

nastavení real-time **PCR** cyklu
Applied Biosystems 7900 **Fast Real-Time** System

(Applied Biosystems)

OBSAH

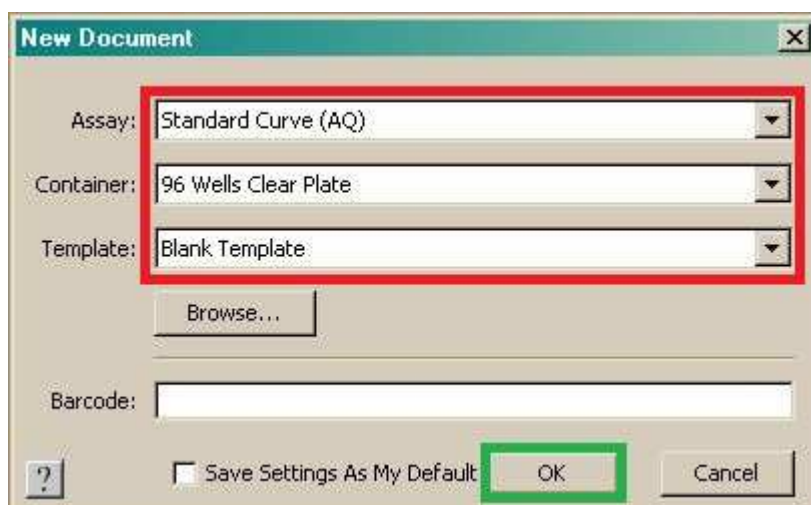
1. Nastavení nového teplotního profilu.....	3
1.1. Vytvoření nového dokumentu „Plate“	3
1.2. Nastavení parametrů runu.....	5
2. Odečet hodnot Ct.....	6
2.1. Zobrazení získaných dat.....	6

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.

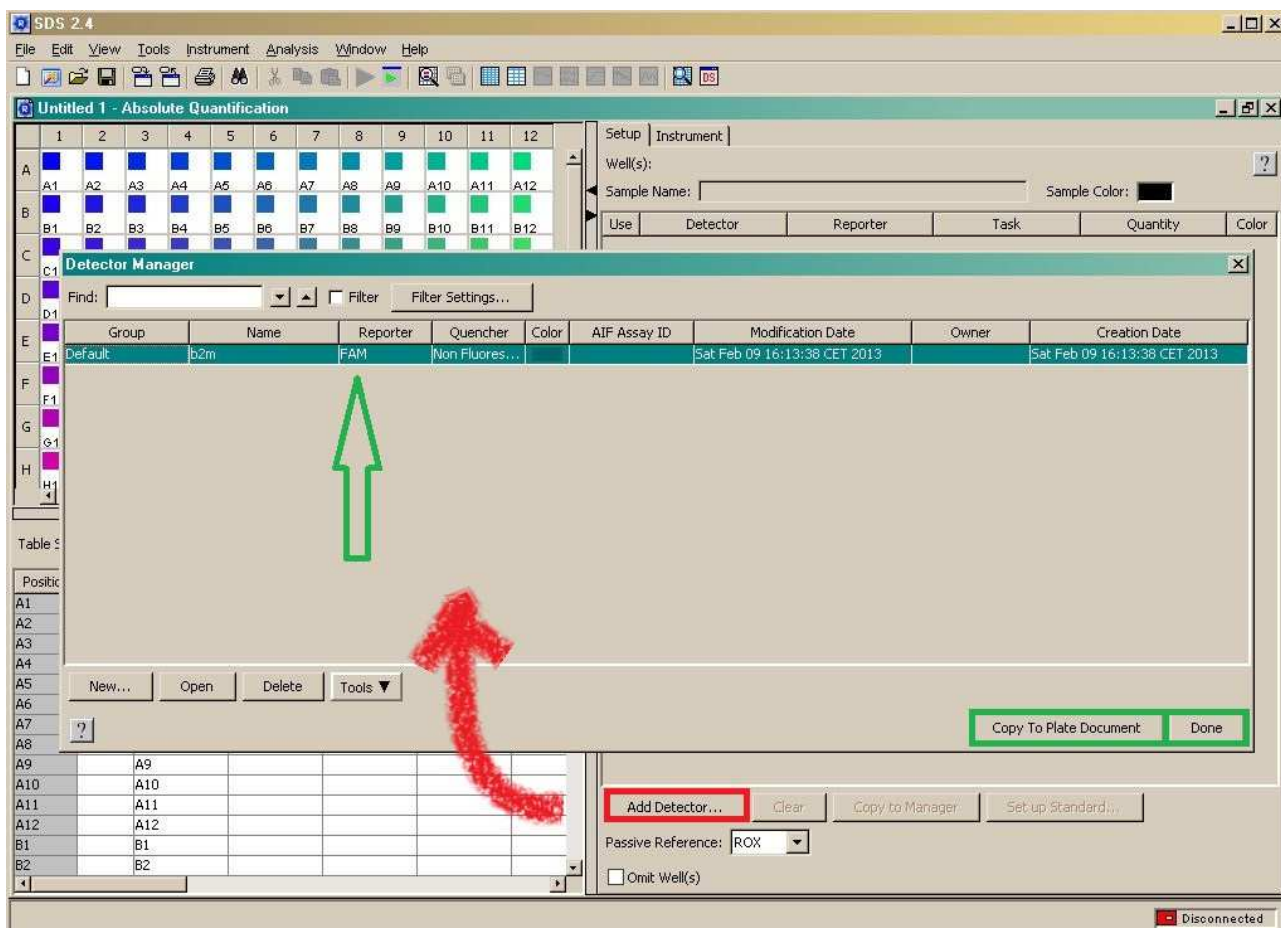
Po otevření programu (verze 2.4) spusťte v záložce „File“ volbu „New...“. V okně, které se objeví je třeba vyplnit požadované údaje a zmáčknout „Další“



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“.

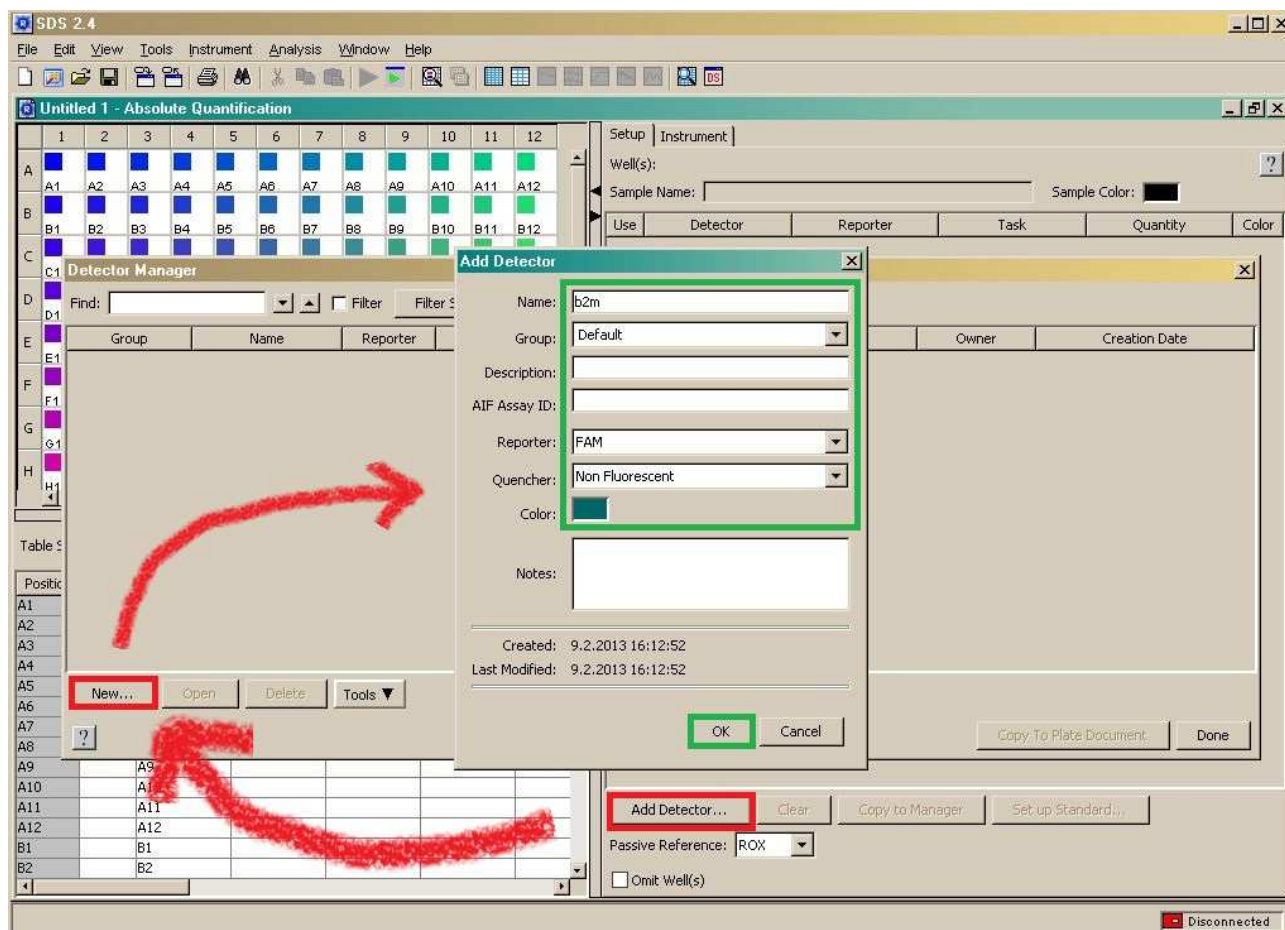
Pro alelickou diskriminaci je třeba ke každému vzorku přiřadit dva typy detektorů (např. FAM/Sybr a HEX/JOE. U každého vzorku se pak vyhodnocují signály z obou kanálů (FAM/Sybr pro heterozygota, HEX/JOE pro mutantní alelu a heterozygot v obou zvolených kanálech).



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).



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


The screenshot displays the SDS 2.4 software interface. On the left, a 96-well plate layout is shown with columns 1-12 and rows A-H. Below the plate is a table with columns: Position, Flag, Sample, Detector, Task, Ct, and Ct Mer?. The table contains sample IDs from A1 to B2. On the right, the 'Thermal Cycler Protocol' window is open, showing 'Standard' mode and 'Sample Volume (µL): 20'. The 'Thermal Profile' tab is active, showing a two-stage protocol: Stage 1 (95.0°C, 3:00) and Stage 2 (95.0°C, 0:10, Repeats: 50) followed by 60.0°C, 0:20. Buttons at the bottom include 'Add Cycle', 'Add Hold', 'Add Step', 'Delete Step', and 'Add Dissociation Stage'.

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 záložce „Real-time“.


2. Odečet hodnot Ct

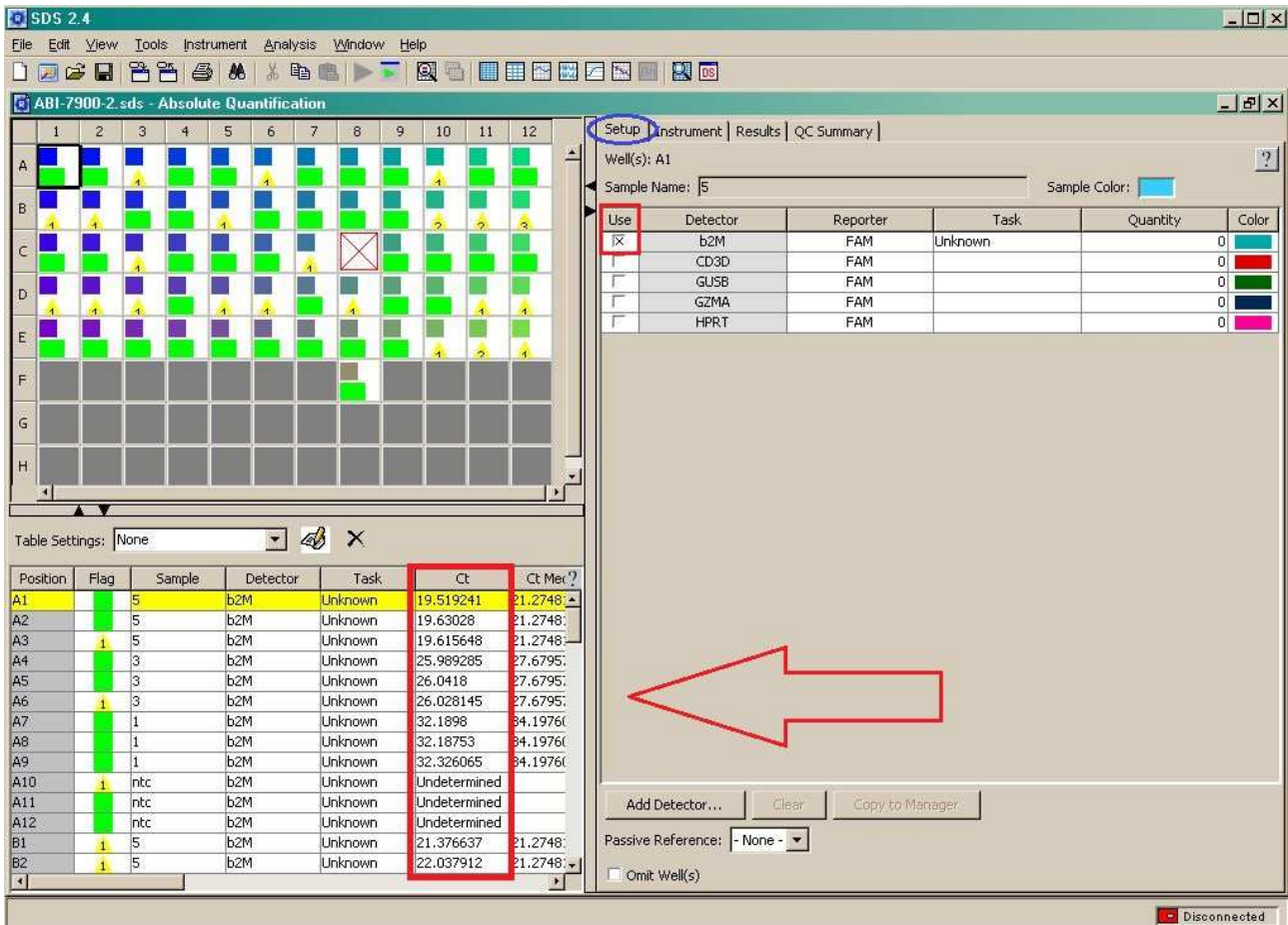
2.1. Zobrazení získaných dat

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 sružených 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 .



The screenshot shows the SDS 2.4 software interface. On the left is a 96-well plate layout with wells A1-H12. Below it is a data table with the following columns: Position, Flag, Sample, Detector, Task, Ct, and Ct Mec. A red box highlights the Ct column. On the right, the 'Setup' tab is active, showing a table with columns: Use, Detector, Reporter, Task, Quantity, and Color. A red box highlights the 'Use' checkbox for the first row (b2M, FAM, Unknown). A red arrow points from this checkbox towards the data table.

Position	Flag	Sample	Detector	Task	Ct	Ct Mec?
A1		5	b2M	Unknown	19.519241	21.2748
A2		5	b2M	Unknown	19.63028	21.2748
A3	1	5	b2M	Unknown	19.615648	21.2748
A4		3	b2M	Unknown	25.989285	27.6795
A5		3	b2M	Unknown	26.0418	27.6795
A6	1	3	b2M	Unknown	26.028145	27.6795
A7		1	b2M	Unknown	32.1898	34.1976
A8		1	b2M	Unknown	32.18753	34.1976
A9		1	b2M	Unknown	32.326065	34.1976
A10	1	ntc	b2M	Unknown	Undetermined	
A11		ntc	b2M	Unknown	Undetermined	
A12		ntc	b2M	Unknown	Undetermined	
B1	1	5	b2M	Unknown	21.376637	21.2748
B2	1	5	b2M	Unknown	22.037912	21.2748

2.1.2. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v tabulce vlevo dole

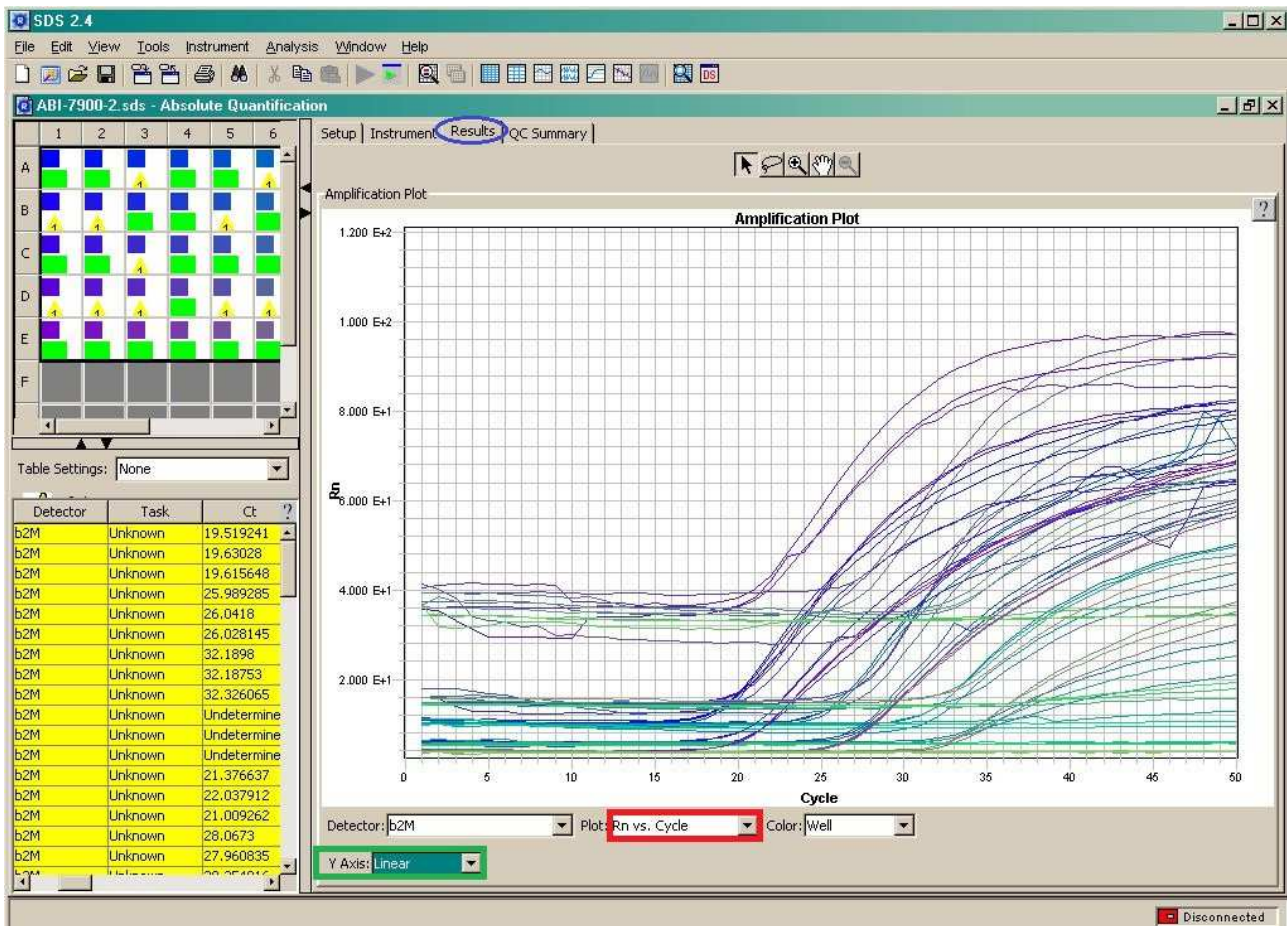
Výsledné hodnoty Ct jsou uvedeny společně s informacemi o jednotlivých vzorcích:

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

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

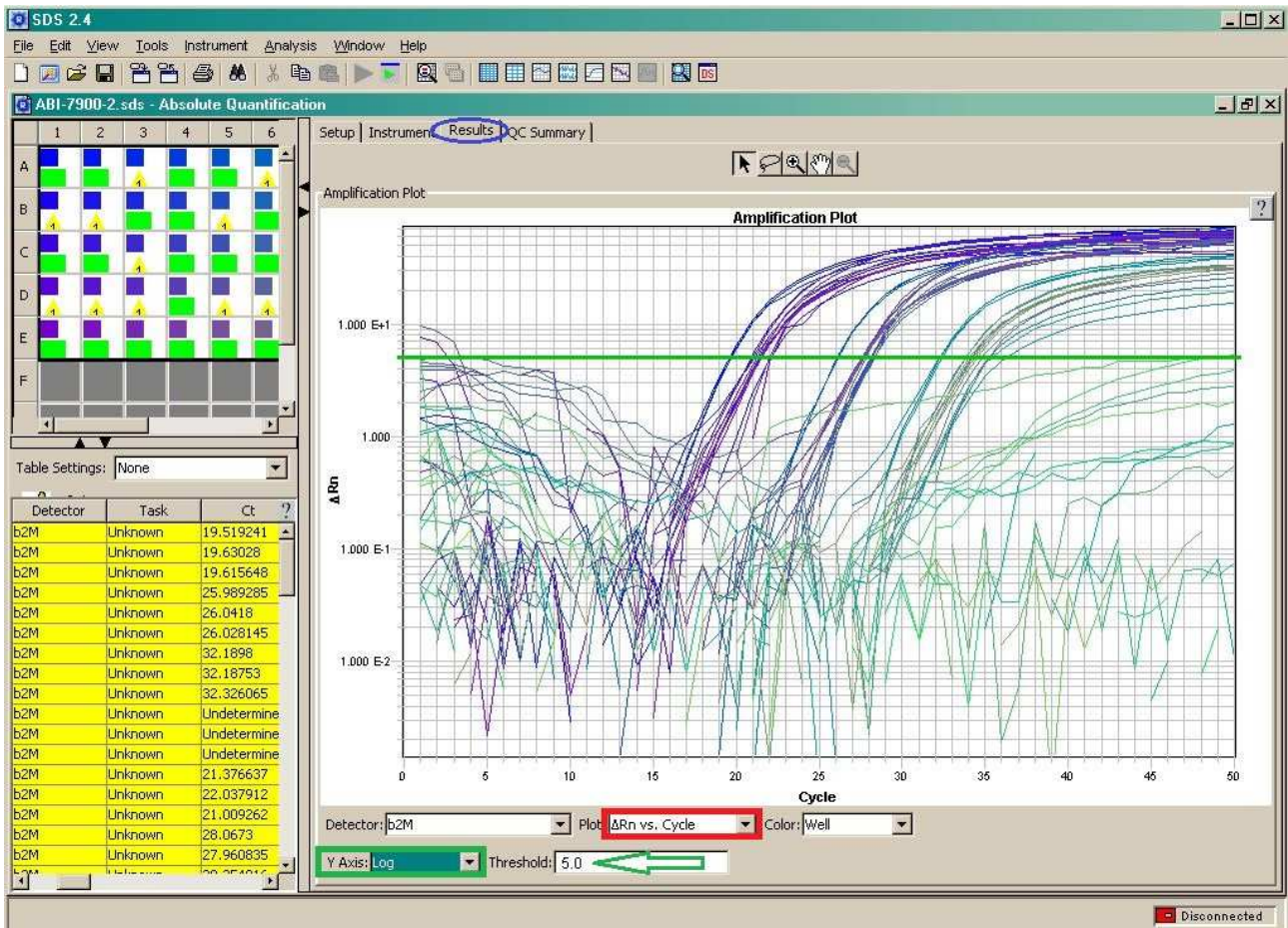
- Rn vs. Cycle (Linear / Log View)

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 C_t (threshold).



- o Ct vs. Well Position

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

