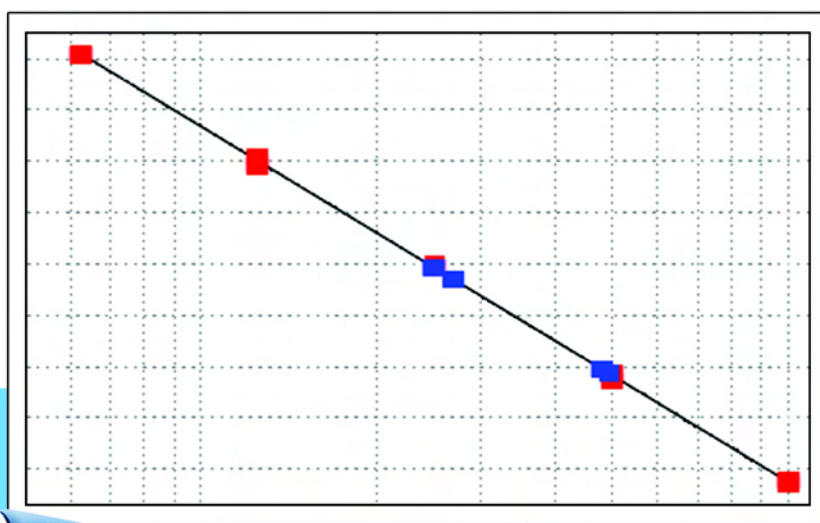


Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ Real-Time PCR systémy

Absolutní kvantifikace pomocí standardní křivky



Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™

Real-Time PCR systémy

Absolutní kvantifikace pomocí standardní křivky

Začínáme

1

Zadání
experimentu

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 NÁSLEDNÉ ŠKODY VZNIKLÉ VE SPOJENÍ S TÍMTO DOKUMENTEM, VČETNĚ ALE NIKOLIV VÝHRADNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ.

UPOZORNĚNÍ PRO KUPUJÍCÍHO:

Real-Time PCR systémy Applied Biosystems StepOne™/StepOnePlus™ 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. 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, StepOne, StepOnePlus, TAMRA a VeriFlex jsou obchodní známky společnosti Applied nebo jejich 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. 4376784 Rev. D
09/2007

Obsah

	Předmluva.....	vii
	Jak používat tuto příručku	vii
	Kde získat více informací	ix
	Kde získat pomoc	xii
	Bezpečnostní upozornění používaná v tomto dokumentu	xiii
	Symbyly na přístrojích	xiv
	Bezpečnostní označení na přístrojích	xvi
	Obecná pravidla bezpečnosti při práci s přístrojem	xvii
	Bezpečná manipulace s chemikáliemi.....	xviii
	Bezpečná manipulace s chemickým odpadem	xix
	Bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními	xx
	Bezpečná práce s diodami	xxi
	Biologické riziko	xxi
	Bezpečná práce	xxii
	Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC)	xxii
Kapitola 1	Začínáme	1
	O systémech StepOne™ a StepOnePlus™	2
	Spotřební materiál	4
	O absolutní kvantifikaci pomocí standardní křivky	6
	Jak používat tuto příručku	9
	Vzorový pokus	10
	Provedení vzorového pokusu	12
Kapitola 2	Zadání experimentu	15
	Přehled	16
	Vytvoření nového experimentu	17
	Zadání vlastností experimentu	20
	Definice metodiky a materiálu	22
	Zadání cílových sekvencí	25
	Zadání standardů.....	27
	Zadání vzorků	29
	Zadání běhu.....	31
	Kontrola zadání.....	33
	Objednání materiálu pro provedení experimentu	38

	Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard).....	42
Kapitola 3	Příprava reakcí	45
	Přehled	46
	Ředění vzorků.....	47
	Příprava ředící řady standardů.....	49
	Příprava reakční směsi.....	51
	Příprava destičky s reakcemi.....	53
Kapitola 4	Provedení experimentu	59
	Přehled	60
	Příprava běhu	61
	(Volitelné) Zapnutí odesílání emailových zpráv.....	63
	Spuštění běhu.....	65
	Sledování průběhu běhu	69
	Vyjmutí destičky a přenos dat.....	76
Kapitola 5	Analýza výsledků experimentu	81
	Přehled	82
	Část 5.1: Shlédnutí výsledků.....	83
	Analýza výsledků experimentu	84
	Zobrazení standardní křivky	90
	Zobrazení amplifikačního grafu	92
	Zobrazení tabulky výsledků	99
	Publikování výsledků	102
	Část 5.2: Řešení problémů (je-li zapotřebí).....	103
	Zobrazení parametrů analýzy.....	104
	Zobrazení kontroly kvality.....	106
	Vynechání jamek z analýzy	108
	Zobrazení multikomponentního grafu.....	109
	Zobrazení hrubých dat.....	112
Příloha A	Jiné způsoby zadání experimentu 115	
	Pokročilé zadání experimentu	116
	Rychlé spuštění	117
	Zadání pomocí templátu.....	119
	Zadání pomocí exportu/importu.....	121

Literatura.....	125
Terminologický slovník.....	127
Rejstřík.....	143

Jak používat tuto příručku

O dokumentaci Níže uvedené příručky jsou dodávány společně s Real-Time PCR systémy Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™.

Příručka	Účel a komu je určena	Kat. č.
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Genotypovací experimenty</i>	Vysvětlují jak provádět pokusy na systémech StepOne™ a StepOnePlus™. Každá příručka funguje současně jako:	4376786
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Experimenty typu Ano/Ne (Přítomnost/Nepřítomnost)</i>	<ul style="list-style-type: none"> Návod k použití – za pomoci demonstračních dat dodávaných spolu s programem Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software (StepOne™ software). Průvodce vašimi vlastními experimenty. 	4376787
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Relativní standardní křivka a komparativní C_T metoda</i>	Určené zaměstnancům laboratoří a vědcům, kteří provádějí pokusy s pomocí přístrojů StepOne™ nebo StepOnePlus™.	4376785
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Standardní křivka</i>		4376784
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy - Instalace, práce v síti a údržba - Uživatelská příručka</i>	Vysvětlují jak zprovoznit a provádět údržbu systémů StepOne™ a StepOnePlus™.	4376782
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Instalace – Zkrácený návod</i>	Určené zaměstnancům laboratoří zodpovědným za zprovoznění a údržbu přístrojů StepOne™ nebo StepOnePlus™	4376783
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Volba reagensů</i>	Poskytují informace, které je možné používat na systémech StepOne™ a StepOnePlus™ včetně: <ul style="list-style-type: none"> Vysvětlení principu chemizmů TaqMan® a SYBR® Green Popisu a doporučení pro návrh následujících typů experimentů: <ul style="list-style-type: none"> Kvantifikace Genotypizace Pokusy typu Ano/Ne <p>Určené zaměstnancům laboratoří a vědcům, kteří provádějí pokusy s pomocí přístrojů StepOne™ nebo StepOnePlus™.</p>	4379704

Příručka	Účel a komu je určena	Kat. č.
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy – Příprava místa</i>	Popisuje nároky systémů StepOne™ nebo StepOnePlus™ z hlediska jejich umístění a přípravy zvoleného místa. Určené osobám zodpovědným za přípravu místa pro systémy StepOne™ nebo StepOnePlus™.	4376768
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR systém – nápověda programu</i>	Vysvětluje jak v programu StepOne™ : <ul style="list-style-type: none"> • Nastavit, spustit a analyzovat experimenty pomocí systémů StepOne™ a StepOnePlus™. • Monitorovat činnost do sítě připojených přístrojů StepOne™ a StepOnePlus™. • Kalibrovat přístroje StepOne™ a StepOnePlus™. • Ověřit funkčnost přístrojů StepOne™ a StepOnePlus™ pomocí běhu RNázy P. Určená: <ul style="list-style-type: none"> • Zaměstnancům laboratoří a vědcům, kteří provádějí pokusy s pomocí přístrojů StepOne™ nebo StepOnePlus™.. • Zaměstnancům laboratoří zodpovědným za zprovoznění a údržbu přístrojů StepOne™ nebo StepOnePlus™.. 	NA

Předpoklady

Tato příručka předpokládá, že:

- Jste obeznámeni s operačním systémem Microsoft Windows® XP.
- Jste obeznámeni s fungováním internetu a internetovými prohlížeči.
- Jste obeznámeni s tím jak manipulovat se vzorky DNA a RNA a přípravou PCR.
- Umíte zálohovat data, přenášet a kopírovat soubory.
- Máte zkušenosti s prací v síti (plánujete-li integrovat systém StepOne nebo StepOnePlus 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 matrici.
- Znaménko (>) odděluje po sobě následující příkazy, které volíte z rozbalovacích menu nebo nabídek. Například:
Zvolte **File > Open**.

Upozornění pro uživatele

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

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

DŮLEŽITÉ! (IMPORTANT!) – Poskytuje informace, které jsou nezbytné pro správné ovládání přístroje, používání reagensů 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 xiii.

Kde získat více informací

Související dokumentace Více informací o používání přístrojů StepOne™ a StepOnePlus™ naleznete v příručkách (nejsou dodávány se systémem):

Dokument	Kat. č.
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy Protokol pro ověření úspěšné instalace</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy Protokol pro kvalifikaci instalace</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ - Real-Time PCR systémy Protokol plánování údržby[†]</i>	4376788

Dokumenty týkající se genotypování

Dokument	Kat. č.
<i>Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card</i>	4312212
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol</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-jamkové Plates Quick Reference Card</i>	4371394
<i>Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-jamkové 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

Dokumenty týkající se experimentů typu Ano/Ne (Přítomnost/Nepřítomnost)

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
<i>PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol</i>	4318925

Dokumenty týkající se metody relativní standardní křivky a komparativní Ct 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

Dokumenty týkající se metody 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


Dokumenty týkající se reagentů

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 (2□) 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 xii.

Získání informací
v nápovědě
programu

Nápověda programu StepOne™ popisuje používání všech nástrojů uživatelského rozhraní. Nápovědu lze otevřít přímo z prostředí programu takto:

- Stiskněte **F1**.
- Klikněte  v ovládací liště.
- Zvolte **Help (Pomoc) > StepOne 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 zasílání 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 xii).

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)
- Přímou položku dotaz Technické podpory
- 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 reagensů 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 **DŮLEŽITÉ! (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 xv).*

Příklady

DŮLEŽITÉ! Pro každou 96-ti jamkovou destičku musíte vytvořit zvláštní tabulku.



CAUTION

CHEMICKÉ RIZIKO. TaqMan 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.



WARNING

RIZIKO PORANĚNÍ. Je-li přístroj v provozu, může být blok na vzorky ohřátý až na 100 °C.



DANGER

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

Symboly na přístrojích

Elektrické symboly

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 xvi**). Tyto bezpečnostní symboly se mohou rovněž objevit v textu tohoto nebo dalších dokumentů vedle označení DANGER (NEBEZPEČÍ), WARNING (VÝSTRAHA) a CAUTION (VAROVÁNÍ).

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

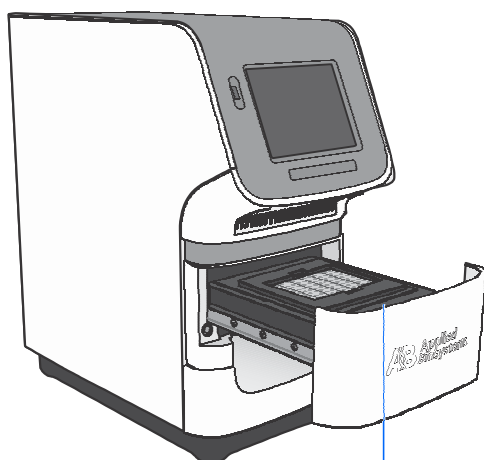
Bezpečnostní označení na přístrojích

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.
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.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	NEBEZPEČÍ Laserové záření třídy 3B (III) a/nebo neviditelné záření LED při otevření a vypnutí kontaktní pojistky. Vyhněte se přímému vystavení se laserovému paprsku.

Umístění
bezpečnostních
označení


Bezpečnostní označení 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 xviii.

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 RIZIKO UCHOVÁVÁNÍ CHEMIKÁLIÍ.** Nikdy neuchovávejte odpad ve skleněných nádobách kvůli možnosti jejich rozbití. Láhve na reagentie a odpad se mohou rozbít a vytéct. 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 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 xviii.)
- 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. Neponechávejte 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.

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.

Chcete-li získat bezpečnostní list:

1. Otevřete stránku <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html>
2. V poli hledání:
 - a. Zadejte název chemikálie, katalogové číslo nebo další informaci z bezpečnostního listu, který vás zajímá.
 - b. Zvolte jazyk.

- c. Klikněte na **Search** (Hledat).
3. Zvolte dokument, který vás zajímá, klikněte pravým tlačítkem myši na jeho název a zvolte jednu z následujících možností:
 - **Open** – Otevření dokumentu
 - **Print Target** – Vytisknutí dokumentu
 - **Save Target As** – Stažení dokumentu ve verzi PDF do zvoleného adresáře
 4. Chcete-li, aby vám byl bezpečnostní list zaslán emailem nebo faxem:
 - a. Zvolte **Fax** nebo **Email** pod názvem dokumentu.
 - b. Klikněte na **RETRIEVE DOCUMENTS** (Získat dokumenty) na konci jejich seznamu.
 - c. Vyplňte požadované informace.
 - d. Klikněte na **View/Deliver Selected Documents Now** (Nyní doručit zvolené dokumenty).

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

Bezpečná manipulace s chemickým odpadem

Výstraha -
chemické riziko



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 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.

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. Neopouštějte 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 ovládní

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 Systémy StepOne™ a StepOnePlus™ spadají do třídy II (přepětí) a jsou klasifikovány jako přenosné přístroje.

Bezpečná práce s diodami

Abyste se nevystavovali nebezpečnému účinku záření diod:

- Musí údržbu systémů provádět servisní technici společnosti Applied Biosystems.
- Veškeré kryty přístroje musí být během jeho provozu na svém místě. V takovém případě nedochází k detekovatelné emisi záření. Odstraníte-li během provozu přístroje kryt (např. během servisního zásahu při vypnutí kontaktních pojistek), můžete být vystaveni záření přesahující rozsah třídy **3B**.
- Neodstraňujte bezpečnostní označení a nevypínejte kontaktní pojistky.

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 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 započítím 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; <http://bml.od.nih.gov>)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html).

- Pravidla práce s nebezpečným infekčním odpadem platná ve vaší společnosti/instituci.

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)

Bezpečnostní předpisy v USA a Kanadě



Systémy StepOne a StepOnePlus byly testovány podle a splňují požadavky norem:

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92, "Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements."

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010, "Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials."

FDA "Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard 21 CFR 1040.10 and 1040.11," as applicable.

Kanadské normy EMC

Systémy StepOne a StepOnePlus byly testovány podle normy ICES-001, Issue 3: "Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators" a splňují její požadavky

Evropské bezpečnostní předpisy a normy



Bezpečnost

Tento přístroj splňuje bezpečnostní požadavky evropské Směrnice pro nízké napětí 73/23/EEC. Tento přístroj byl testován podle a splňuje požadavky norem EN 61010-1:2001 "Bezpečnostní požadavky na elektrická měřicí, řídicí a laboratorní zařízení, část 1: Obecné požadavky",

EN 61010-2-010 “Zvláštní požadavky pro laboratorní zařízení pro ohřev materiálu”,

EN 61010-2-081 “Zvláštní požadavky pro automatická a poloautomatická laboratorní zařízení pro analytické a jiné účely”

EN 60825-1, “Bezpečnost laserových zařízení - Část 1: Klasifikace zařízení, požadavky a pokyny pro používání.

EMC

Tento přístroj splňuje požadavky směrnice Rady Evropské unie pro elektromagnetické rušení a odolnost vůči němu (EMC směrnice 89/336/EEC). Tento přístroj byl testován podle normy EN 61326 (Skupina 1, Třída B) “Elektrická zařízení pro měření, kontrolu a laboratorní použití – požadavky EMC.”

Australské
normy EMC




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

Předmluva

Bezpečnost a normalizace v oblasti elektromagnetické kompatibility (EMC)

V této kapitole naleznete:

- O systémech StepOne™ a StepOnePlus™ 2
- Spotřební materiál 4
- O absolutní kvantifikaci pomocí standardní křivky 6
- Jak používat tuto příručku 9
- Vzorový pokus 10
- Provedení vzorového pokusu 12

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu StepOne™ Real-Time PCR System Software, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > StepOne Software Help** (Nápověda > Nápověda programu StepOne).

O systémech StepOne™ a StepOnePlus™

Tento systém pro Real-Time PCR se dodává ve dvou provedeních:

Systém	Vlastnosti
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR systém (StepOne™ systém)	<ul style="list-style-type: none"> pro 48-jamkové destičky tříbarevná detekce
Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR systém (StepOnePlus™ systém)	<ul style="list-style-type: none"> pro 96-ti jamkové destičky čtyřbarevná detekce blok na vzorky VeriFlex™

Real-Time PCR systémy Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™ 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 StepOne™ a StepOnePlus™ 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*) 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 StepOne™ uloží tato tzv. hrubá data pro následnou analýzu.

Po skončení běhu použije program StepOne™ kalibrační soubory (prostorová kalibrace, kalibrace barev a kalibrace pozadí) ke stanovení intenzity fluorescenčního signálu jednotlivých jamek v každém čtení, k určení barev emitujících daný fluorescenční signál a ke stanovení jeho významu.

O filtrech Systémy StepOne a StepOnePlus používají následující filtry:

Systém StepOne		Systém StepOnePlus	
Filtr	Barva	Filtr	Barva
1	FAM™	1	FAM™
	SYBR® Green		SYBR® Green
2	JOE™	2	JOE™
	VIC®		VIC®
3	ROX™	3	TAMRA™
			NED™
		4	ROX™

O bloku na vzorky VeriFlex™

Přístroj StepOnePlus™ je vybaven blokem na vzorky VeriFlex™, který je rozčleněn na šest nezávisle ovládaných teplotních zón pro snazší optimalizaci teplotních profilů vašich reakcí. Pro jednu nebo více zón lze nastavit různé teploty nebo lze pro všechny zóny nastavit stejnou teplotu.

Více informací Více informací o:

- Systémech StepOne a StepOnePlus získáte v nápovědě programu *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR*.

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

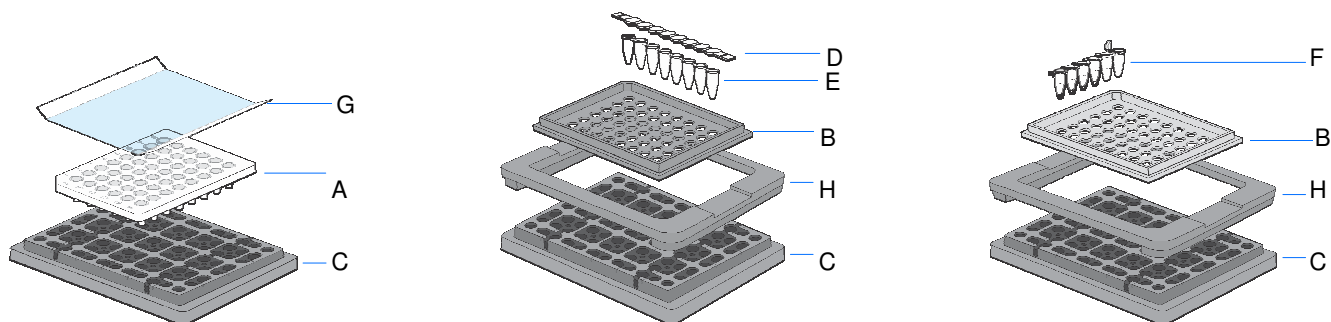
- Genotypování naleznete v příručce *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Genotyping Experiments*.
- Experimentech typu Ano/Ne (Přítomnost/Nepřítomnost) naleznete v příručce *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting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

Spotřební materiál

Systém StepOne Na přístroji StepOne můžete používat níže uvedený spotřební materiál (určený pro použití se standardními reagenčními/protokolem i s reagenčními/protokolem Fast).

DŮLEŽITÉ! Na přístrojích StepOne a StepOnePlus používejte spotřební materiál výhradně typu Fast (destičky, stripy, zkumavky), a to i když provádíte experimenty se standardními reagenčními.

Spotřební materiál	Kat. č.
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast optické 48-jamkové destičky • MicroAmp™ optická adhezivní fólie (pro 48-jamkovou destičku) 	<ul style="list-style-type: none"> • 4375816 • 4375323 a 4375928
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 8-zkumavkový strip • MicroAmp™ optická víčka ve stripech po 8 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358293 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp® Fast zkumavky s víčkem 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358297
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 48-jamková nosítka • MicroAmp™ 48-jamkový adaptér • MicroAmp™ 96-jamková nosítka 	<ul style="list-style-type: none"> • 4375282 • 4375284 • 4379590

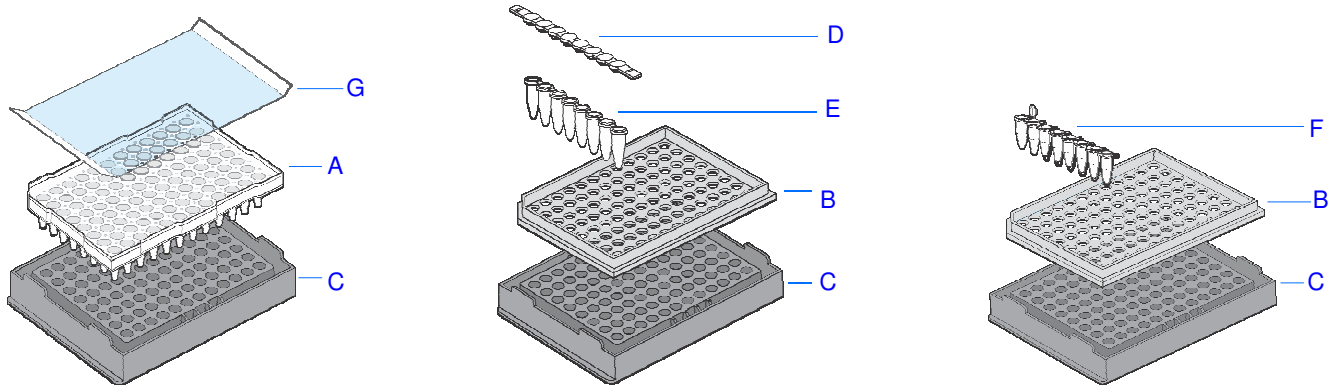


#	Spotřební materiál
A	MicroAmp™ Fast optická 48-jamková destička
B	MicroAmp™ Fast 48-jamková nosítka
C	MicroAmp™ 96-jamková nosítka
D	MicroAmp™ optický 8-zkumavkový strip
E	MicroAmp™ Fast 8-zkumavkový strip
F	MicroAmp® Fast zkumavky s víčkem
G	MicroAmp™ optická adhezivní fólie (pro 48-jamkovou destičku)
H	MicroAmp™ 48-jamkový adaptér

Systém StepOnePlus Na přístroji StepOne můžete používat níže uvedený spotřební materiál (určený pro použití se standardními reagensii/protokolem i s reagensii/protokolem Fast).

DŮLEŽITÉ! Na přístrojích StepOne a StepOnePlus používejte spotřební materiál výhradně typu Fast (destičky, stripy, zkumavky), a to i když provádíte experimenty se standardními reagensii.

Spotřební materiál	Kat. č.
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast optické 96-jamkové destičky s čárovým kódem • MicroAmp™ optická adhezivní fólie 	<ul style="list-style-type: none"> • 4346906 a 4366932 • 4360954 a 4311971
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 8-zkumavkový strip • MicroAmp™ optická víčka ve stripech po 8 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358293 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp® Fast zkumavky s víčkem 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358297
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ 96- jamková nosítka pro bloky VeriFlex™ • MicroAmp™ 96- jamková nosítka 	<ul style="list-style-type: none"> • 4379983 • 4379590
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ aplikátor pro adhezivní fólii • MicroAmp™ nástroj pro nasazování víček 	<ul style="list-style-type: none"> • 4333183 • 4330015



#	Spotřební materiál
A	MicroAmp™ Fast optická 96-jamková destička
B	MicroAmp™ 96- jamková nosítka pro bloky VeriFlex™
C	MicroAmp™ 96- jamková nosítka
D	MicroAmp™ optická víčka ve stripech po 8
E	MicroAmp™ Fast 8-zkumavkový strip
F	MicroAmp® Fast zkumavky s víčkem
G	MicroAmp™ optická adhezivní fólie

O absolutní kvantifikaci pomocí standardní křivky

Real-Time PCR experimenty Absolutní kvantifikace se provádí metodou Real-Time PCR (PCR monitorovaná v reálném čase). Při provádění real-time PCR:

- Přístroj monitoruje průběh PCR (Kwok and Higuchi, 1989).
- Během PCR jsou sbírána data.
- Reakce charakterizuje ten bod v jejích průběhu, kdy je poprvé detekována amplifikace produktu (Saiki *et al.*, 1985).

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

O metodě standardní křivky

Metoda standardní křivky (tzv. absolutní kvantifikace) se používá ke stanovení absolutního množství cílového templátu ve vzorcích. Program StepOne 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 těžké 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.

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 7](#))

Singleplexní vs. Multiplexní PCR

PCR reakci lze provést v uspořádání:

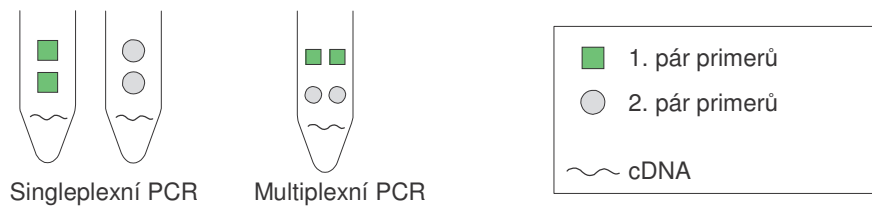
- **Singleplexní PCR** – V reakční jamce nebo zkumavce je jeden pár primerů. V každé reakci je amplifikován pouze jeden cílový templát.

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.

DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.



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 uchování 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 StepOne™ and StepOnePlus™ 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 StepOne a StepOnePlus chemizmy TaqMan® a SYBR® Green, popsané v následující tabulce.

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> <p>a. Součásti eseje b. Denaturovaný templát a annealing c. Tvorba signálu</p> <div data-bbox="1307 646 1461 961" 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 dvouřetězcovou DNA) umožňují detekci PCR produktů tak jak dochází k jejich akumulaci v průběhu PCR.</p> <p>Výhody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ekonomické řešení (není zapotřebí sondy). • Možnost provádění analýzy disociační křivky • Lze použít pro 1- nebo 2-krokovou RT-PCR. <p>Nevýhody Váže se nespecificky na veškerou dvouřetězcovou 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 generuje fluorescenční signál je-li vázáno na dvouřetězcovou DNA.</p> <p>Krok 2: Denaturace Je-li DNA denaturována, barvivo SYBR® Green I se uvolní a fluorescenční signál se dramaticky sníží.</p> <p>Krok 3: Polymerace Primery nasednou na templát a dochází k jejich prodlužování a vzniku PCR produktu.</p> <p>Krok 4: Polymerace ukončena Barvivo SYBR® Green I se váže na dvouřetězcový produkt reakce, dochází k nárůstu detekovaného fluorescenčního signálu.</p>

DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášeč v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášeč v systému StepOnePlus™.

Další reagenty

V systémech StepOne a StepOnePlus je možné použít i jiné fluorescenční reagenty, nicméně je zapotřebí:

- Zadat experiment pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání) a nikoliv Design Wizard (Průvodce zadáním). (Viz [“Pokročilé zadání experimentu”](#) na straně 116.)
- Při použití reagentů TaqMan a SYBR green společnosti Applied Biosystems je možné použít funkci automatického výpočtu reakčního objemu v záložce Reaction Setup (Sesazení reakcí).

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

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 StepOne, můžete tuto příručku použít jako návod pro provedení experimentů absolutní kvantifikace na přístrojích StepOne nebo StepOnePlus. Postupujte podle pokynů v kapitolách 2 až 5:

Kapitola	Procedura
2	Návrh experimentu pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard) v programu StepOne.
3	Příprava experimentu za použití reagentů a objemů vypočítaných v Průvodci zadáním (Design Wizard) v kapitole 2.
4	Spuštění experimentu na přístroji StepOne nebo StepOnePlus (instalace s nebo bez počítače)
5	Analýza výsledků.

Více informací viz [“Vzorový pokus”](#) na straně 10.

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 StepOne 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 116
QuickStart (Rychlý start)	Spuštění nového experimentu bez zadání informací o destičce. Parametry lze zadat po skončení běhu.	strana 117
Template (Templát)	Zadání nového experimentu pomocí informací obsažených v templátu.	strana 119
Export/Import	Import zadání experimentu ve formátu ASCII, který obsahuje potřebné informace.	strana 121

Vzorový pokus

Pro lepší nástin toho jak navrhnout, připravit, provést a vyhodnotit pokus absolutní kvantifikace je jako příklad v této příručce uveden pokus vzorový. Vzorový pokus demonstruje typický postup práce na systémech StepOne nebo StepOnePlus a umožňuje vám se s těmito systémy rychle seznámit.

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

Ve vzorovém pokusu:

- 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 možné statistické 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.
- Experiment je proveden jako 2-kroková RT-PCR.
- 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.

DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.

Rozvržení reakcí v destičce Vzorový experiment kvantifikace pomocí standardní křivky byl vytvořen pro přístroj StepOne. Pro přístroj StepOne program zobrazí následující rozvržení vzorků v 48-jamkové destičce:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3
C	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
D								
E								
F								

Můžete vytvořit vzorový experiment i pro přístroj StepOnePlus, rozvržení reakcí v destičce však bude odlišné od rozvržení v 48-jamkové destičce, které je používáno v této příručce. Pro přístroj StepOnePlus program zobrazí následující rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4
B	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
C												
D												
E												
F												
G												
H												

O vzorovém experimentu

V této příručce budete používat dva soubory:

- V kapitole 2 vytvoříte vzorový soubor obsahující informace k zadání experimentu a uložíte jej do adresáře s experimenty ve vašem počítači:

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

- V kapitole 5 zobrazíte výsledky vzorového experimentu. Výsledky vzorového experimentu jsou součástí souboru, který se instaluje spolu s programem StepOne. Soubor naleznete na disku vašeho počítače:

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

kde:

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

Soubory v adresáři Examples (Příklady)

Adresář Examples (Příklady) obsahuje několik souborů, které můžete použít jako vzor při analýze vašich vlastních výsledků (viz níže). Tyto soubory se instalují spolu s programem StepOne.

Poznámka: Ujistěte se, že při používání této příručky jako návodu používáte soubor Standard Curve Example.eds. Soubor 96-jamkové Standard Curve Example.eds je jiným příkladem absolutní kvantifikace.

Přístroj StepOne	Přístroj StepOnePlus
Comparative CT Example.eds	96-jamkové Comparative CT Example.eds
Multiplex Example.eds	96-jamkové Multiplex Example.eds
Genotyping Example.eds	96-jamkové Genotyping Example.eds
Presence Absence Example.eds	96-jamkové Presence Absence Example.eds
Relative Standard Curve Example.eds	96-jamkové Relative Standard Curve Example.eds
RNase P Experiment.eds	96-jamkové RNase P Experiment.eds
Standard Curve Example.eds	96-jamkové Standard Curve Example.eds
SYBR Example.eds	96-jamkové SYBR Example.eds

Provedení vzorového pokusu

Obrázek na straně 13 znázorňuje postup práce se vzorovým příkladem absolutní kvantifikace.

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.

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

2

Zadání experimentu

V této kapitole naleznete:

■ Přehled.....	16
■ Vytvoření nového experimentu	17
■ Zadání vlastností experimentu.....	20
■ Definice metodiky a materiálu	22
■ Zadání cílových sekvencí	25
■ Zadání standardů	27
■ Zadání vzorků.....	29
■ Zadání běhu	31
■ Kontrola zadání	33
■ Objednání materiálu pro provedení experimentu	38
■ Ukončení průvodce zadáním (Design Wizard)	42

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu StepOne™ Real-Time PCR System Software, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > StepOne Software Help** (Nápověda > Nápověda programu StepOne).

Přehled

V této kapitole je popsáno použití Průvodce zadáním (Design Wizard) programu StepOne™ pro zadání vzorového experimentu absolutní kvantifikace (standardní křivky). Průvodce zadáním (Design Wizard) vás při zadávání parametrů vzorového experimentu seznámí i se souvisejícími doporučeními společnosti Applied Biosystems.

Vzorový experiment

Postup provádění vzorového experimentu je vyobrazen níže.

Poznámka: Vzorový experiment zadejte v programu StepOne pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard). Při zadávání vlastních experimentů můžete zvolit i jiné možnosti zadání (viz [“Používání příručky jako průvodce vašimi experimenty” na straně 9](#)).

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)

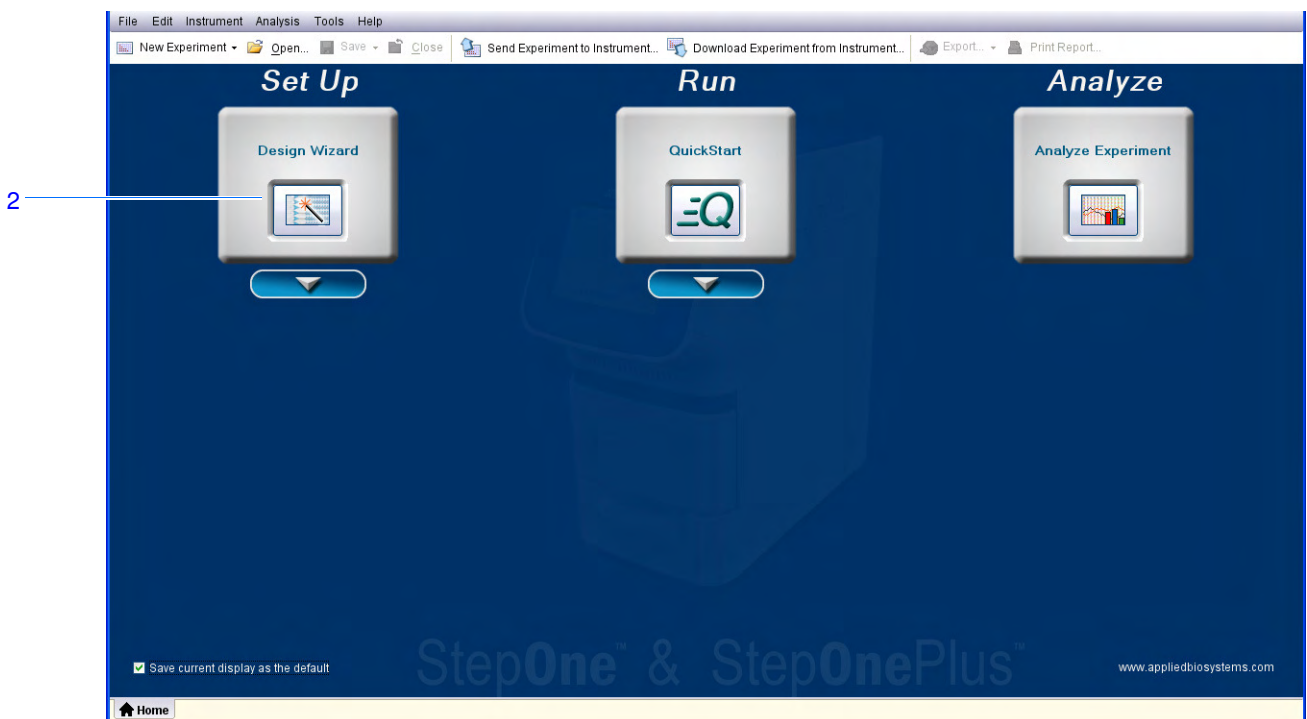
Konec experimentu

Vytvoření nového experimentu

Vytvořte nový experiment pomocí Průvodce zadáním (Design Wizard) v programu StepOne.

Vytvoření experimentu

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



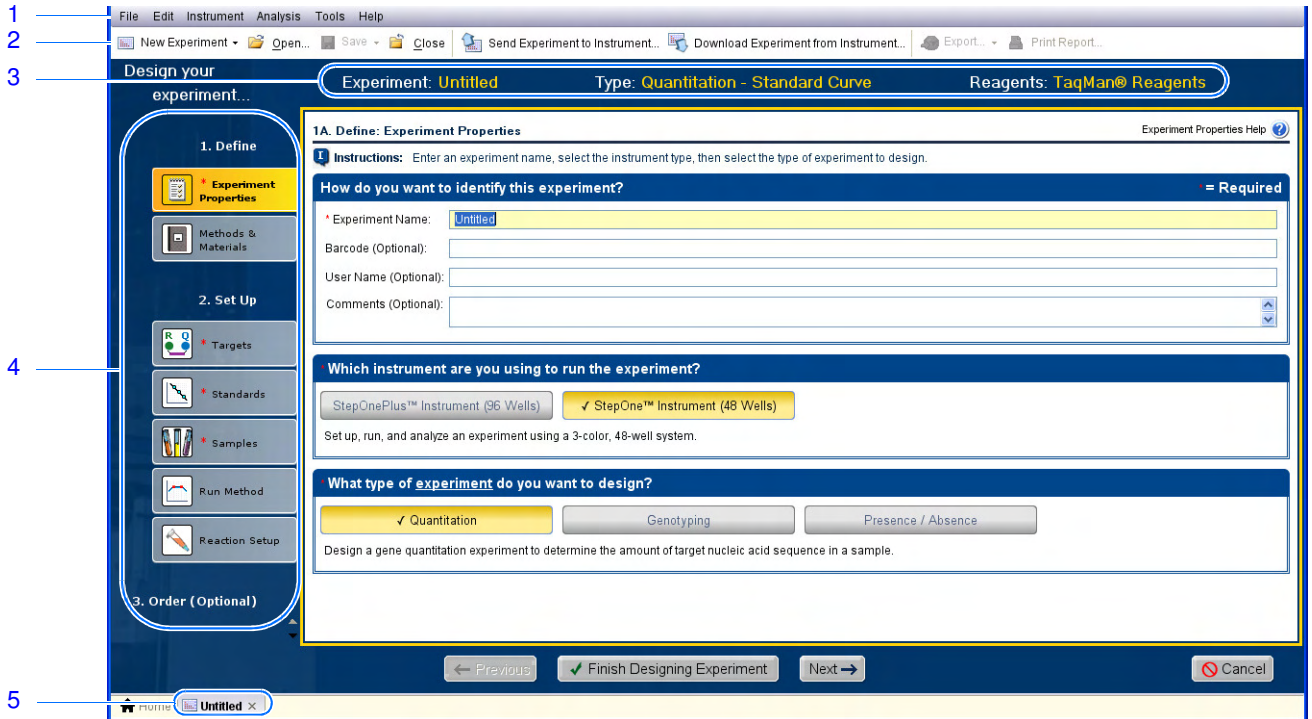
3. Více informací o možnostech Průvodce zadáním (Design Wizard) získáte v části “Součásti programu” na straně 18.

Součásti programu Součásti programu StepOne používané pro Průvodce zadáním (Design Wizard) jsou popsány níže.

1. Lišta nabídek (Menu Bar) – Zobrazuje nabídky, které jsou v programu k dispozici:
 - File (Soubor)
 - Edit (Upravit)
 - Instrument (Přístroj)
 - Analysis (Analýza)
 - Tools (Nástroje)
 - Help (Pomoc)
2. Nástrojová lišta (Toolbar) – Zobrazuje nástroje, které jsou v programu k dispozici:
 - New Experiment (Nový experiment)
 - Open (Otevřít)
 - Close (Zavřít)
 - Send Experiment to Instrument (Odeslat experiment do přístroje)
 - Download Experiment from Instrument (Stáhnout experiment z přístroje)
3. Záhloví experimentu (Experiment header) – Zobrazuje název experimentu, typ experimentu a reagentie pro otevřený experiment.
4. Navigační panel (Navigation pane) – Zobrazuje odkazy na všechny obrazovky Průvodce zadáním (Design Wizard):
 - Experiment Properties (Vlastnosti experimentu)
 - Methods & Materials (Metodika a materiál)
 - Targets (Cílové sekvence)
 - Standards (Standardy)
 - Samples (Vzorky)
 - Run Method (Běh)
 - Reaction Setup (Sesazení reakcí)
 - Materials List (Potřebný materiál)

Poznámka: Průvodce zadáním (Design Wizard) nejprve zobrazí typ experimentu Quantitation - Standard Curve (Kvantifikace – Standardní křivka). Obrazovky Průvodce zadáním (Design Wizard) se mohou změnit, zvolíte-li jiný typ experimentu. Například obrazovka Relative Quantitation Settings (Parametry relativní kvantifikace) se nezobrazí pokud jako typ experimentu nezvolíte relativní standardní křivku nebo komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$) metodu.

5. Záložka(y) Experiment – Zobrazí záložku pro každý otevřený experiment.



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 StepOne.
- Používá se 48-jamková optická destička MicroAmp™ Fast.
- 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 zaktualizuje podle zadaného názvu.

2. Pole Barcode (Čárový kód) ponechte prázdné.

Poznámka: 48-jamková optická destička MicroAmp Fast nemá čárový kód.

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 přístroj **StepOne™ Instrument (48 Wells – 48 jamek)**.

Poznámka: Vzorový experiment byl vytvořen pro přístroj StepOne. Můžete vytvořit vzorový experiment i pro přístroj StepOnePlus, rozvržení reakcí v destičce však bude odlišné od rozvržení v 48-jamkové destičce, které je používáno v této příručce. Program zobrazí rozvržení vzorků v 48-jamkové destičce pro přístroj StepOne a rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce pro přístroj StepOnePlus. Chcete-li vytvořit vzorový pokus pro přístroj StepOnePlus, zvolte **StepOnePlus™ Instrument (96 Wells – 96 jamek)**.

6. Zvolte **Quantitation** (Kvantifikace) jako typ experimentu.

7. Klikněte **Next >** (Další).

Doporučení k zadání Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Zadejte název experimentu:
 - Zadejte popisný dobře zapamatovatelný název. Název může být až 100 znaků dlouhý.

Poznámka: Následující znaky nemůžete v poli Název experimentu použít:
/, \, >, <, *, ?, ", |, :, ;, ;.

- Název experimentu bude použit jako název souboru.
- *(Volitelné)* Používáte-li 96-jamkovou optickou destičku MicroAmp™ Fast, zadejte do pole Barcode (Čárový kód) její čárový kód. Do pole Barcode lze zadat až 100 znaků.

Poznámka: 48-jamková optická destička MicroAmp Fast nemá čárový kód.

- *(Volitelné)* Zadejte uživatelské jméno (User Name), abyste identifikovali osobu, která experiment provádí. Do pole User Name lze zadat až 100 znaků.
- *(Volitelné)* Zadejte komentář (popis - Comments) k experimentu. Do pole Comments lze zadat až 1000 znaků.


- Zvolte přístroj, který používáte:
 - **StepOne™ Instrument (48 Wells)** – 48 jamek
 - **StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)** – 96 jamek

Poznámka: Program StepOne v2.0 nebo vyšší lze použít pro návrh experimentů pro oba typy přístrojů - StepOne a StepOnePlus. Typ přístroje, který zvolíte, následně ovlivní možnosti rozložení reakcí v destičce a seznam potřebného materiálu.

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.

- Jako typ pokusu zvolte **Quantitation** (Kvantifikace).

Více informací Více informací o:

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

Definice metodiky a materiálu

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

O vzorovém experimentu Ve vzorovém experimentu standardní křivky:

- se pro kvantifikaci používá metoda standardní křivky.
- se používají reagentie TaqMan®.
- v průběhu běhu se používá standardní rychlost rampu.
- jako templát se používá gDNA (izolovaná ze dvou populací). Abyste mohli gDNA použít, musíte ji nejprve izolovat z vašeho vzorku.

Vyplnění obrazovky Metodika a materiál

1. Jako metodu kvantifikace zvolte **Standard Curve** (Standardní křivka).
2. Zvolte reagentie **TaqMan®**.
3. Zvolte standardní rychlost rampu **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) Fast (~ 40 minutes 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.

Doporučení k zadání

Zadááte-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.

DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.

– 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.

Zvolte standardní rychlost rampy **Standard**. Mastermix typu Fast pro reagentie SYBR Green není společností Applied Biosystems dodáván.


Poznámka: V systémech StepOne a StepOnePlus 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 rampu:
 - 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 již 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 StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání) získáte v části **“Pokročilé zadání experimentu” na straně 116**.
- Používání dalších metod kvantifikace získáte v příručce *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative Ct Experiments*.
- Reagentiích TaqMan a SYBR Green získáte v příručce *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ 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 StepOne™ and StepOnePlus™ 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 27](#)).
- 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.

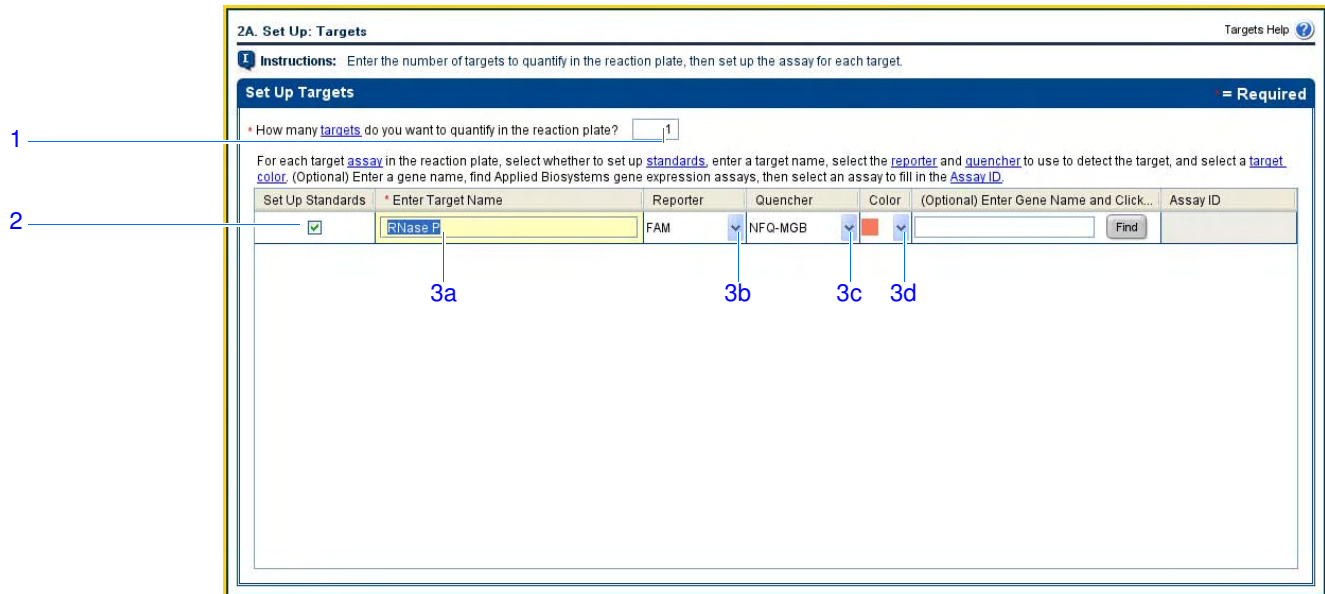
2. Zvolte možnost **Set Up Standards** (Zadání standardů).

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 napišete **RNase P**.
 - b. Z rozbalovací nabídky Reporter zvolte **FAM** (předvoleno).
 - c. Z rozbalovací nabídky Quencher (Zhášec) zvolte **NFQ-MGB** (předvoleno).
 - d. V poli Color (Barva) ponechte předvolenou možnost.

4. Klikněte **Next >** (Další).

Poznámka: Ponechte pole (volitelné) Enter Gene Name (Zadejte název cílové sekvence) volné. Identifikátor eseje můžete nalézt později při objednávání materiálu (viz [“Objednání materiálu pro provedení experimentu” na straně 38](#)).




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).

DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.

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

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 množství 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 rozsah množství 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).

2B. Set Up: Standards

Instructions: Enter the number of points and replicates for all standard curves in the reaction plate. For each standard curve, enter the starting quantity and select the serial factor.

Set Up Standards = Required

How many **points** do you need for each standard curve?

How many **replicates** do you need for each point?

For each standard curve, define the range of standard quantities by entering the **starting quantity** and **serial factor**.

Define the standard curve so that the range of standard quantities spans the expected range of quantities for the unknowns.

Target Name	Enter Starting Quantity	Select Serial Factor
RNase P	10000.0	1:2

Standard Curve Preview

Standard Curve Preview for RNase P

1E4
5E3
2.5E3
1.25E3
6.25E2

Well Count

6 - Unknown 15 - Standard 3 - Negative Control 24 - Empty

View Plate Layout

Arrange Plate by: Rows Place Negative Controls in:


	1	2	3	4	5	6	7	8
A	U RN...	U RN...	U RN...	U RN...	U RN...	U RN...	U RN...	U RN...
B	U RN... 1E4	S RN... 1E4	S RN... 1E4	S RN... 5E3	S RN... 5E3	S RN... 5E3	S RN... 2.5E3	S RN... 2.5E3
C	S RN... 2.5E3	S RN... 2.5E3	S RN... 1.25E3	S RN... 1.25E3	S RN... 1.25E3	S RN... 625	S RN... 625	S RN... 625
D								
E								
F								

**Doporučení
k zadání**

Zadávaté-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 25).
- 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 rozsah množství standardů má vliv na výpočet efektivity amplifikace, pečlivě zvažte vhodný rozsah množství standardů pro vaši esej:
 - Pro přesnější měření účinnosti amplifikace použijte širší rozsah množství standardů (5 až 6 řádů). Zvolíte-li široký rozsah množství 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 rozsahem množství standardů.
- Ředící faktor se používá pro výpočet množství ve všech bodech standardní křivky. Je-li výchozí množství nejvyšší, zvolte jako ředící faktor např. 1:2, 1:3 atd. Je-li výchozí množství nejnižší, zvolte faktor 2×, 3× atd.

Více informací Více informací o:

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

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 **All Sample/Target Reactions** – tím zvolíte možnost provést kvantifikaci všech cílových sekvencí ve všech vzorcích.
7. V části Well Count (Počet jamek) ověřte, že je zde:
 - 6 jamek Unknown (neznámé vzorky) **U**
 - 15 jamek standardů **S**
 - 3 negativní kontroly **N**
 - 24 prázdných jamek
8. V záložce View Plate Layout (Zobrazení destičky):
 - a. Z rozbalovací nabídky Arrange Plate by (Řazení v destičce) zvolte **Rows** (Řádky – předvolené nastavení).

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

9. Klikněte **Next >** (Další).

Doporučení
k zadání

Zadáváte-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.
- Zvolte, které cílové sekvence chcete kvantifikovat v kterých vzorcích:
 - Zvolte **All Sample/Target Reactions** – tím zvolíte možnost provést kvantifikaci všech cílových sekvencí ve všech vzorcích.
 - Zvolte **Specify Sample/Target Reactions** – následně zadáte, která cílová sekvence má být kvantifikována v které jamce.


Note: Používáte-li pro zadání absolutní kvantifikace 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) a nikoliv Průvodce zadáním (Design Wizard).

- Pokud pracujete s přístrojem StepOnePlus a chcete upravit parametry běhu (Run Method - [strana 31](#)) a nastavit různé teploty pro jednu nebo více zón bloku VeriFlex, musíte:
 - a. Pro zadání experimentu použít funkci Advanced Setup (Pokročilé zadání) a nikoliv Průvodce zadáním (Design Wizard).

- b. Na obrazovce Plate Setup (Zadání destičky) zvolit záložku **Assign Targets and Samples** (Definovat rozložení vzorků a cílových sekvencí), zvolit záložku **View Plate Layout** (Zobrazení destičky), poté zvolit možnost **Enable VeriFlex™ Block** (Použít blok VeriFlex™).

DŮLEŽITÉ! Pokud nezvolíte možnost **Enable VeriFlex™ Block**, nebude následně na obrazovce Run Method (Zadání běhu) možné definovat různé teploty pro jednu nebo více zón bloku VeriFlex (strana 31).

Více informací Více informací o:

- Obrazovce Samples (Vzorky) získáte v nápovědě programu StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Funkci Advanced Setup viz “Pokročilé zadání experimentu” na straně 116.

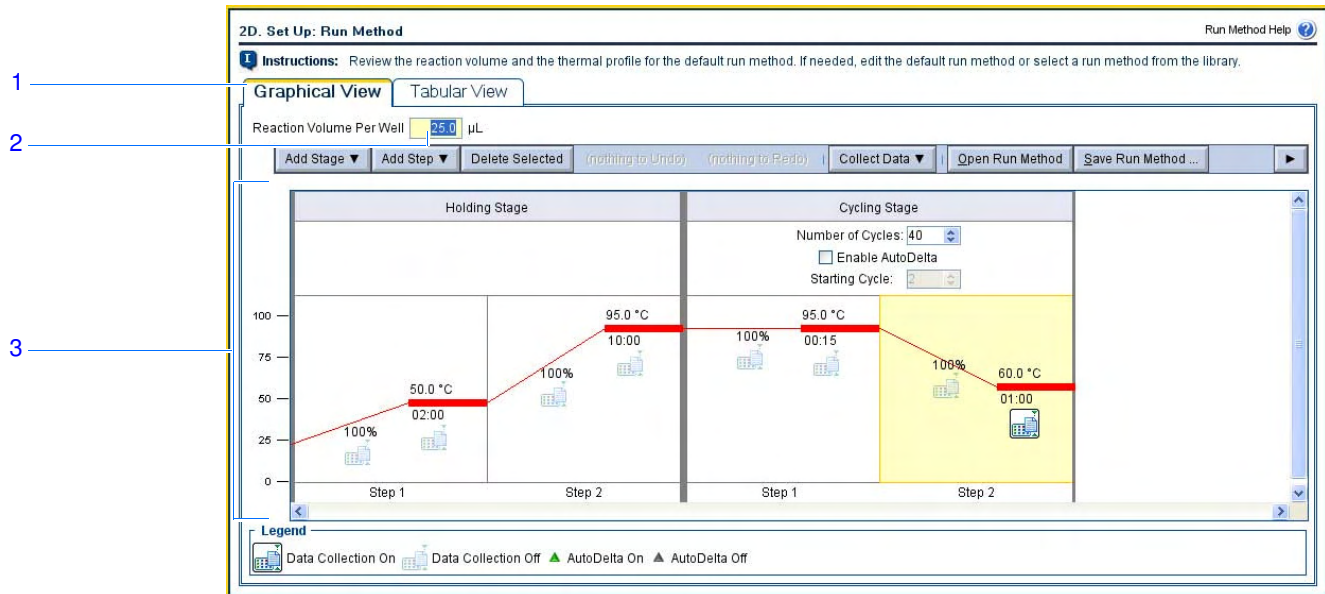
Zadání běhu

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 20 µL ale 25 µL.

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.
4. Klikněte **Next >** (Další).



Doporučení k zadání Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- Zadejte objem reakce v rozsahu 10 až 30. Systémy StepOne a StepOnePlus podporují používání reakčních objemů v rozsahu 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 StepOne.

- Provádíte-li experiment na přístroji StepOnePlus a chcete nastavit různé teploty pro každou zónu bloku VeriFlex, musíte:
 - a. Provést návrh experimentu pomocí funkce Pokročilé zadání (Advanced Setup) namísto Průvodce zadáním (Design Wizard).
 - b. Na obrazovce Plate Setup (Zadání destičky) zvolit záložku **Assign Targets and Samples** (Definovat rozložení vzorků a cílových sekvencí), zvolit záložku **View Plate Layout** (Zobrazení destičky), poté zvolit možnost **Enable VeriFlex™ Block** (Použít blok VeriFlex™).



DŮLEŽITÉ! Pokud nezvolíte možnost **Enable VeriFlex™ Block**, nebude následně na obrazovce Run Method (Zadání běhu) možné definovat různé teploty pro jednu nebo více zón bloku VeriFlex.

- c. Na obrazovce Run Method (Zadání běhu) zvolte záložku **Graphical View** (Grafické vyobrazení).

- d. Pro každou zónu bloku VeriFlex™, jejíž teplotu chcete nastavit, klikněte do pole teploty a zadejte požadovanou hodnotu.

Poznámka: Pro jednu nebo více zón bloku VeriFlex můžete nastavit různé teploty nebo můžete pro všechny zóny nastavit tutéž teplotu. Není-li teplota sousedních zón bloku stejná, musí se lišit v rozsahu 0.1 až 5.0 °C. Maximální teplota je 99.9°C.

Více informací Více informací o:

- Databázi metod (Run Method library) nebo o obrazovce Run Method (Zadání běhu), získáte v nápovědě programu StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Nastavení teploty v bloku VeriFlex získáte v nápovědě programu StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.
- Funkci Advanced Setup viz “[Pokročilé zadání experimentu](#)” na straně 116.

2

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! Proveďte 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×) nebo TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - RNase P Assay Mix (20×)
 - 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)

1. Zvolte záložku **Reaction Mix Calculations** (Výpočet složení reakce).
2. V části Select Target (Zvolte cílovou sekvenci) zvolte **RNase P** (RNáza P).
3. Z rozbalovací nabídky Assay Type (Typ eseje) zvolte **Inventoried/Made to Order** (Skladem/Na objednávku).
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%**.
6. V části Reactions for RNase P (Reakce pro RNázu P):
 - a. Ujistěte se, že koncentrace mastermixu (Master Mix Concentration) je **2.0x**.
 - b. Ujistěte se, že koncentrace eseje (Assay Mix Concentration) je **20.0x**.
 - c. Zkontrolujte složky a jejich objemy v PCR reakcích:

Složka	Objem (µL) na 1 reakci
Master Mix (2.0x)	12.5
Assay Mix (20.0x)	1.3
Vzorek (10x) nebo Standard	2.5‡
H ₂ O	8.8
Celkový objem	25.0

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

1. Reaction Mix Calculations

2. Select Target: RNase P

3. Assay Type: Inventoried/Made to Order

4. Reaction Volume Per Well: 25 µL

5. Excess Reaction Volume: 10 %

6a. Master Mix Concentration: 2.0 X

6b. Assay Mix Concentration: 20.0 X

6c. Reactions for RNase P table

7. V části Standard Dilution Series for RNase P (Ředění standardů pro RNázu P):

- 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).
- Zkontrolujte vypočítané objemy ředící řady standardů:

Ředění	Zdroj	Objem (μL)	Objem rozpouštědla (μL)	Celkový objem (μL)	Koncentrace standardu (kopie/ μL)
1 (10,000)	Zás. roztok	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 (5,000)	Ředění 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 (2,500)	Ředění 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 (1,250)	Ředění 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 (625)	Ředění 4	9.1	9.1	18.2	250.0

2E. Set Up: Reaction Setup

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select Target: RNase P

Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 25 μL | Excess Reaction Volume: 10 % | Print Reaction Setup

Total Volume: 25.0

Standard Dilution Series for RNase P

Standard Concentration in Stock: 20000 copies per μL

Dilution Point	Source	Source Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume (μL)	Standard Concentration (copies/ μL)
1 (10,000)	Stock	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 (5,000)	Dilution 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 (2,500)	Dilution 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 (1,250)	Dilution 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 (625)	Dilution 4	9.1	9.1	18.2	250.0

Vyplňte záložku Sample Dilution Calculations (Výpočet koncentrace vzorků)

- Zvolte záložku **Sample Dilution Calculations** (Výpočet koncentrace vzorků).
- Klikněte do pole **Diluted Sample Concentration (10 \times for Reaction Mix)** (Koncentrace ředěného vzorku - 10 \times do reakční směsi), zadejte **6.6**.
- Z rozbalovací nabídky jednotek (unit) zvolte **ng/ μL** (přednastaveno).

4. Zkontrolujte vypočítané objemy pro ředění vzorků:

Název vzorku	Koncentrace zás. roztoku (ng/μL)	Objem vzorku (μL)	Objem rozpouštědla (μL)	Celkový objem rozpuštěného vzorku (μL)
pop1	100.0	1.0	14.2	15.2
pop2	100.0	1.0	14.2	15.2

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations Reaction Setup Help ?

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10 × for Reaction Mix): ng/μL Print Reaction Setup

Sample Name	Stock Concentration (ng/μL)	Sample Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume of Diluted Sample (μL)
pop1	<input type="text" value="100.0"/>	<input type="text" value="1.0"/>	<input type="text" value="14.2"/>	<input type="text" value="15.2"/>
pop2	<input type="text" value="100.0"/>	<input type="text" value="1.0"/>	<input type="text" value="14.2"/>	<input type="text" value="15.2"/>

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).

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations Reaction Setup Help ?

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

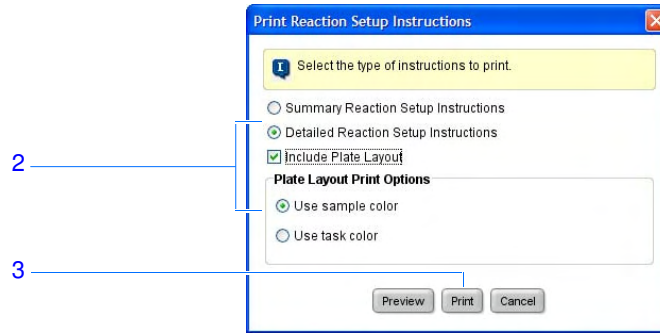
Reaction Mix Calculations **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10 × for Reaction Mix): ng/μL Print Reaction Setup

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).

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 rozsahu 10 až 30. Systémy StepOne a StepOnePlus podporují používání reakčních objemů v rozsahu 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.

- Zkontrolujte výpočet ředění každého vzorku. Je-li potřeba, upravte koncentraci ředěného vzorku (včetně jednotek) a zásobního roztoku.

Více informací

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

Objednání materiálu pro provedení experimentu

Na obrazovce Materials List (Potřebný materiál) projděte seznam materiálu, doporučeného k přípravě destičky s PCR reakcí. (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™ Fast optické 48-jamkové destičky
- MicroAmp™ optický adhezivní film pro 48-jamkové destičky
- MicroAmp™ 96-jamková nosítka
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG

- Esej 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® eseje pro kvantifikaci genové exprese (kat. č. 4331348).

DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.

Poznámka: Vzorový experiment kvantifikace pomocí standardní křivky byl vytvořen pro přístroj StepOne. Používáte-li přístroj StepOnePlus (volba viz [strana 20](#)), budou v seznamu 96-jamkové destičky a související materiál (např. MicroAmp™ Fast optické 96-jamkové destičky) namísto 48-jamkových.

Vyplnění
obrazovky
Seznam
materiálu

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

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® eseje pro kvantifikaci genové exprese (kat. č. 4331348). Viz protokol *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

Poznámka: Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky, naleznete informace k vyplnění části Find Assay (Vyhledat eseji) v [“Doporučení k zadání” na straně 41](#).

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

Poznámka: Více informací o specifické položce získáte kliknutím na její katalogové číslo. Spojíte 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).

4. (Volitelné) Vložte položky ze seznamu do nákupního košíku:

a. Zvolte následující položky:

- MicroAmp™ Fast optické 48-jamkové destičky
- MicroAmp™ optický adhezivní film pro 48-jamkové destičky
- MicroAmp™ 96-jamková nosítka
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) nebo TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG

b. Klikněte **Add Selected Items to Shopping List** (Přidat zvolené položky do nákupního košíku).

5. (Volitelné) V online obchodě Applied Biosystems založte nákupní košík:

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.

- a. Ověřte, že objednávka obsahuje potřebný materiál v potřebném množství a poté klikněte **Order Materials in List** (Objednat položky seznamu).

3A. Order: Materials List (Optional) Materials List Help

Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List" then log in.

Find Assay

Enter Gene Name Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.

Experiment Materials List

Display: All Items

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Description
<input checked="" type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate...	4375816	The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating. An optical-clear adhesive film used to seal the samples into the...

Experiment Shopping List (2 items)

Shopping Basket Name: Standard Curve Example StepOne

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Quantity
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction P...	4375816	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ 96-Well Support Base (10 bases)	4379590	<input type="text" value="1"/>

- b. 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

c. 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 42.

Doporučení k zadání

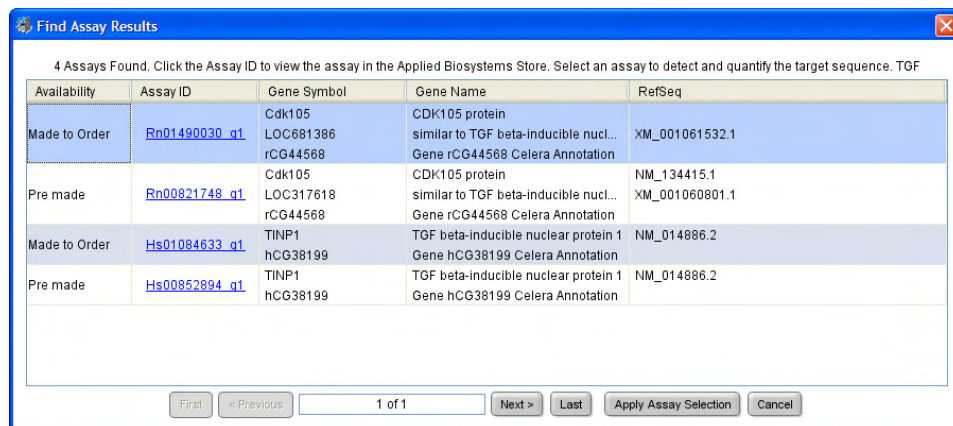
Zadáváte-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- 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

Poznámka: 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 StepOne kliknutím na nebo stiskem klávesy **F1**.

Ukončení Průvodce zadáním (Design Wizard)

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

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

- Reakce jsou uspořádány podle vyobrazení níže.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNase P	N RNase P	N RNase P	U pop1 RNase P	U pop1 RNase P	U pop1 RNase P	U pop2 RNase P	U pop2 RNase P
B	U pop2 RNase P	S RNase P IE4	S RNase P IE4	S RNase P IE4	S RNase P SE3	S RNase P SE3	S RNase P SE3	S RNase P 2.5E3
C	S RNase P 2.5E3	S RNase P 2.5E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 625	S RNase P 625	S RNase P 625
D								
E								
F								

Poznámka: Vzorový experiment byl vytvořen pro přístroj StepOne. Můžete vytvořit vzorový experiment i pro přístroj StepOnePlus (strana 20), rozvržení reakcí v destičce však bude odlišné než na vyobrazení. Program zobrazí rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce pro přístroj StepOnePlus. Příklad rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce naleznete na straně 11.

- Experiment je potřeba uložit a zavřít.

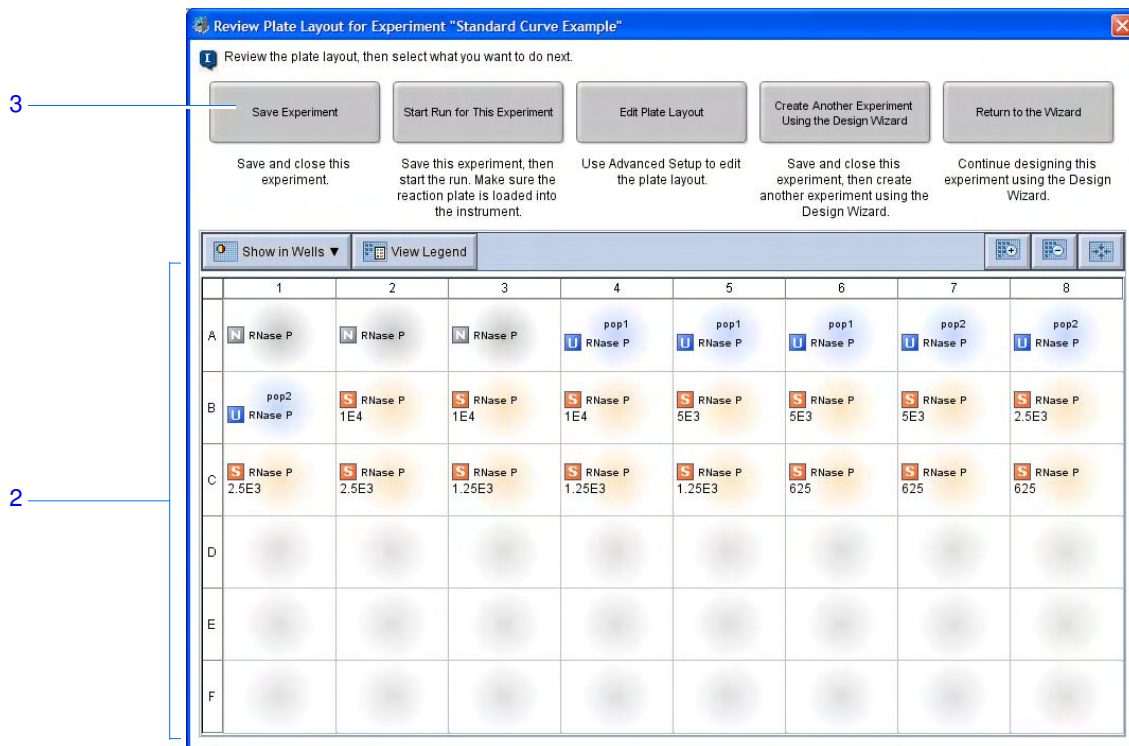
Poznámka: V případě vzorového experimentu nespouštějte běh.

Ukončete Průvodce zadáním (Design Wizard)

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

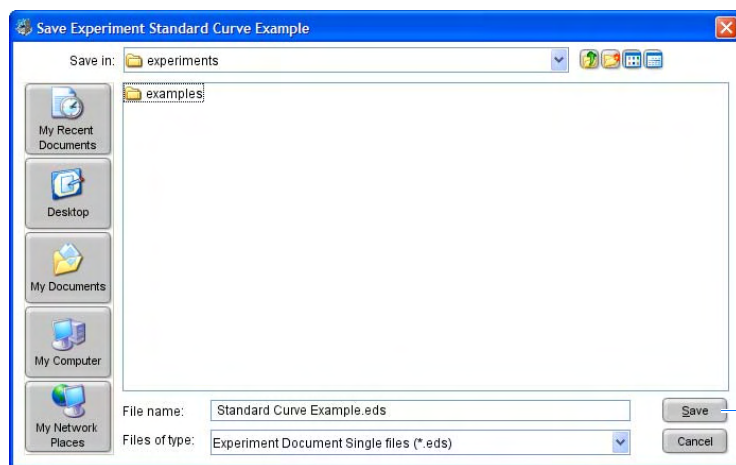
Poznámka: Nemí-li vyobrazení destičky správně, klikněte **Return to the Wizard** (Zpět do průvodce) a zkontrolujte zadané parametry.

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



4. V dialogovém okně **Save Experiment** (Uložit experiment) klikněte **Save** (Uložit) čímž potvrdíte přednastavený název souboru a umístění. Vzorový experiment se uloží a zavře a vrátíte se na výchozí obrazovku.

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



Doporučení
k zadání

Zadávat-li vlastní experiment kvantifikace pomocí standardní křivky:

- V okně Review Plate for Experiment (Přehleďte 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	<ul style="list-style-type: none"> • pomocí funkce Advanced setup (Pokročilé zadání) upravit parametry destičky. • (<i>pouze přístroj StepOnePlus</i>) nastavit různé teploty pro jednu nebo více zón bloku VeriFlex.
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 116.

3

Příprava reakcí

V této kapitole naleznete:

■ Přehled.....	46
■ Ředění vzorků	47
■ Příprava ředící řady standardů.....	49
■ Příprava reakční směsi	51
■ Příprava destičky s reakcemi	53

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu StepOne™ Real-Time PCR System Software, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > StepOne Software Help** (Nápověda > Nápověda programu StepOne).

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

Postup provádění vzorového experimentu je vyobrazen níže.

Zahájení experimentu

Zadání experimentu (Kapitola 2)

Příprava reakcí (Kapitola 3)

1. Ředění vzorků.
2. Příprava ředící řady standardů.
3. Příprava reakční směsi for each target assay.
4. Příprava destičky s reakcemi.

Provedení experimentu (Kapitola 4)

Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)

Konec experimentu

Ředění vzorků

Před pipetováním vzorků do reakční směsi musíte vzorky ředit. Ředění proveďte podle výpočtů provedených v programu StepOne™ (“**Výpočet koncentrace vzorků**” na straně 35).

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 StepOne). 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	14.2	15.2
pop2	100.0	1.0	14.2	15.2

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	14.2
2	Population 2	14.2

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 StepOne může být objem vzorků max. 10% celkového reakčního objemu.
- Pro optimální fungování esejí TaqMan® pro kvantifikaci genové exprese nebo vlastních (Custom) esejí TaqMan® pro kvantifikaci genové exprese používejte 10 až 100 ng templátu cDNA pro jednu reakci o objemu 20-μL. Při použití reagentů 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*

Příprava ředící řady standardů

Připravte ředící řadu standardů podle výpočtů provedených v programu StepOne (“Výpočet složení reakční směsi” na straně 34).

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	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 (5,000)	Ředění 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 (2,500)	Ředění 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 (1,250)	Ředění 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 (625)	Ředění 4	9.1	9.1	18.2	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**

2. Pipetujte potřebný objem vody do každé zkumavky:

Zkumavka	Název standardu	Objem vody (μL)
1	RNase P Std. 1	14.5
2	RNase P Std. 2	9.1
3	RNase P Std. 3	9.1

Zkumavka	Název standardu	Objem vody (μL)
4	RNase P Std. 4	9.1
5	RNase P Std. 5	9.1

3. Připravte ředění 1 ve zkumavce RNase P Std. 1:
 - a. Vortexujte zásobní roztok 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.
 - b. Pomocí nové špičky pipetujte 3.6 μL zásobního roztoku do zkumavky RNase P Std. 1.
 - c. Vortexujte Std. 1 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.
4. Připravte ředění 2 ve zkumavce RNase P Std. 2:
 - a. Pomocí nové špičky pipetujte 9.1 μL ředění 1 do zkumavky RNase P Std. 2.
 - b. Vortexujte Std. 2 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.
5. Připravte ředění 3 ve zkumavce RNase P Std. 3:
 - a. Pomocí nové špičky pipetujte 9.1 μL ředění 2 do zkumavky RNase P Std. 3.
 - b. Vortexujte Std. 3 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.
6. Připravte ředění 4 ve zkumavce RNase P Std. 4:
 - a. Pomocí nové špičky pipetujte 9.1 μL ředění 3 do zkumavky RNase P Std. 4.
 - b. Vortexujte Std. 4 3 až 5 vteřin a krátce centrifugujte.
7. Připravte ředění 5 ve zkumavce RNase P Std. 5:
 - a. Pomocí nové špičky pipetujte 9.1 μL ředění 4 do zkumavky RNase P Std. 5.
 - b. 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.

Příprava reakční směsi

Připravte reakční směs pomocí složek a objemů získaných podle výpočtů provedených v programu StepOne (“Výpočet složení reakční směsi” na straně 34).

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 53).

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×)	12.5
Assay Mix (20.0×)	1.3
H ₂ O	8.8
Celkový objem	22.6

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 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

**CAUTION**

CHEMICKÉ RIZIKO. TaqMan® Universal PCR Master Mix, 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	12.5	330.0
RNase P Assay Mix (20×)	1.3	34.3
Voda	8.8	232.3
Celkový objem reakční směsi	22.6	596.6

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 reagensů, které používáte):

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

Příprava destičky s reakcemi

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

O vzorovém experimentu V případě vzorového experimentu standardní křivky:

- Používá se MicroAmp™ Fast optická 48-jamková destička.
- Reakční objem je 25 µL/jamku.
- Destička obsahuje:
 - 6 neznámých vzorků **U**
 - 15 standardů **S**
 - 3 negativní kontroly **N**
 - 24 prázdných jamek
- Používá se vyobrazení destičky vytvořené automaticky v programu StepOne:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3
C	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
D								
E								
F								

Poznámka: Vzorový experiment byl vytvořen pro přístroj StepOne. Můžete vytvořit vzorový experiment i pro přístroj StepOnePlus (strana 20), rozvržení reakcí v destičce však bude odlišné než na vyobrazení. Program zobrazí rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce pro přístroj StepOnePlus. Příklad rozvržení vzorků v 96-jamkové destičce naleznete na straně 11.

Potřebný materiál

- Mikrozkušavky
- Mikropipety
- Pipetovací špičky
- Reakční směs RNáza P (ze strany 52)
- Voda
- Standardy (ze strany 49)
- Vzorky (ze strany 47)
- MicroAmp™ Fast optická 48-jamková reakční destička
- MicroAmp™ optická adhezivní fólie pro 48-jamkovou destičku
- Centrifuga

Příprava reakční destičky

1. Připravte negativní kontrolu pro cílovou sekvenci:
 - a. 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	74.6	8.3

- b. Promíchejte reakci pipetováním nahoru a dolů a uzavřete zkumavku víčkem.

- c. Krátce zkumavku centrifugujte, abyste odstranili vzduchové bublinky.
- d. Pipetujte 25 μL reakce negativní kontroly do příslušných jamek reakční destičky.

2. Připravte standardy:

- a. 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	74.6	RNase P Std 1	8.3
2	RNáza P	74.6	RNase P Std 2	8.3
3	RNáza P	74.6	RNase P Std 3	8.3
4	RNáza P	74.6	RNase P Std 4	8.3
5	RNáza P	74.6	RNase P Std 5	8.3

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

3. Připravte reakce pro vzorky o neznámé koncentraci:

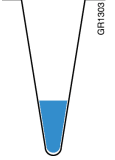
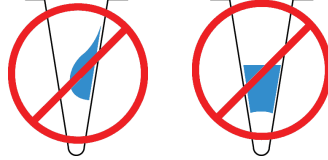
- a. Do zkumavky vhodného objemu pipetujte reakční směs a vzorky podle tabulky níže.

Zkumavka	Reakce	Reakční směs	Objem reakční směsi (μL)	Vzorek	Objem vzorku (μL)
1	RNase P pop1	RNáza P	74.6	pop1	8.3
2	RNase P pop2	RNáza P	74.6	pop2	8.3

- 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.

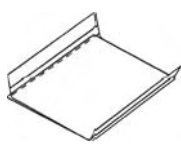

Správně	Špatně
 <p>Tekutina na dně jamky.</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • Nedostatečné otáčky <i>nebo</i> • Nedostatečná doba centrifugace

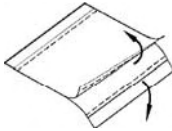

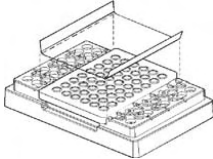
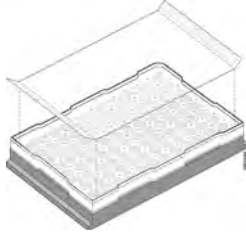

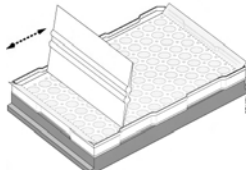
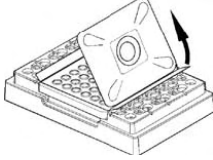
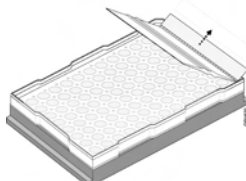
7. Nejste-li ještě připraveni spustit běh, držte destičku na ledu a ve tmě.

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 StepOne. Můžete buď:
 - Přijmout rozvržení reakcí automaticky vytvořené programem.
 - nebo*
 - Pomocí funkce Advanced Setup (Pokročilé zadání) rozvržení reakcí změnit.
- Používáte-li pro uzavření destiček optickou adhezivní fólii, postupujte následujícím způsobem:

Krok	Příklad	
	StepOne™	StepOnePlus™
1. Umístěte destičku do středu 96-jamkových nosítek. Ujistěte se, že destička je v rovině s povrchem 96-jamkových nosítek.		
2. Vložte reakční destičku.		
3. Vyjměte jednu adhezivní optickou fólii z krabičky. <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pro destičku pro systém StepOne</i> ohněte oba okraje fólie nahoru. Držte fólii zadní stranou nahoru. • <i>Pro destičku pro systém StepOnePlus</i> ohněte jeden okraj fólie dolů. Držte fólii zadní stranou nahoru. 		

Krok	Příklad	
	StepOne™	StepOnePlus™
<p>4. Jedním plynulým pohybem oddělte bílou krycí fólii od adhezivní fólie. Nedotýkejte se adhezivní fólie.</p> <p>DŮLEŽITÉ! Nesprávné oddělení bílé krycí fólie povede k zneprůhlednění, ale nebude mít vliv na výsledky. Neprůhlednost zmizí jakmile se fólie dostane do styku s vyhříváním víkem přístroje.</p>		
<p>5. 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.</p>		
<p>6. Přitlačte aplikátor k destičce a pomalu jím pohybujte po celém povrchu fólie, horizontálně i vertikálně, aby se fólie dobře přisála k povrchu reakční destičky.</p>		
<p>7. Přitiskněte aplikátor na rozhraní mezi fólií a jejím zdviženým okrajem a tento okraj prudce odtrhněte směrem vzhůru. Opakujte tento krok i pro druhý okraj fólie.</p>		
<p>8. Abyste zajistili, že nebude docházet k evaporaci:</p> <ol style="list-style-type: none"> Opakujte krok 6. Přitlačte okraj aplikátoru k destičce a obtáhněte všechny čtyři okraje fólie. <p>Poznámka: Optické adhezivní fólie nepřilnou po prvním kontaktu. Aby dokonale přilnuly a nedocházelo k evaporaci, je zapotřebí je přitlačit k destičce.</p>		
<p>9. Prohlédněte si destičku a zkontrolujte, že jsou všechny jamky uzavřeny. Jamky by měly být obtisknuty do fólie.</p>		

Více informací

Více informací o:


- Přípravě reakční destičky naleznete v protokolu pro vámi používané reagenty:
 - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol (Protokol pro TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese)*
 - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol (Protokol pro TaqMan® eseje pro kvantifikaci genové exprese navrhované na zakázku)*
- 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 116**.

4

Provedení experimentu

V této kapitole naleznete:

■ Přehled.....	60
■ Příprava běhu.....	61
■ (Volitelné) Zapnutí odesílání emailových zpráv	63
■ Spuštění běhu	65
■ Sledování průběhu běhu	69
■ Vyjmutí destičky a přenos dat	76

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu StepOne™ Real-Time PCR System Software, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > StepOne Software Help** (Nápověda > Nápověda programu StepOne).

Přehled

V této kapitole je popsáno jak spustit a sledovat běh na přístrojích Applied Biosystems StepOne™ a StepOnePlus™.

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 a přenos dat.


Analýza výsledků experimentu (Kapitola 5)

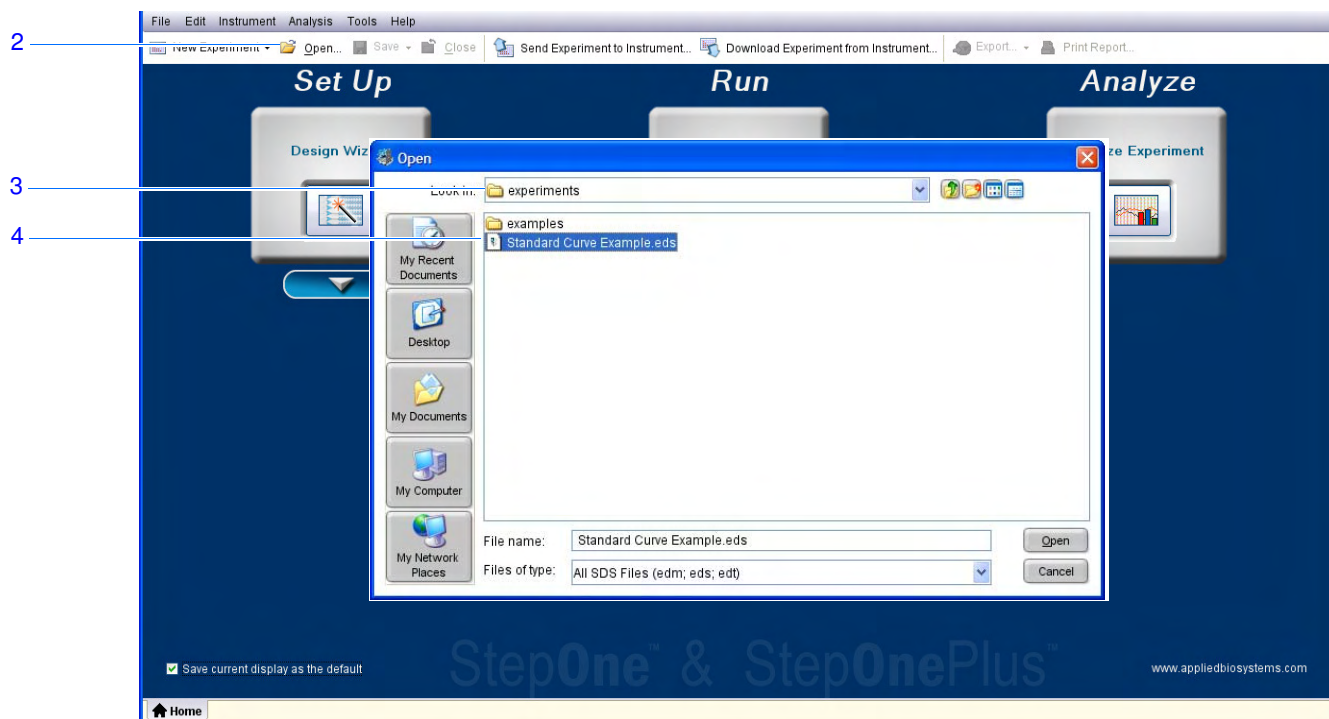
Konec experimentu

Příprava běhu

Otevřete soubor vzorového experimentu, který jste připravili v [Kapitole 2](#), poté vložte uzavřenou reakční destičku do přístroje StepOne™ nebo StepOnePlus™.

Otevření souboru vzorového experimentu

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



Vložení
destičky do
přístroje

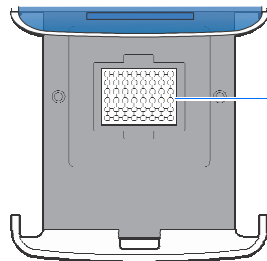
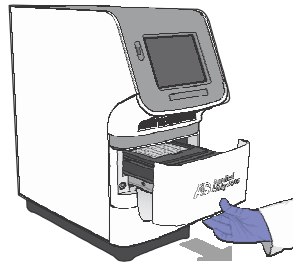


CAUTION RIZIKO PORANĚNÍ. Při provozu přístroje může teplota bloku na vzorky překročit 100 °C. Pokud byl přístroj aktuálně používán, vyčkejte, než dojde k ochlazení bloku na vzorky na pokojovou teplotu.

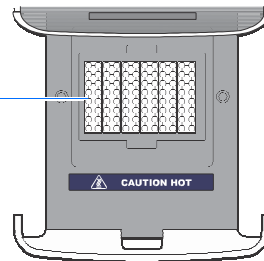


DŮLEŽITÉ! Při manipulaci s destičkou používejte rukavice bez pudru.

1. Otevřete nosítka přístroje.



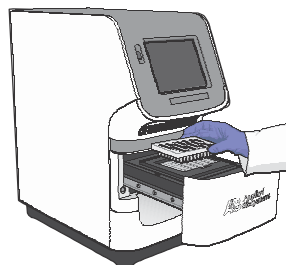
Přístroj StepOne
blok na vzorky



Přístroj StepOnePlus
blok na vzorky VeriFlex™

2. Umístěte destičku do bloku na vzorky:

- Používáte-li destičku: Umístěte destičku do bloku na vzorky tak, aby jamka A1 byla vlevo vzadu.
- Používáte-li zkumavkové stripy: Umístěte nosítka se stripy do bloku na vzorky.
- Používáte-li zkumavky: Umístěte nosítka se zkumavkami do bloku na vzorky.



DŮLEŽITÉ! Není-li blok zcela naplněn, pro optimální průběh experimentu:

Přístroje StepOnePlus – Vložte do bloku alespoň 16 zkumavek a uspořádejte je:

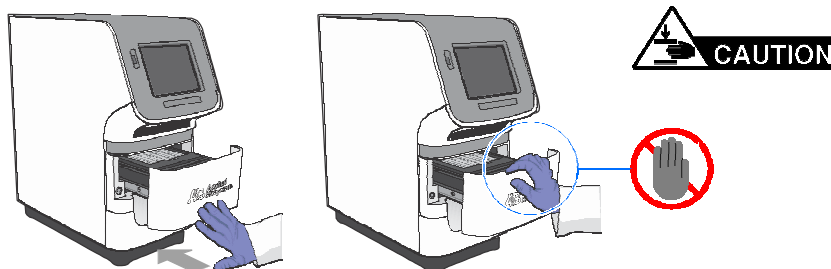
- Do vedle sebe ležících sloupců po 8 zkumavkách do řádků A až H. Například do sloupců 1 (řádky A až H) a 2 (řádky A až H).

nebo

- Do vedle sebe ležících řádků po 8 zkumavkách, přičemž použijete sloupce 3 až 10. Například do řádky A (sloupce 3 až 10) a B (sloupce 3 až 10).

Přístroje StepOne – Vložte do bloku alespoň 4 zkumavky.

3. Opatrně uzavřete nosítka přístroje.



(Volitelné) Zapnutí odesílání emailových zpráv

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

DŮLEŽITÉ! Odesílání emailových zpráv je možné pouze pokud je přístroj StepOne nebo StepOnePlus ovládán z počítače a počítač je připojen do sítě.



Poznámka: Odesílání emailových zpráv je rovněž k dispozici pro počítače, které slouží ke vzdálenému monitorování přístrojů StepOne nebo StepOnePlus. Více informací viz [“Vzdálené monitorování” na straně 73](#).

O vzorovém experimentu

Ve vzorovém experimentu:

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

Nastavení
odesílání
emailových
zpráv

1. V programu StepOne 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**.

Doporučení

Pokud provádíte tato nastavení v systému StepOne nebo StepOnePlus:

- Váš systém musí být připojen do sítě. Viz příručka *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation, Networking, and 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)

Spuštění běhu

Spusťte běh podle aktuální konfigurace vašeho systému StepOne nebo StepOnePlus:

Konfigurace	Popis	Viz...
S počítačem	Přístroj je připojen k počítači žlutým kabelem	"Spuštění s počítačem" níže
Bez počítače	<ul style="list-style-type: none"> • Přístroj není připojen k počítači nebo • Přístroj a počítač jsou propojeny v rámci téže sítě. 	"Spuštění bez počítače" na straně 66


Spuštění s počítačem Postupujte podle tohoto návodu je-li váš počítač přímo propojen se systémem StepOne nebo StepOnePlus žlutým kabelem.

1. V programu StepOne klikněte na ikonu  **Run** (Běh).
2. Klikněte **START RUN**  (Spustit běh).



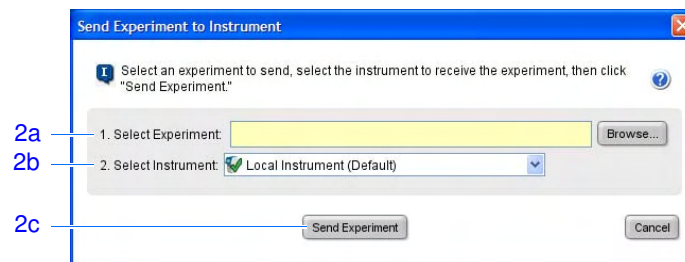
- Spuštění bez počítače** Postupujte podle tohoto návodu není-li váš počítač přímo propojen se systémem StepOne nebo StepOnePlus žlutým kabelem. Viz:
- “Odeslání experimentu do přístroje přes síť” na straně 66 pokud váš počítač a přístroj jsou propojeny v rámci téže sítě.
nebo
 - “Přenos experimentu do přístroje pomocí USB disku” na straně 66 pokud váš počítač a přístroj nejsou propojeny v rámci téže sítě.

Odeslání experimentu do přístroje přes síť

1. V programu StepOne klikněte  **Send Experiment to Instrument** (Odeslat experiment do přístroje).
2. V dialogovém okně Send Experiment to Instrument (Odeslání experimentu do přístroje):
 - a. Klikněte **Browse** (Vyhledat), vyhledejte adresář se souborem vzorového experimentu, poté klikněte **Open** (Otevřít).
 - b. Zvolte přístroj, do něhož chcete experiment odeslat.


Poznámka: Není-li váš přístroj v seznamu, nastavte jej pro vzdálené monitorování podle postupu v příručce *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-TimePCR Systems Installation, Networking, and Maintenance Guide*.

- c. Klikněte **Send Experiment** (Poslat experiment).



3. Potvrďte kliknutím **OK**.
4. Pokračujte v části “Spuštění běhu pomocí dotykového displeje” na straně 67.

Přenos experimentu do přístroje pomocí USB disku

1. Připojte k vašemu počítači USB disk.
2. V programu StepOne zvolte  **Save > Save As** (Uložit > Uložit jako).
3. V dialogovém okně Save (Uložit) vyhledejte USB disk a poté klikněte **Save** (Uložit).


4. Vyjměte USB disk z počítače a připojte jej k přístroji StepOne nebo StepOnePlus.





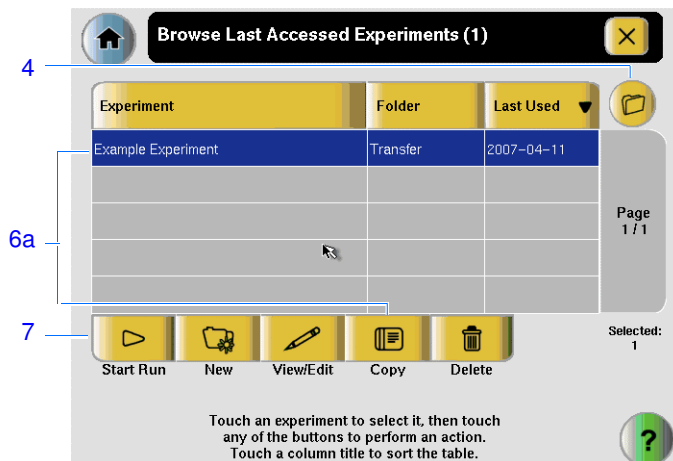
5. Pokračujte v části “[Spuštění běhu pomocí dotykového displeje](#)” níže.

Spuštění běhu pomocí dotykového displeje

1. Dotkněte se dotykového displeje přístroje StepOne nebo StepOnePlus, aby se přístroj uvedl do chodu.

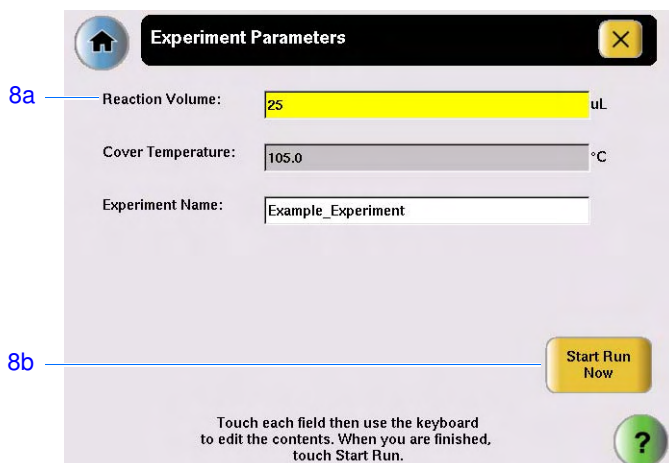
Poznámka: Není-li na dotykovém displeji hlavní nabídka, dotkněte se .

2. Vyčkejte, až se na displeji objeví značka USB.
3. V hlavní nabídce se dotkněte **Browse/New Experiments** (Vyhledat/Nové experimenty).
4. Na obrazovce Browse (Vyhledat) se dotkněte  **Folders** (Adresáře).
5. Na obrazovce Choose an Experiment Folder (Zvolte adresář):
 - Dotkněte se **USB**, je-li váš experiment na USB disku.
 - Dotkněte se **Default**, pokud jste experiment do přístroje odeslali přes síť.
6. Před spuštěním běhu uložte experiment do vašeho přístroje:
 - a. Na obrazovce Browse (Vyhledat) se dotkněte vašeho souboru a poté se dotkněte **Copy** (Kopírovat).
 - b. Na obrazovce Save Experiment (Uložit experiment) vyhledejte cílový adresář, poté klikněte **Save & Exit** (Uložit a Konec).
7. Na obrazovce Browse (Vyhledat) se dotkněte vašeho souboru, poté se dotkněte  **Start Run** (Spustit běh).



8. Na obrazovce Run Parameters (Parametry běhu):

- Dotkněte se pole **Reaction Volume** (Reakční objem) a pomocí klávesnice zadejte reakční objem pro vzorový experiment, poté se dotkněte **Done** (Hotovo).
- Dotkněte se **Start Run Now** (Spustit běh teď).






Sledování průběhu běhu

Sledování průběhu běhu podle aktuální konfigurace vašeho systému StepOne nebo StepOnePlus:

Konfigurace	Popis	Viz...
S počítačem	Přístroj je připojen k počítači žlutým kabelem.	"Sledování běhu na počítači" níže
Bez počítače (v síti)	Přístroj a počítač jsou propojeny v rámci téže sítě.	"Vzdálené monitorování" na straně 73
Bez počítače (není v síti)	Přístroj není připojen k počítači.	"Monitorování bez počítače" na straně 75

Sledování běhu na počítači Je-li váš počítač přímo připojen k přístroji StepOne nebo StepOnePlus žlutým kabelem, můžete sledovat průběh běhu v reálném čase podle postupu níže. V průběhu běhu sledujte všechny tři dostupné grafy programu StepOne kvůli případným potížím.

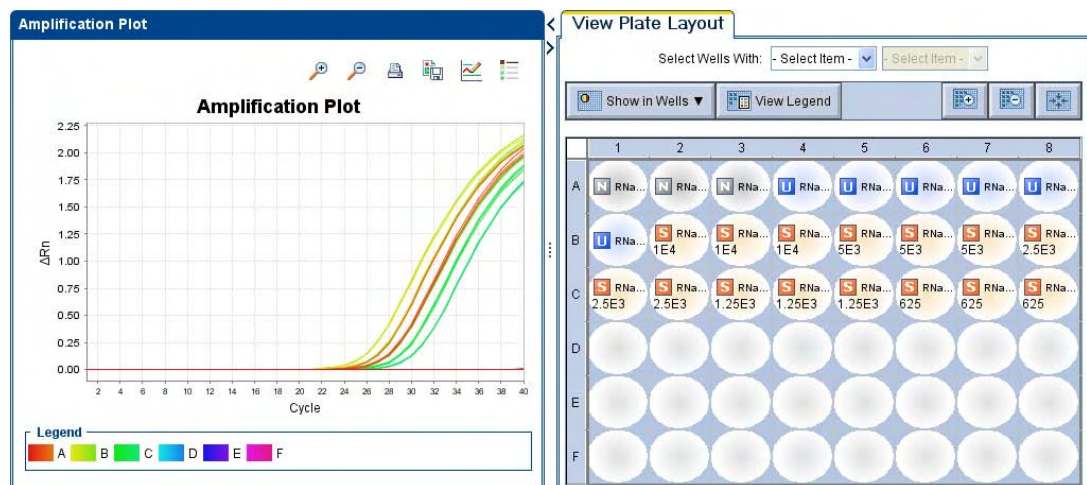
#	Chcete-li...	Krok
A	Zastavit běh	1. V programu StepOne klikněte STOP RUN . 2. V dialogovém okně Stop Run zvolte: <ul style="list-style-type: none"> – Stop Immediately – běh se ihned zastaví. – Stop after Current Cycle/Hold – běh se zastaví po skončení aktuálního cyklu/inkubace. – Cancel – běh bude pokračovat.
B	Sledovat amplifikaci v reálném čase	Zvolte  Amplification Plot (Amplifikační graf). Viz "O amplifikačním grafu" na straně 70.
C	Sledovat teplotní profil v reálném čase	Zvolte  Temperature Plot (Grafický záznam teplot). Viz "O grafickém záznamu teplot" na straně 71.
D	Sledovat průběh běhu na obrazovce Run Method (Běh)	Zvolte  Run Method (Běh). Viz "O obrazovce Běh" na straně 72.
E	Zapnout/vypnout odesílání zpráv	Zatrhněte nebo odznačte Enable Notifications (Zapnout odesílání zpráv). Viz "(Volitelné) Zapnutí odesílání emailových zpráv" na straně 63.



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 (ΔRn) 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.

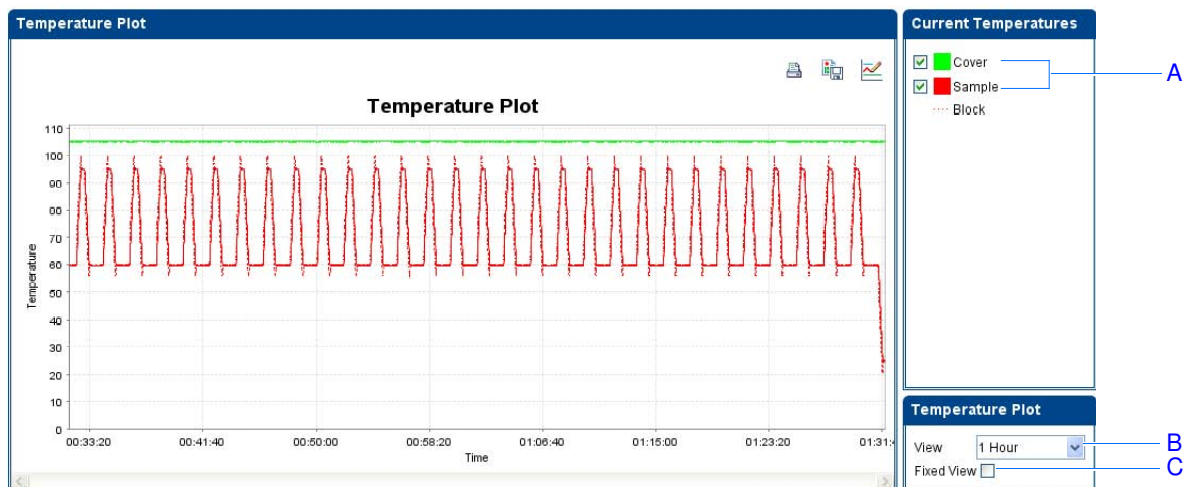
- Absence nárůstu fluorescence v určitém cyklu (očekávané na základě provedení obdobných experimentů za použití týchž reagentů a podmínek předešle).

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

O grafickém záznamu teplot


V průběhu běhu jsou v grafickém záznamu teplot v reálném čase zobrazovány údaje o teplotě bloku na vzorky, vyhřívaného víka a (vypočítané) teplotě vzorků. Na obrázku níže je vyobrazen příklad grafického záznamu teplot během vzorového experimentu.

	Chcete-li...	Krok
A	Přidat/odebrat záznam teploty	Zvolte Cover (Víko) nebo Sample Block (Blok na vzorky).
B	Změnit čas zobrazený v záznamu	Z rozbalovací nabídky View (Zobrazit) zvolte čas, který se má zobrazit v záznamu.
C	Zobrazit pevný časový interval z průběhu běhu Pokud se celý záznam nevejde na obrazovku, nedochází v průběhu běhu k jeho aktualizaci. Zvolíte-li například v nabídce View 10 minut, budou v záznamu data za dobu 10 minut. Trvá-li běh déle než 10 minut: <ul style="list-style-type: none"> • Není-li zvoleno zobrazení Fixed View, záznam se aktualizuje. • Je-li zvoleno zobrazení Fixed View, záznam se neaktualizuje. 	Zvolte Fixed View (Fixní zobrazení).



Grafický záznam teplot s výhodou využijete při selhání hardwaru. Sledujte záznam teploty vzorků a bloku na vzorky.

- Normálně by teplota vzorků a bloku na vzorky měla víceméně korelovat. Výrazná odchylka těchto dvou grafů může indikovat problém.
- Teplota víka by měla být konstantní a taková, jaká byla definována. Není-li tomu tak, může to indikovat problém.

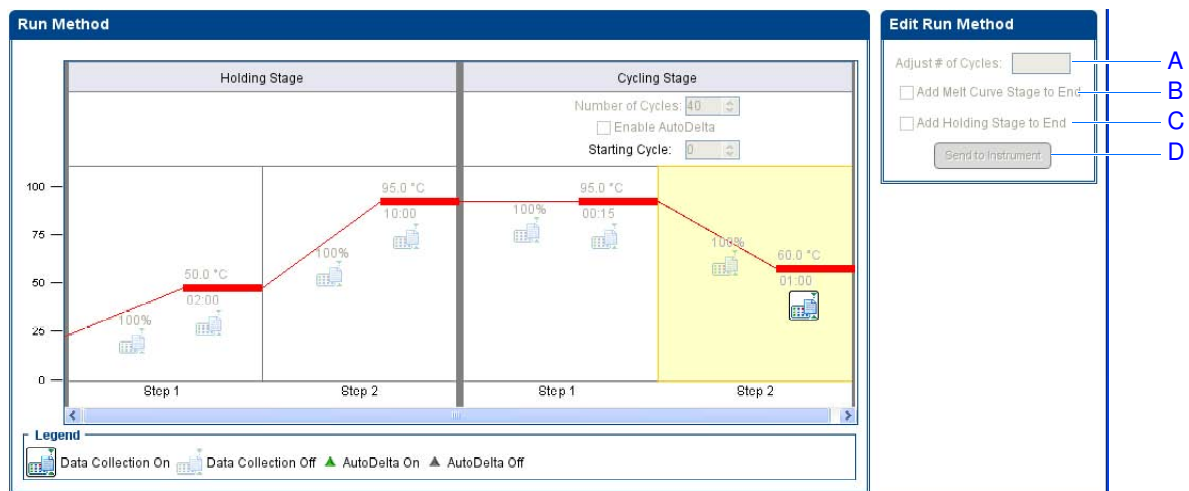
Pokud zaznamenáte abnormální průběh teplotních křivek, vyřešte tento problém podle postupu v nápovědě programu StepOne (klikněte  nebo stiskněte **F1**).


Poznámka: Zobrazená teplota vzorků je pouze odhadnutá.

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 Adjust # of Cycles zadejte počet cyklů, které chcete přidat.
B	Přidat na konec běhu analýzu křivky tání	Zvolte Add Melt Curve Stage to End .
C	Přidat na konec běhu krok inkubace (Hold Stage)	Zvolte Add Holding Stage to End .
D	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 StepOne (klikněte  nebo stiskněte **F1**).

Vzdálené monitorování

Je-li váš přístroj StepOne nebo StepOnePlus připojen do sítě, můžete použít funkci Remote Monitor (Vzdálené monitorování) programu StepOne, která umožňuje zobrazit data o průběhu běhu v reálném čase na jakémkoliv počítači v síti.

DŮLEŽITÉ! Počítače v síti nelze použít k ovládání přístrojů StepOne nebo StepOnePlus, pouze k monitorování.

Chcete-li váš přístroj vzdáleně monitorovat:

1. V programu StepOne zvolte **Instrument > Remote Monitor** (Přístroj > Vzdálené monitorování).
2. V navigační liště zvolte váš přístroj.

Není-li váš přístroj v navigační liště:

- a. Klikněte **Add Instrument** (Přidat přístroj).
- b. Zadejte jméno vašeho přístroje.

Poznámka: Zadejte jakékoliv jméno, které vám pomůže identifikovat váš přístroj. Jméno bude zobrazeno v okně Remote Monitor (Vzdálené monitorování) při odesílání experimentů do přístroje, stahování experimentů z přístroje nebo monitorování přístrojů.

- c. V poli Instrument Name (Jméno přístroje), Host Name nebo IP Address (IP adresa):
 - Znáte-li host name, zadejte je.
 - Neznáte-li host name, zadejte jméno přístroje nebo IP adresu.

Poznámka: Jméno přístroje a IP adresa se zobrazují na displeji přístroje. Zvolte **Settings Menu > Admin Menu > Set Instrument Name** nebo **Set IP Address** (Nastavení > Administrátor > Nastavení jména přístroje nebo IP adresy). Host name vám sdělí správce vaší sítě.


- d. Klikněte **Save & Exit** (Uložit a Konec).

2b

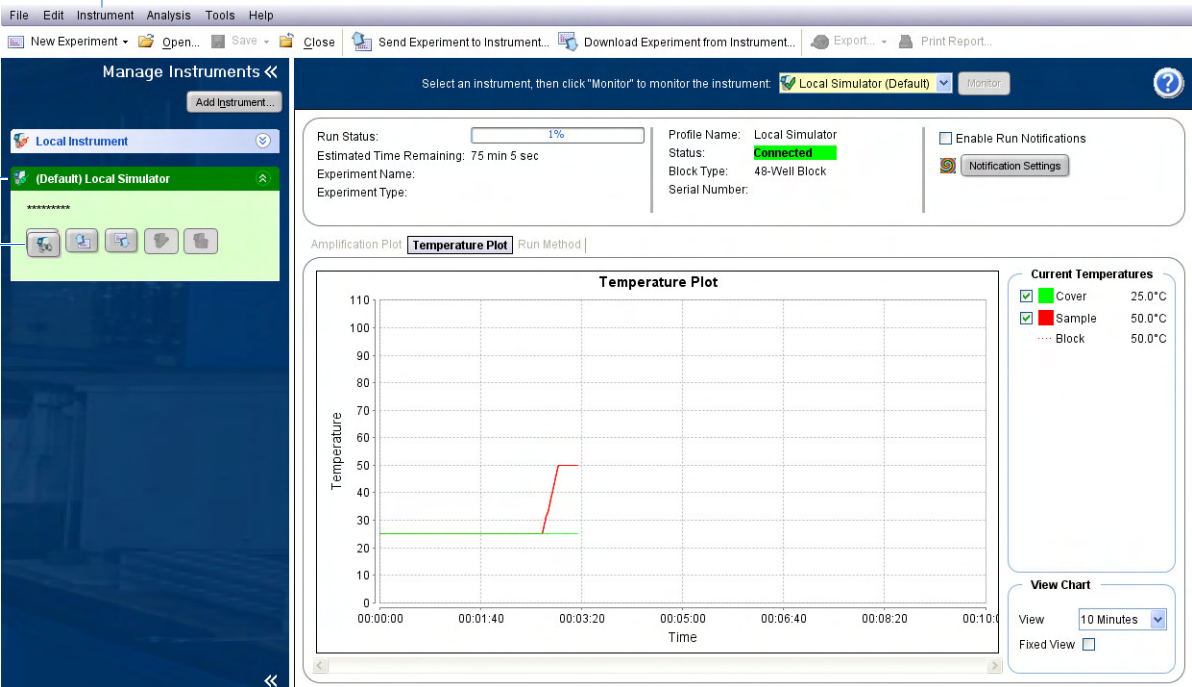
2c

2d

Poznámka: Více informací o nastavení přístrojů StepOne nebo StepOnePlus pro používání v síti a o vzdáleném monitorování naleznete v příručce *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation, Networking, and Maintenance Guide*.

3. Klikněte  **Start monitoring the instrument** (Zahájit monitorování přístroje). Odeslání informací z přístroje do počítače může trvat několik minut.

1

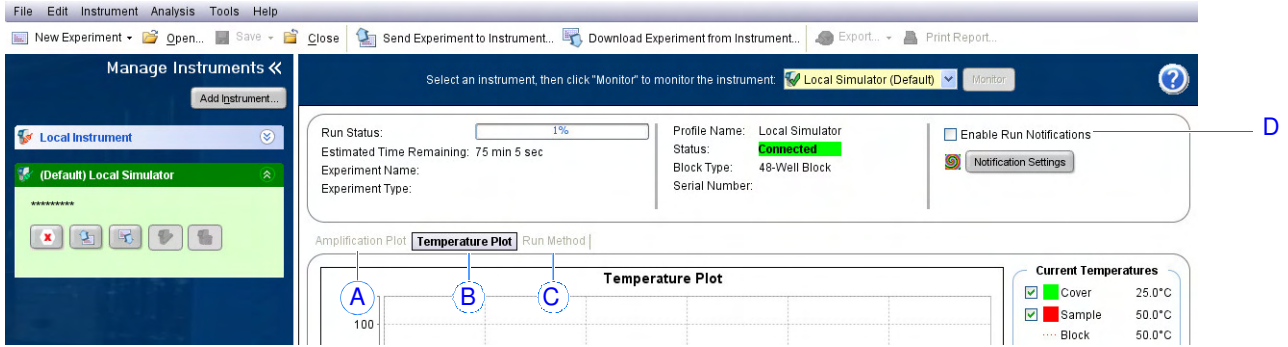


2

3

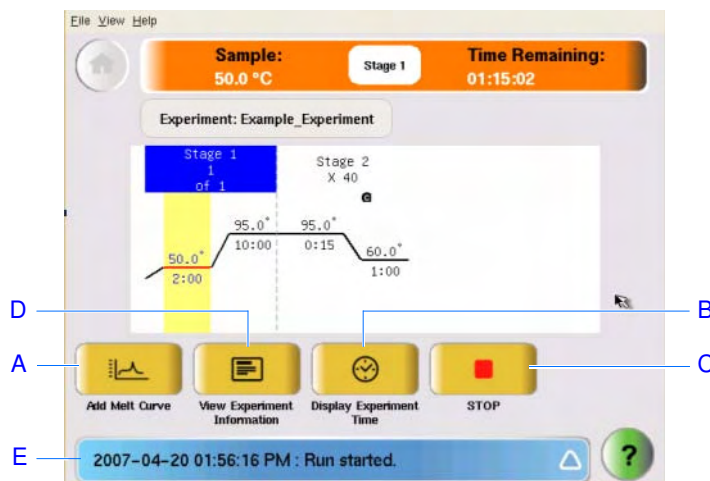
4. Zobrazte data podle postupu níže.

#	Chcete-li...	Krok
A	Sledovat amplifikaci v reálném čase	Klikněte Amplification Plot (Amplifikační graf). Viz " O amplifikačním grafu " na straně 70.
B	Sledovat teplotní profil v reálném čase	Klikněte Temperature Plot (Grafický záznam teplot). Viz " O grafickém záznamu teplot " na straně 71.
C	Sledovat průběh běhu na obrazovce Run Method (Běh)	Klikněte Run Method (Běh). Viz " O obrazovce Běh " na straně 72.
D	Zapnout/Vypnout odesílání zpráv	Zatrhněte nebo odznačte Enable Notifications (Zapnout odesílání zpráv). Viz " (Volitelné) Zapnutí odesílání emailových zpráv " na straně 63.



Monitorování bez počítače Pokud jste spustili běh pomocí displeje přístroje StepOne nebo StepOnePlus, můžete sledovat průběh běhu na displeji. Obrazovka Run Method (Běh) zobrazuje informace o průběhu běhu a zvýrazňuje aktuálně prováděné kroky.

#	Chcete-li...	Krok
A	Přidat na konec běhu analýzu křivky tání	Dotkněte se Add Melt Curve a OK .
B	Zobrazit dobu zbývající do konce běhu	Dotkněte se Display Experiment Time , poté X .
C	Zastavit běh	Dotkněte se STOP , poté se dotkněte: <ul style="list-style-type: none"> Stop - běh se zastaví po skončení aktuálního cyklu/inkubace. Abort – běh se ihned zastaví. X – běh bude pokračovat.
D	Zobrazit informace o experimentu	Dotkněte se View Experiment Information , poté X
E	Zobrazit záznam chyb	Dotkněte se stavové lišty.



Vyjmutí destičky a přenos dat


Zobrazí-li váš přístroj StepOne nebo StepOnePlus hlavní nabídku, vyjměte reakční destičku z přístroje a přeneste výsledky experimentu do počítače k analýze.

Vyjmutí
destičky



CAUTION RIZIKO PORANĚNÍ. Při provozu přístroje může teplota bloku na vzorky překročit 100 °C. Pokud byl přístroj aktuálně používán, vyčkejte, než dojde k ochlazení bloku na pokojovou teplotu.

Poznámka: Po skončení běhu uloží přístroj StepOne nebo StepOnePlus údaje o běhu do archivu běhů, kde zůstanou až do skončení dalšího běhu.

1. Objeví-li se na displeji obrazovka Run Report (Zpráva o běhu), dotkněte se .
2. Otevřete nosítka přístroje.
3. Vyjměte destičku z bloku na vzorky.
4. Opatrně uzavřete nosítka přístroje.




Přenos dat Přeneste experiment do vašeho počítače za účelem analýzy – přenos dat závisí na konfiguraci vašeho systému StepOne nebo StepOnePlus:

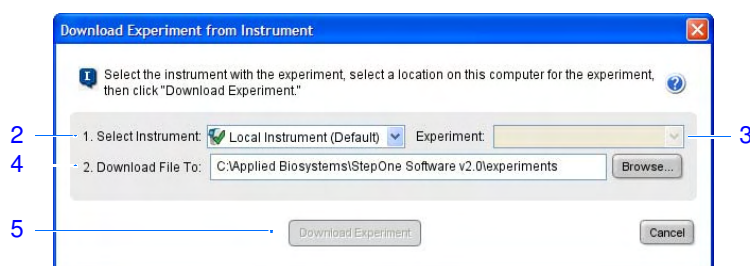
Konfigurace	Popis	Viz...
S počítačem	Přístroj je připojen k počítači žlutým kabelem.	“Přenos dat do připojeného počítače” níže
Bez počítače (v síti)	Přístroj a počítač jsou propojeny v rámci téže sítě.	“Vzdálený přenos dat” na straně 77
Bez počítače (není v síti)	Přístroj není připojen k počítači.	“Přenos dat bez počítače” na straně 78

Přenos dat do připojeného počítače Je-li váš počítač přímo připojen k přístroji StepOne nebo StepOnePlus žlutým kabelem, není zapotřebí nic přenášet. Program StepOne automaticky přenesé výsledky experimentu po jeho skončení z přístroje do počítače.

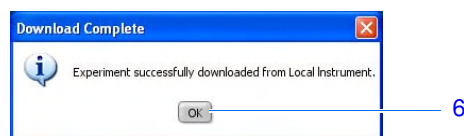
Poznámka: Je-li přístroj připojen k počítači, je možné spustit běh z počítače nebo z displeje. Program StepOne přenesé výsledky experimentu automaticky pouze je-li běh spuštěn z počítače (viz “**Spuštění s počítačem**” na straně 65).

Vzdálený přenos dat Je-li váš počítač a přístroj StepOne nebo StepOnePlus propojen v rámci sítě, můžete stáhnout experiment z přístroje přes síť:

1. V programu StepOne klikněte  **Download Experiment from Instrument** (Stáhnout experiment z přístroje), čímž otevřete dialogové okno Download Experiment from Instrument (Stáhnout experiment z přístroje).
2. Z rozbalovací nabídky Select Instrument (Zvolte přístroj) zvolte přístroj.
3. Z rozbalovací nabídky Experiment zvolte experiment.
4. V poli Download File To (Stáhnout soubor do):
 - a. Klikněte **Browse** (Vyhledat).
 - b. Vyhledejte:
`<disk>:\Applied Biosystems\<název softwaru >\experiments\`
 kde:
`<disk>` je pevný disk počítače, na kterém je instalován program StepOne. Přednastavený disk pro instalaci programu je disk D.
`<název softwaru>` je současná verze programu StepOne.
 - c. Klikněte **Select** (Zvolit).
5. Klikněte **Download Experiment** (Stáhnout experiment), čímž stáhnete experiment z přístroje do počítače přes síť.

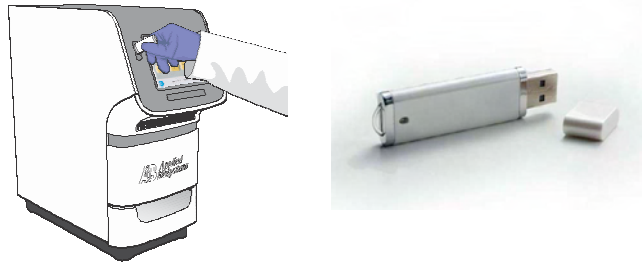


6. Klikněte **OK**.



Přenos dat bez počítače Není-li počítač připojen k přístroji StepOne nebo StepOnePlus, použijte pro přenos experimentu z přístroje do počítače USB disk:

1. Není-li již připojen, připojte USB disk do USB portu.



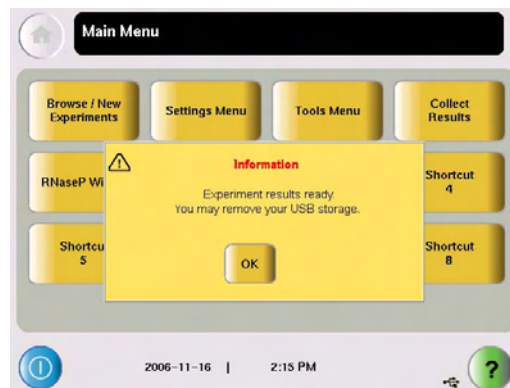
2. Dotkněte se dotykového displeje přístroje StepOne nebo StepOnePlus, aby se přístroj uvedl do chodu.

Poznámka: Není-li na dotykovém displeji hlavní nabídka, dotkněte se .

3. Vyčkejte, až se na displeji objeví značka USB.
4. V hlavní nabídce se dotkněte **Collect Results**, čímž uložíte výsledky na USB disk.

Poznámka: Pokud váš přístroj nedetekuje USB disk, vyjměte jej a znovu připojte. Pokud váš přístroj stále nedetekuje USB disk, zkuste jiný USB disk.

5. Objeví-li se hláška o úspěšném přenosu dat, dotkněte se **OK**.



6. Odpojte USB disk od přístroje a připojte jej k počítači.
7. Pomocí Windows Explorer zobrazte obsah USB disku.

8. Kopírujte experiment do:

<disk>:\Applied Biosystems*<název softwaru>*\experiments\

kde:


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

5

Analýza výsledků experimentu

V této kapitole naleznete:

- Přehled..... 82
- Část 5.1 Shlédnutí výsledků 83
- Část 5.2 Řešení problémů (je-li zapotřebí)..... 103

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu StepOne™ Real-Time PCR System Software, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > StepOne Software Help** (Nápověda > Nápověda programu StepOne).

Přehled

Program StepOne™ 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 kontroly kvality.
3. Vynechání jamek. z analýzy
4. Zobrazení multikomponentního grafu.
5. Zobrazení hrubých dat.

Konec experimentu

Část 5.1 Shlédnutí výsledků

V této části naleznete:

■ Analýza výsledků experimentu	84
■ Zobrazení standardní křivky.....	90
■ Zobrazení amplifikačního grafu	92
■ Zobrazení tabulky výsledků	99
■ Publikování výsledků	102

Analýza výsledků experimentu

Program StepOne 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 StepOne. Tento soubor byl vytvořen podle postupu v [Kapitole 2](#), poté byl proveden běh na přístroji StepOne™. Soubor naleznete ve vašem počítači:

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

kde:

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

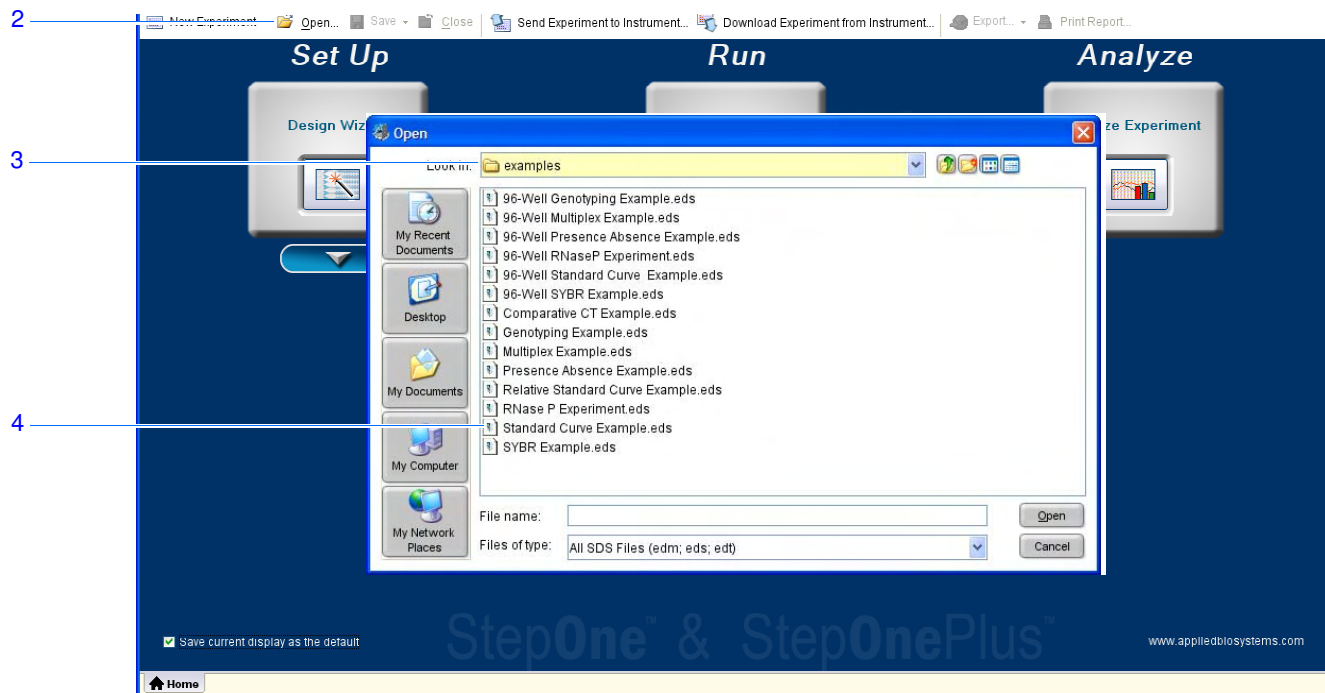
Analýza vzorového experimentu

1. Dvakrát klikněte na ikonu programu StepOne  nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software <název softwaru >**

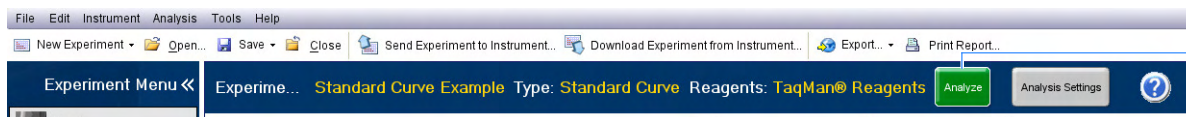
kde < *název softwaru* > je současná verze programu StepOne.

2. Na výchozí obrazovce klikněte na **Open** (Otevřít).
3. V dialogovém okně Open (Otevřít) vyhledejte adresář **examples** (příklady):
<disk>:\Applied Biosystems\<název softwaru>\experiments\examples
4. Dvakrát klikněte na **Standard Curve Example**.

Poznámka: Adresář příklady obsahuje několik souborů, ujistěte se, že jste vybrali **Standard Curve Example**. Více informací o dalších souborech naleznete v části [“Soubory v adresáři Examples \(Příklady\)”](#) na straně 12.



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



6. Informace o obrazovkách zobrazujících výsledky analýzy naleznete v části “Součásti programu” níže a “Tipy pro snadnou orientaci” na straně 88.

Doporučení Provádíte-li analýzu vlastních experimentů standardní křivky:

- Program StepOne 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).

Součásti programu Součásti programu StepOne:

1. Lišta nabídek (Menu Bar) – Zobrazuje nabídky, které jsou v programu k dispozici:
 - File (Soubor)
 - Edit (Upravit)
 - Instrument (Přístroj)
 - Analysis (Analýza)
 - Tools (Nástroje)
 - Help (Pomoc)

2. Nástrojová lišta (Toolbar) – Zobrazuje nástroje, které jsou v programu k dispozici:
 - New Experiment (Nový experiment)
 - Open (Otevřít)
 - Close (Zavřít)
 - Send Experiment to Instrument (Odeslat experiment do přístroje)
 - Download Experiment from Instrument (Stáhnout experiment z přístroje)
 - Export
 - Print Report (Tisk zprávy)
3. Záhlaví experimentu (Experiment header) – Zobrazuje název experimentu, typ experimentu a reagentie pro otevřený experiment.
4. Panel Experiment Menu – Zobrazuje odkazy na obrazovky:
 - Setup (Zadání)
 - Run (Běh)
 - Analysis (Analýza):
 - Amplification Plot (Amplifikační graf)
 - Standard Curve (Standardní křivka)
 - Multicomponent Plot (Multikomponentní graf)
 - Raw Data Plot (Hrubá data)
 - QC Summary (Kontrola kvality)
 - Multiple Plots View (Zobrazení více grafů)
5. Panel Plot (Graf) – Zobrazuje zvolenou obrazovku s výsledky analýzy.
6. Záložky View Plate Layout (Zobrazení destičky) – Zobrazují rozvržení destičky nebo tabulku s údaji o jamkách destičky
7. Záložka(y) Experiment – Zobrazují záložku pro každý otevřený experiment.

The screenshot displays the software interface for a real-time PCR experiment. The main window is titled "Standard Curve Example" and shows an "Amplification Plot" on the left and a "View Plate Layout" on the right. The plot shows ΔRn vs Cycle for six samples (A-F). The plate layout shows a 6x8 grid of wells with data for each well, including RNa and Ct values. The interface includes a menu bar (1), a toolbar (2), a left-hand navigation pane (3, 4), and a status bar (5, 7). A callout (6) points to the "View Plate Layout" tab.

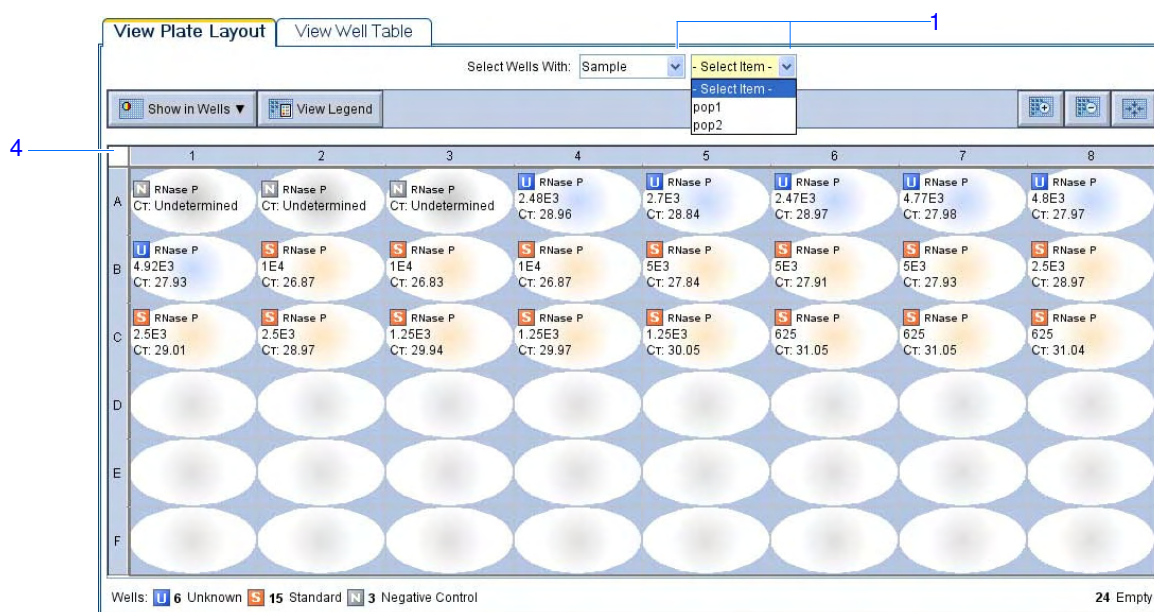
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	U RNa... Ct: Undet	U RNa... Ct: Undet	U RNa... Ct: Undet	U RNa... Ct: 28.96	U RNa... Ct: 28.84	U RNa... Ct: 28.97	U RNa... Ct: 27.98	U RNa... Ct: 27.97
B	U RNa... Ct: 27.93	S RNa... Ct: 26.87	S RNa... Ct: 26.83	S RNa... Ct: 26.87	S RNa... Ct: 27.84	S RNa... Ct: 27.91	S RNa... Ct: 27.93	S RNa... Ct: 28.97
C	S RNa... Ct: 29.01	S RNa... Ct: 28.97	S RNa... Ct: 29.94	S RNa... Ct: 29.97	S RNa... Ct: 30.05	S RNa... Ct: 31.05	S RNa... Ct: 31.05	S RNa... Ct: 31.04
D								
E								
F								

Analysis Summary: Total Wells in Plate: 48 | Wells Set Up: 24 | Wells Omitted Manually: 0 | Wells Flagged: 0 | Wells Omitted by Analysis: 0 | Samples Used: 2 | Targets Used: 1

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 myší, stiskněte **CTRL+klikněte**, nebo stiskněte **Shift+klikněte** (ve vyobrazení destičky).
4. Chcete-li vybrat všechny jamky, klikněte do horního levého rohu vyobrazení destičky.



Jak zobrazit více grafů

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

1. Na panelu Experiment Menu 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.



Zobrazení standardní křivky

Obrazovka Standard Curve (Standardní křivka) zobrazuje standardní křivku pro vzorky označené jako standardy. Program StepOne 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

Zobrazení standardní křivky

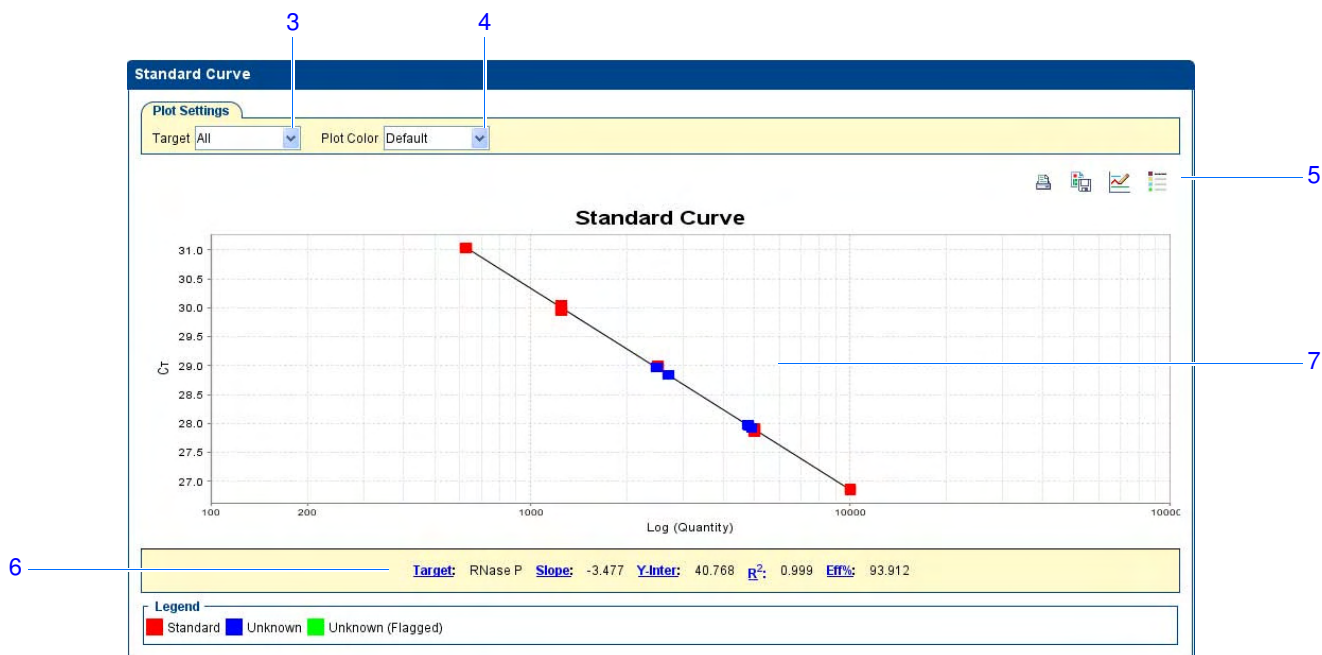
1. Na panelu Experiment Menu zvolte **Analysis** >  **Standard Curve** (Analýza > Standardní křivka)

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 hodnot:
 - Sklon je -3.477 .
 - R_2 je 0.999 .
 - Účinnost amplifikace (Eff%) je 93.912% .
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 Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SC
RNase P - NTC													
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undeterm...					
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undeterm...					
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undeterm...					
RNase P - STANDARD - 10000.0													
4	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
5	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
6	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
RNase P - STANDARD - 1250.0													
7	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
8	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
9	C5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		
RNase P - STANDARD - 2500.0													
10	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
11	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
12	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
RNase P - STANDARD - 5000.0													
13	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
RNase P - STANDARD - 625.0													
16	C6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	31.05255	31.04659	0.01	625		

- 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 blízky -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 108.](#)
nebo
- opakujte experiment.

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

Zobrazení amplifikačního grafu

V amplifikačním grafu se zobrazuje amplifikace všech vzorků (zvolených jamek). K dispozici jsou tři různé grafy:


- **ΔR_n vs Cycle** – Graf závislosti ΔR_n na cyklu. ΔR_n je normalizovaný signál reportérové barvy po odečtení signálu pozadí měřený v každém cyklu PCR amplifikace. Tento graf lze využít k analýze nepravidelného průběhu amplifikačních křivek a k zobrazení prahu a pozadí.

- **Rn vs Cycle** – Graf závislosti **Rn** na cyklu. Rn je fluorescenční signál reportérové barvy normalizovaný na fluorescenční signál pasivní reference. Tento graf lze využít k analýze nepravidelného průběhu amplifikačních křivek.
- **Ct vs Well** – Graf závislosti Ct na poloze jamky. Ct je PCR cyklus v němž fluorescence překročí práh v amplifikačním grafu. Tento graf lze využít k detekci odlehlých bodů.

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

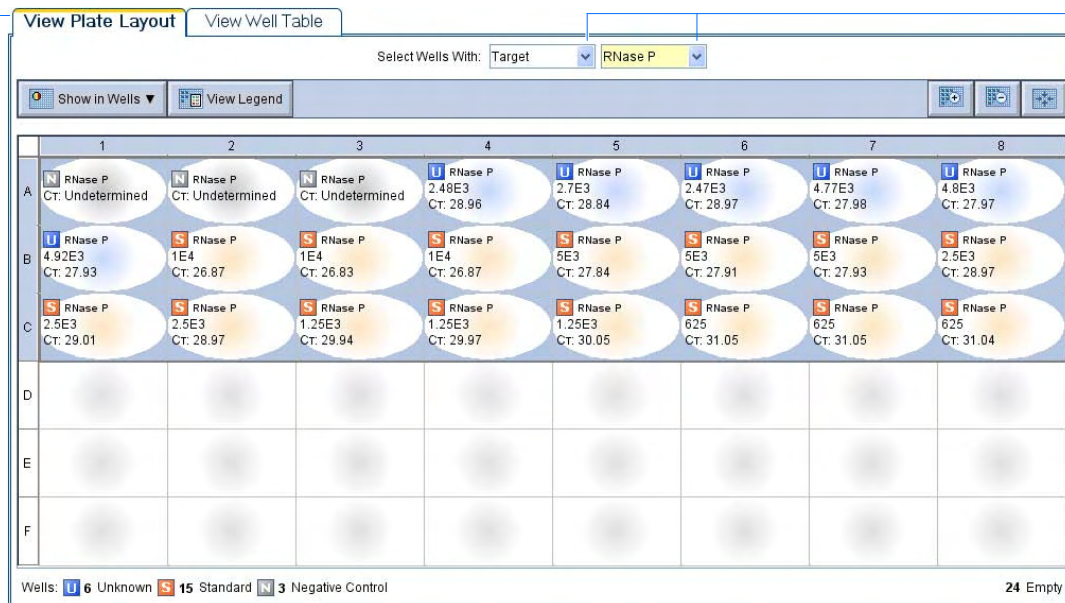
Zobrazení amplifikačního grafu V panelu Experiment Menu zvolte Analysis >  Amplification Plot (Analýza > Amplifikační graf).

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**.


2a



2b

3. Na obrazovce amplifikační graf:

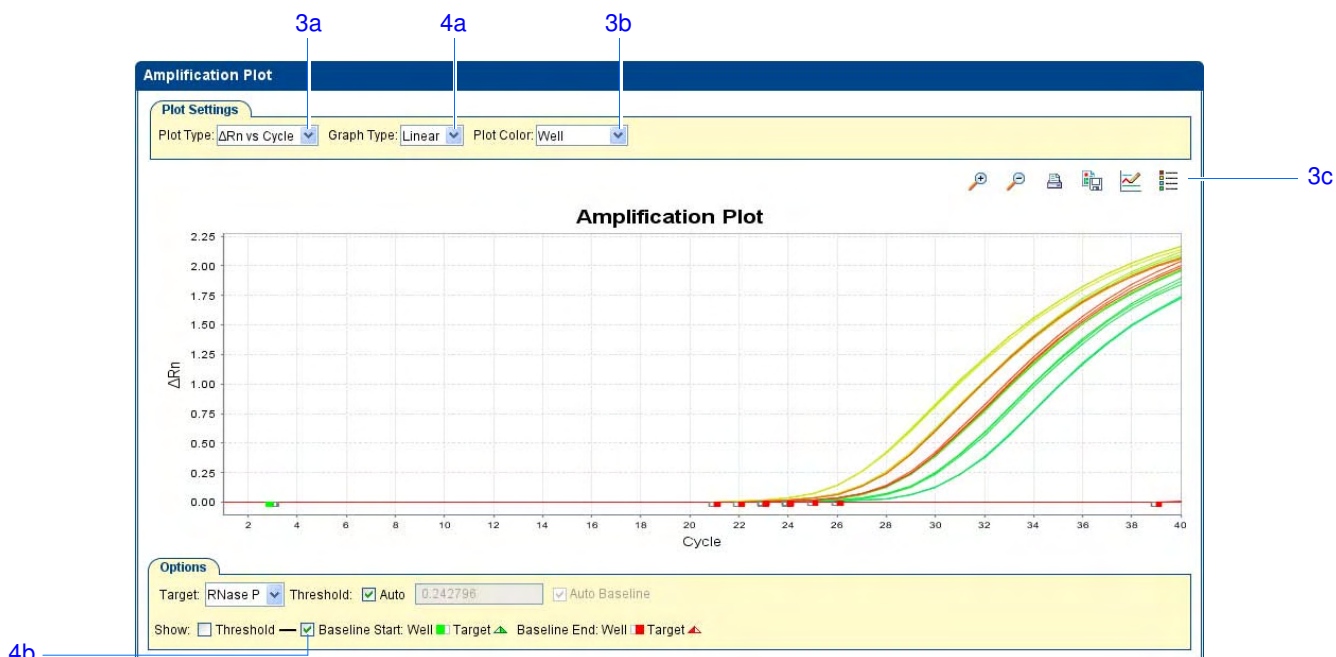
- Z rozbalovací nabídky Plot Type (Typ grafu) zvolte **ΔRn vs Cycle** (přednastaveno).
- Z rozbalovací nabídky Plot Color (Barva grafu) zvolte **Well** (podle jamky - přednastaveno).

- 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).

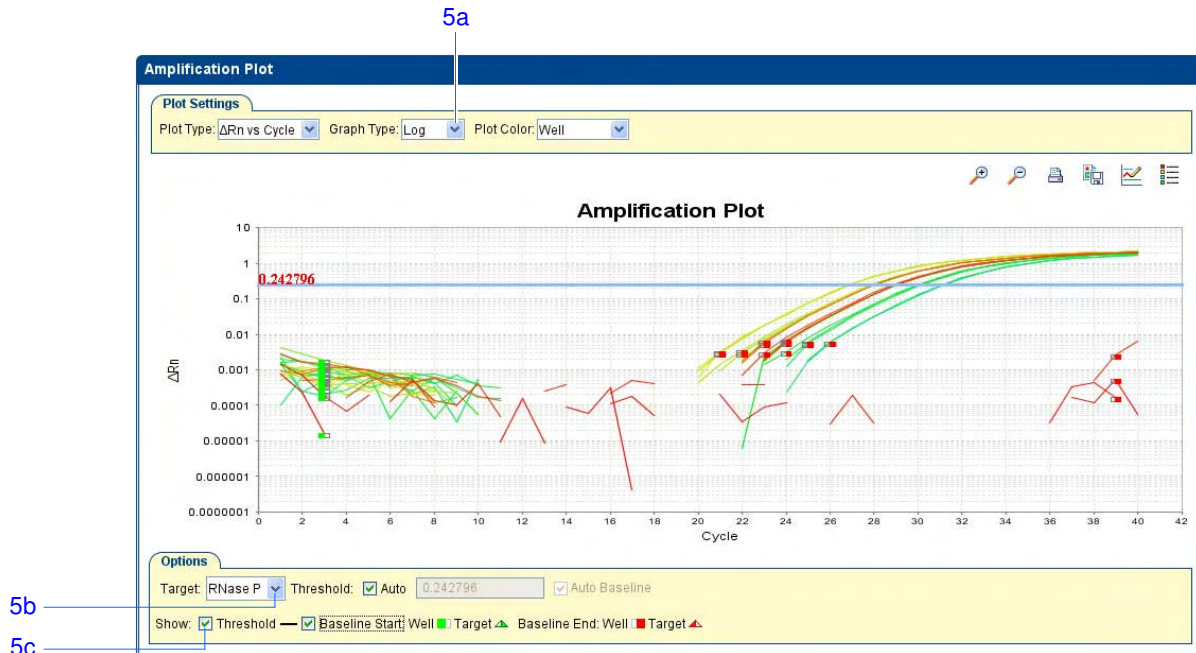
4. Zobrazte pozadí:

- Z rozbalovací nabídky Graph Type (Typ grafu) zvolte **Linear** (Lineární).
- Zatrhnete 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.



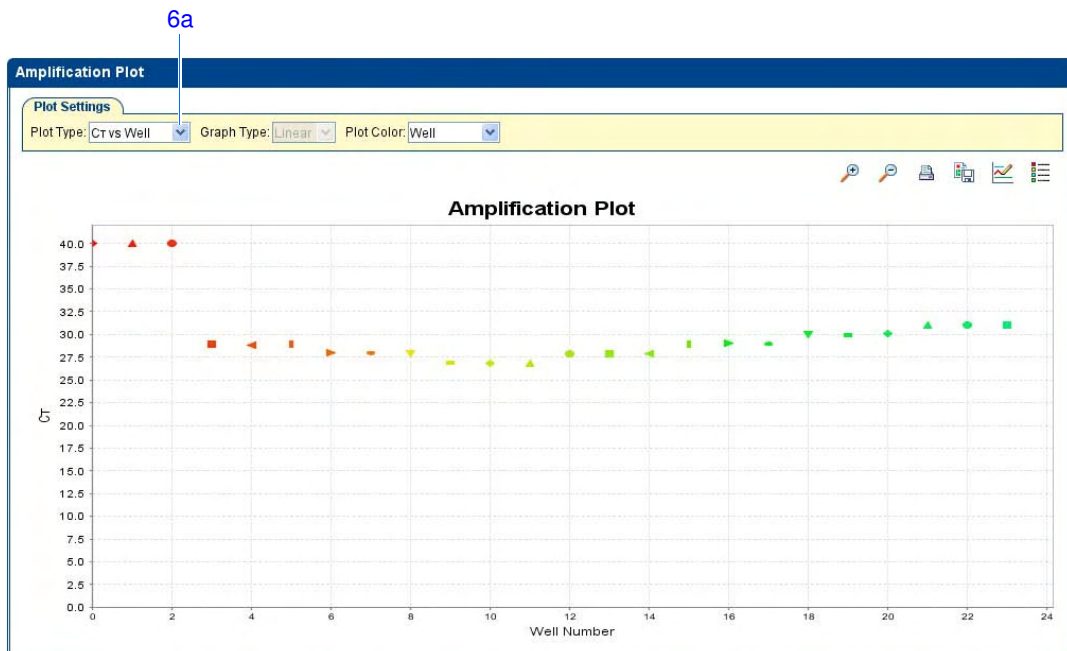
5. Zobrazte práh:

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



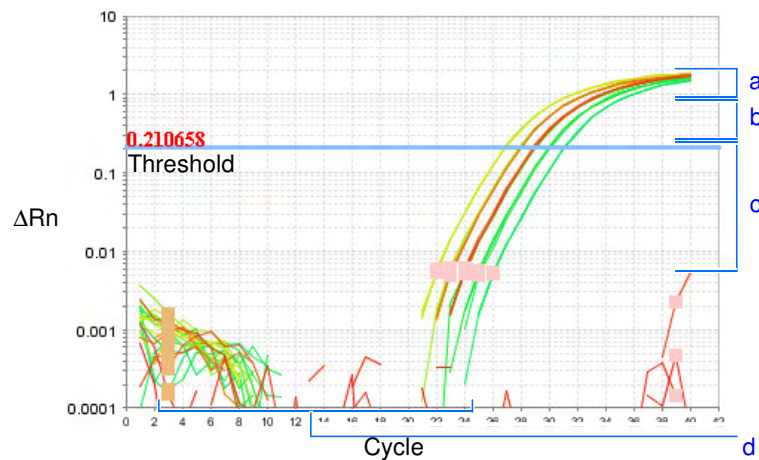
6. Vyhledejte odlehlé body:

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



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

- Odlehlé body
- Typický amplifikační graf – Program StepOne 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 StepOne. Společnost Applied Biosystems proto doporučuje, abyste nastavení pozadí a prahu po provedení analýzy v amplifikačním grafu zkontrolovali.

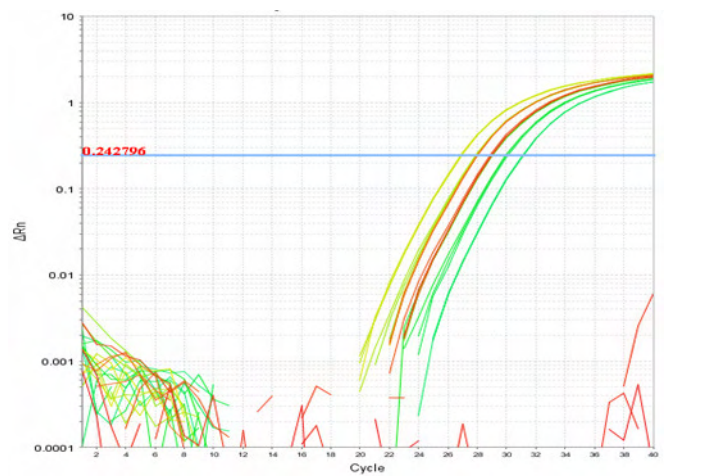
- Správné nastavení pozadí a prahu – Viz příklady nastavení prahu na straně 97 a pozadí na straně 98.

Správné nastavení prahu

Práh je nastaven v exponenciální fázi amplifikační křivky.

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

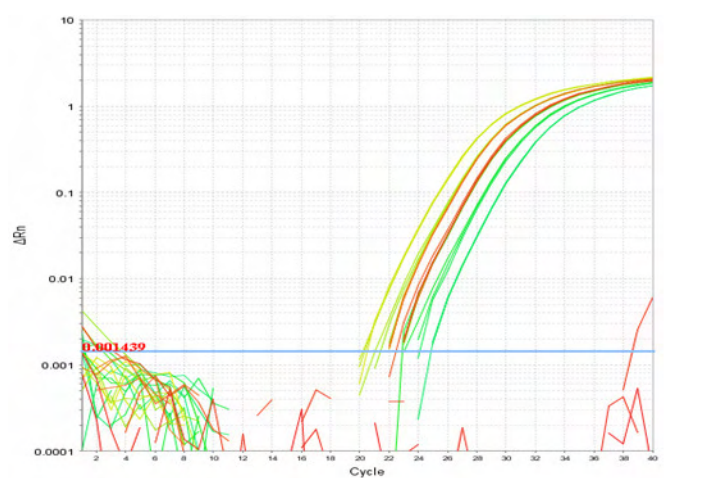
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity...	Quantity...	Comme
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2,484.31	2,551.476	126.2	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2,697.054	2,551.476	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.

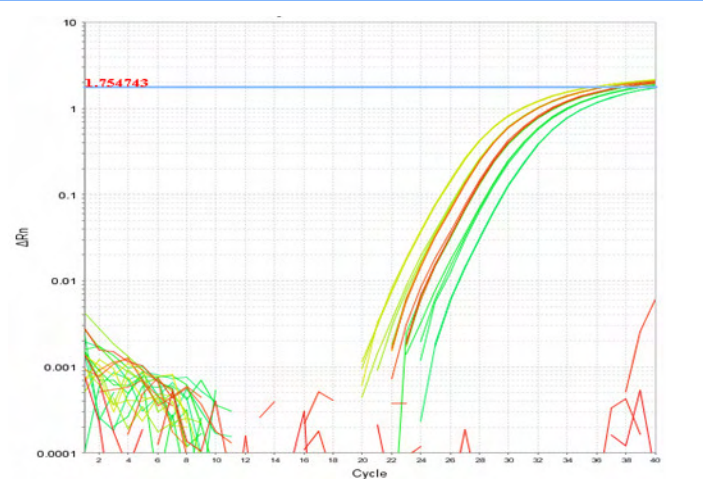
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity...	Quantity...	Comme
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	38.453182						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.85404	22.761744	0.252	2,314.852	2,472.463	400.435	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.476973	22.761744	0.252	2,927.722	2,472.463	400.435	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.954218	22.761744	0.252	2,174.816	2,472.463	400.435	

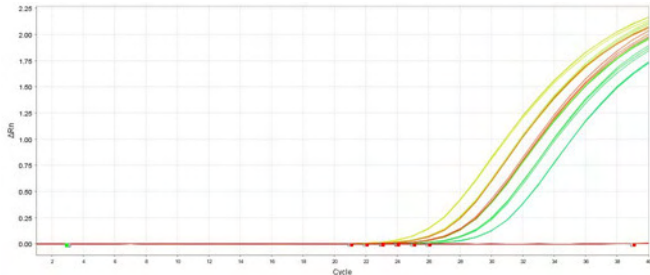
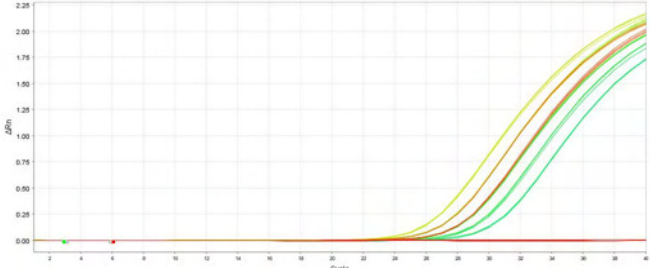
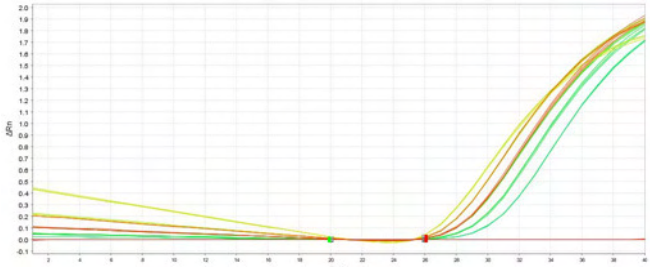


Práh nastaven příliš vysoko

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	



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

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

- [“Vynechání jamek z analýzy” na straně 108.](#)
nebo
- Manuálně nastavte pozadí a/nebo práh (viz [“Zobrazení parametrů analýzy” na straně 104](#)).

Více informací Více informací o amplifikačním grafu získáte v nápovědě programu StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

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
- Vlaječky

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

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

Zobrazení tabulky výsledků

1. Na panelu Experiment Menu 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, vlaječky 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: Ve vzorovém experimentu byly sloupce Quantity (Množství), Quantity Mean (Průměrné množství) a Quantity SD (Standardní odchylka množství) přesunuty z jejich přednastaveného umístění na počátek tabulky. Chcete-li přesunout sloupec, klikněte do jeho záhlaví a přetáhněte jej.

2a

#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
RNase P - STANDARD - 10000.0													
4	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
5	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
6	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
RNase P - STANDARD - 1250.0													
7	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
8	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
9	C5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		
RNase P - STANDARD - 2500.0													
10	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
11	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
12	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
RNase P - STANDARD - 5000.0													
13	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
RNase P - STANDARD - 625.0													
16	C6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.05255	31.04659	0.01	625		
17	C7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.052055	31.04659	0.01	625		

- b. V rozbalovací nabídce Group By (Seskupit podle) zvolte **Flag** (Vlajčka). Program seskupí jamky s a bez vlajček. Ve vzorovém experimentu nejsou žádné jamky s vlajčkami.

2b

#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
Flagged Wells													
UnFlagged Wells													
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
4	A4	<input type="checkbox"/>	pop1		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2,484.31	2,551.476	126
5	A5	<input type="checkbox"/>	pop1		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2,697.054	2,551.476	126
6	A6	<input type="checkbox"/>	pop1		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96972	28.923796	0.074	2,473.064	2,551.476	126
7	A7	<input type="checkbox"/>	pop2		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.976233	27.958857	0.024	4,774.927	4,830.585	76.1
8	A8	<input type="checkbox"/>	pop2		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.968481	27.958857	0.024	4,799.501	4,830.585	76.1
9	B1	<input type="checkbox"/>	pop2		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.931858	27.958857	0.024	4,917.327	4,830.585	76.1
10	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
11	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
12	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
13	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
16	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
17	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
18	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
19	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
20	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		

- 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 Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
4	A4	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2,484.31	2,551.476	126
5	A5	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2,697.054	2,551.476	126
6	A6	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96972	28.923796	0.074	2,473.064	2,551.476	126
7	A7	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.976233	27.958857	0.024	4,774.927	4,830.585	76.1
8	A8	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.968481	27.958857	0.024	4,799.501	4,830.585	76.1
9	B1	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.931858	27.958857	0.024	4,917.327	4,830.585	76.1
10	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
11	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
12	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
13	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
16	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
17	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
18	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
19	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
20	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
21	C5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		

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 StepOne naleznete v části “Zobrazení kontroly kvality” na straně 106.
- **Ct – Ct** je PCR cyklus v němž fluorescence překročí práh v amplifikačním grafu (tzv. prahový cyklus). Žádoucí je dosáhnout hodnoty Ct >8 a <35. Hodnota Ct <8 znamená, že v reakci je příliš mnoho templátu. Hodnota Ct >35 znamená, že v reakci je příliš málo templátu; pro Ct >35 očekávejte vyšší hodnoty standardní odchylky.

Více informací Více informací o tabulce výsledků získáte v nápovědě programu StepOne 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 StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Část 5.2 Řešení problémů (je-li zapotřebí)

V této části naleznete:

■ Zobrazení parametrů analýzy	104
■ Zobrazení kontroly kvality	106
■ Vynechání jamek z analýzy	108
■ Zobrazení multikomponentního grafu.....	109
■ Zobrazení hrubých dat.....	112

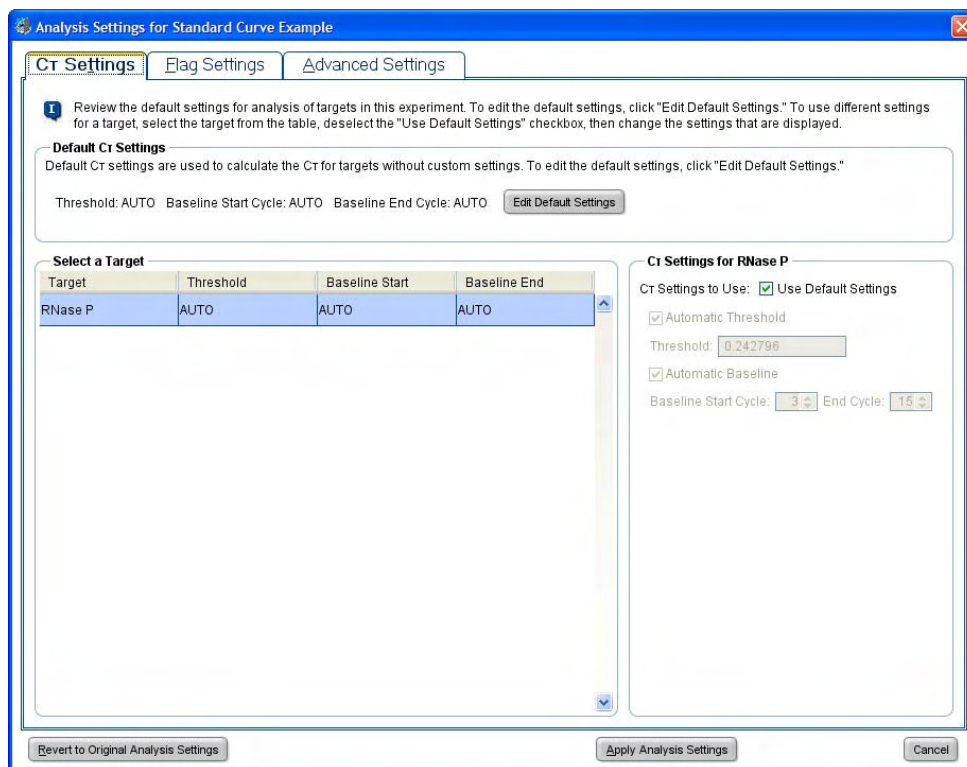
Zobrazení parametrů analýzy

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 panelu Experiment Menu zvolte Analysis.
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)




Doporučení k analýze Pokud neznáte optimální nastavení parametrů pro váš experiment, použijte parametry tak jak jsou přednastaveny v programu StepOne. 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 StepOne.
- **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 StepOne kliknutím na  nebo stiskem klávesy **F1**.

Zobrazení 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 nejsou žádné vlaječky.

Zobrazení kontroly kvality

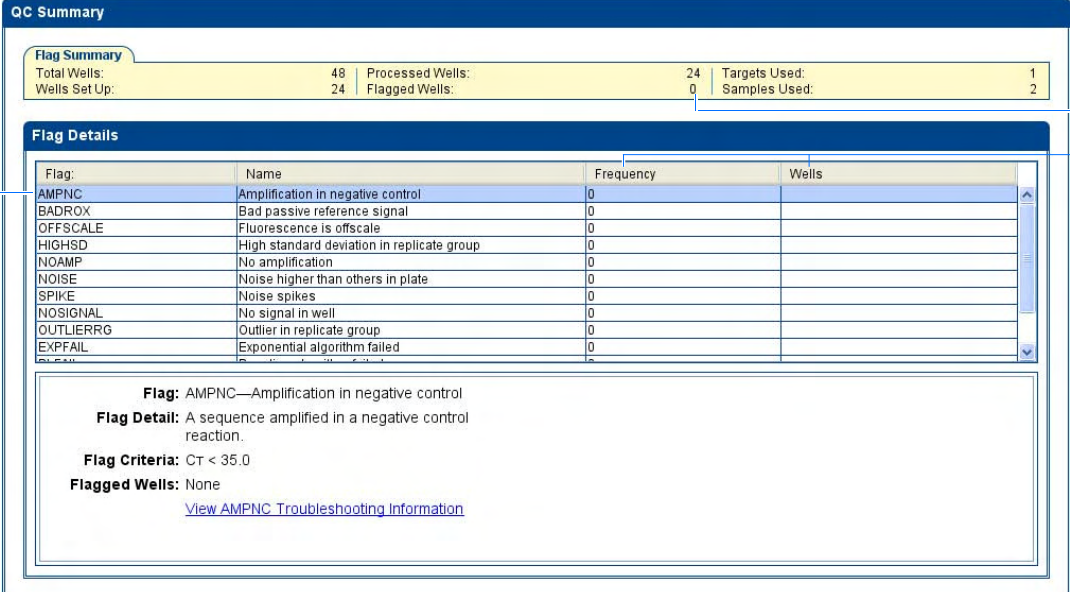
1. V panelu Experiment Menu zvolte **Analysis** >  **QC Summary** (Analýza > Kontrola kvality).

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

2. Shlédněte vyobrazenou statistiku vlaječek. Ve vzorovém experimentu nejsou žádné jamky s vlaječkami.
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) pro všechny vlaječky 0.

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

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



QC Summary

Flag Summary

Total Wells:	48	Processed Wells:	24	Targets Used:	1
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	0	Samples Used:	2

Flag Details

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	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	

Flag: AMPNC—Amplification in negative control
Flag Detail: A sequence amplified in a negative control reaction.
Flag Criteria: Ct < 35.0
Flagged Wells: None
[View AMPNC Troubleshooting Information](#)


Vlaječky V případě experimentů standardní křivky se mohou zobrazit níže uvedené vlaječky.

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

Vlaječka	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 piků 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 vlaječku v tabulce Flag Details (Detailní údaje o vlaječkách) s vyšší frekvencí než 0, čímž zobrazíte detailní informace o vlaječce. Je-li zapotřebí, klikněte na odkaz k řešení problému.
- Nastavení vlaječek můžete měnit:
 - Upravte citlivost nastavení, což se projeví počtem jamek s vlaječkami.
 - Změňte vlaječky používané programem StepOne.

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

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 nejsou žádné odlehlé body; není zapotřebí z analýzy vypouštět žádné jamky.

Vynechání jamek 1. V panelu Experiment Menu 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) **Ct vs Well**.

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

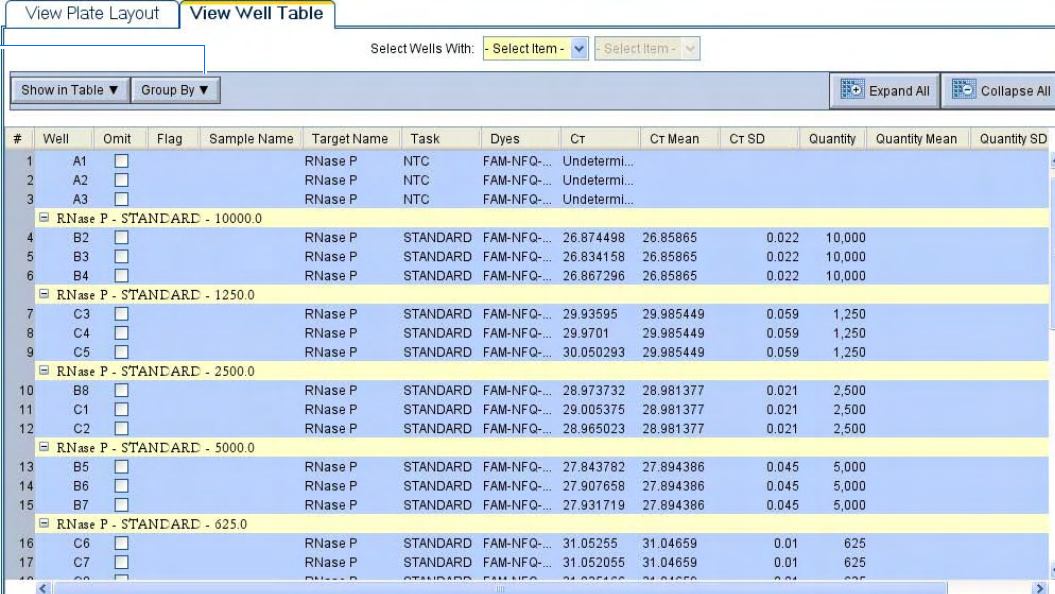
4. V tabulce jamek:

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

b. Hledejte odlehlé body ve skupinách replikátů (musí být označeny vlaječkou).
Ve vzorovém experimentu nejsou žádné odlehlé body.

3

4a




#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1	<input type="checkbox"/>		RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
2	A2	<input type="checkbox"/>		RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
3	A3	<input type="checkbox"/>		RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
RNase P - STANDARD - 10000.0													
4	B2	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		26.874498	26.85865	0.022	10,000		
5	B3	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		26.834158	26.85865	0.022	10,000		
6	B4	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		26.867296	26.85865	0.022	10,000		
RNase P - STANDARD - 1250.0													
7	C3	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		29.93595	29.985449	0.059	1,250		
8	C4	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		29.9701	29.985449	0.059	1,250		
9	C5	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		30.050293	29.985449	0.059	1,250		
RNase P - STANDARD - 2500.0													
10	B8	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		28.973732	28.981377	0.021	2,500		
11	C1	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		29.005375	28.981377	0.021	2,500		
12	C2	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		28.965023	28.981377	0.021	2,500		
RNase P - STANDARD - 5000.0													
13	B5	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		27.931719	27.894386	0.045	5,000		
RNase P - STANDARD - 625.0													
16	C6	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		31.05255	31.04659	0.01	625		
17	C7	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		31.052055	31.04659	0.01	625		
18	C8	<input type="checkbox"/>		RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...		31.052055	31.04659	0.01	625		

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:

1. V panelu Experiment Menu 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) **Ct 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).
 - c. Zatrhněte **Omit** (Vynechat).
5. Klikněte **Analyze** (Analyzovat), čímž analyzujete výsledky experimentu bez dat z vynechaných jamek.

Více informací Více informací o vynechání jamek z analýzy získáte v nápovědě programu StepOne 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.

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 panelu Experiment Menu zvolte **Analysis** >  Multicomponent Plot (Multikomponentní graf).

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

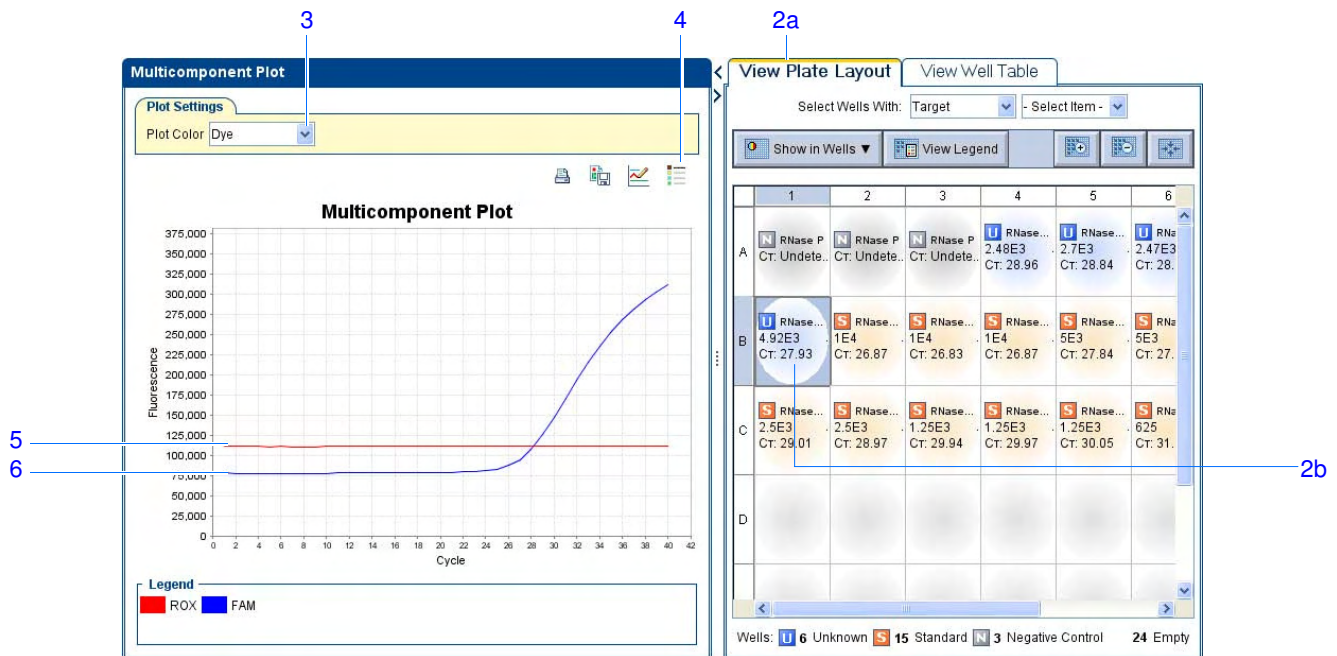
2. Zobrazte postupně jamky s neznámými vzorky a standardy:
 - a. Klikněte **View Plate Layout** (Zobrazení destičky).
 - b. Zvolte jednu jamku ve vyobrazení destičky.

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

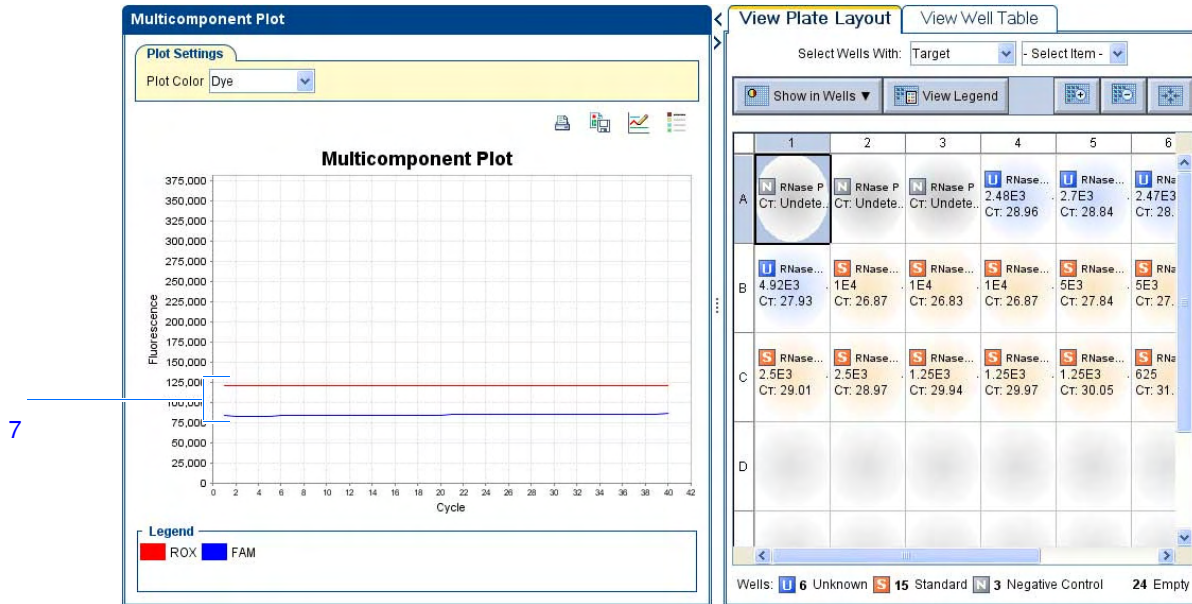
3. Z rozbalovací nabídky Plot Color (Barva grafu) zvolte **Dye** (Barva fluoroforu).
4. Klikněte  **Show a legend for the plot** (Zobrazit legendu grafu - přednastaveno).

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.




Doporučení k analýze

Analýzujete-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 StepOne 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 panelu Experiment Menu 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).

Poznámka: 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:

StepOne		StepOnePlus	
Filtr	Barva	Filtr	Barva
1	FAM™	1	FAM™
	SYBR® Green		SYBR® Green
2	JOE™	2	JOE™
	VIC®		VIC®
3	ROX™	3	TAMRA™
			NED™
		4	ROX™

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 StepOne kliknutím na nebo stiskem klávesy **F1**.




Jiné způsoby zadání experimentu

A

V této příloze naleznete:

- Pokročilé zadání experimentu 116
- Rychlé spuštění 117
- Zadání pomocí šablony 119
- Zadání pomocí exportu/importu 121

Poznámka: Více informací k tématům diskutovaným v této příručce naleznete v online nápovědě programu StepOne™ Real-Time PCR System Software, do které se dostanete stiskem klávesy **F1** nebo ikony  nebo volbou **Help > StepOne Software Help** (Nápověda > Nápověda programu StepOne).

Pokročilé zadání experimentu

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



1. Dvakrát klikněte na ikonu  (program StepOne) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software <název softwaru>**

kde <název softwaru> je současná verze programu StepOne.




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 záložku  **Run Method** (Běh), zkontrolujte a upravte objem reakce a teplotní profil podle potřeby.
- d. Klikněte na záložku  **Reaction Setup** (Zadání reakce), zkontrolujte a upravte součásti reakce a vypočítané objemy reagentů.
- e. (*Volitelné*) Klikněte na záložku  **Materials List** (Potřebný materiál), zkontrolujte a objednejte seznam materiálů potřebného k přípravě destičky s reakcemi.

4. Připravte PCR reakce:

Typ experimentu	Krok
<i>Relativní standardní křivka</i>	a. Příprava templátu. b. Ředění vzorků.
Standardní křivka	c. Příprava ředící řady standardů. d. Příprava mastermixu. e. Příprava destičky s reakcemi.

Typ experimentu	Krok
<i>Komparativní C_T</i>	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků.
Přítomnost/Nepřítomnost	c. Příprava mastermixu.
	d. Příprava destičky s reakcemi.

5. Provedení experimentu:

- 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 StepOne.
- b. V nabídce Experiment Menu 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).

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
<i>Relativní standardní křivka</i>	a. Příprava templátu.
Standardní křivka	b. Ředění vzorků.
	c. Příprava ředící řady standardů.
	d. Příprava mastermixu.
	e. Příprava destičky s reakcemi.
<i>Komparativní C_T</i>	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků.
Přítomnost/Nepřítomnost	c. Příprava mastermixu.
	d. Příprava destičky s reakcemi.

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

- a. Dvakrát klikněte na ikonu  (program StepOne) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software <název softwaru>**

kde <název softwaru> je současná verze programu StepOne.

- b. Na výchozí obrazovce klikněte na  **QuickStart** (Rychlé spuštění).
- c. Klikněte na záložku **Experiment Properties** (Vlastnosti experimentu - předvoleno), zadejte název experimentu, poté definujte jeho vlastnosti.
- d. Klikněte na záložku **Run Method** (Běh), zkontrolujte a upravte objem reakce a teplotní profil podle potřeby.

3. Provedení experimentu:

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

4. V programu StepOne 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 StepOne.
- b. V nabídce Experiment Menu 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).


Zadání pomocí šablony

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


Vytvoření šablony

1. Dvakrát klikněte na ikonu  (program StepOne) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software <název softwaru>** kde <název softwaru> je současná verze programu StepOne.
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 116](#)).

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

Zadání experimentu pomocí šablony

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

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

2. Zvolte šablonu, který jste vytvořili v [kroku d](#), poté klikněte **Open** (Otevřít). Na základě zadání v šabloně 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 116](#)).
4. Klikněte  **Save** (Uložit), zadejte název souboru, poté klikněte **Save** (Uložit).
5. Připravte PCR reakce:

Typ experimentu	Krok
Relativní standardní křivka	a. Příprava šablony. b. Ředění vzorků.
Standardní křivka	c. Příprava ředící řady standardů. d. Příprava mastermixu. e. Příprava destičky s reakcemi.

Typ experimentu	Krok
Komparativní C _T	a. Příprava templátu.
Genotypování	b. Ředění vzorků.
Přítomnost/Nepřítomnost	c. Příprava mastermixu.
	d. Příprava destičky s reakcemi.

6. 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 StepOne.
- b. V nabídce Experiment Menu 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).

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.

Poznámka: Zadání exportované z experimentů v programu StepOne v1.0 lze importovat do experimentů v programu StepOne v2.0 nebo vyšší. Zadání exportované z experimentů v programu StepOne v2.0 nebo vyšší nelze importovat do experimentů v programu StepOne v1.0.


Export zadání

1. Dvakrát klikněte na ikonu  (program StepOne) nebo zvolte **Start > All Programs > Applied Biosystems > StepOne Software <název softwaru>**

kde <název softwaru> je současná verze programu StepOne.

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 116](#)).

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 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 tabelátorem)..
 - 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 experiment.

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 116](#)).
3. Připravte PCR reakce:

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

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

5. Analýza dat:

- a. Otevřete experiment v programu StepOne.
- b. V nabídce Experiment Menu 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).



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 StepOne™, 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 StepOne™ 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 StepOne™ a StepOnePlus™ jsou pro použití této barvy prekalibrovány. Barva ROX se používá jako pasivní reference.

blok na vzorky VeriFlex™

Blok na vzorky v přístroji StepOnePlus™. Blok VeriFlex obsahuje 96 jamek a je rozdělen do zón. Umožníte-li používat blok VeriFlex v programu StepOne™, můžete pro každou zónu nastavit různou teplotu.

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 nukleové kyseliny, 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](#).

dotykový displej

Displej přístroje StepOne™ nebo StepOnePlus™, který umožňuje tyto přístroje ovládat pomocí.

efektivita amplifikace (EFF%)

Výpočet efektivit PCR amplifikace. Efektivita amplifikace se počítá na základě sklonu regresní linie standardní křivky. Sklon blízky -3.32 znamená optimální 100% efektivitu PCR amplifikace. Efektivitu amplifikace ovlivňují:

- **Koncentrační rozsah standardů** – Chcete-li zvýšit přesnost měření efektivit 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 snížit amplifikaci a ovlivnit měření efektivit.

EFF%

Viz [efektivita amplifikace \(EFF%\)](#).

endogenní kontrola

Detektor pro gen relativně stabilně exprimovaný ve všech analyzovaných vzorcích. Endogenní kontrola se používá pro normalizaci fluorescenčního signálu cílového ampliconu při kvantifikaci metodou relativní standardní křivky a komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$) metodou. Jako endogenní kontrolu lze použít tzv. housekeepingové (“provozní”) geny. Viz též [housekeepingové \(“provozní”\) geny](#).

endpoint čtení

Viz [post-PCR čtení](#).

esej

V systémech StepOne™ a StepOnePlus™ : reakční mix 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 StepOne™ nebo StepOnePlus™, zahrnuje zadání, vlastní běh a analýzu. Na přístrojích StepOne™ a StepOnePlus™ lze provádět následující typy experimentů:

- Kvantifikace – standardní křivka
- Kvantifikace - relative standard curve
- Kvantifikace - komparativní C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- Křivka tání
- Genotypování
- 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 StepOne™ při provádění běhů na přístroji StepOne™ nebo StepOnePlus™.
- 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](#).
- hranice zóny** Okraj zóny v bloku VeriFlex™. V programu StepOne™ jsou hranice zón vyznačeny tlustou červenou čarou ve vyobrazení destičky.
- 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 Ano/Ne reakce obsahující inhibitor amplifikace IPC (interní pozitivní kontrola). V programu StepOne™ 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.
- instalace bez počítače** Instalace přístroje StepOne™ nebo StepOnePlus™ bez přímého propojení přístroje s počítačem pomocí žlutého kabelu. Ovládání přístroje je možné pouze pomocí dotykového displeje a přenos dat mezi počítačem a přístrojem je možný pouze pomocí USB disku nebo počítačové sítě.
- instalace s počítačem** Způsob instalace systému StepOne™ nebo StepOnePlus™, kdy je přístroj přímo připojen k počítači pomocí žlutého propojovacího kabelu. V této konfiguraci lze přístroj ovládat programem StepOne™ instalovaným v počítači nebo pomocí dotykového displeje.
- interní pozitivní kontrola (IPC)** Používaná 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 reagensů či přístroje.
- IPC** U experimentů typu Ano/Ne zkratka pro interní pozitivní kontrolu (internal positive control - IPC). V programu StepOne™ úloha detektoru v jamkách obsahujících IPC a neobsahujících inhibitor IPC. Viz též [interní pozitivní kontrola \(IPC\)](#).
- IPC+** Viz [negativní kontrola-IPC jamky](#).
- kalibrátor** Viz [referenční vzorek](#).
- Knihovna cílových sekvencí (Target Library)** V programu StepOne™ se jedná o soubor cílových sekvencí používaných v experimentech, definovaných pomocí názvu, reportérové barvy, zhášeče a barvy cílové sekvence.
- Knihovna SNP esejí (SNP Assay Library)** V programu StepOne™ se jedná o soubor SNP esejí, které lze použít v genotypovacích experimentech. SNP esejí jsou definovány pomocí názvu a barvy a každá alela je definována názvem nebo pomocí báze, barvou reportérové barvy, zhášeče a alely.

Knihovna vzorků (Sample Library)

Soubor vzorků v programu StepOne™. 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 StepOne™ 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 StepOne™ : 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. V systému StepOnePlus™, který je vybaven blokem VeriFlex™, obsahuje každý krok 6 teplot (1 pro každou zónu).

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 StepOne™ 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 StepOne™ nebo StepOnePlus™.

metoda kvantifikace

Při kvantifikačních experimentech je možné ke kvantifikaci používat různé metody. Systémy StepOne™ a StepOnePlus™ 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 StepOne™ 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 StepOne™ 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](#).

mix primerů

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

mix primerů/sondy

Součást reakční směsi PCR obsahující primery a sondu TaqMan® k detekci amplikonu.

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 StepOne™ 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 StepOne™ obsahuje 6 řádek a 8 sloupců. U systému StepOnePlus™ obsahuje 8 řádek a 12 sloupců.

V programu StepOne™ 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 StepOne™ 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 StepOne™ 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 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 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. Zadávejte-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 StepOne™ se jedná o úlohu detektoru pro SNP eseji v jamce obsahující vzorek o známém genotypu.

práh	<ol style="list-style-type: none">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).2. Při provádění experimentů typu Ano/Ne se jedná o úroveň fluorescence, nad níž program StepOne™ vyhodnotí výsledek rozhodnutím Ano.
prahový cyklus (threshold cycle - C_T)	Cyklus PCR v němž fluorescence protne práh v amplifikačním grafu.
prostorová kalibrace (spatial calibration)	Jedna z kalibrací systému StepOne™ a StepOnePlus™ používaná k mapování pozic jednotlivých jamek v bloku na vzorky. Používá se k tomu, aby program správně přiřadil detekovaný nárůst fluorescence během běhu dané jamce destičky.
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 StepOne™ umožňující definovat zadání experimentu a poskytující rady k zadání.
QuickStart	Funkce programu StepOne™, 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	Součásti PCR reakce používané k amplifikaci cílové sekvence a k detekci amplifikace. V systémech StepOne™ a StepOnePlus™ lze použít: <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 templátu (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 linie	Používá se při kvantifikaci pomocí standardní křivky a metodou relativní standardní křivky, jedná se o přímku proloženou standardní křivkou. Vzorec regresní linie: $C_T = m [\log (Q_{ty})] + b$ kde m je sklon, b je průsečík s osou y (y-intercept) a Q_{ty} je množství standardu. Viz též regresní koeficienty .
replikáty	Celkový počet identických reakcí obsahujících tytéž komponenty a totožné objemy.
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 ampliconu. 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) .
rs číslo	Viz refSNP ID .

rychlost rampu	<p>Rychlost s níž se v průběhu běhu mění teplota. K dispozici jsou varianta rychlá (fast) a standardní.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pro dosažení optimálních výsledků při rychlém rampingu doporučuje společnost Applied Biosystems používání reagentů TaqMan® Fast. • Pro dosažení optimálních výsledků při standardním rampingu doporučuje společnost Applied Biosystems používání standardních reagentů. <p>DŮLEŽITÉ! Reagencie TaqMan Fast nejsou podporovány při genotypovacích experimentech a experimentech typu Ano/Ne.</p>
ředící faktor	Viz sériový faktor .
ředící látka	Látka používaná k ředění vzorku nebo standardu předtím, než jsou pipetovány do PCR reakce. Jedná se o vodu nebo pufr.
ředící série standardů	<p>Používá se při kvantifikaci metodou standardní křivky a relativní standardní křivky, jedná se o sadu standardů obsahujících templát v určitém rozsahu množství. Přípravuje 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 StepOne™ 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.</p>
sběr dat (data collection)	<p>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 StepOne™ je fáze sběru dat indikována ikonkou v teplotním profilu:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sběr dat zapnut : • Sběr dat vypnut :
série	Viz ředící série standardů .
sériový faktor	<p>V programu StepOne™ 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 10x, rozdíl mezi dvěma sousedními body křivky je desetinásobný.</p>
sklon	<p>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 linie.</p>
skupina replikátů	Soubor identických reakcí v témže experimentu.

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 esejí (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.
systemová barva	Barva dodávaná společností Applied Biosystems, pro kterou jsou systémy StepOne™ nebo StepOnePlus™ 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 StepOne™: <ul style="list-style-type: none"> • FAM™ • JOE™ • ROX™ • SYBR® Green • VIC® Systémové barvy pro systém StepOnePlus™: <ul style="list-style-type: none"> • FAM™ • JOE™ • NED™ • ROX™ • SYBR® Green • TAMRA™ • VIC® <p>DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec, v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.</p>

templát	<p>V Průvodci zadáním experimentu (Design Wizard) v programu StepOne™ (a v průvodci QuickStart při kvantifikaci) se jedná o typ nukleové kyseliny přidávané do PCR reakce. Doporučení stran templátu se liší podle typu experimentu:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kvantifikace (standardní křivka, relativní standardní křivka a komparativní Ct) – 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)	<p>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.</p>
teplotní profil	<p>Definice teplot, času, rampu a sběru dat pro všechny kroky a fáze běhu přístroje StepOne™ nebo StepOnePlus™.</p>
T _m	<p>Viz teplota tání (T_m).</p>
typ experimentu	<p>Typy experimentů, které lze provádět na přístrojích StepOne™ nebo StepOnePlus™:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Standardní křivka • Komparativní Ct ($\Delta\Delta C_T$) • Relativní standardní křivka • Křivka tání (není k dispozici v průvodci návrhem) • Genotypování • Ano/Ne <p>Zvolený typ experimentu ovlivní zadání, běh i analýzu.</p>
úloha (task)	<p>Typ reakce prováděné v dané jamce. Používají se tyto různé úlohy:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 Ano/Ne) • Inhibovaná IPC - Blocked IPC (při experimentech typu Ano/Ne)

vlastní barva	<p>Barva nepodporovaná společností Applied Biosystems. Při práci se systémy StepOne™ a StepOnePlus™ lze používat vlastní barvy. Používáte-li vlastní barvy, měli byste je přidat do knihovny barev (Dye Library) a provést kalibraci vlastní barvy.</p> <p>DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec, v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.</p>
výchozí množství (starting quantity)	<p>Definujete-li v programu StepOne™ standardní křivku, odpovídá výchozí množství nejvyššímu nebo nejnižšímu množství.</p>
vynechání jamky (omit well)	<p>Krok, kterým vynecháte jednu nebo více jamek z analýzy. Data z vynechaných jamek nejsou nijak analyzována a neobsahují tedy žádné výsledky.</p>
Vzdálené monitorování	<p>Nástroj programu StepOne™, který umožňuje monitorovat činnost systémů StepOne™ nebo StepOnePlus™ prostřednictvím počítačové sítě. Pomocí tohoto nástroje můžete monitorovat stav přístroje, odeslat do přístroje experiment, monitorovat nárůst amplifikačních křivek a teplotní průběh PCR v grafech a stahovat dokončené experimenty z přístroje. Funkce Vzdáleného monitorování neumožňuje přístroje StepOne™ nebo StepOnePlus™ ovládat.</p>
vzorek	<p>Templát, který testujete.</p>
Vzorek DNA (10×)	<p>V programu StepOne™ 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.</p>
Vzorek nebo Standard (10×)	<p>V programu StepOne™ 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.</p>
zhášec	<p>Molekula na 3' konci sondy typu TaqMan®, která absorbuje (zháší) fluorescenci reportérové barvy na 5' konci sondy, dokud je sonda nedegradována. Při použití reagensů typu TaqMan® lze použít nefluorescenční zhášec v kombinaci s MGB (minor groove binder). Při použití reagensů SYBR® Green se zhášec nepoužívá.</p> <p>DŮLEŽITÉ! Společnost Applied Biosystems nedoporučuje používat barvu TAMRA™ ani jako reportér, ani jako zhášec, v systému StepOne™. Naopak barvu TAMRA™ lze použít jako reportér nebo zhášec v systému StepOnePlus™.</p>
zóna	<p>Jedna z šesti oblastí bloku VeriFlex™, pro kterou lze v rámci běhu nastavit specifickou teplotu.</p> <p>Poznámka: Při provádění analýzy křivky tání musíte pro všechny zóny nastavit tutéž teplotu.</p>

Číslice

1-kroková RT-PCR 7, 24, 32, 37

2- kroková RT-PCR 7, 11, 24

A

amplifikační graf

sledování během běhu 70

zobrazení po skončení běhu 92

amplifikační graf, typický 96

analýza

amplifikační graf 92

hrubá data 112

kontrola kvality 106

multikomponentní graf 109

součástí programu 85

standardní křivka 90

Tabulka jamek 99

tipy pro snadnou orientaci 88

více grafů najednou (Multiple Plots) 89

analýza experimentu

doporučení 85, 92, 96, 101, 105, 107, 109, 111, 113

postup 82

publikování výsledků 102

více informací 92, 98, 101, 105, 107, 109, 111, 113

vynechání jamek 108

zobrazení amplifikačního grafu 92

zobrazení hrubých dat 112

zobrazení kontroly kvality 106

zobrazení multikomponentního grafu 109

zobrazení parametrů analýzy 104

zobrazení standardní křivky 90

zobrazení tabulky jamek 99

zobrazení více grafů 89

Applied Biosystems

kontakt xii

připomínky k dokumentaci xii

technická podpora xii

používání této příručky viii

B

bezpečná manipulace s elektrickými zařízeními xx

bezpečná manipulace s chemickým odpadem xix

bezpečná manipulace s chemikáliemi xviii

bezpečná práce xxii

bezpečnost
 biologické riziko [xxi](#)
 doporučení [xviii](#), [xix](#), [xx](#)
 elektrická zařízení [xx](#)
 ergonomie [xxii](#)
 chemický odpad [xix](#)
 ovládání přístroje [xvii](#)
 před uvedením do provozu [xvii](#)
 standardy [xxii](#)
 zvedání a přenášení přístroje [xvii](#)
 bezpečnostní listy
 popis [xviii](#)
 získání [xviii](#)
 bezpečnostní označení, na přístrojích [xvi](#)
 bezpečnostní standardy [xxii](#)
 bezpečnostní symboly, na přístrojích [xv](#)
 biologický odpad, manipulace [xx](#)

C

CAUTION - VAROVÁNÍ, popis [xiii](#)
 cílové sekvence
 doporučení k zadání [26](#)
 zadání [25](#)
 CT [101](#)

D

DANGER – NEBEZPEČÍ, popis [xiii](#)
 další reagenty [9](#)
 data
 o sběru dat [2](#)
 publikování [102](#)
 přenos [76](#)
 vzorový experiment [9](#), [84](#)
 Databáze metod [32](#)
 dokumentace, související [ix](#)
 doporučení
 analýza [85](#), [92](#), [96](#), [101](#), [105](#), [107](#), [109](#), [111](#), [113](#)
 běh [64](#)
 bezpečná manipulace s chemickým odpadem [xix](#)
 bezpečná manipulace s chemikáliemi [xviii](#)
 chemický odpad, odstraňování [xix](#)
 návrh [21](#), [23](#), [26](#), [28](#), [30](#), [32](#), [37](#), [41](#), [44](#)
 příprava [48](#), [50](#), [52](#), [56](#)

E

efektivita amplifikace [28](#), [92](#)
 ergonomie, bezpečnost [xxii](#)
 eseje na objednávku (Made to Order) [37](#)
 eseje skladem (Inventoried) [37](#)
 experimenty standardní křivky [6](#)
 Export/Import [10](#), [121](#)

H

hrubá data 112

I

instalace bez počítače
 monitorování 75
 přenos dat 78
 spuštění 66
 vzdálené monitorování (Remote Monitor) 73
 vzdálený přenos dat 77
instalace s počítačem
 monitorování 69
 přenos dat 77
 spuštění 65

J

jamky
 negativní kontrola 29, 42, 53
 neznámý vzorek 29, 42, 53
 standard 29, 42, 53
 volba 88
 vynechání 108

K

kategorie přepětí *xxi*
knihovna 32
kontrola kvality 106

M

monitorování běhu
 amplifikační graf 70
 graf teplot 71
 instalace bez počítače 75
 instalace bez počítače (vzdáleně) 73
 instalace s počítačem 69
multikomponentní graf 109
multiplexní PCR 6, 24

N

nápověda, přístup *xi*
nastavení analýzy
 CT 105
 pokročilé 105
 pozadí 105
 práh 105
 vlaječka 105
 zobrazení 104
nastavení emailových zpráv 63

návrh experimentu

- doporučení 21, 23, 26, 28, 30, 32, 37, 41, 44
- kontrola zadání reakcí 33
- materiál a metodika 22
- objednání materiálu 38
- postup 16
- příprava standardů 27
- příprava vzorků 29
- součásti programu 18
- ukončení Průvodce zadáním (Design Wizard) 42
- více informací 22, 24, 26, 28, 31, 33, 38, 41, 44
- vlastnosti experimentu 20
- vytvoření nového 17
- zadání běhu 31

negativní kontrola 6

O

- odchylka, standardní 97
- odstraňování odpadu, doporučení xx

P

Pokročilé zadání (Advanced Setup) 9, 10, 24, 30, 56, 116

postup

- Export/Import 10, 121
- Pokročilé zadání (Advanced Setup) 116
- rychlé spuštění (QuickStart) 10, 117
- templát 10, 119

potřebný materiál 47, 49, 51, 54

používání této příručky

- jako návodu 9
- pro vaše experimenty 9

pozadí

- manuální nastavení 105
- příklady 98

práh

- manuální nastavení 105
- příklady 97
- správné hodnoty 96

Průvodce zadáním (Design Wizard)

- cílové sekvence 25
- seznam materiálu 38
- součásti programu 18
- standards 27
- ukončení 42
- vlastnosti experimentu 20
- vzorky 29
- zadání reakcí 33

přenos dat 76

příprava běhu 61

příprava experimentu

- doporučení 48, 50, 52, 56
- více informací 48, 53, 57

publikování výsledků 102

R

- radioaktivní odpad, manipulace xx
- reagencie
 - SYBR Green 8
 - TaqMan 8
- reakční směs
 - objemy 51
 - postup 46
 - příprava 51
 - reakční destička 53
 - ředění standardu 49
 - ředění vzorku 47
 - vypočítané objemy 34
- reakční destička
 - příprava 53
 - rozvržení 42
 - vložení 62
 - vyjmutí z přístroje 76
- replikát 6
- Rychlé spuštění (QuickStart) 10, 117
 - doporučení 64
 - monitorování 69
 - nastavení emailových zpráv 63
 - přenos dat 76
 - postup 60
 - příprava 61
 - start 65
 - více informací 63, 72, 73
- rychlost rampu 22, 24

Ř

- ředění vzorku
 - příprava 47
 - vypočítané objemy 36, 47
- ředící řada standardů
 - příprava 49
 - součástí experimentu 6
 - vypočítané objemy 35
- řešení problémů
 - nastavení pozadí 105
 - nastavení prahu 105
 - vlaječky 107
 - vynechání jamek 108
 - zobrazení hrubých dat 112
 - zobrazení kontroly kvality 106
 - zobrazení multikomponentního grafu 109
 - zobrazení parametrů analýzy 104

S

- sběr dat 2
 - filtry 3, 113
 - konfigurace 65, 69, 76
 - reagencie 8

singleplexní PCR 6, 24
 spotřební materiál
 podporovaný 4
 spuštění běhu
 instalace bez počítače 66
 instalace s počítačem 65
 standardy
 bezpečnostní xxii
 doporučení k přípravě 28
 EMC xxii
 ředění 49
 zadání 27
 standardy elektromagnetické kompatibility EMC xxii
 standardní odchylka, vliv prahu na 97
 StepOne systém spotřební materiál 4
 SYBR Green reagensie 3, 8, 24, 26, 37, 113
 symboly, bezpečnostní xv

T

tabulka jamek 99
 TaqMan reagensie 3, 8, 23, 24, 26, 37, 113
 templát 10, 119
 tipy pro snadnou orientaci
 volba jamek 88
 zobrazení více grafů 89

V

vlaječka 101
 vlaječka
 nastavení analýzy 105
 v experimentech standardní křivky 107
 vlaječka AMPNC 107
 vlaječka BADROX 107
 vlaječka BLFAIL 107
 vlaječka CTFAIL 107
 vlaječka EXPFAIL 107
 vlaječka HIGHSD 107
 vlaječka MTP 107
 vlaječka NOAMP 107
 vlaječka NOISE 107
 vlaječka NOSIGNAL 107
 vlaječka OFFSCALE 107
 vlaječka OUTLIERRG 107
 vlaječka SPIKE 107
 vlaječka THOLDFAIL 107
 vlastní (Custom) eseje 37
 vlastnosti experimentu 20
 vložení reakční destičky 62
 volba jamek 88
 vyjmutí destičky 76
 vynechání jamek 108
 výsledky, interpretace 83
 výstraha 72

vytištění zadání reakcí 36
vytvoření nového experimentu 17
vzorky
 doporučení 30
 neznámé - unknowns 55
 ředění 47
 zadání 29
vzorový experiment 13
 analýza 82
 běh 60
 data 12
 návrh 16
 název 20
 popis 10
 postup 13
 příprava 46
 umístění dat 12

W

WARNING - VÝSTRAHA, popis [xiii](#)

Z

zvedání a přemísťování, bezpečnost [xvii](#)

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

09/2007

