nastavení real-time PCR cykleru

Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time System

(Applied Biosystems)

OBSAH

1. Nas	tavení nového teplotního profilu	. 3
1.1.	Vytvoření nového dokumentu "Plate"	. 3
1.2.	Nastavení parametrů runu	5
2. Ode	čet hodnot Ct	6
2.1.	Zobrazení získaných dat	. 6

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 (verze 2.4) spusťte v záložce "File" volbu "New…". V okně, které se objeví je třeba vyplnit požadované údaje a zmáčknout "Další"

Assay:	Standard Curve (AQ)	•
Container:	96 Wells Clear Plate	
Template:	Blank Template	•
	Browse	
Barcode:		Ĩ

1.1.2. Volba detektoru (fluorescenčního kanálu) – záložka "Setup"

V případě, že jsou detektory přednastavené a uložené, je možno je přenést do seznamu stisknutím tlačítka "Add Detector", následně vybrat z nabídky detektorů a označit jej. Po stisknutí "Copy To Plate Document" a potom "Done" se detektor nahraje do seznamu a bude použit u daného vzorku (popř. všech vzorků, pokud si je na začátku - na obrázku vlevo nahoře označíte všechny). V případě, že chcete detektor ze seznamu odstranit, lze po zaškrtnutí detektoru použít tlačítko "Clear".

Pro alelickou diskriminaci je třeba ke každému vzorku přiřadit dva typy detektorů (např. FAM/Sybr a HEX/JOE. U každého vzorku se pak vyhodnocují signály z obou kanálů (FAM/Sybr pro heterozygota, HEX/JOE pro mutantní alelu a heterozygot v obou zvolených kanálech).

😨 SDS	5 2.4																	-OX
<u>Eile</u>	dit <u>⊻</u> iew	jools (nst	ument	<u>A</u> nalysis	Window	∧v <u>H</u> el	p											
	😂 🖬 🔋	3616	88	1 @ 3	跑 		9.8					DS						
🕅 Unt	titled 1 - Ab	solute Qu	antificat	ion														- 5 ×
1	2	3 4	5	6 7	8	. 9	10	11	12		Setup Instr	ument						
										4	Well(s):							?
A1	A2 A3	A4	A5 A	3 A7	A8	A9	A10	A11	A12		Sample Name					Sample	Color:	
в						-			- 1		Like I	Dotoctor	Dep	retor	Tack		Ousetitu	Color
B1	82 8	84	95 B	5 87	BS	89	810	811	812		036	Detettor	Тор	51 (61			Quanticy	
C 01	Detector N	anager																×
D	Find:				Filter	Fi	ilter Seti	ings										
01	Grou	0	Nar	ne	Re	porter	Qu	encher	Color		AIF Assay ID	Mod	fication Date		Owner	1	Creation Date	
E E1	Default	b2r	1		FAM		Non F	luores.,				Sat Feb 09 16	:13:38 CET 2	013		Sat Feb 0	9 16:13:38 CET 20	13
F					A													
F1					Λ													
G																		
ы 📕					11	V												
1 H1																		
Table S																		
Positic																		
A1	1						1											
A2							5	Sec. 1										
A3						4	11/20	27										
A9 A5	New	1 000		Telete	Toolo	¥ l	× 19											
A6					TOOIS	<u> </u>	-	1							-	_		
A7	?						1								Сору	To Plate D	ocument D	one
A8 . 49		9	ľ	-		Ť	-	SA.		- r	T							
A10	į į	.10					-	1100	-	i.		-						
A11	ł	11						1	1.14		Add Dete	tor	llear 🖉	lopy to Mar	rager Sel	up Standa	andia	
A12	4	12			-						Passive Refe	ence: ROX	T					
B2	E	2								-		order lives						
1									3			s)						
																	Dis	connected

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

Pozn.: název detektoru lze zvolit podle assaye (např. b2m), při následné analýze dat získaných z více runů ("Relative Quantification Multiple Plate Document"), lze potom vybrat daný detektor a zobrazí se data pro assay b2m.

V tomto kroku je také možno vybrat si pasivní referenční barvivo v kolonce "Passive Reference" (popř. vybrat volbu "None" pro možnost bez barviva).

😨 SD	5 2.4																						_ID ×
Eile E	dit ⊻iew	Tools	Instrumer	nt <u>A</u> na	alysis	Windo	∧v <u>H</u> el⊧	9															
				新一番				2						DS									
🖲 Un	titled 1 - /	bsolute	Quantif	ication																			- 8×
	1 2	3	4 5	6	7	8	9	10	11	12		Setu	P Instr	rument									
											-	Well	(s):										?
A1	A2	A3 A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12		Sam	ole Name	e: 🔽							— Sam	ple Color:	
В						-						Use	1	Detecto	or	1	Rer	orter	12	Tas	k	Quantity	Color
81	82	83 84	85	86	87	88	89	810	811	812			1	Detett	01		Not	1		145	<u>.</u>	- Quantici	
C 01	Detector	Manage	I	111 m		M. 11.			Add De	tector							×						×
D	Find	anteotraneotra				- Filtor	E	ltor S		Name	b2m						-1						
D1						Tiller				Numes							Tente I						
E	Gro	up		Name		Rep	oorter			Group:	Def	ault					-		1 0	Owner		Creation Date	
E									Desc	ription:													
F F1																	-						
6									mii ma	50y ID.													
G									Re	porter:	FAN	1					-						
н						-	ten.		00	encher:	Nor	Fluore	escent				F						
					STATES	and the second second			20	Series of the		-					_						
			al series	-	1 mar - 1		7			Color:	<u> </u>												
Table :		1																					
Positie		1								Notes:													
A1		1																					
A2																							
A3									G	reated;	9.2.	2013 1	6:12:52										
A4 05	-	-					1		Last M	odified:	9.2.	2013 1	6:12:52										
A6	New		pen	Dela	te	Tools																	
A7	21	100	No.	4										ОК		Cance					iv To Plat	e Document	Done
A8	<u> </u>	100	-		-									-							a		
A9		A1	3	_			1		_									-					
A11		A11	1	Per la						-	ī.	4	dd Dete	ector		Clear	1	Copy to I	Manag	er 📔 🖻	iet up Sta	nderd	
A12		A12	14		St.m.	in the second			Children of						In ou	1							
B1 P2		B1			-	2			and the second	AL Y	-	Pass	ive Refe	erence:	кох	_							
1		με								3	-)mit Wel	l(s)									
					_	_		-														-	Discourse in the
																							visconnected

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 "Repeats")

Pro případné smazání cyklu či kroku je nutné jej nejdříve označit (podbarví se) a pak stisknout tlačítko "Delete".

Lze si vybrat z více módů pro teplotní profil:

- Fast
- Standard
- 9600 Emulation

Bit Yes Y	SDS 2	.4													
Image:	Eile Edit	⊻iew	Iod	ols (na	trume	nt <u>A</u> n	alysis	Windo	ow <u>H</u>	elp					
C Unitide 1 Absolute Quantification I I		3	8	8	3 8	6 %					6				
1 2 3 4 6 7 8 9 10 11 12 A <td>C Untitle</td> <td>ed 1</td> <td>Abso</td> <td>lute D</td> <td>uantif</td> <td>ication</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	C Untitle	ed 1	Abso	lute D	uantif	ication	1								
1 2 3 6 7 6 7 6 7 6 7 6 7 6 7		2	2	4	E	6	7	0	0	10	44	12		Π.	Sature Instrument
A A A2 A2 A3 A6 A6 A7 A6 A6 A1 A		6	3	-	2	0	-	0	3	10	11	12			Themal Curles Les L
B B	A	42	42	64	AE	AB	47	0.0	00	A40	A14	042			memarcycler Keal-time Queue
B B															- Thermal Curley Distoral
C C1 C2 C3 C4 C6 C7 C8 C0 C10 C11 C12 C1 C2 C3 C4 C6 C7 C8 C0 C10 C11 C12 C1 C2 C3 C4 C6 C7 C8 C0 C10 C11 C12 C1 C2 C3 C4 C6 C7 C8 C0 C10 C11 C12 C1 C2 C3 C4 C6 C7 C8 C0 C10 C11 C12 C12 C10 C11 C12 C11 </td <td>B B1</td> <td>82</td> <td>B3</td> <td>в4</td> <td>85</td> <td>B6</td> <td>87</td> <td>BS</td> <td>89</td> <td>B10</td> <td>B11</td> <td>B12</td> <td></td> <td></td> <td></td>	B B1	82	B3	в4	85	B6	87	BS	89	B10	B11	B12			
C1 C2 C3 C4 C6 6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C3 C4 C6 6 C7 C8 C9 C10 C11 C11 C12 C3 C4 C6 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C11 C12 C3 C4 C6 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C3 C4 C6 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C3 C4 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C1 C11	c 🗖														Mode: C Fast C Standard C 9600 Emulation Sample Volume (µL): [20
D D D D D D D D D D D D D D D D D D D	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CS	C9	C10	C11	C12		K	Thermal Profile Louis Increment Ramo Rate Data Collection
D1 D2 D3 D4 05 D7 D8 D4 D1 D1 <td< td=""><td>D</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>-</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>Stage 1 Stage 2</td></td<>	D								-						Stage 1 Stage 2
E E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E0 E11 E12 F F1 F2 F3 F4 F6 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 G G1 G2 G2 G4 G6 G7 G8 G9 G10 G11 G10	D1	D2	D3	D4	D5	DB	D7	DS	D9	D10	D11	D12			Paraota 50
F F1 F2 F3 F4 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 G G1 G2 G3 G4 G6 G7 G8 G9 G10 G11 G12 H H2 H3 H4 H5 H6 H7 F8 F9 F10 F11 F12 Table Settings: None Image: All intermediation intermediatintermediation intermediation intermediation i	E E1	E2	E3	E4	E5	EB	E7	ES	ES	E10	E11	E12			Repears 1 30
F1 F2 F3 F4 F5 F0 F7 F8 F9 F10 F11 F12 G	F										1		È		95.0 95.0
G 61 62 63 64 05 66 07 68 09 610 011 012 H H H2 H3 H4 H3 H4 H1 H1 <t< td=""><td>F1</td><td>F2</td><td>F3</td><td>F4</td><td>F5</td><td>F6</td><td>F7</td><td>F8</td><td>F9</td><td>F10</td><td>F11</td><td>F12</td><td></td><td></td><td>3:00 0:10</td></t<>	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12			3:00 0:10
1 02 03 04 05 06 07 08 09 010 011 012 H H H2 H3 H4 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H12 H1 H1 H12 H12 H1 H1	G														
H H	G1	G2	63	64	G5	G6	G7	68	G9	G10	G11	G12			
Image: International and the international andinternatine and the international and the international	H														
Table Settings: None Position Flag Sample Detector Task Ct Ct Mer? A1 A1 A1 A2 A2 A3 A3 A2 A2 A2 A3 A4 A4 A4 A5 A5 A5 A5 A6 A6 A6 A7 A7 A7 A7 A7 A7 A7 A8 A8 A8 A10 A10 A11 A11 A12 A14 A14<		ни	нз	(H4	THO	THE	H7	188	(HS	ни	H11	0812	Ŀ		0:20
Table Settings: None Image: Control of the setting of the set is a set in the se		A Y _						-							
Position Flag Sample Detector Task Ct Ct Mer? A1 A1 A1 A2 A2 A2 A2 A3 A4 A5 A5 A5 A6 A6 A6 A6 A6 A7 A7 A7 A7 A7 A7 A7 A10 A10 A10 A11 A11 A11 A11 A11 A11 A12 A12 A12 A2 Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	Table Sett	ings:	Vone			-		×							
A1 A1 A2 A2 A3 A3 A3 A3 A4 A4 A5 A5 A6 A6 A7 A7 A8 A8 A9 A9 A10 A10 A11 A11 A12 A12 B1 B1 B2 B2 A2 Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	Position	Flag		Sample		Detect	tor	Ta	isk		Ct	Ctr	1ec?		
A2 A2 A3 A3 A3 A4 A4 A4 A5 A5 A6 A6 A6 A6 A7 A7 A8 A8 A9 A9 A10 A10 A11 A11 B1 B1 B2 B2 A2 Add Cycle Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	A1	1	A1										<u>*</u>		
A4 A4 A4 A5 A5 A6 A6 A7 A7 A8 A8 A9 A9 A10 A10 A11 A11 A12 A12 B1 B1 B2 B2	A2		A2										_		
A5 A5 A5 A6 A6 A6 A7 A7 A7 A8 A8 A8 A9 A9 A10 A10 A10 A11 A12 A12 A12 B1 B1 Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	A4		A4										-		
A6 A6 A7 A7 A8 A8 A9 A9 A10 A11 A11 A11 A12 A12 B1 B1 B2 B2	AS		A5										-		
A7 A7 A8 A8 A9 A9 A10 A10 A11 A11 A12 A12 B1 B1 B2 B2 Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	A6		A6		1										
AB AB A9 A9 A10 A10 A11 A11 A12 A12 B1 B1 B2 B2 Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	A7		A7										_		
A10 A10 A10 A11 A11 A11 A12 A12 A12 A12 A12 A12 A12	A8 49		A8 49										-		
Al1 Al1 Al1 Al1 Al2	A10		A10	Ŭ.									-		
A12 A12 B1 B1 Add Cycle Add Hold Add Step Delete Step Add Dissociation Stage	A11		A11	e.											
B1 B1 B2 B2 Image: State of the stat	A12		A12	9											
	B1		B1										-		Add Cycle Add Hold Add Sten Delete Sten Add Discovision Stane
	1		D2												How are How h
					_									تتلك	

Dále je nutné zadat objem vzorku v μ l ("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 záložce "Real-time".

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.

Pozn.: pokud máte více runů sdružených do jednoho dokumentu: "Relative Quantification Multiple Plate Document", pak je třeba nejprve označit všechny vzorky na desičce vlevo nahoře) a v záložce "Setup" pak zaškrtnout assay, kterou chcete analyzovat a teprve pak se zaktivní tlačítko



2.1.2. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v tabulce vlevo dole

Výsledné hodnoty Ct jsou uvedeny společně s informacemi o jednotlivých vzorcích:

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

2.1.3. V záložce "Results" které zobrazují získaná data graficky lze vybrat z možností:

• Rn vs. Cycle (Linear / Log View)

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



o Delta Rn vs. Cycle (Linear / Log View)

Zobrazí graf závislosti ΔRn na pořadí cyklu (Cycle). Graf v logaritmickém zobrazení je vhodný pro manuální nastavení hodnoty Ct (threshold).



o Ct vs. Well Position

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



