

Únor 2022

Uživatelská příručka k přístroji Rotor-Gene[®] Q MDx CE



IVD

CE

REF

9002022, 9002032, 9002042



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R1

Obsah

1	Úvod	8
1.1	O této uživatelské příručce	8
1.2	Všeobecné informace	9
1.2.1	Technická podpora	9
1.2.2	Prohlášení zásad	9
1.2.3	Správa verzí	10
1.3	Zamýšlené použití přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	10
1.3.1	Požadavky na přístroj Rotor-Gene Q MDx	10
1.4	Potřebné materiály.....	11
1.5	Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky	11
2	Informace o bezpečnosti	12
2.1	Správné použití.....	13
2.2	Elektrická bezpečnost.....	15
2.3	Biologická bezpečnost.....	16
2.4	Chemická bezpečnost	17
2.5	Likvidace odpadu.....	18
2.6	Mechanická nebezpečí.....	18
2.7	Bezpečnost údržby	20
2.8	Symboly na přístroji Rotor-Gene Q MDx.....	21
3	Všeobecný popis.....	22
3.1	Princip přístroje Rotor-Gene Q MDx	22
3.1.1	Tepelný výkon	22
3.1.2	Optický systém	23
3.1.3	Dostupné kanály	24
3.2	Prvky na vnějším povrchu přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	25
3.2.1	Odvzdušňovací otvory na víku.....	25
3.2.2	Madlo na víku	25
3.2.3	Komora rotoru.....	25
3.2.4	Stavové kontrolky na přístroji.....	25

3.3	Prvky uvnitř přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	26
3.3.1	Hlava rotoru	26
3.3.2	Optická čočka	26
4	Postupy instalace	27
4.1	Dodání a instalace systému	27
4.1.1	Vybalení přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	27
4.1.2	Instalace hardwaru	28
4.1.3	Instalace softwaru.....	29
4.1.4	Verze softwaru.....	32
4.1.5	Další software v počítačích připojených k přístrojům Rotor-Gene Q MDx ...	32
4.2	Požadavky na pracoviště.....	39
4.3	Připojení síťového napájení.....	40
4.3.1	Požadavky na napájení	40
4.3.2	Požadavky na uzemnění	40
4.3.3	Instalace napájecího kabelu pro střídavý proud	40
4.4	Konfigurace pro zabezpečení systému Windows	40
4.5	Požadavky na pracovní stanici	42
4.6	Vybalení a instalace přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	43
4.6.1	Aktualizace softwaru	44
4.7	Příslušenství	44
4.8	Opětovné balení a odeslání přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	44
4.9	Začínáme	44
4.9.1	Zapnutí přístroje Rotor-Gene Q MDx a pracovní stanice.....	44
5	Provozní postupy	45
5.1	Použití softwaru přístroje Rotor-Gene Q MDx.....	45
5.1.1	Průvodce rychlým spuštěním.....	45
5.1.2	Průvodce rozšířenými možnostmi.....	49
5.2	Použití hardwaru přístroje Rotor-Gene Q MDx	67
5.2.1	Typy rotorů	67
5.2.2	Příprava reakce	70
5.2.3	Příprava kotouče Rotor-Disc.....	73

6	Uživatelské rozhraní pro provádění analýz	77
6.1	Pracovní prostor.....	77
6.2	Panel nástrojů	77
6.3	Zobrazení kanálů pro nezpracovaná data.....	77
6.4	Přepínání mezi vzorky	78
6.5	Nabídka Soubor	80
6.5.1	Nový	80
6.5.2	Otevřít a Uložit.....	81
6.5.3	Protokoly.....	82
6.5.4	Nastavení	83
6.6	Nabídka Analýza.....	83
6.6.1	Analýza.....	83
6.6.2	Kvantifikace	84
6.6.3	Dvě standardní křivky	96
6.6.4	Relativní kvantifikace delta delta C _T	100
6.6.5	Analýza křivky tání.....	103
6.6.6	Komparativní kvantifikace.....	106
6.6.7	Aleická diskriminace	108
6.6.8	Analýza bodového grafu	109
6.6.9	EndPoint analýza.....	111
6.6.10	Analýza koncentrací	117
6.6.11	Analýza křivky tání s vysokým rozlišením.....	120
6.7	Nabídka Zpracování	121
6.7.1	Spustit zpracování	121
6.7.2	Pozastavit zpracování.....	121
6.7.3	Zastavit zpracování	122
6.8	Nabídka Zobrazení	122
6.8.1	Nastavení zpracování	122
6.8.2	Teplotní graf	125
6.8.3	Průběh profilu	126
6.8.4	Upravit vzorky.....	127

6.8.5	Možnosti zobrazení	133
6.9	Ochrana přístupu k softwaru Rotor-Gene Q	133
6.9.1	Konfigurace pro systém Windows 7	134
6.9.2	Konfigurace pro systém Windows 10	139
6.9.3	Spuštění několika uživatelů ve stejném počítači.....	141
6.9.4	Auditové stopy	142
6.9.5	Signatury zpracování	143
6.9.6	Uzamknutí vzorků	145
6.9.7	Zamknuté šablony	147
6.10	Nabídka Zesílení.....	147
6.11	Nabídka Okno.....	148
6.12	Funkce nápovědy	148
6.12.1	Odeslat e-mail podpory.....	149
7	Další funkce	153
7.1	Šablony analýz.....	153
7.2	Otevření druhého zpracování	153
7.3	Možnosti škálování	153
7.4	Exportování grafů	154
7.5	Ikona s montážním klíčem.....	157
7.6	Možnosti vybrané oblasti	158
8	Údržba	159
8.1	Čištění povrchu přístroje Rotor-Gene Q MDx	159
8.2	Dekontaminace povrchu přístroje Rotor-Gene Q MDx	160
8.3	Oprava přístroje Rotor-Gene Q	160
9	Optické ověření teploty	161
9.1	Princip OTV.....	161
9.2	Součásti soupravy Rotor-Disc OTV Kit	161
9.3	Spuštění OTV	162
10	Analýza křivky tání s vysokým rozlišením	165
10.1	Přístrojové vybavení	166
10.2	Chemikálie	167

10.3	Příklad genotypování SNP	167
10.4	Příklad metylační analýzy	169
10.5	Pokyny pro úspěšnou analýzu HRM	170
10.6	Příprava vzorku	172
10.7	Nastavení softwaru	172
10.8	Analýza dat real-time PCR	178
10.9	Analýza dat HRM	179
11	Řešení potíží	183
11.1	Archivy protokolů	184
11.2	Hardwarové a softwarové chyby	184
11.2.1	Řešení potíží s analýzou HRM	184
11.3	Chybová a varovná hlášení	185
11.3.1	Obecné chyby přístroje	185
11.3.2	Zprávy softwaru Rotor-Gene Q	187
12	Glosář	192
13	Technické specifikace	193
13.1	Podmínky prostředí – provozní podmínky	193
13.2	Podmínky transportu	193
13.3	Podmínky skladování	193
13.4	Mechanické údaje a charakteristiky technického vybavení	193
13.5	Specifikace (hardware a software)	194
13.5.1	Tepelné specifikace	194
13.5.2	Optické specifikace	194
14	Příloha A – Právní informace	195
14.1	Prohlášení FCC	195
14.2	Shoda s normou IEC EN 61326	196
14.3	Prohlášení o shodě	197
14.4	Odpadní elektrická a elektronická zařízení (OEEZ)	198
14.5	Doložka o odpovědnosti	199
14.6	Licenční smlouva k softwaru	200

15	Příloha B – Matematické techniky	203
15.1	Kvantifikace.....	203
15.1.1	Intervaly spolehlivosti pro vypočtené koncentrace.....	203
15.1.2	Intervaly spolehlivosti pro hodnoty CT	204
16	Informace pro objednání	205
16.1	Produkty, příslušenství a spotřební materiál k přístroji Rotor-Gene Q MDx.....	205
17	Historie revizí dokumentu	208

1 Úvod

Děkujeme, že jste si vybrali přístroj Rotor-Gene Q MDx. Jsme přesvědčeni, že se stane nedílnou součástí vaší laboratoře.

Před použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx je zcela zásadní, abyste si důkladně přečetli tuto uživatelskou příručku a věnovali pozornost informacím o bezpečnosti. Pokyny a informace o bezpečnosti obsažené v uživatelské příručce musíte dodržovat z důvodu zajištění bezpečného provozu přístroje a jeho udržování v bezpečném stavu.

Upozorňujeme, že přístroj Rotor-Gene Q MDx se dodává v různých konfiguracích. Podrobnosti včetně informací o objednání naleznete v části 16.

1.1 O této uživatelské příručce

Tato uživatelská příručka obsahuje informace o přístroji Rotor-Gene Q MDx v následujících částech:

- Úvod
- Informace o bezpečnosti
- Všeobecný popis
- Postupy instalace
- Provozní postupy
- Údržba
- Řešení potíží
- Technické specifikace
- Přílohy

Přílohy obsahují následující informace:

- Příloha A – Právní informace
- Příloha B – Matematické techniky

1.2 Všeobecné informace

1.2.1 Technická podpora

Ve společnosti QIAGEN® jsme hrdí na kvalitu a dostupnost naší technické podpory. V našich odděleních technické podpory pracují zkušení vědci s rozsáhlými praktickými a teoretickými zkušenostmi v molekulární biologii a v použití produktů značky QIAGEN. Pokud budete mít jakékoliv dotazy či narazíte na jakékoliv obtíže v souvislosti s přístrojem Rotor-Gene Q MDx nebo výrobky QIAGEN obecně, neváhejte nás kontaktovat.

Zákazníci společnosti QIAGEN jsou hlavním zdrojem informací pro pokročilé nebo specializované použití našich produktů. Tyto informace jsou užitečné pro ostatní vědce a také pro výzkumné pracovníky společnosti QIAGEN. Proto bychom vás rádi vyzvali k tomu, abyste nás kontaktovali, pokud máte připomínky k účinnosti produktů nebo návrhy pro nové aplikace a techniky.

S požadavky o technickou podporu se obraťte na technické služby společnosti QIAGEN.

Aktuální informace o přístroji Rotor-Gene Q MDx najdete na webu <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>.

Internetové stránky: **support.qiagen.com**

Než se obrátíte na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN s dotazem na chyby, připravte si následující informace:

- sériové číslo, typ a verzi přístroje Rotor-Gene Q MDx,
- kód chyby (je-li relevantní),
- časový bod, kdy se chyba poprvé objevila,
- četnost chyby (tzn. občasná nebo trvalá chyba),
- kopie souborů protokolu.

1.2.2 Prohlášení zásad

Strategií společnosti QIAGEN je zlepšovat produkty s přicházejícími novými technologiemi a součástmi. Společnost QIAGEN si vyhrazuje právo technické údaje kdykoliv změnit. Snažíme se vytvořit užitečnou a vhodnou dokumentaci, takže přivítáme vaše připomínky k této příručce. Kontaktujte prosím oddělení technických služeb společnosti QIAGEN.

1.2.3 Správa verzí

Tento dokument je *Uživatelská příručka k přístroji Rotor-Gene Q MDx*, revize R1, pro přístroje Rotor-Gene Q MDx používající software Rotor-Gene Q verze 2.3.x (kde x je ≥ 0).

1.3 Zamýšlené použití přístroje Rotor-Gene Q MDx

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je určen k provádění tepelného cyklování v reálném čase, detekce a/nebo kvantifikace s využitím polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) v klinických aplikacích.

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je určen k použití pouze v kombinaci se soupravami QIAGEN určenými k použití s přístroji Rotor-Gene Q pro způsoby použití popsané v příslušných návodech k soupravám QIAGEN.

Pokud se přístroj Rotor-Gene Q MDx používá s jinými soupravami než QIAGEN, je uživatel povinen ověřit funkčnost takové kombinace výrobků pro konkrétní použití.

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je určen pro diagnostické účely in vitro.

Přístroj Rotor-Gene Q MDx je určen k použití profesionálními uživateli jako techniky a lékaři vyškoleními v molekulárně-biologických technikách a provozu přístroje Rotor-Gene Q MDx.

1.3.1 Požadavky na přístroj Rotor-Gene Q MDx

Tato tabulka uvedená níže obsahuje hlavní stupně kvalifikace a odborných zkušeností, které jsou nutné pro transport, instalaci, použití, údržbu a servis přístroje Rotor-Gene Q MDx.

Úkol	Personál	Odborná příprava a zkušenosti
Dodání	Žádné speciální požadavky	Žádné speciální požadavky
Instalace	Laboratorní technici nebo obdobný personál	Adekvátně vyškolené a zkušené osoby, které jsou obeznámené s použitím počítače a automatizací obecně
Běžné použití (spouštění protokolů)	Laboratorní technici nebo obdobný personál	Profesionální uživatelé, např. technici nebo lékaři vyškolení v technikách molekulární biologie
Běžná údržba	Laboratorní technici nebo obdobný personál	Profesionální uživatelé, např. technici nebo lékaři vyškolení v technikách molekulární biologie
Opravy a roční údržba	Pouze terénní servisní specialisté firmy QIAGEN	Pravidelně proškolení, certifikovaní a pověřeni společností QIAGEN

1.4 Potřebné materiály

Poznámka: Používejte pouze příslušenství dodané společností QIAGEN.

- Rotor-Gene Q MDx 5Plex (kat. č. 9002020)
- Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM (kat. č. 9002030)
- Rotor-Gene Q MDx 6Plex (kat. č. 9002040)
- Laptop (kat. č. 9026760)
- 72-Well Rotor (kat. č. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor (kat. č. 9018904)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (kat. č. 9018901)
- Rotor Holder (kat. č. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) (kat. č. 981103)
- Rotor Gene Q SW (kat. č. 9023241)

1.5 Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky


- Bezpečnostní brýle
- Rukavice
- Laboratorní plášť


Pro použití přístroje Rotor-Gene Q MDx je nutná souprava PCR, kterou je nutné zakoupit samostatně; informace o dodávané řadě souprav naleznete na [QIAGEN.com](https://www.qiagen.com).

2 Informace o bezpečnosti

Před použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx je zcela zásadní, abyste si důkladně přečetli tuto uživatelskou příručku a věnovali pozornost informacím o bezpečnosti. Pokyny a informace o bezpečnosti obsažené v uživatelské příručce musíte dodržovat z důvodu zajištění bezpečného provozu přístroje a jeho udržování v bezpečném stavu.

V *uživatelské příručce k přístroji Rotor-Gene Q MDx* se objevují následující typy informací o bezpečnosti.


VAROVÁNÍ 	Termín VAROVÁNÍ se používá k tomu, aby vás informoval o situacích, které by mohly mít za následek újmu na zdraví vás nebo jiných osob. Podrobnosti o těchto okolnostech jsou uvedeny v podobném rámečku.
--	--

UPOZORNĚNÍ 	Termín UPOZORNĚNÍ se používá k tomu, aby informoval o situacích, které by mohly mít za následek poškození přístroje nebo jiného zařízení. Podrobnosti o těchto okolnostech jsou uvedeny v podobném rámečku.
--	---


Pokyny uvedené v této příručce neslouží jako doplněk či náhrada normálních bezpečnostních požadavků platných v zemi uživatele.


Veďte prosím na vědomí, že podle místních předpisů od vás může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobcí a/nebo jeho autorizovanému zástupci a regulačnímu orgánu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.


2.1 Správné použití

VAROVÁNÍ 	Riziko zranění a škody na zařízení Nesprávné použití přístroje Rotor-Gene Q MDx může způsobit fyzickou újmu nebo škodu na přístroji. Rotor-Gene Q MDx smí obsluhovat pouze kvalifikovaný personál, který byl odpovídajícím způsobem vyškolen. Servis přístroje Rotor-Gene Q MDx smí provádět pouze servisní specialista společnosti A QIAGEN.
--	---


Provedte údržbu, jak ji popisuje část 8. QIAGEN účtuje poplatky za opravy, které jsou nutné kvůli nesprávné údržbě.


VAROVÁNÍ 	Riziko zranění a škody na zařízení Přístroj Rotor-Gene Q MDx je příliš těžký na to, aby jej mohla zdvihat jedna osoba. Aby nedošlo ke zranění osob nebo poškození přístroje, nezvedejte přístroj sami. Kontaktujte technické služby QIAGEN s žádostí o přemístění přístroje.
--	---


VAROVÁNÍ 	Riziko zranění a škody na zařízení Nepokoušejte se přemísťovat přístroj Rotor-Gene Q MDx během provozu.
--	---


UPOZORNĚNÍ 	Poškození přístroje Vyvarujte se rozlítí vody nebo chemikálií na přístroj Rotor-Gene Q MDx. Poškození způsobené rozlítím vody nebo chemikálií vede ke ztrátě záruky.
--	--


Poznámka: V nouzové situaci vypněte Rotor-Gene Q MDx vypínačem napájení na zadní straně přístroje a odpojte napájecí kabel ze zásuvky elektrické sítě.


<p>UPOZORNĚNÍ</p> 	<p>Riziko zranění a škody na zařízení</p> <p>Nepokoušejte se otevřít víko během experimentu nebo během otáčení přístroje Rotor-Gene Q MDx. Jinak, pokud překonáte zámek víka a dostanete se dovnitř, riskujete dotyk součástí, které jsou horké, pod elektrickým napětím nebo se vysokou rychlostí pohybují, a můžete utrpět zranění nebo poškodit přístroj.</p>
--	---

<p>UPOZORNĚNÍ</p> 	<p>Riziko zranění a škody na zařízení</p> <p>Pokud potřebujete rychle zastavit experiment, vypněte napájení přístroje a pak otevřete víko. Než sáhnete dovnitř, nechte ochladit komoru. Jinak riskujete zranění při dotyku horkých součástí.</p>
--	---

<p>UPOZORNĚNÍ</p> 	<p>Riziko zranění a škody na zařízení</p> <p>Pokud bude zařízení používáno způsobem, který výrobce nestanovil, může dojít k porušení ochrany, kterou zařízení poskytuje.</p>
--	---

<p>UPOZORNĚNÍ</p> 	<p>Riziko zranění a škody na zařízení</p> <p>Volný papír pod přístrojem Rotor-Gene Q MDx brání chlazení přístroje. Doporučujeme udržovat plochu pod přístrojem v čistotě.</p>
--	--


<p>UPOZORNĚNÍ</p> 	<p>Poškození přístroje</p> <p>Vždy používejte pojistný kroužek na rotor. Zabráníte tím uvolnění víček ze zkumavek během experimentu. Jestliže se během experimentu uvolní víčka, mohou poškodit komoru.</p>
--	--

UPOZOR- NĚNÍ 	Riziko materiální škody Před každým zpracováním rotor vizuálně zkontrolujte a ujistěte se, že není poškozený nebo deformovaný.
--	--

Pokud se během experimentu dotknete přístroje Rotor-Gene Q MDx, když jste nabití statickou elektřinou, může se Rotor-Gene Q MDx v některých případech resetovat. Software však přístroj Rotor-Gene Q MDx restartuje a experiment pokračuje.

2.2 Elektrická bezpečnost

Před zahájením servisu odpojte napájecí kabel od elektrické zásuvky.

VAROVÁNÍ 	Nebezpečí úrazu elektrickým proudem Jakékoliv narušení ochranného vodiče (uzemňovací/zemnicí vývod) uvnitř nebo vně přístroje nebo odpojení koncové svorky ochranného vodiče povede pravděpodobně k tomu, že přístroj bude nebezpečný. Úmyslné přerušení vodiče je zakázáno. Životu nebezpečné napětí uvnitř přístroje Když bude přístroj připojen k síťovému napájení, koncové svorky mohou být pod proudem a otevírání krytů či vyjímání dílů pravděpodobně odhalí díly pod napětím.
--	--


Aby byl zaručen uspokojivý a bezpečný provoz přístroje Rotor-Gene Q MDx, dodržujte následující doporučení:

- Síťový napájecí kabel musí být zapojen do síťové napájecí zásuvky s ochranným vodičem (uzemněním).
- Neseřizujte ani nevyměňujte vnitřní součásti přístroje.
- Nepracujte s přístrojem, pokud byly odstraněny jakékoliv jeho kryty nebo části.
- Pokud uvnitř přístroje došlo k rozlité tekutiny, přístroj vypněte, odpojte jej ze zásuvky a kontaktujte technický servis společnosti QIAGEN.

Pokud přístroj začne být elektricky nebezpečný, nedovolte ostatním, aby s ním pracovali, a kontaktujte technický servis společnosti QIAGEN.

Přístroje mohou být elektricky nebezpečné, pokud:

- Samotný přístroj nebo jeho síťový napájecí kabel vypadá poškozený.
- Byl dlouhou dobu skladován v nevhodných podmínkách.
- Byl vystaven velkému zatížení při přepravě.


VAROVÁNÍ 	Nebezpečí úrazu elektrickým proudem Přístroj má štítek elektrotechnických parametrů, který udává napětí a frekvenci elektrického napájení a také jmenovité hodnoty pojistek. Zařízení smí pracovat pouze za těchto podmínek.
--	--

2.3 Biologická bezpečnost

Se vzorky a reagensy obsahujícími materiály z biologických zdrojů je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními. Používejte bezpečné laboratorní postupy, které jsou uvedené v publikacích, jako např. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, HHS (<https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>).

Vzorky

Vzorky mohou obsahovat infekční látky. Musíte brát ohled na zdravotní rizika takových látek a používat, skladovat a likvidovat takové vzorky podle požadovaných bezpečnostních předpisů.


<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Vzorky obsahující infekční látky</p> <p>Některé vzorky používané s tímto přístrojem mohou obsahovat infekční látky. Zacházejte s těmito vzorky s největší možnou opatrností a v souladu s požadovanými bezpečnostními předpisy.</p> <p>Vždy používejte ochranné brýle, 2 páry rukavic a laboratorní plášť.</p> <p>Odpovědný orgán (např. vedoucí laboratoře) musí provést taková bezpečnostní opatření, aby bylo zajištěno, že je pracoviště bezpečné, že jsou pracovníci obsluhující přístroj řádně vyškoleni a nejsou vystaveni nebezpečným hodnotám infekčních činitelů definovaných v příslušných bezpečnostních listech (BL) nebo dokumentech OSHA*, ACGIH† nebo COSHH‡.</p> <p>Odvětrání výparů a likvidace odpadních látek musí být v souladu s národními, státními a místními zdravotnickými a bezpečnostními předpisy.</p>
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Úřad pro ochranu zdraví a bezpečnosti při práci) (USA).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Americká konference státních průmyslových hygieniků) (USA).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola látek škodlivých zdraví) (Spojené království).

2.4 Chemická bezpečnost

<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Nebezpečné chemické látky</p> <p>Některé chemické látky používané s tímto přístrojem mohou být nebezpečné nebo se mohou stát nebezpečnými po dokončení zpracování podle protokolu. Vždy používejte ochranné brýle, rukavice a laboratorní plášť. Odpovědný orgán (např. vedoucí laboratoře) musí přijmout nutná bezpečnostní opatření, která zajistí, aby okolní pracoviště bylo bezpečné a pracovníci obsluhující přístroje nebyli vystaveni nebezpečným úrovním toxických látek (chemických či biologických) dle údajů v příslušných bezpečnostních listech (BL) nebo dokumentech OSHA*, ACGIH† nebo COSHH‡.</p> <p>Odvětrání výparů a likvidace odpadních látek musí být v souladu s národními, státními a místními zdravotnickými a bezpečnostními předpisy.</p>
--	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Úřad pro ochranu zdraví a bezpečnosti při práci) (USA).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Americká konference státních průmyslových hygieniků) (USA).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola látek škodlivých zdraví) (Spojené království).

Toxické výpary

Při práci s těkavými rozpouštědly nebo toxickými látkami musíte zajistit účinný systém odvětrávání laboratoře, který bude odvádět případně vznikající páry.


2.5 Likvidace odpadu


Použité laboratorní nádoby mohou obsahovat nebezpečné chemické látky. Takový odpad musí být sbírán a správně zlikvidován podle místních bezpečnostních předpisů.


Další informace o tom, jak zlikvidovat přístroj Rotor-Gene Q MDx, naleznete v části „Odpadní elektrická a elektronická zařízení (OEEZ)“, strana 198.


2.6 Mechanická nebezpečí


Víko přístroje Rotor-Gene Q MDx musí během provozu přístroje zůstat zavřené.


VAROVÁNÍ 	Pohyblivé díly Aby během provozu přístroje nedošlo k dotyku pohyblivých dílů, musí Rotor-Gene Q MDx pracovat se zavřeným víkem.
--	---

VAROVÁNÍ 	Riziko zranění a škody na zařízení Víko přístroje Rotor-Gene Q MDx otevírejte a zavírejte opatrně, abyste předešli zachycení prstů nebo oděvu.
--	--


VAROVÁNÍ 	Poškození přístroje Dbejte na to, aby rotor a pojistný kroužek byly správně nainstalované. Pokud rotor nebo pojistný kroužek vykazuje známky mechanického poškození nebo koroze, přístroj Rotor-Gene Q MDx nepoužívejte; kontaktujte technické služby společnosti QIAGEN.
--	---


<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Poškození přístroje</p> <p>Je-li přístroj Rotor-Gene Q MDx spuštěn bezprostředně po přepravě ve studených podmínkách, mohou se zablokovat mechanické součásti.</p> <p>Než zapnete přístroj, nechte ho aklimatizovat nejméně hodinu na pokojovou teplotu.</p>
--	--

<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Poškození přístroje</p> <p>V případě poruchy způsobené výpadkem elektrického napájení odpojte napájecí kabel a počkejte 10 min, než se pokusíte ručně otevřít víko.</p>
--	---

<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Nebezpečí přehřátí</p> <p>Aby byla zaručena správná ventilace, udržujte minimální vůli 10 cm po stranách přístroje Rotor-Gene Q MDx a za ním.</p> <p>Štěrbiny a otvory, které zajišťují ventilaci přístroje Rotor-Gene Q MDx, nesmí být zakryté.</p>
--	--


Nebezpečí vysokých teplot


<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Horký povrch</p> <p>Komora přístroje Rotor-Gene Q MDx může dosahovat teplot přes 120 °C. Nedotýkejte se jí, dokud je horká.</p>
--	---


<p>VAROVÁNÍ</p> 	<p>Horký povrch</p> <p>Při pozastavení zpracování se Rotor-Gene Q MDx neochladí až na pokojovou teplotu. Při manipulaci s rotorem nebo zkumavkami v přístroji buďte opatrní.</p>
--	---


2.7 Bezpečnost údržby

Provedte údržbu, jak ji popisuje část 8. QIAGEN účtuje poplatky za opravy, které jsou nutné kvůli nesprávné údržbě.

VAROVÁNÍ/ UPOZOR- NĚNÍ 	Riziko zranění a škody na zařízení Údržbu provádějte pouze tak, jak je konkrétně popsáno v této uživatelské příručce.
--	---











VAROVÁNÍ 	Nebezpečí požáru Při čištění přístroje Rotor-Gene Q MDx dezinfekčním prostředkem na bázi alkoholu nechte dvířka přístroje Rotor-Gene Q MDx otevřená, aby se mohly rozptýlit hořlavé páry.
---	---

VAROVÁNÍ/ UPOZOR- NĚNÍ 	Nebezpečí úrazu elektrickým proudem Neprovádějte demontáž přístroje Rotor-Gene Q MDx.
--	---

UPOZOR- NĚNÍ 	Poškození krytu přístroje Nikdy nečistěte kryt přístroje alkoholem ani roztoky na bázi alkoholu. Alkohol kryt poškodí. K čištění krytu používejte pouze destilovanou vodu.
--	--

2.8 Symboly na přístroji Rotor-Gene Q MDx

V uživatelské příručce anebo na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Umístění	Popis
	U komory na vzorky, je vidět, když je otevřené víko	Nebezpečí vysokých teplot – teplota komory může dosáhnout teplot nad 120 °C
	Zadní strana přístroje	Prostudujte si návod k použití
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Označení CE pro shodu s požadavky EU
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Typový štítek na zadní straně přístroje	Označení certifikace CSA pro Kanadu a USA
	Typový štítek na pravé straně	Zákonný výrobce.
	Typový štítek na pravé straně	Směrnice OEEZ o nakládání s použitým elektrickým a elektronickým zařízením pro Evropu a ostatní země.
	Typový štítek na pravé straně	Označení FCC znamená „United States Federal Communications Commission“ (Federální komise Spojených států pro komunikace)
	Typový štítek na pravé straně	RCM (původně značka „C-Tick“) pro Austrálii (identifikace dodavatele N17965)
	Typový štítek na pravé straně	Označení RoHS pro Čínu (omezení použití určitých nebezpečných látek v elektrických a elektronických zařízeních)

3 Všeobecný popis

Rotor-Gene Q MDx je inovační přístroj, který umožňuje vysoce přesné real-time PCR a je vysoce vhodný pro diagnostiku in vitro v kombinaci se soupravami QIAGEN s označením IVD.

Tento výkonný a uživatelsky přívětivý software poskytuje jednoduchost pro začátečníky i otevřenou experimentální platformu pro pokročilé uživatele.

3.1 Princip přístroje Rotor-Gene Q MDx

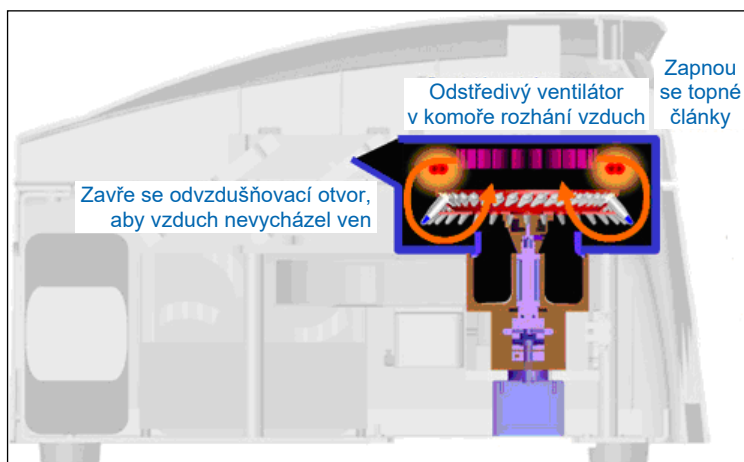
3.1.1 Tepelný výkon

Rotor-Gene Q MDx využívá sofistikované konstrukce systému ohřevu a chlazení k dosažení optimálních reakčních podmínek. Jediné rotační provedení umožňuje optimální tepelnou a optickou stejnoměrnost vzorků, která je nezbytná pro precizní a spolehlivou analýzu.

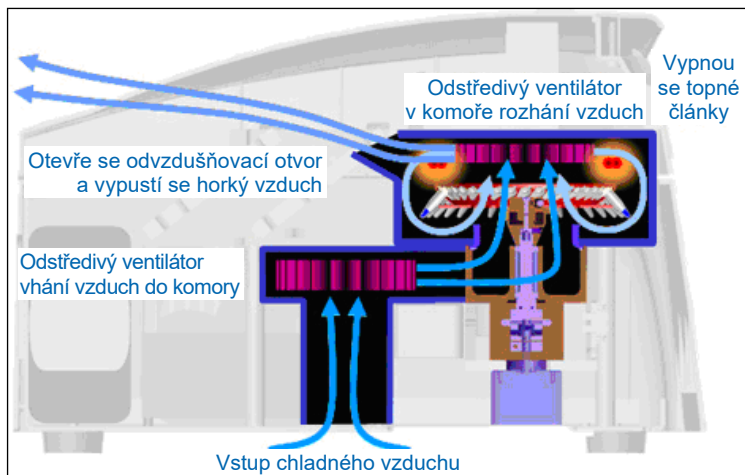
Vzorky se během zpracování neustále otáčejí rychlostí 400 ot/min. Odstředování brání kondenzaci a odstraňuje vzduchové bubliny, ale nezpůsobuje sedimentaci DNA. Vzorky navíc již není nutné před vlastním zpracováním odstředovat.

Vzorky se zahřívají a ochlazují v nízkohmotnostní vzduchové lázni. Ohřev zajišťuje chromniklový článek ve víku. Komora se ochlazuje odvodem vzduchu ven z horní části komory, kdežto do spodní části je vpouštěn vzduch s okolní teplotou.

Ohřev



Chlazení

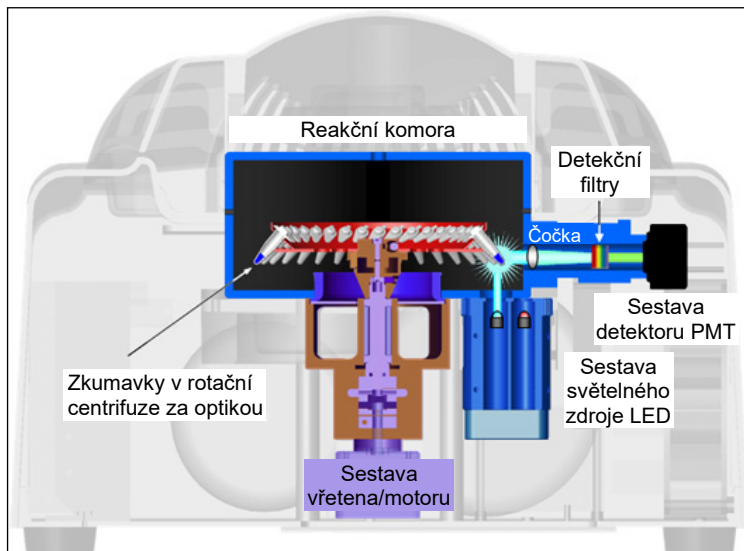


Ilustrace systému ohřevu a chlazení.

3.1.2 Optický systém

Díky možnosti volby až 6 excitačních zdrojů a 6 detekčních filtrů společně s krátkou, fixní optickou dráhou lze Rotor Gene Q MDx použít pro multiplexní reakce. Zajišťuje minimální variabilitu fluorescence vzorků a eliminuje nutnost kalibrace nebo kompenzace.

Vzorky jsou excitovány ze dna komory elektroluminiscenční diodou. Energie je přenášena tenkými stěnami v základně zkumavky. Emitovaná fluorescence prochází emisními filtry na boku komory a pak je shromažďována fotonásobičem. Fixní optická dráha zajišťuje konzistentní excitaci každého vzorku, což znamená, že není nutné používat pasivní vnitřní referenční barvivo, např. ROX™.



Ilustrace optického systému.

3.1.3 Dostupné kanály

Kanál	Excitace (nm)	Detekce (nm)	Příklady detekovaných fluoroforů
Blue	365 ±20	460 ±20	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X, ATTO 390
Green	470 ±10	510 ±5	FAM®, SYBR® Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Yellow	530 ±5	557 ±5	JOE™, VIC®, HEX™, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Orange	585 ±5	610 ±5	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Red	625 ±10	660 ±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680 ±5	712 horní propust	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Křivky tání s vysokým rozlišením (high resolution melt, HRM)	460 ±20	510 ±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Poznámka: Soupravy QIAGEN určené pro použití s přístroji Rotor-Gene Q MDx jsou optimalizovány s ohledem na určité kombinace barviv. Další informace naleznete v příručkách k příslušným soupravám.

3.2 Prvky na vnějším povrchu přístroje Rotor-Gene Q MDx



- | | | | |
|---|------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 | Odvzdušňovací otvory na víku | 3 | Komora rotoru |
| 2 | Madlo na víku | 4 | Stavové kontrolky na přístroji |

3.2.1 Odvzdušňovací otvory na víku

Na zadní straně víka přístroje Rotor-Gene Q jsou odvzdušňovací otvory. Těmito otvory lze z přístroje za provozu odvádět teplo z komory. Zakrytí těchto otvorů nebo nedostatečný prostor kolem nich může mít vliv na funkčnost přístroje

3.2.2 Madlo na víku

Madlo na víku slouží k posunutí víka přístroje dozadu. Toto madlo není určeno k tomu, aby udrželo hmotnost přístroje, a nesmí se používat k jeho zvedání.

3.2.3 Komora rotoru

Komora rotoru je prostor s vloženými rotory, kde se provádí naprogramované kroky ohřevu a cyklování.

3.2.4 Stavové kontrolky na přístroji

Na přístroji Rotor-Gene Q jsou dvě stavové kontrolky. Kontrolka pohotovostního stavu signalizuje, že se přístroj nepoužívá. Kontrolka chodu bliká, když se přístroj Rotor-Gene Q aktuálně používá.

3.3 Prvky uvnitř přístroje Rotor-Gene Q MDx



Pohled do vnitřního prostoru přístroje Rotor-Gene Q

1 Hlava rotoru

2 Optická čočka

3.3.1 Hlava rotoru

Hlava rotoru drží rotor na místě v přístroji.

3.3.2 Optická čočka

Optická čočka v místě zaměření světla excitační diody na zkumavky.

4 Postupy instalace

4.1 Dodání a instalace systému

Při instalaci by měla být přítomna osoba, která je obeznámena s laboratorním a počítačovým vybavením.

Dodaný systém obsahuje:

- Přístroj Rotor-Gene Q MDx
- *Uživatelská příručka k přístroji Rotor-Gene Q MDx*
- Pracovní stanice
- Software Rotor-Gene Q MDx (nainstalují pracovníci terénního servisu společnosti QIAGEN při prvotním sestavení)

4.1.1 Vybalení přístroje Rotor-Gene Q MDx

Přístroj Rotor-Gene Q MDx se dodává se všemi potřebnými součástmi pro sestavení a provoz přístroje. Krabice také obsahuje seznam všech dodaných součástí.

Poznámka: Zkontrolujte úplnost tohoto seznamu a ověřte, že byly dodány všechny součásti.

Poznámka: Před instalací zkontrolujte, že nedošlo k poškození přístroje a dodaného příslušenství při přepravě.

Krabice s příslušenstvím je položena na pěnovém obalu. Krabice s příslušenstvím obsahuje:

- Návod k instalaci (v angličtině; překlady jsou k dispozici na vyměnitelném médiu s příručkami)
- Removable Media (software)
- Removable Media (příručky)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (demontovaný kvůli bezpečné přepravě)
- 36-Well Rotor (tento rotor je červený)
- 36-Well Rotor Locking Ring

Na každé straně pěnového obalu jsou zabaleny tyto položky:

- Kabel USB a sériový kabel RS-232
- Sada mezinárodních napájecích kabelů
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (1000)

Po vyjmutí všech těchto součástí z krabice vyjměte pěnový obal na přístroji Rotor-Gene Q MDx. Opatrně vyjměte přístroj Rotor-Gene Q MDx z krabice a vybalte jej z plastového obalu. Otevřete víko jeho posunutím dozadu, abyste získali přístup k reakční komoře.


Uvnitř přístroje Rotor-Gene Q MDx jsou již instalovány tyto položky:

- 72-Well Rotor (tento rotor je modrý)
- 72-Well Rotor Locking Ring

V závislosti na obsahu objednávky může být přibalen i přenosný počítač.

4.1.2 Instalace hardwaru

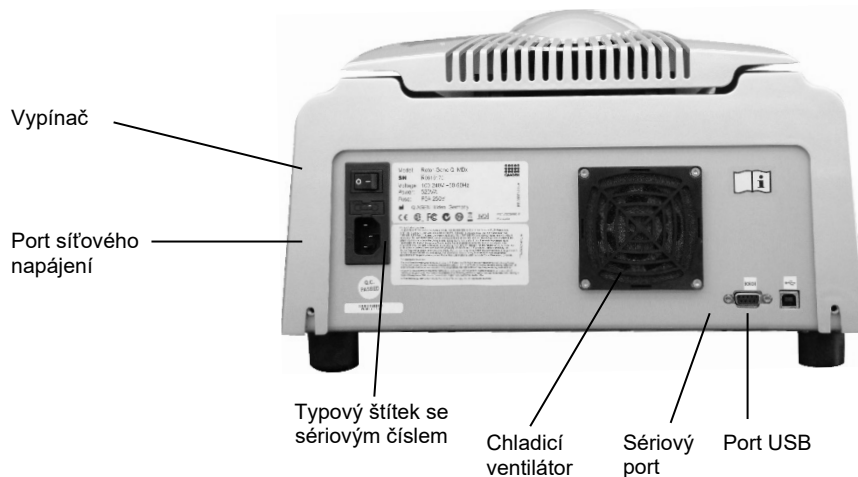
Po vybalení přístroje Rotor-Gene Q MDx proveďte jeho instalaci níže uvedeným postupem.

UPOZORNĚNÍ 	Poškození přístroje Je-li přístroj Rotor-Gene Q MDx spuštěn bezprostředně po přepravě ve studených podmínkách, mohou se zablockovat mechanické součásti. Než zapnete přístroj, nechte ho aklimatizovat nejméně hodinu na pokojovou teplotu.
--	---

Postupujte následovně:

1. Položte Rotor-Gene Q MDx na rovný povrch.
2. Ověřte, že je za přístrojem dostatek místa, abyste mohli úplně otevřít víko.
3. Ujistěte se, že je snadno přístupný vypínač napájení v zadní části přístroje.
4. Nezakrývejte zadní stranu přístroje. Ověřte, že je možné snadno odpojit napájecí kabel, bude-li to třeba, a odpojit napájení přístroje.
5. Zapojte dodaný kabel USB nebo sériový kabel RS-232 do portu USB nebo komunikačního portu na zadní straně přístroje.

6. Zapojte kabel USB nebo sériový kabel RS-232 do zdířek na zadní straně přístroje Rotor-Gene Q MDx.
7. Pak připojte Rotor-Gene Q MDx ke zdroji elektrického napájení. Zapojte jeden konec napájecího kabelu pro střídavý proud do zásuvky umístěné na zadní straně přístroje Rotor-Gene Q MDx a druhý konec do napájecí zásuvky pro střídavý proud.

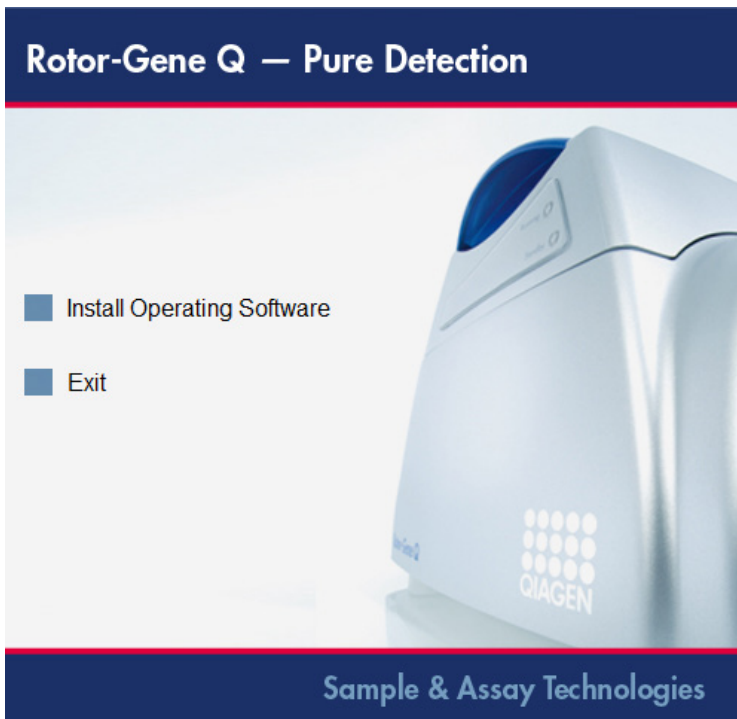


Poznámka: Přístroj Rotor-Gene Q MDx připojte pouze k počítači pomocí kabelu USB a sériového kabelu dodaného s přístrojem. Nepoužívejte jiné kabely.

4.1.3 Instalace softwaru

1. Chcete-li nainstalovat software Rotor-Gene Q, stáhněte jej z webu **QIAGEN.com** a přeneste do počítače na vyměnitelném médiu bez virů, nebo do počítače vložte jednotku Removable Media (software) dodanou s přístrojem.
2. Pokud se automaticky spustí instalace softwaru, v zobrazeném okně vyberte možnost **Install Operating Software** (Instalovat operační software), nebo vyhledejte složku se softwarem RGQ na vyměnitelném médiu.

Poznámka: Přečtěte si dokument *Rotor-Gene Q Installation Guide* (Příručka pro instalaci softwaru Rotor-Gene Q) popisující další postup instalace softwaru.



3. Po nainstalování softwaru se na ploše automaticky vytvoří ikona.
4. Zapněte přístroj Rotor-Gene Q MDx přepnutím spínače umístěného na zadní straně vlevo do polohy „I“. Modrá kontrolka „pohotovostního“ stavu na přední straně přístroje Rotor-Gene Q MDx signalizuje, že přístroj je připraven k použití.

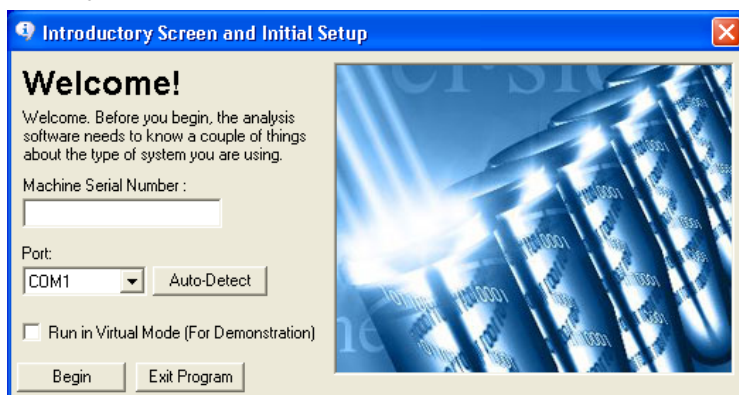
Poznámka: Při prvním spuštění přístroje Rotor-Gene Q MDx připojeného k počítači operační systém přístroj rozpozná a zobrazí se řada zpráv. Přečtěte si pokyny uvedené v dokumentu *Rotor-Gene Q Installation Guide* (Příručka pro instalaci softwaru Rotor-Gene Q) dodaném s přístrojem (Removable Media a tištěné vydání).



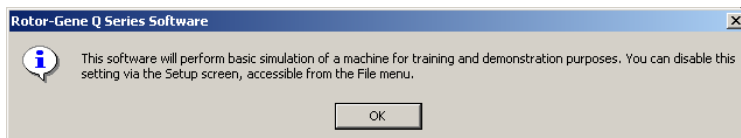
5. Dvěma kliknutími na ikonu **Rotor-Gene Q Series Software** (Software série Rotor-Gene Q) na ploše spusťte software.



6. Při prvním spuštění softwaru se objeví okno **Welcome** (Vítejte), ale při následných upgradech softwaru se neobjeví.



Machine Serial Number (Sériové číslo přístroje):	Napište sériové číslo (7 číslic) uvedené na zadní straně přístroje Rotor-Gene Q MDx.
Port:	Vyberte buďto kabel USB, nebo sériový kabel. Vyberte vhodný komunikační port nebo klikněte na tlačítko Auto-Detect (Detekovat automaticky).
Auto-Detect (Detekovat automaticky)	Při použití této možnosti bude automaticky detekován odpovídající port USB nebo sériový port a zobrazí se v rozevřacím seznamu Port .
Run in Virtual Mode (for demonstration) (Spustit ve virtuálním režimu) (na ukázkou):	Zaškrtnutí tohoto políčka umožní instalaci softwaru Rotor-Gene Q na počítač, který není připojen k přístroji Rotor-Gene Q MDx. Software je plně funkční a může simulovat zpracování. Poznámka: Bude-li toto políčko zaškrtnuto a přístroj Rotor-Gene Q MDx připojen k počítači, před spuštěním zpracování se objeví tato zpráva: You are about to run in Virtual mode (Bude provedeno spuštění ve virtuálním režimu). Chcete-li provést skutečné zpracování, je nutné změnit nastavení v okně Setup (Nastavení) (viz část 6.5.4).
Begin (Začít):	Po zadání všech informací klikněte na tlačítko Begin (Začít). Počkejte, dokud se nedokončí inicializace, která může trvat několik sekund. Pokud byl zvolen virtuální režim, objeví se tato zpráva:

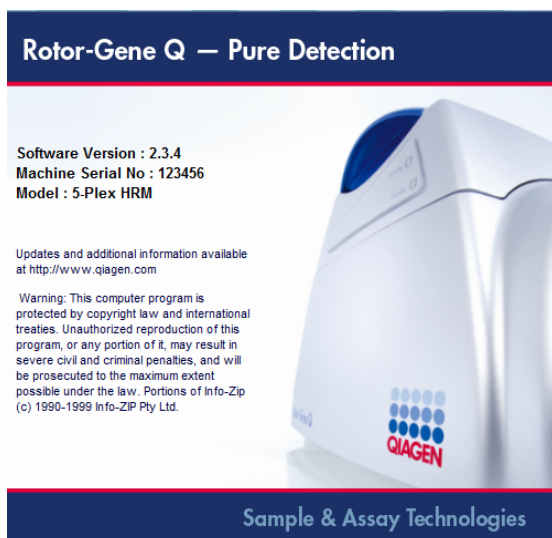


Pokud políčko **Run in Virtual Mode** (Spustit ve virtuálním režimu) není zaškrtnuté, software se automaticky inicializuje a otevře.

- Exit Program (Ukončit program): Kliknutím na toto tlačítko zavřete program.

4.1.4 Verze softwaru

Chcete-li zjistit číslo vaší verze, klikněte na tlačítko **Help** (Nápověda), pak na **About This Software...** (O tomto softwaru...).



V tomto okně se zobrazí všeobecné informace o softwaru včetně jeho verze a sériového čísla a modelu přístroje.

Software je možné volně kopírovat pro použití v rámci organizace vlastníci přístroj Rotor-Gene Q MDx. Tento software je zakázáno kopírovat a předávat jiným osobám mimo organizaci.

4.1.5 Další software v počítačích připojených k přístrojům Rotor-Gene Q MDx

Software Rotor-Gene Q řídí časově náročné procesy v průběhu PCR a proces pořizování dat. Proto je důležité zajistit, aby důležité systémové zdroje nebyly využívány žádnými jinými procesy, které by software Rotor-Gene Q zpomalovaly. Je zvláště důležité věnovat pozornost bodům uvedeným dále.

Správcům systému se doporučuje, aby před provedením modifikace systému vzali v úvahu případný vliv na zdroje.

Antivirový software

Společnost QIAGEN si je vědoma toho, že počítačové viry ohrožují každý počítač, který si vyměňuje data s jinými počítači. Předpokládá se, že software Rotor-Gene AssayManager verze 1.0 nebo 2.1 bude primárně nainstalován v prostředích, v nichž je toto ohrožení minimalizováno dodržováním místních zásad. Společnost QIAGEN však doporučuje v každém případě používat antivirový software.

Výběr a instalace vhodného nástroje ke skenování virů je odpovědností uživatele. Společnost QIAGEN však validovala použití softwaru Rotor-Gene Q přenosným počítačem QIAGEN v kombinaci s tímto antivirovým softwarem k zobrazování kompatibility:

- Microsoft Defender, verze klienta 4.18.2005.5

Podívejte se na stránku s produkty na webu QIAGEN.com s nejnovějšími verzemi antivirového softwaru, které byly validovány v kombinaci se softwarem Rotor-Gene Q a Rotor-Gene AssayManager verze 1.0 nebo 2.1.

Po výběru antivirového softwaru ověřte, že jej lze konfigurovat tak, aby ze skenování bylo možné vyloučit cestu ke složce s databází. V opačném případě může dojít k chybám připojení databáze. Vzhledem k tomu, že software Rotor-Gene AssayManager verze 1.0 a 2.1 dynamicky vytváří nové databázové archivy, je nutné vyloučit cestu ke složce se soubory, a nikoli jednotlivé soubory. Nedoporučujeme používat antivirový software, v němž lze vyloučit jen jednotlivé soubory, např. McAfee Antivirus Plus V16.0.5. Jestliže se počítač používá v prostředí bez síťového přístupu, ověřte také, že antivirový software podporuje aktualizace prováděné offline.

Za účelem získání konzistentních výsledků po instalaci antivirového softwaru musí proto správci systému zajistit následující:

- Jak již bylo vysvětleno, cestu k databázové složce softwaru Rotor-Gene AssayManager 1.0 a 2.1 (**C:\Program Files\Microsoft SQL Server\MSSQL10_50.RGAMINSTANCE\MSSQLDATA**) je nutné vyloučit ze skenování souborů.
- Aktualizace databáze virů se během používání softwaru Rotor-Gene AssayManager 1.0 nebo 2.1 nesmí provádět.
- Ověřte, že v průběhu pořizování dat při provádění real-time PCR je deaktivováno úplné i částečné skenování pevného disku. V opačném případě hrozí riziko nežádoucího účinku na činnost přístroje.

Podrobnosti o konfiguraci si přečtete v příručce ke zvolenému antivirovému softwaru.

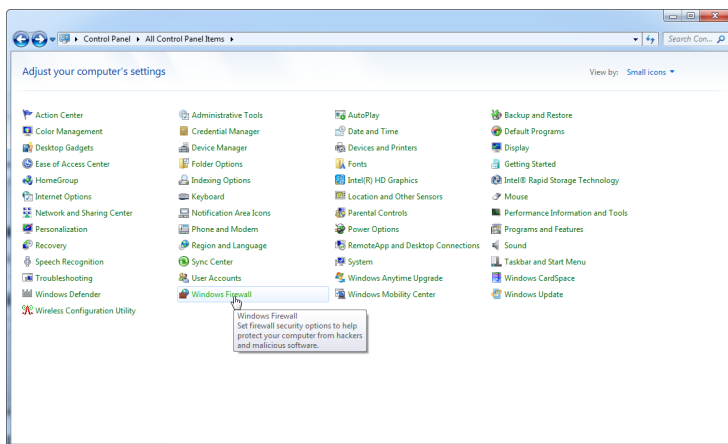
Brána firewall a síť

Software Rotor-Gene Q může být spuštěn buďto v počítačích bez přístupu k síti, nebo v síťovém prostředí, pokud se používá vzdálený databázový server. Brána firewall na přenosném počítači dodaném společností QIAGEN je pro síťový provoz konfigurována tak, aby byl příchozí provoz blokován pro všechny porty kromě těch, jež jsou nutné k navázání síťového spojení.

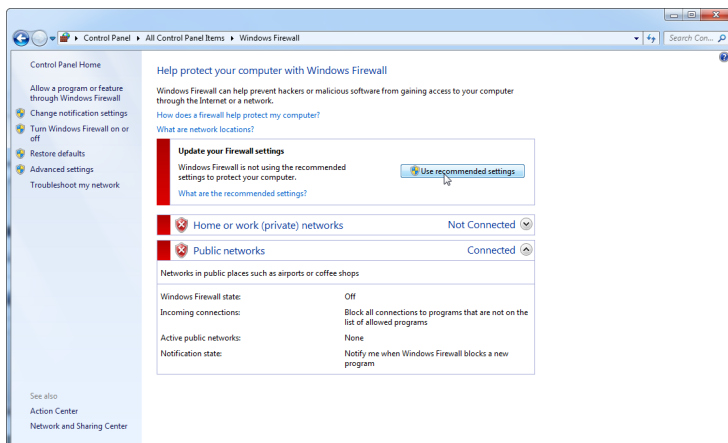
Upozorňujeme, že blokování příchozích připojení nemá vliv na odpovědi na dotazy vznesené uživatelem. Odchozí připojení jsou povolena, protože mohou být nutná k načtení aktualizací.

Máte-li jinou konfiguraci, společnost QIAGEN doporučuje nakonfigurovat bránu firewall tak, jak je popsáno výše. Za tím účelem se správce systému musí přihlásit a poté provede následující kroky:

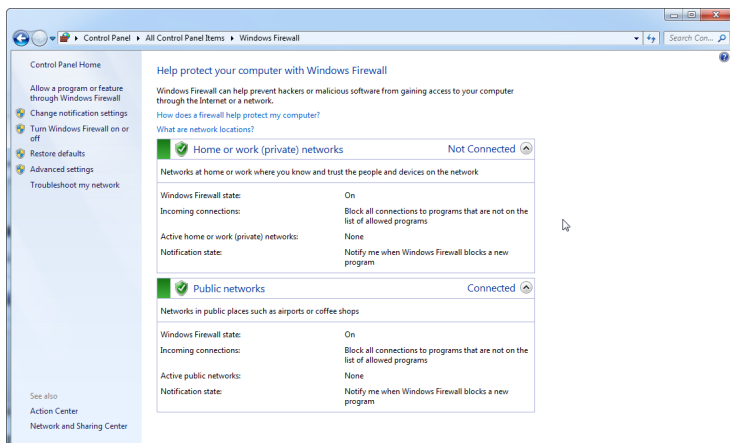
1. Otevřete okno **Control Panel** (Ovládací panel) a vyberte možnost **Windows Firewall** (Brána Windows Firewall).



2. Vyberte možnost **Use recommended settings** (Použít doporučená nastavení).

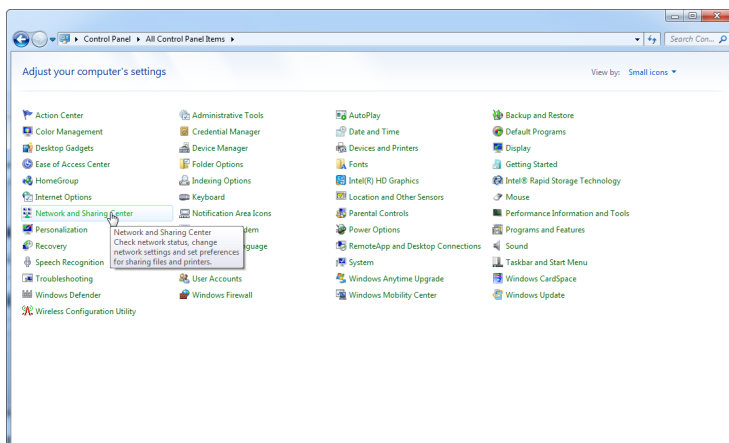


3. Zkontrolujte, že jsou aktivní následující nastavení:

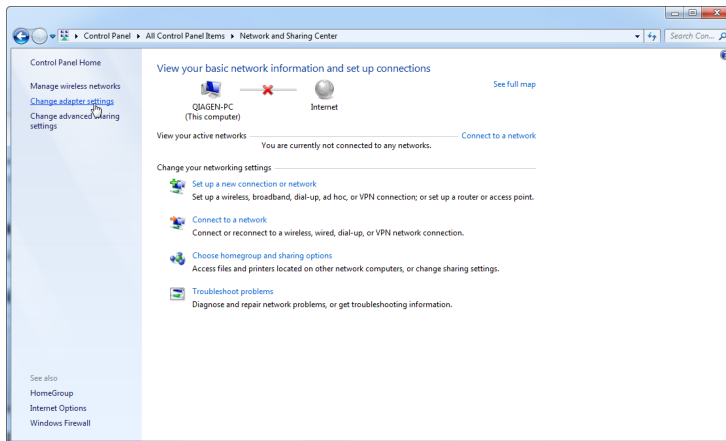


Z důvodů zabezpečení a spolehlivosti bude použit přístup ke kabelové síti místo Wi-Fi. Přenosné počítače dodané společností QIAGEN mají zakázaný adaptér Wi-Fi. Máte-li jinou konfiguraci, správce systému musí adaptér Wi-Fi ručně zakázat tímto postupem:

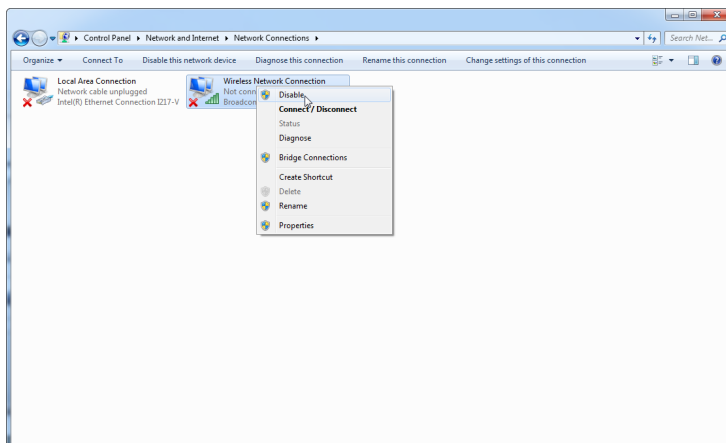
1. Otevřete okno **Control Panel** (Ovládací panel) a vyberte možnost **Network and Sharing Center** (Centrum síťových připojení a sdílení).



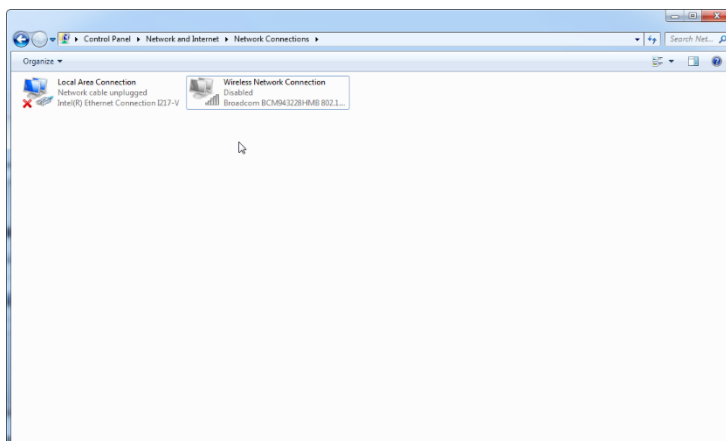
2. Vyberte možnost **Change adapter settings** (Změnit nastavení adaptéru).



3. Přejedte přes položku **Wireless Network Connection** (Bezdrátové připojení k síti), stiskněte pravé tlačítko myši a z místní nabídky vyberte možnost **Disable** (Zakázat).



4. Zkontrolujte, že bezdrátové připojení k síti je zakázané.



Systémové nástroje

Řada systémových nástrojů může využívat významné systémové zdroje i bez interakce uživatele. K typickým příkladům těchto nástrojů patří:

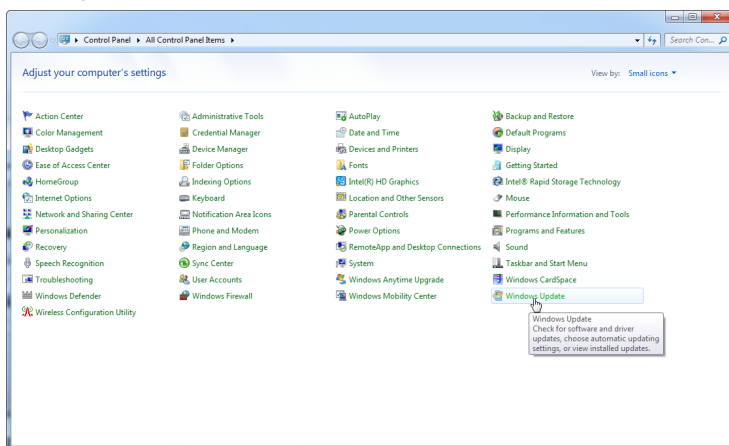
- indexování souborů, které provádí jako úlohu na pozadí mnoho současných kancelářských aplikací,
- defragmentace disku, která rovněž často používá provádění úloh na pozadí,
- kterýkoli software, jenž vyhledává aktualizace na internetu,
- nástroje vzdáleného monitorování a správy.

Vezměte prosím na vědomí, že vzhledem k dynamické povaze světa IT tento seznam nemusí být úplný a mohou být publikovány nástroje, které v době psaní tohoto textu nejsou známé. Je důležité, aby správci systému dbali o to, aby tento nástroj nebyl během provádění PCR aktivní.

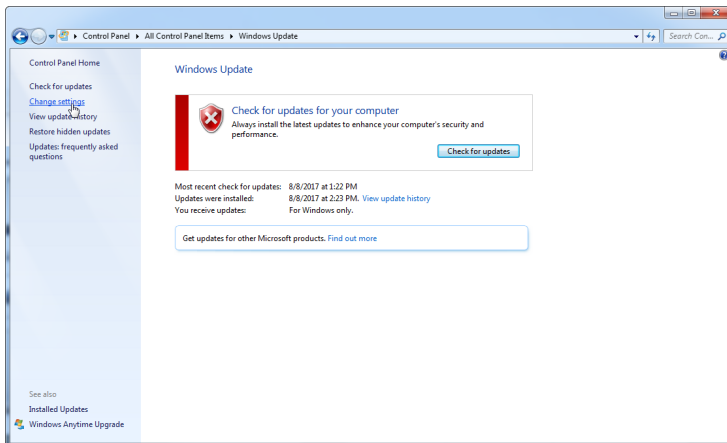
Aktualizace operačního systému

Přenosné počítače dodané společností QIAGEN jsou konfigurovány tak, aby byly automatické aktualizace operačního systému zakázané. Pokud se vaše konfigurace liší, správce systému musí zakázat všechny automatické aktualizace operačního systému následujícím postupem:

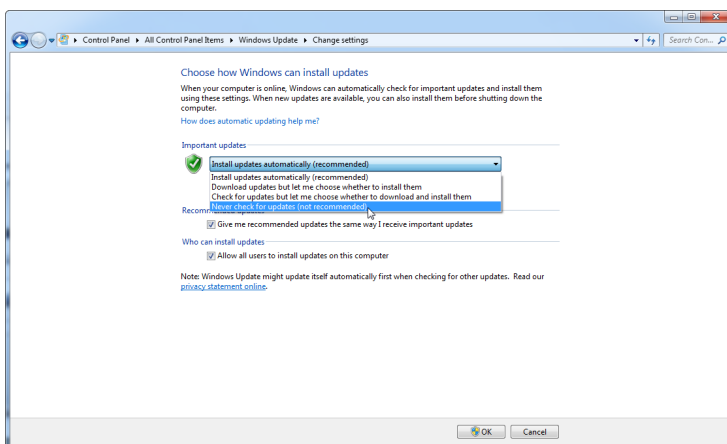
1. Otevřete okno **Control Panel** (Ovládací panel) a vyberte možnost **Windows Update** (Služba Windows Update).



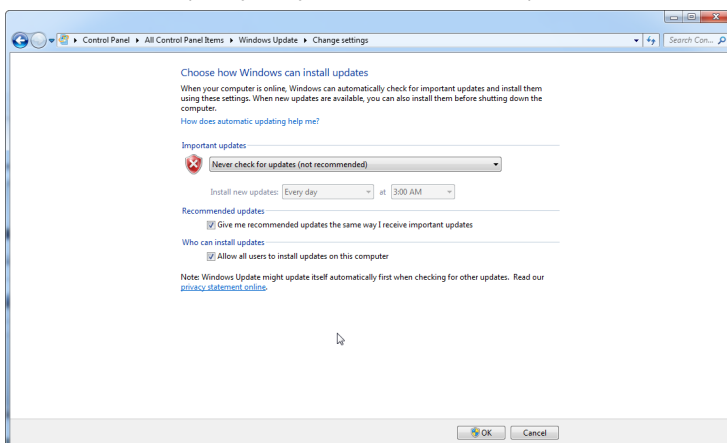
2. Vyberte možnost **Change settings** (Změnit nastavení).



3. Vyberte možnost **Never check for updates** (Nikdy nevyhledávat aktualizace).



4. Zkontrolujte, že pod položkou **Important updates** (Důležité aktualizace) je aktivní možnost **Never check for updates** (Nikdy nevyhledávat aktualizace).



V případě, že jsou aktualizace nutné z důvodu nezajištěných chyb zabezpečení, společnost QIAGEN poskytuje mechanismy pro instalaci stanovené sady validovaných oprav zabezpečení buďto online (je-li v přenosném počítači QIAGEN k dispozici připojení k internetu), nebo ve formě offline balíčku připraveného v samostatném počítači s připojením k internetu.

Další informace naleznete na stránce s produkty na webu **QIAGEN.com**.


4.2 Požadavky na pracoviště


Přístroj Rotor-Gene Q MDx musí být umístěn mimo přímé sluneční světlo, mimo dosah zdrojů tepla a interferencí způsobených vibracemi nebo elektřinou. Viz příloha A, kde jsou uvedeny provozní podmínky (teplota a vlhkost). Místo instalace nesmí být vystaveno nadměrnému průvanu, nadměrné vlhkosti, nadměrné prašnosti ani významnému kolísání teploty.

Viz příloha A s hmotností a rozměry přístrojů Rotor-Gene Q MDx. Dbejte na to, aby byl pracovní stůl suchý, čistý a měl dodatečný prostor pro příslušenství. Další informace o požadovaných technických parametrech pro laboratorní stůl získáte od technických služeb QIAGEN.

Poznámka: Je mimořádně důležité, aby byl přístroj Rotor-Gene Q MDx umístěn na stabilním povrchu, který je rovný a bez vibrací. Přečtěte si provozní podmínky – viz příloha A.

Přístroj Rotor-Gene Q MDx musí být umístěn ve vzdálenosti přibližně do 1,5 m od řádně uzemněného zdroje střídavého proudu.

VAROVÁNÍ 	Prostředí s nebezpečím výbuchu Přístroj Rotor-Gene Q MDx není vhodný k použití prostředí s nebezpečím výbuchu.
--	--

VAROVÁNÍ 	Nebezpečí přehřátí Aby byla zaručena správná ventilace, udržujte minimální vůli 10 cm za přístrojem Rotor-Gene Q MDx. Štěrbiny a otvory, které zajišťují ventilaci přístroje Rotor-Gene Q MDx, nesmí být zakryté.
--	--

4.3 Připojení síťového napájení

4.3.1 Požadavky na napájení

Přístroj Rotor-Gene Q MDx pracuje při:

- 100–240 V AC při 50–60 Hz, 520 VA (špička)

Ujistěte se, že je jmenovité napětí přístroje Rotor-Gene Q MDx kompatibilní se střídavým napětím, které je k dispozici v místě instalace. Kolísání síťového napětí nesmí překročit 10 % nominální hodnoty napětí.

4.3.2 Požadavky na uzemnění

K ochraně personálu společnost QIAGEN doporučuje řádné uzemnění přístroje Rotor-Gene Q MDx. Přístroj je vybaven 3žilovým síťovým kabelem, který přístroj uzemní po připojení do vhodné síťové zásuvky. Pro zachování této ochranné funkce nenapájejte přístroj přes síťovou zásuvku, která nemá připojení k uzemnění.

4.3.3 Instalace napájecího kabelu pro střídavý proud

Zapojte jeden konec napájecího kabelu pro střídavý proud do zásuvky umístěné na zadní straně přístroje Rotor-Gene Q MDx a druhý konec do napájecí zásuvky pro střídavý proud.

4.4 Konfigurace pro zabezpečení systému Windows

Přenosné počítače dodávané společností QIAGEN pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx mají předem nainstalovaný systém Microsoft Windows 7 nebo Windows 10 a je v něm nakonfigurován standardní uživatelský účet Windows (který není určen pro správu) a účet správce. Při rutinním používání systému se používá standardní účet, neboť software Rotor-Gene Q software a Rotor-Gene AssayManager verze 1.0 nebo 2.1 je určen pro fungování bez oprávnění správce. Účet správce – s červeným pozadím na ploše – se používá jen pro instalaci softwaru Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene AssayManager verze 1.0 nebo 2.1 a Další software v počítačích připojených k přístrojům Rotor-Gene Q MDx (viz část „Antivirový software“). Používání účtu správce signalizuje červené pozadí plochy. Při rutinním používání vždy ověřte, že se přihlašujete jako standardní uživatel.

Výchozí heslo účtu správce je Q1a#g3n!A6. Heslo správce po prvním přihlášení změňte. Ujistěte se, že je heslo bezpečné a nemůže se ztratit. Pro účet obsluhy není žádné heslo.

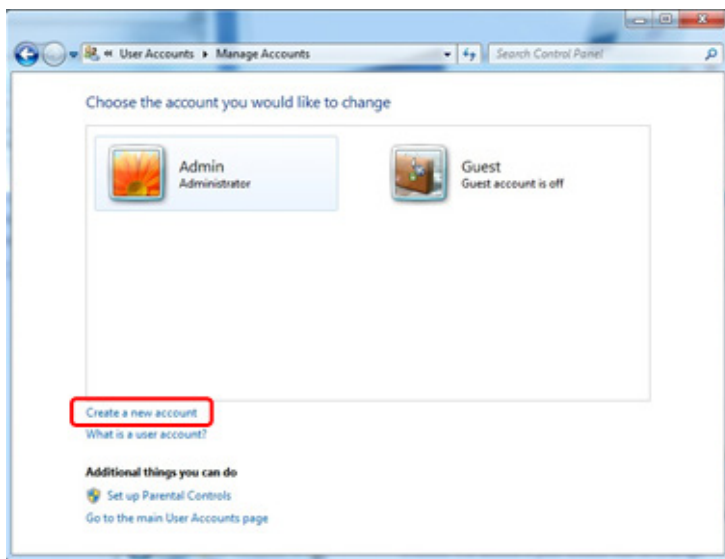
Dojde-li ke ztrátě hesla správce pro přístup k přenosnému počítači, radíme kontaktovat společnost Microsoft.

Pokud je vaše konfigurace jiná a není obsažen žádný účet, který není určen pro správu, správci systému by měli v systému Windows zřídit další účet standardního uživatele, aby zabránili přístupu ke kritickým systémovým oblastem, např. k adresářům Program Files, Windows (např. pro přístup k funkcím instalace nebo odinstalace včetně aplikací, komponent operačního systému, nastavení data a času, aktualizací systému Windows, brány firewall, uživatelských práv a rolí, aktivace antivirové ochrany), nebo k provádění důležitých nastavení, například úspory energie.

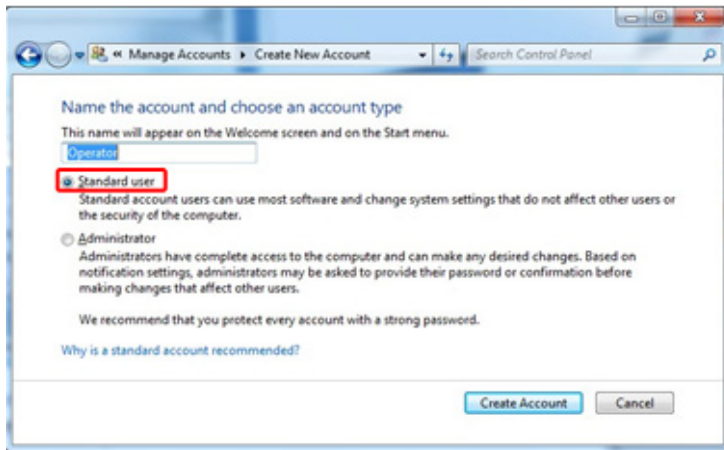
Chcete-li vytvořit standardní uživatelský účet v systému Windows 7, postupujte podle pokynů uvedených v části „Vytvoření nového uživatelského účtu“:

Otevřete ovládací panel systému v nabídce **Start** a vyberte možnost **User Accounts > Manage Accounts** (Uživatelské účty > Spravovat účty).

1. Vyberte možnost **Create a new account** (Vytvořit nový účet).



2. Nazvěte účet a jako typ účtu vyberte možnost **Standard User** (Standardní uživatel).



3. Klikněte na tlačítko **Create Account** (Vytvořit účet).

4.5 Požadavky na pracovní stanici

Přenosný počítač volitelně dodávaný s přístrojem Rotor-Gene Q MDx splňuje požadavky softwaru Rotor-Gene Q, uvedené v následující tabulce.

Systémové požadavky na pracovní stanici

Popis	Minimální požadavek
Operační systém	Microsoft® Windows® 10 edice Professional (64bitová); Microsoft Windows 7 edice Professional (32bitová nebo 64bitová)* (Service Pack 1)
Procesor	Intel® Core™ 2 Duo 1,66 GHz nebo lepší
Hlavní paměť	RAM minimálně 1 GB
Místo na pevném disku	HDD minimálně 10 GB
Grafika	Adaptér a obrazovka s minimálně 1200 x 800 pixely
Porty	Sériový port RS-232 nebo port USB
Ukazovací zařízení	Je požadován touchpad nebo myš nebo ekvivalentní zařízení
Bluetooth	Musí být vypnutý
Prohlížeč PDF nebo podobný	Musí být nainstalován; není součástí balíčků pro instalaci softwaru
Možnosti napájení	Nikdy nevypínejte pevné disky ani je nepřepínejte do režimu spánku nebo pohotovosti (standby)

* Ke spuštění softwaru Rotor-Gene Q s funkcemi zabezpečení je požadován systém Microsoft Windows 10 nebo Windows 7 edice Professional (viz část 6.9). Funkce zabezpečení nejsou k dispozici, pokud se používá edice Home systému Windows 10 nebo Windows 7.

† Při používání softwaru Rotor-Gene AssayManager® verze 1.0 nebo 2.1 se liší následující minimální požadavky na počítač: Je požadován procesor Intel Core i3-380M, hlavní paměť RAM 4 GB, místo na pevném disku 250 GB, port USB.

4.6 Vybalení a instalace přístroje Rotor-Gene Q MDx

Přístroj Rotor-Gene Q MDx se dodává se všemi potřebnými součástmi pro sestavení a provoz přístroje. Krabice také obsahuje seznam všech dodaných součástí.

Poznámka: Zkontrolujte úplnost tohoto seznamu a ověřte, že byly dodány všechny součásti.

Poznámka: Před instalací zkontrolujte, že nedošlo k poškození přístroje a dodaného příslušenství při přepravě.

Krabice s příslušenstvím je položena na pěnovém obalu. Krabice s příslušenstvím obsahuje:

- Návod k instalaci (v angličtině; překlady jsou k dispozici na vyměnitelném médiu s příručkami)
- Removable Media (software)
- Removable Media (příručky)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (demontovaný kvůli bezpečné přepravě)
- 36-Well Rotor (tento rotor je červený)
- 36-Well Rotor Locking Ring

Na každé straně pěnového obalu jsou zabaleny tyto položky:

- Kabel USB a sériový kabel RS-232
- Sada mezinárodních napájecích kabelů
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (1000)

Po vyjmutí všech těchto součástí z krabice vyjměte pěnový obal na přístroji Rotor-Gene Q MDx. Opatrně vyjměte přístroj Rotor-Gene Q MDx z krabice a vybalte jej z plastového obalu. Otevřete víko jeho posunutím dozadu, abyste získali přístup k reakční komoře.

Uvnitř přístroje Rotor-Gene Q MDx jsou již instalovány tyto položky:

- 72-Well Rotor (tento rotor je modrý)
- 72-Well Rotor Locking Ring

V závislosti na obsahu objednávce může být přibaleno i přenosný počítač.

4.6.1 Aktualizace softwaru

Aktualizace softwaru jsou k dispozici na webu společnosti QIAGEN na <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>, který lze také otevřít v nabídce **Help** (Nápověda) v softwaru. Chcete-li stáhnout software, je nutné se online zaregistrovat.

4.7 Příslušenství

Rotorové kotouče a příslušenství je možné objednat samostatně pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx. Další podrobnosti naleznete v části 16.

4.8 Opětovné balení a odeslání přístroje Rotor-Gene Q MDx

Při opětovném balení přístroje Rotor-Gene Q MDx v přípravě na přepravu je nutné použít původní obalové materiály. Pokud původní přepravní materiály nejsou vhodné, kontaktujte oddělení technických služeb společnosti QIAGEN. Před zabalením se ujistěte, že byl přístroj adekvátně připraven (viz část Údržba) a že nepředstavuje biologická ani chemická rizika.


4.9 Začínáme


4.9.1 Zapnutí přístroje Rotor-Gene Q MDx a pracovní stanice

Ověřte, že je přístroj Rotor-Gene Q připojený k notebooku kabelem USB nebo RS-232 a notebook i přístroj Rotor-Gene Q jsou zapojené do sítě a zapnuté.

5 Provozní postupy

Než budete pokračovat, doporučujeme seznámit se s prvky přístroje uvedenými v části 3.

UPOZORNĚNÍ 	Poškození přístroje S přístrojem Rotor-Gene Q MDx používejte pouze průtokové kyvety a spotřební materiál společnosti QIAGEN. Poškození způsobené použitím jiných typů průtokových kyvet nebo spotřebního materiálu zneplatní vaši záruku.
--	---

UPOZORNĚNÍ 	Riziko materiální škody Nepohybujte pracovním stolem a nezpůsobujte vibrace přístroje Rotor-Gene Q MDx, který je v chodu, aby nebyla narušena citlivá optická měření.
--	---

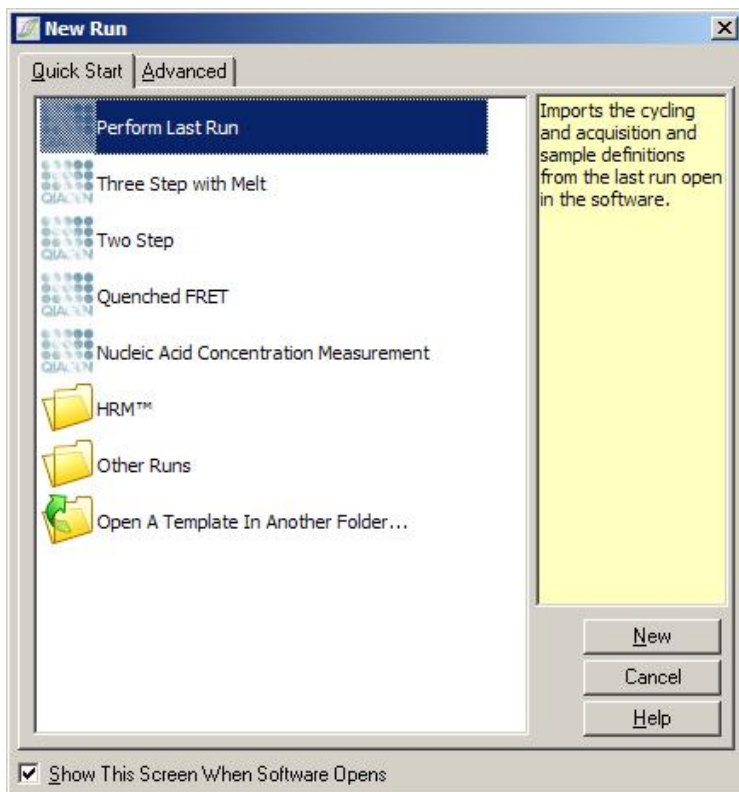
5.1 Použití softwaru přístroje Rotor-Gene Q MDx

Nová zpracování lze nastavit pomocí průvodce Quick Start (Rychlé spuštění) nebo průvodce Advanced (Rozšířené možnosti), který se objeví po spuštění softwaru. Průvodce Quick Start (Rychlé spuštění) je určen k tomu, aby uživatel mohl co nejrychleji spustit zpracování. Průvodce Advanced (Rozšířené možnosti) poskytuje více možností, například konfiguraci optimalizace zesílení a nastavení objemu. Průvodci pro usnadnění obsahují řadu šablon s výchozími podmínkami cyklování a akvizičními kanály. Chcete-li změnit typ průvodce, vyberte příslušnou kartu v horní části okna **New Run** (Nové zpracování).

5.1.1 Průvodce rychlým spuštěním

Průvodce Quick Start (Rychlé spuštění) uživateli umožňuje co nejrychlejší spuštění zpracování. Aby mohl uživatel začít, může si vybrat ze souboru běžně používaných šablon a zadat minimální parametry. Průvodce Quick Start (Rychlé spuštění) předpokládá, že reakční objem je 25 µl. V případě jiných reakčních objemů použijte průvodce Advanced (Rozšířené možnosti) (viz část 5.1.2).

Nejdříve vyberte požadovanou šablonu pro zpracování dvojitým kliknutím na šablonu v seznamu v okně **New Run** (Nové zpracování).



- | | |
|---|---|
| Perform Last Run
(Provést poslední zpracování): | Možnost Perform Last Run (Provést poslední zpracování) používá cyklování, akvizici a definice vzorku ze zpracování, které bylo v softwaru otevřeno naposledy. |
| Three Step with Melt
(Tříkrokový s táním): | Jedná se o tříkrokový profil cyklování a křivku tání s pořizováním dat v zeleném kanálu. |
| Two Step (Dvoukrokový): | Jedná se o dvoukrokový profil cyklování s akvizicí dat v zeleném, žlutém, oranžovém a červeném kanálu. |
| Quenched FRET
(Zhášení FRET): | Jedná se o tříkrokový profil cyklování a křivku tání. Na rozdíl od možnosti Three Step with Melt (Tříkrokový s táním) dochází k akvizici na konci kroku nasedání primerů. |
| Nucleic Acid Concentration Measurement (Měření koncentrace kyseliny nukleové): | Jedná se o výchozí šablonu pro měření koncentrace kyseliny nukleové pomocí interkalačních barviv. |
| HRM: | Tato složka obsahuje profily křivek tání s vysokým rozlišením. |
| Other Runs (Jiná zpracování): | Tato složka obsahuje doplňující profily. |

Profily cyklování a akvizice všech šablon lze změnit pomocí průvodce.

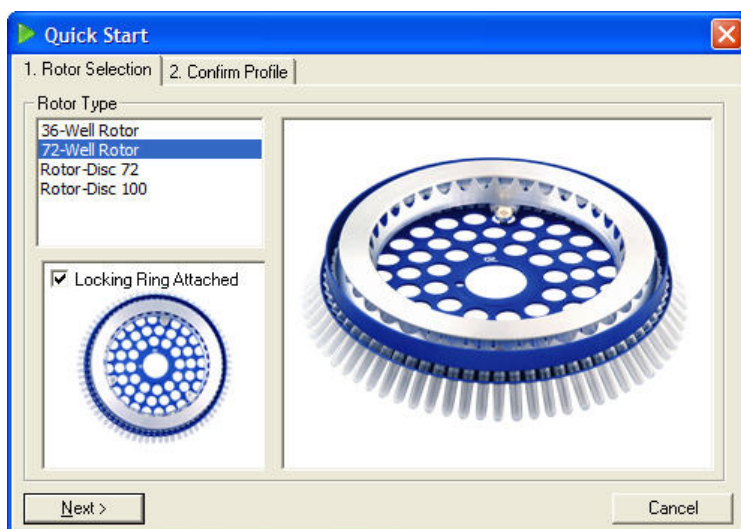
Poznámka: Šablony definované uživatelem lze přidat do seznamu šablon v průvodci Quick Start (Rychlé spuštění) kopírováním nebo uložením souborů *.ret do složky **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates**. Po zkopírování souboru do této cesty se šablona objeví jako ikona v seznamu. Kdybyste chtěli vlastní ikony pro své šablony, vytvořte obrázek ve formátu *.ico se stejným názvem jako šablona.

Podsložky je možné vytvářet do šablon týkajících se skupiny. Umožňuje to uspořádání šablon, což může být užitečné například když stejný přístroj používá několik uživatelů.

Výběr rotoru

V dalším okně vyberte ze seznamu typ rotoru.

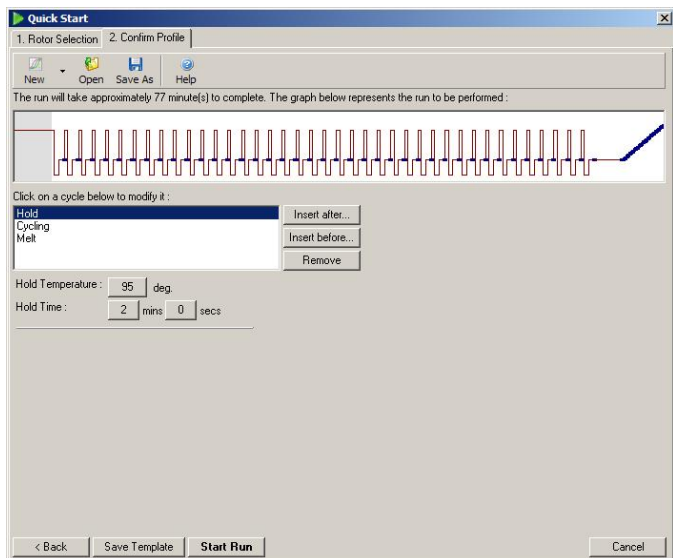
Zaškrtněte pole **Locking Ring Attached** (Přípevněn pojistný kroužek) a pak klikněte na tlačítko **Next** (Další).



Potvrzení profilu

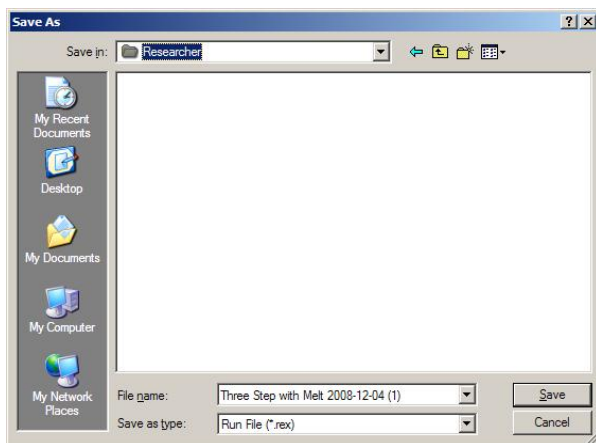
Jsou importovány podmínky cyklování a akviziční kanály zvolené šablony. Lze je změnit v okně **Edit Profile** (Upravit profil) (viz část „Edit Profile (Upravit profil)“).

Chcete-li zahájit zpracování, klikněte na tlačítko **Start Run** (Spustit zpracování). Dále můžete uložit šablonu před spuštěním zpracování kliknutím na tlačítko **Save Template** (Uložit šablonu).



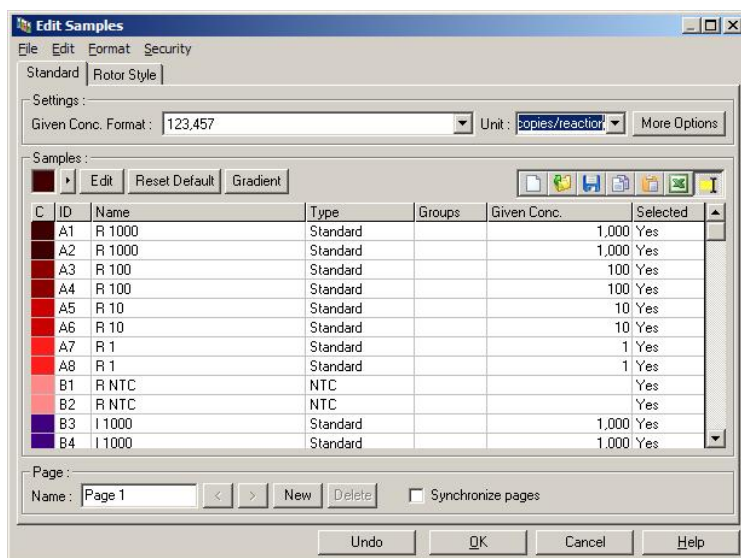
Uložení zpracování

Po kliknutí na tlačítko **Start Run** (Spustit zpracování) se objeví okno **Save As** (Uložit jako). Zpracování lze uložit v umístění, které si uživatel zvolí. Zpracování dostane název souboru, který obsahuje použitou šablonu a datum zpracování. Název souboru též obsahuje pořadové číslo (1, 2 atd.), které umožňuje automatické pojmenování různých zpracování prováděných se stejnou šablonou téhož dne.



Nastavení vzorku

Po spuštění zpracování je možné definovat a popsat vzorky v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky).

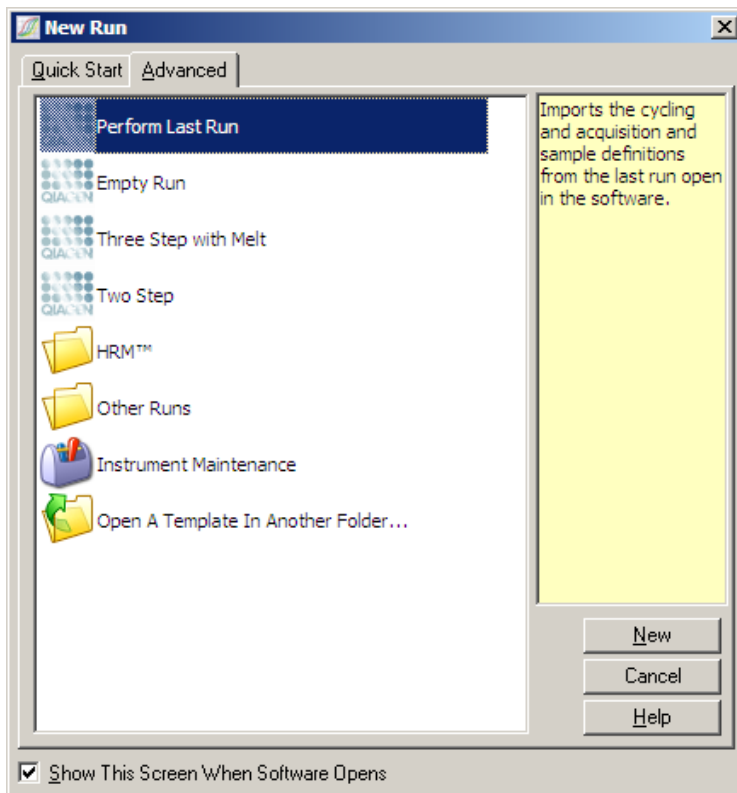


Okno **Edit Samples** (Upravit vzorky) se objeví po spuštění zpracování, aby uživatel mohl tento čas využít k zadání názvů vzorků. Budou-li názvy vzorků zadávány během zpracování příliš rychle (např. pomocí čtečky čárových kódů), může to vést k překrývání písmen v názvech vzorků. Doporučuje se proto čtečku čárových kódů nepoužívat a je-li to možné, zadat názvy vzorků po dokončení zpracování. Informace o nastavení definic vzorků v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky) si přečtete v části 6.8.4.

5.1.2 Průvodce rozšířenými možnostmi

Průvodce Advanced (Rozšířené možnosti) poskytuje možnosti, které nejsou v průvodci Quick Start (Rychlé spuštění) k dispozici, například konfiguraci optimalizace zesílení.

Chcete-li použít průvodce Advanced (Rozšířené možnosti), vyberte šablonu dvojitým kliknutím na její název v seznamu na kartě **Advanced** (Rozšířené možnosti) v okně **New Run** (Nové zpracování).



Možnosti šablony uvedené v tomto okně jsou podobné jako možnosti při použití průvodce Quick Start (Rychlé spuštění) (část 5.1.1).

Perform Last Run (Provést poslední zpracování):	Možnost Perform Last Run (Provést poslední zpracování) importuje cyklování, akvizici a definice vzorku ze zpracování, které bylo v softwaru otevřeno naposledy.
Empty Run (Prázdné zpracování):	Jedná se o prázdné zpracování, které uživateli umožňuje definovat všechny parametry profilu.
Three Step with Melt (Tříkrokový s táním):	Jedná se o dvoukrokový profil cyklování s pořizováním dat pouze v zeleném kanálu pro urychlení zpracování.
HRM:	Tato složka obsahuje 2 profily křivek tání s vysokým rozlišením.
Other Runs (Jiná zpracování):	Tato složka obsahuje doplňující profily.
Instrument Maintenance (Údržba přístroje):	Obsahuje šablonu používanou během optického ověření teploty (Optical Temperature Verification, OTV). Další informace naleznete v části 9. Tato šablona je zamknutá, aby bylo stále zajištěno správné fungování tohoto profilu.

Poznámka: Šablony definované uživatelem lze přidat do seznamu šablon kopírováním nebo uložením souborů *.ret do složky **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates**. Po zkopírování souboru do této cesty se šablona objeví jako ikona v seznamu.

Okno 1 průvodce novým zpracováním

V dalším okně vyberte ze seznamu typ rotoru.

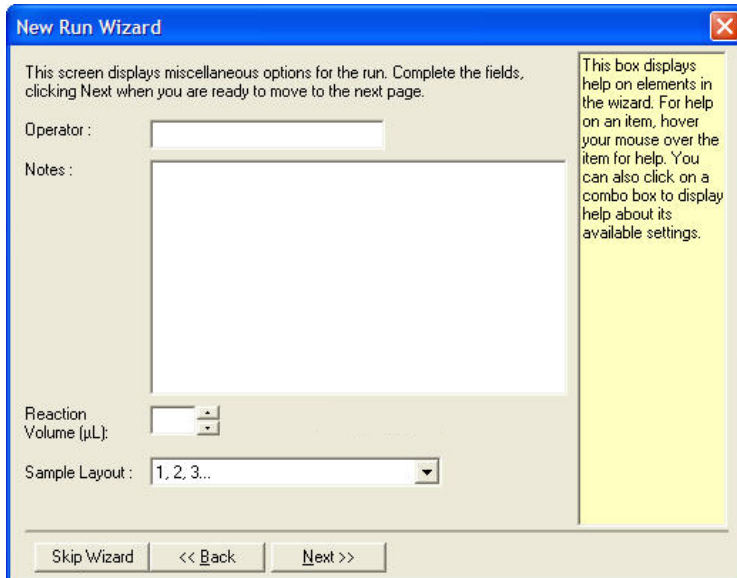
Chcete-li pokračovat, zaškrtněte pole **Locking Ring Attached** (Připevněn pojistný kroužek) a klikněte na tlačítko **Next** (Další).



Okno 2 průvodce novým zpracováním

V dalším okně je možné zadat jméno uživatele a poznámky o zpracování. Také je nutné zadat reakční objem.

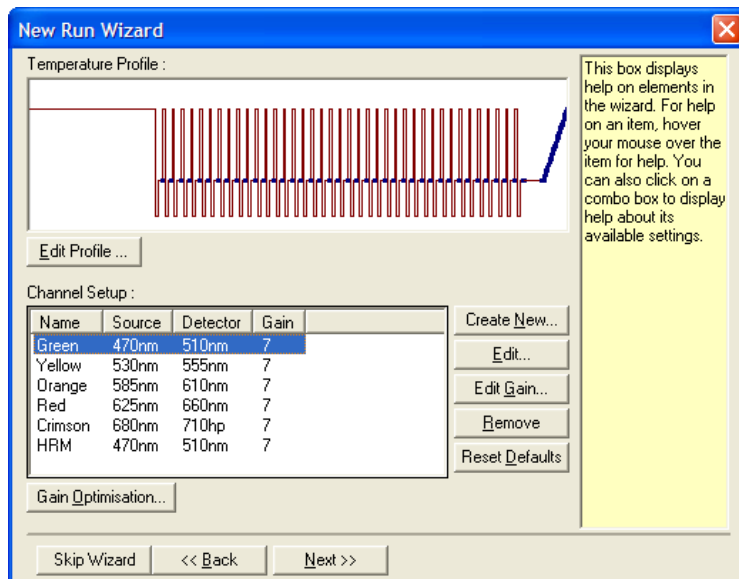
Pokud byla v 1. okně zvolena možnost 72-Well Rotor (72jamkový rotor), v rozevírací nabídce budou k dispozici tři možnosti pro **Sample Layout** (Rozvržení vzorků). Výchozí možnost je „**1, 2, 3...**“. Tuto možnost volí většina uživatelů. Možnost „**1A, 1B, 1C...**“ je vhodné vybrat, když byly vzorky vloženy do sousedních stripů se zkumavkami Strip Tubes 0,1 ml pomocí vícekanálové pipety s 8 kanály. Je-li to vhodné, lze vybrat rozvržení „**A1, A2, A3...**“.



Okno 3 průvodce novým zpracováním

V tomto okně je možné změnit parametry **Temperature Profile** (Teplotní profil) a **Channel Setup** (Nastavení kanálu). Pokud kliknete na tlačítko **Edit Profile...** (Upravit profil...), objeví se okno **Edit Profile** (Upravit profil) umožňující změnu podmínek cyklování a výběr akvizčních kanálů (část Edit Profile (Upravit profil)).

Po nastavení profilu kliknutím na tlačítko **Gain Optimisation...** (Optimalizace zesílení...) otevřete okno **Gain Optimisation** (Optimalizace zesílení) (viz strana 62).



Upravit profil

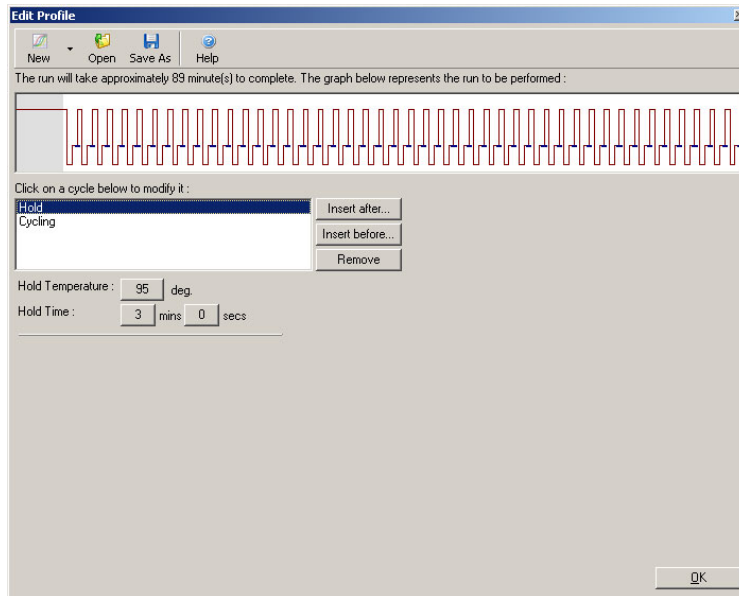
Okno **Edit Profile** (Upravit profil) umožňuje zadat podmínky cyklování a akviziční kanály. Výchozí zobrazený profil závisí na zvolené šabloně při nastavování zpracování (viz strana 45). Profil se zobrazí graficky. Pod grafickým zobrazením se objeví seznam segmentů. Tento seznam může obsahovat položky Hold (Výdrž) (strana 53), Cycling (Cyklování) (strana 55), Melt (Tání) (strana 55) nebo HRM, pokud má přístroj kanál HRM (strana 57).

Každou fázi profilu lze upravit kliknutím na příslušnou oblast grafického zobrazení nebo na název v seznamu a pak změnit zobrazené nastavení.

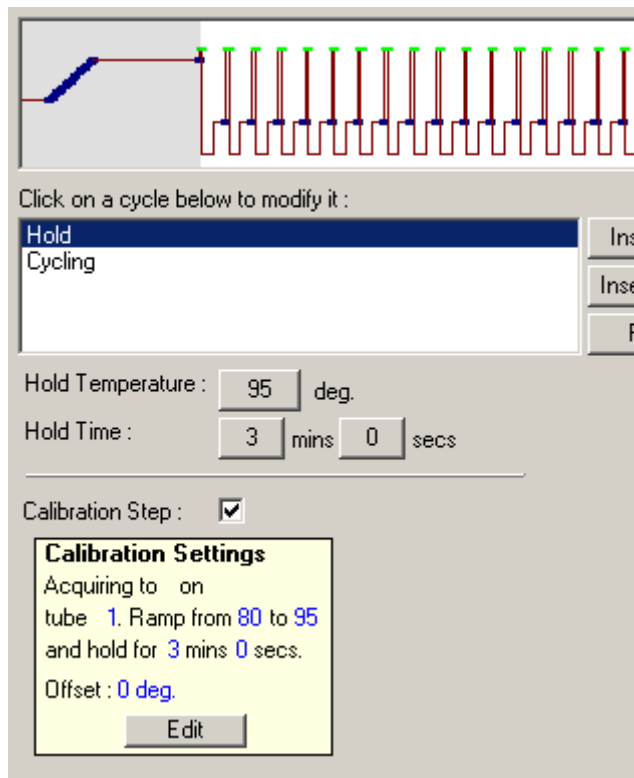
- Insert after... (Vložit za...): Umožňuje přidat nový cyklus za zvolený cyklus.
- Insert before... (Vložit před...): Umožňuje přidat nový cyklus před zvolený cyklus.
- Remove (Odebrat): Odebere vybraný cyklus z profilu.

Výdrž

Parametr Hold (Výdrž) dává přístroji Rotor-Gene Q MDx pokyn zůstat na určené teplotě po nastavenou dobu. Chcete-li změnit teplotu, klikněte na tlačítko **Hold Temperature** (Výdrž) a napište požadovanou teplotu, nebo ji vyberte pomocí posuvníku. Chcete-li změnit dobu trvání výdrže, klikněte na tlačítka **Hold Time** (Doba výdrže), **mins** (minuty) a **secs** (sekundy).



Při provádění optického denaturačního cyklování může být výdrž použita jako kalibrační krok. V takovém případě se před výdrží provede kalibrační táhání. Ve výchozím nastavení se konfigurace provádí pro první výdrž ve zpracování, ale parametry lze dle potřeby změnit.



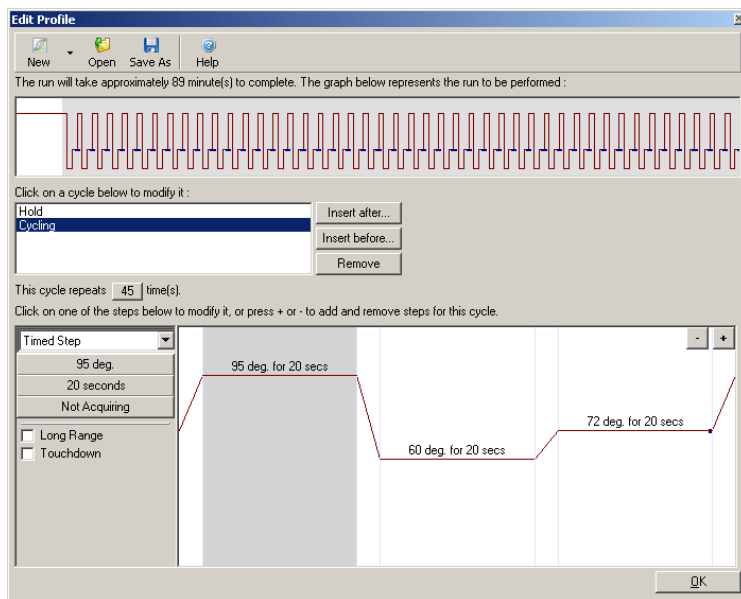
Další informace o optickém denaturačním cyklování najdete na straně 58.

Cyklování

Cyklování provádí zadaný počet opakování kroků teploty a času definovaných uživatelem. Počet opakování se nastavuje pomocí tlačítka **This cycle repeats X time(s)**. (Tento cyklus se opakuje Xkrát.).

Jednotlivý cyklus se zobrazí graficky (jako na snímku obrazovky dále). Každý krok cyklu lze obměnit. Teplotu je možné změnit tažením bodu na teplotní čáře v grafu nahoru nebo dolů. Doba trvání kroku je možné změnit tažením hranice teploty v grafu doleva nebo doprava. Nebo klikněte na krok a pomocí tlačítek pro teplotu a čas na levé straně grafu.

Kroky lze přidat nebo odebrat z cyklu tlačítky „-“ a „+“ v pravém horním rohu grafu.

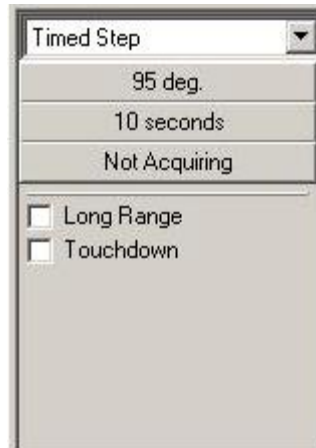


Long Range (Dlouhý rozsah): Zaškrtnutím tohoto políčka se s každým novým cyklem prodlouží doba výdrže vybraného kroku o 1 s.

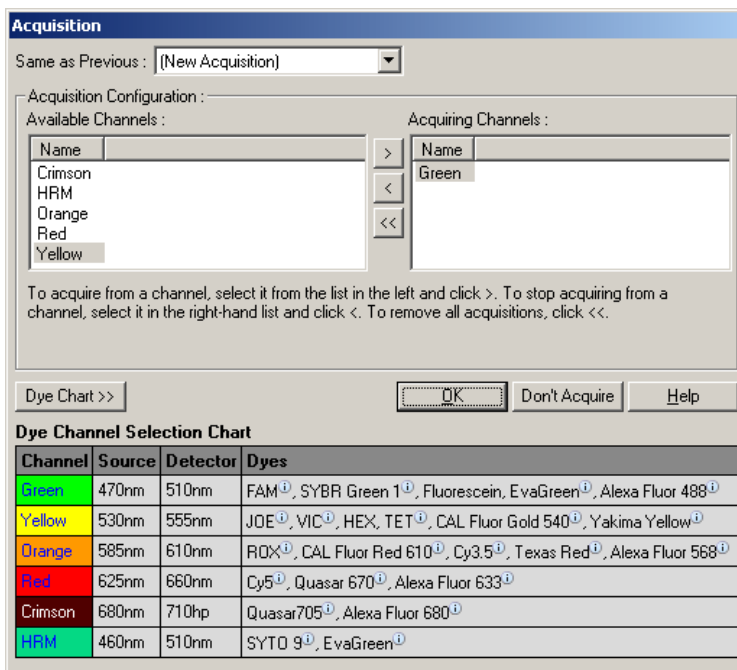
Touchdown (Snížení): Zaškrtnutím tohoto políčka se sníží teplota o zadaný počet stupňů během zadaného počtu počátečních cyklů. Ten se pak zobrazí na displeji.

Akvizice

Data lze pořizovat v libovolném kanálu v libovolném kroku cyklování. Chcete-li u některého kanálu nastavit akvizici dat, klikněte na tlačítko **Not Acquiring** (Neprovádí akvizici) (pokud byl kanál již nastaven na pořizování v tomto kroku, budou zde uvedeny akviziční kanály).



Po kliknutí na tlačítko **Not Acquiring** (Neprovádí akvizici) se objeví okno **Acquisition** (Akvizice).



Chcete-li u kanálu nastavit akvizici, vyberte kanál a přesuňte jej ze seznamu „Available Channels“ (Dostupné kanály) do seznamu „Acquiring Channels“ (Kanály provádějící akvizici) tlačítkem **>**. Chcete-li odebrat vybraný kanál ze seznamu „Acquiring Channels“ (Kanály provádějící akvizici), použijte tlačítko **<**. Tlačítkem **<<** odeberete všechny kanály ze seznamu „Acquiring Channels“ (Kanály provádějící akvizici). Kliknutím na tlačítko **Don't Acquire** (Neprovádět akvizici) také odebere všechny akvizice z tohoto kroku.

Je-li součástí profilu více než jedna sekvence cyklování, pořízená data lze připojit k datům pořízeným při dřívějším cyklování. V rozevírací nabídce **Same as Previous** (Stejně jako předchozí) vyberte krok cyklování ke kterému mají být data připojena.

Dye Channel Selection Chart (Tabulka pro výběr kanálu barviva) je pomůckou pro uživatele při rozhodování, který kanál je vhodný pro barvivo, jež hodlá použít. Barviva uvedená v tabulce jsou běžně používaná barviva a přístroj tímto výčtem není omezen.

Výše popsané možnosti akvizice se také vztahují na kroky „Melt“ (Tání) s tou výjimkou, že není možné připojit získaná data pomocí nabídky **Same as Previous** (Stejně jako předchozí).

Tání a hybridizace

Tání je náběhový přechod mezi 2 teplotami, z nižší na vyšší teplotu. Dovolený rozsah teplot je 35–99 °C.

Chcete-li nastavit parametr Melt (Tání), zadejte počáteční teplotu, koncovou teplotu, přírůstek teploty, dobu výdrže na první akvizici před zahájením náběhu, dobu výdrže každého přírůstku a akvizici kanály.

Náběh se vytvoří mezi 2 teplotami. Bude-li počáteční teplota vyšší než koncová, název kroku se změní na **Hybridisation** (Hybridizace). Možnost **Acquiring To** (Provést akvizici do) nastavená v zobrazeném snímku obrazovky na Melt A (Tání A), lze změnit kliknutím na tlačítko. Objeví se okno **Acquisition**, ve kterém lze vybrat kanály.

Ramp from 50 degrees to 90 degrees,
Rising by 1 degree(s) each step,
Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step,
Wait for 5 seconds for each step afterwards.
Acquire to Melt A on Green

Při provádění standardního tání se teplota zvyšuje o přírůstek 1 °C s čekáním 5 sekund před každou akvizicí. Na přístroji Rotor-Gene Q MDx je možné nastavit provádění tání s přírůstkem 0,02 °C. Minimální doba výdrže mezi teplotními kroky se liší podle počtu stupňů mezi jednotlivými kroky.

Křivka tání s vysokým rozlišením

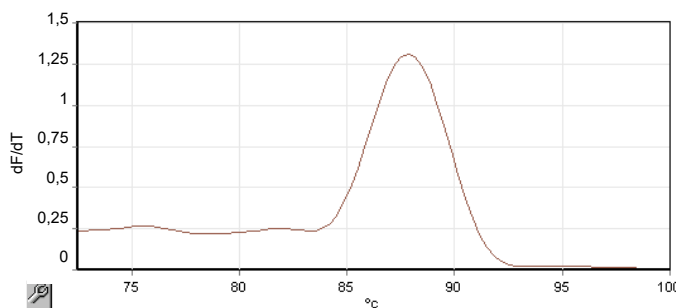
Analýza křivek tání s vysokým rozlišením (high resolution melt, HRM) charakterizuje vzorky dvouvláknové DNA podle jejich chování při disociaci (tání). Je podobná analýze klasických křivek tání, ale poskytuje daleko více informací pro širší spektrum aplikací. Vzorky lze rozlišovat podle sekvence, délky, obsahu GC nebo komplementarity vlákna až po změny jednotlivých párů bází.

Analýza HRM lze provádět pouze v přístrojích, které mají hardware a nainstalovaný software pro HRM. Data jsou pořizována pomocí specializovaných zdrojů a detektorů HRM. Analýza HRM též obsahuje možnost provést optimalizaci zesílení těsně před zahájením tání. Po provedení HRM je možné analyzovat data pomocí softwaru pro analýzu HRM (část 10).

Optické denaturační cyklování

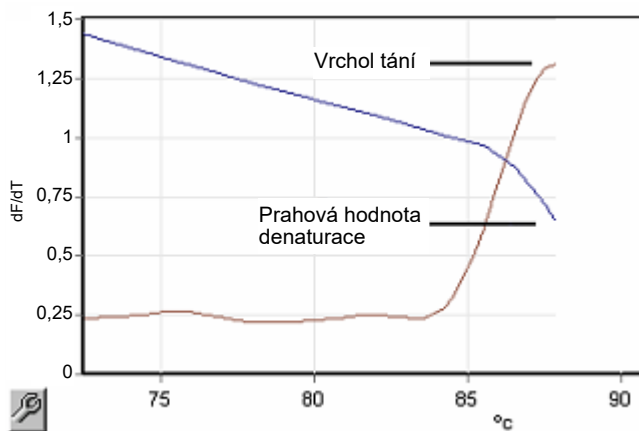
Optické denaturační cyklování je technika excitace dostupná v přístroji Rotor-Gene Q MDx, která provádí analýzu křivek tání v reálném čase ke stanovení vrcholu tání referenčního vzorku. Udává denuraci produktu PCR s vyšší přesností než nastavení určité denaturační teploty pro dobu výdrže. Chcete-li provést tuto techniku, jednoduše umístíte referenční zkumavku s produktem PCR do pozice 1 pro zkumavku v rotoru. Referenční zkumavka musí také obsahovat detekční chemikálii umožňující detekci disociace vlákna.

Při ohřevu na počáteční denaturační teplotu se tání provádí v zeleném kanálu s výchozím nastavením od 80 do 95 °C. Parametry tohoto počátečního tání může uživatel upravit. Z těchto údajů se vygeneruje a automaticky analyzuje křivka tání.



Vrchol tání je vztažen k nezpracovaným datům, aby byla získána prahová hodnota denaturace. Pak se přístroj v každém kroku optického denaturačního cyklování co nejdříve zahřeje a data jsou pořizována kontinuálně. Jakmile referenční zkumavka dosáhne úrovně fluorescence při prahové hodnotě denaturace, přístroj se ihned ochladí a přejde k dalšímu naprogramovanému kroku v cyklu. Vrchol se během cyklování nevypočítá. Místo toho je úroveň fluorescence vztažena k vrcholu tání, což označuje prahovou hodnotu denaturace.

V následujícím grafu se překrývají nezpracované hodnoty fluorescence a první derivace. Znázorňujte to vztah mezi prahovou hodnotou denaturace a vrcholem tání získaným během kalibrace.



K provedení optického denaturačního cyklování budete potřebovat:

- Předamplifikovaný produkt PCR, který umístíte do pozice 1 v rotoru. Tento vzorek by měl obsahovat stejný produkt PCR jako zkoumané vzorky a detekční chemikálii pro monitorování disociace produktu PCR.
- Optický denaturační profil. Bude vytvořen nový profil nebo je možné upravit existující profil (podrobnosti viz dále).

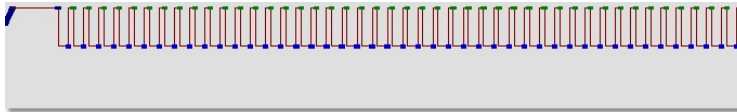
Optický denaturační cyklus vypadá téměř stejně jako ostatní cykly. K hlavním rozdílům patří krok tání automaticky vložený na začátek profilu a ostrý profil kroku denaturace během cyklování. Optický denaturační cyklus nevyžaduje definované doby výdrže, protože disociace produktu je monitorována v každém cyklu.

Chcete-li provést tuto techniku, jsou potřeba tyto informace o zpracování:


- Počáteční teplota denaturace. Jedná se o stejnou teplotu jako v kroku denaturace ve standardním profilu cyklování.
- Pozice zkumavky se vzorkem pro PCR, ze kterého se vytvoří křivka tání v zeleném kanálu.
- Je nutné definovat profil optického denaturačního cyklování.

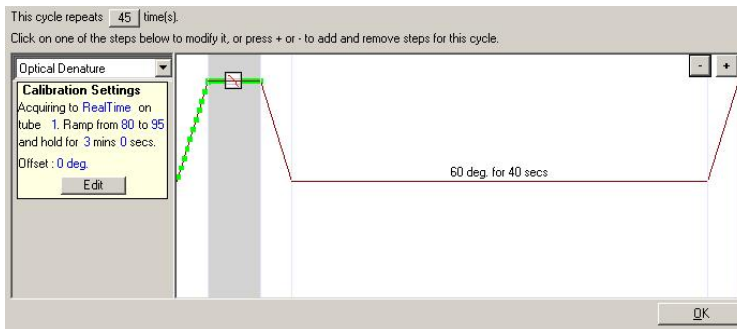
Následujícím postupem vytvořte nový optický denaturační cyklus.

1. Otevřete okno **Edit Profile** (Upravit profil). Pak klikněte na tlačítko **New** (Nový). Zobrazí se okno, v němž klikněte na tlačítko **Insert after** (Vložit za) a z nabídky vyberte položku **New Cycling** (Nové cyklování). Kliknutím na graf vyberte jeden z teplotních kroků. V rozevírací nabídce změňte položku **Timed Step** (Časovaný krok) na **Optical Denature** (Optická denaturace). Objeví se výchozí profil obsahující krok Denature (Denaturace) a objeví se krok Optical Denature Cycle (Optický denaturační cyklus).

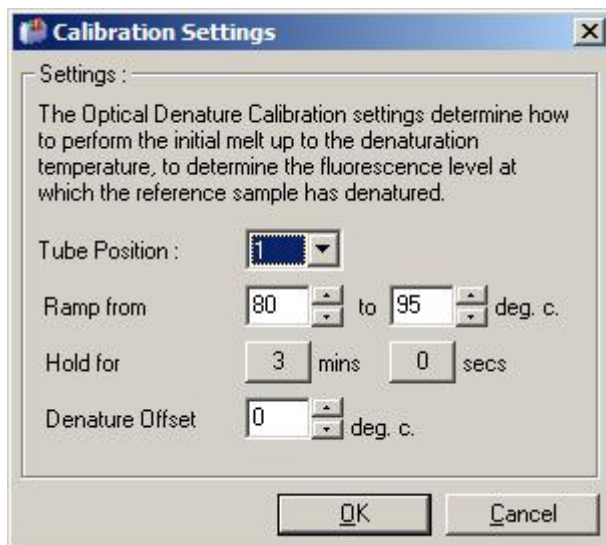


Oblast s náběhem na začátku zpracování představuje proces kalibrace. Zelené tečky představují akvizice pořízené při ohřevu v každém cyklu. Modré tečky představují akvizici na konci kroku nasedání prumerů při 60 °C. Pověšimněte si, že přestože je v profilu zobrazen každý krok se stejnou teplotou denaturace, v tomto případě tomu tak nemusí být. Pokud vzorek potřebuje na konci zpracování poněkud delší čas tání, proces optické denaturace na tání počká podle dat o fluorescenci a nikoli podle času. Proto se teplotní stopa u jednotlivých cyklů může lišit.

2. Klikněte na první polovinu grafu se symbolem optické denaturace . Na levé straně obrazovky se objeví informace v poli **Calibration Settings** (Nastavení kalibrace).



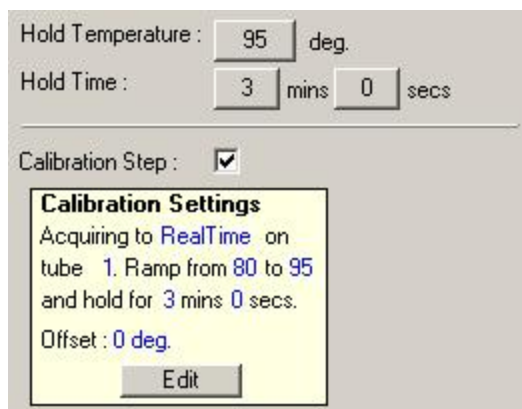
3. Informace v poli „Calibration Settings“ (Nastavení kalibrace) jsou obvykle správné. Chcete-li je změnit, podle potřeby klikněte na tlačítko **Edit** (Upravit). Objeví se okno **Calibration Settings** (Nastavení kalibrace).



4. Ověřte tyto skutečnosti:

- Zkumavka uvedená v poli **Tube Position** (Pozice zkumavky) obsahuje produkt PCR, který zobrazí vrchol tání v zeleném kanálu.
- Koncová teplota náběhu vzorek nespálí, ale bude dost vysoká na jeho roztavení.
- Doba výdrže postačuje k denaturaci vzorku.
- Posunutí denaturace je správně nastaveno. Výchozí hodnota 0 °C je pro většinu tání dostatečná. Křivky tání s velmi ostrými přechody mohou vyžadovat posunutí denaturace $-0,5\text{ °C}$ až -2 °C stanovené uživatelem, aby bylo zajištěno detekování přechodu k tání.

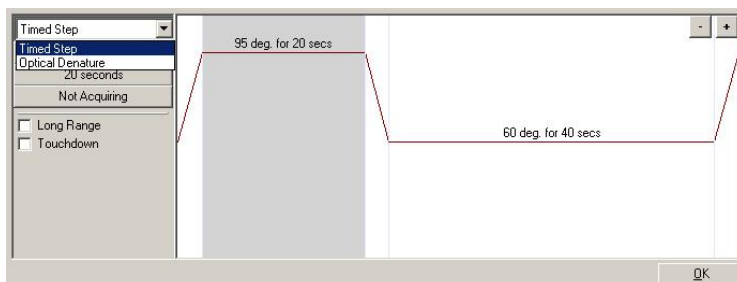
Krok denaturace můžete také definovat zavedením nového kroku výdrže. Klikněte na tlačítko **Insert before** (Vložit před) a v nabídce vyberte položku **New Hold at Temperature** (Nová výdrž při teplotě). Objeví se nastavení kalibrace




Nastavení kalibrace jsou synchronizována s nastaveními denaturace, a proto se při změně doby výdrže v kroku denaturace automaticky aktualizuje doba výdrže kalibrace. Je to proto, že proces kalibrace a denaturace jsou v optickém denaturačním cyklování ekvivalentní.

Změna existujícího kroku pro použití optického denaturačního cyklování

Chcete-li změnit existující krok denaturace v sekvenci cyklování, vyberte cyklus v seznamu v okně **Edit Profile** (Upravit profil). Pak vyberte krok Denature (Denaturace) kliknutím na něj na displeji.



Klikněte na rozevírací nabídku a vyberte možnost **Optical Denature** (Optická denaturace). Teplota a doba výdrže se odstraní a zobrazí se ikona **Optical Denature** (Optická denaturace) 

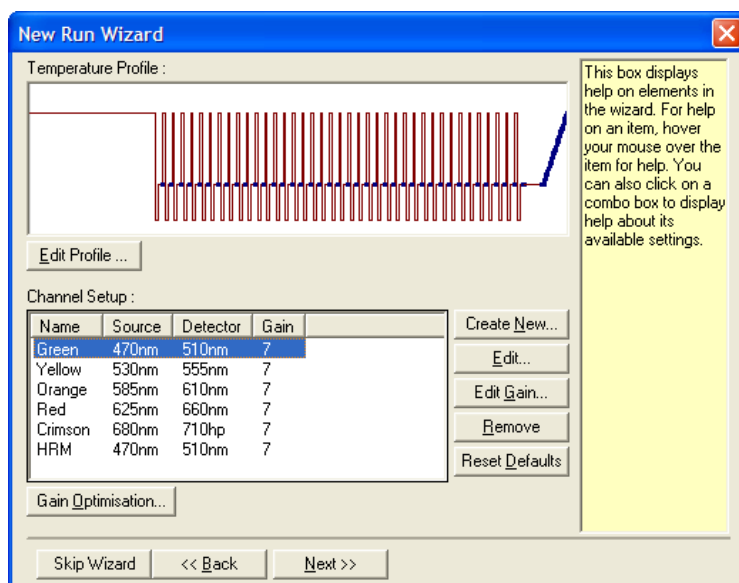
Optimalizace zesílení

Při nastavování nového zpracování je užitečné použít funkci **Gain Optimisation** (Optimalizace zesílení). Máte tak možnost optimalizovat zesílení, abyste docílili požadovaného rozsahu počáteční fluorescence při nastavené teplotě (obvykle teplotě, při níž se provádí pořizování dat) v každém z akvizičních kanálů. Cílem optimalizace zesílení je zajistit, aby všechna data byla shromážděna v dynamickém rozsahu detektoru. Bude-li zesílení příliš nízké, signál se ztratí v šumu na pozadí. Bude-li příliš vysoké, signál bude mimo rozsah (saturovaný) a ztratí se.

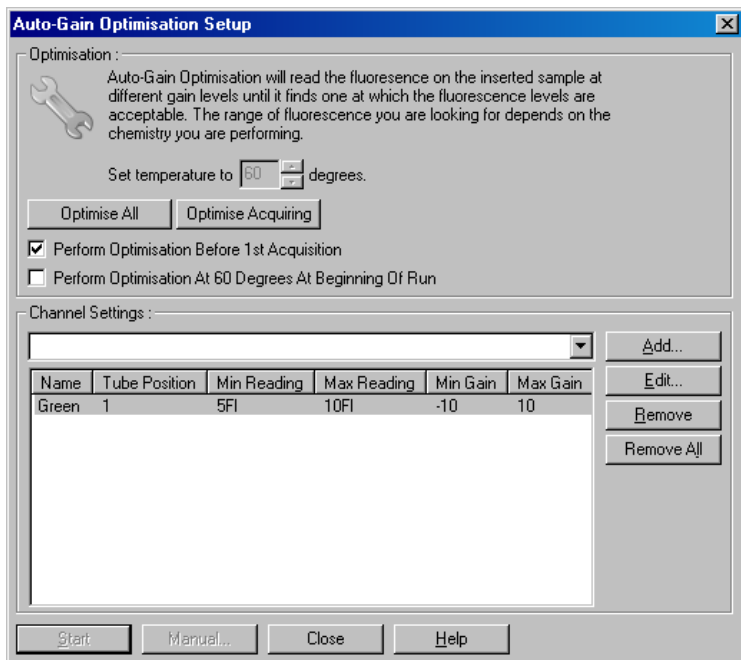
Rozsah zesílení pro každý kanál je -10 až 10 , kde -10 je nejnižší citlivost a 10 je nejvyšší citlivost.

Při provádění reakcí poprvé doporučujeme připravit testovací vzorek obsahující všechny reakční složky. Vložte testovací vzorek do přístroje Rotor-Gene Q MDx a pomocí funkce Gain Optimisation (Optimalizace zesílení) určete nastavení pro nejlepší zesílení. Pokud zesílení zvolené funkcí Gain Optimisation (Optimalizace zesílení) vede ke slabému signálu, je třeba zvýšit hodnotu **Target Sample Range** (Cílový rozsah vzorků). Pokud vede k signálu, který je saturovaný, je třeba hodnotu **Target Sample Range** (Cílový rozsah vzorků) snížit.

Chcete-li provést optimalizaci zesílení, klikněte na tlačítko **Gain Optimisation...** (Optimalizace zesílení...) v okně New Run Wizard (Průvodce novým zpracováním) 3 (viz část Okno New Run Wizard (Průvodce novým zpracováním) 3).



Objeví se okno **Auto-Gain Optimisation Setup** (Nastavení optimalizace automatického zesílení). Toto okno umožňuje optimalizaci automatickou úpravou nastavení zesílení, dokud hodnoty u všech vybraných kanálů nebudou na určité prahové hodnotě nebo pod ní.



Set temperature to
(Nastavit teplotu na):

Před odečtením hodnot se přístroj Rotor-Gene Q MDx zahřeje nebo ochladí, aby dosáhl specifikované teploty. Ve výchozím nastavení je nastavena jako teplota při akvizici.

Optimise All/Optimise Acquiring (Optimalizovat vše / Optimalizovat akviziční):

Funkce **Optimise All** (Optimalizovat vše) se pokusí optimalizovat všechny kanály, které software zná. Funkce **Optimise Acquiring** (Optimalizovat akviziční) bude optimalizovat pouze kanály používané v tepelném profilu definovaném ve zpracování (cyklování a táni).

Perform Optimisation Before First Acquisition (Provést optimalizaci před první akvizicí):

Zaškrtněte toto políčko, chcete-li provést optimalizaci zesílení v prvním cyklu, v němž dochází k pořizování dat. Doporučuje se to pro optimalizaci automatického zesílení.

Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run (Provést optimalizaci při [x] stupních na začátku zpracování):

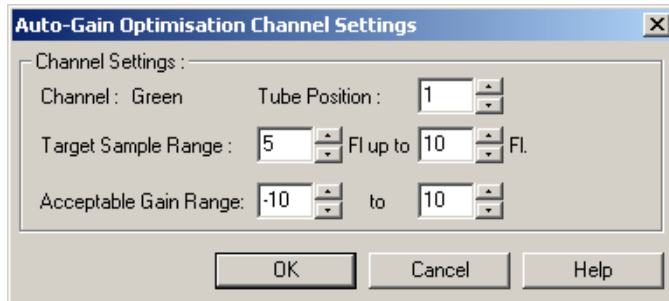
Zaškrtněte toto políčko, chcete-li provést optimalizaci zesílení těsně před spuštěním zpracování. Přístroj Rotor-Gene Q MDx se zahřeje na specifikovanou teplotu, provede se optimalizace zesílení a pak se v prvním kroku zahájí cyklování, obvykle v kroku denaturace. Tuto možnost lze zvolit, když by optimalizace zesílení během zpracování vedla k tomu, že první krok bude příliš dlouhý. Obvykle se preferuje možnost **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Provést optimalizaci před 1. akvizicí), protože optimalizace zesílení se provede v podmínkách co nejpodobnějších podmínkám zpracování.

Channel Settings
(Nastavení kanálů):

Tato rozevírací nabídka umožňuje přidání kanálů. Zvolte požadovaný kanál a klikněte na tlačítko **Add** (Přidat).

Edit (Upravit):

Otevře se okno, v němž lze nastavit **Target Sample Range** (Cílový rozsah vzorků). **Target Sample Range** (Cílový rozsah vzorků) je rozsah počáteční fluorescence, který je třeba nastavit pro vzorek ve specifikované zkumavce. Optimalizace automatického zesílení načte každý kanál používající nastavení zesílení v rozsahu zadaném v parametru **Acceptable Gain Range** (Přijatelný rozsah zesílení). Zvolí první nastavení zesílení, které vede k hodnotám fluorescence spadajícím do hodnot **Target Sample Range** (Cílový rozsah vzorků). V zobrazeném příkladu funkce Auto-Gain Optimisation (Optimalizace automatického zesílení) vyhledá nastavení zesílení od -10 do 10, které dává hodnotu od 5 do 10 FI ve zkumavce 1. Pro interkalační barviva jsou obecně vhodné hodnoty **Target Sample Range** (Cílový rozsah vzorků) 1–3 FI, kdežto rozsah 5–10 FI je vhodnější pro chemikálie sond.



Remove/Remove All (Odebrat / Odebrat vše): Funkce **Remove** (Odebrat) odebere zvýrazněný kanál. Funkce **Remove All** (Odebrat vše) odebere všechny kanály.

Start: Stisknutím tlačítka **Start** zahájíte optimalizaci zesílení. Zvolí se zesílení, které má za následek úroveň fluorescenčního signálu v zadaném rozsah. Bude-li fluorescence mimo zadaný rozsah, zesílení se nastaví tak, aby bylo co nejbližší zadanému rozsahu.

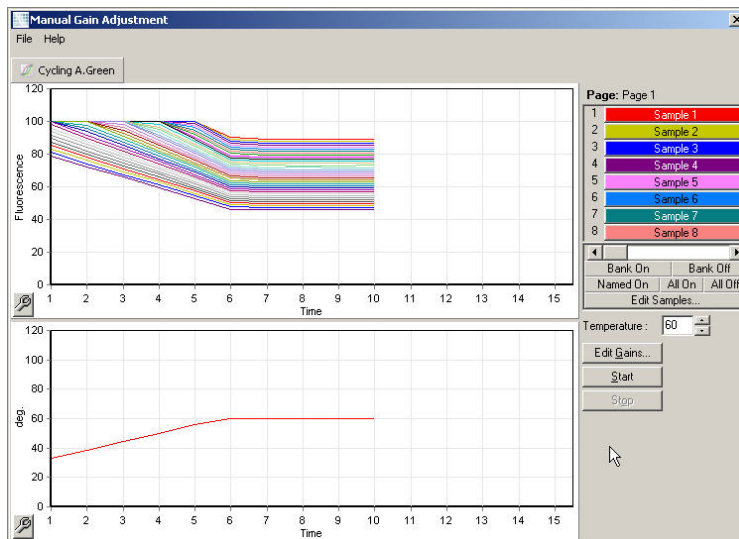
Manual (Manuální): Otevře se okno **Manual Gain Adjustment** (Manuální úprava zesílení).

Changing Gain During a Run (Změna zesílení během zpracování): Pokud bylo zesílení na začátku zpracování příliš vysoké nebo příliš nízké, během prvních deseti cyklů je lze změnit. V místě změny zesílení se objeví svislá čára. Cykly před touto změnou budou z analýzy vyloučeny.

Poznámka: Optimalizace zesílení může zvolit nastavení, které nebude spadat do zadaného rozsahu. Může to být způsobeno změnami fluorescence po prvním kroku výdrže. Výsledek optimalizace zesílení však poskytuje dobrou indikaci úrovně fluorescence, na které bude zahájeno zpracování.

Manuální úprava zesílení

Chcete-li provést akci „Manual Gain Adjustment“ (Manuální úprava zesílení), klikněte na tlačítko **Manual...** (Manuální...) v okně **Auto-Gain Optimisation Setup** (Nastavení optimalizace automatického zesílení). Objeví se okno **Manual Gain Adjustment** (Manuální úprava zesílení). V tomto okně se zobrazují hodnoty fluorescence při kterékoli dané teplotě v reálném čase. Používá se, když je pozadí vzorku neznámé, a proto je nutné určit zesílení, aby bylo zajištěno, že signál vzorku bude dostatečný pro detekci.



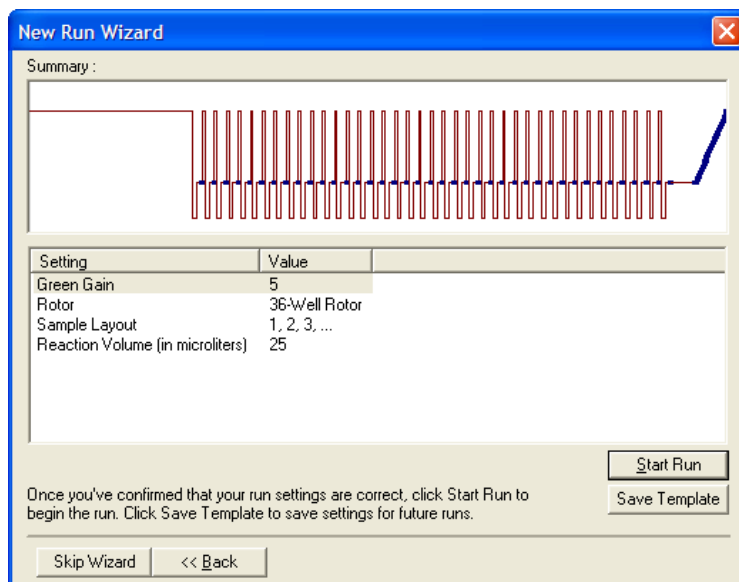
Na displeji se ve výchozím nastavení zobrazují všechny vzorky. Vzorky lze ze zobrazení odebrat nebo do něj přidat přepínačem vpravo. Přepínač obsahuje barevná políčka, z nichž každé odpovídá vzorku na displeji. Vzorky s jasně zbarvenými políčky jsou zobrazené, kdežto vzorky s tlumeně zbarvenými políčky nejsou zobrazené. Vzorky lze zapínat nebo vypínat kliknutím na políčko nebo přetažením několika políček ukazatelem myši najednou.

Doporučujeme provést manuální úpravu zesílení níže uvedeným postupem.

1. Upravte teplotu v okně **Manual Gain Adjustment** (Manuální úprava zesílení) na akviziční teplotu potřebnou pro zpracování.
Poznámka: Dokud bude přístroj Rotor-Gene Q MDx v chodu, teplota se neupraví. Chcete-li použít změny teploty, přístroj Rotor-Gene Q MDx znovu spustíte.
2. Klikněte na tlačítko **Start**. Zahájí se zpracování. Teplota v přístroji Rotor-Gene Q MDx se upraví na teplotu uvedenou v okně. V grafech v okně se začnou zobrazovat data.
3. Počkejte, dokud se nestabilizuje teplota.
4. Poznamenejte si hodnotu konečné fluorescence (FI).
5. Pokud hodnota FI nebude na požadované úrovni, klikněte na tlačítko **Edit Gains...** (Upravit zesílení...) a proveďte potřebné úpravy. Tento proces se nemusí projevit okamžitě, protože přístroji Rotor-Gene Q MDx trvá akvizice každého bodu v každém kanálu přibližně 4 s a v této době je uživatelské rozhraní deaktivované.
6. Opakujte proces, dokud hodnota FI nebude na požadované úrovni.
7. Klikněte na tlačítko **Stop**. Pokud při stisknutí tlačítka **Stop** ještě dochází k akvizici dat pro zpracování, přístroj Rotor-Gene Q MDx nejdříve dokončí akvizici a pak se zastaví. Tento proces může trvat až 5 s pro každý akviziční kanál.

Okno 4 průvodce novým zpracováním

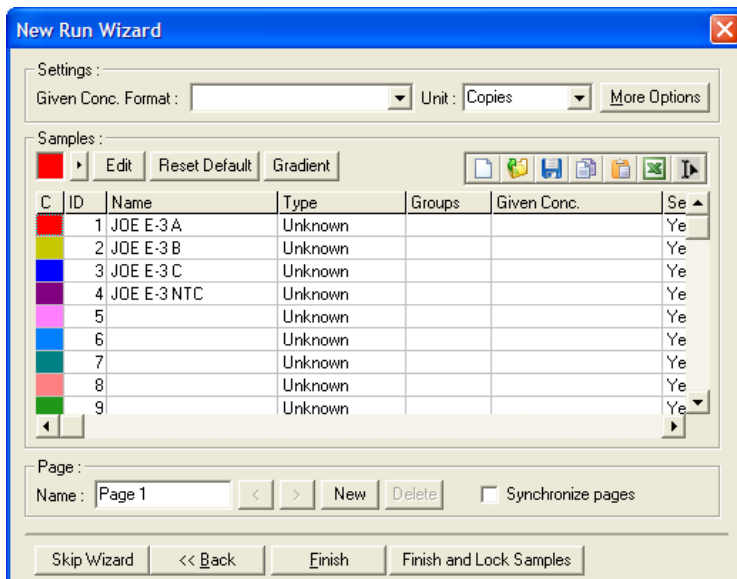
V tomto okně jsou souhrnné údaje o zpracování. Zkontrolujte parametry a jsou-li správné, klikněte na tlačítko **Start Run** (Spustit zpracování). Budete vyzváni, abyste zadali název souboru. Tlačítkem **Save Template** (Uložit šablonu) můžete také uložit nastavení zpracování jako šablonu pro budoucí zpracování.



Okno 5 průvodce novým zpracováním

V tomto okně se zadávají typy a popisy vzorků během zpracování. Funkčnost tohoto okna je stejná jako u okna **Edit Samples** (Upravit vzorky) (strana 127). Informace o vzorcích je též možné zadat po dokončení zpracování.

Tlačítkem **Finish and Lock Samples** (Dokončit a uzamknout vzorky) se zavře obrazovka a nebude možné změnit názvy vzorků. Další informace o této a dalších funkcích zabezpečení si přečtete v části „Ochrana přístupu k softwaru Rotor-Gene Q“ (strana 133).



5.2 Použití hardwaru přístroje Rotor-Gene Q MDx

5.2.1 Typy rotorů

Nejdříve vyberte, který typ zkumavek a rotor chcete použít. K dispozici jsou 4 rotory, do nichž lze vkládat různé typy zkumavek.

Poznámka: S přístrojem se dodává 36-Well Rotor a 72-Well Rotor. Rotory Rotor-Disc® jsou příslušenství.

Důležité: V rámci jednoho zpracování používejte stejné zkumavky. Nekombinujte různé typy zkumavek ani zkumavky od různých výrobců, protože to ovlivní jednotnost optických parametrů. Doporučujeme používat zkumavky značky QIAGEN, které jsou speciálně určeny pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx (viz část Informace pro objednání). Zkumavky od jiných výrobců mohou vykazovat autofluorescenci, což by ovlivnilo spolehlivost výsledků. Zkumavky od jiných výrobců mohou mít též různou délku a tloušťku, což vede k porušení souososti optické dráhy přístroje Rotor-Gene Q MDx a reakce ve zkumavce. Společnost QIAGEN si vyhrazuje právo odmítnout technickou podporu u problémů způsobených plastovými materiály neschválenými společností QIAGEN v přístroji Rotor-Gene Q MDx.

Důležité: Použití plastových materiálů neschválených společností QIAGEN v přístroji Rotor-Gene Q MDx může zneplatnit záruku na váš přístroj.

**UPOZOR-
NĚNÍ**



Poškození přístroje

Před každým zpracováním rotor vizuálně zkontrolujte a ujistěte se, že není poškozený nebo deformovaný.

36-Well Rotor

36-Well Rotor má červenou barvu. 36-Well Rotor a 36-Well Rotor Locking Ring umožňují použití zkumavek o objemu 0,2 ml. Zkumavky nemusí mít opticky čiré uzávěry, protože přístroj Rotor-Gene Q MDx odečítá fluorescenci ze dna zkumavky a nikoli z její horní části. Rovněž lze používat zkumavky s vypouklými uzávěry.



72-Well Rotor

72-Well Rotor má modrou barvu. 72-Well Rotor a 72-Well Rotor Locking Ring se používají s produkty Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, které lze používat pro objemy od 20 µl. Uzávěry zajišťují bezpečné a spolehlivé uzavření.



Rotor-Disc 72 Rotor

Rotor-Disc 72 Rotor má tmavě šedou barvu. Rotor-Disc 72 Rotor a Rotor-Disc 72 Locking Ring umožňují použití produktu Rotor-Disc 72. Rotor-Disc 72 je kotouč se 72 jamkami pro vysokokapacitní použití. Rotor-Disc 72 lze uzavřít přiložením fólie z čirého polymeru na horní povrch a zatavením. Použití fólie je rychlé a zabraňuje kontaminaci zajištěním pevného a trvanlivého utěsnění odolného proti nežádoucí manipulaci. Další informace o produktu Rotor-Disc 72 si přečtete v části 5.2.3.



Rotor-Disc 100 Rotor

Rotor-Disc 100 Rotor má zlatou barvu. Rotor-Disc 100 Rotor a Rotor-Disc 100 Locking Ring umožňují použití produktu Rotor-Disc 100. Rotor-Disc 100 je kotouč se 100 jamkami pro vysokokapacitní použití. Rotor-Disc 100 je rotační ekvivalent 96jamkové destičky s dalšími 4 referenčními jamkami. Umožňuje integraci přístroje Rotor-Gene Q MDx s laboratorními pracovními postupy pro 96 jamek. Přídavné jamky lze s výhodou použít pro další vzorky, reakce dalších kontrol nebo orientační reakce, aniž by bylo nutné zabrat některou z pozic 96 standardních jamek. Za účelem bezproblémové kompatibility s pracovním postupem pro 96 jamek se při označování jamek v produktu Rotor-Disc 100 používají konvence pro 96 jamek, tedy A1–A12 až H1–H12. Dodatečné 4 referenční jamky jsou označené R1–R4. Další informace o produktu Rotor-Disc 100 si přečtete v části 5.2.3.



Specifikace rotoru

Typ rotoru	Kapacita jamky (µl)	Č. vzorku	Typ zkumavky	Doporučený reakční objem (µl)
36-Well Rotor	200	36	PCR Tubes, 0.2 ml	20–50
72-Well Rotor	100	72	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml	20–50
Rotor-Disc 72 Rotor	100	72	Rotor-Disc, 72	20–25
Rotor-Disc 100 Rotor	30	100	Rotor Disc, 100	15–20

Poznámka: Produkty 36-Well Rotor a 72-Well Rotor pro přístroj Rotor-Gene Q MDx nejsou určeny pro použití v přístrojích Rotor-Gene 3000 z důvodu nekompatibilního optického vyrovnaní. S přístroji Rotor-Gene 3000 prosím dále používejte starší rotory se 36 a 72 pozicemi.

5.2.2 Příprava reakce

Důležité: Aby byly zajištěny spolehlivé výsledky, v každém zpracování je nutné použít vhodné kontroly.

Reakce lze připravit s využitím produktů Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes (pro PCR Tubes, 0.2 ml), Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (pro nastavení Strip Tubes and Caps, 0.1 ml s jednobokou pipetou), Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel (pro nastavení Strip Tubes and Caps, 0.1 ml s vícekanálovou pipetou), Rotor-Disc 72 Loading Block (pro Rotor-Disc 72) nebo Rotor-Disc 100 Loading Block (pro Rotor-Disc 100). Všechny bloky jsou vyrobeny z hliníku a lze je předem vychladit.

Do produktu Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (na obrázku) lze vložit 18 zkumavek Strip Tubes a také až osm zkumavek 0,5 ml, které lze použít pro přípravu master mixu, a až šestnáct zkumavek 0,2 ml, které lze použít pro přípravu standardních křivek. Níže uvedený postup popisuje přípravu reakce s využitím produktu 72-Well Rotor. Stejný postup je možné použít pro přípravu reakce s využitím produktu 36-Well Rotor a vhodného příslušenství.

1. Umístěte zkumavky Strip Tubes do bloku Loading Block a připravte alikvoty reakčních složek.

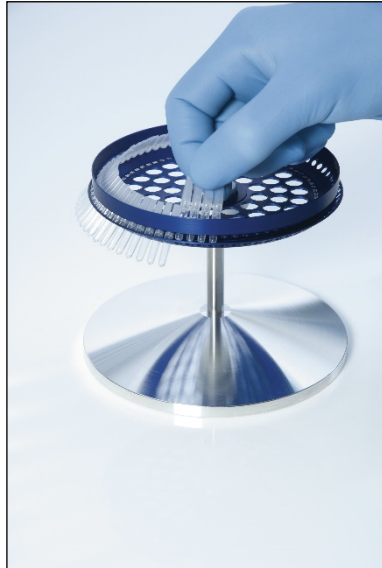


2. Umístěte uzávěry Caps bezpečně na zkumavky Strip Tubes a vizuálně zkontrolujte, že jsou pevně uzavřené.



3. Vložte zkumavky Strip Tubes do produktu 72-Well Rotor a ověřte, že každá zkumavka je na správném místě ve správné orientaci.

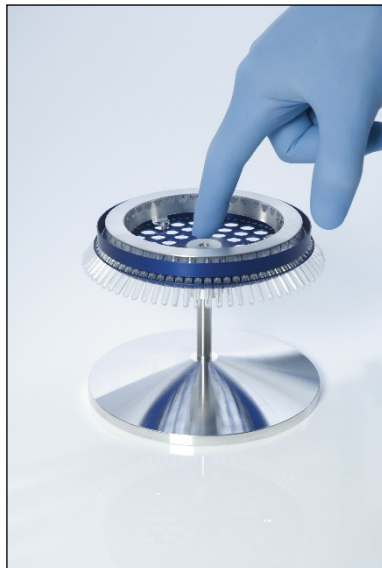
Pokud vzorky nejsou správně umístěné v rotoru, nevyrovnejí se optimálně nad systémem detekce. To může vést k zeslabení získaného fluorescenčního signálu a snížení citlivosti detekce. S přístrojem se dodává Rotor Holder, který umožňuje snadné vkládání zkumavek.



Důležité: Pro dosažení maximální rovnoměrnosti teploty musí každá pozice v rotoru obsahovat zkumavku. Zaplnění všech pozic v rotoru zaručuje rovnoměrné proudění vzduchu ke každé zkumavce. Mějte vždy k dispozici sadu prázdných zavíčkovaných zkumavek, abyste je mohli použít k zaplnění případně nepoužitých pozic.

4. Vložte 72-Well Rotor Locking Ring na 72-Well Rotor prostrčením 3 vodících kolíků vnějšími otvory v rotoru.

Locking Ring zajišťuje, že uzávěry zůstanou během zpracování na zkumavkách.



5. Vložte sestavu do komory v přístroji Rotor-Gene Q MDx tak, aby zacvakla na místo, pomocí vodícího kolíku na hlavě rotoru. Chcete-li ji vyjmout, jednoduše zatlačte hlavu rotoru dolů, aby se uvolnila, a vytáhněte ji.



6. Zavřete víko a nastavte profil zpracování v softwaru Rotor-Gene Q.

5.2.3 Příprava kotouče Rotor-Disc

Kotouče Rotor-Disc 72 nebo Rotor-Disc 100 obsahují 72 respektive 100 jamek v jednoduchém kotouči určeném pro vysoké kapacity. V kotoučích Rotor-Disc 72 a Rotor-Disc 100 se nepoužívají uzávěry. Místo toho se na horní povrch přiloží fólie Rotor-Disc Heat Sealing Film, který se zataví přístrojem Rotor-Disc Heat Sealer. Použití fólie zabraňuje kontaminaci zajištěním pevného a trvanlivého utěsnění odolného proti nežádoucí manipulaci. Zatavení kotouče Rotor-Disc se provádí níže uvedeným postupem.

Důležité: Před zahájením tohoto postupu si přečtěte informace o produktu dodané s přístrojem Rotor-Disc Heat Sealer.

1. Zapněte Rotor-Disc Heat Sealer vypínačem, který se nachází vzadu vlevo.
Rozsvítí se červená kontrolka „Power“ (Napájení). Rotor-Disc Heat Sealer se zahřívá na provozní teplotu přibližně 10 min, kdy se rozsvítí zelená kontrolka „Ready“ (Připraveno).
2. Zvolte trvalé nebo odstranitelné utěsnění.
Poznámka: Jakmile je přístroj Rotor-Disc Heat Sealer připravený, je bezpečné nechat ho v nepřetržitém provozu.
3. Vložte kotouč Rotor-Disc do bloku Rotor-Disc Loading Block pomocí výstupku pozice číslo jedna na kotouči Rotor-Disc a vodících otvorů pro zkumavky v bloku Rotor-Disc Loading Block.

4. Připravte reakce v kotouči Rotor-Disc ručním pipetováním nebo pomocí automatického systému pro manipulaci s kapalinami.



5. Sejměte středovou část z jednoho listu fólie Rotor-Disc Heat Sealing Film jejím přehnutím napůl, propíchnutím středového dílu a jeho opatrným odtrhnutím.
6. Položte fólii na Rotor-Disc ve správné orientaci, která je znázorněna na štítku s nápisem „SIDE UP“ (Horní strana). Ověřte, že je štítek s nápisem „SIDE UP“ (Horní strana) umístěn ve spodní části bloku Rotor-Disc Loading Block.

Středový otvor ve fólii by se měl snadno posouvat po válci bloku Rotor-Disc Loading Block na vrchní stranu kotouče Rotor-Disc.



7. Celou sestavu zasuňte do přístroje Rotor-Disc Heat Sealer pomocí vodicích lišt po straně bloku Rotor-Disc Loading Block. Ověřte, že je Rotor-Disc Loading Block zcela zatlačený dovnitř.



8. Chcete-li aktivovat zatavovací mechanismus, nejdříve stlačte dolů modrou eloxovanou lištu v horní části přístroje Heat Sealer, pak zajistěte černou západku.



9. Když zatavovací mechanismus sjede dolů, rozsvítí se oranžová kontrolka „Sealing“ (Probíhá zatavování). Pokud blok Rotor-Disc Loading Block není ve správné poloze, ozve se varovné pípání.
10. Když je zatavení dokončeno, ozve se nepřetržité pípání a oranžová kontrolka „Sealing“ (Probíhá zatavování) začne blikat. Stlačením modré eloxované lišty zvedněte a uvolněte zatavovací mechanismus do původní polohy

Důležité: Jakmile se ozve pípání, již nezatavujte, protože by se kotouč Rotor-Disc mohl zdeformovat.

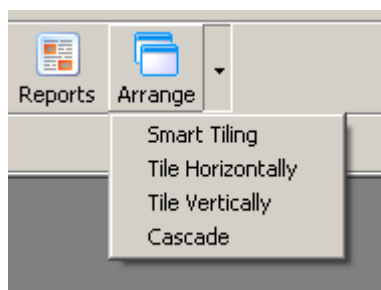
Poznámka: Pokud omylem neuvolníte zajišťovací mechanismus, upozorní vás na to oranžová kontrolka „Sealing“ (Probíhá zatavování), která místo blikání začne trvale svítit a nepřerušované pípání se změní na přerušované.

11. Vysuňte blok Rotor-Disc Loading Block z přístroje Rotor-Disc Heat Sealer. Nechejte fólii chladnout cca 10 s. Zatažením dolů odstraňte přebytečnou těsnicí fólii. Za přebytečnou fólii netahejte směrem nahoru.
12. Vyjměte kotouč Rotor-Disc z bloku Rotor-Disc Loading Block.
13. Vložte kotouč Rotor-Disc do rotoru pomocí výstupku pozice číslo jedna, který je vodítkem pro správnou orientaci.

6 Uživatelské rozhraní pro provádění analýz

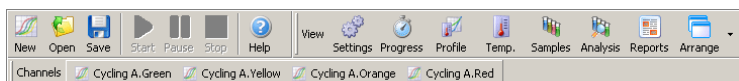
6.1 Pracovní prostor

Pracovní prostor tvoří pozadí hlavního okna. Na této ploše je možné otevřít grafy nezpracovaných dat a výsledky analýz. Je-li otevřeno několik oken najednou, můžete je uspořádat kliknutím na tlačítko **Arrange** (Uspořádat) na panelu nástrojů. K dispozici je několik možností uspořádání oken, které lze vybrat kliknutím na šipku dolů vedle tlačítka **Arrange** (Uspořádat).



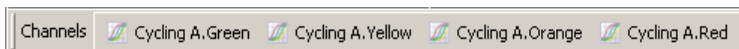
6.2 Panel nástrojů

Tato tlačítka jsou zkratky k často používaným operacím. K těmto operacím máte také přístup v rozevíracích nabídkách.



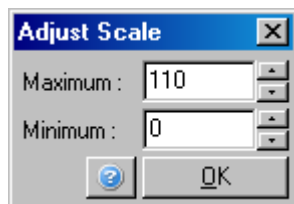
6.3 Zobrazení kanálů pro nezpracovaná data

Kliknutím na tato tlačítka se zobrazí nezpracovaná (neanalyzovaná) data z určitých kanálů v daném zpracování.



Při prohlížení těchto dat je k dispozici řada možností jejich zázornění. Nezpracovaná data je také možné transformovat pro usnadnění různých druhů analýz.

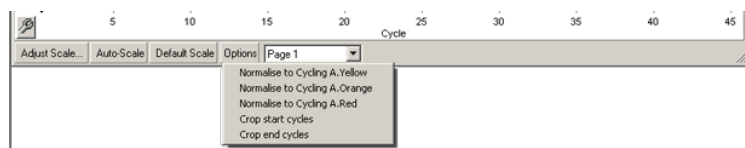
Adjust Scale (Upravit stupnici): Chcete-li vybrat možnost **Adjust Scale** (Upravit stupnici), klikněte pravým tlačítkem myši na příslušné okno. Stisknutím tlačítka **Adjust Scale** (Upravit stupnici) se otevře okno, v němž lze zadat stupnici.



Autoscale (Automatická stupnice): Tlačítko **Autoscale** (Automatická stupnice) se pokusí přizpůsobit stupnici podle maximální a minimální naměřené hodnoty.

Default Scale (Výchozí stupnice): **Default Scale** (Výchozí stupnice) nastaví stupnici zobrazení zpět od 0 do 100 jednotek fluorescence.

Ikona s montážním klíčem: Další informace naleznete v části 7.5.



Options (Možnosti): Zobrazí se rozevírací nabídka uvedená na obrázku nahoře, která obsahuje možnosti transformace nezpracovaných dat.

Normalise to... (Normalizovat na...): Tato funkce umožňuje normalizaci amplifikačních dat na data z pasivního referenčního barviva, například ROX, získaná v jiném kanále.

Crop start cycles (Smazat počáteční cykly): Vytvoří se nový soubor dat z kanálu, ve kterém byly odebrány některé počáteční cykly. To je užitečné, když jsou v počátečních cyklech pozorovány velké skoky, k nimž může docházet při použití určitých chemikálií.

Crop end cycles (Smazat koncové cykly): Vytvoří se nový soubor dat z kanálu, ve kterém byly odebrány některé koncové cykly.

Page 1 (Strana 1): Udává stranu, která je aktuálně zvolena pro zobrazení grafů nezpracovaných dat. Okno **Edit Sample** (Upravit vzorek) umožňuje vytvoření několika definic vzorků. Data lze zobrazit například s různými tloušťkami čar, definicemi vzorků a dalšími možnostmi zobrazení. To je zvláště užitečné, když se provádí relativní kvantifikace v jednom kanálu, protože uživatel může snadno přepínat zobrazení mezi zkoumaným genem a referenčními vzorky definovanými 2 stran se vzorky.

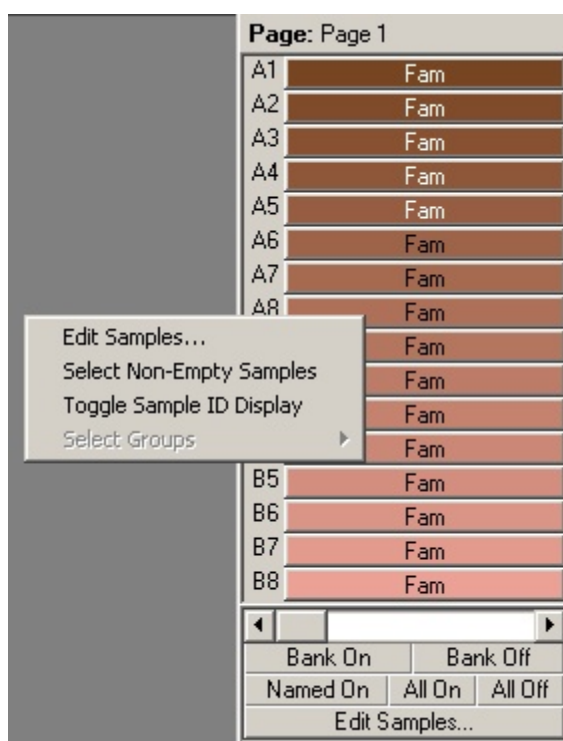
6.4 Přepínání mezi vzorky

Na pravé straně hlavního okna je přepínač s legendou ke vzorkům. Obsahuje barevná políčka, z nichž každé odpovídá vzorku na displeji. Přepínač slouží k řízení toho, které vzorky se na displeji zobrazí. Vzorky s jasně zbarvenými políčky jsou zobrazené, kdežto vzorky s tlumeně zbarvenými políčky nejsou zobrazené. Vzorky lze zapínat nebo vypínat kliknutím na políčko nebo přetažením několika políček ukazatelem myši najednou. Pomocí tlačítek **Bank On** (Zobrazit skupinu) a **Bank Off** (Skrýt skupinu) lze skrýt, respektive zobrazit, všechny vzorky aktuálně viditelné v seznamu. Další skupiny vzorků lze zobrazit pomocí posuvníku.

Poznámka: Počet zobrazených vzorků je dynamický a závisí na tom, kolik je v okně volného místa.

Kliknutím na tlačítko **Named On** (Zobrazit pojmenované) se zobrazí pouze vzorky, které dostaly název. Takto rychle zobrazíte pouze relevantní vzorky. Kliknutím na tlačítko **All On** (Zobrazit vše) nebo **All Off** (Skrýt vše) se zobrazí všechny, respektive žádné vzorky v rotoru. Stisknutím tlačítka **Edit Samples...** (Upravit vzorky...) se otevře okno **Edit Samples** (Upravit vzorky), v němž lze upravit názvy vzorků, jejich typy a standardní koncentrace (viz část 6.8.4).

Přepínač je na obrázku dole. Po kliknutí pravým tlačítkem myši na přepínač se zobrazí další možnosti.



Page (Strana):

Toto označení v horní části přepínače udává stranu se vzorky, která je zobrazena. Použití stránek umožňuje zobrazení různých nezávislých analýz sady dat z jednoho kanálu. Můžete například vytvořit dvě standardní křivky v zeleném kanálu a vygenerovat nezávislé protokoly. Další informace o nastavení stran se vzorky najdete v části 6.8.4.

Toggle Sample ID Display
(Přepnout zobrazení ID vzorku):

Při použití produktu 72-Well Rotor se vzorky zobrazí ve formátu A1 až A8, B1 až B8 atd. Volba **Toggle Sample ID Display** (Přepnout zobrazení ID vzorku) uživateli umožňuje přepnout na číselné označení vzorků (1 až 72).

Select Non-Empty Samples
(Vybrat neprázdné vzorky):

Tato volba zruší výběr vzorků, které mají **Type** (Typ) specifikovaný jako **None** (Žádný) v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky). Zajišťuje se tak, že se zobrazí jen vzorky relevantní pro danou analýzu.

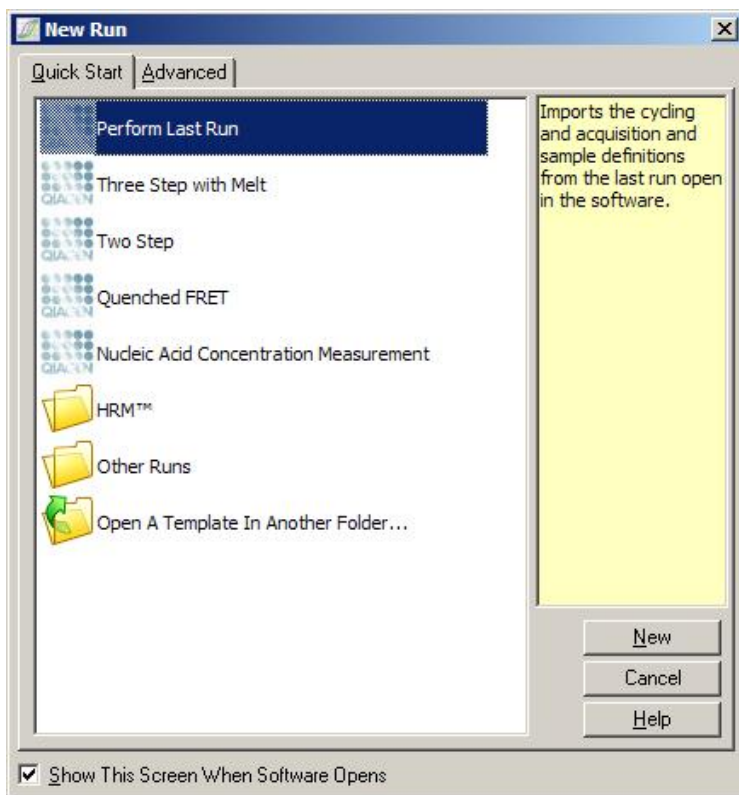
Select Groups (Vybrat skupiny):

Máte-li definované skupiny, touto funkcí můžete přepínat (vypnout/zapnout) zobrazení vzorků ve skupinách. Skupiny jsou volitelné sbírky vzorků, které umožňují rozšířené oznamování statistických výsledků. Například lze definovat skupiny vzorků od léčených a neléčených pacientů. Skupiny je možné nastavit v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky).

6.5 Nabídka Soubor

6.5.1 Nový

Po výběru nabídky **File** a poté možnosti **New** (Nový) se objeví okno **New Run** (Nové zpracování). Toto okno obsahuje běžně používané šablony uspořádané na kartě **Quick Start** (Rychlé spuštění) a **Advanced** (Rozšířené možnosti). Po výběru šablony vás průvodce provede přípravou zpracování a umožní úpravu nastavení a profilů.



Informace o poskytovaných šablonách naleznete v části 5.1.1 a části 5.1.2.

Nové zpracování

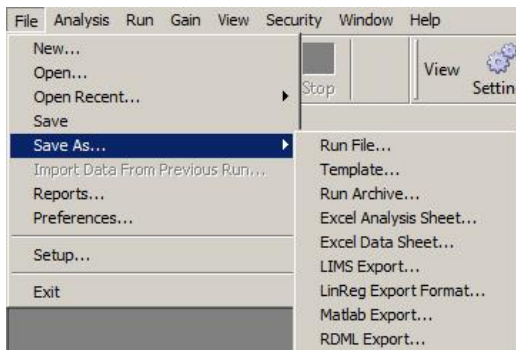
New (Nový):	Zahájí se příprava zpracování pomocí zvolené šablony.
Cancel (Zrušit):	Okno se zavře.
Help (Nápověda):	Otevře se online nápověda.
Show This Screen When Software Opens (Zobrazit tuto obrazovku po otevření softwaru):	Pokud se zaškrtně toto políčko, po spuštění softwaru se zobrazí okno New Run (Nové zpracování).

6.5.2 Otevřít a Uložit

Open... (Otevřít...): Otevře se dříve uložený soubor zpracování v softwaru Rotor-Gene Q (*.rex) nebo archiv zpracování v softwaru Rotor-Gene Q (*soubor .rea).

Open Recent... (Otevřít poslední...): Zobrazí se 4 soubory, které byly naposledy otevřené nebo uložené.

Save (Uložit): Uloží se případné změny provedené v souboru zpracování.



Save As... (Uložit jako...): Pomocí této funkce se uloží soubor zpracování nebo data v různých formátech. Níže je uveden seznam možností.

Run File... (Soubor zpracování...): Uloží se kopie souboru. Uživatel může změnit název a uložit umístění. Jedná se o výchozí formát.

Template... (Šablona...): Uloží se nastavení profilu a související nastavení, ale nikoli data zpracování. Šablonu je možné použít k zahájení budoucích zpracování.

Run Archive...
(Archiv zpracování...): Provede uložení v kompaktnějším formátu souboru. Soubory uložte v tomto formátu před jejich odesláním e-mailem. Zkrátí se čas nutný k odeslání souboru a zajistí se, že soubory nebudou e-mailovými klienty poškozeny.

LIMS Export (Export do LIMS): Analýza se uloží ve formátech kompatibilních se systémem LIMS podle požadavků uživatele. Více informací vám poskytnou technické služby QIAGEN.

Excel Data Sheet...
(Datový list v aplikaci Excel...): Provede se export všech kanálů pro nezpracovaná data do listu v aplikaci Excel®. Exportovány budou pouze vybrané vzorky.

Excel Analysis Sheet...
(List analýz v aplikaci Excel): Provede se export všech analýz v aktuálním zpracování do jednoho listu v aplikaci Excel.

LinReg Export Format...
(Exportovat do formátu pro LinReg...): Provede se export všech nezpracovaných dat z kanálu do formátu čitelného pro LinReg (nástroj pro analýzu účinnosti). Další podrobnosti naleznete dále v části „Export do nástroje LinReg“.

Matlab Export...
(Export do formátu pro Matlab...): Provede se export dat do formátu čitelného pro vědecký balíček Matlab (nebo jeho opensourcový ekvivalent Octave). Může to být užitečné pro výzkum metod.

RDML Export (Export do RDML): Provede export do souboru vyhovujícího softwaru RDML v1.1. Vytvořený soubor exportu do RDML je zkomprimovaný soubor ZIP ve formátu XML s příponou *.rdml a vyhovuje dokumentu se schématem RDML (https://rdml.org/rdml_v_1_1.html) na webu: https://rdml.org/rdml_v_1_1.html.

Export do nástroje LinReg

LinReg je nástroj vyvinutý C. Ramakersem a jeho kolegy.* Nástroj LinReg je k dispozici na: <https://medischebiologie.nl/files/>.

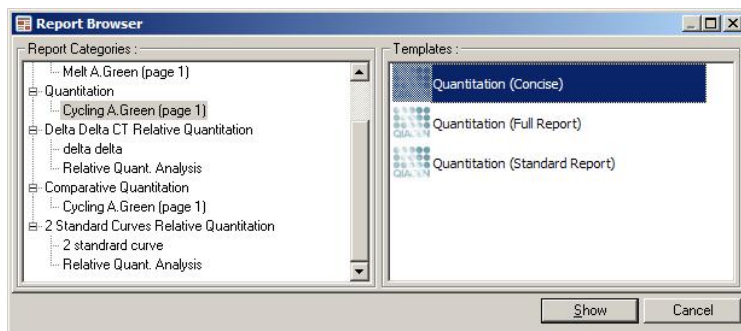
Software Rotor-Gene Q uživateli umožňuje exportovat nezpracovaná data ve formátu, který pak může nástroj LinReg importovat pro analýzu.

1. Otevřete soubor zpracování Rotor-Gene Q s nezpracovanými daty.
2. Exportujte data do formátu pro export do nástroje LinReg výběrem možnosti **Save As...** (Uložit jako...) a pak **LinReg Export Format...** (Exportovat do formátu pro LinReg...).
3. Microsoft Excel automaticky zobrazí exportovaná nezpracovaná data.
4. Spusťte nástroj LinReg.

Nástroj vás požádá o výběr rozsahu buněk, v nichž se nacházejí nezpracované údaje. Nástroj dokáže analyzovat vždy pouze jeden kanál pro nezpracovaná data, takže je nutné vybrat vhodnou oblast listu Excel.

6.5.3 Protokoly

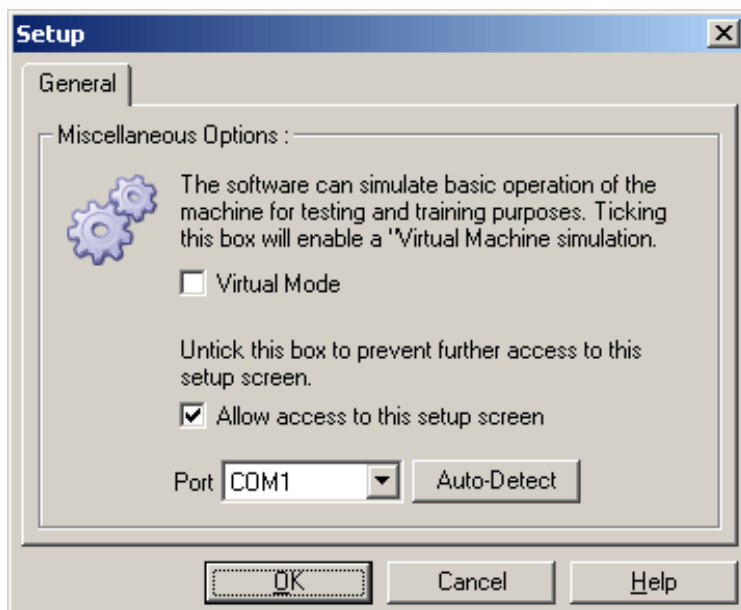
Po výběru možnosti **Reports** (Protokoly) se zobrazí okno **Report Browser** (Prohlížeč protokolů). Pokud byla data již analyzována, protokol o dané analýze lze zobrazit v okně **Report Browser** (Prohlížeč protokolů). V nabídce je několik typů protokolů s různou úrovní podrobnosti.



* Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**, e45.

6.5.4 Nastavení

Počáteční nastavení přístroje Rotor-Gene Q MDx je nutné provést během instalace. Tato volba však dává možnost změnit nastavení připojení přístroje Rotor-Gene Q MDx, budete-li si to po instalaci přát.

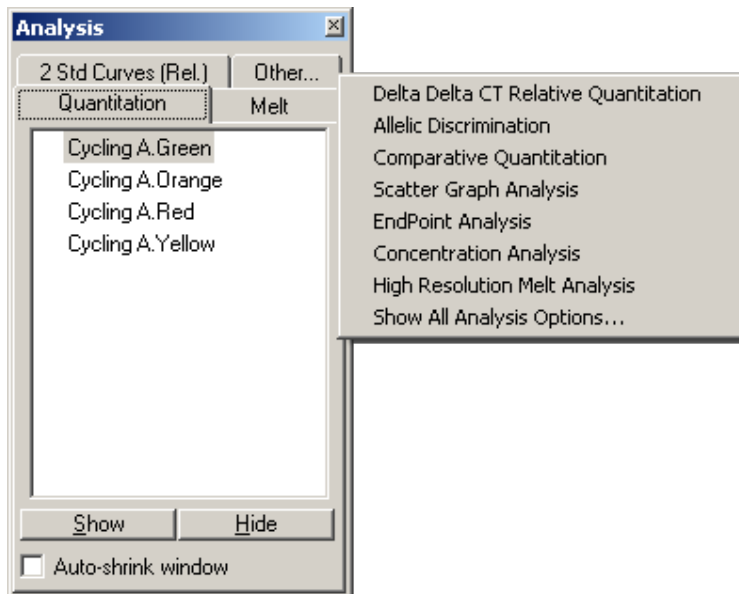


- Virtual Mode** (Virtuální režim): Zaškrtněte tuto možnost, pokud se software bude používat bez připojeného přístroje Rotor-Gene Q MDx. Software si zachová všechny funkce. Tento režim je užitečný pro demonstrační účely, analýzu dat a nastavení šablon.
- Allow access to this setup screen** (Umožnit přístup k této obrazovce nastavení): Nebude-li tato možnost během instalace zaškrtnuta, k tomuto oknu již nebude přístup. Toto bezpečnostní opatření zamezuje uživateli změnit nastavení. Chcete-li přístup znovu umožnit, kontaktujte distributora.
- Port:** Vyberte správný komunikační port pro umožnění komunikace mezi počítačem a přístrojem Rotor-Gene Q MDx.
- Auto-Detect** (Detekovat automaticky): Nejste-li si jisti, který port vybrat, kliknutím na tlačítko **Auto-Detect** (Detekovat automaticky) vyhledejte všechny dostupné porty.

6.6 Nabídka Analýza

6.6.1 Analýza

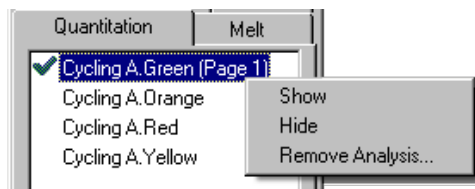
Po kliknutí na nabídku **Analysis** (Analýza) se zobrazí okno **Analysis** (Analýza). Toto okno umožňuje vytvoření nových analýz a zobrazení stávajících analýz. Metoda analýzy se vybírá pomocí karet. Zobrazí se seznam kanálů, které lze zvolenou metodou analyzovat. Je možné nezávisle provést několik analýz prováděných ve stejném kanálu za předpokladu, že byly nastaveny jako samostatné stránky v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky). Vedle stránek, které už byly analyzovány, je zelený symbol zaškrtnutí. Znamená to, že pro tuto analýzu byla uložena nastavení prahu a normalizace. Chcete-li některý kanál zobrazit nebo analyzovat, dvakrát na něj klikněte. Objeví se okno konkrétní analýzy.



Auto-shrink window (Automaticky zmenšit okno): Zaškrtnutím položky **Auto-shrink window** (Automaticky zmenšit okno) se okno zmenší, když se nepoužívá. Když přes okno přejedete kurzorem, znovu se zvětší.

Uspořádání pracovního prostoru

Při každém spuštění nové analýzy se její okna uspořádají tak, aby se vešla k těm, která jsou již na obrazovce. Zobrazení příliš velkého počtu oken může být nepraktické. Zavřete okna, která nepotřebujete, pak klikněte na tlačítko **Arrange** (Uspořádat) na panelu nástrojů. Okna se automaticky uspořádají podle metody **Smart Tiling** (Chytré dlaždice). Nebo vyberte jinou metodu uspořádání kliknutím na šipku vedle tlačítka **Arrange** (Uspořádat). Další možnosti se také nabídnou, když kliknete tlačítkem pravé myši na název analýzy.



Show (Zobrazit): Zobrazí se vybraná analýza.

Hide (Skrýt): Skryje se vybraná analýza.

Remove Analysis... (Odebrat analýzu...): Zvolená analýza se zcela odebere. Znamená to, že budou ztracena nastavení normalizace nebo biny křivek tání nastavené v analýze.

6.6.2 Kvantifikace

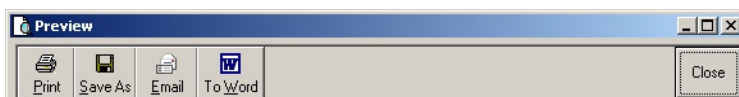
Vyberte kartu **Quantitation** (Kvantifikace) v okně **Analysis** (Analýza) a pak dvakrát klikněte na název kanálu nebo vyberte kanál a pak stisknutím tlačítka **Show** (Zobrazit) otevřete požadovaný kanál. Objeví se tři okna: hlavní obrazovka, standardní křivka a výsledky.

Protokoly

Reports (Protokoly):

Stisknutím tlačítka **Reports** (Protokoly) se otevře okno **Report Browser** (Prohlížeč protokolů), v němž lze vygenerovat protokol o aktuální analýze. Existují 3 možnosti: standardní protokol, kompletní protokol a stručný protokol. Dvojitým kliknutím na požadovanou možnost otevřete protokol v okně **Preview** (Náhled).

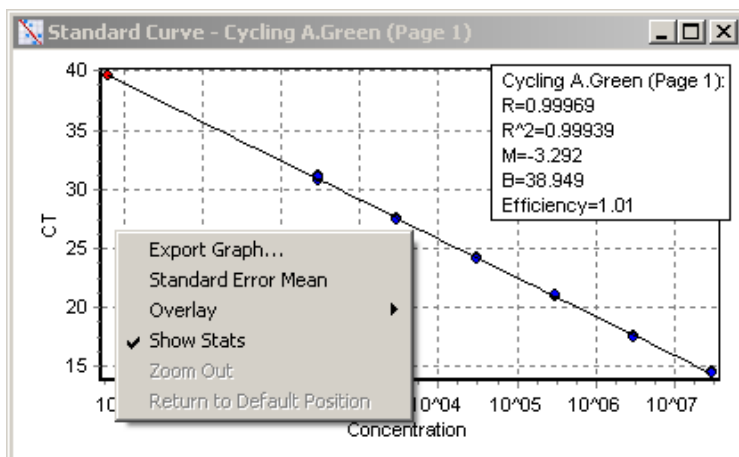
Po vygenerování protokolu je možné pomocí tlačítek v horní části okna **Preview** (Náhled) protokol vytisknout, uložit, odeslat e-mailem nebo exportovat do aplikace Word.



Standardní křivka

Std. Curve (Standardní křivka):

Tímto tlačítkem se otevře okno **Standard Curve** (Standardní křivka). Ve výchozím nastavení se toto okno otevře při otevření analýzy. Když okno zavřete, lze je znovu otevřít tímto příkazem.



Hodnoty na standardní křivce se dynamicky přepočítávají se změnou úrovně prahu kliknutím na čáru prahu a jejím přetažením v hlavním okně.

Modré tečky na křivce představují vzorky, které byly definovány jako standardy, a červené tečky představují neznámé datové body vzorku.

Poznámka: Pokud redefinujete standardy pro přepočítání standardní křivky, vypnutím viditelnosti standardního vzorku přepínačem na pravé straně obrazovky jej odeberete z výpočtu standardní křivky. Odebrání standardů z grafu ke zvýšení hodnoty R^2 není vědecky platné. Neplatný standard naznačuje, že vzorky jsou možná také neplatné, a takto by měly být zařazeny do výsledků.

Efficiency (Účinnost):

Jedná se o reakční účinnost zpracování. Tato hodnota je podrobněji popsána na straně 93.

R^2 value (correlation coefficient) (Hodnota R^2 (korelační koeficient)):

Hodnota R^2 neboli R^2 je procentuální poměr dat, která odpovídají hypotéze, že standardy tvoří standardní křivku. Je-li hodnota R^2 nízká, standardy budou v okolí přímky nejlepši shody příliš rozptýlené. To znamená, že výsledky (tj. vypočtené koncentrace) nemusí být spolehlivé. Dobrá hodnota R^2 je přibližně 0,999.

Poznámka: Je možné dosáhnout vysoké hodnoty R^2 se slabou standardní křivkou, pokud byl testován nedostatečný počet standardů. Hodnota R^2 se zlepšuje se snižujícím se počtem standardů. Spolehlivost výsledků přesněji indikují intervaly spolehlivosti na vypočtených koncentracích.

R value (square root of correlation coefficient)
(Hodnota R (odmocnina korelačního koeficientu)):

Hodnota R je odmocnina hodnoty R². Obecně je ke stanovení korelace užitečnější hodnota R².

M and B (M a B):

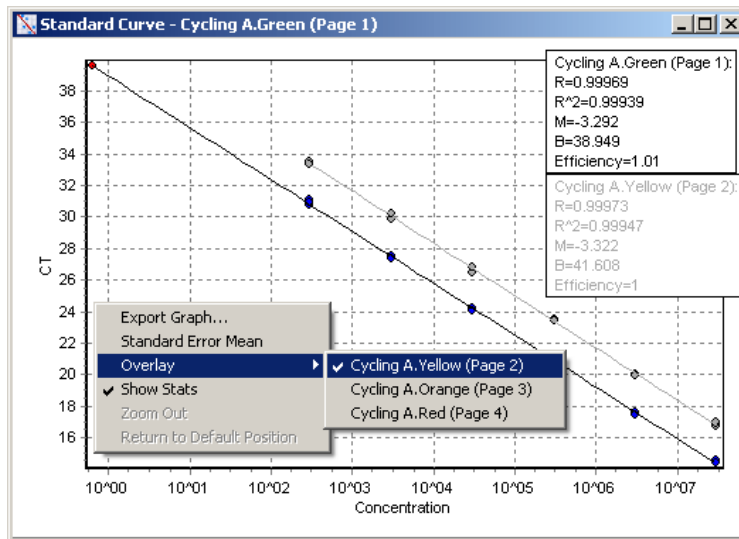
Směrnice (M) a úsek (B) standardní křivky se automaticky vypočítají ze vzorce $y = Mx + B$ a zobrazí se v okně Standard Curve (Standardní křivka).

Export Graph...
(Exportovat graf...):

Kliknutím pravým tlačítkem myši na standardní křivku se zobrazí možnost exportovat graf (viz část 7.4).

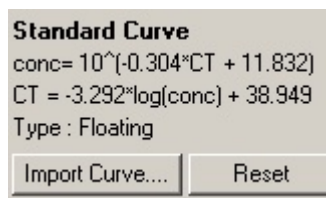
Overlay (Překryv):

Když bylo ve stejném zpracování provedeno několik kvantifikačních zpracování, je možné překrýt standardní křivky v témže okně. To je užitečné pro grafické zobrazení rozdílu mezi různými prahy. Tato funkce je znázorněna dále na snímku obrazovky.



Výpočet standardní křivky

„ $\text{konc} = \dots * \text{CT} + \dots$ “ a „ $\text{CT} = \dots$ “ jsou 2 verze rovnice používané ke vztažení hodnot CT a koncentrací. V publikacích se nejčastěji používá vzorec „ $\text{CT} = \dots$ “. Standardní křivka může být buďto „Floating“ (Plovoucí), nebo „Fixed“ (Pevná). Je-li „Floating“ (Plovoucí), optimální rovnice pro standardní křivku se vypočte při každém posunutí prahu v hlavním okně. Je-li „Fixed“ (Pevná), rovnice se nemění, protože byla importována z jiného zpracování.



Import křivky

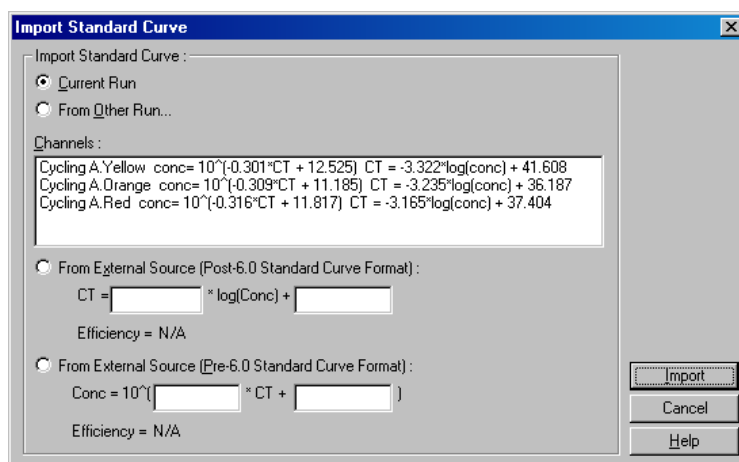
Importování standardní křivky umožňuje odhad koncentrací, když v určitém zpracování není standardní křivka k dispozici a účinnost reakce se mezi 2 zpracováními neliší. Křivky je možné importovat z jiného kanálu nebo z jiného zpracování kliknutím na tlačítko **Import Curve** (Importovat křivku).

Standardní křivku je možné v případě potřeby upravit. Úprava standardní křivky znamená, že do aktuálního zpracování bude importována pouze účinnost zdrojové standardní křivky. Zda má být standardní křivka upravena nebo ne, závisí na použitých chemikáliích.

Chcete-li standardní křivku upravit, použijte referenci v novém zpracování se známou koncentrací. Definujte referenci nastavením typu vzorku na „Standard“ (Standardní) a zadáním hodnoty koncentrace v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky). Ke zvýšení přesnosti je možné zadat několik kopií téže reference. Pověšimněte si, že není možné definovat více než jednu referenční koncentraci nebo standard. Například je možné mít ve stejném zpracování 3 reference replikátů 1 000 kopií, ale není možné mít jednu referenci 1 000 kopií a jinou se 100 kopiemi.

Po importování standardní křivky se její typ změní na „Fixed“ (Pevná). Kliknutím na tlačítko **Reset** (Obnovit) změníte typ standardní křivky zpět na „Floating“ (Plovoucí).

Níže je uveden snímek obrazovky s oknem **Import Standard Curve** (Importovat standardní křivku).



Pomocí tohoto okna lze importovat standardní křivku z jiného kanálu analyzovaného v aktuálním zpracování, nebo z jiného zpracování.

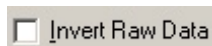
Current Run (Aktuální zpracování):	Když je zvolena tato možnost, kvantitativní analýzy v jiných kanálech z tohoto zpracování budou uvedeny s odpovídajícími standardními křivkami.
From Other Run... (Z jiného zpracování...):	Po zaškrtnutí této možnosti se otevře dialogové okno, ve kterém lze vybrat a otevřít soubor zpracování. Pokud byla pro dané zpracování provedena kvantitativní analýza, pro každý analyzovaný kanál budou uvedeny standardní křivky. Poznámka: V souboru zpracování musí být uloženo nastavení kvantitativní analýzy.
Channels (Kanály):	Zobrazí se seznam analyzovaných kanálů a vzorců jejich standardních křivek.
From External Source (Z externího zdroje):	V této oblasti je možné přímo zadat hodnoty M a B. To je užitečné v případech, kdy tyto hodnoty pocházejí z externího zdroje, například z tabulky aplikace Excel.

Výpočet hodnoty C_T

Invert Raw Data

(Převrátit nezpracovaná data):

Některé chemikálie produkují fluorescenční signál, který se exponenciálně snižuje, místo aby se zvyšoval. Tato data lze analyzovat metodou „Quantitation“ (Kvantifikace), ale je nutné zaškrtnout položku **Invert Raw Data** (Převrátit nezpracovaná data). U všech ostatních kvantitativních analýz by tato možnost měla zůstat nezaškrtnutá.



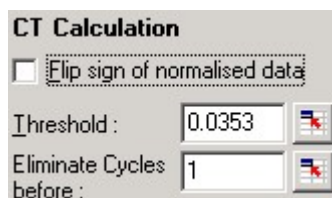
C_T Calculations

(Výpočty hodnoty C_T):

Hodnota C_T je počet cyklů v okamžiku, kdy amplifikační křivka protne práh detekce. Nastavením přímkou prahu a výpočtem průsečíku s každou z těchto křivek se určí hodnota C_T každého vzorku.

Threshold (Prahová hodnota):

Chcete-li nastavit prahovou hodnotu, klikněte na ikonu (mřížku s červenou šipkou), pak klikněte na graf a táhněte čáru na požadovanou úroveň. Nebo zadejte logaritmickou hodnotu. Také je možné práh určit automaticky pomocí funkce **Auto-Find Threshold** (Automaticky najít práh). Při ručním nastavení prahové hodnoty ji nastavte v exponenciální fázi zpracování, výrazně nad základní úroveň, aby nevznikl šum, a pod začátkem stabilní úrovně signálu v pozdějších cyklech.



Eliminate Cycles before

(Eliminovat cykly před):

Chcete-li je nastavit, klikněte na ikonu (mřížku s červenou šipkou), pak klikněte na graf a podržte jej a nakreslete čáru doprava. Eliminujete tak prahovou hodnotu pro nízké počty cyklů.

Poznámka: To je užitečné, když během počátečních cyklů vzniká šum například vlivem míchání vzorků.

Auto-Find Threshold

(Automaticky najít práh):

Tato funkce skenuje vybranou oblast grafu, aby bylo nalezeno nastavení prahové hodnoty, jehož výsledkem budou optimální odhady daných koncentrací. Vybranou oblast lze změnit zadáním nové horní a dolní hranice v zobrazených textových polích.

Výchozí horní a dolní hranice je vhodná pro většinu analýz. Naskenuje se rozsah prahových úrovní k získání nejlepší aproximace standardní křivky podle vzorků, které byly definovány jako standardy (tj. s hodnotou R nejbližší hodnotě 1,0)



Výsledky

Stisknutím tohoto tlačítka se otevře okno **Quantitation Results** (Výsledky kvantifikace). Ve výchozím nastavení se toto okno otevře při otevření analýzy. Když se zavře, lze je znovu otevřít tímto příkazem.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)														
Analysis	No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc	Calc. Conc [c]	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Std	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc	Rep. Calc. Conc (95%)
Cycling A.Green (Page 1)	1	10a8	Standard		3.73		1.00E+08	7.15E+07	28.1%	3.73	0.00	(3.73, 3.74)	7.17E+07	(1.17E+07, 4.39E+08)
Cycling A.Green (Page 1)	2	10a8	Standard		3.74		1.00E+08	7.17E+07	29.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	3	10a8	Standard		3.74		1.00E+08	7.16E+07	29.4%					
Cycling A.Green (Page 1)	4	10a7	Standard		6.11		1.00E+07	1.44E+07	44.0%	6.06	0.06	(5.91, 6.21)	1.49E+07	(3.29E+06, 6.73E+07)
Cycling A.Green (Page 1)	5	10a7	Standard		6.08		1.00E+07	1.47E+07	46.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	6	10a7	Standard		5.95		1.00E+07	1.56E+07	55.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	7	10a6	Standard		10.43		1.00E+06	7.72E+05	22.8%	10.38	0.09	(10.15, 10.60)	8.00E+05	(2.62E+05, 2.44E+06)
Cycling A.Green (Page 1)	8	10a6	Standard		10.27		1.00E+06	8.58E+05	14.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	9	10a6	Standard		10.43		1.00E+06	7.71E+05	22.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	10	10a5	Standard		13.49		1.00E+05	9.68E+04	9.2%	13.65	0.13	(13.31, 13.98)	8.74E+04	(2.96E+04, 2.59E+05)
Cycling A.Green (Page 1)	11	10a5	Standard		13.75		1.00E+05	8.13E+04	18.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	12	10a5	Standard		13.69		1.00E+05	8.48E+04	15.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	13	10a4	Standard		15.66		1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46	0.25	(14.84, 16.08)	2.56E+04	(7.62E+03, 8.39E+04)
Cycling A.Green (Page 1)	14	10a4	Standard		15.54		1.00E+04	2.42E+04	141.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	15	10a4	Standard		15.18		1.00E+04	3.09E+04	208.8%					
Cycling A.Green (Page 1)	16	10a3	Standard		21.36		1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24	(20.49, 21.69)	5.65E+02	(9.13E+01, 3.50E+03)
Cycling A.Green (Page 1)	17	10a3	Standard		20.89		1.00E+03	6.47E+02	25.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	18	10a3	Standard		21.02		1.00E+03	5.94E+02	40.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	19	10a2	Standard	NEG (Multi Ct)			1.00E+02							
Cycling A.Green (Page 1)	20	10a2	Standard		23.98		1.00E+02	7.99E+01	20.1%					
Cycling A.Green (Page 1)	21	10a2	Standard	NEG (Multi Ct)			1.00E+02							
Cycling A.Green (Page 1)	22	NTC	NTC	NEG (NTC)										
Cycling A.Green (Page 1)	23	NTC	NTC	NEG (NTC)										
Cycling A.Green (Page 1)	24	NTC	NTC	NEG (NTC)										

V okně **Quantitation Results** (Výsledky kvantifikace) jsou výsledky zpracování shrnuty v tabulce. Kliknutím pravým tlačítkem myši a výběrem položky **Export to Excel** (Exportovat do Excelu) se tabulka exportuje do aplikace Excel. Excel se otevře automaticky. Chcete-li zkopírovat data do stávající tabulky, místo toho vyberte možnost **Copy** (Kopírovat), otevřete tabulku a pak vyberte možnost **Paste** (Vložit).

Okno **Quantitation Results** (Výsledky kvantifikace) obsahuje následující sloupce.

Analysis (Analýza):	Aktuální datový soubor (akviziční kanál a strana se vzorky).
No. (Č.):	Číslo vzorku.
Color (Barva):	Definovaná barva grafu jednotlivého vzorku.
Type (Typ):	Definovaný typ vzorku.
C _T :	Stanovená hodnota C _T .
C _T Comment (Komentář k hodnotě C _T):	Automatická anotace ke stanovení hodnoty C _T , jsou-li hodnoty C _T vyloučeny. Mohou se objevit následující příznaky: NEG (Multi Ct): Práh protíná fluorescenční křivku alespoň dvakrát (dva průsečíky). Nelze určit jednoznačnou hodnotu C _T . NEG (NTC): Celkové zvýšení fluorescence nesplňuje podmínky definované ve funkci „NTC threshold“ (Práh NTC) v nabídce Outlier Removal (Odstranění odlehlých hodnot) (viz níže). Fluorescenční křivku například protíná daný práh, ale z menšího celkového zvětšení směrnice vyplývá kontrola mimo šablonu a není uvedena hodnota C _T . NEG (R.Eff): Celkové zvýšení fluorescence nesplňuje podmínky definované ve funkci „Reaction efficiency threshold“ (Práh účinnosti reakce) v nabídce Outlier Removal (Odstranění odlehlých hodnot) (viz níže). Vzorky, které nemají určitou účinnost reakce, jsou vyloučeny a hodnota C _T není uvedena. Tento příznak se zobrazí, jen když je aktivní odpovídající funkce.
%Var (%Odch.)	Procentuální odchylka mezi vypočtenou a známou koncentrací. $%Var = \text{Abs}(\text{Calculated}/\text{Given} - 1)$
Rep. Ct (Rep. Ct):	Průměrná hodnota C _T všech vzorků se stejným názvem jako u tohoto vzorku.
Rep. Ct Std. Dev. (Rep. Ct směr. odch.):	Směrodatná odchylka hodnoty C _T všech vzorků se stejným názvem jako u tohoto vzorku.
Rep. Ct. 95% C.I. (Rep. Ct 95% CI):	Rozsah hodnot C _T , který statisticky představuje 95 % variace hodnoty C _T . Jedná se o konzervativní statistickou hodnotu, kterou lze použít jako měřítko kvality. Tento rozsah lze zúžit testováním více replikátů nebo menší variací u replikátů.

Rep. Calc. Conc.
(Rep. vypočt. konc.):

Vypočtená koncentrace všech vzorků se stejným názvem.

Poznámka: Nejedná se o prostý průměr vypočtených koncentrací. Jde o geometrický průměr, který je matematicky vhodnější vzhledem k exponenciální povaze amplifikace v reálném čase.

Rep. Calc. Conc. 95% C.I.
(Rep. vypočt. konc. 95% CI):

Rozsah koncentrací, který představuje 95 % variace u jednotlivého vzorku i lineární regresní model, na němž je založen. Interpretace tohoto měrného údaje je, že se jedná o rozsah koncentrací, které lze očekávat v 95 % času, kdyby toto zpracování bylo prováděno opakovaně se stejnou mírou variace. Jedná se o konzervativní odhad a rozsah může být poměrně velký vlivem variace charakteristické pro každou analýzu v reálném čase. Tento rozsah může být velký, jsou-li testovány standardy s jinými koncentracemi než koncentrace neznámých vzorků, je-li použit malý počet replikátů nebo existuje-li významná variace.

Důležité: Variace hlášené tímto měrným údajem jsou charakteristické pro exponenciální proces amplifikace v reálném čase a nejsou způsobené přístrojem Rotor-Gene Q MDx. Podobné testy prováděné na cyklerech blokového typu by dávaly větší variaci vlivem nižší jednotnosti teplot v blokových systémech. Pro případné porovnání cyklierů doporučujeme porovnat směrodatnou odchylku hodnoty Ct.

Poznámka: Podrobnější informace o intervalech spolehlivosti jsou k dispozici v příloze B.

Poznámka: S výjimkou sloupců Color (Barva), Name (Název), Ct a Ct Comment (Komentář k hodnotě Ct) je možné každý sloupec zobrazit nebo skrýt kliknutím pravým tlačítkem myši na okno a poté výběrem či zrušením výběru názvu sloupce.

No.	C	Name	Ct	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc. Conc (Copie)	% Var
1		3x10 ⁸			300.000.000.	324.345.068.	8,1%
2		3x10 ⁸			300.000.000.	301.264.230.	0,4%
3		3x10 ⁸			300.000.000.	308.453.920.	2,8%
4		3x10 ⁸			300.000.000.	298.576.301.	0,5%
5		3x10 ⁷			30.000.000.	27.524.578.	8,3%
6		3x10 ⁷			30.000.000.	26.405.444.	12,0%
7		3x10 ⁷			30.000.000.	28.701.296.	4,3%
8		3x10 ⁷			30.000.000.	23.847.613.	20,5%
9		3x10 ⁶			3.000.000.	3.392.142.	13,1%
10		3x10 ⁶			3.000.000.	3.170.880.	5,7%
11		3x10 ⁶			3.000.000.	3.130.752.	4,4%
12		3x10 ⁶			3.000.000.	3.166.396.	5,5%
13		3x10 ⁵			300.000.	321.913.	7,3%
14		3x10 ⁵			300.000.	305.744.	1,9%
15		3x10 ⁵			300.000.	312.045.	4,0%
16		3x10 ⁵			300.000.	324.696.	8,2%
17		3x10 ⁴	19,47		30.000.	32.420.	8,1%
18		3x10 ⁴	19,59		30.000.	29.872.	0,4%
19		3x10 ⁴	19,53		30.000.	31.102.	3,7%
20		3x10 ⁴	19,52		30.000.	31.301.	4,3%
21		3x10 ³	22,93		3.000.	2.850.	5,0%
22		3x10 ³	22,96		3.000.	2.793.	6,9%
23		3x10 ³	22,94		3.000.	2.825.	5,8%
24		3x10 ³	22,91		3.000.	2.888.	3,7%
25		3x10 ²	26,03		300.	322.	7,5%
26		3x10 ²	26,11		300.	305.	1,6%
27		3x10 ²	26,26		300.	275.	8,5%
28		3x10 ²	26,18		300.	291.	3,1%

Funkce **AutoStat** pro usnadnění automaticky vypočítá průměr, směrodatnou odchylku a minimální a maximální hodnoty zkoumaných vzorků. Vyberte požadované výsledky jejich přetažením levým tlačítkem myši a hodnoty se zobrazí v tabulce na pravé straně obrazovky.

Na tomto snímku obrazovky jsou analyzovány koncentrace několika vzorků.

Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	f
14.42	30000000	28255064	5.8%	
14.59	30000000	25142920	16.2%	
14.40	30000000	28730050	4.2%	
17.44	30000000	3422624	14.1%	
17.58	30000000	3103391	3.4%	
17.42	30000000	3467111	15.6%	
20.99	3000000	285353	4.9%	
20.92	3000000	298898	0.4%	
21.04	3000000	275802	8.1%	
21.20	3000000	30286	1.0%	

Statistics	
Maximum :	28730050
Minimum :	25142920
Count :	3
Mean :	27328521
Std. Dev :	1.07537
(Orders of Mag.)	

Důležité: Funkce **AutoStat** závisí na kontextu. To znamená, že kde je to možné, generuje jen informace, které jsou užitečné.

Například:

- Není možné získat 95% interval spolehlivosti ze sady vybraných vypočtených koncentrací, protože je též nutné vzít v úvahu regresní model.
- Směrodatná odchylka „Orders of Magnitude“ (Řádová velikost) se uvádí u vypočtených koncentrací a nikoli u absolutní hodnoty. Jedná se o variaci v procentech. Například hodnota 1,07537 představuje 7,54% variaci $(278\ 974 - 322\ 611) = (300\ 000/1,07537 - 00\ 000 * 1,07537)$. Uvádění absolutní hodnoty nemá u standardní křivky smysl. Hodnota by mohla být uváděna při nejnižší koncentraci k vytvoření zdánlivé nízké chyby (± 3 kopie) nebo při vysoké koncentraci ($\pm 3\ 000\ 000$ kopií). Směrodatná odchylka „Orders of Magnitude“ (Řádová velikost) se uvádí z tohoto důvodu.
- U vypočtených koncentrací se místo aritmetického průměru používá geometrický průměr. Odráží exponenciální povahu real-time PCR. Například v případě dvojnásobných ředění s 1, 2, 8 a 16 kopiemi by průměr měly být 4 kopie, protože se jedná o střed řady ředění. Nicméně aritmetický průměr je 6,75. Geometrický průměr je $(1 * 2 * 8 * 16)^{(1/4)} = 4$ kopie.

Normalizace dynamické zkumavky

Možnost **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka) je ve výchozím nastavení zaškrtnutá a slouží ke stanovení průměrného pozadí každého vzorku těsně před začátkem amplifikace.

Standardní normalizace prostě trvá prvních 5 cyklů a používá je jako indikátoru úrovně pozadí jednotlivých vzorků. Normalizace dat se pak provede vydělením všech datových bodů vzorku touto hodnotou. Může to být nepřesné, protože u některých vzorků nemusí úroveň pozadí během prvních 5 vzorků svědčit o úroveň pozadí těsně před amplifikací. Naproti tomu normalizace

dynamické zkumavky využívá druhé derivace stopy jednotlivých vzorků ke stanovení jejich startovacího bodu. Úroveň pozadí je pak průměr z cyklu 1 až do počtu startovacích cyklů u každého vzorku. Výsledky kvantifikace jsou takto nejpřesnější.

Povšimněte si, že u některých datových souborů není fluorescence pozadí během cyklů před začátkem amplifikace konzistentní. V těchto případech může být nutné zrušit zaškrtnutí normalizace dynamické zkumavky kliknutím na položku **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka), protože by to mohlo vést k méně přesné kvantifikaci.

Korekce směrnice šumu

Fluorescence pozadí (FI) vzorku by měla ideálně zůstat před amplifikací konstantní. Parametr FI však někdy znázorňuje postupné zvyšování nebo snižování během několika cyklů vlivem použitých chemikálií. Výsledkem je šikmá hladina šumu. Korekce směrnice šumu ke stanovení úrovně šumu využívá namísto průměru čáru nejlepší aproximace a provádí normalizaci k této čáře. Výběrem této možnosti kliknutím na tlačítko **Slope Correct** (Korekce směrnice) lze zlepšit data z replikátů, pokud jsou základní linie vzorků výrazně zešikmené. Korekce směrnice šumu zlepšuje data, když pozadí nezpracovaných dat před bodem startu stoupá nebo klesá (C_T).

Jestliže sklon není rovnoměrný nebo počáteční cykly vykazují výrazné zvýšení nebo snížení signálu oproti zbývajícím částem křivky, korekce směrnice šumu může vést k některým nežádoucím jevům, například k protnutí prahu křivkami negativních kontrol vlivem aproximace základní linie jako čáry nejlepší aproximace a příslušné normalizaci nezpracovaných dat. Tato funkce v důsledku toho vždy nezlepšuje kvalitu dat a měla by se používat, jen když mají křivky nezpracovaných dat rovnoměrný sklon.

Úprava startovacího bodu

Algoritmus úpravy startovacího bodu lze použít k definování minimální délky základní linie použité pro normalizaci. Pro použití úpravy startovacího bodu je nutné definovat dva parametry. Pokud je startovací bod vypočítán podle parametru **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka), který je nižší než první parametr, jako startovací bod se použije druhý parametr. Úpravu startovacího bodu lze použít jen ve spojení s normalizací parametru **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka).

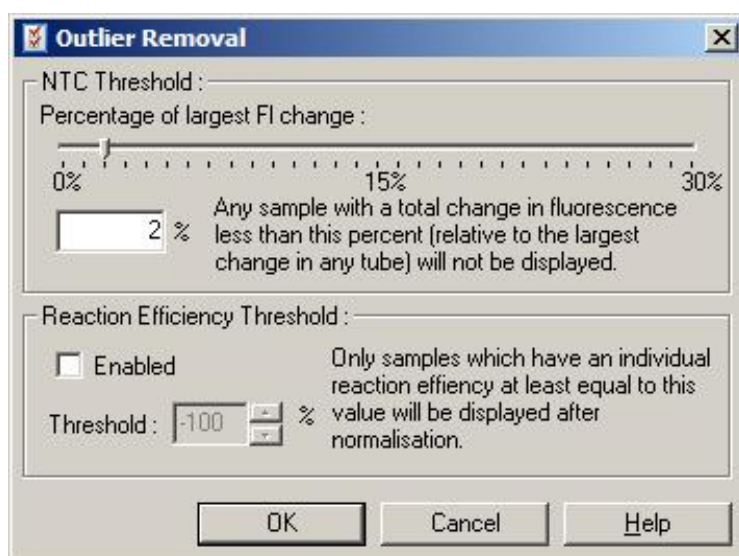
Ignorování prvních

Fluorescenční signál z prvních několika cyklů ve zpracování nemusí být pro zbývajících část běhu reprezentativní. Proto lze dosáhnout lepších výsledků, bude-li několik prvních cyklů ignorováno. Ignorovat je možné až 10 cyklů. Budou-li však první cykly vypadat podobně jako následující cykly,

lepších výsledků se dosáhne zrušením výběru funkce **Ignore First** (Ignorovat první), protože algoritmus normalizace bude moci pracovat s více daty.

Odstranění odlehlých hodnot

K rozlišení mezi menšími změnami fluorescence a pravými reakcemi v beztemplátových kontrolách (NTC) jsou k dispozici 2 parametry: **NTC Threshold** (Práh detekce NTC) a **Reaction Efficiency Threshold** (Práh účinnosti reakce). **NTC Threshold** (Práh detekce NTC) se doporučuje pro většinu použití. Použitý přístup je třeba validovat.



NTC Threshold
(Práh detekce NTC):

Umožňuje, aby byly z analýzy vyloučeny vzorky nebo NTC měly mírný sklon vzhůru. Nebudou uvedeny žádné vzorky se změnou nižší než „NTC Threshold“ (Práh detekce NTC) a ve sloupci „CT Comment“ (Komentář k hodnotě CT) se zobrazí příznak „NEG (NTC)“.

Procentuální hodnota je vztažena k největší maximální změně zjištěné v libovolné zkumavce. Pokud například jeden vzorek začal na pozadí 2 FI a zvýšil se na 47 FI, pak 45 FI představuje 100 %. „NTC Threshold“ (Práh detekce NTC) rovný 10 % by považoval každý vzorek menší než 4,5 FI za šum.

Reaction Efficiency Threshold
(Práh účinnosti reakce):

„Reaction Efficiency Threshold“ (Práh účinnosti reakce) je alternativní metoda vyloučení šumu z analýzy. Tento normalizační algoritmus využívá techniky odhadu účinnosti reakce používané v komparativní kvantifikaci (viz část 6.6.6). Všechny vzorky, které nemají účinnost reakce alespoň na této úrovni, budou vyloučeny a ve sloupci „CT Comment“ (Komentář k hodnotě CT) se zobrazí příznak „NEG (R.Eff)“.

Úroveň 0 % udává, že v exponenciální fázi nedošlo k žádné reakci. Hodnota 100 % udává, že v exponenciální fázi došlo ke kompletně účinné reakci. Záporné procentuální hodnoty znamenají, že se v exponenciální fázi zeslabil signál.

Ze současného výzkumu nevyplynou jednoznačné a přesné úrovně účinnosti nezbytné k rozlišení pravých reakcí od kontaminace a jiných vlivů. Proto doporučujeme tuto funkci používat konzervativně s předpokladem, že každý vzorek s pravou reakcí bude mít určitou viditelnou exponenciální fázi s určitým zvýšením fluorescence. Bude-li nastavena hodnota vyšší než 0 %, budou vyloučeny některé vzorky s neúčinným, avšak znatelným zvýšením fluorescence, kdežto po nastavení hodnoty nižší než 0 % se zobrazí vzorky, u nichž v exponenciální fázi došlo ke snížení fluorescence a které by měly být jednoznačně vyloučeny.

Poznámka: Bude-li některá hodnota vyloučena z důvodu aktivace některé z těchto technik, v okně **Quantitation Results** (Výsledky kvantifikace) se nezobrazí odpovídající hodnota Ct. Současně se ve sloupci „Ct Comment“ (Komentář k hodnotě Ct) zobrazí příznak označující toto vyloučení. Je proto důležité zajistit, aby sloupec „Ct Comment“ (Komentář k hodnotě Ct) byl stále zobrazený.

Na obrázku byly vyloučeny vzorky 7, 8 a 9 z důvodu „Reaction Efficiency Threshold“ (Práh účinnosti reakce).

No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/reaction)
7	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
8	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
9	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
10	10e5	Standard	15,04		1,00E+05
11	10e5	Standard	15,03		1,00E+05
12	10e5	Standard	15,05		1,00E+05

Směrnice, amplifikace, účinnost reakce

Směrnici (M) reakce (zobrazená v okně **Standard Curve** (Standardní křivka)) lze použít ke stanovení exponenciální amplifikace a účinnosti reakce pomocí těchto výpočtů:

$$\text{Exponenciální amplifikace} = 10^{(-1/M)}$$

$$\text{Účinnost reakce} = [10^{(-1/M)}] - 1$$

Optimální hodnoty M, exponenciální amplifikace a účinnost reakce jsou –3,322, 2 a 1 v uvedeném pořadí. Účinnost reakce se zobrazí ve zprávě (v úplné a standardním protokolu, viz strana 82) a v okně **Standard Curve** (Standardní křivka).

Směrnice se vypočte jako změna hodnoty Ct dělená změnou logaritmičeského vstupu (např. počtu kopií). 100% účinná amplifikace znamená zdvojnásobení produktu amplifikace v každém cyklu vedoucí k hodnotě M rovné –3,322, koeficientu amplifikace 2 a účinnosti reakce 1.

Za předpokladu, že hodnota M je rovna –3,322, budou výpočty následovné:

$$\text{Exponenciální amplifikace: } 10^{(-1/-3,322)} = 2$$

$$\text{Účinnost reakce: } [10^{(-1/-3,322)}] - 1 = 1$$

Alternativní příklad: hodnota M rovná 3,8 znamená, že reakce má exponenciální amplifikaci přibližně 1,83 a účinnost reakce 0,83 (nebo 83 %).

Posunutí

Ve vzorci popisujícím vztah mezi 2 proměnnými je posunutí vyjádřeno písmenem B ($y = Mx + B$). Posunutí se někdy označuje jako úsek. B představuje C_T pro danou koncentraci 1 jednotky. Substitucí 1 ve vzorci pro výpočet koncentrace získáme:

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

$$C_T = 0 * M + B$$

Výsledek je $C_T = B$

Úsek se může mezi jednotlivými zpracováními měnit a jedná se o méně stabilní veličinu než gradient. Gradient se proto analyzuje častěji než úsek.

Hlavní okno

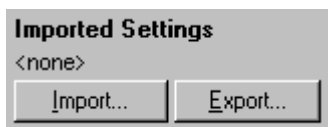
V hlavním okně jsou zobrazeny grafy amplifikace na logaritmické stupnici.

Kliknutím na možnost **Linear Scale** (Lineární stupnice) ve spodní části okna se stupnice změní z logaritmické na lineární a obráceně. Změnou těchto stupnic se změní pouze zobrazení grafů, nikoli výpočty. Lze to ověřit použitím nástroje lokalizátoru kliknutím pravým tlačítkem myši na graf a výběrem možnosti **Show pinpointer** (Zobrazit lokalizátor). Při použití logaritmické stupnice jsou v grafu lépe viditelné menší hodnoty, kdežto na lineární stupnici je lépe vidět celá reakce.

Poznámka: Amplifikační grafy se aktualizují v reálném čase s tím, jak přístroj Rotor-Gene Q MDx během zpracování aktivně pořizuje data. Toto monitorování dat v reálném čase uživateli umožňuje vidět výsledky, jakmile se na křivkách zobrazí exponenciální růst. Lze vyvodit předběžné závěry a rozhodnutí pro další zpracování.

Šablony kvantitativní analýzy

Šablony kvantitativní analýzy uživateli umožňují exportovat nastavení normalizace a prahové hodnoty do jednoho souboru ve formátu *.qut. Tento soubor je možné importovat a znovu použít v jiných experimentech. Další podrobnosti naleznete v části 7.1.



6.6.3 Dvě standardní křivky

Analýzu relativní genové exprese pomocí normalizačního genu lze provést metodou 2 standardních křivek.

Tato metoda vyžaduje standardní křivku pro každý gen. Koncentrace se pro každý gen kvantifikuje podle této standardní křivky. Expese zkoumaného genu se pak normalizuje pomocí normalizačního genu (často housekeeping genu).

Je důležité, aby standardy a replikáty vzorků byly během přípravy vzorků správně označeny (viz část „Nastavení vzorku“). Odpovídající vzorky musí mít hlavně stejný název v každé analýze. U multiplexní reakce, kde jsou pozice zkumavek se zkoumaným genem a normalizačním genem stejné, postačuje jedna sada definicí vzorku. Při provádění relativní analýzy s normalizačním genem pomocí jednoho kanálu (tj. reakce probíhají v samostatných zkumavkách s použitím téhož fluoroforu) je nutné vytvořit 2 strany se vzorky. Na první by měly být označeny pozice zkumavek s názvy vzorků zkoumaného genu a ostatní pozice by měly být bez názvu. Na druhé by měly být označeny pozice použité pro normalizační gen. Software pak přiřadí vzorky z těchto 2 analýz podle jejich názvů.

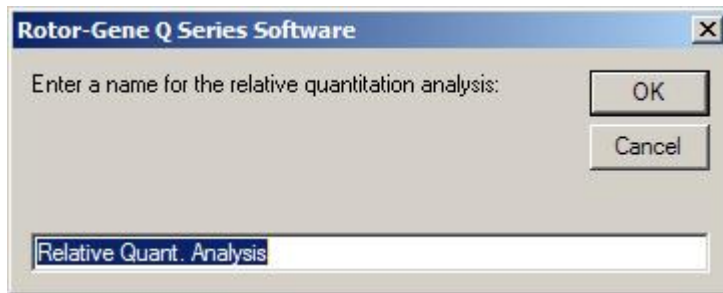
Analýza exprese metodou dvou standardních křivek

Data mohou být nejdříve analyzována pro každý gen pomocí kvantitativní analýzy. Jinak budou výsledky pro každý gen automaticky stanoveny pomocí nástroje **Autofind Threshold** (Automatické vyhledání prahu).

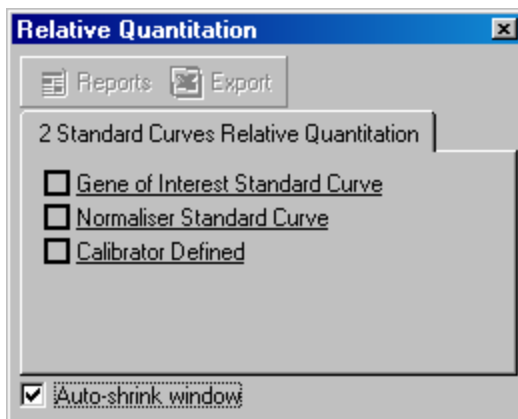
1. V okně **Analysis** (Analýza) vyberte kartu **2 Std Curve (Rel.)** (2 kalibr. křivky (rel.)). Klikněte na položku **New Analysis...** (Nová analýza...).

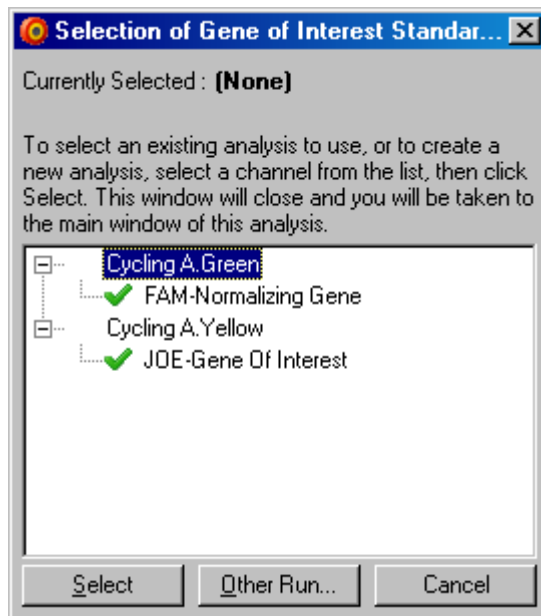


2. Zadejte název analýzy.

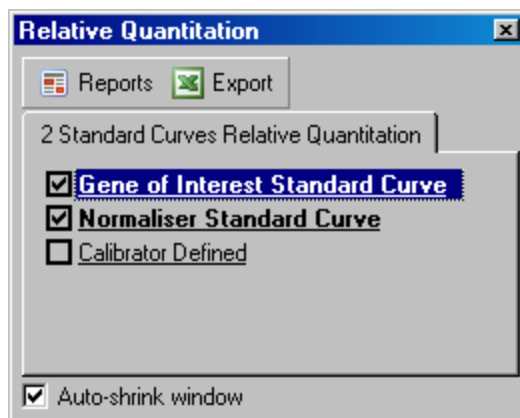


3. Označte strany použité pro analýzu normalizačního genu a analýzu zkoumaného genu. Například po kliknutí na položku **Gene of Interest Standard Curve** (Standardní křivka zkoumaného genu) se otevře okno **Selection of Gene of Interest Standard...** (Výběr standardu zkoumaného genu...). Vyberte stranu, na které byl zkoumaný gen kvantifikován. Postup zopakujte pro normalizační gen. Volitelně lze definovat kalibrátor. Bude-li tato možnost zaškrtnuta, kalibrátoru se přiřadí hodnota 1 a koncentrace všech ostatních vzorků se vypočítají ve vztahu k tomuto vzorku.

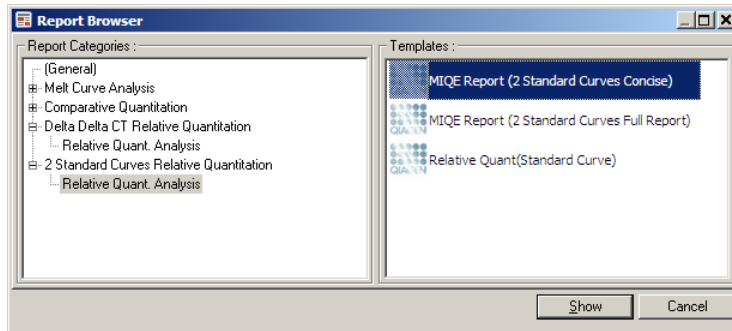




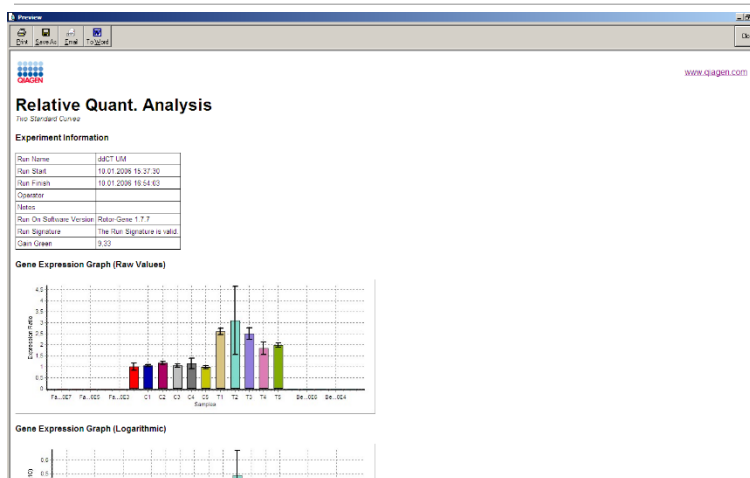
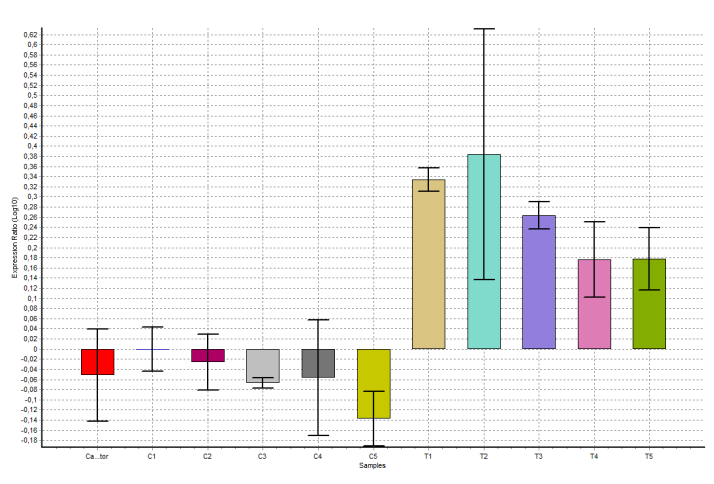
Po provedení výběru budou možnosti zaškrtnuté, jak je vidět na obrázku.



4. Kliknutím na tlačítko **Reports** (Protokoly) zobrazíte **Report Browser** (Prohlížeč protokolů). V seznamu vyberte analýzu se správným názvem. Kliknutím na tlačítko **Show** (Zobrazit) zobrazíte protokol o relativní kvantifikaci. Funkce **Export** (Exportovat) pak výsledky exportuje do nové tabulky v aplikaci Excel. Je-li zařazen kalibrátor, výsledky se vypočtou vzhledem ke vzorku kalibrátoru, který má přiřazenu hodnotu 1.



5. Zobrazí se koncentrace odečtené z standardních křivek zkoumaného genu (GOI Conc.) a normalizačního genu (Norm. Conc.) a dále relativní koncentrace (Relative Conc.). Výsledky se pak uloží do souboru ve formátu Word.



6. Hodnoty Rel Min a Rel Max se vygenerují výpočtem směrodatné odchylky kvocientu ze směrodatných odchylek zkoumaného genu (GOI) a normalizačního genu z tohoto vzorce:

$$CV_{relconc} = \sqrt{CV_{GOI}^2 + CV_{Norm}^2}$$

kde:

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} = \frac{stddev}{meanvalue}$$

6.6.4 Relativní kvantifikace delta delta C_T

Metoda delta delta CT umožňuje analýzu relativní genové exprese. Popisují ji autoři Livak a Schmittgen (2001).*

Tato metoda nevyžaduje zařazení standardních křivek do každého zpracování. Každý vzorek je nejdříve normalizován na množství templátu přidaného porovnáním s normalizačním genem. Tyto normalizované hodnoty jsou dále normalizovány vzhledem ke zpracování kalibrátoru. Kalibrátor může být například divokého typu, neošetřená kontrola nebo vzorky z času nula.

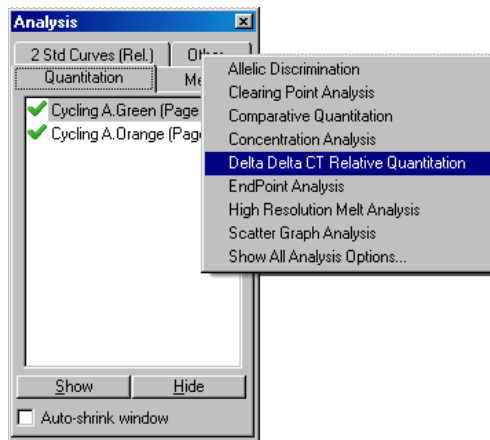
Je důležité, aby účinnosti amplifikace zkoumaného genu a normalizačního genu byly totožné a aby to bylo validováno podle pokynů autorů Livak a Schmittgen.

Je důležité, aby názvy vzorků byly v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky) správně definovány a stejné vzorky byly totožně označeny v každé kombinované kvantitativní analýze.

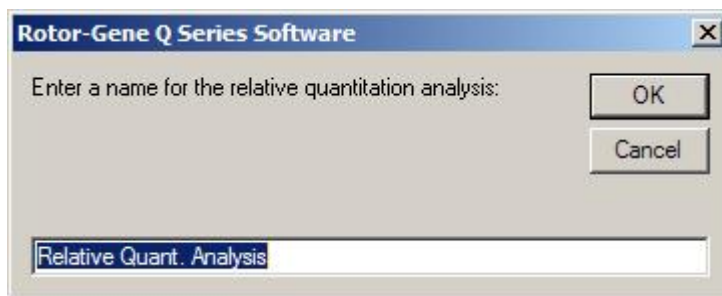
1. Analyzujte data pomocí funkce „Quantitation“ (Kvantifikace). Po provedení validace již není nutné vytvořit standardní křivku.

Na kartě **Other** (Jiné) v okně **Analysis** (Analýza) vyberte možnost **Delta Delta CT Relative Quantitation** (Relativní kvantifikace delta delta CT). Vyberte možnost **New Analysis** (Nová analýza).

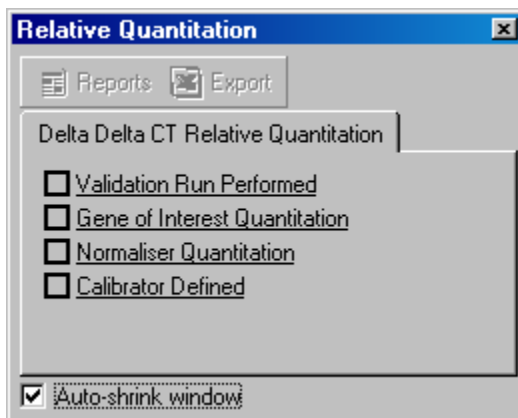
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* **25**, 402.

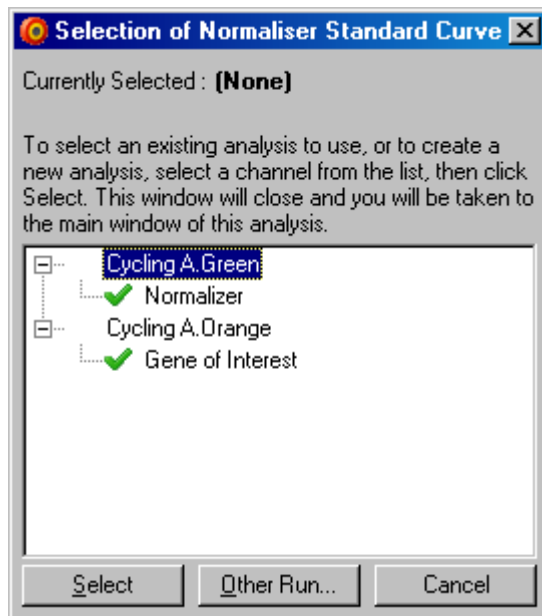


2. Zadejte název analýzy.

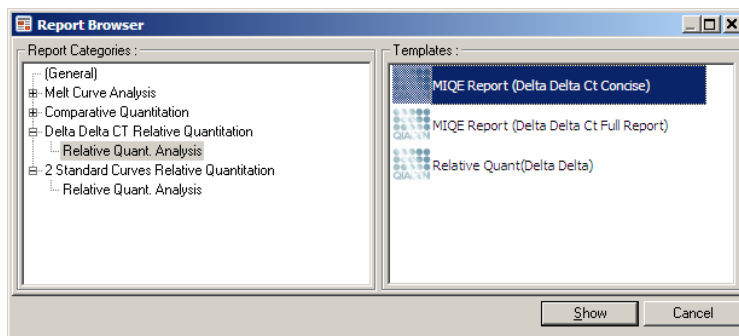


3. Abyste mohli pokračovat v analýze, musí být zaškrtnutá položka **Validation Run Performed** (Provedeno validační zpracování). Definujte strany, na kterých byl analyzován zkoumaný gen a normalizační gen.





4. Kliknutím na tlačítko **Reports** (Protokoly) zobrazíte **Report Browser** (Prohlížeč protokolů). V seznamu vyberte analýzu se správným názvem. Kliknutím na tlačítko **Show** (Zobrazit) zobrazíte protokol o relativní kvantifikaci. Funkce **Export** (Exportovat) pak výsledky exportuje do nové tabulky v aplikaci Excel. Je-li zařazen kalibrátor, výsledky budou vztaženy ke vzorku kalibrátoru, který má hodnotu 1.



Příklad výsledků z této analýzy je uveden níže. Zobrazí se hodnoty C_T zkoumaného genu ($GOI C_T$), hodnoty C_T normalizačního genu (Norm. C_T), ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, a relativní koncentrace (Relative Conc.). Exprese je vztažena ke vzorku kalibrátoru, kterému je přiřazena relativní exprese s hodnotou 1.

Další informace o derivaci výpočtů hodnot Rel Min a Rel Max uvádějí autoři Litvak a Schmittgen (2001).*

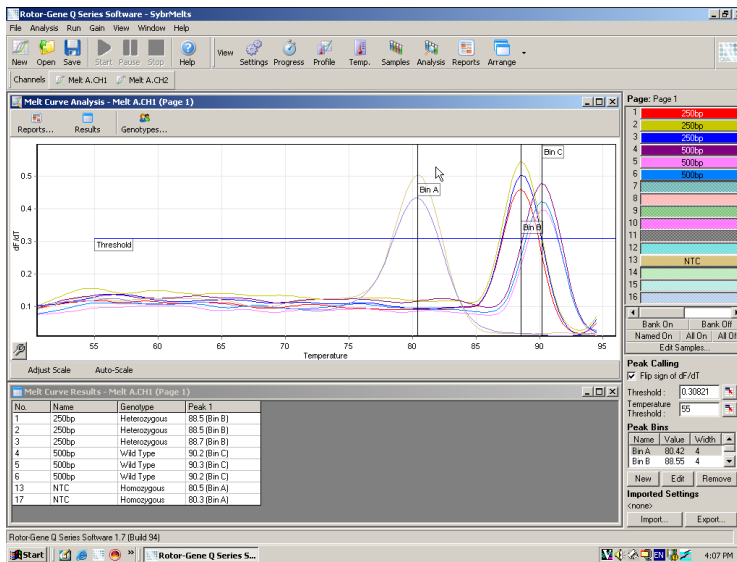
* Litvak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* **25**, 402.

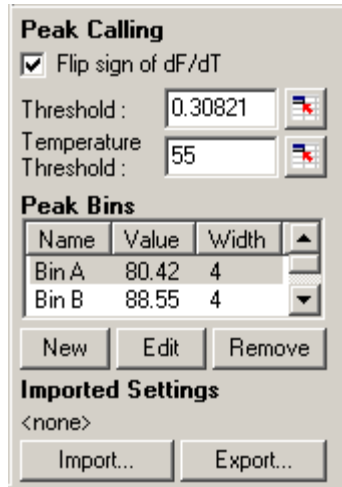
C	Replicate Name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Rel Min	Rel Max	Calibrator
	Dilution 8		28.37						
	Dilution 7	37.61	28.39	9.22	4.40	0.04728	0.04128	0.05414	
	Dilution 6	35.72	28.28	7.44	2.62	0.16228	0.14904	0.17669	
	Dilution 5	35.04	28.24	6.80	1.98	0.25292	0.11715	0.54605	
	Dilution 4	32.94	28.12	4.82	0.00	1.00000	0.69432	1.44025	Yes
	Dilution 3	31.66	28.23	3.43	-1.38	2.60825	2.16257	3.14579	
	Dilution 2	30.05	28.02	2.03	-2.79	6.92153	6.49040	7.38130	
	Dilution 1	28.61	27.92	0.69	-4.12	17.41896	16.47839	18.41322	
	QS 0.1 IU/µl		28.11						
	0.316 IU/µl	37.62	28.10	9.51	4.70	0.03957	0.03633	0.04094	
	1 IU/µl	36.84	28.15	8.69	3.88	0.06805	0.04415	0.10489	
	3.16 IU/µl	34.45	28.05	6.40	1.59	0.33305	0.28206	0.39325	
	QS4	32.67	28.29	4.38	-0.43	1.34925	1.09820	1.65770	
	QS3	30.07	27.98	2.09	-2.73	6.61982	6.18888	7.08076	
	QS2	26.88	27.64	-0.76	-5.57	47.61474	45.02202	50.35677	
	QS1	24.07	27.10	-3.03	-7.85	230.60440	208.45384	255.10870	

6.6.5 Analýza křivky tání

Analýza křivky tání analyzuje derivaci nezpracovaných dat po vyhlazení. Tato analýza se běžně používá pro genotypování a alelickou diskriminaci. Vrcholy na křivce jsou seskupeny do binů a všechny vrcholy pod prahovou hodnotou budou vyloučeny. Biny pak lze zmapovat do genotypů příkazem „Genotypes“ (Genotypy).

Po dokončení zpracování lze u některých chemikálií přidat krok tání pro vizualizaci kinetiky disociace amplifikovaných produktů. Teplota se zvyšuje lineárně a zaznamenává se fluorescence jednotlivých vzorků. Typická křivka tání je znázorněna na obrázku dole.





Flip sign of dF/dT
(Převrátit znaménko dF/dT):

Před definováním vrcholů se ujistěte, že znaménko dF/dT je u datového souboru správné, aby byly získány kladné vrcholy.

Defining peaks
(Definování vrcholů):

Při analýze křivky tání lze definovat vrcholy a uvádět je různými způsoby. Jedním z nich je automatické vyvolání všech vrcholů pro každý vzorek. Druhým je přiřazení vrcholů k binům, což je užitečné pro genotypování.

Biny vymezují oblast, v níž se předpokládá výskyt vrcholů. Software pro analýzu křivky tání seskupuje vrcholy do binů podle skutečných vrcholových hodnot na křivce. Biny je možné v případě potřeby upravit.


Každý vrchol, který je v definovaném rozmezí binu, bude do binu přidělen. Existují-li 2 biny blízko u sebe, vrchol bude přidělen do nejbližšího binu.

Poznámka: Biny by neměly být vizuálně umístěny pro odhad pozic vrcholů. Nastavte biny do přibližné oblasti zájmu, pak pomocí skutečných hodnot udávaných v tabulce výsledků určete přesnější výsledek.


Peak Bins (Biny vrcholů):

Chcete-li definovat bin, klikněte na tlačítko **New Bin** (Nový bin), pak kliknutím na určité místo v grafu a jeho podržením definujte střed binu. Chcete-li přidat další bin, postup opakujte. Tlačítkem **Remove** (Odebrat) můžete biny odstranit.

Threshold (Prahová hodnota):

Chcete-li nastavit práh (na ose y), klikněte na ikonu , pak klikněte na graf a táhněte čáru prahu na požadovanou úroveň.

Temperature Threshold
(Teplotní práh):

Chcete-li nastavit teplotní práh (na ose x), klikněte na ikonu , pak klikněte na graf a táhněte čáru prahu doprava. Tím se eliminuje čára prahu pro nižší teploty.

Poznámka: Je to užitečné, pokud se při nízkých teplotách vyskytuje v signálu šum.

Protokoly

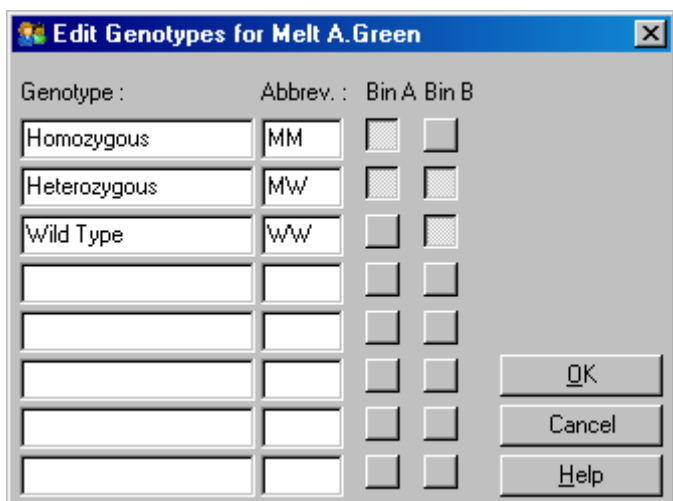
Otevře se **Report Browser** (Prohlížeč protokolů), ve kterém lze zvolit protokol a zobrazit jeho náhled. Protokol je možné vygenerovat podle aktuálně zvoleného kanálu, nebo lze vygenerovat protokol o genotypování vícekanalovou technikou.

Výsledky

Zobrazí se okno **Melt Curve Results** (Výsledky křivky tání) se zobrazenými vrcholy vzorků.

Genotypy

Klikněte na možnost **Genotypes...** (Genotypy...) a vyberte genotypy podle níže uvedeného obrázku.

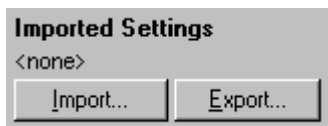


V tomto okně lze přiřadit genotypy k výskytům vrcholů v binech. Na snímku obrazovky je zobrazena výchozí konfigurace genotypu s heterozygotními vzorky se 2 vrcholy, homozygotními vzorky s jedním vrcholem v prvním binu a vzorky divokého typu s vrcholem ve druhém binu. Do pole vedle názvu každého genotypu lze napsat zkratku. Používá se při tisku protokolů o genotypování vícekanálovou technikou, takže lze snadno přečíst všechny výsledky z několika kanálů.

V případě multiplexní analýzy je nutné genotypy nastavit v každém kanálu. Pokud se provádí například analýza zhášení FRET ve dvou kanálech, kdy se v každém kanále očekává genotyp divokého typu a heterozygotní genotyp, parametry binu se musí nastavit pro každý kanál. Výsledky pak budou uvedeny v multiplexním protokolu.

Šablony analýzy křivky tání

Šablony analýzy křivky tání uživateli umožňují exportovat nastavení normalizace, prahu, genotypu a binů do jednoho souboru ve formátu *.met. Tento soubor je možné importovat a znovu použít v jiných experimentech. Další podrobnosti naleznete v části 7.1.



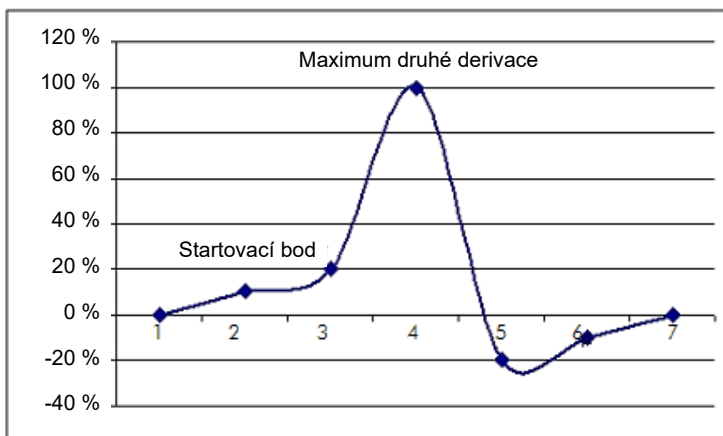
6.6.6 Komparativní kvantifikace

Komparativní kvantifikace porovnává relativní expresi vzorků s kontrolním vzorkem při zpracování, když standardní křivka není k dispozici. Často se používá při mikročipové analýze. Příklad použití této techniky uvádějí Warton a kolegové (2004)*.

1. Chcete-li provést analýzu, vyberte možnost **Other** (Jiné) a pak **Comparative quantitation** (Komparativní kvantifikace) v okně **Analysis** (Analýza). Dvakrát klikněte na kanál pro analýzu.
2. V rozevírací nabídce na pravé straně obrazovky pod přepínačem vyberte kontrolní vzorek.
3. Výsledky se automaticky vypočítají a zobrazí v okně **Comparative Quantitation Results** (Výsledky komparativní kvantifikace) pod grafem.

V prvních sloupcích v okně **Comparative Quantitation Results** (Výsledky komparativní kvantifikace) je zobrazeno číslo a název vzorku. Ve sloupci **Takeoff** (Start) je startovací bod vzorku. Výsledkem druhé derivace amplifikačního grafu jsou vrcholy odpovídající maximální rychlosti nárůstu fluorescence v reakci. Startovací bod je definován jako cyklus, v němž je druhá derivace ve 20 % maximální úrovně, a označuje konec šumu a přechod do exponenciální fáze.

Tento graf znázorňuje druhou derivaci amplifikačního grafu a zobrazuje relativní polohy vrcholu druhé derivace a startovací bodu



Sloupec „Amplification“ (Amplifikace) obsahuje účinnost vzorku. 100% účinná reakce by vedla k hodnotě amplifikace rovné 2 pro každý vzorek, což znamená, že amplikon se v každém cyklu zdvojnásobil. U nezpracovaných dat by se měl signál zdvojnásobit v exponenciální fázi.

* Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A., and Stanley, K.K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* **342**, 85.

Kdyby byl signál například 50 jednotek fluorescence ve 12. cyklu a pak 51 jednotek fluorescence ve 13. cyklu, měl by se ve 14. cyklu zvýšit na 53 jednotek fluorescence. Všechny hodnoty amplifikace pro jednotlivé vzorky se zprůměrují, aby byla získána hodnota amplifikace, která je zobrazena na pravé straně obrazovky pod přepínačem. Čím větší je variace mezi odhadovanými hodnotami amplifikace jednotlivých vzorků, tím bude větší interval spolehlivosti (udávaný hodnotou za znaménkem \pm). Interval spolehlivosti u velkého počtu vzorků (N) dává 68,3% pravděpodobnost, že skutečná amplifikace vzorků leží v tomto rozmezí (1 směrodatná odchylka). Zdvojnásobením intervalu \pm je dosaženo 95,4% intervalu spolehlivosti pro velký počet N.

Replikát kalibrátoru

Stejně jako u metody delta delta C_T je nutný vzorek kalibrátoru a měření jsou vztažena k tomuto vzorku kalibrátoru. Replikáty kalibrátoru je možné analyzovat, protože pokud má několik pozic vzorků stejný název, použije se průměr startovacích bodů těchto vzorků. Chcete-li tuto funkci správně použít, ověřte, že replikáty mají totožné názvy.



Pro výpočet exprese se používá průměrná amplifikace. Například u vzorku s nízkou hodnotou amplifikace bude trvat déle, než bude dosaženo určitého absolutního počtu kopií, než u vzorku s vyšší hodnotou amplifikace. Ve sloupci „Rep. Conc.“ v okně **Comparative Quantitation Results** (Výsledky komparativní kvantifikace) je uvedena relativní koncentrace. Relativní koncentrace každého vzorku ve srovnání se vzorkem kalibrátoru se vypočítá podle startovacího bodu a účinnosti reakce. To je vyjádřeno ve vědecké notaci.

Poznámka: Hodnota zobrazená v položce **Average Amplification** (Průměrná amplifikace) napravo od znaménka \pm představuje směrodatnou odchylku průměrné amplifikace po odstranění odlehlých hodnot amplifikace. Je-li tato hodnota vysoká, může existovat velká chyba celkových vypočtených hodnot koncentrace.

Software vypočítá relativní koncentrace takto:

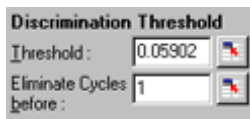
1. Startovací bod každého vzorku se vypočte z vrcholů druhé derivace.
2. Vypočte se průměrné zvýšení ve 4 cyklech nezpracovaných dat za startovacím bodem. To je hodnota amplifikace vzorku.
3. Amplifikace odlehlých bodů se odstraní z důvodu šumu ve fluorescenci pozadí.

4. Vypočte se průměr ze zbývajících amplifikací. To je průměrná amplifikace.
5. Pro každý replikát kalibrátoru se vypočte průměrný startovací bod.
6. Relativní koncentrace vzorku se vypočte jako $\text{Amplifikace}^{\text{Startovací hodnota kalibrátoru}} - \text{Startovací hodnota vzorku}$.
7. Výsledek se zobrazí ve vědecké notaci ve sloupci „Rep. Conc.“ v okně **Comparative Quantitation Results** (Výsledky komparativní kvantifikace).

6.6.7 Alelická diskriminace

Alelická diskriminace využívá kinetická data v reálném čase ze 2 nebo více kanálů ke genotypování vzorků. Chcete-li provést tuto analýzu, vyberte možnost **Other** (Jiné) a pak **Allelic Discrimination** (Alelická diskriminace) v okně **Analysis** (Analýza). Při provádění alelické diskriminace nestačí dvakrát kliknout na kanál pro analýzu, protože tato analýza se provádí pomocí několika kanálů současně. Chcete-li provést tuto analýzu, buďto podržte klávesu CTRL a kliknutím zvýrazněte každý kanál, který chcete analyzovat, nebo táhněte ukazatelem myši nad těmito kanály. Po zvýraznění požadovaných kanálů klikněte na možnost **Show** (Zobrazit). Seznam se aktualizuje a zobrazí se v něm všechny kanály na jednom řádku, vedle se symbolem zaškrtnutí. Znamená to, že všechny budou použity v jedné analýze. Chcete-li jeden či více těchto kanálů odebrat, klikněte pravým tlačítkem na analýzu a vyberte možnost **Remove Analysis...** (Odebrat analýzu...). Tyto kanály pak lze zařadit do jiné analýzy alelické diskriminace. Určitý kanál může být vždy použit jen v jedné analýze.

Reports (Protokoly):	Otevře se protokol „Allelic Discrimination Analysis“ (Analýza alelické diskriminace) pro náhled.
Results (Výsledky):	Zobrazí se okno Allelic Discrimination Results (Výsledky alelické diskriminace). Toto okno se standardně otevře při prvním zobrazení analýzy.
Možnosti normalizace:	<p>K dispozici je řada možností, jak optimalizovat normalizaci nezpracovaných dat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dynamic Tube (Dynamická zkumavka) (normalizace dynamické zkumavky) • Slope Correct (Korekce směrnice) (korekce směrnice šumu) • Ignore First x cycles (Ignorovat prvních x cyklů) (korekce šumu v prvních cyklech) • Takeoff point adjustment (Úprava startovacího bodu) <p>Další podrobnosti naleznete na straně 91.</p>
Discrimination Threshold (Práh diskriminace):	Zadáním hodnot do těchto textových polí umístíte práh diskriminace. Všechny křivky protínající tento práh budou považovány za vzorky pro genotypování. Klikněte na ikonu po pravé straně každého textového pole, pak tažením prahu v grafu tyto hodnoty vizuálně nastavte.



Genotypes (Genotypy):

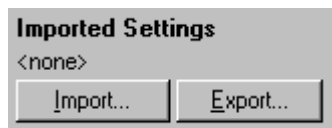
Otevře se okno **Genotyping** (Genotypování), v němž lze definovat, který genotyp je v jednotlivých kanálech detekován. Toto okno umožňuje přiřazení genotypů k jednotlivým kanálům pro analýzu alelické diskriminace.

V níže uvedeném příkladu je vzorek heterozygotní, pokud hodnoty naměřené v kanálech Cycling A.Green a Cycling A.Yellow protnou práh.



Šablony alelické analýzy:

Šablony alelické analýzy umožňují exportovat nastavení normalizace, prahu a genotypů do jednoho souboru ve formátu *.alt. Tento soubor je možné importovat a znovu použít v jiných experimentech. Další podrobnosti naleznete v části 7.1.



6.6.8 Analýza bodového grafu

Analýza bodového grafu umožňuje genotypování na základě relativní exprese amplifikačních grafů ve 2 kanálech. Na rozdíl od alelické diskriminace se o genotypu rozhoduje podle oblastí definovaných v bodovém grafu a nikoli podle jedné prahové hodnoty. Chcete-li provést tuto analýzu, vyberte možnost **Other** (Jiné) a pak **Scatter Graph Analysis** (Analýza bodového grafu) v okně **Analysis** (Analýza).

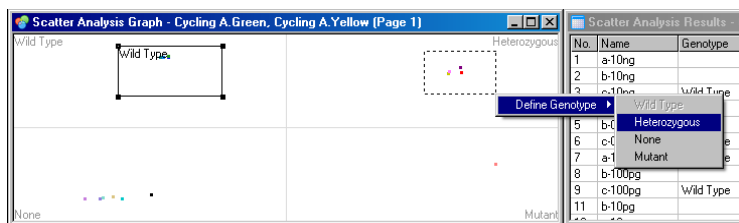
Při provádění analýzy bodového grafu nestačí dvakrát kliknout na kanál pro analýzu, protože tato analýza se provádí pomocí 2 kanálů současně. Chcete-li provést tuto analýzu, buďto podržte klávesu SHIFT a kliknutím zvýrazněte kanály, které chcete analyzovat, nebo nad nimi táhněte ukazatelem myši. Po zvýraznění požadovaných kanálů klikněte na možnost **Show** (Zobrazit).

Seznam se aktualizuje a zobrazí se v něm všechny kanály na jednom řádku, u každého se symbolem zaškrtnutí. Znamená to, že všechny budou použity v jedné analýze. Chcete-li jeden či více těchto kanálů odebrat, klikněte pravým tlačítkem na analýzu a vyberte možnost **Remove Analysis...** (Odebrat analýzu...). Tyto kanály pak lze zařadit do jiné analýzy bodového grafu. Určitý kanál může být vždy použit jen v jedné analýze.

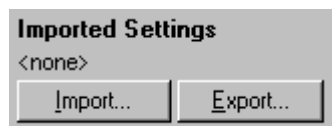
- Reports (Protokoly): Otevře se protokol **Scatter Analysis** (Analýza bodů) pro náhled.
- Results (Výsledky): Zobrazí se okno Scatter Analysis Results (Výsledky analýzy bodů). Toto okno se standardně otevře při prvním zobrazení analýzy.
- Možnosti normalizace: K dispozici je řada možností, jak optimalizovat normalizaci nezpracovaných dat:
- **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka) (normalizace dynamické zkumavky)
 - **Slope Correct** (Korekce směrnice) (korekce směrnice šumu)
 - **Ignore First x cycles** (Ignorovat prvních x cyklů) (korekce šumu v prvních cyklech)
 - **Takeoff point adjustment** (Úprava startovacího bodu)
- Další podrobnosti naleznete na straně 91.
- Genotypes (Genotypy): Otevře se okno **Genotyping** (Genotypování), v němž lze definovat, který genotyp je v jednotlivých kanálech detekován. V tomto okně lze přiřadit genotypy podle kanálů, v němž vzorek reaguje. Zvolené kanály budou použity k označení rohů bodového grafu a uživatelé zavedou do obecné části bodového grafu, ve které je třeba oblasti definovat.



- Scatter Graph (Bodový graf): V bodovém grafu je zobrazena relativní exprese ve 2 vybraných kanálech. Zobrazení se normalizuje, aby byla zohledněna různá násobná zvýšení v jednotlivých kanálech a logaritmuje se ke zdůraznění rozdílných expresí u různých vzorků.
- Chcete-li provést genotypování, definujte oblasti kliknutím na zvolený bod grafu a jeho tažením. Výběr je pak možné označit podle genotypů konfigurovaných v okně **Genotyping** (Genotypování).



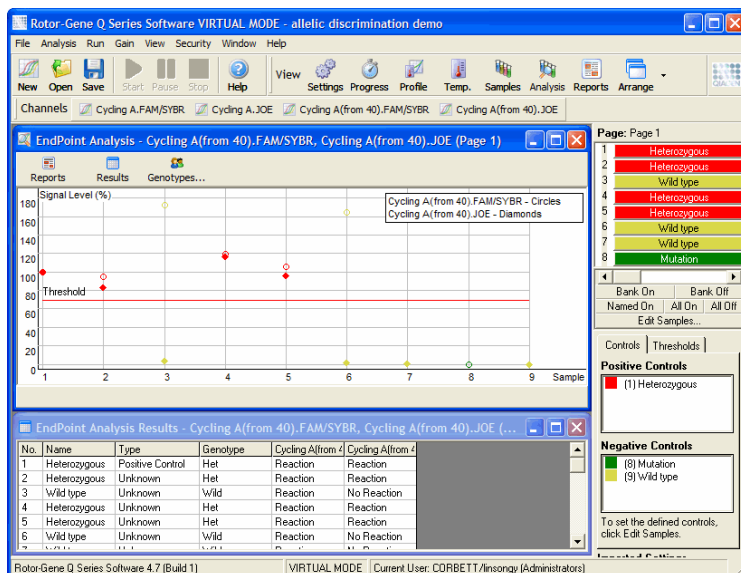
- Scatter graph analysis templates (Šablony analýzy bodového grafu): Šablony analýzy bodového grafu umožňují export nastavení genotypu a oblasti do jednoho souboru ve formátu *.sct. Tento soubor je možné importovat a znovu použít v jiných experimentech. Další podrobnosti naleznete v části 7.1.



6.6.9 EndPoint analýza

EndPoint analýza umožňuje diskriminaci mezi amplifikovaným a neamplifikovaným vzorkem na konci zpracování. Výsledky jsou kvalitativní (pozitivní/negativní), nikoli kvantitativní.

EndPoint analýza je znázorněna dále na snímku obrazovky.



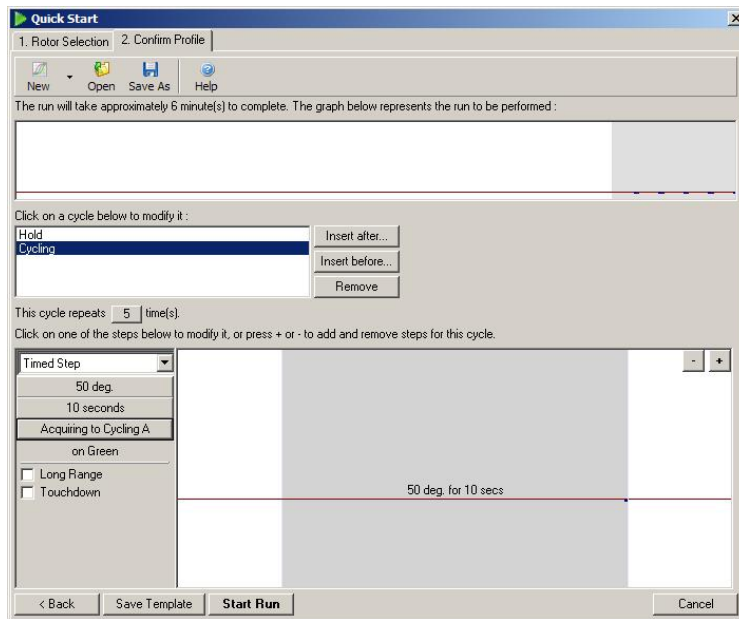
EndPoint analýza se podobá alelické diskriminaci v tom, že výsledky jsou kvalitativní a že názvy lze přiřadit určitým permutacím reakcí v různých kanálech. V EndPoint analýze je však k dispozici jen jedna naměřená hodnota, na rozdíl od alelické diskriminace, v níž se používají naměřené hodnoty každého vzorku po jednotlivých cyklech. To znamená, že uživatel musí pro usnadnění analýzy určit pozitivní a negativní kontroly. U nezpracovaných dat jsou úrovně signálů normalizovány vůči známým pozitivním a negativním kontrolám pro každý kanál. Uživatel pak vybere úroveň signálu v procentech jako prahovou hodnotu.

Pojmy používané v EndPoint analýze

Dále jsou vysvětleny některé pojmy používané v EndPoint analýze.

- Pozitivní kontrola:** Jedná se o vzorek, o němž je známo, že v něm došlo k amplifikaci.
- Negativní kontrola:** Jedná se o vzorek, o němž je známo, že v něm nedošlo k amplifikaci. Představuje typický signál pozadí.
- Prahová hodnota:** Prahová hodnota je úroveň signálu, nad kterou je vzorek považován za pozitivní (amplifikovaný). Uživatel musí toto nastavení upravit pro každé zpracování.
- Úroveň signálu:** Fluorescenční signál v procentech, normalizovaná tak, aby nejvyšší signál z pozitivních kontrol byl 100 % a nejnižší signál z negativních kontrol byl 0 %.
- Genotyp:** Interpretace různých permutací reakcí v různých kanálech. Například „heterozygotní“ genotyp lze přiřadit vzorkům, které reagovaly jak v zeleném, tak žlutém kanálu. Genotyp lze také použít ke hlášení výsledků reakcí s interními kontrolami. Například výsledky by mohly být uváděny jako „inhibovaný“, „pozitivní“ nebo „negativní“ podle toho, zda byla reakce v určitých kanálech pozorována nebo ne.

Konfigurace profilu



Chcete-li provést EndPoint analýzu, vytvořte profil s výdrží na 50 °C po dobu několika minut, pak krok cyklování s 1 krokem (50 °C po dobu 10 s), s akvizicí v požadovaném kanálu. Nastavte počet opakování na 5 dle obrázku nahoře. Tyto časy jsou jen orientační a pro vaše konkrétní účely se mohou lišit. Čím více opakování v profilu, tím více informací bude k dispozici pro provedení analýzy. Analýza automaticky vypočte průměr všech naměřených hodnot, aby byla pro každý vzorek získána jedna hodnota. Nepožaduje se určitý počet opakování. Pokud není vyžadována velmi vysoká přesnost, obvykle postačí 5 opakování.

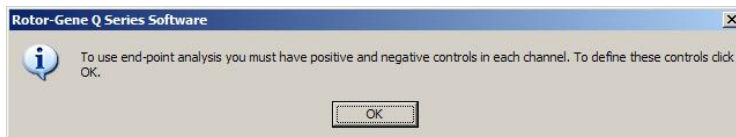
Analýza

EndPoint analýzu lze provádět v několika kanálech současně. Chcete-li vytvořit novou analýzu, klikněte na kartu **EndPoint**, vyberte kanály tažením ukazatelem myši nad nimi a pak klikněte na tlačítko **Show** (Zobrazit).



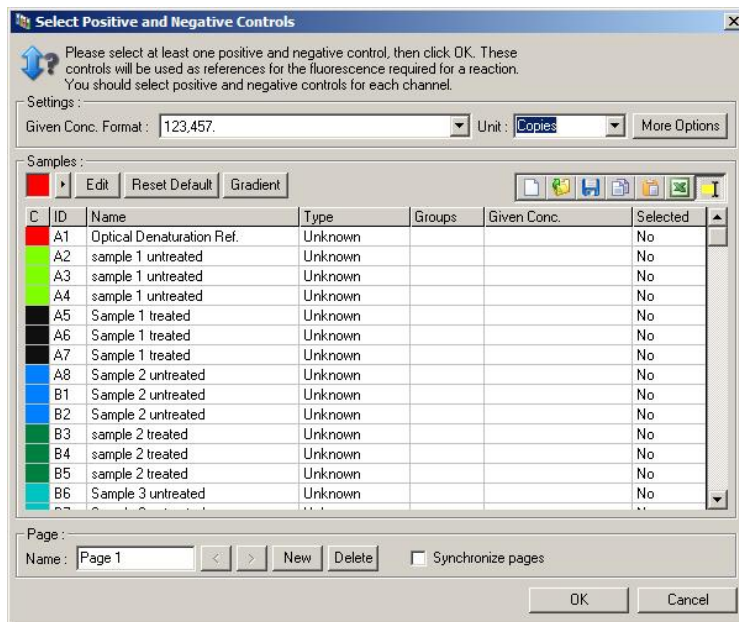
Definování kontrol

Když EndPoint analýzu otevřete poprvé, zobrazí se následující zpráva, pokud nebyla definována pozitivní a negativní kontrola.



Klikněte na tlačítko **OK**. Zobrazí se okno **Edit Samples** (Upravit vzorky), v němž lze definovat pozitivní a negativní kontrolu. Chcete-li určitý vzorek definovat jako pozitivní nebo negativní kontrolu, klikněte na buňku typu vzorku, pak z rozevírací nabídky vyberte příslušný typ kontroly.

Poznámka: Aby bylo možné provést analýzu, kontroly musí být „zapnuté“ pomocí přepínače na pravé straně hlavního okna.



Tato obrazovka funguje stejně jako okno **Edit Samples** (Upravit vzorky) (část „Nastavení vzorku“).

Normalizace

Normalizace dat EndPoint analýzy převede všechny úrovně signálu do rozmezí 0–100 %. Je nutné vybrat alespoň jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu, případně více, pokud se analyzuje v několika kanálech a standardy nejsou multiplexované. Existuje-li riziko, že u pozitivní kontroly nedošlo k amplifikaci, je třeba otestovat více než jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu.

1. V každém kanálu jsou analyzovány všechny pozitivní kontroly a pozitivní kontrole s nejvyšší fluorescence se nastaví hodnota 100 %. Znamená to, že budou-li testovány duplicitní kontroly, pozitivní kontrola může selhat, aniž by ovlivnila celé zpracování.
2. Jsou analyzovány všechny negativní kontroly a negativní kontrole s nejnižší úrovní fluorescence se nastaví hodnota 0 %.
3. Nezpracované hodnoty fluorescence zbývajících vzorků jsou škálovány vzhledem k nejvyšší pozitivní kontrole a nejnižší negativní kontrole.

Například:

Vzorek	Typ	Fluorescence
1	Pozitivní kontrola	53,6
2	Pozitivní kontrola	53,0
3	Negativní kontrola	4,5
4	Negativní kontrola	4,3
5	Vzorek	48,1
6	Vzorek	6,4

Toto zpracování bylo úspěšné, protože 2 pozitivní a 2 negativní kontroly jsou blízko u sebe a jsou mimo hodnoty fluorescence vzorků.

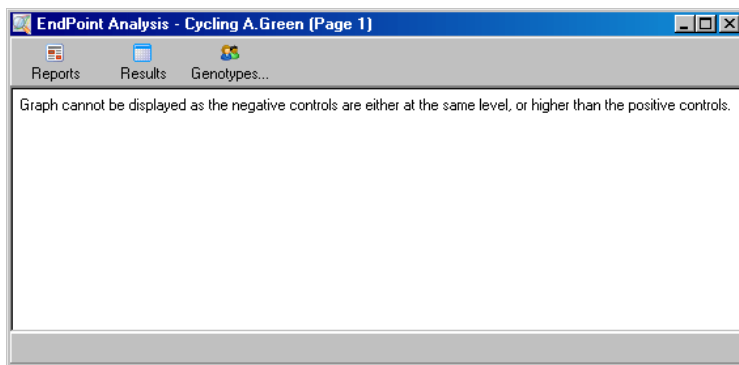
Normalizované hodnoty jsou:

Vzorek	Typ	Expese (%)
1	Pozitivní kontrola	100,0
2	Pozitivní kontrola	97,3
3	Negativní kontrola	0,4
4	Negativní kontrola	0,0
5	Vzorek	84,2
6	Vzorek	4,0

Vzorek 1 byl pozitivní kontrola s největší fluorescencí, a tak byl nastaven na 100 %. Druhá pozitivní kontrola byla mírně nižší. Vzorek 4, nejnižší negativní kontrola, byl nastaven na 0 %. Nyní je jasné, že ve vzorku 5 pravděpodobně došlo k amplifikaci, kdežto ve vzorku 6 pravděpodobně ne.

Poznámka: V závislosti na zvolených pozitivních a negativních kontrolách lze dosáhnout úrovní exprese větších než 100 % nebo menších než 0 %. Výsledek větší než 100 % je možno interpretovat tak, že ve vzorku došlo k větší expresi než v pozitivních kontrolách. Výsledek menší než 0 % je možno interpretovat tak, že je méně pravděpodobné, že ve vzorku došlo k amplifikaci, než že došlo k amplifikaci v negativních kontrolách. Protože je tato analýza kvalitativní, tyto výsledky nepředstavují problém.

Pokud negativní kontroly vedou k vyšší fluorescenci než pozitivní kontroly, vzorky byly nesprávně nastaveny a zobrazí se níže uvedená zpráva.



Normalizace v několika kanálech

Je možné analyzovat data signálu z několika kanálů, ale nastavení vzorků bude složitější. EndPoint analýza předpokládá provedení multiplexování, a proto může mít každá zkumavka pouze jednu pozici. Aktuálně není možné analyzovat nastavení, v němž pozice vzorku představuje pozitivní kontrolu pro jeden kanál a negativní kontrolu pro jiný.

Přestože je v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky) uvedena jen jedna definice vzorku na jednu pozici zkumavky, normalizace se provádí nezávisle u každého kanálu.

Pokud je pozice zkumavky pozitivní kontrola alespoň pro jeden kanál, měla by být zadána jako pozitivní kontrola ve sloupci „Type“ (Typ) v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky). V opačném případě by její typ měl být **Sample** (Vzorek). Totéž platí pro negativní kontroly.

Je-li například některý vzorek pozitivní kontrolou v zeleném kanálu, ale ne ve žlutém kanálu, vzorek by měl být stále definován jako kontrola. Protože se používá nejvyšší pozitivní kontrola v každém kanálu, pak pokud existuje alespoň jedna pozitivní kontrola ve žlutém kanálu s amplifikací, definice vzorku jako kontroly pro zelený kanál bude ignorována.

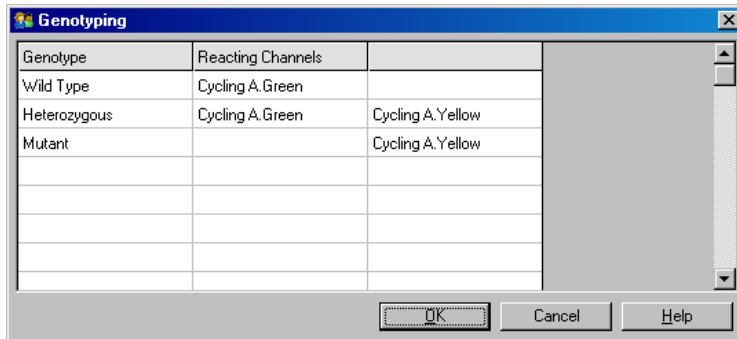
Prahová hodnota

Prahová hodnota slouží ke stanovení exprese v procentech, potřebné k reakci v jednotlivých kanálech. Po definování pozitivní a negativní kontroly budou všechny kanály normalizovány podle stejné stupnice 0–100 %. Proto je i při analýze několika kanálů potřeba jen jedna prahová hodnota.

Klikněte na čáru prahové hodnoty a táhněte ji do oblasti mezi 0 a 100. Prahová hodnota by neměla být příliš blízko u vzorků na obou stranách čáry, protože by to znamenalo, že zpracování nebylo jednoznačné. Pokud rozdíl mezi vzorkem definovaným jako amplifikovaný nebo neamplifikovaný činí jen několik procent, znamená to, že kdyby byla reakce opakována, vzorek by se mohl objevit na druhé straně prahové čáry.

Genotypy

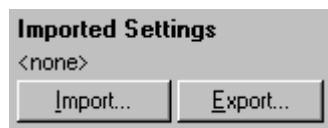
Tato možnost otevře okno **Genotyping** (Genotypování), v němž lze definovat, který genotyp je v jednotlivých kanálech detekován.



V tomto okně lze přiřadit genotypy ke kanálům. Ve výše uvedeném příkladu je vzorek heterozygotní, pokud hodnoty naměřené v kanálech Cycling A.Green a Cycling A.Yellow protnou práh.

Šablony EndPoint analýzy

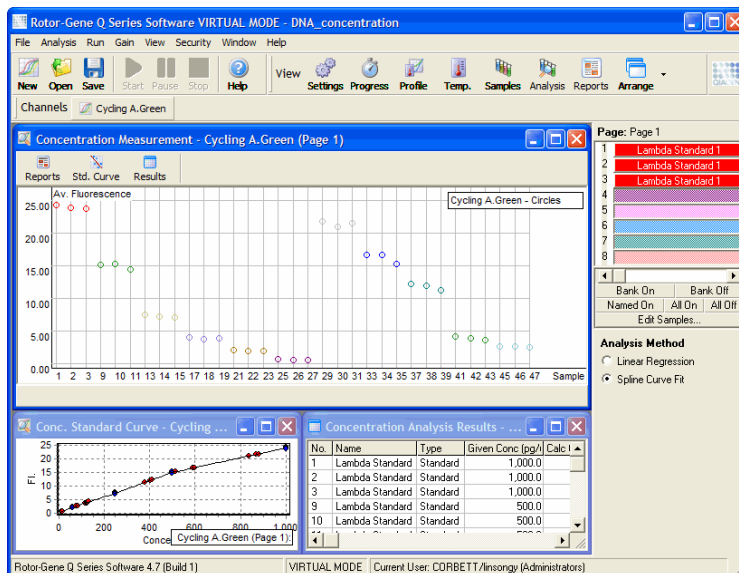
Šablony EndPoint analýzy uživatelům umožňují exportovat nastavení genotypu a prahové hodnoty do jednoho souboru ve formátu *.ent. Tento soubor je možné importovat a znovu použít v jiných experimentech. Další podrobnosti naleznete v části 8.1.



6.6.10 Analýza koncentrací

Analýza koncentrací umožňuje použití přístroje Rotor-Gene Q MDx pro měření koncentrací DNA nebo k získání hodnot naměřených fluorometrem.

Tato analýza je zobrazena dole na snímku obrazovky.



Příprava zpracování

Chcete-li provést analýzu koncentrací, nejdříve připravte fluorescenční standardy a vzorky, ideálně ve třech replikátech.

Příprava standardů

Standardní křivka slouží ke stanovení koncentrace DNA z každého měřeného vzorku.

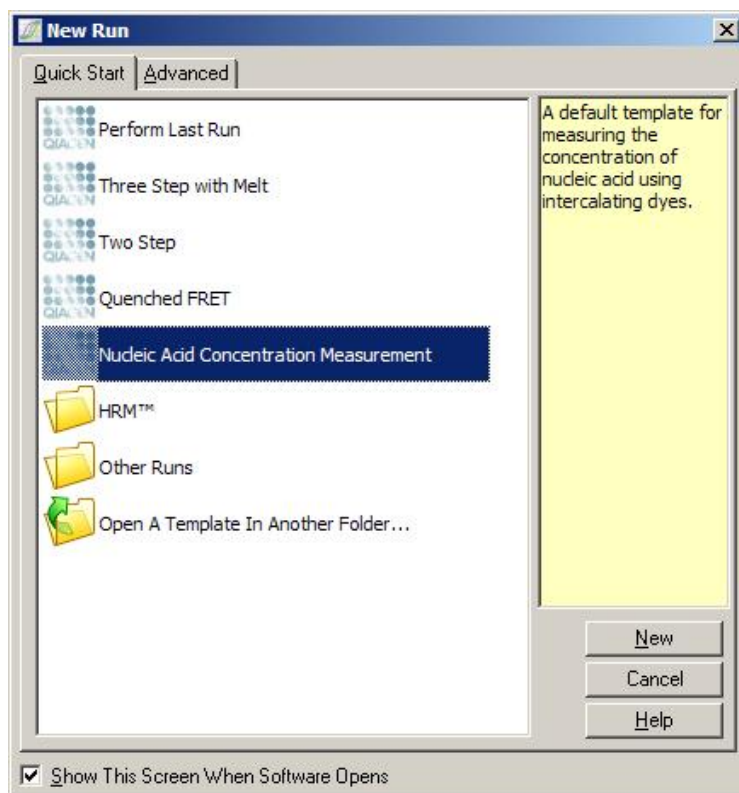
DNA použitá pro standardní křivku by měla být podobného typu jako DNA v měřených vzorcích. Koncentrace alespoň jednoho vzorku DNA by měla být stanovena ultrafialovou spektrofotometrií a tento vzorek by měl být použit jako standard. Je nutné použít minimálně 3 standardy (s replikáty). Je důležité, aby standardy DNA použité při fluorescenční detekci byly pouze lineární v rozmezí 1–100 ng/μl. Pokud je v tomto rozmezí koncentrace DNA vydělena dvěma, platí to i pro naměřenou hodnotu fluorescence. Intervaly spolehlivosti koncentrací mimo toto rozmezí jsou velmi široké vlivem nelinearity chemikálií.

Typ měřené DNA

Byly pozorovány rozdíly v měření různých forem DNA (např. genomové DNA oproti plazmidové DNA). Společně by se tedy měly měřit jen podobné typy DNA a při měření genomové DNA by se jako standardu neměla používat plazmidová DNA.

Nastavení zpracování

Chcete-li nastavit zpracování, vyberte možnost **Nucleic Acid Concentration Measurement** (Měření koncentrace kyseliny nukleové) v průvodci Quick Start (Rychlé spuštění).



Poznámka: Ověřte, že v pozici 1 pro zkumavku se testuje pozitivní kontrola, například standard s vysokou koncentrací. Bez pozitivní kontroly software nedokáže optimalizovat nastavení zesílení pro maximální citlivost. Budete k tomu vyzváni před každým zpracováním.

Analýza

Analýza koncentrací se provádí vztažením úrovně fluorescence k hodnotě koncentrace. K dispozici jsou dva modely analýzy. Volba optimální analýzy závisí na chemikálii a účelu použití.

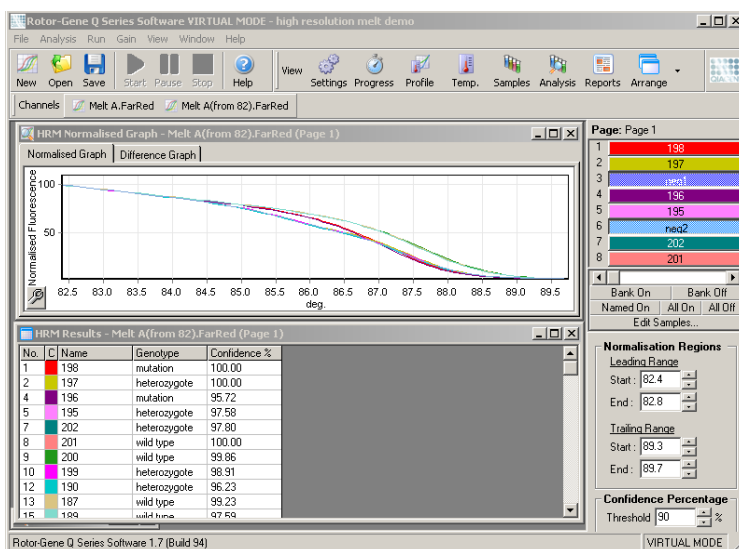
„Linear Regression“ (Lineární regrese) analyzuje data na základě předpokladu lineárního vztahu a odhadu neznámých hodnot z vygenerovaného lineárního modelu. Stanovuje chybu měření zkoumáním odchylky naměřených hodnot od lineárního modelu. Pokud jsou naměřené hodnoty koncentrací lineární, jedná se o nejvhodnější analýzu, protože uživatel poskytuje statistickou analýzu rozptylu (ANOVA).

„Spline Curve Fit“ (Aproximace křivky) předpokládá jen to, že hodnoty koncentrací se zvyšují s fluorescencí. Přestože tato metoda poskytuje přesnější odhady nelineárních dat, neumožňuje analýzu ANOVA, protože neuvažuje lineární model.

6.6.11 Analýza křivky tání s vysokým rozlišením

Analýza křivek tání s vysokým rozlišením (High resolution melt, HRM) charakterizuje vzorky podle délky sekvence, obsahu GC a komplementarity. Analýza HRM se používá při genotypování, například jako analýza genových mutací nebo jednonukleotidových polymorfismů (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), a v epigenetice pro analýzu stavu metylace DNA. Analýza HRM oproti jiným metodám poskytuje přesné výsledky a úspory nákladů na sondy a označení.

Chcete-li provést analýzu, vyberte možnost **Other** (Jiné) a pak **High Resolution Melt Analysis** (Analýza křivky tání s vysokým rozlišením) v okně **Analysis** (Analýza). Dvakrát klikněte na kanál pro analýzu. Křivky tání z kanálu nezpracovaných dat se normalizují zprůměrováním všech počátečních a koncových hodnot fluorescence a poté vynucením, aby koncové body každého vzorku byly stejné jako průměr.



Automatického vyvolání vzorků se dosáhne kliknutím na tlačítko **Genotypes** (Genotypy). Zadejte název genotypu, po něm číslo vzorku, které slouží jako pozitivní kontrola pro automatické vyvolání neznámých vzorků.

HRM Genotypes	
Genotype	Control
mutation	198
wild type	201
heterozygote	197

Clear OK Cancel Help

Podrobnosti o analýze HRM naleznete v části 10.

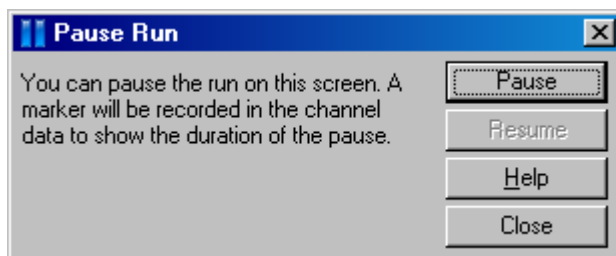
6.7 Nabídka Zpracování

6.7.1 Spustit zpracování

Tato možnost spustí definovaný teplotní profil s aktuálním nastavením zesílení. Před spuštěním zpracování se objeví okno **Profile Run Confirmation** (Potvrzení zpracování profilu). Zobrazí se grafické znázornění teplotního profilu společně s nastavením zesílení pro každý kanál.

6.7.2 Pozastavit zpracování

Tato volba umožňuje pozastavit zpracování a poté v něm pokračovat. Pozastavení a následné pokračování mohou mít výrazný vliv na výsledky zpracování. Proto budou data obsahovat značku udávající, že zpracování bylo pozastaveno, a délku pozastavení. Dále se v okně **Run Settings** (Nastavení zpracování) zobrazí zpráva na kartě zpráv (viz část 6.8.1).



VAROVÁNÍ



Horký povrch

Při pozastavení zpracování se Rotor-Gene Q MDx neochladí až na pokojovou teplotu. Při manipulaci s rotorem nebo zkumavkami v přístroji buďte opatrní.

6.7.3 Zastavit zpracování

Po výběru této možnosti se zobrazí žádost o potvrzení, že má být zpracování zastaveno.

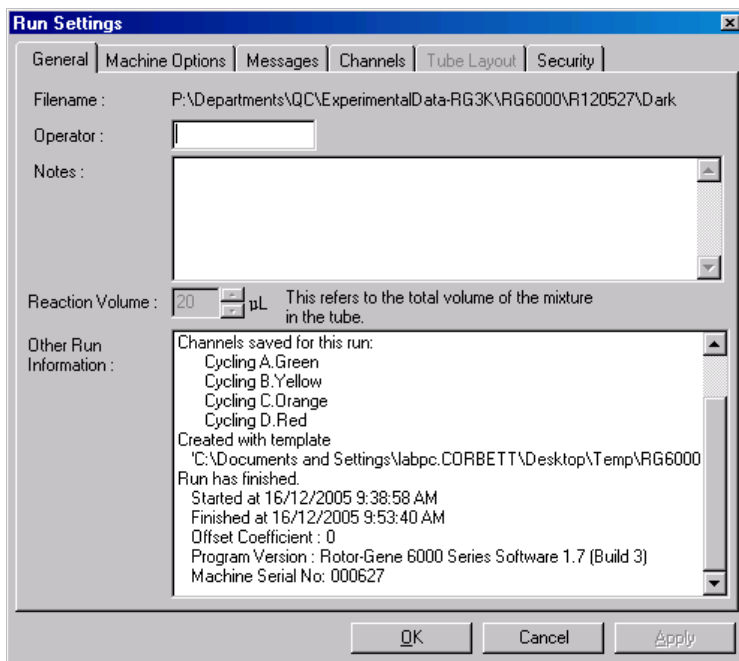
6.8 Nabídka Zobrazení

6.8.1 Nastavení zpracování

Všeobecně

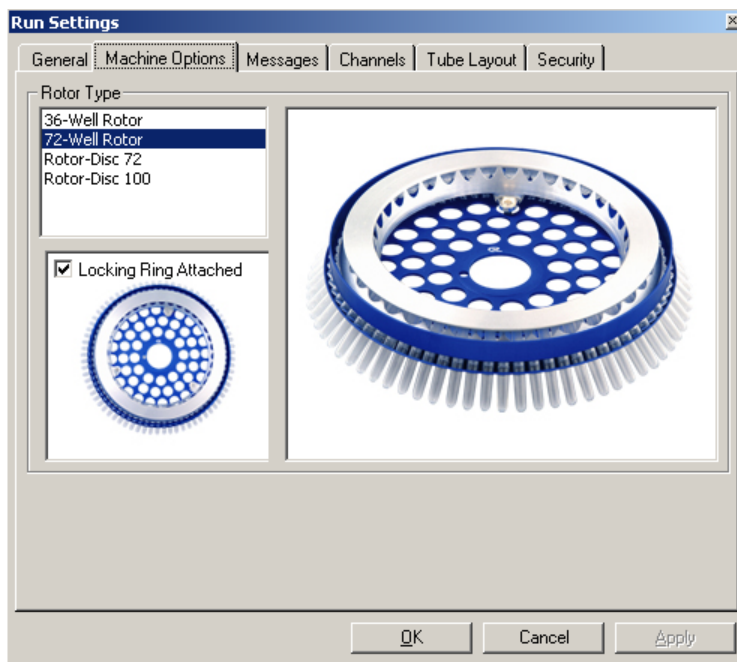
Toto okno umožňuje nastavit informace o zpracování, název souboru zpracování, datum analýzy, označení operátora a související poznámky.

Toto okno obsahuje všechny informace kromě profilu potřebného pro konfiguraci zpracování. Po dokončení zpracování se v tomto okně zobrazí následující informace: použitý cykler, nastavení zesílení, počet kanálů a čas začátku a konce.



Možnosti přístroje

Na této kartě jsou zobrazena nastavení ke konfiguraci přístroje Rotor-Gene Q MDx.



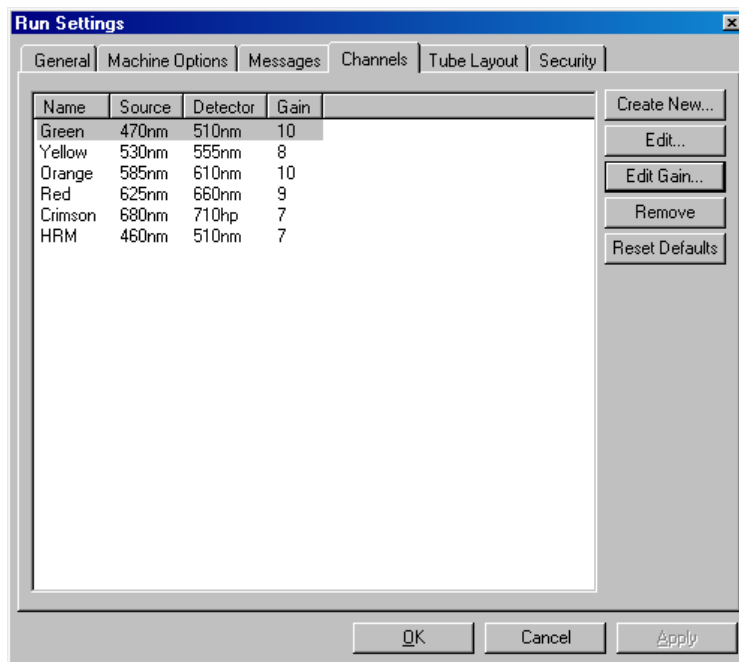
Nastavení rotoru musí odpovídat tomu, který je aktuálně instalovaný v přístroji Rotor-Gene Q MDx. Při otevření existujícího zpracování bude v tomto nastavení uveden rotor, který byl v té době v cyklu instalován.

Zprávy

Na této kartě jsou zobrazeny zprávy udávající, zda uživatel provedl změny, například pozastavil cyklus nebo během zpracování přeskočil některé cykly. Jsou zde také zobrazena varování vzniklá během zpracování. Pokud výsledky neodpovídají očekávání, zkontrolujte tuto kartu.

Kanály

Při konfigurování nového zpracování se na kartě s kanály zobrazí aktuální konfigurace dostupných kanálů. Při zobrazení existujícího zpracování uvedené informace představují konfigurace kanálů v době daného zpracování. Pokud při zpracování dojde k poškození nastavení kanálu, lze obnovit výchozí kanály kliknutím na tlačítko **Reset Defaults** (Obnovit výchozí).



- Name (Název):** Jedná se o název kanálu.
- Source (Zdroj):** Udává excitační vlnovou délku LED zdroje.
- Detector (Detektor):** Udává detekční vlnovou délku a typ filtru (nm = pásmová propust, hp = horní propust).
- Gain (Zesílení):** Udává zesílení pro konkrétní kanál.
- Create New... (Vytvořit nový):** Tato funkce umožňuje vytvoření nových kanálů. Kliknutím na tlačítko **Create New... (Vytvořit nový...)** se otevře okno pro zadání nového názvu, zdroje a detekčního filtru. Filtry lze vybrat z rozevírací nabídky vedle každého okna.
- Channels (Kanály):** Standardní konfigurace pro 4kanálovou multiplexní detekci je zelený, žlutý, oranžový a červený kanál.

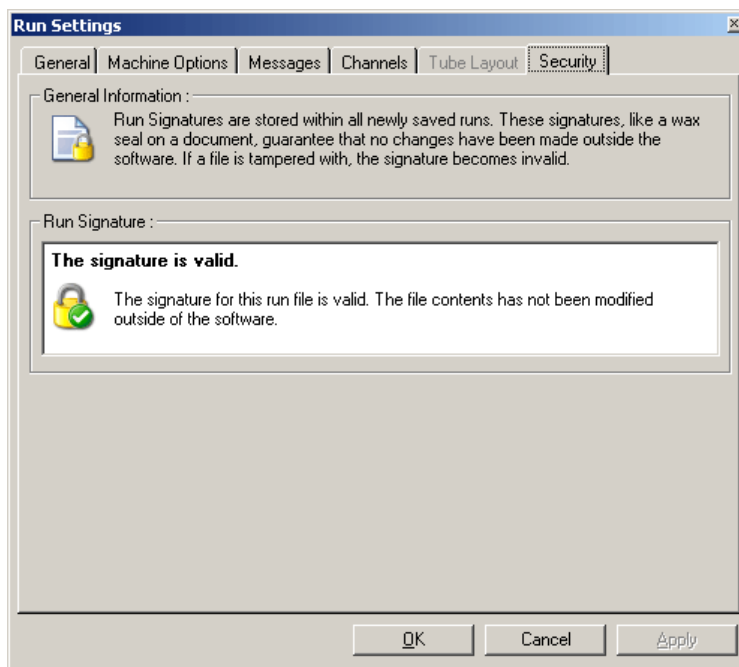
Rozvržení zkumavek

Při použití produktu 72-Well Rotor lze vzorky uspořádat tak, aby odpovídaly označení na bloku 9 x 8. Ve výchozím nastavení je možné na kartě rozvržení zkumavek označit vzorky postupně (tj. 1, 2, 3...). To znamená, že vzorky budou označeny postupně v pořadí, ve kterém byly do přístroje Rotor-Gene Q MDx vloženy. Jinou možností je označit vzorky 1A, 1B, 1C atd. Tato možnost může být užitečná, pokud byly vzorky připraveny vícekanálovou pipetou.

Zabezpečení

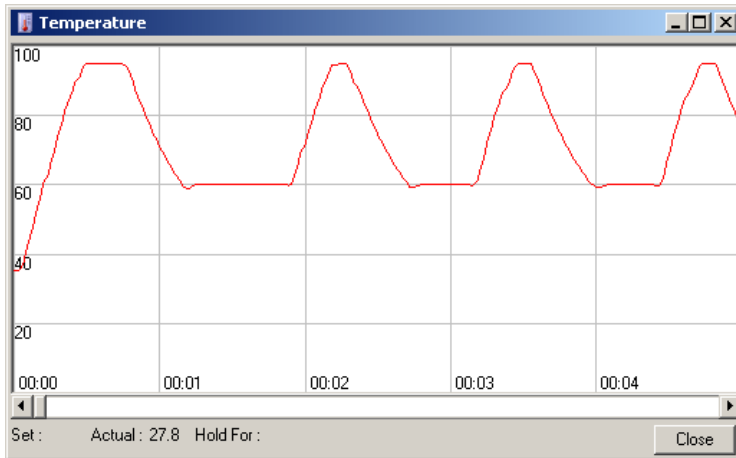
Na kartě zabezpečení jsou zobrazeny informace o signatuře zpracování. Signatura zpracování je nevratný klíč, který se obnoví po každé změně souboru. Bude-li některá část souboru *.rex změněna mimo software, signatura a soubor si již nebudou odpovídat. Zaškrtnutí signatury umožňuje potvrdit, že nezpracovaná data nebyla změněna mimo aplikaci, že s profilem nebylo manipulováno a že je teplotní graf platný. Signatura též chrání před poškozením, například chybami systému souborů.

Poznámka: Jsou-li soubory *.rex odesílány e-mailem, šifrování může signaturu zneplatnit. Aby k tomu nedošlo, soubor před odesláním e-mailem zazipujte.



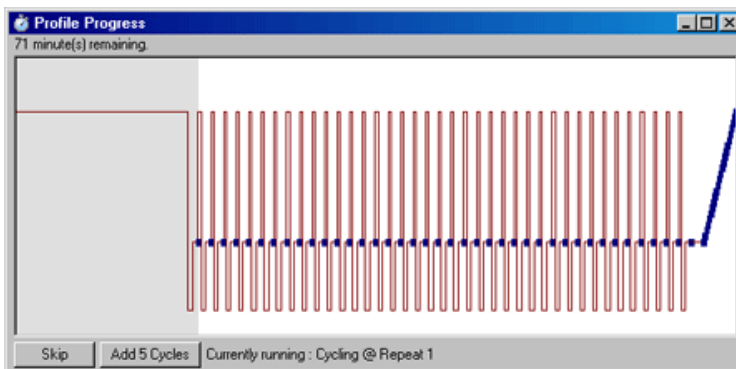
6.8.2 Teplotní graf

Vyberte možnost **Temperature Graph** (Teplotní graf) v nabídce **View** (Zobrazit), nebo kliknutím na tlačítko **Temp.** (Tepl.) otevřete okno **Temperature** (Teplota). V grafu je zobrazen průběh zadaných teplot během cyklování. Neodráží měření teplot v reálném čase. V průběhu zpracování se pro každý krok programu zobrazují hodnoty **Set** (Nastavené), **Actual** (Skutečné) a čas **Hold** (Výdrž). V případě existujícího souboru zpracování se v okně **Temperature** (Teplota) zobrazí historie teplot během zpracování. Svislá stupnice představuje teplotu a vodorovná čas. Pomocí posuvníku můžete v okně **Temperature** (Teplota) rolovat tam a zpět.



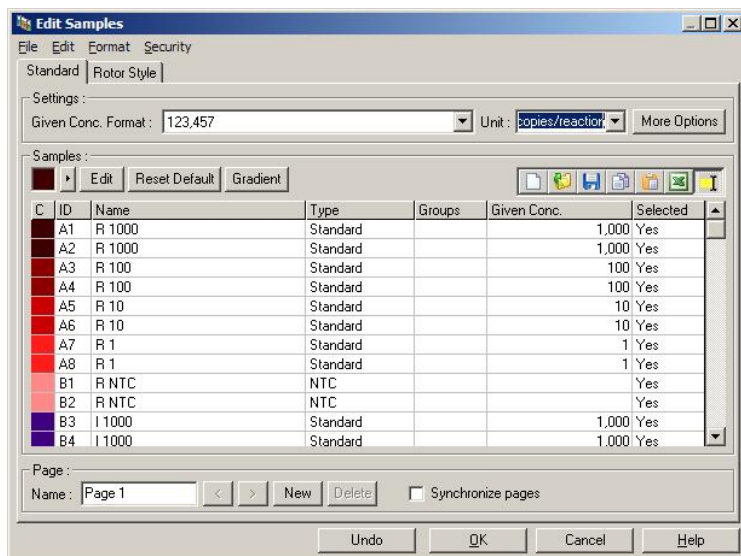
6.8.3 Průběh profilu

Vyberte možnost **Profile Progress** (Průběh profilu) v nabídce **View** (Zobrazit), nebo kliknutím na tlačítko **Progress** (Průběh) otevřete okno **Profile Progress** (Průběh profilu). V tomto okně je grafické znázornění tepelného profilu souvisejícího se zpracováním. Během zpracování vystínovaná část okna označuje počet cyklů, které byly dokončeny. Je zde též uveden odhad počtu minut do konce zpracování.



- Skip** (Přeskočit): Funkce **Skip** (Přeskočit) umožňuje přeskočit libovolné kroky v profilu.
- Add 5 Cycles** (Přidat 5 cyklů): Funkce **Add 5 Cycles** (Přidat 5 cyklů) k aktuálnímu kroku cyklování přidá 5 opakování.

6.8.4 Upravit vzorky



Kliknutím na tlačítko **Samples** (Vzorky) vyvoláte okno **Edit Samples** (Upravit vzorky). Okno **Edit Samples** (Upravit vzorky) lze také otevřít kliknutím pravým tlačítkem na seznam vzorků na pravé straně obrazovky. Toto okno má stejnou funkci jako okno **Edit Samples** (Upravit vzorky) v průvodcích až na to, že funkce panelu nástrojů jsou též k dispozici v nabídce File (Soubor) a Edit (Upravit).

V horní části okna se zobrazí čtyři nabídky, **File** (Soubor), **Edit** (Upravit), **Format** (Formát) a **Security** (Zabezpečení). Nabídka File (Soubor) slouží k vytvoření nového (prázdného) okna **Edit Samples** (Upravit vzorky), k otevření existující šablony vzorků nebo k uložení názvů vzorků ve formě šablony pro pozdější použití. Tyto soubory šablon mají příponu *.smp. V nabídce **Edit** (Upravit) je možné kopírovat a vkládat řádky. Nabídka Security (Zabezpečení) umožňuje uzamknout definice vzorků.

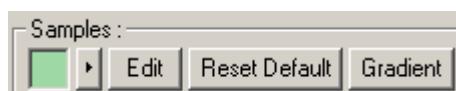
Poznámka: Budou-li názvy vzorků zadávány během zpracování příliš rychle (např. pomocí čtečky čárových kódů), může to vést k překrývání písmen v názvech vzorků. Doporučuje se proto čtečku čárových kódů nepoužívat a je-li to možné, zadat názvy vzorků po dokončení zpracování.



Tato rozevírací nabídka slouží k výběru vhodného formátu pro zobrazení koncentrace. Koncentrace se automaticky formátují podle aktuálně zvoleného umístění.

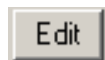


V této rozevírací nabídce se nastavují jednotky měření pro danou analýzu.



Tlačítko	Význam
----------	--------

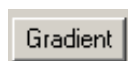
Styl čáry: Změnou stylu čáry je možné zlepšit čitelnost grafů na černobílých tiskárnách. Některé čáry je možné změnou jejich stylu zvýraznit. Chcete-li tuto funkci použít, klikněte na tlačítko se šipkou doprava vedle tlačítka **Edit** (Upravit).



Po stisknutí tlačítka „**Edit**“ (Upravit) se otevře volič barev. Při přiřazování barev zkumavkám lze vybrat několik řádků.



Kliknutím na tlačítko „**Reset Default**“ (Obnovit výchozí) se obnoví výchozí hodnoty barev všech vybraných barevných buněk.



Tlačítko „**Gradient**“ umožňuje vybrat gradient od první do poslední vybrané barvy. V nastavení vzorku lze definovat několik gradientů.



Ikona **New** (Nový) vymaže okno **Edit Samples** (Upravit vzorky) při přípravě pro zadání dat.



Kliknutím na ikonu **Open** (Otevřít) se otevře dialogové okno, v němž lze vybrat soubor Rotor-Gene Q MDx pro import.

Poznámka: Počet vzorků v okně Open (Otevřít) a v importovaném souboru musí být stejný.



Stisknutím ikony **Save** (Uložit) se otevře dialogové okno, v němž lze zadat název a složku, do které bude uložena kopie aktuálních definic vzorků.



Ikonou **Copy** (Kopírovat) se kopírují vybrané buňky.



Ikonou **Paste** (Vložit) se vloží buňky, které byly vybrány příkazem ke kopírování do aktuálně zvolené pozice v mřížce.



Ikonou aplikace **Excel** se otevře dialogové okno s výzvou k zadání názvu souboru a složky, do které se mají uložit informace o vzorku. Po stisknutí tlačítka **Save** (Uložit) se automaticky otevře soubor aplikace Excel.



Ikona **Append/Overwrite** (Připojit/Přepsat) změní editaci buněk v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky). Bude-li zvolena možnost přepsání, při úpravách budou stávající data přepsána. Bude-li zvolena možnost připojení, na konec stávajících dat budou při úpravách doplněna nová data.

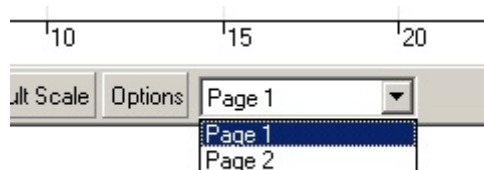
Typy vzorků: Pro vzorky lze definovat jeden z několika typů uvedených v následující tabulce.

Typ vzorku	Popis
None (Žádný)	V dané pozici není žádný vzorek
NTC	Beztemplátová kontrola
Negative Control (Negativní kontrola)	Negativní kontrola
Positive Control (Pozitivní kontrola)	Pozitivní kontrola
Unknown (Neznámý)	Má být analyzován neznámý vzorek
Standard	Ke konstrukci standardní křivky pro výpočet koncentrací neznámého vzorku se použijí standardní hodnoty
Calibrator (RQ) (Kalibrátor (RQ))	Kalibrátoru se přiřadí hodnota 1 a koncentrace všech ostatních vzorků se vypočítají ve vztahu k tomuto vzorku

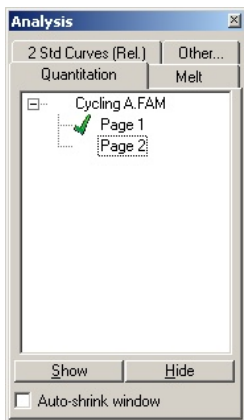
Page (Strana):

Tato funkce uživateli umožňuje mít různé definice vzorků a také oddělené experimenty v témže zpracování. To je užitečné pro analýzu různých produktů v různých kanálech. Pomocí šipek můžete přecházet mezi stranami se vzorky. Pomocí tlačítek **New** (Nová) a **Delete** (Odstranit) můžete vytvořit nové strany nebo odstranit stávající. Můžete mít několik definic vzorku pro stejný kanál, abyste mohli vytvořit několik standardních křivek bez multiplexování. Prostě definujte požadované vzorky a jejich standardní křivky na samostatných stranách. Jeden kanál pak lze analyzovat s každou sadou definic nezávisle. Strany se vzorky je možno označit **Page 1** (Strana 1), **Page 2** (Strana 2) atd., nebo je lze libovolně pojmenovat (např. „Housekeeper“). Tento název se objeví v protokolech.

Při prohlížení nezpracovaných dat je možné vybrat definice vzorků použité pro zobrazení dat v rozevírací nabídce vedle tlačítka **Options** (Možnosti):



Stranu se vzorky, která se má použít při provádění analýzy, lze vybrat v okně **Analysis** (Analýza) (viz část 6.6.1).



Given Conc. (Uvedená konc.):

Udává koncentraci jednotlivých standardů. Jednotky lze definovat jako desetinné číslo nebo logaritmus. Pokud standardy tvoří řadu ředění, stačí napsat jen první 2 standardy. Po stisknutí klávesy ENTER program automaticky do řady přidá další logické ředění.

Styl čáry:

Změnou stylu čáry je možné zlepšit čitelnost grafů na černobílých tiskárnách. Některé čáry je možné změnou jejich stylu zvýraznit. Chcete-li tuto funkci použít, klikněte na tlačítko se šipkou doprava vedle tlačítka **Edit** (Upravit).



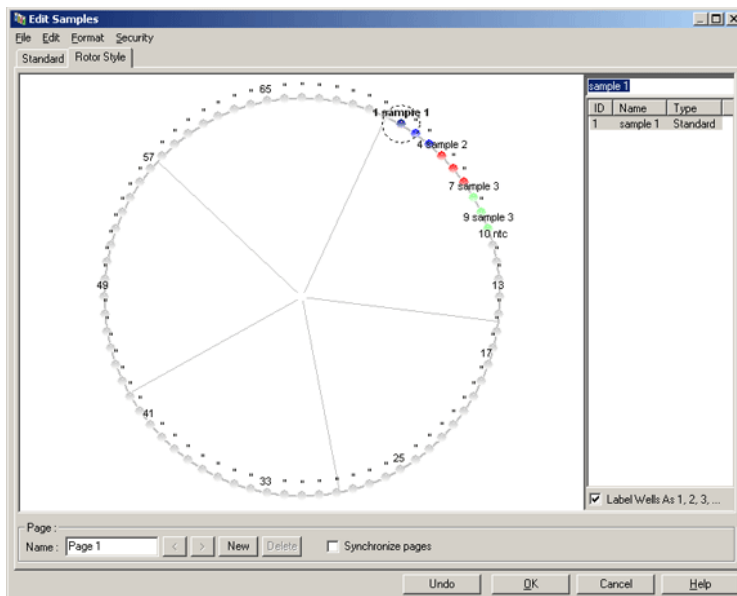
Na panelu nástrojů se zobrazí výchozí styl **Solid** (Plná). Styl čáry lze změnit na **Dashed** (Čárkovaná), **Dotted** (Tečkovaná), **Hairline** (Vlasová), **Thin** (Tenká) nebo **Thick** (Tlustá). Nakonec klikněte na tlačítko s levou šipkou a vraťte se k zobrazení tlačítek Edit (Upravit), Reset Default (Obnovit výchozí) a Gradient.



- Zadání několika řádků: Je-li třeba zadat stejnou informaci do několika řádků najednou, vyberte všechny řádky a začněte psát. Informace se zadají do každého řádku. Stejně to funguje při výběru typů vzorků, výběru barev nebo zadávání koncentrací.
- Klávesová zkratka typu vzorku: Chcete-li rychle vybrat určitý typ vzorku, zadejte první písmeno jeho názvu. Chcete-li například nastavit 5 vzorků na beztemplátové kontroly, vyberte je ve sloupci pro typ vzorku, pak stiskněte N jako NTC. Všechny vzorky se změní na NTC.
- Uložení, opakované použití: Úplný popis vzorku lze uložit jako soubor vzorku (*.smp) a načíst do budoucích zpracování se stejnou konfigurací vzorku.

Styl rotoru

Tato karta v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky) poskytuje alternativní způsob zadávání názvů vzorků. Vyberte replikáty kliknutím ukazatelem myši a tažením po obrázku rotoru. Seznam na pravé straně okna se aktualizuje. Můžete do něj napsat název vzorku a tím se nastaví stejný název pro aktuální výběr. Software tyto jamky rozezná jako replikáty.

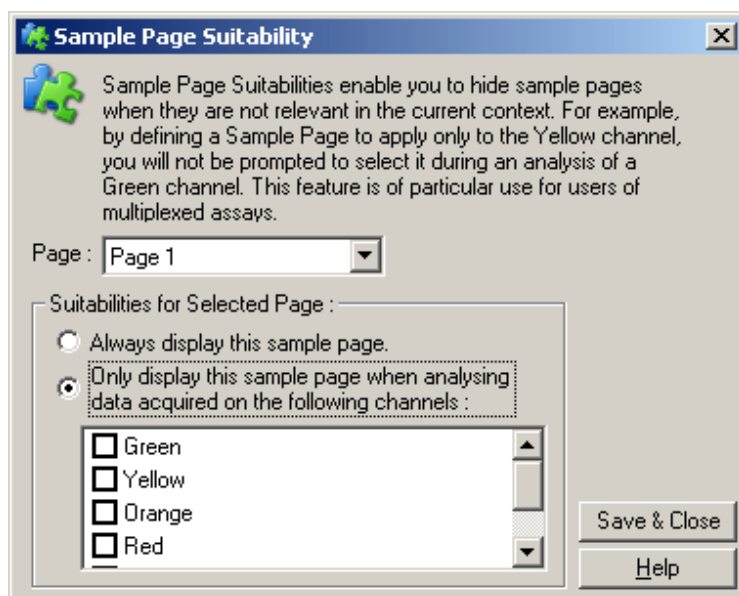


Na kartě **Rotor Style** (Styl rotoru) je zkrácená verze karty **Standard** určené uživatelům, kteří chtějí rychle nastavit názvy vzorků a barvy. Některá nastavení na této kartě nelze definovat, například to, zda vzorek představuje standard nebo známou koncentraci jednotlivých standardů. Potřebujete-li je definovat, použijte standardní kartu.

Vhodnost strany se vzorky

Chcete-li otevřít okno **Sample Page Suitability** (Vhodnost strany se vzorky), klikněte na okno **More Options** (Další možnosti) v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky) a pak klikněte na tlačítko **Define Suitabilities** (Definovat vhodnost). Okno **Sample Page Suitability** (Vhodnost strany se vzorky) uživatelům umožňuje přiřadit strany se vzorky ke kanálům. Například strana se vzorky se zkoumaným genem může platit pro zelený kanál a strana se vzorky s housekeeper genem může platit pro žlutý kanál. V tomto příkladu nastavení vhodnosti strany se vzorky snižuje počet dostupných možností analýzy tak, aby zahrnovaly jen ty, jež jsou pro konkrétní analýzu relevantní.

Okno **Sample Page Suitability** (Vhodnost strany se vzorky) je na obrázku níže.

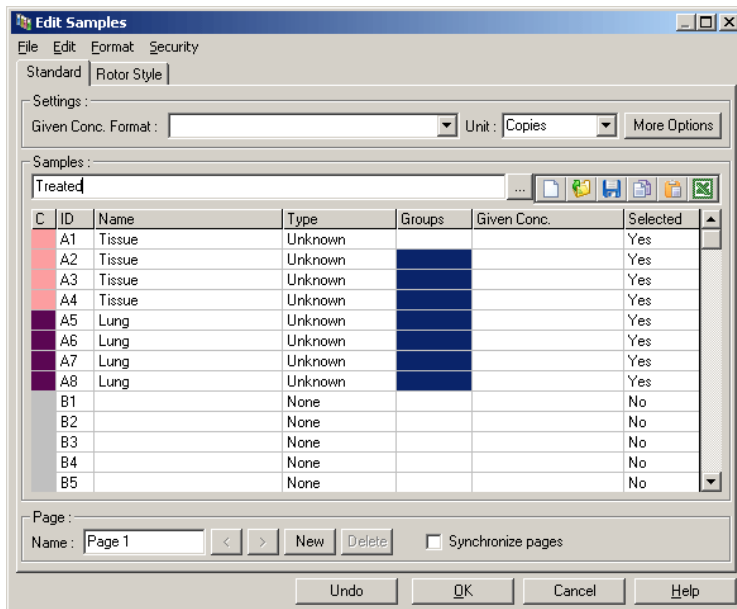


Poznámka: Při nastavení analýzy vytvořte všechny strany se vzorky a vhodnost stran se vzorky a pak je uložte jako šablonu. Bude tak méně práce s přípravou jednotlivých zpracování.

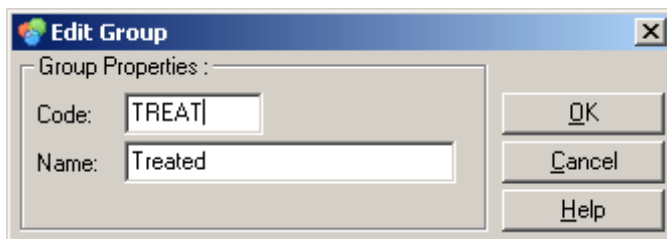
Skupiny

Skupiny vzorků umožňují výpočet statistických údajů pro volitelnou sbírku vzorků. Na rozdíl od replikátů, které musí mít totožné názvy, mohou mít vzorky libovolné názvy, mohou být v rotoru umístěny kdekoli a mohou patřit do několika skupin.

1. Chcete-li definovat skupinu, vedle vzorku napište celý název skupiny a stiskněte klávesu ENTER.



2. Objeví se okno **Edit Group** (Upravit skupinu).

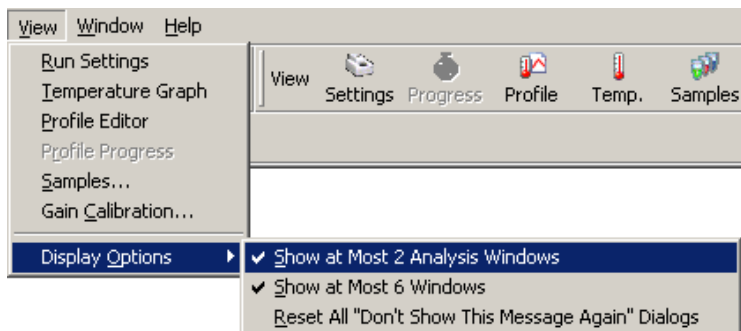


3. Definujte vhodnou zkratku, pak klikněte na tlačítko **OK**. Zkratku lze nyní použít pro nastavení skupin. Pro skupiny v libovolné analýze se automaticky vypočítají souhrnné výsledky, například průměrná hodnota a 95% intervaly spolehlivosti.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.82				18.75	0.17	[18.48, 19.02]	
A2	Tissue	Unknown	18.75							
A3	Tissue	Unknown	18.92							
A4	Tissue	Unknown	18.52							
A5	Lung	Unknown	18.73				18.70	0.09	[18.55, 18.85]	
A6	Lung	Unknown	18.62							
A7	Lung	Unknown	18.81							
A8	Lung	Unknown	18.63							
A1-A8	Treated	Group					18.72	0.13	[18.62, 18.83]	

6.8.5 Možnosti zobrazení

Nabídka možností zobrazení je na obrázku níže.



Show at Most 2 Analysis Windows
(Zobrazit max. 2 okna analýzy):

Je-li tato možnost zaškrtnuta, najednou se zobrazí maximálně 2 okna s analýzou. Několik otevřených oken může ovlivnit přehlednost. Po zaškrtnutí této možnosti se zavře okno první analýzy a nahradí se naposledy otevřeným oknem. Není-li tato možnost zaškrtnuta, lze zobrazit více než 2 okna s analýzou.

Show at Most 6 Windows
(Zobrazit max. 6 oken):

Software při otevření nových oken pro větší přehlednost odstraní nepoužívaná okna. Tato možnost je ve výchozím nastavení povolena, protože ponechává obrazovku softwaru Rotor-Gene Q volnou. Je-li nutné vidět více než 6 oken najednou, zrušte zaškrtnutí této možnosti.

Reset All "Don't Show This Message Again" Dialogs
(Resetovat všechny dialogy „Tuto zprávu již nezobrazovat“):

Po zaškrtnutí této možnosti software znovu zobrazí všechna dialogová okna, u nichž bylo zaškrtnuto políčko **Do not display this message again** (Tuto zprávu již nezobrazovat). Patří k nim zprávy o podezřelém nastavení, které mohly být dříve nastaveny tak, aby se příště nezobrazovaly. Může to být užitečné pro nového uživatele, který není obeznámen s přístrojem Rotor-Gene Q MDx nebo softwarem Rotor-Gene Q.

6.9 Ochrana přístupu k softwaru Rotor-Gene Q

Poznámka: V této kapitole je popsána ochrana přístupu k softwaru Rotor-Gene Q. Informace o relevantním softwaru Rotor-Gene AssayManager naleznete v dokumentech *Uživatelská příručka Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* nebo *Uživatelská příručka Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Software Rotor-Gene Q obsahuje funkce, které zajišťují jeho bezpečné fungování. Je-li software Rotor-Gene Q správně nakonfigurován, může zajišťovat:

- omezení přístupu k přístroji Rotor-Gene Q MDx nebo softwaru pro analýzu na určité skupiny uživatelů,
- protokolování změn v souborech zpracování,
- detekci neoprávněných změn (signatur),
- protokolování šablon pro provádění zpracování,

- ochranu názvů vzorků.

Integrace se zabezpečením systému Windows

Software Rotor-Gene Q za účelem zajištění vysoké úrovně odpovědnosti nespravuje zabezpečení interně. Účty, skupiny a hesla jsou spravovány pomocí integrovaného modelu zabezpečení v rámci systému Windows (Windows Security). Integrace umožňuje mít stejné heslo pro přístup k síťovým souborům a programům pro řízení přístupu k softwaru Rotor-Gene Q, což snižuje pracnost správy. Ve větších organizacích mohou správci sítí snadno odebrat přístup bývalým uživatelům díky centralizovanému modelu zabezpečení.

Bezpečné nastavení softwaru Rotor-Gene Q proto v první řadě zahrnuje konfiguraci rolí zabezpečení systému Windows podle osvědčených postupů.

Předpoklady

Pro správné zabezpečení je nutné mít systém Windows 10 nebo Windows 7 Professional. Funkce zabezpečení nelze používat se systémem Windows 10 nebo Windows 7 Home, protože edice Home nemají propracovaný model správy přístupu, který používá software. Software musí být nainstalován s možností **Force authentication through Windows domain** (Vynutit ověřování prostřednictvím domény systému Windows).

Poznámka: Nabídka Security (Zabezpečení) se nezobrazí, budete-li přihlášení k doméně Linux Samba. Abyste mohli používat funkce zabezpečení, musíte mít buďto místní přihlášení, nebo server Windows.

6.9.1 Konfigurace pro systém Windows 7

Tato část popisuje, jak nastavit systém pro bezpečné fungování softwaru Rotor-Gene Q.

Aby bylo možné používat funkce zabezpečení, software musí být nainstalován s možností **Force authentication through Windows domain** (Vynutit ověřování prostřednictvím domény systému Windows). Dotáže se na doménu Windows pro úroveň vašeho přístupu a přihlašovací údaje a je nezbytná z důvodů odpovědnosti a zabezpečení.

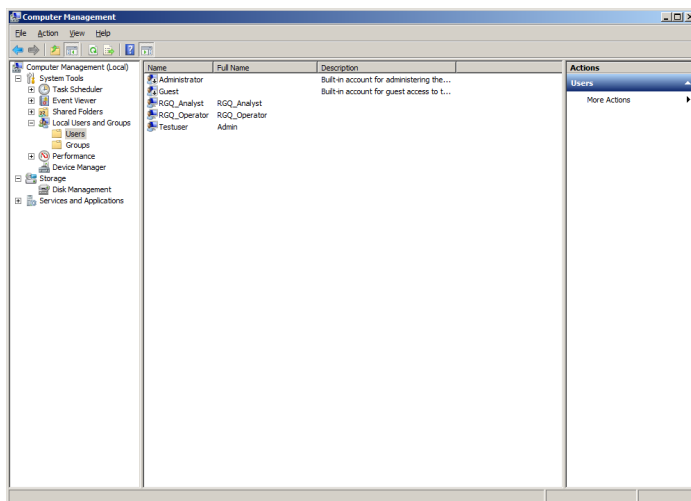
Spuštění v roli správce

Mnoho uživatelů spouští svůj počítač v roli správce, ale bez hesla. Je to sice pohodlné, ale nelze určit, kdo zrovna počítač používá. Je vyloučena odpovědnost a není možné aktivovat řadu funkcí zabezpečení softwaru Rotor-Gene Q. V případě spuštění v roli správce jsou aktivní všechny funkce softwaru. Spuštění softwaru v roli správce proto zajistí, že uživatelé, kteří nepotřebují funkce zabezpečení, budou mít přístup ke všem jeho funkcím.

Vytvoření nového uživatelského účtu

Pro každého uživatele softwaru vytvořte uživatelský účet. U každého uživatele provádějte níže uvedený postup, dokud nebudou vytvořeny všechny účty.

1. Chcete-li vytvořit nového uživatele, zvolte možnost **Start/Control Panel/Administrative Tools/Computer Management (Start/Ovládací panely/Nástroje pro správu/Správa počítače)** a vlevo přejděte k položce **Local Users and Groups (Místní uživatelé a skupiny)**.
2. Zobrazí se okno, v němž vyberte složku **Users**. Pravým tlačítkem klikněte na okno vpravo a vyberte možnost **New User (Nový uživatel)**.



3. Zadejte uživatelské jméno a heslo. Ve výchozím nastavení bude vytvořen uživatel s běžnými přístupovými oprávněními. Znamená to, že může spustit software, ale nesmí instalovat nové programy nebo změnit nastavení systému.

The image shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: (masked with dots)
- Confirm password: (masked with dots)
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Help, Create, Close

4. Klikněte na tlačítko **Create** (Vytvořit). Nyní se můžete přihlásit jako tento uživatel.

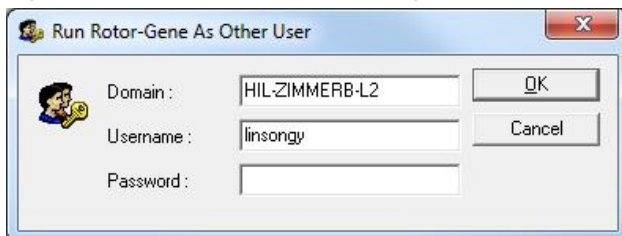
Přiřazování rolí uživatelům

Každému uživateli nyní přiřadíte roli. Přístup je rozdělen na tyto oblasti:

- operátor softwaru Rotor-Gene Q – smí provádět zpracování, ale nesmí generovat protokoly nebo provádět analýzy,
- analytik softwaru Rotor-Gene Q – smí analyzovat data zpracování a generovat protokoly, ale nesmí provádět nová zpracování,
- operátor a analytik softwaru Rotor-Gene Q – má možnosti obou rolí,
- správce – smí odemknout názvy vzorků a provádět všechny operace analytiků a operátorů,
- žádná – přístup k softwaru je zamítnut.

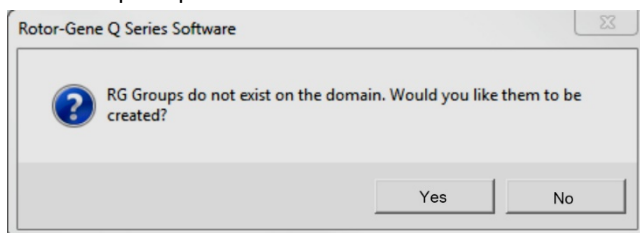
Přiřazení rolí:

1. Přihlaste se do systému Windows jako správce, nebo stisknutím ikony **Rotor-Gene Q Software Login** (Přihlášení k softwaru Rotor-Gene Q) otevřete software a přihlaste se.

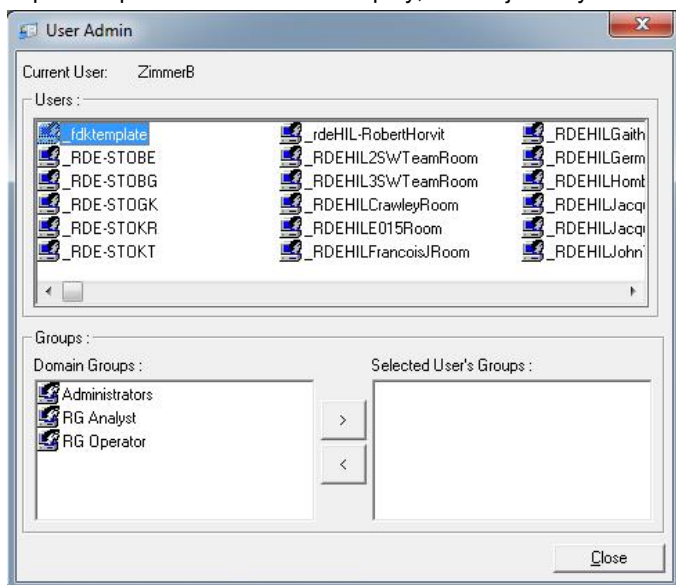


Poznámka: Chcete-li vytvořit v softwaru Rotor-Gene Q skupiny RG, musíte jej spustit s právy správce. Provádí se to kliknutím pravým tlačítkem myši na ikonu plochy a výběrem možnosti **Run as administrator** (Spustit jako správce) v kontextové nabídce.

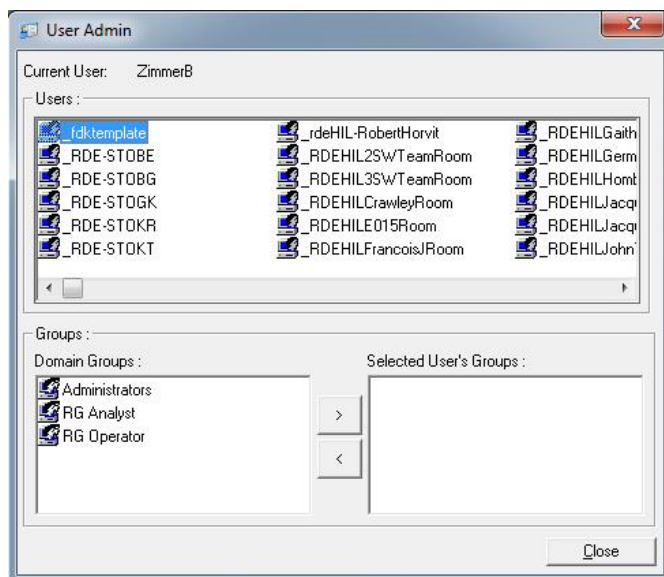
2. Po otevření softwaru klikněte na nabídku **Security** (Zabezpečení). Při prvním otevření nabídky **Security** (Zabezpečení) software Rotor-Gene Q nakonfiguruje počet systémových skupin, které budou řídit přístup k softwaru.



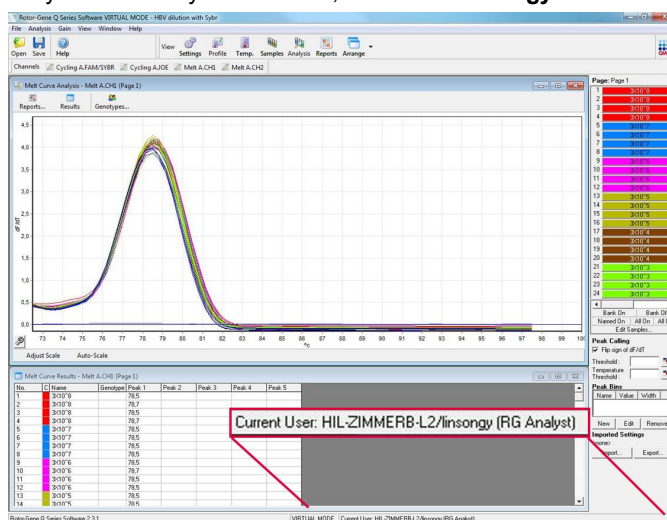
3. Klikněte na tlačítko **Yes** (Ano). Zobrazí se okno **User Admin** (Správce uživatelů). V horním podokně se zobrazí všichni uživatelé počítače. Některé účty používá systém, a proto budou neznámé. Ve spodním podokně se zobrazí skupiny, k nimž je určitý uživatel přiřazen.



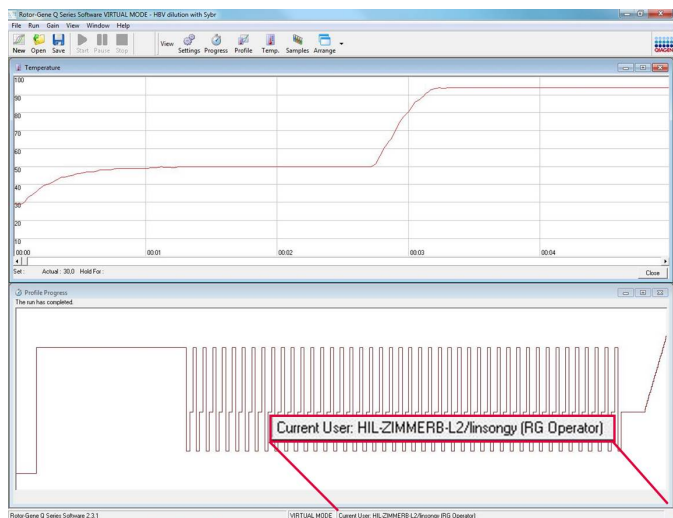
- Chcete-li uživatele přiřadit ke skupině, v seznamu vyberte jméno uživatele. Spodní podokno se aktualizuje. Pokud uživatel není v žádné skupině, nebude moci software spustit.
- V níže uvedeném příkladu přiřadíme uživatele **linsongy** ke skupině RG Analyst výběrem skupiny vlevo a pak kliknutím na tlačítko >. Skupiny lze odebrat tak, že je vyberete a pak kliknete na tlačítko <.



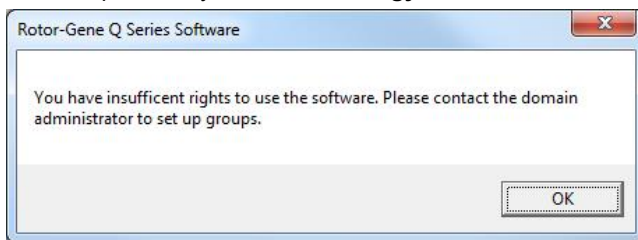
- Nyní se přihlaste jako tento uživatel. V roli RG Analyst budou nabídky **Run** (Zpracování) a tlačítko **Profile** (Profil) nedostupné. Je však možné otevřít a analyzovat existující soubory, jak je vidět ve snímku obrazovky dole. Stavový řádek udává, že uživatel **linsongy** má roli RG Analyst.



- Když se znovu přihlásíte jako správce, uživateli **linsongy** budou přiřazena práva RG Operator a práva RG Analyst je možné znovu odebrat. Pak je nutné software znovu spustit. Tentokrát budou chybět nabídky **Analysis** (Analýza) a tlačítko **Reports** (Protokoly) a nabídka Run (Zpracování) bude aktivní. Stavový řádek udává, že uživatel **linsongy** patří do skupiny RG Operator.



8. Když se přihlásíte jako správce a odeberete uživateli **linsongy** všechny skupiny, pak se zobrazí níže uvedená zpráva, když uživatel **linsongy** otevře software.



6.9.2 Konfigurace pro systém Windows 10

Tato část popisuje, jak nastavit systém pro bezpečné fungování softwaru Rotor-Gene Q.

Aby bylo možné používat funkce zabezpečení, software musí být nainstalován s možností **Force authentication through Windows domain** (Vynutit ověřování prostřednictvím domény systému Windows). Dotáže se na doménu Windows pro úroveň vašeho přístupu a přihlašovací údaje a je nezbytná z důvodů odpovědnosti a zabezpečení.

Spuštění v roli správce

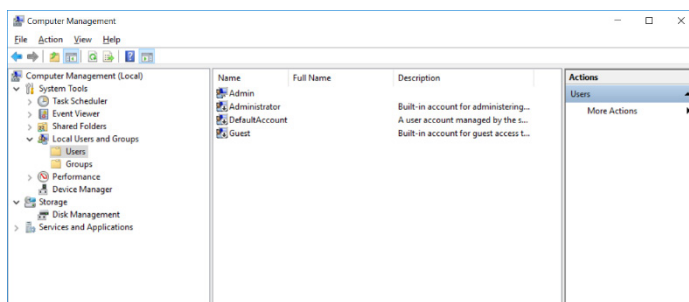
Mnoho uživatelů spouští svůj počítač v roli správce, ale bez hesla. Je to sice pohodlné, ale nelze určit, kdo zrovna počítač používá. Je vyloučena odpovědnost a není možné aktivovat řadu funkcí zabezpečení softwaru Rotor-Gene Q.

V případě spuštění v roli správce jsou aktivní všechny funkce softwaru. Spuštění softwaru v roli správce proto zajistí, že uživatelé, kteří nepotřebují funkce zabezpečení, budou mít přístup ke všem jeho funkcím.

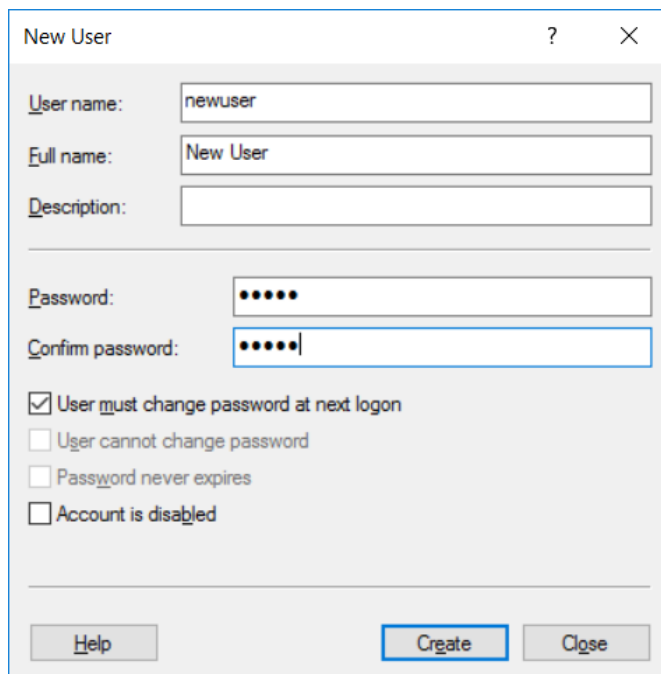
Vytvoření nového uživatelského účtu

Pro každého uživatele softwaru vytvořte uživatelský účet. U každého uživatele provádějte níže uvedený postup, dokud nebudou vytvořeny všechny účty.

1. Chcete-li vytvořit nového uživatele, zvolte možnost **Start**, zadejte **Computer Management** (Správa počítače), stiskněte klávesu **Enter** a vlevo přejděte k položce **Local Users and Groups** (Místní uživatelé a skupiny).
2. Zobrazí se okno, v němž vyberte složku **Users**. Pravým tlačítkem klikněte na okno vpravo a vyberte možnost **New User...** (Nový uživatel...).



3. Zadejte uživatelské jméno a heslo. Ve výchozím nastavení budou vytvořeni uživatelé s běžnými přístupovými oprávněními. Znamená to, že může spustit software, ale nesmí instalovat nové programy nebo změnit nastavení systému.

The image shows a screenshot of the 'New User' dialog box. It contains the following fields and options: 'User name:' with the value 'newuser'; 'Full name:' with the value 'New User'; 'Description:' (empty); 'Password:' (masked with dots); 'Confirm password:' (masked with dots); a checked checkbox for 'User must change password at next logon'; and three unchecked checkboxes for 'User cannot change password', 'Password never expires', and 'Account is disabled'. At the bottom, there are 'Help', 'Create', and 'Close' buttons.

4. Klikněte na tlačítko **Create** (Vytvořit). Nyní se můžete přihlásit jako tento uživatel.

Přiřazování rolí uživatelům

Každému uživateli nyní přiřadte roli. Přístup je rozdělen na tyto oblasti:

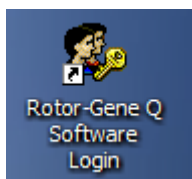
- operátor softwaru Rotor-Gene Q – smí provádět zpracování, ale nesmí generovat protokoly nebo provádět analýzy,
- analytik softwaru Rotor-Gene Q – smí analyzovat data zpracování a generovat protokoly, ale nesmí provádět nová zpracování,
- operátor a analytik softwaru Rotor-Gene Q – má možnosti obou rolí,
- správce – smí odemknout názvy vzorků a provádět všechny operace analytiků a operátorů,
- žádná – přístup k softwaru je zamítnut.

Poznámka: V systému Microsoft Windows 10 nelze pro software Rotor-Gene Q tvořit uživatelské skupiny. Skupiny musí vytvořit v doméně správce domény a taktéž přiřadit uživatele ke konkrétní skupině. Nabídka Run (Zpracování) je aktivní. Stavový řádek udává, že uživatel **linsongy** patří do skupiny RG Operator.

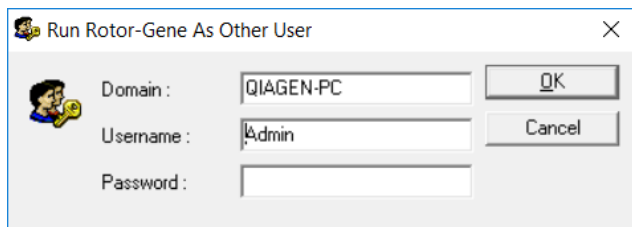
6.9.3 Spuštění několika uživatelů ve stejném počítači

Chcete-li používat software Rotor-Gene Q s několika uživateli, vytvořte uživatelský účet, který nemá přístup k softwaru Rotor-Gene Q. Přihlaste se k systému Windows pod tímto účtem, aby uživatelé nemohli software Rotor-Gene Q MDx otvírat anonymně.

1. Uživatelé budou moci stisknutím ikony **Rotor-Gene Q Software Login** (Přihlášení k softwaru Rotor-Gene Q) software Rotor-Gene Q otevřít.



2. Zobrazí se okno, do kterého zadejte uživatelské jméno a heslo (povinně).



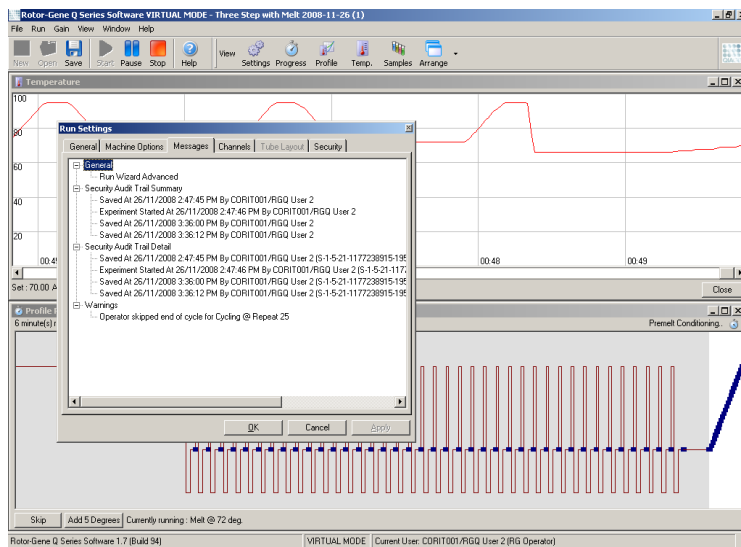
3. Doména je buďto počítač, ke kterému se přihlašujete, nebo název vaší místní sítě společně s názvem hostitele. Pokud si nejste jistí, kterou doménu do tohoto pole zadat, zeptejte se správce sítě.

Poznámka: Po přihlášení bude mít tento uživatel k dispozici všechny uživatelské soubory. Každý uživatel může ukládat soubory na své vlastní místo. Je tak zajištěna vysoká úroveň zabezpečení.

Poznámka: Každý uživatel by se měl po dokončení svého zpracování odhlásit, aby jiní uživatelé nemohli provést zpracování jeho jménem.

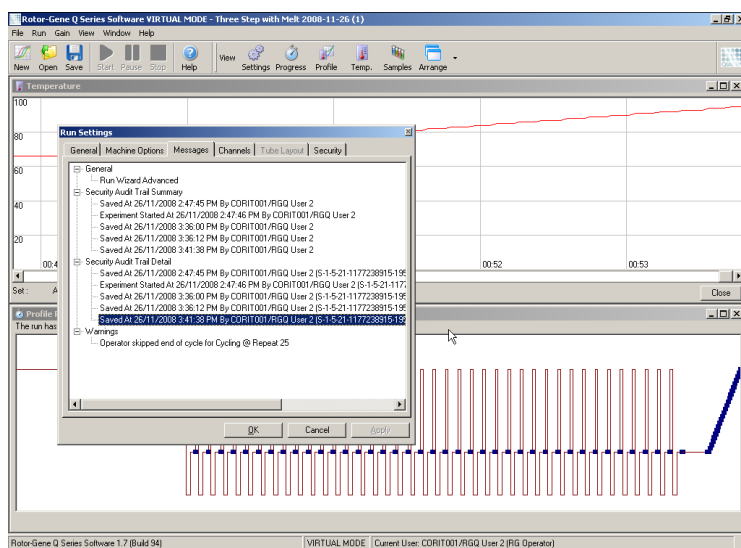
6.9.4 Auditové stopy

Pokaždé, když uživatel uloží soubor, se údaje o něm zaznamenají v okně **Run Settings** (Nastavení zpracování) na kartě **Messages** (Zprávy) jako Security Audit Trail Summary (Souhrnná auditová stopa zabezpečení) a Security Audit Trail Detail (Podrobná auditová stopa zabezpečení).



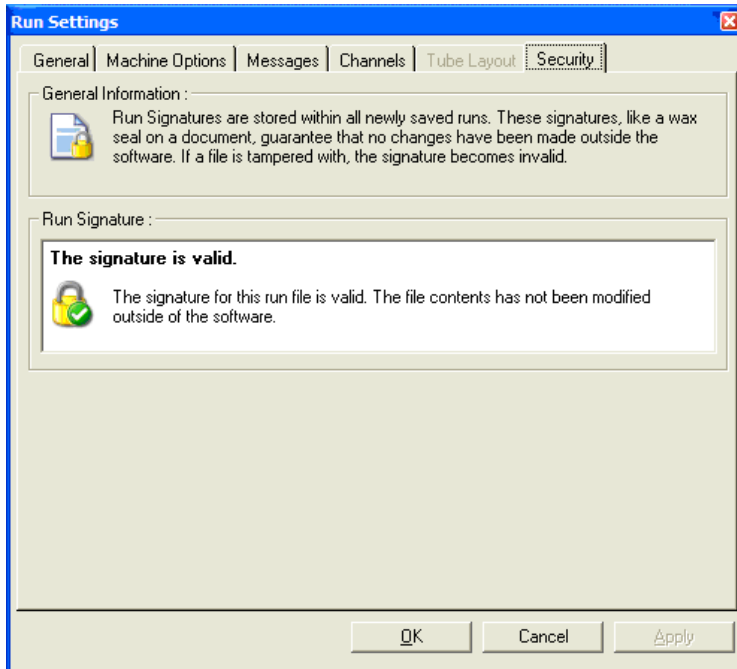
Ty slouží ke sledování, kdo pozměnil obsah souboru. Security Audit Trail Detail (Podrobná auditová stopa zabezpečení) obsahuje více podrobností, například jedinečný identifikátor uživatele. Tento identifikátor je důležitý proto, aby uživatel nemohl v jiném počítači vytvořit účet se stejným názvem a vydávat se za dalšího uživatele. V takovém případě budou uživatelská jména stejná, ale identifikační čísla účtu se budou lišit.

V podrobnostech je zobrazen identifikátor pro účet CORIT001/RGQ User 2, S-1-5-21-1177238915-195.

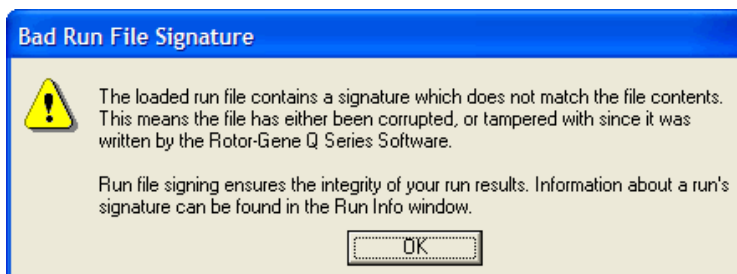


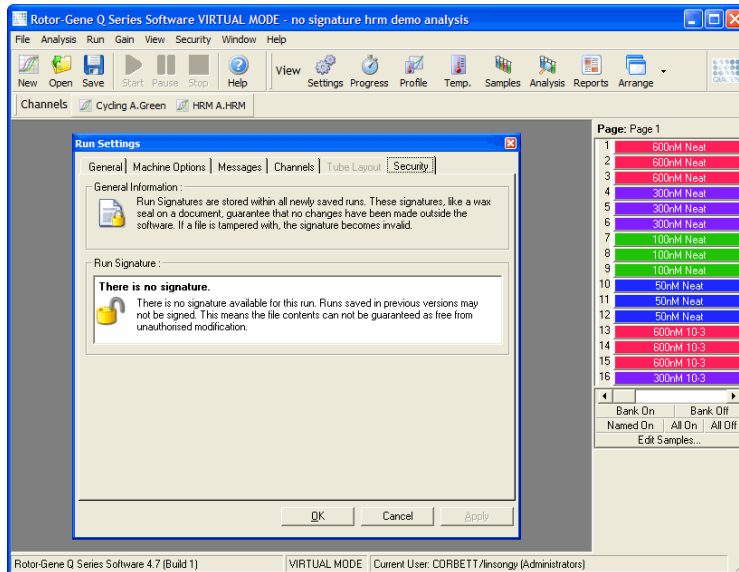
6.9.5 Signatury zpracování

Auditová stopa se ukládá do souboru zpracování softwaru Rotor-Gene Q. Aby nedošlo k nechtěné změně těchto souborů, musí být uchovávány na bezpečném místě přístupném jen osobám s určeným účtem v systému Windows. Ale i tehdy, když jsou soubory ve sdíleném prostoru, signatury zpracování poskytují vyšší úroveň zabezpečení. Na snímku obrazovky je karta **Security** (Zabezpečení) v nabídce Run Settings (Nastavení zpracování) pro soubor s funkcí Run Signature (Signatura zpracování).



Run Signature (Signatura zpracování) je dlouhý výraz, který se vygeneruje při každém uložení souboru a propojí se s jeho obsahem. Například signatura pro tento soubor je **517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081**. Je-li soubor otevřen v nástroji Notepad a zde upraven (např. datum zpracování je posunuto o 3 dny zpět), po opětovném otevření souboru se objeví níže uvedená zpráva.





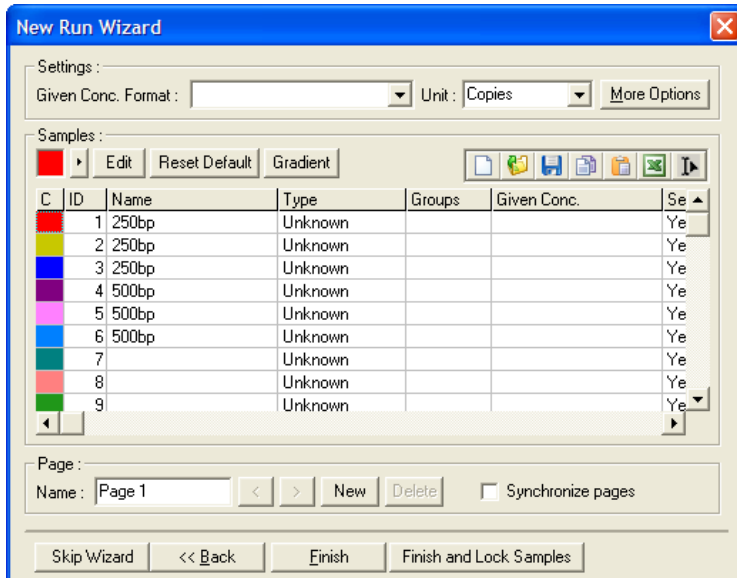
Poznámka: Jsou-li soubory odesílány e-mailem, šifrování může signaturu zneplatnit. Aby k tomu nedošlo, soubor před odesláním e-mailem zazipujte.

6.9.6 Uzamknutí vzorků

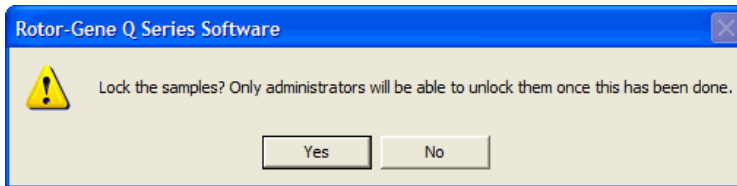
Je důležité zajistit, aby názvy vzorků nebyly poté, co uživatel spustí zpracování, omylem nebo úmyslně změněny. Software Rotor-Gene Q proto poskytuje možnost uzamknutí vzorků. Názvy vzorků může zamknout kterýkoli uživatel, ale odemknout je může jen správce. Pro uživatele, kteří spustí počítač v režimu správce, má tato možnost omezenou hodnotu. Aby bylo možné tuto možnost využít, počítač musí mít nakonfigurováno zabezpečení, jak je popsáno v předchozích částech.

Poznámka: Chcete-li uzamknout vzorky, nespouštějte software jako správce. Vytvořte účet se skupinami RG Operator a RG Analyst a heslo správce držte v tajnosti. Uživatelé pak budou od správce potřebovat oprávnění k odemknutí souborů.

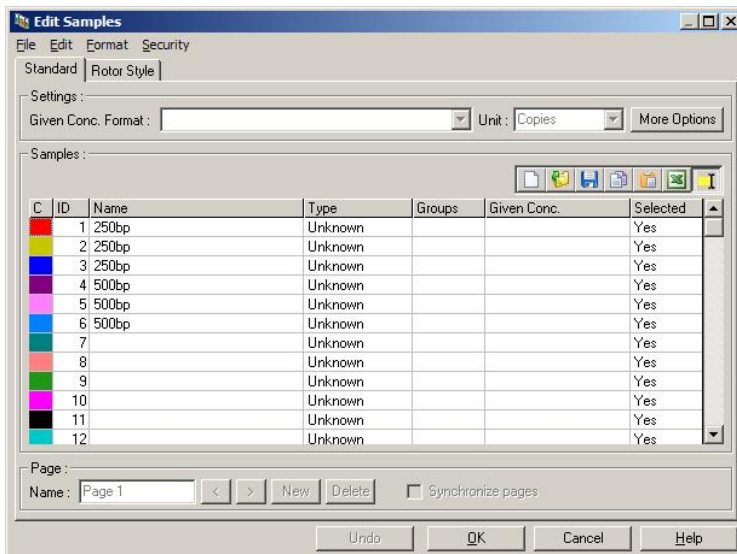
Vzorky je možné zamknout před spuštěním zpracování při použití průvodce Advanced (Rozšířené možnosti) kliknutím na tlačítko **Finish and Lock Samples** (Dokončit a zamknout vzorky).



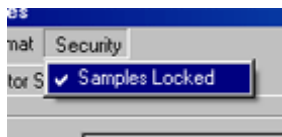
Zobrazí se následující varování. Potvrďte stisknutím tlačítka **Yes** (Ano).



Vzorky po jejich zamknutí již nebude možné upravovat v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky).



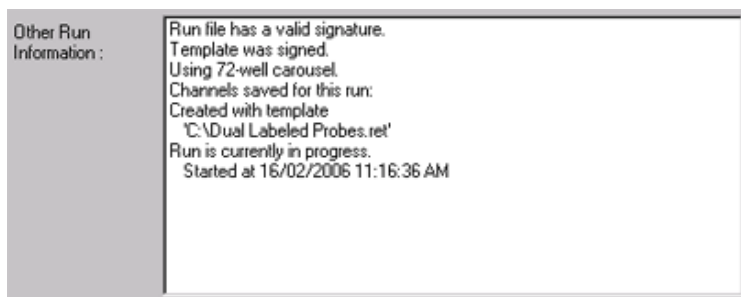
Vzorky je také možné zamknout a odemknout v okně **Edit Samples** (Upravit vzorky). Zamknuté vzorky však smí odemknout pouze správce.



Každá neoprávněná změna souboru zneplatní jeho signaturu zpracování.

6.9.7 Zamknuté šablony

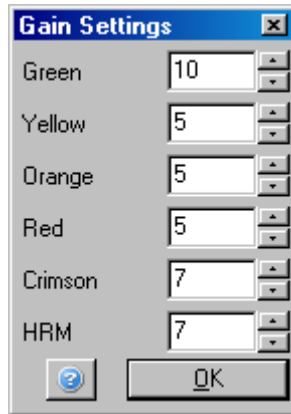
Uživatel v současné době nemá možnost pomocí softwaru Rotor-Gene Q tvořit soubory šablon jen pro čtení. Je-li potřeba, lze zadat jako požadavek, aby všechna zpracování byla prováděna pomocí určitého souboru šablony. Aby byl zajištěn přístup k této šabloně jen pro čtení, měla by být uložena na síťové jednotce, kde uživatelé nemohou změnit data. Uživatelé budou moci spouštět a upravovat své vlastní profily, kdežto šablona na síťové jednotce bude chráněná. Aby bylo možné sledovat, která šablona byla použita, software Rotor-Gene Q uloží název spuštěného souboru šablony. K těmto informacím lze získat přístup kliknutím na tlačítko **Settings** (Nastavení), které pak umožní zobrazení okna **Run Settings** (Nastavení zpracování). Informace o šabloně jsou uloženy pod položkou **Other Run Information** (Další informace o zpracování).



6.10 Nabídka Zesílení

Kliknutím na nabídku **Gain** (Zesílení) zobrazíte ono **Gain Settings** (Nastavení zesílení) pro aktuální zpracování. Zde se nastavuje zesílení v určitém kanále před zpracováním. Nastavení zesílení je zachováno z posledního zpracování. Lze je změnit, pokud ještě zpracování nezačalo, nebo během prvních cyklů. Údaje v políčkách můžete měnit šipkami nahoru/dolů vedle textových polí. Pak klikněte na tlačítko **OK**.

Zesílení je možné změnit během počátečních cyklů. V příslušném kanálu se zobrazí červená čára zobrazující, kde bylo zesílení změněno. Cykly před změnou zesílení budou z analýzy vyloučeny.



6.11 Nabídka Okno

V této nabídce můžete nastavit uspořádání oken svisle nebo vodorovně, případně kaskádovitě. Další možnosti jsou dostupné kliknutím na šipku po pravé straně tlačítka **Arrange** (Uspořádat).

6.12 Funkce nápovědy

Po stisknutí tlačítka **Help** (Nápověda) nebo nabídky Help (Nápověda) se otevře následující rozevírací nabídka.

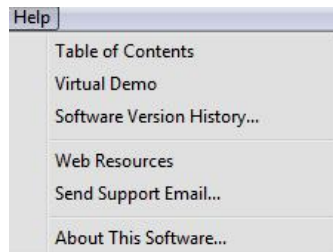


Table of Contents (Obsah):	Přístup k funkci Help (Nápověda).
Virtual Demo (Virtuální ukázka):	Odkaz na webovou stránku společnosti QIAGEN s interaktivní ukázkou softwaru.
Software Version History... (Historie verzí softwaru...):	Zobrazí se stručný přehled nových funkcí přidanych od předchozí nainstalované verze softwaru.
Web Resources (Webové prostředky):	Otevře se webová stránka společnosti QIAGEN v novém okně prohlížeče s cennými nejnovějšími informacemi o přístrojích Rotor-Gene Q MDx a odpovídajících reagentech.
About This Software... (O tomto softwaru...):	Udává informace o připojeném přístroji, sériovém čísle přístroje Rotor-Gene Q MDx a verzi softwaru.

6.12.1 Odeslat e-mail podpory

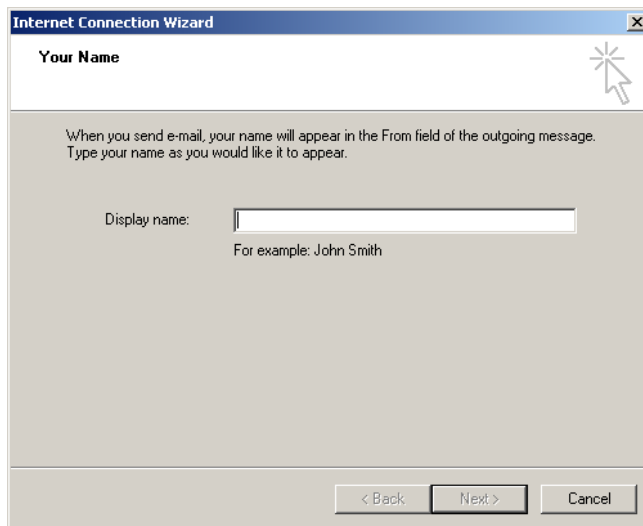
Možnost **Send Support Email** (Odeslat e-mail podpory) v nabídce **Help** (Nápověda) umožňuje společnosti QIAGEN zaslat e-mail podpory obsahující všechny relevantní informace o zpracování. Použitím možnosti **Save As** (Uložit jako) uložíte všechny informace do souboru, který můžete zkopírovat na disk nebo do umístění na síti, pokud nemáte přístup k e-mailu v počítači pro přístroj Rotor-Gene Q MDx.

Při prvním použití funkce e-mailu podpory v přenosném počítači dodávaném volitelně s přístrojem Rotor-Gene Q MDx (v závislosti na dané zemi) musíte nakonfigurovat nastavení e-mailu.

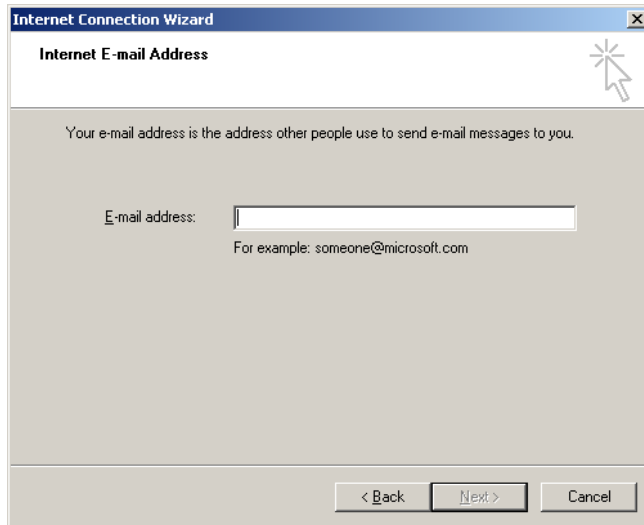
Poznámka: Můžete zadat údaje o IT manažerovi vaší společnosti.

Konfigurace nastavení e-mailu

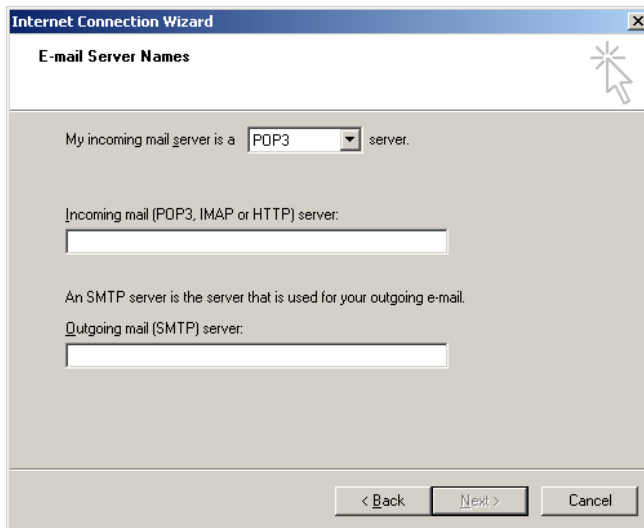
Klikněte na možnost **Send Support Email...** (Odeslat e-mail podpory...). Otevře se následující okno.



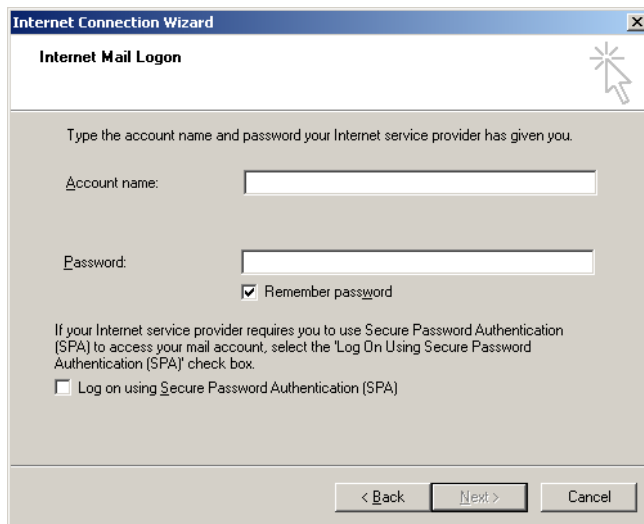
1. Napište své jméno a klikněte na tlačítko **Next** (Další). Otevře se okno **Internet E-mail Address** (Internetová e-mailová adresa).



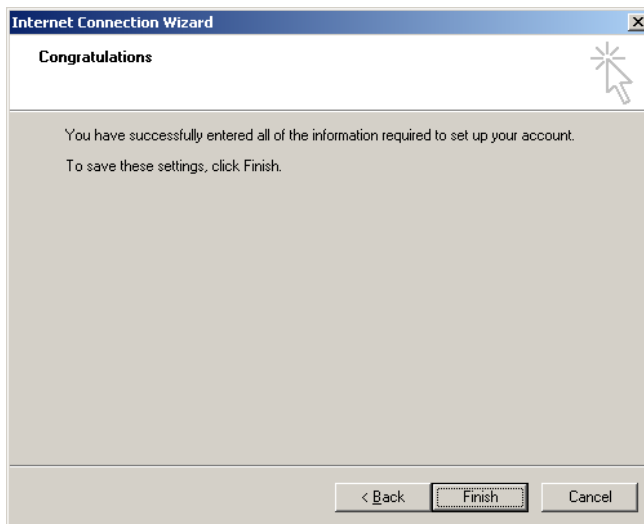
2. Napište svou e-mailovou adresu a stiskněte tlačítko **Next** (Další). Otevře se okno **E-mail Server Names** (Názvy e-mailového serveru).



3. Vyberte typ poštovního serveru pro příchozí poštu a zadejte názvy serverů pro příchozí a odchozí e-maily. Pak stiskněte tlačítko **Next** (Další). Otevře se okno **Internet Mail Logon** (Přihlašování k poště Internetu).



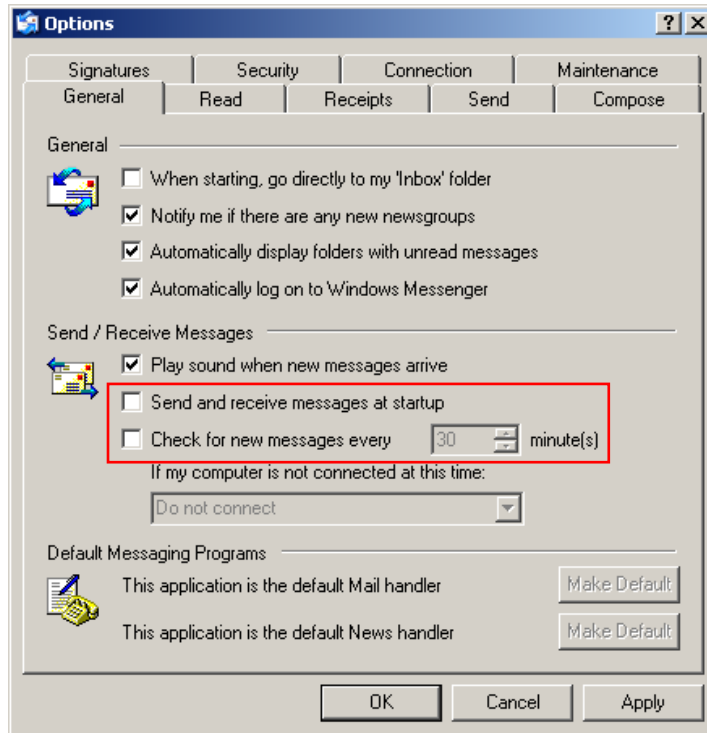
4. Zadejte název svého e-mailového účtu a heslo, pokud server používá zabezpečené ověřování hesel. Pak klikněte na tlačítko **Next** (Další). Otevře se okno s nápisem **Congratulations** (Blahopřejeme).



5. Stisknutím tlačítka **Finish** (Dokončit) potvrďte dokončení nastavení e-mailového účtu.

Nastavení v aplikaci Outlook

1. Otevřete aplikaci **Outlook Express** v nabídce **Start** (**Start** > **All programs** (Všechny programy) > **Outlook Express**).
2. Vyberte možnost **Tools** (Nástroje) a pak **Options** (Možnosti). Otevře se níže uvedené okno.



Důležité: Chcete-li zabránit načítání e-mailů během zpracování PCR, zrušte zaškrtnutí výchozí položky na obrazovce **Send/Receive Messages** (Odesílat/Přijímat zprávy).

3. Deaktivujte položku **Send and receive messages at startup** (Odesílat a přijímat zprávy při spuštění).
4. Deaktivujte položku **Check for new messages every 30 minutes** (Kontrolovat nové zprávy jednou za 30 minut).
5. Potvrďte změny stisknutím tlačítka **OK**.

7 Další funkce

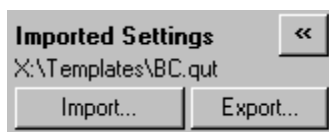
7.1 Šablony analýz

Některé analýzy vyžadují, aby uživatel definoval prahové hodnoty, nastavení normalizace a nastavení genotypu. Tato nastavení se běžně často používají v několika experimentech.

Díky šablonám analýz může uživatel tato nastavení uložit a znovu použít. Není tak nutné znovu zadávat nastavení a snižuje se riziko chyby.

Šablony analýz je možné použít pro analýzy typu Quantitation (Kvantifikace), Melt (Křivka tání), Allelic discrimination (Alelická diskriminace), Scatter graph (Bodový graf) a EndPoint. Při těchto analýzách může uživatel exportovat šablonu, která je pro analýzu jedinečná (např. analýza kvantifikace umožňuje export a import souborů ve formátu *.qut, které obsahují nastavení kvantifikace).

Po importování nebo exportování šablony analýzy se zobrazí název souboru šablony pro budoucí použití.

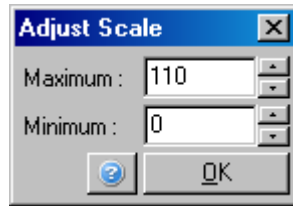


7.2 Otevření druhého zpracování

V průběhu zpracování je možné otevřít a analyzovat zpracování, která byla provedena dříve. V druhém okně není aktivováno několik funkcí, například tlačítko **New** (Nový) nebo **Start Run** (Spustit zpracování). Nové zpracování lze zahájit z prvního okna po dokončení prvního zpracování.

7.3 Možnosti škálování

Chcete-li otevřít okno **Adjust Scale** (Upravit stupnici), klikněte na tlačítko **Adjust Scale...** (Upravit stupnici...) ve spodní části hlavního okna, nebo klikněte pravým tlačítkem myši na graf a v zobrazené nabídce vyberte možnost **Adjust Scale...** (Upravit stupnici...). Zobrazí se okno, do něhož lze ručně zadat stupnici.



Chcete-li otevřít okno **Auto-Scale** (Automatická stupnice), klikněte na tlačítko **Auto-Scale...** (Automatická stupnice...) ve spodní části hlavního okna, nebo klikněte pravým tlačítkem myši na graf a v zobrazené nabídce vyberte možnost **Auto-Scale...** (Automatická stupnice...). Tlačítko **Auto-Scale** (Automatická stupnice) se pokusí přizpůsobit stupnici podle maximální a minimální naměřené hodnoty.

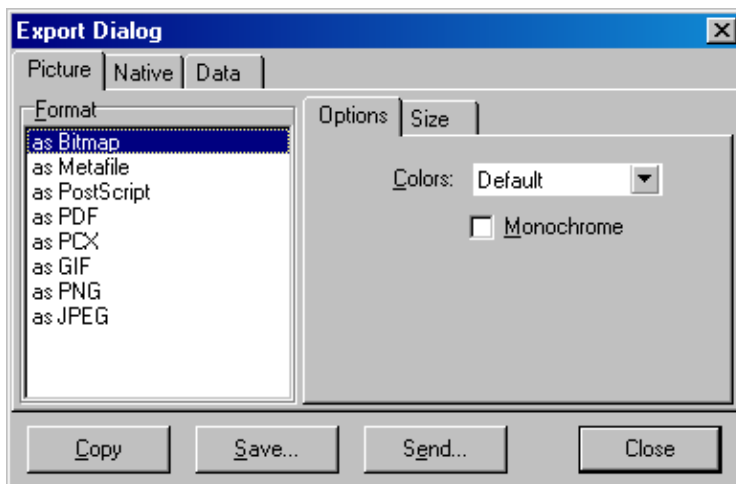
Chcete-li otevřít okno **Default Scale** (Výchozí stupnice), klikněte na tlačítko **Default Scale...** (Výchozí stupnice...) ve spodní části hlavního okna, nebo klikněte pravým tlačítkem myši na graf a v zobrazené nabídce vyberte možnost **Default Scale...** (Výchozí stupnice...). **Default Scale** (Výchozí stupnice) nastaví stupnici zobrazení zpět od 0 do 100 jednotek fluorescence.

7.4 Exportování grafů

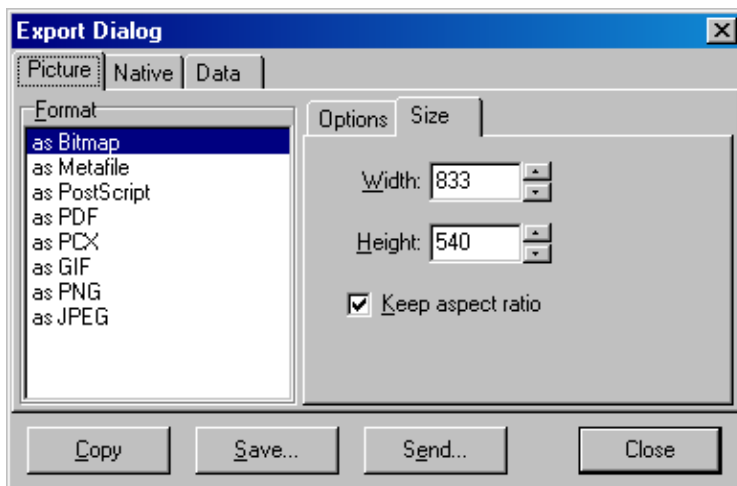
Export obrázků

Následující kroky popisují, jak uložit obrázek.

1. Pravým tlačítkem myši klikněte na obrázek. Zobrazí se nabídka, ve které vyberte možnost **Export**.
2. Objeví se okno **Export Dialog** (Dialog exportu). V seznamu **Format** (Formát) vyberte požadovaný formát.



3. Vyberte kartu **Size** (Velikost) a určete velikost.



4. Zaškrtnutím políčka **Keep aspect ratio** (Zachovat poměr stran) zachováte při úpravách velikosti obrázku správné proporce.

5. Klikněte na tlačítko **Save** (Uložit) a v zobrazeném dialogovém okně vyberte název a umístění souboru.

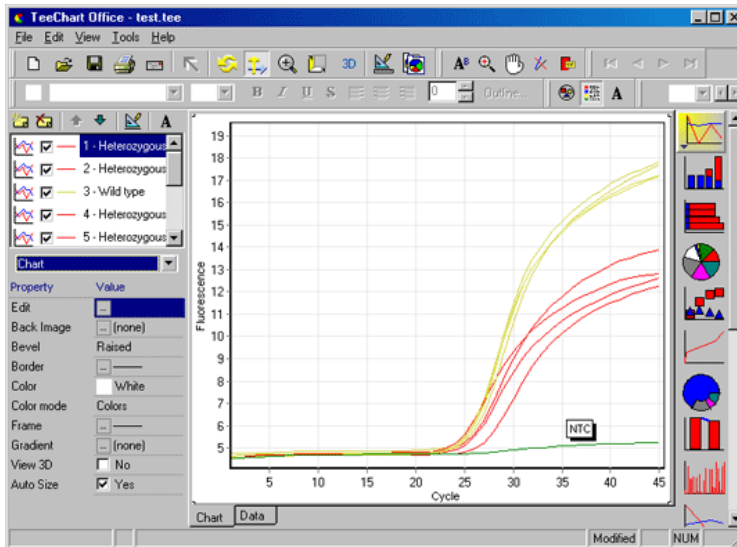
Je-li potřeba obrázek s vyšším rozlišením, doporučujeme buďto obrázek zvětšit podle požadavků, nebo uložit graf jako metasoubor (*.emf, *.wmf). Jedná se o vektorový formát, který lze otevřít v programu jako Adobe® Illustrator®, který uživateli umožňuje vytvořit obrázek s libovolným rozlišením.

Export v nativním formátu

V grafech v softwaru Rotor-Gene Q se používá externí komponenta TeeChart® vytvořená společností Steema software. Chcete-li uložit graf v nativním formátu, vyberte kartu **Native** (Nativní) v okně **Export Dialog** (Dialog exportu) (viz předchozí snímek obrazovky) a pak klikněte na tlačítko **Save** (Uložit). Nativní formát je standardní formát souborů v nástroji TeeChart. Uživatel tak může používat aplikaci TeeChart Office od společnosti Steema software. TeeChart Office je k dispozici jako freeware a je nainstalován jako součást balíku softwaru Rotor-Gene Q. Chcete-li software otevřít, klikněte na ikonu **TeeChart** na ploše.

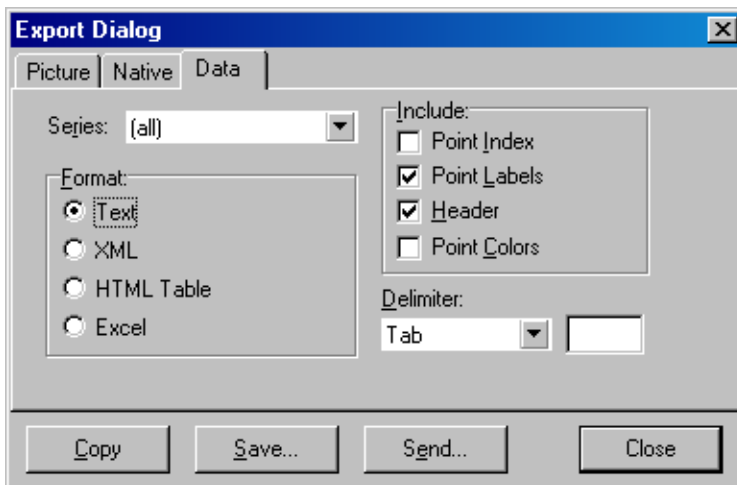


TeeChart Office umožňuje manipulaci s exportovanými grafy, včetně změn barev křivek, přidávání anotací, změn řezů písma a úprav datových bodů.




Export dat

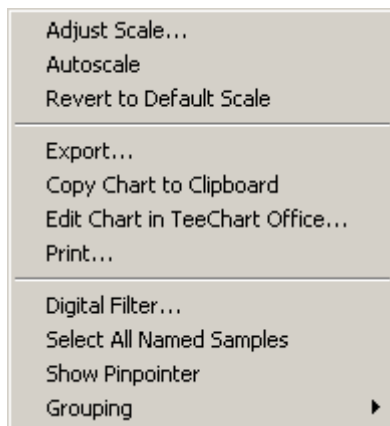
Chcete-li exportovat data v různých formátech, vyberte kartu **Data** v okně **Export Dialog** (Dialog exportu). Exportovaný soubor obsahuje nezpracované datové body použité v grafu.



Export nezpracovaných dat a dat analýzy lze také provést výběrem možnosti **Save As** (Uložit jako) v nabídce **File** (Soubor) (viz část 6.5).

7.5 Ikona s montážním klíčem

Ikona s montážním klíčem  se zobrazuje v levém dolním rohu hlavního okna. Po kliknutí na ikonu s montážním klíčem se nabízí několik možností. K těmto možnostem lze také získat přístup kliknutím pravým tlačítkem myši na graf.



Adjust Scale (Upravit stupnici),
Autoscale (Automatická
stupnice), **Revert to Default
Scale** (Zpět na výchozí stupnici):

Viz část 7.3.

Export...:

Graf lze uložit v různých formátech (viz část 6.4).

Copy Chart to Clipboard
(Kopírovat graf do schránky):

Obrázek grafu se zkopíruje do schránky.

Edit Chart in TeeChart Office...
(Upravit graf v nástroji TeeChart
Office...):

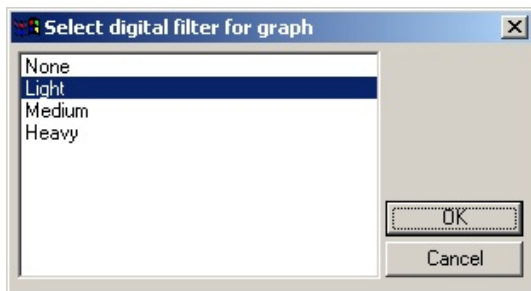
Graf se otevře přímo v nástroji TeeChart Office pro úpravy (viz část 6.4).

Print (Tisk):

Graf se vytiskne.

Digital Filter... (Digitální filtr...):

Změní se aktuálně vybraný digitální filtr na grafu. Digitální filtr vyhlazuje data posouvajícím se oknem s body.



Show Pinpointer
(Zobrazit lokalizátor):

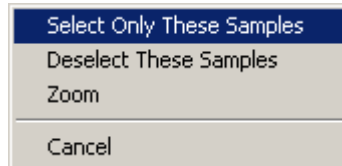
Otevře se okno, v němž se zobrazí přesné souřadnice pozice ukazatele myši.

Grouping (Seskupování):

Vizuálně seskupí vzorky s totožnými názvy. Může to být užitečné při zpracování s plným rotorem. Výběr této možnosti nemá vliv na vypočtené hodnoty.

7.6 Možnosti vybrané oblasti

Oblast v grafu je možné vybrat kliknutím a přidržením levého tlačítka myši a přetažením ukazatele myši. Objeví se následující možnosti.



Select Only These Samples
(Vybrat pouze tyto vzorky):

Zruší se výběr vzorků mimo vybranou oblast.

Select Only These Samples
(Vybrat pouze tyto vzorky):

Zruší se výběr vzorků mimo vybranou oblast.

Zoom (Lupa):

Přiblíží se vybraná oblast grafu. Oddálení provedete kliknutím na tlačítko **Default Scale** (Výchozí stupnice).

8 Údržba

Udržování přístroje Rotor-Gene Q MDx v provozuschopném stavu je snadné. Optická výkonnost se udržuje zajištěním čistoty čoček, které se nacházejí u zdroje emisí i zdroje detekce. Toho lze dosáhnout jemným otřením čoček aplikátorem s bavlněným tamponem navlhčeným v etanolu nebo izopropanolu*.

Poznámka: Čočky čistěte alespoň jednou za měsíc podle četnosti používání. Přitom otřete i komoru rotoru.

Udržujte prostor pracovního stolu v čistotě a zbavený prachu a archů papíru. Přívod vzduchu do přístroje Rotor-Gene Q MDx je na spodní straně a volný materiál, např. papír nebo prach, může ohrozit fungování.



Aby se neusazoval prach, nechejte víko přístroje Rotor-Gene Q MDx zavřené, když se přístroj aktuálně nepoužívá.

Poznámka: Používejte pouze díly dodané společností QIAGEN.

8.1 Čištění povrchu přístroje Rotor-Gene Q MDx

Vnější povrchy přístroje Rotor-Gene Q lze čistit běžně dostupnými laboratorními chemikáliemi.

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

8.2 Dekontaminace povrchu přístroje Rotor-Gene Q MDx

Dojde-li ke znečištění komory rotoru, lze ji vyčistit otřením povrchů utěrkou nepouštějící vlas, navlhčenou (nikoli namočenou) v 0,1% (obj.) roztoku bělidla.* Zbytky bělidla z komory odstraňte otřením utěrkou nepouštějící vlas, navlhčenou ve vodě pro PCR.

8.3 Oprava přístroje Rotor-Gene Q

Potřebujete-li opravu nebo servis přístroje Rotor-Gene Q, kontaktujte technické služby společnosti QIAGEN na adrese <https://www.qiagen.com/service-and-support/technical-support/technical-support-form/>.

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

9 Optické ověření teploty

Optické ověření teploty (Optical Temperature Verification, OTV) je metoda pro ověření teploty ve zkumavce uvnitř přístroje Rotor-Gene Q MDx. Validace teploty ve zkumavce může být důležitým postupem v certifikovaných laboratořích. OTV se provádí pomocí soupravy Rotor-Disc OTV Kit (viz část 16). Následující text obsahuje jen krátký úvod do principu OTV. Provedení postupu OTV je vysvětleno v softwaru přístroje Rotor-Gene Q MDx. Podrobnější popis postupu OTV včetně pokynů pro řešení potíží naleznete v dokumentu *Příručka pro OTV produktu Rotor-Disc*.

9.1 Princip OTV

OTV využívá optické vlastnosti 3 termochromatických kapalných krystalů (thermochromatic liquid crystals, TLC)*, které slouží jako reference absolutní teploty. TLC se po zahřátí změní za velmi přesných teplot (50, 75 a 90 °C) z neprůsvitných na průsvitné. TLC samy o sobě nefluoreskují. Je proto nutné zakrýt excitační zdroj fluorescenční vložkou, aby optický systém přístroje Rotor-Gene Q MDx mohl detekovat přechodové body TLC. TLC, které mají nižší než přechodovou teplotu, jsou neprůhledné a odrážejí světlo. Část odraženého světla se rozptýlí směrem k detektoru a zvýší fluorescenci. Když teplota ve zkumavce dosáhne přechodového bodu TLC, TLC zprůhlední a světlo bude vzorkem procházet, místo aby se odráželo k detektoru, což vede ke snížení fluorescence. Změna fluorescence slouží ke stanovení přesné přechodové teploty každého TLC. Přechodová teplota se porovná s teplotou uvedenou v kalibračním souboru výrobce pro OTV Rotor-Disc, aby bylo možné ověřit, zda přístroj Rotor-Gene Q MDx splňuje specifikaci teploty.

9.2 Součásti soupravy Rotor-Disc OTV Kit

K provedení OTV jsou potřeba tyto součásti:

- souprava Rotor-Disc OTV Kit, která obsahuje:
 - utěsněný Rotor-Disc 72 OTV Rotor (obsahuje TLC),
 - vložka s fluorescenční rozptylovou destičkou (přístroj Rotor-Gene 3000 nebo přístroje Rotor-Gene Q/6000),
 - jednotka Removable Media obsahující tyto soubory: sériové číslo produktu OTV Rotor a soubor s datem použitelnosti (*.txt); soubor šablony testu OTV (*.ret); produktový list (*.pdf); kalibrační soubor výrobce (*.rex),
 - produktový list,

* Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

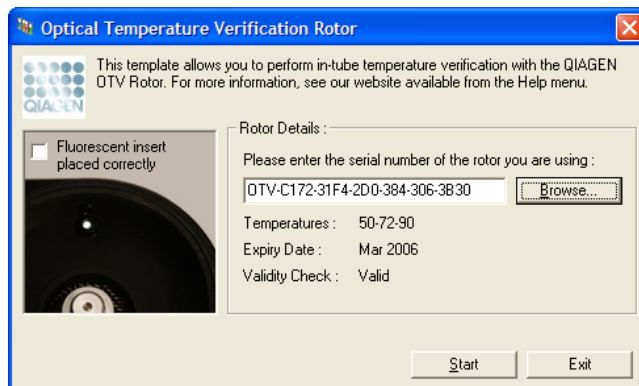
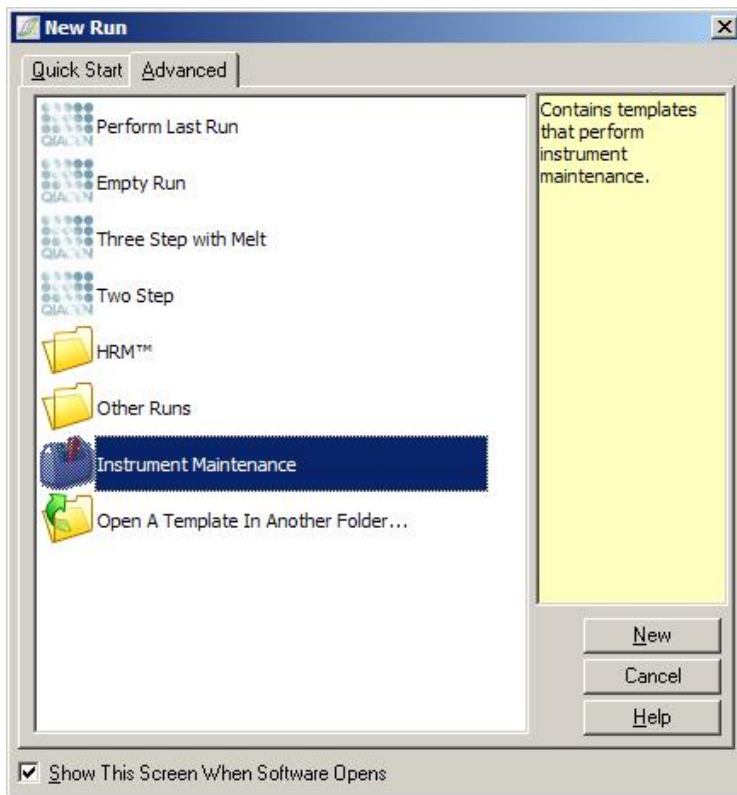
- software řady Rotor-Gene verze 1.7 nebo vyšší, který obsahuje průvodce pro OTV Rotor,
- Rotor-Disc 72 Rotor,
- Rotor-Disc 72 Locking Ring.

9.3 Spuštění OTV

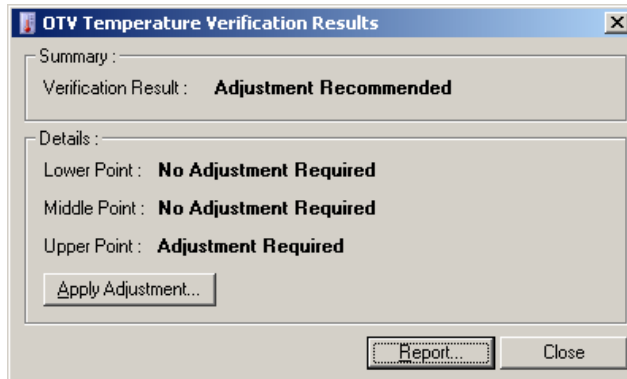
1. Položte fluorescenční vložku na emisní čočku ve spodní části komory přístroje Rotor-Gene Q MDx.
2. Vložte OTV Rotor-Disc do produktu Rotor-Disc 72 Rotor. Zajistěte jej pojistným kroužkem Rotor-Disc 72 Locking Ring. Sestavu vložte do přístroje Rotor-Gene Q MDx a zaklapněte na místo. Zavřete víko přístroje Rotor-Gene Q MDx.



3. Otevřete průvodce Advanced (Rozšířené možnosti) výběrem karty **Advanced** (Rozšířené možnosti) v okně **New Run** (Nové zpracování). V průvodci Advanced (Rozšířené možnosti) klikněte na položku **Instrument maintenance** (Údržba přístroje) a pak na **OTV**. Průvodce vyzve k zadání sériového čísla OTV, které se nachází na kroužku OTV. Pak klikněte na tlačítko **Start**.



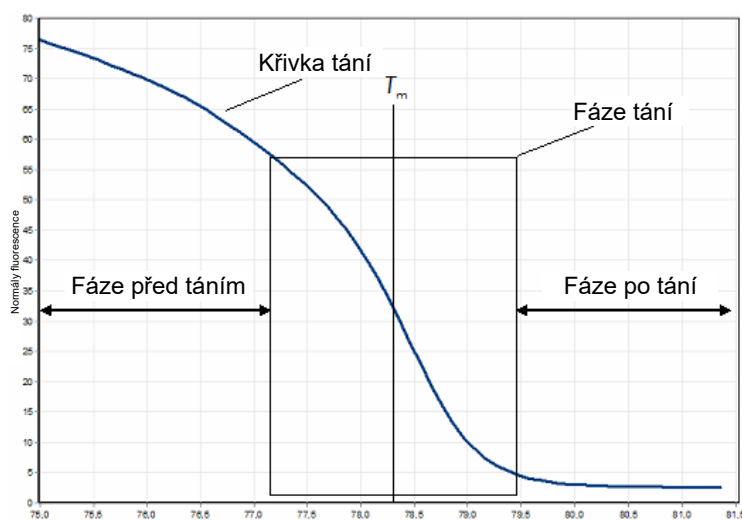
4. Software pak vyzve k zadání názvu souboru zpracování. Pak se zahájí zpracování.
5. Provede se série křivek tání, které určují tepelné charakteristiky přístroje Rotor-Gene Q MDx.



- Po dokončení zpracování software uvede, zda přístroj Rotor-Gene Q MDx splňuje předepsané hodnoty.
- Jsou-li nutné úpravy, klikněte na tlačítko **Apply Adjustment** (Použít úpravy). Uživatel bude vyzván k provedení ověřovacího zpracování. Po ověřovacím zpracování by již žádná úprava neměla být nutná. Bude-li nutná další úprava, kontaktujte distributora.
- Když přístroj Rotor-Gene Q MDx splňuje specifikaci, lze zkontrolovat a vytisknout protokol o zpracování.

10 Analýza křivky tání s vysokým rozlišením

Analýza křivky tání s vysokým rozlišením (High resolution melt, HRM) je inovační technika založená na analýze tání DNA. HRM charakterizuje vzorky DNA podle jejich disociačního chování, když se při zvyšování teploty mění z dvouvláknové DNA (double-stranded DNA, dsDNA) na jednovláknovou DNA (single-stranded DNA, ssDNA) (viz obrázek dole). Přístroj HRM shromažďuje fluorescenční signály s mimořádně vysokou optickou a tepelnou přesností, takže má velké možnosti využití.



Typický graf HRM. Křivka tání vykresluje přechod od vysoké fluorescence během počáteční fáze před táním přes snížení fluorescence ve fázi tání po bazální úroveň fluorescence ve fázi po tání. Fluorescence se snižuje s tím, jak se uvolňuje interkalační barvivo DNA z dsDNA, která se rozpouští na jednotlivá vlákna. Střed fáze tání, v němž je rychlost změny fluorescence největší, určuje teplotu tání (T_m) analyzované DNA.

Před provedením analýzy HRM je nutné amplifikovat cílovou sekvenci na vysoký počet kopií. Obvykle se to provádí při PCR za přítomnosti interkalačního fluorescenčního barviva dsDNA. Barvivo neinteraguje s ssDNA, ale aktivně interkaluje s dsDNA a při interkalaci výrazně fluoreskuje. Změnu fluorescence lze využít k měření nárůstu koncentrace DNA během PCR a poté k přímému měření tepelně indukovaného tání DNA při HRM. Během HRM je fluorescence zpočátku vysoká, protože ve vzorku je nejdříve dsDNA. Se zvyšováním teploty se fluorescence snižuje a DNA se štěpí na jednotlivá vlákna. Pozorované chování při tání je pro konkrétní vzorek DNA charakteristické.

Pomocí HRM může přístroj Rotor-Gene Q MDx charakterizovat vzorky podle délky sekvence, obsahu GC a komplementarity sekvence DNA. Metodu HRM je možné použít pro genotypování, například pro analýzu inzercí/delecí nebo jednonukleotidových polymorfismů (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), případně ke screeningu neznámých genových mutací.

Lze ji také použít v epigenetice pro detekci a analýzu stavu metylace DNA. Dále ji lze použít ke kvantitativní detekci malé části variantní DNA na pozadí sekvence divokého typu s citlivostí blízkou 5 %. To lze použít například ke zkoumání somaticky získaných mutací nebo změn stavu metylace ostrůvků CpG.

HRM v přístroji Rotor-Gene Q MDx má řadu možností využití, například:

- identifikaci kandidátních predispozičních genů,
- asociační studie (porovnání případů a kontrol, genotypu s fenotypem),
- stanovení prevalence alel v populaci nebo podskupině,
- screening a validace SNP,
- screening ztráty heterozygotnosti,
- identifikace pomocí DNA,
- charakterizace haplotypových bloků,
- analýzu metylace DNA,
- mapování DNA,
- určování druhů organismů,
- zjišťování mutací,
- určování poměru somaticky získaných mutací,
- typizace HLA.

Metoda HRM je snazší a méně nákladná než analýzy genotypování pomocí sond a na rozdíl od konvenčních metod se jedná o systém s uzavřenými zkumavkami, který zabraňuje kontaminaci produkty PCR. Výsledky jsou srovnatelné s konvenčními metodami, například SSCP, DHPLC, RFLP a sekvenováním DNA.

10.1 Přístrojové vybavení

Přístroj Rotor-Gene Q MDx nabízí níže uvedené možnosti analýz v reálném čase a tepelné a optické vybavení pro HRM:

- vysokou intenzitu osvětlení,
- vysoce citlivou optickou detekci,
- rychlé pořizování dat,
- precizní řízení teploty vzorků,
- minimální rozptyl tepelných a optických hodnot mezi vzorky.

10.2 Chemikálie

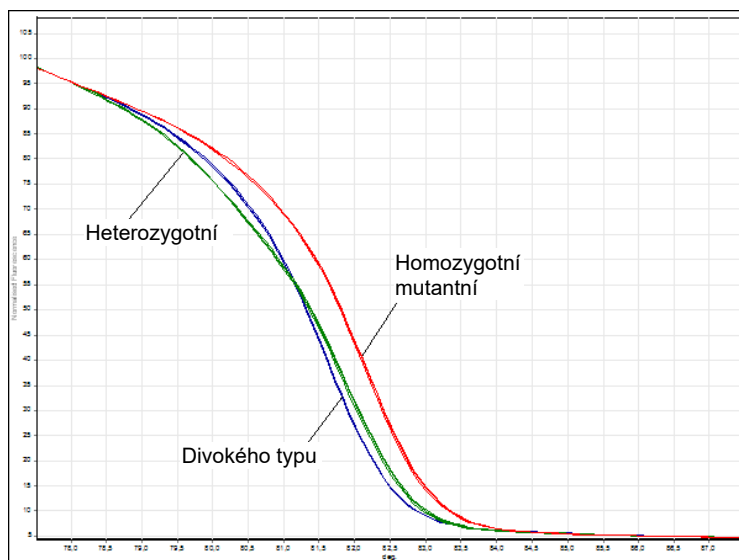
Společnost QIAGEN nabízí soupravu Type-it® HRM PCR Kit pro analýzu SNP a mutací pomocí HRM a soupravu EpiTect® HRM PCR Kit pro analýzu metylace. Obě soupravy obsahují interkalační fluorescenční barvivo třetí generace EvaGreen. Tyto soupravy kombinují optimalizovaný pufr HRM a látku HotStarTaq® Plus DNA Polymerase, aby nevznikaly nespecifické amplifikační produkty a byly získány spolehlivé výsledky.

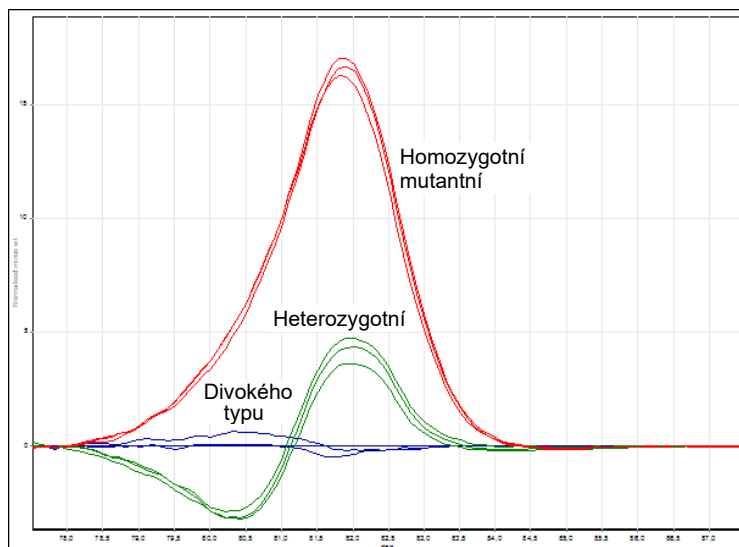
Poznámka: Všechny soupravy a reagentie společnosti QIAGEN pro HRM jsou indikovány pro použití s přístroji Rotor-Gene Q pouze pro aplikace popsané v příslušných příručkách k soupravám QIAGEN.

10.3 Příklad genotypování SNP

V uvedeném příkladu byla při analýze HRM použita souprava Type-it HRM PCR Kit pro rozlišení mezi homozygotními formami divokého typu, homozygotními mutantními a heterozygotními formami lidského SNP rs60031276. Technické podrobnosti si přečtěte v dokumentu *Příručka pro PCR pomocí HRM Type-it*.

A



B**C**

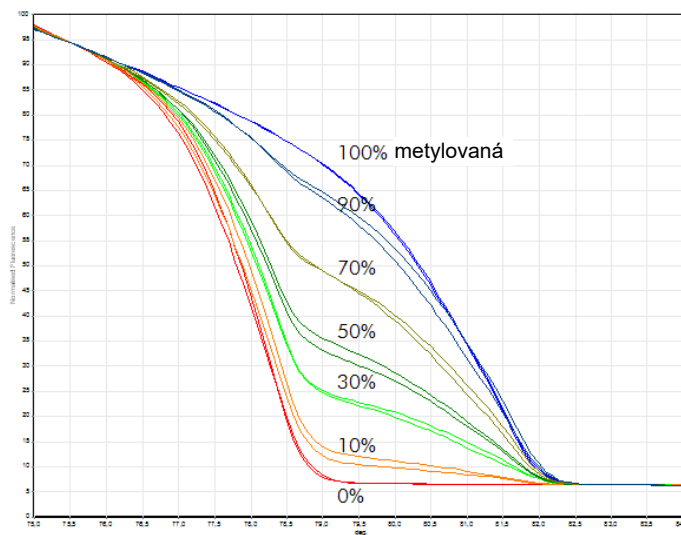
HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)				
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	AA	Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	unknown		homo AA	99,49
24	unknown		homo AA	99,76
28	AG	Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	unknown		hetero AG	99,49
30	unknown		hetero AG	98,47
34	GG	Human SNP rs60031276	homo GG	100,00
35	unknown		homo GG	98,80
36	unknown		homo GG	99,53

Genotypování SNP pomocí HRM. Byla analyzována lidská SNP rs60031276 (substituce A až G) v genu PPP1R14B (proteinfosfatáza 1, regulační (inhibiční) podjednotka 14B) v přístroji Rotor-Gene Q s pomocí 10 ng genomové DNA různých genotypů a soupravy Type-it HRM Kit. Homozygotní vzorky divokého typu (AA), homozygotní mutantní vzorky (GG) a heterozygotní (AG) vzorky jsou znázorněny na standardní normalizované křivce tání **A** a diferenčním grafu **B** normalizovaném podle vzorků divokého typu. **C** Genotypy u neznámých vzorků byly přiřazeny softwarem Rotor-Gene Q.

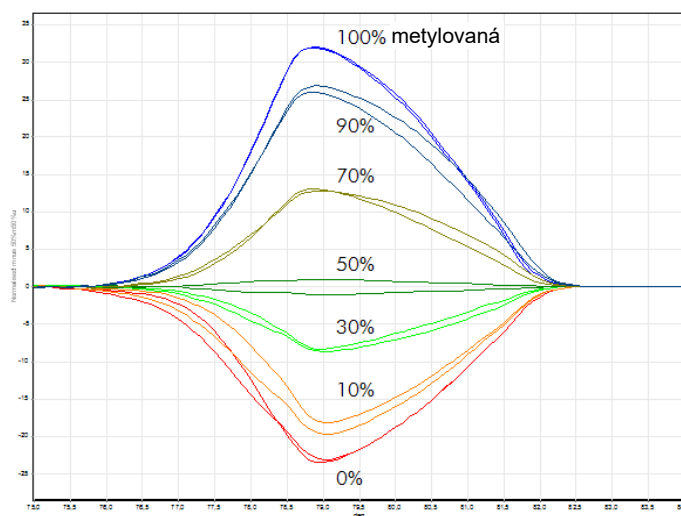
10.4 Příklad metylační analýzy

V uvedeném příkladu byla při analýze HRM pro rozlišení různých poměrů metylované a nemetylované DNA použita souprava EpiTect HRM PCR Kit. Technické podrobnosti si přečtete v dokumentu *Příručka pro PCR pomocí HRM EpiTect*.

A



B



Kvantitativní metylační analýza pomocí HRM. V přístroji Rotor-Gene Q byly s pomocí soupravy EpiTect HRM Kit analyzovány a rozlišeny různé poměry metylované a nemetylované DNA-APC (adenomatosis polyposis coli). Zobrazena je standardní normalizovaná křivka tání **A** a diferenční graf **B** normalizovaný podle 50% metylovaného vzorku.

10.5 Pokyny pro úspěšnou analýzu HRM

Úspěšnost analýzy HRM do značné míry závisí na konkrétní zkoumané sekvenci. Některé sekvenční motivy, například tzv. vlásenky nebo jiné sekundární struktury, lokalizované oblasti s nezvykle vysokým nebo nízkým obsahem GC či opakovanými sekvencemi, mohou ovlivnit výsledek. Použití standardizovaných souprav a optimalizovaných protokolů společnosti QIAGEN může vyřešit řadu uvedených potenciálních potíží. Níže je uvedeno několik jednoduchých pokynů k zajištění úspěšnosti analýzy.

Analyzujte malé fragmenty DNA

Analyzujte fragmenty do velikosti cca 250 bp. Větší produkty lze úspěšně analyzovat, ale obvykle dávají nižší rozlišení. Je to proto, že například jednobázová variace má větší vliv na chování při tání ampliconu o velikosti 100 bp než na amplicon o velikosti 500 bp.

Ověřte, že PCR obsahuje pouze specifický produkt

Vzorky kontaminované artefakty po PCR, například dimery primerů nebo nespecifické produkty, mohou ztížit interpretaci výsledků HRM. Soupravy od společnosti QIAGEN pro analýzu HRM zajišťují maximální specifitu bez nutnosti optimalizace.

Používejte dostatečný předamplifikační templát

Analýza dat real-time PCR může být velmi užitečná při řešení potíží s HRM. Amplifikační grafy by měly mít C_T (prahový cyklus) menší nebo roven 30 cyklům. Produkty, které amplifikují později (z důvodu malého počátečního množství templátu nebo degradace templátu), nejčastěji dávají rozdílné výsledky HRM vlivem artefaktů při PCR.

Normalizujte koncentraci templátu

Množství templátu přidávaného do reakce by mělo být konzistentní. Normalizujte výchozí koncentrace tak, aby všechny amplifikační grafy měly navzájem 3násobek hodnoty C_T . Tím se zajistí, že vstupní koncentrace budou v 10násobném rozmezí.

Zkontrolujte aberantní amplifikační grafy

Před spuštěním HRM pečlivě prohlédněte data amplifikačního grafu, zda nemá abnormální tvar. Grafy s logaritmicke-lineární fází, která není strmá, je zubatá nebo má oproti jiným reakcím nízké plató signálu, mohou naznačovat slabou amplifikaci nebo příliš nízký fluorescenční signál (např. mohlo by to nastat, kdyby koncentrace primeru byla příliš nízká). Slabé reakce mohou být způsobeny inhibitory reakce nebo nesprávnou přípravou reakce. Data HRM z těchto vzorků mohou být nejednoznačná nebo mít nízké rozlišení. Aby se zabránilo nespolehlivým výsledkům, pro přípravu vzorků a analýzu HRM doporučujeme používat soupravy společnosti QIAGEN.

Udržujte podobné koncentrace ve vzorcích po amplifikaci

Koncentrace fragmentu DNA má vliv na jeho teplotu tání (T_m). Proto musí být koncentrace DNA ve vzorcích co nejpodobnější. Při analýze produktů PCR ověřte, že každá reakce amplifikovala do fáze plató. Ve fázi plató budou všechny reakce amplifikované v podobné míře bez ohledu na počáteční množství. Povšimněte si však, že slabé reakce nemusí dosáhnout fáze plató se stejným amplifikovaným množstvím, například vlivem nekonzistentního nastavení analýzy (např. koncentrace primeru byla příliš nízká).

Zajistěte jednotnost vzorků

Všechny vzorky musí mít stejný objem a měly by obsahovat stejnou koncentraci barviva. Chování DNA při tání je ovlivněno solemi v reakční směsi, a proto je důležité, aby koncentrace pufru, Mg a jiných solí byly ve všech vzorcích pokud možno jednotné. Podobně také používejte jen stejné reakční zkumavky od stejného výrobce, aby nevznikly odchylky vlivem tloušťky plastu a autofluorescenčních vlastností.

Umožněte dostatečný sběr dat pro fázi před táním a po tání

Datové body HRM pořizujte v rozmezí cca 10 °C, se středem kolem pozorované hodnoty T_m (viz obrázek na straně 10). Zajistíte tak dostatek datových bodů počáteční úrovně pro efektivní normalizaci křivky, reprodukovatelnější replikáty a snazší interpretaci dat.

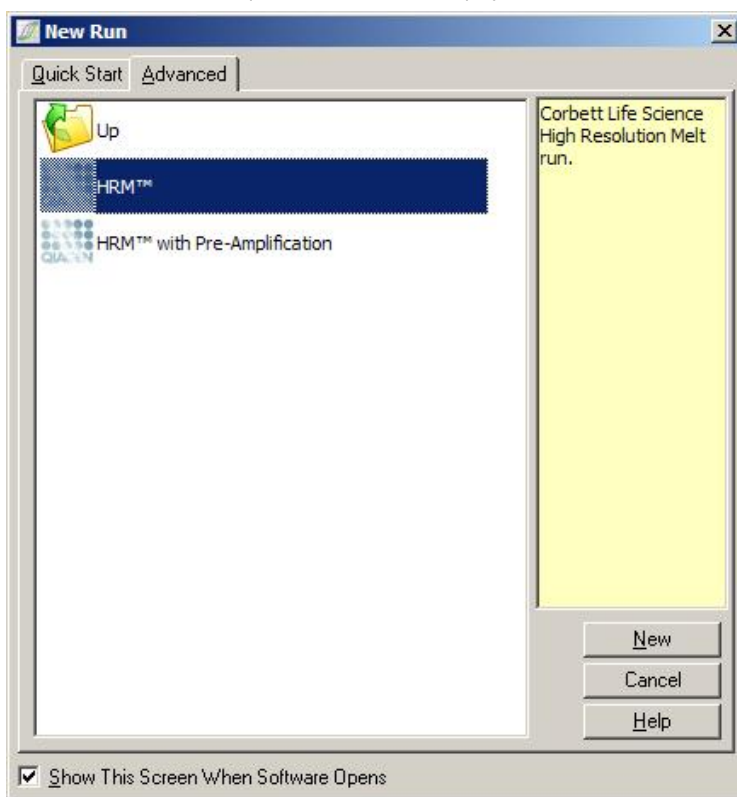
10.6 Příprava vzorku

Během purifikace a skladování je třeba zamezit degradaci vzorků. Nepoužívejte příliš velká množství inhibitorů, například z přenosu ethanolu. Chcete-li zlepšit výsledky HRM, doporučujeme udržovat množství templátu použitého ve vzorcích konzistentní. Doporučuje se spektrofotometrická analýza ke stanovení koncentrace DNA a čistoty. Pro přípravu vzorků doporučujeme soupravy QIAGEN.

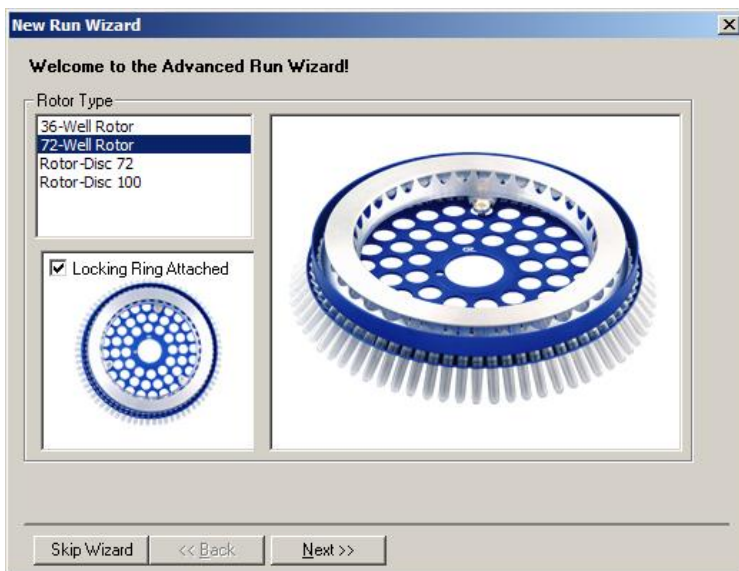
Poznámka: Při 260 nm je jedna jednotka absorbance rovna 50 µg/ml DNA. Čistá DNA má v rozmezí 260 nm až 280 nm poměr 1,8.

10.7 Nastavení softwaru

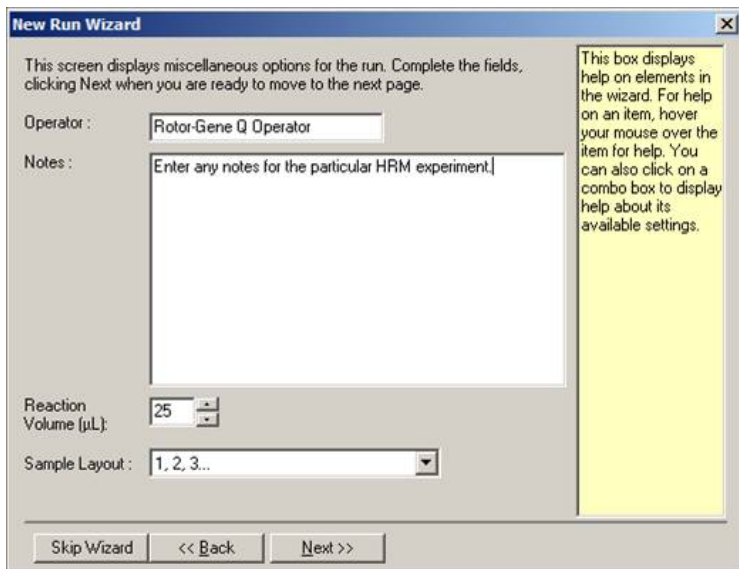
1. Otevřete soubor nového zpracování výběrem možnosti **New...** (Nový...) v nabídce **File** (Soubor). V průvodci Advanced (Rozšířené možnosti) vyberte možnost **HRM**.



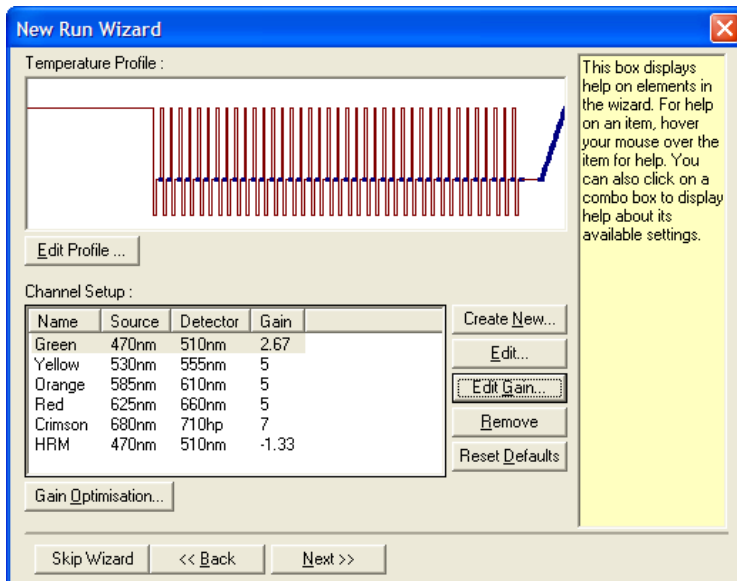
- Nastavte typ rotoru (v tomto příkladu se používá 72-Well Rotor). Než přejdete k dalšímu kroku, ujistěte se, že je pojistný kroužek na místě a je zaškrtnuté políčko **Locking Ring Attached** (Přípevněn pojistný kroužek).



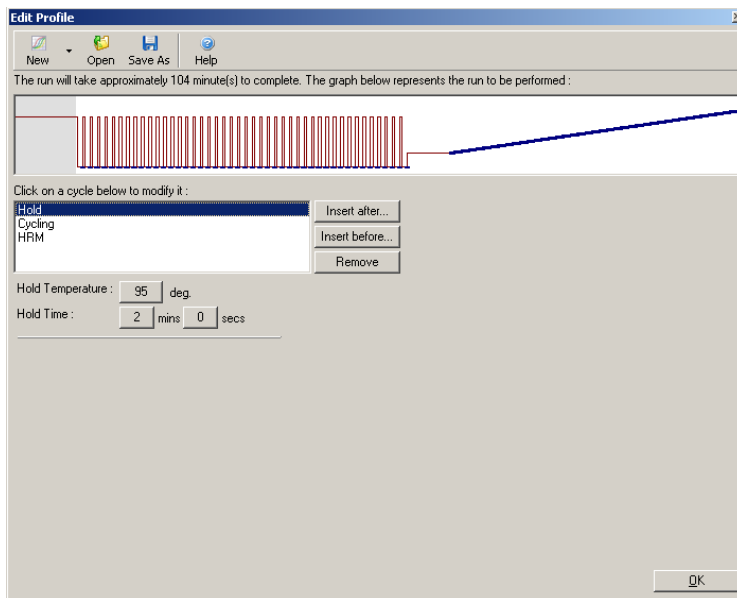
- Nastavte podrobnosti o zpracování. Zadejte jméno operátora (volitelně) a doplňte poznámky o experimentu (volitelně). Vyberte reakční objem (povinně) a požadované rozvržení vzorků.



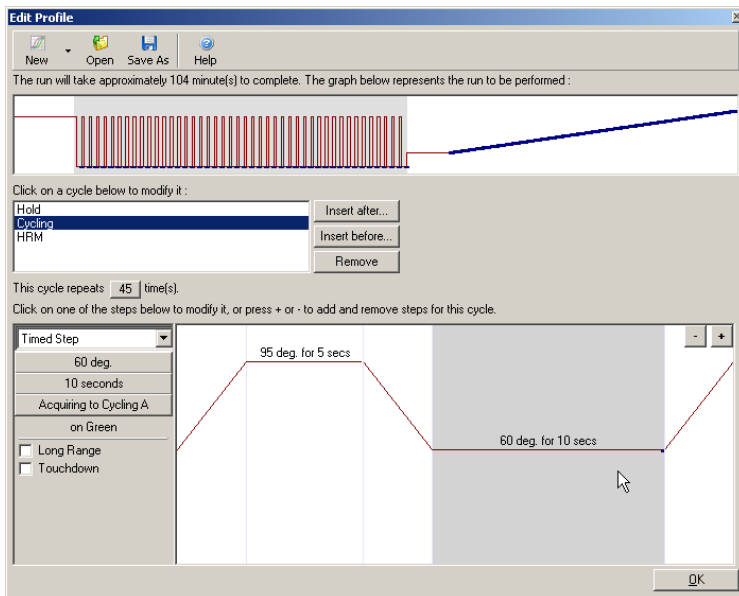
4. Kliknutím na tlačítko **Edit Profile...** (Upravit profil...) upravte časy a teploty reakce.



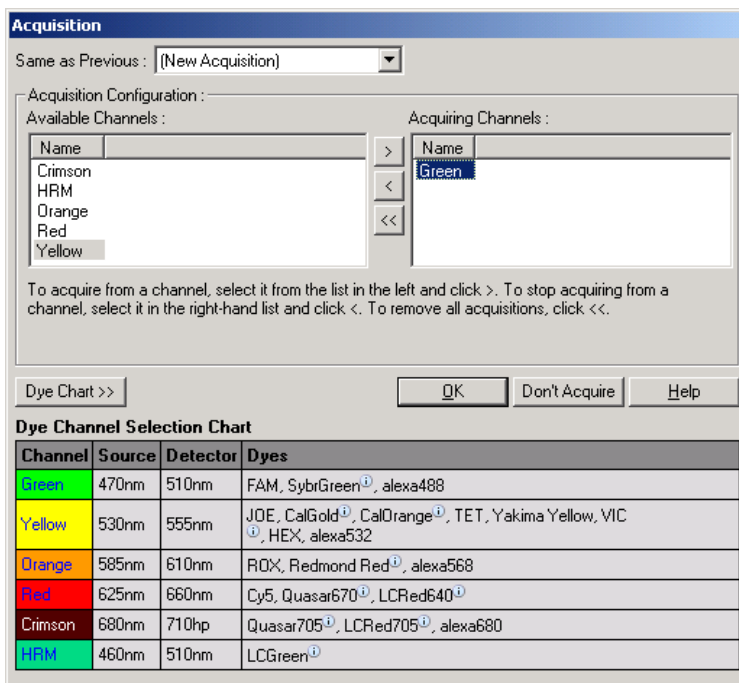
5. Nastavte vhodnou počáteční dobu výdrže. Tato doba závisí na typu použité DNA polymerázy. Souprava Type-it HRM PCR Kit a EpiTect HRM PCR Kit potřebuje aktivační čas 5 min. Výchozí aktivační čas je 10 min.



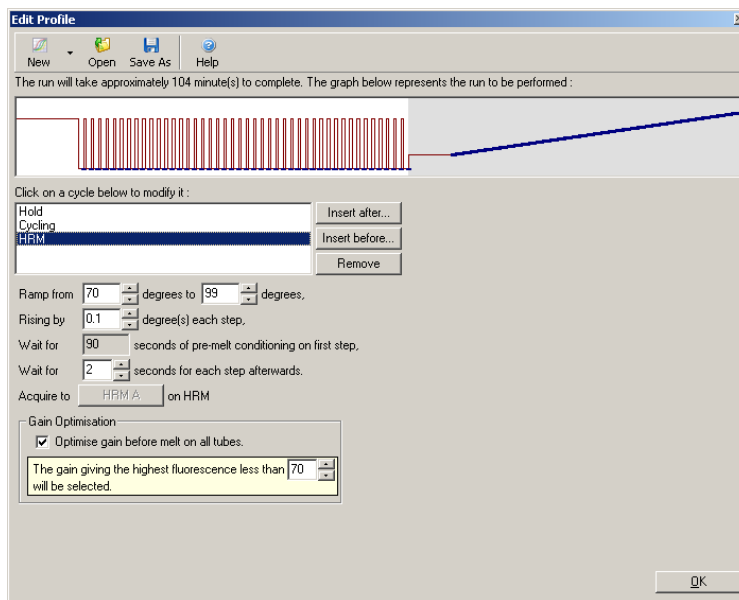
6. Upravte cyklování podle amplitudonu.



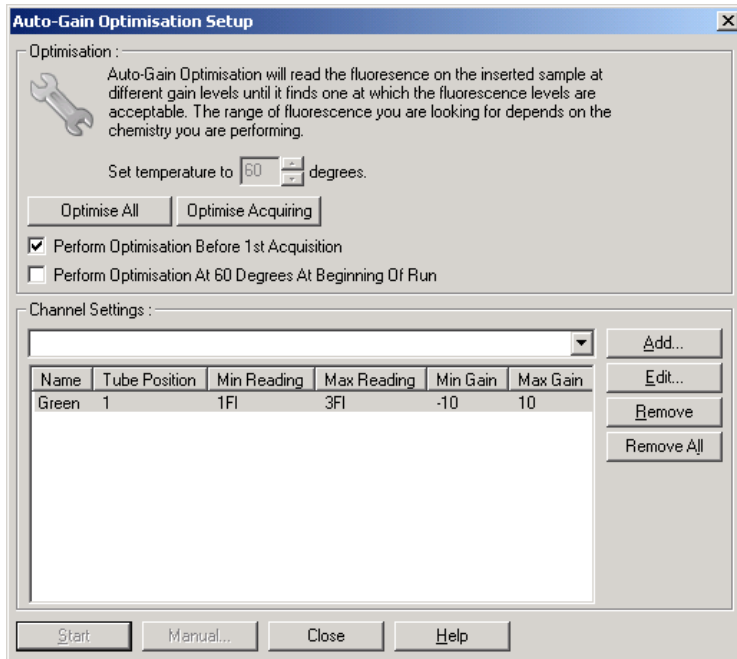
7. Ověřte, že budou pořizována fluorescenční data. Data získáte v zeleném kanálu na konci kroku nasedání primerů.



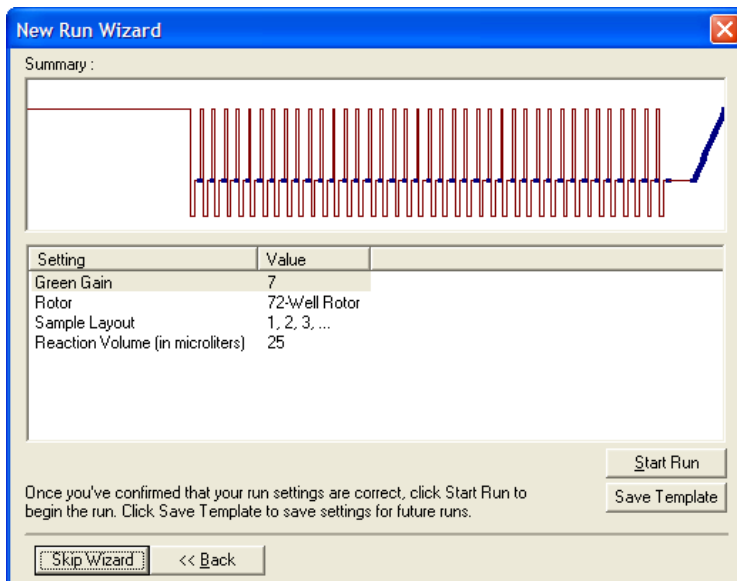
8. Nastavte podmínky zpracování HRM. Upravte podmínky podle amplitudonu. V první sadě experimentů počítejte s širokou oblastí tání. Jako vodítko pro vhodné rozmezí použijte teoretickou T_m . Po určení bodu tání produktu omezte oblast tání na max. 10 °C. Ověřte, že začátek tání nastane 5 °C před prvním přechodem k tání. Výchozí náběh je nastaven na 0,1 °C s výdrží 2 s v každém kroku. Minimální náběh přechodu k tání je 0,05 °C s druhou výdrží při každém kroku. Data se automaticky pořizují do kanálu HRM. Ve výchozím nastavení se provádí Automatic Gain Optimisation (Automatická optimalizace zesílení). Software bude hledat optimální nastavení zesílení, aby nejvyšší hodnota hlášená fluorescence nebyla větší než 70 jednotek na stupnici 100. Povšimněte si, že tuto hodnotu lze zvýšit maximálně na 100.



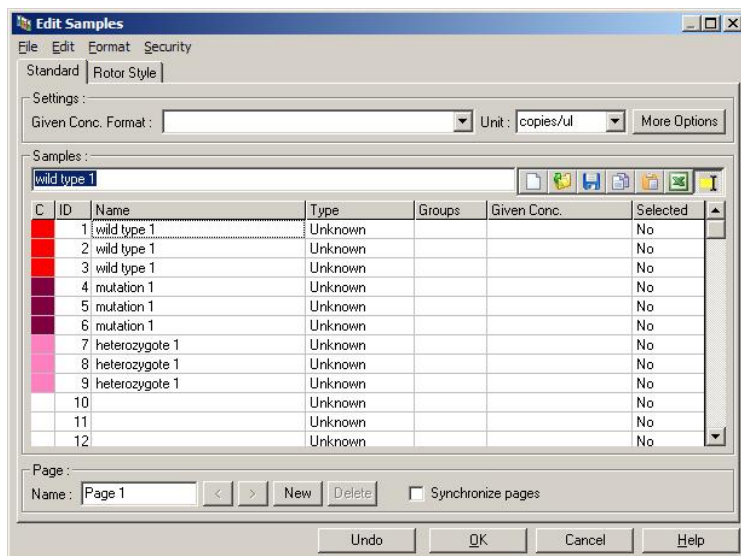
9. Volitelné: Nastavte funkci Auto-Gain Optimisation (Automatická optimalizace zesílení). Platí pouze pro krok amplifikace v reálném čase a nastavuje se pro zelený kanál. Klikněte na tlačítko **Optimize Acquiring** (Optimalizovat akviziční) (aby se optimalizovaly pouze kanály použité ve zpracování). Optimalizace se nejlépe provádí těsně před prvním krokem akvizice, zaškrtněte tedy políčko **Perform Optimization Before First Acquisition** (Provést optimalizaci před první akvizicí). Doporučený rozsah fluorescence na pozadí pro interkalační barviva je 1 až 3 jednotky fluorescence. Chcete-li toto nastavení změnit, kliknutím na název kanálu jej vyberte v seznamu a pak klikněte na tlačítko **Edit** (Upravit).



10. Spusťte zpracování kliknutím na tlačítko **Start Run** (Spustit zpracování) a uložte soubor zpracování v počítači.



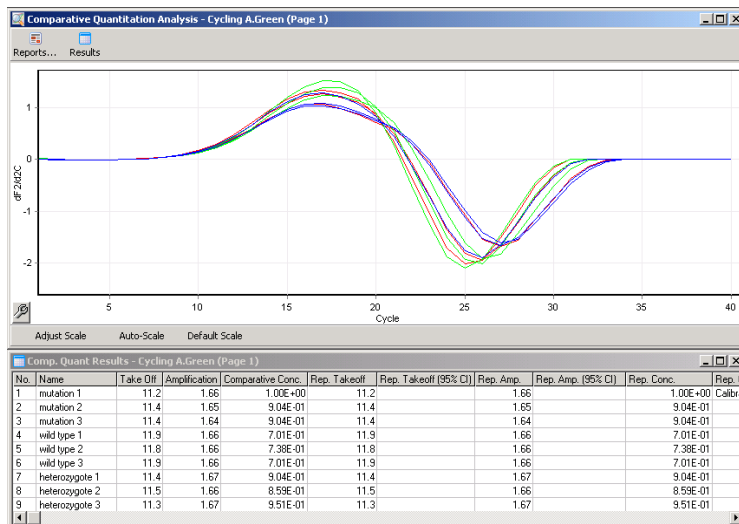
11. Upravte názvy vzorků (volitelně) Názvy vzorků je možné upravit během zpracování nebo po něm.



10.8 Analýza dat real-time PCR

Analýza dat real-time PCR před analýzou dat HRM je výhodná. Data real-time PCR mohou upozornit na nesprávně fungující analýzy. Určení těchto odlehých hodnot a jejich vyfiltrování z následné analýzy HRM značně zlepšuje celkovou účinnost analýzy HRM, neboť analyzování nekvalitního produktu PCR vede ke špatným výsledkům HRM. Doporučujeme analyzovat data z kvantitativní real-time PCR níže uvedeným postupem.

1. Analyzujte data v reálném čase pomocí možnosti **Quantitation** (Kvantifikace) v okně **Analysis** (Analýza). Budou-li některé hodnoty C_T rovny 30 nebo vyšší, má se za to, že odpovídající reakce amplifikovaly příliš pozdě. Tyto vzorky je nutné analyzovat obezřetně, nebo je z analýzy vyloučit z důvodu odlehých hodnot. Opožděná amplifikace je obvykle zapříčiněna příliš malým počátečním množstvím templátu a/nebo vysokou mírou degradace vzorku.
2. Zhodnoťte úroveň konečné fluorescence. Bude-li konečná fluorescence v kterémkoli amplifikačním grafu oproti většině grafů v datové sadě nízká, tyto vzorky z analýzy vynechejte, bude-li jejich hodnota C_T menší než 30. Nízká konečná fluorescence může naznačovat nesprávné množství barviva, nesprávné úrovně reakčních složek (například primerů) nebo účinek inhibitorů.
3. K získání účinnosti reakce jednotlivých vzorků použijte možnost **Comparative Quantitation** (Komparativní kvantifikace) v okně **Analysis** (Analýza). Nebude-li účinnost podobná jako u jiných reakcí v experimentu nebo bude nižší než přibližně 1,4, reakci z důvodu odlehých hodnot vynechejte.



Výsledky komparativní kvantifikace. Účinnost reakce je uvedena ve sloupci „Amplification“ (Amplifikace) jako skóre ze 2 (2 = 100% účinnost).

Poznámka: Máte-li podezření na přítomnost primerů-dimerů nebo nespecifických produktů, posudte reakce na grafu derivací použitím možnosti **Melt** (Křivka tání) v okně **Analysis** (Analýza). Ověřte, že je zde jen jeden vrchol svědčící o jednom produktu. Je-li to možné, proveďte zpracování gelu pro kontrolu, že je zde jeden produkt amplifikace. Zjistíte-li více než jeden produkt, reakci je třeba opakovat nebo znovu optimalizovat.

10.9 Analýza dat HRM

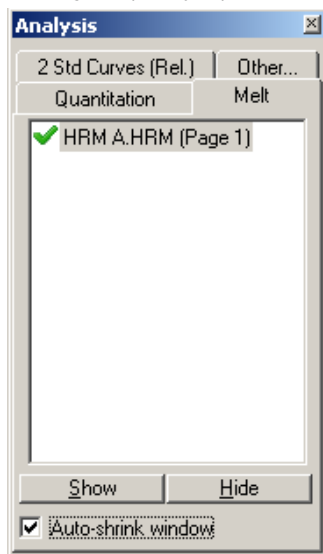
Analýza HRM umožňuje vizuální i automatické vyvolání genotypů. Výsledky lze zobrazit buďto jako normalizovanou křivku tání, nebo jako diferenční graf. Normalizované křivky poskytují základní znázornění různých genotypů na základě posunutí křivky (u homozygotů) a změny tvaru křivky (u heterozygotů).

Diferenční grafy jsou pomůckou při vizuální interpretaci. Vykreslují rozdíl ve fluorescenci vzorku na vybrané kontrole při každém teplotním přechodu. Diferenční grafy umožňují alternativní pohled na rozdíly mezi přechody na křivce tání.

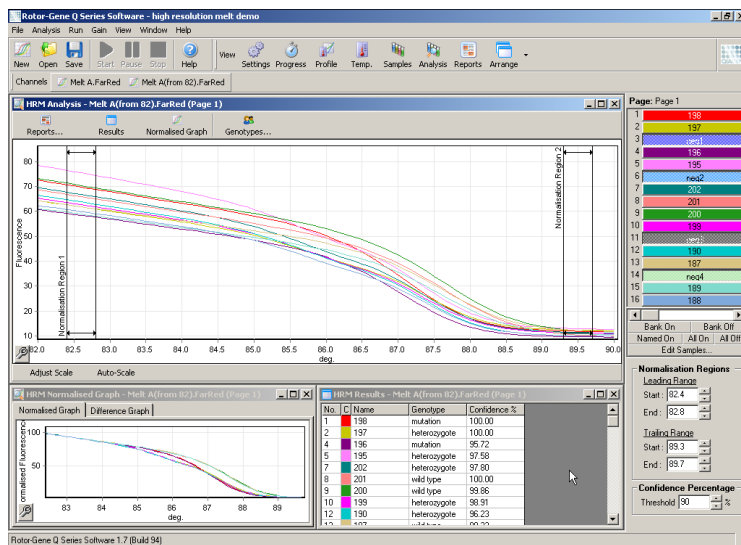
Poznámka: Analýza první derivace křivky tání (jak ji používá standardní volba **Melt** (Křivka tání) v okně **Analysis** (Analýza)) se považuje pro analýzu HRM za nevhodnou. Je to proto, že každá derivace dat vnáší umělý šum a znesnadňuje interpretaci dat.

Analýzu výsledků HRM pomocí softwaru Rotor-Gene Q popisují následující kroky.

1. Vyberte možnost **HRM** v okně **Analysis** (Analýza).

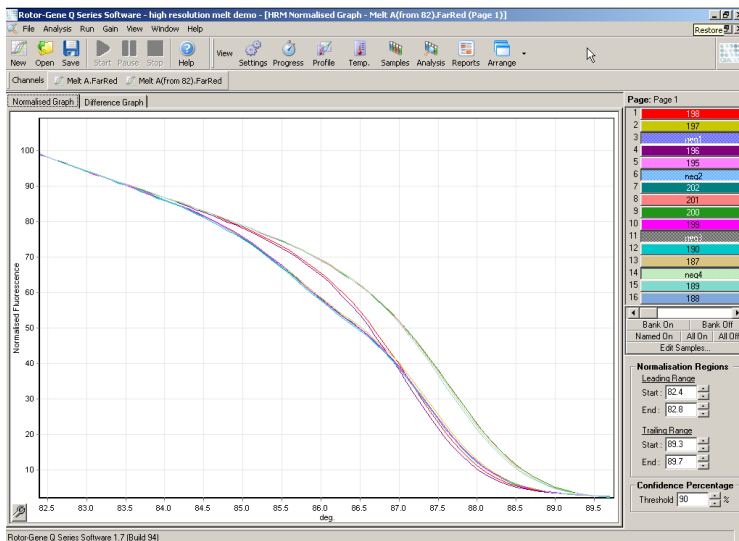


2. Objeví se okna s nezpracovanými údaji, normalizovaným grafem a výsledky. Okno s nezpracovanými údaji umožňuje úpravu regionů normalizace. Normalizace umožňuje porovnání všech křivek se stejnou počáteční a konečnou úrovní fluorescenčního signálu, což usnadňuje interpretaci a analýzu. V každém regionu jsou dva kurzory standardně umístěné na konce křivky. Datové body v regionech slouží k normalizaci fluorescence (pouze osa y) pro začátek (Region 1) a konec (Region 2) křivky tání. Data mimo nastavené regiony jsou ignorována. Upravte regiony tak, aby obsahovaly reprezentativní počáteční data pro fázi před táním a po tání. Rozšíření regionů (kliknutím a potažením) umožňuje softwaru úpravu sklonu základní linie. Chcete-li zajistit účinnou normalizaci křivek, nerozšiřujte regiony normalizace do fáze tání.

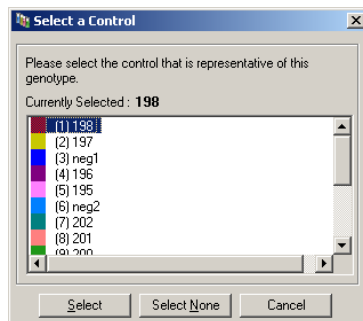
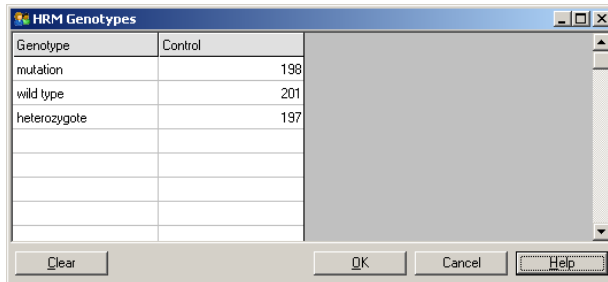


Poznámka: Doporučujeme posouvat kurzory jen v případě, že se chcete vyhnout některým oblastem křivky tání. Přesun kurzorů směrem k přechodům do fáze tání může ovlivnit grafy odčítání a procenta spolehlivosti.

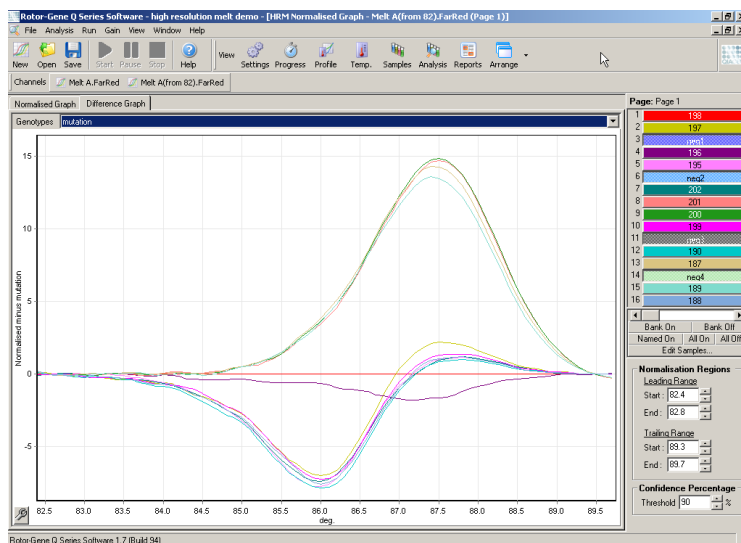
3. V okně **Normalised Graph** (Normalizovaný graf) jsou zobrazeny normalizované křivky tání. Vzorky je také možné zobrazit jako diferenční křivku ve srovnání s jednou z kontrol.



4. Kliknutím na tlačítko **Genotypes...** (Genotypy...) definujete genotypy. Zadejte název jednotlivých kategorií genotypů a ze seznamu vzorků pro každý vyberte reprezentativní vzorek.



5. Zobrazte diferenční graf výběrem karty **Difference Graph** (Diferenční graf). Pak v rozevírací nabídce v horní části okna vyberte genotyp, který chcete porovnat se všemi ostatními vzorky. V uvedeném příkladu jsou všechny vzorky vykresleny jako odečtené od průměrného grafu všech vzorků označených jako **Mutation 1** (Mutace 1).



6. Genotypy budou automaticky vyvolány softwarem v okně **Results** (Výsledky). Hodnota spolehlivosti je uvedena pro kontrolu integrity automaticky vyvolaných výsledků. Prahovou hodnotu, nad kterou se provádí automatické vyvolání, lze upravit. Vzorky spadající pod nastavenou prahovou hodnotu budou označeny jako odchylka pro bližší zkoumání nebo opakování testu.

No.	C	Name	Genotype	Confidence %
1	198	mutation	mutation	100.00
2	197	heterozygote	heterozygote	100.00
4	196	mutation	mutation	95.72
5	195	heterozygote	heterozygote	97.58
7	202	heterozygote	heterozygote	97.80
8	201	wild type	wild type	100.00
9	200	wild type	wild type	99.86
10	199	heterozygote	heterozygote	98.91
12	190	heterozygote	heterozygote	96.23
13	187	wild type	wild type	99.23
15	189	wild type	wild type	97.59

Normalisation Regions

Leading Range
 Start: 82.4
 End: 82.8

Trailing Range
 Start: 89.3
 End: 89.7

Confidence Percentage
 Threshold: 90 %

11 Řešení potíží

Tato kapitola obsahuje informace o tom, co dělat, když dojde k chybě při použití systému Rotor-Gene Q MDx system.

Pokud potřebujete další pomoc, obraťte se na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN za použití níže uvedených kontaktních údajů:

Internetové stránky: **support.qiagen.com**

Až budete oddělení technických služeb společnosti QIAGEN informovat o chybě systému Rotor-Gene Q MDx, poznamenejte si kroky vedoucí k chybě a případné informace v dialogových oknech. Tyto informace pomohou pracovníkům technických služeb společnosti QIAGEN problém vyřešit.

Než se obrátíte na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN s dotazem na chyby, připravte si následující informace:

- sériové číslo, typ a verzi přístroje Rotor-Gene Q MDx,
- verzi softwaru (je-li relevantní),
- časový bod, kdy se chyba poprvé objevila,
- četnost chyby (tzn. občasná nebo trvalá chyba),
- podrobný popis chybové situace,
- fotografii chyby, je-li to možné,
- kopie souborů protokolu.

Tyto informace pomohou vám a specialistovi z oddělení technických služeb společnosti QIAGEN vyřešit problém co nejefektivněji.

Poznámka: Informace o nejnovějších verzích softwaru a protokolu lze nalézt na adrese **www.qiagen.com**. V některých případech mohou být k dispozici aktualizace pro řešení specifických problémů.

11.1 Archivy protokolů

Software v úložišti Log Archive (Archiv protokolů) uchovává neupravený záznam každého zpracování společně s diagnostickými údaji. Když stisknete tlačítko **Help** (Nápověda) a pak možnost **Send Support Email** (Odeslat e-mail podpory), můžete oddělení technických služeb společnosti QIAGEN zaslat e-mail se všemi potřebnými diagnostickými údaji (viz část 6.12.1).

Aby se ušetřilo místo na disku, do archivu protokolů se ukládá 60 nejnovějších zpracování. Starší zpracování jsou v archivu protokolů při vytvoření nových zpracování v archivu protokolů přepíší.

11.2 Hardwarové a softwarové chyby

11.2.1 Řešení potíží s analýzou HRM

Komentáře a návrhy	
Nelze spustit HRM	
Model přístroje Rotor-Gene Q MDx není vybaven pro HRM	Kontaktujte místního zástupce společnosti QIAGEN.
Nebyla získána žádná data HRM	
Nesprávné nastavení	Zkontrolujte nastavení filtru. Zkontrolujte, zda je správný typ rotoru. Zkontrolujte, zda byly použity správné reagenty. Zkontrolujte, zda byla reakce správně nastavena. Proveďte experiment s pozitivní kontrolou (tj. analýzu se známými výsledky).
Křivky mají rozeklaný vzhled	
Slabá nebo žádná amplifikace	Zkontrolujte, zda byly použity správné protokoly a reagenty. Pro analýzu HRM doporučujeme soupravy QIAGEN. Zkontrolujte, zda byla reakce správně nastavena. Zkontrolujte podmínky cyklování. Zkontrolujte počáteční kvalitu a množství templátu. Pro přípravu vzorků doporučujeme soupravy QIAGEN.
Grafy amplifikace nebo tání jsou satureované	
Nastavené zesílení je příliš vysoké	Použijte funkci Auto-Gain Optimisation (Automatická optimalizace zesílení) (viz strana 62).
Procentuální hodnota spolehlivosti se změnil	
Regiony normalizace byly přesunuty kliknutím a potažením	Regiony normalizace přesouvejte, jen když je to nutné, abyste se vyhnuli určitým částem křivky tání.
Data obsahují odlehle hodnoty	
Nekonzistentní nastavení reakce	Zkontrolujte, zda byly použity správné reagenty. Zkontrolujte, že použité zkumavky jsou jednotné.
Inhibitory ve vzorku	Zkontrolujte, že byla u všech vzorků použita stejná směs master mix.
Příliš málo templátů nebo degradovaný templát	Zkontrolujte počáteční kvalitu a množství templátu.

11.3 Chybová a varovná hlášení

11.3.1 Obecné chyby přístroje

Chybová zpráva	Komentáře a návrhy
Can't open the serial port <COMPORT> (Nelze otevřít sériový port <COMPORT>)	<p>K této chybě dochází při spuštění softwaru, pokud software nemůže komunikovat s přístrojem prostřednictvím nakonfigurovaného portu COM. Nejčastěji ji způsobují vadné kabely, uvolněné kabely, vadné sériové porty, vadné porty USB, problém s ovladačem rozhraní USB nebo problém s ovladačem převodníku z rozhraní USB na sériové.</p> <p>Znovu připojte nebo vyměňte kabel. Znovu nainstalujte vhodné ovladače. Spusťte software pomocí funkce Virtual Mode (Virtuální režim) a výběrem tlačítka Setup/Auto-Detect (Nastavit/Detekovat automaticky) v nabídce File (Soubor) resetujte nakonfigurovaný port COM.</p>
Chamber lid open (Otevřené víko komory) Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software. (Nelze pokračovat ve zpracování; víko komory bylo během zpracování otevřeno. Resetujte přístroj a znovu spusťte software.)	<p>K této chybě dochází, když software během zpracování zjistí, že je otevřené víko.</p> <p>Resetujte přístroj a znovu spusťte software.</p>
Chamber lid open (Otevřené víko komory) The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue. (Víko komory v přístroji je otevřené. Zavřete víko a pak klikněte na tlačítko Continue (Pokračovat).)	<p>K této chybě dojde, když se uživatel pokusí spustit zpracování a víko přístroje je otevřené.</p> <p>Zavřete víko komory přístroje a pak klikněte na tlačítko Continue (Pokračovat).</p>
Communication corrupted (Poškozená komunikace)	<p>K této chybě dochází, pokud data přijatá z přístroje neodpovídají očekávanému vzoru.</p> <p>K diagnostice problému s přístrojem je zapotřebí, aby specialista terénního servisu společnosti QIAGEN provedl další šetření.</p> <p>Kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.</p>
Communication out of sequence (Komunikace mimo sekvenci) Instrument has received data from the machine that is out of sequence. (Přístroj obdržel z procesoru data, která jsou mimo sekvenci.)	<p>K této chybě dochází, pokud data přijatá z přístroje nemají správné pořadí.</p> <p>K diagnostice problému s přístrojem je zapotřebí, aby specialista terénního servisu společnosti QIAGEN provedl další šetření.</p> <p>Kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.</p>
Communication protocol error (Chyba protokolu komunikace) A communication protocol error occurred with this run. (U tohoto zpracování došlo k chybě protokolu komunikace.)	<p>K této chybě dochází, když komunikační protokol nakonfigurovaný ve firmwaru neodpovídá očekávanému protokolu.</p> <p>K diagnostice problému s komunikačním protokolem přístrojem je zapotřebí, aby specialista terénního servisu společnosti QIAGEN provedl další šetření.</p>
Detector motor jam, stopped machine (Zablokování motoru detektoru, stroj se zastavil)	<p>K této chybě může dojít, když byl přístroj Rotor-Gene Q MDx spuštěn ihned po jeho dodání v chladném prostředí.</p> <p>V takovém případě nechte přístroj před zapnutím aklimatizovat nejméně hodinu na pokojovou teplotu.</p> <p>Pokud chyba přetrvává, kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.</p>
Fatal hardware malfunction (Závažná závada hardwaru) The instrument detected that there was a fatal hardware malfunction. Do not attempt to re-use the machine until the machine has been serviced by your distributor. (Přístroj detekoval závažnou závadu hardwaru. Nepokoušejte se jej znovu použít, dokud jej neopraví distributor.)	<p>K této chybě dochází, když software detekoval závažnou závadu hardwaru a automaticky aktivoval ochranný postup vypnutí přístroje.</p> <p>Přístroj okamžitě vypněte a kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.</p>

Chybová zpráva

Komentáře a návrhy

Machine error (Chyba přístroje)

This run was stopped as machine errors occurred that could not be recovered from. Please contact your distributor if this occurs again, attaching a support archive file. (Toto zpracování bylo zastaveno, protože u přístroje došlo k chybám, které nebylo možné odstranit. Pokud se tato chyba objeví znovu, kontaktujte distributora a přiložte pomocný archivní soubor.)

Machine unplugged (Přístroj nezapojen)

The instrument is not responding and failed with the message <ERROR MESSAGE >. This is an unrecoverable failure, please reset the instrument and restart the software. (Přístroj neodpovídá a zobrazila se zpráva <CHYBOVÁ ZPRÁVA>. Tuto závadu nelze odstranit. Resetujte přístroj a znovu spusťte software.)

Machine unplugged (Přístroj nezapojen)

The instrument is not connected to your computer on <PORT NAME>. Reconnect the serial cable to the back of the computer and then click Continue. (Přístroj není připojen k počítači na <NÁZEV PORTU>. Znovu zapojte sériový kabel do zadní části počítače a pak klikněte na tlačítko Continue (Pokračovat).)

Object variable or with block variable not set (Proměnná typu Object nebo blok With není nastavena)

Rotor speed failure (Chyba otáček rotoru)

Time out while setting the rotor speed. (Vypršení časového limitu při nastavování otáček rotoru.)

Serial port in use (Používá se sériový port)

The serial port is currently being used by another application. Close any applications such as communications or synchronization software and then retry. (Sériový port aktuálně používá další aplikace. Zavřete všechny aplikace, například komunikační nebo synchronizační software, a pak pokus opakujte.)

Shutdown timeout (Časový limit pro vypnutí)

The instrument has exceeded the expected time to shutdown. Please reset the machine, and reset the software. (Přístroj překročil předpokládanou dobu do vypnutí. Resetujte přístroj a resetujte software.)

K této chybě dochází, když software detekuje chyby, které není možné odstranit. Software zastavil zpracování.

Zkuste další zpracování. Pokud problém přetrvává, kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN a přiložte pomocný archivní soubor.

K této chybě dochází, když přístroj po definovaném intervalu časového limitu nekomunikuje se softwarem. Často ji způsobuje závada přístroje nebo nadměrná aktivita v počítači, která vede ke ztrátě paketu.

K častým příčinám souvisejícím se softwarem patří úlohy zatěžující procesor, například antivirová ochrana nebo naplánované antivirové kontroly, bezdrátové karty nebo infračervené karty.

Deaktivujte nebo odinstalujte příslušný software nebo úlohu zatěžující procesor.

Resetujte přístroj a znovu spusťte software.

Pokud problém přetrvává, kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.

K této chybě dochází, když selže sériová nebo USB komunikace s přístrojem.

Znovu zapojte sériový kabel nebo kabel USB do zadní části počítače a pak klikněte na tlačítko **Continue** (Pokračovat).

K této chybě dochází při spuštění softwaru, pokud byl poškozen soubor výchozí šablony experimentu. To se může stát, když je software nebo počítač vypnut bez správného ukončení, například při výpadku napájení.

Odstraňte soubor **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\normal.ret** a pak znovu spusťte software.

K této chybě dochází, když se software pokusí nastavit otáčky rotoru a nepodaří se nastavit cílové otáčky v časovém limitu.

K diagnostice problému s přístrojem je zapotřebí, aby specialista terénního servisu společnosti QIAGEN provedl další šetření.

Kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.

K této chybě dochází, když se software pokouší připojit k přístroji na nakonfigurovaném portu COM, ale tento port je právě používán jiným softwarem.

Zavřete všechny aplikace, například komunikační nebo synchronizační software, a pak pokus opakujte.

K této chybě dochází, když software vydal příkaz k vypnutí přístroje a procesor stále odesílá data zpět i po předpokládaném časovém limitu.

Resetujte přístroj a znovu spusťte software.

Chybová zpráva

Komentáře a návrhy

Temperature protection activated (Aktivována tepelná ochrana)

The instrument detected that the chamber temperature increased above a safe level. It has therefore entered a self-protection mode. Please turn off the instrument and contact your distributor if the problem persists. (Přístroj zjistil, že teplota komory se zvýšila nad bezpečnou úroveň. Přístroj proto přešel do režimu automatické ochrany. Pokud problém přetrvává, vypněte přístroj a kontaktujte distributora.)

K této chybě dochází, když software zjistí, že teplota komory se zvýšila nad bezpečnou úroveň, a proto aktivoval automatický postup ochrany.

Přístroj okamžitě vypněte a kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.

Thermistor is open (Je otevřený termistor)

The instrument detected that the thermistor is open, and so to prevent damage to the machine, it has been turned off. Please contact your distributor if this occurs again. (Přístroj zjistil, že je otevřený termistor, a aby nedošlo k poškození přístroje, vypnul se. Pokud se tato chyba objeví znovu, kontaktujte distributora.)

K této chybě dochází, když software zjistí, že je otevřený termistor, a proto nemůže odečíst teplotu; software tedy aktivoval automatický postup ochrany na vypnutí přístroje.

Přístroj okamžitě vypněte a kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.

Unrecoverable errors occurred (Došlo k neodstranitelným chybám)

This run was stopped as machine errors occurred that could not be recovered from. Please contact your distributor if this occurs again, attaching a support archive file. (Toto zpracování bylo zastaveno, protože u přístroje došlo k chybám, které nebylo možné odstranit. Pokud se tato chyba objeví znovu, kontaktujte distributora a přiložte pomocný archivní soubor.)

K této chybě dochází během zpracování poté, co software učinil všechny možné pokusy o její odstranění a nepodařilo se to.

K diagnostice problému s přístrojem je zapotřebí, aby specialista terénního servisu společnosti QIAGEN provedl další šetření.

Kontaktujte distributora nebo technické služby společnosti QIAGEN.

11.3.2 Zprávy softwaru Rotor-Gene Q

Níže uvádíme přehled zpráv týkajících se používání, varovných a jiných zpráv, které se mohou objevit v softwaru Rotor-Gene během činnosti hardwaru a softwaru. Všechny části zprávy, které představují proměnnou, např. charakteristický popis chyby, jsou uvedeny v závorkách (např. <POPIS CHYBY>).

Text zprávy

Obecné zprávy

- 1 A raw channel already exists for this page. If you would like to recreate this page, you must first delete the raw channel via the Options button and then try again. (Pro tuto stranu již existuje kanál nezpracovaných dat. Chcete-li tuto stranu vytvořit znovu, musíte nejdříve odstranit kanál nezpracovaných dat pomocí tlačítka Options (Možnosti) a pak pokus zopakovat.)
- 2 A serious problem has occurred which requires shutting down the software. After you click OK, your current work will be saved, and the machine will be turned off, if possible. If this problem persists, please contact your distributor. (Došlo k vážnému problému, který vyžaduje vypnutí softwaru. Po kliknutí na tlačítko OK se vaše aktuální práce uloží a bude-li to možné, přístroj se vypne. Bude-li tento problém přetrvávat, kontaktujte distributora.)
- 3 Cannot delete this page. There must always be at least one sample page. (Tuto stranu nelze odstranit. Vždy musí existovat alespoň jedna strana se vzorky.)

Text zprávy

- 4 Can't connect to instrument on serial port <COMPORT>. Check the machine is correctly plugged into the back of the computer, then retry. (Nelze se připojit k přístroji na sériový port <COMPORT>. Zkontrolujte, zda je přístroj správně zapojen na zadní straně počítače, pak pokus zopakujte.)
- 5 Can't open the serial port <COMPORT> to connect to the instrument. Check you do not have any communications software open, then retry. (Nelze otevřít sériový port <COMPORT> pro připojení k přístroji. Zkontrolujte, zda není otevřený nějaký komunikační software, pak pokus zopakujte.)
- 6 Could not save to run because some data on the form was invalid. Please check your entries then try again. (Nepodařilo se uložit zpracování, protože některá data ve formuláři jsou neplatná. Zkontrolujte zadané hodnoty, pak pokus zopakujte.)
- 7 Couldn't save file. Confirm the disk has enough space and that it is free of errors. (Nepodařilo se uložit soubor. Potvrďte, že je na disku dost místa a že na něm nejsou chyby.)
- 8 E-mail application could not be started. Confirm that it has been correctly installed on your computer. (E-mailovou aplikaci nebylo možné spustit. Potvrďte, že je v počítači správně nainstalovaná.)
- 9 Encountered an error during run: <ERROR DESCRIPTION>. The run will continue, and a message will be logged in the messages tab of Run Info. (Během zpracování došlo k chybě: <POPIS CHYBY>. Zpracování bude pokračovat a zpráva bude uložena na kartu se zprávami v okně Run Info (Informace o zpracování).)
- 10 Instrument was not detected. Please ensure you have correctly connected the instrument, and that the instrument is turned on. (Nebyl detekován přístroj. Ověřte, že je přístroj správně připojený a že je zapnutý.)
- 11 Logging is currently disabled due to a previous error. Archived logs cannot be viewed until the software has been restarted. (Protokolování je aktuálně neaktivní z důvodu předchozí chyby. Archivované protokoly bude možné zobrazit až po restartování softwaru.)
- 12 Not all samples could be normalised as the fluorescent level was too low. (Nebylo možné normalizovat všechny vzorky z důvodu příliš nízké úrovně fluorescence.)
- 13 Only runs performed with the same rotor as the current run may be imported. (Lze importovat pouze zpracování provedená se stejným rotorem jako v aktuálním zpracování.)
- 14 Please note that log files for the current run will not be available until it has completed. (Upozorňujeme, že soubory protokolů pro aktuální zpracování budou dostupné až po jeho dokončení.)
- 15 Please type valid number of times to repeat. It should be more than 0. (Napište platný počet opakování. Číslo musí být vyšší než 0.)
- 16 Problem encountered while updating log data. Logging has been disabled, but will be reenabled on the next run. (Při aktualizaci dat protokolu došlo k problému. Protokolování je deaktivováno, ale bude znovu aktivní v příštím zpracování.)
- 17 Run file signing ensures the integrity of your run results. Information about a run's signature can be found in the Run Info window. (Podpis souboru zpracování zajišťuje integritu výsledků vašeho zpracování. Informace o podpisu zpracování jsou uvedeny v okně Run Info (Informace o zpracování).)
- 18 Sample ID is locked. Cannot paste over locked samples. (ID vzorku je uzamknuté. Nelze vkládat přes uzamknuté vzorky.)
- 19 TeeChart Office has not been installed on this computer. Please re-install the Rotor-Gene software. (Nástroj TeeChart Office není v tomto počítači nainstalovaný. Přeinstalujte software Rotor-Gene.)
- 20 The COM port configured for the instrument is not selected. You must select a COM port. (Port COM nakonfigurovaný pro přístroj není zvolený. Musíte zvolit port COM.)
- 21 The loaded run file contains a signature which does not match the file contents. This means the file has either been corrupted, or tampered with since it was written by the Rotor-Gene software. (Načtený soubor zpracování obsahuje podpis, který neodpovídá obsahu souboru. To znamená, že soubor je buďto poškozený, nebo s ním bylo od jeho zápisu softwarem Rotor-Gene manipulováno.)
- 22 The loaded run file has no signature. The contents of this file cannot be guaranteed. (Načtený soubor zpracování nemá podpis. Obsah tohoto souboru nelze zaručit.)
- 23 The Machine serial number is not valid. Serial numbers must be at least 6 digits long. (Sériové číslo přístroje není platné. Sériová čísla musí mít alespoň 6 číslic.)
- 24 The machine will now be cooled to <TEMPERATURE> degrees. The chamber and surfaces will still be very hot when opening the machine. Please exercise due caution and wear protective gloves if touching any of the surfaces or tubes. (Přístroj se nyní ochladí na <TEPLOTA> stupňů. Komora a povrch budou při otevírání přístroje stále velmi horké. Budete-li se dotýkat povrchů nebo zkumavek, postupujte opatrně a navlékněte si ochranné rukavice.)
- 25 The regional settings for your computer are conflicting. Ensure your currency and numeric decimal place holders are matching. (Regionální nastavení pro váš počítač jsou konfliktní. Ověřte, že odpovídají zástupné symboly pro měnu a desetinná čísla.)
- 26 The serial number entered in the welcome screen <SERIAL NUMBER1> does not match the serial number stored in the attached machine <SERIAL NUMBER2>. The computer's serial number has now been updated to match the connected machine. (Sériové číslo zadané na úvodní obrazovce <SÉRIOVÉ ČÍSLO1> neodpovídá sériovému číslu uloženému v připojeném přístroji <SÉRIOVÉ ČÍSLO2>. Sériové číslo počítače bylo nyní aktualizováno podle připojeného přístroje.)

Text zprávy

- 27 There was a problem communicating with the communication board. You should reboot the computer and then retry. (Došlo k problému komunikace s komunikačním panelem. Restartujte počítač a zkuste to znovu.)
- 28 There was a timeout attempting to talk to the instrument. Check it is correctly plugged in. (Při navazování komunikace s přístrojem vypršel časový limit. Zkontrolujte připojení přístroje.)
- 29 This feature cannot be used in virtual mode. (Tuto funkci nelze použít ve virtuálním režimu.)
- 30 This profile file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. (Tento soubor profilu byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé aspekty se nemusí načíst správně.)
- 31 This run file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the run may not load correctly. (Tento soubor zpracování byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé aspekty zpracování se nemusí načíst správně.)
- 32 This sample file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. (Tento soubor vzorku byl vytvořen v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé aspekty se nemusí načíst správně.)
- 33 This software will perform basic simulation of a machine for training and demonstration purposes. You can disable this setting via the Setup screen, accessible from the File menu. (Tento software provede základní simulaci přístroje pro nácvik a na ukázkou. Toto nastavení můžete deaktivovat na obrazovce Setup (Nastavení) přístupné z nabídky File (Soubor).)
- 34 This template was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the template may not load correctly. (Tato šablona byla vytvořena v novější verzi softwaru Rotor-Gene. Některé aspekty šablony se nemusí načíst správně.)
- 35 Unable to load this sample file as tube layouts do not match. Load these samples before starting the run. (Nelze načíst tento soubor vzorku, protože rozvržení zkumavek vzájemně neodpovídají. Načtete tyto vzorky před zahájením zpracování.)
- 36 Unable to open communications with the machine because another application is already using <COMPORT>. Check you do not have any applications running that use the same serial port, then retry. (Nelze navázat komunikaci s přístrojem, protože port <COMPORT> je již používán jinou aplikací. Zkontrolujte, zda nejsou spuštěné aplikace, které používají stejný sériový port, pak to zkuste znovu.)
- 37 Unrecoverable errors were encountered while attempting to load the file. The file was not loaded. (Při pokusu o načtení souboru došlo k neodstranitelným chybám. Soubor nebyl načten.)
- 38 You cannot stop the program while the run is in progress. (Nelze zastavit program v průběhu zpracování.)
- 39 You have insufficient rights to use the software. Please contact the domain administrator to set up groups. (Nemáte oprávnění používat software. Požádejte správce domény o nastavení skupin.)
- 40 You must have performed a quantitation analysis to export samples. (Pro export vzorků musíte provést kvantitativní analýzu.)
- 41 You must select a COM port before continuing. (Abyste mohli pokračovat, musíte vybrat port COM.)
- 42 Your run could not be saved to its default location. On the following window, select an alternative location to save your run. (Zpracování nebylo uloženo do výchozího umístění. V následujícím okně vyberte alternativní umístění pro uložení zpracování.)
- 43 Your settings have been saved. Click OK to close the software. (Nastavení bylo uloženo. Kliknutím na tlačítko OK zavřete software.)
- 44 You must select a rotor before continuing. (Abyste mohli pokračovat, musíte vybrat rotor.)
- 45 You cannot start the run until you tick the checkbox to confirm that the locking ring has been attached. (Zpracování lze spustit až po zaškrtnutí políčka pro potvrzení, že byl připevněn pojistný kroužek.)
- Zprávy o úpravách automatického zesílení**
- 46 Manual gain adjustment uses the channels you have defined in your profile. As you have not defined any acquisition points in your profile, you cannot perform manual gain adjustment. (Při manuální úpravě zesílení se používají kanály definované ve vašem profilu. Protože jste ve svém profilu nedefinovali žádné akviziční body, manuální úpravu zesílení nemůžete provést.)
- 47 The temperature you entered was not saved because it was outside the range of the machine. Enter a valid temperature. (Zadaná teplota nebyla uložena, protože je mimo rozsah přístroje. Zadejte platnou teplotu.)
- Zprávy editoru**
- 48 Please enter a valid group code. Group codes must be a maximum of 5 characters, and contain no spaces or commas. (Zadejte platný kód skupiny. Kódy skupiny musí mít maximálně 5 znaků a nesmí obsahovat mezery ani čárky.)
- 49 Please enter a valid group name. Group names cannot contain commas or be empty. (Zadejte platný název skupiny. Názvy skupin nesmí obsahovat čárky a nesmí být prázdné.)
- Zprávy o kalibraci optické denaturace**
- 50 Unable to set as optical denature point due to calibration failure. Please enter a valid number of seconds to hold. It should be a positive value. (Nelze nastavit jako bod pro optickou denaturaci z důvodu chyby kalibrace. Zadejte platný počet sekund výdrže. Hodnota musí být kladná.)

Text zprávy

51 A melt peak could not be detected during Optical Denature Calibration. This may be because the incorrect tube was selected for calibration, or that an inappropriate chemistry was used for this sample. A timed step profile was run instead. (Během kalibrace optické denaturace nebyl detekován vrchol tání. Může to být z důvodu výběru nesprávné zkumavky pro kalibraci nebo použití nevhodné chemikálie pro tento vzorek. Místo toho byl proveden profil s časovanými kroky.)

Zprávy o OTV

52 You must enter a valid OTV serial number to perform the run. (Abyste mohli provést zpracování, musíte zadat platné sériové číslo OTV.)

53 This temperature verification file has been corrupted. Please uninstall and re-install the Rotor-Gene software to correct this error. (Tento soubor ověření teploty je poškozený. Tuto chybu odstraníte, když odinstalujete a znovu nainstalujete software Rotor-Gene.)

54 This run file is not correctly signed. Results cannot be displayed. (Tento soubor zpracování není správně podepsaný. Výsledky nelze zobrazit.)

55 You cannot start until you tick the checkbox to confirm that the fluorescent insert has been placed correctly. (Bude možné začít až po zaškrtnutí políčka pro potvrzení, že byla správně umístěna fluorescenční vložka.)

56 This rotor has expired. Please contact your distributor to obtain a replacement. (Uplynula doba použitelnosti tohoto rotoru. Požádejte distributora o náhradní.)

Zprávy nabídky zabezpečení

57 Could not open the Windows user/group manager. (Nelze otevřít správce uživatelů/skupin systému Windows.)

58 Could not create groups. (Nelze vytvořit skupiny.)

59 Cannot modify access of inbuilt accounts. (Nelze změnit přístup k předdefinovaným účtům.)

Nabídka Analýza

60 You have only selected one channel for analysis. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window. (Pro analýzu jste vybrali jen jeden kanál. Chcete-li vybrat několik kanálů, nakreslete obdélník kolem kanálů, které se mají zobrazit v okně výběru pro analýzu.)

61 You have selected multiple channels for analysis. This analysis technique only allows single channels to be analysed. (Pro analýzu jste vybrali několik kanálů. Tato technika analýzy umožňuje analýzu jen jednoho kanálu.)

Zprávy o měření koncentrace

62 Concentration Measurement performs auto-gain optimisation on the first rotor position. Ensure you have your highest concentration standard in the first rotor position. (Měření koncentrace provádí automatickou optimalizaci zesílení v první pozici na rotoru. Ověřte, že v první pozici na rotoru máte standard s nejvyšší koncentrací.)

Zprávy o analýze konečné fluorescence

63 To use end-point analysis you must have positive and negative controls in each channel. To define these controls click OK. (Abyste mohli použít analýzu konečné fluorescence, musíte mít v každém kanálu pozitivní a negativní kontrolu. Chcete-li tyto kontroly definovat, klikněte na tlačítko OK.)

64 You have not defined any positive controls. You must define positive controls for each channel you are analysing. (Nedefinovali jste žádné pozitivní kontroly. Musíte definovat pozitivní kontroly pro každý analyzovaný kanál.)

65 You have not defined any negative controls. You must define negative controls for each channel you are analysing. (Nedefinovali jste žádné negativní kontroly. Musíte definovat negativní kontroly pro každý analyzovaný kanál.)

66 You have not defined any NTC controls. You must define NTC controls for each group. (Nedefinovali jste žádné kontroly NTC. Musíte definovat kontroly NTC pro každou skupinu.)

Zprávy o analýze HRM

67 Genotype <GENOTYPE NAME> does not have a control defined. (Genotyp <NÁZEV GENOTYPU> nemá definovanou kontrolu.)

68 Duplicate genotype combinations are not allowed. (Duplicitní kombinace genotypů nejsou povoleny.)

69 High resolution melts are not supported on this instrument. Please contact your distributor for more information. (Křivky tání s vysokým rozlišením nejsou v tomto přístroji podporovány. Další informace obdržíte od distributora.)

Zprávy o analýze křivek tání

70 The genotypes can not be defined until bins have been placed. Please define all bins and then try again. (Genotypy lze definovat až po umístění binů. Definujte všechny biny a pak to zkuste znovu.)

71 You must enter an abbreviation for <GENOTYPE NAME> genotype. (Musíte zadat zkratku pro genotyp <NÁZEV GENOTYPU>.)

Text zprávy

Zprávy o analýze bodového grafu

- 72 Scatter plot analysis requires exactly 2 channels to be selected. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window, or click while holding the SHIFT key on each channel. (Analýza bodového grafu vyžaduje výběr přesně 2 kanálů. Chcete-li vybrat několik kanálů, nakreslete obdélník kolem kanálů, které se mají zobrazit v okně výběru pro analýzu, nebo stiskněte klávesu SHIFT a přitom klikněte na jednotlivé kanály.)

Zprávy o kvantitativní analýze

- 73 The auto-find threshold feature requires that you have defined at least 2 selected standards. To set this up, right-click on the sample list and select "Edit Samples..." (Funkce automatického vyhledání prahové hodnoty vyžaduje, abyste definovali alespoň 2 vybrané standardy. Nastavení provedte kliknutím pravým tlačítkem myši na seznam vzorků a výběrem možnosti „Edit Samples...“ (Upravit vzorky...)).

12 Glosář

Termín	Popis
Akvizice	Akvizice je sběr dat o fluorescenci. Každá akvizice (soubor daty o fluorescenci) z určitého kanálu se zobrazí v softwaru jako neanalyzovaná data v okně „Raw channel“ (Kanál pro nezpracovaná data). Tato data lze analyzovat pomocí možnosti v nabídce „Analysis“ (Analýza).
Biny	V analýze křivek tání biny určují oblast, v němž se předpokládá výskyt vrcholu tání. Genotypy lze definovat podle přítomnosti vrcholů v určitých binech nebo kombinacích binů.
CE-IVD	Shoda s evropskou směnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro.
Kanál	Kanál se skládá z diody emitující světlo (LED) s excitačním filtrem spárovaným s filtrem emisním. LED dioda a excitační filtr excitují vzorky při dané vlnové délce. Fluorescence emitovaná ze vzorků prochází emisním filtrem a pak je detekována fotonásobičem.
Zesílení	Rotor-Gene Q MDx používá fotonásobič ke shromažďování fluorescenčních fotonů a k jejich převádění na elektronické signály. Zesílení je nastavení, které určuje citlivost fotonásobiče. Pokud je zesílení nastaveno příliš vysoké, je signál přesycený. Je-li zesílení nastaveno příliš nízké, nelze odlišit signál od šumu pozadí.
Optimalizace zesílení	Optimalizace zesílení je proces, který dynamicky upravuje nastavení zesílení a umožňuje zvolit vhodné nastavení, což vede k optimální detekci signálů.
Loading Block	Jedná se o hliníkové bloky dodávané v různých velikostech, které drží zkumavky nebo kotouče Rotor-Disc během přípravy reakce. Bloky Loading Block pro kotouče Rotor-Disc se také používají se zařízením Rotor-Disc Heat Sealer k zatavení kotoučů Rotor-Disc.
Locking Ring	Jedná se o kovové kroužky, které se umísťují na rotor a brání uvolnění zkumavek a uzávěrů během provozu přístroje Rotor-Gene Q MDx. Volné zkumavky nebo uzávěry mohou způsobit poškození přístroje.
Rotor	Kovový rotor drží zkumavky nebo kotouče Rotor-Disc v přístroji Rotor-Gene Q MDx. Umožňuje otáčení vzorků v komoře přístroje a zajišťuje, aby vzorky byly správně vyrovnané s optickým systémem. Rotor je zajištěný kroužkem Locking Ring.
Rotor-Disc	Kotouče Rotor-Disc jsou kruhové desky se svisle orientovanými reakčními jamkami. K dispozici jsou formáty kotoučů Rotor-Disc pro 72 a 100 reakcí. Kotouče Rotor-Disc jsou utěsněné pomocí tepelně svařované fólie Rotor-Disc Heat Sealing Film a zařízení Rotor-Disc Heat Sealer.

13 Technické specifikace

Společnost QIAGEN si vyhrazuje právo technické údaje kdykoliv změnit.

13.1 Podmínky prostředí – provozní podmínky

Napájení	100–240 V AC, 50–60 Hz, 520 VA (špička) Napájecí příkon 60 VA (pohotovostní režim) Kolísání síťového napětí nesmí překročit 10 % nominální hodnoty napětí.
Pojistka	Pojistka F5A 250 V
Rozptyl tepla / tepelné zatížení	Průměr: 0,183 kW (632 BTU/h) Špička: 0,458 kW (1578 BTU/h)
Kategorie přepětí	II
Teplota vzduchu	18 až 30 °C
Relativní vlhkost	10–75 % (bez kondenzace)
Nadmožská výška	Do 2 000 m
Místo provozu	Pouze pro použití uvnitř budov
Úroveň znečištění	2
Klasifikace podmínek prostředí	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

13.2 Podmínky transportu

Teplota vzduchu	–25 °C až 60 °C v obalu od výrobce
Relativní vlhkost	Max. 75 % (bez kondenzace)
Klasifikace podmínek prostředí	2K2 (IEC 60721-3-2)

13.3 Podmínky skladování

Teplota vzduchu	15 °C až 30 °C v obalu od výrobce
Relativní vlhkost	Max. 75 % (bez kondenzace)
Klasifikace podmínek prostředí	1K2 (IEC 60721-3-1)

13.4 Mechanické údaje a charakteristiky technického vybavení

Rozměry	Šířka: 370 mm Výška: 286 mm Hloubka (bez kabelů): 420 mm Hloubka (otevřená dvířka): 538 mm
Hmotnost	Standardní konfigurace 12,5 kg
Kapacita	Až 100 vzorků v jednom zpracování při použití kotouče Rotor-Disc 100
Software	Software Rotor-Gene Q verze 2.3.x (kde x je ≥ 0)

13.5 Specifikace (hardware a software)

13.5.1 Tepelné specifikace

Popis	Specifikace
Rozsah teplot	35 °C až 99 °C (50 °C až 99 °C u aplikací s cyklováním)
Přesnost hodnot teploty	±0,5 °C (kalibrováno postupem Rotor-Disc OTV)
Rozlišení teploty	±0,02 °C (nejmenší naprogramovatelný přírůstek)
Stejnóměrnost teploty	±0,02 °C

13.5.2 Optické specifikace

Popis	Specifikace
Excitační zdroje	Vysokoenergetické světelné diody
Detektor	Fotonásobič
Doba akvizice	4 s

14 Příloha A – Právní informace

14.1 Prohlášení FCC

„United States Federal Communications Commission“ (Federální komise Spojených států pro komunikace, USFCC) (hlava 47 část 15.105 zákona CFR) vyhlásila, že uživatelé tohoto výrobku musí být informováni o následujících skutečnostech a okolnostech.

„Toto zařízení je ve shodě s částí 15 FCC: Provozování podléhá těmto dvěma podmínkám: (1) Toto zařízení nesmí způsobovat škodlivé rušení a (2) toto zařízení musí odolat jakémukoliv přijatému rušení včetně rušení, které může způsobit nežádoucí provoz.“

„Tento digitální přístroj třídy B splňuje kanadskou normu ICES-0003.“

Následující prohlášení se vztahuje na výrobky zahrnuté v této příručce, pokud není stanoveno jinak. Prohlášení ohledně jiných výrobků bude uvedeno v příložené dokumentaci.

Poznámka: Toto zařízení bylo testováno a bylo zjištěno, že je ve shodě s limity pro digitální zařízení třídy B, podle části 15 Pravidel FCC a splňuje všechny požadavky kanadské normy o zařízení způsobujícím rušení ICES-003 pro digitální přístroje. Tyto limity poskytují dostatečnou ochranu proti škodlivému rušení v domovním prostředí. Toto zařízení vytváří, používá a může vyzařovat vysokofrekvenční energii, a pokud nebude instalováno a používáno v souladu s pokyny, může způsobovat škodlivé rušení radiových komunikací. Nicméně nelze zaručit, že se toto rušení neobjeví při určité instalaci. Pokud toto zařízení ruší rozhlasový nebo televizní příjem, což lze zjistit zapnutím a vypnutím zařízení, pokuste se rušení napravit následujícími opatřeními:

- Otočením nebo přemístěním přijímové antény.
- Zvětšením oddělovací vzdálenosti mezi zařízením a přijímačem.
- Připojením zařízení k jinému obvodu, než ke kterému je připojen přijímač.

Poradte se s prodejcem nebo zkušeným radio/TV technikem.

14.2 Shoda s normou IEC EN 61326

Přístroj Rotor Gene-Q MDx vyhovuje požadavkům na rušivé emise a odolnost vůči rušení popsaným v normě IEC 61326-1 a IEC 61326-2-6.

QIAGEN GmbH Germany neodpovídá za žádné rádiové či televizní rušení způsobené neoprávněnými úpravami tohoto zařízení nebo náhradou či připojením propojovacích kabelů a jiných zařízení, než jsou zařízení specifikovaná společností QIAGEN GmbH Germany. Za opravu rušení způsobeného takovou neoprávněnou úpravou, náhradou nebo připojením bude zodpovídat uživatel.

14.3 Prohlášení o shodě

Název a adresa zákonného výrobce

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
Německo

Aktuální prohlášení shody si můžete vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN.

14.4 Odpadní elektrická a elektronická zařízení (OEEZ)

Tato část uvádí informace o nakládání s použitým elektrickým a elektronickým zařízením ze strany uživatelů.

Přeškrtnutý symbol popelnice na kolečkách (viz níže) znamená, že tento výrobek nesmí být likvidován s jiným odpadem; musí se odevzdat do schváleného zpracovatelského zařízení nebo do určeného sběrného místa k recyklaci podle místních zákonů a předpisů.

Oddělený sběr a recyklace elektronického odpadu v době likvidace pomáhá chránit přírodní zdroje a zajišťuje, že bude výrobek recyklován způsobem, který chrání lidské zdraví a životní prostředí.



Recyklaci může zajistit společnost QIAGEN na požádání za příplatek. V Evropské unii v souladu se specifickými recyklačními požadavky na OEEZ a v případě, že náhradní výrobek dodává společnost QIAGEN, je zajištěna recyklace elektronického zařízení označeného OEEZ zdarma.

Pro recyklaci elektronického vybavení kontaktujte místní prodejní zastoupení QIAGEN s žádostí o požadovaný formulář pro vrácení výrobku. Po podání formuláře se s vámi spojí zástupce společnosti QIAGEN, který buď požádá o doplňující informace pro naplánování sběru elektronického odpadu, nebo vám poskytne individuální nabídku.

14.5 Doložka o odpovědnosti

Společnost QIAGEN bude zbavena všech povinností podle této záruky v případě, že opravy či úpravy provádí jiné osoby než její vlastní personál s výjimkou případů, kdy společnost udělila písemný souhlas k provedení takových oprav a úprav.

Veškerý materiál vyměněný v rámci záruky má záruční dobu totožnou s původní záruční dobou a tato v žádném případě nepřekračuje původní dobu záruky, pokud není písemnou formou zástupcem společnosti ujednáno jinak. Délka záruční doby odečítacích a přídavných zařízení a přidruženého softwaru se řídí podmínkami, které poskytuje výrobce těchto zařízení. Ujistění a záruky poskytnuté jakoukoliv osobou, včetně zástupců společnosti QIAGEN, které neodpovídají těmto podmínkám této záruky nebo jsou s nimi v rozporu, nebudou pro společnost závazné, pokud je vedoucí pracovník společnosti QIAGEN nevydá v písemné podobě a neschválí.

14.6 Licenční smlouva k softwaru

1. „Qiagen“ v následujícím textu označuje společnost Qiagen GmbH a její přidružené společnosti a „softwarem“ se rozumí programy a data dodané na tomto fyzickém médiu (např. CD-ROM) či po internetu za těchto podmínek. (Nejste-li si jisti některým aspektem této smlouvy nebo máte-li dotazy, zašlete je e-mailem na adresu support@qiagen.com.) Software a případná doprovodná dokumentace byly vyvinuty zcela na soukromé náklady. Jsou dodávány a licencovány jako „komerční počítačový software“.

2. Licence

Vaše licence nezakládá žádné vlastnické právo k softwaru a nepředstavuje prodej jakýchkoli práv k softwaru. Společnost Qiagen vám uděluje nepřenositelnou nevýhradní licenci za těchto podmínek:

2.1 V rámci své organizace smíte používat libovolný počet kopií softwaru za předpokladu, že software bude přístupný pouze zaměstnancům organizace a že vaše organizace je aktuálním vlastníkem přístroje Rotor-Gene Q. Zpřístupnění tohoto softwaru pro použití mimo vaši organizaci představuje porušení této smlouvy.

2.2 Kopie softwaru smíte pořizovat pouze v případě, že je to nezbytné pro účely zálohování nebo pokud je kopírování nezbytným krokem při autorizovaném používání softwaru. Na všech kopiích musíte uvést všechna oznámení o autorských právech v původním softwaru. Za žádných okolností nesmíte software kopírovat na žádnou nástěnku, internetové stránky nebo podobný veřejný či soukromý distribuční systém.

2.3 Software nesmíte dát k dispozici žádné třetí straně formou daru, výpůjčky nebo pronájmu.

2.4 Software nebo jakoukoli jeho část nesmíte začlenit do programů nebo počítačových systémů, které vyvíjíte nebo používáte.

2.5 Nesmíte používat ani jinak vytvářet datové soubory nebo jiné soubory zpracovávané softwarem (kromě případů, kdy k tomu dochází při běžném provozu softwaru).

2.6 Nesmíte rozebírat, zpětně analyzovat, zpětně kompilovat, odemykat nebo překládat žádnou část softwaru ani se pokoušet zjistit zdrojový kód či základní algoritmy softwaru. Nesmíte měnit žádné datové soubory ani jiné soubory, které tvoří software (kromě případů, kdy k tomu dochází při běžném provozu softwaru).

2.7 Pokud se jedná o demonstrační nebo zkušební verzi softwaru, máte právo ji používat pouze pro účely hodnocení a v rámci popsaných omezení (např. časový limit nebo omezené spuštění či jiná omezení). Software se může, ale nemusí pokoušet tato omezení vymáhat, a to, že software tato omezení nevyvíhá, neznamená, že máte právo tato omezení překračovat.

2.8 Souhlasíte s tím, že potřebný registrační/licenční klíč získáte pouze od společnosti Qiagen nebo autorizovaného distributora a že budete tento klíč uchovávat v tajnosti před všemi třetími stranami.

3. Ukončení

3.1 Pokud nedodržíte podmínky této licence, společnost Qiagen může tuto licenci ukončit, aniž by byla dotčena jakákoli jiná práva.

3.2 Do 7 dnů od ukončení této licence předložíte společnosti Qiagen dopis potvrzující zničení originálu a všech kopií softwaru a zničení všech kopií registračního/licenčního klíče. Tuto licenci můžete kdykoli ukončit předložením takového potvrzení.

4. Omezená záruka/odpovědnost

4.1 Společnost Qiagen vám zaručuje pouze to, že:

a) Pokud je software dodáván na disku CD-ROM, je CD-ROM bez vad materiálu a zpracování při běžném používání po dobu devadesáti dnů ode dne zakoupení. (Jakýkoli vadný disk CD-ROM vám bezplatně vyměníme.)

b) Při správném používání bude software po dobu devadesáti dnů ode dne zakoupení v zásadě odpovídat dokumentaci dodané se softwarem nebo jiné specifikaci zveřejněné společností Qiagen.

4.2 Celou odpovědností společnosti Qiagen a vaším výhradním prostředkem nápravy je dle rozhodnutí společnosti Qiagen buď náhrada škody v hodnotě 250 USD (dvě stě padesát amerických dolarů), nebo výměna softwaru, který nesplňuje podmínky omezené záruky.

4.3 S VÝJIMKOU ZÁRUK UVEDENÝCH V ČÁSTI 4.1 VÝŠE A V MAXIMÁLNÍM ROZSAHU POVOLENÉM ZÁKONEM SPOLEČNOST QIAGEN NEPOSKYTUJE ŽÁDNÉ DALŠÍ ZÁRUKY TÝKAJÍCÍ SE SOFTWARE.

4.4 V MAXIMÁLNÍM ROZSAHU POVOLENÉM ZÁKONEM A ZA ŽÁDNÝCH OKOLNOSTÍ A NA ZÁKLADĚ ŽÁDNÉ PRÁVNÍ TEORIE, DELIKTNÍ, SMLUVNÍ ANI JINÉ, NEBUDE SPOLEČNOST QIAGEN ODPOVĚDNÁ VÁM ANI ŽÁDNÉ JINÉ OSOBE ZA JAKÉKOLI NEPŘÍMÉ, ZVLÁŠTNÍ, NÁHODNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY JAKÉHOKOLI CHARAKTERU, MIMO JINÉ VČETNĚ ŠKOD ZE ZTRÁTY DOBRÉ POVĚSTI, ZASTAVENÍ PRÁCE, SELHÁNÍ NEBO PORUCHY POČÍTAČE NEBO JAKÉKOLI JINÉ OBCHODNÍ ŠKODY NEBO ZTRÁTY, A TO I V PŘÍPADĚ, ŽE SPOLEČNOST QIAGEN BYLA O MOŽNOSTI TAKOVÝCH ŠKOD INFORMOVÁNA. V KAŽDÉM PŘÍPADĚ JE VEŠKERÁ ODPOVĚDNOST SPOLEČNOSTI QIAGEN PODLE TÉTO SMLOUVY OMEZENA NA LICENČNÍ POPLATEK, KTERÝ JSTE ZA SOFTWARE ZAPLATILI. TOTO OMEZENÍ ODPOVĚDNOSTI SE NEVZTAHUJE NA ODPOVĚDNOST ZA SMRT NEBO ÚJMU NA ZDRAVÍ, POKUD PLATNÉ PRÁVNÍ PŘEDPISY TAKOVÉ OMEZENÍ ZAKAZUJÍ.

15 Příloha B – Matematické techniky

V této příloze jsou podrobněji popsány používané matematické techniky.

15.1 Kvantifikace

Vypočtené koncentrace se získají z jednoduchého lineárně regresního modelu, přičemž známé hodnoty jsou logaritmické koncentrace (x) a experimentální hodnoty jsou hodnoty CT (y).

Logaritmické koncentrace a hodnoty CT standardů se použijí k vytvoření modelu ve tvaru:

$$y = Mx + B$$

15.1.1 Intervaly spolehlivosti pro vypočtené koncentrace

Používáme následující interval spolehlivosti $100(1 - \alpha)\%$ pro odhad nového pozorování x_0 ze standardní křivky.

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

Jedná se o interval spolehlivosti pro koncentraci jedné neznámé.

Předpokládejme, že máme k dalším pozorování při $x = x_0$ a jejich průměr označíme jako \bar{Y}_0 . Pak

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

a argumenty podobné výše uvedenému dávají

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

Tento vzorec určuje, jak se stanoví intervaly spolehlivosti pro koncentrace neznámých replikátů.

Pro odhad standardů lze získat užší interval spolehlivosti:

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

Z tohoto vzorce vyplývá, že přidáním replikátů ke standardní individuální koncentraci se s rostoucí hodnotou n zmenšuje šířka intervalu pro všechny odhady. Přidáním velkého počtu replikátů k neznámé se její nejistota sníží na nejistotu jediného standardu. Další replikáty snižují nejistotu způsobenou neznámou, která není součástí lineárního modelu.

15.1.2 Interval spolehlivosti pro hodnoty CT

Předpokládáme, že chyba hodnot CT replikátu je lineární a normálně rozložená.

Použijeme tedy interval spolehlivosti jednoho vzorku t . Nechť μ je střední hodnota hodnot CT replikátu $(x_0 \dots x_{n-1})$. Interval spolehlivosti $100(1-\alpha)\%$ pro hodnotu CT μ pak bude:

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

Chtěli bychom poděkovat Peteru Cookovi z katedry matematiky University of NSW v Sydney v Austrálii za neocenitelnou pomoc při ověřování použitých matematických přístupů.

16 Informace pro objednání

16.1 Produkty, příslušenství a spotřební materiál k přístroji Rotor-Gene Q MDx

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q MDx 5plex	Cykler pro real-time PCR s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cykler pro real-time PCR a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex	Cykler pro real-time PCR s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis	9002042
Příslušenství		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Souprava obsahuje: 2 balení Rotor-Disc 100, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 100 Rotor a Locking Ring, Rotor-Disc 100 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Na vyžádání
Rotor-Disc 100 (30)	30 jednotlivě balených kotoučů pro 3 000 reakcí	981311
Rotor-Disc 100 (300)	10 × 30 jednotlivě balených kotoučů pro 30 000 reakcí	981313
Rotor-Disc 100 Rotor	Pro držení kotoučů Rotor-Disc 100 v přístroji Rotor-Gene Q MDx; je nutný kroužek Rotor-Disc 100 Locking Ring	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	Pro zajištění kotouče Rotor-Disc 100 v zařízení Rotor-Disc 100 Rotor	9018896
Rotor-Disc 100 Loading Block	Hliníkový blok pro manuální a automatickou přípravu reakce v kotoučích Rotor-Disc 100	9018909

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Disc Pipetting Aid	Pomůcka pro označení jamky během manuální přípravy reakce na bloku Rotor-Disc Loading Block	9018897
Rotor-Disc Heat Sealer	Přístroj na zatavování pro použití s kotouči Rotor-Disc; je nutný Loading Block pro Rotor-Disc 72 nebo 100	9018898
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	60 fólií pro zatavení kotoučů Rotor-Disc 100 nebo Rotor-Disc 72	981601
Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	10 × 60 fólií pro zatavení kotoučů Rotor-Disc 100 nebo Rotor-Disc 72	981604
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Souprava obsahuje: 3 balení Rotor-Disc 72, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 72 Rotor a Locking Ring, Rotor-Disc 72 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Na vyžádání
Rotor-Disc 72 (24)	24 jednotlivě balených kotoučů pro 1 728 reakcí	981301
Rotor-Disc 72 (240)	10 × 24 jednotlivě balených kotoučů pro 17 280 reakcí	981303
Rotor-Disc 72 Rotor	Pro držení kotoučů Rotor-Disc 72 v přístroji Rotor-Gene Q MDx; je nutný kroužek Rotor-Disc 72 Locking Ring	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	Pro zajištění kotouče Rotor-Disc 72 v zařízení Rotor-Disc 72 Rotor	9018900
Rotor-Disc 72 Loading Block	Hliníkový blok pro manuální a automatickou přípravu reakce v kotoučích Rotor-Disc 72	9018910
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s uzávěry, pro 1 000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 stripů po 4 zkumavkách s uzávěry na 10 000 reakcí	981106
72-Well Rotor	K držení Strip Tubes and Caps, 0.1 ml; je nutný Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	K zajištění Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, v rotoru 72-Well Rotor	9018904

Produkt	Obsah	Kat. č.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro manuální nastavení reakce pomocí jednonábové pipety s využitím zkumavek 72 × 0,1 ml	9018901
Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel	Hliníkový blok pro nastavení reakce pomocí vícenábové pipety s využitím zkumavek 72 × 0,1 ml	9018902
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1 000 tenkostěnných zkumavek pro 1 000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 × 1 000 tenkostěnných zkumavek pro 10 000 reakcí	981008
36-Well Rotor	K držení PCR Tubes, 0.2 ml; je nutný 36-Well Rotor Locking Ring	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	K zajištění PCR Tubes, 0.2 ml, v rotoru 36-Well Rotor	9018906
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce ve standardní sestavě 8 × 12 s využitím zkumavek 96 × 0,2 ml	9018905
Rotor-Disc OTV Kit	Souprava pro optické ověření teploty systémů Rotor-Gene, obsahuje kotouč Rotor-Disc s integrovanými termochromatickými kapalnými krystaly, fluorescenčními vložkami, je nutný Rotor-Disc 72 Rotor a Locking Ring nebo Rotor-Disc 72 Starter Kit	981400
Rotor Holder	Kovový samostatně stojící držák pro umístování zkumavek a kotoučů Rotor-Disc do rotorů	9018908

Aktuální licenční údaje a prohlášení o odmítnutí odpovědnosti specifické pro daný produkt jsou uvedeny v příručce pro soupravu QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od oddělení technických služeb společnosti QIAGEN či místního distributora.

17 Historie revizí dokumentu

Datum	Změny
R1, únor 2022	První vydání

Ujednání o omezené licenci k přístroji Rotor-Gene Q MDx

Používáním tohoto produktu vyjadřuje každý kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento produkt se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto produktem a tímto návodem k použití a pro použití pouze s komponentami dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo zařazení komponent, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv komponentami, které v této soupravě obsaženy nejsou, s výjimkou případů popsaných v tomto návodu k použití a dalších protokolech dostupných na webových stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživatelům produktů společnosti QIAGEN pro jiné uživatele produktů QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato souprava a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmějí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti anebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy, včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou a/nebo jejími komponentami.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, EpiTect®, HotStarTaq®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, Type-it® (QIAGEN Group); Adobe®, Illustrator® (Adobe Systems, Inc.); Alexa Fluor®, HEX™, JOE™, Marina Blue®, ROX™, SYBR®, SYTO®, TET™, Texas Red®, VIC® (Thermo Fisher Scientific nebo její pobočky); CAL Fluor®, Quasar® (Biosearch Technologies, Inc.); Core™, Intel® (Intel Corporation); Cy® (GE Healthcare); EvaGreen® (Biotium, Inc.); Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation); LC Green® (Idaho Technology, Inc.); LightCycler® (Roche Group); Symantec® (Symantec Corporation); TeeChart® (Steema Software SL); Yakima Yellow® (Nanogen, Inc.). Registrované názvy, ochranné známky atd., použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem. Registrované názvy, ochranné známky atd., použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem.

TeeChartOffice: Copyright 2001-2013 vlastní David Berneda. Všechna práva vyhrazena.

Pro příslušné země:

Tento termocyklyer pro analýzy v reálném čase je licencován v rámci probíhajících řízení patentových práv USA na přístroj nebo systém zahrnující automatizované termocyklyery s fluorescenčními detektory a usilující o prioritu k sériovému číslu 07/695,201 v USA a odpovídajícím nárokům v jakémkoli jeho zahraničním protějšku, který vlastní společnost Applied Biosystems LLC, a to ve všech oblastech, včetně výzkumu a vývoje, všech aplikovaných oblastí a diagnostiky in vitro u člověka a zvířat. Žádná práva nejsou výslovně, implicitně nebo zprostředkovaně převedena na patenty na metody analýz v reálném čase, mimo jiné včetně 5' nukleázových analýz, ani na patenty na činidla nebo soupravy. Další informace o nákupu dalších práv poskytne Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Kalifornie 94404, USA.

Pro příslušné země:

Zakoupení tohoto produktu zahrnuje omezenou, nepřenositelnou licenci na jeden nebo více patentů USA č. 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; 7,273,749; 7,160,998; přihlášku k patentu USA č. 2003-0224434 a 2006-0019253 a přihlášku k patentu PCT č. WO 2007/035806 a všechna pokračování a rozdělení a odpovídající nároky v patentech a patentových přihláškách mimo Spojené státy, které vlastní University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH a/nebo Roche Diagnostics GmbH pouze pro diagnostiku in vitro u člověka a zvířat. Výslovně, implicitně ani zprostředkovaně se nepřevádí žádné právo na jakoukoli reagenční nebo soupravu ani na základě jakéhokoliv jiného patentu nebo patentových nároků, které vlastní University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH nebo jakákoliv jiná strana. Tento produkt se smí používat pouze se schválenými reagenčními, například plně licencovanými soupravami a analýzami společnosti QIAGEN. Informace o zakoupení licencí na aplikace či reagence pro diagnostiku in vitro poskytne Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

HB-3090-001 02/2022 © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky: www.qiagen.com/contact | Technická podpora: support.qiagen.com | Webové stránky: www.qiagen.com