ABI PRISM® 7900HT

Real-Time PCR systém a databáze SDS Enterprise

Uživatelská příručka

Ovládání a údržba

Applied Biosystems

ABI PRISM® 7900HT

Real-Time PCR systém a databáze SDS Enterprise

Uživatelská příručka

Applied Biosystems

© Copyright 2003, Applied Biosystems. Všechna práva vyhrazena.

Pouze pro výzkumné účely. Není určeno pro diagnostické účely.

Informace obsažené v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího oznámení. Společnost Applied Biosystems nepřijímá žádnou zodpovědnost za chyby, které se mohou v tomto dokumentu objevit. V okamžiku svého vydání je tento dokument pokládán za kompletní a přesný. Společnost Applied Biosystems není v žádném případě zodpovědná za náhodné, zvláštní, opakované nebo následné škody, vzniklé ve spojení s tímto dokumentem nebo v přímé souvislosti s jeho používáním.

AUTORIZOVANÝ TEPLOTNÍ CYKLER: Tento Real-Time PCR systém ABI PRISM® 7900HT, výrobní číslo_____ spolu s bloky na vzorky (tyto bloky lze okamžitě připojit) představuje autorizovaný teplotní cykler. Kupní cena systému zahrnuje zálohový licenční poplatek vztahující se k patentům U.S. Patent č. 4,683,195, 4,683,202 a 4,965,188 ve vlastnictví společnosti Roche Molecular Systems, Inc., a k nárokům vyplývajícím z odpovídajících patentů platných mimo území USA, vlastněných společností F. Hoffmann_La Roche Ltd, které se týkají procesu polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction - "PCR") a jeho využití pro interní výzkumné a vývojové účely za použití tohoto přístroje. Průběžné licenční poplatky lze zakoupit od společnosti Applied Biosystems nebo získat používáním autorizovaných reagencií. Tento přístroj je rovněž autorizovaným teplotním cyklerem pro provádění procesů licencovaných společností Applied Biosystems. Používáním tohoto přístroje spolu s autorizovanými reagenciemi je poskytována omezená licence na proces PCR v souladu s ochrannými známkami takových reagencií. Koupě přístroje sama o sobě nepředstavuje udělení úplné licence uživateli nebo práva provádět PCR. Další informace týkající se koupě licencí na provádění procesu PCR podá Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

LICENČNÍ UJEDNÁNÍ: Žádná práva jakéhokoliv použití, včetně použití v in vitro diagnostice, nejsou tímto udělena, ať již výslovně nebo nepřímo, podle žádného patentu nebo patentové přihlášky týkající se homogenních metod detekce nebo metod detekce v reálném čase (real_time), včetně patentů pokrývajících metody používané ve spojitosti s procesem PCR nebo jiným amplifikačním procesem. 5' nukleázová detekční esej a určité další homogenní nebo v reálném čase prováděné amplifikační a detekční metody jsou chráněny U.S. patenty č. 5,210,015, 5,487,972, 5,804,375 a 5,994,056 ve vlastnictví společnosti Roche Molecular Systems, Inc.; odpovídajícími patenty a patentovými přihláškami platnými mimo území USA ve vlastnictví společnosti F. Hoffmann_La Roche Ltd; a U.S. patenty č. 5,538,848 a 6,030,787 a odpovídajícími patenty a patentovými přihláškami platnými mimo území USA ve vlastnictví společnosti Applera. Koupě tohoto přístroje nepředstavuje udělení licence uživateli nebo práv vyplývajících ze zmíněných patentů.
Používání těchto a dalších patentovaných postupů ve spojitosti s PCR vyžaduje licenci. Další informace týkající se získání licencí podá Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 nebo The Licensing Department, Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California, 94501.

UPOZORNĚNÍ PRO KUPUJÍCÍHO: VÍCE INFORMACÍ O LICENCI A LICENČNÍCH UJEDNÁNÍCH NALEZNETE V UŽIVATELSKÉ PŘÍRUČCE K DATABÁZI SDS ENTERPRISE.

JpegEncoder – Licenční prohlášení

JpegEncoder je chráněn autorským právem Copyright © 1998, James R. Weeks a BioElectroMech. Na vývoji tohoto programu se částečně podílela i Independent JPEG Group.

Další šíření a používání zdrojového kódu nebo binární formy programu, v modifikované nebo nemodifikované podobě, je možné za dodržení následujících podmínek:

1. Spolu se zdrojovým kódem musí být šířeno shora uvedené oznámení o autorských právech, tento seznam podmínek, všechny soubory připojené ke zdrojovému kódu a následující prohlášení.

2. Spolu s binární formou programu musí být šířeno shora uvedené oznámení o autorských právech, tento seznam podmínek a následující prohlášení.

TENTO PROGRAM (JpegEncoder) JE POSKYTOVÁN VE STAVU 'TAK JAK JE" A JAKÉKOLIV VÝSLOVNÉ NEBO NEPŘÍMÉ ZÁRUKY, VČETNĚ, ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ, ZÁRUK PRODEJNOSTI NEBO VHODNOSTI PRO URČITÝ ÚČEL, NEJSOU POSKYTOVÁNY. ZA ŽÁDNÝCH OKOLNOSTÍ NENÍ AUTOR NEBO OSOBY PODÍLEJÍCÍ SE NA VZNIKU PROGRAMU ZODPOVĚDNÝ ZA PŘÍMÉ, NEPŘÍMÉ, NÁHODNÉ, ZVLÁŠTNÍ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY (VČETNĚ, ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ, POVINNOSTI DODÁVKY NÁHRADNÍHO ZBOŽÍ NEBO SLUŽEB; KOMPENZACE ZTRÁTY VZNIKLÉ V DŮSLEDKU POUŽÍVÁNÍ, ZTRÁTY DAT NEBO UŠLÉHO ZISKU NEBO NARUŠENÍ OBCHODNÍCH VZTAHŮ) ZPŮSOBENÉ V JAKÉKOLIV SOUVISLOSTI S POUŽÍVÁNÍM TOHOTO PROGRAMU, A TO ANI PO VAROVÁNÍ O MOŽNOSTI TAKOVÉ ŠKODY.

OBCHODNÍ ZNÁMKY:

ABI PRISM, Applied Biosystems, MicroAmp, Primer Express a VIC jsou registrované obchodní známky společnosti Applera nebo jejích poboček v USA a/nebo v jiných zemích.

AB (Design), ABI PRISM, Applera, Assays-by-Design, Assays-on-Demand, FAM, JOE, NED, ROX, TAMRA a TET jsou obchodní známky společnosti Applera nebo jejích poboček v USA a/nebo v jiných zemích.

AmpErase, AmpliTaq Gold, GeneAmp a TaqMan jsou registrované obchodní známky společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR je registrovaná obchodní známka společnosti Molecular Probes, Inc.
Twister je registrovaná obchodní známka společnosti Zymark.

Windows a Windows NT jsou registrované obchodní známky společnosti Microsoft.
Všechny ostatní obchodní známky jsou výhradním vlastnictvím svých oprávněných majitelů.

Dokument č. 4317596 Rev. C
10/2003

Obsah

Předmluva

Jak používat tuto příručku xi
Kde získat více informací xii
Kde získat pomoc xii

Bezpečnost a elektromagnetická kompatibilita (EMC)

Bezpečnostní upozornění používaná v tomto dokumentu xiv
Symboly na přístrojích xv
Bezpečnostní označení na přístrojích xvi
Obecná pravidla bezpečnosti při práci s přístrojem xvii
Bezpečná manipulace s chemikáliemi xviii
Bezpečná manipulace s chemickým odpadem xix
Bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními xx
Pohyblivé součásti xxi
Biologické riziko xxi
Bezpečná manipulace s laserem xxi
Bezpečná manipulace s laserem čtečky čárových kódů xxii
Bezpečná práce xxii
Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC) xxiii

Kapitola 1 Přehled

Popis systému 1-2

Část 1.1 Poznáváme hardware 1-3
Přístroj 7900HT 1-4
Počítač 1-7
Čtečky čárových kódů 1-8
Podavač mikrodestiček Zymark Twister 1-9
Spotřební materiál 1-10
Zapojení přístroje 1-11

Část 1.2 Poznáváme software 1-13
Jednotlivé součásti softwaru 1-14
Program SDS - soubory a jejich formáty 1-15
Správa dat 1-17

Část 1.3 Databáze SDS Enterprise 1-21
O databázi SDS Enterprise 1-22
O softwaru databáze SDS Enterprise 1-25
Koncepce databáze a správa dat 1-27
Podpora dokumentace API 1-28

Kapitola 2 Začínáme

Začínáme 2-2
Zapnutí přístroje 7900HT 2-4
Používání programu SDS 2-6
Základní dovednosti pro ovládání programu - cvičení 2-9
Poznámky pro uživatele databáze 2-10
Lekce 1: Používání dokumentů destiček 2-11
Lekce 2: Zobrazování a změna velikosti panelů 2-20
Lekce 3: Zobrazení destičky 2-22
Lekce 4: Používání ruční čtečky čárových kódů 2-26
Lekce 5: Používání kontextových nabídek 2-27
Lekce 6: Používání klávesových zkratek 2-27
Používání dokumentů SDS 2-28

Kapitola 3 Příprava běhu

Poznámky pro uživatele databáze 3-2
Dříve než začnete 3-3
Přehled 3-4
Rychlé opakování: Zapnutí přístroje 7900HT 3-7
Krok 1 – Vytvoření dokumentu destičky 3-8
Krok 2 – Přidání detektorů a markerů 3-9
Krok 3 – Nastavení úlohy detektorů 3-14
Krok 4 – Nastavení pasivní reference a vynechání jamek 3-16
Krok 5 – Programování běhu 3-17
Krok 6 – Uložení dokumentu destičky jako templátu 3-22
Krok 7 – Vytvoření dokumentu destičky z templátu 3-24
Krok 8 – Zadání názvů vzorků a informací o destičce 3-25
Krok 9 – Spuštění běhu na přístroji 7900HT 3-26

Kapitola 4 Ovládání přístroje

Poznámky pro uživatele databáze 4-2
Dříve než začnete....4-3

Část 4.1 Příprava spotřebního materiálu....4-5
Prevence kontaminace....4-6
Spotřební materiál....4-6
Příprava 96-ti a 384-jamkových mikrodestiček....4-7
Příprava mikrofluidních karet....4-9
O mikrofluidních kartách....4-9
O centrifuze....4-11
O nástroji na zaslepení jamek....4-13
Plnění mikrofluidních karet....4-13
Centrifugace mikrofluidních karet....4-15
Zaslepení jamek mikrofluidních karet....4-18

Část 4.2 Spuštění běhu – jedna destička....4-21
Uložení dokumentu destičky....4-22
Spuštění běhu – jedna destička (používání programu SDS)....4-23
Po skončení běhu....4-27

Část 4.3 Automatický provoz....4-29
Ovládání programu s databází SDS Enterprise....4-30
Ovládání programu bez databáze SDS Enterprise....4-32
Spuštění destiček pomocí programu Automation Controller....4-39
Po skončení běhu....4-42

Kapitola 5 Analýza esejí typu End-Point

Eseje typu End-Point na přístroji 7900HT....5-2
Poznámky pro uživatele databáze....5-3

Část 5.1 Alelická diskriminace....5-5
Přehled....5-6
Dříve než začnete....5-9
Seznam kroků....5-10
Otevření výsledků běhu....5-11
Analýza výsledků alelické diskriminace....5-12
Odečítání a kontrola výsledků alelické diskriminace....5-13
Po skončení analýzy....5-18

Kapitola 6 Analýza výsledků Real-Time PCR

Poznámky pro uživatele databáze 6-2
Real-Time PCR experimenty na přístroji 7900HT 6-3

Část 6.1 Absolutní kvantifikace 6-5
Přehled 6-6
Dříve než začnete 6-8
Seznam kroků 6-9
Otevření výsledků běhu 6-10
Analýza výsledků 6-11
Zobrazení výsledků 6-13
Po skončení analýzy 6-14

Část 6.2 Relativní kvantifikace 6-15
Přehled 6-16
Matematické zpracování hrubých dat 6-17
Automatické odstranění odlehlých bodů 6-19
Koncepce experimentu 6-20
Začínáme 6-21
Seznam kroků 6-22
Možnosti analýzy výsledků relativní kvantifikace 6-23
Vytvoření studie 6-23
Analýza studie 6-26
O parametrech analýzy 6-26
Nastavení parametrů analýzy 6-29
Analýza studie 6-30
Zobrazení výsledků 6-31
Po skončení analýzy 6-35

Část 6.3 Analýza disociační křivky 6-37
Přehled 6-38
Dříve než začnete 6-39
Seznam kroků 6-40
Otevření výsledků běhu 6-41
Analýza výsledků 6-41
Odečtení hodnoty Tm 6-42
Po skončení analýzy 6-44

Část 6.4 Poznámky k analýze 6-45
Nastavení pozadí a prahu 6-46
Odstranění odlehlých bodů 6-49
Po skončení analýzy 6-51

Kapitola 7 Údržba přístroje

Poznámky pro uživatele databáze 7-2
Doporučená frekvence kroků údržby 7-3

Část 7.1 Údržba přístroje 7900HT 7-5
Výměna bloku na vzorky 7-6
Výměna adaptéru na destičky 7-12
Dekontaminace bloku na vzorky 7-14
Provedení kalibrace pozadí 7-16
Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci pozadí 7-17
Vytvoření dokumentu destičky pro kalibraci pozadí 7-17
Spuštění destičky pro kalibraci pozadí nebo mikrofluidní karty 7-18
Analýza výsledků kalibrace pozadí 7-19
Provedení kalibrace barev 7-20
Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev 7-22
Příprava dokumentu destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev 7-22
Spuštění destiček nebo mikrofluidních karet pro kalibraci barev 7-24
Analýza výsledků kalibrace barev 7-25
Přidání vlastní barvy do sady barev 7-27
Ověření funkčnosti přístroje 7-30

Část 7.2 Údržba podavače mikrodestiček 7-35
Součásti podavače mikrodestiček a pozice úložných věží 7-36
Nastavení citlivosti senzoru destiček 7-37
Seřízení podavače mikrodestiček 7-41
Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49
Čistění a výměna podložek ramene (pro úchop destiček) 7-52

Část 7.3 Údržba hardwaru a softwaru 7-53
Běžná údržba počítače 7-54
Údržba programu SDS 7-55

Kapitola 8 Řešení problémů

Tabulka problémů 8-2
Nízká přesnost nebo nereprodukovatelnost 8-5
Kalibrace pozadí 8-9
Kalibrace barev 8-11
Eseje v reálném čase (Kvantitativní PCR a analýza disociační křivky) 8-12
Eseje typu End-Point (Alelická diskriminace) 8-13
Software a přístroj 7900HT 8-14
Podavač mikrodestiček Zymark Twister a pevně umístěná čtečka čárových kódů 8-17

Mikrofluidní karta 8-18
Databáze SDS Enterprise 8-20

Příloha A Nástroje programu SDS

Import zadání dokumentu destičky A-2
Soubory zadání A-4
1. Verze souboru A-5
Údaje o destičce A-5
2. Velikost destičky A-5
3. Identifikace destičky A-5
Údaje o detektorech A-6
4. Počet detektorů A-6
5. Záhlaví seznamu detektorů A-6
6. Seznam detektorů A-7
Údaje o markerech A-8
7. Počet markerů (pouze alelická diskriminace) A-8
8. Záhlaví seznamu markerů (pouze alelická diskriminace) A-8
9. Seznam markerů (pouze alelická diskriminace) A-9
Informace o detektorech v jamkách A-10
10. Záhlaví seznamu detektorů použitých v daných jamkách A-10
11. Seznam detektorů použitých v daných jamkách A-10
Informace o markerech v jamkách A-12
12. Záhlaví seznamu markerů použitých v daných jamkách (pouze alelická diskriminace) A-12
13. Seznam markerů použitých v daných jamkách (pouze alelická diskriminace) A-12
Příklady zadání A-14
Export obrázků A-16
Export údajů z dokumentů destičky A-16
Ovládání programu SDS z příkazové řádky A-18
Vyhledávání A-19
Propojení programu SDS s databází A-21

Příloha B Návrh esejí s chemizmem TaqMan

Doporučení pro návrh esejí B-2
Tipy pro návrh esejí alelické diskriminace B-4
Tipy pro návrh kvantitativní PCR B-5

Příloha C Kity, reagencie a spotřební materiál

Výměnné bloky na vzorky a příslušenství C-2
Spotřební materiál C-3
Údržba přístroje a ověřování funkčnosti C-5
Eseje TaqMan a reagencie C-6
Syntéza oligonukleotidů na zakázku C-6

Příloha D Principy fungování

Chemizmus D-2
Detekce fluorescence a sběr dat D-4
Matematické výpočty D-5
Analýza Real-Time PCR D-7
Relativní kvantifikace metodou $\Delta\Delta C_T$ D-11

Příloha E Podmínky záruky

Literatura

Terminologický slovník

Rejstřík

Předmluva

Jak používat tuto příručku

Účel této příručky

Uživatelská příručka *ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System and SDS Enterprise Database* popisuje, jakým způsobem připravit k provozu, provádět údržbu a řešit možné problémy související s provozem Real-Time PCR přístroje ABI PRISM® 7900HT, podavače mikrodestiček Zymark Twister® a databáze SDS Enterprise.

Komu je příručka určena

Tato příručka je určena vědeckým a ostatním laboratorním pracovníkům, kteří budou používat a provádět údržbu přístroje 7900HT s nebo bez databáze SDS Enterprise.

Předpoklady

Tato příručka předpokládá, že servisní technik společnosti Applied Biosystems provedl instalaci Vašeho systému 7900HT, podavače mikrodestiček a databáze SDS Enterprise, a že jste obeznámeni se:

- Základním ovládáním systému Microsoft® Windows®, jako je používání myši, volba příkazů, práce s okny a používání hierarchického systému souborů.
- Elektronickými nástroji na uchovávání dat (pevné disky) a datovými soubory
- Přípravou reakcí a základními technikami práce v laboratoři

Práce s textem

Pro lepší pochopení pracuje tato příručka s textem následujícím způsobem:

- **Tučně** jsou vyznačeny aktivní zásahy uživatele. Například:
  Napište **0**, poté stiskněte **Enter** pro každé ze zbývajících polí.
- *Kurzívou* jsou vyznačena nová nebo důležitá slova a též zdůraznění. Například:
  Před provedením kalibrace barev *vždy* proveďte kalibraci pozadí.
- Znaménko (>) odděluje po sobě následující příkazy, které volíte z rozbalovacích nabídek. Například:
  Zvolte **File > Open > Spot Set**.

Upozornění pro uživatele

V dokumentaci Applied Biosystems se používají upozornění pro uživatele. Každé upozornění vyžaduje určitou míru pozornosti nebo aktivity, jak je popsáno níže:

Poznámka (Note) – Poskytuje informace, které mohou být zajímavé nebo nápomocné, ale které nejsou kritické z hlediska používání přístroje.

DŮLEŽITÉ! (IMPORTANT!) – Poskytuje informace, které jsou nezbytné pro správné ovládání přístroje, používání reagencií nebo bezpečné používání chemikálií.

Výstražná upozornění

Součástí uživatelské dokumentace jsou i výstražná upozornění. Podrobněji viz “Výstražná upozornění” na straně xiv.

Kde získat více informací

Související dokumentace

Více informací o používání přístroje naleznete v příručkách:

- ***ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Quick Reference Cards –*** Poskytuje stručný popis kroků, jejichž provedení je nezbytné pro konkrétní použití přístroje 7900HT.
- ***SDS Software Online Help –*** Popisuje software Sequence Detection System a rady pro provádění běžných kroků.
- ***SDS Enterprise Database Administration Guide –*** Poskytuje informace pro administrátory databáze SDS Enterprise.

PDF verzi této příručky a dokumentů Quick Reference Cards naleznete na instalačním CD pro software SDS 2.2.

Poznámka: Další dokumentace viz “Kde získat pomoc” na straně xii.

Pošlete nám Vaše návrhy

V Applied Biosystems vítáme Vaše komentáře a návrhy na zlepšení uživatelské dokumentace. Své připomínky můžete zaslat na adresu:

techpubs@appliedbiosystems.com

Kde získat pomoc

Chcete-li kontaktovat technickou podporu Applied Biosystems v Severní Americe, volejte **1.800.899.5858**.

Nejaktuálnější služby a informace Technické podpory (Support) naleznete na adrese **http://www.appliedbiosystems.com**, kde klikněte na odkaz **Support**.

Na stránkách technické podpory můžete:

- Prohledávat často kladené otázky - Frequently asked questions (FAQs)
- Přímo položit dotaz Technické podpoře
- Objednat uživatelské dokumenty Applied Biosystems, bezpečnostní listy (MSDS), certifikáty o analýze a další související dokumenty
- Stahovat dokumenty ve formátu PDF
- Získat informace o školení pro zákazníky
- Stahovat programové aktualizace a opravné balíčky

Kromě toho je na stránkách technické podpory možné získat telefonní a faxová čísla všech oddělení Technické podpory a prodejních poboček Applied Biosystems.

Bezpečnost a elektromagnetická kompatibilita (EMC)

Tato část textu popisuje:

Bezpečnostní upozornění používaná v tomto dokumentu xiv
Symboly na přístrojích xv
Bezpečnostní označení na přístrojích xvi
Obecná pravidla bezpečnosti při práci s přístrojem xvii
Bezpečná manipulace s chemikáliemi xviii
Bezpečná manipulace s chemickým odpadem xix
Bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními xx
Pohyblivé součásti xxi
Biologické riziko xxi
Bezpečná manipulace s laserem xxi
Bezpečná manipulace s laserem čtečky čárových kódů xxii
Bezpečná práce xxii
Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC) xxiii

Bezpečnostní upozornění používaná v tomto dokumentu

Výstražná upozornění

V uživatelské dokumentaci Applied Biosystems jsou používána čtyři výstražná upozornění, a to na těch místech dokumentů, kde je zapotřebí upozornit na odpovídající rizika. Každé z těchto slov – **DŮLEŽITÉ (IMPORTANT), VAROVÁNÍ (CAUTION), VÝSTRAHA (WARNING), NEBEZPEČÍ (DANGER)** – vyžaduje potřebu určité úrovně pozornosti nebo aktivity jak je popsáno níže:

Definice

DŮLEŽITÉ! (IMPORTANT!) – Poskytuje informace, které jsou nezbytné pro správné ovládání přístroje, používání reagencií nebo bezpečné používání chemikálií.

– VAROVÁNÍ Indikuje potenciálně nebezpečnou situaci, která, pokud se jí nevyhnete, může vést k malému nebo středně těžkému zranění. Lze též použít jako varování před nebezpečnými činnostmi.

– VÝSTRAHA Indikuje potenciálně nebezpečnou situaci, která, pokud se jí nevyhnete, může způsobit smrt nebo těžké zranění.

– NEBEZPEČÍ Indikuje bezprostřední nebezpečnou situaci, která, pokud se jí nevyhnete, způsobí smrt nebo vážné zranění. Používání tohoto výstražného upozornění je omezeno jen na nejzávažnější situace.

Vyjma DŮLEŽITÉ! (IMPORTANT) se každé výstražné upozornění v dokumentaci Applied Biosystems objevuje spolu s bezpečnostními symboly ve výstražném trojúhelníku. *Tyto výstražné symboly jsou totožné se symboly na přístrojích Applied Biosystems* (viz “Symboly na přístrojích” na straně xv).

Příklady

Níže jsou uvedeny příklady použití výstražných upozornění:

DŮLEŽITÉ! Pro každou 96ti-jamkovou mikrodestičku musíte vytvořit samostatný seznam vzorků.

Lampa je velmi horká. Nedotýkejte se lampy dokud nevychladne na pokojovou teplotu.

CHEMICKÉ RIZIKO. Formamid. Expozice vede k podráždění očí, kůže a dýchacího ústrojí. Možné riziko vývojových vad a poškození plodu. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

ELEKTRICKÉ RIZIKO. Nesprávně uzemněný přístroj může způsobit úraz elektrickým proudem**.** Uzemněte přístroj podle připojeného návodu.

Symboly na přístrojích

Elektrické symboly na přístrojích

Následující tabulka popisuje elektrické symboly, které mohou být použity na přístrojích Applied Biosystems.

Symbol	Popis	Symbol	Popis
	Označuje polohu hlavního spínače **Zapnuto**.		Ochranná svorka - označuje chráněný uzemněný výstup, který musí být uzemněn předtím, než je provedeno jakékoliv jiné elektrické připojení přístroje (připojení hlavního ochranného vodiče).
	Označuje polohu hlavního spínače **Vypnuto**.		
	Označuje polohu hlavního spínače **Zapnuto/Vypnuto** (týká se spínače, který se ovládá stlačením).		Označuje výstup, který může být připojen na střídavý napájecí zdroj.
	Svorka uzemnění. Neslouží jako ochranná svorka.		Označuje výstup, který může být připojen na střídavý nebo stejnosměrný napájecí zdroj.

Bezpečnostní symboly

Následující tabulka popisuje bezpečnostní symboly, které mohou být použity na přístrojích Applied Biosystems. Každý symbol může být použit sám o sobě nebo v kombinaci s textem, který vysvětluje případné riziko (viz "Bezpečnostní označení na přístrojích" na straně xvi). Tyto bezpečnostní symboly se mohou rovněž objevit v textu tohoto nebo dalších dokumentů vedle označení DANGER (NEBEZPEČÍ), WARNING (VÝSTRAHA) a CAUTION (VAROVÁNÍ).

Symbol	Popis
	Indikuje, že byste měli získat další informace z manuálu a pokračovat s patřičnou obezřetností.
	Indikuje možný úraz elektrickým proudem a nutnost pokračovat s patřičnou obezřetností.
	Indikuje horký povrch nebo jiné riziko související s vysokou teplotou a nutnost pokračovat s patřičnou obezřetností.
	Indikuje přítomnost laseru a nutnost pokračovat s patřičnou obezřetností.
	Indikuje přítomnost pohyblivých součástí a nutnost pokračovat s patřičnou obezřetností.

Bezpečnostní označení na přístrojích

Následující prohlášení CAUTION (VAROVÁNÍ), WARNING (VÝSTRAHA) a DANGER (NEBEZPEČÍ) mohou být použity na přístrojích Applied Biosystems v kombinaci s bezpečnostními symboly popsanými v předchozí části.

English	Česky
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	**VAROVÁNÍ** Nebezpečná chemikálie. Před použitím čtěte bezpečnostní list (MSDS).
CAUTION Hazardous waste. Read the waste profile (if any) in the site preparation guide for this instrument before handling or disposal.	**VAROVÁNÍ** Nebezpečný odpad. Před manipulací nebo likvidací čtěte informace o odpadu (jsou-li) v návodu na přípravu místa.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	**VAROVÁNÍ** Nebezpečný odpad. Při manipulaci a likvidaci postupujte podle pokynů v bezpečnostním listu a místních předpisů.
WARNING Hot lamp.	**VÝSTRAHA** Horká lampa.
WARNING Hot. Replace lamp with an Applied Biosystems lamp.	**VÝSTRAHA** Horké. Zaměňte lampu za lampu Applied Biosystems.
CAUTION Hot surface.	**VAROVÁNÍ** Horký povrch.
DANGER High voltage.	**NEBEZPEČÍ** Vysoké napětí.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	**VÝSTRAHA** Neodstraňujte kryty, na jejichž odstranění je zapotřebí nástrojů – riziko úrazu elektrickým proudem. Potřeba uživatelských zásahů v prostoru pod krytem je vyloučena. Servis provádí pouze kvalifikovaný technik Applied Biosystems.
DANGER Class 3B laser radiation present when open and interlock defeated. Avoid direct exposure to laser beam.	**NEBEZPEČÍ** Laserové záření třídy 3B při otevření a vypnutí kontaktní pojistky. Vyhněte se přímému vystavení se laserovému paprsku.
DANGER Class 3B laser radiation when open. Avoid direct exposure to laser beam.	**NEBEZPEČÍ** Laserové záření třídy 3B při otevření. Vyhněte se přímému vystavení laserovému paprsku.
DANGER Class 3B laser radiation present when open and interlock defeated. Do not stare directly into the beam	**NEBEZPEČÍ** Laserové záření třídy 3B při otevření a vypnutí kontaktní pojistky. Chraňte svůj zrak – nedívejte se přímo do paprsku.
DANGER Class 3B laser radiation present when open. Do not stare directly into the beam.	**NEBEZPEČÍ** Laserové záření třídy 3B při otevření. Chraňte svůj zrak – nedívejte se přímo do paprsku.
DANGER Class 3B LED when open and interlock defeated. Do not stare directly into the beam.	**NEBEZPEČÍ** Při otevření a vypnutí kontaktní pojistky třída 3B LED. Chraňte svůj zrak – nedívejte se přímo do paprsku.
DANGER Class 3B LED when open. Do not stare directly into the beam.	**NEBEZPEČÍ** Při otevření třída 3B LED. Chraňte svůj zrak – nedívejte se přímo do paprsku.
CAUTION Moving parts.	**VAROVÁNÍ** Pohyblivé součásti.

Obecná pravidla bezpečnosti při práci s přístrojem

RIZIKO PORANĚNÍ. Používejte tento výrobek pouze v souladu s postupy uvedenými v tomto dokumentu. Jiné používání než v souladu s instrukcemi Applied Biosystems může vést ke zranění nebo k poškození přístroje.

Přemisťování a zvedání přístroje

RIZIKO PORANĚNÍ. Přístroj smí přemisťovat pouze osoby nebo dodavatelé uvedení v návodu na přípravu místa. Rozhodnete-li se přístroj přemisťovat nebo zvedat poté, co byl instalován, provádějte to vždy v dostatečném počtu osob, za použití příslušného vybavení a odpovídajícím způsobem. Nesprávná manipulace může způsobit bolestivá a trvalá poranění zad. V závislosti na jeho hmotnosti může přemisťování nebo zvedání přístroje vyžadovat dvě a více osob.

Přemisťování a zvedání počítačů a monitorů

Zvedání nebo přenášení počítačů a monitorů provádějte vždy v dostatečném počtu osob. V závislosti na hmotnosti počítače a/nebo monitoru může jejich přemisťování nebo zvedání vyžadovat dvě a více osob.

Před zvedáním počítače a/nebo monitoru:

- Ujistěte se, že máte ke zvedání počítače nebo monitoru vhodné nástroje.
- Ujistěte se, že na předpokládané dráze pohybu přenášeného objektu se nenacházejí žádné překážky.
- Při zvedání předmětu se současně neotáčejte.
- Dbejte, aby vaše páteř byla při zvedání předmětu ve stabilní neutrální poloze.
- Všechny zúčastněné osoby musí postup zvedání a přenášení vzájemně koordinovat.
- Nevyjímejte předmět z krabice, namísto toho položte krabici na bok a přidržte ji, zatímco někdo jiný nechá její obsah opatrně vyklouznout ven.

Ovládání přístroje

Ujistěte se, že každý kdo ovládá přístroj:

- byl obeznámen s obecnými pravidly bezpečnosti pro práci v laboratoři a zvláštními pravidly bezpečnosti týkajícími se tohoto přístroje.
- četl a pochopil veškeré související bezpečnostní listy (MSDS). Viz „O bezpečnostních listech” na straně xviii.

RIZIKO PORANĚNÍ. Používejte tento výrobek pouze v souladu s postupy uvedenými v tomto dokumentu. Jiné používání než v souladu s instrukcemi Applied Biosystems může vést ke zranění nebo k poškození přístroje.

Bezpečná manipulace s chemikáliemi

Výstraha – chemické riziko

CHEMICKÉ RIZIKO. Před manipulací s jakýmikoliv chemikáliemi si prostudujte příslušný bezpečnostní list - Material Safety Data Sheet (MSDS), poskytnutý dodavatelem chemikálie, a řiďte se jeho pokyny.

CHEMICKÉ RIZIKO. Veškeré chemikálie nacházející se v přístroji včetně tekutin v hadičkách představují potenciální riziko. Před výměnou reagencií nebo součástí přístroje si vždy zjistěte, jaké chemikálie v něm byly použity. Při práci používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

CHEMICKÉ RIZIKO. Čtyřlitrové zásobní a odpadní lahve mohou prasknout a protékat. Každou čtyřlitrovou láhev je nutné umístit do polypropylenového obalu. Při práci používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

NEBEZPEČNÝ ODPAD. Nikdy nesbírejte nebo neuchovávejte odpad ve skleněných nádobách kvůli možnému riziku jejich rozbití. Zásobní a odpadní lahve mohou prasknout a protékat. Každou odpadní láhev je nutné umístit do polypropylenového obalu. Při práci používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

O bezpečnostních listech

Výrobci chemikálií poskytují *novým* zákazníkům s dodávkou chemikálií bezpečnostní listy. Bezpečnostní list je rovněž poskytnut spolu s dodávkou chemikálií v případě, že byl aktualizován. Bezpečnostní listy obsahují informace, které potřebujete pro bezpečné ukládání, manipulaci, přepravu a odstranění chemikálie. Obdržíte-li s dodávkou chemikálie i bezpečnostní list, vždy jej založte – udržujte tyto listy aktuální

Získání bezpečnostního listu

Bezpečnostní listy pro chemikálie dodávané Applied Biosystems získáte vždy od Applied Biosystems. Tato služba je bezplatná a dostupná 24 hodin denně. Chcete-li získat bezpečnostní list:

1. Otevřete stránku https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html
2. V poli hledání zadejte název chemikálie, katalogové číslo nebo další informaci z bezpečnostního listu, který vás zajímá. Zvolte jazyk, klikněte na Search (Hledat).
3. Zvolte dokument, který vás zajímá, klikněte pravým tlačítkem myši na jeho název a zvolte jednu z následujících možností:
   - Open – Otevření dokumentu
   - Print Target – Vytištění dokumentu
   - Save Target As – Stažení dokumentu ve verzi PDF do zvoleného adresáře
4. Chcete-li získat kopii dokumentu faxem nebo emailem, zvolte Fax or Email po levé straně názvu dokumentu ve výsledcích hledání, pak klikněte na RETRIEVE DOCUMENTS (ZÍSKAT DOKUMENTACI) na konci seznamu dokumentů.
5. Po zadání požadovaných informací klikněte na View/Deliver Selected Documents Now (Zobrazit/Stáhnout vybranou dokumentaci).

Pravidla manipulace s chemikáliemi

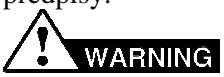
Abyste minimalizovali riziko plynoucí z používání chemikálií, musíte:

- Přečíst a pochopit bezpečnostní listy dodávané výrobci chemikálií, a to ještě před tím, než začnete tyto chemikálie nebo rizikové materiály ukládat nebo s nimi manipulovat či pracovat. (Viz “O bezpečnostních listech” na straně xviii.)
- Minimalizujte kontakt s chemikáliemi. Používejte odpovídající osobní ochranné pomůcky pro práci s chemikáliemi (např. ochranné brýle, rukavice, ochranný oděv). Další bezpečnostní opatření naleznete v bezpečnostním listu.
- Minimalizujte inhalaci chemikálií. Neponechávejte nádoby s chemikáliemi otevřené. Používejte odpovídající větrání (například digestoř). Další bezpečnostní opatření naleznete v bezpečnostním listu.
- Pravidelně kontrolujte, zda nedošlo k vylití nebo rozsypání chemikálií. Pokud k tomu dojde, postupujte podle čistících procedur doporučených výrobcem chemikálie v bezpečnostním listu.
- Dodržujte všechna místní nebo národní nařízení a předpisy týkající se uchovávání chemikálií, manipulace s nimi a jejich odstraňování.

Bezpečná manipulace s chemickým odpadem

Výstraha - chemické riziko

NEBEZPEČNÝ ODPAD. Při manipulaci s nebezpečným odpadem a při jeho odstraňování se řiďte pokyny v bezpečnostním listu a místními předpisy.



NEBEZPEČNÝ ODPAD. Odpady produkované přístroji Applied Biosystems představují potenciální riziko a mohou způsobit zranění, nemoc nebo smrt.

Pravidla manipulace s chemickým odpadem

Abyste minimalizovali riziko plynoucí z manipulace s chemickým odpadem, musíte:

- Přečíst a pochopit bezpečnostní listy, dodávané výrobci chemikálií z nichž odpad vzniká, předtím než začnete chemický odpad ukládat, manipulovat s ním nebo ho odstraňovat.
- Mít k dispozici primární i sekundární nádoby na odpad. (Primární nádoba na odpad je pro jeho okamžité shromažďování. Sekundární nádoba na odpad osahuje to, co vyteče nebo se vysype z primární nádoby. Obě nádoby musí odpovídat typu ukládaného odpadu a splňovat požadavky místních předpisů.)
- Minimalizovat kontakt s chemikáliemi. Při práci s chemikáliemi používejte odpovídající osobní ochranné pomůcky (např. ochranné brýle, rukavice, ochranný oděv). Další bezpečnostní opatření naleznete v bezpečnostním listu.
- Minimalizovat inhalaci chemikálií. Neponechávejte nádoby s chemikáliemi otevřené. Používejte odpovídající větrání (například digestoř). Další bezpečnostní opatření naleznete v bezpečnostním listu.
- Manipulovat s chemickým odpadem v digestoři.
- Pytle s odpadem zajistit svorkou.
- Odstraňovat odpad z odpadní nádoby a odstraňovat odpadní láhve v souladu se správnou laboratorní praxí a místními předpisy.

Složení odpadu

Složení odpadu vznikajícího v souvislosti s činností přístroje ABI PRISM 7900HT je uvedeno v příručce *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Site Preparation Guide.*

Složení odpadu je uvedeno v procentuálním zastoupení reagencií v odpadu vzniklém v průběhu instalace a při provádění typických experimentů, i když ve vaší laboratoři nemusí být prováděny typické experimenty.

Informace o složení odpadu vám pomáhají plánovat způsoby manipulace a odstraňování odpadu, vytvářeného při provozu přístroje. Před touto manipulací či odstraňováním se seznamte se složením odpadu a informacemi v bezpečnostním listu.

Odstranění odpadu

Pokud při práci s přístrojem vznikne potenciálně nebezpečný odpad, musíte:

- Charakterizovat (analyzovat, pokud je to nutné) tento odpad, reagencie a substráty používané ve vaší laboratoři.
- Zajistit ochranu zdraví a bezpečnost všech pracovníků vaší laboratoře.
- Zajistit, že odpad z přístroje je ukládán, přenášen, transportován a odstraňován v souladu se všemi místními i národními předpisy.

DŮLEŽITÉ! Radioaktivní nebo biologické odpady mohou vyžadovat zvláštní způsoby zacházení a mohou se na ně vztahovat omezení stran možností jejich odstraňování.

Bezpečná manipulace s elektrickým zařízením

DANGER **NEBEZPEČÍ ÚRAZU ELEKTRICKÝM PROUDEM.** Při ovládání přístroje ABI PRISM 7900HT bez ochranných krytů může dojít k vážnému úrazu elektrickým proudem. Neodstraňujte kryty přístroje. Po jejich odstranění je možný přístup ke zdrojům vysokého napětí

Pojistky

DANGER **NEBEZPEČÍ ÚRAZU ELEKTRICKÝM PROUDEM.** Použití nevhodných pojistek nebo zdroje vysokého napětí může způsobit poškození a požár přístroje. Před zapojením přístroje se ujistěte, že byly správně instalovány pojistky, a že provozní napětí přístroje odpovídá napětí v elektrické síti ve vaší laboratoři.

WARNING **NEBEZPEČÍ POŽÁRU.** V zájmu nepřetržité ochrany před rizikem vzniku požáru používejte pouze pojistky typu a jmenovitého proudu odpovídajícího požadavkům přístroje.

Zdroj

DANGER **NEBEZPEČÍ ÚRAZU ELEKTRICKÝM PROUDEM.** Pro bezpečný provoz zařízení je nezbytné jeho uzemnění. Nikdy nepoužívejte přístroj, který není správným způsobem uzemněn.

DANGER **NEBEZPEČÍ ÚRAZU ELEKTRICKÝM PROUDEM.** Používejte pouze schválené elektrické kabely, odpovídající napětí ve vaší elektrické síti.

DANGER **NEBEZPEČÍ ÚRAZU ELEKTRICKÝM PROUDEM.** Připojte přístroj pouze do uzemněné zásuvky s odpovídajícím elektrickým proudem.

Vysoké napětí

Přístroj ABI PRISM 7900HT spadá do třídy II (přepětí) a je klasifikován jako přenosný přístroj.

Pohyblivé součásti

Pohyblivé součásti

RIZIKO PORANĚNÍ. Pohyblivé součásti se mohou zlomit či jinak poškodit. Při ovládání přístroje nesahejte na pohyblivé součásti. Před servisním zásahem vypojte přístroj ze sítě.

RIZIKO PORANĚNÍ. Při ovládání přístroje neodstraňujte kryt podavače. Nedávejte ruce do podavače je-li v chodu.

Biologické riziko

Biohazard

BIOHAZARD. Biologické (lidské nebo zvířecí) vzorky jako např. tkáně, tělní tekutiny a krev mohou být zdrojem infekčních onemocnění. Postupujte podle všech místních/národních předpisů. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice. Prostudujte si a postupujte podle pokynů v následujících publikacích:

- Doporučení U.S. Department of Health and Human Services publikované v *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (č. 017-040-00547-4; **http://bmbl.od.nih.gov**)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; **http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html**).

Další informace týkající se biologického rizika naleznete na: **http://www.cdc.gov**

Bezpečná manipulace s laserem

Laser

Real-Time PCR systém ABI PRISM 7900HT používá laser třídy 3B. Za normálních provozních podmínek se jedná o laser třídy 3B. Jsou-li během určitých servisních zásahů vyřazeny z činnosti kontaktní pojistky, může laser způsobit trvalé poškození zraku a je tudíž za těchto podmínek zařazen jako laser třídy 3B.

Real-Time PCR systém ABI PRISM 7900HT odpovídá požadavkům nařízení 21 CFR, 1040.10 a 1040.11.

Real-Time PCR systém ABI PRISM 7900HT byl testován podle a odpovídá požadavkům nařízení "Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard CFR 1040."

Real-Time PCR systém ABI PRISM 7900HT byl testován podle a odpovídá požadavkům nařízení EN60825-1, "Bezpečnost laserových zařízení – Část 1: Klasifikace zařízení, požadavky a pokyny pro používání."

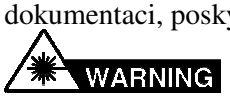
Pravidla manipulace s laserem

Pro bezpečný provoz laseru:

- Systém musí být instalován a udržován servisním technikem Applied Biosystems.
- Je-li přístroj v provozu, musí být všechny ochranné kryty na svých místech. V případě, že jsou všechny kryty na svých místech, žádné záření nelze detekovat. Je-li kterýkoliv z krytů sejmut během provozu laseru (v případě servisu při vypnutí kontaktních pojistek), vystavujete se možnosti expozice laserového záření vyššího než třídy 3B.
- Neodstraňujte bezpečnostní označení nebo nevypínejte kontaktní pojistky.

Další informace k bezpečnému provozu laseru

Další informace týkající se bezpečnostních předpisů naleznete v uživatelské dokumentaci, poskytnuté společně s laserem.



NEBEZPEČÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ. Laser může trvale poškodit sítnici. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku. Odstraňte šperky a další předměty, které mohou odrážet paprsek do vašich očí. Neodstraňujte svrchní nebo boční kryty přístroje. Používejte odpovídající prostředky ochrany očí a v případě odstranění krytů během servisního zásahu na vstup do laboratoře umístěte varování o přítomnosti laseru.

NEBEZPEČÍ POPÁLENÍ LASEROVÝM PAPRSKEM. Je-li v kontaktu s kůží, může přehřátý laserový paprsek způsobit těžké popáleniny**.** NIKDY nepoužívejte laser pokud nemůže být ochlazován ventilátorem. Vždy používejte ochranné pomůcky pro práci s laserem.

Bezpečná manipulace s laserem čtečky čárových kódů

Laser

Čtečka čárových kódů, která je součástí systému ABI PRISM 7900HT, je vybavena laserem třídy 2 (II).

Bezpečná manipulace s laserem

Lasery třídy 2 (II) jsou nízkoenergetické lasery s viditelným paprskem, který může způsobit poškození očí. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku. Skener je konstruován tak, aby laserový paprsek nebyl dostupný pro operátora přístroje při jeho běžném používání, údržbě nebo během předepsaných servisních zásahů.

NEBEZPEČÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ. Lasery třídy 2 (II) mohou způsobit poškození očí. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku třídy 2 (II) nebo neobracejte tento paprsek proti očím někoho jiného.

Bezpečná práce

Správná ergonomie vašeho pracovního místa může snížit nebo eliminovat únavu, bolest a námahu. Tyto průvodní jevy můžete omezit nebo odstranit takovým umístěním vašeho systému, které umožní jeho pohodlné ovládání.

NEBEZPEČÍ SVALOVÉHO PORANĚNÍ. Toto nebezpečí je způsobeno např. ale nikoliv výlučně opakovanými pohyby, nevhodným umístěním, vysokou namáhavostí, udržováním těla ve statických pozicích, tlakem a dalšími faktory.

Abyste toto nebezpečí snížili:

- Používejte zařízení, které vám umožní pracovat v neutrálních pozicích s dobrou dostupností klávesnice, monitoru a myši.
- Umístěte klávesnici, myš a monitor tak, aby byla umožněná relaxovaná poloha hlavy a těla.

Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC)

Tato část obsahuje informace o:

- Bezpečnostních předpisech v USA a Kanadě
- Kanadských normách EMC
- Evropských bezpečnostních předpisech a normách EMC
- Australských normách EMC

Bezpečnostní předpisy v USA a Kanadě

Tento přístroj byl testován podle normy UL 3101-1 “Safety Requirements for Electrical Equipment for Laboratory Use, Part 1: General Requirements” a splňuje její požadavky.

Tento přístroj byl testován podle normy CSA 1010.1 “Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements” a splňuje její požadavky.

Kanadské normy EMC

Tento přístroj byl testován podle normy ICES-001, Issue 3: “Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators“ a splňuje její požadavky.

Evropské bezpečnostní předpisy a normy EMC

Bezpečnost

Tento přístroj splňuje bezpečnostní požadavky evropské Směrnice pro nízké napětí 73/23/EEC. Tento přístroj byl testován podle norem EN 61010-1:2001 “Bezpečnostní požadavky na elektrické měřicí, řídící a laboratorní zařízení, část 1: Obecné požadavky” a EN 61010-2-010 “Zvláštní požadavky pro laboratorní zařízení pro ohřev materiálu” a splňuje jejich požadavky.

EMC

Tento přístroj splňuje požadavky směrnice Rady Evropské unie pro elektromagnetické rušení a odolnost vůči němu (EMC směrnice 89/336/EEC). Tento přístroj byl testován podle normy EN 61326 (Třída B) “Elektrická zařízení pro měření, kontrolu a laboratorní použití – požadavky EMC”.

Australské normy EMC

Tento přístroj byl testován podle normy AS/NZS 2064 “Limits and Methods Measurement of Electromagnetic Disturbance Characteristics of Industrial, Scientific, and Medical (ISM) Radio-frequency Equipment” a splňuje její požadavky.

Přehled 1

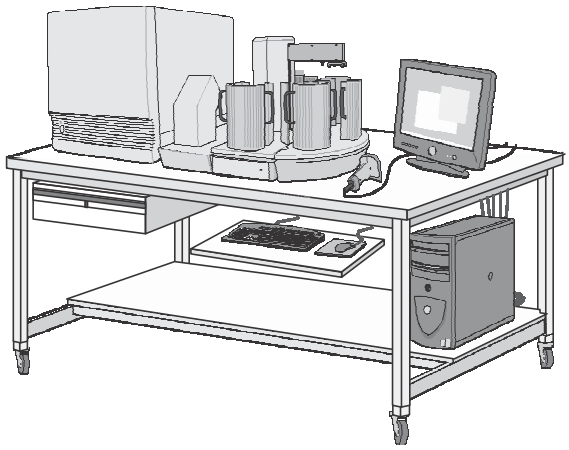
V této kapitole

Popis systému....1-2
Část 1.1 Poznáváme hardware....1-3
Přístroj 7900HT....1-4
Počítač....1-7
Čtečky čárových kódů....1-8
Podavač mikrodestiček Zymark Twister....1-9
Spotřební materiál....1-10
Zapojení přístroje....1-11
Část 1.2 Poznáváme software....1-13
Jednotlivé součásti softwaru....1-14
Program SDS - soubory a jejich formáty....1-15
Správa dat....1-17
Část 1.3 Databáze SDS Enterprise....1-21
O databázi SDS Enterprise....1-22
O softwaru databáze SDS Enterprise....1-25
Koncepce databáze a správa dat....1-27
Podpora dokumentace API....1-28

Popis systému

O přístroji 7900HT

Real-Time PCR systém ABI PRISM® 7900HT je Real-Time PCR přístroj druhé generace navržený pro provádění Real-Time PCR (PCR v reálném čase) v automatickém režimu provozu a pro snadné zpracovávání velkého počtu vzorků. Přístroj provádí eseje typu Real-Time, eseje detekované po skončení reakce (tzv. eseje typu end-point) a analýzu disociační křivky. Přístroj 7900HT je optimalizován pro používání reagencií společnosti Applied Biosystems pro kvantifikaci a detekci nukleových kyselin.



Obrázek 1-1 Real-Time PCR přístroj ABI PRISM 7900HT a jeho příslušenství

Podporované eseje a chemizmy

Přístroj ABI PRISM 7900HT podporuje provádění dvou typů esejí za použití reagencií společnosti Applied Biosystems a příbuzných společností.

Eseje detekované po skončení reakce (End-Point)

V esejích detekovaných po skončení reakce (end-point) se teplotní cyklování mikrodestiček s reagenciemi a templáty provádí v teplotním cykleru. Po skončení PCR se použije přístroj 7900HT pro provedení jediného měření fluorescence ukončených reakcí. Příkladem eseje tohoto typu je alelická diskriminace.

Eseje detekované v reálném čase (Real-Time)

V esejích detekovaných v reálném čase se teplotní cyklování mikrodestiček s reagenciemi a templáty provádí v přístroji 7900HT. Data jsou zaznamenávána v průběhu běhu při každém cyklu PCR. Výsledkem je chronologický záznam fluorescence jednotlivých reakcí. Příkladem eseje tohoto typu je absolutní kvantifikace, relativní kvantifikace a analýza disociační křivky.

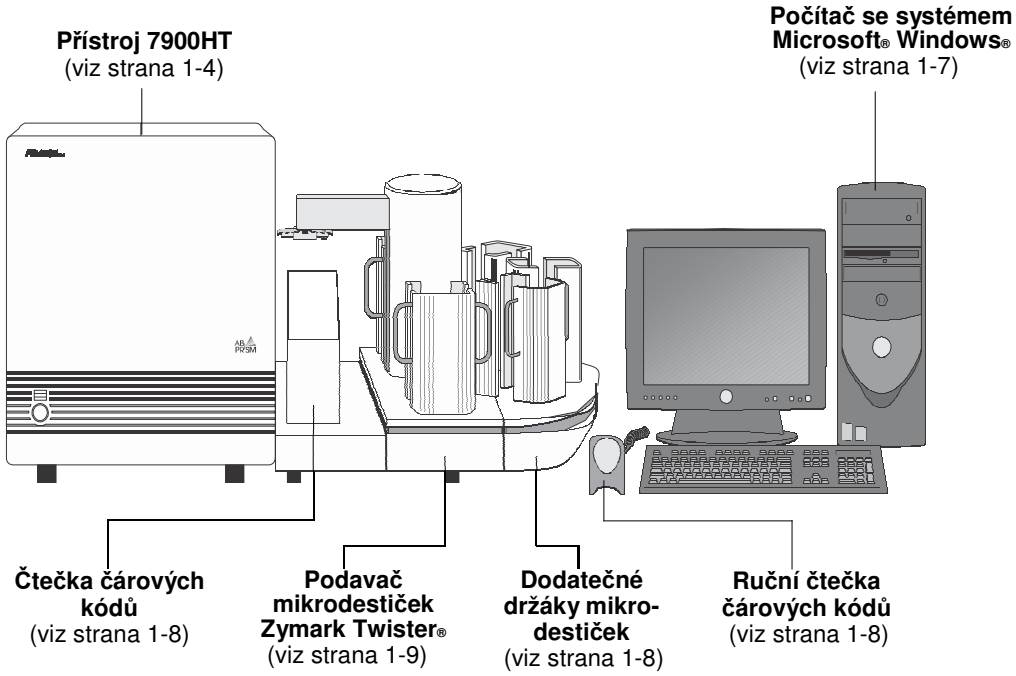
Část 1.1 Poznáváme hardware

V této části

Přístroj 7900HT 1-4
Počítač 1-7
Čtečky čárových kódů 1-8
Podavač mikrodestiček Zymark Twister 1-9
Spotřební materiál 1-10
Zapojení přístroje 1-11

Součásti přístroje

Real-Time PCR systém ABI PRISM 7900HT se skládá z následujících součástí, zobrazených na obrázku 1-2.



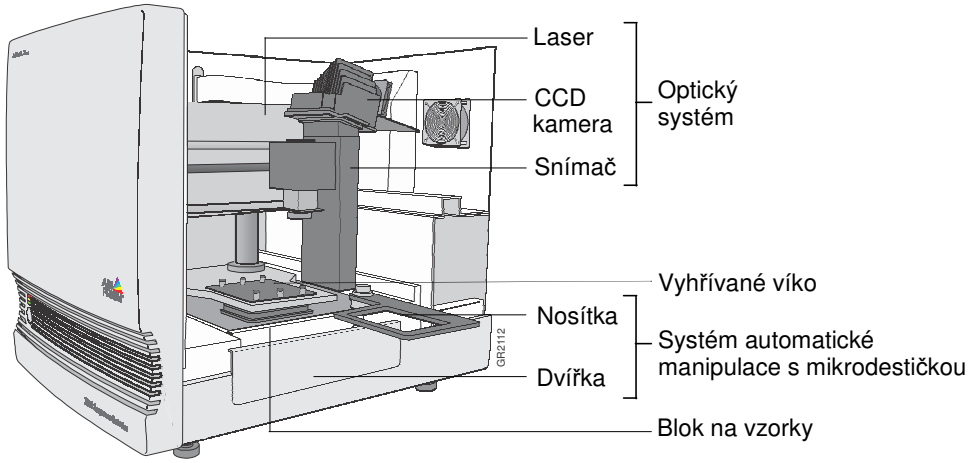
Obrázek 1-2 Součásti Real-Time PCR systému ABI PRISM 7900HT

Přístroj 7900HT

Popis přístroje

Součástí přístroje 7900HT je zařízení pro provádění teplotního cyklování a detekci fluorescence (viz strana 1-2). Na obrázku 1-3 jsou vyobrazeny hlavní součásti přístroje podrobněji popsané níže.

CAUTION Neodstraňujte kryty přístroje ABI PRISM 7900HT. Vnitřní součásti přístroje může opravovat či měnit jejich nastavení pouze kvalifikovaný technik společnosti Applied Biosystems. Nedodržení této výstrahy může vést k vážnému zranění a/nebo poškození přístroje.



Obrázek 1-3 Součásti přístroje7900HT

Automatický podavač mikrodestiček

WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Dbejte, aby se při práci s přístrojem vaše ruce a volné součásti oblečení nedostaly k nosítkům a dvířkům přístroje. Vnitřní součásti systému 7900HT mohou způsobit vážné zranění.

Přístroj 7900HT je vybaven automatickým podavačem mikrodestiček, který umožňuje snadné vkládání a vyjímání destiček z přístroje. Přístroj v automatickém režimu provozu tak umožňuje bezobslužnou práci.

Vyhřívané víko

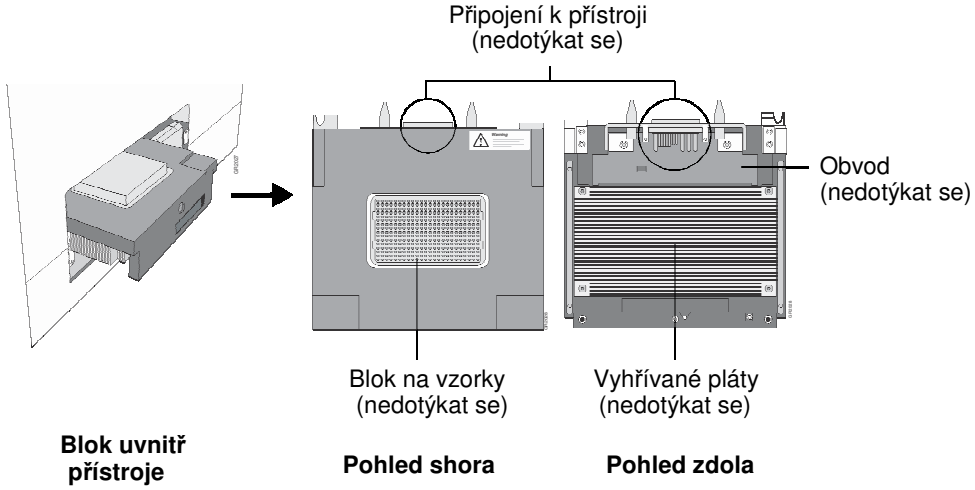
WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Horký povrch. Při práci v těsné blízkosti vyhřívaného víka dbejte, aby nedošlo k popálení.

Přístroj 7900HT má vyhřívané víko pro optimální přenos tepla a rovnoměrný ohřev během teplotního cyklování. Po vložení mikrodestičky do přístroje na ni tlačí víko vahou 31,8 kg. V průběhu běhu má víko konstantní teplotu 105°C (±3°C), aby nedocházelo ke kondenzaci v jamkách mikrodestičky.

Vyměnitelné bloky na vzorky

Přístroj 7900HT je vybaven vyměnitelnými bloky na ohřev vzorků na bázi peltierových článků (technologie odvozená od přístroje GeneAmp® PCR System 9700). Součástí bloku na vzorky jsou peltierovy články pro ohřev/chlazení vzorků (obrázek 1-4). Blok na vzorky je vyroben z hliníku, aby byl zajištěn optimální přenos tepla mezi blokem a mikrodestičkou nebo mikrofluidní kartou.

WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Horký povrch. Při práci dbejte, aby nedošlo k popálení.



Obrázek 1-4 Součásti vyměnitelného teplotního bloku

Vlastnosti vyměnitelného bloku na vzorky:

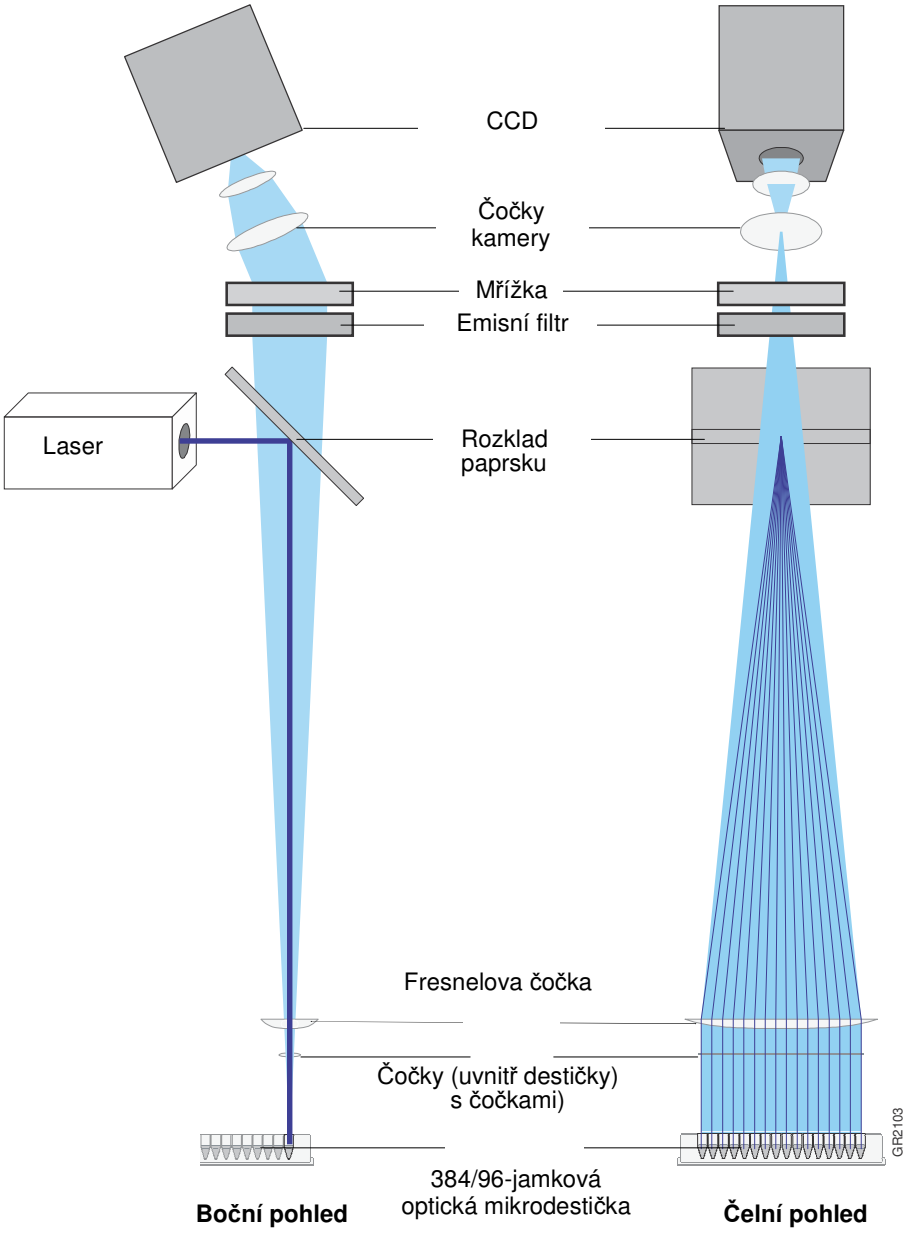
- Široký rozsah teplot: 4–99.9 °C
- Přesnost: ±0.25 °C v rozsahu 35–99.9 °C
- Rychlost ohřevu/chlazení: 1.5 °C za vteřinu
- Teplotní uniformita: ±0.5 °C (měřeno 30 sec po spuštění časovače)
- Dlouhodobá stabilita a vysoká spolehlivost
- Možnost používání různých druhů spotřebního materiálu (viz strana 1-10)
- Několik různých režimů provozu včetně režimu simulace běhu přístroje 9600 a programovatelné rychlosti změny teplot (ramping) (viz strana 3-19)
- Zkrácená doba mimo provoz díky možnosti okamžité výměny bloku (viz strana 7-6)
- Snadný přístup k bloku na vzorky (řešení problémů a údržba – viz strana 7-6)

Optický systém

DŮLEŽITÉ! Neodstraňujte kryt přístroje 7900HT. Vnitřní součásti přístroje může opravovat či měnit jejich nastavení pouze kvalifikovaný technik společnosti Applied Biosystems.

Optický systém přístroje 7900HT je odvozen od optického systému Real-Time PCR ABI PRISM® 7700. Na obrázku 1-5 je vyobrazen optický systém přístroje 7900HT.

Poznámka: Více informací o optickém systému přístroje 7900HT naleznete v příloze A "Princip fungování."



Obrázek 1-5 Optický systém přístroje 7900HT

Počítač

Funkce

Pro správné fungování systému 7900HT a podavače mikrodestiček Zymark Twister je zapotřebí počítač s operačním systémem Microsoft Windows. Pomocí programů SDS a Automation Controller počítač umožňuje:

- Programovat a ovládat přístroj
- Koordinovat fungování přístroje 7900HT, systému automatického režimu provozu a čteček čárových kódů
- Uchovávání a správu dat vzniklých činností systému 7900HT
- Propojení místní sítě (LAN) a databáze SDS Enterprise (je-li instalována)

Systémové požadavky

Požadavky na konfiguraci operačního systému počítače sloužícího k ovládání přístroje 7900HT se liší podle verze programu SDS. Chcete-li znát nároky na systém vašeho počítače, naleznete je v dokumentu Release notes pro vaši verzi programu SDS.

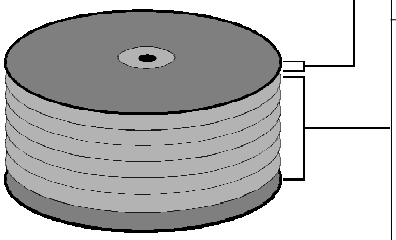
Tento soubor je umístěn:

```
D:\AppliedBiosystems\SDS2.2\ReleaseNotes.txt
```

Poznámka: Pro čtení souboru je možno použít programy Microsoft Notepad, Wordpad nebo Word.

Rozdělení pevného disku

Během instalace přístroje 7900HT provede servisní technik společnosti Applied Biosystems rozdělení pevného disku tak, jak je uvedeno v následující tabulce.



Disk	Vel. (GB)	Obsahuje
C	2	Soubory operačního systému·
D	≥25	• Program SDS 2.2 • Program Automation Controller • Program pro Zymark Twister • Program LAVA† • Programy třetích stran • Datové soubory sds • (Volitelné) Klient databáze SDS Enterprise

*Společnost Applied Biosystems doporučuje, abyste na disk C neinstalovali programy. Počítač se spouští rychleji, je-li na disku C pouze operační systém.

†Program pro ovládání čtečky čárových kódů..

Poznámka: Rozdělení pevného disku podle tabulky viz výše je pouze základním rozdělením požadovaným programem SDS. Konkrétní konfigurace rozdělení pevného disku (pevných disků) je závislá na konkrétním modelu ovládacího počítače, dodaného k přístroji.

Čtečky čárových kódů

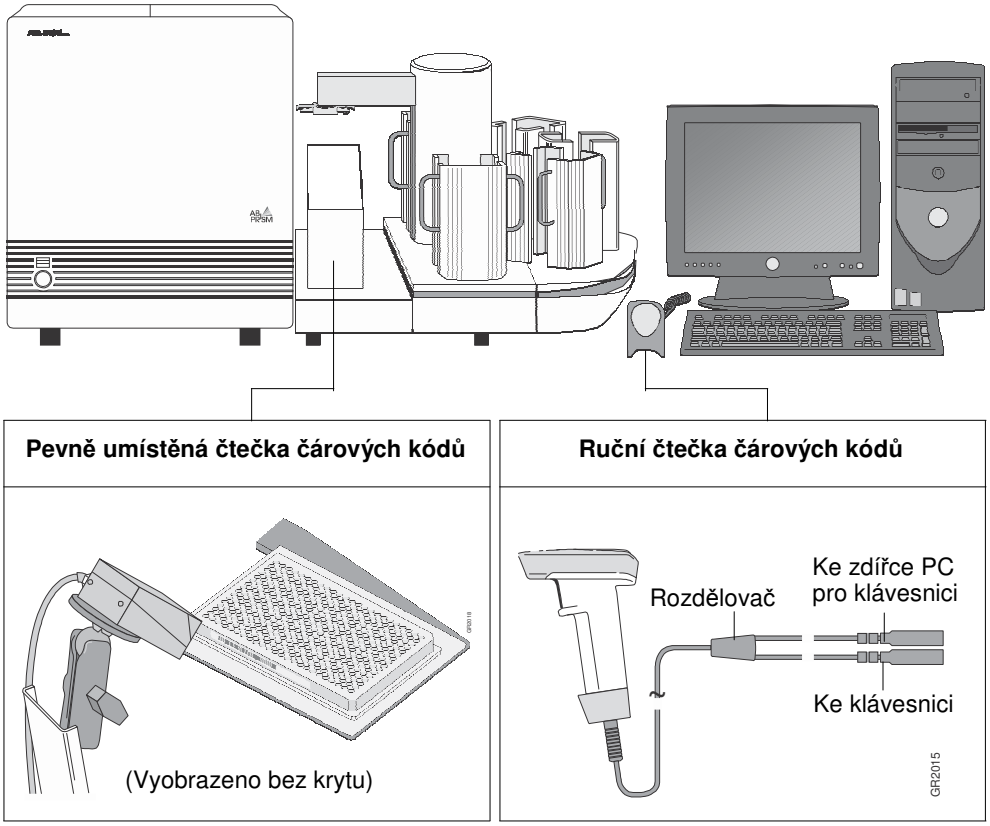
Popis

Součástí systému ABI PRISM 7900HT jsou i dvě čtečky čárových kódů pro načítání dat a rozeznání mikrodesiček:

- Ruční čtečka čárových kódů slouží k manuálnímu načítání kódů
- Pevně umístěná čtečka čárových kódů je používána pro automatické snímání kódu mikrodestičky umísťované do přístroje (je používána pouze v součinnosti s automatickým podavačem vzorků)

Obě čtečky čárových kódů pracují s laserovým paprskem třídy II o vlnové délce 670 nm a podporují formát 128 ASCII znakového čárového kódu.

Umístění čteček čárových kódů



Obrázek 1-6 Čtečky čárových kódů přístroje 7900HT

Používání čteček čárových kódů

WARNING **NEBEZPEČÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ**. Přímé nebo odražené laserové paprsky mohou poškodit sítnici, což může vést k trvalém poškození zraku. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku. Odstraňte šperky a další předměty, které mohou odrážet paprsek do vašich očí. Chraňte ostatní před laserovými paprsky.

Více informací o čtečkách čárových kódů naleznete v :

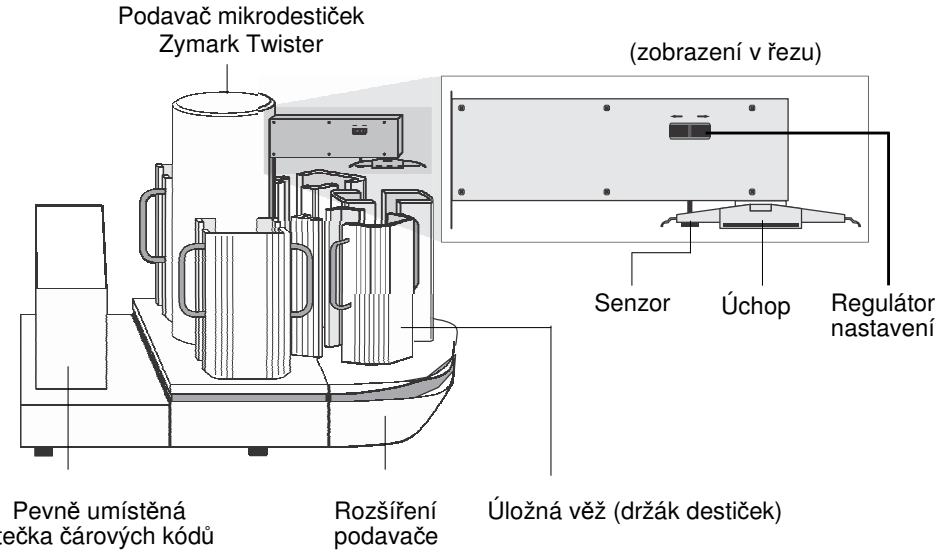
Používání ruční čtečky čárových kódů 2-26
Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49

Podavač mikrodestiček Zymark Twister

Popis

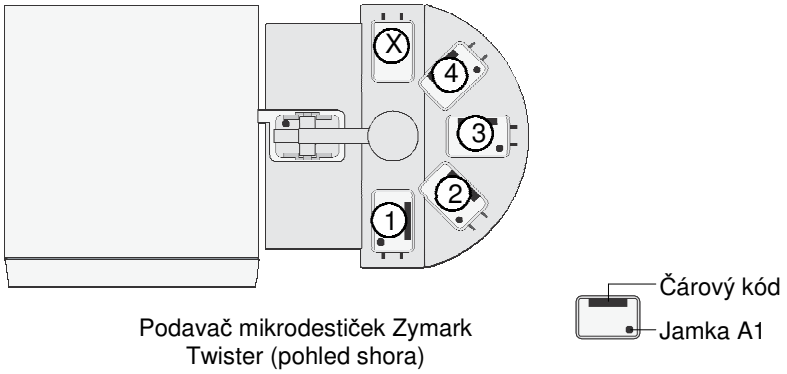
Podavač mikrodestiček Zymark Twister® slouží k manipulacím s mikrodestičkami, a tak umožňuje bezobslužný provoz přístroje 7900HT. Rameno podavače se pohybuje v rozsahu 310 stupňů, čímž je umožněn přístup k zásuvce přístroje 7900HT, až k pěti úložným věžím na mikrodestičky a k pevně umístěné čtečce čárových kódů.

Součásti podavače mikrodestiček Zymark Twister



Obrázek 1-7 Součásti podavače mikrodestiček Zymark Twister

Úložné věže



Obrázek 1-8 Úložné věže podavače mikrodestiček Zymark Twister

Používání podavače mikrodestiček Zymark Twister

WARNING **NEBEZPEČÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ**. Přímé nebo odražené laserové paprsky mohou poškodit sítnici, což může vést k trvalému poškození zraku. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku. Odstraňte šperky a další předměty, které mohou odrážet paprsek do vašich očí. Chraňte ostatní před laserovými paprsky.

Více informací o podavači mikrodestiček Zymark Twister naleznete v:

Zapnutí přístroje 7900HT 2-4
Zapnutí a nastavení programu Automation Controller 4-37
Údržba podavače mikrodestiček 7-35

Spotřební materiál

Spotřební materiál k přístroji 7900HT

Díky vyměnitelným blokům umožňuje přístroj 7900HT používání různých typů spotřebního materiálu tak je popsáno v následující tabulce.

Tabulka 1-1 Spotřební materiál

Spotřební plastik	Uzavření (víčka)
ABI PRISM™ optické 384-jamkové mikrodestičky	ABI PRISM™ optická adhezívní fólie
ABI PRISM™ optické 96-jamkové mikrodestičky	• Kompresní podložky (Compression Pads): – Standardní podložka pro ruční ovládání – Zacvakávací podložka • 96-ti jamkové destičky: – ABI PRISM optická adhezívní fólie – ABI PRISM optická víčka (pouze plochá)
Mikrofluidní karty	Žádné (samozatavitelné)

Kompresní podložky

Společnost Applied Biosystems doporučuje pro dosažení optimálního přenosu tepla používat kompresní podložky. Standardní kompresní podložky jsou dodávány s optickými 96-ti jamkovými mikrodestičkami a lze je použít při ručním ovládání přístroje. Pro provoz v automatickém režimu s podavačem mikrodestiček Zymark Twister dodává společnost Applied Biosystems opakovaně použitelné zacvakávací podložky.

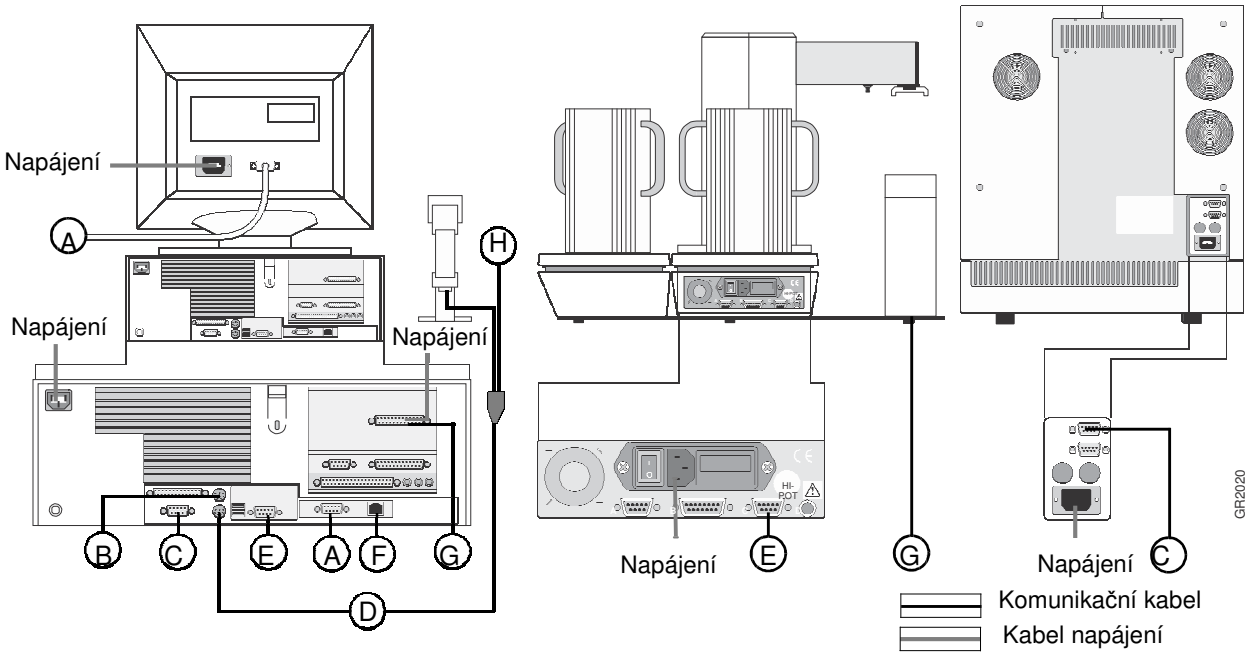
Více informací o spotřebním materiálu

Více informací o spotřebním materiálu a údaje pro jeho objednání naleznete v příloze C “Kity, reagencie a spotřební materiál”.

Zapojení přístroje

Elektrické propojení

Na obrázku 1-9 a v tabulce 1-2 je znázorněno propojení jednotlivých součástí přístroje ABI PRISM 7900HT.



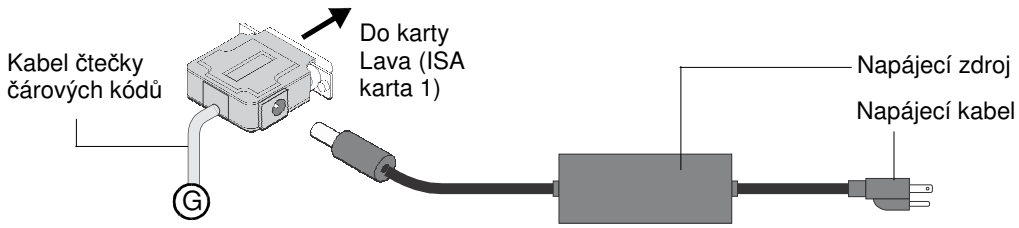
Obrázek 1-9 Propojení součástí přístroje ABI PRISM 7900HT

Tabulka 1-2 Propojení přístroje ABI PRISM 7900HT

Kabel	Typ	Propojení z …	do…
A	Komunikace	Počítač (port pro monitor)	Monitor
B	Komunikace/ Napájení	Počítač (port myši)	Myš – není zobrazena
C	Sériová komunikace	Počítač (sériový port 1)	Přístroj 7900HT
D	Komunikace/ Napájení	Počítač (port klávesnice)	Ruční čtečka čárových kódů
E	Komunikace	Počítač (sériový port 2)	Automatický podavač mikrodestiček (port C)
F	Ethernet	Místní počítačová síť	Počítač (ethernetový port) nebo HUB
G*	Komunikace/ Napájení	Počítač (ISA karta 1)	Pevně umístěná čtečka čárových kódů
H	Komunikace/ Napájení	Kabel čtečky čárového kódu	Klávesnice (není zobrazena)

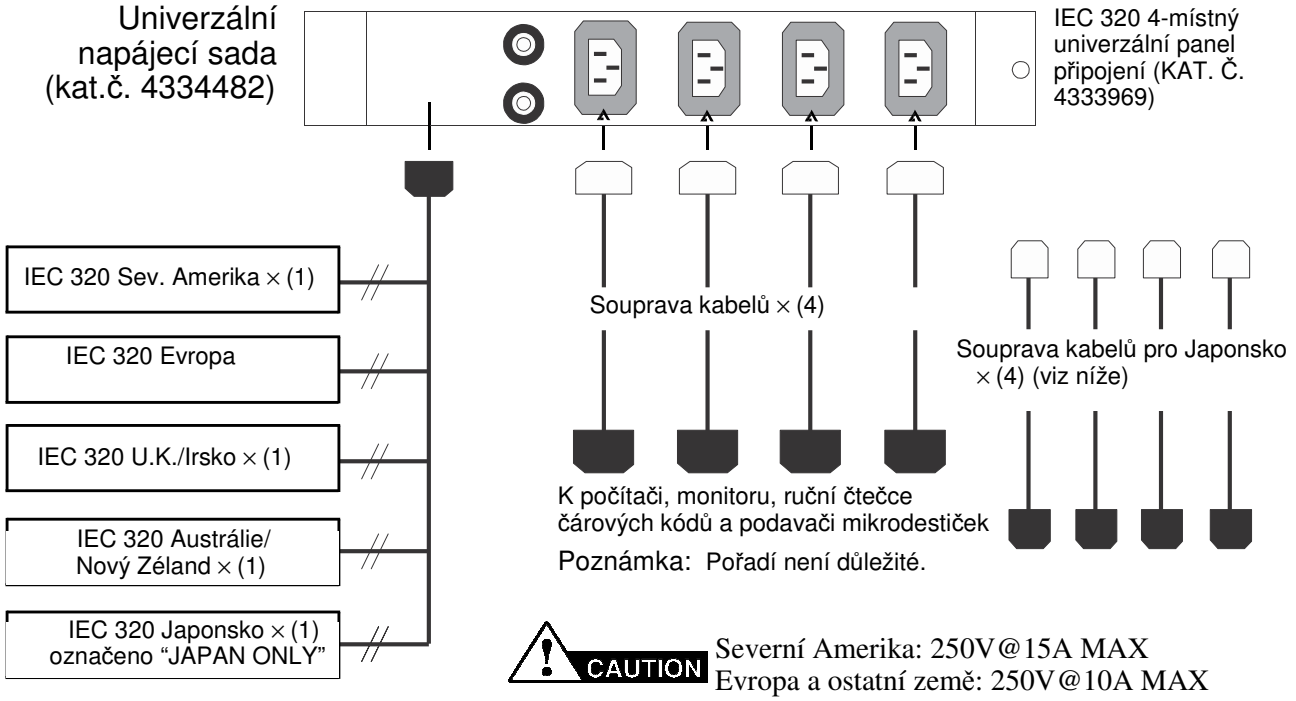
*Viz obrázek 1-10 na straně 1-12.

Pevně umístěná čtečka čárových kódů



Obrázek 1-10 Připojení pevně umístěné čtečky čárových kódů

Univerzální napájecí sada (kat.č. 4334482)



Obrázek 1-11 Univerzální panel připojení

Při instalaci univerzální napájecí sady kabelů (všechny země mimo Japonska):

1. Propojte jeden konec speciálních propojovacích kabelů s jednotlivými spotřebiči.
2. Druhý konec propojovacích kabelů zapojte do panelu.
3. Zvolte správnou koncovku pro napájecí kabel podle dané země (pro ČR platí norma IEC320) a kabel propojte do panelu.
4. Vypněte všechny komponenty (monitor, počítač a automatický podavač).
5. Napájecí kabel propojte do napájecí zásuvky.
6. Zapněte komponenty.
7. Nepoužité propojovací kabely nenechávejte zapojené do panelu.

Část 1.2 Poznáváme software

V této části

Jednotlivé součásti softwaru 1-14
Program SDS - soubory a jejich formáty 1-15
Správa dat 1-17

Jednotlivé součásti softwaru

Programové vybavení

Pro práci s přístrojem ABI PRISM 7900HT se používá soubor programů, které slouží k nastavení a spuštění a k analýze výsledků vytvářených přístrojem 7900HT.

Tabulka 1-3 Standardní program SDS

Program	Funkce
Program SDS	• Vytváření a editace souborů destiček • Provádění vstupní a finální analýzy dat alelické diskriminace, relativní a absolutní kvantifikace • Ukládání, tisk a export výsledků
Java™ Runtime Environment	Přídavný software používaný při běhu programu SDS DŮLEŽITÉ! Nemažte součásti Java Runtime Environment. Jsou nutné pro správnou funkci programu SDS.
Firmware přístroje 7900HT	• Provádí řízení základních funkcí a operací přístroje 7900HT • Je ovládán příkazy z počítače • Spojuje příkazy vydávané programem SDS s operacemi prováděnými přístrojem 7900HT

Tabulka 1-4 Programy pro práci v automatickém režimu nebo s databází Enterprise

Program	Funkce
Program Automation Controller	• Řídí a koordinuje operace přístroje 7900HT v režimu automatického provozu • Spouští a řídí provádění jednotlivých běhů • Provádí odečítání dat v průběhu běhu
Program Zymark Twister	Program pro kalibraci automatického podavače mikrodestiček.
Program LAVA	Program pro nastavení polohy pevně instalované čtečky čárových kódů.
Klient databáze SDS Enterprise	Zabezpečuje propojení programu SDS a databáze Enterprise pomocí síťového propojení. Poznámka: Více informací viz strana 1-21.

Program SDS – soubory a jejich formáty

Soubory používané a vytvářené programem SDS

DŮLEŽITÉ! Nikdy nemažte nebo nepřemisťujte programové soubory nebo adresáře programu SDS a souvisejících programů vyjma případů, kdy jste k tomu vyzváni zástupcem nebo dokumentací společnosti Applied Biosystems.

Program SDS používá různé soubory a adresáře (Tabulka 1-5). Některé z těchto souborů obsahují výsledky nebo kalibrační data, jiné jsou zapotřebí pro provoz přístroje 7900HT.

Tabulka 1-5 Běžné soubory programu SDS

Typ souboru	Přípona	Ikona	Popis/Komentář
Soubory dokumentů destiček			
ABI PRISM SDS dokument	*.sds		• Virtuální záznam mikrodestičky (nebo jiného typu spotř. materiálu) se vzorky • Obsahuje údaje o vzorcích a esejích (názvy, umístění, reportérová barva) v destičce • Obsahuje údaje o teplotním profilu a nastavení pro odečítání dat • Ukládá data zaznamenaná v průběhu běhu
ABI PRISM SDS soubor typu sdm	*.sdm		• Pro analýzu výsledků relativní kvantifikace (malé soubory dat)
ABI PRISM SDS templát*	*.sdt		• Pro vytváření dokumentů destiček (sds) • Může obsahovat informace o jednotlivých esejích, teplotní profil a nastavení pro odečítání dat
Importované/Exportované soubory			
Nastavení dokumentu destičky	*.txt		Pro vytváření dokumentu destičky
Exportovaný datový soubor	*.txt		• Obsahuje exportovaná hrubá nebo analyzovaná data pro všechny nebo zvolenou skupinu jamek • Používá formát *.txt (tabelátorem oddělená data kompatibilní s většinou tabulkových editorů)
Grafický soubor JPEG†	*.jpg	‡	• Pro export grafů nebo panelů dokumentu destičky • Kompatibilní s většinou textových nebo tabulkových editorů • Může být začleněn přímo do souborů typu HTML nebo XML

*Používání templátů není nutné, ale je doporučeno kvůli úspoře času v případech, kdy jsou opakovaně používány destičky s identickým nastavením jednotlivých esejí.
†Joint Photographic Experts Group
‡Ikona se mění podle toho, kterému programu je přiřazen soubor typu jpeg

Velikost souborů

Činností programu SDS vznikají soubory o různé velikosti v závislosti na typu běhu. V tabulce 1-6 jsou uvedeny průměrné velikosti typických souborů vzniklých činností programu SDS.

Tabulka 1-6 Průměrná velikost dokumentů destičky

Typ běhu	**Aplikace**	**Velikost souboru***	
		Nekomprimovaný	**Komprimovaný**
Jedno čtení	Alelická diskriminace	150 až 180 KB	70 až 90 KB
Čtení v reálném čase (Real-Time)†	Absolutní kvantifikace	15 až 25 MB‡	10 až 15 MB
	Relativní kvantifikace		

*Velikost komprimovaných souborů je pouze odhad na základě komprese programem WinZip®. Více informací viz “Archivace souborů programu SDS” na straně 7-54.

† Maximální velikost souborů při čtení v reálném čase (absolutní nebo relativní kvantifikace) je jen přibližná. Velikost může být větší v závislosti na nastavení režimu záznamu dat.

‡Velikost souborů při čtení v reálném čase závisí na délce běhu a nastavení záznamu dat v dokumentu destičky. Delší běhy a běhy v nichž jsou data snímána ve více krocích mohou vést ke vzniku souborů výrazně větších než 15 až 25 MB.

DŮLEŽITÉ! Z důvodu omezení paměti nemůže databáze SDS Enterprise ukládat soubory, jejichž velikost přesahuje 40 MB.

Správa dat

Fungování systému a tok dat

Správa dat je klíčovým prvkem úspěšné integrace přístroje ABI PRISM 7900HT do procesu ostatních činností v laboratoři. Během 24 hodin provozu v režimu čtení v reálném čase (Real-Time) může přístroj 7900HT vytvořit více než 200 MB dat. K úspěšné správě dat je nutné pochopit základní principy jejich záznamu, ukládání a zpracovávání.

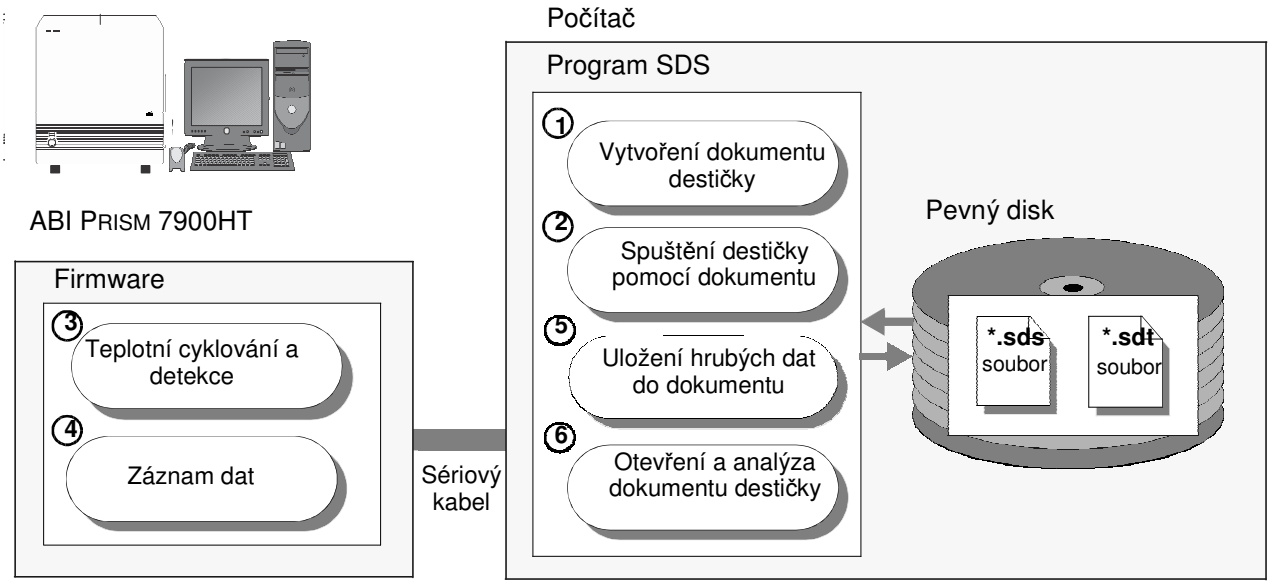
Standardní režimy provozu

Přístroj ABI PRISM 7900HT má tři standardní režimy provozu v závislosti na příslušenství, které bylo zakoupeno spolu s přístrojem

- Provoz samostatného přístroje (Stand-Alone – viz níže)
- Provoz v automatickém režimu (viz strana 1-18)
- Provoz s databází (viz strana 1-18)

Provoz samostatného přístroje

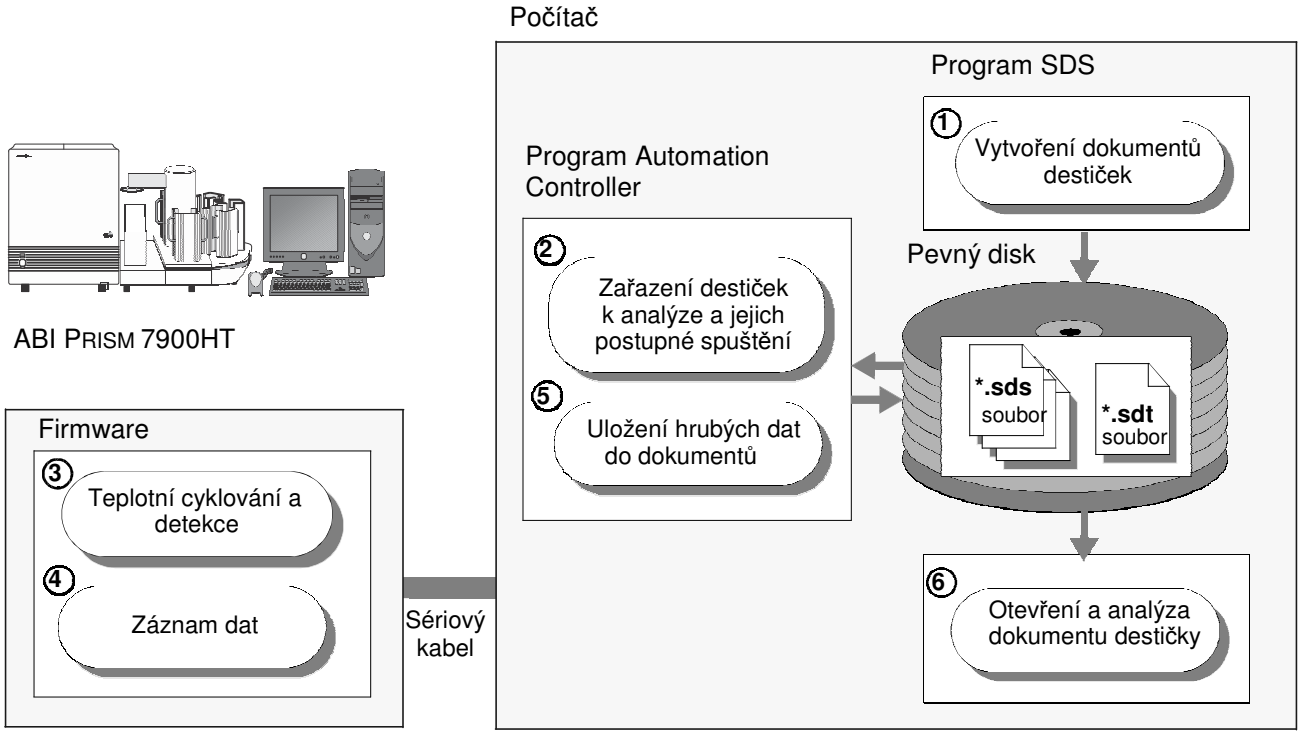
V tomto režimu provozu se používá pouze přístroj ABI PRISM 7900HT (Obrázek 1-12) bez jakéhokoliv příslušenství. Jednotlivé běhy spouští laborant/ka za použití programu SDS, který ukládá data na pevné disky počítače.



Obrázek 1-12 Samostatný provoz přístroje 7900HT

Provoz v automatickém režimu

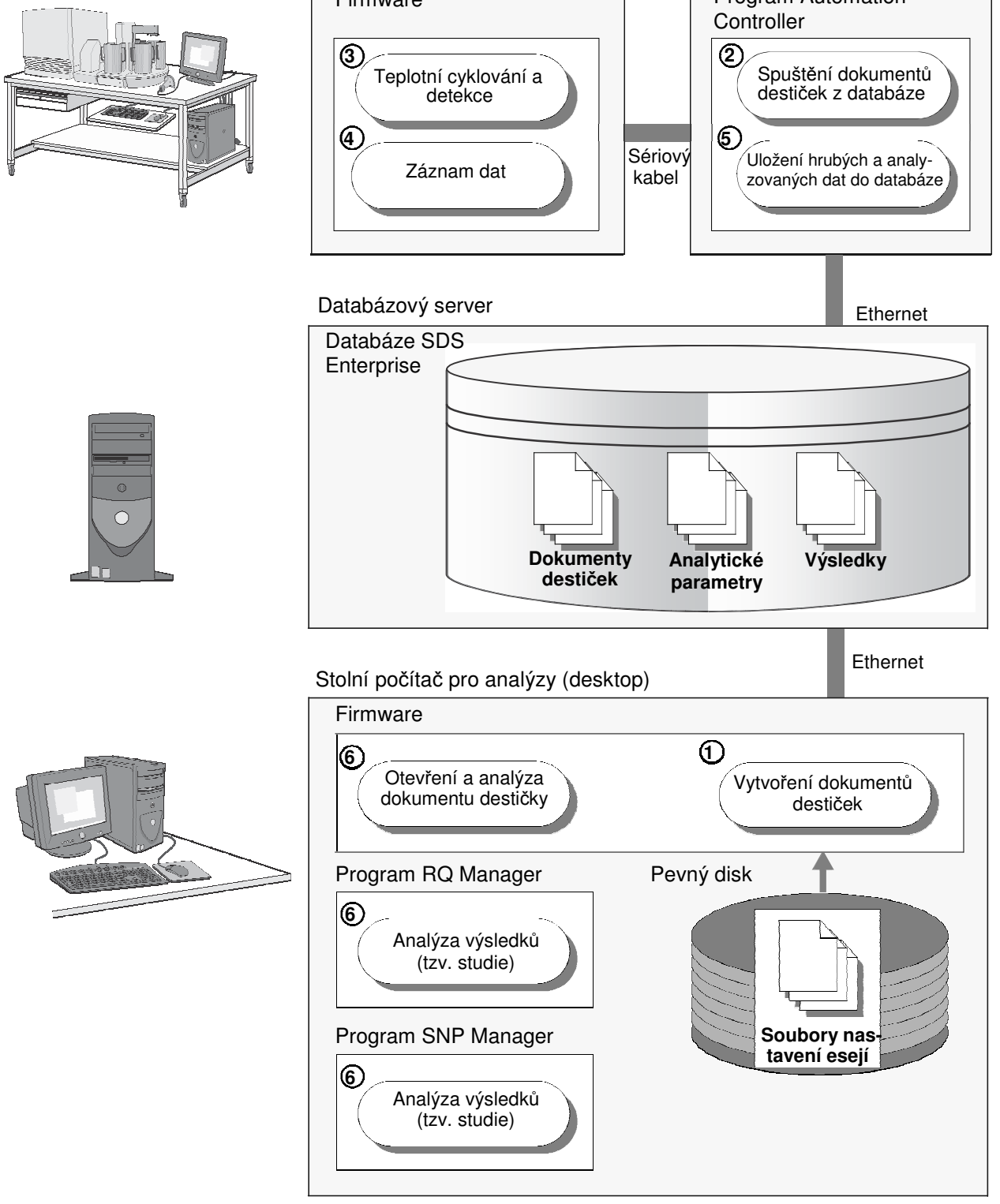
V tomto režimu provozu používá přístroj ABI PRISM 7900HT příslušenství – podavač mikrodestiček Zymark Twister a pevně umístěnou čtečku čárových kódů, což umožňuje zpracovávání velkého počtu vzorků. Pomocí programu Automation Controller tak může laborant/ka zpracovat větší počet destiček aniž je jejich zpracování osobně přítomen/přítomna. Obdobně jako v režimu samostatného provozu ukládá počítač veškerá data a umožňuje jejich analýzu.



Obrázek 1-13 Automatický režim provozu přístroje 7900HT

Provoz s databází Enterprise

V tomto provozním režimu používá přístroj ABI PRISM® 7900 HT databázi SDS Enterprise a automatický podavač mikrodestiček tak, aby bylo možné zpracování co nejvyššího počtu vzorků. V této konfiguraci (viz obrázek 1-14 na straně 1-19) má přístroj 7900HT dostatečnou kapacitu pro uložení a dostatečné možnosti pro analýzu velkého množství vzorků, ať již pro kvantifikaci genové exprese nebo genotypování. Kromě toho slouží databáze SDS Enterprise i pro úschovu výsledků souvisejících analýz, vzniklých na počítačích, které jsou připojeny prostřednictvím místní sítě.



Obrázek 1-14 Automatický režim provozu přístroje 7900HT s databází SDS Enterprise

Část 1.3 Databáze SDS Enterprise

V této části

O databázi SDS Enterprise....1-22
O softwaru databáze SDS Enterprise....1-25
Koncepce databáze a správa dat....1-27
Podpora dokumentace API....1-28

O databázi SDS Enterprise

O databázi

Program SDS verze 2.2 je vybaven rozhraním pro komunikaci s databází SDS Enterprise společnosti Applied Biosystems jako součástí laboratorního informačního a řídícího systému (LIMS). Databáze SDS Enterprise je relační databáze založená na databázovém systému Oracle, navržená speciálně pro ukládání dat, která jsou generována přístrojem ABI PRISM® 7900HT. Mezi další funkce databáze patří autentizace uživatelů, výkonný a nastavitelný systém správy dat a nastavitelné možnosti archivování. Databáze dále obsahuje programové nástroje pro začlenění přístroje 7900HT do procesů správy dat v laboratorním provozu.

Řízení přístupu

Databáze SDS Enterprise umožňuje víceúrovňové řízení přístupu uživatelů a díky tomuto systému je možné různým uživatelům zamezit v přístupu k funkcím nejen samotné SDS databáze, ale i k programu SDS a k ovládání přístroje 7900HT. Součástí databáze je také modul pro nastavení práv jednotlivých uživatelů (SDS User Account Manager). Tento modul dovoluje nastavení práv a hesel jednotlivým uživatelům, přidávání a mazání uživatelů, to vše pouze uživateli s oprávněními administrátora. Práva přístupu k jednotlivým úkonům jsou uvedena v této příručce ve formě krátkých poznámek u popisu daného úkonu.

Poznámka: Úplný popis uživatelských účtů v databázi SDS Enterprise naleznete v příručce *SDS Enterprise Database Administration Guide* (kat. č. 4346513).

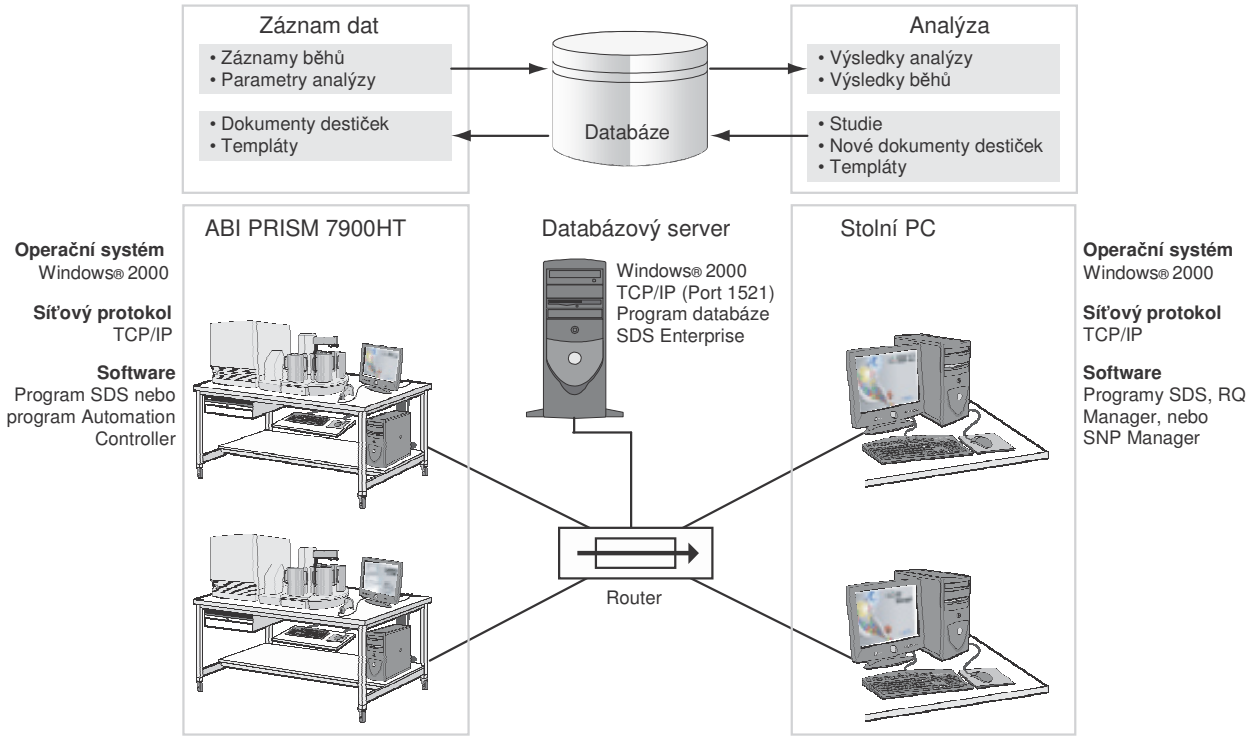
Struktura sítě

Databáze SDS Enterprise je koncipována jako dvoupásmová databáze s architekturou klient-server v prostředí sítě Ethernet (10Base-T) nebo Fast Ethernet (100Base-T). Databázi je možno provozovat jako součást izolované hvězdicové sítě s využitím routeru SMC dodávaného spolu s databází (obr. 1-15) nebo jako jeden uzel větší síťové sběrnice (obr. 1-16). Server databáze používá statickou IP adresu a je schopen obsluhovat až 5 klientských stanic najednou. Stanice mohou fungovat buď v režimu DHCP nebo mohou mít přiděleny statickou TCP/IP adresu.

Příklad architektury místní sítě (LAN)

V základní konfiguraci je databáze SDS Enterprise schopna obsluhovat až čtyři DHCP nebo TCP/IP klientské stanice v topologii hvězdicové sítě. V této konfiguraci je server propojen s klientskými stanicemi přes router, dodávaný spolu s databází, se statickou IP adresou.

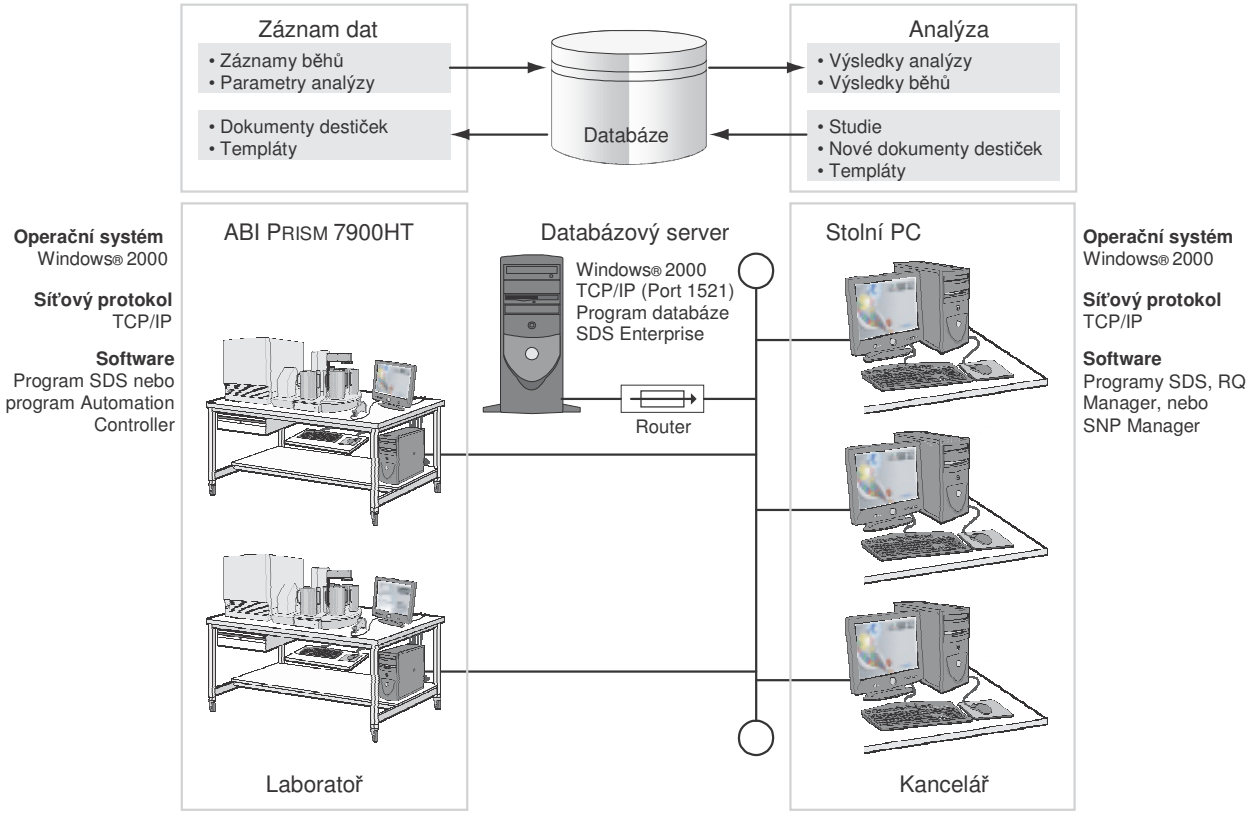
Poznámka: Router umožňuje propojení i do vzdálené sítě (WAN).



Obrázek 1-15 Základní architektura lokální sítě (LAN) pro databázi SDS Enterprise

Příklad architektury vzdálené sítě (WAN)

V konfiguraci WAN je databáze SDS Enterprise schopna obsluhovat až 5 klientských stanic jako jednotlivých síťových uzlů. Stejně jako v předchozí konfiguraci musí být server pro identifikaci v síti konfigurován s pevnou IP adresou a klientské stanice pak mohou být konfigurovány buď DHCP nebo pevnou TCP/IP adresou.



Obrázek 1-16 Základní architektura vzdálené sítě (WAN) pro databázi SDS Enterprise

O softwaru databáze SDS Enterprise

Program správy databáze

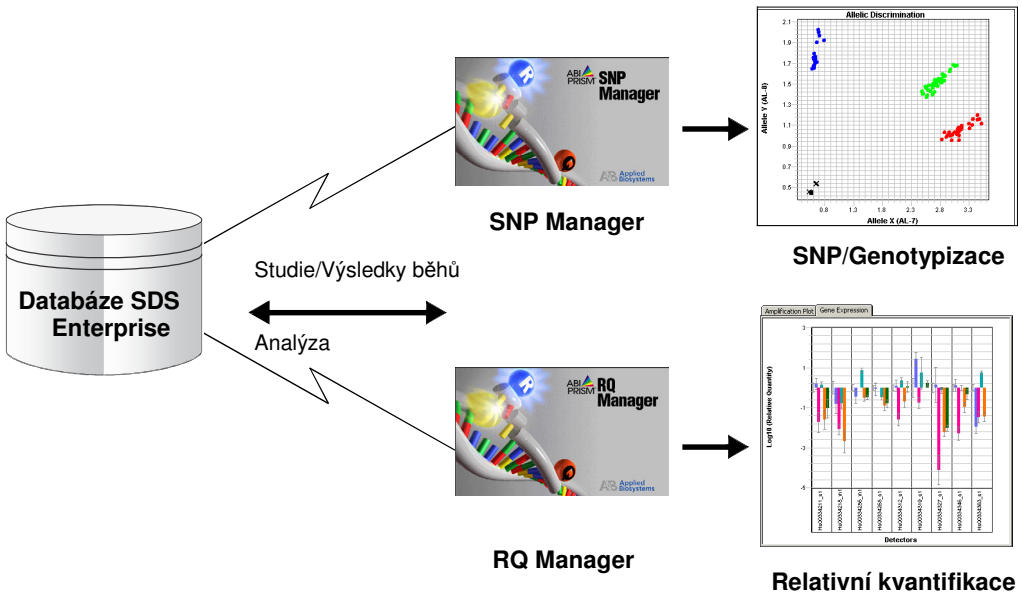
Databáze SDS Enterprise obsahuje nástroje, které umožňují uživateli začlenit ji do běžného provozu laboratoře tak, jak je popsáno v části:

Databázové moduly pro velkokapacitní analýzu 1-25
Nástroje pro správu databáze 1-26

Databázové moduly pro velkokapacitní analýzu

O modulech

Společnost Applied Biosystems nabízí pro provádění středně- a velkokapacitních analýz genotypizace a genové exprese v databázi SDS Enterprise dva moduly (SNP Manager a RQ Manager) (Obrázek 1-17).



Obrázek 1-17 Databáze SDS Enterprise – Velkokapacitní analýza

O programu SNP Manager

Program SNP Manager slouží k provádění analýzy SNP (genotypové analýzy) pro středně velké a velké objemy dat uložené v databázi SDS Enterprise. Program je schopen najednou zpracovat až 5000 destiček, což znamená až 1,9 milionu 5´nukleázových reakcí zpracovaných na přístroji ABI PRISM® 7900 HT. Více informací naleznete v příručce *SDS SNP Manager User Guide* (kat. č. 4338776).

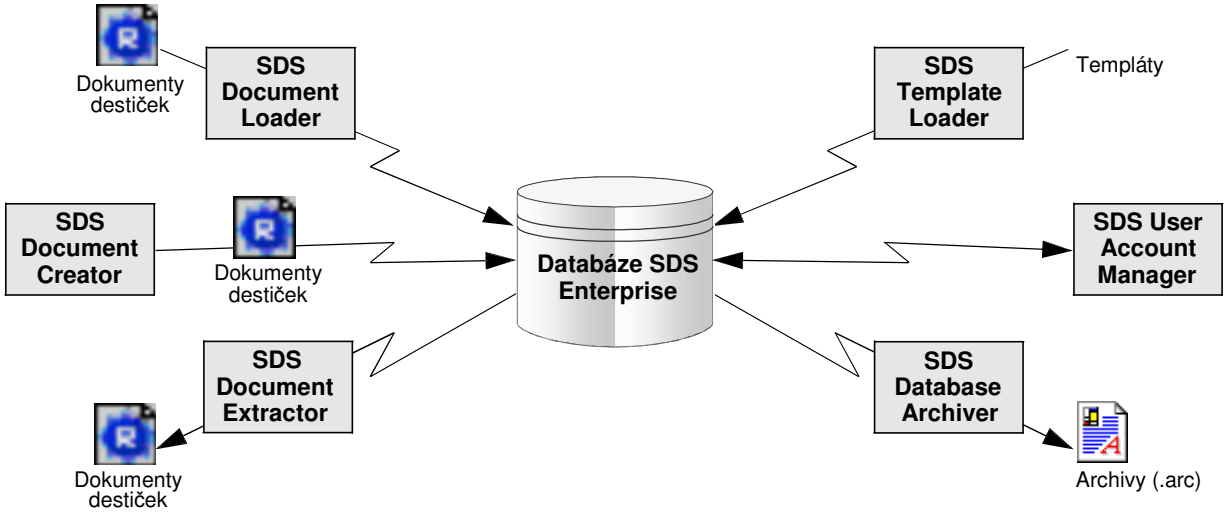
O programu RQ Manager

Program RQ Manager slouží k provádění analýzy relativní kvantifikace (genové exprese) pro středně velké a velké objemy dat uložené v databázi SDS Enterprise. Program dokáže provést srovnávací analýzy pro až 97 detektorů (96 cílových genů a 1 endogenní kontrola) pro až 200 destiček nebo přibližně 153600 multiplexních reakcí zpracovaných přístrojem ABI PRISM® 7900HT. Více informací naleznete v příručce *SDS RQ Manager User Guide* (kat. č. 4339753).

Nástroje pro správu databáze

Přehled

Databáze SDS Enterprise obsahuje soubor nástrojů, které provádějí správu používání a obsahu databáze. Na obrázku 1-18 jsou shrnuty základní funkce každého z těchto nástrojů a typ dat, s kterými pracuje.



Obrázek 1-18 Přehled nástrojů pro správu databáze

Nástroje pro práci s dokumenty SDS

Součástí programového vybavení databáze SDS Enterprise jsou čtyři nástroje, spustitelné z příkazové řádky, které zabezpečují správu dokumentů destiček, templátů a výsledků, které jsou generovány přístrojem 7900HT.

- **SDS Document Creator** (nástroj pro tvorbu dokumentů destiček) – Vytváří v databázi pomocí templátu a souboru nastavení eseje dokumenty destiček (assay plate setup file) (viz "Vytvoření dokumentu pomocí templátu" na straně A-51).
- **SDS Document Loader** (nástroj pro zavádění dokumentů destiček) – Zavádí do databáze obsah již existujících dokumentů destiček (viz "Zavádění dokumentů" na straně A-54).
- **SDS Document Extractor** (nástroj pro extrakci dokumentů z databáze) – Vytváří dokumenty destiček z dat v databázi (viz "Extrahování dokumentů" na straně A-55).
- **SDS Template Loader** (nástroj pro zavádění templátů) – Zavádí do databáze obsah již existujících templátů (viz "Zavádění do templátů" na straně A-50).

Nástroj pro archivaci dat

Program SDS Archiver se instaluje spolu s programem SDS, jehož součástí je Klient databáze SDS Enterprise. Tento program umožňuje administrátorovi databáze vytvářet archivy dat z databáze a následně data z archivních souborů opět do databáze nahrát. Viz "Archivace a zpětné nahrání dat do databáze" na straně A-56.

Správce uživatelských účtů

Program SDS User Account Manager se instaluje spolu s programem SDS, jehož součástí je Klient databáze SDS Enterprise. Tento program umožňuje administrátorům databáze přidělovat ostatním uživatelům práva a hesla, přidávat a odstraňovat je. Viz "Správa uživatelských účtů" na straně A-16.

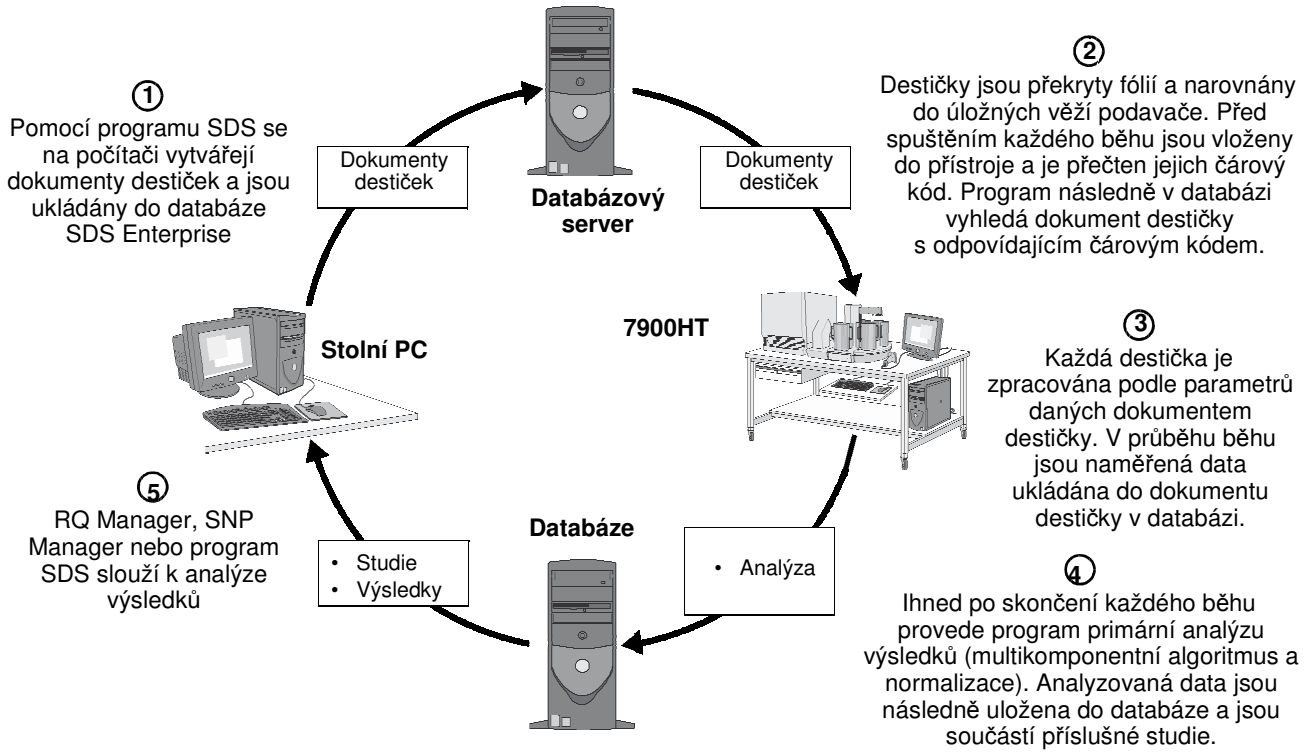
Koncepce databáze a správa dat

Koncepce databáze

Součástí databáze SDS Enterprise jsou tři primární typy datových souborů, používaných pro ovládání přístroje 7900HT a analýzu výsledků:

- Dokumenty destiček
- Analýza
- Studie

Na obrázku 1-19 je vyobrazeno, odkud jsou získávány různé datové soubory a jejich použití při provozu přístroje ABI PRISM 7900HT.



Obrázek 1-19 Tok dat v databázi SDS Enterprise

Typy znovu použitelných dat

Trvalé dokumenty destiček

Trvalé dokumenty destiček obsahují stejné informace jaké jsou uloženy v dokumentech destiček (SDS). Dokumenty destiček pak odpovídají mikrodestičkám nebo mikrofluidním kartám. Každý trvalý dokument destičky zahrnuje údaje nezbytné pro provedení běhu s danou destičkou na přístroji 7900HT:

- Údaje o vzorku/jamce,
- Definice markerů/detektorů a jejich přiřazení k destičkám,
- Definice úlohy (task) pro každý marker/detektor a množství,
- Čárový kód destičky

Analýza

Analýzou se rozumí soubor výsledků, které vznikly z hrubých dat určitého dokumentu destičky. Pro každý dokument destičky lze vytvořit více analýz. Každá analýza má unikátní název, který ji odliší od ostatních.

Tento typ dat existuje v databázi ve dvou stavech: propojený nebo nepropojený. Data jsou propojena v okamžiku, kdy byla přiřazena ke specifické studii buď pomocí programu Automation Controller nebo RQ Manager / SNP Manager.

DŮLEŽITÉ! Po propojení dat a studie není možné tato data propojit s jinou studií, dokud je znovu neodpojíte. Více informací viz příručka *SDS RQ Manager Software User Guide* nebo *SDS SNP Manager Software User Guide*.

RQ a SNP studie

Program databáze SDS Enterprise používá pro organizaci sekundární analýzy dat vytvářených přístrojem ABI PRISM 7900HT systém tzv. studií. Hlavním cílem těchto studií je seskupit data pro analýzu za použití programů SNP Manager nebo RQ Manager.

Podpora dokumentace API

Technická podpora

Součástí databáze SDS Enterprise je i kopie příručky *SDS Enterprise Database Administrators Guide*, která poskytuje informace pro integraci databáze do provozu laboratoře.

V této příručce naleznete:

- Detailní informace o databázi SDS Enterprise API
- Podpůrné informace jako jsou kódy vzorků, reference javadoc, a požadavky pro připojení do databáze.

Začínáme 2

V této kapitole

Začínáme 2-2
Zapnutí přístroje 7900HT 2-4
Používání programu SDS 2-6
Základní dovednosti pro ovládání programu - cvičení 2-9
Používání dokumentů SDS 2-28

Začínáme

Dříve než začnete

Pokud budete používat přístroj ABI PRISM® 7900HT poprvé, doporučujeme, abyste si prošli "Basic Software Skills Tutorial" (Základní dovednosti při ovládání programu - cvičení) na straně 2-9. V tomto cvičení se seznámíte se základními znalostmi potřebnými pro ovládání programu SDS a naučíte se jej rychle a efektivně využívat.

Odkazy

V následujícím přehledu naleznete odkazy na základní kroky popsané v této příručce.

Zadávání a spouštění experimentů

Vytvoření dokumentu destičky 3-8
Spuštění jednoho dokumentu destičky 4-21
Spuštění několika dokumentů destiček (várka dokumentů) 4-29
Zastavení běhu z programu SDS 4-26
Zastavení běhu z programu Automation Controller 4-39
Vysunutí destičky z programu SDS 4-27
Vysunutí destičky z programu Automation Controller 4-39

Analýza výsledků

Analýza výsledků alelické diskriminace 5-5
Analýza výsledků absolutní kvantifikace 6-5
Analýza výsledků relativní kvantifikace 6-15
Analýza disociační křivky 6-37

Údržba přístroje 7900HT

Výměna adaptéru na destičky 7-12
Výměna bloku na vzorky 7-6
Dekontaminace bloku na vzorky 7-14
Provedení kalibrace pozadí 7-16
Provedení kalibrace barev 7-20
Přidání vlastní barvy do sady barev 7-27
Ověření funkčnosti přístroje pomocí destičky TaqMan RNáza P 7-30

Údržba příslušenství přístroje

Nastavení citlivosti senzoru destiček 7-37
Seřízení ramene podavače 7-41
Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49
Čistění a výměna podložek ramene 7-52

Používání nápovědy programu SDS

Součástí programu SDS je nápověda pro všechny kroky zadávání, spouštění a analýzy experimentů. Nápověda je přístupná kliknutím na klávesu ? (Help - Pomoc) umístěné v okně, v kterém zrovna pracujete.

Nápovědu je možné otevřít dvěma možnými způsoby:

Chcete-li…	**pak…**
otevřít nápovědu obecně,	zvolte **Help** > **SDS Online Help (Nápověda)**.
otevřít nápovědu pro specifický úkon, který zrovna provádíte,	klikněte na ikonu ? v dialogovém okně, ve kterém právě pracujete.

Další informace

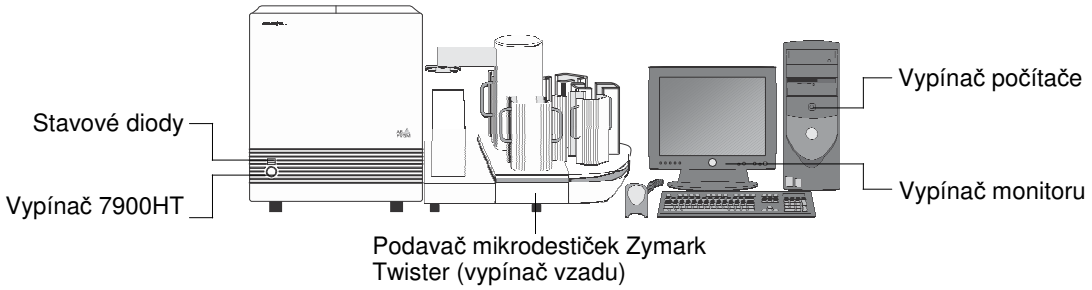
Další informace o používání přístroje ABI PRISM 7900HT nebo programu SDS naleznete v příručkách:

- *ABI PRISM* 7900HT Sequence Detection System *Site Preparation and Safety Guide* (Kat. č. 4317595) – *Příprava místa*
- *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Quick Reference Cards for:*
  - Allelic Discrimination (Kat. č. 4342506) – Alelická diskriminace
  - Absolute Quantification (Kat. č. 4342507) – Absolutní kvantifikace
  - Relative Quantification (Kat. č. 4342505) – Relativní kvantifikace
- *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software Online Help – Nápověda programu SDS*
- *Microsoft Windows Operating System Online Help – Nápověda operačního systému Windows*
- *SDS Enterprise Database Administration Guide – Správa databáze SDS Enterprise*

Zapnutí přístroje 7900HT

Zapnutí přístroje

Přístroj ABI PRISM 7900HT se zapíná postupně. Každá část systému musí být zapnuta v určitém pořadí tak, aby byl celý systém uveden do chodu správně. Pokud je toto pořadí narušeno, jednotlivé součásti přístroje mezi sebou nemusí navázat kontakt, nezbytný pro jejich správné fungování.

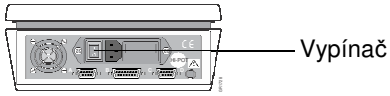


Obrázek 2-1 Vypínače systému ABI PRISM 7900HT

DŮLEŽITÉ! Přístroj a podavač mikrodestiček zapněte alespoň 10 min před použitím. Po zapnutí dochází k zahřátí vyhřívaného víka bloku na vzorky na 105 °C. Pokud spustíte běh dříve než teplota víka dosáhne 105 °C, přístroj nespustí běh a vyčká na dosažení této teploty.

1. Zapněte monitor a počítač.
2. Zapněte podavač mikrodestiček Zymark Twister (vypínač je umístěn na zadní straně podavače, viz níže).

   WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Při zapínání dbejte, abyste neblokovali pohyb ramene. Rameno se po zapnutí automaticky přesune do výchozí pozice.

   Zadní panel podavače

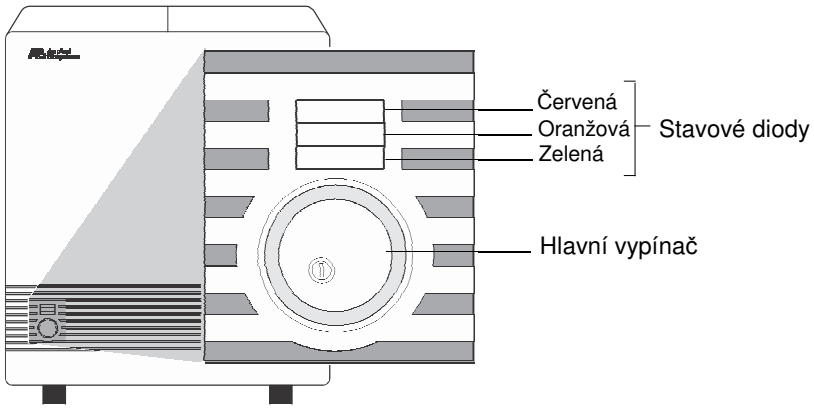
   Rameno se po zapnutí automaticky přesune do výchozí pozice (nad úložnou věž na zpracované destičky).
3. Stiskem hlavního spínače na předním panelu pod stavovými diodami zapněte přístroj 7900HT (viz obrázek 2-1).

   Po zapnutí provede přístroj 7900HT následující kroky:
   - Vydá vysoký signální tón, což označuje správné zapnutí.
   - Stavové diody (červená, oranžová, zelená) zablikají, což je známka aktivace přístroje (podrobněji viz “Stavové diody přístroje” na straně 2-5).

DŮLEŽITÉ! Nezapínejte přístroj 7900HT, pokud jste odstranili boční spodní kryt. Pokud to učiníte, nebude do přístroje z počítače nahrán firmware a objeví se chybová hláška.

Stavové diody přístroje

Přístroj 7900HT je vybaven třemi stavovými diodami, umístěnými v levé dolní části předního panelu (viz obrázek 2-2).



Obrázek 2-2 Stavové diody přístroje 7900HT

Tabulka 2-1 Stavové diody přístroje

Dioda - stav		**Přístroj - stav**	**Požadovaný krok**
(Zelená)	Svítí	Přístroj je zapnut a připraven k provozu	Žádný Indikuje normální stav přístroje.
	Bliká	• Bezpečnostní spínače jsou rozpojeny a/nebo čtecí hlava není ve své pozici. • Otevřená dvířka přístroje.	
(Oranžová)	Bliká	Přístroj přijímá/odesílá data z/do počítače (většinou během běhu).	Žádný Indikuje normální stav přístroje.
	Svítí	Svítí-li po zapnutí déle než dvě minuty: • Nebyla správně provedena inicializace přístroje • Systémová chyba	1. Zkontrolujte, že ovládací počítač je zapnutý a připojený k přístroji (více informací na straně 1-11) 2. Pokud ano, vypněte přístroj, vyčkejte 30 sec a znovu zapněte podle pokynů na straně 2-4.
(Červená)	Svítí	Systémová chyba.	Vypněte přístroj, vyčkejte 30 sec a znovu zapněte. Poznámka: Pokud se situace opakuje, kontaktujte Technickou podporu společnosti Applied Biosystems.

Používání programu SDS

Spuštění programu

1. Spusťte program:
   - Zvolte Start > **Programs** > **Applied Biosystems** > **SDS 2.2** > **SDS 2.2**., nebo
   - Dvakrát klikněte na ikonu (SDS 2.2) na ploše počítače.

   Používáte-li ve vaší místní síti databázi SDS Enterprise, budete automaticky vyzváni k přihlášení.

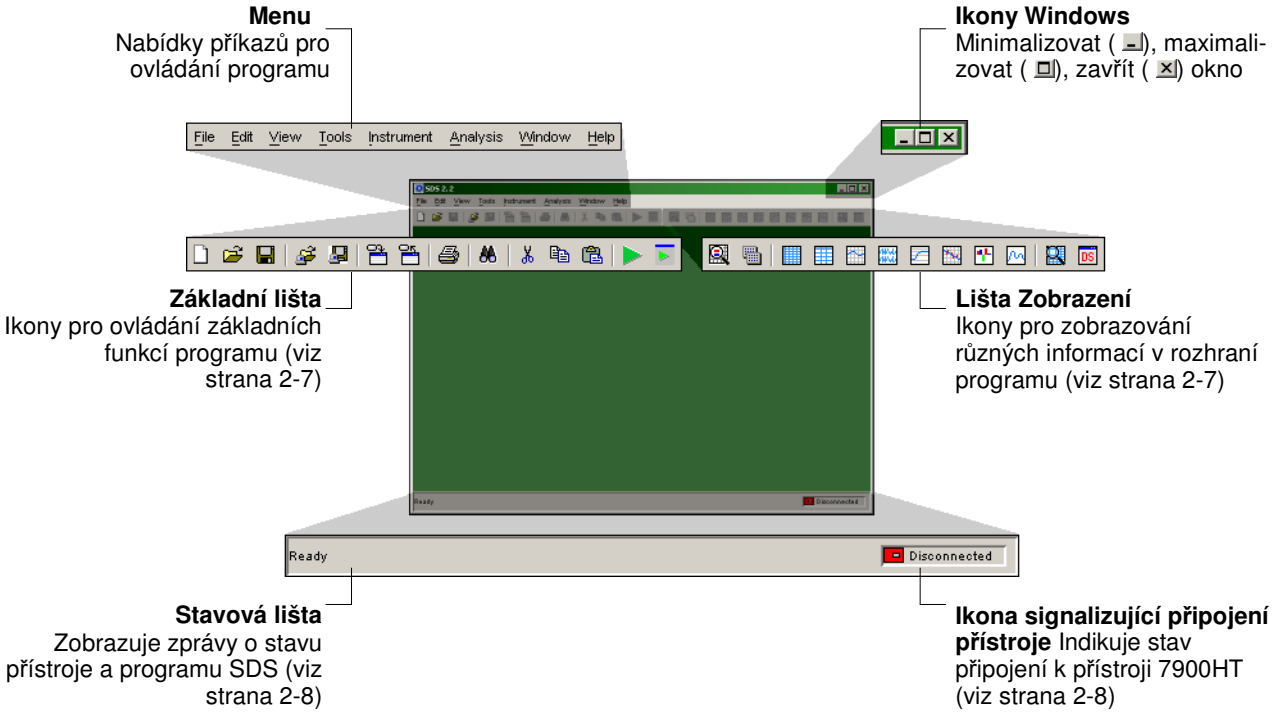
2. (pouze pro databázi) V okně Login (Přihlášení) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.

   Poznámka: Používáte-li databázi, program SDS požaduje, aby každý uživatel měl uživatelské jméno a heslo (viz "Správa uživatelských účtů" na straně A-16).

Počítač spustí program SDS a pokusí se navázat komunikaci s přístrojem 7900HT. Pokud je komunikace navázána, zobrazí se po otevření dokumentu destičky ve stavové liště ikona Připojeno (Connected to 'PlateName').
Více informací viz "O stavové diodě" na straně 2-8.

O rozhraní programu

Informace o veškerých krocích programu jsou zobrazovány v okně programu SDS. Program umožňuje rychlý přístup k funkcím pomocí rozbalovacích nabídek a ikon. Na obrázku 2-3 jsou vlastnosti programového rozhraní zevrubně shrnuty.



Obrázek 2-3 Součásti rozhraní programu SDS

Základní lišta

Součástí základní lišty jsou ikony odkazující na hlavní funkce programu, týkající se správy a analýzy dat. V následujícím seznamu jsou tyto ikony popsány včetně odkazů na úkony, při nichž jsou ikonami odkazované příkazy využívány.

– Vytvoření nového dokumentu destičky (viz strana 2-12)

– Otevření dokumentu destičky z disku (viz strana 2-18)

– Uložení dokumentu destičky na disk (viz strana 2-16)

– Otevření dokumentu destičky z databáze (viz strana 2-18)

– Uložení dokumentu destičky do databáze (viz strana 2-16)

DŮLEŽITÉ! Ikony a jsou na liště zobrazeny pouze je-li program SDS připojen k databázi SDS Enterprise.

– Import dat z textového souboru (viz strana 2-15)

– Export dat do textového souboru (viz strana 2-13)

– Tisk (viz strana 2-12)

– Hledání (viz strana 2-12)

– Vyjmout (viz strana 2-12)

– Kopírovat (viz strana 2-12)

– Vložit (viz strana 2-12)

– Analýza dokumentu destičky (viz strana 2-12)

– Nastavení parametrů analýzy (viz strana 2-12)

Lišta zobrazení

Součástí lišty zobrazení jsou ikony používané pro zobrazování dat v programu SDS. V následujícím seznamu jsou tyto ikony popsány včetně odkazů na úkony, při nichž jsou ikonami odkazované příkazy využívány.

– Skrýt/Zobrazit panel Well Inspector (Prohlížeč jamek) (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit panel Plate List (Seznam destiček) (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit destičku (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit tabulku (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit panel hrubých dat (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit multikomponentní graf (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit amplifikační graf (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit standardní křivku (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit graf genové exprese (viz strana 2-11)

– Skrýt/Zobrazit záznam disociační křivky (viz strana 2-11)

– Zvětšení destičky (viz strana 2-11)

– Nastavení zobrazení (Display Settings) (viz strana 2-11)

Stavová lišta

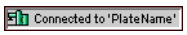
Ve stavové liště jsou zobrazovány zprávy o stavu přístroje a programu. V následující tabulce jsou uvedeny všechny zprávy, které se mohou zobrazit.

Tabulka 2-2 Stavové zprávy

Zpráva	**Program SDS …**
Ready (Připraven)	je připraven a čeká na příkazy.
Collecting Data (Čtení dat)	čte data z aktuálního běhu..
Reanalyze data (Znovu analyzovat data)	vyžaduje analýzu dokumentu destičky. Změnilo se nastavení parametrů analýzy a je nutné provést analýzu znovu za použití těchto změn
Analyzing data... **(Analýza dat…** + Ukazatel postupu)	provádí analýzu. Ukazatel postupu vpravo od zprávy znázorňuje postup analýzy.
Saving data... **(Ukládání dat…** + Ukazatel postupu)	ukládá dokument destičky nebo templát. Ukazatel postupu vpravo od zprávy znázorňuje postup ukládání.
Importing data... ¨ **(Import dat** + Ukazatel postupu)	importuje soubor. Ukazatel postupu vpravo od zprávy znázorňuje postup importu.
Exporting data... **(Export dat…** + Ukazatel postupu)	exportuje data z dokumentu destičky do souboru. Ukazatel postupu vpravo od zprávy znázorňuje postup exportu.

Ikona připojení přístroje

Ikona připojení přístroje znázorňuje stav připojení programu k přístroji 7900HT.



– Počítač je připojen k přístroji a očekává příkazy

– Počítač se nemůže připojit k přístroji (přístroj není připojen nebo zapnut)

Základní dovednosti při ovládání programu - cvičení

Přístup

Používáte-li počítač připojený k databázi SDS Enterprise, musíte mít pro dokončení tohoto cvičení práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

O tomto cvičení

V tomto cvičení se:

- Naučíte, jak vytvářet, ukládat, tisknout, exportovat a importovat dokumenty destiček
- Seznámíte, se základními součástmi rozhraní programu SDS
- Dozvíte, jak nastavit uživatelské rozhraní tak, aby vyhovovalo vašim potřebám
- Naučíte, jak používat ruční čtečku čárových kódů
- Dozvíte, jak ušetřit čas při práci s programem SDS

Jak spustit cvičení

Součástí nápovědy programu SDS je i toto cvičení. Pokud dáváte přednost této on-line verzi, otevřete Nápovědu:

1. Pokud není ještě spuštěn, spusťte program SDS podle návodu na straně 2-6.
2. Zvolte **Help > SDS Online Help** (Nápověda > Nápověda programu SDS).
3. V Nápovědě klikněte na **Basic Skills Tutorial** (Základní dovednosti při ovládání programu – cvičení).
4. Postupujte podle pokynů na obrazovce.

Poznámky pro uživatele databáze

Databáze a cvičení

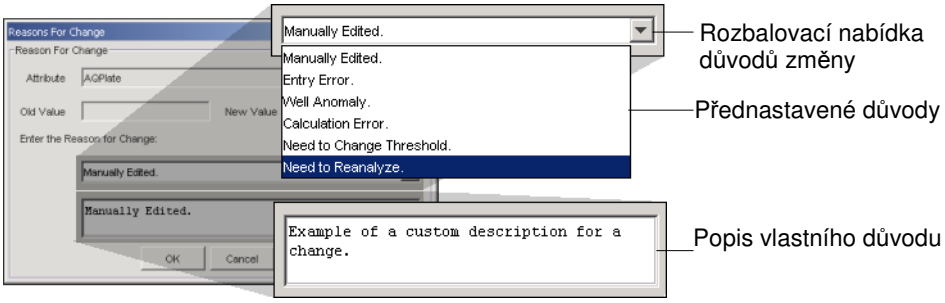
Používáte-li databázi SDS Enterprise pro ukládání dokumentů SDS, studií a dat, je možné, že v průběhu tohoto cvičení budete muset provést nějaké dodatečné úkony. Níže jsou tyto úkony popsány (nutnost jejich provedení závisí na tom, jak správce provedl nastavení databáze).

Dialogové okno Reason(s) For Change

Dialogové okno Reason(s) for Change (Důvod/y změny) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje zdůvodnění prováděných kroků (tzv. audit). Systém auditu sleduje vytváření, změny a mazání dat v databázi.

Objeví-li se dialogové okno Reasons for Change, proveďte jeden z následujících kroků:

- Zvolte důvod změny z rozbalovací nabídky a poté klikněte na ikonu OK.
- Zadejte důvod změny do příslušného pole a poté klikněte na ikonu OK.



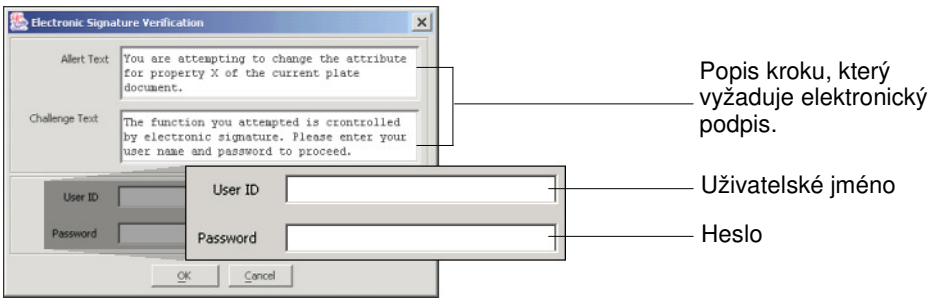
Obrázek 2-4 Dialogové okno Reasons for Change (Důvod/y změny)

Dialogové okno Electronic Signature

Dialogové okno Electronic Signature (Elektronický podpis) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje elektronický podpis. Systém elektronického podpisu omezuje a sleduje přístup uživatelů k datům v databázi.

Objeví-li se toto dialogové okno:

1. Do pole User ID (Jméno) a Password (Heslo) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.
2. Program následně zobrazí zprávu o úspěšném či neúspěšném použití elektronického podpisu. Pro pokračování klikněte OK.



Obrázek 2-5 Dialogové okno Elektronický podpis

Lekce 1: Používání dokumentů destiček

O dokumentu destičky

Každá destička analyzovaná na přístroji ABI PRISM 7900HT vyžaduje vytvoření dokumentu destičky v programu SDS. Dokument destičky je virtuální záznam mikrodestičky nebo jiného typu spotřebního materiálu se vzorky. Program používá dokument destičky pro řízení činnosti přístroje (teplotní cyklování a čtení dat), pro organizaci a ukládání dat získaných během PCR a pro analýzu dat.

Tabulka 2-3 Typy dokumentů destičky

Typ souboru	Přípona	Ikona	Popis/Komentář
ABI PRISM SDS dokument	*.sds		Dokumenty destiček jsou základní používané soubory. Jsou vytvářeny pro každý experiment.
ABI PRISM SDS templát	*.sdt		Templáty jsou volitelné dokumenty používané v experimentech, v kterých se používá identická konfigurace esejí v destičce. Jejich používání vede k úspoře času.
ABI PRISM SDS soubor typu sdm (multiplate)	*.sdm		Dokumenty typu sdm se používají pro analýzu výsledků relativní kvantifikace. Více informací viz Kapitola 6 “Analýza výsledků.”

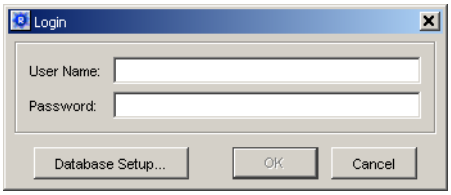
Cvičení v této lekci vás naučí pracovat s těmito typy dokumentů .

Cvičení 1: Vytvoření dokumentu destičky

Pro každou destičku, kterou budete chtít analyzovat na přístroji 7900HT, musíte vytvořit dokument destičky.

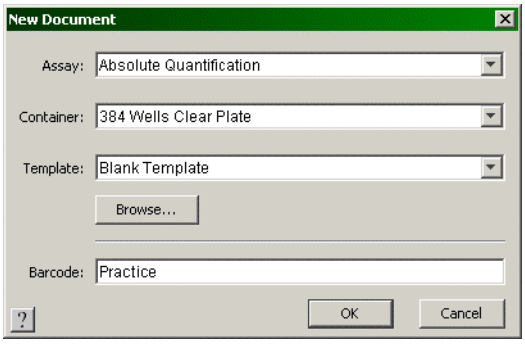
DŮLEŽITÉ! Program SDS umožňuje pracovat s několika dokumenty destiček najednou. S každým dalším otevřeným dokumentem destičky však klesá rychlost práce. Z tohoto důvodu doporučuje společnost Applied Biosystems, abyste neotvírali více než deset dokumentů destiček.

1. Pokud není ještě spuštěn, spusťte program SDS:
   a. Zvolte Start **> Programs > Applied Biosystems > SDS 2.2 > SDS 2.2**).
   b. (pouze pro databázi) V okně Login (Přihlášení) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.



2. Klikněte nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
3. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:
   - Rozbalovací nabídka **Assay** (Esej) – Zvolte **Absolute Quantification** (Absolutní kvantifikace).
   - Rozbalovací nabídka **Container** (Destička) – Zvolte **96 Wells Clear Plate** (96-ti jamková destička).
   - Rozbalovací nabídka **Template** (Templát) – Zvolte **Blank Template** (Žádný templát).
   - V poli **Barcode** (Čárový kód) – Zadejte **Practice** (Nácvik).

   Poznámka: Za normální situace byste zadali název souboru nebo čárový kód (max. 128 znaků).



4. Klikněte OK.

   Program zobrazí nový dokument destičky.

5. Otevřete templát 96-ti jamkové ověřovací destičky RNázyP a exportujte jej podle návodu na straně 2-13.

Cvičení 2: Export dokumentu destičky

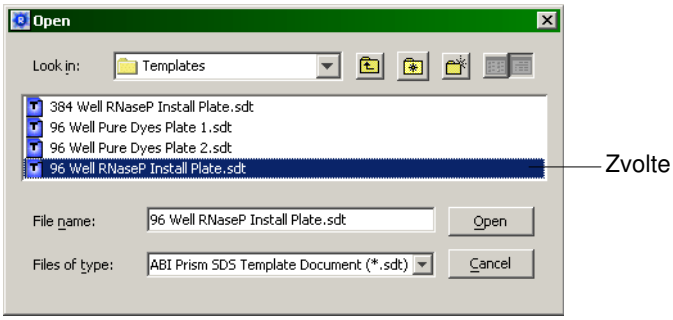
Další možností jak vytvořit dokument destičky (kromě manuálního vytvoření podle kapitoly 4 Ovládání přístroje) je import dokumentu destičky do programu SDS ze souboru nastavení eseje (Assay Plate Setup File). Tento soubor lze z programu SDS exportovat nebo vytvořit např. pomocí tabulkového procesoru či v systému LIMS (viz Příloha A "Související programy"). V následujícím cvičení exportujete soubor nastavení eseje (Assay Plate Setup File) jako templát, který následně v cvičení 3 importujete (viz strana 2-15).

Poznámka: Kromě souboru nastavení eseje může program SDS též exportovat většinu grafů a tabulek. Viz Příloha A, "Související programy".

Otevření templátu

Níže je popsán postup jak otevřít templát pro ověřovací destičku RNáza P. Program SDS instaluje templáty do adresáře: \AppliedBiosystems\SDS2.2\Templates. Kromě templátu pro destičku RNázaP jsou v tomto adresáři přednastaveny i templáty pro destičky, které jsou na přístroji 7900HT pravidelně analyzovány.

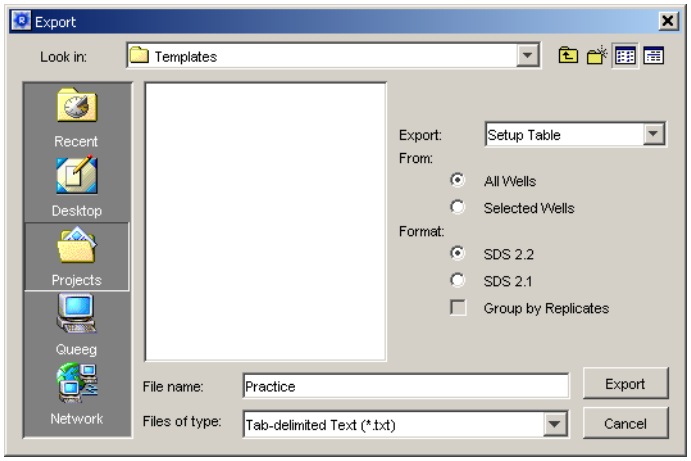
1. Klikněte nebo zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
2. V poli Look In (Vyhledat) dialogového okna Open (Otevřít) vyhledejte adresář: **\AppliedBiosystems\SDS2.2\Templates**.
3. Zvolte **File of type > ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)** (Typ souboru > Templát).
4. V poli Look In (Vyhledat) zvolte soubor **96 Well RNaseP Install Plate.sdt**.



5. Klikněte Open (Otevřít).
   Program otevře templát.
6. Exportujte dokument podle návodu na straně 2-14.

Export dokumentu destičky

1. Klikněte nebo zvolte **File > Export** (Soubor > Exportovat).
2. V poli Look In (Vyhledat) dialogového okna Export vyhledejte adresář: **Applied Biosystems/SDS Documents**.
3. V dialogovém okně Export zvolte **Export > Setup Table** (Export > Zadání).
4. Zvolte **All Wells** (Všechny jamky).
5. Zvolte **SDS 2.2**.
6. V poli **File name** (Název souboru) zadejte **Practice** (Nácvik).



7. Klikněte Export.

   Program uloží zadání dokumentu destičky ve formě textového souboru, v němž jsou data oddělena tabelátorem, pod názvem ‘Practice.txt’.

   Poznámka: Soubor ‘Practice.txt’ můžete otevřít pomocí programů Microsoft Notepad, Wordpad nebo Word.

8. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít), čímž templát zavřete.

   DŮLEŽITÉ! Dokument destičky, vytvořený v “Cvičení 1: Vytvoření dokumentu destičky” na straně 2-12 nezavírejte.

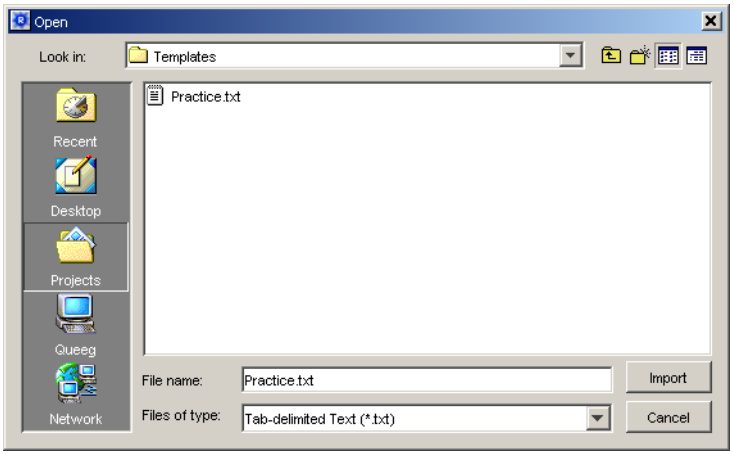
9. Importujte exportovaný dokument do dokumentu destičky podle postupu na straně 2-15.

Cvičení 3: Import zadání do dokumentu destičky

Program SDS vám umožňuje importovat zadání do dokumentu destičky z exportovaného nebo připraveného souboru nastavení eseje (Assay Plate Setup File). Tím ušetříte čas. Importujte zadání dokumentu ze souboru Practice.txt (viz "Cvičení 2: Export dat z dokumentu destičky" na straně 2-13) do prázdného dokumentu destičky vytvořeného v "Cvičení 1: Vytvoření dokumentu destičky" na straně 2-12.

1. Je-li dokument destičky z Cvičení 1 stále otevřen, postupte na krok 2. Jinak vytvořte nový dokument destičky:
   a. Klikněte nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
   b. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte totéž nastavení jako v templátu:
      Rozbalovací nabídka **Assay** (Esej) – Zvolte **Absolute Quantification** (Absolutní kvantifikace).
      Rozbalovací nabídka **Container** (Destička) – Zvolte **96 Wells Clear Plate** (96-ti jamková destička).
      Rozbalovací nabídka **Template** (Templát) – Zvolte **Blank Template** (Žádný templát).
      Pole Barcode (Čárový kód) – nechte prázdné.
   c. Klikněte OK.

   Program zobrazí nový dokument destičky.
2. Klikněte nebo zvolte **File > Import** (Soubor > Import).
3. V poli Look In (Vyhledat) dialogového okna Import vyhledejte adresář: **Applied Biosystems/SDS Documents**.
4. Zvolte soubor **Practice.txt** vytvořený v cvičení 5.



5. Klikněte Import.

   Program importuje zadání z dokumentu **Practice.txt** do nového dokumentu destičky.

   Poznámka: Více informací o importování a exportování zadání pomocí programu SDS naleznete v příloze A "Související programy."
6. Uložte dokument podle postupu na straně 2-16.

Cvičení 4: Uložení dokumentu destičky

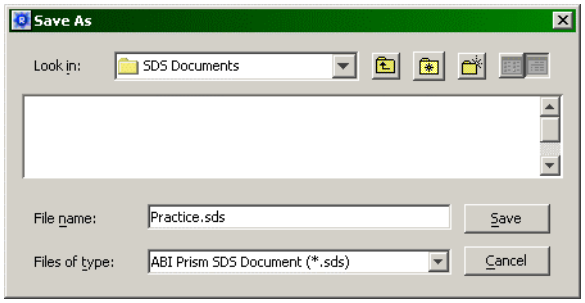
Příkazem Save (Uložit) uložíte všechny změny dokumentu destičky (zadání a zobrazení). Používáte-li verzi programu SDS s databází SDS Enterprise, máte rovněž možnost uložit dokument destičky do databáze.

Zvolte jednu z následujících možností:

- Používáte-li databázi, uložte dokument do databáze podle postupu na straně 2-17.
- Nepoužíváte-li databázi, uložte dokument destičky na disk vašeho počítače podle postupu uvedeného níže.

Uložení dokumentu destičky na disk

1. Klikněte nebo zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).
2. Zvolte **File of type** (Typ souboru) > **ABI PRISM SDS Document (*.sds)**.
3. V poli **File name** (Název souboru) zadejte **Practice** (Nácvik).



4. Klikněte Save (Uložit).
5. V okně Document not properly set up (Dokument není správně zadán), klikněte OK.

Program uloží dokument destičky jako soubor **Practice.sds**.

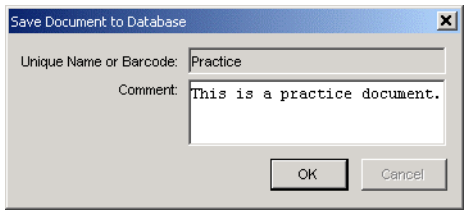
6. Uzavřete uložený dokument destičky podle postupu na straně 2-17.

Uložení dokumentu destičky do databáze SDS Enterprise

1. Klikněte nebo zvolte **File** > **Save Document to Database** (Soubor > Uložit dokument do databáze).
2. V okně Document not properly set up (Dokument není správně zadán), klikněte OK.

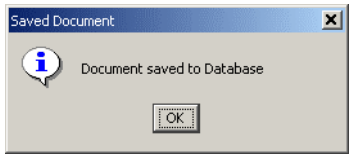
3. V dialogovém okně Save Document to database (Uložit dokument do databáze) nechte pole **Comment** (Komentář) prázdné nebo zadejte stručný popis souboru.

   Poznámka: Popis v tomto poli může mít max. 256 znaků.



4. Klikněte OK čímž soubor uložíte.
5. V okně Document not properly set up (Dokument není správně zadán), klikněte OK.

6. V okně Saved Document (Dokument uložen) klikněte OK.



7. Zvolte **File** > **Close** (Soubor > Zavřít).
8. Jste-li vyzváni k uložení dokumentu destičky, klikněte No (Ne).

   Program SDS soubor zavře, aniž jej uloží.
9. Otevřete dokument destičky podle postupu na straně 2-18.

Cvičení 5: Otevření dokumentu destičky

V tomto cvičení otevřete dva dokumenty destičky (dokument z cvičení 3 a templát) a následně je použijete v následujících cvičeních. Účelem tohoto cvičení je seznámit se s kroky, které je nutné provést, pokud chcete otevřít dokument destičky předešle uložený na disk nebo do databáze SDS Enterprise.

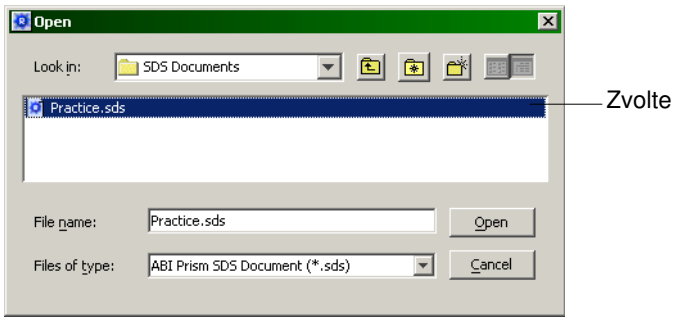
Zvolte jednu z následujících možností::

- Používáte-li databázi, otevřete dokument z databáze podle postupu na straně 2-17.
- Nepoužíváte-li databázi, otevřete dokument destičky z disku vašeho počítače podle postupu uvedeného níže.

Otevření dokumentu destičky z disku

1. Klikněte nebo zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
2. V poli Look In (Vyhledat) vyhledejte adresář:

   Applied Biosystems/SDS Documents
3. V poli Look In (Vyhledat) zvolte soubor **Practice.sds**.

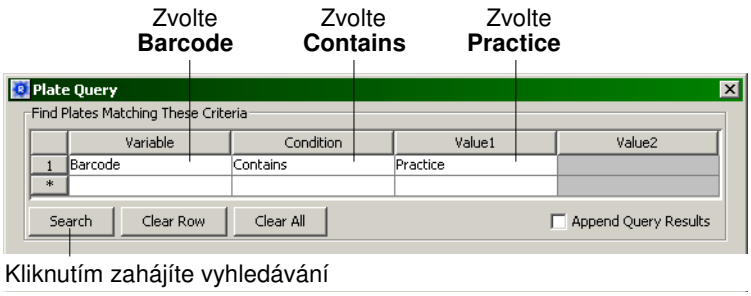


4. Klikněte Open (Otevřít).

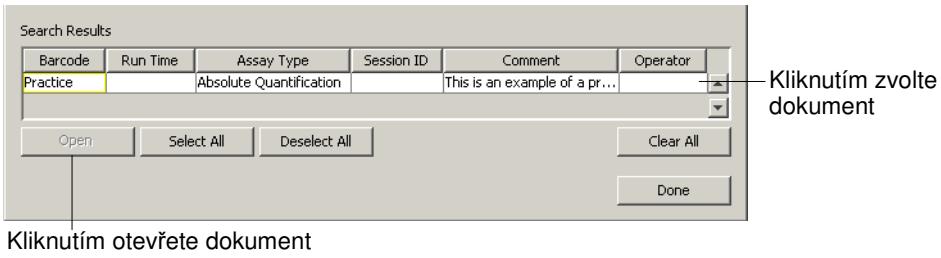
   Program otevře soubor Practice.sds.
5. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít).

Otevření dokumentu destičky z databáze SDS Enterprise

1. Klikněte nebo zvolte **File > Open Document from Database** (Soubor > Otevřít dokument z databáze).
2. V dialogovém okně Plate Query (Vyhledání destičky) nastavte parametry vyhledávání (**Find Plates Matching These Criteria)** takto:
   a. Klikněte do první buňky ve sloupci **Variable** (Volitelný) a zvolte **Barcode** (Čárový kód).
   b. Klikněte do první buňky ve sloupci **Conditions** (Parametr) a zvolte **Contains** (obsahuje).
   c. Klikněte do první buňky ve sloupci **Value1** (Hodnota1) a zadejte **Practice** (Nácvik).
   d. Klikněte Search (Vyhledat).



4. V seznamu výsledků zvolte dokument **Practice** (Nácvik) a klikněte Open (Otevřít).



5. Klikněte Done (Hotovo).
6. Pokračujte v části “Lekce 2: Zobrazování a změna velikosti panelů” na straně 2-20.

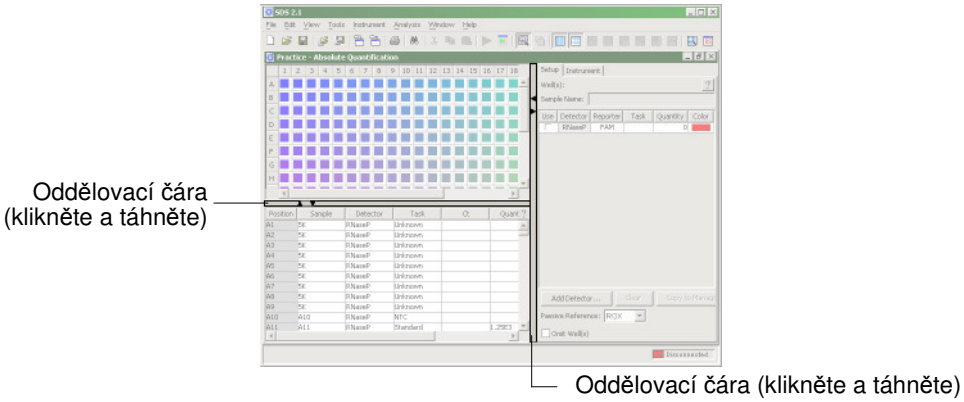
Lekce 2: Zobrazování a změna velikosti panelů

Přehled

V dokumentech destiček je možné zobrazit zadání a výsledky naráz v několika různých zobrazeních. V této lekci se seznámíte s různými možnostmi jak optimalizovat zobrazení dat na obrazovce a efektivně program využívat.

Cvičení 1: Změna velikosti panelů a grafů

Velikost panelů a grafů v dokumentu destičky můžete změnit posunutím šedé čáry, která je horizontálně i vertikálně odděluje.



1. Klikněte na šedou čáru, která odděluje destičku a prohlížeč jamek (well inspector), a táhněte za ni doprava.

   Program rozšíří destičku a tabulku.

2. Procvičte si používání tohoto nástroje, dokud jej dokonale neovládáte.

Cvičení 2: Skrytí a zobrazení panelů a grafů

Zobrazení panelů a grafů můžete rovněž zapnout pomocí ikon v liště Zobrazení (Display).

1. V liště Zobrazení klikněte (Skrýt/Zobrazit tabulku).

   Tabulka bude skryta.

2. Klikněte znovu , čímž tabulku opět zobrazíte.

   Lišta Zobrazení je obzvláště výhodná pro změnu zobrazení údajů v dokumentu destičky. Více informací viz “Lišta zobrazení” na straně 2-7.

3. Vyzkoušejte si skrývání a zobrazování dalších součástí dokumentu destičky klikáním na další ikony v liště Zobrazení, abyste se s touto možností dokonale seznámili.

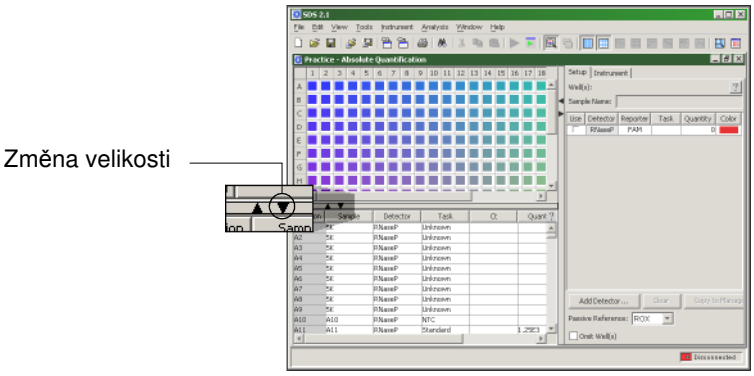
Cvičení 3: Maximální/ Minimální velikost panelů a grafů

Velikost panelů a grafů můžete změnit na maximum či minimum kliknutím na tlačítka změny velikosti v šedé oddělovací čáře.

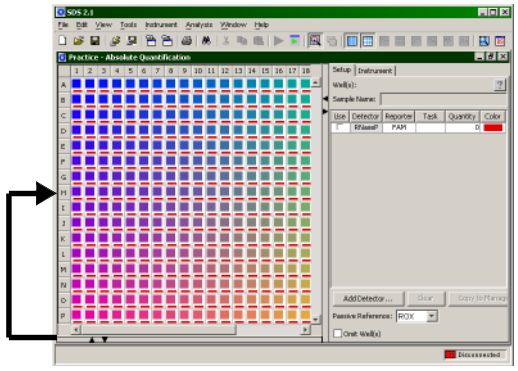
Poznámka: Těmito tlačítky jsou černé šipky (▲▼) mezi sousedícími částmi dokumentu destičky. Kliknete-li na ně, skryje se ta část dokumentu na níž šipka ukazuje.

1. Šipka▼ (ukazuje směrem dolů) v šedé čáře mezi destičkou a tabulkou slouží k maximálnímu zvětšení destičky ve vertikálním směru.

   Program zvětší destičku a odstraní (minimalizuje) tabulku.



2. Kliknutím na šedou lištu ve spodní části dokumentu destičky a potažením obnovíte původní velikost tabulky (viz postup v cvičení 1).



3. Vyzkoušejte si práci s tlačítky změny velikosti, dokud se s jejich funkcí dokonale neseznámíte.

Lekce 3: Zobrazení destičky

Přehled

Zobrazení destičky (viz obrázek 2-6) je důležitou součástí programu SDS. Program používá toto zobrazení pro práci s informacemi týkajícími se destičky a umožňuje vám zvolit určité jamky a zobrazit jich se týkající informace. V následujících cvičeních se seznámíte s používáním a úpravou údajů v zobrazení destičky.

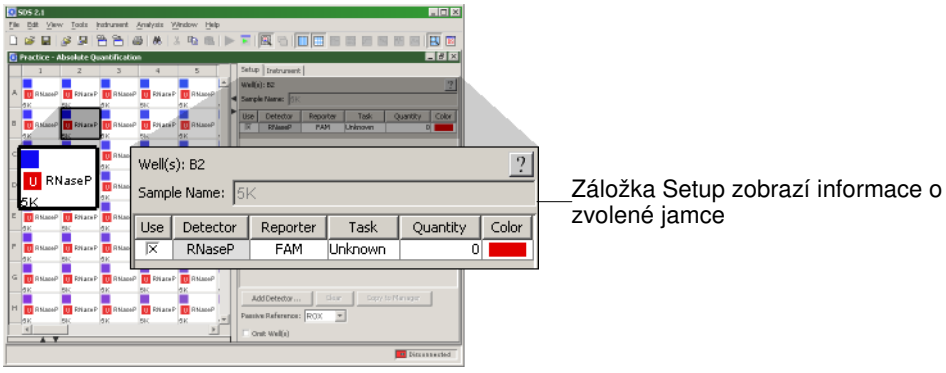
Obrázek 2-6 Zobrazení destičky dokumentu SDS

Cvičení 1: Zobrazení informací o jamce

Zobrazení informací o jamce/jamkách je v programu SDS možné dvěma způsoby. Proveďte jeden z následujících kroků, chcete-li zobrazit informace o nějaké jamce dokumentu destičky:

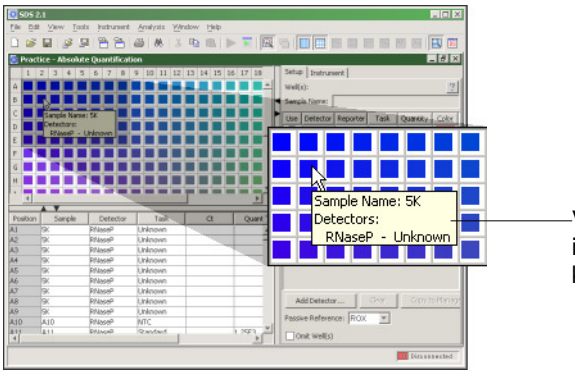
- Kliknutím zvolte jakoukoliv jamku v destičce.

  Zvolená destičky je zvýrazněna černě a v panelu well inspector (prohlížeč jamek) se v záložce Setup (Zadání) zobrazí související informace.



- Přesuňte myš nad kteroukoliv jamku v zobrazení destičky.

  Ve žlutém vyskakovacím okně se zobrazí informace o dané jamce.

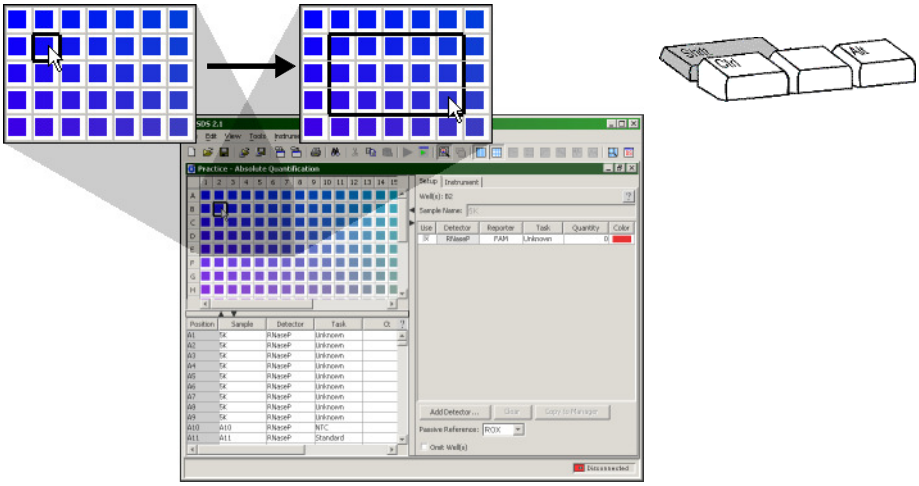


Cvičení 2: Označení několika jamek

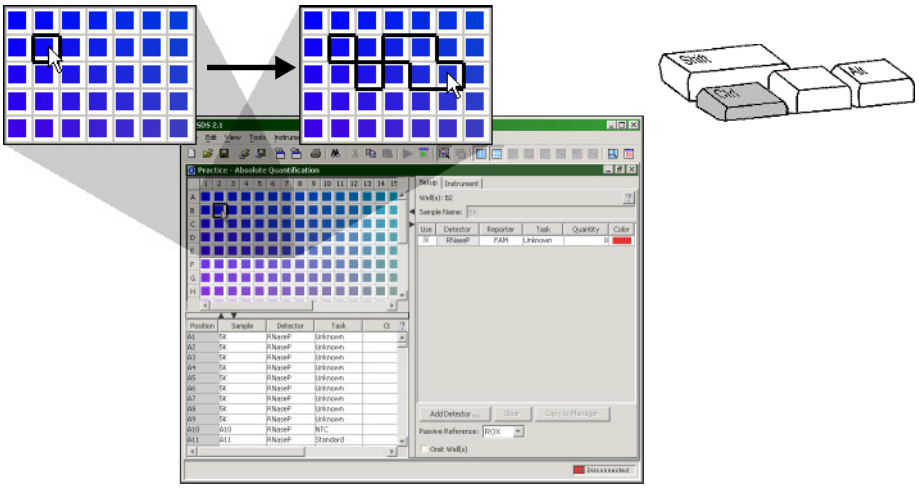
V programu SDS je možné použít několik různých způsobů pro označení několika jamek. V následujícím cvičení si většinu z nich osvojíte.

1. Zvolte skupinu jamek pomocí některé z následujících akcí:
   - Kliknutím a tažením myší okolo skupiny jamek, nebo
   - Kliknutím na jamku vlevo nahoře ve skupině jamek a následně kliknutím na jamku vpravo dole ve skupině jamek za současného stisku klávesy **Shift**.

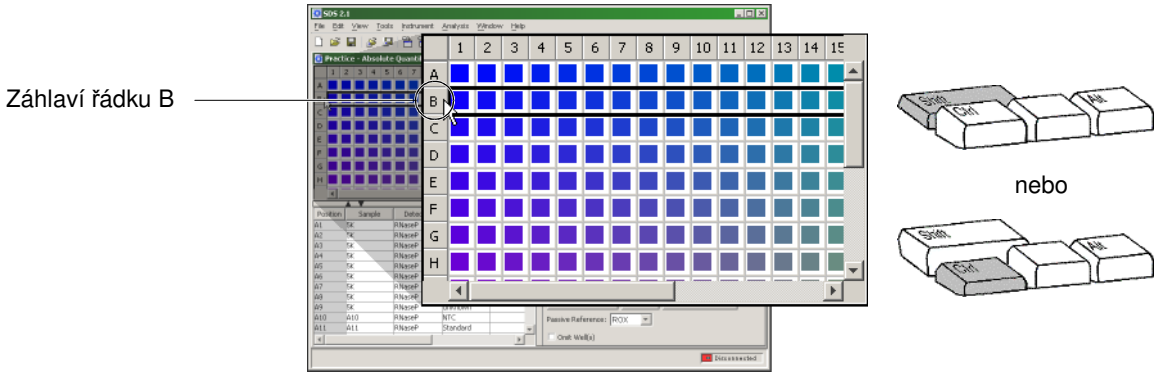
   Zvolené jamky jsou ohraničeny černě.



2. Zvolte několik izolovaných jamek pomocí některé z následujících akcí:
   a. Stiskněte klávesu **Ctrl** a klikejte na jednotlivé jamky, které chcete zvolit. Zvolené jamky jsou ohraničeny černě.
   b. Stiskněte klávesu **Ctrl** a klikejte na jamky, které nechcete zvolit.

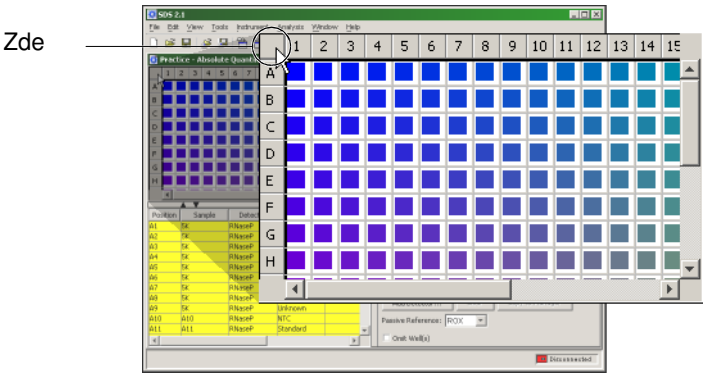


3. Zvolte celý sloupec nebo řádek jamek pomocí záhlaví:
   a. Klikněte do záhlaví řádku **B**, čímž zvolíte všechny jamky v řádku.
      Zvolené jamky v řádku B jsou ohraničeny černě.
   b. Přidržte klávesu **Shift** nebo **Ctrl**, poté klikněte do záhlaví dalších řádků či sloupců, čímž je zvolíte.



4. Všechny jamky destičky zvolíte kliknutím do levého horního rohu ve schématu destičky.

   Všechny jamky destičky jsou ohraničeny černě.

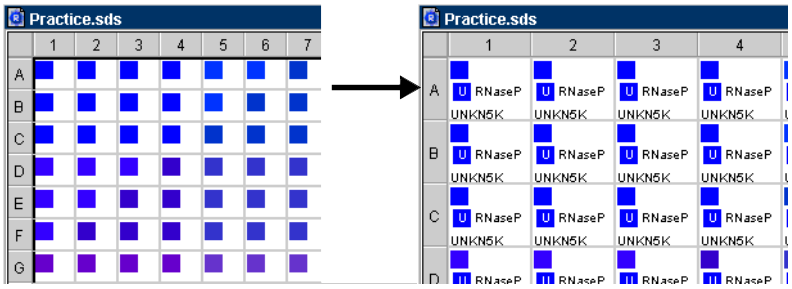


5. Pomocí postupu popsaného v krocích 1 až 4 si procvičte zvolení různých oblastí destičky, abyste si tento postup dokonale osvojili.

Cvičení 3: Zvětšení zobrazení destičky

Kliknutím na ikonu můžete zobrazení destičky zvětšit a tím zobrazit informace o jednotlivých jamkách.

1. Klikněte na ikonu a sledujte, jak se jamky zvětší.



2. Klikněte na ikonu znovu čímž obnovíte zobrazení destičky v původní velikosti.
3. Procvičte si tuto funkci programu, abyste si ji osvojili.

Cvičení 4: Změna velikosti jamek pomocí oddělovací linky

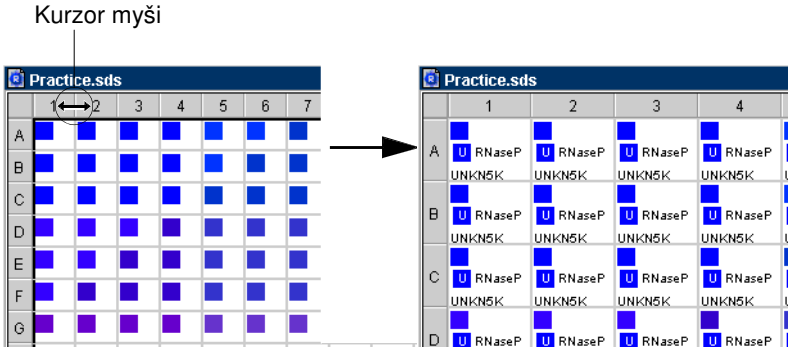
Velikost zobrazených jamek lze rovněž změnit posunutím linek v záhlaví řádků nebo sloupců.

1. Umístěte myš nad linku v záhlaví oddělující sloupce nebo řádky.

   Z kurzoru myši se tímto stane dvojitá šipka (↔).

2. Kliknutím a tažením myší upravte šířku jamky.

   Program upraví šířku všech jamek podle vámi nastavené šířky.



3. Procvičte si tuto funkci programu, abyste si ji osvojili.

Lekce 4: Používání ruční čtečky čárových kódů

Přehled

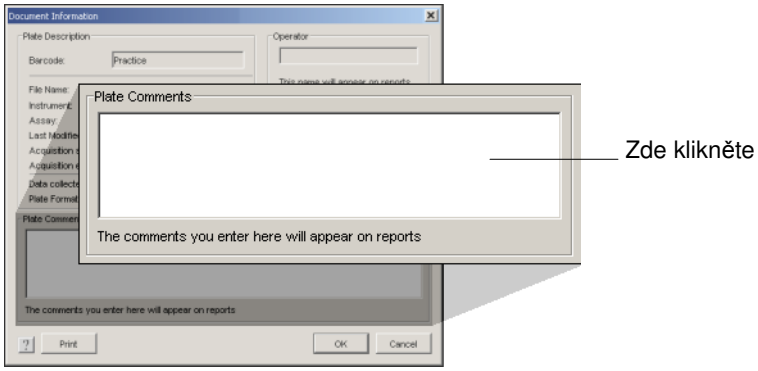
Ruční čtečka čárových kódů funguje jako přídatné zařízení ke klávesnici a slouží k automatickému zadání čárových kódů do programu SDS. Čtečka naskenuje čárový kód a :

- Předá informaci o čárovém kódu v abecedněčíslicové formě do programu SDS. Program vloží čárový kód do místa v němž je umístěn kurzor.
- Předá signál k potvrzení zadaného údaje (obdoba stisku klávesy Enter).

Cvičení: Zadávání čárových kódů pomocí ruční čtečky

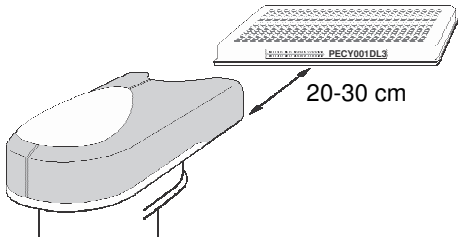
Postup níže vysvětluje jak zadat čárové kódy pomocí ruční čtečky čárových kódů. Běžné je zadat čárový kód do dialogového okna při vytváření dokumentu destičky.

1. Zvolte **Tools > Document Information** (Nástroje > Informace o dokumentu).
2. V dialogovém okně Document Information klikněte do pole **Comments** (Komentář).



3. Podržte ruční čtečku čárových kódů 20 až 30 cm od destičky zacílenou na střed čárového kódu a stiskněte spoušť. Ze čtečky vyjde laserový paprsek, který se na destičce projeví jako červená čára. Pomalu posouvejte tento paprsek přes čárový kód dokud čtečka nevydá vysoký tón signalizující přečtení kódu.

   WARNING **NEBEZPEČÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ**. Přímé nebo odražené laserové paprsky mohou poškodit sítnici, což může vést k trvalému poškození zraku. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku. Odstraňte šperky a další předměty, které mohou odrážet paprsek do vašich očí. Chraňte ostatní před laserovými paprsky.



   Po odečtení čárového kódu je tento kód automaticky vložen v abecedněčíslicové formě do zvoleného pole programu.

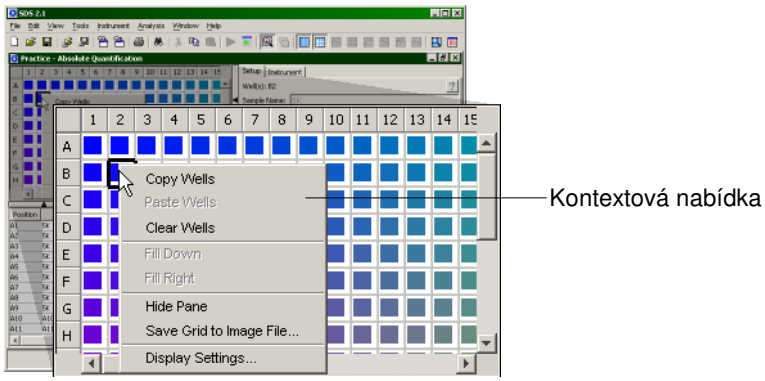
4. Klikněte OK, čímž uzavřete dialogové okno Document Information.

Lekce 5: Používání kontextových nabídek

Přehled

V programu SDS je možné používat kontextové nabídky, které umožňují rychlý přístup k příkazům dostupným v daném zobrazení nebo panelu.

Chcete-li otevřít kontextovou nabídku, přesuňte kurzor nad panel nebo zvolené zobrazení a klikněte pravým tlačítkem myši. V místě kurzoru se zobrazí kontextová nabídka.



Obrázek 2-7 Kontextová nabídka programu SDS

Následující příkazy jsou součástí všech kontextových nabídek:

Tabulka 2-4 Standardní příkazy kontextových nabídek

Příkaz	Výsledek	Viz strana
Hide (Skrýt) <panel nebo graf>	Skryje panel nebo zobrazení.	2-20
Save <panel nebo graf> **to Image File (Uložit jako obrázek)**	Otevře dialogové okno Export Graphic (Uložit jako obrázek) pro export zvoleného zobrazení nebo panelu ve formátu JPEG.	A-16
Display Settings (Nastavení zobrazení)	Otevře dialogové okno Display Settings (Nastavení zobrazení), v němž je možné upravit vzhled panelů nebo grafů.	3-22

Lekce 6: Používání klávesových zkratek

Cvičení: Zavření dokumentu destičky

Ovládání hlavních funkcí programu SDS je možné pomocí klávesových zkratek. Klávesová zkratka je kombinace dvou kláves (Ctrl a další klávesy), které, jsou-li stisknuty současně, vedou k provedení určité akce. Seznam klávesových zkratek je součástí každé nabídky v hlavní liště.

Zavřete otevřený dokument destičky pomocí klávesové zkratky podle následujícího postupu:

1. Stiskněte současně klávesy **Ctrl** a **W** (**Ctrl+W**).
2. Až se program zeptá, chcete-li uložit dokument destičky, klikněte No (Ne).

Poznámka: Součástí nápovědy programu SDS je úplný výčet klávesových zkratek používaných v programu. Chcete-li tento výčet zobrazit, otevřete nápovědu podle postupu “Používání nápovědy programu SDS” na straně 2-3.

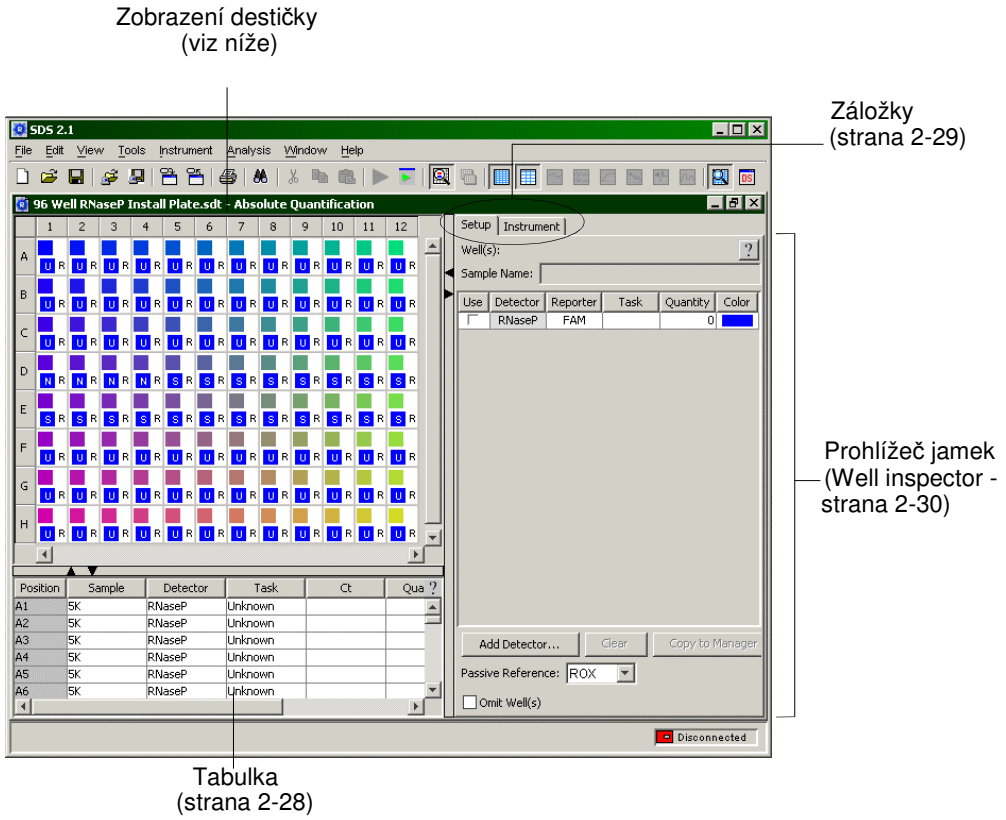
Používání dokumentů destiček

Používání několika dokumentů destiček

Ačkoliv program SDS umožňuje pracovat s několika dokumenty destiček najednou, s každým dalším otevřeným dokumentem destičky klesá rychlost práce. Z tohoto důvodu doporučuje společnost Applied Biosystems, abyste neotvírali více než deset dokumentů destiček.

Součásti dokumentu destičky

Obrázek 2-8 znázorňuje typický dokument destičky a jeho součásti, popsané na následujících stránkách.



Obrázek 2-8 Součásti dokumentu destičky

Zobrazení destičky

Buňky zobrazené destičky odpovídají jamkám mikrodestičky. Informace v buňkách jsou zobrazeny podle typu dokumentu destičky. V Nastavení zobrazení (Display settings) je možné upravit obsah a vzhled údajů v buňkách.

Poznámka: Více informací o změně parametrů zobrazení destičky získáte po kliknutí na ikonu ? (nápověda).

Tabulka

V tabulce je zobrazováno zadání a výsledky analýzy dokumentu destičky. Tabulku je možné exportovat ve formě textového souboru (tabelátorem oddělená data kompatibilní s tabulkovým editorem – více informací viz Příloha A “Související programy”).

Záložky

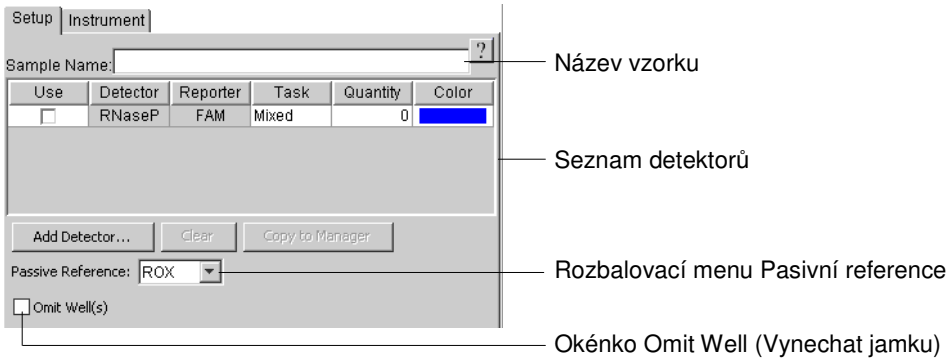
V dokumentech destiček může být až šest záložek (v závislosti na jejich funkci) jak je popsáno níže:

Tabulka 2-5 Záložky programu SDS

Záložka	**Funkce**	**Zobrazení/Grafy**
Setup (Zadání)	Zobrazí informace o jamkách a umožňuje zadávat údaje.	Prohlížeč jamek (Well Inspector)
Instrument (Přístroj)	Používá se k programování teplotního profilu, ke spuštění běhu nebo k zařazení běhu do řady.	• Method Editor (Nastavení metody) – Záložka Thermal Profile – Záložka Auto Increment – Záložka Ramp Rate – Záložka Data Collection • Záložka Real-Time • Záložka Plate-Read
Graf Raw Data Plot (Hrubá data)	Zobrazí naměřenou fluorescenci (před analýzou). Data jsou zobrazena pouze v dokumentech destičky, které byly spuštěny. Chcete-li je zobrazit, otevřete spuštěný dokument destičky, klikněte a zvolte záložku **Raw Data Plot**.	Hrubá data
Calibration Data (Kalibrační data)	Zobrazí výsledky kalibrace pozadí (Background) a barev (Pure Spectra), používaných pro normalizaci a multikomponentní analýzu hrubých dat. Data jsou zobrazena pouze v dokumentech destičky, které byly spuštěny. Chcete-li je zobrazit, otevřete spuštěný dokument destičky, klikněte a zvolte záložku **Calibration Data**.	Kalibrační data • Pozadí (Background Plot) • Barvy (Pure Dyes Plot)
Results (Výsledky)	Zobrazí výsledky běhu po analýze. Záložka Analysis (Analýza) je zobrazena pouze v dokumentech destičky, které byly analyzovány.	Alelická diskriminace • graf alelické diskriminace Absolutní kvantifikace • amplifikační graf • standardní křivka Relativní kvantifikace • amplifikační graf
Disociační křivka	Zobrazí výsledky analýzy disociační křivky. Záložka je zobrazena pouze v dokumentech destičky, které byly analyzovány a pochází z běhu monitorovaného v reálném čase, v němž byla disociační křivka provedena.	Disociační graf

Prohlížeč jamek

Prohlížeč jamek (Well Inspector – obrázek 2-9) slouží k zadání údajů (detektoru a údajů o vzorku) do jamek a k zobrazení informací ze zvolených jamek v zobrazení destičky.



Obrázek 2-9 Součásti prohlížeče jamek

- **Sample Name** (Název vzorku) – V tomto poli (lze jej upravit) se zobrazuje název vzorku ve zvolené jamce/jamkách

  Poznámka: V poli se zobrazí ***Mixed*** (Smíšené) byly-li zvoleny jamky s rozdílnými názvy vzorků.

- **Detector list** (Seznam detektorů) – Seznam všech detektorů, které jsou součástí dokumentu destičky.
- **Omit Well** (Vynechat jamku) – Je-li toto okénko zatrženo, data získaná měřením této jamky jsou vynechána při všech analýzách, které program provádí.
- **Passive Reference** (Pasivní reference) – Zobrazuje fluorescenční barvy používané jako pasivní reference.

Příprava běhu 3

V této kapitole

Poznámky pro uživatele databáze 3-2
Dříve než začnete 3-3
Přehled 3-4
Rychlé opakování: Zapnutí přístroje 7900HT 3-7
Krok 1 – Vytvoření dokumentu destičky 3-8
Krok 2 – Přidání detektorů a markerů 3-9
Krok 3 – Nastavení úlohy detektorů 3-14
Krok 4 – Nastavení pasivní reference a vynechání jamek 3-16
Krok 5 – Programování běhu 3-17
Krok 6 – Uložení dokumentu destičky jako templátu 3-22
Krok 7 – Vytvoření dokumentu destičky z templátu 3-24
Krok 8 – Zadání názvů vzorků a informací o destičce 3-25
Krok 9 – Spuštění běhu na přístroji 7900HT 3-26

Poznámky pro uživatele databáze

Dodatečné úkony

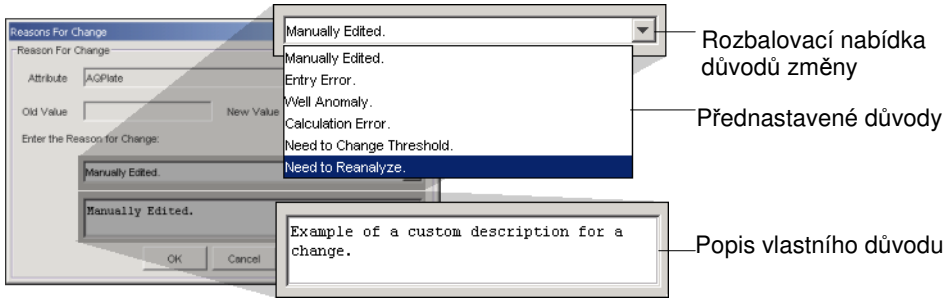
Používáte-li databázi SDS Enterprise pro ukládání dokumentů SDS, studií a dat, je možné, že v průběhu tohoto cvičení budete muset provést nějaké dodatečné úkony. Níže jsou tyto úkony popsány (nutnost jejich provedení závisí na tom, jak správce provedl nastavení databáze). Více informací o úkonech popsaných níže naleznete v příručce SDS Enterprise Database Administration Guide.

Dialogové okno Reason(s) For Change

Dialogové okno Reason(s) for Change (Důvod/y změny) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje zdůvodnění prováděných kroků (tzv. Audit). Systém auditu sleduje vytváření, změny a mazání dat v databázi.

Objeví-li se dialogové okno Reasons for Change, proveďte jeden z následujících kroků:

- Zvolte důvod změny z rozbalovací nabídky a poté klikněte na ikonu OK.
- Zadejte důvod změny do příslušného pole a poté klikněte na ikonu OK.



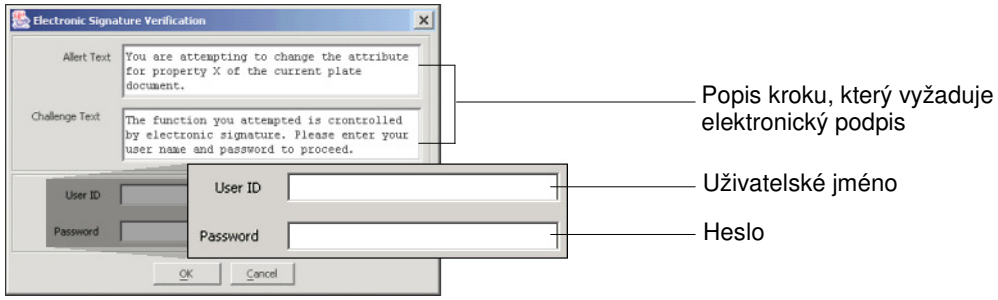
Obrázek 3-1 Dialogové okno Reasons for Change (Důvod/y změny)

Dialogové okno Electronic Signature

Dialogové okno Electronic Signature (Elektronický podpis) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje elektronický podpis. Systém elektronického podpisu omezuje a sleduje přístup uživatelů k datům v databázi.

Objeví-li se toto dialogové okno:

1. Do pole User ID (Jméno) a Password (Heslo) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.
2. Program následně zobrazí zprávu o úspěšném či neúspěšném použití elektronického podpisu. Pro pokračování klikněte OK.



Obrázek 3-2 Dialogové okno Elektronický podpis

Dříve než začnete

Přehled

V kapitolách 5 “Analýza esejí typu End-point” a 6 “Analýza výsledků Real-Time PCR” jsou stručně popsány experimenty, které můžete na přístroji 7900HT provádět. Před zahájením se můžete chtít seznámit s částmi těchto kapitol, které se týkají vámi prováděného experimentu:

Alelická diskriminace 5-5
Absolutní kvantifikace 6-5
Relativní kvantifikace 6-15
Analýza disociační křivky 6-37

Získání informací v nápovědě

Součástí programu SDS je i nápověda, která vás provede přípravou, provedením a analýzou experimentu. Nápovědu získáte kliknutím na ikonu ? v dialogovém okně, ve kterém pracujete.

Zpracování velkého počtu vzorků s analýzou výsledků po skončení běhu

Při provádění aplikací se sběrem dat po skončení běhu (jako je alelická diskriminace) je možné zvýšit počet zpracovávaných vzorků tak, že použijete přístroj ABI PRISM® 7900HT a několik teplotních cyklerů. Na rozdíl od experimentů se sběrem dat v reálném čase je sběr dat prováděn až po skončení běhu. Proto je možné provést běh s destičkou kdekoliv a analyzovat ji na přístroji 7900HT po jeho skončení.

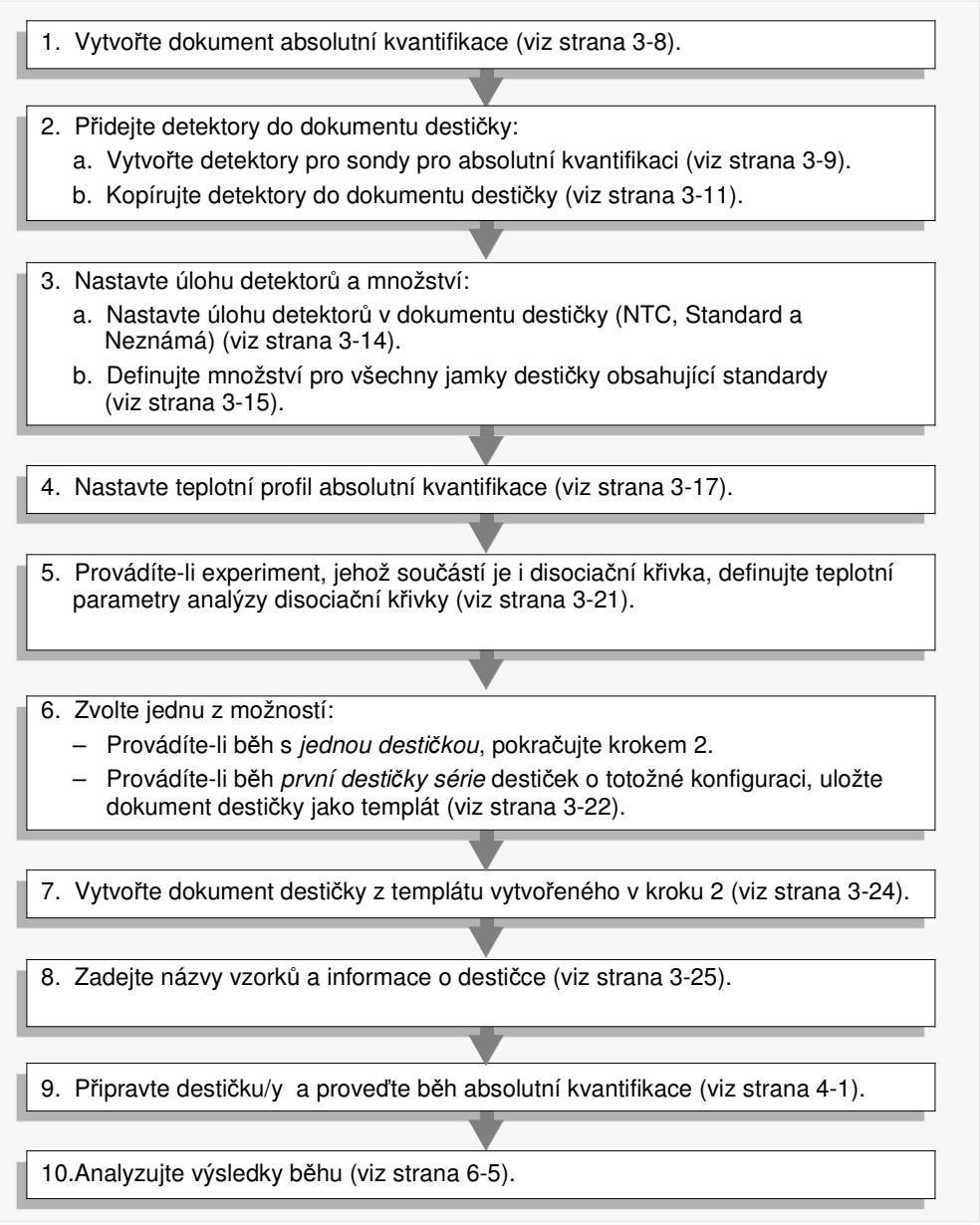
DŮLEŽITÉ! Chcete-li provést teplotní cyklování a odečet dat na přístroji 7900HT, proveďte nejprve běh se sběrem dat v reálném čase a následně druhý běh – alelickou diskriminaci (více informací viz “Krok 5 – Programování běhu” na straně 3-17).

Přehled

Experimenty/ Běhy prováděné na přístroji 7900HT

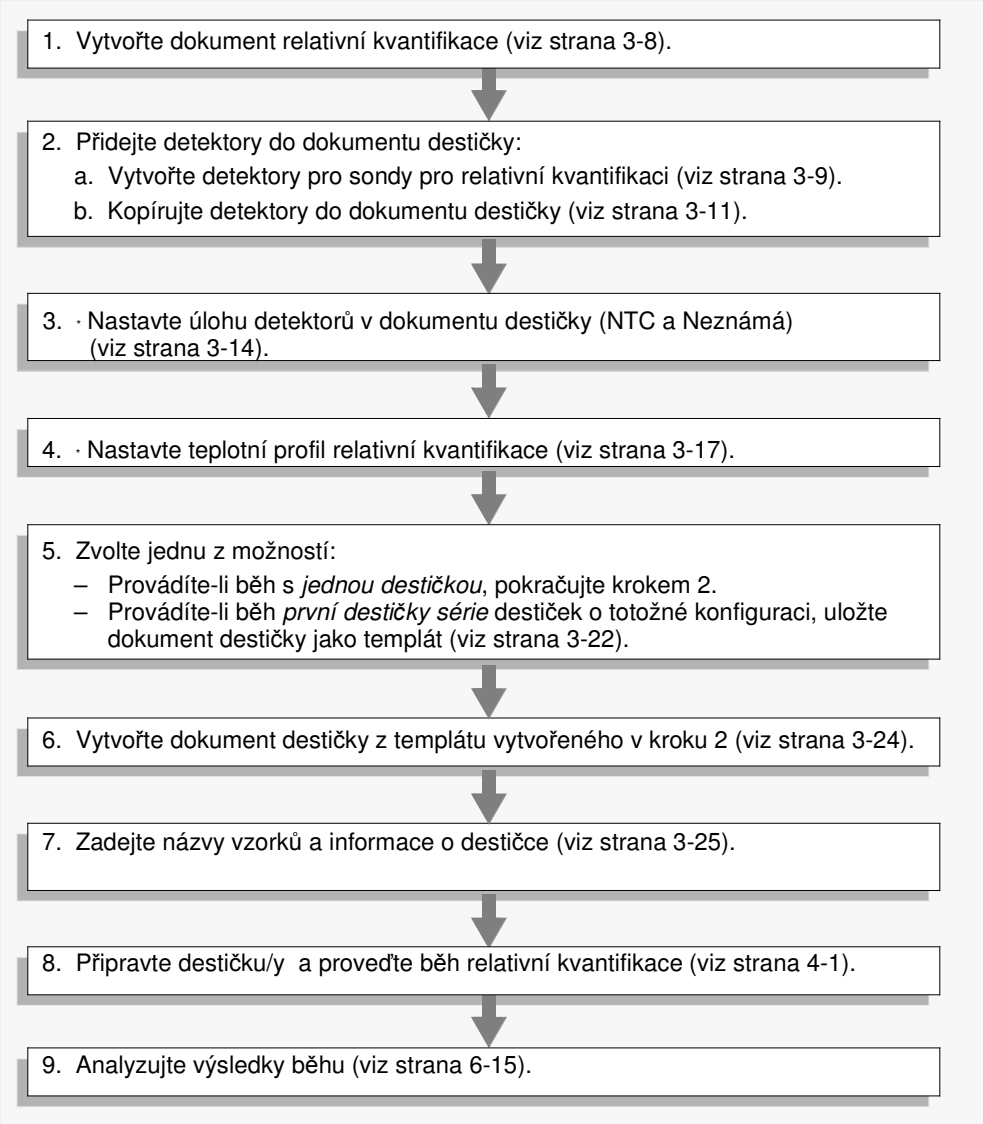
Absolutní kvantifikace 3-4
Alelická diskriminace 3-6
Pozadí 7-16
Disociační křivka (Křivka tání) 3-5
Kalibrace barev (Spektrální kalibrace) 7-20
Relativní kvantifikace 3-5
Ověřovací běh s destičkou RNáza P 7-30

Absolutní kvantifikace



*Kroky 2 a 2 lze vynechat tím, že importujete zadání dokumentu destičky ze souboru. Více informací viz “Import zadání dokumentu destičky” na straně A-2.

Relativní kvantifikace

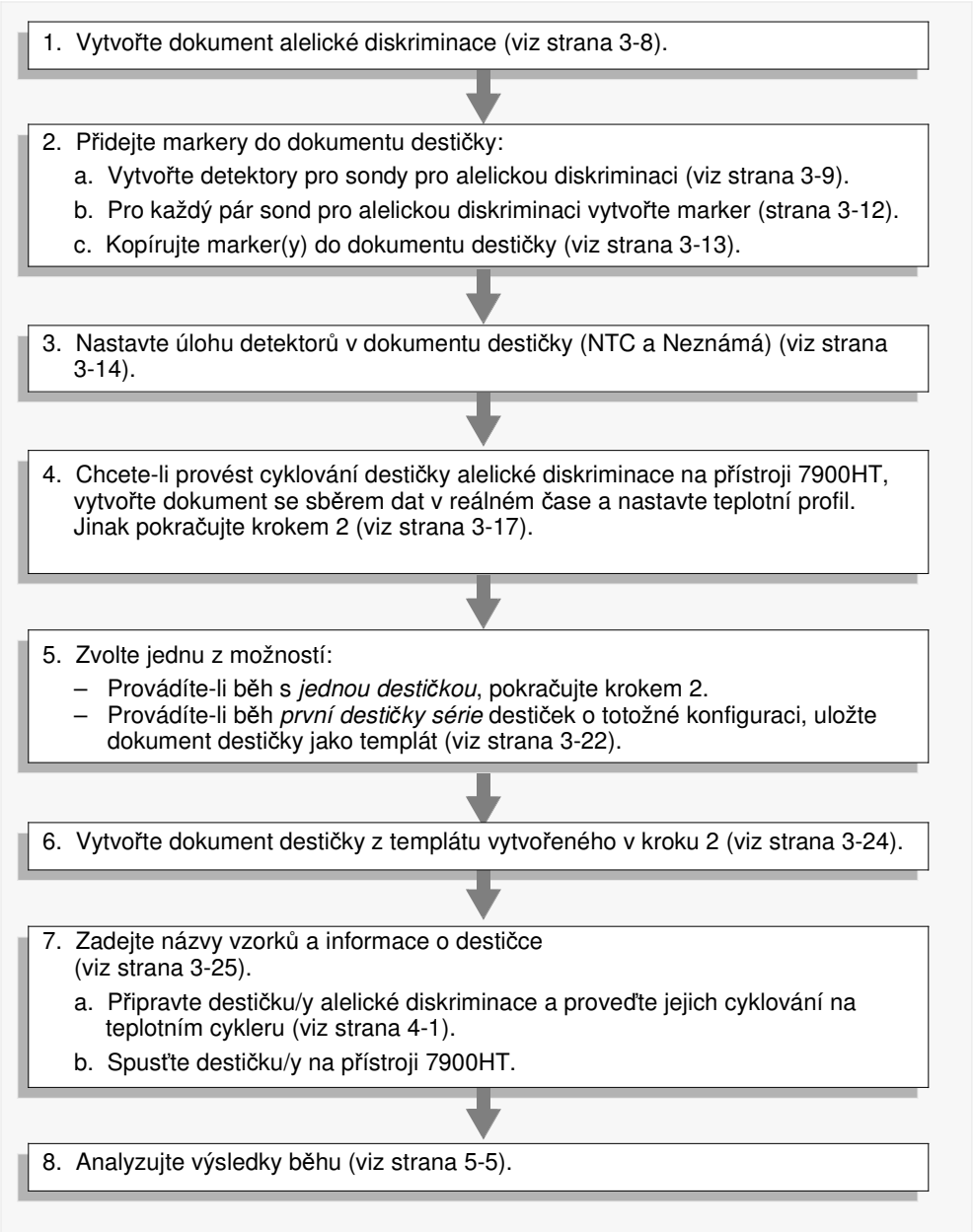


* Kroky 2 a 2 lze vynechat tím, že importujete zadání dokumentu destičky ze souboru. Více informací viz “Import zadání dokumentu destičky” na straně A-2.

Disociační křivka (Křivka tání)

V programu SDS je možné provést analýzu disociační křivky jako součást běhu absolutní kvantifikace. Proto chcete-li provést analýzu disociační křivky, definujte dokument destičky pro absolutní kvantifikaci podle postupu na straně 3-4 a zadejte provedení analýzy disociační křivky podle postupu na straně 3-21.

Alelická diskriminace



* Kroky 2 a 2 lze vynechat tím, že importujete zadání dokumentu destičky ze souboru. Více informací viz “Import zadání dokumentu destičky” na straně A-2.

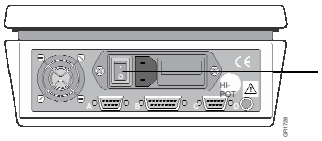
Rychlé opakování: Zapnutí přístroje 7900HT

Zapnutí přístroje

Poznámka: Níže je uveden zkrácený popis zapínání součástí přístroje ABI PRISM 7900HT. Zevrubný popis naleznete v části “Zapnutí přístroje7900HT” na straně 2-4.

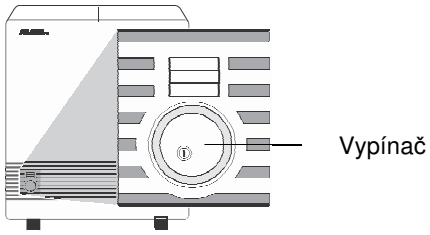
DŮLEŽITÉ! Nezapínejte přístroj 7900HT, pokud jste odstranili boční spodní kryt. Pokud to učiníte, nebude do přístroje z počítače nahrán firmware a objeví se chybová hláška.

1. Zapněte monitor a počítač.
2. Zapněte podavač mikrodestiček Zymark Twister® , pokud je součástí vašeho systému.

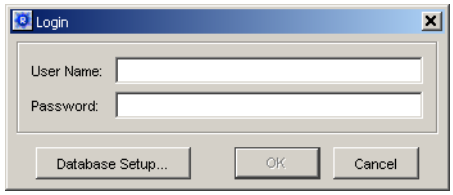


(Zadní panel podavače)

3. Zapněte přístroj 7900HT.



4. Spusťte program SDS 2.2 (zvolte Start > **Programs** > **Applied Biosystems** > **SDS 2.2** > **SDS 2.2**)
5. (pouze pro databázi) V okně Login (Přihlášení) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK .



Zobrazí se hlavní okno programu.

Krok 1 – Vytvoření dokumentu destičky

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro vytváření dokumentu destičky práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

O dokumentu destičky

Každá destička analyzovaná na přístroji ABI PRISM 7900HT vyžaduje vytvoření dokumentu destičky v programu SDS. Dokument destičky je virtuální záznam mikrodestičky nebo jiného typu spotřebního materiálu se vzorky (ABI PRISM® 384/96-ti jamková destička nebo AB Mikrofluidní karta).

Dokumenty destiček obsahují tyto údaje:

- Informace o detektorech a jejich uspořádání v destičce
- Informace o markerech a jejich uspořádání v destičce (pouze alelická diskriminace)
- Informace o vzorcích a jejich uspořádání v destičce
- Teplotní profil experimentu (absolutní a relativní kvantifikace)

Vytvoření dokumentu destičky

1. Pokud není ještě spuštěn, spusťte program SDS podle postupu na straně 3-7.
2. Klikněte nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
3. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:
   - Rozbalovací nabídka **Assay** (Esej) – Zvolte esej pro vaši destičku.
   - Rozbalovací nabídka **Container** (Destička) – Zvolte typ spotřebního materiálu, který zamýšlíte použít.
   - Rozbalovací nabídka **Template** (Templát) – Zvolte **Blank Template** (Žádný templát).
   - V poli **Barcode** (Čárový kód) – proveďte jeden z kroků:

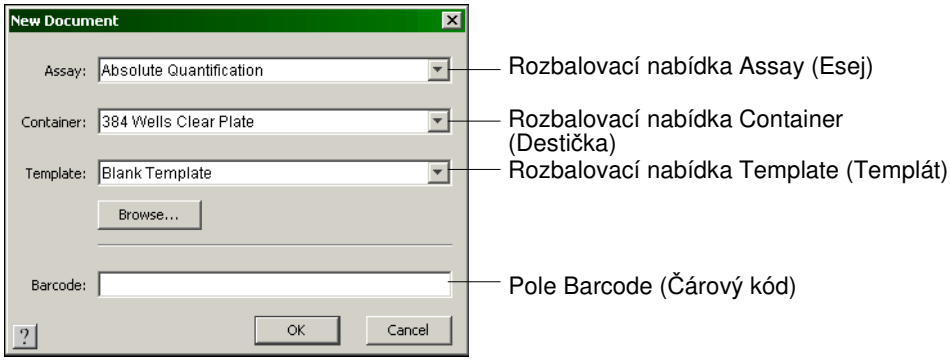
     Vytváříte-li:

     – *Dokument destičky* pro spuštění jedné destičky, naskenujte nebo zadejte čárový kód destičky.

     – *Templát* pro zadání více destiček, ponechte toto pole prázdné.

   DŮLEŽITÉ! V databázi SDS Enterprise není možné vytvořit dva dokumenty destiček pro různé typy běhů s týmž čárovým kódem.

   Poznámka: Provádíte-li analýzu disociační křivky, zvolte v rozbalovací nabídce Assay (Esej) možnost Absolute Quantification (Absolutní kvantifikace).



4. Klikněte OK.
5. Vytvořte a kopírujte detektory (a markery) do nového dokumentu destičky podle popisu v kroku 2 “Přidání detektorů a markerů” na straně 3-9.

Krok 2 – Přidání detektorů a markerů

.

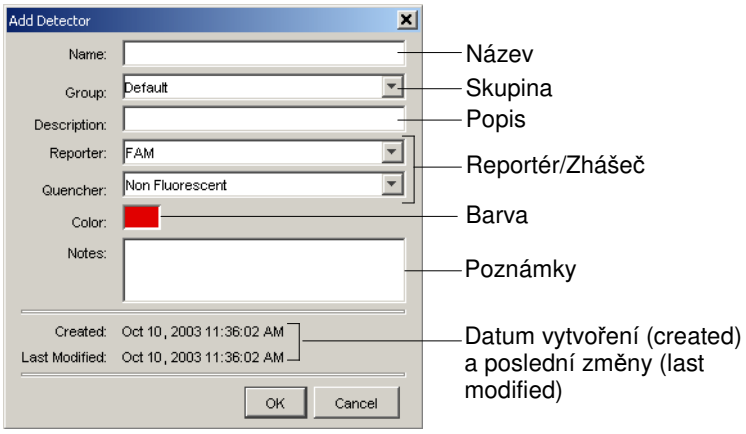
Vytváření detektorů

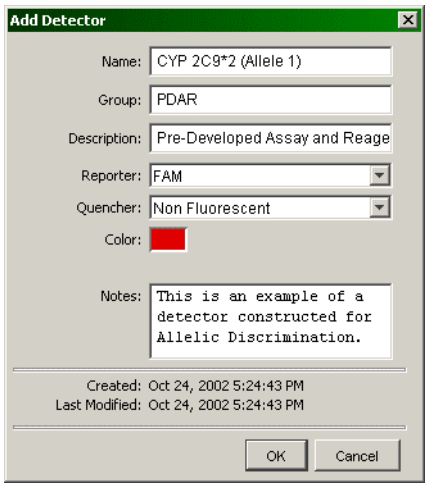
Před tím než můžete použít dokument destičky ke spuštění běhu, musíte definovat jaké detektory (a případně markery, provádíte-li alelickou diskriminaci) budou v daném experimentu používány. Detektor je virtuálně vyjádřená genově specifická kombinace primerů a TaqMan® sondy, které jsou používány v dané eseji, nebo kombinace primerů za současného použití barviva SYBR® Green 1 (používá se pro detekci dvouřetězcové DNA). Před použitím dokumentu destičky musíte vytvořit a přidat detektory pro všechny eseje na destičce.

1. Zvolte **Tools > Detector Manager** (Nástroje > Správce detektorů).
2. V dialogovém okně Detector Manager klikněte New... (Nový).
3. V dialogovém okně Add Detector (Přidat detektor) zadejte:
   - **Name** (Název) – Zadejte název detektoru.

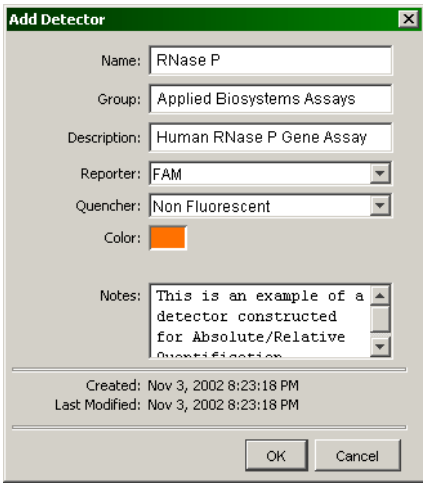
     Název detektoru musí být jedinečný a měl by odkazovat na cílový lokus dané eseje (např. GAPDH nebo RNaza P). Nepoužívejte totéž jméno pro více než jeden detektor. Program SDS nerozlišuje mezi detektory stejného jména, i když používají odlišné barvy.
   - **Group** (Skupina) – (nepovinné) Zadejte nebo zvolte skupinu, do které detektor patří.
   - **Description** (Popis) – (nepovinné) Zadejte stručný popis eseje (max. 32 znaků).
   - **Reporter/Quencher** (Reportér a zhášeč)– Zvolte reportérovou barvu a zhášeč podle vaší sondy.

     Vytváříte-li detektor pro esej používající barvivo SYBR Green 1, zvolte zhášeč nefluorescenční (Quencher Dye - Non Fluorescent).
     Používáte-li vlastní barvu, která není dodávána společností Applied Biosystems, musíte před jejím použitím provést kalibraci přístroje pro tuto barvu (viz “Přidání vlastních barev” na straně 7-27).
   - **Color** (Barva) – (nepovinné) Kliknutím na čtvereček zvolte barvu detektoru a potvrďte OK.
   - **Notes** (Poznámky) – (nepovinné) Zadejte libovolný komentář k detektoru (max. 200 znaků).





Detektor alelické diskriminace

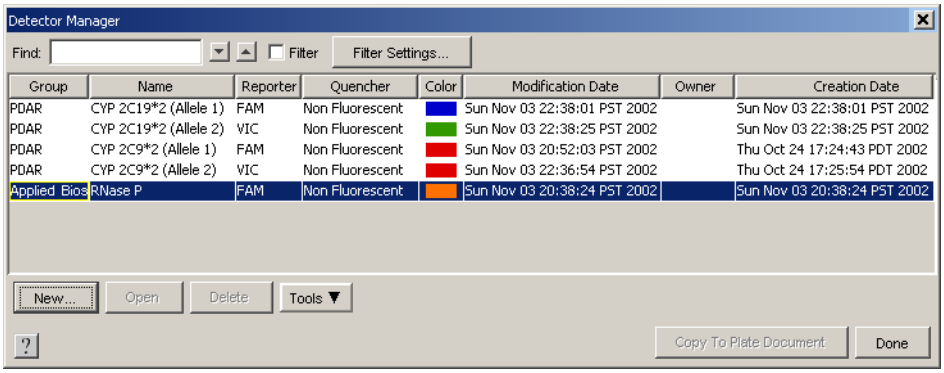


Detektor absolutní nebo relativní kvantifikace

4. Klikněte OK.

   Program uloží nový detektor a zobrazí jej v seznamu detektorů.

   Poznámka: Používáte-li databázi SDS Enterprise, nemůžete vytvořit detektor používající kombinaci téhož názvu, reportérové barvy a zhášeče jako existující detektor.



5. Opakujte kroky 2 až 4, až vytvoříte detektory pro všechny eseje na destičce.

   Poznámka: Kliknutím na ikonu ? otevřete nápovědu s informacemi o správci detektorů a s popisem postupů změny, mazání nebo vyhledávání detektorů.

6. Zvolte jednu z možností:

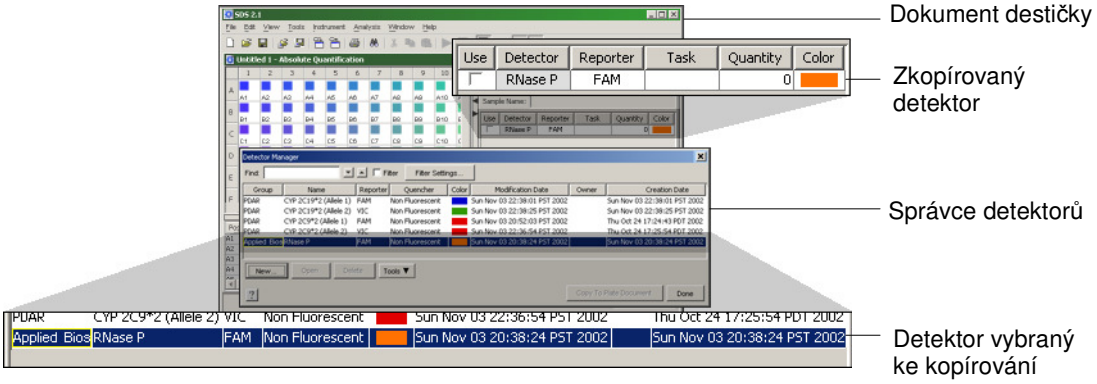
Vytváříte-li dokument destičky pro …	**Pak…**
• absolutní kvantifikaci • relativní kvantifikaci • analýzu disociační křivky	kopírujte detektor(y) do dokumentu destičky podle postupu na straně 3-11.
alelickou diskriminaci	vytvořte a přidejte do dokumentu destičky markery podle popisu na straně 3-12.

Kopírování a přidání detektorů do dokumentu destičky

DŮLEŽITÉ! Jakmile zkopírujete detektor do dokumentu destičky, není tento detektor nijak propojen se záznamem ve správci detektorů. Změníte-li tedy detektor ve správci detektorů poté, co jste jej kopírovali do dokumentu destičky, musíte jej z dokumentu destičky odstranit a kopírovat znovu, aby se tato změna v dokumentu destičky projevila.

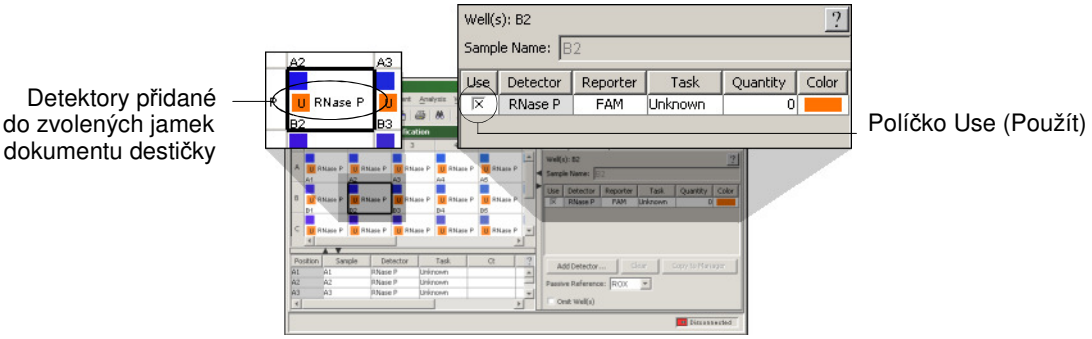
1. V dialogovém okně Detector Manager (Správce detektorů) programu SDS kopírujte detektory do dokumentu destičky:
   a. Přidržte klávesu **Ctrl** a zvolte detektory, které chcete přidat do dokumentu destičky. Zvolené detektory budou zvýrazněny.
   b. Klikněte Copy To Plate Document (Kopírovat do dokumentu destičky).

   Program přidá detektory do Prohlížeče jamek (Well Inspector) dokumentu destičky.



2. Klikněte Done (Hotovo), čímž správce detektorů uzavřete.
3. Ve schématu destičky zvolte jamky obsahující esej pro první detektor.

   Poznámka: Výběr jamek je snazší za pomoci kláves **Ctrl** a **Shift**, které umožňují vybrat jednotlivé jamky nebo jejich skupiny. Více informací viz strana 2-22.
4. Přidejte detektory do zvolených jamek tak, že zatrhnete políčko detektoru ve sloupci **Use** (Použít) v prohlížeči jamek (well inspector).



5. Opakujte kroky 3 až 4, až přidáte do schématu destičky i ostatní detektory.
6. Nastavte úlohy detektorů v dokumentu destičky podle postupu v části “Krok 3 – Nastavení úlohy detektorů” na straně 3-14.

Vytvoření markerů pro alelickou diskriminaci

Součástí dokumentů destičky pro alelickou diskriminaci jsou tzv. ‘markery’, jejichž účelem je snazší organizace a používání detektorů. Marker je dvojice detektorů, představujících dvě eseje, zacílené na dvě různé alely téhož lokusu.

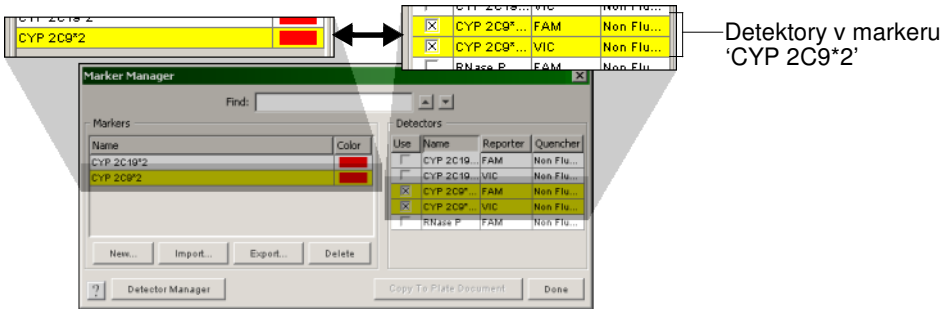
DŮLEŽITÉ! Dokumenty destiček pro alelickou diskriminaci musí obsahovat alespoň jeden marker.

1. Je-li otevřen Správce detektorů (Detector Manager), klikněte na Done, čímž jej zavřete.
2. Zvolte **Tools > Marker Manager** (Nástroje > Správce markerů).
3. V dialogovém okně Marker Manager klikněte New... (Nový).
4. V poli **Enter name of new Marker** (Zadejte název nového markeru) zadejte název nového markeru a klikněte OK.

   Nový marker se zobrazí v poli **Markers** (Markery).

   Poznámka: Používáte-li databázi SDS Enterprise, nemůžete vytvořit marker, který používá kombinaci téhož názvu a detektorů jako existující marker.
5. Přidejte do nového markeru detektory:
   a. V poli **Markers** (Markery) zvolte kliknutím nový marker. Zvolený marker bude zvýrazněn.
   b. V seznamu detektorů zatrhněte políčko **Use** (Použít) u detektorů, které mají být součástí markeru. Zvolený detektor bude zvýrazněn.

   DŮLEŽITÉ! V jednom markeru není možné použít více než dva detektory a ty nesmí používat tutéž reportérovou barvu.



6. Pracujete-li s více esejemi pro alelickou diskriminaci, opakujte kroky 3 až 5, až vytvoříte všechny potřebné markery.

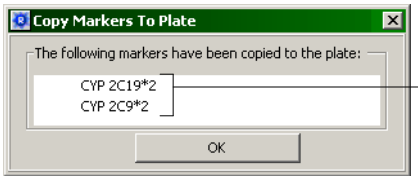
   DŮLEŽITÉ! Před přidáním markeru do dokumentu destičky do něj musíte přidat dva detektory.

   Poznámka: Kliknutím na ikonu ? otevřete nápovědu s informacemi o správci markerů nebo o mazání markerů ze seznamu.
7. Přidejte marker(y) do dokumentu destičky pro alelickou diskriminaci podle postupu v části “Kopírování a přidání markerů” na straně 3-13.

Kopírování a přidání markerů

DŮLEŽITÉ! Jakmile zkopírujete marker do dokumentu destičky, není tento marker nijak propojen se záznamem ve správci markerů. Změníte-li tedy marker ve správci markerů poté, co jste jej kopírovali do dokumentu destičky, musíte jej z dokumentu destičky odstranit a kopírovat znovu, aby se tato změna v dokumentu destičky projevila.

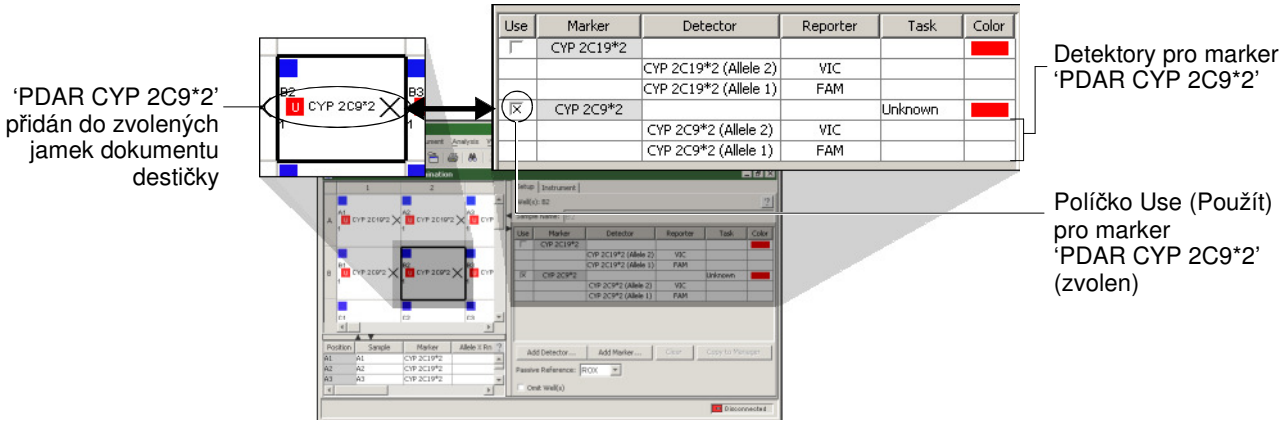
1. V dialogovém okně Marker Manager (Správce markerů) programu SDS kopírujte marker do dokumentu destičky:
   a. Přidržte klávesu **Ctrl** a zvolte marker(y), které chcete přidat do dokumentu destičky..
   b. Klikněte Copy To Plate Document (Kopírovat do dokumentu destičky)
   c. V dialogovém okně Copy Markers To Plate (Kopírovat markery do destičky) klikněte OK.



   d. Opakujte kroky a a c, čímž zkopírujete další markery do dokumentu destičky alelické diskriminace.
2. Klikněte Done (Hotovo), čímž správce markerů uzavřete.
3. Ve schématu destičky zvolte jamky obsahující esej pro marker, který jste předešle definovali.

   Poznámka: Výběr jamek je snazší za pomoci kláves **Ctrl** a **Shift**, které umožňují vybrat jednotlivé jamky nebo jejich skupiny. Více informací viz strana 2-22.
4. Přidejte markery do zvolených jamek tak, že zatrhnete políčko markeru ve sloupci **Use** (Použít) v prohlížeči jamek (well inspector).

   Poznámka: Detektory, které jsou součástí markeru, jsou přidány do jamek automaticky, jakmile je přidán marker.



5. Opakujte kroky 3 a 4, až přidáte do schématu destičky i ostatní markery.
6. Nastavte úlohy detektorů v dokumentu destičky podle postupu v části "Krok 3 – Nastavení úlohy detektorů" na straně 3-14.

Krok 3 – Nastavení úlohy detektorů

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro nastavení a změnu úlohy detektorů práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

O úlohách detektorů

Pro každý detektor nebo marker použitý v jamkách dokumentu destičky musíte definovat jeho úlohu (‘task’). Úloha udává specifický účel nebo funkci daného detektoru nebo markeru v destičce. Program SDS používá úlohy detektorů k definici toho, jakým způsobem zpracovávat data z jednotlivých jamek během analýzy. Úlohy detektorů se mění v závislosti na typu dokumentu destičky.

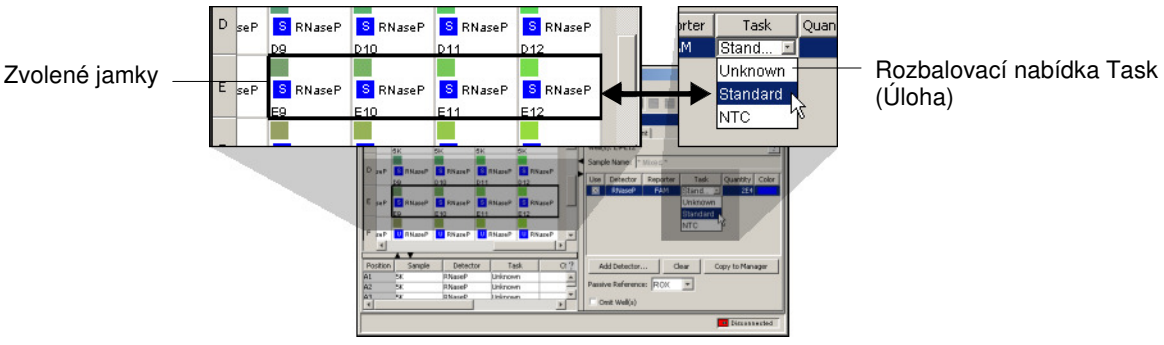
Nastavení úlohy detektorů

1. Pomocí kláves **Ctrl** a **Shift** zvolte jamky ve schématu destičky, obsahující vzorky s danou úlohou, jak je popsáno níže.

Tabulka 3-1 Úlohy detektorů v programu SDS

Experiment	Úloha		Použití pro…
Alelická diskriminace	Unknown (Neznámá)	U	všechny detektory jamek obsahujících PCR reagencie a neznámé vzorky.
	NTC	N	všechny detektory jamek s negativními kontrolami, které obsahují PCR reagencie ale ne templát.
Absolutní kvantifikace	Unknown (Neznámá)	U	všechny detektory jamek obsahujících PCR reagencie a kvantifikované vzorky.
	Standard	S	detektory jamek obsahujících PCR reagencie a vzorky o známém množství. (Více informací viz strana 3-15.)
	NTC	N	všechny detektory jamek s negativními kontrolami, které obsahují PCR reagencie ale ne templát.
Relativní kvantifikace	Target (Cíl)	T	všechny detektory jamek obsahujících PCR reagencie pro amplifikaci cílových sekvencí.
	Endogenní kontrola	E	všechny detektory jamek obsahujících PCR reagencie pro amplifikaci endogenní kontroly.

2. V prohlížeči jamek klikněte u každého detektoru do pole ve sloupci **Task** (Úloha) a zvolte odpovídající úlohu z rozbalovací nabídky. Úloha se zobrazí ve všech vybraných jamkách.



3. Opakujte kroky 1 a 2, až definujete všechny úlohy detektorů.
4. Zvolte jednu z možností:

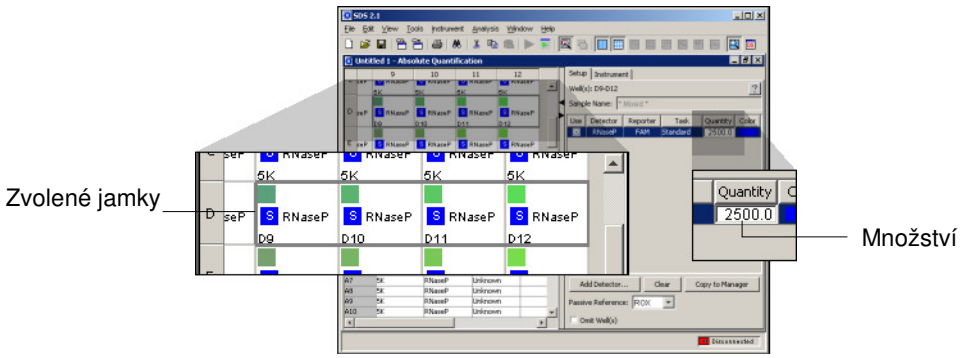
Vytváříte-li dokument destičky pro …	**Pak…**
absolutní kvantifikaci	definujte množství jednotlivých standardů použitých v destičce podle postupu níže.
• alelickou diskriminaci • relativní kvantifikaci • analýzu disociační křivky	• Je-li to nezbytné, definujte pasivní referenci pro dokument destičky podle postupu na straně 3-16. • Jinak nastavte teplotní profil podle postupu na straně 3-17.

Definice standardů pro absolutní kvantifikaci

Aby mohl program SDS vytvořit standardní křivku pro kvantifikaci neznámých vzorků, musíte definovat úlohu detektoru typu Standard a zadat množství jednotlivých standardů do dokumentu destičky absolutní kvantifikace.

1. Ve schématu destičky v programu SDS zvolte jamky obsahující první ředění standardu.
2. V prohlížeči jamek klikněte u příslušného detektoru do pole ve sloupci **Task** (Úloha) a z rozbalovací nabídky zvolte **Standard**.
3. V prohlížeči jamek klikněte u příslušného detektoru do pole ve sloupci **Quantity** (Množství) a zadejte množství nebo koncentraci standardu ve zvolených jednotkách (výchozí počet kopií, pikogramy, nanogramy, atd.) a stiskněte **Enter**.

   Zadané množství se zobrazí ve zvolených jamkách.



4. Opakujte kroky 1 až 3 až zadáte množství i pro ostatní ředění standardu.

   Po skončení této činnosti by se ve schématu destičky ve všech replikátech standardu mělo zobrazovat označení **Standard** a definované množství, které program následně použije pro výpočet standardní křivky.

5. Proveďte jeden z následujících kroků:
   - Je-li to nezbytné, definujte pasivní referenci pro dokument destičky podle postupu v části
     "Krok 4 – Nastavení pasivní reference a vynechání jamek" na straně 3-16.
   - Jinak nastavte teplotní profil podle postupu v části
     "Krok 5 – Programování běhu" na straně 3-17.

Krok 4 – Nastavení pasivní reference a vynechání jamek

Přístupová práva

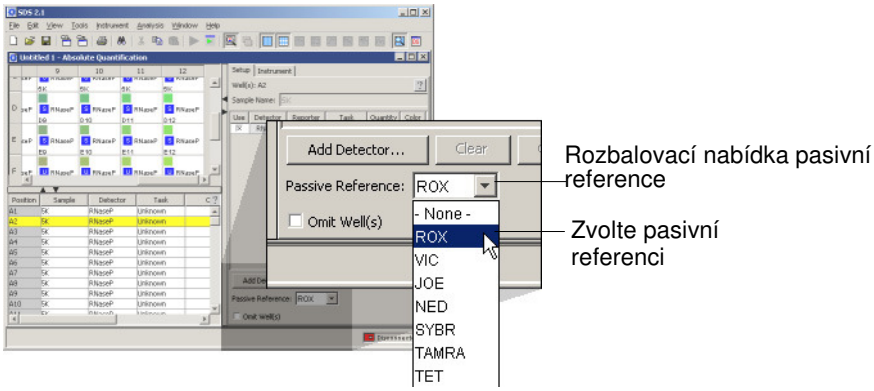
Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro změnu pasivní reference nebo vynechání jamek práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Nastavení pasivní reference

Používáte-li kity a mixy společnosti Applied Biosystems, použijte přednastavenou pasivní referenci (společnost Applied Biosystems používá pasivní referenci ROX™). Používáte-li vlastní reagencie, zvolte pasivní referenci, kterou chcete použít.

Poznámka: Společnost Applied Biosystems doporučuje používat pasivní referenci k normalizaci signálu reportérové barvy (více informací viz strana D-6).

1. V rozbalovací nabídce **Passive Reference** (Pasivní reference) zvolte barvu.



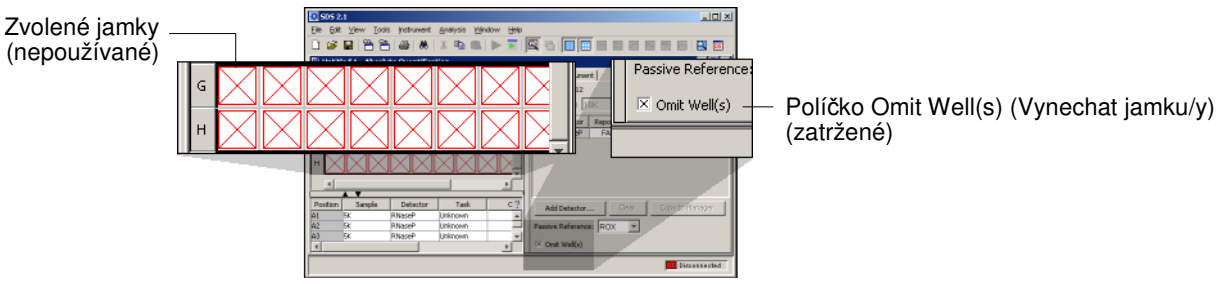
2. Je-li to nezbytné, vynechejte jamky podle postupu níže. Jinak nastavte teplotní profil podle postupu na straně 3-17.

Vynechání jamek

Program SDS umožňuje vynechat (nepoužívat) určité jamky před nebo po provedení běhu.

DŮLEŽITÉ! Vynecháte-li určité jamky *před* provedením běhu, program SDS nebude během běhu odečítat data z těchto jamek. Pokud vynecháte jamky *po* provedení běhu, bude jamka vynechána z analýzy, ale data nebudou vymazána.

1. Stiskněte klávesu **Ctrl** a zvolte ve schématu destičky jamky, které chcete vynechat.
2. V prohlížeči jamek v záložce Setup (Zadání) klikněte do políčka **Omit Well(s)** (Vynechat jamku/y).



3. Nastavte teplotní profil podle postupu na straně 3-17.

Krok 5 – Programování běhu

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro nastavení teplotního profilu práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

O programování běhu

V průběhu běhu je činnost přístroje kontrolována z programu SDS prostřednictvím dokumentu destičky, v němž jsou naprogramovány pokyny k provedení běhu. Součástí každého nového běhu (vyjma alelické diskriminace) je přednastavený program běhu (teplotní profil), který je pro potřeby vašeho pokusu nutné upravit.

Součástí programu je:

- Nastavení teplotního profilu
- Automatické změny nastavených parametrů (Auto Increment)
- Nastavení rychlostí, jakými jsou prováděny změny teplot (Ramp Rates)
- Nastavení sběru dat
- Nastavení reakčního objemu

Programujete-li běh…	**Pak…**
• absolutní kvantifikace • relativní kvantifikace	postupujte podle návodu na straně 3-19. DŮLEŽITÉ! Používáte-li databázi SDS Enterprise, přečtěte si odstavec níže.
alelické diskriminace	viz strana 3-18.
analýzy disociační křivky	Chcete-li provést analýzu disociační křivky, proveďte: 1. Programujte běh absolutní kvantifikace podle postupu na straně 3-19. 2. Přidejte krok zvyšování teploty (pro analýzu disociační křivky) podle postupu na straně 3-21.

O používání databáze

Programujte běh takovým způsobem, aby sběr dat probíhal pouze v nezbytných krocích (stage). Kvůli omezené kapacitě paměti není možné do databáze SDS Enterprise ukládat dokumenty destiček větší než 40 MB. Velikost dokumentu se čtením v reálném čase závisí na délce běhu a nastavení sběru dat. Delší běhy a běhy, v nichž je sběr dat nastaven ve více krocích během cyklu, mohou vést ke vzniku dokumentů s velikostí výrazně větší než průměrných 15–25 MB.

Programování běhu alelické diskriminace

Aby bylo možné na přístroji zpracovávat co nejvíce vzorků, není při provádění běhu alelické diskriminace k dispozici možnost programování běhu. Jelikož experimenty alelické diskriminace jsou experimenty se čtením po skončení reakce (end-point) a nevyžadují sběr dat v reálném čase, můžete teplotní cyklování provádět na jiném PCR cykleru a na přístroji 7900HT provést pouze sběr dat a analýzu.

Chcete-li provést teplotní cyklování pokusu alelické diskriminace na…	**Pak…**
jiném PCR cykleru	pokračujte krokem 8 “Zadání názvů vzorků a informací o destičce” na straně 3-25
přístroji 7900HT	postupujte podle návodu níže.

Provedení teplotního cyklování pokusu alelické diskriminace na přístroji 7900HT

Chcete-li provést teplotní cyklování a sběr dat na přístroji 7900HT, proveďte nejprve běh se sběrem dat v reálném čase a následně další běh jako dokument alelické diskriminace.

DŮLEŽITÉ! Podle postupu uvedeného níže postupujte pouze provádíte-li PCR na přístroji 7900HT. Jinak proveďte PCR na jiném PCR cykleru a poté přeneste destičku do přístroje 7900HT pro sběr dat.

1. Spusťte program SDS.
2. Vytvořte dokument absolutní kvantifikace se sběrem dat v reálném čase podle postupu na straně 3-8.

   Poznámka: Není nutné nastavovat v dokumentu destičky detektory.
3. V dokumentu destičky nastavte teplotní profil a inkubační doby podle vašeho protokolu, jak je popsáno v části “Nastavení běhu absolutní nebo relativní kvantifikace” na straně 3-19.
4. Uložte dokument destičky podle postupu na straně 4-22.

   DŮLEŽITÉ! Neukládejte dokument se sběrem dat v reálném čase do databáze. V databázi nelze uložit dokumenty destiček pro různé typy běhů se stejným čárovým kódem.
5. Spusťte běh pomocí dokumentu se sběrem dat v reálném čase podle postupu na straně 4-23.

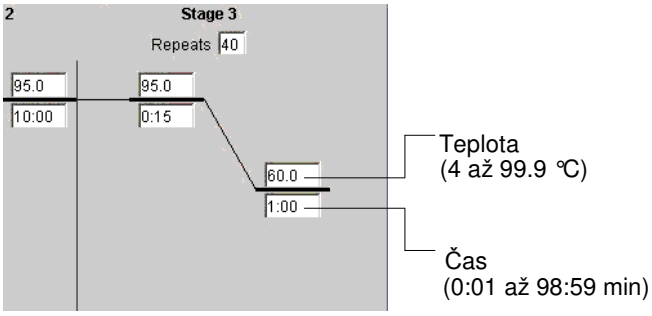
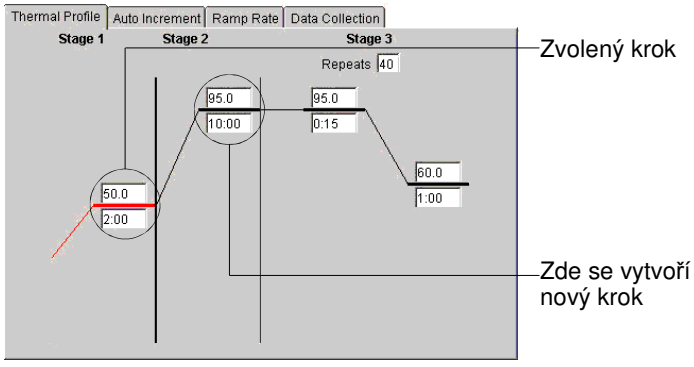
   Poznámka: Dokumenty se sběrem dat v reálném čase mohou být velmi užitečné při řešení problémů a neočekávaných výsledků, které se případně mohou vyskytnout v průběhu pokusu alelické diskriminace.
6. Po skončení běhu uzavřete dokument absolutní kvantifikace.
7. Pokračujte krokem 6 “Vytvoření templátu z dokumentu destičky” na straně 3-22.

Programování běhu absolutní nebo relativní kvantifikace

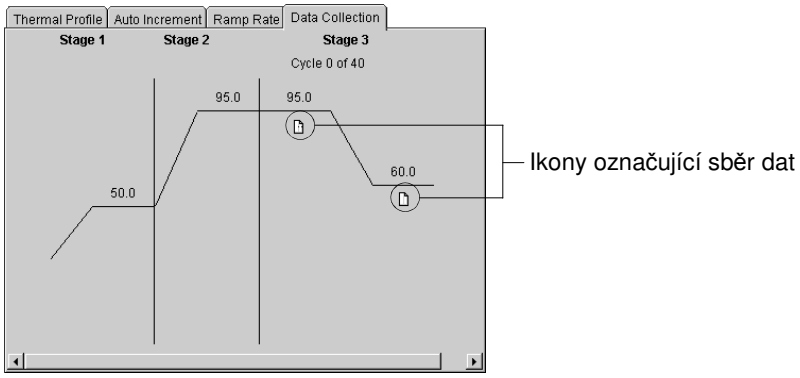
Poznámka: Níže jsou popsány pouze základní kroky nastavení běhu: teplotní profil, objem vzorku a sběr dat. Chcete-li získat více informací o nastavení běhu, kliknutím na ikonu [?] v záložce Instrument (Přístroj) otevřete nápovědu, kde získáte informace o nastavení automatické změny parametrů (auto increment) a nastavení rychlostí, jakými jsou prováděny změny teplot (Ramp Rates).

1. V programu SDS zvolte záložku **Instrument** (Přístroj) v dokumentu destičky.
2. Je-li zapotřebí, zatrhněte možnost **9600 Emulation**.

   Poznámka: Je-li zatržena možnost **9600 Emulation**, program SDS sníží rychlost, s jakou jsou prováděny změny teplot při cyklování na přístroji 7900HT tak, aby odpovídala rychlosti přístroje ABI PRISM® 7700.
3. Pozměňte přednastavený teplotní profil podle potřeby:

Chcete-li…	**Pak…**
změnit nastavení času a teplot	klikněte do příslušného pole, zadejte novou hodnotu a klikněte kdekoliv mimo toto pole. 
přidat krok inkubace (hold), cyklus nebo krok	1. Klikněte na krok vlevo od místa, kde chcete přidat nový krok. . 2. Klikněte Add Cycle (Přidat cyklus) nebo Add Hold (Přidat krok inkubace). Program vloží nový krok do teplotního profilu. Poznámka: Chcete-li přidat nový krok do cyklu, zvolte krok vlevo od místa, kde jej chcete přidat a klikněte Add Step. 
odstranit krok	1. Klikněte na krok, který chcete odstranit. Zvolený krok bude zvýrazněn. 2. Klikněte na Delete Step (Odstranit krok), čímž krok odstraníte.

4. Nastavte sběr dat v průběhu běhu:
   a. Zvolte záložku **Data Collection** (Sběr dat).
   b. Klikněte pod každý krok inkubace nebo změny teploty v teplotním profilu, chcete-li v něm provádět sběr dat.



DŮLEŽITÉ! Sběr dat v průběhu běhu nastavte pouze v nezbytných krocích PCR. Velikost dokumentu se čtením v reálném čase závisí na délce běhu a nastavení sběru dat. Delší běhy a běhy, v nichž je sběr dat nastaven ve více krocích během cyklu, mohou vést ke vzniku dokumentů s velikostí výrazně větší než průměrných 15–25 MB

5. Klikněte do pole **Sample Volume (µL)** (Objem vzorku) a zadejte objem vzorků v destičce.

   Poznámka: Objemem vzorku se rozumí celkový objem jakékoliv jamky, včetně jamek neobsahujících templát, nebo jakékoliv kombinace mastermixu a templátu.

   DŮLEŽITÉ! Všechny jamky destičky musí obsahovat vzorky o totožném objemu.

6. Zvolte jednu z následujících možností:

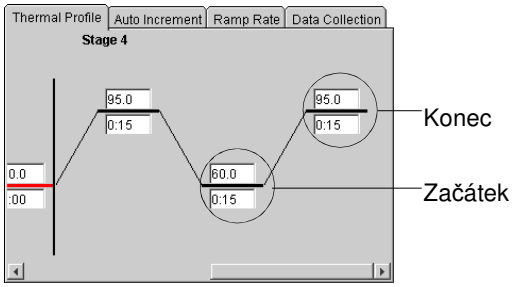
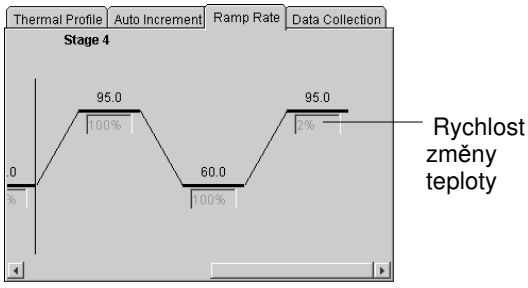
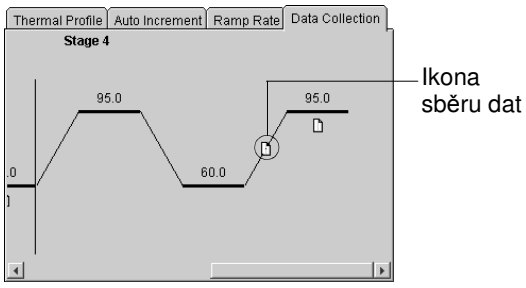
Provádíte-li…	**Pak…**
pouze běh absolutní nebo relativní kvantifikace	pokračujte krokem 6 “Vytvoření templátu z dokumentu destičky” ¨na straně 3-22.
běh absolutní kvantifikace s analýzou disociační křivky	definujte provedení analýzy disociační křivky podle postupu na straně 3-21.

Programování disociační křivky

Abyste získali data pro analýzu disociační křivky, musíte na přístroji 7900HT naprogramovat postupné pomalé zvyšování teploty (‘temperature ramp’) vzorku za současného měření fluorescence každých 7-10 vteřin (detailní vysvětlení viz strana 6-38).

1. V záložce Instrument (Přístroj) zvolte **Thermal Profile** (Teplotní profil).
2. Klikněte na krok vlevo od místa, kde chcete zadat krok disociační křivky.
3. V záložce Thermal Profile (Teplotní profil) klikněte Add Dissociation Stage (Přidat krok disociační křivky).

   Program SDS vloží krok postupného zvyšování teploty na konec naprogramovaného teplotního profilu.
4. Předvolené nastavení zvyšování teploty lze měnit, společnost Applied Biosystems však pro dosažení maximálního rozlišení (maximální oddělení píků při analýze) doporučuje postupovat následujícím způsobem.

Doporučení	**Příklad**
Počáteční a konečná teplota musí být rozdílné o minimálně 35 °C. Každý krok trvá 15 vteřin (0:15).	
Nastavení rychlosti změny teploty (ramp rate) pro konečný krok musí být 2 %. DŮLEŽITÉ! Volba 9600 Emulation nesmí být zatržena, chcete-li toto nastavení provést.	
Zvyšování teploty musí být spojeno se sběrem dat (ikona).	

5. Pokračujte krokem 6 “Vytvoření templátu z dokumentu destičky” na straně 3-22.

Krok 6 – Vytvoření templátu z dokumentu destičky

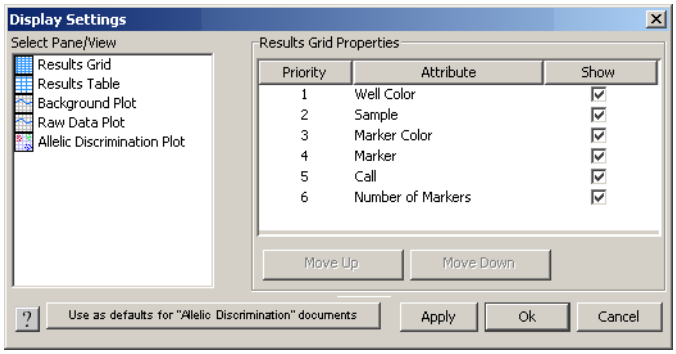
Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro vytvoření templátu z dokumentu destičky práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Nastavení zobrazení (volitelné)

Dokumenty destiček vytvořené na základě templátu si podrží v templátu definované nastavení zobrazení, nastavte proto zobrazení templátu tak, aby se na jeho základě vytvořené dokumenty destiček zobrazovaly, jak si přejete.

1. Klikněte nebo zvolte **View > Display Settings** (Zobrazit > Nastavení zobrazení).
2. V okně Display Settings (Nastavení zobrazení) nastavte zobrazení pro **Results Grid** (Schéma destičky) a **Results Table** (Tabulka výsledků).



Více informací o dialogovém okně Display Settings (Nastavení zobrazení) získáte kliknutím na ikonu , čímž otevřete nápovědu.

3. Nastavení potvrďte .

   Nové nastavení zobrazení bude použito v dokumentu destičky.

4. Pokračujte částí “Vytvoření templátu z dokumentu destičky (volitelné)” na straně 3-23.

Vytvoření templátu z dokumentu destičky (volitelné)

DŮLEŽITÉ! Uložení dokumentu destičky jako templátu je nepovinný krok, který je doporučen, je-li možné dokument použít pro vytvoření více dokumentů destiček s totožnou konfigurací esejí. Nechcete-li vytvořit templát, pokračujte částí "Zadání názvů vzorků a informací o destičce (volitelné)" na straně 3-25.

Chcete-li uložit templát:

1. Zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).
2. V poli **Save in** (uložit v) v dialogovém okně Save As (Uložit jako) vyhledejte adresář **AppliedBiosystems > SDS2.2 > Templates**.

   Poznámka: Uložíte-li templát do adresáře Templates (Templáty), bude přístupný z rozbalovací nabídky **Template** v dialogovém okně New Document (Nový dokument).
3. Zvolte **File of type** (Typ souboru) > **ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)**.
4. Klikněte do pole **File name** (Název souboru) a zadejte název templátu.
5. Klikněte Save (Uložit).

   Templát se uloží.
6. Zobrazí-li program jedno nebo více varování, přečtěte si je a potvrďte OK.
7. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít).

   Vyzve-li vás program k uložení dokumentu destičky, klikněte No (Ne).

   Templát se zavře.
8. Vytvořte dokument destičky z templátu podle postupu na straně 3-24.

Chcete-li uložit templát do databáze SDS Enterprise:

1. Zvolte **File > Save Template to Database** (Soubor > Uložit templát do databáze).
2. V dialogovém okně Save Document as Template (Uložit dokument jako templát) klikněte Yes (Ano).
3. Zobrazí-li program jedno nebo více varování, přečtěte si je a potvrďte OK.
4. V poli **Template Name** (Název templátu) dialogového okna Save Template to Database zadejte název templátu (max. 128 znaků) a klikněte OK.
5. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít).

   Vyzve-li vás program k uložení dokumentu destičky, klikněte No (Ne).

   Templát se zavře.
6. Vytvořte dokument destičky z templátu podle postupu na straně 3-24.

Krok 7 – Vytvoření dokumentu destičky z templátu

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro vytváření dokumentu destičky z templátu práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Možnosti vytváření dokumentu destičky z templátu

Program SDS nabízí dvě možnosti jak vytvořit dokument destičky z templátu – jednotlivě a pro více dokumentů najednou.

Možnost	Popis	Viz
Vytvořit jeden dokument destičky z templátu	Níže je popsáno jak vytvořit jeden dokument destičky z templátu. Opakováním tohoto postupu můžete vytvořit libovolný počet dokumentů destičky.	Níže.
Vytvořit více dokumentů destičky z templátu pomocí nástroje Template Batch DŮLEŽITÉ! Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte zvolit tuto možnost.	Součástí programu je nástroj Template Batch, který umožňuje vytvořit naráz a rychleji více dokumentů destiček z templátu.	Strana 4-34

Vytvoření dokumentu destičky z templátu

1. V programu SDS klikněte nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
2. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:
   - Rozbalovací nabídka **Assay** (Esej) – Zvolte stejný typ jako templát.
   - Rozbalovací nabídka **Container** (Destička) – Zvolte stejný typ jako templát.
   - Rozbalovací nabídka **Template** (Templát) – Zvolte příslušný templát (*.sdt) vytvořený na straně 3-22.

   Není-li soubor templátu v rozbalovací nabídce Template, vyhledejte jej takto:

   a. Klikněte Browse... (Vyhledat).

   b. Vyhledejte na straně 3-22 vytvořený soubor templátu (*.sdt).

   c. Klikněte Open (Otevřít).

   V rozbalovací nabídce Template (Templáty) se zobrazí soubor templátu.

   Poznámka: Rozbalovací nabídka Template obsahuje všechny soubory templátů z podadresáře Templates programu SDS.

   - V poli **Barcode** (Čárový kód) – (volitelné) zvolte:
     – Zadejte čárový kód destičky, nebo
     – Naskenujte čárový kód pomocí ruční čtečky čárových kódů.
3. Klikněte OK, čímž vytvoříte nový dokument destičky z templátu.
4. Pokračujte částí "Zadání názvů vzorků a informací o destičce (volitelné)" na straně 3-25.

Krok 8 – Zadání názvů vzorků a informací o destičce

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro zadání (změnu) názvů vzorků práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

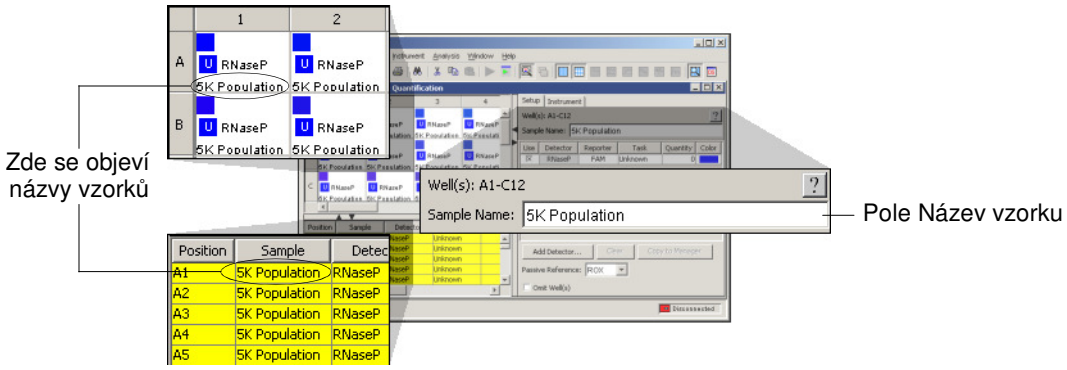
Zadání názvů vzorků do dokumentu destičky

V dokumentu destičky musí být zadány názvy vzorků, aby byla možná efektivní analýza výsledků. Program zobrazuje názvy vzorků ve schématu destičky a v tabulkách.

Poznámka: Názvy vzorků lze zadat až po skončení běhu, ale vždy před analýzou.

Poznámka: Program SDS umožňuje importovat zadání (detektor, úloha detektoru a názvy vzorků) do dokumentu destičky ze souboru txt (tabelátorem oddělená data). Více informací viz “Import zadání do dokumentu destičky” na straně A-2.

1. Ve schématu destičky zvolte jamky obsahující první vzorek.
2. Klikněte do pole **Sample Name** (Název vzorku), zadejte název a potvrďte **Enter**. Ve zvolených jamkách se objeví nový název vzorku.
3. Opakujte kroky 1 a 2 pro všechny zbývající vzorky.



4. Zadejte do dokumentu destičky informace o destičce podle popisu níže.

Zadání informací o destičce (volitelné)

1. V programu SDS zvolte **Tools > Document Information** (Nástroje > Informace o dokumentu).
2. V dialogovém okně Document Information (Informace o dokumentu) upravte informace v polích **Barcode** (Čárový kód), **Operator** (Uživatel) nebo **Plate Comments** (Komentář).

   DŮLEŽITÉ! Používáte-li databázi SDS Enterprise:

   - Čárový kód zadaný do dokumentu destičky musí být jedinečný a nesmí být použit v jiném dokumentu destičky.
   - Do pole Operator (Uživatel) je automaticky předvyplněno jméno uživatele, který se přihlásil do programu SDS a spustil běh (jméno je předvyplněno pouze po provedení běhu).
   - Čárový kód dokumentu destičky, který byl již spuštěn, neměňte.

3. Po skončení klikněte OK.
4. Spusťte běh podle popisu na straně 3-26.

Krok 9 – Spuštění běhu na přístroji 7900HT

Přístupová práva

Pro spuštění běhu destiček uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

DŮLEŽITÉ! Dokument destičky musí být před spuštěním uložen do databáze. Spustit jej může uživatel ze skupiny Operator.

Možnosti spuštění destiček

Na přístroji 7900HT je možné spustit běh destičky jednotlivě nebo ve skupinách za použití podavače mikrodestiček Zymark Twister.

DŮLEŽITÉ! Nepoužíváte-li podavač mikrodestiček Zymark Twister, musíte spouštět destičky jednotlivě.

Zvolte jednu z možností spuštění destičky:

Spouštíte-li destičku…	**Popis**	**Viz strana**
jednotlivě	1. Připravte si destičku nebo mikrofluidní kartu Applied Biosystems 7900HT 2. Spusťte běh pomocí programu SDS.	4-5 4-21
v rámci skupiny (automaticky)	1. Připravte si destičky nebo mikrofluidní karty 2. Spusťte skupinu destiček pomocí podavače mikrodestiček Zymark Twister. DŮLEŽITÉ! Váš systém musí být vybaven podavačem mikrodestiček, chcete-li spouštět destičky automaticky.	4-5 4-29

Ovládání přístroje 4

V této kapitole

Poznámky pro uživatele databáze 4-2
Dříve než začnete 4-3
Část 4.1 Příprava spotřebního materiálu 4-5
Prevence kontaminace 4-6
Spotřební materiál 4-6
Příprava 96-ti a 384-jamkových mikrodestiček 4-7
Příprava mikrofluidních karet 4-9
Část 4.2 Spuštění běhu – jedna destička 4-21
Uložení dokumentu destičky 4-22
Spuštění běhu – jedna destička (používání programu SDS) 4-23
Po skončení běhu 4-27
Část 4.3 Automatický provoz 4-29
Ovládání programu s databází SDS Enterprise 4-30
Ovládání programu bez databáze SDS Enterprise 4-32
Spuštění destiček pomocí programu Automation Controller 4-39
Po skončení běhu 4-42

Poznámky pro uživatele databáze

Dodatečné kroky

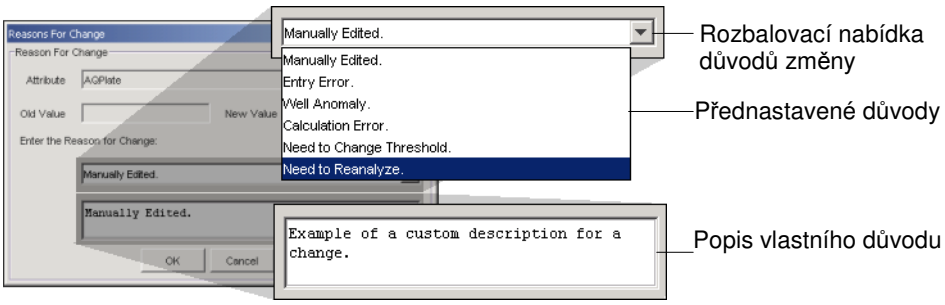
Používáte-li databázi SDS Enterprise pro ukládání dokumentů SDS, studií a dat, je možné, že při vytváření a provádění změn dokumentů destiček budete muset provést dodatečné kroky jak je popsáno v této kapitole. Níže jsou tyto úkony popsány (nutnost jejich provedení závisí na tom, jak správce provedl nastavení databáze). Více informací naleznete v příručce SDS Enterprise Database Administration Guide.

Dialogové okno Reason(s) For Change

Dialogové okno Reason(s) for Change (Důvod/y změny) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje zdůvodnění prováděných kroků (tzv. Audit). Systém auditu sleduje vytváření, změny a mazání dat v databázi.

Objeví-li se dialogové okno Reasons for Change, proveďte jeden z následujících kroků:

- Zvolte důvod změny z rozbalovací nabídky a poté klikněte na ikonu OK.
- Zadejte důvod změny do příslušného pole a poté klikněte na ikonu OK.



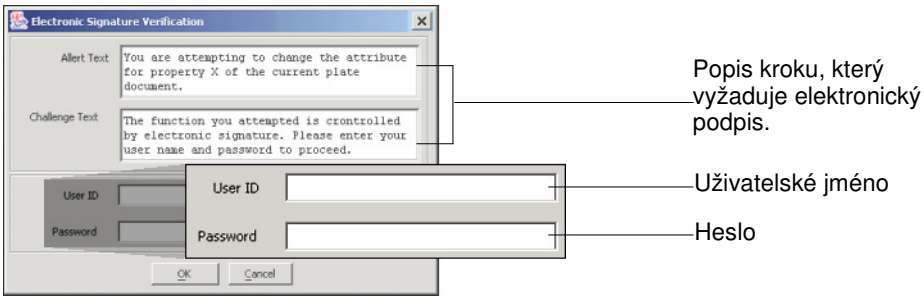
Obrázek 4-1 Dialogové okno Reasons for Change (Důvod/y změny)

Dialogové okno Electronic Signature

Dialogové okno Electronic Signature (Elektronický podpis) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje elektronický podpis. Systém elektronického podpisu omezuje a sleduje přístup uživatelů k datům v databázi.

Objeví-li se toto dialogové okno:

1. Do pole User ID (Jméno) a Password (Heslo) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.
2. Program následně zobrazí zprávu o úspěšném či neúspěšném použití elektronického podpisu. Pro pokračování klikněte OK.



Obrázek 4-2 Dialogové okno Elektronický podpis

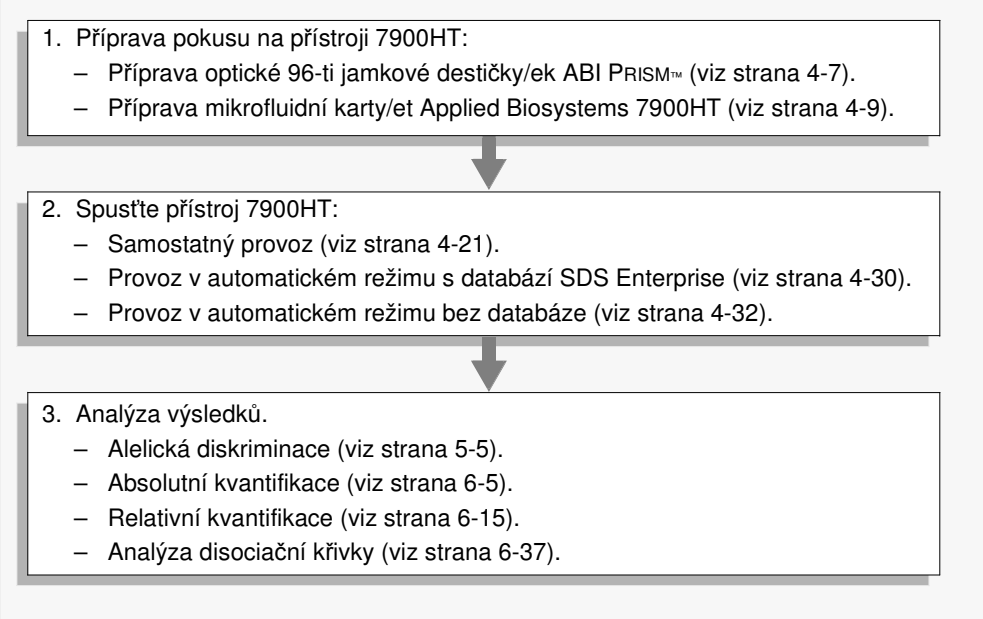
Dříve než začnete

Seznam kroků před spuštěním běhu

Chcete-li spouštět destičky na přístroji 7900HT, musíte nejprve provést následující kroky. Více informací naleznete na příslušné straně.

Provedeno	Úkol	Viz strana
	V posledním měsíci byla provedena kalibrace pozadí.	7-16
	V posledním půlroce byla provedena kalibrace barev.	7-20
	V přístroji není destička. DŮLEŽITÉ! Chcete-li spustit běh, musí být přístroj prázdný. Je-li v něm destička, musíte ji vyjmout.	4-42
Pracujete-li v automatickém režimu, ověřte …		
	Zásobník na destičky, které již byly spuštěny, je prázdný.	–

Přehled



Část 4.1 Příprava spotřebního materiálu

V této části

Prevence kontaminace....4-6
Spotřební materiál....4-6
Příprava 96-ti a 384-jamkových mikrodestiček....4-7
Příprava mikrofluidních karet....4-9

Prevence kontaminace

Kontaminace a 5´ nukleázová reakce

Metodika PCR vyžaduje odpovídající postupy práce, aby nedocházelo ke vzniku falešně pozitivních výsledků (Kwok and Higuchi, 1989). Opakované provádění PCR reakcí a vysoký počet zpracovávaných vzorků může v principu vést k amplifikaci až jediné DNA molekuly (Saiki *et al.*, 1985; Mullis and Faloona, 1987).

PCR – Správná laboratorní praxe

Při přípravě destiček nebo mikrofluidních karet dodržujte následující zásady:

- Při přípravě vzorků pro amplifikaci pomocí PCR používejte čistý laboratorní plášť (který nebyl předešle použit při manipulaci s PCR produkty nebo během přípravy vzorků) a čisté rukavice.
- Máte-li podezření, že rukavice jsou kontaminované, ihned je vyměňte.
- Používejte vyhrazené pracovní prostory a zařízení pro:
  - Přípravu vzorků
  - Sesazení PCR reakcí
  - Amplifikaci pomocí PCR
  - Analýzu PCR
- Nikdy nenoste PCR produkty do pracovních prostor vyhrazených pro přípravu PCR.
- Otvírejte a zavírejte zkumavky a destičky se vzorky opatrně. Zabraňte rozlití vzorků a vytváření aerosolů.
- Uchovávejte reakce i reagencie vždy v dokonale uzavřených zkumavkách, destičkách apod.
- Používejte speciální pipety pro pipetování (tzv. positive displacement pipety) nebo špičky bránící šíření aerosolů (s filtrem).
- Pravidelně čistěte pracovní plochy a zařízení 10% roztokem chlornanu sodného.

Spotřební materiál

Spotřební materiál pro přístroj 7900HT

Tabulka 4-1 Spotřební materiál

Typ	**Uzavření (víčka) a kompresní podložky**	
	Používejte…	**Nepoužívejte…**
Optické 384-jamkové destičky ABI PRISM™	Optické adhezivní fólie ABI PRISM™	384-jamková septa
Optické 96-ti jamkové destičky ABI PRISM™	Kompresní podložky: • Standardní podložka pro ruční ovládání • Podložka ‘Snap-On’ 96-ti jamkové kryty: • ABI PRISM optické adhezivní fólie • ABI PRISM optická víčka (pouze plochá)	Nepoužívejte: • ABI PRISM optická víčka (kulatá) • 96-ti jamková septa
Mikrofluidní karty	Žádná (samozatavení)	Žádná (samozatavení)

Příprava 96-ti a 384-jamkových mikrodestiček

Příprava destiček pro spuštění na přístroji 7900HT

1. Připravte reakce v optické 96-ti nebo 384-jamkové destičce tak, že rozplníte do jednotlivých jamek destičky reagencie, enzym a vzorky.

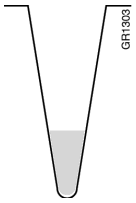
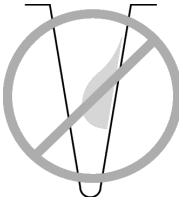
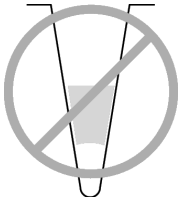
   DŮLEŽITÉ! Uspořádání reakcí (vzorků a esejí) na destičce musí odpovídat zadání názvů vzorků a detektorů/markerů v odpovídajícím dokumentu destičky.

2. Uzavřete optickou reakční destičku způsobem kompatibilním s přístrojem 7900HT (obrázky 4-3 a 4-4 na straně 4-8).

   Poznámka: Seznam nástrojů k uzavření použitelných na přístroji ABI PRISM 7900HT naleznete na straně 4-6 v části “Spotřební materiál”.

3. Destičku krátce centrifugujte, abyste odstranili případné vzduchové bubliny.

4. Ověřte, že se všechny reakce nacházejí na dně jamky.

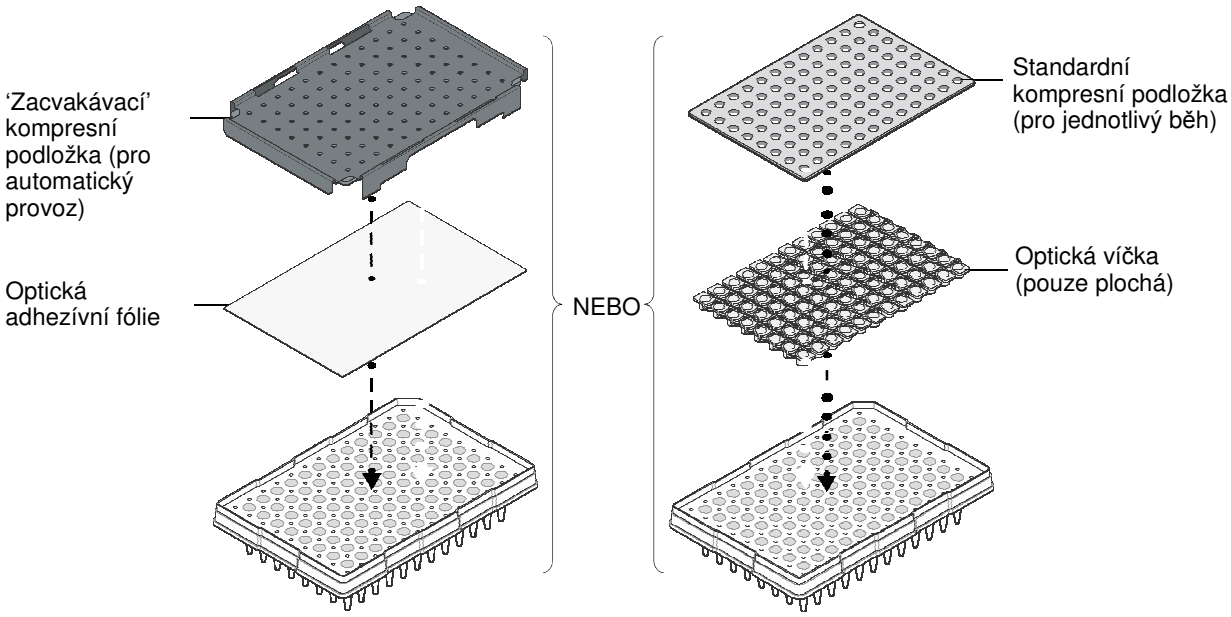
Správně	**Špatně**	
		
Reakce je na dně jamky.	Reakce je na boku jamky, protože destička nebyla centrifugována.	Na dně jamky je vzduchová bublina – reakce nebyla centrifugována dostatečně dlouho nebo při dostatečných otáčkách:

5. Používáte-li 96-ti jamkovou destičku, musíte použít i odpovídající kompresní podložku.

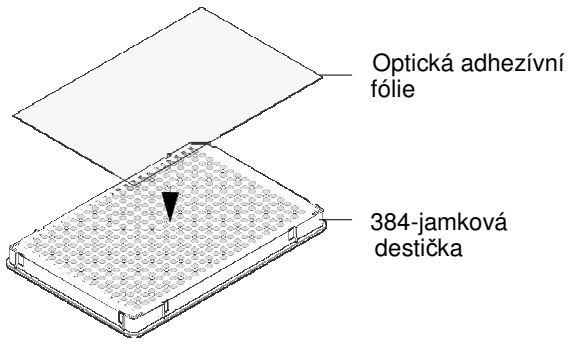
   Spouštíte-li destičku:

   - Jednotlivě pomocí programu SDS, použijte standardní kompresní podložku (obrázek 4-3).
   - V rámci skupiny pomocí programu Automation Controller, použijte zacvakávací podložku (obrázek 4-3).

6. Zvolte jednu z možností. Provádíte-li:
   – *Absolutní* nebo *Relativní kvantifikaci* nebo *Analýzu disociační křivky*
     Spusťte destičku podle postupu v části “Spuštění destičky” na straně 4-23.
   – *Alelickou diskriminaci*
     a. Vložte destičku do PCR cykleru a proveďte PCR.
     b. Krátce destičku centrifugujte.
     c. Spusťte destičku podle postupu v části “Spuštění destičky” na straně 4-23.



Obrázek 4-3 96-ti jamková destička – příprava ke spuštění



Obrázek 4-4 384-jamková destička – příprava ke spuštění

Příprava mikrofluidních karet

O mikrofluidních kartách

Mikrofluidní karty společnosti Applied Biosystems jsou nástroj pro studium genové exprese pomocí komparativní C_T metody relativní kvantifikace. Mikrofluidní karty umožňují stanovit genovou expresi v jednom až osmi vzorcích cDNA syntetizované podle lidské RNA v dvoukrokovém pokusu RT-PCR.

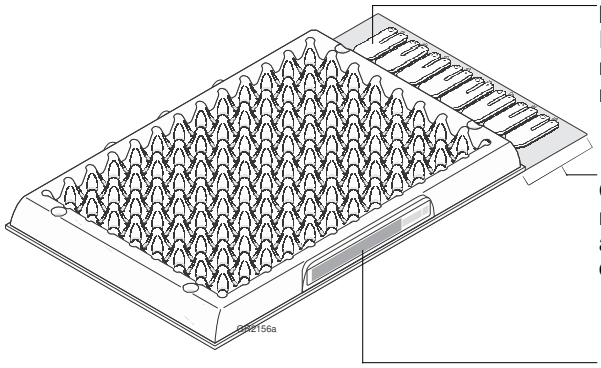
Jak fungují

Mikrofluidní karty fungují jako sada reakčních rezervoárů pro provedení kvantitativní Real-Time PCR. V běžném uspořádání obsahují jamky mikrofluidních karet reagencie TaqMan® (viz poznámka níže) detekující amplifikaci cílových sekvencí v reálném čase. Relativní hladina genové exprese je stanovena pomocí programu Relative Quantification na základě naměřených hodnot fluorescence během PCR reakce provedené na přístroji ABI PRISM® 7900HT.

Poznámka: V této příručce je termín *reagencie TaqMan* používán pro označení 5´ exonukleázové reakce používající TaqMan® primery a sondy společnosti Applied Biosystems (včetně PDAR společnosti Applied Biosystems, esejí typu Assays-By-Design™ , Assays-On-Demand™ a jakýchkoliv esejí typu TaqMan vyráběných na zakázku.)

Součásti mikrofluidních karet

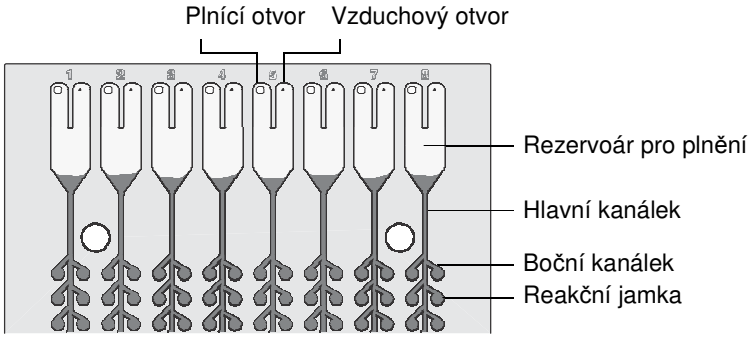
Mikrofluidní karty (obrázek 4-5) fungují jako rezervoáry pro provedení PCR v reálném čase. Sestávají z 384 propojených jamek rozdělených do osmi sad. Umožňují pracovat s uživatelem definovaným počtem replikátů. Každá jamka obsahuje lyofilizované TaqMan primery a sondy společnosti Applied Biosystems pro jednu cílovou mRNA.



Obrázek 4-5 Mikrofluidní karta

Vnitřní struktura

Na obrázku 4-6 je vyobrazena vnitřní struktura mikrofluidní karty.



Obrázek 4-6 Vnitřní struktura mikrofluidní karty

Detektory

Mikrofluidní karta umožňuje amplifikaci cílové a kontrolní cDNA pomocí 5´ nukleázové reakce.

Sondy používané v reakci fungují následujícím způsobem:

- Sondy značené barvou FAM™ detekují amplifikaci cílové cDNA.
- Sondy značené barvou FAM™ detekují amplifikaci externí endogenní kontroly.

Kontaminace genomickou DNA

TaqMan sondy a primery pro amplifikaci cDNA jsou navrhovány přes spojení exon-exon, čímž je minimalizováno riziko amplifikace kontaminující genomické DNA. Testy bylo prokázáno, že 5´ exonukleázové eseje lze provádět v přítomnosti až 10,000 kopií genomické DNA aniž je tato detekována, není-li v dokumentaci společnosti Applied Biosystems uvedeno jinak.

Amplifikace externí endogenní kontroly

Vezměte na vědomí, že běžně používaná esej pro amplifikaci externí endogenní kontroly není RNA-specifická, a proto má na ní vliv kontaminace genomickou DNA. Nicméně vzhledem k extrémně vysokým hladinám exprese rRNA je i v případě velké kontaminace genomickou DNA tento vliv na výsledky relativní kvantifikace získané pomocí mikrofluidní karty zanedbatelný.

Singleplexní reakce

V mikrofluidních kartách je doporučeno provádět singleplexní reakce s reagenciemi TaqMan (například barva FAM). Esej amplifikující externí endogenní kontrolu (například FAM-18S nebo FAM-GAPDH) se používá jako kalibrátor pro výpočet výsledků relativní kvantifikace.

Poznámka: Více informací o relativní kvantifikaci získáte v příručce *ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression* (Kat. č. 4303859).

Kontrola jakosti

V rámci kontroly jakosti společnosti Applied Biosystems je provedeno funkční ověření sond a primerů plněných do mikrofluidních karet.

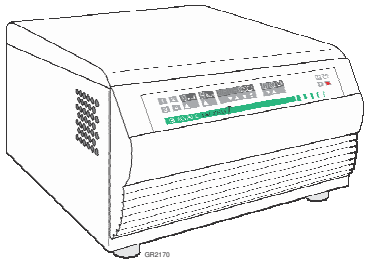
O centrifuze

Po naplnění rezervoárů mikrofluidních karet vzorky cDNA je zapotřebí tyto karty centrifugovat, aby byl vzorek cDNA rozplněn do reakčních jamek. Centrifuga umožňuje stáčet až 12 mikrofluidních karet najednou.

Potřebná centrifuga a příslušenství

Pro správnou centrifugaci mikrofluidních karet budete potřebovat následující centrifugu a příslušenství:

- Centrifuga Sorvall® Legend T



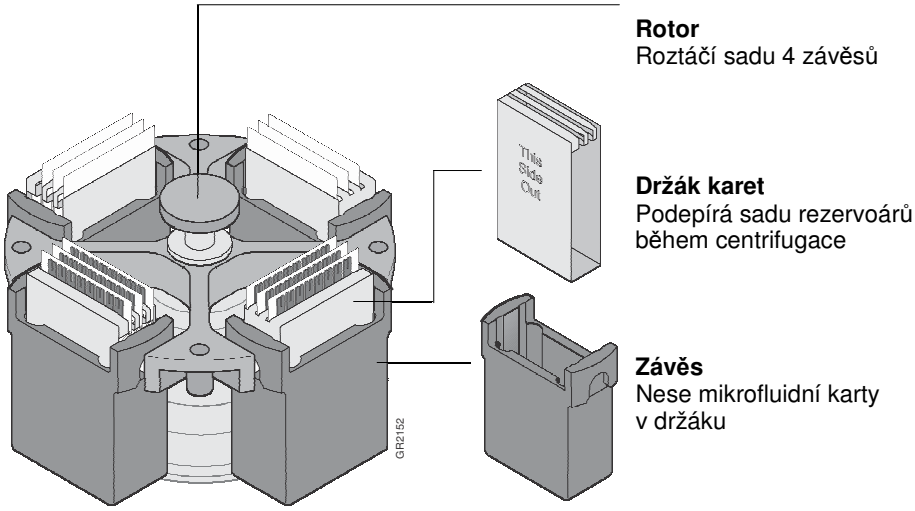
Obrázek 4-7 Centrifuga Sorvall Legend T

- Výkyvný rotor Sorvall®/Heraeus "Tool-less" 750-mL
- Sadu čtyř speciálních závěsů Sorvall®/Heraeus, každý s držákem karet (Kontaktujte zástupce společnosti Applied Biosystems, chcete-li objednat tyto speciální závěsy.)
- Aktuální firmware

  Dokupujete-li vybavení k centrifuze Sorvall Legend T nebo Legend RT, kterou již vlastníte, může být zapotřebí provést aktualizaci firmwaru tak, aby bylo speciální závěsy na mikrofluidní karty možné používat.

Součásti centrifugy

Na obrázku 4-8 jsou vyobrazeny součásti centrifugy.



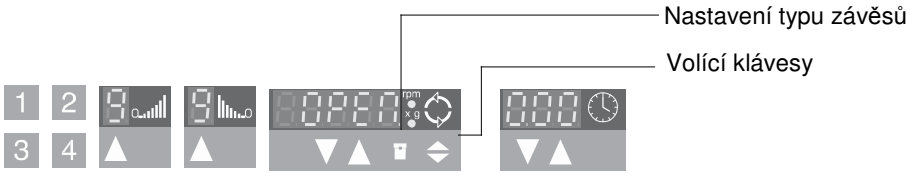
Obrázek 4-8 Součásti centrifugy

Umístění

Centrifuga se umístí na standardní laboratorní stůl. Více informací o provozu centrifugy naleznete v návodu.

Nastavení typu závěsu

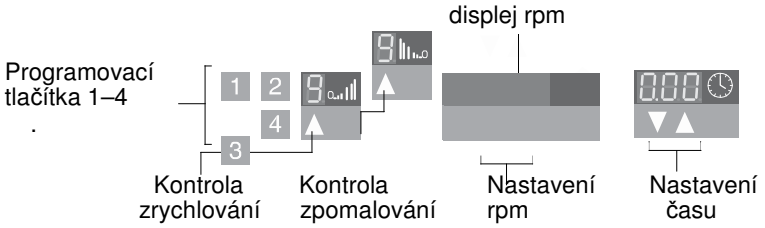
1. Zapněte centrifugu.
2. Podle pokynů v návodu pro centrifugu Sorvall Legend T použijte tlačítka předního panelu centrifugy pro nastavení typu závěsů **15679**



DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že jste nastavili správný typ závěsu. Pouze tak je zajištěno, že budou dodrženy maximální rychlosti centrifugace, povolené výrobcem pro daný typ závěsů.

3. Pomocí tlačítek předního panelu centrifugy nastavte následující parametry:

Parametr	Hodnota
Up ramp rate (Zrychlování)	9
Down ramp rate (Zpomalování)	9
Rotational speed (Rychlost centrifugace)	1200 rpm (331 × *g*)
Centrifugation time (Doba centrifugace)	1 min



4. Vypněte centrifugu.

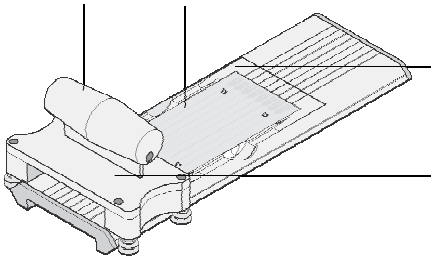
O nástroji na zaslepení jamek

Nástroj na zaslepení jamek mikrofluidních karet je nezbytný pro zaslepení jednotlivých jamek v kartě poté, co je tato naplněna vzorky cDNA a mastermixem. Nástrojem zaslepíte hlavní distribuční kanálky karty.

Součásti nástroje

Madlo
Pro pohyb zaslepovacích nožů

Mikrofluidní karta
Vyobrazena fólií nahoru s plnícími rezervoáry vpravo (zaslepovací nože se při zaslepování pohybují zleva doprava ve směru šipek vyznačených v základně)



Vlis pro kartu
Drží mikrofluidní kartu ve správné poloze

Základna
Drží mikrofluidní kartu ve správné poloze a vede zaslepovací nože

Obrázek 4-9 Součásti nástroje (vyobrazeno s odstraněným krytem)

Umístění

Nástroj na zaslepení jamek mikrofluidních karet se umisťuje na běžný laboratorní stůl. Nevyžaduje připojení do elektrické sítě.

Plnění mikrofluidních karet

Potřebný materiál a vybavení

Pro plnění reakčních mixů do rezervoárů mikrofluidních karet společnosti Applied Biosystems budete potřebovat následující materiál a vybavení:

- Mikropipetu Rainin F-100 (100-µL)
- Pipetovací špičky Rainin Fine Point (100-µL)
- Mikrofluidní kartu/y společnosti Applied Biosystems
- Reakční mixy PCR (návod na přípravu reakčních mixů naleznete v protokolu přiloženém k reagenciím pro vaše mikrofluidní karty)

Doporučení pro plnění karet

Pro správné plnění mikrofluidních karet je zapotřebí dodržet následující doporučení.

- Nevyjímejte mikrofluidní kartu z jejího obalu dokud se obal neohřál na pokojovou teplotu a vy jste připraveni kartu plnit reakčním mixem PCR.

  DŮLEŽITÉ! Dlouhodobé vystavení fluorescenčních sond uvnitř mikrofluidních karet vnitřnímu osvětlení může vést k jejich fotodegradaci. Nevystavujte mikrofluidní karty slunečnímu světlu.

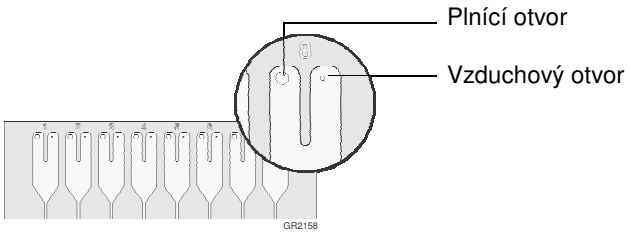
- Neohýbejte před plněním část karty se sadou rezervoárů (obrázek 4-5 na straně 4-9).

  DŮLEŽITÉ! Pro úspěšné plnění reakčních mixů je nezbytné, aby hlavní kanálky vedoucí od sady rezervoárů k jamkám zůstaly otevřené a nepoškozené.

Plnění rezervoárů

1. Ohřál-li se obal karty na pokojovou teplotu a vy jste připraveni k plnění karty, opatrně vyjměte kartu z obalu.
2. Umístěte mikrofluidní kartu na laboratorní stůl fólií dolů.
3. Pipetujte 100 µL reakčního mixu PCR do 100-µL mikropipety.
4. Podržte mikropipetu v úhlu a umístěte hrot špičky k plnícímu otvoru.

   Poznámka: Plnící otvor je v levé části plnícího rezervoáru; je to ten větší z otvorů.



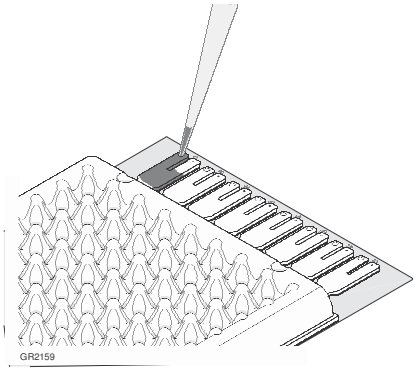
   DŮLEŽITÉ! Nedotýkejte se špičkou fólie pod plnícím otvorem, mohlo by dojít k jejímu poškození.

5. Pipetujte reakční mix PCR tak, že zaplní plnící rezervoár ve směru ke vzduchovému otvoru.

   DŮLEŽITÉ! Pipetujte do plnícího rezervoáru celých 100 µL.

   DŮLEŽITÉ! Nedotýkejte se špičkou fólie pod plnícím otvorem, mohlo by dojít k jejímu poškození.

   DŮLEŽITÉ! Buďte opatrní při vytlačování tekutiny ze špičky pipety kdy stlačujete píst pipety až do druhé dorazové polohy. Vytlačíte-li velký objem vzduchu, může dojít k vytlačení reakčního mixu z plnícího rezervoáru vzduchovým otvorem.



6. Plnění reakčního mixu z plnícího rezervoáru do reakčních jamek se provádí centrifugačně.

   Pokračujte částí “Centrifugace mikrofluidních karet” na straně 4-15.

Centrifugace mikrofluidních karet

Potřebný materiál a vybavení

Pro správnou centrifugaci mikrofluidních karet budete potřebovat následující centrifugu a příslušenství:

- Mikrofluidní kartu/y s reakčním mixem PCR (strana 4-13)
- Centrifuga Sorvall® Legend T
- Speciální závěsy Sorvall®/Heraeus (celkem čtyři), každý s držákem karet
- Prázdné karty na vyvážení

Umístění karet do závěsů

Poznámka: Do centrifugy se vkládají čtyři závěsy Sorvall/Heraeus. Do každého závěsu lze vložit až tři mikrofluidní karty (naplněné a/nebo prázdné).

1. Připravte si prázdný závěs Sorvall/Heraeus a držák karet.

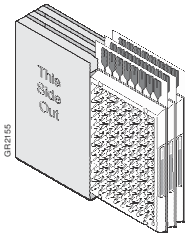
   DŮLEŽITÉ! Závěsy Sorvall/Heraeus a držáky karet jsou speciálně vyráběny pro stáčení mikrofluidních karet. Nepoužívejte žádné jiné závěsy/držáky.

2. Umístěte závěs na laboratorní stůl označením směrem k vám.

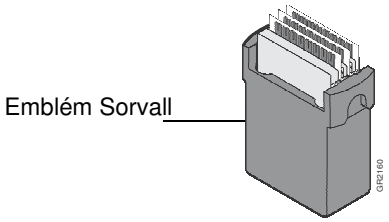
3. Vložte mikrofluidní kartu do držáku a ujistěte se, že:
   - Plnící rezervoáry směřují vzhůru z držáku
   - Reakční jamky směřují stejně jako nápis “This Side Out”

   DŮLEŽITÉ! Použijte prázdné karty na vyplnění všech zbývajících pozic v držáku.

   Poznámka: Držák karet podepírá sadu rezervoárů během centrifugace.

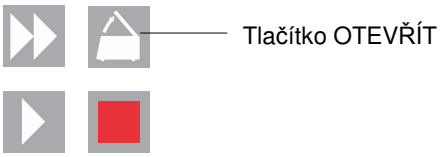


4. Umístěte naplněný držák karet do závěsu tak, že nápis “This Side Out” směřuje k té části závěsu, na níž je emblém Sorvall.



Umístění závěsů do centrifugy

1. Ujistěte se, že centrifuga je zapnuta a rotor se nepohybuje .
2. Otevřete víko centrifugy stiskem tlačítka OPEN (Otevřít).



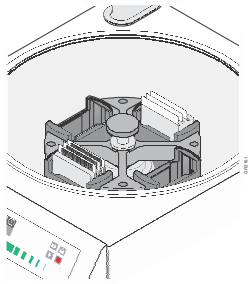
3. Umístěte naplněný závěs do volného ramena rotoru.

   Poznámka: Ujistěte se, že závěs se v rotoru může volně vyklápět.

4. Umístěte do rotoru i ostatní závěsy podle kroku 3.

   CAUTION Výrobce doporučuje spouštět centrifugu vždy se čtyřmi závěsy, i když pouze dva z nich obsahují mikrofluidní karty.

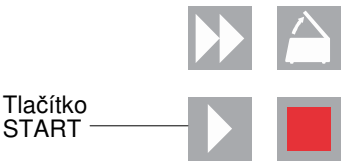
   CAUTION Ujistěte se, že protilehlé závěsy mají shodnou hmotnost. Nejsou-li závěsy úplně naplněny mikrofluidními kartami s reakcemi, umístěte do závěsů prázdné karty a držáky karet.



5. Uzavřete víko centrifugy.

Stáčení karet

1. Stiskněte tlačítko START.



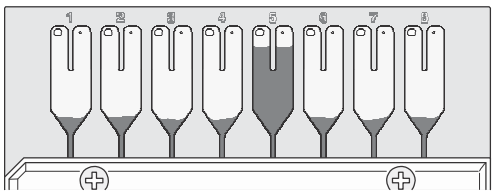
   Centrifuga se spustí a po jedné minutě automaticky vypne jak je naprogramováno.

2. Opakujte krok 1 takže se mikrofluidní karty budou stáčet celkem dvakrát jednu minutu, čímž je zajištěno úplné rozplnění reakčních mixů.
3. Otevřete víko centrifugy stiskem tlačítka OPEN.

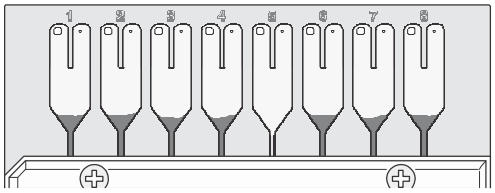
4. Jakmile se víko úplně otevře, vyjměte závěsy z centrifugy a držáky karet ze závěsů.
5. Opatrně vyjměte mikrofluidní karty ze závěsů.
6. Ověřte, že v mikrofluidních kartách došlo k úplnému rozplnění reakčních mixů.

   Objem vzorků, který zůstane v rezervoárech, by měl být ve všech rezervoárech zhruba stejný.

   - Pokud v některém z rezervoárů zůstal výrazně odlišný objem (viz obrázek níže), rozplnění se nezdařilo. Pokračujte následujícím krokem.



   - Je-li některý z rezervoárů úplně prázdný (viz obrázek níže), je možné, že některé jamky nebyly správně naplněny.
     – S mikrofluidní kartou byste neměli dále pracovat. Použijte jinou kartu.
     – Druhou možností je pokračovat v práci s touto kartou, ale výsledky z jamek plněných z problematického rezervoáru byste neměli brát v potaz.



7. Ověřte naplnění rezervoárů:

Jsou-li rezervoáry...	**Pak...**
po první centrifugaci naplněny nerovnoměrně	centrifugujte mikrofluidní kartu znovu další minutu stejným způsobem.
po druhé centrifugaci naplněny nerovnoměrně	• S mikrofluidní kartou byste neměli dále pracovat. Použijte jinou kartu. • Druhou možností je pokračovat v práci s touto kartou, ale výsledky z jamek plněných z problematického rezervoáru byste neměli brát v potaz.

DŮLEŽITÉ! Centrifugace nesmí probíhat při otáčkách vyšších než 1200 rpm nebo déle než 3 min, jinak by mohlo dojít k poškození mikrofluidní karty.

Zaslepení jamek mikrofluidních karet

Potřebný materiál a vybavení

Pro zaslepení jamek mikrofluidních karet společnosti Applied Biosystems potřebujete následující materiál a vybavení:

- Nástroj na zaslepení
- Pevný stůl
- Mikrofluidní kartu/y společnosti Applied Biosystems, která byla centrifugována (strana 4-15)
- Nůžky

Doporučení pro zaslepování

Při zaslepování jamek mikrofluidních karet postupujte podle následujících pokynů.

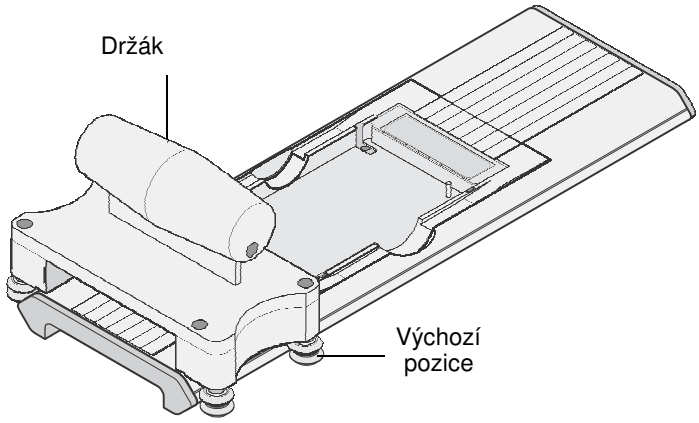
- Zaslepte jamky v kartě co nejdříve po provedení centrifugace. Omezíte tím riziko kontaminace.
- Vždy umisťujte mikrofluidní kartu do nástroje tak, že aby se zaslepovací nože pohybovaly směrem k plnícím rezervoárům karty.
- Vždy zaslepujte jamky ve směru šipek zobrazených na nástroji, čímž zajistíte, že mixy jsou vytlačovány z kanálků karty do rezervoárů.

Umístění nástroje pro zaslepování

Nástroj pro zaslepování se nejlépe ovládá takovým způsobem, že tlačíte na držák ve směru od sebe (nikoliv horizontálně, ze strany na stranu). Při umisťování nástroje na zaslepování postupujte podle níže uvedených pokynů.

1. Umístěte nástroj na zaslepování na pevný stůl zhruba ve výšce pasu.
2. Otočte nástroj tak, že jeho čelní strana (kde zaslepování začíná) je co nejblíže k vám a zadní strana co nejdál od vás.

   Poznámka: Šipky na nástroji pro zaslepování směřují směrem od vás.

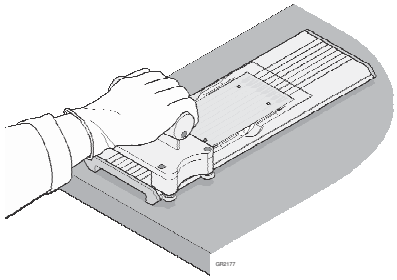


Vložení karty

1. Posuňte madlo se zaslepovacími noži do výchozí pozice.

   DŮLEŽITÉ! Nikdy nevkládejte mikrofluidní kartu do nástroje pro zaslepování není-li madlo ve své výchozí pozici. Posunete-li madlo přes mikrofluidní kartu do výchozí pozice, dojde k poškození karty.

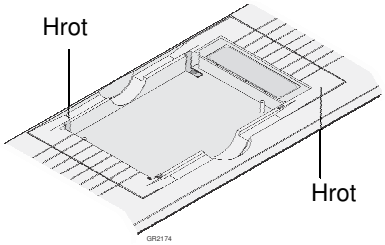
2. Vložte mikrofluidní kartu do nástroje na zaslepení:
   a. Umístěte mikrofluidní kartu do nástroje na zaslepení ve správné orientaci tak, že rezervoáry pro plnění karty jsou co nejblíže šipkám vylisovaným do základny nástroje na zaslepení.
   b. Orientujte mikrofluidní kartu do nástroje na zaslepení fólií nahoru.



3. Jemně na mikrofluidní kartu zatlačte, aby dosedla do nástroje na zaslepení.

   Poznámka: Dva kovové hroty na základně nástroje pro zaslepení karty zapadají do odpovídajících otvorů mikrofluidní karty. Při správném umístění zapadne karta do nástroje tak, že její povrch splývá s povrchem nástroje.

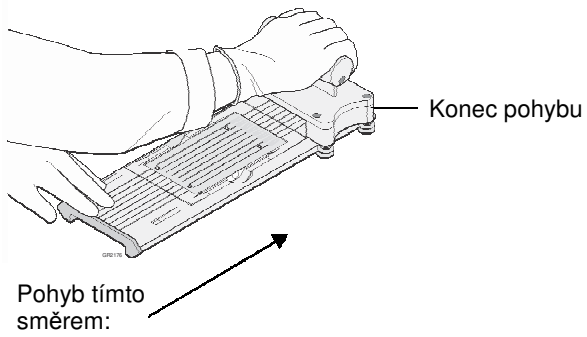
   Poznámka: Ve správné pozici drží mikrofluidní kartu i čtyři úchytky.



Zaslepení karty

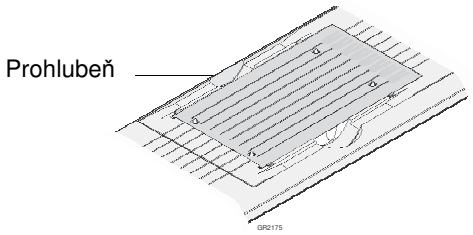
1. Přesuňte madlo se zaslepovacími noži přes základnu nástroje na zaslepení ve směru šipek. Proveďte to jediným plynulým pohybem až na konec.

   CAUTION Na obou stranách nástroje jsou mechanické zábrany, které brání pohybu madla s noži tak, aby nedošlo k jeho vysunutí ze základny nástroje. Přesun neprovádějte nadměrnou silou nebo rychlostí. Nadměrná síla nemá vliv na kvalitu zaslepení karty, ale pouze zatěžuje nástroj na zaslepení.



2. Uchopte zaslepenou mikrofluidní kartu po stranách a vyjměte ji z nástroje.

   Poznámka: Ve střední části základny nástroje na zaslepení je prohlubeň pro snazší přístup k boku karty.



3. Ověřte, že karta byla dobře zaslepena. Zářezy vytvořené zaslepovacími noži by měly odpovídat hlavním kanálkům mikrofluidní karty.

   Pokud tomu tak není nebo je fólie jakkoliv poškozena, mikrofluidní kartu nepoužívejte.

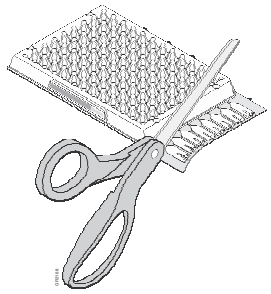
4. Přesuňte madlo s noži do výchozí pozice na základně nástroje.

   DŮLEŽITÉ! Nepřesouvejte madlo do výchozí pozice pokud jste mikrofluidní kartu z nástroje nevyjmuli.

Oddělení rezervoárů pro plnění

1. Pomocí nůžek oddělte rezervoáry pro plnění od mikrofluidní karty. Odstřihněte je na okraji karty.

   CAUTION **RIZIKO PORANĚNÍ**. Při oddělování rezervoárů od karty dbejte opatrnosti. Použijte nůžky spíše než nějaké nástroje s nechráněnými břity.



   Mikrofluidní karta je nyní připravena ke spuštění na přístroji 7900HT.

2. Zvolte jednu z následujících možností. Provádíte-li:
   - Absolutní nebo relativní kvantifikaci nebo analýzu disociační křivky
     Spusťte běh podle postupu v části “Spuštění běhu” na straně 4-23.
   - Alelickou diskriminaci
     a. Vložte destičku do PCR cykleru a proveďte PCR.
     b. Krátce destičku centrifugujte, abyste odstranili případné vzduchové bubliny.
     c. Spusťte běh podle postupu v části “Spuštění běhu” na straně 4-23.

Část 4.2 Spuštění běhu – jedna destička

V této části

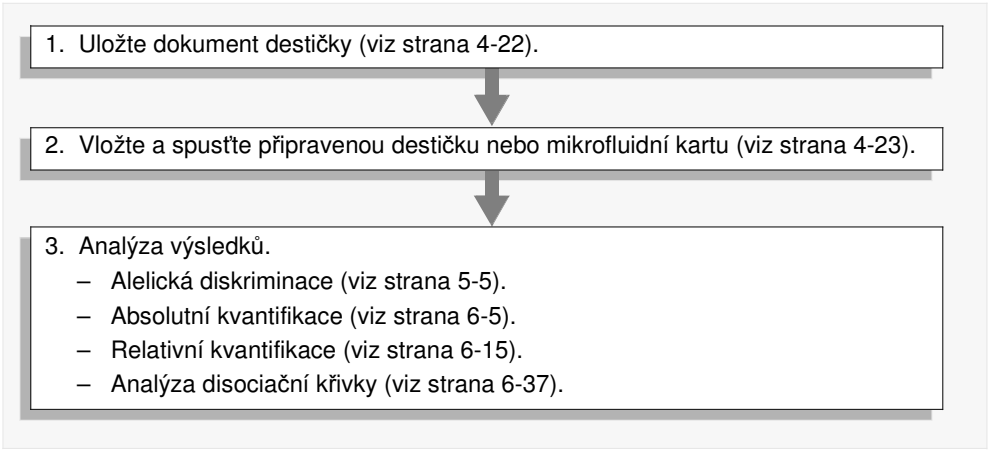
Uložení dokumentu destičky 4-22
Spuštění běhu – jedna destička (používání programu SDS) 4-23
Po skončení běhu 4-27

Seznam kroků před spuštěním běhu

Chcete-li spouštět destičky na přístroji 7900HT, musíte nejprve provést následující kroky. Více informací naleznete na příslušné straně.

Provedeno	Úkol	Viz strana
	V posledním měsíci byla provedena kalibrace pozadí.	7-16
	V posledním půlroce byla provedena kalibrace barev.	7-20
	V přístroji není destička. DŮLEŽITÉ! Chcete-li spustit běh, musí být přístroj prázdný. Je-li v něm destička, musíte ji vyjmout.	4-42

Přehled



Uložení dokumentu destičky

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro uložení dokumentu destičky do databáze práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Uložení dokumentu destičky při běhu s jednou destičkou

Dokument destičky musí být před spuštěním uložen do databáze SDS Enterprise nebo jako dokument SDS (*.sds).

Chcete-li uložit dokument SDS:

1. V programu SDS zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).
2. V poli Look In (Vyhledat) dialogového okna Save As (Uložit jako) vyhledejte adresář pro uložení dokumentu.
3. V poli **File name** (Název souboru) buď:
   - Zadejte název souboru (dokumentu destičky) nebo
   - Zadejte nebo naskenujte čárový kód destičky.

   Poznámka: Název souboru nemusí být čárový kód destičky.
4. Klikněte Save (Uložit).

   Program uloží dokument destičky do zvoleného adresáře.
5. Spusťte běh podle postupu v části “Spuštění běhu” na straně 4-23.

Chcete-li uložit dokument do databáze SDS Enterprise:

1. Zvolte **File > Save Document to Database** (Soubor > Uložit dokument do databáze).
2. V dialogovém okně Save Document to database (Uložit dokument do databáze):
   a. Zadejte stručný popis souboru do pole **Comment** (Komentář) (max. 255 znaků).

      Ukládáte-li dokument destičky do databáze, bude název souboru ztracen, nenapíšete-li jej do pole Comment.

   b. Klikněte OK.
3. V okně Saved Document (Dokument uložen) klikněte OK.
4. Spusťte běh podle postupu v části “Spuštění běhu” na straně 4-23.

Spuštění běhu – jedna destička (používání programu SDS)

Přístupová práva

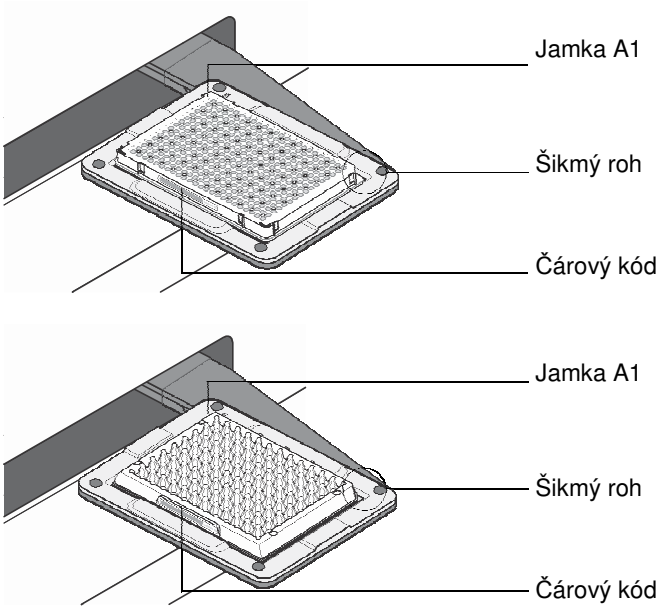
Pro spuštění běhu destiček uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Spuštění běhu

1. V programu SDS zvolte v dokumentu destičky záložku **Instrument** (Přístroj).
2. V záložce Real-Time nebo Plate-Read klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít).

   Nosítka přístroje se vysunou ven.
3. Umístěte připravenou destičku nebo mikrofluidní kartu do nosítek přístroje podle vyobrazení níže.

   Před vložením destičky nebo mikrofluidní karty do nosítek se ujistěte, že:
   - V programu SDS je otevřen odpovídající dokument destičky.
   - Destička je uzavřena nebo mikrofluidní karta zaslepena.



DŮLEŽITÉ! Pozice A1 – viz vyobrazení.

4. Proveďte jeden z následujících kroků:
   - Provádíte-li běh v reálném čase, klikněte Start.
   - Provádíte-li běh se čtením po skončení běhu, klikněte Post Read.

   Nosítka přístroje se zasunou zpět a přístroj spustí běh nebo čtení destičky.

   Poznámka: Před spuštěním běhu může přístroj vyčkat až 15 minut na ohřátí vyhřívaného víka na požadovanou teplotu.

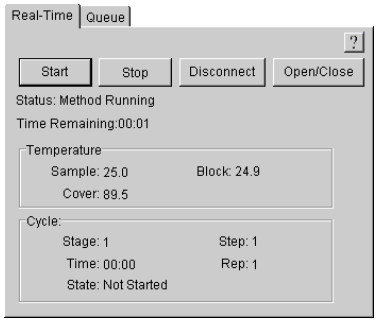
   Poznámka: Více informací o záložkách **Real-Time** a **Plate-Read** získáte po kliknutí na ikonu ? v nápovědě programu SDS.

   Během a po skončení běhu můžete:

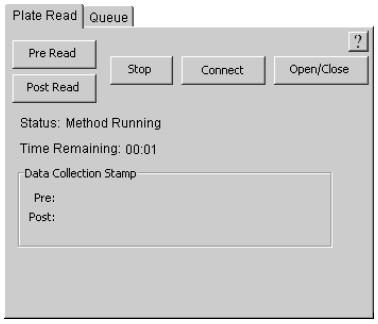
Činnost…	**Viz strana**
Sledování průběhu běhu	4-25
Zastavení běhu DŮLEŽITÉ! Musíte-li z jakéhokoliv důvodu běh zastavit, pečlivě si nejprve přečtěte pokyny na straně 4-26.	4-26
Otevření nosítek přístroje (po skončení běhu)	4-27
Analýza výsledků po skončení běhu	4-27

Sledování průběhu běhu

Program SDS zobrazuje v záložce Real-Time nebo Plate Read informace o stavu přístroje a průběhu běhu. Na obrázku 4-10 jsou příklady údajů z těchto záložek během provozu přístroje 7900HT.



Záložka Real-Time
(sběr dat v reálném čase)



Záložka Plate Read
(sběr dat po skončení běhu)

Obrázek 4-10 Záložky Real-Time a Plate Read

- **Status** – Zobrazuje stav přístroje 7900HT
- **Time Remaining** – Zobrazuje dobu do konce běhu

Temperature - Teplota (pouze záložka Real-Time)

- **Block** – Zobrazuje aktuální teplotu bloku na vzorky
- **Cover** – Zobrazuje aktuální teplotu vyhřívaného víka
- **Sample** – Zobrazuje vypočítanou teplotu vzorků

Cycle - Cyklus (pouze záložka Real-Time)

- **Rep** – Zobrazuje počet opakování cyklu
- **Stage** – Zobrazuje v kterém kroku se běh nachází
- **State** – Zobrazuje údaje o aktuálním kroku
- **Step** – Zobrazuje aktuální fázi cyklu
- **Time** – Zobrazuje dobu do konce kroku

Data Collection Stamp – Sběr dat (pouze záložka Plate Read)

- **Pre** – Zobrazuje datum provedení čtení před zahájením cyklování (pre-read).
- **Post** – Zobrazuje datum provedení čtení po ukončení cyklování (post-read).

Poznámka: Více informací o záložkách **Real-Time** a **Plate-Read** získáte po kliknutí na ikonu [?] v nápovědě programu SDS.

Zastavení běhu

DŮLEŽITÉ! Před zastavením běhu si přečtěte následující pokyny.

Zastavení běhu typu End-Point (Alelická diskriminace)

V záložce Plate-Read dokumentu destičky klikněte Stop.

Zastavení běhu v režimu Real-Time (Absolutní nebo relativní kvantifikace)

Dosáhla teplota víka (**Cover**) **v záložce** Real-Time **104 °C**?

- *No* (teplota víka je nižší než 104 °C)

  V záložce **Real-Time** klikněte Stop.
- *Yes* (teplota víka dosáhla 104 °C)

  Teplotní cyklování destičky již bylo zahájeno. Postupujte podle pokynů v následující tabulce:

Důvod zastavení běhu	**Pak…**
Zapomněli jste definovat některé parametry dokumentu destičky jako např. přidání detektoru, úlohy detektoru, názvu vzorku (netýká se chyb v teplotním profilu)	nezastavujte běh. Nechte přístroj dokončit běh a zadejte údaje před analýzou výsledků. Program nepoužívá informace o názvech vzorků nebo detektorech dříve než při analýze výsledků.
• Zapomněli jste něco pipetovat do destičky (např. enzym nebo mastermix) • Špatně jste definovali teplotní profil.	1. V záložce **Real-Time** klikněte Stop. 2. Zjistěte jak dlouho již běh trvá. 3. Rozhodněte, zda je možné destičku spustit znovu. 4. Je-li to nezbytné, vyjměte destičku a přidejte do ní co je potřeba. 5. Spusťte destičku znovu pomocí nově vytvořeného dokumentu destičky.

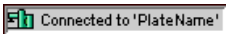
Po skončení běhu

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro uložení dokumentu destičky do databáze práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Vyjmutí destičky (Otevření a zavření nosítek)

Podle stavové ikony poznáte, z jakého dokumentu destičky lze provést vyjmutí destičky.

Stavová ikona	Krok
 Connected to *platename* (Propojeno s *název destičky)*	1. V programu SDS zvolte **Window** (Okno) > (*dokument destičky propojený s přístrojem*). 2. V dokumentu destičky zvolte záložku **Instrument** (Přístroj) 3. Zvolte záložku **Plate-Read** nebo **Real-Time** podle typu běhu. 4. Zvolte Open/Close (Otevřít/Zavřít).
 Disconnected (Odpojeno)	1. V programu SDS klikněte nebo zvolte **File** > **New** (Soubor > Nový). 2. Klikněte OK. 3. Zvolte záložku **Instrument** (Přístroj). 4. Zvolte záložku **Plate-Read** nebo **Real-Time**. 5. Zvolte Open/Close (Otevřít/Zavřít).

Uložení běhu

Po skončení běhu musíte uložit výsledky buď do databáze SDS Enterprise nebo ve formě souboru SDS (*.sds).

Chcete-li uložit výsledky ve formě souboru SDS:

1. V programu SDS zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).

Chcete-li uložit výsledky do databáze SDS Enterprise:

DŮLEŽITÉ! Pokud jste dokument destičky uložili do databáze již před spuštěním destičky, uložil program SDS výsledky běhu dočasně do adresáře /temp. Pokud po skončení běhu uzavřete dokument destičky aniž jej uložíte, otevřete adresář temp a přejmenujte dočasně uložený soubor na soubor typu *.sds, takže jej budete schopni jej znovu otevřít.

1. Zvolte **File > Save Document to Database** (Soubor > Uložit dokument do databáze):
2. V poli **Comment** (Komentář) dialogového okna Save Document to Database zadejte stručný popis dokumentu destičky (max. 255 znaků).

   Poznámka: Ukládáte-li dokument destičky do databáze, přijdete o jeho název pokud jej neuvedete v poli Comment (Komentář).
3. Klikněte OK.
4. V dialogovém okně Saved Document (Uložený dokument) klikněte OK.

Analýza výsledků běhu

Část 5.1 Alelická diskriminace 5-5
Část 6.1 Absolutní kvantifikace 6-5
Část 6.2 Relativní kvantifikace 6-15
Část 6.3 Analýza disociační křivky 6-37

Odpojení programu a přístroje

V programu SDS je možné zastavit všechnu komunikaci s přístrojem 7900HT. Přístroj ABI PRISM 7900HT je ovládán programem SDS nebo Automation Controller, chcete-li ovládat přístroj jedním z nich, musíte ovládání tím druhým ukončit.

Chcete-li…	**Pak…**
odpojit program a přístroj	1. V programu SDS zvolte záložku **Instrument** (Přístroj) otevřeného dokumentu destičky. 2. Zvolte záložku **Real-Time** nebo **Plate-Read**. 3. Zvolte Disconnect (Odpojit). Poznámka: Po odpojení program ani nemonitoruje ani nekontroluje činnost přístroje 7900HT.
znovu propojit program a přístroj	pro propojení otevřeného dokumentu destičky: 1. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít) čímž zavřete dokument destičky. 2. Klikněte nebo zvolte **File** > **Open** (Soubor > Otevřít). 3. V poli **Look In** (Vyhledat) vyhledejte požadovaný dokument destičky. 4. Klikněte Open (Otevřít). , Po otevření dokumentu destičky program znovu naváže spojení s přístrojem 7900HT.
	pro propojení nového dokumentu destičky klikněte nebo zvolte **File** > **New** (Soubor > Nový). Po vytvoření dokumentu destičky program znovu naváže spojení s přístrojem 7900HT.

Část 4.3 Automatický režim provozu

V této části

Ovládání programu s databází SDS Enterprise 4-30
Ovládání programu bez databáze SDS Enterprise 4-32
Spuštění destiček pomocí programu Automation Controller..... 4-37
Po skončení běhu 4-42

Seznam kroků před spuštěním běhu

Chcete-li spouštět destičky na přístroji 7900HT, musíte nejprve provést následující kroky. Více informací naleznete na příslušné straně.

Provedeno	Úkol	Viz strana
	V posledním měsíci byla provedena kalibrace pozadí.	7-16
	V posledním půlroce byla provedena kalibrace barev.	7-20
	V přístroji není destička. DŮLEŽITÉ! Chcete-li spustit běh, musí být přístroj prázdný. Je-li v něm destička, musíte ji vyjmout.	4-42
	Zásobník na destičky, které již byly spuštěny, je prázdný.	–

Přehled

Přístroj ABI PRISM 7900HT je možné používat v bezobslužném režimu provozu s ovládáním pomocí programu Automation Controller. Program Automation Controller umožňuje ovládání přístroje 7900HT, pevně umístěné čtečky čárových kódů a podavače mikrodestiček Zymark Twister a zpracovávat připravené destičky s potřebou minimálních uživatelských zásahů. Program Automation Controller může spouštět dokumenty destiček uložené na pevném disku počítače, připojeného k přístroji, nebo v databázi SDS Enterprise.

Možnosti automatického provozu

Obdobně jako program SDS i program Automation Controller vyžaduje vytvoření dokumentu destičky pro každou spouštěnou destičku. Program Automation Controller může spouštět dokumenty destiček uložené na pevném disku počítače, připojeného k přístroji, nebo v databázi SDS Enterprise.

Postupujte podle odpovídajícího návodu:

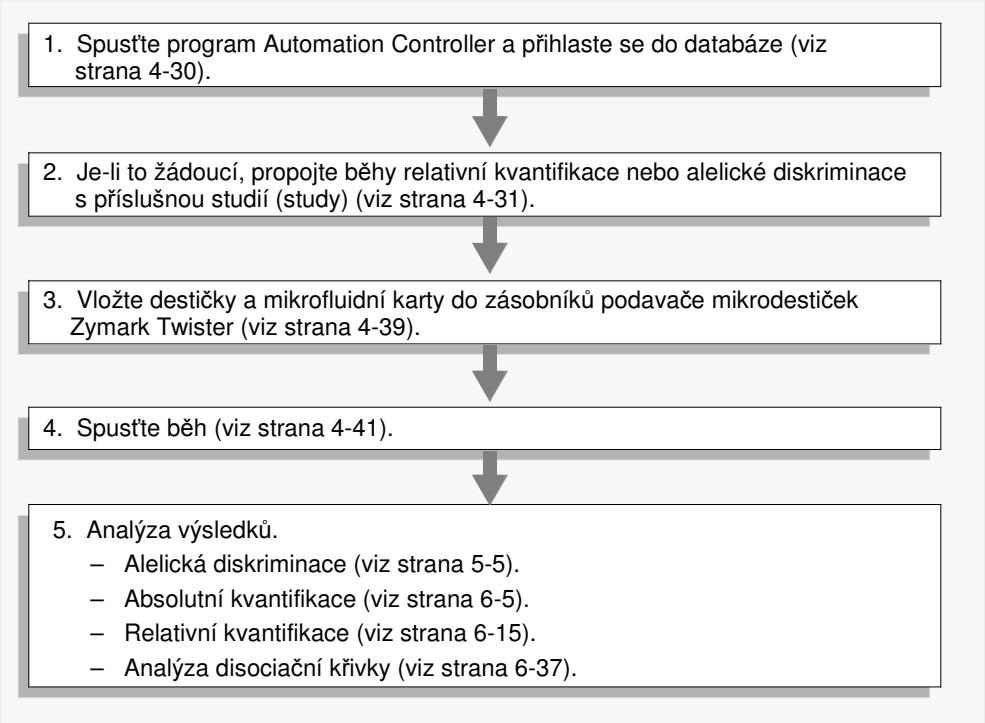
Ovládání programu s databází SDS Enterprise 4-30
Ovládání programu bez databáze SDS Enterprise 4-32

Ovládání programu s databází SDS Enterprise

Přehled

Nejjednodušším způsobem ovládání přístroje ABI PRISM 7900HT je provoz pomocí programu Automation Controller s databází SDS Enterprise. Dokumenty destiček uložené v databázi SDS Enterprise jsou pro použití v programu Automation Controller automaticky řazeny. Po vytvoření dokumentu destičky mohou být připraveny samotné destičky a vloženy do podavače mikrodestiček Zymark Twister.

Postup



Přihlášení do programu Automation Controller

1. Máte-li spuštěn program SDS:
   - Zvolte **Instrument > Disconnect** (Přístroj > Odpojit), čímž odpojíte přístroj a program, nebo
   - Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec), čímž program SDS ukončíte.
2. Spusťte program Automation Controller (zvolte Start > **Programs** > **Applied Biosystems** > **SDS 2.2** > **Automation Controller 2.2**).
3. V dialogovém okně Login (Přihlášení) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a klikněte OK, čímž se přihlásíte do databáze.
4. Propojte běh se studií podle postupu v části “Propojení běhu a studie” na straně 4-31.
5. Vložte destičky do podavače destiček podle postupu v části “Vložení destiček do podavače destiček” na straně 4-39.

Propojení běhu a studie

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, má každý uživatel právo propojit běh a studii. Novou studii ale mohou vytvořit pouze uživatelé s právy uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

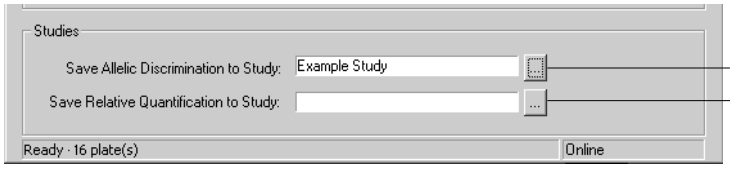
O propojování studií

Program Automation Controller může automaticky propojit výsledky běhů (tzv. seance - '*sessions*') s určitou studií. Tento krok není povinný a lze je provést později prostřednictvím programu RQ nebo SNP Manager. Více informací o používání studií naleznete v části "Koncepce databáze a správa dat" na straně 1-27.

DŮLEŽITÉ! Pokud jste propojili běh a studii, nemůžete daný běh propojit s jinou studií dokud jej znovu neodpojíte v programu RQ nebo SNP Manager.

Chcete-li provést propojení se studií:

1. V programu Automation Controller:
   - Běhy relativní kvantifikace – Klikněte na ... v poli **Save Relative Quantification to Study** (Uložit relativní kvantifikaci do studie) nebo zvolte **Enterprise > Select RQ Study** (Zvolte RQ studii).
   - Běhy alelické diskriminace – Klikněte na ... v poli **Save Allelic Discrimination to Study** (Uložit alelickou diskriminaci do studie) nebo zvolte **Enterprise > Select AD Study** (Zvolte AD studii).



2. V dialogovém okně Select Study (Zvolte studii) buď:
   - Zvolte již existující studii
   - Klikněte New... (Nový) a zadejte údaje do dialogového okna New Study (Nová studie), poté klikněte OK.
     – **Name** (Název) – Zadejte název studie (max. 128 znaků).
     – **Creator** (Vytvořil) – (Nelze změnit) Zobrazí vaše uživatelské jméno.
     – **Description** (Popis) – Zadejte stručný popis studie (max. 255 znaků).
3. Klikněte OK.
4. Vložte destičky do podavače destiček podle postupu v části "Vložení destiček do podavače destiček" na straně 4-39.

DŮLEŽITÉ! V dialogovém okně Database Options (Možnosti databáze) musí být zvolena volba Save Analysis Results (Uložit výsledky analýzy), chcete-li propojit běhy řízené programem Automation Controller (možnost je předvolena). Je-li tato možnost zvolena, program automaticky provádí analýzu každého dokumentu destičky a ukládá analyzované výsledky do databáze. Okno otevřete zvolením **Enterprise > Database Options** (Možnosti databáze).

Ovládání programu bez databáze SDS Enterprise

Přehled

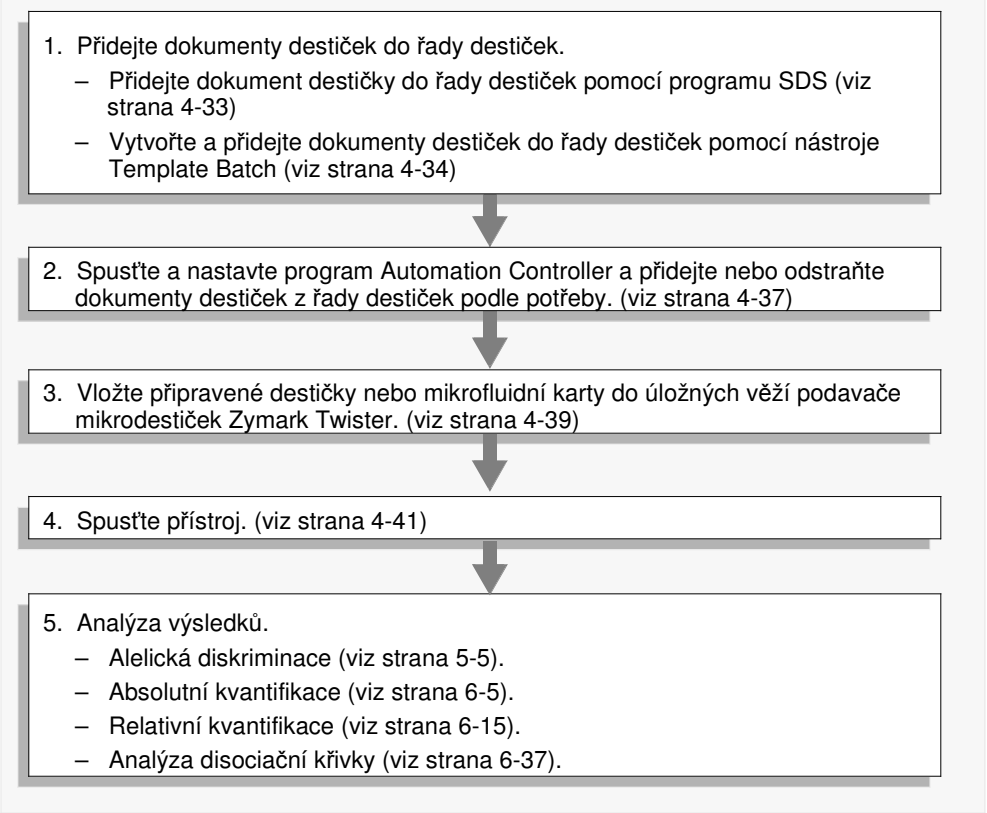
Prvním krokem v režimu automatického provozu přístroje ABI PRISM 7900HT je přidání dokumentů destiček do řady destiček. Řada destiček je seznam dokumentů destiček, který používá program Automation Controller při identifikaci a provedení běhu připravených destiček. Tím, že přidáte dokument destičky do řady destiček, je tento dokument připraven k použití programem Automation Accessory.

DŮLEŽITÉ! Poté co jste přidali dokument destičky do řady destiček, program tento soubor uzamkne, čímž zabrání provedení dalších změn v souboru dokud nebude proveden běh nebo nebude tento dokument destičky vyjmut z řady destiček.

Přístroj ABI PRISM 7900HT nabízí tři různé možnosti jak přidat dokument destičky do řady destiček. Seznamte se s těmito možnostmi uvedenými níže a zvolte možnost, která nejlépe odpovídá vašim potřebám.

- Přidejte dokument destičky do řady destiček pomocí programu SDS. (strana 4-33)
- Pomocí nástroje Template Batch vytvořte skupinu dokumentů destiček na základě templátu a přidejte je do řady destiček. (strana 4-34)
- Přidejte nebo odstraňte jednotlivé destičky nebo více destiček do řady destiček pomocí programu Automation Controller. (strana 4-37)

Postup



Přidání dokumentu destičky do řady destiček (pomocí programu SDS)

DŮLEŽITÉ! Součástí dokumentu destičky musí být čárový kód, teprve pak lze dokument přidat do řady destiček. Více informací o vložení čárového kódu do dokumentu destičky viz strana 3-25.

1. V programu SDS zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
2. V záložce Instrument (Přístroj) zvolte záložku **Queue** (Řada).
3. V záložce Queue (Řada) klikněte Send To Queue (Poslat do řady).

   Uložili jste dokument destičky?
   - *Ano*, program dokument destičky uloží automaticky.
   - *Ne*, proveďte následující:
     a. V poli Look in (Vyhledat) dialogového okna Save As (Uložit jako) vyhledejte adresář v němž chcete dokument destičky uložit.
     b. Zvolte **Files of type** (Typ souboru) **> ABI PRISM SDS Single Plate (*.sds)**.
     c. Klikněte do pole File name (Název souboru) a proveďte:
        - Zadejte název souboru dokumentu destičky, nebo
        - Zadejte nebo naskenujte čárový kód destičky.
     d. Klikněte Save (Uložit). Program dokument uloží.
4. Jakmile jste vyzváni, klikněte Yes (Ano), čímž zařadíte dokument do řady destiček.

   Poté co jste přidali dokument destičky do řady destiček, program tento soubor uzamkne, čímž zabrání provedení dalších změn v souboru dokud nebude proveden běh nebo nebude tento dokument destičky vyjmut z řady destiček.

   Poznámka: Chcete-li dokument destičky vyjmout z řady, spusťte program Automation Controller a vyjměte dokument destičky z řady podle postupu na straně 4-38.
5. Klikněte OK.
6. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít). Program SDS zavře dokument destičky.
7. Opakujte postup uvedený v této části tak dlouho dokud chcete vytvářet a přidávat destičky do řady.
8. Po ukončení vytváření dokumentů destiček spusťte destičky seřazené v řadě podle postupu v části “Spuštění a nastavení programu Automation Controller” na straně 4-37.

Vytváření dokumentů destiček pomocí nástroje Template Batch

O nástroji Template Batch

Nástroj Template Batch umožňuje rychle vytvořit mnoho dokumentů destiček z jediného SDS templátu (*.sdt). Tento nástroj může být výhodné použít v situacích kdy jsou analyzovány vzorky v destičkách s totožným uspořádáním esejí.

DŮLEŽITÉ! Dokumenty destiček vytvořené nástrojem Template Batch neobsahují informace o vzorcích a destičce (čárový kód a pole komentář). Tyto informace musíte zadat ručně po skončení běhu.

Vytvoření dokumentů destiček z templátu

Poznámka: Více informací o jednotlivých součástech dialogového okna Template Batch získáte v nápovědě programu SDS po kliknutí na ikonu ?.

1. V programu SDS otevřete soubor templátu z:

   pevného disku počítače

   a. Klikněte nebo zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
   b. Zvolte **File of type** (Typ souboru) > **ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)**.
   c. V poli **Look in** (Vyhledat) vyhledejte a zvolte templát.
   d. Klikněte Open (Otevřít).
   e. Pokračujte krokem 2.

   databáze SDS Enterprise

   a. Zvolte **File > Open Template from Database** (Soubor > Otevřít templát z databáze.
   b. V poli **Template Names** (Název templátu) dialogového okna Select Template (Zvolte templát) vyhledejte a zvolte templát
   c. Klikněte OK.
   d. Klikněte Done (Hotovo).
   e. Uložte templát na pevný disk počítače podle postupu na straně 3-23.
   f. Pokračujte krokem 2.

   Program SDS zobrazí soubor templátu.

2. Zařaďte soubor templátu do řady:
   a. Zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
   b. Zvolte záložku **Queue** (Řada).
3. Klikněte Send To Queue (Poslat do řady).
4. V dialogovém okně Template Batch zadejte identifikační údaje destičky (Plate ID):
   a. Klikněte New... (Nový).

b. Do pole **Plate ID** (Identifikační údaje destičky) dialogového okna New Plate (Nová destička) naskenujte pomocí ruční čtečky čárových kódů čárový kód první destičky.

WARNING **NEBEZPEČÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ**. Přímé nebo odražené laserové paprsky mohou poškodit sítnici, což může vést k trvalém poškození zraku. Nikdy se nedívejte přímo do laserového paprsku. Odstraňte šperky a další předměty, které mohou odrážet paprsek do vašich očí. Chraňte ostatní před laserovými paprsky.

DŮLEŽITÉ! Používáte-li databázi SDS Enterprise musí být čárové kódy unikátní a nesmí být použity již existujícím dokumentem destičky.

c. Opakujte krok b pro všechny destičky.

d. Po skončení klikněte OK.

Čárové kódy destiček se zobrazí v poli Plate ID.

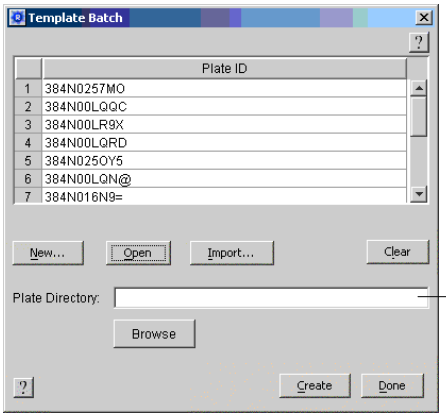
5. Zvolte cílový adresář pro uložení nových dokumentů destičky:

a. Klikněte Browse... (Zvolit).

b. V poli **Look in** (Vyhledat) vyhledejte a zvolte adresář, do něhož chcete ukládat nové soubory.

c. Klikněte Select directory (Zvolit adresář).

V poli **Plate Directory** (Adresář destiček) dialogového okna Template Batch se zobrazí název cílového adresáře.



6. Klikněte Create (Vytvořit).

Program vytvoří dokumenty destiček pro všechny položky v seznamu Plate ID, uloží je do cílového adresáře, přidá je do řady destiček a zobrazí zprávu o počtu dokumentů destiček, které vytvořil a zařadil do řady destiček.

7. Klikněte OK, čímž zprávu uzavřete.

8. Klikněte Done (Hotovo), čímž uzavřete dialogové okno Template Batch.

9. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít), čímž zavřete templát.

10. Opakujte kroky v kapitolách 3 “Příprava běhu” a 4 “Ovládání přístroje” tak, abyste vytvořili a přidali do řady další destičky podle potřeby.

    Poznámka: Poté co jste přidali dokument destičky do řady destiček, program tento soubor uzamkne, čímž zabrání provedení dalších změn v souboru dokud nebude proveden běh nebo nebude tento dokument destičky vyjmut z řady destiček.

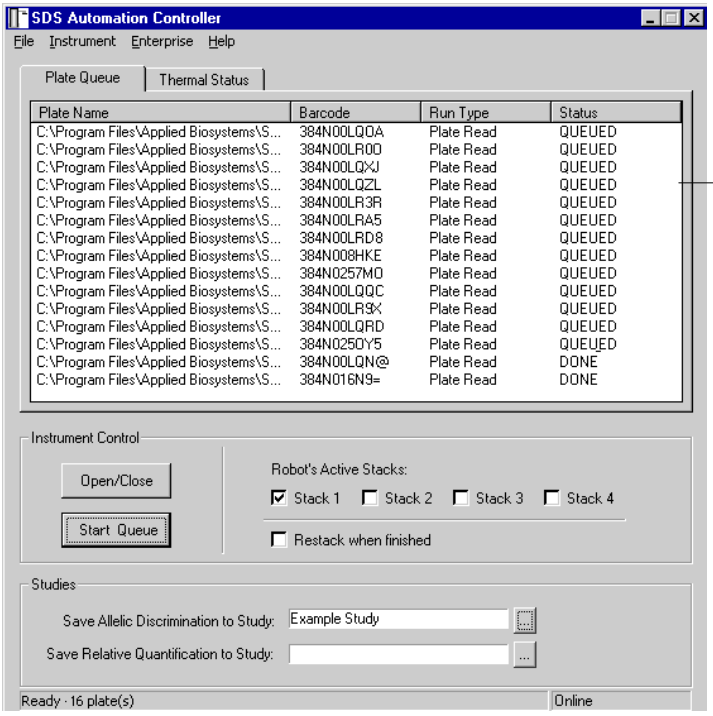
11. Po ukončení vytváření a přidávání dokumentů destiček do řady spusťte destičky seřazené v řadě podle postupu v části “Spuštění a nastavení programu Automation Controller” na straně 4-37.

Spuštění a nastavení programu Automation Controller

Spuštění a nastavení programu

Přístroj ABI PRISM 7900HT je možné provozovat v automatickém režimu pomocí programu Automation Controller. Program koordinuje fungování přístroje 7900HT, čtečky čárových kódů a podavače mikrodestiček a snímá a ukládá data v průběhu běhu.

1. Používáte-li program SDS, proveďte:
   - Zvolte **Instrument > Disconnect** (Přístroj > Odpojit), čímž ukončíte komunikaci mezi programem a přístrojem, nebo
   - Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec), čímž uzavřete program SDS.
2. Spusťte program Automation Controller (zvolte Start > **Programs** > **Applied Biosystems** > **SDS 2.2** > **Automation Controller 2.2**).
3. Používáte-li databázi SDS Enterprise, zadejte do odpovídajících polí dialogového okna Log In (Přihlásit) programu Automation Controller vaše uživatelské jméno a heslo, poté klikněte OK.
4. Používáte-li databázi SDS Enterprise, definujte propojení jednotlivých běhů a studií podle postupu v části “Propojení běhu a studie” na straně 4-31.
5. Používáte-li program Automation Controller ve spojení s řadou destiček, ověřte, že pole **Plate Queue** (Řada destiček) obsahuje všechny dokumenty destiček, které chcete spustit.
   - Chcete-li *přidat* dokument destičky do řady destiček – viz “Přidání destiček do řady destiček” na straně 4-38.
   - Chcete-li *odebrat* dokument destičky z řady destiček – viz “Odebrání destiček z řady destiček” na straně 4-38.



6. Připravte destičky do podavače podle postupu na straně 4-39.

Přidání destiček do řady destiček

1. V programu Automation Controller zvolte **File > Add Plates** (Soubor > Přidat destičky).
2. V poli **Look in** (Vyhledat) dialogového okna Open (Otevřít) vyhledejte adresář obsahující hledaný soubor/y.
3. Za současného stisku klávesy **Ctrl** zvolte dokument(y) destičky/ek, které chcete přidat do řady destiček.

   Vybrané soubory budou zvýrazněny.

   DŮLEŽITÉ! Součástí dokumentu destičky musí být čárový kód, jinak jej nelze přidat do řady destiček. Více informací o zadávání čárových kódů do dokumentu destičky viz strana 3-25.
4. Klikněte Open (Otevřít).

   Program Automation Controller přidá dokument/y destičky/ek do řady destiček.

   Poznámka: Poté co jste přidali dokument destičky do řady destiček, program tento soubor uzamkne, čímž zabrání provedení dalších změn v souboru dokud nebude proveden běh nebo nebude tento dokument destičky vyjmut z řady destiček.

Odebrání destiček z řady destiček

Chcete-li odebrat dokument destičky z řady destiček:

Odebíráte-li…	**Pak…**
určitý dokument destičky z řady destiček	1. Za současného stisku klávesy **Ctrl** zvolte dokumenty destiček, které chcete odebrat. Vybrané soubory budou zvýrazněny. 2. Zvolte **File > Clear Selected Plate(s)** (Soubor > Odstranit zvolené destičky). 3. Klikněte Yes (Ano). Program odstraní zvolené dokumenty z řady destiček.
všechny dokumenty z řady destiček	1. V programu Automation Controller zvolte **File > Clear All Plates** (Soubor > Odstranit všechny destičky). 2. Klikněte Yes (Ano). Program odstraní všechny dokumenty z řady destiček.

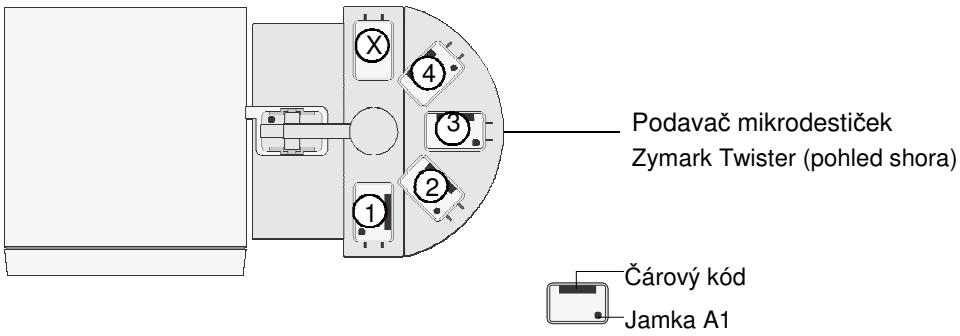
Spuštění destiček pomocí programu Automation Controller

Přístupová práva Pro spuštění běhu destiček uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Vložení destiček do podavače

Doporučení Při vkládání destiček do podavače postupujte následujícím způsobem:

- Před vložením destiček do podavače se ujistěte, že:
  - dokument destičky pro každou destičku byl přidán do řady destiček nebo je v databázi SDS Enterprise
  - destička byla uzavřena pomocí optické adhezívní fólie.
- Vložte destičky do zásobníků podavače v libovolném pořadí. Program načte čárový kód každé destičky před jejím použitím a vyhledá odpovídající dokument destičky. Program Automation Controller umožňuje provést běh až 84 destiček (21 destiček v jednom zásobníku).
- Vložte destičky do zásobníků tak, že umístění jamky A1 každé destičky odpovídá obrázku 4-11.
- Neumisťujte destičky do zásobníku na destičky, které již byly spuštěny (X). Tento zásobník slouží k umisťování již analyzovaných destiček po skončení běhu.
- Používáte-li v podavači mikrofluidní kartu/y Applied Biosystems:
  - Nedávejte do zásobníku více než 20 karet.
  - Karty na sebe dobře zarovnejte. (Podavač nemusí nalézt kartu, není-li balík karet dobře zarovnán.)

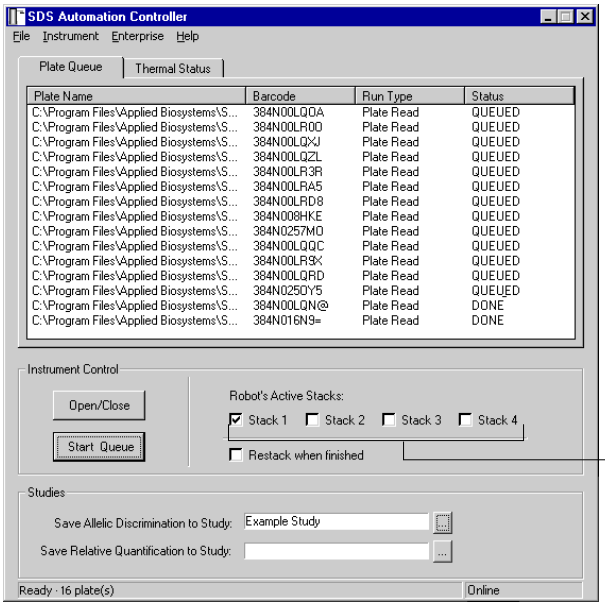


Obrázek 4-11 Umístění destiček v podavači mikrodestiček Zymark Twister

Vložení destiček

1. Vložte uzavřené destičky nebo karty do zásobníků podavače podle postupu na straně 4-39.
2. V programu Automation Controller zatrhněte, které zásobníky používáte.

   DŮLEŽITÉ! Pokud nepoužíváte zásobník 1 nebo možnost Restack vysvětlenou níže, odstraňte všechny destičky ze zásobníku 1. Při takovémto nastavení bude podavač umisťovat destičky z podavače 2 (po provedení běhu) do podavače 1. Obsahuje-li podavač 1 destičky, běh bude ukončen.



3. Pokud chcete, aby po skončení běhu byly destičky umístěny v témže zásobníku jako na začátku, zvolte možnost **Restack when finished** (Po skončení přeskládat).

   Restack when finished (Po skončení přeskládat) – Po skončení běhu všech destiček v jednom zásobníku budou tyto destičky umístěny zpět do téhož zásobníku a v tomtéž pořadí jako na začátku. Není-li tato možnost zvolena, budou destičky umístěny do nejbližšího volného zásobníku ve směru hodinových ručiček počínaje zásobníkem na destičky, které již byly spuštěny (X).

   Poznámka: Zpracováváte-li více destiček, trvá jejich přeskládání dosti dlouho. Používejte tuto možnost pouze je-li to nezbytně nutné.

4. Spusťte řadu destiček podle postupu na straně 4-41.

Spuštění přístroje

Spuštění řady destiček

Poté co jste přidali všechny dokumenty destiček do řady destiček nebo je uložili do databáze SDS Enterprise, můžete řadu destiček spustit.

Chcete-li spustit řadu destiček, klikněte na Start Queue (Spustit řadu) ze záložky Plate Queue (Řada destiček). Program Automation Controller provede následující kroky:

1. Podavač mikrodestiček Zymark Twister vyjme první destičku ze zásobní věže 1 a vloží ji do nosítek přístroje 7900HT.
2. Pevně umístěná čtečka čárových kódů načte čárový kód destičky.
3. Program Automation Controller provede následující kroky:
   - Je-li program propojen s databází SDS Enterprise, vyhledá v databázi dokument destičky s odpovídajícím čárovým kódem. Jakmile jej nalezne, stáhne jej z databáze.

     Pokud program nenalezne dokument destičky s odpovídajícím čárovým kódem, prohledá řadu destiček postupem uvedeným níže.
   - Není-li program propojen s databází, vyhledá v řadě destiček dokument destičky s odpovídajícím čárovým kódem. Jakmile jej nalezne, použije informace o parametrech běhu v něm obsažené.
4. Přístroj 7900HT uzavře nosítka přístroje a spustí běh podle parametrů v dokumentu destičky.

Poznámka: Před spuštěním běhu může přístroj vyčkat až 15 minut na ohřátí vyhřívaného víka na požadovanou teplotu.

Používáte-li databázi SDS Enterprise, program Automation Controller automaticky provádí počáteční analýzu každého ukončeného běhu a ukládá výsledky do databáze. Pokud jste definovali studii nebo studie podle postupu “Propojení běhu a studie” na straně 4-31, program automaticky propojí analyzované výsledky s příslušnou studií.

Během a po skončení běhu jsou k dispozici následující možnosti:

Chcete-li…	**Viz strana**
Sledovat průběh běhu	4-42
Zastavit běh DŮLEŽITÉ! Musíte-li z jakéhokoliv důvodu zastavit nedokončený běh, pečlivě si přečtěte pokyny na straně 4-26.	4-42
Otevřít nosítka přístroje (po skončení běhu)	4-42
Analyzovat výsledky běhu po jeho skončení	4-42

Sledování průběhu běhu

Program Automation Controller zobrazuje informace o průběhu běhu v záložce Real-Time nebo Plate Read. Více informací viz strana 4-25.

Zastavení přístroje

Chcete-li zastavit přístroj, klikněte kdykoliv na ikonu Stop v programu Automation Controller.

Kliknete-li Stop...	**Přístroj...**
pokud podavač destiček manipuluje s destičkou	ukončí běh a přesune rameno podavače do výchozí pozice.
po vložení destičky do přístroje ale před spuštěním běhu	ukončí běh, vysune destičku a přesune rameno podavače do výchozí pozice.
po zahájení běhu	ukončí běh, vysune destičku a přesune rameno podavače do výchozí pozice. DŮLEŽITÉ! Zastavení běhu v jeho průběhu může mít vliv na průběh reakce. Před zastavením běhu si pečlivě přečtěte pokyny na straně 4-26.

Vysunutí destičky

Chcete-li po zastavení běhu vysunout destičku (nebo otevřít/zavřít nosítka přístroje), klikněte na ikonu Open/Close (Otevřít/Zavřít) v okně programu Automation Controller.

Po skončení běhu

Analýza výsledků

Výsledky můžete analyzovat ihned po skončení běhu.

Pokračujte podle typu vaší aplikace:

Část 5.1 Alelická diskriminace 5-5
Část 6.1 Absolutní kvantifikace 6-5
Část 6.2 Relativní kvantifikace 6-15
Část 6.3 Analýza disociační křivky 6-37

Analýza esejí typu End-Point 5

V této kapitole

Eseje typu End-Point na přístroji 7900HT 5-2
Poznámky pro uživatele databáze 5-3
Část 5.1 Alelická diskriminace 5-5
Přehled 5-6
Dříve než začnete 5-9
Seznam kroků 5-10
Otevření výsledků běhu 5-11
Analýza výsledků alelické diskriminace 5-12
Odečítání a kontrola výsledků alelické diskriminace 5-13
Po skončení analýzy 5-18

Běhy typu End-Point na přístroji 7900HT

Běhy End-Point

Běhy typu End-point jsou takové běhy, jejichž výsledky jsou detekované - tzn. fluorescence vzorků měřena - přístrojem ABI PRISM® 7900HT až po skončení reakce (cyklování). Narozdíl od běhů monitorovaných v reálném čase, které poskytují kvantitativní údaje, umožňují běhy typu end-point získání kvalitativních výsledků. Tento typ analýzy se běžně používá v kombinaci s chemizmem TaqMan® pro potvrzení přítomnosti či nepřítomnosti určité specifické cílové nukleové kyseliny.

Program SDS podporuje jeden typ analýzy typu end-point: Alelickou diskriminaci.

Poznámky pro uživatele databáze

Databáze a alelická diskriminace

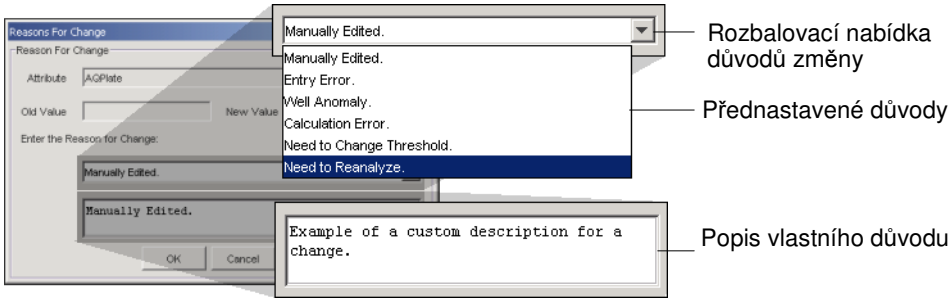
Používáte-li databázi SDS Enterprise pro ukládání dokumentů SDS, studií a dat, je možné, že během analýzy výsledků alelické diskriminace budete muset provést nějaké dodatečné úkony. Níže jsou tyto úkony popsány (nutnost jejich provedení závisí na tom, jak správce provedl nastavení databáze). Více informací naleznete v případě potřeby v příručce SDS Enterprise Database Administration Guide.

Dialogové okno Reason(s) For Change

Dialogové okno Reason(s) for Change (Důvod/y změny) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje zdůvodnění prováděných kroků (tzv. audit). Systém auditu sleduje vytváření, změny a mazání dat v databázi.

Objeví-li se dialogové okno Reasons for Change, proveďte jeden z následujících kroků:

- Zvolte důvod změny z rozbalovací nabídky a poté klikněte na ikonu OK.
- Zadejte důvod změny do příslušného pole a poté klikněte na ikonu OK.



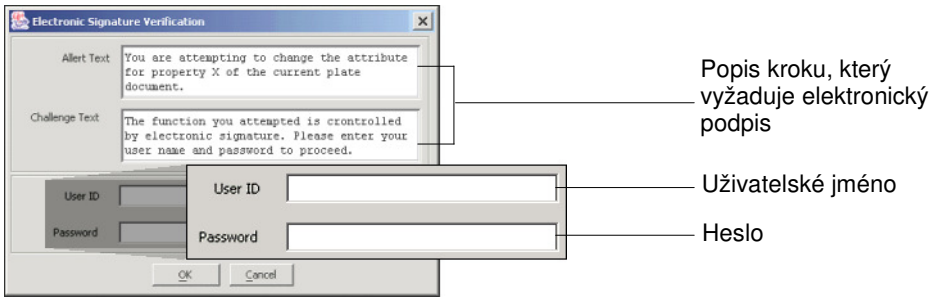
Obrázek 5-1 Dialogové okno Reasons for Change (Důvod/y změny)

Dialogové okno Electronic Signature

Dialogové okno Electronic Signature (Elektronický podpis) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje elektronický podpis. Systém elektronického podpisu omezuje a sleduje přístup uživatelů k datům v databázi.

Objeví-li se toto dialogové okno:

1. Do pole User ID (Jméno) a Password (Heslo) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.
2. Program následně zobrazí zprávu o úspěšném či neúspěšném použití elektronického podpisu. Pro pokračování klikněte OK.



Obrázek 5-2 Dialogové okno Elektronický podpis

Část 5.1 Alelická diskriminace

V této části

Přehled 5-6
Dříve než začnete 5-9
Seznam kroků 5-10
Otevření výsledků běhu 5-11
Analýza výsledků alelické diskriminace 5-12
Odečítání a kontrola výsledků alelické diskriminace 5-13
Po skončení analýzy 5-18

Přehled

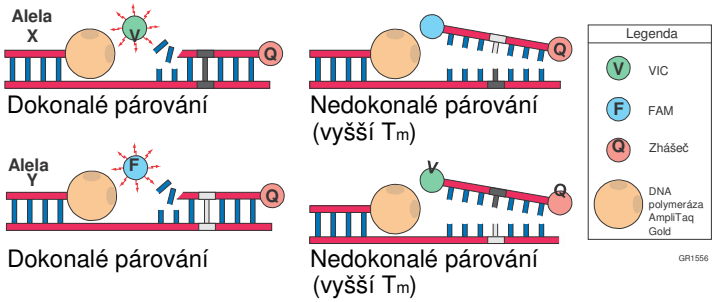
Alelická diskriminace na přístroji 7900HT

Přístroj ABI PRISM 7900HT umožňuje provádění alelické diskriminace pomocí sond typu TaqMan®. Alelická diskriminace je esej, při níž jsou v připraveném vzorku detekovány dvě varianty jedné nukleové kyseliny. Lze ji použít pro detekci jednonukleotidových polymorfismů (single-nucleotide polymorphism - SNP).

5´ nukleázová esej v alelické diskriminaci

Alelická diskriminace prováděná na přístroji 7900HT využívá fluorogenní 5´ nukleázovou esej (viz strana D-2). V průběhu PCR nasedají fluorogenní sondy specificky na komplementární sekvence DNA templátu v oblasti mezi primery. Následně při prodlužování primerů DNA polymeráza AmpliTaq Gold® rozštěpí sondy, které nasedly na alelu s odpovídající sekvencí. Tímto štěpením dochází k oddělení reportérové barvy a zhášeče což vede k nárůstu fluorescenčního signálu vyzařovaného reportérem. Po skončení PCR je destička analyzována na přístroji 7900HT a je odečtena fluorescence. Kvantifikováním a porovnáním fluorescenčních signálů pomocí programu SDS je možné stanovit, jaké alelické varianty se nacházejí v daném vzorku.

Nedokonalé párování mezi sondou a cílovou sekvencí snižuje efektivitu hybridizace sondy. Navíc je mnohem pravděpodobnější, že DNA polymeráza AmpliTaq Gold nedokonale nasednutou sondu vytěsní aniž ji degraduje, a nedojde tak k uvolnění reportérové barvy. Je-li polymerační fáze PCR prováděna při optimální teplotě z hlediska nasednutí sond, nižší teploty tání (T_m) nedokonale spárovaných sond snižují stupeň jejich degradace a následně i fluorescenci. Na obrázku 5-3 je popsaná situace vyobrazena (Livak *et al.*, 1995; Livak *et al.*, 1999).



Obrázek 5-3 Interakce sondy a cílové sekvence

Tabulka 5-1 uvádí souvislosti mezi fluorescenčním signálem a sekvencemi ve vzorku.

Tabulka 5-1 Souvislost signálu a sekvence

Nárůst …	**znamená…**
jen fluorescence barvy VIC®	homozygozitu pro alelu X.
jen fluorescence barvy FAM™	homozygozitu pro alelu Y.
fluorescence obou barev	heterozygozitu.

Algoritmické zpracování hrubých dat alelické diskriminace

Program SDS může zpracovávat hrubá data okamžitě po skončení běhu alelické diskriminace. Pojmem ‘hrubá data’ je míněn spektrální signál v rozsahu vlnových délek 500 až 660 nm zaznamenaný programem SDS pro jednotlivé jamky destičky. V průběhu analýzy používá program několik matematických algoritmů tak, aby na základě hrubých dat odvodil přímý vztah mezi změnami spekter v neznámých vzorcích.

Prvním z těchto matematických algoritmů je přepočet hrubých dat, vyjádřených jako závislost intenzity fluorescenčního signálu na vlnové délce, na signál jednotlivých čistých barev, který se provádí pomocí údajů získaných během kalibrace barev (použijí se extrahovaná spektra čistých barev). Jakmile program zjistí jednotlivé barvy, vypočítá jejich příspěvek do celkového naměřeného signálu (hrubá data) pomocí multikomponentního algoritmu. Úplný popis těchto výpočtů naleznete v části “Multikomponentní algoritmus” na straně D-5.

O systému odečítání

Po provedení normalizace program následně využívá unikátní algoritmus společnosti Applied Biosystems, tzv. algoritmus maximální pravděpodobnosti (Maximum Likelihood Algorithm), a to pro zpracování všech vzorků, s nimiž jsou spojeny nějaké markery, které mají být automaticky odečítány (angl. autocalling). Tento algoritmus provádí klastrovou analýzu dat na základě poměru normalizovaného signálu reportérových barev (např. poměr barvy FAM™ vůči VIC®). Typickým výsledkem analýzy jsou tři hlavní klastry (shluky) odpovídající třem různým genotypům: homozygot pro alelu X, homozygot pro alelu Y a heterozygot.

Po provedení této klastrové analýzy program následně využije řadu dalších pravděpodobnostních testů, aby výsledky analýzy upřesnil a identifikoval odlehlé body. Pro každý vzorek následně vypočítá tzv. ukazatel kvality (“quality value”), jenž vyjadřuje míru pravděpodobnosti, že vzorek patří do určitého klastru. Na základě prahové hodnoty ukazatele kvality pro určitý marker (definované v nastavení parametrů analýzy – dialogovém okně Analysis Settings) jsou potom analyzovány vzorky. Jsou-li hodnoty ukazatele kvality pro danou kombinaci vzorek – klastr vyšší než definovaná prahová hodnota, je daný vzorek řazen do tohoto klastru a je mu přiřazen příslušný genotyp.

Poznámka: Jakýkoliv SNP, který se významně liší od předpokládaných frekvencí podle Hardy-Weinberga, je zapotřebí analyzovat manuálně.

O dvouklastrové analýze

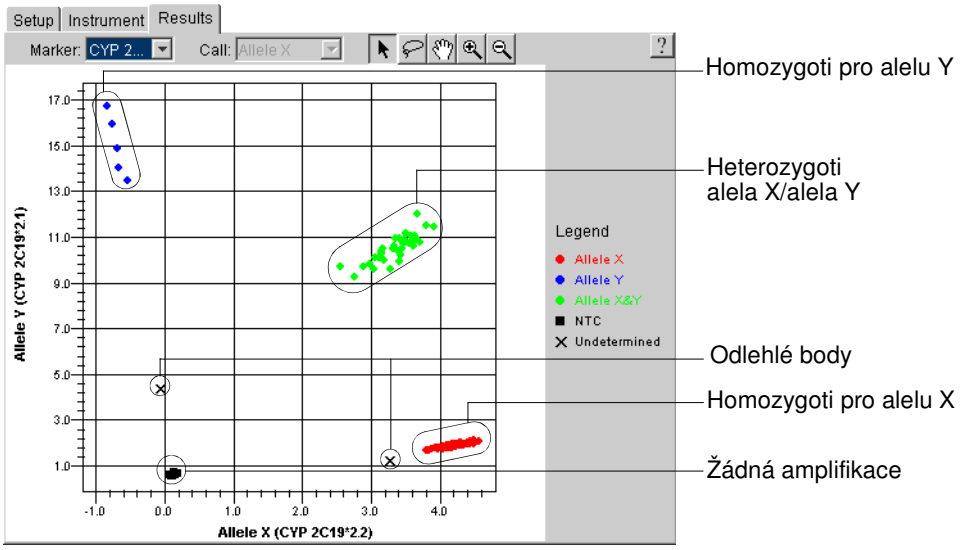
Jsou-li v dané studii přítomny pouze dva klastry, používá algoritmus automatického odečítání pro přiřazení genotypů předpokládané frekvence genotypů těchto klastrů. Obsahuje-li studie dva velké klastry a jeden vzorek mezi nimi, bude tento vzorek považován spíše za odlehlý bod než za klastr a data budou zpracována jako dvouklastrová.

Poznámka: Algoritmus maximální pravděpodobnosti využívá netemplátovou kontrolu a odečítání je nejefektivnější, jsou-li netemplátové kontroly součástí experimentu.

O klastrech

Program SDS znázorňuje výsledky alelické diskriminace v grafu zobrazujícím fluorescence obou reportérových barev (R_n alely X vůči R_n alely Y). Program znázorní každou jamku 384-jamkové destičky jako jediný bod v grafu. Poloha klastrů těchto bodů se může měnit – podél horizontální osy (alela X), vertikální osy (alela Y) nebo diagonálně (alela X/alela Y). Tyto změny vyplývají z rozdílů v PCR amplifikaci, která může být důsledkem různých vstupních koncentrací DNA.

Na obrázku níže je znázorněna variace klastrů kvůli rozdílné PCR amplifikaci.



Obrázek 5-4 Variace klastrů

Genotypická segregace klastrů

Obrázek 5-4 znázorňuje koncept genotypické segregace vzorků v grafu. V grafu se nacházejí čtyři oddělené samostatné klastry, představující netemplátové kontroly a tři možné genotypy (homozygot pro alelu X, homozygot pro alelu Y a heterozygot). Homozygotní vzorky mají zvýšenou intenzitu fluorescence v jedné ose grafu (v závislosti na alele, kterou obsahují). Naopak heterozygotní vzorky se nacházejí ve střední části grafu, neboť obsahují obě alely a mají proto zvýšenou intenzitu fluorescence obou reportérových barev.

O odlehlých bodech

Vzorky, které nejsou součástí žádného klastru, mohou:

- Obsahovat řídce se vyskytující sekvenční varianty
- Obsahovat sekvenční duplikace
- Být výsledkem chybné přípravy (pipetovací chyba)

Dříve než začnete

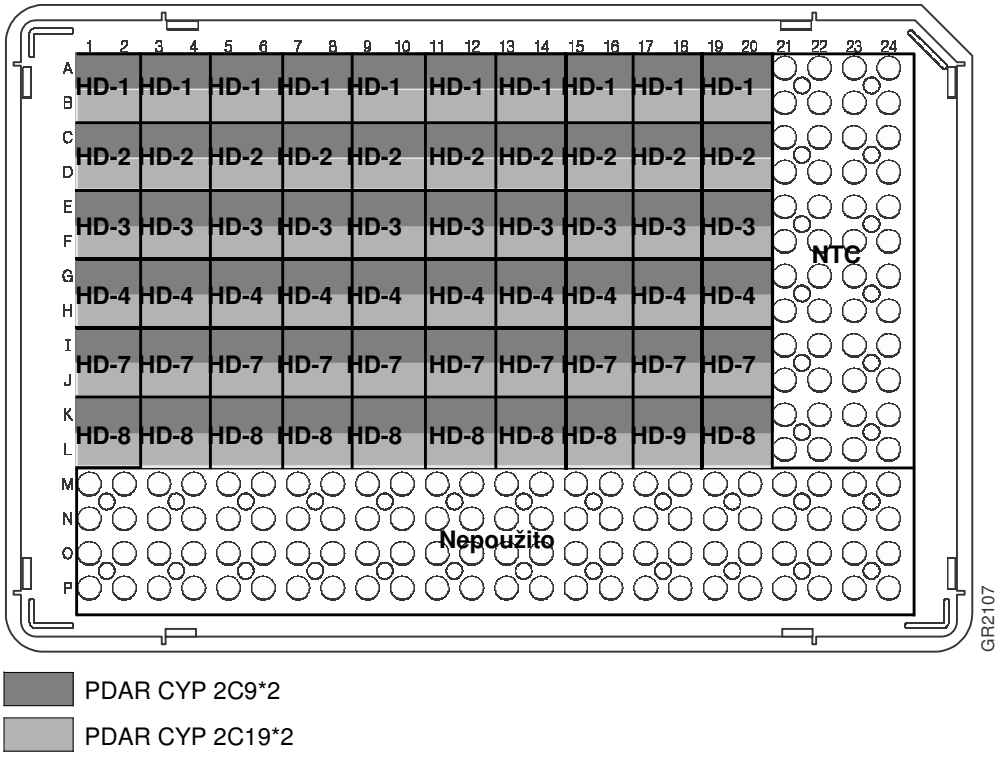
Používání nápovědy

Bližší informace o krocích popsaných v této části naleznete v nápovědě programu SDS. Chcete-li otevřít nápovědu, klikněte na ikonu ? , která je součástí každého (dialogového) okna, v němž pracujete.

Použité příklady

Vyobrazení a náhledy, které jsou součástí této kapitoly, byly vytvořeny za použití destičky obsahující reagencie TaqMan pro alelickou diskriminaci dvou cílů (CYP 2C9*2 a CYP 2C19*2) za použití šesti vzorků lidské genomové DNA (HD 1, 2, 3, 4, 7, 8). Každá jamka destičky obsahuje 1 µL DNA, 1X TaqMan® Universal PCR Master Mix, primery a sondy TaqMan značené barvami FAM a VIC.

Na obrázku 5-5 je znázorněno uspořádání esejí, testovaných vzorků a netemplátových kontrol (NTC) na destičce.



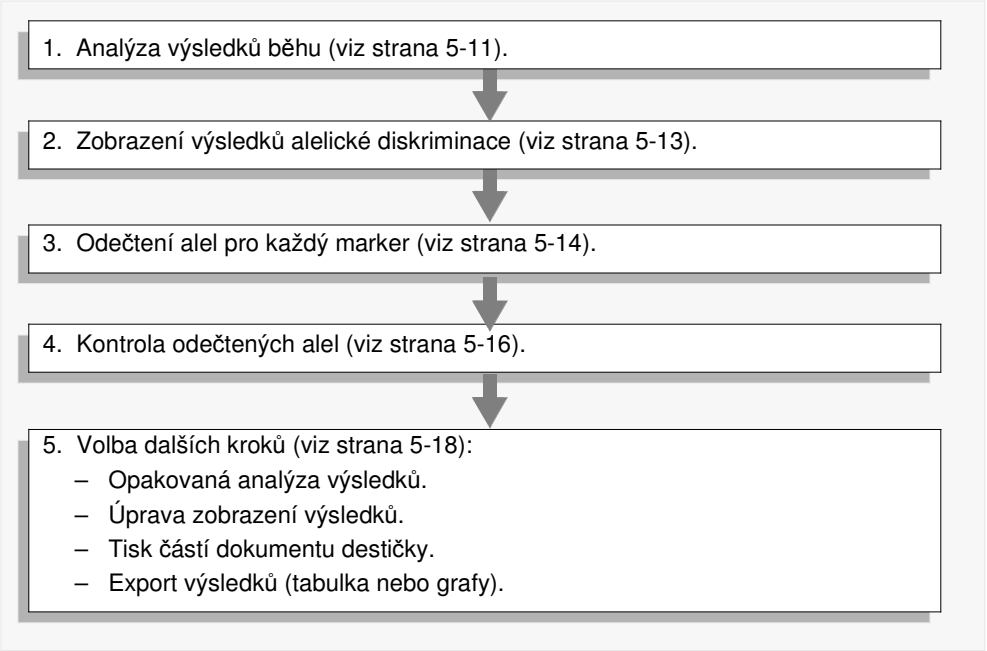
Obrázek 5-5 Uspořádání vzorků a detektorů na destičce

Poznámka: Sondy používané v tomto pokusu byly navrženy pomocí programu Primer Express® a při dodržení pravidel popsaných v části “Pravidla pro návrh esejí” na straně B-2.

DŮLEŽITÉ! Program SDS nevyžaduje, aby součástí experimentu absolutní kvantifikace byly pozitivní kontroly.

Průběh analýzy

Postupné kroky



Otevření výsledků běhu

Přístupová práva

Pro otevření výsledků běhu alelické diskriminace uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Otevření výsledků

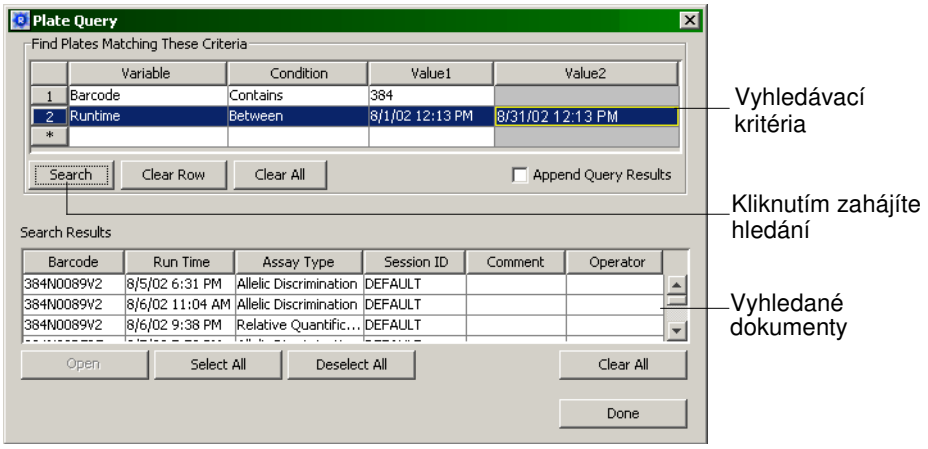
Otevření dokumentu destičky

1. Klikněte nebo zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
2. V poli **Look in** (Vyhledat) vyhledejte a zvolte příslušný dokument destičky.
3. Klikněte Open (Otevřít).

   Program SDS zobrazí soubor s dokumentem destičky.
4. Nastavte pro každý marker parametry analýzy (Analysis Settings) podle postupu níže.

Otevření neanalyzovaných výsledků z databáze SDS Enterprise

1. Klikněte nebo zvolte **File > Open Document from Database** (Soubor > Otevřít dokument z databáze).
2. V dialogovém okně Plate Query (Volba destičky) upravte parametry vyhledávání destičky (Find Plates Matching These Criteria) dle potřeby.
3. Klikněte Search (Vyhledat).



4. V seznamu Search Results (Výsledky vyhledávání) zvolte dokument, s nímž chcete pracovat.
5. Klikněte Open (Otevřít).
6. Klikněte Done (Hotovo).
7. Nastavte pro každý marker parametry analýzy (Analysis Settings) podle postupu níže.

Analýza výsledků alelické diskriminace

Přístupová práva

Pro analýzu výsledků běhu alelické diskriminace neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

O analýze

Součástí analýzy SNP (neboli genotypování) je automatické nebo manuální "odečítání" výsledků pro každý vzorek a marker. "Odečítáním" se rozumí určení alelických variant přítomných v každém vzorku.

Program SDS umožňuje odečítání:

- Manuální.
- Automatické, pomocí systému automatického odečítání ("AutoCalling") – viz "O systému automatického odečítání" na straně 5-7.

Nastavení parametrů analýzy

Před zahájením analýzy je zapotřebí nastavit její parametry, a to pro každý marker, který chcete pomocí algoritmu automatického odečítání analyzovat. Parametry analýzy jsou specifické pro daný marker a musí být tudíž i nastaveny zvlášť pro každý marker.

DŮLEŽITÉ! Parametry analýzy je zapotřebí nastavit pouze hodláte-li používat systém automatického odečítání.

Nastavení parametrů analýzy:

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analysis Settings** (Analýza > Parametry analýzy).
2. Chcete-li nastavit parametry analýzy:
   - Pro *jediný marker*, zvolte tento marker z rozbalovací nabídky.
   - Pro všechny markery, zvolte v rozbalovací nabídce **All markers** (Všechny markery).
3. V dialogovém okně Analysis Settings (Parametry analýzy):
   a. Zvolte možnost **Autocaller enabled** (Zapnutí automatického odečítání), čímž tento systém pro daný marker aktivujete.
   b. Předpokládáte-li, že data budou pouze ve dvou klastrech, zvolte možnost **2-Cluster Calling** (Dvouklastrové odečítání).
   c. Do pole **Quality** (Kvalitativní ukazatel) zadejte procentuálně vyjádřenou hodnotu ukazatele kvality pro automatické odečítání vzorků.
4. Opakujte kroky 2 a 3 i pro zbývající markery v dokumentu destičky.
5. Po ukončení klikněte na ikonu

.

Analýza výsledků

Během analýzy program používá různé algoritmy tak, aby na základě hrubých dat odvodil vztah mezi změnami spektrálních signálů v jednotlivých vzorcích.

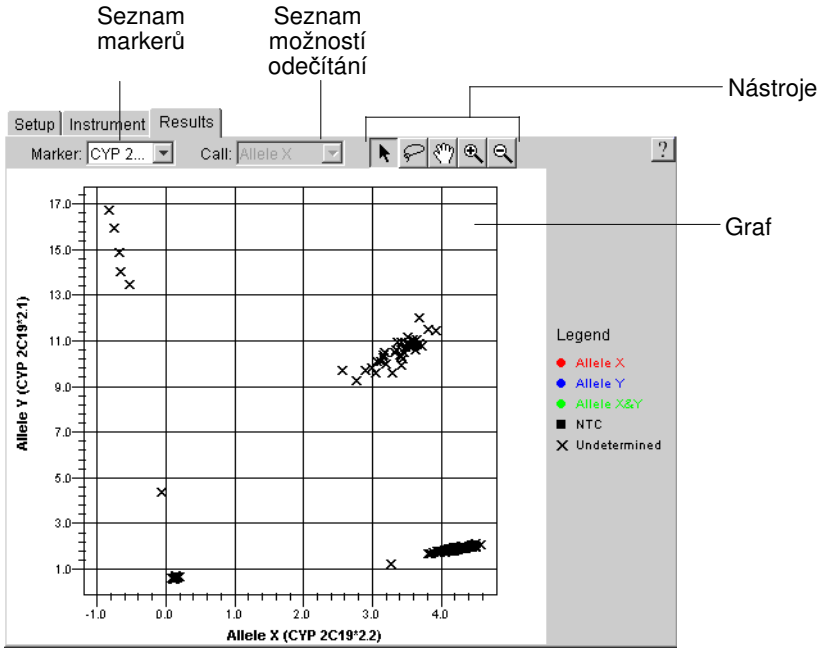
Chcete-li analyzovat výsledky:

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat).
   Program SDS provede analýzu dat a zobrazí výsledky v záložce **Results**.

Odečítání a kontrola výsledků alelické diskriminace

O zobrazení výsledků

Program SDS zobrazuje výsledky běhů alelické diskriminace v grafu podle intenzity signálu reportérových barev. Po provedení normalizace signálu a multikomponentní analýzy jsou normalizované výsledky zobrazeny tak, že každé jamce odpovídá jediný bod v grafu. Na obrázku 5-6 jsou znázorněny součásti tohoto grafu.



Obrázek 5-6 Součásti grafu alelické diskriminace

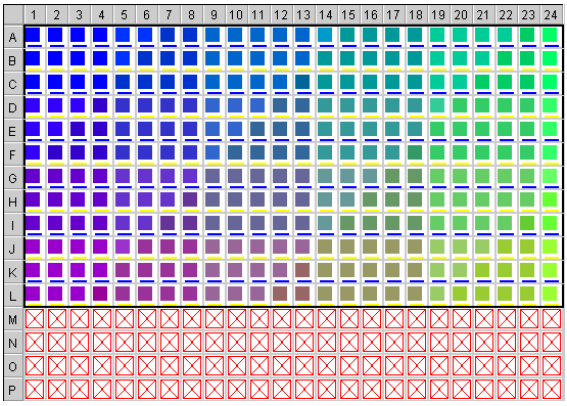
- **Seznam markerů** – Určuje, kterého markeru se graf týká.
- **Seznam možností odečítání** – Pomocí tohoto seznamu můžete zvolenému bodu v grafu přiřadit příslušnou alelickou variantu.
- Nástroje – Umožňují upravovat graf následujícím způsobem:

Ikona	Popis
	Kliknutím nebo potažením okolo skupiny bodů zvolíte body v grafu.
	Zakroužkováním skupiny bodů zvolíte body v grafu.
	Posun zobrazení (kliknutím a tažením myší).
	Zvětšení části grafu (kliknutím nebo označením výseku grafu).
	Zobrazení celého grafu (kliknutím do grafu).

- Graf – Graf výsledků běhu.

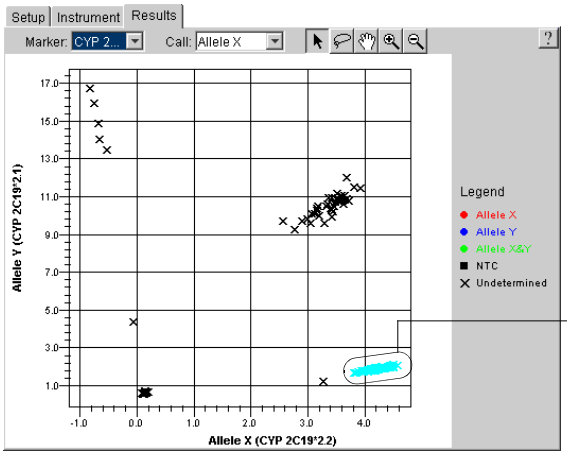
Manuální odečítání alel

1. Zvolte záložku **Results** (Výsledky).
2. Upravte zobrazení grafu alelické diskriminace tak, abyste viděli všechny výsledky (křížky v grafu).
   a. Klikněte na ikonu .
   b. Klikněte na graf.
   c. Klikněte na ikonu .
   d. Zvolte všechny křížky v grafu (kliknutím a tažením kurzoru přes všechny body v grafu).
      Všechny zvolené jamky budou v zobrazení destičky zvýrazněny.
   e. Ověřte, že jsou zvoleny všechny jamky. Pokud ne, opakujte kroky a až d, dokud nezvolíte všechny jamky.



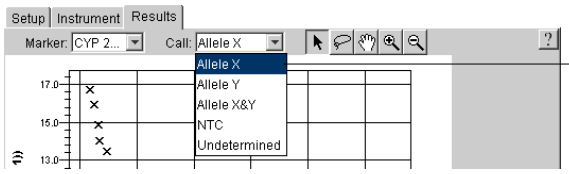
— Černá čára (ohraničuje zvolené jamky)

3. Zvolte klastr vzorků odpovídající první alele.

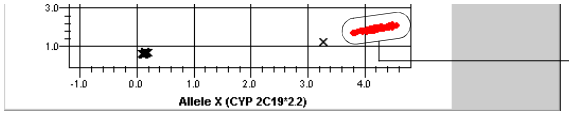


Homozygoti pro alelu X

4. Zvolte **Call** (Odečítání) > **Allele X** (Alela X).



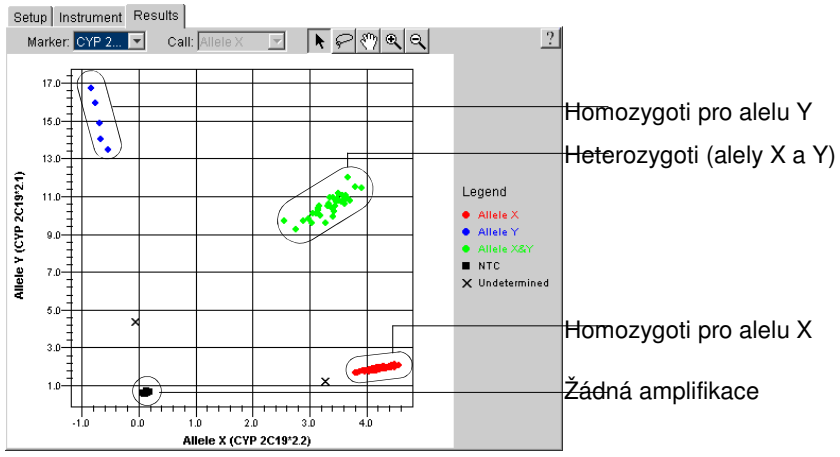
Program automaticky označí vybrané vzorky a jamky jako alelu X.



5. Opakujte kroky 3 a 4 dokud neodečtete o jaké alely se jedná i ve všech zbývajících vzorcích v grafu.

Odečet	Symbol	Definice
Alela X	●	Homozygot pro alelu v příslušné ose grafu.
Alela Y	●	
Obě (Both)	●	Heterozygot (alely X a Y)
NTC	■	Netemplátová kontrola
Undetermined (neznámé)	□	Neznámý genotyp (neoznačeno)

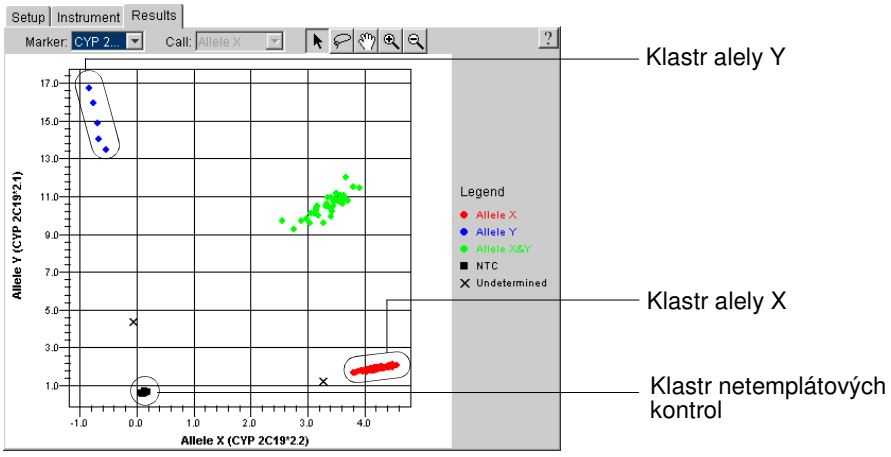
Poznámka: Způsob zobrazení grafu výsledků alelické diskriminace můžete upravit v dialogovém okně Display Settings (Možnosti zobrazení). Více informací naleznete v nápovědě.



6. Provádíte-li analýzu více markerů:
   a. V rozbalovací nabídce **Marker** zvolte další marker.
   b. Opakujte pro tento marker kroky 2 až 5.
   c. Opakujte kroky a a b dokud neodečtete alely pro všechny markery.

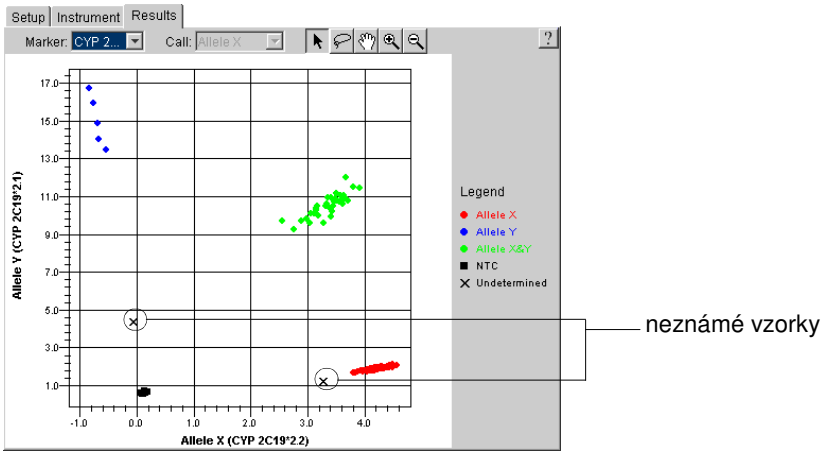
Ověření odečtených alel

1. Ověřte správné odečtení alel v kontrolních vzorcích.
   a. V zobrazení destičky označte všechny netemplátové kontroly. Program označí odpovídající body v grafu.
   b. Ověřte, že body jsou v klastru v očekávaném místě grafu.
   c. Používáte-li pozitivní kontroly, opakujte kroky a a b i pro jamky s pozitivními kontrolami pro alelu X a alelu Y.



2. Vzorky, které nejsou součástí klastrů, označte jako **Undetermined** (neznámé).

   Vzorky, které nejsou součástí klastrů, mohou:
   - Obsahovat málo se vyskytující sekvenční varianty
   - Obsahovat duplikované sekvence
   - Obsahovat kontaminace
   - Být výsledkem chybné přípravy reakce nebo vzorku

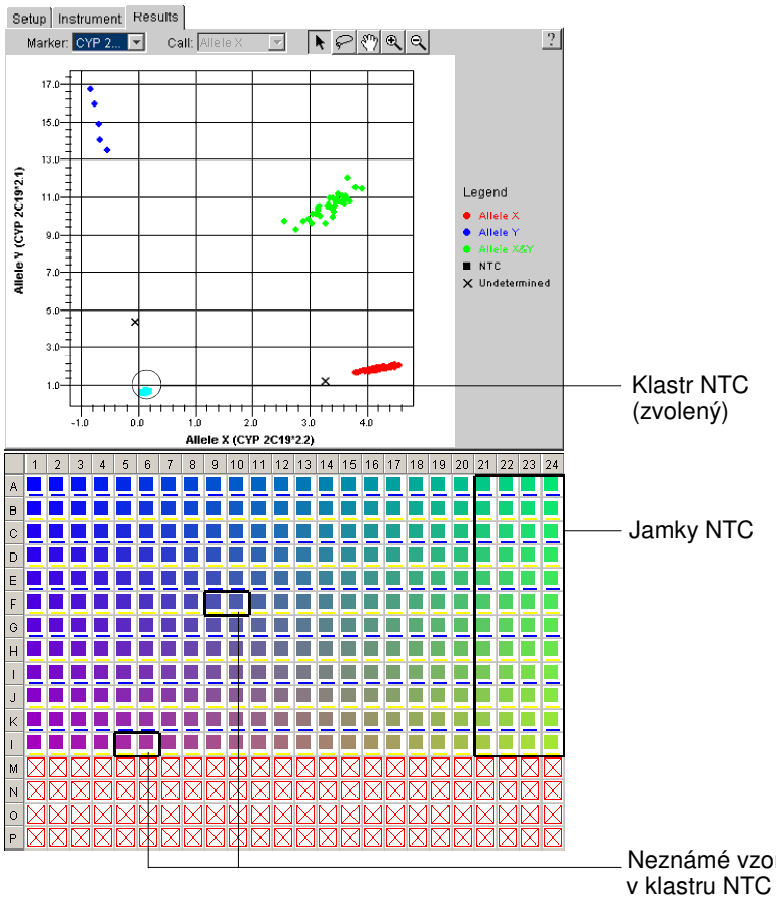


3. Vyhledejte vzorky, které se nepodařilo amplifikovat:
   a. V grafu zvolte klastr netemplátových kontrol.

      Program SDS zvýrazní body v grafu a jamky v zobrazení destičky.

   b. V zobrazení destičky zkontrolujte jamky, které jsou součástí klastru netemplátových kontrol a přitom jsou označeny jako neznámé.

   Vzorky, které jsou součástí klastru netemplátových kontrol (NTC):
   - Neobsahují DNA
   - Obsahují inhibitory PCR
   - Mají homozygotní deleci cílové oblasti



4. Proveďte znovu PCR se vzorky, které nejsou součástí klastru nebo jsou součástí klastru NTC.
5. Provádíte-li analýzu více markerů:
   a. V rozbalovací nabídce **Marker** zvolte další marker.
   b. Opakujte pro tento marker kroky 1 až 4.
   c. Opakujte kroky a a b dokud neověříte odečet alel pro všechny markery.

Po skončení analýzy

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro ukládání výsledků analýzy do databáze práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Volba dalších kroků

Po ukončení analýzy jsou k dispozici následující možnosti:

Úprava zobrazení výsledků ..... (viz níže)
Tisk zprávy ..... (viz níže)
Export dokumentu destičky ..... (viz níže)
Uložení výsledků 5-19

Úprava zobrazení výsledků

Před vytištěním nebo exportem výsledků analýzy můžete pozměnit vzhled některých součástí dokumentu destičky včetně tabulky výsledků, zobrazení destičky a většiny grafů (alelická diskriminace, hrubá data a pozadí).

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **View > Display Settings** (Zobrazit > Nastavení zobrazení).
2. V dialogovém okně Display Settings (Nastavení zobrazení) klikněte na ikonu , čímž získáte více informací o možnostech změny zobrazení.

Tisk zprávy

Program SDS umožňuje vytisknout zprávu s výsledky analýzy. Zpráva může obsahovat vybrané součásti dokumentu destičky.

1. Klikněte nebo zvolte **File > Print Report** (Soubor > Tisk zprávy).
2. V dialogovém okně Print Report (Tisk zprávy) klikněte na ikonu , čímž získáte více informací o nastavení a tisku zprávy.

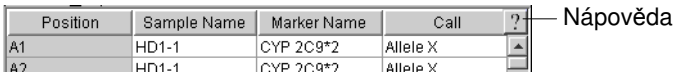
Export dokumentu destičky

Export dokumentu destičky ve formě souboru *.txt

Program SDS umožňuje exportovat hrubá data nebo analyzované výsledky ve formě souboru *.txt (tabelátorem oddělená data), a to pro všechny nebo zvolené jamky dokumentu destičky. Exportovaný soubor je kompatibilní s většinou tabulkových editorů.

Chcete-li exportovat dokument destičky, zvolte jednu z následujících možností:

- Pokračujte částí “Export dokumentu destičky” na straně A-16.
- Klikněte na ikonu v zobrazení tabulky



Export grafů jako obrázků

Program SDS umožňuje export většiny grafů z dokumentu destičky ve formě grafických souborů formátu JPEG (Joint Photographic Experts Group). Formát JPEG je kompatibilní s většinou textových a tabulkových editorů a lze jej použít přímo též v dokumentech typu HTML.

Chcete-li exportovat graf ve formátu JPEG, získáte více informací v části “Export obrázků” na straně A-16 nebo kliknutím na ikonu v příslušném grafu.

Uložení výsledků

Program SDS ukládá výsledky analýzy různými způsoby v závislosti na tom, zda je analýza ukládána do databáze SDS Enterprise (viz níže) nebo do dokumentu destičky (viz strana 5-20).

Uložení výsledků do databáze SDS Enterprise

Používáte-li databázi SDS Enterprise, lze výsledky analýzy uložit jako tzv. seance (session).

DŮLEŽITÉ! Při ukládání do databáze dodržujte následující pokyny:

- Pokud jste jakkoliv upravili informace v dokumentu destičky (vypuštění jamek, změna způsobu zobrazení), musíte uložit dokument destičky do databáze, chcete-li tyto změny zachovat (zvolte **File > Save Plate Document to Database** – Soubor > Uložit dokument do databáze).
- Databáze SDS Enterprise umožňuje dvěma nebo více uživatelům otevírat a upravovat data najednou. Pokud jiný uživatel otevřel, upravil a uložil táž data, která jste právě analyzovali, program tyto úpravy po uložení v databázi přepíše.
- Výsledky analýzy uložené v databázi jsou přímo propojeny s dokumentem destičky, na jehož základě byly vytvořeny. Pokud poté, co jste výsledky analýzy uložili do databáze, upravíte propojený dokument destičky (vypustíte jamky, pozměníte názvy vzorků atp.), výsledky vaší analýzy nemusí být s tímto dokumentem více propojeny. Následně může dojít ke změně výsledků vaší analýzy, pokud tuto analýzu zopakujete, poněvadž jste změnili obsah propojeného dokumentu destičky, v němž jsou uložena hrubá data.

  Společnost Applied Biosystems doporučuje dodržovat při práci s výsledky analýzy následující doporučení:
  - Ukládejte dokument destičky jako nový dokument kdykoliv v jeho zadání provedete nějaké změny (vypuštění jamek, pozměnění názvů vzorků, úprava detektorů nebo markerů atp.)
  - Pro každý uložený dokument ukládejte pouze jedny výsledky analýzy
  - Vezměte na vědomí, že pouze výsledky analýzy uložené po provedení posledních změn v dokumentu destičky odpovídají obsahu tohoto dokumentu.

Chcete-li uložit výsledky do databáze:

1. Zvolte **File > Save Results to Database** (Soubor > Uložit výsledky do databáze).
2. V poli **Description** (Popis) dialogového okna Save Results to Database (Uložit výsledky do databáze) zadejte popis dokumentu destičky (max. 255 znaků).

   Poznámka: Program vám automaticky nabízí možnost uložit výsledky analýzy pod názvem propojeného dokumentu destičky.
3. (Volitelné) V poli **Add to Study** (Přidat ke studii) klikněte na ikonu … a zvolte studii nebo vytvořte novou studii pomocí ikony New... (Nová) a provedením následujících kroků:
   a. V poli **Name** (Název) dialogového okna Create New Study (Vytvořit novou studii) zadejte název studie (max. 128 znaků).
   b. V poli **Description** (Popis) zadejte stručný popis studie (max. 255 znaků).
   c. Klikněte OK.
   d. Klikněte OK.

4. V dialogovém okně Save Results to Database (Uložit výsledky do databáze) klikněte OK.
5. Potvrďte ještě jednou kliknutím OK.

Uložení dokumentu typu *.sds

Ačkoliv program ukládá změny provedené v zobrazení dokumentu destičky a nastavení parametrů analýzy, neukládá odečtené alely.

1. Zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).
2. V poli Look in (Vyhledat) dialogového okna Save As (Uložit jako) vyhledejte a zvolte adresář, do něhož chcete uložit nový soubor.
3. V poli File name (Název souboru):
   - Zadejte název souboru dokumentu destičky, nebo
   - Zadejte nebo naskenujte čárový kód destičky.

   Poznámka: Program SDS nepožaduje, aby název souboru odpovídal čárovému kódu destičky.
4. Klikněte Save (Uložit).

   Program uloží dokument destičky do zvoleného adresáře.

Analýza výsledků Real-Time PCR 6

V této kapitole

Poznámky pro uživatele databáze 6-2
Real-Time PCR experimenty na přístroji 7900HT 6-3
Část 6.1 Absolutní kvantifikace 6-5
Přehled 6-6
Dříve než začnete 6-8
Seznam kroků 6-9
Otevření výsledků běhu 6-10
Analýza výsledků 6-11
Zobrazení výsledků 6-13
Po skončení analýzy 6-14
Část 6.2 Relativní kvantifikace 6-15
Přehled 6-16
Koncepce experimentu 6-20
Začínáme 6-21
Seznam kroků 6-22
Možnosti analýzy výsledků relativní kvantifikace 6-23
Vytvoření studie 6-23
Analýza studie 6-26
Zobrazení výsledků 6-31
Po skončení analýzy 6-35
Část 6.3 Analýza disociační křivky 6-37
Přehled 6-38
Dříve než začnete 6-39
Seznam kroků 6-40
Otevření výsledků běhu 6-41
Analýza výsledků 6-41
Odečtení hodnoty T_m 6-42
Po skončení analýzy 6-44
Část 6.4 Poznámky k analýze 6-45
Nastavení pozadí a prahu 6-46
Odstranění odlehlých bodů 6-49
Po skončení analýzy 6-51

Poznámky pro uživatele databáze

Databáze a výsledky Real-Time PCR

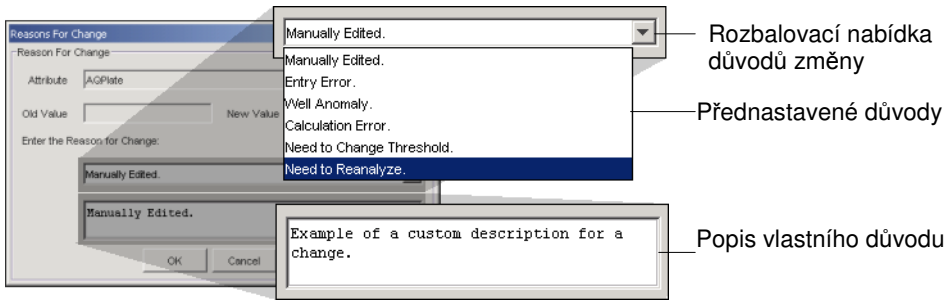
Používáte-li databázi SDS Enterprise pro ukládání dokumentů SDS, studií a dat, je možné, že během analýzy výsledků budete muset provést nějaké dodatečné úkony. Níže jsou tyto úkony popsány (nutnost jejich provedení závisí na tom, jak správce provedl nastavení databáze). Více informací naleznete v případě potřeby v příručce SDS Enterprise Database Administration Guide.

Dialogové okno Reason(s) For Change

Dialogové okno Reason(s) for Change (Důvod/y změny) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje zdůvodnění prováděných kroků (tzv. audit). Systém auditu sleduje vytváření, změny a mazání dat v databázi.

Objeví-li se dialogové okno Reasons for Change, proveďte jeden z následujících kroků:

- Zvolte důvod změny z rozbalovací nabídky a poté klikněte na ikonu OK.
- Zadejte důvod změny do příslušného pole a poté klikněte na ikonu OK.



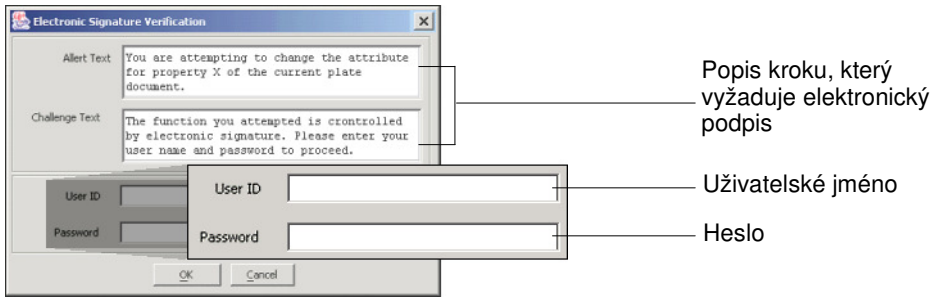
Obrázek 6-1 Dialogové okno Reasons for Change (Důvod/y změny)

Dialogové okno Electronic Signature

Dialogové okno Electronic Signature (Elektronický podpis) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje elektronický podpis. Systém elektronického podpisu omezuje a sleduje přístup uživatelů k datům v databázi.

Objeví-li se toto dialogové okno:

1. Do pole User ID (Jméno) a Password (Heslo) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.
2. Program následně zobrazí zprávu o úspěšném či neúspěšném použití elektronického podpisu. Pro pokračování klikněte OK.



Obrázek 6-2 Dialogové okno Elektronický podpis

Real-Time PCR experimenty na přístroji 7900HT

Real-Time PCR

Termín Real-Time PCR (PCR v reálném čase) se používá v případě těch amplifikačních experimentů, při nichž se na přístroji ABI PRISM® 7900HT provádí měření fluorescence biologického vzorku během teplotního cyklování. Na rozdíl od experimentů typu end-point (s vyhodnocením po skončení běhu) je v experimentech typu Real-Time možné vyhodnocovat výsledky kvalitativně a kvantitativně. Analýzu v reálném čase je možné provádět v kombinaci s reagenciemi typu TaqMan® nebo SYBR® Green 1 za různým účelem včetně kvantitativní PCR a analýzy disociační křivky.

Kvantitativní RT-PCR

Kvantitativní RT-PCR je metoda kvantifikace sekvencí ribonukleové kyseliny izolované ze vzorku biologického původu. V typickém případě se jedná o buňky, tkáně a tělní tekutiny. V průběhu kroku reverzní transkripce (RT) se provede přepis cílové RNA do sekvence komplementární DNA (cDNA). Následuje provedení PCR v níž je počáteční množství cílové cDNA kvantifikováno zmnožením (amplifikací) až na detekovatelnou úroveň. Dva typy kvantitativní RT-PCR, které je možné provádět na přístroji 7900HT, absolutní a relativní kvantifikace, jsou popsány níže.

Absolutní kvantifikace

Cílem absolutní kvantifikace je přesně stanovit absolutní množství cílové nukleové kyseliny v neznámém vzorku. Výsledky absolutní kvantifikace jsou udávány ve stejných jednotkách jako standardy použité pro jejich kvantifikace.

Relativní kvantifikace

Cílem relativní kvantifikace je stanovit množství cílové nukleové kyseliny v neznámém vzorku v poměru k téže sekvenci v kalibrátoru. Relativní kvantifikace exprese cílového genu je vypočítána pomocí dat získaných přístrojem ABI PRISM 7900HT jednou ze dvou níže uvedených metod:

Metoda relativní standardní křivky

Metoda relativní standardní křivky je obdobou standardní křivky v absolutní kvantifikaci. Ale protože cílem metody relativní kvantifikace je poměrná kvantifikace, jsou výsledky vytvořené touto metodou používány odlišně. Pro všechny experimentální vzorky se stanoví množství cílové sekvence na základě standardní křivky a vydělí se množstvím cílové sekvence v kalibrátoru. Jelikož výsledkem je bezjednotkové číslo, není nutné pro stanovení relativního množství cílové nukleové kyseliny znát absolutní množství používaných standardů.

O komparativní C_T metodě

Program SDS počítá relativní hladinu genové exprese pomocí komparativní C_T metody. Tato metoda je podobná metodě standardní křivky s tím rozdílem, že pro dosažení výsledků relativní kvantifikace používá aritmetický vzorec. Nepoužívá standardní křivku, ale počítá relativní genovou expresi pomocí vzorce:

Relativní množství = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Část 6.1 Absolutní kvantifikace

V této části

Přehled 6-6
Dříve než začnete 6-8
Seznam kroků 6-9
Otevření výsledků běhu 6-10
Analýza výsledků 6-11
Zobrazení výsledků 6-13
Po skončení analýzy 6-14

Přehled

O absolutní kvantifikaci

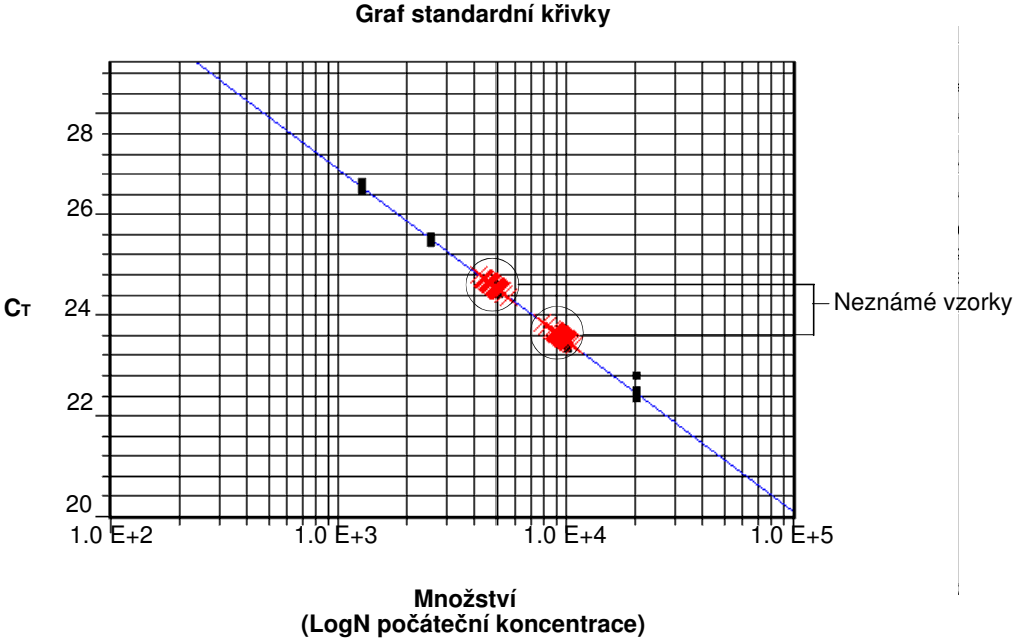
Přístroj ABI PRISM 7900HT umožňuje provádění absolutní kvantifikace nukleových kyselin v reálném čase pomocí metody standardní křivky. Cílem absolutní kvantifikace je přesně stanovit absolutní množství cílové nukleové kyseliny v neznámém vzorku. Výsledky absolutní kvantifikace jsou udávány ve stejných jednotkách jako standardy použité pro kvantifikaci.

5´ nukleázová esej v absolutní kvantifikaci

Provádění absolutní kvantifikace na přístroji 7900HT je umožněno díky fluorogenní 5´ nukleázové eseji (viz strana D-2). Nejprve jsou připraveny standardy, ředěné v rozpětí několika řádů, a neznámé vzorky. Následně jsou standardy i neznámé vzorky pipetovány do optické destičky s mastermixem a reagenciemi TaqMan pro detekci specifické cílové sekvence nukleové kyseliny. Destička se vloží do přístroje 7900HT a provede se běh s měřením fluorescence v reálném čase. Během teplotního cyklování přístroj zaznamenává fluorescenční signál emitovaný v důsledku štěpení sondy TaqMan® v přítomnosti cílové sekvence. Po skončení běhu program SDS zpracuje hrubá data (naměřený fluorescenční signál) a vypočítá prahový cyklus (C_T) pro každý vzorek (viz strana D-9). Následně program propočítá standardní křivku na základě hodnot C_T pro ředěné standardy a na základě této křivky a hodnot C_T neznámých vzorků vypočítá jejich absolutní množství (viz níže).

Poznámka: Více informací o fluorogenní 5´ nukleázové eseji, snímání dat v reálném čase a souvisejících matematických výpočtech naleznete v příloze D “Principy fungování”.

Na obrázku 6-3 je vyobrazena standardní křivka vytvořená pomocí instalační destičky s RNázou P. Uspořádání vzorků a standardů na destičce je vyobrazeno v části “Příklady v této části” na straně 6-8.



Obrázek 6-3 Standardní křivka vytvořená na základě instalační destičky s RNázou P

Matematické zpracování hrubých dat

Program SDS může provést analýzu hrubých dat ihned po ukončení běhu absolutní kvantifikace. Pojmem ‘hrubá data’ je míněn spektrální signál v rozsahu vlnových délek 500 až 660 nm zaznamenaný programem SDS pro jednotlivé jamky destičky. V průběhu analýzy používá program několik matematických algoritmů tak, aby na základě hrubých dat odvodil přímý vztah mezi změnami spekter v neznámých vzorcích.

Multikomponentní algoritmus

Prvním z těchto matematických algoritmů je přepočet hrubých dat, vyjádřených jako závislost intenzity fluorescenčního signálu na vlnové délce, na signál jednotlivých čistých barev, který se provádí pomocí údajů získaných během kalibrace barev (použijí se extrahovaná spektra čistých barev). Jakmile program zjistí jednotlivé barvy, vypočítá jejich příspěvek do celkového naměřeného signálu (hrubá data) pomocí multikomponentního algoritmu.

Nastavení prahu a odečtení hodnot C_T

Po provedení normalizace musí být pro každý běh stanoveny hodnoty pozadí a prahu (více informací viz “Kinetická analýza / Kvantitativní PCR” na straně D-7). Výsledky pokusu lze znázornit pomocí grafu standardní křivky v záložce Results (Výsledky). V grafu jsou znázorněny hodnoty prahového cyklu (C_T) standardů a neznámých vzorků v závislosti na množství.

Dříve než začnete

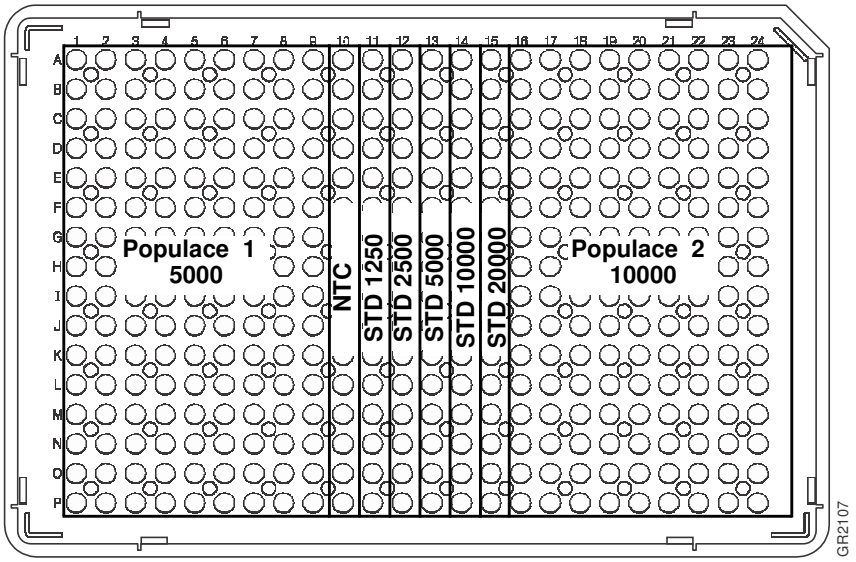
Používání nápovědy

Bližší informace o krocích popsaných v této části naleznete v nápovědě programu SDS. Chcete-li otevřít nápovědu, klikněte na ikonu , která je součástí každého (dialogového) okna, v němž pracujete.

Příklady v této části

Vyobrazení a náhledy, které jsou součástí této kapitoly, byly vytvořeny za použití ověřovací destičky TaqMan® RNáza P, což je destička používaná při instalaci přístroje 7900HT z důvodu ověření jeho funkčnosti. V destičce jsou předpřipraveny reagencie pro detekci a kvantifikaci genomických kopií lidského genu kódujícího RNázu P (gen se vyskytuje v genomu v jediné kopii a kóduje RNA podjednotku enzymu RNáza P). Každá jamka obsahuje reakční směs (1X TaqMan® Universal PCR Master Mix, primery pro RNázu P a sondu značenou barvou FAM™) a templát.

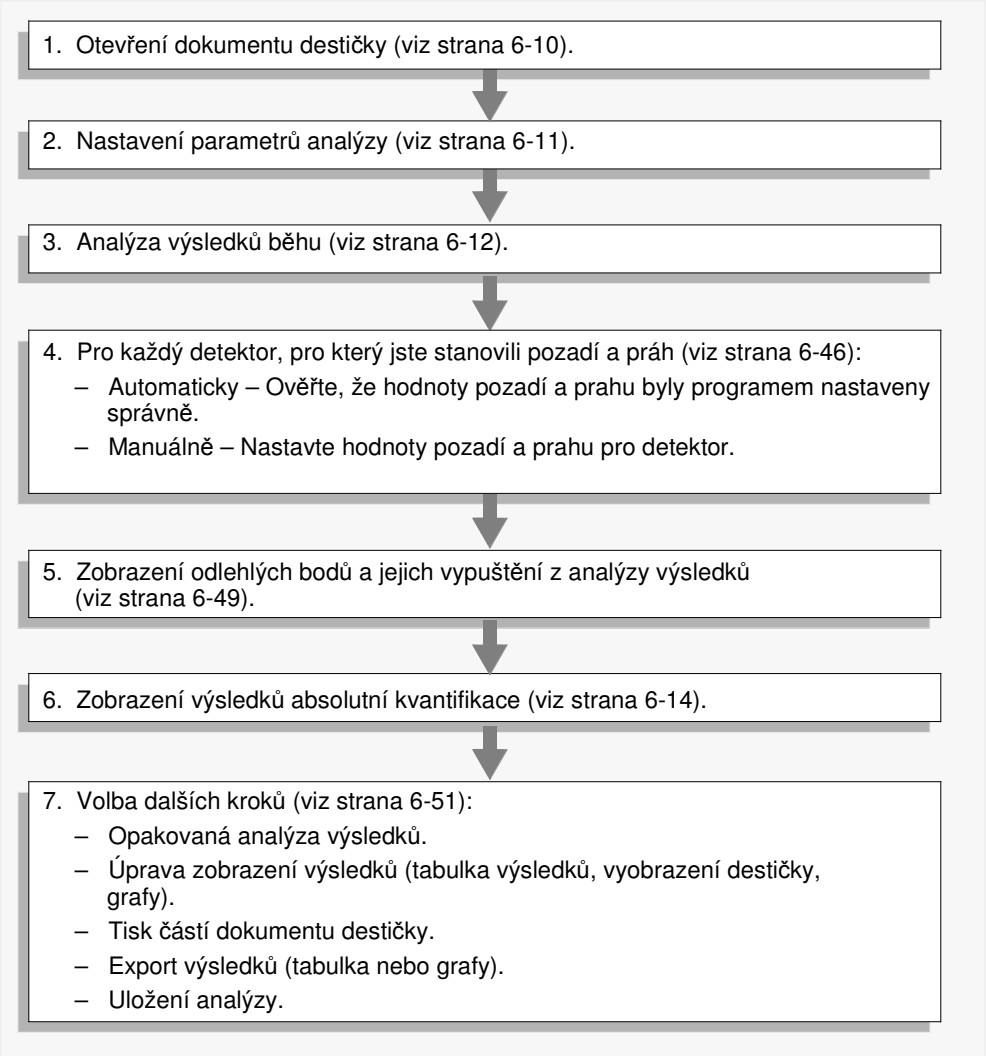
Na obrázku 6-4 je znázorněno uspořádání standardů a vzorků na destičce RNáza P. Jedná se o pět sloupců standardů (1250, 2500, 5000, 10000 a 20000 kopií) a dvě skupiny vzorků (5000 a 10000 kopií).



Obrázek 6-4 Uspořádání vzorků na destičce

Seznam kroků

Postupné kroky



Otevření výsledků běhu

Přístupová práva

Pro otevření výsledků běhu z databáze SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Otevření dokumentu destičky

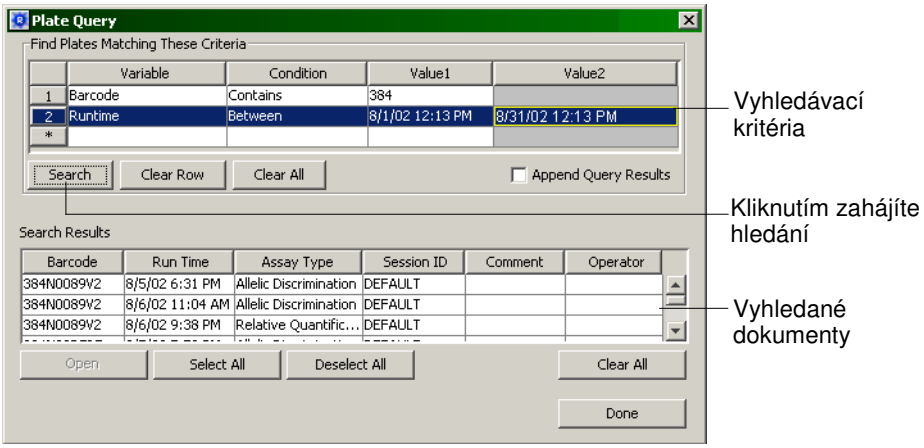
Otevření dokumentu destičky

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
2. V poli **Look in** (Vyhledat) vyhledejte a zvolte příslušný dokument destičky.
3. Klikněte Open (Otevřít).

   Program SDS zobrazí soubor s dokumentem destičky.
4. Nastavte parametry analýzy (Analysis Settings) pro každý detektor podle postupu v části “Nastavení parametrů analýzy” na straně 6-11.

Otevření dokumentu destičky z databáze SDS Enterprise

5. Klikněte nebo zvolte **File > Open Document from Database** (Soubor > Otevřít dokument z databáze).
6. V dialogovém okně Plate Query (Volba destičky) upravte parametry vyhledávání destičky (Find Plates Matching These Criteria) dle potřeby.
7. Klikněte Search (Vyhledat).



8. V seznamu Search Results (Výsledky vyhledávání) zvolte dokument, s nímž chcete pracovat.
9. Klikněte Open (Otevřít).
10. Klikněte Done (Hotovo).
11. Nastavte parametry analýzy (Analysis Settings) pro každý detektor podle postupu v části “Nastavení parametrů analýzy” na straně 6-11.

Analýza výsledků

Přístupová práva

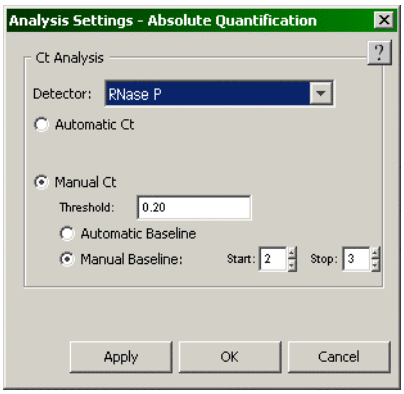
Pro analýzu výsledků absolutní kvantifikace uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Nastavení parametrů analýzy

Před zahájením analýzy je zapotřebí nastavit její parametry, a to pro každý detektor, který chcete analyzovat. Parametry analýzy jsou specifické pro daný detektor a musí být tudíž i nastaveny zvlášť pro každý detektor. Program SDS počítá pro každý detektor pozadí a práh automaticky pomocí algoritmu AutoCT nebo je možné toto nastavení provést ručně.

Poznámka: Analýzu je možné provést aniž nastavíte její parametry, v takovém případě budou použity přednastavené hodnoty – pozadí bude kalkulováno v rozsahu od 3. do 15. cyklu a práh bude mít hodnotu 0.2.

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analysis Settings** (Analýza > Parametry analýzy).
2. V rozbalovací nabídce **Detektor** (Detektor) zvolte detektor.
3. V okně Analysis Settings (Parametry analýzy) zvolte metodu analýzy (automatická nebo manuální), která má být použita pro stanovení pozadí a prahu pro zvolený detektor:



Chcete-li stanovit pozadí a práh:

Automaticky – Zvolte možnost **Automatic CT**.

DŮLEŽITÉ! Zvolíte-li použití algoritmu AutoCT, ověřte po skončení analýzy, že hodnoty pozadí a prahu byly vypočítány správně (podle postupu na straně 6-46).

Poznámka: Více informací o algoritmu AutoCT naleznete v části "Automatické stanovení prahu a pozadí" na straně 6-18.

Manuálně – Proveďte:

a. Zvolte možnost **Manual CT**.

b. V poli Threshold (Práh) zadejte prahovou hodnotu platnou pro zvolený detektor(y) nebo ponechte toto pole prázdné a nastavte práh ručně podle postupu na straně 6-46.

c. Zvolte jednu z možností:

Automatic Baseline (Automatické stanovení pozadí) – program vypočítá pozadí pro zvolený detektor(y) automaticky.

Manual Baseline (Ruční stanovení pozadí) a zadejte do polí **Start** (Začátek) a **End** (Konec) hodnoty pro daný detektor(y).

Manual Baseline (Ruční stanovení pozadí) ponechte pole **Start** a **End** prázdná. (Nastavíte tyto hodnoty ručně podle postupu na straně 6-46.)

4. Je-li toho zapotřebí, opakujte kroky 2 a 3 pro další detektory.

   DŮLEŽITÉ! Parametry analýzy (práh a pozadí) nastavované v kroku 3 na straně 6-11 jsou specifické pro daný detektor a musí být tudíž i nastaveny zvlášť pro každý detektor v dokumentu destičky.

5. Po ukončení klikněte na ikonu OK.

6. Analyzujte výsledky podle postupu níže.

Analýza výsledků

Poté co jste nastavili parametry analýzy můžete analyzovat výsledky běhu. Během analýzy program používá různé matematické algoritmy tak, aby na základě hrubých dat odvodil vztah mezi změnami spektrálních signálů pasivní reference a reportérových barev v jednotlivých vzorcích. Na základě těchto přepočtů pak vypočítá prahový cyklus (C_T) pro každou reakci (standardy a neznámé vzorky). Následně program vynesením hodnot standardních vzorků do grafu závislosti hodnoty C_T na počátečním počtu kopií vytvoří standardní křivku.

Poznámka: Více informací o souvisejících matematických výpočtech naleznete v příloze D “Principy fungování”.

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat). Program SDS provede analýzu dat a zobrazí výsledky v záložce **Results**.

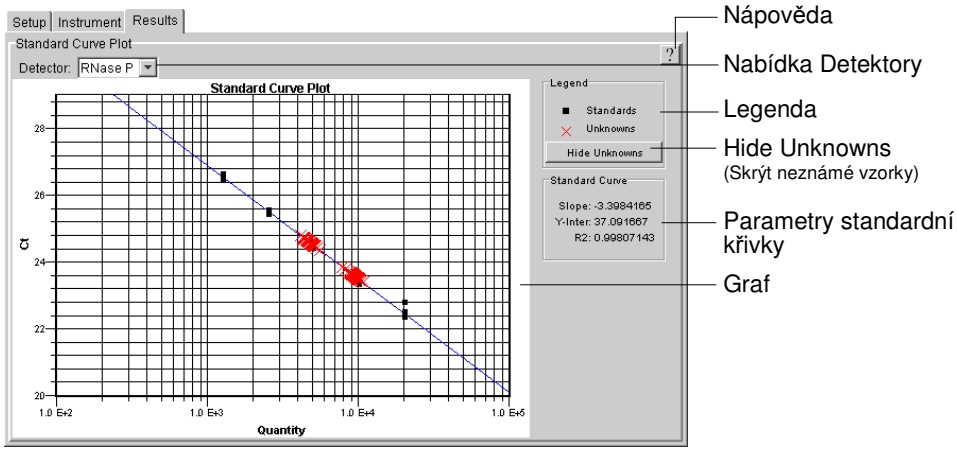
2. Zvolte jednu z možností:
   - Používáte-li pro nastavení pozadí a prahu pro detektory v destičce algoritmus AutoCT, ověřte, že nastavení bylo pro každý detektor provedeno správně – viz postup na straně 6-46,
   - Nastavujete-li pozadí a práh manuálně, nastavte je pro každý detektor podle postupu na straně 6-46.

3. Pokud manuálně odstraňujete odlehlé body, postupujte podle pokynů na straně 6-46.

Zobrazení výsledků

Zobrazení standardní křivky

Program zobrazí vytvořenou standardní křivku v záložce Results (Výsledky) dokumentu destičky. Jedná se o graf závislosti hodnot CT (prahový cyklus) na množství (LogN). Na obrázku 6-5 jsou znázorněny součásti tohoto grafu.



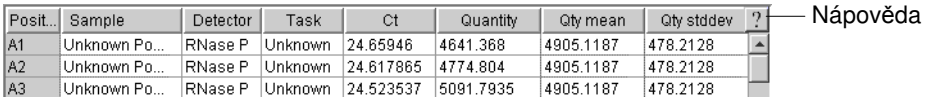
Obrázek 6-5 Součásti grafu standardní křivky

- [?] – Nápověda programu SDS.
- Nabídka **Detektory** – Přepínání údajů zobrazených v grafu podle zvoleného detektoru.
- **Legenda** – Vysvětlení symbolů v grafu.
- **Hide Unknowns** (Skrýt neznámé vzorky) – Vypíná a zapíná zobrazení neznámých vzorku v grafu.
- **Parametry standardní křivky:**
  - **Slope (Sklon)** – Sklon standardní křivky. Ze sklonu standardní křivky se odvozuje efektivita eseje. Má-li reakce 100% efektivitu, bude mít standardní křivka sklon –3.33, jelikož 10-tinásobný rozdíl v koncentracích vede k rozdílu 3.33 v hodnotách CT.
  - **Y-Inter** – Průsečík standardní křivky a osy Y.
  - **R2** – Tento parametr popisuje korelaci mezi hodnotami CT a logaritmicky vyjádřeným množstvím templátu ve standardních vzorcích. Nabývá hodnot v rozsahu od 1 do 0, přičemž hodnoty blízké 1 vyjadřují lepší korelaci mezi hodnotami CT a logaritmicky vyjádřeným množstvím templátu.

  Poznámka: Program počítá druhou mocninu parametru R umocněním tzv. Pearsonova korelačního koeficientu (též známého jako parametr *r*). K výpočtu používá pouze standardní vzorky, které tvoří křivku.
- Graf – Grafické znázornění výsledků absolutní kvantifikace.

Zobrazení tabulky výsledků

Výsledky absolutní kvantifikace se zobrazují v tabulce v dokumentu destičky. Na obrázku 6-6 je příklad takové tabulky s výsledky běhu s ověřovací destičkou RNáza P.



Obrázek 6-6 Tabulka výsledků běhu absolutní kvantifikace

Sloupce v tabulce:

- **Position (Pozice)** – Označení jamky v destičce.
- **Sample (Vzorek)** – Název vzorku v dané jamce.
- **Detector (Detektor)** – Název detektoru použitého v dané jamce.
- **Task (Úloha detektoru)** – Úloha detektoru (**NTC**, **Standard** nebo **Unknown – Neznámý vzorek**) v dané jamce.

  Poznámka: Více informací o úlohách detektorů viz strana 3-14.

- **C**T – Prahový cyklus naměřený v dané jamce v průběhu PCR.

  Poznámka: V tomto sloupci se zobrazí ‘Undetermined’ (Nestanoveno), pokud v dané jamce nedojde k zaznamenatelnému nárůstu fluorescenčního signálu během PCR (fluorescenční signál v dané jamce nikdy nepřekročí práh pro daný detektor).

- **Quantity (Množství)** – V jamkách obsahujících:
  - Neznámé vzorky udává tento sloupec vypočítané množství cílové nukleové kyseliny (templátu) ve stejných jednotkách v jakých jsou definovány standardy.
  - Standardy udává tento sloupec jejich množství.

  Poznámka: Více informací o zadávání množství jednotlivých standardů viz strana 3-15.

Následující dva sloupce obsahují data pouze v případě, byla-li daná jamka analyzována v rámci replikátu.

- **Qty Mean (Průměrné množství)** – Aritmetický průměr množství templátu v dané skupině replikátů.
- **Qty stddev (Standardní odchylka)** – Standardní odchylka množství templátu pro danou jamku.
- **Status (Stav)** – Stav analýzy.

Po skončení analýzy

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro ukládání výsledků analýzy do databáze práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Volba dalších kroků

Úprava zobrazení výsledků 6-51
Tisk zprávy 6-51
Export dokumentu destičky 6-51
Uložení výsledků 6-52

Část 6.2 Relativní kvantifikace

V této části

Přehled 6-16
Koncepce experimentu 6-20
Začínáme 6-21
Seznam kroků 6-22
Možnosti analýzy výsledků relativní kvantifikace 6-23
Vytvoření studie 6-23
Analýza studie 6-26
Zobrazení výsledků 6-31
Po skončení analýzy 6-35

Přehled

Relativní kvantifikace na přístroji 7900HT

Přístroj ABI PRISM 7900HT umožňuje provádění relativní kvantifikace nukleových kyselin v reálném čase pomocí komparativní C_T metody. Tato metoda používá pro výpočet výsledků relativní kvantifikace následující vzorec:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

kde:

$\Delta\Delta C_T$ = Normalizovaný signál vzorku vyjádřený v poměru k normalizovanému signálu kalibrátoru.

Poznámka: Odvození shora uvedeného vzorce je popsáno v příručce *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantification of Gene Expression* (kat. č. 4303859).

Poznámka: Shora zmíněnou normalizací signálu se rozumí signál vytvořený amplifikací cílové sekvence v neznámém vzorku a v kalibrátoru normalizovaný na signál vytvořený amplifikací endogenní kontroly.

Poznámka: Program SDS nepodporuje používání metody relativní standardní křivky.

5´ nukleázová esej v relativní kvantifikaci

Provádění relativní kvantifikace na přístroji 7900HT je umožněno díky fluorogenní 5´ nukleázové eseji. Po pečlivém zvolení endogenní kontroly jsou navrženy sondy a primery pro cílové i kontrolní sekvence. Jakmile je ověřeno fungování esejí, jsou neznámé vzorky pipetovány do optické destičky s mastermixem a reagenciemi TaqMan pro detekci specifické cílové sekvence nukleové kyseliny. Destička se vloží do přístroje 7900HT a provede se běh s měřením fluorescence v reálném čase.

Během teplotního cyklování přístroj zaznamenává fluorescenční signál emitovaný v důsledku štěpení sondy TaqMan® v přítomnosti cílové sekvence. Po skončení běhu program SDS zpracuje hrubá data (naměřený fluorescenční signál) a vypočítá prahový cyklus (C_T) pro každý vzorek. Program SDS následně vypočítá relativní kvantitu genové exprese na základě hodnot C_T kalibrátoru a neznámého vzorku.

Poznámka: Více informací o fluorogenní 5´ nukleázové eseji, snímání dat v reálném čase a souvisejících matematických výpočtech naleznete v příloze D “Principy fungování”.

Matematické zpracování hrubých dat

Program SDS může provést analýzu hrubých dat ihned po ukončení běhu relativní kvantifikace. Pojmem ‘hrubá data’ je míněn spektrální signál v rozsahu vlnových délek 500 až 660 nm zaznamenaný programem SDS pro jednotlivé jamky destičky. V průběhu analýzy používá program několik matematických algoritmů tak, aby na základě hrubých dat odvodil přímý vztah mezi změnami spekter v neznámých vzorcích.

Multikomponentní algoritmus

Prvním z těchto matematických algoritmů je přepočet hrubých dat, vyjádřených jako závislost intenzity fluorescenčního signálu na vlnové délce, na signál jednotlivých čistých barev, který se provádí pomocí údajů získaných během kalibrace barev (použijí se extrahovaná spektra čistých barev). Jakmile program zjistí jednotlivé barvy, vypočítá jejich příspěvek do celkového naměřeného signálu (hrubá data) pomocí multikomponentního algoritmu.

Nastavení prahu a odečtení hodnot C_T

Po provedení normalizace musí být pro každý detektor v rámci studie stanoveny hodnoty pozadí a prahu. Program umožňuje nastavit pozadí a práh manuálně (viz strana 6-49) nebo automaticky (viz strana 6-19). Hodnoty C_T vypočítané na základě pozadí a prahu jsou základem pro výpočet relativní genové exprese.

Odlehlé body

Při každé PCR může dojít k tomu, že v důsledku experimentální chyby dochází v některých jamkách k nedostatečné nebo vůbec žádné amplifikaci. Výsledkem jsou hodnoty C_T, které se výrazně liší od průměru ostatních jamek v rámci skupiny replikátů. Budou-li tyto výsledky zahrnuty do výpočtů, mohou vést k chybným závěrům. Před zahájením analýzy proto musí být každá skupina replikátů pečlivě zkontrolována z hlediska možného výskytu odlehlých bodů. Program umožňuje automatické (viz strana 6-19) nebo manuální (viz strana 6-49) odstranění odlehlých bodů.

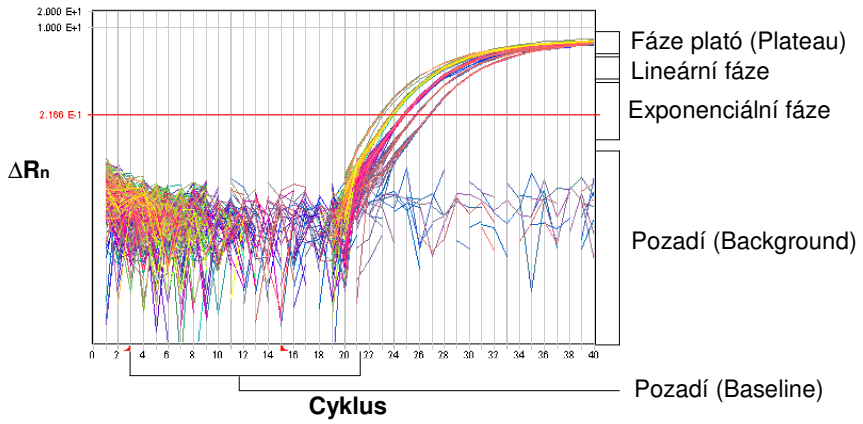
Výpočet relativní genové exprese

Konečným krokem analýzy je výpočet relativní genové exprese na základě hodnot C_T. Algoritmus výpočtu výsledků relativní kvantifikace je stručně popsán na straně D-11. Zevrubný popis odvození vzorce $\Delta\Delta C_T$, matematických operací s výsledky relativní kvantifikace a dalších souvisejících informací o chemizmu 5´ nukleázové reakce naleznete v následujících příručkách:

- Informace o provádění relativní kvantifikace na přístroji 7900HT:
  - *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantification Of Gene Expression* (kat. č. 4303859)
  - *RQ Manager Software User Guide*(kat. č. 4339753)
  - Bibliografické odkazy v této příručce.
- Informace o odvození vzorce $\Delta\Delta C_T$:
  - *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantification Of Gene Expression* (kat. č. 4303859)

Automatické nastavení pozadí a prahu

Součástí programu SDS je algoritmus AutoCT, který umožňuje automatické nastavení pozadí a prahu pro každý detektor. Algoritmus vypočítává pozadí a práh pro každý detektor na základě předpokladu, že výsledkem amplifikace je "typický" průběh křivek – viz obrázek 6-7.



Obrázek 6-7 Typická amplifikační křivka

Experimentální chyby (jako např. kontaminace, chyby při pipetování apod.) mohou vést k výsledkům, které se od typického průběhu amplifikačních křivek výrazně liší. Takové výsledky pak vedou k tomu, že softwarový algoritmus nastaví pozadí a práh pro daný detektor nesprávně. Společnost Applied Biosystems proto doporučuje, abyste po provedení analýzy studie pomocí algoritmu AutoCT provedli kontrolu nastavení pozadí a prahu pro všechny detektory.

Automatické odstranění odlehlých bodů

O odlehlých bodech

Při každé PCR může dojít k tomu, že v důsledku experimentální chyby dochází v některých jamkách k nedostatečné nebo vůbec žádné amplifikaci. Výsledkem jsou hodnoty C_T, které se výrazně liší od průměru ostatních jamek v rámci skupiny replikátů. Budou-li tyto výsledky zahrnuty do výpočtů, mohou vést k chybným závěrům, neboť změní průměrné hodnoty pro skupinu replikátů.

O automatickém odstranění odlehlých bodů

Program SDS je pro studie sestávající ze skupin alespoň tří a více replikátů vybaven algoritmem pro identifikaci a odstranění odlehlých bodů. Program používá statistickou metodu založenou na Grubbsově postupu odstraňování odlehlých bodů (též známém jako Maximum Normalized Residual Test), která umožňuje vyřazení jednoho odlehlého bodu ve skupině nejméně tří replikátů.

Program využívá tento postup podle Grubbse v různých fázích kalkulace $\Delta\Delta C_T$ v závislosti na typu endogenní kontroly používané v rámci studie. Ve studiích typu singleplex dochází k odstranění odlehlých bodů ze skupiny replikátů ihned po výpočtu prahového cyklu (C_T). Ve studiích typu multiplex po výpočtu ΔC_T. Přitom má-li zřejmý odlehlý bod hodnotu C_T lišící se o ne více než 0.25 od průměru dané skupiny replikátů, program jej neodstraní.

Poznámka: Odstranění odlehlých bodů je volitelná možnost, kterou lze aktivovat v dialogovém okně Analysis Settings (Parametry analýzy - viz strana 6-29). Odlehlé body lze rovněž identifikovat a odstranit ručně podle postupu na straně 6-49.

Kromě Grubbsova testu používá program i další algoritmy pro zpracování výsledků. Mají-li vzorky hodnoty C_T rovné nebo vyšší než je maximální počet cyklů, jsou ignorovány (s výjimkou, že těchto hodnot nabývá většina vzorků v rámci dané skupiny replikátů).

Reproducibilita amplifikace

Experimentální reproducibilita hodnot C_T při relativní kvantifikaci klesá, tak jak se snižuje výchozí počet kopií templátu k extrémně nízkým hodnotám (méně než 100 kopií). Výsledky PCR amplifikace nízkého počtu kopií a následné vysoké hodnoty C_T mohou mít výrazně sníženou statistickou reproducibilitu. Chcete-li se vyhnout problémům s reproducibilitou kvantifikace nízce se exprimujících genů, musíte experimentálně stanovit, při jaké koncentraci templátu jsou výsledky ještě reproducibilní, a to pro každou esej (všechny cílové sekvence a endogenní kontrola).

Koncepce experimentu

Endogenní kontrola

Předpokladem provedení všech experimentů typu relativní kvantifikace je vždy amplifikace sekvence endogenní kontroly. V typickém případě je endogenní kontrola cílová sekvence RNA nebo DNA, která má ve všech vzorcích v rámci daného experimentu hladinu genové exprese na statisticky srovnatelné úrovni. Endogenní kontrola je používána pro normalizaci rozdílů v množství celkové RNA přidávané do každé reakce. Příkladem běžně používaných endogenních kontrol jsou GAPDH, 18S rRNA a β-Actin.

Endogenní kontrolu je možné amplifikovat nezávisle na cílové sekvenci v samostatných jamkách destičky (singleplex), nebo v téže jamce jako cílovou kvantifikovanou sekvenci (multiplex).

DŮLEŽITÉ! Pro výpočet standardní odchylky relativního množství cílové sekvence musí každá destička obsahovat minimálně dva replikáty cílové sekvence a endogenní kontroly.

Kalibrátor

Předpokladem provedení všech experimentů typu relativní kvantifikace je vždy definice kalibrátoru. Během analýzy výsledků počítá program SDS genovou expresi ve vzorcích ve vztahu ke genové expresi v kalibrátoru. Kalibrátor je tedy nezbytnou součástí výpočtů, neboť jsou k němu vztahovány výsledky kvantifikace genové exprese.

Kalibrátorem může být:

- Vzorek odebraný v bodě nula nějakého experimentu prováděného v čase
- Vzorek, který nebyl vystaven působení experimentálního zásahu (ve srovnání se vzorkem, který takovému působení vystaven byl)

Poznámka: Program SDS vždy bere v úvahu všechny výsledky kalibrátoru v rámci skupiny replikátů, ať již jsou replikáty umístěny na jedné nebo více destičkách.

Replikáty

Při provádění relativní kvantifikace doporučuje společnost Applied Biosystems používání tří nebo více replikátů pro každý vzorek, aby výsledky byly statisticky signifikantní.

Replikáty vám umožňují:

- **Získat výsledky i v případě selhání amplifikace v některé jamce –** Nedojde-li v některé z jamek k amplifikaci, je možné získat výsledky, byla-li tato jamka součástí skupiny replikátů. Zejména v případě endogenních kontrol je to zvlášť důležité, neboť při selhání jejich amplifikace mohou být k nepoužití všechny výsledky v dané destičce.
- **Odstranit odlehlé body –** Používání replikátů umožňuje zobrazení a odstranění odlehlých bodů.
- **Zajistit reprodukovatelnost výsledků –** V obecném slova smyslu umožňuje používání replikátů dosáhnout vyšší stupeň reprodukovatelnosti prováděného pokusu, neboť umožňuje identifikovat a odstranit výsledky vzniklé v důsledku experimentální chyby (jako je kontaminace, pipetovací chyby apod.).

Začínáme

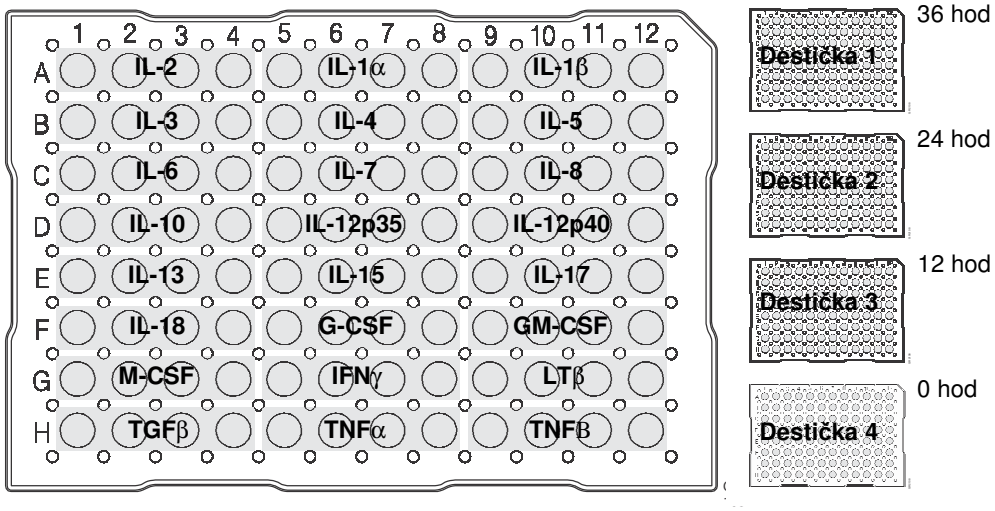
Používání nápovědy

Bližší informace o krocích popsaných v této části naleznete v nápovědě programu SDS. Chcete-li otevřít nápovědu, klikněte na ikonu , která je součástí každého (dialogového) okna, v němž pracujete.

Příklady v této části

Vyobrazení a náhledy, které jsou součástí této kapitoly, byly vytvořeny za použití destiček TaqMan® Cytokine Gene Expression Plates (kat.č. 4304671), které slouží k *in vitro* kvantifikaci (v reálném čase) genové exprese lidských genů pro cytokiny. Jedna destička umožňuje kvantifikovat expresi 24 genů pro cytokiny a endogenní kontrolu za použití vzorků komplementární DNA (cDNA). Destička TaqMan Cytokine Gene Expression Plate I je vlastně optická 96-ti jamková destička v níž je 24 skupin replikátů, v každé skupině sondy TaqMan a primery pro kvantifikaci mRNA jednoho lidského cytokinového genu a endogenní kontroly. Na obrázku 6-8 je vyobrazeno uspořádání jednotlivých esejí v destičce.

Studie použitá pro vytvoření náhledů, které jsou v této části, sestávala ze čtyř destiček, které byly použity ke kvantifikaci genové exprese 24 cílových genů během 36-tihodinového intervalu.

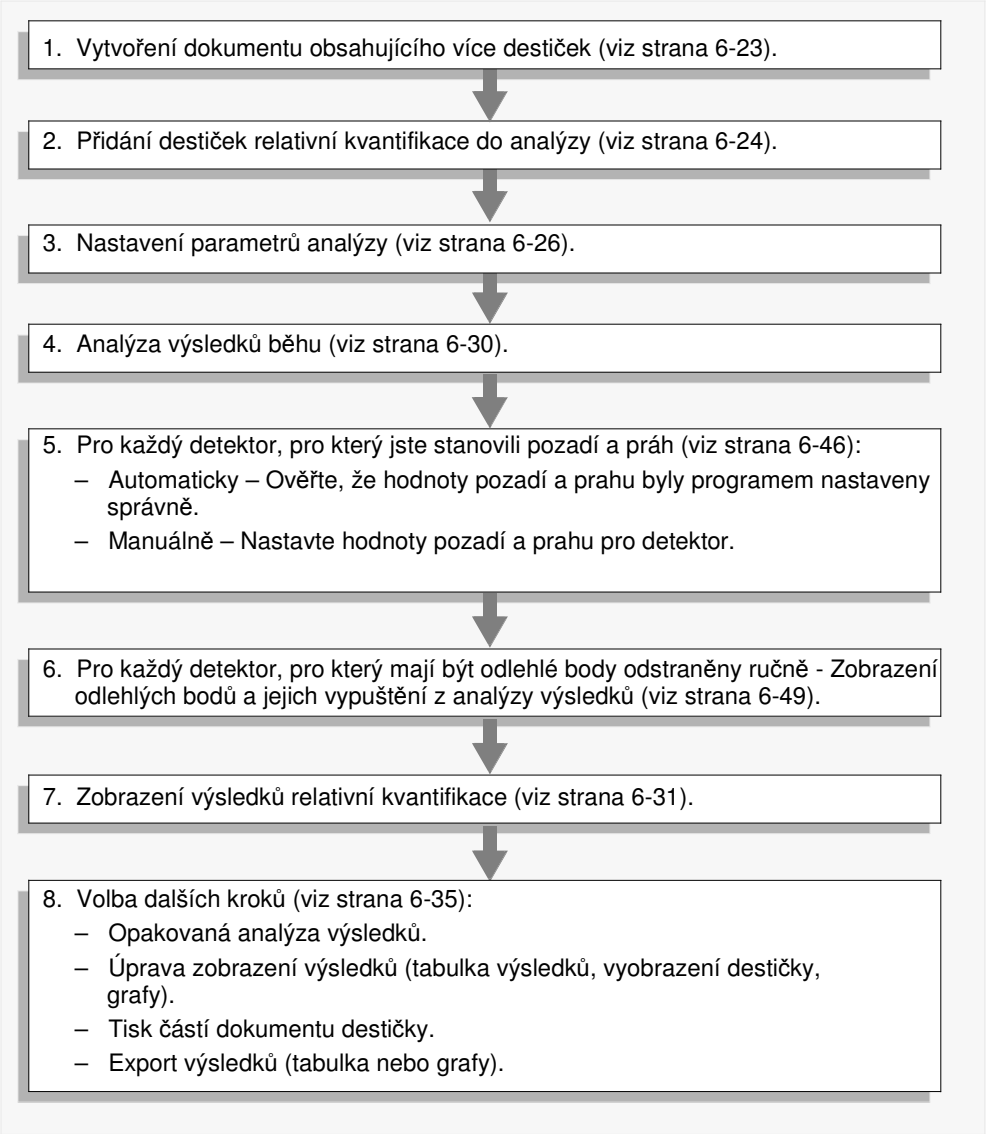


Obrázek 6-8 Uspořádání vzorků na destičkách

Poznámka: Více informací o použité destičce naleznete v příručce *TaqMan Cytokine Gene Expression Plate I Protocol* (kat. č. 4306744).

Seznam kroků

Postupné kroky



Možnosti analýzy výsledků relativní kvantifikace

Společnost Applied Biosystems nabízí dva způsoby jak analyzovat výsledky relativní kvantifikace.

Dokumenty obsahující více destiček (pro nízký počet vzorků)

Pro analýzu výsledků relativní kvantifikace používá program SDS odlišný typ dokumentu destičky, tzv. násobný dokument (ABI PRISM SDS Multiplate Document, *.sdm). Tento dokument umožňuje analýzu výsledků získaných použitím ne více než 10 destiček. Narozdíl od jednotlivých dokumentů destičky umožňuje tento typ dokumentu ukládat nastavení a výsledky analýzy. Bez ohledu na to zda analyzujete výsledky získané za použití jedné nebo více destiček, musíte pro provedení analýzy vytvořit tento násobný typ dokumentu.

Poznámka: Program SDS umožňuje otevřít jednotlivé dokumenty destičky pro relativní kvantifikaci, ale nelze je jako takové použít pro výpočet relativní genové exprese.

Program RQ Manager (pro střední až vysoký počet vzorků)

Program RQ Manager je samostatný software pro provádění analýzy relativní kvantifikace se středním až vysokým počtem vzorků na základě výsledků uložených v databázi SDS Enterprise. Umožňuje srovnávací analýzu až 97 detektorů (96 cílových sekvencí a 1 endogenní kontrola) na 200 destičkách, nebo přibližně 153600 multiplexních reakcí provedených na přístroji ABI PRISM 7900HT. Více informací naleznete v příručce *SDS RQ Manager User Guide* (kat. č. 4339753).

Vytvoření studie

Vytvoření dokumentu obsahujícího více destiček

Chcete-li provést srovnávací analýzu několika destiček v rámci studie, musíte nejprve vytvořit dokument (studii relativní kvantifikace) obsahující více destiček.

1. V programu SDS klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
2. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) nastavte:
   - **Assay** (Esej) – Relative Quantification ($\Delta\Delta C_T$) Study (Studie relativní kvantifikace)
   - **Container** (Destička) – zvolte typ používané destičky.

   DŮLEŽITÉ! V rámci studie relativní kvantifikace nemůžete porovnávat výsledky z běhů provedených za použití různých typů destiček (např. vzorky analyzované na 96-ti jamkové destičce nelze porovnávat se vzorky analyzovanými na 384-jamkové destičce).
3. Klikněte OK. Program zobrazí nový dokument.
4. Přidejte do studie relativní kvantifikace dokumenty destiček podle postupu na straně 6-24.

Přidání dokumentů destiček do studie

Chcete-li provést srovnávací analýzu několika destiček v rámci studie, musíte nejprve přidat destičky do násobného dokumentu destiček.

Dokumenty destiček přidané do studie musí:

- Mít tentýž formát (nemůžete porovnávat výsledky z běhů provedených za použití různých typů destiček)
- Být připraveny za týchž podmínek (stejný teplotní profil, objem vzorku a nastavení sběru dat)
- Mít pojmenované vzorky ve všech používaných jamkách. (Pokud dokument destičky neobsahuje názvy vzorků, můžete je zadat pomocí programu SDS.)

DŮLEŽITÉ! V průběhu analýzy nebudou analyzovány nepojmenované vzorky.

DŮLEŽITÉ! V rámci studie relativní kvantifikace nemůžete porovnávat výsledky z běhů provedených za použití různých typů destiček (např. vzorky analyzované na 96-ti jamkové destičce nelze porovnávat se vzorky analyzovanými na 384-jamkové destičce).

Chcete-li přidat destičky do násobného dokumentu relativní kvantifikace:

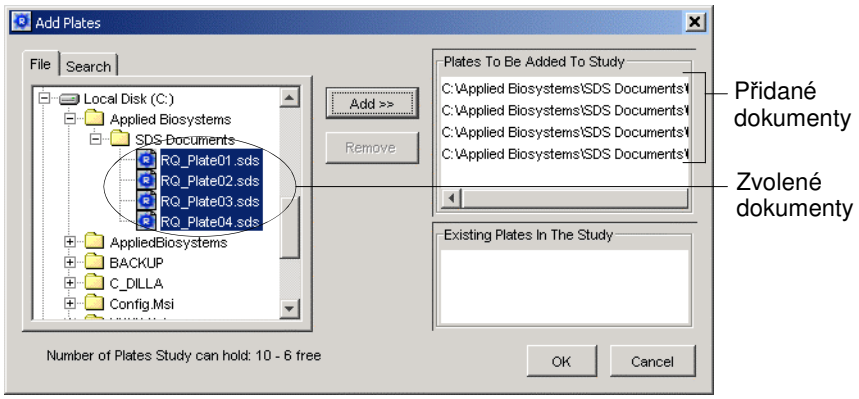
1. V násobném dokumentu klikněte Add Plate(s).. (Přidat destičku/y).
2. V dialogovém okně Add (Přidat) proveďte:

   Víte-li, kde jsou dokumenty destiček uloženy:

   a. Zvolte záložku **File** (Soubor).

   b. Vyhledejte adresář obsahující dokumenty destiček.

   c. Za současného stisku klávesy **Ctrl** zvolte vybrané soubory, poté klikněte Add (Přidat).



   Nevíte-li, kde jsou dokumenty destiček uloženy nebo chcete vyhledat specifický dokument/y destičky:

   a. Zvolte záložku **Search** (Hledat).

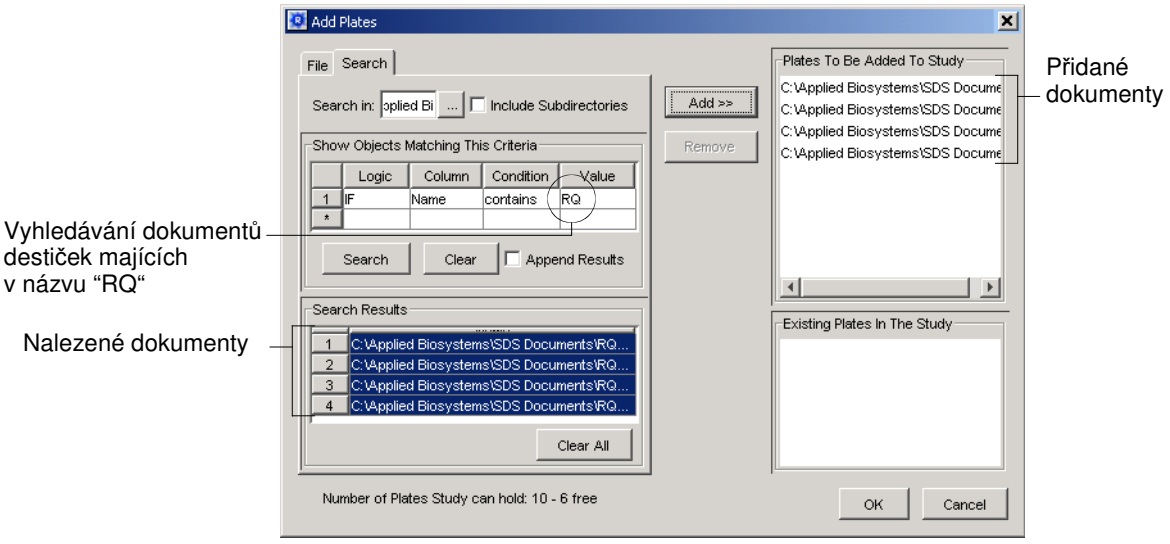
   b. V poli **Search in** (Hledat v) zadejte adresář, který chcete prohledávat nebo klikněte a zvolte umístění (adresář nebo pevný disk), které chcete prohledávat.

   c. Chcete-li prohledat všechny podadresáře, zvolte **Include Subdirectories** (Včetně podadresářů).

d. V dialogovém okně Plate Query (Vyhledání destičky) nastavte parametry vyhledávání (**Find Plates Matching These Criteria**).

e. Klikněte Search (Hledat).

f. V seznamu Search Results (Výsledky vyhledávání) zvolte za současného stisku klávesy **Ctrl** dokumenty, které chcete použít, a poté klikněte Add (Přidat).



Poznámka: Více informací o vyhledávání dokumentů destiček naleznete v části "Vyhledávání destiček" na straně A-20.

3. Chcete-li přidat do studie další destičky, opakujte krok 2 (můžete přidat max. 10 destiček).

   Poznámka: Destičky můžete ze studie odstranit tak, že zvolíte příslušný dokument a kliknete Remove (Odstranit).

4. Po skončení přidávání destiček klikněte OK.

5. Nastavte parametry analýzy pro danou studii podle postupu na straně 6-26.

Analýza studie

Přístupová práva

Pro analýzu výsledků relativní kvantifikace uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Nastavení parametrů analýzy

Před zahájením analýzy studie je zapotřebí nastavit její parametry, a to pro každý detektor, který chcete analyzovat. Parametry analýzy jsou specifické pro daný detektor a musí být tudíž i nastaveny zvlášť pro každý detektor. Níže jsou stručně popsány možnosti nastavení parametrů analýzy:

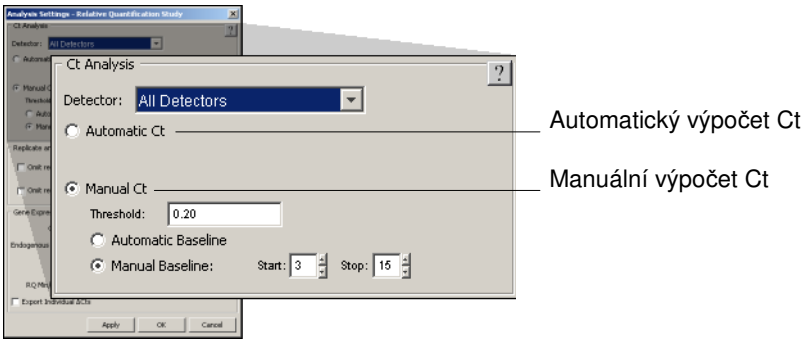
- O parametrech analýzy (viz níže)
- Nastavení parametrů analýzy (viz strana 6-29)

Poznámka: Analýzu je možné provést aniž nastavíte její parametry, v takovém případě budou použity přednastavené hodnoty – pozadí bude kalkulováno v rozsahu od 3. do 15. cyklu a práh bude mít hodnotu 0.2.

O parametrech analýzy

Nastavení pro zvolený detektor

Tato nastavení definují, jakým způsobem program SDS počítá hodnoty C_T skupin replikátů pro *zvolený* detektor z rozbalovací nabídky Detector. Jak je znázorněno na obrázku 6-9, je možné zvolit jak automatický tak manuální způsob stanovení pozadí a prahu.



Obrázek 6-9 Nastavení pro zvolený detektor

- **Automatic C_T** (Automatický výpočet C_T) – Program stanoví rozsah cyklů pro výpočet pozadí a práh (pro zvolený detektor) pomocí algoritmu AutoC$_T$ (viz strana 6-18).

  DŮLEŽITÉ! Zvolíte-li použití algoritmu AutoC$_T$, ověřte po skončení analýzy, že hodnoty pozadí a prahu byly vypočítány správně (podle postupu na straně 6-46).

- **Manual CT** (Manuální výpočet CT) – Program použije pro výpočet hodnot CT pozadí a práh (pro zvolený detektor) specifikované v dialogovém okně Analysis Settings (Parametry analýzy).

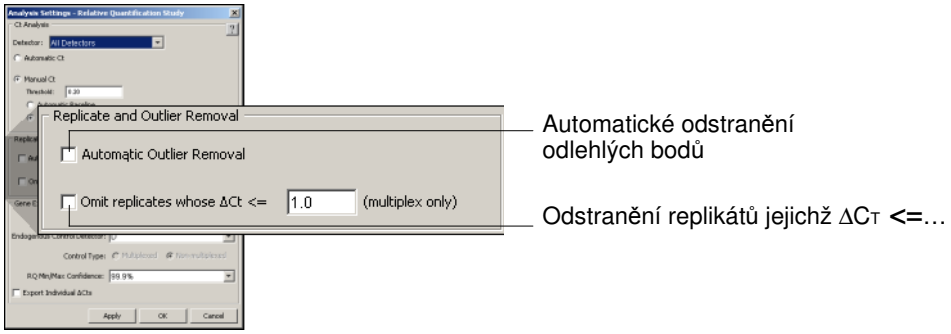
  Program nabízí dvě možnosti jak manuálně nastavit pozadí a práh pro daný detektor:

  – Znáte-li hodnoty, které chcete použít, zadejte je do odpovídajících polí v dialogovém okně Analysis Settings (Parametry analýzy).

  – Chcete-li nastavit pozadí a práh pomocí nástrojů v záložce Amplification Plot (Amplifikační graf), ponechte tato pole prázdná a nastavte tyto hodnoty ručně podle postupu na straně 6-46.

Odstranění vybraných replikátů a odlehlých bodů ze studie

Tato nastavení definují, jakým způsobem program identifikuje a odstraní odlehlé body pro *všechny* detektory ve studii.



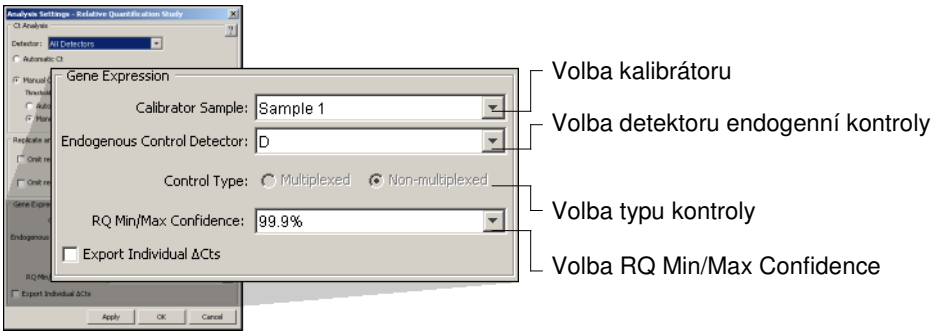
Obrázek 6-10 Odstranění vybraných replikátů a odlehlých bodů ze studie

- **Automatic Outlier Removal** (Automatické odstranění odlehlých bodů) – Program pomocí speciálního algoritmu automaticky odstraní ze studie odlehlé body. Více informací o tomto algoritmu viz “Automatické odstranění odlehlých bodů” na straně 6-19.
- **Omit replicates whose** (Odstranění replikátů jejichž) ΔCT **<=…** – Program automaticky odstraní ze studie všechny jamky, jejichž hodnota ΔCT je menší nebo rovna zadané hodnotě. Tato možnost je k dispozici pouze u experimentů typu multiplex, kde obdobné hodnoty CT pro cílový gen a endogenní kontrolu mohou znamenat vzájemnou kompetici v rámci eseje a její vliv na amplifikaci.

Poznámka: Identifikaci a odstranění odlehlých bodů je možné provést i manuálně podle postupu na straně 6-49.

Nastavení dalších parametrů studie

Tato nastavení definují níže uvedené parametry. Jejich nastavení má pro vyhodnocení výsledků zásadní význam a používá se v rámci celé studie.



Obrázek 6-11 Nastavení parametrů pro vyhodnocení genové exprese v rámci studie

- **Calibrator Sample** (Kalibrátor) – Zobrazí název vzorku používaného v rámci studie jako kalibrátor.
- **Endogenous Control Detector** (Detektor endogenní kontroly) – Zobrazí název detektoru, který program používá jako endogenní kontrolu v rámci studie.
- **Control Type** (Typ kontroly) – Možnosti Multiplexed/Non-Multiplexed (multiplexní / singleplexní reakce) – udává, jak program zpracuje výsledky z jamek označených jako endogenní kontrola.
- **RQ Min/Max Confidence** – Definuje hladinu významnosti, kterou program použije pro výpočet standardní chyby průměru hladiny genové exprese (hodnoty RQMax a RQMin) pro vzorky v rámci studie.
- **Export Individual** ΔC_T**s** (Export jednotlivých hodnot ΔC_T) – Je-li tato možnost zvolena, program bude exportovat hodnoty ΔC_T jednotlivých vzorků (namísto průměrných hodnot ΔC_T pro skupinu replikátů).

Nastavení parametrů analýzy

Nastavení parametrů analýzy

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analysis Settings** (Analýza > Parametry analýzy).
2. V rozbalovací nabídce **Detector** (Detektor) zvolte:
   - *detector name (název detektoru)* – Abyste nastavili parametry analýzy pro tento detektor.
   - **All Detectors** (všechny detektory) – Abyste nastavili parametry analýzy pro všechny detektory najednou.
3. V dialogovém okně Analysis Settings (Parametry analýzy) definujte způsob (automatický nebo manuální) výpočtu pozadí a prahu pro zvolené detektory:

   Chcete-li stanovit pozadí a práh:

   Automaticky – Zvolte možnost **Automatic CT**. (Více informací o algoritmu Automatic Ct viz strana.)

   DŮLEŽITÉ! Zvolíte-li použití algoritmu AutoCT, ověřte po skončení analýzy, že hodnoty pozadí a prahu byly vypočítány správně (podle postupu na straně 6-46).

   Manuálně – Proveďte:

   a. Zvolte možnost **Manual CT**.

   b. V poli Threshold (Práh) zadejte prahovou hodnotu platnou pro zvolený detektor(y) nebo ponechte toto pole prázdné a nastavte práh ručně podle postupu na straně 6-46.

   c. Zvolte jednu z možností:

      Automatic Baseline (Automatické stanovení pozadí) – program vypočítá pozadí pro zvolený detektor(y) automaticky.

      Manual Baseline (Ruční stanovení pozadí) a zadejte do polí **Start** (Začátek) a **End** (Konec) hodnoty pro daný detektor(y).

      Manual Baseline (Ruční stanovení pozadí) ponechte pole **Start** a **End** prázdná. (Nastavíte tyto hodnoty ručně podle postupu na straně 6-46.)

4. Je-li toho zapotřebí, opakujte kroky 2 a 3 pro další detektory.

   DŮLEŽITÉ! Parametry analýzy (práh a pozadí) nastavované v kroku 3 jsou specifické pro daný detektor a musí být tudíž i nastaveny zvlášť pro každý detektor v dokumentu destičky.

5. Počítáte-li výsledky pro dva nebo více replikátů pro vzorek, zvolte nebo naopak neoznačujte možnost **Automatic Outlier Removal** (Automatické odstranění odlehlých bodů).
6. Pokud chcete, zvolte možnost **Omit Samples Whose** (Odstranění replikátů jejichž) ΔC_T **<=**, následně zadejte příslušnou hodnotu. Více informací naleznete v části "Odstranění vybraných replikátů a odlehlých bodů ze studie" na straně 6-27.
7. V rozbalovací nabídce **Calibrator Sample** (Kalibrátor) zvolte vzorek, který chcete používat jako kalibrátor.

8. V rozbalovací nabídce **Endogenous Control Detector** (Detektor endogenní kontroly) zvolte detektor, který reprezentuje endogenní kontrolu používanou v rámci vaší studie.

   DŮLEŽITÉ! Detektor používaný jako endogenní kontrola musí být součástí všech dokumentů v rámci studie.

9. Zvolte možnost **Multiplexed** nebo **Non-Multiplexed** (multiplexní / singleplexní reakce), abyste definovali typ používané endogenní kontroly.

   Poznámka: Možnosti Multiplexed nebo Non-Multiplexed jsou k dispozici pouze pokud analyzované dokumenty obsahují *jak* multiplexní tak singleplexní reakce.

10. V rozbalovací nabídce **RQ Min\Max Confidence** zvolte hladinu významnosti, kterou má program použít pro výpočet standardní chyby průměrné genové exprese (pro zobrazení přesnosti odhadu populačního průměru).

11. Pokud chcete, zvolte možnost **Export Individual ΔC_T** (Export jednotlivých hodnot ΔC_T). Je-li tato možnost zvolena, program SDS zobrazí hodnoty to display the ΔC_T pro jednotlivé vzorky z příslušné skupiny replikátů. Není-li tato možnost zvolena, program zobrazí průměrné hodnoty ΔC_T skupiny replikátů.

12. Klikněte OK, čímž potvrdíte nastavení parametrů analýzy.

13. Analyzujte výsledky podle postupu na straně 6-30.

Analýza studie

Analýza výsledků

Během analýzy program používá různé matematické algoritmy tak, aby na základě hrubých dat odvodil vztah mezi změnami spektrálních signálů pasivní reference a reportérových barev v jednotlivých vzorcích. Na základě těchto přepočtů pak vypočítá prahový cyklus (C_T) pro každou reakci (endogenní kontrola a neznámé vzorky).

Poznámka: Více informací o souvisejících matematických výpočtech naleznete v příloze D “Principy fungování”.

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat). Program SDS provede analýzu dat a zobrazí výsledky v záložce **Results**.

2. Zvolte jednu z možností:
   - Nastavujete-li pozadí a práh manuálně, nastavte je pro každý detektor podle postupu na straně 6-46.
   - Používáte-li pro nastavení pozadí a prahu pro detektory v destičce algoritmus AutoC_T, ověřte, že nastavení bylo pro každý detektor provedeno správně – viz postup na straně 6-46.

3. Pokud manuálně odstraňujete odlehlé body, postupujte podle pokynů na straně 6-46.

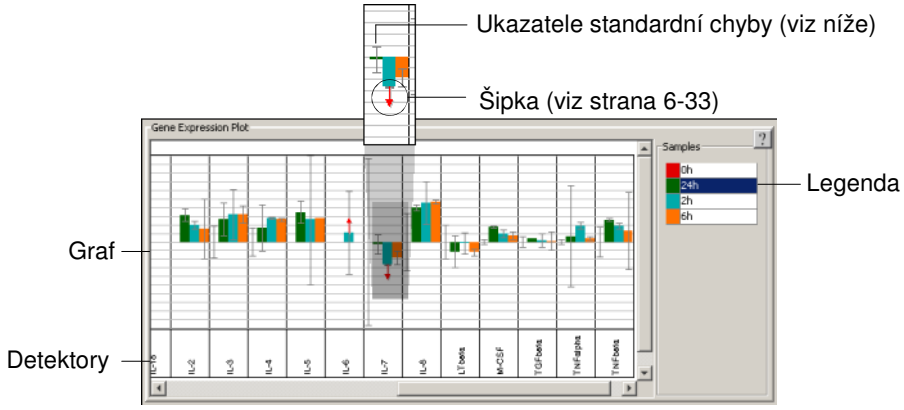
Zobrazení výsledků

Zobrazení analyzovaných dat

Graf genové exprese zobrazuje výsledky pro detektor(y) zvolený z rozbalovací nabídky Detectors. Program SDS vám umožňuje v grafu genové exprese omezit zobrazení detektoru a destičky pomocí tabulek Plates (Destičky) a Targets (Cílové geny) v panelu Plate List (Seznam destiček). Program zobrazí výsledky pouze pro zvolené cílové geny a destičky.

O grafu genové exprese

Program SDS zobrazuje v grafu genové exprese výsledky relativní kvantifikace ($\Delta\Delta C_T$). Graf je v horní části násobného dokumentu. Na obrázku 6-12 jsou znázorněny důležité součásti grafu.



Obrázek 6-12 Součásti grafu genové exprese

- Osa X – Seznam všech kvantifikovaných genů. Program pro každý cílový gen zobrazí relativní expresi genu v konkrétním vzorku.
- Osa Y – Výsledky výpočtu relativní kvantifikace jsou seskupeny podle cílového kvantifikovaného genu a vyjádřeny v logaritmické škále. Hladina genové exprese je vypočítána a znázorněna relativně vůči hladině exprese v kalibrátoru a každý přírůstek odpovídá 10-tinásobné změně genové exprese.

O hladině genové exprese

Program SDS zobrazuje výsledky relativní kvantifikace v logaritmické škále, kde každý přírůstek odpovídá 10-tinásobné změně genové exprese. Hladina genové exprese je vypočítána a znázorněna relativně vůči hladině exprese v kalibrátoru (zvoleném v rozbalovací nabídce Calibrator).

Poznámka: Jelikož kalibrátor je porovnáván sám se sebou, je jeho hladina genové exprese vždy 1 (1E+00).

V tabulce 6-1 na straně 6-32 jsou uvedeny různé možnosti vyjádření hladiny genové exprese pro skupinu replikátů, které mohou nastat. Stínované řádky tabulky označují kombinace výsledků, pro které program není schopen vypočítat přesnou úroveň genové exprese.

Poznámka: Minimální (↑) a maximální (↓) možná hladina genové exprese jsou detailně popsány na straně 6-33.

Tabulka 6-1 Hladina genové exprese

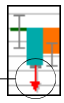
Detektor	ΔC_T vzorku		Hladina exprese je	Příklad (40 cyklů amplifikace)		
	Kalibrátor	Neznámý vzorek		Kalib. ΔC_T	Nezn. ΔC_T	Výsledek
Target	<a	<	Zobrazena	25	32	• RQ se zobrazí
Endo	<	<		33	35	• USC se zobrazí
Target	Maxb	<	Minimum možného	—b	34	• RQ se zobrazí
Endo	<	<	(zobrazí se ↑)	35	30	• USC zobrazí ↑
Target	<	Max	Maximum možného	33	—	• RQ se zobrazí
Endo	<	<	(zobrazí se ↓)	33	33	• USC zobrazí ↓
Target	Max	Max	Nestanoveno	—	—	• RQ se nevypočítá • USC se nezobrazí
Endo	Max	Max	(nezobrazí se)	—	—	
Target	<	Max	Nestanoveno	30	—	
Endo	Max	Max	(nezobrazí se)	—	—	
Target	Max	<	Nestanoveno	—	30	
Endo	Max	Max	(nezobrazí se)	—	—	
Target	Max	Max	Nestanoveno	—	—	
Endo	Max	<	(nezobrazí se)	—	30	
Target	Max	Max	Nestanoveno	—	—	
Endo	<	Max	(nezobrazí se)	30	—	
Target	<	<	Nestanoveno	30	20	
Endo	Max	Max	(nezobrazí se)	—	—	
Target	<	Max	Nestanoveno	35	—	
Endo	Max	<	(nezobrazí se)	—	33	
Target	<	Max	Nestanoveno	30	—	
Endo	<	Max	(nezobrazí se)	20	—	
Target	Max	<	Nestanoveno	—	30	
Endo	Max	<	(nezobrazí se)	—	20	
Target	Max	Max	Nestanoveno	—	—	
Endo	<	<	(nezobrazí se)	20	20	
Target	Max	<	Nestanoveno	—	35	
Endo	<	Max	(nezobrazí se)	33	—	
Target	<	<	Nestanoveno	30	33	
Endo	<	Max	(nezobrazí se)	35	—	
Target	<	<	Nestanoveno	33	30	
Endo	Max	<	(nezobrazí se)	—	35	

Target – cílový gen, Endo – Endogenní kontrola, RQ – relativní hladina genové exprese, USC – Ukazatel standardní chyby

a **<** : Označuje případ, kdy je hodnota C_T nižší než maximální cyklus PCR daného běhu (platná hodnota C_T).
b **Max** (nebo **—**): Označuje případ, kdy amplifikační křivky dané skupiny replikátů nepřekročí práh (hodnota 'nestanoveno').

O šipkách směrem dolů

Šipka dolů



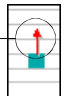
Program zobrazí šipku směrem dolů, aby indikoval, že udávaná hladina genové exprese představuje pro daný gen maximum možného. Šipka dolů se zobrazí pokud:

- Kalibrátor má platné hodnoty C_T pro cílový gen i endogenní kontrolu (C_T je nižší než počet cyklů PCR) a
- Hodnota C_T pro cílový detektor neznámého vzorku není stanovena (hodnota C_T endogenní kontroly je platná).

Za shora zmíněné situace neobsahuje neznámý vzorek dostatečné množství cílové cDNA, tak aby mohl být porovnán s kalibrátorem. Proto program udává maximálně možnou hladinu genové exprese pro daný neznámý vzorek.

O šipkách směrem nahoru

Šipka nahoru



Program zobrazí šipku směrem nahoru, aby indikoval, že udávaná hladina genové exprese představuje pro daný gen minimum možného. Šipka nahoru se zobrazí pokud:

- Neznámý vzorek má platné hodnoty C_T pro cílový gen a endogenní kontrolu (C_T je nižší než počet cyklů PCR) a
- Hodnota C_T pro cílový detektor kalibrátoru není stanovena (hodnota C_T endogenní kontroly je platná).

Za shora zmíněné situace neobsahuje kalibrátor dostatečné množství cílové cDNA, tak aby mohl být porovnán s neznámým vzorkem. Proto program udává minimálně možnou hladinu genové exprese pro daný neznámý vzorek.

O ukazatelích standardní chyby

Pokud byla hladina genové exprese vypočítána pro skupinu dvou nebo více replikátů, program zobrazuje pro každý sloupec v grafu ukazatele standardní chyby. Tím je vyjádřena vypočítaná maximální (RQMax) a minimální (RQMin) hladina exprese, vyjadřující standardní chybu průměrné hladiny genové exprese (hodnota RQ). Společně tyto dva limity definují rozsah hladiny genové exprese, v němž se skutečná hladina genové exprese pravděpodobně nachází. Pro výpočet program používá nastavení parametru RQMin/RQMax confidence (Hladina významnosti) v dialogovém okně Analysis Settings (Parametry analýzy).

Poznámka: Jelikož standardní odchylku lze vypočítat pouze při použití dvou a více replikátů, program SDS nezobrazuje ukazatele standardní chyby, hodnoty RQMin a RQMax nebo standardní odchylku je-li cílový gen nebo endogenní kontrola kvantifikována v jediném vzorku.

Poznámka: Ukazatele standardní chyby jsou vyjádřením pravděpodobnosti, že náhodně zvolený vzorek splňuje kritéria definovaná na základě standardní populace, stupňů volnosti a hladiny významnosti RQ Min/Max. Program nezobrazuje ukazatele standardní chyby pro kalibrátor, poněvadž ten je porovnáván sám se sebou.

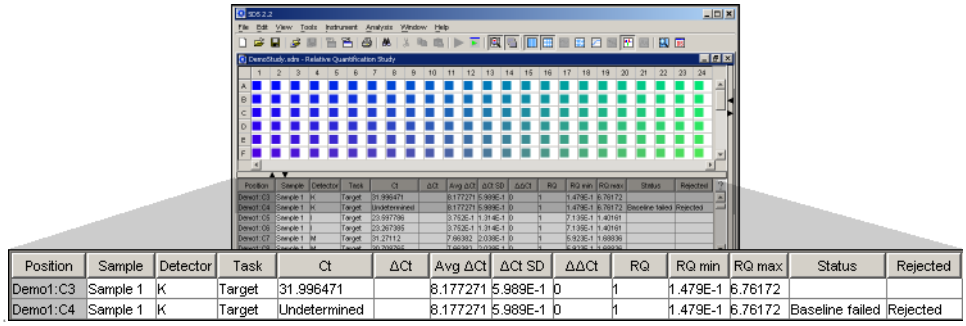
Vzorky s nestanovenou hodnotou C_T a odstranění odlehlých bodů

Program nestanoví hodnotu C_T pokud amplifikační křivky replikátů v průběhu běhu nepřekročí nastavený práh pro daný detektor.

- *Není-li zapnuta* funkce odstranění odlehlých bodů, program ignoruje všechny jamky s nestanovenou hodnotou C_T a udává průměr C_T zbývajících jamek.
- *Je-li zapnuta* funkce odstranění odlehlých bodů a současně většina jamek v rámci skupiny replikátů nemá stanovenu hodnotu C_T, program nestanoví průměrnou hodnotu C_T. Má-li polovina nebo více jamek stanovenu hodnotu C_T, program ignoruje všechny jamky s nestanovenou hodnotou C_T, ze zbylých jamek odstraní odlehlé body a znázorní průměrnou hodnotu C_T zbylých jamek.

Zobrazení tabulky výsledků

Program zobrazuje výsledky výpočtu relativní kvantifikace v tabulce v dokumentu destičky. Na obrázku 6-13 je příklad takové tabulky výsledků, obsahující údaje získané za použití TaqMan Human Cytokine Plate I.



Position	Sample	Detector	Task	Ct	ΔCt	Avg ΔCt	ΔCt SD	ΔΔCt	RQ	RQ min	RQ max	Status	Rejected
Demo1:C3	Sample 1	K	Target	31.996471		8.177271	5.989E-1	0	1	1.479E-1	6.76172		
Demo1:C4	Sample 1	K	Target	Undetermined		8.177271	5.989E-1	0	1	1.479E-1	6.76172	Baseline failed	Rejected

Obrázek 6-13 Tabulka výsledků relativní kvantifikace

Sloupce v tabulce::

- **Position (Pozice)** – Označení destičky a jamky v destičce
- **Sample (Vzorek)** – Název vzorku v dané jamce
- **Detector (Detektor)** – Název detektoru použitého v dané jamce
- **Task (Úloha detektoru)** – Úloha detektoru použitého v dané jamce.
- **C**T – Průměrný vypočítaný prahový cyklus skupiny replikátů, do níž daný vzorek patří.

  Poznámka: V tomto sloupci se zobrazí ‘Undetermined’ (Nestanoveno), pokud v dané jamce nedojde k zaznamenatelnému nárůstu fluorescenčního signálu během PCR (fluorescenční signál v dané jamce nikdy nepřekročí práh pro daný detektor).

- **ΔC**T – Normalizovaný prahový cyklus daného vzorku
- **Avg**ΔCT – Průměrná vypočítaná hodnota prahového cyklu pro skupinu replikátů, do níž daný vzorek patří
- **ΔC**T **SD** – Standardní odchylka od průměrné hodnoty ΔCT skupiny replikátů, do níž daný vzorek patří
- **ΔΔC**T – Vypočítaná hodnota ΔΔCT pro skupinu replikátů, do níž daný vzorek patří.
- **RQ** – Vypočítaná relativní hladina genové exprese pro skupinu replikátů, do níž daný vzorek patří
- **RQ min** – Minimální možná hladina genové exprese daných vzorků
- **RQ max** – Maximální možná hladina genové exprese daných vzorků
- **Status** (Stav) – Probíhá-li vyhodnocení vzorku automaticky a algoritmus vyřadí vzorek z další analýzy, zobrazí se zde důvod vyřazení.
- **Rejected** (Vyřazen) – Probíhá-li vyhodnocení vzorku automaticky, zobrazí se zde, zda byl vzorek vyřazen z analýzy.

Po skončení analýzy

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro ukládání výsledků analýzy do databáze práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Volba dalších kroků

Úprava zobrazení výsledků 6-51
Tisk zprávy 6-51
Export dokumentu destičky 6-51
Uložení výsledků ..... (viz níže)

Uložení studie

Po ukončení analýzy je možné její výsledky uložit v programu SDS ve formátu Multiplate Document File (*.sdm).

Chcete-li uložit analýzu ve formátu Multiplate Document File (*.sdm):

1. V programu SDS zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).
2. V poli Look in (Vyhledat) dialogového okna Save As (Uložit jako) vyhledejte a zvolte adresář, do nějž chcete výsledky uložit.
3. V poli File name (Název souboru) zadejte název souboru.
4. Klikněte

(Uložit). Program uloží dokument destičky do zvoleného adresáře.

Uložení studie do databáze SDS Enterprise

Databáze SDS Enterprise neumožňuje ukládání studií relativní kvantifikace (ABI PRISM Multiplate Document File).

Část 6.3 Analýza disociační křivky

V této části

Přehled 6-38
Dříve než začnete 6-39
Seznam kroků 6-40
Otevření výsledků běhu 6-41
Analýza výsledků 6-41
Odečtení hodnoty T_m 6-42
Po skončení analýzy 6-44

Přehled

O analýzy disociační křivky

Na přístroji ABI PRISM 7900HT je možné provádět analýzu disociační křivky nukleových kyselin pomocí barviva SYBR® Green 1, které se váže na dvouřetězcovou DNA. Cílem analýzy disociační křivky je přesné stanovení teploty tání (melting temperature - T_m) cílové nukleové kyseliny v neznámém vzorku. Typickým příkladem použití disociační křivky je detekce přítomnosti nespecifických produktů a stanovení optimální koncentrace primerů.

Barvivo SYBR Green 1

Analýza disociační křivky na přístroji 7900HT je proveditelná pomocí fluorogenního barviva SYBR Green 1, které se váže na dvouřetězcovou DNA (viz strana D-3). Běžně se provádí po skončení PCR reakce, v níž bylo toto barvivo použito, s cílem detekovat přítomnost nespecifických produktů. Po skončení PCR se provede dodatečný krok – pomalé postupné zvyšování teploty. Vazebné vlastnosti barviva SYBR Green 1 umožňují monitorovat hybridizaci nukleových kyselin ve vzorku. Přístroj během tohoto kroku zaznamenává pokles fluorescence barviva SYBR Green, který je důsledkem disociace dsDNA.

Matematické zpracování výsledků

Po skončení běhu provádí program SDS pomocí různých algoritmů zpracování naměřeného fluorescenčního signálu barviva SYBR Green 1. Výstupem tohoto zpracování je graf závislosti změny fluorescenčního signálu na teplotě.

Multikomponentní algoritmus a normalizace

Prvním z těchto matematických algoritmů je přepočet hrubých dat, vyjádřených jako závislost intenzity fluorescenčního signálu na vlnové délce, na signál jednotlivých čistých barev, který se provádí pomocí údajů získaných během kalibrace barev (použijí se extrahovaná spektra čistých barev). Jakmile program zjistí jednotlivé barvy, vypočítá jejich příspěvek do celkového naměřeného signálu (hrubá data) pomocí multikomponentního algoritmu (více informací o multikomponentním algoritmu naleznete na straně D-5). Následně program provede normalizaci signálu pomocí signálu pasivní reference podle postupu níže.

$$R_n = \frac{R_{(SYBR)}}{R_{(Passive\ Reference)}}$$

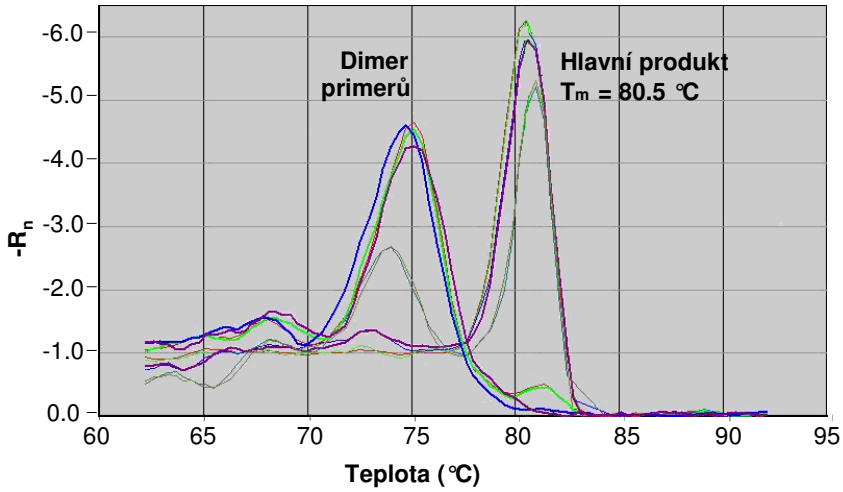
Derivace

Program SDS poté vypočítá první derivaci normalizovaného signálu (R_n), a to pro každé přístrojem 7900HT zaznamenané měření během kroku zvyšování teploty. Výsledkem ($R_n´$) je rychlost změny fluorescence v závislosti na teplotě (viz níže).

$$Rn' = \frac{dRn}{dT}$$

Jako poslední krok program vynese do grafu závislost negativní hodnoty derivovaných dat -$R_n´$ na teplotě (T), čímž zobrazí změnu fluorescence při každé změně teploty. T_m cílové nukleové kyseliny lze pak odvodit z grafu – jedná se o teplotu, při níž dochází k maximální rychlosti poklesu fluorescenčního signálu (zobrazí se jako pík) pro danou amplifikační křivku.

Příklad Na obrázku 6-14 je vyobrazena disociační křivka detekující nespecifický produkt amplifikace ve vzorku cDNA. Jsou zde vyobrazeny dva píky, což je typický signál tvory dimerů primerů. Amplifikace specifického produktu vede ke vzniku píku s T_m 80.5 °C, pík vzniklý v důsledku tvorby dimerů primerů má nižší T_m 74.9 °C.



Obrázek 6-14 Příklad výsledku analýzy disociační křivky

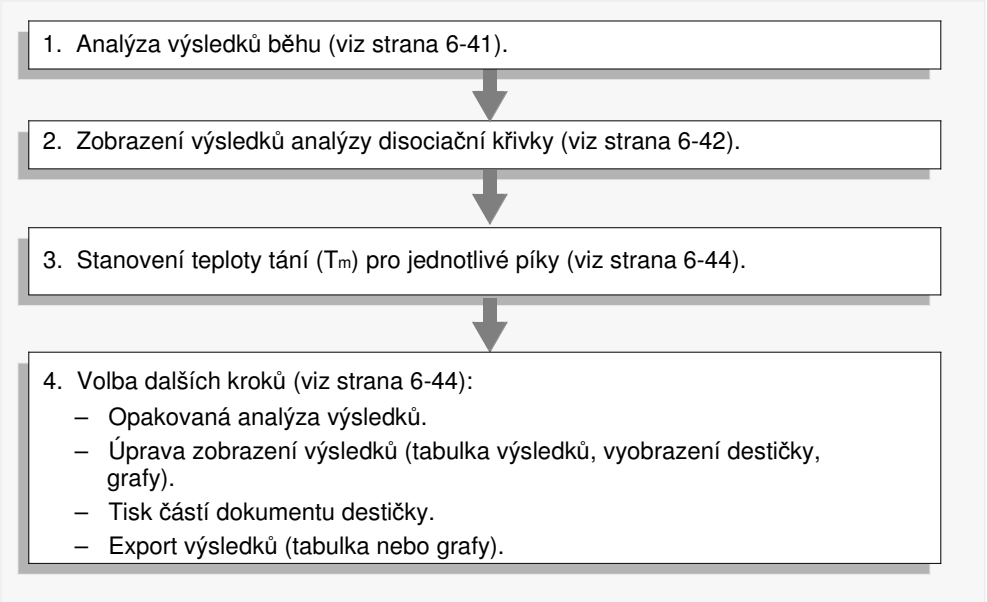
Dříve než začnete

Používání nápovědy Bližší informace o krocích popsaných v této části naleznete v nápovědě programu SDS. Chcete-li otevřít nápovědu, klikněte na ikonu ?, která je součástí každého (dialogového) okna, v němž pracujete.

Příklady v této části Vyobrazení a náhledy, které jsou součástí této kapitoly, byly vytvořeny za použití běhu ověřujícího specifický průběh amplifikace fragmentu genu kódujícího β-aktin v neznámých vzorcích. Každá z jamek destičky obsahovala barvivo SYBR Green 1, primery a genomickou DNA jako templát.

Seznam kroků

Postupné kroky



Otevření výsledků běhu

Přístupová práva

Pro otevření výsledků běhu z databáze SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Otevření neanalyzovaného dokumentu destičky

Otevření dokumentu destičky

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
2. V poli **Look in** (Vyhledat) vyhledejte a zvolte příslušný dokument destičky.
3. Klikněte Open (Otevřít).

   Program SDS zobrazí soubor s dokumentem destičky.
4. Nastavte parametry analýzy (Analysis Settings) pro každý detektor podle postupu níže.

Otevření neanalyzovaného dokumentu destičky z databáze SDS Enterprise

5. Klikněte nebo zvolte **File > Open Document from Database** (Soubor > Otevřít dokument z databáze).
6. V dialogovém okně Plate Query (Volba destičky) upravte parametry vyhledávání destičky (Find Plates Matching These Criteria) dle potřeby.
7. Klikněte Search (Vyhledat).
8. V seznamu Search Results (Výsledky vyhledávání) zvolte dokument, s nímž chcete pracovat.
9. Klikněte Open (Otevřít).
10. Klikněte Done (Hotovo).

Analýza výsledků

Přístupová práva

Pro analýzu výsledků disociační křivky uložených v databázi SDS Enterprise neexistují žádná omezení z hlediska přístupových práv.

Analýza výsledků

Analýzu výsledků lze provést ihned po skončení běhu. Vysvětlení postupu analýzy naleznete v části “Matematické zpracování hrubých dat” na straně 6-7.

1. Vyberte všechny jamky destičky.

   Program ohraničí vybrané jamky černou čárou.
2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat).

   Program SDS provede analýzu dat a zobrazí výsledky v záložce **Dissociation Curve** (Disociační křivka).
3. Stanovte T_m pro disociační křivky zobrazené v grafu podle postupu na straně 6-44.

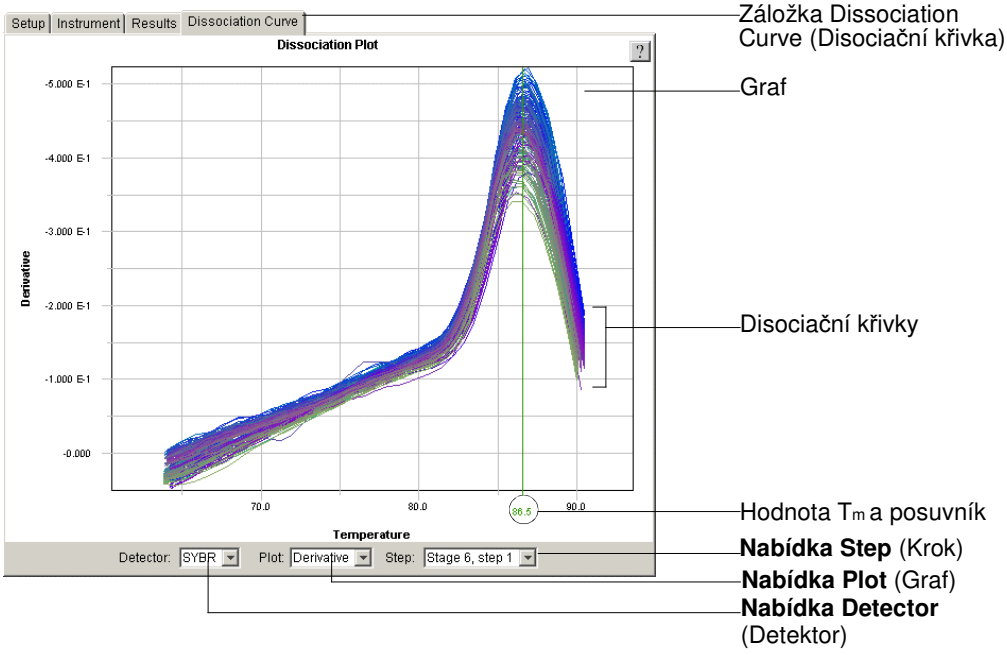
Stanovení hodnot T_m

Zobrazení výsledků analýzy disociační křivky

Program SDS zobrazuje výsledky analýzy disociační křivky v záložce Dissociation Curve dokumentu destičky. Zobrazí se graf závislosti negativní hodnoty derivovaných dat $-R_n'$ na teplotě (T), tedy změna fluorescence při každé změně teploty.

Poznámka: V grafu se zobrazují pouze údaje z vybraných jamek destičky. Pokud nevidíte žádné křivky, zvolte příslušné jamky ve vyobrazení destičky.

Na obrázku 6-15 jsou znázorněny součásti tohoto grafu.



Obrázek 6-15 Součásti grafu disociační křivky

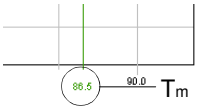
- Graf – Zobrazuje data ze zvolených jamek ve vyobrazení destičky.

  Poznámka: Způsob zobrazení grafu lze změnit. Více informací o možnostech změny zobrazení získáte v nápovědě programu SDS po kliknutí na ikonu ?.

- Nabídka **Step** (Krok) – Zvolte, z kterého kroku zvyšování teploty se mají data zobrazit.

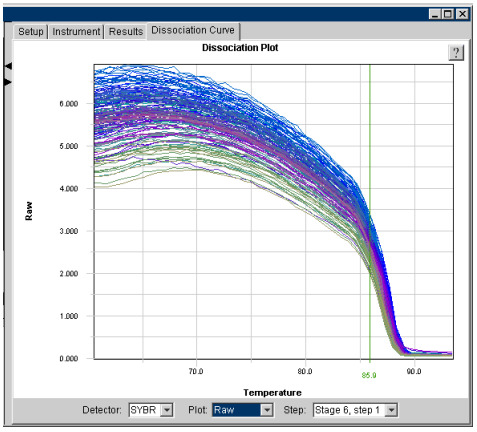
  Je-li součástí dokumentu destičky více než jeden krok zvyšování teploty, je možné v nabídce Step (Krok) zvolit, z kterého z těchto kroků budou data zobrazena.

- Hodnota T_m a posuvník – Program SDS zobrazuje hodnotu T_m pod zeleným posuvníkem (viz níže).

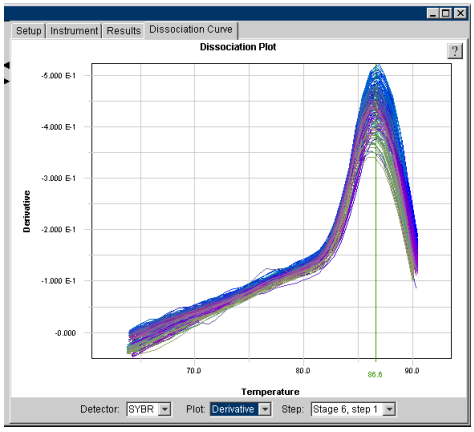


  Parametr T_m lze definovat dvěma způsoby:
  - Z chemického hlediska se jedná o teplotu, při níž je 50% DNA v dvouřetězcové formě.
  - Z matematického hlediska se jedná o maximální hodnotu první derivace křivky pro daný pík.
- Nabídka **Plot** (Graf) – Zvolte, v jaké formě mají být data zobrazena. K dispozici jsou dvě možnosti:
  - **Raw** (Hrubá data) – Při zvolení této možnosti se zobrazí normalizovaný fluorescenční signál reportérové barvy (R_n) v závislosti na teplotě (graf vlevo na obrázku 6-16).
  - **Derivative** (Derivace) – Při zvolení této možnosti se zobrazí derivace signálu (R_n´) v závislosti na teplotě (graf vpravo na obrázku 6-16). Jedná se o graf závislosti negativní rychlosti změny fluorescence.

  Na obrázku 6-16 jsou vyobrazeny oba grafy.



Hrubá data



Derivace

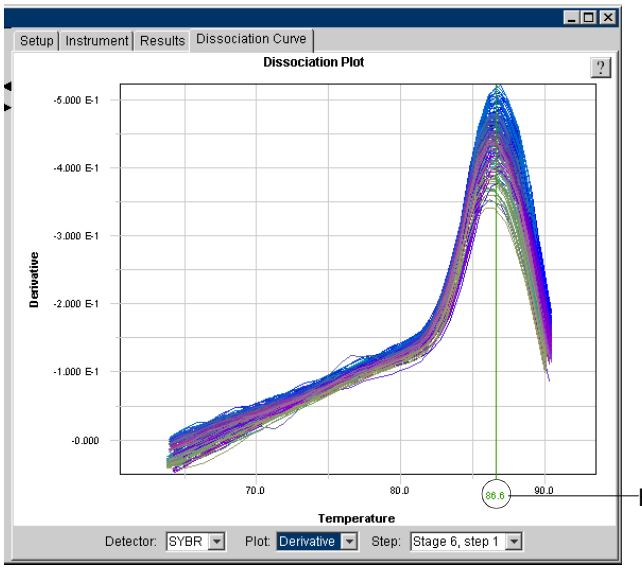
Obrázek 6-16 Grafy v záložce Disociační křivka

- Nabídka **Detector** (Detektor) – Umožňuje zvolit detektor, pro nějž budou výsledky zobrazeny.

Stanovení hodnot T_m

1. Umístěte kurzor nad zelenou linku T_m vedoucí ve směru osy Y.
2. Klikněte a táhněte za tuto linku tak, abyste ji umístili do maxima zvoleného píku.

Program SDS zobrazí hodnotu T_m pro křivku pod linkou T_m.



Poznámka: Vrchol píku představuje maximální rychlost změny normalizované fluorescence.

Po skončení analýzy

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, musíte mít pro ukládání výsledků analýzy do databáze práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce).

Volba dalších kroků

Úprava zobrazení výsledků 6-51
Tisk zprávy 6-51
Export dokumentu destičky 6-51
Uložení výsledků 6-52

Část 6.4 Poznámky k analýze

V této části

Nastavení pozadí a prahu 6-46
Odstranění odlehlých bodů 6-49
Po skončení analýzy 6-51

Nastavení pozadí a prahu

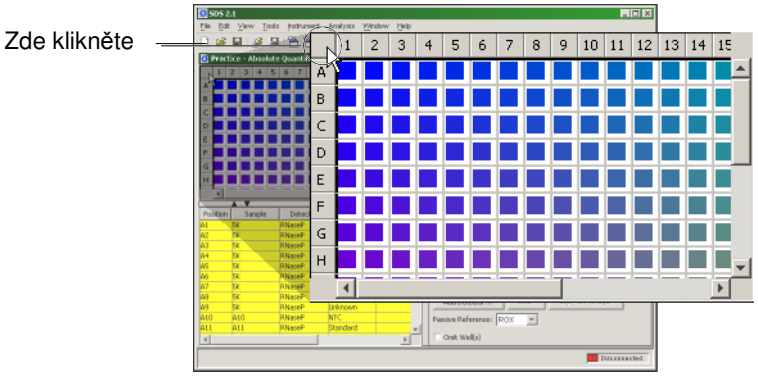
Nastavení pozadí a prahu

Rozhodnete-li se pro určitý detektor nastavit pozadí a práh ručně, postupujte následujícím způsobem:

1. Zvolte záložku **Results** (Výsledky).
2. Provádíte-li nastavení pozadí a prahu:

   Pro experiment absolutní kvantifikace

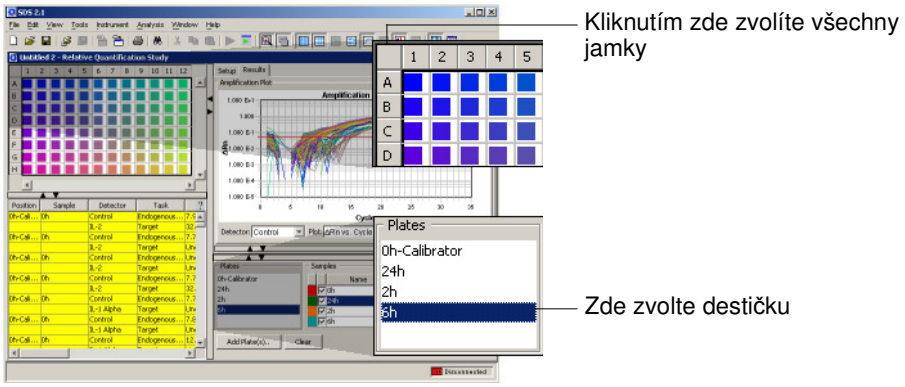
   Zvolte všechny jamky kliknutím do levého rohu ve vyobrazení destičky.



   Pro experiment relativní kvantifikace (v násobném dokumentu)

   a. Zvolte destičku a zvolte všechny jamky v destičce kliknutím do levého rohu ve vyobrazení destičky.

   b. Opakujte krok a, dokud nevyberete jamky všech destiček v rámci studie.



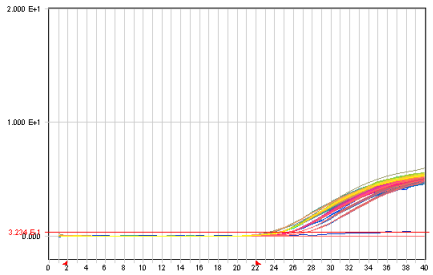
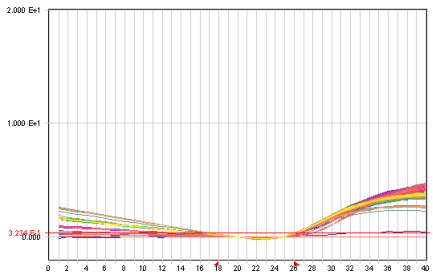
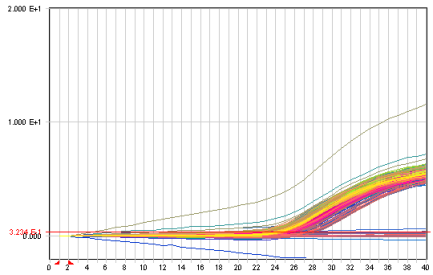
3. V rozbalovací nabídce **Detector** (Detektor) v amplifikačním grafu zvolte detektor, pro který chcete nastavit pozadí a práh.

   Data vybraných jamek budou zobrazena v amplifikačním grafu.

4. V rozbalovací nabídce **Plot** (Graf) zvolte **ΔR_n vs. Cycle** (Graf závislosti ΔR_n na cyklu).
5. Dvakrát klikněte na amplifikační graf nebo jednou na ikonu .

6. V dialogovém okně Display Settings (Nastavení zobrazení):
   a. V poli Select Pane/View (Volba zobrazení) zvolte **Amplification Plot** (Amplifikační graf).
   b. V části Y Axis (Osa Y) zvolte **Linear** (Lineární).
   c. Klikněte OK.
7. Nastavte pozadí (baseline) tak, aby se amplifikační křivky začínaly zvedat později, než je číslo cyklu v poli Stop.

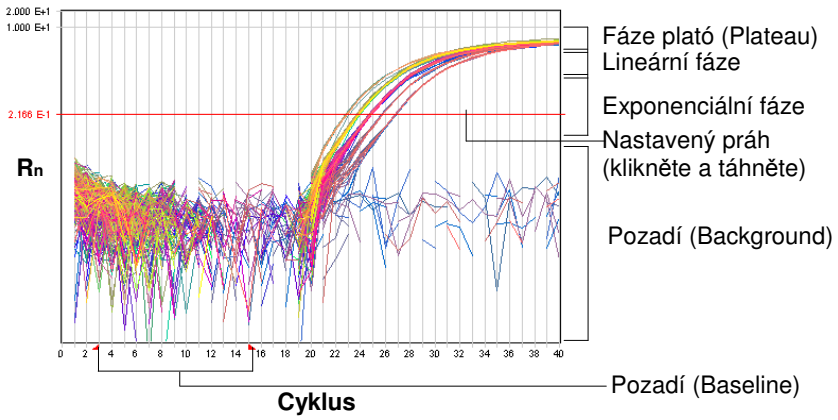
   Pokud ověřujete nastavení pozadí pro předešle automaticky analyzovaný detektor, ověřte, že je nastaveno správně, a pokračujte krokem 8. Není-li pozadí nastaveno správně, otevřete okno Analysis Settings (Parametry analýzy), zadejte volbu manuální analýzy pro daný detektor a potvrďte OK. Poté co budou data zobrazena, nastavte pozadí a práh ručně.

Vypadá-li graf amplifikace takto...	**Pak...**
	Amplifikační křivka začíná později, než je přednastavená horní hranice pro výpočet pozadí (cyklus 15). Pozadí je nastaveno správně.
	Vysoký rozsah nastavení pozadí. Upravte horní hranici pro výpočet pozadí tažením značky ◣ doleva (nižší cyklus).
	Nízký rozsah nastavení pozadí. Upravte horní hranici pro výpočet pozadí tažením značky ◣ doprava (vyšší cyklus).

8. Dvakrát klikněte na amplifikační graf nebo jednou na ikonu .

9. V dialogovém okně Display Settings (Nastavení zobrazení):
   a. V poli Select Pane/View (Volba zobrazení) zvolte **Amplification Plot** (Amplifikační graf).
   b. V části Y Axis (Osa Y) zvolte **Log** (Logaritmické).
   c. Klikněte OK.
10. Nastavte práh tak, aby byl:
   - Vyšší než pozadí (background)
   - Níž než je fáze plató a lineární fáze amplifikační křivky
   - V exponenciální fázi amplifikační křivky

Pokud ověřujete nastavení prahu pro předešle automaticky analyzovaný detektor, ověřte, že je nastaven správně, a pokračujte krokem 11. Není-li práh nastaven správně, otevřete okno Analysis Settings (Parametry analýzy), zadejte volbu manuální analýzy pro daný detektor a potvrďte OK. Poté co budou data zobrazena, nastavte pozadí a práh ručně.



11. Opakujte kroky 3 až 10, dokud nenastavíte pozadí a práh pro všechny zbývající detektory.
12. Odstraňujete-li odlehlé body
   - Automaticky – Zobrazte výsledky.
   - Manuálně – Zobrazte a odstraňte odlehlé body podle postupu na straně 6-49.

Odstranění odlehlých bodů

Přehled

Při každé PCR může dojít k tomu, že v důsledku experimentální chyby dochází v některých jamkách k nedostatečné nebo vůbec žádné amplifikaci. Výsledkem jsou hodnoty C_T, které se výrazně liší od průměru ostatních jamek v rámci skupiny replikátů. Budou-li tyto výsledky zahrnuty do výpočtů, mohou vést k chybným závěrům, neboť změní průměrné hodnoty pro skupinu replikátů.

Zobrazení odlehlých bodů

Abyste získali přesné výpočty výsledků relativní kvantifikace, musíte zjistit, zda se v některé ze skupin replikátů nenachází odlehlé body. K tomu použijete graf C_T vs. Well Position (Hodnoty C_T v závislosti na poloze jamky).

1. Zvolte záložku **Results** (Výsledky).
2. Analyzujete-li výsledky v rámci studie relativní kvantifikace, zvolte destičku a odznačte všechny jamky v zobrazení destičky. Opakujte tento postup pro všechny destičky v rámci studie. Po ukončení tohoto kroku bude amplifikační graf prázdný.
3. Odstraňujete-li odlehlé body v rámci experimentu:

   Absolutní kvantifikace

   Zvolte všechny jamky kliknutím do levého rohu ve vyobrazení destičky.

   Relativní kvantifikace (v násobném dokumentu)

   Zvolte destičku a zvolte všechny jamky v destičce kliknutím do levého rohu ve vyobrazení destičky.
4. V rozbalovací nabídce **Plot** (Graf) zvolte **C_T vs. Well Position** (Graf závislosti hodnoty C_T na poloze jamky).
5. V grafu ověřte uniformitu každé skupiny replikátů porovnáním hodnot C_T všech vzorků patřících do dané skupiny.

Odlehlé body?	Pak…
Ano	Poznamenejte si čísla jamek, které odpovídají odlehlým bodům, a pokračujte dalším krokem.
Ne	Pokračujte dalším krokem.

6. V rozbalovací nabídce **Detector** (Detektor) zvolte další detektor a opakujte kroky 3 až 5. Opakujte pro všechny detektory.
7. Analyzujete-li přítomnost odlehlých bodů v rámci studie relativní kvantifikace, opakujte kroky 3 až 6 pro všechny destičky v rámci studie.
8. Jsou na destičce odlehlé body?

   Ano – Odstraňte je z analýzy postupem uvedeným v části “Odstranění jamek z analýzy” na straně 6-50.

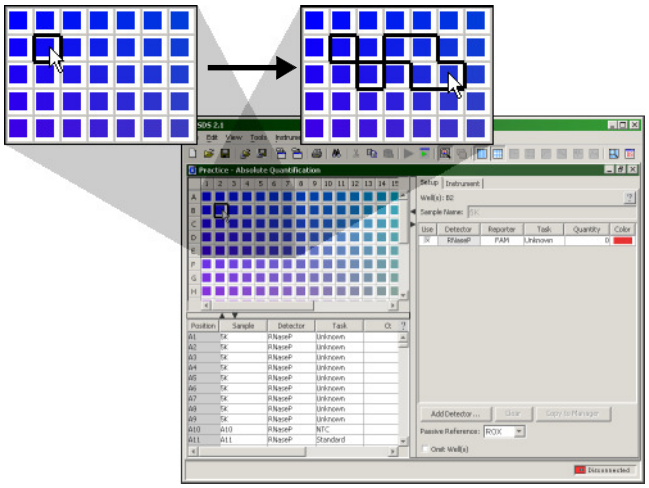
   Ne – Proveďte jeden z následujících kroků:
   - Analyzujete-li výsledky absolutní kvantifikace, zobrazte výsledky běhu v grafu standardní křivky a v tabulce Results (Výsledky).
   - Analyzujete-li výsledky relativní kvantifikace, zobrazte výsledky běhu v grafu genové exprese a v tabulce Results (Výsledky).

Odstranění jamek z analýzy

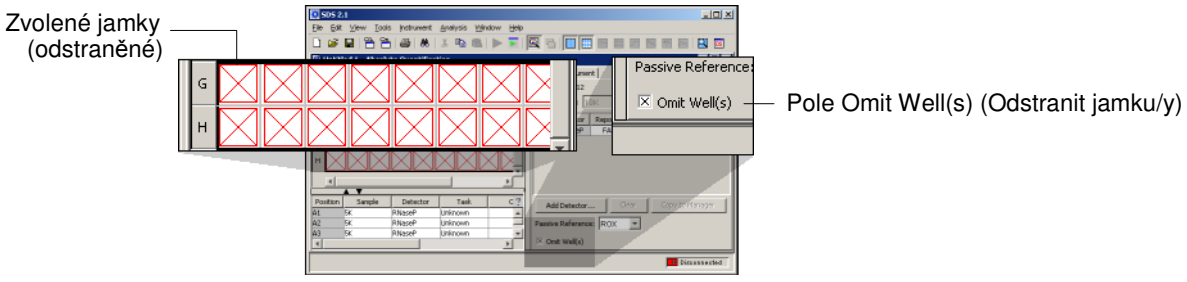
Program SDS umožňuje odstranit zvolené jamky z analýzy. Pokud jste identifikovali odlehlé body nebo výsledky, které nechcete zahrnout do analýzy, můžete jim odpovídající jamky z analýzy odstranit postupem uvedeným níže.

DŮLEŽITÉ! Odstraníte-li jamku před provedením běhu, program SDS nebude měřit v dané jamce fluorescenci. Je-li jamka odstraněna až po provedení běhu, program ji vyřadí z analýzy, ale naměřená data zůstanou zachována.

1. Chcete-li odstranit jamku v rámci studie relativní kvantifikace, zvolte nejprve příslušnou destičku.
2. Za současného stisku klávesy **Ctrl** zvolte ve vyobrazení destičky jamku(y), kterou chcete odstranit.



3. Chcete-li odstraňovat jamky v rámci studie relativní kvantifikace, opakujte kroky 1 a 2 pro všechny destičky studie.
4. Zvolte záložku **Setup** (Zadání).
5. V okně Well inspector (Prohlížeč jamek), klikněte do pole **Omit Well(s)** (Odstranit jamku/y), čímž vybrané jamky odstraníte z analýzy.



Poznámka: Chcete-li odstraněnou jamku opět použít, označte ji a klikněte do pole Omit Well(s) (Odstranit jamku/y).

6. Klikněte na ikonu nebo zvolte **Analysis** > **Analyze** (Analýza > Analyzovat).
7. Opakujte postup v části “Odstranění odlehlých bodů” na straně 6-49, abyste ověřili, že všechny odlehlé body byly odstraněny.

Po skončení analýzy

Přístupová práva

Používáte-li databázi SDS Enterprise, mohou všichni uživatelé provádět níže uvedené kroky vyjma ukládání výsledků. Pro ukládání výsledků analýzy do databáze musíte mít práva uživatele třídy Scientist (Vědec) nebo Administrator (Správce)

Volba dalších kroků

Úprava zobrazení výsledků..... (viz níže)
Tisk zprávy .....(viz níže)
Export dokumentu destičky .....(viz níže)
Uložení výsledků 6-52

Úprava zobrazení výsledků

Před vytištěním nebo exportem výsledků můžete upravit jejich zobrazení (tabulku výsledků, zobrazení destičky a většinu grafů).

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **View > Display Settings** (Zobrazit > Nastavení zobrazení).
2. V dialogovém okně Display Settings (Nastavení zobrazení) klikněte na ikonu , čímž získáte více informací o možnostech změny zobrazení.

Tisk zprávy

Program SDS umožňuje tisk zprávy o výsledcích analýzy. Tato zpráva může sestávat z různých částí dokumentu destičky.

1. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Print Report** (Soubor > Tisk zprávy).
2. V dialogovém okně Print Report (Tisk zprávy) klikněte na ikonu , čímž získáte více informací o nastavení a tisku zprávy.

Export dokumentu destičky

Export dokumentu destičky ve formě souboru *.txt

Program SDS umožňuje exportovat hrubá nebo analyzovaná data ve formě textového souboru (tabelátorem oddělená data - *.txt). Exportovat lze výsledky všech nebo zvolených jamek. Exportovaný soubor je kompatibilní s většinou tabulkových editorů.

Chcete-li exportovat dokument destičky, zvolte jednu z následujících možností:

- Pokračujte částí “Export dokumentu destičky” na straně A-16.
- Klikněte na ikonu v zobrazení tabulky.

Export grafů jako obrázků

Program SDS umožňuje export většiny grafů z dokumentu destičky ve formě grafických souborů formátu JPEG (Joint Photographic Experts Group). Formát JPEG je kompatibilní s většinou textových a tabulkových editorů a lze jej použít přímo též v dokumentech typu HTML.

Chcete-li exportovat graf ve formátu JPEG, získáte více informací v části “Export obrázků” na straně A-16 nebo kliknutím na ikonu v příslušném grafu.

Uložení výsledků

Program SDS ukládá výsledky analýzy různými způsoby v závislosti na tom, zda je analýza ukládána do databáze SDS Enterprise (viz níže) nebo do dokumentu destičky (viz strana 6-53).

Uložení výsledků do databáze SDS Enterprise

Používáte-li databázi SDS Enterprise, lze výsledky analýzy uložit jako tzv. seance (session).

DŮLEŽITÉ! Při ukládání do databáze dodržujte následující pokyny:

- Pokud jste jakkoliv upravili informace v dokumentu destičky (vypuštění jamek, změna způsobu zobrazení), musíte uložit dokument destičky do databáze, chcete-li tyto změny zachovat (zvolte **File > Save Plate Document to Database** – Soubor > Uložit dokument do databáze).
- Databáze SDS Enterprise umožňuje dvěma nebo více uživatelům otevírat a upravovat data najednou. Pokud jiný uživatel otevřel, upravil a uložil táž data, která jste právě analyzovali, program tyto úpravy po uložení v databázi přepíše.
- Výsledky analýzy uložené v databázi jsou přímo propojeny s dokumentem destičky, na jehož základě byly vytvořeny. Pokud poté, co jste výsledky analýzy uložili do databáze, upravíte propojený dokument destičky (vypustíte jamky, pozměníte názvy vzorků atp.), výsledky vaší analýzy nemusí být s tímto dokumentem více propojeny. Následně může dojít ke změně výsledků vaší analýzy, pokud tuto analýzu zopakujete, poněvadž jste změnili obsah propojeného dokumentu destičky, v němž jsou uložena hrubá data.

  Společnost Applied Biosystems doporučuje dodržovat při práci s výsledky analýzy následující doporučení:
  - Ukládejte dokument destičky jako nový dokument kdykoliv v jeho zadání provedete nějaké změny (vypuštění jamek, pozměnění názvů vzorků, úprava detektorů nebo markerů atp.)
  - Pro každý uložený dokument ukládejte pouze jedny výsledky analýzy
  - Vezměte na vědomí, že pouze výsledky analýzy uložené po provedení posledních změn v dokumentu destičky odpovídají obsahu tohoto dokumentu.

Chcete-li uložit výsledky do databáze:

1. Zvolte **File > Save Results to Database** (Soubor > Uložit výsledky do databáze).
2. V poli **Description** (Popis) dialogového okna Save Results to Database (Uložit výsledky do databáze) zadejte popis dokumentu destičky (max. 255 znaků).

   Poznámka: Program vám automaticky nabízí možnost uložit výsledky analýzy pod názvem propojeného dokumentu destičky.
3. (Volitelné) V poli **Add to Study** (Přidat ke studii) klikněte na ikonu ... a zvolte studii nebo vytvořte novou studii pomocí ikony New... (Nová) a provedením následujících kroků:
   a. V poli **Name** (Název) dialogového okna Create New Study (Vytvořit novou studii) zadejte název studie (max. 128 znaků).
   b. V poli **Description** (Popis) zadejte stručný popis studie (max. 255 znaků).
   c. Klikněte OK.
   d. Klikněte OK.

4. V dialogovém okně Save Results to Database (Uložit výsledky do databáze) klikněte OK.
5. Potvrďte ještě jednou kliknutím OK.

Uložení dokumentu typu *.sds

Ačkoliv program ukládá změny provedené v zobrazení dokumentu destičky a nastavení parametrů analýzy, neukládá výsledky analýzy.

1. Zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).
2. V poli Look in (Vyhledat) dialogového okna Save As (Uložit jako) vyhledejte a zvolte adresář, do něhož chcete uložit nový soubor.
3. V poli File name (Název souboru):
   - Zadejte název souboru dokumentu destičky, nebo
   - Zadejte nebo naskenujte čárový kód destičky.

   Poznámka: Program SDS nepožaduje, aby název souboru odpovídal čárovému kódu destičky.
4. Klikněte Save (Uložit).
   Program uloží dokument destičky do zvoleného adresáře.

Údržba přístroje 7

V této kapitole

Poznámky pro uživatele databáze 7-2
Doporučená frekvence kroků údržby 7-3
Část 7.1 Údržba přístroje 7900HT 7-5
Výměna bloku na vzorky 7-6
Výměna adaptéru na destičky 7-12
Dekontaminace bloku na vzorky 7-14
Provedení kalibrace pozadí 7-16
Provedení kalibrace barev 7-20
Přidání vlastní barvy do sady barev 7-27
Ověření funkčnosti přístroje 7-30
Část 7.2 Údržba podavače mikrodestiček 7-35
Součásti podavače mikrodestiček a pozice úložných věží 7-36
Nastavení citlivosti senzoru destiček 7-37
Seřízení podavače mikrodestiček 7-41
Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49
Čistění a výměna podložek ramene (pro úchop destiček) 7-52
Část 7.3 Údržba hardwaru a softwaru 7-53
Běžná údržba počítače 7-54
Údržba programu SDS 7-55

Poznámky pro uživatele databáze

Dodatečné úkony

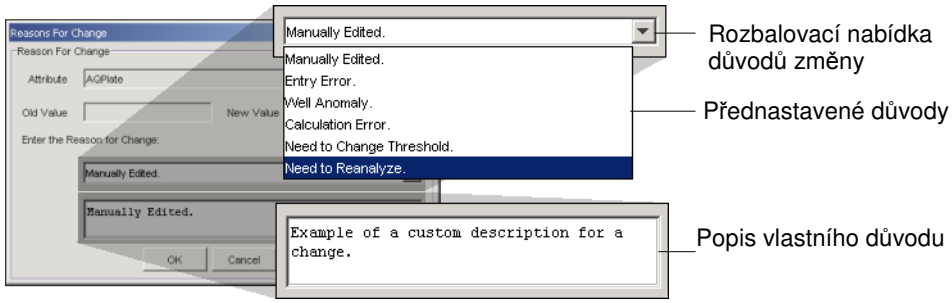
Používáte-li databázi SDS Enterprise pro ukládání dokumentů SDS, studií a dat, je možné, že v průběhu tohoto cvičení budete muset provést nějaké dodatečné úkony. Níže jsou tyto úkony popsány (nutnost jejich provedení závisí na tom, jak správce provedl nastavení databáze). Více informací o úkonech popsaných níže naleznete v příručce SDS Enterprise Database Administration Guide.

Dialogové okno Reason(s) For Change

Dialogové okno Reason(s) for Change (Důvod/y změny) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje zdůvodnění prováděných kroků (tzv. Audit). Systém auditu sleduje vytváření, změny a mazání dat v databázi.

Objeví-li se dialogové okno Reasons for Change, proveďte jeden z následujících kroků:

- Zvolte důvod změny z rozbalovací nabídky a poté klikněte na ikonu OK.
- Zadejte důvod změny do příslušného pole a poté klikněte na ikonu OK.



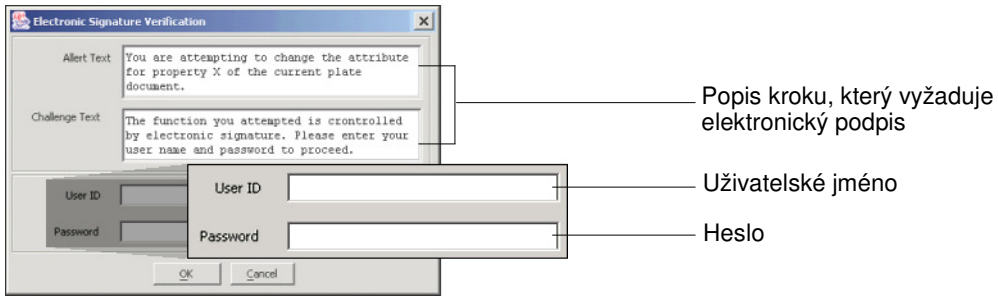
Obrázek 7-1 Dialogové okno Reasons for Change (Důvod/y změny)

Dialogové okno Electronic Signature

Dialogové okno Electronic Signature (Elektronický podpis) se objevuje pouze v případě, je-li databáze SDS Enterprise nastavena tak, že vyžaduje elektronický podpis. Systém elektronického podpisu omezuje a sleduje přístup uživatelů k datům v databázi.

Objeví-li se toto dialogové okno:

1. Do pole User ID (Jméno) a Password (Heslo) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a potvrďte OK.
2. Program následně zobrazí zprávu o úspěšném či neúspěšném použití elektronického podpisu. Pro pokračování klikněte OK.



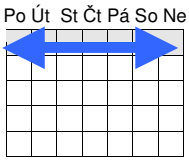
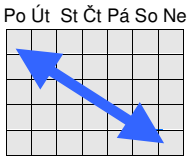
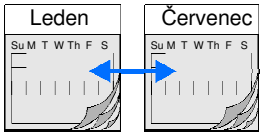
Obrázek 7-2 Dialogové okno Elektronický podpis

Doporučená frekvence kroků údržby

Frekvence údržby

V následující tabulce jsou uvedeny kroky údržby přístroje ABI PRISM® 7900HT, které je doporučeno provádět pravidelně.

Tabulka 7-1 Plán údržby přístroje 7900HT Instrument

Interval	Krok	Viz strana
 Týden (7 dní)	Archivujte soubory SDS	7-54
 Měsíc (30 dní)	Proveďte kalibraci pozadí	7-16
	Zkontrolujte (a případně vyměňte) podložky ramene podavače	7-52
	Defragmentujte pevný disk počítače	7-54
 Každý půlrok (6 měsíců)	Proveďte kalibraci barev*	7-20
	Ověřte, zda se na internetových stránkách společnosti Applied Biosystems nacházejí aktualizace softwaru.	7-55

*Kalibraci pozadí proveďte před každou kalibrací barev.

Část 7.1 Údržba přístroje 7900HT

V této části

Výměna bloku na vzorky 7-6
Výměna adaptéru na destičky 7-12
Dekontaminace bloku na vzorky 7-14
Provedení kalibrace pozadí 7-16
Provedení kalibrace barev 7-20
Přidání vlastní barvy do sady barev 7-27
Ověření funkčnosti přístroje 7-30

Výměna bloku na vzorky

Kdy provádět

DŮLEŽITÉ! Před výměnou bloku na vzorky proveďte všechny požadované aktualizace programu SDS a firmwaru přístroje. Pokud tento krok neprovedete, může se stát, že přístroj nebude možné ovládat nebo dojde k poškození jeho součástí.

Blok na vzorky musíte vyjmout, pokud:

- Chcete dekontaminovat jamky v bloku (viz strana 7-14)
- Chcete blok vyměnit za jiný

DŮLEŽITÉ! Po instalaci nového bloku vždy proveďte kalibraci pozadí.

Postup instalace bloku na vzorky

Pokud nedostanete jiné pokyny, postupujte podle níže uvedených pokynů pro výměnu bloku.

Chcete-li instalovat blok na vzorky:

1. Proveďte všechny požadované aktualizace programu SDS a firmwaru přístroje ABI PRISM 7900HT (viz strana 7-55).
2. Vyjměte stávající blok na vzorky (viz strana 7-7).
3. Instalujte nový blok na vzorky (viz strana 7-10).
4. Vyměňte adapér na destičky (viz strana 7-12).
5. Proveďte běh s destičkou pro kalibraci pozadí, abyste ověřili případnou přítomnost kontaminace v bloku (viz strana 7-16).

Měníte-li typ bloku nebo budete používat nový blok, rovněž proveďte:

DŮLEŽITÉ! Po výměně bloku vždy proveďte kalibraci pozadí a kalibraci barev, i když měníte blok za jiný blok téhož formátu.

6. Proveďte kalibraci barev pro nový formát bloku (viz strana 7-20).
7. Proveďte ověřovací běh s destičkou TaqMan® RNase P Instrument Verification Plate nebo s ověřovací mikrofluidní kartou TaqMan™ TGF-β Instrument Verification Micro Fluidic Card, čímž ověříte správné fungování bloku (viz strana 7-30).

Používáte-li podavač mikrodestiček, rovněž proveďte:

8. Měníte-li formát destiček (např. blok pro 384-jamkovou destičku za blok pro 96-ti jamkovou destičku nebo blok na mikrofluidní karty), nastavte citlivost senzoru destiček ramene podavače pro nový formát (viz strana 7-37).
9. Proveďte seřízení podavače mikrodestiček Zymark Twister® pro nový formát (viz strana 7-41).

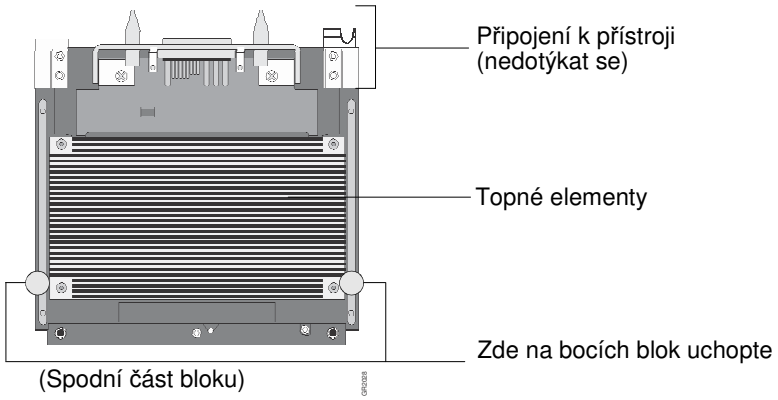
   DŮLEŽITÉ! Podavač mikrodestiček musíte seřídit pouze do pozice Instrument (Přístroj) (Zymark pozice 2) podle pokynů na straně 7-41 až 7-44.
10. Proveďte seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů pro nový formát (viz strana 7-49).

Potřebné pomůcky

- Blok na vzorky (pokud jej měníte)
- Imbus 5/32 (pouze pro určité přístroje)
- Imbus 5/16 (pro některé přístroje může být potřeba hasák)

Manipulace s blokem na vzorky

Výměnné bloky na vzorky jsou citlivá zařízení, jejichž některé součásti jsou křehké a mohou se při nesprávné manipulaci snadno rozbít. Na obrázku 7-3 je znázorněno jak s blokem manipulovat.



Obrázek 7-3 Manipulace s blokem na vzorky

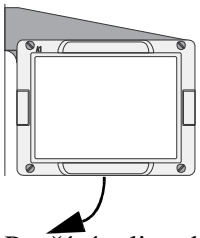
Vyjmutí bloku na vzorky

1. Spusťte program Automation Controller:
   a. Zvolte záložku **Thermal Status** (Teplotní parametry) a ověřte, že blok funguje. Blok funguje, pokud program odečítá informace o teplotě.
   b. Klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít) čímž vysunete nosítka přístroje.
2. Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec), čímž program Automation Controller ukončíte.
3. Vypněte a vypojte přístroj 7900HT ze sítě.

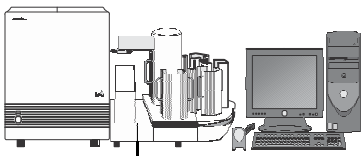
   WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Během následujících kroků musí být přístroj vypnut a vypojen ze zásuvky. Nedodržení těchto opatření může vést k vážnému zranění nebo poškození přístroje.
4. Vyčkejte 20 až 30 min, než se ochladí vyhřívané víko.

   WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Je-li přístroj v provozu, může být teplota bloku na vzorky až 100 °C. Před provedením následujících kroků vyčkejte, než se blok na vzorky ochladí na pokojovou teplotu.

5. Jsou-li nosítka vysunuta ven, zatlačte je dovnitř, abyste měli více místa.



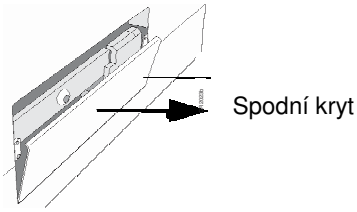
6. Používáte-li podavač mikrodestiček Zymark Twister, odstraňte kryty pevně umístěné čtečky čárových kódů a podstavce.



Kryty pevně umístěné čtečky čárových kódů a podstavce

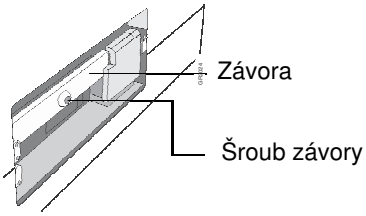
7. Zasuňte nosítka zpět do přístroje, a pak odstraňte spodní kryt otvoru, abyste měli přístup k bloku na vzorky.

   DŮLEŽITÉ! Spodní kryt je nasazen na dvou čepech a jeho odstranění může vyžadovat sílu (žádné nástroje nejsou zapotřebí).

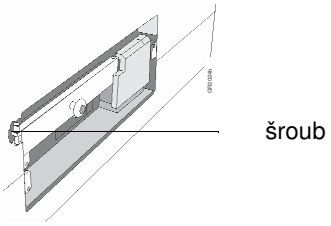


8. Pomocí imbusu 5/16 vyšroubujte šroub závory, držící blok, aby byl volný, ale nikoliv úplně povolený.

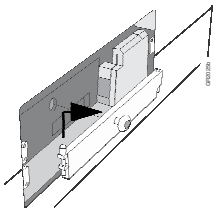
   DŮLEŽITÉ! Pro uvolnění závory u některých přístrojů může být zapotřebí nastavitelný hasák.



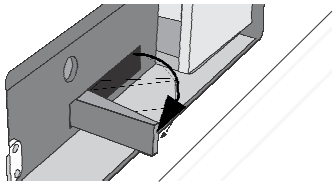
9. Uvolněte šroub, jímž je závora připevněna ke kostře přístroje (na některých přístrojích pomocí imbusu 5/32).



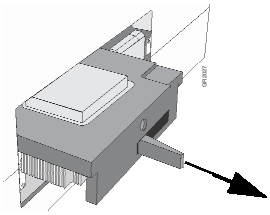
10. Vyjměte závoru nahoru a ven z přístroje.



11. Vyjměte blok z přístroje:
    a. Otočte uvolňovací páku na spodní straně bloku o 90 stupňů.



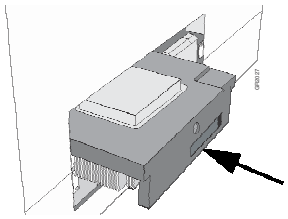
    b. Opatrně, abyste nepoškodili topné elementy na spodní straně bloku, vysuňte blok na vzorky z přístroje a umístěte jej na čistý a rovný povrch.



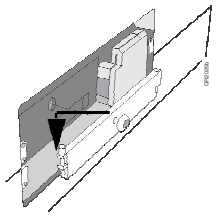
Výměna bloku na vzorky

DŮLEŽITÉ! Před výměnou bloku na vzorky proveďte všechny požadované aktualizace programu SDS a firmwaru přístroje. Pokud tento krok neprovedete, může se stát, že přístroj nebude možné ovládat nebo dojde k poškození jeho součástí.

1. Vložte blok na vzorky do přístroje:
   a. Opatrně, abyste nepoškodili topné elementy na spodní straně bloku, položte blok na vzorky do vodicích kolejnic na stranách jeho úložiště v přístroji.
   b. Opatrně zasuňte blok na vzorky do přístroje.
   c. Po jeho zasunutí na blok pevně zatlačte, abyste zajistili propojení kontaktů s přístrojem.

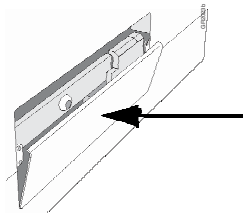


2. Zajistěte blok na vzorky závorou.

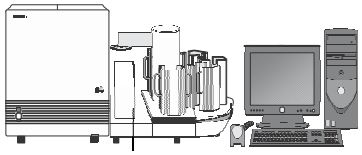


3. Dotáhněte šroub (z kroku 9 na straně 7-9), kterým připevníte závoru bloku ke kostře přístroje (případně pomocí imbusu 5/32).
4. Pomocí imbusu 5/16 dotáhněte šroub závory.
5. Znovu zatlačte na pravé i levé čelní straně bloku, abyste se ujistili, že je správně usazen v úložišti.
6. Nasaďte zpět spodní kryt:
   a. Přiložte spodní kryt spodní stranou k otvoru v boku přístroje.
   b. Zatlačte na kryt dokud čepy nezacvaknou.

   DŮLEŽITÉ! Spodní kryt musíte nasadit zpět předtím než znovu zapnete přístroj. Pokud tak neučiníte, přístroj si nestáhne z počítače firmware a program SDS zobrazí chybovou hlášku.



7. Používáte-li podavač mikrodestiček, nasaďte zpět kryty pevně umístěné čtečky čárových kódů a podstavce (odstraněné v kroku 6 na straně 7-8).



Pevně umístěná čtečka čárových kódů a kryty

8. Zapojte přístroj 7900HT do sítě a zapněte jej.
9. Ověřte, že blok funguje:
   a. Spusťte program Automation Controller.
   b. Zvolte záložku **Thermal Status** (Teplotní parametry).

Odečítá program informace o teplotě?	**Pak…**
Ano	instalace proběhla úspěšně. Odečítané údaje o teplotě potvrzují, že přístroj 7900HT je úspěšně propojen s blokem.
Ne	přístroj 7900HT nebyl úspěšně propojen s blokem. 1. Vypněte přístroj 7900HT a vypojte jej ze sítě. 2. Odstraňte spodní kryt. 3. Zatlačte na pravé i levé čelní straně bloku, abyste se ujistili, že je správně usazen v úložišti. 4. Znovu zasaďte spodní kryt. 5. Opakujte krok 8 dokud neuslyšíte tón potvrzující navázanou komunikaci mezi přístrojem a blokem na vzorky.

10. Poté co je blok v přístroji:
    a. Proveďte kalibraci pozadí (viz strana 7-16), abyste ověřili, že blok na vzorky:
       – Správně funguje
       – Není kontaminován fluorescenčními kontaminacemi
    b. Měníte-li formát bloku, pokračujte podle pokynů v části “Výměna bloku na vzorky” na straně 7-6.

DŮLEŽITÉ! Po výměně bloku proveďte kalibraci barev a pozadí, a to i když měníte jeden blok za druhý téhož formátu.

Výměna adaptéru na destičky

Kdy provádět

Vyjměte a vyměňte adaptér na destičky poté co vyměníte blok za blok jiného formátu (např. 384-jamkový blok na vzorky za 96-ti jamkovou verzi).

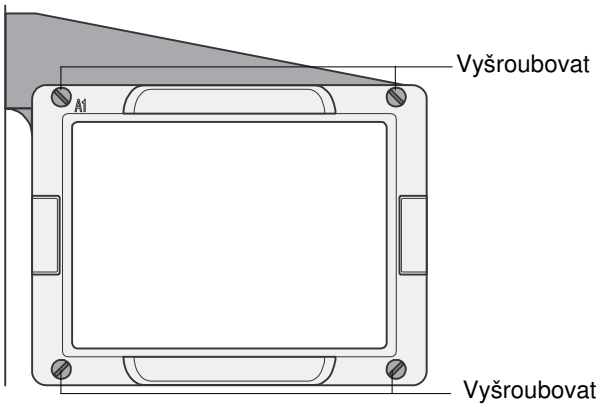
Poznámka: Blok určitého formátu lze používat pouze s adaptérem na tytéž destičky.

Potřebné pomůcky

- Imbus 3/32
- Některý z adaptérů:
  - Adaptér na 384-jamkové destičky
  - Adaptér na 96-jamkové destičky
  - Adaptér na mikrofluidní karty

Výměna adaptéru na destičky

1. Jsou-li nosítka uvnitř přístroje 7900HT, vysuňte je ven:
   a. Spusťte SDS.
   b. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
   c. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) klikněte OK.
   d. V okně nového dokumentu zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
   e. V záložce Real-Time klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít). Nosítka přístroje se vysunou ven.
   f. Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec), čímž program SDS ukončíte.
2. Vyšroubujte čtyři šrouby, jimiž je adaptér na destičky připevněn k ramenu.

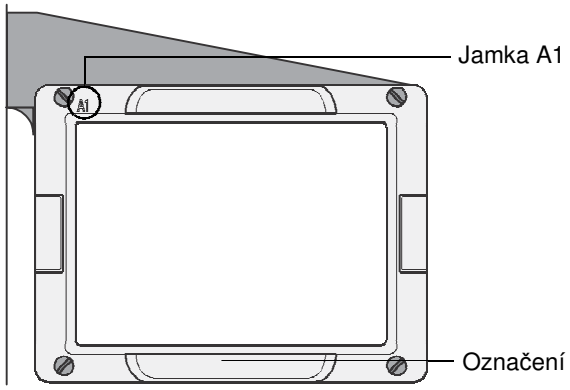


3. Vyjměte adaptér na destičky.

   Poznámka: Měníte-li formát bloku na vzorky (např. 384-jamkový blok na vzorky za 96-ti jamkovou verzi), uložte adaptér na destičky spolu s vyjmutým blokem téhož formátu.

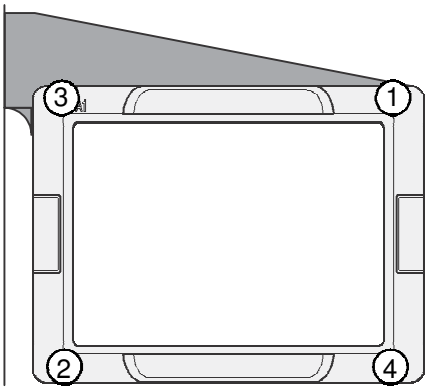
4. Umístěte nový adaptér na rameno tak, že je značka A1 v zadním levém rohu (viz níže).

   DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že instalujete adaptér správného formátu (384-jamková, 96-jamková destička nebo mikrofluidní karta). Na adaptérech na destičky je vyznačeno, pro jaký spotřební materiál jsou určeny.



5. Přišroubujte zpět čtyři vyjmuté šrouby v pořadí uvedeném níže:

   DŮLEŽITÉ! Pořadí, v jakém jsou jednotlivé šrouby utahovány, je důležité pro dodržení správné pozice adaptéru na destičky v bloku na vzorky uvnitř přístroje 7900HT.



Dekontaminace bloku na vzorky

Kdy provádět

Tento postup popisuje jak provádět dekontaminaci jamek bloku na vzorky. Tato procedura slouží k odstranění zbytkových kontaminujících produktů PCR a reagencií včetně fluorescenčních sond TaqMan®. Čistěte blok na vzorky tak často, jak je potřeba.

DŮLEŽITÉ! Plánujete-li používat jinou metodu čistění nebo dekontaminace, než je uvedena v této příručce, ověřte si nejprve u společnosti Applied Biosystems, že tato metoda nepoškodí blok na vzorky nebo přístroj 7900HT.

Potřebné pomůcky

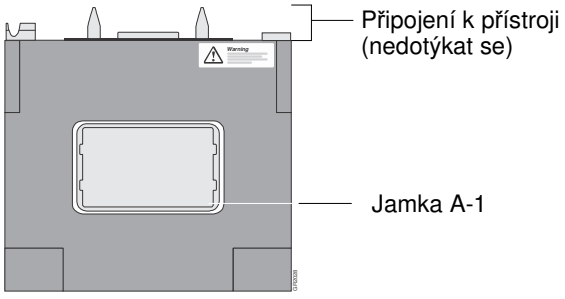
- 10% roztok chlornanu sodného
- Izopropanol, 100 procentní
- Imbus 5/32
- Tyčinky s vatou

WARNING **CHEMICKÉ RIZIKO**. **10% roztok chlornanu sodného** je tekutý dezinfekční prostředek, který může poškodit pokožku a vést k její depigmentaci. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

WARNING **CHEMICKÉ RIZIKO**. **Izopropanol** je hořlavá kapalina a vytváří hořlavé výpary. Expozice vede k podráždění očí, kůže a dýchacího ústrojí. Delší nebo opakovaný kontakt může vysušit pokožku a způsobit podráždění. Může též způsobit ospalost, závratě, bolesti hlavy a apod. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

Čistění bloku na mikrofluidní karty

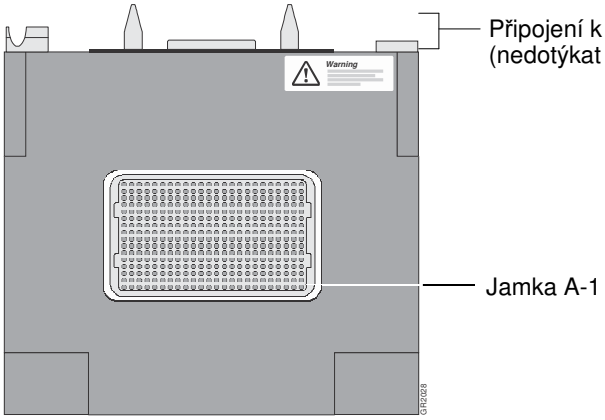
1. Otřete povrch bloku (šedý hliník) pomocí 10% roztoku chlornanu sodného.
2. Otřete blok třikrát pomocí destilované vody.
3. Otřete blok pomocí izopropanolu a nechte jej uschnout.



4. Vyměňte blok podle postupu v části “Výměna bloku na vzorky” na straně 7-10.
5. Proveďte kalibraci pozadí pomocí mikrofluidní karty, abyste ověřili, že se kontaminaci podařilo odstranit.

Čistění 384- nebo 96-ti jamkového bloku na vzorky

1. Vyjměte blok na vzorky z přístroje 7900HT podle postupu v části “Výměna bloku na vzorky” na straně 7-7.
2. Za pomoci následujícího obrázku vyhledejte kontaminovanou jamku/y v bloku na vzorky.



3. Pipetujte odpovídající objem 10% roztoku chlornanu sodného do každé potenciálně kontaminované jamky.
   - Pro 96-ti jamkový blok pipetujte 150 µL roztoku chlornanu sodného do každé jamky.
   - Pro 384 jamkový blok pipetujte 40 µL roztoku chlornanu sodného do každé jamky.
4. Nechte roztok působit 3 až 5 min.
5. Pomocí pipety roztok z jamek odstraňte.
6. Třikrát opláchněte každou kontaminovanou jamku odpovídajícím objemem destilované vody (pipetujte do jamky a odsajte).
   - Pro 96-ti jamkový blok použijte na oplach 150 µL deionizované vody.
   - Pro 384 jamkový blok použijte na oplach 40 µL deionizované vody

   Poznámka: V třetím kole oplachu můžete použít absolutní izopropanol namísto vody.
7. Odsajte zbytkový izopropanol nebo vodu z jamek bloku na vzorky.
8. Vyměňte blok podle postupu v části “Výměna bloku na vzorky” na straně 7-10.
9. Proveďte kalibraci pozadí, abyste ověřili, že se kontaminaci podařilo odstranit.

Provedení kalibrace pozadí

Kdy provádět

Společnost Applied Biosystems doporučuje provádět kalibraci pozadí měsíčně nebo podle potřeby v závislosti na využití přístroje.

Účel kalibrace pozadí

Kalibrace pozadí slouží ke změření úrovně fluorescence pozadí v přístroji – používá se destička nebo mikrofluidní karta s deionizovanou vodou. V průběhu kalibrace pozadí systém provádí po dobu 2 minut při 60°C kontinuální odečítání signálu z destičky pro kalibraci pozadí. Poté program SDS spočítá průměrnou hodnotu zaznamenaných spekter a na jejich základě generuje výsledný kalibrační soubor. Systém během následně prováděných běhů používá tento kalibrační soubor pro odečet fluorescence pozadí z naměřených hodnot.

Jelikož signál pozadí se může měnit se stárnutím přístroje, společnost Applied Biosystems doporučuje provádět kalibraci pozadí každý měsíc.

Poznámka: Běhy kalibrace pozadí lze rovněž využít k detekci kontaminace v bloku na vzorky.

O signálu pozadí

V rámci měření fluorescence přístrojem ABI PRISM 7900HT je zaznamenávána i fluorescence, která je systému vlastní a běžně se označuje jako fluorescence pozadí. Fluorescence pozadí je složený signál, který je detekován v celém spektru. Tento signál sestává z fluorescence, která pochází z různých zdrojů - elektronický šum pozadí, blok na vzorky, voda použitá ve spotřebním materiálu, spotřební plast (destičky a víčka). Jelikož signál pozadí může snižovat přesnost měření, přístroj 7900HT byl konstruován tak, aby signál pozadí byl minimální. Kromě toho využívá program SDS rovněž algoritmus odpočtu signálu pozadí z každého vzorku, čímž se zvyšuje citlivost detekce (viz strana D-5).

Potřebné pomůcky

Jedna z následujících možností

- Destička pro kalibraci pozadí, která je součástí spektrálního kalibračního kitu, a centrifuga s adaptéry na destičky
- Věci pro přípravu destičky pro kalibraci pozadí:
  - ABI PRISM™ optická 394- nebo 96-jamková destička
  - ABI PRISM optická adhezívní fólie nebo ABI PRISM optická víčka
  - Pipetman, 100-µL (a špičky)
  - Centrifuga s adaptéry na destičky
- Mikrofluidní karta pro kalibraci pozadí vyžaduje:
  - Reagencie pro kalibraci (Micro Fluidic Card Spectral Calibration Reagents)
  - Centrifuga
  - Nástroj pro zaslepení mikrofluidních karet

Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci pozadí

Příprava karty

1. Vyjměte mikrofluidní kartu pro kalibraci pozadí z obalu a nechte ji ohřát na pokojovou teplotu.
2. Vyjměte zkumavku s roztokem pro kalibraci pozadí z mrazáku a nechte ji roztát. Poté co roztaje ji promíchejte na vortexu.
3. Rozplňte roztok pro kalibraci pozadí do mikrofluidní karty, vždy 100 µL roztoku do každého plnícího rezervoáru.
4. Centrifugujte mikrofluidní kartu podle postupu v části "Centrifugace mikrofluidních karet" na straně 4-15.
5. Zaslepte mikrofluidní kartu podle postupu v části "Zaslepení mikrofluidních karet" na straně 4-18.
6. Pokračujte částí "Vytvoření dokumentu destičky pro kalibraci pozadí" níže.

Příprava destičky

1. Zvolte jednu z možností:

Pokud…	pak…
používáte destičku pro kalibraci pozadí ze spektrálního kalibračního kitu	vyjměte destičku z mrazáku a nechte ji ohřát na pokojovou teplotu
vytváříte vlastní destičku pro kalibraci pozadí	1. Pipetujte deionizovanou vodu do každé jamky. – 384-jamková destička: 20 µL do každé jamky. – 96-ti jamková destička: 50 µL do každé jamky. 2. Uzavřete destičku pomocí optické adhezívní fólie nebo optických plochých víček.

2. Krátce destičku centrifugujte.
3. Pokračujte částí "Vytvoření dokumentu destičky pro kalibraci pozadí" níže.

Vytvoření dokumentu destičky pro kalibraci pozadí

Příprava dokumentu destičky

1. Spusťte program SDS.
2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
3. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:
   - Assay (Esej) – Zvolte **Background** (Pozadí).
   - Container (Destička) – Zvolte odpovídající formát destičky.
   - Template (Templát) – Zvolte **Blank Template** (Žádný templát).
4. Má-li destička pro kalibraci pozadí nebo mikrofluidní karta čárový kód, klikněte do pole **Barcode** (Čárový kód) a pomocí ruční čtečky čárových kódů jej naskenujte.

5. Klikněte OK.

   Program vytvoří dokument destičky pro kalibraci pozadí.

   DŮLEŽITÉ! Dokument destičky pro kalibraci pozadí neměňte. Teplotní parametry běhu pro kalibraci pozadí jsou uloženy v programu SDS a zahrnují jedlinou inkubaci při 60 °C 2 min. Jelikož destička obsahuje pouze vodu, není nutné zadávat vzorky nebo detektory.

6. Uložte dokument destičky:
   a. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).
   b. V poli **File name** (Název souboru) zadejte:
      Background_<*datum ve formátu RRMMDD* >
      Např. běh provedený 31. května 2001 bude pojmenován: Background_010531.
   c. Klikněte Save (Uložit).

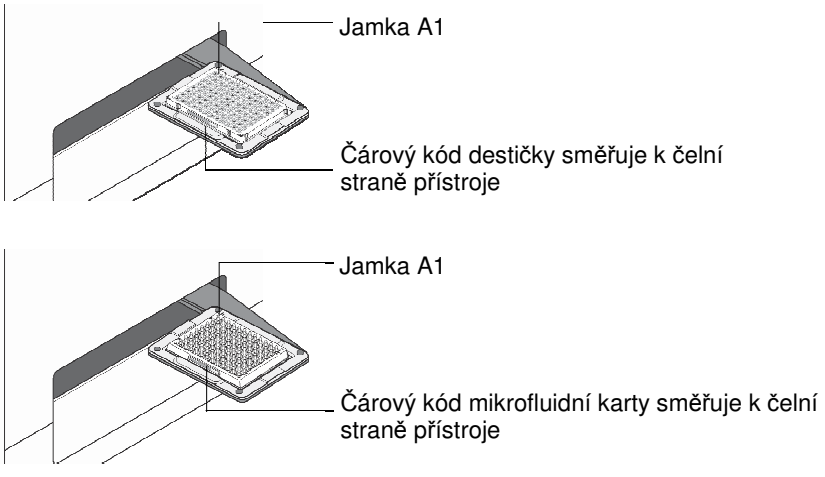
   Program dokument destičky uloží a je připraven provést běh.

7. Pokračujte částí "Spuštění destičky pro kalibraci pozadí nebo mikrofluidní karty" níže.

Spuštění destičky pro kalibraci pozadí nebo mikrofluidní karty

Provedení běhu kalibrace pozadí

1. Vložte destičku pro kalibraci pozadí do přístroje 7900HT:
   a. V programu SDS v dokumentu destičky zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
   b. Zvolte záložku **Real-Time**.
   c. Klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít).
   d. Umístěte destičku pro kalibraci pozadí nebo mikrofluidní kartu do nosítek přístroje podle obrázku níže.



Poznámka: Pozice A1 je vlevo nahoře.

2. Klikněte Start.

   Přístroj 7900HT spustí běh kalibrace pozadí.

   Poznámka: Před spuštěním běhu může přístroj vyčkat až 15 minut na ohřátí vyhřívaného víka na požadovanou teplotu.

3. Po skončení běhu se objeví dialogové okno Run Complete (Běh ukončen):
   a. Klikněte OK.
   b. Klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít) a vyjměte destičku z nosítek.
   c. Proveďte extrakci pozadí podle popisu na straně 7-19.

Analýza výsledků kalibrace pozadí

Extrakce pozadí

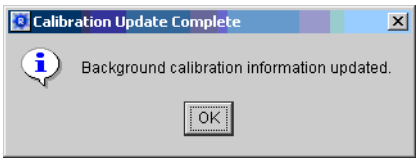
Během této procedury vytvoří program SDS na základě běhu kalibrace pozadí kalibrační soubor a uloží jej v podadresáři Calibration (Kalibrace) adresáře SDS 2.2.

1. Zvolte **Analysis > Extract Background** (Analýza > Extrakce pozadí).
   Program se pokusí extrahovat signál pozadí a zobrazí hlášku o průběhu extrakce.

   Zobrazí-li:

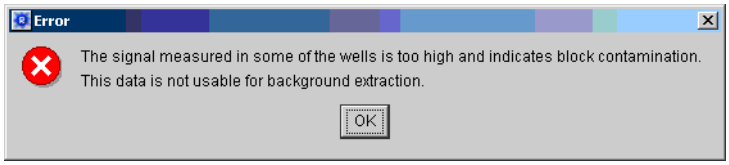
   - Dialogové okno Calibration Update Complete (Kalibrace ukončena), byl běh úspěšný.
     Pokračujte krokem 2.

     Signál odečtený z destičky pro kalibraci pozadí je v rámci povolených limitů.



   - Dialogové okno Error (Chyba), je běh neúspěšný. Vyhledejte problémové jamky a dekontaminujte blok podle postupu v části “Běhy kalibrace pozadí” na straně 8-9.

     Program extrakci přerušil, protože jedna nebo více jamek dává signál vyšší než 2500 FSU.



2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).
   Program uloží dokument destičky.
3. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít).
   Program zavře dokument destičky.

Provedení kalibrace barev

Kdy provádět

Společnost Applied Biosystems doporučuje provádět kalibraci barev:

- Každých 6 měsíců v závislosti na používání přístroje
- Po výměně bloku na vzorky za jiný typ (viz strana 7-6)

DŮLEŽITÉ! Před kalibrací barev musíte vždy provést kalibraci pozadí.

Účel kalibrace barev

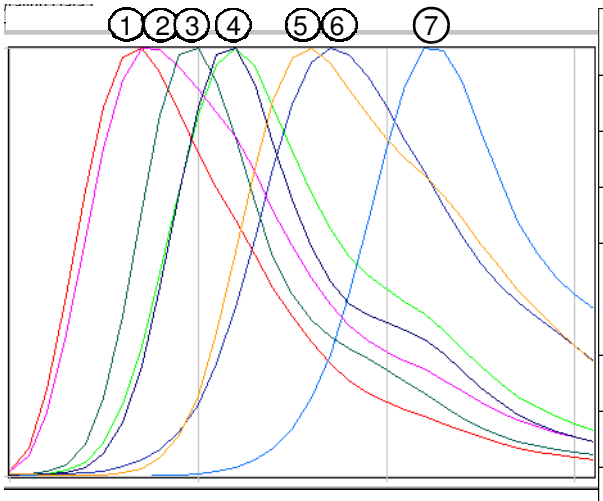
V rámci kalibrace barev systém odečte během 2-minutové inkubace při 60 °C spektra sérií standardů jednotlivých barev a uloží informace o spektrech jednotlivých barev v příslušném kalibračním souboru pro danou barvu v adresáři SDS. Po skončení běhu program provede extrakci příspěvku každé jednotlivé barvy do celkového signálu.

DŮLEŽITÉ! Jelikož stáří a používání přístroje mohou ovlivnit odečítání čistých spekter, doporučuje společnost Applied Biosystems aktualizovat kalibraci barev jedenkrát až dvakrát ročně v závislosti na využití přístroje.

Soubory barev

Přístroj ABI PRISM 7900HT monitoruje fluorescenční signály barev FAM™, NED™, ROX™, SYBR®, TAMRA™, TET™ a VIC® pipetovaných v předpřipravených 384- nebo 96-ti jamkových destičkách.

V případě mikrofluidních karet jsou monitorovány tři barvy: FAM™, VIC® a ROX™. Vaše instalační souprava tyto tři barvy obsahuje a vy je pipetujete do tří mikrofluidních karet, abyste provedli kalibraci.



	Barva	Max. (nm)
1	FAM	~520
2	SYBR	~520
3	TET	~540
4	VIC	~550
	JOE	~550
5	NED	~570
6	TAMRA	~580
7	ROX	~610

Obrázek 7-4 Spektra čistých barev na přístroji 7900HT

Poznámka: Přístroj 7900HT umožňuje používání vlastních barev (jiných než těch, které nabízí společnost Applied Biosystems). Chcete-li používat vlastní barvy, postupujte podle části "Přidání vlastní barvy do sady barev" na straně 7-27.

Po ukončení běhu je každé snímání provedené v jeho průběhu uloženo v programu SDS ve formě nezpracovaných spektrálních dat. Příspěvek emise jedné každé fluorescenční barvy je v daném vzorku stanoven porovnáním nezpracovaných spektrálních dat a spektrálních dat této barvy uložených v kalibračním souboru (tzv. multikomponentní analýza, viz str. D-5). Ukládáte-li po ukončení analýzy dokument destičky, program uloží kalibrační soubor i fluorescenční data naměřená v průběhu daného experimentu.

Potřebné pomůcky

384-nebo 96-ti jamková destička

- Spektrální kalibrační kit
  - verze pro 384-jamkovou destičku
  - verze pro 96-ti jamkovou destičku
- Destička pro kalibraci barev
- Informační leták
- Centrifuga s adaptérem na destičky

Poznámka: Spektrální kalibrační kit obsahuje destičku/y pro kalibraci barev a informační leták. Verze pro 96-ti jamkovou destičku obsahuje dvě destičky pro kalibraci barev.

Mikrofluidní karta

- Spektrální kalibrační reagencie pro mikrofluidní kartu
- Centrifuga
- Nástroj pro zaslepení mikrofluidní karty

Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev

Příprava destiček

DŮLEŽITÉ! Před kalibrací barev musíte vždy provést kalibraci pozadí. Viz "Provedení kalibrace pozadí" na straně 7-16.

1. Vyjměte 384- nebo 96-ti jamkovou destičku pro kalibraci barev z lednice a nechte ji ohřát na pokojovou teplotu.
2. Vyjměte destičku pro kalibraci barev z obalu.
3. Krátce destičku centrifugujte.

Příprava mikrofluidních karet

DŮLEŽITÉ! Před kalibrací barev musíte vždy provést kalibraci pozadí. Viz "Provedení kalibrace pozadí" na straně 7-16.

1. Vyjměte tři prázdné mikrofluidní karty z lednice a nechte je ohřát na pokojovou teplotu.
2. Vyjměte tři mikrozkumavky (barvy FAM, VIC a ROX) z mrazáku a nechte je roztát. Po roztátí je vortexujte.
3. Naplňte jednu prázdnou mikrofluidní kartu barvou FAM (100 µL na jeden plnící rezervoár).
4. Centrifugujte mikrofluidní kartu podle postupu v části "Centrifugace mikrofluidních karet" na straně 4-15.
5. Zaslepte mikrofluidní kartu podle postupu v části "Zaslepení jamek mikrofluidních karet" na straně 4-18.
6. Opakujte kroky 3 až 5 pro barvy VIC a ROX.

Příprava dokumentu destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev

Příprava dokumentu destičky pro kalibraci barev

1. Spusťte program SDS.
2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
3. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:
   - Assay (Esej) – Zvolte **Pure Spectra** (Barvy).
   - Container (Destička) – Zvolte odpovídající formát destičky.
   - Template (Templát) – Provádíte-li:
     - *Běh s 384-jamkovými destičkami*: zvolte **384 Well Pure Dyes Plate.sdt**.
       Nejsou-li k dispozici templáty, vytvořte dokument podle návodu v informačním letáku ze spektrálního kalibračního kitu a podle postupu na straně 7-28.
     - *Běh s 96-jamkovými destičkami*: zvolte odpovídající templát.
       Spouštíte-li destičku 1 (obsahuje barvy FAM, JOE™, NED a ROX), zvolte **96 Well Pure Dyes Plate 1.sdt**.
       Spouštíte-li destičku 2 (obsahuje barvy SYBR, TAMRA, TET a VIC), zvolte **96 Well Pure Dyes Plate 2.sdt**.

- *Běh s mikrofluidní kartou*: ponechte toto pole prázdné.
  Pro mikrofluidní kartu FAM (obsahuje barvu FAM), zvolte **MFC FAM Pure Dyes.sdt**.
  Pro mikrofluidní kartu ROX (obsahuje barvu ROX), zvolte **MFC ROX Pure Dyes.sdt**.
  Pro mikrofluidní kartu VIC (obsahuje barvu VIC), zvolte **MFC VIC Pure Dyes.sdt**.

4. Do pole **Barcode** (Čárový kód) naskenujte pomocí ruční čtečky čárových kódů čárový kód.
5. Klikněte OK. Program vytvoří dokument destičky pro kalibraci barvy.
6. Uložte dokument destičky:
   a. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).
   b. Zvolte **Files of type** (Typ souboru) **> ABI PRISM SDS Document (*.sds)**.
   c. V poli **File name** (Název souboru) zadejte:
   - *384-jamková destička:* **PureDye_<** *datum ve formátu RRMMDD* **>**
     Např. běh provedený 31. května 2001 bude pojmenován: **PureDye_053101**.
   - *96-ti jamková destička*, zadejte **PureDye_Plate<***plate #***>_<** *datum ve formátu RRMMDD* **>**. Např. běh s destičkou 1 provedený 31. května 2001 bude pojmenován: **PureDye_Plate1_053101**.
   - *384-jamková karta*: zadejte **<***Barva***><** *datum ve formátu RRMMDD* **>_MFC.** Např. běh provedený 31. května 2001 bude pojmenován **FAM_053101_MFC**.

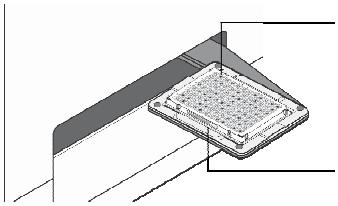
   d. Klikněte Save (Uložit).

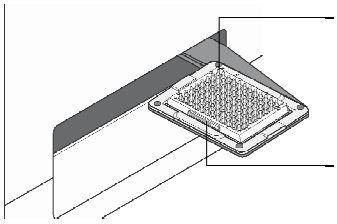
   Program dokument destičky uloží.
7. Připravte a spusťte destičky pro kalibraci barev podle postupu níže.

Spuštění destiček nebo mikrofluidních karet pro kalibraci barev

Spuštění destičky pro kalibraci barev

1. Vložte destičku pro kalibraci barev do přístroje 7900HT:
   a. V programu SDS v dokumentu destičky zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
   b. Zvolte záložku **Real-Time** a klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít).
   c. Umístěte destičku pro kalibraci barev nebo mikrofluidní kartu do nosítek přístroje podle obrázku níže.





Poznámka: Pozice A1 je vlevo nahoře.

2. Klikněte Start.

   Přístroj 7900HT spustí běh kalibrace barev. Teplotní profil běhu je uložen v přístroji a sestává z jediné dvouminutové inkubace při 60 °C.

   Poznámka: Před spuštěním běhu může přístroj vyčkat až 15 minut na ohřátí vyhřívaného víka na požadovanou teplotu.

3. Po skončení běhu se objeví dialogové okno Run Complete (Běh ukončen):
   a. Klikněte OK.
   b. Klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít) a vyjměte destičku z nosítek.
   c. Proveďte extrakci barev podle popisu na straně 7-25.

Analýza výsledků kalibrace barev

Extrakce barev

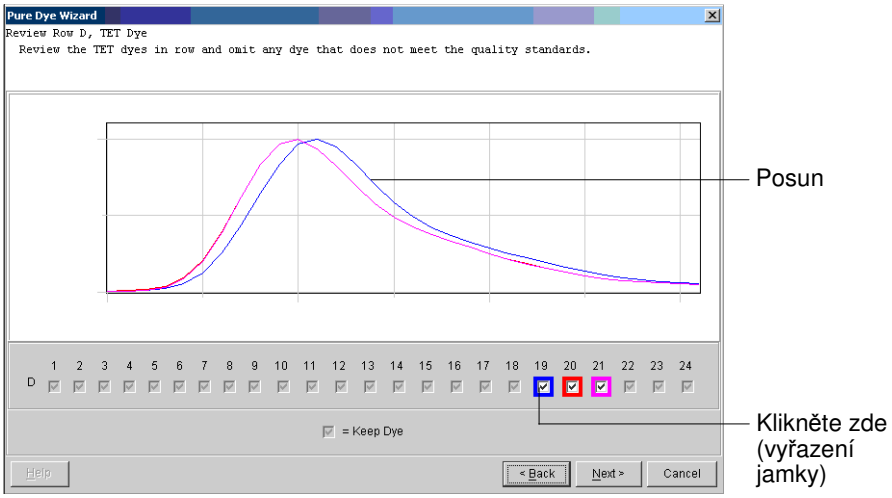
Účelem zobrazení výsledků pomocí průvodce (Pure Dye Wizard) je vyhledat a odstranit nepravidelné barevné signály. Průvodce zobrazuje spektrální data vždy pro tři jamky najednou. Tyto jamky obsahují vždy tutéž barvu v identické koncentraci a zobrazené křivky by proto měly mít identický průběh. Nepřesnosti pipetování nebo kontaminace mohou způsobit mírné změny signálu v určité jamce. Signál z takové jamky musí být vyřazen.

1. Zvolte **Analysis > Extract Pure Dye Wizard** (Analýza > Průvodce extrakcí barev).
2. Postupujte podle pokynů v průvodci.

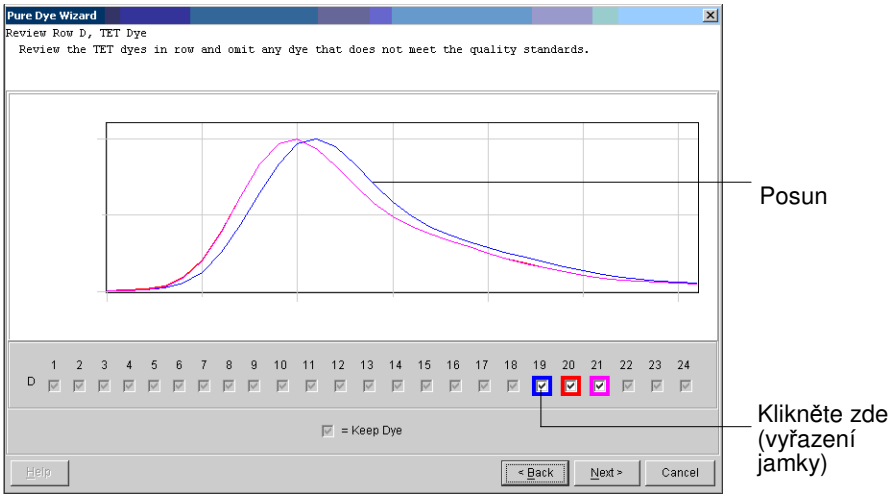
   Proveďte následující kroky:

   a. Zkontrolujte zda nedochází k posunu vrcholků (píků) spekter.

   Příklad destičky:



Příklad mikrofluidní karty:



b. Pokud dojde k posunu píku (odlehlý bod), klikněte do políčka příslušné jamky, čímž tuto jamku odstraníte (nebude použita pro vytvoření kalibračního souboru).

Poznámka: Spektrální signály jsou obecně přijatelné, mají-li pík ve stejné pozici jako ostatní vzorky téže skupiny a mírný posun signálu při jiných vlnových délkách.

c. Klikněte Next > (Další).

d. Opakujte kroky a až c i pro všechny zbývající jamky dokud se nezobrazí hláška signalizující provedení extrakce spektrálního signálu.

Program provede extrakci signálu jednotlivých barev a uloží tato data jako kalibrační soubor.

3. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).

   Program uloží dokument destičky.

4. Zvolte **File > Close** (Soubor > Zavřít).

   Program zavře dokument destičky.

5. Provádíte-li spektrální kalibraci pro:
   - 384-jamkový blok – Kalibrace barev je hotova.
   - 96-ti jamkový blok – Proveďte běh s druhou destičkou pro kalibraci barev. Opakujte kroky:

     – “Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev” na straně 7-22

     – “Spuštění destiček nebo mikrofluidních karet pro kalibraci barev” na straně 7-24

     – “Analýza výsledků kalibrace barev” na straně 7-25
   - 384-jamkovou mikrofluidní kartu – Proveďte běh s druhou a třetí mikrofluidní kartou pro kalibraci barev obsahující barvy VIC a ROX. Opakujte kroky:

     – “Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev” na straně 7-22

     – “Spuštění destiček nebo mikrofluidních karet pro kalibraci barev” na straně 7-24

     – “Analýza výsledků kalibrace barev” na straně 7-25

Přidání vlastní barvy do sady barev

Kdy provádět

Přístroj ABI PRISM 7900HT lze použít k provádění reakcí používajících vlastní barvy (nevyráběné společností Applied Biosystems). Před jejich použitím je nezbytně nutné vytvořit destičku a spustit běh s destičkou pro kalibraci této barvy.

Potřebné pomůcky

- ABI PRISM optické 384- nebo 96-ti jamkové destičky
- ABI PRISM optická adhezívní fólie nebo ABI PRISM optická plochá víčka
- vlastní barva(y)
- pipeta, 100-µL (se špičkami)
- centrifuga s adaptérem na destičky

Vytvoření destičky s vlastní barvou

Poznámka: Účel této destičky je totožný jako u destiček ABI PRISM pro kalibraci barev. Program SDS použije takovouto destičku jako standard, používaný následně při multikomponentní analýze každého běhu, kde je daná barva použita.

1. Připravte si destičku s ředící řadou vlastní barvy.
2. Spusťte program SDS.
3. Vytvořte dokument destičky pro alelickou diskriminaci a spusťte běh s připravenou destičkou.

Poznámka: Pro tento dokument destičky není nutné definovat názvy vzorků, detektory apod. Účelem běhu je stanovit správnou pracovní koncentraci barvy. Toho je docíleno porovnáním intenzity spektrálních signálů jednotlivých ředění.

4. Zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat).

   Program analyzuje výsledky běhu.

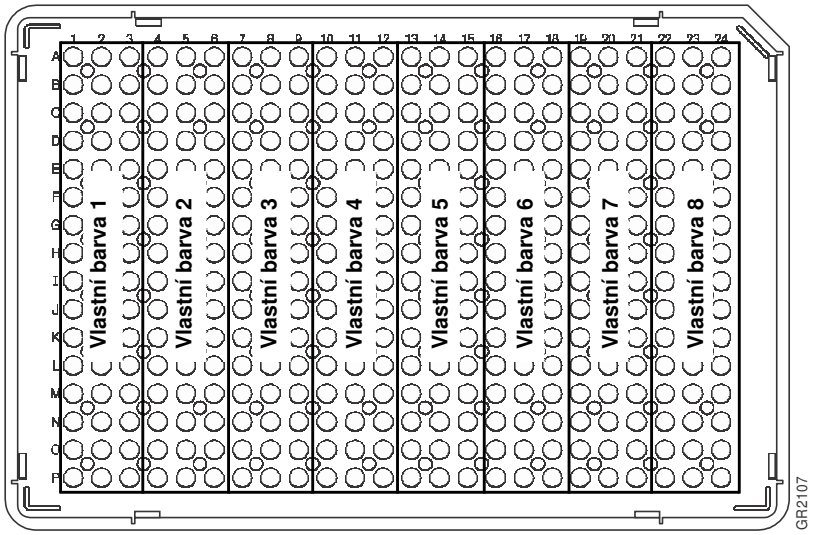
5. Klikněte na ikonu (Zobrazit graf hrubých dat).
6. Ze zobrazeného grafu odečtěte nejvyšší koncentraci barvy, která nedá vzniknout saturovanému signálu, a poznamenejte si ji.

   Poznámka: Saturované signály mají píky přesahující detekční mez (> 65,000 fluorescenčních jednotek) a v grafu hrubých dat vytvářejí plató.

   Koncentrace vlastní barvy, která vede ke vzniku nejsilnějšího možného signálu ale nikoliv k saturaci, je maximální použitelná koncentrace dané barvy na přístroji 7900HT.

7. Opakujte kroky 1 až 6 pro všechny vlastní barvy.

8. Vytvořte si destičku pro kalibraci vlastní barvy (barev) tak, že pipetujete každou vlastní barvu do nejméně tří sloupců v optické destičce ABI PRISM™ v koncentracích stanovených v kroku 7.



DŮLEŽITÉ! Optické parametry přístroje 7900HT vyžadují, aby byla každá vlastní barva pipetována do nejméně tří sloupců.

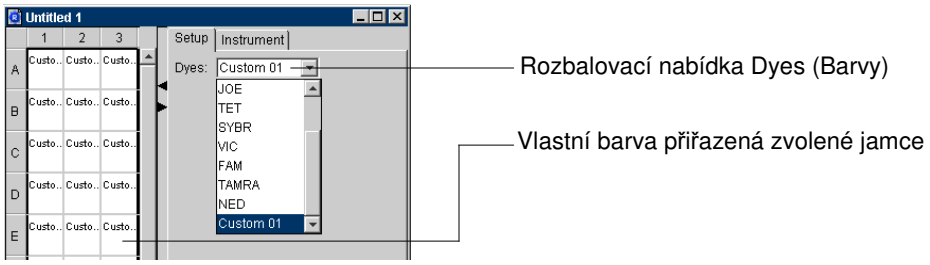
9. Uzavřete destičku pomocí adhezívní optické fólie nebo optických plochých víček.

10. Vytvořte templát pro běh s vlastní barvou podle postupu níže.

Vytvoření templátu pro destičku s vlastní barvou

1. Spusťte program SDS.
2. Přidejte novou barvu do programu pomocí **Dye Manager** (Správce barev):
   a. Zvolte **Tools > Dye Manager** (Nástroje > Správce barev).
   b. V dialogovém okně Dye Manager (Správce barev) klikněte New... (Nová).
   c. V dialogovém okně Add Dye (Přidat barvu) zadejte název vlastní barvy a klikněte OK.
      Program přidá novou barvu do seznamu vlastních barev.
   d. Opakujte kroky b a c pro další vlastní barvy, které chcete přidat do Správce barev.
   e. Klikněte Done (Hotovo).
      Program SDS vám následně umožní tyto barvy použít, budete-li chtít provést jejich kalibraci.
3. Vytvořte dokument destičky pro provedení kalibrace vlastní barvy:
   a. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
   b. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:
      Assay (Esej) – Zvolte **Pure Spectra** (Barvy).
      Container (Destička) – Zvolte odpovídající formát destičky.
      Template (Templát) – Zvolte **Blank Template** (Žádný templát).
   c. Klikněte OK. Program vytvoří dokument destičky pro kalibraci barvy.

4. Do dokumentu destičky přidejte vlastní barvy:
   a. Zvolte jamky obsahující vlastní barvy.
   b. V rozbalovací nabídce **Dyes** (Barvy) v záložce **Setup** (Zadání) zvolte příslušnou barvu.
      Program přiřadí zvolenou barvu vybraným jamkám.
   c. Opakujte kroky a a b, chcete-li přiřadit další vlastní barvy.



5. Uložte takto vytvořený dokument jako templát:
   a. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).
   b. V dialogovém okně Save (Uložit) vyhledejte adresář **Program Files > Applied Biosystems > SDS 2.2 > Templates** (Templáty).
      Adresář **Templates** se objeví v poli **Look in** (Vyhledat). Uložíte-li templát do adresáře Templáty, bude k dispozici v rozbalovací nabídce **Template** (Templáty) v dialogovém okně New Document (Nový dokument).
   c. Zvolte **Files of type** (Typ souboru) > **ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)**.
   d. V poli **File name** (Název souboru) zadejte název templátu.
   e. Klikněte Save (Uložit). Program uloží dokument destičky jako templát.
6. Proveďte běh s destičkou pro kalibraci vlastní barvy podle postupu v části “Příprava destičky nebo mikrofluidní karty pro kalibraci barev” na straně 7-22.

Ověření funkčnosti přístroje

Kdy provádět

Společnost Applied Biosystems doporučuje ověřit funkčnost přístroje pomocí destičky TaqMan® RNase P Instrument Verification Plate (TaqMan® RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje) nebo mikrofluidní karty TaqMan™ TGF-β Instrument Verification Micro Fluidic Card (TaqMan™ TGF-β pro ověření funkčnosti přístroje):

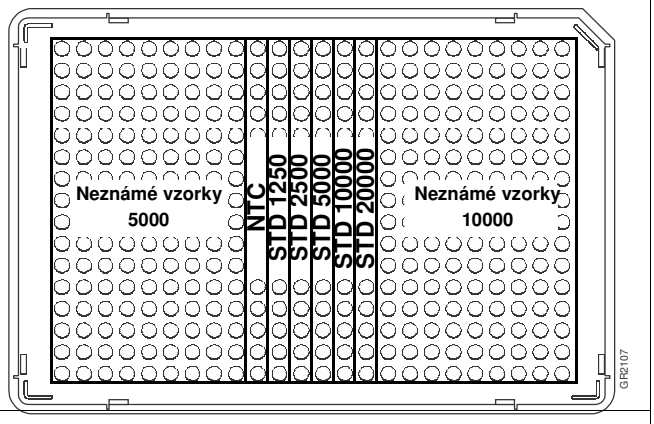
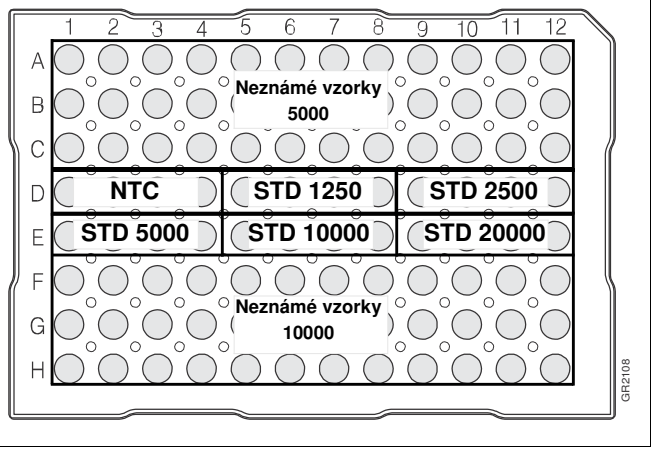
- Při výměně bloku na vzorky za jiný typ (první výměna svého druhu)
- Je-li zapotřebí ověřit funkčnost přístroje 7900HT

Účel běhů RNázy P

Běh s destičkou TaqMan® RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje ověřuje fungování přístroje 7900HT při použití optických destiček téhož formátu (384- nebo 96-ti jamkové). Destička s RNázou P obsahuje rozplněné reagencie potřebné pro detekci a kvantifikaci genomových kopií lidského genu pro RNázu P (jednokopiový gen kódující RNázovou podjednotku enzymu RNáza P). Každá jamka obsahuje reakční mix (1× TaqMan® univerzální PCR mastermix, primery na RNázu P a sonda značená FAM) a templát.

Tabulka 7-2 znázorňuje uspořádání standardů a skupin neznámých vzorků na destičce RNáza P. Destička RNáza P obsahuje pět skupin standardů (1250, 2500, 5000, 10000 a 20000 kopií) a dvě skupiny neznámých vzorků (5000 a 10000 kopií).

Tabulka 7-2 Organizace vzorků a standardů na 384- a 96-ti jamkové destičce RNáza P

Destička RNáza P	Organizace vzorků a standardů
384 jamek	
96 jamek	

Účel běhů TGF-β

Běh s mikrofluidní kartou TaqMan™ TGF-β pro ověření funkčnosti přístroje ověřuje fungování přístroje 7900HT při použití mikrofluidních karet. Mikrofluidní karta TGF-β obsahuje rozplněné reagencie potřebné pro detekci a kvantifikaci genomových kopií lidského genu pro TGF-β. Každá jamka obsahuje primery na TGF-β a FAM značenou MGB sondu.

Potřebné pomůcky

Běhy RNáza P

- destička TaqMan® RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje
- centrifuga s adaptéry na destičky

Běhy TGF-β

- mikrofluidní karta TaqMan TGF-β pro ověření funkčnosti přístroje
- TaqMan® univerzální PCR mastermix
- voda, prostá DNáz/RNáz, deionizovaná
- 2-mL mikrozkumavka, sterilní
- centrifuga
- nástroj pro zaslepení mikrofluidních karet

Příprava ověřovací destičky nebo mikrofluidní karty

Příprava destičky RNáza P

1. Vyjměte ověřovací destičku TaqMan RNáza P z mrazáku a nechte ji roztát při pokojové teplotě.
2. Krátce destičku centrifugujte.
3. Pokračujte částí “Příprava dokumentu destičky” na straně 7-32.

Příprava mikrofluidní karty TGF-β

4. Vyjměte mikrofluidní kartu TGF-β z mrazáku a nechte ji ohřát na pokojovou teplotu.
5. Ve sterilní 2-mL mikrozkumavce připravte reakční směs:

Reagencie	Objem (µL)
TaqMan univerzální PCR mastermix	500
lidská cDNA	50
voda prostá RNáz/DNáz	450
Celkový objem	1000

6. Opatrně obsah zkumavky promíchejte poklepem.
7. Pipetujte 100 µL reakční směsi do každého z osmi plnících rezervoárů.
8. Pokračujte částí “Příprava dokumentu destičky” na straně 7-32.

Příprava dokumentu destičky

1. Spusťte program SDS.
2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
3. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte:

   Assay (Esej) – **Absolute Quantification** (Absolutní kvantifikace)

   Container (Destička) – Zvolte odpovídající formát destičky.

   Template (Templát) – Provádíte-li:

   - Běh s 384-jamkovou destičkou RNáza P, zvolte **384 Well RNaseP Install Plate.sdt**.
   - Běh s 96-ti jamkovou destičkou RNáza P, zvolte **96 Well RNaseP Install Plate.sdt**.
   - Běh s mikrofluidní kartou TGF-β, zvolte **rnase p card template.sdt**.

   Poznámka: Nejsou-li k dispozici templáty, vytvořte dokument pro kalibraci barev pomocí návodu v informačním letáku ze spektrálního kalibračního kitu a podle postupu na straně 7-28.

4. Do pole **Barcode** (Čárový kód) naskenujte pomocí ruční čtečky čárových kódů čárový kód:
   a. Klikněte do pole **Barcode** (Čárový kód).
   b. Vyjměte destičku RNáza P nebo mikrofluidní kartu TGF-β z obalu a naskenujte čárový kód.
5. Klikněte OK. Program vytvoří dokument destičky.

   Poznámka: Dokument destičky neměňte. Součástí templátu je i přednastavený teplotní profil.

6. Uložte dokument destičky:
   a. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit).
   b. V poli Barcode (Čárový kód) dialogového okna Save (Uložit) proveďte:
      – Zadejte název nebo čárový kód a klikněte Save (Uložit).
      – Pomocí ruční čtečky čárových kódů naskenujte čárový kód.
   c. Zvolte **Files of type** (Typ souboru) > **ABI PRISM SDS Document (*.sds)**.
   d. Klikněte Save (Uložit).

   Program dokument destičky uloží. Nyní je možné spustit běh RNázaP.

Spuštění destičky RNáza P nebo mikrofluidní karty TGF-β

1. V dokumentu destičky programu SDS zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
2. Zvolte záložku **Real-Time**.
3. Jsou-li nosítka zasunuta do přístroje 7900HT, klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít). Nosítka se vysunou ven.
4. Umístěte destičku RNáza P nebo mikrofluidní kartu TGF-β do nosítek přístroje.

   Poznámka: Pozice A1 je vlevo nahoře.

5. V záložce Real-Time klikněte Start. Spustí se běh.

   Poznámka: Před spuštěním běhu může přístroj vyčkat až 15 minut na ohřátí vyhřívaného víka na požadovanou teplotu.

6. Po skončení běhu:
   a. Proveďte analýzu výsledků podle postupu na straně 6-12.
   b. Nastavte pozadí a práh podle postupu na straně 6-46.
   c. Ověřte funkčnost přístroje 7900HT podle postupu níže.

Ověření funkčnosti přístroje

Analýza výsledků běhu RNáza P

Ověření funkčnosti přístroje je úspěšné, pokud získaná data dokládají, že přístroj je schopen rozlišit 5000 a 10000 genomových ekvivalentů s 99.7% koeficientem spolehlivosti.

Ověření funkčnosti přístroje 7900HT se provádí pomocí následujícího výpočtu:

$$[(CopyUnk_1) - 3(\sigma_{Copy\,Unk\,1})] > [(CopyUnk_2) + 3(\sigma_{CopyUnk2})]$$

kde:

- $CopyUnk_1$ - Průměrný počet kopií skupiny 1 (Obsahuje 10000 kopií)
- $\sigma_{CopyUnk1}$ - Standardní odchylka skupiny 1 (Obsahuje 10000 kopií)
- $CopyUnk_2$ - Průměrný počet kopií skupiny 2 (Obsahuje 5000 kopií)
- $\sigma_{CopyUnk2}$ - Standardní odchylka skupiny 2 (Obsahuje 5000 kopií)

Poznámka: Údaje pro dosazení do vzorce lze získat ze zprávy o výsledcích.

Poznámka: Při analýze je z každé skupiny neznámých vzorků v 96-jamkové destičce TaqMan RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje možné vyloučit maximálně šest odlehlých bodů.

Poznámka: Při analýze je z každé skupiny neznámých vzorků v 384 jamkové destičce TaqMan RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje možné vyloučit maximálně deset odlehlých bodů.

Část 7.2 Údržba podavače mikrodestiček

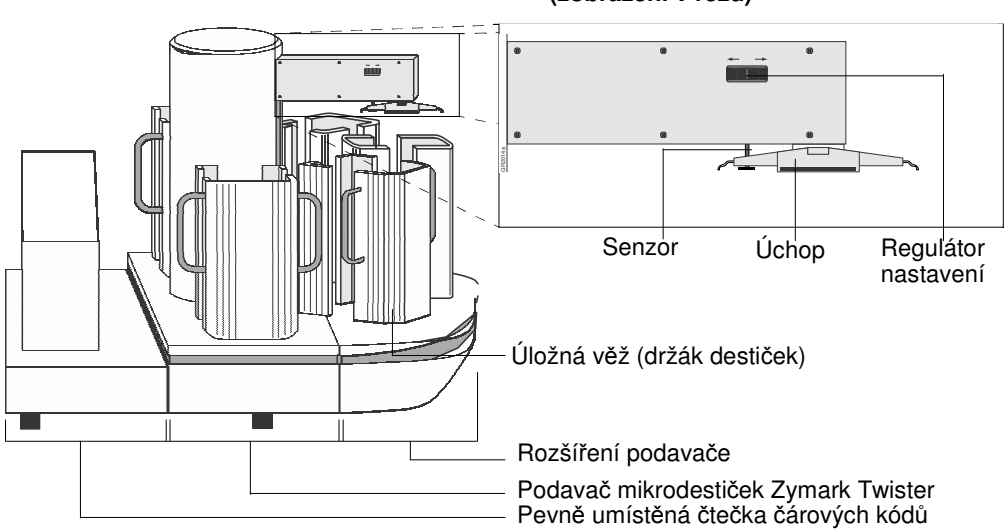
V této části

Součásti podavače mikrodestiček a pozice úložných věží 7-36
Nastavení citlivosti senzoru destiček 7-37
Seřízení podavače mikrodestiček 7-41
Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49
Čištění a výměna podložek ramene (pro úchop destiček) 7-52

Součásti podavače mikrodestiček a pozice úložných věží

Součásti podavače mikrodestiček

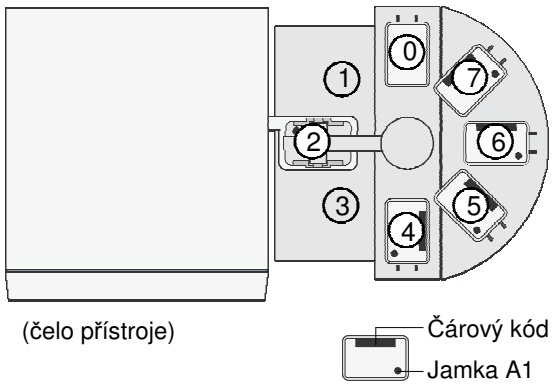
Součásti zmíněné v textu níže jsou vyobrazeny na obrázku 7-5.



Obrázek 7-5 Součásti podavače mikrodestiček

Úložné věže

Seřízení podavače mikrodestiček Zymark Twister se provádí pomocí programu Zymark Twister® . Definice úložných věží je odlišná v tomto programu a v programu Automation Controller. Na obrázku 7-6 jsou vyjmenovány jednotlivé pozice tak jak jsou těmito dvěma programy označovány.



Zymark Twister	Automation Controller
Pozice 0	Output
Pozice 1	(nepoužíváno)
Pozice 2	Instrument
Pozice 3	(nepoužíváno)
Pozice 4	Stack 1
Pozice 5	Stack 2

Obrázek 7-6 Definice úložných věží v programech Automation Controller a Zymark Twister

Nastavení citlivosti senzoru destiček

Kdy provádět

Senzor destiček, umístěný pod ramenem podavače mikrodestiček Zymark Twister vyžaduje seřízení v následujících situacích:

- Při výměně bloku na vzorky za blok jiného formátu
- Vyskytnou-li se problémy při detekci destiček

Potřebné pomůcky

- Optické reakční destičky ABI PRISM (odpovídající aktuálnímu formátu bloku na vzorky)

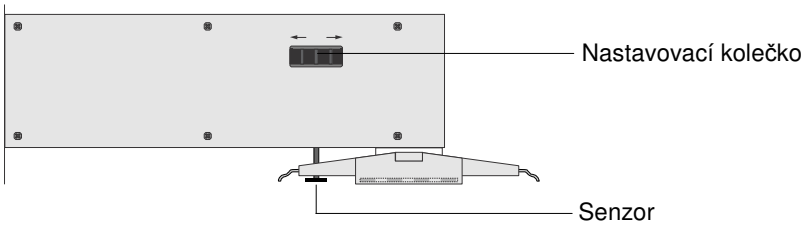
Seřízení citlivosti senzoru

Různé rozměry destiček vyžadují různý úchop ramenem podavače. Proto je senzor zapotřebí seřídit při každé změně formátu spotřebního materiálu.

1. Vypněte podavač mikrodestiček Zymark Twister.

   WARNING **RIZIKO PORANĚNÍ**. Podavač mikrodestiček Zymark Twister musí být při provádění následujících kroků vždy vypnut, jinak může dojít k vážnému poranění uživatele nebo poškození podavače.

2. Otáčejte nastavovacím kolečkem až na doraz, aby se senzor dostal do pozice Up (nahoře – viz boční panel).



3. Seřiďte senzor:
   a. Vezměte 96-ti nebo 384-jamkovou optickou destičku ABI PRISM za okraje a netlačte přitom na její střed, abyste ji nedeformovali.
   b. Umístěte destičku mezi úchopy ramene přesně na střed.
   c. Přidržujte destičku v této pozici a pomalu otáčejte nastavovacím kolečkem tak dlouho, než senzor klesne k destičce:

   – Senzor se musí dotýkat svrchní strany destičky a
   – Vydá měkké “kliknutí”

   DŮLEŽITÉ! Kliknutí je velice tiché a může být obtížné je zaslechnout. Pro usnadnění přibližte při seřizování ucho k senzoru .

4. Odstraňte destičku a poslouchejte, uslyšíte-li rozpojení senzoru.

Slyšeli jste rozpojení senzoru?	pak…
Ne	1. Posuňte senzor směrem dolů pootočením nastavovacího kolečka ve směru vyznačeném na rameni podavače. 2. Umístěte destičku do úchopu a poslouchejte sepnutí spínače senzoru: – Neslyšíte-li sepnutí senzoru, vyjměte destičku a opakujte kroky 1 a 2 výše. – Slyšíte-li sepnutí senzoru, vyjměte destičku a pokrakujte krokem viz níže
Ano	1. Posuňte senzor pomocí nastavovacího kolečka o jeden krok směrem nahoru, jak je vyznačeno na rameni podavače. 2. Umístěte destičku do úchopu a poslouchejte sepnutí spínače senzoru: – Slyšíte-li sepnutí senzoru, vyjměte destičku a opakujte kroky 1 a 2 výše. – Neslyšíte-li sepnutí senzoru, úspěšně jste nalezli nulovou pozici senzoru. Poznámka: V nulové pozici způsobí posun nastavovacího kolečka o jeden krok dolů sepnutí senzoru.

5. Jakmile naleznete nulovou pozici, opatrně otáčejte nastavovacím kolečkem ve směru dolů o potřebný počet kroků podle formátu destičky jak je specifikováno níže:

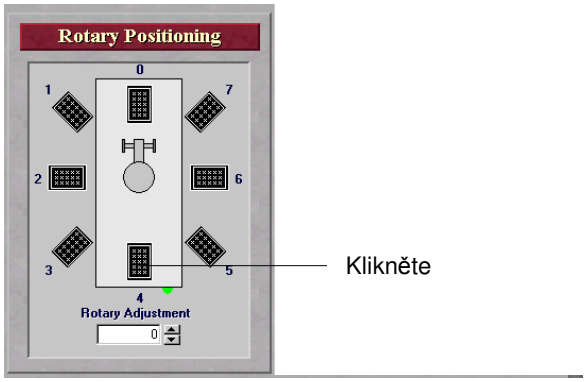
Destička	Otočení nastavovacího kolečka o…
96-ti jamková optická destička	20 kroků
384- jamková optická destička	15 kroků
mikrofluidní karta	15 kroků

Poznámka: Pokud se spletete, začněte znovu krokem 4 a nalezněte nulovou pozici senzoru.

6. Zkontrolujte seřízení podle postupu na straně 7-39.

Kontrola seřízení

1. Umístěte destičku do úložné věže 1 podavače.
2. Zapněte přístroj 7900HT, podavač mikrodestiček a počítač.
3. Zvolte Start > **Programs** > **Zymark Twister Plate Handler** > **Twister**.
   Spustí se program Zymark Twister.
4. Klikněte **Manual Control** (Ruční ovládání).
5. V dialogovém okně Manual Control (Ruční ovládání) klikněte na věž **4**.



   Rameno podavače se natočí nad vstupní věž.
6. Klikněte Find Plate (Najít destičku).
   Bylo-li seřízení provedeno správně, klesne rameno podavače až k destičce a sepne se spínač senzoru, signalizující nalezení destičky.
   Vydá-li rameno podavače skřípavý zvuk, upravte nastavení senzoru:
   a. V programu Zymark Twister klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice), čímž přesunete rameno podavače nahoru.
   b. Otočte nastavovacím kolečkem ve směru dolů o 10 kroků.
   c. Opakujte krok 6 dokud nebude destička nalezena.
7. Klikněte Close Gripper (Sevřít úchop), pak klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).
   Bylo-li seřízení provedeno správně, rameno podavače uchopí destičku a vyjme ji z věže.
   Pokud se rameno podavače zastaví předtím, než může úchop uchopit destičku, a k jejímu uchopení nedojde, upravte nastavení senzoru:
   a. Otočte nastavovacím kolečkem ve směru nahoru o 10 kroků.
   b. Uchopte destičku rukou a v programu Zymark Twister klikněte Open Gripper (Otevřít úchop), čímž ji uvolníte.
   c. Umístěte destičku zpět do věže 1.
8. Opakujte kroky 6 a 7 dokud rameno správně neuchopí destičku.
9. Uchopte destičku rukou a v programu Zymark Twister klikněte Open Gripper (Otevřít úchop), čímž ji uvolníte.

10. Ukončete program Zymark Twister.
    a. Klikněte

(Hlavní nabídka).
    b. Klikněte **Quit Application** (Ukončit program).

Chyba programu Zymark Twister může způsobit, že program zůstane neukončený v paměti počítače i poté, co byl ukončen. Jelikož v takovém případě dojde ke konfliktu s programem SDS, použijte Správce úloh operačního systému Windows:

1. a. Stiskněte najednou klávesy **Crtl** + **Alt** + **Del**.
   b. V dialogovém okně Windows Security klikněte **Task Manager** (Správce úloh).
   c. V dialogovém okně Task Manager (Správce úloh) se ujistěte, že se program zavřel – nevidíte-li v seznamu úloh (Task) program Zymark Twister, je vše v pořádku. Pokud program stále běží, klikněte na jeho název a klikněte **Close** (Zavřít).
   d. Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec).

Seřízení podavače mikrodestiček

Kdy provádět

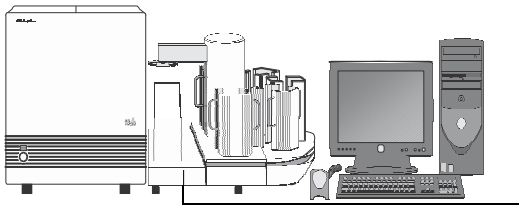
Následující proceduru proveďte, přemístíte-li přístroj ABI PRISM 7900HT, nebo potřebuje-li podavač mikrodestiček Zymark Twister seřídit.

Potřeba seřízení vzniká zejména v následujících případech:

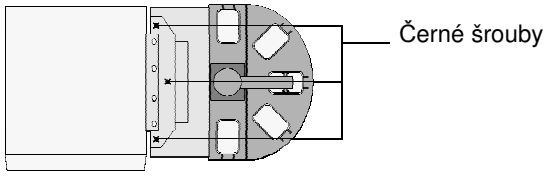
- Rameno podavače destiček se pohybuje příliš ve směru dolů (rameno skřípe při uchopení nebo uvolnění destičky)
- Rameno podavače naráží do úložných věží
- Rameno podavače uvolňuje destičky nade dnem úložných věží
- Destičky se při umístění do nosítek přístroje naklánějí

Příprava přístroje k seřízení

1. Odstraňte kryty pevně umístěné čtečky čárových kódů a podstavce.



2. Uvolněte tři černé šrouby připevňující přístroj 7900HT k podstavci podavače.

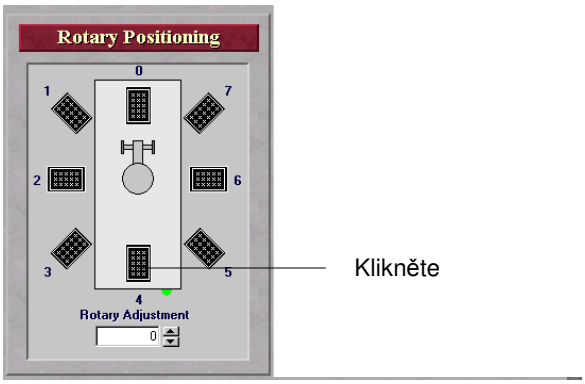


3. Vysuňte nosítka přístroje.
   a. Spusťte program Automation Controller.
      Objeví-li se chybová hláška, '**Machine calibration values are not valid. Please refer to documentation for calibration process**,' (Kalibrační hodnoty přístroje nejsou správně. Proveďte kalibraci podle návodu.) klikněte OK.
   b. Klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít).
      Nosítka přístroje se vysunou ven.
   c. Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec).
      Program Automation Controller se ukončí.
4. Zvolte Start > **Programs** > **Zymark Twister Plate Handler** > **Twister**.
   Spustí se program Zymark Twister.
5. Klikněte **Manual Control** (Ruční ovládání).

Seřízení věže 1 (Zymark – pozice 4)

Prvním krokem seřízení je seřízení věže 1 (pozice 4 v programu Zymark Twister). Toto seřízení je základem pro následné seřízení pozic dalších věží podavače.

1. Umístěte prázdnou destičku do úložné věže 1 podavače (Zymark - pozice 4).
2. V programu Zymark Twister klikněte na pozici **4**.

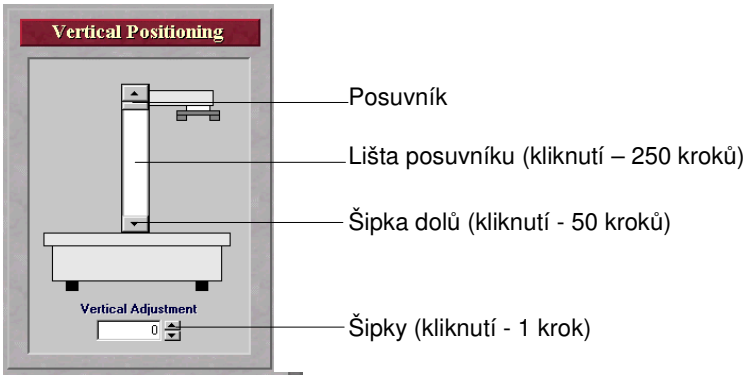


Rameno podavače se natočí nad vstupní věž.

3. Pomocí příkazů **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) posuňte rameno podavače dolů tak, aby bylo těsně nad věží.

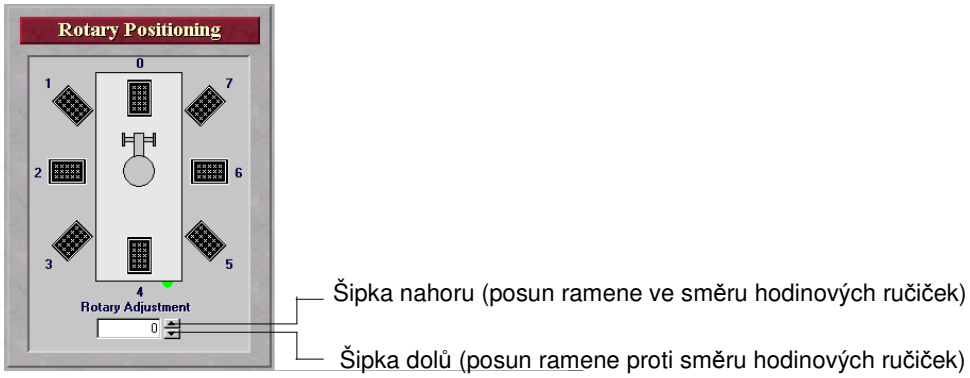
   Seřízení ve vertikálním směru lze provádět čtyřmi různými způsoby:

   - Výrazné posuny proveďte pomocí posuvníku..
   - Klikněte do lišty posuvníku – posun ramene o 250 kroků.
   - Klikněte na spodní šipku – posun ramene o 50 kroků.
   - Klikněte na šipky nahoru a dolů v okně **Vertical Adjustment** (Seřízení ve vertikálním směru) – posun ramene o 1 krok.
   - Klikněte do okna **Vertical Adjustment** (Seřízení ve vertikálním směru), zadejte hodnotu a stiskněte klávesu **Enter** – posun do specifického místa.



4. Ověřte rotační pozici ramene podavače, abyste se ujistili, že úchop:
   - je přímo nad věží
   - při pohybu dolů se nedotkne stěn věže

5. Pomocí šipek v okně **Rotary Adjustment** (Nastavení rotace) upravte pozici úchopu tak, že je přímo nad věží (vycentrován) a při pohybu dolů se nedotkne stěn věže.
   - Chcete-li posunout rameno podavače ve směru hodinových ručiček, klikněte na šipku nahoru.
   - Chcete-li posunout rameno podavače proti směru hodinových ručiček, klikněte na šipku dolů.



6. Pomocí nastavení **Vertical Adjustment** (Seřízení ve vertikálním směru) opatrně snižte rameno podavače do úložné věže. Upravte (Nastavení rotace) (Rotary Adjustment) podle potřeby, aby byl úchop uprostřed věže.

7. Poté co je úchop uvnitř věže, klikněte Find Plate (Najít destičku).
   Rameno podavače se pohne směrem dolů k destičce.

   Ujistěte se, že:
   - Destička je uprostřed úchopu.
   - Senzor destičky je v kontaktu s destičkou.
   - Ani úchop, ani destička se nedotýkají stěn věže.

8. Klikněte Close Gripper (Sevřít úchop)**.**
   Destička je uchopena.

9. Zvolte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).
   Rameno podavače se přesune nahoru. Dotýká-li se destička stěn věže, upravte rotační nastavení ramene podavače tak, aby k tomu nedocházelo.

   Poznámka: Může se stát, že je kontakt mezi destičkou a stěnou věže (věží) nevyhnutelný. Každopádně se jej snažte minimalizovat jak je to jen možné.

10. Pomocí příkazů Vertical Positioning (Seřízení ve vertikálním směru) přesuňte rameno podavače několikrát nahoru a dolů, abyste ověřili správnost seřízení.

11. Přesuňte rameno podavače směrem dolů na dno úložné věže, klikněte Rotary Offset (Definice rotační pozice) a klikněte Yes (Ano).

    Program zaznamená rotační pozici ramene pro věž 1 (Zymark – pozice 4).

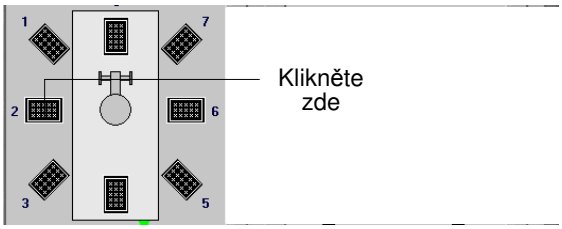
12. Klikněte Open Gripper (Otevřít úchop)**.**
    Destička se uvolní.

Seřízení podavače mikrodestiček k přístroji

Dalším krokem je seřízení ramene podavače mikrodestiček vůči nosítkům přístroje (Zymark – pozice 2). Tím zajistíte bezproblémový přenos destičky z ramene podavače do nosítek přístroje a zpět.

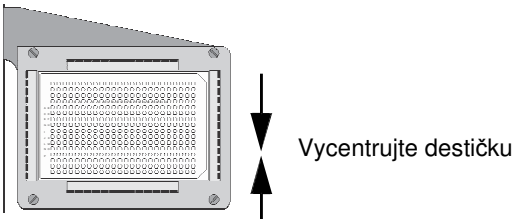
Poznámka: Během následující procedury nastavíte pozici podavače mikrodestiček vůči přístroji 7900HT. Musíte uvolnit tři černé šrouby na podstavci podavače mikrodestiček, které jej propojují s přístrojem 7900HT.

1. Pokud tam již není umístěte prázdnou destičku do úložné věže 1 (Zymark - pozice 4) a zvedněte ji pomocí ramene podavače:
   a. V programu Zymark Twister klikněte na pozici **4**.
   b. Klikněte Find Plate (Najít destičku).
   c. Klikněte Close Gripper (Sevřít úchop).
2. Klikněte na pozici **2**.

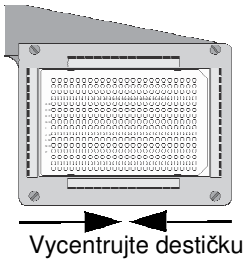


Rameno podavače se přesune nad nosítka přístroje.

3. Pomocí příkazů **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) snižte rameno podavače tak, aby bylo přibližně 1 cm nad nosítky přístroje.
4. Pomocí šipek v nastavení **Rotary Adjustment** (Nastavení rotace) vycentrujte úchop a destičku podél osy Y nosítek přístroje.



5. Posuňte podavač mikrodestiček a jeho základnu k nebo od přístroje 7900HT tak, abyste vycentrovali úchop a destičku podél osy X nosítek přístroje.



6. Proveďte opět centrování úchopu a destičky podél osy Y nosítek přístroje pomocí příkazů programu tak jako v kroku 4.

7. Pomocí příkazů **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) opatrně snižte rameno podavače na nosítka přístroje a ověřte, že destička dosedá přesně do nosítek.
8. Dotáhněte tři černé šrouby na základně spojující přístroj 7900HT a podavač mikrodesiček.
9. Uvolněte destičku z ramene podavače.
   a. Klikněte Open Gripper (Otevřít úchop).
   b. Klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).
10. Klikněte Find Plate (Najít destičku).
    Rameno podavače se pohne směrem dolů k destičce.
11. Uložte rotační a vertikální nastavení:
    a. Klikněte Rotary Offset (Definice rotační pozice) a klikněte Yes (Ano). Program zaznamená rotační pozici pro nosítka přístroje (Zymark - pozice 2).
    b. Klikněte Vertical Offset (Definice vertikální pozice) a klikněte Yes (Ano). Program zaznamená vertikální pozici pro nosítka přístroje.

Ověření seřízení věže 1

Je-li poloha podavače mikrodesiček vůči přístroji definována, je možné provést seřízení úložných věží podavače a toto seřízení zaznamenat.

1. Umístěte prázdnou destičku do úložné věže 1.
2. V programu Zymark Twister klikněte na pozici **4**.
   Rameno podavače se natočí nad vstupní věž.
3. Pomocí příkazů **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) posuňte rameno podavače dolů tak, aby bylo 1 cm nad věží, a ověřte, že je vycentrováno. Je-li zapotřebí, proveďte vycentrování ramene vůči věži pomocí Nastavení rotace (**Rotary Adjustment**).
4. Opatrně snižte rameno podavače do úložné věže. Upravte **Rotary Adjustment** (Nastavení rotace) podle potřeby, aby byl úchop uprostřed věže.
5. Poté co je úchop uvnitř věže, klikněte Find Plate (Najít destičku).
   Rameno podavače se pohne směrem dolů k destičce.
   Ujistěte se, že:
   - Destička je uprostřed úchopu.
   - Senzor destičky je v kontaktu s destičkou.
   - Ani úchop, ani destička se nedotýkají stěn věže.
6. Klikněte Close Gripper (Sevřít úchop).
7. Klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).
   Rameno podavače se přesune nahoru. Dotýká-li se destička stěn věže, upravte rotační nastavení ramene podavače tak, aby k tomu nedocházelo

   Poznámka: Může se stát, že je kontakt mezi destičkou a stěnou věže (věží) nevyhnutelný. Každopádně se jej snažte minimalizovat jak je to jen možné.

8. Klikněte Rotary Offset (Definice rotační pozice) a klikněte Yes (Ano).
   Program znovu zaznamená rotační pozici ramene pro věž 1 (Zymark – pozice 4).
9. Přidržujte destičku a klikněte Open Gripper (Otevřít úchop). Vyjměte destičku.

Definice dna úložné věže

Pro správné fungování programu Automation Controller je zapotřebí definovat dno všech úložných věží. Tím je zabráněno nárazu ramene podavače na dno úložných věží při jeho pohybu směrem dolů.

1. Vyjměte všechny destičky z přístroje a ramene podavače.
2. Umístěte prázdnou destičku do úložné věže na zpracované destičky (Zymark – pozice 0).
3. V programu Zymark Twister klikněte na pozici **0**.
   Rameno podavače se přesune nad úložnou věž na zpracované destičky.
4. Pomocí příkazů **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) posuňte rameno podavače dolů tak, aby bylo těsně nad věží.
5. Ověřte rotační pozici ramene podavače, abyste se ujistili, že úchop:
   - je přímo nad věží
   - při pohybu dolů se nedotkne stěn věže
6. Pomocí šipek v okně **Rotary Adjustment** (Nastavení rotace) upravte pozici úchopu tak, že je přímo nad věží (vycentrován) a při pohybu dolů se nedotkne stěn věže.
7. Pomocí nastavení **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) opatrně snižte rameno podavače do úložné věže. Upravte (Nastavení rotace) (Rotary Adjustment) podle potřeby, aby byl úchop uprostřed věže.
8. Poté co je úchop uvnitř věže, klikněte Find Plate (Najít destičku).
   Rameno podavače se pohne směrem dolů k destičce.
   Ujistěte se, že:
   - Destička je uprostřed úchopu.
   - Senzor destičky je v kontaktu s destičkou.
   - Úchop se nedotýká stěn věže
9. Klikněte Close Gripper (Sevřít úchop)**.**
   Destička je uchopena.
10. Zvolte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).
    Rameno podavače se přesune nahoru. Dotýká-li se destička stěn věže, upravte rotační nastavení ramene podavače tak, aby k tomu nedocházelo.

    Poznámka: Může se stát, že je kontakt mezi destičkou a stěnou věže (věží) nevyhnutelný. Každopádně se jej snažte minimalizovat jak je to jen možné.
11. Pomocí příkazů Vertical Positioning (Seřízení ve vertikálním směru) přesuňte rameno podavače několikrát nahoru a dolů, abyste ověřili správnost seřízení.
12. Přesuňte rameno podavače směrem dolů a klikněte Rotary Offset (Definice rotační pozice) a klikněte Yes (Ano).
    Program zaznamená rotační pozici ramene pro věž 0.

13. Klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).
14. Přidržujte destičku a klikněte Open Gripper (Otevřít úchop). Vyjměte destičku.
15. V poli **Vertical Adjustment** (Seřízení ve vertikálním směru) zadejte **–3200** a stiskněte **Enter**. Rameno podavače se přesune ke dnu úložné věže na zpracované destičky.
16. Opatrně snižte rameno podavače tak, aby bylo přibližně 1–2 mm ode dna věže.
17. Klikněte Vertical Offset (Definice vertikální pozice), klikněte Yes (Ano) a poznamenejte si číslo v poli **Vertical Adjustment** (Seřízení ve vertikálním směru). Program zaznamená vertikální pozici ramene pro věž 0.
18. Klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice). Rameno podavače se přesune nahoru.
19. V poli **Vertical Adjustment** (Seřízení ve vertikálním směru) zadejte definici vertikální pozice (Vertical Offset) z kroku 17 a stiskněte **Enter**. Rameno podavače se přesune do definované vertikální pozice.
20. Je-li zapotřebí, upravte definici pozice **Vertical Offset** a opakujte kroky 18 a 19, dokud není nastavení správně.

Definice pozic zbývajících věží

1. Umístěte prázdnou destičku do úložné věže 2 (Zymark – pozice 5).
2. V programu Zymark Twister klikněte na pozici **5**.

   Rameno podavače se přesune nad vstupní věž.
3. Pomocí příkazů **Vertical Positioning** (Seřízení ve vertikálním směru) snižte rameno podavače tak, aby bylo přibližně 1 cm nad věží a vycentrujte je pomocí Nastavení rotace (**Rotary Adjustment**) podle potřeby.
4. Opatrně snižte rameno podavače do věže. Pomocí Nastavení rotace (**Rotary Adjustment**) upravte vycentrování úchopu podle potřeby.
5. Jakmile je rameno podavače uvnitř věže vycentrováno, klikněte Find Plate (Najít destičku). Rameno podavače se pohne směrem dolů k destičce.

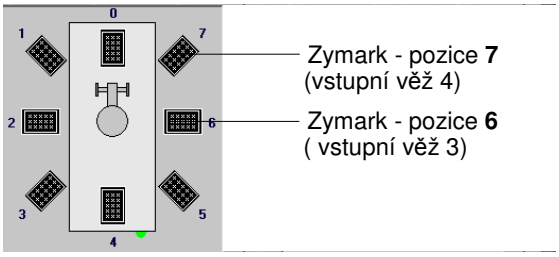
   Ujistěte se, že:
   - Destička je uprostřed úchopu.
   - Senzor destičky je v kontaktu s destičkou.
   - Ani úchop, ani destička se nedotýkají stěn věže.
6. Klikněte Close Gripper (Sevřít úchop).
7. Klikněte Vertical Home (Výchozí vertikální pozice).

   Rameno podavače se přesune nahoru. Dotýká-li se destička stěn věže, upravte rotační nastavení ramene podavače tak, aby k tomu nedocházelo.

   Poznámka: Může se stát, že je kontakt mezi destičkou a stěnou věže (věží) nevyhnutelný. Každopádně se jej snažte minimalizovat jak je to jen možné.
8. Pomocí příkazů Vertical Positioning (Seřízení ve vertikálním směru) přesuňte rameno podavače několikrát nahoru a dolů, abyste ověřili správnost seřízení.

9. Klikněte Rotary Offset (Definice rotační pozice) a klikněte Yes (Ano). Program zaznamená rotační pozici ramene pro věž 5 (vstupní věž 2).

10. Opakujte kroky 1 až 9 pro věže **3** a **4**, abyste definovali Výchozí rotační pozici (Rotary Offset) i pro pozice **6** a **7**:



11. Ukončete program Zymark Twister.

    a. Klikněte Main Menu.

    b. Klikněte **Exit** (Konec).

    Chyba programu Zymark Twister může způsobit, že program zůstane neukončený v paměti počítače i poté, co byl ukončen. Jelikož v takovém případě dojde ke konfliktu s programem SDS, použijte Správce úloh operačního systému Windows.

12. Ujistěte se, že je program Zymark Twister ukončen. Spusťte Task Manager (Správce úloh).

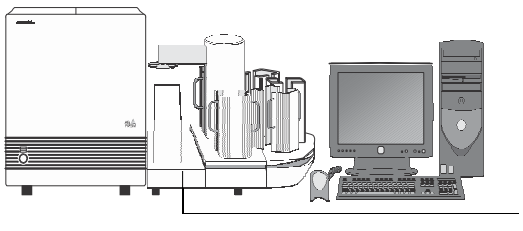
    a. Stiskněte najednou klávesy **Crtl** + **Alt** + **Del**.

    b. V dialogovém okně Windows Security klikněte **Task Manager** (Správce úloh).

    c. V dialogovém okně Task Manager (Správce úloh) se ujistěte, že se program zavřel – nevidíte-li v seznamu úloh (Task) program Zymark Twister, je vše v pořádku. Pokud program stále běží, klikněte na jeho název a klikněte **Close** (Zavřít).

    d. Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec), čímž Správce úloh ukončíte.

13. Vraťte zpátky na místo kryty pevně umístěné čtečky čárových kódů a podstavce (odstraněné v kroku 1 na straně 7-41).



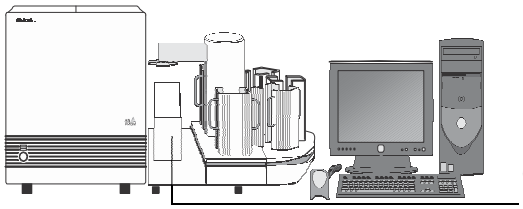
Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů

Popis

Pevně umístěná čtečka čárových kódů musí být nastavena tak, aby mohla automaticky skenovat čárové kódy destiček v okamžiku, kdy jsou umístěny pomocí ramene podavače do nosítek přístroje.

Přípravné kroky

1. Odstraňte kryt pevně umístěné čtečky čárových kódů.



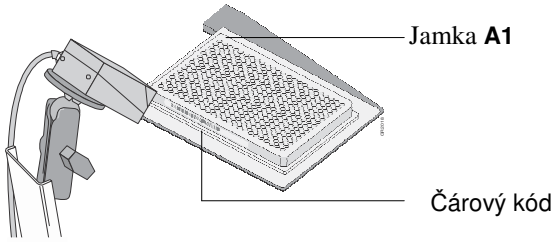
2. Zapněte počítač.
3. Spusťte program Automation Controller.
4. Klikněte Open/Close (Otevřít/Zavřít).
   Nosítka přístroje 7900HT se vysunou ven.
5. Zvolte **File > Exit** (Soubor > Konec).
   Program Automation Controller se ukončí.

Umístění čtečky čárových kódů

DŮLEŽITÉ! Pro seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů musí být nosítka přístroje vždy vysunuta.

1. Umístěte destičku s čárovým kódem do nosítek přístroje.

   DŮLEŽITÉ! Jamka **A1** musí odpovídat pozici **A1** nosítek přístroje a čárový kód je orientován směrem k pevně umístěné čtečce čárových kódů.



2. Zvolte Start > **Programs > PSC Laser Data > LDHOST**.
   Spustí se program LDHOST.

3. Navažte spojení s pevně umístěnou čtečkou čárových kódů:

   a. Klikněte (Edit).

   b. Klikněte (Terminal).
   Otevřou se dialogová okna Edit Configuration (Změna konfigurace) a Terminal.

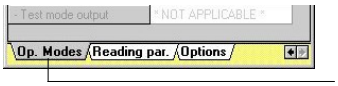
   c. V dialogovém okně Device Control (Ovládání zařízení) klikněte (**Připojit k zařízení**).
   V okně Terminal se zobrazí odpověď čtečky čárových kódů.

   d. Klikněte OK, čímž zavřete informační dialogové okno.

   Na základě komunikace mezi programem LD Host a čtečkou čárových kódů se aktualizují nastavení v okně Edit Configuration (Změna konfigurace).

4. Proveďte tato nastavení:

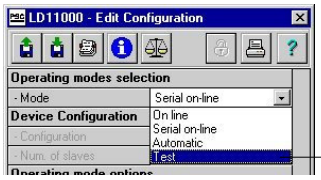
   a. V dolní části okna Edit Configuration (Změna konfigurace) zvolte záložku **Op. Modes** (Režimy provozu).



Záložka Op. Modes

Poznámka: Možná budete při vyhledání záložky Op. Modes (Režimy provozu) muset použít šipky ve spodní části dialogového okna.

   b. Z rozbalovací nabídky **Mode** (Režim) zvolte **Test**.



Rozbalovací nabídka Mode (Režim)

   c. V dialogovém okně Device Control (Ovládání zařízení) klikněte na tlačítko **RAM**, čímž se přepnete do režimu **EEPROM**.

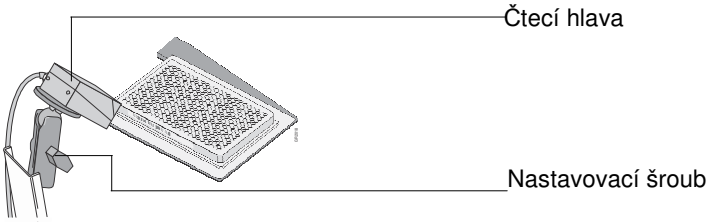
Tlačítko RAM

   d. V dialogovém okně Device Control (Ovládání zařízení) klikněte **Send** (Odeslat).

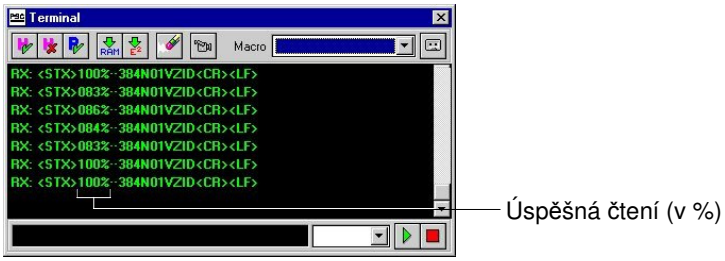
   e. V dialogovém okně Confirm (Potvrdit) klikněte **YES** (Ano).

Pevně umístěná čtečka čárových kódů začne skenovat čárový kód. Dialogové okno Terminal se aktualizuje každou 0,5 sec, čímž udává procentuální počet přesných čtení v tomto časovém intervalu.

5. Uvolněte černý nastavovací šroub na pevně umístěné čtečce čárových kódů a umístěte čtecí hlavu čtečky co nejdále od destičky, přičemž ale zachováte orientaci ve směru k čárovému kódu (viz níže)



6. Pozorujte dialogové okno Terminal a současně pomalu upravte orientaci pevně umístěné čtečky čárových kódů tak, aby se v okně zobrazoval co nejvyšší údaj (v %).



Poznámka: Abyste viděli oblast, kterou čte laser čtečky čárových kódů, umístěte list bílého papíru před čárový kód destičky

7. Je-li seřízení v pořádku, dotáhněte černý nastavovací šroub na čtečce čárových kódů.

8. Uveďte čtečku čárových kódů do normálního režimu provozu:

   a. V dialogovém okně Edit Configuration (Změna konfigurace) přepněte z nastavení **Test** zpět na **Serial on Line**.

   b. V dialogovém okně Device Control (Ovládání zařízení) potvrďte, že je stále zvolen režim **EEPROM** a klikněte **Send** (Odeslat).

   c. V dialogovém okně New Decision (Nová volba) klikněte **YES**.

   Pevně umístěná čtečka čárových kódů přestane skenovat čárový kód a přepne se do normálního režimu provozu.

9. Klikněte **Exit** (, Konec) čímž ukončíte program **LDHOST**.

10. Připevněte zpět kryt pevně umístěné čtečky čárových kódů (z kroku 1 na straně 7-49).

Čistění a výměna podložek ramene (pro úchop destiček)

Kdy provádět

Některé typy mikrodestiček mají čárové kódy nalepené pomocí adhezívních materiálů, které se mohou postupem času nabalovat na podložky ramene podavače mikrodestiček Zymark Twister. Následně může docházet k tomu, že podložky ramene se na destičky při manipulaci s nimi chytají (lepí) . Abyste tomu zabránili, je zapotřebí pravidelně (měsíčně) kontrolovat podložky ramene a v případě potřeby je vyčistit či vyměnit.

Potřebné pomůcky

Tabulka 7-3 Pomůcky potřebné pro výměnu podložek ramene

Materiál	**Kat. č.**
Souprava Finger Pad Replacement Kit, obsahuje 10 podložek	4315472
Malý plochý šroubovák	—
Šroubovák Phillips, malý	—
Isopropanol ve střičce	—

CHEMICKÉ RIZIKO. Izopropanol je hořlavá tekutina a vytváří hořlavé výpary. Způsobuje podráždění očí, kůže a dýchacího ústrojí a může způsobit poškození centrálního nervového systému. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice..

Čištění podložek ramene

Chcete-li vyčistit podložky ramene, otřete je dokonale izopropanolem. Mají-li hrubý povrch nebo na nich nalepená adheziva nelze setřít, vyměňte je podle postupu níže.

Výměna podložek ramene

1. Pomocí šroubováku Phillips vyšroubujte dva malé šroubky vyšroubujte šrouby v držácích podložek na každé straně úchopu a držáky sejměte.

   Poznámka: Rameno podavače si posuňte tak, abyste měli ke šroubům snadný přístup.

2. Pomocí plochého šroubováku vyjměte použité podložky z držáků.

   Poznámka: Výrobce doporučuje měnit všechny podložky najednou.

3. Vyčistěte držáky pomocí izopropanolu.
4. Vyjměte náhradní podložku z obalu a umístěte ji do držáku.
5. Opakujte tento krok i pro ostatní podložky.
6. Nasaďte držáky podložek zpět, podložky směřují do středu úchopu.
7. Nasaďte a dotáhněte šrouby.

   Poznámka: Dotažením šroubů neprovedete seřízení úchopu. Ujistěte se, že podložky jsou v těsném kontaktu s destičkou pokud s ní rameno manipuluje.

Část 7.3 Údržba hardwaru a softwaru

V této části

Běžná údržba počítače 7-54
Údržba programu SDS 7-55

Poznámka: Optimální fungování Real-Time PCR systému ABI PRISM 7900HT vyžaduje pravidelnou údržbu programu SDS. I když většinu kroků údržby provádí servisní technici společnosti Applied Biosystems, v této části naleznete důležité údaje, které byste měli znát.

Běžná údržba počítače

Kroky údržby

Počítač připojený k přístroji 7900HT vyžaduje provádění pravidelné údržby tak, aby bylo zajištěno optimální fungování všech komponent přístroje ABI PRISM 7900HT. Společnost Applied Biosystems doporučuje provádět následující kroky:

Tabulka 7-4 Údržba počítače

Krok	Kdy provádět
Archivace nebo odstranění starých souborů SDS	Týdně
Defragmentace pevného disku	Měsíčně nebo před dosažením 10% fragmentace
Aktualizace operačního systému	Je-li k dispozici/doporučena
Aktualizace programu 7900HT SDS	Je-li k dispozici

Správa dat

Společnost Applied Biosystems doporučuje, abyste zavedli postupy nakládání se soubory, vytvářenými programem SDS. Během jediného dne (jsou-li prováděny experimenty v reálném čase) může přístroj ABI PRISM 7900HT vytvořit více než 200 MB dat. Nemáte-li zavedeny postupy, jak s těmito daty dále nakládat, může přístroj 7900HT zaplnit pevný disk vašeho počítače během jen několika týdnů provozu. Podrobnější informace k tomuto tématu naleznete v části “Správa dat” na straně 1-17.

Archivace souborů SDS

Abyste šetřili prostor na pevném disku, lze soubory SDS archivovat pomocí kompresních nástrojů, které snižují jejich velikost. Kompresi a dekompresi souborů SDS lze provádět opakovaně.

K dispozici je několik komerčně dostupných kompresních nástrojů. Pro operační systém Microsoft Windows jsou běžné formáty PKZIP a *.arc.

Defragmentace pevného disku

Společnost Applied Biosystems doporučuje provádět defragmentaci pevného disku počítače, který je připojen k přístroji, alespoň jedenkrát týdně nebo předtím, než fragmentace dosáhne 10%. S používáním přístroje ABI PRISM 7900HT a vytvářením a mazáním souborů SDS dochází k tomu, že volný prostor na disku je dělen do stále menších bloků (nazývaných “klastry”). Následně není možné, aby nově vytvářené soubory SDS byly uchovávány jako jediný blok, ale počítač rozdělí soubor SDS na několik kusů, které uloží do různých částí pevného disku.

Fragmentace souborů SDS vede ke zhoršení fungování jak programu SDS tak operačního systému počítače. S postupnou fragmentací pevného disku se prodlužuje doba, kterou programy potřebují pro přístup k jednotlivým souborům, neboť musí vyhledávat jejich fragmenty.

Pro defragmentaci jsou k dispozici různé komerčně dostupné defragmentační nástroje. Tyto nástroje spojují fragmenty souborů a ukládají je na jediné místo na pevném disku, čímž zlepšují výkon systému.

Aktualizace operačního systému

Aktualizaci operačního systému počítače, připojeného k přístroji 7900HT, neprovádějte, nejste-li k tomu vyzváni zástupcem společnosti Applied Biosystems. Nové verze operačního systému Microsoft Windows nemusí být nutně kompatibilní s programem SDS a mohou vést k tomu, že program nebude fungovat.

Servisní technici společnosti Applied Biosystems provádějí aktualizace operačního systému v rámci pravidelných kroků údržby. Jsou-li k dispozici aktualizace operačního systému počítače a jejich použití je validováno společností Applied Biosystems, bude operační systém aktualizován servisním technikem společnosti.

Údržba programu SDS

Přístupová práva

DŮLEŽITÉ! Pro instalaci a/nebo aktualizaci programu SDS musíte mít pro daný počítač administrátorská práva.

Aktualizace programu SDS

Společnost Applied Biosystems neustále pracuje na vývoji programu SDS. Tak jak jsou k dispozici nové aktualizace programu, jsou i zákazníci společnosti Applied Biosystems o těchto aktualizacích informováni. Lze-li instalaci takové aktualizace provést uživatelsky, naleznete ji na internetových stránkách společnosti Applied Biosystems.

Poznámka: Servisní technici společnosti Applied Biosystems provádějí pravidelné aktualizace softwaru během plánovaných návštěv.

Opakovaná instalace programu

Ve vzácných případech, dojde-li např. k poškození části programu SDS, může být nutné program opakovaně instalovat. V takovém případě dodržujte následující pokyny:

- Nebyli-li jste informováni jinak, odstraňte instalovaný program SDS pomocí nástroje pro odinstalování softwaru. Nemažte adresář programu z adresáře Program Files.
- Instalujte program SDS jako uživatel s právy administrátora k danému počítači.
- Nebyli-li jste informováni jinak, instalujte program SDS do téhož adresáře, v němž byl instalován předešle.
- Seznamte se s veškerou dokumentací, týkající se instalované verze programu (poznámky k instalaci nebo uživatelská příručka). Nové verze programu mohou mít nové vlastnosti vyžadující vaši pozornost.

Řešení problémů 8

V této kapitole

Tabulka problémů 8-2
Nízká přesnost nebo nereprodukovatelnost 8-5
Kalibrace pozadí 8-9
Kalibrace barev 8-11
Eseje v reálném čase (Kvantitativní PCR a analýza disociační křivky) 8-12
Eseje typu End-Point (Alelická diskriminace) 8-13
Software a přístroj 7900HT 8-14
Podavač mikrodestiček Zymark Twister a pevně umístěná čtečka čárových kódů 8-17
Mikrofluidní karta 8-18
Databáze SDS Enterprise 8-20

Tabulka problémů

Přehled

Následující tabulka by vám měla pomoci vyřešit většinu problémů, s nimiž se můžete při práci s přístrojem ABI PRISM® 7900HT setkat.

Informace v tabulce jsou uspořádány v následujících kategoriích:

- Problémy s reagenciemi
- Problémy při provádění běhu
- Problémy související s přístrojem a jeho příslušenstvím

Součástí každé kategorie jsou i podkategorie, obsahující stručný popis problémů a toho jak se projevují.

Tabulku používejte tak, že vyhledáte problém, na který jste narazili. Na stránce uvedené v pravém sloupci tabulky vedle problému pak najdete popis možných příčin a doporučení pro vyřešení toho konkrétního problému.

Tabulka 8-1 Tabulka problémů

Kategorie	Popis	Strana
Problémy s reagenciemi a při provádění běhu		
Reagencie	Nízká přesnost	8-5
	Nereprodukovatelnost	
Instalace softwaru		
Program SDS	Nelze dokončit instalaci (instalace “zamrzla”)	8-5
	Instalace přerušena	
Problémy při provádění běhu		
Kalibrace pozadí	Software neprovedl extrakci pozadí	8-9
	Příliš vysoké pozadí (vyšší než 2500)	
Kalibrace barev	Software neprovedl extrakci barev	8-11
	Hrubá data běhu kalibrace barev jsou divná	
	Signál vytváří plató (saturace)	
	Signál je příliš nízký (< 10,000 FSU)	
	Více než dva odlehlé body (pro jednu barvu) v jedné řadě	
Eseje v reálném čase (Kvantitativní PCR a analýza disociační křivky)		8-12
Eseje typu End-Point (Alelická diskriminace)		8-13

Tabulka 8-1 Tabulka problémů

Kategorie	Popis	Strana
Problémy související s přístrojem a jeho příslušenstvím		
Software a přístroj 7900HT	Program SDS nelze spustit Program vede k “zamrznutí” počítače nebo k zobrazení chybové hlášky	8-14
	Komunikační chyba	
	Chyby teplotního cyklování	
	Program Automation Controller nenalezl soubor destičky	
	Zobrazí se dialogové okno Run Completed Successfully (Běh úspěšně ukončen) ale počítač nereaguje	
	Běh nezačne	
	Počítač je při analýze dat, otevírání a zavírání dialogových oken a dalších krocích pomalý.	
	Nelze se přihlásit do operačního systému Windows.	
	Počítač nelze vůbec spustit.	
Podavač mikrodestiček Zymark Twister a pevně umístěná čtečka čárových kódů	Rameno podavače vydává při zvedání nebo ukládání destiček skřípavý zvuk	8-17
	Rameno podavače se při pohybu věží dotýká jejích stěn	
	Rameno podavače umisťuje destičky do věží špatně	
	Destičky se při umístění do nosítek přístroje naklánějí	
	Rameno podavače nenalezne nebo neuchopí destičku	
	Destičky se lepí k podložkám ramene podavače	
	Rameno podavače nepřeskládá destičky na jejich původní místo	
	Pevně umístěná čtečka čárových kódů nečte čárové kódy destiček	

Tabulka 8-1 Tabulka problémů

Kategorie	**Popis**	**Strana**
Mikrofluidní karta	Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu jsou plnící rezervoáry poškozené (zmačkané, ohnuté).	8-18
	Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu je její krycí hliníková fólie poškozena.	
	Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu se na reakčních jamkách usazuje prach nebo jiné nečistoty.	
	Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu na ní kondenzuje vlhkost.	
	Podařilo se napipetovat příliš málo reakční směsi do plnícího rezervoáru.	
	Při pipetování reakční směsi dochází k jejímu úniku vzduchovým otvorem plnícího rezervoáru.	
	Během PCR dochází ke ztrátám reakční směsi.	
	Po výpočtu průměru a standardní odchylky skupiny replikátů se specifický replikát jeví jako odlehlý bod.	
Databáze SDS Enterprise	Archivace nebo získávání dat z databáze bylo ukončeno předčasně	8-20
	Nelze se připojit k databázi	

Nízká přesnost nebo nereprodukovatelnost

Přehled

Důvody vedoucí k tomu, že určitý experiment provedený na přístroji ABI PRISM 7900HT má nižší než optimální přesnost, mohou být značně rozdílné. Faktory, které mají vliv na přesnost, jsou popsány níže.

Nesprávně nastavený práh 8-5
Nepřesné pipetování 8-6
Neprovedená optimalizace reakce 8-6
Nedokonalé promíchání 8-6
Vzduchové bubliny 8-6
Destička nebyla centrifugována 8-6
Kapky 8-7
Popis destiček 8-7
Fluorescenční kontaminace destiček 8-7
Chyby 8-7
Kontaminace bloku na vzorky 8-7
Nesprávný nebo poškozený spotřební plast 8-8
Nízká koncentrace templátu 8-8
Používání reagencií od jiných dodavatelů 8-8

Nesprávně nastavený práh

Klíčem k vysoké přesnosti kvantitativní PCR je přesné rozeznání exponenciální fáze amplifikace. Přístroj ABI PRISM 7900HT má – za předpokladu rozumně optimalizované PCR reakce – dostatečnou citlivost, aby byly zobrazeny alespoň tři cykly v exponenciální fázi reakce. Program SDS následně vypočítá práh (fixní intenzitu signálu). Předpokladem detekce amplifikace v určité jamce je právě dostatečná intenzita fluorescenčního signálu v této jamce, tak aby tento signál překračoval práh. Vypočítaný práh je zapotřebí vždy ověřit a podle potřeby upravit.

Úprava nastavení prahu

U experimentů v reálném čase lze v programu SDS v amplifikačním grafu (Amplification plot) změnit vypočítaný práh. Více informací naleznete v části “Nastavení pozadí a prahu” na straně 6-46.

Nepřesné pipetování

Na kvantifikaci má bezprostřední vliv přesnost pipetování templátu do reakčních směsí. Přesnost pipetování má rovněž vliv na další jednotlivě přidávané reagencie (např. různé koncentrace hořčíku mají vliv na efektivitu amplifikace).

Používání mastermixů

Z těchto důvodů společnost Applied Biosystems důrazně doporučuje používání mastermixů. Všechny složky reakce, u kterých je to možné, by měly být před rozpipetováním do jamek destičky promíchány dohromady. Pro další zlepšení přesnosti skupin replikátů je pak na místě používání sub-mastermixů. Např. namísto pipetování 5 µL téhož templátu do čtyř jamek pipetujte 20 µL templátu do dílčího mastermixu a pak jej rozpipetujte do čtyř jamek. Při přípravě mastermixu počítejte s dodatečným objemem (5–10% celkového objemu), abyste kompenzovali ztráty vzniklé v důsledku pipetování.

Používání pipetmanů

Přesnost pipetování rovněž zlepšíte:

- Pravidelnou kalibrací a údržbou pipetmanů
- Pipetováním větších objemů
- Snížením počtu pipetovacích kroků na minimum

Informace o tom, jak správně používat konkrétní pipetman, získáte od jeho výrobce. Některými pipetmany například pipetujete žádaný objem při domáčknutí pístu na první doraz, takže domáčknutí na druhý doraz může vést k pipetovací chybě. Rovněž používáte-li novou špičku pro rozpipetování mastermixu, nejprve ji v mastermixu smočte nasátím a opět vytlačením směsi mastermixu.

Neprovedená optimalizace reakce

Reakce, jejichž chemizmus nebyl optimalizován, mohou být náchylné k nereprodukovatelným výsledkům. Chcete-li maximalizovat přesnost a efektivitu reakce, musíte pro každou používanou esej provést optimalizaci koncentrací primerů a sond. Informace týkající se optimalizace koncentrací primerů a sond v reakcích naleznete v příručce *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (kat. č. 4304449).

Nedokonalé promíchání

Pro docílení maximální přesnosti musí být mastermix PCR dokonale promíchán. Po přidání všech jeho součástí vortexujte mastermix 4-5 vteřin a teprve poté jej rozpipetujte do jamek destičky. Provádíte-li jakékoliv ředění, naředěnou směs vždy opět vortexujte.

Vzduchové bubliny

Jsou-li v jamkách destičky vzduchové bubliny, může dojít k lomu a nepřesnostem měření fluorescenčního signálu. Pipetujte reagencie do jamek destičky takovým způsobem, aby nedocházelo ke tvorbě bublin. Pokud destička přeci jen obsahuje bubliny, je možné je odstranit náklonem destičky, poklepem na ní nebo krátkou centrifugací.

Destička nebyla centrifugována

Jsou-li PCR reagencie na spodní straně optické adhezívní fólie, může v důsledku ohřevu této fólie shora dojít k jejich připečení na fólii, což může vést k nepřesnostem měření fluorescenčního signálu. Destičku vždy krátce centrifugujte, aby byly všechny reagencie na dně jamek.

Kapky

Kapky reagencií na stěnách jamek destičky nemusí být v kontaktu s blokem a v konečném důsledku v nich nemusí proběhnout amplifikace. Sklouzne-li taková kapka na dno jamky v průběhu PCR, dojde k naředění amplifikovaného produktu a zkreslení výsledku v dané jamce ve srovnání s ostatními jamkami v rámci dané skupiny replikátů. Dbejte proto při přenosu destičky do přístroje 7900HT, aby nedocházelo k tvorbě kapek. Vytvoří-li se kapky, přijměte taková opatření, abyste se jich zbavili (např. centrifugace).

Popis destiček

Na optické 384/96-ti jamkové destičky nebo optické kryty nepište. Fluorescenční látky v inkoustu mohou zkreslit výsledky měření fluorescence. Poznámky o obsahu jednotlivých jamek destičky veďte na list papíru nebo si vytiskněte zadání destičky (setup).

Fluorescenční kontaminace destiček

Mnohé v laboratořích používané látky jsou fluorescenční a dostanou-li se do kontaktu s optickými destičkami, může dojít ke zkreslení výsledků měření fluorescence. Například pudr používaný v rukavicích často obsahuje fluorescenční látky. Používejte proto pouze rukavice bez pudru a dotýkejte se destiček nebo optických víček pouze je-li to nezbytně nutné.

Chyby

Lidským chybám jako pipetování do nesprávné jamky nebo chyba v ředění se nelze úplně vyhnout.

Chcete-li četnost těchto chyb snížit:

- Pipetujte systematicky. Například uspořádání vzorků v destičce by mělo být intuitivní (nenechávejte mezi vzorky prázdné jamky).
- Při pipetování mastermixu se dívejte přímo dolů na dno jamek, abyste viděli pipetovanou tekutinu.
- Přidáváte-li reagencie o malém objemu jako např. templát, pipetujte je na stěnu jamky. Poklepem nebo centrifugací pak dostanete tyto kapky na dno jamek.
- Po skončení pipetování se ujistěte, že v jamkách nejsou vytvořeny kapky. Poklepem nebo centrifugací dostanete tyto kapky na dno jamek
- Provádíte-li sériová ředění, vyměňte po každém ředícím kroku špičku.
- Provádějte vizuální kontrolu, že pipetovaný objem je přibližně správný. Běžnou chybou je použití nesprávného pipetmanu (nastavení 20 µL namísto 2.0 µL).
- Provádějte vizuální kontrolu celkového objemu reakce. Soustřeďte se na vyhledání jamek, jejichž objem se liší od ostatních jamek.

Kontaminace bloku na vzorky

Jakákoliv kontaminace bloku na vzorky může mít vliv na výsledky. Například minerální olej omezuje přenos tepla. Psaní na reakční jamku může vést k absorbci světla.

Je zapotřebí provádět pravidelnou kontrolu čistoty bloků na vzorky. Případnou kontaminaci v bloku na vzorky můžete zjistit pomocí běhu s destičkou pro kalibraci pozadí a následnou analýzou výsledků z hlediska přítomnosti píků s intenzitou signálu vyšší než 2500 FSU (viz strana 7-16). Návod na dekontaminaci bloku na vzorky viz strana 7-14.

Nesprávný nebo poškozený spotřební plast

Na přístroji ABI PRISM 7900HT používejte pouze optické reakční destičky ABI PRISM, optické adhezívní fólie a optická plochá víčka ABI PRISM. Plast pro výrobu optického spotřebního materiálu je speciálně testován z hlediska přítomnosti fluorescenčních kontaminací. Optické reakční destičky jsou matné, aby přesněji odrážely světlo. Ohnuté, zdeformované nebo jinak poškozené destičky mohou mít vliv na přenos fluorescenčního signálu nebo bránit těsnému uzavření pomocí fólie, což může vést k evaporaci, změnám v objemu vzorků a chemizmu reakce. Ujistěte se, že používáte odpovídající spotřební materiál a každou destičku před použitím zkontrolujte.

Poznámka: Soupis spotřebního materiálu a reagencií naleznete v příloze C “Kity, reagencie a spotřební materiál”.

Nízká koncentrace templátu

Amplifikujete-li vzorky obsahující velmi nízká množství nukleových kyselin (obecně méně než 100 molekul), musíte předpokládat nižší přesnost díky Poissonovské distribuci. Templát o nízké koncentraci je rovněž více náchylný ke ztrátám kvůli nespecifické adhezi na plastové jamky, pipetovací špičky apod. Přídavek nosičové nukleové kyseliny jako je kvasinková tRNA nebo glykogenu může těmto ztrátám zabránit a tím zvýšit přesnost a citlivost eseje.

Používání reagencií od jiných dodavatelů

Pufr společnosti Applied Biosystems obsahuje vnitřní pasivní referenci (barva ROX™), která slouží k normalizaci fluorescenčního signálu vzorků (viz strana D-6).

DŮLEŽITÉ! PCR pufry jiných dodavatelů nemusí obsahovat pasivní referenci ROX. Při používání těchto pufrů musíte nastavit odpovídající pasivní referenci podle postupu v části “Nastavení pasivní reference” na straně 3-16.

Kalibrace pozadí

Řešení problémů

Tabulka 8-2 Řešení problémů kalibrace pozadí

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Software neprovede extrakci pozadí	Byl zvolen nesprávný typ destičky během zadání	Proveďte novou kalibraci pozadí a definujte správný typ destičky.
	Pozadí je příliš vysoké (≥ 2500 FSU[a])	Viz níže.
Pozadí je příliš vysoké (=>2500 FSU)	Kontaminace bloku na vzorky	1. Vytvořte novou destičku pro kalibraci pozadí. 2. Viz "Vyhledání kontaminovaných jamek v bloku" níže
	Kontaminace destičky pro kalibraci pozadí	

a Fluorescenční standardní jednotky – zobrazovány na ose Y grafu kalibrace pozadí.

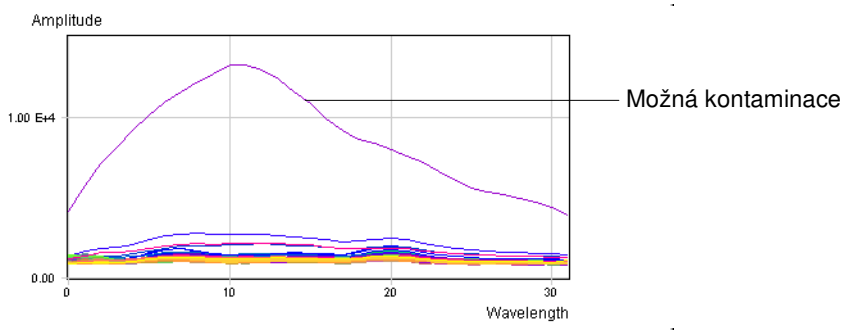
Vyhledání kontaminovaných jamek v bloku

Signál přesahující hodnotu 2500 FSU je považován za signál převyšující normální úroveň fluorescence pozadí a je známkou toho, že je buď destička pro kalibraci pozadí nebo blok na vzorky kontaminován.

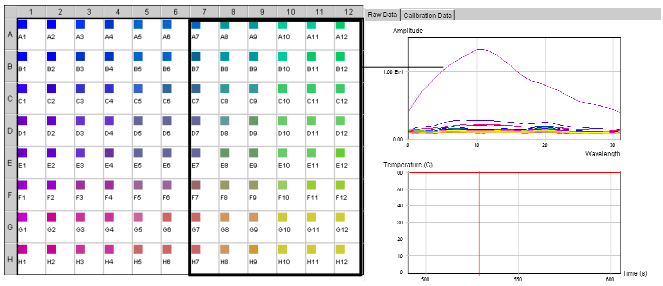
1. Není-li již otevřen, otevřete dokument destičky pro kalibraci pozadí.
2. Klikněte na ikonu (**Skrýt/zobrazit hrubá data**).

   Program SDS zobrazí hrubá data pro běh kalibrace pozadí.
3. Zvolte všechny jamky.
4. Zkontrolujte spektrální profil.

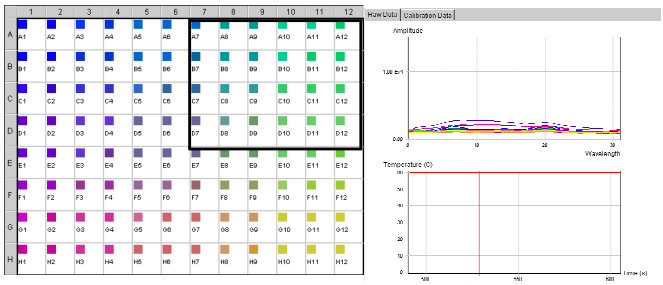
   Jamky, v nichž signál přesahuje hodnotu 2500 FSU, mohou být kontaminovány. Na následujícím obrázku jsou znázorněna hrubá data získaná s blokem na vzorky, v němž je jedna jamka kontaminována.



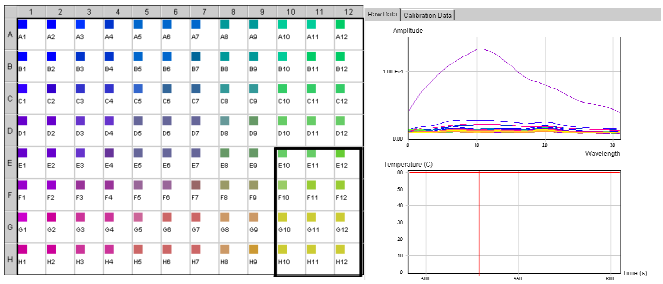
5. Výběrem stále nižšího počtu jamek v destičce identifikujte, která jamka/jamky v bloku na vzorky je kontaminována (viz níže).



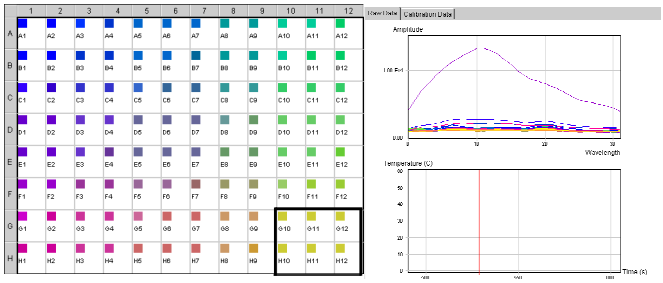
a. Hrubá data zvolených jamek obsahují problémový pík. Kontaminovaná jamka je ve sloupcích 7-12.



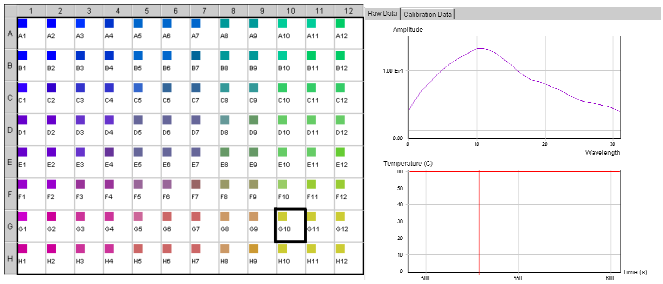
b. Hrubá data zvolených jamek neobsahují problémový pík. Kontaminovaná jamka je v posledních čtyřech jamkách sloupců 7-12.



c. Hrubá data zvolených jamek obsahují problémový pík. Kontaminovaná jamka je v posledních čtyřech jamkách sloupců 10-12.



d. Hrubá data zvolených jamek obsahují problémový pík. Kontaminovaná jamka je v posledních dvou jamkách sloupců 10-12.



e. Postupnou volbou jedné jamky za druhou zjistíte kontaminovanou jamku (G10).

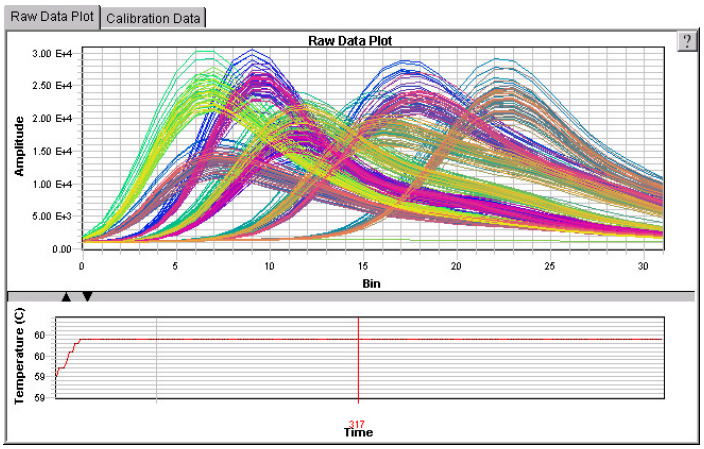
6. Opakujte krok 4 dokud neidentifikujete všechny kontaminované jamky.
7. Proveďte dekontaminaci bloku na vzorky podle postupu v části “Dekontaminace bloku na vzorky” na straně 7-14.
8. Proveďte kalibraci pozadí, abyste se ujistili, že se podařilo kontaminaci odstranit.

   Je-li kontaminace přítomna i po druhém běhu kalibrace pozadí, je pravděpodobným zdrojem kontaminace destička pro kalibraci pozadí.

Kalibrace barev

Řešení problémů

Tabulka 8-3 Řešení problémů kalibrace barev

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Software neprovede extrakci barev	Byl zvolen nesprávný typ destičky během zadání	Proveďte novou kalibraci barev a definujte správný typ destičky.
	Před kalibrací barev nebyla provedena kalibrace pozadí	Proveďte kalibraci pozadí a pak kalibraci barev
Hrubá data kalibrace barev vypadají divně (viz níže)	Destička pro kalibraci barev byla založena opačně	1. Ověřte, že vlnové délky jednotlivých barev odpovídají předpokladu. 2. Proveďte znovu běh.
		
Saturace signálu	Intenzita je nastavena příliš vysoko/nízko	Kontaktujte technickou podporu Applied Biosystems.
Signál je příliš nízký (< 10,000 FSU)		
Více než dva odlehlé body pro danou barvu v jedné řadě	• Evaporace • Kontaminace	Opakujte běh. Pokud problém přetrvává, použijte novou destičku pro kalibraci barvy.

Eseje v reálném čase (Kvantitativní PCR a analýza disociační křivky)

Řešení problémů

Dostanete-li atypické výsledky, můžete použít program SDS ke zjištění jejich možných příčin, ať již souvisejí s chemizmem reakcí nebo s přístrojem. Níže jsou uvedena doporuční stran postupu hledání příčin různých problémů.

Hrubá data

Graf hrubých dat (Raw Data) zobrazuje neanalyzované fluorescenční signály (před provedením normalizace) pro zvolené jamky v průběhu každého cyklu Real-Time PCR.

Na co se soustředit:

- **Signály jsou uniformní** – Jsou hrubá spektra jednotlivých skupin replikátů obdobná? Pokud ne, destička nebo blok na vzorky by mohly být kontaminovány.
- **Charakteristický tvar signálu** – Jsou vrcholy píků v odpovídajících vlnových délkách? Např. vzorky obsahující pouze barvou FAM™ značené sondy TaqMan® by neměly generovat signál ve vlnové délce odpovídající barvě VIC®. Takový signál může být známkou kontaminace vzorku, mastermixu nebo jamky.
- **Charakteristický nárůst signálu** – Posunete-li posuvník ve směru k vyšším cyklům PCR, dochází k nárůstu signálu podle očekávání? Nedojde-li k nárůstu, může to být známkou pipetovací chyby (jamka neobsahuje templát).
- **Saturace signálu (plató)** – Dochází k saturaci signálu? Pokud ano, může to být známkou, že jamka obsahuje příliš mnoho templátu nebo fluorescenční barvy.

Multikomponentní graf

Multikomponentní graf slouží k zobrazení normalizovaných signálů jednotlivých barev ze zvolené jamky. Zobrazují se signály barev přispívajících k celkovému složenému signálu dané jamky.

Na co se soustředit:

- **Zobrazují se správné barvy** – Jsou v grafu zobrazeny všechny předpokládané barvy? Je-li zobrazena nepředpokládaná barva, může to znamenat chybu v definici detektoru, jako např. zadání nesprávné reportérové barvy nebo zhášeče.
- **Fluorescenční signál ROX** – Je fluorescence ROX nižší než fluorescence reportérových barev? Pokud nikoliv, je možné, že příslušná reportérová barva resp. jí značená sonda nebyla pipetována do jamky (pipetovací chyba).
- **Fluorescence pozadí** – Je signál všech barev vyšší než pozadí? Není-li tomu tak, je velmi pravděpodobné, že v dané jamce nejsou sondy značené touto barvou (jamka neobsahuje sondu, mastermix nebo obojí).
- **Úroveň MSE** –MSE (mean squared error – střední kvadratická chyba) vyjadřuje jak přesně multikomponentní data odpovídají hrubým datům. Čím vyšší je hodnota MSE, tím vyšší je rozdíl mezi multikomponentními a hrubými daty.

Amplifikační graf

Amplifikační graf zobrazuje výsledky běhů v reálném čase po normalizaci a miltikomponentní analýze. Umožňuje nastavit pozadí (baseline) a práh pro daný běh.

Na co se soustředit:

- **Správné nastavení pozadí a prahu** – Jsou pozadí a práh nastaveny správně?
  Identifikujte jednotlivé části amplifikační křivky a nastavte pozadí tak, aby nárůst amplifikační křivky začínal v cyklu, který má vyšší pořadové číslo, než je pořadové číslo horní hranice rozsahu cyklů pro odečet pozadí.

  DŮLEŽITÉ! Neměňte přednastavený rozsah cyklů pro odečet pozadí pokud nárůst amplifikační křivky začíná až po 15. cyklu.

  Identifikujte jednotlivé části amplifikační křivky a nastavte práh tak, aby byl:
  - Vyšší než pozadí
  - Níže než je fáze plató a lineární fáze
  - V exponenciální fázi amplifikační křivky
- **Nepravidelný průběh amplifikace** – Amplifikovaly se všechny vzorky normálně? V každé křivce byste měli být schopni identifikovat tři fáze amplifikace.
- **Odlehlé body** – Zobrazíte-li výsledky v grafu závislosti C_T na pozici jamky, jsou výsledky replikátů srovnatelné? C_T hodnoty jamek, které se výrazně liší od průměru skupiny replikátů, do níž patří, lze považovat za odlehlé body.

  Nejsou-li výsledky replikátů srovnatelné, mohlo dojít k odpaření některých vzorků. Ujistěte se, že destička je těsně uzavřena optickou adhezívní fólií.

Eseje typu End-Point (Alelická diskriminace)

Řešení problémů

Dostanete-li atypické výsledky, můžete použít program SDS ke zjištění jejich možných příčin, ať již souvisejí s chemizmem reakcí nebo s přístrojem. Níže jsou uvedena doporuční stran postupu hledání příčin různých problémů.

Hrubá data

Graf hrubých dat (Raw Data) zobrazuje neanalyzované fluorescenční signály (před provedením normalizace) pro zvolené jamky v průběhu každého cyklu PCR.

Na co se soustředit...

- **Signály jsou uniformní** – Jsou hrubá spektra jednotlivých skupin replikátů obdobná? Pokud ne, destička nebo blok na vzorky by mohly být kontaminovány.
- **Charakteristický tvar signálu** – Jsou vrcholy píků v odpovídajících vlnových délkách? Např. vzorky obsahující pouze barvou FAM™ značené sondy TaqMan® by neměly generovat signál ve vlnové délce odpovídající barvě VIC®. Takový signál může být známkou kontaminace vzorku, mastermixu nebo jamky.
- **Saturace signálu (plató)** – Dochází k saturaci signálu? Pokud ano, může to být známkou, že jamka obsahuje příliš mnoho templátu nebo fluorescenční barvy.

Software a přístroj 7900HT

Řešení problémů

Tabulka 8-4 Řešení problémů se softwarem a počítačem

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Nelze dokončit instalaci (instalační program jakoby nereaguje)	Okno instalačního programu je skryté	1. Stiskněte a držte klávesu **Alt**. 2. Stiskněte klávesu **Tab** a zvolte ikonu instalačního programu. 3. Uvolněte obě klávesy. Okno instalačního programu se zobrazí.
Verze 2.0 programu SDS po instalaci verze 2.2 nefunguje	Verze 2.0 programu SDS je při instalaci automaticky odstraněna	Instalujte znovu program SDS, verze 2.0
Program SDS nelze spustit Program vede k “zamrznutí” počítače nebo k zobrazení chybové hlášky	• Nesprávné pořadí zapnutí • Poškozený program • Selhání hardwaru • Poškození operačního systému • Uvolněný kabel čtečky čárových kódů	Postupujte podle návodu níže dokud problém nezmizí.
		1
		1. Vypněte přístroj 7900HT. 2. Zkontrolujte propojení kabely. 3. Restartujte počítač a přihlašte se do něj. 4. Zapněte přístroj 7900HT. 5. Spusťte program SDS.
		2
		6. Restartujte počítač a přihlašte se do něj. 7. Instalujte znovu program SDS. 8. Spusťte program SDS.
		3
		Při problémech s operačním systémem nebo pokud počítač vůbec nelze spustit kontaktujte servisní oddělení Applied Biosystems. Může být zapotřebí reinstalovat operační systém.
		4
		Při problémech s hardwarem kontaktujte firmu Dell.

Tabulka 8-4 Řešení problémů se softwarem a počítačem

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Komunikační chyba	Nesprávně propojené kabely	Ověřte propojení kabelů a nastavení portu COM. Viz “Zapojení přístroje” na straně 1-11.
Chyby teplotního cyklování	Blok na vzorky není správně umístěn	Umístěte blok na vzorky do přístroje podle postupu v části “Výměna bloku na vzorky” na straně 7-6.
Program Automation Controller nenalezl soubor destičky	Soubor není umístěn tam, kde má být	Odstraňte záznam z řady destiček a znovu jej přidejte.
Zobrazí se dialogové okno Run Completed Successfully (Běh úspěšně ukončen), ale počítač nereaguje	Java Runtime Error	Kliknutím uzavřete dialogové okno.
Běh nezačne	Chybí kalibrační soubor	Proveďte kalibraci pozadí a barev. Viz “Provedení kalibrace pozadí” na straně 7-16 a “Provedení kalibrace barev” na straně 7-20.
	Nebyla provedena kalibrace pozadí	
	Nebyla provedena kalibrace barev	
	Součástí kalibračního souboru nejsou data pro barvu, která je součástí dokumentu destičky	
	Kalibrační soubor byl vytvořen na jiném přístroji	
	Disk, na němž je dokument destičky uložený, má méně než 50 MB volného místa	Ověřte kapacitu disku. Je-li na něm méně než 50 MB volného místa, odstraňte nebo archivujte datové soubory (viz strana 7-54).
	Vyhřívané víko nemůže dosáhnout požadované teploty, protože v nosítkách není destička	Otevřete nosítka přístroje a ověřte, že v nich je destička.
	V nosítkách přístroje je destička	
	Věž na zpracované destičky obsahuje destičku/y	Vyjměte všechny destičky z věže předtím, než spustíte analýzu řady destiček.

Tabulka 8-4 Řešení problémů se softwarem a počítačem

Jev	**Možná příčina**	**Doporučený krok**
Počítač je při analýze dat, otevírání a zavírání dialogových oken a dalších krocích pomalý. Nelze se přihlásit do operačního systému Windows.	Pevný disk je fragmentován	Defragmentujte pevný disk podle postupu v části “Defragmentace pevného disku” na straně 7-54.
	Pevný disk je téměř plný	Odstraňte nebo archivujte datové soubory (strana 7-54).
Počítač nelze vůbec spustit. Počítač je při analýze dat, otevírání a zavírání dialogových oken a dalších krocích pomalý. Nelze se přihlásit do operačního systému Windows.	Okno **Logon** (Přihlášení) se neobjeví	Restartujte počítač a přihlaste se do něj
	Nejste přihlášeni jako **Administrator**	1. Odhlaste se z počítače. 2. Přihlaste se znovu jako **Administrator**.
	Zkusili jste shora uvedené možnosti ale problém to neřeší.	Kontaktujte technickou podporu firmy Dell.
Počítač nelze vůbec spustit.	Nesprávné propojení kabelů	Zkontrolujte propojení kabelů.
		1. Spusťte počítač pomocí instalačního CD Windows NT® Operating System Installation CD. 2. Spusťte počítač ze záchranného disku. 3. Instalujte znovu operační systém Windows NT.
	Zkusili jste shora uvedené možnosti ale problém to neřeší.	Kontaktujte technickou podporu firmy Dell.

Podavač mikrodestiček Zymark Twister a pevně umístěná čtečka čárových kódů

Řešení problémů

Tabulka 8-5 Řešení problémů s příslušenstvím pro automatický provoz

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Rameno podavače vydává při zvedání či ukládání destiček skřípavý zvuk	Vertikální pozice (nastavení vertical offset) je příliš nízko	Seřiďte znovu rameno podavače podle postupu v části “Seřízení ramene podavače” na straně 7-41.
	Senzor destiček je nastaven příliš vysoko	
Rameno podavače se při zvedání či ukládání destiček dotýká úložných věží	Výchozí rotační pozice ramene je nesprávně definována nebo je vertikální pozice příliš nízko	
Rameno podavače umisťuje destičky do úložných věží s problémy		
Destičky se při umístění do nosítek přístroje pomocí ramene podavače naklánějí		
Rameno podavače nerozezná nebo neuchopí destičku	Senzor destiček není správně seřízen	Seřiďte senzor destiček podle postupu v části “Nastavení citlivosti senzoru destiček” na straně 7-37.
	Podložky ramene jsou opotřebované nebo špinavé	Vyměňte podložky ramene podle postupu v části “Čistění a výměna podložek ramene” na straně 7-52.
Destičky se lepí na podložky ramene	Podložky ramene jsou opotřebované nebo špinavé	Vyměňte podložky ramene podle postupu v části “Čistění a výměna podložek ramene” na straně 7-52.
Rameno podavače neumisťuje destičky na jejich původní místo	Nebyla zvolena možnost **Restack when finished** (Po skončení přeskládat)	Nastavte program Automation Controller podle postupu na straně 4-40.
Pevně umístěná čtečka čárových kódů nečte čárové kódy	Čtečka není seřízena	Seřiďte čtečku podle postupu v části “Seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů” na straně 7-49.
	Čtečka je poškozena	

Mikrofluidní karta

Řešení problémů

Tabulka 8-6 Řešení problémů s mikrofluidní kartou

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu jsou plnící rezervoáry poškozené (zmačkané, ohnuté).	-	Jsou-li plnící rezervoáry poškozené, reakční směs se nemusí dostat při centrifugaci do reakčních jamek. Mikrofluidní kartu vyhoďte.
Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu je její krycí hliníková fólie poškozena.	-	Je-li hliníková fólie poškozena, reakční směs se nemusí dostat při centrifugaci do reakčních jamek. Mikrofluidní kartu vyhoďte.
Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu se na reakčních jamkách usazuje prach nebo jiné nečistoty.	-	Odstraňte prach nebo nečistoty poklepáním nebo ofouknutím mikrofluidní karty. Lze použít i stlačený dusík nebo fén. DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že prach i částice byly odstraněny. Reakční jamky mikrofluidní karty musí být čisté, nesmí na nich ulpívat zejména fluorescenční částice
Po vyjmutí mikrofluidní karty z obalu na ní kondenzuje vlhkost.	Mikrofluidní karta nebyla před vyjmutím z obalu ohřáta na pokojovou teplotu.	Odstraňte vlhkost pomocí ofouknutí mikrofluidní karty stlačeným dusíkem nebo pomocí fénu. DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že veškerá kondenzovaná vlhkost byla odstraněna. Reakční jamky mikrofluidní karty musí být bez jakékoliv kondenzované vlhkosti.

Tabulka 8-6 Řešení problémů s mikrofluidní kartou

Jev	**Možná příčina**	**Doporučený krok**
Podařilo se napipetovat příliš málo reakční směsi do plnícího rezervoáru.	Reakční směs nebyla správně pipetována do plnícího rezervoáru.	Při pipetování reakční směsi (100 µL) do plnícího rezervoáru je nezbytné postupovat velmi pečlivě. 1. Postupujte podle návodu v části “Plnění mikrofluidních karet” na straně 4-13. 2. Po provedení centrifugace zkontrolujte hladinu tekutiny v plnících rezervoárech podle kroku 6 na straně 4-17
Při pipetování reakční směsi dochází k jejímu úniku vzduchovým otvorem plnícího rezervoáru.		
Během PCR dochází ke ztrátám reakční směsi.	Při zaslepení karty mohlo dojít k poškození hliníkové fólie.	Mikrofluidní kartu vyhoďte. Poznámka: Zaslepování karet - viz “O nástroji na zaslepení karet” na straně 4-13.
Po výpočtu průměru a standardní odchylky skupiny replikátů se specifický replikát jeví jako odlehlý bod.	-	Pro daný replikát zkontrolujte multikomponentní graf. Odlehlý bod vypusťte a výsledky znovu analyzujte.

Databáze SDS Enterprise

Řešení problémů

Tabulka 8-7 Řešení problémů s databází SDS Enterprise

Jev	Možná příčina	Doporučený krok
Nelze se připojit k databázi	-	Chcete-li otestovat nebo resetovat propojení s databází: 1. Spusťte program SDS. 2. Přihlašte se do databáze jako uživatel s právy administrátora. 3. Otestujte a upravte propojení s databází podle postupu v části "Úprava propojení s databází" na straně A-23.
Chybová hláška: `java.sql.SQLException: Io exception: End of TNS data channel`	Zřídka se vyskytující chybová hláška (při archivaci nebo otevírání velkých datových souborů z databáze).	Opakujte krok archivace nebo otevírání dat z databáze.

Nástroje programu SDS

A

V této příloze

Import zadání dokumentu destičky A-2
Soubory zadání A-4
Export obrázků A-16
Export údajů z dokumentů destičky A-16
Ovládání programu SDS z příkazové řádky A-18
Vyhledávání A-19
Propojení programu SDS s databází A-21

Import zadání dokumentu destičky

O importu

Program SDS umožňuje provádět import zadání dokumentu destičky (detektor, úloha detektoru, marker a názvy vzorků) do dokumentu destičky ze souboru ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data). Jedná se o nástroj umožňující vytváření zadání dokumentů destiček v jiném programu než v programu SDS a jejich následný import do programu SDS, což vede k úspoře času.

Aby byl zajištěn úspěšný import dat z textového souboru do dokumentu destičky, musí data v tomto souboru:

- být oddělena pomocí tabelátoru
- odpovídat formátům popsaným na straně A-15

Vytvoření a import zadání dokumentu destičky

Import zadání do dokumentu destičky se provádí ve třech hlavních krocích.

Vytvoření prázdného zadání

Prvním krokem je export zadání z prázdného dokumentu.

Poznámka: Soubor zadání lze vytvořit i pomocí dalších programů (jako Microsoft Excel nebo textový editor) – data musí být oddělena tabelátorem a mít formát popsaný na straně A-15.

1. Spusťte program SDS.
2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > New** (Soubor > Nový).
3. V dialogovém okně New Document (Nový dokument) zvolte odpovídající typ eseje a formát destičky a klikněte OK.
4. Klikněte nebo zvolte **File > Export** (Soubor > Export).
5. V poli **Look In** (Vyhledat) dialogového okna Export vyhledejte adresář, do kterého chcete uložit exportovaný soubor.
6. Zvolte **Export > Setup Table** (Zadání).
7. Zvolte tlačítko **All Wells** (Všechny jamky).
8. Zvolte tlačítko **SDS 2.2**.
9. Klikněte do pole **File name** (Název souboru) a zadejte název souboru.
10. Klikněte Export...

    Program exportuje zadání prázdného dokumentu destičky ve formátu souboru *.txt (data oddělená tabelátorem).
11. Vytvořte zadání dokumentu destičky (detektor, úloha, marker a údaje o vzorcích) podle postupu na straně A-3.

Zadání údajů do prázdného souboru zadání

Druhým krokem je import prázdného souboru zadání do nějakého jiného programu, zadání informací o vzorcích a detektorech a uložení ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data).

1. Spusťte program, který chcete použít pro vytvoření zadání dokumentu destičky.
2. Importujte prázdné zadání vytvořené v předchozím kroku jako soubor *.txt.

   Používáte-li pro vytváření zadání tabulkový procesor, budou tabelátorem oddělená data automaticky vložena do buněk tabulky.
3. Zadejte informace o vzorcích a detektorech v souladu s formátem souboru podle popisu na straně A-4.
4. Uložte zadání ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data)..
5. Importujte hotové zadání do prázdného dokumentu destičky podle postupu níže.

Import hotového zadání do dokumentu destičky

Posledním krokem je import hotového zadání ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data) do prázdného dokumentu destičky.

1. Pokud je v programu SDS stále otevřen dokument destičky vytvořený v části "Vytvoření prázdného zadání" na straně A-2, pokračujte krokem 2. Jinak vytvořte dokument destičky, do nějž budete importovat zadání:
   a. Spusťte program SDS.
   b. Vytvořte nebo otevřete dokument destičky, do nějž budete importovat zadání.
2. Klikněte nebo zvolte **File > Import** (Soubor > Import).
3. V poli **Look In** (Vyhledat) dialogového okna Import vyhledejte a zvolte zadání dokumentu destičky ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data), vytvořené v kroku 4 výše.
4. Klikněte

.

   Program importuje zadání dokumentu destičky z textového souboru a automaticky v něm rozezná informace týkající se detektorů, úloh detektorů, markerů a údajů o vzorcích.

Soubory zadání

O souborech zadání

Program SDS umožňuje provádět import zadání dokumentu destičky do dokumentu destičky ze souboru ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data). Aby byl zajištěn úspěšný import dat z textového souboru do dokumentu destičky, musí data v tomto souboru odpovídat formátu uvedenému níže.

Formát

Informace obsažené v souboru zadání musí být seřazeny následujícím způsobem:

1. Verze souboru (viz strana A-5)

Údaje o destičce

2. Velikost destičky (viz strana A-5)
3. Identifikace destičky (viz strana A-5)

Údaje o detektorech

4. Počet detektorů (viz strana A-6)
5. Záhlaví seznamu detektorů (viz strana A-6)
6. Seznam detektorů (viz strana A-7)

Údaje o markerech

7. Počet markerů (pouze alelická diskriminace) (viz strana A-8)
8. Záhlaví seznamu markerů (pouze alelická diskriminace) (viz strana A-8)
9. Seznam markerů (pouze alelická diskriminace) (viz strana A-9)

Detektory v jamkách

10. Záhlaví seznamu detektorů použitých v daných jamkách (viz strana A-10)
11. Seznam detektorů použitých v daných jamkách (viz strana A-10)

Markery v jamkách

12. Záhlaví seznamu markerů použitých v daných jamkách (pouze alelická diskriminace) (viz strana A-12)
13. Seznam markerů použitých v daných jamkách (pouze alelická diskriminace) (viz strana A-12)

Používání textu

Níže je text používán následujícím způsobem:

- **`courier`** – Text zobrazený tímto fontem (tučně) musí být v zadání naprosto shodně jako je uveden zde.
- *`kurzíva`* – Text kurzívou je v zadání nahrazen konkrétním textem podle typu zadávaných údajů.
- `[` *`požadovaný text`* `]` – Text v hranatých závorkách musíte zadat, aby jej program SDS mohl importovat.
- `{` *`volitelný text`* `}` – Text ve složených závorkách můžete ale nemusíte zadat.
- `<tab>` – klávesa Tabelátor
- `<cr>` – klávesa Enter

DŮLEŽITÉ! Aby import proběhl úspěšně, musí být v souboru všechny součásti a v pořadí popsaném níže.

1. Verze souboru

Popis V této řádce je uvedena verze formátu (file version) souboru SDS Assay Plate File.

Poznámka: Verze 4 a vyšší nelze importovat přímo do programu SDS 2.0 nebo SDS 2.1.

Formát `[ *** SDS Setup File Version <tab> version number <cr> ]`

Příklad

```
*** SDS Setup File Version 3
```

Údaje o destičce

2. Velikost destičky

Popis V této řádce je uveden počet jamek (number of wells) destičky (384 nebo 96).

Formát `[ *** Output Plate Size <tab> number of wells <cr> ]`

Příklad

```
*** Output Plate Size      384
```

3. Identifikace destičky

Popis V této řádce je uvedena identifikace destičky (plate id). Za normální situace je to čárový kód.

Formát `[ *** Output Plate ID <tab> plate id <cr> ]`

Příklad

```
*** Output Plate ID        384N75822034
```

Údaje o detektorech

V bodech 4 až 6 jsou definovány detektory, které se následně používají v popisu jednotlivých jamek níže. Údaje o detektorech jsou trojího druhu: počet detektorů, záhlaví seznamu detektorů a seznam detektorů.

4. Počet detektorů

Popis V této řádce je uveden celkový počet detektorů (number of detectors) v destičce.

Formát

```
[ *** Number of Detectors <tab> number of detectors <cr>                    ]
```

Příklad

```
*** Number of Detectors    5
```

5. Záhlaví seznamu detektorů

Popis V této řádce je uvedeno záhlaví seznamu detektorů (Detectors List Header) souboru zadání, což umožňuje snazší úpravy souboru zadání v programech jako je Microsoft Excel.

Formát

```
[ Detector <tab> Reporter <tab> Quencher <tab> Description <tab>
     Comments <cr> ]
```

Příklad

Příklad A-1 Záhlaví seznamu detektorů

Detector	Reporter	Quencher	Description	Comments

6. Seznam detektorů

Popis

Seznam detektorů (Detectors List) sestává z jedné nebo více řádek zobrazujících informace o každém detektoru používaném v dokumentu destičky.

- Informace o každém detektoru používaném v destičce musí být v seznamu detektorů v jediné řádce.
- Počet řádek v seznamu detektorů musí být roven počtu detektorů definovaném v části Počet detektorů (viz bod 4 výše).
- Pro detektory používající barvu SYBR Green I nebo nefluorescenční zhášeč ponechte pole zhášeč (Quencher) prázdné.

Formát (pro jeden detektor):

```
[ detector name <tab> reporter dye <tab> quencher dye <tab>
    description <tab> comments <cr> ]
```

Příklady:

Příklad A-2 Alelická diskriminace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         384
*** Output Plate ID           384N75822034
*** Number of Detectors       2
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
CYP 2C9*2.1    FAM                           PDAR CYP 2C9*2 A11    Example Probe
CYP 2C9*2.2    VIC                           PDAR CYP 2C9*2 A12    Example Probe
...
```

Příklad A-3 Absolutní nebo relativní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         96
*** Output Plate ID           96JG729FF903
*** Number of Detectors       3
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
GAPDH          VIC                           GAPDH Probe           Example Probe
SYBR Green     SYBR                          SYBR Green I          Example Probe
RNase P        FAM            TAMRA          RNase P Probe         Example Probe
...
```

Údaje o markerech

V bodech 7 až 9 jsou definovány markery, které se následně používají v popisu jednotlivých jamek níže. Údaje o markerech jsou trojího druhu: počet markerů, záhlaví seznamu markerů a seznam markerů.

7. Počet markerů (pouze alelická diskriminace)

DŮLEŽITÉ! Údaj o počtu markerů je požadován pouze v zadání dokumentů alelické diskriminace. Neobjevuje se v dokumentech absolutní nebo relativní kvantifikace.

Popis V této řádce je uveden celkový počet markerů (number of markers) v destičce.

Formát

```
[ *** Number of Markers <tab> number of markers <cr>                    ]
```

Příklad

```
*** Number of Markers      2
```

8. Záhlaví seznamu markerů (pouze alelická diskriminace)

DŮLEŽITÉ! Údaj o záhlaví seznamu markerů je požadován pouze v zadání dokumentů alelické diskriminace. Neobjevuje se v dokumentech absolutní nebo relativní kvantifikace.

Popis V této řádce je uvedeno záhlaví seznamu markerů (Markers List Header) souboru zadání, což umožňuje snazší úpravy souboru zadání v programech jako je Microsoft Excel.

Formát

```
[ Marker <tab> AlleleX <tab> AlleleY <tab> Description <tab> Comments
     <cr> ]
```

Příklad

Příklad A-4

```
Marker        AlleleX       AlleleY       Description          Comments
```

9. Seznam markerů (pouze alelická diskriminace)

DŮLEŽITÉ! Seznamu markerů je požadován pouze v zadání dokumentů alelické diskriminace. Neobjevuje se v dokumentech absolutní nebo relativní kvantifikace.

Popis Seznam markerů (Markers List) sestává z jedné nebo více řádek zobrazujících informace o každém markeru používaném v dokumentu destičky.

- Informace o každém markeru používaném v destičce musí být v seznamu markerů v jediné řádce.
- Počet řádek v seznamu markerů musí být roven počtu markerů definovaném v části Počet markerů (viz bod 7 výše).
- V zadání pro relativní nebo absolutní kvantifikaci ponechte seznam markerů prázdný. (V těchto dokumentech se nepoužívají markery.)

Formát (pro jeden marker):

```
[ marker name <tab> alleleX <tab> alleleY <tab> description <tab>
    comments <cr> ]
```

Příklady:

Příklad A-5 Alelická diskriminace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         384
*** Output Plate ID           384N75822034
*** Number of Detectors       2
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
CYP 2C9*2.1    FAM                           PDAR CYP 2C9*2 A11    Example Probe
CYP 2C9*2.2    VIC                           PDAR CYP 2C9*2 A12    Example Probe
*** Number of Markers         1
Marker         AlleleX        AlleleY        Description           Comments
CYP 2C9*2      CYP 2C9*2.2    CYP 2C9*2.2    PDAR CYP 2C9*2        Example marker
...
```

Příklad A-6 Absolutní nebo relativní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         96
*** Output Plate ID           96JG729FF903
*** Number of Detectors       3
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
GAPDH          VIC                           GAPDH Probe           Example Probe
SYBR Green     SYBR                          SYBR Green I          Example Probe
RNase P        FAM            TAMRA          RNase P Probe         Example Probe
```

Informace o detektorech v jamkách

V bodech 10 a 11 je definováno, jaké detektory jsou používány v jaké jamce. Tyto údaje jsou dvojího druhu: záhlaví seznamu detektorů použitých v daných jamkách a seznam detektorů použitých v daných jamkách.

10. Záhlaví seznamu detektorů použitých v daných jamkách

Popis V této řádce je uvedeno záhlaví seznamu detektorů použitých v daných jamkách (Well-Detector List Header) souboru zadání, což umožňuje snazší úpravy souboru zadání v programech jako je Microsoft Excel.

Formát

```
[ Well <tab> Sample Name <tab> Detektor <tab> Task <tab> Quantity ] {
... <tab> Detektor <tab> Task <tab> Quantity } [ <cr> ]
```

Příklad

Příklad A-7

```
Well   Sample Name   Detector      Task   Quantity      Detector      Task   Quantity
```

11. Seznam detektorů použitých v daných jamkách

Popis V této části je definován obsah jamek. Soubor zadání musí definovat obsah každé použité jamky na destičce. Každá jamka je zadána pomocí údajů ukončených <cr>. Obsah jamky je definován pomocí údajů trojího druhu:

- Číslo jamky (Well number) – První tabelátorem oddělený údaj udává číslo jamky v destičce. Číslování začíná číslem 1 pro jamku A-1 (horní levý roh destičky) a pokračuje zleva doprava a shora dolů. Jamky musí být uvedeny ve správném pořadí (1,2,3,…).
- Název vzorku (Sample name) – Definuje název vzorku v destičce.
- Detektor – Definuje detektory použité v jamce. Každý detektor je zadán údaji trojího druhu:
  - Název detektoru
  - Úloha detektoru (UNKN – Unknown - Neznámý, STND - Standard, NTC - No Template Control – Netemplátová kontrola)
  - Množství. (V jamkách, které obsahují standardy, musíte definovat jejich množství. V ostatních jamkách bude v poli Množství (Quantity) 0.)

Je-li v dané jamce použito více detektorů, definujte i další detektory. Počet detektorů v jamce není nijak omezen.

DŮLEŽITÉ! Všechny zde používané detektory musí být předešle definovány (viz Údaje o detektorech, část 4–6).

Formát (pro jednu jamku):

```
[ Well number <tab> SDS Sample Name <tab> Detector name <tab>
    Detector task <tab> Detector quantity ] { <tab> Detector name
    <tab> Detector task <tab> Detector quantity … <tab> Detector name
    <tab> Detector task <tab> Detector quantity } [ <cr> ]
```

Příklad

Příklad A-8 Alelická diskriminace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         384
*** Output Plate ID           384N75822034
*** Number of Detectors       2
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
CYP 2C9*2.1    FAM                           PDAR CYP 2C9*2 A11    Example Probe
CYP 2C9*2.2    VIC                           PDAR CYP 2C9*2 A12    Example Probe
*** Number of Markers         1
Marker         AlleleX        AlleleY        Description           Comments
CYP 2C9*2      CYP 2C9*2.2    CYP 2C9*2.2    PDAR CYP 2C9*2        Example marker
Well    Sample Name    Detector       Task    Quantity       Detector       Task    Quantity
1       Sample 1
2       Sample 2
3       ...
384     Sample 48
```

Příklad A-9 Absolutní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         96
*** Output Plate ID           96JG729FF903
*** Number of Detectors       1
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
RNase P        FAM            TAMRA          RNase P Probe         Example Probe
Well    Sample Name    Detector       Task    Quantity
1       Sample 1       GAPDH          UNKN           0
2       Sample 2       GAPDH          STND           20000
3       ...
96      Sample 30      GAPDH          UNKN           0
```

Příklad A-10 Relativní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         96
*** Output Plate ID           96FRE505SDA2
*** Number of Detectors       2
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
GAPDH          VIC                           GAPDH Probe           Example Probe
TNF-α          FAM                           TNF-α Probe           Example Probe
Well    Sample Name    Detector       Task    Quantity       Detector       Task    Quantity
1       Calibrator     GAPDH          ENDO    0              TNF-α          UNKN    0
2       Sample 1       GAPDH          ENDO    0              TNF-α          UNKN    0
3       ...
96      Sample 12      GAPDH          ENDO    0              TNF-α          UNKN    0
```

Informace o markerech v jamkách

V bodech 12 a 13 je definováno, jaké markery jsou používány v jaké jamce. Tyto údaje jsou dvojího druhu: záhlaví seznamu markerů použitých v daných jamkách a seznam markerů použitých v daných jamkách.

12. Záhlaví seznamu markerů použitých v daných jamkách (pouze alelická diskriminace)

DŮLEŽITÉ! Záhlaví seznamu markerů použitých v daných jamkách je požadováno pouze v zadání dokumentů alelické diskriminace. Neobjevuje se v dokumentech absolutní nebo relativní kvantifikace.

Popis

V této řádce je uvedeno záhlaví seznamu markerů použitých v daných jamkách (Well-Marker List Header) souboru zadání, což umožňuje snazší úpravy souboru zadání v programech jako je Microsoft Excel.

Formát

```
[ Well <tab> Sample Name <tab> Detektor <tab> Task <tab> Quantity ] {
... <tab> Detektor <tab> Task <tab> Quantity } [ <cr> ]
```

Příklad

Příklad A-11

```
Well    Sample Name    Marker         Task    Marker         Task
```

13. Seznam markerů použitých v daných jamkách (pouze alelická diskriminace)

DŮLEŽITÉ! Seznam markerů použitých v daných jamkách (Well-Marker Definition List) je požadován pouze v zadání dokumentů alelické diskriminace. Neobjevuje se v dokumentech absolutní nebo relativní kvantifikace..

Popis

V této části je definován obsah jamek. Soubor zadání musí definovat obsah každé použité jamky na destičce. Každá jamka je zadána pomocí údajů ukončených <cr>. Obsah jamky je definován pomocí údajů trojího druhu:

- Číslo jamky (Well number) – První tabelátorem oddělený údaj udává číslo jamky v destičce. Číslování začíná číslem 1 pro jamku A-1 (horní levý roh destičky) a pokračuje zleva doprava a shora dolů. Jamky musí být uvedeny ve správném pořadí (1,2,3,…).
- Název vzorku (Sample name) – Definuje název vzorku v destičce
- Marker – Definuje marker použitý v jamce. Každý marker je zadán údaji dvojího druhu:
  - Název markeru
  - Úloha markeru (UNKN – Unknown - Neznámý, NTC – No Template Control – Netemplátová kontrola)

Je-li v dané jamce použito více markerů, definujte i další detektory. Počet markerů v jamce není nijak omezen.

DŮLEŽITÉ! Všechny zde používané markery musí být předešle definovány (viz Údaje o markerech, část 7–9).

Formát (pro jednu jamku):

```
[ Well number <tab> SDS Sample Name <tab> Marker name <tab> Marker task ]
    { <tab> Marker name <tab> Marker task <tab> … } [ <cr> ]
```

Příklad

Příklad A-12 Alelická diskriminace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         384
*** Output Plate ID           384N75822034
*** Number of Detectors       2
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
CYP 2C9*2.1    FAM                           PDAR CYP 2C9*2 Al1    Example Probe
CYP 2C9*2.2    VIC                           PDAR CYP 2C9*2 Al2    Example Probe
*** Number of Markers         1
Marker         AlleleX        AlleleY        Description           Comments
CYP 2C9*2      CYP 2C9*2.2    CYP 2C9*2.2    PDAR CYP 2C9*2        Example marker
Well    Sample Name    Detektor       Task    Quantity
1       Sample 1
2       Sample 2
3       ...
384     Sample 48
Well    Sample Name    Marker         Task    Marker         Task
1       Sample 1       CYP 2C9*2      UNKN
2       Sample 2       CYP 2C9*2      UNKN
3       ...
384     Sample 48      CYP 2C9*2      UNKN
```

Příklad A-13 Absolutní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         96
*** Output Plate ID           96JG729FF903
*** Number of Detectors       1
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
RNase P        FAM            TAMRA          RNase P Probe         Example Probe
Well    Sample Name    Detector       Task    Quantity       Detector       Task    Quantity
1       Sample 1       GAPDH          UNKN           0
2       Sample 2       GAPDH          STND           20000
3       ...
96      Sample 30      GAPDH          UNKN           0
```

Příklad A-14 Relativní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version    3
*** Output Plate Size         96
*** Output Plate ID           96FRE505SDA2
*** Number of Detectors       2
Detector       Reporter       Quencher       Description           Comments
GAPDH          VIC                           GAPDH Probe           Example Probe
TNF-α          FAM                           TNF-α Probe           Example Probe
Well    Sample Name    Detector       Task    Quantity       Detector       Task    Quantity
1       Calibrator     GAPDH          ENDO    0              TNF-α          UNKN    0
2       Sample 1       GAPDH          ENDO    0              TNF-α          UNKN    0
3       ...
96      Sample 12      GAPDH          ENDO    0              TNF-α          UNKN    0
```

Příklady zadání

Příklad A-15 Relativní kvantifikace

```
*** SDS Setup File Version 3
*** Output Plate Size      384
*** Output Plate ID        384JQZ55A4
*** Number of Detectors    25
Detector     Reporter     Quencher     Description  Comments
18S-VIC-mgb  VIC
Bcl-2        FAM                                    Human Bcl-2
Bcl-xL       FAM                                    Human Bcl-xL
GAPDH        FAM                                    Human GAPDH
GBP2         FAM                                    guanlylate binding protein 2
GOS2         FAM                                    Human GOS2 protein gene
IL-15        FAM                                    Human IL-15
IL-17        FAM                                    Human IL-17
IL-18        FAM                                    Human IL-18
IL-1a        FAM                                    Human IL-1a
IL-1b        FAM                                    Human IL-1 beta
IL12p40      FAM                                    Human IL-12p40
INF-a2       FAM                                    Interferon-alpha2
IP-10        FAM                                    Human IP-10
ISG56        FAM                                    Interferon-induced protein 56
Nfkb-I       FAM                                    Nuclear factor of kappa light...
PKCi         FAM                                    Protein kinase C, iota
RAP1A        FAM                                    RAP1A, member of RAS oncogene...
RhoPK2       FAM                                    Homo sapiens Rho-associated...
TNF-a        FAM                                    Human TNF-alpha
c-fos        FAM                                    Human c-fos
c-jun        FAM                                    Human c-jun
c-myc        FAM                                    Human c-myc
cot          FAM                                    Cancer Osaka thyroid oncogene
p53          FAM                                    Human p53
Well         Sample Name  Detektor     Task         Quantity
1            A1           18S-VIC-mgb  ENDO         0.0
2            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   GOS2   TARG         0.0
3            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
4            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
5            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
6            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
7            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   GOS2   TARG         0.0
8            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
9            Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
10           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
11           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
12           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   GOS2   TARG         0.0
13           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
14           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
15           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
16           Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
...
381          Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   GOS2   TARG         0.0
382          Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
383          Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   cot    TARG         0.0
384          Liver        18S-VIC-mgb  ENDO   0.0   ISG56  TARG         0.0
```

Jamky 17 až 380 vypuštěny kvůli stručnosti.

Příklad A-16 Alelická diskriminace

```
*** SDS Setup File Version 3
*** Output Plate Size     384
*** Output Plate ID       NU03000081
*** Number of Detectors   8
Detector     Reporter     Quencher     Description  Comments
AL2-1        FAM
AL1-1        VIC
AL2-2        FAM
AL1-2        VIC
AL2-3        FAM
AL1-3        VIC
AL2-4        FAM
AL1-4        VIC
*** Number of Markers     4
Marker       AlleleX      AlleleY      Description  Comments
SNP1         AL2-1        AL1-1
SNP4         AL2-4        AL1-4
SNP3         AL2-3        AL1-3
SNP2         AL2-2        AL1-2
Well         Sample Name  Detektor     Task         Quantity
1            A1
2            A2
3            A3
4            A4
5            A5
6            A6
7            A7
8            A8
9            A9
10           A10
11           A11
12           A12
13           A13
...
382          P22
383          P23
384          P24
Well         Sample Name  Marker       Task
1            A1           SNP1         UNKN
2            A2           SNP1         UNKN
3            A3           SNP1         UNKN
4            A4           SNP1         UNKN
5            A5           SNP1         UNKN
6            A6           SNP1         UNKN
7            A7           SNP1         UNKN
8            A8           SNP1         UNKN
9            A9           SNP1         UNKN
10           A10          SNP1         UNKN
11           A11          SNP1         UNKN
12           A12          SNP1         UNKN
13           A13          SNP1         UNKN
...
382          P22          SNP4         UNKN
383          P23          SNP4         UNKN
384          P24          SNP4         UNKN
```

Jamky 11 až 381 vypuštěny kvůli stručnosti.

Export obrázků

Export grafů ve formátu JPEG

Program SDS umožňuje exportovat většinu zobrazení a grafů dokumentu destičky ve formátu JPEG (Joint Photographic Experts Group). Formát JPEG je kompatibilní s většinou textových a tabulkových editorů a lze jej použít přímo též v dokumentech typu HTML.

Chcete-li exportovat část dokumentu destičky jako obrázek:

1. Zvolte graf nebo zobrazení, které chcete exportovat.
2. Zvolte jednu z možností:
   - Exportujete-li graf, upravte jeho rozměry (délka a šířka) jak je chcete mít v exportovaném obrázku. Exportovaný obrázek bude mít rozměry tak, jak je vidíte na obrazovce.
   - Exportujete-li zobrazení destičky, velikost jamek neupravujte. Program exportuje celé zobrazení bez ohledu na to, jaká část zobrazení je vidět na obrazovce.
3. Klikněte pravým tlačítkem myši do grafu nebo zobrazení a z nabídky zvolte **Save Plot/Grid to Image File** (Uložit graf/zobrazení jako obrázek).

   Poznámka: Pokud dané zobrazení nelze exportovat, v nabídce se možnost **Save Plot/Grid to Image File** nezobrazí.
4. V dialogovém okně Save As (Uložit jako) vyhledejte adresář, do kterého chcete exportovaný obrázek uložit.
5. V poli **File name** (Název souboru) zadejte název nového souboru.
6. Klikněte Save (Uložit).

   Program uloží graf nebo zobrazení ve formátu JPEG do zvoleného adresáře.

Export údajů z dokumentů destičky

Export dat z dokumentu destičky

Program SDS umožňuje exportovat hrubá nebo analyzovaná data ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data), a to pro zvolené nebo všechny jamky destičky. Exportované soubory lze otevřít ve většině tabulkových editorů.

Chcete-li exportovat data z dokumentu destičky:

1. Kliknutím zvolte dokument destičky.
2. Klikněte na ikonu nebo zvolte **File > Export** (Soubor > Export).
3. Vyhledejte adresář, do kterého chcete exportovat.

4. V nabídce **Export** zvolte, která data chcete exportovat.
   - **Background Spectra** (Spektrum pozadí) – Budou exportovány hodnoty fluorescence pozadí, použité pro analýzu výsledků v každé jamce.
   - **Clipped** (Dílčí data) – Budou exportovány průměrné hodnoty R_n a ΔR_n naměřené v každém cyklu v každé jamce.
   - **Dissociation Curve** (Disociační křivka) **–** Budou exportovány:

     Teplota – Pro každou použitou jamku destičky budou v souboru uvedeny teploty v jamkách při čtení dat.

     Hrubá data – Pro každou použitou jamku destičky budou v souboru uvedeny hodnoty R_n v jamkách při čtení dat.

     Derivovaná data – Pro každou použitou jamku destičky budou v souboru uvedeny hodnoty první derivace hrubých dat.
   - **Multicomponent** (Multikomponentní data) **–** Budou exportovány:
     – Vypočítané příspěvky jednotlivých barev v každé jamce pro každé čtení dat
     – Čistá spektra jednotlivých barev
     – Vypočítaná inverzní matrice
   - **Pure Spectra** (Čistá spektra) – Budou exportovány hodnoty fluorescence čistých spekter, použité pro analýzu výsledků v každé jamce.
   - **Raw Spectra** (Hrubá spektra) – Budou exportovány hodnoty fluorescence naměřené pro každý spektrální interval (tzv. bin) v průběhu běhu.
   - Při exportu program vytvoří adresář a uloží hrubá spektra pro každou jamku do zvláštního souboru *.txt.
   - **Results Table** (Tabulka výsledků) – Bude exportován obsah tabulky výsledků analyzovaného souboru destičky.

   Poznámka: Struktura exportovaných dat závisí na tom, jakého typu je otevřený dokument destičky.

   - **Setup Table** (Tabulka zadání) – Budou exportovány údaje z tabulky zadání dokumentu destičky před analýzou. Struktura exportovaných dat závisí na tom, jakého typu je otevřený dokument destičky. Detailní popis zadání viz strana A-4.

5. Chcete-li exportovat data:
   - Ze všech jamek dokumentu destičky – Zvolte tlačítko **All Wells** (Všechny jamky).
   - Z vybraných jamek dokumentu destičky – Zvolte tlačítko **Selected Wells** (Vybrané jamky).

6. V rozbalovací nabídce **Files of type** (Typ souboru) zvolte formát exportovaných dat.

7. Klikněte do pole **File name** (Název souboru) a zadejte název exportovaného souboru.

8. Klikněte Export... .

   Program uloží exportovaná data do zvoleného adresáře.

Ovládání programu SDS z příkazové řádky

Přehled

Program SDS umožňuje provádět analýzu a export výsledků pomocí dávkových souborů z příkazové řádky. Toto ovládání je určeno zkušeným uživatelům (jako administrátoři, bioinformatici a správci laboratorních sítí), kteří se rozhodnou ovládat program pomocí skriptování.

Poznámka: Pokud neznáte systém Microsoft DOS, společnost Applied Biosystems doporučuje používat pro ovládání softwaru jeho uživatelské rozhraní.

Spuštění programu z příkazové řádky

1. Zvolte **My Computer > AppliedBiosystems > SDS2.2**.
2. Vytvořte kopii souboru SDS 2.bat a přejmenujte jej (jako třeba SDS_RESULTS.bat).
3. Pomocí Poznámkového bloku (Notepad) upravte obsah souboru takto:

Příklad A-17 Dávkový soubor SDS2.bat

Text dávkového souboru:

```
set classpath=./service/config;./service/Lib/audit.jar;./service/Lib/rtc.jar;
       ./service/Lib/ab-reqres.jar;./service/Lib/translation.jar;./service/Lib/apv.jar;
       ./service/lib/coreutil.jar;./service/JMS/lib/fmprtl.zip;./service/Lib/coregui.jar;
       ./service/lib/EmlException.jar;./service/lib/emlhandler.jar;./service/lib/esig.jar;
       ./service/lib/esig/exception.jar;./service/lib/Coreutil.jar;
set path=./lib/algorithm/bin/win32;./lib;%path%
jre\bin\java -Dab.home=C:\AppliedBiosystems\SDS2.2\service -
Dcom.apldbio.sds.global.approot=.
       -Dcom.apldbio.sds.global.config= .\config\config.properties -Xms110m -Xmx300m
       -Dsource=batchfile -Ddefport=8080 -classpath
       %classpath%;lib\SDS2.jar;lib\common.jar;
       lib\sdsdb.jar;lib\ojdbc14.jar;lib\accesscontrol.jar;lib\sdsdb.jar;lib\activation.jar
       ; lib\mail.jar;lib\accesscontrol.jar;lib\Coreutil.jar;lib\EmlException.jar
       com.apldbio.sds.shell.SDSMain
```

V poslední řádce nahraďte text

```
com.apldbio.sds.shell.SDSMain
```

jiným textem podle toho, chcete-li exportovat :

- Multikomponentní data:

  ```
  com.apldbio.sds.MulticompAnalyzerMain %*
  ```

- Analyzovaná data:

  ```
  com.apldbio.sds.SDSResultsAnalyzerMain %*
  ```

- Multikomponentní a analyzovaná data:

  ```
  com.apldbio.sds.MulticompAndResultsAnalyzerMain %*
  ```

4. Uložte a zavřete dávkový soubor.
5. Spusťte soubor z příkazové řádky. Zadejte:

   `SDS_RESULTS.bat sdsfile.sds sdsresultsfile.txt`, kde:

   - `SDS_RESULTS.bat` – Je název dávkového souboru, který jste vytvořili.
   - `sdsfile.sds` – Je soubor SDS, který analyzujete.
   - `sdsresultsfile.txt` – Je název exportovaného souboru.

Zvýšení výkonu programu SDS

Výkon (rychlost) programu SDS je možné zvýšit zvětšením části paměti počítače, která je programu k dispozici. Chcete-li alokovat programu SDS větší část paměti, vložte do jakéhokoliv příkazu programu SDS následující parametry.

```
jre\bin\java -Dab.home=C:\AppliedBiosystems\SDS2.2\service
  -Dcom.apldbio.sds.global.approot=. -Dcom.apldbio.sds.global.config=
  .\config\config.properties -Xms80m -Xmx90m -Dsource=batchfile
  -Ddefport=8080…
```

kde:

- **-Xms***80***m** – Je minimální velikost paměti alokované programu SDS.
- **-Xmx***90***m** – Je maximální velikost paměti alokované programu SDS.

Společnost Applied Biosystems doporučuje následující nastavení:

- Alelická diskriminace: `-Xms20m -Xmx60m`
- Absolutní nebo relativní kvantifikace): `-Xms80m -Xmx90m`

Vyhledávání

Vyhledávací filtry

Nástroj Vyhledávání (Search) umožňuje organizovat velké soubory dat v dialogovém okně Add files (Přidat soubory). Díky tomuto nástroji je možné zobrazit pouze vybrané dokumenty destiček na základě předdefinovaných parametrů.

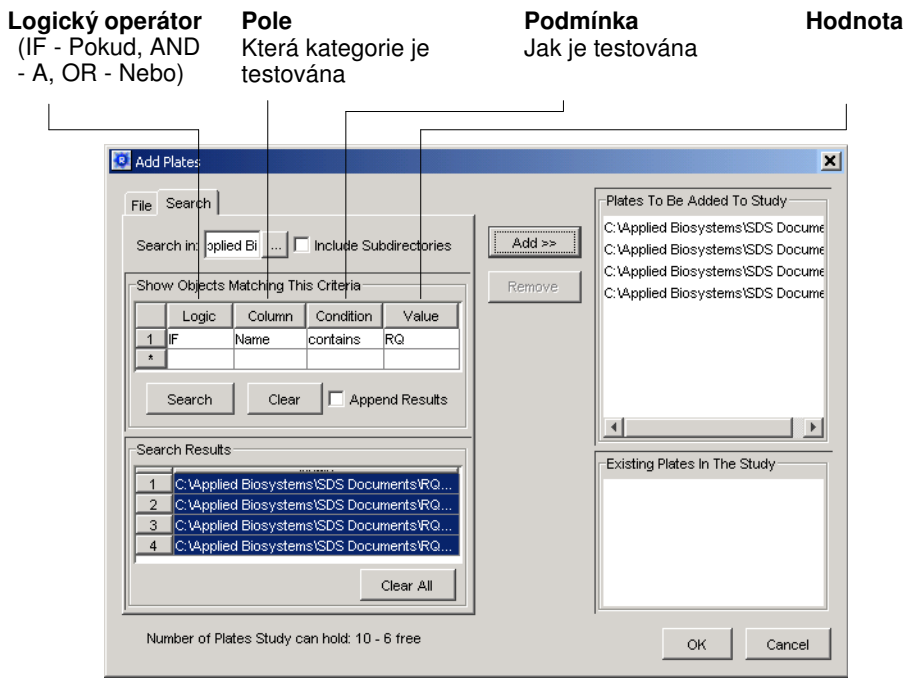
Vyhledávání funguje s obdobnou logikou jako jednoduché programovací jazyky. Každý vyhledávací filtr sestává z jedné logické podmínky, která programu říká, jak vybrat nebo vyloučit určité dokumenty destiček. Logické podmínky lze vzájemně spojovat.

Vyhledávací podmínky

Nástroj Vyhledávání je tabulka, ve které každý řádek představuje jednu podmínku. Kdykoliv je do tabulky přidána řádka (podmínka), program otestuje, zda všechny dokumenty destiček ve zvoleném adresáři tuto podmínku splňují. Pokud ano, je dokument destičky zobrazen v poli Search Results (Výsledky vyhledávání). Pokud ne, dokument destičky není zobrazen a data jsou vyloučena z analýzy. Jak je vysvětleno níže, nástroj Vyhledávání může použít několik podmínek najednou.

Syntaxe vyhledávání

Na obrázku A-1 je znázorněn filtr vytvořený v dialogovém okně Add Files (Přidat soubory).



Obrázek A-1 Dialogové okno Add Files (Přidat soubory)

Logické operátory (IF, AND, OR)

Každá podmínka začíná jedním ze tří logických operátorů: IF - Pokud, OR - Nebo, AND - A. Logické operátory definují vztahy mezi jednotlivými podmínkami v dialogovém okně Add Files (Přidat soubory).

Podmínky Pokud (IF)

První podmínka je vždy předdefinována tak, aby začínala operátorem IF (Pokud). Splňuje-li dokument destičky definované kritérium, je zobrazen v dialogovém okně Add Files (Přidat soubory).

Podmínky A (AND)

Podmínka s logickým operátorem AND (A) vyhodnocuje platnost dvou podmínek pro dokument destičky – podmínky v řádku s operátorem AND (A) a podmínky v předchozím řádku tabulky. Dokument destičky je zobrazen pouze pokud splňuje *obě* podmínky.

Podmínky Nebo (OR)

Obdobně jako podmínky s logickým operátorem AND i logický operátor OR (Nebo) vyhodnocuje platnost dvou podmínek (ve svém a předchozím řádku). Je-li tento logický operátor použit, dokument destičky je zobrazen, je-li splněna alespoň jedna podmínka.

Pole

Každá podmínka je aplikována na parametr dokumentu destičky, definovaný ve sloupci Pole.

Podmínka

Ve sloupci Podmínka je definován vztah mezi parametrem definovaným ve sloupci Pole a ve sloupcích Value 1 a Value 2 (Hodnota). V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny možnosti, které lze použít ve sloupci podmínka.

- **>** : Větší než Hodnota 1
- **>=** : Větší nebo roven Hodnotě 1
- **<** : Menší než Hodnota 1
- **<=** : Menší nebo roven Hodnotě 1
- **equals** (rovno) : Roven Hodnotě 1
- **< >** : Není roven Hodnotě 1
- **between** (mezi) : Větší než Hodnota 1 ale menší než Hodnota 2
- **contains** (obsahuje) : Obsahuje abecedněčíslicový řetězec z Hodnoty 1

Hodnota 1 a 2

Hodnoty 1 a 2 definují co má podmínka splňovat.

Propojení programu SDS s databází

Požadované informace

DŮLEŽITÉ! Pro propojení programu SDS s databází musíte mít práva administrátora nebo být servisní technik.

Pro propojení programu SDS s databází potřebujete následující informace:

- **Host Name** (Server) – Název serveru s databází SDS Enterprise nebo jeho IP adresa. Údaje získáte od vašeho administrátora.
- **Port Number** (Číslo portu) – Přednastavené číslo portu je 1521. (Případnou změnu portu vám sdělí váš administrátor.)
- **Service Name** (Název služby) – Název služby je definován při instalaci databáze SDS Enterprise. Přednastaveno je SDS22.

Vypnutí/Zapnutí funkcí databáze v programu SDS

Program SDS umožňuje uživatelům ze skupiny Administrator vypnout v programu SDS funkce databáze. Jsou-li tyto funkce vypnuty, program skryje ikony a nabídky pro otevírání a ukládání dat do databáze.

Poznámka: Vypnutí/Zapnutí funkcí databáze lze použít v okamžiku, kdy není k dispozici síťové připojení. Jsou-li funkce databáze vypnuty, program SDS nevyžaduje před používáním přístroje 7900HT přihlašování uživatelů. Poté co je databáze opět k dispozici, lze do ní do té doby získaná data uložit pomocí nástroje SDS Document Loader (viz příručka *SDS Enterprise Database Administration Guide* (Kat. č. 4346513)).

Chcete-li vypnout či zapnout funkce databáze v programu SDS:

DŮLEŽITÉ! Musíte mít práva administrátora, chcete-li měnit parametry databáze.

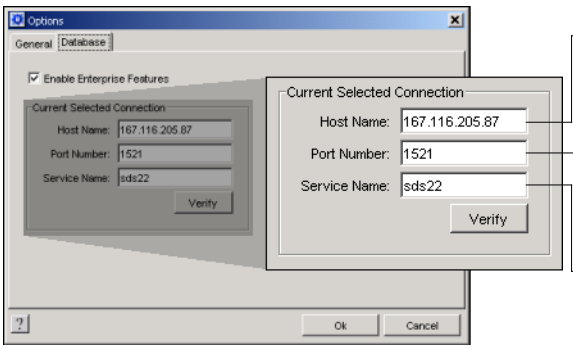
1. Spusťte program SDS (více informací viz strana 2-6).
2. V dialogovém okně Login (Přihlášení) zadejte uživatelské jméno a heslo uživatele patřícího mezi administrátory (o uživatelských účtech získáte více informací v příručce *SDS Enterprise Database Administration Guide*).
3. Zvolte **Tools > Options** (Nástroje > Možnosti).
4. V dialogovém okně Options (Možnosti) zvolte záložku **Database** (Databáze).
5. Zvolte nebo naopak odznačte pole **Enable Enterprise Options** (Zapnout funkce databáze).
6. Klikněte OK.
7. Jste-li k tomu vyzváni, zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a klikněte OK.

Změna nastavení propojení databáze

DŮLEŽITÉ! Chcete-li změnit nastavení propojení s databází SDS Enterprise, musíte patřit mezi uživatele skupiny Administrator (o uživatelských účtech získáte více informací v příručce *SDS Enterprise Database Administration Guide*).

Propojení s databází SDS Enterprise lze změnit z dialogového okna Options (Možnosti) podle postupu níže.

1. Spusťte program SDS (více informací viz strana 2-6).
2. V dialogovém okně Login (Přihlášení) zadejte uživatelské jméno a heslo uživatele patřícího mezi administrátory.
3. Zvolte **Tools > Options** (Nástroje > Možnosti).
4. V dialogovém okně Options (Možnosti) zvolte záložku **Database** (Databáze).
5. Změňte aktuální nastavení propojení:

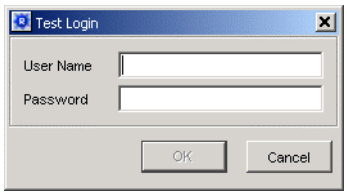


Pole Host Name
Zadejte název nebo IP adresu databáze

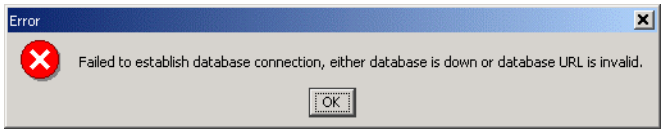
Pole Port Number
Zadejte číslo portu pro spojení s databází (přednastaveno je 1521)

Pole Service Name
Zadejte název databáze (přednastaveno je SDS22)

6. Chcete-li otestovat nové propojení:
   a. Klikněte Verify (Ověřit).
      Program rychle ověří, že se databáze nachází na udané IP adrese. Je-li propojení úspěšné, program zobrazí dialogové okno Login (Přihlášení).
   b. V dialogovém okně Test Login (Testovací přihlášení) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo a klikněte OK.



   - Není-li program SDS schopen se propojit s databází, zobrazí níže uvedenou chybovou hlášku.



7. Klikněte OK.
8. Přihlaste se do databáze pomocí vašeho uživatelského jména a hesla a klikněte OK.

Návrh esejí s chemizmem TaqMan

B

V této příloze

Doporučení pro návrh esejí B-2
Tipy pro návrh esejí alelické diskriminace B-4
Tipy pro návrh kvantitativní PCR B-5

Doporučení pro návrh esejí

Vývoj esejí s chemizmem TaqMan

1. Identifikujte cílovou sekvenci(e) (viz strana B-2).
2. Navrhněte sondy TaqMan® a primery (forward a reverzní) (viz strana B-2).
3. Objednejte reagencie.
4. Změřte koncentraci sond a primerů (viz strana B-3).
5. Připravte mastermix (viz strana B-3).
6. Proveďte optimalizaci koncentrace primerů (viz strana B-3).
7. Esej je připravena k použití (viz strana B-3).

Identifikace cílové sekvence

Cílovým templátem je DNA, cDNA nebo RNA, případně plazmid nesoucí cílovou nukleotidovou sekvenci. Chcete-li dosáhnout optimálních výsledků, měl by templát splňovat následující předpoklady:

- Cílová nukleotidová sekvence musí obsahovat vazebná místa pro oba primery a fluorogenní sondu.
- Nejlépe fungují krátké amplikony o velikosti 50–150 bp, které dávají nejkonzistentnější výsledky.
- Navrhujete-li eseje pro kvantitativní PCR, naleznete více informací v části “Tipy pro návrh kvantitativní PCR” na straně B-5.

Návrh sond a primerů

Níže jsou uvedena obecná doporučení pro návrh primerů a sond. Specifická doporučení naleznete v odpovídajících částech této přílohy: pro alelickou diskriminaci na straně B-4 a pro kvantitativní PCR na straně B-5.

Návrh sond

Při návrhu sond typu TaqMan dodržujte následující doporučení:

- Obsah G-C by měl být v rozsahu 30–80%.
- Vyhněte se opakování téhož nukleotidu několikrát za sebou (zejména se to týká guaninu, vyhněte se opakování čtyř nebo více G za sebou).
- Na 5´ konci nesmí být G.
- Teplota tání (T_m) by měla být pro kvantitativní PCR v rozsahu 68-70 °C a pro alelickou diskriminaci 65-67 °C (za použití programu Primer Express™).
- Zvolte pro návrh řetězec DNA tak, aby sonda měla více C než G.
- Pro alelickou diskriminaci (viz strana B-4):
  - Upravte délku sond tak, aby obě měly stejnou T_m.
  - Místo polymorfizmu umístěte zhruba do středu každé sondy.
- Pro absolutní nebo relativní kvantifikaci (viz strana B-5)

- Navrhujete-li sondy pro multiplexní PCR (více sond v jedné reakci), musí mít každá sonda různou reportérovou barvu (viz Tabulka B-1).

Tabulka B-1 Reportérové barvy pro multiplexní PCR

	První sonda	**Druhá sonda**
Reportérová barva*	FAM™	VIC™

*Použití barev FAM a VIC v multiplexní PCR je doporučeno z důvodu minimálního překryvu jejich spekter.

Návrh primerů

Při návrhu primerů pro eseje TaqMan dodržujte následující doporučení:

- Obsah G-C by měl být v rozsahu 30–80%.
- Vyhněte se opakování téhož nukleotidu několikrát za sebou (zejména se to týká guaninu, vyhněte se opakování čtyř nebo více G za sebou).
- Teplota tání (T_m) by měla být v rozsahu 58-60 °C (za použití programu Primer Express™).
- Omezte obsah G a/nebo C na 3´ konci. V sekvenci posledních pěti nukleotidů primeru by nemělo být více než dvě G a/nebo C.
- Umístěte primery co nejblíže k sondě, aniž dojde k překryvu jejich sekvencí.
- Pro kvantitativní PCR používejte teplotu annealingu v rozsahu 58-60 °C, pro alelickou diskriminaci 58-60 °C (vyjma TaqMan® PDAR pro alelickou diskriminaci).

Měření koncentrace sond a primerů

Pomocí spektrofotometrie změřte koncentrace primerů a sond, které jste si objednali. Více informací o kvantifikaci naleznete v příručce *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (Kat. č. 4304449).

Příprava mastermixu

Informace o přípravě mastermixu naleznete v příručce *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (Kat. č. 4304449).

DŮLEŽITÉ! PCR mastermix pro použití na přístroji 7900HT musí obsahovat barvu použitou jako pasivní referenci. Program SDS používá signál pasivní reference pro normalizaci signálu reportérové barvy, což umožňuje vzájemné porovnání jednotlivých jamek. Všechny mastermixy společnosti Applied Biosystems obsahují jako pasivní referenci barvu ROX v optimální koncentraci.

Poznámka: Příručky společnosti Applied Biosystem jsou k dispozici na internetových stránkách společnosti.

Optimalizace koncentrace primerů/sond

Informace o optimalizaci koncentrací primerů a sond naleznete v příručce *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (Kat. č. 4304449).

Poznámka: Příručky společnosti Applied Biosystem jsou k dispozici na internetových stránkách společnosti.

Esej je připravena k použití

Poznámka: Provádíte-li kvantitativní PCR, zvažte používání replikátů pro zvýšení přesnosti výsledků.

Tipy pro návrh esejí alelické diskriminace

Diskriminace pomocí několika sond

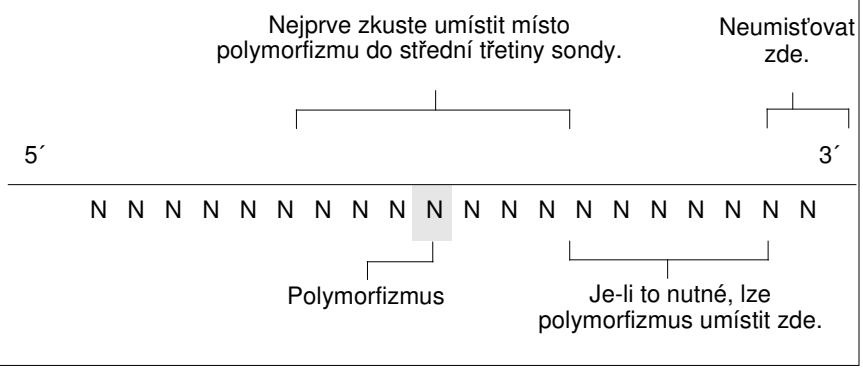
Používáte-li několik sond s různými reportérovými barvami, můžete jejich štěpení detekovat v jediné PCR reakci. Jednou z možných aplikací takové eseje je použití sond specifických pro různé alely k rozlišení genetického polymorfizmu (Bloch, 1991, Lee *et al.*, 1993). Sondy se mohou lišit pouze v jediné bázi. Takto lze použít i sondy s reportérovou barvou na 5' konci a nefluorescenčním zhášečem na 3´ konci(Bloch, 1991).

Návrh sond typu TaqMan

DŮLEŽITÉ! Při návrhu sond zvažte návrh na základě obou řetězců.

Při návrhu sond typu TaqMan MGB dodržujte níže uvedená doporučení:

Tabulka B-2 Doporučení pro návrh sond typu TaqMan MGB pro alelickou diskriminaci

Priorita	Doporučení
1	Na 5´ konci sondy nesmí být guaninový zbytek. Guaninový zbytek v sousedství reportérové barvy působí i po rozštěpení sondy jako zhášeč.
2	Navrhněte sondy pomocí programu Primer Express – přibližná T_m 65–67 °C.
3	Sondy TaqMan MGB musí být co nejkratší, ale ne kratší než 13 nukleotidů.
4	Vyhněte se opakování téhož nukleotidu několikrát za sebou (zejména se to týká guaninu, vyhněte se opakování čtyř nebo více G za sebou).
5	Místo polymorfizmu umístěte zhruba do střední třetiny každé sondy. Poznámka: Místo polymorfizmu lze posunout i směrem k 3´ konci, ale musí být nejméně dva nukleotidy od 3´ konce. Obrázek níže znázorňuje umístění polymorfizmu ve vzorové sondě (N = Nukleotid). 

Tipy pro návrh kvantitativní PCR

Umístění amplikonu při analýze genové exprese

Vhodným umístěním amplikonu při amplifikaci cílové mRNA lze zajistit, že nebude amplifikována genomická DNA, pseudogeny a příbuzné geny. Společnost Applied Biosystems doporučuje při volbě umístění amplikonu pro kvantitativní PCR dodržovat následující doporučení:

- Primery a sondy musí být navrženy při dodržení doporučení na straně B-2.
- Amplikon by měl být navržen přes rozhraní exon-exon, aby bylo zabráněno amplifikaci cílové sekvence z genomické DNA.
- Pár primerů musí být specifický pro cílový gen a nesmí vést k amplifikaci pseudogenů nebo příbuzných genů.
- Otestujte několik různých amplikonů a zvolte takový, který dává nejvyšší poměr signálu vůči pozadí (takové co vedou k nízkým hodnotám C_T při použití cDNA jako templátu a k žádné amplifikaci s netemplátovou kontrolou nebo genomickou DNA).
- Pokud takový amplikon nenaleznete, může být nutné otestovat další sekvence a případně změnit návrh amplikonu.

Pokud gen, jehož expresi studujete, nemá introny, pak nemůžete navrhnout amplikon tak, aby docházelo pouze k amplifikaci mRNA a nikoliv genomické DNA. V takovém případě může být zapotřebí použít kontrolní vzorek bez reverzní transkripce.

Volba a příprava standardů pro absolutní kvantifikaci

Abyste získali přesné výsledky, musíte standardy pro absolutní kvantifikaci pečlivě navrhnout, validovat a kvantifikovat. Před používáním kvantifikace metodou standardní křivky je proto zapotřebí věnovat pozornost následujícím bodům:

- Používaná DNA nebo RNA musí být čistá. Např. plazmidová DNA připravená izolací z E. coli je často kontaminována RNA, která zkresluje kvantifikaci měřením A_{260}.
- Obecně nelze používat DNA jako standard pro absolutní kvantifikaci RNA, protože v takovém případě není nijak kontrolována efektivita reverzní transkripce.
- Absolutní množství standardů musíte zjistit nějakou jinou metodou. Pro přípravu standardů jsou běžně používány plazmidová DNA nebo *in vitro* transkribovaná RNA. Jejich koncentrace je měřena pomocí A_{260} a přepočítána na počet kopií při znalosti molekulové hmotnosti DNA nebo RNA.
- Důležitým faktorem je stabilita ředěných standardů, zejména RNA. Rozdělte ředěné standardy do malých alikvotů, uchovávejte je při -80 °C a nechte je roztát pouze jedenkrát před použitím. Příkladem přípravy důvěryhodných standardů je postup podle Collins *et al.* (Anal. Biochem. 226:120-129, 1995), kteří popisují kroky použité k přípravě RNA standardů pro absolutní kvantifikaci virové nálože.
- Pipetování musí být přesné, protože standardy se ředí přes několik řádů. Plazmidová DNA nebo *in vitro* transkribovaná RNA musí být pro účel přesného měření A_{260} koncentrovaná. Koncentrovaná DNA nebo RNA musí být poté ředěna 10^6 –10^{12} -krát, aby měla koncentraci srovnatelnou s koncentrací v biologických vzorcích.

Kity, reagencie a spotřební materiál C

V této příloze

Výměnné bloky na vzorky a příslušenství C-2
Spotřební materiál C-3
Údržba přístroje a ověřování funkčnosti C-5
Eseje TaqMan a reagencie C-6
Syntéza oligonukleotidů na zakázku C-6

Poznámka: Katalogová čísla, uvedená v této příloze, se týkají zákazníků ze Spojených Států Amerických. Vaše katalogová čísla a ceny Vám sdělí místní zastoupení společnosti Applied Biosystems.

Výměnné bloky na vzorky a příslušenství

Přístroj 7900HT je vybaven vyměnitelnými bloky na ohřev vzorků na bázi peltierových článků (technologie odvozená od přístroje GeneAmp® PCR System 9700).

Výměnné bloky na vzorky:

- snižují "mrtvý čas" v používání přístroje, protože je možné je okamžitě vyměnit.
- umožňují snadný přístup k bloku při řešení problémů s ním souvisejících a při jeho údržbě (viz strana 7-14).
- umožňují používat různé typy spotřebního materiálu.
- umožňují různé režimy provozu (včetně režimu Max a programovatelného zvyšování teploty).

Tabulka C-1 Výměnné bloky na vzorky a příslušenství

Kat. č.	Popis	Množství
4331406	384-jamkový výměnný blok na vzorky pro přístroj ABI PRISM® 7900HT Zahrnuje 384-jamkový blok na vzorky, adapter na 384-jamkové destičky a spektrální kalibrační kit pro 384-jamkové destičky (Kat. č. 4323977)	1 kit
4331405	96-ti jamkový výměnný blok na vzorky pro přístroj ABI PRISM® 7900HT Zahrnuje 96-ti jamkový blok na vzorky, adapter na 96-ti jamkové destičky a spektrální kalibrační kit pro 96-ti jamkové destičky (Kat. č. 4328639)	1 kit
*	Výměnný blok na mikrofluidní karty pro přístroj ABI PRISM® 7900HT	1 kit

*kontaktujte Vaše místní zastoupení Applied Biosystems.

Spotřební materiál

Na přístroji ABI PRISM 7900HT lze používat:

- Optické 384-jamkové destičky ABI PRISM™ uzavřené pomocí optických adhezívních fólií ABI PRISM™
- Optické 96-ti jamkové destičky ABI PRISM™ uzavřené pomocí optických adhezívních fólií ABI PRISM nebo optických víček ABI PRISM (pouze plochá víčka)
- Mikrofluidní karty

DŮLEŽITÉ! Na přístroji 7900HT nepoužívejte optická víčka MicroAmp® nebo optické zkumavky MicroAmp®. Tento spotřební materiál není pro přístroj 7900HT určen a může poškodit jeho vnitřní součásti.

Poznámka: Optické destičky ABI PRISM jsou určeny pro provádění PCR s přímou detekcí amplifikace na bázi fluorescence a jsou matné, aby bylo minimalizováno riziko přenosu signálu fluorescenční kontaminace z vnějšího prostředí. Před jejich použitím na přístroji 7900HT musí být destičky uzavřeny pomocí optické adhezívní fólie ABI PRISM. Tyto fólie umožňují přenos světelného signálu z a do jamky optické destičky.

Tabulka C-2 Spotřební materiál pro přístroj 7900HT

Kat. č.	Popis	Množství
Optické adhezívní kryty ABI PRISM™		
4313663	ABI PRISM™ Optical Adhesive Cover Starter Kit Zahrnuje 20 optických adhezívních fólií ABI PRISM, nástroj pro uzavření a optickou kompresní podložku ABI PRISM.	20 fólií
4311971	Optické adhezívní fólie ABI PRISM™	100 fólií
4323032	Optická víčka ABI PRISM™ , 8 víček/strip	300 Stripů/ bal 2400 víček/ bal
384-jamkové optické destičky		
4309849	384-jamkové optické destičky s čárovým kódem ABI PRISM™ (kód 128)	50 destiček
4326270	10 balení, 384-jamkové optické destičky s čárovým kódem ABI PRISM™ , (kód 128) Zahrnuje 10 balení 384-jamkových optických destiček s čárovým kódem ABI PRISM™ (Kat. č. 4309849).	500 destiček

Tabulka C-2 Spotřební materiál pro přístroj 7900HT

Kat. č.	Popis	Množství
96-ti jamkové optické destičky		
4306737	96-ti jamkové optické destičky s čárovým kódem ABI PRISM™ (kód 128)	20 destiček
4326659	25 balení, 96-ti jamkové optické destičky s čárovým kódem ABI PRISM™ , (kód 128) Zahrnuje 25 balení 96-ti jamkových optických destiček s čárovým kódem ABI PRISM™ (Kat. č. 4306737).	500 destiček
4314320	96-ti jamkové optické destičky s čárovým kódem ABI PRISM™ (kód 128) a optické adhezívní fólie ABI PRISM™ Zahrnuje 100 optických adhezívních fólií ABI PRISM (Kat. č. 4311971) a 5 balení 96-ti jamkových optických destiček s čárovým kódem ABI PRISM™ (Kat. č. 4306737).	100 destiček 100 fólií
Různé		
4312063	Stojánek MicroAmp® Splash Free Support Base pro 96-ti jamkové destičky	10 stojánků

Údržba přístroje a ověřování funkčnosti

Níže uvedené soupravy a reagencie se používají pro provádění běžné údržby a ověřování funkčnosti přístroje ABI PRISM 7900HT. Více informací o používání těchto souprav naleznete v kapitole 7 "Údržba přístroje."

Tabulka C-3 Spotřební materiál pro údržbu a ověřování funkčnosti přístroje

Kat. č.	Popis	Množství
Spektrální kalibrační kity		
4328639	Spektrální kalibrační kit, 96-ti jamkové destičky, pro přístroj ABI PRISM™ 7900HT Zahrnuje tři optické 96-ti jamkové destičky ABI PRISM: jednu destičku pro kalibraci pozadí a dvě destičky pro kalibraci barev, obsahující osm různých barevných standardů (FAM™, JOE™, NED™, ROX™, SYBR® Green, TAMRA™, TET™, VIC®).	3 x 96-ti jamkové destičky
4323977	Spektrální kalibrační kit, 384-jamkové destičky, pro přístroj ABI PRISM™ 7900HT Zahrnuje dvě optické 384-jamkové destičky ABI PRISM: jednu destičku pro kalibraci pozadí a jednu destičku pro kalibraci barev, obsahující osm různých barevných standardů (FAM™, JOE™, NED™, ROX™, SYBR® Green, TAMRA™, TET™, VIC®).	2 x 384-jamkové destičky
Ověřovací destičky TaqMan RNáza P		
4310982	Destička TaqMan® RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje Zahrnuje jednu 96-ti jamkovou optickou destičku ABI PRISM v níž je rozplněna kompletní esej (včetně templátu) pro detekci a kvantifikaci genomických kopií lidského genu pro RNázu P.	1 x 96-ti jamková destička
4323306	384-jamková destička TaqMan® RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje Zahrnuje jednu 384-jamkovou optickou destičku ABI PRISM v níž je rozplněna kompletní esej (včetně templátu) pro detekci a kvantifikaci genomických kopií lidského genu pro RNázu P.	1 x 384-jamková destička

Eseje TaqMan a reagencie

Nejnovější informace o esejích TaqMan pro kvantifikaci genové exprese a alelickou diskriminaci naleznete na internetových stránkách společnosti Applied Biosystems:

- www.appliedbiosystems.com

Syntéza oligonukleotidů na zakázku

Chcete-li si objednat oligonukleotidy na zakázku:

- Navštivte on-line obchod společnosti Applied Biosystems (http://store.appliedbiosystems.com) nebo
- pošlete objednávku emailem na adresu OligosUS@appliedbiosystems.com

Tabulka C-4 Oligonukleotidy na zakázku

Kat. č.	Popis
TaqMan® MGB sondy (5'-fluorescenční značky: 6-FAM, VIC nebo TET)	
4316034	5,000-6,000 pmol
4316033	15,000-25,000 pmol
4316032	50,000-100,000 pmol
TaqMan® sondy (5'-fluorescenční značky: 6-FAM, VIC nebo TET; 3'-značka: TAMRA)	
450025	5,000-6,000 pmol
450024	15,000-25,000 pmol
450023	50,000-100,000 pmol
Primery	
4304970	Minimálně 4,000 pmol
4304971	Minimálně 40,000 pmol
4304972	Minimálně 130,000 pmol

Principy fungování

D

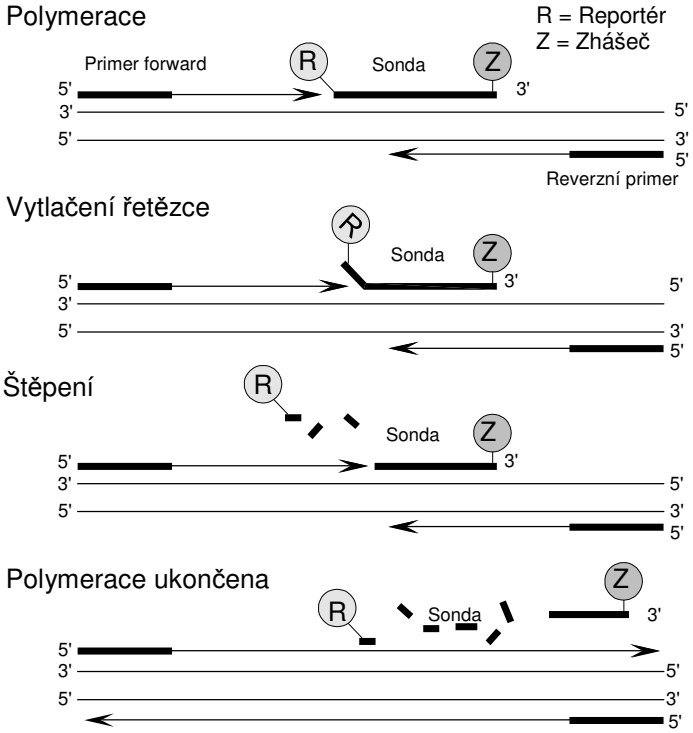
V této příloze

Chemizmus D-2
Detekce fluorescence a sběr dat D-4
Matematické výpočty D-5
Analýza Real-Time PCR D-7
Relativní kvantifikace metodou $\Delta\Delta C_T$ D-11

Chemizmus

Princip 5´ nukleázové eseje

V průběhu PCR dochází díky 5´ nukleázové aktivitě AmpliTaq Gold® DNA polymerázy k rozštěpení sondy typu TaqMan®. Sonda TaqMan má na 5´ konci navázanou reportérovou barvu a na 3´ konci zhášeč. Dojde-li k rozštěpení sondy, dojde i k oddělení reportérové barvy a zhášeče, což vede ke zvýšení fluorescence reportéru. Tento mechanizmus slouží k detekci zvyšujícího se množství PCR produktu v reakci, neboť nárůst fluorescenčního signálu reportérové barvy je úměrný množství degradované sondy a toto množství se s průběhem PCR a akumulací PCR produktu stále zvyšuje. Na obrázku D-1 je vyobrazeno schéma PCR amplifikace a vytlačování a degradace sondy pomocí 5´–3´ nukleázové aktivity AmpliTaq Gold DNA polymerázy.



Obrázek D-1 5´–3´ nukleázová aktivita DNA polymerázy AmpliTaq Gold

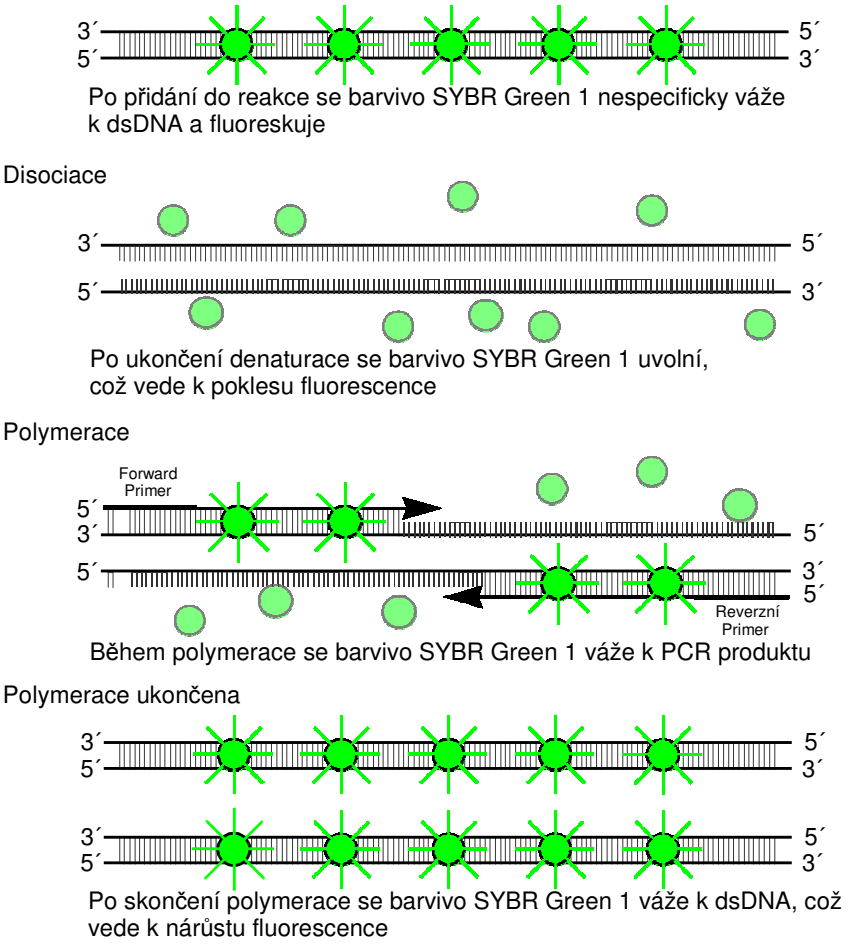
Dokud nedojde k degradaci sondy, dochází k zhášení fluorescence reportérové barvy molekulou zhášeče, neboť ta je v těsné blízkosti reportéru, a to mechanizmem Försterova přenosu energie (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). Během PCR se sonda specificky váže mezi vazebnými místy pro primery.

5´–3´ nukleázová aktivita DNA polymerázy AmpliTaq Gold rozštěpí sondu pouze v případě, že se tato váže k cílové nukleové sekvenci. Fragmenty sondy se uvolní od nukleové kyseliny, k níž byla sonda navázána, a polymerace pokračuje. 3´ konec sondy je blokován, aby nedocházelo k jejímu prodlužování během PCR. Tento proces probíhá v každém cyklu PCR a nijak nebrání exponenciální akumulaci produktu reakce.

Nárůst fluorescenčního signálu je detekován pouze je-li sonda komplementární k cílové sekvenci. Proto nedochází k detekci žádné nespecifické amplifikace.

Chemizmus SYBR Green

Barvivo SYBR® Green 1, které se váže na dvouřetězcovou DNA (dsDNA), lze použít pro fluorescenční detekci PCR produktu. Barvivo SYBR Green 1 se váže nespecificky na jakoukoliv dsDNA a vytváří obdobný excitační-emisní profil jako barva FAM™. Používá-li se v kombinaci s pasivní referencí, lze barvivo SYBR Green 1 použít k řadě aplikací včetně kvantitativní PCR a analýzy disociační křivky. Na obrázku D-2 je znázorněn princip fungování barviva SYBR Green 1 v průběhu jednoho cyklu PCR.



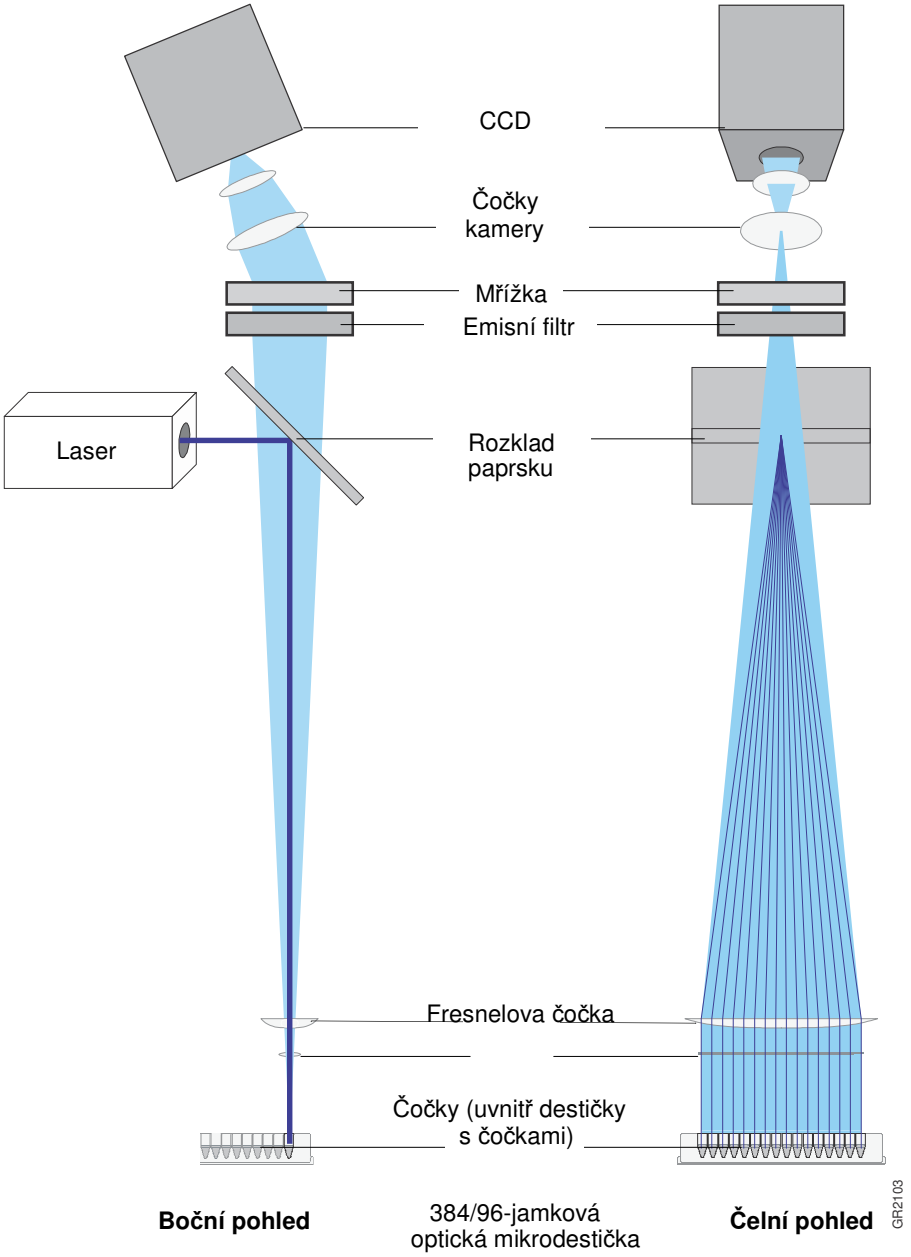
Obrázek D-2 Barvivo SYBR Green 1 v průběhu PCR

Detekce fluorescence a sběr dat

Detekce fluorescence

Během PCR je paprsek argonového laseru postupně směrován na každou jamku mikrodestičky. Prochází skrz optickou adhezívní fólii ABI PRISM™ a excituje fluorescenční barvy v jamce. Výsledná,z každé jamky emitovaná fluorescence (v rozsahu vlnových délek 500 nm až 660 nm) je měřena a čtení údajů z celé destičky trvá 7–10 vteřin.

Systém čoček, filtrů a dichroického zrcadla zaměřuje emitovaný fluorescenční signál na mřížku. Mřížka rozděluje fluorescenční signál (v závislosti na jeho vlnové délce) do obrazce na CCD kameře. Program SDS snímá fluorescenční signály z CCD kamery a zpracovává je pomocí matematických algoritmů.



Matematické výpočty

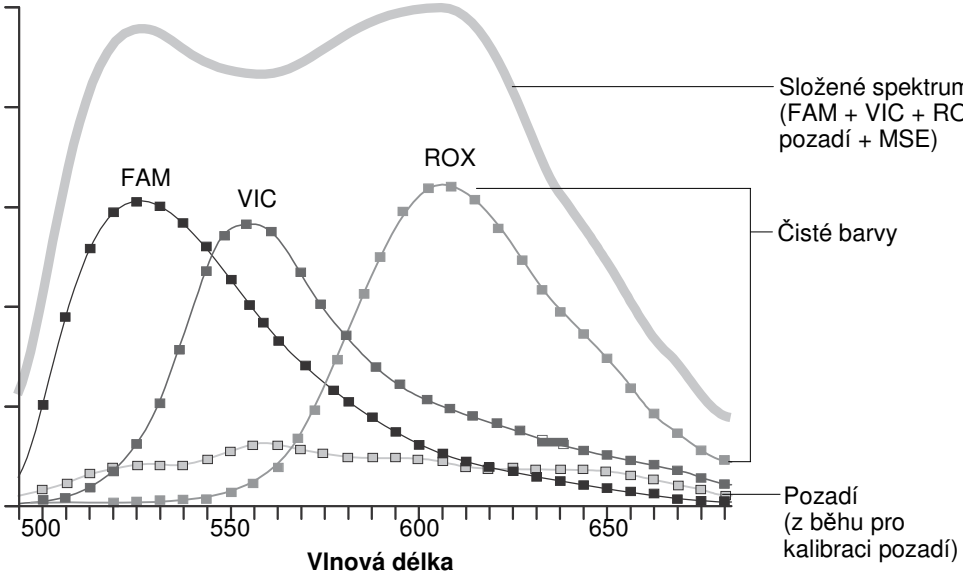
Přehled

Po skončení běhů typu End-point nebo v reálném čase zpracovává program SDS hrubá data pomocí řady matematických transformací. Pojmem ‘hrubá data’ je míněn spektrální signál v rozsahu vlnových délek 500 až 660 nm zaznamenaný programem SDS pro jednotlivé jamky destičky. Programem SDS prováděné matematické transformace hrubých dat jsou popsány níže.

Multikomponentní analýza

Multikomponentní analýza je termín označující výpočet příspěvku jedné každé barvy a pozadí do celkového naměřeného fluorescenčního spektra, které přístroj 7900HT zaznamená. V průběhu analýzy hrubých dat pomocí multikomponentního algoritmu používá program SDS dílčí algoritmy, aby rozlišil jednotlivá dílčí spektra, která přispívají k celkovému naměřenému fluorescenčnímu signálu.

Pomocí kalibračního souboru vytvořeného na základě extrakce signálu pozadí je nejprve rozpoznán a eliminován příspěvek pozadí k celkovému naměřenému fluorescenčnímu signálu (viz strana 7-16). Současně program rozpočítá celkový fluorescenční signál na signály jednotlivých barev, a to pomocí extrahovaných spekter čistých barev (viz strana 7-20). Na obrázku D-3 je jedno takové složené spektrum znázorněno, a to pro jamku obsahující pasivní referenci a dvě sondy značené reportérovými barvami FAM™ a VIC® a nefluorescenčním zhášečem. Z obrázku je patrné, jak překryv jednotlivých dílčích signálů přispívá k celkovému zaznamenanému signálu.



Obrázek D-3 Příklad složeného spektra

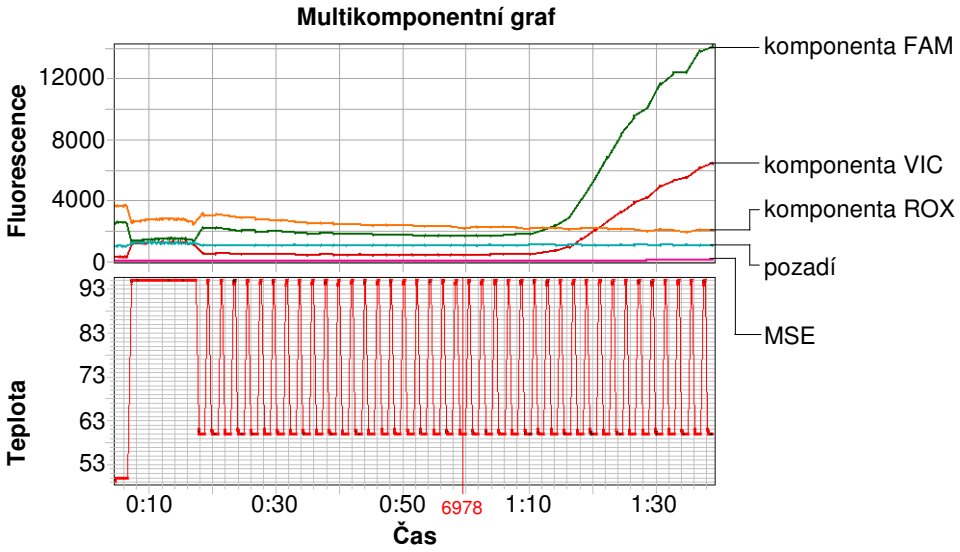
Program používá spektra čistých barev, vytvořená v rámci kalibrace přístroje (viz strana 7-20) pro výpočet koeficientů *a*, *b* a *c* v následující rovnici:

$$\text{Naměřené spektrum} = a(\text{FAM}) + b(\text{VIC}) + c(\text{ROX}) + d(\text{pozadí}) + \text{MSE}$$

kde koeficienty *a*, *b* a *c* představují příspěvek jedné každé barvy do signálu složeného spektra.

Poznámka: Shora uvedený příklad předpokládá provedení kalibrace barev pro barvy FAM, VIC a ROX™ a kalibrace pozadí.

Po vypočítání *a*, *b*, *c* a *d* je vypočítána střední kvadratická chyba (MSE), která je měřítkem toho, jak multikomponentní spektrum odpovídá signálu hrubých dat. Na obrázku D-4 je znázorněn příklad multikomponentního grafu, znázorňující příspěvek každé součásti spektra do celkového signálu (pro jednotlivou jamku).



Obrázek D-4 Typické komponenty multiplexní reakce

Normalizace signálu reportérové barvy

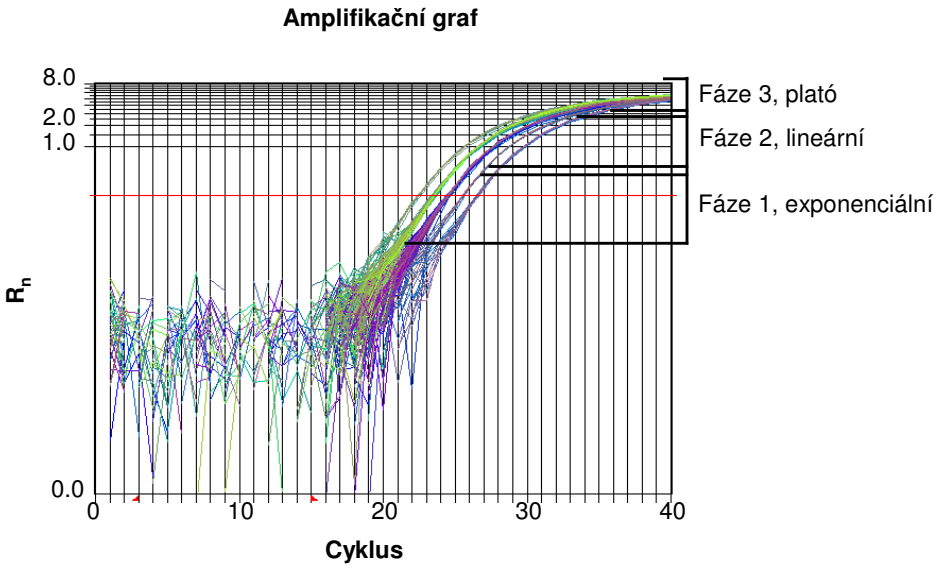
Zatímco multikomponentní analýza vyjadřuje absolutní změny intenzity emitovaného signálu, program SDS zobrazuje cyklus po cyklu normalizovaný signál reportérové barvy (R_n). Program SDS normalizuje signál každé reportérové barvy tak, že jej vydělí fluorescenčním signálem pasivní reference. Jelikož je pasivní reference součástí mastermixu, je tato barva v identické koncentraci ve všech jamkách destičky. Díky normalizaci vůči signálu pasivní reference může program zohlednit drobné fluktuace v intenzitě signálu způsobené nepřesným pipetováním a v konečném důsledku provést přesnější porovnání signálu reportérové barvy pro jednotlivé jamky.

Poznámka: Pro shora uvedený příklad jsou výsledkem normalizované signály barev FAM R_n a VIC R_n.

Analýza výsledků Real-Time PCR

Kinetická analýza/ Kvantitativní PCR

Přístroj 7900HT lze použít ke stanovení absolutního nebo relativního množství cílové nukleové kyseliny v testovaném vzorku pomocí analýzy změn intenzity fluorescenčního signálu během PCR amplifikace. Tato kvantitativní analýza PCR, nazývaná “kinetická analýza”, byla poprvé popsána za použití sekvenčně nespecifického fluorescenčního barviva ethidiumbromidu (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Používání sond TaqMan a dalších reagencií rozšiřuje potenciál této metodiky, neboť umožňuje sekvenčně specifickou amplifikaci a kvantifikaci různých cílových nukleových kyselin. Čím méně cyklů je zapotřebí pro dosažení detekovatelného fluorescenčního signálu, tím vyšší je počáteční počet kopií cílové nukleové kyseliny.



Obrázek D-5 Typická amplifikační křivka

Znázorníme-li průběh Real-Time PCR jako závislost normalizované fluorescence na počtu cyklů, dostaneme graf jako na obrázku D-5. Tato ‘amplifikační’ křivka sestává ze tří různých částí:

Fáze 1: Exponenciální (geometrická)

Základem přesnosti kvantifikace pomocí PCR je rozpoznání exponenciální fáze reakce. Exponenciální fáze je dána rozsahem cyklů mezi cyklem, v němž je poprvé zaznamenán nárůst fluorescence, a cyklu, který odpovídá počátku lineární fáze amplifikace, a pro průběh amplifikace v exponenciální fázi je charakteristická vysoká a neměnná efektivita reakce. Znázorníme-li průběh Real-Time PCR jako závislost logaritmu koncentrace DNA na počtu cyklů, blíží se záznam průběhu exponenciální fáze přímce. Za předpokladu optimalizované PCR reakce lze na přístroji 7900HT v typickém případě docílit takové citlivosti detekce, aby byly zaznamenány alespoň 3 cykly exponenciální fáze.

Fáze 2: Lineární

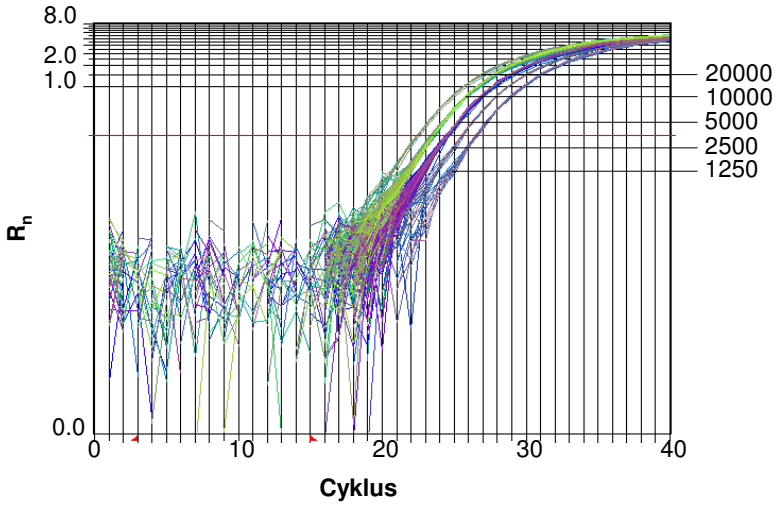
Pro lineární fázi amplifikace je typický pokles sklonu amplifikační křivky. V této fázi reakce dochází k poklesu koncentrace jedné nebo více jejích složek pod kritickou mez a k poklesu efektivity amplifikace. Této fázi se říká lineární, neboť amplifikace je spíše aritmetická než geometrická. Jelikož v průběhu této fáze dochází k poklesu efektivity amplifikace, nelze ji použít pro kvantifikaci.

Fáze 3: Plató

Poslední fází amplifikační křivky je fáze plató, v níž se PCR zastaví a hodnota R_n zůstává víceméně neměnná.

Stanovení počáteční koncentrace templátu

V jakémkoliv cyklu v rámci exponenciální fáze PCR je množství produktu úměrné výchozímu počtu kopií templátu. Naředíme-li některý templát několikrát, jako např. při experimentu s destičkou TaqMan® RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje (viz příloha C), je pro všechna ředění poměr koncentrace templátu vůči detekovanému signálu v rámci exponenciální fáze reakce neměnný (viz obrázek D-6). Tento vztah se mění s blížící se fází plató.



Obrázek D-6 Amplifikační graf – destička RNáza P pro ověření funkčnosti přístroje

Fluorescence a akumulace produktu

Při použití sond typu TaqMan na přístroji 7900HT dochází k nárůstu emise fluorescence v přímé závislosti na akumulaci specifického amplifikačního produktu. Jak je znázorněno na obrázku D-6 na straně D-8, graf závislosti normalizovaného signálu reportérové barvy (R_n) na počtu cyklů PCR má tři fáze. Nejprve se hodnota R_n nemění, protože fluorescenční signál je nižší, než je detekční limit přístroje. V druhé fázi je již signál detekovatelný a roste tak jak dochází k akumulaci produktu PCR. S rostoucí akumulací PCR produktu klesá poměr polymerázy AmpliTaq Gold k tomuto PCR produktu. Dosáhne-li koncentrace templátu 10^{-8} M, PCR produkt se přestává akumulovat exponenciálně. To je třetí fáze změny Rn, která je přibližně lineární a na konec dosáhne plató při koncentraci asi 10^{-7} M (Martens and Naes, 1989).

Postupné štěpení sond TaqMan v průběhu PCR umožňuje odvodit korelaci mezi počáteční koncentrací templátu a nárůstem fluorescence. Jak ve vzorku roste koncentrace amplifikovaného produktu, roste i hodnota parametru R_n. V průběhu exponenciální fáze reakce lze vztah množství amplifikovaného PCR produktu k počáteční koncentraci templátu vyjádřit následujícím vzorcem:

$$Nc = N (1 + E)^c$$

kde N_c je koncentrace amplifikovaného produktu v libovolném cyklu, N je počáteční koncentrace templátu, E je efektivita reakce a *c* je číslo cyklu.

Výpočet prahových cyklů

Přístroj ABI PRISM 7900HT umožňuje kvantifikaci neznámých vzorků na základě počtu cyklů, potřebných k dosažení určité úrovně fluorescence. Fluorescence vzorků obsahujících vyšší počáteční počet kopií templátu překročí práh po uplynutí nižšího počtu cyklů než u vzorků s nižší výchozí koncentrací templátu.

Prahový cyklus (C_T) pro danou amplifikační křivku je cyklus, v němž fluorescenční signál daného vzorku překročí práh. Hodnota C_T představuje detekční práh přístroje 7900HT a je závislá na dvou faktorech:

- Výchozím počtu kopií templátu
- Efektivitě amplifikace DNA

Jak program SDS stanoví hodnoty C_T

Aby mohl stanovit hodnoty C_T, použije program SDS nejprve data z fáze tzv. ‘baseline’ (pozadí – přednastavené pozadí je v rozsahu od 3. do 15. cyklu) a na základě hodnot R_n v této fázi vytvoří graf závislosti ΔR_n na počtu cyklů, kde ΔR_n je normalizovaná fluorescence po odečtení pozadí . Následně vyhledá v amplifikačním grafu bod, v němž hodnota ΔR_n protíná nastavený práh (přednastavený práh je 0.2). Cyklus, v němž k tomu dojde, je prahový cyklus (threshold cycle - C_T) pro danou amplifikační křivku.

Poznámka: Je možné, že nastavení pozadí (baseline) a prahu bude nutné změnit, abyste získali přesné výsledky. Více informací o nastavení pozadí a prahu naleznete v části “Nastavení pozadí a prahu” na straně 6-46.

Vypovídací hodnota prahových cyklů

Ve vzorci, který popisuje exponenciální fázi PCR amplifikace:

$$X_n = X_m (1 + E_X)^{n - m}$$

znamená:

X_n	=	počet cílových molekul v cyklu n (takže $n \geq m$)
X_m	=	počet cílových molekul v cyklu m (takže $m \leq n$)
E_X	=	efektivita amplifikace (v rozsahu 0–1)
n - m	=	počet cyklů, které uplynuly mezi cykly m a n

Amplikony navržené a reakce optimalizované podle doporučení společnosti Applied Biosystems (velikost amplikonu <150 bp) mají efektivitu amplifikace blížící se 100%. Proto platí, že $E_X=1$, takže:

$$X_n = X_m (1 + 1)^{n-m}$$
$$= X_m (2)^{n-m}$$

Chcete-li vyjádřit vypovídací hodnotu jednoho cyklu amplifikace, definujete $n - m = 1$ takže:

$$X_1 = X_0 (2)^{1}$$
$$= 2 X_0$$

Každý cyklus PCR tedy odpovídá dvojnásobnému nárůstu množství jejího produktu. Obdobně změna prahového cyklu o jedna odpovídá dvojnásobnému rozdílu v počáteční koncentraci templátu.

Srovnávací C_T metoda relativní kvantifikace

Aritmetický vzorec

Srovnávací (komparativní) C_T metoda je podobná metodě standardní křivky. Nicméně pro výpočet relativního množství používá aritmetický vzorec. Množství cílové nukleové kyseliny normalizované na endogenní kontrolu a vyjádřené relativně ve vztahu ke kalibrátoru je dáno vzorcem:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Odvození vzorce

Ve vzorci, který popisuje exponenciální fázi PCR amplifikace:

$$X_n = X_o \times (1 + E_X)^n$$

znamená:

X_n	=	počet cílových molekul v cyklu n
X_o	=	počáteční počet cílových molekul
E_X	=	efektivita amplifikace
n	=	počet cyklů

Prahový cyklus (C_T) označuje číslo cyklu, v němž množství amplifikovaného produktu dosáhne nastavený práh.

Takže

$$X_T = X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

kde:

X_T	=	počet cílových molekul při dosažení prahu
$C_{T,X}$	=	prahový cyklus
K_X	=	konstanta

Pro endogenní kontrolu lze odvodit obdobný vzorec:

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

kde:

R_T	=	počet molekul endogenní kontroly při dosažení prahu
R_o	=	počáteční počet molekul endogenní kontroly
E_R	=	efektivita amplifikace endogenní kontroly
$C_{T,R}$	=	prahový cyklus amplifikace endogenní kontroly
K_R	=	konstanta

Vydělíme-li X_T a R_T, dostaneme následující vztah:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Hodnoty X_T a R_T závisí na řadě faktorů, včetně:

- Použité reportérové barvy
- Kontextu sekvence, který ovlivňuje fluorescenční vlastnosti sondy
- Efektivitě štěpení sondy
- Čistotě sondy
- Nastavení prahu

Konstanta K tedy nemusí být nutně rovna jedné.

Předpokládáme-li identické efektivity amplifikace cílové nukleové kyseliny a endogenní kontroly:

$E_X = E_R = E$,

$$\frac{X_o}{R_o} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

nebo

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

kde:

X_N	=	X_o/R_o, normalizované množství cílové nukleové kyseliny
ΔC_T	=	$C_{T,X}$ - $C_{T,R}$, rozdíl prahových cyklů cílové nukleové kyseliny a endogenní kontroly

Tento vzorec lze napsat následujícím způsobem:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Posledním krokem je vydělit X_N pro libovolný vzorek q hodnotou X_N pro kalibrátor (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

kde

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$$

Amplikony navržené a reakce optimalizované podle doporučení společnosti Applied Biosystems (velikost amplikonu <150 bp) mají efektivitu amplifikace blížící se 100%. Proto je množství cílové nukleové kyseliny normalizované vůči endogenní kontrole a vyjádřené relativně vůči kalibrátoru dáno vzorcem:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Podmínky záruky

E

Záruka

Společnost Applera se prostřednictvím společnosti Applied Biosystems zavazuje, že po dobu jeden rok od dokončení instalace nebo patnáct (15) měsíců od data odeslání zákazníkovi, podle toho co nastane dříve (dále jen "záruční doba"), bude přístroj ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (dále jen "přístroj") bez závad na materiálu a provedení a bude fungovat v souladu se svou technickou specifikací, která je uvedena na listu, jenž je součástí dodávky, nebo je k dispozici u obchodních zástupců společnosti Applied Biosystems.

Dojde-li během záruční doby k poškození přístroje, jeho kontaminaci nebo k jiné závadě takového druhu, že přístroj nebude fungovat v souladu se svou technickou specifikací, společnost Applied Biosystems na své náklady přístroj opraví nebo vymění, aby znovu splňoval uvedené technické specifikace. Dojde-li k poškození nebo kontaminaci přístroje nebo ke změně jeho funkčnosti v důsledku používání materiálů a/nebo chemikálií jiných než výslovně doporučených společností Applied Biosystems, společnost Applied Biosystems tyto závady odstraní na náklady zákazníka. Po provedení takového servisního zásahu bude na vyměněné nebo opravené součásti přístroje poskytnuta záruka na dobu, která zbývá z původní záruční doby.

Tato záruka se nevztahuje na přístroj nebo jeho součásti, které byly (a) poškozeny v důsledku nehody, nesprávného použití nebo zanedbání, (b) pozměněny nebo opraveny jinou osobou než společností Applied Biosystems nebo (c) používány způsobem, který není v souladu s návodem k použití, jež je součástí dodávky přístroje. Tato záruka se nevztahuje na příslušenství nebo spotřební materiál, které instaluje sám zákazník, jak je uvedeno v návodu k použití přístroje. Na tyto položky se vztahuje jejich vlastní záruka.

Závazky společnosti Applied Biosystems, plynoucí z této záruky, se vztahují pouze na opravy závad nebo výměny součástí přístroje, které společnost Applied Biosystems považuje za nezbytné provést tak, aby byl přístroj uveden do stavu, jež odpovídá jeho technickým specifikacím. Veškeré opravy a výměny vyplývající z této záruky budou provedeny společností Applied Biosystems u zákazníka a na náklady společnosti Applied Biosystems.

Žádný zástupce nebo zaměstnanec společnosti Applied Biosystems není oprávněn zavázat společnost Applied Biosystems k poskytnutí jakékoliv záruky k přístroji, která by nebyla uvedena v tištěných návodech a další literatuře související s přístrojem a vydané společností Applied Biosystems, nebo v těchto záručních podmínkách. Jakékoliv kroky tohoto druhu, učiněné zástupcem nebo zaměstnancem společnosti Applied Biosystems, nejsou pro společnost Applied Biosystems závazné.

Společnost Applied Biosystems nebude zodpovědná za jakékoliv náhodné, zvláštní nebo následné ztráty, škody nebo výdaje přímo nebo nepřímo související s pořízením nebo používáním přístroje. Společnost Applied Biosystems neposkytuje jakoukoliv záruku ve vztahu k výrobkům nebo součástem třetích stran.

Platnost této záruky se vztahuje pouze na původní umístění přístroje a je nepřenosná.

TATO ZÁRUKA JE JEDINÁ A EXKLUZIVNĚ POSKYTOVANÁ ZÁRUKA NA PŘÍSTROJ. SPOLEČNOST APPLIED BIOSYSTEMS VÝSLOVNĚ ODMÍTÁ VEŠKERÉ JINÉ ZÁRUKY VE VZTAHU K PŘÍSTROJI, VYJÁDŘENÉ NEBO IMPLICITNÍ, VČETNĚ ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ ZÁRUK PRODEJNOSTI NEBO VHODNOSTI PRO URČITÝ ÚČEL. ZA ŽÁDNÝCH OKOLNOSTÍ NENÍ SPOLEČNOST APPLIED BIOSYSTEMS ZODPOVĚDNÁ, AŤ JIŽ NA ZÁKLADĚ SMLOUVY, OBČANSKÉHO PRÁVA, ZÁRUKY NEBO JINÉHO USTANOVENÍ NEBO NA JINÉM ZÁKLADĚ, ZA SPECIÁLNÍ, VEDLEJŠÍ, NEPŘÍMÉ, TRESTNÍ, MNOHOČETNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY, VZNIKLÉ VE SPOJENÍ S PŘÍSTROJEM, VČETNĚ ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ, NEBO VZNIKLÉ V DŮSLEDKU POUŽÍVÁNÍ TOHOTO DOKUMENTU.

Literatura

Bloch, W. **1991**. A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. Biochemistry 30:2735–2747.

Förster, V. Th., **1948**, Zwischenmolekulare Energie-wanderung und Fluoreszenz. Annals of Physics (Leipzig) 2: 55-75.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. **1992**. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. BioTechnology 10:413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. **1993**. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. BioTechnology 11:1026-1030.

Lakowicz, J.R. **1983**. Chapter 10. Energy Transfer. In: Principles of Fluorescent Spectroscopy, Plenum Press, N.Y. pp, 303-339.

Lee, L.G., Connell, C.R., and Bloch, W. **1993**. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucl. Acids Res. 21: 3761-3766.

Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., and Mullah, K.B., inventors; Applied Biosystems (Foster City, CA), assignee. 2 Mar. **1999**. Hybridization assay using self-quenching fluorescence probe. United States patent 5,876,930.

Livak, K.J., Marmaro, J., and Todd, J.A. **1995**. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening [letter]. Nat. Genet. 9:341–342.

Martens, H. and Naes, T., **1989**. In: Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Chichester.

Obecné články o reagenciích TaqMan a izolacích nukleových kyselin

de Kok, J.B., Hendriks, J.C., van Solinge, W.W., Willems, H.L., Mensink, E.J., and Swinkels, D.W. Use of Real-Time quantitative PCR to compare DNA isolation methods. *Clin.Chem.* 44(10):2201-2204, 1998.

Goldsworthy, S.M., Stockton, P.S., Trempus, C.S., Foley, J.F., and Maronpot, R.R. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol.Carcinog.* 25(2):86-91, 1999.

Kruse, N., Pette, M., Toyka, K., and Rieckmann, P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *J.Immunol.Methods* 210(2):195-203, 1997.

Lie, Y. S. and C. J., Petropoulos. "Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays." *Curr Opin Biotechnol* 9 (1998): 43-48.

Orlando, C., P. , Pinzani, and M. , Pazzagli. "Developments in quantitative PCR." *Clin Chem Lab Med* 36 (1998): 255-269.

Smetsers, T.F., Stevens, E.H., van de Locht, L.T., and Mensink, E.J. Freezing of PCR master mixture retains full amplification activity and facilitates PCR standardisation for molecular diagnostics and Real-Time quantitative PCR [letter]. *Leukemia* 12(8):1324-1325, 1998.

Obecné články o absolutní kvantifikaci

Arnold, B.A., Hepler, R.W., and Keller, P.M. One-Step Fluorescent Probe Product-Enhanced Reverse Transcriptase Assay. BioTechniques 25(1):98-106, 1998.

Ambs S., S. Dennis, J. Fairman, M. Wright and J. Papkoff. 1999. Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of a human angiostatin transgene in transfected B16F10 melanoma cells [In Process Citation]. Cancer Res. 59:5773-5777, 1999.

Becker K., D. Pan and C.B. Whitley. 1999. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. Hum. Gene Ther. 10:2559-2566, 1999.

Berg, T., M ller, A.R., Platz, K.P., Hohne, M., Bechstein, W.O., Hopf, U., Wiedenmann, B., Neuhaus, P., and Schreier, E. Dynamics of GB virus C viremia early after orthotopic liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C replication. Hepatology 29(1):245-249, 1999.

Chiang, P.W., Wei, W.L., Gibson, K., Bodmer, R., and Kurnit, D.M. A fluorescent quantitative PCR approach to map gene deletions in the Drosophila genome [In Process Citation]. Genetics 153(3):1313-1316, 1999.

de Kok, J.B., Hendriks, J.C., van Solinge, W.W., Willems, H.L., Mensink, E.J., and Swinkels, D.W. Use of Real-Time quantitative PCR to compare DNA isolation methods. Clin.Chem. 44(10):2201-2204, 1998.

Fairman, J., Roche, L., Pieslak, I., Lay, M., Corson, S., Fox, E., Luong, C., Koe, G., Lemos, B., Grove, R., Fradkin, L., and Vernachio, J. Quantitative RT-PCR to evaluate in vivo expression of multiple transgenes using a common intron [In Process Citation]. BioTechniques 27(3):566-70, 572-4, 1999.

Gerard, C. J., et al. "Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using Real-Time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards." Cancer Res 58 (1998): 3957-3964.

Hartel, C., Bein, G., Kirchner, H., and Kluter, H. A Human Whole-Blood Assay for Analysis of T-Cell Function by Quantification of Cytokine mRNA. Scand.J.Immunol. 49(6):649-654, 1999.

Higgins, J. A., et al. "5' nuclease PCR assay to detect Yersinia pestis [In Process Citation]." J Clin Microbiol 36 (1998): 2284-2288.

Hennig, H., et al. "Lack of evidence for Marek's disease virus genomic sequences in leukocyte DNA from multiple sclerosis patients in Germany [In Process Citation]." Neurosci Lett 250 (1998): 138-140.

Houng, H.H., Hritz, D., and Kanesa-thasan, N. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. J.Virol.Methods 2000.Apr;86(1):1-11.

Kafert S., J. Krauter, A. Ganser and M. Eder. Differential quantitation of alternatively spliced messenger RNAs using isoform-specific Real-Time RT-PCR. Anal. Biochem. 269:210-213, 1999.

Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., and Morishima, T. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a Real-Time PCR assay. J.Clin.Microbiol. 37(1):132-136, 1999.

Klein, D., Janda, P., Steinborn, R., Muller, M., Salmons, B., and Gunzburg, W.H. Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using Real-Time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification [In Process Citation]. Electrophoresis 20(2):291-299, 1999.

Lo, Y. M., et al. "Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis." Am J Hum Genet 62 (1998): 768-775.

Lo, Y.M., Chan, L.Y., Lo, K.W., Leung, S.F., Zhang, J., Chan, A.T., Lee, J.C., Hjelm, N.M., Johnson, P.J., and Huang, D.P. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 59(6):1188-1191, 1999.

Lo, Y.M., Leung, T.N., Tein, M.S., Sargent, I.L., Zhang, J., Lau, T.K., Haines, C.J., and Redman, C.W. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia [see comments]. Clin.Chem. 45(2):184-188, 1999.

Lo Y.M., L.Y. Chan, A.T. Chan, S.F. Leung, K.W. Lo, J. Zhang, J.C. Lee, N.M. Hjelm, P.J. Johnson and D.P. Huang. 1999. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 59:5452-5455.

Leutenegger, C.M., Klein, D., Hofmann-Lehmann, R., Mislin, C., Hummel, U., Boni, J., Boretti, F., Guenzburg, W.H., and Lutz, H. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic Real-Time detection system [In Process Citation]. J.Virol.Methods 78(1-2):105-116, 1999

Lockey, C., E. , Otto, and Z. , Long. "Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule." BioTechniques 24 (1998): 744-746.

Luthra, R., et al. "Novel 5' exonuclease-based Real-Time PCR assay for the detection of t(14;18)(q32;q21) in patients with follicular lymphoma." Am J Pathol 153 (1998): 63-68.

Maudru, T. and K. W., Peden. "Adaptation of the fluorogenic 5'-nuclease chemistry to a PCR-based reverse transcriptase assay." BioTechniques 25 (1998): 972-975.

Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C.R., Izumo, S., and Osame, M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. J.Neurovirol. 4(6):586-593, 1998.

Nogva, H.K. and Lillehaug, D. Detection and quantification of Salmonella in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction [In Process Citation]. Int.J.Food Microbiol. 51(2-3):191-196, 1999.

Pusterla, N., Huder, J.B., Leutenegger, C.M., Braun, U., Madigan, J.E., and Lutz, H. Quantitative Real-Time PCR for detection of members of the Ehrlichia phagocytophila genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks. J.Clin.Microbiol. 37(5):1329-1331, 1999.

Pusterla, N., Leutenegger, C.M., Chae, J.S., Lutz, H., Kimsey, R.B., Dumler, J.S., and Madigan, J.E. Quantitative Evaluation of Ehrlichial Burden in Horses after Experimental Transmission of Human Granulocytic Ehrlichia Agent by Intravenous Inoculation with Infected Leukocytes and by Infected Ticks. J.Clin.Microbiol. 37(12):4042-4044, 1999.

Smith, G.J., et al. "Fast and accurate method for quantitating E. coli host-cell DNA contamination in plasmid DNA preparations." BioTechniques 26 (1999): 518-526.

Wang, S.C., Klein, R.D., Wahl, W.L., Alarcon, W.H., Garg, R.J., Remick, D.G., and Su, G.L. Tissue coexpression of LBP and CD14 mRNA in a mouse model of sepsis. J.Surg.Res. 76(1):67-73, 1998.

Wang, T. and Brown, M.J. mRNA Quantification by Real Time TaqMan Polymerase Chain Reaction: Validation and Comparison with RNase Protection [In Process Citation]. Anal.Biochem. 269(1):198-201, 1999.

Wang X., X. Li, J.A. Erhardt, F.C. Barone and G.Z. Feuerstein. 2000. Detection of tumor necrosis factor-alpha mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of Real-Time polymerase chain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2000. Jan;20(1):15-20. 20:15-20.

Wang X., X. Li, R.W. Currie, R.N. Willette, F.C. Barone and G.Z. Feuerstein. 2000. Application of Real-Time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1beta mRNA in ischemic brain tolerance. J. Neurosci. Res. 2000. Jan. 15;59(2):238-46.

Ying H., T.Z. Zaks, R.F. Wang, K.R. Irvine, U.S. Kammula, F.M. Marincola, W.W. Leitner and N.P. Restifo. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. Nat. Med. 5:823-827, 1999.

Relativní kvantifikace

Araki, R. and et al Nonsense mutation at Tyr-406 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *PNAS* 94:2438-2443, 1997.

Bieche, I., et al. "Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer." Int J Cancer 78 (1998): 661-666.

Bieche I., P. Onody, I. Laurendeau, M. Olivi, D. Vidaud, R. Lidereau and M. Vidaud. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. Clin. Chem. *45*:1148-1156, 1999.

Casteels, K. M., et al. "Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by late intervention with nonhypercalcemic analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in combination with a short induction course of cyclosporin A." Endocrinology 139 (1998): 95-102.

Chiang, P.W., Beer, D.G., Wei, W.L., Orringer, M.B., and Kurnit, D.M. Detection of erbB-2 amplifications in tumors and sera from esophageal carcinoma patients. *Clin.Cancer Res.* 5(6):1381-1386, 1999.

Collins, C., et al. "Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998): 8703-8708.

de Kok, J.B., Ruers, T.J., van Muijen, G.N., van Bokhoven, A., Willems, H.L., and Swinkels, D.W. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin.Chem.2000.Mar;46*(3):313-8.

Dittmer D., C. Stoddart, R. Renne, V. Linquist-Stepps, M.E. Moreno, C. Bare, J.M. McCune and D. Ganem. 1999. Experimental Transmission of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV/HHV-8) to SCID-hu Thy/Liv Mice. J. Exp. Med. *190*:1857-1868.

Dolken, L., F. , Schuler, and G. , Dolken. "Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by Real-Time quantitative PCR using fluorogenic probes." BioTechniques 25 (1998): 1058-1064.

Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Danenberg, P.V., and Laird, P.W. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res.* 59(10):2302-2306, 1999.

Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P.V., and Laird, P.W. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic.Acids.Res.2000.Apr.15;28(8):E32.*

Eder, M., Battmer, K., Kafert, S., Stucki, A., Ganser, A., and Hertenstein, B. Monitoring of BCR-ABL expression using Real-Time RT-PCR in CML after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia* 13(9):1383-1389, 1999.

Fink, L., et al. "Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking." Nat Med 4 (1998): 1329-1333.

Haugland, R.A., Vesper, S.J., and Wymer, L.J. Quantitative measurement of stachybotrys chartarum conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan(TM)fluorogenic probe system. *Mol.Cell Probes.* 13(5):329-340, 1999.

Hirayama, Y., et al. "Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells." Blood 92 (1998): 46-52.

Johnson, M.R., Wang, K., Smith, J.B., Heslin, M.J., and Diasio, R.B. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.2000.Feb.15;278(2):*175-84.

Krauter J., M.P. Wattjes, S. Nagel, O. Heidenreich, U. Krug, S. Kafert, D. Bunjes, L. Bergmann, A. Ganser and G. Heil. 1999. Real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21)-positive AML patients. Br. J. Haematol. 107:80-85.

Kruse, N., Pette, M., Toyka, K., and Rieckmann, P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *J.Immunol.Methods* 210(2):195-203, 1997.

Lee, L.Y., Patel, S.R., Hackett, N.R., Mack, C.A., Polce, D.R., El-Sawy, T., Hachamovitch, R., Zanzonico, P., Sanborn, T.A., Parikh, M., Isom, O.W., Crystal, R.G., and Rosengart, T.K. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann.Thorac.Surg.2000.Jan;69(1):14-23;.discussion.23-4.*

Leutenegger C.M., C.N. Mislin, B. Sigrist, M.U. Ehrengruber, R. Hofmann-Lehmann and H. Lutz. 1999. Quantitative Real-Time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. Vet. Immunol. Immunopathol. 71:291-305.

Maeda, I., Takano, T., Matsuzuka, F., Maruyama, T., Higashiyama, T., Liu, G., Kuma, K., and Amino, N. Rapid screening of specific changes in mRNA in thyroid carcinomas by sequence specific-differential display: decreased expression of acid ceramidase mRNA in malignant and benign thyroid tumors [In Process Citation]. *Int.J.Cancer* 81(5):700-704, 1999.

Mandigers, C.M., Meijerink, J.P., Raemaekers, J.M., Schattenberg, A.V., and Mensink, E.J. Graft-versus-lymphoma effect of donor leucocyte infusion shown by real- time quantitative PCR analysis of t(14;18) [letter]. *Lancet* 352(9139):1522-1523, 1998.

Marcucci, G., et al. "Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay." Leukemia12 (1998): 1482-1489.

Mensink, E., et al. "Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using Real-Time quantitative RT-PCR." Br J Haematol 102 (1998): 768-774.

Moody, A., Sellers, S., and Bumstead, N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex Real-Time quantitative RT-PCR. *Virol.Methods 2000.Mar;85(1-2):55-64.*

Patterson, B. K., et al. "Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission." Am J Pathol153 (1998): 481-490.

Pongers-Willemse, M.J., Verhagen, O.J., Tibbe, G.J., Wijkhuijs, A.J., de Haas, V., Roovers, E., van der Schoot, C.E., and van Dongen, J.J. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 12(12):2006-2014, 1998.

Pugazhenthi, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E., and Reusch, J.E. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J.Biol.Chem.2000.Apr.14;275(15):10761-6.*

Raggi, C.C., Bagnoni, M.L., Tonini, G.P., Maggi, M., Vona, G., Pinzani, P., Mazzocco, K., De Bernardi, B., Pazzagli, M., and Orlando, C. Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin.Chem.* 45(11):1918-1924, 1999.

Ringel, M.D., Balducci-Silano, P.L., Anderson, J.S., Spencer, C.A., Silverman, J., Sparling, Y.H., Francis, G.L., Burman, K.D., Wartofsky, L., Ladenson, P.W., Levine, M.A., and Tuttle, R.M. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 84(11):4037-4042, 1999.

Sangoram, A. M., et al. "Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription." Neuron 21 (1998): 1101-1113.

Sgroi D.C., S. Teng, G. Robinson, R. LeVangie, J.R. Hudson, Jr. and A.G. Elkahloun. 1999. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. Cancer Res. *59*:5656-5661.

Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer [see comments]. *Nat.Genet.* 21(1):99-102, 1999.

Shimokawa, T., et al. "Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation." Biochem Biophys Res Commun 246 (1998): 287-292.

Taoufik, Y., Froger, D., Benoliel, S., Wallon, C., Dussaix, E., Delfraissy, J.F., and Lantz, O. Quantitative ELISA-polymerase chain reaction at saturation using homologous internal DNA standards and chemiluminescence revelation. *Eur.Cytokine.Netw.* 9(2):197-204, 1998.

Virtanen M., H. Torma and A. Vahlquist. 2000. Keratin 4 upregulation by retinoic acid In vivo: A sensitive marker for retinoid bioactivity in human epidermis. J. Invest. Dermatol. 2000. Mar;114(3):487-93.

Wingo, S.T., Ringel, M.D., Anderson, J.S., Patel, A.D., Lukes, Y.D., Djuh, Y.Y., Solomon, B., Nicholson, D., Balducci-Silano, P.L., Levine, M.A., Francis, G.L., and Tuttle, R.M. Quantitative reverse transcription-PCR measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of healthy subjects. *Clin.Chem.* 45(6 Pt 1):785-789, 1999.

Yajima, T., et al. "Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system." Clinical Chemistry 44 (1998): 2441-2445.

Yamada Y., N. Itano, H. Narimatsu, T. Kudo, S. Hirohashi, A. Ochiai, A. Niimi, M. Ueda and K. Kimata. 1999. Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using Real-Time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Jpn. J. Cancer Res. *90*:987-992.

Yoneyama H., A. Harada, T. Imai, M. Baba, O. Yoshie, Y. Zhang, H. Higashi, M. Murai, H. Asakura and K. Matsushima. 1998. Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. *J. Clin. Invest. 102*:1933-1941.

Zhang, A.W., Hartman, G.L., Curio-Penny, B., Pedersen, W.L., and Becker, K.B. Molecular Detection of Diaporthe phaseolorum and Phomopsis longicolla from Soybean Seeds. *Phytopathology* 89(9):796-804, 1999.

Alelická diskriminace

Breen, G., Harold, D., Ralston, S., Shaw, D., and St Clair, D. Determining SNP allele frequencies in DNA pools. *Biotechniques 2000.Mar;28(3):464-8,.470.*

Fujii K., Y. Matsubara, J. Akanuma, K. Takahashi, S. Kure, Y. Suzuki, M. Imaizumi, K. Iinuma, O. Sakatsume, P. Rinaldo and K. Narisawa. 2000. Mutation detection by TaqMan-allele specific amplification: application to molecular diagnosis of glycogen storage disease type Ia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Hum. Mutat. 2000;15(2):189-96.

Germer, S. and Higuchi, R. Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Res.* 9(1):72-78, 1999.

Happich, D., Schwaab, R., Hanfland, P., and Hoernschemeyer, D. Allelic discrimination of factor V Leiden using a 5' nuclease assay. *Thromb.Haemost.* 82(4):1294-1296, 1999.

Holloway, J.W., Beghe, B., Turner, S., Hinks, L.J., Day, I.N., and Howell, W.M. Comparison of three methods for single nucleotide polymorphism typing for DNA bank studies: sequence-specific oligonucleotide probe hybridisation, TaqMan liquid phase hybridisation, and microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE). *Hum.Mutat.* 14(4):340-347, 1999.

Livak, K.J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay [In Process Citation]. *Genet.Anal.* 14(5-6):143-149, 1999.

Mizugaki M., M. Hiratsuka, Y. Agatsuma, Y. Matsubara, K. Fujii, S. Kure and K. Narisawa. 2000. Rapid detection of CYP2C18 genotypes by Real-Time fluorescence polymerase chain reaction. J. Pharm. Pharmacol. 2000. Feb;52(2):199-205.

*Paris, P.L., Kupelian, P.A., Hall, J.M., Williams, T.L., Levin, H., Klein, E.A., Casey, G., and Witte, J.S. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients [In Process Citation]. *Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 8(10):901-905, 1999.

Shi M.M., S.P. Myrand, M.R. Bleavins and F.A. de la Iglesia. High-throughput genotyping method for glutathione S-transferase T1 and M1 gene deletions using TaqMan probes. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 103:3-15, 1999.

Terminologický slovník

.sdd	Přípona souboru detektoru pro program SDS 2.2.
.sdm	Přípona násobného dokumentu destičky (Multiple Plate file - *.sdm) pro program SDS 2.2
.sds	Přípona dokumentu destičky (*.sds) pro program SDS 2.2.
.sdt	Přípona templátu (*.sdt) pro program SDS 2.2.
ΔC_T	Rozdíl prahového cyklu vzorku a prahového cyklu endogenní kontroly: $\Delta C_T = C_T$(cílový gen) - C_T (endogenní kontrola).
$\Delta\Delta C_T$	Pro daný cílový gen se jedná o rozdíl průměru ΔC_T vzorku a průměru ΔC_T kalibrátoru: $\Delta\Delta C_T$ (vzorek) = Průměr ΔC_T (vzorek) – Průměr ΔC_T (kalibrátor). Tato hodnota se používá pro výpočet relativní změny genové exprese pomocí vzorce: Relativní změna genové exprese = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.
ΔR_n	Normalizovaný signál reportérové barvy po odečtení signálu pozadí. Hodnota pozadí je stanovena v několika prvních cyklech PCR. Obdobně jako R_n ani ΔR_n není neměnná, ale v průběhu PCR se zvyšuje tak, jak se zvyšuje počet kopií amplikonu, dokud se reakce nedostane do fáze plató.
5′ nukleázová esej	5′ (pět s čarou) nukleázová esej při současném použití sond typu TaqMan® je základem technologie Real-Time polymerázové řetězové reakce (polymerázové řetězové reakce v reálném čase). Více informací viz část “Princip 5′ nukleázové eseje” na straně D-2.
absolutní kvantifikace (AQ)	Cílem absolutní kvantifikace je přesně stanovit absolutní množství cílové nukleové kyseliny v neznámém vzorku. Výsledky absolutní kvantifikace jsou udávány v týchž jednotkách, v jakých jsou zadány standardy.
alela	Varianta genu v určitém lokusu neboli místě na chromozómu
alelická diskriminace (AD)	Proces v němž je stanovena přítomnost dvou variant cílové nukleové kyseliny ve vzorcích DNA pomocí reagencií typu TaqMan. Nejčastějšími detekovanými variantami jsou jednobodové polymorfizmy - single nucleotide polymorphisms (SNPs).

amplikon — Část DNA amplifikovaná pomocí PCR

amplifikační graf — Amplifikační graf slouží k zobrazení dat z běhů PCR v reálném čase po provedení normalizace signálu a multikomponentní analýzy. Amplifikační graf je součástí pouze těch dokumentů destičky, které byly analyzovány v reálném čase. Je to dvourozměrný graf závislosti normalizované fluorescence reportérové barvy (ΔR_n) na počtu cyklů PCR. Používá se pro výpočet prahového cyklu (C_T).

analytická seance — Soubor výsledků analýzy hrubých dat z jediného dokumentu destičky provedené v programu SDS 2.2. Analytická séance je uložena v databázi a lze ji zpětně otevřít v programu SDS. Z jediného dokumentu destičky lze vytvořit více analytických seancí, ale každá musí mít unikátní název. Analytická seance nemusí být nutně propojena se studií, ale pokud propojena je, lze ji propojit maximálně s jednou studií najednou.

annealing — Nasednutí sondy nebo primeru na DNA nebo cDNA v průběhu PCR

Application Program Interface (API)
Soubor protokolů a nástrojů pro tvorbu programů. Poskytuje vývojářům všechny "stavební kameny" pro propojování jednotlivých součástí systému.

auto increment — Nastavení teplotního profilu umožňují zvyšování nebo snižování teploty nebo prodlužování či zkracování doby inkubace během cyklů PCR o předem definovanou hodnotu.

barvy (pure dyes) — Předpokladem fungování multikomponentní analýzy výsledků je provedení kalibrace barev. V rámci kalibrace barev program odečte spektrální data standardů (jednotlivých barev) (inkubace 2 min při 60 °C). Získaná spektrální data jsou uložena do kalibračního souboru v adresáři SDS. Kalibrační soubor je následně využíván při multikomponentní analýze. Po skončení běhu program provede extrakci signálu každé jednotlivé barvy (komponenty), která přispívá k celkovému naměřenému signálu. Jelikož stárnutí a používání přístroje může ovlivnit odečet spekter čistých barev, společnost Applied Biosystems doporučuje provést kalibraci barev jedenkrát až dvakrát ročně (v závislosti na využití přístroje).

běh/analýza v reálném čase (Real-Time)
Označuje způsob analýzy výsledků absolutní a relativní kvantifikace. Přístroj 7900HT měří fluorescenci vzorků v průběhu každého cyklu PCR.

cDNA (komplementární DNA)
Molekula DNA, jejíž nukleotidová sekvence je komplementární k RNA. cDNA je vytvořena na základě RNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. RNA je převáděna do cDNA, poněvadž cDNA je mnohem stabilnější než RNA, a poněvadž pro mnohé aplikace včetně PCR je zapotřebí použít jako templátu DNA.

delta C_T — Viz ΔC_T.

delta delta C_T — Viz $\Delta\Delta C_T$.

delta R_n — Viz ΔR_n.

detektor — Virtuálně vyjádřená genově nebo alelově specifická kombinace primerů a sondy, které jsou používány v dané eseji (při absolutní kvantifikaci, relativní kvantifikaci, alelické diskriminaci nebo dalších analýzách, prováděných na přístroji 7900HT).

dílčí (clipped) data — V režimu real time je fluorescence celé destičky měřena každých 8,5 vteřiny.Dílčí (clipped) data jsou získána na základě výpočtu průměru posledních tří vypočítaných hodnot R_n (normalizovaný signál reportérové barvy) získaných během fáze polymerace v každém cyklu. Jsou udávána před odečtením signálu pozadí (baseline) - závislost R_n na pořadí cyklu a po odečtení signálu pozadí (baseline) – závislost ΔR_n na pořadí cyklu.

dokument destičky (*.sds) — Soubor používaný programem SDS 2.2 pro ukládání dat dokumentu destičky na disku počítače. Nese informace o použité destičce (spotřebním materiálu) obsahující vzorky a reagencie a používané při vlastním běhu. Program používá dokument destičky pro ukládání informací o činnosti přístroje (teplotní profil a sběr dat), pro ukládání dat zaznamenaných v průběhu PCR, ukládání výsledků běhu a nastavení parametrů analýzy a zobrazení výsledků.

endogenní kontrola — Detektor pro gen relativně stabilně exprimovaný ve všech analyzovaných vzorcích. Endogenní kontrola se používá pro normalizaci kvantifikace cílové mRNA. Účelem je eliminovat nespecifické ovlivnění získaných výsledků v důsledku použití nestejného vstupního množství RNA v reakci.

endogenní reference — Viz *endogenní kontrola*.

end-point eseje (detekované po skončení reakce) — Označuje způsob analýzy výsledků alelické diskriminace nebo esejí typu plus/mínus. Přístroj 7900HT provede jediné čtení fluorescence po ukončení PCR. Výsledkem následné analýzy provedené v programu SDS 2.2 je informace o přítomnosti či nepřítomnosti cílové sekvence v neznámých vzorcích.

high throughput (HT) - vysokokapacitní — Označuje schopnost analyzovat velké množství vzorků při genotypování nebo analýze genové exprese.

hrubá (raw) data — Nezpracovaný spektrální signál v rozsahu vlnových délek 500 až 660 nm zaznamenaný programem SDS pro jednotlivé jamky destičky.

inkubace (hold) — Krok teplotního cyklování PCR, kdy je nastavená teplota udržována delší dobu.

jednobodový polymorfizmus
: (single nucleotide polymorphism – SNP) Jeden pár bází v sekvenci DNA, který mají různí jedinci odlišný.

kalibrátor
: Vzorek, vůči němuž je při relativní kvantifikaci genové exprese vyjadřována její změna.

lokus
: Konkrétní místo na chromozómu, někdy chápané jako poloha nějakého genu, obvykle chápané jako poloha nějakého markeru.

marker
: Kombinace dvou detektorů, z nichž každý je specifický pro jednu alelickou variantu. Používá se v dokumentech alelické diskriminace, nikoliv absolutní nebo relativní kvantifikace. Dokumenty alelické diskriminace musí obsahovat alespoň jeden marker

metoda
: Protokol, který přístroj ABI PRISM 7900HT používá při provádění PCR. Zahrnuje informace o teplotním profilu (doba inkubace a teplota), o rychlosti změny teploty (tzv. ramp rates, viz ramp), o možnosti auto-increment (viz příslušné heslo tohoto slovníku) a nastavení čtení fluorescence.

minor groove binder (MGB)
: Protein vážící se do malého žlábku dvoušroubovicové DNA. Je-li navázán na oligonukleotid, stabilizuje duplex vytvořený vazbou tohoto oligonukleotidu na komplementární DNA, což vede k prudkému nárůstu T_m tohoto oligonukleotidu. Fluorogenní sondy, které mají navázán MGB na 3′ konci, bez problémů fungují v 5′ nukleázové eseji. Díky použití MGB mohou mít tyto sondy kratší sekvenci (13- až 20-mery) při zachování optimální T_m. Použití MGB tedy umožňuje konstrukci kratších fluorogenních sond s lepší schopností diskriminace.

množství (quantity)
: (1) množství (koncentrace) standardů v destičce (2) počáteční množství cílové nukleové kyseliny vypočítané pro neznámé vzorky v destičce.

multikomponentní analýza
: Analýza prováděná programem SDS 2.2 k rozlišení příspěvku jednotlivých barev do celkového naměřeného signálu (hrubá data). Přesah spekter jednotlivých barev přítomných v dané jamce vede ke vzniku složeného spektra a v rámci multikomponentní analýzy je definován příspěvek těchto jednotlivých barev.

multiplexní PCR
: Metoda používající více fluorogenních sond TaqMan® pro simultánní detekci amplifikace dvou nebo více cílových nukleových kyselin ve vzorku DNA.

násobný dokument destičky - Multiple Plate file (*.sdm)
: Násobný dokument destičky se používá pro analýzu výsledků relativní kvantifikace.

netemplátová kontrola (NTC)
: Kontrolní reakce zahrnující všechny komponenty PCR vyjma templátu. Při definování úlohy detektoru je jednou z možných úloh i NTC, používaná pro všechny detektory negativní kontroly (reakce bez templátu).

normalizovaný signál reportérové barvy (R_n) - Viz R_n.

nukleotid
: Základní stavební kámen DNA a RNA. Sestává z báze (adenin, tymin/uracil, guanin, cytosin), cukerného zbytku a zbytku kyseliny fosforečné.

odlehlý bod
: Neobvykle se lišící výsledek měření určitého parametru. V programu SDS2.2 funguje v rámci studií relativní kvantifikace algoritmus automatického odstranění odlehlých bodů, který provádí eliminaci těch výsledků měření, u nichž dojde k ovlivnění naměřených hodnot C_T v důsledku nějakého jiného vlivu, než je vstupní množství vzorku.

PCR mastermix
: Směs všech reagencií pro provedení PCR vyjma templátové DNA a primerů/sond. Např. TaqMan Universal PCR mastermix obsahuje AmpliTaq Gold® DNA polymerázu, AmpErase® UNG, která brání kontaminaci, pasivní referenci pro normalizaci signálu všech 5′ nukleázových esejí, dNTPs a reakční pufr.

pozadí (background)
: Součást fluorescenčního signálu dané eseje, která pochází z přístroje ABI PRISM 7900HT. Může mít vliv na citlivost detekce a stanovení C_T. Proto se signál pozadí měří při kalibraci přístroje a je pomocí matematického algoritmu během multikomponentní analýzy eliminován.

pozadí (baseline)
: V terminologii amplifikačního grafu: fluorescence vzorku ve vymezeném rozsahu cyklů předtím, než je detekovatelná amplifikace produktu. Pro standardní PCR používá program SDS 2.2 při stanovení pozadí eseje (baseline) přednastavený rozsah cyklů 3-15.

práh (threshold)
: Určitá úroveň normalizovaného signálu reportérové barvy (R_n), používaná pro stanovení hodnot C_T při provádění PCR v reálném čase. Nastavuje se výše než je pozadí (baseline) a dostatečně nízko, aby byl položen ve fázi exponenciální amplifikace. Jedná se o čáru, jejíž průnik s amplifikační křivkou definuje hodnotu C_T.

prahový cyklus (threshold cycle - C_T)
: Cyklus PCR v němž program SDS poprvé detekuje nárůst fluorescence reportérové barvy nad úroveň pozadí (baseline).

průměrné množství (quantity mean)
: Statistický průměr množství cílové nukleové kyseliny ve vzorcích v rámci skupiny replikátů (jamky mající totéž jméno, detektor a úlohu detektoru). Vypočítá se jako součet množství cílové nukleové kyseliny v jednotlivých vzorcích dané skupiny replikátů vydělený počtem těchto replikátů.

překryv spekter
: Fluorescenční signál jedné barvy se může překrývat s fluorescenčním signálem jiné barvy. Vliv tohoto překryvu je eliminován v rámci multikomponentní analýzy.

příkazový řádek — Některé programy lze spustit pomocí příkazové řádky systému DOS a/nebo ze skriptu .bat, většinou bez grafického uživatelského rozhraní. Takové programy mohou pomocí příkazové řádky podporovat i zadávání uživatelských hodnot vybraných parametrů jako např. názvů souborů, cest k jednotlivým adresářům atp..

ramp (změna teploty) — Interval mezi dvěma nastavenými teplotami, během něhož přístroj ohřívá nebo ochlazuje vzorky.

relativní hladina genové exprese — Exprese cílového genu vyjádřená ve vztahu k expresi kontrolního genu v témže vzorku a vyjádřená relativně k hladině exprese v kalibrátoru. Viz $\Delta\Delta C_T$.

relativní kvantifikace — Proces v němž je vyjádřeno množství cílové nukleové kyseliny v jednom vzorku, vypočítané relativně vůči kontrolní nukleové kyselině, vůči množství v jiném vzorku. Např. množství c-myc v mozkové tkáni je vyjádřeno relativně vůči množství c-myc v jaterních buňkách.

reportérová barva — Fluorescenční barva navázaná na 5′ konci sondy typu TaqMan® . Používá se celá řada různých barev jako FAM™ a VIC®, kovalentně navázaných na 5′ konec sondy.

R_n — Normalizovaný signál reportérové barvy. Poměr fluorescence reportérové barvy a fluorescence pasivní reference v dané jamce. V průběhu PCR hodnota R_n roste tak jak dochází k nárůstu počtu kopií amplikonu, dokud reakce nedosáhne fáze plató. Při analýzách typu end point je fluorescenční signál měřen pouze jednou po skončení PCR.

seance — Viz *Analytická seance*.

singleplexní PCR — PCR prováděná s jediným detektorem detekující amplifikaci jediné cílové nukleové kyseliny.

SNP — Viz *jednobodový polymorfizmus*.

soubor detektoru (*.sdd) — Soubor detektoru je soubor ve formátu *.txt (tabelátorem oddělená data) používaný pro přenos informací o detektoru z a do programu SDS pomocí funkcí Export a Import ve správci detektorů. Tento soubor obsahuje: (a) záhlaví "SDS2.2[GDF[Global Detector File", (b) tabelátorem oddělené údaje o každém z detektorů (název alely, název reportérové barvy, název zhášeče, popis, komentář, údaje o osobě, která detektor vytvořila, datum a čas, kdy byl detektor vytvořen, datum a čas, kdy byl detektor pozměněn a barvu, kterou je detektor graficky zobrazován v programu SDS 2.2).

spektrální bin — Část celkového rozsahu spektra měřeného přístrojem 7900HT (přibližně 500-660 nm).

spektrální kalibrace — Spektrální kalibrace se provádí na základě výsledků kalibrace barev. Získaná spektrální data jsou uložena do kalibračního souboru v adresáři SDS. Po skončení běhu program provede extrakci signálu každé jednotlivé barvy (komponenty), která přispívá k celkovému naměřenému signálu. Jelikož stárnutí a používání přístroje může ovlivnit odečet spekter čistých barev, společnost Applied Biosystems doporučuje provést kalibraci barev jedenkrát až dvakrát ročně (v závislosti na využití přístroje).

spotřební materiál — (1) Plastik pro provedení reakce na přístroji 7900HT (96-ti nebo 384-jamková mikrodestička nebo mikrofluidní karta). Používaný spotřební materiál se definuje v rozbalovací nabídce Container (Destička) při vytváření dokumentu destičky. (2) Soupravy, chemikálie atp. používané v rámci nějaké eseje.

standardní odchylka množství (quantity standard deviation) — Statistická standardní odchylka množství cílové nukleové kyseliny ve vzorcích v rámci skupiny replikátů (jamky mající totéž jméno, detektor a úlohu detektoru). Vypočítá se jako druhá odmocnina součtu druhých mocnin odchylek množství v jednotlivých vzorcích od průměrného množství, vydělených n-1 stupni volnosti, kde n je počet replikátů.

studie — V rámci databáze SDS Enterprise se jedná o soubor analytických seancí alelické diskriminace nebo relativní kvantifikace. V rámci programu SDS 2.2 se jedná o dokument destičky typu '.sdm', který obsahuje jeden nebo více dokumentů typu '.sds' (dokumenty relativní kvantifikace).

templát (*.sdt) — Templáty mají totožný formát jako dokumenty *.sds, ale neobsahují hrubá data a čárové kódy.

templát — (1) Šablona pro vytvoření dokumentu destičky. Pro soubor templátu se používá přípona .sdt. Templáty usnadňují vytváření dokumentů destiček a obvykle se používají při vytváření většího počtu dokumentů (2) Vzorek DNA amplifikovaný v průběhu PCR.

T_m — (1) Teplota, při níž je 50% určité DNA v dvouřetězcové formě. (2) Maximální hodnota první derivace křivky normalizovaného signálu reportérové barvy (R_n).

typ eseje — V rámci programu SDS 2.2 Enterprise: alelická diskriminace, absolutní kvantifikace nebo relativní kvantifikace.

ukazatel kvality (quality value) — Odhad pravděpodobnosti, že genotyp stanovený pro daný bod je správný (s ohledem na ostatní body v analyzovaném souboru dat). Používá se pouze při automatickém odečítání výsledků alelické diskriminace.

úloha detektoru — Definovaný parametr detektoru v dané jamce destičky, který určuje, jakým způsobem budou použita v dané jamce získaná data. K dispozici jsou různé úlohy detektoru podle typu eseje.

zhášeč	Molekula na 3′ konci sondy typu TaqMan®, která tlumí (zháší) fluorescenci reportérové barvy na 5′ konci sondy pomocí mechanizmu FRET.

Rejstřík

Symboly

– 6-31
↑ 6-33
↓ 6-33

Číslice

7900HT, viz *přístroj*
9600, režim simulace běhu 3-19

A

ABI Prism 7700, Real-Time PCR systém, režim simulace běhu 3-19
ABI Prism® nástroj na zaslepení, viz *nástroj na zaslepení*
absolutní kvantifikace
  analýza dat 6-9 až 6-13
  o kvantifikaci 6-6 až 6-7
  řešení problémů 8-12
  seznam kroků 6-9
  tipy pro návrh kvantitativní PCR B-5
  volba a příprava standardů B-5
adapter na destičky, výměna 7-12
aktualizace
  operačního systému 7-55
  programu SDS 7-55
alelická diskriminace
  analýza dat 5-10 až 5-18
  o alelické diskriminaci 5-6 až 5-8
  programování běhu 3-18
  řešení problémů 8-13
  seznam kroků 5-10
  tipy pro návrh esejí alelické diskriminace B-4
alelická diskriminace - graf
  export dat A-16
  export ve formátu jpeg A-16
  genotypická segregace 5-8
  manuální odečítání alel 5-14
  odlehlé body 5-8
  o grafu alelické diskriminace 5-13
  ověření odečtených alel 5-16
  variace klastrů 5-8
alely - odečítání
  manuální odečítání 5-14
  o odečítání alel 5-15
  ověření 5-16
amplifikace, reproducibilita 6-19
amplifikační graf
  export dat A-16
  export ve formátu jpeg A-16
amplifikační křivka
  exponenciální (geometrická) fáze D-7
  fáze plató D-8
  lineární fáze D-8
  o amplifikační křivce D-7
analytické seance 5-19
analýza
  disociační křivky 6-40 až 6-44
  výsledků absolutní kvantifikace 6-9 až 6-13
  výsledků alelické diskriminace 5-10 až 5-18
  výsledků kalibrace barev 7-25
  výsledků kalibrace pozadí 7-19
  výsledků relativní kvantifikace 6-22 až 6-35
architektura
  místní sítě 1-23
  vzdálené sítě 1-24
archivace souborů 7-54
automatické odstranění odlehlých bodů 6-19

B

barvivo SYBR Green 1 ´o barvivu SYBR Green 1 D-3
běhy typu end-point
  alelická diskriminace, viz *alelická diskriminace*
  o bězích typu end-point 5-2
blok na vzorky
  čistění jamek bloku na vzorky 7-15
  kontaminace 8-7
  o bloku na vzorky 1-5
  výměna 7-6

C

centrifuga
  instalace a provoz 4-12
  mikrofluidní karta, umístění do závěsu 4-15
  nastavení typu závěsu 4-12
  požadavky 4-11
  požadavky na závěsy 4-15
  součásti 4-11
  umístění závěsu do centrifugy 4-16
centrifugace, mikrofluidní karta 4-15
CT, viz *prahový cyklus*

Č

čárové kódy
- zadání do dokumentu destičky 2-26, 3-25

číslo portu A-22

čistění
- bloku na vzorky 7-15
- podložek ramene 7-52

čtečky čárových kódů
- pevně umístěná, viz *pevně umístěná čtečka čárových kódů*
- ruční, viz *ruční čtečka čárových kódů*

D

databáze
- ukládání templátů 3-23
- ukládání výsledků 5-19, 6-52
- uložení dokumentů destiček 4-22

databáze SDS Enterprise
- o databázi 1-22
- databáze SDS 1-26
- program RQ Manager 1-25
- program SNP Manager 1-25
- SDS User Account Manager 1-26
- studie 1-27
- uložení dokumentů destičky 4-22
- uložení templátů 3-23
- uložení výsledků 5-19, 6-52

defragmentace pevného disku 7-54

dekontaminace bloku na vzorky 7-14 až 7-15

destička pro kalibraci barev
- příprava k použití 7-24
- vytvoření 7-27

destičky
- spuštění jednotlivých destiček 4-23
- spuštění řady destiček 4-37, 4-39
- typy, viz *spotřební materiál*

detektory
- import do dokumentu destičky A-2
- kopírování do dokumentu destičky 3-11
- o detektorech 3-9
- přidání do dokumentu destičky 3-11
- úloha, viz *úloha detektoru*
- vytvoření 3-9

diagram
- databáze – architektura místní sítě 1-23
- databáze – architektura vzdálené sítě 1-24

diody, viz *přístroj, stavové diody*

disociační křivka
- analýza 6-40 až 6-44
- definice Tm 6-43
- o disociační křivce 6-38
- programování rychlosti změny teploty 3-21
- seznam kroků 6-22, 6-40

dokumenty destiček 3-8
- definice standardů 3-15
- export 2-13
- import zadání 2-15, A-2
- informace o dokumentu 3-25
- kopírování detektorů 3-11
- kopírování markerů 3-13
- metody, viz *metody*
- nastavení objemu vzorku 3-20
- nastavení pasivní reference 3-16
- názvy vzorků 3-25
- o dokumentech destiček 2-11
- otevření 2-18
- programování metody 3-17
- přidání do řady destiček 4-33, 4-38
- úloha detektoru 3-14
- uložení 2-16
- uložení do databáze 4-22
- uložení jako jeden soubor 4-22
- uložení jako templát 3-22
- vyjmutí z řady destiček 4-38
- vytvoření 2-12, 3-8
- vytvoření z templátu 3-24, 4-34
- zavření 2-17

doporučená údržba 7-3

doporučení
- pro návrh absolutní kvantifikace B-5
- pro návrh alelické diskriminace B-4
- pro návrh relativní kvantifikace B-5
- pro návrh sond TaqMan B-2 až B-3
- pro vkládání destiček do podavače 4-39

E

endogenní kontrola 6-20

exponenciální (geometrická) fáze D-7

export
- dat z dokumentu destičky 2-13, A-16
- grafů a zobrazení ve formátu jpeg A-16

export dat A-17

exportovatelná data A-17

F

fáze plató amplifikační křivky D-8

fluorescenční kontaminace 8-7

fluorogenní sonda
- návrh B-2 až B-3
- o fluorogenní sondě D-2

G

genomická DNA, minimalizace kontaminace 4-10

genotypická segregace klastrů (graf alelické diskriminace) 5-8
graf disociační křivky
o grafu 6-42
export dat A-16
export ve formátu jpeg A-16
graf genové exprese 6-31
graf standardní křivky 6-13
export dat A-16
export ve formátu jpeg A-16
grafy
skrytí 2-20
změna velikosti 2-20, 2-21
zobrazení 2-20¨
zvětšení/zmenšení 2-21

H

hladina genové exprese
maximální 6-33
minimální 6-33
o hladině genové exprese 6-31

CH

chemizmus
neoptimalizovaná reakce 8-6
řešení problémů 8-5 až 8-8
SYBR Green D-3
TaqMan D-2

I

import zadání 2-15, A-2
inkubace, přidání do metody 3-19
instalace
adaptéru na destičky 7-12
bloku na vzorky 7-6
operačního systému 7-55
programu SDS 7-55
IP adresa A-22

J

Java Runtime Environment 1-14

K

kalibrace barev
extrakce barev 7-25
kdy provádět 7-20
o kalibraci barev 7-20
provedení 7-24
řešení problémů 8-11
vytvoření dokumentu destičky 7-21
kalibrace pozadí 7-16 až 7-19
extrakce 7-19
kdy provádět 7-16
o kalibraci pozadí 7-16
příprava destičky 7-17
příprava destičky pro kalibraci pozadí 7-17
řešení problémů 8-9
vytvoření dokumentu destičky 7-17
kalibrace přístroje 7900HT
nastavení citlivosti senzoru destiček 7-37
provedení kalibrace barev (spekter) 7-20
provedení kalibrace pozadí 7-16
seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49
seřízení podavače mikrodestiček 7-41
kalibrátor 6-20
klávesové zkratky, používání 2-27
komentář
přidání do dokumentu destičky 3-25
přidání k detektoru 3-9
komparativní C_T metoda kvantifikace
odvození vzorce D-11
o metodě 6-3, D-11
koncentrace primerů a sond optimalizace B-3
kontaminace
dekontaminace bloku na vzorky 7-14
fluorescence, běžné zdroje 8-7
genomická DNA 4-10
prevence 4-6
vyhledání v bloku na vzorky 8-9
kontextové nabídky, používání 2-27
kontrolní reakce 4-10
kopírování
detektorů do dokumentu destičky 3-11
markerů do dokumentu destičky 3-13
krok
přidání do metody 3-19
kvantifikace
sond a primerů B-3
standardů pro absolutní kvantifikaci B-5
kvantitativní RT-PCR
absolutní, viz *absolutní kvantifikace*
o kvantitativní RT-PCR 6-3
relativní, viz *relativní kvantifikace*
typy 6-3

L

lineární fáze amplifikační křivky D-8

M

markery
- import do dokumentu destičky A-2
- kopírování do dokumentu destičky 3-13
- o markerech 3-12
- přidání markerů do dokumentu destičky 3-13
- vytvoření 3-12

mastermixy
- používání 8-6
- příprava B-3

maximální hladina genové exprese 6-33

mazání kroku metody 3-19

metoda standardní křivky 6-3

metody
- nastavení objemu vzorku 3-20
- nastavení rychlosti změny teploty 3-21
- odstranění kroku 3-19
- o metodách 3-17 až 3-21
- programování 3-18 až 3-21
- přidání kroku, inkubace nebo cyklu 3-19
- sběr dat 3-20
- změna nastavení času a teploty 3-19

mikrofluidní karta
- centrifugace 4-15
- doporučení pro plnění 4-13
- jak funguje 4-9
- kontrola jakosti 4-11
- manipulace 4-13
- oddělení po zaslepení 4-20
- plnění 4-13
- plnění rezervoárů, kontrola po centrifugaci 4-17
- plnění rezervoárů, oddělení po zaslepení 4-20
- přehled 4-9
- součásti 4-9
- správná laboratorní praxe 4-6
- TaqMan primery a sondy 4-9
- umístění do závěsů 4-15
- umístění závěsu do centrifugy 4-16
- vyjmutí z obalu 4-13
- zaslepení 4-18

minimální hladina genové exprese 6-33

množství, zadání do dokumentu destičky 3-15

multikomponentní analýza D-5

N

nápověda
- další informace 2-3
- používání 2-3

nastavení
- běhu 3-19
- citlivosti senzoru destiček 7-37 až 7-40
- možností zobrazení 3-22
- parametrů analýzy absolutní kvantifikace 6-11

nastavení zobrazení 3-22

nástroj pro zaslepení
- instalace 4-13
- přehled 4-13

Název služby A-22

názvy vzorků
- import do dokumentu destičky A-2
- zadání do dokumentu destičky 3-25

nepřesné pipetování 8-6
- nereprodukovatelnost, příčiny 8-5 až 8-8

nesprávně nastavený práh 8-5

netemplátová kontrola (NTC)
- odečítání NTC 5-15
- ověření odečtených NTC 5-16
- úloha detektoru 3-14

nízká koncentrace templátu 8-8

nízká přesnost
- příčiny nízké přesnosti 8-5 až 8-8

normalizace
- signálu reportérové barvy D-6

normalizovaný signál reportérové barvy D-6

nosítka přístroje 4-42
- otevírání a zavírání (program Automation Controller) 4-42
- otevírání a zavírání (program SDS) 4-27
- výměna adaptéru na destičky 7-12

nové propojení programu SDS 4-28

O

objem vzorku - nastavení 3-20

odlehlé body
- alelická diskriminace 5-8
- automatické odstranění odlehlých bodů 6-19

odpojení programu SDS 4-28

operační systém
- aktualizace 7-55
- podporovaný 1-7

optimalizace koncentrace primerů a sond B-3

otevření
- dokumentů destičky 2-18
- nosítek přístroje (program Automation Controller) 4-42
- nosítek přístroje (program SDS) 4-27

ověření fungování přístroje
- karta RNáza P, příprava 7-31

ověření odečtených alel 5-16
ověřovací destičky TaqMan RNáza P 7-30
  analýza 7-33
  kity C-5
  příprava dokumentu destičky 7-32
  spuštění 7-30, 7-31
ovládání hlavního spínače přístroje 7900HT 2-4
ovládání programu SDS 2-9

P

parametr Y (v grafu standardní křivky) 6-13
pasivní reference
  nastavení 3-16
  použití při multikomponentní analýze D-5
PCR
  5´ nukleázová esej D-2
  exponenciální (geometrická) fáze D-7
  fáze plató D-8
  chemizmus SYBR Green D-3
  kinetická analýza D-7
  lineární fáze D-8
pevně umístěná čtečka čárových kódů
  připojení 1-11
  seřízení 7-49 až 7-51
  specifikace 1-8
  umístění 1-8
pevný disk
  defragmentace 7-54
  rozdělení 1-7
pipetmany, používání 8-6
pipetování, chyby 8-6
počítač
  o počítači 1-7
  rozdělení pevného disku 1-7
  řešení problémů 8-14
  systémové požadavky 1-7
  údržba 7-54
  zapnutí 2-4
podavač destiček 1-9, 7-36
  čistění podložek ramene 7-52
  pozice úložných věží 7-36
  regulátor nastavení 7-36
  senzor 7-36
  seřízení 7-41 až 7-48
  úchop 7-36
  výměna podložek ramene 7-52
  zapnutí 2-4
podložky ramene
  čistění 7-52
  výměna 7-52
podmínky záruky E-1
Post-read – čtení po skončení běhu (záložka Plate Read) 4-25
potřebné vybavení 4-11
pozadí (baseline)
  automatický výpočet pozadí 6-11
  o pozadí D-9
práh
  nastavení pro automatickou analýzu 6-11
  nesprávné nastavení 8-5
  o prahu D-9
prahový cyklus výpočet D-9
  vztah k PCR produktu D-10
Pre-read – čtení před zahájením běhu (záložka Plate Read) 4-25
prevence kontaminace 4-6
program Archiver 1-26
program Automation Controller
  odebrání destiček z řady destiček 4-38
  o programu 1-14, 4-37
  přidání destiček do řady destiček 4-38
  sledování průběhu běhů 4-42
  spuštění 4-37
  spuštění řady destiček 4-41
  vložení destiček 4-40
  vysunutí destičky 4-42
  zastavení přístroje 4-42
program LAVA
  o programu 1-14
  seřízení pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49 až 7-51
  spuštění 7-49
program LDHost, viz *program LAVA*
programování
  metod (absolutní kvantifikace) 3-19
  metod (alelická diskriminace) 3-18
  metod (analýza disociační křivky) 3-21
  metod (relativní kvantifikace) 3-19
  rychlosti změny teploty 3-21
program RQ Manager 1-25
program SDS
  aktualizace 7-55
  dovednosti 2-9
  instalace 7-55
  nové propojení 4-28
  odpojení 4-28
  o programu SDS 1-14
  spuštění 2-6
program SNP Manager 1-25
program Zymark Twister o programu 1-14
  seřízení podavače destiček 7-41 až 7-48
  spuštění 7-41
  test citlivosti senzoru 7-39

ukončení 7-48
prohlížeč jamek 2-30
propojení s databází A-22
přeskládání destiček 4-40
přidání cyklu, programování 3-19
přidání
čárového kódu do dokumentu destičky 2-26, 3-25
detektorů do dokumentu destičky 3-11
dokumentů destiček do řady 4-33, 4-38
markerů do dokumentu destičky 3-13
názvů vzorků do dokumentu destičky 3-25
úlohy detektoru do dokumentu destičky 3-14
vlastní barvy do sady barev 7-27
příprava
destičky 4-6
mastermixů B-3
přístroj 1-4
externí součásti 1-3
firmware 1-14
interní součásti 1-4
o přístroji 1-2 až 1-11
optický systém 1-6, D-4
podporované eseje a chemizmy 1-2
řešení problémů 8-14
stavové diody 2-5
údržba 7-3
vložení destičky 4-23
zapnutí 2-4

R

R2 (v grafu standardní křivky) 6-13
reagencie
eseje TaqMan a reagencie C-6
oligonukleotidy na zakázku C-6
ověřovací destičky TaqMan RNáza P C-5
reagencie jiných dodavatelů 8-8
reagencie TaqMan, popis 4-9
regulátor nastavení 7-36
relativní kvantifikace
analýza výsledků 6-22 až 6-35
komparativní C_T metoda 6-3
metoda relativní standardní křivky 6-3
o relativní kvantifikaci 6-3, 6-16 až 6-20
řešení problémů 8-12
seznam kroků 6-22
tipy pro návrh kvantitativní PCR B-5
replikáty, používání 6-20
reproducibilita amplifikace 6-19
režim simulace běhu přístroje 9600 na přístroji 7900 3-19
režimy provozu 1-17
automatický 1-18
s databází 1-18
samostatný přístroj 1-17
R_n, viz *normalizovaný signál reportérové barvy*
RQ Min/Max Confidence 6-28
ruční čtečka čárových kódů
používání 2-26
připojení 1-11
specifikace 1-8
umístění 1-8

Ř

řada destiček
odebrání dokumentů destiček 4-38
přidání dokumentů destiček (nástroj Template Batch) 4-34
přidání dokumentů destiček (program Automation Controller) 4-38
přidání dokumentů destiček (program SDS) 4-33
spuštění 4-41
zastavení 4-42
řešení problémů 8-2 až 8-20
běhy typu end-point 8-13
běhy v reálném čase 8-12
chemizmus 8-5 až 8-8
kalibrace barev 8-11
kalibrace pozadí 8-9
pevně umístěná čtečka čárových kódů 8-17, 8-20
počítač 8-14
podavač mikrodestiček Zymark Twister 8-17, 8-20
program SDS 8-14
přístroj 7900HT 8-14

S

saturace signálu 7-27
senzor destičky 7-36
nastavení citlivosti 7-37 až 7-40
seřízení
pevně umístěné čtečky čárových kódů 7-49 až 7-51
podavače destiček 7-41 až 7-48
seznamy kroků
absolutní kvantifikace 6-9
alelická diskriminace 5-10
disociační křivka 6-22, 6-40
relativní kvantifikace 6-22
signál reportérové barvy, normalizace D-6
sonda TaqMan
návrh B-2 až B-3
o sondě TaqMan D-2

soubory zadání
o souborech zadání A-4
export A-17
formát A-4
import do dokumentu destičky A-2
příklady A-4
součásti
centrifugy 4-11
mikrofluidní karty 4-9
spektrální kalibrace, viz *kalibrace barev*
spotřební materiál
384-jamkové optické reakční destičky C-3
96-ti jamkové optické reakční destičky C-4
nesprávný nebo poškozený spotřební plast 8-8
optická víčka ve stripech C-3
optické adhezívní kryty C-3
popis destiček 8-7
správa dat 1-17
spuštění
programu Automation Controller 4-37
programu SDS 2-6
spuštění
běhu v programu SDS 4-23
jednotlivých destiček 4-23
řady destiček 4-41
standardy
kvantifikace pro absolutní kvantifikaci B-5
volba pro absolutní kvantifikaci B-5
volba pro relativní kvantifikace B-5
stanovení teploty tání 6-44
studie 1-28

Š

šedá oddělovací čára, používání 2-20
šipky v grafu genové exprese 6-31

T

templáty
o templátech 2-11
uložení 3-22
vytvoření dokumentu destičky 3-24
vytvoření více dokumentů destiček 4-34
teplota bloku (záložka Real Time) 4-25
teplota tání
definice 6-43
stanovení 6-44
teplota víka 4-25
teplotní blok, viz *blok na vzorky*
teplotní protokol, viz *metody*
tipy pro návrh esejí
absolutní kvantifikace B-2 až B-3, B-5
alelická diskriminace B-2 až B-4
relativní kvantifikace B-5
T_m, viz *teplota tání*

U

úchop 7-36
ukazatele standardní chyby 6-31
osa X 6-31
osa Y 6-31
úloha, viz *úloha detektoru*
úloha detektoru
o úloze detektoru 3-14
import do dokumentu destičky A-2
nastavení 3-14
uložení
dokumentů destiček 2-16, 4-22
templátů 3-22
úložné věže
pozice 7-36
vložení destiček 4-39, 4-40
uzavření
dokumentů destiček 2-17
nosítek přístroje (program Automation Controller) 4-42
nosítek přístroje (program SDS) 4-27
programu Zymark Twister 7-48

V

vkládání destiček
do přístroje 4-23
do úložných věží 4-40
vlastní barvy
přidání do sady barev 7-27 až 7-29
vytvoření destičky 7-27
volba jamek v zobrazení destičky 2-23
vyhřívané víko 1-4
vyjmutí destičky z přístroje 7900HT 4-27, 4-42
vyjmutí
dokumentů destiček z řady destiček 4-38
kroku metody 3-19
výměna
bloku na vzorky 7-6
podložek ramene 7-52
vytvoření
detektorů 3-9
dokumentů destiček 2-12, 3-8
dokumentů destiček na základě templátu 3-24, 4-34
dokumentů destiček pro kalibraci barvy 7-22

dokumentů destiček pro kalibraci pozadí 7-17
dokumentů destiček pro kalibraci vlastní barvy 7-28
markerů 3-12
vzduchové bubliny 8-6
vzorek
kalibrátor 6-20

Z

zadání
čárových kódů 2-26, 3-25, 4-34
detektorů v dokumentu destičky 3-11
komentářů 3-9, 3-25
markerů v dokumentu destičky 3-13
názvů vzorků 3-25
názvů vzorků do dokumentu destičky 3-25
úlohy detektorů 3-14
zapnutí systému ABI PRISM 7900HT 2-4
zaslepení
doporučení 4-18
mikrofluidní karty 4-18
oddělení rezervoárů po plnění 4-20
zastavení
běhu v programu SDS 4-26
řady destiček 4-42
závora bloku na vzorky 7-8
změna velikosti panelů a grafů 2-20
zobrazení, viz *zobrazení destičky*
zobrazení
maximální/minimální 2-21 skrytí 2-20
změna velikosti 2-20, 2-21
zobrazení destičky
o zobrazení destičky 2-28
volba jamek 2-23
zobrazení informací o jamce 2-22
zvětšení zobrazení 2-25
zobrazení informací o jamce 2-22
zobrazení tabulky
export A-16
o tabulce 2-28
zpracování velkého počtu vzorků 3-3
zvětšení/zmenšení grafů a zobrazení 2-21

Sídlo společnosti
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Telefon: +1 650.638.5800
Bezplatná linka (v Severní Americe): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

Celosvětová prodejní a servisní síť
Široká distribuční a servisní síť školených specialistů Applied Biosystems funguje ve 150 zemích na šesti kontinentech. Adresy našich obchodních zastoupení a technické podpory získáte ve vaší místně příslušné pobočce nebo na internetové adrese www.appliedbiosystems.com

www.appliedbiosystems.com

Applied Biosystems

Posláním společnosti Applera je poskytování prvotřídních technologií a informací v oblasti life science.
Applera Corporation zahrnuje společnosti Applied Biosystems a Celera Genomics.

Vytištěno v USA, 10/2003
Dokument č. 4317596 Rev. C

an Applera business

Real-Time PCR systém ABI PRISM 7900HT a databáze SDS Enterprise

Uživatelská příručka

Applied Biosystems