

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, варианты исполнений: Rotor-Gene Q 2plex, Rotor-Gene Q 2plex HRM, Rotor-Gene Q 5plex, Rotor-Gene Q 5plex HRM, Rotor-Gene Q 6plex

ROTOR-GENE Q



РУКОВОДСТВО ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ

- 1.1. Об этой инструкции по эксплуатации

2. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

- 2.1. Система термоциклирования
- 2.2. Оптическая система

3. УСТАНОВКА И ОБСЛУЖИВАНИЕ

- 3.1. Технические условия
- 3.2. Распаковка прибора Rotor-Gene Q
- 3.3. Аксессуары
- 3.4. Установка оборудования
- 3.5. Инсталляция программного обеспечения
- 3.6. Версия программного обеспечения
- 3.7. Обновление программного обеспечения

4. ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ – ОБОРУДОВАНИЕ

- 4.1. Тип ротора
- 4.2. Подготовка пробирок с реакционной смесью
- 4.3. Подготовка

5. ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ – ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

- 5.1. Быстрый Мастер
 - 5.1.1. Выбор ротора
 - 5.1.2. Подтверждение температурного профиля
 - 5.1.3. Сохранение данных анализа
 - 5.1.4. Таблица образцов
- 5.2. Детальный мастер старта
 - 5.2.1. Окно 1 Мастера нового теста
 - 5.2.2. Окно 2 Мастера нового теста
 - 5.2.3. Окно 3 Мастера нового теста
 - 5.2.4. Редактирование профиля
 - 5.2.5. Окно 4 Мастера нового теста
 - 5.2.6. Окно 5 Мастера нового теста

6. ОБЗОР ОСНОВНЫХ ФУНКЦИЙ

- 6.1. Рабочее пространство
- 6.2. Панель инструментов

- 6.3. Обзор необработанных данных по каналам
- 6.4. Переключение образцов
- 6.5. Меню Файлов
 - 6.5.1. Новый
 - 6.5.2. Опции Открыть файл, сохранить файл
 - 6.5.3. Опция Отчеты
 - 6.5.4. Опция Установки
- 6.6. Меню Анализа данных
 - 6.6.1. Панель инструментов меню Анализ
 - 6.6.2. Количественный анализ
 - 6.6.3. Относительный Количественный Анализ по Двум Графикам Стандартов
 - 6.6.4. Относительный Количественный Анализ методом Дельта-дельта St
 - 6.6.5. Плавление - Анализ кривых плавления
 - 6.6.6. Сравнительный Количественный Анализ
 - 6.6.7. Генотипирование
 - 6.6.8. Анализ Распределения
 - 6.6.9. Анализ по Конечной Точке
 - 6.6.10. Измерение концентрации ДНК
 - 6.6.11. HRM Анализ – Анализ Плавления Высокого Разрешения
- 6.7. Обзор основных функций в Меню
 - 6.7.1. Меню Старт / стоп
 - 6.7.2. Пауза
 - 6.7.3. Стоп
- 6.8. Меню Просмотр
 - 6.8.1. Установки Теста
 - 6.8.2. Температура (Темп.)
 - 6.8.3. Продвижение Профиля
 - 6.8.4. Образцы (Таблица образцов)
 - 6.8.5. Окна
- 6.9. Меню Защита (Безопасность информации)
 - 6.9.1. Конфигурация
 - 6.9.2. Работа многих пользователей с одним компьютером
 - 6.9.3. Сообщения
 - 6.9.4. Подпись файла анализа

- 6.9.5. Блокировка образцов
- 6.9.6. Блокировка Шаблонов
- 6.10. Окна

7. ОБЩИЕ ФУНКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НЕСКОЛЬКИМИ ОКНАМИ

- 7.1. Шаблоны анализа данных
- 7.2. Опция Открыть Второй Анализ
- 7.3. Опции Масштабирования
- 7.4. Экспорт графиков и данных
- 7.5. Символ Гаечный Ключ

8. ОБСЛУЖИВАНИЕ СИСТЕМЫ

9. АНАЛИЗ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ (HRM)

- 9.1. Оборудование
- 9.2. Химический анализ
- 9.3. Пример генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов
- 9.4. Пример анализа метилирования
- 9.5. Руководства для проведения успешного анализа HRM
- 9.6. Подготовка образца
- 9.7. Настройка ПО
- 9.8. Анализ данных ПЦР в режиме реального времени
- 9.9. Анализ данных анализа плавления с высоким разрешением (HRM)

Приложение А

Приложение В

Приложение С

Приложение D

1. ВВЕДЕНИЕ

Спасибо что вы выбрали Rotor-Gene Q. Мы убеждены, что он станет неотъемлемой частью вашей лаборатории.

Перед использованием Rotor-Gene Q очень важно чтобы вы внимательно прочитали эту инструкцию по эксплуатации и обратили особое внимание на информацию о технике безопасности. Указания и информация о технике безопасности, изложенные в этой инструкции по эксплуатации, должны обеспечить безопасность проведения всех операционных процессов прибора и будут способствовать поддержанию прибора в безопасных условиях.

1.1. Об этой инструкции по эксплуатации

Эта инструкция по эксплуатации содержит информацию о Rotor-Gene Q, которая разделена на следующие разделы:

1. Информация о технике безопасности
2. Введение
3. Принципы работы системы
4. Установка прибора
5. Технологические процедуры – оборудование
6. Технологические процедуры – программное обеспечение
7. Обзор основных функций
8. Дополнительные функции
9. Правила технического обслуживания
10. Оптическая верификация температуры
11. Анализ Плавления Высокого Разрешения (HRM)
12. Выявление неисправностей

Приложения содержат:

- Технические характеристики
- Математические методы
- Аксессуары Rotor-Gene Q

2. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

Rotor-Gene Q – это термоциклирующая система для проведения высоко – точной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Real-time), ПЦР по конечной точки и анализ плавления высокого разрешения (HRM). Он идеально подходит для исследований по анализу экспрессии генов, генотипированию, индикации инфекционных агентов и многих других областях исследований.

Мощное и удобное, интуитивно понятное пользователю программное обеспечение обеспечивает простоту использования для начинающих пользователей и при этом предоставляет чрезвычайно широкие возможности.



2.1. Система термоциклирования

В приборе Rotor-Gene Q используется сложная система нагрева-охлаждения, обеспечивающая точное выполнение заданного температурного режима и оптимальные условия реакции для эффективной амплификации и детекции. Ротор с образцами постоянно вращается во время анализа со скоростью 400 оборотов в минуту. Такое центрифугирование не создает градиента концентраций, не мешает протеканию реакции, при этом препятствует образованию конденсата на крышках пробирок и устраняет пузырьки воздуха, попавшие в раствор. Образцы нагреваются и охлаждаются в потоке воздуха, создаваемого воздушным вентилятором. Нагревание воздуха обеспечивается с помощью никель-хромового элемента в крышке прибора. Охлаждение реакционной камеры осуществляется путем обдува

воздухом, забираемым снаружи снизу прибора, при этом воздух находившийся до этого в камере выдувается наружу через отверстия в верхней части прибора.

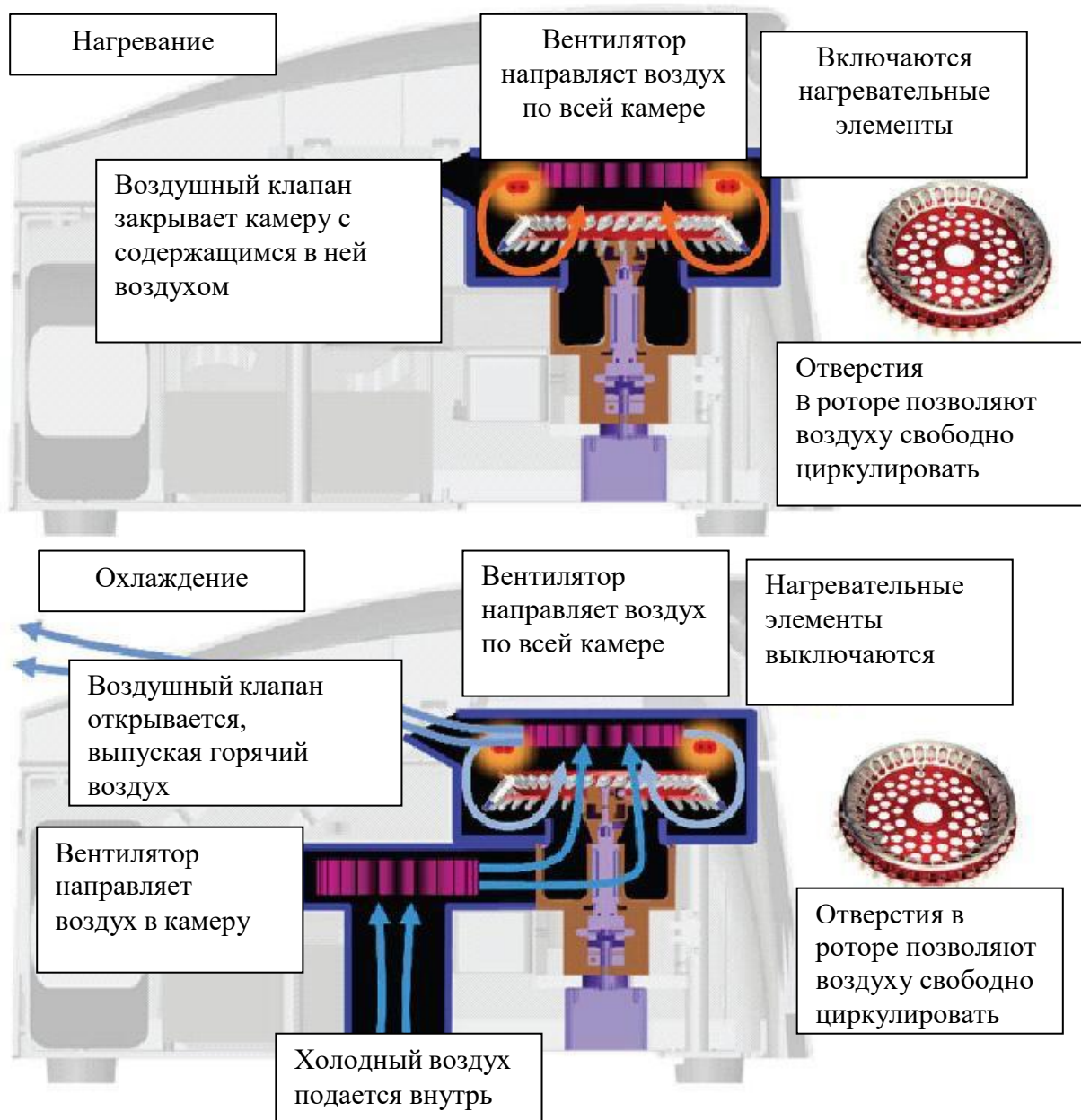


Рисунок. Схема системы нагрева-охлаждения Rotor-Gene Q
После завершения выполнения заданной программы термоциклирования прибор выполнит охлаждение образцов и камеры до безопасной (комнатной) температуры.

2.2. Оптическая система

Наличие выбора до 6 источников возбуждения и 6 детектирующих светофильтров в комбинации с короткой и постоянной длиной оптического пути предоставляют широкие возможности для проведения мультиплексных реакций. Постоянная длина оптического пути при детекции всех образцов обеспечивает максимальную

воспроизводимость и точность детекции флуоресцентного сигнала каждого из образцов. Оптическая система Rotor-Gene Q не требует ни проведения калибровки, ни компенсации искажений при измерении, используемых в других системах.

Когда пробирки с образцами в ходе вращения проходят перед модулем детекции светодиод с высокой энергией снизу освещает образец для возбуждения флуоресценции в реакционной смеси, и фотоэлектронный умножитель, находящийся сбоку, детектирует энергию флуоресцентного излучения, проходящего через соответствующий светофильтр.

Постоянная длина оптического пути в ходе измерения для каждого из анализируемых образцов обеспечивает максимальную точность и воспроизводимость измерения независимо от положения образца в роторе. При этом совершенно не нужно использовать пассивный краситель для нормализации данных, такой как ROX.

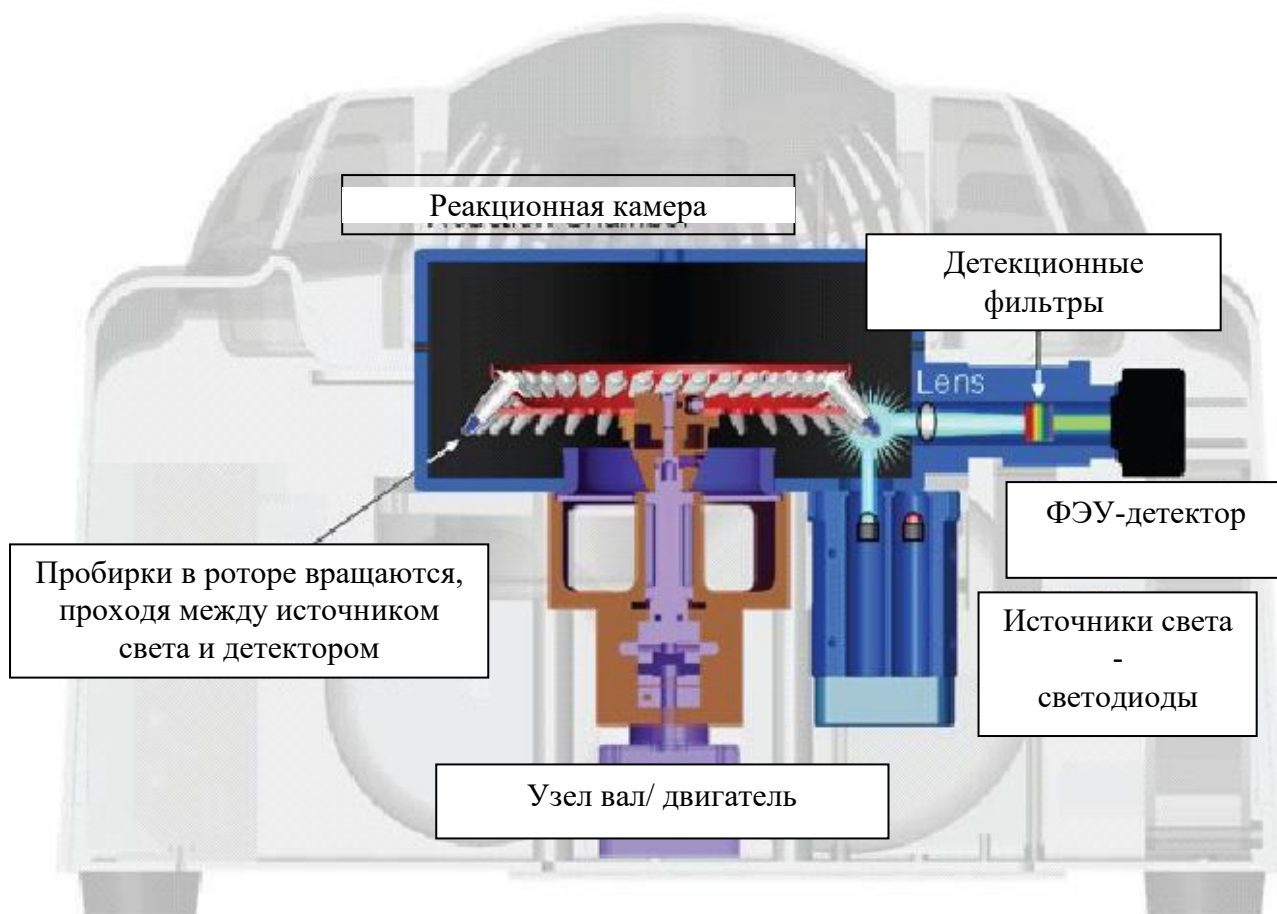


Рисунок. Оптическая система прибора

КАНАЛ	Длины волн света возбуждение/детекция	Примеры детектируемых флуорофоров
Blue (синий)	365±20 nm / 460±20 nm	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X ATTO 390
Green (зеленый)	470±10 nm / 510±5 nm	FAM®, SYBR® Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488

Yellow (желтый)	530±5 nm / 557±5 nm	JOE™, VIC®, HEX, TET™, CAL Fluor®, Gold 540, Yakima Yellow®
Orange (оранжевый)	585±5 nm / 610±5 nm	ROX™, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Red (красный)	625±10 nm / 660±10 nm	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Crimson (темно-красный)	680±5 nm / 712 hp	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Плавление с высоким разрешением	460±20 nm / 510±5 nm	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Замечание: для определения наиболее подходящих комбинаций красителей для мультиплексных реакций, пожалуйста, обратитесь к соответствующим инструкциям к наборам, например инструкция к мультиплексным реакциям, используя Rotor-Gene Multiplex Handbook и инструкция к набору для определения вирусов QuantiTect® Virus Handbook

3. УСТАНОВКА И ОБСЛУЖИВАНИЕ

3.1. Технические условия

Требуемое напряжение
Rotor-Gene Q эксплуатируется при:

Напряжение 100-240 Вольт переменного тока при частоте 50-60 Герц и мощности 520 Вольтампер

Убедитесь, что напряжение, соответствующее эксплуатации Rotor-Gene Q соответствует напряжению в вашей сети. Изменения напряжения электропитания не должны превышать 10% номинального напряжения электросети.

Требование к заземлению

Для защиты технического персонала, QIAGEN рекомендует, чтобы Rotor-Gene Q был правильно заземлен. Прибор снабжен специальным сетевым шнуром, который при соединении к соответствующей розетки питания заземляет прибор. Для сохранения этих защитных свойств не эксплуатируйте прибор без розетки питания с заземлением.

Ноутбук, поставляемый с Rotor-Gene Q, полностью соответствует для установки программного обеспечения для Rotor-Gene Q и детально описан в следующей таблице.

Описание	Минимальные требования
Операционная система	Microsoft® Windows® XP
Процессор	Pentium® IV или выше, частота 2 ГГц
Оперативная память	512 Мегабайт RAM

Пространство на жестком диске	10 Гигабайт HDD
-------------------------------	-----------------

3.2. Распаковка прибора Rotor-Gene Q

Rotor-Gene Q поставляется со всеми необходимыми компонентами для установки и начала работы с прибором. Коробка также содержит список всех аксессуаров, поставляемых с прибором. Используйте этот список, чтобы убедиться, что все элементы присутствуют.

Коробка с принадлежностями к прибору находится сверху прокладки из пенопласта. Коробка с принадлежностями содержит:

Инсталляционный диск

96-ти луночный алюминиевый штатив (для пробирок 0,2 мл)

72-ти луночный алюминиевый штатив (для пробирок 0,1 мл)

Держатель ротора (снимается для безопасной транспортировки)

36-ти луночный ротор (роток окрашен в красный цвет)

Фиксирующее кольцо для 36-ти луночного ротора

Следующие аксессуары располагаются с двух сторон прокладки из пенопласта.

RS-232 серийный кабель

Международный кабель питания

0.2 мл ПЦР-пробирки (в коробке по 1000 шт)

0.1 мл стрипованные ПЦР-пробирки и крышки (в коробке по 1000 шт)

Как только Вы извлечете все эти элементы и проверите их, снимите защитный кожух, расположенный сверху Rotor-Gene Q. Аккуратно извлеките прибор Rotor-Gene Q из коробки и освободите от полиэтиленовой упаковки.

Откройте крышку, двигая ее назад. Внутри Вы найдете 72-х луночный ротор с фиксирующим кольцом.

Теперь, когда Вы успешно распаковали Rotor-Gene Q, можно приступить к инсталляции

Примечание: Для связи Rotor-Gene Q с компьютером используйте только те USB шнур и серийный кабель, которые поставляются вместе с приборами. Не используйте других кабелей.

3.3. Аксессуары

Роторы для прибора и прочие аксессуары могут быть отдельно заказаны для использования вместе с Rotor-Gene. Для получения большей информации, смотрите приложение С.

3.4. Установка оборудования

Сразу после распаковки Rotor-Gene Q осуществите установку, как указано ниже:

1. Установите Rotor-Gene Q на ровную поверхность
2. Убедитесь, что достаточно свободного места сзади прибора для того, чтобы полностью открыть его крышку
3. Убедитесь, что Вы без затруднений можете достать до выключателя питания на задней стенке

4. Не загромождайте прибор сзади. Убедитесь, что имеется доступ для выключения шнура питания из розетки при необходимости.
5. Прежде чем включить Rotor-Gene Q проверьте переключатель напряжения на задней панели прибора. Он устанавливается дистрибьютором для определенных регионов. Убедитесь, что его установка соответствует напряжению в вашей сети – 220 V. Если установка переключателя не соответствует используемому напряжению, обратитесь к специалисту службы технической поддержки.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ 	Электрическая опасность [w10] Выбранный вольтаж может быть изменен только вашим дистрибьютором или авторизованным персоналом. Пользователям не следует заниматься изменением уровня напряжения. Подобные действия могут лишить вас гарантии.
--	---

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ 	Электрическая опасность [w11] Не изменяйте уровень напряжения прибора во время его работы, это может стать причиной повреждения прибора или возникновения короткого замыкания.
---	---

6. Присоедините прилагаемый USB-кабель или RS-232 кабель к USB порту или COM-порту на задней панели компьютера.
7. Подключите USB-кабель или RS-232 кабель к Rotor-Gene Q сзади.
8. После этого подключите Rotor-Gene Q к источнику питания. Подсоедините конец АС шнура питания к разъему расположенному на задней панели Rotor-Gene Q и другой конец к розетке питания.



3.5. Установка программного обеспечения

1. Чтобы установить программное обеспечение вставьте компакт-диск с программой Rotor-Gene Q в дисковод Вашего компьютера
2. Выберите опцию установки программы Install Rotor-Gene Software. Следуйте всем появляющимся инструкциям по установке



3. После того, как программное обеспечение установлено на компьютер, присоединенный к Rotor-Gene Q, включите прибор переключателем включения, находящимся справа на задней стенке корпуса прибора. Появится голубая подсветка светового индикатора STANDBY, что означает, что прибор готов к работе



4. Дважды щелкните по значку программы Rotor-Gene Q на рабочем столе, чтобы запустить работу программы, появится вводный экран с приветствием Добро пожаловать. Это окно появляется только один раз после установки программы. Нужно внести в соответствующие поля информацию о серийном номере прибора и о том, через какой порт он подключен к компьютеру



Серийный номер прибора: введите серийный номер прибора (шесть цифр), указанный на задней панели его корпуса.

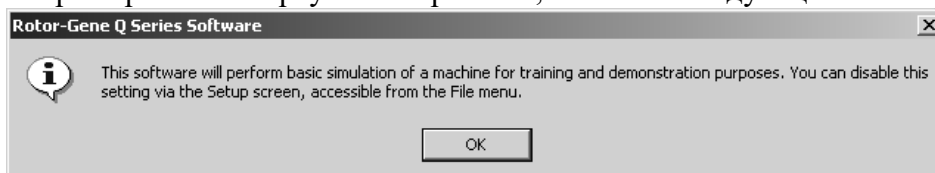
Порт: Выберите, какой порт используется: USB или последовательный COM. Если Вы не знаете, какой COM-порт используется, выберите кнопку автодетекция “Auto-Detect”

Работа программы в виртуальном режиме (для демонстрации).

Если Вы хотите установить демонстрационную версию программного обеспечения на компьютер, к которому не подключен прибор Rotor-Gene, оставьте эту опцию помеченной при запуске. Программа будет полностью функционально активна и может даже показывать в виртуальном режиме эмулированный анализ в режиме реального времени.

Примечание: Если этот квадратик выделен, а Rotor-Gene Q подключен к компьютеру, перед запуском прибора появится следующее сообщение: “Вы собираетесь работать в виртуальном режиме”. Для перехода в реальный запуск должны быть изменены установки в меню ”Setup” (см. раздел 7.5.4)

Начало: После внесения всей информации, нажмите кнопку “Begin”. Подождите окончания инициализации, которая может занять несколько секунд. Если была выбрана работа в виртуальном режиме, появится следующее окно:



Если квадратик “Работа программы в виртуальном режиме” не идентифицирована, программное обеспечение инициализирует это автоматически

Выход из программы: нажатие этой кнопки приведет к выходу из программы.

3.6. Версия программного обеспечения

Усовершенствование программного обеспечения для Rotor-Gene происходит постоянно.

Чтобы узнать номер Вашей версии, щелкните Спр. (Справка), а затем О программе...



Появившаяся картинка на экране представляет общие сведения о программном обеспечении и включает номер версии программного обеспечения и серийный номер прибора.

3.7. Обновление программного обеспечения

Обновление программы пользователь может получить на веб-сайте компании QIAGEN: www.qiagen.com/Rotor-Gene, который можно взять из меню Help программы Rotor-Gene. Для скачивания программного обеспечения необходимо зарегистрироваться на сайте. По вопросам обновления свяжитесь с сервисным центром компании “ИнтерЛабСервис”.

4. ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ – ОБОРУДОВАНИЕ

Этот раздел описывает эксплуатацию Rotor-Gene Q

4.1. Тип ротора

Типы роторов

Вначале, определитесь с типом пробирок и роторов. На данный момент доступны для использования 4 типа роторов, каждому из которых соответствует свой тип используемых с ним пробирок.

Ротор 36-луночный

36-луночный ротор окрашен в красный цвет. Этот ротор со своим фиксирующим кольцом предназначен для работы со стандартными пробирками объемом 0,2 мл, которые используются в большинстве случаев. Используют обычные пробирки с плоской крышкой. Поскольку детекция в системе Rotor-Gene Q проводится через стенки пробирки в ее нижней части, не требуется использовать специальные пробирки с оптически прозрачной крышкой. Допускается также использовать пробирки с выпуклой крышкой.

ВАЖНО: Используйте идентичные пробирки при запуске. Не смешивайте разные типы пробирок и пробирки производства разных производителей, т.к. это приведет к появлению оптической неоднородности. Мы рекомендуем использовать пробирки производства компании QIAGEN, которые специально разработаны для использования с Rotor-Gene Q. Пробирки других производителей могут автофлуоресцировать, что может привести к стабильности результатов. Также, пробирки от прочих производителей могут быть различной длины и толщины, что приведет к отклонению оптического пути Rotor-Gene Q и несовпадению реакций в пробирке.



72-луночный ротор

72-луночный ротор голубого цвета. 72-луночный ротор и его фиксирующее кольцо предназначены для работы со специальными пробирками и крышками объемом 0,1 мл, которые могут быть использованы для таких маленьких объемов как 10 мкл. Крышки обеспечивают безопасное и надежное закрывание пробирок



Ротор для Gene Disc 72-луночный

72-луночный ротор для Gene Disc темно серого цвета. Ротор для Gene Disc 72-луночный и его фиксирующее кольцо позволяют использовать Gene Disc 72, содержащий 72 пробирки объединенные в одну структуру, для высокопроизводительного формата анализа. Для закрывания пробирок в Gene Disc 72 используются не крышки, а наклеиваемая при нагревании прозрачная полимерная пленка. Преимущество пленки состоит в том, что она предотвращает контаминацию, обеспечивая прочное длительное заклеивание. Для дополнительной информации о 72-луночный ротор для Gene Disc, см. Раздел 5.3



Ротор для Gene Disc 100-луночный

100-луночный ротор для Gene Disc золотого цвета. 100-луночный ротор для Gene Disc содержит 100 лунок, объединенных в одну структуру, для высокопроизводительного формата анализа. 100-луночный ротор для Gene Disc это роторный эквивалент 96 – луночных планшет, но с добавлением 4 референсных лунок. Это позволяет интегрировать Rotor-Gene Q с 96 – луночным рабочим потоком лаборатории. Дополнительные лунки могут быть удобно использованы для исследования большего количества образцов, дополнительных контролей реакции, без необходимости занимать какие-либо позиции из стандартных 96 лунок. Для полной совместимости с 96 – луночным потоком, 100-луночный ротор использует обозначения характерные для 96 луночных плашек, например от A1- A12 до H1 до H12. Дополнительные 4 референсные пробирки маркируются от R1 до R4. Для дополнительной информации 100-луночный ротор для Gene Disc, см. Раздел 5.3



Тип ротора	Вместимость пробирок	Число образцов	Тип пробирок	Диапазон объемов реакционной смеси
36-луночный	200 мкл	36	0.2 мл пробирки для ПЦР	20 – 50 мкл
72-луночный	100 мкл	72	0.1 мл стрипованные пробирки и их крышки	10 – 50 мкл
Gene-Disc 72	100 мкл	72	0.1 мл Gene-Disc 72	20 – 25 мкл
Gene-Disc 100	30 мкл	100	0.03мл Gene-Disc 100	15 - 25 мкл

Примечание:

Роторы, предназначенные для прибора Rotor-Gene Q не могут быть использованы с прежде выпускаемыми моделями Rotor-Gene 3000, вследствие оптической несовместимости. Для модели Rotor-Gene 3000 используйте, пожалуйста, роторы из его комплектации.

Примечание:

Для стрипованных пробирок объемом 0,1 мл, для объемов меньше чем 5 мкл может быть использован силикон для ПЦР производства компании QIAGEN Vapor-Lock PCR.

4.2. Подготовка пробирок с реакционной смесью

ВАЖНО: Адекватные контроли следует использовать при каждом запуске для уверенности в верности результатов.

Подготовку пробирок с реакционной смесью можно проводить, используя специальные штативы: 96-луночный штатив для пробирок объемом 0.2 мл, 72-луночный штатив для пробирок объемом 0.1 мл, или загрузочные блоки для планшет роторного типа для Gene Disc 72 и Gene Disc 100. Все штативы сделаны из алюминия и могут быть предварительно охлаждены.

В 72-луночный штативе есть также лунки, позволяющие разместить до 18 пробирок объемом 0.5 мл, которые можно использовать для приготовления мастер-микс, а также 16 пробирок объемом 0.2 мл.

1. Поставьте пробирки в лунки штатива и внесите нужные компоненты реакционной смеси.



2. Плотнo закройте крышки пробирок и визуальнo проверьте, что все они хорошо закрыты



3. Вставьте стрипованные пробирки в 72 – луночный ротор и убедитесь, что все пробирки находятся в правильном положении в роторе. Если пробирки не до конца входят в ячейки ротора, они будут плохо детектироваться, это приводит к снижению сигнала и чувствительности анализа. Можно воспользоваться специальной подставкой для ротора, чтобы было удобно помещать в него пробирки.



ВАЖНО: Чтобы достичь максимальной точности температурного режима, заполните все ячейки ротора пробирками, не используемые для анализируемых образцов ячейки заполните пустыми пробирками. Для этого следует иметь некоторое количество пустых пробирок.

4. Наденьте 72 – луночное фиксирующее кольцо на ротор для 72 пробирок, пропустив три пина фиксирующего кольца во внутренние отверстия ротора. Фиксирующее кольцо будет удерживать пробирки в правильном положении во время работы прибора.

5. Вставьте ротор с реакционными пробирками в камеру прибора Rotor-Gene Q, совместив отверстие для фиксации в роторе с фиксирующим пином на штифте и надавив слегка на ротор. Чтобы снять ротор с оси слегка надавите на фиксатор сверху, чтобы он освободил ротор, и потяните ротор вверх.

После того как ротор с фиксирующим кольцом закреплены в камере, закройте крышку прибора и запустите выполнение анализа в программе Rotor-Gene.

4.3. Подготовка

72 – луночные или 100 – луночные планшеты роторного типа содержит 72 (100) пробирки, объединенные в одно целое и могут использоваться для повышения пропускной способности методики при достаточно большом количестве анализируемых образцов. Для него не используются крышки, а используется специальная полимерная пленка для термогерметизации. Ее накладывают сверху и запечатывают (заклеивают) с помощью нагревания. Преимущество пленки – в том, что она обеспечивает прочное, длительное запечатывание пробирок, предотвращая возможность контаминации. Запечатывание пробирок осуществляется так как указано ниже:

ВАЖНО: Пожалуйста, прочитайте карту технологического процесса термозапаивателя для планшет роторного типа перед началом процедуры:

1. Включите термозапаиватель для планшет роторного типа выключателем слева сзади. Загорится красный индикатор Power сверху на аппарате. Необходимо дать аппарату прогреться в течение примерно 10 минут после включения, чтобы он достиг нужной температуры, после чего загорится зеленый индикатор Ready.

Примечание: как только термозапаиватель для планшет роторного типа готов к работе, безопаснее не оставлять его без присмотра.

2. Поместите планшет роторного типа в загрузочный блок для планшет роторного типа используя маркированные отверстия в загрузочном блоке для планшет.

3. Используя специальный штатив для планшет роторного типа можно подготовить реакционные смеси либо вручную, либо используя автоматическую систему QIAgility.

4. Достаньте один лист запечатающей пленки и снимите с нее центральную часть, слегка изогнув пленку в середине, выпятив центральную часть, и аккуратно оторвав ее.

5. Надпись SIDE UP (Верхняя сторона) обеспечивает правильную ориентацию пленки для ее заклеивания. Проверьте, что эта надпись читается правильно внизу штатива, над рядом лунок для реактивов. Отверстие в центре пленки вместит выступающий цилиндр центральной части штатива и пленка ляжет сверху на планшет роторного типа.

6. Поместите внутрь планшет с пленкой в штативе, используя направляющие по бокам штатива. Убедитесь, что штатив полностью помещен внутрь.

7. Высвободите черный фиксатор на крышке аппарата, чтобы опустить заклеивающий механизм. Для этого надавите вниз синий анодированный бар в верхней передней части ячейки ладонью и надавите на черный фиксатор.

8. Когда механизм опустится, появится оранжевый индикатор Sealing сверху. Если загрузочный блок для планшет роторного типа находится в неправильной позиции, прозвучит предупреждающий сигнал.

9. Когда процесс завершится, появится оранжевый индикатор Sealing сверху. После того, как раздастся звуковой сигнал, надавите на синий анодированный бар, чтобы поднять и зафиксировать заклеивающий механизм в исходном положении. Поднимайте механизм сразу после звукового сигнала, иначе при превышении времени планшет может деформироваться.

10. Вытащите штатив из аппарата для запечатавания. Дайте остыть пленке примерно 10 секунд, затем оторвите лишнюю, выступающую за края диска часть пленки.

11. Выньте планшет роторного типа из штатива. Чтобы поместить планшет в ротор используйте петлю в первой позиции, чтобы найти нужную ориентацию.

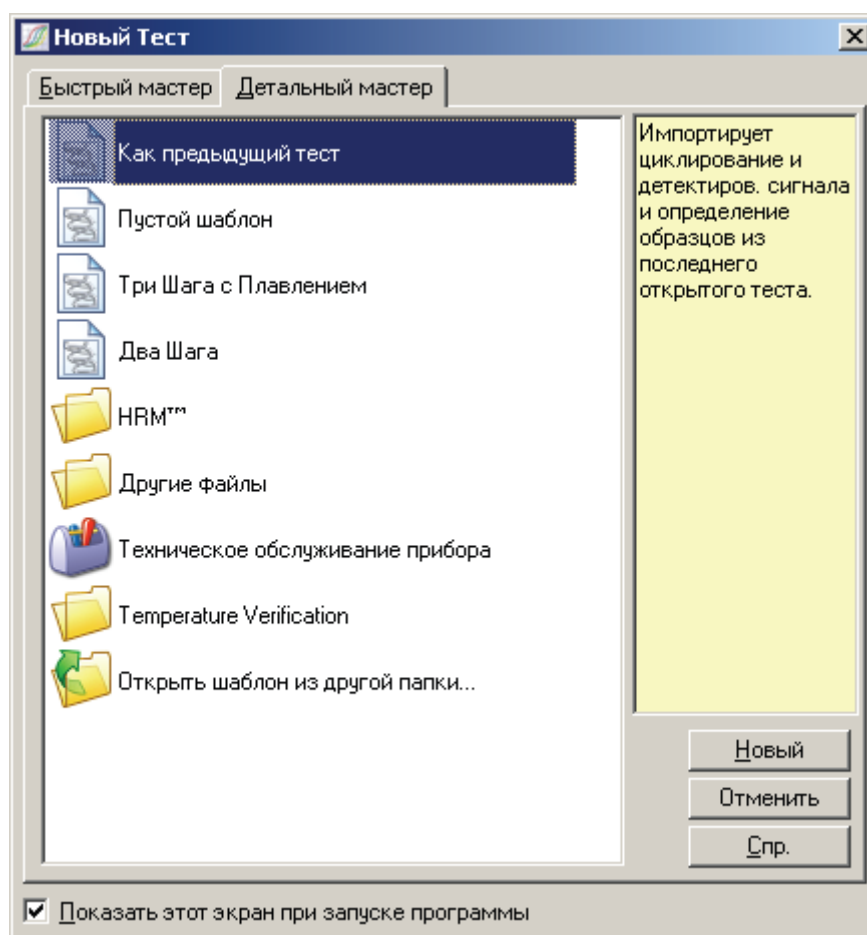
5. ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ – ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Установка параметров и запуск выполнения анализа на приборе RotorGene Q может быть осуществлен при использовании одного из двух видов Мастера Нового Теста: Быстрый Мастер или Детальный Мастер. Быстрый Мастер создан для максимально быстрого запуска нового теста. Детальный Мастер содержит больше опций, таких как оптимизация сигнала и установка уровня фона. Детальный Мастер содержит ряд шаблонов в которых установлены параметры термоциклирования и детектирующие каналы по умолчанию. Вам нужно выбрать подходящий шаблон из списка. Для переключения между видами Мастера используйте кнопки вверху окна Новый Тест.

5.1. Быстрый Мастер

Быстрый Мастер позволяет пользователю запустить тест как можно быстрее. Пользователь может выбрать из набора наиболее часто используемых шаблонов исследований и ввести минимальное количество параметров для старта прибора. Быстрый Мастер подразумевает, что объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Для задания других объемов реакционной смеси используйте Детального Мастера (см. раздел 6.2).

Первым шагом вам необходимо выбрать желаемый шаблон исследования, выбрав его двойным щелчком в окне “Новый запуск”.



Как предыдущий Тест: - используются все параметры - профиль термоциклирования, каналы детекции, обозначение образцов - установленные в последнем из ранее проведенных анализов

Три Шага с плавлением: трехступенчатый профиль термоциклирования с детекцией сигнала на канале Green, с измерением кривой плавления на этом канале.

Два Шага: двухступенчатый профиль термоциклирования с детекцией сигнала на каналах Green, Yellow, Orange и Red

ФРЭТ с гашением (FRET): трехступенчатый профиль термоциклирования с кривой плавления. В отличие от Три Шага с плавлением детекция осуществляется в конце шага отжига.

Измерение концентрации ДНК – это шаблон, используемый для измерения концентрации ДНК с применением интеркалирующего красителя.

HRM™: шаблоны для проведения анализа кривых плавления с высоким разрешением.

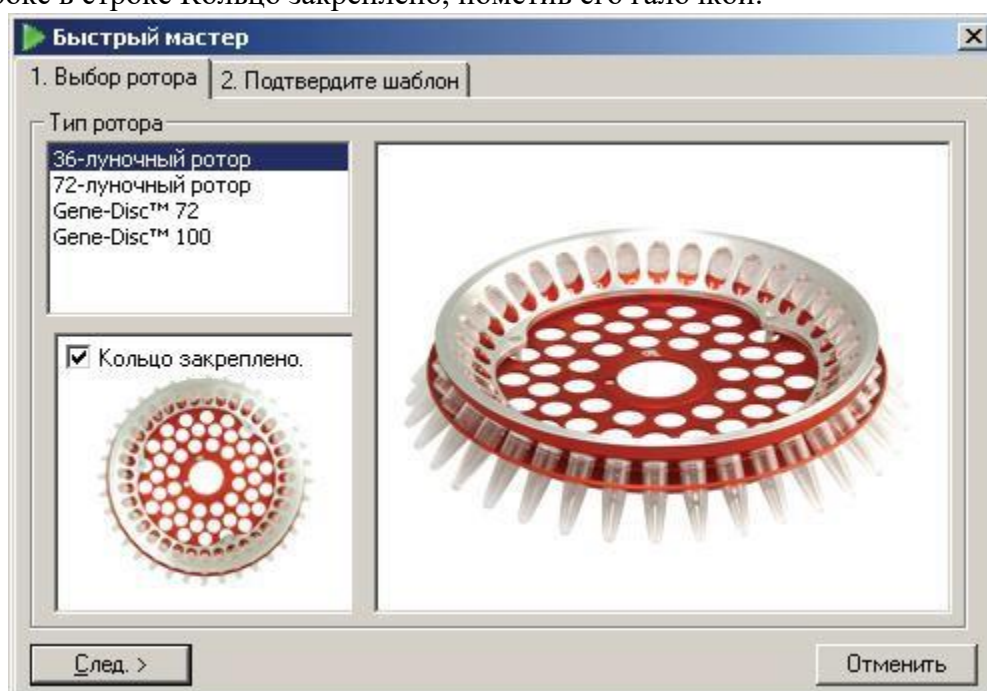
Другие запуски: Эта папка содержит дополнительные профили.

Профили циклирования и детектирования всех шаблонов могут быть изменены используя Мастера.

Примечание: Определенные пользователем шаблоны могут быть добавлены в список шаблонов, используя Быстрого Мастера копируя или сохраняя файлы с расширением .ret в C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates. После копирования файла в эту папку, шаблон будет появляться в виде иконки в списке. Если вы хотите создать иконку для своих шаблонов, создайте изображение в формате .ico с таким же названием, как и файл шаблона. Подпапки могут быть созданы для персональных шаблонов. Это позволяет организовать шаблоны, что могло бы быть удобно, если одним прибором пользуются несколько пользователей.

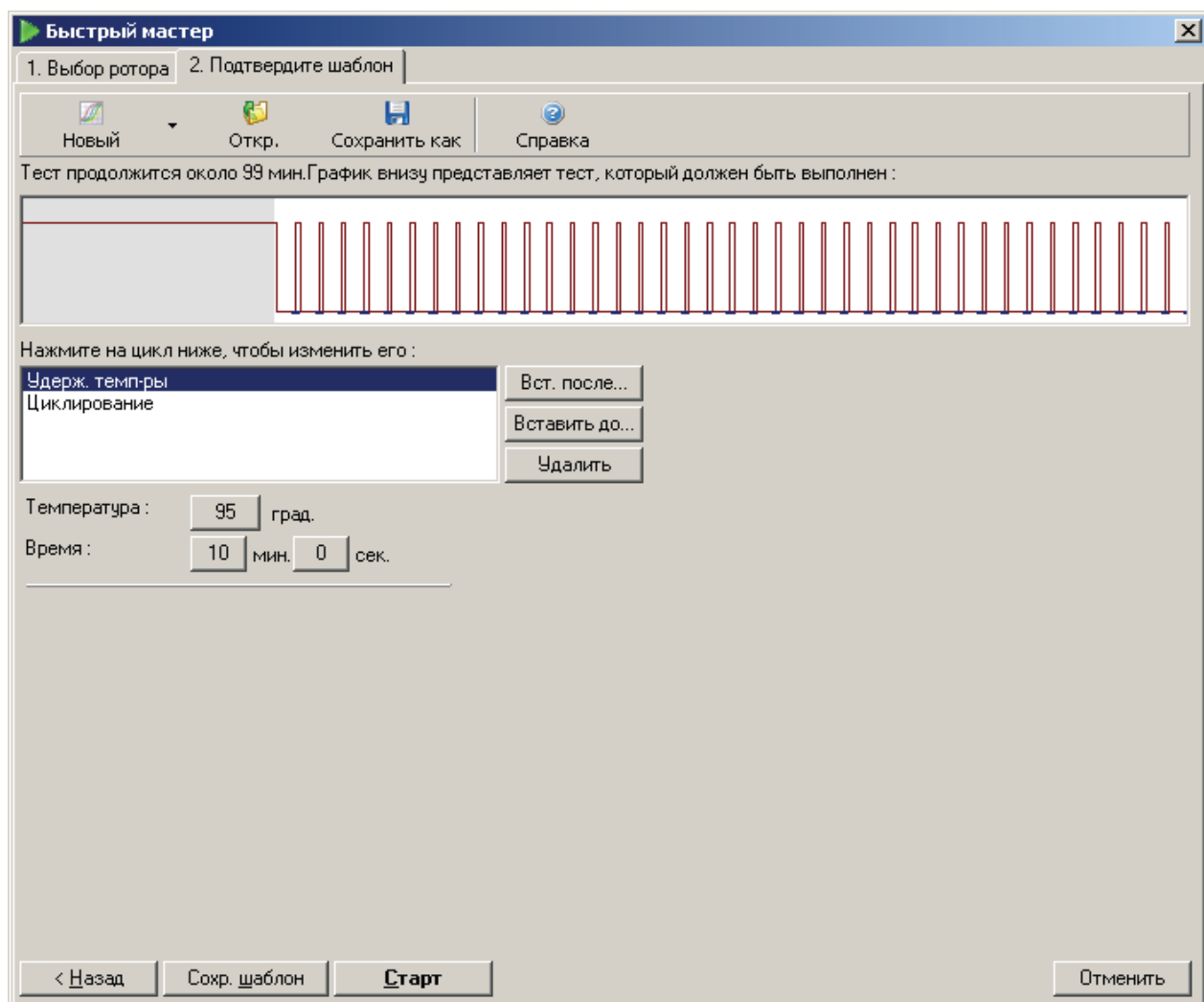
5.1.1. Выбор ротора

В следующем окне выберите нужный тип ротора из списка. Фиксирующее пробирки кольцо должно быть прикреплено к ротору. Кликните бокс в строке Кольцо закреплено, пометив его галочкой.



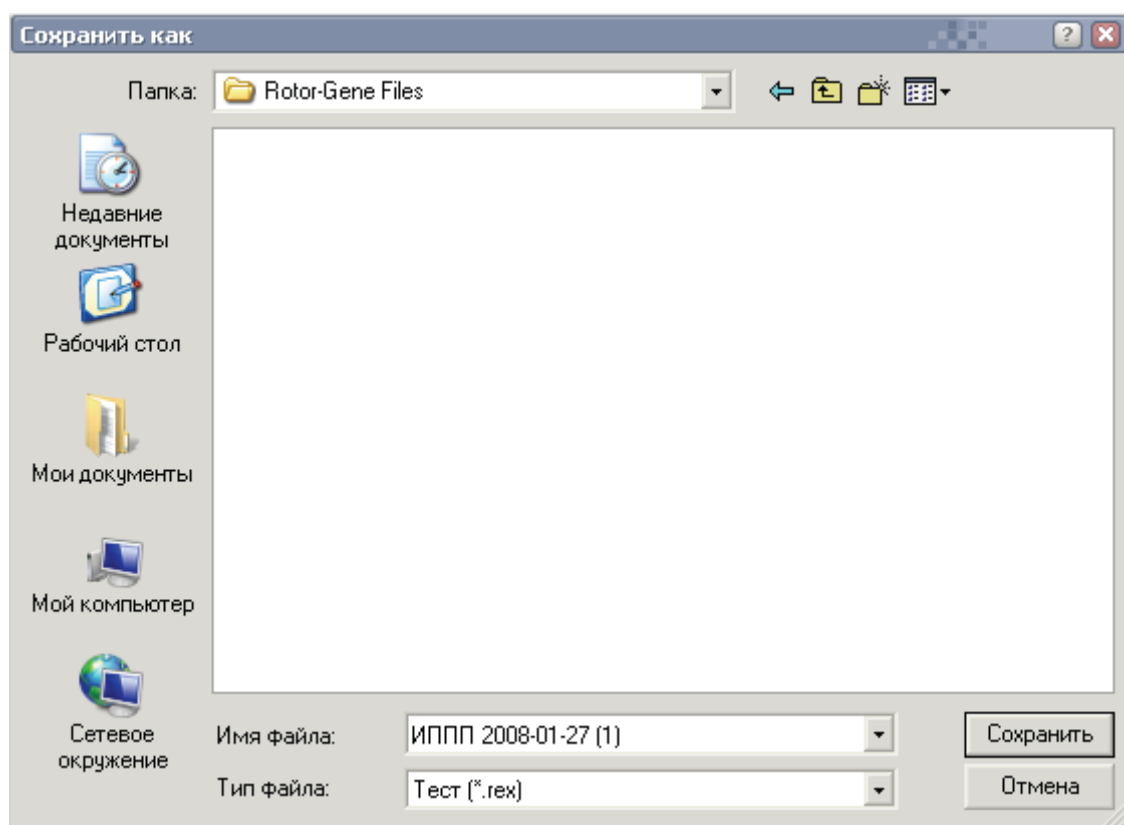
5.1.2. Подтверждение температурного профиля

Выбранный Вами шаблон импортирует параметры термоциклирования и назначенные для детекции каналы. Изменить эти параметры при необходимости можно, используя Редактор Профиля в окне (см. Раздел 6.2.4). Подтвердите шаблон. Подробно редактирование профиля термоциклирования и детекции флуоресцентного сигнала описано в разделе 6.3 Для старта теста, нажмите на кнопку “Старт запуска”. Также возможно сохранять шаблон перед стартом теста нажмите ”Сохранить шаблон”



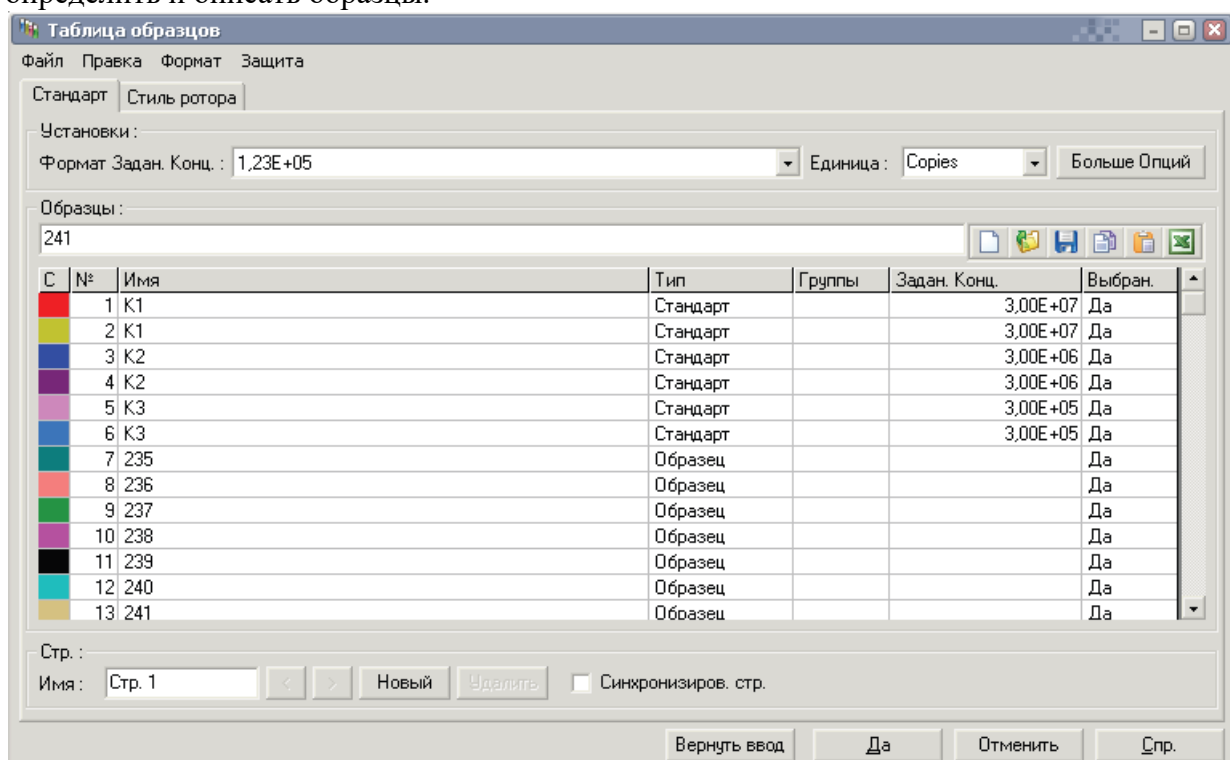
5.1.3. Сохранение данных анализа

После нажатия кнопки Старт, появляется окно “Сохранить как”. Файл с данными анализа может быть сохранен по желанию пользователя в любом выбранном месте. Вы можете использовать название, которое предлагает программа по умолчанию – с указанием даты и используемого шаблона. Порядковый номер исследования проводимого в этот день по данному шаблону также автоматически включается название запуска.



5.1.4. Таблица образцов

После того как тест стартует, окно “Редактирование образцов” позволяет определить и описать образцы.



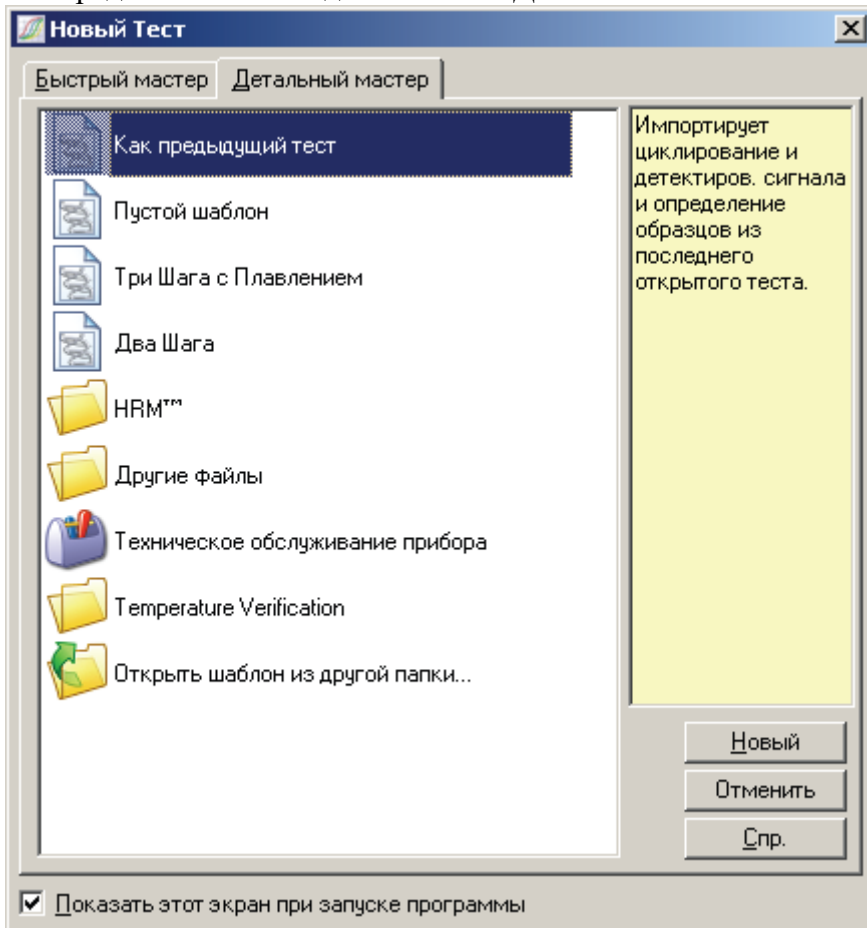
После того как прибор начнет выполнение теста согласно заданной программе, автоматически откроется окно редактирования таблицы образцов. Введите обозначения (идентификаторы) образцов и другую нужную информацию о них в

соответствующие графы таблицы. Подробнее редактирование таблицы образцов описано в разделе 7.8.4. Редактирование таблицы образцов.

5.2. Детальный мастер старта

Детальный Мастер позволяет использовать больше опций, которых нет в Быстром Мастере, таких как оптимизация сигнала.

Для использования Детального Мастера двойным щелчком выберите шаблон, выделив его имя среди шаблонов под названием "Детальный" в окне "Новый запуск".



Опции шаблонов представленные в этом окне сходны с опциями, представленными в окне Быстрого Мастера (Раздел 6.1).

Как предыдущий Тест: - используются все параметры - профиль термоциклирования, каналы детекции, обозначение образцов - установленные в последнем из ранее проведенных анализов

Пустой шаблон: позволяет создать пользователю все параметры шаблона теста «с нуля».

Три Шага с плавлением: трехступенчатый профиль термоциклирования с детекцией сигнала на канале Green, с измерением кривой плавления на этом канале.

Два Шага: двухступенчатый профиль термоциклирования с детекцией сигнала на каналах Green, Yellow, Orange и Red

HRM™: шаблоны для проведения анализа кривых плавления с высоким разрешением.

Другие запуски: Эта папка содержит дополнительные профили.

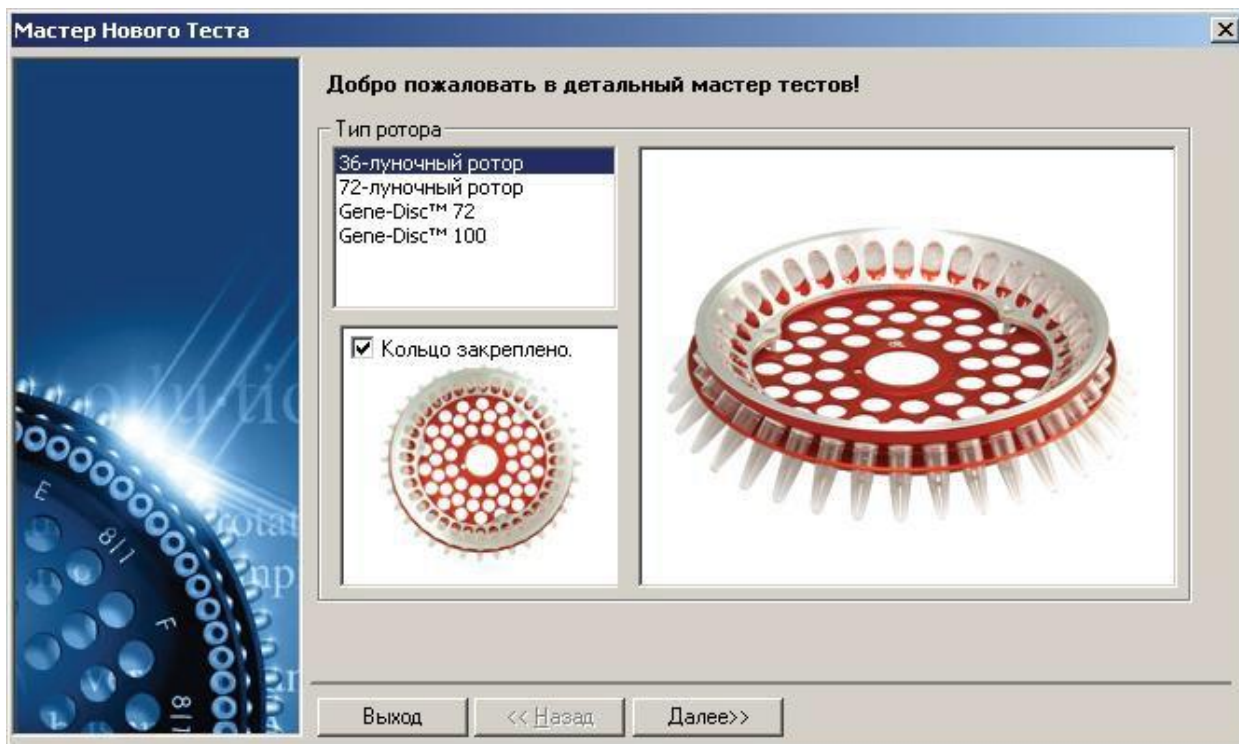
Техническое обслуживание прибора: содержит шаблон OTV™, который используется с оптическим ротором для верификации температуры. Для получения дополнительной информации смотрите раздел 10. Этот шаблон закрыт от изменений для того чтобы быть всегда уверенным в корректности работы этого профиля.

Закрытые шаблоны: Эта папка содержит шаблоны для использования с наборами и тестами производства компании QIAGEN, которые не могут быть изменены пользователем (смотрите раздел 7.9.6).

Примечание: Определенные пользователем шаблоны могут быть добавлены в список шаблонов, копируя или сохраняя файлы с расширением .ret в C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\. После копирования файла в эту папку, шаблон будет появляться в виде иконки в списке.

5.2.1. Окно 1 Мастера нового теста

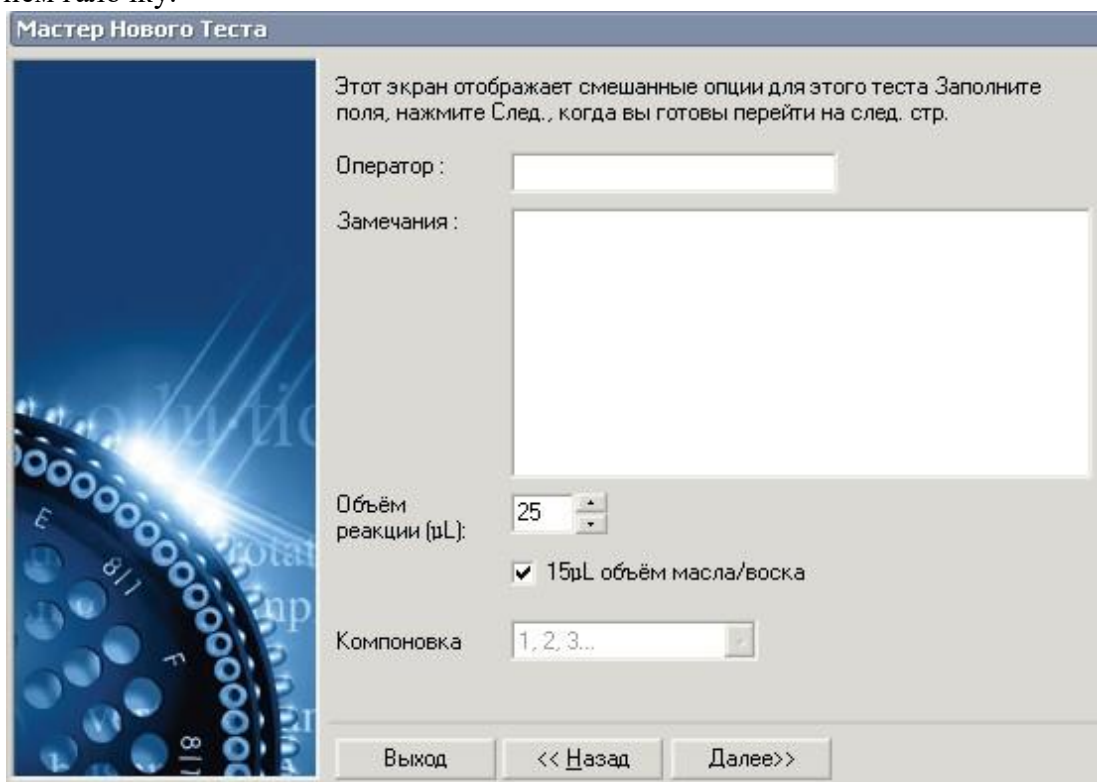
В следующем окне выберите тип используемого ротора из списка. Проверьте, что Вы отметили, что фиксирующее кольцо прикреплено к ротору, поставив галочку в строке “Кольцо закреплено”. Чтобы продолжить, нажмите кнопку Далее >> внизу окна.



5.2.2. Окно 2 Мастера нового теста

В данном окне вы можете обозначить имя пользователя и информацию о выполняемом анализе. Необходимо ввести объем реакционной смеси. Rotor-Gene настроен на объем образцов 20-25 мкл. При использовании больших объемов программное обеспечение рекомендует увеличить длительность «полок» при циклировании.

При вводе объема реакции 25 мкл становится доступной дополнительная опция для регуляции процесса термоциклирования – опция 15 μ L объем масла/воска. Эту опцию необходимо активировать при использовании прослойки воска для разделения компонентов реакционной смеси для обеспечения горячего старта. Для активации опции кликните в бокс в строке 15 μ L объем масла/воска, установив в нем галочку.

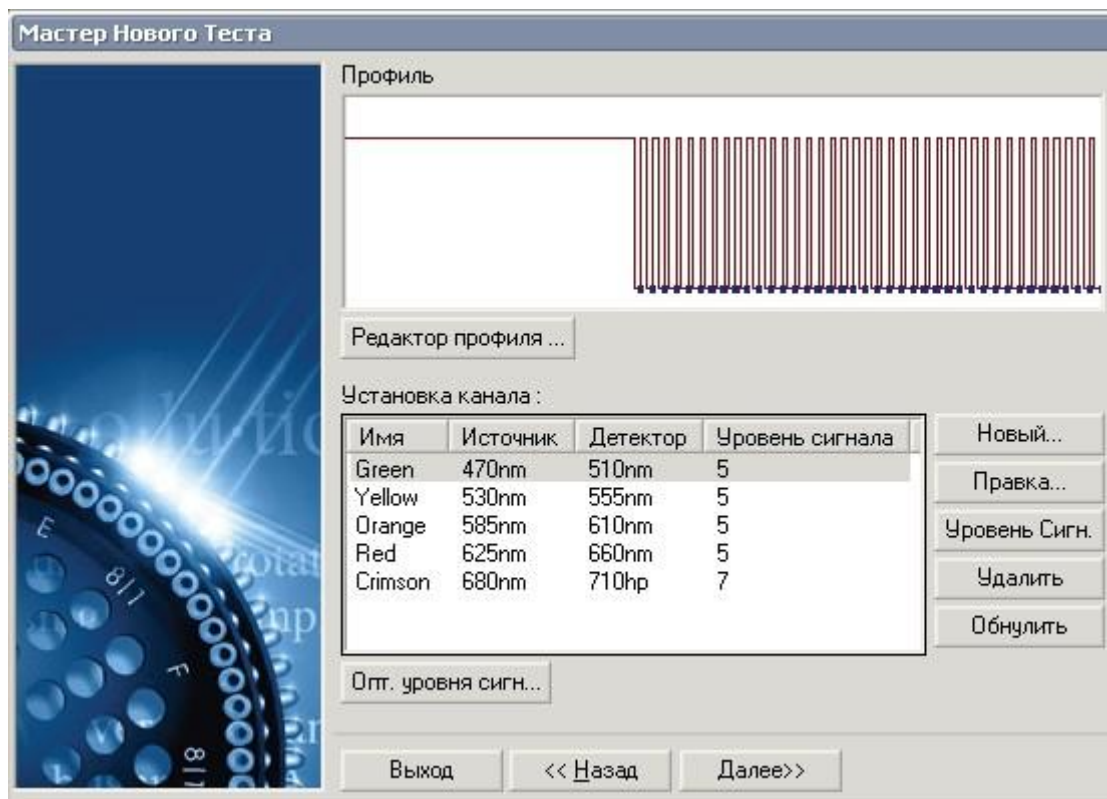


При использовании 72-луночного ротора нужно определить, какой из трех возможных форматов расположения и нумерации образцов Вы используете, в строке Компоновка. По умолчанию предлагается вариант нумерации пробирок цифрами 1, 2, 3... (от 1 до 72). Если есть соответствие образцов в стрипах друг другу (по положению в стрипе при использовании 72-луночного штатива), можно использовать формат нумерации 1A, 1B, 1C. Если последовательные (соответствующие друг другу) образцы находятся в каждой восьмой пробирке (при использовании многоканальной пипетки), можно использовать формат A1, A2, A3

5.2.3. Окно 3 Мастера нового теста

Это окно позволяет вносить изменения в температурный Профиль и установки

уровня сигнала детектируемых каналов. Кликнув кнопку Редактор Профиля... в верхней половине окна, Вы открываете редактор, позволяющий изменить программу термоциклирования и выбрать детектирующие каналы (Раздел 6.2.4). После установления настроек профиля, нажмите “Оптимизация уровня сигнала” и попадете в окно “Оптимизация уровня сигнала” (смотрите страницу 6-24)



5.2.4. Редактирование профиля

Окно “Редактирование профиля” позволяет определить условия термоциклирования и детектируемые каналы. Показанный изначально профиль основан на шаблонах, выбранных при настройке теста (смотрите страницу 6-1). Показ блоков, из которых состоит профиль, представлен ниже в виде графической схемы. Профиль может состоять из следующих блоков: Удержание фиксированной Температуры (смотрите страницу 6-13), циклирование (страница 6 - 14), Плавление (страница 6 -17), а также HRM (Плавление с Высоким Разрешением). Плавление с высоким разрешением доступно, если данный прибор имеет соответствующий специальный канал HRM (смотрите страницу 6-18).

Установки температуры и времени для каждого блока профиля можно редактировать, кликнув по соответствующему сегменту на графической схеме или по его обозначению в списке.

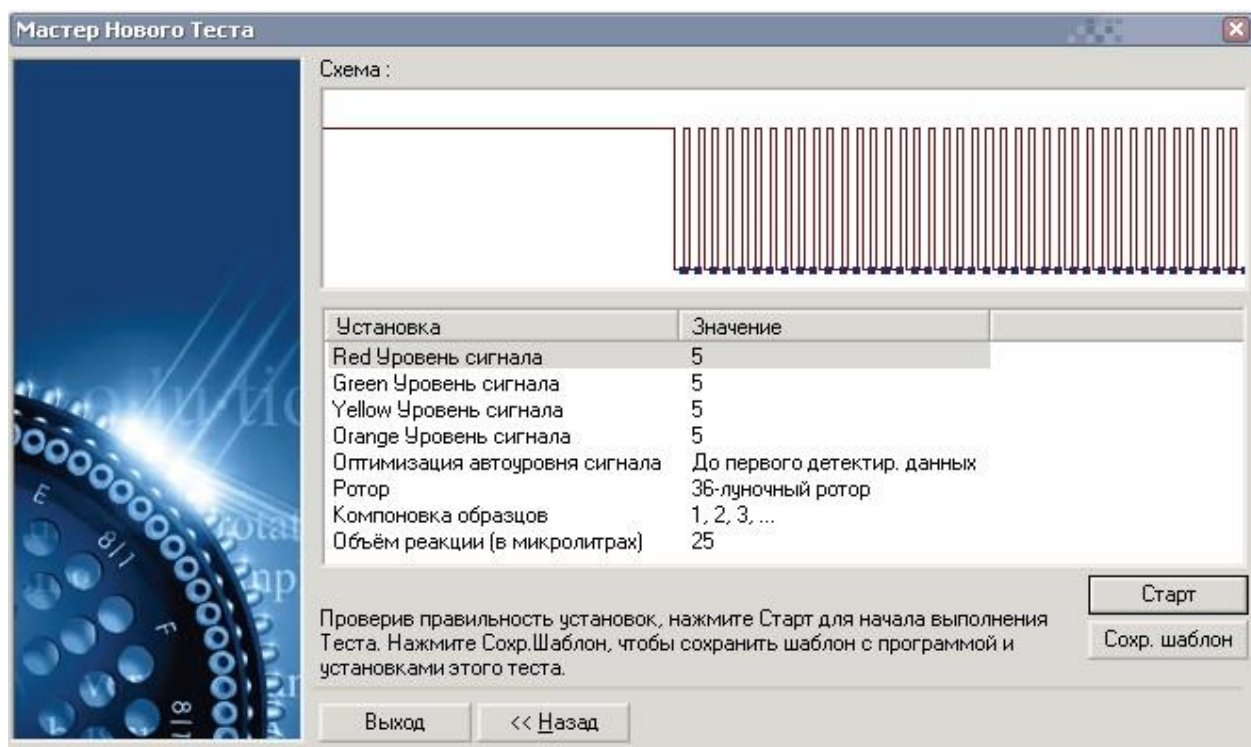
Вставить после: Вставка нового цикла после выбранного цикла

Вставить перед: Вставка нового цикла перед выбранным циклом

Удалить: Удаление выбранного цикла из профиля

Удержание температуры

Удержание дает команду прибору Rotor-Gene Q оставаться при определенной температуре в течение заданного времени. Для изменения температуры, нажмите кнопку "Удержание температуры", появится отдельный экран, в котором вы можете ввести значение в текстовую ячейку или установить его скользящим бегунком. Для изменения времени удержания температуры нажмите в меню "Время удержания" кнопки "минуты" и "секунды".



При использовании опции Оптической денатурации, можно выбрать, какой блок удержания температуры используется для калибровки. По умолчанию для этого назначен первый блок в профиле, но это можно изменить при необходимости.

Подробнее об опции оптической денатурации, смотрите в разделе 6 – 18.

Циклирование

Этот блок предназначен для циклического повторения комбинации заданных пользователем шагов с различной температурой/временем, и проведения измерений в заданных точках. Цикл повторяется заданное количество раз. Число повторов задается в строке "Цикл повторить X раз" над окном с графическим отображением данного блока циклирования.

Блок циклирования, который выделен, отображается графической схемой в нижней половине окна. В цикле может быть несколько шагов, для которых задается своя температура и время удержания. Параметры каждого шага (температуру, время, детекцию флуоресцентного сигнала) можно изменять, выделив его на графической схеме.

Шаги могут быть добавлены или удалены из цикла используя кнопки "+" и "-" в правом верхнем графике.

Мастер Нового Теста

Установки:
 Формат Задан. Конц: 1,23E+05 Единица: Копии Больше Опций

Образцы:

С	№	Имя	Тип	Группы	Задан. Конц.	Вы
1	K1	Стандарт		4,00E+05	Да	
2	K1	Стандарт		4,00E+05	Да	
3	K2	Стандарт		4,00E+04	Да	
4	K2	Стандарт		4,00E+04	Да	
5	K3	Стандарт		4,00E+02	Да	
6	K3	Стандарт		4,00E+02	Да	
7	294	Образец			Да	
8	295	Образец			Да	
9	196	Образец			Да	

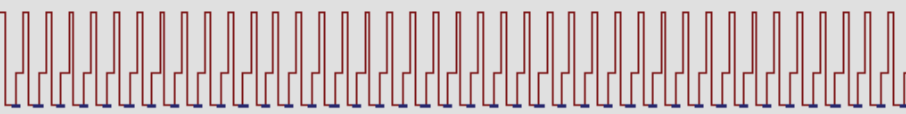
Стр.:
 Имя: Page 1 Новый Удалить ☐ Синхронизиров. стр.

Выход << Назад Закончить Закончить и заблокировать

Редактор Профиля

Новый Откр. Сохранить как Справка

Тест продолжится около 82 мин. График внизу представляет тест, который должен быть выполнен:



Нажмите на цикл ниже, чтобы изменить его:

Удерж. темп-ры Вст. после...
 Циклирование Вставить до...
 Удалить

Цикл повторить 40 раз

Нажмите на шаг внизу для его изменения или нажмите + шаг или - шаг, чтобы добавить или удалить шаги этого цикла.

Обычный шаг - +

- 60 град.
- 20 сек.
- Детек на Циклирование А на Green, Yellow
- ☐ Удлин. Шаг.
- ☐ Снижать темп-ру шага

95 град. на 10 сек.

60 град. на 20 сек.

72 град. на 15 сек.

Удлинение Шага: с помощью этой опции можно задать постепенное увеличение длительности выбранного шага на 1 секунду при каждом следующем повторе цикла

в течение нескольких первых шагов (нужное число задается).

Снижение температуры шага: с помощью этой опции можно задать постепенное снижение температуры данного шага на определенную величину при каждом

следующем повторе цикла в течение нескольких определенных шагов. Это затем отображается на экране.

Детекция флуоресцентного сигнала

Можно назначить детекцию флуоресцентного сигнала по любому каналу на любом шаге (шагах) блока циклирования. Для этого используется кнопка “Не детектировать” (если детекция канала на заданном шаге уже была определена, затем определите канал из представленных в списке)

После нажатия кнопки “Не детектировать”, появится окно “Детекция сигнала”

Детекция сигнала

Такой как пред. : (Новая Детекция)

Детекция :
Все каналы :

Имя
Crimson
Orange
Red
Yellow

Детектировать каналы :

Имя
Green

Чтобы детект. данные на канале выберите его из списка слева и нажмите >. Для того чтобы остановить детект. данных с канала выберите его из списка справа и нажмите <. Чтобы убрать все точки детект данных, нажмите <<.

Выбор фл. >> OK Не детект. Спр.

Таблица выбора каналов для флуорофоров

Канал	Источник	Детектор	Красители
Green	470nm	510nm	FAM [®] , SYBR Green 1 [®] , Fluorescein, EvaGreen [®] , Alexa Fluor 488 [®]
Yellow	530nm	555nm	JOE [®] , VIC [®] , HEX, TET [®] , CAL Fluor Gold 540 [®] , Yakima Yellow [®]
Orange	585nm	610nm	ROX [®] , CAL Fluor Red 610 [®] , Cy3.5 [®] , Texas Red [®] , Alexa Fluor 568 [®]
Red	625nm	660nm	Cy5 [®] , Quasar 670 [®] , Alexa Fluor 633 [®]
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 [®] , Alexa Fluor 680 [®]

Чтобы назначить детекцию по каналу, переместите его название из левого списка в правый список “Детектировать каналы” с помощью кнопки стрелки →(между списками). Чтобы отменить детекцию по каналу, соответственно, из правого списка переместите его в левый с помощью кнопки <<. Чтобы отменить детекцию по всем каналам на данном шаге (очистить список) нажмите кнопку или кнопку “Не детектировать”

Если для детекции назначены более одного блока циклирования, то данные, полученные в последующем блоке, могут быть соединены с данными, полученными в предыдущем блоке циклирования. Для этого можно воспользоваться опцией “Как предыдущий” (вверху окна) с ниспадающим списком других блоков циклирования в профиле.

Таблица выбора каналов для флуорофоров в этом окне помогает пользователю правильно выбрать канал, который нужно использовать для детекции сигнала определенного флуорофора. В этой таблице представлены флуорофоры, широко

применяемые пользователями, но этот список отнюдь не исчерпывает все флуорофоры, которые можно детектировать при использовании Rotor-Gene Q.

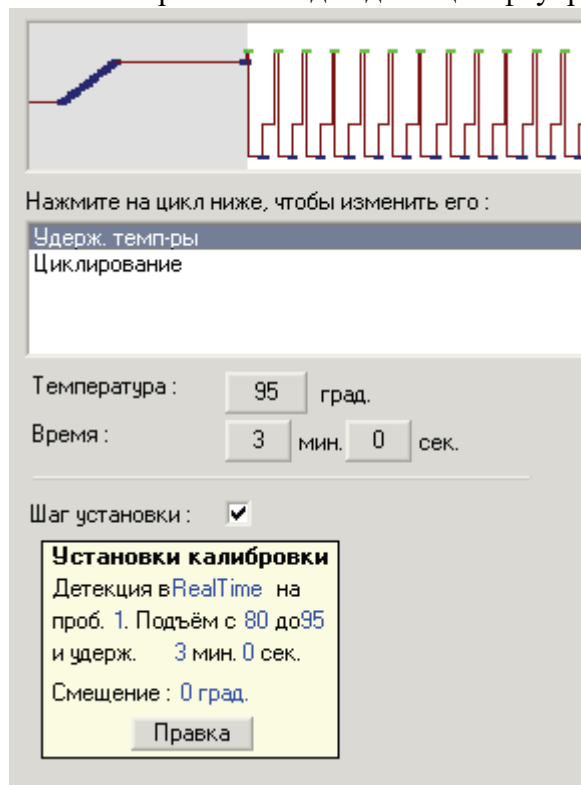
Описанные здесь опции для детекции применяются аналогичным образом и для блока «Плавление», за исключением возможности добавлять информацию о детекции, используя меню «Как предыдущий».

Плавление и гибридизация

Плавление – это снижение температуры между двумя точками, от более низкой к более высокой температуре. Допустимая температура находится в диапазоне между 35 - 99°C.

Для цикла плавления определите начальную температуру, окончательную температуру, время ожидания до первой точки измерения, время удерживания в каждой точке, и с каким увеличением температуры в каждом шаге будет произведен постепенный переход между двумя температурами.

Если стартовая температура выше, чем конечная имя шага называется «Гибридизация». Назначение опции «Детекция на» установленное здесь для Melt A на канале может быть изменено после щелчка по этой кнопке. Появится тот же экран, что и при установке параметров детекции для блока циклирования, где можно выбрать канал для детекции флуоресценции.



Стандартно при измерении кривой плавления используется повышение температуры приростами в 1° и с удерживанием на каждом шаге по 5 сек. С помощью Rotor-Gene Q можно проводить плавление с минимальным шагом температуры 0.02. При этом минимальное необходимое время удерживания на каждой температуре зависит от того, какой шаг увеличения температуры используется.

HRM - Плавление с высоким разрешением (High Resolution Melt)

Плавление с высоким разрешением (HRM) процедура в принципе аналогичная процедуре Плавление, и аналогичным образом редактируется температурный

профиль для нее. Плавление с высоким разрешением предоставляет значительно больше информации для разнообразных исследований. Образцы могут быть исследованы для определения нуклеотидной последовательности, длину, содержание ГЦ, комплементарность цепей и единичные изменения в нуклеотидной последовательности.

HRM анализ может быть выполнен только на приборе с специальным каналом для HRM и специальным программным обеспечением. HRM анализ также поддерживает оптимизацию уровня сигнала перед началом Плавления. После получения результатов HRM информация может быть проанализирована при помощи программного обеспечения для анализа HRM.

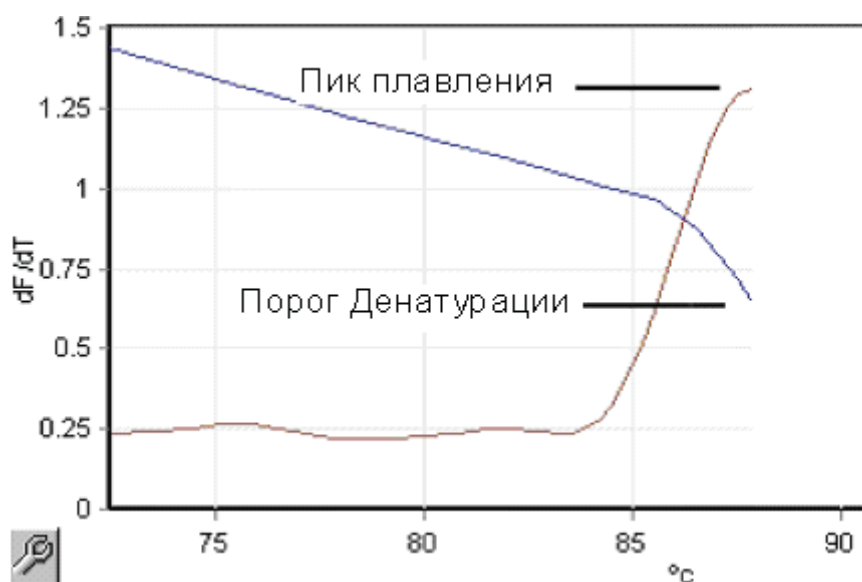
Оптическая денатурация при циклировании

Оптическая денатурация при циклировании – принципиально новая функция, имеющаяся только у приборов Rotor-Gene Q, которая позволяет проводить анализ плавления референс-образца в режиме реального времени и в соответствии с этим выбирать динамически температуру денатурации в ходе циклирования. Данная функция предназначена, чтобы оптимизировать условия денатурации для данного типа реакции и снизить время, требуемое для проведения анализа.

Для проведения этой процедуры просто поместите пробирку с заранее амплифицированным продуктом данной реакции в позицию 1 в роторе.

В этой пробирке также должен содержаться реагент, используемые для детекции денатурации ДНК.

При первом нагревании до температуры денатурации для этой пробирки измеряется кривая плавления в диапазоне от 80 до 95°C (можно изменять этот диапазон).



Определяется Пик Кривой Плавления и соответствующий ему пороговый уровень флуоресценции референс-образца Порог Денатурации. Затем на шаге оптической денатурации каждый раз измеряется флуоресценция референс-пробирки и как только она снижается ниже указанного порогового уровня, прибор начинает

выполнять охлаждение до температуры отжига. В процессе циклирования пик не определяется, а фиксируется, когда флуоресценция референсной пробирки достигнет соответствующего этому пику уровня (порога).

На рисунке ниже показана исходная кривая плавления и ее первая производная совмещенные на одном графике. Рисунок иллюстрирует соответствие между Порогом Денатурации и Пиком плавления, полученными в ходе такой калибровки

Чтобы проводить оптическую денатурацию нужно:

- Поместить предварительно амплифицированный образец в первую позицию в роторе. Этот образец должен содержать продукт амплификации, тот же, какой получается в образцах при проведении этого анализа, и интеркалирующий краситель, позволяющий детектировать денатурацию продукта
- Запрограммировать соответствующий профиль, где включено использование опции оптической денатурации

Циклы оптической денатурации практически идентичны другим циклам.

Принципиальным отличием является автоматическое помещение шага плавления в начало профиля и резкие шаги денатурации в течение термоциклирования. Циклы оптической денатурации не требуют определенное время для удержания, в то время как диссоциация продукта детектируется на каждом цикле.

Для осуществления этой техники необходимо получить следующую информацию о тесте:

-Стартовая температура денатурации. Эта такая же температура, как и шаг Денатурации в стандартном профиле термоциклирования

-Положение пробирки с ПЦР образцом, в котором будет проанализирована кривая плавления в зеленом канале

-Должен быть определен профиль оптической денатурации при циклировании

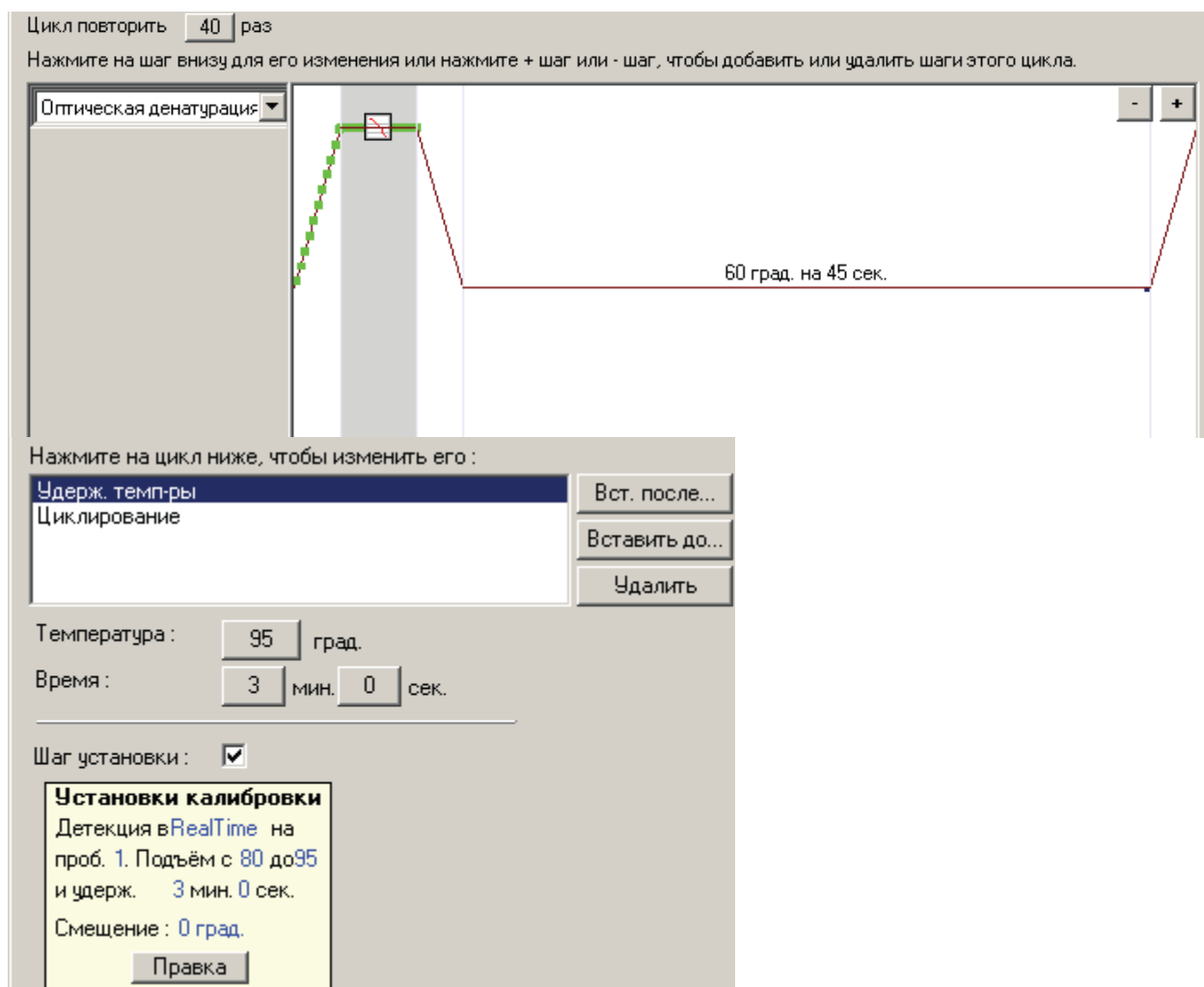
Для того чтобы создать новый цикл Оптической Денатурации:

1. Открыть окно “Редактирование профиля”. Затем нажмите “Новый”. В появившемся окне нажмите кнопку “Вставить после” и выберите “Новое циклирование”. В появившемся внизу меню замените “Временной шаг” на “Оптическую Денатурацию”. Профиль по умолчанию содержащий Денатурирующий Шаг будет появляться.



Наклонный регион вначале теста изображает калибровочный процесс. Зеленые точки показывают замер поглощения при каждом цикле нагревания. Голубые точки показывают поглощение в конце каждого шага отжига при 60°C. Заметьте что во время показа профиля каждый шаг имеет сходную температуру денатурации, это может быть и не так. Если образец необходимо немного дольше плавить ближе к концу теста, процесс оптической денатурации ожидает плавления соответствующей информации о флуоресценции, температурные значения могут варьироваться в каждом цикле.

2. Нажмите на первую половину графика с символом Оптическая Денатурация. Информация “Установка Калибровки” появляется в левом углу экрана.



3. Информация “Установка Калибровки” обычно правильна. Для изменения, если необходимо, нажмите ”Редактирование”. Окно “Установка Калибровки” появляется.

4. Убедитесь что:

- пробирка, указанная в “Положение пробирки” содержит ПЦР продукт, который будет показан в виде кривой плавления на зеленом канале
- Убедиться, что заданное время удерживания достаточно, чтобы денатурировать ДНК, и что конечная температура не слишком высока, чтобы не испортить образцы.
- Время удержания температуры достаточно для денатурации образца
- Смещение денатурации устанавливается соответственно. По умолчанию это 0°C подходит для большинства плавлений. Плавление с очень острыми переходами могут требовать смещение от – 0,5°C до -2°C, который выбирается пользователем, для обеспечения детекции перехода плавления.

Вы также можете определить Денатурирующий шаг для внедрения нового шага Удержания. Нажмите “Вставьте вперед” и выберите в меню ”Новая температура Удержания”. Далее появляются установки калибровки.

Установки калибровки синхронизированы с настройками денатурациями, так изменение денатурирующего шага будет автоматически обновлено при калибровке

время удержания. Это связано с тем процессы калибровки и денатурации эквивалентны при Оптической Денатурация при Циклировании.

Изменения существующих шагов используя Оптическую Денатурацию при Циклировании

Для изменения существующих денатурирующих шагов при циклировании последовательности, выберите цикл в списке в окне "Редактирование Профиля". Затем выберите Денатурирующий шаг нажимая на него на экране.

Нажмите на появившееся в окне меню и выберите "Оптическая денатурация". Температура и время удержание удалится и появится иконка "Оптическая денатурация"

Оптимизация Уровня Сигнала

При подготовке нового анализа с реакциями, которые ранее не проводились в приборе Rotor-Gene Q, полезно использовать функцию автоматической оптимизации уровня сигнала. Эта опция позволит Вам установить значения параметра Уровень сигнала для каждого из каналов и установить температуру оптимизации. Цель Оптимизации Сигнала убедиться, что всю получаемая информация проходит через динамический диапазон детектора. Если сигнал слишком мал, сигнал будет потерян в фоновом шуме. Если сигнал слишком высок, сигнал будет экстраполирован за шкалу.

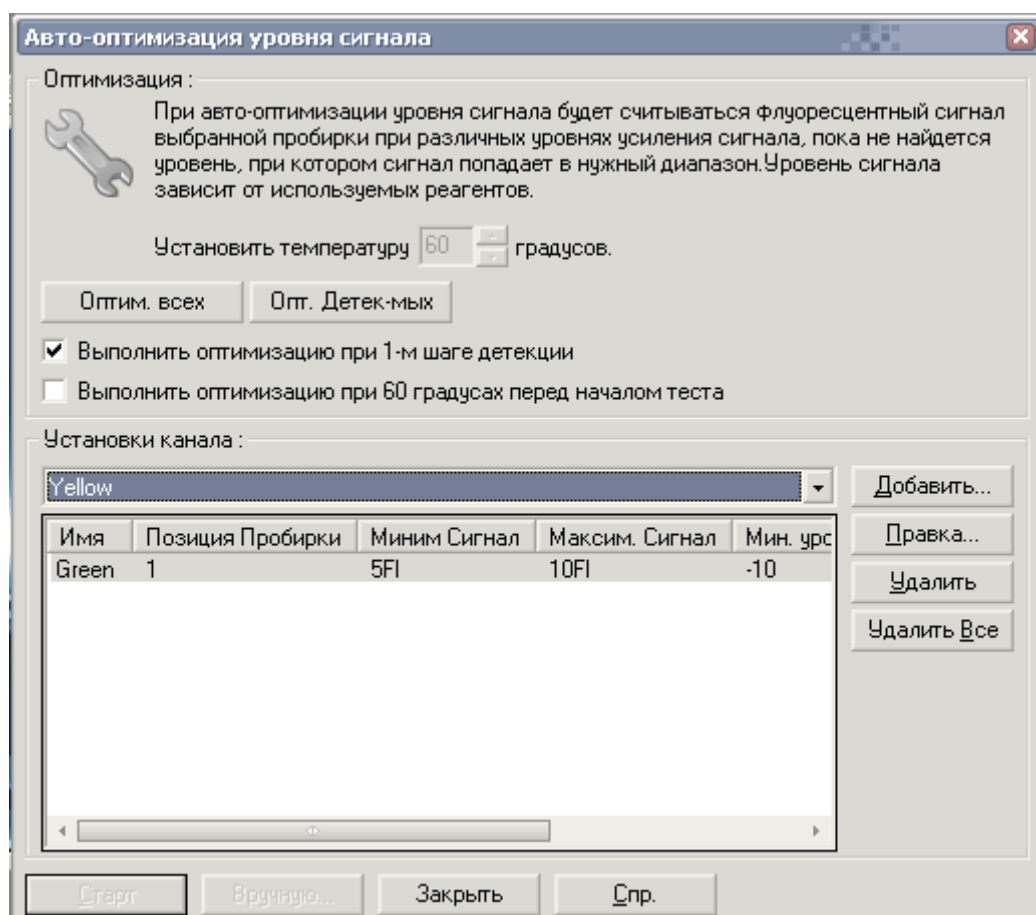
Параметр Уровень сигнала для каждого канала может изменяться от -10 до 10. -10=наименьшая чувствительность, 10=наибольшая чувствительность.

Установки параметра Уровень сигнала (усиление) задаются при запуске анализа и заданные значения используются для всех данных по этому каналу измеряемых в данном анализе.

При постановке реакции в первый раз рекомендуется подготовить пробный образец, содержащий все компоненты реакции. Этот образец помещают в Rotor-Gene Q и используя Оптимизацию уровня сигнала определяют лучшие настройки приема сигнала. Если сигнал, выбранный при Оптимизации уровня сигнала, получился бедным, тогда Целевая Широта Выборки должна быть увеличена. Если в результате этот сигнал стал насыщенным, тогда Целевая Широта Выборки должна быть уменьшена.

Для выполнения Оптимизации Уровня сигнала нажмите кнопку "Оптимизация Уровня сигнала" в окне Мастер Нового Теста Окно 3 (смотрите раздел 6.2.3).

Появляется окно "Авто-оптимизация уровня сигнала". Это окно позволяет автоматически оптимизировать настройки поглощения сигнала до того момента как будут прочитаны все выбранные каналы выше или ниже определенного порога.



Установить температуру: Перед чтением, Rotor-Gene Q будет прогрет или охлажден до достижения определенной температуры. По умолчанию, она устанавливается как температура поглощения.

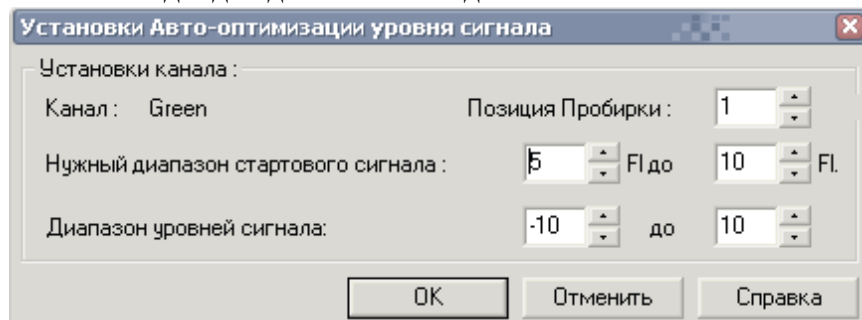
Оптимизировать все/ оптимизировать поглощение: “Оптимизировать все” будет пытаться оптимизировать все каналы, известные программному обеспечению. “Оптимизировать поглощение” будет оптимизировать только те каналы, которые используются в термическом профиле определенного теста (циклирование и плавление)

Выполнить оптимизацию перед первым поглощением: Пометка (галочка) в данной ячейке позволяет провести оптимизацию уровня сигнала в ходе первого цикла, когда начинается измерение данных. Это рекомендуется для Авто – оптимизации уровня сигнала.

Выполнить оптимизацию на x Градусов в Начале Теста: Пометка в этой ячейке позволяет провести оптимизацию уровня сигнала непосредственно перед началом выполнения программы анализа. Камера прибора нагревается до заданной температуры, проводится оптимизация по уровням сигнала, и затем начинается термоциклирование по заданной программе, начиная с первого шага (обычно это шаг денатурации). Это может быть полезно, если оптимизация в течение первого цикла слишком влияет на длительность удерживания на температуре первого шага детекции в программе. Однако обычно оптимальным является использование варианта Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции, поскольку оптимизация происходит при условиях максимально близких к условиям дальнейших измерений сигнала в ходе анализа.

Установки канала: Это ниспадающее меню, позволяет Вам добавить дополнительные каналы в окно оптимизации уровня сигнала. Выберите интересующий Вас канал и нажмите кнопку “Добавить”

Правка: Эта кнопка открывает диалоговое окно, где устанавливается “Нужный диапазон стартового сигнала”, в котором должен находиться флуоресцентный сигнал пробирки по которой проводится оптимизация, и Позиция Пробирки в роторе, по которой проводится оптимизация. Процесс автоматической оптимизации состоит в проведении постепенного перебора значений параметра Уровень сигнала и считывания флуоресценции. При этом выбирается первое значение Уровня сигнала, при котором получен флуоресцентный сигнал, попадающий в заданный диапазон. В приведенном ниже примере была выбрана авто-оптимизация и диапазона флуоресцентного сигнала образца от 5 до 10 FI в пробирке позиции 1. В общем для интеркалирующего красителя “Нужный диапазон стартового сигнала” составляет от 1 – 3 FI в то время как диапазон от 5 – 10 более подходит для химии зондов.



Кнопки Удалить и Удалить Все: Удаляет выделенные каналы или все каналы.

Старт: Начинает процесс оптимизации. Будет выбрано значение «gain», при котором флуоресцентный сигнал находится в заданном диапазоне. Если ни одно значение, удовлетворяющее этому условию, не найдено, то будет выбрано наиболее подходящее из ближайших значений.

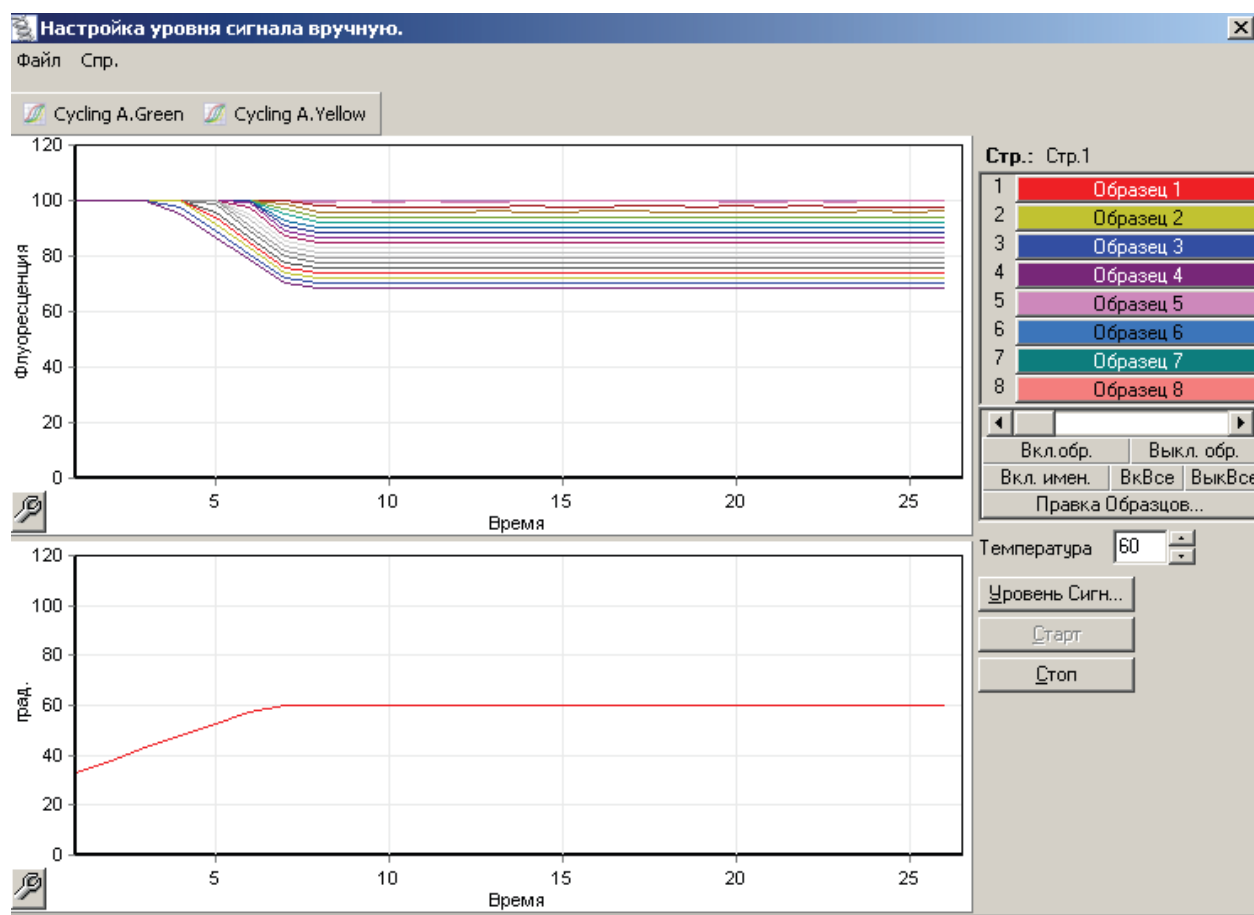
Вручную: Открывает Экран Ручной Оптимизации (рассмотрено ниже).

Изменение Уровня сигнала в ходе работы: Если в начале выполнения анализа был случайно выбран слишком высокий или слишком низкий уровень сигнала то его можно изменить в течение первых десяти циклов. На главном экране появится вертикальная линия там, где уровень сигнала был изменен. Вследствие изменения уровня флуоресценции циклы, предшествующие изменению, будут исключены из анализа.

Примечание: Оптимизация уровня сигнала может изменять установки, которые не опускаются ниже определенного диапазона. Они могут привести к изменениям флуоресценции после первичной денатурации. Как бы то ни было, результатом Оптимизации уровня сигнала будет хорошая индикация уровня флуоресценции теста.

Установка уровня сигнала вручную

Для выполнения “Установки уровня сигнала вручную” нажмите кнопку “Вручную” в окне “Авто-оптимизация уровня сигнала”. Открывается окно “Установки уровня сигнала вручную”. Настройка уровня сигнала вручную, которое позволит Вам в реальном времени просмотреть уровень флуоресцентного сигнала при любой заданной температуре. Оно применяется, когда неизвестен фон образца и, соответственно, уровень сигнала необходимо установить так, чтобы сигнал образца был достаточным для детекции и не превышал предела шкалы.



По умолчанию выводятся на экран графики всех образцов. Можно выбрать нужные образцы с помощью меню выбора (включения/выключения) образцов, расположенного справа от окна графиков, как это делается и в других окнах программы. В течение этого времени интерфейс пользователя не активен, поэтому оптимальная последовательность действий такова:

1. Настройте температуру в окне “Установки уровня сигнала вручную” необходимую для проведения теста.

Примечание: Нельзя настраивать температуру во время работы Rotor-Gene Q.

Перезапустите Rotor-Gene Q в случае внесения температурных изменений

2. Нажмите “Старт”. Начинается тестирование. В окне температура Rotor-Gene Q достигает определенной температуры. График в окне начинает показывать информацию.

3. Дождитесь стабилизации температуры.

4. Зарегистрируйте флуоресцентный сигнал в конечной точке.

5. Если чтение уровня флуоресценции не достигает определенного уровня, нажмите “Редактирование сигнала” и отредактируйте. Этот процесс невозможно провести мгновенно, так для Rotor-Gene Q требуется примерно 4 секунды для получения данных с одного канала. В течение этого времени интерфейс пользователя не активен.

6. Повторите процесс до тех пор, пока флуоресценция не достигнет желаемого уровня

7. Нажмите “Стоп”. Если прибор все еще получает новые данные, когда Вы нажимаете на эту кнопку, то сначала он завершит получение данных, а затем остановится. Этот процесс может потребовать до 5 секунд для каждого канала

5.2.5. Окно 4 Мастера нового теста

Это окно резюмирует тест. Проверьте показатели и если они правильны, нажмите “Начать тест”. Вы можете указать имя файла. Вы также можете сохранить настройки теста для будущих тестов, используя кнопку “Сохранить шаблон”.

5.2.6. Окно 5 Мастера нового теста

Введите в этом окне тип образцов и их описание во время проведения теста. Функциональные возможности этого окна совпадают с окном “Редактирование образцов” (страница 7-70). Информация об образцах может быть также введена после завершения теста.

Кнопка “Закончить и зафиксировать образцы” закрывает экран и предохраняет от последующего переименования образцов. Для получения более подробной информации об этом и возможностей защиты, смотрите меню Безопасность (Раздел 7-81).

Таблица образцов

Файл Правка Формат Защита

Стандарт Стил ротора

Установки:

Формат Задан. Конц 1,23E+05 Единица: Копии Больше Опций

Образцы:

С	№	Имя	Тип	Группы	Задан. Конц.	Выбран.
	1	K1	Стандарт		4,00E+05	Да
	2	K1	Стандарт		4,00E+05	Да
	3	K2	Стандарт		4,00E+04	Да
	4	K2	Стандарт		4,00E+04	Да
	5	K3	Стандарт		4,00E+02	Да
	6	K3	Стандарт		4,00E+02	Да
	7	294	Образец			Да
	8	295	Образец			Да
	9	196	Образец			Да
	10	197	Образец			Да
	11	198	Образец			Да
	12	199	Образец			Да
	13	200	Образец			Да

Стр.:
Имя: Page 1 Новый Удалить ☐ Синхронизиров. стр.

Вернуть ввод OK Отменить Спр.

6. ОБЗОР ОСНОВНЫХ ФУНКЦИЙ

Данная глава поможет ознакомиться с элементами интерфейса Rotor-Gene Q.

6.1. Рабочее пространство

Рабочее пространство программы Rotor-Gene занимает большую часть основного окна. Это область, в которой Вы можете открыть графики необработанных данных, температуры и результатов анализа. Если во время работы у Вас открыто несколько окон одновременно, Вы можете организовать их расположение, щёлкнув по кнопке “Упорядочить” в панели инструментов основного меню. Существует несколько доступных дополнительных опций, которыми Вы можете воспользоваться, щёлкнув по значку «Стрелка Вниз», который появляется рядом с кнопкой “Упорядочить”.

6.2. Панель инструментов

Эти кнопки обеспечивают быстрое выполнение наиболее часто используемых операций. Чтобы увидеть, какова их функция, задержите курсор мыши поверх клавиши, после этого появится краткое объяснение. Доступ к этим командам также может быть осуществлен через соответствующие пункты основного меню с теми же наименованиями.

6.3. Обзор необработанных данных по каналам

Щёлкните по этим кнопкам, чтобы увидеть данные различных каналов в открытом файле анализа.

При просмотре данных канала можно использовать различные опции для изменения представления данных. Можно трансформировать данные для выполнения каких-либо редко используемых вариантов анализа данных.

Настроить Шкалу: Для выбора “Настроить шкалу” нажмите правую кнопку мыши над соответствующим экраном. В окне “Настроить шкалу” Вы сможете ввести масштаб вручную.

Автошкала: автоматически приводит шкалу в соответствие с максимальными и минимальными значениями полученных данных.

Возврат к шкале по умолчанию: установит масштаб от 0 до 100 флуоресцентных единиц.

Символ гаечный ключ Для получения информации смотрите раздел 8.5.

Опции: Это окно появляется в раскрывающемся меню выше, который обеспечивает опции для изменения необработанных данных

Нормализовать: Это позволяет нормализовать информацию об амплификации к пассивному референсному красителю, такому как ROX, полученному в другом канале

Обрезать стартовые циклы: Это создает набор данных нового канала, в котором несколько стартовых циклов было удалено. Это полезно в случае если большие скачки

были обнаружены в стартовых циклах, которые могут появляться при использовании определенных реагентов

Обрезать конечные циклы: Это создает набор данных нового канала, в котором несколько конечных циклов было удалено.

Страница 1: Это показывает страницу, в которой в данный момент выделено на экране график необработанных результатов. Окно "Редактировать образцы" позволяет создать выборку значений образца. Например, может быть показана информация с разной длиной линий, параметры образца и другие опции.

6.4. Переключение образцов

С правой стороны главного окна есть переключатель, который содержит название образцов. Он содержит окрашенные клетки, каждый из которых соответствует определенному образцу. Используйте данное средство управления, чтобы скрыть или показать различные образцы на экране.). Вы можете просматривать образцы по отдельности, щёлкая по ним курсором мыши, или Вы можете скрыть/показать все образцы, входящие в часть таблицы образцов, которая видна на экране (их количество зависит от пространства экрана), щёлкнув по кнопке "Вкл.обр. / Выкл.обр." Чтобы выбрать ряд образцов, щёлкните курсором мыши на первом образце и протащите мышью до последнего выбираемого. Когда Вы отпустите кнопку мыши, то выбранные образцы будут либо выделены, либо выключены.

Примечание: Количество показываемых на экране образцов динамично и зависит от доступного свободного пространства на экране.

Щёлкнув по кнопке "Вкл. Именованные", Вы сможете увидеть только те образцы, которым Вы присвоили имена; это быстрый способ показать только отдельные необходимые образцы. Щёлкая по кнопкам "Включить все" и "Выключить все", Вы можете соответственно включить или выключить все образцы, в зависимости от соответствующего ротора. Нажатие на кнопку "Правка образцов" открывает окно редактирования таблицы образцов, где можно редактировать названия образцов, типы и стандартные концентрации.

Переключатель показан внизу. Дополнительные опции появляются после нажатия правой кнопки мыши.

1	1298
2	1989
3	1987
4	1989
5	1878
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

Вкл.обр.

Выкл.обр.

Вкл.имен.

ВкВсе

ВыкВсе

Правка Образцов...

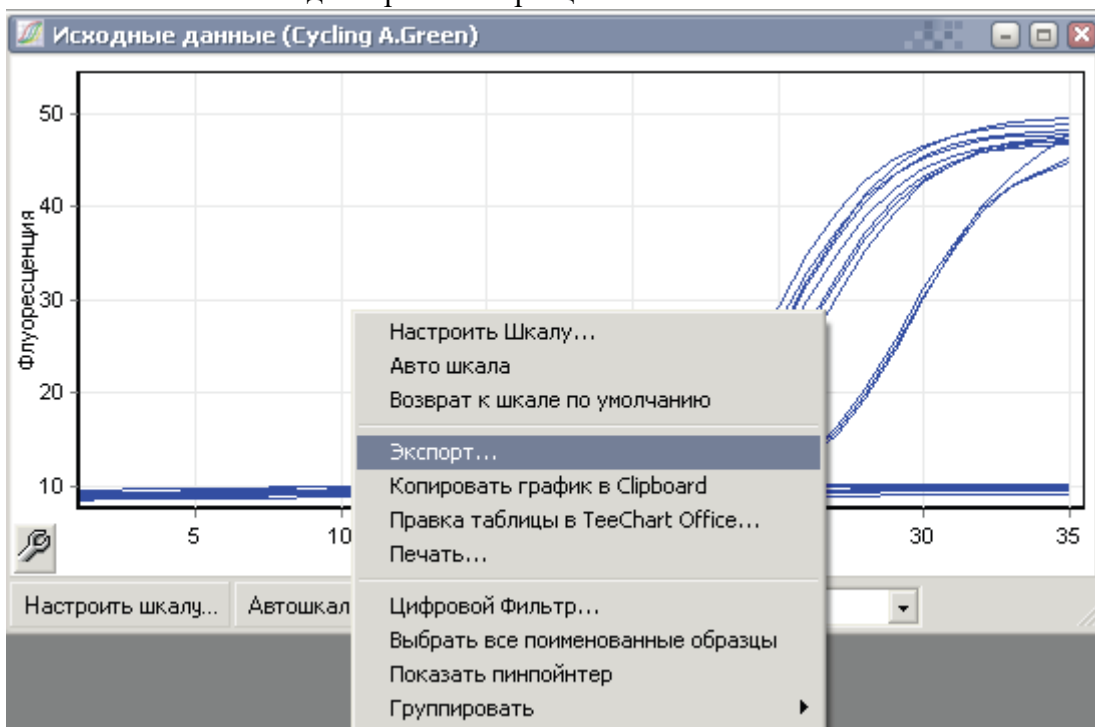
Страница: Это название сверху переключателя выделяет показываемую страницу с образцами. Страницы позволяют варьировать независимые исследования из набора данных, полученных из одного канала. Например, вы можете запустить две стандартных кривых в зеленом канале и получать независимые отчеты. Для получения большей информации о настройках страницы образцов смотрите раздел 7.8.4.

Вывод образцов на экран - если используется 72-луночный ротор, то образцы показываются от A1 до A8, от B1 до B8 и т. д. Использование кнопки вывода идентификаторов образцов на экран позволяет пользователю переключиться на формат таблицы образцов, при котором указывается порядковый номер образца в роторе от 1 до 72.

Выбор существующих образцов: Эта опция убирает выделение образцов, которые в меню “Редактирование образцов” выделены как отсутствующие. Это обеспечит что только действительные образцы будут отображаться на экране.

Выбор групп: Если вы определили группы, это свойство переключит экран к группе образцов. В группы произвольно собираются образцы, что позволяет проводить продвинутую статистическую обработку. Например, могут быть определены группы пациентов подвергнувшихся и неподвергнувшихся лечению. Группы могут быть

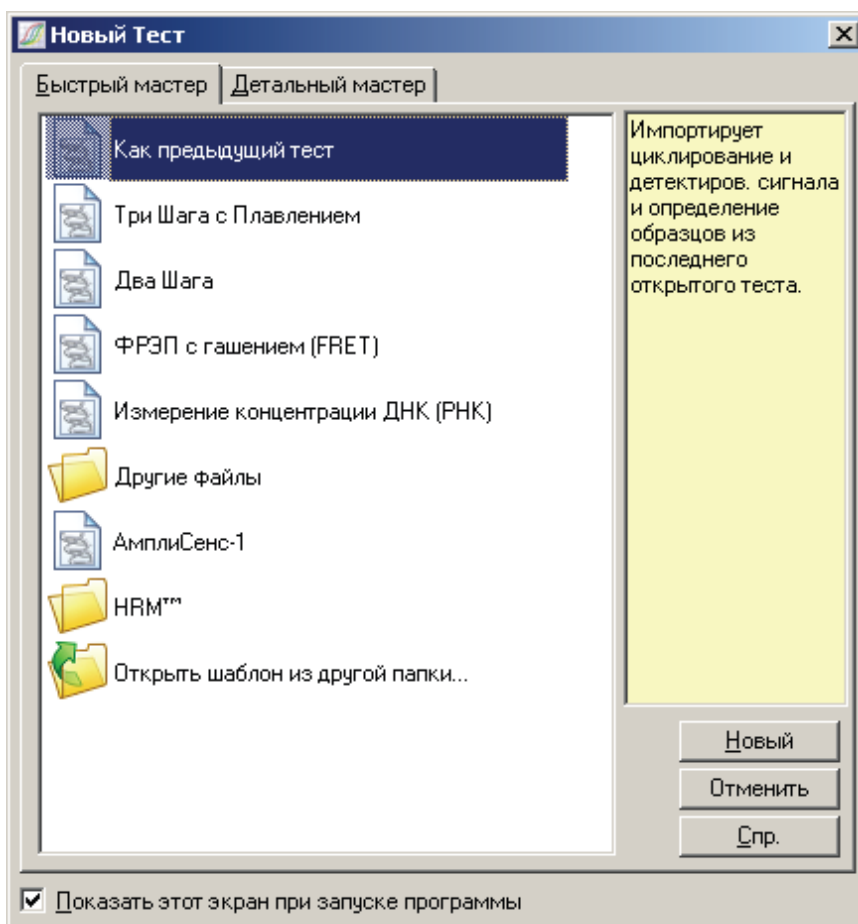
составлены в окне "Редактировать образцы".



6.5. Меню Файлов

6.5.1. Новый

При выборе в меню раздела "Файл" а затем "Новый" открывается окно "Новый Тест". Это окно предоставляет Вам возможность воспользоваться широко используемыми шаблонами, собранными в списке шаблонов Мастера Быстрый старт или Детального Мастера. После выбора вида Мастера, его последовательно открывающиеся окна проведут пользователя по всем параметрам, которые нужно определить, чтобы запрограммировать режим выполнения определенного вида анализа.



Информация о шаблонах представлена в разделах Быстрый мастер и Детальный мастер (смотрите разделы 6.1 и 6.2).

Новый тест:

Новый: запускает Мастер для создания программы анализа на основе выбранного шаблона.

Отменить: Закрывает это окно.

Справка: открывает окно справки.

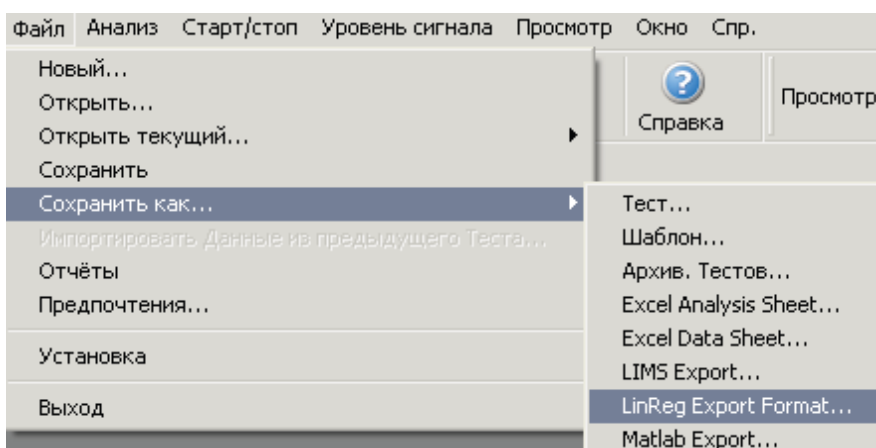
Показать этот экран при запуске программы: Если эта опция отмечена галочкой, то окно “Новый Тест” для запуска нового анализа будет автоматически открываться, когда открывается программа Rotor-Gene.

6.5.2. Опции Открыть файл, сохранить файл

Открыть...: Позволяет открыть ранее сохраненный файл с данными анализа (.tex) или архивный файл (.rea file).

Открыть текущий...: Показывает список последних четырех файлов, которые открывали или сохраняли

Сохранить: Сохраняет файл с внесенными в него изменениями



Сохранить как...: Позволяет сохранять файл в различных форматах, например, как шаблон для последующих запусков анализа. Возможные форматы следующие:

Тест...(файл данных теста): Сохраняет копию данного файла. Можно изменить имя или директорию, в которой сохраняется файл. Этот формат выбирается по умолчанию.

Шаблон: Сохраняет файл, как шаблон для последующих запусков такого же анализа, с заданным профилем термоциклирования и детекции и некоторыми другими установками, но без данных анализа.

Архив. Тестов: Сохраняет в наиболее компактном формате. Следует сохранять в таком формате файлы, которые Вы хотите отправить по E-mail. Это упростит пересылку файла и защитит его.

LIMS Export: Сохраняет файлы в формате LIMS в соответствии с необходимостью пользователей. Для получения более подробной информации, пожалуйста, свяжитесь с сервисной службой компании QIAGEN.

Excel Data Sheet...(Лист Данных Excel): Экспортирует все необработанные данные по всем каналам в лист Excel. При этом экспортируются данные только выделенных образцов.

Excel Анализ Sheet... (Лист Анализированных Данных Excel): Экспортирует все данные анализа в один лист Excel.

LinReg Export Format...(Экспорт в формат LinReg): Экспортирует все необработанные данные в формат распознаваемый программой LinReg. См. раздел «Экспорт в LinReg» для получения дополнительной информации.

Matlab Export... – Экспорт в формат, распознаваемый пакетом научных программ Matlab (или его эквивалент в свободном доступе, Octave). Эта опция может быть полезна для научных исследований.

Экспорт в формат LinReg / LinReg Export Format

Программа LinReg – это приложение, разработанное авторами публикации:

«Assumptionfree

Анализ of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.»

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Neurosci Lett. 2003 Mar 13;339(1):62-6.

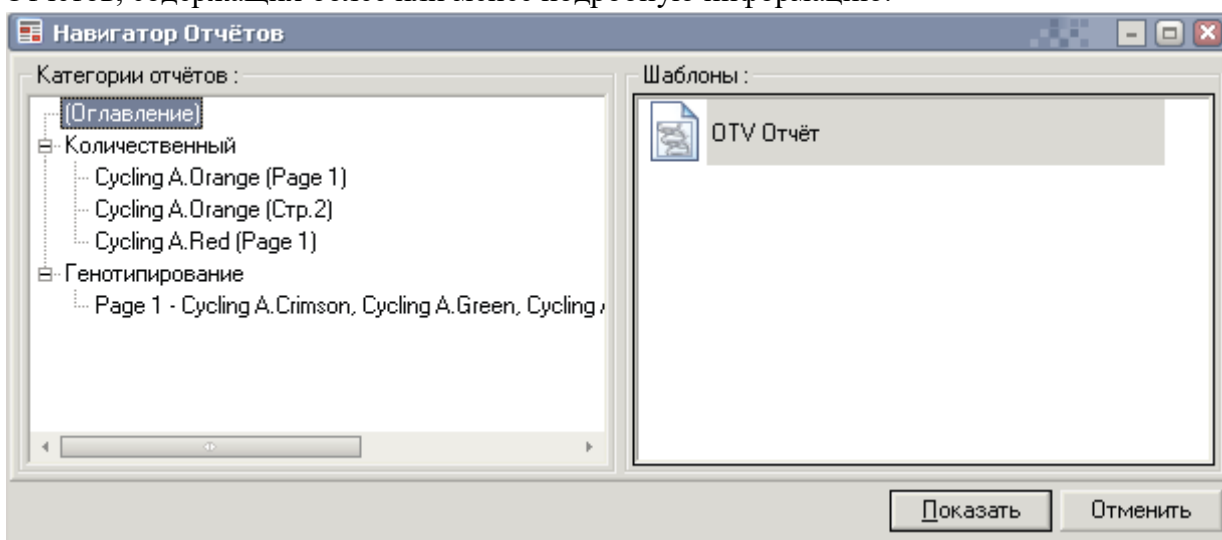
Программное обеспечение позволяет пользователю экспортировать необработанные данные в формат, который может импортироваться в приложение для анализа LinReg

1. Откройте файл запуска Rotor-Gene Q содержащий необработанную информацию

2. Экспортируйте информацию в формат LinReg
Чтобы импортировать в формат LinReg выполните выбор опции "Сохранить как...", затем "LinReg Export Format"
3. Экспортируемые необработанные данные автоматически показываются в формате Microsoft Excel
4. Запускается программа для обработки LinReg
5. Программа для обработки LinReg попросит вас выделить диапазон клеток, где расположены необработанные данные. Программа может анализировать только данные одного канала одновременно, соответственно нужный для анализа регион листа формата Excel должен быть выделен.

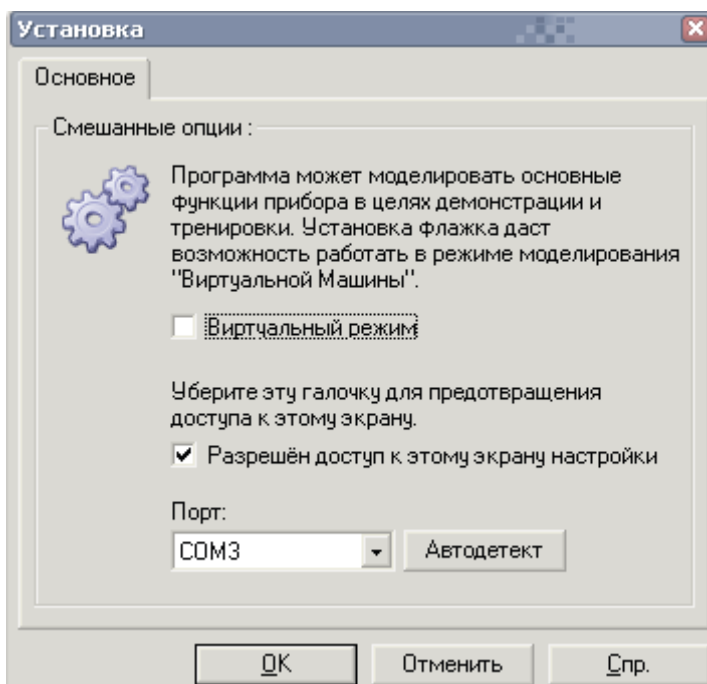
6.5.3. Опция Отчеты

После выбора "Отчеты"...появляется окно "Report Browser". Если данные ранее уже были проанализированы, то можно вывести отчет о результатах непосредственно через данную опцию, не обращаясь вновь к модулю анализа. Можно получать разные формы Отчетов, содержащих более или менее подробную информацию.



6.5.4. Опция Установки

Установки программы задаются пользователем в процессе инсталляции Rotor-Gene Q. Однако если вы захотите, вы можете изменить настройки соединения с Rotor-Gene Q и после инсталляции.



Виртуальный режим: отметьте галочкой эту опцию, если программа будет использоваться без подключения прибора Rotor-Gene Q для анализа данных, создания шаблонов или демонстрации. Все функции программы будут активны.

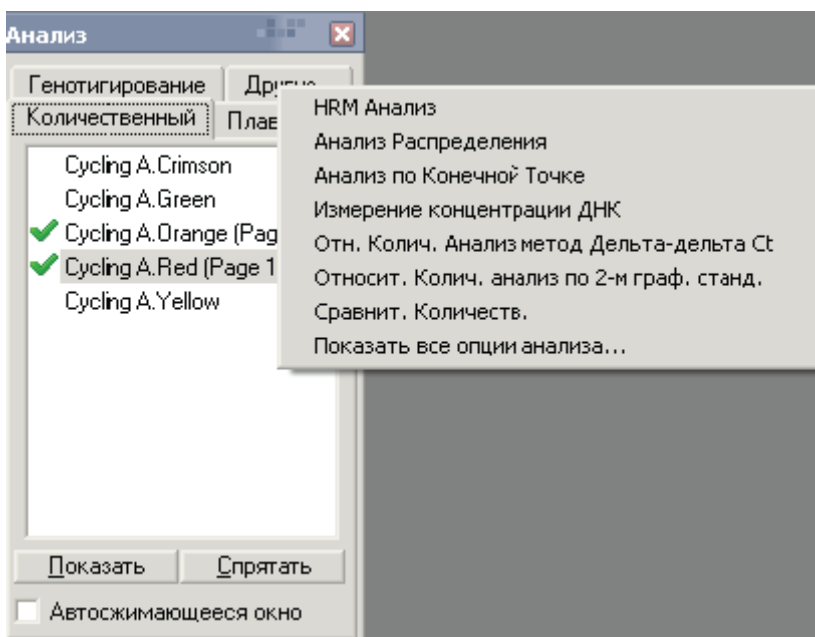
Разрешен доступ к этому экрану настройки: Если не отметить галочкой эту опцию, то впоследствии Вы не сможете обращаться к этому окну. Чтобы восстановить доступ нужно будет обратиться к дистрибьютору.

Порт: Выберите правильно, какой последовательный (COM) порт используется между компьютером и Rotor-Gene Q. Если Вы не уверены, какой порт выбрать, используйте функцию автодетекции “Автодетекция” для поиска всех доступных портов.

6.6. Меню Анализа данных

6.6.1. Панель инструментов меню Анализ

После выбора “Анализ”, появляется окно “Анализ”. Эта панель инструментов позволяет Вам провести новый анализ, выбрав его формат, или вывести на экран уже существующие результаты. Кнопки вверху окна позволяют Вам выбрать метод проведения анализа. Как только Вы выбрали метод, ниже перечисляется список каналов, которые могут быть проанализированы данным методом независимо, что можно выполнить, переместившись на разные страницы ” Редактирование образцов”. Рядом с теми каналами, данные которых уже были ранее проанализированы, появится зелёная отметка (галочка). Это означает, что для данного анализа сохранены в памяти установки уровня порога и нормализации. Чтобы проанализировать данные канала или включить обзор данных канала, щелкните дважды по его названию. После этого откроется специальное окно анализа.



Автосжимающееся окно – отметка в данной графе означает сворачивание окна, если оно не используется. Перемещение курсора над окном вновь разворачивает его.

Организация рабочего пространства

Каждый раз, когда стартует новый анализ, окна появляются, занимая пространство экрана. Если открыто много окон это может быть громоздко. Закрывать все эти окна нет необходимости, просто нажмите на панели “Организовать”. Окна автоматически выстраиваются согласно методу “Идеальной мозаики”.

Показ: Показывает выбранные исследования

Скрыть: Скрывает выделенные исследования

Удалить исследования: Полностью удаляются выбранные исследования. Это означает, что любые настройки нормализации или плавления будут потеряны.

6.6.2. Количественный анализ

Выбрав “Количественный” в окне “Анализ”, щёлкните дважды по кнопке или нажмите кнопки Количественный и Показать, чтобы открыть анализ данных интересующего Вас канала. Автоматически могут быть открыты сразу три окна: основное окно, окно стандартная кривая и окно результаты.

Отчеты

Отчёты: Отчеты открывают окно “Обзор отчетов”, где Вы можете выбрать отчёт для предварительного просмотра избранного количественного анализа. Существуют три различные опции: Стандартный отчёт, Полный отчёт и Короткий отчёт. Двойное нажатие на желаемую опцию откроет отчет в окне “Предварительный просмотр”.

После того как будет составлен отчет, могут быть использованы кнопки для распечатывания, сохранения, отправки по электронной почте или экспорта в Word.

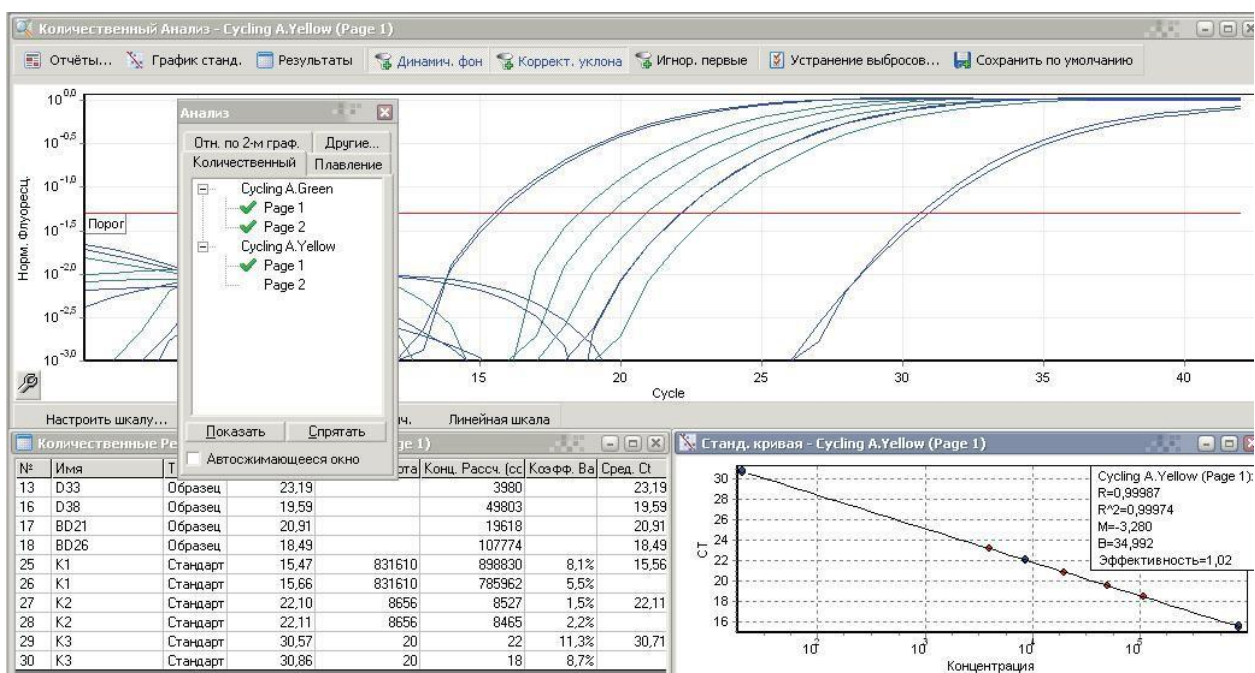


График Стандартов

График стандартов. Эта кнопка открывает “График стандартов”.

По умолчанию это окно открывается при выполнении количественного анализа. Если Вы закроете данное окно, оно может быть повторно открыто.

Значения параметров кривой стандартов пересчитываются в динамическом режиме, если изменять уровень пороговой линии (с помощью щелчка по ней и перетаскивания мышью).

Синие точки на кривой соответствуют данным образцов, которые были определены как стандарты, а красные точки показывают данные неизвестных (анализируемых) образцов.

Примечание: При повторном определении стандартов с целью пересчитать кривую стандартов выключение или включение образцов-стандартов в панели образцов соответственно удалит их данные из расчёта кривой стандартов или добавит их.

Удаление стандартов для улучшения значения R^2 не обосновано, поскольку при этом снижается достоверность полученных результатов. (Наличие стандартов, для которых полученное значение СТ не соответствует кривой стандартов, свидетельствует, что значения, полученные для анализируемых образцов, также могут быть не корректными).

Точность: Регулирует эффективность реакции теста. Это отдельно детально обсуждается на странице 7 – 28

R^2 -значение, коэффициент корреляции: коэффициент R^2 для кривой стандартов показано в правом верхнем углу каждого окна кривой стандартов.

R^2 – это число (в диапазоне от 0 до 1), которое представляет, насколько хорошо линия наибольшего соответствия описывает зависимость между двумя переменными. Иначе говоря, характеризует процент данных, согласующихся со статистической гипотезой, что зависимость между концентрацией и СТ для данных стандартов описывается данной линией кривой стандартов. R-значение, равное 0, подразумевает, что линия не описывает это взаимоотношение. Коэффициент R, равный 1, показывает, что значения данных попадают прямо на линию наибольшего соответствия, и, следовательно, эта

линия даёт хорошее описание зависимости между двумя переменными. Хорошие значения коэффициента R^2 составляют около 0,99.

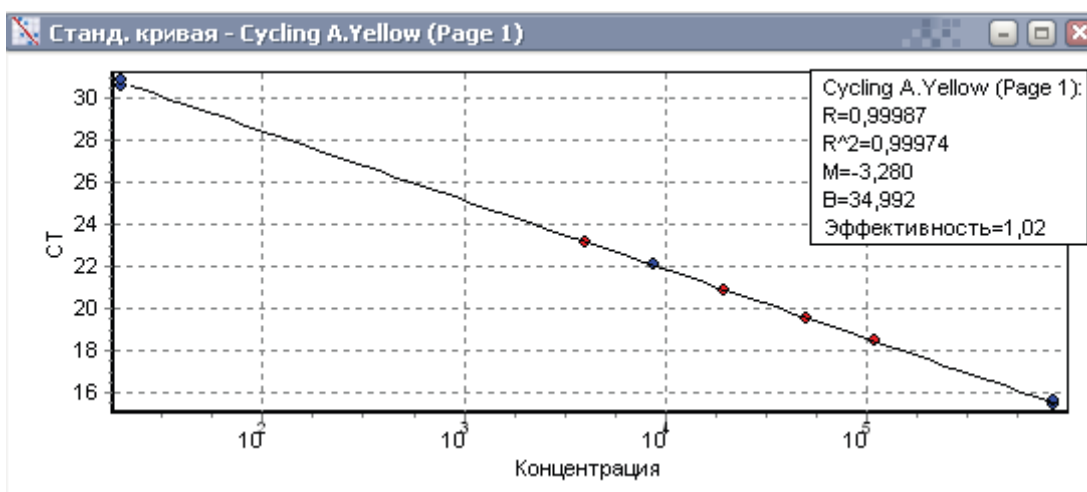
Примечание: Можно достигнуть высоких значений R^2 для стандартной кривой построенной по недостаточному объёму данных, если было использовано недостаточное количество стандартов. Значение R^2 улучшается при уменьшении числа используемых стандартов, однако это не увеличивает достоверность полученных результатов.

R значение (квадратный корень коэффициента корреляции): Значение R является квадратным корнем R^2 и более полезна для определения корреляций

М и В: Наклон (М) и В (точка пересечения) находят соответствии с формулой $y = Mx + B$ параметры М и В для кривой рассчитаны автоматически и показаны в правом верхнем углу окна кривой стандартов.

Экспорт Графика: Щёлкните по правой кнопке мыши на кривой стандартов, чтобы обозначить опцию сохранения графика стандартов в графическом формате (смотрите раздел 8.4).

Показать вместе: Когда одновременно в одном приборе проводят несколько количественных анализов можно совместить несколько графиков стандартов в одном окне. Эта функция полезна, например, для того, чтобы представить влияние разного уровня пороговой линии на статистические параметры результатов. Ниже представлен пример.



Расчет графика стандартов

« $conc = \dots * ST + \dots$ » и « $ST = \dots$ » два варианта формул, используемых для описания соотношения между значениями СТ и концентрациями ДНК-мишени.

Тип кривой может быть либо “Плавающим”, либо “Фиксированным”. При “Плавающем” типе уравнение оптимальной стандартной кривой вновь рассчитывается, как только Вы меняете порог. При “Фиксированном” типе уравнение не изменяется. Эта опция (фиксированного типа) полезна, если Вы повторно используете кривую стандартов в нескольких анализах, импортируя ее.

Импорт Графика Стандартов

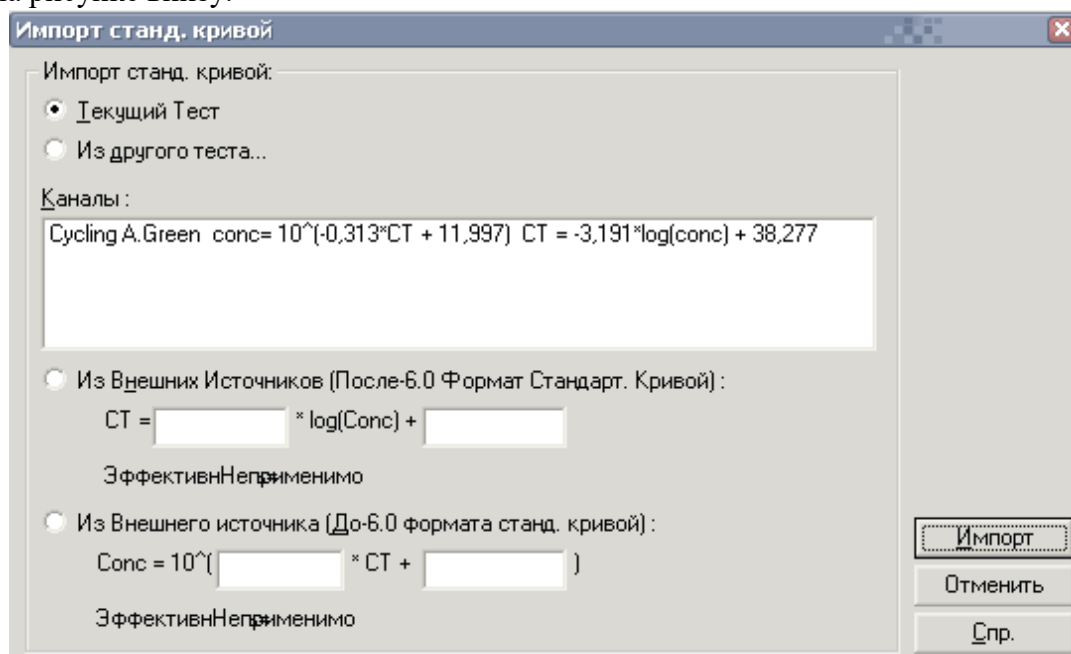
Импортирование стандартной кривой позволяет оценить концентрацию, когда кривая стандартов не доступна для отдельного исследования и точность реакции не колеблется между двумя тестами. Чтобы импортировать график стандартов из другого файла анализа или кривую, полученную для другого канала, щёлкните по кнопке “Импорт Кривой” в правой нижней части экрана.

Есть возможность регулировать кривую стандартов, если имеется такая необходимость. Регулирование кривой стандартов подразумевает, что только точные кривые стандарты

импортируются в определенный тест. Так или иначе, кривая стандартов должна регулироваться в зависимости от используемых реагентов.

Для регулирования кривой стандартов используйте в новом тесте стандарты с известной концентрацией. Определите стандарт устанавливая тип образца в "Стандарт" и введите величину концентрации в окне "Редактирование образцов". Для улучшения достоверности могут быть введено количество копий в сходных стандартах. Заметьте, что невозможно определить более чем одной стандартной концентрации. Например, можно обладать тремя стандартами репликаций 1000 копий, но невозможно иметь один стандарт 1000 копий и другой 100 копий в одном и том же тесте.

Как только кривая стандартов была импортирована, кривая стандартов изменяется на "Фиксированная". Нажмите "Сброс" для изменения кривой стандартов назад в "Плавающее". Изображение окна показывающее "Импорт Графика Стандартов" показано на рисунке внизу.



Используя этот экран, Вы можете импортировать график стандартов другого канала, который Вы уже проанализировали в ходе данного анализа.

Текущий тест: После выбора этой опции, в тестовом поле Каналы будут перечислены количественные анализы на других каналах с их соответствующими формулами графиков стандартов.

Из другого теста...: Выбор этой опции вызовет появление окна, в котором Вы сможете выбрать, какой файл с данными анализа использовать. Если в этом файле был выполнен какой-либо количественный анализ, Вы увидите перечисленные графики стандартов для каждого проанализированного канала.

Примечание: Настройки количественного анализа могут быть сохранены в файле запуска.

Каналы: в этом окне перечислены проанализированные каналы и соответствующие им формулы графиков стандартов, которые можно импортировать.

Из внешнего источника: воспользовавшись этой опцией, Вы можете напрямую ввести значения параметров М и В для формулы кривой стандартов.

Меню Вычисление СТ, Порог

Зеркальное отображение информации: Некоторые реактивы создают флуоресцентный сигнал, который экспоненциально уменьшается вместо увеличения. Есть возможность анализировать эти тесты, используя "Количественный анализ", но пункт "Зеркальное

отображение информации” следует всегда проверять. Для всех прочих количественных исследований эта опция должна быть невыделенной.

Расчет Значения СТ: Значения СТ образца соответствует значению цикла, при котором кривая амплификации (флуоресценции) образца пересекает пороговую линию. Значения СТ для каждого образца определяются посредством установки положения пороговой линии и расчета точки ее пересечения с кривой флуоресценции этого образца.

Меню, используемое для того, чтобы определить уровень пороговой линии или включить автоматический поиск уровня порога для расчета Ст и графика стандартов, находится в правой нижней части экрана, под цветной таблицей обозначения образцов.

Порог: Чтобы установить порог, щёлкните по символу (сетка с красной стрелкой) в строке Порог, затем нажмите клавишу мыши на графике и перетащите пороговую линию на желаемый уровень или введите значение уровня порога в текстовом окошке в строке Порог. При ручной установке для количественного анализа следует выбирать уровень соответствующий экспоненциальному участку кривых амплификации (флуоресценции). При использовании Логарифмической шкалы, которая установлена по умолчанию (в нижней панели в основном окне), это соответствует линейному участку кривых флуоресценции. При этом уровень пороговой линии должен значительно превышать уровень фона.

В качестве альтернативы можно использовать функцию “Авто-выбор Порога” для автоматической установки оптимального уровня.

Исключить циклы до: Щёлкните по символу (решётка с красной стрелкой), затем щёлкните на графике, удерживайте щелчок и перетащите пороговую линию вправо. При этом из расчетов исключаются пересечения пороговой линии в начальных циклах. Задать число, не учитываемых начальных циклов можно также введя численное значение в боксе в строке “Исключить циклы до”.

Примечание. Это полезно, когда существует шум (случайные флуктуации) сигнала в ходе первых циклов.

Авто-выбор порога: Функция автоматического поиска порога просканирует затемнённую область графика, для выбора уровня порога при котором получаются оптимальные статистические параметры для образцов-стандартов (с заданными концентрациями). Вы можете изменить область сканирования, введя новые верхнюю и нижнюю границы в текстовых графах. В большинстве случаев подходит область, заданная по умолчанию. Основываясь на данных, полученных для заданных стандартов, автоматически сканируется ряд пороговых уровней, чтобы получить наиболее подходящий график стандартов, то есть такой график, для которого получено максимальное значение коэффициента корреляции R, приближающееся к 1.0.

Таблица Результатов

Эта кнопка в меню открывает таблицу результатов “Количественного Анализа”. По умолчанию это окно открывается, когда Вы выполнили анализ Количественный. Если Вы закроете его, то это окно может быть повторно открыто с помощью этой кнопки в меню основного окна количественного анализа.

Количественные Результаты - Cycling A.Yellow (Page 1)								
№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Рассч. (сс)	Кэфф. Ва	Сред. Ct	Ст.Откл Ср
18	V 006	Образец	18,54		72 077		18,54	
19	V 008	Образец	27,45		182		27,45	
20	V 009	Образец	23,22		108		23,22	
23	B1+	Образец	29,33		51		29,33	
24	B2+	Образец	25,00		942		25,00	
25	K1	Стандарт	15,28	661 360	644 081	2,6%	15,25	0,04
26	K1	Стандарт	15,22	661 360	671 717	1,6%		
27	K2	Стандарт	21,76	8 820	8 300	5,9%	21,65	0,15
28	K2	Стандарт	21,55	8 820	9 550	8,3%		
29	K3	Стандарт	30,62	20	22	8,1%	30,74	0,17
30	K3	Стандарт	30,86	20	18	8,2%		

В “Таблице результатов” в соответствующих столбцах указываются полученные значения соответствующего параметра для каждого из образцов. Нажимая правой кнопкой мыши и выделяя ”Экспорт в Excel” для экспорта таблицы в Excel. Программа Excel открывается автоматически. Для копирования информации существующих электронных таблиц, выберите опцию “Копировать”, откроется электронная таблица а затем выберите “Вставить”.

В таблице ниже можно видеть следующие столбцы, содержащие значения следующих основных параметров:

Кэфф. Вариации %: Коэффициент вариации (CV) между рассчитанной и заданной концентрацией. $CV \% = \text{Abs}(\text{Конц.Рассч.} / \text{Конц. Стандарта} - 1) \times 100\%$

Сред. Ct: Среднее значение Ct для всех образцов с тем же именем.

Ст.Откл.Сред. Ct: Стандартное отклонение для среднего Ct для группы всех образцов с тем же именем.

Сред. Ct (95% ДИ): 95% Доверительный интервал для значений Ct группы образцов с тем же именем. Это стандартно используемый при количественных анализах статистический показатель. Его величина может быть уменьшена при увеличении количества реплик образца или при меньших вариациях данных по образцам-репликам.

Сред. Рассч. Конц.: Средняя расчетная концентрация для группы образцов с тем же именем. Это не среднее расчетных концентраций каждого из образцов, а скорее геометрическое среднее, что является более точной оценкой для этой величины.

Примечание: Это не просто расчет средних значений концентраций. Это геометрическая пропорция, которая математически более подходит для экспоненциальной природы реал – тайм амплификации.

Сред. Рассч. Конц. (95% ДИ): 95% доверительный интервал для величины концентрации для группы образцов с тем же названием. Учитывает как 95% доверительный интервал концентрации каждого образца, так и модель линейной регрессии, на которой базируется расчет. Его можно интерпретировать так: диапазон концентраций, которые можно получить в 95% случаев, когда выполняется такой же анализ для этих образцов при таких же вариациях. Это консервативная оценка и полученная величина диапазона может быть довольно большой, из-за вариаций присущих любому ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Диапазон может быть большим, если значительны вариации между образцами, используется малое количество реплик, или если концентрации образцов далеки от концентраций образцов-стандартов.

Примечание: Вариации, описанные здесь, не связаны с точностью прибора Rotor-Gene Q, но присущи параметрам процесса экспоненциальной амплификации с детекцией в режиме реального времени. При проведении аналогичных тестов с помощью других приборов для ПЦР с детекцией в режиме реального времени Вы

можете получить даже большие показатели вариаций, из-за меньшей однородности температуры в блоке. При перекрестном сравнении результатов, полученных при использовании разных приборов, используйте величину стандартного отклонения St , эта оценка поддерживается всеми основными производителями.

Примечание: Каждая из колонок может быть показана или скрыта, нажимая правой кнопкой мыши на окно и затем выделяя или отменяя выделение названия колонки.

Количественные Результаты - Cycling A.Yellow (Page 1)

№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Рассч. (copies/ul)	Кс	Анализ
18	V 006	Образец	18,54		72 077		☒ №
19	V 008	Образец	27,45		182		☒ Цвет
20	V 009	Образец	23,22		3 108		☒ Имя
23	B1+	Образец	29,33		51		☒ Тип
24	B2+	Образец	25,00		942		☒ СТ
25	K1	Стандарт	15,28	661 360	644 081		☒ Конц. Стандарта (copies/ul)
26	K1	Стандарт	15,22	661 360	671 717		☒ Конц. Рассч. (copies/ul)
27	K2	Стандарт	21,76	8 820	8 300		☒ Коэфф. Вариации %
28	K2	Стандарт	21,55	8 820	9 550		☒ Сред. Ст
29	K3	Стандарт	30,62	20	22		☒ Ст. Откл Сред. Ст
30	K3	Стандарт	30,86	20	18		☒ Сред. Ст (95% ДИ)
							☒ Сред. Рассч. Конц.
							☒ Сред. Рассч. Конц. (95% ДИ)

Более подробная информация о доверительной области доступна в Приложении В. Мы выражаем благодарность Peter Cook с кафедры математики Университета NSW, Сидней, Австралия, за неоценимую помощь в верификации и использовании математических подходов.

Для увеличения удобства в работе, используется опция "АвтоСтат", которая автоматически подсчитывает следующие параметры для выделенных образцов: Сред. знач. (Среднее), Std.Dev. (Стандартное Отклонение), Минимум, Максимум. Просто выделите интересующую Вас область ячеек в таблице результатов с помощью мыши, и значения статистических параметров выделенной группы образцов будут даны в меню Статистика в правой нижней части окна (под таблицей образцов).

На этой картинке проанализированы концентрации нескольких образцов.

Количественные Результаты - Cycling A.Yellow (Page 1)

№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Рассч. (copies/ul)	Коэфф. Вариации %	Сред. Ст	Статистика
16	T 108	Образец	22,86		3 956		22,86	Максимум : 27,45
17	T 116	Образец	24,24		1 563		24,24	Минимум : 18,54
18	V 006	Образец	18,54		72 077		18,54	Число : 5
19	V 008	Образец	27,45		182		27,45	Сред. знач. : 23,26
20	V 009	Образец	23,22		3 108		23,22	Std. Dev. : 3,20
23	B1+	Образец	29,33		51		29,33	95% Повторять И.Д. : [19,29 , 27,24]
24	B2+	Образец	25,00		942		25,00	Копировать
25	K1	Стандарт	15,28	661 360	644 081	2,6%	15,25	
26	K1	Стандарт	15,22	661 360	671 717	1,6%		
27	K2	Стандарт	21,76	8 820	8 300	5,9%	21,65	
28	K2	Стандарт	21,55	8 820	9 550	8,3%		

Примечание: Опция "АвтоСтат" является контекстным. Это означает, что везде где возможно генерируется информация являющаяся полезной.

Например:

- Невозможно получить 95% доверительный интервал от подсчитанных выбранных концентраций так как модель регрессии должна также приниматься в расчет
- Порядок величины среднеквадратичного отклонения является для расчета концентраций предпочтительней, чем абсолютные величины. Это процентное отклонение. Например величина 1,07537 представляет в отклонение $(278,974 - 322,611) = (300,000/1.07537 - 300,000 \cdot 1.07537)$. Представленная абсолютная величина не целесообразна для кривой стандартной. Величина могла бы быть получена при мельчайшей концентрации для создания выявленной маленькой ошибки (± 3 копий) или

высокой концентрации ($\pm 3,000,000$ копий). По этой причине получают порядок величины среднеквадратичного отклонения.

- Для расчета концентраций, геометрическая прогрессия предпочтительней арифметической прогрессии. Это обуславливается экспоненциальной природой реал – тайм ПЦР. Например, в случае двукратных разведений, 1,2,8 и 16 копий, средним следовало бы быть 4 копий, потому что это в середине серии разведений. Как бы то ни было, арифметическая прогрессия получает 6,75 копий. Геометрическая прогрессия получает $(1*2*8*16)^{(1/4)}=4$ копий. Более подробную информацию о геометрической прогрессии можно получить на сайте: <http://mathworld.wolfram.com/GeometricMean.html>.

Нормализация динамического фона пробирки

Эта опция включена по умолчанию и используется, чтобы установить средний фон каждого индивидуального образца на участке, предшествующем логарифмическому участку кривой амплификации. При стандартной нормализации просто рассматриваются значения флуоресценции в первых пяти циклах как индикатор уровня фона каждого образца. Все значения флуоресцентного сигнала, полученные от данного образца, затем делятся на это значение фона, чтобы нормализовать данные. Эта операция повторяется для всех образцов. Этот способ может быть не вполне точным, поскольку уровень фона в течение первых пяти циклов иногда не может служить хорошим показателем фона непосредственно перед логарифмической фазой амплификации. При включении опции “Динамический Фон” используется вторая производная кривой каждого образца, чтобы установить для него стартовый номер цикла, с которого начинается подъем. Затем уровень фона образца определяется как среднее значений сигнала от первого цикла до этого стартового цикла. Этот метод даёт наиболее точные количественные результаты. В качестве альтернативы для некоторых данных может понадобиться отключить опцию “Динамический Фон”. В этом случае средний уровень фона будет подсчитываться только за первые 5 циклов. Если фон не является постоянным в течение всех циклов перед логарифмической фазой амплификации, то данные будут менее точными.

Коррекция уклона

В идеальном случае фоновая флуоресценция (F1) образца перед началом логарифмической фазы амплификации должна оставаться постоянной. Однако иногда уровень флуоресценции повышается или снижается за счёт происходящих химических реакций что приводит к искаженной скошенной линии фона. Опция Коррекция уклона использует наиболее подходящую линию, чтобы аппроксимировать уровень искажений (вместо среднего значения) и проводит нормализацию с учетом помех. Включение этой функции может улучшить статистические параметры данных (уменьшить разброс), если фоновая линия образца заметно наклонена. Эта функция улучшает данные, когда очевидно, что фон необработанных данных скошен вверх или вниз перед участком логарифмической фазы амплификации, иначе говоря, когда по данным видно, что фон кривой флуоресценции постепенно повышается в течение первых циклов.

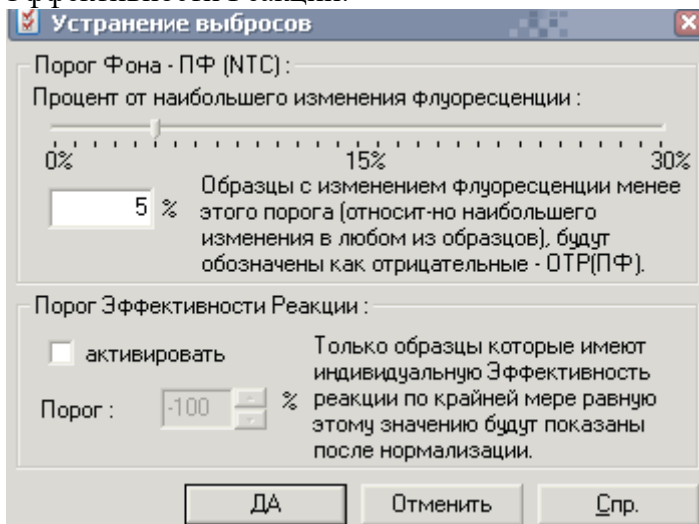
Игнорировать первые циклы

Иногда данные первых нескольких циклов не репрезентативны по отношению ко всей кривой флуоресценции при количественном анализе. Поэтому Вы можете получить более точные результаты, если выберете опцию Игнорировать первые, чтобы пренебречь данными нескольких первых циклов. Если фон в первых циклах не отличается от последующих, то можно получить лучшие результаты, если отключить эту функцию,

поскольку алгоритм нормализации будет обрабатывать большее количество данных. Вы можете установить число циклов, которыми следует пренебречь (до 10).

Устранение выбросов...

Эти установки на экране количественного анализа позволяют дифференцировать образцы с минорными неспецифическими изменениями флуоресценции от образцов, в которых действительно регистрируется амплификация ДНК-мишени. Включить эту функцию можно с помощью кнопки Устранение выбросов... в панели инструментов основного окна количественного анализа. При этом можно выбрать один из двух механизмов такой дискриминации: опцию Порог Фона - ПФ или опцию Порог Эффективности Реакции.



Порог Фона: Эти установки на экране количественного анализа позволяют исключить образцы или контрольные образцы (NTC - контроли без ДНК матрицы), которые имеют небольшой сдвиг флуоресценции вверх за счёт деградации зонда или других неспецифических эффектов. Для каждого образца рассматривается изменение абсолютной флуоресценции, выраженное в процентах относительно максимального изменения флуоресценции среди всех образцов. Все образцы, для которых это изменение флуоресцентного сигнала ниже порога ПФ, рассматриваются как отрицательные. Например, если у вас есть один образец с максимальным увеличением флуоресцентного сигнала, для которого начальный фон составлял 2FI, а в конце его флуоресценция достигла 47FI, тогда 45FI представляется как 100%. Если выбрать равный 10% Порог Фона, то 10% от сигнала 45FI будет расцениваться как незначительное изменение или, иначе говоря, шум сигнала, т.е. для данного примера шумом будет считаться любое изменение сигнала меньшее, чем 4,5 FI.

Порог Эффективности Реакции:

Это альтернативный метод исключения образцов, для который подъем флуоресценции обусловлен неспецифически и является «шумом» сигнала. Этот нормализующий алгоритм использует технику оценки эффективности реакции, применяемую для Сравнительного Количественного Анализа (смотрите раздел 7.6.6). При этом исключаются из таблицы результатов все образцы, для которых эффективность реакции ниже определенного уровня. Эффективность, равная 0%, означает, что в логарифмической фазе не происходила специфическая реакция, а эффективность, равная 100%, означает, что реакция происходила с максимальной эффективностью. Отрицательное значение эффективности означает, что флуоресценция образца снижалась, такие образцы, естественно, следует исключать из таблицы, поскольку в них не

происходила специфическая реакция. В настоящее время нет согласованных данных о том, какой уровень эффективности реакции позволяет правильно различать специфическую реакцию и неспецифические эффекты. Поэтому мы рекомендуем применять эту опцию с осторожностью, иначе можно аннулировать результат реакции для образцов с невысокой эффективностью реакции, которая, тем не менее, является специфической.

В любом случае, применение этой опции невозможно, если нет сильного нарастания флуоресцентного сигнала для образцов, в которых действительно протекает реакция. При использовании некоторых форматов реакции, степень нарастания флуоресценции недостаточна, чтобы применять данную опцию. В каждом случае это требует проверки.

Примечание: Если величины исключены из этих методик, тогда величина C_t в окне “Количественный подсчет результатов” будет показывать произведенное исключение. На рисунке снизу, образцы 19,20 и 22 были исключены для проведения “Порога эффективности реакции”

Наклон, Амплификация, Эффективность Реакции

Параметр Наклон (M) (показанный в окне графика стандартов) может быть использован для вычисления величин экспоненциальной амплификации и эффективности реакции с помощью следующих уравнений:

Экспоненциальная амплификация = $10^{-1/\text{наклон}}$ или

Эффективность реакции = $[10^{-1/\text{наклон}}]-1$.

Оптимальные значения для наклона, амплификации и эффективности реакции равны $-3,322$; 2 и 1, соответственно. Эффективность реакции указывается в количественном отчёте.

Наклон рассчитывается делением изменения величины C_t на изменение логарифма концентрации (например, количество копий). Эффективность амплификации 100% означает удвоение продукта амплификации в каждом цикле, результатом чего являются наклон, равный $-3,322$, фактор амплификации, равный 2, и эффективность реакции, равная 1.

При наклоне равном $-3,322$, расчеты будут следующими:

Величина амплификации: $10^{-1/-3,322} = 2$,

Эффективность реакции: $[10^{-1/-3,322}]-1 = 1$.

Далее приводятся два примера для двух различных значений наклона.

Величина наклона, равная $-3,8$, означает, что реакция характеризуется величиной амплификации примерно 1,83 и эффективностью реакции 0,83 (или 83%).

Для такой величины может быть несколько причин. Если эту величину необходимо улучшить, то можно предпринять такие шаги по оптимизации, как изменение концентрации праймеров или зонда, концентраций $MgCl_2$ или Sybr-Green I.

Наклон, равный -3 , означает, что эффективность реакции более 100%. Причиной этого может быть непропорциональное расщепление зонда по отношению к нарабатанному количеству ампликона. К тому же, если R-значение низкое, то статистическая ошибка может вызвать неправильное значение эффективности реакции.

Отклонение

В формуле описываются соотношение между двумя переменными, отклонение изображается в виде буквы B ($y = Mx + B$). Отклонение также иногда отсекается. B представляет C_t взятую в концентрации 1 единица. Для замены 1 в формуле расчета концентрации показано внизу:

$$C_t = \log(1) * M + B$$

$$C_t = 0 * M + B$$

Результат $C_t = B$

Отсечение можно изменить от теста к тесту и это менее стабильная размерность, чем градиент. По этой причине, градиент анализируется чаще, чем отсечение.

Главное окно

Главное окно показывает график амплификации в логарифмической шкале. При нажатии на "Линейный размер" внизу окна изменяются размерность с логарифмической размерности и наоборот. Изменения между этими размерностями может отражаться только на графиках, но не в расчетах. Они могут быть проверены, используя острие инструментов, нажимая правой кнопкой мыши на график и выбирая "Показать острие". Используя логарифмическую размерность, меньших объемов и более видимые на графиках, в то время как линейная размерность облегчает обзор полной реакции.

Примечание: Графики амплификации обновляются в режиме реального времени, в то время как Rotor-Gene Q получает информацию в течение теста. Это позволяет пользователю видеть результаты одновременно с нарастанием кривых экспоненциального роста. Предварительные заключения могут быть изображены и принято решения для следующего теста.

Шаблон Количественного Анализа данных

Пользователь может сохранить в виде шаблона настройки обработки графиков и выбранный уровень порога для анализа в файл с расширением .QUT. Этот файл можно импортировать и использовать для применения такого же анализа данных в других файлах анализа. Для получения более подробной информации смотрите раздел 8.1

6.6.3. Относительный Количественный Анализ по Двум Графикам Стандартов

Анализ Относительной Экспрессии генов с использованием Гена Нормализации может быть выполнен с помощью Анализа по Двум Кривым Стандартов.

Метод основан на построении для каждого из генов своего графика стандартов. По графику стандартов для каждого из генов вычисляется его концентрация.

Экспрессию Гена-Мишени выражают в виде нормализованном по концентрации Гена Нормализации, в качестве которого обычно используют один из генов

«домашнего хозяйства» (housekeeping gene). Здесь важно правильно определить образцы в таблице образцов, чтобы образцы-стандарты и реплики правильно идентифицировались.

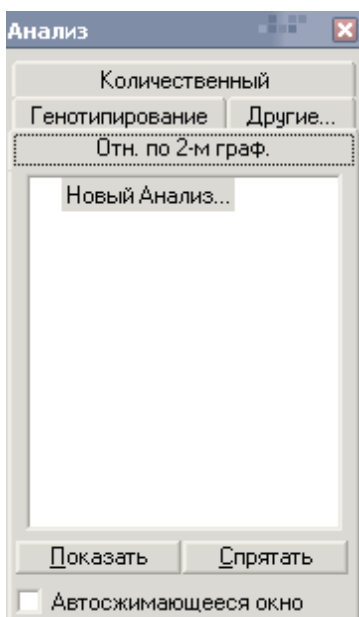
Если для анализа используется один канал, то образцы задают в таблице, состоящей из двух страниц: одна для образцов Гена-Мишени, вторая для Гена Нормализации.

Первоначально следует пометить позицию пробирки с образцом содержащей интересующий ген, с другой позицией остающейся безымянной. Потом следует пометить позицию, используемую для нормализующего гена. Затем программное обеспечение соотнесет два анализируемых образца в соответствие с их именем.

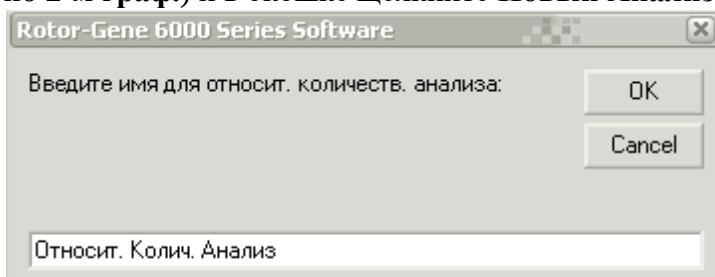
Выполнение Относительного Анализа по Двум Кривым Стандартов.

Первоначально могут быть проанализированы данные по каждому гену, используя количественный анализ. Или же результаты по каждому гену могут быть автоматически определены, используя инструмент "Автопоиск Порога".

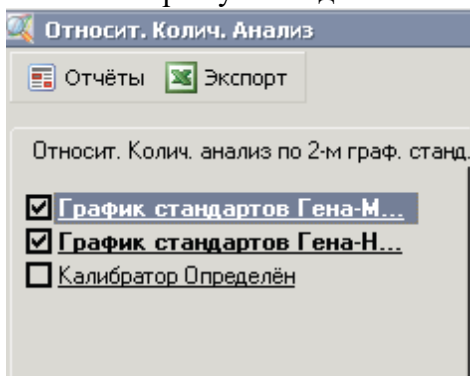
1. Сначала нужно проанализировать данные по каждому гену с помощью меню анализа **Количественный**. Если это не сделано, то автоматически такой анализ будет выполнен с использованием опции Авто-выбора уровня Порога.



2. Далее в меню **Анализ** выберите **Относит. Колич. Анализ по 2-м граф станд. (Отн. по 2-м граф.)** и в окошке щелкните **Новый Анализ**. Введите имя анализа.

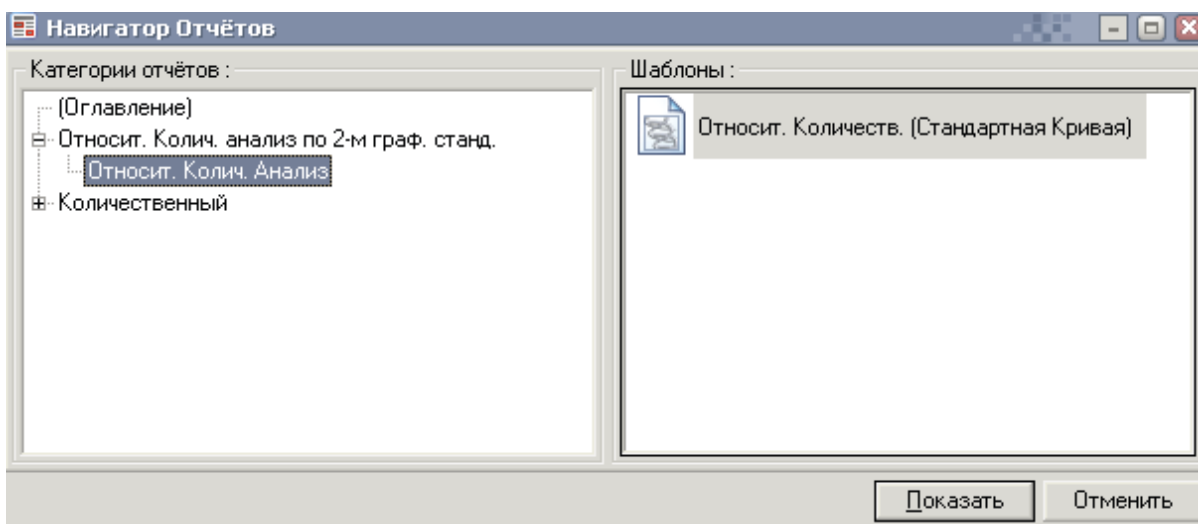


3. Требуется обозначить по каким данным (какого канала) выполняются расчеты для **Гена-Мишени** и для **Гена Нормализатора**. Для этого, щелкнув кнопкой мыши, поставьте галочку в строке **График стандартов Гена-Мишени** и в появившемся окне выберите нужный вариант, соответствующий каналу и странице в таблице образцов для Гена-Мишени, и нажмите кнопку **Выбрать**. Аналогично выполните выбор данных для Гена Нормализации, поставив галочку в строке **График стандартов Гена-Нормализатора**. Если нужно, то обозначьте образец-калибратор, пометив галочкой бокс в строке **Калибратор Определен** (опционально). Если назначен образец-калибратор, то результаты по всем образцам будут представлены нормированными относительно этого образца, результат которого принимается за единицу. После выбора нужных данных соответствующая опция будет отмечена галочкой



4. Нажмите кнопку **Отчеты**, откроется окно **Навигатор Отчетов**. Выберите нужный вид анализа и нажмите кнопку **Показать**, чтобы получить отчет о результатах. Выбрав

кнопку **Экспорт**, Вы можете экспортировать результаты в лист Excel.



5. В последнем окне подготовки отчета будет представлена таблица результатов, включающая для каждого образца рассчитанные по кривой стандартов концентрации Гена-Мишени (колонок **Мишень Конц.**) и Гена Нормализации (**Норм. Конц.**), а также относительную концентрацию (**Относит. Конц.**). Результаты можно сохранить в файл Word.

6.6.4. Относительный Количественный Анализ методом Дельта-дельта St

Метод сравнительного анализа St является методом, применяемым для анализа Относительной Экспрессии генов. Этот метод описан в следующих публикациях: "Анализ of

relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method." Livak KJ & Schmittgen TD. Methods 2001 Dec;25(4): 402-408

Этот метод не требует построения кривой стандартов в каждом анализе. Результат каждого образца сначала нормализуется по количеству ДНК-мишени в образце относительно

количества Гена Нормализации (гена «домашнего хозяйства»), представляющего собой эндогенный внутренний контроль. Это нормализованное значение далее нормализуется по калибратору. Калибратором может быть, например, образец дикого типа, не подвергавшийся

воздействиям контрольный образец или образец, взятый в нулевой момент времени.

Важно при применении этого метода, чтобы эффективность реакции амплификации для Гена-Мишени и для Гена Нормализации были одинаковыми, это нужно проверить согласно

рекомендациям, приведенным в указанной выше статье.

Важно правильно определить образцы в Редакторе таблицы Образцов, чтобы один и тот же образец был обозначен одинаково во всех частях таблицы.

Последовательность действий для выполнения такого анализа описана ниже.

1. Проанализируйте данные, используя меню Количественного анализа **Количественный**. При этом не требуется построения кривой стандартов, поскольку данный метод оперирует только значениями St.

2. В меню Анализ выберите кнопку **Другие...** и в появившемся списке выберите **Отн. Колич. Анализ метод Дельта-дельта ST**, затем **Новый Анализ**.

3. Введите название для анализа

4. В открывшемся окне **Относит. Колич. Анализ** нужно отметить галочкой бокс в строке **Валидация проведена**, чтобы можно было применить данный вид анализа (это означает, что Вы проверили корректность применения этого варианта анализа для данных Вашего теста в соответствии с рекомендациями в статье, указанной выше). Затем требуется обозначить по какому каналу и с какой страницей таблицы образцов анализируется Ген-Мишень и Ген-Нормализатор. Для этого, щелкнув кнопкой мыши, поставьте галочку в строке **Колич. Анализ Гена-Мишени**, и в появившемся окне выберите нужный вариант, т.е. соответствующий канал и страницу в таблице образцов для Гена-Мишени, и нажмите кнопку **Выбрать**. Аналогично выполните выбор данных для Гена Нормализации, поставив галочку в строке **Колич. Анализ Гена-Нормализатора**. Чтобы обозначить образец-калибратор пометьте галочкой бокс в строке **Калибратор Определен**.

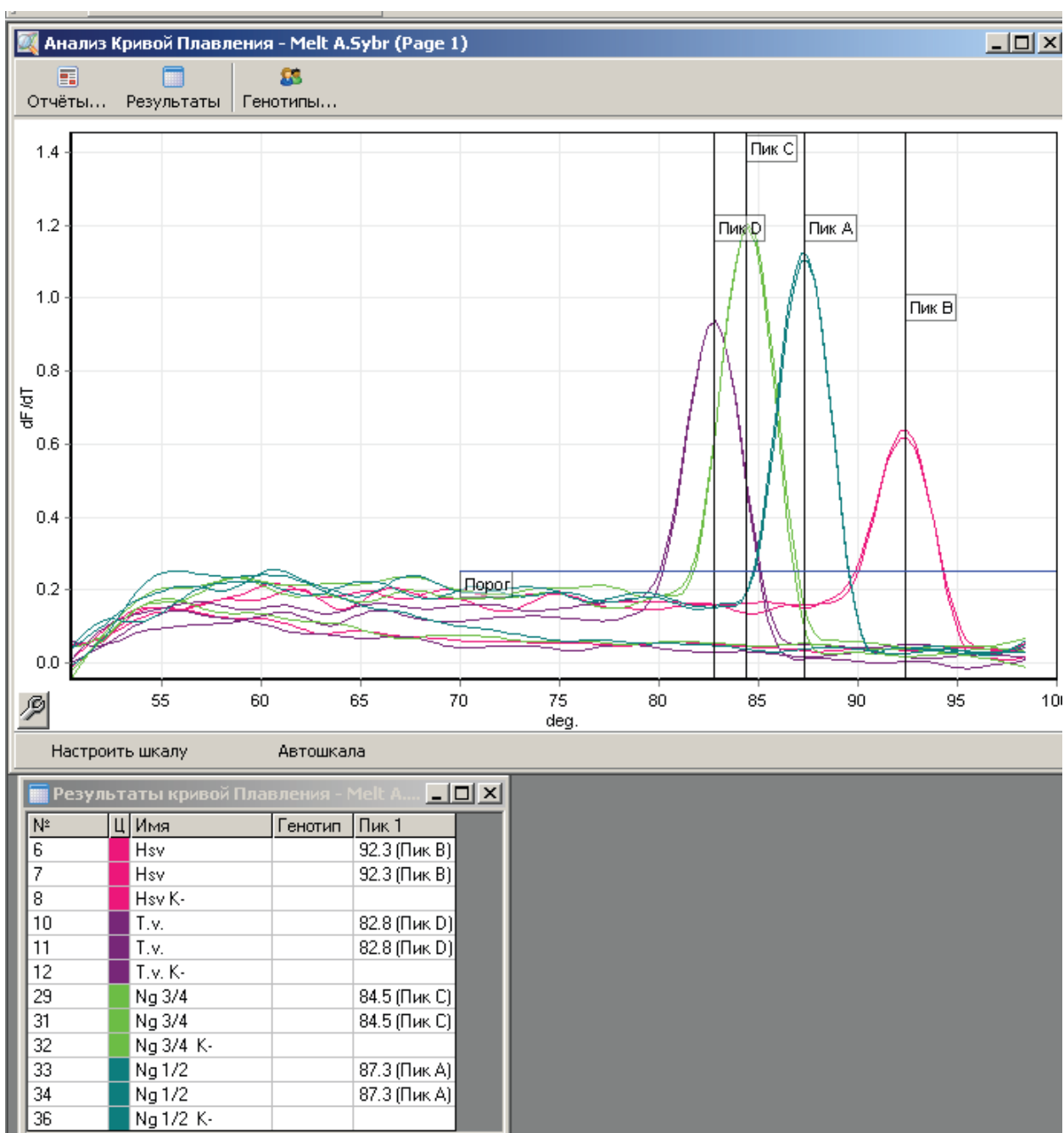
5. Нажмите кнопку **Отчеты**, откроется окно **Навигатор Отчетов**. Выберите нужный вид анализа и нажмите кнопку **Показать**, чтобы получить отчет о результатах.

6. В последнем окне подготовки отчета будет представлена таблица результатов, включающая для каждого образца значения *St* для Гена-Мишени в графе *Мишень ST*, *St* Гена Нормализации в графе *Норм. ST*, и Относительную Концентрацию в графе *Относит. Конц.* Когда определен образец-калибратор, то Относительные Концентрации образцов представлены в виде их отношения к концентрации образца-калибратора, принятой за единицу. Результаты можно сохранить в файл Word

6.6.5. Плавление - Анализ кривых плавления

Меню анализа **Плавление** анализирует кривые производной флуоресценции по температуре, полученные из первичных данных по кривым плавления после сглаживания. Вы можете использовать этот раздел меню анализа, вызвав его с помощью кнопки **Плавление** в меню **Анализ**, для проведения генотипирования или других видов анализа. Пики на кривой можно объединять в группы, указывая диапазон температур для группы пиков. Можно устанавливать порог для дискриминации незначительных пиков. Все пики, которые ниже порогового уровня, выбраковываются и не учитываются. Вы можете картировать пики в группах по отношению к генотипу, используя опцию **Генотип** в меню основного окна **Анализа Кривой Плавления**. При проведении такого анализа в профиле термоциклирования (обычно после окончания ПЦР-амплификации) добавляют операцию **Плавление (Новое Плавл.)**, чтобы получить кривые зависимости флуоресценции от температуры, по которым определяются температуры плавления продуктов реакции. При этой процедуре температура образцов повышается линейным образом и на каждом шаге регистрируется флуоресценция каждого образца. Чтобы проанализировать данные кривых плавления нужно выбрать в меню **Анализ** кнопку **Плавление** и затем нажать кнопку **Показать**, выбрав анализируемый канал в открывшемся списке. При этом откроется графическое окно, в котором будут представлены дифференциальные кривые плавления – то есть графики производной исходной кривой плавления по температуре (dF/dT).

.



Обратный знак dF/dT : Прежде чем приступить к определению величины пиков убедитесь, что знак dF/dT выбран верно, чтобы давать положительные пики. Опция **Перевернуть** позволяет изменить знак dF/dT на обратный, если пики перевернуты вниз.

Пики – пиковые области - используются для определения области температур, в которой ожидается возникновение пиков, определяемых как одна группа. Программа анализа плавления собирает пики в пиковые группы, исходя из фактических величин пиков на кривой. На экране анализа кривой плавления пики могут быть определены и описаны различными методами. Одним из них является автоматический вызов всех пиков для каждого образца. Другой способ состоит в определении положения значимых пиков, что удобно использовать при генотипировании образцов. Любой пик, находящийся в заданном диапазоне от указанного положения Пика, будет

приписан к этому Пика. Если два указателя положения Пика расположены близко друг к другу, то пик, полученный для образца, будет приписан к ближайшему обозначенному пика.

Примечание: Группы пиков не должны использоваться для оценки расположения пиков. Для этих целей используйте таблицу автоматического вызова пиков.

Пики: Чтобы определить Пик щёлкните по кнопке **Новый**, затем щёлкните и удерживайте щелчок на графике, чтобы определить центр температурного диапазона для данного пика. Чтобы добавить другой пик, повторите процесс или используйте кнопку **Удалить** для удаления Пиков.

Порог: Чтобы установить пороговый уровень, щелкните по значку сетки с красной стрелкой в строке **Порог**, затем щёлкните на графике и, удерживая щелчок, протащите пороговую линию до желаемого уровня. Можно также задать уровень порога, введя численное значение в текстовом боксе в строке **Порог**. При этом пики ниже порогового уровня учитываться не будут.

Порог Темп-ры: Порог по температуре. Чтобы установить порог по температуре, щелкните по значку сетки с красной стрелкой в строке **Порог Темп-ры**, затем щёлкните на графике и, удерживая щелчок, протащите пороговую линию вправо. Это применяет пороговую линию для температуры: пики при более низких температурах не учитываются.

Элементы панели инструментов

Отчеты: Открывает окно для выбора Отчёта об анализе кривых плавления, где можно выбрать отчёт для предварительного просмотра.

Результаты: Выводит на экран таблицу результатов, в которой фиксируются пики в образцах.

Генотипы: Открывает окно конфигурации генотипов, где вы можете определить соответствие между пиками и специфическими генотипами.

Назначение пиков

☒ Перевернуть

Порог : 0.25

Порог темп-ры : 70

Пики

Имя	Знач.	Ширина
Пик А	87.3	4

Новый Правка Удалить

Шаблон анализа

<пусто>

Импорт... Экспорт...

Этот экран дает Вам возможность определить генотипы по тем группам пиков, в которые фиксируются на кривых плавления образцов. Конфигурация генотипов, заданная по умолчанию, показана на экране. При этом гетерозиготные образцы имеют два пика, гомозиготные образцы (мутанты) дают один пик в первом бине А, а образцы дикого типа — в втором бине В. Рядом с названием каждого генотипа находится поле для обозначения сокращенного названия. Оно используется при распечатывании отчетов о генотипировании таким образом, чтобы все результаты легко читались на экране.

Шаблон Анализа данных кривых плавления Плавление

Пользователь может сохранить настройки нормализации кривых, пороги, настройки генотипов и бинов для анализа, экспортированные с помощью кнопки **Экспорт** в файл с расширением **.MET**. Этот файл можно импортировать кнопкой **Импорт** и использовать для приложения такого же анализа данных в других файлах анализа кривых плавления.

6.6.6. Сравнительный Количественный Анализ

Опция меню анализа **Сравнит. Количеств. (Сравн. Количеств.)** используется для сравнения относительной экспрессии гена в образцах с экспрессией в контрольном образце при отсутствии кривой стандартов. Такой подход часто используется при анализе с помощью микрочипов.

1. Чтобы выполнить такой анализ в меню анализа выберите кнопку **Другие...** и в появившемся списке выберите **Сравнит. Количеств.**, выберите двойным щелчком мыши канал, данные которого требуется проанализировать.

2. Выберите контрольный образец в появившемся меню **Calibrator Replicate** в правой части экрана под таблицей образцов.

3. В таблице под графиком будут представлены результаты автоматического расчета. В таблице в первой колонке указаны названия образцов. Во второй колонке, которая озаглавлена «*Точка Подъема (Takeoff)*», для каждого образца указана точка начала амплификации. График второй производной от кривой накопления флуоресцентного сигнала в ходе амплификации содержит пик, соответствующий максимальной скорости нарастания флуоресцентного сигнала. Точка начала амплификации, *Точка Подъема*, определяется как цикл, при котором величина второй производной составляет 20% от своего максимального значения. Эта точка указывает на конец базального участка с шумами сигнала и начало экспоненциальной фазы.

На приведенном ниже рисунке показан график второй производной от кривой накопления флуоресцентного сигнала в ходе реакции и показано относительное расположение пика и *Точки Подъема*. ____

Третий столбец в таблице результатов - «*Амплификация*» - представляет эффективность реакции в каждом образце. В результате реакции со 100%-ой эффективностью значение амплификации было бы равно 2 для каждого образца, это означает, что в каждом цикле происходит удвоение количества ампликонов. Что касается необработанных данных, то в логарифмической фазе сигнал должен усиливаться в два раза за каждый цикл. Таким образом, если сигнал во время 12 цикла был равен 50, затем во время 13 цикла он повысился до 51, он должен возрасти до 53 флуоресцентных единиц во время 14 цикла. Все

значения показателя *Амплификация* для каждого образца усредняются для получения величины амплификации, которая показана справа под таблицей образцов. Чем больше колебания рассчитанных величин эффективности амплификации в каждом образце, тем больше будет доверительный интервал (показан в виде значения после символа $\pm$). При большом количестве (N) анализируемых образцов доверительный интервал указывает диапазон в который с вероятностью 68,3% попадают значения показателя эффективности реакции в образцах (1 стандартное отклонение). Удваивая $\pm$ интервал, получим 95,4%

доверительный интервал при большом количестве образцов N. ____

Образцы-калибраторы

Также как и для метода «дельта-дельта C_t » относительного количественного анализа (Livak, 1991) для рассматриваемого метода необходимо знать параметры образца калибратора, чтобы определять остальные образцы относительно него. Обратите внимание, что если образец-калибратор имеет реплики в виде нескольких образцов с одинаковым именем, то будет рассчитываться среднее значений параметра *Точка Подъема* этих образцов. Таким образом, чтобы воспользоваться усредненными по нескольким репликам параметрами образца-калибратора, необходимо обозначить эти реплики одним и тем же именем.

Средняя величина амплификации нужна, чтобы правильно рассчитать для образца экспрессию гена в нем. Если, например, величина амплификации в образце ниже, то такое же количество ампликонов с ДНК-мишени будет наработано позже, чем при более высоком

показателе амплификации. Основываясь на точке начала амплификации *Точка подъема* и показателе эффективности реакции в образце, программа рассчитывает относительную концентрацию в каждом образце по сравнению с образцом-калибратором, заданным пользователем. Концентрация указана в формате научной записи числа.

Последовательность действий для расчета относительной концентрации:

1. Рассчитывают точки начала амплификации *Точки подъема*, основываясь на пиках второй производной.
2. Рассчитывают среднее возрастание флуоресцентного сигнала (не обработанных данных) по 4 точкам (циклам) непосредственно после *Точки подъема* и таким образом определяют показатель амплификации образца.
3. Выбросы значений показателя амплификации (резко отличающиеся от остальных) удаляются, чтобы учесть возможность шумов фоновой флуоресценции.
4. Все значения показателя амплификации, кроме выбросов, усредняют, чтобы рассчитать среднюю эффективность амплификации *Сред. Амплиф.*
5. Для всех образцов, являющихся репликами образца-калибратора рассчитывается среднее показателя начала амплификации *Точка подъема*.
6. Относительная концентрация образца рассчитывается по формуле:
 $\text{Амплификация}^{\wedge} (\text{Точка подъема калибратора} - \text{Точка подъема данного образца})$
7. Рассчитанная относительная концентрация представляется в формате научной записи.

6.6.7. Генотипирование

Генотипирование: Открывает окно раздела меню анализа, предназначенного для генотипирования. Для этого анализа используются кинетические данные по двум или более каналов.

Для Генотипирования нужно выделить несколько каналов в списке, данные которых Вы хотели бы проанализировать. Для проведения такого анализа либо удерживайте клавишу **CTRL** и щелкните мышью, чтобы высветить каждый канал, который Вам хотелось бы проанализировать, либо протащите мышь по этим каналам. Как только желаемые каналы высветились, щёлкните по кнопке **Показать**. Список обновится, показывая все выбранные каналы на одной линии с пометкой (галочкой), стоящей рядом с ними. Это показывает, что все они используются в одном анализе. Вы можете «разделить» эти каналы, сделав щелчок правой кнопки мыши на анализе и выбрав опцию **Удалить Анализ**. Тогда Вы сможете включить эти каналы в другой анализ Генотипирования.

87

Пожалуйста, обратите внимание, что один канал может быть использован лишь однократно в каждом типе анализа.

Анализ с помощью меню **Генотипирование** позволяет проводить генотипирование, используя флуоресцентно-меченые зонды. Полученные генотипы образцов выводятся на экран в таблице результатов.____

Панель инструментов – находится в основном окне данного анализа вверху и включает следующие опции:

Отчеты: Открывает для предварительного просмотра отчет по анализу Генотипирование.

Результаты: Выводит на экран таблицу результатов генотипирования. Эта таблица открывается с установками по умолчанию, когда анализ впервые выводится на экран. Опции нормализации и обработки данных: **Динамич. фон, Коррект. уклона, Игнор. Первые и Устранение выбросов.** Эти опции объяснены в главе «Количественный анализ».

Порог для типирования: Введите нужные значения в указанные текстовые ячейки, чтобы обозначить порог распознавания (дискриминации) генотипа.

Все образцы, графики флуоресценции которых, превышают (пересекают) эту линию порога, будут считаться положительными по соответствующему каналу, т.е. содержащими соответствующую ему ДНК-мишень. Чтобы установить эти значения 88

графически, нажмите на кнопку с сеткой справа от каждой текстовой ячейки, затем перетащите уровень порога на графике.

Генотипы...: Открывает окно таблицы генотипов для установления соответствия между генотипом и каналом (каналами) по которому регистрируется сигнал об амплификации (положительный результат) при данном генотипе. На основании этой таблицы проводится анализ и интерпретация результатов генотипирования.

Полученный результат указывается в графе Генотип в таблице результатов.

В приведённом выше примере образец гетерозиготен, если кривые нормализованной флуоресценции этого образца по каналам **Cycling A.Green** и **Cycling A.Orange** пересекают заданный порог.

Шаблон Анализа Генотипирование

Пользователь может сохранить настройки нормализации кривых, выбранного уровня порога и настроек генотипов для анализа, экспортированные с помощью кнопки **Экспорт...** в файл с расширением **.ALT**. Этот файл можно импортировать кнопкой **Импорт...** и использовать для приложения такого же анализа данных в других файлах анализа.

6.6.8. Анализ Распределения

Анализ распределения позволяет генотипировать образцы на основании сравнения кривых амплификации, детектируемых на двух различных каналах. Результаты будут представлены в одном окне, где Вы можете визуальное сравнить результаты по обоим каналам для каждого образца. В отличие от анализа Генотипирование определение генотипа здесь основано на том, в какой области находится точка, отображающая данный образец на диаграмме распределения.

Для анализа распределения не достаточно дважды щёлкнуть по каналу, который Вы хотели бы проанализировать, поскольку такой анализ проводится по нескольким каналам одновременно.

Для проведения такого анализа либо удерживайте клавишу SHIFT и щелкните мышью,

чтобы высветить каждый канал, который Вам хотелось бы проанализировать, либо протащите мышь по этим каналам. Как только желаемые каналы высветились, щёлкните по кнопке **Показать**. Список пополнится и будет показывать все выбранные каналы на одной линии с пометкой (*галочкой*), стоящей рядом с ними. Это показывает, что все они используются в одном анализе. Вы можете «разделить_____» эти каналы щелчком правой

кнопки мыши на анализе и выбором опции **Удалить Анализ**. Тогда Вы сможете включить эти каналы в другой Анализ Распределения. Обратите внимание, что один канал может быть использован однократно в каждом типе анализа.

Панель инструментов:

Отчеты: Открывает для предварительного просмотра Отчет об Анализе Распределения.

Результаты: Выводит на экран таблицу результатов генотипирования. Генотип каждого образца определяется в соответствии с определенными пользователем областями на диаграмме распределения. Когда анализ впервые выводится на экран, эта таблица открывается с установками по умолчанию.

Опции нормализации и обработки данных: **Динамич. фон, Коррект. уклона, Игнор. Первые и Устранение выбросов.** Эти опции объяснены в главе «Количественный анализ».

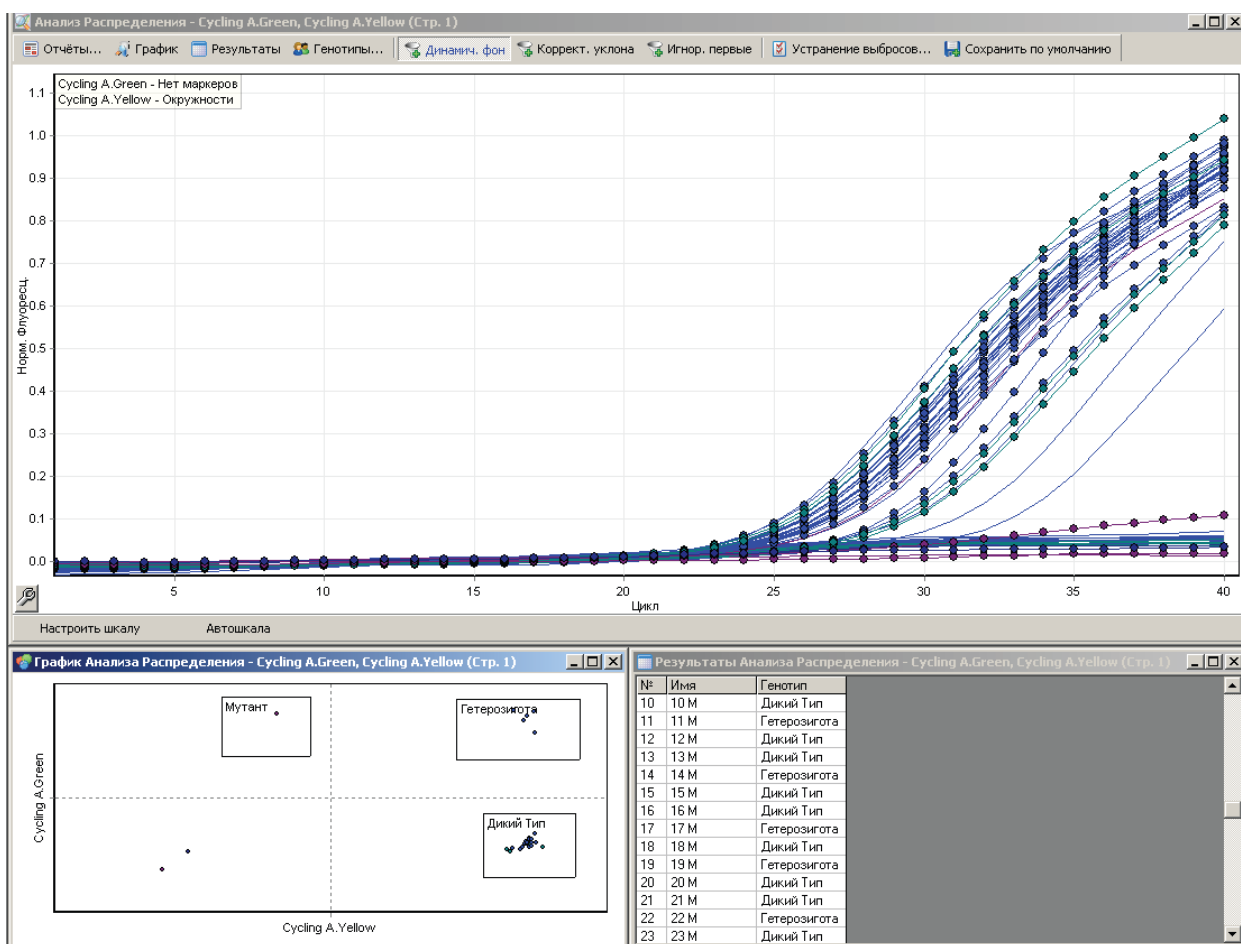
Генотипы: Открывает окно таблицы генотипов, в которой определяют, какой генотип определяется по каждому из каналов.

Это окно позволяет Вам задать соответствие генотипа и канала, по которому регистрируется амплификация для Анализа Распределения. Определение генотипов здесь сделает доступной опцию для определения генотипов на диаграмме распределения. Обратите внимание, что результаты будут анализироваться на основе генотипов, заданных пользователем в окне **График Анализа Распределения**. В таблице, представленной выше, определены генотипы по умолчанию, которые используются для графического представления и будут выведены в соответствующих углах графика распределения.

График Анализа Распределения: На этой диаграмме представлены данные по обоим каналам в виде точек, соответствующих образцам, координаты которых по соответствующим осям отражают сигнал об амплификации, регистрируемый по соответствующему каналу. Пользователь может изменять границы областей на графике, которые отвечают различным генотипам *Дикий тип, Гетерозигота, Мутант*. Для этого нужно кликнуть по нужной области и протащить мышь для выделения желаемой области. В окне диаграммы распределения пространство нормализовано с учетом различной степени нарастания сигнала по каждому из каналов и переведено в логарифмический масштаб, чтобы усилить различия между образцами разных генотипов.

Шаблон Анализа Распределения

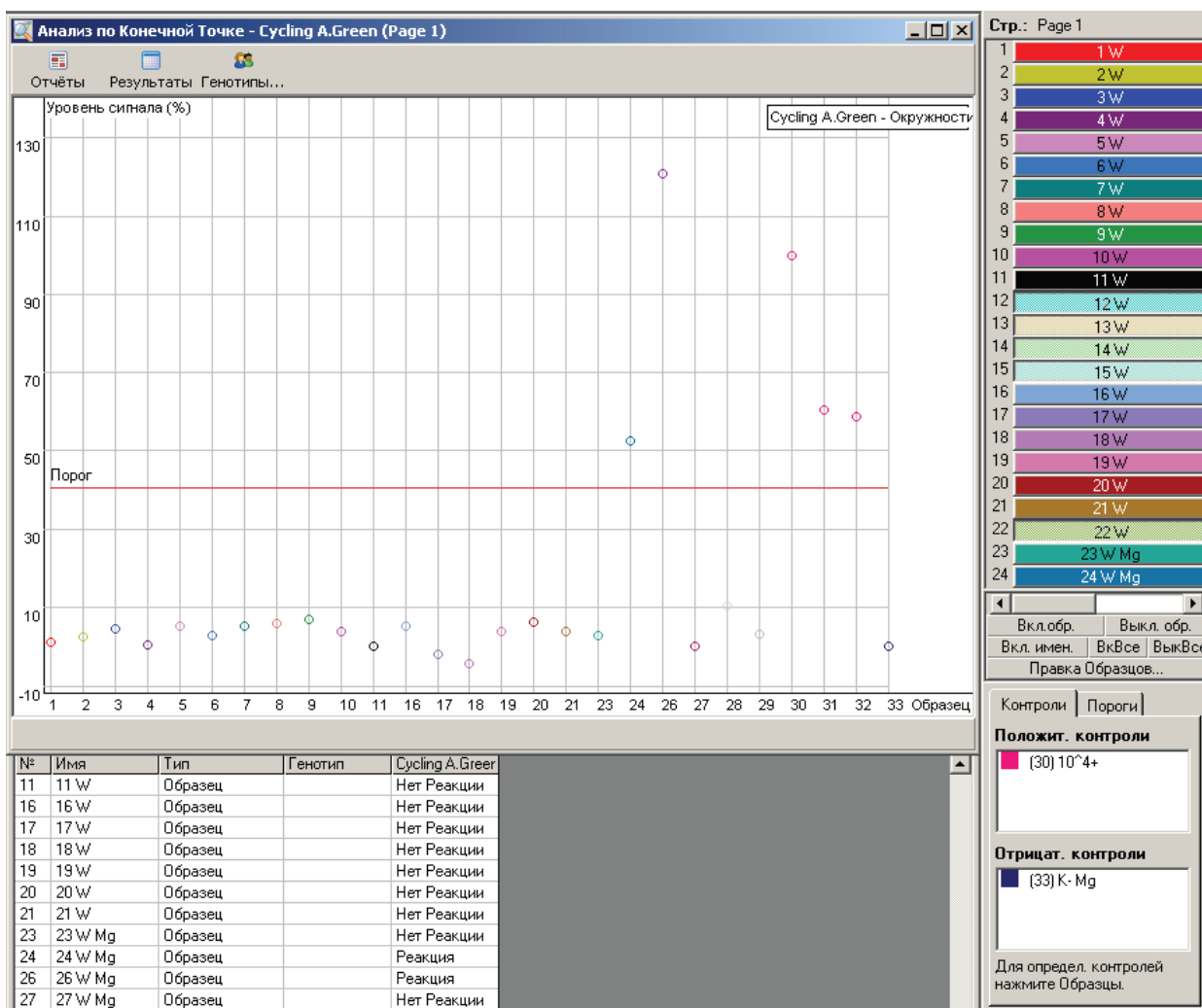
Пользователь может сохранить настройки генотипов и границы областей на Графике Распределения, экспортированные с помощью кнопки **Экспорт...** в файл с расширением **.SCT**. Этот файл можно импортировать кнопкой **Импорт...** и использовать для приложения такого же анализа данных в других файлах анализа кривых плавления.



6.6.9. Анализ по Конечной Точке

Анализ по Конечной Точке – метод, который позволяет детектировать результаты амплификации, проведенной на любом другом термоциклере (обычном термоциклере без системы детекции) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала, обусловленного накоплением продукта ПЦР. Это – качественный анализ (т.е. результат либо положительный, либо отрицательный). Образец определяется как положительный, если его нормированный флуоресцентный сигнал по соответствующему каналу превышает пороговый уровень.

Ниже показано основное окно, открывающееся при использовании меню **Анализ по Конечной Точке** программы **Rotor-Gene**.



Функционально меню **Анализ по Конечной Точке** сходно с меню **Генотипирование**, поскольку также предоставляет результат анализа в форме «**Реакция**» или «**Нет реакции**», и можно присваивать имена различным комбинациям результатов реакции по разным каналам. Анализ по Конечной Точке отличается тем, что измерение флуоресценции проводится только один раз, а не из цикла в цикл для каждого образца. Поэтому для выполнения анализа данных пользователю нужно задать дополнительную информацию – определить в таблице образцов контрольные образцы:

Положительный контроль и **Отрицательный контроль**, выбрав соответствующий тип образца.

Чтобы упростить представление данных, уровень сигнала каждого образца нормализуется относительно уровней сигнала от заданных Положительных и Отрицательных контрольных образцов по каждому каналу. Пользователь устанавливает уровень порога сигнала, по отношению к которому образцы распределяются на положительные и отрицательные.

Термины, используемые при Анализе по Конечной Точке

Положительный контроль – Образец, о котором заранее известно, что в нем должна происходить реакция и который представляет уровень сигнала, равный 100%

Отрицательный контроль – Образец, о котором заранее известно, что в нем не происходит специфическая реакция. Он представляет уровень сигнала 0%.

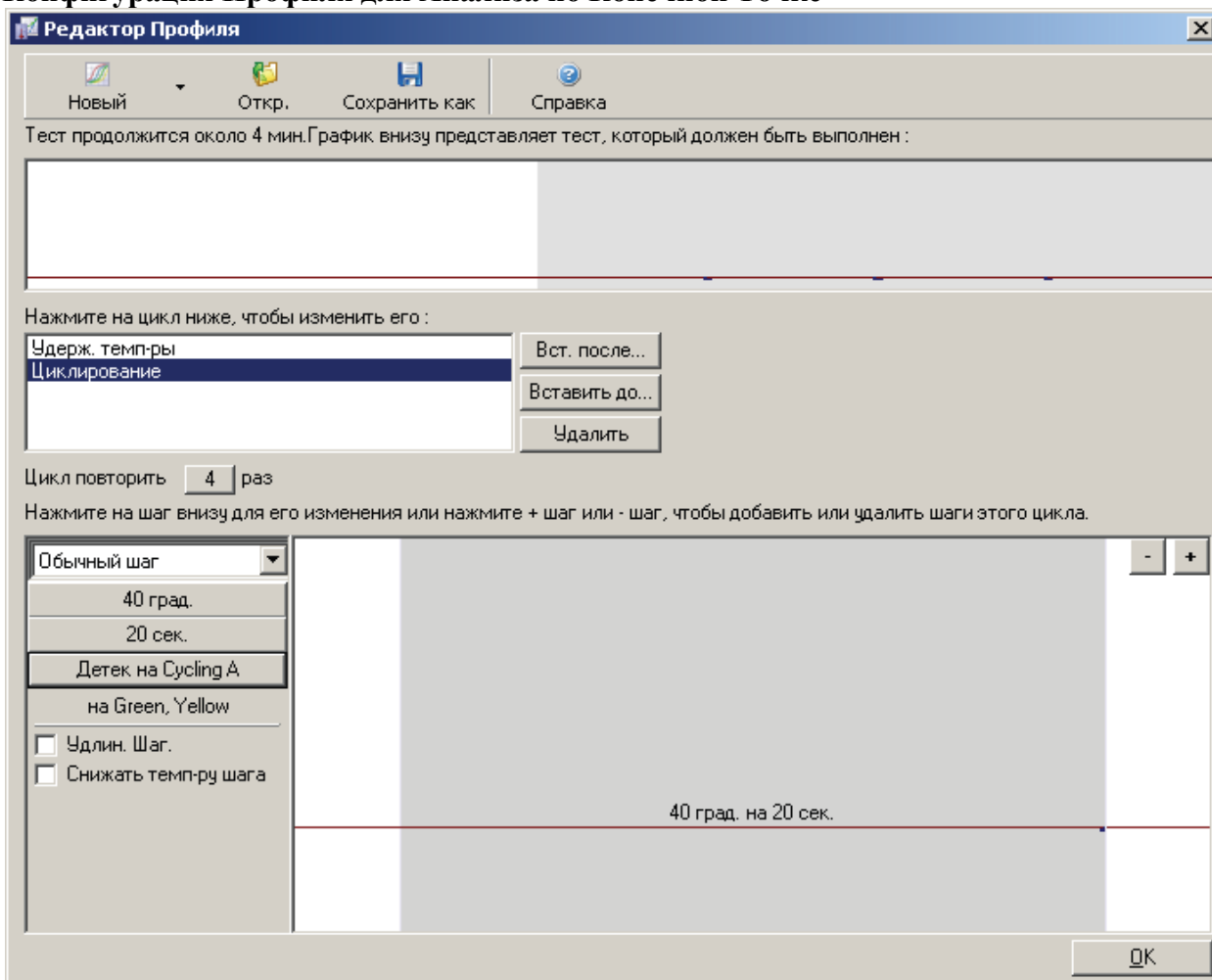
Порог – Уровень сигнала в процентах, при превышении которого образец считают положительным (прореагировавшим). Значение этого параметра пользователю следует задавать при каждом анализе данных.

Уровень сигнала (%) – Величина относительной флуоресценции в процентах, выраженная относительно разности максимального флуоресцентного сигнала

Положительного контроля и минимального флуоресцентного сигнала Отрицательного контроля.

Генотип – Интерпретация различных вариантов результатов реакции по различным каналам. Например, можно определить как *Гетерозиготные* образцы, для которых по обоим каналам (например, **Green** и **Yellow**) получен положительный результат реакции. Меню **Генотип** можно также использовать для того, чтобы ввести обозначения для регистрации результатов ПЦР-анализа с учетом использования внутреннего контроля. Например, можно обозначить результаты как «*Положительный*», «*Отрицательный*» и «*Ингибирование*» в соответствии с результатами, полученными по соответствующим каналам.

Конфигурация Профиля для Анализа по Конечной Точке



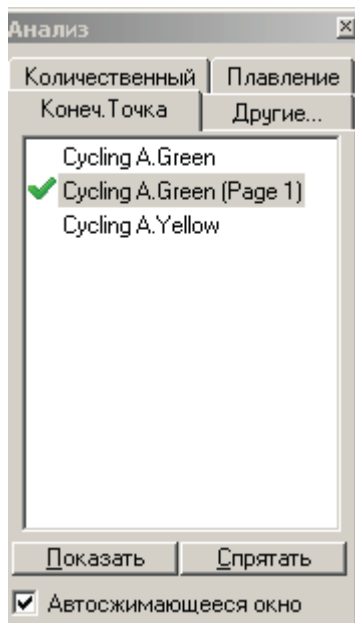
Для проведения **Анализа по Конечной Точке** проведите амплификацию образцов на другом термоциклере в соответствии с требуемым для данной реакции режимом термоциклирования. По окончании реакции перенесите пробирки в **Rotor-Gene** и проведите профиль состоящий из стадии **Удерж. Темп-ры** при температуре, например, **40°C** в течение минуты, а затем цикла из одного шага при той же температуре **40°C** в течение **20** секунд с измерением флуоресценции на соответствующих каналах, с повторением этого цикла четыре или пять раз. Профиль представлен на примере ниже: _____

Анализ данных

Вы можете проводить **Анализ по Конечной Точке** по нескольким каналам одновременно.

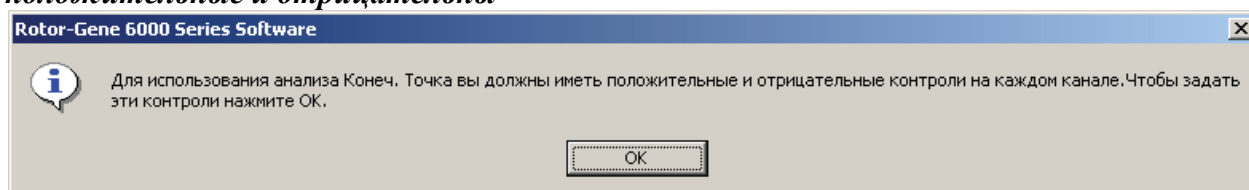
Для выполнения этого вида анализа данных выберите в меню **Анализ**, затем **Другие...**, в появившемся списке выберите **Анализ по Конечной Точке** (вкладка **Конечн. Точка**), в списке каналов в этом же окне выделите с

помощью мыши требуемые каналы и нажмите кнопку **Показать**. Появится окно Анализа по Конечной Точке.



Определение контролей

Если Положительный и Отрицательный контроли заранее не были заданы в таблице образцов, то когда Вы выберете в меню выполнение анализа EndPoint для этих данных, то появится следующее сообщение: **«Для использования анализа Конеч. Точка вы должны иметь положительные и отрицательны**



После того как Вы нажмете кнопку ОК, откроется окно таблицы образцов, позволяющее определить образцы, представляющие собой Положительный контроль и Отрицательный контроль. Это окно аналогично окну редактора таблицы образцов. Если образец является положительным контролем хотя бы по одному каналу, определите его тип в таблице образцов как Положительный контроль. Аналогично для отрицательных контролей (хотя бы по одному каналу) задайте тип Отрицательный контроль. Остальные образцы следует определить как Образец.

Выбирать положит. и отриц. контроли

Пожалуйста, выбирайте по крайней мере один положит. и один отриц. контроль и нажмите OK. Эти контроли будут использованы в качестве ссылок на флуоресценцию требуемую для реакции. Вы должны выбрать

Установки:

Формат Задан. Конц: 123457 Единица: IU/ul Больше Опций

Образцы:

Положительный контроль

С	N°	Имя	Тип	Группы	Задан. Конц.	Выбран.
	23	23 W Mg	Образец			Да
	24	24 W Mg	Образец			Да
	25	25 W Mg	Образец			Да
	26	26 W Mg	Образец			Да
	27	27 W Mg	Образец			Да
	28	BKD 1x	Образец			Да
	29	BKD 1x	Образец			Да
	30	10 ⁴ +	Положительный			Да
	31	10 ³ +	Образец			Да
	32	10 ³ +	Образец			Да
	33	K- Mg	Отрицательный			Да
	34		Образец			Нет
	35		Образец			Нет
	36		Образец			Нет

Стр.:
Имя: Page 1 < > Новый Удалить ☒ Синхронизиров. стр.

OK Отменить

Нормализация

Нормализация данных Анализа по Конечной Точке приводит данные для всех образцов по всем анализируемым каналам в диапазон от **0** до **100**. При этом необходимо задать минимум по одному контрольному образцу, представляющему **Положительный контроль** и **Отрицательный контроль**, однако потребуется больше контролей, если Вы проводите анализ по нескольким каналам, а используемые контрольные образцы – не мультиплексные (т.е. содержат одну ДНК-мишень, детектируемую по одному каналу). Следует также использовать несколько контролей каждого типа, если существует риск, что положительный контроль может не амплифицироваться.

1. Для каждого канала из всех образцов, определенных как положительные контроли, будет выбран один с максимальным уровнем флуоресценции и его флуоресцентный сигнал будет принят за **100%**. Таким образом, если задано два или несколько положительных контролей, то даже если один из них не прореагирует, полученные при проведении анализа данные можно будет интерпретировать.
2. Из всех отрицательных образцов будет выбран один с самым низким уровнем флуоресценции и этот уровень принимается за **0%**.
3. Данные измерений интенсивности флуоресценции для остальных образцов нормализуются относительно *наибольшего* уровня положительного контроля и *наименьшего* уровня отрицательного контроля. ____

В данном примере получены удачные данные, для двух положительных контрольных образцов получены близкие значения, аналогично для двух отрицательных контрольных образцов, а значения, полученные для исследуемых образцов **5** и **6**, находятся в диапазоне между значениями, полученными для *положительных* и *отрицательных контролей*.

Далее приведены значения нормализованного сигнала

Образец 1 определен как *Положительный контроль* и величина флуоресцентного сигнала, полученного для него, имеет наибольшее значение, поэтому его уровень сигнала принят за 100%. Образец 4 – *Отрицательный контроль*, для которого получен наименьший уровень флуоресцентного сигнала, определяет уровень сигнала 0%. Очевидно, что образец 5, дал положительный результат реакции, а образец 6, по-видимому, отрицательный.

Если вы получаете сообщение, что сигнал образца *Отрицательный контроль* выше, чем образца *Положительный контроль*, значит, образцы были обозначены неправильно. Поскольку такие результаты нельзя логически интерпретировать, то программа выдаст следующее предупреждение: «**График не может быть построен, так как отрицательные контроли находятся на том же уровне или выше, чем положительные контроли.**».

Генотип	Каналы Детекции
Дикий Тип	Cycling A.Green
Гетерозигота	Cycling A.Green Cycling A.Orange
Мутант	Cycling A.Orange

Нормализация при анализе по нескольким каналам

Если Вы анализируете данные по нескольким каналам, то, тем не менее, **Отрицательные** и **Положительные контроли** задаются в одной таблице.

Если образец является положительным контролем хотя бы по одному каналу, определите его тип как **Положительный**. Аналогично для отрицательных контролей (хотя бы по одному каналу) задайте тип **Отрицательный**.

Таким образом, если образец является положительным контролем по каналу **Green**, но не является контролем по каналу **Yellow**, его следует определить как **Положительный контроль**. Поскольку другой положительный контроль по каналу **Yellow** будет давать положительный результат реакции, образец, являющийся контролем по каналу **Green** будет проигнорирован (не будет использоваться как положительный контроль по каналу **Yellow**). Единственное ограничение здесь состоит в том, что один образец не может одновременно являться положительным контролем по одному каналу и отрицательным контролем по другому.

Порог: используется для того, чтобы определить уровень сигнала в процентах, необходимый, чтобы считать образец прореагировавшим по каждому каналу. Когда заданы положительный и отрицательный контроли, все данные по сигналам образцов по всем каналам будут нормализованы в одном масштабе от **0** до **100%**, поэтому для анализа достаточно определить один уровень порога и в том случае, если анализ проводится по нескольким каналам.

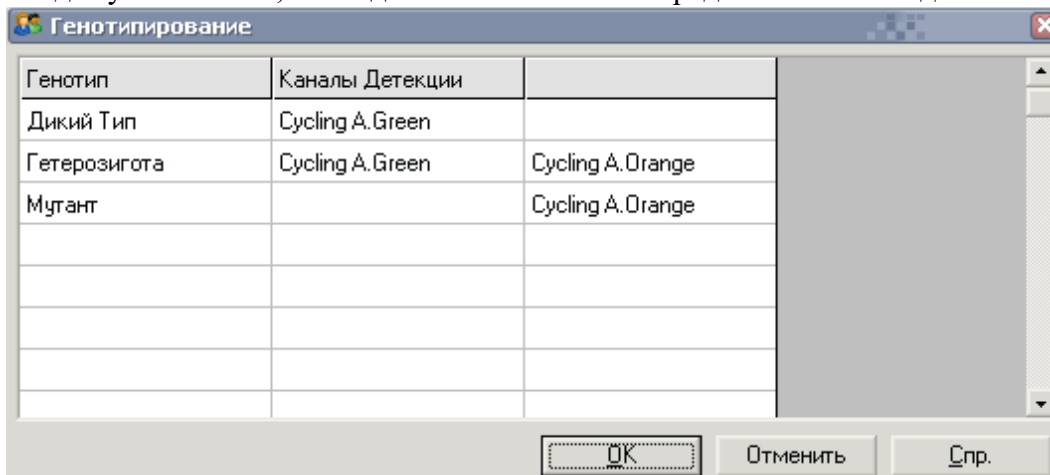
Щелкните кнопкой мыши на линии порога и передвиньте ее на нужный уровень в области между **0** и **100 %**. Уровень порога не должен быть слишком близко к точкам, полученным для образцов с обеих сторон от него (если точки образцов находятся близко

к порогу, это признак того, что данные нельзя интерпретировать с уверенностью). Если

разность между реагирующим и не реагирующим образцом составляет всего **2-3%**, то один и тот же образец при повторном анализе может оказаться как с одной, так и с другой стороны линии порога, то есть давать как положительный, так и отрицательный результат

Генотипы

Как и в меню Генотипирование, данная опция открывает окно, в котором можно задать схему определения результата в зависимости от комбинации результатов по каждому из каналов, т.е. задать какой генотип определяется на каждом из каналов.



В приведенном выше примере генотип образца *Гетерозигота*, в случае, если относительные значения, полученные для этого образца, превышают порог как по каналу **Cycling A.Green**, так и по каналу **Cycling A.Yellow**.

Функцию **Генотип** можно также использовать для того, чтобы ввести обозначения для регистрации результатов ПЦР-анализа с учетом использования внутреннего контроля. Например, можно обозначить результаты как «*Положительный*», «*Отрицательный*» и «*Ингибирование*» в соответствии с результатами, полученными по соответствующим каналам.

Шаблон Анализа по Конечной Точке

Пользователь может сохранить настройки генотипа и выбранный уровень порога для анализа, экспортированные с помощью кнопки **Экспорт** в файл с расширением **.ENT**. Этот файл можно импортировать кнопкой **Импорт** и использовать для приложения такого же анализа данных в других файлах Анализа по Конечной Точке.

6.6.10. Измерение концентрации ДНК

Меню **Измерение концентрации ДНК (Концентрация)** позволяет использовать прибор и для измерения концентрации ДНК, а также для флуориметрических измерений. Ниже показано окно анализа **Измерение концентрации ДНК**.

Подготовка к проведению анализа

Для проведения анализа по измерению концентраций ДНК в образцах сначала подготовьте свои образцы-стандарты и тестируемые образцы, желательно в трех повторах каждый.

Подготовка Стандартов

Для определения концентрации ДНК в каждом из измеренных образцов используют

кривую стандартов. ДНК, используемая для образцов-стандартов, должна быть аналогичной

ДНК в измеряемых образцах. Рекомендуется измерить концентрацию ДНК хотя бы одного

образца с помощью UV-спектрофотометра и использовать его в качестве стандарта.

Минимальное количество образцов-стандартов, которые нужно использовать, составляет 3 образца. Важно, что линейность зависимости флуоресценции от концентрации сохраняется

только в диапазоне от 1 до 100 нанограмм на микролитр. (Т.е. в этом диапазоне если концентрация ДНК уменьшится в два раза, то так же в два раза уменьшится флуоресценция). Доверительный интервал для концентраций вне этого диапазона будет весьма широким из-за отклонения от линейности.

Тип измеряемой ДНК. Для разных форм ДНК наблюдаются различия при измерении концентрации, например, геномная ДНК отличается по сравнению с плазмидной ДНК. Поэтому рекомендуется измерять вместе только образцы, содержащие сходную ДНК. Не следует использовать стандарты с плазмидной ДНК для измерения геномной ДНК.

Проведение анализа

Выберите в мастере старта Быстрый Мастер Измерение концентрации ДНК__

Примечание. Убедитесь, что в первой пробирке в роторе находится положительный контроль. Без этого положительного контроля программа не сможет автоматически оптимизировать установки уровня сигнала для получения максимальной чувствительности. Подсказка об этом появится перед каждым запуском такого анализа.

Анализ данных

Меню анализа **Измерение Концентрации** основывается на зависимости флуоресценции от концентрации. Есть два доступных алгоритма, которые могут быть более или менее оптимальными в зависимости от используемых реагентов и задачи.

1. Линейная регрессия: анализируют данные, исходя из предположения о линейной зависимости и рассчитывая оценку неизвестных величин на базе линейной модели. При этом можно определить ошибку измерения по отклонению полученных данных от линейной модели и получить статистический анализ вариаций.

2. Аппроксимация сплайновой кривой. При этом варианте делается меньше допущений о зависимости флуоресценции от концентрации. Он позволяет получать более точные результаты для данных с нелинейностью, однако не позволяет получить статистический анализ вариаций.

6.6.11. HRM Анализ – Анализ Плавления Высокого Разрешения

Этот анализ позволяет характеризовать образцы ДНК-мишени по длине, GC-составу и комплементарности контрольной ДНК. Генотипирование по полиморфизму единичных нуклеотидов (SNP) – типичное применение данного анализа, при этом его использование

позволяет снизить себестоимость такого теста по сравнению с другими применяемыми для этого методами.

Использовать опцию **HRM**-анализа могут пользователи, работающие с прибором Rotor-Gene Q определенной конфигурации, предоставляющим эту опцию.

Чтобы выполнить такой анализ данных выберите в меню **Анализ** кнопку **HRM Анализ**. Дважды щелкните по значку канала, используемого для анализа. Исходные кривые плавления будут нормализованы путем усреднения их начального и конечного уровней флуоресценции с последующим приравниванием начальной и конечной точки кривой для каждого из образцов соответствующему среднему.

Для автоматического определения генотипа образцов выберите кнопку **Генотипы...** в меню основного окна (над графиками). Введите имя генотипа и номер образца, который используется в качестве положительного контроля для данного генотипа. После определения положительных контролей генотипов программа автоматически определит генотипы тестируемых образцов (генотип которых неизвестен) по форме кривой образца. Для каждого образца также рассчитывается величина параметра R, характеризующего достоверность результата.

Для более детального изучения HRM смотрите раздел 11.

6.7. Обзор основных функций в Меню

6.7.1. Меню Старт / стоп

Старт

Запускает выполнение программы анализа с определенным Температурным Профилем и установками для уровня сигнала для детекции данных. Прежде чем **Rotor-Gene** начнёт работу, появляется экран подтверждения программы анализа. На экран выводится графическое изображение планируемого профиля термоциклирования и детекции и установок параметра уровня сигнала для каждого канала.

6.7.2. Пауза

Вы можете использовать эту кнопку, чтобы приостановить и возобновить выполнение программы анализа. Поскольку выполнение этой операции может серьёзно повлиять на результаты, через все каналы будет нарисован маркёр, обозначающий цикл, в котором была включена пауза. На экране также появляется сообщение.

ОСТОРОЖНО: при паузе (временной остановке) прибор не будет охлаждаться до комнатной температуры, необходимо подождать, прежде чем можно будет брать за ротор или пробирки, находившиеся в приборе.

6.7.3. Стоп

Эту кнопку можно использовать для экстренной остановки работы прибора. При остановке работы прибора с помощью этой кнопки в меню появится подсказка, которая

попросит Вас подтвердить необходимость прекращения выполнения программы анализа.

6.8. Меню Просмотр

6.8.1. Установки Теста

Основное: Это окно позволяет просматривать информацию о проведении данного анализа, название файла анализа, дополнительные сведения, имя оператора и другие сопутствующие сведения.

Окно информации содержит всю информацию за исключением профиля, требуемого для конфигурации программы выполнения анализа. После завершения выполнения анализа на экран выводится следующая информация: тип и серийный номер прибора, использованная версия программного обеспечения, использованные для детекции каналы и время старта и окончания.

Опции прибора: Эта таблица содержит установки для конфигурации прибора **Rotor-Gene**.

Тип ротора: Следует установить тип ротора, в соответствии с тем, какой ротор установлен в текущий момент. Если открыть файл ранее проведенного анализа, то он 115 будет содержать сведения о том роторе, который был задан для использования в момент выполнения анализа.

Сообщения: Это окно выводит на экран сообщения, если оператор изменял программу анализа в процессе ее выполнения, т.е. применял такие действия, как приостановка работы прибора или пропуск циклов во время термоциклирования. Она также показывает предупреждения, полученные в ходе выполнения анализа. Следует проверить эту таблицу, если Вы получили необычные результаты.

Каналы: При создании конфигурации новой программы анализа эта таблица каналов выводит на экран текущую конфигурацию каналов, доступную для использования в приборе. Если Вы просматриваете файл уже выполненного анализа, то это окно отражает информацию о конфигурации каналов во время его проведения.

С помощью этого окна при запуске анализа Вы можете изменять параметр **Уровень сигнала** и создать или модифицировать каналы. Чтобы восстановить установки каналов по умолчанию в случае, если новые установки не подходят, щелкните по кнопке **Обнулить**.

Имя: Описывает названия каналов.

Источник: Определяет длину волны источника энергии (светодиода).

Детектор: Указывает длину волны, пропускаемую фильтром детекции (максимум пропускания).

Уровень сигнала: Устанавливает значение параметра уровень сигнала для каждого канала.

Новый: Эта опция в панели кнопок справа позволяет создавать новые каналы. При нажатии на данную кнопку открывается окно, которое запрашивает информацию о новом названии, источнике и фильтре детекции. Фильтр можно выбрать, используя ниспадающее меню рядом с каждым окном.

Схема Пробирок: Если Вы используете **72-луночный** ротор, возможно, Вы захотите реорганизовать таблицу образцов для более точного соответствия со схемой, которую Вы используете при размещении пробирок в штативах **9x8**. Опции схемы пробирок позволяют Вам обозначать образцы последовательно (по умолчанию), так что они будут

перечислены по порядку их расположения в роторе, или обозначать каждые **9** образцов (**1A, 1B, 1C** и т.д.) Это полезно при использовании многоканальной пипетки для внесения

образцов. При изменении этой установки Вам следует проделать пробный тест, чтобы убедиться, что конфигурация, которую Вы выбрали для данной опции, работает правильно, так, как Вам хотелось бы.

Защита: Это окно содержит информацию о Подписи (коде) файла анализа. Подпись – это не отменяемый ключ, который обновляется каждый раз, когда файл с данными анализа был изменен. Если какая-либо часть файла ***.Rex** была изменена вне программы, подпись и файл перестанут соответствовать друг другу. Используя подпись, вы можете убедиться, что первичные (необработанные) данные анализа никто не изменял вне программы, что файл не был подделан и температурный график достоверен. Подпись предохраняет также от непредумышленных ошибок, таких как ошибки файловой системы. ____

6.8.2. Температура (Темп.)

Температурный график показывает, как менялась температура в камере во время выполнения программы анализа. Для каждого шага программы показаны Заданная температура (*Устан.*), Фактическая температура (*Действ.*) и Время удерживания (*Держать*).

При загрузке файла уже существующего анализа температурный график показывает изменение температуры в ходе его выполнения. Вертикальная шкала имеет диапазон **20-100°C**, горизонтальная шкала отражает время в минутах. Используйте панель прокрутки для перемещения вперед и назад по графику изменения температуры.

6.8.3. Продвижение Профиля

Этот экран показывает графическое изображение профиля термоциклирования, выполняемого в данном анализе. После старта, когда прибор начал выполнять программу в затенённой части экрана показывается число циклов, которые уже были завершены. Сверху указано время в минутах, которое необходимо для завершения программы.

Внизу имеются 2 кнопки: **Пропуск** (пропустить блок), которая позволяет перескочить через любой шаг профиля и кнопка **Добав. 5 цик**, которая дает возможность добавить 5 циклов к циклическому профилю.

6.8.4. Образцы (Таблица образцов)

Это окно функционально идентично редактору таблицы образцов в Мастере Старта. Доступ к этому меню можно получить, выбрав в основной панели инструментов

Образцы, или щелкнув кнопку **Правка образцов** под цветной таблицей образцов справа (а также после щелчка правой кнопкой мыши по этой цветной таблице образцов и выбора опции Редактировать Образцы...). В данном окне Вы вводите информацию обо всех анализируемых образцах: положение пробирки в роторе, имя (идентификатор) и тип образца, а также задаёте цвет, которым будут обозначены графики данных для данного образца. Подробно эти действия описаны в разделе **6.5 Редактирование таблицы образцов**.

6.8.5. Окна

Меню **Окно** позволяет Вам расположить окна вертикально, горизонтально или организовать окна в каскад. Эта опция для организации расположения окон находится также в меню панели инструментов – кнопка **Окна**

Содержание включает все файлы помощи, рассортированные по названиям. Просто войдите в оглавление и выберите интересующую вас область. Опция **Что нового?** даёт краткий обзор новых и дополненных или модифицированных по сравнению с предыдущими выпусками программы функций и опций.

Помощь в Контексте откроет файл помощи в соответствии с активированным окном программы **Rotor-Gene**. Выбор **Web-сайт** автоматически откроет **Веб-страницу** компании-изготовителя прибора, в то время как форум можно посетить, нажав **Web-сайт**. Кнопка **О Программе** выводит информацию о версии программного обеспечения, которой Вы пользуетесь, и о серийном номере прибора.

Примечание. *Доступ на сайт изготовителя возможен только при подключении данного компьютера к сети Internet.*

6.9. Меню Защита (Безопасность информации)

Меню Защита

Программа Rotor-Gene содержит функциональные возможности, которые обеспечивают безопасность информации при работе в диагностической лаборатории. Когда программа правильно настроена, она может гарантировать следующее:

- Доступ к прибору Rotor-Gene Q или к программному обеспечению для анализа данных ограничен для и определен для различных групп пользователей.
- Изменения в файле данных анализа заблокированы
- Несанкционированные изменения фиксируются с помощью функции подписи
- Шаблоны, используемые для выполнения анализа, заблокированы

Объединение с защитой Windows

Чтобы поддерживать высокий уровень ответственности, программа Rotor-Gene управляет защитой информации не внутренне, а используя встроенную защиту Windows (Windows NT Security). Таким образом организовано управление для всех учетные записей пользователей, групп и паролей. Такая интеграция позволяет использовать один пароль для доступа к компьютерной сети и для управления доступом в программе Rotor-Gene, что означает более удобное администрирование. В больших организациях администраторы сети могут легко отменить доступ к сети для пользователей, которые уходят из компании, с помощью централизованной модели защиты информации.

Таким образом, установка защиты программы Rotor-Gene главным образом включает в себя конфигурацию установок защиты Windows в соответствии с наилучшей практикой.

Предварительные условия

Для использования защиты вы должны использовать Windows NT4 Service Pack 6, Windows 2000 или Windows XP Professional. Возможности защиты не могут быть использованы с Windows XP Home, так как эта операционная система не имеет

соответствующей модели доступа, используемой программой. Необходимо также при установке программы активировать опцию "Форсир. идент. с использованием Win NT домена".

6.9.1. Конфигурация

Здесь описано, как установить систему, чтобы использовать возможности обеспечения безопасности информации программы Rotor-Gene.

Для использования возможности защиты информации программы Rotor-Gene вы должны установить программу с опцией "Форсир. идент. с использованием Win NT домена". При этом программа запрашивает Windows домен о вашем уровне доступа и правах, что необходимо для обеспечения ответственности и безопасности информации.

Не используйте регистрацию как администратор

Большинство пользователей используют свои компьютеры как администратор, без пароля. Хотя это и удобно, но при этом невозможно определить, кто использует компьютер. В силу этого невозможно контролировать ответственность и активизировать и применять многие защитные меры программы Rotor-Gene. Когда Вы входите как *Administrator*, Вам разрешено использование всех возможностей программы. Это гарантирует, что пользователи, которые не нуждаются в возможностях защиты, не будут неприятно удивлены ограниченным доступом к опциям, которые они использовали ранее.

Создание новой учетной записи пользователя

Вы должны создать учетную запись пользователя для каждого пользователя программы. Для этого повторите нижеследующие шаги для создания каждой из нужных учетных записей.

1. Для создания нового пользователя нажмите на **Пуск**, выберите **Настройка**, затем **Панель управления**
2. дважды кликните **Пользователи и пароли (Учетные записи пользователей)**.
3. Кликните кнопку **Дополнительно**, затем кнопку **Дополнительно** расположенную ниже (в средней части открывшегося окна):
4. В открывшемся окне выберите папку Пользователи. Кликните правой кнопкой мыши в правой части окна и выберите **Новый пользователь**.
5. Введите имя пользователя и пароль. По умолчанию учетная запись пользователя будет создан с нормальными правами доступа. Это значит, что он сможет использовать программу, но не сможет устанавливать новые программы или менять установки системы.
6. Нажмите кнопку **Создать**. Теперь Вы сможете входить в сеть как этот пользователь.

Присвоение ролей каждому пользователю

Вы должны присвоить роли каждому пользователю. Доступ разделяется на следующие области:

- RG Оператор (Rotor-Gene Operator) – Может работать с прибором и производить операции, нужные для выполнения анализа, но не может генерировать отчет или производить анализ данных.
- RG Аналитик (Rotor-Gene Analyst) – Может анализировать данные и генерировать отчеты, но не может выполнять новые анализы.
- RG Оператор и Аналитик (Rotor-Gene Operator and Analyst) – Имеет возможности выполнять обе роли.
- Администратор – Может разблокировать имена образцов и производить все операции Аналитика и Оператора.

• None – Доступ к программе запрещён.

1. Чтобы назначать роли войдите в систему Windows как Администратор или используйте Rotor-Gene Logon окно для открытия программы и ввода логина за один шаг:

2. Далее, после того как программа открыта, кликните в меню **Защита**. В первый раз, когда вы сделаете это, программа Rotor-Gene сконфигурирует несколько системных групп, которые будут контролироваться в программе:

3. Нажмите **Да**, после этого появится главное окошко меню защиты. В верхней части окна будут отображены все пользователи вашего компьютера. Некоторые учетные записи используются системой по умолчанию и поэтому, они Вам будут неизвестны. Нижняя панель показывает группы присвоенные пользователям:

4. Чтобы присвоить пользователю группу выберите имя пользователя из списка. Верхняя панель будет обновлена так, что она будет показывать, какую роль пользователь выполняет сейчас. Если пользователь не принадлежит ни к одной группе, то он не сможет пользоваться программой. В этом примере (ниже) мы присваиваем пользователю "matthew" доступ в группе **RG Analyst** (Аналитик) путём выбора группы из панели слева с последующим нажатием кнопки [**>**]. Для удаления Группы выберите ее и нажмите кнопку [**<**].

5. В приведенном примере мы зарегистрировались как указанный пользователь. Поскольку его группа «Аналитик», то при этом недоступны опции меню **Новый Тест** и редактировать **Профиль**. Можно открывать уже существующие файлы и анализировать данные, как показано на рисунке ниже. Внизу экрана в строке состояния указан статус пользователя STEW/matthew – **RG Аналитик**, чем объясняется недоступность некоторых функций:

6. Зарегистрировавшись вновь как Администратор, мы можем присвоить пользователю Matthew права **RG Operator** и снова открыть программу. При этом будут отключены опции меню **Анализ** и **Отчеты** и активирована опция запуска **Новый Тест**:

7. Строка состояния показывает, что пользователь "STEW/matthew" принадлежит к группе RG Operator.

8. Если вы вошли в систему как Администратор и убрали все группы для пользователя Matthew, то, когда вы откроете программу как пользователь Matthew, появится следующее сообщение:

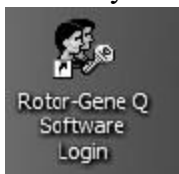


6.9.2. Работа многих пользователей с одним компьютером

Для использования программы Rotor-Gene многими пользователями вы должны

создать учетные записи пользователей, которые не имеют доступа к программе Rotor-Gene. Входите в Windows, используя эту учетную запись, чтобы пользователи не могли анонимно иметь доступ к Rotor-Gene Q.

1. Используя Rotor-Gene 6 Login, пользователи могут открыть программу Rotor-Gene, используя свою учетную запись:



2. Для этого нужно ввести свое имя пользователя и пароль:

3. Доменом является либо компьютер, на который вы входите, либо имя вашей локальной сети. Обращайтесь к администратору сети, которую Вы используете, чтобы узнать, как следует регистрироваться

СОВЕТ: Когда вы вводите логин при входе в программу Rotor-Gene, все файлы пользователя будут доступны этому пользователю. Вы можете таким образом быть уверены, что каждый пользователь сохраняет файлы в своей собственной области. Если настроить всё правильно, то это является максимальной возможной формой защиты.

СОВЕТ: Каждый пользователь должен выходить из программы Rotor-Gene после того, как его анализ был закончен, чтобы предотвратить возможность использования программы и прибора под его именем другим пользователями.

6.9.3. Сообщения

Каждый раз, когда файл сохраняется пользователем, его детали записываются в Установках в закладке **Сообщения**, как *Сводка шагов контроля защиты* и *Детали шагов контроля защиты*

Этим можно пользоваться для проверки того, кто изменил содержимое файла. *Детали шагов контроля защиты* содержит больше деталей, таких как уникальный идентификатор пользователя. Этот идентификатор важен, для того чтобы избежать ситуации, когда пользователь создает учетную запись с тем же самым именем, но на другом компьютере и, таким образом может выдавать себя за другого пользователя. В этом случае имя пользователя будет тем же самым, но идентификатор учетной записи будет другим.

Идентификатор для учетной записи STEW/matthew, S-1-5-21-1287529892-...

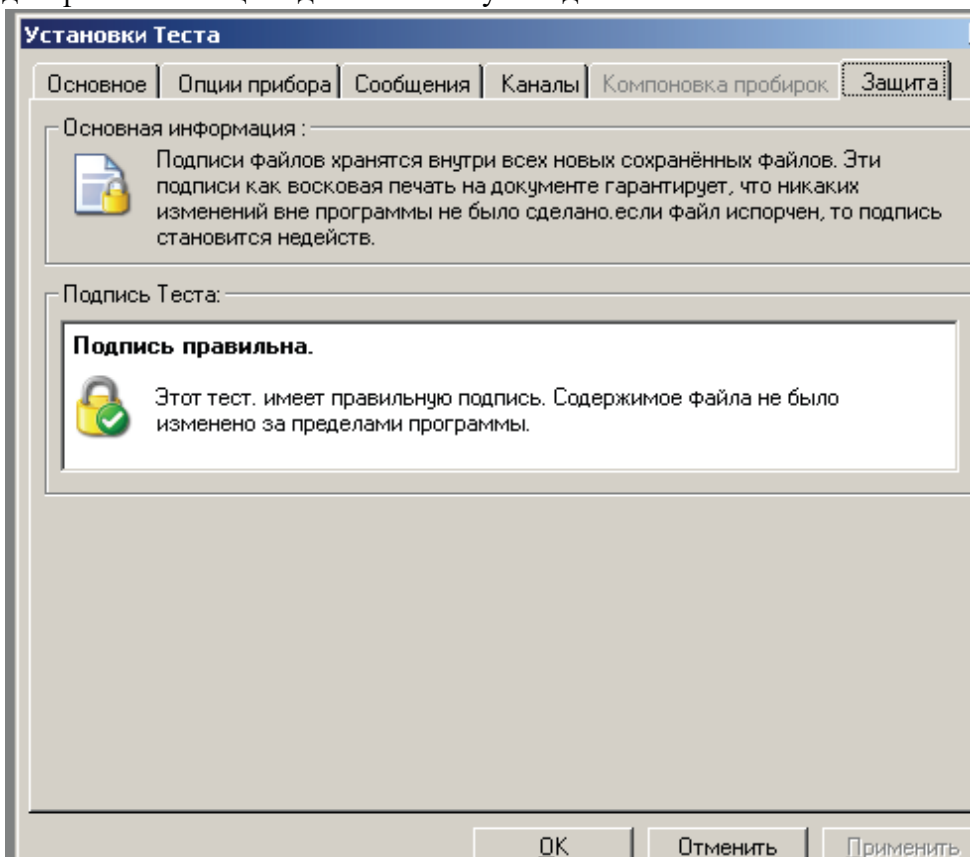
показан в Security Audit Trail Detail:

6.9.4. Подпись файла анализа

Все записи проверок сохраняются внутри файла Rotor-Gene. Существует вероятность того, что этот файл был изменён злоумышленниками, чтобы убрать следы их действий. Наилучшей защитой против таких повреждений является сохранение файлов в безопасном месте. Это может быть сделано установкой Windows учетных записей с доступом только к определенным файлам. Тем не менее, когда файлы хранятся в области общего доступа, электронная Подпись Анализа может давать

дополнительный уровень защиты против таких изменений.

Ниже приведён снимок экрана закладки **Защита** находящейся в меню **Установки** для файла имеющего действительную подпись



Подпись – это длинное слово, которое генерируется каждый раз, когда сохраняется файл, и которое связано с содержимым файла. Например, "517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081" является подписью для этого файла. Если вы теперь откроете файл анализа и поменяете дату его проведения на 3 дня раньше, то когда этот файл будет открыт опять, появится следующее сообщение

Следует рассматривать с подозрением любой новый файл с данными анализа, не имеющий электронной подписи.

6.9.5. Блокировка образцов

При диагностике важно быть уверенным, что имена образцов по случайности или

умышленно не были изменены после того, как оператор запустил выполнение программы анализа. Чтобы обеспечить это, программа Rotor-Gene предоставляет механизм блокировки образцов. Имена образцов могут быть заблокированы любым пользователем, а разблокированы только Администратором. Так как большинство пользователей используют свои компьютеры в режиме Администратора, то эта опция будет использоваться ограничено, если система защиты данных на этом компьютере не была сконфигурирована надежно, как было описано в предыдущих параграфах.

Совет: Если Вы собираетесь заблокировать образцы, то не используйте программу как Администратор. Создайте счёта с доступами RG Оператор и RG Аналитик и не делайте пароль Администратора публично доступным.

Пользователям будет требоваться Ваше разрешение, чтобы разблокировать файлы, которые содержат ошибки.

Образцы могут быть заблокированы до старта выполнения анализа, когда вы используете Детальный Мастер при нажатии на кнопку **Закончить и Заблокировать**:

Появится следующее предупреждение. нажмите **Да** для подтверждения

После этого завершения редактирования образцов в Редакторе Образцов все функции редактора будут заблокированы:

Блокировка Образцов может быть переключена из одного состояния в другое внутри Редактора Образцов, после того, как она была установлена, но сделать это может только Администратор.

Как и ранее, пользователь может изменять файл анализа и убирать флажок включения блокировки. Тем не менее, если произошло несанкционированное изменение файла анализа, то это опять разрушит подпись файла анализа, предупреждая вас о нарушении.

6.9.6. Блокировка Шаблонов

При диагностике может потребоваться, чтобы все анализы были выполнены путём запуска специальных файлов шаблонов. Этот Шаблон может быть сохранён на диске там, где пользователи компьютерной сети не смогут изменять данные. Пользователи также имеют возможность выполнения их собственных профайлов.

Учитывая это, программа Rotor-Gene сохраняет в файле анализа имя шаблона файла, который выполнялся в данном анализе. Его имя и расположение доступны через меню **Установки** в окне *Информация о тесте*.

В настоящее время невозможно создать заблокированные для редактирования файлы шаблонов через интерфейс программы Rotor-Gene. Тем не менее, такие шаблоны, как используемый для Системы Оптической Верификации Температуры **OTV** могут быть заблокированы разработчиками, если вы пошлёте запрос на адрес технической поддержки. Возможность функционально заблокировать шаблон, используя программу, намечена в будущих выпусках программы.

6.10. Окна

Меню **Окно** позволяет Вам расположить окна вертикально, горизонтально или

организовать окна в каскад. Эта опция для организации расположения окон находится также в меню панели инструментов – кнопка **Окна**.

7.12 Справка (Спр.)

Содержание включает все файлы помощи, рассортированные по названиям. Просто войдите в оглавление и выберите интересующую вас область. Опция **Что нового?** даёт краткий обзор новых и дополненных или модифицированных по сравнению с предыдущими выпусками программы функций и опций.

Помощь в Контексте откроет файл помощи в соответствии с активированным окном программы **Rotor-Gene**. Выбор **Web-сайт** автоматически откроет **Веб-страницу** компании-изготовителя прибора, в то время как форум можно посетить, нажав **Web-**

сайт. Кнопка **О Программе** выводит информацию о версии программного обеспечения, которой Вы пользуетесь, и о серийном номере прибора

7. ОБЩИЕ ФУНКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НЕСКОЛЬКИМИ ОКНАМИ

7.1. Шаблоны анализа данных

Многие виды анализа данных требуют операций по установке порогов, установок нормализации графиков, установок генотипов, и довольно часто пользователи повторно используют те же установки для анализа новых данных.

Функция создания шаблона анализа данных позволяет пользователю сохранить информацию об этих установках отдельно и удобным образом повторно использовать их для анализа данных, при этом снижается вероятность ошибки при их установке.

В настоящее время эта опция поддерживается для Количественного анализа (Количественный), Анализа Кривых Плавления (Плавление), Генотипирования, Анализа Распределения и Анализа по Конечной Точке. Выполнив любой из этих видов анализа можно экспортировать установки анализа данных в файл с соответствующим расширением (например, для анализа Количественный – .QUT). Чтобы воспользоваться шаблоном, надо обратиться к меню с кнопками Экспорт и Импорт, которое обычно расположено в нижней правой части окна программы, как на приведенном рисунке

7.2. Опция Открыть Второй Анализ

Во время работы прибора (выполнения программы термоциклирования и детекции) можно открывать и анализировать файлы ранее выполненных анализов. При этом в меню второго окна не активны меню **Новый** (Мастер Старта) и **Старт**. Запустить новый анализ можно только из первого окна, после того как выполняемый анализ будет закончен.

7.3. Опции Масштабирования

Настроить Шкалу...: выведет окно, в котором Вы сможете ввести масштаб вручную или выбрать его интерактивно. Чтобы выбрать эту опцию, просто нажмите правую кнопку мыши над соответствующим экраном.

Автошкала: автоматически приводит шкалу в соответствие с

максимальными и минимальными считываемыми данными.

Шкала по умолчанию: установит масштаб от 0 до 100 флуоресцентных единиц.

7.4. Экспорт графиков и данных

Сейчас доступен широкий спектр опций экспорта графиков. Вы можете выбрать предпочтительный формат, а в меню справа – размеры рисунка.

1. Нажмите **Сохранить** и введите имя файла. Полученный файл будет содержать выбранный график.

2. Улучшены и возможности экспорта данных в различных форматах. Экспортировать данные анализа и необработанные данные можно также через меню **Файл / Сохранить как**

Для пользователей, которым требуется изображение с гораздо большим разрешением, предлагается либо увеличить размер изображения, пока оно не достигнет требуемого, либо воспользоваться другой опцией сохраняющей график как метафайл в формате .EMF или .WMF. Такой файл можно открыть с помощью такой программы как Adobe Illustrator и создать изображение с любым требуемым разрешением.

Графики в программе Rotor-Gene используют компоненты программы TeeChart.

Графики, сохраненные в исходном формате, представляют собой стандартные файлы формата Tchart, что позволяет воспользоваться программой TeeChart Office для работы с ними. TeeChart Office дистрибутируется как программа свободного доступа и устанавливается как часть пакета Rotor-Gene, при этом значок программы TeeChart появляется на Вашем рабочем столе.

TeeChart Office позволяет пользователю различным образом редактировать экспортированные в него графики, включая изменение цвета графиков, добавление надписей, изменение шрифтов, корректировка нужных точек данных и так далее. Есть множество опций, которые могут быть полезны пользователям.

7.5. Символ Гаечный Ключ

Щелкнув по значку гаечного ключа, Вы получаете доступ к набору инструментов, упрощающих ручной анализ данных. Доступ к этим инструментам также может быть осуществлен при нажатии правой кнопки мыши в соответствующих окнах.

Опции Масштабирования описаны в предыдущем разделе.

Печать....: Эта функция позволяет распечатать текущий график, выведенный на экран.

Цифровой Фильтр: Изменяет текущий избранный цифровой фильтр на графике. Цифровой фильтр выравнивает, сглаживает данные с помощью скользящего окна точек. Чтобы открыть это окно, щёлкните правой кнопкой мыши над окном, содержащим данные.

Показать указатель: Открывает окно с точными координатами текущей позиции курсора на графике.

Выбрать образцы: Показывает данные только тех образцов, графики которых Вы поместили в область прямоугольника.

Увеличение: С этой функцией Вы можете получить увеличение изображения в некоторых областях экрана.

8. ОБСЛУЖИВАНИЕ СИСТЕМЫ

Единственное, что требуется выполнять пользователю, это поддерживать линзы в относительной чистоте и освобождать их от пыли, которая может накапливаться со временем.

Рекомендуется держать крышку прибора закрытой, если он не используется, чтобы минимизировать попадание пыли в камеру.

Заглядывая в термоциклирующую камеру можно заметить в дне камеры округлую линзу, за которой располагаются светоизлучающие светодиоды. Если эта линза покрывается пылью или другими загрязнениями, следует очистить ее, используя хлопковый тампон и этиловый спирт.

На боковой стенке нагревательной камеры также имеется круглая линза. На ней обычно не накапливается пыль, однако, если помещать в камеру влажные или пыльные пробирки, то частицы с них могут попадать при вращении ротора на линзу. Если требуется очистить эту линзу, ротор можно снять, открутив фиксатор в центре. Линзы можно чистить, используя хлопковый тампон и этиловый спирт.



9. АНАЛИЗ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ (HRM)

Анализ HRM представляет собой инновационную технику, которая основывается на анализе плавления ДНК. Анализ HRM характеризует образцы ДНК в соответствии с характером их диссоциации, так как их трансформация из двухцепочечной ДНК (дцДНК) в одноцепочечную ДНК (оцДНК) протекает с повышением температуры (см. Рисунок далее). Прибор HRM улавливает сигналы флуоресценции с очень высокой оптической и термальной точностью, что создает целый ряд возможностей использования техники.

Типичный график HRM. Графики плавления ДНК отображают переход от высоких уровней флуоресценции исходного состояния ДНК перед плавлением через снижение флуоресценции в стадии плавления до базового уровня флуоресценции в стадии после плавления. Показатель флуоресценции снижается по мере выделения интеркалирующего красителя ДНК из дцДНК по мере ее расплавления в одиночные цепи. Срединная точка фазы плавления, на которой скорость изменения флуоресценции достигает максимального значения, определяет температуру плавления (T_m) анализируемой ДНК.

Перед проведением анализа плавления с высоким разрешением (HRM), конечная последовательность должна быть амплифицирована до высокого числа копий. Обычно это осуществляется при использовании техники ПЦР в присутствии интеркалирующего

флуоресцентного красителя дцДНК. Краситель не взаимодействует с оцДНК, а активно включается в дцДНК и производит яркую флуоресценцию при вставке. Изменение интенсивности флуоресценции может использоваться для измерения повышения концентрации ДНК во время ПЦР анализа, а затем для прямого измерения термоиндуцированного плавления ДНК методом HRM анализа. При проведении анализа HRM флуоресценция изначально высока, так как в качестве исходного образца используется дцДНК. Флуоресценция снижается по мере повышения температуры и диссоциации ДНК на одиночные цепи. Наблюдаемый характер плавления характерен для определенного образца ДНК.

При использовании анализа HRM Rotor-Gene Q может характеризовать образцы в зависимости от длины последовательности цепи ДНК, содержания ГК и комплементарности последовательности ДНК. Анализ HRM может использоваться для процедур генотипирования, таких как анализ вставок/делеции или отдельных полиморфизмов нуклеотидов (SNP), или для сканирования на наличие неизвестных генетических мутаций. Он также может применяться для эпигенетики с целью определения и анализа статуса метилирования ДНК. Также возможно его использования для количественного определения небольшой доли измененных ДНК на фоне последовательного дикого типа с чувствительностью до 5%. Анализ HRM может использоваться, например, для изучения соматически приобретенных мутаций или изменений в статусе метилирования районов CpG.

Анализ HRM на приборе Rotor-Gene Q обеспечивает выполнение множества задач, включая:

- ☐ Определение генов предрасположенности кандидата
- ☐ Исследование ассоциаций (сравнение результатов и контрольных значений, генотипа и фенотипа)
- ☐ Определение доминирования аллелей в популяции или подгруппе
- ☐ Исследование и валидация однонуклеотидных полиморфизмов
- ☐ Исследование на утрату гетерозиготности
- ☐ Выявление характерных признаков ДНК
- ☐ Характеристика блоков гаплотипов
- ☐ Анализ метилирования ДНК
- ☐ Картирование ДНК
- ☐ Выявление типов
- ☐ Определение мутаций
- ☐ Определение соотношения соматических приобретенных мутаций
- ☐ Типирование HLA

Анализ HRM прост в проведении и более экономичный по сравнению с анализом генотипирования на основании проб и в отличие от традиционных методов представляет собой систему с закрытой трубкой, которая предотвращает заражение продуктами ПЦР. Результаты сопоставимы с результатами традиционно применяемых методов, таких как SSCP, DHPLC, RFLP и секвенирование ДНК .*

9.1. Оборудование

Оборудование Rotor-Gene Q обеспечивает следующие термо-оптические возможности и четкие возможности в режиме реального времени, которые необходимы для проведения анализа HRM.

- ☐ Высокоинтенсивное освещение
- ☐ Высокочувствительное оптическое определение

- Быстрое получение данных
- Точно контролируемая температура образца
- Минимальное колебание термальных и оптических показателей от образца к образцу

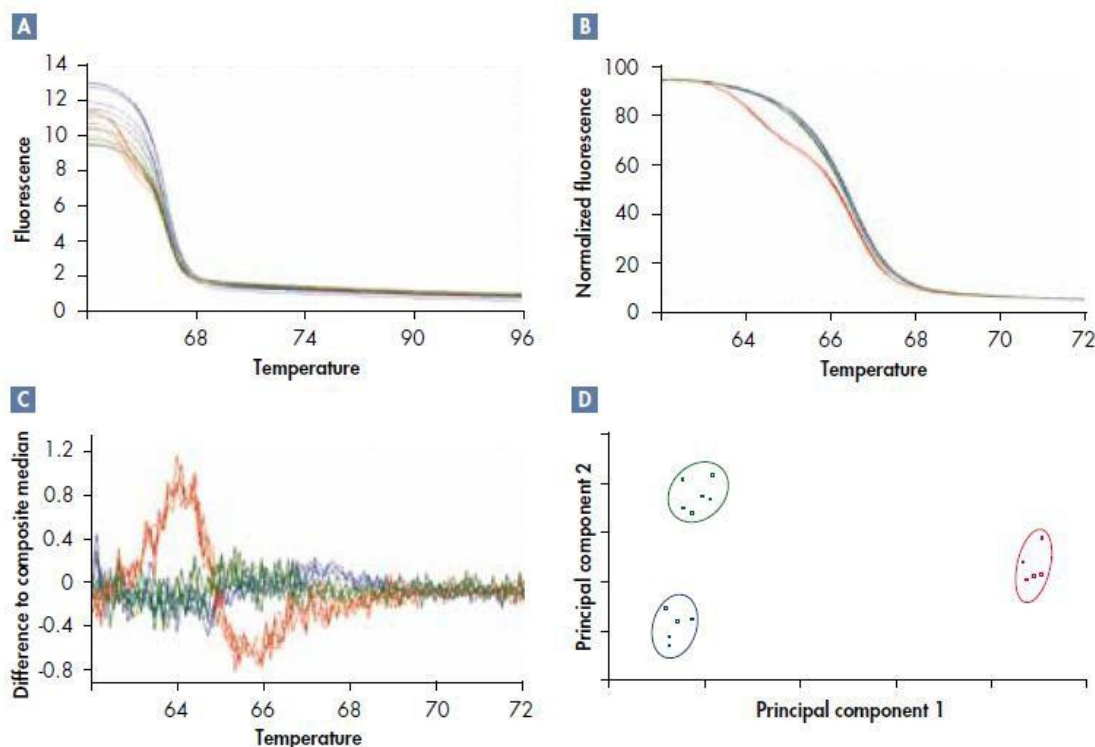
9.2. Химический анализ

QIAGEN предлагает набор реагентов Type-it® HRM PCR для анализа однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций при использовании анализа плавления с высоким разрешением HRM, а также набор реагентов EpiTest® HRM PCR для проведения анализа метилирования при использовании HRM (скоро поступит в продажу). Оба набора реагентов содержат интеркалирующий флуоресцентный краситель третьего поколения EvaGreen. В наборах реагентов объединяются оптимизированный буфер для HRM и HotStarTaq® Plus, что предотвращает получение неспецифических продуктов амплификации и обеспечивает надежные результаты анализа.

9.3. Пример генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов

На представленном примере набор реагентов Type-it HRM PCR использовался в анализе плавления с высоким разрешением HRM для различения между человеческим однонуклеотидным полиморфизмом SNP rs60031276 гомозиготного дикого типа, гомозиготного мутирующего типа и гетерозиготного типа.

Техническая информация представлена в Руководстве по использованию *Type-it HRM PCR*.



Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов SNP методом HRM. Человеческий однонуклеотидный полиморфизм SNP rs60031276 (замена A на G) в гене PPP1R14B (протеин фосфатаза 1, регуляторная (ингибирующая) субъединица 14B) был проанализирован на приборе Rotor-Gene Q при использовании 10 нг геномной ДНК

различных генотипов и набора реагентов Type-it HRM Kit (скоро поступит в продажу). Образцы гомозиготного дикого типа (AA), гомозиготного мутлирующего типа (GG) и гетерозиготного типа (AG) показаны на стандартной нормализованной кривой плавления и на графике отличий, нормализованном до образцов дикого типа. Генотипы для неизвестных образцов были присвоены ПО Rotor-Gene Q.

9.4. Пример анализа метилирования

На представленном примере набор реагентов EpiTest HRM PCR использовался в анализе HRM для распознавания между различными соотношениями метилированных и неметилированных ДНК. Техническая информация представлена в Руководстве по использованию *EpiTest HRM PCR*.

Количественный анализ метилирования методом HRM. Различные соотношения метилированных и неметилированных ДНК-АПС (аденоматозный кишечный полипоз) были проанализированы и классифицированы анализом метилирования HRM при использовании Инструкции по проведению анализа плавления с высоким разрешением на Rotor-Gene Q 11/2009 11-7 с использованием набора реагентов EpiTest HRM Kit (скоро поступит в продажу). Представлены стандартная нормализованная кривая плавления и график отличий, нормализованный до 50% метилированного образца.

9.5. Руководства для проведения успешного анализа HRM

Успех проведения анализа HRM в значительной мере зависит от определенной исследуемой последовательности. Определенные виды последовательностей, такие как петли «шпилька» или прочие структуры второго порядка, локализованные районы необычно высокого или низкого содержания GC или повторяющиеся последовательности, могут влиять на результат анализа. В дополнение к этому, использование стандартизированных наборов реагентов и оптимизированных протоколов QIAGEN позволяют избежать многие из перечисленных проблем. Некоторые простые советы могут обеспечить успех проводимого анализа.

Проводите анализ небольших фрагментов ДНК

Анализируйте фрагменты, не превышающие 250 bp. Анализ более крупных фрагментов может проводиться последовательно, но обычно предоставляет менее высокое разрешение. Это связано, например, с тем, что одноосновная вариация оказывает большее воздействие на характер плавления ампликона 100 bp, чем на характер ампликона 500 bp. Удостоверьтесь, что ПЦР содержит только специфический продукт

Образцы, содержащие примеси, появляющиеся после проведения ПЦР, такие праймеры, димеры или неспецифические продукты, могут привести к сложностям в интерпретации результатов анализа HRM. Наборы реагентов QIAGEN для проведения анализа HRM обеспечивают максимальную специфичность и не требуют оптимизации.

Используйте достаточный объем стандартного образца для предварительной амплификации

Анализ данных ПЦР в режиме реального времени может быть очень полезным для устранения ошибок анализа HRM. На графиках амплификации пороговый цикл (СТ) должен быть менее или равен 30 циклам.

Продукты, амплификация которых происходит позднее указанного значения (благодаря незначительному объему исходного стандартного образца или деградации образца), обычно проявляют изменчивые результаты HRM в связи с наличием примесей ПЦР.

Нормализуйте концентрацию стандартного образца

Объем стандартного образца, добавляемого к реакции, должен быть соответствующим.

Приведите в норму исходные концентрации, так чтобы все графики амплификации были в 3-х значениях пороговых циклов друг от друга. Это обеспечивает 10-кратный интервал для исходных концентраций.

Проверка на отклонение графика амплификации от нормы

Перед проведением анализа плавления с высоким разрешением (HRM) тщательно проверьте данные графика амплификации, чтобы исключить отклонение формы графика от нормы. Графики с прямо пропорциональной фазой, форма которых слишком крутая или зазубренная или которые достигают слишком низкого уровня по сравнению с другими реакциями, могут свидетельствовать о недостаточной амплификации или о том, что флуоресцентный сигнал слишком низкий (например, это может произойти, если концентрация праймера слишком низка). Слабая реакция может быть вызвана ингибиторами или неправильной настройкой реакции. Данные анализа плавления с высоким разрешением по таким образцам не дают убедительных результатов или свидетельствуют о низком разрешении. Для того чтобы предотвратить получение недостоверных результатов,

мы рекомендуем использовать наборы QIAGEN для подготовки образцов и проведения анализа плавления с высоким разрешением (HRM).

Сохраняйте концентрации образцов после амплификации с одинаковым значением

Концентрация фрагмента ДНК влияет на температуру (T_m) его плавления. По этой причине концентрации образцов ДНК должны сохраняться одинаковыми. При проведении анализа продуктов ПЦР удостоверьтесь, что каждая реакция была амплифицирована до стабильной фазы. На стабильной фазе все реакции будут амплифицированы до одного уровня независимо от их исходного объема. Обращаем ваше внимание, что реакции неудовлетворительного качества могут не достичь стабильной фазы в том же амплифицированном объеме благодаря, например, ненадлежащей подготовке пробы (например, концентрация праймера была слишком низкой).

Обеспечьте однородность показателей всех образцов

Все образцы должны быть одинакового объема и должны содержать одинаковую концентрацию красителя. Характер плавления ДНК может изменяться солями в реакционной смеси, поэтому важно, чтобы концентрация буферного раствора, Mg, и прочие соли были максимально одинаковыми во всех образцах. Схожим образом, используйте только идентичные реакционные трубки одного и того же производителя, чтобы предотвратить изменчивость значений в связи с толщиной пластика и свойствами автофлуоресценции.

Отберите достаточное количество данных для фаз предварительной амплификации и фазы, следующей за амплификацией

Снимайте значения при проведении анализа HRM через каждые 10°C ,

центрированные около наблюдаемого значения T_m (см. Рисунок на стр. 11-1).

Это обеспечивает получение достаточных точек с исходными данными для нормализации кривой плавления и позволяет получать воспроизводимые копии и интерпретировать полученные данные.

9.6. Подготовка образца

Распад образца необходимо предотвращать на стадиях очистки и хранения. Не используйте чрезмерного количества ингибиторов, таких как остатки этанола. Для улучшения результатов анализа HRM мы рекомендуем сохранять стандартный образец в одинаковом объеме. Рекомендуется проведение спектрофотометрического анализа для определения концентрации и чистоты ДНК.

Мы рекомендуем использовать наборы QIAGEN для подготовки образцов.
Примечание: При 260 нм одна единица абсорбции составляет 50 мкг/мл ДНК. Чистая ДНК в интервале 260 нм - 280 нм позволяет получить значение 1.8.

9.7. Настройка ПО

1. Откройте новый файл, выбрав команду New/Новый файл в меню File/Файл. В Мастере подсказок выберите HRM.
2. Установите тип ротора (в настоящем примере используется ротор с 72 лунками). Удостоверьтесь, что запорное кольцо находится на месте и установлен флажок Locking Ring Attached/Запорное кольцо установлено перед проведением следующего шага операции.
3. Установите данные для проведения анализа. Введите имя оператора (не является обязательным требованием) и внесите все данные и комментарии по анализу (не является обязательным требованием).
Выберите объем реакционной смеси (обязательное требование) и вид образца.
4. Выберите Edit Profile/Редактировать профиль, чтобы внести изменения в показатели длительности и температуры реакции.
5. Установите соответствующее исходное время выдерживания. Это время зависит от типа используемой ДНК полимеразы. Для наборов реагентов Type-it HRM PCR Kit и EpiTect HRM PCR Kit требуется 5 минут для активации. Время активации, установленное по умолчанию, составляет 10 минут.
6. Измените характер циклического повторения в соответствии с ампликоном.
7. Удостоверьтесь, что значения флуоресценции будут получены. Обеспечьте получение данных на зеленом канале в конце фазы соединения комплементарных нитей ДНК.
8. Настройте условия проведения анализа HRM. Измените условия в соответствии с типом ампликона. Для первого проведения анализа используйте широкую область плавления. Используйте теоретическую температуру T_m , чтобы получить необходимый интервал значений. После определения температур плавления снизьте интервал плавления на не более чем 10°C . Удостоверьтесь, что начало плавления происходит за 5°C до первого плавления. Шаг плавления устанавливается равным 0.1°C с выдерживанием в течение 2-х секунд на каждом этапе. Минимальный шаг плавления составляет 0.05°C с выдерживанием в течение 1-й секунды на каждом этапе. Данные автоматически подаются на канал HRM. Автоматическая оптимизация усиления производится по умолчанию. ПО производит поиск оптимальной настройки усиления, таким образом, что максимальное значение флуоресценции указывается как не превышающее 70 единиц по шкале 100. Обращаем ваше внимание, что данное значение может быть увеличено до 100.
9. Не является обязательным требованием: Настройте оптимизацию автоматического усиления. Это относится исключительно к этапу амплификации в режиме реального времени и устанавливается для зеленого канала. Нажмите кнопку Optimize Acquiring/Оптимизация получения данных (для оптимизации только тех каналов, которые используются в реакции).

Оптимизация производится наилучшим образом после первого этапа получения данных, поэтому рекомендуем отметить функцию Perform Optimization Before First Acquisition/Оптимизация перед первым получением данных. Рекомендованный интервал флуоресценции для интеркалирующих красителей – между 1 и 3 единицами флуоресценции. Для изменения настройки выберите название канала из списка и нажмите кнопку Edit/Редактировать.

10. Начните реакцию, нажав Start Run/Начало реакции и сохраните файл с данными по реакции на вашем компьютере.

11. Отредактируйте названия образцов (не является обязательным требованием). Названия образцов могут быть изменены во время или после проведения реакции.

9.8. Анализ данных ПЦР в режиме реального времени

Анализ данных ПЦР в режиме реального времени Перед проведением анализа данных анализа плавления с высоким разрешением (HRM) является предпочтительным. Данные ПЦР в режиме реального времени могут выявить пробы плохого качества. Их определение и отсеивание от дальнейшего анализа HRM может значительно увеличить общую эффективность анализа HRM, так как анализ продуктов ПЦР плохого качества приведет к неудовлетворительным результатам анализа HRM results. Мы рекомендуем проведение анализа данных ПЦР в режиме реального времени Следующим образом.

1. Проведите анализ данных ПЦР в режиме реального времени При использовании опции Quantitation/Количественное определение в окне Analysis/Анализ. Если значения СТ составляют 30 или выше, амплификации реакций произошла слишком поздно. Эти образцы следует анализировать с особой настороженностью или удалить из анализа как образцы с резко отклоняющимися значениями. Поздняя амплификация происходит чаще всего благодаря небольшому объему исходного образца и/или высоким уровням распада образца.
2. Оцените уровень флуоресценции конечной точки. Если флуоресценция конечной точки на любом из графиков амплификации слишком низкая по сравнению с большинством графиков в определенной серии данных, удалите данные образцы из анализа, даже если значения пороговых циклов (СТ) менее 30. Низкая флуоресценция конечной точки может указывать на неправильное количество красителя, ненадлежащие уровни компонентов реакции (таких как праймеры) или на действие ингибиторов.
3. Используйте опцию Comparative Quantitation/Сравнительное количественное определение в окне Analysis/Анализ, чтобы получить эффективность реакции для каждого образца. Если эффективность не совпадает с эффективностью других реакций в исследовании или является меньшей по сравнению с приблизительно 1.4, не используйте результаты реакции для анализа как образцы с резко отклоняющимися значениями. Результаты сравнительного количественного определения. Эффективность реакции показана в колонке Amplification/Амплификация со значением 2 ($2 = 100\%$ эффективность).

Примечание: Если у вас есть подозрения, что анализируемый образец содержит праймер-димеры или неспецифические продукты, оцените реакции посредством составления графика при использовании опции Melt/Плавнение в окне Analysis/Анализ.

Удостоверьтесь, что на графике имеется единственный пик, который свидетельствует о наличии единственного продукта. Если возможно, проведите реакцию с гелем, чтобы проверить, что имеется единственный продукт амплификации. Если обнаруживается наличие более чем одного продукта, реакцию необходимо провести снова или оптимизировать ее настройки.

9.9. Анализ данных анализа плавления с высоким разрешением (HRM)

Анализ HRM обеспечивает визуальное и авто-определение генотипов. Результаты могут отображаться в виде нормализованного графика результатов плавления или графика отличий. Нормализованные кривые представляют основной вид различных генотипов на основании отклонения кривых (для гомозигот) и изменения формы кривых (для гетерозигот).

Графики отличий помогают визуально интерпретировать результаты анализа. Они отображают отличия во флуоресценции образца, который выбран в качестве контроля, при каждом изменении температуры. Графики отличий представляют альтернативное изображение отличий между характером кривых плавления.

Примечание: Первый производный анализ кривой плавления (который проводят при выборе опции Melt/Плавление в окне Analysis/Анализ) считается неудовлетворительным для анализа HRM. Это происходит, потому что любое отклонение данных приносит искусственные помехи и значительно усложняет интерпретацию результатов.

Далее описаны этапы анализа результатов HRM при использовании ПО Rotor-Gene Q.

1. Выберите опцию HRM в окне Analysis/Анализ.
2. Появятся окна, на которых будут отображаться исходные данные, нормализованный график и результаты. Окно с исходными данными позволяет корректировать области нормализации. Нормализация обеспечивает сравнение всех полученных кривых с уровнем сигнала флуоресценции в начале и конце исследования, что способствует более эффективной интерпретации и анализу результатов. В каждой области двигаются два курсора, которые по умолчанию устанавливаются на крайних точках кривой. Точки на графиках в данных областях используются для нормализации флуоресценции (только ось y) для начала (Область 1) и конца (Область 2) графика плавления. Данные за пределами установленных областей игнорируются. Отрегулируйте области так, чтобы они включали типичные исходные данные для фаз, предшествующих и следующих за фазой плавления. Расширение областей (выбором щелчком по кнопке мыши и переносом границы) позволяет ПО отрегулировать наклон исходного графика. Для нормального функционирования кривых не расширяйте области нормализации в фазу плавления. Примечание: Рекомендуем передвигать курсоры, если вы хотите не использовать области кривой плавления. Изменение положения курсоров в область плавления может повлиять на графики удаления и уровень достоверности данных.
3. В окне Normalized Graph/Нормализованный график показаны нормализованные кривые плавления. Образцы также можно рассмотреть как графики отличий по сравнению с одним из контрольных графиков.
4. Нажмите на кнопку Genotypes/Генотипы, чтобы определить генотипы. Введите название каждой категории генотипов и выберите типичный образец из списка образцов.

5. Просмотрите график отличий, выбрав опцию Difference Graph/График отличий. Затем выберите генотип, который вы хотите сравнить со всеми прочими образцами, вызвав раскрывающееся меню в верхней части окна. В показанном примере все графики образцов показаны как выбранные из усредненного графика всех образцов под названием “Mutation 1”.

6. Генотипы будут автоматически вызываться ПО в окно Results/Результаты. Уровень достоверности указывается в целях проверки точности результатов, выбранных автоматическим вызовом. Пороговое значение, при превышении которых производится автоматический вызов генотипов, может быть изменено. Образцы, значения которых ниже установленного порогового значения, будут отмечены как отличие для более тщательного исследования или повторного проведения анализа.

Приложение А

Технические данные

QIAGEN оставляет за собой право изменить технические условия в любой момент времени.

Условия окружающей среды

Напряжение	100–240 В, переменный ток, 50–60 Гц, 520 вольт-ампер (установки в зависимости от страны) Потребление энергии 8 ВольтАмпер (режим ожидания) Изменение напряжения не должно превышать 10% от номинального напряжения
Предохранитель	F5A 250 Вольт
Теплоотдача	В среднем: 0,183 киловатт (632 британской единицы теплоты/час)
Тепловая нагрузка	Максимально: 0,458 киловатт (1578британской единицы теплоты/час)
Категория перенапряжения	II
Температура воздуха	18–30°C (64–86°F)
Относительная влажность	10–75% (неконденсирующийся)
Высота над уровнем моря	До 2000 м (6500 футов)
Место эксплуатации	Только внутри помещений. Помещение без сквозняков, подальше от окна. Беречь от прямых солнечных лучей
Уровень загрязнения	2
Класс охраны окружающей среды	3К2 (IEC 60721-3-3)

Условия транспортировки

Температура воздуха От -25°C до 60°C (-13°F до 140°F)

Относительная влажность Макс. 75% (неконденсирующийся)

Класс охраны окружающей среды 2K2 (IEC 60721-3-2)

Условия хранения

Температура воздуха От 15°C до 30°C (59°F до 86°F)

Относительная влажность Макс. 75% (неконденсирующийся)

Класс охраны окружающей среды 1K2 (IEC 60721-3-1)

Механические характеристики и свойства оборудования

Размеры:

Ширина 37 см

Высота 27,5 см

Глубина 42 см (без кабеля).

Глубина 56см (с открытой дверью)

Масса 12 кг (стандартная конфигурация)

Вместимость до 100 образцов за запуск, используя диски на 100

Программное обеспечение Программное обеспечение для RotorGene Q на компакт диске

Температурные характеристики

Описание	Спецификация
Диапазон температуры	Комнатная температура - 99°C
Точность температуры	±0,25°C (30 секунд после старта)
Температурное разрешение	±0,02°C (мельчайшее программируемое)

	приращение)
Температурная однородность	$\pm 0,01^{\circ}\text{C}$
Скорость нагрева/охлаждения	$>15^{\circ}\text{C}$ (нагрев) $>20^{\circ}\text{C}$ (охлаждение)

Оптические характеристики

Описание	Спецификация
Источник возбуждения	Высокоэнергетические фотодиоды
Детектор	Фотоэлектронный умножитель
Время захвата	4 секунды

Утилизация отработанного электрического и электронного оборудования (Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE))

Этот раздел содержит информацию об утилизации отработанного электрического и электронного оборудования пользователями, находящимися на территории Европейского Союза.

Европейская директива 2002/96/EC WEEE требует, чтобы электрическое и электронное оборудование после окончания срока эксплуатации утилизировалось должным образом. Значок перечеркнутого мусорного бака (смотри ниже) означает, что этот продукт не должен утилизироваться с прочими отходами; его можно отправлять только в специальное предприятие по переработке отходов или пункт сбора вторсырья для переработки в согласии с местными нормативными актами. Такой отдельный сбор и утилизация отработанного электрического и электронного оборудования способствует сохранению природных ресурсов, а также обеспечивает безопасную для человека и окружающей среды утилизацию продукта.



QIAGEN принимает на себя ответственность в связи с выполнением требований директивы WEEE, и, в тех случаях, когда замену оборудования производит QIAGEN, компания производит в Европе бесплатную утилизацию электронного оборудования,

обозначенного знаком WEEE. Если оборудование для замены приобреталось не в QIAGEN, то утилизация может быть произведена по просьбе пользователя за отдельную плату. Для утилизации электронного оборудования свяжитесь с местным представителем QIAGEN, чтобы заполнить необходимый документ о возврате оборудования. После подачи заявления с вами свяжутся представители QIAGEN и либо попросят дополнительную информацию о сроках, когда можно забрать отработанное электронное оборудование, или сообщат индивидуальную цену.

Приложение В

Математическое приложение: методы вычислений.

Этот раздел описывает математические методы, используемые для вычислений в программе **Rotor-Gene**.

Расчет концентраций при количественном анализе

Расчет концентраций выполняется с помощью метода линейной регрессии, используется простая модель с известными значениями логарифма концентрации (x) и экспериментальными значениями C_t (y). Логарифмы концентрации и значения C_t по модели должны быть связаны уравнением $y = mx + b$

Доверительные интервалы для рассчитанных концентраций

Используется следующий 100% $(1-\alpha)$ доверительный интервал для оценки новых значений x_0 по кривой стандартов:

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Предположим, теперь мы имеем еще k наблюдений для $x=x_0$, и обозначим их среднее как $\bar{Y}_0$, тогда

$$\bar{Y}_0 \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_0, \frac{\sigma^2}{k})$$

и, аналогично рассмотренному выше,

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Эта формула определяет доверительный интервал для концентраций реплик тестируемых (неизвестных) образцов.

Для оценки значений образцов-стандартов используется более узкий доверительный интервал:

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Доверительный интервал для значений C_t

Предполагая, что ошибка среднего для C_t реплик – линейна и нормально распределена, используем односторонний t-доверительный интервал. Пусть среднее значение C_t

$(x_0 \dots x_{n-1})$

Тогда $100(1 - \alpha)\%$ доверительный интервал для величины C_t :

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

Приложение С

Аксессуары для RotorGene Q

9001601	Rotor-Disc 72 Starter Kit (230V)	Стартовый набор для работы с планшетами роторного типа Gene-Disc 72
9001603	Rotor-Disc 100 Starter Kit (230V)	Стартовый набор для работы с планшетами роторного типа Gene-Disc 72
9018895	Rotor-Disc 100 Rotor	Ротор для Gene-Disc 100
9018896	Rotor-Disc 100 Locking Ring	Прижимное кольцо к ротору для Gene-Disc 100
9018897	Rotor-Disc Pipetting Aid	Вспомогательное устройство для пипетирования в планшеты роторного типа
9018899	Rotor-Disc 72 Rotor	Ротор для Gene-Disc 72
9018900	Rotor-Disc 72 Locking Ring	Прижимное кольцо к ротору для Gene-Disc 72
9018901	Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Штатив для загрузки 0,1 мл пробирок
9018902	Loading Block 72 x 0.1 mL Multi-channel	Штатив для загрузки 0,1 мл пробирок, для использования с многоканальной пипеткой
9018903	72-Well Rotor	72-луночный ротор
9018904	Locking Ring 72-Well Rotor	Прижимное кольцо для 72-луночного ротора
9018905	Loading Block 96 x 0.2 mL Tubes	Штатив для загрузки 0,2 мл пробирок
9018906	36-Well Rotor Locking Ring	Прижимное кольцо для 36-луночного ротора
9018907	36-Well Rotor	36-луночный ротор
9018908	Rotor Holder	Держатель для ротора
9020147	Rotor-Gene ScreenClust HRM Software	CD-диск с программным обеспечением для HRM исследований

9018909	Rotor-Disc 100 Loading Block	Загрузочный блок для планшет роторного типа для Gene-Disc 100
9018910	Rotor-Disc 72 Loading Block	Загрузочный блок для планшет роторного типа для Gene-Disc 72
981311	Rotor-Disc 100 (30)	Планшет роторного типа Gene-Disc 100
981313	Rotor-Disc 100 (300)	Планшет роторного типа Gene-Disc 100
981301	Rotor-Disc 72 (24)	Планшет роторного типа Gene-Disc 72
981303	Rotor-Disc 72 (240)	Планшет роторного типа Gene-Disc 72
9018898	Rotor-Disc Heat Sealer	Термозапаиватель для планшет роторного типа
981601	Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	Плёнка для заклеивания планшет роторного типа
981604	Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	Плёнка для заклеивания планшет роторного типа
981400	Rotor-Disc OTV Kit	Набор ротор-диска для OTV
981103	Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	Стрипованные 0,1 мл пробирки с крышками
981106	Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	Стрипованные 0,1 мл пробирки с крышками
981005	PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	ПЦР пробирки 0,2 мл
981008	PCR Tubes, 0,2 ml (10 000)	ПЦР пробирки 0,2 мл