

nastavení real-time PCR cyklu
Applied Biosystems 7300 a 7500 Fast Real-Time
System

(Applied Biosystems)

OBSAH

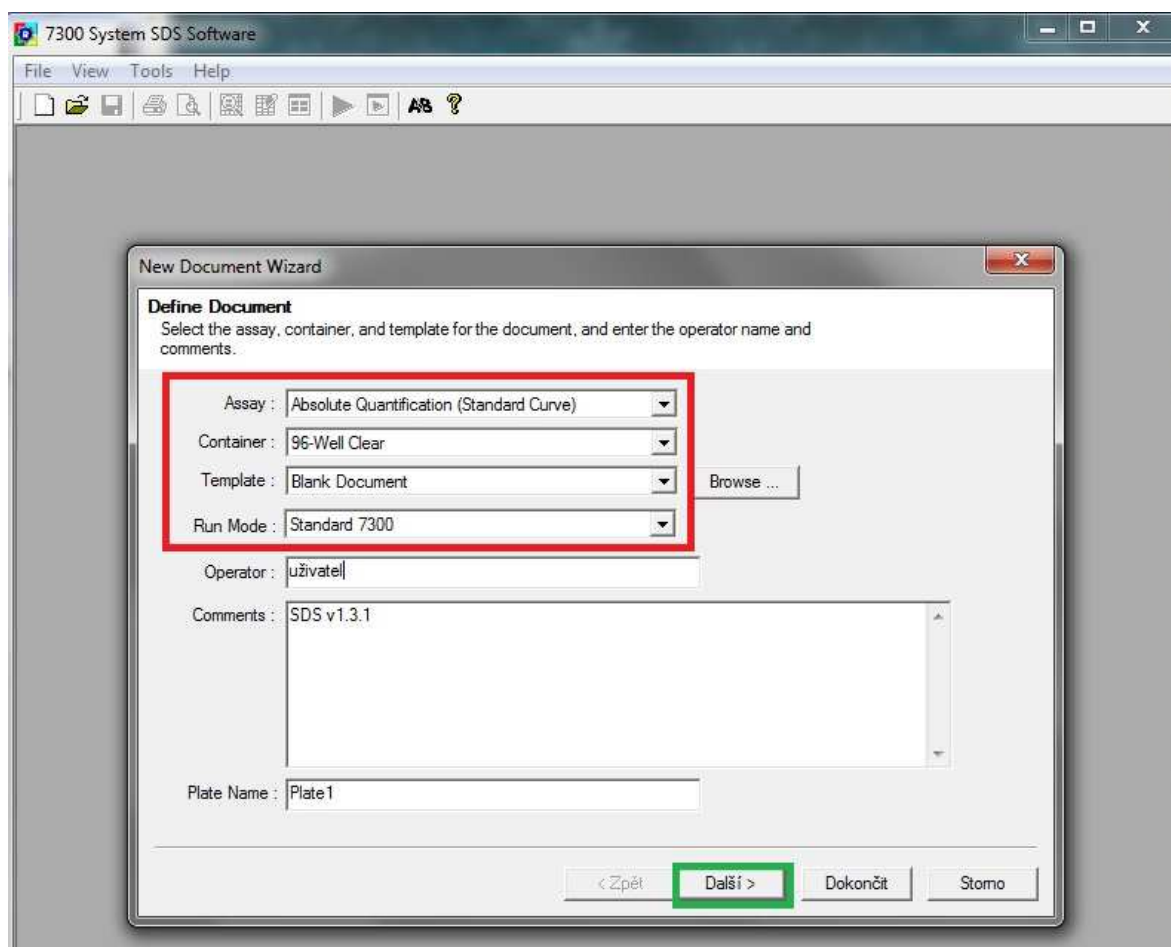
1.	Nastavení nového teplotního profilu.....	3
1.1.	Vytvoření nového dokumentu „Plate“	3
1.2.	Nastavení parametrů runu.....	6
2.	Odečet hodnot Ct.....	7
2.1.	Zobrazení získaných dat.....	7

1. Nastavení nového teplotního profilu

1.1. Vytvoření nového dokumentu „Plate“

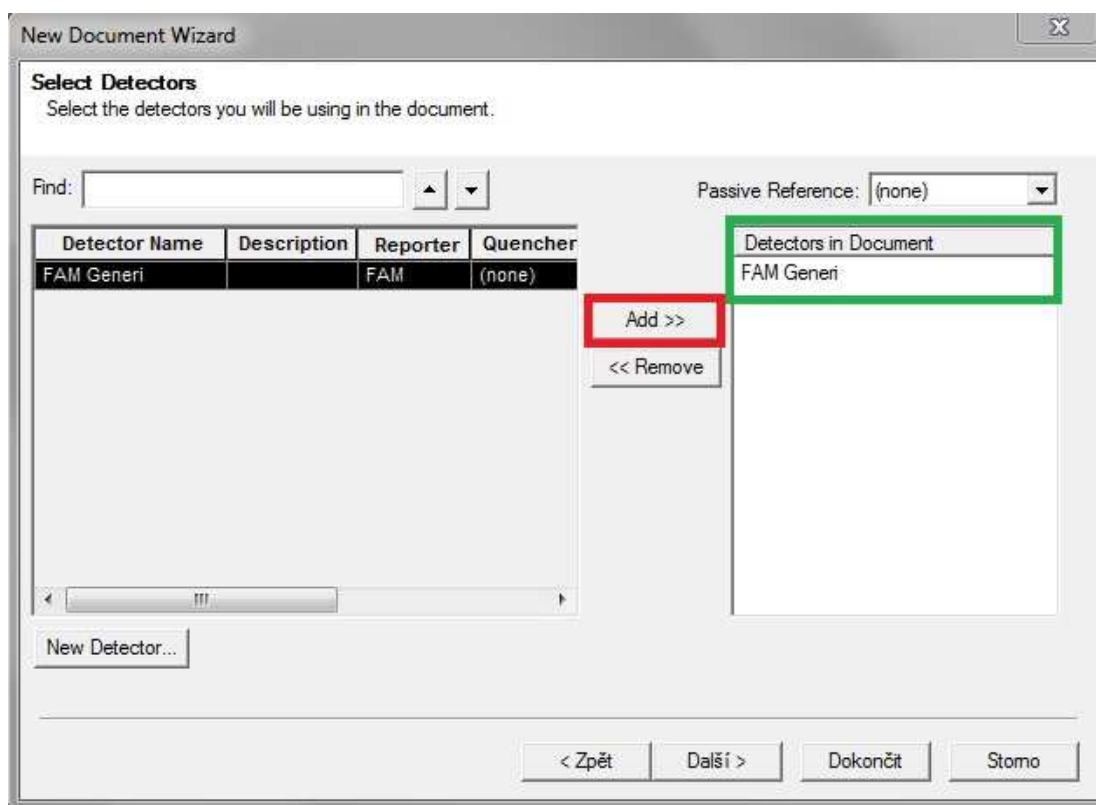
1.1.1. Nejdříve je potřeba vytvořit dokument, do kterého se budou data v průběhu analýzy ukládat.

Po otevření programu spusťte v záložce „File“ volbu „New...“. V okně, které se objeví je třeba vyplnit požadované údaje a zmáčknout „Další“

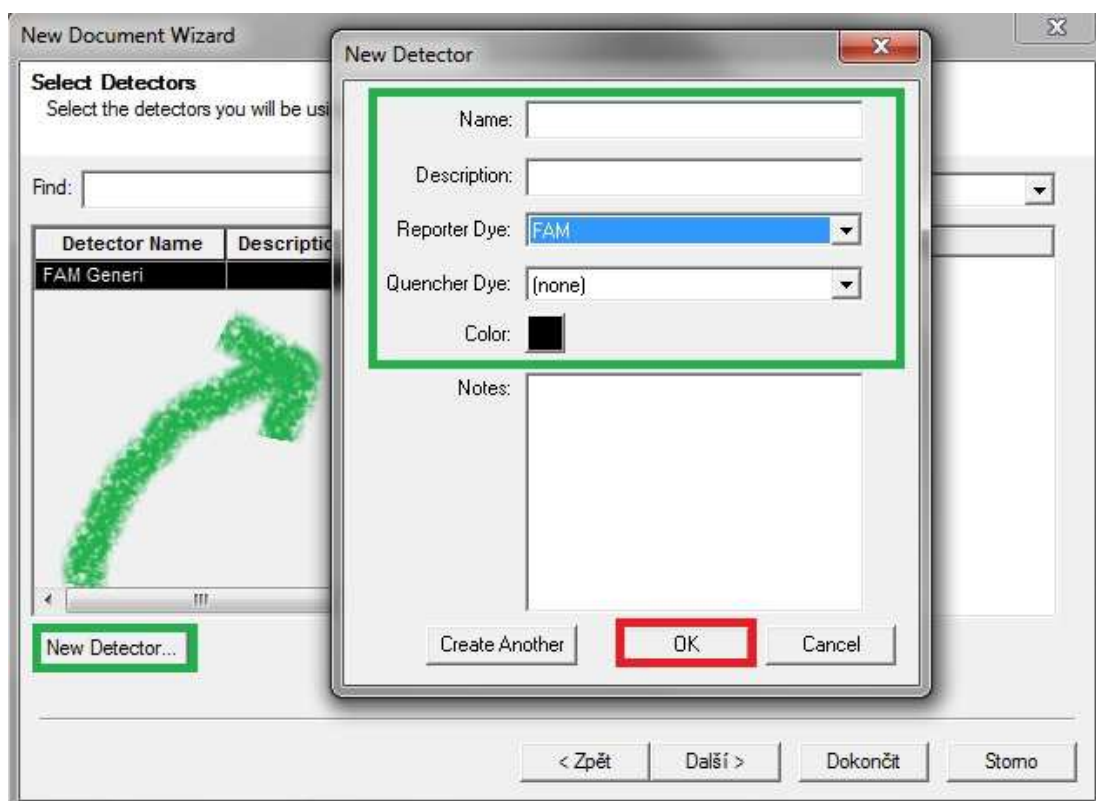


1.1.2. Volba detektoru (fluorescenčního kanálu)

V případě, že jsou detektory přednastavené a uložené, stačí pouze přenést vybraný (a označený) detektor pomocí tlačítka „Add“ do okna „Detectors in Document“. V případě, že chcete detektor ze seznamu odstranit, lze použít tlačítko „Remove“.

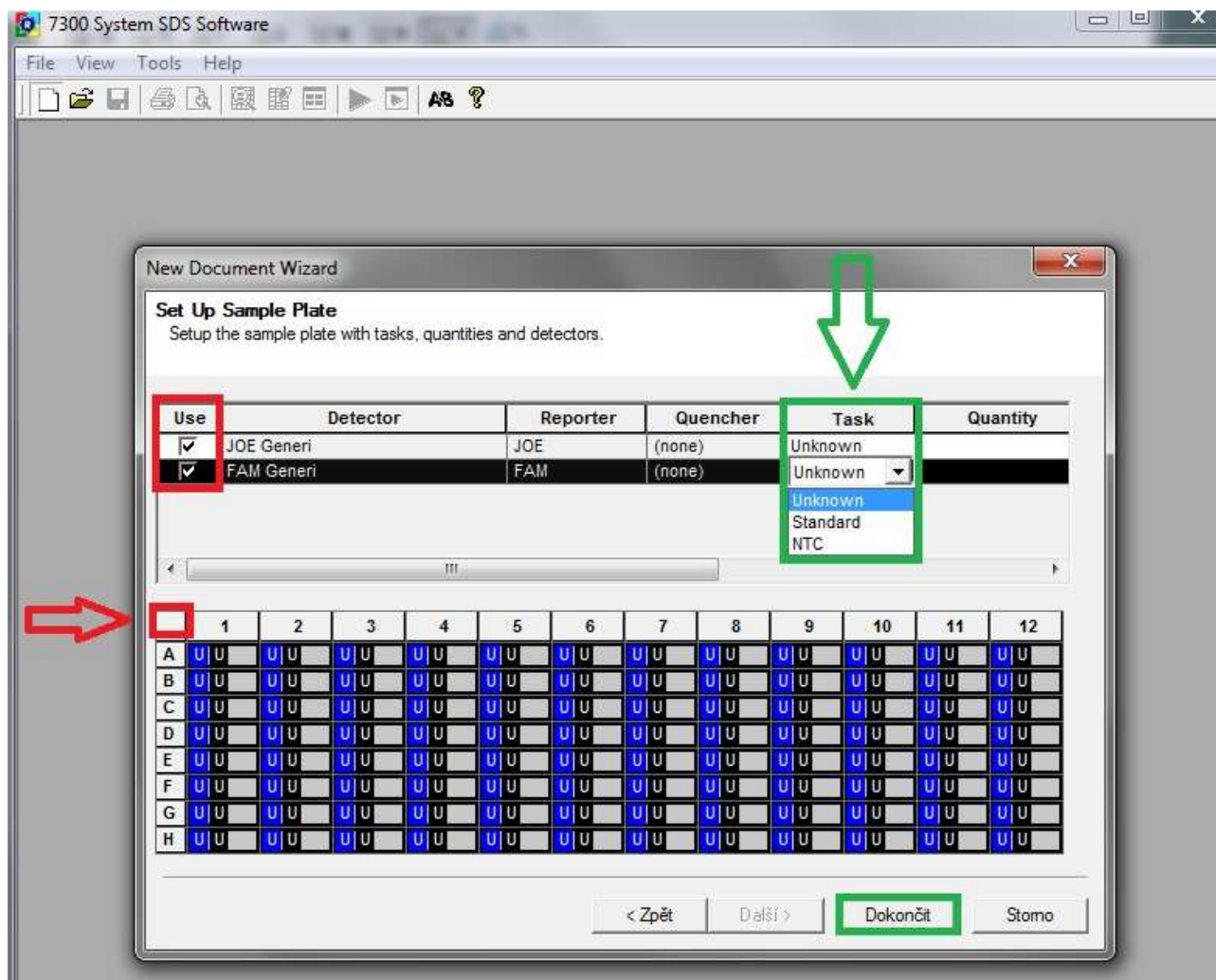


Pokud není detektor přednastaven, lze jej definovat pomocí tlačítka „New Detector“. Zde je třeba vyplnit požadované údaje (název nového detektoru, fluorescenční kanál a barvu, pod kterou se bude detektor zobrazovat) a potvrdit tlačítkem OK.



1.1.3. V okně „Set Up Sample Plate“, které se objeví automaticky po stisknutí tlačítka „Další“, označte všechny jamky kliknutím na levý horní roh destičky a následně zaškrtněte ve sloupci „Use“ požadované detektory (v každé jamce se objeví barva detektoru, který byl na začátku vybrán)

Přímo do jamky deštičky lze vepsat název vzorku, nebo v nabídce „Task“ vybrat zda jde o standard či negativní kontrolu (NTC).



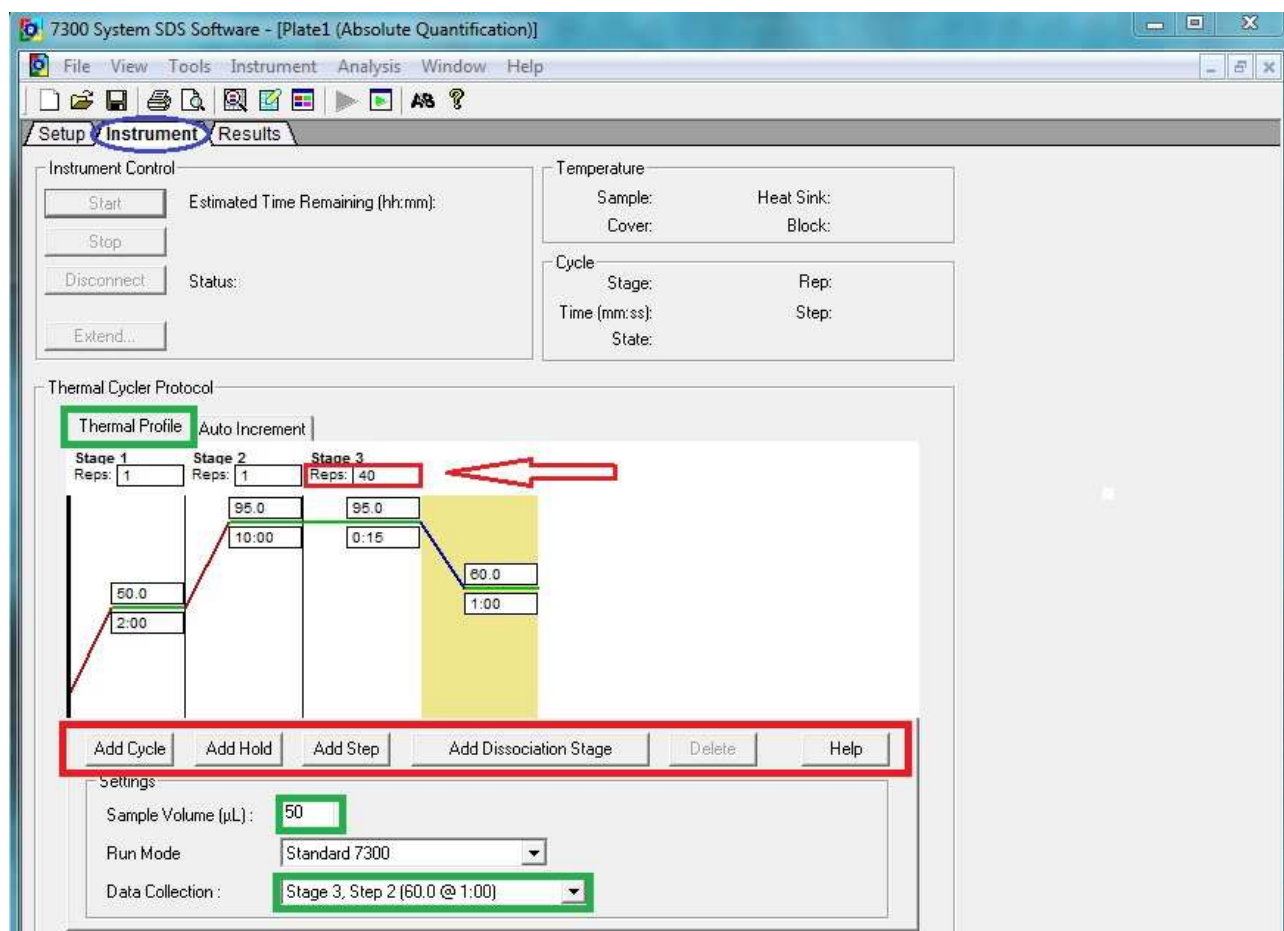
Po stisknutí tlačítka „Dokončit“ se vytvoří nový dokument „Plate“, který se otevře v novém okně.

1.2. Nastavení parametrů runu

1.2.1. V záložce „Instrument“ je třeba nastavit teplotní profil:

- zvolením jednotlivých cyklů (Add Cycle – přidá do profilu cyklus o dvou krocích společně s počtem opakování cyklu)
- přidáním jednotlivých kroků v daném cyklu (Add Step)
- nastavením teplot a časů (vepsáním přímo do rámečku pro daný krok)
- zvolením počtu opakování jednotlivých cyklů (vepsáním přímo do rámečku „Reps“)

Pro případné smazání cyklu či kroku je nutné jej nejdříve označit dvojitým kliknutím a pak stisknout tlačítko „Delete“.




Dále je nutné zadat objem vzorku v μL („Sample Volume“) a krok, ve kterém bude snímána fluorescence („Data Collection“).

Soubor je před spuštěním runu nutné uložit výběrem z nabídky „File“ – „Save As...“ a pojmenovat. Teprve potom spusťte run pomocí tlačítka „Start“ v horní levé části tabulky.

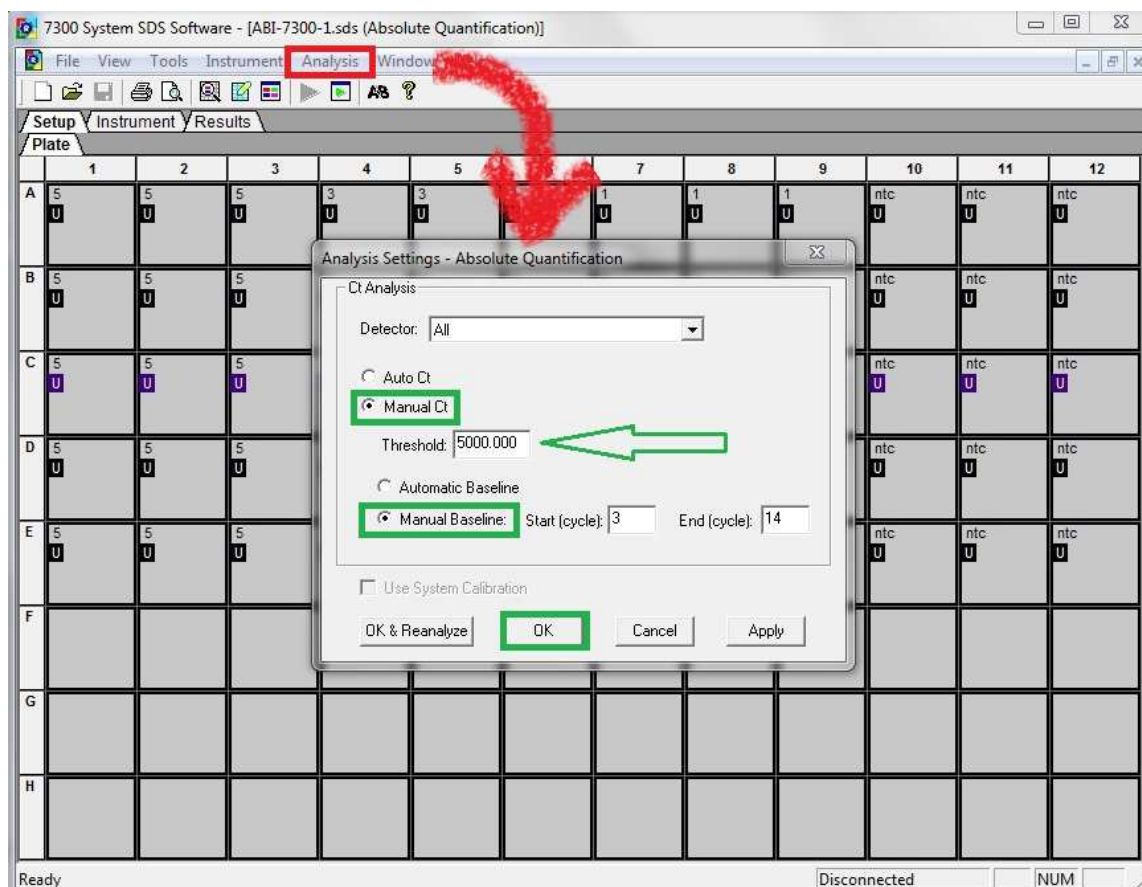
2. Odečet hodnot Ct

2.1. Zobrazení získaných dat

2.1.1. Po proběhlém runu se zaktivní tlačítko  (nebo je možno vybrat z nabídky v horní liště „Analysis“ – „Analyze“)

Pro manuální nastavení prahové hodnoty (threshold) je třeba vybrat z nabídky v horní liště „Analysis“ – „Analysis Settings“ a zde zaškrtnout „Manual Ct“ a pro nastavení rozmezí baseline pak „Manual Baseline“. Pro přepočítání výsledků s novými parametry je nutné potvrdit volbu stisknutím tlačítka „OK & Reanalyze“

Tento krok se opakuje pokaždé, když se rozhodnete změnit parametry pro vyhodnocování výsledků analýzy.



2.1.2. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v záložce „Results“. Tyto výsledky se objeví teprve po označení jamek v záložce „Setup“ – „Plate“

Výsledné hodnoty Ct jsou uvedeny v záložce „Results“ – „Report“ společně s informacemi o jednotlivých vzorcích:

- označení jamky (Well)
- název vzorku (Sample Name)
- typ detektoru (Detector)
- ...

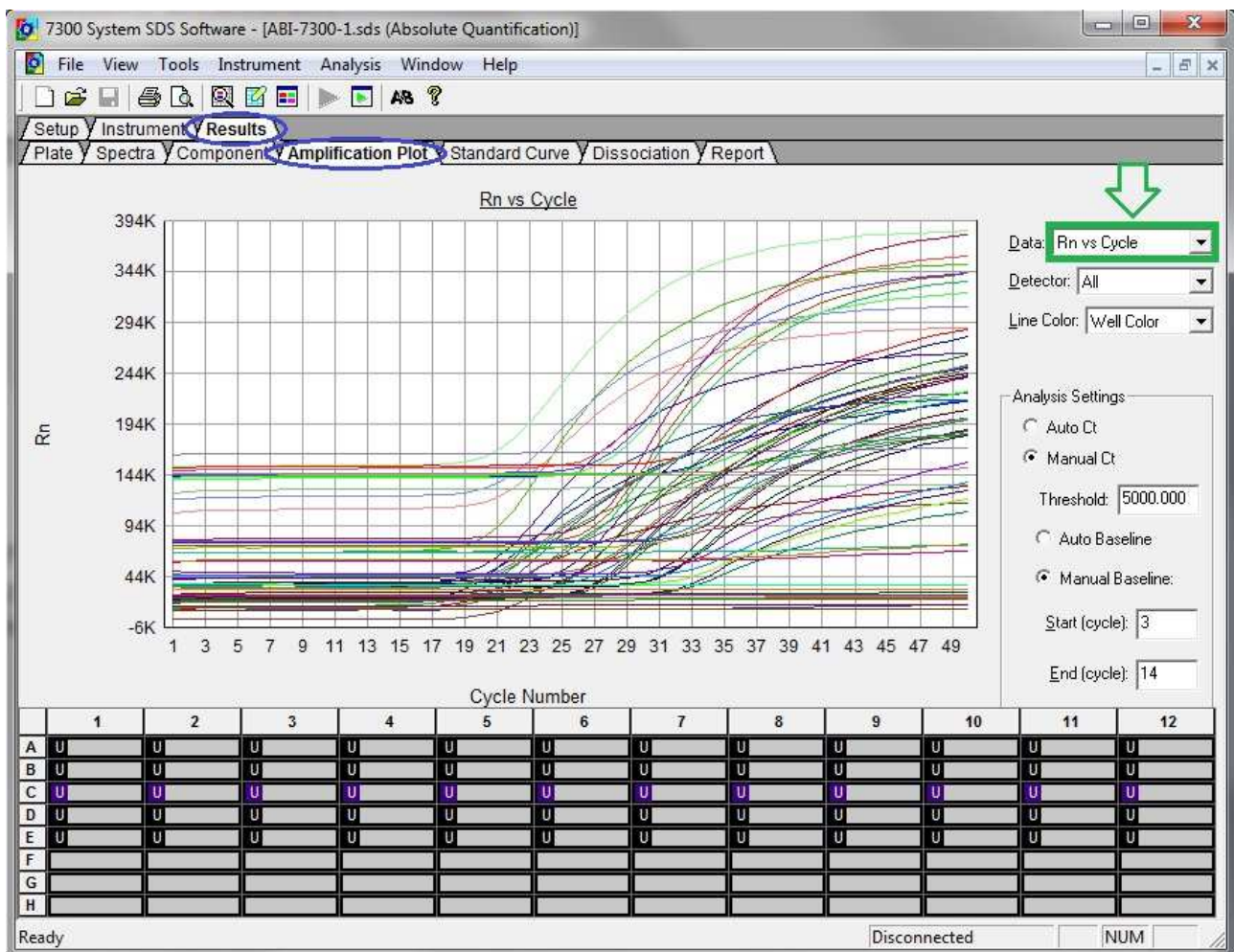
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	5	B2M	Unknown	18.92	0.397					
A2	5	B2M	Unknown	18.30	0.397					
A3	5	B2M	Unknown	18.17	0.397					
A4	3	B2M	Unknown	24.15	0.051					
A5	3	B2M	Unknown	24.09	0.051					
A6	3	B2M	Unknown	24.05	0.051					
A7	1	B2M	Unknown	30.17	0.135					
A8	1	B2M	Unknown	30.43	0.135					
A9	1	B2M	Unknown	30.23	0.135					
A10	ntc	B2M	Unknown	Undet.						
A11	ntc	B2M	Unknown	Undet.						
A12	ntc	B2M	Unknown	Undet.						
B1	5	HPRT	Unknown	20.43	0.406					
B2	5	HPRT	Unknown	19.76	0.406					
B3	5	HPRT	Unknown	19.70	0.406					
B4	3	HPRT	Unknown	25.93	0.172					
B5	3	HPRT	Unknown	25.78	0.172					
B6	3	HPRT	Unknown	26.12	0.172					
B7	1	HPRT	Unknown	Undet.	0.250					
B8	1	HPRT	Unknown	31.80	0.250					
B9	1	HPRT	Unknown	32.16	0.250					
B10	ntc	HPRT	Unknown	Undet.						
B11	ntc	HPRT	Unknown	Undet.						

2.1.3. Dalšími záložkami, které popisují získaná data jsou:

- **Plate** (graficky zobrazí jednotlivé jamky destičky včetně zvoleného typu detektoru a popisu vzorku)
- **Spectra** (zde je možno sledovat hodnoty fluorescence jak se měnily v průběhu runu, pohybem po linii „Cycle“ se mění fluorescence jednotlivých vzorků po cyklech, číslo právě zobrazovaného cyklu je uvedeno v okénku „# Cycle“)

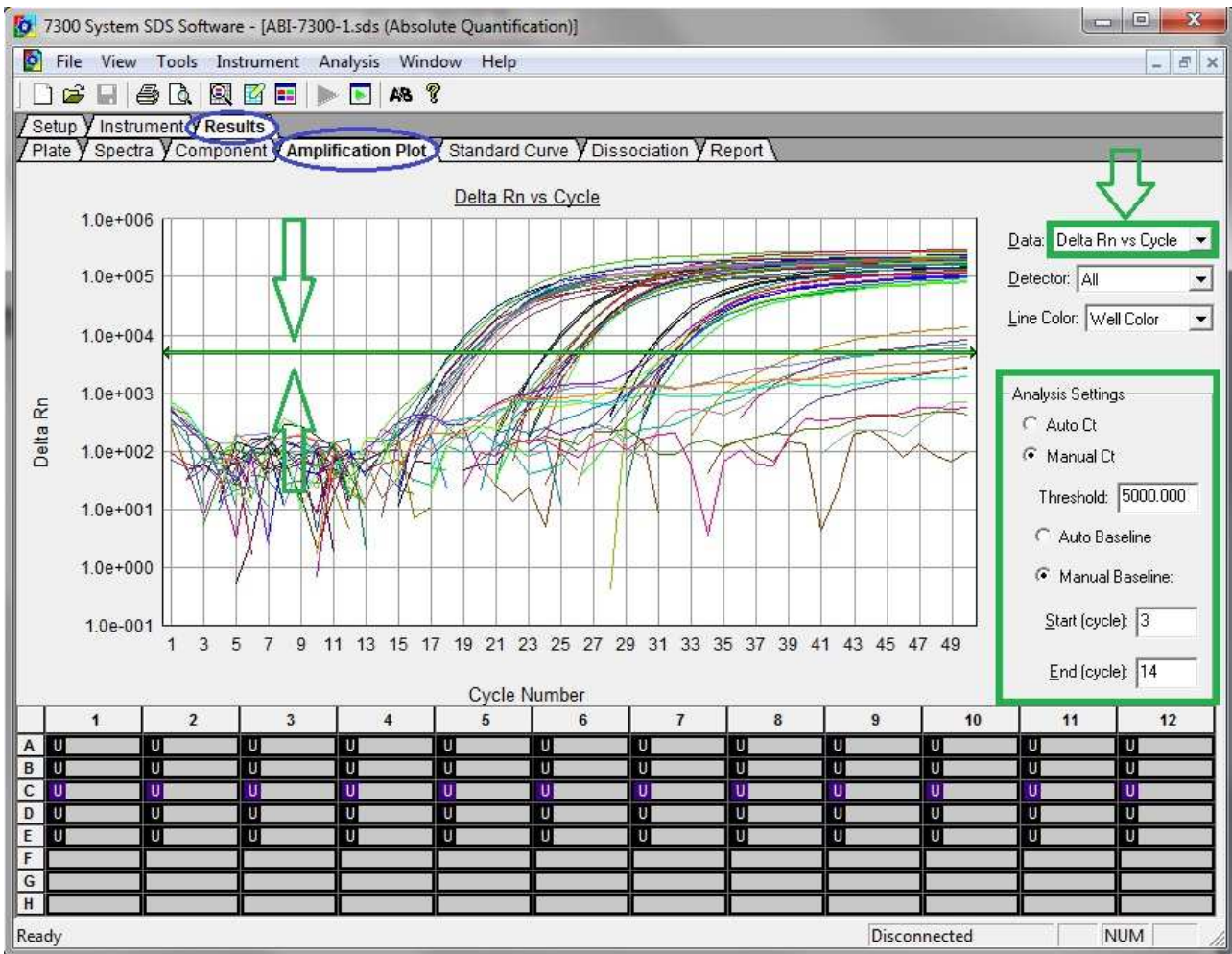
- **Component** (zde je vidět vzrůstající / klesající fluorescence pro daný vzorek a typ detektoru v průběhu runu, křivka se zobrazí vždy pouze pro jeden vzorek podle toho, který si vyznačíte na obrázku plata pod grafem)
- **Amplification Plot**
 - Rn vs. Cycle (Linear View)

Při volbě této možnosti se v grafu zobrazí amplifikační křivky jednotlivých vzorků, popisuje závislost hodnot fluorescence (Rn) na pořadí cyklu (Cycle Number). Toto zobrazení je vhodné např. při vizualizaci vzorků s atypickým průběhem amplifikace.



o Delta Rn vs. Cycle (Log View)

Zobrazí graf závislosti ΔRn na pořadí cyklu (Cycle Number). Graf lze využít k manuálnímu nastavení hodnoty Ct (threshold) a rozmezí pro výpočet baseline.



o Ct vs. Well Position

Graf závislosti hodnot Ct a pozice jamky na platu. Toto zobrazení je vhodné k vizualizaci odlehlých hodnot.

- **Standard Curve** (zobrazení kalibrační přímky ze vzorků, které jsou označeny jako „Standard“)
- **Dissociation** (křivka tání)