

Veljača 2022.

# Korisnički priručnik za Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx CE



IVD

CE

REF

9002022, 9002032, 9002042



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

R1

# Sadržaj

1	Uvod.....	8
1.1	O ovom korisničkom priručniku .....	8
1.2	Općenite informacije .....	9
1.2.1	Tehnička podrška .....	9
1.2.2	Izjava o pravilima .....	9
1.2.3	Informacije o inačici .....	10
1.3	Predviđena uporaba instrumenta Rotor-Gene Q MDx .....	10
1.3.1	Zahtjevi za instrument Rotor-Gene Q MDx .....	10
1.4	Potrebni materijali .....	11
1.5	Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni .....	11
2	Sigurnosne informacije.....	12
2.1	Pravilna uporaba .....	13
2.2	Električna sigurnost.....	15
2.3	Biološka sigurnost .....	16
2.4	Kemijska sigurnost.....	17
2.5	Odlaganje otpada.....	18
2.6	Mehaničke opasnosti .....	18
2.7	Sigurnost pri održavanju.....	20
2.8	Simboli na instrumentu Rotor-Gene Q MDx.....	21
3	Općenit opis .....	22
3.1	Načelo instrumenta Rotor-Gene Q MDx.....	22
3.1.1	Toplinske radne značajke .....	22
3.1.2	Optički sustav .....	23
3.1.3	Dostupni kanali .....	24
3.2	Vanjske značajke instrumenta Rotor-Gene Q MDx.....	25
3.2.1	Ventilacijski otvori na poklopcu .....	25
3.2.2	Ručka poklopca .....	25
3.2.3	Komora rotora .....	25
3.2.4	Svjetla pokazatelja stanja instrumenta.....	25

3.3	Unutrašnji dijelovi instrumenta Rotor-Gene Q MDx.....	26
3.3.1	Središte rotora .....	26
3.3.2	Optička leća .....	26
	Optička leća, gdje se svjetlo ekscitacijske diode usmjerava na epruvete .....	26
4	Postupci instaliranja .....	27
4.1	Isporuka i instaliranje sustava .....	27
4.1.1	Raspakiravanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx.....	27
4.1.2	Instaliranje hardvera .....	28
4.1.3	Instaliranje softvera.....	29
4.1.4	Inačica softvera.....	32
4.1.5	Dodatni softver na računalima povezanim s instrumentima Rotor-Gene Q MDx .....	32
4.2	Zahtjevi za lokaciju.....	39
4.3	AC priključak napajanja.....	40
4.3.1	Zahtjevi u pogledu napajanja .....	40
4.3.2	Zahtjevi za uzemljenje .....	40
4.3.3	Instalacija AC kabela napajanja.....	40
4.4	Konfiguracija za sigurnost sustava Windows .....	40
4.5	Zahtjevi radne stanice .....	42
4.6	Raspakiravanje i instaliranje instrumenta Rotor-Gene Q MDx .....	43
4.6.1	Nadogradnja softvera .....	44
4.7	Dodatna oprema .....	44
4.8	Ponovno zapakiravanje i otprema instrumenta Rotor-Gene Q MDx .....	44
4.9	Početak .....	44
4.9.1	Uključivanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx i radne stanice .....	44
5	Radni postupci .....	45
5.1	Uporaba softvera instrumenta Rotor-Gene Q MDx .....	45
5.1.1	Čarobnjak Quick Start (Brzi početak rada).....	45
5.1.2	Čarobnjak Advanced (Napredno) .....	49
5.2	Uporaba hardvera instrumenta Rotor-Gene Q MDx.....	68
5.2.1	Vrste rotora .....	68

	5.2.2	Postavljanje reakcije .....	71
	5.2.3	Postavljanje rotirajućeg diska Rotor-Disc.....	74
6		Korisničko sučelje analize .....	78
	6.1	Radni prostor.....	78
	6.2	Alatna traka .....	78
	6.3	Prikaz neobrađenih kanala.....	78
	6.4	Prebacivanje uzoraka.....	79
	6.5	Izbornik datoteka.....	81
	6.5.1	Novo .....	81
	6.5.2	Otvaranje i zatvaranje .....	82
	6.5.3	Izvešća.....	83
	6.5.4	Postavljanje .....	84
	6.6	Izbornik za analizu .....	84
	6.6.1	Analiza .....	84
	6.6.2	Kvantifikacija.....	86
	6.6.3	Dvije standardne krivulje.....	97
	6.6.4	Delta delta C <sub>T</sub> relativna kvantifikacija.....	101
	6.6.5	Analiza krivulje taljenja.....	104
	6.6.6	Komparativna kvantifikacija .....	107
	6.6.7	Alelna diskriminacija .....	109
	6.6.8	Analiza grafikona raspršenosti.....	110
	6.6.9	Analiza krajnje točke .....	112
	6.6.10	Analiza koncentracije .....	118
	6.6.11	Analiza taljenja velike razlučivosti.....	121
	6.7	Izbornik postupka .....	122
	6.7.1	Pokreni postupak .....	122
	6.7.2	Pauziraj postupak .....	122
	6.7.3	Zaustavi postupak.....	123
	6.8	Izbornik prikaza .....	123
	6.8.1	Postavke postupka .....	123
	6.8.2	Temperaturni grafikon.....	126

6.8.3	Napredak profila .....	127
6.8.4	Uređivanje uzoraka .....	128
6.8.5	Mogućnosti prikaza .....	134
6.9	Zaštita pristupa za softver Rotor-Gene Q .....	134
6.9.1	Konfiguracija za sustav Windows 7 .....	135
6.9.2	Konfiguracija za sustav Windows 10 .....	141
6.9.3	Rad više korisnika na istom računalu.....	143
6.9.4	Zapisi o nadzoru .....	144
6.9.5	Potpisi postupka .....	146
6.9.6	Zaključavanje uzoraka .....	147
6.9.7	Zaključani predlošci .....	149
6.10	Izbornik pojačanja .....	149
6.11	Izbornik za uređivanje prozora .....	150
6.12	Funkcija za pomoć .....	150
6.12.1	Slanje e-poruke podršci .....	151
7	Dodatne značajke .....	155
7.1	Predlošci za analizu .....	155
7.2	Otvaranje drugog postupka .....	155
7.3	Mogućnosti skaliranja.....	155
7.4	Izvoz grafikona .....	156
7.5	Ikona matičnog/francuskog ključa .....	159
7.6	Mogućnosti na odabranom području .....	160
8	Održavanje.....	161
8.1	Čišćenje površine instrumenta Rotor-Gene Q MDx .....	161
8.2	Dekontaminacija površine instrumenta Rotor-Gene Q MDx.....	162
8.3	Popravak instrumenta Rotor-Gene Q .....	162
9	Optička potvrda temperature .....	163
9.1	Načelo OTV.....	163
9.2	Komponente kompleta Rotor-Disc OTV Kit.....	163
9.3	Izvođenje OTV-a .....	164
10	Analiza taljenja velike razlučivosti .....	167

10.1	Instrumentacija .....	169
10.2	Kemijska sredstva .....	169
10.3	Primjer genotipizacije polimorfizma jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP) .....	169
10.4	Primjer analize metilacije.....	172
10.5	Smjernice za uspješnu analizu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM).....	173
10.6	Priprema uzoraka .....	175
10.7	Postavljanje softvera .....	175
10.8	Analiza podataka postupka real-time PCR.....	181
10.9	Analiza podataka o taljenju velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) ..	182
11	Rješavanje problema .....	186
11.1	Arhiva zapisa.....	187
11.2	Hardverske i softverske pogreške .....	187
	11.2.1 Rješavanje problema na testu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM).....	187
11.3	Poruke o pogreškama i upozorenjima .....	188
	11.3.1 Općenite pogreške instrumenta .....	188
	11.3.2 Poruke povezane sa softverom Rotor-Gene Q .....	190
12	Glosar .....	194
13	Tehničke specifikacije .....	195
13.1	Okolišni uvjeti – radni uvjeti.....	195
13.2	Uvjeti prijevoza .....	195
13.3	Uvjeti pohrane .....	195
13.4	Mehanički podaci i značajke hardvera .....	195
13.5	Specifikacije (hardver i softver) .....	196
	13.5.1 Toplinske specifikacije .....	196
	13.5.2 Optičke specifikacije .....	196
14	Dodatak A – Pravni dokumenti.....	197
14.1	Izjava FCC .....	197
14.2	Usklađenost s normom IEC EN 61326.....	198

---

14.3	Izjava o sukladnosti .....	199
14.4	Otpadna električna i elektronička oprema (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE) .....	200
14.5	Klauzula o odgovornosti .....	201
14.6	Ugovor o softverskoj licenci .....	202
15	Prilog B – Matematičke tehnike .....	205
15.1	Kvantifikacija .....	205
15.1.1	Intervali pouzdanosti za izračunane koncentracije .....	205
15.1.2	Intervali pouzdanosti za vrijednosti CT-a .....	206
16	Informacije za naručivanje .....	207
16.1	Proizvodi, dodatne oprema i potrošni materijal Rotor-Gene Q MDx .....	207
17	Povijest revizija dokumenta .....	210

# 1 Uvod

Hvala vam na odabiru instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Sigurni smo da će postati sastavni dio vašeg laboratorija.

Prije nego što krenete s radom na instrumentu Rotor-Gene Q MDx, morate pažljivo pročitati ovaj korisnički priručnik i obratiti posebnu pozornost na sigurnosne informacije. Morate slijediti upute i sigurnosne informacije iz korisničkog priručnika da biste osigurali siguran rad instrumenta i održali instrument u sigurnom stanju.

Imajte na umu da instrument Rotor-Gene Q MDx dolazi u više konfiguracija. Pojediniosti, uključujući informacije o naručivanju, potražite u odjeljku 16.

## 1.1 O ovom korisničkom priručniku

Ovaj korisnički priručnik sadržava informacije o instrumentu Rotor-Gene Q MDx raspodijeljene u odjeljke u nastavku:

- Uvod
- Sigurnosne informacije
- Općenit opis
- Postupci instaliranja
- Radni postupci
- Održavanje
- Rješavanje problema
- Tehničke specifikacije
- Prilozi

Prilozi sadržavaju sljedeće informacije:

- Dodatak A – Pravni dokumenti
- Prilog B – Matematičke tehnike



## 1.2 Općenite informacije

### 1.2.1 Tehnička podrška

Mi u tvrtki QIAGEN® ponosni smo na kvalitetu i dostupnost svoje tehničke podrške. U našim odjelima Tehničke službe rade iskusni znanstvenici s bogatim praktičnim i teorijskim znanjem iz područja molekularne biologije i uporabe proizvoda tvrtke QIAGEN. Ako imate bilo kakvih pitanja ili iskusite bilo kakve poteškoće u vezi s instrumentom Rotor-Gene Q MDx ili proizvodima tvrtke QIAGEN općenito, slobodno nam se obratite.

Klijenti tvrtke QIAGEN glavni su izvor informacija o naprednoj ili specijaliziranoj uporabi naših proizvoda. Te informacije pomažu drugim znanstvenicima kao i istraživačima tvrtke QIAGEN. Stoga vas potičemo da nam se obratite ako imate bilo kakvih prijedloga u vezi s radnim značajkama proizvoda ili novim primjenama i tehnikama.

Za tehničku podršku obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Za najnovije informacije o instrumentu Rotor-Gene Q MDx posjetite stranicu <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>.

Web-mjesto: **support.qiagen.com**

Kada se javljate Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN u vezi s pogreškama, pripremite sljedeće informacije:

- serijski broj, vrstu i verziju instrumenta Rotor-Gene Q MDx
- kôd pogreške (ako je primjenjivo)
- trenutak u kojem se pogreška prvi put pojavila
- učestalost javljanja pogreške (tj. povremena ili trajna pogreška)
- kopiju datoteka zapisa.

### 1.2.2 Izjava o pravilima

Prema pravilima tvrtke QIAGEN proizvodi se poboljšavaju kada postanu dostupne nove tehnike i komponente. QIAGEN zadržava pravo na izmjenu specifikacija u bilo kojem trenutku. U nastojanju za pružanjem korisne i odgovarajuće dokumentacije cijenimo vaše komentare o ovom korisničkom priručniku. Obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

### 1.2.3 Informacije o inačici

Ovaj dokument jest *Korisnički priručnik za Rotor-Gene Q MDx*, revizija R1, za instrumente Rotor-Gene Q MDx koji upotrebljavaju softver Rotor-Gene Q, inačica 2.3.x (pri čemu je  $x \geq 0$ ).

## 1.3 Predviđena uporaba instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Instrument Rotor-Gene Q MDx osmišljen je za izvođenje toplinskog cikliranja, otkrivanja i/ili kvantificiranja u stvarnom vremenu primjenom lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction, PCR) u kliničkim postupcima.

Rotor-Gene Q MDx namijenjen je za uporabu samo u kombinaciji s kompletima tvrtke QIAGEN indiciranim za uporabu s instrumentima Rotor-Gene Q za primjene opisane u priručnicima za odgovarajući komplet tvrtke QIAGEN.

Ako se instrument Rotor-Gene Q MDx upotrebljava s kompletima osim kompleta tvrtke QIAGEN, odgovornost je korisnika potvrditi učinak takve kombinacije proizvoda za određenu primjenu.

Instrument Rotor-Gene Q MDx namijenjen je za in vitro dijagnostičku uporabu.

Predviđeno je da instrument Rotor-Gene Q MDx upotrebljavaju profesionalni korisnici, kao što su tehničari i liječnici osposobljeni za molekularno-biološke tehnike i rukovanje instrumentom Rotor-Gene Q MDx.

### 1.3.1 Zahtjevi za instrument Rotor-Gene Q MDx

Tablica u nastavku obuhvaća opću razinu kompetencija i stručnosti potrebnu za prijevoz, postavljanje, uporabu, održavanje i servisiranje instrumenta Rotor-Gene Q MDx.

Zadatak	Osoblje	Osposobljavanje i iskustvo
Isporuka	Nema posebnih zahtjeva	Nema posebnih zahtjeva
Instaliranje	Laboratorijski tehničari ili ekvivalent	Odgovarajuće osposobljeno i iskusno osoblje upoznato s uporabom računala i automatizacijom općenito
Rutinska uporaba (pokretanje protokola)	Laboratorijski tehničari ili ekvivalent	Profesionalni korisnici, kao što su tehničari ili liječnici, osposobljeni za molekularno-biološke tehnike
Rutinsko održavanje	Laboratorijski tehničari ili ekvivalent	Profesionalni korisnici, kao što su tehničari ili liječnici, osposobljeni za molekularno-biološke tehnike
Servisiranje i godišnje održavanje	Samo stručnjaci Terenske službe tvrtke QIAGEN	Redovito osposobljavanje, certificiranje i odobrenje tvrtke QIAGEN

## 1.4 Potrebni materijali

**Napomena:** upotrebljavajte samo dodatnu opremu koji isporučuje tvrtka QIAGEN.

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

## 1.5 Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni


- Zaštitne naočale
- Rukavice
- Laboratorijska kuta


Za uporabu instrumenta Rotor-Gene Q MDx potreban je komplet za lančanu reakciju polimerazom (polymerase chain reaction, PCR) koji se mora kupiti odvojeno. Da biste otkrili asortiman dostupnih kompleta, posjetite **QIAGEN.com**.

## 2 Sigurnosne informacije

Prije nego što krenete s radom na instrumentu Rotor-Gene Q MDx, morate pažljivo pročitati ovaj korisnički priručnik i obratiti posebnu pozornost na sigurnosne informacije. Morate slijediti upute i sigurnosne informacije iz korisničkog priručnika da biste osigurali siguran rad instrumenta i održali instrument u sigurnom stanju.

Sljedeće se vrste sigurnosnih informacija pojavljuju u *Korisničkom priručniku za Rotor-Gene Q MDx*.


<b>UPOZORENJE</b> 	Pojam UPOZORENJE upotrebljava se za obavještanje o situacijama koje bi mogle dovesti do <b>tjelesne ozljede</b> vas ili drugih osoba. Pojednosti o tim okolnostima navedene su u okviru poput ovoga.
--	---

<b>OPREZ</b> 	Pojam OPREZ upotrebljava se za obavještanje o situacijama koje bi mogle dovesti do <b>oštećenja instrumenta</b> ili druge opreme. Pojednosti o tim okolnostima navedene su u okviru poput ovoga.
--	---


Smjernice navedene u ovom priručniku nadopunjuju, a ne zamjenjuju uobičajene sigurnosne zahtjeve koji se primjenjuju u državi korisnika.


Imajte na umu da ćete ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem, ovisno o lokalnim propisima koje je potrebno proučiti, možda morati prijaviti proizvođaču i/ili njegovu ovlaštenom predstavniku i regulatornom tijelu koje je nadležno za korisnika i/ili pacijenta.


## 2.1 Pravilna uporaba

<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Nepravilna uporaba instrumenta Rotor-Gene Q MDx može uzrokovati tjelesne ozljede ili oštećenje instrumenta.  Instrumentom Rotor-Gene Q MDx smije rukovati samo kvalificirano osoblje koje je na odgovarajući način osposobljeno.  Servisiranje instrumenta Rotor-Gene Q MDx smije provoditi samo stručnjak Terenske službe tvrtke QIAGEN.
--	--


Održavanje provodite kako je opisano u odjeljku 8. QIAGEN naplaćuje popravke koji su potrebni zbog neispravnog održavanja.


<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Instrument Rotor-Gene Q MDx pretežak je da bi ga podigla jedna osoba. Da biste izbjegli tjelesnu ozljedu ili oštećenje instrumenta, instrument nemojte podizati sami.  Obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN da biste premjestili instrument.
--	---


<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Nemojte pokušavati pomicati Rotor-Gene Q MDx za vrijeme rada.
--	--


<b>OPREZ</b> 	<b>Oštećenje instrumenta</b> Izbjegavajte prolijevanje vode ili kemikalija po instrumentu Rotor-Gene Q MDx. Oštećenje uzrokovano prolijevanjem vode ili kemikalija poništiti će jamstvo.
---	---


**Napomena:** u hitnim slučajevima isključite instrument Rotor-Gene Q MDx na prekidaču za napajanje koji se nalazi na stražnjoj strani instrumenta i iskopčajte kabel napajanja iz strujne utičnice.


<b>OPREZ</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Nemojte pokušavati otvoriti poklopac tijekom ispitivanja ili dok se instrument Rotor-Gene Q MDx vrti. U suprotnome, ako otključate bravu poklopca i posegnete u instrument, postoji rizik od kontakta s dijelovima koji su vrući, pod naponom ili koji se kreću velikom brzinom te možete ozlijediti sebe i oštetiti instrument.
---	---

<b>OPREZ</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Ako morate brzo zaustaviti ispitivanje, isključite napajanje instrumenta i potom otvorite poklopac. Pričekajte da se komora ohladi prije nego što posegnete u nju. U suprotnome postoji rizik od ozljede zbog dodirivanja dijelova koji su vrući.
---	--

<b>OPREZ</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Ako se oprema upotrebljava na način koji nije odredio proizvođač, može doći do narušavanja zaštite koju ta oprema pruža.
---	---

<b>OPREZ</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Listovi papira ispod instrumenta Rotor-Gene Q MDx ometaju njegovo hlađenje. Preporučuje se pripaziti na to da područje ispod instrumenta bude uredno.
---	--


<b>OPREZ</b> 	<b>Oštećenje instrumenta</b> Uvijek upotrebljavajte prsten za zaključavanje na rotoru. To onemogućuje ispadanje čepova s epruveta tijekom ispitivanja. Ako čepovi ispadnu tijekom ispitivanja, mogu oštetiti komoru.
---	---

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p><b>Rizik od oštećenja materijala</b></p> <p>Prije svake uporabe vizualno pregledajte rotor i provjerite je li oštećen ili deformiran.</p>
---	--

Ako instrument Rotor-Gene Q MDx dotaknete tijekom ispitivanja, a nabijeni ste statičkim elektricitetom, u teškim se slučajevima instrument Rotor-Gene Q MDx može resetirati. No softver će ponovno pokrenuti instrument Rotor-Gene Q MDx i ispitivanje će se nastaviti.

## 2.2 Električna sigurnost

Prije servisiranja iskopčajte kabel linijskog napajanja iz strujne utičnice.

<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Električna opasnost</b></p> <p>Svaki prekid zaštitnog vodiča (voda za uzemljenje) unutar ili izvan instrumenta ili odvajanje terminala zaštitnog vodiča može instrument učiniti opasnim.</p> <p>Zabranjeni su namjerni prekidi.</p> <p><b>Smrtonosni naponi unutar instrumenta</b></p> <p>Kada je instrument priključen na linijsko napajanje, terminali mogu biti pod naponom, a otvaranjem poklopaca ili uklanjanjem dijelova može doći do izlaganja dijelova pod naponom.</p>
---	--


Da biste osigurali zadovoljavajući i siguran rad instrumenta Rotor-Gene Q MDx, pridržavajte se savjeta navedenih u nastavku:

- Kabel linijskog napajanja mora biti priključen na utičnicu linijskog napajanja sa zaštitnim vodičem (za uzemljenje).
- Nemojte podešavati niti mijenjati unutrašnje dijelove instrumenta.
- Nemojte rukovati instrumentom ako je bilo koji pokrov ili dio instrumenta uklonjen.
- Ako se unutar instrumenta prolije tekućina, isključite instrument, iskopčajte ga iz strujne utičnice i obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Ako instrument postane opasan u pogledu električne struje, spriječite ostalo osoblje da rukuje njime i obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Instrument može biti opasan u pogledu električne struje u sljedećim situacijama:

- Čini se da su instrument ili kabel linijskog napajanja oštećeni.
- Instrument je dulje vrijeme pohranjen u nepovoljnim uvjetima.
- Instrument je podvrgnut jakom naprezanju tijekom prijevoza.

<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Električna opasnost</b> Na instrumentu se nalazi oznaka o električnoj sukladnosti na kojoj su navedeni napon i frekvencija napajanja, kao i nazivna snaga osigurača. Opremom se treba rukovati samo u tim uvjetima.
--	---


## 2.3 Biološka sigurnost

Ispitcima i reagensima koji sadržavaju materijale iz bioloških izvora potrebno je rukovati kao da su potencijalno zarazni. Upotrebljavajte sigurne laboratorijske postupke navedene u publikacijama kao što je *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, HHS (<https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>).

### Uzorci

Uzorci mogu sadržavati infektivne agense. Morate biti svjesni opasnosti po zdravlje koju predstavljaju takvi agensi te takve uzorke upotrebljavati, čuvati i zbrinjavati u skladu s obveznim sigurnosnim propisima.




<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Uzorci koji sadržavaju infektivne agense</b></p> <p>Neki uzorci koji se upotrebljavaju s ovim instrumentom mogu sadržavati infektivne agense. Takvim uzorcima rukujte na najpažljiviji mogući način i u skladu s obveznim sigurnosnim propisima.</p> <p>Uvijek nosite zaštitne naočale, 2 para rukavica i laboratorijsku kutu.</p> <p>Odgovorno tijelo (npr. voditelj laboratorija) mora poduzeti potrebne mjere opreza kako bi osiguralo da je okolno radno mjesto sigurno i da su rukovatelji instrumentima primjereno osposobljeni te da nisu izloženi opasnim razinama infektivnih agensa definiranima u primjenjivim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS) ili dokumentima organizacija OSHA*, ACGIH† ili COSHH‡.</p> <p>Ventiliranje zbog para i odlaganje otpada moraju biti u skladu sa svim nacionalnim, državnim i lokalnim propisima i zakonima u području zdravlja i sigurnosti.</p>
--	--

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Agencija za sigurnost i zdravlje na radu) (Sjedinjene Američke Države).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Američka konferencija vladinih stručnjaka za industrijsku higijenu) (Sjedinjene Američke Države).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola tvari opasnih po zdravlje) (Ujedinjena Kraljevina).

## 2.4 Kemijska sigurnost

<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Opasne kemikalije</b></p> <p>Neke kemikalije koje se upotrebljavaju s ovim instrumentom mogu biti opasne ili postati opasne nakon završetka postupka protokola. Uvijek nosite zaštitne naočale, rukavice i laboratorijsku kutu. Odgovorno tijelo (npr. voditelj laboratorija) mora poduzeti potrebne mjere opreza kako bi osiguralo da je okolno radno mjesto sigurno i da rukovatelji instrumentima nisu izloženi opasnim razinama otrovnih tvari (kemijskih ili bioloških) definiranima u primjenjivim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS) ili dokumentima organizacija OSHA*, ACGIH† ili COSHH‡.</p> <p>Ventiliranje zbog para i odlaganje otpada moraju biti u skladu sa svim nacionalnim, državnim i lokalnim propisima i zakonima u području zdravlja i sigurnosti.</p>
--	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Agencija za sigurnost i zdravlje na radu) (Sjedinjene Američke Države).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Američka konferencija vladinih stručnjaka za industrijsku higijenu) (Sjedinjene Američke Države).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Kontrola tvari opasnih po zdravlje) (Ujedinjena Kraljevina).

## Otrovne pare

Ako radite s hlapljivim otapalima ili otrovnim tvarima, morate osigurati učinkovit sustav ventilacije laboratorija da biste uklonili pare koje mogu nastati.


## 2.5 Odlaganje otpada


Korištena laboratorijska oprema može sadržavati opasne kemikalije. Takav se otpad mora propisno prikupiti i odložiti u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.


Više informacija o načinu odlaganja instrumenta Rotor-Gene Q MDx pogledajte u odjeljku „Otpadna električna i elektronička oprema (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE)”, stranica 200.


## 2.6 Mehaničke opasnosti


Poklopac instrumenta Rotor-Gene Q MDx mora ostati zatvoren tijekom rada instrumenta.


<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Pomični dijelovi</b> Da biste izbjegli kontakt s pomičnim dijelovima za vrijeme rada instrumenta Rotor-Gene Q MDx, instrumentom morate rukovati dok je poklopac zatvoren.
--	---

<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Poklopac instrumenta Rotor-Gene Q MDx pažljivo otvarajte i zatvarajte da biste izbjegli zahvaćanje prstiju ili odjeće.
--	---


<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Oštećenje instrumenta</b> Pobrinite se da rotor i prsten za zaključavanje budu ispravno postavljeni. Ako rotor ili prsten za zaključavanje pokazuju znakove mehaničkog oštećenja ili korozije, nemojte upotrebljavati instrument Rotor-Gene Q MDx. Obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.
--	--


<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Oštećenje instrumenta</b></p> <p>Ako se instrument Rotor-Gene Q MDx pokreće odmah nakon isporuke u hladnim klimatskim uvjetima, mehanički se dijelovi mogu blokirati.</p> <p>Ostavite instrument najmanje sat vremena da se prilagodi sobnoj temperaturi prije nego što ga uključite.</p>
--	---

<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Oštećenje instrumenta</b></p> <p>U slučaju kvara uzrokovanog prekidom napajanja, uklonite kabel napajanja i pričekajte 10 minuta te potom pokušajte ručno otvoriti poklopac.</p>
--	--

<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Rizik od pregrijavanja</b></p> <p>Da bi se zajamčila odgovarajuća ventilacija, održavajte minimalni razmak od 10 cm na bočnim stranama i na stražnjoj strani instrumenta Rotor-Gene Q MDx.</p> <p>Prorezi i otvori za ventilaciju proizvoda Rotor-Gene Q MDx ne smiju se prekrivati.</p>
---	--


#### Opasnost od topline


<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Vruća površina</b></p> <p>Komora instrumenta Rotor-Gene Q MDx može dosegnuti temperature više od 120 °C. Nemojte je dodirivati dok je vruća.</p>
--	--


<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Vruća površina</b></p> <p>Kad pauzirate postupak, instrument Rotor-Gene Q MDx neće se u potpunosti ohladiti na sobnu temperaturu. Poduzmite mjere opreza prije rukovanja rotorom ili bilo kakvim epruvetama u instrumentu.</p>
--	--


## 2.7 Sigurnost pri održavanju

Održavanje provodite kako je opisano u odjeljku 8. QIAGEN naplaćuje popravke koji su potrebni zbog neispravnog održavanja.

<b>UPOZORENJE/ OPREZ</b> 	<b>Rizik od tjelesne ozljede i oštećenja materijala</b> Provodite samo ono održavanje koje je posebno opisano u ovom korisničkom priručniku.
---	---











<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Rizik od požara</b> Kada instrument Rotor-Gene Q MDx čistite dezinficijensima na bazi alkohola, ostavite vratašca instrumenta Rotor-Gene Q MDx otvorena da bi se zapaljive pare mogle raspršiti.
--	--

<b>UPOZORENJE/ OPREZ</b> 	<b>Rizik od strujnog udara</b> Nemojte rastavljati instrument Rotor-Gene Q MDx.
---	--

<b>OPREZ</b> 	<b>Oštećenje kućišta instrumenta</b> Nikada nemojte čistiti kućište instrumenta alkoholom ili otopinama na bazi alkohola. Alkohol će oštetiti kućište. Za čišćenje kućišta upotrebljavajte samo destiliranu vodu.
---	--

## 2.8 Simboli na instrumentu Rotor-Gene Q MDx

U korisničkom priručniku ili na ambalaži i oznakama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Lokacija	Opis
	U blizini komore za uzorke, vidljivo kad je poklopac otvoren	Opasnost od topline – temperatura komore može dosegnuti temperature više od 120 °C
	Stražnja strana instrumenta	Pročitajte upute za uporabu
	Natpisna pločica sa stražnje strane instrumenta	Oznaka CE europske sukladnosti
	Natpisna pločica sa stražnje strane instrumenta	In vitro dijagnostički medicinski uređaj
	Natpisna pločica sa stražnje strane instrumenta	Oznaka popisa CSA za Kanadu i SAD
	Natpisna pločica na desnoj ploči	Proizvođač.
	Natpisna pločica na desnoj ploči	Oznaka OEEO o odlaganju otpadne električne i elektroničke opreme za Europu i ostatak svijeta.
	Natpisna pločica na desnoj ploči	Oznaka FCC Američkog saveznog povjerenstva za komunikacije
	Natpisna pločica na desnoj ploči	Oznaka RCM (prethodno C-Tick) za Australiju (identifikacija dobavljača N17965)
	Natpisna pločica na desnoj ploči	Oznaka RoHS za Kinu (ograničenje uporabe određenih opasnih tvari u električnoj i elektroničkoj opremi)

## 3 Općenit opis

Rotor-Gene Q MDx inovativan je instrument koji omogućuje vrlo precizni real-time PCR te koji je u kombinaciji s kompletima s oznakom QIAGEN IVD iznimno prilagođen za in vitro dijagnostičke primjene.

Snažan i korisniku prilagođen softver početnicima nudi jednostavnost, a naprednim korisnicima otvorenu ispitivačku platformu.

### 3.1 Načelo instrumenta Rotor-Gene Q MDx

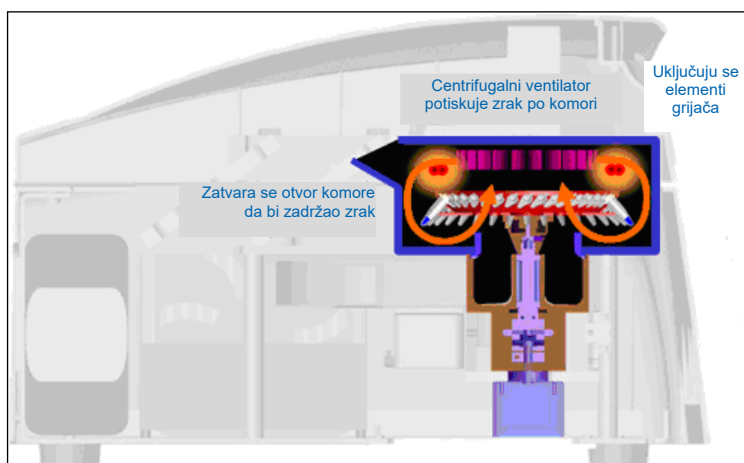
#### 3.1.1 Toplinske radne značajke

Rotor-Gene Q MDx upotrebljava sofisticiran dizajn zagrijavanja i hlađenja da bi postigao optimalne uvjete reakcije. Jedinstven rotacijski oblik osigurava optimalnu toplinsku i optičku ujednačenost među uzorcima koja je ključna za precizno i pouzdano analiziranje.

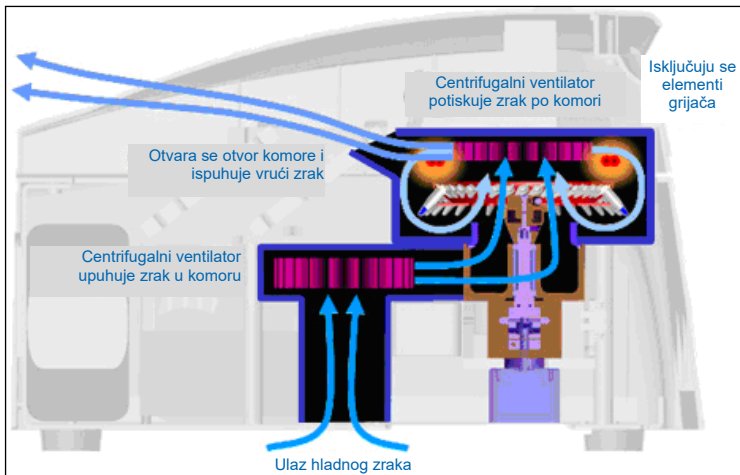
Uzorci se za vrijeme rada kontinuirano okreću brzinom od 400 o/min. Centrifuga onemogućuje kondenzaciju i uklanja mjehuriće zraka, ali ne taloži DNK. Osim toga, brzinu okretanja uzoraka nije potrebno usporiti prije početka postupka.

Uzorci se zagrijavaju i hlade u zračnoj pećnici male mase. Zagrijavanje se postiže zahvaljujući nikal-krom elementu u poklopcu. Komora se hladi ispuštanjem zraka prema van kroz vrh komore, dok se okolni zrak upuhuje kroz bazu.

#### Zagrijavanje



## Hlađenje

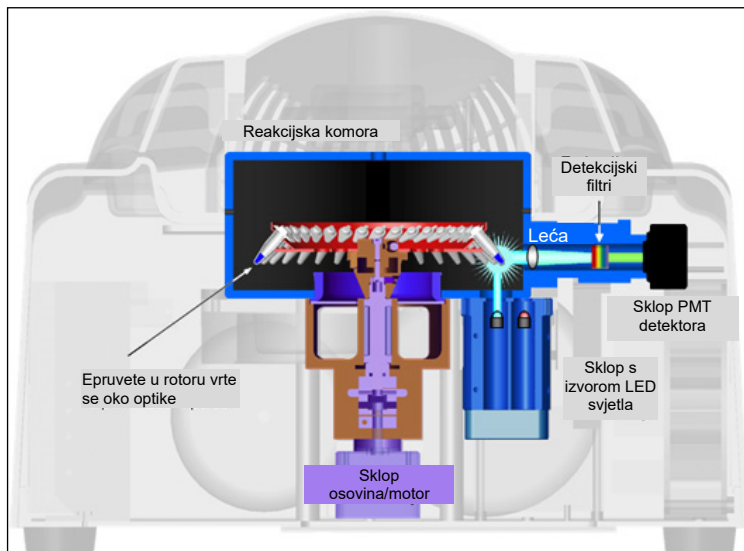


Ilustracija sustava za grijanje i hlađenje.

### 3.1.2 Optički sustav

Uz izbor do čak šest ekscitacijskih izvora i šest detekcijskih filtara u kombinaciji s kratkim, fiksnim optičkim putem, Rotor Gene Q MDx može se upotrebljavati za multipleksne reakcije, čime se osigurava najmanja varijabilnost fluorescencije među uzorcima te se uklanja potreba za kalibracijom ili kompenzacijom.

Uzorci se svjetlećom diodom ekscitiraju s dna komore. Energija se prenosi kroz tanke stijenke pri bazi epruvete. Emitirana fluorescencija prolazi kroz emisijske filtre na strani komore i tada se prikuplja fotomultiplikatorom. Fiksni optički put osigurava dosljednu ekscitaciju za svaki uzorak, što znači da nema potrebe za uporabom pasivne unutarnje referentne boje kao što je ROX™.



Ilustracija optičkog sustava.

### 3.1.3 Dostupni kanali

Kanal	Ekscitacija (nm)	Detekcija (nm)	Primjeri detektiranih fluorofora
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 visoka propusnost	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)	460 ± 20	510 ± 5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

**Napomena:** kompleti tvrtke QIAGEN indicirani za uporabu s instrumentima Rotor-Gene Q MDx optimizirani su s obzirom na određene kombinacije boja. Više informacija potražite u pripadajućim priručnicima za komplete.



## 3.2 Vanjske značajke instrumenta Rotor-Gene Q MDx



- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1 Ventilacijski otvori na poklopcu | 3 Komora rotora                          |
| 2 Ručka poklopca                   | 4 Svjetla pokazatelja stanja instrumenta |

### 3.2.1 Ventilacijski otvori na poklopcu

Rotor-Gene Q ima ventilacijske otvore na stražnjoj strani poklopca instrumenta. Ti otvori omogućuju instrumentu da tijekom rada ispušta toplinu iz komore. Blokiranje ili nedovoljan razmak oko otvora mogu utjecati na radni učinak instrumenta.

### 3.2.2 Ručka poklopca

Ručka poklopca upotrebljava se za povlačenje poklopca instrumenta unatrag. Nije namijenjena da podržava težinu instrumenta i ne bi se trebala upotrebljavati za podizanje instrumenta.

### 3.2.3 Komora rotora

U komoru rotora postavljaju se rotori te prolaze korake programiranog zagrijavanja i cikliranja.

### 3.2.4 Svjetla pokazatelja stanja instrumenta

Dva su svjetla pokazatelja stanja na instrumentu Rotor-Gene Q. Svjetlo stanja mirovanja ukazuje na to da se instrument ne upotrebljava. Svjetlo koje ukazuje na to da instrument radi treperi kad se Rotor-Gene Q upotrebljava.

### 3.3 Unutrašnji dijelovi instrumenta Rotor-Gene Q MDx



Unutarnji prikaz komore instrumenta Rotor-Gene Q

- 1 Središte rotora      2 Optička leća

#### 3.3.1 Središte rotora

Središte rotora drži rotor na mjestu unutar instrumenta.

#### 3.3.2 Optička leća

Optička leća, gdje se svjetlo ekscitacijske diode usmjerava na epruvete.

## 4 Postupci instaliranja

### 4.1 Isporučka i instaliranje sustava

Osoba koja je upoznata s vašom laboratorijskom i računalnom opremom treba biti prisutna tijekom instaliranja.

Isporučuju se sljedeće stavke:

- instrument Rotor-Gene Q MDx
- *korisnički priručnik za Rotor-Gene Q MDx*
- radna stanica
- softver instrumenta Rotor-Gene Q MDx (instalirat će ga stručnjaci Terenske službe tvrtke QIAGEN tijekom početnog postavljanja).

#### 4.1.1 Raspakiranje instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Instrument Rotor-Gene Q MDx isporučuje se sa svim potrebnim dijelovima za postavljanje i pokretanje instrumenta. U kutiji se nalazi i popis isporučenih dijelova.

**Napomena:** provjerite je li popis potpun kako biste bili sigurni da imate sve dijelove.

**Napomena:** prije instaliranja provjerite da na instrumentu i dostavljenoj dodatnoj opremi nema oštećenja nastalih tijekom transporta.

Kutija s dodatnom opremom nalazi se na pjenastoj ambalaži. Kutija s dodatnom opremom sadržava:

- vodič za instalaciju (na engleskom; prijevodi su dostupni na prijenosnim medijima uz priručnike)
- prijenosne medije (softver)
- prijenosne medije (priručnici)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (rastavljen radi sigurnog transporta)
- 36-Well Rotor (crveni rotor)
- 36-Well Rotor Locking Ring.

Sljedeći predmeti nalaze se sa svake strane pjenaste ambalaže:

- USB i serijski kabel RS-232
- komplet kabela za napajanje za međunarodnu uporabu
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (1000).

Nakon što sve dijelove izvadite iz kutije, skinite pjenastu ambalažu s instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Pažljivo izvadite instrument Rotor-Gene Q MDx iz kutije i odmotajte plastični omot. Otvorite poklopac tako da ga povučete prema natrag da biste pristupili reakcijskoj komori.


Sljedeći predmeti već su instalirani u instrumentu Rotor-Gene Q MDx:

- 72-Well Rotor (plavi rotor)
- 72-Well Rotor Locking Ring.

Ovisno o pojedinostima narudžbe, u pakiranje može biti uključeno prijenosno računalo.

#### 4.1.2 Instaliranje hardvera

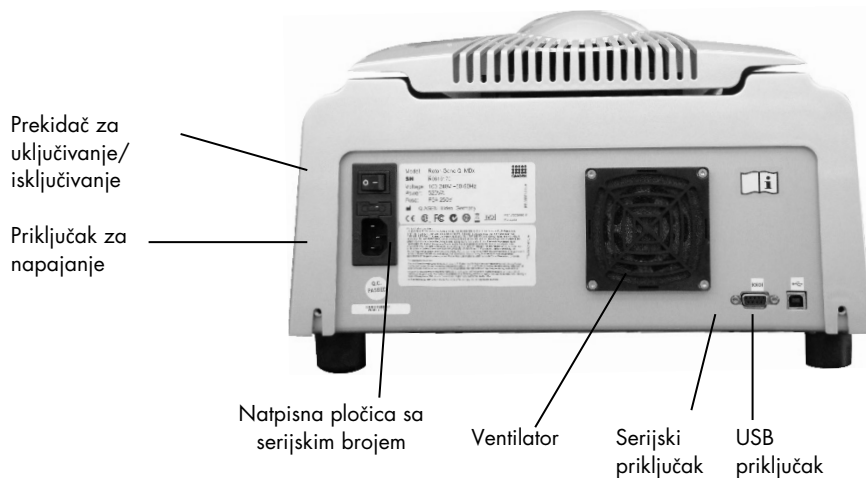
Nakon što raspakirate instrument Rotor-Gene Q MDx, nastavite s instaliranjem kako je opisano u nastavku.

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p><b>Oštećenje instrumenta</b></p> <p>Ako se instrument Rotor-Gene Q MDx pokrene odmah nakon isporuke u hladnim klimatskim uvjetima, može doći do blokade mehaničkih dijelova. Ostavite instrument najmanje sat vremena da se prilagodi sobnoj temperaturi prije nego što ga uključite.</p>
---	--

Postupite kako slijedi:

1. Postavite Rotor-Gene Q MDx na ravnu površinu.
2. Pobrinite se da iza instrumenta ima dovoljno prostora kako bi se poklopac mogao u potpunosti otvoriti.
3. Pobrinite se da se prekidač na stražnjoj strani instrumenta može lako dohvatiti.
4. Nemojte blokirati stražnju stranu instrumenta. Pobrinite se da se kabel napajanja može jednostavno odvojiti ako je to potrebno za isključivanje napajanja instrumenta.
5. Isporučeni USB kabel ili serijski kabel RS-232 spojite na USB ili komunikacijski priključak na stražnjoj strani računala.

6. USB ili serijski kabel RS-232 spojite na stražnju stranu instrumenta Rotor-Gene Q MDx.
7. Potom instrument Rotor-Gene Q MDx povežite s izvorom napajanja. Spojite jedan kraj AC kabela napajanja u utičnicu koja se nalazi sa stražnje strane proizvoda Rotor-Gene Q MDx, a drugi kraj u AC strujnu utičnicu.

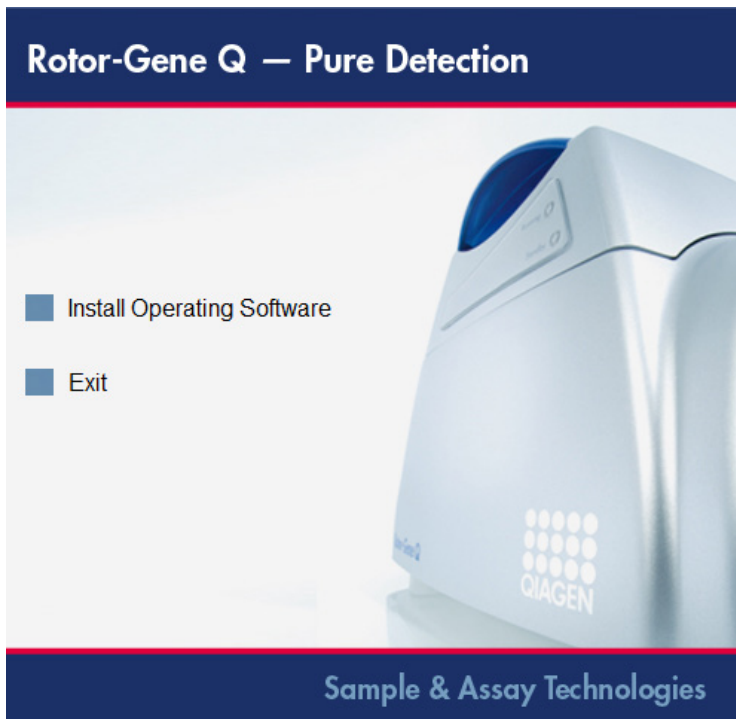


**Napomena:** instrument Rotor-Gene Q MDx povežite s računalom samo USB i serijskim kabelima isporučenima s instrumentom. Nemojte upotrebljavati druge kabele.

#### 4.1.3 Instaliranje softvera

1. Da biste instalirali softver Rotor-Gene Q, preuzmite ga s internetske stranice **QIAGEN.com** i prenesite na računalo na prijenosnom mediju bez virusa ili u računalo umetnite prijenosni medij (softver) isporučen s instrumentom.
2. Ako se instaliranje softvera automatski pokrene, u prozoru koji se pojavi odaberite **Install Operating Software** (Instaliraj operacijski softver) ili otvorite mapu softvera RGQ na prijenosnom mediju.

**Napomena:** pročitajte *Vodič za instalaciju instrumenta Rotor-Gene Q* isporučen uz instrument kako biste jednostavno instalirali instrument i kako bi vas vodio kroz sljedeće korake instaliranja softvera.



3. Nakon instaliranja softvera automatski će se izraditi ikona na radnoj površini.
4. Uključite instrument Rotor-Gene Q MDx pomicanjem prekidača koji se nalazi s lijeve stražnje strane u položaj „I”. Plavo svjetlo „Standby” na prednjoj strani instrumenta Rotor-Gene Q MDx ukazuje na to da je instrument spreman za uporabu.

**Napomena:** kad se instrument Rotor-Gene Q MDx prvi put pokreće povezan na računalo, operacijski će ga sustav prepoznati i pojavit će se niz poruka. Smjernice potražite u *Vodiču za instalaciju instrumenta Rotor-Gene Q* koji je isporučen uz instrument (prijenosni medij i tiskano izdanje).



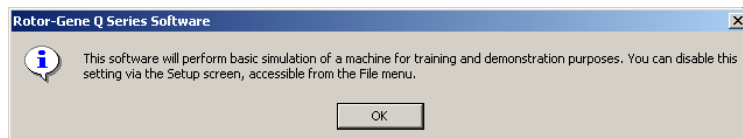
5. Dvapat kliknite ikonu na radnoj površini **Rotor-Gene Q Series Software** (Softver serije Rotor-Gene Q) da biste pokrenuli softver.



6. Pri prvom pokretanju softvera pojavljuje se prozor **Welcome** (Dobro došli), ali se ne pojavljuje pri sljedećim nadogradnjama softvera.



- Machine Serial Number (Serijski broj uređaja): Unesite serijski broj (sedam znamenki) koji možete pronaći sa stražnje strane instrumenta Rotor-Gene Q MDx.
- Port (Priključak): Odaberite ili USB ili serijski kabel. Odaberite odgovarajući komunikacijski priključak ili kliknite gumb **Auto-Detect** (Automatsko detektiranje).
- Auto-Detect (Automatsko detektiranje) (Automatsko detektiranje): Kad upotrebljavate ovu mogućnost, automatski će se detektirati odgovarajući USB ili serijski priključak te se prikazati u padajućem popisu **Port** (Priključak).
- Run in Virtual Mode (Pokreni u virtualnom načinu rada) (za demonstraciju): Označivanjem ovog okvira dopušta se instaliranje softvera Rotor-Gene Q na računalo koje nije povezano s instrumentom Rotor-Gene Q MDx. Softver je u cijelosti funkcionalan i može simulirati postupke.  
**Napomena:** ako je označen ovaj okvir i ako je instrument Rotor-Gene Q MDx povezan na računalo, prije pokretanja postupka pojavljuje se sljedeća poruka: **You are about to run in Virtual mode** (Pokrenut ćete virtualni način rada). Za izvođenje stvarnog postupka morate promijeniti postavke u prozoru **Setup** (Postavljanje) (pogledajte odjeljak 6.5.4).
- Begin (Započni): Nakon unosa svih informacija kliknite **Begin** (Započni). Pričekajte dok inicijalizacija ne završi, što može potrajati nekoliko sekundi. Ako je odabran virtualni način rada, pojavljuje se sljedeća poruka:

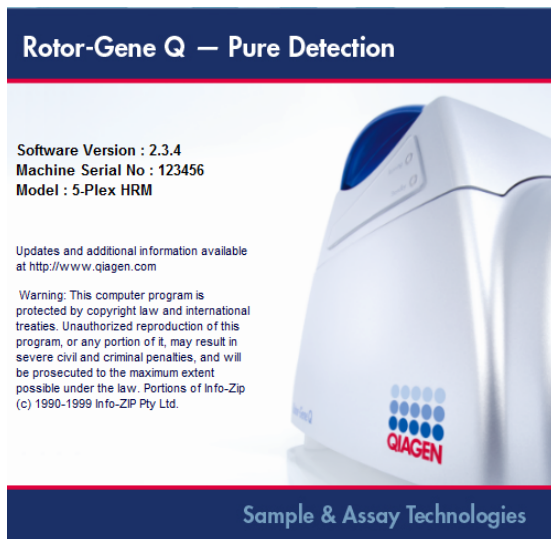


Ako okvir **Run in Virtual Mode** (Pokreni u virtualnom načinu rada) nije označen, softver se automatski pokreće i otvara.

- Exit Program (Izlaz iz programa): Klikom na ovaj gumb izlazi se iz programa.

#### 4.1.4 Inačica softvera

Da biste saznali broj svoje inačice, kliknite **Help** (Pomoć), a potom **About This Software...** (O ovom softveru...).



U ovom se prozoru prikazuju općenite informacije o softveru, uključujući inačicu softvera te serijski broj i model instrumenta.

Softver se može besplatno umnažati za uporabu unutar organizacije koja posjeduje instrument Rotor-Gene Q MDx. Softver se ne smije kopirati i distribuirati ostalima izvan organizacije.

#### 4.1.5 Dodatni softver na računalima povezanim s instrumentima Rotor-Gene Q MDx

Softver Rotor-Gene Q upravlja vremenski kritičnim procesima tijekom postupka lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction, PCR) i procesima prikupljanja podataka. Stoga je važno osigurati da nijedan drugi proces ne upotrebljava značajne resurse sustava usporavajući tako softver Rotor-Gene Q. Posebno je važno obratiti pozornost na stavke navedene u nastavku.

Administratorima sustava savjetuje se da prije implementacije bilo kakve izmjene sustava razmotre učinke koje bi mogla imati na resurse.

#### **Antivirusni softver**

Tvrtka QIAGEN svjesna je prijetnje koju računalni virusi predstavljaju za svako računalo koje razmjenjuje podatke s drugim računalima. Očekuje se da će se inačica 1.0 ili 2.1 softvera Rotor-Gene AssayManager prvenstveno instalirati u okruženjima u kojima su na snazi lokalna pravila koja minimiziraju tu prijetnju. Ipak, tvrtka QIAGEN u svakom slučaju preporučuje uporabu antivirusnog softvera.



Kupac je odgovoran za odabir i instalaciju odgovarajućeg alata za skeniranje virusa. Međutim, tvrtka QIAGEN odobrila je softver Rotor-Gene Q s prijenosnim računalom QIAGEN u kombinaciji sa sljedećim antivirusnim softverom kako bi potvrdila kompatibilnost:

- Microsoft Defender, inačica klijenta 4.18.2005.5

Na stranici proizvoda na internetskoj stranici QIAGEN.com potražite najnovije inačice antivirusnog softvera koje su potvrđene u kombinaciji sa softverom Rotor-Gene Q i inačicom 1.0 ili 2.1 softvera Rotor-Gene AssayManager.

Ako je odabran antivirusni softver, provjerite može li se konfigurirati na način da se put mape u bazi podataka može izuzeti iz skeniranja. U suprotnome postoji rizik od pogrešaka pri povezivanju s bazom podataka. Budući da inačice 1.0 i 2.1 softvera Rotor-Gene AssayManager dinamički kreiraju nove arhive baza podataka, potrebno je izuzeti put mape do datoteka, a ne pojedinačne datoteke. Ne preporučujemo uporabu antivirusnog softvera koji omogućuje izuzimanje samo pojedinačnih datoteka, npr. McAfee Antivirus Plus V16.0.5. Ako se računalo upotrebljava u okruženju u kojem nema mrežnog pristupa, provjerite podržava li antivirusni softver ažuriranja izvan mreže.

Da bi se nakon instaliranja antivirusnog softvera dobili dosljedni rezultati, administratori sustava trebali bi se pobrinuti za sljedeće:

- Kao što je prethodno opisano, iz skeniranja datoteka potrebno je isključiti put mape u bazi podataka softvera Rotor-Gene AssayManager 1.0 i 2.1 (**C:\Program Files\Microsoft SQL Server\MSSQL10\_50.RGAMINSTANCE\MSSQL\DATA**).
- Ažuriranja virusne baze podataka ne provode se kad se upotrebljava softver Rotor-Gene AssayManager 1.0 ili 2.1.
- Provjerite jesu li tijekom prikupljanja podataka o real-time PCR-u onemogućena potpuna ili djelomična skeniranja tvrdog diska. U protivnome postoji rizik od štetnog učinka na rad instrumenta.

Pojedinosti o konfiguraciji pročitajte u priručniku odabranog antivirusnog softvera.

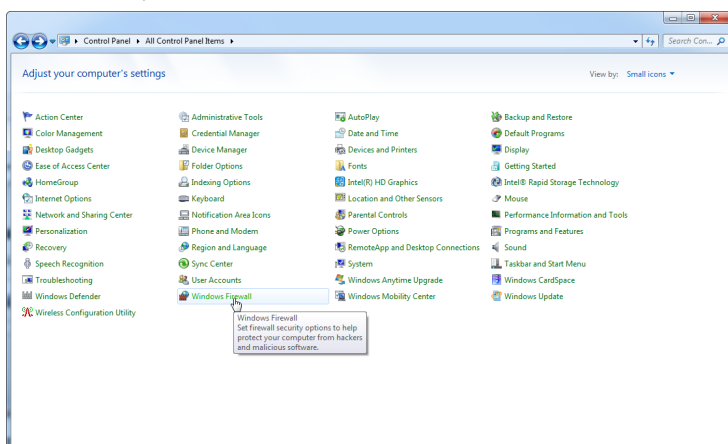
## **Vatrozid i mreže**

Softver Rotor-Gene Q može raditi ili na računalima bez mrežnog pristupa ili u mrežnom okruženju ako se upotrebljava daljinski poslužitelj baze podataka. Vatrozid na prijenosnom računalu koje isporučuje tvrtka QIAGEN za umreženi rad konfiguriran je tako da je ulazni promet blokiran za sve priključke osim za one koji su potrebni za uspostavu mrežne veze.

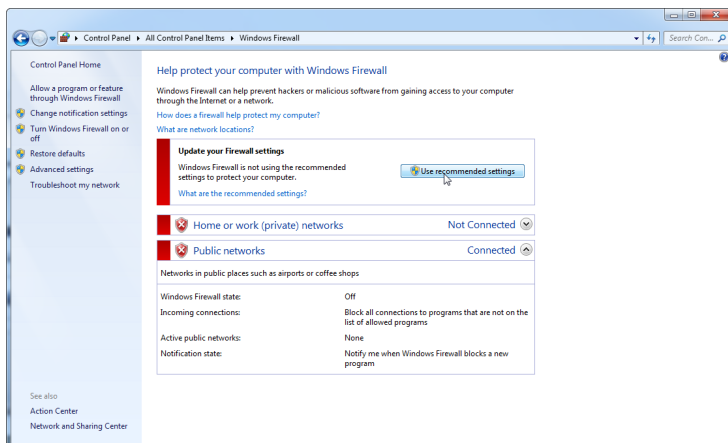
Imajte na umu da blokiranje ulaznih veza ne utječe na odgovore na zahtjeve koje aktivira korisnik. Izlazne veze dopuštene su jer mogu biti potrebne za dohvaćanje ažuriranja.

Ako se vaša konfiguracija razlikuje, tvrtka QIAGEN preporučuje konfiguriranje vatrozida na prethodno opisani način. Da bi se to učinilo, administrator sustava mora se prijaviti i izvesti sljedeće korake:

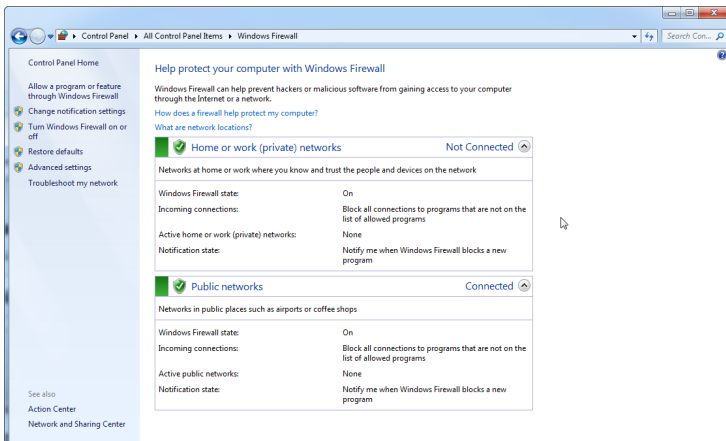
1. Otvorite **Control Panel** (Upravljačka ploča) i odaberite **Windows Firewall** (Vatrozid sustava Windows).



2. Odaberite **Use recommended settings** (Upotrijebi preporučene postavke).

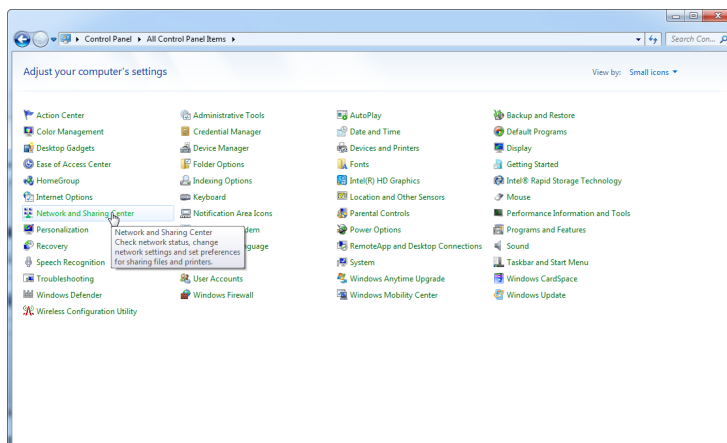


### 3. Provjerite jesu li sljedeće postavke aktivne:

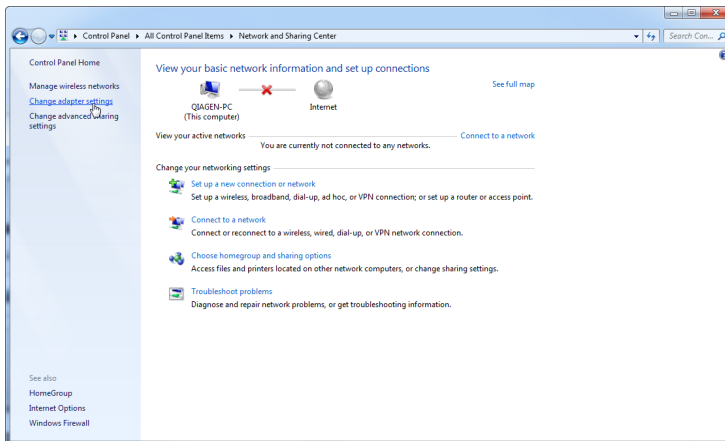


Zbog sigurnosti i pouzdanosti upotrebljavat će se pristup mreži kabelom umjesto tehnologijom Wi-Fi. Wi-Fi prilagodnik onemogućen je na prijenosnim računalima koja isporučuje tvrtka QIAGEN. Ako se vaša konfiguracija razlikuje, administrator sustava mora ručno onemogućiti Wi-Fi prilagodnik izvođenjem sljedećih koraka:

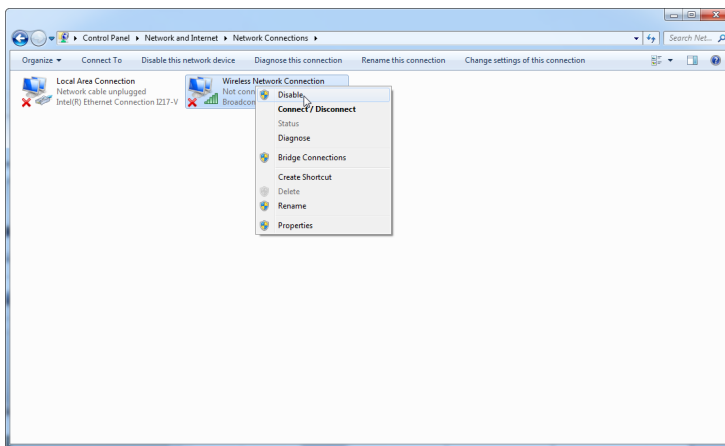
### 4. Otvorite **Control Panel** (Upravljačka ploča) i odaberite **Network and Sharing Center** (Centar za mreže i zajedničko korištenje).



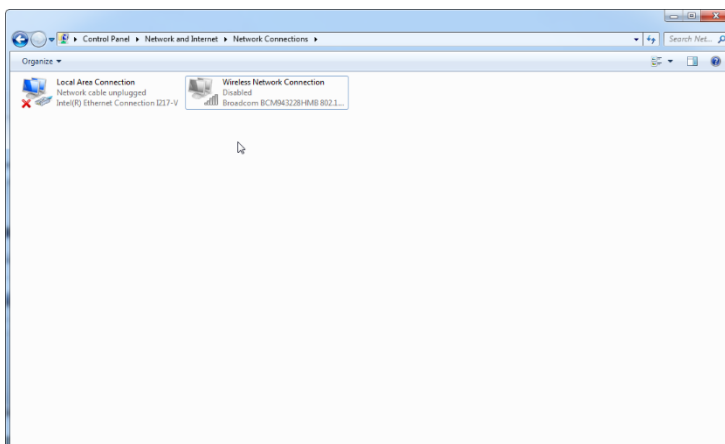
5. Odaberite **Change adapter settings** (Promijeni postavke prilagodnika).



6. Držite miša iznad mogućnosti **Wireless Network Connection** (Veza s bežičnom mrežom), pritisnite desni gumb miša i u kontekstnom izborniku odaberite **Disable** (Onemogućiti).



7. Provjerite je li mogućnost **Wireless Network Connection** (Veza s bežičnom mrežom) onemogućena.



## Alati sustava

Mnogi alati sustava mogu upotrebljavati značajne resurse sustava, čak i bez ikakve interakcije s korisnikom. Uobičajeni primjeri takvih alata jesu:

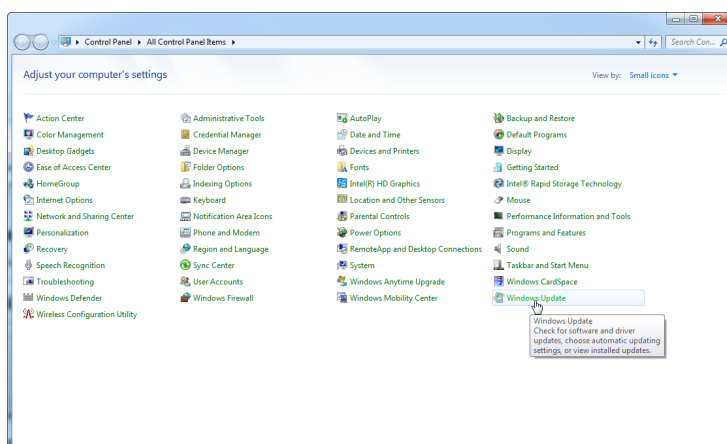
- indeksiranje datoteka, koje se izvodi kao pozadinski zadatak mnogih suvremenih uredskih aplikacija
- defragmentacija diska, koja se također često izvodi kao pozadinski zadatak
- bilo kakav softver koji provjerava ažuriranja na internetu
- alati za daljinsko praćenje i upravljanje.

Imajte na umu da zbog dinamičke prirode IT svijeta ovaj popis možda nije potpun i možda su objavljeni alati koji nisu bili poznati u vrijeme pisanja ovog priručnika. Važno je da se administratori sustava pobrinu da takav alat ne bude aktivan tijekom postupka lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction, PCR).

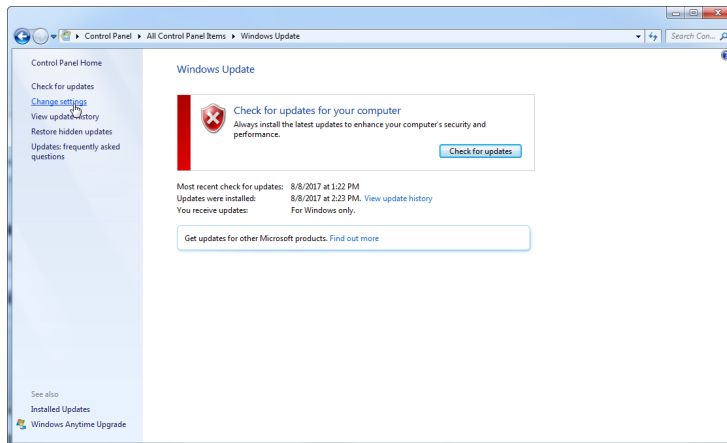
## Ažuriranja operacijskog sustava

Prijenosna računala koja isporučuje tvrtka QIAGEN konfigurirana su tako da su automatska ažuriranja operacijskog sustava onemogućena. Ako se vaša konfiguracija razlikuje, administrator sustava mora onemogućiti sve postupke automatskog ažuriranja operacijskog sustava s pomoću sljedećih koraka:

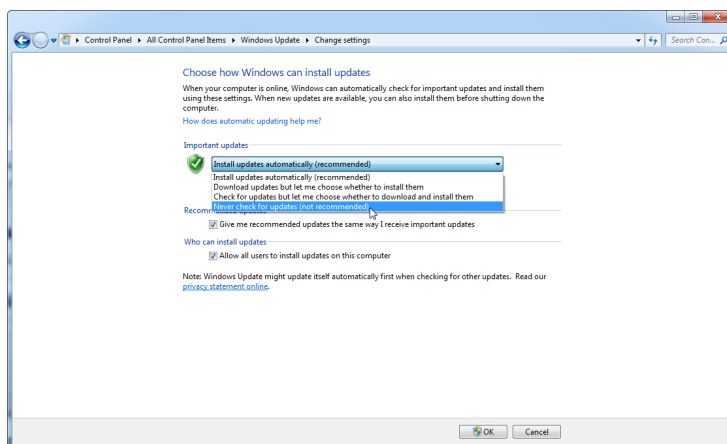
1. Otvorite **Control Panel** (Upravljačka ploča) i odaberite **Windows Update** (Ažuriranje sustava Windows).



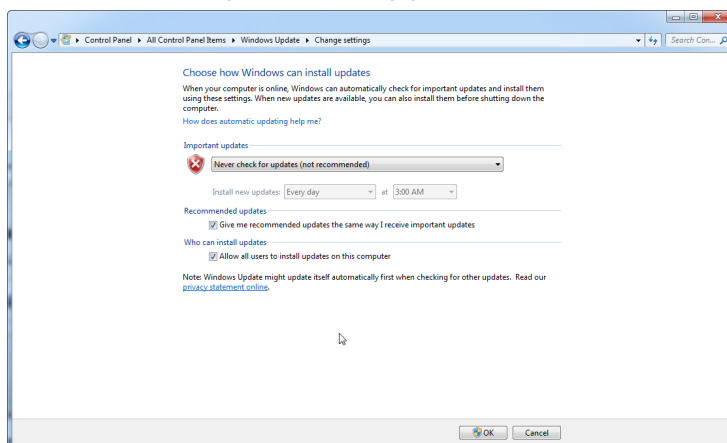
## 2. Odaberite **Change settings** (Promijeni postavke).



## 3. Odaberite **Never check for updates** (Nikad ne provjeravaj ažuriranja).



## 4. Provjerite je li mogućnost **Never check for updates** (Nikad ne provjeravaj ažuriranja) aktivna u odjeljku **Important updates** (Važna ažuriranja).



Ako su ažuriranja potrebna zbog neotkrivenih sigurnosnih ranjivosti, tvrtka QIAGEN omogućuje mehanizme za instaliranje definiranog skupa provjerenih sigurnosnih zakrpa sustava Windows preko mreže (ako je na prijenosnom računalu tvrtke QIAGEN dostupna internetska veza) ili u obliku izvanmrežnog paketa pripremljenog na zasebnom računalu s internetskom vezom.

Za dodatne informacije posjetite stranicu proizvoda na stranici **QIAGEN.com**.


## 4.2 Zahtjevi za lokaciju


Instrument Rotor-Gene Q MDx mora se nalaziti dalje od izravne Sunčeve svjetlosti, dalje od izvora topline i dalje od izvora vibracija i električnih smetnji. Za radne uvjete (temperatura i vlažnost) pogledajte Dodatak A. Na mjestu instalacije ne smije biti prekomjernog propuha, prekomjerne vlage, prekomjerne prašine te ono ne smije biti izloženo velikim promjenama temperature.

Težinu i dimenzije instrumenata Rotor-Gene Q MDx potražite u Dodatku A. Radna površina mora biti suha, čista i imati dodatnog prostora za dodatnu opremu. Dodatne informacije o potrebnim specifikacijama radne površine zatražite od Tehničke službe tvrtke QIAGEN.

**Napomena:** iznimno je važno da se instrument Rotor-Gene Q MDx nalazi na stabilnoj površini koja je ravna i koja nije izložena vibracijama. Pročitajte radne uvjete – pogledajte Dodatak A.

Instrument Rotor-Gene Q MDx mora se postaviti unutar otprilike 1,5 m od propisno uzemljene AC strujne utičnice.

<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Eksplozivna atmosfera</b> Instrument Rotor-Gene Q MDx nije predviđen za uporabu u eksplozivnoj atmosferi.
--	---

<b>UPOZORENJE</b> 	<b>Rizik od pregrijavanja</b> Da bi se zajamčila odgovarajuća ventilacija, održavajte minimalni razmak od 10 cm na stražnjoj strani instrumenta Rotor-Gene Q MDx.  Prorezi i otvori za ventilaciju instrumenta Rotor-Gene Q MDx ne smiju se prekrivati.
--	--

## 4.3 AC priključak napajanja

### 4.3.1 Zahtjevi u pogledu napajanja

Instrument Rotor-Gene Q MDx radi na:

- 100 – 240 V AC pri 50 – 60 Hz, 520 VA (vršno)

Provjerite je li nazivni napon instrumenta Rotor-Gene Q MDx kompatibilan s AC naponom dostupnim na mjestu instalacije. Kolebanja napona mrežnog napajanja ne smiju premašivati 10 % nazivnog napona napajanja.

### 4.3.2 Zahtjevi za uzemljenje

Da biste zaštitili osoblje koje rukuje instrumentom, tvrtka QIAGEN preporučuje pravilno uzemljivanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Instrument je opremljen AC kabelom napajanja s trima vodičima koji, kada ga se priključi na odgovarajuću AC strujnu utičnicu, uzemljuju instrument. Da biste zadržali ovu zaštitnu značajku, nemojte raditi na instrumentu priključenom na AC strujnu utičnicu koja nije priključena na uzemljenje.

### 4.3.3 Instalacija AC kabela napajanja

Spojite jedan kraj AC kabela napajanja u utičnicu koja se nalazi sa stražnje strane instrumenta Rotor-Gene Q MDx, a drugi kraj u AC strujnu utičnicu.

## 4.4 Konfiguracija za sigurnost sustava Windows

Na prijenosnim računalima koja isporučuje tvrtka QIAGEN za uporabu s instrumentom Rotor-Gene Q MDx može biti predinstaliran sustav Microsoft Windows 7 ili Windows 10, a računala su konfigurirana sa standardnim (neadministrativnim) Windows korisničkim računom i s administratorskim računom. Tijekom rutinske uporabe sustava upotrebljava se standardni račun jer su softver Rotor-Gene Q i inačica 1.0 ili 2.1 softvera Rotor-Gene AssayManager predviđene za rad bez administratorskih prava. Administratorski račun, onaj s crvenom radnom površinom, upotrebljava se samo za instaliranje softvera Rotor-Gene Q ili Rotor-Gene AssayManager inačica 1.0 ili 2.1 i u skladu s odjeljkom Dodatni softver na računalima povezanim s instrumentima Rotor-Gene Q MDx (pogledajte odjeljak „Antivirusni softver“). Crvena radna površina ukazuje na to da se upotrebljava administratorski račun. Svaki put provjerite jeste li se za rutinsku uporabu prijavili kao standardni korisnik.



Zadana lozinka administratorskog računa glasi Q1a#g3n!A6. Administratorsku lozinku promijenite nakon prve prijave. Lozinka mora biti sigurna i ne smijete je izgubiti. Za račun rukovatelja nema lozinke.

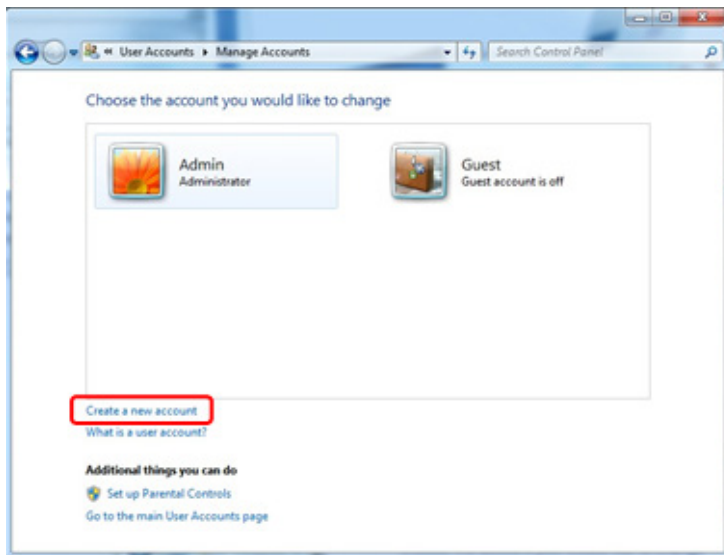
Ako se izgubi administratorska lozinka za prijenosno računalo, savjeovali bismo vam da se obratite tvrtki Microsoft za podršku.

Ako se vaša konfiguracija razlikuje i ne sadržava neadministrativni račun, administratori sustava postaviti će dodatni standardni korisnički račun sustava Windows da bi spriječili pristup ključnim područjima sustava kao što su programske datoteke, direktorij sustava Windows (npr. pristup funkciji instaliranja ili deinstaliranja, uključujući aplikacije, komponente operacijskog sustava, postavke datuma/vremena, ažuriranja sustava Windows, vatrozid, korisnička prava i uloge, aktivacija antivirusne zaštite) ili postavke važne za rad poput uštede energije.

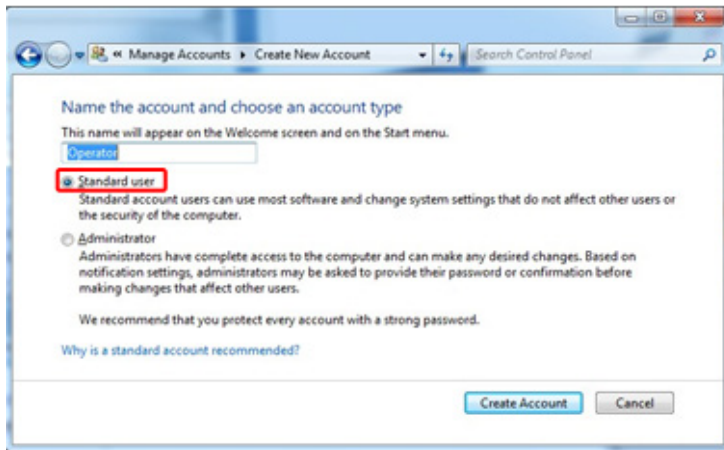
Da biste izradili standardni korisnički račun u sustavu Windows 7, slijedite korake opisane u odjeljku „Izrada novog korisničkog računa“:

Putem izbornika **Start** otvorite Windows Control Panel (Upravljačka ploča sustava Windows) i odaberite **User Accounts** (Korisnički računi) > **Manage Accounts** (Upravljaj računima).

1. Odaberite **Create a new account** (Izradi novi račun).



2. Dajte naziv računu i odaberite **Standard User** (Standardni korisnik) kao vrstu računa.



3. Kliknite **Create Account** (Izradi račun).

## 4.5 Zahtjevi radne stanice

Prijenosno računalo, koje se opcionalno isporučuje s instrumentom Rotor-Gene Q MDx, zadovoljava zahtjeve softvera Rotor-Gene Q, koji su detaljno navedeni u tablici u nastavku.

### Zahtjevi sustava radne stanice

Opis	Minimalni zahtjev
Operacijski sustav	Microsoft® Windows® 10 Professional edition (64 bita); Microsoft Windows 7 Professional edition (32 bita ili 64 bita)* (servisni paket 1)
Procesor	Intel® Core™ 2 Duo 1,66 GHz ili jači
Glavna memorija	Najmanje 1 GB RAM-a
Prostor na tvrdom disku	Najmanje 10 GB HDD-a
Grafika	Adapter i zaslon s najmanje 1200 x 800 piksela
Priključci	Serijski priključak RS-232 ili USB priključak
Pokazivački uređaj	Potrebni su dodirna pločica, miš ili ekvivalentan uređaj
Bluetooth	Mora biti isključen
PDF preglednik ili slično	Mora biti instaliran; nije dio paketa za instaliranje softvera
Mogućnosti napajanja	Nikad nemojte isključiti tvrde diskove, hibernirati ili ići u stanje mirovanja

\* Sustav Microsoft Windows 10 ili Windows 7, Professional edition potreban je za pokretanje softvera Rotor-Gene Q sa sigurnosnim značajkama (pogledajte odjeljak 6.9). Sigurnosne značajke nisu dostupne ako se upotrebljava izdanje Home sustava Windows 10 ili Windows 7.

† Kada se upotrebljava inačica 1.0 ili 2.1 softvera Rotor-Gene AssayManager®, razlikuju se sljedeći minimalni zahtjevi osobnog računala: Procesor Intel Core i3-380M, glavna memorija 4 GB RAM-a, prostor na tvrdom disku 250 GB, potreban USB priključak.

## 4.6 Raspakiravanje i instaliranje instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Instrument Rotor-Gene Q MDx isporučuje se sa svim potrebnim dijelovima za postavljanje i pokretanje instrumenta. U kutiji se nalazi i popis isporučenih dijelova.

**Napomena:** provjerite je li popis potpun kako biste bili sigurni da imate sve dijelove.

**Napomena:** prije instaliranja provjerite da na instrumentu i dostavljenoj dodatnoj opremi nema oštećenja nastalih tijekom transporta.

Kutija s dodatnom opremom nalazi se na pjenastoj ambalaži. Kutija s dodatnom opremom sadržava:

- vodič za instalaciju (na engleskom; prijevodi su dostupni na prijenosnim medijima uz priručnike)
- prijenosne medije (softver)
- prijenosne medije (priručnici)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (rastavljen radi sigurnog transporta)
- 36-Well Rotor (crveni rotor)
- 36-Well Rotor Locking Ring.

Sljedeći predmeti nalaze se sa svake strane pjenaste ambalaže:

- USB i serijski kabel RS-232
- komplet kabela za napajanje za međunarodnu uporabu
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (1000).

Nakon što sve dijelove izvadite iz kutije, skinite pjenastu ambalažu s instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Pažljivo izvadite instrument Rotor-Gene Q MDx iz kutije i odmotajte plastični omot. Otvorite poklopac tako da ga povučete prema natrag da biste pristupili reakcijskoj komori.

Sljedeći predmeti već su instalirani u instrumentu Rotor-Gene Q MDx:

- 72-Well Rotor (plavi rotor)
- 72-Well Rotor Locking Ring.

Ovisno o pojedinostima narudžbe, u pakiranje može biti uključeno prijenosno računalo.

#### 4.6.1 Nadogradnja softvera

Ažuriranja softvera dostupna su na internetskoj stranici tvrtke QIAGEN <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>, kojoj se može pristupiti i iz izbornika **Help** (Pomoć) u softveru. Da biste preuzeli softver, morate se registrirati na mreži.

#### 4.7 Dodatna oprema

Rotirajući diskovi Rotor-Discs i dodatna oprema mogu se zasebno naručiti za uporabu s instrumentom Rotor-Gene Q MDx. Dodatne pojedinosti potražite u odjeljku 16.

#### 4.8 Ponovno zapakiranje i otprema instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Pri ponovnom zapakiravanju instrumenta Rotor-Gene Q MDx za otpremu mora se upotrijebiti originalna ambalaža. Ako se originalna ambalaža ne može upotrijebiti, obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN. Provjerite je li instrument pravilno pripremljen (pogledajte odjeljak Održavanje) prije zapakiranja te se uvjerite da ne predstavlja biološku ili kemijsku opasnost.


#### 4.9 Početak


##### 4.9.1 Uključivanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx i radne stanice

Provjerite je li Rotor-Gene Q povezan s prijenosnim računalom USB-om ili RS-232 kabelom te jesu li i prijenosno računalo i Rotor-Gene Q uključeni i napajaju li se.

## 5 Radni postupci

Preporučujemo da prije nastavka pročitate odjeljak 3 i upoznate se sa značajkama instrumenta.

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p><b>Oštećenje instrumenta</b></p> <p>S instrumentom Rotor-Gene Q MDx upotrebljavajte samo protočne ćelije i potrošni materijal tvrtke QIAGEN. Oštećenje uzrokovano uporabom drugih vrsta protočnih ćelija ili potrošnog materijala poništiti će jamstvo.</p>
---	--

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p><b>Rizik od oštećenja materijala</b></p> <p>Izbjegavajte pomicanje radne površine i uzrokovanje vibracija za instrument Rotor-Gene Q MDx tijekom rada kako biste spriječili ometanje osjetljivih optičkih mjerenja.</p>
---	--

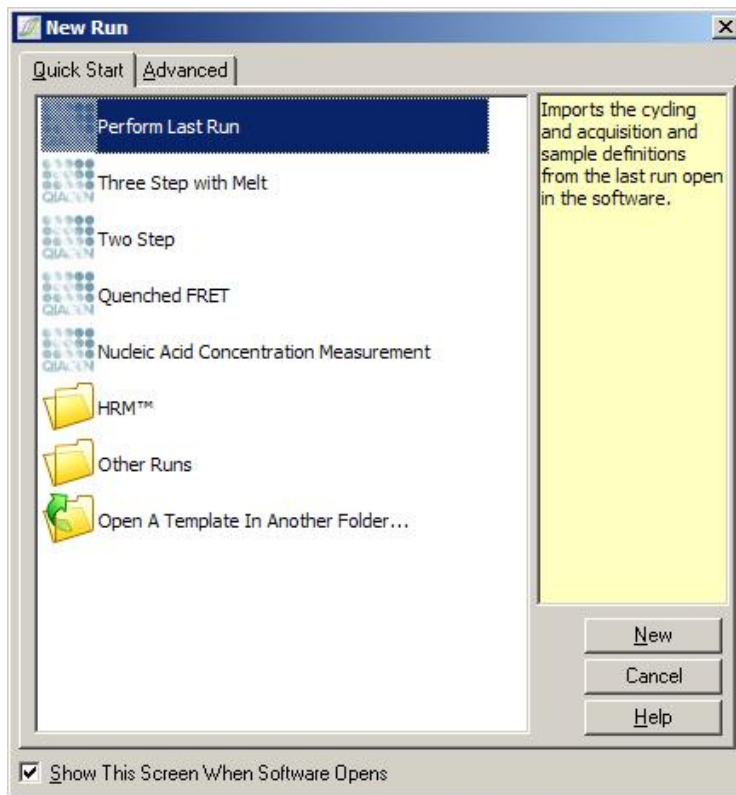
### 5.1 Uporaba softvera instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Novi postupci mogu se postaviti s pomoću čarobnjaka Quick Start (Brzi početak rada) ili čarobnjaka Advanced (Napredno), koji se pojavljuju pri pokretanju softvera. Čarobnjak Quick Start (Brzi početak rada) osmišljen je tako da korisniku omogući da što brže pokrene postupak. Čarobnjak Advanced (Napredno) omogućuje više mogućnosti, kao što su konfiguracija značajke Gain Optimization (Optimizacija pojačanja) i postavke volumena. Kako bi bili praktični, čarobnjaci imaju niz predložaka sa zadanim uvjetima cikliranja i kanalima za prikupljanje. Da biste promijenili vrstu čarobnjaka, odaberite odgovarajuću karticu na vrhu prozora **New Run** (Novi postupak).

#### 5.1.1 Čarobnjak Quick Start (Brzi početak rada)

Čarobnjak Quick Start (Brzi početak rada) omogućuje korisniku da što brže pokrene postupak. Korisnik može odabrati iz skupa često upotrebljivanih predložaka i unijeti minimalne parametre da bi počeo s radom. Čarobnjak Quick Start (Brzi početak rada) pretpostavlja da volumen reakcije iznosi 25 µl. Za ostale volumene reakcije upotrijebite čarobnjaka Advanced (Napredno) (pogledajte odjeljak 5.1.2).

Kao prvi korak odaberite željeni predložak za postupak tako što ćete dvaput kliknuti na predložak s popisa u prozoru **New Run** (Novi postupak).



<b>Perform Last Run</b> (Izvedi zadnji postupak):	<b>Perform Last Run</b> (Izvedi zadnji postupak) upotrebljava definicije cikliranja, prikupljanja i uzoraka iz zadnjeg postupka otvorenog u softveru.
<b>Three Step with Melt</b> (Tri koraka s taljenjem):	Ovo je profil cikliranja u tri koraka s krivuljom taljenja uz prikupljanje podataka na zelenom kanalu.
<b>Two Step</b> (Dva koraka):	Ovo je profil cikliranja u dva koraka s podacima prikupljenima na zelenom, žutom, narančastom i crvenom kanalu.
<b>Quenched FRET</b> (Prigušeni FRET):	Ovo je profil cikliranja u tri koraka s krivuljom taljenja. Za razliku od profila Three Step with Melt (Tri koraka s taljenjem), do prikupljanja dolazi na kraju koraka sparivanja.
<b>Nucleic Acid Concentration Measurement</b> (Mjerenje koncentracije nukleinske kiseline):	Ovo je zadani predložak za mjerenje koncentracije nukleinske kiseline interkalirajućim bojama.
<b>HRM</b> (Taljenje velike razlučivosti):	Ova mapa sadržava profile taljenja velike razlučivosti.
<b>Other Runs</b> (Ostali postupci):	Ova mapa sadržava dodatne profile.

Profili cikliranja i prikupljanja za sve predloške mogu se mijenjati s pomoću čarobnjaka.

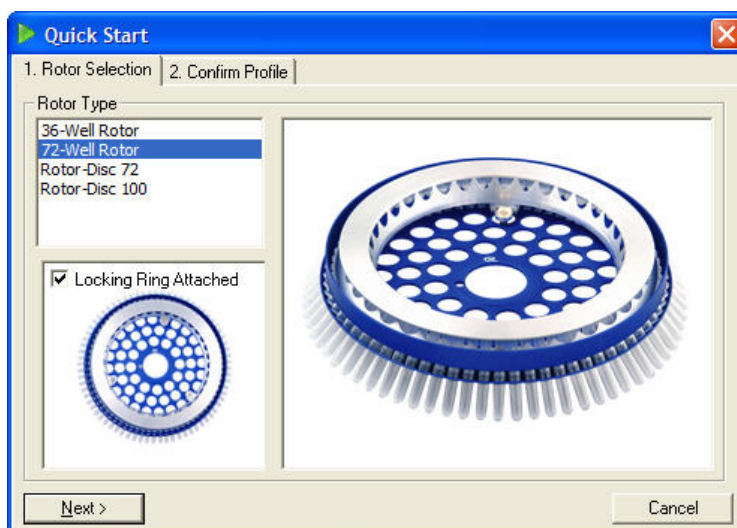
**Napomena:** predlošci koje određuje korisnik mogu se dodati popisu predložaka u čarobnjaku Quick Start (Brzi početak rada) kopiranjem ili spremanjem \*.ret datoteka u **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates**. Nakon kopiranja datoteke na ovaj put predložak će se pojaviti kao ikona na popisu. Ako biste za svoje predloške željeli korisnički prilagođene ikone, izradite sliku u formatu \*.ico i datoteku nazovite kao i predložak.

Podmape se mogu izraditi za predloške povezane sa skupinama. To omogućuje organiziranje predložaka koje može biti praktično ako, na primjer, nekoliko korisnika upotrebljava isti instrument.

### Odabir rotora

U sljedećem prozoru s popisa odaberite vrstu rotora.

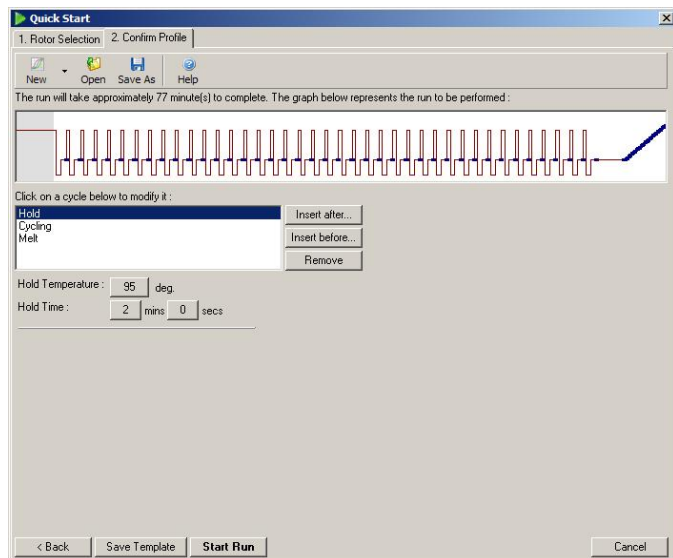
Označite potvrdni okvir **Locking Ring Attached** (Prsten za zaključavanje pričvršćen) i kliknite **Next** (Sljedeće).



### Potvrda profila

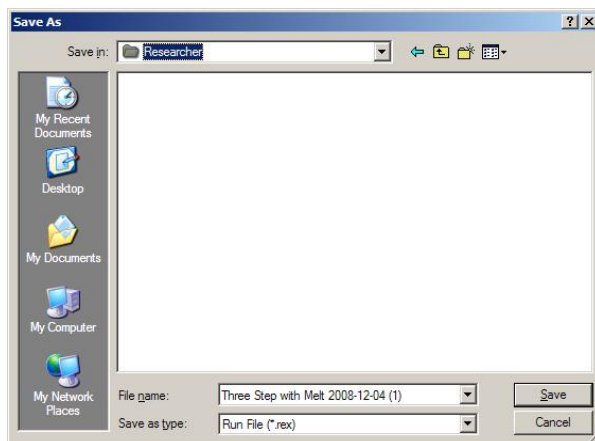
Uvoze se uvjeti cikliranja i kanali prikupljanja odabranog predloška. Mogu se mijenjati u prozoru **Edit Profile** (Uredi profil) (pogledajte odjeljak „Uređivanje profila”).

Da biste pokrenuli postupak, kliknite gumb **Start Run** (Pokreni postupak). Predložak se može spremiti i prije pokretanja postupka klikom na mogućnost **Save Template** (Spremi predložak).



## Spremanje postupka

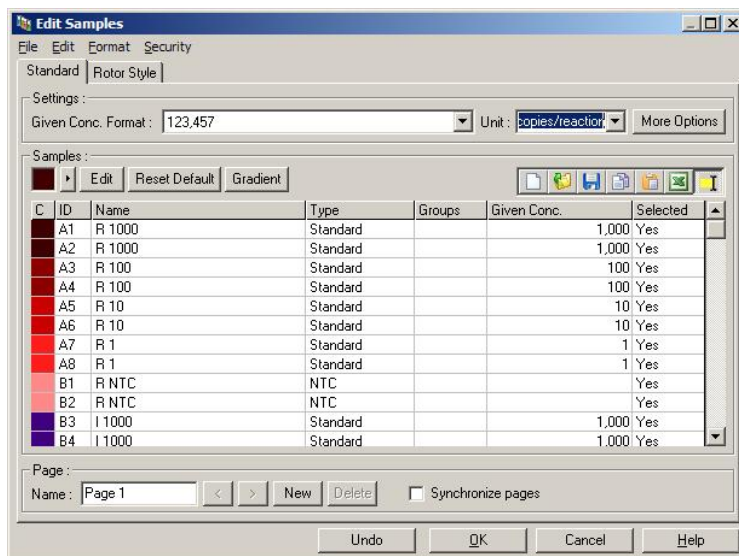
Nakon što kliknete na gumb **Start Run** (Pokreni postupak), pojavljuje se prozor **Save As** (Spremi kao). Postupak se može spremiti na lokaciju koju korisnik želi. Postupku se daje naziv datoteke koji sadržava upotrijebljen predložak i datum postupka. Naziv datoteke uključuje i serijski broj (1, 2 itd.) kako bi se omogućilo automatsko imenovanje brojnih postupaka koji istog dana upotrebljavaju isti predložak.





## Postavljanje uzorka

Nakon što postupak započne, u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) mogu se definirati i opisati uzorci.

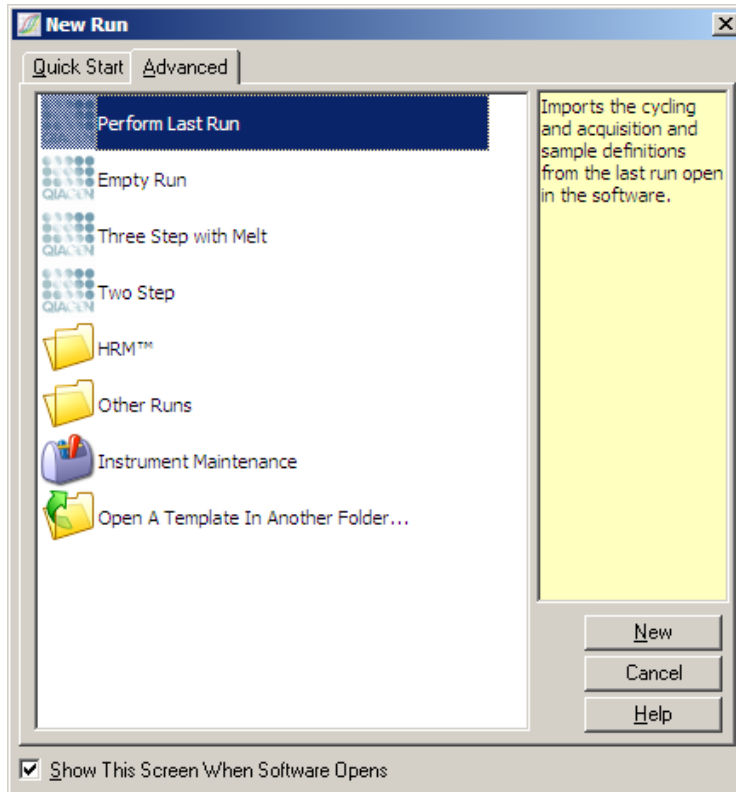


Prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke) pojavljuje se nakon što postupak započne kako bi korisnik to vrijeme mogao iskoristiti za unos naziva uzoraka. Ako se nazivi uzoraka unose jako brzo tijekom postupka (npr. s pomoću čitača crtičnih kodova), to može rezultirati transponiranim slovima u nazivima uzoraka. Stoga se preporučuje izbjegavati uporabu čitača crtičnih kodova i, ako je to primjenjivo, unositi nazive uzoraka nakon što postupak završi. Informacije o postavljanju definicija uzoraka u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) potražite u odjeljku 6.8.4.

### 5.1.2 Čarobnjak Advanced (Napredno)

Čarobnjak Advanced (Napredno) omogućuje mogućnosti koje nisu dostupne u čarobnjaku Quick Start (Brzi početak rada), kao što je konfiguracija optimizacije pojačanja.

Da biste upotrebljavali čarobnjak Advanced (Napredno), odaberite predložak tako da dvaput kliknete na naziv predložka na popisu u kartici **Advanced** (Napredno) unutar prozora **New Run** (Novi postupak).



Mogućnosti predložka ponuđene u ovom prozoru slične su onima koje se nude pri uporabi čarobnjaka Quick Start (Brzi početak rada) (odjeljak 5.1.1).

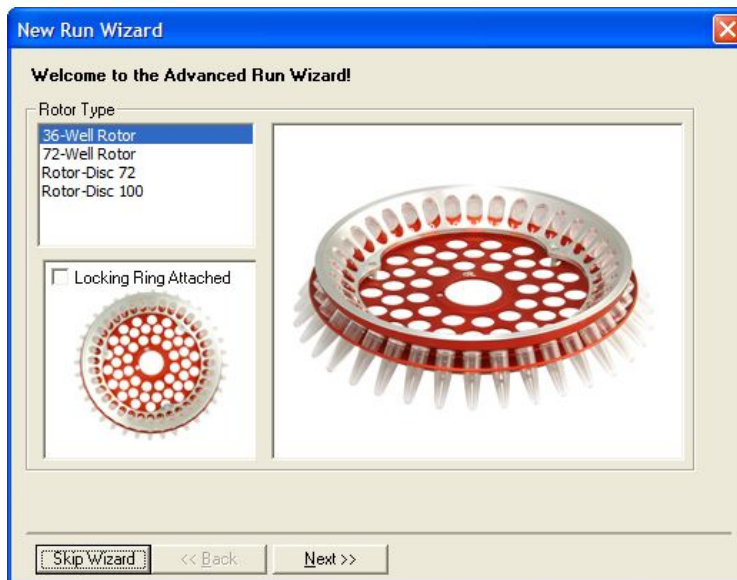
<b>Perform Last Run</b> (Izvedi zadnji postupak):	Radnjom <b>Perform Last Run</b> (Izvedi zadnji postupak) uvoze se definicije cikliranja, prikupljanja i uzoraka iz zadnjeg postupka koji je otvoren u softveru.
<b>Empty Run</b> (Prazan postupak):	Ovo je prazan postupak koji korisniku omogućuje definiranje svih parametara profila.
<b>Three Step with Melt</b> (Tri koraka s taljenjem):	Ovo je profil cikliranja u dva koraka s prikupljanjem podataka samo na zelenom kanalu da bi se postupak ubrzao.
<b>HRM</b> (Taljenje velike razlučivosti):	Ova mapa sadržava dva profila taljenja velike razlučivosti.
<b>Other Runs</b> (Ostali postupci):	Ova mapa sadržava dodatne profile.
<b>Instrument Maintenance</b> (Održavanje instrumenta):	Sadržava predloške upotrijebljene tijekom postupka optičke potvrde temperature (Optical Temperature Verification, OTV). Više informacija potražite u odjeljku 9. Ovaj je predložak zaključan kako bi se osiguralo da profil uvijek ispravno radi.

**Napomena:** predlošci koje određuje korisnik mogu se dodati na popis predložaka kopiranjem ili spremanjem \*.ret datoteka u **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\**. Nakon kopiranja datoteke na ovaj put predložak će se pojaviti kao ikona na popisu.

## Prozor čarobnjaka za pokretanje novog postupka 1

U sljedećem prozoru s popisa odaberite vrstu rotora.

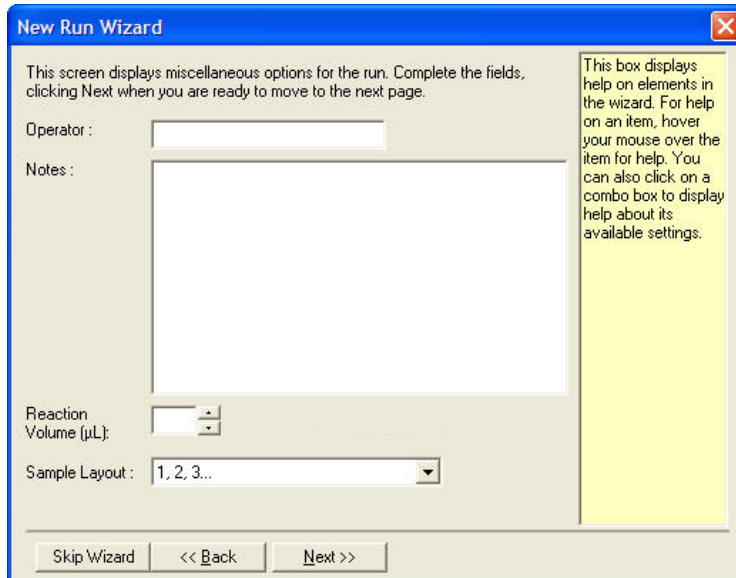
Označite potvrdi okvir **Locking Ring Attached** (Prsten za zaključavanje pričvršćen) i kliknite **Next** (Sljedeće) da biste nastavili.



## Prozor čarobnjaka za pokretanje novog postupka 2

U sljedećem se prozoru mogu unijeti ime korisnika i napomene o postupku. Morate unijeti i volumen reakcije.

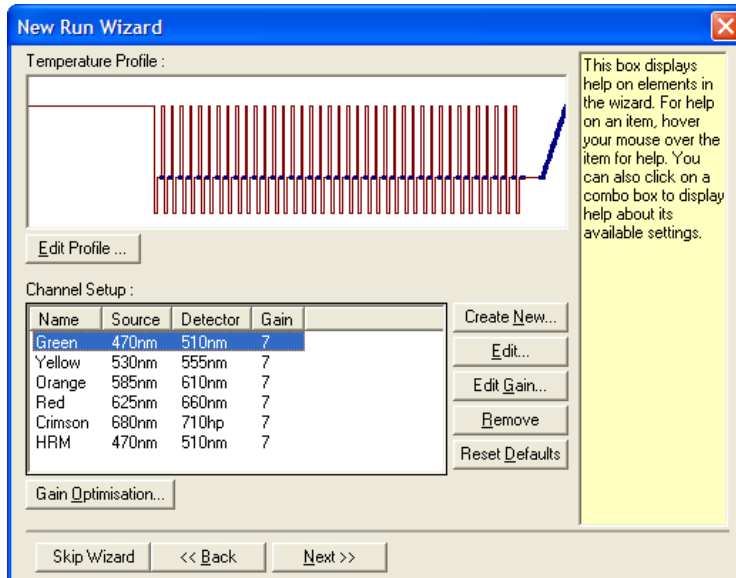
Ako je u prozoru 1 odabran 72-Well Rotor, u padajućem su izborniku dostupne tri mogućnosti **Sample Layout** (Raspored uzoraka). Zadana je mogućnost „1, 2, 3...”. Većina korisnika odabere tu mogućnost. Mogućnost „1A, 1B, 1C...” treba izabrati kada su uzorcima napunjene susjedne epruvete 0.1 ml Strip Tubes s pomoću višekanalne pipete s 8 kanala. Po potrebi se može odabrati raspored „A1, A2, A3...”.



### Prozor čarobnjaka za pokretanje novog postupka 3

U ovom se prozoru mogu izmijeniti mogućnosti **Temperature Profile** (Temperaturni profil) i **Channel Setup** (Postavke kanala). Ako se klikne gumb **Edit Profile...** (Uredi profil), pojavljuje se prozor **Edit Profile** (Uredi profil), što omogućuje izmjenu uvjeta cikliranja i odabir kanala prikupljanja (odjeljak Uređivanje profila).

Nakon postavljanja profila kliknite gumb **Gain Optimisation...** (Optimizacija pojačanja) da bi se otvorio prozor **Gain Optimisation** (Optimizacija pojačanja) (pogledajte stranicu 63).



## Uređivanje profila

Prozor **Edit Profile** (Uredi profil) omogućuje specificiranje uvjeta cikliranja i kanala prikupljanja. Prikazani početni profil temelji se na predlošku odabranom pri postavljanju postupka (pogledajte stranicu 45). Profil je grafički prikazan. Popis segmenata profila prikazuje se ispod grafičkog prikaza. Taj popis može uključivati mogućnosti Hold (Zadržavanje) (stranica 53), Cycling (Cikliranje) (stranica 55), Melt (Taljenje) (stranica 55) ili HRM (Taljenje velike razlučivosti) ako instrument ima kanal za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) (stranica 58).

Svaka faza profila može se urediti tako da se klikne na odgovarajuće područje grafičkog prikaza ili na naziv popisa te da se potom promijene postavke koje se pojave.

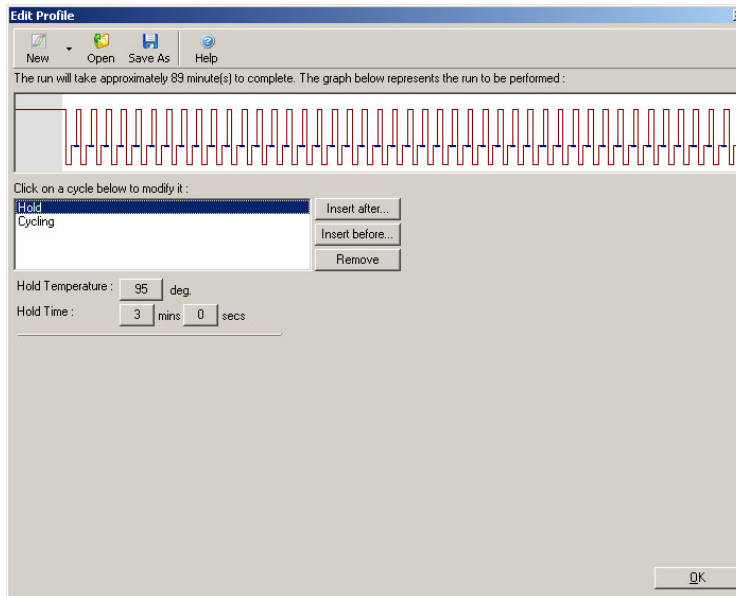
Insert after... (Umetni nakon...): Omogućuje dodavanje novog ciklusa nakon odabranog ciklusa.

Insert before... (Umetni prije...): Omogućuje dodavanje novog ciklusa prije odabranog ciklusa.

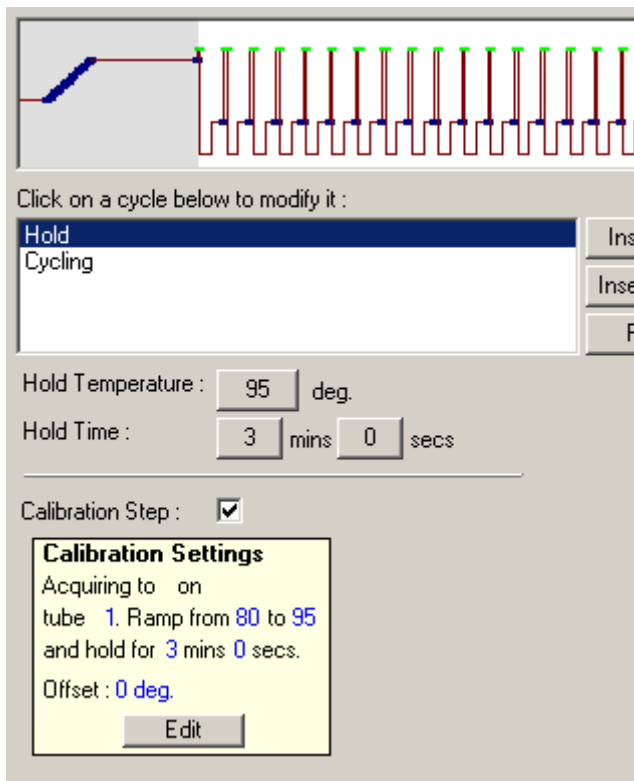
Remove (Ukloni): Iz profila se uklanja odabran ciklus.

### Zadržavanje

Mogućnost Hold (Zadržavanje) daje instrumentu Rotor-Gene Q MDx uputu da tijekom postavljenog vremena ostane na označenoj temperaturi. Da biste promijenili temperaturu, kliknite gumb **Hold Temperature** (Zadrži temperaturu) te utipkajte ili s pomoćnu klizne trake odaberite željenu temperaturu. Da biste promijenili trajanje zadržavanja, kliknite gumb **Hold Time** (Vrijeme zadržavanja), **mins** (minute) i **secs** (sekunde).



Ako se izvodi postupak Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije), mogućnost Hold (Zadržavanje) može se upotrijebiti kao korak kalibracije. U tom se slučaju kalibracijsko taljenje izvodi prije mogućnosti Hold (Zadržavanje). Prema zadanim postavkama, to je konfigurirano za prvu mogućnost Hold (Zadržavanje) u postupku, ali se, po potrebi, može promijeniti.



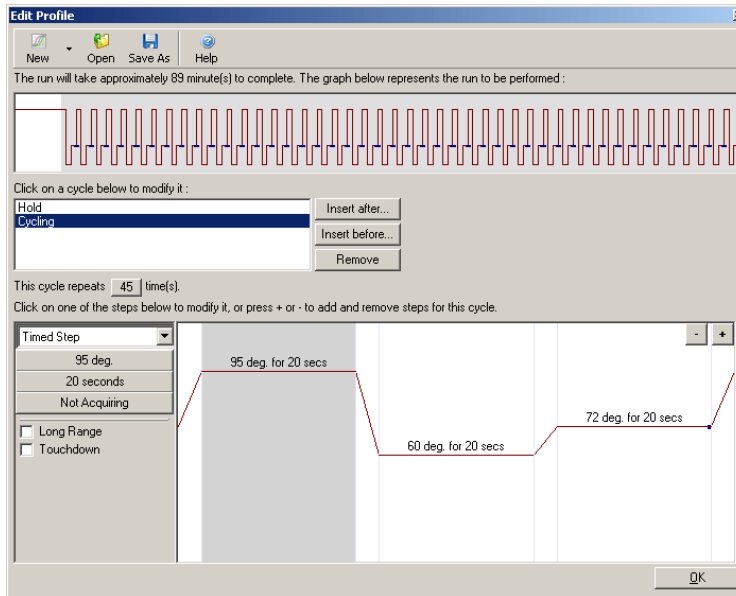
Više informacija o postupku Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije) potražite na stranici 59.

### Cikliranje

Tijekom cikliranja određeni se broj puta ponavljaju korisnički definirani koraci povezani s temperaturom i vremenom. Broj ponavljanja postavlja se gumbom **This cycle repeats X time(s)**. (Ovaj ciklus ponavlja se X puta).

Pojedinačni je ciklus grafički prikazan (kako je prikazano na snimci zaslona u nastavku). Svaki korak ciklusa može se izmijeniti. Temperatura se može mijenjati povlačenjem temperaturene linije na grafikonu prema gore ili prema dolje. Trajanje koraka može se mijenjati povlačenjem temperaturene granice na grafikonu ulijevo ili udesno. Alternativno možete kliknuti korak i upotrijebiti gumbе za temperaturu i vrijeme s lijeve strane grafikona.

Gumbima „-“ i „+“ s gornje desne strane grafikona mogu se dodavati ili uklanjati koraci u ciklusu.



**Long Range** (Dugi raspon): Označivanjem ovog okvira vrijeme zadržavanja odabranog koraka povećava se za 1 s sa svakim novim ciklusom.

**Touchdown** (Spuštanje): Označivanjem ovog okvira temperatura se spušta za određeni broj stupnjeva tijekom određenog broja početnih ciklusa. Ovo se potom prikazuje na zaslonu.

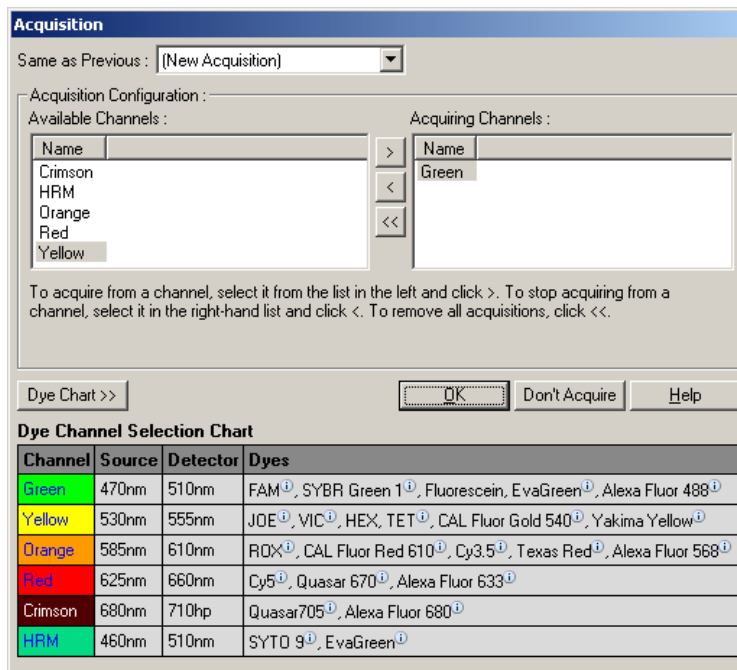
## Prikupljanje

Podaci se mogu prikupljati na bilo kojem kanalu u bilo kojem koraku cikliranja. Da biste postavili kanal za prikupljanje podataka, kliknite gumb **Not Acquiring** (Ne prikuplja se) (ako je kanal već postavljen da u ovom koraku prikuplja, ovdje su popisani kanali koji prikupljaju).



Nakon što kliknete gumb **Not Acquiring** (Ne prikuplja se), pojavljuje se prozor **Acquisition** (Prikupljanje).





Da biste postavili kanal za prikupljanje, odaberite kanal te ga s pomoću gumba **>** premjestite s popisa „Available Channels” (Dostupni kanali) na popis „Acquiring Channels” (Kanali za prikupljanje). Da biste odabrani kanal uklonili s popisa „Acquiring Channels” (Kanali za prikupljanje), upotrijebite gumb **<**. S pomoću gumba **<<** uklanjaju se svi kanali s popisa „Acquiring Channels” (Kanali za prikupljanje). Klikom gumba **Don't Acquire** (Nemoj prikupljati) uklanjaju se sva prikupljanja iz koraka.

Ako profil uključuje više od jedne sekvence cikliranja, prikupljeni podaci mogu se dodati podacima prikupljenima iz prethodnog cikliranja. U padajućem izborniku **Same as Previous** (Isto kao prethodno) odaberite korak cikliranja kojemu treba dodati podatke.

Tablica Dye Channel Selection Chart (Tablica odabira kanala za boju) pomaže korisniku da odabere koji je kanal primjeren za boju koju namjerava upotrijebiti. U tablici su prikazane boje koje se obično upotrebljavaju i ne naznačuju ograničenja instrumenta.

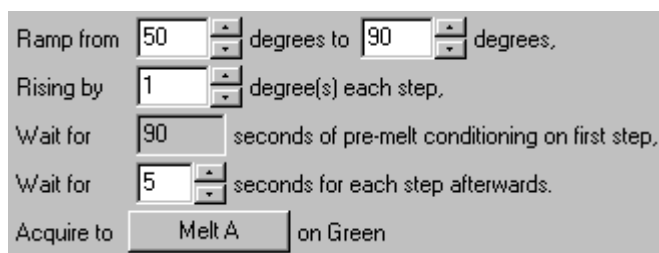
Prethodno opisane mogućnosti prikupljanja također se primjenjuju na korake „Melt” (Taljenje), osim što se podaci o prikupljanju ne mogu dodati s pomoću izbornika **Same as Previous** (Isto kao prethodno).

### Taljenje i hibridizacija

Melt (Taljenje) predstavlja povećanje između dvije temperature, s niže na višu temperaturu. Dopusteni raspon temperature iznosi 35 – 99 °C.

Da biste postavili postupak Melt (Taljenje), specificirajte početnu temperaturu, završnu temperaturu, uvećanja temperature, trajanje držanja temperature prvog prikupljanja prije nego što se pokrene povećanje, vrijeme držanja svakog povećanja i kanale prikupljanja.

Između dvije temperature generirat će se povećanje. Ako je početna temperatura viša od završne temperature, naziv koraka promijenit će se u **Hybridisation** (Hibridizacija). Mogućnost **Acquiring To** (Prikupljanje u), postavljena na Melt A (Taljenje A) na snimci zaslona u nastavku, može se mijenjati klikom gumba. Pojavit će se prozor **Acquisition** (Prikupljanje) gdje se mogu odabrati kanali.



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

Kada se provodi standardno taljenje, temperatura se povećava u koracima od 1 °C, uz čekanje od 5 sekundi prije svakog prikupljanja. Rotor-Gene Q MDx može se konfigurirati tako da taljenja provodi u koracima od 0,02 °C. Minimalno vrijeme zadržavanja između temperaturnih koraka razlikuje se ovisno o broju stupnjeva između svakog koraka.

### Taljenje velike razlučivosti

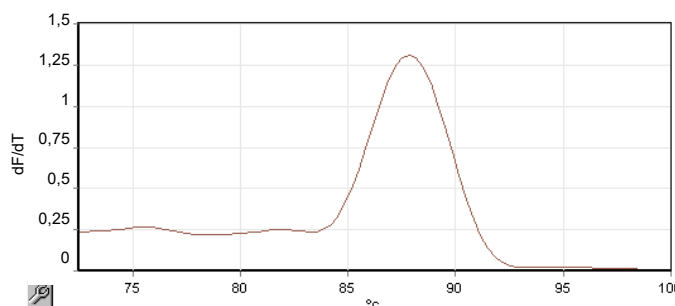
Analiza taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) karakterizira dvolančane uzorke DNK na temelju njihova disocijativnog ponašanja (taljenja). Slična je klasičnoj analizi krivulje taljenja, no pruža mnogo više informacija za širi raspon primjena. Uzorci se mogu razlikovati prema sekvenci, duljini, sadržaju GC-a ili komplementarnosti lanca, sve do promjena na razini pojedinačnog baznog para.

Analiza taljenja velike razlučivosti može se provoditi na instrumentima na kojima su instalirani hardver i softver za taljenje velike razlučivosti. Podaci se prikupljaju specijaliziranim izvorima i detektorima za taljenje velike razlučivosti. Analiza taljenja velike razlučivosti također uključuje mogućnost izvođenja postupka Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) netom prije nego što započne postupak Melt (Taljenje). Nakon izvođenja taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) podaci se mogu analizirati softverom za analizu taljenja velike razlučivosti (odjeljak 10).

### Cikliranje optičke denaturacije

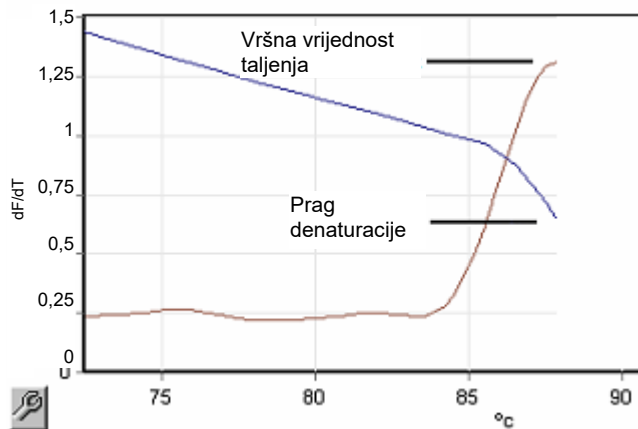
Cikliranje optičke denaturacije uzbuđljiva je tehnika dostupna na instrumentu Rotor-Gene Q MDx tijekom koje se provodi analiza taljenja u stvarnom vremenu da bi se utvrdila vršna vrijednost taljenja referentnog uzorka. To naznačuje denaturaciju PCR produkta s većom preciznošću od postavljanja određene temperature denaturacije za vrijeme zadržavanja. Da biste izveli ovu tehniku, jednostavno postavite referentnu epruvetu PCR produkta u položaj za epruvetu 1 na rotoru. Referentna epruveta mora sadržavati i detekcijska kemijska sredstva koja omogućuju detekciju disocijacije lanca.

Kada zagrijavate na početnu temperaturu denaturacije, taljenje se po zadanim postavkama izvodi na zelenom kanalu na temperaturama od 80 do 95 °C. Korisnik može prilagoditi parametre tog početnog taljenja. Na temelju tih podataka generira se krivulja taljenja te se automatski analizira.



Vršna točka taljenja ponovno se povezuje s neobrađenim podacima da bi se dobio prag denaturacije. Potom se u svakom koraku postupka Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije) instrument što brže zagrijava i podaci se kontinuirano prikupljaju. Nakon što referentna epruveta dosegne razinu fluorescencije praga denaturacije, instrument se trenutačno hladi i prelazi na sljedeći programirani korak ciklusa. Vršna vrijednost ne izračunava se tijekom cikliranja. Umjesto toga razina fluorescencije referira se na vršnu vrijednost taljenja, što označuje prag denaturacije.

Na sljedećem grafikonu preklapljeni su neobrađena očitavanja fluorescencije i prvi derivat. To pokazuje korespondenciju između praga denaturacije i vršne vrijednosti taljenja dobivene tijekom kalibracije.



Da biste izveli postupak Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije), trebat će vam:

- Prethodno amplificiran PCR produkt koji ćete staviti u položaj 1 u rotoru. Ovaj uzorak treba sadržavati isti PCR produkt kao i uzorci od interesa te detekcijska kemijska sredstva za praćenje disocijacije PCR produkta.
- Profil optičke denaturacije. Može se izraditi novi profil ili se može urediti postojeći profil (pogledajte pojedinosti navedene u daljnjem tekstu).

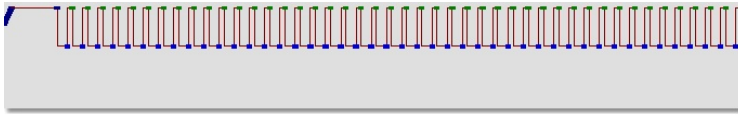
Postupak Optical Denature Cycle (Ciklus optičke denaturacije) čini se gotovo identičan drugim ciklusima. Najvažnije razlike uključuju korak taljenja koji se automatski umeće na početku profila te oštar profil koraka denaturacije tijekom cikliranja. Postupak Optical Denature Cycle (Ciklus optičke denaturacije) ne zahtijeva definirana vremena zadržavanja jer se disocijacija produkta prati u svakom ciklusu.

Za izvođenje ove tehnike potrebne su sljedeće informacije o postupku:


- Početna temperatura denaturacije. To je ista temperatura kao u koraku Denature (Denaturacija) u standardnom profilu cikliranja.
- Položaj epruvete PCR uzorka koji će proizvesti krivulju taljenja na zelenom kanalu.
- Mora se definirati profil Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije).

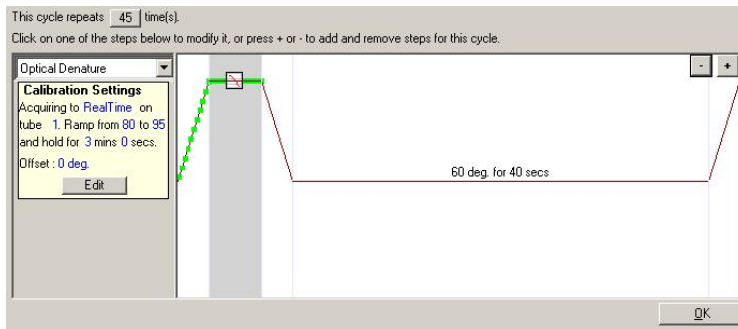
Izradite novi postupak Optical Denature Cycle (Ciklus optičke denaturacije) kako slijedi.

1. Otvorite prozor **Edit Profile** (Uredi profil). Potom kliknite **New** (Novo). U prozoru koji se pojavi kliknite gumb **Insert after** (Umetni nakon) i u izborniku odaberite **New Cycling** (Novo cikliranje). Klikom na grafikon odaberite jedan od temperaturnih koraka. U padajućem izborniku promijenite **Timed Step** (Vremenski definiran korak) u **Optical Denature** (Optička denaturacija). Pojavit će se zadani profil koji sadržava korak Denature (Denaturacija) i korak Optical Denature Cycle (Ciklus optičke denaturacije).

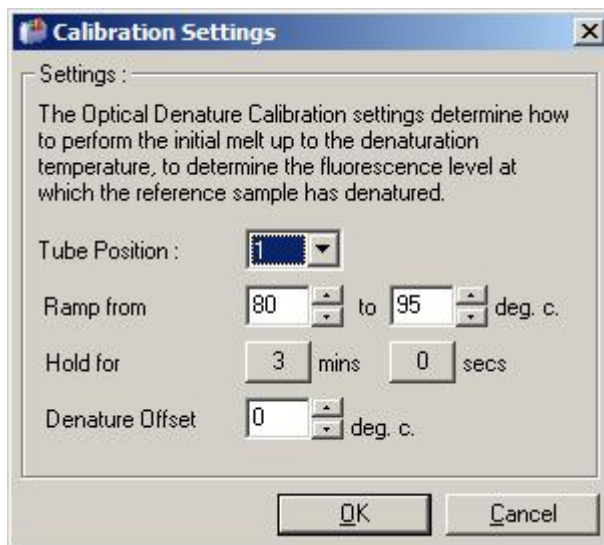


Povećana regija na početku postupka predstavlja proces kalibracije. Zelene točkice predstavljaju prikupljanja u svakom ciklusu tijekom zagrijavanja. Plave točkice predstavljaju prikupljanje na kraju koraka sparivanja pri 60 °C. Imajte na umu da profil pokazuje svaki korak s istom temperaturom denaturacije, iako to možda nije slučaj. Ako uzorak zahtijeva nešto više vremena za taljenje pri kraju postupka, proces optičke denaturacije čeka na taljenje u skladu s podacima o fluorescenciji, a ne u skladu s vremenom. Stoga se temperaturni trag može razlikovati za svaki ciklus.

2. Kliknite na prvu polovicu grafikona sa simbolom Optical Denature (Optička denaturacija) . Na lijevoj strani zaslona pojavljuju se informacije **Calibration Settings** (Postavke kalibracije).



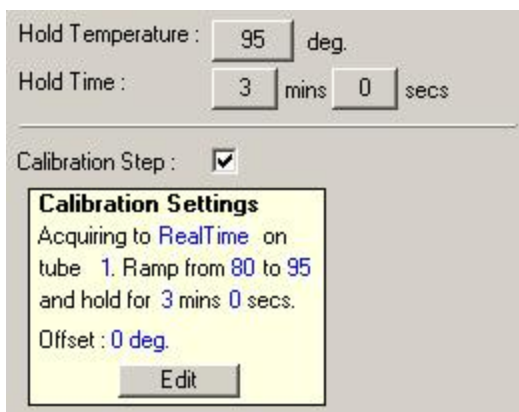
3. Informacije „Calibration Settings” (Postavke kalibracije) obično su ispravne. Da biste ih izmijenili, ako je to potrebno, kliknite **Edit** (Uredi). Pojavljuje se prozor **Calibration Settings** (Postavke kalibracije).



#### 4. Provjerite sljedeće:

- Epruveta naznačena u **Tube Position** (Položaj epruvete) sadržava PCR produkt čije će se vršne vrijednosti taljenja prikazati na zelenom kanalu.
- Konačno povećanje temperature neće spaliti uzorak, ali će biti dovoljno visoko da omogućiti njegovo taljenje.
- Vrijeme zadržavanja dovoljno je za denaturaciju uzorka.
- Pomak denaturacije ispravno je postavljen. Zadana vrijednost od 0 °C primjerena je za većinu taljenja. Taljenja s vrlo oštrim prijelazima mogu zahtijevati pomak denaturacije od -0,5 °C do -2 °C, kako je definirao korisnik, da bi se osigurala detekcija prijelaza taljenja.

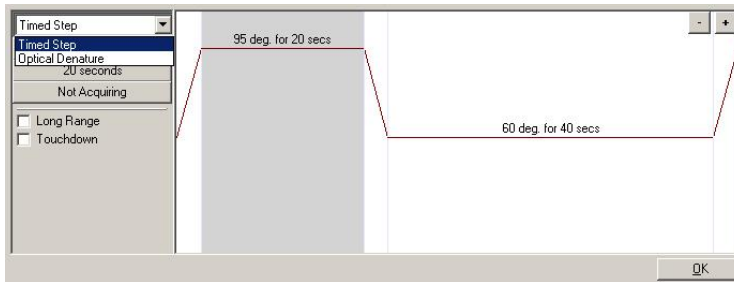
Također možete definirati korak Denature (Denaturacija) uvođenjem novog koraka Hold (Zadržavanje). Kliknite **Insert before** (Umetni prije) i u izborniku odaberite **New Hold at Temperature** (Novo zadržavanje pri temperaturi). Pojavit će se postavke kalibracije.




Postavke kalibracije sinkroniziraju se s postavkama denaturacije, stoga će se promjenom vremena zadržavanja u koraku Denature (Denaturacija) automatski ažurirati vrijeme zadržavanja kalibracije. To je rezultat činjenice da su proces kalibracije i denaturacija ekvivalentni u postupku Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije).

#### **Promjena postojećeg koraka da bi se upotrijebio postupak Optical Denature Cycling (Cikliranje optičke denaturacije)**

Da biste u sekvenci cikliranja promijenili postojeći korak Denature (Denaturacija), odaberite ciklus s popisa u prozoru **Edit Profile** (Uredi profil). Potom odaberite korak Denature (Denaturacija) tako što ćete ga kliknuti na prikazu.



Kliknite na padajući izbornik i odaberite **Optical Denature** (Optička denaturacija). Uklanjaju se temperatura i vrijeme zadržavanja i prikazuje se ikona **Optical Denature** (Optička denaturacija) .

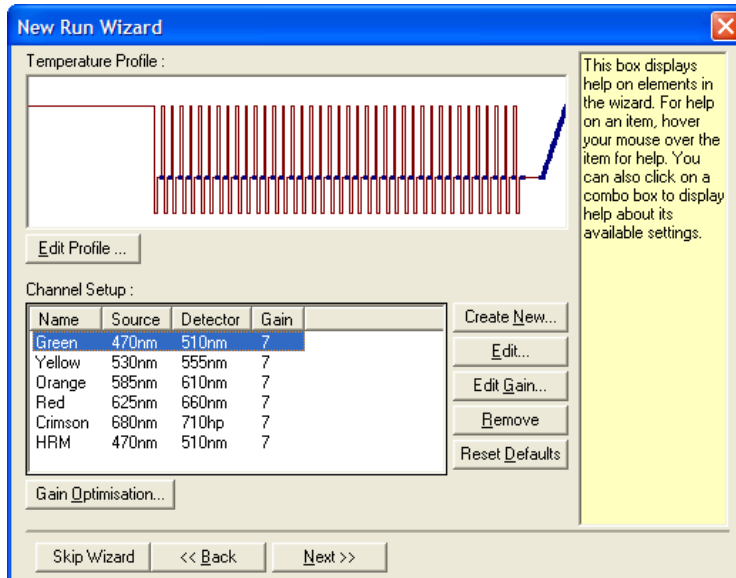
### Optimizacija pojačanja

Pri postavljanju novog postupka korisno je upotrijebiti funkciju **Gain Optimisation** (Optimizacija pojačanja). To vam omogućuje da optimizirate pojačanje na postavku koja će pružiti željeni raspon početne fluorescencije pri postavljenoj temperaturi (obično temperatura pri kojoj dolazi do prikupljanja podataka) na svakom kanalu prikupljanja. Cilj postupka Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) jest osigurati da se svi podaci prikupljaju unutar dinamičkog raspona detektora. Ako je pojačanje preslabo, signal će se izgubiti u pozadinskom šumu. Ako je preveliko, svi će signali biti izvan skale (zasićeni).

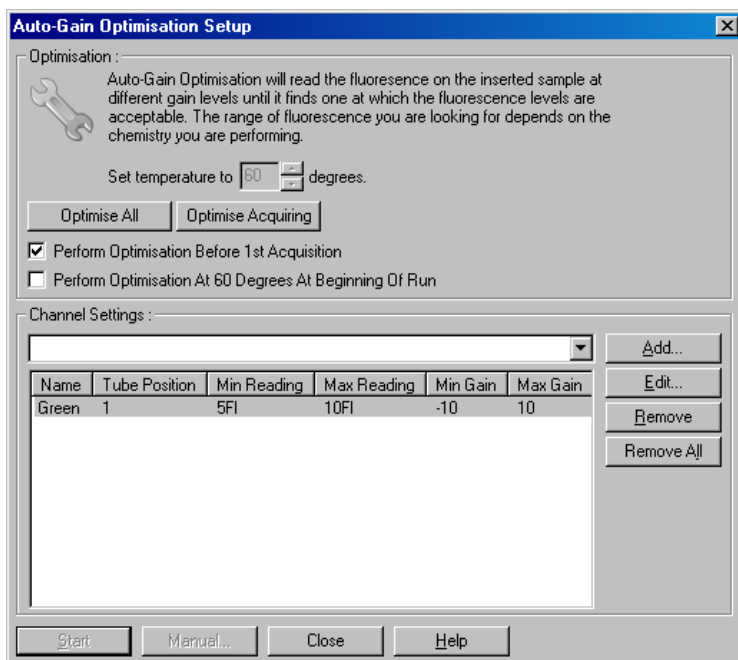
Raspon pojačanja za svaki kanal iznosi od -10 do 10, pri čemu je -10 najmanje osjetljiv, a 10 najosjetljiviji.

Kad prvi put pokrećete reakcije, preporučujemo da pripremite testni uzorak sa svim reakcijskim komponentama. Testni uzorak postavite u Rotor-Gene Q MDx i upotrijebite postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) da biste odredili najbolju postavku pojačanja. Ako pojačanje odabrano postupkom Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) rezultira lošim signalom, potrebno je povećati mogućnost **Target Sample Range** (Ciljani raspon uzorka). Ako rezultira signalom koji je zasićen, tada je potrebno smanjiti mogućnost **Target Sample Range** (Ciljani raspon uzorka).

Da biste izveli postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja), kliknite gumb **Gain Optimisation...** (Optimizacija pojačanja) u prozoru New Run Wizard (Čarobnjak za pokretanje novog postupka) 3 (pogledajte Prozor čarobnjaka za pokretanje novog postupka 3).



Pojavljuje se prozor **Auto-Gain Optimisation Setup** (Postavljanje automatske optimizacije pojačanja). Taj prozor omogućuje optimizaciju automatskim prilagođavanjem postavki pojačanja sve dok očitavanja za sve odabrane kanale ne padnu unutar ili ispod određenog praga.





**Set temperature to** (Postavi temperaturu na):

Prije očitavanja Rotor-Gene Q MDx zagrijat će se ili ohladiti da bi se podudarao sa specificiranom temperaturom. Prema zadanim postavkama, ova mogućnost postavljena je na temperaturu prikupljanja.

**Optimise All/Optimise Acquiring** (Optimiziraj sve / Optimiziraj prikupljeno):

Mogućnost **Optimise All** (Optimiziraj sve) pokušat će optimizirati sve kanale koji su softveru poznati. Mogućnost **Optimise Acquiring** (Optimiziraj prikupljeno) optimizirat će samo kanale koji se upotrebljavaju u toplinskom profilu definiranom u postupku (cikliranje i taljenje).

**Perform Optimisation Before First Acquisition** (Izvedi optimizaciju prije prvog prikupljanja):

Označite ovaj okvir da biste postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) izveli u prvom ciklusu u kojem dođe do prikupljanja podataka. Preporučuje se za mogućnost Auto-Gain Optimisation (Automatska optimizacija pojačanja).

**Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run** (Izvedi optimizaciju pri [x] stupnjeva na početku postupka):

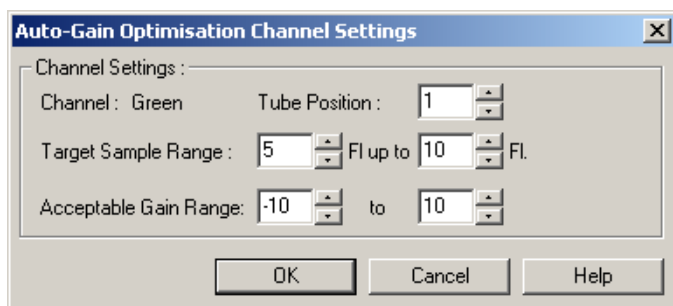
Označite ovaj okvir da biste izveli postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) prije pokretanja postupka. Instrument Rotor-Gene Q MDx zagrijava se na specificiranu temperaturu, izvodi se postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) i tada započinje cikliranje u prvom koraku, obično korak Denature (Denaturacija). Ta se mogućnost može odabrati ako bi postavka Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) tijekom postupka dovela do toga da se previše vremena troši na početni korak. Obično se preferira postavka **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Izvedi optimizaciju prije prvog prikupljanja) jer se postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) izvodi što je bliže moguće uvjetima izvođenja postupka.

**Channel Settings** (Postavke kanala):

Ovaj padajući izbornik omogućuje dodavanje kanala. Odaberite kanal od interesa i kliknite **Add** (Dodaj).

**Edit** (Uredi):

Otvora prozor u kojem se može postaviti postavka **Target Sample Range** (Ciljani raspon uzorka). Postavka **Target Sample Range** (Ciljani raspon uzorka) jest raspon početne fluorescencije koji treba postaviti za uzorak u specificiranoj epruveti. Postupak Auto-Gain Optimisation (Automatska optimizacija pojačanja) očitava svaki kanal s pomoću postavki pojačanja u rasponu specificiranom u mogućnosti **Acceptable Gain Range** (Prihvatljivi raspon pojačanja). Bira prvu postavku pojačanja koja rezultira očitanjem fluorescencije u okviru raspona **Target Sample Range** (Ciljani raspon uzorka). U prikazanom primjeru postavka Auto-Gain Optimisation (Automatska optimizacija pojačanja) traži postavku pojačanja između -10 i 10 koja daje očitavanje između 5 i 10 FI u epruveti 1. Općenito, za interkalirajuće boje prikladan je raspon **Target Sample Range** (Ciljani raspon uzorka) 1 – 3 FI, dok je raspon 5 – 10 FI prikladniji za probe kemijskih sredstava.



**Remove/Remove All** (Ukloni / Ukloni sve):

Mogućnost **Remove** (Ukloni) uklanja istaknuti kanal. Mogućnost **Remove All** (Ukloni sve) uklanja sve kanale.

**Start** (Pokreni):

Mogućnost **Start** (Pokreni) pokreće postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja). Bira se pojačanje koje rezultira razinama signala fluorescencije u okviru određenog raspona. Ako fluorescencija izlazi iz određenog raspona, pojačanje se postavlja da daje najbliže moguće podudaranje.

**Manual** (Ručno):

Ovime se otvara prozor **Manual Gain Adjustment** (Ručno prilagođavanje pojačanja).

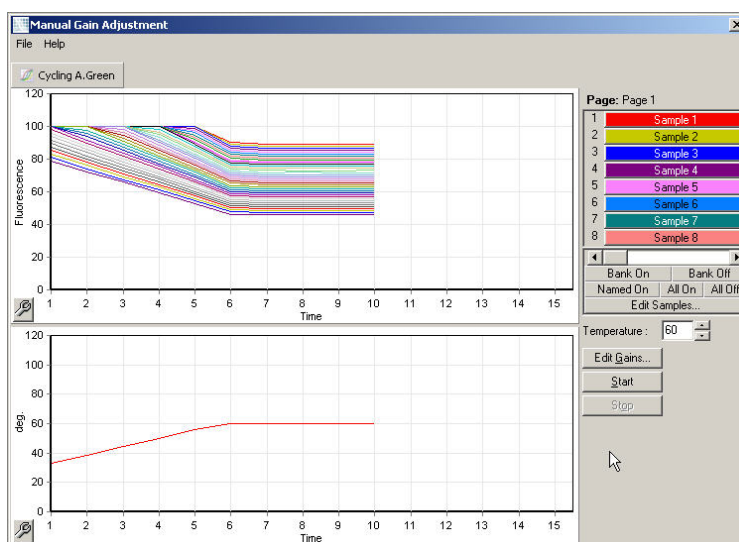
**Changing Gain During a Run** (Mijenjanje pojačanja tijekom postupka):

Ako je pojačanje na početku postupka bilo previsoko ili prenisko, može ga se promijeniti tijekom prvih deset ciklusa. Na mjestu promjene pojačanja pojavljuje se okomita linija. Ciklusi prije promjene isključuju se iz analize.

**Napomena:** postupak Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) može odabrati postavku koja ne spada u okvir određenog raspona. Razlog tome mogu biti promjene u fluorescenciji nakon prvog koraka Hold (Zadržavanje). Međutim, rezultat postupka Gain Optimisation (Optimizacija pojačanja) daje dobru naznaku razine fluorescencije na kojoj će se pokrenuti postupak.

### Ručno prilagođavanje pojačanja

Da biste izveli postupak „Manual Gain Adjustment” (Ručno prilagođavanje pojačanja), kliknite **Manual...** (Ručno) u prozoru **Auto-Gain Optimisation Setup** (Postavljanje automatske optimizacije pojačanja). Pojavljuje se prozor **Manual Gain Adjustment** (Ručno prilagođavanje pojačanja). U prozoru su prikazana očitavanja fluorescencije pri svakoj danoj temperaturi u stvarnom vremenu. Upotrebljava se kada pozadina uzorka nije poznata i stoga se mora odrediti pojačanje da bi se osiguralo da je signal uzorka dovoljan za otkrivanje.



Prema zadanim postavkama na zaslonu se prikazuju svi uzorci. Uzorci se mogu ukloniti sa zaslona ili dodati na zaslon s pomoću preklopnika na desnoj strani. Preklopnik se sastoji od obojenih ćelija, a svaka ćelija odgovara uzorku na zaslonu. Prikazuju se uzorci s jarko obojenom ćelijom, dok se uzorci s izbledjelim ćelijama ne prikazuju. Uzorci se mogu uključivati ili isključivati klikom na ćeliju ili povlačenjem pokazivača miša preko nekoliko ćelija u isto vrijeme.

Preporučujemo da postupak Manual Gain Adjustment (Ručno prilagođavanje pojačanja) izvedete na način opisan u nastavku.

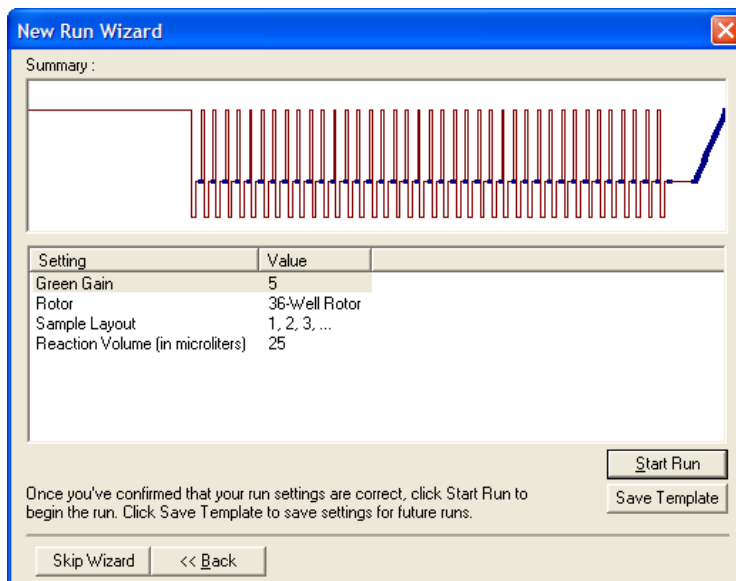
1. U prozoru **Manual Gain Adjustment** (Ručno prilagođavanje pojačanja) prilagodite temperaturu na temperaturu prikupljanja potrebnu za postupak.

**Napomena:** temperatura se neće prilagoditi dok instrument Rotor-Gene Q MDx radi. Ponovno pokrenite instrument Rotor-Gene Q MDx da biste primijenili promjene temperature.

2. Kliknite **Start** (Započni). Započinje postupak. Temperatura instrumenta Rotor-Gene Q MDx prilagođava se temperaturi određenoj u prozoru. Grafikoni u prozoru počinju prikazivati podatke.
3. Pričekajte da se temperatura stabilizira.
4. Zabilježite očitavanje fluorescencije završne točke (FI).
5. Ako očitavanje FI-a nije na potrebnoj razini, kliknite na **Edit Gains...** (Uredi pojačanja) i uredite po potrebi. Ovaj proces možda neće biti trenutna jer su instrumentu Rotor-Gene Q MDx potrebne približno 4 s da prikupi svaku točku u svakom kanalu, a tijekom tog vremena korisničko je sučelje deaktivirano.
6. Ponavljajte proces dok FI ne bude na željenoj razini.
7. Kliknite **Stop** (Zaustavljanje). Ako se u postupku još prikupljaju podaci kad kliknete gumb **Stop** (Zaustavljanje), instrument Rotor-Gene Q MDx najprije dovršava prikupljanje, a potom se zaustavlja. Taj proces može trajati do 5 s za svaki kanal prikupljanja.

#### Prozor čarobnjaka za pokretanje novog postupka 4

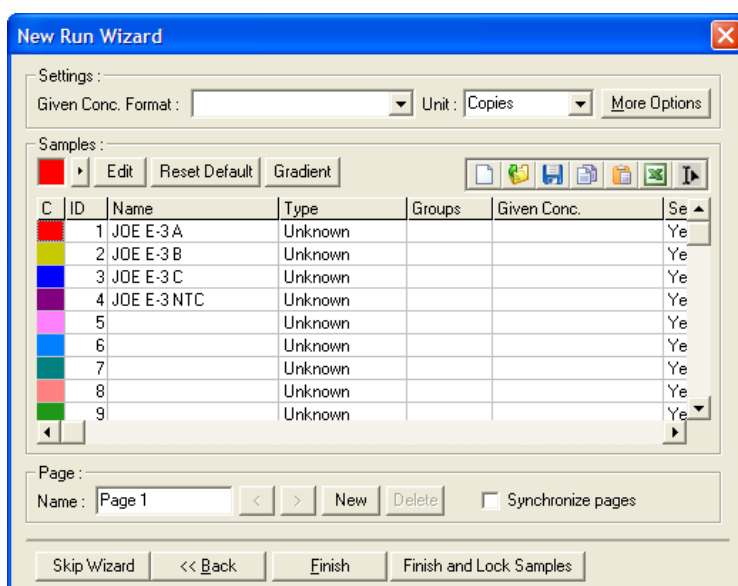
U ovom prozoru sažeto je prikazan postupak. Provjerite parametre i, ako su točni, kliknite **Start Run** (Pokreni postupak). Od vas će se zatražiti da navedete naziv datoteke. Postavke postupka možete spremeniti i kao predložak za buduće postupke s pomoću gumba **Save Template** (Spremi predložak).



## Prozor čarobnjaka za pokretanje novog postupka 5

U ovaj prozor unesite vrste i opise uzoraka dok je postupak u tijeku. Funkcija ovog prozora identična je funkciji prozora **Edit Samples** (Uredi uzorke) (stranica 128). Informacije o uzorku također se mogu unijeti i nakon završetka postupka.

Gumbom **Finish and Lock Samples** (Završi i zaključaj uzorke) zaključava se zaslom i onemogućuje se izmjena naziva uzoraka. Za više informacija o ovoj i drugim sigurnosnim značajkama pogledajte „Zaštita pristupa za softver Rotor-Gene Q” (stranica 134).



## 5.2 Uporaba hardvera instrumenta Rotor-Gene Q MDx

### 5.2.1 Vrste rotora


Najprije odaberite koju ćete vrstu epruveta i rotora upotrebljavati. Dostupna su četiri rotora u koje se mogu smjestiti različite vrste epruveta.

**Napomena:** rotori 36-Well Rotor i 72-Well Rotor isporučuju se s instrumentom. Rotori Rotor-Disc® Rotors dodatna su oprema.

**Važno:** u jednom postupku upotrebljavajte identične epruvete. Nemojte miješati različite vrste epruveta ili epruvete različitih proizvođača jer će to utjecati na optičku ujednačenost. Preporučujemo uporabu epruveta tvrtke QIAGEN koje su posebno dizajnirane za uporabu s instrumentom Rotor-Gene Q MDx (pogledajte Informacije za naručivanje). Epruvete drugih proizvođača mogu biti autofluorescentne, što može utjecati na pouzdanost rezultata. Dodatno, epruvete drugih proizvođača mogu se razlikovati po duljini i debljini, što rezultira nepodudarnošću

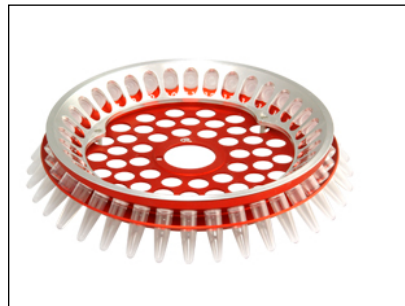
optičkog puta instrumenta Rotor-Gene Q MDx i reakcije u epruveti. Tvrtka QIAGEN zadržava pravo odbiti tehničku podršku za probleme koje uzrokuju plastični materijali koje nije odobrila tvrtka QIAGEN na instrumentu Rotor-Gene Q MDx.

**Važno:** svaka uporaba plastičnih materijala koje nije odobrila tvrtka QIAGEN na instrumentu Rotor-Gene Q MDx može poništiti jamstvo instrumenta.

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p><b>Oštećenje instrumenta</b></p> <p>Prije svake uporabe vizualno pregledajte rotor i provjerite je li oštećen ili deformiran.</p>
---	--

### 36-Well Rotor

36-Well Rotor crvene je boje. 36-Well Rotor i prsten za zaključavanje 36-Well Rotor Locking Ring omogućuju uporabu epruveta od 0,2 ml. Epruvete ne trebaju imati optički prozirne čepove jer Rotor-Gene Q MDx očitava fluorescenciju s dna epruvete umjesto s njezina vrha. Mogu se upotrebljavati i epruvete s kupolastim čepom.



### 72-Well Rotor

72-Well Rotor plave je boje. 72-Well Rotor i prsten za zaključavanje 72-Well Rotor Locking Ring upotrebljavaju se s opremom Strip Tubes and Caps, 0.1 ml koja se može upotrebljavati već za volumene od 20 µl. Čepovi omogućuju sigurnu i pouzdanu zaštitu.



### **Rotor-Disc 72 Rotor**

Rotor-Disc 72 Rotor tamnosive je boje. Rotor-Disc 72 Rotor i prsten za zaključavanje Rotor-Disc 72 Locking Ring omogućuju uporabu rotirajućeg diska Rotor-Disc 72. Rotor-Disc 72 jest disk sa 72 jažice za uporabu s velikim protokom. Da bi se zatvorio Rotor-Disc 72, na vrh se stavlja prozirna polimerska folija i toplinski se zatvara. Folija se brzo postavlja i sprječava kontaminaciju pružanjem čvrste i trajne zaštite koja onemogućuje neovlašteno rukovanje. Za više informacija o rotirajućem disku Rotor-Disc 72 pogledajte odjeljak 5.2.3.



### **Rotor-Disc 100 Rotor**

Rotor-Disc 100 Rotor zlatne je boje. Rotor-Disc 100 Rotor i prsten za zaključavanje Rotor-Disc 100 Locking Ring omogućuju uporabu rotirajućeg diska Rotor-Disc 100. Rotor-Disc 100 jest disk sa 100 jažica za uporabu s velikim protokom. Rotor-Disc 100 rotirajući je ekvivalent pločice s 96 jažica, no uz dodatne četiri referentne jažice. Omogućuje integraciju instrumenta Rotor-Gene Q MDx s laboratorijskim tijekovima rada s 96 jažica. Dodatne jažice mogu se po potrebi upotrebljavati za dodatne uzorke, dodatne kontrolne reakcije ili orijentacijske reakcije, a da se pritom ne zauzima nijedan od standardnih položaja 96 jažica. Za neometanu kompatibilnost s tijekom rada s 96 jažica, Rotor-Disc 100 primjenjuje konvencije označivanja koje vrijede za pločicu s 96 jažica, to jest A1 – A12 do H1 – H12. Dodatne četiri referentne jažice označuju se kao R1 – R4. Za više informacija o rotirajućem disku Rotor-Disc 100 pogledajte odjeljak 5.2.3.



#### Specifikacije rotora

Vrsta rotora	Kapacitet jažice (µl)	Br. uzoraka	Vrsta cijevi	Preporučeni volumen reakcije (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

**Napomena:** 36-Well Rotor i 72-Well Rotor za instrument Rotor-Gene Q MDx ne smiju se upotrebljavati na instrumentima Rotor-Gene 3000 zbog nekompatibilnosti s optičkim poravnanjem. S instrumentima Rotor-Gene 3000 nastavite upotrebljavati starije rotore s 36 i 72 položaja.

#### 5.2.2 Postavljanje reakcije

**Važno:** da bi se osigurali pouzdani rezultati, u svakom postupku trebaju se primijeniti odgovarajuće kontrole.

Reakcije se mogu pripremiti s pomoću bloka za postavljanje Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes (za epruvete PCR Tubes, 0.2 ml), bloka za postavljanje Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (za dodatnu opremu Strip Tubes and Caps 0.1 ml s jednokanalnom pipetom), bloka za postavljanje Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel (za dodatnu opremu Strip Tubes and Caps, 0.1 ml s višekanalnom pipetom), bloka za postavljanje Rotor-Disc 72 Loading Block (za Rotor-Disc 72) ili bloka za postavljanje Rotor-Disc 100 Loading Block (za Rotor-Disc 100). Svi blokovi izrađeni su od aluminijske i mogu se prethodno rashladiti.

Blok za postavljanje Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (na slici) prima 18 epruveta Strip Tubes kao i do osam epruveta od 0,5 ml, koje se mogu upotrebljavati za pripremu glavne mješavine, te do 16 epruveta od 0,2 ml, koje se mogu upotrebljavati za postavljanje standardnih krivulja. Postupak u nastavku opisuje postavljanje reakcije s pomoću rotora 72-Well Rotor. Isti postupak može se primijeniti za postavljanje reakcije s pomoću rotora 36-Well Rotor i odgovarajuće dodatne opreme.

1. Epruvete Strip Tubes postavite u blok za postavljanje Loading Block i alikvotirajte reakcijske komponente.



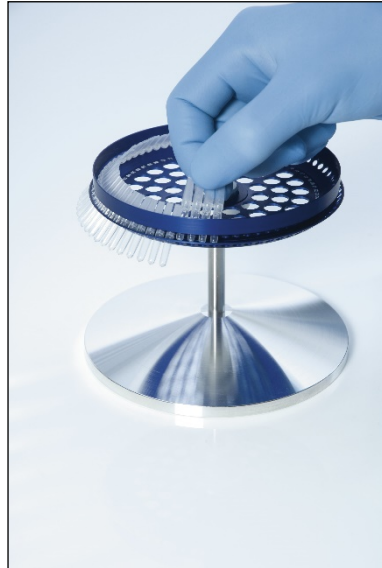
2. Čvrsto postavite čepove Caps na epruvete Strip Tubes i vizualno pregledajte da biste potvrdili čvrsto prianjanje.



3. Umetnite Strip Tubes u rotor 72-Well Rotor te provjerite da je svaka epruveta ispravno postavljena na svoje mjesto u ispravnom smjeru.

Ako ih se ne postavi ispravno u rotor, uzorci se neće optimalno poravnati nad sustavom za detekciju. To bi moglo rezultirati smanjenjem prikupljenog signala fluorescencije i osjetljivosti detekcije. S instrumentom se isporučuje Rotor Holder koji omogućuje jednostavno postavljanje epruveta.

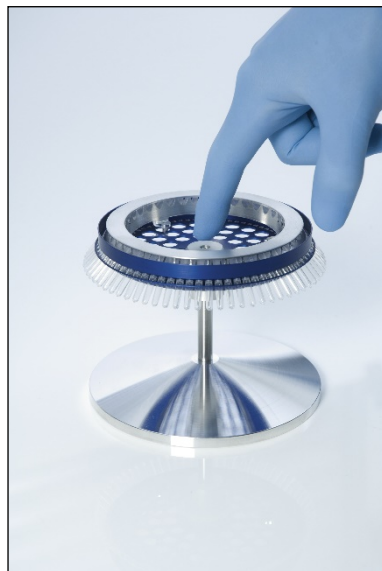




**Važno:** da biste postigli maksimalnu temperaturnu ujednačenost, na svakom položaju u rotoru mora se nalaziti epruveta. Popunjavanje svih položaja u rotoru osigurava ravnomjerni protok zraka prema svakoj epruveti. Neka vam bude dostupan komplet praznih epruveta s čepom koje možete upotrijebiti za punjenje svih neiskorištenih položaja.

4. Umetnite prsten za zaključavanje 72-Well Rotor Locking Ring na 72-Well Rotor tako da kroz vanjske otvore na rotoru pritisnete tri pozicionirajuća klina.

Prsten za zaključavanje Locking Ring osigurava da čepovi ostanu na epruvetama tijekom postupka.



5. Umetnite sklop u komoru instrumenta Rotor-Gene Q MDx tako da ga s pomoću pozicionirajućeg klina u središtu rotora pritisnete na mjesto dok ne začujete klik. Da biste ga izvadili, središte rotora jednostavno pritisnite prema dolje da biste otključali sklop i izvadite ga.



6. Zatvorite poklopac i postavite profil postupka s pomoću softvera Rotor-Gene Q.

### 5.2.3 Postavljanje rotirajućeg diska Rotor-Disc

Rotor-Disc 72 ili Rotor-Disc 100 sastoje se od 72 odnosno 100 jažica u jednodijelnom disku osmišljenom za visoki protok. U rotirajućim diskovima Rotor-Disc 72 i Rotor-Disc 100 ne upotrebljavaju se čepovi. Umjesto toga, na vrh se postavlja folija Rotor-Disc Heat Sealing Film te se toplinski brtvi s pomoću instrumenta Rotor-Disc Heat Sealer. Folija sprječava kontaminaciju pružanjem čvrste i trajne zaštite koja onemogućuje neovlašteno rukovanje. Toplinsko brtvljenje rotirajućeg diska Rotor-Disc izvodi se kako je opisano u nastavku.

**Važno:** prije nego što počnete izvoditi ovaj postupak, pročitajte specifikacijski list isporučen s instrumentom Rotor-Disc Heat Sealer.

1. Rotor-Disc Heat Sealer uključite prekidačem koji se nalazi na stražnjoj lijevoj strani.  
Svijetli crveno svjetlo „Power” (Napajanje). Instrumentu Rotor-Disc Heat Sealer potrebno je otprilike 10 minuta da dosegne radnu temperaturu. Tada će svijetliti zeleno svjetlo „Ready” (Spremno).
2. Odaberite trajno ili uklonjivo brtvljenje.  
**Napomena:** kad je Rotor-Disc Heat Sealer spreman za rad, može ga se sa sigurnošću ostaviti da neprestano radi.
3. Umetnite Rotor-Disc u blok za postavljanje Rotor-Disc Loading Block koristeći se oznakom za prvi položaj na rotirajućem disku Rotor-Disc i otvorima vodilicama za epruvete na bloku za postavljanje Rotor-Disc Loading Block.

4. Reakcije u rotirajućem disku Rotor-Disc postavite ručnim pipetiranjem ili s pomoću automatiziranog sustava za rukovanje tekućinama.



5. Uklonite središnji dio jednog lista folije Rotor-Disc Heat Sealing Film tako što ćete foliju lagano preklopiti na pola, kažiprstom i palcem primiti središnji dio i pažljivo ga istrgnuti van.
6. Foliju postavite na rotirajući disk Rotor-Disc u ispravnom smjeru, kako je prikazano na naljepnici „SIDE UP” (Gornja strana). Provjerite je li naljepnica „SIDE UP” (Gornja strana) pozicionirana na dnu bloka za postavljanje Rotor-Disc Loading Block.

Središnji otvor folije trebao bi jednostavno kliznuti preko cilindra bloka za postavljanje Rotor-Disc Loading Block te na vrh rotirajućeg diska Rotor-Disc.



7. Sklop gurnite u instrument Rotor-Disc Heat Sealer s pomoću vodilica na bočnoj strani bloka za postavljanje Rotor-Disc Loading Block. Provjerite je li blok za postavljanje Rotor-Disc Loading Block u potpunosti umetnut.



8. Da biste aktivirali mehanizam brtvljenja, prvo pritisnite prema dolje plavu anodiziranu traku na vrhu instrumenta Heat Sealer, a potom potisnite crnu sklopku prema natrag.



9. Kad se mehanizam brtvljenja spusti, svijetli narančasto svjetlo „Sealing” (Brtvljenje). Ako blok za postavljanje Rotor-Disc Loading Block nije u ispravnom položaju, oglasit će se zvučni signal upozorenja.
10. Kad brtvljenje završi, javljaju se kontinuirani zvučni signali i počinje treperiti narančasto svjetlo „Sealing” (Brtvljenje). Plavu anodiziranu traku pritisnite prema dolje da biste podigli mehanizam brtvljenja i otpustili ga natrag u originalni položaj.

---

**Važno:** nemojte nastaviti brtviti nakon zvučnog signala jer se rotirajući disk Rotor-Disc može deformirati.

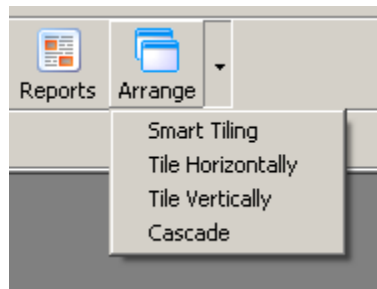
**Napomena:** da bi vas upozorilo ako slučajno ne otpustite mehanizam zaključavanja, treperavo narančasto svjetlo „Sealing“ (Brtvljenje) svijetlit će bez prestanka, dok će kontinuirani zvučni signal prijeći u povremeni.

11. Izvucite blok za postavljanje Rotor-Disc Loading Block iz instrumenta Rotor-Disc Heat Sealer. Pričekajte otprilike 10 s dok se folija ne ohladi. Potom uklonite višak folije za brtvljenje tako što ćete je povući prema dolje da se odvoji. Višak folije nemojte povlačiti prema gore.
12. Uklonite rotirajući disk Rotor-Disc iz bloka za postavljanje Rotor-Disc Loading Block.
13. Postavite rotirajući disk Rotor-Disc u rotor koristeći se oznakom lokatora za prvi položaj kao vodilicom do ispravne orijentacije.

## 6 Korisničko sučelje analize

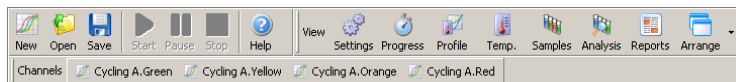
### 6.1 Radni prostor

Radni prostor jest pozadina glavnog prozora. Na tom se području mogu otvoriti grafikoni s neobrađenim podacima i rezultati analize. Ako je istodobno otvoreno nekoliko prozora, možete ih organizirati klikom gumba **Arrange** (Rasporedi) na alatnoj traci. Dostupno je nekoliko mogućnosti rasporeda prozora koje se mogu odabrati klikom strelice okrenute prema dolje uz gumb **Arrange** (Rasporedi).



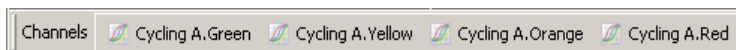
### 6.2 Alatna traka

Ovi su gumbi prečaci do često upotrebljivanih radnji. Tim radnjama može se pristupiti i iz padajućih izbornika.



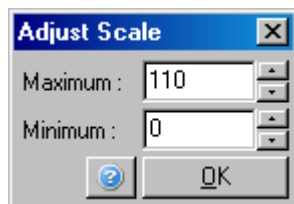
### 6.3 Prikaz neobrađenih kanala

Kliknite ove gumbе da biste vidjeli neobrađene (neanalizirane) podatke iz određenih kanala u postupku.



Pri pregledu tih podataka dostupan je niz mogućnosti za promjenu prikaza podataka. Neobrađeni podaci mogu se preoblikovati i tako da olakšaju različite vrste analiza.

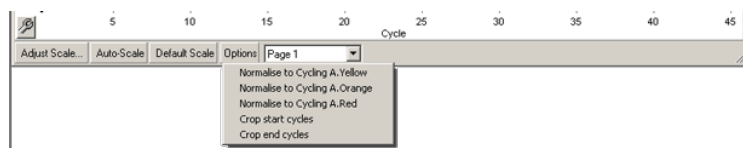
**Adjust Scale** (Prilagodi skalu): Da biste odabrali **Adjust Scale** (Prilagodi skalu), kliknite desnom tipkom miša na odgovarajući prozor. Mogućnost **Adjust Scale** (Prilagodi skalu) otvara prozor u kojem možete odrediti skalu.



**Autoscale** (Automatski skaliraj): Mogućnost **Autoscale** (Automatski skaliraj) pokušava prilagoditi skalu najvišim i najnižim očitanjima podataka.

**Default Scale** (Zadana skala): Mogućnost **Default Scale** (Zadana skala) vraća skalu na prikaz od 0 do 100 jedinica fluorescencije.

Ikona matičnog/francuskog ključa: Više informacija potražite u odjeljku 7.5.



**Options** (Mogućnosti): Prikazuje se prethodno prikazan padajući izbornik koji nudi mogućnosti preoblikovanja neobrađenih podataka.

**Normalise to...** (Normaliziraj na): Omogućuje normalizaciju podataka o amplifikaciji na podatke iz pasivne referentne boje, kao što je ROX, prikupljene u drugom kanalu.

**Crop start cycles** (Skrati početne cikluse): Izrađuje se novi skup podataka kanala u kojemu su uklonjeni neki početni ciklusi. Korisno je ako su u početnim ciklusima uočeni veliki skokovi do kojih može doći kad se upotrebljavaju određena kemijska sredstva.

**Crop end cycles** (Skrati završne cikluse): Izrađuje se novi skup podataka kanala u kojemu su uklonjeni neki završni ciklusi.

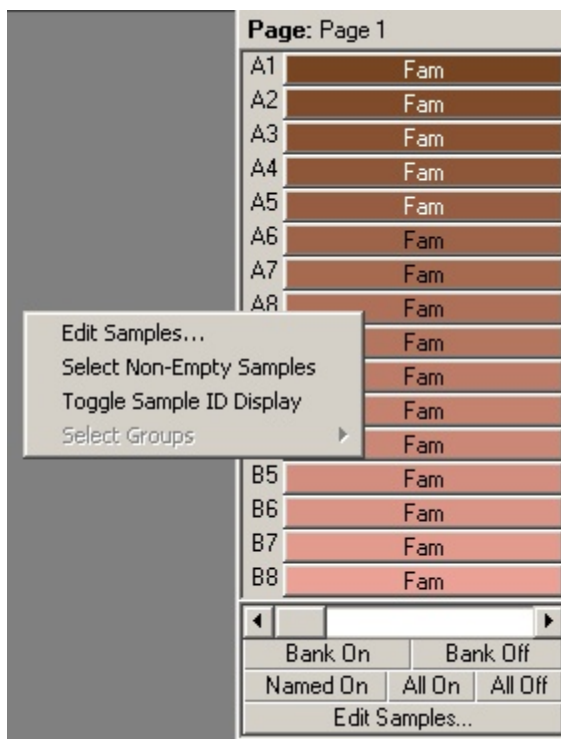
**Page 1** (1. stranica): Naznačuje stranicu koja je trenutno odabrana za prikaz grafikona neobrađenih podataka. Prozor **Edit Sample** (Uredi uzorak) dopušta izradu definicija više uzoraka. Na primjer, podaci se mogu pregledavati s promjenjivom debljinom linije, definicijama uzoraka i drugim mogućnostima prikaza. To je posebno korisno ako se na jednom kanalu provodi relativna kvantifikacija jer korisnik može jednostavno mijenjati prikaz između gena od interesa i uzoraka konstitutivnih gena definiranjem dviju stranica uzoraka.

## 6.4 Prebacivanje uzoraka

S desne strane glavnog prozora nalazi se preklopnik koji uključuje i legendu uzoraka. Sastoji se od ćelija u boji, a svaka ćelija odgovara uzorku na zaslonu. Preklopnik se upotrebljava za kontroliranje koji se uzorci mogu vidjeti na zaslonu. Prikazuju se uzorci s jarko obojenom ćelijom, dok se uzorci s izbljedjelim ćelijama ne prikazuju. Uzorci se mogu uključivati ili isključivati klikom na ćeliju ili povlačenjem pokazivača miša preko nekoliko ćelija u isto vrijeme. Gumbi **Bank On** (Uključi banku) i **Bank Off** (Isključi banku) skrivaju, odnosno prikazuju sve uzorke koji su trenutno vidljivi na popisu. Klizač se može upotrebljavati za prikaz sljedeće skupine uzoraka.

**Napomena:** broj prikazanih uzoraka dinamičan je te ovisi o dostupnom prostoru u prozoru.

Ako kliknete **Named On** (Uključeno imenovanje), prikazuju se samo oni uzorci koji su imenovani. Ovo je brz način prikaza samo relevantnih uzoraka. Ako kliknete **All On** (Sve uključeno) ili **All Off** (Sve isključeno), prikazuju se svi uzorci u rotoru, odnosno ne prikazuje se nijedan uzorak u rotoru. Pritiskanjem gumba **Edit Samples...** (Uredi uzorke) otvara se prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke) u kojemu se nazivi, vrste i standardne koncentracije uzoraka mogu uređivati (pogledajte odjeljak 6.8.4). Preklopnik je prikazan u nastavku. Dodatne prikazane mogućnosti pojavljuju se nakon što kliknete desnom tipkom miša nad preklopnikom.



**Page** (Stranica):

Ova oznaka na vrhu preklopnika upućuje na to da se prikazuje stranica uzorka. Stranice dopuštaju razne neovisne analize iz jednog skupa podataka kanala. Na primjer, možete pokrenuti dvije standardne krivulje u zelenom kanalu i generirati neovisna izvješća. Više informacija o postavljanju stranica uzoraka dostupno je u odjeljku 6.8.4.

**Toggle Sample ID Display**  
(Prebacuj između prikaza ID broja uzorka):

Ako se upotrebljava 72-Well Rotor, uzorci se prikazuju u formatu od A1 do A8, od B1 do B8 itd. Mogućnost **Toggle Sample ID Display** (Prebacuj između prikaza ID broja uzorka) omogućuje korisniku da se prebaci na numerički redoslijed uzoraka (od 1 do 72).

**Select Non-Empty Samples**  
(Odaberi uzorke koji nisu prazni):

U ovoj mogućnosti poništava se odabir svih uzoraka čiji je **Type** (Vrsta) određen kao **None** (Nema) u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke). Time se osigurava prikaz samo uzoraka koji su relevantni za analizu.

**Select Groups** (Odaberi skupine):

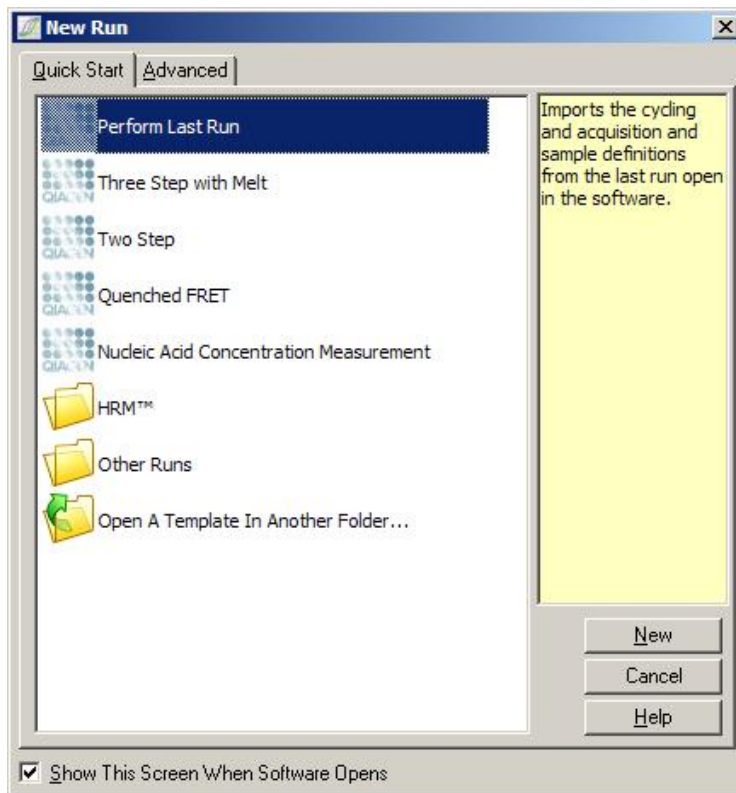
Ako ste definirali skupine, ova će značajka prebacivati (uključivati/isključivati) prikaz uzoraka u skupinama. Skupine su proizvodnje zbirke uzoraka koje omogućuju napredno izvješćivanje statističkih rezultata. Na primjer, mogu se definirati skupine uzoraka liječenih i neliječenih pacijenata. Skupine se mogu postaviti u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke).



## 6.5 Izbornik datoteka

### 6.5.1 Novo

Nakon što odaberete **File** (Datoteka) i potom **New** (Novo), pojavljuje se prozor **New Run** (Novi postupak). Taj prozor prikazuje često upotrebljavane predloške organizirane u kartice **Quick Start** (Brzi početak) i **Advanced** (Napredno). Nakon odabira predloška čarobnjak vas vodi kroz postavljanje postupka te dopušta izmjenu postavki i profila.



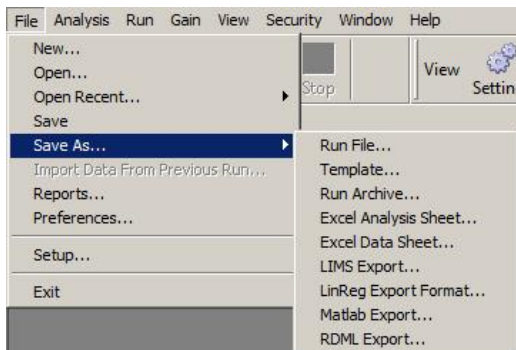
Informacije o pruženim predlošcima potražite u odjeljku 5.1.1 i odjeljku 5.1.2.

### Novi postupak

<b>New</b> (Novo):	Pokreće se postavljanje postupka s pomoću odabranog predloška.
<b>Cancel</b> (Otkazi):	Zatvara se prozor.
<b>Help</b> (Pomoć):	Otvara se pomoć na mreži.
<b>Show This Screen When Software Opens</b> (Prikaži ovaj zaslon kad se softver otvori):	Ako je ovaj okvir označen, prikazuje se prozor <b>New Run</b> (Novi postupak) kad se softver pokrene.

## 6.5.2 Otvaranje i zatvaranje

- Open...** (Otvori...): Otvara se prethodno spremljena datoteka postupka instrumenta Rotor-Gene Q (\*.rex) ili arhiva postupka instrumenta Rotor-Gene Q (\*.rea datoteka).
- Open Recent...** (Otvori nedavno...): Prikazuju se zadnje četiri datoteke koje su otvorene ili spremljene.
- Save** (Spremi): Spremaju se sve promjene unesene u datoteku postupka.



- Save As...** (Spremi kao...): Ovu funkciju upotrijebite za spremanje datoteke postupka ili podataka u različitim formatima. Mogućnosti su popisane u nastavku.
- Run File...** (Datoteka postupka...): Sprema se kopija datoteke. Korisnik može promijeniti naziv i spremiti lokaciju. To je zadani format.
- Template...** (Predložak...): Spremaju se profilna postavka i povezane postavke, ali ne i podaci postupka. Predložak se može upotrebljavati za pokretanje budućih postupaka.
- Run Archive...** (Arhiva postupka...): Spremanje u kompaktnijem datotečnom formatu. Spremite datoteke u ovom formatu prije njihova slanja e-poštom. Time se skraćuje vrijeme potrebno za slanje datoteke i osigurava se da klijenti e-pošte ne oštete datoteke.
- LIMS Export** (Izvoz u LIMS): Sprema analizu u formatima kompatibilnima s LIMS-om, u skladu sa zahtjevima korisnika. Obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN da biste dobili više informacija.
- Excel Data Sheet...** (Podatkovni list programa Excel...): Izvozi sve neobrađene kanale u list programa Excel®. Izvoze se samo odabrani uzorci.
- Excel Analysis Sheet...** (List analize programa Excel...): Sve analize trenutnog postupka izvoze se u jedan list programa Excel.
- LinReg Export Format...** (Format izvoza LinReg...): Svi neobrađeni podaci kanala izvoze se u format koji LinReg (alat za analizu učinkovitosti) može očitavati. Više pojedinosti potražite u odjeljku „Izvoz u LinReg“ u nastavku.
- Matlab Export...** (Izvoz u Matlab...): Podaci se izvoze u format koji može očitati znanstveni paket programa Matlab (ili njegov ekvivalent otvorenog koda; Octave). To može biti korisno za istraživanje metoda.
- RDML Export** (Izvoz u RDML): Omogućuje izvoz datoteke koja je sukladna s inačicom 1.1 RDML-a. Kreirana izvozna datoteka RDML jest datoteka formata XML koja je komprimirana u ZIP paket, s ekstenzijom datoteke \*.rdml te je usklađena s dokumentom sheme RDML ([https://rdml.org/rdml\\_v\\_1\\_1.html](https://rdml.org/rdml_v_1_1.html)) koji je dostupan na web-mjestu: [https://rdml.org/rdml\\_v\\_1\\_1.html](https://rdml.org/rdml_v_1_1.html).

## Izvoz u LinReg

LinReg je alat koji su razvili C. Ramakers i suradnici.\* Alat LinReg dostupan je na stranici: <https://medischebiologie.nl/files/>.

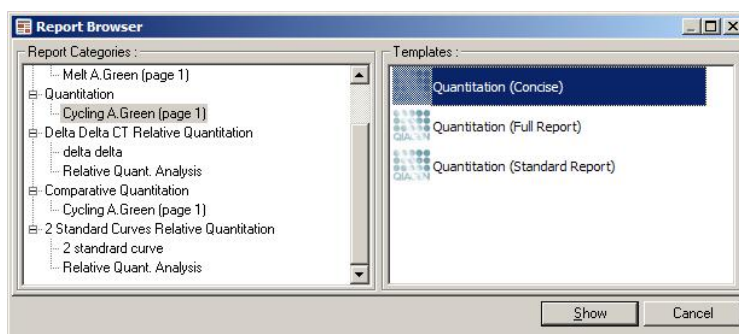
Softver Rotor-Gene Q omogućuje korisniku da neobrađene podatke izveze u formatu koji alat LinReg potom može uvesti za analizu.

1. Otvorite datoteku postupka instrumenta Rotor-Gene Q koja sadržava neobrađene podatke.
2. Izvezite podatke u format za izvoz u LinReg odabirom **Save As...** (Spremi kao) i potom **LinReg Export Format...** (Format izvoza LinReg...).
3. Microsoft Excel automatski prikazuje izvezene neobrađene podatke.
4. Pokrenite alat LinReg.

Alat će od vas tražiti da odaberete raspon ćelija u kojem se nalaze neobrađeni podaci. Alat može analizirati samo po jedan neobrađeni kanal, stoga je potrebno odabrati odgovarajuću regiju Excel lista.

### 6.5.3 Izvješća

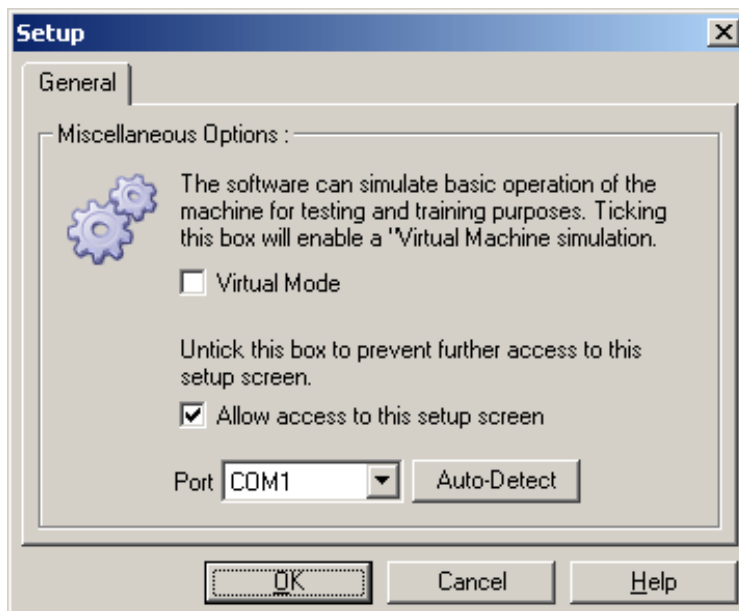
Nakon što odaberete **Reports** (Izvješća), pojavljuje se prozor **Report Browser** (Preglednik izvješća). Ako su podaci već analizirani, izvješće te analize može se prikazati iz prozora **Report Browser** (Preglednik izvješća). Ponuđeno je nekoliko vrsta izvješća s različitim stupnjevima pojedinosti.



\* 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 Postavljanje

Početno postavljanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx treba biti dovršeno tijekom instaliranja. Međutim, ova mogućnost omogućuje vam da mijenjate postavke povezivanja instrumenta Rotor-Gene Q MDx ako to želite nakon instaliranja.

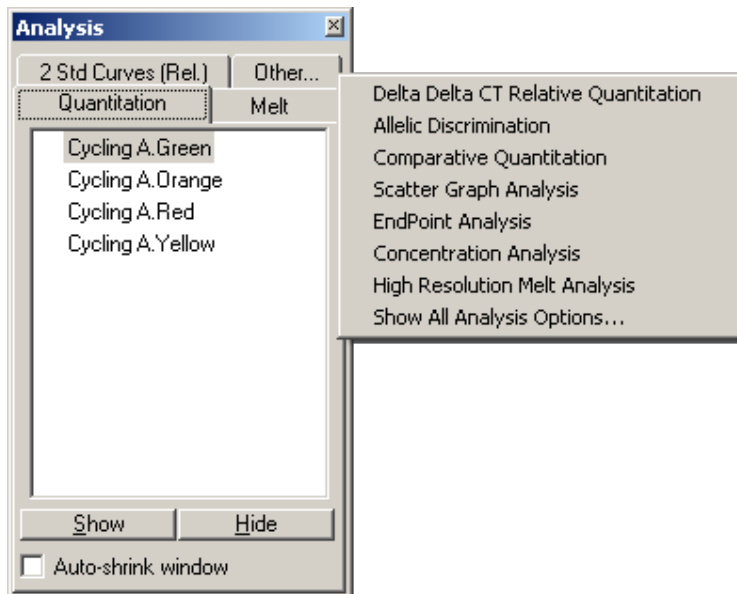


<b>Virtual Mode</b> (Virtualni način rada):	Odaberite ovu mogućnost ako će se softver upotrebljavati bez povezanog instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Softver zadržava sve funkcije. Taj je način rada koristan u svrhe demonstracije, analize podataka i postavljanja predložaka.
<b>Allow access to this setup screen</b> (Dozvoli pristup ovom zaslonu za postavljanje):	Ako se ova mogućnost ne označi tijekom postavljanja, ovom se prozoru više ne može pristupiti. Ova sigurnosna mjera sprječava da korisnici mijenjaju postavke. Da biste ponovno dobili pristup, obratite se svojem distributeru.
<b>Port</b> (Priključak):	Odaberite ispravni komunikacijski priključak da biste omogućili komunikacije između računala i instrumenta Rotor-Gene Q MDx.
<b>Auto-Detect</b> (Automatsko detektiranje):	Ako niste sigurni koji priključak trebate odabrati, kliknite na mogućnost <b>Auto-Detect</b> (Automatsko detektiranje) da biste tražili sve dostupne priključke.

## 6.6 Izbornik za analizu

### 6.6.1 Analiza

Nakon što kliknete **Analysis** (Analiza), pojavljuje se prozor **Analysis** (Analiza). Ovaj prozor omogućuje izradu novih analiza i prikazivanje postojećih analiza. Metoda analize odabire se s pomoću kartica. Prikazuje se popis kanala koji se mogu analizirati odabranom metodom. Višestruki postupci ispitivanja u istom kanalu mogu se analizirati neovisno, pod uvjetom da su u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) postavljeni kao zasebne stranice. Kraj stranica koje su već analizirane nalazi se zelena kvačica. To znači da su za tu analizu spremljene postavke praga i normalizacije. Da biste vidjeli ili analizirali kanal, dvaput ga kliknite. Pojavljuje se prozor određene analize.

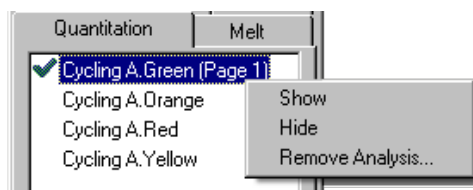


**Auto-shrink window** (Automatsko smanjivanje prozora):

Odaberete li mogućnost **Auto-shrink window** (Automatsko smanjivanje prozora), prozor se smanjuje kad se ne upotrebljava. Prozor se ponovno povećava kad se pokazivačem prijeđe preko prozora.

## Organiziranje radnog prostora

Svaki put kad se pokrene nova analiza, njezini se prozori rasporede tako da se uklape s prozorima koji su već na zaslonu. Ako se prikazuju brojni prozori, to može biti nepregledno. Zatvorite prozore koji vam nisu potrebni, a potom kliknite **Arrange** (Rasporedi) na alatnoj traci. Prozori se automatski raspoređuju u skladu s metodom **Smart Tiling** (Pametno raspoređivanje pločica). Alternativno, drugu metodu određivanja rasporeda možete odabrati klikom na strelicu uz gumb **Arrange** (Rasporedi). Kliknete li desnom tipkom miša na naziv analize, također će vam se ponuditi dodatne mogućnosti.



**Show** (Prikaži):

Prikazuju se odabrane analize.

**Hide** (Sakrij):

Skrivaju se odabrane analize.

**Remove Analysis...**  
(Ukloni analizu...):

Odabrana analiza u cijelosti se uklanja. To znači da će se izgubiti sve postavke normalizacije ili intervali taljenja postavljeni u analizi.

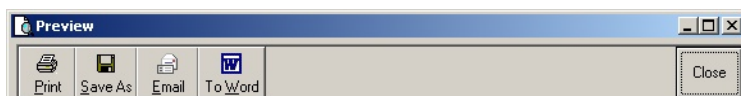
## 6.6.2 Kvantifikacija

Odaberite karticu **Quantitation** (Kvantifikacija) u prozoru **Analysis** (Analiza) i potom dvaput kliknite naziv kanala ili odaberite kanal i pritisnite gumb **Show** (Prikaži) da biste otvorili željeni kanal. Pojavljuju se tri prozora: glavni zaslon, standardna krivulja i rezultati.

### Izvešća

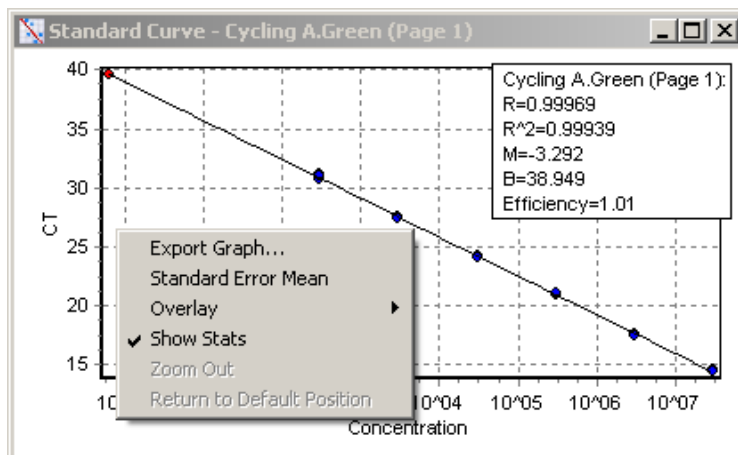
**Reports** (Izvešća): Ako kliknete **Reports** (Izvešća), otvara se prozor **Report Browser** (Preglednik izvješća) u kojem se može generirati izvješće za trenutnu analizu. Tri su mogućnosti: standardno izvješće, cjelovito izvješće i sažeto izvješće. Dvaput kliknite željenu mogućnost da biste otvorili izvješće u prozoru **Preview** (Pretpregled).

Nakon što se izvješće generira, gumbi na vrhu prozora **Preview** (Pretpregled) mogu se upotrebljavati za ispis, spremanje ili slanje izvješća e-poštom, ili za izvoz izvješća u Word



### Standardna krivulja

**Std. Curve** (Standardna krivulja): Ovim gumbom otvara se prozor **Standard Curve** (Standardna krivulja). Prema zadanim postavkama ovaj se prozor otvara kad je analiza otvorena. Ako zatvorite prozor, možete ga ponovno otvoriti s pomoću ove naredbe.



Vrijednosti na standardnoj krivulji dinamički se ponovno izračunavaju jer se razina praga mijenja klikom na liniju praga u glavnom prozoru i njezinim povlačenjem.

Plave točkice na krivulji predstavljaju uzorke koji su definirani kao standardi, a crvene točkice predstavljaju podatkovne točke nepoznatog uzorka.

**Napomena:** ako ponovno definirate standarde da biste ponovno izračunali standardnu krivulju, isključivanje vidljivosti standardnog uzorka s pomoću preklopnika s desne strane zaslona uklonit će krivulju iz izračuna standardne krivulje. Uklanjanje standarda s grafikona da bi se povećala vrijednost R<sup>2</sup> nije znanstveno valjano. Neuspjeli standard ukazuju na to da su i uzorci možda neuspjeli te bi stoga trebali biti uključeni u rezultate.

**Efficiency** (Učinkovitost): To je učinkovitost reakcije postupka. O ovoj se vrijednosti detaljnije raspravlja na stranici 94.

R<sup>2</sup> value (correlation coefficient)  
(Vrijednost R<sup>2</sup> (koeficijent korelacije)):

Vrijednost R<sup>2</sup> ili vrijednost R2 jest postotak podataka koji je u skladu s hipotezom da standardi čine standardnu krivulju. Ako je vrijednost R2 niska, standardi se ne uklapaju lako na liniju najbolje prilagodbe. To znači da rezultati (tj. izračunane koncentracije) možda nisu pouzdani. Dobra vrijednost R2 približno iznosi 0,999.

**Napomena:** visoka vrijednost R<sup>2</sup> može se postići uz lošu standardnu krivulju ako se ispituje nedovoljan broj standarda. Vrijednost R<sup>2</sup> poboljšava se kako se smanjuje broj standarda. Da bi indikacija pouzdanosti rezultata bila točnija, kao smjernicu upotrebljavajte intervale pouzdanosti na izračunanim koncentracijama.

R value (square root of correlation coefficient)  
(Vrijednost R (kvadratni korijen koeficijenta korelacije)):

Vrijednost R je kvadratni korijen vrijednosti R<sup>2</sup>. Općenito je vrijednost R<sup>2</sup> korisnija za određivanje korelacije.

M and B (M i B):

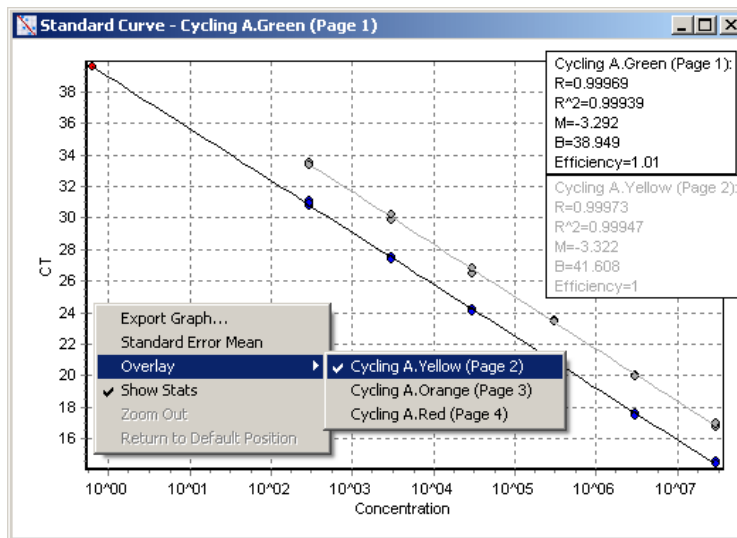
Nagib (M) i sjecište (B) standardne krivulje automatski se izračunavaju formulom  $y = Mx + B$  te se prikazuju u prozoru Standard Curve (Standardna krivulja).

Export Graph...  
(Izvezi grafikon...):

Klikom desnom tipkom miša iznad standardne krivulje prikazuje se mogućnost izvoza grafikona (pogledajte odjeljak 7.4).

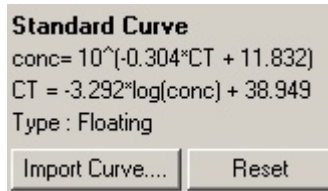
Overlay (Preklopi):

Kada je u istom postupku provedeno više kvantificiranja, standardne krivulje mogu se preklopiti u istom prozoru. To je korisno za grafički prikaz razlika između različitih pragova. Ta je značajka prikazana na snimci zaslona u nastavku.



### Izračun standardne krivulje

„ $\text{conc} = \dots * \text{CT} + \dots$ ” i „ $\text{CT} = \dots$ ” dvije su verzije jednadžbe koje se upotrebljavaju za povezivanje vrijednosti CT i koncentracija. U publikacijama se najčešće upotrebljava formula „ $\text{CT} = \dots$ ”. Standardna krivulja može biti „Floating” (Plutajuća) ili „Fixed” (Fiksna). Ako je krivulja „Floating” (Plutajuća), optimalna jednadžba za standardnu krivulju izračunava se svaki put kad se u glavnom prozoru promijeni prag. Ako je krivulja „Fixed” (Fiksna), jednadžba se ne mijenja jer je uvezena iz drugog postupka.



## Uvoz krivulje

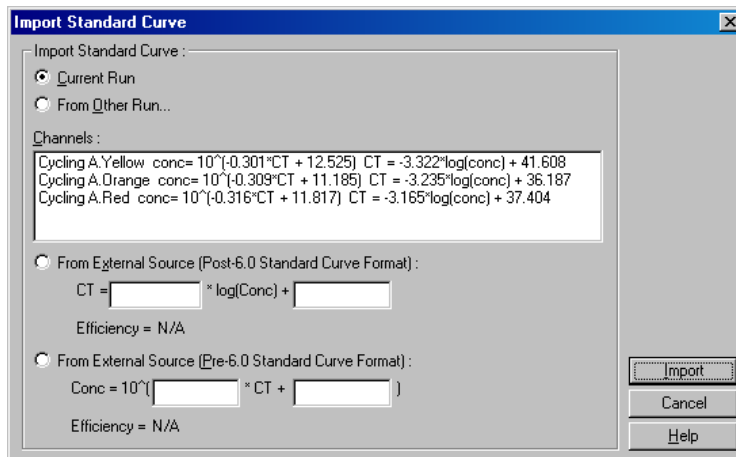
Uvoz standardne krivulje omogućuje procjenu koncentracija kad standardna krivulja nije dostupna u određenom postupku i kad se učinkovitost reakcije nije mijenjala između dvaju postupaka. Krivulje se mogu uvesti iz drugog kanala ili iz drugog postupka klikom na **Import Curve** (Uvezi krivulju).

Ako je to potrebno, standardna krivulja može se prilagoditi. Prilagodba standardne krivulje znači da se u trenutačni postupak uvozi samo učinkovitost izvorne standardne krivulje. O kemijskim sredstvima koja se upotrebljavaju ovisi treba li se standardna krivulja prilagođavati.

Da biste prilagodili standardnu krivulju, u novom postupku upotrijebite referencu poznate koncentracije. Definirajte referencu postavljanjem vrste uzorka na „Standard” (Standardni) i unosom vrijednosti koncentracije u prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke). Moguće je unijeti više kopija iste reference radi poboljšanja točnosti. Imajte na umu da nije moguće definirati više od jedne referentne koncentracije ili standarda. Na primjer, moguće je imati tri ponovljene reference s 1000 kopija, ali nije moguće imati jednu referencu s 1000 kopija i drugu sa 100 kopija u istom postupku.

Nakon uvoza standardne krivulje vrsta standardne krivulje mijenja se na „Fixed” (Fiksna). Kliknite **Reset** (Resetiraj) da biste vrstu standardne krivulje ponovno vratili na „Floating” (Plutajuća).

U nastavku je prikazana snimka prozora **Import Standard Curve** (Uvezi standardnu krivulju).



S pomoću ovog prozora standardna krivulja može se uvesti iz drugog kanala koji se analizira u trenutačnom postupku ili iz drugog postupka.



**Current Run** (Trenutačni postupak):

Kad je odabrana ova mogućnost, analize kvantifikacije na drugim kanalima iz ovog postupka uvrštavaju se s odgovarajućim standardnim krivuljama.

**From Other Run...** (Iz drugog postupka...):

Odabirom ove mogućnosti otvara se dijaloški okvir iz kojeg se može odabrati datoteka postupka koja će se otvoriti. Ako je za postupak provedena bilo kakva kvantifikacijska analiza, za svaki analizirani kanal navedeni su popisi standardnih krivulja.

**Napomena:** postavke kvantifikacijske analize moraju biti spremljene u datoteci postupka.

**Channels** (Kanali):

Popisani su analizirani kanali i formule njihove standardne krivulje.

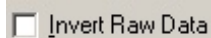
**From External Source** (Iz vanjskog izvora):

Vrijednosti M i B mogu se izravno unijeti na ovo područje. To je korisno u slučajevima u kojima vrijednosti potječu iz vanjskog izvora, kao što je proračunska tablica programa Excel.

## Izračun vrijednosti $C_T$

**Invert Raw Data** (Obrni neobrađene podatke):

Neka kemijska sredstva proizvode fluorescentni signal koji se eksponencijalno smanjuje umjesto da se povećava. Ti se podaci mogu analizirati s pomoću mogućnosti „Quantitation“ (Kvantifikacija), ali potvrdni okvir **Invert Raw Data** (Obrni neobrađene podatke) mora biti označen. Ova mogućnost treba ostati neoznačena za sve ostale kvantifikacijske analize.

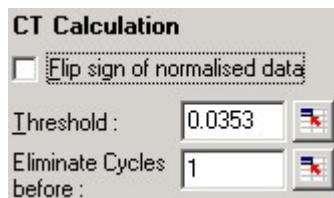


**$C_T$  Calculations** (Izračuni vrijednosti  $C_T$ ):

Vrijednost  $C_T$  je broj ciklusa u točki u kojoj amplifikacijska krivulja prelazi prag detekcije. Postavljanjem linije praga i izračunavanjem sjecišta sa svakom krivuljom utvrđuje se vrijednost  $C_T$  za svaki uzorak.

**Threshold** (Prag):

Da biste postavili prag, kliknite ikonu (mreža s crvenom strelicom), a potom kliknite grafikon i držite ga te povucite liniju na željenu razinu. Alternativno možete unijeti vrijednost zapisa. Alternativno možete upotrijebiti mogućnost **Auto-Find Threshold** (Automatski pronađi prag) da biste automatski utvrdili prag. Kad ručno postavljate prag, trebalo bi ga postaviti u eksponencijalnoj fazi postupka, znatno iznad pozadinske razine da bi se izbjegao šum i ispod početka platoa signala u kasnijim ciklusima.



**Eliminate Cycles before** (Eliminiraj prethodne cikluse):

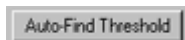
Da biste postavili ovu postavku, kliknite ikonu (mreža s crvenom strelicom), a potom kliknite grafikon i držite ga te povucite liniju udesno. Time se eliminira prag za cikluse nižeg broja.

**Napomena:** ovo je korisno ako tijekom početnih ciklusa postoji šum, na primjer, zbog učinaka miješanja uzoraka.

**Auto-Find Threshold** (Automatski pronađi prag):

Ova funkcija skenira odabranu regiju grafikona da bi se pronašla postavka praga koja daje optimalne procjene za dane koncentracije. Odabrana regija može se mijenjati unošenjem novih gornjih i donjih granica u tekstne okvire koji se pojavljuju.

Zadane gornje i donje granice za većinu su analiza primjerene. Raspon razina praga skenira se da bi se na temelju uzoraka koji su definirani kao standardi dobila najbolja prilagodba standardne krivulje (tj. vrijednost R najbliža vrijednosti 1,0).



## Rezultati

Otvara se prozor **Quantitation Results** (Rezultati kvantifikacije). Prema zadanim postavkama ovaj se prozor otvara kad je analiza otvorena. Ako je zatvoren, ovom ga naredbom možete ponovno otvoriti.

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	10e8	Standard	3.73		1.00E+08	7.19E+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	10e9	Standard	3.74		1.00E+09	7.17E+07	28.3%					
Cycling A Green (Page 1)	3	10e8	Standard	3.74		1.00E+08	7.16E+07	28.4%					
Cycling A Green (Page 1)	4	10e7	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	10e7	Standard	6.08		1.00E+07	1.47E+07	46.6%					
Cycling A Green (Page 1)	6	10e7	Standard	5.59		1.00E+07	1.56E+07	55.5%					
Cycling A Green (Page 1)	7	10e6	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	10e6	Standard	10.27		1.00E+06	8.58E+05	14.2%					
Cycling A Green (Page 1)	9	10e6	Standard	10.43		1.00E+06	7.71E+05	22.5%					
Cycling A Green (Page 1)	10	10e5	Standard	13.49		1.00E+05	9.68E+04	3.2%	13.65	0.13	(13.31, 13.98)	8.74E+04	(2.96E+04, 2.59E+05)
Cycling A Green (Page 1)	11	10e5	Standard	13.75		1.00E+05	8.13E+04	18.7%					
Cycling A Green (Page 1)	12	10e5	Standard	13.69		1.00E+05	8.48E+04	15.2%					
Cycling A Green (Page 1)	13	10e4	Standard	15.66		1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46	0.25	(14.94, 16.08)	2.59E+04	(7.02E+03, 8.38E+04)
Cycling A Green (Page 1)	14	10e4	Standard	15.54		1.00E+04	2.42E+04	141.7%					
Cycling A Green (Page 1)	15	10e4	Standard	15.18		1.00E+04	3.09E+04	208.8%					
Cycling A Green (Page 1)	16	10e3	Standard	21.36		1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24	(20.49, 21.69)	5.65E+02	(8.13E+01, 3.50E+03)
Cycling A Green (Page 1)	17	10e3	Standard	20.89		1.00E+03	6.01E+02	35.3%					
Cycling A Green (Page 1)	18	10e3	Standard	21.02		1.00E+03	5.94E+02	40.8%					
Cycling A Green (Page 1)	19	10e2	Standard	NEG (Multi Ct)		1.00E+02							
Cycling A Green (Page 1)	20	10e2	Standard	23.98		1.00E+02	7.99E+01	20.1%					
Cycling A Green (Page 1)	21	10e2	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)									

U prozoru **Quantitation Results** (Rezultati kvantifikacije) rezultati iz postupka sažeto su prikazani u tablici. Kliknete li desnom tipkom miša i odaberete li mogućnost **Export to Excel** (Izvezi u Excel), rezultati se izvoze u Excel. Excel se automatski otvara. Da biste podatke kopirali u postojeću proračunsku tablicu, umjesto navedenog odaberite mogućnost **Copy** (Kopiraj), otvorite proračunsku tablicu i potom odaberite **Paste** (Zalijepi).

Prozor **Quantitation Results** (Rezultati kvantifikacije) ima sljedeće stupce.

Analysis (Analiza):	Trenutačni skup podataka (kanal prikupljanja i stranica uzorka).
No. (Br.):	Broj uzorka.
Color (Boja):	Definirana boja grafikona pojedinačnog uzorka.
Type (Vrsta):	Definirana vrsta uzorka.
C <sub>T</sub> :	Utvrđena vrijednost C <sub>T</sub> .
C <sub>T</sub> Comment (Komentar za C <sub>T</sub> ):	Automatska bilješka za određivanje vrijednosti C <sub>T</sub> ako su vrijednosti C <sub>T</sub> isključene. Moguće su sljedeće oznake: NEG (Multi Ct): prag prelazi krivulju fluorescencije barem dva puta (dvostruko sjecište). Ne može se odrediti nedvosmislena vrijednost C <sub>T</sub> . NEG (NTC): ukupno povećanje fluorescencije ne zadovoljava zahtjeve definirane u funkciji „NTC threshold” (Prag NTC-a) u izborniku <b>Outlier Removal</b> (Uklanjanje sumnjive vrijednosti) (pogledajte u nastavku). Na primjer, krivulja fluorescencije presijeca navedeni prag, ali manje ukupno povećanje nagiba ukazuje na kontrolu bez predloška i ne navodi se vrijednost C <sub>T</sub> . NEG (R.Eff): ukupno povećanje fluorescencije ne zadovoljava zahtjeve definirane u funkciji „Reaction efficiency threshold” (Prag učinkovitosti reakcije) u izborniku <b>Outlier Removal</b> (Uklanjanje sumnjive vrijednosti) (pogledajte u nastavku). Uzorci koji nemaju određenu učinkovitost reakcije isključuju se i ne navodi se vrijednost C <sub>T</sub> . Ova oznaka prikazuje se samo ako je omogućena odgovarajuća funkcija.
%Var (Postotak varijacije):	Postotak varijacije između izračunane i poznate koncentracije. %Var = Abs (Izračunano/Dano – 1)

Rep. Ct. (Vrijednost Ct replika):	Prosječni CT svih uzoraka istog naziva kao ovaj uzorak.
Rep. Ct Std. Dev. (Standardna devijacija vrijednosti Ct replika):	Standardna devijacija vrijednosti CT svih uzoraka istog naziva kao ovaj uzorak.
Rep. Ct. 95% C.I. (95-postotni CI vrijednosti Ct replika):	Raspon vrijednosti $C_T$ koji, statistički gledano, obuhvaća 95 % varijacije u vrijednosti $C_T$ . Ovo je konzervativna statistička mjera koja se može upotrebljavati kao mjera kvalitete. Ovaj se raspon može smanjiti izvođenjem postupka na više replika ili manjim brojem varijacija u replikama.
Rep. Calc. Conc. (Izračunana koncentracija replika):	Izračunana koncentracija za sve uzorke istog imena. <b>Napomena:</b> ovo nije jednostavna prosječna vrijednost izračunanih koncentracija. Riječ je o geometrijskoj sredini koja je matematički primjerenija prosječna vrijednost zbog eksponencijalne prirode amplifikacije u stvarnom vremenu.
Rep. Calc. Conc. 95% C.I. (95-postotni CI izračunane koncentracije replika):	Raspon koncentracija koji obuhvaća 95 % varijacije u pojedinačnom uzorku kao i model linearne regresije na kojem se temelji. Ova mjera tumači se kao raspon koncentracija koji se može očekivati 95 % vremena ako se postupak opetovano ponavlja s jednakom varijacijom. Riječ je o konzervativnoj procjeni i raspon može biti prilično velik zbog varijacije koja je inherentna svakoj analizi u stvarnom vremenu. Taj raspon može biti velik ako se standardi određuju u koncentracijama koje se razlikuju od nepoznatih uzoraka, ako se upotrebljava malo replika ili ako postoji znatna varijacija. <b>Važno:</b> varijacije prijavljene na temelju ove mjere inherentne su eksponencijalnom procesu amplifikacije u stvarnom vremenu, a ne uzrokuje ih instrument Rotor-Gene Q MDx. Da se slični testovi provedu na ciklerima na bazi bloka, to bi rezultiralo većom varijacijom zbog niže temperature ujednačenosti sustava temeljenih na blokovima. Ako želite usporediti ciklere, preporučujemo usporedbu standardne devijacije vrijednosti CT.

**Napomena:** detaljnije informacije o intervalima pouzdanosti dostupne su u Dodatku B.

**Napomena:** osim stupaca Color (Boja), Name (Naziv), Ct i Ct Comment (Komentar za Ct), svaki stupac moguće je prikazati ili sakriti tako da desnom tipkom kliknete na prozor i potom odaberete ili poništite odabir naziva stupca.

No.	Ct	Name	Ct	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var
1	3x10 <sup>8</sup>	Analysis			300.000.000,	324.345.068,	8,1%
2	3x10 <sup>8</sup>	✓ No.			300.000.000,	301.264.230,	0,4%
3	3x10 <sup>8</sup>	✓ Color			300.000.000,	308.453.920,	2,8%
4	3x10 <sup>8</sup>	✓ Name			300.000.000,	298.576.301,	0,5%
5	3x10 <sup>7</sup>	Type			30.000.000,	27.524.578,	8,3%
6	3x10 <sup>7</sup>	✓ Ct			30.000.000,	26.405.444,	12,0%
7	3x10 <sup>7</sup>	✓ Ct Comment			30.000.000,	28.701.296,	4,3%
8	3x10 <sup>7</sup>	✓ Given Conc (Copies)			30.000.000,	23.847.613,	20,5%
9	3x10 <sup>6</sup>	✓ Calc Conc (Copies)			3.000.000,	3.392.142,	13,1%
10	3x10 <sup>6</sup>	✓ % Var			3.000.000,	3.170.880,	5,7%
11	3x10 <sup>6</sup>	✓ Rep. Ct			3.000.000,	3.130.752,	4,4%
12	3x10 <sup>6</sup>	✓ Rep. Ct Std. Dev.			3.000.000,	3.166.396,	5,5%
13	3x10 <sup>5</sup>	✓ Rep. Ct (95% CI)			300.000,	321.913,	7,3%
14	3x10 <sup>5</sup>	✓ Rep. Calc. Conc.			300.000,	305.744,	1,9%
15	3x10 <sup>5</sup>	Rep. Calc. Conc.			300.000,	312.045,	4,0%
16	3x10 <sup>5</sup>	Rep. Calc. Conc. (95% CI)			300.000,	324.696,	8,2%
17	3x10 <sup>4</sup>		19,47		30.000,	32.420,	8,1%
18	3x10 <sup>4</sup>		19,59		30.000,	29.872,	0,4%
19	3x10 <sup>4</sup>		19,53		30.000,	31.102,	3,7%
20	3x10 <sup>4</sup>		19,52		30.000,	31.301,	4,3%
21	3x10 <sup>3</sup>		22,93		3.000,	2.850,	5,0%
22	3x10 <sup>3</sup>		22,96		3.000,	2.793,	6,9%
23	3x10 <sup>3</sup>		22,94		3.000,	2.825,	5,8%
24	3x10 <sup>3</sup>		22,91		3.000,	2.888,	3,7%
25	3x10 <sup>2</sup>		26,03		300,	322,	7,5%
26	3x10 <sup>2</sup>		26,11		300,	305,	1,6%
27	3x10 <sup>2</sup>		26,26		300,	275,	8,5%
28	3x10 <sup>2</sup>		26,18		300,	291,	3,1%

Radi veće praktičnosti, značajka **AutoStat** automatski izračunava prosjek, standardnu devijaciju te minimalne i maksimalne vrijednosti uzoraka od interesa. Odaberite rezultate od interesa tako što ćete ih povući lijevom tipkom miša. Vrijednosti se prikazuju u tablici s desne strane zaslona.

Na ovoj snimci zaslona analiziraju se koncentracije nekoliko uzoraka.

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	3000000	3422624	14,1%	
17.58	3000000	3103391	3,4%	
17.42	3000000	3467111	15,6%	
20.99	300000	285353	4,9%	
20.92	300000	298898	0,4%	
21.04	300000	275802	8,1%	
24.20	30000	30786	1,0%	

**Statistics**

Maximum : 28730050  
 Minimum : 25142920  
 Count : 3

Mean : 27328521  
 Std. Dev : 1.07537  
 (Orders of Mag.)

Copy

**Važno:** značajka **AutoStat** prilagođava se kontekstu. To znači da, kad je to moguće, generira samo informacije koje su korisne.

Na primjer:

- Nije moguće dobiti 95-postotni interval pouzdanosti (confidence interval, CI) iz skupa odabranih izračunanih koncentracija jer se u obzir mora uzeti i regresijski model.

- Standardna devijacija „Orders of Magnitude” (Redovi veličina) iskazuje se za izračunane koncentracije umjesto za apsolutnu vrijednost. To je postotna varijacija. Na primjer, vrijednost od 1,07537 predstavlja varijaciju od 7,54 %  $(278,974 - 322,611) = (300,000 / 1,07537 - 00,000 * 1,07537)$ . Iskazivanje apsolutne vrijednosti nema smisla za standardnu krivulju. Vrijednost bi se mogla iskazati pri najnižoj koncentraciji kako bi se kreirala percipirana niska greška ( $\pm 3$  kopije) ili pri visokoj koncentraciji ( $\pm 3\,000\,000$  kopija). Stoga se iskazuje standardna devijacija „Orders of Magnitude” (Redovi veličina).
- Za izračunane koncentracije upotrebljava se geometrijska sredina umjesto aritmetičke sredine. Time se u obzir uzima eksponencijalna priroda postupka real-time PCR. Na primjer, u slučaju dvostrukih razrjeđivanja s 1, 2, 8 i 16 kopija, prosjek treba biti četiri kopije jer je to sredina serije razrjeđivanja. Međutim, aritmetička je sredina 6,75. Geometrijska sredina iznosi  $(1 * 2 * 8 * 16)^{(1/4)} = 4$  kopije.

### Normalizacija dinamičke epruvete

Mogućnost **Dynamic Tube** (Dinamička epruveta) odabrana je prema zadanim postavkama te se upotrebljava za određivanje prosječne pozadine svakog uzorka netom prije nego što započne amplifikacija.

Standardna normalizacija jednostavno uzima prvih pet ciklusa i upotrebljava ih kao pokazatelj pozadinske razine svakog uzorka. Sve podatkovne točke za uzorak tada se dijele tom vrijednošću da bi se podaci normalizirali. To može biti netočno jer za neke uzorke pozadinska razina tijekom prvih pet ciklusa ne mora ukazivati na pozadinsku razinu neposredno prije amplifikacije. Nasuprot tome, normalizacija dinamičke epruvete upotrebljava drugu derivaciju traga svakog uzorka da bi se utvrdila početna točka za svaki uzorak. Pozadinska razina zatim se uprosječuje od ciklusa 1 do broja početnog ciklusa za svaki uzorak. Tako se dobivaju najprecizniji rezultati kvantifikacije.

Imajte na umu da za neke skupove podataka pozadinska fluorescencija nije dosljedna tijekom ciklusa prije nego što započne amplifikacija. U tim slučajevima može biti potrebno poništiti odabir normalizacije dinamičke epruvete klikom na značajku **Dynamic Tube** (Dinamička epruveta) jer to može rezultirati u manje preciznoj kvantifikaciji.

### Ispravak nagiba šuma

Pozadinska fluorescencija (FI) uzorka treba idealno ostati konstantna prije amplifikacije. Međutim, ponekad FI pokazuje postupno povećanje ili smanjenje tijekom nekoliko ciklusa zbog upotrijebljenih kemijskih sredstava. To proizvodi iskrivljenu razinu šuma. Ispravak nagiba šuma upotrebljava liniju najbolje prilagodbe da bi se utvrdila razina šuma umjesto prosjeka i normalizira tu liniju. Odabir te mogućnosti klikom gumba **Slope Correct** (Ispravak nagiba) može poboljšati podatke replika ako su osnovne linije uzorka primjetno nagnute. Ispravak nagiba šuma poboljšava podatke kad su pozadine neobrađenih podataka nagnute prema gore ili prema dolje prije početne točke ( $C_T$ ).

---

Ako nagib nije ravnomjeran ili ako početni ciklusi osnovne linije pokazuju znatno povećanje ili smanjenje signala u usporedbi s ostatkom krivulje, značajka Noise Slope Correction (Ispravak nagiba šuma) može dovesti do neželjenih učinaka kao što su krivulje negativne kontrole koje prelaze prag zbog određivanja približne vrijednosti osnovne linije kao linije najbolje prilagodbe i normaliziranja neobrađenih podataka u skladu s time. Posljedično, ova funkcija ne poboljšava uvijek kvalitetu podataka te bi se trebala upotrebljavati samo ako krivulje neobrađenih podataka pokazuju ravnomjeran nagib.

### Prilagodba početne točke

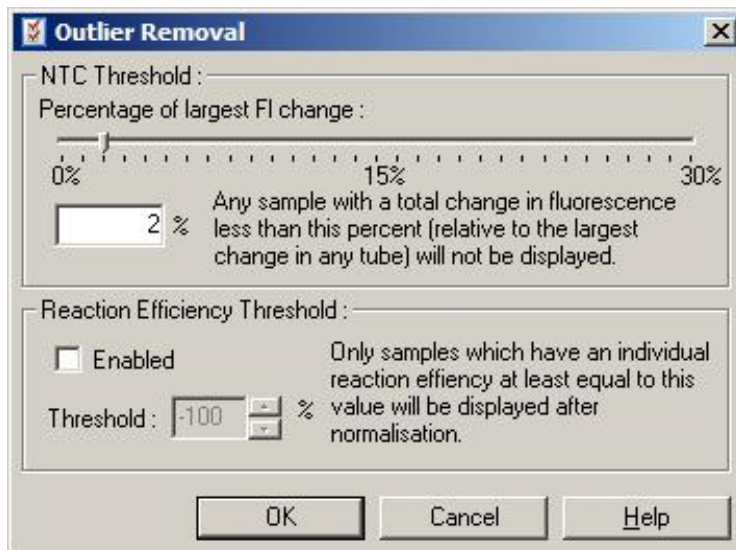
Algoritam prilagodbe početne točke može se upotrebljavati za definiranje minimalne duljine osnovne linije koja se upotrebljava za normalizaciju. Da bi se primijenila prilagodba početne točke, moraju se definirati dva parametra. Ako se početna točka izračunava s pomoću mogućnosti **Dynamic Tube** (Dinamička epruveta) koja je niža od prvog parametra, tada se kao početna točka uzima drugi parametar. Prilagodba početne točke može se upotrebljavati samo u vezi s normalizacijom mogućnosti **Dynamic Tube** (Dinamička epruveta).

### Zanemarivanje prvih

Fluorescentni signal iz prvih nekoliko ciklusa u postupku možda neće biti reprezentativan za ostatak postupka. Stoga se bolji rezultati mogu postići ako se prvih nekoliko ciklusa zanemari. Moguće je zanemariti do 10 ciklusa. Međutim, ako prvi ciklusi nalikuju sljedećim ciklusima, bolji rezultati postići će se ako se poništi odabir mogućnosti „**Ignore First**” (Zanemari prve) jer će algoritam normalizacije imati više podataka za obradu.

### Uklanjanje sumnjive vrijednosti

Da bi se razlikovale manje promjene u fluorescenciji i stvarne reakcije u kontrolama bez predložaka (no template controls, NTC), omogućene su dvije mjere: **NTC Threshold** (Prag za NTC) i **Reaction Efficiency Threshold** (Prag učinkovitosti reakcije). Za većinu aplikacija preporučuje se mjerenje **NTC Threshold** (Prag za NTC). Treba potvrditi primijenjeni pristup.



**NTC Threshold** (Prag za NTC): Omogućuje da se iz analize isključe uzorci ili NTC-ovi koji imaju mali pomak prema gore. Svi uzorci s promjenom ispod praga „NTC Threshold” (Prag za NTC) neće biti iskazani te će se u stupcu „CT Comment” (Komentar za CT) prikazivati oznaka „NEG (NTC)”.

Postotak se odnosi na najveću maksimalnu promjenu utvrđenu u bilo kojoj epruveti. Na primjer, ako je jedan uzorak započeo s pozadinom od 2 FI i narastao na 47 FI, tada 45 FI predstavlja 100 %. Značajka „NTC Threshold” (Prag za NTC) od 10 % smatrala bi svaki uzorak manji od 4,5 FI šumom.

**Reaction Efficiency Threshold** (Prag učinkovitosti reakcije): Metoda „Reaction Efficiency Threshold” (Prag učinkovitosti reakcije) alternativna je metoda isključivanja šuma iz analize. Ovaj normalizirajući algoritam upotrebljava tehnike procjene učinkovitosti reakcije koje se primjenjuju u komparativnoj kvantifikaciji (pogledajte odjeljak 6.6.6). Isključeni su svi uzorci čija učinkovitost reakcije nije barem na ovoj razini te će se u stupcu „CT Comment” (Komentar za CT) prikazivati oznaka „NEG (R.Eff)”.

Razina od 0 % ukazuje na to da tijekom eksponencijalne faze uopće nije došlo do reakcije. Razina od 100 % ukazuje na to da je tijekom eksponencijalne faze došlo do reakcije koja je bila potpuno učinkovita. Negativni postotci ukazuju na to da se tijekom eksponencijalne faze smanjio fluorescentni signal.

Trenutačno istraživanje ne donosi nikakav zaključak o preciznim razinama učinkovitosti koje su potrebne za razlikovanje pravih reakcija od kontaminacije i ostalih učinaka. Stoga preporučujemo konzervativnu uporabu ove značajke, pod pretpostavkom da će svaki uzorak s pravom reakcijom imati neku vidljivu eksponencijalnu fazu s određenim povećanjem fluorescencije. Postavljanje ove vrijednosti iznad 0 % isključit će neke uzorke s neučinkovitim, ali primjetnim povećanjem fluorescencije, dok će postavljanje ispod 0 % prikazivati uzorke u kojima je došlo do smanjenja fluorescencije tijekom eksponencijalne faze i za koje je jasno da ih treba isključiti.

**Napomena:** ako je vrijednost isključena zbog aktivacije bilo koje od ovih tehnika, neće se prikazivati odgovarajuća vrijednost CT u prozoru **Quantitation Results** (Rezultati kvantifikacije). Istodobno će se u stupcu „CT Comment” (Komentar za CT) prikazivati oznaka koja ukazuje na isključivanje. Stoga je važno osigurati da se stupac „CT Comment” (Komentar za CT) stalno prikazuje.

Na slici u nastavku uzorci 7, 8 i 9 isključeni su zbog značajke „Reaction Efficiency Threshold” (Prag učinkovitosti reakcije).

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

### Nagib, amplifikacija, učinkovitost reakcije

Nagib (M) reakcije (prikazan u prozoru **Standard Curve** (Standardna krivulja)) može se upotrebljavati za utvrđivanje eksponencijalne amplifikacije i učinkovitosti reakcije primjenom sljedećih izračuna:

Eksponencijalna amplifikacija =  $10^{(-1/M)}$

Učinkovitost reakcije =  $[10^{(-1/M)}] - 1$

Optimalne vrijednosti za M, eksponencijalnu amplifikaciju i učinkovitost reakcije jesu -3,322, 2 i 1. Učinkovitost reakcije prikazuje se u izvješću (u potpunim i standardnim izvješćima, pogledajte stranicu 83) i u prozoru **Standard Curve** (Standardna krivulja).

Nagib se izračunava kao promjena u vrijednosti  $C_T$  podijeljena s promjenom iz unosa u zapisniku (npr. broj kopija). Ako amplifikacija ima učinkovitost od 100 %, to znači da udvostručavanje produkta amplifikacije u svakom ciklusu rezultira vrijednošću M od -3,322, faktorom amplifikacije od 2 i učinkovitošću reakcije od 1.

Ako vrijednost M iznosi -3,322, izračuni su kako slijedi:

Eksponencijalna amplifikacija:  $10^{(-1/-3,322)} = 2$

Učinkovitost reakcije:  $[10^{(-1/-3,322)}] - 1 = 1$

Alternativni primjer glasi: vrijednost M od 3,8 znači da reakcija ima eksponencijalnu amplifikaciju od približno 1,83 i učinkovitost reakcije od 0,83 (ili 83 %).

### Pomak

U formuli koja opisuje odnos između dviju varijabli pomak se iskazuje slovom B ( $y = Mx + B$ ). Pomak se ponekad naziva i sjecištem. B predstavlja vrijednost  $C_T$  za danu koncentraciju od 1 jedinice. Zamijeni li se 1 u formuli koncentracije kako je prikazano u nastavku:

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

$C_T = 0 * M + B$

Rezultat je  $C_T = B$



Sjecišta se može mijenjati od postupka do postupka te je manje stabilna mjera od gradijenta. Stoga se gradijent analizira češće od sjecišta.

## Glavni prozor

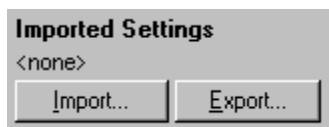
U glavnom prozoru prikazuju se grafikoni s amplifikacijskim krivuljama na logaritamskoj skali.

Kliknete li na mogućnost **Linear Scale** (Linearna skala) na dnu prozora, logaritamska skala mijenja se u linearnu, i obrnuto. Promjenom između tih dviju skala mijenja se samo prikaz grafikona, a ne mijenjaju se izračuni. To se može potvrditi uporabom alata za pokazivanje klikom desnom tipkom na grafikon i odabirom mogućnosti **Show pinpointer** (Pokaži pokazivač). Pri uporabi logaritamske skale na grafikonu su vidljivije manje vrijednosti, dok linearna skala olakšava prikaz cijele reakcije.

**Napomena:** grafikoni s amplifikacijskom krivuljom ažuriraju se u stvarnom vremenu jer uređaj Rotor-Gene Q MDx aktivno prikuplja podatke tijekom postupka. Takvo praćenje podataka u stvarnom vremenu omogućuje korisniku da vidi rezultate čim krivulje pokažu eksponencijalni rast. Mogu se izvesti preliminarni zaključci i mogu se donijeti odluke za sljedeći postupak.

## Predlošci za kvantifikacijsku analizu

Predlošci za kvantifikacijsku analizu omogućuju korisniku izvoz postavki normalizacije i praga u jednu datoteku formata \*.qut. Datoteka se može uvesti i ponovno upotrijebiti u drugim eksperimentima. Više pojedinosti potražite u odjeljku 7.1.



### 6.6.3 Dvije standardne krivulje

Analiza relativne ekspresije gena u kojoj se upotrebljava normalizirajući gen može se izvoditi primjenom metode dviju standardnih krivulja.

Metoda zahtijeva standardnu krivulju za svaki gen. Koncentracija svakog gena kvantificira se u skladu s njegovom standardnom krivuljom. Ekspresija gena od interesa potom se normalizira normalizirajućim genom (često konstitutivni gen).

Važno je točno označiti standarde i uzorke replika tijekom postavljanja uzoraka (pogledajte odjeljak „Postavljanje uzorka”). Posebno je važno da odgovarajući uzorci obavezno imaju isti naziv u svakoj analizi. U višestrukoj reakciji, u kojoj su položaji epruvete gena od interesa i normalizirajućega gena jednaki, dovoljan je jedan skup definicija uzorka. Ako izvodite relativnu analizu s normalizirajućim genom koristeći se jednim kanalom (tj. reakcije se odvijaju u zasebnim epruvetama primjenom istog fluorofora), potrebno je izraditi dvije stranice uzoraka. Na prvoj treba označiti položaje epruveta s nazivima uzorka za gene od interesa, a ostale položaje ne treba imenovati. Na drugoj treba označiti položaje upotrijebljene za normalizirajući gen. Softver će tada upariti uzorke između dvije analize na temelju njihovih naziva.

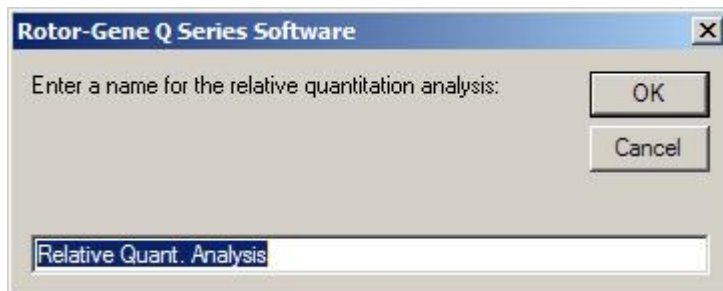
### Analiza ekspresije primjenom metode dviju standardnih krivulja

Podaci se najprije mogu analizirati za svaki gen s pomoću kvantifikacijske analize. U suprotnome će rezultati za svaki gen biti automatski određeni primjenom alata **Autofind Threshold** (Automatski pronađi prag).

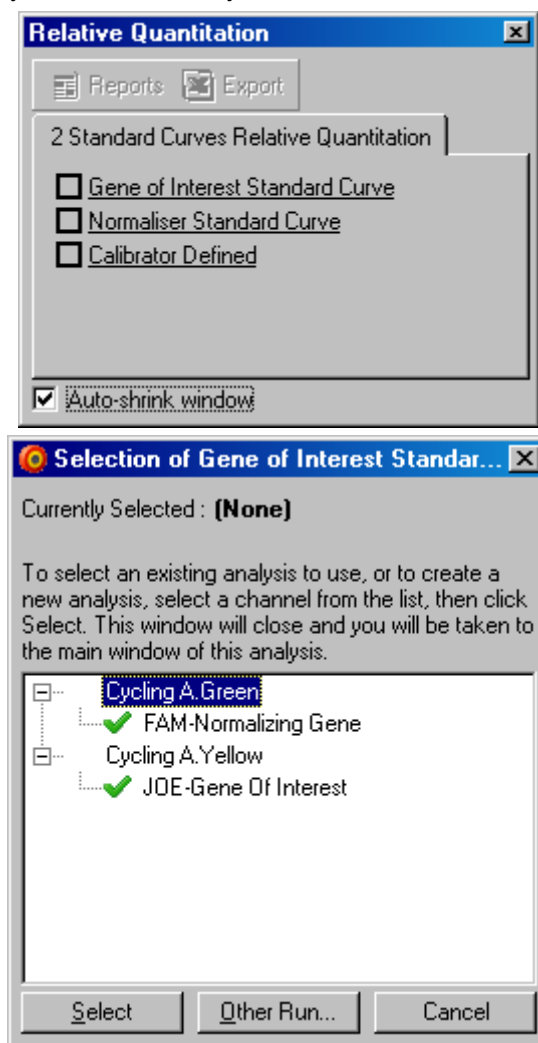
1. U prozoru **Analysis** (Analiza) odaberite karticu **2 Std Curve (Rel.)** (2 stand. krivulje (Rel.)). Kliknite **New Analysis...** (Nova analiza...).



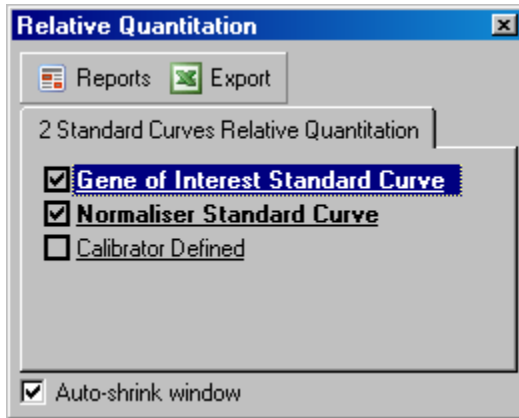
2. Unesite naziv analize.



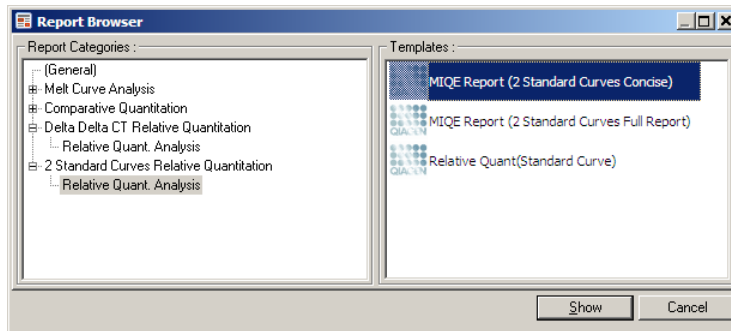
3. Odredite stranice koje se upotrebljavaju za analizu normalizirajućega gena i za analizu gena od interesa. Na primjer, ako kliknete **Gene of Interest Standard Curve** (Standardna krivulja gena od interesa), otvara se prozor **Selection of Gene of Interest Standard...** (Odabir standarda gena od interesa...). Odaberite stranicu na kojoj je gen od interesa kvantificiran. Ponovite postupak za normalizirajući gen. Ako želite, možete definirati kalibrator. Ako je odabrana ova mogućnost, kalibratoru se dodjeljuje vrijednost od 1, a koncentracije svih ostalih uzoraka izračunavaju se u odnosu na taj uzorak.



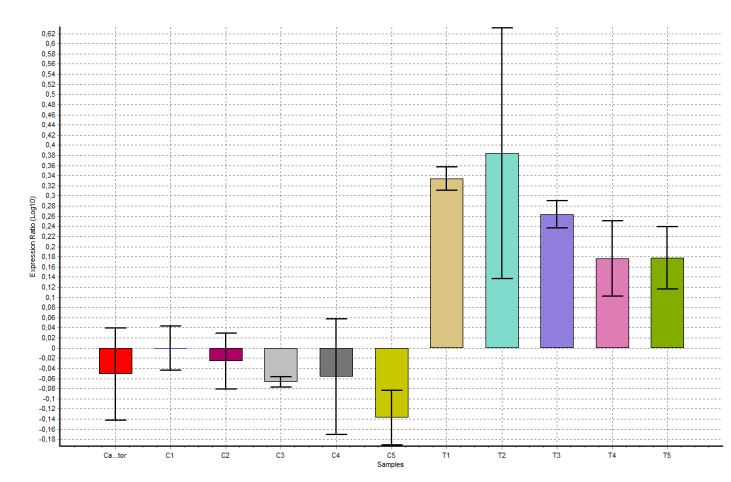
Nakon dovršetka odabira mogućnosti će biti označene kvačicom kako je prikazano u nastavku.

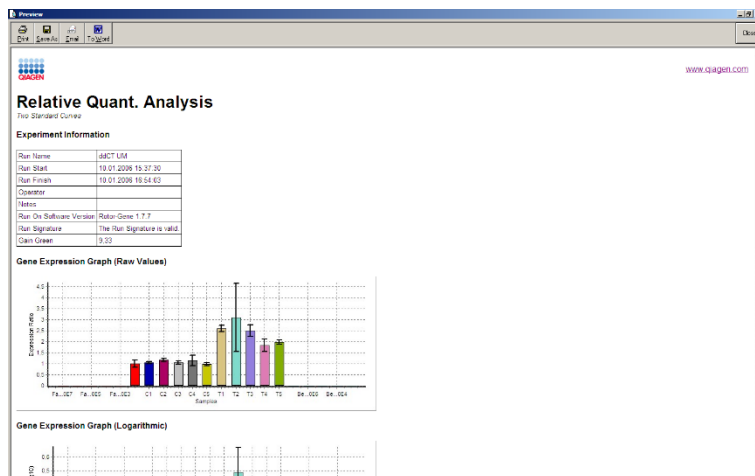


4. Kliknite gumb **Reports** (Izvešća) da bi se prikazao **Report Browser** (Preglednik izvješća). S popisa odaberite analizu s točnim nazivom. Kliknite gumb **Show** (Pokaži) da bi se prikazalo izvješće relativne kvantifikacije. Mogućnost **Export** (Izvoz) izvozi rezultate u novu proračunsku tablicu programa Excel. Ako je uključen kalibrator, rezultati se izračunavaju u odnosu na uzorak kalibratora kojemu se dodjeljuje vrijednost 1.



5. Prikazuju se koncentracije očitane sa standardnih krivulja za gen od interesa (GOI Conc.) i normalizirajući gen (Norm. Conc.), kao i relativna koncentracija (Relative Conc.). Rezultati se mogu spremiti kao datoteka programa Word.





6. Vrijednosti Rel Min i Rel Max generiraju se izračunom standardne devijacije kvocijenta od standardnih devijacija GOI-ja i normalizatora primjenom sljedeće formule:

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

pri čemu je:

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

#### 6.6.4 Delta delta C<sub>T</sub> relativna kvantifikacija

Metoda delta delta CT omogućuje analizu relativne ekspresije gena. Opisali su je Livak i Schmittgen (2001).\*

Ta metoda ne zahtijeva uključivanje standardnih krivulja u svaki postupak. Svaki se uzorak najprije normalizira prema količini predloška dodanog u usporedbi s normalizirajućim genom. Te normalizirane vrijednosti dodatno se normaliziraju ovisno o obradi kalibratora. Na primjer, kalibrator može biti divljeg tipa, neobrađena kontrola ili uzorci u nultom vremenu.

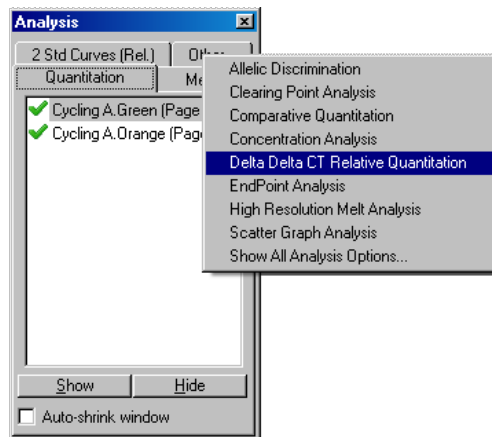
Ključno je da učinkovitosti amplifikacije gena od interesa i normalizirajućega gena budu identične i da se to potvrdi u skladu sa smjernicama koje su dali Livak i Schmittgen.

Ključno je da se nazivi uzoraka točno definiraju u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) te da isti uzorci budu identično označeni u svakoj složenoj kvantifikacijskoj analizi.

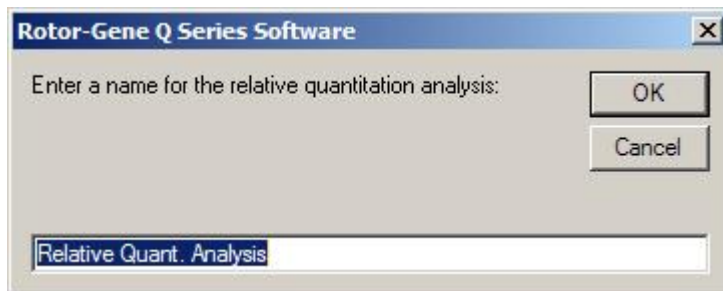
\* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001.) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> method. *Methods* 25, 402.

1. Analizirajte podatke s pomočju postavke „Quantitation“ (Kvantifikacija). Nije potrebno pokretati standardnu krivulju nakon što je izvršena provjera.

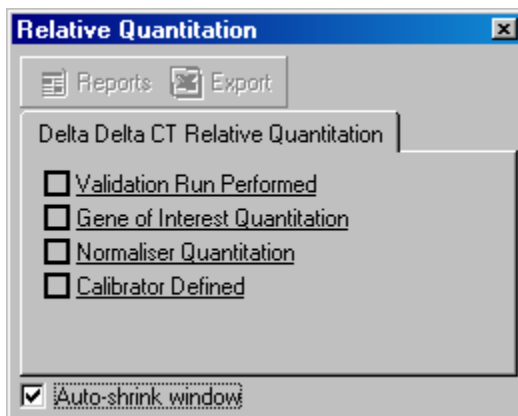
Iz kartice **Other** (Ostalo) u prozoru **Analysis** (Analiza) odaberite **Delta Delta CT Relative Quantitation** (Delta delta CT relativna kvantifikacija). Odaberite **New Analysis** (Nova analiza).

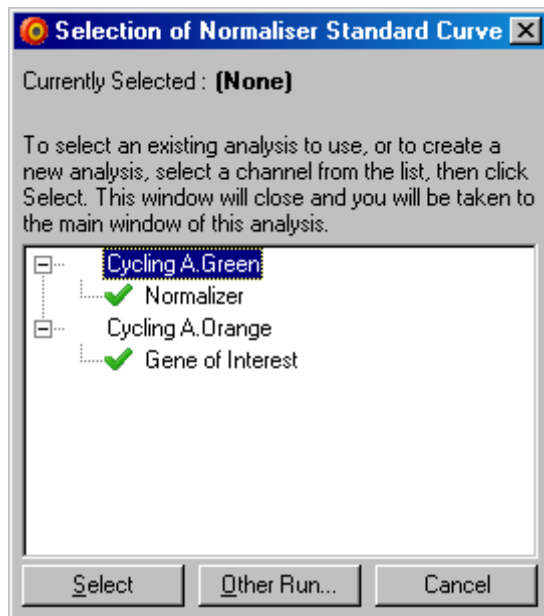


2. Unesite naziv analize.

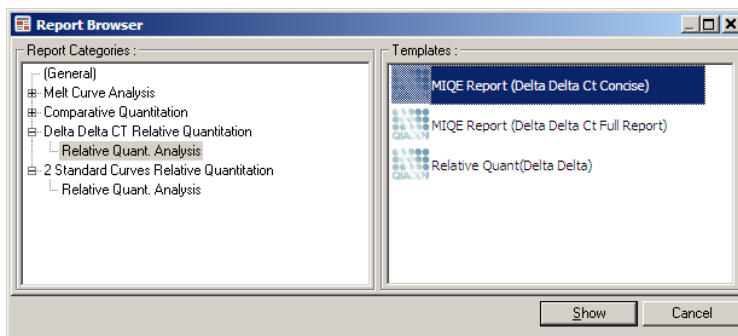


3. Da biste nastavili s analizom, mora biti označena mogućnost **Validation Run Performed** (Izveden postupak provjere). Definirajte stranice na kojima su analizirani gen od interesa i normalizirajući gen.





4. Kliknite gumb **Reports** (Izvjješća) da bi se prikazao **Report Browser** (Preglednik izvješća). S popisa odaberite analizu s točnim nazivom. Kliknite gumb **Show** (Pokaži) da bi se prikazalo izvješće relativne kvantifikacije. Mogućnost **Export** (Izvoz) izvozi rezultate u novu proračunsku tablicu programa Excel. Ako je uključen kalibrator, rezultati su razmjerni uzorku kalibratora koji ima vrijednost 1.



U nastavku je prikazan primjer rezultata dobivenih ovom analizom. Prikazuju se vrijednosti  $C_T$  za gen od interesa (GOI  $C_T$ ), vrijednosti  $C_T$  za normalizirajući gen (Norm.  $C_T$ ), Delta  $C_T$ , Delta Delta  $C_T$  i relativna koncentracija (Relative Conc.). Ekspresija je razmjerna uzorku kalibratora kojemu je dodijeljena relativna ekspresija 1.

Dodatne informacije o derivaciji izračuna Rel Min i Rel Max potražite kod autora Litvak and Schmittgen (2001).\*

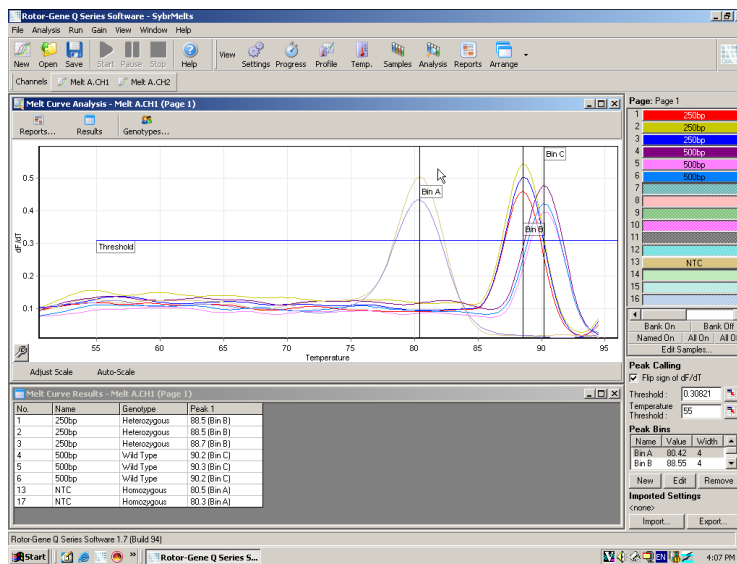
\* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001.) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. Methods 25, 402.

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	
	Q5 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	
	Q54	32.67	28.29	4.38	-0.43	1.34925	1.09820	1.65770	
	Q53	30.07	27.98	2.09	-2.73	6.61982	6.18888	7.08076	
	Q52	26.88	27.64	-0.76	-5.57	47.61474	45.02202	50.35677	
	Q51	24.07	27.10	-3.03	-7.85	230.60440	208.45384	255.10870	

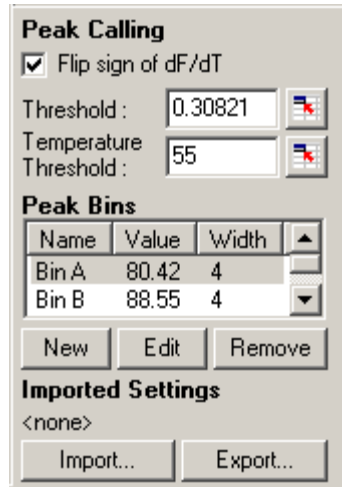
### 6.6.5 Analiza krivulje taljenja

Analizom krivulje taljenja analizira se derivat neobrađenih podataka nakon izgladivanja. Ova se analiza obično upotrebljava za genotipizaciju i alelnu diskriminaciju. Vršne vrijednosti krivulje grupiraju se u intervale i sve se vršne vrijednosti ispod praga odbacuju. Intervali se tada mogu mapirati u genotipove s pomoću naredbe „Genotypes” (Genotipovi).

Nakon dovršetka postupka za neka se kemijska sredstva može dodati korak taljenja da bi se vizualizirala kinetika disocijacije amplificiranih produkata. Temperatura se linearno povećava i bilježi se fluorescencija svakog uzorka. U nastavku je prikazana analiza uobičajene krivulje taljenja.







**Flip sign of dF/dT**  
(Okreni znak dF/dT):

Prije definiranja vršnih vrijednosti provjerite je li znak dF/dT točan za skupinu podataka koja daje pozitivne vršne vrijednosti.

Definiranje vršnih vrijednosti:

U analizi krivulje taljenja vršne se vrijednosti mogu definirati i o njima se može izvjestiti primjenom različitih metoda. Jedna je metoda automatsko pozivanje svih vršnih vrijednosti za svaki uzorak. Druga je metoda dodjeljivanje vršnih vrijednosti intervalima, što je korisno za genotipizaciju.

Intervali definiraju područje na kojem se očekuje da će pojaviti vršne vrijednosti. Softver za analizu krivulje taljenja grupira vršne vrijednosti u skupine intervala na temelju stvarnih vršnih vrijednosti krivulje. Intervali se po potrebi mogu uređivati.


Svaka vršna vrijednost koja je unutar definiranog raspona intervala bit će dodijeljena tom intervalu. Ako su dva intervala blizu jedan drugome, tada će se vršna vrijednost dodijeliti najbližem intervalu.

**Napomena:** intervali ne bi smjeli biti vizualno postavljeni za procjenu vršnih položaja. Intervale postavite u približnom području od interesa, a potom upotrijebite vrijednosti koje su zaista prijavljene u tablici rezultata da biste dobili točniji rezultat.


**Peak Bins** (Vršni intervali):

Da biste definirali interval, kliknite gumb **New Bin** (Novi interval), a potom kliknite grafikon i držite ga da biste definirali središte intervala. Da biste dodali još jedan interval, ponovite postupak. Da biste izbrisali intervale, upotrijebite gumb **Remove** (Ukloni).

**Threshold** (Prag):

Da biste postavili prag (os y), kliknite ikonu , potom kliknite grafikon i držite ga te povucite liniju praga do željene razine.

**Temperature Threshold**  
(Temperaturni prag):

Da biste postavili temperaturni prag (os x), kliknite ikonu , potom kliknite grafikon i držite ga te povucite liniju praga udesno. Time se linija praga eliminira za niže temperature.

**Napomena:** to je korisno ako postoji šum u signalu pri niskim temperaturama.

## Izvešća

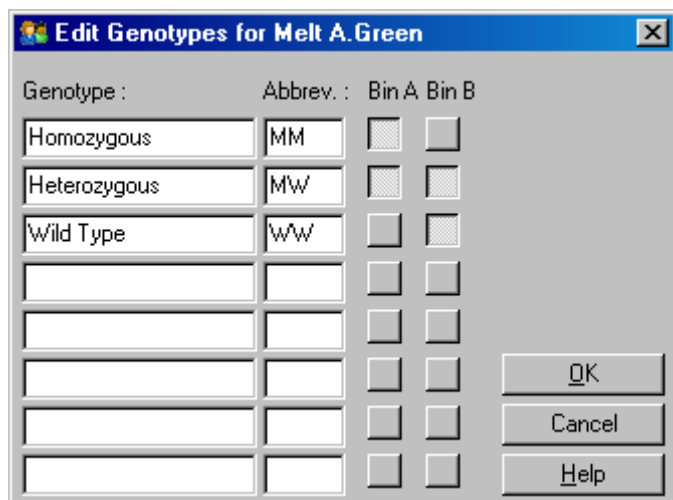
Otvora se **Report Browser** (Preglednik izvješća) u kojem možete izabrati izvješće koje želite pregledati. Izvješće se može generirati na temelju trenutno odabranog kanala ili se može generirati izvješće višekanalne genotipizacije.

## Rezultati

Prikazuje se prozor **Melt Curve Results** (Rezultati krivulje taljenja) u kojem se prikazuju vršne vrijednosti uzorka.

## Genotipovi

Kliknite **Genotypes...** (Genotipovi...) i odaberite genotipove kako je prikazano u nastavku.

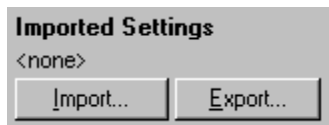


Ovaj prozor omogućuje dodjeljivanje genotipova incidenciji vršnih vrijednosti u intervalima. Zadana konfiguracija genotipa prikazana je na snimci zaslona. Pritom heterozigotni uzorci imaju dvije vršne vrijednosti, homozigotni uzorci imaju vršnu vrijednost u prvom intervalu, a uzorci divljeg tipa u drugom intervalu. Kratica se može utipkati u polje pokraj naziva svakoga genotipa. Upotrebljava se pri ispisivanju izvješća o višekanalnoj genotipizaciji kako bi se svi rezultati iz više kanala mogli jednostavno očitati.

Za multipleksne analize genotipovi se moraju postaviti u svakom kanalu. Ako se, na primjer, provodi dvokanalna analiza prigušenog FRET-a, u kojoj se u svakom kanalu očekuju genotip divljeg tipa i heterozigotni genotip, za svaki kanal moraju biti postavljeni parametri intervala. Rezultati će se tada predstaviti u multipleksnom izvješću.

## Predlošci za analizu taljenja

Predlošci za analizu taljenja omogućuju korisniku da u jednu datoteku formata \*.met izveze postavke normalizacije, praga, genotipa i intervala. Datoteka se može uvesti i ponovno upotrijebiti u drugim eksperimentima. Više pojedinosti potražite u odjeljku 7.1.



### 6.6.6 Komparativna kvantifikacija

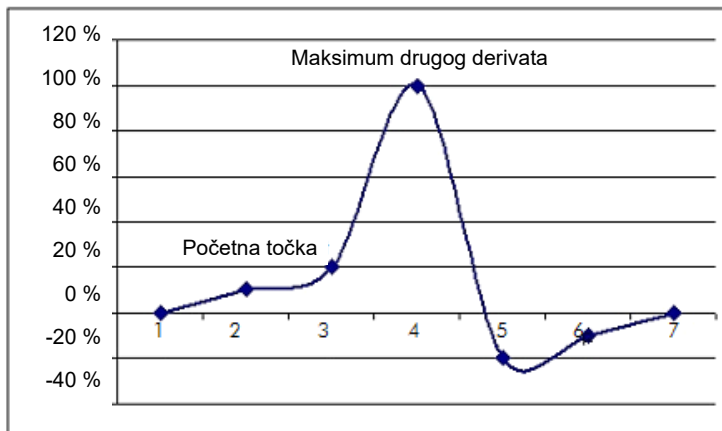
Komparativnom kvantifikacijom uspoređuje se relativna ekspresija uzoraka s kontrolnim uzorkom u postupku kad standardna krivulja nije dostupna. Često se upotrebljava u analizi oligonukleotidnih mikročipova. Warton i suradnici (2004.)\* pružili su primjer za ovu tehniku.

1. Da biste proveli analizu, odaberite **Other** (Ostalo) i potom **Comparative quantitation** (Komparativna kvantifikacija) u prozoru **Analysis** (Analiza). Dvaput kliknite kanal da biste ga analizirali.
2. Odaberite kontrolni uzorak koristeći se padajućim izbornikom s desne strane zaslona, ispod preklopnika.
3. Rezultati se automatski izračunavaju i prikazuju u prozoru **Comparative Quantitation Results** (Rezultati komparativne kvantifikacije) ispod grafikona.

U prvim stupcima prozora **Comparative Quantitation Results** (Rezultati komparativne kvantifikacije) prikazuju se broj i naziv uzorka. U stupcu **Takeoff** (Početna točka) navedena je početna točka uzorka. Drugi derivat grafikona s amplifikacijskom krivuljom proizvodi vršne vrijednosti koje odgovaraju maksimalnom povećanju stope fluorescencije u reakciji. Početna točka definira se kao ciklus u kojemu je drugi derivat na 20 % od maksimalne razine te ukazuje na završetak šuma i prijelaz na eksponencijalnu fazu.

Ovaj grafikon prikazuje drugi derivat grafikona s amplifikacijskom krivuljom prikazujući relativne položaje vršne vrijednosti drugog derivata i početne točke.

\* 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.



U stupcu „Amplification” (Amplifikacija) navodi se učinkovitost uzorka. Reakcija koja je 100-postotno učinkovita rezultirala bi amplifikacijskom vrijednošću 2 za svaki uzorak, što znači da se ampikon udvostručio u svakom ciklusu. U neobrađenim podacima signal bi se trebao udvostručavati u eksponencijalnoj fazi. Na primjer, ako je signal bio 50 fluorescentnih jedinica u ciklusu 12 i potom 51 fluorescentna jedinica u ciklusu 13, trebao bi se povećati na 53 fluorescentne jedinice u ciklusu 14. Sve se vrijednosti amplifikacije za svaki uzorak svode na prosječnu vrijednost da bi proizvele vrijednost amplifikacije prikazanu s desne strane zaslona, ispod preklopnika. Što je veća varijacija između procijenjenih vrijednosti amplifikacije svakog uzorka, to će interval pouzdanosti biti veći (naznačen je vrijednošću nakon znaka  $\pm$ ). Za velik broj uzoraka (N) interval pouzdanosti navodi vjerojatnost od 68,3 % da je prava amplifikacija uzoraka unutar tog raspona (1 standardna devijacija). Udvostručenjem intervala  $\pm$  postiže se interval pouzdanosti od 95,4 % za veliki N.

### Repliciranje kalibratora

Kao i u metodi delta delta  $C_T$  potreban je uzorak kalibratora, a mjerenja su razmjerna tom uzorku kalibratora. Repliciranja kalibratora mogu se analizirati jer će se, ako više položaja uzoraka ima isti naziv, upotrebljavati prosjek početnih točaka tih uzoraka. Da bi se ova značajka ispravno upotrebljavala, provjerite imaju li repliciranja identične nazive.



Za izračun ekspresije upotrebljava se prosječna amplifikacija. Na primjer, uzorku niske vrijednosti amplifikacije trebat će dulje da dostigne određen apsolutan broj kopija nego uzorku visoke vrijednosti amplifikacije. U stupcu „Rep. Conc.” (Konc. rep.) u prozoru **Comparative Quantitation Results** (Rezultati komparativne kvantifikacije) navodi se relativna koncentracija. Relativna koncentracija svakog uzorka u usporedbi s uzorkom kalibratora izračunava se na temelju početne točke i učinkovitosti reakcije. To se navodi u znanstvenoj bilješci.

**Napomena:** vrijednost prikazana pod **Average Amplification** (Prosječna amplifikacija) s desne strane znaka  $\pm$  predstavlja standardno odstupanje od prosječne amplifikacije nakon uklanjanja sumnjivih vrijednosti amplifikacije. Ako je ta vrijednost velika, može postojati velika greška u ukupno izračunanim vrijednostima koncentracije.

Relativne koncentracije izračunavaju se softverom na sljedeći način:

1. Početna točka svakog uzorka izračunava se uzimajući u obzir vršne vrijednosti drugog derivata.
2. Izračunava se prosječno povećanje u četiri ciklusa neobrađenih podataka nakon započinjanja. To je amplifikacijska vrijednost uzorka.
3. Sumnjive amplifikacije uklanjaju se na račun šuma u pozadinskoj fluorescenciji.
4. Preostale se amplifikacije svode na prosječnu vrijednost. To je prosječna amplifikacija.
5. Prosječna početna točka izračunava se za svako repliciranje kalibratora.
6. Relativna koncentracija za uzorak izračunava se kao Amplifikacija <sup>^</sup> (Početna točka kalibratora – Početna vrijednost uzorka).
7. Rezultat se prikazuje u znanstvenoj bilješci u stupcu „Rep. Conc.” (Konc. rep.) u prozoru **Comparative Quantitation Results** (Rezultati komparativne kvantifikacije).

### 6.6.7 Alelna diskriminacija

Alelna diskriminacija upotrebljava kinetičke podatke u stvarnom vremenu s dva ili više kanala da izradi genotip uzoraka. Da biste izveli ovu analizu, odaberite **Other** (Ostalo) i potom **Allelic Discrimination** (Alelna diskriminacija) u prozoru **Analysis** (Analiza). Pri izvođenju alelne diskriminacije nije dovoljno dvaput kliknuti na jedan kanal da bi se analiziralo jer se ova analiza izvodi istodobnom uporabom više kanala. Da biste izveli ovu analizu, morate ili pritisnuti i držati CTRL i kliknuti da biste označili svaki kanal koji želite analizirati ili morate povući pokazivač miša preko tih kanala. Nakon što označite željene kanale, kliknite **Show** (Pokaži). Popis će se ažurirati tako da na jednoj liniji prikazuje sve kanale, s kvačicom pored njih. To ukazuje na to da će se svi oni upotrebljavati u jednoj analizi. Da biste uklonili jedan od tih kanala ili više njih, kliknite desnom tipkom na analizu i odaberite **Remove Analysis...** (Ukloni analizu...). Ti se kanali tada mogu uključiti u drugu analizu alelne diskriminacije. Kanal se može istovremeno upotrebljavati samo u jednoj analizi.

<b>Reports</b> (Izvešća):	Otvora se izvješće „Allelic Discrimination Analysis” (Analiza alelne diskriminacije) za pregled.
<b>Results</b> (Rezultati):	Prikazuje se prozor <b>Allelic Discrimination Results</b> (Rezultati alelne diskriminacije). Ovaj prozor otvara se prema zadanim postavkama pri prvom prikazu analize.

Mogućnosti normalizacije:

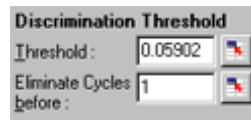
Dostupan je niz mogućnosti za optimizaciju normalizacije neobrađenih podataka:

- **Dynamic Tube** (Dinamička epruveta) (normalizacija dinamičke epruvete)
- **Slope Correct** (Ispravak nagiba) (ispravak nagiba šuma)
- **Ignore First x cycles** (Ignoriraj prvih x ciklusa) (ispravak šuma u početnim ciklusima)
- **Takeoff point adjustment (Prilagodba početne točke)**

Za dodatne pojedinosti pogledajte stranicu 93.

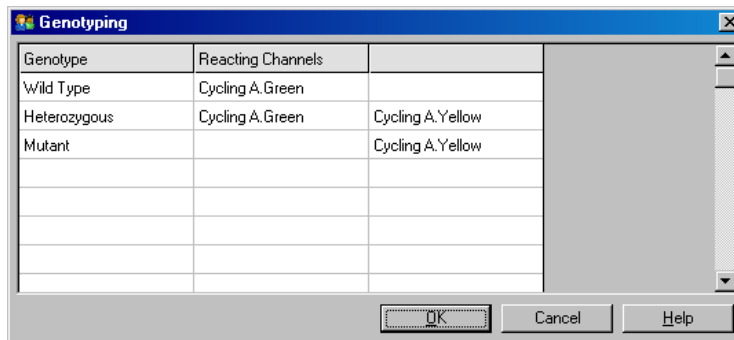
**Discrimination Threshold** (Prag diskriminacije):

Unesite vrijednosti u ove tekstne okvire da biste pozicionirali prag diskriminacije. Sve krivulje koje prelaze ovaj prag smatraju se genotipizacijskim uzorcima. Kliknite ikonu s desne strane svakog tekstnog okvira, a potom povucite prag na grafikonu da biste ove vrijednosti vizualno postavili.



Genotypes (Genotipovi): Otvora se prozor **Genotyping** (Genotipizacija) koji se upotrebljava za definiranje koji se genotip otkriva u kojem kanalu. Ovaj prozor omogućuje dodjelu genotipova kanalima za analizu alelnu diskriminaciju.

U primjeru u nastavku uzorak je heterozigotni ako očitavanja u kanalima Cycling A.Green i Cycling A.Yellow prelaze prag.



Predlošci za alelnu analizu:

Predlošci za alelnu analizu omogućuju izvoz postavki normalizacije, praga i genotipa u jednu datoteku \*.alt. Datoteka se može uvesti i ponovno upotrijebiti u drugim eksperimentima. Više pojedinosti potražite u odjeljku 7.1.



### 6.6.8 Analiza grafikona raspršenosti

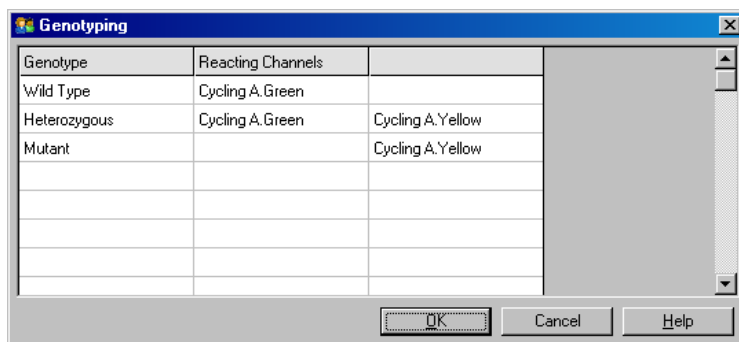
Analiza grafikona raspršenosti omogućuje genotipizaciju na temelju relativne ekspresije grafikona s amplifikacijskom krivuljom među dvama kanalima. Za razliku od alelnu diskriminacije, genotip se utvrđuje na temelju regija definiranih iz grafikona raspršenosti umjesto na temelju jednog praga. Da biste izveli ovu analizu, odaberite **Other** (Ostalo) i potom **Scatter Graph Analysis** (Analiza grafikona raspršenosti) u prozoru **Analysis** (Analiza).

Pri izvođenju analize grafikona raspršenosti, nije dovoljno dvaput kliknuti na jedan kanal za analizu jer se ova analiza provodi istodobnom uporabom dvaju kanala. Da biste izveli ovu analizu, morate ili pritisnuti i držati SHIFT i kliknuti da biste označili kanale za analizu ili morate povući pokazivač miša preko tih kanala. Nakon što označite željene kanale, kliknite **Show** (Pokaži).

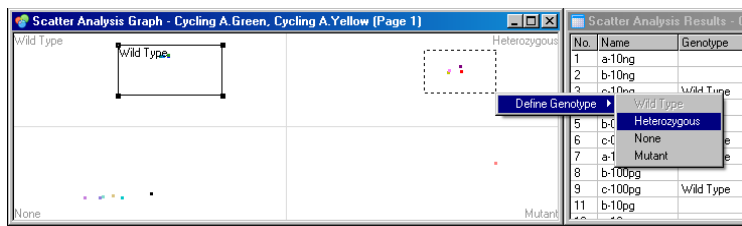
Popis će se ažurirati tako da na jednoj liniji prikazuje sve kanale, s kvačicom pored njih. To ukazuje na to da će se svi oni upotrebljavati u jednoj analizi. Da biste uklonili jedan od tih kanala ili više njih, kliknite desnom tipkom na analizu i odaberite **Remove Analysis...** (Ukloni analizu...). Ti se kanali tada mogu uključiti u drugu analizu grafikona raspršenosti. Kanal se može istovremeno upotrebljavati samo u jednoj analizi.

- Reports (Izvešća): Otvara se izvješće **Scatter Analysis** (Analiza raspršenosti) za pregled.
- Results (Rezultati): Prikazuje se prozor Scatter Analysis Results (Rezultati analize raspršenosti). Ovaj prozor otvara se prema zadanim postavkama pri prvom prikazu analize.
- Mogućnosti normalizacije: Dostupan je niz mogućnosti za optimizaciju normalizacije neobrađenih podataka:
- **Dynamic Tube** (Dinamička epruveta) (normalizacija dinamičke epruvete)
  - **Slope Correct** (Ispravak nagiba) (ispravak nagiba šuma)
  - **Ignore First x cycles** (Ignoriraj prvih x ciklusa) (ispravak šuma u početnim ciklusima)
  - **Takeoff point adjustment (Prilagodba početne točke)**
- Za dodatne pojedinosti pogledajte stranicu 93.

Genotypes (Genotipovi): Otvara se prozor **Genotyping** (Genotipizacija) koji se upotrebljava za definiranje koji se genotip otkriva u kojem kanalu. U ovom se prozoru genotipovi mogu dodijeliti na temelju kanala u kojima uzorak reagira. Odabrani kanali upotrebljavat će se za označavanje kutova grafikona raspršenosti i usmjeravat će korisnika na opće područje grafikona raspršenosti u kojem se trebaju definirati regije.

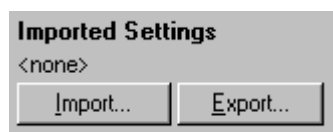


Scatter Graph (Grafikon raspršenosti): Grafikon raspršenosti prikazuje relativnu ekspresiju dvaju odabranih kanala. Prikaz se normalizira uzimajući u obzir različita povećanja u svakom kanalu i log koji je preoblikovan da naglasi razlike u ekspresiji između uzoraka. Da bi izveo genotipizaciju, korisnik definira regije tako da klikne odabir na grafikonu i povuče ga. Odabir se tada može označiti na temelju genotipova konfiguriranih u prozoru **Genotyping** (Genotipizacija).



Scatter graph analysis templates (Predložci za analizu grafikona raspršenosti):

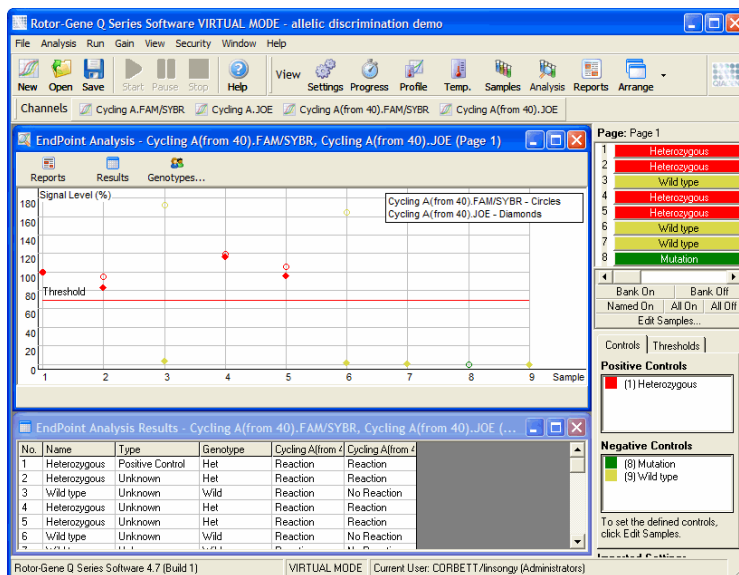
Predložci za analizu grafikona raspršenosti omogućuju izvoz genotipa i postavki regije u jednu datoteku formata \*.sct. Datoteka se može uvesti i ponovno upotrijebiti u drugim eksperimentima. Više pojedinosti potražite u odjeljku 7.1.



## 6.6.9 Analiza krajnje točke

Analiza krajnje točke omogućuje diskriminaciju između amplificiranih i neamplificiranih uzoraka na kraju postupka. Rezultati su kvalitativni (pozitivni/negativni), a ne kvantitativni.

Analiza krajnje točke prikazana je na snimci zaslona u nastavku.



Analiza krajnje točke slična je alelnoj diskriminaciji utoliko što su rezultati kvalitativni i što se nazivi mogu dodjeljivati određenim permutacijama reakcija nad različitim kanalima. Međutim, u analizi krajnje točke dostupno je samo jedno očitavanje, za razliku od alelne diskriminacije u kojoj se za svaki uzorak upotrebljavaju očitavanja po ciklusima. To znači da korisnik mora identificirati pozitivne



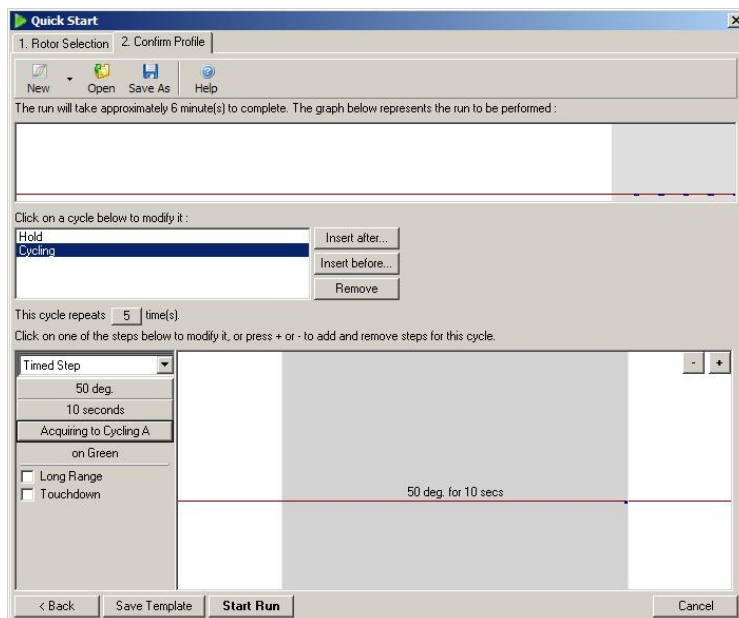
i negativne kontrole da bi olakšao analizu. Kad je riječ o neobrađenim podacima, razine signala normalizirane su u odnosu na poznate pozitivne i negativne kontrole za svaki kanal. Korisnik potom bira postotnu razinu signala kao prag.

## Pojmovi koji se upotrebljavaju u analizi krajnje točke

U nastavku su objašnjeni neki pojmovi koji se upotrebljavaju u analizi krajnje točke.

Positive control (Pozitivna kontrola):	Uzorak za koji se zna da se amplificira.
Negative control (Negativna kontrola):	Uzorak za koji se zna da se ne amplificira. Predstavlja uobičajeni pozadinski signal.
Threshold (Prag):	Prag je razina signala iznad koje se smatra da je uzorak pozitivan (amplificiran). Korisnik mora prilagođavati ovu postavku za svaki postupak.
Signal level (Razina signala):	Postotak fluorescentnog signala koji je normaliziran tako da najviši signal pozitivnih kontrola iznosi 100 %, a najniži signal negativnih kontrola iznosi 0 %.
Genotype (Genotip):	Tumačenje različitih permutacija reakcija na različitim kanalima. Na primjer, genotip „heterozigotno“ može se dodijeliti uzorcima koji su reagirali i u zelenom i u žutom kanalu. Genotip se također može upotrebljavati za izvješćivanje o rezultatima reakcija s internim kontrolama. Na primjer, rezultati se mogu prijaviti kao „inhibited“ (inhibirani), „positive“ (pozitivni) ili „negative“ (negativni), ovisno o tome je li u nekim kanalima uočena reakcija.

## Konfiguracija profila



Da biste izveli analizu krajnje točke, izvedite profil sa zadržavanjem od nekoliko minuta na 50 °C nakon kojeg slijedi ciklirajući korak s 1 korakom (50 °C tijekom 10 s) tijekom kojeg se prikuplja na potrebnom kanalu. Broj ponavljanja postavite na 5, kako je prethodno prikazano. Taj su vremena samo smjernica i mogu varirati za vašu određenu aplikaciju. Što je više ponavljanja u profilu, to je više dostupnih informacija za izvođenje analize. Analiza će automatski utvrditi prosjek svih očitavanja da bi se za svaki uzorak postigla jedna vrijednost. Ne postoji određeni broj potrebnih ponavljanja. Ako nije potrebna iznimno visoka razina točnosti, 5 ponavljanja je obično dovoljno.

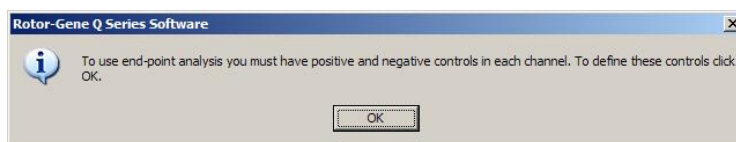
## Analiza

Analiza krajnje točke može se istovremeno provoditi na više kanala. Da biste izradili novu analizu, kliknite karticu **EndPoint** (Krajnja točka), odaberite kanale tako što ćete ih povući pokazivačem miša i potom kliknite **Show** (Pokaži).



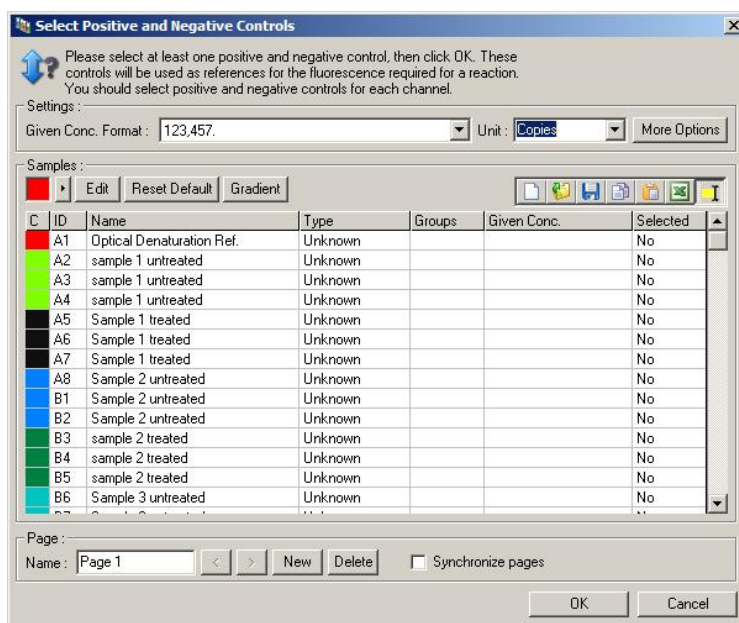
## Definiranje kontrola

Kad se analiza krajnje točke prvi put otvori, prikazivat će se sljedeća poruka ako nisu definirane pozitivna i negativna kontrola.



Kliknite **OK** (U redu). Pojavljuje se prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke) koji omogućuje definiranje pozitivnih i negativnih kontrola. Da biste uzorak definirali kao pozitivnu ili negativnu kontrolu, kliknite ćeliju vrste uzorka, a potom iz padajućeg izbornika odaberite relevantnu vrstu kontrole.

**Napomena:** da bi se provela analiza, kontrole moraju biti prebačene na „on” (uključene) s pomoću preklopnika s desne strane glavnog prozora.



Ovaj zaslon funkcionira jednako kao i prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke) (odjeljak „Postavljanje uzorka”).

## Normalizacija

Normalizacija podataka iz analize krajnje točke skalira sve razine signala u raspon 0 – 100 %. Mora se odabrati najmanje jedna pozitivna i jedna negativna kontrola ili više ako se analizira više kanala, a standardi nisu multipleksirani. Ako postoji rizik da se pozitivna kontrola možda neće amplificirati, potrebno je izvesti više od jedne pozitivne i jedne negativne kontrole.

1. Za svaki kanal analiziraju se sve pozitivne kontrole i ona s najvišom fluorescencijom postavlja se na 100 %. To znači da bi, ako se provode duplicirane kontrole, pozitivna kontrola mogla biti neuspješna, a da pritom ne utječe na postupak.
2. Analiziraju se sve negativne kontrole i ona s najnižom razinom fluorescencije postavlja se na 0 %.
3. Neobrađene vrijednosti fluorescencije preostalih uzoraka skaliraju se ovisno o najvišoj pozitivnoj kontroli i najnižoj negativnoj kontroli.

Na primjer:

Uzorak	Vrsta	Fluorescencija
1	Pozitivna kontrola	53,6
2	Pozitivna kontrola	53,0
3	Negativna kontrola	4,5
4	Negativna kontrola	4,3
5	Uzorak	48,1
6	Uzorak	6,4

Ovaj postupak bio je uspješan jer su vrijednosti dviju pozitivnih i dviju negativnih kontrola blizu te su izvan vrijednosti fluorescencije uzoraka.

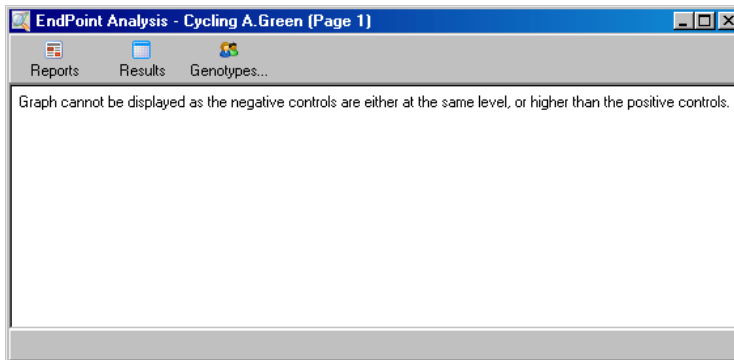
Normalizirane vrijednosti jesu:

Uzorak	Vrsta	Ekspresija (%)
1	Pozitivna kontrola	100,0
2	Pozitivna kontrola	97,3
3	Negativna kontrola	0,4
4	Negativna kontrola	0,0
5	Uzorak	84,2
6	Uzorak	4,0

Uzorak 1 bio je pozitivna kontrola s najvišom fluorescencijom, stoga je postavljen na 100 %. Druga pozitivna kontrola bila je neznatno niža. Uzorak 4, najniža negativna kontrola, bila je postavljena na 0 %. Sada je jasno da je uzorak 5 najvjerojatnije amplificiran, dok uzorak 6 vjerojatno nije amplificiran.

**Napomena:** ovisno o odabranim pozitivnim i negativnim kontrolama, moguće je postići razine ekspresije veće od 100 % ili manje od 0 %. Rezultat veći od 100 % može se tumačiti kao da znači da je uzorak jače ekspimiran od pozitivnih kontrola. Rezultat manji od 0 % može se tumačiti kao da znači da je manje vjerojatno da je uzorak amplificiran nego da su negativne kontrole amplificirane. Budući da je analiza kvalitativna, takvi rezultati nisu zabrinjavajući.

Ako negativne kontrole rezultiraju višom fluorescencijom od pozitivnih kontrola, uzorci su neispravno postavljeni i pojavljuje se sljedeća poruka.



### Normalizacija na više kanala

Podaci o signalu mogu se analizirati na više kanala, ali je postavljanje uzorka složenije. Analiza krajnje točke pretpostavlja da je provedeno multipleksiranje i da svaka epruveta može imati samo jedan položaj. Trenutačno nije moguće analizirati postavu u kojoj je položaj uzorka pozitivna kontrola za jedan kanal i negativna kontrola za drugi.

Iako se u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) navodi definicija samo jednog uzorka po epruveti, normalizacija se neovisno odvija za svaki kanal.

Ako je položaj epruvete pozitivna kontrola za najmanje jedan kanal, treba biti označena kao pozitivna kontrola u stupcu „Type” (Vrsta) u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke). U suprotnome njezina vrsta treba biti **Sample** (Uzorak). To se primjenjuje i za negativne kontrole.

Na primjer, ako je uzorak pozitivna kontrola na zelenom kanalu, ali nije na žutom kanalu, uzorak se treba definirati kao pozitivna kontrola. Budući da se upotrebljava najviša pozitivna kontrola na svakom kanalu, ako se na žutom kanalu nalazi barem jedna pozitivna kontrola koja se amplificira, ignorira se definicija uzorka kao kontrole za zeleni kanal.

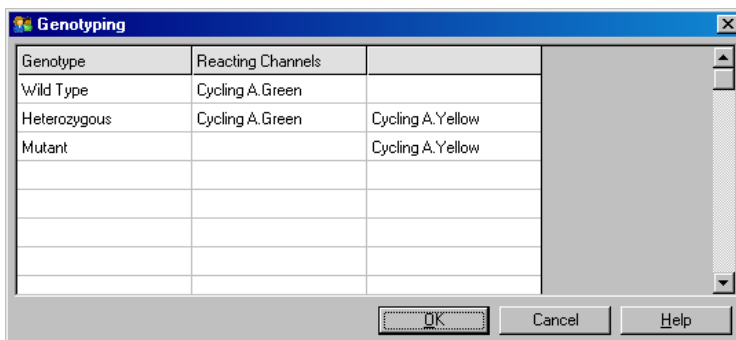
### Prag

Prag se upotrebljava za određivanje postotka ekspresije potrebnog za reakciju u svakom kanalu. Nakon što se definiraju pozitivne i negativne kontrole, svi kanali normalizirat će se na istu skalu 0 – 100 %. Stoga je potreban samo jedan prag, čak i kad se analizira više kanala.

Kliknite liniju praga i povucite je na područje između 0 i 100. Prag ne bi trebao biti preblizu uzorcima ni s jedne strane linije jer to ukazuje na to da u postupku nisu dobiveni uvjerljivi rezultati. Ako je razlika između uzorka koji se definira kao amplificirani ili neamplificirani samo nekoliko postotaka, to znači da bi se uzorak, ako se reakcija ponovi, mogao naći na drugoj strani praga.

## Genotipovi

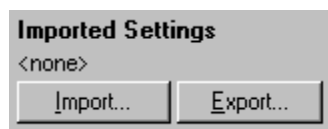
Ova mogućnost otvara prozor **Genotyping** (Genotipizacija) koji se upotrebljava za definiranje koji je genotip pronađen na svakom kanalu.



Ovaj prozor omogućuje dodjelu genotipova kanalima. U prethodnom primjeru uzorak je heterozigotan ako očitavanja na kanalima Cycling A.Green i Cycling A.Yellow prelaze prag.

## Predlošci za analizu krajnje točke

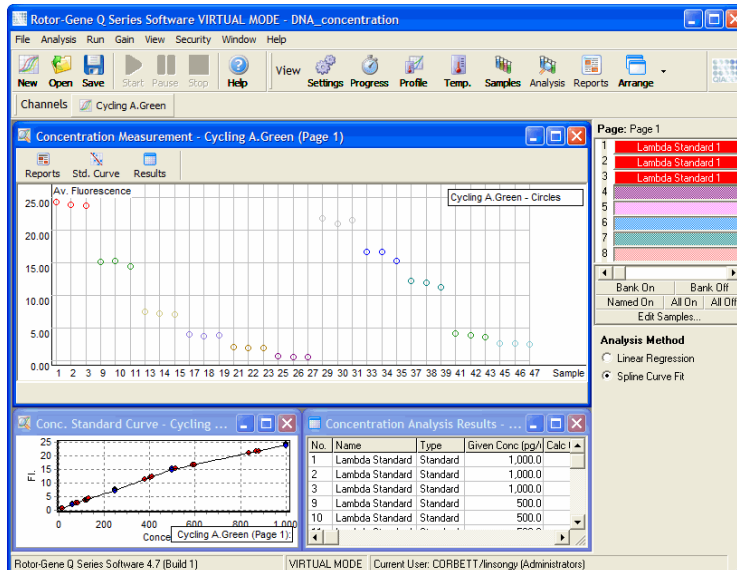
Predlošci za analizu krajnje točke omogućuju korisniku da postavke genotipa i praga izveze u jednu datoteku formata \*.ent. Datoteka se može uvesti i ponovno upotrijebiti u drugim eksperimentima. Više pojedinosti potražite u odjeljku 8.1.



### 6.6.10 Analiza koncentracije

Analiza koncentracije omogućuje da se instrument Rotor-Gene Q MDx upotrebljava za mjerenje koncentracija DNK ili za dobivanje očitavanja fluorometra.

Na snimci zaslona u nastavku prikazana je ova analiza.



## Priprema procesa

Da bi se izvela analiza koncentracije, najprije pripremite fluorescentne standarde i uzorke, idealno u triplikatu.

## Priprema standarda

Standardna krivulja upotrebljava se za određivanje koncentracije DNK u svakom mjenom uzorku.

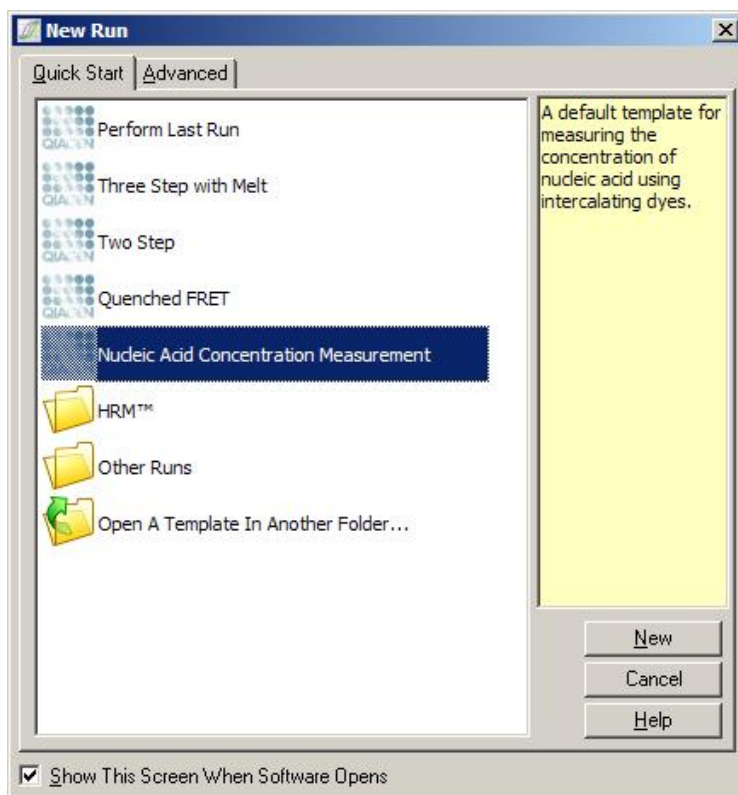
DNK koji se upotrebljava za standardnu krivulju trebao bi biti DNK slične vrste kao u uzorcima koji se mjere. Koncentracija najmanje jednog uzorka DNK trebala bi se odrediti primjenom ultraljubičaste spektrofotometrije i taj bi se uzorak trebao upotrebljavati kao standardni. Treba upotrijebiti najmanje tri standarda (s replikama). Važno je da DNK standardi koji se upotrebljavaju u detekciji fluorescencije budu linearni samo u rasponu 1 – 100 ng/μl. Ako se u tom rasponu koncentracija DNK prepolovi, prepolovit će se i očitavanje fluorescencije. Intervali pouzdanosti za svaku koncentraciju izvan tog raspona vrlo su široki zbog nelinearnosti kemijskog sredstva.

## Vrsta mjenog DNK

Uočene su razlike u mjerjenju različitih oblika DNK (npr. genomski DNK u usporedbi s plazmidnim DNK). Stoga se samo slične vrste DNK trebaju skupa mjeriti te je pri mjerjenju genomskog DNK potrebno izbjeći uporabu plazmidnog DNK kao standarda.

## Postavljanje postupka

Da biste postavili postupak, odaberite **Nucleic Acid Concentration Measurement** (Mjerenje koncentracije nukleinske kiseline) u čarobnjaku Quick Start (Brzi početak rada).



**Napomena:** pobrinite se da pozitivna kontrola, kao što je standard visoke koncentracije, bude postavljena na položaj epruvete 1. Bez pozitivne kontrole softver neće moći optimizirati postavke pojačanja za maksimalnu osjetljivost. Bit ćete upozoreni na to prije svakog postupka.

## Analiza

Analiza koncentracije funkcionira tako da razinu fluorescencije povezuje s vrijednošću koncentracije. Dostupna su dva modela analize. Odabir optimalne analize ovisi o kemijskim sredstvima i primjeni.

Metodom „Linear Regression” (Linearna regresija) analiziraju se podaci tako da se pretpostavi linearni odnos i da se nepoznate vrijednosti procijene na temelju generiranog linearnog modela. Ona utvrđuje pogrešku mjerenja ispitivanjem odstupanja očitavanja od linearnog modela. Ako su očitavanja koncentracije linearna, ovo je najprikladnija analiza jer korisniku pruža statističku analizu varijacije (ANOVA).

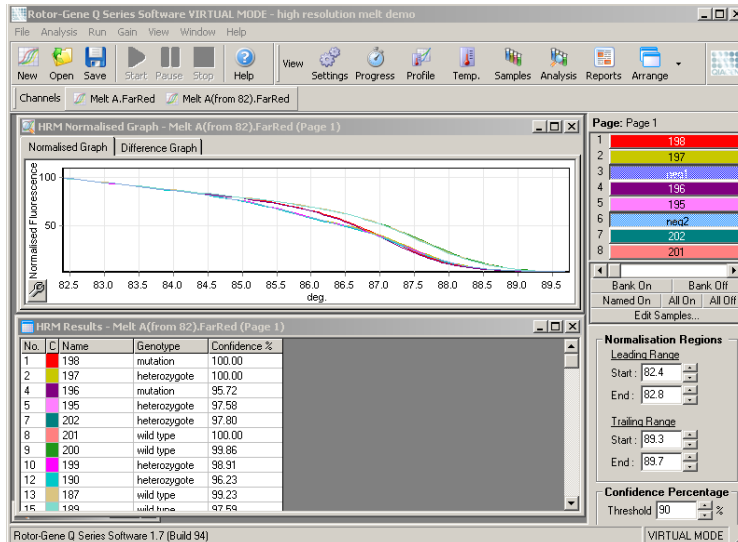


Metoda „Spline Curve Fit“ (Prilagođavanje splajn krivulje) pretpostavlja samo da se vrijednosti koncentracije povećavaju zajedno s fluorescencijom. Iako su procjene nelinearnih podataka u ovom pristupu mnogo točnije, on ne može pružiti ANOVA-u jer ne preuzima linearni model.

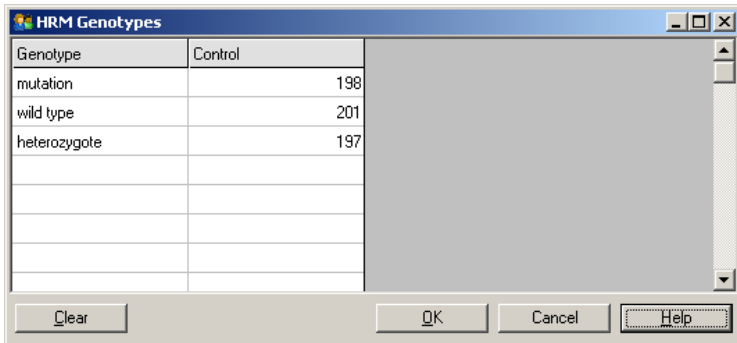
### 6.6.11 Analiza taljenja velike razlučivosti

Analizom taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) karakteriziraju se uzorci na temelju duljine sekvence, sadržaja GC-a i komplementarnosti. Analiza taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) upotrebljava se u primjenama za genotipizaciju kao što su analiza mutacija gena ili polimorfizmi jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP) te u epigenetičkim primjenama za analizu statusa metilacije DNK. Analiza taljenja velike razlučivosti pruža točne rezultate i uštede na troškovima proba i oznaka u usporedbi s ostalim metodama.

Da biste izveli analizu, odaberite **Other** (Ostalo) i potom **High Resolution Melt Analysis** (Analiza taljenja velike razlučivosti) u prozoru **Analysis** (Analiza). Dvaput kliknite kanal da biste ga analizirali. Krivulje taljenja iz neobrađenog kanala normaliziraju se određivanjem prosječne vrijednosti svih početnih i završnih vrijednosti fluorescencije te potom prisilnim pomakom krajnjih točaka svakog uzorka da bi bile jednake prosjeku.



Automatsko pozivanje uzoraka postiže se klikom na mogućnost **Genotypes** (Genotipovi). Unesite naziv genotipa, a potom broj uzorka koji se upotrebljava kao pozitivna kontrola da bi se automatski pozivali nepoznati uzorci.



Više pojedinosti o analizi taljenja velike razlučivosti potražite u odjeljku 10.

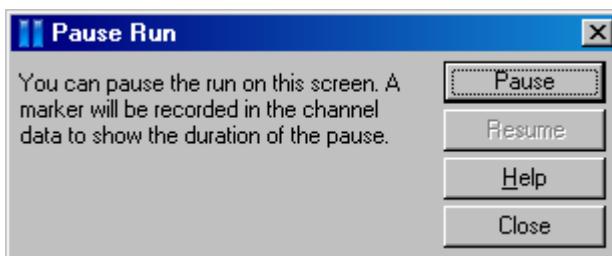
## 6.7 Izbornik postupka


### 6.7.1 Pokreni postupak

Ova mogućnost pokreće definirani temperaturni profil s trenutačnim postavkama pojačanja. Prije nego što postupak započne, pojavljuje se prozor **Profile Run Confirmation** (Potvrda pokretanja profila). Grafički prikaz temperaturnog profila prikazuje se uz postavke pojačanja za svaki kanal.

### 6.7.2 Pauziraj postupak

Ova mogućnost omogućuje pauziranje i ponovno pokretanje postupka. Pauziranje i ponovno pokretanje mogu ozbiljno utjecati na rezultate postupka. Stoga će marker u podacima upućivati na to da je postupak pauziran te na trajanje pauze. Poruka se pojavljuje i u kartici poruka prozora **Run Settings** (Postavke postupka) (pogledajte odjeljak 6.8.1).



<p><b>UPOZORENJE</b></p> 	<p><b>Vruća površina</b></p> <p>Kad pauzirate postupak, instrument Rotor-Gene Q MDx neće se u potpunosti ohladiti na sobnu temperaturu. Poduzmite mjere opreza prije rukovanja rotorom ili bilo kakvim epruvetama u instrumentu.</p>
--	--

### 6.7.3 Zaustavi postupak

Ako je odabrana ova mogućnost, pojavit će se upozorenje u kojem će se tražiti potvrda da se postupak treba zaustaviti.

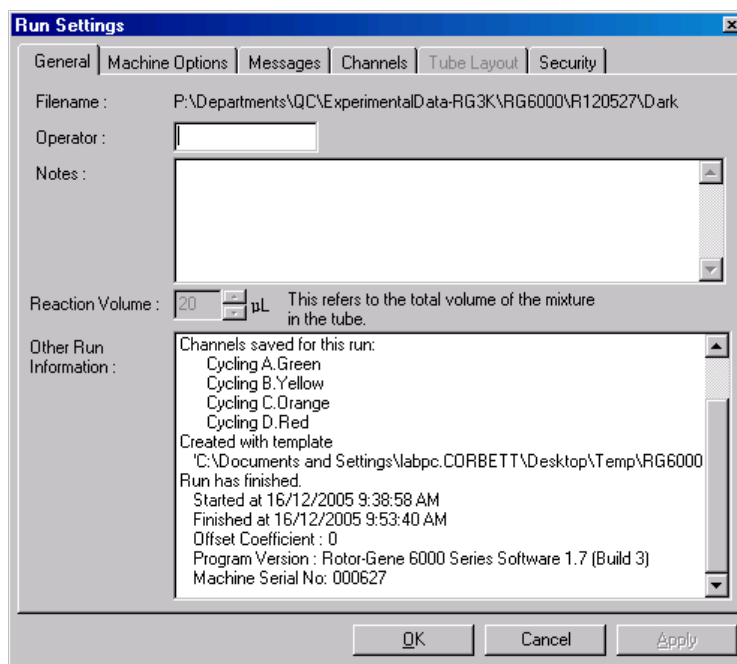
## 6.8 Izbornik prikaza

### 6.8.1 Postavke postupka

#### Općenito

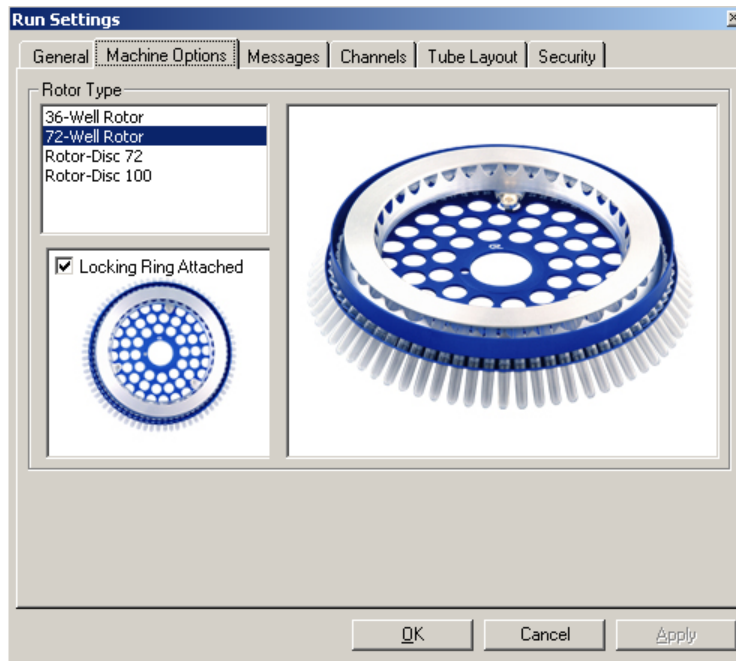
Ovaj prozor omogućuje postavljanje informacija o postupku, naziva datoteke postupka, datuma analize, operatora i svih povezanih napomena.

Prozor sadržava sve informacije potrebne za konfiguriranje postupka, osim profila. Nakon završetka postupka u ovom se prozoru prikazuju sljedeće informacije: korišteni cikler, postavke pojačanja, broj kanala te vrijeme početka i završetka.



## Mogućnosti uređaja

U ovoj se kartici prikazuju postavke konfiguracije instrumenta Rotor-Gene Q MDx.



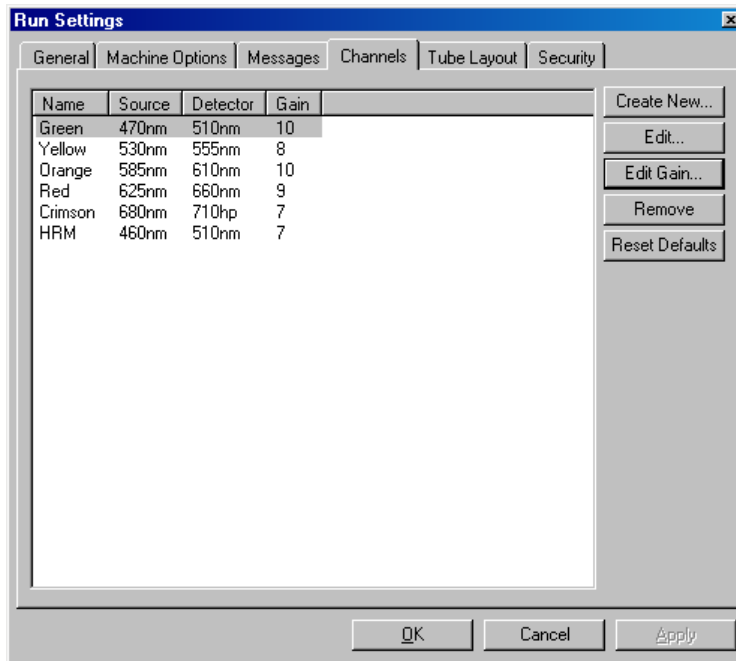
Rotor treba postaviti na onu koje je trenutno instalirana u instrumentu Rotor-Gene Q MDx. Ako otvarate postojeći postupak, ova će postavka odražavati rotor koji je u tom trenutku postavljen u cikler.

## Poruke

U ovoj kartici prikazuju se poruke koje ukazuju na to je li korisnik napravio promjene kao što su pauziranje ciklera ili preskakanje ciklusa tijekom postupka. Također se prikazuju upozorenja dobivena tijekom postupka. Ovu karticu treba provjeriti ako dobiveni rezultati nisu u skladu s očekivanjima.

## Kanali

Ako se konfigurira novi postupak, kartica o kanalima prikazuje trenutnu konfiguraciju dostupnih kanala. Ako se pregledava postojeći postupak, prikazane informacije predstavljaju konfiguraciju kanala u vrijeme izvođenja postupka. Ako postupak kvari postavke kanala, zadani kanali mogu se vratiti klikom na **Reset Defaults** (Ponovno postavi zadane postavke).



- Name (Naziv):** To je naziv kanala.
- Source (Izvor):** Specificira se ekscitacijska valna duljina LED izvora.
- Detector (Detektor):** Specificira se detekcijska valna duljina i vrsta filtra (nm = širina vala, hp = visina vala).
- Gain (Pojačanje):** Specificira se pojačanje za taj određeni kanal.
- Create New... (Izradi novi...):** Ova značajka omogućuje izradu novih kanala. Ako kliknete **Create New...** (Izradi novi...), otvara se prozor u kojem treba navesti novi naziv, izvor i filter detekcije. Filtri se mogu odabrati na padajućem izborniku pored svakog prozora.
- Channels (Kanali):** Zeleni, žuti, narančasti i crveni kanali standardne su konfiguracije za četverokanalnu multipleksnu detekciju.

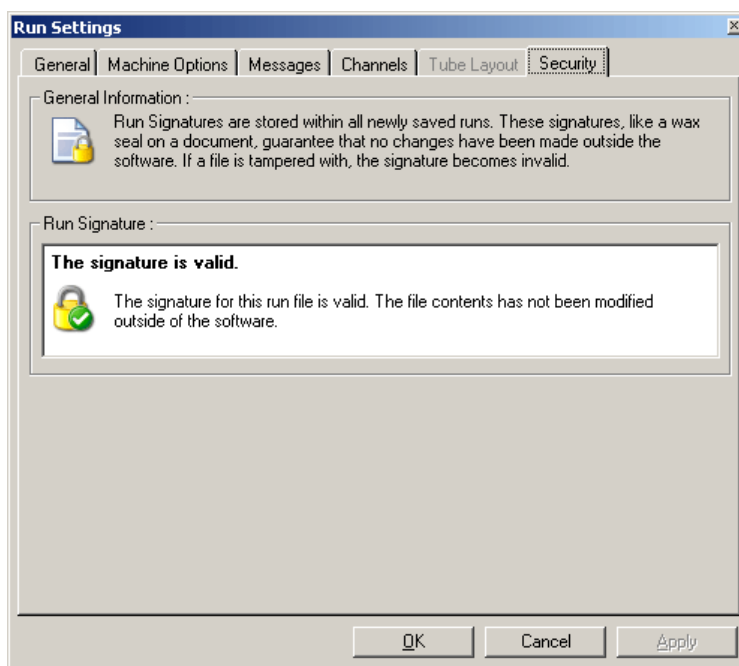
## Raspored epruveta

Ako upotrebljavate 72-Well Rotor, uzorci se mogu rasporediti tako da se blisko podudaraju s oznakom na bloku 9 x 8. Prema zadanim postavkama, kartica s rasporedom epruveta omogućuje njihovo uzastopno označavanje (tj. 1, 2, 3...). To znači da se uzorci označuju konsektivno, redosljedom kojim se stavljaju u Rotor-Gene Q MDx. Druga je mogućnost označavanje uzoraka kao 1A, 1B, 1C itd. Ta mogućnost može biti korisna ako su uzorci postavljeni multikanalnom pipetom.

## Sigurnost

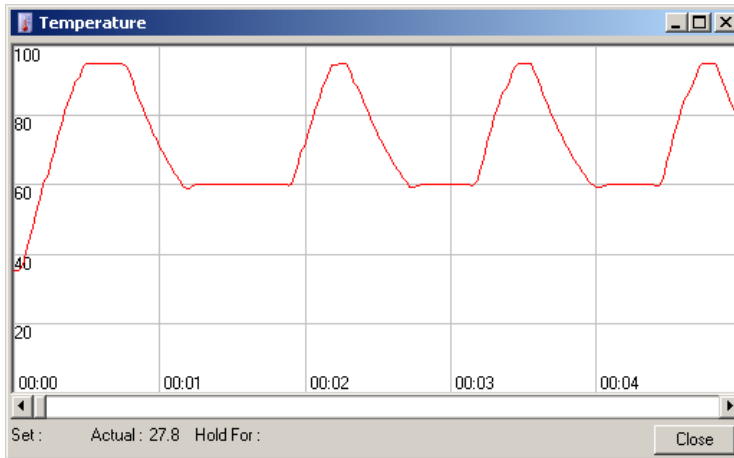
U kartici o sigurnosti prikazuju se informacije o potpisu postupka. Potpis postupka neponištiv je ključ koji se ponovno generira pri svakoj promjeni datoteke. Ako se bilo koji dio datoteke \*.rex izmijeni izvan softvera, potpis i datoteka više se neće podudarati. Provjera potpisa dopušta potvrdu da neobrađeni podaci nisu mijenjani izvan aplikacije, da se profil nije neovlašteno mijenjao te da je temperaturni grafikon valjan. Potpis također štiti od oštećenja kao što su pogreške u datotečnom sustavu.

**Napomena:** ako se datoteke u formatu \*.rex šalju e-poštom, proces šifriranja može poništiti valjanost potpisa. Da biste to izbjegli, komprimirajte datoteku prije slanja e-poštom.



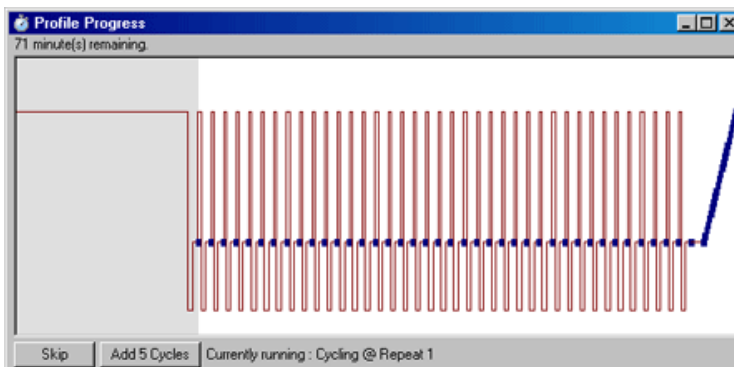
### 6.8.2 Temperaturni grafikon

Odaberite mogućnost **Temperature Graph** (Temperaturni grafikon) iz izbornika **View** (Prikaz) ili kliknite gumb **Temp.** da bi se otvorio prozor **Temperature** (Temperatura). Grafikon prikazuje tijek postavljenih vrijednosti temperature tijekom cikliranja. Ne odražava mjerenje temperature u stvarnom vremenu. Kako postupak napreduje, za svaki korak programa prikazuju se vremena **Set** (Postavljeno), **Actual** (Stvarno) i **Hold** (Zadržavanje). Za postojeću datoteku postupka prozor **Temperature** (Temperatura) pokazuje temperaturnu povijest tijekom postupka. Vertikalna skala predstavlja temperaturu, a horizontalna vrijeme. S pomoću klizača klizite prema natrag i prema naprijed kroz prozor **Temperature** (Temperatura).



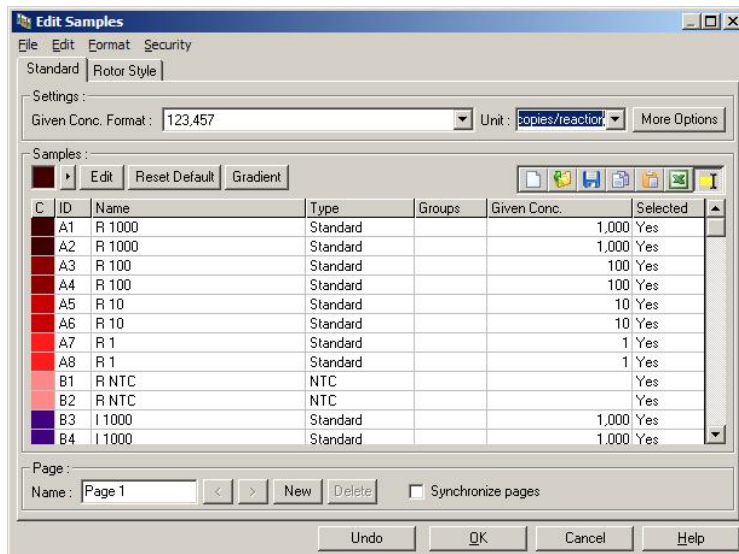
### 6.8.3 Napredak profila

Odaberite mogućnost **Profile Progress** (Napredak profila) iz izbornika **View** (Prikaz) ili kliknite gumb **Progress** (Napredak) da bi se otvorio prozor **Profile Progress** (Napredak profila). U prozoru je grafički prikazan toplinski profil povezan s postupkom. Kad se izvodi postupak, zasjenjeni dio prozora prikazuje broj ciklusa koji su dovršeni. Navedena je i procjena koliko će minuta trajati postupak.



- Skip** (Preskoči):                      Mogućnost **Skip** (Preskoči) omogućuje preskakanje bilo kojeg koraka profila.
- Add 5 Cycles** (Dodaj 5 ciklusa):      Mogućnost **Add 5 Cycles** (Dodaj 5 ciklusa) dodaje 5 ponavljanja trenutnom koraku cikliranja.

## 6.8.4 Uređivanje uzoraka



Kliknite gumb **Samples** (Uzorci) da bi se otvorio prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke). Prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) može se pristupiti i tako da se desnom tipkom klikne iznad popisa uzoraka s desne strane zaslona. Ovaj prozor ima identičnu funkciju kao i prozor **Edit Samples** (Uredi uzorke) u čarobnjacima, osim što su funkcije alatne trake dostupne i u izbornicima File (Datoteka) i Edit (Uredi).

Na vrhu prozora pojavljuju se četiri izbornika: **File** (Datoteka), **Edit** (Uredi), **Format** (Format) i **Security** (Sigurnost). Izbornik File (Datoteka) upotrebljava se za izradu novog (praznog) prozora **Edit Samples** (Uredi uzorke), za otvaranje postojećeg predloška uzorka ili za spremanje naziva uzorka kao predloška za buduću uporabu. Te datoteke predložaka imaju nastavak \*.smp. Izbornik **Edit** (Uredi) omogućuje kopiranje i lijepljenje redaka. Izbornik Security (Sigurnost) omogućuje zaključavanje definicija uzoraka.

**Napomena:** ako se nazivi uzoraka unose jako brzo tijekom postupka (npr. s pomoću čitača crtičnih kodova), to može rezultirati transponiranim slovima u nazivima uzoraka. Stoga se preporučuje izbjegavati uporabu čitača crtičnih kodova i, ako je to primjenjivo, unositi nazive uzoraka nakon što postupak završi.

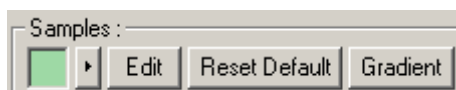




Ovaj padajući izbornik upotrebljava se za odabir primjerenog formata za prikaz koncentracije. Koncentracije se automatski formatiraju u skladu sa trenutno odabranom lokacijom.



Ovaj padajući izbornik postavlja jedinice mjerenja za ispitivanje.

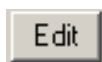


#### Gumb

#### Važnost

Line style (Stil linije):

Stil linije može se modificirati da se poboljša čitljivost grafova na crno-bijelim pisačima. Određene linije mogu se naglasiti modificiranjem njihova stila. Da biste pristupili ovoj značajki, kliknite gumb desne strelice pored gumba **Edit** (Uredi).



Pritiskom na „**Edit**“ (Uredi) otvara se selektor boja. Pri dodjeli boje epruvetama može se odabrati više redaka.



Kliknite mogućnost „**Reset Default**“ (Ponovno postavi zadane postavke) da biste sve odabrane ćelije u boji vratili na njihove zadane vrijednosti boja.



Značajka „**Gradient**“ (Grijent) omogućuje odabir gradijenta od prve do zadnje odabrane boje. Nekoliko gradijenata može se definirati pri postavljanju uzorka.



Ikona **New** (Novo) briše sadržaj prozora **Edit Samples** (Uredi uzorke) kao pripremu za unos podataka.



Ikona **Open** (Otvori) otvara dijaloški okvir u kojem se datoteka instrumenta Rotor-Gene Q MDx može odabrati za uvoz.

**Napomena:** broj uzoraka u otvorenom prozoru mora se podudarati s brojem uzoraka u datoteci koja se uvozi.



Ikona **Save** (Spremi) otvara dijaloški okvir u koji se mogu unijeti naziv i mapa u kojoj će biti spremljene definicija trenutnih uzoraka.



Ikona **Copy** (Kopiraj) kopira odabrane ćelije.



Ikona **Paste** (Zalijepi) lijepi ćelije odabrane naredbom kopiranja u trenutno odabran položaj u mreži.



Ikona **Excel** otvara dijaloški okvir koji traži naziv datoteke i mapu u koju treba spremiti informacije o uzorku. Nakon što pritisnete **Save** (Spremi), automatski se otvara Excel datoteka.



Ikona **Append/Overwrite** (Dodaj/Prebriši) mijenja uređenje ćelija u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke). Ako odaberete prebrisanje, postojeći će podaci biti prebrisani pri uređivanju. Ako odaberete dodavanje, novi podaci dodaju se na kraju postojećih podataka pri uređivanju.

Sample Types  
(Vrste uzoraka):

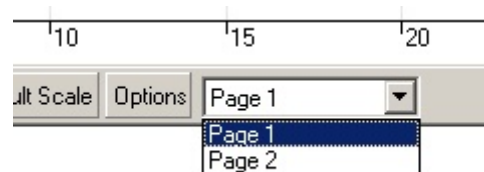
Uzorci se mogu definirati kao jedna od nekoliko vrsta navedenih u sljedećoj tablici.

Vrsta uzorka	Opis
None (Nema)	Na tom položaju nema uzorka
NTC (Kontrola bez predloška)	Kontrola bez predloška
Negative Control (Negativna kontrola)	Negativna kontrola
Positive Control (Pozitivna kontrola)	Pozitivna kontrola
Unknown (Nepoznat)	Nepoznat uzorak za analizu
Standard (Standardni)	Standardne vrijednosti upotrebljavaju se za izradu standardne krivulje za izračun nepoznatih koncentracija uzoraka
Calibrator (RQ) (Kalibrator (RQ))	Kalibratoru se dodjeljuje vrijednost 1, a sve ostale koncentracije uzoraka izračunavaju se prema tom uzorku

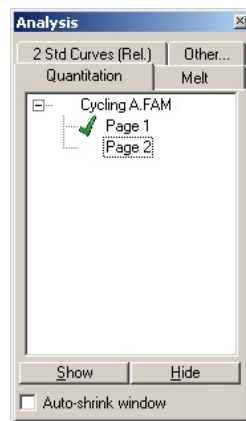
Page (Stranica):

Ova funkcija omogućuje korisniku da ima različite definicije uzorka i zasebne eksperimente u istom postupku. To je korisno za analizu različitih produkata u različitim kanalima. Gumbima sa strelicama pomičite se među stranicama uzoraka. Koristite se gumbima **New** (Novo) i **Delete** (Izbrisi) za izradu i brisanje stranica. Moguće su višestruke definicije uzorka za isti kanal da bi se pokretalo više standardnih krivulja bez multipleksiranja. Jednostavno definirajte uzorke od interesa i njihove povezane standardne krivulje na zasebnim stranicama. Tada se jedan kanal može zasebno analizirati sa svakim skupom definicija. Stranice uzoraka mogu se označiti kao **Page 1** (Stranica 1), **Page 2** (Stranica 2) itd. ili im možete dati bilo kakav naziv (npr. „Housekeeper“ (Konstitutivni)). Taj će se naziv upotrebljavati u izvješćima.

Kad se pregledavaju neobrađeni podaci, definicije uzoraka upotrijebljene za prikaz podataka mogu se odabrati iz padajućeg izbornika koji se nalazi uz gumb **Options** (Mogućnosti):



Stranica uzorka koju treba upotrijebiti pri analizi može se odabrati u prozoru **Analysis** (Analiza) (pogledajte odjeljak 6.6.1).



Given Conc. (Dana konc.):

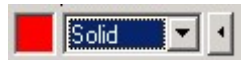
Pokazuje koncentraciju za svaki standard. Jedinice se mogu definirati kao decimalni ili logaritamski broj. Ako su standardi serija razrjeđivanja, treba unijeti samo prva dva standarda. Pritiskom na ENTER program automatski dodaje sljedeće logičko razrjeđivanje u seriju.

Line style (Stil linije):

Stil linije može se modificirati da se poboljša čitljivost grafova na crno-bijelim pisačima. Određene linije mogu se naglasiti modificiranjem njihova stila. Da biste pristupili ovoj značajki, kliknite gumb desne strelice pored gumba **Edit** (Uredi).



Na alatnoj traci prikazivat će se zadani stil **Solid** (Puno). On se može promijeniti u **Dashed** (Iskrtkano), **Dotted** (Istočkano), **Hairline** (Vrlo tanko), **Thin** (Tanko) ili **Thick** (Debelo). Kad završite, kliknite gumb lijeve strelice za povratak u prikaz Edit (Uredi), Reset Default (Ponovno vrati na zadano) i Gradient (Gradijent).



Multiple row entry (Unos u nekoliko redaka):

Ako istu informaciju treba istodobno unijeti u nekoliko redaka, odaberite sve retke i počnite tipkati. Informacije će se unositi u svaki redak. To funkcionira i za odabir vrsta uzoraka, odabir boja ili unos koncentracija.

Sample type hotkey (Tipkovni prečac za vrstu uzorka):

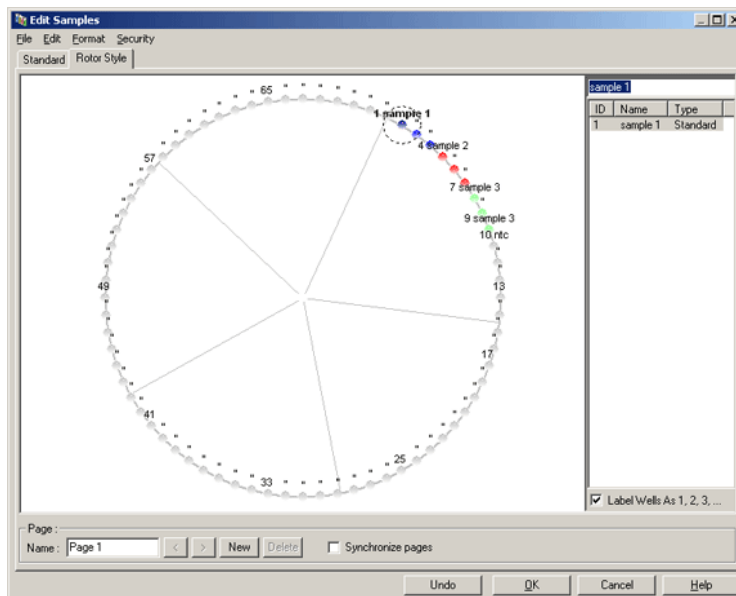
Da biste brzo odabrali vrstu uzorka, unesite prvo slovo njegova naziva. Na primjer, da biste postavili pet uzoraka da budu bez kontrole predložaka, odaberite ih u stupcu vrste uzorka, a potom pritisnite N za NTC. Svi uzorci prebacit će se u NTC.

Save it, reuse it (Spremi, ponovno upotrijebi):

Potpun opis uzorka može se spremiti kao datoteka uzorka (\*.smp) i učitati u buduće postavke s istom konfiguracijom uzoraka.

## Stil rotora

Ova kartica u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) nudi alternativni način unosa naziva uzoraka. Odaberite replike tako da kliknete i pokazivač miša povučete preko slike rotora. Ažurirat će se popis s desne strane prozora. Može se unijeti naziv uzorka i time će se postaviti isti naziv za trenutačni odabir. Softver te jažice prepoznaje kao replike.

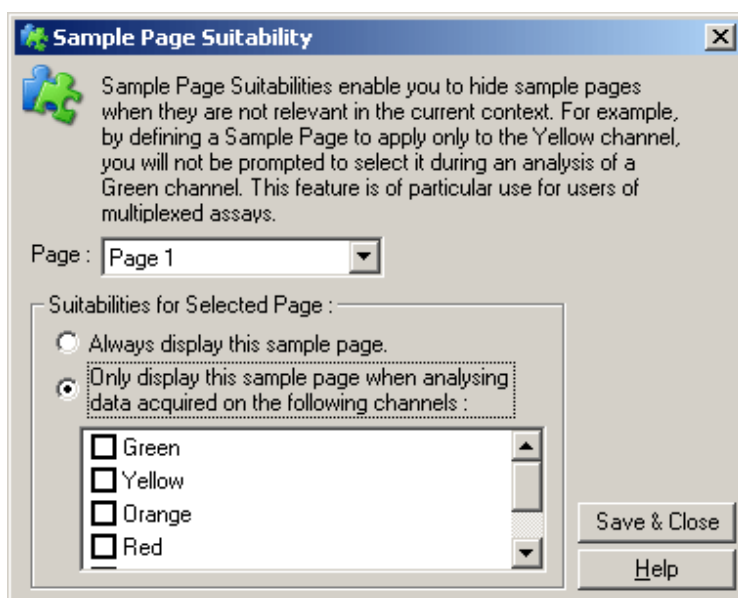


Kartica **Rotor Style** (Stil rotora) nudi manju verziju kartice **Standard** (Standard) i osmišljena je za korisnike koji žele brzo postaviti nazive i boje uzoraka. U ovoj se kartici neke postavke ne mogu definirati, na primjer, ne može se definirati predstavlja li uzorak standard ili poznatu koncentraciju svakog standarda. Ako se te postavke trebaju definirati, treba se upotrijebiti standardna kartica.

### Prikladnost stranice uzoraka

Da biste pristupili prozoru **Sample Page Suitability** (Prikladnost stranice uzoraka), kliknite mogućnost **More Options** (Više mogućnosti) u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke) i potom kliknite **Define Suitabilities** (Definiraj prikladnosti). Prozor **Sample Page Suitability** (Prikladnost stranice uzoraka) omogućuje korisnicima uparivanje stranica uzoraka s kanalima. Na primjer, stranica uzoraka za gen od interesa može se odnositi na zeleni kanal, a stranica uzoraka za konstitutivni gen može se odnositi na žuti kanal. U ovom primjeru postavljanje prikladnosti stranice uzoraka smanjuje broj dostupnih mogućnosti analize samo na one koje su relevantne za određeno ispitivanje.

Prozor **Sample Page Suitability** (Prikladnost stranice uzoraka) prikazan je u nastavku.

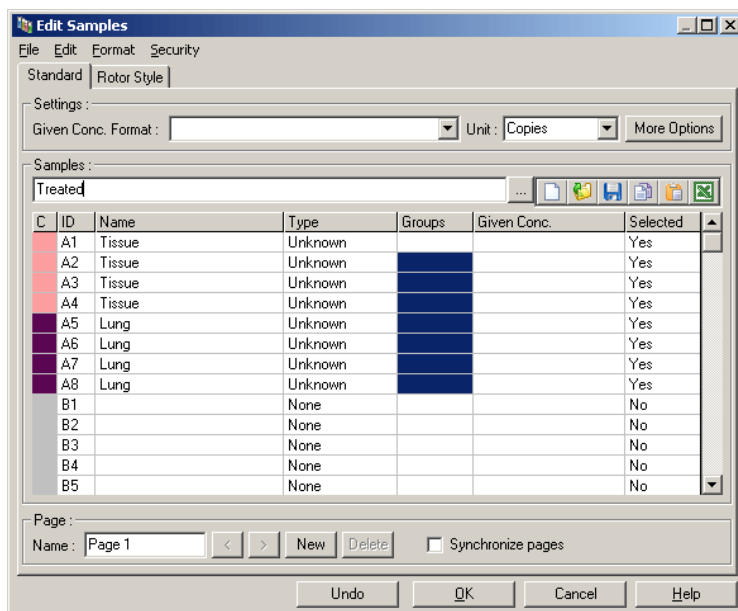


**Napomena:** pri postavljanju ispitivanja izradite sve stranice uzoraka i prikladnosti stranica uzoraka, a potom ih spremite kao predložak. To smanjuje opseg postavljanja koji je potreban za svaki postupak.

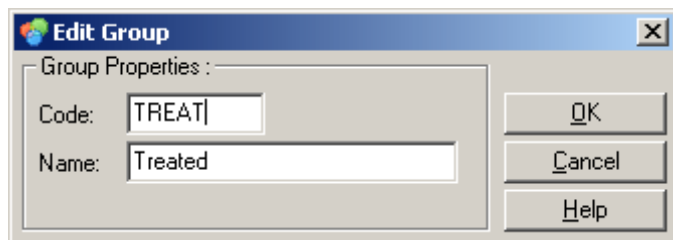
## Skupine

Skupine uzoraka omogućuju izračun statističkih podataka za proizvoljni skup uzoraka. Za razliku od replika, koje moraju imati identične nazive, uzorci mogu imati bilo koji naziv, mogu se pozicionirati bilo gdje u rotoru i mogu pripadati u više skupina.

1. Da biste definirali skupinu, unesite puni naziv skupine pored uzorka i potom pritisnite ENTER.



2. Otvara se prozor **Edit Group** (Uredi skupinu).

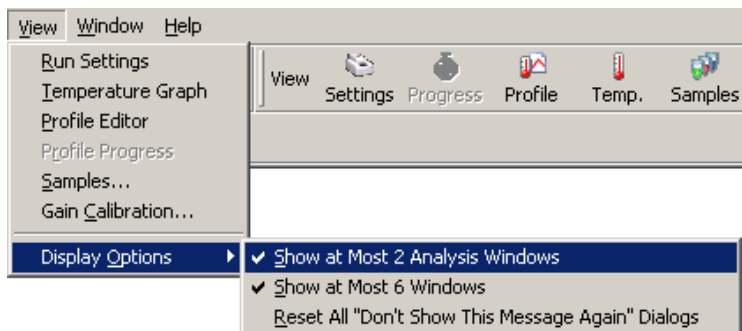


3. Definirajte primjerenu kraticu i potom kliknite **OK** (U redu). Kratica se sada može upotrebljavati za postavljanje skupina. Objedinjeni rezultati, kao što su prosječna vrijednost i intervali pouzdanosti od 95 %, automatski se izračunavaju za skupine u bilo kojoj analizi.

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 Mogućnosti prikaza

U nastavku je prikazan izbornik mogućnosti prikaza.



**Show at Most 2 Analysis Windows** (Pokaži najviše 2 prozora analize):

Ako je označena ova mogućnost, istodobno se prikazuju najviše dva prozora analize. Ako je otvoreno više prozora, to može utjecati na čitljivost. Označavanjem ove mogućnosti zatvara se prvi prozor analize i zamjenjuje ga se zadnjim otvorenim prozorom. Ako ova mogućnost nije označena, mogu se prikazivati više od dva prozora analize.

**Show at Most 6 Windows** (Pokaži najviše 6 prozora):

Da bi se poboljšala čitljivost, softver uklanja nekorisćene prozore kad se otvore novi prozori. Ova je mogućnost prema zadanim postavkama omogućena jer održava zaslon softvera Rotor-Gene Q praznim. Ako je potrebno istodobno vidjeti više od šest prozora, poništite odabir ove mogućnosti.

**Reset All „Don't Show This Message Again” Dialogs:** (Vrati na zadano sve dijaloške okvire „Nemoj više prikazivati ovu poruku”):

Ako je ovo odabrano, softver će ponovno prikazivati sve dijaloške okvire u kojima je označen potvrđni okvir **Do not display this message again** (Nemoj više prikazivati ovu poruku). To uključuje ponovni prikaz poruka o sumnjivim postavkama koje su prethodno možda postavljene tako da se više ne prikazuju. To može biti korisno za novog korisnika koji nije upoznat s instrumentom Rotor-Gene Q MDx ili softverom Rotor-Gene Q.

## 6.9 Zaštita pristupa za softver Rotor-Gene Q

**Napomena:** u ovom se poglavlju opisuje zaštita pristupa za softver Rotor-Gene Q. Informacije o relevantnom softveru Rotor-Gene AssayManager potražite u *Korisničkom priručniku za Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* ili u *Korisničkom priručniku za Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Softver Rotor-Gene Q ima značajke koje omogućuju njegov siguran rad. Kada je ispravno konfiguriran, softver Rotor-Gene Q može osigurati sljedeće:

- Pristup instrumentu Rotor-Gene Q MDx ili softveru za analizu ograničen je na korisničke skupine.
- Evidentiraju se izmjene u datotekama postupka.
- Otkrivaju se neovlaštene izmjene (potpisi).
- Evidentiraju se predlošci koji se upotrebljavaju za izvođenje postupaka.
- Nazivi uzoraka su zaštićeni.

## Integracija sa sustavom Windows Security

Da bi pružao visoku razinu odgovornosti, softver Rotor-Gene Q ne upravlja sigurnošću interno. Računima, skupinama i lozinkama upravlja s pomoću ugrađenog sigurnosnog modela sustava Windows (Windows Security). Integracija omogućuje da se ista lozinka koja omogućuje pristup mrežnim datotekama i programima upotrebljava za kontrolu pristupa softveru Rotor-Gene Q, što rezultira s manje administracije. Na primjer, u većim organizacijama mrežni administratori mogu jednostavno ukloniti pristup bivšim korisnicima zahvaljujući centraliziranom sigurnosnom modelu.

Stoga sigurno postavljanje softvera Rotor-Gene Q prvenstveno uključuje konfiguraciju sigurnosnih uloga sustava Windows u skladu s najboljom praksom.

### Preduvjeti

Da biste upotrebljavali sigurnosne značajke, morate raditi u sustavima Windows 10 ili Windows 7 Professional edition. Sigurnosne značajke ne mogu se upotrebljavati u sustavima Windows 10 ili Windows 7 Home edition jer izdanja Home nemaju model precizne kontrole pristupa koji upotrebljava softver. Softver se mora instalirati s mogućnošću **Force authentication through Windows domain** (Nametni provjeru autentičnosti putem domene sustava Windows).

**Napomena:** izbornik Security (Sigurnost) neće se pojaviti ako ste prijavljeni na domenu Linux Samba. Da biste upotrebljavali sigurnosne značajke, morate biti lokalno prijavljeni ili imati Windows poslužitelj.

#### 6.9.1 Konfiguracija za sustav Windows 7

U ovom se odjeljku opisuje kako postaviti sustav da bi softver Rotor-Gene Q radio sigurno.

Da biste upotrebljavali sigurnosne značajke, softver mora biti instaliran s mogućnošću **Force authentication through Windows domain** (Nametni provjeru autentičnosti putem domene sustava Windows). Tada se šalju upiti domeni sustava Windows o vašoj razini pristupa i vjerodajnicama, što je ključno za pružanje značajki povezanih s odgovornošću i sigurnošću.

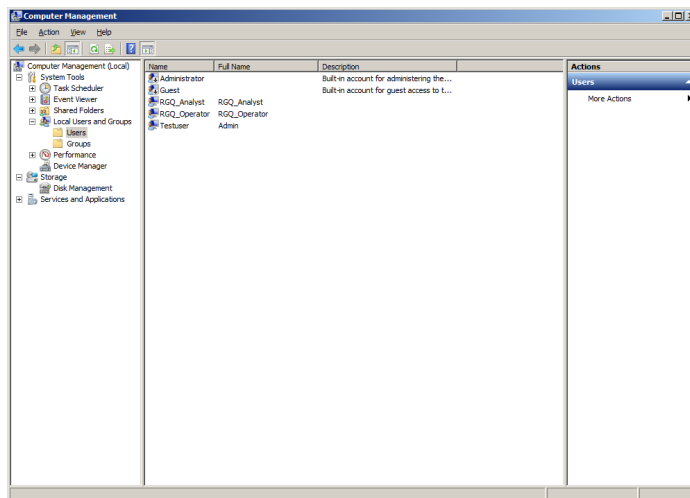
### Pokretanje u ulozi administratora

Brojni korisnici svoja računala pokreću kao administratori, bez lozinke. Iako je to praktično, onemogućuje utvrđivanje korisnika računala. Time se eliminira odgovornost i onemogućuje se aktivacija sigurnosnih mjera softvera Rotor-Gene Q. Kada računalo pokrećete kao administrator, omogućene su sve značajke softvera. Stoga pokretanje računala u ulozi administratora osigurava da korisnici kojima nisu potrebne sigurnosne značajke mogu pristupiti svim značajkama softvera.

## Izrada novog korisničkog računa

Izradite korisnički račun za svakog korisnika softvera. Za svakog korisnika ponovite korake u nastavku dok ne izradite sve račune.

1. Da biste izradili novog korisnika, odaberite **Start/Control Panel/Administrative Tools/Computer Management** (Start / Upravljačka ploča / Administrativni alati / Upravljanje računalom) te navigirajte do mogućnosti **Local Users and Groups** (Lokalni korisnici i skupine) na lijevoj strani.
2. U prozoru koji se otvori odaberite mapu **Users** (Korisnici). Desnom tipkom miša kliknite desni prozor i odaberite **New User** (Novi korisnik).



3. Unesite korisničko ime i lozinku. Prema zadanim postavkama izradit će se korisnik s uobičajenim ovlastima za pristup. To znači da takav korisnik može pokretati softver, ali ne može instalirati nove programe niti mijenjati postavke sustava.



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 5 dots)
- Confirm password: (masked with 5 dots)
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Help, Create, Close

4. Kliknite **Create** (Izradi). Sad se možete prijaviti kao ovaj korisnik.

### **Dodjela uloga svakom korisniku**

Sada trebate dodijeliti uloge svakom korisniku. Pristup se dijeli na sljedeća područja:

- Rotor-Gene Q Operator (Rukovatelj softverom Rotor-Gene Q) – može izvoditi postupke, ali ne može generirati izvješća ili izvoditi analize
- Rotor-Gene Q Analyst (Analitičar softvera Rotor-Gene Q) – može analizirati podatke postupka i generirati izvješća, ali ne može izvoditi nove postupke
- Rotor-Gene Q Operator and Analyst (Rukovatelj i analitičar softvera Rotor-Gene Q) – ima mogućnosti obiju uloga
- Administrator – može otključati nazive uzoraka te izvoditi sve radnje analitičara i rukovatelja
- None (Nijedno) – odbija se pristup softveru

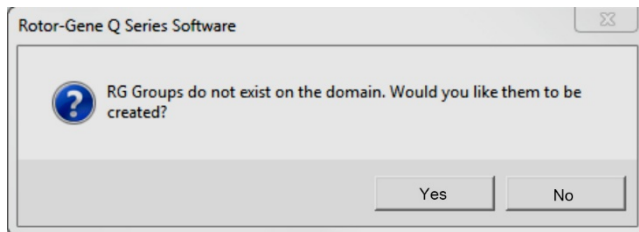
Da biste dodijelili uloge:

1. Prijavite se u sustav Windows kao administrator ili s pomoću ikone **Rotor-Gene Q Software Login** otvorite softver i prijavite se.

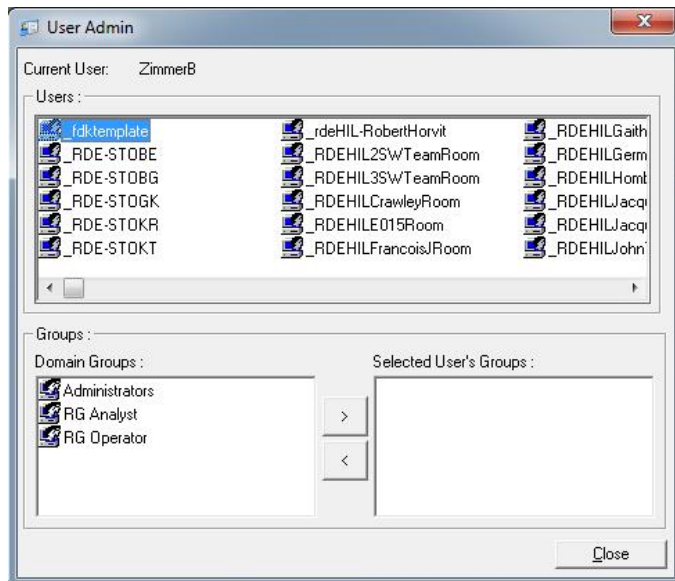


**Napomena:** da biste s pomoću softvera Rotor-Gene Q izradili RG Groups (RG skupine), potrebno je pokrenuti softver s administratorskim pravima. To možete učiniti tako da desnom tipkom miša kliknete na ikonu na radnoj površini i u kontekstnom izborniku odaberete mogućnost **Run as administrator** (Pokreni kao administrator).

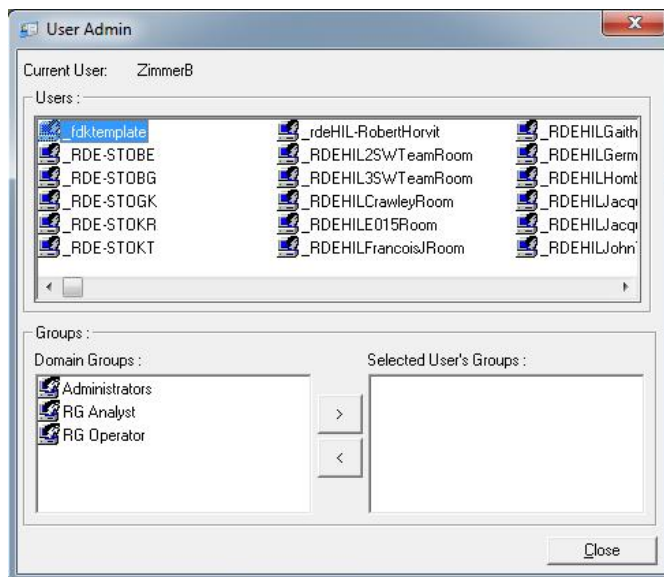
2. Kad se softver otvori, kliknite izbornik **Security** (Sigurnost). Pri prvom pristupanju izborniku **Security** (Sigurnost) softver Rotor-Gene Q konfigurira broj skupina sustava koje će kontrolirati pristup softveru.



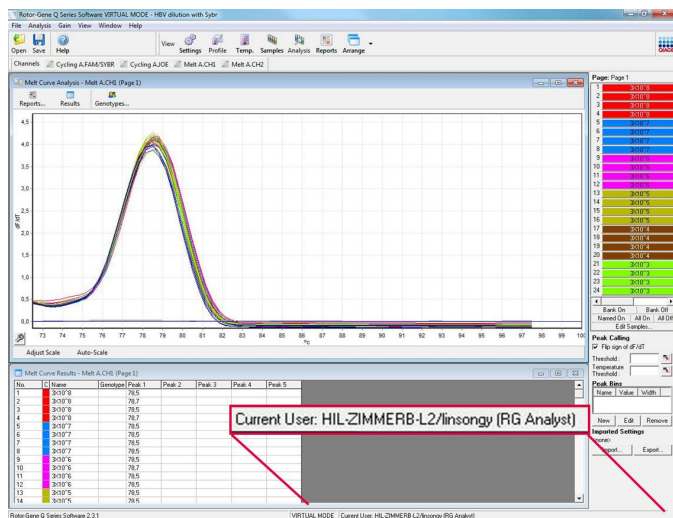
3. Kliknite **Yes** (Da). Otvara se prozor **User Admin** (Administrator korisnika). U gornjem okviru prikazuju se svi korisnici računala. Neke račune upotrebljava sustav te će biti nepoznati. U donjem oknu prikazuju se skupne dodijeljene korisniku.



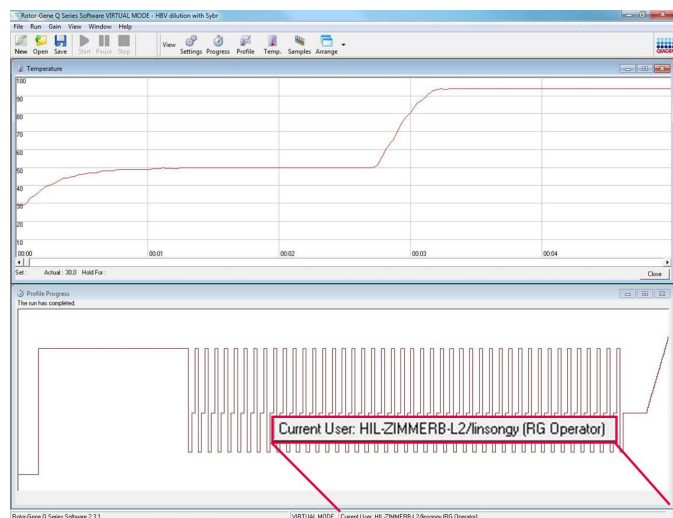
4. Da biste dodijelili skupinu korisniku, na popisu odaberite ime korisnika. Donji će se okvir ažurirati. Ako korisnik nema skupina, ne može pokrenuti softver.
5. U primjeru u nastavku korisnika **linsongy** dodijelit ćemo skupini RG Analyst (RG analitičar) tako što ćemo s lijeve strane odabrati skupinu i potom kliknuti gumb >. Skupine se mogu ukloniti tako da ih se odabere i da se potom klikne gumb <.



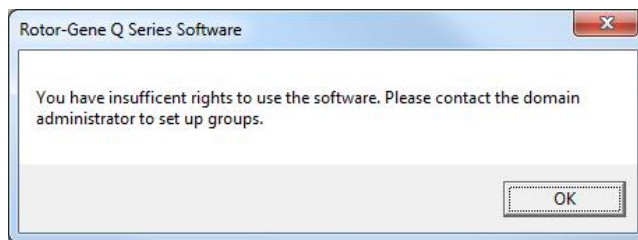
6. Sad se prijavite kao ovaj korisnik. Ulozi RG Analyst (RG analitičar) nisu dostupni izbornik **Run** (Pokreni) i gumb **Profile** (Profil). Međutim, postojeće se datoteke mogu otvarati i analizirati, kako je prikazano na snimci zaslona u nastavku. Statusna traka pokazuje da je korisnik **linsongy** RG Analyst (RG analitičar).



7. Ponovnom prijavom u funkciji administratora, prava RG Operator (RG rukovatelj) mogu se dodijeliti korisniku **insongy** te se prava RG Analyst (RG analitičar) mogu ponovno ukloniti. Softver je potom potrebno ponovno pokrenuti. Ovaj put nedostaju izbornik **Analysis** (Analiza) i gumb **Reports** (Izvešća), a omogućen je izbornik Run (Pokreni). Statusna traka pokazuje da korisnik **insongy** pripada skupini RG Operator (RG rukovatelj).



8. Ako se prijavite kao administrator i korisniku **insongy** uklonite sve skupine, pojavit će se sljedeća poruka kad korisnik **insongy** otvori softver.



## 6.9.2 Konfiguracija za sustav Windows 10

U ovom se odjeljku opisuje kako postaviti sustav da bi softver Rotor-Gene Q radio sigurno.

Da biste upotrebljavali sigurnosne značajke, softver mora biti instaliran s mogućnošću **Force authentication through Windows domain** (Nametni provjeru autentičnosti putem domene sustava Windows). Tada se šalju upiti domeni sustava Windows o vašoj razini pristupa i vjerodajnicama. što je ključno za pružanje značajki povezanih s odgovornošću i sigurnošću.

### Pokretanje u ulozi administratora

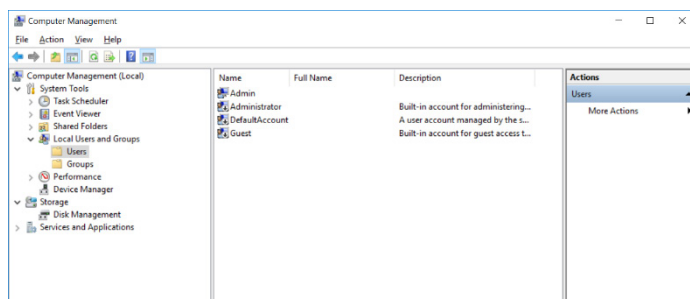
Brojni korisnici svoja računala pokreću kao administratori, bez lozinke. Iako je to praktično, onemogućuje utvrđivanje korisnika računala. Time se eliminira odgovornost i onemogućuje se aktivacija sigurnosnih mjera softvera Rotor-Gene Q.

Kada računalo pokrećete kao administrator, omogućene su sve značajke softvera. Stoga pokretanje računala u ulozi administratora osigurava da korisnici kojima nisu potrebne sigurnosne značajke mogu pristupiti svim značajkama softvera.

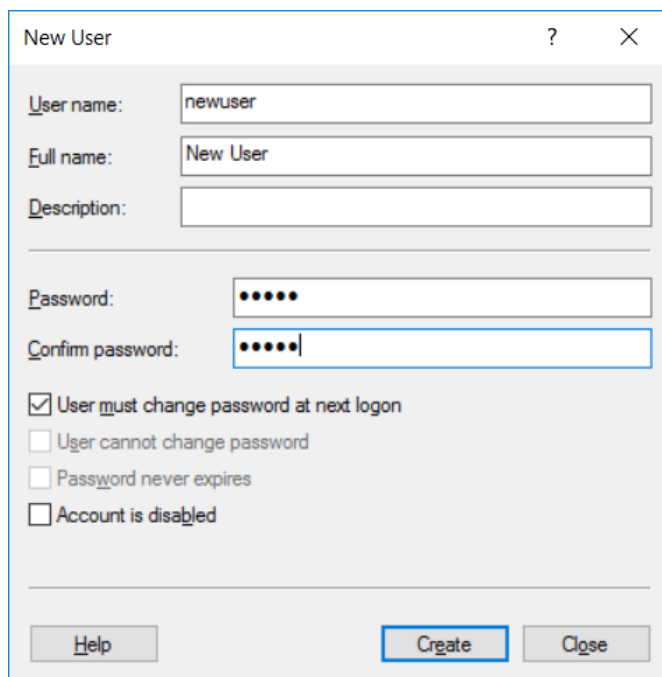
### Izrada novog korisničkog računa

Izradite korisnički račun za svakog korisnika softvera. Za svakog korisnika ponovite korake u nastavku dok ne izradite sve račune.

1. Da biste izradili novog korisnika, odaberite **Start**, unesite **Computer Management** (Upravljanje računalom), pritisnite **Enter** i navigirajte do mogućnosti **Local Users and Groups** (Lokalni korisnici i skupine) s lijeve strane.
2. U prozoru koji se otvori odaberite mapu **Users** (Korisnici). Desnom tipkom miša kliknite desni prozor i odaberite **New User...** (Novi korisnik...).



3. Unesite korisničko ime i lozinku. Prema zadanim postavkama izradit će se korisnici s uobičajenim ovlastima za pristup. To znači da takav korisnik može pokretati softver, ali ne može instalirati nove programe niti mijenjati postavke sustava.



4. Kliknite **Create** (Izradi). Sad se možete prijaviti kao ovaj korisnik.

### Dodjela uloga svakom korisniku

Sada trebate dodijeliti uloge svakom korisniku. Pristup se dijeli na sljedeća područja:

- Rotor-Gene Q Operator (Rukovatelj softverom Rotor-Gene Q) – može izvoditi postupke, ali ne može generirati izvješća ili izvoditi analize
- Rotor-Gene Q Analyst (Analitičar softvera Rotor-Gene Q) – može analizirati podatke postupka i generirati izvješća, ali ne može izvoditi nove postupke
- Rotor-Gene Q Operator and Analyst (Rukovatelj i analitičar softvera Rotor-Gene Q) – ima mogućnosti obiju uloga
- Administrator – može otključati nazive uzoraka te izvoditi sve radnje analitičara i rukovatelja
- None (Nijedno) – odbija se pristup softveru

**Napomena:** u sustavu Microsoft Windows 10 nije moguće izrađivati korisničke skupine s pomoću softvera Rotor-Gene Q. Administrator domene mora izraditi skupine na domeni te korisnike mora dodijeliti određenoj skupini. Omogućen je izbornik Run (Pokreni). Statusna traka pokazuje da korisnik **linsongy** pripada skupini RG Operator (RG rukovatelj).

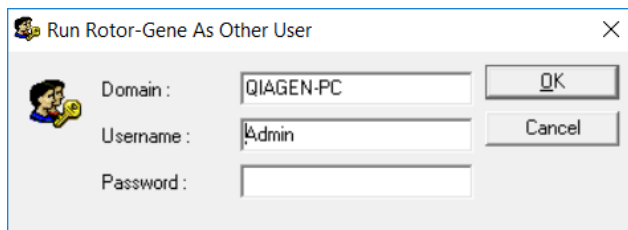
### 6.9.3 Rad više korisnika na istom računalu

Da bi više korisnika upotrebljavalo softver Rotor-Gene Q, izradite korisnički račun koji nema pristup softveru Rotor-Gene Q. Prijavite se u sustav Windows s tim računom kako korisnici ne bi mogli anonimno pristupati instrumentu Rotor-Gene Q MDx.

1. Upotrebljavajući ikonu **Rotor-Gene Q Software Login** (Prijava u softver Rotor-Gene Q) korisnici mogu otvoriti svoj korisnički račun u softveru Rotor-Gene Q.



2. U okvir koji se otvori unesite korisničko ime i lozinku (obavezno).



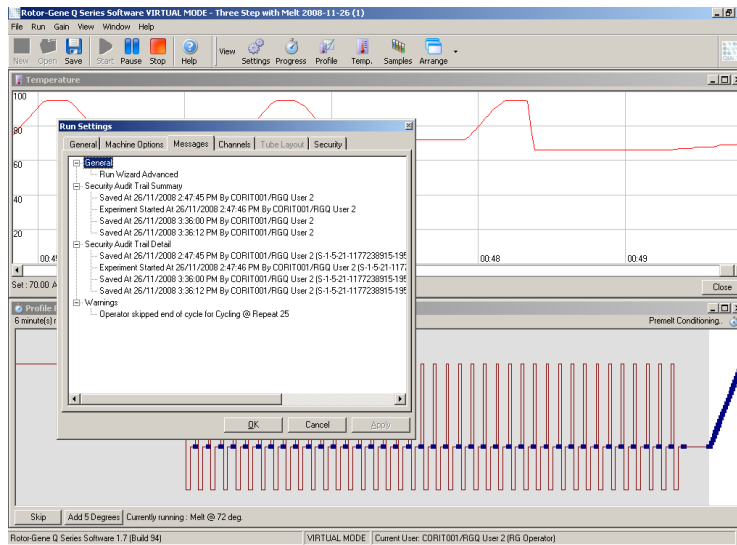
3. Domena je ili računalo na koje se prijavljujete ili naziv vaše lokalne mreže, zajedno s nazivom glavnog računala. Ako niste sigurni koju domenu trebate unijeti u ovo polje, savjetujte se s administratorom mreže.

**Napomena:** nakon prijave korisniku će biti dostupne sve njegove korisničke datoteke. Svaki korisnik može spremati datoteke na vlastitom području. To osigurava visoku razinu sigurnosti.

**Napomena:** svaki korisnik treba se odjaviti nakon što njegov postupak završi kako bi spriječio da drugi korisnici izvode postupak u njegovo ime.

## 6.9.4 Zapisi o nadzoru

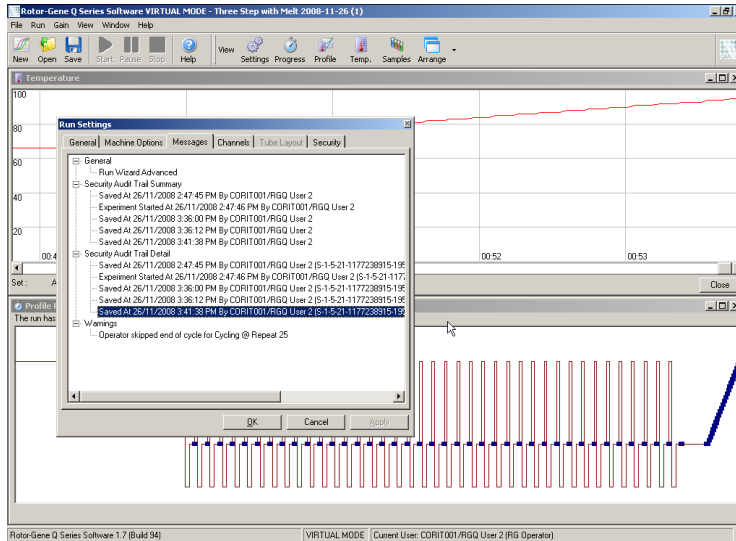
Svaki put kad korisnik spremi datoteku, pojedini se spremaju pod **Run Settings** (Postavke postupka) u kartici **Messages** (Poruke) kao Security Audit Trail Summary (Sažetak zapisa o sigurnosnom nadzoru) i Security Audit Trail Detail (Pojedini zapis o sigurnosnom nadzoru).



To može poslužiti za praćenje osoba koje su mijenjale sadržaj datoteke. Mogućnost Security Audit Trail Detail (Pojedini zapis o sigurnosnom nadzoru) ima više pojedinih, npr. jedinstveni identifikator korisnika. Taj je identifikator važan da bi se izbjeglo da korisnik na drugom računalo izradi račun s istim nazivom te se tako lažno predstavlja kao drugi korisnik. U tom će slučaju korisnička imena biti jednaka, ali će se ID brojevi računa razlikovati.

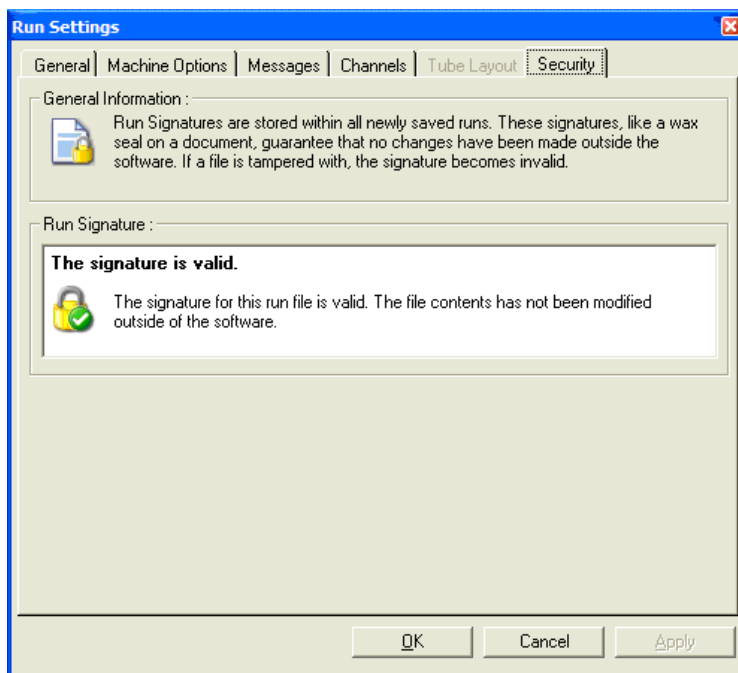


Identifikacijski broj za račun CORIT001/RGQ User 2, S-1-5-21-1177238915-195, prikazan je u pojedinostima.

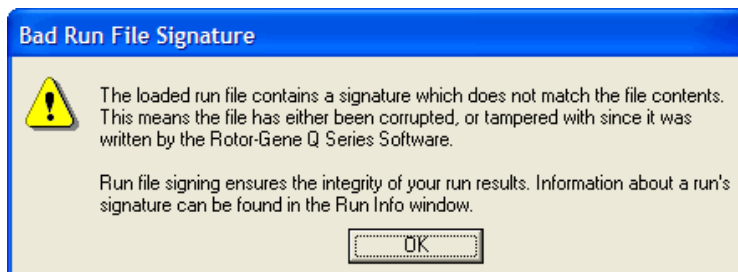


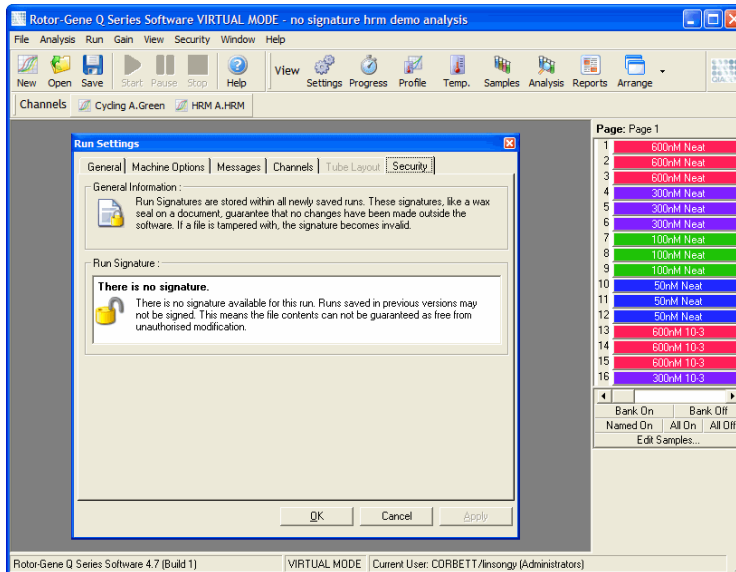
## 6.9.5 Potpisi postupka

Zapis o nadzoru pohranjuje se u datoteci postupka Rotor-Gene Q. Da bi se izbjegle neželjene izmjene tih datoteka, trebalo bi ih čuvati na sigurnoj lokaciji kojoj mogu pristupiti samo određeni Windows računari. Međutim, ako su datoteke pohranjene na zajedničkom području, mogućnost Run Signatures (Potpisi postupka) pruža dodatnu sigurnost. Na snimci zaslona prikazana je kartica **Security** (Sigurnost) u Run Settings (Postavke postupka) za datoteku sa značajkom Run Signature (Potpis postupka).



Značajka Run Signatures (Potpis postupka) duga je riječ koja se generira svaki put kad se datoteka spremi i koja je povezana sa sadržajem datoteke. Na primjer, potpis ove datoteke jest **517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081**. Ako se datoteka otvori u programu Notepad i ako se uredi (npr. ako se datum postupka promijeni na tri dana raniji datum), pri ponovnom otvaranju datoteke pojavljuje se sljedeća poruka.





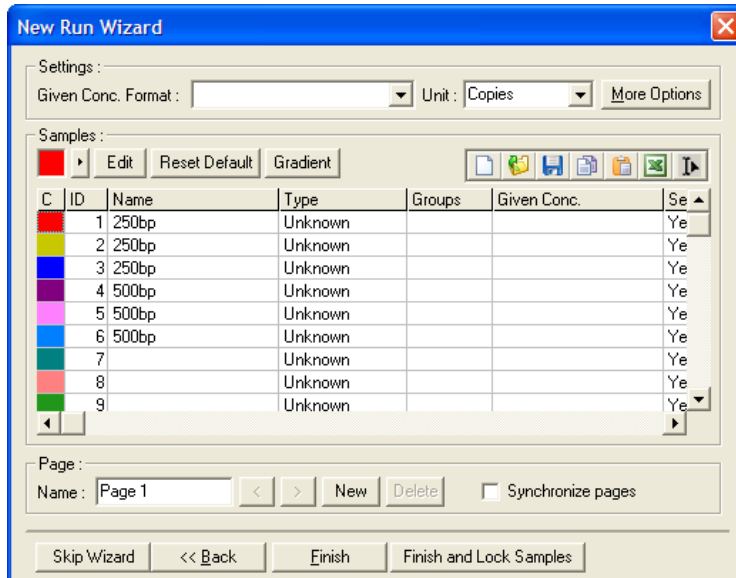
**Napomena:** ako se datoteke šalju e-poštom, proces šifriranja može poništiti valjanost potpisa. Da biste to izbjegli, komprimirajte datoteku prije slanja e-poštom.

### 6.9.6 Zaključavanje uzoraka

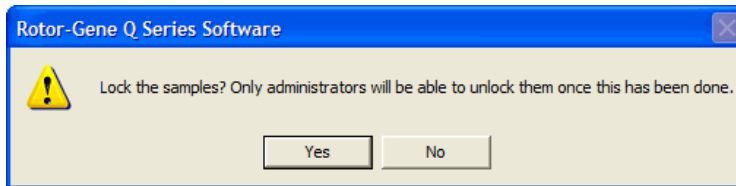
Važno je osigurati da se nazivi uzoraka slučajno ili namjerno ne promijene nakon što korisnik pokrene postupak. Stoga softver Rotor-Gene Q omogućuje zaključavanje uzoraka. Bilo koji korisnik može zaključati nazive uzoraka, ali samo ih administrator može otključati. Korisnicima koji svoje računalo pokreću u načinu rada administratora ta je mogućnost ograničena. Da bi se ta mogućnost upotrebljavala, računalo se mora sigurno konfigurirati na način opisan u prethodnim odjeljcima.

**Napomena:** ako želite zaključati uzorke, nemojte pokretati softver u svojstvu administratora. Izradite račun sa skupinama RG Operator (RG rukovatelj) i RG Analyst (RG analitičar) te čuvajte lozinku administratora u tajnosti. Korisnici će tada zahtijevati autorizaciju administratora za otključavanje datoteka.

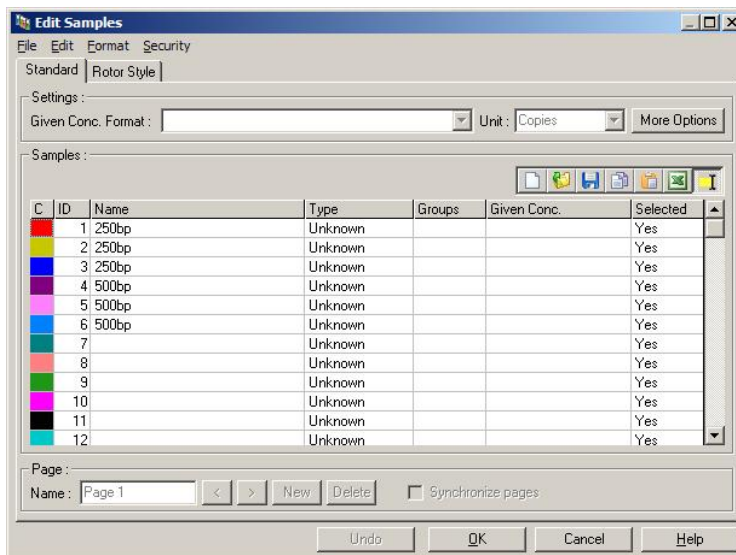
Uzorci se mogu zaključati prije pokretanje postupka kad se upotrebljava čarobnjak Advanced (Napredno) klikom na mogućnost **Finish and Lock Samples** (Završi i zaključaj uzorke).



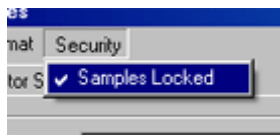
Pojavit će se sljedeće upozorenje. Kliknite **Yes** (Da) za potvrdu.



Nakon što uzorci budu zaključani, neće biti moguće uređivati uzorke u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke).



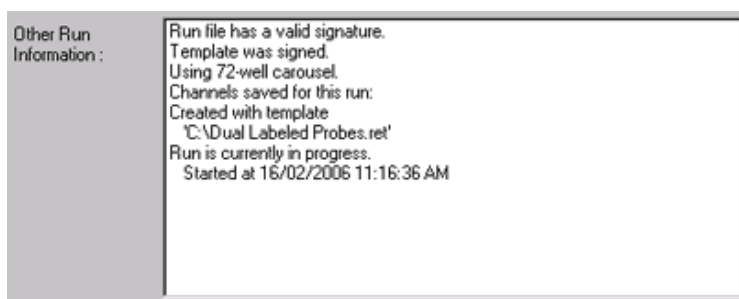
Uzorci se također mogu zaključavati i otključavati u prozoru **Edit Samples** (Uredi uzorke). Međutim, samo administrator može otključati uzorke nakon što ih se zaključa.



Svaka neovlaštena promjena datoteke poništiti će valjanost potpisa postupka.

### 6.9.7 Zaključani predlošci

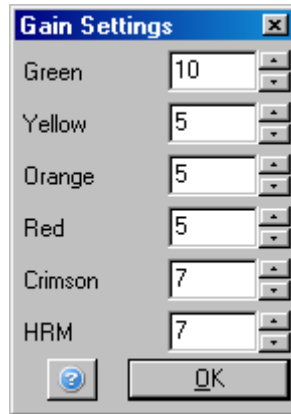
Korisnik s pomoću softvera Rotor-Gene Q trenutačno ne može izraditi datoteke predložaka koje su samo za čitanje. Međutim, po želji se kao zahtjev može navesti da se svi postupci izvode uz primjenu određenog predloška datoteke. Da bi se osigurao pristup tom predlošku koji je samo za čitanje, potrebno ga je pohraniti na mrežnom pogonu na kojem korisnici ne mogu mijenjati podatke. Korisnici mogu i dalje pokretati i izmjenjivati vlastite profile dok je predložak na mrežnom pogonu poput ovog zaštićen. Da bi se pratilo koji se predložak upotrebljava, softver Rotor-Gene Q pohranjuje naziv datoteke predloška koja je pokrenuta. Toj se informaciji može pristupiti tako da se klikne gumb **Settings** (Postavke) koji omogućuje prikaz prozora **Run Settings** (Postavke postupka). Informacije o predlošku pohranjuju se pod **Other Run Information** (Ostale informacije o postupku).



### 6.10 Izbornik pojačanja

Kliknite izbornik **Gain** (Pojačanje) da biste vidjeli mogućnost **Gain Settings** (Postavke pojačanja) za trenutačni postupak. Tako se prije pokretanja postupka postavlja pojačanje određenog kanala. Postavke pojačanja zadržavaju se od zadnjeg postupka. Mogu se mijenjati ako postupak još nije započeo ili ako je u početnim ciklusima. Za promjenu polja koristite se strelicama gore/dolje uz svako tekstno polje. Potom kliknite **OK** (U redu).

Pojačanje se može mijenjati tijekom početnih ciklusa. U odgovarajućem kanalu bit će nacrtana crvena linija prikazujući gdje je pojačanje promijenjeno. Ciklusi prije promjene pojačanja bit će isključeni iz analize.

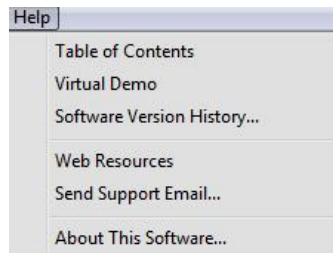


## 6.11 Izbornik za uređivanje prozora

Ovaj izbornik omogućuje organizaciju prozora u okomite ili vodoravne stupce ili kaskadno. Dodatne mogućnosti dostupne su ako kliknete na strelicu s desne strane gumba **Arrange** (Rasporedi).

## 6.12 Funkcija za pomoć

Kad se upotrebljava gumb **Help** (Pomoć) ili izbornik Help (Pomoć), otvorit će se sljedeći padajući izbornik.



### **Table of Contents** (Sadržaj):

Pristupa funkciji Help (Pomoć).

### **Virtual Demo** (Virtualna demonstracija):

Povezuje na stranicu web-mjesta tvrtke QIAGEN s interaktivnom demonstracijom softvera.

### **Software Version History...** (Povijest inačice softvera...):

Daje kratki pregled novih značajki koje su dodane od prethodno instalirane inačice softvera.

### **Web Resources** (Mrežni resursi):

Otvara se stranica web-mjesta tvrtke QIAGEN u novom prozoru preglednika s vrijednim najnovijim informacijama o instrumentima Rotor-Gene Q MDx i odgovarajućim reagensima.

### **About This Software...** (O ovom softveru...):

Pružuje informacije o povezanom uređaju, serijskom broju uređaja Rotor-Gene Q MDx te o inačici softvera.

## 6.12.1 Slanje e-poruke podršci

Mogućnost **Send Support Email** (Pošalji e-poruku podršci) u izborniku **Help** (Pomoć) omogućuje vam da pošaljete e-poruku podršci tvrtke QIAGEN sa svim relevantnim informacijama iz postupka. Mogućnost **Save As** (Spremi kao) spremit će sve informacije u datoteku koju možete kopirati na disk ili međumrežno ako nemate pristup e-pošti na računalu na kojem se pokreće Rotor-Gene Q MDx.

Ako funkciju e-poruke podršci prvi put upotrebljavate na prijenosnom računalu koje može biti isporučeno s instrumentom Rotor-Gene Q MDx (ovisi o zemlji), morate konfigurirati postavke svoje e-adrese.

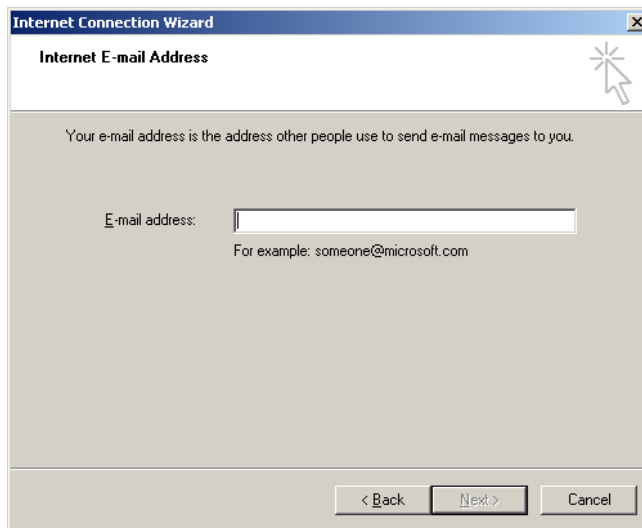
**Napomena:** možete unijeti unose IT upravitelja svoje tvrtke.

### Konfiguriraj postavke e-pošte

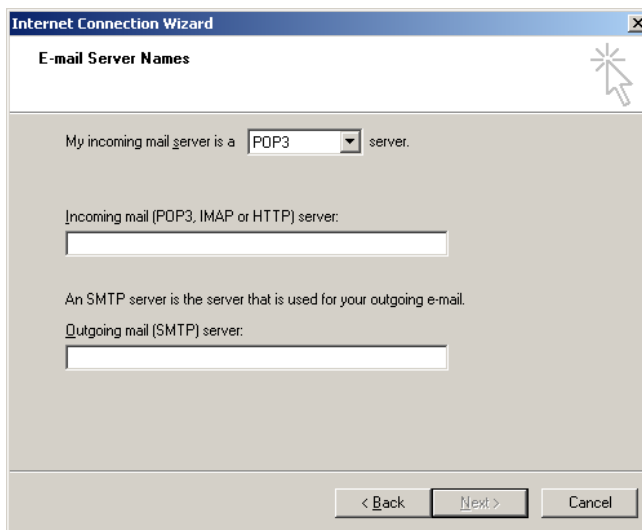
Kliknite mogućnost **Send Support Email...** (Pošalji e-poruku podršci...). Otvorit će se sljedeći prozor.



1. Unesite svoje ime i kliknite **Next** (Sljedeće). Otvorit će se prozor **Internet E-mail Address** (Internetska adresa e-pošte).

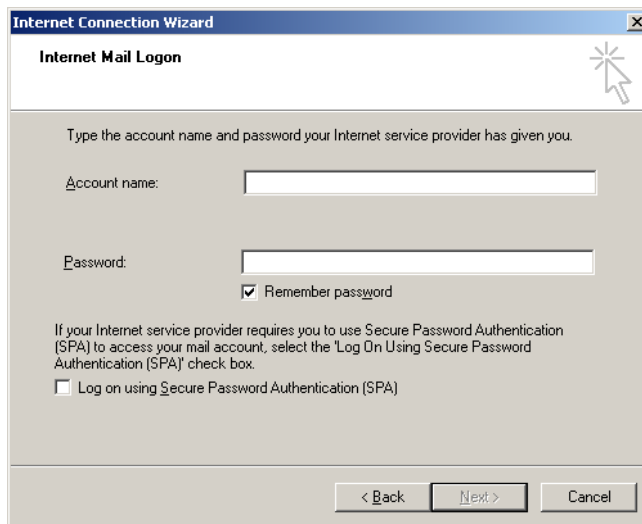


2. Unesite svoju adresu e-pošte i kliknite **Next** (Sljedeće). Otvorit će se prozor **E-mail Server Names** (Nazivi poslužitelja e-pošte).

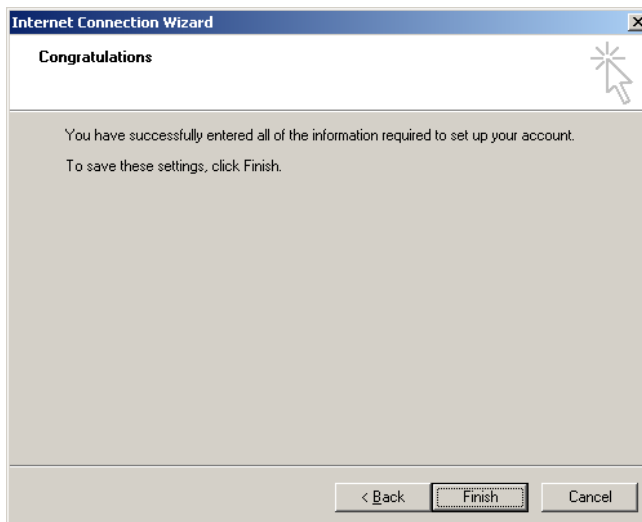


3. Odaberite vrstu poslužitelja pošte za dolaznu poštu i specificirajte nazive poslužitelja za dolazne i izlazne poruke e-pošte. Potom pritisnite **Next** (Sljedeće). Otvorit će se prozor **Internet Mail Logon** (Internetska prijava na poštu).





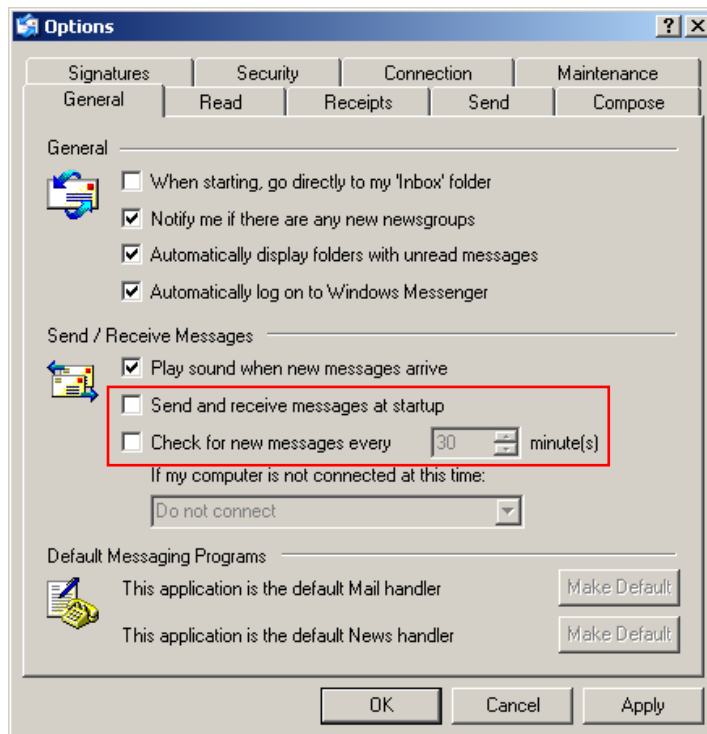
4. Unesite naziv i lozinku za svoj račun e-pošte ako vaš poslužitelj upotrebljava provjeru autentičnosti sigurnom lozinkom. Potom kliknite **Next** (Sljedeće). Otvorit će se prozor **Congratulations** (Čestitamo).



5. Potvrdite s **Finish** (Završi) da biste dovršili postavljanje računa za e-poštu.

### Postavljanje u programu Outlook

1. Otvorite **Outlook Express** u izborniku **Start** (**Start** > **All programs** (Svi programi) > **Outlook Express**).
2. Odaberite **Tools** (Alati) i potom **Options** (Mogućnosti). Pojavljuje se prozor u nastavku.



**Važno:** da biste izbjegli bilo kakvo dohvaćanje poruka e-pošte tijekom PCR postupaka, onemogućite zadane unose na zaslonu **Send/Receive Messages** (Slanje/Primanje poruka).

3. Onemogućite mogućnost **Send and receive messages at startup** (Šalji i primaj poruke pri pokretanju).
4. Onemogućite mogućnost **Check for new messages every 30 minutes** (Provjeri nove poruke svakih 30 minuta).
5. Potvrdite promjene s **OK** (U redu).

## 7 Dodatne značajke

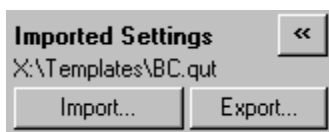
### 7.1 Predlošci za analizu

Neke analize zahtijevaju od korisnika da definira pragove, postavke normalizacije i postavke genotipa. Te se postavke često ponovno upotrebljavaju u više eksperimenata.

Predlošci za analizu omogućuju korisniku da spremi i ponovno upotrijebi postavke. Time se smanjuje napor pri ponovnom unošenju postavki te se smanjuje rizik od pogreške.

Analize Quantitation (Kvantifikacija), Melt (Taljenje), Allelic discrimination (Alelna diskriminacija), Scatter graph analysis (Analiza grafikona raspršenosti) i EndPoint analysis (Analiza krajnje točke) podržavaju predloške za analizu. Te analize omogućuju korisniku da izveze predložak koji je jedinstven za analizu (npr. kvantifikacijska analiza omogućuje izvoz i uvoz datoteka u formatu \*.qut koje sadržavaju postavke kvantifikacije).

Nakon što se predložak za analizu uveze ili izveze, naziv datoteke predloška prikazuje se za buduću uporabu.

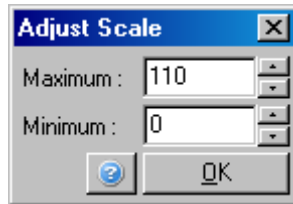


### 7.2 Otvaranje drugog postupka

Dok izvodite postupak, možete otvoriti i analizirati postupke koji su prethodno izvedeni. U drugom prozoru neće se aktivirati nekoliko funkcija, kao što su gumbi **New** (Novo) ili **Start Run** (Pokreni postupak). Nakon što završi prvi postupak može se pokrenuti novi postupak iz prvog prozora.

### 7.3 Mogućnosti skaliranja

Da biste pristupili mogućnosti **Adjust Scale** (Prilagodi skalu), kliknite mogućnost **Adjust Scale...** (Prilagodi skalu...) na dnu glavnog prozora ili desnom tipkom miša kliknite na grafikon i odaberite mogućnost **Adjust Scale...** (Prilagodi skalu...) na izborniku koji se pojavi. Skala se može ručno unijeti u prozoru koji se pojavi.



Da biste pristupili mogućnosti **Auto-Scale** (Automatski skaliraj), kliknite mogućnost **Auto-Scale...** (Automatski skaliraj...) na dnu glavnog prozora ili desnom tipkom miša kliknite na grafikon i izaberite **Auto-Scale...** (Automatski skaliraj...) na izborniku koji se pojavi. Mogućnost **Auto-Scale** (Automatski skaliraj) pokušava prilagoditi skalu maksimalnim i minimalnim očitavanjima u podacima.

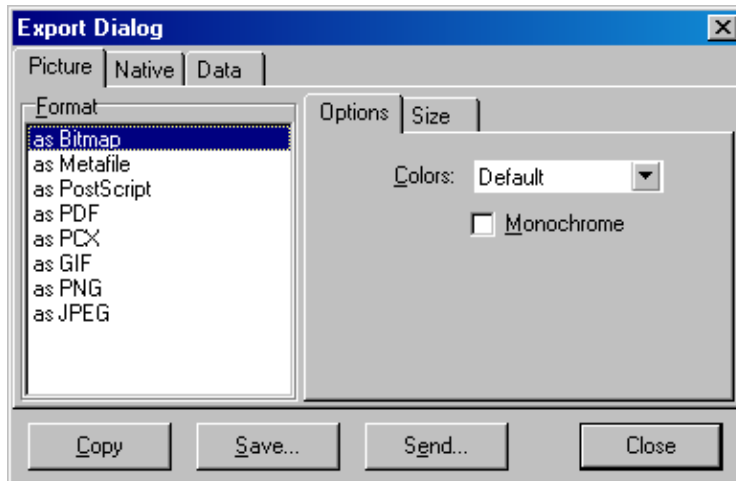
Da biste pristupili mogućnosti **Default Scale** (Zadana skala), kliknite mogućnost **Default Scale...** (Zadana skala...) na dnu glavnog prozora ili desnom tipkom miša kliknite na grafikon i izaberite **Default Scale...** (Zadana skala...) na izborniku koji se pojavi. Mogućnost **Default Scale** (Zadana skala) vraća skalu na prikaz od 0 do 100 jedinica fluorescencije.

## 7.4 Izvoz grafikona

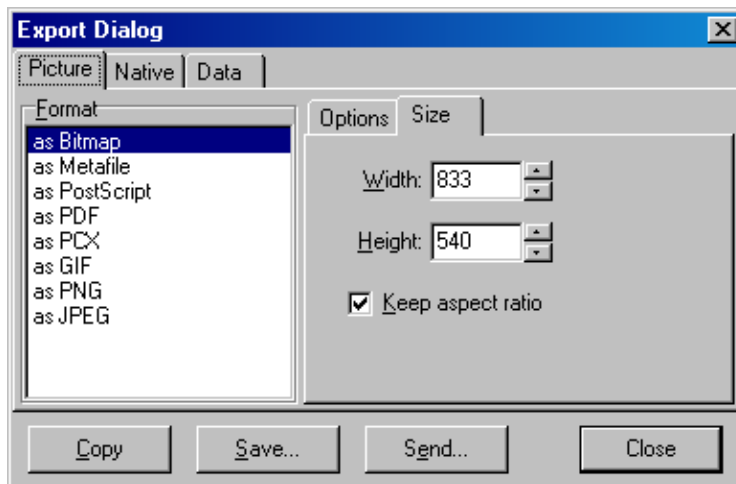
### Izvoz slike

Sljedeći koraci opisuju kako spremiti sliku.

1. Kliknite desnom tipkom sliku i odaberite **Export** (Izvoz) na izborniku koji se pojavljuje.
2. Pojavljuje se prozor **Export Dialog** (Dijaloški okvir za izvoz). Odaberite željeni format s popisa **Format**.



3. Odaberite karticu **Size** (Veličina) i odaberite željenu veličinu.



4. Označite potvrdni okvir **Keep aspect ratio** (Zadrži omjer širine i visine) da biste zadržali sliku u točnom omjeru kad prilagođavate njezinu veličinu.
5. Kliknite **Save** (Spremi) i u dijaloškom okviru koji se pojavi odaberite naziv datoteke i lokaciju za datoteku.

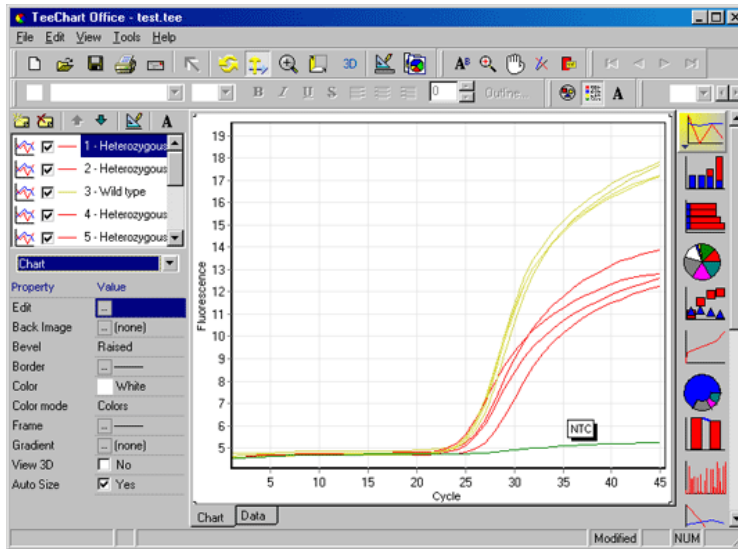
Ako je potrebna slika veće razlučivosti, preporučujemo da ili povećate veličinu slike dok ne zadovolji vaše zahtjeve ili da spremite grafikon kao metadatoteku (\*.emf, \*.wmf). To je format koji se temelji na vektorima i koji se može otvoriti u softveru kao što je Adobe® Illustrator®, što korisniku omogućuje da izradi sliku bilo koje razlučivosti.

### Izvoz u nativni format

Grafikoni u softveru Rotor-Gene Q upotrebljavaju komponentu treće strane TeeChart® koju je razvio softver Steema. Da biste grafikon spremili u nativnom formatu, odaberite karticu **Native** (Nativno) u prozoru **Export Dialog** (Dijaloški okvir za izvoz) (pogledajte prethodnu snimku zaslona), a potom kliknite **Save** (Spremi). Nativni format standardni je format datoteke TeeChart. To omogućuje korisniku da upotrebljava alat TeeChart Office iz softvera Steema. Alat TeeChart Office dostupan je kao besplatni softver (freeware) i instalira se kao dio softverskog paketa Rotor-Gene Q. Da biste pristupili softveru, kliknite ikonu **TeeChart** na radnoj površini.

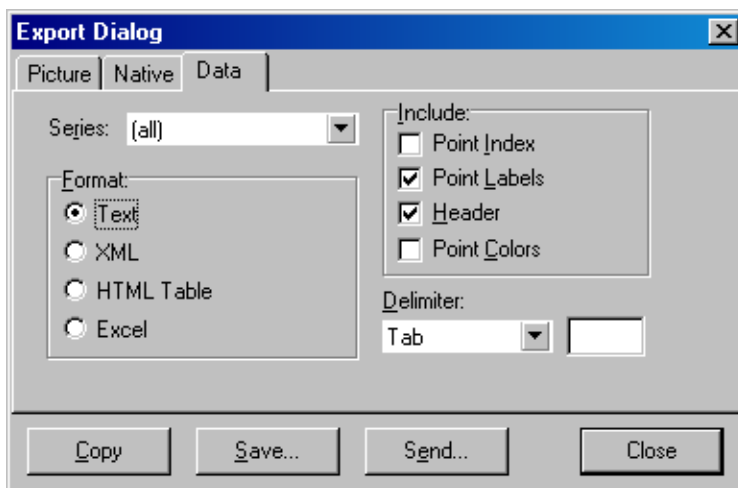


Alat TeeChart Office omogućuje rukovanje izvezenim grafikonima, uključujući promjenu boja krivulja, dodavanje bilježaka, promjenu fontova i prilagodbu podatkovnih točaka.



## Izvoz podataka

Da biste izvezli podatke u različitim formatima, odaberite karticu **Data** (Podaci) u prozoru **Export Dialog** (Dijaloški okvir za izvoz). Izvezena datoteka sadržava neobrađene podatkovne točke koje se upotrebljavaju na grafikonu.

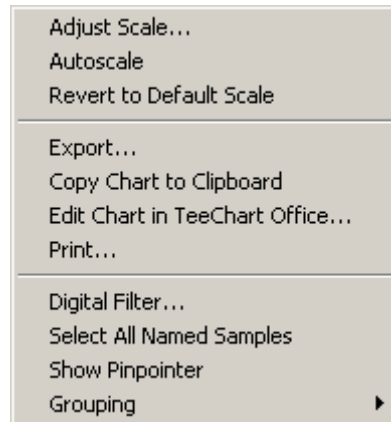


Izvoz neobrađenih podataka i podataka analiza također se može izvesti odabirom mogućnosti **Save As** (Spremi kao) u izborniku **File** (Datoteka) (pogledajte odjeljak 6.5).

## 7.5 Ikona matičnog/francuskog ključa



Ikona matičnog/francuskog ključa pojavljuje se u donjem lijevom uglu glavnog prozora. Klikom ikone matičnog/francuskog ključa omogućuje se nekoliko mogućnosti. Tim se mogućnostima može i pristupiti klikom desne tipke na grafikon.



**Adjust Scale** (Prilagodi skalu), Pogledajte odjeljak 7.3.  
**Autoscale** (Automatski skaliraj),  
**Revert to Default Scale** (Vrati na zadanu skalu):

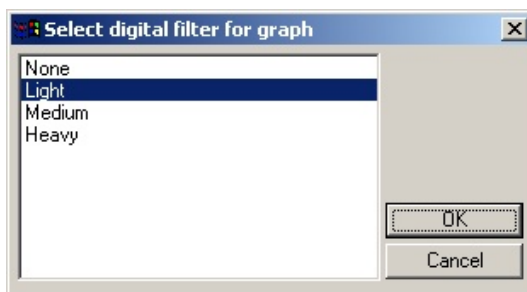
**Export...** (Izvoz...): Sprema grafikon u nizu formata (pogledajte odjeljak 6.4).

**Copy Chart to Clipboard** (Kopiraj grafikon u međuspremnik): Kopira sliku grafikona u međuspremnik.

**Edit Chart in TeeChart Office...** (Uredi grafikon u alatu TeeChart Office za uređivanje (pogledajte odjeljak 6.4).  
**Office...** (Uredi grafikon u alatu TeeChart Office...):

**Print** (Ispiši): Grafikon se ispisuje.

**Digital Filter...** (Digitalni filter...): Izmjenjuje se trenutno odabran digitalni filter na grafikonu. Digitalni filter ujednačuje podatke s pomoću kliznog prozora točaka.

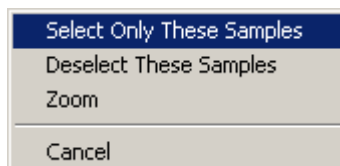


**Show Pinpointer** (Pokaži pokazivač): Otvara se prozor koji prikazuje točne koordinate položaja pokazivača miša.

**Grouping** (Grupiranje): Vizualno se grupiraju uzorci identičnih naziva. To može biti korisno za ispitivanje s punim rotorom. Odabir ove mogućnosti ne utječe na izračunane vrijednosti.

## 7.6 Mogućnosti na odabranom području

Područje grafikona može se odabrati tako da se klikne i drži lijeva tipka miša te povlači pokazivač miša. Pojavljuju se sljedeće mogućnosti.



**Select Only These Samples**  
(Odaberi samo ove uzorke):

Poništava se odabir izvan odabranog područja.

**Select Only These Samples**  
(Odaberi samo ove uzorke):

Poništava se odabir izvan odabranog područja.

**Zoom** (Zumiraj):

Zumira se odabrano područje grafikona. Kliknite gumb **Default Scale** (Zadana skala) da biste smanjili prikaz.



## 8 Održavanje

Održavanje radnih značajki instrumenta Rotor-Gene Q MDx je jednostavno. Optičke radne značajke održavaju se provjeravanjem jesu li leće, koje se nalaze i u emisijskom i u detekcijskom izvoru, čiste. To se postiže nježnim brisanjem leća aplikatorom s pamučnim vrhom navlaženim etanolom ili izopropanolom\*.

**Napomena:** ovisno o uporabi, leće čistite barem jednom na mjesec. Istovremeno obrišite i komoru rotora.

Pazite da radna površina bude čista te da na njoj nema prašine i listova papira. Dovod zraka na instrumentu Rotor-Gene Q MDx nalazi se s donje strane te rasuti materijal, poput papira ili prašine, može narušiti radne značajke.



Da biste izbjegli nakupljanje prašine, držite poklopac instrumenta Rotor-Gene Q MDx zatvorenim kad se instrument ne upotrebljava.

**Napomena:** Upotrebljavajte samo dijelove koje isporučuje tvrtka QIAGEN.

### 8.1 Čišćenje površine instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Vanjske površine instrumenta Rotor-Gene Q mogu se čistiti široko dostupnim laboratorijskim kemijskim sredstvima.

\* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku katu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

---

## 8.2 Dekontaminacija površine instrumenta Rotor-Gene Q MDx

Ako se komora rotora kontaminira, može se očistiti brisanjem površina mekom krpom koja ne ostavlja dlačice navlaženom 0,1-postotnom (v/v) otopinom izbjeljivača (no iz nje ne smije kapati otopina).\* Komoru obrišite mekom krpom koja ne ostavlja dlačice navlaženom vodom stupnja čistoće za PCR da biste uklonili tragove izbjeljivača.

## 8.3 Popravak instrumenta Rotor-Gene Q

Za popravak ili servisiranje instrumenta Rotor-Gene Q obratite se Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN na <https://www.qiagen.com/service-and-support/technical-support/technical-support-form/>.

\* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku katu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

## 9 Optička potvrda temperature

Optička potvrda temperature (Optical Temperature Verification, OTV) metoda je kojom se potvrđuje temperatura u epruveti u instrumentu Rotor-Gene Q MDx. Potvrda temperature u epruveti može biti važan postupak u ovlaštenim laboratorijima. OTV se provodi s pomoću kompleta Rotor-Disc OTV Kit (pogledajte odjeljak 16). U nastavku se navodi samo kratak uvod u načelo OTV-a. Izvođenje postupka OTV-a objašnjeno je u softveru instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Detaljniji opis postupka OTV-a, uključujući vodič za rješavanje problema, potražite u *Priručniku za Rotor-Disc OTV*.

### 9.1 Načelo OTV

OTV upotrebljava optička svojstva triju termokromatskih tekućih kristala (TLC)\* kao apsolutnih temperaturnih referenci. Kada se zagrijavaju, TLC-ovi se na vrlo preciznim temperaturama (50, 75 i 90 °C) mijenjaju iz neprozirnih u prozirne. TLC-ovi sami po sebi nisu fluorescentni. Stoga je nužno pokriti ekscitacijski izvor fluorescentnim umetkom kako bi se optičkim sustavom instrumenta Rotor-Gene Q MDx mogle detektirati točke prijelaza TLC-a. TLC-ovi koji su ispod svoje temperature prijelaza neprozirni su i reflektiraju svjetlo. Dio reflektiranog svjetla raspršuje se prema detektoru, povećavajući fluorescenciju. Kad temperatura u epruveti dosegne točku prijelaza TLC-a, TLC postaje proziran i svjetlo prolazi kroz uzorak umjesto da se reflektira prema detektoru, što rezultira smanjenjem fluorescencije. Promjena u fluorescenciji upotrebljava se za utvrđivanje precizne temperature prijelaza svakog TLC-a. Temperatura prijelaza uspoređuje se s temperaturom navedenom u datoteci tvorničke kalibracije za OTV Rotor-Disc da bi se potvrdilo je li instrument Rotor-Gene Q MDx u granicama temperaturne specifikacije.

### 9.2 Komponente kompleta Rotor-Disc OTV Kit

Za izvođenje OTV-a potrebne su sljedeće komponente:

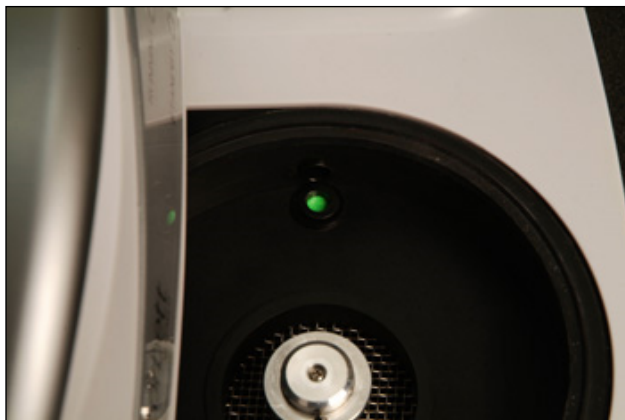
- Komplet Rotor-Disc OTV Kit koji uključuje:
  - zatvoren rotirajući disk Rotor-Disc 72 OTV Rotor (sadržava TLC-ove)
  - umetak s pločicom za fluorescentno raspršenje (instrument Rotor-Gene 3000 ili instrumenti Rotor-Gene Q/6000 )
  - uklonjiv medij koji sadržava sljedeće datoteke: datoteku sa serijskim brojem OTV rotora i rokom trajanja (\*.txt); datoteku s predloškom OTV testa (\*.ret); specifikacijski list proizvoda (\*.pdf); datoteku tvorničke kalibracije (\*.rex)
  - specifikacijski list proizvoda

\* Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku katu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

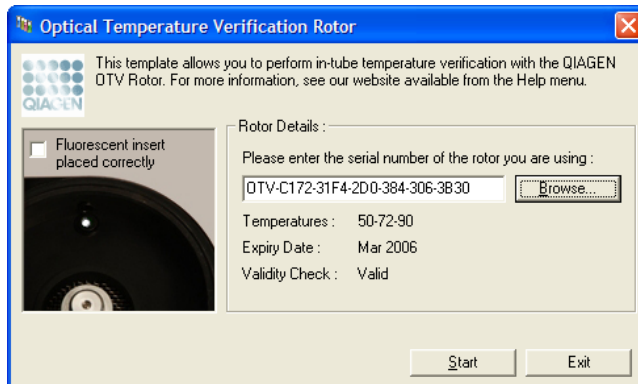
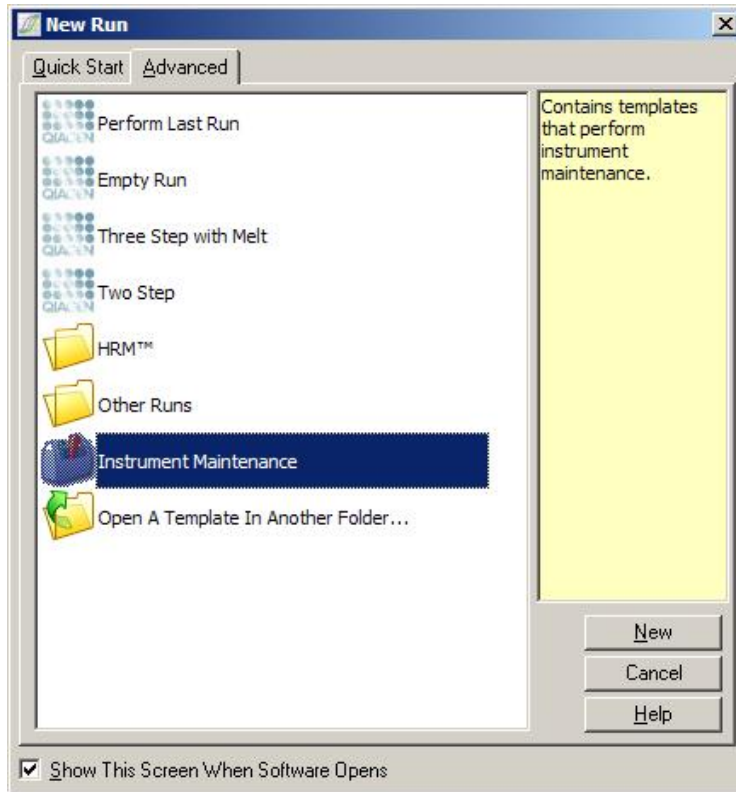
- softver Rotor-Gene Series Software Version 1.7 ili noviji, koji sadržava čarobnjaka za OTV Rotor koji je jednostavan za uporabu
- Rotor-Disc 72 Rotor
- Rotor-Disc 72 Locking Ring.

### 9.3 Izvođenje OTV-a

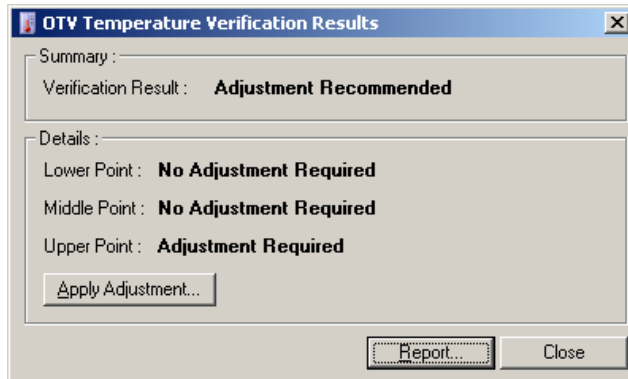
1. Fluorescentni umetak postavite iznad emisijskih leća na dnu komore instrumenta Rotor-Gene Q MDx.
2. Postavite OTV Rotor-Disc u Rotor-Disc 72 Rotor. Osigurajte prstenom za zaključavanje Rotor-Disc 72 Locking Ring. Sklop postavite u instrument Rotor-Gene Q MDx i pritisnite ga na mjesto dok ne klikne. Zatvorite poklopac instrumenta Rotor-Gene Q MDx.



3. Pristupite čarobnjaku Advanced (Napredno) odabirom kartice **Advanced** (Napredno) u prozoru **New Run** (Novi postupak). U čarobnjaku Advanced (Napredno) kliknite **Instrument maintenance** (Održavanje instrumenta) i potom na **OTV**. Čarobnjak će zatražiti serijski broj OTV-a koji je naveden na OTV prstenu. Potom kliknite **Start** (Pokreni).



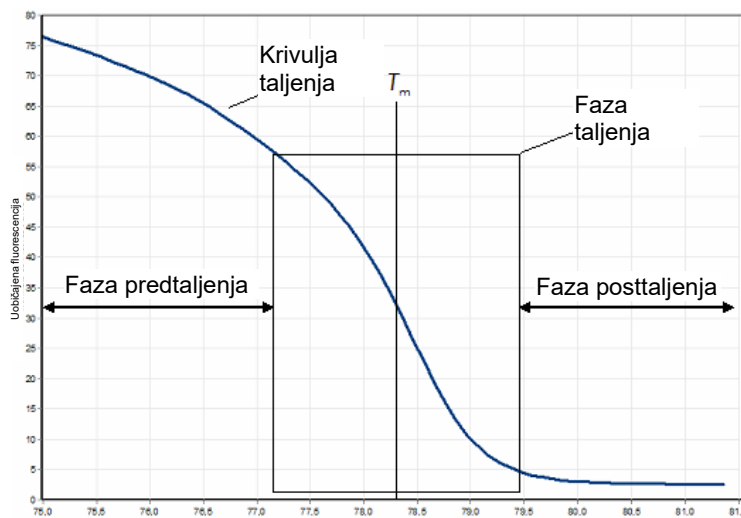
4. Softver tada traži naziv datoteke koju treba obraditi. Tada započinje postupak.
5. Tijekom postupka izvodi se niz otapanja kojima se određuju termalne karakteristike instrumenta Rotor-Gene Q MDx.



6. Kada postupak završi, softver naznačuje je li instrument Rotor-Gene Q MDx unutar specifikacije.
7. Ako ga je potrebna prilagodba, korisnik treba kliknuti **Apply Adjustment** (Primijeni prilagodbu). Od korisnika će se tada zatražiti da izvede postupak potvrde. Nakon završetka postupka potvrde dodatna prilagodba ne bi trebala biti potrebna. Ako je potrebna dodatna prilagodba, obratite se svojem distributeru.
8. Kada je instrument Rotor-Gene Q MDx unutar specifikacije, može se revidirati i ispisati izvješće o postupku.

## 10 Analiza taljenja velike razlučivosti

Analiza taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) inovativna je tehnika koja se temelji na analizi taljenja DNK. Taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) karakterizira uzorke DNK u skladu s njihovim disocijativnim ponašanjem pri prijelazu iz dvolančanog DNK (dIDNK) u jednolančani DNK (jIDNK) uz povećanje temperature (pogledajte sliku u nastavku). Instrument za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) prikuplja fluorescentne signale s iznimno visokom optičkom i toplinskom preciznošću, čime stvara brojne mogućnosti primjene.



**Uobičajeni grafikon taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM).** Krivulja taljenja prikazuje prijelaz iz visoke fluorescencije početne faze predtaljenja preko smanjenja fluorescencije u fazi taljenja do osnovne razine fluorescencije u fazi posttaljenja. Fluorescencija se smanjuje ako se interkalirajuća boja DNK otpušta iz dIDNK dok se otapa u jednostruke lance. Središnja točka faze taljenja, u kojoj je brzina promjene u fluorescenciji najveća, definira temperaturu taljenja ( $T_m$ ) za DNK koji se analizira.

Prije izvođenja analize taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) ciljanu sekvencu treba amplificirati do velikog broja kopija. To se obično provodi PCR-om u prisutnosti interkalirajuće fluorescentne boje dIDNK. Boja ne reagira s jIDNK, ali aktivno interkalira s dIDNK i sjajno fluorescira kad se interkalira. Promjena u fluorescenciji može se upotrebljavati za mjerenje povećanja koncentracije DNK tijekom PCR-a i potom za izravno mjerenje toplinski induciranog taljenja DNK koje se provodi taljenjem velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM). Tijekom taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) fluorescencija je na početku visoka jer je uzorak u početku dIDNK. Fluorescencija se smanjuje kako se temperatura povećava i DNK se rastavlja u jednostruke lance. Uočeno ponašanje taljenja karakteristično je za uzorak DNK u pitanju.

Primjenom taljenja velike razlučivosti Rotor-Gene Q MDx može karakterizirati uzorke na temelju duljine sekvence, sadržaja GC-a i komplementarnosti sekvence DNK. Taljenje velike razlučivosti može se upotrebljavati u genotipizirajućim primjenama kao što su analiza umetanja/brisanja ili polimorfizmi jednog nukleotida (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP-ovi) ili za probir za nepoznate genske mutacije. Može imati i epigenetičke primjene i služiti za otkrivanje i analizu statusa metilacije DNK. Može se primjenjivati i za kvantitativno otkrivanje malog dijela varijante DNK u pozadini sekvence divlje vrste pri osjetljivostima koje se približavaju vrijednosti od 5 %. To se, na primjer, može upotrijebiti za istraživanje somatski stečenih mutacija ili promjena u metilacijskom stanju CpG otoka.

Taljenje velike razlučivosti na instrumentu Rotor-Gene Q MDx omogućuje višestruke primjene, uključujući:

- identifikaciju predispozicijskih gena kandidata
- studije povezanosti (usporedba slučajeva i kontrola, od genotipa do fenotipa)
- određivanje prevalencije alela u populaciji ili podskupini
- probir i potvrdu polimorfizma jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP)
- probir za gubitak heterozigotnosti
- utvrđivanje otiska prsta DNK
- karakterizaciju blokova haplotipa
- analizu metilacije DNK
- mapiranje DNK
- identificiranje vrsta
- otkrivanje mutacija
- određivanje omjera stečenih somatskih mutacija
- HLA tipizaciju.

Taljenje velike razlučivosti (high resolution melting, HRM) jednostavnije je i jeftinije od ispitivanja za genotipizaciju na temelju probe te je, za razliku od konvencionalnih metoda, riječ o sustavu zatvorenih epruveta koji sprječava kontaminaciju s PCR produktima. Rezultati se mogu usporediti s konvencionalnim metodama kao što su SSCP, DHPLC, RFLP i sekvenciranje DNK.



## 10.1 Instrumentacija

Instrument Rotor-Gene Q MDx nudi sljedeće zahtjevne termooptičke mogućnosti u stvarnom vremenu koje su potrebne za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM):

- osvijetljenje visokog intenziteta
- vrlo osjetljiva optička detekcija
- brzo prikupljanje podataka
- precizno kontrolirana temperatura uzorka
- minimalna toplinska i optička varijacija među uzorcima.

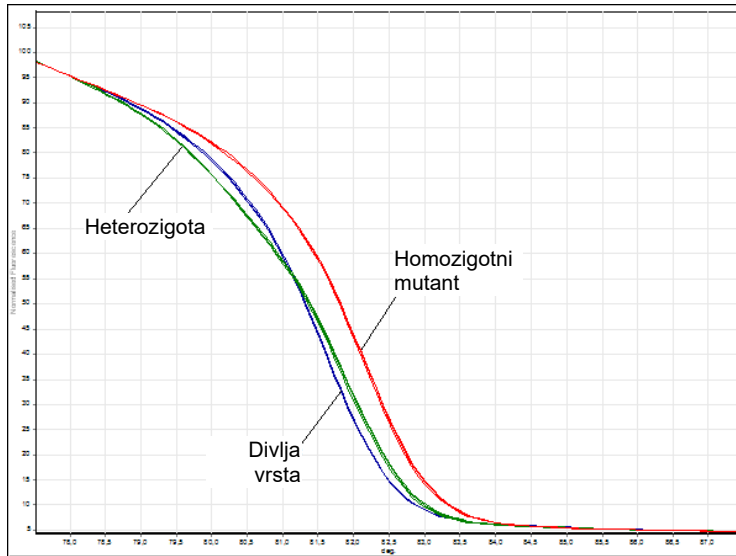
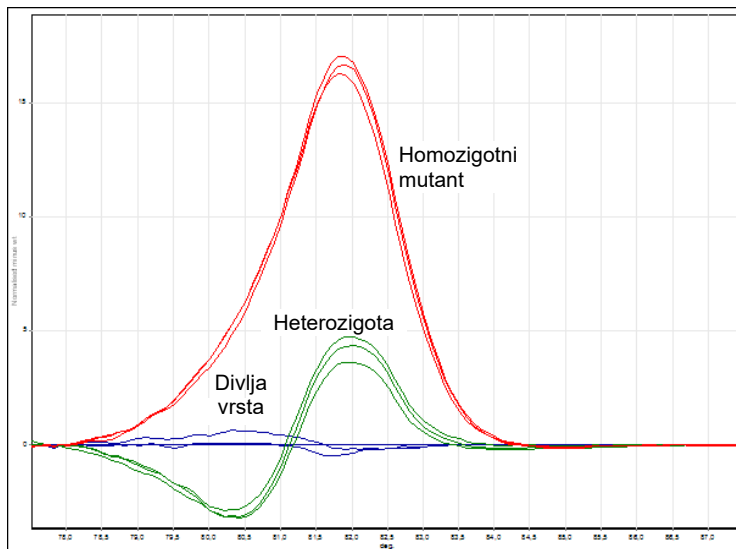
## 10.2 Kemijska sredstva

Tvrtka QIAGEN nudi komplet Type-it® HRM PCR Kit za analizu polimorfizama jednog nukleotida (single nucleotide polymorphisms, SNPs) i mutacija primjenom taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) te komplet EpiTect® HRM PCR Kit za analizu metilacije. Oba kompleta sadržavaju interkalirajuću fluorescentnu boju treće generacije EvaGreen. Kompleti kombiniraju optimizirani pufer za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) te HotStarTaq® *Plus* DNA Polymerase radi izbjegavanja nespecifičnih produkata amplifikacije te pružanja pouzdanih rezultata.

**Napomena:** svi kompleti i reagensi za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) tvrtke QIAGEN indicirani su za uporabu s instrumentima Rotor-Gene Q samo za primjene opisane u priručnicima pojedinačnih kompleta tvrtke QIAGEN.

## 10.3 Primjer genotipizacije polimorfizma jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP)

U prikazanom primjeru komplet Type-it HRM PCR Kit korišten je u analizi taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) za razlikovanje između homozigotnih oblika divlje vrste, homozigotnih mutanata i heterozigotnih oblika humanog polimorfizma jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP) rs60031276. Tehničke pojedinosti potražite u *Priručniku za Type-it HRM PCR*.

**A****B**

**C**

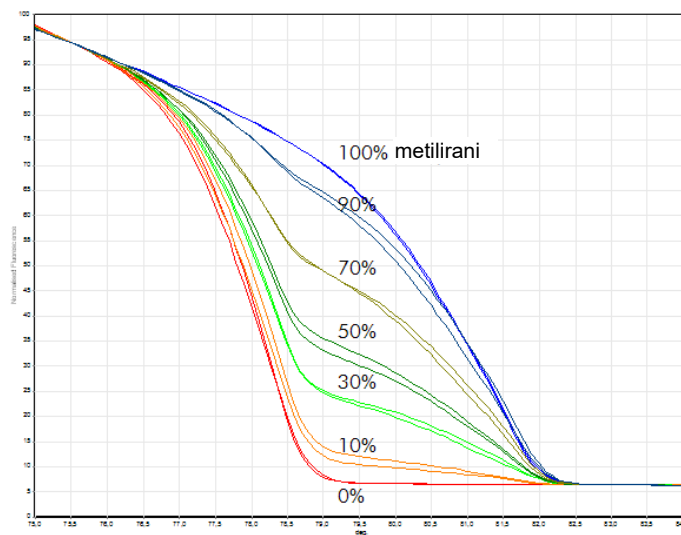
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	■	AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	■	unknown	homo AA	99,49
24	■	unknown	homo AA	99,76
28	■	AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	■	unknown	hetero AG	99,49
30	■	unknown	hetero AG	98,47
34	■	GG Human SNP rs60031276	homo GG	100,00
35	■	unknown	homo GG	98,80
36	■	unknown	homo GG	99,53

**Genotipizacija polimorfizma jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP) taljenjem velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM).** Humani polimorfizam jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP) rs60031276 (zamjena A s G) u genu PPP1R14B (protein-fosfataza 1, regulatorna (inhibitorska) podjedinica 14B) analiziran je na instrumentu Rotor-Gene Q uz uporabu 10 ng genomskog DNK različitih genotipova i kompleta Type-it HRM Kit. Homozigotni uzorci divlje vrste (AA), homozigotni mutanti (GG) i heterozigotni (AG) uzorci prikazani su na **A** standardnoj normaliziranoj krivulji taljenja i **B** grafikonu razlikovanja normaliziranom prema uzorcima divlje vrste. **C** Genotipove za nepoznate uzorke dodijelio je softver Rotor-Gene Q.

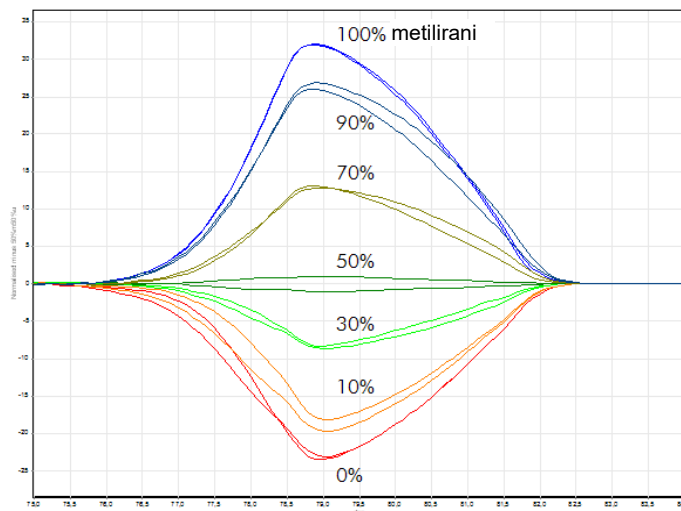
## 10.4 Primjer analize metilacije

U prikazanom primjeru komplet EpiTect HRM PCR Kit korišten je u analizi taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) za diskriminaciju različitih omjera metiliranog i nemetiliranog DNK. Tehničke pojedinosti potražite u *Priručniku za EpiTect HRM PCR*.

**A**



**B**



**Kvantitativna analiza metilacije s pomoću taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM).** Različiti omjeri metiliranog i nemetiliranog DNK-APC (adenomatozna polipoza kolona) analizirani su i diskriminirani u analizi metilacije s pomoću taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) na rotoru Rotor-Gene Q, pri čemu se upotrebljavao komplet EpiTect HRM Kit. Prikazani su standardna normalizirana krivulja taljenja **A** i prikaz razlikovanja normaliziran na 50 % metiliranog uzorka **B**.

## 10.5 Smjernice za uspješnu analizu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)

Uspjeh analize taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) uvelike ovisi o određenoj sekvenci koja se istražuje. Određeni motivi sekvence, kao što su petlje ukosnice ili druge sekundarne strukture, lokalizirane regije visokog ili niskog sadržaja GC-a ili ponavljajuće sekvence, mogu utjecati na rezultat. Osim toga, uporabom standardiziranih kompleta i optimiziranih protokola tvrtke QIAGEN mogu se riješiti mnogi od mogućih navedenih izazova. U nastavku su navedene jednostavne smjernice koje mogu pomoći u postizanju uspjeha.

### **Analiziranje malih odsječaka DNK**

Analizirajte fragmente koji nisu veći od oko 250 bp. Veći produkti mogu se uspješno analizirati, ali obično pružaju nižu razlučivost. Razlog tome, na primjer, može biti to što varijacija pojedine baze ima veći učinak na ponašanje taljenja ampikona od 100 bp od ampikona od 500 bp.

### **Osiguranje da PCR sadržava samo određen produkt**

Uzorci kontaminirani post-PCR artefaktima, kao što su primer-dimeri ili nespecifični produkti, mogu otežati tumačenje rezultata taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) Kompleti tvrtke QIAGEN za analizu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) osiguravaju maksimalnu specifičnost, bez potrebe za optimizacijom.

### **Uporaba predloška dostatne preamplifikacije**

Analiza podataka real-time PCR-a može biti vrlo korisna pri rješavanju problema povezanih s analizama taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM). Grafikoni s amplifikacijskom krivuljom trebali bi imati  $C_T$  (ciklus praga) koji je manji od ili jednak 30 ciklusa. Produkti koji se amplificiraju nakon toga (zbog niskog iznosa početnog predloška ili degradacije predloška) obično proizvode varijabilne rezultate taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) zbog artefakata PCR-a.

### **Normaliziranje koncentracije predloška**

Količina predložaka koji se dodaju reakciji treba biti konzistentna. Normalizirajte početne koncentracije kako bi grafikoni s amplifikacijskom krivuljom međusobno bili unutar 3  $C_T$  vrijednosti. Time se osigurava da su ulazne koncentracije unutar deseterostrukog raspona.

## Provjera postoje li pogrešni grafikoni s amplifikacijskom krivuljom

Prije pokretanja taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) pažljivo pregledajte podatke o grafikonu s amplifikacijskom krivuljom kako biste uočili neuobičajeni oblik grafikona s amplifikacijskom krivuljom. Grafikoni s logaritamsko-linearnom fazom koja nije razvučena, nego je nazubljena, ili oni koji dosežu plato niskog signala u usporedbi s drugim reakcijama, mogu ukazivati na slabu amplifikaciju ili preniski signal fluorescencije (npr. to se može pojaviti ako je koncentracija početnice bila preniska). Slabe reakcije mogu biti rezultat reakcijskih inhibitora ili neispravnog postavljanja reakcije. Podaci o taljenju velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) iz takvih primjera mogu biti neuvjerljivi ili niske razlučivosti. Da biste izbjegli nepouzdanu rezultate, preporučujemo uporabu kompleta tvrtke QIAGEN za pripremu uzoraka i analizu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM).

## Održavanje sličnih koncentracija uzoraka nakon amplifikacije

Koncentracija fragmenta DNK utječe na njegovu temperaturu taljenja ( $T_m$ ). Stoga koncentracije uzoraka DNK moraju biti što sličnije. Pri analizi PCR produkata provjerite je li svaka reakcija dosegla fazu platoa. U fazi platoa sve reakcije amplificirat će se do slične razine, neovisno o početnoj količini. No imajte na umu da slabe reakcije možda neće dosegnuti plato s istom amplificiranom količinom zbog, na primjer, nedosljednosti u pripremi ispitivanja (npr. koncentracija početnice bila je preniska).

## Osiguranje ujednačenosti među uzorcima

Svi uzorci moraju biti jednakog volumena i trebaju sadržavati jednaku koncentraciju boje. Na ponašanje DNK pri taljenju utječu soli u reakcijskoj mješavini, stoga je važno da su koncentracije pufera, Mg i ostalih soli što ujednačenije u svim uzorcima. Slično tome, upotrebljavajte samo identične reakcijske epruvete istog proizvođača da biste izbjegli varijacije zbog debljine plastike i svojstava autofluorescencije.

## Dopuštanje prikupljanja dostatne količine podataka za faze predtaljenja i posttaljenja

Dohvaćajte podatkovne točke taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) iznad raspona od približno 10 °C, centrirane oko promatrane vrijednosti  $T_m$  (pogledajte sliku na stranici 10). To pruža dovoljno početnih podatkovnih točaka za učinkovitu normalizaciju krivulje te će rezultirati replikama koje se lakše reproduciraju i jednostavnijim tumačenjem podataka.

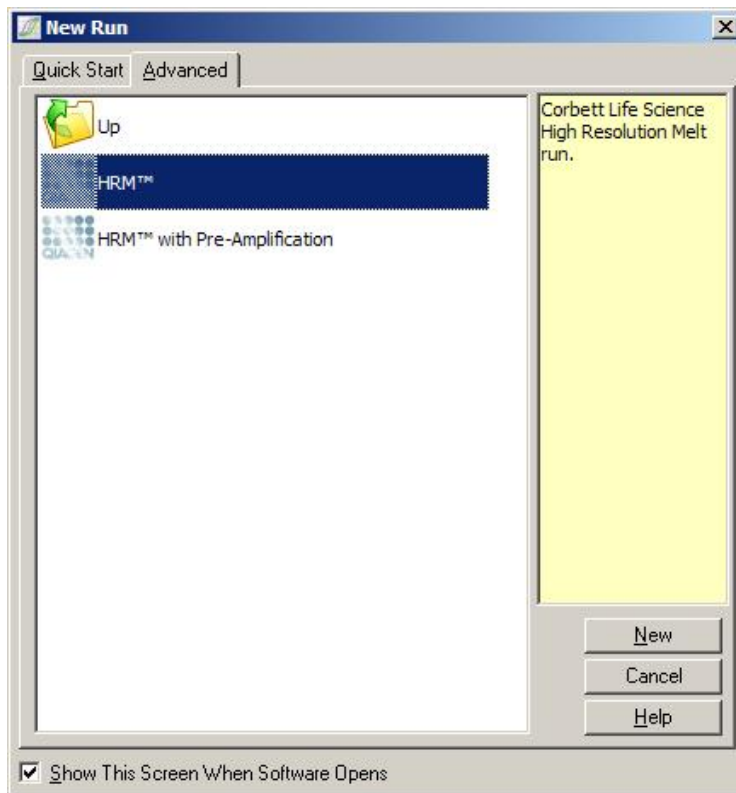
## 10.6 Priprema uzoraka

Tijekom pročišćivanja i pohrane treba izbjeći degradaciju uzorka. Izbjegavajte prevelike količine inhibitora, primjerice, od prijenosa etanola. Da biste unaprijedili rezultate taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM), preporučujemo da se količina predloška među uzorcima dosljedno upotrebljava. Preporučuje se spektrofotometrijska analiza za određivanje koncentracije i čistoće DNK. Preporučujemo da za pripremu uzoraka upotrebljavate komplete tvrtke QIAGEN.

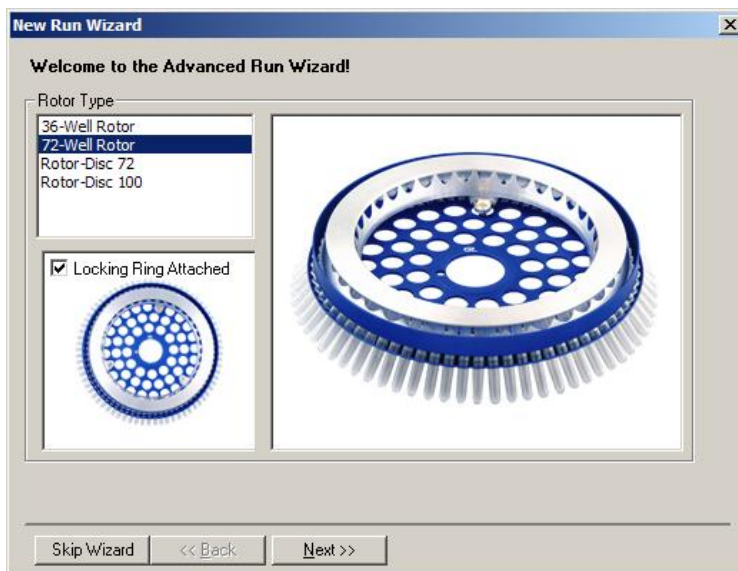
**Napomena:** pri 260 nm jedna apsorpcijska jedinica iznosi 50 µg/ml DNK. Čisti DNK dat će od 260 nm do 280 nm omjera 1,8.

## 10.7 Postavljanje softvera

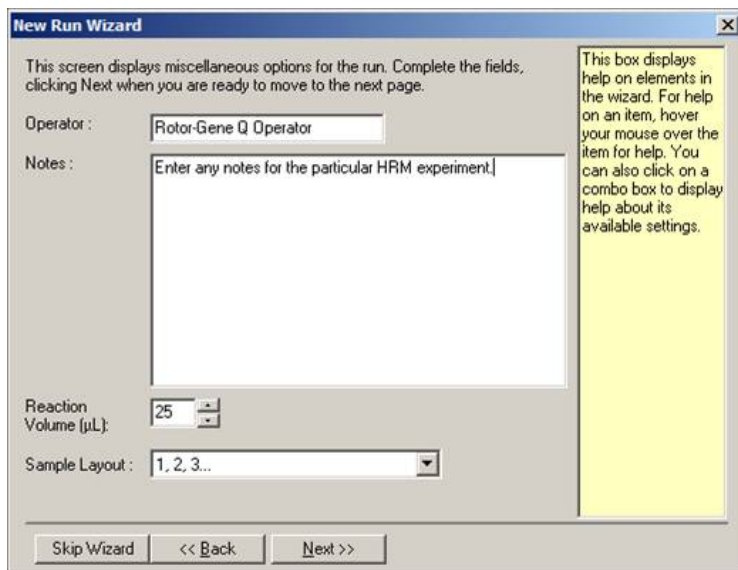
1. Odaberite **New...** (Novo) iz izbornika **File** (Datoteka) da biste mogli otvoriti datoteku novog postupka. U čarobnjaku Advanced (Napredno) odaberite **HRM** (Taljenje velike razlučivosti).



2. Postavite vrstu rotora (u ovom primjeru upotrebljava se 72-Well Rotor). Prije prelaska na sljedeći korak provjerite je li postavljen prsten za zaključavanje i je li označen potvrdni okvir **Locking Ring Attached** (Pričvršćen prsten za zaključavanje).

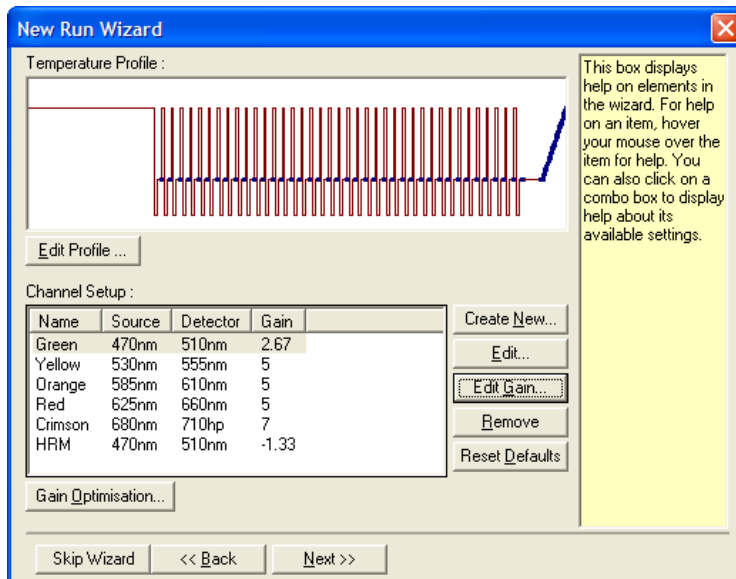


3. Postavite pojedini postupak. Unesite ime rukovatelja (opcionalno) i dodajte sve napomene o eksperimentu (opcionalno). Odaberite volumen reakcije (obavezno) i željeni raspored uzoraka.

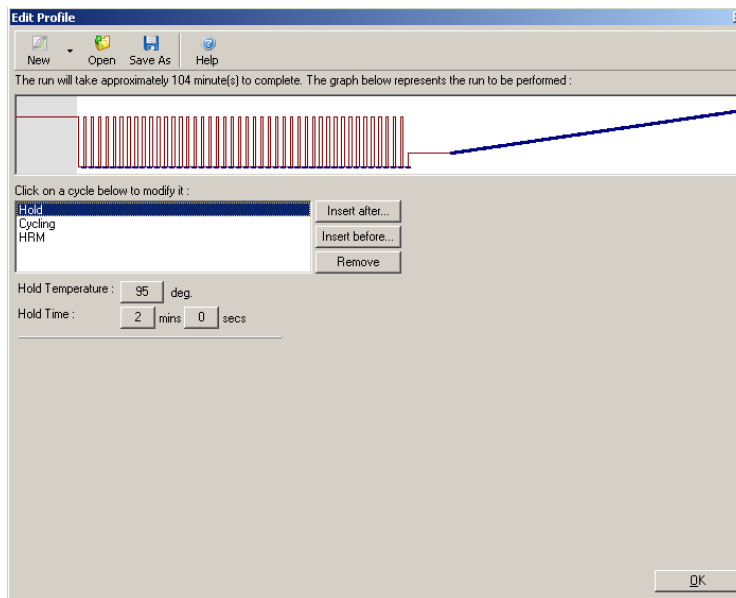




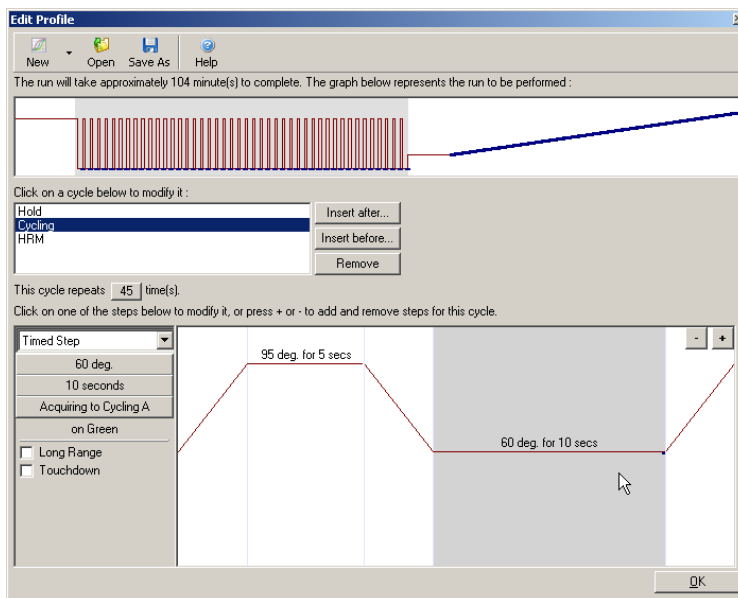
4. Kliknite gumb **Edit Profile...** (Uredi profil) da biste izmijenili vremena i temperature reakcije.



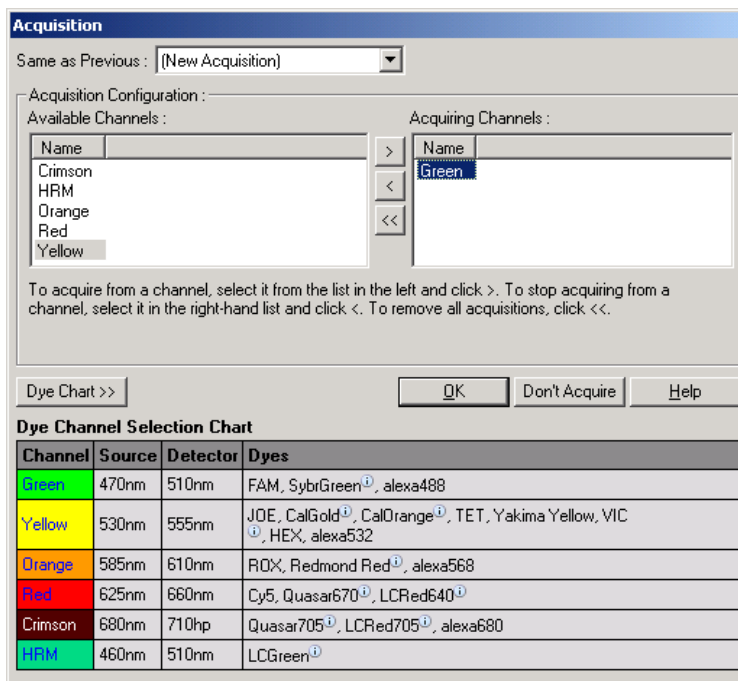
5. Postavite odgovarajuće početno vrijeme zadržavanja. To vrijeme ovisi o vrsti DNK polimeraze koja se upotrebljava. Kompleti Type-it HRM PCR Kit i EpiTect HRM PCR Kit zahtijevaju vrijeme aktivacije od 5 minuta. Zadano vrijeme aktivacije iznosi 10 minuta.



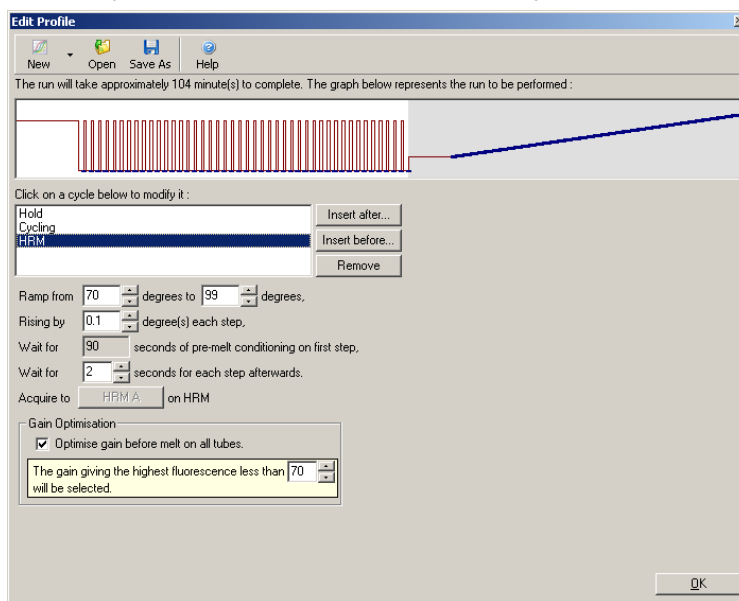
6. Zmijenite cikliranje da odgovara amplitkonu.



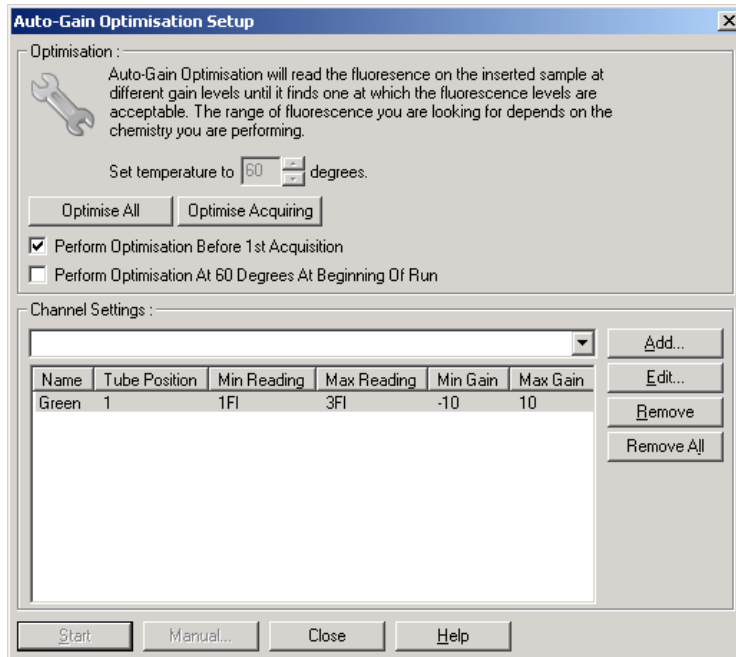
7. Provjerite hoće li se prikupljati podaci o fluorescenciji. Prikupljajte podatke na zeleni kanal na kraju koraka sparivanja.



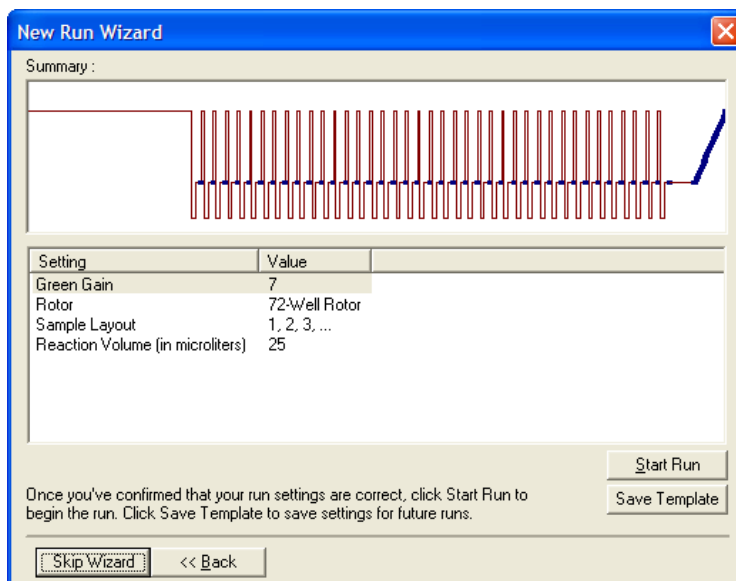
8. Postavite uvjete za postupak taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM). Izmijenite uvjete da odgovaraju amplitudoni. Za prvi set eksperimenata dopustite širu domenu taljenja. Upotrijebite teoretski  $T_m$  kao vodič za primjeren raspon. Nakon što utvrdite gdje će se produkt taliti, smanjite domenu taljenja na najviše 10 °C. Provjerite počinje li postupak taljenja 5 °C prije prvog prijelaza taljenja. Zadana stopa povećanja postavljena je na 0,1 °C sa zadržavanjem od 2 s u svakom koraku. Najmanja stopa povećanja pri prijelazu jest 0,05 °C sa sekundom zadržavanja u svakom koraku. Podaci se automatski prikupljaju na kanal za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM). Postupak Automatic Gain Optimisation (Automatska optimizacija pojačanja) provodi se prema zadanim postavkama. Softver će tražiti postavku optimalnog pojačanja kako najviša prijavljena vrijednost fluorescencije ne bi prelazila 70 jedinica na skali od 100. Imajte na umu da se to može povećati do najviše 100.



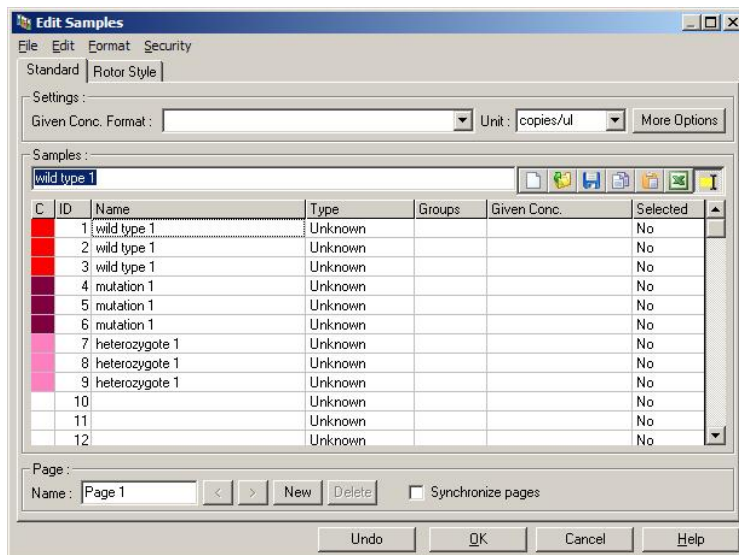
9. Opcionalno: postavite Auto-Gain Optimisation (Automatska optimizacija pojačanja). To se primjenjuje na korak amplifikacije u stvarnom vremenu te je postavljeno za zeleni kanal. Kliknite gumb **Optimize Acquiring** (Optimiziraj prikupljanje) (da biste optimizirali samo kanale koji se upotrebljavaju u postupku). Najbolje je optimizaciju provoditi prije prvog koraka prikupljanja, stoga označite potvrdni okvir **Perform Optimization Before First Acquisition** (Izvedi optimizaciju prije prvog prikupljanja). Preporučeni raspon pozadinske fluorescencije za interkalirajuće boje iznosi između 1 i 3 jedinice fluorescencije. Da biste promijenili tu postavku, kliknite naziv kanala i odaberite ga na popisu te potom kliknite gumb **Edit** (Uredi).



10. Pokrenite postupak klikom na gumb **Start Run** (Pokreni postupak) i spremite datoteku postupka na svoje računalo.



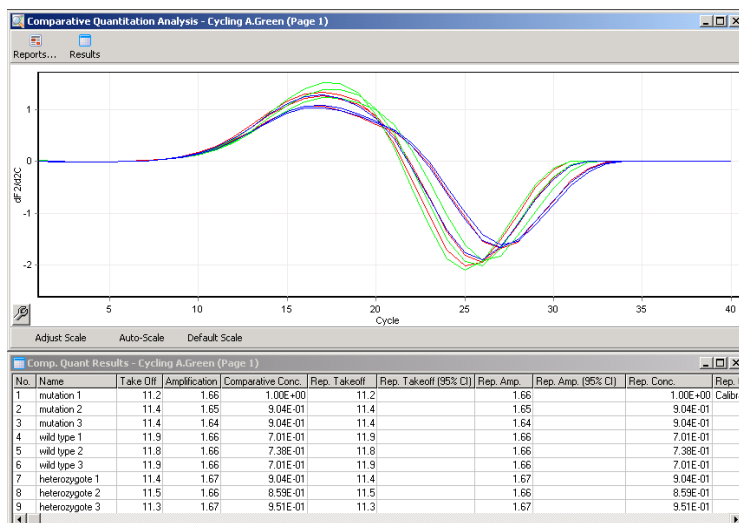
1. Uredite nazive uzoraka (opcionalno). Nazivi uzoraka mogu se uređivati tijekom postupka ili nakon njega.



## 10.8 Analiza podataka postupka real-time PCR

Analiza podataka o postupku real-time PCR koja se provodi prije analiza podataka o taljenju velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) ima svoje prednosti. Podaci postupka real-time PCR mogu istaknuti ispitivanja s iznimno slabim rezultatima. Utvrđivanje takvih sumnjivih vrijednosti i njihovo izostavljanje iz analize taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) koja slijedi uvelike će poboljšati cjelokupnu učinkovitost analize taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) jer će analiziranje PCR produkta loše kvalitete rezultirati lošim rezultatima taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM). Preporučujemo da kvantitativne podatke o postupku real-time PCR analizirate kako je opisano u nastavku.

1. Analizirajte podatke u stvarnom vremenu koristeći se mogućnošću **Quantitation** (Kvantifikacija) u prozoru **Analysis** (Analiza). Ako bilo koja vrijednost  $C_T$  prelazi 30 ili više, smatra se da su se odgovarajuće reakcije prekasno amplificirale. Ti se uzorci moraju analizirati sa sumnjom ili ih treba ukloniti iz analize kao sumnjive vrijednosti. Kasna amplifikacija često je rezultat premalog početnog predloška i/ili visokih razina degradacije uzoraka.
2. Procijenite razinu fluorescencije krajnje točke. Ako je fluorescencija krajnje točke na bilo kojem grafikonu s amplifikacijskom krivuljom niska u usporedbi s većinom grafikona u podatkovnom skupu, te uzorke izostavite iz analize čak i ako im je vrijednost  $C_T$  manja od 30. Niska fluorescencija krajnje točke može ukazivati na neispravnu količinu boje, neispravne razine reakcijskih komponenti (kao što su početnice) ili na aktivnost inhibitora.
3. Primijenite mogućnost **Comparative Quantitation** (Komparativna kvantifikacija) u prozoru **Analysis** (Analiza) da biste dobili učinkovitost reakcije svakog uzorka. Ako učinkovitost nije slična drugim reakcijama u eksperimentu ili ako je manja od približno 1,4, izostavite reakciju kao sumnjivu.



**Rezultati komparativne kvantifikacije.** Učinkovitost reakcije prikazana je u stupcu „Amplification” (Amplifikacija) kao rezultat od 2 (2 = 100-postotna učinkovitost).

**Napomena:** ako sumnjate da su prisutni primer-dimeri ili neodređeni produkti, procijenite reakcije crtanjem derivativnog grafikona s pomoću mogućnosti **Melt** (Taljenje) u prozoru **Analysis** (Analiza). Provjerite postoji li samo jedna vršna vrijednost, indikativna za određeni produkt. Ako je to moguće, provedite razdvajanje na gelu da biste provjerili postoji li samo jedan produkt amplifikacije. Ako postoji više produkata, reakciju treba ponoviti ili ponovno optimizirati.

## 10.9 Analiza podataka o taljenju velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)

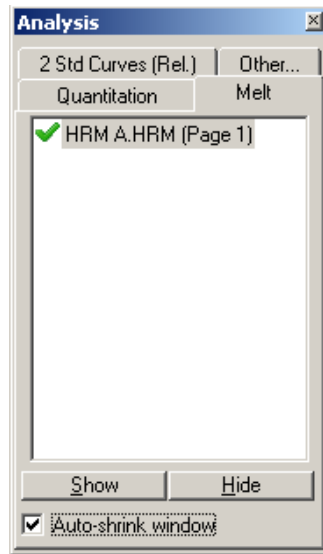
Analiza podataka o taljenju velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) omogućuje vizualno i automatsko pozivanje genotipova. Rezultati se mogu pregledati ili kao normalizirane grafikone mekšanja ili razlikovni prikaz. Normalizirane krivulje omogućuju osnovni prikaz različitih genotipova na temelju pomaka krivulje (za homozigote) i promjene oblika krivulje (za heterozigote).

Razlikovni grafikoni pomoć su u vizualnom tumačenju. Prikazuju razliku u fluorescenciji uzorka prema odabranoj kontroli kod svakog prijelaza temperature. Razlikovni grafikoni omogućuju alternativni prikaz razlika između prijelaza krivulje taljenja.

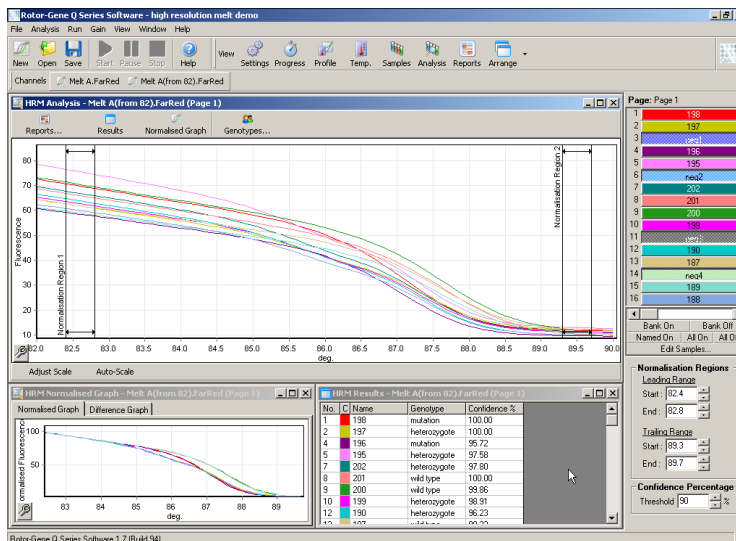
**Napomena:** analiza prve derivacije krivulje taljenja (koju upotrebljava standardna mogućnost **Melt** (Taljenje) u prozoru **Analysis** (Analiza)) smatra se neprikladnom za analizu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM). Razlog je činjenica da svaka derivacija podataka dodaje umjetni šum i dodatno otežava tumačenje podataka.

Sljedeći koraci opisuju analizu rezultata taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) s pomoću softvera Rotor-Gene Q.

1. Odaberite mogućnost **HRM** (Taljenje velike razlučivosti) u prozoru **Analysis** (Analiza).

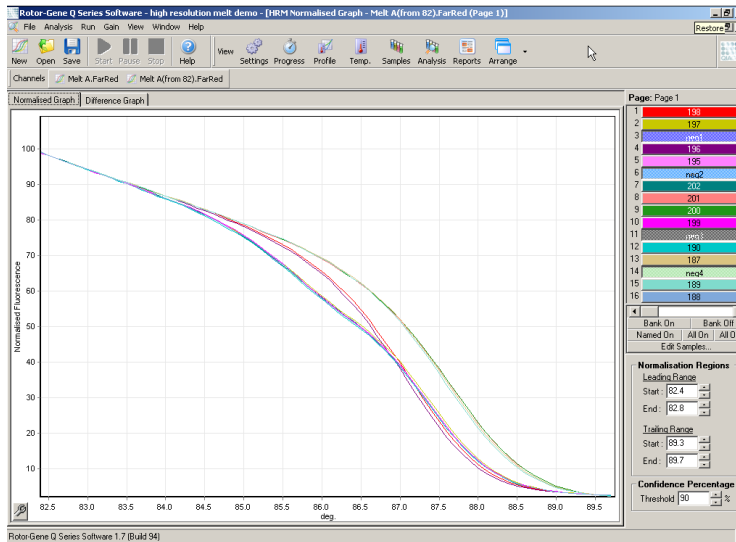


2. Pojavljuju se prozori u kojima se prikazuju neobrađeni podaci, normalizirani grafikon i rezultati. Prozor neobrađenih podataka dopušta prilagodbu regija normalizacije. Normalizacija dopušta da se sve krivulje uspoređuju s istom razinom početnog i završnog fluorescentnog signala kako bi se pomoglo pri tumačenju i analizi. Navode se dva pokazivača po regiji koja su postavljena na krajeve krivulje. Podatkovne točke u regijama upotrebljavaju se za normalizaciju fluorescencije (samo y-os) za početak (Regija 1) i kraj (Regija 2) grafikona taljenja. Podaci koji se nalaze izvan postavljenih regija ignoriraju se. Prilagodite regije da bi uključivale reprezentativne početne podatke za faze predtaljenja i posttaljenja. Proširenje regija (tako da kliknete na njih i povučete ih) dopušta softveru da se prilagodi nagibu osnovne linije. Da bi se osigurala učinkovita normalizacija krivulja, izbjegavajte širenje regija normalizacije u fazi taljenja.

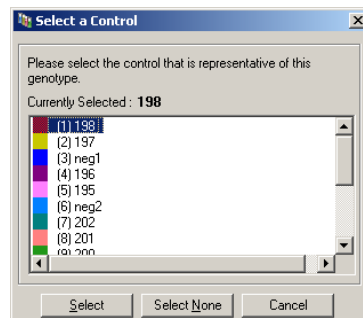
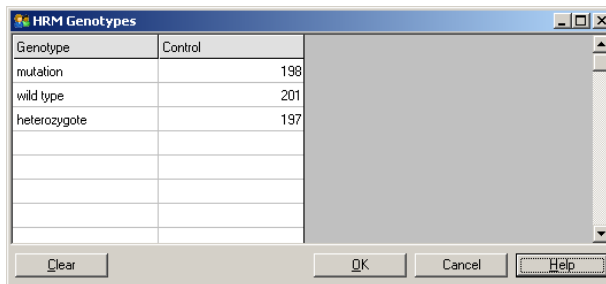


**Napomena:** preporučujemo da pokazivače pomičete samo ako želite izbjeći područja krivulje taljenja. Pomicanje pokazivača prema tranzicijama u fazi taljenja može utjecati na grafikon oduzimanja i postotke pouzdanosti.

- U prozoru **Normalised Graph** (Normaliziran grafikon) prikazuju se normalizirane krivulje taljenja. Uzorci se također mogu prikazivati kao razlikovni grafikon u odnosu na kontrole.

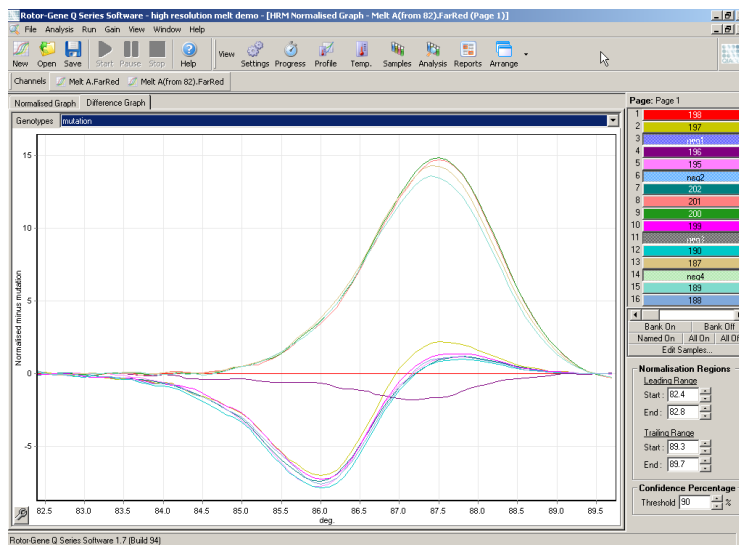


- Kliknite gumb **Genotypes...** (Genotipovi...) da biste definirali genotipove. Unesite naziv za svaku kategoriju genotipa i odaberite reprezentativni primjer za svaki s popisa uzoraka.





5. Pogledajte razlikovni grafikon odabirom kartice **Difference Graph** (Razlikovni grafikon). Potom u padajućem izborniku na vrhu prozora odaberite genotip koji želite usporediti sa svim drugim uzorcima. U prikazanom primjeru svi su uzorci prikazani na grafikonu oduzeti od prosječnog grafikona svih uzoraka označenog kao **Mutation 1** (Mutacija 1).



6. Genotipovi će automatski pozivati softver u prozoru **Results** (Rezultati). Vrijednost pouzdanosti prikazuje se kao provjera integriteta automatski pozvanih rezultata. Vrijednost praga, iznad koje se automatski poziva, može se uređivati. Uzorci koji spadaju ispod postavljenog praga bit će označeni kao varijacija za pobliže istraživanje ili ponovno ispitivanje.

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

U ovom odjeljku navedene su informacije o tome što treba učiniti ako dođe do pogreške tijekom uporabe sustava Rotor-Gene Q MDx System.

Ako trebate dodatnu pomoć, poslužite se kontaktnim podacima u nastavku kako biste se obratili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN:

Web-mjesto: **support.qiagen.com**

Kada se javljate Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN u vezi s pogreškom u softveru Rotor-Gene Q MDx, zabilježite korake koji su doveli do pogreške i sve informacije navedene u dijaloškim okvirima. Te će informacije pomoći Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN u rješavanju problema.

Kada se javljate Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN u vezi s pogreškama, pripremite sljedeće informacije:

- serijski broj, vrstu i verziju instrumenta Rotor-Gene Q MDx
- inačicu softvera (ako je primjenjivo)
- trenutak u kojem se pogreška prvi put pojavila
- učestalost javljanja pogreške (tj. povremena ili trajna pogreška)
- detaljan opis slučaja pogreške
- fotografiju pogreške, po mogućnosti
- kopiju datoteka zapisa.

Te informacije omogućit će vama i stručnjaku Tehničke službe tvrtke QIAGEN rješavanje problema na najučinkovitiji mogući način.

**Napomena:** informacije o najnovijim inačicama softvera i protokola možete pronaći na stranici **www.qiagen.com**. U nekim slučajevima za rješavanje određenih problema mogu biti dostupna ažuriranja.

## 11.1 Arhiva zapisa

U repozitoriju Log Archive (Arhiva zapisa) softvera pohranjuje se neizmijenjeni zapis svakog postupka zajedno s dijagnostičkim informacijama. Uporaba mogućnosti **Help** (Pomoć), **Send Support Email** (Pošalji e-poruku podršci) omogućuje vam slanje poruke e-pošte Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN sa svim potrebnim dijagnostičkim informacijama (pogledajte odjeljak 6.12.1).

Da bi se sačuvao prostor na disku, u repozitoriju Log Archives (Arhiva zapisa) pohranjuju se zapisi o samo 60 najnovijih postupaka. Stariji postupci evidentirani u repozitoriju Log Archives (Arhiva zapisa) bit će prepisani kako se budu izrađivali zapisi u Log Archives (Arhiva zapisa) za nove postupke.

## 11.2 Hardverske i softverske pogreške

### 11.2.1 Rješavanje problema na testu taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)

#### Komentari i prijedlozi

##### Nije moguće provesti taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)

Rotor-Gene Q MDx model is not HRM equipped (Model instrumenta Rotor-Gene Q MDx nije opremljen za izvođenje taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM))  
Obratite se lokalnom predstavniku tvrtke QIAGEN.

##### Nema prikupljenih podataka o taljenju velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)

Neispravno postavljanje  
Provjerite postavke filtra.  
Provjerite je li vrsta rotora ispravna.  
Provjerite jesu li upotrijebljeni odgovarajući reagensi.  
Provjerite je li reakcija ispravno postavljena.  
Izvedite eksperiment pozitivne kontrole (tj. ispitivanje za koje se zna da pruža rezultate).

##### Grafikoni izgledaju šiljasto

Slaba amplifikacija ili nema amplifikacije  
Provjerite jesu li upotrijebljeni odgovarajući protokoli i reagensi. Preporučujemo da za izvođenje analize taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) upotrebljavate komplete tvrtke QIAGEN.  
Provjerite je li reakcija ispravno postavljena.  
Provjerite uvjete cikliranja.  
Provjerite početnu kvalitetu i količinu predloška. Preporučujemo da za pripremu uzoraka upotrebljavate komplete tvrtke QIAGEN.

##### Zasićena grafikoni amplifikacije ili taljenja

Pojačanje je postavljeno previsoko  
Upotrebljavajte značajku **Auto-Gain Optimisation** (Automatska optimizacija pojačanja) (pogledajte stranicu 63).

##### Promijenili su se postotci pouzdanosti

Regije normalizacije pomaknute su klikanjem i povlačenjem  
Regije normalizacije pomičite samo ako je to potrebno za izbjegavanje dijelova krivulje taljenja.

##### U podacima su navedene sumnjive vrijednosti

Nedosljedno postavljanje reakcija  
Provjerite jesu li upotrijebljeni odgovarajući reagensi.  
Provjerite jesu li upotrijebljene jednake epruvete.  
U uzorku su prisutni inhibitori  
Provjerite je li u svim uzorcima upotrijebljena jednaka glavna mješavina.  
Premali ili degradirani predložak  
Provjerite početnu kvalitetu i količinu predloška.

## 11.3 Poruke o pogreškama i upozorenjima

### 11.3.1 Općenite pogreške instrumenta

Poruke o pogreškama	Komentari i prijedlozi
<b>Can't open the serial port &lt;COMPORT&gt;</b> (Nije moguće otvoriti serijski priključak <COMPORT> )	Do ove pogreške dolazi pri pokretanju softvera ako softver ne može komunicirati s instrumentom preko konfiguriranog COM priključka. Razlog tome često leži u oštećenim kabelima, labavim kabelima, oštećenim serijskim priključcima, oštećenim USB priključcima, problemu s USB pogonom ili u problemu s pogonom koji USB priključak konvertira u serijski priključak. Ponovno povežite ili zamijenite kabel. Ponovno instalirajte odgovarajuće pogone. Pokrenite softver u načinu <b>Virtual Mode</b> (Virtualni način rada) i odaberite gumb <b>Setup/Auto-Detect</b> (Postavljanje / Automatsko detektiranje) iz izbornika <b>File</b> (Datoteka) da biste ponovno postavili konfigurirani COM priključak.
<b>Chamber lid open</b> (Otvoren je poklopac komore) Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software. (Nije moguće nastaviti s postupkom; poklopac komore otvoren je tijekom postupka. Vratite uređaj na zadane postavke i ponovno pokrenite softver.)	Do ove pogreške dolazi kad je softver detektirao da je poklopac otvoren usred postupka. Vratite uređaj na zadane postavke i ponovno pokrenite softver.
<b>Chamber lid open</b> (Otvoren je poklopac komore) The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue. (Otvoren je poklopac komore instrumenta. Zatvorite poklopac i potom kliknite Continue (Nastavi).)	Do ove pogreške dolazi kad korisnik pokuša pokrenuti postupak dok je poklopac instrumenta otvoren. Zatvorite poklopac i potom kliknite <b>Continue</b> (Nastavi).
<b>Communication corrupted</b> (Došlo je do problema pri komunikaciji)	Do ove pogreške dolazi kada podaci primljeni s instrumenta nisu u skladu s očekivanim obrascem. Stručnjak Terenske službe tvrtke QIAGEN mora provesti dodatno istraživanje kako bi dijagnosticirao problem s instrumentom. Obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.
<b>Communication out of sequence</b> (Komunikacija se ne odvija točnim redoslijedom) Instrument has received data from the machine that is out of sequence. (Instrument je s uređaja primio podatke koji nisu točnog redoslijeda.)	Do ove pogreške dolazi kada podaci primljeni s instrumenta nisu točnog redoslijeda. Stručnjak Terenske službe tvrtke QIAGEN mora provesti dodatno istraživanje kako bi dijagnosticirao problem s instrumentom. Obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.
<b>Communication protocol error</b> (Pogreška komunikacijskog protokola) A communication protocol error occurred with this run. (U ovom postupku došlo je do pogreške komunikacijskog protokola.)	Do ove pogreške dolazi kad komunikacijski protokol konfiguriran u firmveru nije jednak očekivanom protokolu. Stručnjak Terenske službe tvrtke QIAGEN mora provesti dodatno istraživanje kako bi dijagnosticirao problem s komunikacijskim protokolom ili instrumentom.
<b>Detector motor jam, stopped machine</b> (Zastoj motora detektora, zaustavljen uređaj)	Do ove pogreške dolazi kad se Rotor-Gene Q MDx pokreće odmah nakon dostave u hladnim klimatskim uvjetima. U ovom slučaju pričekajte barem sat vremena da se instrument prilagodi temperaturi prostorije prije nego što uključite instrument. Ako pogreška i dalje postoji, obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.
<b>Fatal hardware malfunction</b> (Fatalni kvar hardvera) 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 (Instrument je otkrio fatalni kvar hardvera. Nemojte pokušavati ponovno upotrebljavati uređaj dok ga vaš distributer ne servisira.)	Do ove pogreške dolazi kada softver utvrdi fatalni kvar hardvera te aktivira postupak sigurne zaštite za isključivanje uređaja. Odmah isključite instrument i obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

## Poruke o pogreškama

### Machine error (Pogreška uređaja)

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. (Ovaj postupak zaustavljen je jer je došlo do pogreška uređaja od kojih se nije mogao oporaviti. Ako se to ponovi, obratite se svojem distributeru i priložite datoteku arhive koja to potvrđuje.)

### Machine unplugged (Uređaj je isključen)

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. (Instrument ne reagira i ne radi te se pojavljuje poruka <PORUKA O POGREŠCI>. Ovo je kvar od kojeg se ne može oporaviti, vratite uređaj na zadane postavke i ponovno pokrenite softver.)

### Machine unplugged (Uređaj je isključen)

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. (Instrument nije povezan s vašim računalom na priključku <NAZIV PRIKLJUČKA>. Ponovno povežite serijski kabel sa stražnjom stranom računala i potom kliknite Continue (Nastavi).)

**Object variable or with block variable not set** (Nisu postavljene objektna varijabla ili varijabla bloka With)

### Rotor speed failure (Pogreška povezana s brzinom rotora)

Time out while setting the rotor speed. (Prekid tijekom postavljanja brzine rotora.)

### Serial port in use (Serijski priključak u uporabi)

The serial port is currently being used by another application. Close any applications such as communications or synchronization software and then retry. (Serijski priključak trenutno upotrebljava druga aplikacija. Zatvorite sve aplikacije kao što su komunikacije ili sinkronizacijski softver te potom pokušajte ponovno.)

### Shutdown timeout (Istek vremena za isključivanje)

The instrument has exceeded the expected time to shutdown. Please reset the machine, and reset the software. (Instrument je premašio očekivano vrijeme za isključivanje. Ponovno pokrenite uređaj i vratite softver na zadane postavke.)

## Komentari i prijedlozi

Do ove pogreške dolazi kad softver utvrdi pogreške uređaja od kojih se nije mogao oporaviti. Softver je prestao raditi.

Pokušajte izvesti još jedan postupak. Ako problem i dalje postoji, obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN i priložite datoteku arhive koja to potvrđuje.

Do ove pogreške dolazi ako instrument ne komunicira sa softverom nakon definiranog vremenskog ograničenja. Razlog tome često je kvar instrumenta ili prevelika aktivnost računala, što uzrokuje gubitak paketa.

Česti uzroci koji su povezani softverom uključuju zadatke koji intenzivno opterećuju procesor poput rezidentne antivirusne zaštite ili zakazanih antivirusnih skeniranja, bežične ili infracrvene kartice.

Onemogućite ili deinstalirajte relevantni softver/zadatak koji intenzivno opterećuje procesor.

Vratite instrument na zadane postavke i ponovno pokrenite softver.

Ako problem i dalje postoji, obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Do ove pogreške dolazi uslijed gubitka serijske ili USB komunikacije s instrumentom.

Ponovno povežite serijski ili USB kabel sa stražnjom stranom računala i potom kliknite gumb **Continue** (Nastavi).

Do ove pogreške dolazi pri pokretanju softvera ako je zadana datoteka predloška eksperimenta oštećena. To se može dogoditi ako se softver/računalo ugase prije ispravno izlaska iz softvera / gašenja računala, primjerice, u slučaju nestanka struje.

Izbrišite datoteku **C:\Program Files\Rotor-Gene Q**

**Software\Templates\normal.ret** i potom ponovno pokrenite softver.

Do ove pogreške dolazi kad softver pokuša postaviti brzinu rotora i ne uspije postaviti ciljanu brzinu u određenom vremenskom razdoblju.

Stručnjak Terenske službe tvrtke QIAGEN mora provesti dodatno istraživanje kako bi dijagnosticirao problem s instrumentom.

Obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Do ove pogreške dolazi kada se softver pokuša povezati s uređajem preko konfiguriranog priključka COM kad taj priključak upotrebljava drugi softver.

Zatvorite sve aplikacije kao što su komunikacije ili sinkronizacijski softver te potom pokušajte ponovno.

Do ove pogreške dolazi kad je softver izdao naredbu o isključivanju da bi se instrument isključio, a uređaj nastavlja slati podatke nakon očekivanog razdoblja odgode.

Vratite uređaj na zadane postavke i ponovno pokrenite softver.

## Poruke o pogreškama

## Komentari i prijedlozi

### Temperature protection activated (Aktivirana je temperaturna zaštita)

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. (Instrument je otkrio da je temperatura u komori narasla iznad sigurne razine. Stoga je ušao u način samozaštite. Ako problem i dalje postoji, isključite instrument i obratite se svojem distributeru.)

### Thermistor is open (Termistor je otvoren)

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. (Instrument je otkrio da je termistor otvoren te se isključio da bi spriječio oštećivanje uređaja. Obratite se distributeru ako se to ponovi.)

### Unrecoverable errors occurred (Došlo je do nepopravljivih pogrešaka)

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. (Ovaj postupak zaustavljen je jer je došlo do pogrešaka uređaja od kojih se nije mogao oporaviti. Ako se to ponovi, obratite se svojem distributeru i priložite datoteku arhive koja to potvrđuje.)

Do ove pogreške dolazi kad softver otkrije da je temperatura u komori narasla iznad sigurne razine te stoga aktivira način samozaštite.

Odmah isključite instrument i obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Do ove pogreške dolazi kad instrument otkrije da je termistor otvoren te stoga ne može očitavati temperaturu. Potom softver aktivira postupak sigurne zaštite kako bi se uređaj isključio.

Odmah isključite instrument i obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Do ove pogreške dolazi usred postupka, nakon što softver izvede sve mogućnosti oporavka i ne uspije se oporaviti.

Stručnjak Terenske službe tvrtke QIAGEN mora provesti dodatno istraživanje kako bi dijagnosticirao problem s instrumentom.

Obratite se svojem distributeru ili Tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

## 11.3.2 Poruke povezane sa softverom Rotor-Gene Q

Slijedi popis poruka o uporabi, upozorenja i ostalih poruka koje se mogu pojaviti u softveru Rotor-Gene Q tijekom rada hardvera i softvera. U navodnicima se navode svi dijelovi poruke koji su promjenjivi, npr. opisi karakterističnih pogrešaka (npr. <OPIS POGREŠKE>).

### Tekst poruke

#### Općenite poruke

- 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. (Za ovu stranicu već postoji neobrađeni kanal. Ako biste željeli ponovno izraditi ovu stranicu, najprije morate izbrisati neobrađeni kanal s pomoću gumba Options (Mogućnosti), a potom pokušajte ponovno.)
- 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 je do ozbiljnog problema koji zahtijeva gašenje softvera. Nakon što kliknete OK (U redu), spremiće se ono na čemu trenutno radite i uređaj će se isključiti ako je to moguće. Ako problem i dalje postoji, obratite se svojem distributeru.)
- 3 Cannot delete this page. There must always be at least one sample page. (Nije moguće izbrisati ovu stranicu. Uvijek mora postojati najmanje jedna stranica predloška.)
- 4 Can't connect to instrument on serial port <COMPORT>. Check the machine is correctly plugged into the back of the computer, then retry (Nije moguće priključiti instrument na serijski priključak <COMPORT>. Provjerite je li uređaj ispravno priključen na stražnju stranu računala i potom pokušajte ponovno.)
- 5 Can't open the serial port <COMPORT> to connect to the instrument. Check you do not have any communications software open, then retry. (Nije moguće otvoriti serijski priključak <COMPORT> radi povezivanja s instrumentom. Provjerite je li vam neki komunikacijski softver otvoren i potom pokušajte ponovno.)
- 6 Could not save to run because some data on the form was invalid. Please check your entries then try again. (Nije moguće spremiti u postupak jer su neki podaci na obrascu nevaljani. Provjerite svoje unose i potom pokušajte ponovno.)
- 7 Couldn't save file. Confirm the disk has enough space and that it is free of errors. (Nije moguće spremiti datoteku. Potvrdite da na disku ima dovoljno prostora i da na njemu nema pogrešaka.)

## Tekst poruke

- 8 E-mail application could not be started. Confirm that it has been correctly installed on your computer. (Nije uspjelo pokretanje aplikacije e-pošte. Potvrdite je li točno postavljena na vašem računalu.)
- 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. (Došlo je do pogreške tijekom postupka: <OPIS POGREŠKE>. Postupak će se nastaviti i poruka će biti zabilježena u karticu poruka u prozoru Run Info (Informacije o postupku).)
- 10 Instrument was not detected. Please ensure you have correctly connected the instrument, and that the instrument is turned on. (Nije pronađen instrument. Provjerite jeste li točno povezali instrument i je li instrument uključen.)
- 11 Logging is currently disabled due to a previous error. Archived logs cannot be viewed until the software has been restarted. (Zapisivanje je trenutačno onemogućeno zbog prethodne pogreške. Arhivirani zapisi ne mogu se vidjeti prije ponovnog pokretanja softvera.)
- 12 Not all samples could be normalised as the fluorescent level was too low. (Nisu se svi uzorci mogli normalizirati jer je razina fluorescencije bila preniska.)
- 13 Only runs performed with the same rotor as the current run may be imported. (Kao trenutačni postupak mogu se uvesti samo postupci koji se izvode na istom rotoru.)
- 14 Please note that log files for the current run will not be available until it has completed. (Imajte na umu da datoteke zapisnika za trenutačni postupak neće biti dostupne dok on ne bude dovršen.)
- 15 Please type valid number of times to repeat. It should be more than 0. (Unesite valjani broj ponavljanja. Broj treba biti veći od 0.)
- 16 Problem encountered while updating log data. Logging has been disabled, but will be reenabled on the next run. (Došlo je do problema tijekom ažuriranja podataka zapisnika. Zapisivanje je onemogućeno, no bit će ponovno omogućeno za sljedeći postupak.)
- 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. (Potpisivanje datoteke postupka osigurava integritet rezultata postupka. Informacije o potpisu postupka mogu se naći u prozoru Run Info (Informacije o postupku).)
- 18 Sample ID is locked. Cannot paste over locked samples. (ID broj uzorka je zaključan. Ne možete lijepiti na zaključane uzorke.)
- 19 TeeChart Office has not been installed on this computer. Please re-install the Rotor-Gene software. (TeeChart Office nije instaliran na ovom računalu. Ponovno instalirajte softver Rotor-Gene.)
- 20 The COM port configured for the instrument is not selected. You must select a COM port. (Nije odabran priključak COM konfiguriran za instrument. Morate odabrati priključak 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. (Učitana datoteka postupka sadržava potpis koji ne odgovara sadržaju datoteke. To znači da je datoteka ili oštećena ili da je neovlašteno mijenjana otkad ju je napisao softver Rotor-Gene.)
- 22 The loaded run file has no signature. The contents of this file cannot be guaranteed. (Učitana datoteka postupka nije potpisana. Ne može se jamčiti za sadržaj te datoteke.)
- 23 The Machine serial number is not valid. Serial numbers must be at least 6 digits long. (Serijski broj uređaja nije valjan. Serijski brojevi moraju imati najmanje šest znamenki.)
- 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. (Uređaj će se sada ohladiti na <TEMPERATURA> stupnjeva. Komora i površine i dalje će biti jako vrući pri otvaranju uređaja. Poduzmite potrebne mjere opreza i nosite zaštitne rukavice ako dodirujete bilo koju površinu ili epruvetu.)
- 25 The regional settings for your computer are conflicting. Ensure your currency and numeric decimal placeholders are matching. (Regionalne postavke za vaše računalo proturječne su. Provjerite podudaraju li se zadana mjesta za valutu i decimalne brojeve.)
- 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. (Serijski broj unesen na zaslonu dobrodošlice <SERIJSKI BROJ1> ne odgovara serijskom broju pohranjenom u priloženom uređaju <SERIJSKI BROJ2>. Serijski broj računala sada je ažuriran da odgovara povezanom uređaju.)
- 27 There was a problem communicating with the communication board. You should reboot the computer and then retry. (Došlo je do problema pri komunikaciji s komunikacijskom pločom. Trebate ponovno pokrenuti računalo i potom pokušati ponovno.)
- 28 There was a timeout attempting to talk to the instrument. Check it is correctly plugged in. (Isteklo je vrijeme pri pokušaju komunikacije s instrumentom. Provjerite je li ispravno priključen.)
- 29 This feature cannot be used in virtual mode. (Ova značajka ne može se upotrebljavati u virtualnom načinu rada.)
- 30 This profile file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. (Datoteka ovog profila izrađena je u novijoj inačici softvera Rotor-Gene. Određeni aspekti možda se neće točno učitati.)
- 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. (Datoteka ovog postupka izrađena je u novijoj inačici softvera Rotor-Gene. Određeni aspekti možda se neće točno učitati.)

## Tekst poruke

- 32 This sample file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. (Datoteka predloška izrađena je u novijoj inačici softvera Rotor-Gene. Određeni aspekti možda se neće točno učitati.)
- 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. (Ovaj softver izvest će osnovnu simulaciju uređaja u svrhe obuke i demonstracije. Ovu postavku možete onemogućiti na zaslону Setup (Postavljanje) koji je dostupan iz izbornika File (Datoteka).)
- 34 This template was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the template may not load correctly. (Ovaj predložak izrađen je u novijoj inačici softvera Rotor-Gene. Određeni aspekti možda se neće točno učitati.)
- 35 Unable to load this sample file as tube layouts do not match. Load these samples before starting the run. (Nije moguće učitati ovu datoteku predloška jer se rasporedi epruveta ne podudaraju. Postavite uzorke prije pokretanja postupka.)
- 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. (Nije moguće pokrenuti komunikacije s uređajem jer druga aplikacija već upotrebljava <COMPORT>. Provjerite jesu li aktivne druge aplikacije koje upotrebljavaju taj isti serijski priključak i potom pokušajte ponovno.)
- 37 Unrecoverable errors were encountered while attempting to load the file. The file was not loaded. (Pri pokušaju učitavanja datoteke pojavile su se pogreške koje se ne mogu otkloniti. Datoteka nije učitana.)
- 38 You cannot stop the program while the run is in progress. (Ne možete zaustaviti program dok je postupak u tijeku.)
- 39 You have insufficient rights to use the software. Please contact the domain administrator to set up groups. (Nemate dovoljno prava za uporabu softvera. Obratite se administratoru domene da bi se postavile skupine.)
- 40 You must have performed a quantitation analysis to export samples. (Da biste izvezli uzorke, morate izvesti kvantifikacijsku analizu.)
- 41 You must select a COM port before continuing. (Prije nego što nastavite, morate odabrati COM priključak.)
- 42 Your run could not be saved to its default location. On the following window, select an alternative location to save your run. (Vaš se postupak nije mogao spremi na zadanu lokaciju. U sljedećem prozoru odaberite alternativnu lokaciju za spremanje postupka.)
- 43 Your settings have been saved. Click OK to close the software. (Vaše su postavke spremljene. Kliknite OK (U redu) da biste zatvorili softver.)
- 44 You must select a rotor before continuing. (Prije nego što nastavite, morate odabrati rotor.)
- 45 You cannot start the run until you tick the checkbox to confirm that the locking ring has been attached. (Ne možete pokrenuti postupak dok ne označite potvrdni okvir da biste potvrdili da je priložen prsten za zaključavanje.)
- Poruke o podešavanju automatskog pojačanja**
- 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. (Ručno prilagođavanje pojačanja upotrebljava kanale koje ste definirali u svojem profilu. Budući da u svojem profilu niste definirali točke prikupljanja, ne možete izvoditi ručno prilagođavanje pojačanja.)
- 47 The temperature you entered was not saved because it was outside the range of the machine. Enter a valid temperature. (Temperatura koju ste unijeli nije spremljena jer je izvan raspona uređaja. Unesite valjanu temperaturu.)
- Poruke urednika**
- 48 Please enter a valid group code. Group codes must be a maximum of 5 characters, and contain no spaces or commas. (Unesite valjani kôd skupine. Kodovi skupine moraju imati najviše 5 znakova i ne sadržavaju razmake ili zareze.)
- 49 Please enter a valid group name. Group names cannot contain commas or be empty. (Unesite valjani naziv skupine. Nazivi skupine ne smiju sadržavati zareze ili biti prazan.)
- Poruke o kalibraciji optičke denaturacije**
- 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. (Nije moguće postaviti točku optičke denaturacije zbog pogreške denaturacije. Unesite valjani broj sekundi za zadržavanje. Vrijednost treba biti pozitivna.)
- 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. (Tijekom kalibracije optičke denaturacije nije bilo moguće utvrditi vršnu vrijednost taljenja. Razlog može biti odabir neispravne epruvete za kalibraciju ili uporaba neodgovarajućeg kemijskog sredstva za ovaj uzorak. Umjesto toga izveden je profil vremenski određenih koraka.)
- OTV poruke**
- 52 You must enter a valid OTV serial number to perform the run. (Da biste izveli postupak, morate unijeti valjani OTV serijski broj.)
- 53 This temperature verification file has been corrupted. Please uninstall and re-install the Rotor-Gene software to correct this error. (Ova datoteka potvrde temperature oštećena je. Deinstalirajte i ponovno instalirajte softver Rotor-Gene da biste ispravili tu pogrešku.)



## Tekst poruke

- 54 This run file is not correctly signed. Results cannot be displayed. (Ova datoteka postupka nije točno potpisana. Rezultati se ne mogu prikazati.)
- 55 You cannot start until you tick the checkbox to confirm that the fluorescent insert has been placed correctly. (Ne možete početi dok ne označite potvrdni okvir da biste potvrdili da je fluorescentni umetak ispravno postavljen.)
- 56 This rotor has expired. Please contact your distributor to obtain a replacement. (Ovom rotoru istekao je rok trajanja. Obratite se svojem distributeru da biste dobili zamjenski.)
- Poruke izbornika za sigurnost**
- 57 Could not open the Windows user/group manager. (Nije moguće otvoriti upravitelja korisnicima / skupinom programa Windows.)
- 58 Could not create groups. (Nije moguće izraditi skupine.)
- 59 Cannot modify access of inbuilt accounts. (Nije moguće izmijeniti pristup ugrađenih računa.)
- Izbornik za analizu**
- 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. (Odabrali ste samo jedan kanal za analizu. Da biste odabrali više kanala, povucite pravokutnik oko kanala za koje želite da se prikazuju u prozoru za odabir analize.)
- 61 You have selected multiple channels for analysis. This analysis technique only allows single channels to be analysed. (Odabrali ste više kanala za analizu. Ova tehnika analize dopušta analizu samo pojedinačnih kanala.)
- Poruke o mjerenju koncentracije**
- 62 Concentration Measurement performs auto-gain optimisation on the first rotor position. Ensure you have your highest concentration standard in the first rotor position. (Mjerenje koncentracije izvodi automatsku optimizaciju pojačanja na prvom položaju rotora. Provjerite je li na prvom položaju rotora standard najveće koncentracije.)
- Poruke o analizi završne točke**
- 63 To use end-point analysis you must have positive and negative controls in each channel. To define these controls click OK. (Da biste primjenjivali analizu završne točke, morate imati pozitivne i negativne kontrole u svakom kanalu. Da biste definirali te kontrole, kliknite OK (U redu).)
- 64 You have not defined any positive controls. You must define positive controls for each channel you are analysing. (Niste definirali nijednu pozitivnu kontrolu. Morate definirati pozitivne kontrole za svaki kanal koji analizirate.)
- 65 You have not defined any negative controls. You must define negative controls for each channel you are analysing. (Niste definirali nijednu negativnu kontrolu. Morate definirati negativne kontrole za svaki kanal koji analizirate.)
- 66 You have not defined any NTC controls. You must define NTC controls for each group. (Niste definirali nijednu NTC kontrolu. Morate definirati NTC kontrole za svaku skupinu.)
- Poruke o analizi taljenja velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM)**
- 67 Genotype <GENOTYPE NAME> does not have a control defined. (Genotip <NAZIV GENOTIPA> nema definiranu kontrolu.)
- 68 Duplicate genotype combinations are not allowed. (Nisu dopuštene duplikatne genotipske kombinacije.)
- 69 High resolution melts are not supported on this instrument. Please contact your distributor for more information. (Ovaj instrument ne podržava taljenja velike razlučivosti. Obratite se svojem distributeru za više informacija.)
- Poruke o analizi taljenja**
- 70 The genotypes can not be defined until bins have been placed. Please define all bins and then try again. (Genotipovi se ne mogu definirati dok nisu postavljeni intervali. Definirajte intervale i pokušajte ponovno.)
- 71 You must enter an abbreviation for <GENOTYPE NAME> genotype. (Morate unijeti kraticu za genotip <NAZIV GENOTIPA>.)
- Poruke o analizi grafikona raspršenosti**
- 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. (Analiza grafikona raspršenosti zahtijeva da izaberete točno dva kanala. Da biste odabrali više kanala, povucite kvadrat oko kanala koje želite prikazati u prozoru za odabir analize ili kliknite svaki kanal istovremeno držeći tipku SHIFT.)
- Poruke o kvantifikacijskoj analizi**
- 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..." (Značajka automatskog traženja praga zahtijeva da definirate najmanje dvije odabrane norme. Za postavljanje kliknite desnom tipkom na popis uzoraka i odaberite mogućnost „Edit Samples...“ (Uredi uzorke...))

## 12 Glosar

Pojam	Opis
Prikupljanje	Podrazumijeva prikupljane fluorescentnih podataka. Svako prikupljanje (skupa fluorescentnih podataka) s kanala prikazuje se u softveru u obliku neanaliziranih podataka u prozoru „Raw channel“ (Neobrađeni kanal). Ti podaci mogu se analizirati s pomoću mogućnosti u izborniku „Analysis“ (Analiza).
Intervali	U analizi taljenja intervali su postavljeni da definiraju regiju u kojoj se očekuje da će se pojaviti vršna vrijednost taljenja. Genotipovi se mogu definirati na temelju prisutnosti vršnih vrijednosti u određenim intervalima ili kombinacijama intervala.
CE-IVD	Sukladnost s europskom Direktivom 98/79/EZ o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima.
Kanal	Kanal se sastoji od svjetleće diode (LED) s ekscitacijskim filtrom u paru s emisijskim filtrom. LED i ekscitacijski filtar ekscitiraju uzorke na danoj valnoj duljini. Fluorescencija koju emitiraju uzorci prolazi kroz emisijski filtar prije nego što je detektira fotomultiplikator.
Pojačanje	Rotor-Gene Q MDx upotrebljava fotomultiplikator za prikupljanje fluorescentnih fotona i njihovo konvertiranje u elektroničke signale. Pojačanje je postavka kojom se određuje osjetljivost fotomultiplikatora. Ako je pojačanje postavljeno previsoko, signal je prezasićen. Ako je pojačanje postavljeno prenisko, nije moguće razlikovati signal od pozadinskog šuma.
Optimizacija pojačanja	Optimizacija pojačanja proces je u kojem se dinamički prilagođava postavka pojačanja, čime se omogućuje odabir odgovarajuće postavke, što rezultira optimalnom detekcijom signala.
Loading Block	Blokovi za postavljanje Loading Blocks aluminijski su blokovi dostupni u različitim formatima koji se upotrebljavaju za držanje epruveta ili diskova Rotor-Discs tijekom postavljanja reakcije. Blokovi Rotor-Disc Loading Blocks također se upotrebljavaju s alatom Rotor-Disc Heat Sealer da bi se toplinski zabrtvili rotirajući diskovi Rotor-Discs.
Locking Ring	Prstenovi za zaključavanje Locking Rings metalni su prstenovi koji se postavljaju na rotor da bi se spriječilo da se epruvete i čepovi olabave tijekom rada instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Labavi čepovi i epruvete mogu oštetiti instrument.
Rotor	Metalni rotor drži epruvete ili rotirajuće diskove Rotor-Discs u instrumentu Rotor-Gene Q MDx. Omogućuje okretanje uzoraka u komori instrumenta i osigurava točnu poravnatost uzoraka s optičkim sustavom. Rotor je pričvršćen prstenom Locking Ring.
Rotor-Disc	Rotirajući diskovi Rotor-Discs okrugle su ploče okomito postavljenih reakcijskih jažica. Dostupni su formati rotirajućih diskova Rotor-Discs za 72 i 100 reakcija. Rotirajući diskovi Rotor-Discs zabrtvljeni su folijom Rotor-Disc Heat Sealing Film i alatom Rotor-Disc Heat Sealer.

## 13 Tehničke specifikacije

QIAGEN zadržava pravo na izmjenu specifikacija u bilo kojem trenutku.

### 13.1 Okolišni uvjeti – radni uvjeti

Napajanje	100 – 240 V AC, 50 – 60 Hz, 520 VA (vršno) Potrošnja električne energije 60 VA (stanje mirovanja) Kolebanja napona mrežnog napajanja ne smiju premašivati 10 % nazivnog napona napajanja.
Osigurač	Osigurač F5A 250 V
Raspršivanje topline / toplinsko opterećenje	Prosjek: 0,183 kW (632 BTU/sat) Vršno: 0,458 kW (1578 BTU/sat)
Prenaponska kategorija	II
Temperatura zraka	18 do 30 °C
Relativna vlažnost	10 – 75 % (bez kondenzacije)
Nadmorska visina	Do 2000 m
Mjesto rada	Samo za uporabu u zatvorenom prostoru
Razina onečišćenja	2
Ekološki razred	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

### 13.2 Uvjeti prijevoza

Temperatura zraka	–25 °C do 60 °C u pakiranju proizvođača
Relativna vlažnost	Maks. 75 % (bez kondenzacije)
Ekološki razred	2K2 (IEC 60721-3-2)

### 13.3 Uvjeti pohrane

Temperatura zraka	15 °C do 30 °C u pakiranju proizvođača
Relativna vlažnost	Maks. 75 % (bez kondenzacije)
Ekološki razred	1K2 (IEC 60721-3-1)

### 13.4 Mehanički podaci i značajke hardvera

Dimenzije	Širina:	370 mm
	Visina:	286 mm
	Dubina (bez kabela):	420 mm
	Dubina (vratašca otvorena):	538 mm
Masa	12,5 kg standardna konfiguracija	
Kapacitet	Do 100 uzoraka u jednom postupku ako se upotrebljava Rotor-Disc 100	
Softver	Softver Rotor-Gene Q, inačica 2.3.x (pri čemu je x ≥ 0)	

## 13.5 Specifikacije (hardver i softver)

### 13.5.1 Toplinske specifikacije

<b>Opis</b>	<b>Specifikacija</b>
Raspon temperature	35 °C do 99 °C (50 °C do 99 °C za ciklirajuće primjene)
Točnost temperature	± 0,5 °C (kalibrirano primjenom OTV postupka rotora Rotor-Disc)
Razlučivost temperature	± 0,02 °C (najmanje povećanje koje se može programirati)
Ujednačenost temperature	± 0,02 °C

### 13.5.2 Optičke specifikacije

<b>Opis</b>	<b>Specifikacija</b>
Ekscitacijski izvori	Svjetleće diode visoke energije
Detektor	Fotomultiplikator
Vrijeme prikupljanja	4 s

## 14 Dodatak A – Pravni dokumenti

### 14.1 Izjava FCC

Američko savezno povjerenstvo za komunikacije (United States Federal Communications Commission, USFCC) (prema 47. CRF 15. 105) izjavilo je da korisnici proizvoda moraju biti informirani o sljedećim činjenicama i okolnostima.

„Ovaj je uređaj u skladu s dijelom 15. FCC-a: Rad uređaja podložan je sljedećim dvama uvjetima: (1) ovaj uređaj ne smije uzrokovati štetne smetnje i (2) ovaj uređaj mora prihvatiti sve primljene smetnje, uključujući smetnje koje mogu uzrokovati neželjen rad.”

„Ovaj digitalni uređaj razreda B sukladan je s kanadskom normom ICES-0003.”

Sljedeća tvrdnja odnosi se na proizvode obuhvaćene korisničkim priručnikom, ako nije navedeno drukčije. Tvrdnja za druge proizvode nalazit će se u pripadajućoj dokumentaciji.

**Napomena:** Ova je oprema testirana i utvrđeno je da je u skladu s ograničenjima za digitalne uređaje razreda B, u skladu s dijelom 15. Pravila FCC-a te da zadovoljava sve zahtjeve kanadske norme ICES-003 za opremu koja uzrokuje interferenciju za digitalne uređaje. Ta su ograničenja osmišljena za pružanje razumne zaštite od štetnih smetnji instalacija u stambenom području. Ta oprema generira, upotrebljava i može emitirati radiofrekvencijsku energiju i, ako se ne postavi i upotrebljava u skladu s uputama, može uzrokovati štetne smetnje radijskoj komunikaciji. Međutim, nema jamstva da u određenoj instalaciji neće doći do smetnje. Ako ova oprema uzrokuje štetne smetnje radijskom ili televizijskom prijmu, što se može utvrditi isključivanjem i uključivanjem opreme, korisniku se savjetuje da pokuša popraviti štetne smetnje primjenom jedne ili više od sljedećih mjera:

- Ponovno orijentirajte ili promijenite lokaciju antene koja prima signal.
- Povećajte razmak između opreme i prijamnika.
- Povežite opremu u priključak na strujnom krugu koji je različit od kruga na koji je povezan prijamnik.

Pomoć potražite kod distributera ili iskusnog tehničara za radijske/televizijske prijamnike.

---

## 14.2 Usklađenost s normom IEC EN 61326

Instrument Rotor-Gene Q MDx usklađen je sa zahtjevima za emisije interferencije i imunitet interferencije koji su opisani u normama IEC 61326-1 i IEC 61326-2-6.

Tvrtka QIAGEN GmbH Njemačka nije odgovorna ni za kakve radio-televizijske smetnje uzrokovane neovlaštenim preinakama ove opreme ili zamjenom ili priključivanjem priključnih kabela i opreme koju nije navela tvrtka QIAGEN GmbH, Njemačka. Za ispravljanje smetnji uzrokovanih neovlaštenom preinakom, zamjenom ili priključivanjem bit će odgovoran korisnik.

---

## 14.3 Izjava o sukladnosti

Naziv i adresa zakonitog proizvođača

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
Njemačka

Najnoviju izjavu o sukladnosti možete zatražiti od Tehničke službe tvrtke QIAGEN.

## 14.4 Otpadna električna i elektronička oprema (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE)

Ovaj odjeljak sadržava informacije o tome kako korisnici trebaju odlagati otpadnu električnu i elektroničku opremu.

Simbol prekrižene kante za otpad na kotačima (pogledajte u nastavku) označuje da se taj proizvod ne smije odlagati s ostalim otpadom; mora se odnijeti u odobreno postrojenje za obradu ili predviđene sabirne točke za recikliranje, u skladu s lokalnim zakonima i propisima.

Odvojeno sakupljanje i recikliranje otpadne elektroničke opreme prilikom odlaganja pomaže u očuvanju prirodnih resursa i omogućuje recikliranje proizvoda na način koji štiti ljudsko zdravlje i okoliš.



Uslugu recikliranja tvrtka QIAGEN može pružiti na zahtjev, uz dodatan trošak. U Europskoj uniji, u skladu s posebnim zahtjevima za recikliranje otpadne električne i elektroničke opreme (OEEO) i kada QIAGEN isporučuje zamjenski proizvod, omogućeno je besplatno recikliranje elektroničke opreme s oznakom otpadne električne i elektroničke opreme (OEEO).

Za recikliranje elektroničke opreme obratite se lokalnom prodajnom uredu tvrtke QIAGEN u kojemu ćete dobiti potrebni obrazac za povrat. Nakon što predate zahtjev, tvrtka QIAGEN javit će vam se kako bi zatražila daljnje informacije za zakazivanje sakupljanja elektroničkog otpada ili kako bi vam pružila pojedinačnu ponudu.



---

## 14.5 Klauzula o odgovornosti

QIAGEN se oslobađa svih obveza u okviru jamstva u slučaju da popravke ili preinake izvrše osobe koje nisu njegovo osoblje, osim u slučajevima kada QIAGEN da svoje pisano odobrenje za provođenje takvih popravaka ili preinaka.

Za sve materijale zamijenjene u okviru ovog jamstva, jamstvo vrijedi samo u trajanju izvornog jamstvenog razdoblja i ni u kojem slučaju nakon datuma isteka izvornog jamstva, osim ako to pisanim putem odobri službenik tvrtke QIAGEN. Za uređaje za očitavanje, uređaje za povezivanje i povezani softver jamstvo će vrijediti samo u razdoblju koje je ponudio izvorni proizvođač tih proizvoda. Izjave i jamstva bilo koje osobe, uključujući predstavnike tvrtke QIAGEN, koje nisu dosljedne ili su u sukobu s uvjetima u ovom jamstvu nisu obvezujuće za tvrtku ako nisu u pisanom obliku i ako ih ne potvrdi službenik tvrtke QIAGEN.

---

## 14.6 Ugovor o softverskoj licenci

1. U sljedećem ugovoru nazivom „Qiagen” obuhvaćeni su društvo Qiagen GmbH i njegova pridružena društva, a pojam „softver” znači programi i podaci isporučeni na fizičkom mediju (npr. CD-ROM-u) ili preko interneta pod ovim uvjetima. (Ako niste sigurni u neki aspekt ovog ugovora ili ako imate pitanja, trebete se obratiti porukom e-pošte na adresu [support@qiagen.com](mailto:support@qiagen.com).) Softver i sva pripadajuća dokumentacija u cijelosti su razvijeno o privatnom trošku. Isporučeni su i licencirani kao „komercijalni računalni softver”.

### 2. Licencija

Vašom licencijom ne prenosi se nikakav naslov ili vlasništvo nad softverom te ona ne predstavlja prodaju prava na softver. Tvrtka Qiagen jamči vam neprenosivu i neekskluzivnu licenciju prema sljedećim uvjetima:

2.1 U svojoj organizaciji smijete upotrebljavati neograničeni broj primjeraka softvera pod uvjetom da softveru radi uporabe mogu pristupiti samo zaposlenici organizacije te da je vaša organizacija trenutni vlasnik instrumenta Rotor-Gene Q. Stavljanje ovog softvera na raspolaganje za uporabu izvan organizacije predstavlja povredu ovog ugovora.

2.2 Smijete izraditi samo onoliko kopija softvera koliko ih je potrebno u svrhe sigurnosnog kopiranja ili kada se kopira ključan korak u ovlaštenoj uporabi softvera. Ne smijete reproducirati napomene o autorskim pravima s izvornog softvera na kopije. Ni pod kojim uvjetima ne smijete kopirati softver na neku oglasnu ploču, internetsko web-mjesto ili neki slični javni ili privatni distribucijski sustav.

2.3 Softver ne smijete staviti na raspolaganje nijednoj trećoj strani darovanjem, posudbom ili najmom.

2.4 Softver ili bilo koji njegov dio ne smijete inkorporirati u programe ili računalne sustave koje vi razvijete ili upotrebljavate.

2.5 Ne smijete upotrebljavati ili na drugi način stvarati podatkovne datoteke ili ostale datoteke koje softver obrađuje (osim u slučajevima tijekom uobičajenog rada softvera).

2.6 Nijedan dio softvera ne smijete rastavljati, primjenjivati obrnuti inženjering, obrnuto kompilirati, otključavati ili prevoditi te ne smijete pokušavati otkriti izvorni kôd ili temeljne algoritme softvera. Ne smijete izmjenjivati podatkovne datoteke ili druge datoteke koje čine softver (osim u slučajevima tijekom uobičajenog rada softvera).

2.7 Ako je ovo demonstracija ili probna inačica softvera, licencirani ste samo za uporabu softvera u evaluacijske svrhe te u okviru opisanih ograničenja (kao što su vremensko ograničenje, ograničen broj izvedbi ili druga ograničenja). Ovaj softver može pokušati provoditi navedena ograničenja. Neuspjeh softvera pri provedbi navedenih ograničenja ne predstavlja licenciju za vas koja bi vam omogućila da prelazite ta ograničenja.

2.8 Suglasni ste pribaviti sve nužne registracije / licencne ključeve samo od tvrtke Qiagen ili njezina ovlaštena distributera. Također ste suglasni navedeni ključ čuvati strogo povjerljivim od svih trećih strana.

### 3. Raskid

3.1 Ako se ne pridržavate uvjeta i odredbi ove licencije, tvrtka Qiagen ima pravo raskinuti ovaj Ugovor o licenciji ne dovodeći u pitanje ostala prava.

3.2 U roku od sedam dana od raskida ovog Ugovora o licenciji dužni ste tvrtki Qiagen dostaviti dopis potvrđujući da ste uništili izvornik i sve kopije softvera kao i sve kopije registracije / licencnog ključa. Ovaj Ugovor o licenciji možete raskinuti u bilo kojem trenutku slanjem takva dopisa.

### 4. Ograničeno jamstvo / odgovornost

4.1 Tvrtka Qiagen jamči vam samo sljedeće:

a) Ako je softver isporučen na CD-ROM-u, na tom CD-ROM-u nema grešaka u materijalima i izvedbi tijekom uobičajene uporabe tijekom razdoblja od 90 dana od datuma kupnje. (Sve CD-ROM-ove s greškom besplatno ćemo zamijeniti.)

b) Ako se ispravno upotrebljava, softver će biti u skladu s dokumentacijom isporučenom sa softverom ili drugim specifikacijama koje izda tvrtka Qiagen tijekom razdoblja od 90 dana od datuma kupnje.

4.2 O cjelokupnoj odgovornosti tvrtke Qiagen i vašem isključivom pravnom lijeku odlučuje tvrtka Qiagen između naknade u vrijednosti od dvjesto i pedeset američkih dolara (250 USD) ili zamjene softvera koji ne zadovoljava uvjete ograničenog jamstva.

4.3 UZ IZNIMKU JAMSTAVA IZ PRETHODNO NAVEDENE TOČKE 4.1 I U NAJVEĆOJ ZAKONSKI DOPUŠTENOJ MJERI TVRTKA QIAGEN NE DAJE DRUGA JAMSTVA U POGLEDU SOFTVERA.

---

4.4 U NAJVEĆOJ ZAKONSKI DOPUŠTENOJ MJERI TE NI U KAKVIM OKOLNOSTIMA I NI POD KOJOM PRAVNOM TEORIJOM, NI PREMA KAKVIM ŠTETNIM RADNJAMA, UGOVORU ILI OSTALOM TVRTKA QIAGEN NEĆE SNOSITI ODGOVORNOST PREMA VAMA ILI BILO KOJOJ DRUGI OSOBI ZA BILO KAKVE NEIZRAVNE, POSEBNE, SLUČAJNE ILI POSLJEDIČNE ŠTETE BILO KAKVE VRTSE, UKLJUČUJUĆI, MEĐU OSTALIM, ODŠTETE RADI GUBITKA UGLEDA (GOODWILL), OBUSTAVE RADA, OŠTEĆENJA ILI KVARA RAČUNALA ILI SVIH OSTALIH KOMERCIJALNIH OŠTEĆENJA ILI KVAROVA, ČAK I AKO JE TVRTKA QIAGEN INFORMIRANA O MOGUĆNOSTI TAKVIH OŠTEĆENJA. U SVAKOM SLUČAJU, CJELOKUPNA ODGOVORNOST TVRTKE QIAGEN NA TEMELJU OVOG UGOVORA OGRANIČIT ĆE SE NA PLAĆANJE NAKNADE ZA LICENCIJU KOJU PLAĆATE ZA SOFTVER. TO OGRANIČENJE OD ODGOVORNOSTI NE PRIMJENJUJE SE NA ODGOVORNOST ZA SMRT ILI TJELESNU OZLJEDU U MJERI U KOJOJ NADLEŽNO PRAVO ZABRANJUJE TAKVO OGRANIČENJE.

## 15 Prilog B – Matematičke tehnike

U ovom prilogu detaljnije se opisuju primijenjene matematičke tehnike.

### 15.1 Kvantifikacija

Izračunane koncentracije dobivene su jednostavnim modelom linearne regresije, s poznatim vrijednostima log koncentracija ( $x$ ) i eksperimentalni vrijednostima CT-a ( $y$ ).

Log koncentracije i vrijednosti CT-a standardi su koji se upotrebljavaju za izradu modela u obliku:

$$y = Mx + B$$

#### 15.1.1 Intervali pouzdanosti za izračunane koncentracije

Sljedeći interval pouzdanosti 100(1-  $\alpha$ ) % upotrebljava se za procjenu nove opservacije  $x_0$  od standardne krivulje.

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

To je interval pouzdanosti za pojedinačnu nepoznatu koncentraciju.

Pretpostavir la postoji  $k$  daljnjih opservacija, pri čemu je  $x = x_0$  te označimo njihovu prosječnu vrijednost s  $\bar{Y}_0$ . Potom

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

i argumenti slični prethodnima daju

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

Ovom formulom određuje se kako se utvrđuju intervali pouzdanosti za koncentracije nepoznatih replika.

Za procjenu normi može se izračunati uži interval pouzdanosti:

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

Ovom formulom implicira se da se dodavanjem replika standardnoj pojedinačnoj koncentraciji smanjuje širina intervala za sve procjene kako se n povećava. Dodavanje velikog broja replika nepoznatom smanjuje njegovu nesigurnost do one pojedinačne norme. Dodatne replike smanjuju nesigurnost zbog nepoznatog koji ne čini dio linearnog modela.

### 15.1.2 Intervali pouzdanosti za vrijednosti CT-a

Pretpostavljamo da je pogreška u vrijednostima CT-a replike linearna i uobičajeno distribuirana.

Stoga se upotrebljava interval One-Sample t Confidence Interval. Neka je  $\mu$  srednja vrijednost za vrijednosti CT-a replike  $(x_0 \dots x_{n-1})$ . Tada interval pouzdanosti 100(1-  $\alpha$ ) % za vrijednosti CT-a  $\mu$  iznosi:

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

Željeli bismo zahvaliti Peteru Cooku s Odsjeka za matematiku Sveučilišta NSW-a, Sydney, Australija, čija je pomoć pri potvrdi primijenjenih matematičkih pristupa bila nezamjenjiva.

## 16 Informacije za naručivanje

### 16.1 Proizvodi, dodatne oprema i potrošni materijal Rotor-Gene Q MDx

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Rotor-Gene Q MDx 5plex	Cikler za Real-time PCR s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni), prijenosno računalo, softver, dodatna oprema, jednogodišnje jamstvo na dijelove te rad	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cikler za Real-time PCR i analizator High Resolution Melt Analyzer s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni) plus kanal za taljenje velike razlučivosti (High Resolution Melt, HRM), prijenosno računalo, softver, dodatna oprema, jednogodišnje jamstvo na dijelove te rad	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex	Cikler za Real-time PCR sa 6 kanala (plavi, zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni), uključujući prijenosno računalo, softver, dodatna oprema, jednogodišnje jamstvo na dijelove te rad	9002042
<b>Dodatna oprema</b>		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Komplet uključuje: 2 Rotor-Disc, pakiranje od 100 komada, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 100 Rotor i Locking Ring, Rotor-Disc 100 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Na upit
Rotor-Disc 100 (30)	30 pojedinačno pakiranih diskova za 3000 reakcija	981311
Rotor-Disc 100 (300)	10 x 30 pojedinačno pakiranih diskova za 30 000 reakcija	981313
Rotor-Disc 100 Rotor	Za pohranu 100 diskova Rotor-Disc u instrumentu Rotor-Gene Q MDx; zahtijeva Rotor-Disc 100 Locking Ring	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	Za zaključavanje rotirajućeg diska Rotor-Disc 100 u rotoru Rotor-Disc 100 Rotor	9018896
Rotor-Disc 100 Loading Block	Aluminijski blok za ručno i automatsko postavljanje reakcije u diskovima Rotor-Disc 100 diskova	9018909

<b>Proizvod</b>	<b>Sadržaj</b>	<b>Kat. br.</b>
Rotor-Disc Pipetting Aid	Pomoć za ispravno označivanje tijekom ručnog postavljanja reakcije na blok Rotor-Disc Loading Block	9018897
Rotor-Disc Heat Sealer	Instrument za toplinsko brtvljenje za uporabu s rotirajućim diskovima Rotor-Discs; zahtijeva Rotor-Disc 72 ili 100 Loading Block	9018898
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	60 folija za brtvljenje Rotor-Disc 100 ili Rotor-Disc 72 diska	981601
Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	10 x 60 folija za brtvljenje Rotor-Disc 100 ili Rotor-Disc 72 diska	981604
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Komplet uključuje: 3 Rotor-Disc pakiranje od 72 komada, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 72 Rotor i Locking Ring, Rotor-Disc 72 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Na upit
Rotor-Disc 72 (24)	24 pojedinačno pakirana diska za 1728 reakcija	981301
Rotor-Disc 72 (240)	10 x 24 pojedinačno pakirana diska za 17 280 reakcija	981303
Rotor-Disc 72 Rotor	Za pohranu 72 diska Rotor-Disc u instrumentu Rotor-Gene Q MDx; zahtijeva Rotor-Disc 72 Locking Ring	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	Za zaključavanje rotirajućeg diska Rotor-Disc 72 u rotoru Rotor-Disc 72 Rotor	9018900
Rotor-Disc 72 Loading Block	Aluminijski blok za ručno i automatsko postavljanje reakcije u diskovima Rotor-Disc 72 diska	9018910
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripova po 4 epruvete i čepova za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripova po 4 epruvete i čepova za 10 000 reakcija	981106
72-Well Rotor	Za držanje epruveta i čepova Strip Tubes and Caps, 0.1 ml; zahtijeva se Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Za zaključavanje epruveta i čepova Strip Tubes and Caps, 0.1 ml u rotor 72-Well Rotor	9018904



Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije s jednokanalnom pipetom sa 72 epruvete od 0,1 ml	9018901
Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel	Aluminijski blok za postavljanje reakcije s višekanalnim pipetama sa 72 epruvete x 0,1 ml	9018902
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 epruveta s tankim stijenkama za 1000 reakcija	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 epruveta s tankim stijenkama za 10 000 reakcija	981008
36-Well Rotor	Za držanje epruveta PCR Tubes, 0.2 ml; zahtijeva prsten za zaključavanje 36-Well Rotor Locking Ring	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	Za zaključavanje epruveta PCR Tubes, 0.2 ml, u rotoru 36-Well Rotor	9018906
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije sa standardnim rasporedom 8 x 12 s 96 epruveta x 0,2 ml	9018905
Rotor-Disc OTV Kit	Komplet za optičku potvrdu temperature sustava Rotor-Gene uključuje Rotor-Disc prethodno napunjen termokromatskim tekućim kristalima, fluorescentni umetak, zahtijeva Rotor-Disc 72 Rotor i prsten za zaključavanje Locking Ring ili komplet Rotor-Disc 72 Starter Kit	981400
Rotor Holder	Metalni samostojeći držač za grupiranje epruveta i rotirajućih diskova Rotor-Discs u rotore	9018908

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju odgovornosti specifične za proizvod potražite u odgovarajućem priručniku za komplet ili korisničkom priručniku tvrtke QIAGEN. Priručnici za komplete tvrtke QIAGEN i korisnički priručnici dostupni su na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili ih možete zatražiti od Tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

## 17 Povijest revizija dokumenta

<b>Datum</b>	<b>Izmjene</b>
R1, veljača 2022.	Prvo izdanje

#### Ugovor o ograničenoj licenciji za Rotor-Gene Q MDx

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se smije upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim Uputama za uporabu i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane u kompletu. Tvrtka QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponentata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije uključena u ovaj komplet, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, ovim Uputama za uporabu i dodatnim protokolima dostupnim na stranici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici brtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik kompleta potvrđuju da neće poduzeti niti dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja prethodno navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na adresi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Zaštitni znakovi: 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 ili njegova pridružena društva); 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.). Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima. Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

TeeChartOffice: Autorsko pravo 2001. – 2013. David Berneda. Sva prava pridržana.

Za zemlje na koje se to primjenjuje:

Ovaj real-time termocikler licenciran je u skladu s patentnim pravima u SAD-u na čekanju za uređaj ili sustav kojim se obuhvaćaju automatizirani termociklari s fluorescentnim detektorima i kojim se traži prioritet prema serijskom broju u SAD-u 07/695,201 i odgovarajućim zahtjevima u bilo kojem stranom odgovarajućem patentu u vlasništvu tvrtke Applied Biosystems LLC, na svim područjima, uključujući istraživanje i razvoj, sva primijenjena područja te in-vitro dijagnostiku u ljudi i životinja. Nikakvo se pravo ne prenosi izričito, implicitno ili estoppelom ni za koji patent za metode u stvarnom vremenu, uključujući, među ostalim, 5 ispitivanja nukleaze, ili bilo koji patent kojim se polaže pravo na reagens ili komplet. Za dodatne informacije o kupnji dodatnih prava obratite se direktoru za licenciranje tvrtke Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, SAD.

Za zemlje na koje se to primjenjuje:

Kupnja ovog proizvoda uključuje ograničenu licenciju koja se ne može prenijeti na jedan ili više patenata SAD-a br. 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; na patentne zahtjeve u SAD-u br. 2003-0224434 i 2006-0019253 te na PCT patentni zahtjev br. WO 2007/035906 kao i na sve nastavke prijave ili razvijene prijave i odgovarajuće zahtjeve za patente i patentne prijave izvan Sjedinjenih Američkih Država u vlasništvu Zaklade za istraživanje Sveučilišta Utah, tvrtki Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH i/ili Roche Diagnostics GmbH samo za in-vitro dijagnostiku u ljudi i životinja. Nikakvo se pravo ne prenosi izričito, implicitno ili estoppelom ni za koji reagens ili komplet, niti pod bilo kojim drugim patentnom ili patentnim zahtjevima u vlasništvu Zaklade za istraživanje Sveučilišta Utah, tvrtki Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH ili bilo koje treće strane. Ovim se proizvodom može se rukovati samo s ovlaštenim reagensima kao što su cjelovito zaštićeni kompleti i ispitivanja tvrtke QIAGEN. Za informacije o kupnji licencija za in-vitro dijagnostičke primjene ili reagense obratite se društvu Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, SAD.

HB-3090-001 02/2022 © 2022 QIAGEN, sva prava pridržana.

---

Naručivanje [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Tehnička podrška [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Web-mjesto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)