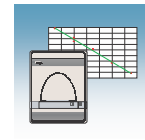
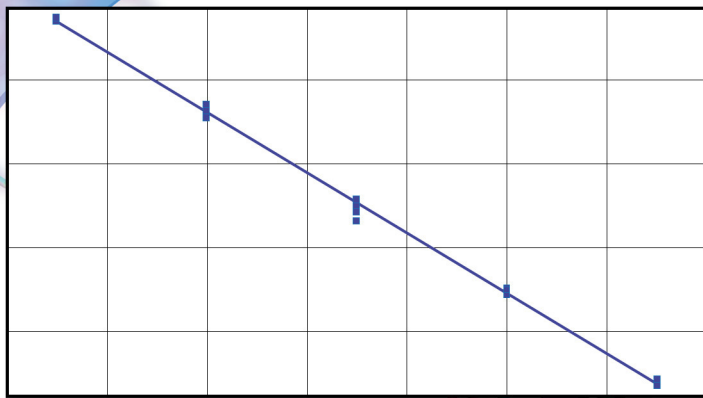
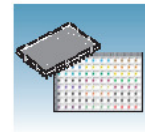


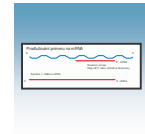
Absolutní kvantifikace pomocí standardní křivky Uživatelská příručka



Úvod



Příprava
kvantifikačního
pokusu



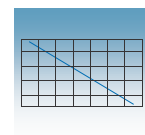
Provedení
reverzní
transkripce



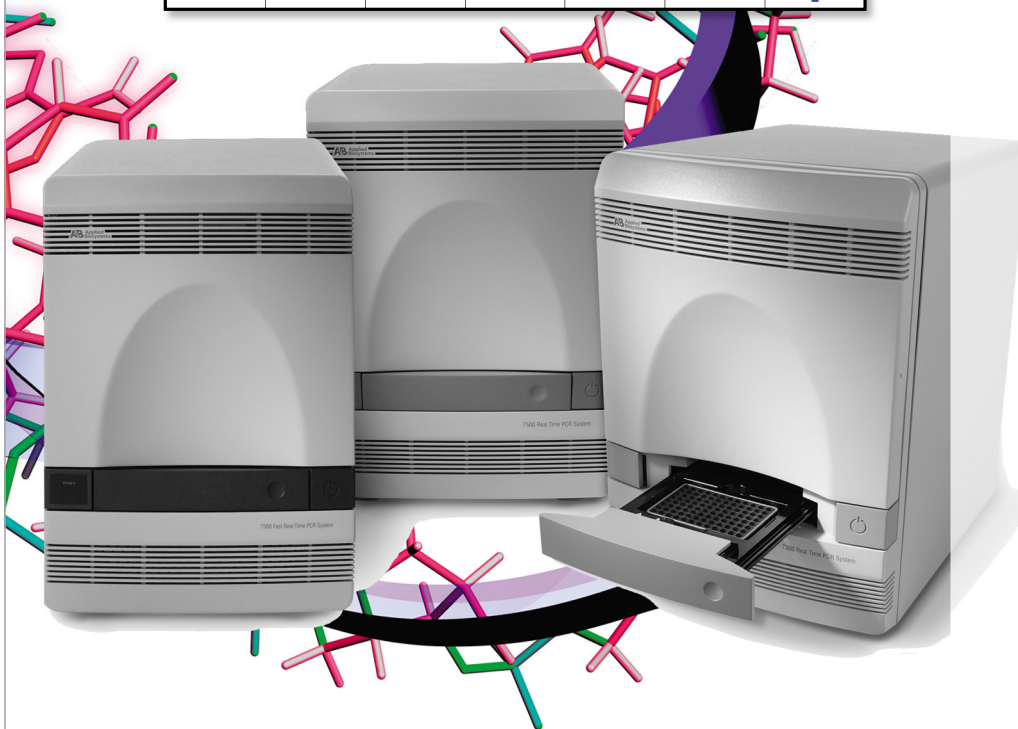
Provedení
kvantifikace –
systém 7300/7500



Provedení
kvantifikace –
systém 7500 Fast



Analýza
výsledků
kvantifikace



© Copyright 2006, Applied Biosystems. Všechna práva vyhrazena.

Pouze pro výzkumné účely. Ne 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.

SPOLEČNOST APPLIED BIOSYSTEMS VÝSLOVNĚ ODMÍTÁ VEŠKERÉ ZÁRUKY VE VZTAHU K TOMUTO DOKUMENTU, VYJÁDŘENÉ NEBO IMPLICITNÍ, VČETNĚ ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ ZÁRUK PRODEJNOSTI NEBO VHODNOSTI PRO URČITÝ ÚČEL. ZA ŽÁDNÝCH OKOLNOSTÍ NENÍ SPOLEČNOST APPLIED BIOSYSTEMS ZODPOVĚDNÁ, AŽ JIŽ NA ZÁKLADĚ SMLOUVY, OBČANSKÉHO PŘÁVA, ZÁRUKY NEBO JINÉHO USTANOVENÍ NEBO NA JINÉM ZÁKLADĚ, ZA SPECIÁLNÍ, VEDLEJŠÍ, NEPŘÍMÉ, TRESTNÍ, MNOHOČETNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY VZNIKLÉ VE SPOJENÍ S NEBO VYPLÝVAJÍCÍ Z TOHOTO DOKUMENTU, VČETNĚ ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ.

UPOZORNĚNÍ PRO KUPUJÍCÍHO:

Real-Time PCR systémy 7300, 7500 a 7500 Fast společnosti Applied Biosystems jsou real-time teplotní cyklery chráněné jedním nebo více U.S. patenty č. 6,814,934, 5,038,852, 5,333,675, 5,656,493, 5,475,610, 5,602,756, 6,703,236, 6,818,437, 7,008,789, 6,982,166 a 6,677,151 a odpovídajícími nároky jiných subjektů mimo území USA, vlastněnými společností Applied. Další informace týkající se získání licencí podá Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

OBCHODNÍ ZNÁMKY:

AB (Design), Applied Biosystems, ABI PRISM a Primer Express jsou registrované obchodní známky a Applied, FAM, MicroAmp, MultiScribe, ROX, TAMRA a Tempus jsou obchodní známky společnosti Applied nebo jejích součástí v USA a/nebo v jiných zemích.

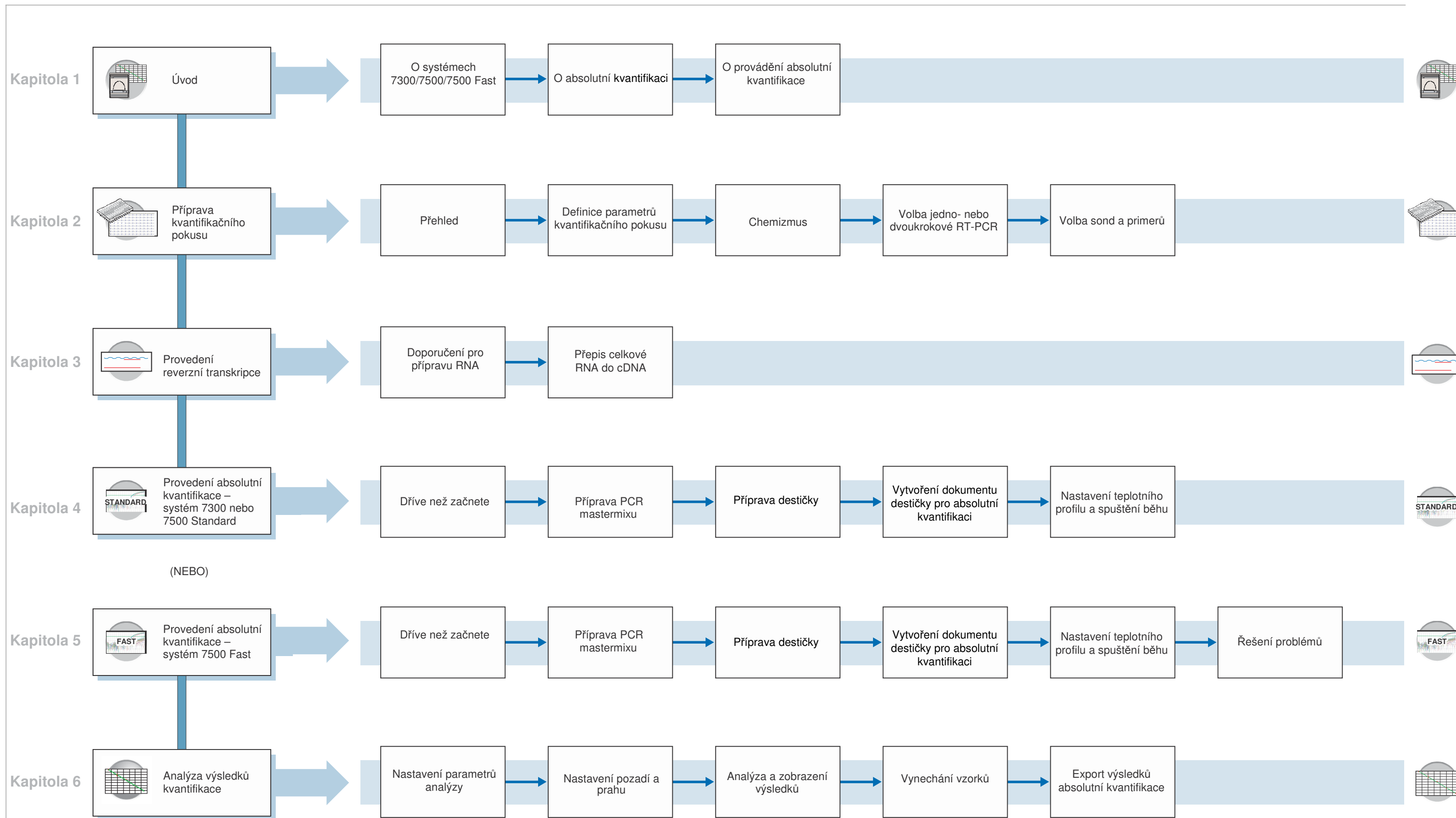
AmpErase, AmpliTaq Gold a TaqMan jsou registrované obchodní známky společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR Green je registrovaná obchodní známka společnosti Molecular Probes, Inc.

Excel, Microsoft, PowerPoint a Windows jsou registrované obchodní známky společnosti Microsoft.

Všechny ostatní obchodní známky jsou výhradním vlastnictvím svých oprávněných majitelů.

Dokument č. 4347825 Rev. E
07/2006



	Absolutní kvantifikace – Pracovní schéma	iii
	Předmluva	vii
	Jak používat tuto příručku.....	vii
	Kde získat více informací.....	viii
	Kde získat pomoc.....	ix
	Správná laboratorní praxe	x
Kapitola 1	Úvod	1
	O systémech 7300/7500/7500 Fast.....	2
	O absolutní kvantifikaci	2
	O provádění absolutní kvantifikace.....	3
Kapitola 2	Příprava kvantifikačního pokusu	9
	Přehled.....	10
	Definice parametrů kvantifikačního pokusu	10
	Chemizmus	11
	Volba jedno- nebo dvoukrokové RT-PCR.....	12
	Volba sond a primerů	14
Kapitola 3	Provedení reverzní transkripce	15
	Doporučení pro přípravu RNA	16
	Přepis celkové RNA do cDNA.....	17
Kapitola 4	Provedení absolutní kvantifikace – systém 7300 nebo 7500 Standard	19
	Dříve než začnete	20
	Příprava PCR mastermixu	20
	Příprava destičky.....	21
	Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci	24
	Nastavení teplotního profilu a spuštění běhu	29

Kapitola 5	Provedení absolutní kvantifikace – systém 7500 Fast.....	33
	Dříve než začnete.....	34
	Příprava PCR mastermixu.....	34
	Příprava destičky.....	35
	Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci.....	38
	Nastavení teplotního profilu a spuštění běhu.....	43
	Řešení problémů.....	48
Kapitola 6	Analýza výsledků kvantifikace.....	51
	Nastavení parametrů analýzy.....	52
	Nastavení pozadí a prahu.....	54
	Analýza a zobrazení výsledků.....	60
	Vynechání vzorků.....	66
	Export výsledků absolutní kvantifikace.....	70
Příloha A	Vytvoření detektorů	73
Příloha B	Doporučení pro vytváření standardních křivek	75
Příloha C	Analýza disociační křivky	77
Příloha D	Izotermické pokusy	79
Příloha E	Absolutní kvantifikace – vzorový pokus	81
	Odkazy	89
	Rejstřík	91

Jak používat tuto příručku

Účel této příručky Tato příručka je určena vědeckým a ostatním laboratorním pracovníkům provádějícím absolutní kvantifikaci pomocí Real-Time PCR systémů Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast.

Předpoklady Tato příručka předpokládá, že máte následující znalosti:

- Jste obeznámeni s operačním systémem Microsoft® Windows® XP.
- Jste obeznámeni s technikami pro přípravu a manipulaci se vzorky DNA a RNA a jejich přípravou pro PCR.
- Máte všeobecné znalosti týkající se pevných disků, ukládání dat, přenosů a kopírování souborů.

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 vlastní analýzou *vždy* připravte čerstvou matrici.
- Znaménko (>) odděluje po sobě následující příkazy, které volíte z rozbalovacích menu nebo nabídek. Například:
Zvolte **File > Open**.

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 reagentů nebo bezpečné používání chemikálií.




CAUTION – 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.



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

Kde získat více informací

- Související dokumentace** Více informací o používání přístrojů 7300/7500/7500 Fast naleznete v příručkách:
- *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Online Help – Náповěda*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Allelic Discrimination Getting Started Guide* (Kat.č. 4347822) – *Alelická diskriminace*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Plus/Minus Getting Started Guide* (Kat.č. 4347821) - *Experimenty typu Plus/Minus*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Relative Quantitation Using Comparative Ct Getting Started Guide* (Kat.č. 4347824) – *Relativní kvantifikace pomocí komparativní Ct metody*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System: User Guide for the 21 CFR Part 11 Module in SDS Software v1.4* (Kat.č. 4374432) – *Uživatelská příručka pro modul programu SDS v 1.4 pro práci podle normy 21 CFR část 11*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Installation and Maintenance Guide* (Kat.č. 4347828) – *Instalace a údržba*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Site Preparation Guide* (Kat.č. 4347823) – *Příprava místa*
 - *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Performing Fast Gene Quantitation Quick Reference Card* (Kat.č. 4362285) – *Stručný přehled*
 - *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System Using Expert Mode User Bulletin* (Kat.č. 4367499) – *Expertní režim používání*
 - *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Computer Setup Guide* (Kat.č. 4365367) – *Příprava počítače*
 - *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* (Kat.č. 4348358) – *Chemizmus*
 - *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (Kat.č. 4351891)
 - *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (Kat.č. 4375575)
- Používání nápovědy** Systém nápovědy otevřete kliknutím na ikonu  v záhlaví hlavního okna programu SDS nebo pomocí volby **Help > Contents and Index** (Pomoc > Obsah a Rejstřík).
- 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

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

Na stránkách technické podpory můžete:

- Získat telefonní a faxová čísla všech oddělení Technické podpory a prodejních poboček Applied Biosystems
- 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

Správná laboratorní praxe

PCR – Správná laboratorní praxe 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).

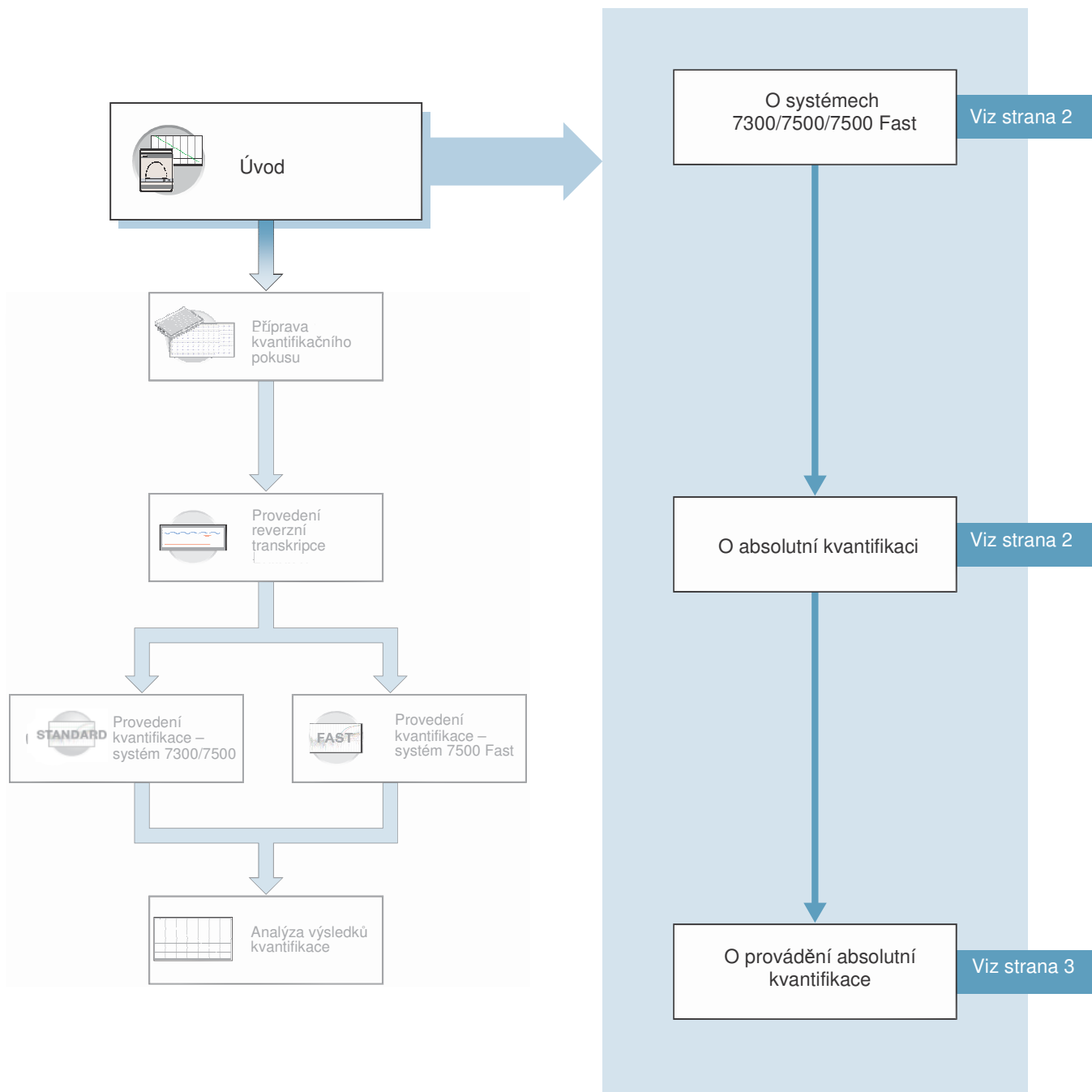
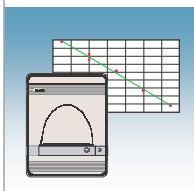
- Při přípravě vzorků pro amplifikaci pomocí PCR používejte čistý laboratorní plášť (který nebyl předešle použit při manipulaci s PCR produkty nebo během přípravy vzorků) a čisté rukavice.
- Máte-li podezření, že rukavice jsou kontaminované, ihned je vyměňte.
- Používejte vyhrazené pracovní prostory a zařízení pro:
- Přípravu vzorků a přípravu PCR reakcí
- Amplifikaci pomocí PCR a post-PCR analýzu
- 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 reagenty 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 čerstvě připraveným 10% roztokem chlornanu sodného.

Odkazy Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238.

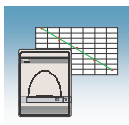
Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

Úvod



Poznámky _____



O systémech 7300/7500/7500 Fast

Popis Real-Time PCR systémy Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast slouží k detekci a kvantifikaci nukleových kyselin v reálném čase a ke kvalitativní detekci nukleových kyselin prováděné po skončení reakce (end-point) a pomocí analýzy disociační křivky (křivky tání). Real-Time PCR systém Applied Biosystems 7500 Fast umožňuje provádět kvantitativní real-time PCR reakce (jako např. relativní kvantifikaci) vysokou rychlostí, takže celková doba reakce je kratší než 40 minut.

Absolutní kvantifikace V systémech 7300/7500/7500 Fast se používají 96-jamkové destičky a lze na nich provádět experimenty různých typů. Tato příručka popisuje metodu absolutní kvantifikace pomocí standardní křivky.

Více informací o dalších typech experimentů naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* (Kat.č. 4348358) a v nápovědě pro systémy 7300/7500/7500 Fast (Online Help).

O absolutní kvantifikaci

Definice Absolutní kvantifikace je postup stanovující absolutní množství jedné určité cílové sekvence nukleové kyseliny v neznámém vzorku.

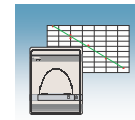
Real-time PCR Absolutní kvantifikace se provádí metodou Real-Time PCR. Principem Real-Time PCR je monitorovat průběh reakce v reálném čase. Data o průběhu reakce jsou sbírána v jejím průběhu a ne až po jejím skončení (tzv. end-point PCR).

Při používání metodiky Real-Time PCR je z hlediska vyhodnocení jednotlivých reakcí klíčový ten bod v jejich průběhu, kdy je poprvé detekována amplifikace jejich produktu, a nikoliv množství produktu, detekované po skončení reakce.

Používání metodiky absolutní kvantifikace pro experimenty typu Plus/ Minus a alelickou diskriminaci I když jsou experimenty typu Plus/Minus a alelická diskriminace experimenty typu end-point (s vyhodnocením po jejich skončení), společnost Applied Biosystems doporučuje je provádět a zobrazovat jejich průběh v reálném čase pomocí systémů 7300/7500/7500 Fast. Došlo-li by k selhání těchto experimentů, je možné na základě amplifikačních grafů definovat příčinu tohoto selhání.

Pro provádění experimentů typu Plus/Minus a alelické diskriminace použijte metodiku absolutní kvantifikace (dokumenty typu AQ Plate). Řešení případných problémů spojených s průběhem těchto experimentů nevyžaduje provedení standardní křivky.

Poznámky _____



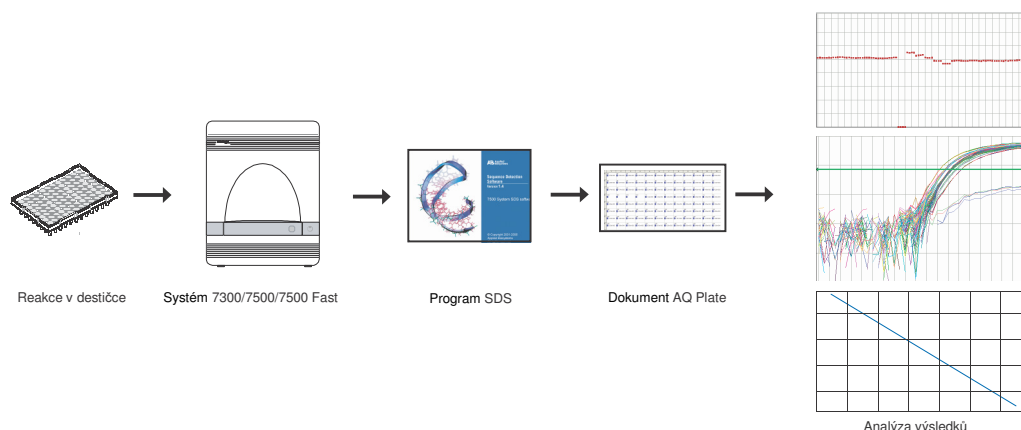
O provádění absolutní kvantifikace

Postup provádění absolutní kvantifikace

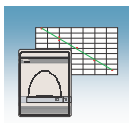
Termín “absolutní kvantifikace”, používaný v této příručce, se vztahuje k celému procesu absolutní kvantifikace, počínaje syntézou cDNA z RNA (reverzní transkripce) až po analýzu výsledků kvantifikace. Absolutní kvantifikace sestává z několika kroků, znázorněných na [straně iii](#).

Při absolutní kvantifikaci se používá standardní křivka, na jejímž základě se vypočítává množství neznámé cílové sekvence. Výsledky absolutní kvantifikace jsou udávány ve stejných jednotkách, v jakých je definována standardní křivka

Systémy 7300/7500/7500 Fast slouží k ukládání dat, získaných na základě analýzy vzorků metodou Real-Time PCR. V každém běhu je v rámci dokumentu typu AQ Plate analyzována jedna destička. Systémy 7300/7500/7500 Fast umožňují několik různých možností analýzy dat.



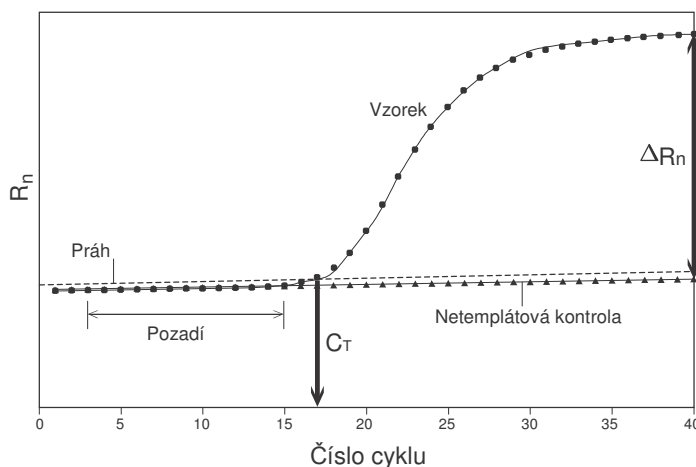
Poznámky _____



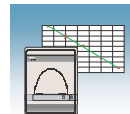
Používané pojmy

Pojem	Definice
Pozadí (Baseline)	Počáteční cykly PCR v nichž dochází k minimálním změnám detekované fluorescence.
Práh (Threshold)	Hodnota ΔR_n —automaticky stanovená programem nebo nastavená manuálně—používaná pro stanovení parametru C_T v Real-Time PCR pokusech. Nastavuje se vyšší než hodnota pozadí a dostatečně nízko, aby se nacházela v exponenciální fázi amplifikační křivky. Práh je přímka, jejíž průsečík s amplifikační křivkou definuje parametr C_T .
Prahový cyklus (Threshold cycle - C_T)	Číslo cyklu, v němž hodnota naměřené fluorescence protíná práh.
Netemplátová kontrola (No template control - NTC)	Vzorek, který neobsahuje templát. Používá se pro kontrolu amplifikace.
Cílová nukleová kyselina ("templát")	Nukleotidová sekvence, kterou chcete detekovat a kvantifikovat.
Pasivní reference (Passive Reference)	Barva, která funguje jako interní fluorescenční referenční signál, vůči němuž je během analýzy výsledků normalizován signál získaný měřením amplifikace (signál reportérové barvy). Normalizace je nezbytná proto, aby byly odstraněny výkyvy naměřené fluorescence, způsobené změnami koncentrace nebo objemu.
Reportérová barva (Reporter dye)	Barva na 5' konci TaqMan® sondy. Její signál je mírou specifické amplifikace.
Normalizovaný signál reportérové barvy (R_n)	Poměr fluorescenčního signálu reportérové barvy k fluorescenčnímu signálu pasivní reference.
Delta R_n (ΔR_n)	Velikost signálu vytvořeného za daných podmínek PCR reakce. ($\Delta R_n = R_n - \text{pozadí}$)
Standard	Vzorek o známém množství, používaný pro vytvoření standardní křivky
Neznámý vzorek	Vzorek obsahující neznámé množství templátu, které chcete zjistit.

Obrázek níže znázorňuje graf amplifikace a jeho součástí jsou i některé shora uvedené pojmy.



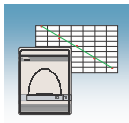
Poznámky _____



Další potřebný materiál

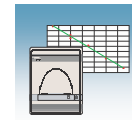
Položka	Dodavatel
ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems - (Kat.č. 6100-01)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1000 reakcí)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4368813)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reakcí)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4368814)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1000 reakcí)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4374967)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 reakcí)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4374966)
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems - (Kat.č. 4304437)
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase® UNG	Applied Biosystems - (Kat.č. 4352042)
TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix	Applied Biosystems - (Kat.č. 4309169)
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems - (Kat.č. 4309155)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems - (Kat.č. 4367659)
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems - (Kat.č. 4306737)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (code 128)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4346906)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film (100 ks)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4311971)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film (25 ks)	Applied Biosystems - (Kat.č. 4360954)
MicroAmp™ Adhesive Film Applicator	Applied Biosystems - (Kat.č. 4333183)

Poznámky _____



Položka	Dodavatel
Značené primery a sondy z jednoho z následujících zdrojů: <ul style="list-style-type: none">• TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese (predesignované primery a sondy)<ul style="list-style-type: none">– skladem (inventoried)– ne skladem (na zakázku – non-inventoried)• Zakázkové TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese (predesignované primery a sondy)<ul style="list-style-type: none">– Small-Scale (20×, 144 × 50 µL reakce)– Medium-Scale (20×, 300 × 50 µL reakce)– Large-Scale (60×, 1160 × 50 µL reakce)• Primer Express® Software (pro návrh vlastních primerů a sond)<ul style="list-style-type: none">– Licence pro 1 uživatele– Licence pro 5 uživatelů	<ul style="list-style-type: none">• Applied Biosystems - (Kat.č. 4331182)• Applied Biosystems - (Kat.č. 4351372) • Applied Biosystems - (Kat.č. 4331348)• Applied Biosystems - (Kat.č. 4332078)• Applied Biosystems - (Kat.č. 4332079) • Applied Biosystems - (Kat.č. 4363991)• Applied Biosystems - (Kat.č. 4363993)
6700 reakční zkumavky, 10-mL	Applied Biosystems - (Kat.č. 4305932)
Centrifuga s adapterem na 96-jamkové destičky	Dodavatel laboratorních potřeb (DLP)
Rukavice	DLP
Mikrocentrifuga	DLP
Zkumavky do mikrocentrifugy, sterilní 1.5-mL	DLP
Voda prostá nukleáz	DLP
Pipetovací špičky s filtrem	DLP
Pipety, typ positive-displacement	DLP
Vortex	DLP

Poznámky _____

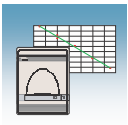


Absolutní kvantifikace – vzorový pokus

Přehled Pro lepší nástin toho jak navrhnout, provést a vyhodnotit pokus absolutní kvantifikace je jako příklad níže uveden pokus vzorový. Tento příklad lze použít pro rychlé seznámení se s jednotlivými kroky takového pokusu. Detailní popis těchto kroků je dále uveden v následujících kapitolách příručky. Součástí těchto kapitol jsou pak i odkazy na tento vzorový pokus, které poskytují související detailní údaje. Podrobnější informace naleznete v části [Příloha E, “Absolutní kvantifikace- vzorový pokus,”](#) na straně 81. Chcete-li otevřít vzorový pokus v programu SDS:

1. Zvolte **File > Open** (Soubor > Otevřít).
2. Vyhledejte soubor **EXAMPLE_AQ.sds** v adresáři **Applied Biosystems\SDS Documents\Example Data Files** a klikněte **Open** (Otevřít).

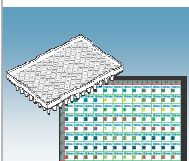
Poznámky _____



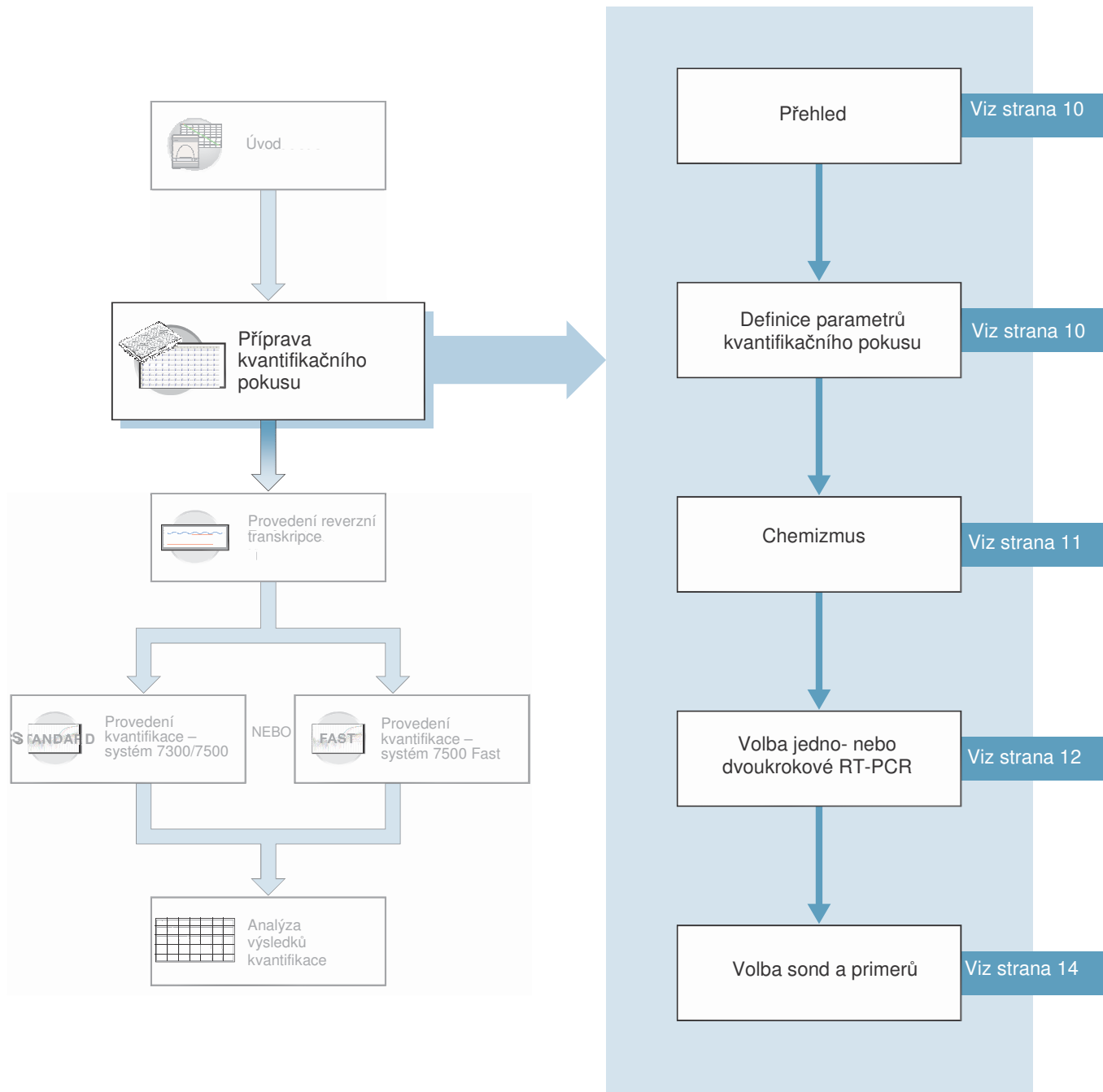
Kapitola 1 Úvod

O provádění absolutní kvantifikace

Poznámky _____

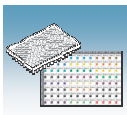


Příprava kvantifikačního pokusu



2

Poznámky _____



Přehled

Typický kvantifikační pokus (absolutní kvantifikace) se provádí jako jediná PCR reakce ve zkumavce (singleplex) za použití primerového páru a sondy TaqMan® nebo primerového páru a barviva SYBR® Green. Následující část popisuje přípravu takového kvantifikačního pokusu.

Definice parametrů kvantifikačního pokusu

Pro každý kvantifikační pokus definujte:

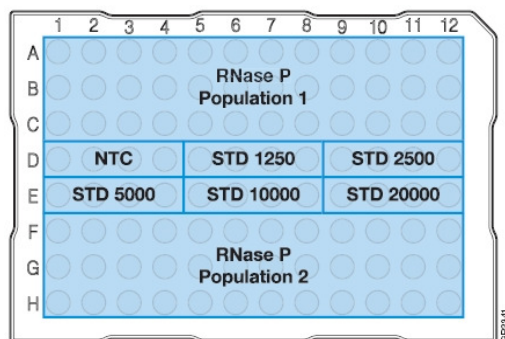
- **Neznámá (Unknown)** – Kvantifikovaná sekvence nukleové kyseliny.
- **Standardy** – Tato příručka předpokládá, že jste připravili sadu standardů pro každou sekvenci, kterou kvantifikujete. V [Příloze B](#) na [straně 75](#) naleznete doporučení týkající se přípravy standardů.
- **Replikáty** – Pro provádění absolutní kvantifikace doporučuje společnost Applied Biosystems používání tří nebo více replikátů (provedení) téže reakce od každého vzorku, aby výsledky byly statisticky signifikantní.

Podrobnější informace, týkající se těchto parametrů, naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* (Kat.č. 4348358).

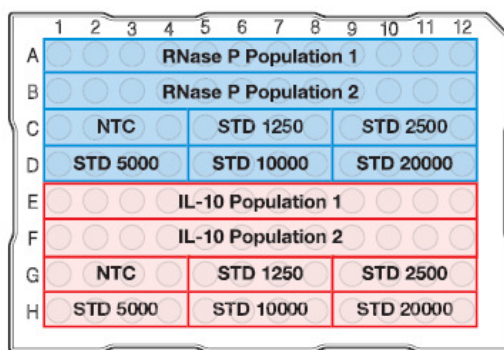
Vzorový pokus

Ve vzorovém pokusu se provádí kvantifikace genu kódujícího RNázu P ve dvou skupinách (populacích) vzorků na Real Time PCR přístroji 7500. Jelikož je kvantifikován pouze jediný gen, je zapotřebí pouze jedna sada standardů (A). Každý standard je kvantifikován ve čtyřech replikátech, aby výsledky byly statisticky signifikantní. V pokusech, kde je studováno více genů, je zapotřebí připravit sadu standardů pro každý gen (B).

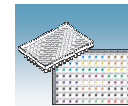
A. Jeden gen, dvě skupiny vzorků



B. Dva geny, dvě skupiny vzorků



Poznámky _____



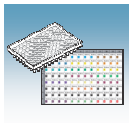
Chemizmus

O chemizmu reakce Společnost Applied Biosystems nabízí pro použití v PCR reakci a pro detekci produktů amplifikace na Real-Time PCR přístrojích chemizmus dvou různých typů, vysvětlených v následující tabulce. Oba typy používaných chemizmů – sondy typu TaqMan® a barvivo SYBR® Green I - lze použít v jedno- nebo dvoukrokovém provedení RT-PCR. Více informací o používaných chemizmech naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* (Kat.č. 4348358).

2

Chemizmus	Popis
<p>Reagencie a kity založené na sondách typu TaqMan®</p> <p>Popis</p> <p>Reagencie a kity založené na sondách typu TaqMan® používají fluorescenčně značenou sondu umožňující detekci specifického PCR produktu tak jak dochází k jeho akumulaci v průběhu PCR.</p> <p>Výhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sonda zajišťuje vyšší specifitu detekce neboť její hybridizace s cílovou DNA je sekvenčně závislá a tedy specifická. • Možnost provádět multiplexní reakce. • K dispozici jsou optimalizované eseje. • V průběhu PCR probíhá 5'-nukleázová reakce. 	<p>PCR a detekce cDNA</p> <p>a. Součásti eseje b. Denaturovaný templát a annealing c. Tvorba signálu</p> <p>LEGENDA</p> <ul style="list-style-type: none"> RP: Náhodné primery RT: Reverzní transkriptáza F: Barva FAM™ Q: Zhášeč MGB: Minor Groove Binder AmpliTaq Gold® DNA polymeráza Sonda Primer Templát Prodloužený primer
<p>Reagencie na bázi SYBR® Green I</p> <p>Popis</p> <p>Reagencie na bázi barvy SYBR Green I (váže se na dvouřetězcovou DNA) umožňují detekci PCR produktů tak jak dochází k jejich akumulaci v průběhu PCR.</p> <p>Výhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ekonomické řešení (není zapotřebí sondy). • Možnost provádění analýzy disociační křivky. • Vyšší intenzita fluorescenčního signálu s rostoucí délkou amplifikačního produktu. <p>Omezení</p> <p>Váže se nespecificky na veškerou dvouřetězcovou DNA. Tvorbu nespecifických produktů reakce (falešně pozitivní výsledky) lze ověřit pomocí disociační křivky nebo agarózového gelu.</p>	<p>Krok 1: Reakce Barvivo SYBR® Green I generuje fluorescenční signál je-li vázáno na dvouřetězcovou DNA.</p> <p>Krok 2: Denaturace Je-li DNA denaturována, barvivo SYBR® Green I se uvolní a fluorescenční signál se dramaticky sníží.</p> <p>Krok 3: Polymerace Primery nasednou na templát a dochází k jejich prodloužení a vzniku PCR produktu.</p> <p>Krok 4: Polymerace ukončena Barvivo SYBR® Green I se váže na dvouřetězcový produkt reakce, dochází k nárůstu detekovaného fluorescenčního signálu.</p>

Poznámky _____



Volba jedno- nebo dvoukrokové RT-PCR

Při provádění Real-Time PCR máte možnost provést reverzní transkripci (RT) a PCR v jediné reakci (jednokroková) nebo ve zvláštních reakcích (dvoukroková). Volba použitých reagensů závisí na tom, pro jakou z těchto dvou variant se rozhodnete:

- Dvoukroková RT-PCR se provádí ve dvou zvláštních reakcích: Nejprve se provede přepis (reverzní transkripce) celkové RNA do cDNA a následně se cDNA amplifikuje PCR. Tato metoda je vhodná pro detekci více transkriptů z jednoho cDNA templátu nebo pro uchovávání alikvotů cDNA pro jejich pozdější využití. Pro zabránění vzniku kontaminace lze použít enzym AmpErase® UNG.

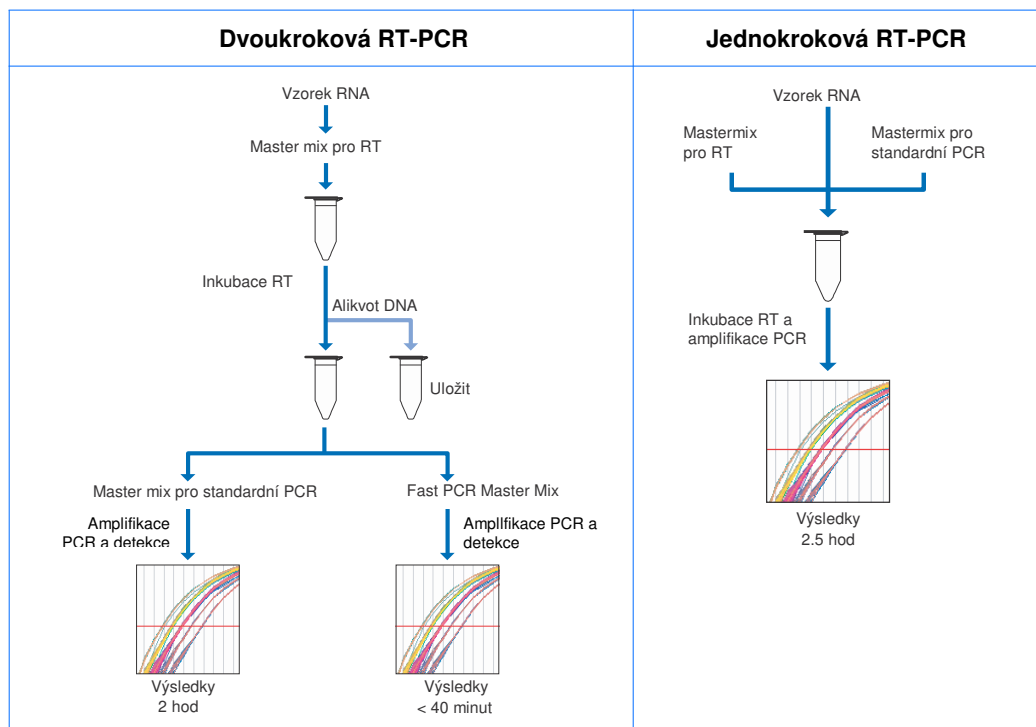
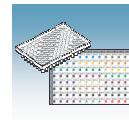
Uživatelé systému 7500 Fast mohou využít TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix nebo TaqMan® Universal PCR Master Mix – tyto analýzy trvají přibližně 40 minut nebo 2 hodiny.

DŮLEŽITÉ! Tato příručka je věnována zejména pokusům absolutní kvantifikace využívajícím dvoukrokovou RT-PCR, nicméně její součástí jsou i informace o jednokrokové RT-PCR. Více informací naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide*.

Poznámka: TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix neobsahuje enzym AmpErase® UNG.

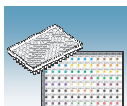
- Při jednokrokové RT-PCR probíhají RT a PCR v témže pufračním systému, což umožňuje provést obě reakce v jediné zkumavce. V tomto uspořádání nicméně není možné použít Fast PCR Master Mix nebo AmpErase® UNG (uracil-N-glykosylázu) pro zabránění kontaminace. Více informací o UNG naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide*.

Poznámky _____



Doporučené kity pro dvoukrokovou RT-PCR			
Chemizmus	Krok	Kit nebo reagentie	Kat. č.
TaqMan reagentie nebo kity	RT	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1000 reakcí)	4368813
		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reakcí)	4368814
		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1000 reakcí)	4374967
		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 reakcí)	4374966
	PCR	TaqMan® Universal PCR Master Mix	4304437
		TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) No AmpErase® UNG	4352042

Poznámky _____



Doporučené kity pro dvoukrokovou RT-PCR			
Chemizmus	Krok	Kit nebo reagencie	Kat. č.
SYBR® Green I reagencie nebo kity	RT	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1000 reakcí)	4368813
		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reakcí)	4368814
		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1000 reakcí)	4374967
		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 reakcí)	4374966
	PCR	SYBR® Green PCR Master Mix	4309155
		Power SYBR® Green PCR Master Mix	4367659
	RT a PCR	SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

Vzorový pokus

Ve vzorovém pokusu byla použita dvoukroková RT-PCR s reagensy a kity TaqMan uvedenými v tabulce výše.

Volba sond a primerů

Pro vaši cílovou sekvenci zvolte primery a sondu. Společnost Applied Biosystems vám nabízí tři možnosti jak zvolit primery a sondu:

- **TaqMan® Gene Expression Assays** (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese) – Připravené, optimalizované (ready-to-use) TaqMan eseje (5'-nukleáza) pro lidské, myší nebo krysí transkripty. Více informací o primerech a sondách, které jsou k dispozici, naleznete na <http://www.allgenes.com>
- **Custom TaqMan® Gene Expression Assays** (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese – na objednávku) – Design, syntéza, složení a dodávka sady primerů a sond se zaručenou kontrolou jakosti. Tato služba je vhodná v případě, že požadovaná sada primerů/sond není aktuálně k dispozici. Chcete-li využít tuto možnost, kontaktujte vašeho zástupce Applied Biosystems.
- **Primer Express® Software** – Vhodný pro návrh primerů a sond pro vaše vlastní kvantifikační experimenty. Více informací o používání tohoto programu naleznete v příručce *Primer Express Software v3.0 Getting Started Guide* (Kat.č. 4362460). Společnost Applied Biosystems doporučuje pro návrh esejí specifické postupy (Assay Design Guidelines), které, jsou-li dodržovány, představují spolehlivý systém návrhu a optimalizace. Více informací o těchto doporučeních naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide*.

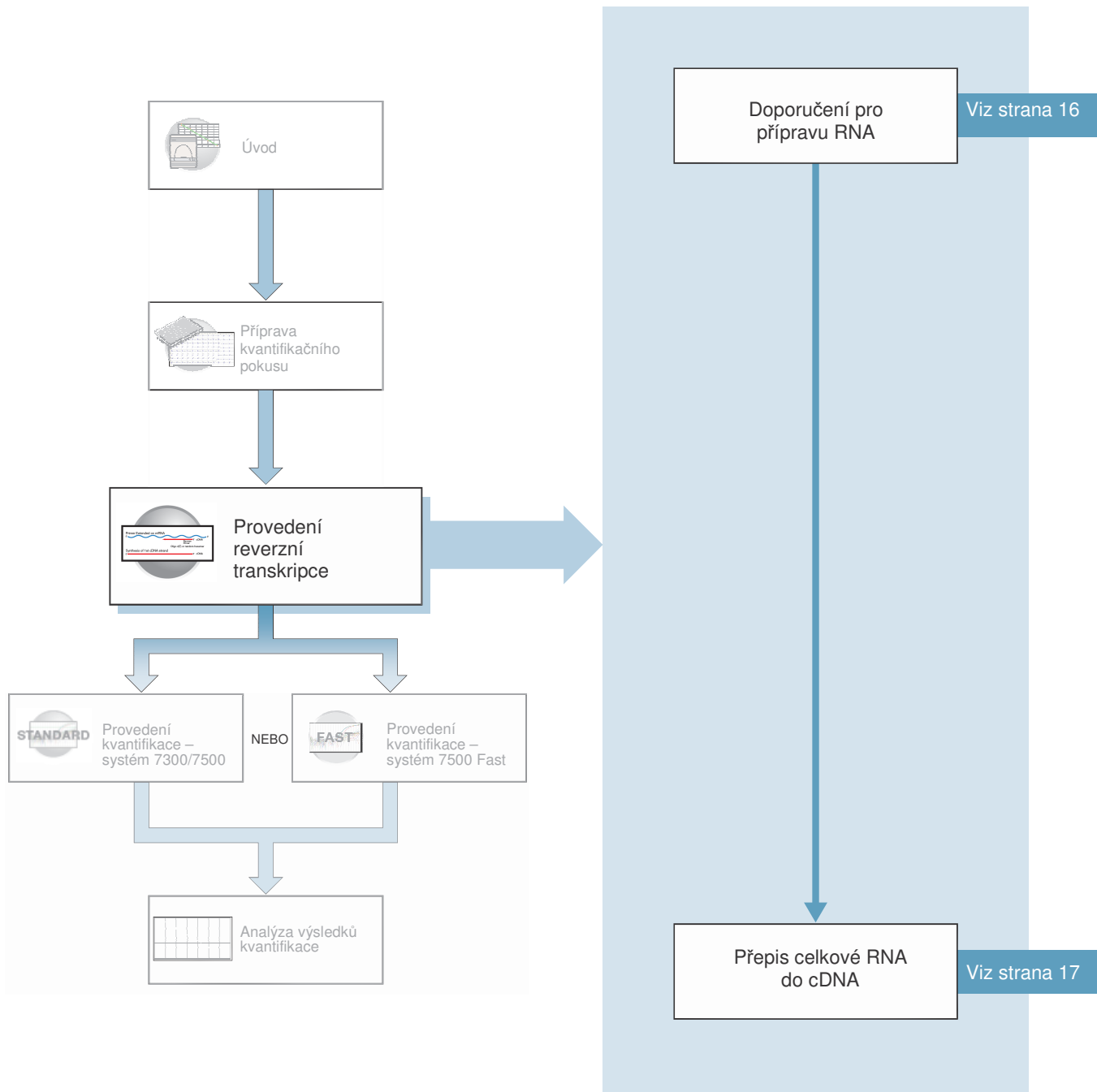
Vzorový pokus

Primery a sondy pro RNázu P byly navrženy pomocí programu Primer Express.

Poznámky _____

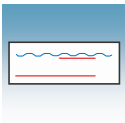


Provedení reverzní transkripce



3

Poznámky _____



Doporučení pro přípravu RNA

Izolace celkové RNA Společnost Applied Biosystems dodává přístrojové platformy, chemizmy a protokoly pro izolaci RNA z různého výchozího materiálu jako je krev, tkáň, buněčné kultury nebo rostlinné tkáň.

Platforma, chemizmus nebo protokol	Dodavatel
Přístroj pro izolaci nukleových kyselin ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems (Kat.č. 6100-01)
6100 Reagents and Disposables Starter Kit (Reagencie a plastík pro přístroj 6100)	Applied Biosystems (Kat.č. 4328773)
Zkumavka Tempus™ Blood RNA Tube (Pro odběr, stabilizaci a izolaci celkové RNA z plné krve pomocí přístroje 6100 za účelem analýzy genové exprese)	Applied Biosystems (Kat.č. 4342792)
Protokol pro izolaci celkové RNA z plné krve a z buněk izolovaných z plné krve	Applied Biosystems (Kat.č. 4332809)
Protokol pro zkumavky Tempus™ Blood RNA Tube a zkumavky na větší objemy	Applied Biosystems (Kat.č. 4345218)
Izolace RNA z tkání: Protokol pro izolaci celkové RNA z rostlinných a živočišných tkání	Applied Biosystems (Kat.č. 4330252)

Kvalita RNA Celková RNA, kterou chcete použít pro pokus absolutní kvantifikace, by měla:

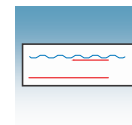
- Mít poměr $A_{260/280}$ větší než 1.9
- Být nedegradovaná (vizualizace pomocí gelové elektroforézy)
- Neměla by obsahovat inhibitory RT nebo PCR

V protokolu pro kity *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Kat.č. 4375575) naleznete další doporučení stran přípravy RNA.

Úprava výchozí koncentrace celkové RNA Kity High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits jsou optimalizovány pro přepis až 2 µg celkové RNA do cDNA v jedné 20 µL reakci. Použijte dostatečné množství celkové RNA tak, aby výsledná koncentrace celkové RNA přepisované do cDNA byla 10 až 100 ng v 5 µL pro každou PCR reakci o objemu 50-µL.

Poznámka: Máte-li podezření, že RNA není prostá RNázové aktivity, přidejte do reakce reverzní transkripce inhibitor RNáz ve výsledné koncentraci 1.0 U/µL.

Poznámky _____



Přepis celkové RNA do cDNA

Použití kitů High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Pro provedení prvního kroku (RT) dvoukrokové RT-PCR použijte High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Postupujte podle metodiky pro přepis celkové RNA do cDNA tak, jak je uvedena v protokolu pro *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (Kat.č. 4375575).

DŮLEŽITÉ! Spolu s kitem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit se nedodává protokol. Protokol je k dispozici na

<http://docs.appliedbiosystems.com/search.taf>

Do pole pro vyhledání zadejte **ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid PrepStation** a klikněte na tlačítko **Search** (Hledat) v dolní části stránky. Protokol naleznete v části **Protocols** (Protokoly).

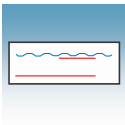
Teplotní profil pro RT Pro RT prováděnou pomocí kitů High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits použijte následující teplotní profil.

Krok	Doba	Teplota
HOLD (Inkubace)	10 min	25 °C
HOLD (Inkubace)	120 min	37 °C
HOLD (Inkubace)	5 sec	85 °C


Poznámka: Používáte-li PCR cykler, můžete přidat dodatečný krok – inkubaci při 4 °C. Více informací naleznete v příručce *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (Kat.č. 4375575).

Poznámka: Teplotní profil pro jednokrokovou RT-PCR je popsán na [straně 30](#).

Poznámky _____



Uchovávání cDNA Uchovávejte všechny vzorky cDNA při teplotách -15 až -25 °C. Aby bylo minimalizováno opakované rozmrazování a zamrazování, uchovávejte vzorky cDNA v alikvotech.

 **WARNING** **CHEMICKÉ RIZIKO.** Pufr $10 \times$ Reverse Transcription Buffer může způsobit podráždění očí, kůže a dýchacího ústrojí. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

Vzorový pokus – destička typu Standard

Ve vzorovém pokusu byla celková RNA izolována z krve a byla stanovena její koncentrace (pomocí A_{260}).

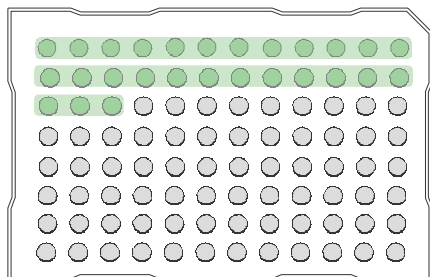
Podle následujícího postupu a při dodržení doporučení uvedených v protokolu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (Kat.č. 4375575) byl připraven RT mastermix:

Složka	$\mu\text{L}/\text{reakci}$	$\mu\text{L}/27$ reakcí [‡]
$10 \times$ pufr pro reverzní transkripci (Reverse Transcription Buffer)	2.0	54
$25 \times$ dNTPs	0.8	21.6
$10 \times$ náhodné primery	2.0	54
MultiScribe™ reverzní transkriptáza, 50 U/ μL	1.0	27
Voda prostá nukleáz	4.2	113.4
Celkem	10	270

[‡] Každá RT reakce má objem 20 μL (viz níže). Potřebujete-li 5 μL cDNA pro každou PCR reakci (celkem 104 PCR reakcí, každá o objemu 50- μL) (viz “Příprava mastermixu na PCR” na straně 20), je zapotřebí provést 27 reakcí RT. Tato kalkulace již bere v úvahu nutnost použít vyšší objem, aby byly eliminovány ztráty vzniklé v důsledku pipetování a též za účelem uchování vzorku cDNA.

Následně byla připravena destička se vzorky cDNA– do každé jamky bylo pipetováno:

- 10 μL RT mastermixu
- 10 μL vzorku RNA



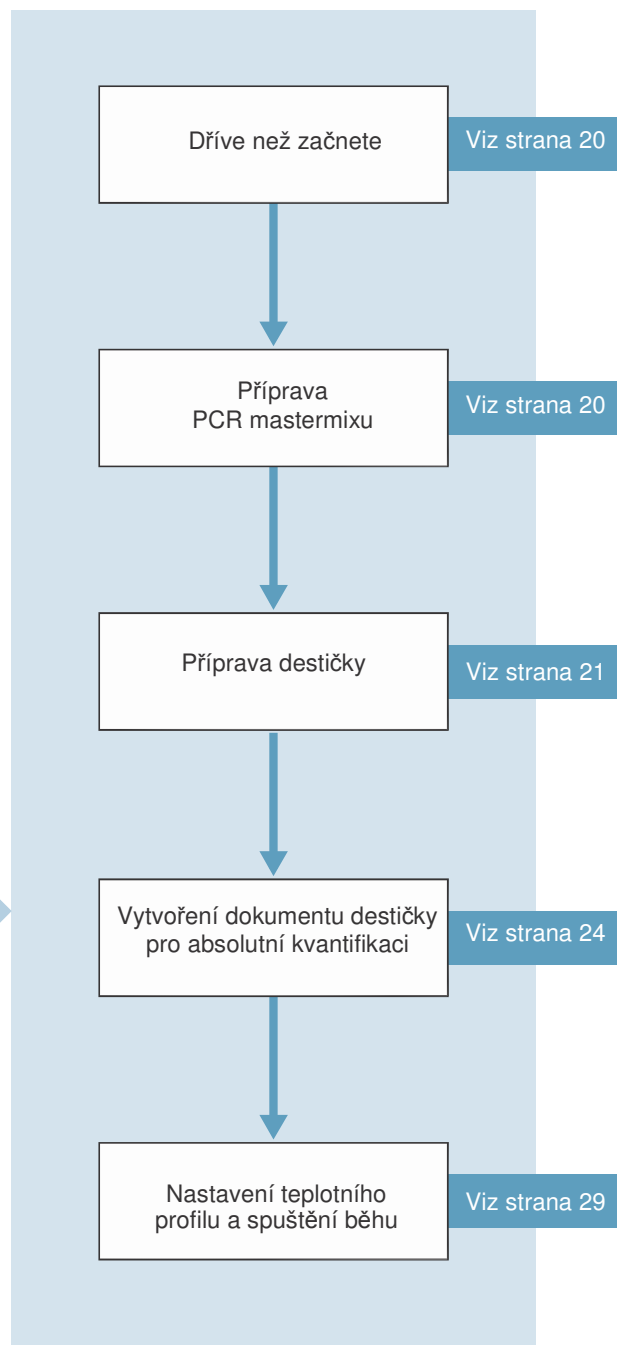
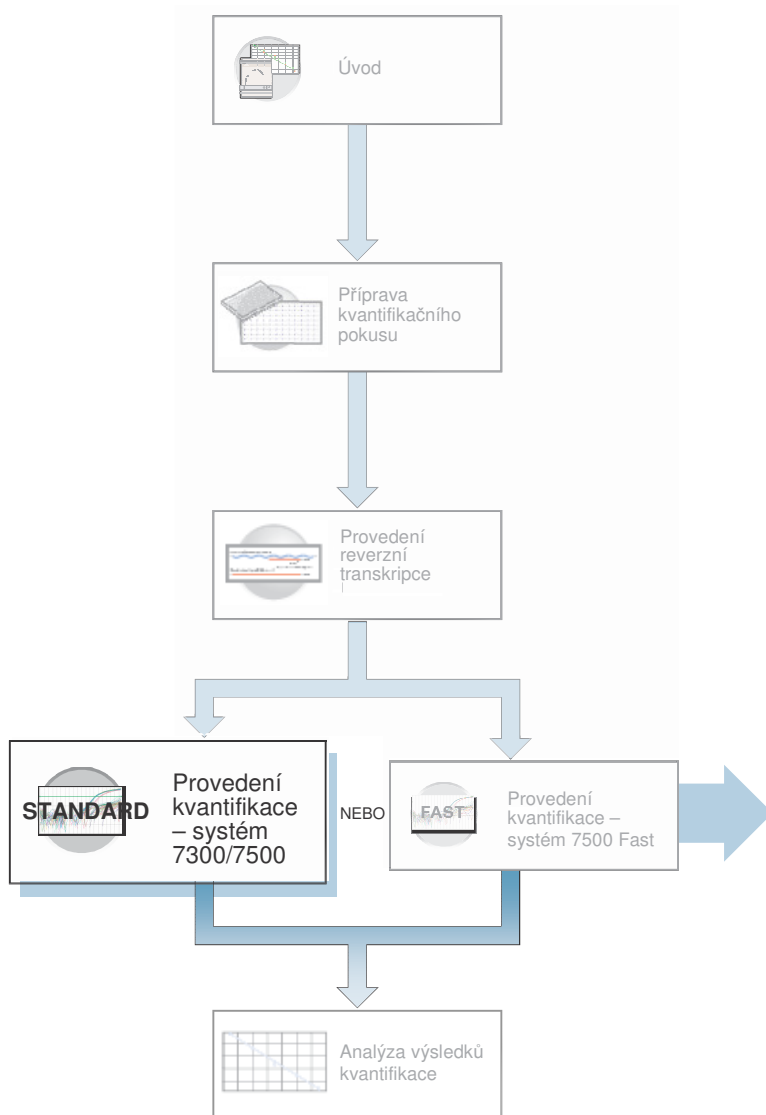
RNA byla přepsána do cDNA za použití teplotního profilu pro dvoukrokovou RT-PCR jak je popsáno v části “Teplotní profil pro RT” na straně 17.

cDNA byla až do dalšího použití uchovávána při -20 °C.

Poznámky _____

STANDARD

Provedení absolutní kvantifikace – systém 7300 nebo 7500 Standard



4

Poznámky _____



Dříve než začnete

Ověřte, že na systémech 7300 nebo 7500 Standard je pravidelně prováděna kalibrace pozadí a kalibrace barev, takže je zajištěno jejich optimální fungování. Více informací o kalibracích systémů 7300/7500 naleznete v Nápovědě (Online Help) a v příručce *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Installation and Maintenance Guide*.

Příprava PCR mastermixu

Druhým krokem (PCR) dvoukrokové procedury RT-PCR je amplifikace cDNA, která se provádí pomocí mastermixu TaqMan® Universal PCR Master Mix.

Používání reagensií je detailně popsáno v protokolu *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (kat. č. 4351891). V následující tabulce jsou uvedeny univerzální podmínky experimentu (objem a výsledná koncentrace) pro používání tohoto mastermixu.



CAUTION CHEMICKÉ RIZIKO. TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) No AmpErase UNG může způsobit podráždění očí a kůže. Polknutí nebo inhalace může vést k nevolnosti. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

Reagencie	μL/ vzorek	Výsledná koncentrace
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×)	25.0	1×
Forward primer	5.0	50 až 900 nM
Reverzní primer	5.0	50 až 900 nM
Sonda TaqMan®	5.0	50 až 250 nM
Vzorek cDNA	5.0	10 až 100 ng
Voda prostá nukleáz	5.0	—
Celkem	50.0	—

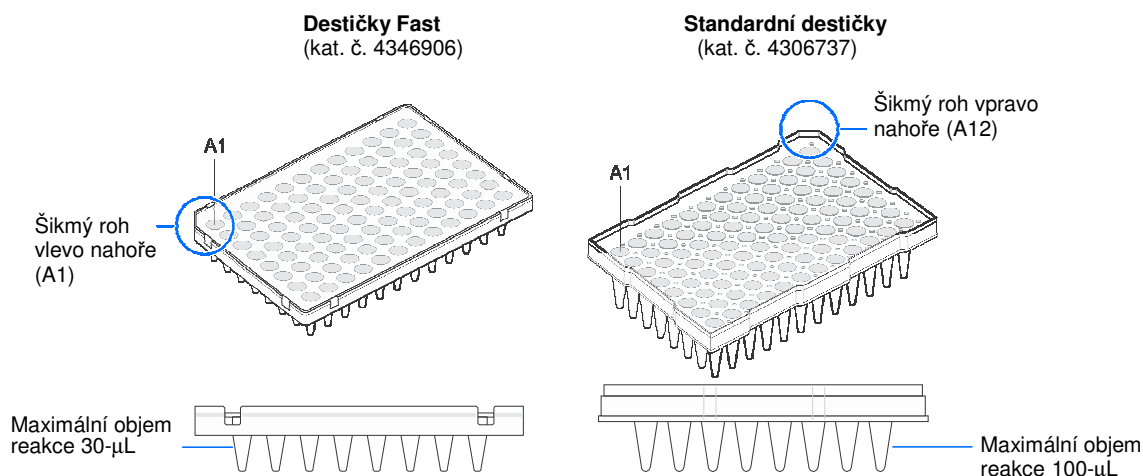
Navrhujete-li primery a sondy pomocí programu Primer Express®, musíte je optimalizovat takovým způsobem, aby fungovaly za použití univerzálních reakčních podmínek a shora uvedených objemů. Optimalizace primerů je popsána v příručce *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* (kat. č. 4351891). Všechny eseje pro kvantifikaci genové exprese (TaqMan® Gene Expression Assays) a vlastní eseje pro kvantifikaci genové exprese (Custom TaqMan® Gene Expression Assays) jsou vždy dodávány v takovém složení, aby byla dodržena doporučení stran výsledné koncentrace primerů a sond.

Poznámky _____

Příprava destičky

Standardní destičky a destičky Fast

DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že na Real-Time PCR systému 7500 používáte standardní optické 96-ti jamkové destičky (Standard Optical 96-Well Plate). Optické destičky typu Fast nelze umístit do standardního bloku .



1. Označte si destičku a ujistěte se, že máte pro každou detekovanou cílovou sekvenci připravenou sadu standardů. Standardy musí být na téže destičce.

Poznámka: Uspořádání reakcí na destičce (vzorky a eseje) by mělo odpovídat popisu (názvy vzorků a detektorů/markerů) v dokumentu destičky pro daný běh.

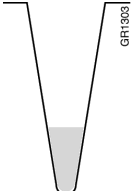
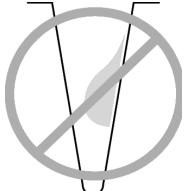
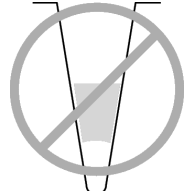
2. Pipetujte 50 µL odpovídajícího PCR mastermixu do každé jamky destičky.

Poznámka: Reakce obsahující standardy připravujte naprosto totožným způsobem jako reakce obsahující neznámé vzorky. Používejte tytéž primery a sondy, složky PCR mastermixu a objem, ale do každého standardu přidejte známé množství templátu (jako je cDNA nebo plazmidová DNA). Všechny součásti před pipetováním do jamek destičky smíchejte.

3. Uzavřete destičku pomocí optické adhezivní fólie.
4. Krátce destičku centrifugujte.

Poznámky _____

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

Správně	Špatně	
 <p data-bbox="495 556 763 588">Reakce je na dně jamky.</p>	 <p data-bbox="803 556 1079 640">Reakce je na boku jamky, protože destička nebyla centrifugována.</p>	 <p data-bbox="1112 556 1404 693">Na dně jamky je vzduchová bublina – reakce nebyla centrifugována dostatečně dlouho nebo při dostatečných otáčkách.</p>

DŮLEŽITÉ! Před spuštěním běhu se ujistěte, že se všechny reakce nacházejí na dně jamky. Není-li tomu tak, bude ovlivněna kvalita měření.

6. Destičku s reakcemi držte na ledu až do té doby, kdy jste připraveni ji umístit do přístroje.

Poznámky _____

Vzorový pokus

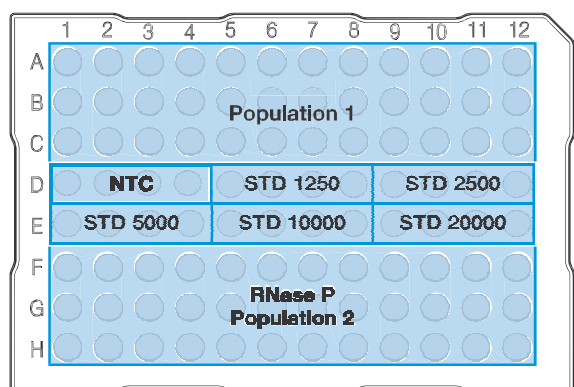
Při přípravě mastermixů pro PCR byly dodrženy univerzální reakční podmínky.

Reagencie	μL/reakci	μL/5 reakcí‡	μL/37 reakcí§	Výsledná koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix (2×)	25.0	125.0	925.0	1×
Forward primer	5.0	25.0	185.0	50 až 900 nM
Reverzní primer	5.0	25.0	185.0	50 až 900 nM
Sonda TaqMan	5.0	25.0	185.0	50 až 250 nM
Vzorek cDNA nebo templát standardu	5.0	25.0	185.0	10 až 100 ng
Voda prostá nukleáz	5.0	25.0	185.0	—
Celkem	50.0	250.0	1850.0	—

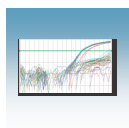
‡ Pro každý z šesti standardů byl připraven jeden mastermix (4 replikáty a rezervní objem pro ztráty při pipetování).

§ Pro každou z obou skupin (populací) vzorků byl připraven jeden mastermix (36 vzorků a rezervní objem pro ztráty při pipetování).

Vzorky obsahující kvantifikovanou cílovou sekvenci i standardy byly uspořádány v destičce. Do každé jamky bylo pipetováno 50 μL odpovídajícího PCR mastermixu. Destička byla až do vložení do systému 7500 inkubována na ledu.



Poznámky _____



Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci

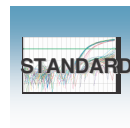
Přehled Dokument destičky pro absolutní kvantifikaci slouží k uchování dat z jednoho běhu, zároveň slouží k uchování dalších údajů o běhu jako jsou názvy vzorků a detektory.

Nastavení běhu Pro každý vytvářený dokument destičky pro absolutní kvantifikaci musíte specifikovat detektory, standardy a úlohu detektoru (detector task):

- Detektor je virtuálně vyjádřená genově specifická kombinace primerů a sondy, které jsou používány v dané eseji. Pro každou detekovanou sekvenci vždy zadáváte detektor. Vytvoření detektorů je popsáno v [Příloze A](#) na [straně 73](#).
- Standard je cílová sekvence o známém množství. Pro každou cílovou sekvenci používanou na destičce musíte mít sadu standardů.
- Úloha detektoru (detektor task) udává, k čemu program používá data naměřená v průběhu analýzy. Každému detektoru je přiřazena jedna ze tří úloh.

Úloha	Symbol	Použijte pro detektory...
Neznámý vzorek (Unknown)		V jamkách obsahujících cílovou kvantifikovanou sekvenci.
Standard		V jamkách obsahujících vzorky o známém množství.
Netemplátová kontrola (No Template Control - NTC)		V jamkách obsahujících PCR reagentie ale nikoliv templát (negativní kontrola).

Poznámky _____




Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci

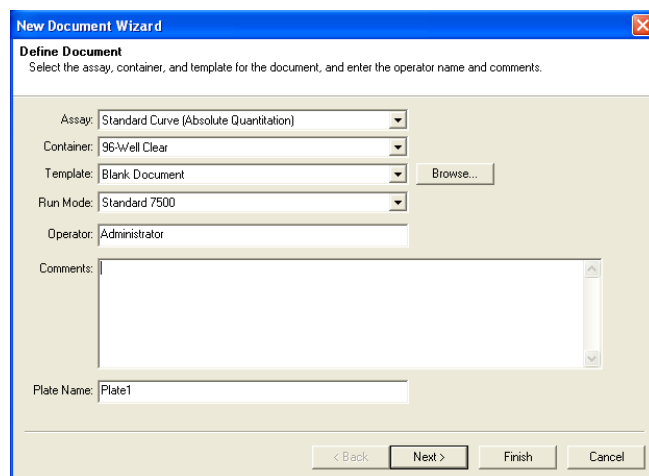
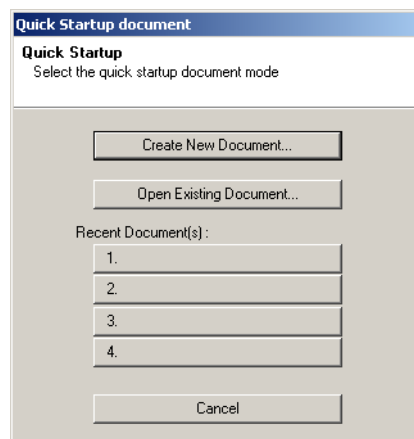
Informace o vzorcích můžete do nového dokumentu destičky zadat, vložit pomocí kopírování z již existujících dokumentů destičky, importovat z existujících dokumentů destičky nebo definovat pomocí šablony. V této části je popsáno vytvoření nového dokumentu destičky prostřednictvím zadání údajů. Více informací o kopírování nebo importování informací o vzorcích z existujících dokumentů destiček nebo o používání šablon naleznete v Nápovědě.

Poznámka: Popsaný postup používá vzorová experimentální data (viz [strana 7](#)).

Vytvoření nového dokumentu destičky:

1. Zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7300/7500 System > 7300/7500 System Software** (), čímž spustíte SDS software.
2. V okně Quick Startup document zvolte **Create New Document** (Vytvořit nový dokument).
3. V rozbalovacím menu Assay (Esej) v okně New Document Wizard (Průvodce vytvořením nového dokumentu) zvolte **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardní křivka – Absolutní kvantifikace). Použijte přednastavené možnosti v nabídkách Container (96-Well Clear – 96-ti jamková destička) a Template (Templát) – Blank document (Nevyplněný dokument). Zvolte odpovídající režim běhu (**Standard 7300, Standard 7500** nebo **9600 Emulation**).

DŮLEŽITÉ! Pro absolutní kvantifikaci nemůžete použít dokument typu RQ (Relativní kvantifikace) a opačně.



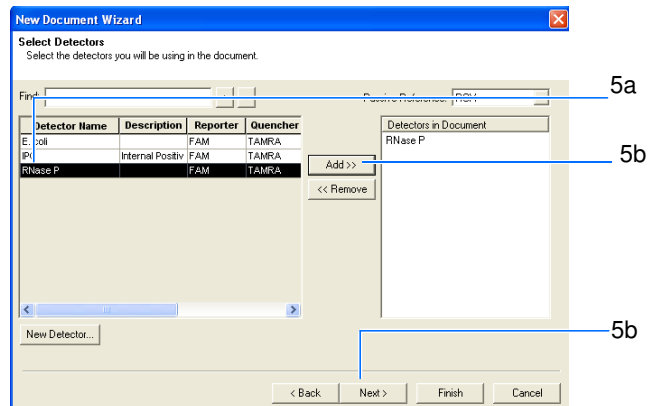
4. V poli Plate Name (Název destičky) zadejte název a klikněte **Next >** (Další).

Poznámky _____

5. Zvolte detektory, které chcete přidat do dokumentu destičky.

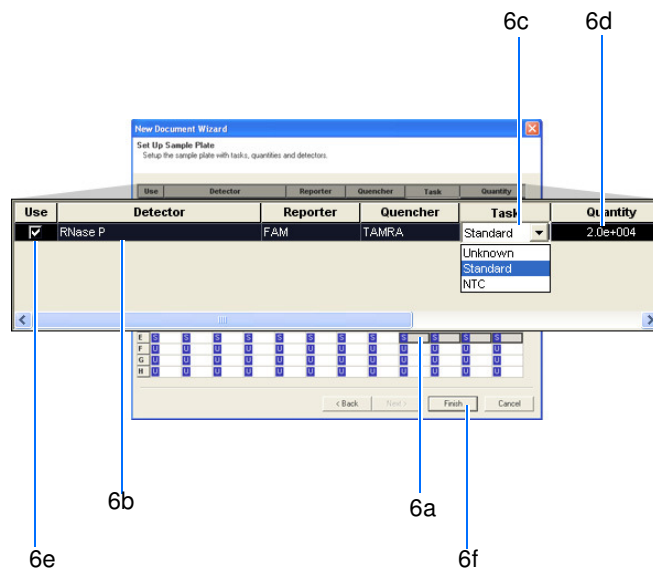
- a. Kliknutím označte detektor, např. **RNase P** (RNázaP). (Ctrl-klik zvolíte více detektorů.) Pokud ve Správci detektorů (Detector Manager) nejsou žádné detektory, klikněte na **New Detector** (Nový detektor), čímž otevřete dialogové okno New Detector. Více informací o vytváření nových detektorů naleznete v **Příloze A** na **straně 73**.
- b. Klikněte na **Add >>** (Přidat), čímž přidáte detektory do dokumentu destičky, následně klikněte na **Next >** (Další).

Poznámka: Chcete-li odstranit detektor z okna Detectors in Document (Detektory v dokumentu), označte jej a klikněte **Remove** (Odstranit).

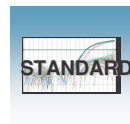


6. Pro každou jamku definujte detektory a jejich úlohu.

- a. Označte jamku (nebo skupinu jamek, pro replikáty).
- b. Klikněte na název detektoru(ů), čímž jej přiřadíte označené jamce.
- c. Ve sloupci Task (Úloha) zvolte úlohu detektoru.
- d. Pro jamky obsahující standardy zadejte jejich množství.
- e. Klikněte **Use** (Použít). Úloha a barva detektoru se zobrazí ve zvolených jamkách.
- f. Klikněte **Finish** (Ukončit). Program SDS vytvoří dokument destičky.



Poznámky _____



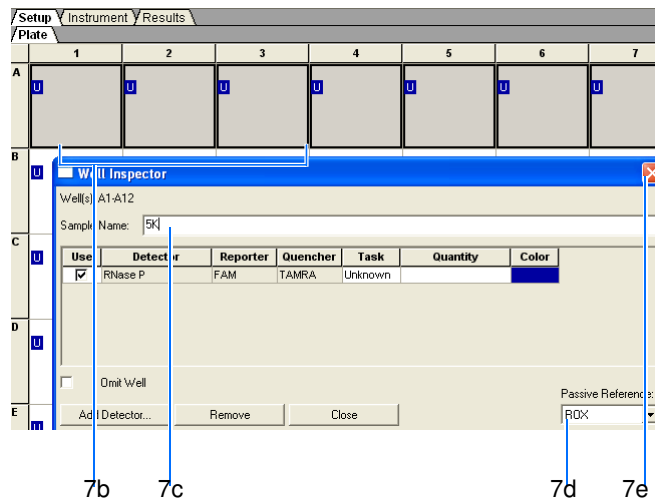
7. Zadejte názvy vzorků.

- a. Klikněte na nebo zvolte **View > Well Inspector** (Zobrazit > Prohlížeč jamek).

Poznámka: Názvy vzorků lze zadat i tak, že označíte vybrané jamky a napíšete název.

- b. Klikněte na jamku nebo označte více jamek.
 c. Zadejte název vzorku.
 d. Je-li zapotřebí, změňte zvolenou pasivní referenci. (Přednastavena je barva ROX™.)
 e. Opakujte kroky b až d tak dlouho, až zadáte názvy vzorků, a definujete pasivní referenci pro všechny jamky na destičce, poté klikněte na (X), čímž okno Well Inspector uzavřete.

Poznámka: Zadané informace (název vzorku, detektor, úloha detektoru) můžete změnit po skončení běhu.



DŮLEŽITÉ! Pokud v pokusu nepoužíváte všechny jamky destičky, nevyřazujte je nyní z analýzy (pomocí funkce Omit - Vypustit). Můžete tak učinit až po skončení běhu. Více informací naleznete v nápovědě .

8. V záložce Setup (Nastavení) ověřte, že jste všechny informace zadali správně.

Poznámky _____

Vzorový pokus

Kvantifikované vzorky i standardy byly uspořádány na jedinou destičku. Každé jamce byl přiřazen detektor (symbol barevného čtverečku). Každé jamce byla rovněž přiřazena úloha detektoru — U (unknown – Neznámý vzorek), S (standard) nebo N (no template control – netemplátová kontrola).

Jelikož byl kvantifikován pouze jeden gen, byl definován pouze jediný detektor (nazvaný RNase P – RNáza P).

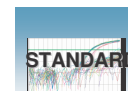
Obrázek níže znázorňuje vzorový dokument destičky pro absolutní kvantifikaci poté, co byly zadány názvy vzorků, detektor a úlohy detektoru pro každou jamku.

Setup / Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SK U	SK S	SK S	SK U	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S
B	SK U	SK S	SK S	SK U	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S
C	SK U	SK S	SK S	SK U	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S
D	NTC N	NTC N	NTC N	SK U	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S	SK S
E	S3 S 5.00e+003	S3 S 5.00e+003	S3 S 5.00e+003	S3 S 5.00e+003	S4 S 1.00e+004	S4 S 1.00e+004	S4 S 1.00e+004	S4 S 1.00e+004	S5 S 2.00e+004	S5 S 2.00e+004	S5 S 2.00e+004	S5 S 2.00e+004
F	10K U	10K S	10K S	10K U	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S
G	10K U	10K S	10K S	10K U	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S
H	10K U	10K S	10K S	10K U	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S	10K S

Název vzorku

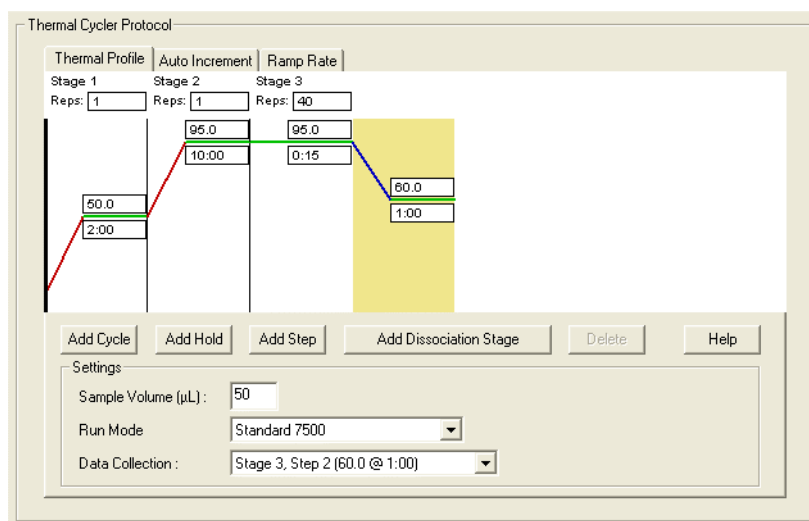
Úloha detektoru a barva

Poznámky _____



Nastavení teplotního profilu a spuštění běhu

Univerzální teplotní profil pro PCR Pokud jste si pro váš pokus absolutní kvantifikace zvolili dvoukrokovou RT-PCR (doporučeno), již jste provedli krok reverzní transkripce. Nyní provedete amplifikaci DNA pomocí PCR.



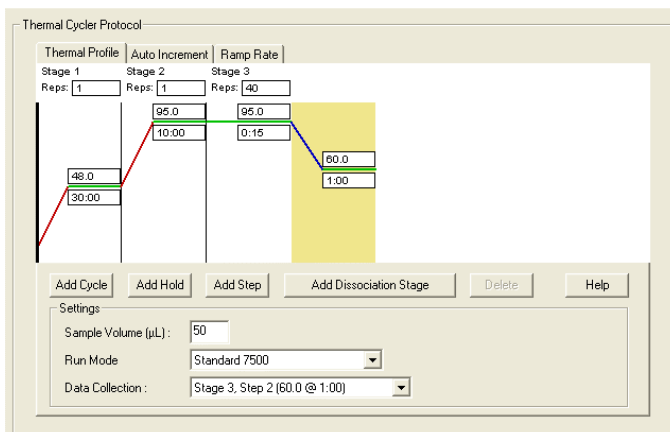
V záložce Instrument (Přístroj) se zobrazí přednastavený teplotní profil PCR, viz následující tabulka Časy a teploty (Dvoukroková RT-PCR).

Časy a teploty (Dvoukroková RT-PCR)			
1) RT	HOLD (Inkubace)	HOLD (Inkubace)	HOLD (Inkubace)
	10 min při 25 °C	120 min při 37 °C	5 sec při 85 °C
2) PCR	Počáteční kroky		PCR (40 cyklů)
	Aktivace AmpErase® UNG	Aktivace AmpliTaq Gold® DNA polymerázy	Denaturace
	HOLD (Inkubace)	HOLD (Inkubace)	Annealing/Polymerace
	2 min při 50 °C	10 min při 95 °C	CYCLE (Cyklování)
		15 sec při 95 °C	1 min při 60 °C

Poznámky _____

Teplotní profil pro jedenkrokovou RT-PCR

Pokud jste si zvolili jednokrokovou RT-PCR, probíhá přepis do cDNA a její amplifikace v jediném kroku.



Následující tabulka Časy a teploty (Jedenkroková RT-PCR) udává teplotní profil pro jednokrokovou RT-PCR.

Časy a teploty (Jedenkroková RT-PCR)			
Počáteční kroky		PCR (40 cyklů)	
Reverzní transkripce	Aktivace AmpliTaq® Gold DNA polymerázy	Denaturace	Annealing/Polymerace
HOLD (Inkubace)	HOLD (Inkubace)	CYCLE (Cyklování)	
30 min při 48 °C	10 min při 95 °C	15 sec při 95 °C	1 min při 60 °C

Poznámky _____



Teplotní profil nastavíte a běh spustíte takto:

1. Zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).

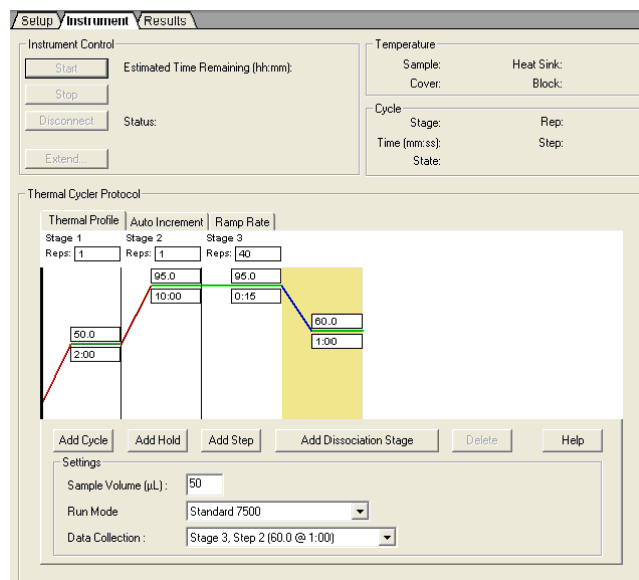
Zobrazí se přednastavený teplotní profil (standardní podmínky pro PCR při dvoukrokové RT-PCR).

2. Ověřte, že:

- Používáte-li dvoukrokovou RT-PCR – je nastaven přednastavený teplotní profil PCR.

Poznámka: Používáte-li jednokrokovou RT-PCR, použijte teplotní profil uvedený v části [“Teplotní profil pro jednokrokovou RT-PCR”](#) na straně 30.

- Objem vzorku je 50 µL.
- Je nastaven požadovaný Run Mode (Režim běhu).



Poznámka: Používáte-li chemizmus SYBR® Green I a chcete ověřit přítomnost kontaminací či stanovit disociační teplotu vašich ampliconů, klikněte na **Add Dissociation Stage** (Přidat krok disociace). Tento krok zahrnuje i ochlazení po skončení disociační analýzy. Více informací naleznete v nápovědě.

Poznámka: V systému 7300 není k dispozici modelování běhu přístroje 9600 (Emulation).

Poznámky _____

3. Zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit), zadejte název dokumentu destičky a klikněte **Save** (Uložit).

(Volitelné) Chcete-li tento dokument destičky použít znovu, uložte jej jako šablónu. Zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako).


V rozbalovacím menu **Save in** (Uložit v) vyhledejte adresář **Applied Biosystems\7300\7500\7500 Fast System\Templates** (Šablóny). Zadejte název souboru, zvolte typ souboru (*.sdt) v **Save as type** (Uložit jako typ) a uložte soubor jako šablónu.

4. Vložte destičku do přístroje.

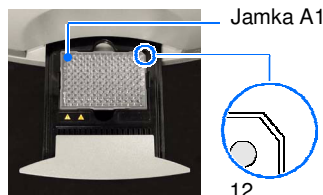
Poznámka: Pozice A1 je v levém horním rohu zásuvky přístroje.

5. Klikněte **Start**.

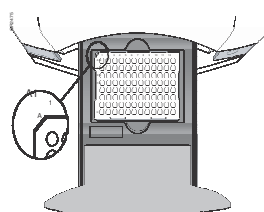
Během provádění PCR zobrazuje přístroj v záložce Instrument (Přístroj) informace v reálném čase a udává naměřené hodnoty fluorescence.

Po skončení běhu jsou stavové hodnoty a tlačítka šedá a tlačítko Analysis (Analýza)  je aktivní. Současně se objeví zpráva oznamující úspěšné či neúspěšné ukončení běhu.

Veškerá data vytvořená v průběhu běhu jsou uložena do dokumentu destičky tak jak byl zadán v [kroku 3](#).



Systém 7300/7500:
Standardní destičky –
šikmý roh vpravo
nahore

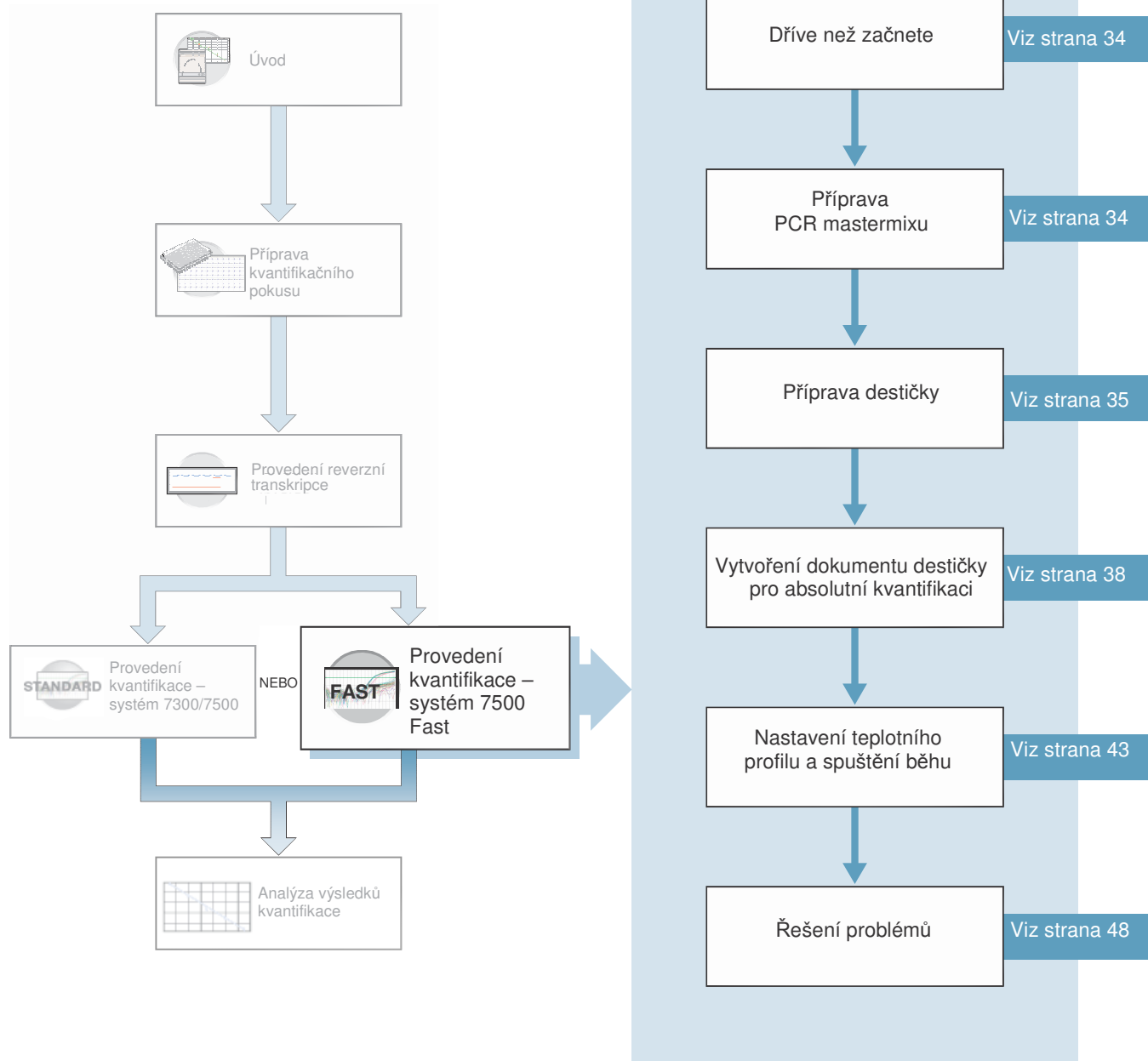


Systém 7500 Fast:
Destičky Fast –
šikmý roh vlevo
nahore

Poznámky _____



Provedení absolutní kvantifikace – systém 7500 Fast



Poznámky _____



Dříve než začnete

Ověřte, že na systému 7500 Fast je pravidelně prováděna kalibrace pozadí a kalibrace barev, takže je zajištěno jeho optimální fungování. Více informací o kalibraci systému 7500 Fast naleznete v Náповědě (Online Help) a v příručce *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Installation and Maintenance Guide*.

Příprava PCR mastermixu

Druhým krokem (PCR) dvoukrokové procedury RT-PCR je amplifikace cDNA, která se provádí pomocí mastermixu TaqMan® Universal PCR Master Mix.

Uživatelé systémů 7300/7500 musí používat standardní *TaqMan Universal PCR Master Mix (2×)* s dobou trvání běhu 2 hod. Uživatelé systému 7500 Fast si mohou zvolit mezi mastermixem *TaqMan Universal PCR Master Mix (2×)* nebo *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×)* s dobou trvání běhu méně než 40 min. Více informací o používání mastermixu Fast naleznete v příručce *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix Protocol* (kat. č. 4351891).

DŮLEŽITÉ! Používáte-li mastermix *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix*, musíte běh spustit do dvou hodin od přípravy destičky. Není-li běh zahájen do dvou hodin, lze destičku uložit do ledničky nebo zamrazit.

Návod na používání reagensů, jež jsou součástí kitu, naleznete v protokolu *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix Protocol* (kat. č. 4351891). V následující tabulce jsou uvedeny univerzální parametry experimentu (objem a výsledná koncentrace) za použití mastermixu.

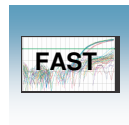


CAUTION CHEMICKÉ RIZIKO. *TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) No AmpErase UNG* může způsobit podráždění očí a kůže. Polknutí nebo inhalace může vést k nevolnosti. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

Reagencie	Objem (μL) / 20-μL reakce
TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20×): <ul style="list-style-type: none">• Forward PCR primer (18 μM)• Reverzní PCR primer (18 μM)• Sonda TaqMan® (5 μM)	1.0
cDNA templát (10 až 100 ng RNA přepsané do cDNA + voda prostá RNáz)	9.0‡
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG	10.0
Celkový objem	20.0

‡ Používáte-li UNG, snižte objem cDNA templátu a vody prosté RNáz na 8.8 μL na 20-μL reakci a přidejte 0.2 μL UNG (1 U/μL).

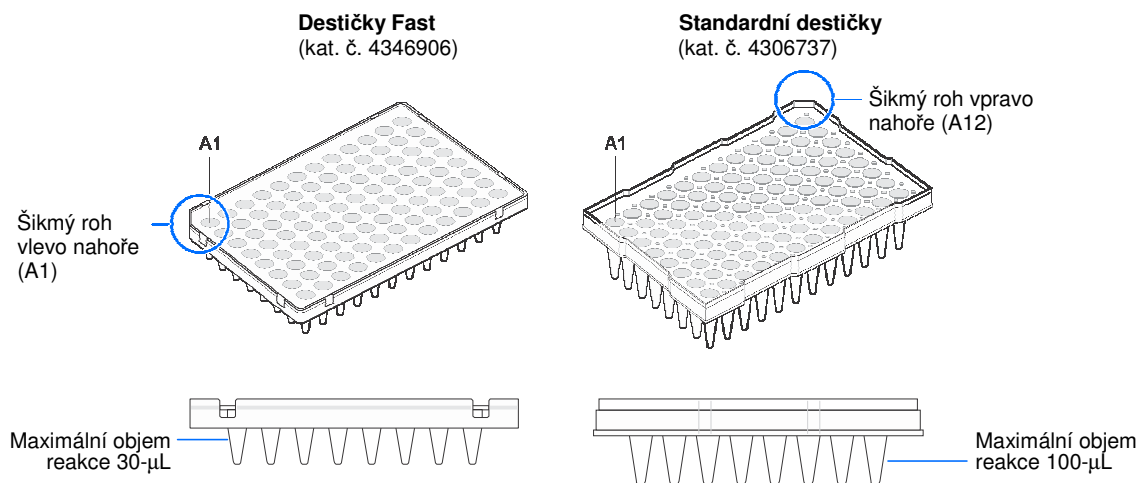
Poznámky _____



Příprava destičky

Destičky Fast a standardní destičky

DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že na přístroji 7500 Fast používáte optické destičky typu Fast (Fast Optical 96-Well Plate). V 96-ti jamkovém bloku typu Fast nefungují standardní destičky správně a může dojít k jejich poškození.



1. Označte si destičku a ujistěte se, že máte pro každou detekovanou cílovou sekvenci připravenou sadu standardů. Standardy musí být na téže destičce.

Poznámka: Uspořádání reakcí na destičce (vzorky a eseje) by mělo odpovídat popisu (názvy vzorků a detektorů/markerů) v dokumentu destičky pro daný běh.

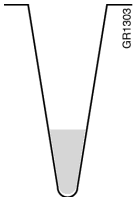
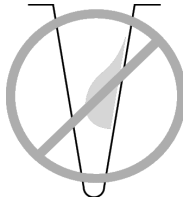
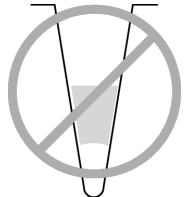
2. Pracujete-li se systémem 7500 Fast, pipetujte do každé jamky destičky 20 μ L příslušného PCR mastermixu.

Poznámka: Reakce obsahující standardy připravujte naprosto totožným způsobem jako reakce obsahující neznámé vzorky. Používejte tytéž primery a sondy, složky PCR mastermixu a objem, ale do každého standardu přidejte známé množství templátu (jako je cDNA nebo plazmidová DNA). Všechny součásti před pipetováním do jamek destičky smíchejte.

3. Uzavřete destičku pomocí optické adhezivní fólie.
4. Krátce destičku centrifugujte.

Poznámky _____

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

Správně	Špatně	
 <p data-bbox="496 562 760 590">Reakce je na dně jamky.</p>	 <p data-bbox="805 562 1081 642">Reakce je na boku jamky, protože destička nebyla centrifugována.</p>	 <p data-bbox="1114 562 1406 690">Na dně jamky je vzduchová bublina – reakce nebyla centrifugována dostatečně dlouho nebo při dostatečných otáčkách.</p>

DŮLEŽITÉ! Před spuštěním běhu se ujistěte, že se všechny reakce nacházejí na dně jamky. Není-li tomu tak, bude ovlivněna kvalita měření.

6. Destičku s reakcemi držte na ledu až do té doby, kdy jste připraveni ji umístit do přístroje.

Poznámky _____

Vzorový pokus

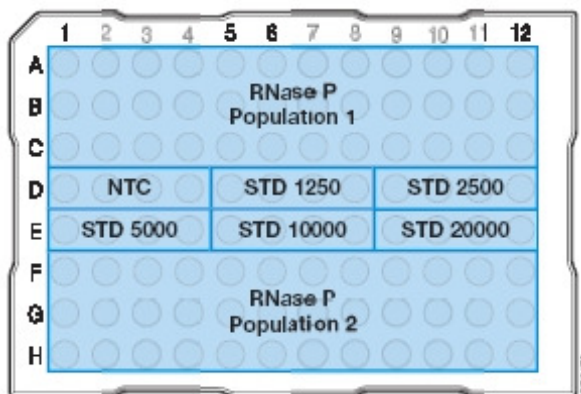
Při přípravě mastermixů pro PCR byly dodrženy univerzální reakční podmínky.

Reagencie	μL/reakci	μL/5 reakcí‡	μL/37 reakcí§	Výsledná koncentrace
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×)	10.0	50.0	370.0	1×
TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20×):				
• Forward PCR primer (18 μM)	Celkem 1.0	Celkem 5.0	Celkem 37.0	50 až 900 nM
• Reverzní PCR primer (18 μM)				50 až 900 nM
• Sonda TaqMan® (5 μM)				50 až 250 nM
Vzorek cDNA nebo templát standardu	Celkem 9.0	Celkem 45.0	Celkem 333.0	10 až 100 ng
Voda prostá nukleáz				—
Celkem	20.0	100.0	740.0	—

‡ Pro každý z šesti standardů byl připraven jeden mastermix (4 replikáty a rezervní objem pro ztráty při pipetování).

§ Pro každou z obou skupin (populací) vzorků byl připraven jeden mastermix (36 vzorků a rezervní objem pro ztráty při pipetování).

Vzorky obsahující kvantifikovanou cílovou sekvenci i standardy byly uspořádány v destičce. Pro systém 7500 Fast se pipetuje 20 μL odpovídajícího PCR mastermixu (včetně cDNA) do každé jamky. Destička byla až do vložení do systému 7500 Fast inkubována na ledu.



Poznámky _____



Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci

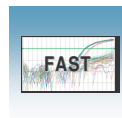
Přehled Dokument destičky pro absolutní kvantifikaci slouží k uchování dat z jednoho běhu, zároveň slouží k uchování dalších údajů o běhu jako jsou názvy vzorků a detektory.

Nastavení běhu Pro každý vytvářený dokument destičky pro absolutní kvantifikaci musíte specifikovat detektory, standardy a úlohu detektoru (detector task):

- Detektor je virtuálně vyjádřená genově specifická kombinace primerů a sondy, které jsou používány v dané eseji. Pro každou detekovanou sekvenci vždy zadáváte detektor. Vytvoření detektorů je popsáno v [Příloze A](#) na [straně 73](#).
- Standard je cílová sekvence o známém množství. Pro každou cílovou sekvenci používanou na destičce musíte mít sadu standardů.
- Úloha detektoru (detector task) udává, k čemu program používá data naměřená v průběhu analýzy. Každému detektoru je přiřazena jedna ze tří úloh.

Úloha	Symbol	Použijte pro detektory...
Neznámý vzorek (Unknown).	U	V jamkách obsahujících cílovou kvantifikovanou sekvenci.
Standard	S	V jamkách obsahujících vzorky o známém množství.
Netemplátová kontrola (No Template Control - NTC)	N	V jamkách obsahujících PCR reagentie ale nikoliv templát (negativní kontrola)

Poznámky _____




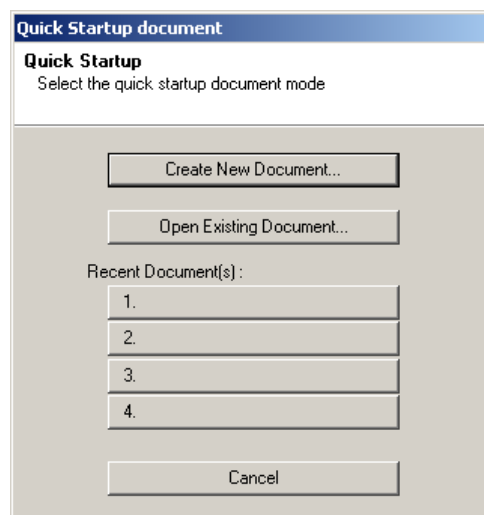
Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci

Informace o vzorcích můžete do nového dokumentu destičky zadat, vložit pomocí kopírování z již existujících dokumentů destičky, importovat z existujících dokumentů destičky nebo definovat pomocí šablony. V této části je popsáno vytvoření nového dokumentu destičky prostřednictvím zadání údajů. Více informací o kopírování nebo importování informací o vzorcích z existujících dokumentů destiček nebo o používání šablonů naleznete v Nápovědě.

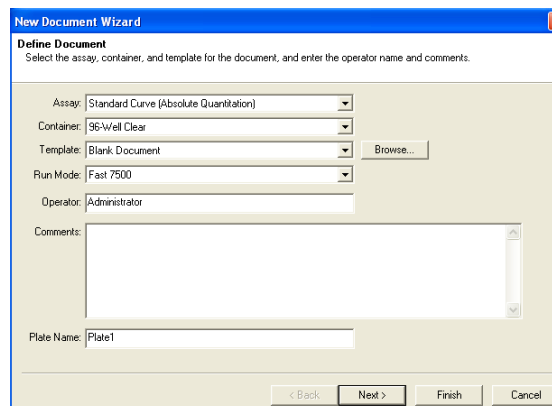
Poznámka: Popsaný postup používá vzorová experimentální data (viz [strana 7](#)).

Vytvoření nového dokumentu destičky:

1. Zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7300/7500 System > 7300/7500 System Software** (), čímž spustíte SDS software.
2. V okně Quick Startup document zvolte **Create New Document** (Vytvořit nový dokument).



3. V rozbalovacím menu Assay (Esej) v okně New Document Wizard (Průvodce vytvořením nového dokumentu) zvolte **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardní křivka – Absolutní kvantifikace). Použijte přednastavené možnosti v nabídkách Container (96-Well Clear – 96-ti jamková destička) a Template (Šablóna) – Blank document (Nevyplněný dokument).



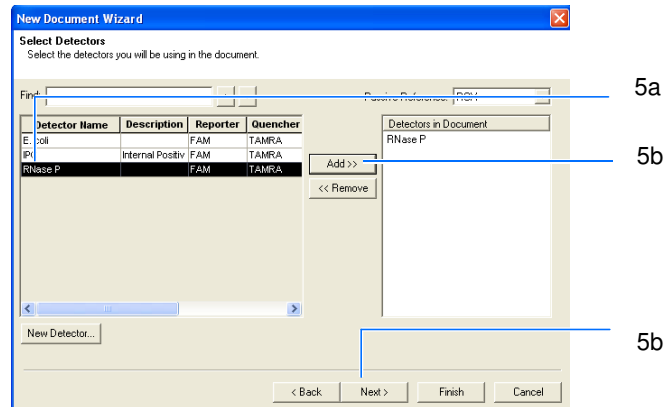
DŮLEŽITÉ! Pro absolutní kvantifikaci nemůžete použít dokument typu RQ (Relativní kvantifikace) a opačně.

4. V poli Plate Name (Název destičky) zadejte název a klikněte **Next >** (Další).

Poznámky _____

5. Zvolte detektory, které chcete přidat do dokumentu destičky.

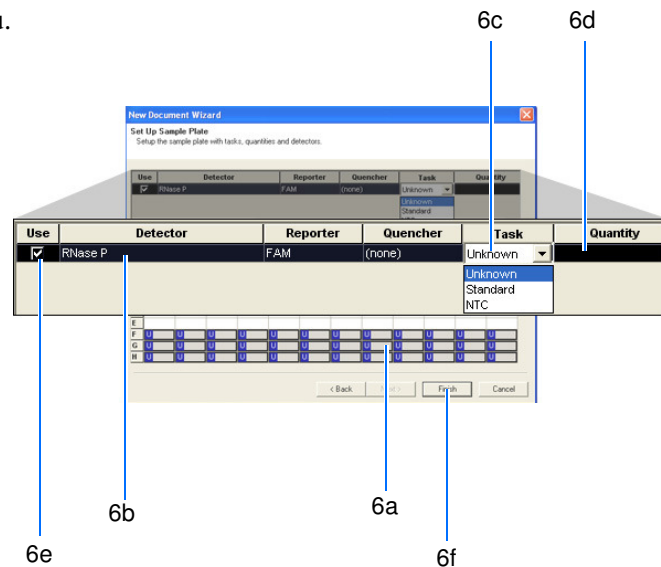
- a. Kliknutím označte detektor, např. **RNase P** (RNázaP). (Ctrl-klik zvolíte více detektorů.) Pokud ve Správci detektorů (Detector Manager) nejsou žádné detektory, klikněte na **New Detector** (Nový detektor), čímž otevřete dialogové okno New Detector. Více informací o vytváření nových detektorů naleznete v Příloze A na straně 73.
- b. Klikněte na **Add >>** (Přidat), čímž přidáte detektory do dokumentu destičky, následně klikněte na **Next >** (Další).

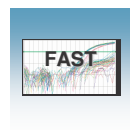


Poznámka: Chcete-li odstranit detektor z okna Detectors in Document (Detektory v dokumentu), označte jej a klikněte **Remove** (Odstranit).

6. Pro každou jamku definujte detektory a jejich úlohu.

- a. Označte jamku (nebo skupinu jamek, pro replikáty).
 - b. Klikněte na název detektoru(ů), čímž jej přiřadíte označené jamce.
 - c. Ve sloupci Task (Úloha) zvolte úlohu detektoru.
 - d. Pro jamky obsahující standardy zadejte jejich množství.
 - e. Klikněte **Use** (Použít).
 - f. Klikněte **Finish** (Ukončit).
- Program SDS vytvoří dokument destičky.





7. Zadejte názvy vzorků.

- a. Klikněte na nebo zvolte **View > Well Inspector** (Zobrazit > Prohlížeč jamek).

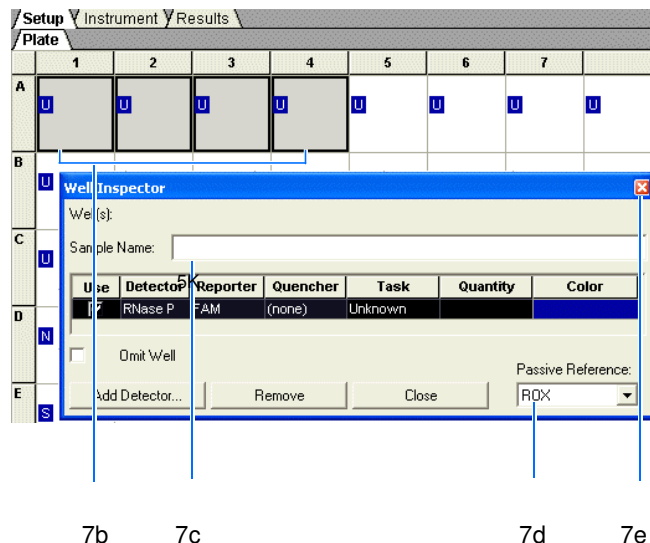
Poznámka: Názvy vzorků lze zadat i tak, že označíte vybrané jamky a napíšete název.

- b. Klikněte na jamku nebo označte více jamek.
 c. Zadejte název vzorku.
 d. Je-li zapotřebí, změňte zvolenou Pasivní referenci. (Přednastavena je barva ROX™.)
 e. Opakujte kroky b až d tak dlouho, až zadáte názvy vzorků a definujete pasivní referenci pro všechny jamky na destičce, poté klikněte na (X), čímž okno Well Inspector uzavřete.

Poznámka: Zadané informace (název vzorku, detektor, úloha detektoru) můžete změnit po skončení běhu.

DŮLEŽITÉ! Pokud v pokusu nepoužíváte všechny jamky destičky, nevyřazujte je nyní z analýzy (pomocí funkce Omit - Vypustit). Můžete tak učinit až po skončení běhu. Více informací naleznete v nápovědě.

8. V záložce Setup (Nastavení) ověřte, že jste všechny informace zadali správně.



Poznámky _____

Vzorový pokus

Kvantifikované vzorky i standardy byly uspořádány na jedinou destičku. Každé jamce byl přiřazen detektor (symbol barevného čtverečku). Každé jamce byla rovněž přiřazena úloha detektoru — U (unknown – Neznámý vzorek), S (standard) nebo N (no template control – netemplátová kontrola).

Jelikož byl kvantifikován pouze jeden gen, byl definován pouze jediný detektor (nazvaný RNase P – RNáza P).

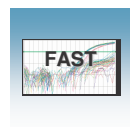
Obrázek níže znázorňuje vzorový dokument destičky pro absolutní kvantifikaci poté, co byly zadány názvy vzorků, detektor a úlohy detektoru pro každou jamku

Setup / Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U
B	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U
C	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U
D	NTC N	NTC N	NTC N	SK U	S1 S 1.25e+003	S2 S 1.25e+003	S3 S 1.25e+003	S4 S 2.50e+003	S5 S 2.50e+003	S6 S 2.50e+003	S7 S 2.50e+003	S8 S 2.50e+003
E	S3 S 5.00e+003	S3 S 5.00e+003	S3 S 5.00e+003	S3 S 5.00e+003	S4 S 1.00e+004	S4 S 1.00e+004	S4 S 1.00e+004	S4 S 1.00e+004	S5 S 2.00e+004	S5 S 2.00e+004	S5 S 2.00e+004	S5 S 2.00e+004
F	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U
G	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U
H	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U	10K U

Název vzorku

Úloha detektoru a barva

Poznámky _____



Nastavení teplotního profilu a spuštění běhu

Teplotní profil typu Fast (Rychlý)

- Optimální fungování režimu rychlého cyklování (Fast mode) a mastermixu TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG bylo ověřeno pouze pro provádění kvantifikace a nikoliv pro reakce s analýzou prováděnou až po jejich skončení (tzv. endpoint) jako např. alelická diskriminace.
- Optimální fungování přednastaveného režimu rychlého cyklování (Fast mode) a mastermixu TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG bylo ověřeno pro TaqMan Gene Expression Assays (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese) a Custom TaqMan® Gene Expression Assays (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese – na objednávku) společnosti Applied Biosystems.
- Pro většinu kvantifikačních esejí, navržených podle doporučení (Assay Design Guidelines) společnosti Applied Biosystems, získáte při použití přednastaveného režimu rychlého cyklování (Fast mode) a mastermixu TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG srovnatelné výsledky, jako při použití standardního režimu cyklování a mastermixu TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix. Pokud nikoliv, postupujte podle části “Řešení problémů” na straně 48.
- Provádíte-li multiplex PCR (v jedné zkumavce je amplifikována více než jedna cílová sekvence), je možné, že bude nutné esej optimalizovat. Před prováděním multiplex PCR si přečtěte informace na [straně 48](#) v části Řešení problémů.

Expertní režim (Expert Mode)

Expertní režim (Expert mode) vám umožňuje provádět měření při použití pouze těch filtrů, které jsou ve vámi prováděném pokusu zapotřebí, což zkracuje dobu trvání běhu na méně než 30 minut. Je zapotřebí dodržovat následující doporučení. Více informací naleznete v příručce *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Using Expert Mode User Bulletin*:

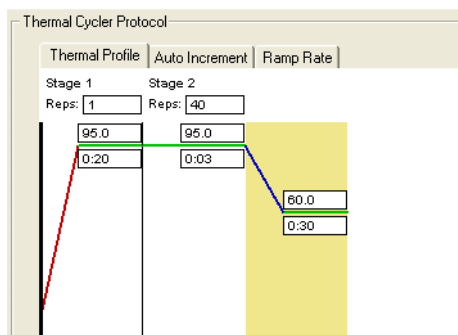
- V přednastaveném teplotním profilu v rychlém režimu (Fast mode) je nastavena doba polymerace 30 vteřin. Možnost použití této doby polymerace byla ověřena pro TaqMan Gene Expression Assays (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese), TaqMan Pre-Developed Assay Reagents (reagencie pro TaqMan® eseje) a eseje navržené pomocí programu Primer Express za použití přednastaveného režimu rychlého cyklování (Fast mode).
- Použití kratší doby polymerace než 30 vteřin má vliv na fungování některých esejí. Chcete-li použít kratší dobu, musíte toto použití validovat pro vámi používanou esej.
- Společnost Applied Biosystems důrazně doporučuje používání barvy ROX™ pro normalizaci fluktuací vzniklých v důsledku nepřesného pipetování.
- Používáte-li pasivní referenci ROX, musíte zvolit *oba* filtry FAM™ a ROX.
- Používáte-li více než tři filtry, prodlužte dobu polymerace (delší doba trvání měření fluorescence).

Poznámka: Filtry jsou označeny A až E, ale můžete je přejmenovat. Zvolte **Tools > Filter Configuration** (Nástroje > Nastavení filtrů), čímž otevřete okno **Filter Naming** (Názvy filtrů).

Poznámky _____

Přednastavený teplotní profil pro PCR

Pokud jste si pro váš pokus absolutní kvantifikace zvolili dvoukrokovou RT-PCR (doporučeno), již jste provedli krok reverzní transkripce. Nyní provedete amplifikaci DNA pomocí PCR. Uživatelé systému 7500 Fast si mohou zvolit mezi přednastaveným standardním režimem cyklování a režimem rychlého cyklování (Fast mode). Expertní režim je nastavený jako vypnutý a lze jej zapnout pouze pro režim rychlého cyklování.



V záložce Instrument (Přístroj) se zobrazí přednastavený teplotní profil PCR, viz následující tabulka.

Časy a teploty Fast (Dvoukroková RT-PCR)			
1) RT	HOLD (Inkubace)	HOLD (Inkubace)	HOLD (Inkubace)
	10 min při 25 °C	120 min při 37 °C	5 sec při 85 °C
Teplotní profil Fast (pouze systém 7500 Fast)			
2) PCR	Aktivace enzymu	Denaturace	Annealing/Polymerace
Režim Fast	20 sec při 95 °C	3 sec při 95 °C	30 sec při 60 °C
Expertní režim	20 sec při 95 °C	3 sec při 95 °C	20 sec při 60 °C

Poznámky _____



Teplotní profil nastavíte a běh spustíte takto:

1. Zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).

Zobrazí se přednastavený teplotní profil (standardní podmínky pro dvoukrokovou RT-PCR).

2. Ověřte, že:

- Používáte-li dvoukrokovou RT-PCR – Je nastaven přednastavený teplotní profil PCR.

Poznámka: Používáte-li jednokrokovou RT-PCR, použijte teplotní profil uvedený v části [“Teplotní profil pro jednokrokovou RT-PCR”](#) na straně 44.

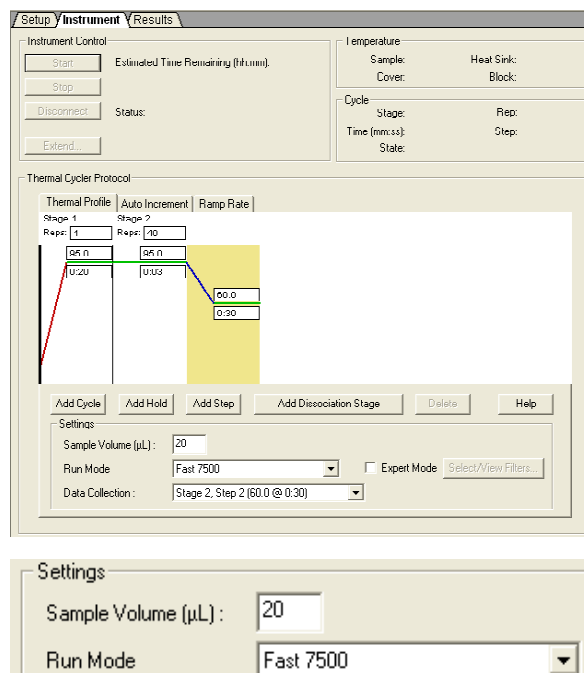
- Objem vzorku je 20 µL (pro 7500 Fast).
- Je nastaven Run Mode (Režim běhu) Fast 7500.

Poznámka: Používáte-li chemizmus SYBR® Green I a chcete ověřit přítomnost kontaminací či stanovit disociační teplotu vašich amplikonů, klikněte na **Add Dissociation Stage** (Přidat krok disociace). Tento krok zahrnuje i ochlazení po skončení disociační analýzy. Více informací naleznete v nápovědě. Uživatelé systému 7500 Fast mohou používat chemizmus SYBR Green I v režimu běhu Standard nebo 9600 Emulation.

DŮLEŽITÉ! Chcete-li použít Expertní režim, pokračujte [krokem 3](#). Jinak pokračujte [krokem 6](#).

3. Zatrhněte políčko Expert Mode (Expertní režim).

4. Zvolte tlačítko **Select/View Filters** (Výběr filtrů).



Poznámky _____

5. Vyberte filtry pro měření a potvrďte **OK**. Filtr zvolíte zatržením okénka vedle názvu filtru.

DŮLEŽITÉ! Není-li zvolen žádný filtr, nebudou provedena žádná měření.

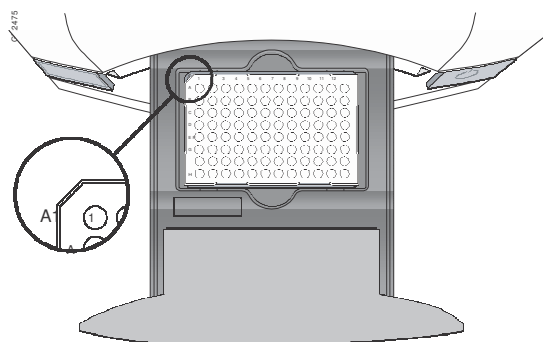
Poznámka: Důrazně se doporučuje používání barvy ROX™ pro normalizaci fluktuací vzniklých v důsledku nepřesného pipetování. Je nutné zvolit filtry FAM a ROX, aby byla excitována i pasivní reference ROX v mastermixu společnosti Applied Biosystems.

Poznámka: Informace o možnosti jak změnit názvy filtrů naleznete v nápovědě nebo příručce *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System Using Expert Mode User Bulletin*.

6. Zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit), zadejte název dokumentu destičky a klikněte **Save** (Uložit).
- (Volitelné) Chcete-li tento dokument destičky použít znovu, uložte jej jako šablónu. Zvolte **File > Save As** (Soubor > Uložit jako). V rozbalovacím menu **Save in** (Uložit v) vyhledejte adresář **Applied Biosystems\7300\7500\7500 Fast System\Templates** (Šablóny). Zadejte název souboru, zvolte typ souboru (*.sdt) v **Save as type** (Uložit jako typ) a uložte soubor jako šablónu.

7. Vložte destičku do zásuvky přístroje. Ujistěte se, že destička je vložena do přístroje ve správné orientaci.


Poznámka: Pozice A1 musí být v levém horním rohu zásuvky přístroje. Čárový kód je směřován k čelní straně přístroje.





8. Klikněte **Start**.

Během provádění PCR zobrazuje přístroj v záložce Instrument (Přístroj) informace v reálném čase a udává naměřené hodnoty fluorescence.

Po skončení běhu jsou stavové hodnoty a tlačítka šedá a tlačítko Analysis (Analýza)  je aktivní. Současně se objeví zpráva oznamující úspěšné či neúspěšné ukončení běhu.

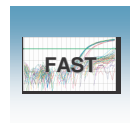
Veškerá data vytvořená v průběhu běhu jsou uložena do dokumentu destičky tak jak byl zadán v [kroku 6](#).

Poznámky _____

Řešení problémů

Řešení problémů		
Problém	Možná příčina	Nápravné kroky
Vysoké hodnoty C_T / nízká přesnost nebo nezdařené PCR reakce	Cílová sekvence se obtížně amplifikuje	<ul style="list-style-type: none"> • Prodloužení doby annealingu/ polymerace v režimu cyklování. • Zvýšení teploty annealingu/ polymerace na 62 °C.
	Nedostatečné množství cDNA	Použijte 10 až 100 ng cDNA templátu na 20- μ L reakci.
	Nízká kvalita cDNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proveďte kvantifikaci cDNA. 2. Ověřte přítomnost inhibitorů v cDNA templátu. 3. Ověřte, že je $OD_{260/280} > 1.8$ pro RNA nebo 1.9 pro DNA.
	Degradace vzorku	Zopakujte pokus s čerstvě připravenou cDNA.
	Použili jste TaqMan Universal PCR Master Mix (2 \times) namísto TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2 \times), No AmpErase UNG	Proveďte reakce za použití správného mastermixu.
	Tvorba dimerů primerů.	Pro dosažení optimálních výsledků je nutné spustit reakce co nejdříve po jejich přípravě. Není-li možné reakce spustit do 2 hodin od ukončení jejich přípravy, umístěte destičku s reakcemi do lednice nebo ji zamrazte do té doby, než je možné ji analyzovat na přístroji 7500 Fast.
Nízké hodnoty ΔR_n nebo R_n	Příliš krátká doba polymerace	Použijte přednastavený teplotní profil (viz strana 44).
	Tvorba dimerů primerů.	Pro dosažení optimálních výsledků je nutné spustit reakce co nejdříve po jejich přípravě. Není-li možné reakce spustit do 2 hodin od ukončení jejich přípravy, umístěte destičku s reakcemi do lednice nebo ji zamrazte do té doby, než je možné ji analyzovat na přístroji 7500 Fast.

Poznámky _____



Řešení problémů		
Problém	Možná příčina	Nápravné kroky
Běh trvá déle než 40 minut	Je nastaven režim cyklování Standard nebo 9600 Emulation	Nastavte rychlý režim cyklování – Fast mode (viz strana 44).
Graf závislosti R_n na cyklu se nezobrazí	Při nastavení běhu nebyla zvolena barva ROX™ jako pasivní reference	Při nastavení běhu zvolte barvu ROX jako pasivní referenci.
Příliš vysoké hodnoty ΔR_n nebo R_n	Při nastavení běhu nebyla zvolena barva ROX jako pasivní reference	Při nastavení běhu zvolte barvu ROX jako pasivní referenci.
	Evaporace	Ujistěte se, že destička je dokonale uzavřena, zejména v rozích.
Vysoká variabilita v reakční destičce	Při nastavení běhu nebyla zvolena barva ROX jako pasivní reference	Při nastavení běhu zvolte barvu ROX jako pasivní referenci.
	Evaporace	Ujistěte se, že destička je dokonale uzavřena, zejména v rozích.
Vysoká variabilita replikátů	Nedokonalé promíchání reakčního mixu	Promíchejte reakční mix několikrát opatrným otočením, před rozplněním do destičky krátce centrifugujte.

Multiplex PCR – Řešení problémů

DŮLEŽITÉ! S ohledem na složitost multiplex PCR a její komplexní charakter je nemožné v multiplexním uspořádání garantovat optimální průběh esejí. Společnost Applied Biosystems doporučuje při provádění multiplexních aplikací za použití rychlého režimu cyklování a mastermixu TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase UNG provedení níže uvedených kroků, a to v pořadí, v jakém jsou uvedeny.

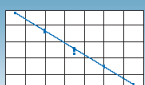
Při provádění multiplex PCR:

1. Zvyšte teplotu annealingu/polymerace na 62 °C.
2. Pokud ani po zvýšení teploty annealingu/polymerace na 62 °C nefungují eseje optimálně, prodlužte dobu annealingu/ polymerace o 5 vteřin na 35 vteřin.
3. Pokud ani po zvýšení teploty či prodloužení doby annealingu/polymerace nefungují eseje optimálně, je možné, že bude nutné je znovu optimalizovat. Více informací naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* (kat. č. 4348358).

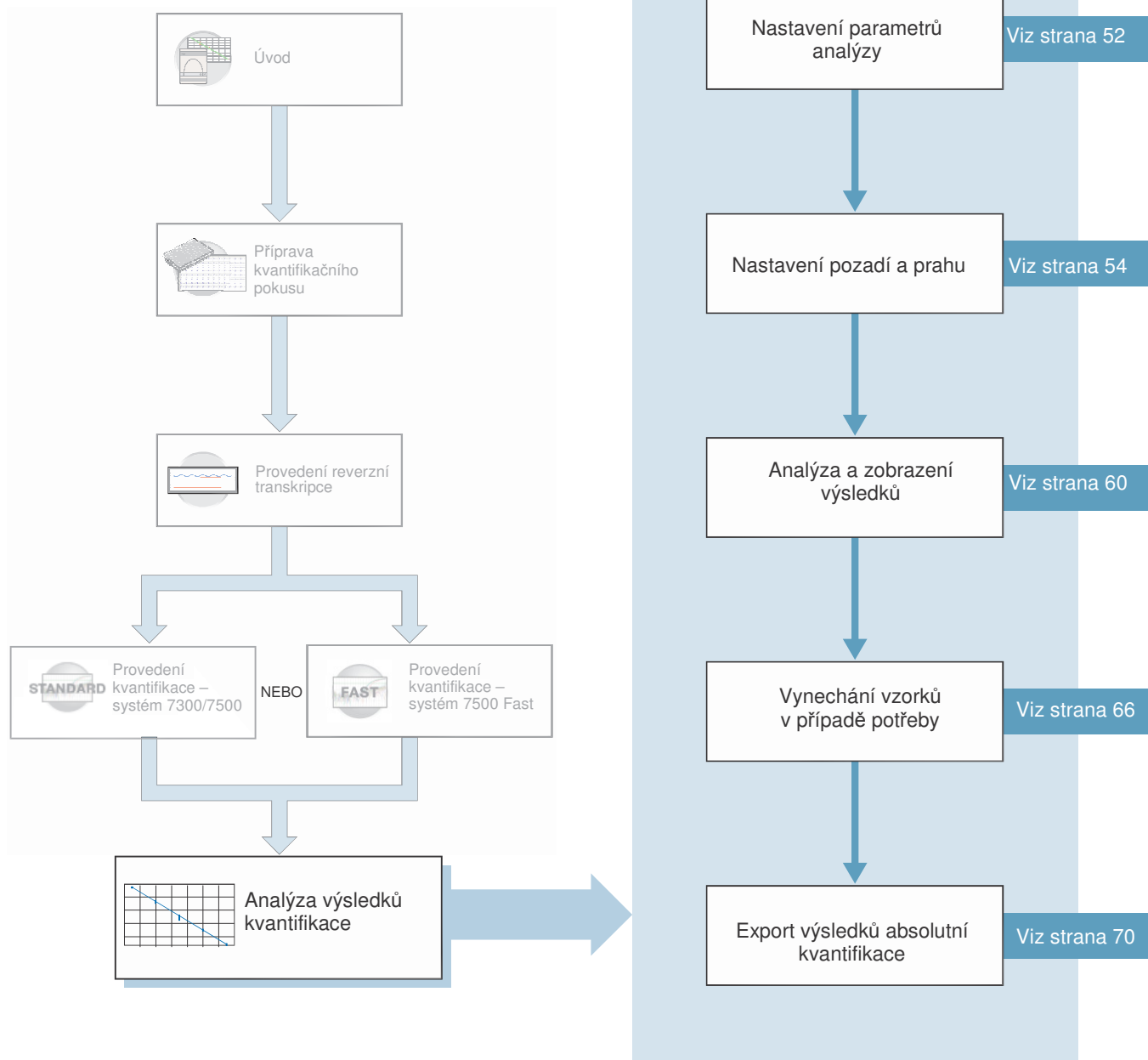
Poznámky _____



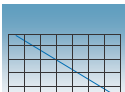
Poznámky _____



Analýza výsledků kvantifikace



Poznámky _____




Nastavení parametrů analýzy

Před vlastní analýzou dat musíte nastavit parametry této analýzy.

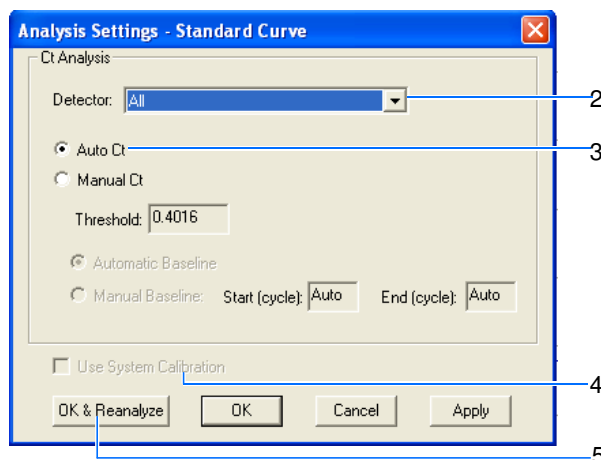
Pokud jste pro váš pokus dosud nestanovili optimální nastavení pozadí (baseline) a prahu (threshold), použijte automatické nastavení těchto parametrů, které je k dispozici v programu SDS (Auto Ct). Bylo-li nastavení pozadí a prahu provedeno správně pro všechny jamky, pokračujte zobrazením výsledků. Pokud nikoliv, musíte nastavení pozadí a prahu provést ručně, viz část [“Ruční nastavení pozadí a prahu” na straně 54](#). Níže je popsáno použití funkce automatického nastavení (auto Ct).

Chcete-li nastavit parametry analýzy:

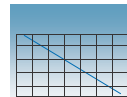
1. Klikněte  nebo **Analysis > Analysis Settings** (Analýza > Parametry analýzy).
2. V rozbalovacím menu Detectors (Detektory) zvolte **All** (Všechny).
3. Zvolte funkci **Auto Ct**. Program SDS nastaví automaticky pozadí pro každou jamku a práh pro každý detektor.

DŮLEŽITÉ! Po provedení analýzy musíte ověřit, že pozadí a práh byly pro každou jamku nastaveny správně, jak je popsáno v části [“Nastavení pozadí a prahu” na straně 54](#).

Případně můžete zvolit Manual Ct (Ruční nastavení prahu) a provést nastavení prahu a pozadí ručně. Rovněž je možné zvolit funkci Auto baseline (Automatické nastavení pozadí) a Manual Ct (Ruční nastavení prahu).



Poznámky _____



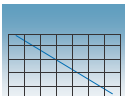
4. (Volitelné) Zvolte **Use System Calibration** (Použít soubory kalibrace systému), čímž použijete kalibrační soubory uložené v počítači, který právě používáte.

Poznámka: Ne zvolíte-li možnost **Use System Calibration**, budou použity kalibrační soubory uložené v dokumentu vaší destičky. Tyto soubory pocházejí z počítače, který byl připojen k Real-Time PCR cykleru v okamžiku analýzy destičky.

Více informací o souborech kalibrace systému naleznete v nápovědě.

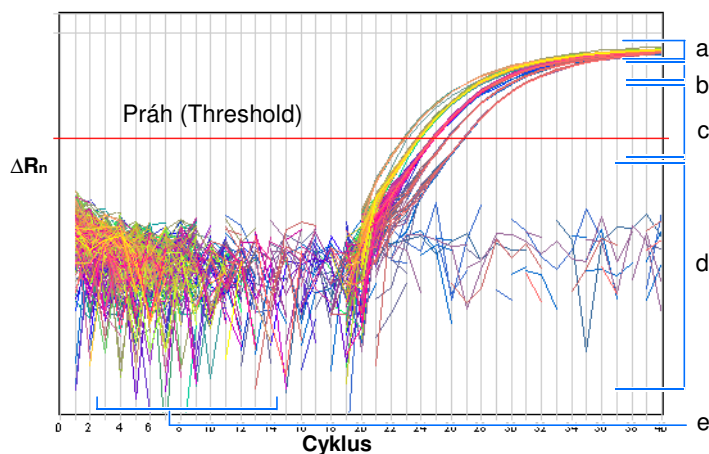
5. Klikněte **OK & Reanalyze** (OK & Analyzovat znovu).
6. Zkontrolujte graf amplifikace a v případě potřeby upravte ručně nastavení pozadí a prahu tak jak je popsáno v následující části.

Poznámky _____



Nastavení pozadí a prahu

Automatické nastavení pozadí a prahu Funkce programu SDS Manual Ct (Ruční nastavení prahu) vypočítává pozadí a práh pro každý detektor na základě předpokladu, že výsledkem amplifikace je “typický” průběh křivek.



Typická amplifikační křivka má:

- Fázi plató (Plateau) (a)
- Fázi lineární (b)
- Fázi exponenciální (geometrickou) (c)
- Pozadí (Background) (d)
- Pozadí (Baseline) (e)

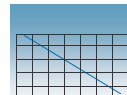
Experimentální chyby (jako např. kontaminace, chyby při pipetování apod.) mohou vést k výsledkům, které se od typického průběhu amplifikačních křivek výrazně liší. Takové výsledky pak vedou k tomu, že softwarový algoritmus nastaví pozadí a práh pro daný detektor nesprávně.

Společnost Applied Biosystems proto doporučuje, abyste po provedení analýzy provedli kontrolu nastavení pozadí a prahu pro všechny detektory. Je-li to nezbytné, nastavte tyto parametry ručně jak je popsáno na [straně 57](#).

Ruční nastavení pozadí a prahu Pokud jste pro některý z detektorů provedli nastavení pozadí a prahu ručně, proveďte pro každý detektor kroky popsané na [straně 57](#).

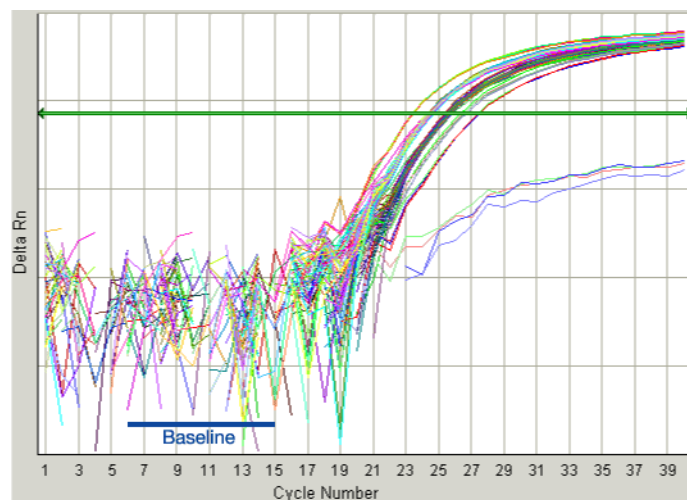
Na následujících amplifikačních grafech je demonstrován vliv nastavení pozadí a prahu.

Poznámky _____



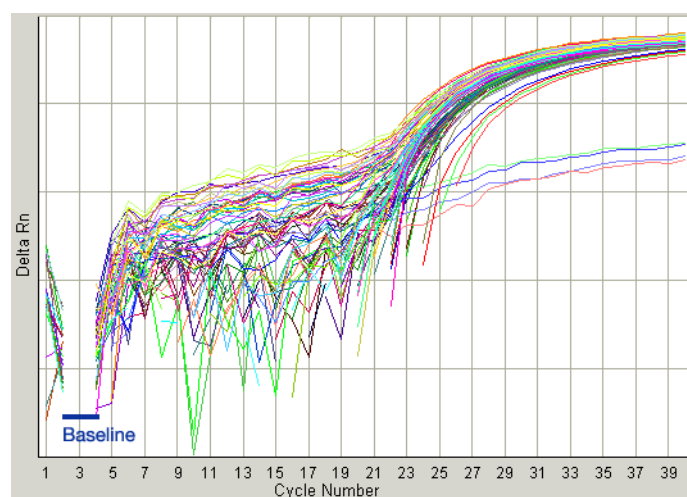
Správné nastavení pozadí (Baseline)

Amplifikační křivka začíná až po ukončení fáze pozadí. Práh je nastaven v exponenciální fázi amplifikační křivky. Žádné korekce nastavení nejsou nutné.



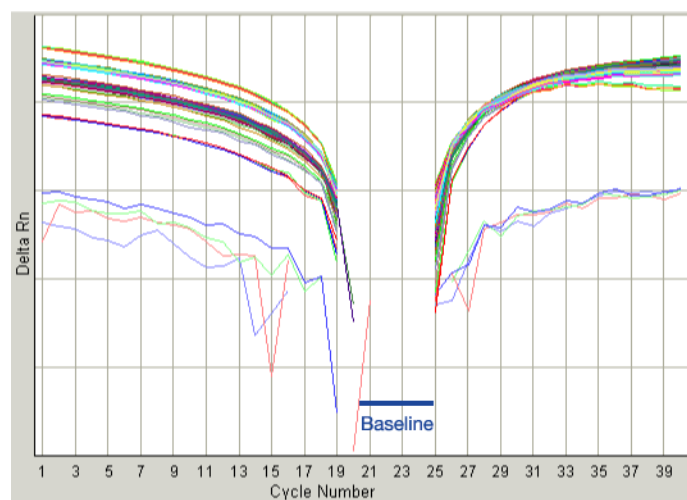
Nízké nastavení pozadí (Baseline)

Amplifikační křivka začíná příliš daleko (vpravo) od maxima pozadí. Zvyšte nastavení End Cycle (Konečný cyklus).

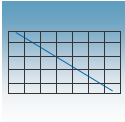


Vysoké nastavení pozadí

Amplifikační křivka začíná před maximem pozadí. Snižte nastavení End Cycle (Konečný cyklus).



Poznámky _____

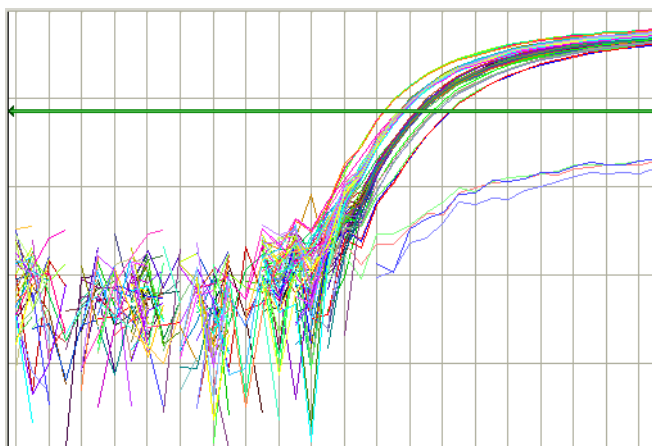


Správné nastavení prahu (Threshold)

Práh je nastaven v exponenciální fázi amplifikační křivky.

Změna nastavení prahu mimo tuto optimální hodnotu se projeví vyšší standardní odchylkou skupiny replikátů.

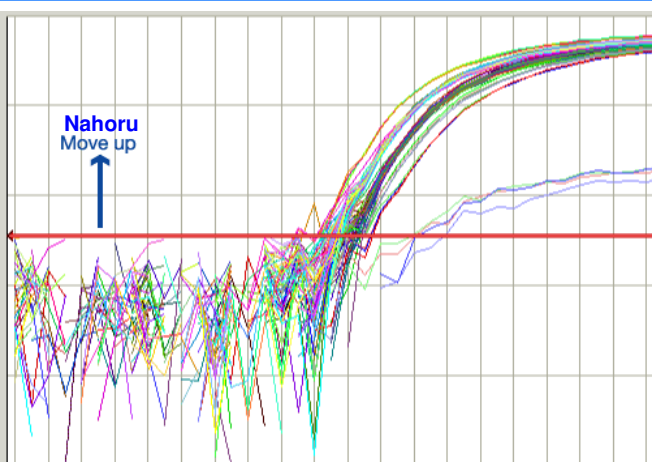
Setup Instrument Results										
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot			Standard Curve		Dissociation	Report	
Well	Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
A1	1-1	RNase P	Unknown	25.51	0.040	4788.97	4732.19	128.616		
A2	1-1	RNase P	Unknown	25.57	0.040	4581.29	4732.19	128.616		
A3	1-1	RNase P	Unknown	25.48	0.040	4877.24	4732.19	128.616		
A4	1-1	RNase P	Unknown	25.54	0.040	4681.28	4732.19	128.616		



Nízké nastavení prahu (Threshold)

Práh je nastaven před započítáním exponenciální fáze amplifikační křivky. Standardní odchylka má výrazně vyšší hodnotu než při správném nastavení prahu. Posuňte práh nahoru do exponenciální fáze křivky.

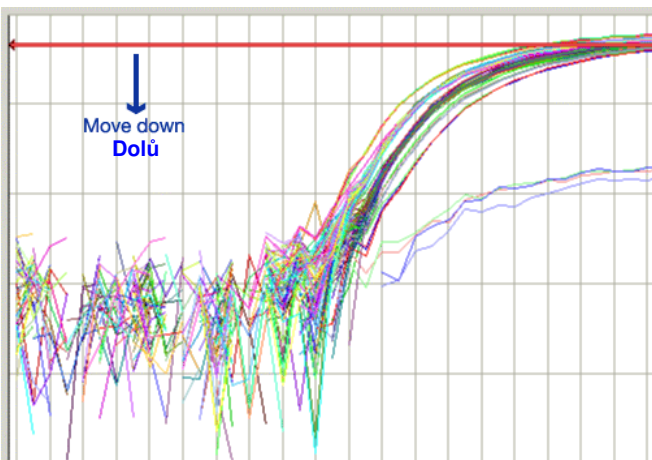
Setup Instrument Results										
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot			Standard Curve		Dissociation	Report	
Well	Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
A1	1-1	RNase P	Unknown	20.27	0.576	8146.32	4586.23	2677.676		
A2	1-1	RNase P	Unknown	21.57	0.576	2171.80	4586.23	2677.676		
A3	1-1	RNase P	Unknown	20.73	0.576	5097.34	4586.23	2677.676		
A4	1-1	RNase P	Unknown	21.28	0.576	2929.45	4586.23	2677.676		



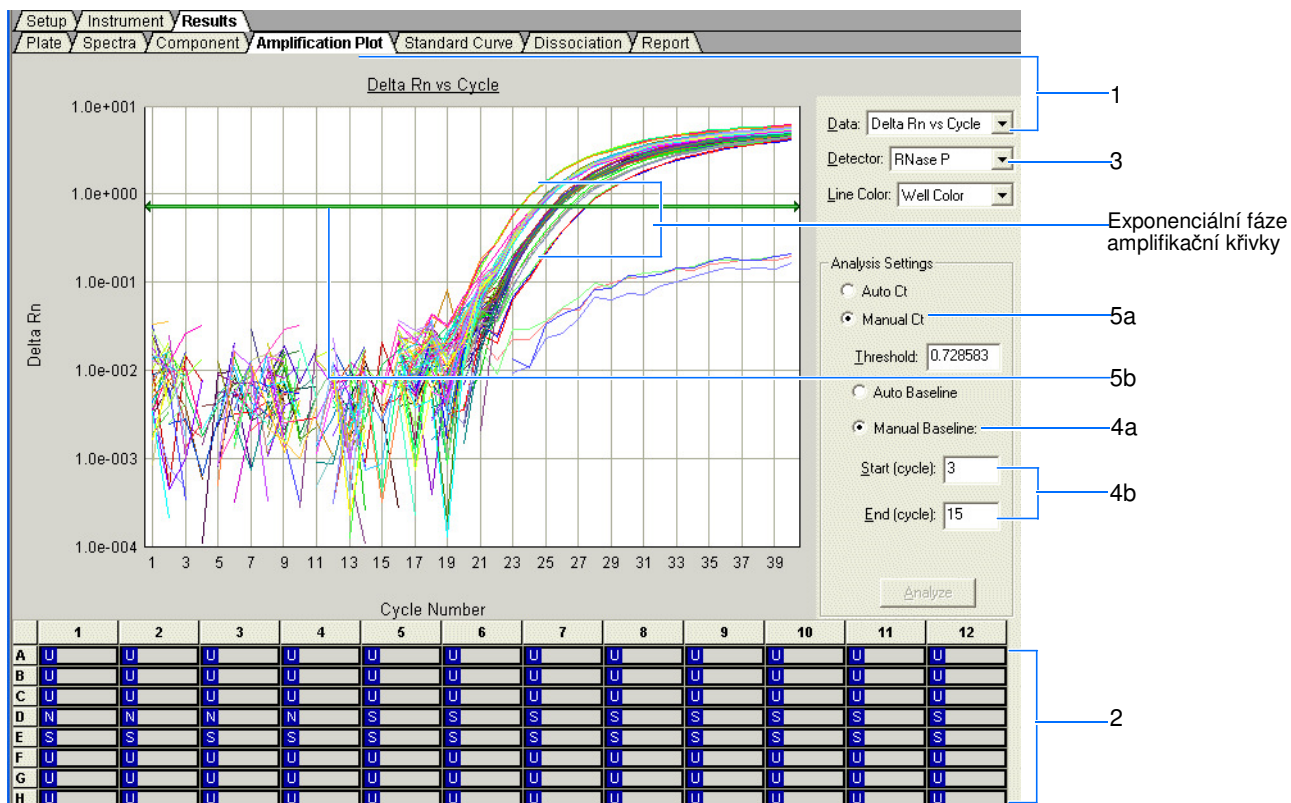
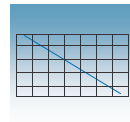
Vysoké nastavení prahu (Threshold)

Práh je nastaven až po skončení exponenciální fáze amplifikační křivky. Standardní odchylka má výrazně vyšší hodnotu než při správném nastavení prahu. Posuňte práh dolů do exponenciální fáze křivky.

Setup Instrument Results										
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot			Standard Curve		Dissociation	Report	
Well	Sample	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	
A1	1-1	RNase P	Unknown	38.24	0.481	4325.50	5015.28	683.698		
A2	1-1	RNase P	Unknown	37.81	0.481	4867.56	5015.28	683.698		
A3	1-1	RNase P	Unknown	37.08	0.481	5960.34	5015.28	683.698		
A4	1-1	RNase P	Unknown	37.78	0.481	4907.72	5015.28	683.698		



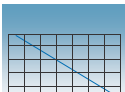
Poznámky _____



Chcete-li ručně nastavit pozadí a práh:

1. Zvolte záložku **Amplification Plot** (Amplifikační graf), následně zvolte v rozbalovacím menu Data **Delta Rn vs Cycle** (Graf závislosti Delta Rn na cyklu).
2. Zvolte jamky, které chcete zobrazit. (Jinak zůstane graf prázdný.)
3. V rozbalovacím menu Detector (Detektor) zvolte detektor. Program SDS zobrazí graf pro zvolený detektor a jamky.

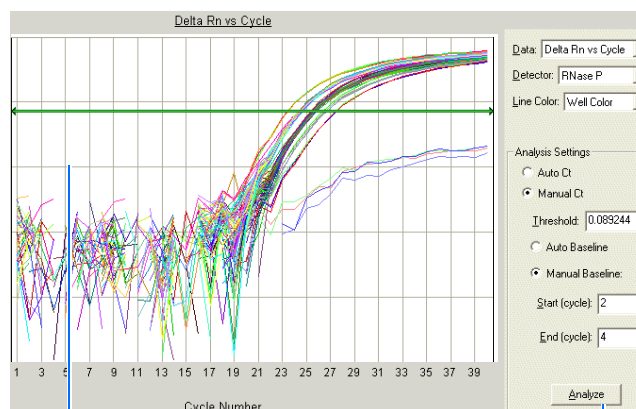
Poznámky _____



4. Nastavte pozadí pro daný detektor.

- a. V části Analysis Settings (Parametry analýzy) zvolte **Manual Baseline** (Ruční nastavení pozadí).
- b. Zadejte údaje do polí Start (cycle) a End (cycle) (Počáteční a konečný cyklus) tak, aby amplifikační křivka začínala v cyklu po nastavené hodnotě End Cycle (Konečný cyklus).

Poznámka: Jakmile změníte nastavení pozadí nebo prahu pro daný detektor, tlačítko **Analyze** (Analýza) bude aktivní, čímž je indikována nutnost provést opakovanou analýzu dat.



Posuňte nastavení prahu. Linka zčervená, což je indikace toho, že jste změnili nastavení.

Tlačítko Analyze (Analýza) bude po změně nastavení pozadí nebo prahu aktivní.

5. Nastavte práh pro daný detektor.

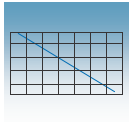
- a. V části Analysis Settings (Parametry analýzy), zvolte **Manual Ct** (Ruční nastavení prahu).
- b. Potažením nastavte práh tak, aby byl:
 - nad úrovní pozadí
 - pod plató fází a lineární fází amplifikační křivky
 - v exponenciální fází amplifikační křivky

Program SDS upraví hodnotu prahu a po analýze ji zobrazí v poli Threshold (Práh).

6. Zopakujte kroky 3 až 4 - proved'te nastavení pozadí a prahu pro každý použitý detektor.

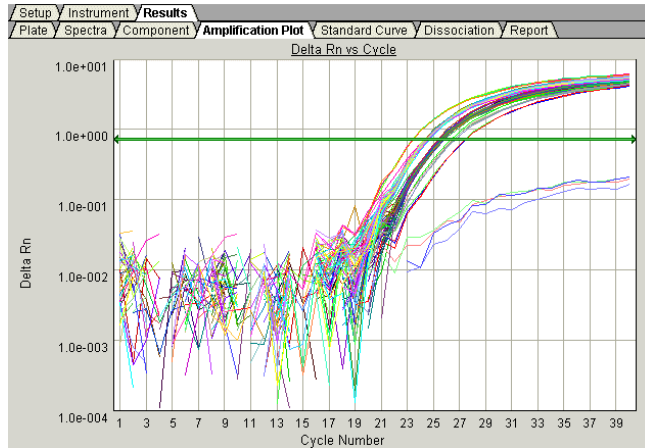
7. Klikněte **Analysis > Analyze** (Analýza > Provést analýzu) čímž zopakujete analýzu s nově nastavenými hodnotami pozadí a prahu.

Poznámky _____



Vzorový pokus

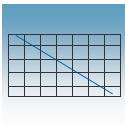
Výsledky byly nejprve analyzovány pomocí funkce automatického nastavení Ct (Auto Ct) a pozadí (Auto Baseline). Výsledkem byl tento amplifikační graf:



Po bližším prostudování je zřejmé, že nastavení pozadí a prahu je v pořádku a nevyžaduje dalších úprav:

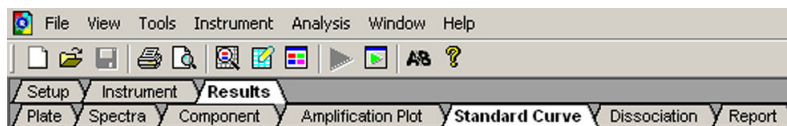
- Amplifikační křivka začíná až po konečném cyklu nastavení pozadí (baseline).
- Práh je položen v exponenciální fázi amplifikační křivky.

Poznámky _____



Analýza a zobrazení výsledků

Záložka Results (Výsledky) V záložce Results (Výsledky) jsou zobrazeny výsledky běhu a je možné zde měnit nastavení. Např. je možné vypustit z analýzy některé vzorky nebo ručně nastavit pozadí a práh. Změníte-li nastavení, musíte výsledky analyzovat znovu.

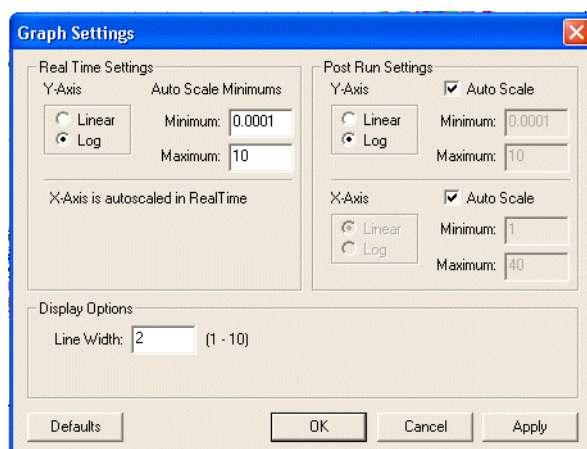


V záložce Results (Výsledky) je několik dalších záložek, které jsou popsány níže. Detailní popis je v nápovědě.

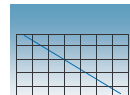
- Chcete-li se posunout na další záložku, klikněte na tabelátor.
- Chcete-li zvolit všech 96 jamek destičky, klikněte do jejího levého horního rohu.

	1	2	3	4	5	6	7
A	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U
B	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U
C	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U	SK U

- Chcete-li změnit způsob jak je zobrazen graf, poklepejte na osu y nebo x, čímž zobrazíte okno Graph Settings (Nastavení grafu). Podle typu grafu můžete změnit některá jeho nastavení.



Poznámky _____



Záložka Plate Pro každou destičku zobrazuje tyto výsledky:

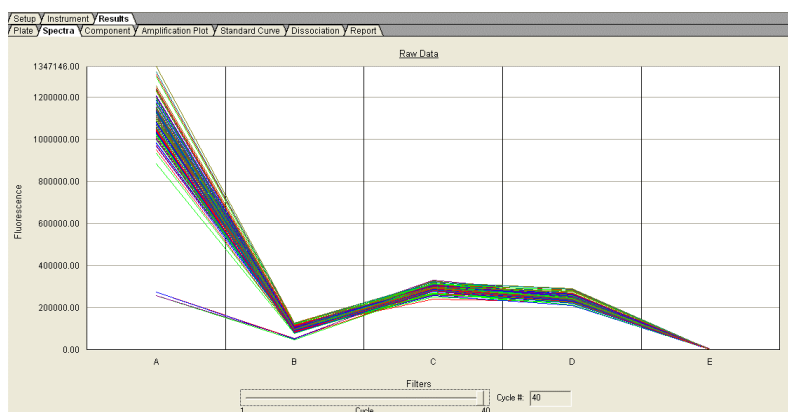
- (Destička)
- Název vzorku a úlohu a barvu detektoru pro každou jamku.
 - Vypočítané množství (přednastaveno), ΔRn nebo Ct. Zvolte **Analysis > Display** (Analýza > Zobrazení), chcete-li změnit zobrazovaný údaj.

Poznámka: Pro detektory, pro něž nebyly definovány standardy, se v záložce Plate (Destička) zobrazuje “Undet.” (undetermined - nestanovené).

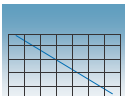
Setup		Instrument		Results				
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report		
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1-1 U 4.79e+00	1-1 U 4.58e+00	1-1 U 4.88e+00	1-1 U 4.68e+00	1-2 U 4.94e+00	1-2 U 4.60e+00	1-2 U 4.68e+00	1-2 U 4.47e+C
	B	1-4 U 4.35e+00	1-4 U 4.57e+00	1-4 U 4.20e+00	1-4 U 4.66e+00	1-5 U 4.79e+00	1-5 U 5.06e+00	1-5 U 4.75e+00
C	1-7 U 4.74e+00	1-7 U 4.74e+00	1-7 U 5.08e+00	1-7 U 5.48e+00	1-8 U 5.24e+00	1-8 U 5.54e+00	1-8 U 5.23e+00	1-8 U 5.25e+C
	D	NTC N	NTC N	NTC N	NTC N	S1 S 1.25e+00	S1 S 1.25e+00	S1 S 1.25e+00
E	S3 S 5.00e+00	S3 S 5.00e+00	S3 S 5.00e+00	S3 S 5.00e+00	S4 S 1.00e+00	S4 S 1.00e+00	S4 S 1.00e+00	S4 S 1.00e+C
	F	2-1 U 1.01e+00	2-1 U 9.90e+00	2-1 U 9.26e+00	2-1 U 9.70e+00	2-2 U 9.86e+00	2-2 U 1.02e+00	2-2 U 1.04e+00
G	2-4 U 1.03e+00	2-4 U 1.09e+00	2-4 U 9.49e+00	2-4 U 1.00e+00	2-5 U 9.09e+00	2-5 U 9.61e+00	2-5 U 9.99e+00	2-5 U 1.01e+C

Záložka Spectra (Spektra) Zobrazuje fluorescenční spektra zvolených jamek.

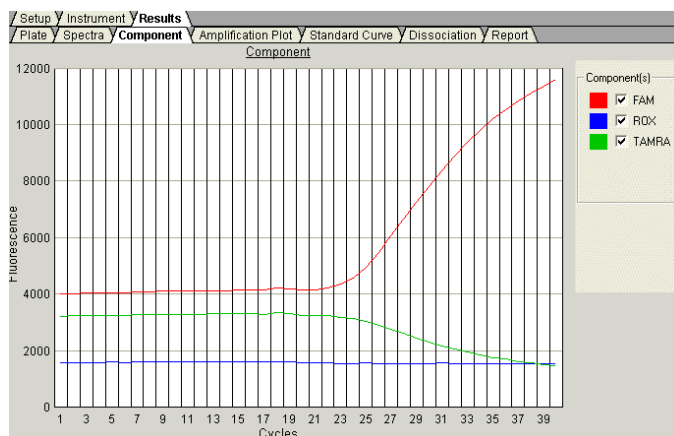
- Posuvník Cycle (cyklus) vám umožňuje zobrazit spektra pro každý jednotlivý cyklus.
- V poli Cycle # (Cyklus) se zobrazuje aktuální pozice posuvníku.



Poznámky _____



Záložka Component (Komponenty) Pro jednotlivé jamky a celý průběh PCR zobrazuje příspěvek signálu každé použité barvy do celkového spektra. Zobrazuje se vždy pouze jediná jamka.



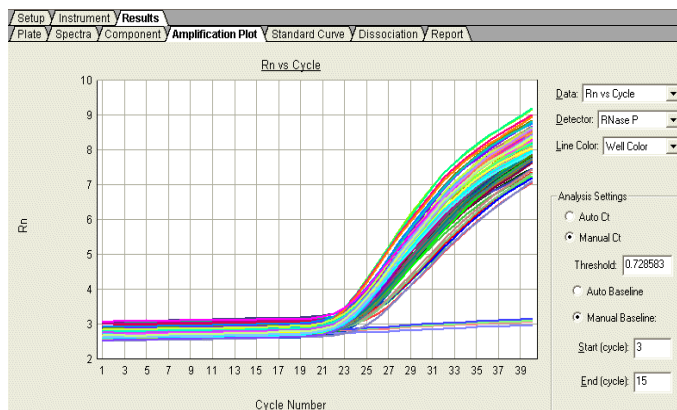
Poznámka: Používáte-li produkty TaqMan®, zobrazují se v této záložce signály tří komponent (barva ROX™, reportérová barva a barva TAMRA™ -zhášec). Používáte-li produkty TaqMan® MGB, zobrazují se pouze signály dvou komponent (ROX a reportérové barvy).

Záložka Amplification (Amplifikace)

Pro zvolené vzorky je možné zobrazit tři různé amplifikační grafy. V těchto grafech se zobrazují všechny vzorky ze zvolených jamek.

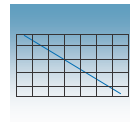
Zobrazení R_n vs. Cycle (Lineární) – Graf závislosti R_n na cyklu

Zobrazuje závislost normalizované fluorescence reportérové barvy (R_n) na cyklu. Tento graf můžete použít, chcete-li prostudovat, zda průběh amplifikačních křivek není atypický.



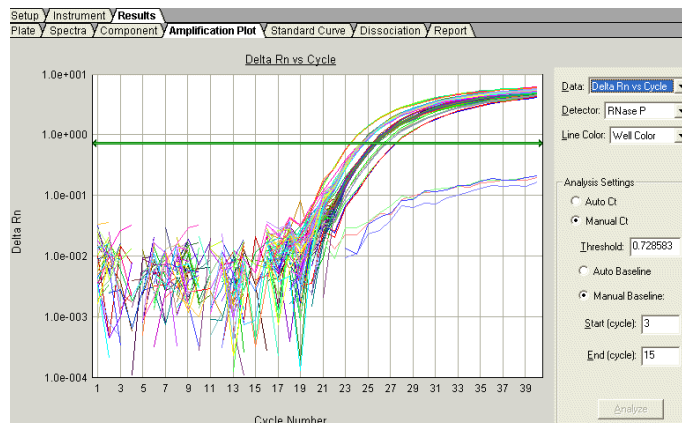
Více informací o parametru R_n naleznete v příručce *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide*.

Poznámky _____



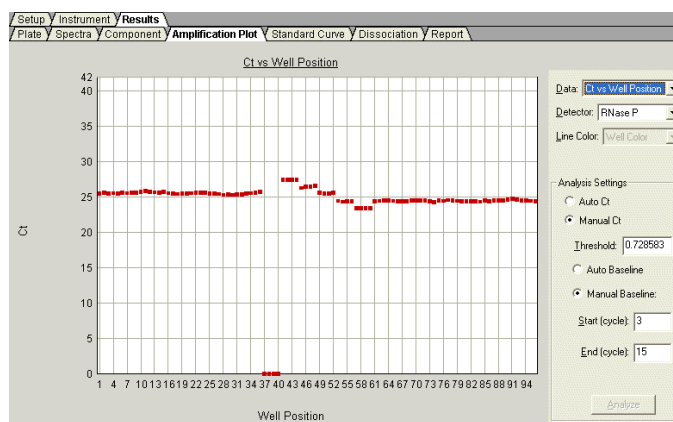
Zobrazení ΔR_n vs. Cycle (Logaritmické) – Graf závislosti ΔR_n na cyklu

Zobrazuje závislost fluorescence barvy (ΔR_n) na cyklu. Tento graf můžete použít, chcete-li prostudovat, zda průběh amplifikačních křivek není atypický, a pro ruční nastavení prahu a pozadí pro daný běh.

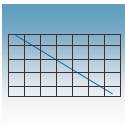


Zobrazení Ct vs. Well Position – Graf závislosti hodnoty Ct na pozici jamky

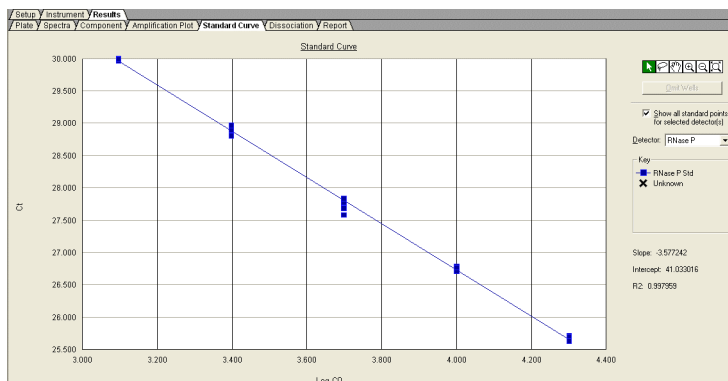
Zobrazuje hodnotu prahového cyklu (C_T) pro každou jamku. Tento graf můžete použít, chcete-li pro daný detektor vyhledat odlehle body (outliers) (viz [“Vynechání vzorků”](#) na straně 66).



Poznámky _____

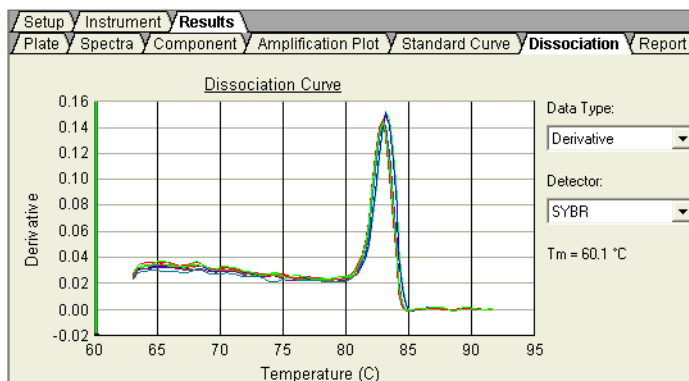


Standardní křivka Zobrazuje standardní křivku, vytvořenou na základě vzorků, označených jako standardy. Program SDS vypočítává množství kvantifikované cílové sekvence ze standardní křivky pro detektor této cílové sekvence.



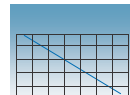
Disociační křivka Zobrazuje křivky teploty tání (T_m). Tyto křivky jsou zobrazeny při použití barvy SYBR® Green pokud:

- V záložce Instrument (Přístroj) bylo zvoleno provedení disociační křivky
- Jako esej byla zvolena disociace (Dissociation)



Analýza disociační křivky je popsána v [Příloze C](#) na [straně 77](#) a v [návodě](#).

Poznámky _____

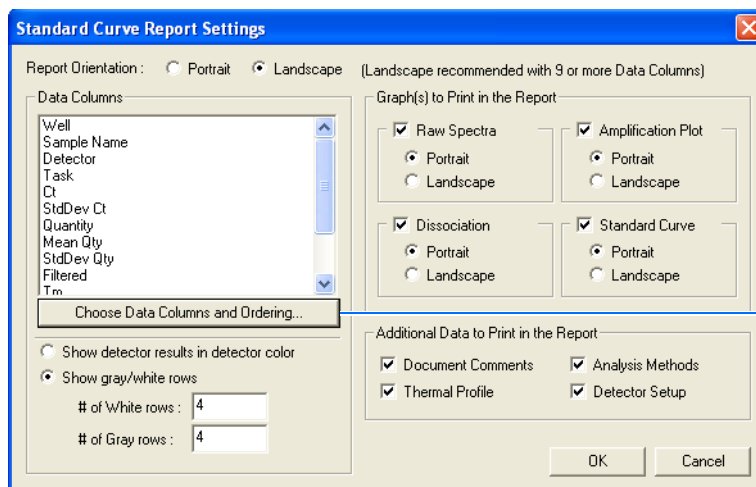


Report (Zpráva) Pro zvolené jamky zobrazuje v tabulce uspořádané výsledky. To jaké sloupce jsou zobrazeny je dáno typem eseje. Při provádění absolutní kvantifikace se zobrazují následující sloupce: Well (Jamka), Sample Name (Název vzorku), Detector (Detektor), Task (Úloha detektoru), Ct, StdDev Ct (Standardní odchylka Ct), Quantity (Množství), Mean Qty (Průměrné množství), StdDev Qty (Standardní odchylka množství), Filtered (Chybové hlášky analýzy), Tm a tři uživatelsky nastavitelné sloupce (jejich nastavení je popsáno v nápovědě).

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	St
A1	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A2	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A3	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A4	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A5	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A6	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A7	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A8	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A9	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A10	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A11	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
A12	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
B1	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
B2	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
B3	5K	RNase P	Unknown	28	0.066
B4	5K	RNase P	Unknown	28	0.066

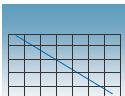
Poznámka: Chcete-li výsledky uspořádat podle některého ze sloupců, klikněte do jeho záhlaví (první kliknutí – uspořádání od A do Z, druhé kliknutí – uspořádání od Z do A).

V dialogovém okně Report Settings (Nastavení zprávy) můžete zvolit způsob zobrazení výsledků a vtištění zprávy. Tato nastavení lze použít i v případě exportu výsledků (viz **“Export výsledků absolutní kvantifikace” na straně 70**). Více informací o tomto dialogovém okně naleznete v nápovědě.



Více možností nastavení se zobrazí po kliknutí na **Choose Data Columns and Ordering** (Volba sloupců a jejich uspořádání).

Poznámky _____



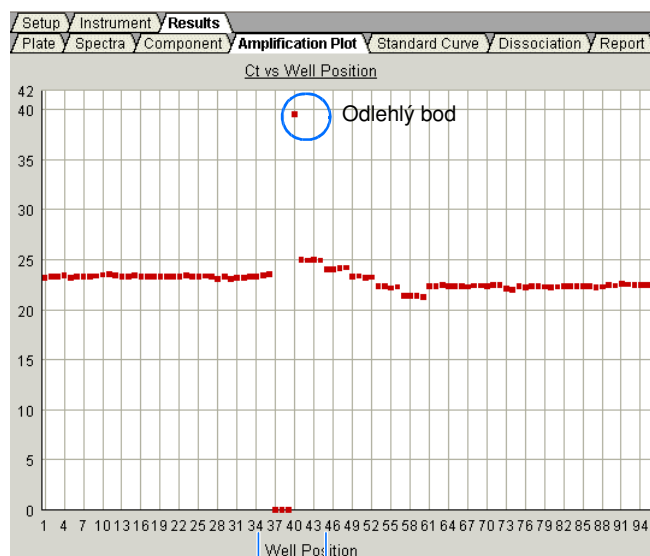
Vynechání vzorků

V důsledku experimentální chyby je možné, že některé jamky budou amplifikovány nedostatečně a nebo vůbec. V takových jamkách pak získáte C_T hodnoty, které se výrazně liší od průměru dané skupiny replikátů. Pokud je zahrnete do výpočtu, mohou tyto odlehle body (outliers) vést ke zkreslení výsledků měření.

Chcete-li dosáhnout maximální přesnosti, pečlivě zkontrolujte, zda v dané skupině replikátů není nějaký odlehle bod. Tyto odlehle body můžete z analýzy odstranit v amplifikačním grafu C_T vs. Well Position – Graf závislosti hodnoty C_T na pozici jamky nebo v grafickém vyobrazení standardní křivky.

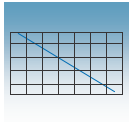
Vynechání odlehle bodů v amplifikačním grafu

1. Zvolte záložku **Amplification Plot** (Amplifikační graf).
2. V rozbalovacím menu Data zvolte **C_T vs Well Position** (Graf závislosti hodnoty C_T na pozici jamky).
3. Označte jamky a porovnejte C_T hodnoty pro každou skupinu replikátů.
4. Naleznete-li odlehle bod, vyhledejte odpovídající jamku:
 - a. Na ose x odečtěte o jakou jamku se přibližně jedná.

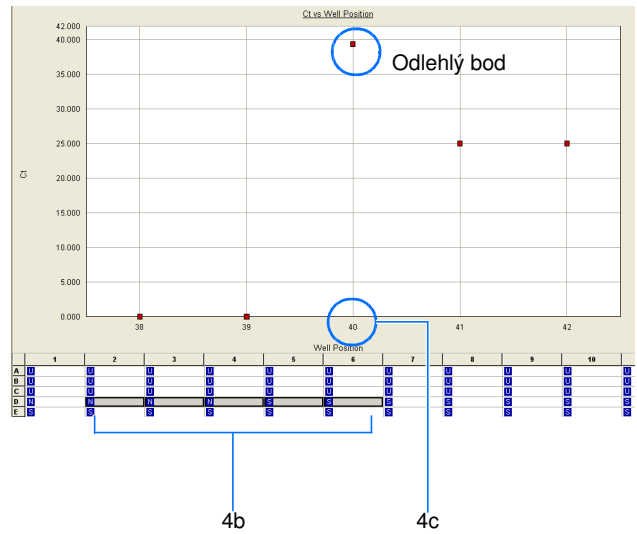


4a

Poznámky _____




- b. Ve vyobrazení destičky označte několik jamek v rozsahu, který zahrnuje i přibližně definovanou jamku.
V grafu se zobrazí pouze označené jamky.
- c. V grafu stanovte o jakou jamku (odpovídající odlehlému bodu) se přesně jedná.

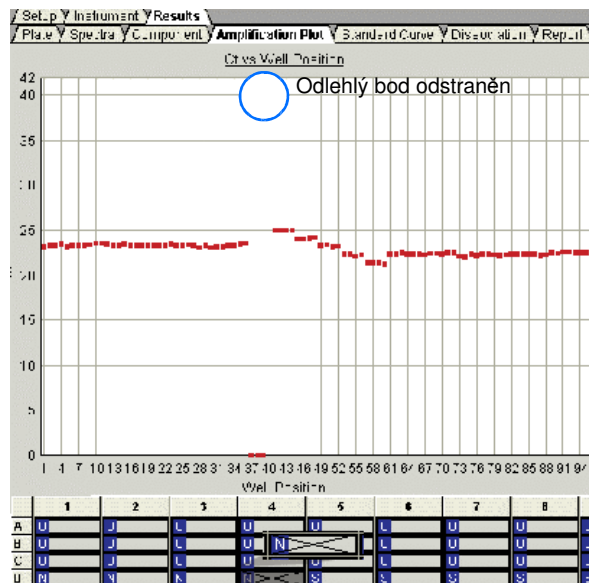


- d. Zvolte **View > Well Inspector** (Zobrazit > Prohlížeč jamek), následně pro danou jamku zatrhněte políčko **Omit Well** (Vynechat jamku).

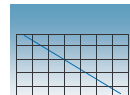
Poznámky _____



5. Klikněte  nebo **Analysis > Analyze** (Analýza > Parametry analýzy), čímž zopakujete analýzu bez vynechané jamky.
6. Opakujte kroky 4 a 5 i pro další jamky dle vaší volby.






Poznámky _____

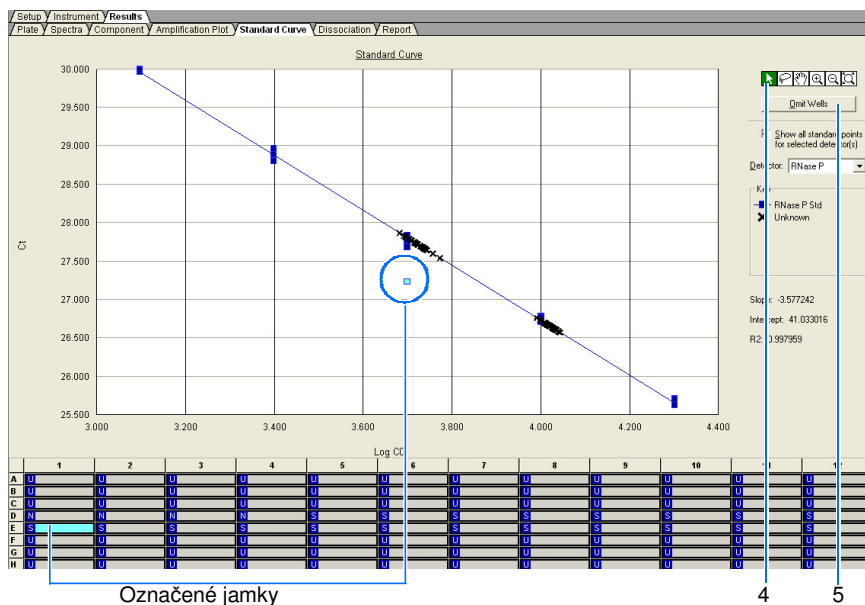


Odstranění odlehlých bodů standardní křivky

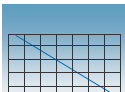
1. Zvolte záložku **Standard Curve** (Standardní křivka).
2. Ve vyobrazení destičky označte všechny jamky.
3. Vyhledejte odlehlé body.

Poznámka: Chcete-li zobrazení zvětšit, klikněte na  (Zoom In), následně klikněte do grafu standardní křivky (nebo kliknutím označte skupinu jamek).

4. Naleznete-li odlehlý bod, klikněte  (Select - Zvolit), následně klikněte na tento odlehlý bod, čímž označíte příslušnou jamku (nebo kliknutím označte skupinu jamek).
5. Klikněte **Omit Wells** (Vynechat jamky) (nebo klikněte pravým tlačítkem myši a zvolte **Omit Wells** – Vynechat jamky).
6. Klikněte  nebo **Analysis > Analyze** (Analýza > Parametry analýzy), čímž zopakujete analýzu bez odlehlého bodu.
7. Opakujte kroky 4 až 6 pro další odlehlé body, které chcete odstranit.



Poznámky _____



Export výsledků absolutní kvantifikace

Číselné údaje můžete exportovat ve formě textových souborů, které lze následně importovat do tabulkových editorů jako např. Microsoft® Excel®. Grafy lze exportovat ve formátu prezentací pro Microsoft® PowerPoint® nebo ve formátu JPEG.

Poznámka: Chcete-li exportovat grafy do programu PowerPoint, musíte mít tento program instalován.

Export dat do tabulkového editoru:

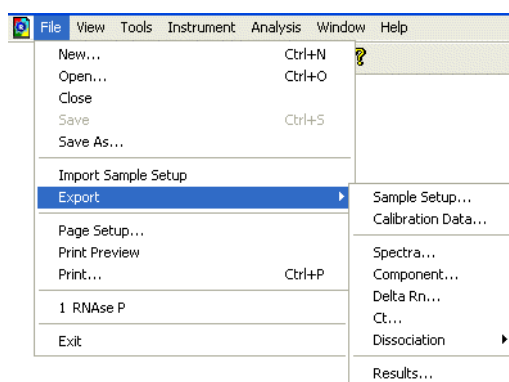
1. Zvolte **File > Export** (Soubor > Export), následně zvolte, co chcete exportovat.
 - **Sample Setup** (*.txt) – Popis vzorků
 - **Calibration Data** (*.csv) – Kalibrační údaje
 - **Spectra** (*.csv) - Spektra
 - **Component** (*.csv) - Komponenty
 - **Delta Rn** (*.csv)
 - **Ct** (*.csv)
 - **Dissociation** (*.csv) - Disociace
 - **Results** - Výsledky

Více informací o typech souborů pro export dat naleznete v nápovědě.

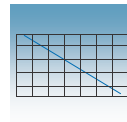
2. Zadejte název exportovaného souboru.
3. Klikněte **Save** (Uložit).

Export dat pro zvolené jamky a/nebo vybrané sloupce výsledků do tabulkového editoru:

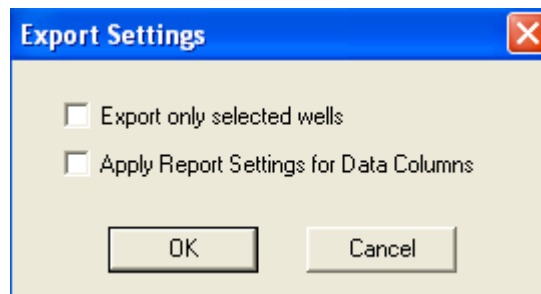
1. Zvolte **File > Export > Results** (Soubor > Export > Výsledky).
2. Zadejte název exportovaného souboru.
3. Klikněte **Save** (Uložit). Otevře se dialogové okno Export Settings (Nastavení exportu).



Poznámky _____



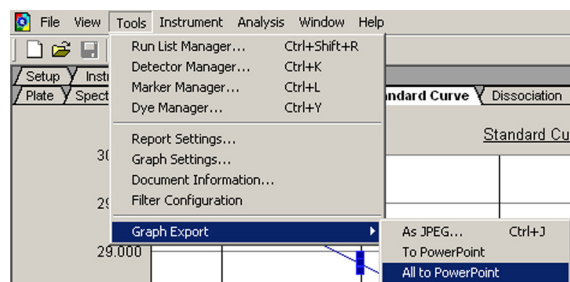
4. (Volitelné) Zvolte nastavení exportu:
 - **Export only selected wells** - exportuje pouze vybrané jamky
 - **Apply Report Settings for Data Columns** – exportuje sloupce zvolené v dialogovém okně Report Settings (Nastavení zprávy, viz “Zpráva” na straně 65).



5. Klikněte **OK**.

Export grafů do programu PowerPoint:

1. Zvolte **Tools > Graph Export > All to PowerPoint** (Nástroje > Export grafu > Vše do PowerPointu) (nebo klikněte pravou myší v jakémkoliv grafu nebo destičce a zvolte **Export All To PowerPoint** – Exportovat vše do PowerPointu).




Do PowerPointu budou exportovány náhledy ze všech záložek aktivního souboru (vyjma záložky Results > Report – Výsledky > Zpráva).

Poznámka: Chcete-li exportovat pouze aktuálně zobrazenou záložku, zvolte **Tools > Graph Export > To PowerPoint** (Nástroje > Export grafu > Do PowerPointu) (nebo klikněte pravou myší v jakémkoliv grafu nebo destičce a zvolte **Export To PowerPoint** – Exportovat do PowerPointu).

2. Potvrďte export do PowerPointu kliknutím **OK**. PowerPoint se otevře a zobrazí vaši prezentaci.

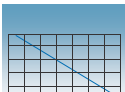
Poznámka: Do prezentace jsou automaticky přidány úvodní a informační snímek.

3. (Volitelné) Vaši prezentaci můžete v PowerPointu upravit.
4. Prezentaci v PowerPointu uložíte kliknutím na  (Save - Uložit).

Export vyobrazení destiček nebo grafů ve formátu JPEG:

1. Zvolte **Tools > Graph Export > As JPEG** (Nástroje > Export grafu > Jako JPEG) případně klikněte pravou myší v jakémkoliv grafu nebo destičce a zvolte **Export as JPEG** (Export ve formátu JPEG).

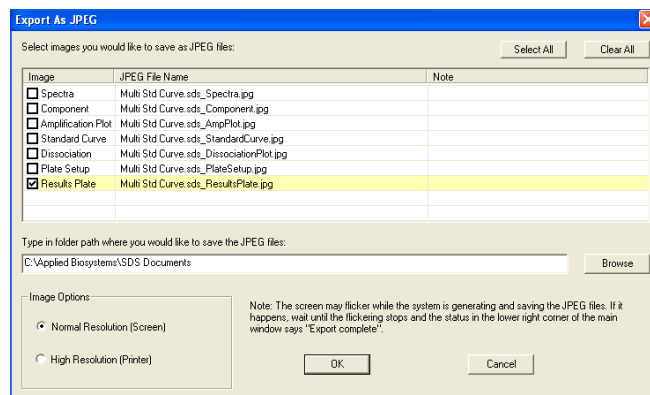
Poznámky _____



Otevře se dialogové okno Export as JPEG (Export ve formátu JPEG).

Poznámka: V tomto dialogovém okně můžete změnit přednastavené názvy souborů, zvolit rozlišení obrázku a zvolit, která vyobrazení destiček nebo grafy mají být exportovány a kde mají být exportované soubory uloženy. Více informací naleznete v nápovědě.

2. Klikněte **OK**.



Poznámky _____

Vytvoření detektorů

A

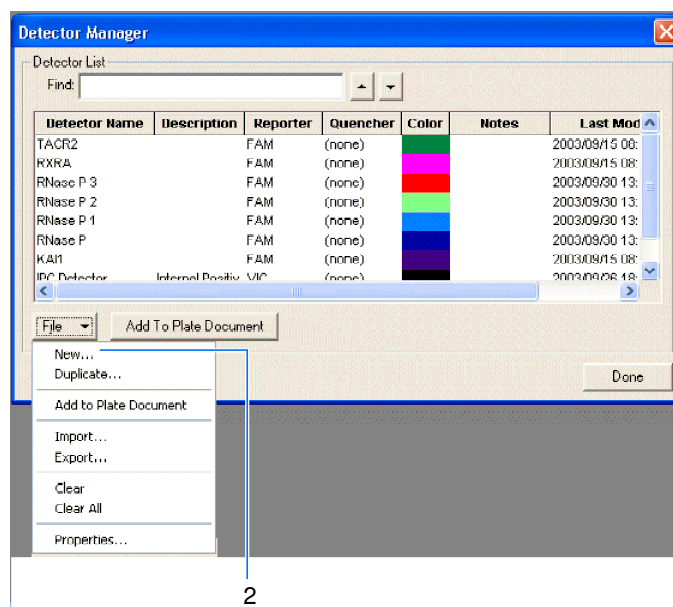
Před vytvořením dokumentu destičky a spuštěním běhu musíte definovat detektory pro všechny vzorky na destičce. Detektor je virtuálně vyjádřená genově nebo alelově specifická kombinace primerů a sondy, které jsou používány v dané eseji.

Chcete-li vytvořit detektor:

1. Zvolte **Tools > Detector Manager** (Nástroje > Správce detektorů).

Poznámka: Nabídka Tools (Nástroje) je přístupná pouze je-li otevřen dokument destičky (jakýkoliv).

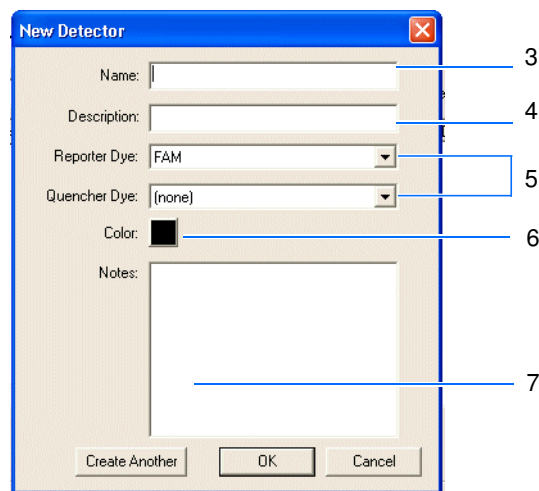
2. V okně Detector Manager zvolte **File > New** (Soubor > Nový) .



3. V dialogovém okně New Detector (Nový detektor) zadejte název (Name) detektoru.

DŮLEŽITÉ! Název detektoru musí být unikátní a měl by souviset s cílovým lokusem dané eseje (jako GAPDH nebo RNáza P). Nepoužívejte totéž jméno pro více detektorů.

4. V poli **Description** (Popis) můžete zadat stručný popis detektoru.



Poznámky _____

5. V rozbalovacích nabídkách Reporter Dye (Reportérová barva) a Quencher Dye (Zhášec) zvolte odpovídající barvy detektoru.

Poznámka: V těchto rozbalovacích nabídkách máte k dispozici pouze ty barvy, které byly předešle zadány pomocí Správce barev (Dye Manager). Pokud chcete použít barvu, která není na seznamu, použijte Správce barev (Dye Manager) pro její přidání a vraťte se zpět do tohoto kroku. Více informací naleznete v nápovědě.

Poznámka: Pro sondy TaqMan® zvolte zhášec **TAMRA** a pro sondy TaqMan MGB zvolte možnost **None** (Žádný).

6. Klikněte do políčka **Color** (Barva) a v dialogovém okně Color (Barva) vyberte barvu pro daný detektor, potvrďte **OK**.
7. Do pole **Notes** (Poznámky) můžete zadat další údaje pro daný detektor.
8. Klikněte **OK**, čímž detektor uložíte a vrátíte se zpět do okna Správce detektorů (Detector Manager).
9. Opakujte [kroky 2 až 8](#) i pro zbývající detektory.
10. Po přidání dalších detektorů klikněte ve správci detektorů **Done** (Hotovo).

Poznámka: **TaqMan® Gene Expression Assays** (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese) jsou dodávány s informačním souborem (assay information file - AIF). Tento textový soubor obsahuje informace o vámi objednaných esejích včetně identifikátoru eseje (ID number), umístění eseje v jamce, koncentrace primerů a jejich sekvence. Rovněž jsou zde informace o reportérových barvách a zhášečích, používaných v dané esejí. Při vytváření detektorů použijte informaci o těchto reportérových barvách a zhášečích a případně názvy genů nebo symboly názvů vzorků. Obsah informačního souboru (AIF) můžete zobrazit v tabulkovém editoru jako např. Microsoft® Excel®.

Vzorový pokus

Ve vzorovém pokusu byl vytvořen jediný detektor pro jedinou kvantifikovanou cílovou sekvenci. Detektor byl nazván RNase P (RNáza P) a označen modrou barvou. Použitá sonda byla typu TaqMan MGB a značená barvou FAM™. Sondy typu TaqMan MGB nesou nefluorescenční zhášec.

V pokusech, kde jsou kvantifikovány dvě nebo více cílových sekvencí, je nutné pro každou z nich vytvořit detektor.

Poznámky _____

Doporučení pro vytváření standardních křivek

Metodika absolutní kvantifikace pomocí systémů 7300/7500/7500 Fast požaduje, aby množství používaných standardů bylo stanoveno jiným nezávislým způsobem. Pro přípravu standardů se běžně používají plazmidová DNA nebo *in vitro* transkribovaná RNA. Jejich koncentrace se stanovuje pomocí A_{260} a přepočítává se na počet kopií pomocí molekulární hmotnosti DNA nebo RNA.

Pro správné používání standardních křivek je nutné dodržet následující pokyny:

- Musí se jednat o čistý izolát DNA nebo RNA. Plazmidy připravené izolací z *E. coli* bývají často kontaminované RNA, což zvyšuje hodnotu A_{260} a zkresluje výpočet počtu kopií plazmidu.
- Jelikož ředící řada standardu musí mít koncentrace v rozsahu několika řádů, je zapotřebí přesně pipetovat. Plazmidová DNA nebo *in vitro* transkribovaná RNA musí být pro správné stanovení A_{260} dostatečně koncentrované. Tato koncentrovaná DNA nebo RNA musí být ředěna 10^6 až 10^{12} -krát, aby měla koncentraci srovnatelnou s koncentracemi v biologických vzorcích.
- Důležitým faktorem je stabilita ředěných standardů, zejména RNA. Rozdělte naředěné standardy do malých alikvotů, uložte je při -80 °C a nechte je roztát pouze jedenkrát těsně před použitím. Příklad postupu jak připravit spolehlivé standardy naleznete v Collins, *et al.* (1995), kde je popsán postup přípravy RNA standardů při kvantifikaci virové nálože.
- Obecně není možné používat DNA jako standard pro absolutní kvantifikaci RNA, protože neumožňuje kontrolovat efektivitu kroku reverzní transkripce.

Poznámky _____

Poznámky _____

Analýza disociační křivky

Přehled

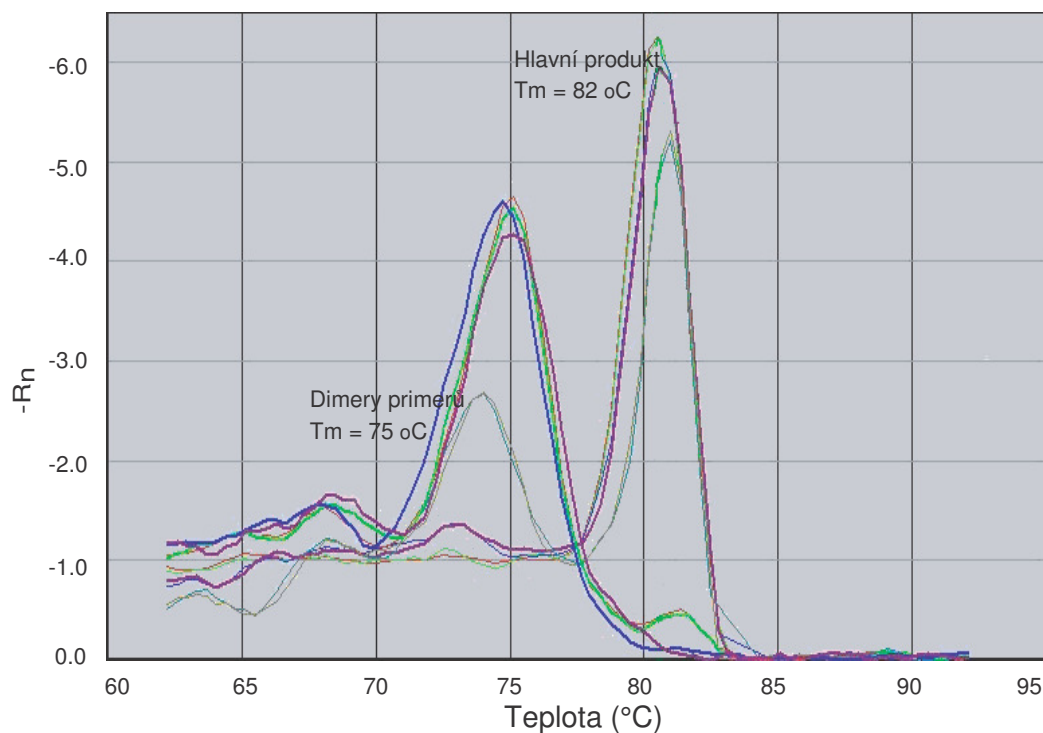
Za použití systémů 7300/7500/7500 Fast lze provádět analýzu disociace nukleových kyselin pomocí barviva SYBR® Green I. Účelem takové analýzy (analýza disociační křivky – křivky tání) je stanovit teplotu tání (melting temperature - T_m) cílové sekvence nukleové kyseliny v neznámém vzorku. V typickém případě se disociační křivky používají pro analýzu přítomnosti nespecifických produktů a při optimalizaci koncentrace primerů.

Celá procedura je zahájena přípravou PCR destičky se vzorky a barvivem SYBR Green I. Destička je následně analyzována v přístroji, který byl naprogramován tak, aby pomalu (během několika minut) zvyšoval teplotu.

Vazebné vlastnosti barviva SYBR Green I umožňují monitorovat proces hybridizace nukleových kyselin. V průběhu analýzy přístroj zaznamenává pokles fluorescence barviva SYBR Green vzniklý v důsledku disociace dvouřetězcové DNA.

Výsledky

Na následujícím obrázku je znázorněn typický průběh disociační křivky detekující vznik nespecifických produktů při amplifikaci vzorků cDNA.



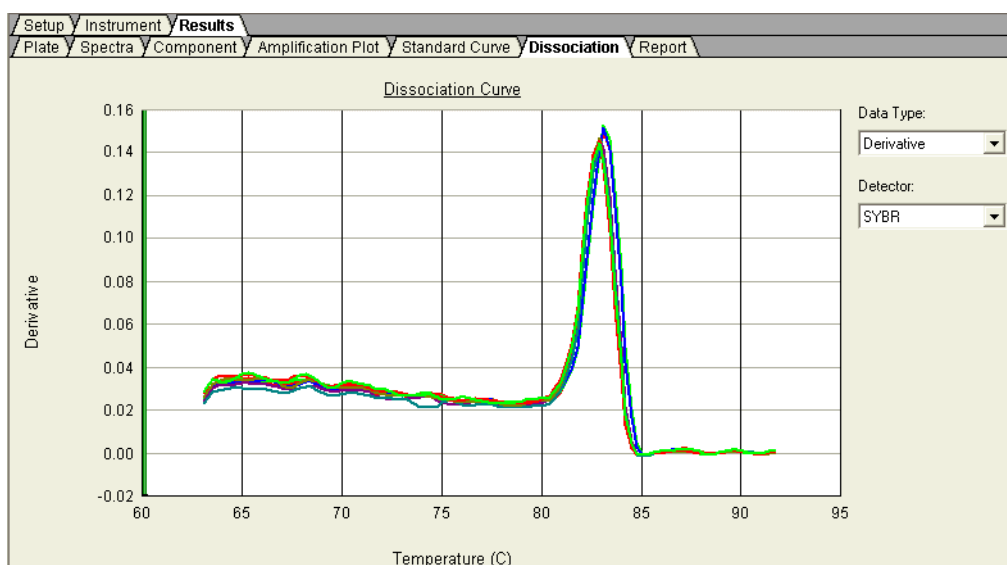
Poznámky _____

Obrázek znázorňuje dva amplifikační píky, což je známka amplifikace dimerů primerů. Amplifikace specifického produktu je signalizována píkem o T_m 82 °C, zatímco produkt odpovídající dimeru primerů má typicky nižší T_m 75 °C.

Zobrazení disociační křivky

Chcete-li zobrazit disociační křivku, zvolte záložku **Dissociation** (Disociace) a v poli Data Type (Typ zobrazení) zvolte:

- **Derivative** (Derivace) – Zobrazí graf závislosti první derivace rychlosti změny fluorescence na teplotě.
- **Raw** (Hrubá data) – Zobrazí graf závislosti fluorescence na teplotě.



V nápovědě naleznete informace o tom, jak provádět analýzu disociační křivky pomocí systémů 7300/7500/7500 Fast.

Pokusy zahrnující analýzu disociační křivky

Podrobné vysvětlení chemizmu barviva SYBR Green I (váže se na dvouřetězcovou DNA) naleznete v příručkách:

- *SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol* (kat. č. 4304965)
- *SYBR® Green PCR Master Mix Protocol* (kat. č. 4310251)

Kity pro analýzu disociační křivky

Společnost Applied Biosystems nabízí následující kity:


Kit	Katalogové číslo
SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179
SYBR® Green PCR Core Reagents	4304886
SYBR® Green PCR Master Mix	4309155
<i>Power SYBR® Green PCR Master Mix</i>	4367659

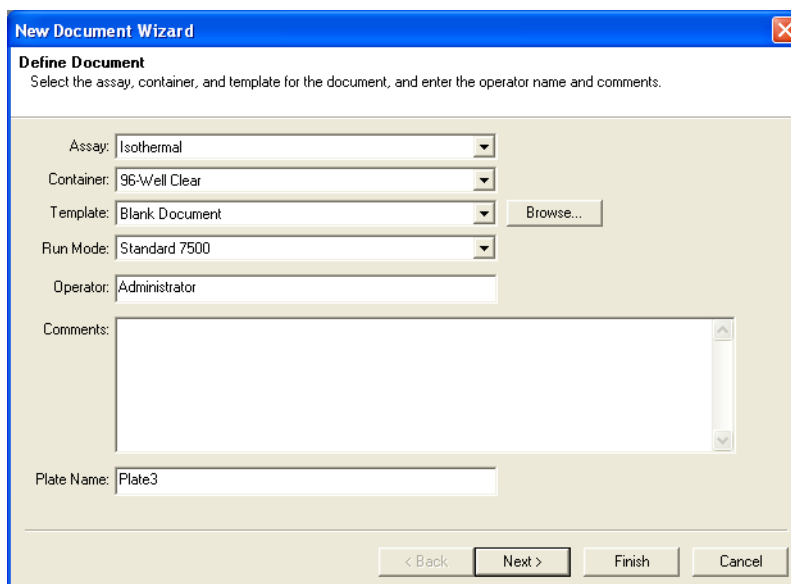
Poznámky _____

Izotermické pokusy

Na přístrojích 7300/7500/7500 Fast lze provádět izotermické pokusy.

Zadání
izotermického
pokusu

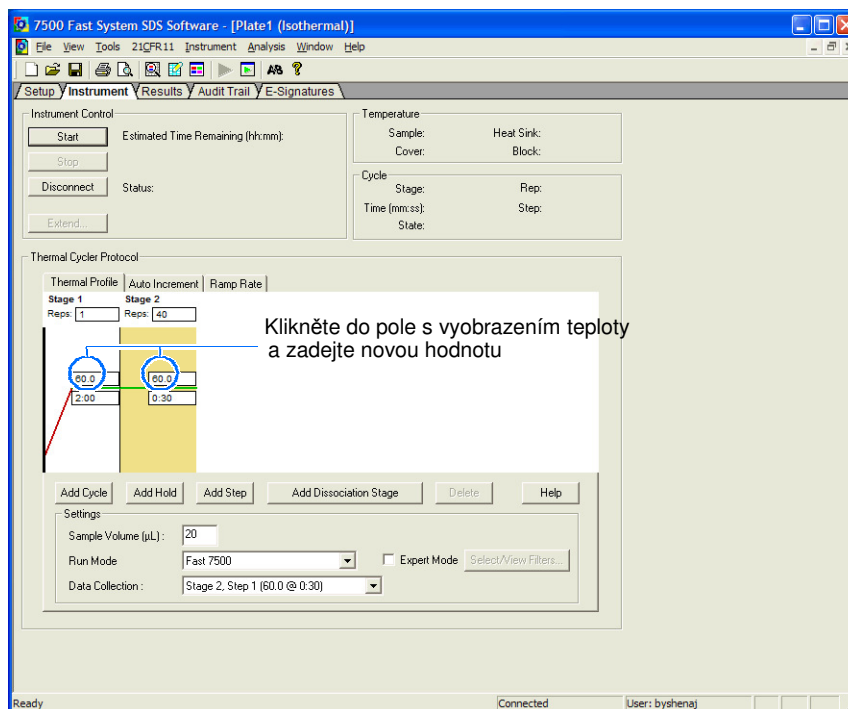
1. Zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast System > 7300/7500/7500 Fast System Software** () čímž spustíte SDS Software.
2. V dialogovém okně Quick Startup document zvolte **Create New Document** (Vytvořit nový dokument).
3. V rozbalovacím menu Assay (Esej) v okně New Document Wizard (Průvodce vytvořením nového dokumentu) zvolte **Isothermal** (Izotermický).



4. Definujte parametry destičky tak jak je popsáno v části **“Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci”** na straně 24 (systém 7300 nebo Standard 7500) nebo na straně 38 (systém 7500 Fast).
5. Klikněte na záložku **Instrument** (Přístroj) čímž zobrazíte teplotní profil.
6. (Volitelné) Klikněte **Add Cycle** (Přidat cyklus), **Add Hold** (Přidat krok inkubace) nebo **Add Step** (Přidat krok) čímž přidáte další fáze izotermického pokusu.

Poznámky _____

- (Volitelné) Chcete-li změnit přednastavenou teplotu 60 °C, klikněte do pole s vyobrazením teploty a zadejte novou hodnotu.



- (Volitelné) Klikněte **Add Dissociation Stage** (Přidat krok disociace).

Poznámka: Krok disociace používá standardní teplotní nastavení a nikoliv nastavení izotermického pokusu.

- Dále postupujte tak jak je popsáno v částech “[Nastavení teplotního profilu a spuštění běhu](#)” na straně 29 (systém 7300 nebo Standard 7500) nebo na straně 43 (systém 7500 Fast).

Poznámky _____

Absolutní kvantifikace – vzorový pokus

Popis Účelem vzorového pokusu absolutní kvantifikace je stanovit počet kopií genu pro RNázu P ve dvou skupinách vzorků (replikátů).

Pokus probíhá jako singleplex PCR (jediná reakce ve zkumavce) a primery a sondy jsou navrženy za použití programu Primer Express®.

Sériovým ředěním vzorku o známém množství templátu se připraví ředící řada standardů.

Vzorky i standardy jsou umístěny v jediné destičce a výsledky jsou po provedení běhu analyzovány za použití softwaru pro systémy 7300/7500/7500 Fast.

Poznámky _____

Vzorový pokus - postup

1. Proved'te návrh pokusu. (Viz [Kapitola 2 na straně 10](#)).
 - a. Označte neznámé vzorky, připravte standardní křivku a definujte počet replikátů.
 - b. Objednejte si reagentie pro provádění kvantifikace pomocí sond TaqMan® nebo navrhnete primery a sondy pomocí programu Primer Express®.
2. Izolujte celkovou RNA. (Viz [Kapitola 3 na straně 16](#).)
3. Za použití kitu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit přepište celkovou RNA do cDNA. (Viz [Kapitola 3 na straně 17](#).)

- a. Připravte si mastermix pro reverzní transkripci (RT) podle tabulky vpravo. Více informací naleznete v protokolu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (Kat. č. 4375575).

**WARNING CHEMICKÉ RIZIKO.****Pufr 10 × Reverse Transcription Buffer**

může způsobit podráždění očí, kůže a dýchacího ústrojí. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

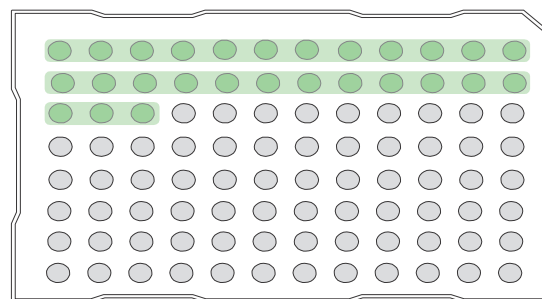
RT Mastermix – Destička typu Standard		
Složka	μL/reakci	μL/27 reakcí‡
10× pufr pro reverzní transkripci (Reverse Transcription Buffer)	2.0	54
25× dNTPs	0.8	21.6
10× náhodné primery	2.0	54
MultiScribe™ reverzní transkriptáza, 50 U/μL	1.0	27
Voda prostá nukleáz	4.2	113.4
Celkem	10	270

‡ Každá RT reakce má objem 20 μL (viz [krok 3b](#)). Potřebujete-li 5 μL cDNA pro každou PCR reakci (celkem 104 PCR reakcí, každá o objemu 50-μL) (viz [krok 4](#)), je zapotřebí provést 27 reakcí RT. Tato kalkulace již bere v úvahu nutnost použít vyšší objem, aby byly eliminovány ztráty vzniklé v důsledku pipetování a též za účelem uchování vzorku cDNA.

- b. Připravte destičku pro přípravu cDNA: pipetujte do každé jamky destičky

- 10 μL mastermixu RT
- 10 μL vzorku RNA

V jedné reakci o objemu 20 μL můžete přepsat až 2 μg celkové RNA do cDNA.



Poznámky _____

- c. Nastavte přístroj pro provedení kroku reverzní transkripce podle uvedeného teplotního profilu (dvoukroková RT-PCR).

Poznámka: Můžete použít i jednokrokovou RT-PCR jak je popsáno v části “[Volba jedno- nebo dvoukrokové RT-PCR](#)” na [straně 12](#). Jednokroková RT-PCR se provádí pomocí mastermixu Standard Universal Master Mix for one-step RT-PCR nebo reagensí EZ-RT.

Krok	Doba	Teplota
HOLD (Inkubace)	10 min	25 °C
HOLD (Inkubace)	120 min	37 °C
HOLD (Inkubace)	5 sec	85 °C

- d. Uchovejte cDNA při –20 °C až do dalšího použití.

4. Připravte si mastermix pro PCR podle tabulky vpravo.

Podrobnější informace viz [Kapitola 4](#) na [straně 20](#).

Poznámka: Reakční objemy pro TaqMan® Gene Expression Assays (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese) a TaqMan® Custom Gene Expression Assays (TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese – na objednávku) jsou uvedeny v produktových letácích těchto výrobků.



CAUTION

CHEMICKÉ RIZIKO.

TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) No AmpErase UNG může způsobit podráždění očí a kůže. Polknutí nebo inhalace může vést k nevolnosti. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

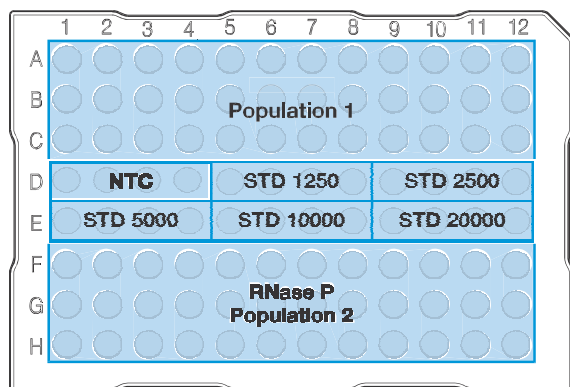
PCR Master Mix‡			
Reagencie	Standard μL/ vzorek	Fast μL/ vzorek	Výsledná koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	25.0	10.0	1×
Forward primer	5.0	2.0	50 až 900 nM
Reverzní primer	5.0	2.0	50 až 900 nM
Sonda TaqMan®	5.0	2.0	50 až 250 nM
Vzorek cDNA	5.0	2.0	10 až 100 ng
Voda prostá nukleáz	5.0	2.0	—
Celkem	50.0	20.0	—

‡ Pro vzorový pokus bylo připraveno osm mastermixů pro PCR, jeden pro každou ze dvou skupin vzorků (pro 37 reakcí) a jeden pro každý ze šesti standardů (pro 5 reakcí). Počítejte s objemem navíc pro ztráty způsobené pipetováním. Do každého mastermixu se přidává cDNA.

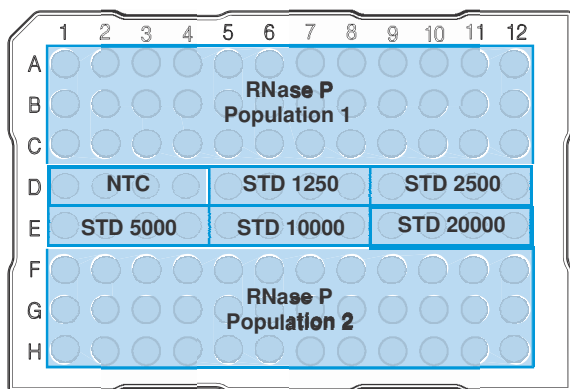
Poznámky _____

5. Připravte destičku.

- a. Označte si destičku a ujistěte se, že pro každou cílovou detekovanou sekvenci máte připravený soubor standardů. Standardy musí být na téže destičce jako je amplifikovaná cílová sekvence.
- b. Pipetujte 50 µL příslušného PCR mastermixu (obsahujícího cDNA) do každé jamky destičky typu Standard nebo 20 µL v případě destičky typu Fast.
- c. Destičku s reakcemi držte na ledu až do té doby, kdy jste připraveni ji umístit do přístroje 7300/7500/7500 Fast.




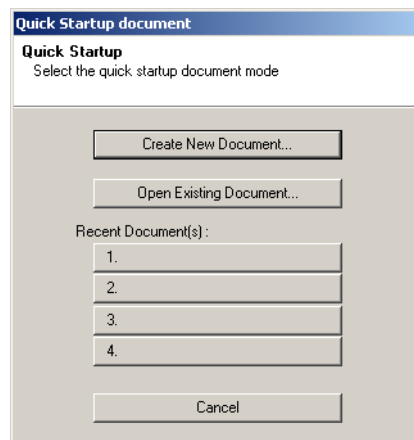
Standardní destička



Destička Fast

6. Vytvořte dokument destičky pro absolutní kvantifikaci. (Viz [“Vytvoření dokumentu destičky pro absolutní kvantifikaci”](#) na straně 24.)

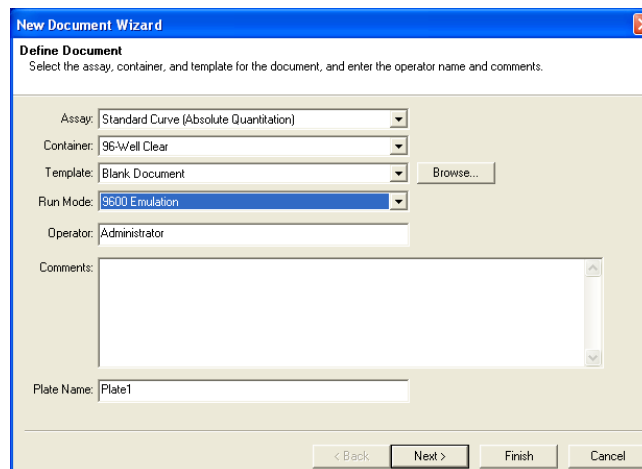
- a. Zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7300/7500/7500 Fast System > 7300/7500/7500 Fast System Software** () čímž spustíte SDS software.
- b. V okně Quick Startup document zvolte **Create New Document** (Vytvořit nový dokument).



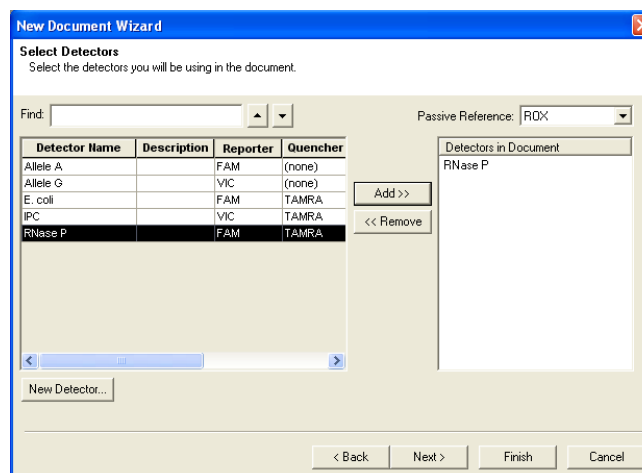
Poznámky _____

- c. V rozbalovacím menu Assay (Esej) v okně New Document Wizard (Průvodce vytvořením nového dokumentu) zvolte **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardní křivka – Absolutní kvantifikace), poté klikněte **Next >** (Další).

DŮLEŽITÉ! Pro absolutní kvantifikaci nemůžete použít dokument typu RQ (Relativní kvantifikace) a opačně.



- d. Zvolte detektory, které chcete přidat do dokumentu destičky, poté klikněte **Next >** (Další).
- e. Pro každou jamku definujte detektory a jejich úlohu, poté klikněte **Finish** (Ukončit).



7. Zadejte názvy vzorků v okně Well Inspector – klikněte **View > Well Inspector** (Zobrazit > Prohlížeč jamek).

DŮLEŽITÉ! Pokud v pokusu nepoužíváte všechny jamky destičky, nevyřazujte je nyní z analýzy (pomocí funkce Omit - Vypustit). Můžete tak učinit až po skončení běhu. Více informací naleznete v nápovědě.

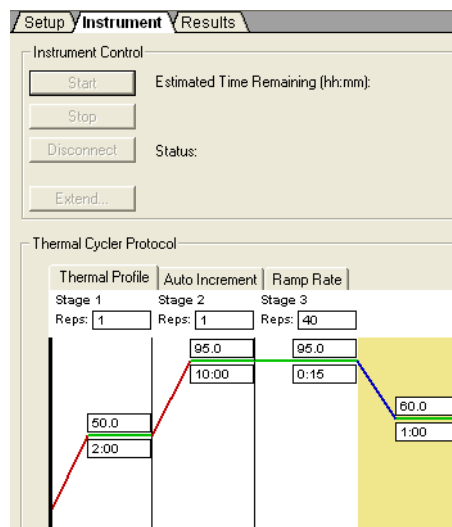
Obrázek vpravo znázorňuje vzorový dokument destičky pro absolutní kvantifikaci poté, co byly zadány názvy vzorků, detektor a úlohy detektoru pro každou jamku.

Sample	Instrument	Y Results	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SK		SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
B	SK		SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
C	SK		SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
D	NTC		NTC	NTC	NTC	NTC	S1	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S2
E	S3		S3	S3	S3	S4	S4	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S5
F	10k		10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k
G	10k		10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k
H	10k		10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k	10k

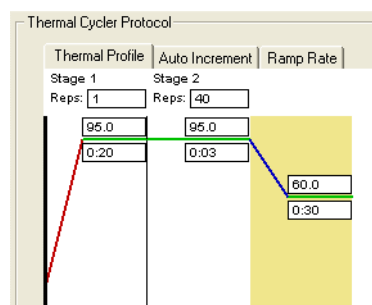
Poznámky _____

8. Spustíte běh.

- a. Zvolte záložku **Instrument** (Přístroj).
Zobrazí se přednastavený teplotní profil (standardní podmínky pro PCR při dvoukrokové RT-PCR). Viz obrázek vpravo.
Na obrázku na [straně 86](#) je vyobrazen teplotní profil PCR pro systém 7500 Fast.



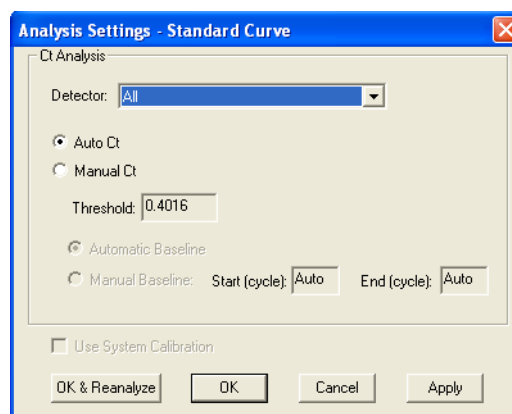
- b. Zvolte **File > Save** (Soubor > Uložit), zadejte název dokumentu destičky a klikněte **Save** (Uložit).
- c. Vložte destičku do přístroje. Ujistěte se, že destička má v přístroji správnou orientaci.
- d. Klikněte **Start**.



Po skončení běhu se objeví zpráva oznamující úspěšné či neúspěšné ukončení běhu.

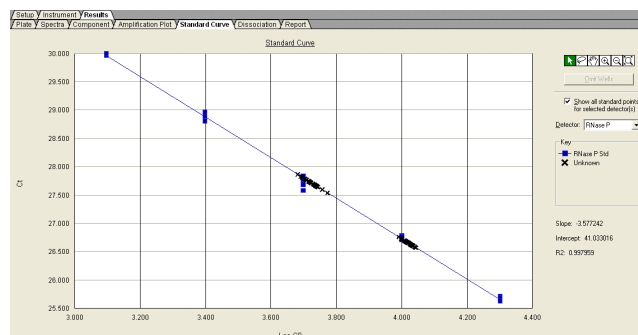
9. Provedte analýzu výsledků absolutní kvantifikace jak je popsáno v [Kapitole 6](#).

- a. Klikněte (**Analysis > Analysis Settings**) (Analýza > Parametry analýzy), abyste nastavili parametry analýzy. Použijte možnost **Auto Ct**. (Viz [“Nastavení parametrů analýzy” na straně 52.](#))
- b. Klikněte **OK & Reanalyze** (OK & Analyzovat znovu) nebo zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat), čímž provedete analýzu dat.
- c. V případě potřeby upravte ručně nastavení pozadí a prahu. (Viz [“Nastavení pozadí prahu” na straně 54.](#))



Poznámky _____

- d. Klikněte **OK & Reanalyze** (OK & Analyzovat znovu) nebo zvolte **Analysis > Analyze** (Analýza > Analyzovat), čímž provedete analýzu dat.



- e. Prostudujte výsledky analýzy.

Závěr

Ze standardní křivky odečtete počet kopií genu pro RNázu P ve skupinách vzorků (populacích) 1 a 2.

Poznámky _____

Poznámky _____

Collins, M.L., Zayati, C., Detmar, J.J., Daly, B., Kolberg, J.A., Cha, T.A., Irvine, B.D., Tucker, J., and M.S. Urdea. 1995. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. *Anal. Biochem.* 226:120–129.

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

Číslice

5'-nukleázová reakce 11

A

absolutní kvantifikace 2
 analýza výsledků 60
 chemizmus 11
 parametry 10
 pojmy 4
 postup provádění 3
 reagensie 11
 sondy a primery 14
 vzorový pokus 81
 absolutní kvantifikace - destičky
 dokument destičky 24, 38
 export dat 70
 graf amplifikace 60
 příprava destičky 21, 35
 příprava mastermixu 20, 34
 řešení problémů 48
 spuštění běhu 32, 47
 typy dat 70
 vynechání vzorků 66
 výsledky 60
 AIF. Viz soubor informací o eseji
 AmpErase UNG 12
 amplifikační křivka 54
 analýza, nastavení parametrů 52
 Applied Biosystems
 kontakt ix
 připomínky zákazníků k dokumentaci viii
 technická podpora ix

B

barvy
 pasivní reference 27, 41
 reportérová 4, 62
 ROX 27, 41, 62
 SYBR Green I 11, 14
 TAMRA 62, 74

zhášeč 62

C

cDNA
 syntéza 17
 uchování 18
 Ct. Viz prahový cyklus

D

data
 analýza 60
 export 70
 import 25, 39
 vynechání z destičky 66
 delta Rn 4
 derivace 78
 destičky Fast a standardní 35
 detektory
 definice 38, 73
 přidání do destičky 26, 40
 úloha 38
 vytvoření 73
 dialogové okno Správce detektorů 73
 dimery primerů 78
 disociace, hrubá data 78
 disociační křivky 64, 77, 79
 dokument
 destičky 24, 38
 export 70
 templáty 25, 39
 dokumentace, související viii
 doporučení
 analýza disociační křivky 77, 79
 příprava RNA 16
 vytvoření standardních křivek 75
 vývoj esejí 14

E

endpoint PCR 2
 Expertní režim 43, 45
 export výsledků kvantifikace 70

F

- Fast systém
 - teplotní profil 44
 - vytvoření dokumentu des-
tičky 39
 - vzorový pokus 37

G

- graf amplifikace
 - typy 60
 - vzorový 4
- graf, nastavení 60
- graf závislosti Ct na pozici jamky 63
- graf závislosti Delta Rn na cyklu 63
- graf závislosti Rn na cyklu 62

H

- High-Capacity cDNA Reverse
Transcription Kity 17

CH

- chemizmus 11

I

- import informací o vzorcích 25, 39
- izotermické pokusy 79

J

- jak používat tuto příručku vii
- jamky, replikáty 10

K

- kalibrace přístroje 7300/7500 20
- kalibrace přístroje 7500 Fast 34
- křivky
 - amplifikační 54
 - disociační 64, 77, 79
 - standardní 10, 75
 - tání 64

M

- mastermix
 - PCR 20, 34, 83
 - RT 18, 82
- materiál 5
- možnosti, graf 60
- možnosti, zobrazení 60

N

- nastavení, graf 60
- Nastavení, záložka 27, 41
- návrh kvantifikačních pokusů
 - primery a sondy 14
 - stanovení koncentrace reagensů 11
 - volba chemizmu reakce 11
- netemplátová kontrola (NTC) 24, 38
- neznámý vzorek 24, 38
- normalizovaný signál reportérové barvy 4
- nový detektor, dialogové okno 73
- NTC 24, 38

O

- odchylka, standardní 56
- odlehle body 66
- osa x 60
- osa y 60

P

- pasivní reference 4
- PCR
 - endpoint 2
 - mastermix, příprava 20, 34
 - Real-Time 2
 - spuštění běhu 32, 47
- pokus, izotermický 79
- postup
 - absolutní kvantifikace, přehled 3
 - vzorový pokus 82
- postupy pro návrh esejí 14
- pozadí (baseline) 4
 - nastavení 54
 - příklady 55
- Primer Express software 14
- primery 14
- práh
 - nastavení 54
 - příklady 56
- prahový cyklus
 - definice 4
 - nastavení pro absolutní kvantifikaci 52
- protokol, disociační 64
- připomínky zákazníkům k dokumentaci
 - Applied Biosystems viii
- přístroj, záložka 31, 45

R

- reagencie 12
- reference, pasivní 4
- replikáty 10
- reportérová barva 4, 62
- reverzní transkripce
 - příprava RNA 16
 - High-Capacity cDNA Reverse Transcription kity 17
 - teplotní profil 17
- Rn. *Viz* normalizovaný signál reportérové barvy
- RNA
 - přepis do cDNA 17
 - příprava 16
 - výchozí koncentrace 16
- ROX, barva 27, 41, 62
- RT-PCR
 - dvoukroková 12
 - jednokroková 12, 30
 - kity pro dvoukrokovou 13
 - teplotní profil 29, 44

S

- sondy 14, 74
- soubor informací o eseji 74
- spuštění běhu 32, 47
- standard 24, 38
- standardní a fast destičky 21
- standardní křivky 10, 75
- standardní odchylka, vliv prahu 56
- SYBR Green I chemizmus 11

T

- TAMRA 62, 74
- TaqMan eseje pro kvantifikaci genové exprese 14
- TaqMan chemizmus 11
- TaqMan MGB sondy 62, 74
- TaqMan Universal PCR Master Mix 20, 34
- technická podpora, kontakt ix
- templáty 25, 39
- teplotní profil
 - přednastavený pro PCR 29, 44
 - pro RT 17
 - jednokroková RT-PCR 30
 - nastavení 31, 43, 45
- tučné písmo, používání vii

U

- uracil-N-glykosyláza 12

V

- VAROVÁNÍ, popis vii, xi
- vynechání vzorků 66
- výsledky 60
- vzorový pokus absolutní kvantifikace
 - dokument destičky, příklad 28, 42
 - chemizmus 14
 - PCR mastermix 23, 37
 - postup 82
 - přehled 7
 - reagencie 14
 - reverzní transkripce 18

Z

- zhášec 62
- zobrazení, možnosti 60
- zobrazení výsledků 60

Anglicko-český terminologický slovník

Annealing – Annealing, nasednutí primerů a sond na templát

AQ – Absolutní kvantifikace

Assay information file (AIF) – soubor informací o eseji

Baseline- Pozadí (Baseline)

Custom TaqMan Gene Expression Assays – TaqMan eseje pro kvantifikaci genové exprese, na objednávku

End-Point PCR – End-Point PCR, PCR vyhodnocená až po skončení reakce

Forward Primer – Forward primer

Minor Groove Binder (MGB) – Minor Groove Binder, molekula vážící se do malého žlábků DNA (MGB)

No Template Control – Netemplátová kontrola

Passive Reference – Pasivní reference

Real-Time PCR – Real-Time PCR, PCR v reálném čase

Quencher – Zhášeč

Replicate – Replikát

Reporter Dye – Reportérová barva

Reverse Primer – Reverzní primer

RNase P – RNáza P

TaqMan® Gene Expression Assays - TaqMan eseje pro kvantifikaci genové exprese

Template – Templát

Threshold – Práh (Threshold)

Threshold Cycle – Prahový cyklus

Unknown – Neznámý vzorek

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.

Posláním společnosti Applera je poskytování prvotřídních technologií a informací v oblasti life science. Společnost Applera zahrnuje společnosti Applied Biosystems a Celera Genomics.

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

07/2006