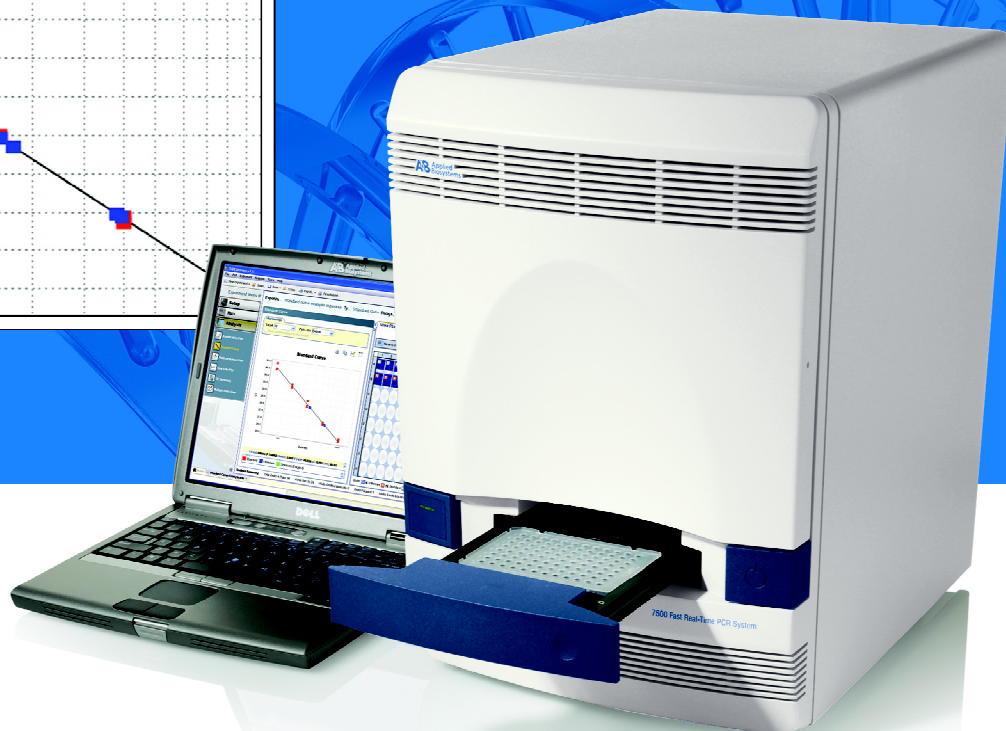
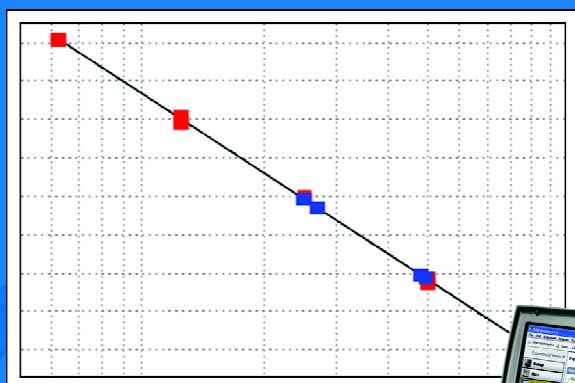


Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systémy

Kvantifikace pomocí standardní křivky



Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systémy

Kvantifikace pomocí
standardní křivky

Úvod

1

Příprava kvantifikace
pomocí standardní
křivky

2

Příprava
reakcí

3

Provedení
experimentu

4

Analýza
výsledků
experimentu

5

© Copyright 2007, Applied Biosystems. Všechna práva vyhrazena.

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 PRÁVA, ZÁRUKY NEBO JINÉHO USTANOVENÍ NEBO NA JINÉM ZÁKLADĚ, ZA SPECIÁLNÍ, VEDLEJŠÍ, NEPŘÍMÉ, TRESTNÍ, MNOHOČETNÉ NEBO NÁSLEDNĚ ŠKODY VZNIKLÉ VE SPOJENÍ S NEBO VYPLÝVAJÍCÍ Z TOHOTO DOKUMENTU, VČETNĚ ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ.

Pouze pro výzkumné účely. Není určeno pro diagnostické účely.

UPOZORNĚNÍ PRO KUPUJÍCÍHO: Omezená oprávnění

Real-Time PCR systémy 7500/7500 Fast jsou chráněné jedním nebo více U.S. patenty č. 5,038,852, 5,333,675, 5,656,493, 5,475,610, 5,602,756, 6,703,236, 6,814,934 a odpovídajícími nároky jiných subjektů mimo území USA, vlastněnými společností Applied. Tímto nejsou udělena žádná práva v souvislosti s nároky vyplývajícími z jiných patentů k přístrojům, reagentům, soupravám nebo metodám jako např. 5' nukleázové reakci. Další informace týkající se získání licencí podá Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

OBCHODNÍ ZNÁMKY:

Applied, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express a VIC jsou registrované obchodní známky a FAM, JOE, ROX a TAMRA 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 je registrovaná obchodní známka společnosti Molecular Probes, Inc.

Macintosh je registrovaná obchodní známka společnosti Apple Computer, Inc.

Microsoft a Windows jsou registrované obchodní známky společnosti Microsoft.

Všechny ostatní obchodní známky jsou výhradním vlastnictvím svých oprávněných majitelů.

Dokument č. 4387779 Rev. B
12/2007

Obsah

	Předmluva	vii
	Jak používat tuto příručku	vii
	Kde získat více informací	ix
	Kde získat pomoc	xi
	Bezpečnostní upozornění používaná v tomto dokumentu	xii
	Symbyly na přístrojích	xiii
	Bezpečnostní označení na přístrojích	xiv
	Obecná pravidla bezpečnosti při práci s přístrojem	xvi
	Bezpečná manipulace s chemikáliemi.....	xvii
	Bezpečná manipulace s chemickým odpadem	xix
	Bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními	xx
	Pohyblivé součásti	xx
	Biologické riziko	xxi
	Bezpečná práce	xxi
	Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC)	xxii
Kapitola 1	Úvod	1
	O systémech 7500/7500 Fast.....	2
	Spotřební materiál	4
	Kvantifikace pomocí standardní křivky	7
	Jak používat tuto příručku	11
	Vzorový experiment.....	12
	Provedení vzorového experimentu.....	14
Kapitola 2	Zadání experimentu	17
	Přehled	18
	Vytvoření nového experimentu	19
	Zadání vlastností experimentu	20
	Definice metodiky a materiálu	22
	Zadání cílových sekvencí	24
	Zadání standardů.....	26
	Zadání vzorků	28
	Zadání běhu.....	30
	Kontrola zadání.....	32
	Objednání materiálu pro provedení experimentu	37

	Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard).....	40
Kapitola 3	Příprava reakcí.....	43
	Přehled	44
	Ředění vzorků.....	45
	Příprava ředící řady standardů.....	47
	Příprava reakční směsi.....	49
	Příprava destičky s reakcemi.....	51
Kapitola 4	Provedení experimentu	55
	Přehled	56
	Příprava běhu	57
	Zapnutí odesílání emailových zpráv (Volitelné).....	59
	Spuštění běhu.....	61
	Sledování průběhu běhu	61
	Vyjmutí destičky z přístroje	64
Kapitola 5	Analýza výsledků experimentu.....	65
	Přehled	66
	Část 5.1: Shlédnutí výsledků	67
	Analýza výsledků experimentu	68
	Zobrazení standardní křivky	71
	Zobrazení amplifikačního grafu	74
	Zobrazení tabulky výsledků	81
	Publikování výsledků	83
	Část 5.2: Řešení problémů (je-li zapotřebí).....	85
	Zobrazení parametrů analýzy.....	86
	Zobrazení výsledků kontroly kvality.....	88
	Vynechání jamek z analýzy	90
	Zobrazení multikomponentního grafu.....	92
	Zobrazení hrubých dat.....	94
Příloha A	Jiné způsoby zadání experimentu	97
	Pokročilé zadání experimentu	98
	Rychlé spuštění	100
	Zadání pomocí templátu.....	102
	Zadání pomocí exportu/importu.....	104

Literatura.....	107
Terminologický slovník.....	109
Rejstřík.....	123

Jak používat tuto příručku

Související dokumentace Níže uvedené příručky jsou dodávány spolu s Real-Time PCR systémy Applied Biosystems 7500/7500 Fast.

Příručka	Komu je určena	Kat. č.
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	Návody na provádění experimentů na přístrojích 7500/7500 Fast. Všechny návody fungují současně jako: <ul style="list-style-type: none"> Instruktažní brožura, která za pomoci vzorových dat demonstruje použití softwaru pro přístroje Applied Biosystems 7500/7500 Fast (7500 software). Průvodce vašimi vlastními experimenty. 	4387784
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>		4387785
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments</i>	Určené vědeckým a ostatním laboratorním pracovníkům provádějícím experimenty za použití přístrojů 7500/7500 Fast.	4387783
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>		4387779
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Maintenance Guide</i>	Popisuje údržbu systémů 7500/7500 Fast. Určena laboratorním pracovníkům zodpovědným za údržbu přístrojů 7500/7500 Fast.	4387777
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Computer Setup Guide</i>		4387778
<i>Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide</i>	Poskytuje informace o reagentech, které lze použít při práci s Real-Time PCR systémy Applied Biosystems, zejména: <ul style="list-style-type: none"> Úvod do používání reagentů TaqMan® a SYBR® Green Popis a doporučení pro následující typy experimentů: <ul style="list-style-type: none"> Kvantifikace Genotypizace Pokusy typu Přítomnost/Nepřítomnost (Kvalitativní eseje) Určené vědeckým a ostatním laboratorním pracovníkům provádějícím experimenty za použití přístrojů 7500/7500 Fast.	4387787
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Site Preparation Guide</i>	Vysvětluje jak připravit vaši laboratoř pro dodávku a instalaci systémů 7500/7500 Fast. Určena osobám zodpovědným za plánování, řízení a provedení úkonů k přípravě vaší laboratoře na instalaci systémů 7500/7500 Fast.	4387776

Příručka	Komu je určena	Kat. č.
<i>Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0 Help</i>	Vysvětluje jak používat 7500 software k: <ul style="list-style-type: none">• Zadání a spuštění experimentů a analýze výsledků na přístrojích 7500/7500 Fast.• Kalibraci přístrojů 7500/7500 Fast.• Ověření funkčnosti přístrojů 7500/7500 Fast pomocí kontrolního běhu (kvantifikace genu pro RNÁzu P). Určena pro: <ul style="list-style-type: none">• vědecké a ostatní laboratorní pracovníky provádějící experimenty za použití přístrojů 7500/7500 Fast.• laboratorní pracovníky zodpovědné za instalaci a údržbu přístrojů 7500/7500 Fast.	-

Předpoklady Tato příručka předpokládá, že máte následující znalosti:

- Jste obeznámeni s operačním systémem Microsoft® Windows® XP.
- Jste obeznámeni s používáním internetu a internetovými prohlížeči.
- Jste obeznámeni s technikami pro přípravu a manipulaci se vzorky DNA a RNA a jejich přípravou pro PCR.
- Máte všeobecné znalosti týkající se ukládání dat, přenosů a kopírování souborů.
- Máte zkušenosti s prací v síti (plánujete-li integrovat systém 7500/7500 Fast do počítačové sítě).

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 matici.
- 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.

Příklady použití těchto upozornění:

Poznámka: Kalibraci lze spustit též z ovládací konzole.

DŮLEŽITÉ! Chcete-li ověřit připojení, musíte znát platné uživatelské jméno.

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

Kde získat více informací

Související dokumentace Dokumentace související s genotypizačními pokusy

Dokument	Kat. č.
<i>Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card</i>	4312212
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol Submission Guidelines</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Ordering TaqMan® SNP Genotyping Assays Quick Reference Card</i>	4374204
<i>Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-well Plates Quick Reference Card</i>	4371394
<i>Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-well Plates Quick Reference Card</i>	4367636
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856

Dokumentace související s pokusy typu Přítomnost/Nepřítomnost (Kvalitativní eseje)

Dokument	Kat. č.
<i>DNA Isolation from Fresh and Frozen Blood, Tissue Culture Cells, and Buccal Swabs Protocol</i>	4343586
<i>NucPrep® Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol</i>	4333959

Dokumentace související s kvantifikací pomocí relativní standardní křivky a komparativní C_T metody

Dokument	Kat. č.
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

Dokumentace související s kvantifikací pomocí standardní křivky


Dokument	Kat. č.
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

Návody na používání reagensů a dalšího softwaru

Dokument	Kat. č.
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol</i>	4367218
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4304965
<i>SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4310251
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol</i>	4308335
<i>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) Protocol</i>	4351891
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol</i>	4371135
<i>TaqMan® Genotyping Master Mix Protocol</i>	4371131
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol</i>	4304449
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859
<i>Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note</i>	127AP08

Poznámka: Další dokumentace viz [“Kde získat pomoc”](#) na straně xi.

Získání informací v nápovědě programu Nápověda programu 7500 popisuje používání všech nástrojů uživatelského rozhraní. Nápovědu lze otevřít přímo z prostředí programu takto:

- Stiskněte **F1**.
- Klikněte  v ovládací liště.
- Zvolte **Help (Pomoc) > 7500 Software Help**.

V nápovědě vyhledáte potřebné:

- Podle obsahu.
- Pomocí vyhledávání.
- Podle rejstříku.

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

DŮLEŽITÉ! Shora uvedená emailová adresa je určena pouze pro zaslání připomínek vztahujících se k uživatelské dokumentaci. Chcete-li si dokumentaci objednat, stáhnout ve formátu PDF nebo kontaktovat technickou podporu, klikněte na stránce <http://www.appliedbiosystems.com> na odkaz **Support**. (Viz “Kde získat pomoc” na straně xi).

Kde získat pomoc

Technickou podporu získáte na stránce <http://www.appliedbiosystems.com> kliknutím na odkaz **Support** (Technická podpora).

Na stránkách technické podpory můžete:

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

Kromě toho zde můžete získat telefonní a faxová čísla všech oddělení Technické podpory a prodejních poboček Applied Biosystems.


DŮLEŽITÉ! Kontaktujte středisko péče o zákazníky Applied Biosystems pokud vás k tomu vyzve tato příručka nebo pokud potřebujete naplánovat údržbu vašeho přístroje (např. roční pravidelnou údržbu nebo teplotní verifikaci/kalibraci). Chcete-li kontaktovat středisko péče o zákazníky Applied Biosystems, naleznete kontaktní údaje na stránce <http://www.appliedbiosystems.com/support/contact>.


Bezpečnostní upozornění používaná v tomto dokumentu


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

Definice

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

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


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


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


Příklady

Příklady níže demonstrují použití bezpečnostních upozornění:

DŮLEŽITÉ! Při manipulaci s halogenovou žárovkou používejte rukavice bez pudru.

 **CAUTION** Žárovka je velmi horká. Nedotýkejte se jí, dokud nevychladne na pokojovou teplotu.









 **WARNING** **CHEMICKÉ RIZIKO.** Etanol je hořlavá kapalina. Způsobuje podráždění očí, kůže a dýchacího ústrojí, může způsobit poškození centrálního nervového systému a jater. Seznamte se s bezpečnostním listem a dodržujte pokyny v něm uvedené stran manipulace s chemikáliemi. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice

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

Symboly na přístrojích






Elektrické symboly na přístrojích

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


Symbol	Popis	Symbol	Popis
	Označuje polohu hlavního spínače Zapnuto .		Svorka uzemnění. Neslouží jako ochranná svorka.
	Označuje polohu hlavního spínače Vypnuto .		Ochranná svorka - označuje chráněný uzemněný výstup, který musí být uzemněn předtím, než je provedeno jakékoliv jiné elektrické připojení přístroje (připojení hlavního ochranného vodiče).
	Označuje spínač sloužící k přepnutí přístroje do pohotovostního režimu (Standby). V přístroji může stále být vysoké napětí.		Označuje výstup, který může být připojen na střídavý napájecí zdroj.
	Označuje polohu hlavního spínače Zapnuto/Vypnuto (týká se spínače, který se ovládá stlačením).		Označuje výstup, který může být připojen na střídavý nebo stejnosměrný napájecí zdroj.

Bezpečnostní symboly

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

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

Environmentální symboly Následující symbol se vztahuje ke všem elektrickým a elektronickým zařízením společnosti Applied Biosystems, které byly uvedeny na evropský trh po 13. srpnu 2005.

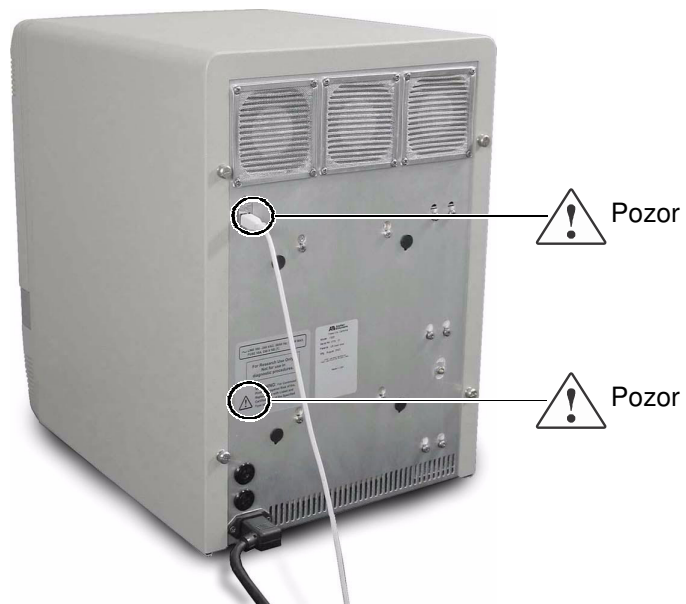
Symbol	Popis
	<p>Tento výrobek nelze odstranit jako běžný komunální odpad. Postupujte podle místních předpisů o nakládání s odpadem s ohledem na minimalizaci rizika vlivu elektrického a elektronického odpadu na životní prostředí.</p> <p>Zákazníci z Evropské unie: Kvůli odstranění přístroje a jeho recyklaci kontaktujte místní zastoupení společnosti Applied Biosystems. Seznam kanceláří společnosti v Evropské unii naleznete na www.appliedbiosystems.com.</p>

Bezpečnostní označení na přístrojích

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

English	Česky
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	VAROVÁNÍ Nebezpečná chemikálie. Před použitím čtěte bezpečnostní list (MSDS).
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	VAROVÁNÍ Nebezpečný odpad. Při manipulaci a likvidaci postupujte podle pokynů v bezpečnostním listu a místních předpisů.
WARNING Hot lamp.	VAROVÁNÍ Horká žárovka.
WARNING Hot. Replace lamp with an Applied Biosystems lamp.	VAROVÁNÍ Horké. Vyměňte žárovku za žárovku Applied Biosystems.
CAUTION Hot surface.	VAROVÁNÍ Horký povrch.
DANGER High voltage.	NEBEZPEČÍ Vysoké napětí.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	VÝSTRAHA Neodstraňujte kryty, na jejichž odstranění je zapotřebí nástrojů – riziko úrazu elektrickým proudem. Potřeba uživatelských zásahů v prostoru pod krytem je vyloučena. Servis provádí pouze kvalifikovaný technik Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	VAROVÁNÍ Pohyblivé součásti.
WARNING This instrument is designed for 12 V, 75 W Halogen lamps only.	VÝSTRAHA V tomto přístroji lze použít pouze halogenovou žárovku 12 V, 75 W.

Umístění bezpečnostních označení
Bezpečnostní označení na přístrojích Applied Biosystems 7500/7500 Fast jsou umístěna jak je vyobrazeno níže.



Obecná pravidla bezpečnosti při práci s přístrojem



WARNING

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

Přemísťování
a zvedání
přístroje



CAUTION

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

Přemísťování
a zvedání
počítačů a
monitorů



WARNING

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

Před zvedáním počítače a/nebo monitoru:

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

Ovládání
přístroje

Ujistěte se, že každý kdo ovládá přístroj:

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



WARNING

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


Čistění nebo
dekontaminace
přístroje





CAUTION

Před použitím jiné než výrobcem doporučené metody čistění či dekontaminace si u výrobce ověřte, že zvolená metoda nemůže způsobit poškození přístroje.

Bezpečná manipulace s chemikáliemi

Výstraha – chemické riziko  **WARNING CHEMICKÉ RIZIKO.** Před manipulací s jakýmkoliv chemikáliemi si prostudujte příslušný bezpečnostní list - Material Safety Data Sheet (MSDS), poskytnutý dodavatelem chemikálie, a řiďte se jeho pokyny.

 **WARNING CHEMICKÉ RIZIKO.** Veškeré chemikálie v přístroji včetně náplně v hadičkách představují potenciální riziko. Před výměnou reagentů nebo součástí přístroje se vždy informujte, jaké chemikálie byly v přístroji používány. Při práci s přístrojem používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

 **WARNING RIZIKO UCHOVÁVÁNÍ CHEMIKÁLIÍ.** Nikdy neuchovávejte odpad ve skleněných nádobách kvůli možnosti jejich rozbití. Láhve na reagenty a odpad se mohou rozbít a vytéct. Každou odpadní láhev je zapotřebí umístit do bezpečnostního polyetylenového zásobníku s dotaženým víkem a úchyty zajištěnými ve svislé poloze. Při manipulacích s láhvemi obsahujícími reagenty a odpad používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

O bezpečnostních listech Výrobci chemikálií poskytují *novým* zákazníkům s dodávkou chemikálií bezpečnostní listy (MSDS). Bezpečnostní list je rovněž poskytnut spolu s dodávkou chemikálií v případě, že byl aktualizován. Bezpečnostní listy obsahují informace, které potřebujete pro bezpečné ukládání, manipulaci, přepravu a odstranění chemikálie.

Obdržíte-li s dodávkou chemikálie i bezpečnostní list, vždy jej založte – udržujte tyto listy aktuální.

Získání bezpečnostního listu Bezpečnostní listy pro chemikálie dodávané společností Applied Biosystems získáte vždy od Applied Biosystems. Tato služba je bezplatná a dostupná 24 hodin denně:

1. Otevřete stránku www.appliedbiosystems.com, klikněte na **Support (Technická podpora)**, poté na **MSDS Search (Vyhledání bezpečnostního listu)**.
2. V poli hledání zadejte název chemikálie, název výrobku, katalogové číslo bezpečnostního listu nebo další informaci z bezpečnostního listu, který vás zajímá. Zvolte jazyk a klikněte **Search (Hledat)**.
3. Zvolte dokument, který vás zajímá, klikněte pravým tlačítkem myši na jeho název a zvolte jednu z následujících možností:
 - **Open** – Otevření dokumentu
 - **Print Target** – Vytisknutí dokumentu
 - **Save Target As** – Stažení dokumentu ve verzi PDF do zvoleného adresáře

Poznámka: Potřebujete-li bezpečnostní listy k chemikáliím nedodávaným společností Applied Biosystems, kontaktujte jejich výrobce.


Pravidla manipulace s chemikáliemi


Abyste minimalizovali riziko plynoucí z používání chemikálií, musíte:

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

Bezpečná manipulace s chemickým odpadem

Výstraha - chemický odpad  **CAUTION NEBEZPEČNÝ ODPAD.** Při manipulaci s nebezpečným odpadem a při jeho odstraňování se řiďte pokyny v bezpečnostním listu.

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

 **WARNING RIZIKO UCHOVÁVÁNÍ CHEMIKÁLIÍ.** Nikdy neuchovávejte odpad ve skleněných nádobách kvůli možnosti jejich rozbití. Láhve na reagentie a odpad se mohou rozbit a vytect. Každou odpadní láhev je zapotřebí umístit do bezpečnostního polyetylénového zásobníku s dotaženým víkem a úchyty zajištěnými ve svislé poloze. Při manipulacích s láhvemi obsahujícími reagentie a odpad používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

Pravidla manipulace s chemickým odpadem

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


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


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


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


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


Bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními


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

Pojistky  **WARNING NEBEZPEČÍ POŽÁRU.** Použití nesprávných pojistek nebo zdroje vysokého napětí může vést k poškození přístroje a vzniku požáru. Před zapnutím přístroje ověřte, zda pojistky byly správně zapojeny, a že zdroj elektrického napětí ve vaší laboratoři splňuje požadavky přístroje.

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


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

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


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

Vysoké napětí Real-Time PCR přístroje Applied Biosystems 7500/7500 Fast spadají do třídy II (přepětí) a jsou klasifikovány jako přenosné přístroje.

Pohyblivé součásti

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

Biologické riziko

Biohazard  **WARNING BIOHAZARD.** Biologické lidské nebo zvířecí vzorky jako např. tkáně, tělní tekutiny a krev mohou být zdrojem infekčních onemocnění. Postupujte podle všech místních/národních předpisů. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný štít, oděv a rukavice. Veškeré činnosti je zapotřebí provádět v prostorách k tomu určených a odpovídajícím způsobem vybavených. Zaměstnanci musí být řádně proškoleni podle místních předpisů ještě před započatím práce s infekčním materiálem. Prostudujte si a postupujte podle pokynů v následujících publikacích:


- Doporučení U.S. Department of Health and Human Services publikované v *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (č. 017-040-00547-4; bmbi.od.nih.gov)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR §1910.1030; www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html).
- Bezpečnostní dokumenty vaší společnosti/instituce, týkající se biologického rizika při práci s potenciálně infekčními materiály.

Další informace týkající se biologického rizika naleznete na:

<http://www.cdc.gov>

Bezpečná práce

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

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

Abyste toto nebezpečí snížili:

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

Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC)

V této části naleznete informace o:

- [Bezpečnostních předpisů v USA a Kanadě](#)
- [Bezpečnostních předpisů v Evropě](#)
- [Bezpečnostních předpisů v Austrálii](#)

Bezpečnostní předpisy v USA a Kanadě



Tento přístroj byl testován podle a splňuje požadavky norem UL 61010A-1 “Safety Requirements for Electrical Equipment for Laboratory Use, Part 1: General Requirements” a UL 61010-2-010 “Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials.”

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

Kanadské normy EMC

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

Evropské bezpečnostní předpisy a normy



Bezpečnost

Tento přístroj splňuje bezpečnostní požadavky evropské Směrnice pro nízké napětí 2006/95/EC. Tento přístroj byl testován podle a splňuje požadavky normy EN 61010-1:2001 “Bezpečnostní požadavky na elektrická měřicí, řídicí a laboratorní zařízení, část 1: Obecné požadavky” a EN 61010-2-010 “Zvláštní požadavky pro laboratorní zařízení pro ohřev materiálu” a podle EN 61010-2-081:2002+A1:2003 “Zvláštní požadavky pro automatická a poloautomatická laboratorní zařízení pro analytické a jiné účely”.

EMC

Tento přístroj splňuje požadavky směrnice Rady Evropské unie pro elektromagnetické rušení a odolnost vůči němu (EMC směrnice 2004/108/EC). Tento přístroj byl testován podle normy EN 61326 (Skupina 1, Třída B) “Elektrická zařízení pro měření, kontrolu a laboratorní použití – požadavky EMC”.


Australské normy EMC



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

V této kapitole naleznete:

- O systémech 7500/7500 Fast..... 2
- Spotřební materiál 4
- Kvantifikace pomocí standardní křivky 7
- Jak používat tuto příručku 11
- Vzorový experiment 12
- Provedení vzorového experimentu 14

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > 7500 Software Help**.

O systémech 7500/7500 Fast

Přístroje Applied Biosystems 7500/7500 Fast jsou 96-jamkové systémy pro provádění Real-Time PCR, umožňující detekci pěti fluorescenčních barev. Tyto přístroje umožňují:

- Kvantifikaci cílových sekvencí nukleových kyselin (tzv. targets) v reálném čase.
- Kvalitativní detekci cílových sekvencí nukleových kyselin pomocí post-PCR analýzy (tzv. analýza typu endpoint).
- Kvalitativní analýzu produktů PCR (pomocí analýzy křivky tání prováděné po skončení PCR).

Sběr dat Systémy 7500/7500 Fast zaznamenávají fluorescenci v různých fázích průběhu PCR v závislosti na typu běhu:

Typ běhu		Sběr dat
Real-time	Standardní křivka	Sběr dat probíhá po každém kroku polymerace.
	Relativní standardní křivka	
	Komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$)	
Post-PCR (endpoint)	Genotypizace	Sběr dat probíhá: <ul style="list-style-type: none"> • Před PCR (Pro experimenty typu Ano/Ne se jedná o volitelný nicméně doporučený krok) • (Volitelně) V průběhu PCR. Přístroj může sbírat data během běhu (real-time); to může být nápomocné při řešení případných problémů. • Po PCR
	Ano /Ne (Přítomnost/ Nepřítomnost)	

Bez ohledu na typ běhu se každý bod sběru dat (tzv. čtení – *read*) na přístrojích 7500/7500 Fast skládá ze tří fází:

1. **Excitace** – Přístroj ozáří všechny jamky destičky a excituje fluorofory v jamkách.
2. **Emise** – Optické zařízení přístroje zaznamená fluorescenci vyzářenou z jamek destičky. Výsledný záznam zahrnuje pouze to fluorescenčního záření, které odpovídá rozsahu emisních filtrů.
3. **Uložení** – Přístroj digitálně zaznamená fluorescenci detekovanou v pevném časovém intervalu. Program 7500 uloží tato tzv. hrubá data pro následnou analýzu.

Po skončení běhu použije program 7500 kalibrační soubory získané během kalibrace ROI (region of interest), optické kalibrace, kalibrace barev a pozadí ke stanovení intenzity fluorescenčního signálu jednotlivých jamek v každém čtení, k určení barev emitujících daný fluorescenční signál a ke stanovení zda je daný signál signifikantní.

Poznámky _____

O filtrech Systémy 7500/7500 Fast používají následující filtry:

Filtr	1	2	3	4	5
Barva	<ul style="list-style-type: none"> FAM™ SYBR® Green 	<ul style="list-style-type: none"> JOE™ VIC® 	<ul style="list-style-type: none"> TAMRA™ NED™ Cy3® 	<ul style="list-style-type: none"> ROX™ Texas Red® 	Cy5®

Více informací Více informací o:

- Systémech 7500/7500 Fast získáte v nápovědě programu *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR*.

Poznámka: Nápovědu v programu otevřete pomocí **Help > 7500 Software Help** (Nápověda > Nápověda programu 7500).

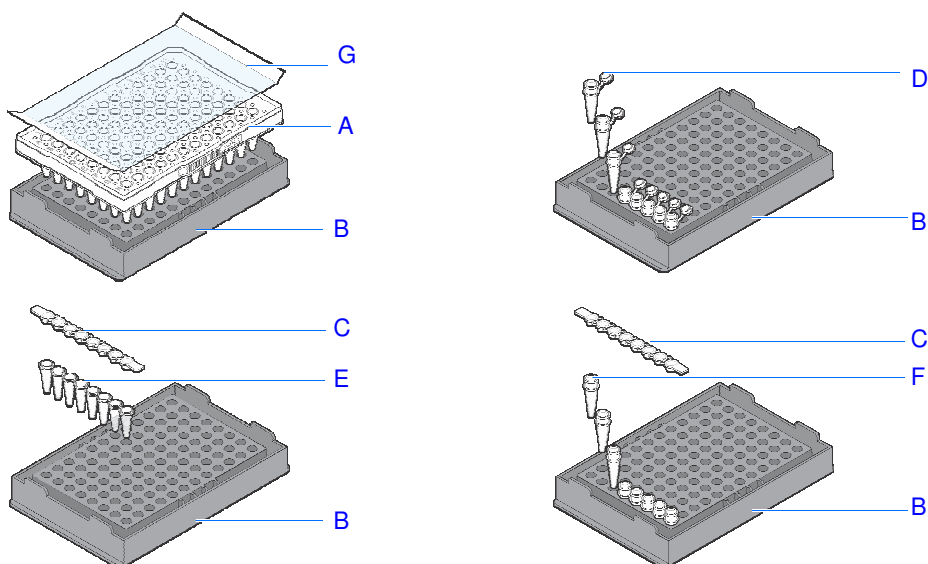
- Genotypování naleznete v příručce *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments*.
- Experimentech typu Ano/Ne (Přítomnost/Nepřítomnost) naleznete v příručce *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.
- Metodě relativní standardní křivky a komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$) metodě naleznete v příručce *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments*.

Poznámky _____

Spotřební materiál

Systém 7500 Na přístroji 7500 můžete používat níže uvedený spotřební materiál.

Spotřební materiál	Kat. č.
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp[®] optické 96-jamkové destičky s čárovým kódem, 0.2-mL • MicroAmp[™] optická adhezivní fólie 	<ul style="list-style-type: none"> • 4306737 • 4311971
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp[™] optické 8-zkumavkové stripy, 0.2-mL • MicroAmp[™] optická víčka ve stripech po 8 	<ul style="list-style-type: none"> • 4316567 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp[®] optické zkumavky bez víčka, 0.2-mL • MicroAmp[®] zkumavky s víčkem, 0.2-mL 	<ul style="list-style-type: none"> • N8010933 • N8010540
<ul style="list-style-type: none"> • Microamp[®] nosítka 	<ul style="list-style-type: none"> • N8010531
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp[™] aplikátor pro adhezivní fólii • MicroAmp[®] nástroj pro nasazování víček • MicroAmp[™] nástroj pro otevírání 	<ul style="list-style-type: none"> • 4333183 • 4330015 • 4313950



#	Spotřební materiál
A	MicroAmp [®] optická 96-jamková destička, 0.2-mL
B	Microamp [®] nosítka
C	MicroAmp [™] optická víčka ve stripech po 8, 0.2-mL
D	MicroAmp [®] zkumavky s víčkem, 0.2-mL

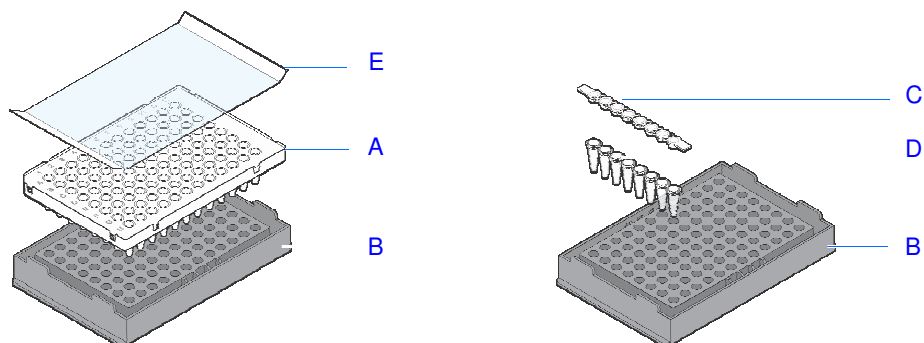
#	Spotřební materiál
E	MicroAmp [™] optický 8-zkumavkový strip
F	MicroAmp [®] optické zkumavky bez víčka
G	MicroAmp [™] optická adhezivní fólie

Poznámky _____

Systém 7500 Fast Na přístroji 7500 Fast můžete používat níže uvedený spotřební materiál.

DŮLEŽITÉ! Na přístroji 7500 Fast používejte spotřební materiál výhradně typu Fast (destičky, stripy, zkumavky), a to i když provádíte experimenty se standardními reagensy.

Spotřební materiál	Kat. č.
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast optické 96-jamkové destičky s čárovým kódem, 0.1-mL • MicroAmp™ optická adhezivní fólie 	<ul style="list-style-type: none"> • 4346906 • 4311971
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 8-zkumavkové stripy, 0.1-mL • MicroAmp™ optická víčka ve stripech po 8 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358293 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • Microamp® nosítka 	<ul style="list-style-type: none"> • N8010531
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ aplikátor pro adhezivní fólii • MicroAmp® nástroj pro nasazování víček • MicroAmp™ nástroj pro otevírání 	<ul style="list-style-type: none"> • 4333183 • 4330015 • 4313950



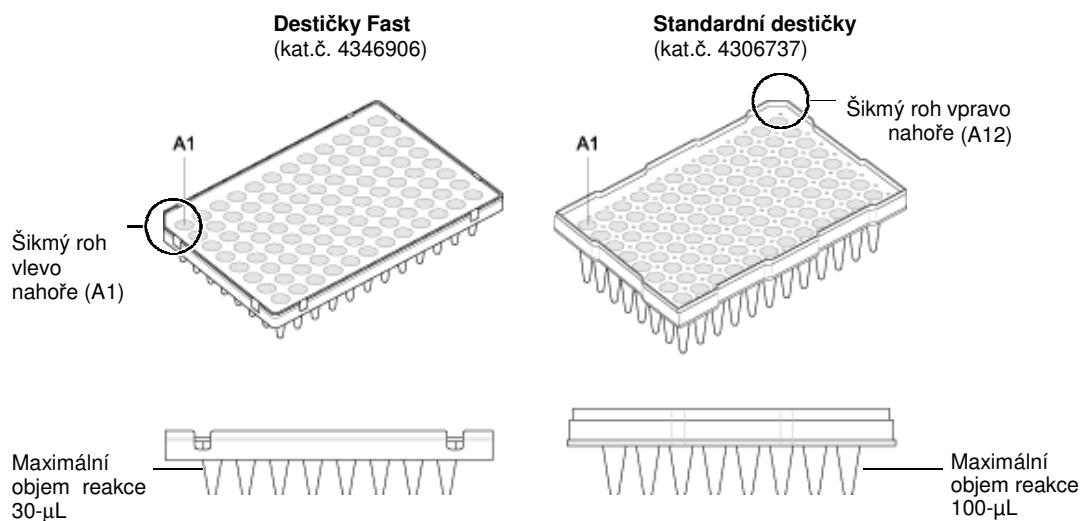
#	Spotřební materiál
A	MicroAmp™ Fast optická 96-jamková destička, 0.1-mL
B	Microamp® nosítka
C	MicroAmp™ optická víčka ve stripech po 8
D	MicroAmp™ Fast 8-zkumavkový strip
E	MicroAmp™ optická adhezivní fólie

Poznámky _____

Standardní
destičky a
zkumavky a
destičky a
zkumavky typu
Fast

Ujistěte se, že používáte správný spotřební materiál:

Systém	Spotřební materiál
7500	<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp® optické 96-jamkové destičky (kat.č. 4306737, tzv. <i>standardní destičky</i>) • MicroAmp® optické zkumavky bez víček, 0,2-mL (kat.č. N8010933, tzv. <i>standardní zkumavky</i>) • MicroAmp® zkumavky s víčky, 0,2-mL (kat.č. N2070540) • MicroAmp™ optické 8-zkumavkové stripy, 0,2-mL (kat.č. 4316567, tzv. <i>standardní stripy</i>) <p>DŮLEŽITÉ! Optické destičky a zkumavky typu Fast nelze umístit do standardního bloku, došlo by ke ztrátě výsledků analýzy.</p>
7500 Fast	<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast optické 96-jamkové destičky, (kat.č. 4346906, tzv. <i>Fast destičky</i>) • MicroAmp™ Fast 8-zkumavkové stripy, 0,1-mL (kat.č. 4358293, tzv. <i>Fast stripy</i>) <p>DŮLEŽITÉ! Standardní destičky a stripy nebudou fungovat a mohou být poškozeny, jsou-li umístěny v bloku typu Fast.</p>



Poznámky _____

Kvantifikace pomocí standardní křivky

- Real-Time PCR experimenty** Kvantifikace pomocí standardní křivky se provádí metodou Real-Time PCR (PCR monitorovaná v reálném čase). Při provádění real-time PCR:
- Přístroj monitoruje průběh PCR.
 - Během PCR jsou sbírána data.
 - Reakce charakterizuje ten bod v jejich průběhu, kdy je poprvé detekována amplifikace produktu.

Poznámka: V této příručce je pojem *experiment* používán pro celý proces prováděný na přístrojích 7500/7500 Fast a zahrnuje sesazení reakcí a zadání do přístroje, vlastní běh a analýzu.

- O metodě standardní křivky** Metoda standardní křivky se používá ke stanovení absolutního množství cílového templátu ve vzorcích. Program 7500 měří amplifikaci cílového templátu ve vzorcích a v ředící řadě standardů. Na základě dat získaných pomocí této ředící řady je vytvořena standardní křivka. Pomocí standardní křivky pak program vypočítá absolutní množství cílového templátu ve vzorcích..

Chcete-li použít metodu standardní křivky, musíte připravit:

- **Vzorek** – Vzorek, v němž chcete stanovit množství cílového templátu.
- **Standard** – Vzorek o známé koncentraci; používá se při kvantifikaci pro vytvoření standardní křivky.
- **Ředící řada standardu** – Soubor standardů o známé koncentraci. Připravuje se sériovým ředěním standardu.
- **Replikáty** – Násobné provedení téže reakce (vlastně identické reakce, obsahující tytéž vzorky, součásti a v identických objemech).
- **Negativní kontroly** – Jamky, které namísto templátu obsahují vodu nebo pufr. V jamkách negativní kontroly se nepředpokládá amplifikace templátu.

Poznámky _____

Možnosti PCR Provádíte-li real-time PCR, volíte mezi různými možnostmi provedení:

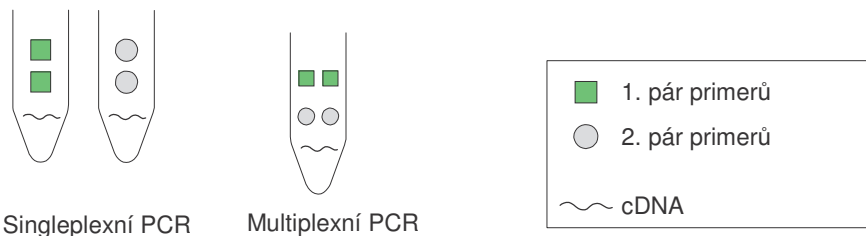
- Singleplexní a multiplexní PCR (níže)
a
- 1-kroková a 2-kroková RT-PCR ([strana 8](#))

Singleplex vs. Multiplex PCR

PCR reakci lze provést v uspořádání:

- **Singleplexní PCR** – V reakční jamce nebo zkumavce je jeden pár primerů. V každé reakci je amplifikován pouze jeden cílový templát.
nebo
- **Multiplexní PCR** – V reakční jamce nebo zkumavce jsou dva nebo více párů primerů. Každý pár amplifikuje specifický templát. Například pomocí sondy značené barvou FAM™ detekujeme amplifikaci cílového kvantifikovaného genu a pomocí sondy značené barvou VIC® detekujeme amplifikaci endogenní kontroly.

DŮLEŽITÉ! Barvivo SYBR® Green nelze použít pro multiplexní PCR



1- vs. 2-kroková 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:

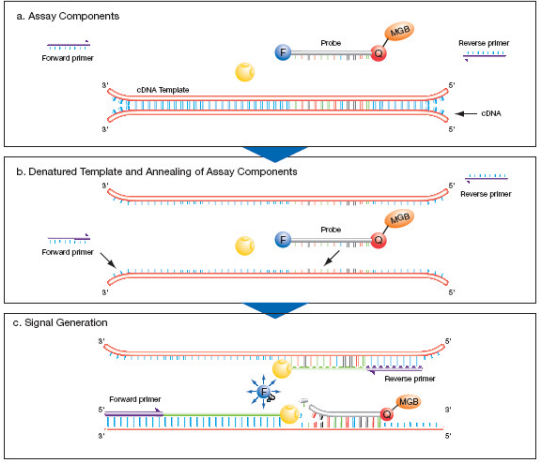
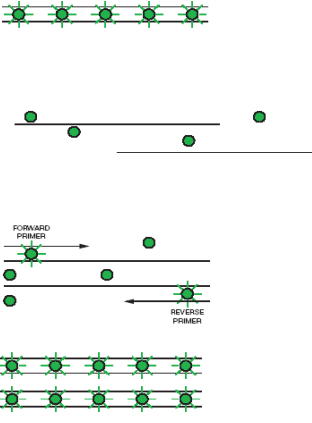
- Při jednokrokové RT-PCR probíhají RT a PCR v témže pufrčním systému, což umožňuje provést obě reakce v jediné zkumavce. V tomto uspořádání nicméně není možné použít Fast PCR Master Mix nebo AmpErase® UNG (uracil-N-glykosylázu) pro zabránění kontaminace.
- Dvoukroková RT-PCR se provádí ve dvou zvláštních 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.

Poznámka: Více informací o AmpErase® UNG naleznete v příručce *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide*.

Reagencie Reagencie TaqMan® a SYBR® Green

Společnost Applied Biosystems nabízí pro detekci produktů amplifikace na Real-Time PCR přístrojích 7500/7500 Fast chemizmy TaqMan® a SYBR® Green, popsané v následující tabulce.

Poznámka: Používáte-li reagencie TaqMan® nebo SYBR® Green, program 7500 automaticky vypočítá reakční objemy v části Reaction Setup (Sesazení reakce).

Chemizmus	Popis
<p>Reagencie a kity založené na sondách typu TaqMan®</p> <p>Popis 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. • Možnost provádět multiplexní reakce. • K dispozici jsou optimalizované eseje pro použití při univerzálních podmínkách reakce. • Lze použít pro 1- nebo 2-krokovou RT-PCR. <p>Nevýhody Syntéza specifické fluorescenčně značené sondy.</p>	<p>PCR a detekce cDNA</p> <ol style="list-style-type: none"> Součásti eseje Denaturovaný templát a annealing Tvorba signálu  <div data-bbox="1356 819 1502 1134" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>LEGENDA</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Barva FAM™ ● Zhášeč ● Minor Groove Binder ● AmpliTaq Gold® DNA polymeráza — Sonda — Primer — Templát — Prodlužovaný primer </div>
<p>Reagencie na bázi SYBR® Green I</p> <p>Popis Reagencie na bázi barvy SYBR Green I (váže se na dvouřetězovou 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 • Lze použít pro 1- nebo 2-krokovou RT-PCR. <p>Nevýhody Váže se nespecificky na veškerou dvouřetězovou DNA. Tvorbu nespecifických produktů reakce (falešně pozitivní výsledky) lze ověřit pomocí křivky tání nebo agarózového gelu.</p>	 <p>Krok 1: Reakce Barvivo SYBR® Green I Barvivo SYBR® Green I generuje fluorescenční signál je-li vázáno na dvouřetězovou 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 prodlužování a vzniku PCR produktu.</p> <p>Krok 4: Polymerace ukončena Barvivo SYBR® Green I se váže na dvouřetězový produkt reakce, dochází k nárůstu detekovaného fluorescenčního signálu.</p>

Poznámky _____

Další reagenty

Používáte-li fluorescenční reagenty jiné než typu TaqMan[®], musíte zadat experiment pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání) a nikoliv Design Wizard (Průvodce zadáním) (viz [“Pokročilé zadání experimentu” na straně 98](#)).

Více informací Více informací o real-time PCR, možnostech, reagentech apod. naleznete v příručce *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide*.

Poznámky _____

Jak používat tuto příručku

Tato příručka funguje současně jako návod i průvodce vašimi vlastními experimenty.

Používání příručky jako návodu

Za použití vzorových experimentů, dodávaných spolu s programem 7500, můžete tuto příručku použít jako návod pro provedení kvantifikace pomocí standardní křivky na přístrojích 7500/7500 Fast. Postupujte podle pokynů v kapitolách 2 až 5:

Kapitola	Procedura
2	Návrh experimentu pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard) v programu 7500.
3	Příprava experimentu za použití reagentů a objemů vypočítaných v Průvodci zadáním (Design Wizard) v kapitole 2.
4	Spuštění experimentu na přístroji 7500/7500 Fast.
5	Analýza výsledků.

Více informací viz [“Vzorový experiment” na straně 12.](#)

Používání příručky jako průvodce vašimi experimenty

Po skončení cvičných kroků v kapitolách 2 až 5 můžete použít tuto příručku jako průvodce vašimi vlastními experimenty. Každá procedura v kapitolách 2 až 5 zahrnuje soubor doporučení pro provádění vlastních experimentů.

Součástí programu 7500 jsou různé nástroje, umožňující zadání, provedení a analýzu experimentu. Jejich výčet je obsažen v následující tabulce.

Nástroj	Popis	Viz...
Design Wizard (Průvodce zadáním)	Zadání nového experimentu pomocí průvodce. Design Wizard (Průvodce zadáním) vás provede celým procesem vytváření nového experimentu. Tato možnost je doporučena pro nové uživatele. Poznámka: Možnosti zadání jsou v průvodci ve srovnání s Pokročilým zadáním omezené.	Kapitola 2
Advanced Setup (Pokročilé zadání)	Pokročilé zadání nového experimentu. Funkce Advanced Setup vám dává při zadání maximální volnost. Tato možnost je doporučena pro zkušené uživatele.	strana 98
QuickStart (Rychlý start)	Spuštění nového experimentu bez zadání informací o destičce. Parametry lze zadat po skončení běhu.	strana 100
Template (Templát)	Zadání nového experimentu pomocí informací obsažených v templátu.	strana 102
Export/Import	Import zadání experimentu ve formátu ASCII, který obsahuje potřebné informace.	strana 104

Poznámky _____

Vzorový experiment

Pro lepší nástin toho jak navrhnout, připravit, provést a vyhodnotit experiment kvantifikace pomocí standardní křivky je jako příklad v této příručce uveden experiment vzorový. Vzorový experiment demonstruje typický postup práce na systémech 7500/7500 Fast a umožňuje vám se s těmito systémy rychle seznámit.

Popis Ve vzorovém experimentu se provádí kvantifikace genu kódujícího RNázu P ve dvou skupinách (populacích) vzorků.

Ve vzorovém experimentu:

- Jako vzorky se používá genomická DNA izolovaná ze dvou populací.
- Cílová sekvence je fragment genu pro RNázu P.
- Pro kvantifikaci cílové sekvence je vytvořena jedna standardní křivka. Standard použitý pro vytvoření ředící řady obsahuje gen pro RNázu P ve známé kvantitě. Jelikož je kvantifikována pouze jedna cílová sekvence, je zapotřebí pouze jediná standardní křivka.

Poznámka: Kvantifikujete-li více cílových sekvencí, pro každou z nich musíte připravit standardní křivku.

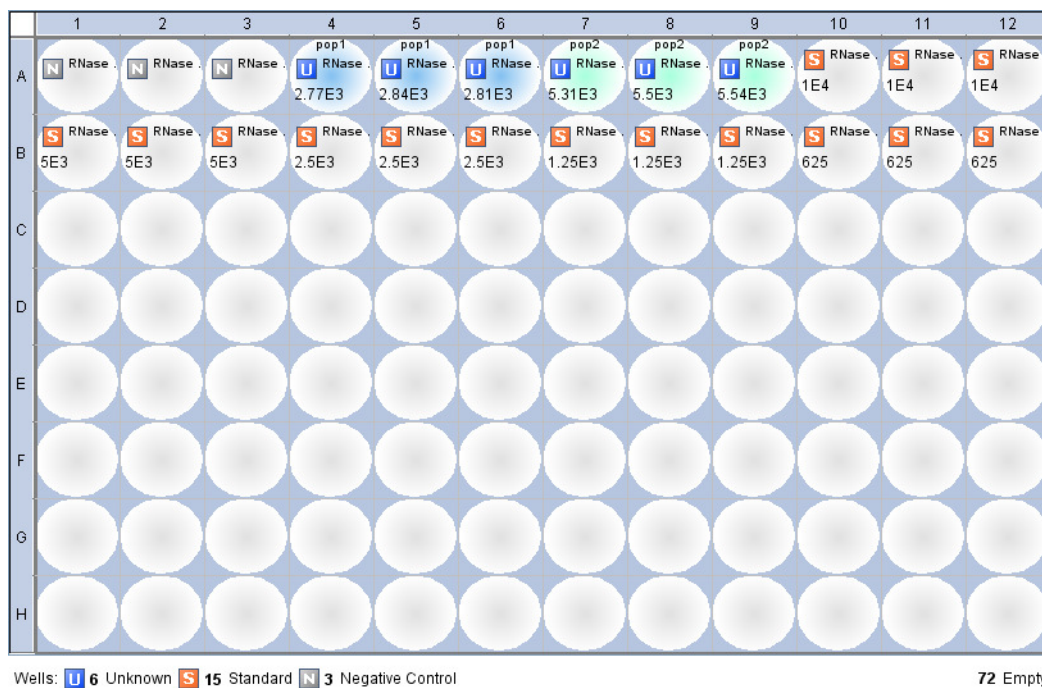
- Pro možnost statistického vyhodnocení výsledků jsou připraveny tři replikáty pro každé ředění standardu a pro každý vzorek.
- Experiment je proveden jako singleplexní PCR, takže každá jamka obsahuje primery/sondu pro jedinou cílovou sekvenci.
- Primery/sonda jsou z eseje Applied Biosystems pro RNázu P.

Poznámka: Sonda pro kvantifikaci lidského genu RNáza P (FAM™ značená MGB sonda) není k dispozici jako součást TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese. Lze ji objednat jako součást tzv. Custom TaqMan® esejí pro kvantifikaci genové exprese (kat. č. 4331348) – eseje navrhované na zakázku.

Poznámky _____

Rozvržení reakcí
v destičce

Program 7500 zobrazí následující rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce:

O vzorovém
experimentu

V této příručce budete používat dva soubory:

- V kapitole 2 vytvoříte vzorový soubor obsahující informace k zadání experimentu a uložíte jej.
- V kapitole 5 zobrazíte výsledky vzorového experimentu. Výsledky vzorového experimentu jsou součástí souboru, který se instaluje spolu s programem 7500. Soubor naleznete na disku vašeho počítače:

```
<disk>:\Applied Biosystems\<název softwaru>\experiments\  
Standard Curve Example.eds
```

kde:

- *<disk>* je pevný disk počítače, na kterém je instalován program 7500. Přednastavený disk pro instalaci programu je disk D.
- *<název softwaru>* je současná verze programu 7500.

Poznámky _____

Soubory v adresáři Experiments (Experimenty)

Adresář s experimenty obsahuje několik souborů, které můžete použít jako vzor při analýze vašich vlastních výsledků. Tyto soubory se instalují spolu s programem 7500:

- Comparative Ct Example.eds
- Comparative Ct Study Example.edm
- Comparative Ct Study (Biological Groups).edm
- Genotyping Example.eds
- Presence Absence Example.eds
- Relative Standard Curve Example.eds
- Standard Curve Example.eds

Poznámka: Ujistěte se, že při používání této příručky jako návodu používáte soubor *Standard Curve Example.eds*.

Provedení vzorového experimentu

Zahájení experimentu

Zadání experimentu (Kapitola 2)

1. Vytvoření nového experimentu.
2. Zadání vlastností experimentu.
3. Definice metodiky a materiálu.
4. Zadání cílových sekvencí.
5. Zadání standardů.
6. Zadání vzorků.
7. Zadání běhu.
8. Kontrola zadání.
9. Objednání materiálu pro provedení experimentu.
10. Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard).

Příprava reakcí (Kapitola 3)

1. Ředění vzorků.
2. Ředění standardů.
3. Příprava reakční směsi pro každou esej.
4. Příprava destičky.

(viz [strana 15](#))

Poznámky _____

(viz strana 14)

Provedení experimentu (Kapitola 4)

1. Příprava běhu.
2. (*volitelné*) Nastavení odesílání zpráv.
3. Spuštění běhu.
4. Monitorování běhu.
5. Vyjmutí destičky a přenos dat.

Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)

Část 1, Shlédnutí výsledků:

1. Analýza.
2. Zobrazení standardní křivky.
3. Zobrazení amplifikačního grafu.
4. Zobrazení výsledků v tabulce.
5. Publikace výsledků.

Část 2, Řešení problémů (v případě potřeby):

1. Zobrazení parametrů analýzy; nastavení pozadí/prahu.
2. Shlédnutí kvalitativních ukazatelů.
3. Vynechání jamek.z analýzy
4. Zobrazení multikomponentního grafu.
5. Zobrazení hrubých dat.

Konec experimentu


Poznámky _____

Poznámky _____

Zadání experimentu

V této kapitole naleznete:

■ Přehled.....	18
■ Vytvoření nového experimentu	19
■ Zadání vlastností experimentu.....	20
■ Definice metodiky a materiálu	22
■ Zadání cílových sekvencí	24
■ Zadání standardů	26
■ Zadání vzorků.....	28
■ Zadání běhu	30
■ Kontrola zadání	32
■ Objednání materiálu pro provedení experimentu	37
■ Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard)	40

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > 7500 Software Help**.

Přehled

V této kapitole je popsáno použití Průvodce zadáním (Design Wizard) programu 7500 pro zadání vzorového experimentu kvantifikace pomocí standardní křivky. Průvodce zadáním (Design Wizard) se řídí při zadávání parametrů vzorového experimentu doporučeními společnosti Applied Biosystems.

Při zadávání vlastních experimentů můžete zvolit i jiné možnosti zadání (viz [“Používání příručky jako průvodce vašimi experimenty” na straně 11](#)).

Vzorový
experiment -
postup

Zahájení experimentu

Zadání experimentu (Kapitola 2)

1. Vytvoření nového experimentu.
2. Zadání vlastností experimentu.
3. Definice metodiky a materiálu.
4. Zadání cílových sekvencí.
5. Zadání standardů.
6. Zadání vzorků.
7. Zadání běhu.
8. Kontrola zadání.
9. Objednání materiálu pro provedení experimentu.
10. Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard).

Příprava reakcí (Kapitola 3)

Provedení experimentu (Kapitola 4)

Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)



Konec experimentu

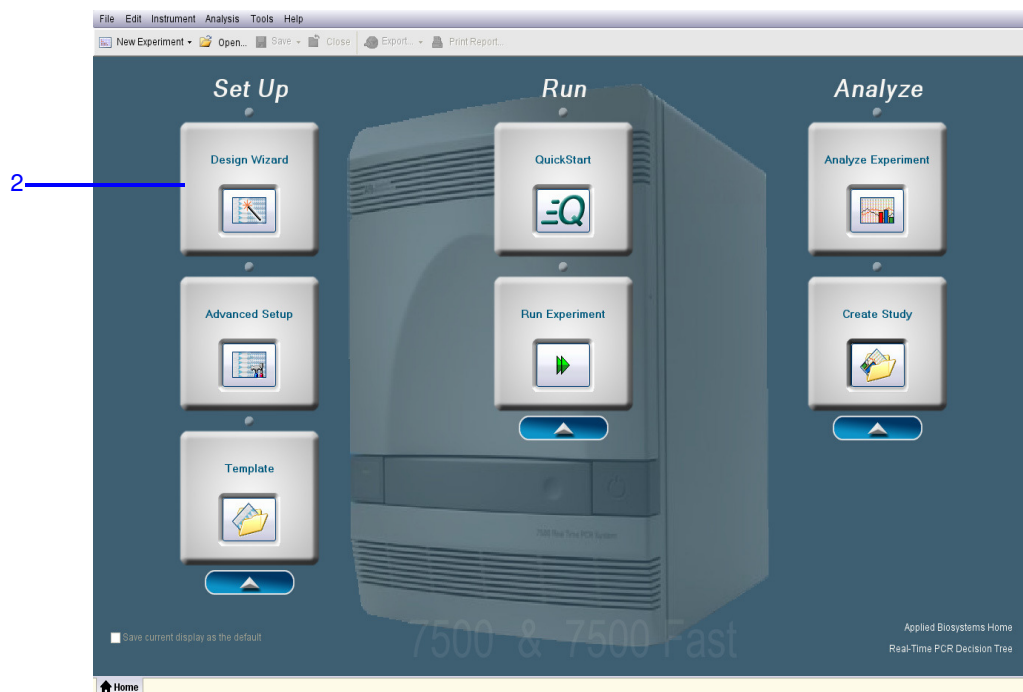
Poznámky _____

Vytvoření nového experimentu

Vytvořte nový experiment pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard) programu 7500:

Vytvoření
experimentu

1. Dvakrát klikněte na ikonu  programu 7500 nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > Applied Biosystems > 7500 Software <název programu>** kde <název programu> značí aktuální verzi programu 7500.
2. Na výchozí obrazovce klikněte na ikonu  **Průvodce zadáním (Design Wizard)** čímž otevřete Průvodce zadáním (Design Wizard).



Poznámky _____

Zadání vlastností experimentu

Na obrazovce Experiment Properties (Vlastnosti experimentu) zadejte základní údaje o experimentu, zvolte typ přístroje a typ experimentu, který chcete zadat.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- Experiment je pojmenován jako example (příklad).
- Je zvolen přístroj 7500.
- Používá se 96-jamková optická destička MicroAmp®.
- Zvolený typ experimentu je kvantifikace.

Vyplnění obrazovky Vlastnosti experimentu

1. Klikněte do pole **Experiment Name** (Název experimentu), poté zadejte **Standard Curve Example** (Příklad standardní křivky).

Poznámka: Záhloví experimentu se aktualizuje podle zadaného názvu.

2. Pole Barcode (Čárový kód) ponechte prázdné.
3. Klikněte do pole **User Name** (Jméno uživatele), zadejte **Example User** (Vzorový uživatel).
4. Klikněte do pole **Comments** (Komentář), zadejte **Standard Curve Getting Started Guide Example** (Příklad standardní křivky podle příručky)
5. Zvolte **7500 (96 Wells)** – (7500 – 96 jamek).
6. Zvolte **Quantitation** (Kvantifikace) jako typ experimentu.
7. Klikněte **Next** (Další).

Poznámky _____

**Doporučení
k zadání**

Zadávejte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

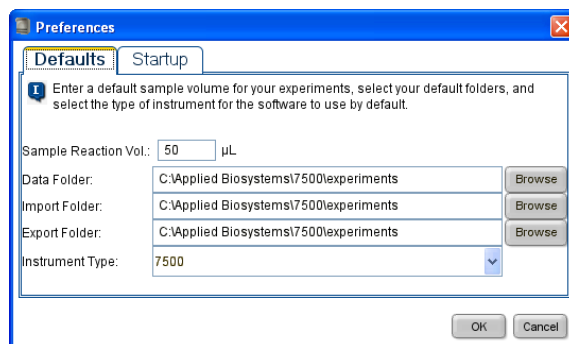
- Zadejte popisný dobře zapamatovatelný název experimentu. Název může být až 100 znaků dlouhý. Následující znaky nemůžete v poli Název experimentu použít: / \ > < * ? " | : ;


Poznámka: Název experimentu bude použit jako název souboru.

- (Volitelné) Zadejte do pole Barcode (Čárový kód). Do pole Barcode lze zadat až 100 znaků.
- (Volitelné) Zadejte uživatelské jméno (User Name), abyste identifikovali osobu, která experiment provádí. Do pole User Name lze zadat až 100 znaků.
- (Volitelné) Zadejte komentář k experimentu. Do pole Comments lze zadat až 1000 znaků.
- Zvolte přístroj, který používáte:
 - **7500 (96 jamek)**
 - **7500 Fast (96 jamek)**

Poznámka: Program 7500 lze použít pro návrh experimentů pro oba typy přístrojů 7500/7500 Fast.

Poznámka: Chcete-li některý typ přístroje předvolit, zvolte **Tools > Preferences** (Nástroje > Předvolby), poté zvolte záložku **General** (Obecné). Z rozbalovací nabídky Default Instrument Type (Předvolený typ přístroje) zvolte příslušný typ.

**Více informací** Více informací o:

- Obrazovce Experiment Properties (Vlastnosti experimentu) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Spotřebním materiálu získáte v části [“Spotřební materiál” na straně 4](#).
- Kvantifikačních experimentech získáte v příručce *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide*.

Poznámky _____

Definice metodiky a materiálu

Na obrazovce Methods & Materials (Metodika a materiál) zvolte kvantifikační metodu, používané reagensie, rychlost rampy a používaný templát pro PCR.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- se pro kvantifikaci používá metoda standardní křivky.
- se používají reagensie TaqMan®.
- v průběhu běhu se používá standardní rychlost rampy.
- jako templát se používá gDNA (izolovaná ze dvou populací). Ve vlastních experimentech musíte gDNA nejprve izolovat z vašeho vzorku.

Vyplnění obrazovky Metodika a materiál

1. Jako metodu kvantifikace zvolte **Standard Curve** (Standardní křivka).
2. Zvolte reagensie **TaqMan®**.
3. Zvolte standardní rychlost rampy **Standard (~ 2 hours to complete a run)**.
4. Zvolte **gDNA (genomická DNA)** jako typ templátu.
5. Klikněte **Next >** (Další).

1B. Define: Methods & Materials Methods & Materials Help

Instructions: Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.

Which quantitation method are you using?

Standard Curve Relative Standard Curve Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)

With the standard curve method, you use standards to determine the absolute quantity of target sequence in a sample.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents SYBR® Green Reagents

These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.

Which ramp speed do you want to include in the instrument run?

Standard (~ 2 hours to complete a run)

For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your real-time PCR reactions.

What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?

cDNA (complementary DNA) RNA gDNA (genomic DNA)

You are adding purified gDNA to the real-time PCR reactions. You have already extracted the gDNA from tissue or sample.

Poznámky _____

Doporučení
k zadání

Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Jako metodu kvantifikace zvolte **Standard Curve** (Standardní křivka). Metoda standardní křivky se používá pro stanovení absolutního množství cílové sekvence ve vzorcích. Pro provedení metody standardní křivky je zapotřebí definovat cílové sekvence, standardy a vzorky.
- Zvolte reagentie, které chcete použít:
 - Zvolte možnost **TaqMan® Reagents** chcete-li použít pro detekci amplifikace a kvantifikaci množství cílové sekvence ve vzorcích reagentie TaqMan. Reagentie TaqMan sestávají ze dvou primerů a sondy TaqMan®. Primery jsou určeny k amplifikaci cílové sekvence a sonda TaqMan je určena k navázání na cílovou sekvenci a k tvorbě fluorescenčního signálu při její amplifikaci.
 - Zvolte možnost **SYBR® Green Reagents** chcete-li použít pro detekci amplifikace a kvantifikaci množství cílové sekvence ve vzorcích reagentie SYBR Green. Reagentie SYBR green sestávají ze dvou primerů a barviva SYBR Green. Primery jsou určeny k amplifikaci cílové sekvence. Barvivo SYBR Green generuje fluorescenční záření je-li navázáno na dvouřetězcovou DNA. Barvivo SYBR Green bývá součástí mastermixu přidávaného do reakce. Používáte-li barvivo SYBR Green:
Zvolte možnost **Include Melt Curve** (Provést analýzu křivky tání), čímž provedete analýzu křivky tání amplikonu.


Poznámka: V systémech 7500/7500 Fast je možné použít i jiné fluorescenční reagentie, nicméně je zapotřebí zadat experiment pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání) a nikoliv Design Wizard (Průvodce zadáním).

- Zvolte odpovídající rychlost rampy:
 - Zvolte **Fast (~ 40 minutes to complete a run)** (Rychlý – běh trvá ca 40 min) používáte-li reagentie typu Fast.
 - Zvolte **Standard (~ 2 hours to complete a run)** (Standardní – běh trvá ca 2 hod) používáte-li standardní reagentie.
- Zvolte odpovídající templát pro PCR:
 - Zvolte **cDNA (complementary DNA – komplementární DNA)** provádíte-li 2-krokovou RT-PCR a již jste provedli reverzní transkripci (přepis RNA do cDNA). Do PCR reakcí pipetujete komplementární DNA.
 - Zvolte **RNA** provádíte-li jednokrokovou RT-PCR. Do PCR reakcí pipetujete celkovou RNA nebo mRNA.

Poznámka: Chcete-li použít rychlé rychlosti rampy (Fast ramp speed) a pracujete s templátem RNA, musíte provést zadání experimentu pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání) namísto Průvodce zadáním (Design Wizard)

- Zvolte **gDNA (genomic DNA – genomická DNA)** pokud jste izolovali genomickou DNA z vašich vzorků. Do PCR reakcí pipetujete purifikovanou genomickou DNA.

Více informací Více informací o:

- Obrazovce Methods & Materials (Metodika a materiál) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání) získáte v části **“Pokročilé zadání experimentu”** na straně 98.
- Používání dalších metod kvantifikace získáte v příručce *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments*.
- Reagenciích TaqMan a SYBR Green získáte v příručce *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide*.
- PCR včetně srovnání singleplexní a multiplexní PCR a 1-krokové a 2-krokové RT PCR získáte v příručce *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide*.

Zadání cílových sekvencí

Na obrazovce Targets (Cílové sekvence) zadejte počet cílových sekvencí, které chcete kvantifikovat v destičce, a poté definujte esej pro každou z nich.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- V reakční destičce je kvantifikována jedna cílová sekvence.
- Je zvolena možnost Set Up Standards (Zadání standardů). Zvolíte-li tuto možnost, program po ukončení zadávání informací na obrazovce Targets (Cílové sekvence) automaticky zobrazí obrazovku Standards (Standardy). Na této obrazovce můžete definovat standardní křivku (viz **“Zadání standardů”** na straně 26).
- Pro cílovou sekvenci, kterou kvantifikujete, je definována esej (jedná se o esej pro kvantifikaci RNázy P).

Vyplnění obrazovky Cílové sekvence

1. Klikněte do pole **How many targets do you want to quantify in the reaction plate?** (Kolik cílových sekvencí chcete v destičce kvantifikovat) a zadejte **1**.

Poznámka: Počet řádků v tabulce se aktualizuje podle počtu zadaných cílových sekvencí.

2. Zvolte možnost **Set Up Standards** (Zadání standardů).

Poznámka: Tato možnost je nastavena jako předvolená.

3. Zadejte esej pro cílovou sekvenci č. 1:

- a. Klikněte do pole **Enter Target Name** (Zadejte název cílové sekvence), poté napište **RNase P**.
- b. Z rozbalovací nabídky Reporter zvolte **FAM** (předvoleno).
- c. Z rozbalovací nabídky Quencher (Zhášec) zvolte **TAMRA**.
- d. V poli Color (Barva) ponechte předvolenou možnost.

Poznámky _____

4. Klikněte **Next** (Další).


Poznámka: Ponechte pole (volitelné) Enter Gene Name (Zadejte název cílové sekvence) volné. Identifikátor eseje můžete zadat později při objednávání materiálu (viz “Objednání materiálu pro provedení experimentu” na straně 37).

Doporučení
k zadání

Zadááte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Zvolte možnost **Set Up Standards** (Zadání standardů). Společnost Applied Biosystems doporučuje, abyste definovali standardní křivku pro každou cílovou sekvenci v destičce.
- Zadejte unikátní název a barvu pro každou esej. Do pole Target Name (Název cílové sekvence) můžete zadat až 100 znaků.
- Zvolte používanou reportérovou barvu. Pokud jste na obrazovce Methods & Materials (Materiál a metodika), viz strana 22, zvolili:
 - reagentie TaqMan®, zvolte barvu, kterou je označena sonda na 5' konci.
 - reagentie SYBR® Green, zvolte **SYBR**.
- Zvolte používaný zhášec. Pokud jste na obrazovce Methods & Materials (Materiál a metodika), viz strana 22, zvolili:
 - reagentie TaqMan®, zvolte zhášec na 3' konci sondy.
 - reagentie SYBR® Green, zvolte **None** (Žádný).

Více informací

Více informací o obrazovce Targets (Cílové sekvence) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**

Poznámky _____

Zadání standardů

Na obrazovce Standards (Standardy) zadejte počet bodů ředící řady a počet replikátů pro všechny standardní křivky v destičce. Pro každou standardní křivku zadejte výchozí koncentraci a zvolte ředící faktor.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- Je zadána jedna standardní křivka pro cílovou sekvenci (RNÁza P). Použitý standard obsahuje známý počet kopií genu pro RNÁzu P. Jelikož je studován pouze jeden gen, je zapotřebí pouze jedna standardní křivka.
- Standardní křivka je vytvořena na základě pěti ředění.
- Pro každé ředění jsou použity tři replikáty. Replikáty jsou identické reakce, obsahují tytéž komponenty i objemy.
- Počáteční množství je 10000 kopií a ředící faktor je 1:2.


Vyplnění obrazovky Standardy

1. Klikněte do pole **How many points do you need for each standard curve?** (Kolik ředění potřebujete pro každou standardní křivku?), poté zadejte **5**.
2. Klikněte do pole **How many replicates do you need for each point?** (Kolik replikátů potřebujete pro každé ředění?), poté zadejte **3**.
3. Definujte koncentraci standardů pro esej RNÁza P:
 - a. Klikněte do pole **Enter Starting Quantity** (Počáteční množství) a zadejte **10000**.
 - b. Z rozbalovací nabídky **Select Serial Factor** (Zvolte ředící faktor) zvolte **1:2**.
4. Prostudujte vyobrazení **Standard Curve Preview** (Náhled standardní křivky). Standardní křivka má následující body: 10000, 5000, 2500, 1250 a 625.
5. Klikněte **Next** (Další).

Poznámky _____

- Doporučení k zadání** Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:
- Zadejte standardní křivku pro každou cílovou sekvenci v reakční destičce. Cílové sekvence byly předešle definovány na obrazovce Targets (Cílové sekvence) (viz “Zadání cílových sekvencí” na straně 24).
 - Zadejte počet ředění pro každou standardní křivku v destičce. Společnost Applied Biosystems doporučuje alespoň pět ředění pro každou standardní křivku.
 - Zadejte počet replikátů (identických reakcí) pro každé ředění standardní křivky. Společnost Applied Biosystems doporučuje tři replikáty pro každé ředění.
 - Jelikož koncentrační rozsah standardů má vliv na výpočet účinnosti amplifikace, pečlivě zvažte vhodný koncentrační rozsah standardů pro vaši esej:
 - Pro přesnější měření účinnosti amplifikace použijte širší koncentrační rozsah standardů (5 až 6 řádů). Zvolíte-li široký koncentrační rozsah standardů, budete muset použít PCR produkt nebo vysoce koncentrovaný templát jako např. cDNA.
 - Máte-li omezené množství cDNA a/nebo je-li cílovou sekvencí nízkokopiový transkript, případně je vám znám předpokládaný koncentrační rozsah, můžete vystačit i s užším koncentračním rozsahem standardů.
 - Ředící faktor se používá pro výpočet koncentrací ve všech bodech standardní křivky. Je-li výchozí koncentrace nejvyšší, zvolte jako ředící faktor např. 1:2, 1:3 atd. Je-li nejnižší, zvolte faktor 2×, 3× atd.

Více informací Více informací o:

- Obrazovce Standards (Standardy) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Účinnosti amplifikace získáte v příručce *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

Poznámky _____

Zadání vzorků

Na obrazovce Samples (Vzorky) zadejte počet vzorků, replikátů a negativních kontrol v reakční destičce, zadejte názvy vzorků a zvolte, v kterých vzorcích budou kvantifikovány které cílové sekvence.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- Používají se dva vzorky: genomická DNA ze dvou populací. Vzorky obsahují neznámé množství cílové sekvence (RNáza P).
- Používají se tři replikáty. Replikáty jsou identické reakce obsahující tytéž komponenty a objemy.
- Používají se tři negativní kontroly. Negativní kontroly obsahují vodu namísto vzorku a v těchto reakcích by tedy nemělo dojít k amplifikaci.

Vyplnění obrazovky Vzorky

1. Klikněte do pole **How many samples do you want to test in the reaction plate?** (Kolik vzorků je v destičce?) a zadejte **2**.

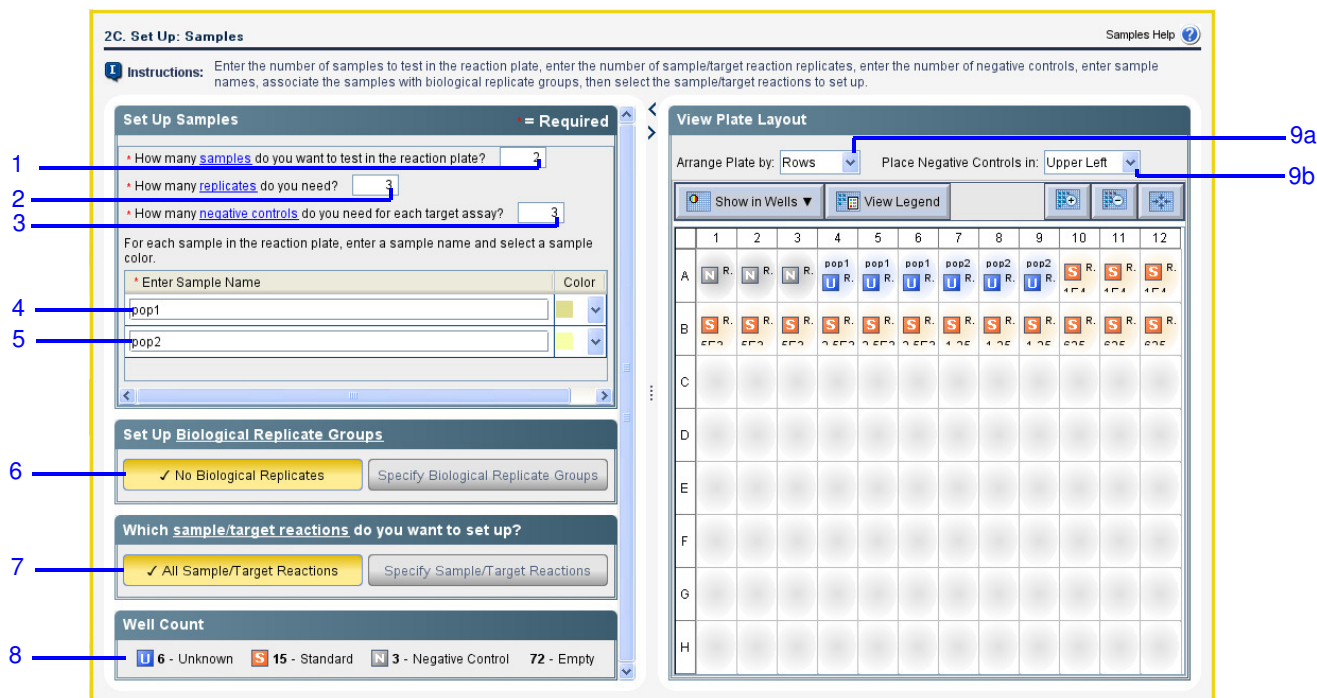
Poznámka: Počet řádků v tabulce vzorků se aktualizuje podle zadaného počtu.

2. Klikněte do pole **How many replicates do you need?** (Kolik replikátů potřebujete?), poté zadejte **3**.
3. Klikněte do pole **How many negative controls do you need for each target assay?** (Kolik negativních kontrol potřebujete pro každou cílovou sekvenci?), poté zadejte **3**.
4. Definujte vzorek (Sample) 1:
 - a. Klikněte do pole **Enter Sample Name** (Zadejte název vzorku), zadejte **pop1** (populace 1).
 - b. V poli Color (Barva) ponechte předvolené nastavení.
5. Definujte vzorek (Sample) 2:
 - a. Klikněte do pole **Enter Sample Name** (Zadejte název vzorku), zadejte **pop2** (populace 2).
 - b. V poli Color (Barva) ponechte předvolené nastavení.
6. Zvolte **No Biological Replicates – Žádné biologické replikáty** (přednastaveno).
7. Zvolte **All Sample/Target Reactions** – tím zvolíte možnost provést kvantifikaci všech cílových sekvencí ve všech vzorcích
8. V části Well Count (Počet jamek) ověřte, že je zde:
 - 6 jamek Unknown (neznámé vzorky) **U**
 - 15 jamek standardů **S**
 - 3 negativní kontroly **N**
 - 72 prázdných jamek
9. V záložce View Plate Layout (Zobrazení destičky):
 - a. Z rozbalovací nabídky Arrange Plate by (Řazení v destičce) zvolte **Rows** (Řádky – předvolené nastavení).

Poznámky _____

b. Z rozbalovací nabídky Place Negative Controls in (Umístění negativních kontrol) zvolte **Upper Left** (Nahore vlevo – předvolené nastavení).

10. Klikněte **Next** (Další).



Doporučení k zadání

Zadávejte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

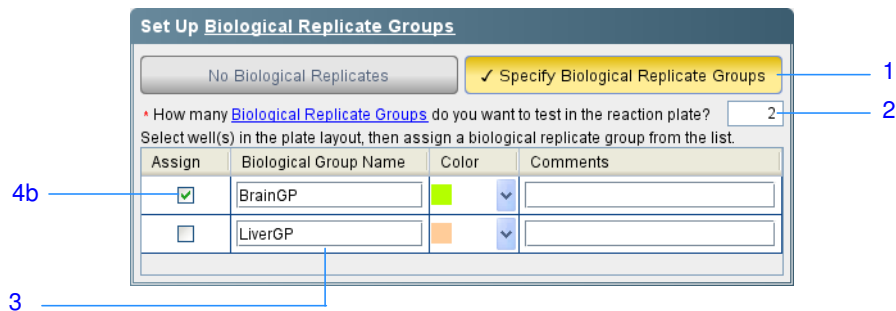
- Pro každý vzorek použijte unikátní název a barvu. Do pole Sample Name (Název vzorku) můžete zadat až 100 znaků.
- Zadejte počet replikátů (identických reakcí). Společnost Applied Biosystems doporučuje tři replikáty pro každý vzorek.
- Zadejte počet negativních kontrol. Společnost Applied Biosystems doporučuje tři negativní kontroly pro každou cílovou sekvenci.
- Můžete definovat biologické replikáty (viz “Zadání biologických replikátů”). Biologické replikáty umožňují postihnout přirozenou variabilitu vámi studované.
- Zvolte, které cílové sekvence chcete ve vzorcích testovat:
 - Zvolte **All Sample/Target Reactions** – tím zvolíte možnost provést kvantifikaci všech cílových sekvencí ve všech vzorcích.
 - Zvolte **Specify Sample/Target Reactions** – zadejte které cílové sekvence chcete testovat v každém vzorku.

DŮLEŽITÉ! Používáte-li pro zadání kvantifikace pomocí standardní křivky Průvodce zadáním (Design Wizard), můžete zadat pouze singleplexní reakce (amplifikace a detekce jedné cílové sekvence v každé jamce). Chcete-li použít multiplexní reakce (amplifikace a detekce dvou nebo více cílových sekvencí v jamce), musíte pro zadání experimentu použít funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání) (viz [strana 98](#)) a nikoliv Průvodce zadáním (Design Wizard).


Poznámky _____

Zadání biologických replikátů

1. Zvolte **Specify Biological Replicate Groups** (Zadejte skupiny biologických replikátů).
2. Zadejte počet skupin biologických replikátů, které chcete testovat.
3. Pro každou skupinu biologických replikátů zadejte název skupiny (do sloupce Biological Group Name). Např. BrainGP.
4. Přiřaďte ke skupině biologických replikátů jamky:
 - a. Zvolte jamky v reakční destičce, v nichž jsou vzorky náležející do skupiny biologických replikátů.
 - b. Zatrhněte políčko ve sloupci Assign (Přiřadit) příslušné skupiny biologických replikátů.



Více informací Více informací o:

- Obrazovce Samples (Vzorky) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Funkci Advanced Setup viz [“Pokročilé zadání experimentu” na straně 98.](#)

Zadání běhu

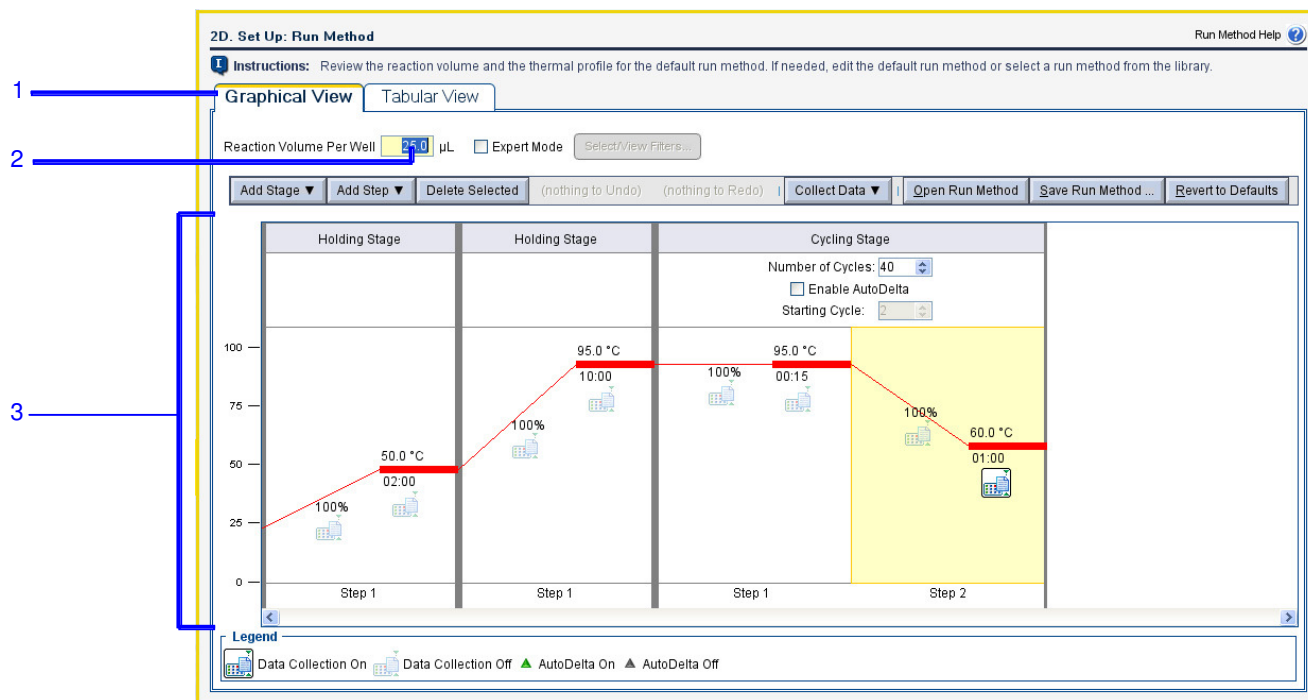
Na obrazovce Run Method (Zadání běhu) ověřte udaný reakční objem a přednastavený teplotní profil. V případě potřeby můžete přednastavený teplotní profil upravit nebo použít teplotní profil z Run Method library (Databáze metod).

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky se používá přednastavený teplotní profil s jedinou výjimkou: Reakční objem v každé jamce není 50 μL ale 25 μL

Poznámky _____

Vyplnění
obrazovky
Zadání běhu

1. Klikněte buď na záložku **Graphical View** (Grafické vyobrazení) (přednastaveno) nebo **Tabular View** (Vyobrazení v tabulce).
2. Klikněte do pole **Reaction Volume Per Well** (Reakční objem v každé jamce), poté zadejte **25 µL**.
3. Zkontrolujte teplotní profil podle vyobrazení níže, podle potřeby přidejte krok nebo upravte teplotu či čas.
4. Klikněte **Next** (Další)..



Doporučení
k zadání

Zadááte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Zadejte objem reakce v každé jamce. Společnost Applied Biosystems doporučuje při kvantifikaci pomocí standardní křivky reakční objem 25 µL. Na systému 7500 je možné pracovat v objemu 20 až 100 µL. Na systému 7500 Fast 10 až 30 µL.
- Zkontrolujte teplotní profil:
 - Ujistěte se, že teplotní profil je vhodný pro vaše reagentie.
 - Provádíte-li jednokrokovou RT-PCR, zahrňte i krok reverzní transkripce.

Pokud je pro váš experiment zapotřebí definovat jiný teplotní profil, upravte jej podle potřeby nebo jej nahraďte teplotním profilem z Databáze metod (Run Method). Databáze metod je součástí programu 7500 software.

Více informací

Více informací o:

- Databázi metod (Run Method library) nebo o obrazovce Run Method (Zadání běhu), získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na nebo stiskem klávesy **F1**.
- Funkci Advanced Setup viz [“Pokročilé zadání experimentu”](#) na straně 98.

Poznámky _____

Kontrola zadání

Na obrazovce Reaction Setup (Sesazení reakcí) zvolte typ eseje (používáte-li reagentie TaqMan), zkontrolujte vypočítané objemy pro přípravu PCR reakcí, ředění standardů a ředění vzorků. Je-li to potřeba, můžete upravit reakční objem, rezervní objem pro nepřesnosti pipetování (excess reaction volume), koncentrace jednotlivých složek, koncentrace standardů a/nebo koncentrace ředěných vzorků.

DŮLEŽITÉ! Proved'te tyto kroky pro každou esej v reakční destičce.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- Se používá esej Applied Biosystems pro RNázu P.
- Objem reakce v každé jamce je 25 μL .
- Rezervní objem pro nepřesnosti pipetování je 10%.
- Složky reakce jsou:
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (2 \times) nebo TaqMan® 2 \times Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - RNase P Assay Mix (20 \times)
 - Vzorek nebo standard
 - Voda
- Koncentrace zásobního roztoku standardu je 20,000 kopií/ μL .
- Koncentrace ředěného vzorku je 6.6 ng/ μL .
- Koncentrace zásobního roztoku vzorku je 100 ng/ μL .

Vyplnění obrazovky Sesazení reakcí

Vyplňte záložku Reaction Mix Calculations (Výpočet složení reakční směsi) (viz [strana 33](#))

1. Zvolte záložku **Reaction Mix Calculations** (Výpočet složení reakce) (přednastaveno).
2. V části Select Target (Zvolte cílovou sekvenci) zvolte **RNase P TAMRA** (RNáza P) (přednastaveno).
3. Z rozbalovací nabídky Assay Type (Typ eseje) zvolte **Inventoried/Made to Order** (Skladem/Na objednávku) (přednastaveno).
4. Ujistěte se, že v poli Reaction Volume Per Well (Reakční objem v každé jamce) je **25 μL** .
5. Ujistěte se, že v poli Excess Reaction Volume (Rezervní objem pro nepřesnosti pipetování) je **10%** (přednastaveno).
6. V části Reactions for RNase P (Reakce pro RNázu P):
 - a. Ujistěte se, že koncentrace mastermixu (Master Mix Concentration) je **2.0 \times** (přednastaveno).
 - b. Ujistěte se, že koncentrace eseje (Assay Mix Concentration) je **20.0 \times** (přednastaveno).

Poznámky _____

c. Zkontrolujte složky a jejich objemy v PCR reakcích:

Složka	Objem (µL) na 1 reakci
Master Mix (2.0x)	12.50
Assay Mix (20.0x)	1.25
Vzorek (10x) nebo Standard	2.50 [‡]
H ₂ O	8.75
Celkový objem	25.00

[‡] Objem vzorku nebo standardu nesmí překročit 10% celkového objemu.

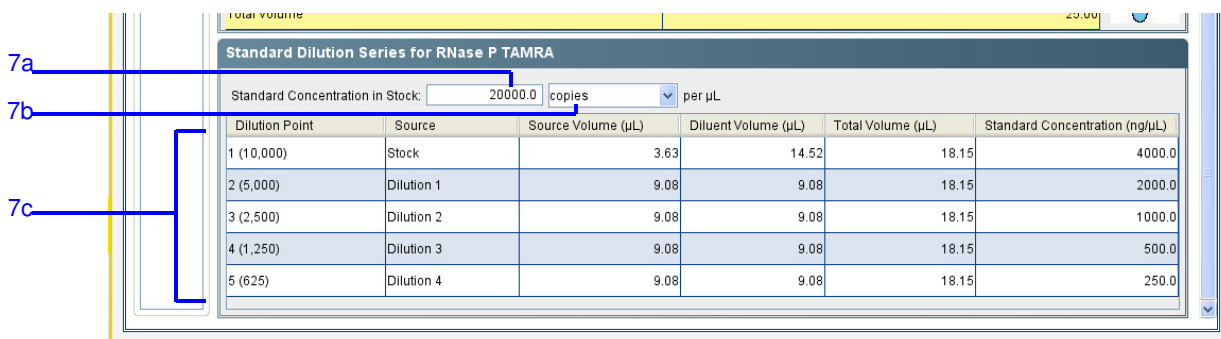
7. V panelu Standard Dilution Series for RNase P TAMRA (Ředění standardů pro RNázu P TAMRA) (viz strana 34):

- Klikněte do pole **Standard Concentration in Stock** (Koncentrace zásobního roztoku standardu), poté zadejte **20000**.
- Klikněte do pole jednotky (units), zadejte **copies per µL** (kopie na µL).

Poznámky _____

c. Zkontrolujte vypočítané objemy ředící řady standardů:

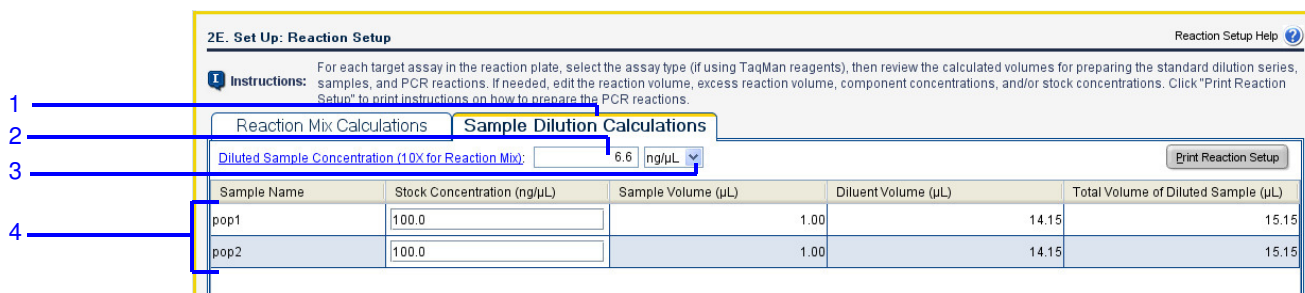
Ředění	Zdroj	Objem (µL)	Objem rozpouštědla (µL)	Celkový objem (µL)	Koncentrace standardu (kopie/µL)
1 (10000)	Zás. roztok	3.63	14.52	18.15	4000.0
2 (5000)	Ředění 1	9.08	9.08	18.15	2000.0
3 (2500)	Ředění 2	9.08	9.08	18.15	1000.0
4 (1250)	Ředění 3	9.08	9.08	18.15	500.0
5 (625)	Ředění 4	9.08	9.08	18.15	250.0



Vyplňte záložku Sample Dilution Calculations (Výpočet koncentrace vzorků)

1. Zvolte záložku **Sample Dilution Calculations** (Výpočet koncentrace vzorků).
2. Klikněte do pole **Diluted Sample Concentration (10x for Reaction Mix)** (Koncentrace ředěného vzorku - 10x do reakční směsi), zadejte **6.6**.
3. Z rozbalovací nabídky jednotek (unit) zvolte **ng/µL** (přednastaveno).
4. Zkontrolujte vypočítané objemy pro ředění vzorků:

Název vzorku	Koncentrace zásobního roztoku (ng/µL)	Objem vzorku (µL)	Objem rozpouštědla (µL)	Celkový objem rozpuštěného vzorku (µL)
pop1	100.0	1.00	14.15	15.15
pop2	100.0	1.00	14.15	15.15

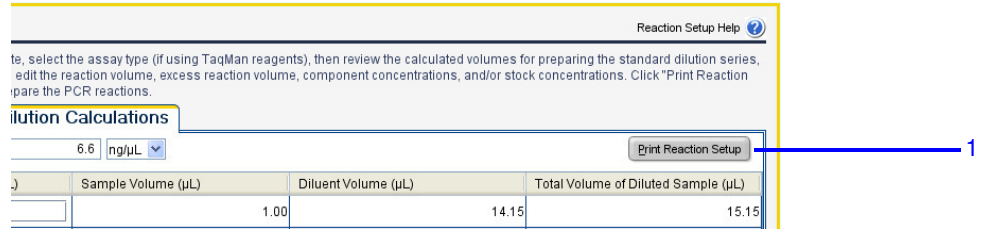


Poznámky _____

Vytiskněte pokyny k přípravě reakcí

Vytiskněte si detailní pokyny k přípravě reakcí, poté pokyny uložte pro **Kapitolu 3** “Příprava reakcí.”

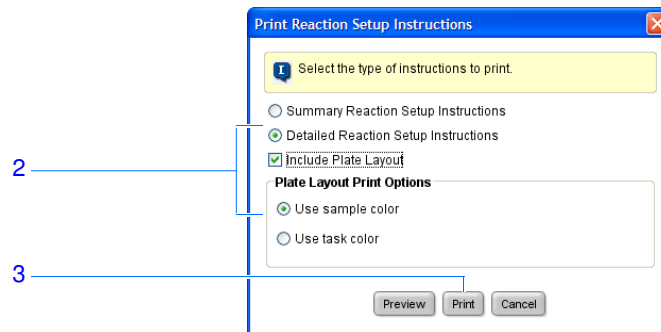
1. Klikněte **Print Reaction Setup** (Vytisknout pokyny k přípravě reakcí).



2. V dialogovém okně zvolte:

- **Detailed Reaction Setup Instructions** (Detailní pokyny)
- **Include Plate Layout** (Včetně vyobrazení destičky)
- **Use sample color** (Používat barvy vzorků)

3. Klikněte **Print**, čímž odešlete tisk na tiskárnu.




4. Klikněte **Next** (Další)

Poznámky _____

- Doporučení k zadání** Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:
- Používáte-li reagentie TaqMan, zvolte typ používané eseje:
 - Zvolte **Inventoried/Made to Order** (Skladem/Na objednávku) pokud používáte TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese Applied Biosystems (Skladem nebo Na objednávku) nebo Custom TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese Applied Biosystems.
 - Zvolte **Custom** (Vlastní) pokud navrhujete vlastní eseje v programu Primer Express®.
 - Zadejte objem reakce v každé jamce. Společnost Applied Biosystems doporučuje při kvantifikaci pomocí standardní křivky reakční objem 25 µL. Na systému 7500 je možné pracovat v objemu 20 až 100 µL. Na systému 7500 Fast 10 až 30 µL.
 - Zadejte rezervní objem pro nepřesnosti pipetování. Společnost Applied Biosystems doporučuje zadat alespoň 10%.
 - Zkontrolujte složky a jejich objemy v PCR reakcích: Je-li potřeba, upravte:
 - Pro reagentie TaqMan koncentraci mastermixu a eseje (assay mix).
 - Pro reagentie SYBR Green koncentraci mastermixu, primerů forward a reverzního.
 - Pro 1-krokovou RT-PCR koncentraci reverzní transkriptázy.
 - Zkontrolujte složky reakce pro každou cílovou sekvenci:
 - Provádíte-li reakce v režimu Fast, ujistěte se, že používáte Fast mastermix.
 - Provádíte-li standardní PCR reakce, ujistěte se, že používáte standardní mastermix.
 - Provádíte-li 1-krokovou RT-PCR, ujistěte se, že v PCR reakci je reverzní transkriptáza a příslušný pufr.
 - Zkontrolujte výpočet ředění standardů pro každou cílovou sekvenci. Je-li potřeba, upravte koncentraci zásobního roztoku standardu (případně i jednotky).

Poznámka: V poli Standard Concentration in Stock units (Jednotky koncentrace zásobního roztoku standardu) můžete z rozbalovací nabídky zvolit **ng** nebo **µg** nebo můžete zadat jiné jednotky (např. **kopie**, **IU**, [mezinárodní jednotky], **nmol**, **pg**, atd.). Tabulka se aktualizuje podle vašeho zadání.

- Více informací** Více informací o:
- Obrazovce Reaction Setup (Sesazení reakcí) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
 - Esejích Applied Biosystems naleznete v protokolech:
 - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Poznámky _____

Objednání materiálu pro provedení experimentu

Na obrazovce Materials List (Potřebný materiál) projděte seznam materiálu, doporučeného k přípravě destičky s PCR reakcemi. (Volitelné) Vytiskněte seznam materiálu a objednejte v online obchodě Applied Biosystems.

Poznámka: Pro přístup do online obchodu Applied Biosystems potřebujete funkční internetové připojení. Dostupnost výrobků a jejich ceny se mohou lišit podle toho, z jaké země pocházíte. Objednávání zboží online v obchodě Applied Biosystems není k dispozici ve všech zemích. V případě potřeby kontaktujte místně příslušnou pobočku Applied Biosystems.

Poznámka: Doporučený seznam materiálu závisí na návrhu vašeho experimentu. Předpokládá se, že nejprve naplánujete experiment, objednáte materiál, poté připravíte (Kapitola 3) a spustíte (Kapitola 4) běh.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky je doporučen následující materiál:

- MicroAmp[®] optické 96-jamkové destičky
- MicroAmp[™] optická adhezivní fólie
- MicroAmp[®] nosítka
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG
- Esej Applied Biosystems pro RNázu P

Vyplnění obrazovky Seznam materiálu

1. V případě vzorového experimentu ponechte část Find Assay (Vyhledat esej) prázdnou.

Sondu pro kvantifikaci lidského genu RNáza P značenou barvou FAM[™] lze objednat od společnosti Applied Biosystems pod označením TaqMan[®] RNase P Detection Reagents (FAM dye) (kat. č. 4316831).

Poznámka: Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky, naleznete informace k vyplnění části Find Assay (Vyhledat esej) v [“Doporučení k zadání” na straně 39](#).

2. Z rozbalovací nabídky Display (Zobrazit) zvolte **All Items** (Všechny položky) (přednastaveno) a zkontrolujte seznam doporučeného materiálu

Poznámka: Více informací o specifické položce získáte kliknutím na její katalogové číslo. Spojte se s online obchodem Applied Biosystems. Pro toto připojení musíte mít k dispozici přístup do sítě internet.

3. (Volitelné) Klikněte **Print Materials List** (Vytisknout seznam materiálu).

Poznámky _____

4. (Volitelné) Vložte položky ze seznamu do nákupního košíku:
- Zvolte následující položky:
 - MicroAmp[®] optické 96-jamkové destičky
 - MicroAmp[™] optická adhezivní fólie
 - MicroAmp[®] nosítka
 - TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG
 - Klikněte **Add Selected Items to Shopping List** (Přidat zvolené položky do nákupního košíku).
5. (Volitelné) V online obchodě Applied Biosystems založte nákupní košík. Dostupnost výrobků a jejich ceny se mohou lišit podle toho, z jaké země pocházíte. Objednávání zboží online v obchodě Applied Biosystems není k dispozici ve všech zemích. V případě potřeby kontaktujte místně příslušnou pobočku Applied Biosystems.
- Ověřte, že objednávka obsahuje potřebný materiál v potřebném množství a poté klikněte **Order Materials in List** (Objednat položky seznamu).
 - V dialogovém okně Order Materials - Log In (Objednávka materiálu – Přihlášení) zadejte vaše uživatelské jméno a heslo do obchodu Applied Biosystems, poté klikněte **Login and Submit** (Přihlásit).

Poznámka: Nemáte-li účet v obchodě Applied Biosystems, klikněte **Register Now** (Registrovat) pro jeho vytvoření.

Order Materials - Log In

Log into the Applied Biosystems Store to place the selected items in your shopping basket. If you do not have a user name and password, click "Register Now" to create a new account.

Store Log In

To log into the Applied Biosystems Store, enter your user name and password then click "Log In and Submit".

User Name:

Password:

OR

Register

If you do not have an Applied Biosystems account, click the link below to create a new account.

[Register Now](#)

Remember my user name and password for future orders

- Jste-li připojeni do online obchodu Applied Biosystems, ukončete objednávku podle pokynů na obrazovce.
6. Pokračujte v části **“Ukončení Průvodce zadáním (Design Wizard)”** na straně 40.

Doporučení
k zadání

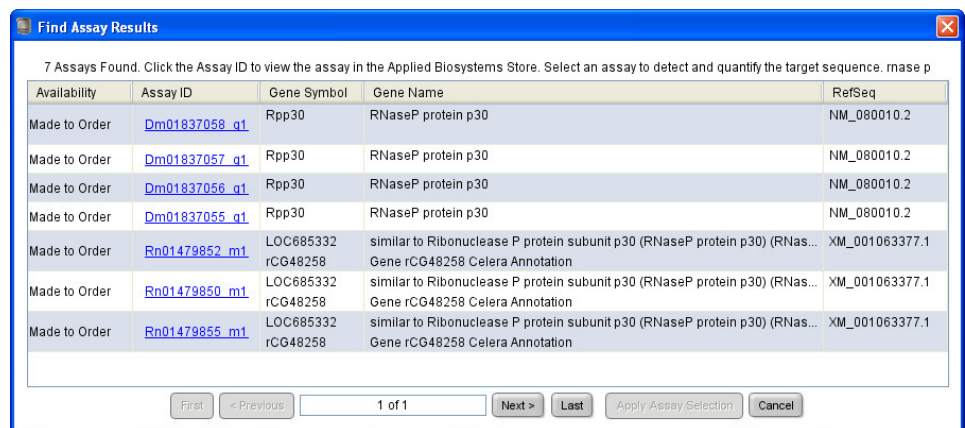
Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Vyberte materiál potřebný pro vaše experimenty.
- Chcete-li se připojit do online obchodu Applied Biosystems:
 - Ověřte, že Váš počítač má internetové připojení.
 - Společnost Applied Biosystems doporučuje pro přístup na své internetové stránky následující verze internetových prohlížečů a verzi Adobe® Acrobat® Reader:


Operační systém	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Macintosh® Safari	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 2000/NT/XP/Vista	v6.x nebo vyšší	v6.x nebo vyšší	Nepodporováno	v4.0 nebo vyšší
Macintosh® OS 9+ a vyšší	Nepodporováno	Nepodporováno	v2.0.4 nebo vyšší	v4.0 nebo vyšší

DŮLEŽITÉ: Pro správnou funkci internetové stránky je nutné povolit používání cookies a Java Script.

- Chcete-li v obchodě Applied Biosystems vyhledat vaši esej, vyplňte část Find Assay (Vyhledat esej):
 - a. Klikněte do pole **Enter Gene Name** (Zadejte název genu), zadejte název genu a klikněte **Find Assay** (Vyhledat esej).
 - b. V dialogovém okně Find Assay Results (Výsledky vyhledávání eseje) zvolte vaši esej.
 - c. Klikněte **Apply Assay Selection** (Vybrat tuto esej).



Více
informací

Více informací o obrazovce Materials List (Potřebný materiál) získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

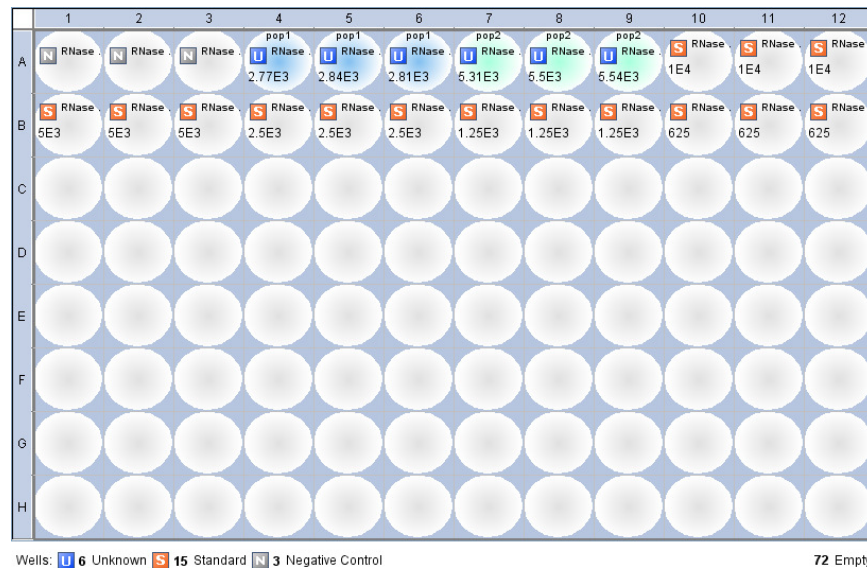
Poznámky _____

Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard)

Chcete-li ukončit Průvodce zadáním (Design Wizard), zkontrolujte vyobrazení destičky, poté průvodce ukončete.

O vzorovém experimentu Program 7500 automaticky zvolí umístění reakcí v destičce. Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- Reakce jsou uspořádány podle vyobrazení níže.



- Experiment je potřeba uložit a zavřít.

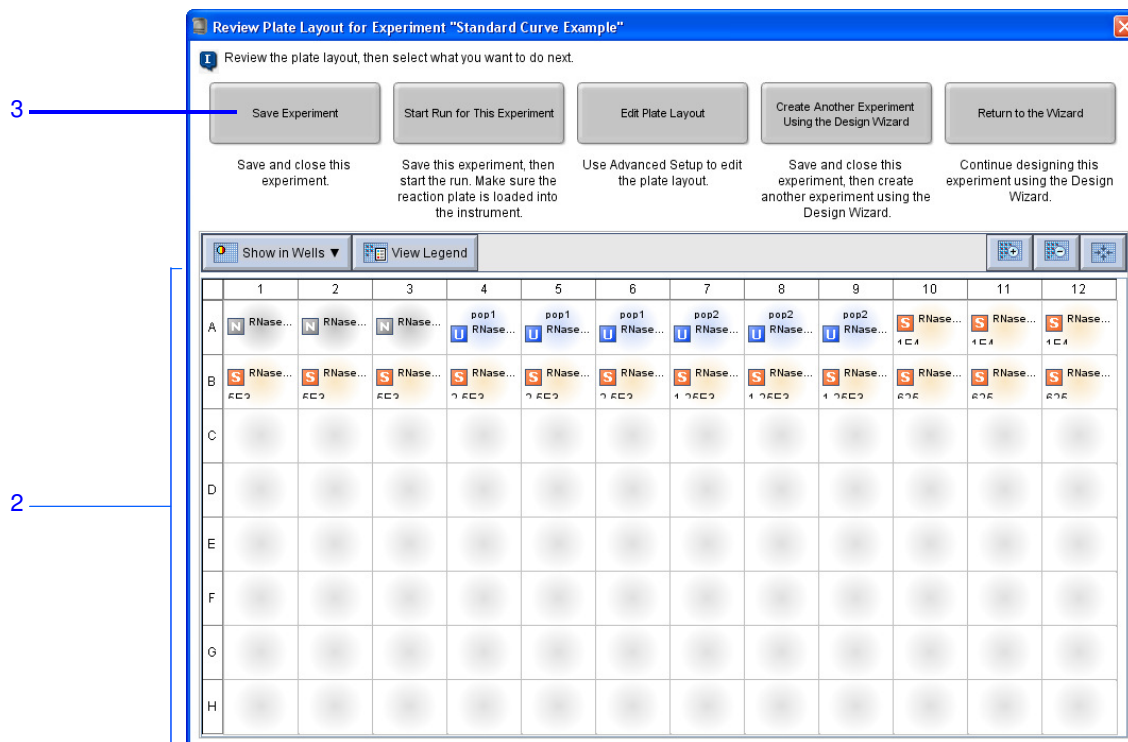
Poznámka: V případě vzorového experimentu nespouštějte běh.

Ukončete
Průvodce
zadáním
(Design Wizard)

1. Ve spodní části obrazovky programu 7500 klikněte **Finish Designing Experiment** (Ukončit návrh experimentu).
2. V okně Review Plate for Experiment (Přehlédněte zobrazení destičky) zkontrolujte rozvržení reakcí v destičce. Ujistěte se, že máte:
 - 6 jamek s neznámými vzorky **U**
 - 15 standardů **S**
 - 3 negativní kontroly **N**
 - 72 prázdných jamek

Poznámka: Není-li vyobrazení destičky správně, klikněte **Return to the Wizard** (Zpět do průvodce) a zkontrolujte zadané parametry.

3. Klikněte **Save Experiment** (Uložit experiment).



4. V dialogovém okně Save Experiment (Uložit experiment) zadejte název souboru (File name) **Standard Curve Example Setup.eds** a klikněte **Save** (Uložit). Vzorový experiment se uloží a zavře a vrátíte se na výchozí obrazovku.

DŮLEŽITÉ! Neukládejte tento experiment pod předvoleným názvem. Pokud byste to udělali, přepíše se již uložený vzorový experiment, uložený v tomtéž adresáři.

Poznámka: Vzorový experiment se uloží do <disk>:\Applied Biosystems*<název programu>*\adresář experiments..

Poznámky _____

Doporučení
k zadání

Zadávaté-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- V okně Review Plate for Experiment (Přehlédněte zobrazení destičky) zvolte jednu z možností:

Klikněte	Chcete-li...
Save Experiment	Uložit a zavřít experiment aniž provedete další změny nebo spustíte běh.
Start Run for This Experiment	Uložit experiment a spustit běh. Destička musí být vložena v přístroji.
Edit Plate Layout	Pomocí funkce Advanced setup (Pokročilé zadání) upravit parametry destičky.
Create Another Experiment Using the Design Wizard	Uložit a zavřít experiment, poté vytvořit další experiment pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard).
Return to the Wizard	Vrátit se do experimentu a provést v jeho nastavení změny pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard).

- V programu je přednastaveno, aby se experimenty ukládaly do
<disk>:\Applied Biosystems*<název programu>*\adresář experiments.
Chcete-li změnit:
 - Umístění konkrétního experimentu, vyhledejte příslušný adresář v dialogovém okně Save Experiment (Uložit experiment).
 - Přednastavený adresář, zvolte **Tools > Preferences** (Nástroje > Předvolby), poté zvolte záložku **General** (Obecné). V poli Default Data Folder (Přednastavený adresář) vyhledejte vámi zvolené umístění.


Více
informacíVíce informací o funkci Pokročilé zadání (Advanced Setup) naleznete v části "[Pokročilé zadání experimentu](#)" na straně 98.

3

Příprava reakcí

V této kapitole naleznete:

■ Přehled	44
■ Ředění vzorků	45
■ Příprava ředící řady standardů	47
■ Příprava reakční směsi	49
■ Příprava destičky s reakcemi	51

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > 7500 Software Help**.

Přehled

V této kapitole je vysvětleno jak připravit PCR reakce pro vzorový experiment kvantifikace pomocí standardní křivky a dále zde naleznete doporučení pro přípravu vašich vlastních PCR reakcí.

Vzorový experiment

Zahájení experimentu

Zadání experimentu (Kapitola 2)

Příprava reakcí (Kapitola 3)

1. Ředění vzorků.
2. Příprava ředící řady standardů.
3. Příprava reakční směsi pro každou esej.
4. Příprava destičky s reakcemi

Provedení experimentu (Kapitola 4)

Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)

Konec experimentu

Poznámky _____

Ředění vzorků

Před pipetováním vzorků do reakční směsi musíte vzorky ředit. Ředění proveďte podle výpočtů provedených v programu 7500 (“Výpočet koncentrace vzorků” na straně 34).

O vzorovém experimentu

V případě vzorového experimentu standardní křivky:

- Je nezbytné vzorky ředit, neboť objem vzorků nesmí přesáhnout 10% celkového objemu (při výpočtech v programu 7500). Celkový objem jedné reakce je 25 μL , objem vzorku je 2.5 μL /reakci.
- Koncentrace zásobního roztoku je 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Poté co vzorek naředíte podle výsledků v záložce Výpočet koncentrace vzorků bude mít koncentraci 6.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Tato koncentrace se po pipetování 2.5 μL do reakce o celkovém objemu 25 μL ještě 10 \times sníží.
- Objemy vypočítané v programu:

Název vzorku	Koncentrace zás. roztoku ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	Objem vzorku (μL)	Objem rozpouštědla (μL)	Celkový objem ředěného vzorku (μL)
pop1	100.0	1.0	14.15	15.15
pop2	100.0	1.0	14.15	15.15

Potřebný materiál

- Voda k ředění vzorků
- Mikrozkušavky (centrifugovatelné)
- Mikropipety
- Pipetovací špičky
- Zásobní roztok vzorku
- Vortex
- Centrifuga

Ředění vzorků

1. Pro každý ředěný vzorek označte jednu mikrozkušavku:
 - **Population 1** (Populace 1)
 - **Population 2** (Populace 2)
2. Pipetujte potřebný objem vody do každé zkumavky:

Zkumavka	Název vzorku	Objem vody (μL)
1	Population 1	14.15
2	Population 2	14.15

Poznámky _____

3. Do každé zkumavky pipetujte potřebný objem zásobního roztoku vzorku:

Zkumavka	Název vzorku	Objem vzorku (μL)
1	Population 1	1.0
2	Population 2	1.0

4. Každý ředěný vzorek vortexujte 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.

5. Inkubujte ředěné vzorky na ledu dokud nezačnete připravovat destičku s reakcemi.

Doporučení k přípravě

Připravujete-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Není vyloučeno, že bude nutné provést ředění vzorků, neboť při provádění výpočtů v programu 7500. Ředění vzorků je nezbytné provést před vlastním přidáním vzorků do reakční směsi.
- Pro optimální fungování esejí TaqMan® pro kvantifikaci genové exprese nebo vlastních (Custom) esejí TaqMan® pro kvantifikaci genové exprese použijte 10 až 100 ng templátu cDNA pro jednu reakci o objemu 20-μL. Při použití reagensů Fast doporučuje společnost Applied Biosystems 10 ng.
- Pro ředění vzorků používejte TE pufr nebo vodu.

Více informací

Více informací o esejích Applied Biosystems naleznete v protokolech:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Poznámky _____

Příprava ředící řady standardů

Připravte ředící řadu standardů podle výpočtů provedených v programu 7500 (“Vyplňte záložku **Reaction Mix Calculations (Výpočet složení reakční směsi)** (viz strana 33)” na straně 32).

O vzorovém experimentu

V případě vzorového experimentu standardní křivky:

- Koncentrace zásobního roztoku standardu je 20000 kopií/μL.
- Objemy vypočítané v programu:

Ředění	Zdroj	Objem (μL)	Objem rozpouštědla (μL)	Celkový objem (μL)	Koncentrace standardu (kopie/μL)
1 (10,000)	Zás. roztok	3.63	14.52	18.15	4000.0
2 (5,000)	Ředění 1	9.08	9.08	18.15	2000.0
3 (2,500)	Ředění 2	9.08	9.08	18.15	1000.0
4 (1,250)	Ředění 3	9.08	9.08	18.15	500.0
5 (625)	Ředění 4	9.08	9.08	18.15	250.0

Potřebný materiál

- Voda k ředění standardů
- Mikrozkušavky (centrifugovatelné)
- Mikropipety
- Pipetovací špičky
- Zásobní roztok standardu
- Vortex
- Centrifuga

Příprava ředící řady standardů pro esej RNáza P

1. Pro každý standard označte jednu mikrozkušavku:
 - **RNase P Std. 1**
 - **RNase P Std. 2**
 - **RNase P Std. 3**
 - **RNase P Std. 4**
 - **RNase P Std. 5**

Poznámky _____

2. Pipetujte potřebný objem vody do každé zkumavky:

Zkumavka	Název standardu	Objem vody (μL)
1	RNase P Std. 1	9
2	RNase P Std. 2	9
3	RNase P Std. 3	9
4	RNase P Std. 4	9
5	RNase P Std. 5	9

3. Připravte ředění 1 ve zkumavce RNase P Std. 1:

- Vortexujte zásobní roztok 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.
- Pomocí nové špičky pipetujte 9.08 μL zásobního roztoku do zkumavky RNase P Std. 1.
- Vortexujte Std. 1 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.

4. Připravte ředění 2 ve zkumavce RNase P Std. 2:

- Pomocí nové špičky pipetujte 9.08 μL ředění 1 do zkumavky RNase P Std. 2.
- Vortexujte Std. 2 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.

5. Připravte ředění 3 ve zkumavce RNase P Std. 3:

- Pomocí nové špičky pipetujte 9.08 μL ředění 2 do zkumavky RNase P Std. 3.
- Vortexujte Std. 3 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.

6. Připravte ředění 4 ve zkumavce RNase P Std. 4:

- Pomocí nové špičky pipetujte 9.08 μL ředění 3 do zkumavky RNase P Std. 4.
- Vortexujte Std. 4 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.

7. Připravte ředění 5 ve zkumavce RNase P Std. 5:

- Pomocí nové špičky pipetujte 9.08 μL ředění 4 do zkumavky RNase P Std. 5.
- Vortexujte Std. 5 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.

8. Inkubujte ředěné standardy na ledu dokud nezačnete připravovat destičku s reakcemi.

Doporučení k přípravě

Připravujete-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Standardy jsou pro dosažení přesných výsledků naprosto zásadní.
- Jakékoliv chyby či nepřesnosti při jejich přípravě budou mít přímý vliv na kvalitu výsledků.
- Kvalita mikropipet a špiček a péče při přípravě a promíchávání jednotlivých ředění má vliv na přesnost.
- Pro ředění standardů používejte TE pufr nebo vodu.

Poznámky _____

Příprava reakční směsi

Připravte reakční směs pomocí složek a objemů získaných podle výpočtů provedených v programu 7500 (“Vyplňte záložku **Reaction Mix Calculations (Výpočet složení reakční směsi)** (viz strana 33)” na straně 32).

Poznámka: Program počítá objemy pro všechny složky PCR reakcí. Při přípravě reakční směsi podle popisu v této části použijte pouze TaqMan mastermix, esej a vodu. Vzorek nebo standard přidávejte teprve při přípravě destičky s reakcemi (viz “**Příprava destičky s reakcemi**” na straně 51).

O vzorovém experimentu

V případě vzorového experimentu standardní křivky:

- Součásti reakce:
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - RNase P Assay Mix (20×) (esej)
 - Voda
- Objemy vypočítané v programu:

Složka	Objem (µL) na 1 reakci
Master Mix (2.0×)	12.50
Assay Mix (20.0×)	1.25
H ₂ O	8.75
Celkový objem	22.50

Poznámka: V tuto chvíli se nepipetují standardy ani vzorky.

Potřebný materiál

- Mikrozkušavky (centrifugovatelné)
- Mikropipety
- Pipetovací špičky
- Složky reakční směsi (seznam viz výše)
- Centrifuga

Příprava reakční směsi



CAUTION

CHEMICKÉ RIZIKO. TaqMan (2×) Universal PCR Master Mix může způsobit podráždění očí a kůže. Při inhalaci nebo polknutí může dojít k projevům nevolnosti. Přečtěte si bezpečnostní list a dodržujte pokyny při manipulaci. Používejte prostředky ochrany očí, ochranný oděv a rukavice.

Poznámky _____



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

1. Vyberte zkumavku o vhodném objemu pro přípravu reakční směsi a označte ji: **RNase P Reaction Mix** (Reakční směs RNáza P).
2. Pipetujte do zkumavky potřebný objem každé složky:

Složka	Objem (μL) na 1 reakci	Objem (μL) na 24 reakcí (Plus 10% rezerva)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12.50	330.0
RNase P Assay Mix (20×)	1.25	33.0
Voda	8.75	231.0
Celkový objem reakční směsi	22.50	594.0

3. Promíchejte reakční směs pipetováním nahoru a dolů a uzavřete víčkem.
4. Krátce zkumavku centrifugujte, abyste odstranili vzduchové bublinky.
5. Inkubujte reakční směs na ledu dokud nezačnete připravovat destičku s reakcemi.

Doporučení k přípravě

Připravujete-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Je-li součástí vašeho experimentu více než jedna esej, připravte reakční směs pro každou esej zvlášť.
- Ve výpočtech počítejte s rezervním objemem pro ztráty způsobené nepřesnostmi pipetování. Společnost Applied Biosystems doporučuje rezervní objem minimálně 10%.
- Pipetujte všechny potřebné součásti směsi.
- Reagencie připravujte podle pokynů výrobce.
- Chraňte esej před světlem, v mrazáku, a vyjímajte ji teprve tehdy, kdy jste připraveni ji použít. Dlouhodobé vystavení světlu může ovlivnit fungování fluorescenčních sond.
- Před použitím:
 - Promíchejte mastermix otočením zkumavky.
 - Resuspendujte esej vortexováním a krátce centrifugujte.
 - Zmrzlé vzorky nechte roztát na ledu. Po roztátí je resuspendujte vortexováním a krátce centrifugujte.

Více informací

Více informací o přípravě reakční směsi naleznete v protokolu (volte protokol podle reagentů, které používáte):

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Poznámky _____

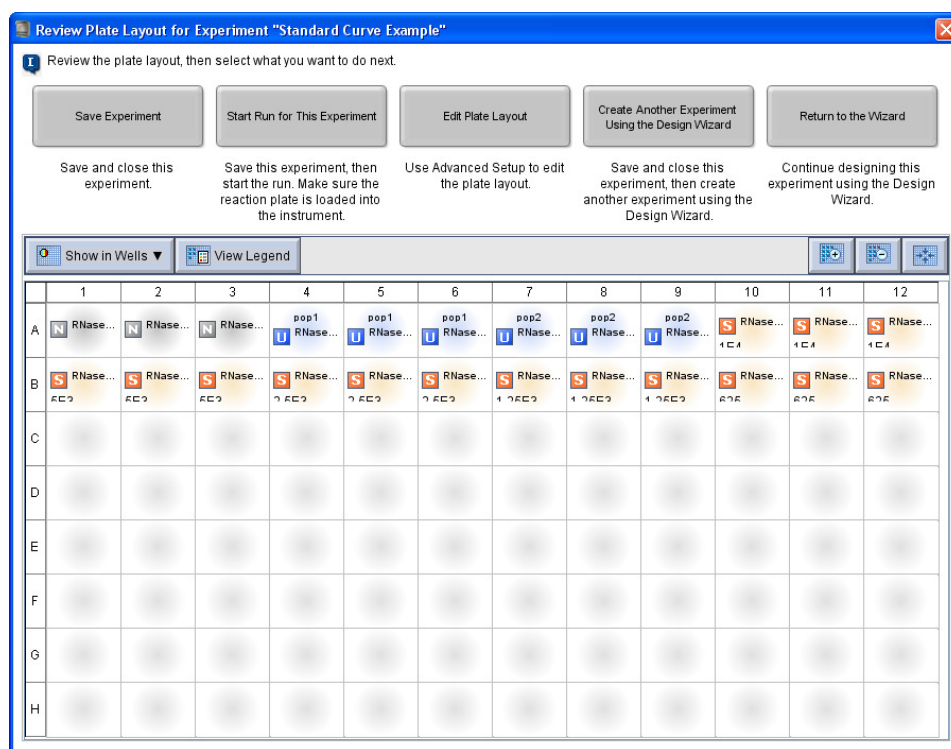
Příprava destičky s reakcemi

Připravte reakce pro každou skupinu replikátů, poté je pipetujte do destičky. Použijte vyobrazení destičky v programu 7500.

O vzorovém experimentu

V případě vzorového experimentu standardní křivky:

- Používá se MicroAmp® optická 96-jamková destička.
- Reakční objem je 25 µL/jamku.
- Destička obsahuje:
 - 6 neznámých vzorků **U**
 - 15 standardů **S**
 - 3 negativní kontroly **N**
 - 72 prázdných jamek
- Používá se vyobrazení destičky vytvořené automaticky v programu 7500:



Poznámky _____

Potřebný materiál

- Mikrozkušavky
- Mikropipety
- Pipetovací špičky
- Reakční směs RNáza P (ze [strany 49](#))
- Voda
- Standardy (ze [strany 47](#))
- Vzorok (ze [strany 45](#))
- MicroAmp[®] optická 96-jamková destička
- MicroAmp[™] optická adhezivní fólie
- Centrifuga

Příprava reakční destičky**1. Připravte negativní kontrolu pro cílovou sekvenci:**

- Do zkumavky vhodného objemu pipetujte reakční směs a vodu podle tabulky níže.

Zkumavka	Reakční směs	Objem reakční směsi (μL)	Objem vody (μL)
1	RNáza P	74.25	8.25

- Promíchejte reakci pipetováním nahoru a dolů a uzavřete zkumavku víčkem.
- Krátce zkumavku centrifugujte, abyste odstranili vzduchové bublinky.
- Pipetujte 25 μL reakce negativní kontroly do příslušných jamek reakční destičky.

2. Připravte standardy:

- Do zkumavky vhodného objemu pipetujte reakční směs a standardy podle tabulky níže.

Zkumavka	Reakční směs	Objem reakční směsi (μL)	Standard	Objem standardu (μL)
1	RNáza P	74.25	RNase P Std 1	8.25
2	RNáza P	74.25	RNase P Std 2	8.25
3	RNáza P	74.25	RNase P Std 3	8.25
4	RNáza P	74.25	RNase P Std 4	8.25
5	RNáza P	74.25	RNase P Std 5	8.25

- Promíchejte reakce pipetováním nahoru a dolů a uzavřete zkumavky víčkem.
- Krátce zkumavky centrifugujte, abyste odstranili vzduchové bublinky.
- Pipetujte 25 μL reakcí standardů do příslušných jamek reakční destičky.

Poznámky _____

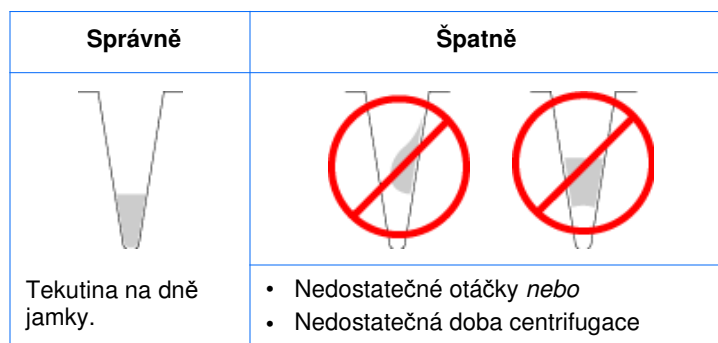
3. Připravte reakce pro vzorky o neznámé koncentraci:

- a. Do zkumavky vhodného objemu pipetujte reakční směs a vzorky podle tabulky níže.

Zkumavka	Reakce	Reakční směs	Objem reakční směsi (μL)	Vzorek	Objem vzorku (μL)
1	RNase P pop1	RNáza P	74.25	pop1	8.25
2	RNase P pop2	RNáza P	74.25	pop2	8.25

- b. Promíchejte reakce pipetováním nahoru a dolů a uzavřete zkumavky víčkem.
 c. Krátce zkumavky centrifugujte, abyste odstranili vzduchové bublinky.
 d. Pipetujte 25 μL reakcí vzorků o neznámé koncentraci do příslušných jamek reakční destičky.
4. Uzavřete reakční destičku pomocí optické adhezivní fólie.
 5. Krátce destičku centrifugujte, abyste odstranili vzduchové bublinky.
 6. Ověřte, že tekutina je v každé jamce destičky na dně. Pokud není, centrifugujte destičku znovu při vyšších otáčkách a delší dobu.

DŮLEŽITÉ! Nedovolte, aby došlo k znečištění dna destičky. Tekutiny a další kontaminace, které přilnou ke dnu reakční destičky, mohou kontaminovat blok na vzorky a způsobit příliš vysoký signál pozadí.



7. Nejste-li ještě připraveni spustit běh, držte destičku na ledu a ve tmě.

Doporučení k přípravě

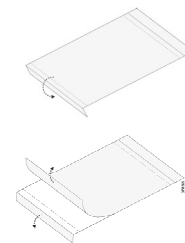
Připravujete-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Ujistěte se, že používáte správný spotřební materiál.
- Ujistěte se, že uspořádání PCR reakcí v destičce odpovídá jejich rozvržení tak jak je zobrazuje program 7500. Můžete buď:
 - Přijmout rozvržení reakcí automaticky vytvořené programem.
 - nebo*
 - Pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání) rozvržení reakcí změnit.

Poznámky _____

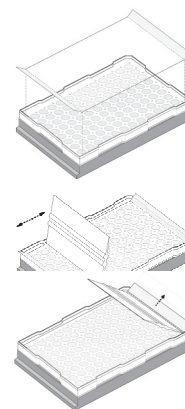
- Používáte-li optickou adhezivní fólii, uzavřete destičku takto:

- Umístěte destičku na 96-jamková nosítka.
- Pipetujte do reakční destičky všechny reakční směsi.
- Vyjměte jednu adhezivní optickou fólii z krabičky. Ohněte jeden okraj fólie dolů. Držte fólii zadní stranou nahoru.
- Jedním plynulým pohybem oddělte bílou krycí fólii od adhezivní fólie. Nedotýkejte se adhezivní fólie.



DŮLEŽITÉ! Nesprávné oddělení bílé krycí fólie povede k zneprůhlednění, ale nebude mít vliv na výsledky. Neprůhlednost zmizí jakmile se fólie dostane do styku s vyhřívaným víkem přístroje.

- Držte fólii za oba okraje a položte ji na reakční destičku (adhezivní stranou k destičce). Ujistěte se, že fólie úplně pokrývá všechny jamky reakční destičky.
- Přitlačte aplikátor k destičce a pomalu jím pohybujte po celém povrchu fólie, horizontálně i vertikálně, aby se fólie dobře přisála k povrchu reakční destičky.
- Přitiskněte aplikátor na rozhraní mezi fólií a jejím zdviženým okrajem a tento okraj odtrhněte směrem vzhůru. Opakujte tento krok i pro druhý okraj fólie.
- Opakujte krok f, abyste zajistili, že nebude docházet k evaporaci. Přitlačte okraj aplikátoru k destičce a obtáhněte všechny čtyři okraje fólie.



Poznámka: Optické adhezivní fólie nepřilnou po prvním kontaktu. Aby dokonale přilnuly a nedocházelo k evaporaci, je zapotřebí je přitlačit k destičce.

- Prohlédněte si destičku a zkontrolujte, že jsou všechny jamky uzavřeny. Jamky by měly být obtisknuty do fólie.

Více informací

Více informací o:


- Přípravě reakční destičky naleznete v protokolu pro vámi používané reagenty:
 - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- Spotřebním materiálu viz [“Spotřební materiál” na straně 4](#).
- O funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání) pro změnu rozvržení vzorků v destičce viz [“Pokročilé zadání experimentu” na straně 98](#).

4

Provedení experimentu

V této kapitole naleznete:

■ Přehled.....	56
■ Příprava běhu.....	57
■ Zapnutí odesílání emailových zpráv (Volitelné).....	59
■ Spuštění běhu	61
■ Sledování průběhu běhu	61
■ Vyjmutí destičky z přístroje	64

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > 7500 Software Help**.

Přehled

V této kapitole je popsáno jak spustit a sledovat průběh běhu na přístrojích Applied Biosystems 7500/7500 Fast.

Vzorový experiment

Postup provádění vzorového experimentu je vyobrazen níže.

Zahájení experimentu

Zadání experimentu (Kapitola 2)

Příprava reakcí (Kapitola 3)

Provedení experimentu (Kapitola 4)

1. Příprava běhu.
2. (Volitelné) Zapnutí odesílání emailových zpráv.
3. Spuštění běhu.
4. Sledování průběhu běhu.
5. Vyjmutí destičky z přístroje.

Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)


Konec experimentu

Poznámky _____

Příprava běhu

Otevřete soubor vzorového experimentu, který jste připravili v [Kapitole 2](#), poté vložte uzavřenou reakční destičku do přístroje 7500/7500 Fast.

Otevření
vzorového
experimentu

1. Dvakrát klikněte na ikonu  programu 7500 nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je název vaší aktuální verze programu 7500.
2. Na výchozí obrazovce klikněte **Open** (Otevřít).
3. V dialogovém okně Open (Otevřít) vyhledejte adresář **experiments** (Experimenty) (přednastaveno):
`<disk>:\Applied Biosystems\<název programu>\experiments`
4. Dvakrát klikněte na soubor **Standard Curve Example Setup.eds**, čímž otevřete soubor pro vzorový experiment, který jste vytvořili v [Kapitole 2](#).

Vložení
destičky do
přístroje

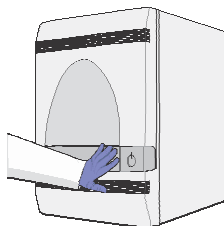


WARNING RIZIKO PORANĚNÍ. Při provozu přístroje může teplota bloku na vzorky překročit 100 °C. Před provedením následujícího postupu se ujistěte, že blok na vzorky je vychladlý na pokojovou teplotu.

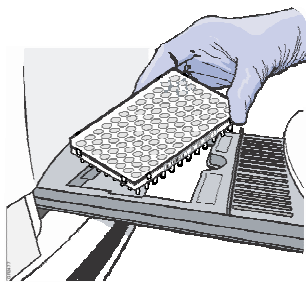


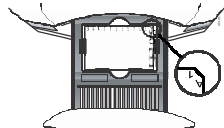
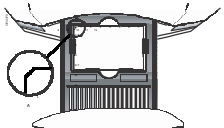
DŮLEŽITÉ! Při manipulaci s destičkou používejte rukavice bez pudru.

1. Stiskem otevřete nosítka přístroje..



2. Umístěte destičku do držáku destičky. Ujistěte se, že destička je vložena ve správné orientaci.



7500	7500 Fast
Standardní destičky umístěte šikmým rohem (pozice A12) doprava nahoru.	Destičky Fast umístěte šikmým rohem (pozice A1) doleva nahoru.
	

Poznámky _____

3. Destička musí být v přístroji ve speciálním držáku – tzv. precision plate holder (PPH). Používáte-li:

- **Reakční destičku** – Umístěte destičku do držáku PPH s jamkou A1 orientovanou vlevo vzadu.

Poznámka: 8-zkumavkové stripy Fast lze použít pouze na přístroji 7500 Fast. Pro systém 7500 použijte MicroAmp® optické 8-zkumavkové stripy.

- **Stripy** – Umístěte stripy do držáku PPH určeného pro stripy.

Poznámka: Zkumavky typu Fast nelze na přístroji 7500 Fast použít.

- **Zkumavky** – Umístěte zkumavky do držáku PPH.

Poznámka: Zkumavky MicroAmp® Fast (kat. č. 4358297) nelze na systému 7500 Fast použít.

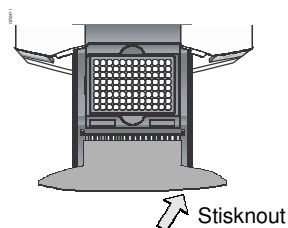
DŮLEŽITÉ! Není-li blok úplně naplněn:

Přístroj 7500

Vložte do bloku alespoň 16 zkumavek, a to nejprve do středních sloupců bloku (sloupce 6 a 7). Další zkumavky vkládejte směrem k okrajům bloku (ke sloupcům 1 a 12).

Přístroj 7500 Fast

- Do sloupců 1 a 12 vložte prázdné stripy, aby nedošlo k deformaci stripů v nichž je reakční směs.
 - Stripy vkládejte do bloku ve vertikálním směru počínaje sloupci 6 a 7 a pokračujte směrem vně.
 - Na přístroji 7500 Fast lze použít maximálně 6 stripů. Sloupce 2, 3, 10 a 11 ponechte prázdné.
4. Uzavřete nosítka přístroje tlakem na pravou stranu nosítek ve směru šipky na vyobrazení níže.



Zapnutí odesílání emailových zpráv (Volitelné)

Zapnutí funkce odesílání emailových zpráv umožní odesílání emailových zpráv z programu 7500 v okamžiku, kdy je na přístroji 7500/7500 Fast spuštěn nebo ukončen běh nebo pokud v průběhu běhu dojde k chybě. Tato funkce je volitelná a nemá vliv na fungování systémů 7500/7500 Fast nebo na trvání běhu.



DŮLEŽITÉ! Odesílání emailových zpráv je možné pouze pokud je počítač, který používáte pro ovládání přístroje 7500/7500 Fast připojen do sítě.

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu:

- Program 7500 je nastaven tak, aby odesílal oznámení třem uživatelům (vědec, dohlížející pracovník a laborant v mycompany.com), a to jakmile přístroj 7500/7500 Fast ukončí běh nebo dojde-li k chybě v průběhu běhu.
- Používaný SMTP server uvedený jako příklad (www.mycompany.com) je nastaven pro kódování Secure Sockets Layer (SSL) a vyžaduje autentizaci.

Nastavení odesílání emailových zpráv

1. V programu 7500 klikněte na ikonu  **Run** (Běh).
2. Klikněte  **Notification Settings** (Nastavení).
3. Zvolte **Yes** (Ano) pro možnost Enable Notifications (Umožnit odesílání zpráv).
4. Zvolte o jakých událostech chcete být informováni:
 - a. Zvolte **Instrument Error** (Chyba přístroje).
 - b. Zvolte **Run Completed** (Běh ukončen).
5. Do pole Enter e-mail addresses for notifications (Zadejte emailové adresy) zadejte: **scientist@mycompany.com, supervisor@mycompany.com, technician@mycompany.com.**
6. Do pole Outgoing Mail Server (SMTP - server pro odchozí poštu) zadejte **smtp.mycompany.com.**
7. Nastavte parametry autentizace :
 - a. Zvolte **Yes** (Ano) pro volbu Server requires authentication (Server požaduje autentizaci).
 - b. Do pole User Name (Uživatelské jméno) zadejte **Example User** (Zkušební uživatel).
 - c. Do pole Password (Heslo) zadejte **password.**

Poznámky _____

Doporučení

Pokud provádíte tato nastavení v systému 7500/7500 Fast:

- Váš systém musí být připojen do sítě. Viz příručka *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems Maintenance Guide*.
- Zvolte události, o nichž mají být odeslány emailové zprávy:
 - **Instrument Error** (Chyba přístroje) – Bude odeslán email o všech chybách, které se vyskytnou během běhu.
 - **Run Started** (Běh spuštěn) – Bude odeslán email vždy když je spuštěn běh.
 - **Run Completed** (Běh ukončen) – Bude odeslán email vždy když je běh ukončen.
- Zadejte emailové adresy.

DŮLEŽITÉ! Jednotlivé adresy oddělujte čárkou (,).



- Potřebujete-li následující informace, kontaktujte vašeho správce sítě:
 - E-mailové adresy uživatelů, kteří mají dostávat zprávy.
 - Síťovou adresu pro SMTP server v místní síti.
 - Uživatelské jméno a heslo pro přístup na server.
 - Secure Sockets Layer (SSL) nastavení serveru (zapnuto nebo vypnuto).

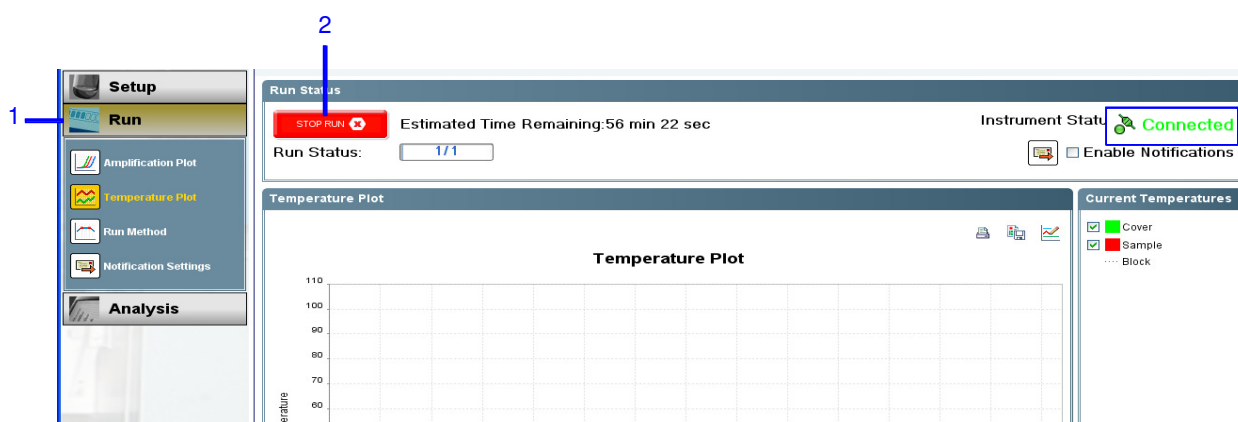
Poznámky _____

Spuštění běhu

DŮLEŽITÉ! Provádíte-li na systému 7500/7500 Fast běh, nezadávejte další experimenty, neprovádějte údržbu, neumožněte spuštění antivirového programu na počítači či přechod počítače do režimu spánku. Provádění těchto kroků může způsobit problémy při snímání dat z běhu.



Chcete-li spustit běh na přístroji 7500/7500 Fast:

1. V programu 7500 klikněte na ikonu  **Run** (Běh).
2. Klikněte **START RUN (SPUSTIT BĚH)** .



Sledování průběhu běhu

Můžete sledovat průběh běhu v reálném čase podle postupu níže. V průběhu běhu sledujte všechny tři dostupné grafy programu 7500 kvůli případným potížím.

Chcete-li...	Krok
Zastavit běh	<ol style="list-style-type: none"> 1. V programu 7500 klikněte STOP RUN. 2. V dialogovém okně Stop Run zvolte: <ul style="list-style-type: none"> – Stop Immediately – běh se ihned zastaví. – Stop after Current Cycle/Hold – běh se zastaví po skončení aktuálního cyklu/inkubace. – Cancel – běh bude pokračovat.
Sledovat amplifikaci v reálném čase	Zvolte  Amplification Plot (Amplifikační graf). Viz "O amplifikačním grafu" na straně 62.
Sledovat průběh běhu na obrazovce Run Method (Běh)	Zvolte  Run Method (Běh). Viz "O obrazovce Běh" na straně.

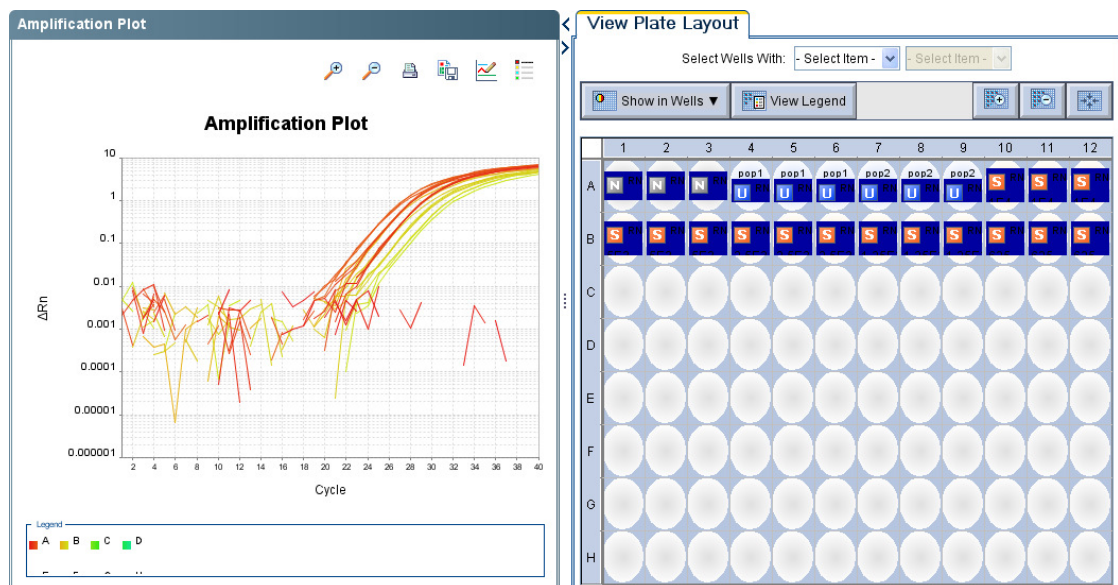
Poznámky _____

Chcete-li...	Krok
Zapnout/Vypnout odesílání zpráv	Zatrhnete nebo odznačte Enable Notifications (Zapnout odesílání zpráv). Viz "Zapnutí odesílání emailových zpráv (Volitelné)" na straně 59.

O amplifikačním grafu

Amplifikační graf umožňuje sledovat průběh amplifikace v průběhu běhu. Je-li běh nastaven pro měření fluorescence v reálném čase, zobrazí se v amplifikačním grafu amplifikační křivky jamek zvolených v záložce View Plate Layout (Zobrazení destičky). V grafu je znázorněna závislost normalizované fluorescence reportérové barvy (ΔR_n) na cyklu. Na obrázku níže je vyobrazen příklad amplifikačního grafu během vzorového experimentu.


Chcete-li v amplifikačním grafu zobrazit výsledky, zvolte příslušné jamky v záložce View Plate Layout (Zobrazení destičky).



Amplifikační graf je vhodný pro analýzu abnormálních výsledků amplifikace.

Mezi takovéto výsledky patří:

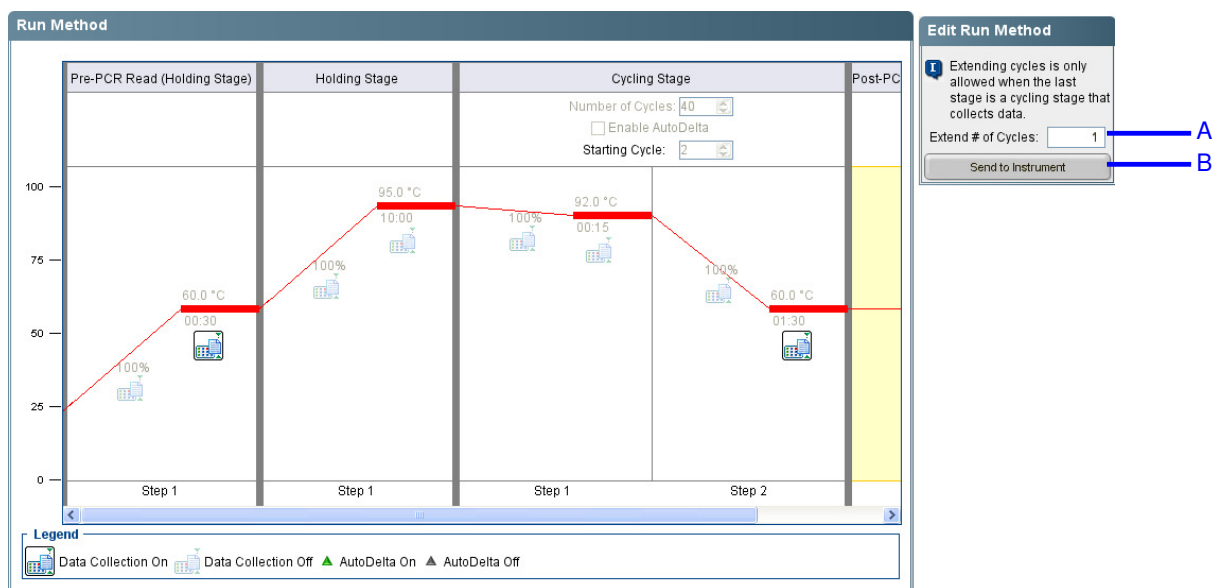
- Zvýšená fluorescence v jamkách negativních kontrol.
- Absence nárůstu fluorescence v určitém cyklu (očekávané na základě provedení obdobných experimentů za použití týchž reagensů a podmínek předešle).


Pokud si povšimnete abnormální amplifikace nebo signál úplně chybí, vyřešte tento problém podle postupu v nápovědě programu **7500** (klikněte  nebo stiskněte **F1**).

O obrazovce Běh

Na obrazovce Běh se zobrazuje teplotní profil a další parametry aktuálního běhu. Pole Run Status (Stav běhu) se v průběhu běhu aktualizuje. Na obrázku níže je vyobrazen příklad obrazovky Běh během vzorového experimentu.

	Chcete-li...	Krok
A	Změnit počet cyklů	V poli Extend # of Cycles zadejte počet cyklů, které chcete přidat.
B	Potvrdit provedené změny	Klikněte Send to Instrument (Poslat do přístroje).



Objeví-li se chybová hláška, klikněte na ni pro získání více informací a vyřešte tento problém podle postupu v nápovědě programu 7500 (klikněte  nebo stiskněte **F1**).

Poznámky _____

Vyjmutí destičky z přístroje

Zobrazí-li váš přístroj 7500/7500 Fast zprávu Run Complete (Běh ukončen), vyjměte destičku z přístroje.

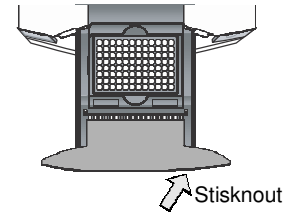
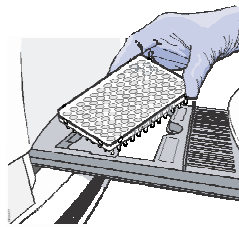
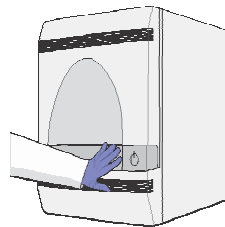
Vyjmutí
destičky



WARNING

RIZIKO PORANĚNÍ. Při provozu přístroje může teplota bloku na vzorky překročit 100 °C. Před provedením následujícího postupu se ujistěte, že blok na vzorky je vychladlý na pokojovou teplotu.

1. Stiskem otevřete nosítka přístroje.
2. Vyjměte destičku.
3. Stiskem uzavřete nosítka přístroje.




Poznámky _____

5

Analýza výsledků experimentu

V této kapitole naleznete:

■ Přehled.....	66
Část 5.1 Shlednutí výsledků.....	67
■ Analýza výsledků experimentu	68
■ Zobrazení standardní křivky.....	71
■ Zobrazení amplifikačního grafu.....	74
■ Zobrazení tabulky výsledků	81
■ Publikování výsledků	83
Část 5.2 Řešení problémů (je-li zapotřebí).....	85
■ Zobrazení parametrů analýzy	86
■ Zobrazení výsledků kontroly kvality.....	88
■ Vynechání jamek z analýzy.....	90
■ Zobrazení multikomponentního grafu.....	92
■ Zobrazení hrubých dat.....	94

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > 7500 Software Help**.

Přehled

Program 7500 analyzuje výsledky pomocí metody standardní křivky. Část 1 této kapitoly vysvětluje, jak shlédnout výsledky pomocí různých obrazovek programu a jak je publikovat. Jsou-li vaše výsledky sporné, naleznete v části 2 této kapitoly rady pro řešení problémů.

Vzorový experiment

Postup provádění analýzy vzorového experimentu je vyobrazen níže.

Zahájení experimentu

Zadání experimentu (Kapitola 2)

Příprava reakcí (Kapitola 3)

Provedení experimentu (Kapitola 4)

Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)

Část 1, Shlédnutí výsledků:

1. Analýza.
2. Zobrazení standardní křivky.
3. Zobrazení amplifikačního grafu.
4. Zobrazení tabulky výsledků.
5. Publikování výsledků.

Část 2, Řešení problémů (je-li zapotřebí):

1. Zobrazení parametrů analýzy; nastavení pozadí/prahu.
2. Zobrazení výsledků kontroly kvality.
3. Vynechání jamek. z analýzy.
4. Zobrazení multikomponentního grafu.
5. Zobrazení hrubých dat.

Konec experimentu

Poznámky _____

Část 5.1 Shlédnutí výsledků

V této kapitole naleznete:

■ Analýza výsledků experimentu	68
■ Zobrazení standardní křivky	71
■ Zobrazení amplifikačního grafu	74
■ Zobrazení tabulky výsledků	81
■ Publikování výsledků	83

Poznámky _____

Analýza výsledků experimentu

Program 7500 provádí analýzu experimentu a výsledky zobrazuje pomocí různých obrazovek (např. amplifikační graf, kontrola kvality atd.).

O vzorovém experimentu


V případě vzorového experimentu standardní křivky použijte soubor, který se instaluje spolu s programem 7500. Tento soubor byl vytvořen podle postupu v [Kapitole 2](#), poté byl proveden běh a analýza na přístroji 7500/7500 Fast. Soubor naleznete ve vašem počítači:

<disk>:\Applied Biosystems*<název softwaru>*\experiments
Standard Curve Example.eds

kde:

- <disk> je pevný disk počítače, na kterém je instalován program 7500.
- <název softwaru> je současná verze programu 7500.

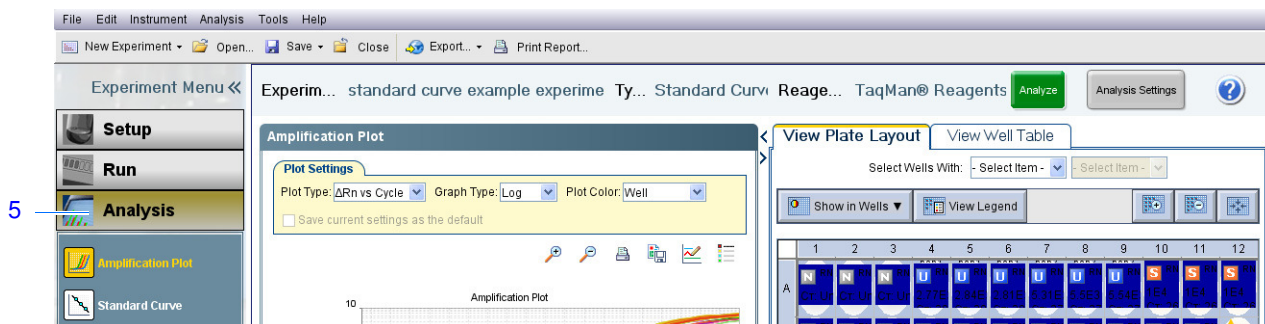
Analýza vzorového experimentu

1. Dvakrát klikněte na ikonu  programu 7500 nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je současná verze programu 7500.
2. Na výchozí obrazovce klikněte na **Open** (Otevřít).
3. V dialogovém okně Open (Otevřít) vyhledejte adresář **experiments**:
<disk>:\Applied Biosystems*<název softwaru>*\experiments\
4. Dvakrát klikněte na **Standard Curve Example.eds**.

Poznámka: Adresář s experimenty obsahuje několik souborů, ujistěte se, že jste vybrali **Standard Curve Example**.

5. Klikněte **Analyze** (Analyzovat). Program 7500 provede analýzu výsledků za použití přednastavených parametrů.

Viz část [“Tipy pro snadnou orientaci” na straně 69](#), kde získáte více informací o obrazovkách zobrazujících výsledky analýzy.



Poznámky _____

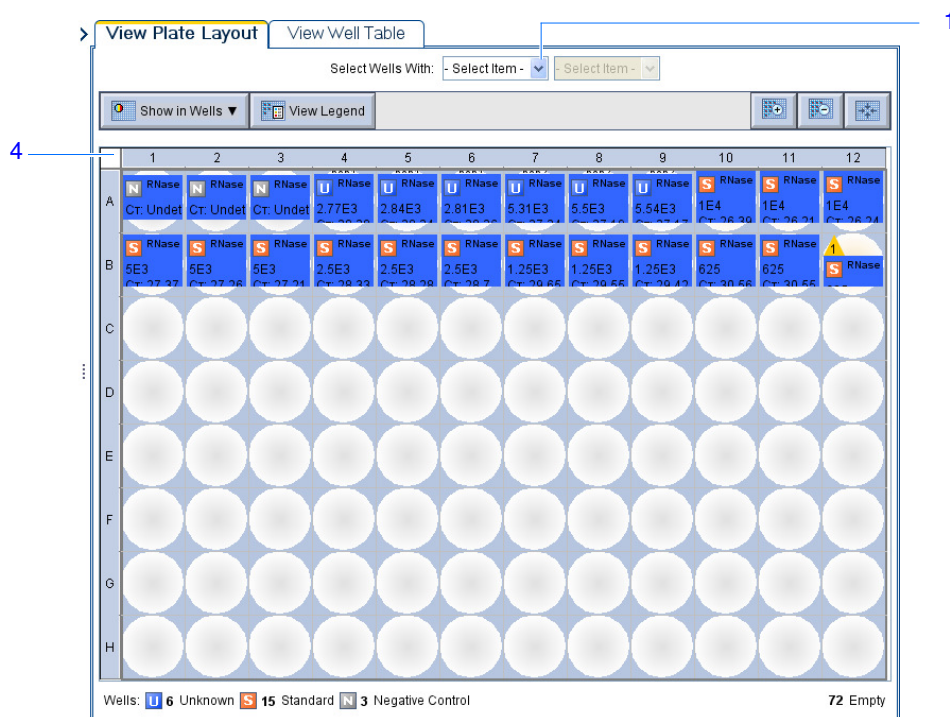
Doporučení Provádíte-li analýzu vlastních experimentů standardní křivky:

- Program 7500 automaticky ihned po skončení běhu provede analýzu výsledků za použití přednastavených parametrů a zobrazí na obrazovce vašeho počítače amplifikační graf.
- Chcete-li výsledky analyzovat znovu, vyberte všechny jamky ve vyobrazení destičky a klikněte **Analyze** (Analyzovat).

Tipy pro snadnou orientaci Jak vybrat jamky

Chcete-li na obrazovkách zobrazujících výsledky analýzy zobrazit data pro specifické jamky, zvolte tyto jamky v záložce View Plate Layout (Zobrazení destičky) takto:





1. Chcete-li zvolit určitý typ jamek, použijte rozbalovací nabídky Select Wells With (Zvolit jamky): Zvolte **Sample** (Vzorek), **Target** (cílová sekvence) nebo **Task** (Úloha), poté zvolte vzorek, cílovou sekvenci nebo úlohu.
2. Chcete-li vybrat jednu jamku, klikněte na ni ve vyobrazení destičky.
3. Chcete-li vybrat více jamek, klikněte a táhněte myš, stiskněte **CTRL+klikněte**, nebo stiskněte **Shift+klikněte** (ve vyobrazení destičky).
4. Chcete-li vybrat všechny jamky, klikněte do horního levého rohu vyobrazení destičky.

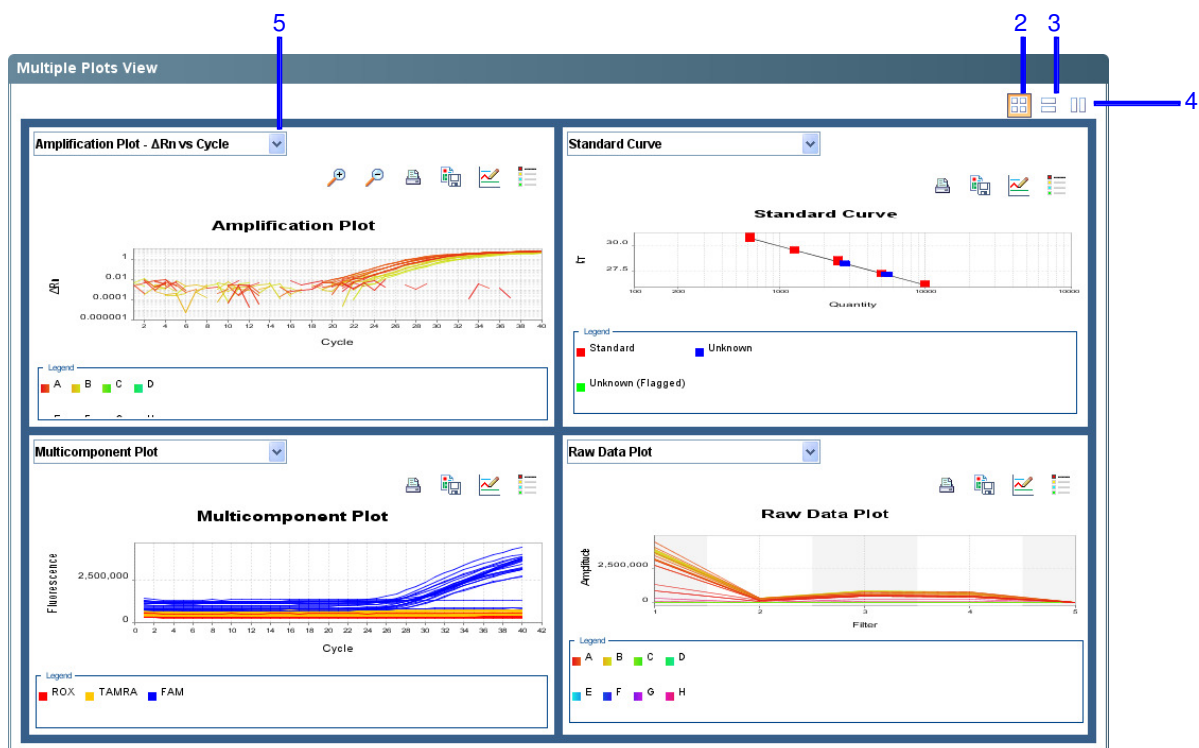


Poznámky _____

Jak zobrazit více grafů

Pomocí obrazovky Multiple Plots (Více grafů) můžete zobrazit až čtyři grafy najednou:

1. Na navigačním panelu zvolte **Analysis** >  **Multiple Plots View** (Analýza > Zobrazit více grafů).
2. Chcete-li zobrazit čtyři grafy, klikněte  **Show plots in a 2 × 2 matrix**.
3. Chcete-li zobrazit dva grafy pod sebou, klikněte  **Show plots in two rows**.
4. Chcete-li zobrazit dva grafy vedle sebe, klikněte  **Show plots in two columns**.
5. Chcete-li zobrazit vybraný graf, zvolte jej v rozbalovací nabídce v každé části okna.



Poznámky _____

Zobrazení standardní křivky

Obrazovka Standard Curve (Standardní křivka) zobrazuje standardní křivku pro vzorky označené jako standardy. Program 7500 na základě standardní křivky vypočítá množství cílových sekvencí v neznámých vzorcích.

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky shlédněte obrazovku standardní křivky a tam uvedené parametry:


- Sklon/Účinnost amplifikace
- parametr R^2 (korelační koeficient)
- C_T hodnoty

Poznámka: Ve vzorovém experimentu jsou sklon, R^2 a účinnost amplifikace ovlivněny C_T hodnotou jamky B12, kterou později v této analýze vynecháte.

Zobrazení standardní křivky

1. Na navigačním panelu zvolte **Analysis** >  **Standard Curve** (Analýza > Standardní křivka)

Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

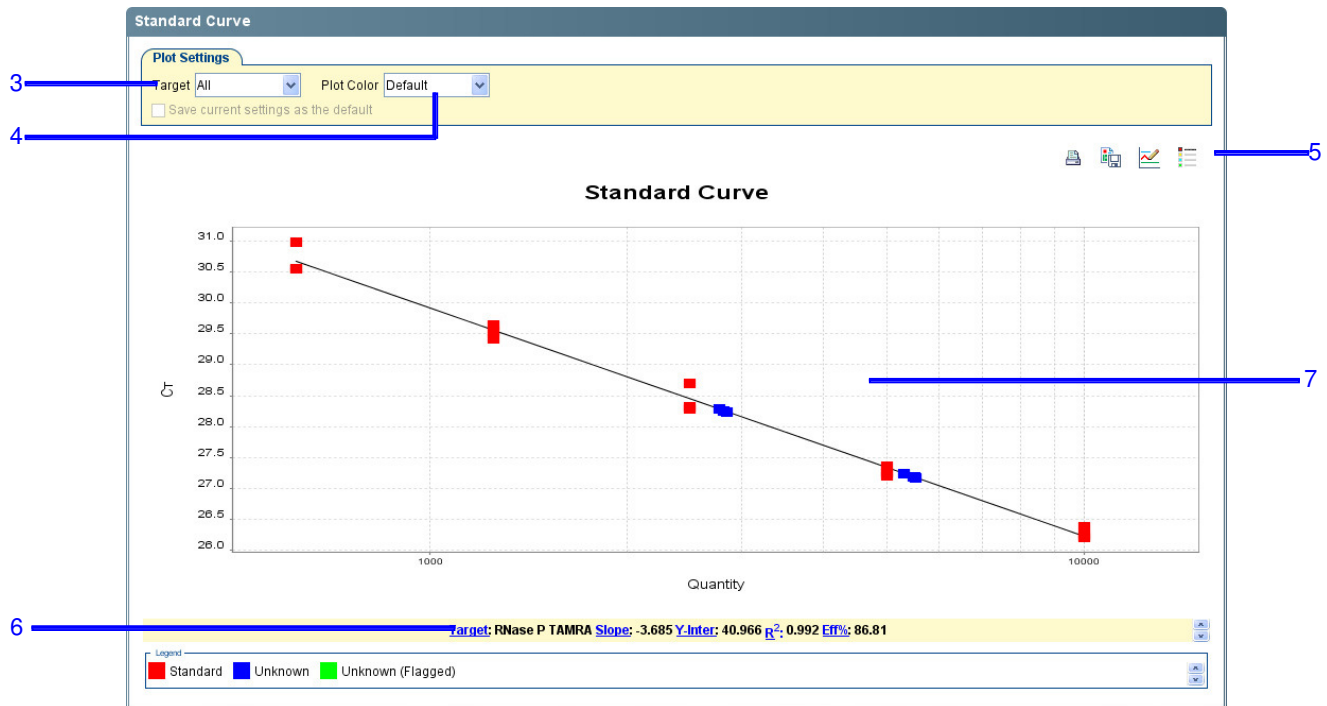
2. Na obrazovce Standard Curve (Standardní křivka) zobrazte všechny jamky (kliknutím do levého horního rohu vyobrazení destičky).
3. Z rozbalovací nabídky Target (Cílová sekvence) zvolte **All** (Všechny).
4. Z rozbalovací nabídky Plot Color (Barva grafu) zvolte **Default** (Přednastavená).
5. Klikněte  **Show a legend for the plot** (Zobrazit legendu grafu - přednastaveno).

Poznámka: Toto tlačítko je přepínací. Je-li legenda zobrazena, tlačítko získá funkci Hide the plot legend (Skrýt legendu grafu).

6. Shlédněte hodnoty parametrů zobrazených pod standardní křivkou. Ve vzorovém experimentu nabývají parametry pro RNázu P těchto přijatelných hodnot:
 - Sklon je -3.685.
 - R^2 je 0.992.
 - Účinnost amplifikace (Eff%) je 86.81%.

Poznámky _____

7. Ověřte, že všechny vzorky leží v rozsahu standardní křivky. Ve vzorovém experimentu leží všechny vzorky (modré tečky) v rozsahu standardní křivky (červené tečky).



8. Shlédněte Ct hodnoty:

- Klikněte na záložku **View Well Table** (Zobrazit tabulku jamek).
- Z rozbalovací nabídky Group By (Seskupit podle) zvolte **Replicate** (Replikát).
- Shlédněte hodnoty ve sloupci Ct. Ve vzorovém experimentu jsou Ct hodnoty v předpokládaném rozpětí (>8 a <35).

View Plate Layout View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Table Group By Expand All Collapse All

#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
RNase P TAMRA - NTC													
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...					
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...					
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...					
RNase P TAMRA - STANDARD - 10000.0													
4	A10	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.389278	26.281769	0.094	10,000		
5	A11	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.213354	26.281769	0.094	10,000		
6	A12	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.242676	26.281769	0.094	10,000		
RNase P TAMRA - STANDARD - 1250.0													
7	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.64913	29.538963	0.114	1,250		
8	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.546368	29.538963	0.114	1,250		
9	B9	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.421392	29.538963	0.114	1,250		
RNase P TAMRA - STANDARD - 2500.0													
10	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.325405	28.434366	0.228	2,500		
11	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.28138	28.434366	0.228	2,500		
12	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.69632	28.434366	0.228	2,500		
RNase P TAMRA - STANDARD - 5000.0													
13	B1	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.36778	27.277845	0.082	5,000		
14	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.258842	27.277845	0.082	5,000		

Poznámky _____

Doporučení k analýze

Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky, zkontrolujte:


- **Sklon/účinnost amplifikace** – Účinnost amplifikace je vypočítána na základě sklonu regresní přímky standardní křivky. Sklon blízký -3.3 indikuje optimální 100% účinnost PCR implikace. Účinnost amplifikace ovlivňuje:
 - Rozsah koncentrací standardů – Přesnější stanovení účinnosti amplifikace dostanete za použití většího rozsahu koncentrací standardů - 5 až 6 řádů (10^5 až 10^6 krát).
 - Počet replikátů standardů – Pro přesnější stanovení účinnosti amplifikace pracujte s replikáty, čímž snížíte vliv nepřesnosti pipetování.
 - PCR inhibitory – PCR inhibitory v reakci mohou snižovat její účinnost.
- **R₂ (korelační koeficient)** – Parametr R₂ je mírou toho, jak individuální hodnoty C_T leží na regresní přímce. Hodnota 1.00 znamená perfektní shodu mezi regresní přímkou a jednotlivými body. Žádoucí je dosáhnout hodnoty R₂ > 0.99.
- **C_T hodnoty** – Prahový cyklus (threshold cycle - C_T) je cyklus PCR, v němž úroveň fluorescence překročí práh. Žádoucí je dosáhnout hodnoty C_T > 8 a < 35. Hodnota C_T < 8 znamená, že v reakci je příliš mnoho templátu. Hodnota C_T > 35 znamená, že v reakci je příliš málo templátu; pro C_T > 35 očekávejte vyšší hodnoty standardní odchylky.

Nesplňuje-li váš experiment shora uvedená doporučení, postupujte podle:

- [“Vynechání jamek z analýzy” na straně 90.](#)
nebo
- opakujte experiment.

Více informací

Více informací o:

- Obrazovce standardní křivky získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Účinnosti amplifikace získáte v dokumentu *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

Poznámky _____


Zobrazení amplifikačního grafu

V amplifikačním grafu se zobrazuje amplifikace všech vzorků ve zvolených jamkách. K dispozici jsou tři různé grafy:

- **ΔR_n vs Cycle** – Graf závislosti ΔR_n na cyklu. ΔR_n je normalizovaný signál reportérové barvy měřený v každém cyklu PCR amplifikace. Graf zobrazuje ΔR_n jako funkci počtu cyklů. Tento graf lze využít k analýze nepravidelného průběhu amplifikačních křivek a k zobrazení prahu a pozadí.
- **R_n vs Cycle** – Graf závislosti R_n na cyklu. R_n je fluorescenční signál reportérové barvy normalizovaný na fluorescenční signál pasivní reference. Graf zobrazuje R_n jako funkci počtu cyklů. Tento graf lze využít k analýze nepravidelného průběhu amplifikačních křivek.
- **C_T vs Well** – Graf závislosti C_T na poloze jamky. C_T je PCR cyklus v němž fluorescence překročí práh v amplifikačním grafu. Graf zobrazuje C_T jako funkci jamky, lze jej využít k detekci odlehlých bodů (outliers).

Každý graf lze zobrazit v lineární nebo log₁₀ škále.

- O vzorovém experimentu** Ve vzorovém experimentu standardní křivky shlédněte v amplifikačním grafu:
- Správné nastavení pozadí a prahu
 - Odlehlé body

Zobrazení amplifikačního grafu V navigačním panelu zvolte Analysis >  Amplification Plot (Analýza > Amplifikační graf).

Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

2. Zobrazte v amplifikačním grafu jamky RNáza P:


- Klikněte do záložky **View Plate Layout** (Vyobrazení destičky).
- Z rozbalovací nabídky **Select Wells With** (Zvolit jamky) zvolte **Target** (Cílová sekvence), poté **RNase P TAMRA**.



3. Na obrazovce amplifikační graf:

- Z rozbalovací nabídky **Plot Type** (Typ grafu) zvolte **ΔR_n vs Cycle** (přednastaveno).
- Z rozbalovací nabídky **Plot Color** (Barva grafu) zvolte **Well** (podle jamky - přednastaveno).

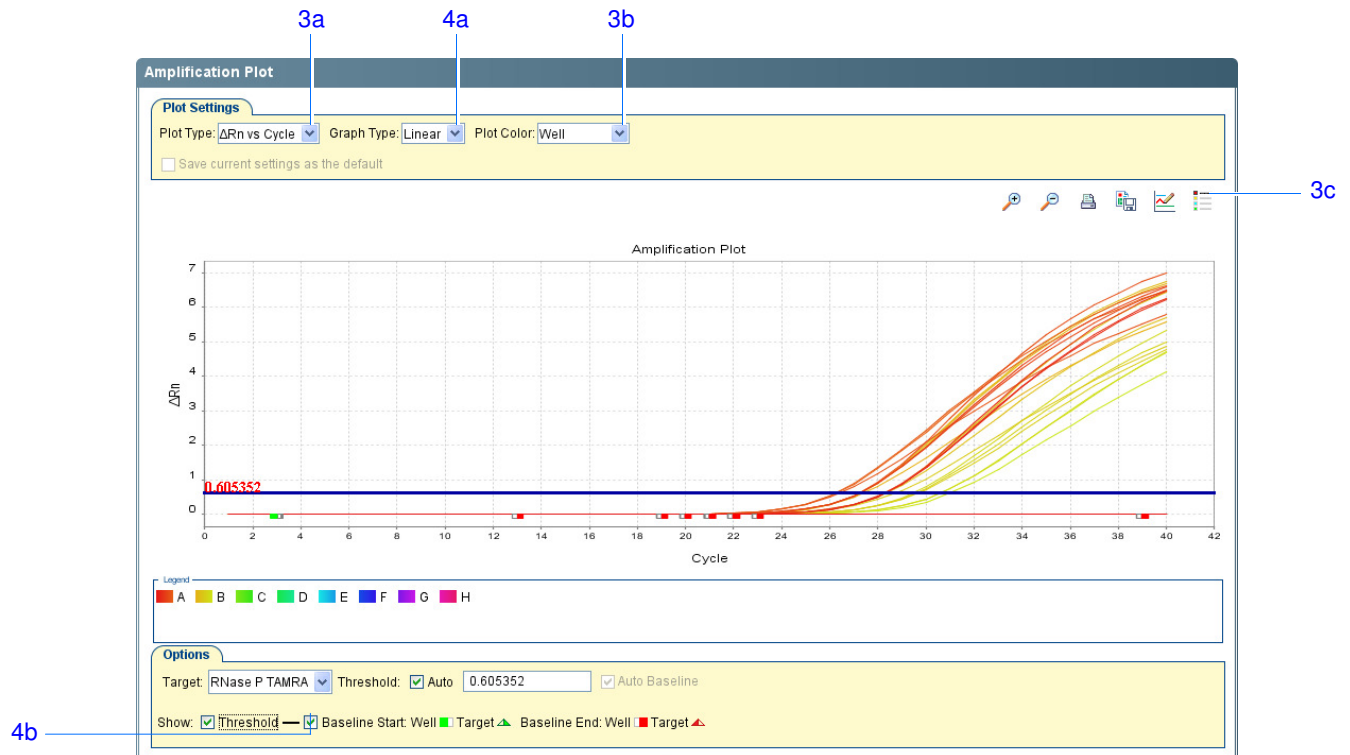
Poznámky _____

- c. Klikněte  **Show a legend for the plot** (Zobrazit legendu grafu - přednastaveno).

Poznámka: Toto tlačítko je přepínací. Je-li legenda zobrazena, tlačítko získá funkci Hide the plot legend (Skrýt legendu grafu).

4. Zobrazte pozadí:

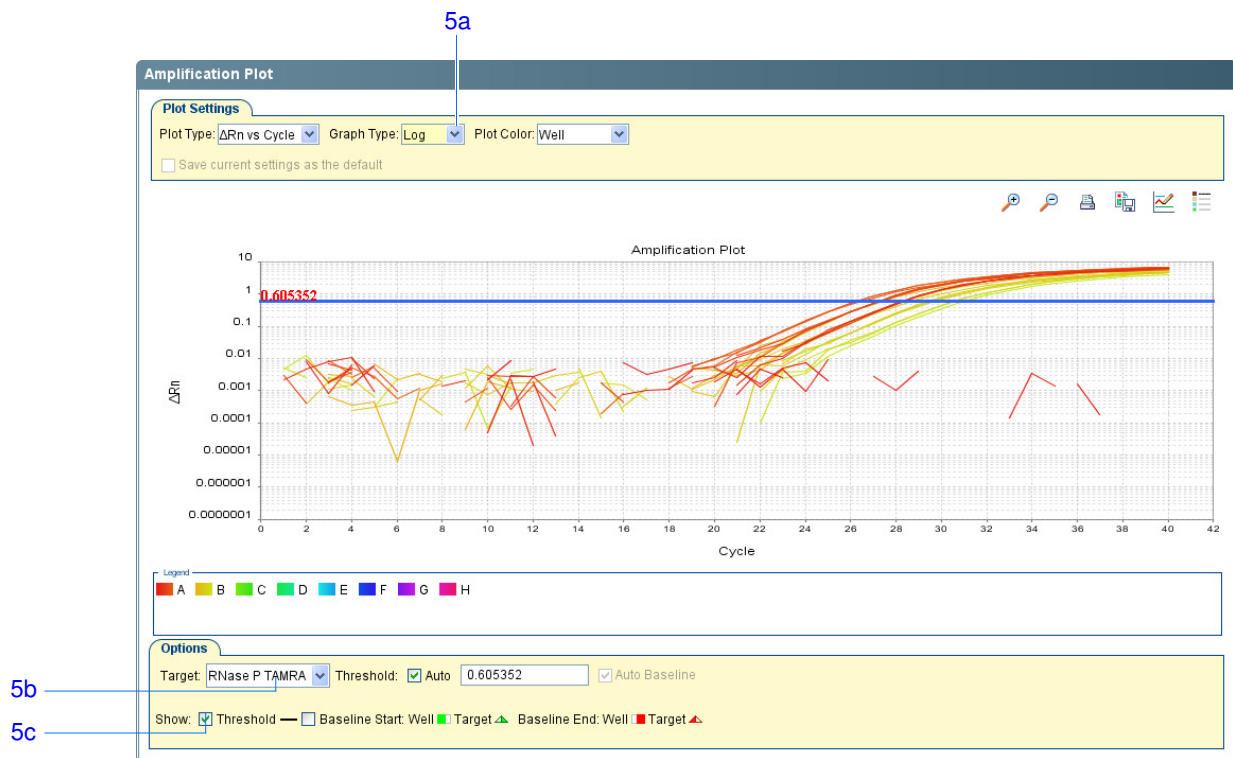
- Z rozbalovací nabídky Graph Type (Typ grafu) zvolte **Linear** (Lineární).
- Zatrhněte políčko **Baseline** (Pozadí), abyste zobrazili počáteční a konečný cyklus.
- Ověřte, že je pozadí správně nastaveno: Konečný cyklus by měl být nastaven několik cyklů před tím, než dojde k významnému nárůstu fluorescenčního signálu. Ve vzorovém experimentu je pozadí nastaveno správně.



Poznámky _____

5. Zobrazte práh:

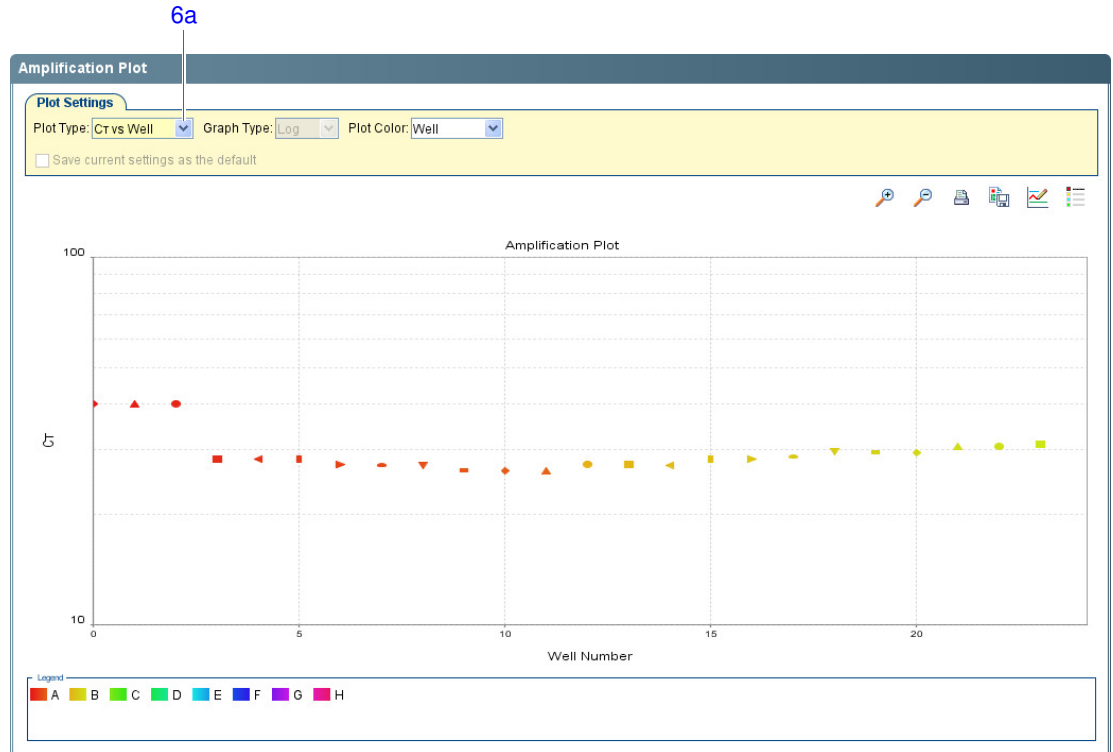
- Z rozbalovací nabídky Graph Type (Typ grafu) zvolte **Log** (Logaritmický).
- Z rozbalovací nabídky Target (Cílová sekvence) zvolte **RNase P TAMRA**.
- Zatrhnete políčko **Threshold** (Práh), čímž zobrazíte práh.
- Ověřte, že je práh nastaven správně. Ve vzorovém experimentu je práh v exponenciální fázi amplifikace.



Poznámky _____

6. Vyhledejte odlehlé body:

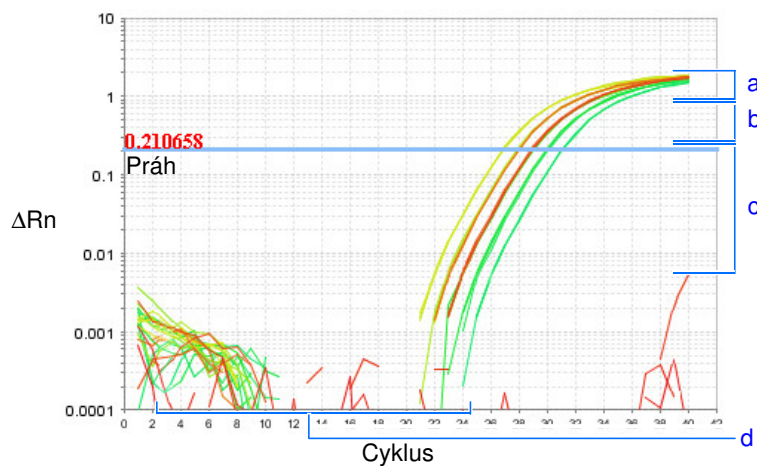
- a. Z rozbalovací nabídky Plot Type (Typ grafu) zvolte **Cr vs Well**.
- b. Vyhledejte odlehlé body v amplifikačním grafu. Ve vzorovém experimentu, nejsou žádné odlehlé body.



Poznámky _____

Doporučení k analýze Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky, zkontrolujte:

- Odlehlé body
- Typický amplifikační graf – Program 7500 automaticky počítá pozadí a práh, tento výpočet je založen na předpokladu, že průběh amplifikačních křivek je *typický*. Typický amplifikační graf má čtyři části:
 - a. Fázi plató
 - b. Lineární fázi
 - c. Exponenciální (geometrickou) fázi
 - d. Pozadí (Baseline)



DŮLEŽITÉ! Experimentální chyby (např. kontaminace nebo chyby pipetování) mohou vést ke vzniku atypických amplifikačních křivek, což vede k nesprávnému nastavení pozadí a prahu programem 7500. Společnost Applied Biosystems proto doporučuje, abyste nastavení pozadí a prahu po provedení automatické analýzy v amplifikačním grafu zkontrolovali.

- Správné nastavení pozadí a prahu – Viz příklady nastavení prahu na straně 79 a pozadí na straně 80.

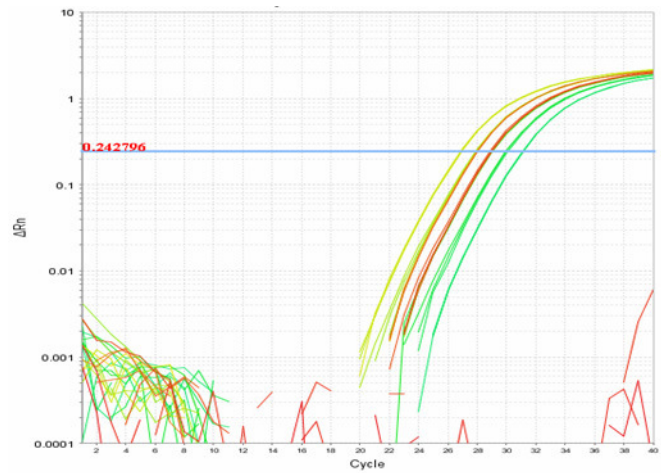
Příklady nastavení prahu

Správné nastavení prahu

Práh je nastaven v exponenciální fázi amplifikační křivky.

Nastavení prahu nad nebo pod optimální hodnotou zvyšuje standardní odchylku skupin replikátů.

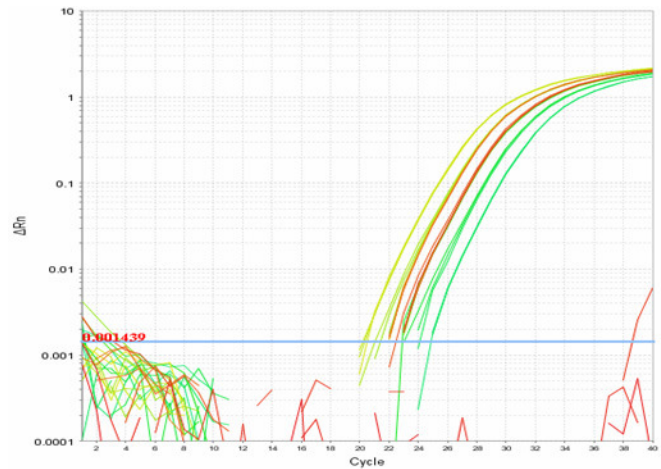
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	Comme
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2.484.31	2.551.476	126.2	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2.697.054	2.551.476	126.2	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96972	28.923796	0.074	2.473.064	2.551.476	126.2	



Práh nastaven příliš nízko

Práh je nastaven příliš nízko – mimo exponenciální fázi amplifikační křivky. Standardní odchylka je výrazně vyšší než při správném nastavení prahu. Přetáhněte linii prahu nahoru do exponenciální fáze amplifikace.

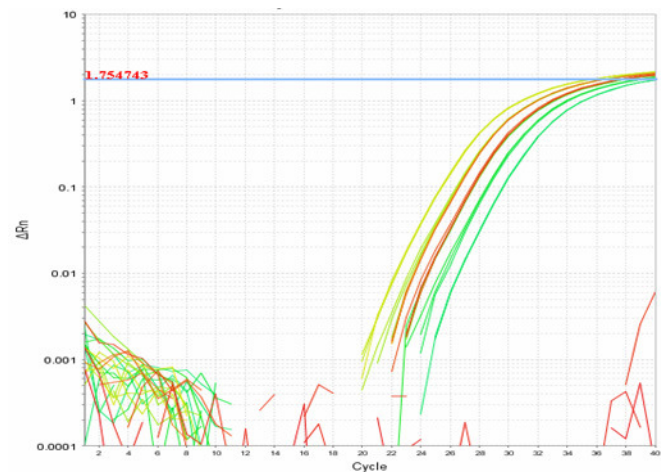
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
NTC	FAM-NFQ...	38.453182					
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.85404	22.761744	0.252	2.314.852	2.472.463	400.435
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.476973	22.761744	0.252	2.927.722	2.472.463	400.435
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.954218	22.761744	0.252	2.174.816	2.472.463	400.435



Práh nastaven příliš vysoko

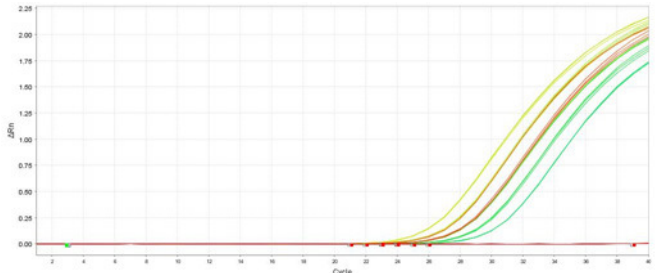
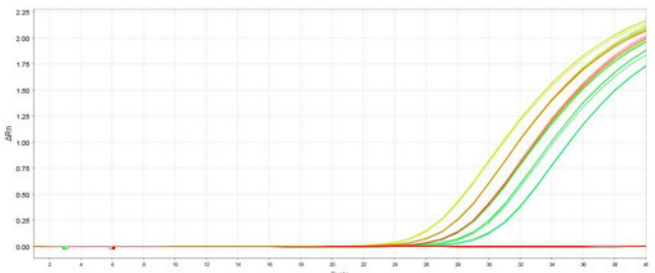
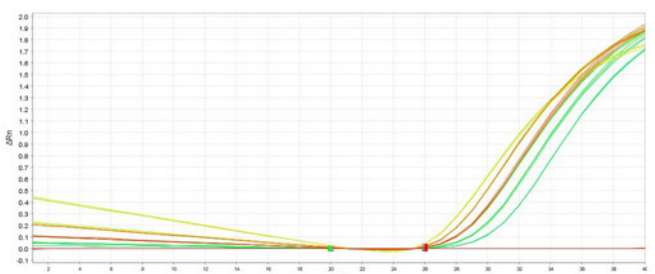
Práh je nastaven příliš vysoko – mimo exponenciální fázi amplifikační křivky. Standardní odchylka je výrazně vyšší než při správném nastavení prahu. Přetáhněte linii prahu dolů do exponenciální fáze amplifikace.

Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	Comme
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	37.681107	37.49507	0.202	2.571.177	2.888.429	353.775	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	37.27971	37.49507	0.202	3.269.923	2.888.429	353.775	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	37.524395	37.49507	0.202	2.824.187	2.888.429	353.775	



Poznámky _____

Příklady nastavení pozadí (Baseline)

<p>Správné nastavení pozadí</p> <p>Amplifikační křivka začíná až po posledním cyklu, ohraničujícím rozsah cyklů pro výpočet pozadí.</p>	
<p>Příliš nízké pozadí</p> <p>Amplifikační křivka začíná příliš vpravo od posledního cyklu, ohraničujícího rozsah cyklů pro výpočet pozadí. Zvyšte hodnotu posledního cyklu.</p>	
<p>Příliš vysoké pozadí</p> <p>Amplifikační křivka začíná před posledním cyklem, ohraničujícím rozsah cyklů pro výpočet pozadí. Snižte hodnotu posledního cyklu.</p>	

Nesplňuje-li váš experiment shora uvedená doporučení, postupujte podle:

- [“Vynechání jamek z analýzy” na straně 90.](#)
nebo
- Manuálně nastavte pozadí a/nebo práh (viz [“Zobrazení parametrů analýzy” na straně 86](#)).

Více informací  Více informací o amplifikačním grafu získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na **F1**.

Poznámky _____

Zobrazení tabulky výsledků

Tabulka výsledků zobrazuje data pro každou jamku reakční destičky:

- Název vzorku, název cílové sekvence, úloha a fluorescenční barvy
- Vypočítaná hodnota prahového cyklu (C_T), normalizované fluorescence (R_n) a množství
- Komentář
- Vlajčky

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky shlédněte zobrazení tabulky výsledků a tam uvedené parametry:

- Množství
- Vlajčky
- C_T hodnoty (včetně standardní odchylky C_T)

Zobrazení tabulky výsledků 1. V navigačním panelu zvolte **Analysis**, poté zvolte záložku **View Well Table** (Zobrazit tabulku výsledků).

Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

2. Pomocí rozbalovací nabídky Group By (Seskupit podle) můžete setřídít jamky podle specifické kategorie. Například podle replikátu, vlajčky nebo hodnoty C_T.

Poznámka: Lze zvolit pouze jednu kategorii.

a. V rozbalovací nabídce Group By (Seskupit podle) zvolte **Replicate** (Replikáty). Program seskupí jamky replikátů: negativní kontroly, standardy a vzorky. Ve vzorovém experimentu jsou množství v rámci skupin replikátů obdobná.

Poznámka: Sloupec lze přesunout tahem za jeho záhlaví.

2a

#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
RNase P TAMRA - NTC													
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P T... NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P T... NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P T... NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
RNase P TAMRA - STANDARD - 10000.0													
4	A10	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		26.389278	26.281769	0.094	10,000		
5	A11	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		26.213354	26.281769	0.094	10,000		
6	A12	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		26.242676	26.281769	0.094	10,000		
RNase P TAMRA - STANDARD - 1250.0													
7	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		29.64913	29.538963	0.114	1,250		
8	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		29.546368	29.538963	0.114	1,250		
9	B9	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		29.421392	29.538963	0.114	1,250		
RNase P TAMRA - STANDARD - 2500.0													
10	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		28.325405	28.434366	0.228	2,500		
11	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		28.28138	28.434366	0.228	2,500		
12	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA		28.69632	28.434366	0.228	2,500		
RNase P TAMRA - STANDARD - 5000.0													

Poznámky

- b. V rozbalovací nabídce Group By (Seskupit podle) zvolte **Flag** (Vlajčka). Program seskupí jamky s a bez vlajček. Ve vzorovém experimentu má vlajčku jamka B12.

2b


#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
Flagged Wells													
1	B12	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	30.982454	30.697205	0.247	625		
Unflagged Wells													
2	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undeterm...					
3	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undeterm...					
4	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undeterm...					
5	A4	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.280773	28.260696	0.02	2,772.365	2,807.509	34.422
6	A5	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.241549	28.260696	0.02	2,841.162	2,807.509	34.422
7	A6	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.259768	28.260696	0.02	2,808.998	2,807.509	34.422
8	A7	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.241302	27.200424	0.036	5,308.388	5,446.654	121.319
9	A8	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.18564	27.200424	0.036	5,496.287	5,446.654	121.319
10	A9	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.174326	27.200424	0.036	5,535.287	5,446.654	121.319
11	A10	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.389278	26.281769	0.094	10,000		
12	A11	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.213354	26.281769	0.094	10,000		
13	A12	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.242676	26.281769	0.094	10,000		
14	B1	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.36778	27.277845	0.082	5,000		
15	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.258842	27.277845	0.082	5,000		
16	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.206913	27.277845	0.082	5,000		
17	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.325405	28.434366	0.228	2,500		
18	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.28138	28.434366	0.228	2,500		
19	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.69632	28.434366	0.228	2,500		
20	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.64913	29.538963	0.114	1,250		
21	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.546368	29.538963	0.114	1,250		
22	B9	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.421392	29.538963	0.114	1,250		
23	B10	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	30.557467	30.697205	0.247	625		
24	B11	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	30.551697	30.697205	0.247	625		
25	C1	<input type="checkbox"/>											
26	C2	<input type="checkbox"/>											

- c. V rozbalovací nabídce Group By (Seskupit podle) zvolte **Ct**. Program seskupí jamky podle hodnot Ct: nízké, střední, vysoké a neurčené. Ve vzorovém experimentu jsou hodnoty Ct v předpokládaném rozsahu (>8 a <35).

2c

#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
Low (Ct less than 24)													
Medium (Ct from 24 to 30)													
1	A4	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.280773	28.260696	0.02	2,772.365	2,807.509	34.422
2	A5	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.241549	28.260696	0.02	2,841.162	2,807.509	34.422
3	A6	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	28.259768	28.260696	0.02	2,808.998	2,807.509	34.422
4	A7	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.241302	27.200424	0.036	5,308.388	5,446.654	121.319
5	A8	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.18564	27.200424	0.036	5,496.287	5,446.654	121.319
6	A9	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P T...	UNKNOWN	FAM-TAMRA	27.174326	27.200424	0.036	5,535.287	5,446.654	121.319
7	A10	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.389278	26.281769	0.094	10,000		
8	A11	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.213354	26.281769	0.094	10,000		
9	A12	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	26.242676	26.281769	0.094	10,000		
10	B1	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.36778	27.277845	0.082	5,000		
11	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.258842	27.277845	0.082	5,000		
12	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	27.206913	27.277845	0.082	5,000		
13	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.325405	28.434366	0.228	2,500		
14	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.28138	28.434366	0.228	2,500		
15	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	28.69632	28.434366	0.228	2,500		
16	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.64913	29.538963	0.114	1,250		
17	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.546368	29.538963	0.114	1,250		
18	B9	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	29.421392	29.538963	0.114	1,250		
High (Ct greater than 30)													
19	B10	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	30.557467	30.697205	0.247	625		
20	B11	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	30.551697	30.697205	0.247	625		
21	B12	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	STANDARD	FAM-TAMRA	30.982454	30.697205	0.247	625		
Undetermined													
22	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undeterm...					
23	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undeterm...					
24	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P T...	NTC	FAM-TAMRA	Undeterm...					


Poznámky _____

- Doporučení k analýze** Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky, seskupte jamky podle:
- **Replikátů** – Program seskupí jamky replikátů: negativní kontroly, standardy a vzorky. Shlédněte výsledky ve sloupcích Quantity (Množství), abyste se ujistili, že tyto hodnoty jsou obdobné. To je známka vysoké přesnosti.
 - **Vlajček** – Program seskupí jamky s a bez vlajček. Vlajčky označují, že program v dané jamce hlásí chybu. Popis chybových vlajček programu 7500 naleznete v části “Zobrazení výsledků kontroly kvality” na straně 88.
 - **C_T – C_T** je PCR cyklus v němž fluorescence překročí práh v amplifikačním grafu (tzv. prahový cyklus). Žádoucí je dosáhnout hodnoty C_T >8 a <35. Hodnota C_T <8 znamená, že v reakci je příliš mnoho templátu. Hodnota C_T >35 znamená, že v reakci je příliš málo templátu; pro C_T >35 očekávejte vyšší hodnoty standardní odchylky.
- Více informací** Více informací o tabulce výsledků získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Publikování výsledků

Výsledky experimentů lze publikovat několika způsoby:

- Graf lze uložit jako obrázek
- Graf lze vytisknout
- Vyobrazení destičky lze vytisknout
- Lze vytvořit prezentaci na základě výsledků experimentu
- Lze vytisknout zprávu s výsledky experimentu
- Data je možné exportovat

Více informací o těchto možnostech získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Poznámky _____

Poznámky _____

Část 5.2 Řešení problémů (je-li zapotřebí)

V této kapitole naleznete:

■ Zobrazení parametrů analýzy	86
■ Zobrazení výsledků kontroly kvality.....	88
■ Vynechání jamek z analýzy.....	90
■ Zobrazení multikomponentního grafu.....	92
■ Zobrazení hrubých dat.....	94

Poznámky _____

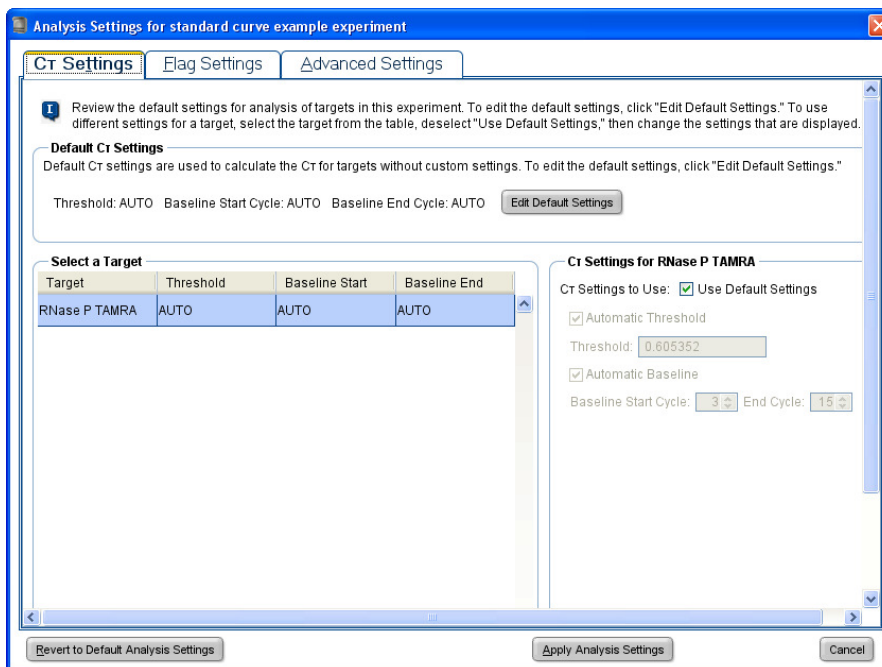
Zobrazení parametrů analýzy

Dialogové okno Analysis Settings (Parametry analýzy) zobrazuje nastavení parametrů analýzy pro prahový cyklus (C_T), vlaječky a rozšířené možnosti nastavení. Pokud nejsou přednastavené parametry vhodné pro váš experiment, můžete je v tomto dialogovém okně změnit a experiment analyzovat znovu.

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky se používají přednastavené parametry analýzy beze změn.

Zobrazení parametrů analýzy

1. V navigačním panelu zvolte Analysis (Analýza).
2. Klikněte **Analysis Settings** (Parametry analýzy) čímž otevřete dialogové okno Analysis Settings.
3. Ve vzorovém experimentu se v každé záložce použijí předvolené parametry:
 - Nastavení C_T
 - Nastavení vlaječek (Flag Settings)
 - Rozšířené možnosti nastavení (Advanced Settings)



Poznámky _____

Doporučení k analýze Pokud neznáte optimální nastavení parametrů pro váš experiment, použijte parametry tak jak jsou přednastaveny v programu 7500. Pokud nejsou přednastavené parametry vhodné pro váš experiment, můžete změnit:

- **Nastavení Ct** – V této záložce můžete ručně nastavit práh a pozadí. Při manuálním nastavování doporučuje společnost Applied Biosystems:

Nastavení	Doporučení
Práh	Definujte práh tak aby: <ul style="list-style-type: none"> • Byl vyšší než pozadí. • Neležel ve fázi plató a lineární fázi amplifikační křivky. • Ležel v exponenciální fázi amplifikační křivky.
Pozadí	Zvolte počáteční (Start Cycle) a konečný cyklus (End Cycle) tak, aby v takto definovaném rozsahu cyklů nedocházelo k výraznému nárůstu fluorescenčního signálu.

- **Nastavení vlaječek (Flag Settings)** – V této záložce můžete:
 - Upravit citlivost nastavení, což se projeví počtem jamek s vlaječkami.
 - Změnit vlaječky používané programem 7500.
- **Rozšířené možnosti nastavení (Advanced Settings)** – V této záložce můžete nastavit rozsah pozadí jednotlivě pro každou jamku.

Více informací Více informací o parametrech analýzy získáte v nápovědě programu 7500 stiskem klávesy **F1** při otevřeném okně Analysis settings (Parametry analýzy).

Poznámky _____


Zobrazení výsledků kontroly kvality

Obrazovka QC Summary (Kontrola kvality) slouží k zobrazení seznamu chybových vlaječek včetně četnosti jejich výskytu a umístění

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu standardní křivky shlédněte obrazovku kontroly kvality a zkontrolujte výskyt vlaječek. Ve vzorovém experimentu je v jamce B12 hodnota C_T , která se výrazně liší od ostatních technických replikátů, což vede k zobrazení vlaječky OUTLIERRG indikující, že tato jamka je potenciální odlehlý bod.

Zobrazení výsledků kontroly kvality

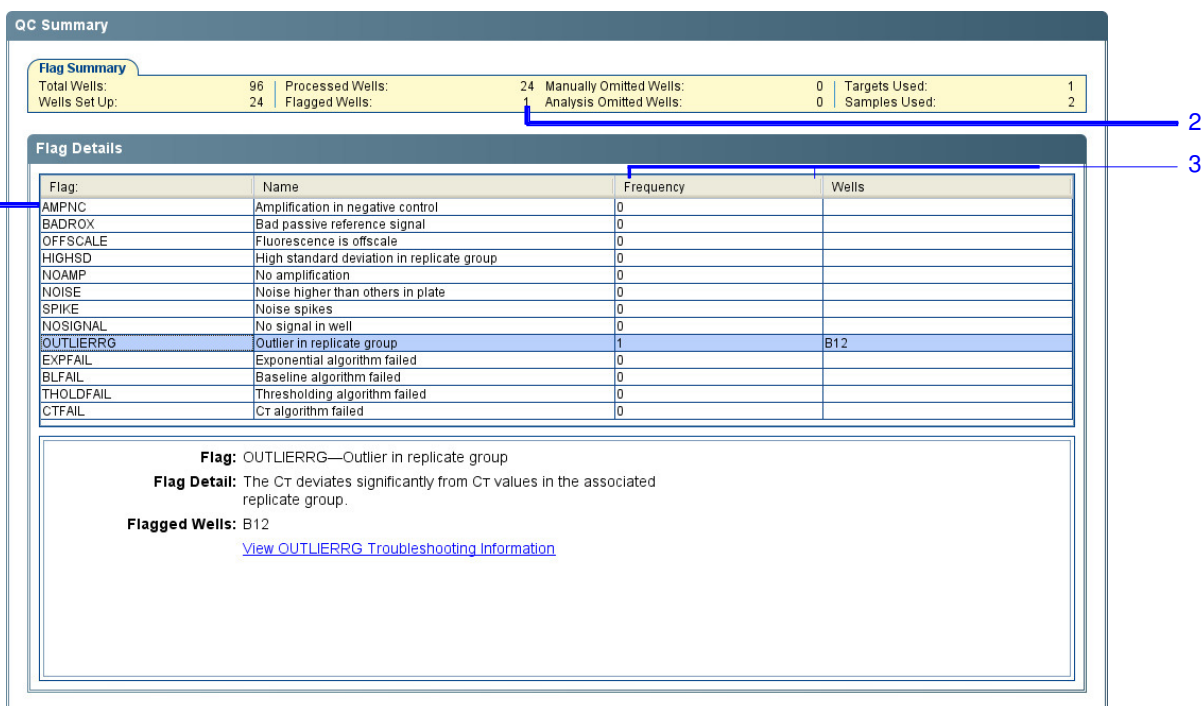
1. V navigačním panelu zvolte **Analysis** >  **QC Summary** (Analýza > Kontrola kvality).

Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

2. Shlédněte vyobrazenou statistiku vlaječek. Ve vzorovém experimentu je jedna jamka s vlaječkou
3. V tabulce Flag Details (Detailní údaje o vlaječkách) shlédněte údaje ve sloupcích Frequency (Četnost) a Wells (Jamky), z nichž zjistíte, které chybové vlaječky se objevily ve vašem experimentu. Ve vzorovém experimentu je ve sloupci Frequency (Četnost) 1 pro vlaječku OUTLIERRG.

Poznámka: 0 zobrazená ve sloupci Frequency (Četnost) značí, že v experimentu není žádná vlaječka toho druhu.

4. (Volitelné) Kliknutím do řádky vlaječky OUTLIERRG zobrazíte detailní informace o dané vlaječce.



QC Summary

Flag Summary							
Total Wells:	96	Processed Wells:	24	Manually Omitted Wells:	0	Targets Used:	1
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	1	Analysis Omitted Wells:	0	Samples Used:	2

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	1	B12
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	
CTFAIL	Cr algorithm failed	0	

Flag: OUTLIERRG—Outlier in replicate group

Flag Detail: The C_T deviates significantly from C_T values in the associated replicate group.

Flagged Wells: B12

[View OUTLIERRG Troubleshooting Information](#)

Poznámky

Vlajčky

V případě experimentů standardní křivky se mohou zobrazit níže uvedené vlajčky.

Pokud se vlajčka v experimentu nezobrazí, je četnost jejího výskytu 0. Je-li četnost výskytu >0, znamená to, že se v experimentu objevila chyba symbolizovaná touto chybovou vlajčkou; ve sloupci Well (Jamka) je informace o tom, v které jamce se chyba vyskytla.


Vlajčka	Popis
AMPNC	Amplifikace v negativní kontrole
BADROX	Špatný signál pasivní reference
BLFAIL	Selhání stanovení pozadí
CTFAIL	Selhání stanovení C _T
EXPFAIL	Selhání stanovení exponenciální fáze amplifikace
HIGHSD	Vysoká standardní odchylka v rámci skupiny replikátů
MTP	Více píků s různou T _m Poznámka: Pouze je-li součástí experimentu křivka tání.
NOAMP	Žádná amplifikace
NOISE	Vyšší šum než v jiných jamkách
NOSIGNAL	Žádný signál v jamce
OFFSCALE	Příliš silný fluorescenční signál
OUTLIERRG	Odlehlý bod ve skupině replikátů
SPIKE	Výkyvy šumu
THOLDFAIL	Selhání stanovení prahu

Doporučení k analýze

Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky:

- Klikněte na každou vlajčku v tabulce Flag Details (Detailní údaje o vlajčkách) s vyšší frekvencí než 0, čímž zobrazíte detailní informace o vlajčce. Je-li zapotřebí, klikněte na odkaz k řešení problému.
- Nastavení vlajček můžete měnit:
 - Upravte citlivost nastavení, což se projeví počtem jamek s vlajčkami.
 - Změňte vlajčky používané programem 7500.

Více informací


Více informací o obrazovce kontroly kvality a nastavení vlajček získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Poznámky _____

Vynechání jamek z analýzy

V důsledku experimentálních chyb je možné, že v některých jamkách dojde k nedostatečné nebo vůbec žádné amplifikaci. V takových jamkách naměříte hodnoty C_t , které se výrazně liší od průměru dané skupiny replikátů. Pokud by tyto výsledky byly zahrnuty do výpočtů, dojde k jejich zkreslení; proto pro zvýšení přesnosti je zapotřebí tyto tzv. odlehlé body vynechat z analýzy.

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky je jamka B12 označena jako potenciální odlehlý bod.

Vynechání jamek 1. V navigačním panelu zvolte **Analysis** >  **Amplification Plot** (Analýza > Amplifikační graf).

Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

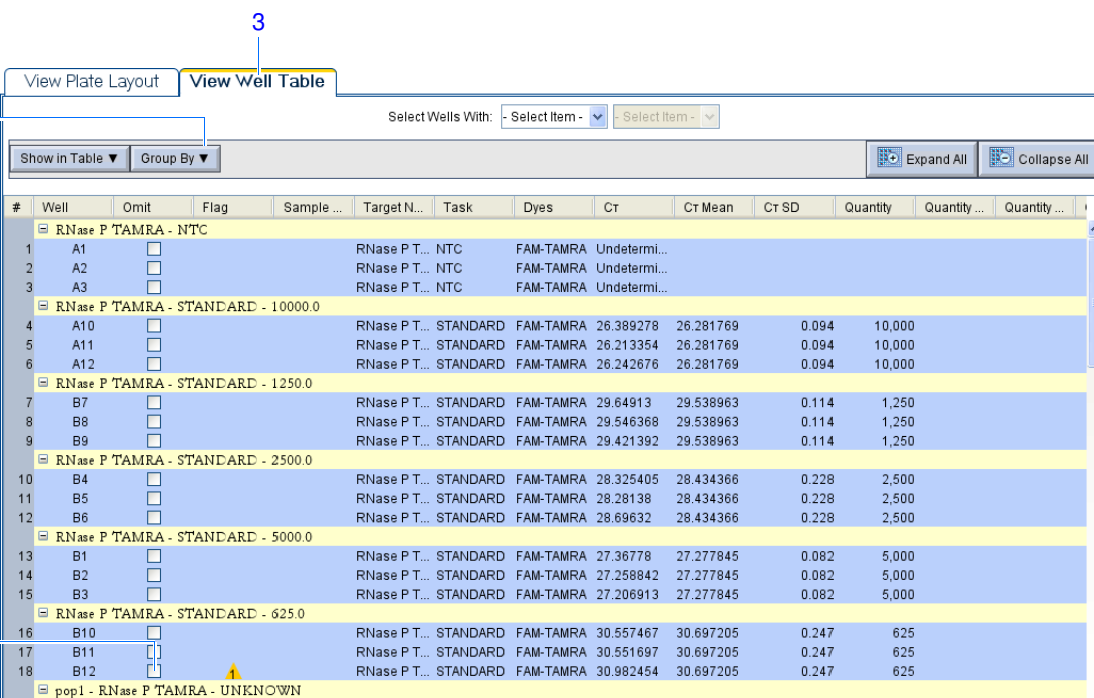
2. Na obrazovce Amplification Plot (Amplifikační graf) zvolte z rozbalovací nabídky Plot Type (Typ grafu) **Cr vs Well**.

3. Zvolte záložku **View Well Table** (Zobrazit tabulku jamek).

4. V tabulce jamek:


a. Z rozbalovací nabídky Group By (Seskupit podle) zvolte **Replicate** (Replikát).

b. Hledejte odlehlé body ve skupinách replikátů (musí být označeny vlaječkou). I ve vzorovém experimentu program 7500 označil jamku B12 jako potenciální odlehlý bod.




#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	C_t	C_t Mean	C_t SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...
RNase P TAMRA - NTC													
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P T... NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P T... NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P T... NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
RNase P TAMRA - STANDARD - 10000.0													
4	A10	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	26.389278	26.281769	0.094	10,000			
5	A11	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	26.213354	26.281769	0.094	10,000			
6	A12	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	26.242676	26.281769	0.094	10,000			
RNase P TAMRA - STANDARD - 1250.0													
7	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	29.64913	29.538963	0.114	1,250			
8	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	29.546368	29.538963	0.114	1,250			
9	B9	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	29.421392	29.538963	0.114	1,250			
RNase P TAMRA - STANDARD - 2500.0													
10	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	28.325405	28.434366	0.228	2,500			
11	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	28.28138	28.434366	0.228	2,500			
12	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	28.69632	28.434366	0.228	2,500			
RNase P TAMRA - STANDARD - 5000.0													
13	B1	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	27.36778	27.277845	0.082	5,000			
14	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	27.258842	27.277845	0.082	5,000			
15	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	27.206913	27.277845	0.082	5,000			
RNase P TAMRA - STANDARD - 625.0													
16	B10	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	30.557467	30.697205	0.247	625			
17	B11	<input type="checkbox"/>			RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	30.551697	30.697205	0.247	625			
18	B12	<input type="checkbox"/>	▲		RNase P T... STANDARD	FAM-TAMRA	30.982454	30.697205	0.247	625			
pop1 - RNase P TAMRA - UNKNOWN													

Poznámky

5. Ve sloupci Omit (Vynechat) označte pole u jamky s vlaječkou, tím danou jamku vyřadíte z analýzy.
6. Klikněte **Analyze** (Analyzovat) abyste znovu analyzovali výsledky experimentu bez odstraněného odlehlého bodu.
7. Zkontrolujte výsledky po odstranění odlehlého bodu:
 - a. V navigačním panelu zvolte **Analysis >**  **Standard Curve (Analýza > Standardní křivka).**
 - b. Zobrazte všech 96 jamek kliknutím do levého horního rohu vyobrazení destičky.
 - c. V rozbalovací nabídce Target (Cílová sekvence) zvolte **All** (Všechny).
 - d. V rozbalovací nabídce (Barva grafu) zvolte **Default** (Přednastavená).
8. Shlédněte hodnoty zobrazené pod standardní křivkou. Ve vzorovém experimentu jsou zobrazené hodnoty pro cílovou sekvenci RNáza P v přijatelném rozsahu:
 - Sklon je -3.614.
 - Hodnota R^2 je 0.993.
 - Účinnost amplifikace (Eff%) je 89.118%.

Doporučení k analýze Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky, zkontrolujte přítomnost odlehlých bodů ve skupinách replikátů. Je-li zapotřebí, odstraňte odlehlé body ručně pomocí tabulky jamek.

Více informací Více informací o vynechání jamek z analýzy získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**. Postupujte takto:

1. Klikněte na záložku **Search** (Hledat).
2. Zadejte **omit well** (vynechat jamku).
3. Klikněte **List Topics** (Zobrazit výsledky).
4. Dvakrát klikněte na zvolený výsledek hledání.

Poznámky _____

Zobrazení multikomponentního grafu

Multikomponentní graf (Multicomponent Plot) zobrazuje příspěvek každé barvy k celkovému spektrálnímu signálu ve zvolené jamce během PCR.

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky shlédněte v zobrazení multikomponentního grafu:

- signál barvy ROX™ (pasivní reference)
- signál barvy FAM™ (reportér)
- výkyvy a náhlé změny
- amplifikaci v jamkách negativních kontrol

Zobrazení multikomponentního grafu

1. V navigačním panelu zvolte **Analysis** >  **Multicomponent Plot** (Multikomponentní graf).

Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

2. Zobrazte postupně jamky s neznámými vzorky a standardy:

- a. Klikněte **View Plate Layout** (Zobrazení destičky).
- b. Zvolte jednu jamku ve vyobrazení destičky, data z dané jamky jsou vyobrazena v multikomponentním grafu.

Poznámka: Zvolíte-li více jamek, obrazovka Multicomponent Plot zobrazí data pro všechny zvolené jamky najednou.

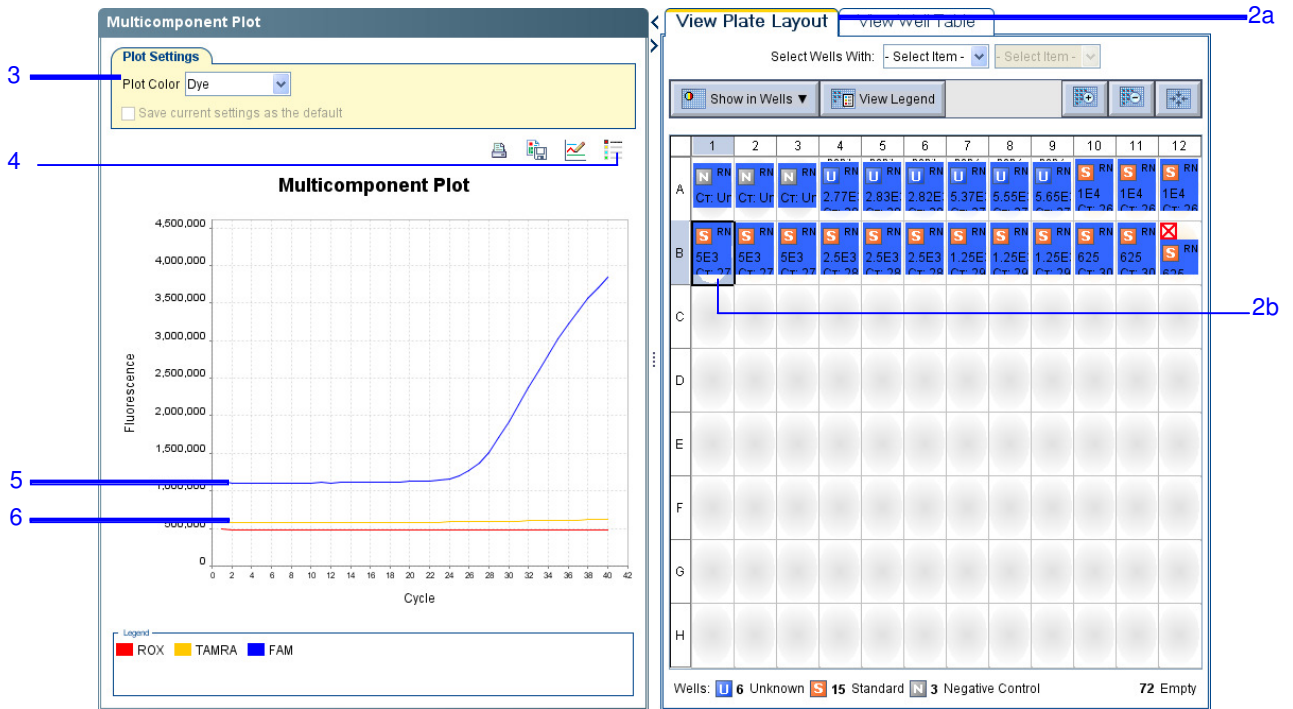
3. Z rozbalovací nabídky Plot Color (Barva grafu) zvolte **Dye** (Barva fluoroforu).

4. Klikněte  **Show a legend for the plot** (Zobrazit legendu grafu - přednastaveno).

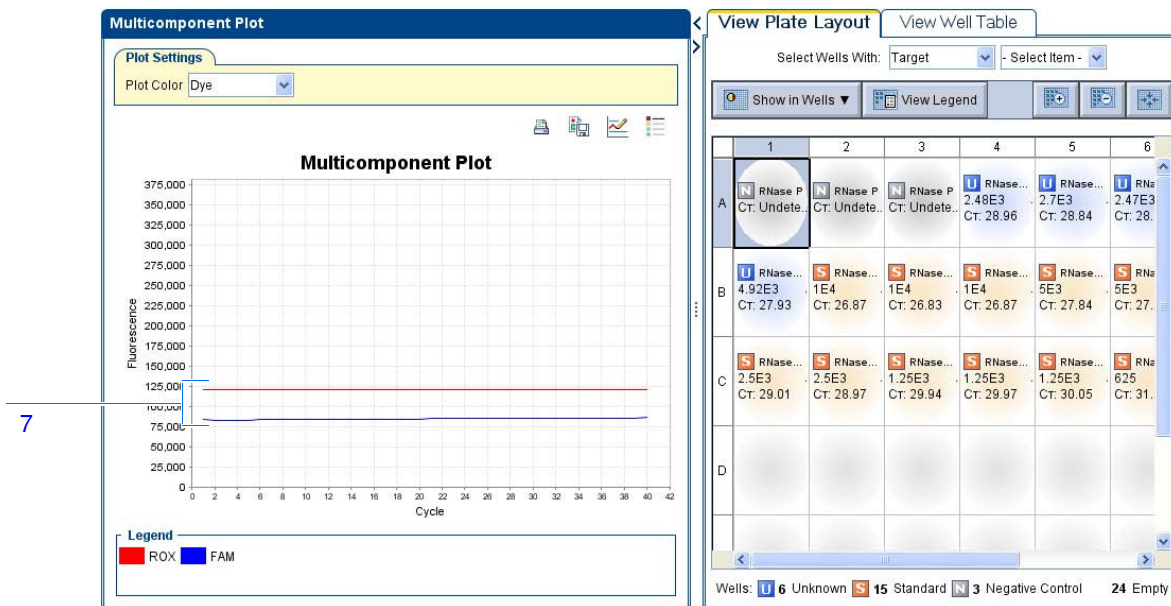
Poznámka: Toto tlačítko je přepínací. Je-li legenda zobrazena, tlačítko získá funkci Hide the plot legend (Skrýt legendu grafu).

5. Ověřte signál ROX. Ve vzorovém experimentu je signál ROX konstantní během celé PCR, což je v pořádku.


6. Ověřte signál FAM. Ve vzorovém experimentu signál FAM během PCR roste, což je známka normální amplifikace.



7. Zvolte postupně jamky s negativními kontrolami a ověřte, že v nich nedochází k amplifikaci. Ve vzorovém experimentu k amplifikaci v jamkách negativních kontrol nedochází.



Poznámky _____

- Doporučení k analýze** Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky, zkontrolujte:
- Pasivní referenci – Fluorescence pasivní reference by měla být během celé PCR víceméně konstantní.
 - Reportér – Signál reportérové barvy by měl být nejprve plochý, což odpovídá pozadí (baseline), a následně by mělo dojít k prudkému nárůstu fluorescenčního signálu, což je známka amplifikace.
 - Nepravidelnosti signálu – Fluorescenční signál by neměl vykazovat žádné nepravidelnosti (žádné náhlé změny, píky apod.).
 - Negativní kontroly – V jamkách negativních kontrol by nemělo docházet k amplifikaci.
- Více informací** Více informací o multikomponentním grafu získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Zobrazení hrubých dat


Obrazovka Raw Data Plot (Hrubá data) zobrazuje fluorescenční signál (nenormalizovaný) v každém optickém filtru pro zvolené jamky a během celé real-time PCR.

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky shlédněte hrubá data – mělo by docházet k stabilnímu nárůstu signálu (žádné náhlé změny) v daném filtru.

Zobrazení hrubých dat

1. V navigačním panelu zvolte **Analysis** >  **Raw Data Plot** (Analýza > Hrubá data).

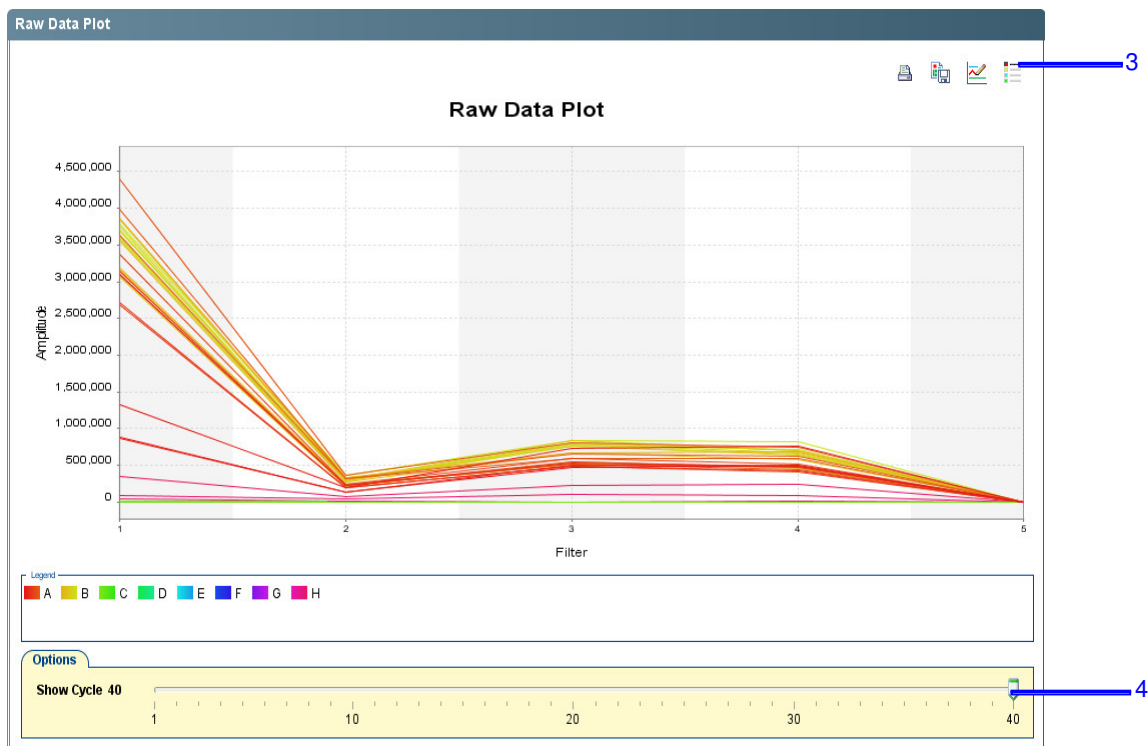
Poznámka: Nejsou-li zobrazeny žádné výsledky, klikněte **Analyze** (Analyzovat).

2. V grafu hrubých dat (Raw Data Plot) zobrazte všechny jamky destičky – klikněte do levého horního rohu ve vyobrazení destičky v záložce View Plate Layout.
3. Klikněte  **Show a legend for the plot** (Zobrazit legendu grafu - přednastaveno).

Poznámka: Toto tlačítko je přepínací. Je-li legenda zobrazena, tlačítko získá funkci Hide the plot legend (Skrýt legendu grafu).

Legenda znázorňuje barvy pro jednotlivé řádky destičky. V příkladu níže je řádka A červená, řádka B žlutozelená, řádka C zelená atd.

4. Klikněte a táhněte počítadlem cyklů (Show Cycle) od cyklu 1 po cyklus 40. Ve vzorovém experimentu dochází ke stabilnímu nárůstu signálu ve filtru 1, který odpovídá filtru pro barvu FAM™.




Filtry:

Filtr	1	2	3	4	5
Barva	<ul style="list-style-type: none"> FAM™ SYBR® Green 	<ul style="list-style-type: none"> JOE™ VIC® 	<ul style="list-style-type: none"> TAMRA™ NED™ Cy3® 	<ul style="list-style-type: none"> ROX™ Texas Red® 	Cy5®

Doporučení k analýze Analyzujete-li vlastní experiment standardní křivky, zkontrolujte v každém filtru:

- Charakteristický nárůst signálu
- Žádné náhlé změny

Více informací Více informací o hrubých datech získáte v nápovědě programu 7500 kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Poznámky _____

Poznámky _____




Jiné způsoby zadání experimentu

A

V této příloze naleznete


- Pokročilé zadání experimentu 98
- Rychlé spuštění 100
- Zadání pomocí šablony 102
- Zadání pomocí exportu/importu 104

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > 7500 Software Help**.

Poznámky _____

Pokročilé zadání experimentu

Vytvoříte-li experiment pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání), můžete jej zadat podle vlastního návrhu.

1. Dvakrát klikněte na ikonu  (program 7500) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je současná verze programu 7500.

2. Na výchozí obrazovce klikněte na  **Advanced Setup** (Pokročilé zadání).



Poznámka: Nevidíte-li ikonu Advanced Setup, klikněte na šipku pod Průvodcem zadáním (Design Wizard).

3. Zadejte nový experiment:

- a. Klikněte na záložku  **Experiment Properties** (Vlastnosti experimentu - předvoleno), zadejte název experimentu, poté definujte jeho vlastnosti.

- b. Klikněte na záložku  **Plate Setup** (Zadání destičky):

Typ experimentu	Krok
<i>Genotypování</i>	Definujte SNP eseje a určete, v kterých jamkách destičky jsou.
<i>Ostatní experimenty</i>	Definujte cílové sekvence a určete, v kterých jamkách destičky jsou.

- c. Klikněte na **Add Biological Group** (Zadejte skupiny biologických replikátů) chcete-li definovat biologické replikáty, a určete, v kterých jamkách destičky jsou vzorky náležející do dané skupiny.
- d. Klikněte  **Run Method** (Zadání běhu), zkontrolujte a upravte objem reakce a teplotní profil podle potřeby.
- e. Klikněte na  **Reaction Setup** (Sesazení reakce), zkontrolujte a upravte součásti reakce a vypočítané objemy reagentů.
- f. (Volitelné) Klikněte na **Materials List** (Potřebný materiál), zkontrolujte a objednejte seznam materiálu potřebného k přípravě destičky s reakcemi.

4. Připravte PCR reakce:

Typ experimentu	Krok
Relativní standardní křivka	a. Příprava templátu.
Standardní křivka	b. Ředění vzorků. c. Příprava ředící řady standardů. d. Příprava mastermixu. e. Příprava destičky s reakcemi.
Komparativní C _T	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků. c. Příprava mastermixu.
Přítomnost/Nepřítomnost	d. Příprava destičky s reakcemi.

5. Provedení experimentu:

DŮLEŽITÉ! Provádíte-li na systému 7500/7500 Fast běh, nezadávejte další experimenty, neprovádějte údržbu, neumožněte spuštění antivirového programu na počítači či přechod počítače do režimu spánku. Provádění těchto kroků může způsobit problémy při snímání dat z běhu.

- a. Vložení destičky do přístroje.
- b. Spuštění běhu
- c. (*Volitelné*) Sledování průběhu běhu.
- d. Vyjmutí destičky z přístroje.

6. Analýza dat:

- a. Otevřete experiment v programu 7500.
- b. V navigačním panelu klikněte **Analysis** (Analýza).
- c. Nejsou-li data analyzována, klikněte **Analyze** (Analyzovat).
- d. Vyberte obrazovku pro zobrazení výsledků analýzy (například **QC Summary** – Kontrola kvality pro zobrazení výsledků kontroly kvality).

Poznámky _____



Rychlé spuštění

Zadáte-li experiment pomocí funkce QuickStart (Rychlé spuštění), můžete reakce spustit aniž o nich zadáte informace.

1. Připravte PCR reakce:

Typ experimentu	Krok
Relativní standardní křivka	a. Příprava templátu.
Standardní křivka	b. Ředění vzorků. c. Příprava ředící řady standardů. d. Příprava mastermixu. e. Příprava destičky s reakcemi.
Komparativní C _T	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků. c. Příprava mastermixu.
Přítomnost/Nepřítomnost	d. Příprava destičky s reakcemi.

2. Spusťte experiment pomocí funkce QuickStart (Rychlé spuštění):

- Dvakrát klikněte na ikonu  (program 7500 software) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je současná verze programu 7500.
- Na výchozí obrazovce klikněte na  **QuickStart** (Rychlé spuštění).
- Klikněte na záložku **Experiment Properties** (Vlastnosti experimentu - předvoleno), zadejte název experimentu, poté definujte jeho vlastnosti.
- Klikněte na záložku **Run Method** (Běh), zkontrolujte a upravte objem reakce a teplotní profil podle potřeby.

3. Provedení experimentu:

DŮLEŽITÉ! Provádíte-li na systému 7500/7500 Fast běh, nezadávejte další experimenty, neprovádějte údržbu, neumožněte spuštění antivirového programu na počítači či přechod počítače do režimu spánku. Provádění těchto kroků může způsobit problémy při snímání dat z běhu.

- Vložení destičky do přístroje.
- Spuštění běhu
- (*Volitelné*) Sledování průběhu běhu.
- Vyjmutí destičky z přístroje.

4. V programu 7500 definujte reakční destičku:

Typ experimentu	Krok
<i>Genotypování</i>	Definujte SNP eseje a určete, v kterých jamkách destičky jsou.
<i>Ostatní experimenty</i>	Definujte cílové sekvence a určete, v kterých jamkách destičky jsou.

5. Analýza dat:


- a. Otevřete experiment v programu 7500.
- b. V navigačním panelu klikněte **Analysis** (Analýza).
- c. Nejsou-li data analyzována, klikněte **Analyze** (Analyzovat).
- d. Vyberte obrazovku pro zobrazení výsledků analýzy (například **QC Summary – Kontrola kvality** pro zobrazení výsledků kontroly kvality).

Poznámky _____


Zadání pomocí templátu

Pro vytvoření nového experimentu lze použít templát. Templáty využijete, pokud chcete zadat hodně experimentů s totožným zadáním.


Vytvoření templátu

1. Dvakrát klikněte na ikonu  (program 7500 software) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je současná verze programu 7500.
2. Otevřete již existující experiment nebo vytvořte nový.


Poznámka: Nový experiment můžete vytvořit pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard - viz [Kapitola 2](#)) nebo funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání - viz [strana 98](#)).

3. Zvolte **File > Save As Template** (Soubor > Uložit jako templát).
4. Zadejte název souboru a zvolte, kam jej chcete uložit, poté klikněte **Save** (Uložit).
5. Klikněte  **Close** (Zavřít).

Zadání experimentu pomocí templátu

1. Na výchozí obrazovce klikněte na  **Template** (Templát).

Poznámka: Nevidíte-li ikonu Template, klikněte na šipku pod Průvodcem zadáním (Design Wizard).

2. Zvolte templát, který jste vytvořili v [krocích 1 až 5](#) výše, poté klikněte **Open** (Otevřít). Na základě zadání v templátu budou definovány parametry nového experimentu:
 - Experiment properties (Vlastnosti experimentu)
 - Plate setup (Zadání destičky)
 - Run method (Zadání běhu)
 - Reaction setup (Sesazení reakcí)
3. (*Volitelné*) Chcete-li parametry experimentu upravit, použijte funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání - viz [strana 98](#)).
4. Klikněte  **Save** (Uložit), zadejte název souboru, poté klikněte **Save** (Uložit).

5. Připravte PCR reakce:

Typ experimentu	Krok
Relativní standardní křivka	a. Příprava templátu.
Standardní křivka	b. Ředění vzorků. c. Příprava ředící řady standardů. d. Příprava mastermixu. e. Příprava destičky s reakcemi.
Komparativní C _T	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků. c. Příprava mastermixu.
Přítomnost/Nepřítomnost	d. Příprava destičky s reakcemi.

6. Provedení experimentu:

DŮLEŽITÉ! Provádíte-li na systému 7500/7500 Fast běh, nezadávejte další experimenty, neprovádějte údržbu, neumožněte spuštění antivirového programu na počítači či přechod počítače do režimu spánku. Provádění těchto kroků může způsobit problémy při snímání dat z běhu.

Provedení experimentu:

- a. Vložení destičky do přístroje.
- b. Spuštění běhu
- c. (*Volitelné*) Sledování průběhu běhu.
- d. Vyjmutí destičky z přístroje.

7. Analýza dat:


- a. Otevřete experiment v programu 7500.
- b. V navigačním panelu klikněte **Analysis** (Analýza).
- c. Nejsou-li data analyzována, klikněte **Analyze** (Analyzovat).
- d. Vyberte obrazovku pro zobrazení výsledků analýzy (například **QC Summary –** Kontrola kvality pro zobrazení výsledků kontroly kvality).

Poznámky _____

Zadání pomocí exportu/importu


Funkci zadání pomocí exportu/importu využijete pro zadání nového experimentu na základě zadání exportovaného z jiného experimentu. Exportují/importují se pouze údaje o reakční destičce.

Export zadání

1. Dvakrát klikněte na ikonu  (program 7500 software) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > 7500 Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je současná verze programu 7500.

2. Otevřete již existující experiment nebo vytvořte nový

Poznámka: Nový experiment můžete vytvořit pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard - viz [Kapitola 2](#)) nebo funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání - viz [strana 98](#)).

3. Zvolte **File > Export** (Soubor > Exportovat).
4. Zvolte záložku **Export Properties** (Parametry exportu - přednastaveno), poté:
 - a. Zvolte **Setup** (Zadání).
 - b. Z rozbalovací nabídky zvolte **One File** (Jeden soubor).
 - c. Zadejte název exportovaného souboru a zvolte, kam jej chcete uložit.
 - d. Z rozbalovací nabídky File Type (Typ souboru) zvolte  (***.txt**).

DŮLEŽITÉ! Soubory typu *.xml nelze exportovat.

5. (*Volitelné*) Klikněte na záložku **Customize Export** (Další parametry exportu), nastavte dle potřeby.
6. Klikněte **Start Export** (Exportovat).
7. Na výzvu klikněte **Close Export Tool** (Konec exportu).

Zadání experimentu na základě importovaného souboru

Chcete-li definovat parametry destičky ve vašem experimentu, můžete zadání importovat z dříve exportovaného textového souboru (*.txt).

DŮLEŽITÉ! Ujistěte se, že exportovaný textový soubor obsahuje pouze údaje o zadání destičky, a že se jedná o experiment shodného typu.

1. Importujte zadání destičky z exportovaného textového souboru:
 - a. Pomocí tabulkového editoru (např. Microsoft® Excel) otevřete exportovaný textový soubor.
 - b. Upravte soubor dle potřeby. Poté jej uložte jako soubor formátu txt (data oddělená tabulátorem).

- c. Na výchozí obrazovce klikněte na  **Advanced Setup** (Pokročilé zadání).

Poznámka: Nevidíte-li ikonu Advanced Setup, klikněte na šipku pod Průvodcem zadáním (Design Wizard).

- d. Otevřete již existující experiment nebo vytvořte nový.
e. Zvolte **File > Import** (Soubor > Importovat).
f. Klikněte **Browse**, vyhledejte textový soubor (*.txt), poté klikněte **Select**.
g. Klikněte **Start Import** (Importovat). Zadání je z exportovaného textového souboru importováno do otevřeného experimentu.

Poznámka: Pokud váš experiment již obsahuje zadání, program vás vyzve, zda si přejete toto zadání nahradit zadáním z textového souboru. Klikněte **Yes** (Ano) a zadání bude nahrazeno.

2. Použijte funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání) pro ukončení zadání vašeho experimentu (viz [strana 98](#)).
3. Připravte PCR reakce:

Typ experimentu	Krok
Relativní standardní křivka	a. Příprava templátu.
Standardní křivka	b. Ředění vzorků. c. Příprava ředící řady standardů. d. Příprava mastermixu. e. Příprava destičky s reakcemi.
Komparativní C _T	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků. c. Příprava mastermixu.
Přítomnost/Nepřítomnost	d. Příprava destičky s reakcemi.

4. Provedení experimentu:

DŮLEŽITÉ! Provádíte-li na systému 7500/7500 Fast běh, nezadávejte další experimenty, neprovádějte údržbu, neumožněte spuštění antivirového programu na počítači či přechod počítače do režimu spánku. Provádění těchto kroků může způsobit problémy při snímání dat z běhu.

- a. Vložení destičky do přístroje.
b. Spuštění běhu
c. (*Volitelné*) Sledování průběhu běhu.
d. Vyjmutí destičky z přístroje.

Poznámky _____



5. Analýza dat:

- a. Otevřete experiment v programu 7500.
- b. V navigačním panelu klikněte **Analysis** (Analýza).
- c. Nejsou-li data analyzována, klikněte **Analyze** (Analyzovat).
- d. Vyberte obrazovku pro zobrazení výsledků analýzy (například **QC Summary** – Kontrola kvality pro zobrazení výsledků kontroly kvality).

Poznámky _____

Literatura

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

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.

Terminologický slovník

Advanced Setup (Pokročilé zadání)	Funkce programu 7500, která umožňuje zadání experimentu podle vaší potřeby. Poskytuje maximální flexibilitu v návrhu a zadání experimentu.
AIF	Viz soubor informací o eseji (AIF) .
alela	Jakákoliv sekvenční varianta genu, která se vyskytuje v populaci.
amplifikace	Zmnožení cílového úseku pomocí PCR. Při kvantifikaci se měří fluorescence v průběhu amplifikace a výsledky měření se použijí pro výpočet výsledků. Při genotypování nebo u experimentů typu Ano/Ne lze fluorescenční data naměřená během amplifikace použít při řešení problémů.
amplifikační graf	Zobrazení dat z běhů PCR v reálném čase. Lze zobrazit jako: <ul style="list-style-type: none">• Závislost normalizované fluorescence reportérové barvy po odečtení pozadí (ΔR_n) na počtu cyklů PCR• Závislost normalizované fluorescence reportérové barvy (R_n) na počtu cyklů PCR• Závislost prahového cyklu (C_T) na jamce
amplikon	Část DNA amplifikovaná pomocí PCR.
AutoDelta	Funkce umožňující zvyšování/snižování teploty a/nebo zkracování/prodlužování doby inkubace v každém dalším cyklu PCR. Je-li funkce AutoDelta zapnuta, poznáte to podle ikony v teplotním profilu: <ul style="list-style-type: none">• AutoDelta zapnuto: ▲• AutoDelta vypnuto: ▲
automatické C_T	Nastavení parametrů analýzy, kdy program automaticky stanoví rozsah cyklů pro výpočet fluorescence pozadí a vypočítá hodnotu prahu (threshold). Následně stanoví hodnoty prahového cyklu (C_T). Viz též prahový cyklus (CT) .
automatické nastavení pozadí (baseline)	Nastavení parametrů analýzy, kdy program automaticky stanoví rozsah cyklů pro výpočet fluorescence pozadí. Automatické nastavení pozadí lze použít pro vybrané jamky destičky. Viz též pozadí (baseline) .
barva cílové sekvence	V programu 7500 se jedná o barvu, jíž je označena cílová sekvence, a která je použita k její identifikaci ve vyobrazení destičky a v amplifikačním grafu.
barva ROX™	Barva dodávaná společností Applied Biosystems, systémy 7500 a 7500 Fast jsou pro použití této barvy prekalibrovány. Barva ROX se používá jako pasivní reference.

biologické replikáty	Reakce obsahující identické složky a objemy, ale prováděné za použití různých vzorků shodného biologického původu (např. vzorky ze tří různých myší téhož kmene nebo samostatné reakce prováděné za použití různých izolátů z téže buněčné linie nebo vzorku tkáně). Viz též technické replikáty .
bod	Jeden standard ve standardní křivce. Množství daného standardu ve standardní křivce se počítá na základě výchozího množství a sériového faktoru.
cílová sekvence (target)	Sekvence, kterou chcete amplifikovat a detekovat
C _T	Viz prahový cyklus (C_T) .
čtení post-PCR	Používá se při genotypování a experimentech typu Ano/Ne, jedná se o fázi sběru dat po amplifikaci. Při genotypování jsou data získaná při čtení post-PCR zobrazena v grafu alelické diskriminace a použita pro odečty alel. Při provádění experimentů typu Ano/Ne jsou data získaná při čtení post-PCR zobrazena v grafu typu Ano/Ne a používána k odečtu výsledků.
čtení pre-PCR	Používá se při genotypování a experimentech typu Ano/Ne, jedná se o fázi sběru dat před amplifikací. Jedná se o nepovinnou součást sběru dat, nicméně doporučenou. Fluorescenční data získaná během čtení pre-PCR lze použít pro normalizaci fluorescence naměřené post-PCR.
delta R _n (ΔR _n)	Viz normalizovaný signál reportérové barvy po odečtení pozadí (DR_n) .
derivace signálu reportérové barvy (–R _n ')	Záporná hodnota první derivace normalizovaného signálu reportérové barvy během amplifikace PCR. V grafu závislosti –R _n ' na teplotě (křivka tání) se zobrazuje na ose y.
disociační křivka	Viz křivka tání .
EFF%	Viz účinnost amplifikace (EFF%) .
endogenní kontrola	Detektor pro gen relativně stabilně exprimovaný ve všech analyzovaných vzorcích. Endogenní kontrola se používá pro normalizaci fluorescenčního signálu cílového amplikonu při kvantifikaci metodou relativní standardní křivky a komparativní C _T (ΔΔC _T) metodou. Jako endogenní kontrolu lze použít tzv. housekeepingové (“provozní”) geny. Viz též housekeepingové (“provozní”) geny .
endpoint čtení	Viz post-PCR čtení .
esej	Směs obsahující primery pro amplifikaci cílové sekvence a reagentie pro detekci amplifikované molekuly.

- eseje na objednávku (made-to-order)**
Eseje pro kvantifikaci genové exprese (TaqMan® Gene Expression Assays) a genotypování (TaqMan® SNP Genotyping Assays) vyráběné v okamžiku objednávky. Odesílány jsou pouze eseje splňující parametry kontroly jakosti.
- eseje skladem (inventoried)**
Eseje pro kvantifikaci genové exprese (TaqMan® Gene Expression Assays) a genotypování (TaqMan® SNP Genotyping Assays), které již byly vyrobeny, splnily parametry kontroly jakosti a jsou k dispozici skladem.
- experiment**
Označení celého procesu provedení běhu na přístroji 7500 nebo 7500 Fast, zahrnuje zadání, vlastní běh a analýzu. Na přístrojích 7500 a 7500 Fast lze provádět následující typy experimentů:
- Kvantifikace – standardní křivka
 - Kvantifikace - relative standard curve
 - Kvantifikace - komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$)
 - Křivka tání
 - Genotypování
 - Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne)
- fáze (stage)**
Skupina jednoho nebo více kroků v teplotním profilu. Existují tři různé fáze: inkubace (holding stage, včetně čtení pre-PCR a čtení post-PCR), cyklování (též tzv. fáze amplifikace) a fáze křivky tání.
- fáze amplifikace (amplification stage)**
Část běhu přístroje kdy dochází k amplifikaci cílové sekvence. V rámci teplotního profilu reakce sestává z kroků denaturace, annealingu primerů a polymerizace, které jsou cyklicky opakovány.

Při kvantifikaci se měří fluorescence v průběhu amplifikace a výsledky měření se použijí pro výpočet výsledků. Při genotypování nebo u experimentů typu Ano/Ne lze fluorescenční data naměřená během amplifikace použít při řešení problémů. Viz též [fáze cyklování](#).
- fáze cyklování (cycling stage)**
Opakování v rámci teplotního profilu. Též nazývána fáze amplifikace. Pro fázi cyklování můžete použít funkci AutoDelta. Viz též [fáze amplifikace](#).
- fáze křivky tání (melt curve stage)**
Fáze teplotního profilu kdy dochází k pomalému zvyšování teploty, aby mohla být vytvořena křivka tání.
- forward primer**
Oligonukleotid ohraničující 5' konec amplikonu. Spolu s reverzním primerem se používá při PCR reakci k amplifikaci.
- graf alelické diskriminace**
Zobrazení dat získaných čtením po provedení PCR. Jedná se o graf závislosti normalizovaného signálu reportérové barvy alely 1 na normalizovaném signálu reportérové barvy alely 2.

graf teploty	Grafický záznam teploty vzorků, vyhřívaného víka přístroje a bloku. K dispozici v programu 7500 při provádění běhů na přístroji 7500 nebo 7500 Fast.
housekeepingový (provozní) gen	Gen, který nějakým způsobem participuje v základních procesech buňky a má konstitutivní hladinu exprese. Provozní geny lze používat jako endogenní kontroly. Viz též endogenní kontrola .
hrubá data	Grafický záznam naměřené fluorescence (nenormalizované) v každém optickém filtru.
ID eseje (Assay ID)	Identifikační označení esejí pro kvantifikaci genové exprese (TaqMan® Gene Expression Assays) a pro genotypování (TaqMan® SNP Genotyping Assays) společnosti Applied Biosystems.
inhibitor IPC	Reagencie přidávaná do PCR reakcí za účelem inhibice amplifikace interní pozitivní kontroly (IPC).
inhibovaná IPC	U experimentů typu Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne) reakce obsahující inhibitor amplifikace IPC (interní pozitivní kontrola). V programu 7500 se jedná o úlohu detektoru v jamkách obsahujících inhibitor amplifikace IPC. Viz též negativní kontrola – inhibované jamky IPC .
inkubace (holding stage)	Fáze teplotního profilu zahrnující jeden nebo více kroků. Kroky inkubace lze zařadit kvůli aktivaci enzymů, inaktivaci enzymů nebo jako inkubaci reakce.
interní pozitivní kontrola (IPC)	Používána u experimentů typu Ano/Ne, jedná se o krátkou syntetickou molekulu DNA přidávanou do PCR reakcí. Využívá se k rozlišení skutečně negativních výsledků (to znamená takových, kde není detekována cílová amplifikovaná molekula) a negativních výsledků způsobených inhibitory PCR, nesprávným sesazením reakcí nebo selháním reagentů či přístroje.
IPC	U experimentů typu Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne) zkratka pro interní pozitivní kontrolu (internal positive control - IPC). V programu 7500 úloha detektoru v jamkách obsahujících IPC a neobsahujících inhibovanou IPC. Viz též interní pozitivní kontrola (IPC) .
IPC+	Viz negativní kontrola-IPC jamky .
kalibrátor	Viz referenční vzorek .
Knihovna cílových sekvencí (Target Library)	V programu 7500 se jedná o soubor cílových sekvencí používaných v experimentech, definovaných pomocí názvu, reportérové barvy, zhášedce a barvy cílové sekvence.

Knihovna SNP esejí (SNP Assay Library)

V programu 7500 se jedná o soubor SNP esejí, které lze použít v genotypovacích experimentech. SNP eseje jsou definovány pomocí názvu a barvy a každá alela je definována názvem nebo pomocí báze, barvou reportérové barvy, zhášedce a alely.

Knihovna vzorků (Sample Library)

Soubor vzorků v programu 7500. Každý vzorek je definován svým jménem a barevným označením.

komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$) metoda

Metoda stanovení relativní kvantity cílového amplikonu ve vzorku. Pomocí komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$) metody program 7500 měří amplifikaci cílové molekuly a endogenní kontroly ve vzorcích a v referenčním vzorku. Měření jsou normalizována pomocí endogenní kontroly. Program stanoví relativní množství cílové molekuly v každém vzorku srovnáním s referenčním vzorkem.

Koncentrace ředěného vzorku (10× pro reakční směs)

V programu 7500 : pole zobrazované v záložce Sample Dilution Calculations (Výpočet koncentrace vzorků) na obrazovce Reaction Setup (Sesazení reakce). V tomto poli zadejte koncentraci vzorku, kterou chcete použít v reakční směsi pro všechny vzorky v destičce. “10× for Reaction Mix” znamená, že program předpokládá, že vzorek nebo standard, které jsou součástí reakční směsi, je 10× koncentrován. Např. je-li koncentrace vzorku 50.0 ng/μL (10×), bude výsledná koncentrace v reakci 5 ng/μL (1×).

kontrola bez amplifikace (no amplification control - NAC)

Viz negativní kontrola - inhibované jamky IPC.

krok (step)

Součást teplotního profilu, pro každý krok lze nastavit rychlost rampy, teplotu inkubace, dobu inkubace a můžete definovat, kdy má dojít k měření dat. Pro fáze cyklování můžete též použít funkci AutoDelta.

křivka tání

Grafický záznam dat získaných během fáze křivky tání – píky označují teplotu tání (T_m) cílové molekuly nebo slouží k identifikaci nespecifické PCR amplifikace. V programu 7500 můžete křivku tání znázornit jako závislost normalizovaného signálu reportérové barvy (R_n) na teplotě nebo první derivace normalizovaného signálu reportérové barvy ($-R_n'$) na teplotě. Též se používá název disociační křivka.

manuální C_T

Nastavení parametrů analýzy, kdy definujete hodnotu prahu a stanovíte zda rozsah cyklů pro výpočet fluorescence pozadí definovat automaticky nebo manuálně. Program používá definované pozadí a práh pro výpočet prahového cyklu (threshold cycle - C_T).

manuální nastavení pozadí (baseline)

Nastavení, kdy stanovíte rozsah cyklů pro výpočet fluorescence pozadí. Manuální nastavení pozadí lze použít pro vybrané jamky destičky.

metoda běhu Definice reakčního objemu a teplotního profilu pro běh přístroje 7500 nebo 7500 Fast.

metoda kvantifikace

Při kvantifikačních experimentech je možné ke kvantifikaci používat různé metody. Systémy 7500 a 7500 Fast podporují tři kvantifikační metody: standardní křivka, relativní standardní křivka a komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$).

metoda relativní standardní křivky

Metoda stanovení relativního množství cílové molekuly ve vzorcích. Používáte-li tuto metodu, měří program 7500 amplifikaci cílové sekvence a endogenní kontroly ve vzorcích, v referenčním vzorku a v ředících řadách standardů. Měření jsou normalizována pomocí endogenní kontroly. Výsledky získané pomocí ředících řad standardů jsou použity k vytvoření standardních křivek. Pomocí standardních křivek pak program vypočítá množství cílové sekvence ve vzorcích a v referenčním vzorku. Následně program vypočítá relativní množství cílové sekvence v každém vzorku porovnáním s referenčním vzorkem.

metoda standardní křivky

Metoda stanovení absolutního množství cílové sekvence ve vzorcích. Používáte-li tuto metodu, měří program 7500 amplifikaci cílové sekvence ve vzorcích a v ředící řadě standardů. Výsledky z ředící řady standardů jsou použity k vytvoření standardní křivky. Na základě standardní křivky pak program vypočítá absolutní množství cílové sekvence ve vzorcích. Viz též [standard](#) a [standardní křivka](#).

množství

Množství cílové molekuly ve vzorcích. Absolutní množství může být vyjádřeno v počtu kopií, hmotnosti, molaritě nebo jako virová nálož. Relativní množství odpovídá násobku rozdílu mezi normalizovaným množstvím cílové molekuly ve vzorku a normalizovaným množstvím cílové molekuly v referenčním vzorku.

množství standardu Známé množství v PCR reakci

- Při kvantifikaci metodou standardní křivky se jedná o množství templátu ve standardech. V programu 7500 lze toto množství definovat jako hmotnost, počet kopií, virová nálož nebo další jednotky.
- Při kvantifikaci metodou relativní standardní křivky se jedná o množství templátu ve standardech. Může odkazovat na množství cDNA nebo množství zásobního roztoku standardu v PCR reakci. Jednotky nejsou důležité, neboť výsledkem výpočtu je bezjednotkové číslo.

multikomponentní graf

Graf zobrazující úplný příspěvek každé barvy k celkovému naměřenému spektrálnímu signálu pro zvolenou jamku v průběhu PCR.

nákres destičky (plate layout)

Grafické vyobrazení jamek a jejich obsahu. U systému 7500/7500 Fast obsahuje 8 řádek a 12 sloupců.

V programu 7500 můžete nákres destičky použít jako nástroj pro definování obsahu jamek, zobrazení obsahu jamek a zobrazení výsledků. Nákres destičky lze vytisknout, zahrnout do zprávy o výsledcích, exportovat a uložit jako diapozitiv pro prezentaci.

název experimentu Identifikátor daného experimentu, definuje se při zadání experimentu. Názvy nesmí být delší než 100 znaků a nesmí obsahovat následující znaky: / , \ , > , < , * , ? , " , | , : , ; .

nefluorescenční zhášec – minor groove binder (NFQ-MGB)

Molekuly na 3' konci sond TaqMan®. Dokud je sonda intaktní, nefluorescenční zhášec (NFQ) brání emisi fluorescence reportérové barvy. Jelikož NFQ neemituje fluorescenční záření, je fluorescence pozadí nižší, což vede k vyšší přesnosti kvantifikace. Minor groove binder (MGB) – protein vážící se do malého žlábků DNA zvyšuje teplotu tání (T_m) aniž je zapotřebí zvýšit délku sondy. Tím je rovněž umožněno navrhovat kratší sondy.

negativní kontrola - inhibované jamky IPC

V experimentech typu Ano/Ne se jedná o jamky obsahující inhibitor amplifikace IPC namísto vzorku. V jamkách negativní kontroly s inhibitorem IPC by nemělo dojít k žádné amplifikaci, neboť v reakci není vzorek a amplifikace IPC je inhibována. Dříve nazývána kontrola bez amplifikace - no amplification control (NAC).

negativní kontrola - IPC jamky

V experimentech typu Ano/Ne se jedná o jamky obsahující templát IPC a pufr nebo vodu namísto vzorku. V těchto jamkách dojde k amplifikaci pouze templátu IPC, protože v reakci není žádný vzorek. Dříve nazývána IPC+.

negativní kontrola (NC)

V programu 7500 úloha detektoru pro jamky obsahující namísto vzorku vodu nebo pufr. V jamkách negativní kontroly by nemělo dojít k žádné amplifikaci. Dříve nazývaná netemplátová kontrola (NTC).

netemplátová kontrola (NTC)

Viz [negativní kontrola \(NC\)](#).

neznámý (unknown)

Typ úlohy v programu 7500 pro jamky obsahující testované vzorky:

- Při kvantifikaci se jedná o úlohu pro jamky obsahující vzorky s neznámým množstvím cílové sekvence.
- Při genotypování se jedná o úlohu pro jamky obsahující vzorek o neznámém genotypu.
- Při provádění experimentů typu Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne) se jedná o úlohu pro jamky obsahující vzorek v němž je testována přítomnost cílové sekvence.

neznámý-IPC (unknown-IPC)

Při provádění experimentů typu Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne) se jedná o jamky obsahující vzorek a interní pozitivní kontrolu (IPC).

normalizované množství

Množství cílové molekuly vydělené množstvím endogenní kontroly.

normalizovaný signál reportérové barvy (Rn)

Fluorescenční signál reportérové barvy normalizovaný na fluorescenční signál pasivní reference.

normalizovaný signál reportérové barvy po odečtení pozadí (ΔRn)

1. V experimentech monitorovaných v reálném čase - násobek normalizované fluorescence reportérové barvy v každém cyklu PCR amplifikace. V grafu závislosti ΔRn na cyklu se ΔRn počítá jako:

ΔRn (cyklus) = Rn (cyklus) – Rn (pozadí), kde Rn = normalizovaný signál reportérové barvy

2. Při genotypování nebo u experimentů typu Ano/Ne – rozdíl normalizované fluorescence reportérové barvy mezi čtením pre-PCR a post-PCR. V grafu alelické diskriminace (genotypování) a u experimentů typu Ano/Ne se ΔRn počítá jako:

ΔRn = Rn (čtení post-PCR) – Rn (čtení pre-PCR), kde Rn = normalizovaný signál reportérové barvy

Viz též **normalizovaný signál reportérové barvy (Rn)**.

odlehlý bod (outlier) Neobvykle se lišící výsledek měření určitého parametru (vyšší nebo nižší).

odmítnutí jamky (reject well)

Krok, kterým program během analýzy výsledků vyřadí jednu nebo více jamek z analýzy, poněvadž nesplnila/y některé z kritérií kvality (je označena výstražnou vlaječkou – tzv. flag). Výsledky jsou v odmítnutých jamkách vypočítány až do fáze, kdy byly tyto jamky z další analýzy dále vyřazeny.

pasivní reference

Barva generující fluorescenční signál. Jelikož signál pasivní reference by měl být srovnatelný ve všech jamkách, používá se k normalizaci signálu reportérové barvy s cílem eliminace fluktuací fluorescence, které nesouvisí s průběhem PCR, ale jsou způsobeny drobnými objemovými nebo koncentračními rozdíly mezi jednotlivými jamkami. Normalizace vůči pasivní referenci zvyšuje přesnost výsledků.

poměr vzorek/cíl v reakci (sample/target reaction)

V kvantifikačních experimentech se jedná o kombinaci toho kterého vzorku v němž je kvantifikována ta která cílová sekvence. Zadávat-li experiment pomocí Průvodce zadáním experimentu (Design Wizard), můžete kvantifikovat pouze jednu cílovou sekvenci v jedné PCR reakci. Použijte Pokročilé zadání (Advanced Setup), chcete-li detekovat a kvantifikovat více než jednu cílovou sekvenci v jedné PCR reakci.

poměr vzorek/SNP eseje v reakci (sample/SNP assay reaction)

V genotypovacích experimentech se jedná o kombinaci toho kterého vzorku testovaného pomocí té které SNP eseje. Každá PCR reakce může obsahovat pouze jeden vzorek a jednu SNP eseji.

pozadí (baseline)

V terminologii amplifikačního grafu: fluorescence vzorku ve vymezeném rozsahu cyklů předtím, než je detekovatelná amplifikace produktu.

pozitivní kontrola

V genotypovacích experimentech se jedná o DNA vzorek o známém genotypu, homozygotní nebo heterozygotní. V programu 7500 se jedná o úlohu detektoru pro SNP eseji v jamce obsahující vzorek o známém genotypu.

práh (threshold)	<p>1. Určitá úroveň fluorescence používaná pro stanovení hodnot C_T při provádění PCR v reálném čase. Nastavuje se výše než je pozadí (baseline) a dostatečně nízko, aby byl položen ve fázi exponenciální amplifikace. Lze definovat automaticky (viz automatické CT) nebo nastavit manuálně (viz manuální CT).</p> <p>2. Při provádění experimentů typu Ano/Ne se jedná o úroveň fluorescence, nad níž program 7500 vyhodnotí výsledek rozhodnutím Ano.</p>
prahový cyklus (threshold cycle - C_T)	Cyklus PCR v němž fluorescence protne práh v amplifikačním grafu.
průsečík s osou y (y-intercept)	Hodnota na ose y – průsečík regresní linie standardní křivky a osy y. Průsečík s osou y indikuje hodnotu prahového cyklu (C_T) pro vzorek s množstvím rovným 1.
Průvodce zadáním experimentu (Design Wizard)	Funkce programu 7500 umožňující definovat zadání experimentu a poskytující rady k zadání.
QuickStart	Funkce programu 7500, která umožňuje zadání experimentu aniž zadáte informace o destičce. Funkce QuickStart vyžaduje instalaci přístroje spolu s počítačem.
R^2 parametr	Regresní koeficient vypočítaný z regresní linie standardní křivky. Parametr R^2 indikuje míru vzájemné shody regresní linie standardní křivky a jednotlivých hodnot C_T standardů. Hodnota 1.00 indikuje perfektní shodu regresní linie a hodnot C_T standardů.
ramp	Rychlost změny teploty v průběhu běhu. Vyjma křivky tání je ramp definován v procentech. V případě křivky tání je ramp definován jako změna teploty. V grafickém záznamu teplotního profilu je ramp vyznačen diagonálou.
reagencie	<p>Součásti PCR reakce používané k amplifikaci cílové sekvence a k detekci amplifikace. V systémech 7500 a 7500 Fast lze použít:</p> <ul style="list-style-type: none"> • reagencie TaqMan® • reagencie SYBR® Green • Jiné reagencie
reagencie SYBR® Green	Součásti PCR reakce – dva primery pro amplifikaci vybraného úseku DNA a barvivo SYBR® Green pro detekci dvouřetězcové DNA.
reagencie TaqMan®	Součásti PCR reakce – primery pro amplifikaci vybraného úseku DNA a sonda TaqMan® pro detekci amplifikace cílové sekvence.
reakční směs	Roztok obsahující všechny komponenty potřebné pro provedení PCR, vyjma teplotu (vzorek, standard nebo kontrola).

real-time PCR	Proces měření fluorescence během PCR. Data získaná během real-time PCR (PCR monitorovaná v reálném čase) lze použít pro výpočet výsledků kvantifikace nebo řešení případných problémů při genotypování nebo při provádění experimentů typu Ano/Ne.
referenční vzorek	Používá se při kvantifikaci metodou relativní standardní křivky a komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$) metodou, jedná se o vzorek používaný pro srovnání výsledků relativní kvantifikaci. Rovněž nazývaný kalibrátor.
refSNP ID	Identifikátor referenčního SNP (refSNP). Vytvářený databází Single Nucleotide Polymorphism Database of Nucleotide Sequence Variation (dbSNP) v National Center for Biotechnology Information (NCBI). Identifikátor refSNP ID lze použít k prohledávání SNP genotypovacích esejí v obchodě Applied Biosystems. Rovněž nazývaný rs číslo (rs number).
regresní koeficienty	Parametry vypočítané z regresní linie standardních křivek, zahrnuje R^2 , sklon (slope) a průsečík s osou y (y-intercept). Lze je použít ke zhodnocení kvality výsledků získaných za pomoci standardů. Viz též standardní křivka.
regresní přímka	Používá se při kvantifikaci pomocí standardní křivky a metodou relativní standardní křivky, jedná se o přímku proloženou standardní křivkou. Vzorec regresní přímky: $C_T = m [\log (Qty)] + b$ kde m je sklon, b je průsečík s osou y (y-intercept) a Qty je množství standardu. Viz též regresní koeficienty .
replikáty	Viz technické replikáty nebo biologické replikáty.
reportér	Fluorescenční barva používaná k detekci amplifikace. Používáte-li reagentie TaqMan®, je reportérová barva připojena k 5' konci sondy. Používáte-li reagentie SYBR® Green, je reportérovou barvou barvivo SYBR® Green.
reverzní primer	Oligonukleotid ohraničující 3' konec amplikonu. Spolu s forward primerem se používá při PCR reakci k amplifikaci.
reverzní transkriptáza	Enzym přepisující RNA do cDNA. Reverzní transkriptáza se přidává do PCR při provádění jednokrokové RT-PCR.
Rn	Viz normalizovaný signál reportérové barvy (Rn) .
rozpuštědlo	Látka používaná k ředění vzorku nebo standardu předtím, než jsou pipetovány do PCR reakce. Jedná se o vodu nebo pufr.
rs číslo	Viz refSNP ID .
rychlost rampu	Rychlost s níž se v průběhu běhu mění teplota. K dispozici jsou varianta rychlá (fast) a standardní. <ul style="list-style-type: none"> Pro dosažení optimálních výsledků při rychlém rampingu doporučuje společnost Applied Biosystems používání reagentií TaqMan® Fast.

- Pro dosažení optimálních výsledků při standardním rampingu doporučuje společnost Applied Biosystems používání standardních reagensů.

DŮLEŽITÉ! Reagencie TaqMan Fast nejsou podporovány při genotypovacích experimentech a experimentech typu Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne).

ředící faktor Viz [sériový faktor](#).



ředící série standardů

Používá se při kvantifikaci metodou standardní křivky a relativní standardní křivky, jedná se o sadu standardů obsahujících templát v určitém rozsahu množství.

Připravuje se sériovým ředěním standardů. Např. koncentrovaný zásobní roztok standardu je použit k přípravě prvního ředění, první ředění je použito k přípravě druhého ředění atd. Program 7500 vypočítá objemy potřebné k přípravě ředící série standardů ze znalosti počtu ředění, počtu replikátů standardů, výchozího množství, sériového faktoru a koncentrace zásobního roztoku standardu. Viz též [standardní křivka](#).

sběr dat (data collection)

Proces v rámci běhu přístroje kdy přístroj měří fluorescenci v každé jamce destičky. Přístroj tento signál konvertuje na elektronický signál a takto data uloží v souboru daného běhu. V programu 7500 je fáze sběru dat indikována ikonkou v teplotním profilu:

- Sběr dat zapnut .
- Sběr dat vypnut .

série Viz [ředící série standardů](#).

sériový faktor V programu 7500 se jedná o číselný parametr, označující ředění standardů. Spolu s definicí výchozího množství se používá k výpočtu množství jednotlivých standardů. Např. je-li standardní křivka definována pomocí sériového faktoru 1:10 nebo 10 \times , rozdíl mezi dvěma sousedními body křivky je desetinásobný.

sklon Regresní koeficient vypočítaný z regresní linie standardní křivky. Je mírou efektivity PCR amplifikace pro danou esej. Sklon -3.32 znamená 100% efektivitu amplifikace. Viz též [efektivita amplifikace \(EFF%\)](#) a [regresní přímka](#).

skupina replikátů Soubor identických reakcí v témže experimentu.

směs primerů Součást reakční směsi PCR obsahující forward primer a reverzní primer pro amplifikaci.

směs primerů/sondy Součást reakční směsi PCR obsahující primery a sondu TaqMan® k detekci amplikonu.

SNP Zkratka pro jednobodový polymorfismus (single nucleotide polymorphism). Může se jednat o substituci, inserci nebo delecii jedné báze.

SNP esej	Používá se při genotypování, jedná se o PCR reakci obsahující dvě sondy k detekci dvou různých alel.
soubor informací o eseji (assay information file - AIF)	Datový soubor na CD dodávaný s každou objednanou esejí. Název souboru obsahuje číslo z čárového kódu destičky. Jedná se o soubor typu *.txt (data oddělená tabulátorem).
standard	Vzorek obsahující známé množství templátu. Standardy se používají k vytváření standardních křivek. Viz též standardní křivka a ředící série standardů .
standardní křivka	Používá se při kvantifikaci metodou standardní křivky a relativní standardní křivky: <ul style="list-style-type: none">• Přímka proložená v grafu závislosti hodnot C_T, získaných na základě kvantifikace standardů, na množství templátu standardů. Viz též regresní linie.• Soubor standardů o určitém rozsahu koncentrace templátu. Standardní křivka je definována počtem bodů v ředící řadě, počtem replikátů standardů, výchozím množstvím a sériovým faktorem. Viz též ředící série standardů.
systémová barva	Barva dodávaná společností Applied Biosystems, pro kterou jsou systémy 7500/7500 Fast prekalibrovány. Před použitím systémových barev ve vašich experimentech se ve Správci údržby přístroje (Instrument Maintenance Manager) ujistěte, že kalibrace barev je platná. Systémové barvy pro systém 7500/7500 Fast: <ul style="list-style-type: none">• FAM™• JOE™• NED™• ROX™• SYBR® Green• TAMRA™• VIC®• CY3 dye• CY5 dye• TEXAS RED® dye
technické replikáty	Identické reakce obsahující tytéž složky a objemy a tentýž vzorek. Viz též biologické replikáty
templát	V Průvodci zadáním experimentu (Design Wizard) v programu 7500 (a v průvodci QuickStart při kvantifikaci) se jedná o typ nukleové kyseliny přidávané do PCR reakce. Doporučení stran templátu se liší podle typu experimentu: <ul style="list-style-type: none">• Kvantifikace (standardní křivka, relativní standardní křivka a komparativní C_T) – cDNA (komplementární cDNA), RNA nebo gDNA (genomická DNA). Při provádění kvantifikace ovlivní typ templátu metodu běhu, zadání reakce a seznam vybavení.• Genotypování –DNA v roztoku (gDNA nebo cDNA) nebo vysušená DNA (gDNA nebo cDNA) Při genotypování ovlivní typ templátu zadání reakce.

- Experimenty typu Ano/Ne - DNA
Při provádění experimentů typu Ano/Ne doporučuje společnost Applied Biosystems přidávat templátovou DNA do PCR reakcí.

teplota tání (T_m)

V experimentech křivky tání se jedná o teplotu, při níž je 50% DNA v dvouřetězcové formě a 50% DNA je disociováno do jednořetězcové DNA. T_m se zobrazí v grafickém záznamu křivky tání.

teplotní profil

Definice teplot, času, rampy a sběru dat pro všechny kroky a fáze běhu přístroje 7500 nebo 7500 Fast.

 T_m

Viz [teplota tání \(\$T_m\$ \)](#).

typ experimentu

Typy experimentů, které lze provádět na přístrojích 7500 nebo 7500 Fast:

- Standardní křivka
- Komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- Relativní standardní křivka
- Křivka tání (není k dispozici v průvodci návrhem)
- Genotypování
- Přítomnost/Nepřítomnost (Ano/Ne)

Zvolený typ experimentu ovlivní zadání, běh i analýzu.

účinnost amplifikace (EFF%)

Výpočet účinnosti PCR amplifikace. Účinnost (efektivita) amplifikace se počítá na základě sklonu regresní linie standardní křivky. Sklon blízký -3.32 znamená optimální 100% účinnost PCR amplifikace. Účinnost amplifikace ovlivňují:

- **Koncentrační rozsah standardů** – Chcete-li zvýšit přesnost měření účinnosti amplifikace, použijte široké rozpětí koncentrací standardů, 5 až 6 řádů (10^5 až 10^6 krát).
- **Počet replikátů standardů** – Chcete-li zvýšit přesnost a snížit vliv nepřesnosti pipetování, používejte replikáty.
- **Inhibitory PCR**– Inhibitory PCR v reakci mohou inhibovat amplifikaci a ovlivnit měření účinnosti.

úloha (task)

Typ reakce prováděné v dané jamce. Používají se tyto různé úlohy:

- Unknown – Neznámý vzorek
- Negative Control – Negativní kontrola
- Standard (při kvantifikaci pomocí standardní křivky a relativní standardní křivky)
- Pozitivní kontrola (při genotypování)
- Interní pozitivní kontrola - IPC (při experimentech typu Přítomnost/Nepřítomnost - Ano/Ne)
- Inhibovaná IPC - Blocked IPC (při experimentech typu Přítomnost/Nepřítomnost - Ano/Ne)

- vlastní barva** Barva nepodporovaná společností Applied Biosystems. Při práci se systémy 7500 a 7500 Fast lze používat vlastní barvy. Používáte-li vlastní barvy, měli byste je přidat do knihovny barev (Dye Library) a provést kalibraci vlastní barvy.
- výchozí množství (starting quantity)** Definujete-li v programu 7500 standardní křivku, odpovídá výchozí množství nejvyššímu nebo nejnižšímu množství.
- vynechání jamky (omit well)** Krok, kterým vynecháte jednu nebo více jamek z analýzy. Data z vynechaných jamek nejsou nijak analyzována a neobsahují tedy žádné výsledky.
- vzorek** Templát, který testujete.
- Vzorek DNA (10×)** V programu 7500 se jedná o součást reakce, zobrazovanou v záložce pro výpočet složení reakční směsi (Reaction Mix Calculations). Program předpokládá, že vzorkovou DNA přidáváte do reakční směsi 10× koncentrovanou. Např. je-li reakční objem 20 µL, vypočítaný objem vzorku pro 1 reakci jsou 2 µL.
- Vzorek nebo Standard (10×)** V programu 7500 se jedná o součást reakce, zobrazovanou v záložce pro výpočet složení reakční směsi (Reaction Mix Calculations). Program předpokládá, že vzorek nebo standard přidáváte do reakční směsi 10× koncentrovaný. Např. je-li reakční objem 20 µL, vypočítaný objem vzorku nebo standardu pro 1 reakci jsou 2 µL.
- zhášec** Molekula na 3' konci sondy typu TaqMan®, která absorbuje (zháší) fluorescenci reportérové barvy na 5' konci sondy, dokud je sonda nedegradovaná. Při použití reagensů typu TaqMan® lze použít nefluorescenční zhášec v kombinaci s MGB (minor groove binder). Při použití reagensů SYBR® Green se zhášec nepoužívá.

Číslice

1-kroková RT-PCR 8, 23, 24, 31, 36

2-kroková RT-PCR 8, 23, 24

A

amplifikační běh, typický 78

analýza experimentu

analýza 68

doporučení 69, 73, 78, 83, 87, 89, 91, 94, 95

publikování výsledků 83

více informací 73, 80, 83, 87, 89, 91, 94, 95

vynechání jamek 90

B

bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními xx

bezpečná práce xxi

bezpečnost

biologické riziko xxi

doporučení xviii, xix

elektrická zařízení xx

ergonomie xxi

chemický odpad xix

chemikálie xvii

ovládání přístroje xvi

pohyblivé součásti xx

před spuštěním přístroje xvi

přemísťování a zvedání xvi

standardy xxii

bezpečnostní listy

popis xvii

získání xvii

bezpečnostní standardy xxii

bezpečnostní symboly na přístrojích xiv

C

CAUTION - VAROVÁNÍ, popis xii

čílové sekvence

doporučení 25

zadání 24

CT 83

D

- DANGER - NEBEZPEČÍ, popis [xii](#)
- data
 - o sběru dat [2](#)
 - publikování [83](#)
 - vzorový experiment [11](#), [68](#)
- definice cílových sekvencí [24](#)
- definice metody běhu [30](#)
- definice standardů [26](#)
- definice vzorků [28](#)
- destičky standard vs. fast [6](#)
- dokumentace, související [ix](#)
- doporučení [21](#), [23](#), [25](#), [27](#), [29](#), [31](#), [36](#), [39](#), [42](#)
- doporučení
 - bezpečná manipulace s chemikáliemi [xviii](#)
 - k analýze [69](#), [73](#), [78](#), [83](#), [87](#), [89](#), [91](#), [94](#), [95](#)
 - manipulace s chemickým odpadem [xix](#)
 - návrh [21](#), [23](#), [25](#), [27](#), [29](#), [31](#), [36](#), [39](#), [42](#)
 - příprava [46](#), [48](#), [50](#), [53](#)

E

- elektromagnetická kompatibilita [xxii](#)
- emailové zprávy [59](#)
- ergonomie [xxi](#)
- eseje na objednávku [36](#)
- eseje skladem [36](#)
- Export/Import [11](#), [104](#)

F

- filtry [3](#), [95](#)

CH

- chemický odpad, bezpečná manipulace [xix](#)
- chemikálie, bezpečná manipulace [xvii](#), [xviii](#)

I

- IMPORTANT - DŮLEŽITÉ, popis [xii](#)

J

- jamky
 - negativní kontrola [28](#), [41](#), [51](#)
 - neznámý [28](#), [41](#), [51](#)
 - standard [28](#), [41](#), [51](#)
 - volba [69](#)
 - vynechání [90](#)

K

- knihovna [31](#)
- knihovna metod [31](#)
- kontrola zadání [32](#)

M

manuální nastavení 87
 multikomponentní graf 92
 multiplexní PCR 8, 24

N

nápověda xi
 nastavení parametrů analýzy
 CT 87
 pokročilé 87
 pozadí 87
 práh 87
 vlaječka 87
 zobrazení 86
 návrh experimentu
 metoda a materiál 22
 ukončení průvodce zadáním 40
 vlastnosti experimentu 20
 vytvoření nového 19
 negativní kontrola 7

O

objednávka materiálu 37
 obrazovka Amplifikační graf
 sledování během běhu 62
 zobrazení po běhu 74
 obrazovka Cílové sekvence 24
 obrazovka Hrubá data 94
 obrazovky Kontroly kvality 88
 obrazovka Standardy 26
 obrazovka s více grafy 70
 obrazovka Vzorky 28
 odchylka, standardní 79
 odpad biohazard, doporučení xxi
 odpad biohazard, manipulace xix
 odstraňování odpadu xix
 ovládání přístroje, bezpečnost xvi

P

pohyblivé součásti, bezpečnost xx
 Pokročilé zadání 10, 11, 23, 29, 53, 98
 postup
 Export/Import 11, 104
 pokročilé zadání 98
 rychlé spuštění 11, 100
 templát 11, 102
 vzorový experiment 14
 potřebný materiál 45, 47, 49, 52
 používání této příručky 11
 příprava experimentu
 doporučení 46, 48, 50, 53
 postup 44
 příprava 49
 reakční destička 51
 ředění standardů 47
 ředění vzorků 45

- více informací 46, 50, 54
- pracovní postup 66
- práh
 - manuální nastavení 87
 - správné nastavení 78
- Průvodce zadáním
 - cílové sekvence 24
 - dokončení 40
 - metoda a materiál 22
 - metoda běhu 30
 - sesazení reakcí 32
 - seznam materiálů 37
 - standardy 26
 - vlastnosti experimentu 20
 - vzorky 28
- přepětí xx
- příklady 80
- příprava běhu 57

R

- radioaktivní odpad, manipulace xix
- reagencie 9
- reagencie
 - jiné fluorescenční 10
 - SYBR Green 9
 - TaqMan 9
- reagencie SYBR Green 3, 9, 23, 24, 25, 36, 95
- reagencie TaqMan 3, 9, 23, 24, 25, 36, 95
- reakční destička
 - příprava 51
 - rozložení 13, 40
 - vložení 57
 - vyjmutí z přístroje 64
- reakční destičky 6
- reakční směs
 - objemy 49
 - vypočítané objemy 33
- replikát 7
- rychlé spuštění 11, 100
- rychlost rampy 22, 23

Ř

- ředění standardů 34
- ředění vzorků
 - příprava 45
 - vypočítané objemy 34, 45
- řešení problémů
 - nastavení pozadí 87
 - nastavení prahu 87
 - vlaječky 89
 - vynechání jamek 90
 - zobrazení hrubých dat 94
 - zobrazení kontroly kvality 88
 - zobrazení multikomponentního grafu 92
 - zobrazení parametrů analýzy 86

S

- sběr dat 2
- seznam materiálu 37
- spuštění experimentu
 - doporučení 60
 - emailové zprávy 59
 - monitorování 61
 - postup 56
 - příprava 57
 - součásti experimentu 7
 - spuštění 61
 - více informací 63
- singleplexní PCR 8, 24
- sledování běhu
 - amplifikační graf 62
 - obrazovka Běh 63
- spotřební materiál podporovaný 4
- standardní křivka 7
- standardní odchylka, vliv prahu na 79
- standards
 - bezpečnost xxii
 - doporučení 27
 - EMC xxii
 - ředění 47
 - součásti experimentu 7
- Systémy 7500/7500 Fast

T

- Technická podpora xi
- templát 11, 102
- tipy pro snadnou orientaci
 - výběr jamek 69
 - zobrazení více grafů 70

U

- účinnost amplifikace 27, 73

V

- více informací 21, 24, 25, 27, 30, 31, 36, 39, 42
- vlaječka 83
 - vlaječka AMPNC 89
 - vlaječka BADROX 89
 - vlaječka BLFAIL 89
 - vlaječka CTFAIL 89
 - vlaječka EXPFAIL 89
 - vlaječka HIGHSD 89
 - vlaječka MTP 89
 - vlaječka NOAMP 89
 - vlaječka NOISE 89
 - vlaječka NOSIGNAL 89
 - vlaječka OFFSCALE 89
 - vlaječka OUTLIERRG 89
 - vlaječka SPIKE 89
 - vlaječka THOLDFAIL 89

- vlaječky
 - parametry analýzy 87
 - v experimentech standardní křivky 89
- vlastnosti experimentu 20
- vložení destičky 57
- vybrání jamek 69
- vyjmutí destičky 64
- výsledky, interpretace 67
- vytištění sesazení reakcí 35
- vynechání jamek 90
- výsledky analýzy
 - amplifikační graf 74
 - hrubá data 94
 - kontrola kvality 88
 - multikomponentní graf 92
 - standardní křivka 71
 - tabulka výsledků 81
 - tipy pro snadnou orientaci 69
 - zobrazení více grafů 70
- výstrahy 63
- vytvoření nového experimentu 19
- vzorky
 - doporučení 29
 - ředění 45
 - reakce (neznámé) 53
- vzorový experiment
 - analýza 66
 - běh 56
 - návrh 18
 - název 20
 - popis 12
 - postup 14
 - příprava 44

W

WARNING – VÝSTRAHA, popis xii

Z

- změna nastavení 78
- zobrazení amplifikačního grafu 74
- zobrazení hrubých dat 94
- zobrazení kontroly kvality 88
- zobrazení multikomponentního grafu 92
- zobrazení parametrů analýzy 86
- zobrazení standardní křivky 71
- zobrazení tabulky výsledků 81
- zobrazení více grafů 70

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

12/2007