativní, podobné výsledky nejsou důvodem ke znepokojení.

Pokud negativní kontrolní vzorky vykážou vyšší fluorescenci než pozitivní kontrolní vzorky, znamená to, že vzorky nebyly správně nastaveny a objeví se následující zpráva:



Normalizace na více kanálech

Je možné analyzovat signální data více kanálů, ale nastavení vzorků je složitější. Analýza koncových bodů předpokládá, že se provádí multiplexování a tak každá zkumavka může mít pouze jednu pozici. V současné době není možné analyzovat sestavu, ve které je pozice vzorku pozitivní kontrolní vzorek pro jeden kanál a negativní kontrolní vzorek pro jiný kanál.

Ačkoliv pouze jedna definice vzorku pro pozici zkumavky je k dispozici v okně „Edit sample“, normalizace probíhá nezávisle u každého kanálu.

Pokud je pozice zkumavky pozitivní kontrolní vzorek pro alespoň jeden kanál, měla by být specifikována jako pozitivní kontrolní vzorek v kolonce „Typ“ v okně „Edit Sample“. Jinak by typ měl být označen jako „Vzorek, Sample“. Toto se týká také negativních kontrolních vzorků.

Takže když je například vzorek pozitivním kontrolním vzorkem v zeleném kanálu, ale nikoliv ve žlutém kanálu, vzorek by stejně měl být definován jako pozitivní kontrolní vzorek. Jelikož se v každém kanálu používá nejvyšší pozitivní kontrolní vzorek, a když je ve žlutém kanálu alespoň jeden kontrolní vzorek, který amplifikuje, definice vzorku jako kontrolního pro zelený kanál je ignorována.

Práh (Threshold)

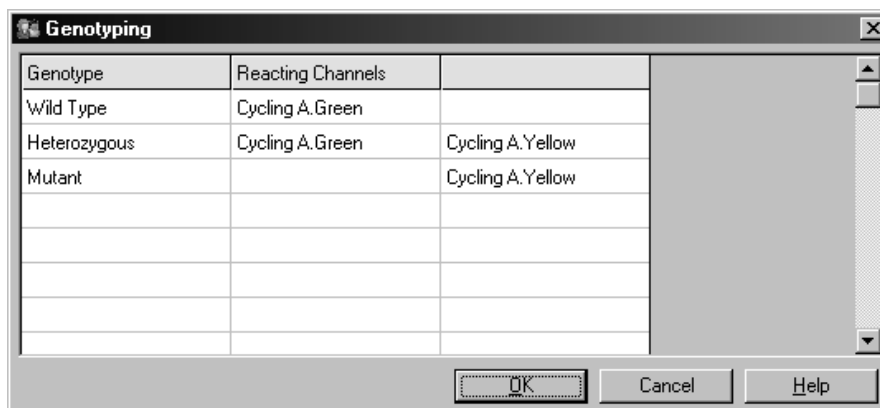
Práh se používá pro stanovení procent exprese vyžadované pro reakci v každém kanálu. Jakmile byly definovány pozitivní a negativní kontrolní vzorky, všechny kanály jsou normalizovány do stejné stupnice 0 až 100%. Z tohoto důvodu je potřeba pouze jeden práh, i když je analyzováno více kanálů.

Klikněte a táhněte čáru prahu do oblasti mezi 0 a 100. Práh by neměl být příliš blízko ke vzorkům ani na jedné straně čáry, protože to by znamenalo, že běh byl nejednoznačný. Pokud je rozdíl mezi vzorkem definovaným jako

amplifikovaný a vzorkem definovaným jako neamplifikovaný pouze několik procent, znamenalo by to, že při opakování reakce by se vzorek mohl objevit na libovolné straně prahu.

Genotypy

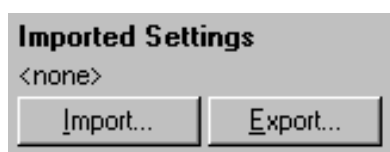
Tato volba otevře okno „Genotyping“, které se používá pro definici genotypů detekovaných v každém kanálu.



Toto okno umožňuje přiřazení genotypů ke kanálům. Na výše uvedeném příkladě je vzorek heterozygotní, když údaje v kanálech cyklování A. Zelené a cyklování A. Žluté překříží práh.

Šablony analýzy Endpoint

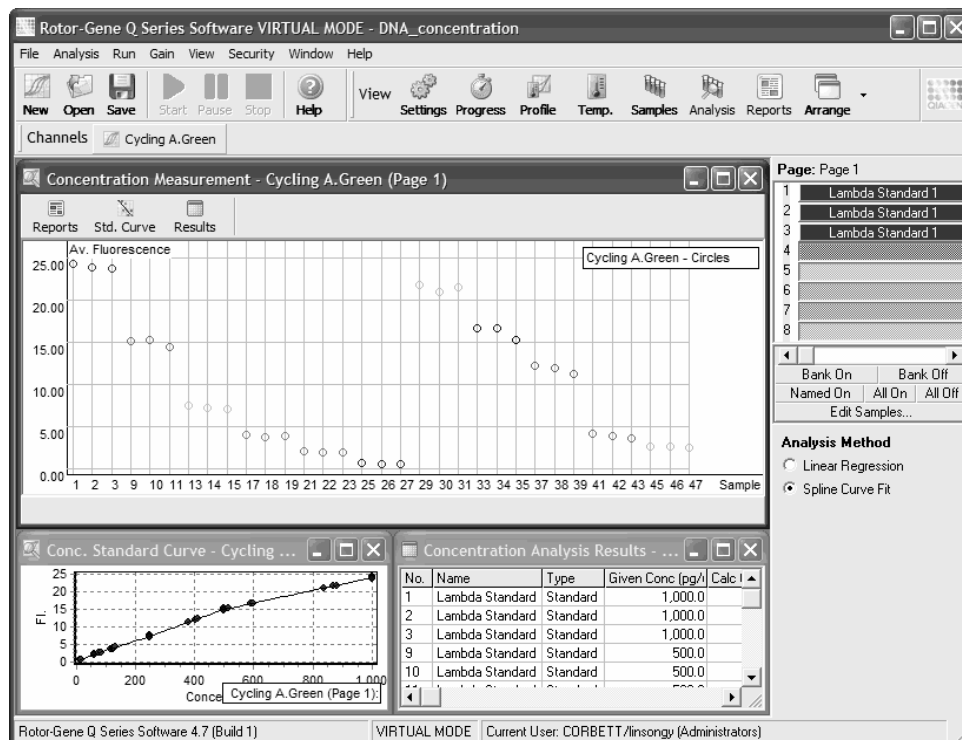
Složka analýzy endpoint umožňuje uživateli exportovat nastavení prahu a genotypu do jediného souboru *.ent. Tento soubor může být importován a znovu použit v dalších experimentech. Více podrobností najdete v kapitole 8.1.



7.6.10 Analýza koncentrace

Analýza koncentrace umožňuje, aby Rotor-Gene Q byl použit na měření koncentrací DNA nebo na získání fluorometrických údajů.

Následující screenshot zobrazuje tuto analýzu:



Příprava běhu

Připravte si fluorescenční standardy a vzorky nejlépe trojmo.

Příprava standardů

Pro určení koncentrace DNA z každého vzorku se používá standardní křivka.

DNA používaná pro standardní křivku by měla být podobného typu jako DNA ve vzorcích, které budou měřeny. Koncentrace alespoň jednoho vzorku DNA by měla být stanovena pomocí ultrafialové spektrofotometrie a tento vzorek by měl být použit jako standard. Minimálně tři standardy (s replikami) by měly být použity. Standardy DNA používané pro detekci fluorescence jsou zásadně pouze lineární s rozsahem od 1 do 100 ng/ μl. Když je uvnitř tohoto rozsahu koncentrace DNA snížena na polovinu, stejně se sníží fluorescenční údaje. Interval spolehlivosti pro jakoukoliv koncentraci vně tohoto rozsahu jsou velmi široké díky nelinearitě chemikálií.

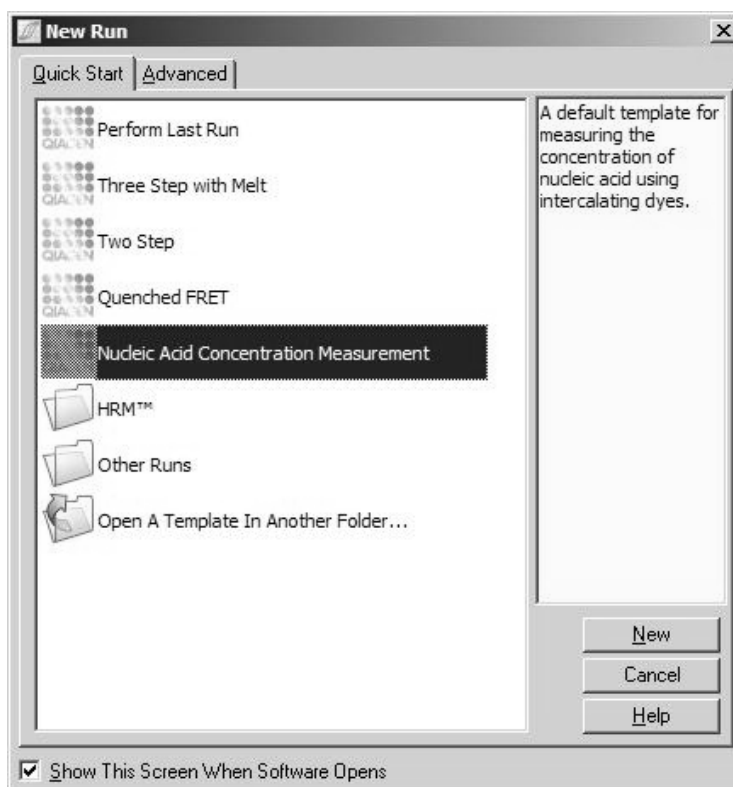
Typ měřené DNA

V měření různých typů DNA (například genomické DNA ve

srovnání s plazmidovou DNA) byly pozorovány rozdíly. Z tohoto důvodu by pouze podobné typy DNA měly být měřeny společně. Použití plazmidové DNA jako standard je nevhodné pro měření genomické DNA.

Nastavení běhu

Zvolte „Nucleic Acid Concentration Measurement“ v Quick Start wizard.



Poznámka: Přesvědčte se, že pozitivní kontrolní vzorek, jako například standard vysoké koncentrace, je v pozici zkumavky 1. Bez pozitivního kontrolního vzorku není software schopen optimalizovat nastavení gainu pro maximální sensitivitu. Před každým během budete vyzváni provést tento krok.

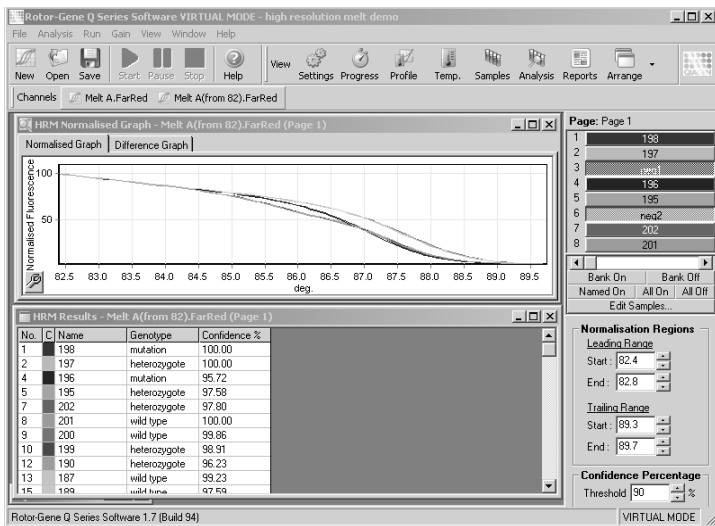
Analýza

Analýza koncentrace je založena na srovnání fluorescenční hladiny a koncentrační hladiny. Jsou k dispozici dva analytické modely. Optimální volba jednoho či druhého závisí na aplikaci a chemickém složení.

„Lineární regrese, Linear Regression“ analyzuje data na bázi předpokladu, že se jedná o lineární vztah a odhaduje neznámé hodnoty na základě vytvořeného lineárního modelu. Stanoví chybu měření zkoumáním odchylky údajů od lineárního modelu.

Pokud jsou údaje koncentrace lineární, je toto nejvhodnější analýza, protože poskytuje uživateli statistickou analýzu variace (ANOVA).

„Přiřazení spline křivce, Spline Curve Fit“ předpokládá, že se koncentrační hodnoty zvyšují s fluorescencí. I když tento přístup vytváří odhady pro



HRM Genotypes

Genotype	Control
mutation	198
wild type	201
heterozygote	197

Clear OK Cancel Help

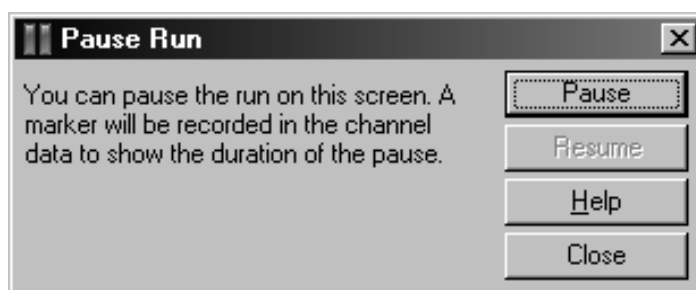
7.7 Menu Běh (Run)


7.7.1 Začátek běhu (Start Run)

Tato volba spustí definovaný teplotní profil se současně nastaveným gainem. Než běh začne, objeví se okno „Potvrzení profilu běhu, Profile Run Confirmation“. Grafické vyjádření teplotního profilu je zobrazeno společně s nastavením gainů pro každý kanál.

7.7.2 Pozastavení běhu (Pause Run)

Tato možnost umožňuje, aby byl běh přerušen a znovu obnoven. Zastavení a opětné rozběhnutí může značně ovlivnit výsledky běhu. Z tohoto důvodu bude na datech značka, která indikuje, že běh byl pozastaven a také délka zastavení. Současně je umístěna zpráva do kolonky zpráv v okně „Nastavení běhu, Run Settings“ (viz strana 7-54).



<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Horký povrch [W18]</p> <p>Když pozastavíte běh, Rotor-Gene Q se úplně neochladí na pokojovou teplotu. Buďte velmi opatrní, než se dotknete rotoru nebo kterýchkoliv zkumavek v přístroji.</p>
--	--

7.7.3 Zastavení běhu (Stop Run)

Když je zvolena tato možnost, objeví se žádost o potvrzení, že běh má skutečně být zastaven.

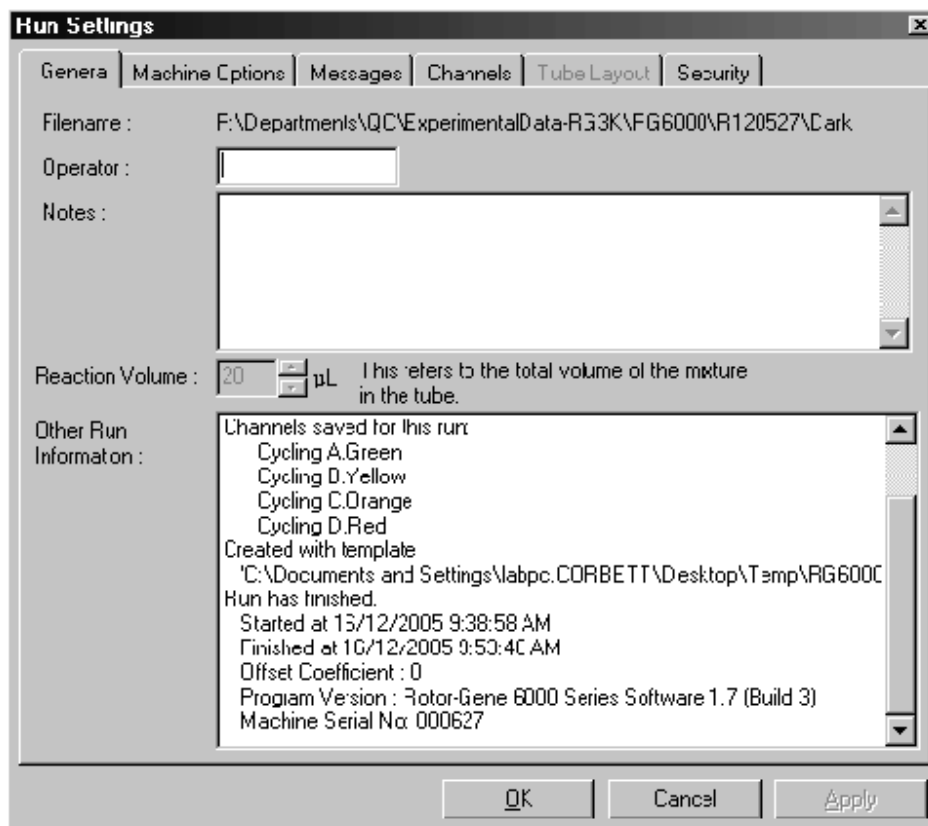
7.8 Náhled menu

7.8.1 Nastavení běhu (Run Settings)

Obecné údaje

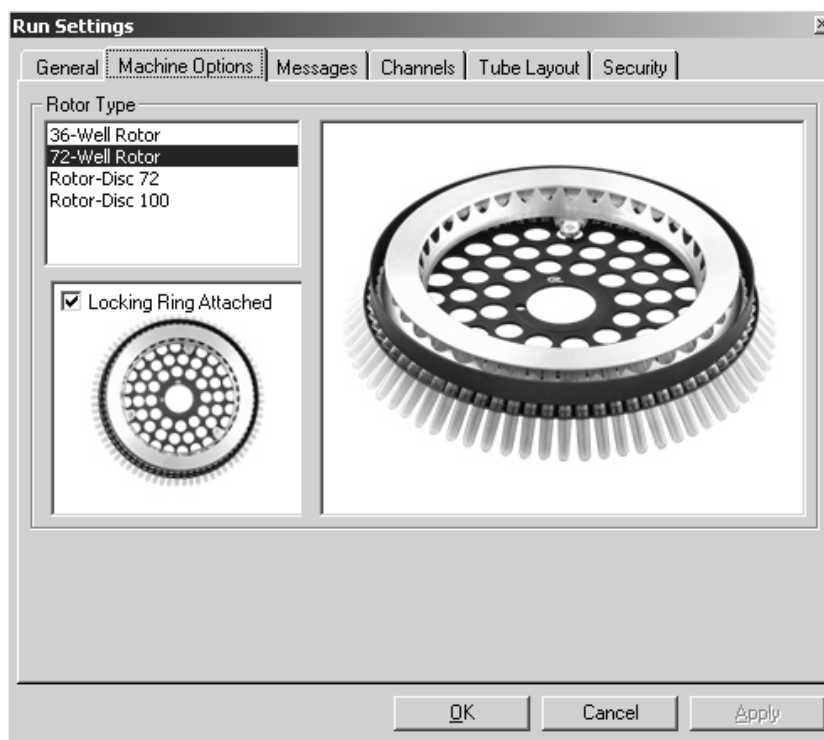
Toto okno umožňuje nastavení informací o běhu, jeho jméno, datum analýzy, jméno operátora a veškeré další poznámky.

Toto okno obsahuje veškeré informace, kromě profilu nutného pro konfiguraci běhu. Poté, co běh skončí, v okně se objeví následující informace: použitý cyklér, nastavení gainu, počet kanálů, čas začátku a konce.



Možnosti přístroje (Machine Options)

Toto tlačítko zobrazí nastavení konfigurace Rotoru-Gene Q MDx.



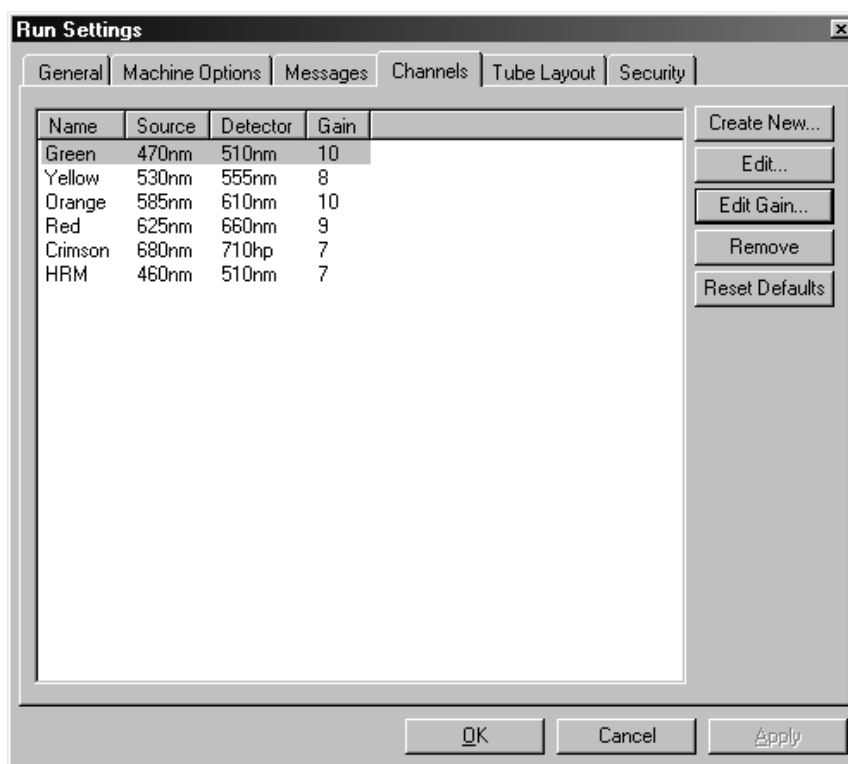
Nastavení rotoru by mělo korespondovat s rotorem instalovaným v Rotoru-Gene Q MDx. Pokud otvíráte existující běh, nastavení by mělo ukazovat rotor, který byl instalován v cykléru v té době.

Vzkazy (Messages)

Toto tlačítko ukáže vzkazy, které indikují, zda uživatel provedl nějaké změny, jako například zastavení cykléru nebo vynechání cyklů během procesu. Také zobrazuje varování, která byla během běhu obdržena. Toto tlačítko by mělo být zkontrolováno, pokud výsledky zcela neplní očekávání.

Kanály (Channels)

Při konfiguraci nového běhu tlačítka na displeji současné konfigurace ukazují kanály, které jsou k dispozici. Pokud sledujeme existující běh, zobrazené informace představují konfiguraci kanálů v průběhu tohoto běhu. Pokud některý běh poškodí nastavení kanálu, výchozí hodnoty mohou být znovu nastaveny kliknutím na „Reset Defaults“.



- Name:** Název kanálu.
- Source:** Specifikuje vlnovou délku excitace zdrojové LED diody.
- Detector:** Specifikuje detekci vlnové délky a typ filtru (nm=band pass, hp=high pass).
- Gain:** Specifikuje gain pro určitý kanál.
- Create New...:** Umožňuje vytvoření nových kanálů. Kliknutí „Otevřete nový“ otevře okno, které se zeptá na nové jméno, zdroj a detekční filtr. Filtry mohou být zvoleny za pomoci rozbalovacího menu vedle každého okna.
- Channels:** Zelený, žlutý, oranžový a červený kanál představují standardní konfiguraci pro 4-kanálovou multiplexovou detekci.

Rozložení zkumavek (Tube Layout)

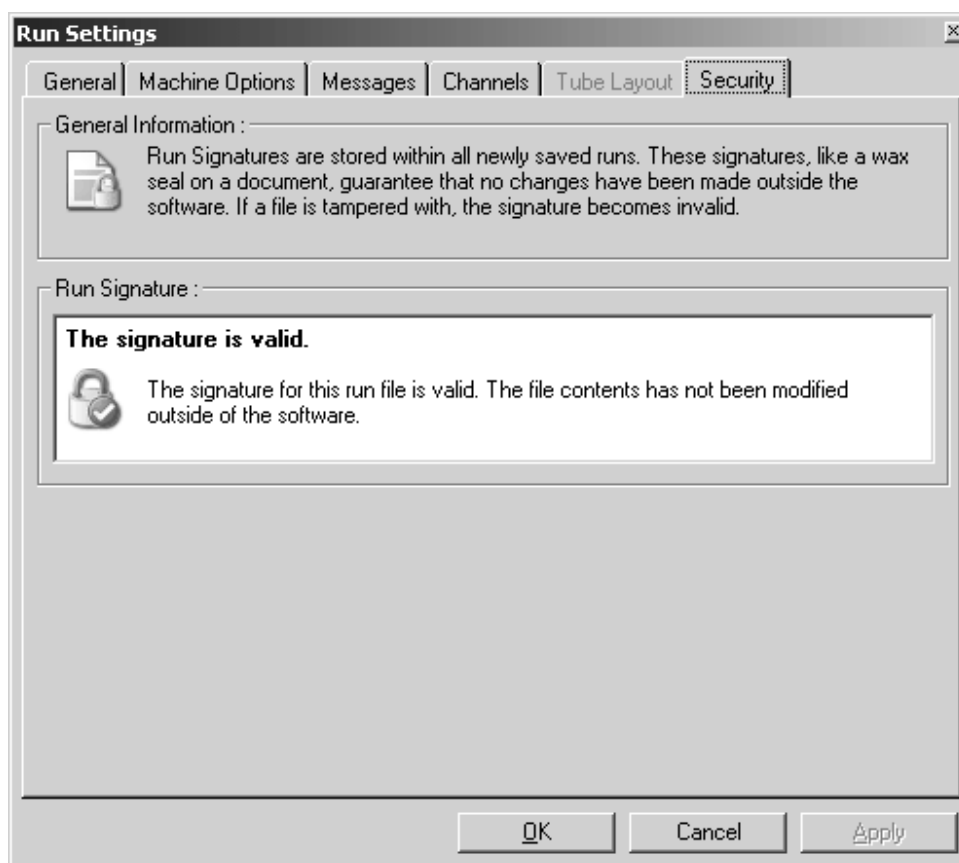
Když používáme 72-jamkový rotor, vzorky mohou být uspořádány tak, aby vyhovovaly značení bloku 9 x 8. Výchozí uspořádání vzorků umožňuje postupné značení (například 1, 2, 3...). To znamená, že vzorky jsou značeny za sebou v pořadí, v jakém jsou vloženy do Rotoru-Gene Q. Vzorky také

mohou být označeny 1A, 1B, 1C atd. Tato možnost je vhodná, když byly vzorky pipetovány multikanálovou pipetou.

Zabezpečení (Security)

Toto tlačítko zobrazuje informace o podpisu u běhu. Tato signatura běhu je ireversibilní klávesa, která je obnovena pokaždé, když je soubor změněn. Když je kterákoliv sekce souboru *.rex modifikována vně softwaru, signatura a soubor již nebudou shodné. Kontrola signatury umožňuje se přesvědčit, že surová data nebyla modifikována vně aplikace, že s profilem nebylo manipulováno a že teplotní graf je platný. Signatura také chrání proti poškození, například chyby v systému souborů.

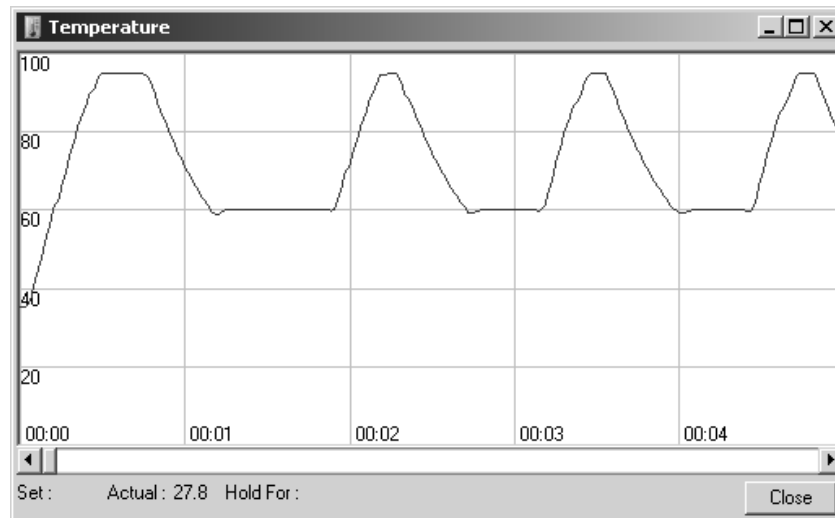
Poznámka: Když jsou soubory *.rex poslány emailem, kódovací proces může znehodnotit signaturu. Abyste tomu zabránili, před emailováním soubory zazipujte.



7.8.2 Graf teploty (Temperature Graph)

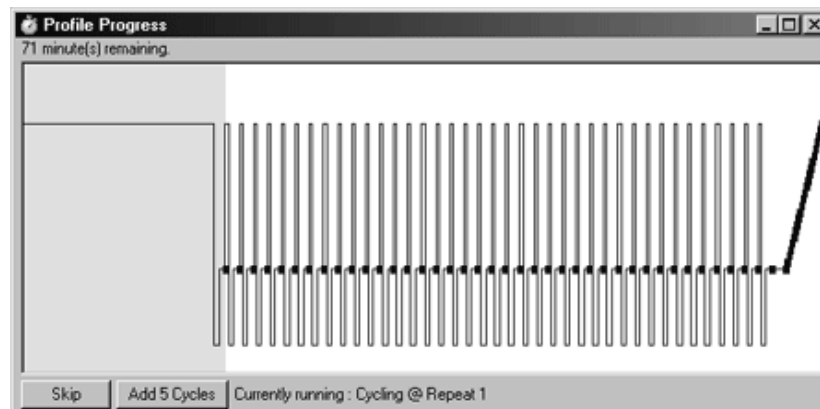
Zvolte „Temperature Graph“ z menu „View“ nebo klikněte na tlačítko „Temp.“. Objeví se okno „Temperature“. Graf ukazuje teplotu vzorků během běhu. Jak běh pokračuje, časy pro „Nastavení“, „Aktuální“ a „Retenci“ jsou zobrazeny pro každý krok programu. Pro soubor existujícího běhu ukazuje okno „Teplota“ teplotní změny během celého běhu. Vertikální stupnice představuje

teplotu a horizontální stupnice znamená čas. Použijte posuvnou lištu pro posun tam a zpět oknem „Teplota“.



7.8.3 Progress v profilu (Profile Progress)

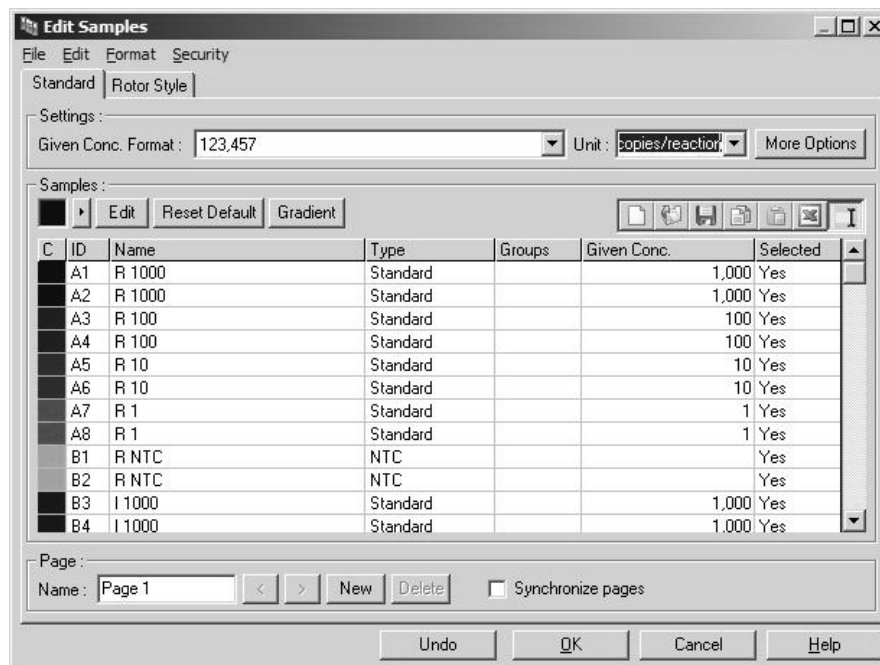
Zvolte „Profile Progress“ z menu „Náhled“ nebo klikněte na tlačítko „Progress“ a objeví se okno „Profile Progress“. Toto okno zobrazuje grafickou prezentaci teplotního profilu spojeného s daným během. Když provádíte běh, zastíněná část okna indikuje počet cyklů, které byly dokončeny. Také je zde odhad, kolik minut bude ještě běh trvat do ukončení.



Skip: Umožňuje vynechání kteréhokoliv kroku v profilu.

Add 5 Cycles: Přidá 5 opakování k současnému cyklovacímu kroku.

7.8.4 Editovat vzorky (Edit Samples)

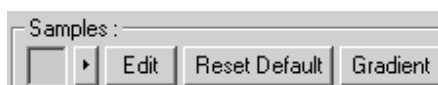


Kliknutím na tlačítko „Samples“ se dostaneme do okna „Edit Sample“. Do tohoto okna se také můžeme dostat pravým kliknutím na seznam vzorků na pravé straně obrazovky. Toto okno má stejnou funkci jako okno „Edit Samples“ ve wizardech, kromě toho, že v rozhraních soubor a edit jsou k dispozici nástrojové lišty.

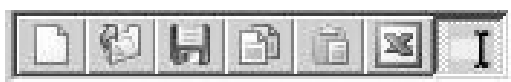
V horní části okna se objeví čtyři nabídky: File, Edit, Format, and Security (Soubor, Editace, Formát a Zabezpečení). Menu Soubor se používá na vytvoření nových oken „Editace vzorků“, na otevření existujících šablon vzorků nebo na uložení názvů vzorků jako šablon pro budoucí použití. Přípona těchto šablonových souborů je ***.smp**. Menu Editace umožňuje kopírování a vkládání řádků. Menu Zabezpečení umožňuje uzamčení definovaných vzorků.








Given Conc. Format: Toto rozbalovací menu se používá pro výběr vhodného formátu displeje koncentrace. Koncentrace jsou automaticky formátovány podle aktuálně zvoleného umístění.

Unit: Toto rozbalovací menu nastavuje jednotky měření pro test.



Line style:	Styl čáry může být upraven pro zlepšení názornosti grafů na černobílých tiskárnách. Některé čáry mohou být zdůrazněny modifikací jejich stylu. Přístup k této funkci je přes kliknutí pravou myší vedle tlačítka Editace.
Edit:	Zmáčknutí tohoto tlačítka otevře volbu barev. Různé řádky mohou být zvoleny, když přiřazujeme barvy ke zkumavkám.
Reset Default:	Resetuje všechny barevné buňky zpět do výchozích barev.
Gradient:	Umožňuje zvolit gradient od první do poslední barvy. Některé gradienty jsou definovány v nastavení vzorku.



Ikona  :	Ikona „New, Nový“ vynuluje okno „Edit Samples“ při přípravě pro vložení nových dat.
Ikona 	Ikona „Open, Otevřít“ otevře políčko pro dialog, ve kterém může být zvolen soubor pro import z Rotoru-Gene Q. Poznámka: Počet vzorků v otevřeném okně a importovaných souborů se musí shodovat.
Ikona 	Ikona „Save, Uložit“ otevře políčko dialogu, ve kterém se vloží název a složka, ve kterém bude kopie současného vzorku uložena.
Ikona 	Ikona „Copy, Kopírovat“ zkopíruje zvolené buňky.
Ikona 	Ikona „Paste, Vložit“ vloží buňky, které byly zvoleny příkazem kopírovat do zvolené pozice v tabulce.
Ikona 	Ikona „Excel“ otevře políčko, kam se vkládá název souboru a složky, do které se uloží informace o vzorku. Po zmáčknutí „Uložit“ se soubor Excelu automaticky otevře.
Ikona 	Ikona „Append/Overwrite, Přidat/přepsat“ změní editaci buněk v okně „Editace vzorků“. Když je zvoleno přepsání, existující data jsou při editování přepsána. Když je zvoleno přidání, nová data jsou

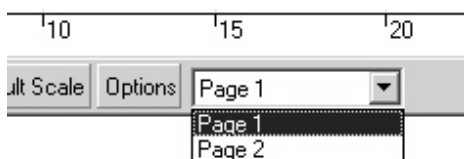
přidána na konec existujících dat.

Sample Types: Vzorky mohou být definovány jako jeden z typů uvedených v následující tabulce.

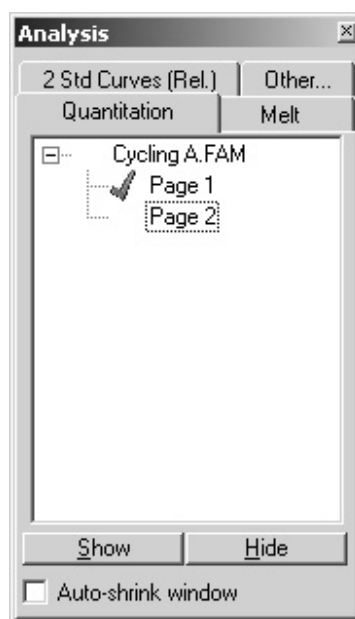
Typ vzorku	Popis
None	Žádný vzorek v této pozici
NTC	Žádný vzorek ze šablony
Negative Control	Negativní kontrolní vzorek
Positive Control	Pozitivní kontrolní vzorek
Unknown	Neznámý vzorek k analýze
Standard	Standardní hodnoty používané k vytvoření standardní křivky pro výpočet koncentrací neznámého vzorku.
Calibrator (RQ)	Kalibrátor má přiřazenu hodnotu 1 a všechny ostatní koncentrace vzorků jsou vypočítány v poměru k tomuto vzorku.

Page: Tato funkce umožňuje uživateli mít různé definice vzorků a také různé experimenty v různém běhu. Tato funkce je vhodná pro analýzu různých produktů v různých kanálech. Používejte tlačítka s šipkou pro pohyb mezi stránkami vzorků. Na vytvoření a vymazání stránek použijte tlačítka „New, Nový“ a „Delete, Vymazat“. Je možné mít několik definic vzorků pro stejný kanál, aby bylo možné používat více standardních křivek bez multiplexování. Definujte zkoumané vzorky a k nim patříci standardní křivky na různých stránkách. Jeden kanál může potom být analyzován každou sadou definic nezávisle. Stránky vzorků mohou být označeny „Strana1“, „Strana 2“ atd. nebo mohou být pojmenovány (například „Housekeeper“). Toto jméno se potom objeví ve zprávách.

Při prohlížení surových dat mohou být zvoleny definice použité k displeji dat za pomoci rozbalovacích menu umístěných vedle tlačítka „Options, Možnosti“.



Stránka pro vzorek na analýzu může být zvolena v okně „Analysis“ (viz kapitola 7.6.1)



Given Conc.: Ukazuje koncentraci pro každý standard. Jednotky mohou být definovány jako decimální nebo logaritmická čísla. Pokud jsou standardy diluční sérií, stačí napsat pouze první dva standardy. Zmáčknutím ENTER program automaticky přidá příští logickou diluci v sérii.

Line style: Styl čáry může být upraven pro zlepšení názornosti grafů na černobílých tiskárnách. Některé čáry mohou být zdůrazněny modifikací jejich stylu. Přístup k této funkci je přes kliknutí pravou myší vedle tlačítka Edit.



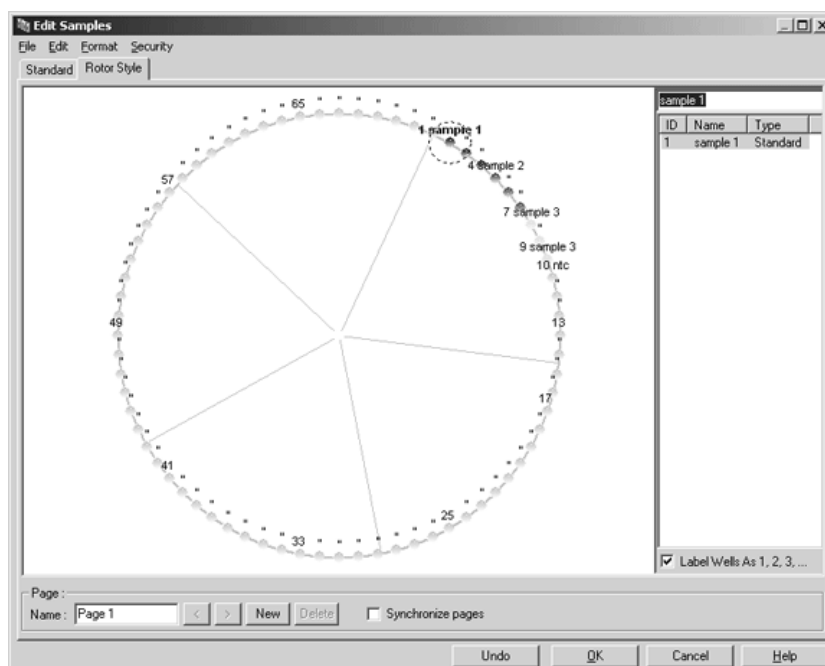
Nástrojová lišta ukazuje výchozí styl „Solid, Plný“. Toto může být změněno na čáru "Dashed", "Dotted", "Hairline", "Thin" or "Thick" tj. čáru „Přerušovanou“, „Tečkovanou“, „Ultratenkou“, „Tenkou“ nebo „Tlustou“. Při ukončení klikněte na tlačítko levé šipky pro návrat do Edit, Reset Default nebo Gradient view.



- Multiple row entry:** Pokud nějaká informace potřebuje být vložena najednou v několika řádcích, zvolte všechny řádky a začněte psát. Informace bude vložena do každého řádku. Toto funguje stejně jako volba typů vzorků, volba barev nebo vkládání koncentrací.
- Sample type hotkey:** Pro rychlou selekci typu vzorku, vložte první písmeno jeho názvu. Například pro nastavení 5 vzorků tak, aby nebyly šablonové kontrolní vzorky, zvolte je v kolonce typ vzorku a potom zmáčkněte N pro NTC. Všechny vzorky budou konvertovány do NTC.
- Save it, reuse it**
Uložit, znovu použít: Kompletní popis vzorku může být uložen jako soubor vzorku (***.smp**) a načten do budoucích běhů se stejnou konfigurací.

Styl rotoru (Rotor Style)

Toto tlačítko v okně „Edit Sample“ poskytuje alternativní možnost vkládání názvů vzorků. Zvolte replikáty kliknutím a tažením kurzoru myši přes obrázek rotoru. Seznam na pravé straně okna se zaktualizuje. Název vzorku může být vložen a tak bude zvoleno jméno pro současnou volbu. Software rozpoznává tyto jamky jako replikáty.

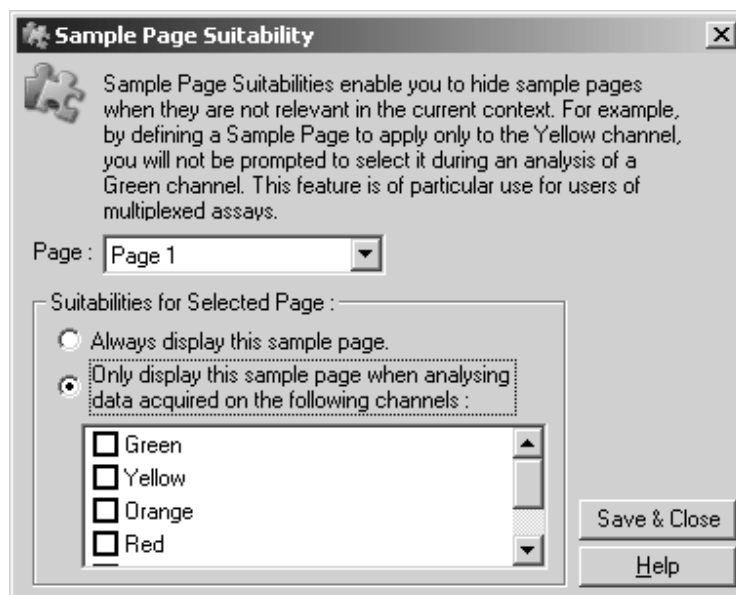


Tlačítko „Rotor Style“ poskytuje omezenou verzi tlačítka „Standard“ a je určen pro uživatele, kteří chtějí nastavit jména vzorků a barvy rychle. Některá nastavení zde nelze definovat, jako například jestli vzorek představuje standard nebo známou koncentraci každého standardu. Pokud tyto skutečnosti musí být definovány, toto standardní tlačítko nemůže být použito.

Vhodnost stránky vzorku (Sample Page Suitability)

Pro přístup do tohoto okna klikněte na „More Options“ v okně „Edit Sample“ a potom na „Define Suitabilities“, Definujte vhodnost stránky vzorku“, což umožňuje uživateli přiřadit stránky vzorků ke kanálům. Například stránka vzorku pro zkoumaný gen se může vztahovat k zelenému kanálu, zatímco stránka pro housekeeper gen je aplikována ke žlutému kanálu. V tomto příkladu redukuje nastavení vhodnosti stránky počet možností analýz na ty, které jsou relevantní pro ten který test.

Okno „Sample Page Suitability“ je zobrazeno níže.

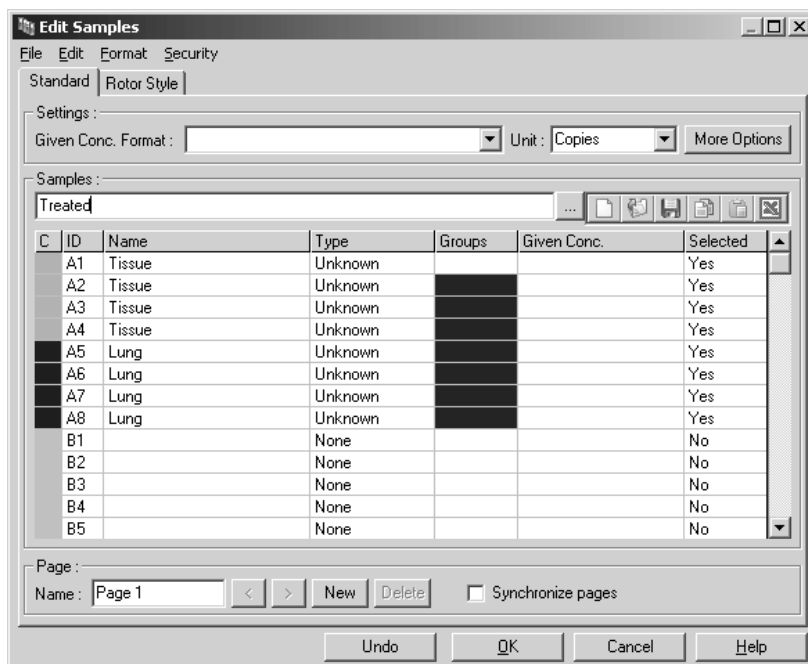


Poznámka: Když nastavujete test, vytvořte všechny vzorkové stránky a vhodnosti stránky vzorku a potom je uložte jako šablonu. Tento krok snižuje náročnost nastavení vyžadovanou pro každý běh.

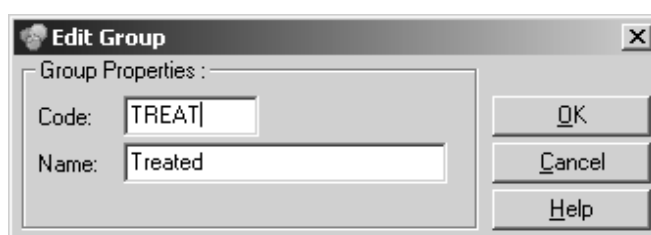
Skupiny (Groups)

Skupiny vzorků umožňují statistické výpočty pro libovolný výběr vzorků. Na rozdíl od replikátů, které musí mít identické názvy, vzorky mohou mít jakékoliv jméno, mohou být umístěny kdekoli v rotoru a mohou patřit k více skupinám.

1. Skupinu definujeme tak, že vložíme plný název skupiny vedle vzorku a zmáčkeme ENTER.



2. Objeví se okno „Edit Group“.

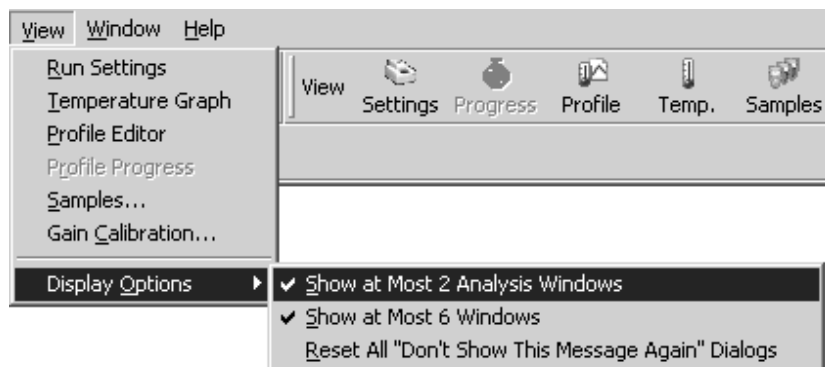


3. Definujte vhodnou zkratku a klikněte „OK“. Tato zkratka může nyní být použita k nastavení skupin. Celkové výsledky, jako například průměrná hodnota a intervaly spolehlivosti 95%, jsou automaticky vypočítány pro skupiny v kterékoliv analýze.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Std	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.82				18.75	0.17	[18.48 , 19.02]	
A2	Tissue	Unknown	18.75							
A3	Tissue	Unknown	18.92							
A4	Tissue	Unknown	18.52							
A5	Lung	Unknown	18.73				18.70	0.09	[18.55 , 18.85]	
A6	Lung	Unknown	18.62							
A7	Lung	Unknown	18.81							
A8	Lung	Unknown	18.63							
A1-A8	Treated	Group					18.72	0.13	[18.62 , 18.83]	

7.8.5 Možnosti displeje (Display options)

Možnosti menu displeje je zobrazeno níže.



Show at Most 2
Analysis Windows:

Když je zatržena tato volba, otevřou se najednou maximálně 2 okna najednou. Pokud je otevřeno více oken, přehlednost může být negativně ovlivněna. Volba této možnosti zavře poslední otevřené okno, když se další okno otevře. Pokud tato volba není zatržena, je možné otevřít více než 2 okna analýzy.

Show at Most 6
Windows:

Pro zlepšení přehlednosti odstraňuje software nepoužívaná okna, když se otevřou nová. Tato volba je výchozí možností Rotoru-Gene Q. Pokud je nutné sledovat více než 6 oken současně, nechte tuto volbu nezatrženou.

Reset All "Don't Show
This Message Again"
Dialogs:

Při volbě této možnosti software znovu zobrazí všechna dialogová okna, u kterých bylo zatrženo políčko „Do not display this message again, Neukazovat znovu tuto zprávu“. Toto zahrnuje zprávy o podezřelých nastaveních, které byly dříve vyřazeny ze zobrazování. Tato možnost může mít význam pro nového uživatele, který není podrobně obeznámen z Rotorem-Gene Q nebo jeho softwarem.

7.9 Menu zabezpečení (Security Menu)

Software Rotoru-Gene Q obsahuje prvky, které zaručují bezpečnou funkci. Když je správně konfigurován, software zajišťuje následující:

- Přístup k Rotoru-Gene Q a analytickému softwaru je omezen pouze pro skupiny uživatelů.
- Modifikace souborů běhů jsou zaznamenávány.
- Neautorizované modifikace jsou detekovány (signatury).
- Šablony používané k provedení běhů jsou zaznamenávány.
- Jména vzorků jsou chráněna.

Integrace se zabezpečením Windows

Za účelem zabezpečení vysoké úrovně odpovědnosti, software Rotoru-Gene Q neřídí zabezpečení interně. Účty, skupiny a hesla jsou všechna řízena použitím vnitřně zabudovaného bezpečnostního modelu Windows (Windows NT Security). Integrace dovoluje řídit přístup k softwaru Rotoru-Gene Q stejnými hesly jako přístup k souborům sítě a programům, což snižuje administraci. U větších organizací mohou například administrátoři sítí lehce odstranit přístup bývalým uživatelům díky tomuto centralizovanému bezpečnostnímu modelu.

Z tohoto důvodu spočívá nastavení zabezpečení softwaru Rotoru-Gene Q primárně ve správné konfiguraci bezpečnostních funkcí Windows.

Požadavky

Pro využití bezpečnostních prvků je nutné používat Windows NT4 Service Pack 6, Windows 2000 nebo XP Professional. Bezpečnostní prvky nemohou být použity s Windows XP Home, protože tento operační systém nemá patřičně sofistikovaný model používaný softwarem Rotoru-Gene Q. Software musí být nainstalován s použitím volby „Force Authentication through Windows NT Logon, Zajištění autenticity přes Windows NT Logon“.

Poznámka: Bezpečnostní menu se nezobrazí, pokud jste přihlášení do domény Linux Samba. Musíte mít buď lokální logon nebo server Windows, pokud chcete používat bezpečnostní funkce.

7.9.1 Konfigurace (Configuration)

Tato kapitola popisuje, jak systém nastavit, aby software Rotoru-Gene Q pracoval bezpečně. Software musí být nainstalován s použitím volby „Force Authentication through Windows NT Logon, Zajištění autenticity přes Windows NT Logon“. Tímto krokem je doména Windows nakonfigurována pro vaši úroveň přístupu a pověření. Tento krok je také nutný pro zajištění odpovědnosti a bezpečnosti.

Funkce administrátora

Mnoho uživatelů používá svoje počítače ve funkci administrátora bez žádných hesel. Toto je sice pohodlné, ale je potom zcela nemožné určit, kdo počítač používá. Toto eliminuje zodpovědnost a zabraňuje bezpečnostnímu softwaru Rotoru-Gene Q v aktivaci zabezpečení. Při použití softwaru ve funkci administrátora jsou všechny prvky softwaru k dispozici. Takže uživatelé ve funkci administrátora, kteří nepotřebují bezpečnostní prvky, mohou používat všechny funkce softwaru.

Vytvoření účtu pro nového uživatele

Pro každého nového uživatele softwaru vytvořte nový účet. Pro každého uživatele opakujte všechny níže uvedené kroky, dokud nebyly vytvořeny všechny účty.

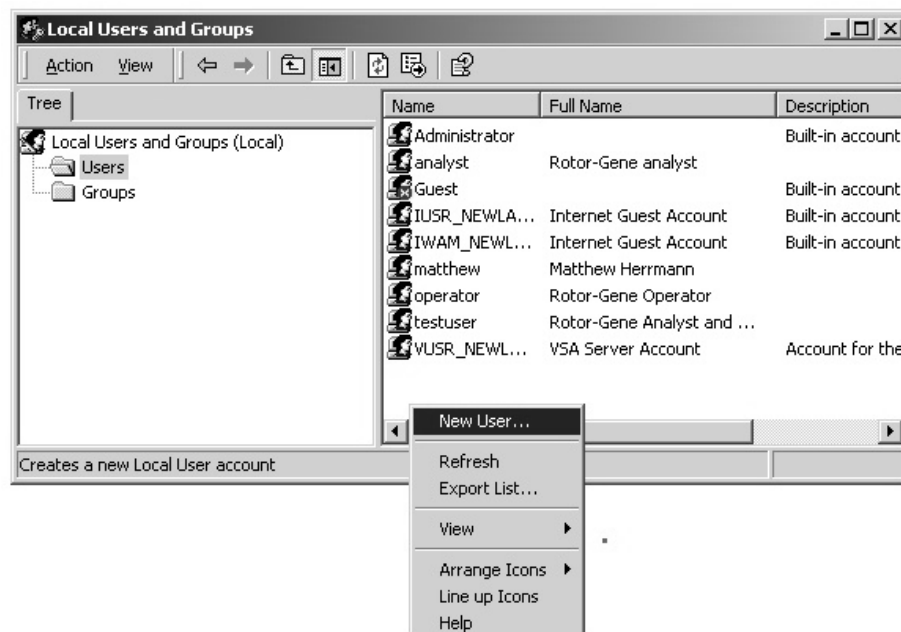
1. Zvolte „Start/ Nastavení/ Ovládací panely“.
2. Dvakrát klikněte na „Uživatelé a hesla“.



3. Klikněte na tab „Pokročilé“, potom na tlačítko „Pokročilé“.



4. V okně, které se objeví, zvolte složku „Uživatelé“. Klikněte pravou myší na okno vpravo a zvolte „Nový uživatel“.



5. Zadejte jméno uživatele a heslo. Jako výchozí možnost bude uživatelský účet vytvořen s běžnými uživatelskými právy. To znamená, že uživatelé mohou používat software, ale nemohou instalovat nové programy nebo měnit nastavení systému.



The screenshot shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: ****
- Confirm password: ****
- ☒ User must change password at next login
- ☐ User cannot change password
- ☐ Password never expires
- ☐ Account is disabled
- Buttons: Create, Close

6. Klikněte „Vytvořit“. Nyní se můžete přihlásit jako tento uživatel.

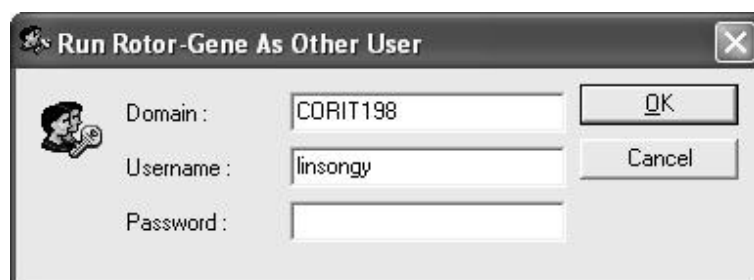
Určení rolí pro každého uživatele

Nyní určete role pro každého uživatele. Přístup je rozdělen do následujících oblastí:

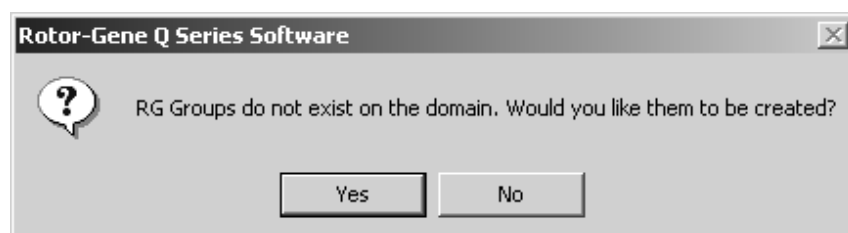
- Rotor-Gene Q operátor – může provádět běhy, ale nemůže generovat zprávy (Reporty) nebo provádět analýzy.
- Rotor-Gene Q analytik – může analyzovat data z běhů a tvořit zprávy, ale nemůže provádět nové běhy.
- Rotor-Gene Q operátor a analytik – je způsobilý provádět obojí.
- Administrátor – může odemknout názvy vzorků a provádět všechny operace analytika a operátora.
- Žádné – přístup k softwaru je odepřen.

Určení rolí:

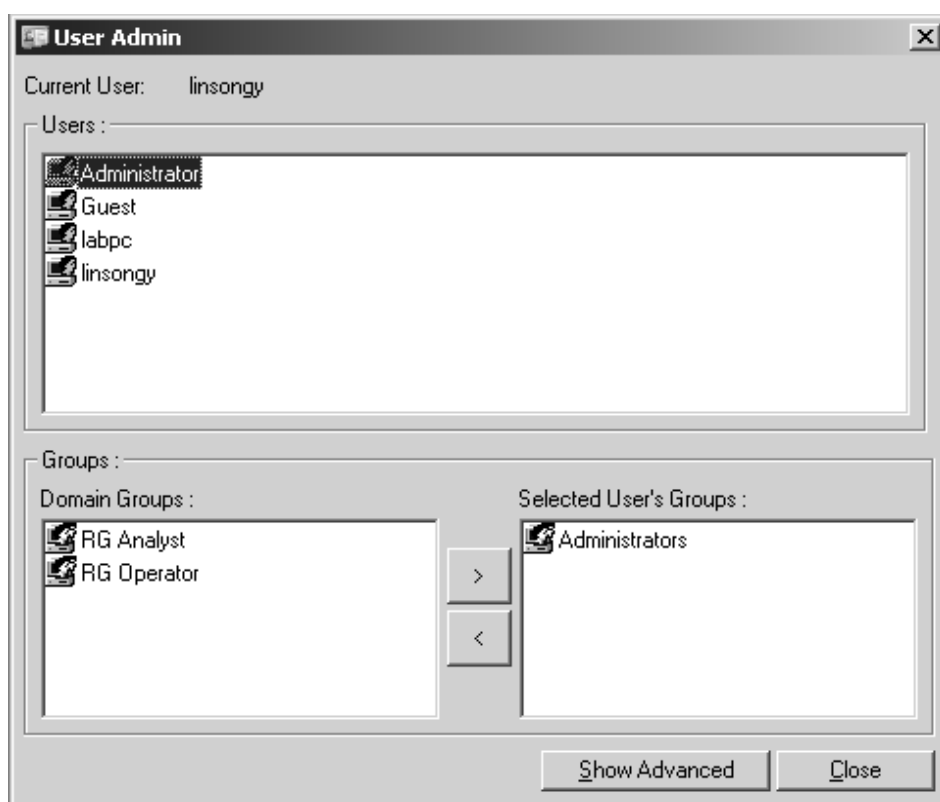
1. Přihlaste se do Windows jako administrátor nebo použijte ikonu „Rotor-Gene Q Software Login“.



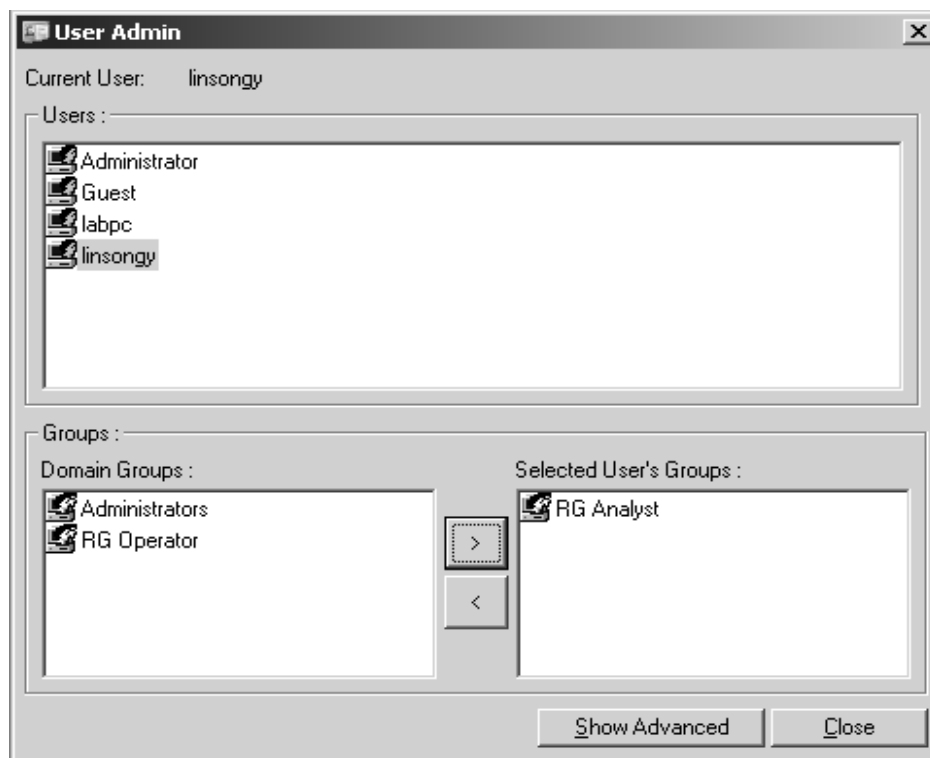
2. Když se software otevře, klikněte na menu „Zabezpečení“. Když poprvé vstoupíte do menu „Zabezpečení“, software Rotoru-Gene Q konfiguruje počet systémových skupin, které budou řídit přístup k softwaru.



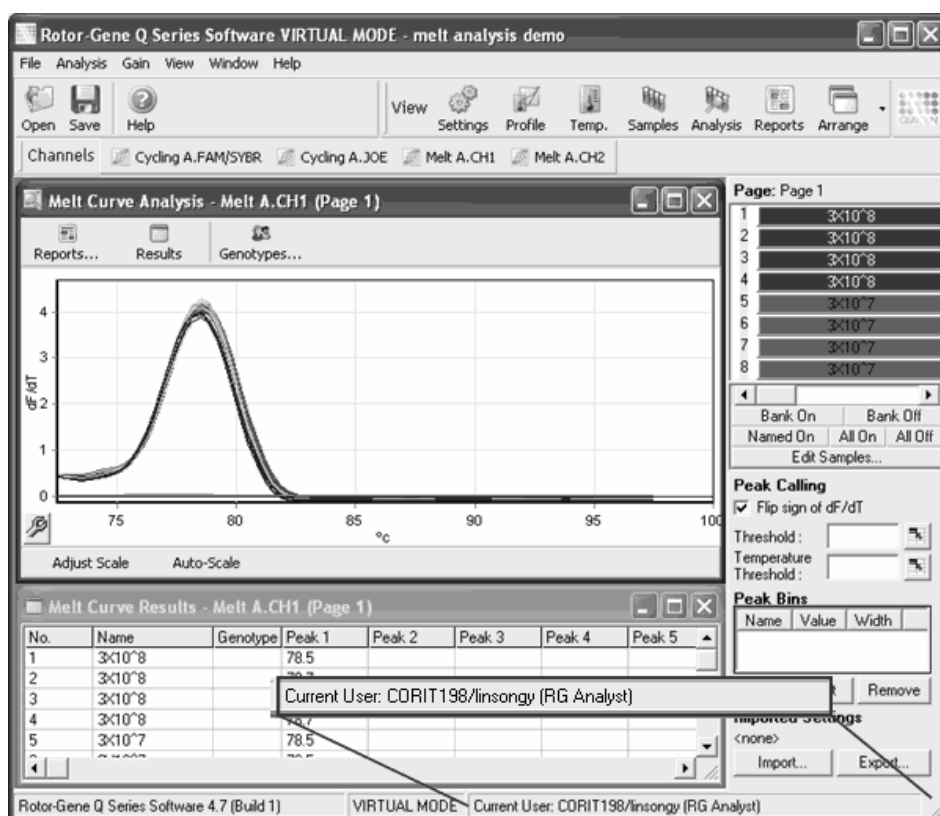
3. Klikněte „Yes, Ano“. Objeví se okno „User Admin“. V horní části panelu jsou zobrazeni všichni uživatelé počítače. Některé účty jsou používány systémem. Spodní tabulka zobrazuje skupiny přiřazené uživatelům.



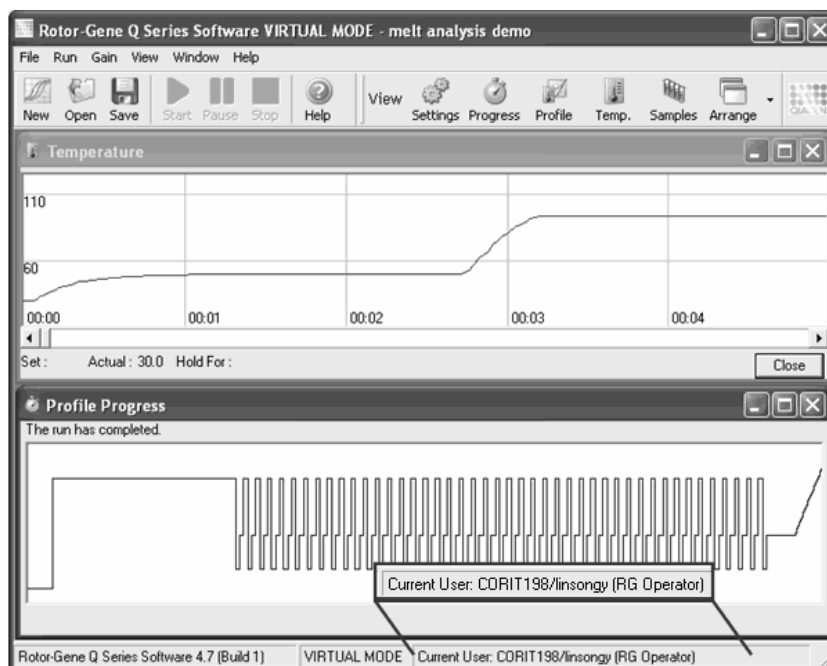
4. Skupina je přiřazena k uživateli tak, že zvolíme uživatelské jméno ze seznamu. Spodní panel se aktualizuje. Pokud uživatel není ve skupině, nemůže spustit software. V příkladu, který je uveden níže, přiřadíme uživatele "linsongy" do skupiny RG Analyst zvolením této skupiny na levé straně a následným kliknutím tlačítka ">". Skupiny mohou být odstraněny volbou a kliknutím tlačítka "<".



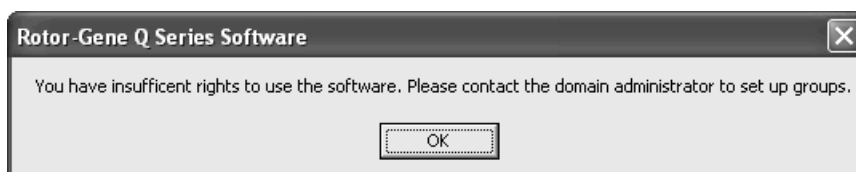
5. Nyní se přihlaste jako uživatel. Pro RG Analytika (RG Analyst) jsou menu „Run, Běh“ a tlačítko „Profil“ nepřístupná. Ale existující soubory mohou být otevřeny a analyzovány, jak znázorňuje screenshot uvedený níže. Statutární lišta indikuje, že uživatel „CORIT198/linsongy“ je RG Analytik.



6. Když se přihlásíme znovu jako administrátor, práva RG operátora mohou být přiřazena k „CORIT198/linsongy“ a software může být znovu spuštěn. Tentokrát menu Analýza a tlačítko „Reports, Zprávy“ chybí a menu Run(Běh) je k dispozici.
7. Stavový řádek indikuje, že uživatel „CORIT198/linsongy“ patří do skupiny RG Operátor.



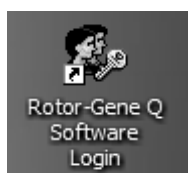
8. Když se přihlásíte jako administrátor a odstraníte všechny skupiny od uživatele „CORIT198/linsongy“, objeví se následující zpráva, když „CORIT198/linsongy“ otevře software.



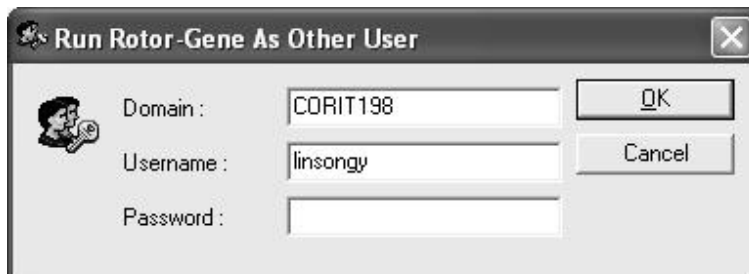
7.9.2 Používání stejného počítače více uživateli

Aby bylo možné používat software Rotoru-Gene Q více uživateli, vytvořte uživatelský účet, který nemá přístup k softwaru Rotor-Gene Q. Přihlaste se do Windows pomocí tohoto účtu, takže uživatelé nemohou anonymně vstoupit do Rotoru-Gene Q.

1. Pomocí ikony „Rotor-Gene Q Software Login“ mohou uživatelé otevřít svůj účet v softwaru Rotor-Gene Q.



2. Zadejte uživatelské jméno a heslo do patřičných políček.



3. Doména je buď počítač do kterého jste přihlášení nebo jméno vaší lokální sítě. Pokud si nejste jisti, kterou doménu zadat do tohoto políčka, zeptejte se administrátora vaší sítě.

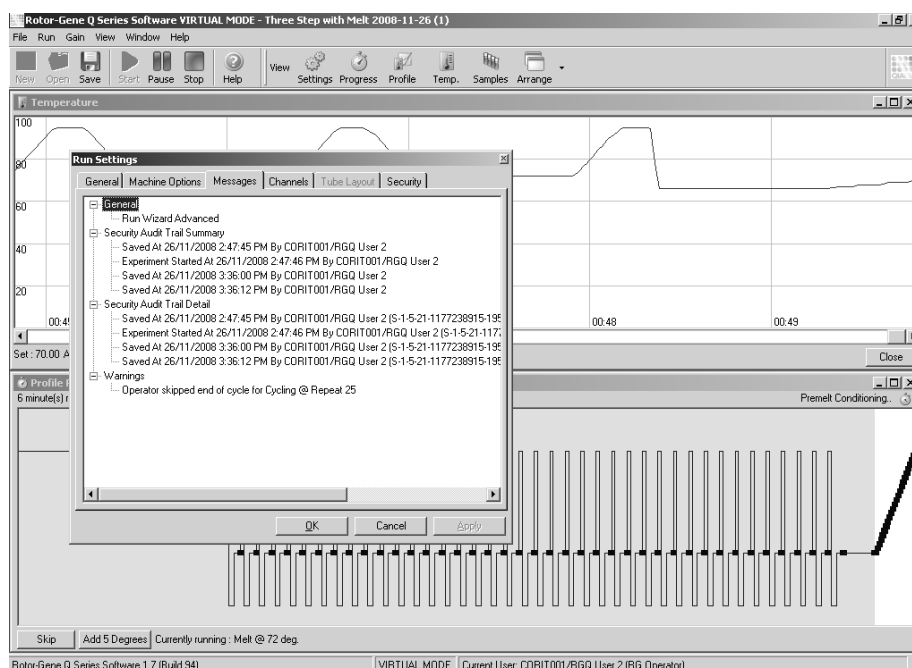
Poznámka: Po přihlášení budou uživatelé k dispozici všechny uživatelské soubory. Každý uživatel může ukládat soubory ve své vlastní oblasti. Toto zajišťuje vysoký stupeň bezpečnosti.

Poznámka: Každý uživatel by se měl odhlásit po dokončení svého běhu, aby zabránil ostatním uživatelům provádění běhů pod jejich jménem.

7.9.3

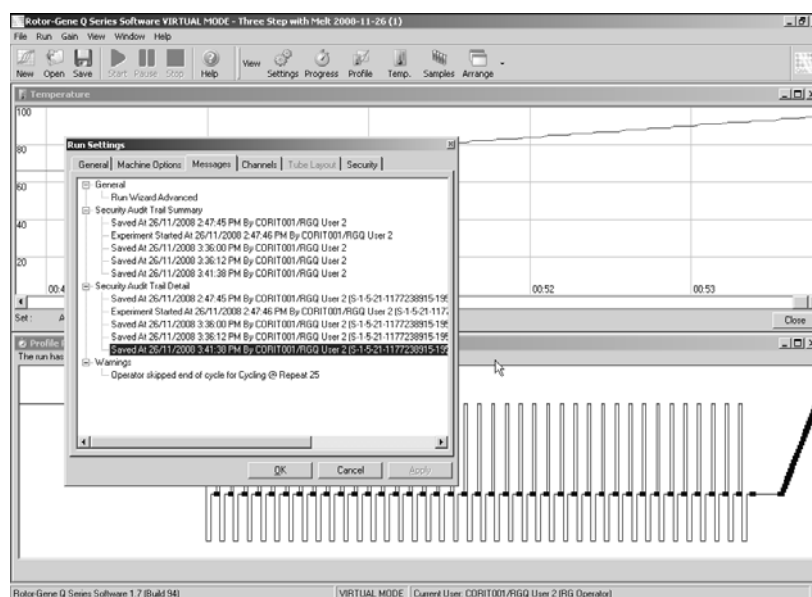
Auditorské záznamy

Pokaždé, když je soubor uložen uživatelem, detaily jsou zaznamenány v „Run Settings, Nastavení běhu“ pod tabem „Messages, Vzkazy“ jako „Shrnutí bezpečnostních záznamů pro účely auditu“ a „Detaily bezpečnostního auditu“. Security Audit Trail Summary and Security Audit Trail Detail



Tento prvek slouží k monitorování osoby, která modifikovala obsah souboru. „Security Audit Trail Detail, Detailní záznam bezpečnostního auditu“ obsahuje více podrobností, jako například specifickou identifikaci uživatele. Tato identifikace je důležitá, aby bylo uživateli zabráněno vytvořit stejné jméno na jiném počítači a tak předstírat jiného uživatele. V těchto případech bude uživatelské jméno stejné, ale identifikace účtu se bude lišit.

Specifická identifikace pro účet CORIT001/RGQ User 2, S-1-5-21-1177238915-195, je zde detailně zobrazena v následující ilustraci.

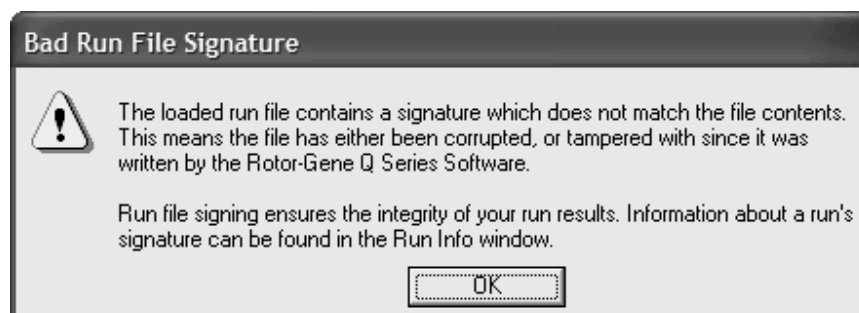


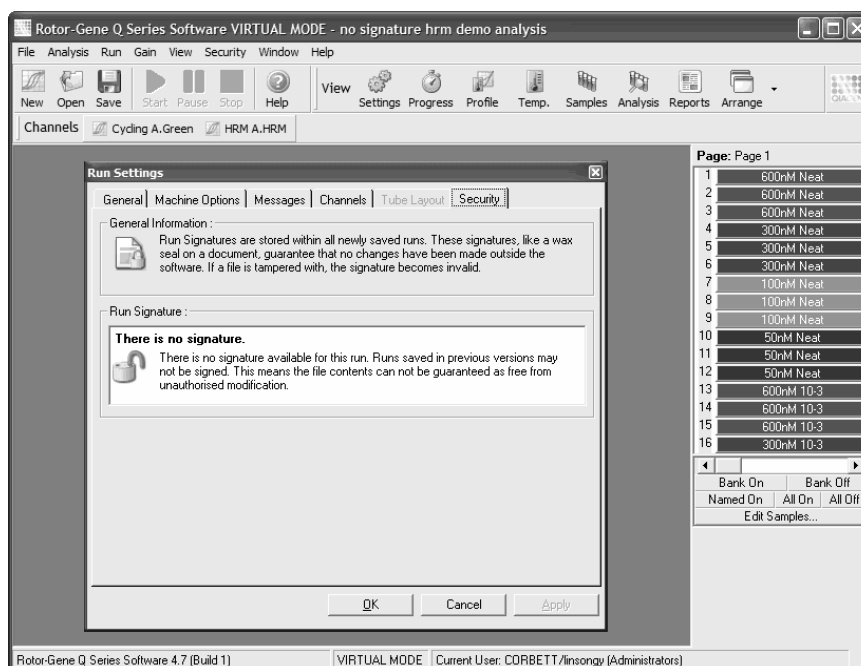
7.9.4 Signatury běhu (Run Signatures)

Auditorský (revizní) záznam je uložen v souboru běhů Rotor-Gene Q. Aby bylo zabráněno nežádoucím modifikacím těchto souborů, měly by být uloženy na bezpečném místě, do kterého mají přístup pouze majitelé pověřených účtů ve Windows. Ale když jsou tyto soubory uloženy v oblasti se společným přístupem, signatura běhů poskytuje zvýšené zabezpečení. Následující screenshot zobrazuje tab „Security, Zabezpečení“ v „Nastavení běhu“ pro soubor se signaturou běhu



Signatura běhu je dlouhé heslo, které je vytvořeno pokaždé, když je soubor uložen a je spojeno s obsahem tohoto souboru. Například signatura pro tento soubor je 517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081. Když je tento soubor otevřen v Notepadu a je provedena úprava (například, když je datum změněno o 3 dny zpět), při následujícím otevření se objeví tato zpráva:





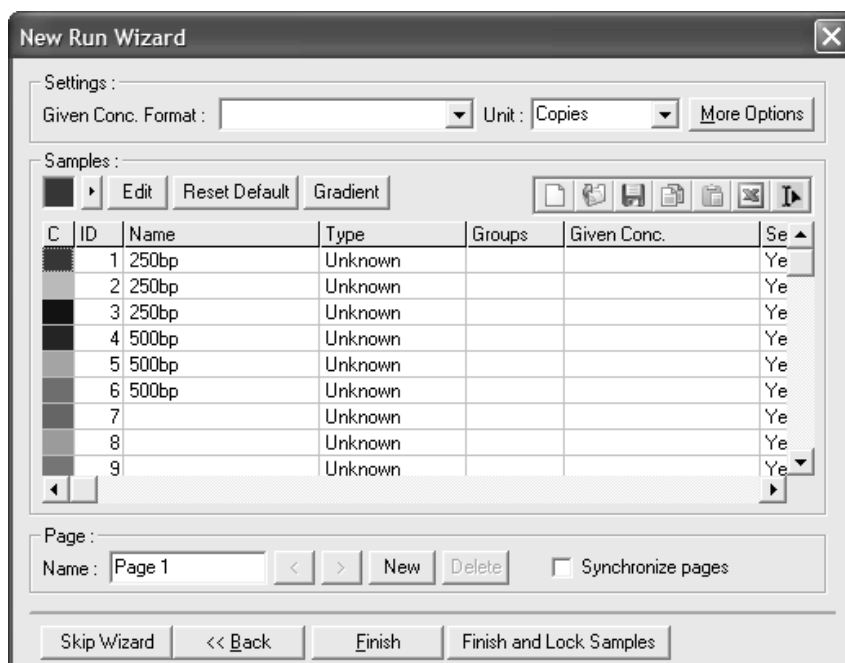
Poznámka: Když jsou soubory zasílány emailem, kódovací proces může signaturu znehodnotit. Abyste tomu zabránili, zazipujte soubor před emailováním.

7.9.5 Uzamčení vzorků (Sample Locking)

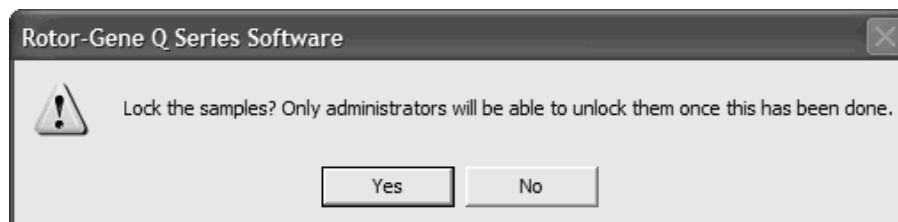
Je velmi důležité zajistit, aby nebylo možné názvy vzorků náhodně nebo úmyslně změnit, jakmile uživatel zahájil běh. Z tohoto důvodu poskytuje software Rotoru-Gene Q prvek uzamykání vzorků. Názvy vzorků mohou být uzamčeny kterýmkoliv uživatelem, ale mohou být odemčeny pouze administrátorem. Pro uživatele, kteří používají své počítače v režimu administrátora, má tato možnost omezenou platnost. Pro plné využití této možnosti musí být počítač bezpečně konfigurován tak, jak je to popsáno v předešlých kapitolách.

Poznámka: Pokud si přejete zamykat vzorky, neprovozujte software jako administrátor. Vytvořte účet u skupin RG Operátor a RG Analyst a uchovejte hesla administrátora v tajnosti. Uživatelé potom budou potřebovat pověření administrátora k odemčení souborů.

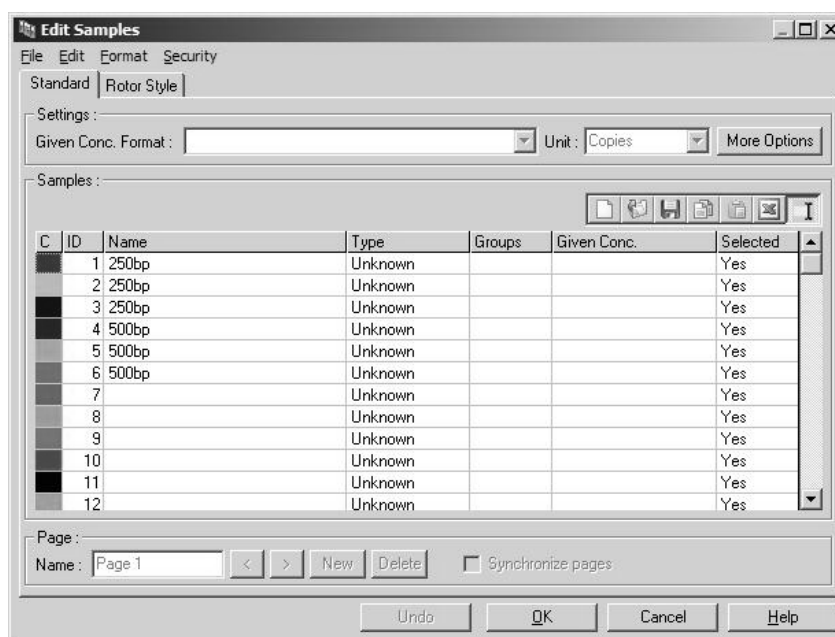
Vzorky mohou být odemčeny před zahájením běhu, když používáte Advanced wizard kliknutím na „Finish and Lock Samples“.



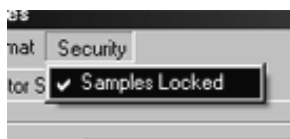
Objeví se následující varování. Potvrďte kliknutím na „Yes, Ano“.



Jakmile jsou vzorky uzamčeny, nebude možné vzorky editovat v okně „Editace vzorků“.



Vzorky také mohou být zamčeny a odemčeny v okně „Editace vzorků“. Avšak pouze administrátor může vzorky odemknout poté, co byly uzamčeny.



Jakákoli neautorizovaná změna v souboru znehodnotí signaturu běhu.

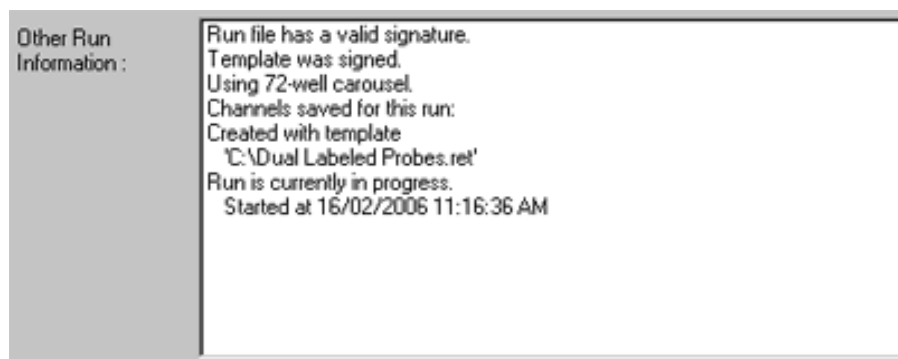
7.9.6 Uzamčené šablony

Složka „Uzamčené šablony“ v programu Advanced wizard obsahuje šablony pro sady a testy QIAGEN, které nemohou být modifikovány uživatelem. Pokud chcete používat tyto šablony, software Rotor-Gene Q musí být nainstalován za použití volby „Force Authentication through Windows NT logon“ (Zadejte nucenou autentizaci přes logon Windows NT).

Podrobný popis funkcí těchto šablon a požadavků různých testů najdete v příslušných manuálech.

V současné době software Rotoru-Gene Q neumožňuje uživateli vytvořit read-only (nepřepisovatelné) soubory. Avšak pokud si to uživatel přeje, je možné specifikovat požadavek, aby všechny běhy byly provedeny s použitím specifického souboru šablon. Abychom zajistili přístup read-only k této šabloně, musí být uložena v síti na disku, na kterém uživatelé nemohou modifikovat data. Uživatelé pořád mohou provozovat a modifikovat své vlastní profily, zatímco šablona na takovém síťovém disku je chráněna. Abychom mohli zjistit, která šablona byla použita, ukládá software Rotoru-Gene Q jméno souboru šablony, která byla použita. Tato informace je

přístupná kliknutím na tlačítko „Nastavení“, kde je možné zobrazit okno „Run Settings“. Informace o šablonách je uložena v „Other Run Information“, Ostatní informace o běhu“.

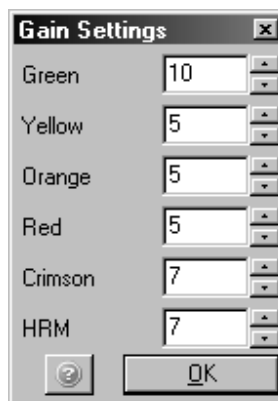


7.10

Menu Gain

Pro náhled „Gain Settings, Nastavení gainu“ pro současný běh klikněte na menu „Gain“. Zde nastavíme gain specifického kanálu před během. Nastavení gainu jsou zachována z posledního běhu. Toto nastavení může být modifikováno, pokud běh ještě nezačal nebo pokud se nachází v počátečních cyklech. Použijte šipky nahoru/ dolů vedle každého textového pole pro modifikaci údajů. Potom klikněte „OK“.

Gain může být změněn během úvodních cyklů. V příslušném kanálu se objeví červená čára označující, kde byl gain změněn. Cykly, které proběhly před změnou gainu, budou z analýzy vyřazeny.



7.11

Menu Okno (Window)

Toto menu umožňuje uspořádat okna vertikálně nebo horizontálně, případně kaskádově. Další možnosti jsou přístupné kliknutím na šipky na pravé straně tlačítka „Arrange“ (uspořádat).

7.12 Menu Pomoc (Help)

V tomto menu je pomoc pod tlačítkem „Contents, Obsah“. Tlačítko „What's New?... Co je nového?“ poskytuje stručný přehled nových prvků, které byly přidány od poslední instalace softwaru. Tlačítko „Website, Webová stránka“ otevře webovou stránku QIAGEN v novém okně. Sekce „About This Software, O tomto softwaru“ poskytuje informaci o připojeném přístroji, sériovém čísle Rotoru-Gene Q a verzi softwaru.

7.12.1 Poslání emailu pro podporu (Support)

Volba „Send Support Email“ v menu „Pomoc“ umožňuje zaslání emailu QIAGENU, včetně všech informací o daném běhu. Volba „Save as, Uložit jako“ uloží všechny informace do souboru, který můžete zkopírovat na disk nebo do sítě, pokud nemáte přístup k emailu na počítači, na kterém běží software Rotor-Gene Q.

8 Další funkce

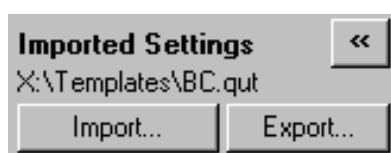
8.1 Šablony pro analýzy (Analysis templates)

Některé analýzy vyžadují, aby uživatel definoval prahy, nastavení normalizace nebo nastavení genotypu. Často se tato nastavení používají znovu v mnoha experimentech.

Šablony pro analýzy umožňují uživateli ukládat a znovu používat tato nastavení. Toto snižuje pracnost opakovaného nastavování a redukuje riziko chyb.

Kvantifikace, tání, alelická diskriminace, analýza bodového grafu a analýza endpoint podporují analyzační šablony. Tyto analýzy umožňují uživateli exportovat šablonu, která je jedinečná pro danou analýzu (například Kvantifikační analýza umožňuje export a import souborů *.qut, které obsahují kvantifikační nastavení).

Po importu či exportu analyzační šablony zůstává jméno této šablony zobrazeno pro budoucí použití.

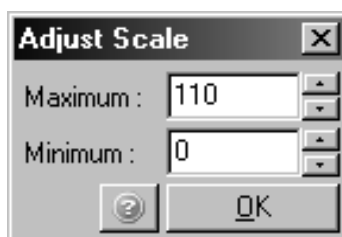


8.2 Otevření druhého běhu

Zatímco probíhá jeden běh, je možné otevřít a analyzovat běhy, které byly provedeny dříve. Různé funkce, například tlačítka „New, Nový“ nebo „Start Run, Začít běh“, nejsou v druhém okně aktivní. Nový běh může být zahájen z prvního okna poté, co první běh skončil.

8.3 Možnosti stupnic (Scaling Options)

Klikněte na „Adjust Scale..., Úprava stupnice“ na spodní straně hlavního okna nebo klikněte pravým tlačítkem na graf a zvolte „Adjust Scale..., Úprava stupnice“ na menu, které se objeví. V tomto okně může být stupnice manuálně vložena.



Pro vstup do „Automatické stupnice“ klikněte na spodní straně hlavního okna nebo klikněte pravou myší na graf a zvolte „Auto-Scale...“ na rozbalovacím menu. Funkce „Automatická stupnice“ má za úkol upravit stupnici podle maximálních a minimálních údajů v datech.

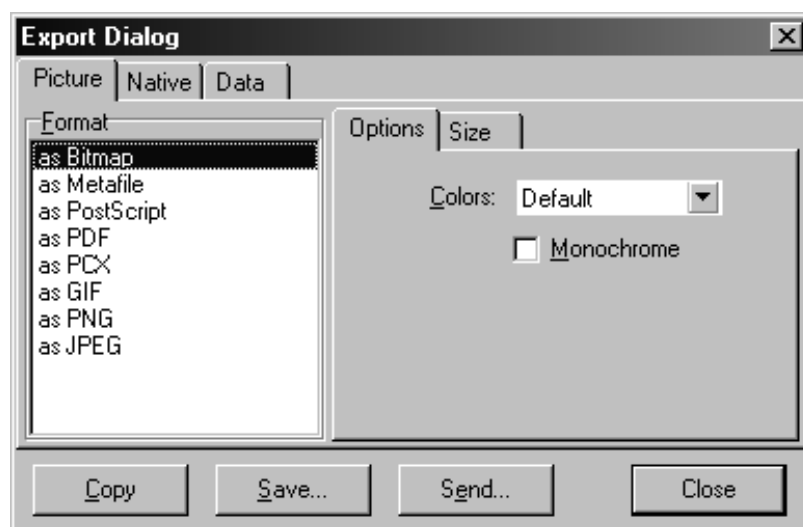
Pro vstup do „Výchozí stupnice“ klikněte na spodní straně hlavního okna nebo klikněte pravou myší na graf a zvolte „Default Scale“ na rozbalovacím menu. Funkce „Default Scale“ resetuje stupnici na rozsah od 0 do 100 fluorescenčních jednotek.

8.4 Exportování grafů

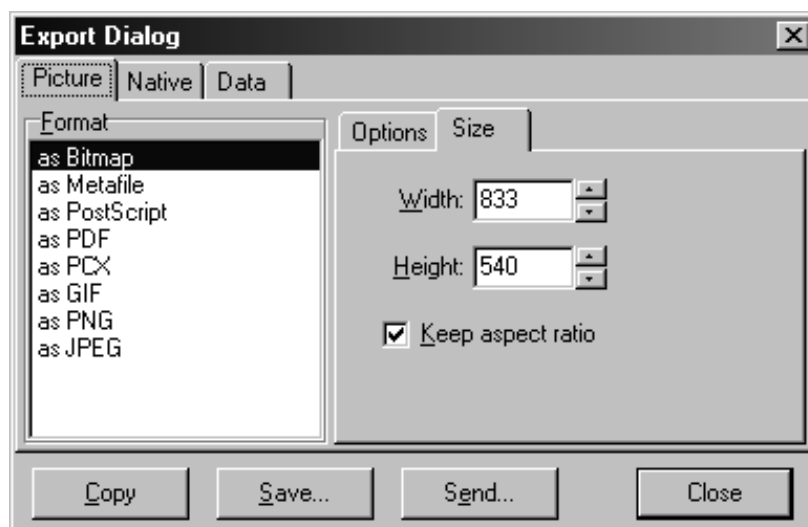
Export obrázků

Následující kroky popisují, jak uložit obrázek.

1. Klikněte pravou myší na obrázek a zvolte „Export z rozbalovacího menu.“
2. Objeví se okno „Export Dialog“. Zvolte požadovaný formát ze seznamu „Formáty“.



3. Zvolte tab „Size“ a specifikujte požadované rozměry.



4. Zatrhněte políčko „Keep aspect ratio, Zachovat poměr stran“ pro zachování správných rozměrů obrázků po úpravě jeho rozměrů.
5. Klikněte „ Save, Uložit“ a zvolte jméno a umístění pro soubor v dialogovém rámečku, který se objevil.

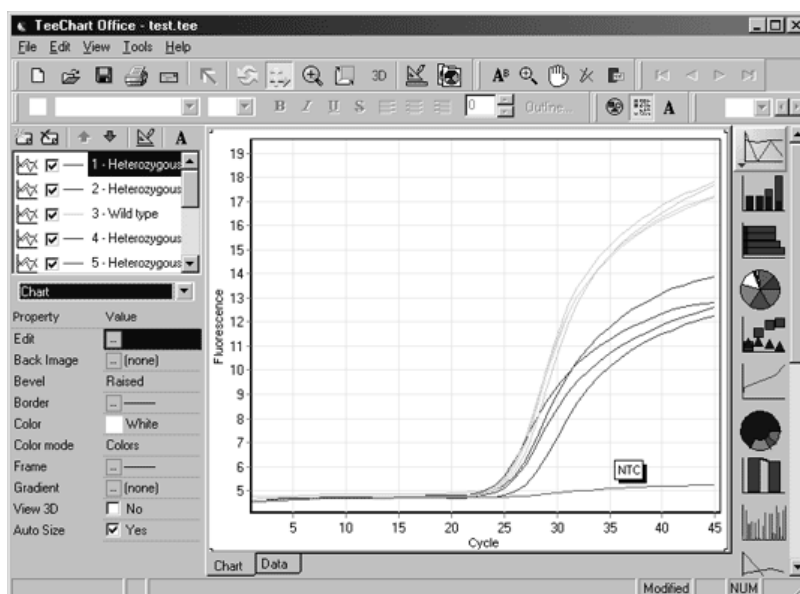
Pokud je vyžadováno vyšší rozlišení obrázku, doporučujeme buď zvyšovat rozměr obrázku dokud nevyhovuje vašim požadavkům nebo uložit graf jako Metafile (*.emf,, *.wmf). Toto je vektorový formát, který může být otevřen v softwarových programech, jako je například Adobe Illustrator, které umožňují uživateli vytvořit obrázky jakéhokoliv rozlišení.

Export nativního formátu

Grafy v softwaru Rotor-Gene Q užívají komponenty TeeChart třetí strany, vyvinuté společností Steema software. Pro uložení obrázku v nativním formátu zvolte tab „Nativní“ v okně „Export Dialog“ (viz předešlý screenshot) a klikněte „Save, Uložit“. Nativní formát je standardní formát pro soubory TeeChart. Toto umožňuje uživateli použít software TeeChart Office, který je k dispozici jako freeware a je instalován jako součást softwaru Rotor-Gene Q. Přístup k tomuto softwaru je možný kliknutím na příslušnou ikonu na ploše.

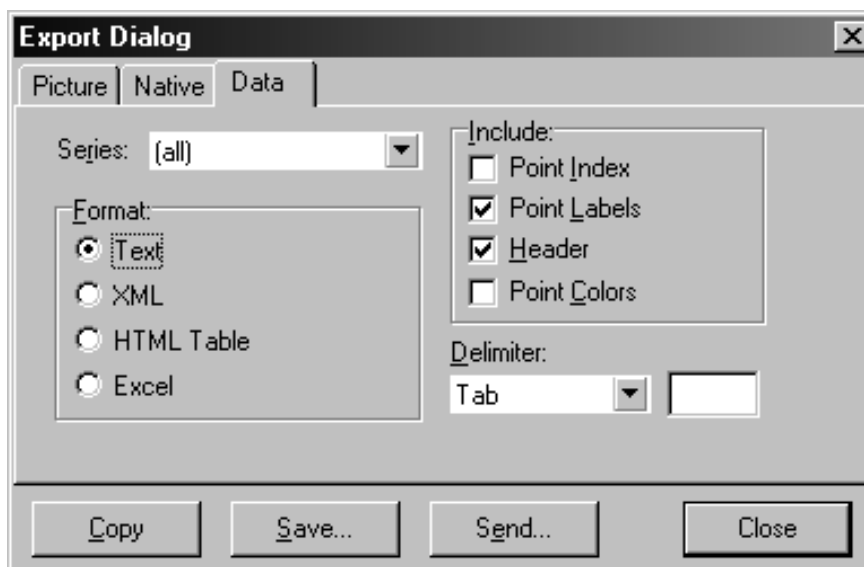


TeeChart Office umožňuje manipulovat exportované grafy včetně změny barev křivek, přidání anotací, změny fontů a úpravy datových bodů.




Export dat

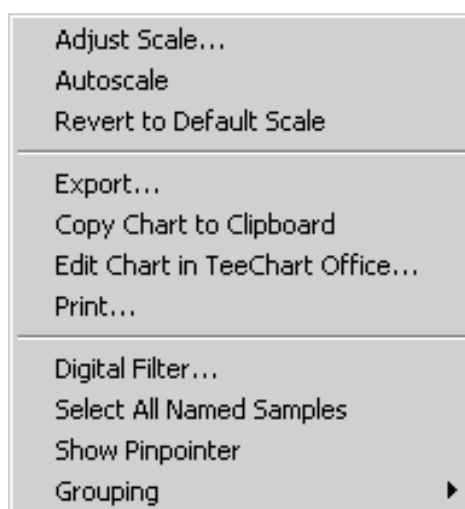
Pro export dat v různých formátech zvolte tab „Data“ v okně „Export Dialog“.
Exportovaný soubor obsahuje surová data použitá v grafu.



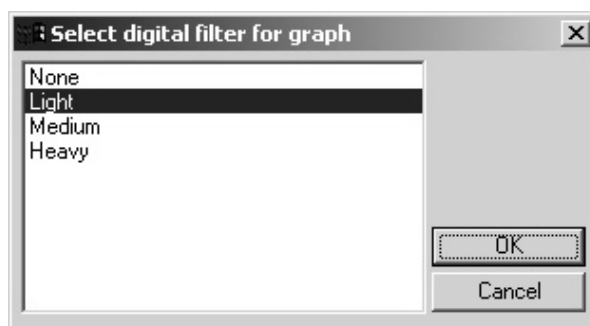
Export surových dat a jejich analýza můžou také být provedeny zvolením „Save as...“, „Uložit jako“ v menu „File, Soubor“ (viz kapitola 7.5).

8.5 Ikona Klíč

Tuto ikonu  najdete na levé spodní straně hlavního okna. Kliknutí na tuto ikonu nabídne několik možností. Tyto možnosti lze také nalézt pravým kliknutím na graf.



Adjust Scale, Autoscale, Revert to Default Scale	Viz kapitola 8.3.
Export...:	Uloží graf v různých formátech (viz kapitola 8.4).
Copy Chart to Clipboard::	Kopíruje obrázek grafu do schránky ve Windows.
Edit Chart in TeeChart Office...:	Otevírá graf přímo v TeeChart Office pro editaci (viz kapitola 8.4).
Print:	Tiskne graf.
Digital Filter...:	Modifikuje zvolený digitální filtr grafu. Tento digitální filtr uhlazuje data za použití posuvného bodového okna.

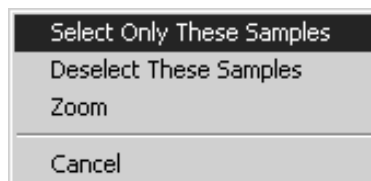


Show Pinpointer: Otevře okno, které zobrazí přesné souřadnice pozice kurzoru myši.

Grouping: Vizuálně seskupuje vzorky, které mají identická jména. Toto je užitečné v bězích s plným rotorem. Volba této možnosti nemá žádný vliv na výpočet hodnot.

8.6 Možnosti volby oblasti

Oblast grafu může být zvolena kliknutím a držením levého tlačítka myši a potažením kurzoru. Objeví se následující možnosti:



Select Only These Samples: Vzorky mimo zvolenou oblast jsou deselektovány.

Deselect These Samples : Všechny vzorky v této oblasti jsou deselektovány.

Zoom: Přiblíží zvolenou oblast grafu.
Klikněte na tlačítko „Default Scale“ pro oddálení.

9 Postupy údržby

Údržba pracovních funkcí Rotoru-Gene Q je snadná. Optická výkonnost je zaručena zabezpečením, že čočky, umístěné na obou stranách emisního a detekčního zdroje, jsou čisté. Čočky jemně otřeme tyčinkou s bavlněným hrotem navlhčenou etanolem*.

Poznámka: Čistěte čočky nejméně jednou měsíčně nebo podle frekvence použití. Také otřete komoru rotoru.

Udržujte pracovní prostor čistý a prostý od prachu a listů papíru. Sací otvor vzduchu Rotoru-Gene Q je umístěn na jeho spodní straně a nasátí volně ležícího materiálu, jako například papíru nebo prachu, může negativně ovlivnit výkon přístroje.



Abyste zabránili ukládání prachu, vždy zavřete kryt Rotoru-Gene Q, když přístroj nepoužíváte.

Když dojde ke kontaminaci komory rotoru, vyčistěte její stěny prachovkou navlhčenou (ale nikoli namočenou) v roztoku 0,1% (objem/objem) desinfekce. * Potom vytřete komoru prachovkou navlhčenou v sterilní vodě prosté DNA (PCR Grade Water) a odstraňte všechny stopy desinfekce.

*Když pracujete s chemikáliemi, vždy na sobě mějte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Více informací o bezpečném zacházení s materiály najdete na bezpečnostních listech, které jsou k dispozici od dodavatelů těchto produktů.

10 Optická verifikace teploty

Optická verifikace teploty (OTV) je metoda, která verifikuje teplotu uvnitř zkumavek v přístroji Rotor-Gene Q MDx. Validace teploty uvnitř zkumavky může být důležitým úkonem v certifikovaných laboratořích. OTV se provádí za použití sady Rotor-Disc OTV (viz příloha C). Následující pojednání obsahuje pouze stručné seznámení s principem OTV. Provedení postupu OTV je vysvětleno na softwaru Rotoru-Gene Q MDx. Podrobnější popis postupů OTV včetně průvodce řešení problémů najdete v *Uživatelské příručce k Rotoru-Discu OTV, OTV princip*.

10.1 Princip OTV

OTV využívá optických vlastností tří termochromatických tekutých krystalů (TLC)* jako absolutních teplotních odkazů. Když jsou tyto krystaly zahřáty, mění se z neprůhledných na průhledné ve velmi přesných teplotních bodech (15°C, 75°C a 90°C). Samotné krystaly TLC nefluoreskují. Z tohoto důvodu je nutné zakrýt excitační zdroje fluorescenční vložkou, aby tranzitní body krystalů TLC mohly být detekovány optickým systémem přístroje Rotoru-Gene Q MDx. Krystaly TLC, které mají teplotu nižší než je teplota tranzitní, jsou neprůhledné a odráží světlo. Jistá část odraženého světla naráží na detektor a zvyšuje fluorescenci. Když teplota uvnitř zkumavky dosáhne tranzitního bodu TLC, krystaly TLC se změní na průhledné (průsvitné) a světlo prochází vzorkem, místo aby se odráželo na detektor, což způsobí pokles ve fluorescenci. Tato změna ve fluorescenci se používá na determinaci přesné tranzitní teploty každého krystalu TLC. Tranzitní teplota je následně porovnávána s teplotním odkazem ze souboru továrních kalibrací OTV, za účelem zjištění, zda Rotor-Gene Q MDx je v mezích teplotních specifikací.

10.2 Komponenty sady Rotoru-Gene MDx

Následující komponenty jsou nutné pro provádění OTV:

- Sada Rotor-Disc OTV obsahuje:
 - Utěsněný Rotor-Disk 72 OTV (obsahuje TLC)
 - Fluorescenční odrazová vkladací destička (přístroj Rotor-Gene 3000 nebo Rotor-Gene Q /6000)
 - CD obsahující tyto soubory: Sériové číslo Rotoru OTV a expirační datum (*.txt), testovací templát (*.ret), výrobní list (*.pdf), soubor tovární kalibrace (*.rex)
 - Výrobní list
- Verze 1,7 softwaru série Rotor-Gene nebo vyšší, obsahující pomocníka OTV Rotor Wizard
- Rotor-Disk 72 pro Rotor-Disk
- Uzamykací kroužek Rotor Disku 72

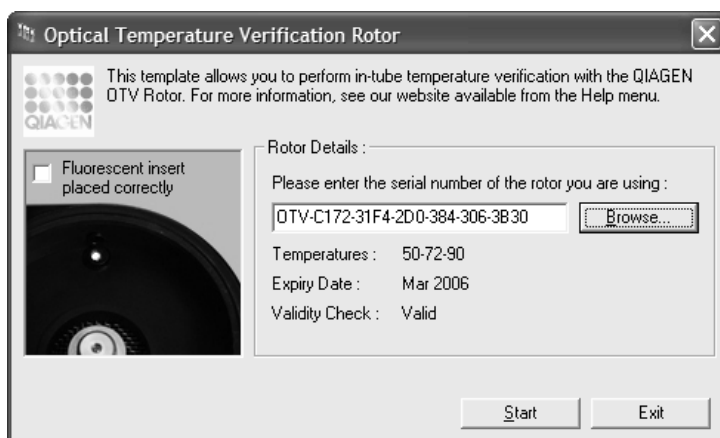
*Když pracujete s chemikáliemi, vždy noste vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Více informací naleznete v bezpečnostních listech, které jsou k dispozici od dodavatelů těchto výrobků.

10.3 Postup OTV

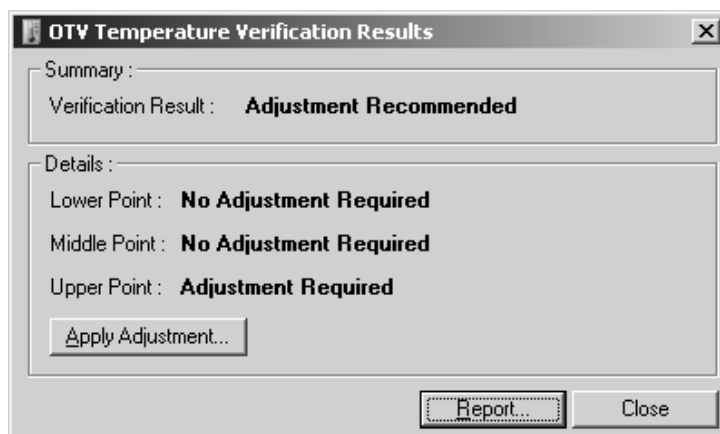
1. Umístěte fluorescentní vložku na emisní čočku na spodní části komory Rotoru-Gene Q MDx.
2. Vložte Rotor-Disk OTV do rotoru Rotor- Disku72. Zajistěte Rotor-Disk 72 uzamykacím kroužkem a vložte do Rotoru-Gene Q MDx a zacvakněte na své místo. Zavřete poklop Rotoru-Gene Q MDx.



3. Vstupte do modulu „Pokročilá pomoc“ (Wizard) volbou tlačítka „Pokročilý“ v okně „Nový běh“. V modulu Wizard klikněte na „Údržba přístroje“ a potom na OTV. Sériové číslo OTV můžete přečíst ze štítku na Rotor-Disku OTV nebo ho můžete importovat z CD kliknutím na „Vyhledávání“ a volbou souboru OTV z tohoto CD. Jakmile zadáte toto číslo, klikněte „Start“.



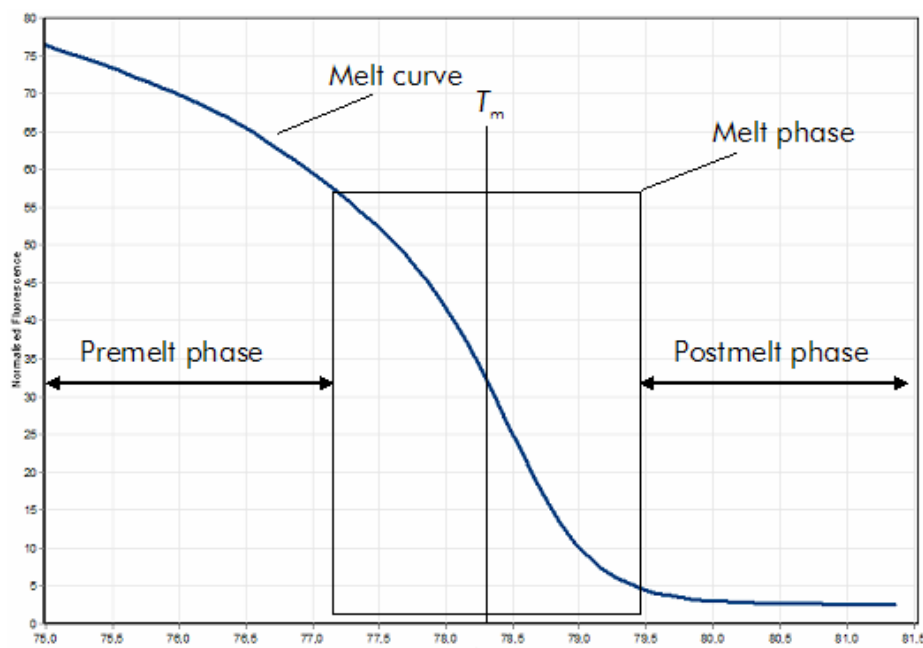
4. Nyní bude software vyžadovat jméno souboru pro následující běh. Jeho zadáním spustíte běh.
5. Běh provede sérii tání, které určí termální charakteristiky Rotoru-Gene QMDx.



6. Když běh skončí, software indikuje, zda Rotor-Gene QMDx vyhovuje specifikaci.
7. Pokud jsou nutné úpravy, klikněte na „Aplikujte úpravy“. Systém vás požádá o provedení verifikačního běhu. Po ukončení verifikačního běhu by neměly být žádné další úpravy nutné. Pokud jsou však vyžadovány další úpravy, kontaktujte prosím svého dodavatele.
8. Pokud se Rotor-Gene QMDx nachází uvnitř specifikací, správa oběhu může být zkontrolována a vytištěna.

11 Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM)

HRM analýza je inovativní technika založená na analýze tání DNA. Metoda HRM charakterizuje vzorky DNA podle jejich separačního chování během přechodu z dvouvláknové (dvoušroubovicové) DNA (dsDNA) na jednovláknovou DNA (ssDNA), ke kterému dochází při zvyšování teploty (viz ilustrace níže). Přístroj HRM zaznamenává fluorescentní signály s extrémně vysokou optickou a termální přesností, čímž vytváří mnoho aplikačních možností.



Typický graf HRM. Křivka tání znázorňuje přechod z vysoké fluorescence v úvodní fázi před tání, přes snižování fluorescence ve fázi tání, do bazální úrovně fluorescence ve fázi po tání. Fluorescence se snižuje s tím, jak se uvolňuje interkalační barvivo DNA z dsDNA při tání do jednovláknové DNA. Střední bod fáze tání, při které je rychlost změny fluorescence největší, definuje teplotu tání (T_m) analyzované DNA.

Než provedeme analýzu HRM, cílová sekvence musí být amplifikována do velkého počtu kopií. Toto se většinou provádí pomocí PCR v přítomnosti interkalačního fluorescentního barviva dsDNA. Barvivo nereaguje s ssDNA, ale aktivně interkaluje s dsDNA a jasně při interkalaci fluoreskuje. Změna ve fluorescenci může být použita k měření zvýšení koncentrace DNA během PCR a následně přímo měřena termálně indukovaným táním DNA pomocí HRM. Během HRM je nejdříve fluorescence vysoká, protože vzorek začíná jako dsDNA. Fluorescence klesá se stoupající teplotou, jak DNA separuje do jednotlivých vláken. Toto chování během tání je charakteristické pro každý partikulární vzorek DNA.

Rotor-Gene Q může pomocí HRM určit vzorky na základě délky sekvence, obsahu GC a komplementarity sekvence DNA. HRM se používá

Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM)

v genotypovacích aplikacích, jako například analýza inzercí/delecí nebo jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) nebo také při vyšetřování neznámých genetických mutací. Další použití zahrnuje epigenetické aplikace pro detekci a analýzu metylačního stavu DNA. HRM také může být použita na kvantitativní detekci malé části variant DNA v pozadí wild-type sekvence při senzitivitách dosahujících 5%. Toto se například používá při studiu somaticky získaných mutací nebo změn v metylačním stavu CpG Islands (metylace CpG oligonukleotidů).

Analýza HRM na Rotoru-Gene Q umožňuje mnoho aplikací, například tyto:

- Identifikace kandidátního genů predispozice.
- Asociační studie (porovnávání případů a kontrolních vzorků, genotypů a fenotypů).
- Určení prevalence alely uvnitř populace nebo podskupiny.
- Vyšetřování SNP a validace.
- Vyšetřování ztráty heterozygotnosti.
- Genetická daktyloskopie (DNA fingerprinting).
- Charakterizace haplotypů.
- Analýza metylace DNA.
- DNA Mapování.
- Identifikace druhů.
- Objevování mutací.
- Určení poměru somaticky získaných mutací.
- Typizace HLA

HRM je jednodušší a finančně efektivnější metoda než genotypovací testování a na rozdíl od konvenčních metod zabraňuje systém uzavřených zkumavek kontaminaci produkty PCR. Výsledky jsou srovnatelné s konvenčními metodami, jako je například SSCP, DHPLC, RFLP a sekvenování DNA. *

11.1 Schopnosti přístroje

Rotor-Gene Q má tyto vynikající termo-optické schopnosti v reálném čase, které jsou pro HRM nutné.

- Iluminace s vysokou intenzitou.
- Optická detekce s vysokou senzitivitou.
- Rychlý sběr dat.
- Jemně kontrolovaná teplota vzorku.
- Minimální termální a optická variace mezi vzorky.

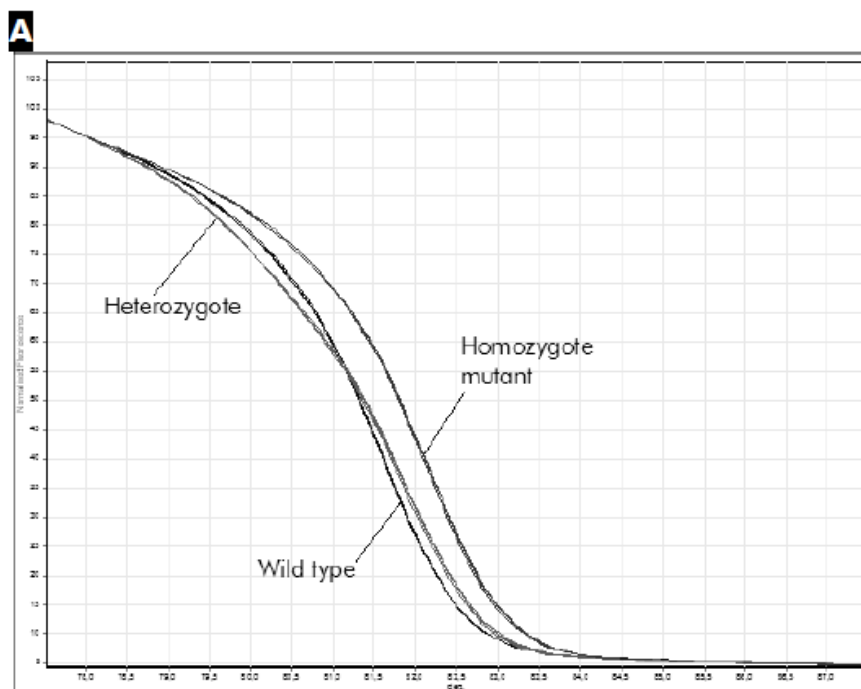
* White, H. and Potts, G. (2006) Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory-Wessex.

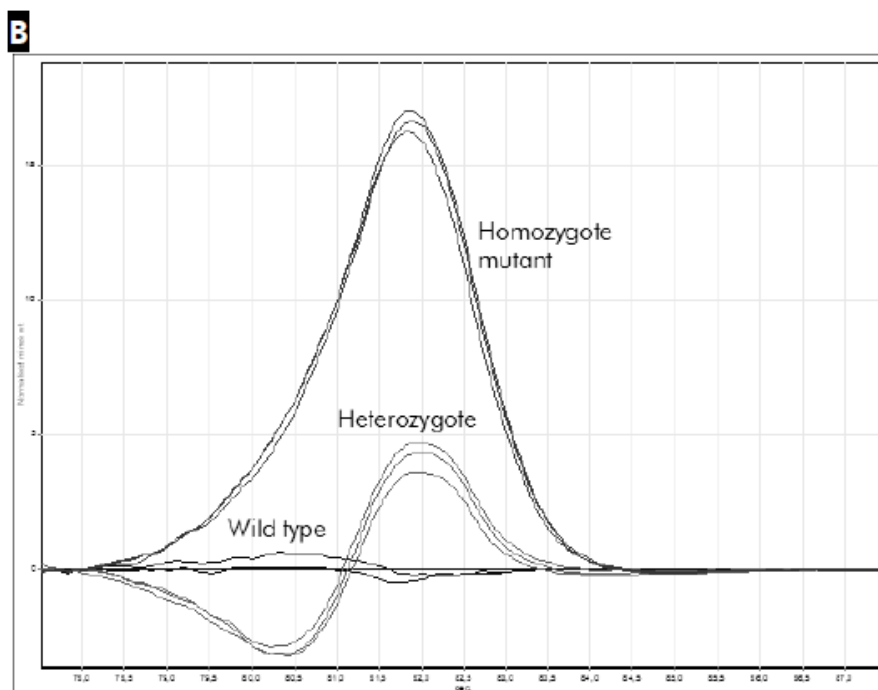
11.2 Chemikálie

QIAGEN nabízí sadu Type-it® HRM PCR Kit pro analýzu SNP a mutací za použití HRM a EpiTect® HRM PCR Kitu pro metylační analýzu za použití HRM. Oba Kity obsahují interkalační fluorescentní barvivo třetí generace EvaGreen. Tyto kity kombinují optimalizovaný HRM buffer a HotStarTaq® Plus za účelem vyřazení nespecifických amplifikačních produktů a poskytování spolehlivých výsledků.

11.3 Genotypovací příklad SNP

V příkladu, který uvádíme, byla použita sestava Type-it® HRM PCR Kit v analýze HRM pro diferenciaci mezi homozygotním přirozeným (wild-type) typem, homozygotním mutantem a heterozygotní lidskou formou SNP rs60031276. Technické detaily naleznete v manuálu Type-it® HRM PCR Kit.





C

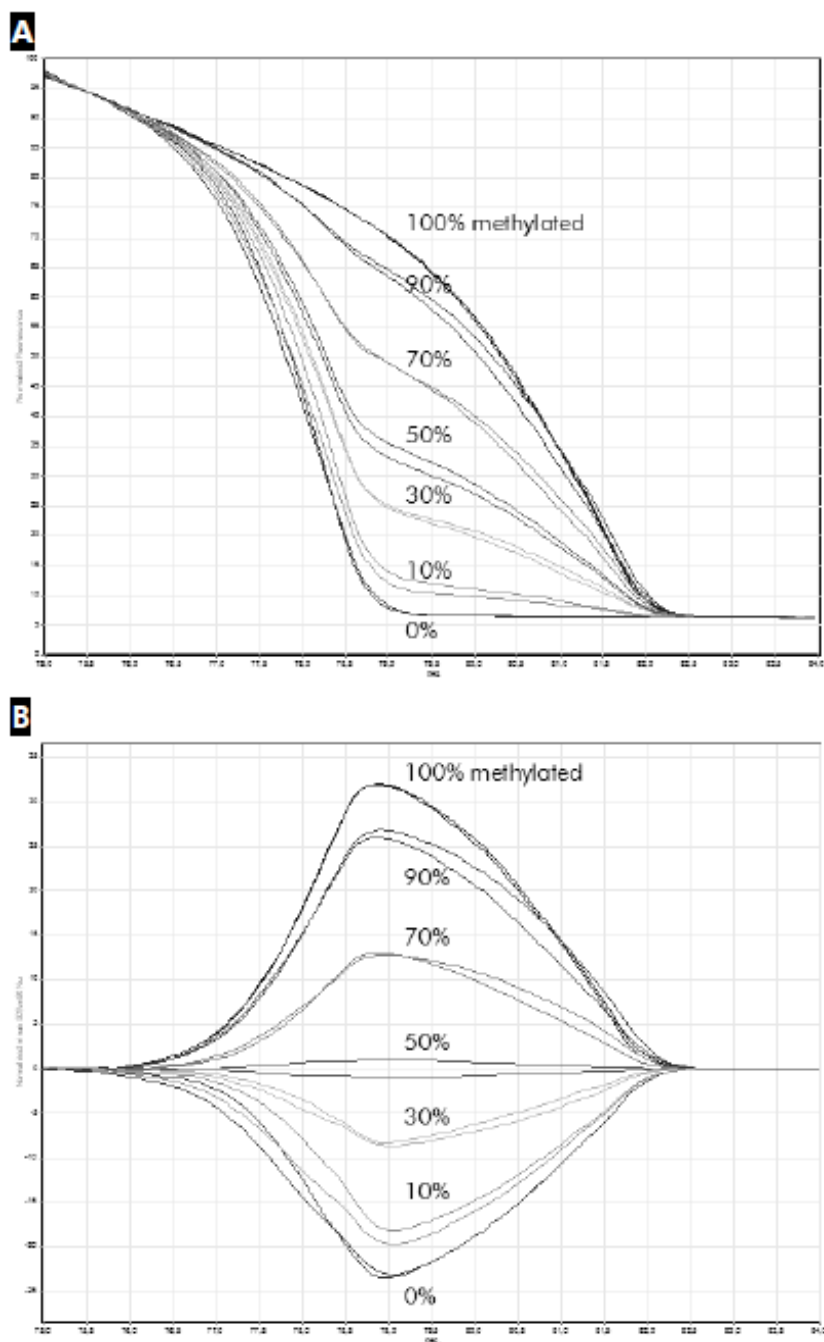
HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)

No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22		AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23		unknown	homo AA	99,49
24		unknown	homo AA	99,76
28		AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29		unknown	hetero AG	99,49
30		unknown	hetero AG	98,47
34		GG Human SNP rs60031276	homo GG	100,00
35		unknown	homo GG	98,80
36		unknown	homo GG	99,53

Genotypování SNP pomocí HRM. Lidský SNP rs60031276 (substituce A do G) v genu PPP1R14B (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B) byl analyzován na Rotoru-Gene Q za použití 10ng genomické DNA různých genotypů a Type-it® HRM PCR Kitu. Homozygotní wild-type (AA), homozygotní mutant (GG) a heterozygotní vzorky (AG) jsou zobrazeny na **A** standardní normalizované křivce tání a **B** diferenční grafu normalizovaného do wild-type vzorku. **C** Genotypy pro neznámé vzorky byly přiřazeny softwarem Rotoru-Gene Q.

11.4 Příklad metylační analýzy

V následujícím příkladu byla použita sada EpiTect HRM PCR Kit v analýze HRM pro diskriminaci různých poměrů metylované a nemetylované DNA. Technické detaily najdete v manuálu EpiTect HRM PCR Kit.



Kvantitativní metylační analýza pomocí HRM. Různé poměry metylované a nemetylované DNA-APC (adenomatosis polyposis coli) byly analyzovány a diskriminovány pomocí metylační analýzy HRM na Rotoru-Gene Q při použití EpiTect HRM Kit (brzy k dispozici). Je zobrazena **A** standardní normalizovaná křivka tání a **B** diferenční graf normalizovaný do 50% metylovaného vzorku.

11.5 Pokyny pro úspěšnou analýzu HRM

Úspěch analýzy HRM do velké míry závisí na partikulární sekvenci, kterou zkoumáme. Některé sekvenční motivy, jako například vlásenka (hairpin loop) nebo jiné sekundární struktury, dále lokální oblasti s neobvykle vysokým nebo nízkým obsahem GC, nebo opakující se sekvence, mohou ovlivnit výsledek. Použití standardizovaných kitů a optimalizovaných protokolů od firmy QIAGEN mohou překonat mnoho potencionálních problémů. Některé jednoduché návody, které mohou zajistit úspěch, jsou uvedeny níže.

Analyzujte malé fragmenty DNA

Neanalyzujte fragmenty větší než 250 bp. Větší produkty mohou být analyzovány úspěšně, ale většinou poskytují menší rozlišení. To je z důvodu, že například single-base variace mají větší vliv na proces tání 100 bp ampliconu než na tání 500 bp ampliconu.

Ujistěte se, že PCR obsahuje pouze specifický produkt

Vzorky kontaminované post-PCR artefakty, jako například primer-dimery nebo nespecifickými produkty, mohou způsobit, že výsledky HRM budou obtížně interpretovatelné. Kity od QIAGENU pro analýzu HRM zajišťují maximální specifitu bez nutnosti optimalizace.

Používejte dostatečnou preamplifikaci templátu

Analýza dat PCR v reálném čase může být velmi užitečná při řešení problémů v analýzách HRM. Amplifikační grafy by měly mít CT (prahový cyklus) rovný nebo menší než 30 cyklů. Produkty, které amplifikují později (díky nízkému počtu templátů nebo degradaci templátu), většinou produkují různé výsledky HRM kvůli artefaktům PCR.

Normalizujte koncentraci templátu

Množství templátu přidaného do reakce by mělo být konsistentní. Normalizujte počáteční koncentrace tak, aby všechny amplifikační ploty byly nejdále 3 CT hodnoty od sebe. Tím je zajištěno, že vstupní koncentrace nepřesáhnou desetinásobný rozsah.

Zkontrolujte přítomnost aberantních amplifikačních plotů

Než spustíte analýzu HRM, zkontrolujte amplifikační ploty dat pečlivě, zda neobsahují abnormální amplifikační tvary plotů. Ploty s logaritmicko-lineární fází, které nejsou strmé, jsou zubaté nebo dosahují nízké signální úrovně v porovnání s ostatními reakcemi, mohou znamenat špatnou amplifikaci nebo fluorescenční signál, který je příliš nízký (k tomu může dojít například, když je koncentrace primerů příliš nízká). Slabé reakce mohou být způsobeny reakčními inhibitory nebo špatným nastavením reakce. Data HRM z takových vzorků mohou být nejednoznačná nebo mají nízké rozlišení. Abyste se

vyhnuli nespolehlivým výsledkům, doporučujeme používat kity QIAGEN pro přípravu vzorků a analýzu HRM.

Udržujte koncentrace post-amplifikačních vzorků podobné

Koncentrace fragmentu DNA má vliv na teplotu tání (T_m). Z toho důvodu koncentrace vzorků DNA musí být udržovány tak podobné, jak je to jen možné. Když analyzujete produkty PCR, přesvědčte se, že každá reakce byla amplifikována do fáze plateau (fáze stagnace). V plateau budou všechny reakce amplifikovat do podobného rozsahu nezávisle na svém počátečním množství. Nicméně slabé reakce nemusí dosáhnout této hladiny (plateau) se stejným amplifikovaným množstvím z důvodu například nejednotného nastavení testu (například koncentrace primerů byla příliš nízká).

Zajistěte jednotnost vzorků

Všechny vzorky musí mít stejný objem a měly by obsahovat stejnou koncentraci barviva. Mechanismus tání DNA je ovlivněn obsahem solí v reakčním mixu, takže je důležité, aby koncentrace bufferu, Mg a jiných solí byla tak stejná u všech vzorků, jak je to jenom možné. Používejte také stejné reakční zkumavky od stejného výrobce, aby se zabránilo variacím vzniklých tloušťkou plastiku či vlivem autofluorescenčních vlastností.

Zajistěte dostatečný sběr dat pro fáze před táním a po tání.

Zaznamenejte datové body HRM v přibližně 10°C rozsahu soustředěným okolo bodu T_m (viz obrázek na str. 11-1). Tento rozsah poskytuje dostatečný základ pro efektivní normalizaci křivky a umožní lépe reprodukovatelné replikáty a snadnější interpretaci dat.

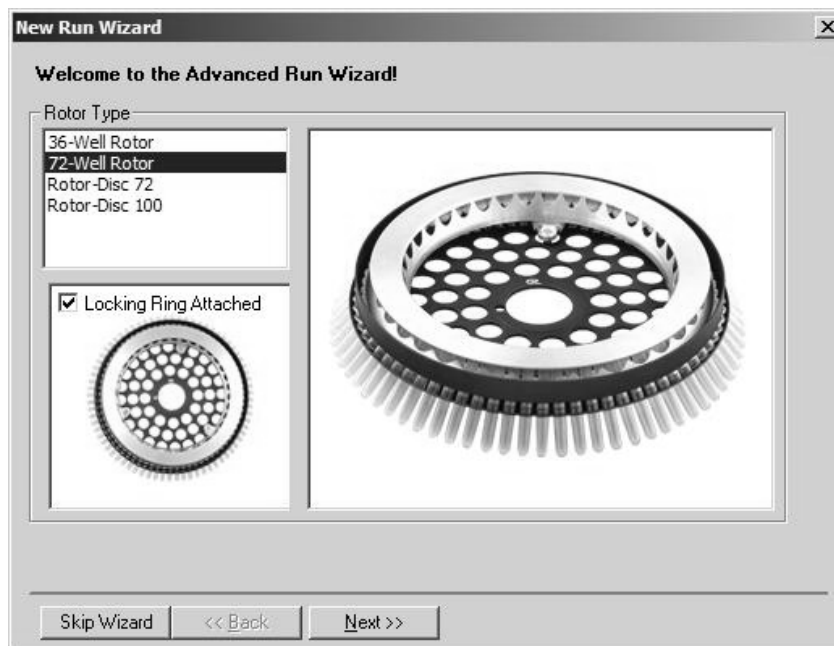
11.6 Příprava vzorků

Během purifikace a skladování musí být zabráněno degradaci vzorků. Vyhněte se přílišnému množství inhibitorů, například z přenosu etanolu. Pro vylepšení výsledků HRM doporučujeme udržovat množství používaných templátů ve stejném množství mezi vzorky. Pro určení koncentrace DNA a čistoty doporučujeme spektrofotometrickou analýzu. Pro přípravu vzorků doporučujeme sady QIAGEN.

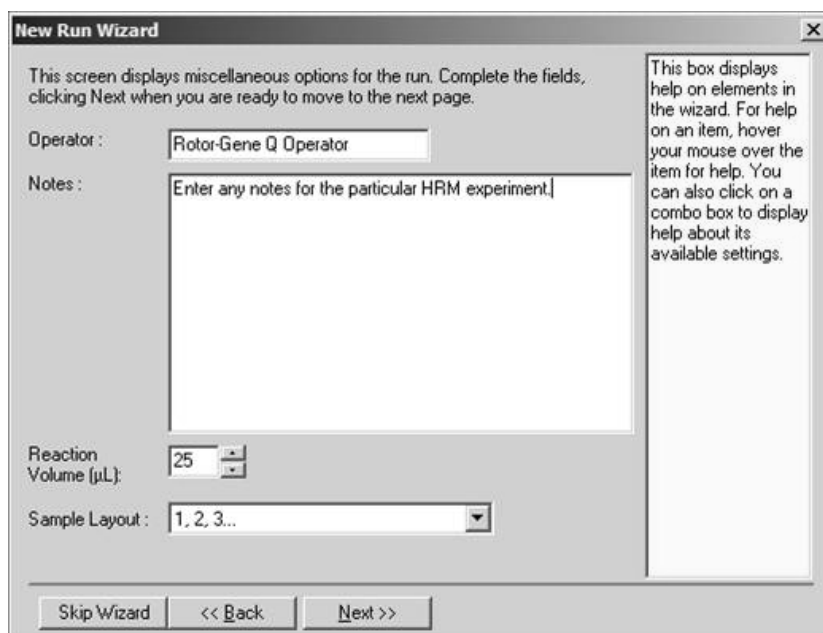
Poznámka: Jedna absorpční jednotka se rovná 50 µg/ml DNA při 260 nm. Čistá DNA vykazuje poměr 260 nm ke 280 nm 1,8.

11.7 Nastavení softwaru

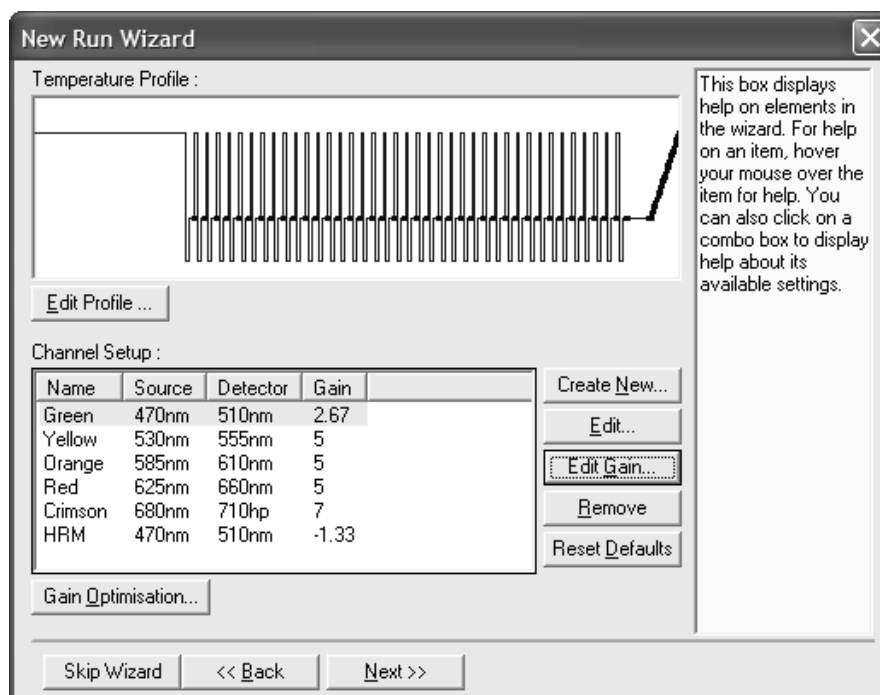
1. Otevřete nový soubor volbou „New, Nový“ z menu Soubor. V Advanced wizard zvolte HRM.
2. Nastavte typ rotoru (v tomto příkladu je použit 72-jamkový rotor). Přesvědčte se, že těsnicí kroužek je správně umístěn a že políčko „Locking Ring Attached“ je zatržené před tím, než budete pokračovat k dalšímu kroku.



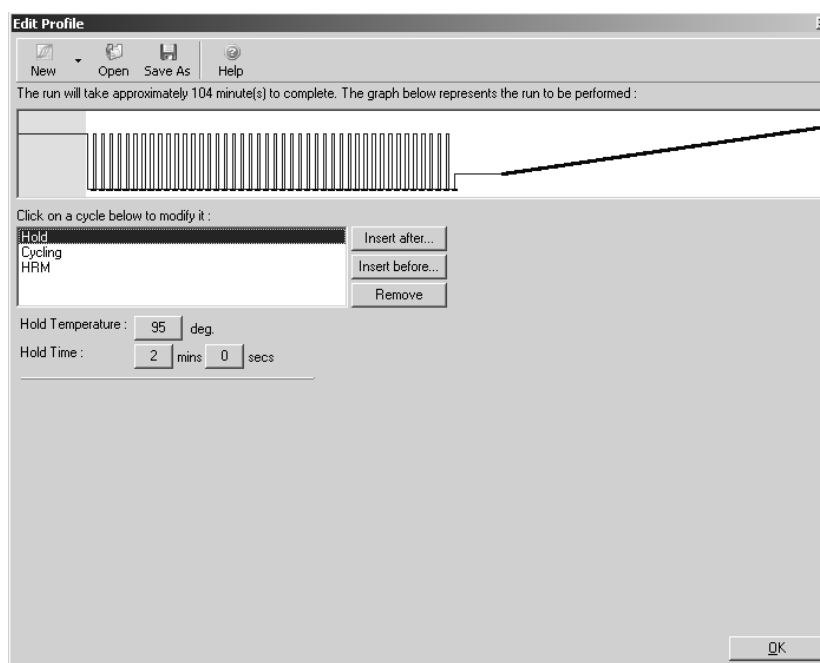
3. Nastavte detaily běhu. Zadejte jméno operátora (volitelné) a přidejte poznámky týkající se experimentu (volitelné). Zvolte objem reakce (nutné) a požadované rozvržení vzorků.



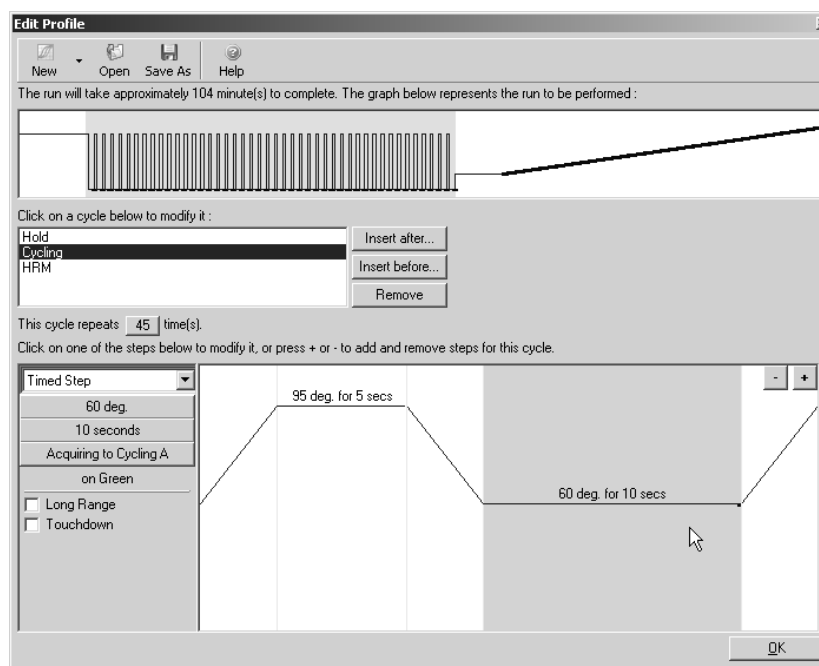
4. Klikněte na tlačítko „Edit Profile“ a modifikujte časy a teploty reakce.



5. Nastavte patřičný počáteční retenční čas. Tento čas závisí na typu použité polymerázy DNA. Sady Type-it HRM PCR Kit a EpiTect HRM PCR Kit vyžadují aktivační čas 5 minut. Výchozí aktivační čas je 10 minut.



6. Modifikujte cyklování tak, aby vyhovovalo amplikonu.



7. Přesvědčte se, že fluorescenční data budou vytěžena. Sbírejte data do zeleného kanálu na konci ochlazovacího kroku.

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition)

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red
Yellow

> < <<

Acquiring Channels :

Name
Green

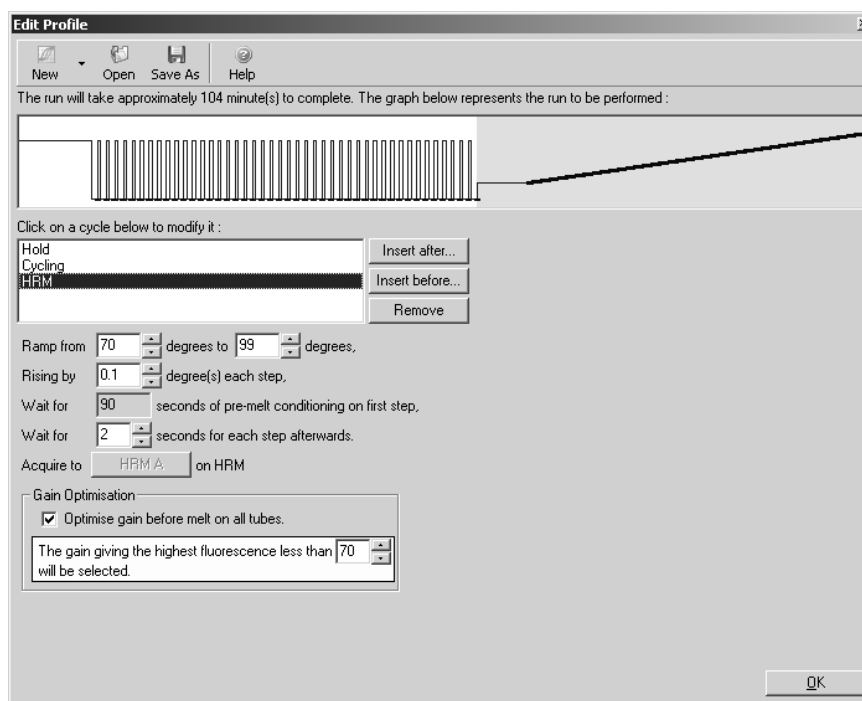
To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >> OK Don't Acquire Help

Dye Channel Selection Chart

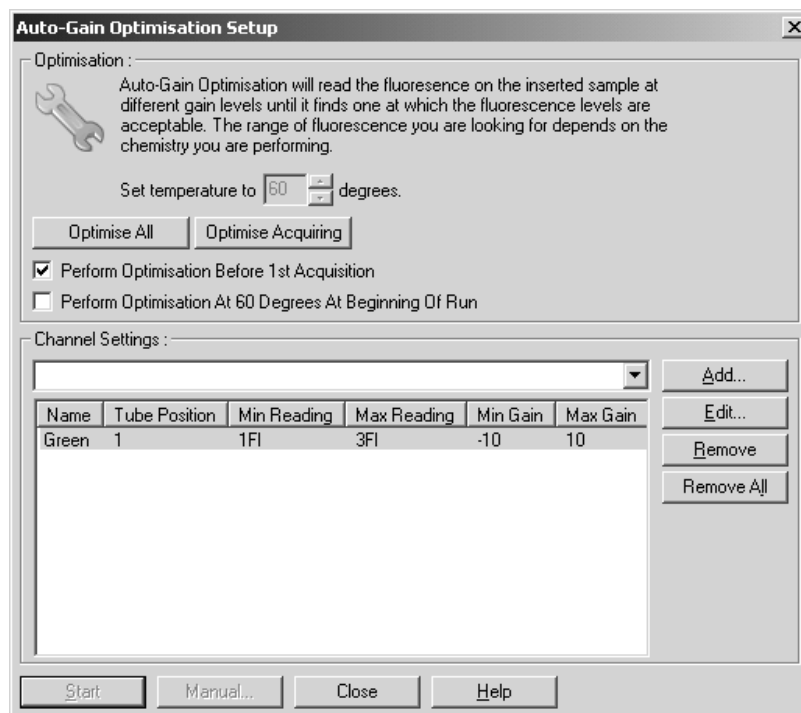
Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM, SybrGreen ^① , alexa488
Yellow	530nm	555nm	JOE, CalGold ^① , CalOrange ^① , TET, Yakima Yellow, VIC ^① , HEX, alexa532
Orange	585nm	610nm	ROX, Redmond Red ^① , alexa568
Red	625nm	660nm	Cy5, Quasar670 ^① , LCRed640 ^①
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ^① , LCRed705 ^① , alexa680
HRM	460nm	510nm	LCGreen ^①

- Nastavte podmínky běhu HRM. Upravte podmínky tak, aby vyhovovaly amplikonu. Pro první sadu experimentů stanovte širokou doménu tání. Použijte teoretický T_m jako vodítko pro stanovení vhodného rozsahu. Jakmile jste určili, kde produkt bude tát, zredukujte doménu tání na rozsah maximálně 10°C. Ujistěte se, že k začátku tání dochází 5°C před prvním přechodem k tání. Výchozí hodnoty pro každý krok jsou nastaveny na 0,1°C s retencí 2 vteřiny. Minimální hodnota tranzice pro každý krok je 0,05°C s retencí 1 vteřina. Data jsou automaticky sbírána kanálem HRM. Automatická optimalizace gainu je prováděna automaticky. Software vyhledává optimální nastavení gainu, takže nejvyšší vykázaná hodnota fluorescence není vyšší než 70 jednotek na stupnici 0 – 100. Tato hodnota může tedy být zvýšena maximálně na 100.

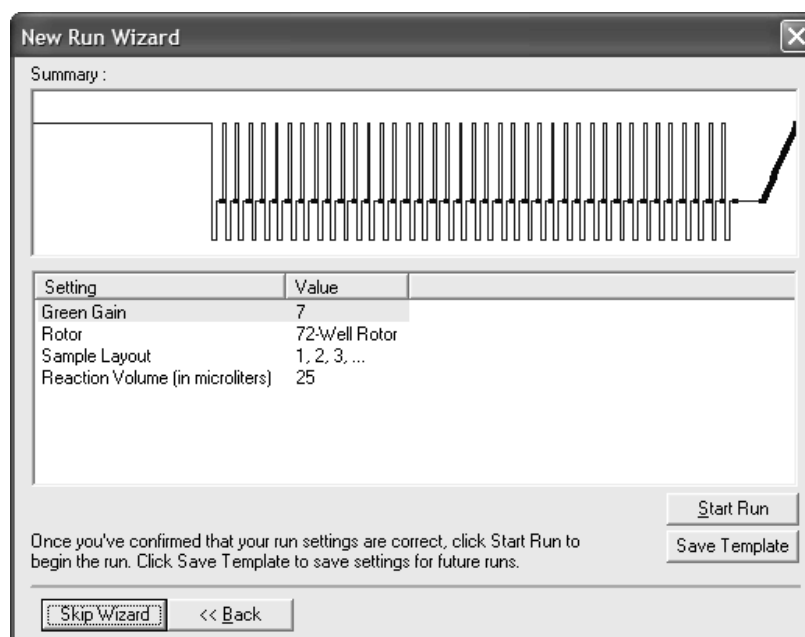


9. Volitelná možnost: Nastavení optimalizace „Auto-Gain Optimisation“. Toto se týká pouze amplifikačního kroku v reálném čase a je nastaveno pro zelený kanál. Klikněte na tlačítko „Optimize Acquiring“ (pro optimalizaci pouze kanálů používaných v tom kterém běhu). Doporučujeme provádět optimalizaci těsně před prvním sběrem, takže doporučujeme zatrnout políčko „Perform Optimization Before First Acquisition“. Doporučený rozsah fluorescence pozadí pro interkalační barviva je mezi 1 až 3 fluorescenčních jednotek. Pokud chcete toto nastavení změnit, klikněte na jméno kanálu v seznamu a potom na tlačítko „Edit“.

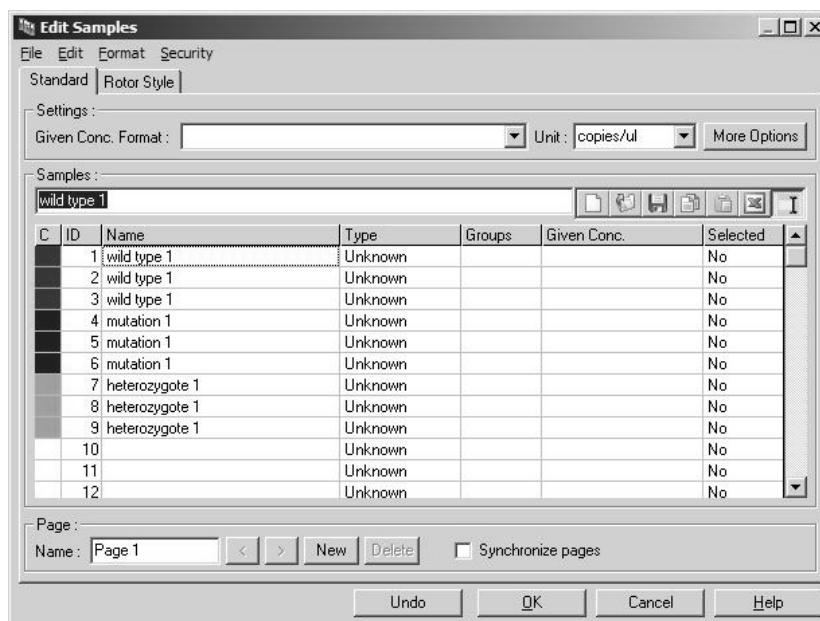
Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM)



10. Spustíte běh kliknutím na „Start Run“ a uložíte soubor běhu do vašeho počítače.



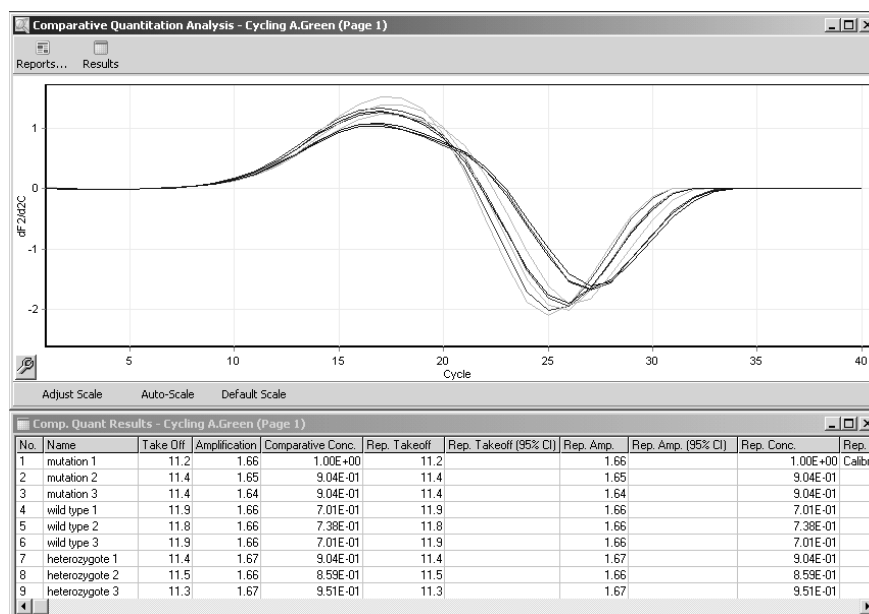
11. Editujte jména vzorků (volitelné). Jména vzorků mohou být editována během nebo po skončení běhu.



11.8 Analýza dat PCR v reálném čase

Analýza dat PCR v reálném čase před analýzou dat HRM je velmi výhodná. Data PCR v reálném čase mohou upozornit na špatně probíhající testy. Identifikace odlehlých hodnot a jejich filtrování před následnou analýzou HRM výrazně vylepší celkovou efektivitu analýzy HRM, protože analyzování produktů PCR špatné kvality pochopitelně vyústí v málo kvalitní výsledky HRM. Doporučujeme analyzovat kvantitativní data PCR v reálném čase následujícím způsobem:

1. Analyzujte data v reálném čase pomocí volby „Quantitation“ z okna „Analysis“. Pokud jsou některé hodnoty CT 30 a vyšší, příslušné reakce se považují za příliš pozdě amplifikované. Tyto vzorky musí být analyzovány s podezřením nebo vyřazeny z analýzy jako šum. Pozdní amplifikace je většinou způsobena příliš malým počátečním množstvím templátů a/nebo vysokými hodnotami degradace vzorků.
2. Zhodnoťte koncovou fluorescenční hladinu. Pokud je koncový bod fluorescence v jakémkoliv amplifikačním plotu nízký ve srovnání s většinou plotů v datové sadě, vynechejte tyto vzorky z analýzy, i když je jejich hodnota CT menší než 30. Nízký koncový bod fluorescence může znamenat nesprávný objem barviva, nesprávné hladiny reakčních komponentů (například primerů) nebo působení inhibitorů.
3. Použijte volbu „Comparative Quantitation“ v okně „Analysis“ pro získání reakční efektivity každého vzorku. Pokud není efektivita podobná reakcím ve stejném experimentu nebo je méně než přibližně 1,4, vynechejte tuto reakci jako odlehlou hodnotu.



Výsledky komparativní kvantitace. Efektivita reakce se zobrazuje v kolonce „Amplifikace“ jako skóre z 2 (2 = 100% efektivita).

Poznámka: Pokud podezříváte přítomnost primer-dimerů nebo nespecifických produktů, vyhodnoťte reakce derivativním grafem za použití možnosti „Melt“ v okně „Analysis“. Přesvědčte se, že existuje jeden jediný vrchol, znázorňující jeden jediný produkt. Pokud je to možné, přesvědčte se pomocí gelu, že se jedná o produkt s jedinou amplifikací. Pokud se jedná o více než jeden produkt, reakce by měla být opakována nebo neoptimalizována.

11.9 Analýza dat HRM

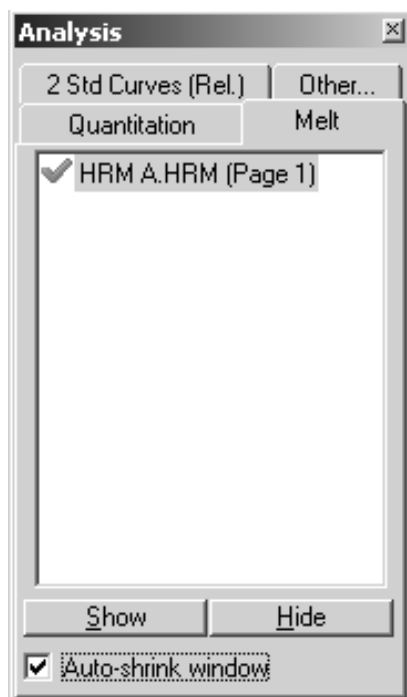
Analýza HRM umožňuje vizuální i automatické zkoumání genotypů. Výsledky mohou být zobrazeny na normalizovaném nebo diferenciálním grafu tání. Normalizované křivky poskytují základní reprezentaci různých genotypů založených na pozici křivky (pro homozygoty) a změnách tvaru křivky (pro heterozygoty).

Diferenciální grafy představují pomoc pro vizuální interpretaci. Plotují rozdíly ve fluorescenci vzorku do zvolených kontrolních vzorků při každé teplotní tranzici. Diferenciální ploty poskytují alternativní náhled na rozdíly mezi tranzicemi v křivkách tání.

Poznámka: Analýza první derivace křivky tání (tak jak ji používá standardní volba „Melt“ v okně „Analysis“ se nepovažuje za vhodnou pro analýzu HRM z toho důvodu, že derivace dat přidává umělý šum a ztěžuje interpretaci dat.

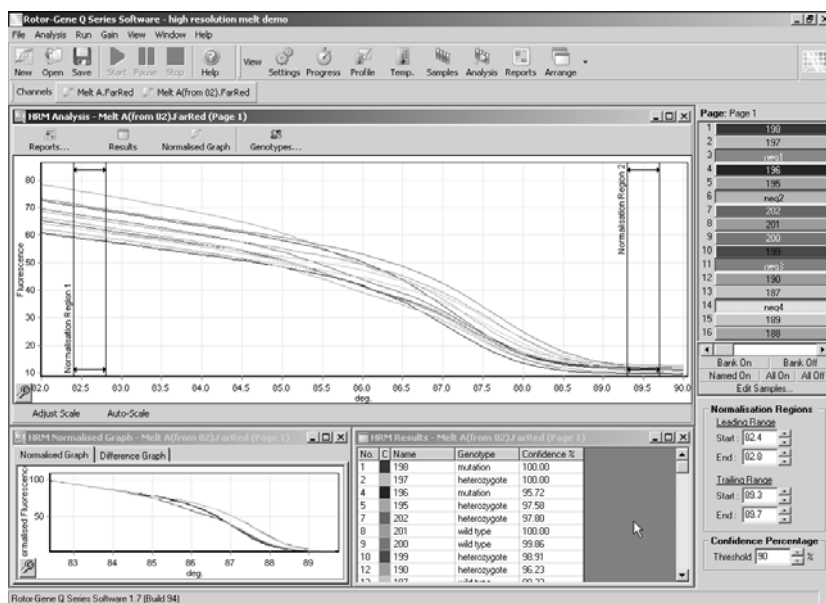
Následující kroky popisují výsledky analýzy HRM při použití softwaru Rotor-Gene Q.

1. Zvolte možnost „HRM“ v okně „Analysis“.



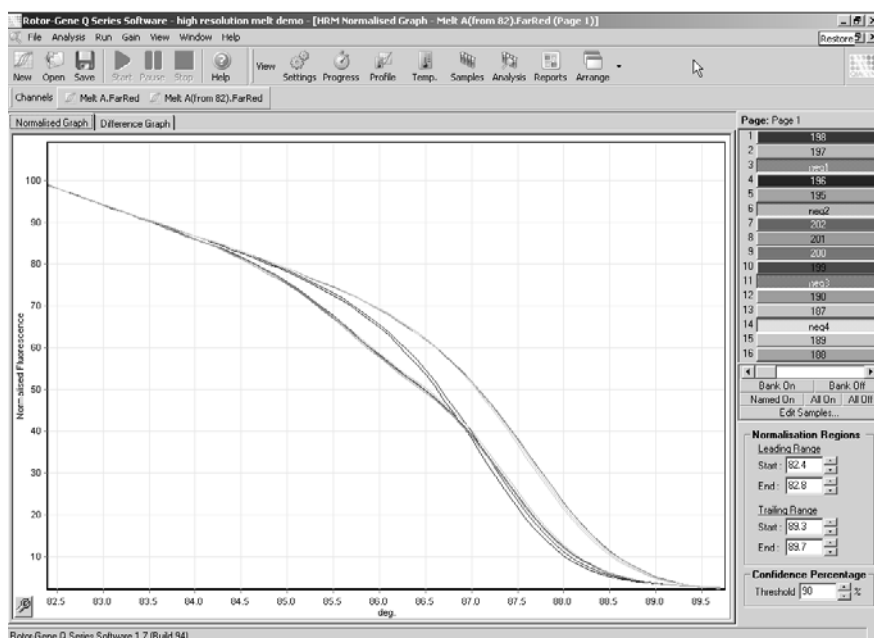
2. Objeví se okna zobrazující surová data, normalizovaný graf a výsledky. Okno surových dat umožňuje úpravy oblastí normalizace. Normalizace umožňuje porovnání všech křivek ze stejnými začínajícími a končícími hladinami fluorescentních signálů pro ulehčení interpretace a analýzy. Každá oblast je opatřena dvěma kurzory, jejichž výchozí nastavení je na koncích křivky. Datové body uvnitř oblastí jsou používány k normalizaci fluorescence (pouze osa y) začátku (Oblast 1) a konce (Oblast 2) grafu tání. Data vně nastavených oblastí jsou ignorována. Upravte oblasti tak, aby zahrnovaly reprezentativní data pro fáze před táním a po tání. Rozšíření oblasti (kliknutím a potažením myši) umožňuje softwaru upravit sklon základní čáry. Za účelem zajištění efektivní normalizace křivek se vyhněte normalizaci oblastí do fáze tání.

Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM)

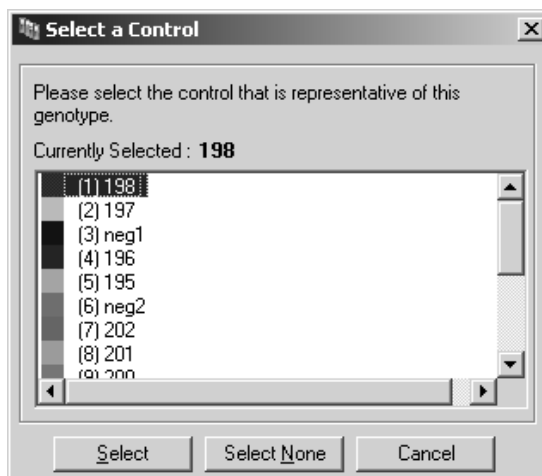
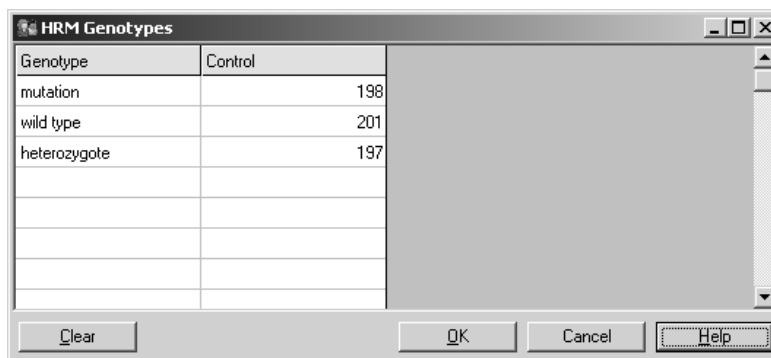


Poznámka: Doporučujeme pohybovat kurzory, pouze když si přejete vyhnout se oblastem v křivce tání. Pohyb kurzorů směrem do fáze tání může ovlivnit subtrakční ploty a procenta spolehlivosti.

- Okno „Difference Graph“ zobrazuje normalizované křivky tání. Vzorky mohou být také zobrazeny jako diferenční grafy proti některému kontrolnímu vzorku.

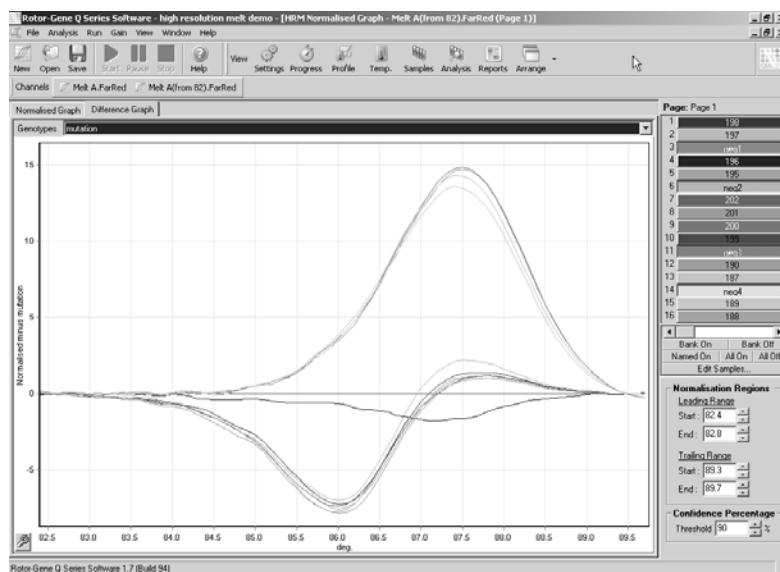


4. Klikněte na tlačítko „Genotypes“ pro definování genotypů. Zadejte jméno každé genotypové kategorie a pro každou z nich zvolte reprezentativní vzorek ze seznamu vzorků.



5. Náhled diferenčního grafu naleznete pod stejnojmenným tabem. Zvolte genotyp, který si přejete porovnat k ostatním vzorkům pomocí rozbalovacího menu v horní části okna. Ve znázorněném příkladě jsou zakreslené polohy (ploty) všech vzorků odečteny z průměrných plotů všech vzorků označených „Mutace 1“.

Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM)



6. Genotypy jsou softwarem automaticky zařazeny do okna „Results“. Hodnota spolehlivosti je zobrazena jako kontrola integrity automaticky zařazených výsledků. Hodnota prahu, nad kterou probíhá automatické zařazení, může být upravena. Vzorky, které spadají pod stanovený práh, budou označeny jako variace pro bližší zkoumání nebo retestování.

HRM Results - Melt A(from 82).FarRed (Page 1)			
No.	C	Name	Genotype
1	198	mutation	100.00
2	197	heterozygote	100.00
4	196	mutation	95.72
5	195	heterozygote	97.58
7	202	heterozygote	97.80
8	201	wild type	100.00
9	200	wild type	99.86
10	199	heterozygote	98.91
12	190	heterozygote	96.23
13	187	wild type	99.23
15	189	wild type	97.59

Normalisation Regions

Leading Range

Start: 82.4

End: 82.8

Trailing Range

Start: 89.3

End: 89.7

Confidence Percentage

Threshold: 90 %

12 Řešení problémů

12.1 Archív záznamu

Software zachovává nemodifikovaný záznam každého běhu spolu s diagnostickou informací v archívu záznamu (Log Archive repository). Můžete poslat email spolu s veškerými nutnými diagnostickými informacemi technické službě firmy QIAGEN použitím volby Help, Send Support Email option (Pomoc a potom volby Pošlete email podpoře) (viz sekce **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Abyste ušetřili místo na disku, přístroj uchovává záznamy pouze 60 nejnovějších běhů. Starší záznamy běhů budou přepsány v pořadí, v jakém jsou nové archivní záznamy tvořeny

12.2 Řešení problémů

Komentáře a návrhy

Neschopnost

spustit běh HRM

Rotor-Gene Q MDx není vybaven modulem HRM	Kontaktujte vašeho lokálního dodavatele firmy QIAGEN.
---	---

Data HRM se nezobrazí

Nesprávné nastavení	Zkontrolujte nastavení filtrů. Zkontrolujte, zda máte správný typ rotoru. Zkontrolujte, zda používáte správná reakční činidla. Zkontrolujte, zda reakce byla správně nastavena. Proveďte kontrolní pozitivní experiment (například u vzorku, u kterého jsou známy výsledky).
---------------------	--

Komentáře a návrhy

Grafy vypadají trhaně

Slabá nebo žádná amplifikace

Zkontrolujte, zda byly použity správné protokoly a reagentie. Doporučujeme používat sady QIAGEN pro analýzu HRM.

Zkontrolujte, zda reakce byla správně nastavena.

Zkontrolujte podmínky cyklování.

Zkontrolujte počáteční kvalitu a kvantitu templátu. Pro přípravu vzorků doporučujeme používat sady QIAGEN.

Grafy amplifikace nebo tání jsou satureované

Gain je nastaven příliš vysoko

Použijte automatickou optimalizaci gain (Auto-Gain Optimisation) (viz strana 6-26).

Procenta spolehlivosti se změnila

Normalizační oblasti byly posunuty klikáním a potahováním

Posunujte normalizační oblasti pouze, když je to nutné, abyste se vyhnuli oblastem křivky tání.

V datech jsou přítomna chybná (okrajová) data

Inkonsistentní nastavení reakce.

Zkontrolujte, zda byly použity správné reagenty.

Zkontrolujte, zda použité zkumavky jsou stejné.

Ve vzorku jsou přítomny inhibitory.

Zkontrolujte, zda byl použit stejný vzorový mix pro všechny vzorky.

Degradovaný nebo příliš malý templát.

Zkontrolujte počáteční kvalitu a kvantitu templátu.

12.3 Obecné chyby přístroje

Hlášení chyby	Komentáře a návrhy
Nelze otevřít sériový port <COMPORT> (Can't open the serial port <COMPORT>)	K této chybě dochází při spuštění softwaru, když software nemůže komunikovat s přístrojem skrz konfigurovaný COM port. Toto je většinou způsobeno poškozenými kabelem, uvolněnými kabelem, poškozenými sériovými porty, poškozenými porty USB, problémem s driverem USB nebo problémem s driverem konvertoru USB na sériový. Připojte nebo vyměňte kabel. Přeinstalujte patřičné drivery. Spustěte software ve „virtuálním režimu“ „Virtual Mode“ a zvolte „Setup/Auto-Detect button“ v menu „Soubor“, „File“ čímž resetujete konfigurovaný port COM.
Otevřený kryt komory (Chamber Lid Open) Nelze pokračovat v běhu; kryt komory byl otevřen během běhu. Resetujte prosím přístroj a restartujte software. (Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software.)	K této chybě dochází, když software detekoval otevřený kryt během běhu. Resetujte přístroj a restartujte software.
Kryt komory je otevřen. (Chamber Lid Open) Kryt komory přístroje je otevřen. Zavřete prosím kryt a klikněte Pokračovat. (The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue.)	K této chybě dochází, když se uživatel pokouší spustit běh, zatímco je kryt přístroje otevřen. Zavřete kryt komory přístroje a klikněte „Pokračovat“ „Continue“.

Hlášení chyby	Komentáře a návrhy
Chybná komunikace (Communication Corrupted)	<p>K této chybě dochází, když data obdržená od přístroje nesouhlasí s očekávanými výsledky.</p> <p>Tato situace vyžaduje hlubší vyšetření servisním specialistou firmy QIAGEN, který provede diagnózu problému.</p> <p>Kontaktujte prosím vašeho dodavatele nebo technické služby firmy QIAGEN.</p>
Komunikační sekvence je porušena (Communication Out Sequence)	<p>K této chybě dochází, když obdržená data z přístroje nenásledují ve správném pořadí.</p>
Přístroj obdržel data od přístroje, jehož sekvence je porušena. (Instrument has received data from the machine that is out of sequence.)	<p>Tato situace vyžaduje hlubší zkoumání servisním specialistou firmy QIAGEN, který bude diagnostikovat problém přístroje.</p> <p>Kontaktujte prosím vašeho dodavatele nebo technický servis firmy QIAGEN.</p>
Chyba v komunikačním protokolu (Communication Protocol Error)	<p>K této chybě dochází, když konfigurovaný komunikační protokol není stejný jako protokol očekávaný.</p>
V tomto běhu došlo k chybě v komunikačním protokolu. (A communication protocol error occurred with this run)	<p>Tato situace vyžaduje hlubší zkoumání servisním specialistou firmy QIAGEN, který bude diagnostikovat problém přístroje.</p>
Ucpaný motor detektoru, přístroj se zastavil (Detector motor jam, stopped machine)	<p>K této chybě dochází, když je Rotor-Gene MDx spuštěn bezprostředně po doručení v chladných oblastech. V tomto případě umožněte přístroji, aby se aklimatizoval na pokojovou teplotu po dobu alespoň jedné hodiny, než přístroj zapnete.</p> <p>Pokud problém přetrvává, kontaktujte prosím vašeho dodavatele nebo technické služby firmy QIAGEN.</p>

Hlášení chyby	Komentáře a návrhy
Totální selhání hardwaru Fatal (Hardware Malfunction)	K této chybě dochází, když software zjistil totální selhání hardwaru a aktivoval bezpečnostní ochranný postup, který vypnul přístroj.
Přístroj detekoval, že došlo k totálnímu selhání hardwaru. Nepokoušejte se přístroj znovu použít, dokud nebyl opraven vaším dodavatelem.	Okamžitě vypněte přístroj a kontaktujte vašeho dodavatele nebo technické služby firmy QIAGEN.
Chyba přístroje (Machine Error)	K této chybě dochází, když software zjistil chybu, kterou přístroj nemůže opravit. Software zastavil běh.
Běh byl zastaven, jelikož došlo k chybě přístroje, kterou nebylo možno napravit. Pokud k této chybě dojde opakovaně, kontaktujte prosím vašeho dodavatele a přiložte příslušný archivní soubor.	Zkuste další běh. Pokud problém přetrvává, kontaktujte vašeho dodavatele nebo technické služby firmy QIAGEN a přiložte příslušný archivní soubor.
Přístroj není zapnut do sítě. (Machine Unplugged)	K této chybě dochází, když přístroj nekomunikuje se softwarem po určitém definovaném časovém intervalu. Toto je často způsobeno chybou přístroje nebo nadměrnou aktivitou PC, jejímž následkem jsou ztraceny části komunikace.
Přístroj nereaguje nebo selže a ukazuje zprávu <ERROR MESSAGE > (zpráva o chybě). Jedná se o neopravitelnou poruchu, resetujte prosím přístroj a restartujte software.	Běžné příčiny zaviněné selháním softwaru jsou například intenzivní požadavky na procesor, jako například antivirová ochrana nebo plánované antivirové skeny, bezdrátové karty nebo infračervené karty. Zablokujte nebo odinstalujte příslušné softwarové úkony náročné na kapacitu procesoru. Resetujte přístroj a restartujte software. Pokud problém přetrvává, kontaktujte prosím vašeho dodavatele nebo technické služby firmy QIAGEN.

Hlášení chyby	Komentáře a návrhy
Přístroj je odpojen ze sítě (Machine Unplugged)	<p>K této chybě dochází, když sériová nebo USB komunikaci k přístroji jsou ztraceny.</p> <p>Připojte sériový nebo USB kabel do zadní části počítače a klikněte na tlačítko „Pokračovat“.</p>
Přístroj není připojen k počítači na <PORT NAME> (název portu). Připojte sériový kabel do zadní části počítače a klikněte Pokračovat.	
Cílová proměnná nebo celková proměnná nejsou nastaveny (Object variable or with block variable not set)	<p>K této chybě dochází při spuštění softwaru, když soubor templátů pokusu byl poškozen. K tomuto jevu může dojít, když je software nebo počítač vypnut nesprávně, například při výpadku elektrického proudu</p> <p>Vymažte soubor C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\normal.ret a potom restartujte software.</p>
Selhání rychlosti rotoru (Rotor Speed Failure)	<p>K této chybě dochází, když se software pokouší nastavit rychlost rotoru a nepodaří se mu nastavit cílovou rychlost během požadovaného časového intervalu.</p>
Přestávka během nastavení rychlosti rotoru. (Time out while setting the rotor speed)	<p>Tato situace vyžaduje hlubší zkoumání servisním specialistou firmy QIAGEN, který bude diagnostikovat problém přístroje.</p> <p>Kontakujte prosím vašeho dodavatele nebo servisní služby firmy QIAGEN.</p>
Sériový port je používán Serial Port In Use	<p>K této chybě dochází, když se software pokouší spojit přístroj na konfigurovaném portu COM a ten je současně používán jiným softwarem.</p> <p>Zavřete všechny komunikační a synchronizační aplikace a operaci opakujte.</p>
Sériový port je aktuálně používán jinou aplikací. Zavřete ostatní aplikace jako například komunikační nebo synchronizační software a zmáčkněte "Opakovat“.	

Hlášení chyby	Komentáře a návrhy
Přestávka při současném vypnutí (Shutdown timeout)	K této chybě dochází, když software vydal příkaz k vypnutí přístroje a přístroj posílá data zpět po očekávaném časovém intervalu. Resetujte přístroj a restartujte software.
Přístroj překročil očekávaný čas vypnutí. Resetujte prosím přístroj a software.	
Teplotní ochrana byla aktivována (Temperature Protection Activated)	K této chybě dochází, když software zjistil, že teplota v komoře vystoupila nad bezpečnou hladinu a následně aktivoval ochranný postup. Okamžitě vypněte přístroj a kontaktujte vašeho dodavatele nebo servisní služby firmy QIAGEN.
Přístroj zjistil, že teplota v komoře se zvýšila nad bezpečnou hranici. Z tohoto důvodu přístroj vstoupil do ochranného režimu. Když problém přetrvává, vypněte prosím přístroj a kontaktujte vašeho distributora.	
Termistor je otevřený (Thermistor Is Open)	K této chybě dochází, když software detekoval, že termistor je otevřen a tudíž nemůže ukazovat teplotu. Software následně aktivoval ochranné postupy, které vypnuly přístroj.
Přístroj zjistil, že termistor je otevřený a z důvodu zabránění poškození přístroje ho vypnul. Když problém přetrvává, kontaktujte vašeho distributora.	Okamžitě vypněte přístroj a kontaktujte vašeho dodavatele nebo servisní služby firmy QIAGEN.

Hlášení chyby

Komentáře a návrhy

Došlo k nenapravitelné chybě. (Unrecoverable errors occurred)

K této chybě dochází uprostřed běhu poté, co všechny dostupné pokusy softwaru opravit chybu selhaly.

Běh byl zastaven, jelikož došlo k chybě, kterou nebylo možno opravit. Pokud se tato situace opakuje, kontaktujte vašeho distributora s příslušným archivním souborem.

Tato situace vyžaduje hlubší zkoumání servisním specialistou firmy QIAGEN, který bude diagnostikovat problém přístroje.

Kontaktujte prosím vašeho dodavatele nebo servisní služby firmy QIAGEN.

12.4 Zprávy softwaru Rotor-Gene Q

Následující seznam obsahuje varování a jiné zprávy, které se mohou objevit v softwaru Rotor-Gene Q během provozu hardwaru a softwaru. Jakákoli část zprávy, která je proměnná, jako například charakteristika popisu chyby, je uvedena v závorkách (například < ERROR DESCRIPTION >) (popis chyby).

Text zprávy

Obecné zprávy

Pro tuto stránku již existuje primární kanál. Pokud chcete tuto stránku předělat, musíte nejdříve vymazat primární kanál pomocí tlačítka Možnosti a potom operaci opakovat.	A raw channel already exists for this page. If you would like to recreate this page, you must first delete the raw channel via the Options button and then try again.
Došlo k vážnému problému, který vyžadoval ukončení softwaru. Po kliknutí na OK bude vaše současná práce uložena, pokud je to možné, a přístroj bude vypnut. Pokud problém přetrvává, kontaktujte svého dodavatele.	A serious problem has occurred which requires shutting down the software. After you click OK, your current work will be saved, and the machine will be turned off, if possible. If this problem persists, please contact your distributor.
Tuto stránku nelze vymazat. Musí vždy existovat alespoň jedna stránka pro vzorky.	Cannot delete this page. There must always be at least one sample page.
Nelze navázat spojení s přístrojem přes sériový port <COMPORT>. Zkontrolujte, zda je přístroj správně zapojen do zadní části počítače a operaci opakujte.	Can't connect to instrument on serial port <COMPORT>. Check the machine is correctly plugged into the back of the computer, then retry
Nelze otevřít sériový port <COMPORT> pro spojení s přístrojem. Zkontrolujte, zda není otevřený žádný komunikační software a operaci opakujte.	Can't open the serial port <COMPORT> to connect to the instrument. Check you do not have any communications software open, then retry.
Nelze uložit běh, protože některá data jsou neplatná. Zkontrolujte prosím údaje, které jste vložili a operaci opakujte.	Could not save to run because some data on the form was invalid. Please check your entries then try again.
Nelze uložit soubor. Přesvědčte se, zda je na disku dostatek místa a že není poškozen.	Couldn't save file. Confirm the disk has enough space and that it is free of errors.

Text zprávy

Nelze spustit e-mailovou aplikaci. Přesvědčte se, že tato aplikace byla správně nainstalovaná do vašeho počítače.	E-mail application could not be started. Confirm that it has been correctly installed on your computer.
Během běhu se objeví chyba: <POPIS CHYBY>. Běh bude pokračovat a zpráva bude zaznamenána v seznamu chyb v informacích o běhu.	Encountered an error during run: <ERROR DESCRIPTION>. The run will continue, and a message will be logged in the messages tab of Run Info.
Přístroj nebyl detekován. Prosím ujistěte se, že jste správně přístroj zapojili a že je přístroj zapnut.	Instrument was not detected. Please ensure you have correctly connected the instrument, and that the instrument is turned on.
Logování je v současné době zablokováno následkem předchozí chyby. Archivní záznamy nemohou být prohlíženy, dokud nebude software restartován.	Logging is currently disabled due to a previous error. Archived logs cannot be viewed until the software has been restarted.
Ne všechny vzorky mohou být normalizovány, protože fluorescenční hladiny mohly být příliš nízké.	Not all samples could be normalised as the fluorescent level was too low.
Pouze běhy vykonané na stejném rotoru jako současný běh mohou být importovány.	Only runs performed with the same rotor as the current run may be imported.
Všimněte si prosím, že logovací soubory (Log files) současného běhu nebudou k dispozici, dokud tento běh nebyl ukončen.	Please note that log files for the current run will not be available until it has completed.
Zadejte prosím platný počet opakování. Musí být víc než 0.	Please type valid number of times to repeat. It should be more than 0.
Došlo k problému při aktualizaci logovacích dat. Logování bylo zablokováno, ale bude odblokováno v příštím běhu.	Problem encountered while updating log data. Logging has been disabled, but will be reenabled on the next run
Podpis (signatura) souboru běhu zabezpečuje integritu vašich výsledků. Bližší informace o podpisování běhu naleznete v okénku Informace o běhu.	Run file signing ensures the integrity of your run results. Information about a run's signature can be found in the Run Info window.

Text zprávy

Identifikace vzorku (ID) je uzamčena. Není možné nic vkládat do uzamčených vzorků.	Sample ID is locked. Cannot paste over locked samples.
Software TeeChart Office nebyl na vašem počítači instalován. Přeinstalujte prosím software Rotor-Gene.	TeeChart Office has not been installed on this computer. Please re-install the Rotor-Gene software.
Není zvolen port COM konfigurován pro tento přístroj. Musíte zvolit port COM.	The COM port configured for the instrument is not selected. You must select a COM port.
Načtený soubor daného běhu obsahuje signaturu, která nesouhlasí s obsahem souboru. To znamená, že soubor je buď poškozen nebo s ním bylo manipulováno, jelikož byl napsán softwarem Rotor-Gene.	The loaded run file contains a signature which does not match the file contents. This means the file has either been corrupted, or tampered with since it was written by the Rotor-Gene software.
Načtený soubor daného běhu neobsahuje signaturu. Obsah tohoto souboru nemůže být zaručen.	The loaded run file has no signature. The contents of this file cannot be guaranteed.
Sériové číslo přístroje je neplatné. Sériová čísla musí být alespoň 6 číslic dlouhá.	The Machine serial number is not valid. Serial numbers must be at least 6 digits long.
Přístroj musí být ochlazen na <TEPLOTA> stupňů. Komora a povrch budou stále velmi horké, když otevřete přístroj. Buďte prosím velmi opatrní a noste ochranné rukavice, pokud se budete dotýkat kterékoli části přístroje nebo zkumavek.	The machine will now be cooled to <TEMPERATURE> degrees. The chamber and surfaces will still be very hot when opening the machine. Please exercise due caution and wear protective gloves if touching any of the surfaces or tubes.
Lokální nastavení vašeho počítače může být v rozporu s továrním nastavením. Přesvědčte se, že měna a numerická dělicí znaménka jsou správně zadána.	The regional settings for your computer are conflicting. Ensure your currency and numeric decimal placeholders are matching.
Sériové číslo vložené na úvodní stránce <SÉRIOVÉ ČÍSLO1> se liší od sériového čísla uloženého v přístroji <SÉRIOVÉ ČÍSLO2>. Sériové číslo počítače bylo nyní aktualizováno, aby se shodovalo s číslem připojeného přístroje.	The serial number entered in the welcome screen <SERIAL NUMBER1> does not match the serial number stored in the attached machine <SERIAL NUMBER2>. The computer's serial number has now been updated to match the connected machine.

Text zprávy

Došlo k problému v komunikaci se základnou. Provedte reboot vašeho počítače a operaci opakujte.	There was a problem communicating with the communication board. You should reboot the computer and then retry.
Došlo k přestávce během pokusů komunikovat s přístrojem. Přesvědčte se, že je správně zapojen.	There was a timeout attempting to talk to the instrument. Check it is correctly plugged in.
Tento úkon nemůže být prováděn ve virtuálním režimu.	This feature cannot be used in virtual mode.
Tento profilový soubor byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé části softwaru se nemusí načítat správně.	This profile file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly.
Tento soubor běhu byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé části softwaru se nemusí načítat správně.	This run file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the run may not load correctly.
Tento soubor vzorků byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé části softwaru se nemusí načítat správně.	This sample file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly.
Tento software může vykonávat základní simulaci přístroje pro školící a předváděcí účely. Toto nastavení můžete zablokovat na obrazovce Nastavení, do které můžete vstoupit přes menu soubory.	This software will perform basic simulation of a machine for training and demonstration purposes. You can disable this setting via the Setup screen, accessible from the File menu.
Tento templát byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé části softwaru se nemusí načítat správně.	This template was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the template may not load correctly.
Přístroj nemůže načíst soubor vzorků, protože rozložení zkumavek se neshoduje. Načtěte tyto vzorky před spuštěním běhu.	Unable to load this sample file as tube layouts do not match. Load these samples before starting the run.
Neschopnost spustit komunikaci s přístrojem, protože jiná aplikace používá <COMPORT>. Zkontrolujte, že neběží žádné jiné aplikace používající stejný sériový port a operaci opakujte.	Unable to open communications with the machine because another application is already using <COMPORT>. Check you do not have any applications running that use the same serial port, then retry.

Text zprávy

Během načítání souboru se objevily neopravitelné chyby. Soubor nebyl načten.	Unrecoverable errors were encountered while attempting to load the file. The file was not loaded.
Nemůžete zastavit program, když je běh spuštěn.	You cannot stop the program while the run is in progress.
Nemáte dostatečná práva používat software. Kontaktujte prosím administrátora domény za účelem nastavení skupin.	You have insufficient rights to use the software. Please contact the domain administrator to set up groups.
Musíte provést kvantifikační analýzu pro export vzorků.	You must have performed a quantitation analysis to export samples.
Před pokračováním musíte zvolit port COM.	You must select a COM port before continuing.
Váš běh nemohl být uložen na své výchozí umístění. V následujícím okně zvolte alternativní umístění pro váš běh.	Your run could not be saved to its default location. On the following window, select an alternative location to save your run.
Vaše nastavení bylo uloženo. Klikněte na OK pro opuštění softwaru.	Your settings have been saved. Click OK to close the software.
Než budete pokračovat, musíte zvolit rotor.	You must select a rotor before continuing.
Nemůžete spustit běh, dokud nezatrhnete políčko potvrzující, že byl umístěn uzamykací kroužek.	You cannot start the run until you tick the checkbox to confirm that the locking ring has been attached.

Zprávy týkající se automatické úpravy gain

Autogain adjustment messages

Manuální úprava gain používá kanály, které jste definovali ve svém profilu. Pokud jste ve vašem profilu nedefinovali žádné sběrné body, nemůžete provést manuální úpravy.	Manual gain adjustment uses the channels you have defined in your profile. As you have not defined any acquisition points in your profile, you cannot perform manual gain adjustment.
Teplota, kterou jste zadali, nebyla uložena, protože se nacházela mimo rozhraní vašeho přístroje. Zadejte prosím platnou teplotu.	The temperature you entered was not saved because it was outside the range of the machine. Enter a valid temperature.

Text zprávy

Editorské zprávy

Zadejte prosím platný kód skupiny. Skupinové kódy nesmí mít víc než 5 znaků a nesmí obsahovat mezery a čárky.

Zadejte prosím platné jméno skupiny. Jména skupin nesmí obsahovat čárky ani nesmí být prázdná.

Zprávy kalibrace optické denaturace

Přístroj není schopen nastavit optický denaturační bod z důvodu kalibračního selhání. Zadejte prosím platnou hodnotu vteřin. Musí se jednat o kladnou hodnotu.

Během kalibrace optické denaturace nelze stanovit horní bod tání. Toto může být z důvodu nesprávného výběru zkumavky pro kalibraci nebo byly zvoleny nesprávné chemikálie pro tento vzorek. Místo toho byl vykonán časovaný profil.

Zprávy týkající se OTV

Abyste mohli spustit běh, musíte vložit platné sériové číslo OTV.

Verifikační soubor pro teplotu je poškozen. Tuto chybu opravíte, když odinstalujete a znovu nainstalujete software Rotor-Gene.

Soubor tohoto běhu není správně signován. Výsledky nemohou být zobrazeny.

Nemůžete začít, dokud nebylo zatrženo políčko potvrzující, že fluorescenční vložka byla správně umístěna.

Životnost rotoru vypršela. Kontaktujte prosím vašeho dodavatele za účelem dodání nového rotoru.

Editor messages

Please enter a valid group code. Group codes must be a maximum of 5 characters, and contain no spaces or commas.

Please enter a valid group name. Group names cannot contain commas or be empty.

Optical denature calibration messages

Unable to set as optical denature point due to calibration failure. Please enter a valid number of seconds to hold. It should be a positive value.

A melt peak could not be detected during Optical Denature Calibration. This may be because the incorrect tube was selected for calibration, or that an inappropriate chemistry was used for this sample. A timed step profile was run instead.

OTV messages

You must enter a valid OTV serial number to perform the run

This temperature verification file has been corrupted. Please uninstall and re-install the Rotor-Gene software to correct this error.

This run file is not correctly signed. Results cannot be displayed.

You cannot start until you tick the checkbox to confirm that the fluorescent insert has been placed correctly.

This rotor has expired. Please contact your distributor to obtain a replacement.

Text zprávy**Zprávy týkající se menu zabezpečení**

Nelze otevřít okna manažera uživatele/skupiny.

Není možné vytvářet skupiny.

Není možné modifikovat přístup k zabudovaným účtům.

Security menu messages

Could not open the Windows user/group manager.

Could not create groups.

Cannot modify access of inbuilt accounts.

Menu analýzy

Zvolili jste pouze jeden kanál pro analýzu. Pro volbu více kanálů potáhněte obdélníkem okolo kanálů, které si přejete zobrazit v okénku volby analýz.

Zvolili jste více kanálů pro analýzu. Tato analytická technika umožňují analýzu pouze jednoho kanálu.

Analysis menu

You have only selected one channel for analysis. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window.

You have selected multiple channels for analysis. This analysis technique only allows single channels to be analysed.

Zprávy týkající se měření koncentrace

Měření koncentrace vykonává automatickou optimalizaci gain na pozici prvního rotoru. Přesvědčte se, že na pozici prvního rotoru máte nejvyšší koncentrační standard.

Concentration measurement messages

Concentration Measurement performs auto-gain optimisation on the first rotor position. Ensure you have your highest concentration standard in the first rotor position.

Zprávy týkající se koncové analýzy End-point analysis messages

Abyste mohli používat analýzu koncového bodu, musíte mít pozitivní a negativní kontrolu u každého kanálu. Pro definování těchto kontrol klikněte na OK.

To use end-point analysis you must have positive and negative controls in each channel. To define these controls click OK.

Nedefinovali jste žádné pozitivní kontroly. Musíte definovat pozitivní parametry pro každý kanál, který analyzujete.

You have not defined any positive controls. You must define positive controls for each channel you are analysing.

Nedefinovali jste žádné negativní kontroly. Musíte definovat negativní kontroly pro každý kanál, který analyzujete.

You have not defined any negative controls. You must define negative controls for each channel you are analysing.

Nedefinovali jste žádné NTC kontroly. Musíte definovat NTC kontroly pro každou skupinu

You have not defined any NTC controls. You must define NTC controls for each group.

Zprávy týkající se analýzy HRM

HRM analysis messages

Genotyp <NÁZEV GENOTYPU> nemá definované parametry.

Genotype <GENOTYPE NAME> does not have a control defined.

Duplicitní genotypové kombinace nejsou povoleny.

Duplicate genotype combinations are not allowed.

Tento přístroj nepodporuje tání vysokého rozlišení. Kontaktujte prosím svého distributora pro bližší informace.

High resolution melts are not supported on this instrument. Please contact your distributor for more information.

Zprávy týkající se analýzy tání

Melt analysis messages

Genotypy nemohou být definovány, dokud nebyly všechny subjekty umístěny. Definujte všechny subjekty a opakujte operaci.

The genotypes can not be defined until bins have been placed. Please define all bins and then try again.

Musíte vložit zkratku pro <NÁZEV GENOTYPU>.

You must enter an abbreviation for <GENOTYPE NAME> genotype.

Zprávy týkající se analýzy grafu rozptylu

Scatter plot analysis messages

Analýza rozptylového grafu vyžaduje volbu přesně dvou kanálů. Pokud chcete zvolit více kanálů, potáhněte obdélníkem okolo kanálů, které si přejete ukázat v okně volby analýz nebo klikněte na každý kanál za současného držení klávesy SHIFT.

Scatter plot analysis requires exactly 2 channels to be selected. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window, or click while holding the SHIFT key on each channel.

Zprávy týkající se kvantitativní analýzy

Quantitation analysis messages

Funkce automatického nalezení prahu vyžaduje, abyste definovali alespoň dva zvolené standardy. Nastavíte je tak, že kliknete pravým tlačítkem myši na seznam vzorků a zvolíte „Editovat vzorky“.

The auto-find threshold feature requires that you have defined at least 2 selected standards. To set this up, right-click on the sample list and select “Edit Samples...”

13 Slovník použitých termínů

Termíny	Popis
Acquisition	Akvizice je sbírání fluorescenčních dat. Každá akvizice (sada fluorescenčních dat) z kanálu je zobrazena v softwaru jako série neanalyzovaných dat v okně „Raw channel“. Tato data mohou být analyzována pomocí možností v menu „Analysis“ (Analýza).
Bins	V analýze tání jsou biny nastaveny pro definování oblastí, kde je očekáván výskyt vrcholu tání. Genotypy mohou být definovány na základě výskytu vrcholů v určitých binech nebo jejich kombinací.
CE-IVD	Shoda s evropským nařízením 98/79/EC týkající se zdravotnických přístrojů pro diagnózu in vitro.
Channel	Kanál se skládá z diody emitující světlo (LED) s excitačním filtrem spárovaným s emisním filtrem. LED a excitační filtr excitují vzorky v určité vlnové délce. Vzorky emitovaná fluorescence prochází přes emisní filtr a následně je detekována fotonásobičem.
Gain	Rotor-Gene Q MDx používá multiplikátor ke sběru fluorescenčních fotonů a konvertuje je do elektronických signálů. „Gain“ je nastavení, které určuje senzitivitu fotonásobiče. Když je gain nastaven příliš vysoko, signál je přesycen. Když je gain nastaven příliš nízko, je nemožné rozlišit signál od šumu pozadí.
Gain optimisation	gain optimisation je proces, který dynamicky upravuje nastavení výnosu a umožňuje volbu správného nastavení s optimální detekcí signálu.
Loading block	Loading bloky jsou hliníková tělesa dodávaná v různých formátech, která se používají pro uložení zkumavek nebo Rotor-Disců během nastavení reakce. Vkládací bloky Rotor-Disců se také používají s teplotními těsněními Rotor-Disc Heat Sealer.
Locking ring	Locking rings jsou kovové kroužky, které sedí na rotoru a zabraňují zkumavkám a víčkům v uvolnění během provozu přístroje rotoru-Gene MDx. Uvolněná víčka a zkumavky by mohly zavinit poškození přístroje.
Rotor	V kovovém rotoru Rotoru-Gene Q jsou uloženy zkumavky nebo Rotor-Disky. Tím je umožněna rotace (odstředování) vzorků v komoře přístroje a zajištěno, že vzorky jsou správně alignovány (osově zarovnaný) s optickým systémem.
Rotor-Disc	Rotor-Disky jsou kruhové desky s vertikálně orientovanými reakčními jamkami. Rotor-Disky jsou dodávány ve verzích pro 72 nebo 100 reakcí. Rotor-Disky jsou utěsněny pomocí zatavovacího filmu Rotor-Disc Heat Sealing Film a Rotor-Disc Heat Sealer.

Slovník použitých termínů

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

Příloha A

Technická data

Firma QIAGEN si vyhrazuje právo kdykoliv změnit specifikace.

Environmentální podmínky

Provozní podmínky

Napájení	100–240 V AC, 50–60Hz, 520 VA (max) Spotřeba elektřiny 8 VA (standby) Fluktuace elektrické sítě nesmí přesáhnout 10% nominálního napájecího napětí.
Pojistka	F5A 250 V pojistka
Disipace tepla/	Průměr: 0,183 kW (632 BTU/hodinu) (1 BTU = 1 055 Joulů)
Termální zatížení	Max.: 0,458 kW (1578 BTU/hodinu)
Kategorie přetížení napětí	II
Teplota vzduchu	18 to 30°C (64 až 86°F)
Relativní vlhkost	10–75% (nekondenzující)
Nadmořská výška	Až 2000 m (6500 stop)
Umístění přístroje	Pouze pro vnitřní použití
Stupeň znečištění	2
Environmentální třída	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

Přepravní podmínky

Teplota vzduchu	–25°C až 60°C (–13°F to 140°F) v továrním kontejneru
Relativní vlhkost	Max. 75% (nekondenzující)
Environmentální třída	2K2 (IEC 60721-3-2)

Skladovací podmínky

Teplota vzduchu 15°C až 30°C (59°F to 86°F) v kontejneru výrobce

Relativní vlhkost Max. 75% (nekondenzující)

Environmentální 1K2 (IEC 60721-3-1)
třída

Mechanická data a vlastnosti hardwaru

Rozměry	Šířka: 37 cm (14,6 in.)
	Výška: 27,5 cm (10,8 in.)
	Hloubka (bez kabelu): 42 cm (16,5 palců)
	Hloubka (s otevřenými dveřmi): 56 cm (22 palců)
Váha	12 kg (26,5 liber) standardní konfigurace
Kapacita	Až 100 vzorků na jeden běh při použití Rotor-Disc 100
Software	Rotor-Gene Q software (verze 2.0.2 nebo vyšší), dodaná se zásilkou na instalačním CD.

Teplotní specifikace

Popis	Specifikace
Rozmezí teploty	35°C až 99°C (95°F až 210,2°F)
Přesnost teploty	±0,5°C
Teplotní rozlišení	±0,02°C (nejmenší programovatelný krok)
Teplotní uniformita	±0,02°C (standardní odchylka)

Optické specifikace

Popis	Specifikace
Zdroje excitace	Vysokoenergetické dioda emitující světlo
Detektor	Fotomultiplikátor
Akviziční čas	4 s

Prohlášení FCC

„Federální komunikační komise Spojených států“ (USFCC , článek 47 CRF 15. 105) prohlásila, že uživatelé tohoto výrobku musí být informováni o následujících skutečnostech a okolnostech.

“Tento přístroj je ve shodě se sekci 15 FCC:

Provoz musí splňovat následující dvě podmínky: (1) Tento přístroj nesmí zapříčinit škodlivou interferenci a (2) tento přístroj musí být schopen akceptovat každou interferenci, včetně interference, která by mohla mít nežádoucí účinky.”

“Tento přístroj třídy B je v souladu s kanadskými předpisy ICES-0003.”

Následující prohlášení se vztahuje na výrobky popsané v této příručce, pokud není uvedeno jinak. Prohlášení pro jiné výrobky jsou uvedena v příslušné přiložené dokumentaci.

Poznámka: Toto zařízení bylo testováno a shledáno v souladu s limity pro digitální zařízení třídy B ve shodě se sekci 15 pravidel FCC a v souladu se všemi požadavky kanadských standardů pro digitální zařízení, způsobující interferenci podle standardu ICES-003. Tyto limity mají za úkol poskytovat oprávněnou ochranu proti škodlivé interferenci v obydlených oblastech. Toto zařízení generuje, používá a může vyzařovat rádiové elektromagnetické energie a pokud není správně instalováno a používáno v souladu s instrukcemi, může zavinit škodlivou interferenci s rádiovými komunikacemi. Nelze však zaručit, že nedojde k interferenci v té které lokalitě. Pokud toto zařízení bude interferovat s rádiovým nebo televizním příjmem, což může být zjištěno zapnutím a vypnutím přístroje, doporučujeme uživatelům vyzkoušet jeden nebo více z následujících kroků za účelem odstranění této interference:

- Přesměrujte nebo přemístěte anténu.
- Zvětšete vzdálenost mezi přijímačem a přístrojem.
- Zapněte přístroj do zásuvky, která je zapnuta na jiný okruh než přijímač.

Poradte se s dodavatelem nebo zkušeným technikem z oboru rádio/T.V.

Firma QIAGEN GmbH Německo, nenese žádnou zodpovědnost za žádnou radiovou ani televizní interferenci způsobenou neoprávněnými modifikacemi na tomto zařízení nebo za náhradní nebo připojené spojovací kabely a zařízení, které nejsou specifikované firmou QIAGEN GmbH, Německo. Opravy takových interferencí způsobené neoprávněnými modifikacemi, nahrazeními nebo přidavnými zařízeními spadá do zodpovědnosti uživatele.

Prohlášení o shodě

Declaration of Conformity

Name and address of the company

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
D-40724 Hilden
Germany

We herewith declare that the product

Rotor-Gene Q MDx

Accessories: **Rotor-Gene Heat Sealer**

meets all applicable requirements of the European Directive on

In vitro diagnostic medical devices (IVDD)

98/79/EC

Classification

Other Device, Annex III

Hombrechtikon, 01 November 2010



Pit Muggli

Senior Director Quality & Compliance Automated Systems



KON-00000051-A

Sample & Assay Technologies

Firma QIAGEN prohlašuje, že výše uvedený výrobek a všechny jeho součásti jsou v souladu se všemi aplikovatelnými požadavky výše uvedených evropských předpisů a klasifikací

Odpad z elektrických a elektronických zařízení (WEEE)

Tato sekce uvádí informace o likvidaci elektrického a elektronického odpadu pro uživatele v Evropské unii.

Evropské nařízení 2002/96/EC týkající se WEEE, vyžaduje správnou likvidaci elektrického a elektronického zařízení po ukončení jejich životnosti. Symbol přeškrtnuté popelnice (viz ilustrace níže) indikuje, že tento výrobek nesmí být likvidován s běžným odpadem; musí být doručen na patřičné místo nebo na úředně schválené recyklační centrum, jak to nařizují vaše lokální zákony. Zvláštní sběrná a recyklační centra sběru elektronického zařízení po ukončení jejich životnosti, pomáhá chránit přírodní zdroje a zajišťuje, že výrobek je recyklován způsobem, který chrání zdraví a životní prostředí.



Firma QIAGEN přijímá plnou zodpovědnost, v souladu se specifickými požadavky WEEE, a v případě výměny výrobku dodávaného firmou QIAGEN, poskytuje bezplatnou recyklaci veškerého elektronického zařízení v Evropě označeného WEEE. Pokud není náhradní výrobek zakoupen od firmy QIAGEN, recyklace může být provedena na žádost zákazníka za poplatek. Pokud chcete recyklovat elektronické zařízení, kontaktujte prosím vašeho lokálního distributora firmy QIAGEN, který vám dodá vyžadované formuláře. Poté co vyplníte náležitý formulář, budete kontaktováni firmou QIAGEN a budete informováni o krocích, které musíte podniknout, nebo vám sdělíme náklady recyklace.

Příloha B

Tato příloha detailně popisuje použité matematické metody.

Kvantifikace

Vypočítané koncentrace jsou získány z jednoduchého lineárního regresivního modelu odvozeného ze známých hodnot logaritmických koncentrací (x) a experimentálních hodnot CT (y).

Logaritmické koncentrace a hodnoty CT standardu jsou použity ke konstrukci následujícího modelu:

$$y = Mx + B$$

Intervaly spolehlivosti pro vypočítané koncentrace

Pro odhad nového výskytu x_0 ze standardní křivky používáme následující interval spolehlivosti $100(1 - \alpha)\%$.

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Toto je interval spolehlivosti pro koncentraci jedné neznámé.

Předpokládejme, že máme k pozorování v $x = x_0$ a že označíme průměr \bar{Y}_0 .
Potom

$$\bar{Y}_0 \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_0, \frac{\sigma^2}{k})$$

postupem jako výše

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Tento vzorec určuje, jak jsou determinovány intervaly spolehlivosti pro koncentrace neznámých replikátů.

Pro odhad standardů může být získán užší interval spolehlivosti:

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Tento vzorec implikuje, že přidání replikátů do standardní individuální koncentrace redukuje šířku intervalu pro všechny odhady s tím, jak se zvyšuje n . Přidání velkého počtu replikátů k neznámé redukuje nejistotu až do hodnoty jediného standardu. Tyto přidané replikáty redukují nejistotu díky tomu, že neznámá tvoří část lineárního modelu.

Intervaly spolehlivosti pro hodnoty C_T

Předpokládáme, že chyba v hodnotách C_T replikátů je lineární a má normální distribuci.

Z tohoto důvodu používáme interval spolehlivosti jednoho vzorku t . Zvolíme μ za střední hodnotu C_T replikátů.

$(x_0 \dots x_{n-1})$. Potom je interval spolehlivosti $100(1-\alpha)\%$ pro C_T hodnotu μ :

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

Děkujeme tímto panu Peter Cokovi z matematického oddělení Univerzity NSW, Sydney, Austrálie, jehož pomoc byla neocenitelná při ověřování matematických pos

Příloha C

Výrobek Rotor Gene MDx, příslušenství a spotřební zboží

Výrobek	Obsah	Č. kateg.
Rotor-Gene Q MDx 2plex	Real-time PCR cykler s dvěma kanály (zelený, žlutý), přenosný počítač, software, příslušenství, jednoroční záruka na součástky a práci.	Zavolejte nám
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM	Real-time PCR cykler s HRM, s 2 kanály (zelený, žlutý) plus kanálem HRM, přenosný počítač, software, příslušenství, jednoroční záruka na součástky a práci.	Zavolejte nám
Rotor-Gene Q MDx 5plex	Real-time PCR cykler, s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový), přenosný počítač, software, příslušenství, jednoroční záruka na součástky a práci.	Zavolejte nám
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Real-time PCR cykler s HRM, s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus kanálem HRM, přenosný počítač, software, příslušenství, jednoroční záruka na součástky a práci.	Zavolejte nám
Rotor-Gene Q MDx 6plex	Real-time PCR cykler se 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový), včetně přenosného počítače, softwaru, příslušenství, jednoroční záruky na součástky a práci.	Zavolejte nám
Příslušenství		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Sada obsahuje: 2 Rotor-Disc 100 packs, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing film, , Rotor-Disc 100 Rotor and Locking Ring, Rotor-Disc 100 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Zavolejte nám
Rotor-Disc 100 (30)	30 individually wrapped discs for 3000 reactions	981311
Rotor-Disc 100 (300)	10 x 30 individually wrapped discs for 30,000 reactions	981313

Příloha C

Výrobek	Obsah	Č. kateg.
Rotor-Disc 100 Rotor	For holding Rotor-Disc 100 discs in the Rotor-Gene Q MDx; requires Rotor-Disc 100 Locking Ring	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	For locking a Rotor-Disc 100 in the Rotor-Disc 100 Rotor .	9018896
Rotor-Disc 100 Loading Block	Aluminum block for manual and automated reaction setup in Rotor-Disc 100 discs	9018909
Rotor-Disc Pipetting Aid	Aid for marking well during manual reaction setup on a Rotor-Disc Loading Block	9018897
Rotor-Disc Heat Sealer	Heat sealing instrument for use with Rotor-Discs; requires Rotor-Disc 72 or 100 Loading Block.	9018898
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	60 films for sealing Rotor-Disc 100 or Rotor-Disc 72 discs	981601
Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	10 x 60 films for sealing Rotor-Disc 100 or Rotor-Disc 72 discs	981604
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Sada obsahuje: 3 Rotor-Disc 72 packs, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 72 Rotor and Locking Ring, Rotor-Disc 72 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Zavolejte nám
Rotor-Disc 72 (24)	24 individually wrapped discs for 1728 reactions	981301
Rotor-Disc 72 (240)	10 x 24 individually wrapped discs for 17,280 reactions	981303
Rotor-Disc 72 Rotor	For holding Rotor-Disc 72 discs in the Rotor-Gene Q MDx; requires Rotor-Disc 72 Locking Ring	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	For locking a Rotor-Disc 72 in the Rotor-Disc 72 Rotor	9018900
Rotor-Disc 72 Loading Block	Aluminum block for manual and automated reaction setup in Rotor-Disc 72 discs	9018910
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips of 4 tubes and caps for 1000 reactions	981103

Výrobek	Obsah	Č. kateg.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips of 4 tubes and caps for 10,000 reactions	981106
72-Well Rotor	For holding Strip Tubes and Caps, 0.1 ml; requires Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	For locking Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, in the 72-Well Rotor	9018904
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction setup with a single-channel pipet in 72 x 0.1 ml tubes.	9018901
Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel	Aluminum block for reaction setup with multichannel pipets in 72 x 0.1 ml tubes	9018902
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 thin-walled tubes for 1000 reactions	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 thin-walled tubes for 10,000 reactions.	981008
36-Well Rotor	For locking PCR Tubes, 0.2 ml, in the 36-Well Rotor	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	For locking PCR Tubes, 0.2 ml, in the 36-Well Rotor	9018906
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction setup in a standard 8 x 12 array using 96 x 0.2 ml tubes	9018905
Rotor-Disc OTV Kit	Kit for optical temperature verification of Rotor-Gene systems, includes a Rotor-Disc preloaded with thermochromatic liquid crystals, fluorescent inserts, CD with calibration files; requires Rotor-Disc 72 Rotor and Locking Ring or Rotor-Disc 72 Starter Kit	981400
Rotor Holder	Metal free-standing holder for assembling tubes and Rotor-Discs into rotors.	9018908
Certifikované sady QIAGEN CE-IVD doporučené pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx*		

* Bližší informace o rozměrech dalších sad najdete na www.qiagen.com.

Výrobek	Obsah	Č. kateg.
Detekce patogenů		
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: 2 Masters, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4513265
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, 5 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4506265
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, Mg-Solution, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4503265
<i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4501265
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4502265
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Magnesium Solution, Water (PCR grade)	4514265
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, Mg Solution, 2 Positive Controls, Internal Control, Water (PCR grade)	4500265
<i>artus</i> M.tuberculosis RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, Mg Solution, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4555265
<i>artus</i> C.trachomatisPlus RG PCR Kit (96) CE	For 96 reactions on Rotor-Gene Q instruments: Master, Mg-Solution, Positive Control, Negative Control, Water (PCR grade)	4559265

Genetická analýza

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	For 24 reactions: 1 Control Assay, 7 Mutation Assays, Positive Control, Taq DNA Polymerase	870111
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Coming soon	Zavolejte nám

Pro aktuální informaci o licencování a odpovědnosti za výrobky konzultujte příslušné příručky a uživatelské manuály od firmy QIAGEN. Uživatelské příručky QIAGEN jsou k dispozici na www.qiagen.com nebo je můžete poptat od technických služeb firmy QIAGEN nebo vašeho lokálního dodavatele.

Příloha D

Klauzule o zodpovědnosti

Firma QIAGEN je zproštěna všech povinností uvedených v záruce v případě, že opravy nebo modifikace byly provedeny osobami jinými než pověřenými, kromě případů, kdy firma QIAGEN dala písemný souhlas k vykonání takových oprav či modifikací.

Všechny součástky a materiály, které byly vyměněny či nahrazeny v době trvání záruky, jsou pod zárukou pouze po dobu trvání původní záruční doby, a v žádném případě neprodlužují původní záruční lhůtu, pokud tak není výslovně specifikováno zástupcem naší firmy. Veškerá zařízení, rozhraní a příslušný software jsou pod zárukou pouze po dobu specifikovanou původním výrobcem těchto produktů. Prohlášení a záruky vyslovené jakoukoli osobou, včetně zástupců firmy QIAGEN, které jsou inkonzistentní nebo v rozporu s podmínkami v této záruce nebudou vnímány jako závazné pro firmu QIAGEN, pokud nejsou doloženy písemně a schváleny zástupcem firmy QIAGEN.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdnou

Rejstřík

A

Adjust scale 7-2
Advanced wizard 6-5
Akvizice - sběr fluorescencenčních dat v
kanálech 6-13
Alelická diskriminace 7-40
Archív záznamu 12-1
Auditorské záznamy 7-77
Autoscale 7-2
AutoStat 7-21

B

Běh
uložení 7-6
zahájení 7-6
Běh
nový 7-6
Běh
začátek 7-54
Běh
pozastavení 7-54
Běh
zastavení 7-54
Běh
nastavení 7-54
Běh
signatury 7-79
Bezpečnost
biologická 1-4
elektrická 1-3
chemická 1-5
likvidace odpadu 1-5
mechanická rizika 1-5
riziko přehřátí 1-7
rotor 1-6
správné používání 1-1
toxické výpary 1-5
údržba 1-7
vzorky 1-4

C

Correlation coefficient 7-13
Crop cycles 7-3
Ct Comment 7-19
Cyklování 6-12

D

Default scale 7-2
Delta delta C_T relativní kvantitace 7-31
Dynamická normalizace ve zkumavce 7-
22, 7-42

E

Editace okna vzorků 7-60
styl rotoru 7-64
Editace profilového okna 6-27
Editování profilového okna 6-10
Efficiency 7-13
Empty run 6-7
EndPoint, analýza 7-43
kontrola 7-46
Exponenciální amplifikace 7-26
Export
data 8-4
grafy 8-2
LinReg 7-7
původní formát 8-3

F

Fluorescenční kanály 7-1

G

Gain
nastavení 7-83
Genotypy
alelická diskriminace 7-41
bodový graf, analýza 7-42
endpoint, analýza 7-44
EndPoint, analýza 7-50
křivka tání, analýza 7-36
Graf teploty 7-58

H

Hardware
provoz 5-1
Hold 6-11
HRM
advanced wizard 6-7
analýza 7-53, 11-1, 11-16
cyklus 6-16
genotypování SNP 11-3

- kity 11-3
- metylační analýza 11-5
- PCR v reálném čase 11-15
- pokyny 11-7
- primer-dimery 11-16
- quick start wizard 6-2
- řešení problému 12-1
- software 11-8
- Hybridizace 6-15

CH

- Chladicí blok 5-4
- Chybové hlášení 12-3

I

- Ignore First 7-42
- Ignorování začátku 7-23
- Instalace 4-1
 - hardware 4-5
 - požadavky na napájení 4-2
 - požadavky na umístění 4-1
 - požadavky pro PC 4-2
 - požadavky pro uzemnění 4-2
 - software 4-6
- Intervaly spolehlivosti 13-2

K

- Kalibrační vzorek, replikáty 7-39
- Kanály 7-56
- Klíč, ikona 8-5
- Komparativní kvantifikace 7-37
- Koncentrace, analýza 7-51
- Koncentrační analýza
 - standards 7-51
- Korekce sklonu šumu 7-23
- Křivka tání, analýza
 - bins 7-36
 - peaks 7-35
- Křivka tání, analýza 7-34
- Křivka tání, výsledky 7-36
- Kvantifikace 13-1
- Kvantitativní analýza 7-11

L

- Likvidace odpadu 1-5
- LinReg
 - export 7-7
- Long Range 6-13

M

- Maintenance
 - advanced wizard 6-7

Menu

- analýza 7-9
- běh/run 7-54
- dispej - možnosti 7-67
- gain 7-83
- náhled 7-54
- okno 7-83
- pomoc 7-84
- soubory 7-5
- zabezpečení 7-68
- Měření koncentrace nukleové kyseliny 6-2
- Měření koncentrace nukleové kyseliny 7-51
- Metoda dvou standardních křivek 7-27
- Možnosti přístroje 7-55

N

- Nastavení 7-8
- Nastavení citlivosti 6-9
- Nastavení reakce 5-4
- Normalizace
 - dynamická ve zkumavce 7-22, 7-42
 - EndPoint, analýza 7-47
- Normalization 7-2

O

- Odstranění krajních hodnot 7-23
- Operace
 - podmínky 1-4
- Optická verifikace teploty 10-1
- Optické denaturační cyklování 6-16
- Optický systém 3-3
- Optimalizace Gainu 6-21
 - manuální 6-26
- OTV 10-1
- Ovládací lišta 7-1

P

- Page 7-3, 7-4, 7-62
- Perform last run 6-2, 6-7
- Podpora 7-84
- Port 4-8, 7-9
- Profil, progress 7-59
- Prostředí 1-4
- Provoz
 - podmínky 1
 - software 6-1
- Přepínač 7-3
- Přeprava 1

Q

Quantitation results 7-18
Quenched FRET 6-2
Quick start wizard 6-1

R

Report browser 7-8
Report Browser 7-12
Reporty
 browser window 7-36
Rotor
 36-jamkový 5-1
 72-jamkový 5-2
 Rotor-Disk 100 5-3
 Rotor-Disk 72-jamkový 5-2
 specifikace 5-3
 typy 5-1
 volba 6-2, 6-7
Rotor-Disk
 nastavení 5-6
 tepelné zatavení 5-6
Rotor-Disk 100 5-3
Rotor-Disk 72 5-2
Rotor-Gene MDx 10-1
Rozptylový graf, analýza 7-41
Řešení problému
 HRM 12-1
 Rotor-Gene Q MDx 12-3
Řešení problémů 12-1

S

Sample types 7-62
Sériové číslo 4-8
Skladování 2
Sklon 7-26
Sklon šumu - korekce 7-42
Skupiny 7-66
Software
 aktualizace 4-11
 chybové hlášení 12-9
 verze 4-9
specifikace
 optická 2
Specifikace
 hardware 2
 teplotní 2
Standardní křivka 7-12
 export 7-15
 import 7-16
 metoda dvou standardních křivek 7-27
 overlay 7-15
 rovnice 7-14

výpočet 7-15

vzorec 7-26

Stupnice 8-1

Symboly 1-8

Šablony

 advanced wizard 6-7

 alelická diskriminace 7-41

 alelická diskriminace 8-1

 bodový graf, analýza 7-43

 bodový graf, analýza 8-1

 endpoint analýza 8-1

 EndPoint, analýza 7-50

 kvantifikace 8-1

 kvantitativní analýza 7-27

 quick start wizard 6-2

 tání, analýza 8-1

 tání, analýzy 7-37

T

Tání 6-15

TeeChart Office 8-5

Technická pomoc 2-1

Termální výkon 3-1

Three step with melt 6-2, 6-7

Threshold 7-17

Touchdown 6-13

Two step 6-2, 6-7

U

Účinnost 7-26

Údržba 9-1

Upozornění 1-1

Úprava profilového okna 6-3

Uzamčení

 šablony 7-82

 vzorky 7-80

Uzamykací kroužek

 72-jamkový rotor 5-2

 Rotor-Disk 100 5-3

 Rotor-Disk 72-jamkový 5-2

Uzamykací kroužek

 36-jamkový rotor 5-1

Uživatel

 určení rolí 7-72

 více účtů 7-76

 vytvoření účtu 7-69

V

Varování 1-1

Verze 2-2

Vhodnost 7-65

Vhodnost stránky vzorku 7-65

Rejstřík

Virtual mode 7-9
Virtuální režim 4-8
Vybalení 4-3
Výpočet CT 7-17
Využití přístroje 2-2
Vzkazy 7-56
Vzorky

příprava 11-8

Z

Zabezpečení 7-58, 7-68
Zkumavky, rozložení 7-57

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999