

Септември 2018

Rotor-Gene® Q MDx РЪКОВОДСТВО

IVD

CE

MAT 1114365BG



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Германия

R3



Sample & Assay Technologies

Хронология на редакциите

Редакция №	Описание на промяната
R3 09/2018	Инструкциите за Microsoft Windows XP са заменени с инструкции за Windows 10. Добавени са конфигурации за сигурност в Windows 7. Преработени са инструкциите за антивирусни скенери, защитни стени и мрежи.

QIAGEN®, EpiTect®, HotStarTaq®, QuantiTect®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, Type-it® (QIAGEN Group); Adobe®, Illustrator® (Adobe Systems, Inc.); Alexa Fluor®, FAM™, HEX™, JOE™, Marina Blue®, ROX™, SYBR®, SYTO®, TET™, Texas Red®, VIC® (Thermo Fisher Scientific или филиалите им); Bluetooth® (Bluetooth SIG, Inc.); 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.). Регистрираните имена, търговските марки и т.н., използвани в този документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.

TeeChartOffice: Copyright 2001-2013 by David Berneda. Всички права запазени.

За приложимите държави:

Реалновремевият термоциклер е лицензиран по предстоящи патентни права в САЩ като апарат или система, представляваща автоматизиран термоциклер с флуоресцентни детектори, търсещи предимство по щатски сериен № 07/695,201 и съответните претенции в чуждестранни дублиращи патенти по настоящото, притежавани от Applied Biosystems LLC, във всички сфери, включително научноизследователска и развойна дейност, всички приложни сфери и ин витро диагностика при хора и животни. Не се предоставят изрично никакви права – по подразбиране или на принципа естопел – към патенти за реалновремевни методи, включително, но не само анализи на 5'-нуклеаза, или към патенти, обхващащи реагент или комплект. За повече информация относно закупуване на допълнителни права се свържете с Директора по лицензирането в Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, САЩ.

За приложимите държави:

Закупуването на този продукт включва ограничен, непрехвърляем лиценз за един или повече щатски патенти с номера 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; щатски патентни приложения с номера 2003-0224434 и 2006-0019253, РСТ патентно приложение № WO 2007/035806, всички продължения и разделяния, съответни претенции по отношение на патенти и патентни приложения извън Съединените щати, притежавани от University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH и/или Roche Diagnostics GmbH само за ин витро диагностика при хора и животни. Не се предоставят изрично, по подразбиране или на принципа естопел никакви права за реагенти или комплекти или по отношение на други патенти или претенции за патенти, притежавани от University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH или от друга страна. Този продукт може да се експлоатира само с одобрени реагенти, като например напълно лицензираните комплекти и анализи на QIAGEN. За повече информация относно закупуване на лицензи за приложения или реагенти за ин витро диагностика, моля, свържете се с Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, САЩ.

За актуална информация относно лицензирането и конкретните за продуктите правни бележки вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на комплекти QIAGEN. Наръчниците и ръководствата за потребителя на комплектите QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или може да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или от местните дистрибутори

© 2005–2018 QIAGEN, всички права запазени. HB-1760-003 1114365 09/2018

Съдържание

1	Информация за безопасността	1-1
1.1	Правилна употреба	1-2
1.2	Електрическа безопасност	1-4
1.3	Околна среда	1-5
1.4	Биологична безопасност	1-5
1.5	Химикали	1-7
1.6	Унищожаване на отпадъците	1-7
1.7	Механична опасност Капакът на Rotor-Gene Q MDx трябва да стои затворен по време на работата на уреда	1-8
1.8	Топлинна опасност	1-9
1.9	Поддръжка	1-9
1.10	Символи на Rotor-Gene Q MDx	1-10
2	Въведение	2-1
2.1	Обща информация	2-1
2.1.1	Техническа поддръжка	2-1
2.1.2	Становище за политиката	2-2
2.1.3	Версия	2-2
2.2	Предназначение на Rotor-Gene Q MDx	2-2
3	Общо описание	3-1
3.1	Температурна характеристика	3-1
3.2	Оптична система	3-3
4	Процедури по инсталация	4-1
4.1	Изисквания към местоположението	4-1
4.2	Захранване	4-2

4.3	Изисквания към компютърната система	4-2
4.4	Конфигурация за защита в Windows 7	4-4
4.5	Разопаковане на Rotor-Gene Q MDx	4-6
4.6	Принадлежности	4-7
4.7	Инсталиране на хардуера	4-7
4.8	Инсталиране на софтуера	4-9
4.9	Версия на софтуера	4-13
4.10	Допълнителен софтуер на компютри, свързани с Rotor-Gene Q MDx уредите	4-13
4.10.1	Антивирусен софтуер	4-14
4.10.2	Защитна стена и мрежи	4-16
4.10.3	Системни инструменти	4-19
4.10.4	Актуализации на операционната система	4-20
4.11	Обновяване на софтуера	4-22
5	Оперативни процедури - хардуер	5-1
5.1	Видове ротори	5-1
5.2	Подготовка на реакцията	5-4
5.3	Подготовка на роторния диск	5-9
6	Оперативни процедури - софтуер	6-1
6.1	Quick Start интерфейс	6-1
6.1.1	Избор на ротора	6-4
6.1.2	Потвърждаване на профила	6-5
6.1.3	Съхраняване на експеримента	6-6
6.1.4	Подготовка на пробите	6-7
6.2	Advanced интерфейс	6-7
6.2.1	New Run Wizard прозорец 1	6-9
6.2.2	New Run Wizard прозорец 2	6-10
6.2.3	New Run Wizard прозорец 3	6-11
6.2.4	Редактиране на профила	6-12

6.2.5	New Run Wizard прозорец 4	6-31
6.2.6	New Run Wizard прозорец 5	6-31
7	Анализен интерфейс	7-1
7.1	Работна площ	7-1
7.2	Лента с инструменти	7-1
7.3	Преглед на грубите данни от каналите	7-1
7.4	Превключване между пробите	7-3
7.5	Меню File	7-5
7.5.1	Ново	7-5
7.5.2	Отваряне и съхранение	7-7
7.5.3	Доклади	7-9
7.5.4	Настройки	7-10
7.6	Меню Analysis	7-11
7.6.1	Анализ	7-11
7.6.2	Количествен анализ	7-13
7.6.3	Двойна стандартна права	7-34
7.6.4	Делта делта C _T относителен анализ	7-39
7.6.5	Анализ на топене	7-42
7.6.6	Сравнителен количествен анализ	7-47
7.6.7	Апелна дискриминация	7-50
7.6.8	Анализ на корелационната диаграма	7-52
7.6.9	EndPoint анализ	7-56
7.6.10	Анализ на концентрацията	7-64
7.6.11	High Resolution Melt анализ	7-67
7.7	Меню Run	7-69
7.7.1	Стартиране на опит	7-69
7.7.2	Пауза	7-69
7.7.3	Спиране на опит	7-69
7.8	Меню View	7-70
7.8.1	Настройки на опита	7-70
7.8.2	Температурна графика	7-74
7.8.3	Прогрес на профила	7-75

7.8.4	Редактиране на проби	7-76
7.8.5	Опции на изгледа	7-86
7.9	Защита на достъпа за софтуера Rotor-Gene Q	7-87
7.9.1	Настройки за Windows 7	7-88
7.9.2	Конфигурация за Windows 10	7-95
7.9.3	Няколко потребителя на един компютър	7-97
7.9.4	Audit следи	7-98
7.9.5	Сигнатури	7-100
7.9.6	Заклучване на проби	7-102
7.9.7	Заклучени шаблони	7-104
7.10	Меню Gain	7-105
7.11	Меню Window	7-106
7.12	Функция Help	7-106
7.12.1	Send Support E-Mail	7-107
8	Допълнителни функции	8-1
8.1	Анализни шаблони	8-1
8.2	Отваряне на втори опит	8-1
8.3	Опции за мащабиране	8-2
8.4	Изнасяне на графики	8-2
8.5	Икона гаечен ключ	8-5
8.6	Опции за избраното поле	8-7
9	Процедури по поддръжка	9-1
10	Оптична температурна верификация	10-1
10.1	Принцип на ОТВ	10-1
10.2	Компоненти на Rotor-Disc OTV кита	10-2
10.3	Пускане на ОТВ	10-2

11	High Resolution Melt анализ	11-1
11.1	Инструменти	11-3
11.2	Химия	11-3
11.3	Пример за SNP генотипиране	11-3
11.4	Пример за метилиране	11-5
11.5	Насоки за успешен HRM анализ	11-7
11.6	Подготовка на пробите	11-9
11.7	Подготовка на софтуера	11-9
11.8	Анализ на данните от Real-time PCR	11-17
11.9	Анализ на данните от HRM	11-19
12	Отстраняване на проблемите	12-1
12.1	Log архиви	12-1
12.2	Отстраняване на проблемите при HRM	12-1
12.3	Общи грешки на уреда	12-3
12.4	Съобщения на Rotor-Gene Q софтуера	12-8
13	Речник	13-1
	Приложение А	А-1
	Технически данни	А-1
	Условия на околната среда	А-1
	FCC декларация	А-4
	Декларация за съответствие	А-6
	Изхвърляне на електрическо и електронно оборудване (WEEE)	А-7
	Приложение В	В-1
	Количествен анализ	В-1



Съдържание

Приложение C	C-1
Rotor-Gene Q MDx продукти, аксесоари и консумативи	C-1
Приложение D	D-1
Клауза за носене на отговорност	D-1
Индекс	Индекс-1

1 Информация за безопасността


Преди да се използва Rotor-Gene Q MDx, е важно внимателно да прочетете това ръководство и да обърнете особено внимание на информацията за безопасността. Инструкциите и информацията за безопасността трябва да се следват, за да се гарантира сигурност при работата на уреда и да се запази уред в безопасно състояние.


Следните видове информация за безопасност се появяват в ръководството.


<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Изразът ПРЕДУПР се използва за информация относно ситуации, които могат да доведат до нараняване на човек. Подробности за тези условия се дават в полетата, подобни на това.</p>
<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Изразът ВНИМАНИЕ се използва за информация относно ситуации, които могат да доведат до повреда на уреда или друго оборудване. Подробности за такива условия се дават в полетата, подобни на това.</p>


Съветите в това ръководство имат за цел да допълнят, а не да изместят, обичайните изисквания за безопасност, които се прилагат в страната на използване на уреда.

1.1 Правилна употреба




<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W1] Неправилната употреба на Rotor-Gene Q MDx може да доведе до нараняване на човек и увреждане на уреда. С Rotor-Gene Q MDx трябва да работи само квалифициран и обучен за целта персонал. Сервизното обслужване на Rotor-Gene Q MDx трябва да се извършва само от сервизни специалисти на QIAGEN.</p>
---	--

<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W2] Rotor-Gene Q MDx е тежък уред. За да избегнете нараняване или увреждане на уреда, внимавайте когато го повдигате.</p>
---	--

<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W3] Не се опитвайте да местите да Rotor-Gene Q MDx по време на работа.</p>
---	---

<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Увреждане на уреда [C1] Избягвайте разливането на вода или химикали върху Rotor-Gene Q MDx. Повреди, причинени от вода или химикали, правят гаранцията невалидна.</p>
---	---

Бележка: При спешност, изключете Rotor-Gene Q MDx от превключателя, който се намира отзад и изтеглете кабела от контакта.

<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W4]</p> <p>Не се опитвайте да отворите капака по време на опит или докато Rotor-Gene Q MDx се върти. В противен случай, ако успеете да преодолеете заключващия механизъм и посегнете вътре, рискувате контакт с части, които са горещи, през тях тече електричество или се движат с висока скорост и можете да се нараните и да повредите уреда.</p>
<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W5]</p> <p>Ако е необходимо да спрете опита бързо, изключете уреда от захранването и отворете капака. Оставете вътрешността да се охлади преди да бръкнете вътре. В противен случай, рискувате да се нараните при допир с горещи части.</p>
<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W6]</p> <p>Ако оборудването се използва по различен от указания от производителя начин, предпазващите механизми на уреда могат да бъдат компрометирани.</p>
<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W7]</p> <p>Наличието на хартия под Rotor-Gene Q MDx пречи на охлаждането на уреда. Препоръчва се площта под уреда да се поддържа чиста.</p>
<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Увреждане на уреда [C2]</p> <p>Винаги използвайте заключващ пръстен върху ротора. Това предотвратява отварянето на капачките на епруветките по време на опит. Ако капачките се отворят, могат да повредят вътрешността.</p>
<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Увреждане на уреда [C3]</p> <p>Преди всеки опит визуално проверете и се уверете, че роторът не е увреден или деформиран.</p>

Ако докоснете Rotor-Gene Q MDx по време на опит, докато сте заредени със статично електричество, в екстремни случаи Rotor-Gene Q MDx може да се изключи. Софтуерът, обаче, ще рестартира Rotor-Gene Q MDx и ще продължи опита.

1.2 Електрическа безопасност

Изключете уреда от контакта преди сервизно обслужване.

ПРЕДУПР	Опасност от електричество [W8] Всяко прекъсване на предпазния проводник (заземяване) вътре или извън уреда, или прекъсването на терминала на предпазния проводник по всяка вероятност ще направи уреда опасен. Забранява се нарочното прекъсване. Смъртоносно напрежение в уреда Когато уредът е свързан към захранването, терминалите може да са активни и отварянето на капацити или махането на части може да разкрие части, по които тече ток.
----------------	---




За да гарантирате задоволителна и сигурна работа на Rotor-Gene Q MDx, следвайте дадените по-долу съвети:

- Захранващият кабел трябва да е свързан към контакт, който е обезопасен (заземен).
- Не приспособявайте и не замествайте вътрешни части на уреда.
- Не работете с инструмента, докато има липсващи капацити или части.
- Ако е разлята течност в уреда, го изключете, извадете кабела от контакта и се свържете с отдела по техническа поддръжка на QIAGEN.

Ако уредът стане електрически опасен, ограничете използването му от други служители и се свържете с отдела по техническа поддръжка на QIAGEN; уредът може да е електрически опасен когато:


- Уредът или кабелът са повредени.


- Е съхраняван при неблагоприятни условия за продължителен период от време.
- Е подложен на извънредни натоварвания по време на транспорт.

ПРЕДУПР 	Опасност от електричество [W9] Уредът има обозначения за електрическите параметри, които посочват напрежението и честотата на тока, както и ампеража на бушоните. Уредът трябва да оперира само при тези условия.
---	---

1.3 Околна среда

Условия на работа

ПРЕДУПР 	Избухлива атмосфера [W10] Rotor-Gene Q MDx не е разработен за работа в избухлива атмосфера.
---	---

ВНИМАНИЕ 	Увреждане на уреда [C4] Пряката слънчева светлина може да избели части на уреда и да увреди пластмасовите части. Rotor-Gene Q MDx не трябва да бъде изложен на пряка слънчева светлина.
--	---

1.4 Биологична безопасност

Пробите и реагентите, съдържащи материали с биологичен произход, трябва да се разглеждат като потенциално заразни. Използвайте процедури за лабораторна безопасност като тези в публикации от рода на Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, NHS (www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm).

Проби

Пробите могат да съдържат заразни агенти. Трябва да сте наясно с рисковете за здравето от такива агенти и

да използвате, съхранявате и изхвърляте такива проби според изискваните условия за безопасност.

ПРЕДУПР



Пробите, съдържащи заразни агенти

[W11]


Някои проби, използвани с този уред, могат да съдържат заразни агенти. Обработвайте такива проби с особено внимание и съобразно предписанията за безопасност.

Винаги носете предпазни очила, два чифта ръкавици и престилка.

Отговорникът (напр. лабораторен мениджър) трябва да предприеме нужните мерки, за да гарантира, че работната среда е безопасна и че работещите с уреда са подходящо обучени и не са изложени на опасни нива на заразни агенти, според приложимите данни за безопасност (SDS), OSHA,* ACGIH,† или COSHH‡ документите.

Проветряването и изхвърлянето на отпадъци трябва да са в съответствие с всички национални и местни разпоредби и закони за безопасност.

1.5 Химикали

<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Опасни химикали [W12]</p> <p>Някои от използваните с този уред химикали може да са опасни или да станат такива след приключване на работния протокол.</p> <p>Винаги носете предпазни очила, ръкавици и престилка.</p> <p>Отговорникът (напр. лабораторен мениджър) трябва да предприеме нужните мерки, за да гарантира, че работната среда е безопасна и че работещите с уреда не са изложени на опасни нива на токсични субстанции (химични или биологични), според приложимите данни за безопасност (SDS), OSHA,* ACGIH,† или COSHH‡ документите.</p> <p>Проветряването и изхвърлянето на отпадъци трябва да са в съответствие с всички национални и местни разпоредби и закони за безопасност.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (САЩ).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (САЩ).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Великобритания).


Отровни изпарения


При работа с летливи разтворители или отровни субстанции, трябва да се осигури ефективна вентилация, за да се отстранят възможните изпарения.


1.6 Унищожаване на отпадъците


Използваните консумативи и пластмасови изделия могат да съдържат опасни химикали или заразни агенти. Подобни отпадъци трябва да се събират и да се изхвърлят в съответствие с местните предписания за безопасност.


1.7 Механична опасност Капакът на Rotor-Gene Q MDx трябва да стои затворен по време на работата на уреда.


ПРЕДУПР 	Подвижни части [W13] За да се избегне контакт с подвижните части по време на работа на Rotor-Gene Q MDx, уредът трябва да работи със затворен капак.
---	--

ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ 	Риск от нараняване и материална вреда [W14] Отваряйте и затваряйте внимателно капака на Rotor-Gene Q MDx, за да избегнете преципване на пръсти или дрехи.
---	---


ВНИМАНИЕ 	Увреждане на уреда [C5] Уверете се, че роторът и заключващият пръстен са поставени правилно. Ако роторът или заключващият пръстен показват признаци на механична повреда или корозия, не използвайте Rotor-Gene Q MDx; свържете се с отдела за техническа поддръжка на QIAGEN.
--	--


ВНИМАНИЕ 	Увреждане на уреда [C6] При включване на Rotor-Gene Q MDx непосредствено след доставка на места със студен климат е възможно блокиране на механичните части. Оставете уредът да се аклиматизира на стайна температура, най-малко за един час, преди да го включите.
--	---

ПРЕДУПР 	Подвижни части [W15] При срив причинен от прекъсване на електричеството, извадете кабела от контакта и изчакайте 10 минути, преди да отворите капака.
---	---

<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Риск от прегряване [W16]</p> <p>За да осигурите правилна вентилация, оставете поне по 10 см отстояние от двете страни и задната част на Rotor-Gene Q MDx.</p> <p>Отворите за вентилацията на Rotor-Gene Q MDx не трябва да се покриват.</p>
---	--


1.8 Топлинна опасност


<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Гореца повърхност [W17]</p> <p>Вътрешността на Rotor-Gene Q MDx може да достигне температури над 120°C (248°F). Не я докосвайте, докато е гореща.</p>
---	--


<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Гореца повърхност [W18]</p> <p>При пауза на опита, Rotor-Gene Q MDx няма да се охлади напълно до стайна температура. Внимавайте когато боравите с ротора или епруветките в уреда.</p>
---	--


1.9 Поддръжка

Провеждайте поддръжката, както е описано в Раздел 9. Поправките, които са резултат на неправилна поддръжка, се заплащат на QIAGEN.

<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от нараняване и материална вреда [W19]</p> <p>Провеждайте поддръжка само според предписанията в това ръководство.</p>
---	---

<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Риск от пожар [W20]</p> <p>Когато почиствате Rotor-Gene Q MDx с алкохолни дезинфектанти, оставайте капака на Rotor-Gene Q MDx отворен, за да се разсеят запалимите изпарения. Почиствайте Rotor-Gene Q MDx само когато камерата му се е охладила.</p>
---	--

<p>ПРЕДУПР/ ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Риск от токов удар [W21] Не разглобявайте Rotor-Gene Q MDx.</p>
---	---

<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Повреда на външната част на инструмента [C7] Никога не почиствайте външната част с алкохол или алкохолни разтвори. Алкохолът ще повреди външната част. За почистване използвайте само дестилирана вода.</p>
--	---

1.10 Символи на Rotor-Gene Q MDx

Символ	Място	Описание
	<p>Близо до камерата с пробите, вижда се когато капакът е отворен</p>	<p>Топлинна опасност - температурата на камерата може да достигне над 120°C (248°F)</p>
	<p>Върху задната част на уреда</p>	<p>Консултирайте се с инструкциите за употреба</p>
	<p>Плаката на задната част на уреда</p>	<p>CE маркировка за Европейско съответствие</p>
	<p>Плаката на задната част на уреда</p>	<p>Ин витро диагностично медицинско изделие</p>
	<p>Плаката на задната част на уреда</p>	<p>CSA маркировка за Канада и САЩ</p>
	<p>Плаката на задната част на уреда</p>	<p>Законен производител</p>

Символ	Място	Описание
	Плаката на задната част на уреда	WEEE маркировка за Европа
	Плаката на задната част на уреда	FCC маркировка на Федералната комуникационна комисия на САЩ
	Плаката на задната част на уреда	C-Tick маркировка за Австралия (идентификационен номер на доставчика N17965)
	Плаката на задната част на уреда	RoHS маркировка за Китай (ограничение за употребата на някои опасни субстанции с електрическо оборудване)

Тази страница умишлено е оставена празна

2 Въведение

Благодарим Ви, че избрахте Rotor-Gene Q MDx. Убедени сме, че той ще се превърне в неразделна част от Вашата лаборатория.

Преди да се използва Rotor-Gene Q MDx, е важно внимателно да прочетете това ръководство и да обърнете особено внимание на информацията за безопасността. Инструкциите и информацията за безопасността трябва да се следват, за да се гарантира сигурност при работата на уреда и да се запази уреда в безопасно състояние.

Имайте предвид, че Rotor-Gene Q MDx се предлага в няколко конфигурации. За подробности, включително информация за поръчки, моля, вижте Приложение В.

2.1 Обща информация

2.1.1 Техническа поддръжка

Ние, в QIAGEN се гордеем с качеството и достъпността на нашата техническа поддръжка. Нашият отдел за Техническа поддръжка се състои от опитни учени с обширен практически и теоретичен опит в сферата на молекулярната биология и използването на продуктите на QIAGEN. Ако имате въпроси или се сблъскате с трудности при работата с Rotor-Gene Q MDx или продуктите на QIAGEN, не се колебайте да се свържете с нас.

Клентите на QIAGEN са основен източник на информация за специализирана употреба на нашите продукти. Тази информация е полезна за останалите учени и за изследователите в QIAGEN. Затова ви окуражаваме да се свържете с нас, ако имате предположения за работата на продуктите ни или за нови техни приложения и техники.

За техническа поддръжка и информация, се свържете с отдела за техническа поддръжка на QIAGEN или с местния дистрибутор (виж задната корица).

За актуална информацията за Rotor-Gene Q MDx, посетете www.qiagen.com/products/rotor-genegmdx.aspx.

2.1.2 Становище за политиката

Политиката на QIAGEN е да подобрява своите продукти с появата на нови техники и компоненти. QIAGEN запазва правото си да променя спецификациите по всяко време.

В усилията си да предоставим полезна и подходяща документация, оценяваме вашите коментари за това ръководство. Моля, свържете се с отела за техническа поддръжка на QIAGEN.

2.1.3 Версия

Този документ е *Ръководство на Rotor-Gene Q MDx*, в. 2.0, рев. R1 за Rotor-Gene Q MDx уреди, работещи с Rotor-Gene Q софтуер в. 2.3.4 или по-нова.

2.2 Предназначение на Rotor-Gene Q MDx

Rotor-Gene Q MDx е разработен за температурни цикли, детекция и/или околичествяване в реално време, чрез полимеразна вержна реакция (PCR) за клинични приложения.

Rotor-Gene Q MDx е предназначен за употреба само с китове на QIAGEN, приложими с Rotor-Gene Q инструментите за описаните в наръчниците на съответните китове приложения.

Ако уредът Rotor-Gene Q MDx се използва с комплекти различни от QIAGEN, потребителят е отговорен да валидира функционалността на подобна продуктова комбинация за всяка отделно приложение.

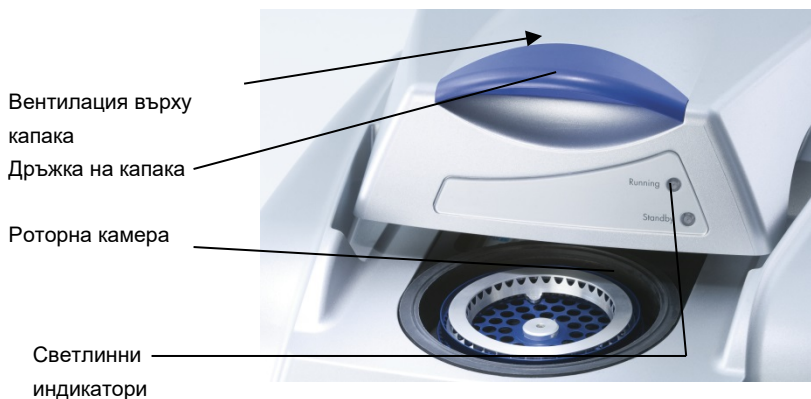
Rotor-Gene Q MDx е предназначен за ин витро диагностика.

Rotor-Gene Q MDx е предназначен за употреба само от професионалисти, като лаборанти и лекари, обучени на молекулярно биологични техники и работа с Rotor-Gene Q MDx уреда.

3 Общо описание

Rotor-Gene Q MDx е иновативен уред, който позволява провеждане на високо прецизен PCR в реално време, и е особено подходящ за ин витро диагностични приложения в комбинация с IVD маркираните китове на QIAGEN.

Мощният и удобен софтуер е опростен за начинаещите, но дава отворена експериментална платформа за напредналите потребители.



3.1 Температурна характеристика

Rotor-Gene Q MDx използва изтънчена система за нагряване и охлаждане за постигане на оптимални реакционни условия. Уникалният роторен формат осигурява оптимална термална и оптична хомогенност между пробите, което е ключово за прецизия и точен анализ.

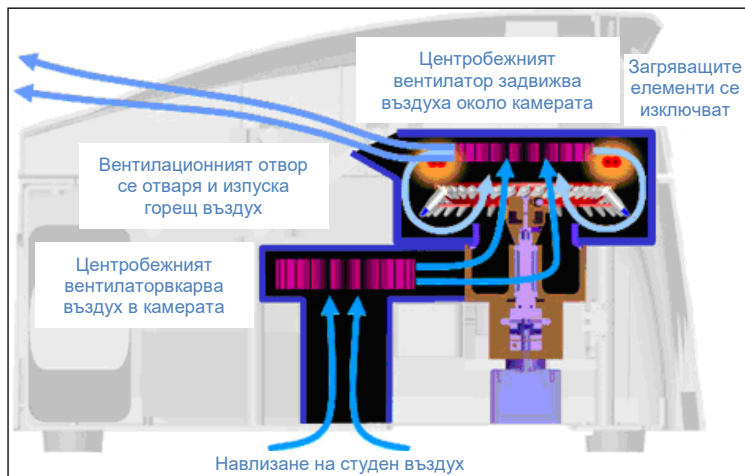
Пробите се въртят постоянно при 400 rpm по време на опит. Това предпазва от кондензация и премахва въздушните мехури без да се утаява ДНК. Освен това, не е нужно пробите да се въртят преди опит.

Пробите се загряват и охлаждат чрез нагрят въздух. Загряването става чрез никело-хромен елемент в капака. Охлаждането става чрез изкарване на въздуха през горната част на камерата, докато въздух отвън навлиза през долната.

Загряване



Охлаждане

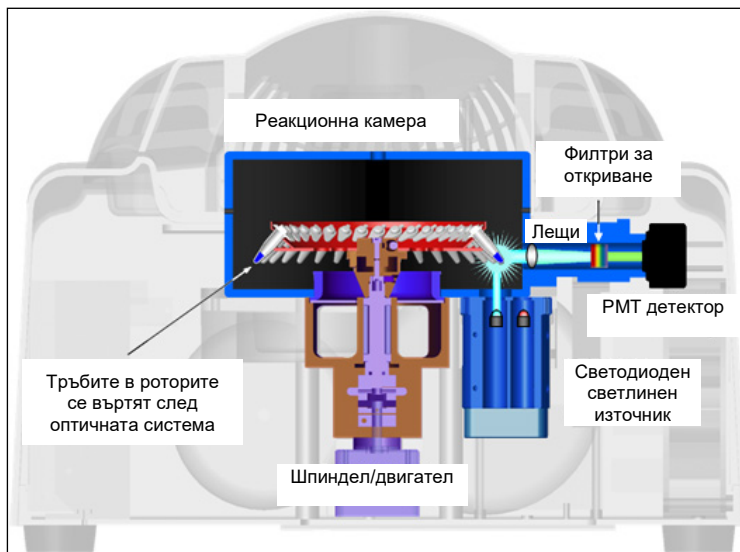


Илюстрация на системата за загряване и охлаждане.

3.2 Оптична система

С набор от до 6 възбудни източника и 6 детекционни филтъра в комбинация с къс, фиксиран оптичен път, RotorGene Q MDx може да се използва за мултиплексни реакции с минимална флуоресцентна вариабилност между пробите и без нужда от компенсация или калибрация.

Пробите се възбудят от дъното на корпуса чрез светлинно-емитиращи диоди. Енергията преминава през тънките стени на дъното на епруветките. Емитираната флуоресценция преминава през емисионните филтри от страни на камерата и се събира от фотоумножител. Фиксираният оптичен път осигурява еднакво възбуждане на всяка проба, което елиминира нуждата от използването на пасивно референтно багрило като ROX™.



Илюстрация на оптичната система.

Налични канали

Канал	Възбуждане (nm)	Детекция (nm)	Примери за детектирани флуорофори
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 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
High resolution melt (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO [®] 9, LC Green [®] , LC Green Plus+, EvaGreen

Забележка: Китовите на QIAGEN с индикация за употреба с Rotor-Gene Q MDx апарати са оптимизирани за определени комбинации от багрила. Моля, обърнете се към наръчниците на съответните китове за повече информация.

4 Процедури по инсталация



4.1 Изисквания към местоположението

Rotor-Gene Q MDx трябва да е на място без пряка слънчева светлина, далеч от източници на топлина, вибрации и електрически смущения. Обърнете се към Приложение А за операционните условия (температура и влажност). Мястото на инсталиране трябва да е лишено от прекомерни течения, влажност, запрашаване и високи температурни флуктуации.

В Приложение А са описани размерите и теглото на Rotor-Gene Q MDx уредите. Уверете се, че работният плот е сух, чист и има достатъчно място за аксесоарите. За повече информация относно изискванията към работния плот, се свържете с отдела за техническа поддръжка на QIAGEN.

Забележка: Изключително важно е Rotor-Gene Q MDx да бъде поставен на стабилна, равна повърхност, лишена от вибрации. Обърнете се към операционните условия – вижте Приложение А.

Rotor-Gene Q MDx трябва да се постави на близо 1.5 m (59 in.) от правилно заземен източник на ток.

<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Избухлива атмосфера [W10]</p> <p>Rotor-Gene Q MDx не е разработен за работа в избухлива атмосфера.</p>
<p>ПРЕДУПР</p> 	<p>Риск от прегряване [W16]</p> <p>За да осигурите правилна вентилация, оставете поне по 10 см отстояние от двете страни и задната част на Rotor-Gene Q MDx.</p> <p>Отворите за вентилацията на Rotor-Gene Q MDx не трябва да се покриват.</p>

4.2 Захранване

Изисквания към мрежата

Rotor-Gene Q MDx работи при:

- 100–240 V при 50–60Hz, 520 VA (връх)

Уверете се, че волтажът, указан на Rotor-Gene Q MDx, е съвместим с този на мястото на монтиране.

Флуктуациите на подавания ток не трябва да надвишават 10% от номиналното напрежение.

Изисквания към заземяването

С цел предпазване на опериращия персонал, QIAGEN препоръчва Rotor-Gene Q MDx да бъде правилно заземен. Уредът е снабден с троен кабел, който при правилно свързване заземява уреда. За да запазите тази особеност на уреда, не го включвайте в незаземен контакт.

Инсталиране на захранващия кабел

Свържете единия край на захранващия кабел с изхода на задната част на Rotor-Gene Q MDx, а другия - с електрическата инсталация.

4.3 Изисквания към компютърната система

Лаптопът, който се доставя с Rotor-Gene Q MDx по желание, изпълнява изискванията на Rotor-Gene Q софтуера, представени в следващата таблица.

Изисквания към компютърната система

Описание	Минимално изискване
Операционна система	Microsoft® Windows® 10 Professional edition (64 бита); Microsoft Windows 7 Professional edition (32 бита или 64 бита)* (Service Pack 1)
Процесор†	Intel® Core™ 2 Duo 1,66 GHz или по-добър
Памет†	Поне 1 GB RAM
Твърд диск†	Поне 10 GB HDD
Графика	Адаптор и екран с поне 1200 x 800 пиксела
Портове†	RS-232 сериен порт или USB порт
DVD-ROM устройство	1
Посочващо устройство	Тъчпад, мишка или еквивалентно
Bluetooth®	Трябва да е изключен
PDF визуализатор или подобен	Трябва да е инсталиран, не е включен в софтуерните инсталационни пакети
Опции за захранването	Никога не изключвайте твърдите дискове, не влизайте в хибернация или режим на изчакване

* За използване на софтуера Rotor-Gene Q със защитни функции е необходим Microsoft Windows 10 или Windows 7 Professional edition (вижте раздел 7.9). Защитните функции не са налични при използване на Home edition на Windows 10 или Windows 7.

† Когато използвате софтуера Rotor-Gene AssayManager® версия 1.0 или 2.1, следните минимални изисквания към компютъра са различни: Процесор Intel Core i3-380M, оперативна памет 4 GB RAM, свободно място на твърдия диск 250 GB, USB порт.

4.4 Конфигурация за защита в Windows 7

Преносимите компютри, предоставени от QIAGEN за използване с апарата Rotor-Gene Q MDx, са с предварително инсталиран Microsoft Windows 7 и са конфигурирани със стандартен (неадминистраторски) профил на потребител и профил на администратор в Windows. При рутинна употреба на системата трябва да се използва стандартният профил, защото софтуерът Rotor-Gene Q и Rotor-Gene AssayManager версия 1.0 или 2.1 са предназначени да работят без администраторски права. Администраторският профил трябва да се използва само за инсталиране на софтуера Rotor-Gene Q или Rotor-Gene AssayManager версия 1.0 или 2.1 и антивирусен софтуер (вижте раздела „Антивирусен софтуер“). Използването на администраторски профил се указва с червен фон на работния плот. При рутинна употреба, моля, винаги се уверявайте, че сте влезли като стандартен потребител.

Q1a#g3n!A6 е паролата на администраторския профил по подразбиране. Моля, променете администраторската парола след първото влизане. Моля, поставете се паролата да е сигурна и да не се изгуби. Няма парола за операторския профил.

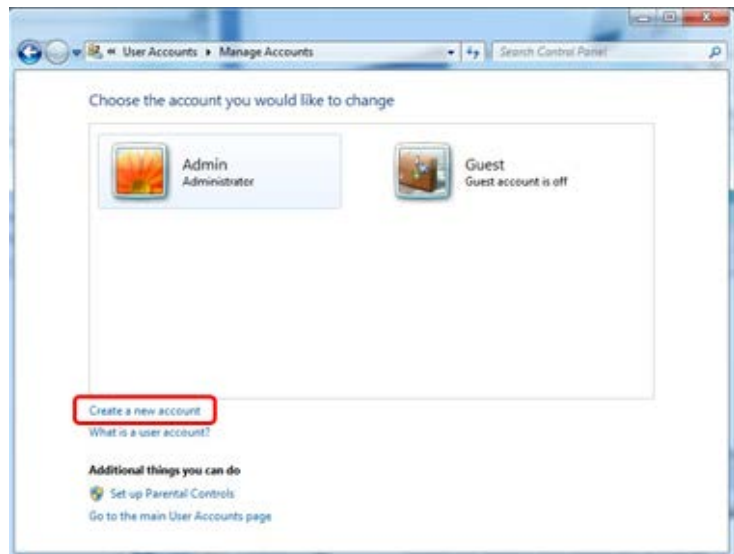
Ако загубите администраторската парола на лаптопа, бихме ви посъветвали да се свържете с Microsoft за поддръжка.

Ако конфигурацията ви е различна и не съдържа неадминистраторски профил, системните администратори трябва да създадат допълнителен профил на стандартен потребител в Windows, за да се предотврати достъпът до критично важни за системата области като директории Program Files и Windows (напр. достъп до функции за инсталиране или деинсталиране, включително на приложения, компоненти на операционната система, настройки за дата/час, актуализации на Windows, защитна стена, потребителски права и роли, активиране на антивирусна програма) или свързани с производителността настройки като енергоспестяващ режим.

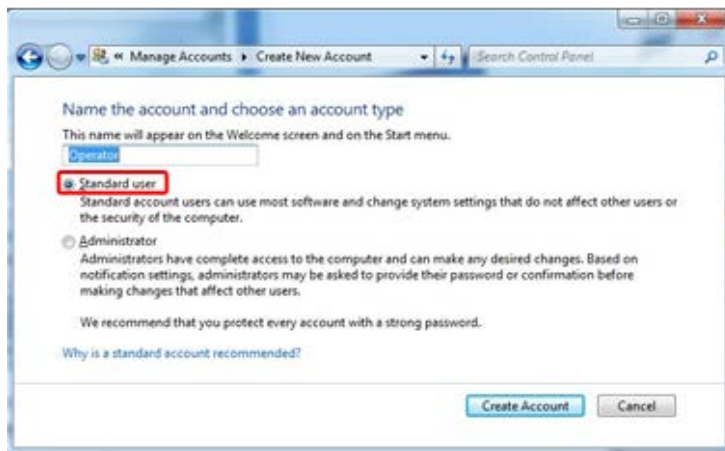
За да създадете профил на стандартен потребител в Windows 7, моля, изпълнете следните стъпки, описани в раздела „Създаване на нов потребителски профил“:

Отворете Windows Control Panel (контролния панел на Windows) от менюто „Start“ (Старт) и изберете „User Accounts > Manage Accounts“ (Потребителски акаунти > Управление на акаунтите).

1. Изберете „Create a new account“ (Създаване на нов акаунт).



2. Дайте име на профила и изберете „Standard User“ (Стандартен потребител) като тип на профила.



3. Щракнете върху „Create Account“ (Създаване на акаунт).

4.5 Разпаковане на Rotor-Gene Q MDx

Rotor-Gene Q MDx се доставя с всички необходими компоненти за настройване и работа с уреда. В опаковката ще намерите и списък на всички доставени компоненти.

Забележка: Проверете списъка, за да сте сигурни, че всички компоненти са налице.

Забележка: Проверете дали уредът и доставените аксесоари не са повредени при транспорта.

Кутията с аксесоарите е поставена върху опаковката от стиропор. Кутията с аксесоарите съдържа:

- Наръчник за инсталиране (на английски; преводи са налични на CD с ръководствата)
- CD (софтуер)
- CD (ръководства)
- Зареждащ блок 96 x 0.2 ml епруветки
- Зареждащ блок 72 x 0.1 ml епруветки
- Държач на ротора (разглобен)

- 36-ямков ротор (този ротор е червен)
- 36-ямков заключващ пръстен

Следните артикули са от всяка страна на стиропорната кутия:

- USB и RS-232 сериен кабел
- Международен набор от кабели
- PCR епруветки, 0.2 ml (1000)
- Стрипове от епруветки и капачки, 0.1 ml (1000)

След като махнете всички тези компоненти от кутията, отворете стиропорената опаковка на Rotor-Gene Q MDx. Внимателно извадете Rotor-Gene Q MDx от кутията и отстранете найлоновата опаковка. Отворете капака чрез плъзгане назад, за да достигнете до реакционната камера.

Следните артикули са вече инсталирани в Rotor-Gene Q MDx:

- 72-ямков ротор (този ротор е син)
- 72-ямков заключващ пръстен

В зависимост от поръчката ви, в опаковката може да е включен и лаптоп.

4.6 Принадлежности

Роторните дискове и аксесоарите за употреба с Rotor-Gene Q MDx могат да се поръчат отделно. За повече детайли вижте Приложение С.

4.7 Инсталиране на хардуера

След като сте разопаковали Rotor-Gene Q MDx, продължете с инсталацията, както е описано по-долу.

ВНИМАНИЕ



Увреждане на уреда

[С6]

При включване на Rotor-Gene Q MDx непосредствено след доставка на места със студен климат е възможно блокиране на механичните части. Оставете уреда да се аклиматизира на стайна температура, най-малко за един час, преди да го включите.

Процедурите по следния начин:

1. Поставете Rotor-Gene Q MDx върху равна повърхност.
2. Уверете се, че зад уреда има достатъчно място, за да се отваря капакът докрай.
3. Уверете се, че ключът отзад е лесно достъпен.
4. Не закривайте задната част на уреда. Уверете се, че кабелът може лесно да се извади при нужда, за да се прекъсне захранването.
5. Свържете USB кабела или RS-232 сериен кабел с USB или комуникационен порт на компютъра.
6. Свържете USB или RS-232 сериен кабел към задната част на Rotor-Gene Q MDx.
7. След това свържете Rotor-Gene Q MDx към захранването. Свържете единия край на захранващия кабел към изхода отзад на Rotor-Gene Q MDx, а другият край към контакта.

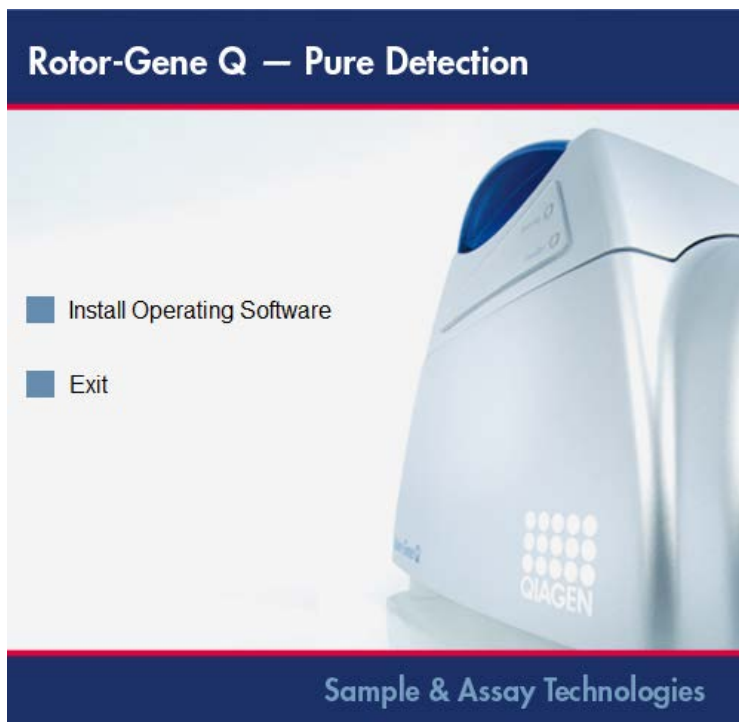


Забележка: Свържете Rotor-Gene Q MDx към компютъра единствено с кабелите, доставени с уреда. Не използвайте други кабели.

4.8 Инсталиране на софтуера

1. За да инсталирате Rotor-Gene Q софтуера, поставете CD (софтуер), доставен с уреда, в CD устройството на компютъра.
2. Изберете “Install Operating Software” в прозореца, който се появява.

Забележка: Моля, обърнете се към *Ръководството за инсталация на Rotor-Gene Q*, доставено с уреда, за по-лесна инсталация и следване на стъпките на инсталиране на софтуера.



3. След като сте инсталирали софтуера автоматично се създава икона върху десктопа

4. Включете Rotor-Gene Q MDx чрез натискане на превключвателя на задната лява страна до позиция "I". Синя светлина "Standby" отпред на Rotor-Gene Q MDx показва, че уредът е готов за работа.

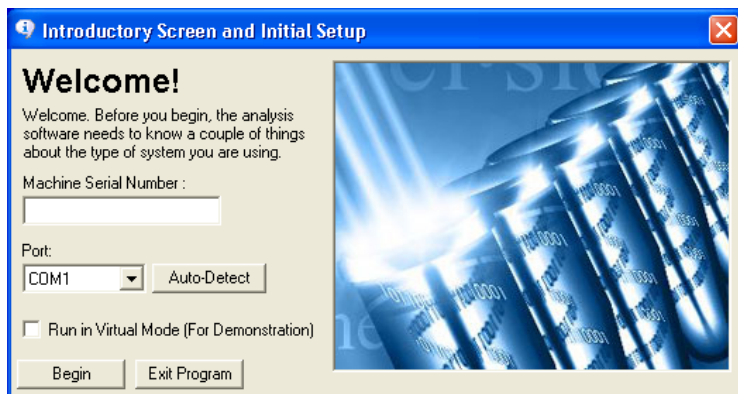
Забележка: Когато започнете да свързвате към компютър за първи път, Rotor-Gene Q MDx ще бъде разпознат от операционната система и се появяват няколко съобщения. Моля, обърнете се към *Ръководството за инсталация на Rotor-Gene Q* предоставено с уреда (на CD и печатно издание) за насоки.



5. Кликнете два пъти иконата "Rotor-Gene Q Series Software" на десктопа, за да стартирате.

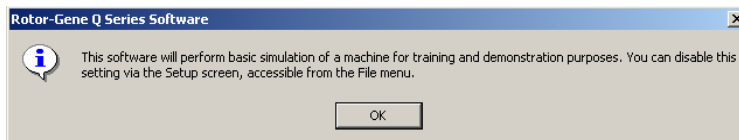


6. Когато стартирате за първи път софтуера, се появява прозорец “Welcome”, но при последващи обновявания не се появява.



- Machine Serial Number:** Въведете серийния номер (7 цифри), който ще намерите отзад на Rotor-Gene Q MDx.
- Port:** Изберете USB или сериен кабел. Изберете подходящия комуникационен порт или натиснете бутона “Auto-Detect”.
- Auto-Detect** Когато използвате тази опция, съответният USB или сериен порт ще бъде намерен автоматично и ще се появи в падащия списък “Port”.
- Run in Virtual Mode (for demonstration):** Маркирането на тази кутийка позволява инсталирането на Rotor-Gene Q софтуера на компютър, не свързан към уреда. Софтуерът е напълно функционален и може да симулира опити.
- Забележка:** Ако кутийката е маркирана и Rotor-Gene Q MDx е свързан с компютъра, преди опита се появява съобщението: “You are about to run in Virtual mode”. За да проведете реален опит, настройката трябва да се промени в прозореца “Setup” (виж Раздел 7.5.4).

Begin: Когато е въведена цялата информация, натиснете “Begin”. Изчакайте няколко секунди докато завърши иницирането. Ако е избран виртуалният режим, се появява съобщението:

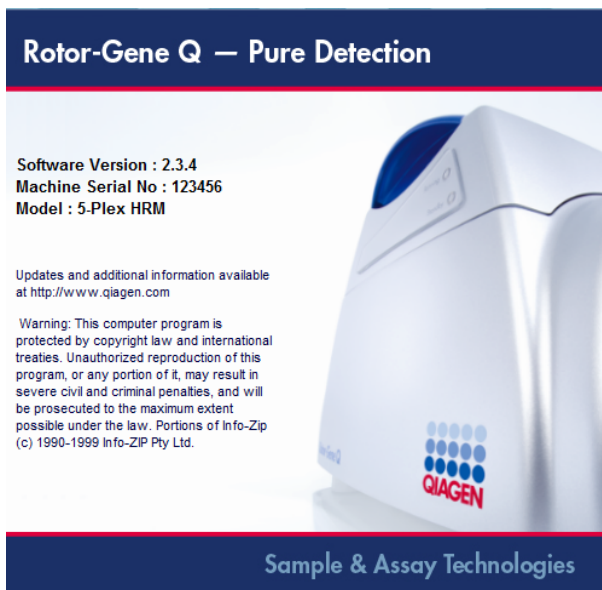


Ако кутийката “Run in Virtual Mode” не е маркирана, софтуерът се иницира и се отваря автоматично.

Exit Program: Този бутон ще ви изведе от програмата.

4.9 Версия на софтуера

Разработването на Rotor-Gene Q софтуера продължава. За да разберете номера на версията, натиснете “Help” и после “About This Software...”.



Този прозорец показва обща информация за софтуера, включително версията на софтуера, сериения номер и модел на уреда.

Софтуерът може свободно да се копира и използва в рамките на организация, притежаваща Rotor-Gene Q MDx. Софтуерът не може се копира и разпространява до лица извън организацията.

4.10 Допълнителен софтуер на компютри, свързани с Rotor-Gene Q MDx уредите

Rotor-Gene Q софтуерът извършва времево-критични процеси повреме на PCR и натрупването на данни. Затова е важно да се уверите, че други процеси не използват ресурсите на системата и не забавят Rotor-Gene Q софтуера. От особено значение е да се обърне внимание на точките по-долу.

Препоръчва се системните администратори да преценят евентуалното влияние на всяка модификация на системата, преди да я приложат.

4.10.1 Антивирусен софтуер

QIAGEN е наясно със заплахата, която компютърните вируси представляват за всеки компютър, обменящ данни с други компютри. Очаква се софтуерът Rotor-Gene AssayManager версия 1.0 или 2.1 да бъде инсталиран главно в среди, където се прилагат локални правила за свеждане на този риск до минимум. Въпреки това QIAGEN препоръчва употребата на антивирусен софтуер във всички случаи.

Изборът и инсталирането на подходящи инструменти за сканиране на вируси е отговорност на клиента. QIAGEN обаче е потвърдил съвместимостта на софтуера Rotor-Gene Q и Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 и 2.1 с лаптопа на QIAGEN в комбинация със следните два антивирусни софтуера:

- Symantec® Endpoint Protection V12.1.6
- Microsoft Security Essentials V4.10.209¹

Моля, вижте продуктовата страница на QIAGEN.com за най-новите версии на антивирусния софтуер, утвърден в комбинация със софтуера Rotor-Gene Q и Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 или 2.1.

¹ **Забележка:** След инсталиране на „Microsoft Security Essentials“ трябва да проверите дали актуализациите на Windows са деактивирани, защото инсталирането може да активира тази настройка (моля, прочетете главата „Актуализации на операционната система“).

Ако е избран антивирусен софтуер, уверете се, че той може да бъде конфигуриран така, че пътят на папката с базата данни да може да се изключи от сканирането. В противен случай има риск от грешки при свързване с базата данни. Тъй като Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 и 2.1 динамично създават нови архиви на базата данни, трябва да изключите пътя до цялата папка с файловете, а не отделни файлове. Не препоръчваме използването на антивирусен софтуер, при който може да се изключват само отделни файлове, напр. McAfee Antivirus Plus V16.0.5. Ако компютърът се използва в среда без мрежов достъп, моля, уверете се, че антивирусният софтуер поддържа офлайн актуализации.

За получаване на съгласувани резултати след инсталирането на антивирусен софтуер, системните администратори трябва да гарантират следното:

- Както е обяснено по-горе, пътят до папката с базата данни на Rotor-Gene AssayManager 1.0 и 2.1 (C:\Program Files\Microsoft SQL Server\MSSQL10_50.RGAMINSTANCE\MSSQL\DATA) трябва да се изключи от сканиранията.
- Не се извършват актуализации на вирусната база данни, когато се използва Rotor-Gene AssayManager 1.0 или 2.1.
- Моля, уверете се, че по време на отчитане на PCR данни в реално време са деактивирани пълните и частичните сканирания. В противен случай има риск от неблагоприятно въздействие върху характеристиките на апарата.

За подробности относно конфигурирането, моля, прочетете ръководството на избория от вас антивирусен софтуер.

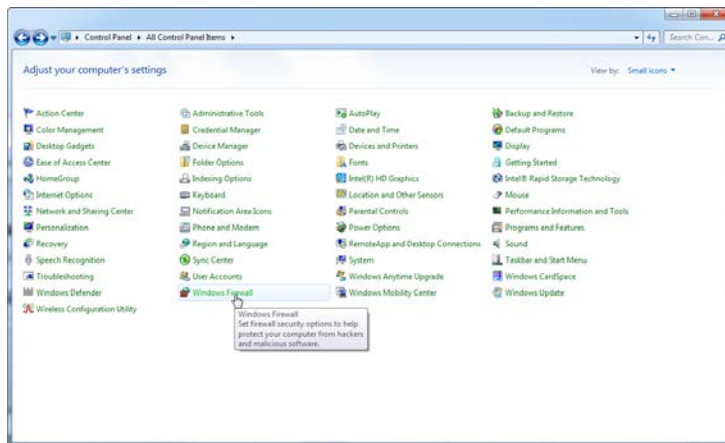
4.10.2 Защитна стена и мрежи

Софтуерът Rotor-Gene Q може да се изпълнява на компютри без мрежов достъп или в мрежова среда, ако се използва отдалечен сървър за база данни. За работа в мрежа защитната стена в преносимия компютър, предоставен от QIAGEN, е конфигурирана така, че да блокира входящия трафик през всички портове освен онези, необходими за установяване на мрежова връзка.

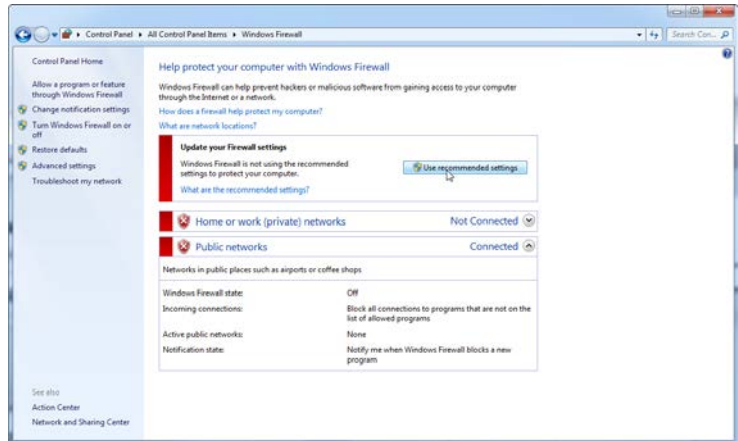
Моля, имайте предвид, че блокирането на входящите връзки не влияе върху изпълнението на заявките, задействани от потребителя. Изходящите заявки са разрешени, защото може да са необходими за извличане на актуализации.

Ако конфигурацията ви е различна, QIAGEN препоръчва да конфигурирате защитната стена по гореописания начин. На този етап трябва да влезе системен администратор и да изпълни следните стъпки:

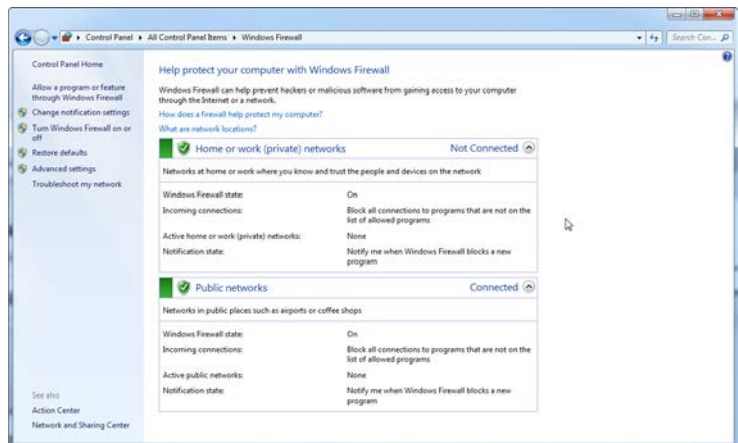
1. Отворете „Control Panel“ (Контролен панел) и изберете „Windows Firewall“ (Защитна стена на Windows).



- Изберете „Use recommended settings“ (Използване на препоръчителните настройки).

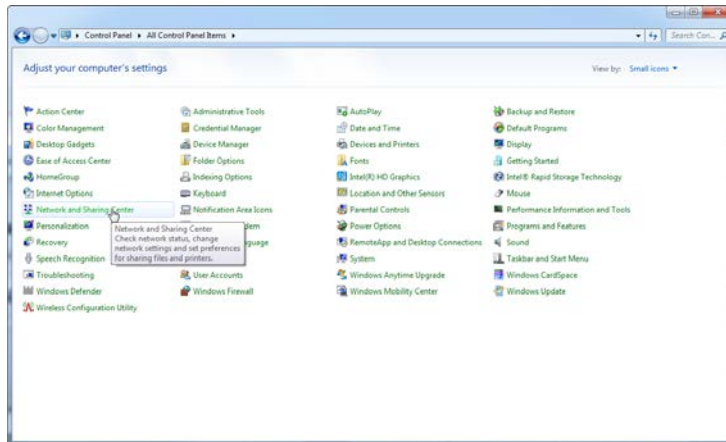


- Проверете дали са активни следните настройки:

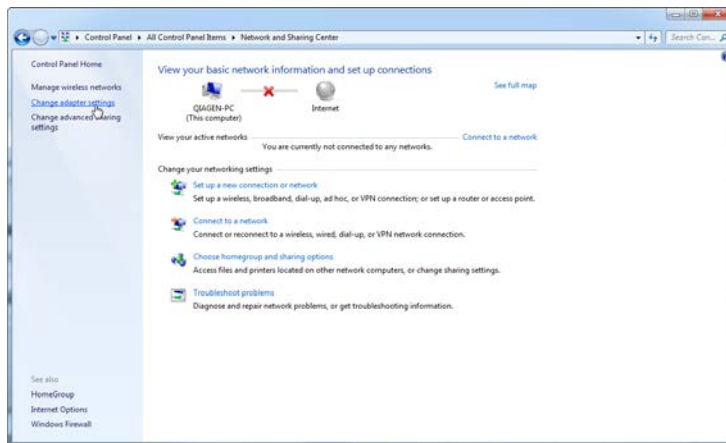


От съображения за сигурност и надеждност трябва да се използва мрежов достъп по кабел, а не по Wi-Fi. Wi-Fi адаптерът на преносимия компютър, предоставен от QIAGEN, е деактивиран. Ако конфигурацията ви е различна, системният администратор трябва да деактивира ръчно Wi-Fi адаптерът, като изпълни следните стъпки:

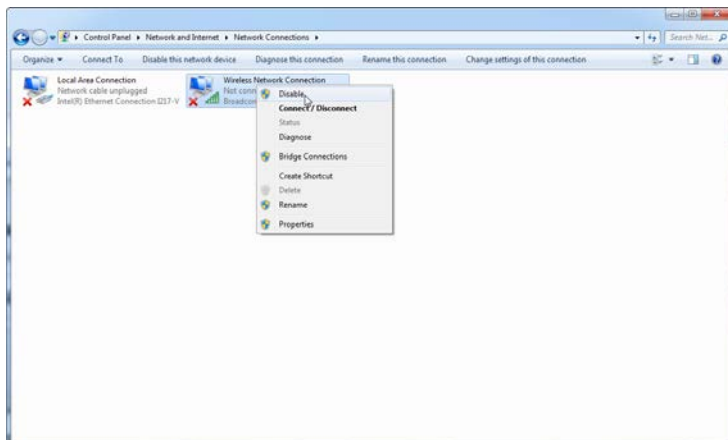
1. Отворете „Control Panel“ (Контролен панел) и изберете „Network and Sharing Center“ (Център за мрежи и споделяне).



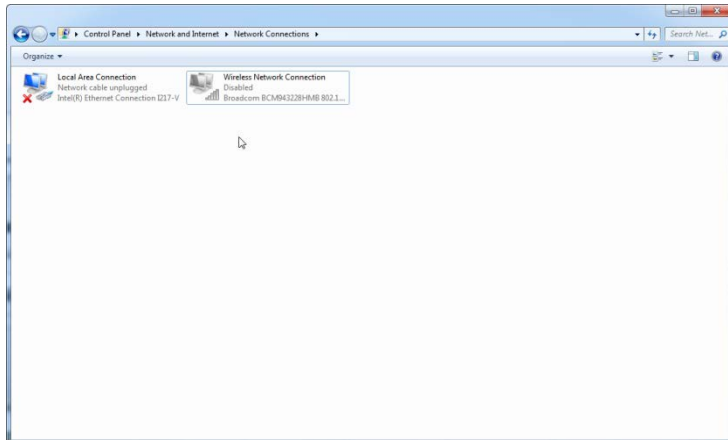
2. Изберете „Change adapter settings“ (Промяна на настройките на адаптера).



3. Посочете „Wireless Network Connection“ (Безжична мрежова връзка), натиснете десния бутон на мишката и изберете „Disable“ (Деактивиране) от контекстното меню.



4. Проверете дали безжичната мрежова връзка е деактивирана.



4.10.3 Системни инструменти

Много системни инструменти използват значителни системни ресурси, дори без намеса на потребителя. Типични примери за такива инструменти са:

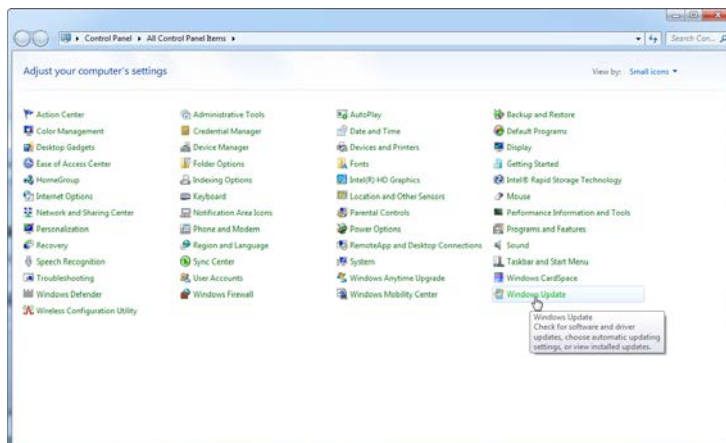
- Индексирането на файлове, което се прави от много офис приложения като фоново изпълнявана задача
- Дефрагментирането на диска, което често също може да е фоново изпълнявана задача
- Всеки софтуер, който проверява за обновяване в интернет
- Инструменти за отдалечено наблюдение и управление

Моля, не забравяйте, че поради динамичната природа на IT света, този списък може да не е пълен и междувременно да са се появили други инструменти. Важно е системният администратор да се увери, че по време на PCR опита няма активни инструменти от този тип.

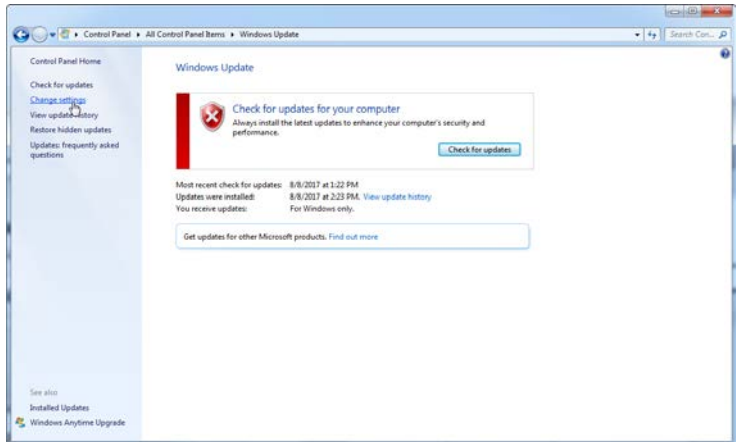
4.10.4 Актуализации на операционната система

Преносимите компютри, предоставени от QIAGEN, са конфигурирани така, че автоматичните актуализации на операционната система са деактивирани. Ако конфигурацията ви е различна, системният администратор трябва да деактивира ръчно автоматичните актуализации на операционната система, като изпълни следните стъпки:

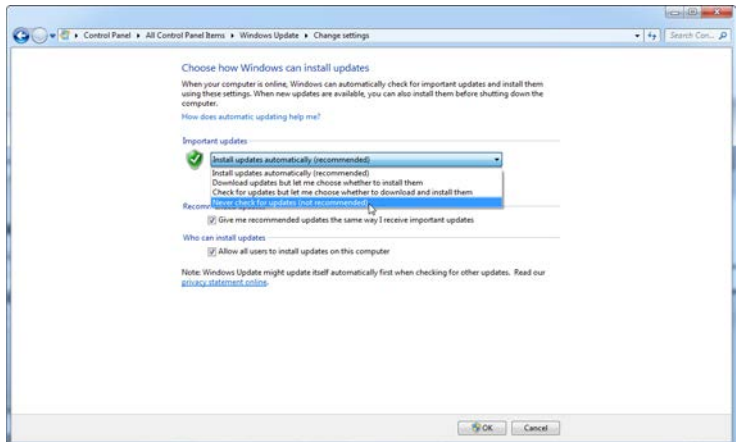
1. Отворете „Control Panel“ (Контролен панел) и изберете „Windows Update“ (Актуализация на Windows).



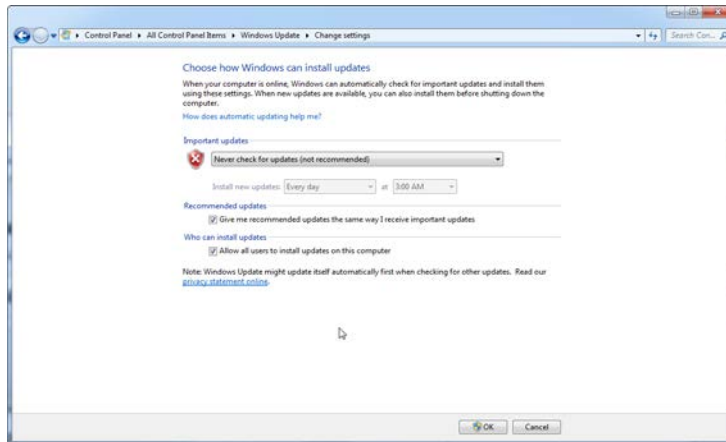
- Изберете „Change settings“ (Промяна на настройките).



- Изберете „Never check for updates“ (Никога да не се проверява за актуализации).



4. Проверете дали е активна опцията „Important updates“ (Важни актуализации) в „Never check for updates“ (Никога да не се проверява за актуализации).



В случай че са необходими актуализации поради открити уязвимости в сигурността, QIAGEN предоставя механизми за инсталиране на утвърдени корекции за защита на Windows онлайн (ако лаптопът на QIAGEN има връзка с интернет) или като офлайн пакет, подготвен на друг компютър с връзка към интернет.

Моля, посетете продуктова страница на QIAGEN.com за повече информация.

4.11 Обновяване на софтуера

Обновленията се намират на страницата на QIAGEN, на www.qiagen.com/products/rotor-genegmdx.asp, където може да стигнете през меню „Help“ на софтуера. За да изтеглите софтуера, е необходимо да се регистрирате онлайн.

5 Оперативни процедури - хардуер

Този раздел описва работата с Rotor-Gene Q MDx.


5.1 Видове ротори

Първо, изберете какви епруветки и ротори ще използвате. Налични са 4 ротора, отговарящи на различните видове епруветки.

Забележка: 36- и 72-ямковите ротори се доставят с уреда. Роторите за Rotor-Disc са аксесоари.

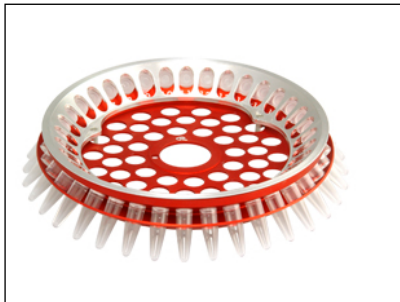
ВАЖНО: Използвайте еднакви епруветки. Не смесвайте различни видове епруветки от различни производители, защото това ще повлияе върху оптичната хомогенност. Препоръчваме епруветки на QIAGEN, разработени за Rotor-Gene Q MDx (виж Приложение С). Епруветки от други производители могат да автофлуоресцират, което би повлияло на надеждността на резултатите. Освен това, те могат да са с различна дължина и дебелилна, което да доведе до отместване на оптичния път на Rotor-Gene Q MDx от реакцията в епруветката. QIAGEN си запазва правото да откаже техническа поддръжка за проблеми породени от неодобрени от QIAGEN пластмасови материали използвани с Rotor-Gene Q MDx.

ВАЖНО: Използването на неодобрени от QIAGEN пластмасови материали може да наруши гаранцията на уреда.

<p>ВНИМАНИЕ</p> 	<p>Увреждане на уреда [С3]</p> <p>Преди всеки опит визуално проверете и се уверете, че роторът не е увреден или деформиран.</p>
--	---

36-ямков ротор

36-ямковият ротор е червен на цвят. 36-ямковият ротор и 36-ямковият заключващ пръстен позволяват използването на 0.2 ml епруветки. Не е нужно епруветките да са с прозрачни капачки, защото Rotor-Gene Q MDx чете флуоресценцията от дъното на епруветката, а не от горната част. Могат да се използват и епруветки с обли капачки.



72-ямков ротор

72-ямковият ротор е син на цвят. 72-ямковият ротор и 72-ямковият заключващ пръстен се използват със стрипове епруветки и капачки от 0.1 ml, които могат да се използват за обеми от 20 μ l. Капачките имат безопасно и сигурно запечатване.



Rotor-Disc 72 ротор

Rotor-Disc 72 роторът е тъмносив на цвят. Rotor-Disc 72 роторът и Rotor-Disc 72 заключващият пръстен позволяват използването на Rotor-Disc 72. Rotor-Disc 72 е диск със 72 ямки за висока производителност. Rotor-Disc 72 се запечатва топлинно с филм от прозрачен полимер. Филмът се слага бързо и предотварява замърсяването като осигурява силно, трайно и надеждно запечатване. За допълнителна информация относно Rotor-Disc 72, вижте Раздел 5.3.



Rotor-Disc 100 ротоп

Rotor-Disc 100 роторът е златист на цвят. Rotor-Disc 100 роторът и Rotor-Disc 100 заключващият пръстен позволяват използването на Rotor-Disc 100. Rotor-Disc 100 е диск със 100 ямки за висока производителност. Той е роторният еквивалент на 96-ямковата плака, но с още 4 референтни ямки. Той позволява интегрирането на Rotor-Gene Q MDx с 96-ямковите лабораторни процедури. Допълнителните ямки могат да се използват за повече проби, допълнителни контроли или за ориентир, без да се заемат някои от стандартните 96 ямки. За пълна съвместимост с 96 ямковите процедури, 100-ямковият Rotor-Disc използва стандартните 96-ямкови означения, т.е. A1-A12 до H1-H12. Допълнителните 4 референтни ямки са означени R1–R4. За повече информация относно Rotor-Disc 100, вижте Раздел 5.3.



Спецификации на роторите

Вид ротор	Ямков капацитет	Бр. проби	Епруветки	Препоръчан реакционен обем
36-ямков ротор	200 µl	36	PCR Tubes, 0.2 ml	20–50 µl
72-ямков ротор	100 µl	72	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml	20–50 µl
Rotor-Disc 72 ротор	100 µl	72	Rotor-Disc 72	20–25 µl
Rotor-Disc 100 ротор	30 µl	100	Rotor-Disc 100	15–20 µl

Забележка: 36- и 72-ямковите ротори за Rotor-Gene Q MDx не трябва да се използват с Rotor-Gene 3000 заради оптичното разместване. Моля, продължете да използвате по-старите 36- и 72-позиционни ротори с Rotor-Gene 3000.

5.2 Подготовка на реакцията

ВАЖНО: За надеждни резултати при всеки опит трябва да се използват адекватни контроли.

Реакциите могат да се подготвят с помощта на Loading Block 96 x 0.2 ml (за PCR епруветки, 0.2 ml), Loading Block 72 x 0.1 ml (за стрипове епруветки и капачки, 0.1 ml, с едноканална пипета), Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel (за стрипове епруветки и капачки, 0.1 ml, с многоканална пипета), Rotor-Disc 72 Loading Block (за Rotor-Disc 72), или Rotor-Disc 100 Loading Block (за Rotor-Disc 100). Всички блокове са произведени от алуминий и могат да се охлаждат предварително.

Loading Block 72 x 0.1 ml (на снимката) помества 18 стрипа епруветки, както и до осем 0.5 ml епруветки, които могат да се използват за приготвяне на мастър микс и до шестнадесет 0.2 ml епруветки, които могат да се използват за стандартни криви. Долната процедура подготвя ротора на реакциите на 72-ямковия ротор. Същата процедура може да се използва и за 36-ямков ротор и съответните аксесоари.

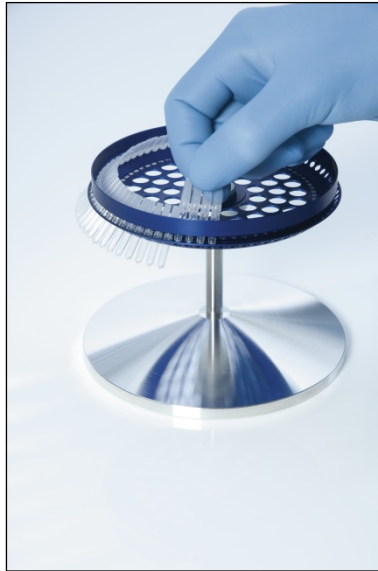
1. Поставете стрип епруветките в блока и отпипетирайте компонентите на реакцията.



2. Затворете стрип епруветките и прегледайте за плътно затваряне.

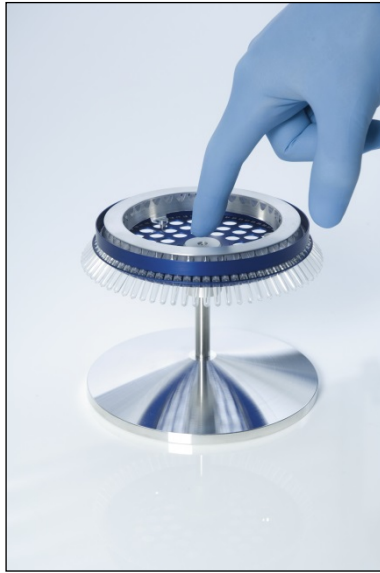


3. Поставете стрип епруветките в 72-ямковия ротор, като се уверите, че всяка от тях е на мястото си и е правилно ориентирана.
Пробите няма да са оптимално изравнени над системата за детекция, ако не са поставени правилно в ротора. Това може да намали флуоресцентния сигнал и чувствителността на детекция. Роторен държач, който улеснява зареждането, се доставя с инструмента.



ВАЖНО: За постигане на максимална температурна хомогенност, всяка позиция в ротора трябва да съдържа епруветка. Запълването на всички позиции в ротора осигурява равномерно движение на въздуха към епруветките. Поддържайте набор от празни епруветки с капачки, с които да запълвате всяка празна позиция.

4. Поставете 72-ямковия заключващ пръстен върху 72-ямковия ротор като натиснете 3-те локализиращи щифта през външните отвори на ротора.
Заклучващият пръстен гарантира, че капачките ще останат върху епруветките по време на опита.



5. Поставете установката на място в камерата на Rotor-Gene Q MDx като използвате локализиращия щифт на роторната главина. За да я освободите, просто натиснете роторната главина, и изтеглете.



6. Затворете капака и настройте реакционния профил, като използвате RotorGene Q софтуера.

5.3 Подготовка на роторния диск

Rotor-Disc 72 или Rotor-Disc 100 съдържат съответно по 72 или 100 ямки в диск за висока производителност. Rotor-Disc 72 и Rotor-Disc 100 не използват капачки. Вместо това, отгоре се прилага Rotor-Disc Heat Sealing Film, който се запечатва с Rotor-Disc Heat Sealer. Филмът предотвратява замърсяване като дава силно, трайно и надеждно запечатване. Топлинното запечатване на Rotor-Disc се извършва както е описано долу.

ВАЖНО: Моля, прочетете Продуктовия лист, който идва с Rotor-Disc Heat Sealer, преди да започнете тази процедура.

1. Включете Rotor-Disc Heat Sealer от превключвателя, разположен на задната лява част. Светва червен индикатор "Power". Rotor-Disc Heat Sealer достига работна температура за около 10 минути, след което светва зелен индикатор "Ready".
2. Изберете дали запечатването да бъде постоянно или временно.

Забележка: Когато Rotor-Disc Heat Sealer стане готов, може да го оставите да работи постоянно.

3. Поставете роторния диск в зареждащия блок, като използвате позицията едно на роторния диск и направляващи отвори върху Rotor-Disc зареждащия блок.
4. Подгответе реакциите в роторния диск чрез ръчно пипетиране или с автоматизирана система за работа с течности.



5. Отстранете централната част от един Rotor-Disc Heat Sealing Film като леко прегънете филма по средата, прищипете средното парче и внимателно го откъснете.
6. Поставете филма върху роторния диск в правилната посока, указана от надписа „SIDE UP“. Уверете се, че надписът “SIDE UP” е разположени в долната част на Rotor-Disc зареждащия блок. Централният отвор във филма трябва лесно да се нагласи върху цилиндъра на Rotor-Disc зареждащия блок и върху роторния диск.



7. Вкарайте установката в Rotor-Disc Heat Sealer по релсите от страни на Rotor-Disc зареждащия блок. Уверете се, че зареждащият блок е вкаран докрай.



8. За да активирате запечатващия механизъм, първо натиснете синьото лостче върху уреда, а след това избутайте назад черното езиче.



9. Когато запечатващият механизъм е снижен, светва оранжев индикатор “Sealing”. Ако Rotor-Disc зареждащият блок не е в правилната позиция, се чува предупредителен звук.
10. Когато запечатването свърши, се чува непрекъснат звук и оранжевият индикатор “Sealing” започва да премигва. Натиснете синието лостче, за да повдигнете и освободите запечатващия механизъм обратно в неговата изходна позиция.
ВАЖНО: Не запечатвайте по-дълго от времето, за което се чува звуковия сигнал или роторният диск може да се деформира.
Забележка: За да Ви предупреди в случай, че не освободите запечатващия механизъм, мигащата оранжева светлина “Sealing” свети постоянно, а непрекъснатият звуков сигнал се променя в прекъсващ.
11. Извадете Rotor-Disc зареждащия блок от уреда за запечатване. Оставете филма да се охлади за около 10 секунди. Отстранете излишния запечатващ филм, като го натискнете надолу, за да се откачи. Не дърпайте излишния филм нагоре.
12. Отстранете роторния диск от Rotor-Disc зареждащия блок.
13. Заредете роторния диск в ротора, като използвате позиция едно за правилна ориентация.

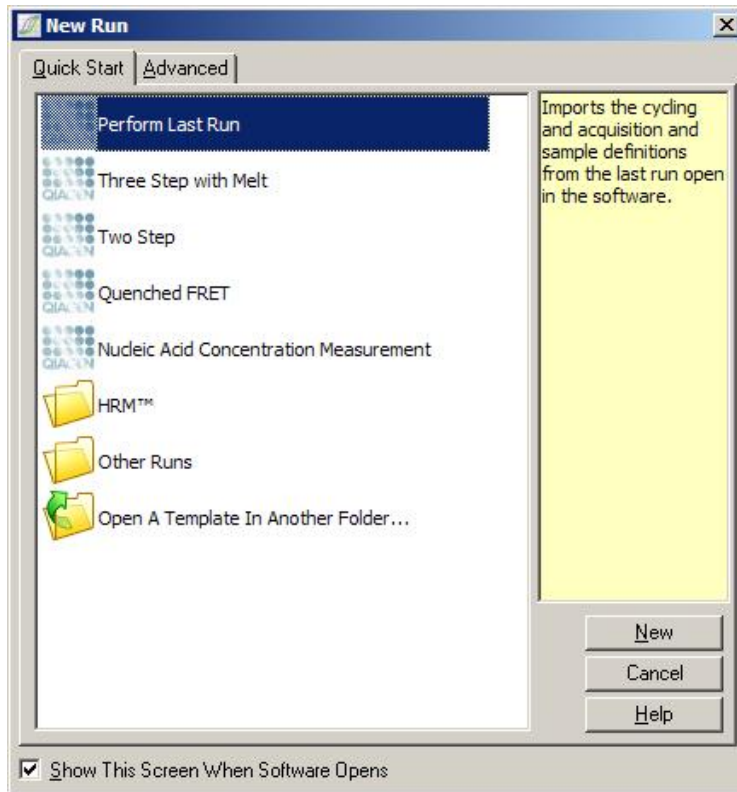
6 Оперативни процедури - софтуер

Новите опити могат се настройват от Quick Start интерфейса или Advanced интерфейса, които се появяват при стартиране на софтуера. Quick Start интерфейсът е създаден, за да може да се стартира опита максимално бързо. Advanced интерфейсът дава повече възможности, като настройване на оптимизацията на увеличението и обемите. За удобство, интерфейсите имат шаблони, с условия на циклите и канали за прихващане по подразбиране. За да промените интерфейса, изберете съответния раздел в горната част на прозореца "New Run".

6.1 Quick Start интерфейс

Quick Start интерфейсът позволява на потребителя да стартира опита възможно най-бързо. Потребителят може да избира от набор от често използвани шаблони и да въведе минимума параметри за стартиране. Quick Start интерфейсът допуска, че реакционният обем е 25 μ l. За други реакционни обеми използвайте Advanced интерфейса (виж Раздел 6.2).

Като първа стъпка, изберете желаните шаблон за опита като кликнете два пъти върху шаблона от списъка в прозореца "New Run".



- Perform Last Run:** “Perform Last Run” използва циклите, прихващането и дефинициите от последния отворен в софтуера опит.
- Three Step with Melt:** Това е тристъпков профил и крива на топене с отчитане на данни на зеления канал.
- Two Step:** Това е двустъпков профил с данни, отчетени от зеления, жълтия, орнажевия и червения канали.
- Quenched FRET:** Това е тристъпков профил и крива на топене. За разлика от Three Step with Melt, отчитането е в края на стъпката на сдвояване.

Nucleic Acid Concentration Measurement:	Това е шаблон за измерване на концентрацията на нуклеинови киселини чрез интеркалиращи бои.
HRM:	Тази папка съдържа профили за HRM.
Other Runs:	Тази папка съдържа допълнителни профили.

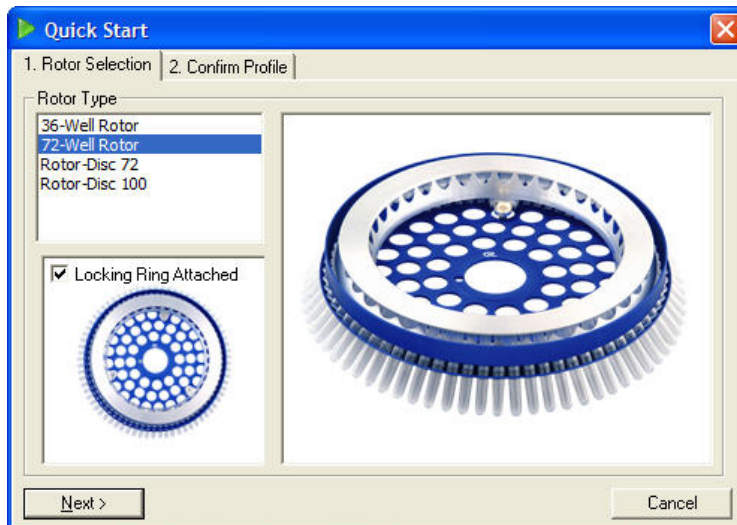
Профилите на циклите и отчитането за всички шаблони могат да се променят от интерфейса.

Забележка: Към списъка в Quick Start интерфейса могат да се добавят нови шаблони, чрез копиране или съхранение на *.ret файловете в **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates**. Ако там бъде копиран файл, шаблонът ще се появи като икона в списъка. Ако искате собствени икони за шаблоните си, създайте *.ico файл с името на файла на шаблона.

Могат да се създават подпапки за групиране на шаблони. Това позволява тяхното организиране по удобен начин ако, например, няколко потребителя използват един уред.

6.1.1 Избор на ротора

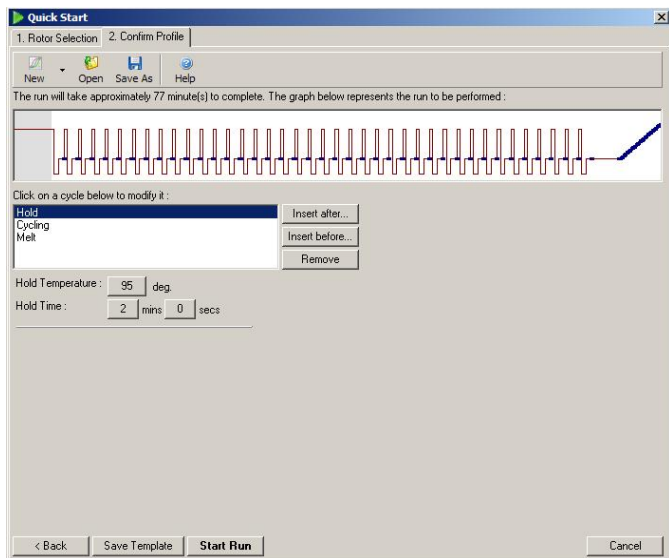
В следващия прозорец, изберете вида ротор от списъка. Маркирайте кутийката “Locking Ring Attached” и натиснете “Next”.



6.1.2 Потвърждаване на профила

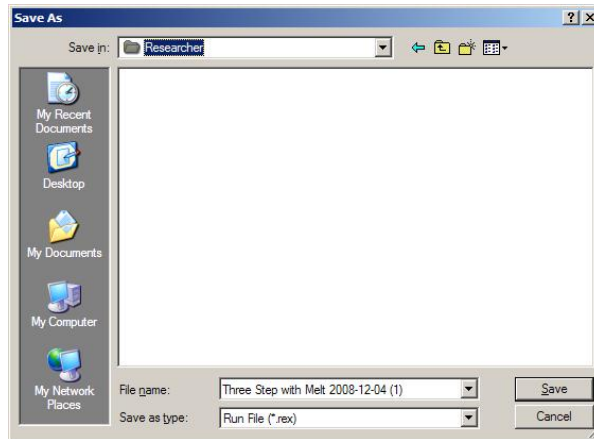
Внасят се условията на циклите и каналите на отчитане от избрания шаблон. Те могат да се променят от прозореца “Edit Profile” (Раздел 6.2.4).

За да стартирате опит, натиснете “Start Run”. Възможно е и да запазите шаблона преди началото на опита като се натисне “Save Template”.



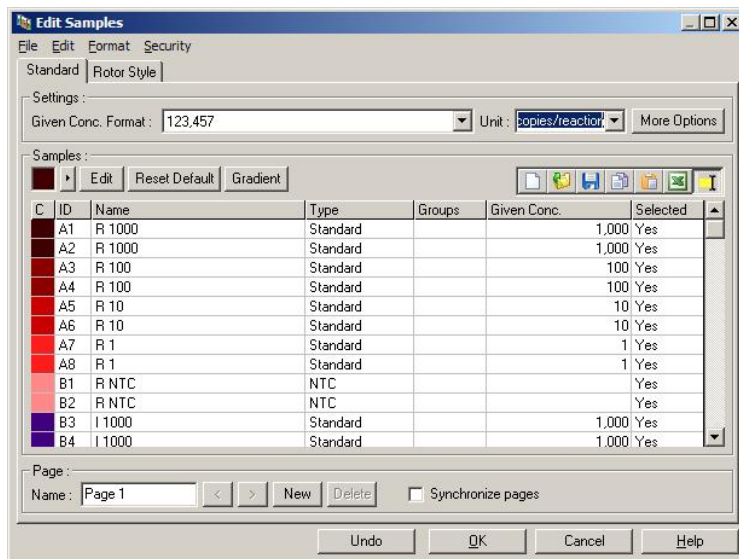
6.1.3 Съхраняване на експеримента

След натискане на бутона “Start Run”, се появява прозорецът “Save As”. Опитът може да се запази в желаното от потребителя място. На цикъла се дава име, състоящо се от шаблона и датата на опита. Пореден номер (1, 2, и т.н.) също се добавя, с цел автоматичното именуване на множество цикли, използващи същия шаблон в един ден.



6.1.4 Подготовка на пробите

След стартирането на опита, прозорецът “Edit Samples” позволява пробите да се дефинират и опишат.

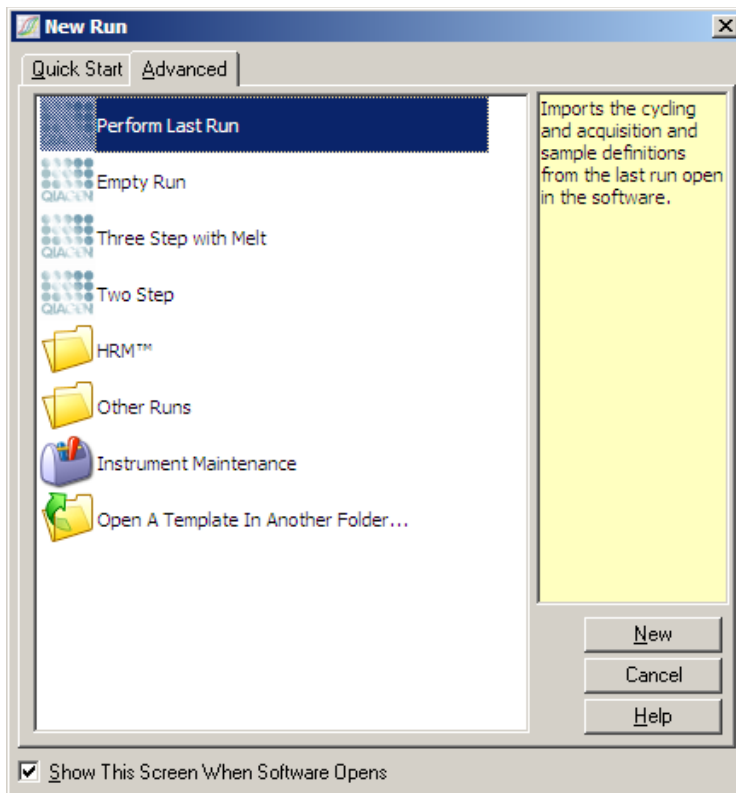


Прозорецът “Edit Samples” се появява след началото на опита и това време може да се използва за въвеждане имената на пробите. Ако имената на пробите са въведени много бързо по време на процеса (напр. с баркод-скенер) това може да доведе до разместени букви в имената на пробите. По тази причина се препоръчва да се избягва използването на баркод-скенер и ако е възможно имената на пробите да се въвеждат след края на процеса. За информация относно настройки на дефинирането на пробите, вижте Раздел 7.8.4.

6.2 Advanced интерфейс

Advanced интерфейсът дава възможности, които не са налични в Quick Start интерфейса, като конфигуриране на оптимизацията на увеличението.

За да използвате Advanced интерфейса, изберете шаблон чрез двойно кликане върху името му в списъка, който се появява под раздела “Advanced” в прозореца “New Run”.



Опциите на шаблоните в този прозорец са подобни на тези при използване на Quick Start интерфейса (Раздел 6.1).

- | | |
|-------------------|---|
| Perform Last Run: | “Perform Last Run” използва циклите, прихващането и дефинициите от последния отворен в софтуера опит. |
| Empty Run: | Това е празен опит, който позволява дефинирането на всички параметри на профила. |

Three Step with Melt:	Това е тристъпков профил и крива на топене с отчитане на данни на зеления канал.
Two Step:	Това е двустъпков профил с отчитане само от зеления канал, за да се ускори опитът.
HRM:	Тази папка съдържа 2 HRM профила.
Other Runs:	Тази папка съдържа допълнителни профили.
Instrument Maintenance:	Съдържа шаблона, който се използва при Оптичната температурна верификация (OTV). За повече информация, вижте Раздел 10. Този шаблон е заключен, за да се гарантира, че профилът винаги ще работи правилно.

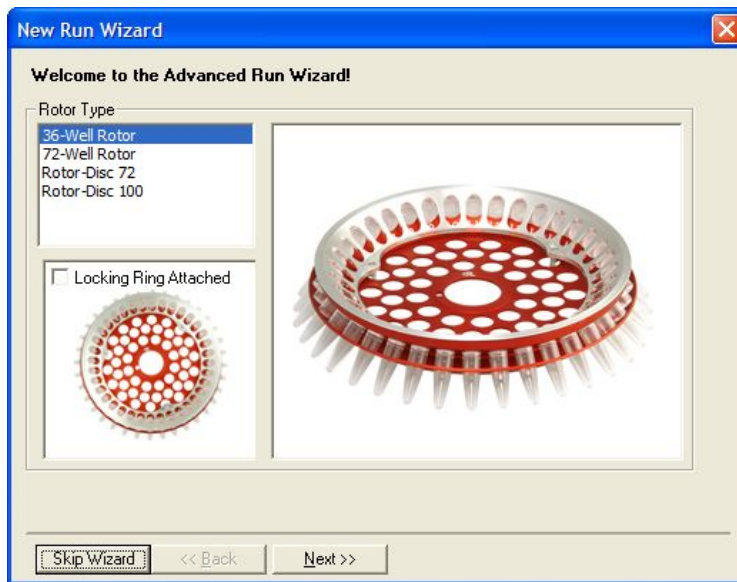
Забележка: Към списъка с шаблони могат да се добавят нови шаблони, чрез копиране или съхранение на *.ret файловете в **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates**. Ако там бъде копиран файл, шаблонът ще се появи като икона в списъка.

6.2.1

New Run Wizard прозорец 1

В следващия прозорец изберете вида ротор от списъка.

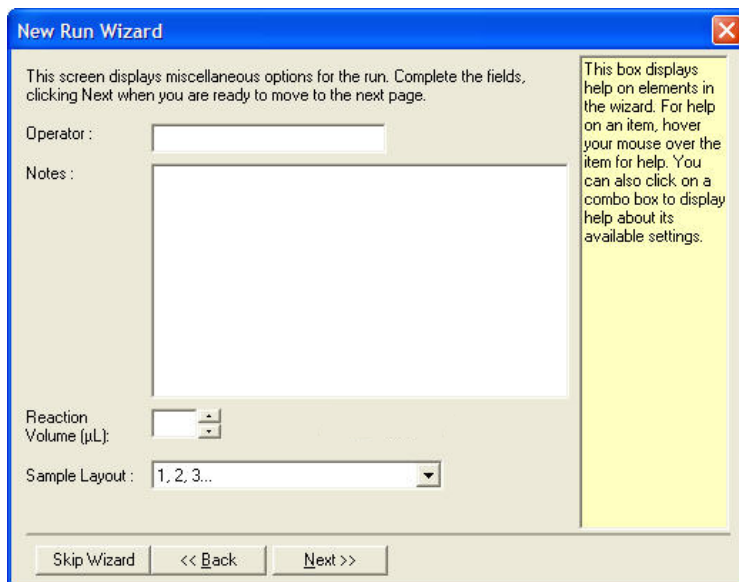
Маркирайте кутийката “Locking Ring Attached” и кликнете “Next”, за да продължите.



6.2.2 New Run Wizard прозорец 2

В следващия прозорец могат да бъдат въведени името на потребителя и бележки за опита. Обемът на реакцията също трябва да бъде въведен.

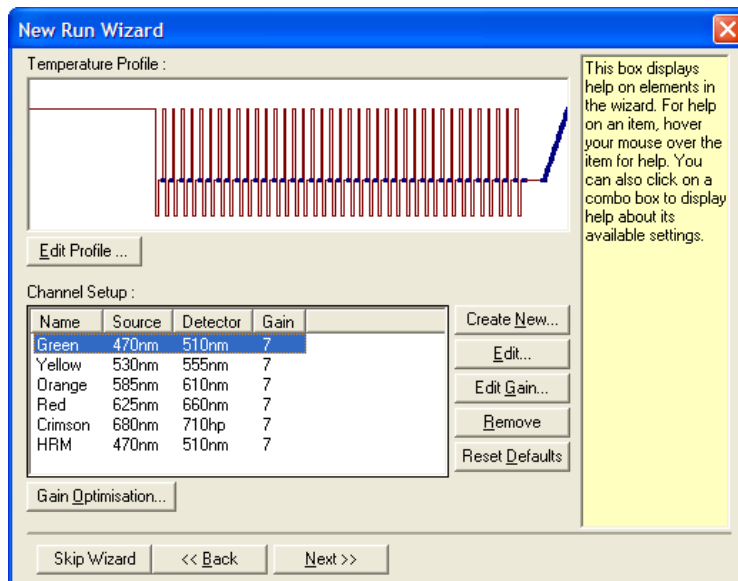
Ако 72-ямковият ротор е избран в прозорец 1, три "Sample Layout" опции са налични в падащото меню. "1, 2, 3..." е по подразбиране. Повечето потребители избират тази опция. "1A, 1B, 1C..." трябва да се избере, когато образците са заредени в съседни 0.1 ml стрип епруветки с 8-канална пипета. "A1, A2, A3..." вариант може да бъде избран, ако е удачно.



6.2.3 New Run Wizard прозорец 3

В този прозорец, могат да се модифицират “Temperature Profile” and “Channel Setup”. Ако се натисне бутон “Edit Profile...”, се появява прозореца “Edit Profile”, позволяващ промяна на условията на циклите и избор на канали на отчитане (Раздел 6.2.4).

След настройване на профила, натиснете бутон “Gain Optimisation...”, за да се появи прозореца “Gain Optimisation” (виж стр. 6-24).



6.2.4 Редактиране на профила

Прозорецът “Edit Profile” позволява задаване на условията на циклите и отчитащите канали. Показаният профил се базира на избрания шаблон при настройването на опита (виж стр. 6-1). Профилът е представен графично. Списъкът от сегменти на профила се появява под графиката. Този списък може да включва Задържане (стр. 6-13), Цикли (стр. 6-14), Топене (стр. 6-17), или HRM, ако уредът има HRM канал (стр. 6-18).

Всеки етап от профила може да се редактира чрез кликане върху съответната част от графиката или името от списъка и промяна на параметрите, които се появяват.

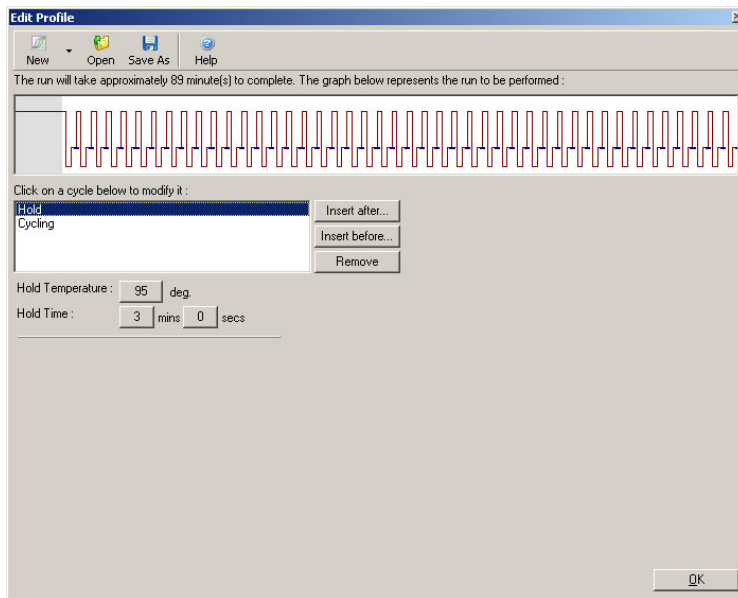
Insert after...: Позволява добавянето на нов цикъл след избрания цикъл.

Insert before...: Позволява добавянето на нов цикъл преди избрания цикъл.

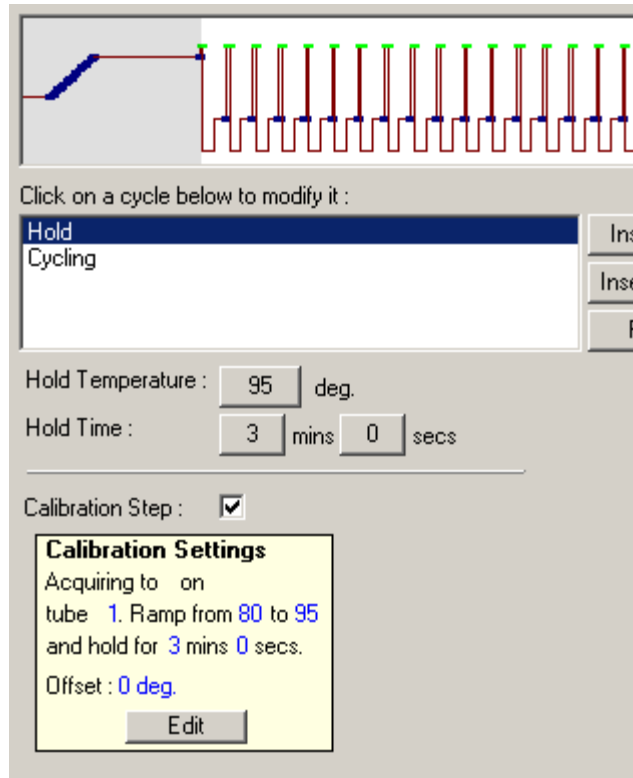
Remove: Премахва избрания цикъл от профила.

Hold

Задържането (Hold) инструктира Rotor-Gene Q MDx да поддържа дадена температура за определено време. За промяна на температурата, кликнете върху бутона “Hold Temperature” и наберете или използвайте скалата, за да изберете желаната температура. За да промените времето на задържане, кликнете върху нутоните “Hold Time”, “mins”, и “secs”.



При провеждане на Оптичен денатуриращ цикъл, задържането може да се използва като калибриране. В този случай, се изпълнява калибриращо топене преди задържането. По подразбиране, това се конфигурира за първото задържането в цикъла, но може да се промени при нужда.



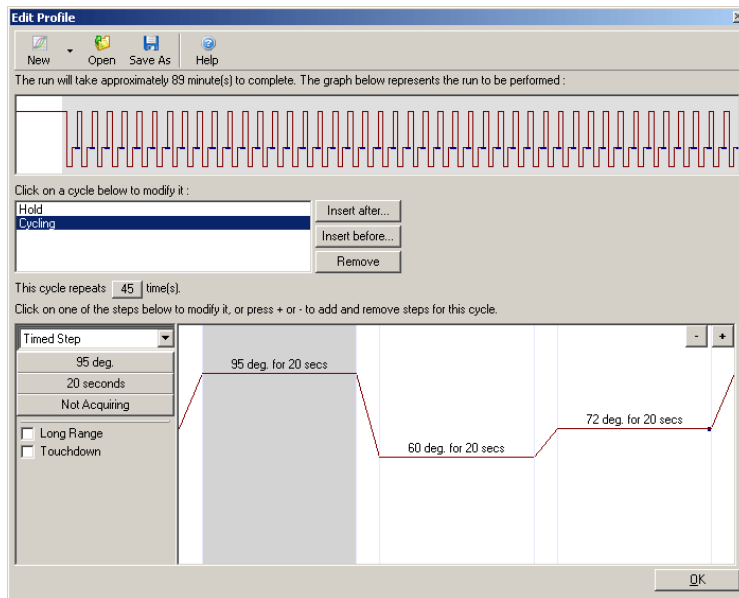
За повече информация относно Оптичен денатуриращ цикъл, виж стр. 6-18.

Cycling

Цикълът (Cycling) повтаря температурните и времевите стъпки определен брой пъти. Броят повторения се задава от бутона “This cycle repeats X time(s).”

Единичен цикъл се показва графично (както се вижда от изображението долу). Всяка стъпка от цикъла може да се променя. Температурата може да се промени чрез изтегляне температураната линия в графиката нагоре или надолу. Продължителността може да се промени чрез изтегляне на температурната граница наляво или надясно. Другият начин е чрез кликване върху стъпката и използване на бутоните за температура и време от ляво на графиката.

Стъпки могат да се прибавят или премахнат от цикъла с бутоните “-“ и “+” в горната дясна част на графиката.

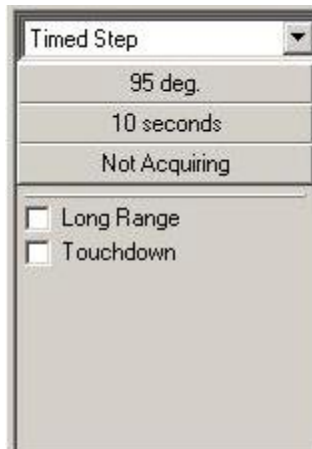


Long Range: Маркирането на тази кутийка увеличава задържането за стъпката с една секунда с всеки нов цикъл.

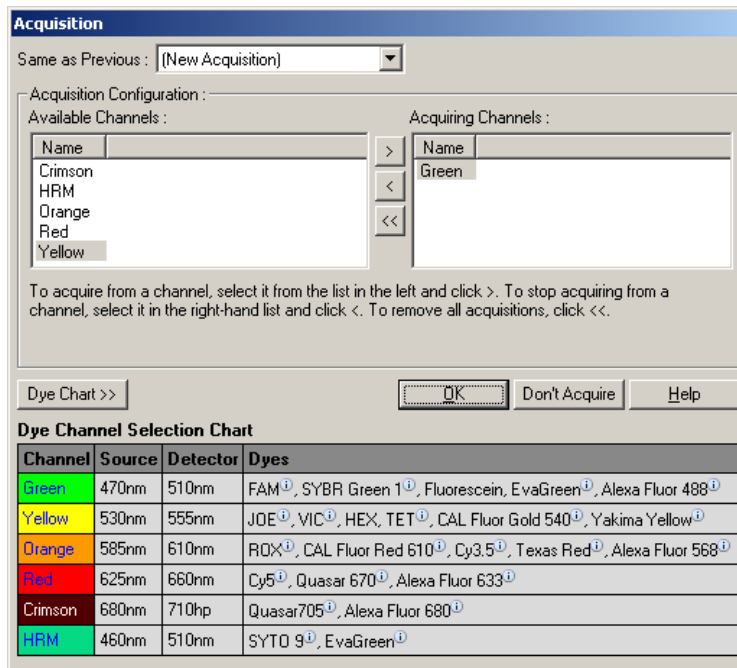
Touchdown: Маркирането на тази кутийка намалява температурата с определен брой градуси за даден брой първоначални цикли. Това се показва на дисплея.

Отчитане



Данни могат да се отчитат от всеки канал при всяка стъпка. За да настроите канал за отчитане, натиснете бутона “Not Acquiring” (ако каналът вече е бил настроен за отчитане при тази стъпка, отчитащите канали са изброени тук).



След натискане на бутона “Not Acquiring” се появява прозорецът “Acquisition”.



За да настроите канал за отчитане, го изберете и го преместете от списъка “Available Channels” в списъка “Acquiring Channels” чрез бутона **>**. да премахнете

избран канал от списъка “Acquiring Channels”, използвайте бутона . Бутонът  премахва всички канали от списъка “Acquiring Channels”. Натискането на бутона “Don't Acquire” също премахва всички отчитания от стъпката.

Ако в профила е включена повече от една поредица от цикли, отчетените данни могат да бъдат прикачени към данните, отчетени в предишни цикли. Използвайте падащото меню “Same as Previous”, за да изберете стъпката от цикъла, към която данните да се прикачат.

Графиката Dye Channel Selection Chart помага на потребителя да реши кой канал е подходящ за използваното багрило. Показаните в таблицата багрила са най-често използваните, но не индикират ограниченията на уреда.

Опциите за отчитане, описани по-горе, се отнасят също и до “Melt” анализа, освен, че е невъзможно да се прикачат натрупани данни чрез менюто “Same as Previous”.

Топене и хибридизация

Топенето е скок между две температури, от по-ниска към по-висока. Разрешеният температурен диапазон е 35–99°C.

За да настроите топене (Melt), посочете началната температура, крайната температура, интервалите на нарастване, времето за задържане на първата температура на отчитане преди да се инициира скока, времето за което да се задържа всяка от температурите, и отчитащите канали.

Скокът се генерира между две температури. Ако стартовта температура е по-висока от крайната температура, наименованото на тази стъпка ще се промени на “Hybridisation”. Опцията “Acquiring To”, настроена за топенето (Melt A) в екрана долу, може да бъде променена чрез натискане на бутона. Появява се прозорецът “Acquisition” и каналите могат да се избират.

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		

При стандартно топене, температурата се повишава с 1°C, изчаквайки 5 секунди преди всеко отчитане. Rotor-Gene Q MDx може да се настрои за топене през интервали от 0.02°C. Минималното време на задържане между температурните стъпки варира в зависимост от градусите между стъпките.

Топене с висока резолюция

Топенето с висока резолюция (HRM) характеризира проби двойно-верижна ДНК на базата на тяхната дисоциация (топене). Доближава се до класическия анализ на кривите на топене, но дава много повече информация с много повече приложения. Пробите се разграничават по секвенция, дължина, GC съдържание или комплементарност на веригата, до единични промени в двойките бази.

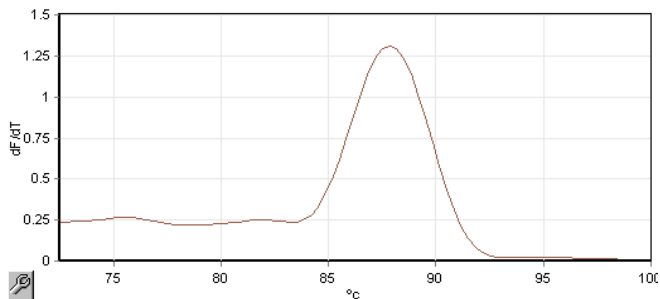
HRM анализът може да се изпълни само ако уредът има инсталиран HRM хардуер и софтуер. Данните се отчитат от специализирани HRM източници и детектори. HRM анализът включва и възможността за Gain Optimisation, точно преди старта на топенето. След извършването на HRM, данните се анализират с HRM софтуер (Раздел 11).

Оптичен денатуриращ цикъл

Оптичният денатуриращ цикъл е вълнуваща техника, налична при Rotor-Gene Q MDx, която изпълнява топене в реално време, за да определи пика на топене на референтна проба. Това показва денатурацията на PCR продукта по-прецизно от задаването на определена денатурираща температура за задържане. За да се използва тази техника, просто поставете референтен

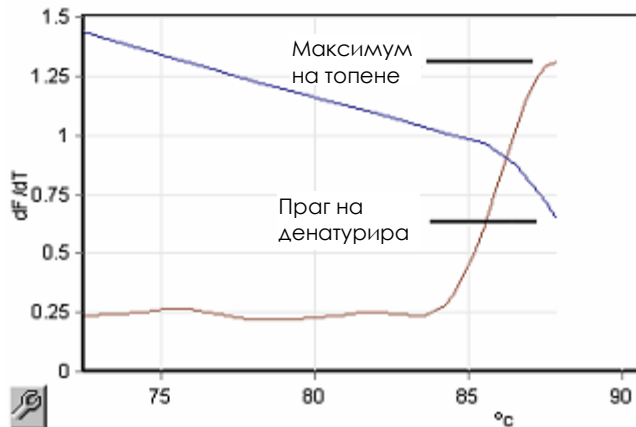
PCR продукт в позиция 1 на ротора. Референтната епруветка трябва да съдържа реагенти, позволяващи детекцията на дисоциация.

При първия денатуриращ цикъл, се отчита топене в зеления канал от 80°C до 95°C по подразбиране. Параметрите на това начално топене могат да се променят от потребителя. От тези данни се генерира крива на топене, която се анализира автоматично.



Пикът на топене се отнася към грубите данни, за да се определи праг на денатурация. След това, при всеки етап на Оптичен денатуриращ цикъл, уредът се нагрява възможно най-бързо и данните се отчитат постоянно. Когато референтната епруветка достигне денатуриращото ниво на флуоресценция, уредът се охлажда и се пристъпва към следващата стъпка от цикъла. По време на циклите не се изчисляват пикове. Вместо това, флуоресценцията се отнася към пика на топене и това определя прага на денатурация.

На следващата графика са наложени грубата флуоресценция и първата производна. Това показва връзката между прага на денатурация и пика на топене, получени по време на калибрирането.



За Оптичен денатуриращ цикъл е нужно:

- Предварително намножен PCR продукт в позиция 1 на ротора. Тази проба трябва да съдържа същия PCR продукт като изследваните проби и реагенти за детекция на дисоциация.
- Оптичен денатуриращ профил. Може да се създаде нов профил или да се редактира съществуващ такъв (виж детайлите долу).

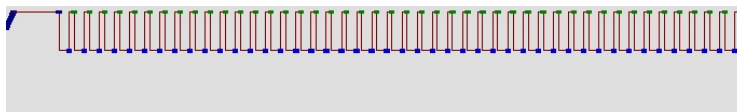
Оптичният денатуриращ цикъл изглежда почти идентичен с другите цикли. Разликите са стъпката за топене в началото на профила и ясният профил на денатуриращата стъпка по време на цикъла. Оптичният денатуриращ цикъл не изисква определени времена на задържане, тъй като дисоциацията на продукта се наблюдава по време на всеки цикъл.

За да се проведе тази техника, е нужна следната информация за опита:


- Първоначалната денатурираща температура. Тя е същата като при денатурацията в стандартния профил.
- Позицията на PCR пробата, за която ще се построи крива на топене от зеления канал.
- Дефиниран профил на Оптичен денатуриращ цикъл.

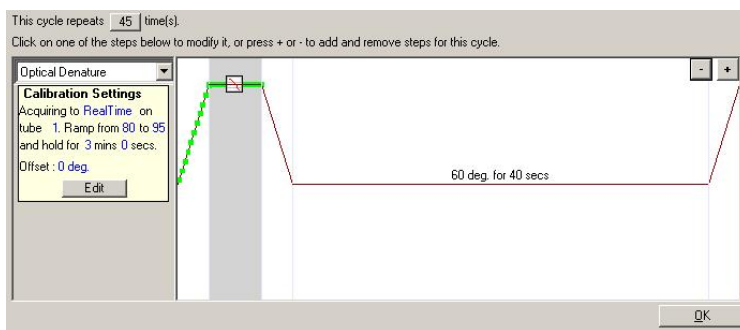
Създаване на нов Оптичен денатуриращ цикъл.

1. Отворете прозореца “Edit Profile”. Кликнете върху “New”. В прозореца, който се появява, кликнете върху бутона “Insert after” и изберете “New Cycling” от менюто. Изберете една от температурните стъпки, като кликнете върху графиката. В падащото меню, променете от “Timed Step” на “Optical Denature”. Появява нормален профил, съдържащ денатурираща стъпка и стъпка на Оптичен денатуриращ цикъл.

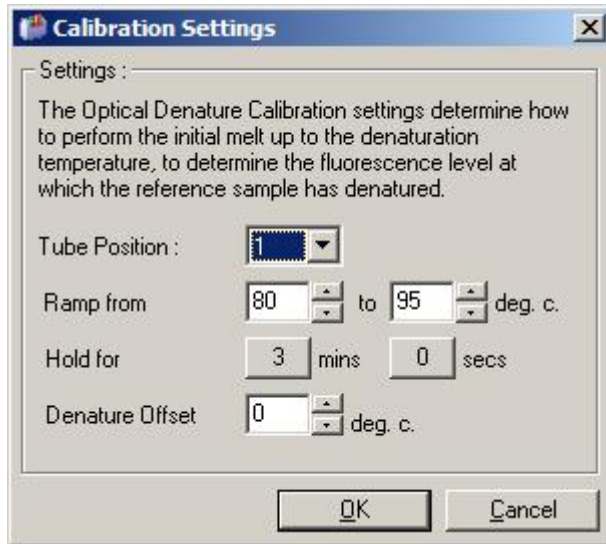


Наклоненият участък в началото на опита представлява процеса на калибриране. Зелените точки са отчитанията по време на всяко нагряване. Сините точки са отчитанията в края на удвояването при 60°C. Докато профилът показва всяка стъпка при еднаква денатурираща температура, случаят може да е друг. Ако пробата изисква малко повече време, за да се разтопи към края на опита, оптичният денатуриращ процес изчаква разтапянето според флуоресценцията, а не времето. Поради тази причина, температурната следа може да е различна за всеки цикъл.

2. Кликнете върху първата половина от графиката със символа за Оптична денатурация . Информацията за “Calibration Settings” се появява от ляво на екрана.

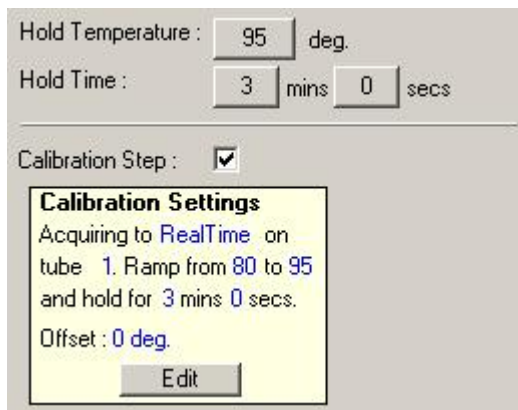


- Информацията за “Calibration Settings” обикновено е вярна. За да я промените при нужда, кликнете върху “Edit”. Появява се прозорецът “Calibration Settings”.



- Уверете се, че:
 - Епруветката посочена в “Tube Position” съдържа PCR продукт, който ще покаже пик на топене в зеления канал.
 - Крайната температура няма да изгори пробата, но ще бъде достатъчно висока за стапянето ѝ.
 - Времето за задържане е достатъчно за денатурация на пробата.
 - Денатуриращото отместване е зададено уместно. Стойността от 0°C обикновено е подходяща. Стапяния с много резки преходи може да изискват отместване от –0.5°C до –2°C, зададено от потребителя, за детекцията на прехода на стапяне.

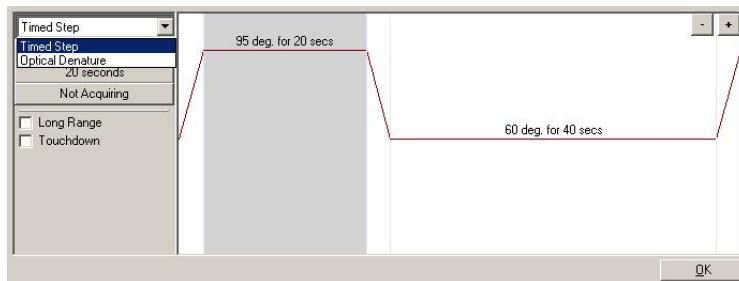
Можете да дефинирате денатуриращата стъпка като въведете нова стъпка на задържане. Кликнете върху “Insert before” и изберете “New Hold at Temperature”. Ще се появят калибрационните параметри.




Параметрите на калибриране се синхронизират с тези на денатурацията така, че промяна във времето за задържане при денатурацията автоматично се пренася при калибрирането. Това се получава, защото калибрирането и денатурацията са еквивалентни при Оптичния денатуриращ цикъл.

Промяна на съществуваща стъпка за използване на Оптичен денатуриращ цикъл

За промените съществуващ а денатурираща стъпка, изберете цикъла в прозореца "Edit Profile". След това изберете денатурираща стъпка чрез натискане върху нея на дисплея.



Натиснете падащото меню и изберете "Optical Denature". Температурата и задържането се премахват и се показва иконата "Optical Denature" .

Оптимизация на увеличението

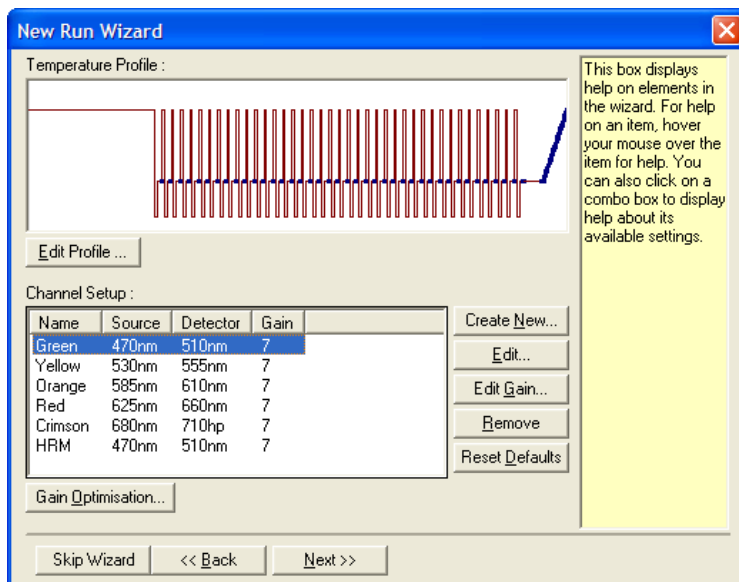
Когато настройвате нов опит, е полезно да използвате функцията “Gain Optimisation”. Тя позволява оптимизирането на увеличението до стойност, която ще осигури желан обхват от начална флуоресценция при дадена температура (обикновено температурата на отчитане на данните) във всеки отчитащ канал.

Оптимизирането на увеличението осигурява отчитането на всички данни в динамичния обхват на детектора. Ако увеличението е твърде ниско, сигналът ще се загуби във фоновия шум. Ако е твърде високо, всички сигнали ще излязат от скалата (насищане).

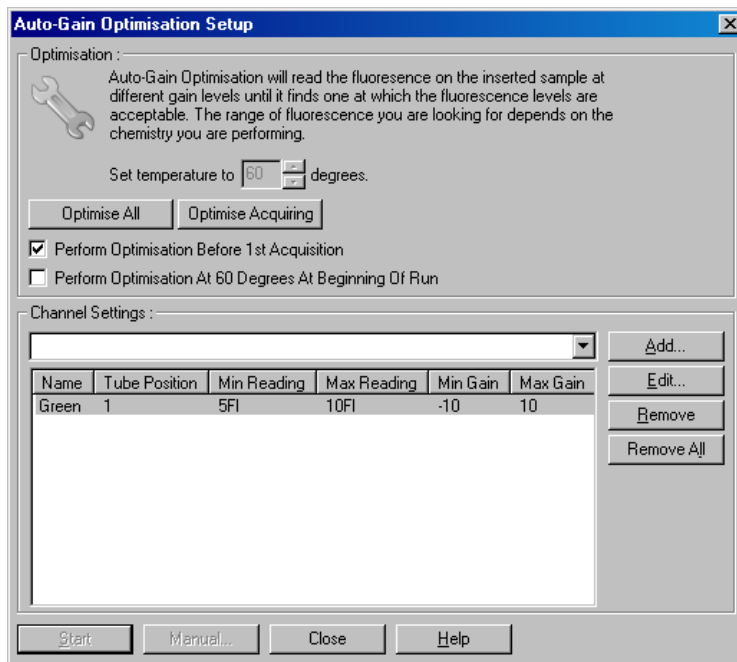
Обхватът на увеличението за всеки канал е от –10 до 10, съответстващи на най-ниска и най-висока чувствителност.

Когато пускате реакции за първи път, препоръчваме подготовка на тест проба с всички компоненти на реакцията. Поставете я в Rotor-Gene Q MDx и използвайте оптимизация на увеличението за определяне на най-доброто увеличение. Ако то доведе до слаб сигнал, трябва да се увеличи “Target Sample Range”. Ако сигналът е наситен, “Target Sample Range” трябва да се намали.

За да оптимизирате увеличението, натиснете бутона “Gain Optimisation...” в New Run Wizard прозорец 3 (виж Раздел 6.2.3).



Появява се прозорецът “Auto-Gain Optimisation Setup”. Той позволява оптимизацията чрез автоматичното регулиране на стойността на увеличението, докато отчетените данни от всички избрани канали пропаднат в рамките на или под определен праг.

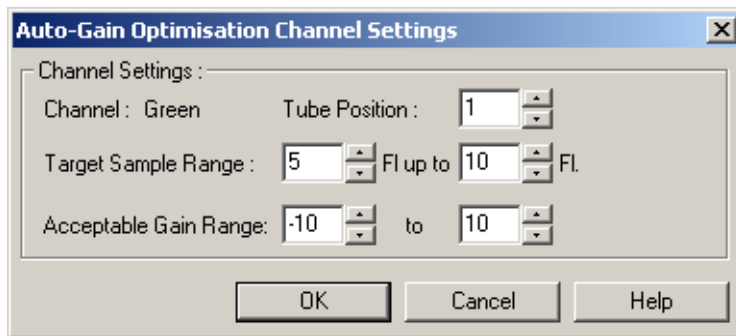


Set temperature to: Преди отчитане, Rotor-Gene Q MDx се нагрява/охлажда до зададената температура (по подразбиране, температурата на отчитане).

Optimise All/Optimise Acquiring: “Optimise All” оптимизира всички канали, разпознати от софтуера. “Optimise Acquiring” оптимизира само каналите в термалния профил на опита (цикли и топене).

Perform Optimisation Before 1st Acquisition: Маркирайте тази кутийка за оптимизиране на увеличението в първия цикъл, в който се отчитат данни. Това се препоръчва за Auto-Gain Optimisation.

Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run:	Маркирайте тази кутийка за Gain Optimisation точно преди старта на опита. Rotor-Gene Q MDx се загрива до зададената температура, оптимизира се увеличението и след това започват циклите с първата стъпка (обикновено денатурация). Тази опция е уместна, ако Gain Optimisation по време на опита доведе до прекалено дълго време на първата стъпка. Обикновено "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" се предпочита, защото Gain Optimisation се изпълнява при възможно най-близки до опита условия.
Channel Settings:	Това падащо меню позволява добавянето на канали. Изберете желанния канал и натиснете "Add".
Edit...:	Отваря прозорец, в който може да се настрои "Target Sample Range". Това е обхватът на първоначалната флуоресценция, която трябва да се настрои за пробата в дадена епруветка. Auto-Gain Optimisation чете всеки канал, използвайки стойностите, посочени в "Acceptable Gain Range". Избира първото увеличение, което доведе до флуоресценция в "Target Sample Range". В показания пример Auto-Gain Optimisation търси стойности между -10 и 10, което дава отчитане между 5 и 10 FI в епруветка 1. По принцип, при интеркалиращи бои е подходящ "Target Sample Range" от 1-3 FI, докато обхват от 5-10 FI е подходящ за сонди.



Remove/ Remove All: “Remove” премахва маркирания канал.
“Remove All” премахва всички канали.

Start: “Start” стартира Gain Optimisation.
Избира се увеличение, водещо до флуоресценция в зададения обхват. Ако флуоресценцията попадне извън този обхват, увеличението се променя до най-близкото съвпадение.

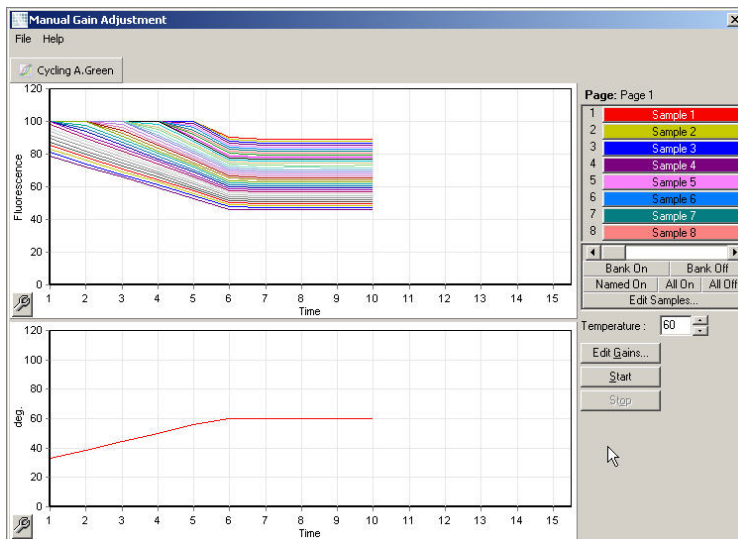
Manual: Отваря прозореца “Manual Gain Adjustment” (виж стр. 6-29).

Changing Gain During a Run: Ако увеличението в началото на опита е твърде ниско или високо, то може да се промени през първите 10 цикъла. Ако това стане, се появява вертикална линия. Циклите преди промяната се изключват от анализа.

Забележка: Gain Optimisation може да избере стойност, която не попада в зададения обхват. Това може да се дължи на промени във флуоресценцията след първото задържане. Резултатът от Gain Optimisation, обаче, е добра индикация за нивото на флуоресценцията, при която ще стартира опитът.

Ръчно настройване на увеличението

За да извършите “Manual Gain Adjustment”, натиснете “Manual...” в прозореца “Auto-Gain Optimisation Setup”. Появява се прозорец “Manual Gain Adjustment”. Той показва флуоресценцията при всяка една температура в реално време. Използва се когато фонът на пробите е непознат и затова увеличението трябва да се определи, за да е налице достатъчен за детекция сигнал.



По презумпция, всички проби са показани на дисплея. Пробите могат да се премахват или добавят към него. Това става чрез оцветени клетки (от дясно), всяка от които съответства на проба от дисплея. Пробите с ярко оцветени клетки се показват, докато тези с бледи клетки са скрити. Пробите могат да се включват или изключват чрез натискане на клетката или чрез изтегляне с мишката през няколко клетки наведнъж.

Препоръчваме да изпълнявате ръчното настройване на увеличението както е указано.

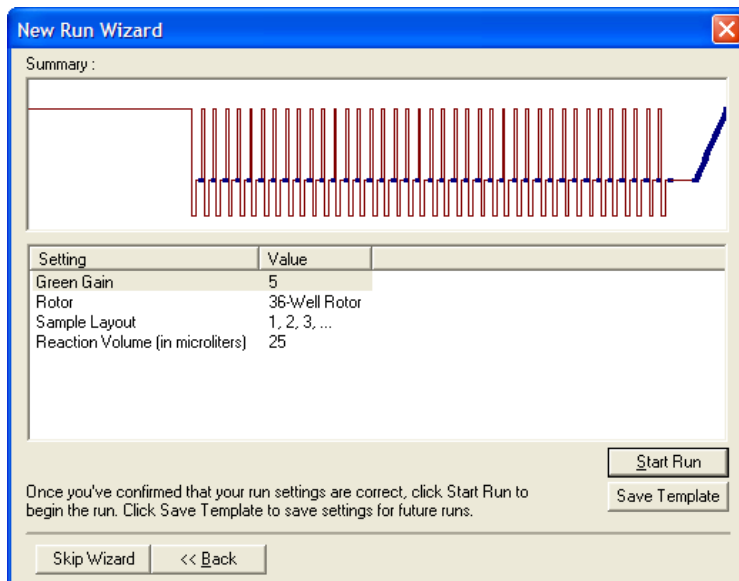
1. Настройте температурата в прозореца “Manual Gain Adjustment” до температурата на отчитане за опита.

Забележка: Температурата не може да се променя, докато Rotor-Gene Q MDx работи. Рестартирайте Rotor-Gene Q MDx, за да приложите промените на температурата.

2. Натиснете “Start”. Опитът започва. Rotor-Gene Q MDx достига температурата, указана в прозореца. Графиките в прозореца започват да показват данни.
3. Изчакайте температурата да се стабилизира.
4. Отбележете крайната флуоресценция (FI).
5. Ако FI не отговаря на очакванията, натиснете “Edit Gains...” и променете. Този процес не е незабавен, защото Rotor-Gene Q MDx изисква ~4 секунди за отчитане всяка стойност във всеки канал и през това време потребителският интерфейс е неактивен.
6. Повторете процеса до достигане на желаните нива на FI.
7. Натиснете “Stop”. Ако все още се отчитат данни след натискането на бутона “Stop”, Rotor-Gene Q MDx първо завършва отчитането, а след това спира. Този процес може да отнеме до 5 секунди за всеки от каналите.

6.2.5 New Run Wizard прозорец 4

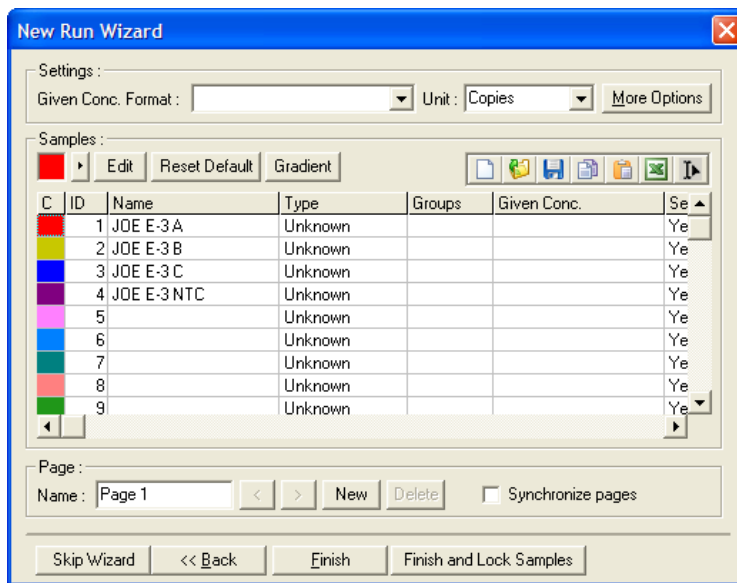
Този прозорец обобщава опита. Проверете параметрите и ако са верни, натиснете “Start Run”. Трябва да въведете име на файла. Може да запазите настройките като шаблон за бъдещи опити чрез бутона “Save Template”.



6.2.6 New Run Wizard прозорец 5

В този прозорец въведете вида и описанията на пробите, докато тече опитът. Функциите на този прозорец са еднакви с тези на прозореца “Edit Samples” (стр. 7-76). Информацията за пробите може да се нанесе и след приключване на опита.

Бутонът „Finish and Lock Samples“ (Завършване и заключване на пробите) затваря екрана и предотвратява редактиране на имената на пробите. За повече информация относно тази и други функции за безопасност вижте „Защита на достъпа за софтуера Rotor-Gene Q“ (страница 7-87).

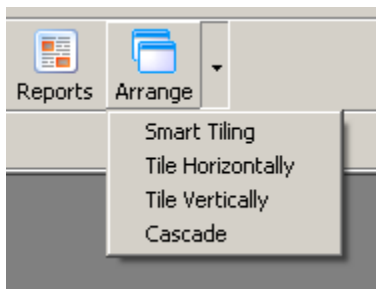


7 Анализен интерфейс

Този раздел описва потребителския интерфейс на Rotor-Gene Q софтуера.

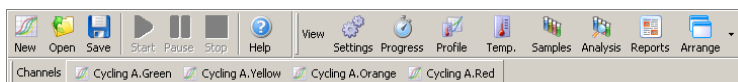
7.1 Работна площ

Работната площ е фонът на главния прозорец. В нея могат да се отворят грубите данни и резултатите от анализа. Ако едновременно са отворени няколко прозореца, те могат да се подредят чрез натискане на бутона „Arrange” в лентата. Има няколко възможности за подредба на прозорците, които могат да бъдат избрани след натискане на долната стрелка до бутона „Arrange”.



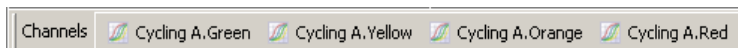
7.2 Лента с инструменти

Тези бутони са препратки към често използвани операции. Тези операции могат да бъдат достигнати и през падащите менюта.



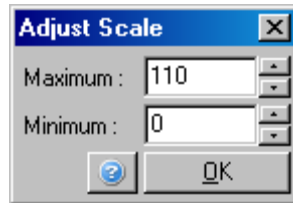
7.3 Преглед на грубите данни от каналите

Кликнете върху тези бутони, за преглед на грубите (неанализирани) данни от каналите на детекция.



При прегледа на тези данни има различни възможности за промяна на техния изглед. Грубите данни също така могат да бъдат трансформирани по начин, способстващ различни типове анализи.

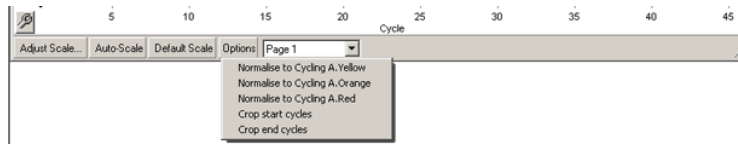
Adjust Scale: За да промените обхвата, кликнете с десния бутон върху съответния прозорец. „Adjust Scale” изкарва прозорец за промяна на обхвата.



Autoscale: „Autoscale” наглася обхвата така, че да включва максималните и минималните отчетени стойности.

Default Scale: „Default Scale” наглася обхвата между 0 и 100 флуоресцентни единици.

Spanner/wrench icon: Вижте Раздел 8.5 за повече информация.



Options: Отваря падащото меню, показано горе, което изброява опциите за трансформиране на грубите данни.

Normalise to ...: Позволява нормализацията на данните спрямо тези от пасивна референтна боя, напр. ROX, отчетени от друг канал.

Crop start cycles: Създава нов набор от данни, при който някои стартови цикли са премахнати. Това е от полза, при големи скокове в началните цикли, което се случва при използването на определени реактиви.

Crop end cycles: Създава нов набор от данни, при който някои крайни цикли са премахнати.

Page 1: Индикира страницата, избрана за визуализация на грубите данни. В прозореца „Edit Sample“ могат да се създадат множество дефиниции за пробите. Напр., данните могат да се преглеждат при варираща дебелина на линиите, пробни дефиниции и други опции за визуализация. Това е от полза при относителен количествен анализ в един канал, тъй като потребителят лесно превключва изгледа между изследвания ген и контролните гени, дефинирайки 2 страници.

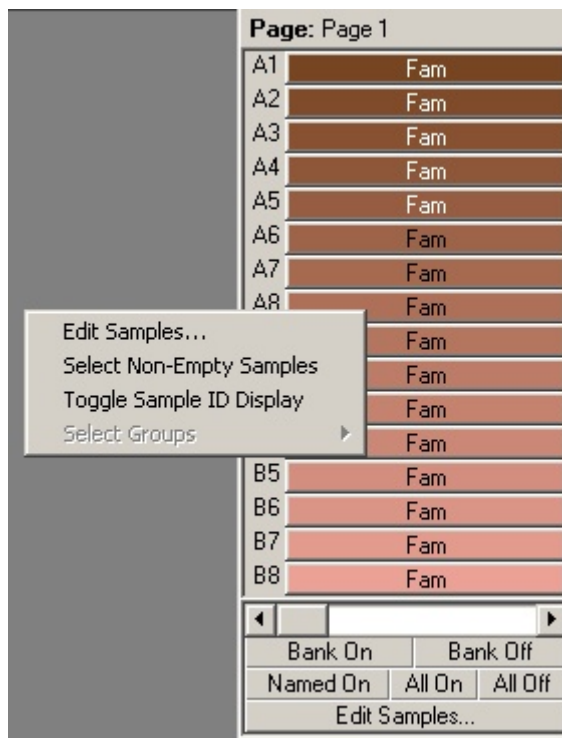
7.4 Превключване между пробите

От дясната страна на главния прозорец има поле за превключване, което съдържа легенда на пробите. То е съставено от цветни клетки, всяка от които съответства на дадена проба от екрана. Полето за превключване посочва кои проби са показани на екрана. Пробите обозначени с ярки цветове са показани, докато тези с бледи цветове не са. Пробите могат да се включат/ изключат чрез натискане върху клетката или влачене на мишката над няколко клетки едновременно. Бутоните „Bank On“ и „Bank Off“ съответно показват или скриват всички проби в дадения списък. Стрелките могат да се използват, за да показват следващите групи от проби.

Забележка: Броят показани проби е променлив и зависи от наличното място в прозореца.

Натискането на „Named On” показва само пробите, които са наименовани. Това е бърз начин да се покажат само важните проби. Натискането на „All On” или “All Off” показва всички (съответно нито една) проби в ротора. Натискането на бутона „Edit Samples...” отваря прозореца „Edit Samples” където могат да бъдат редактирани името, типа и стандартната концентрация на пробите (вижте Раздел 7.8.4).

Полето за превключване е показано по-долу. Допълнителните възможности се появяват след кликане с десния бутон на мишката върху полето.

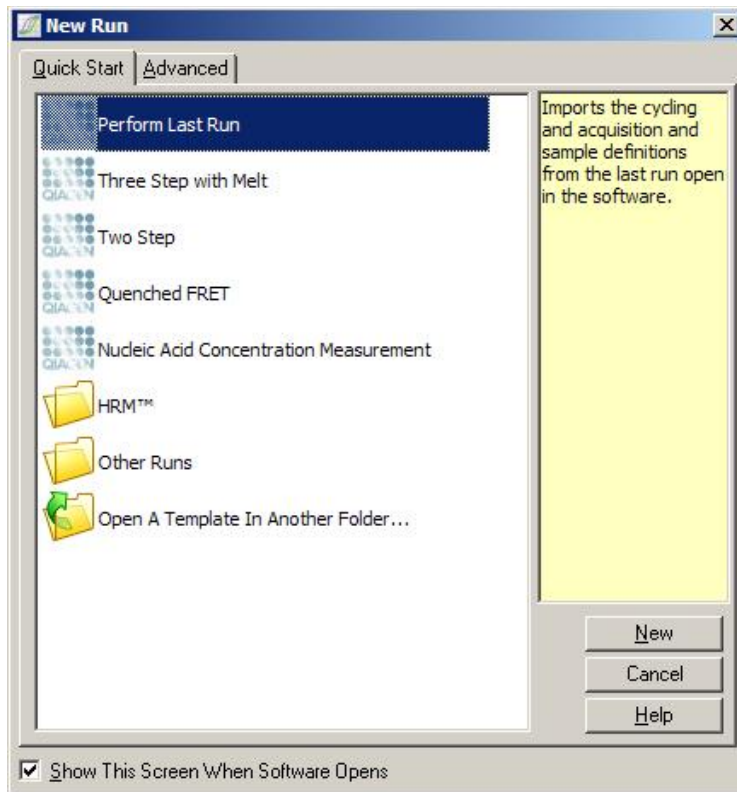


- Page:** Това обозначение индикира показаната страницата на пробата. Страниците позволяват няколко различни анализа на данните от един канал. Напр., може да построите две стандартни криви в зеления канал и да генерирате независими доклади. Повече детайли за настройването на страниците с проби може да намерите в Раздел 7.8.4.
- Toggle Sample ID Display:** Ако е използван 72-ямковият ротор, пробите се показват като A1 до A8, B1 до B8 и т.н. Опцията „Toggle Sample ID Display” превключва към числена подредба (1 до 72).
- Select Non-Empty Samples:** Тази опция деселектира всички проби, за които в „Type” е посочено „None” в прозореца „Edit Samples”. По този начин се показват само пробите от значение за анализа.
- Select Groups:** Ако сте дефинирали групи, тази опция ще включи/изключи изгледа на пробите в групите. Групите са условни обединения от проби, които позволяват специфично докладване на статистическите резултати. Напр., могат да се дефинират групи от лекувани или нелекувани пациенти. Групите се настройват в прозореца „Edit Samples”.

7.5 Меню File

7.5.1 Ново

Когато изберете „File” и след това „New”, се появява прозорецът „New Run”. Този прозорец съдържа често използвани шаблони, организирани в разделите “Quick Start” и “Advanced”. След като шаблонът е избран, интерфейсът Ви води през настройките и позволява модифицирането на настройките и профилите.



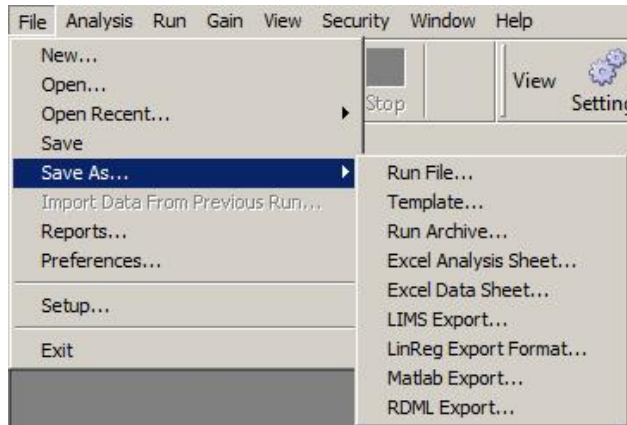
За информация относно шаблоните вижте Раздели 6.1 и 6.2.

Нов опит

- | | |
|---------------------------------------|---|
| New...: | Инициира настройките на опита, използвайки избрания шаблон. |
| Cancel: | Затваря прозореца. |
| Help: | Отваря онлайн менюто за помощ. |
| Show This Screen When Software Opens: | Ако тази кутийка е маркирана, прозорецът „New Run” излиза при стартирането на софтуера. |

7.5.2 Отваряне и съхранение

- Open...: Отваря предварително съхранени Rotor-Gene Q run файлове (*.rex) или Rotor-Gene Q run архиви (*.rea).
- Open Recent...: Показва последните 4 файла, които са отворени и съхранени.
- Save: Съхранява промените, направени в run файла.



- Save As...: Използвайте тази функция, за да съхраните run файла или данните в различни формати. Възможностите са изброени по-долу.
- Run File...: Съхранява копие на файла. Потребителят може да промени наименованието и да съхрани пътеката. Това е форматът по подразбиране.
- Template...: Съхранява настройките на профила, но не и данните от опита. Шаблонът може да се използва за бъдещи опити.

Run Archive...:	Съхранява в по-компактен формат. Съхранете в този формат преди изпращане по и-мейл за по-кратко време на изпращане и по-безопасен трансфер през и-мейл клиентите.
LIMS Export	Съхранява анализа в LIMS формат, според изискванията на потребителя. Моля, обърнете се към QIAGEN Technical Services за повече информация.
Excel Data Sheet...:	Изнася грубите данни от всички канали в таблица на Excel®. Само избраните проби се изнасят.
Excel Analysis Sheet...:	Изнася всички данни от дадения анализ в таблица на Excel.
LinReg Export Format...:	Изнася грубите данни във формат, който може да се чете от LinReg (инструмент за анализ на ефективността). Вижте “Изнасяне към LinReg” долу за повече детайли.
Matlab Export...:	Изнася данните във формат, който може да се чете от научния пакет Matlab (или неговия еквивалент Octave). Това е полезно при методически изследвания.
RDML Export :	Това осигурява експортирането на RDML v1.1 съвместим файл. RDML експортираният файл е създаден като компресиран в ZIP XML формат файл, с *.rdml файлово удължение, и е съвместим с RDML документната схема (http://www.rdml.org/RDML_v1_1_PR.xsd) намираща се на уебсайта http://www.rdml.org/files.php .

Изнасяне към LinReg

LinReg е инструмент, разработен от С. Ramakers и колеги. * LinReg е наличен от: <http://LinRegPCR.nl>.

Rotor-Gene Q софтуерът позволява на потребителя да изнесе грубите данни във формат, който може да бъде отворен от анализния инструмент LinReg.

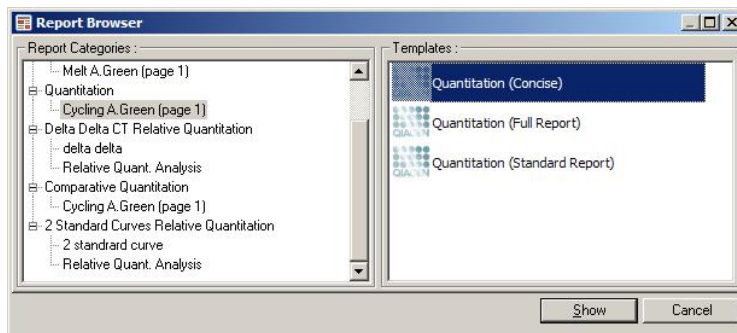
1. Отворете Rotor-Gene Q run файла, който съдържа грубите данни.
2. Изнесете данните в LinReg формат като изберете „Save As...” и след това “LinReg Export Format...”.
3. Microsoft Excel автоматично показва изнесените груби данни.
4. Стартирайте инструмента LinReg.

Трябва да изберете обхвата от клетки, където са разположени грубите данни. Инструментът анализира по един канал наведнъж, поради което трябва да бъде избран уместен участък от таблицата в Excel.

7.5.3 Доклади

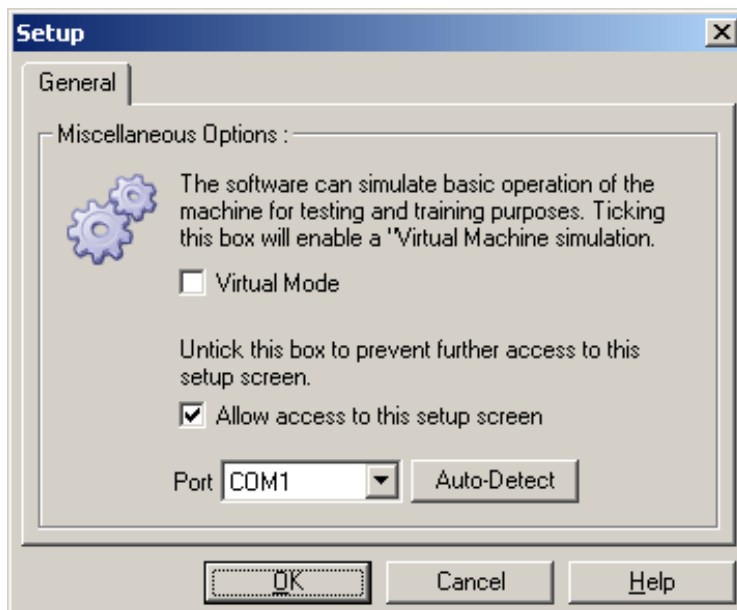
След като изберете “Reports” се появява “Report Browser” прозорецът. Ако данните са анализирани, докладът за анализа може да бъде показан в прозореца “Report Browser”. Възможни са няколко типа доклади, с вариращо ниво на детайли.

* 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.



7.5.4 Настройки

Първоначалното настройване на Rotor-Gene Q MDx става при инсталирането. Въпреки това, тази опция позволява промени в настройките за свързването на Rotor-Gene Q MDx, след инсталацията, при нужда.

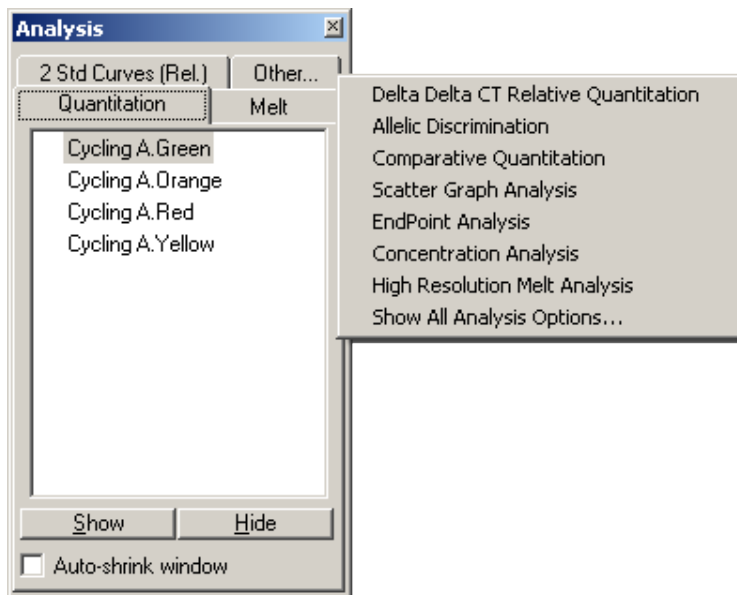


- Virtual Mode:** Изберете тази опция при използване на софтуера без свързан Rotor-Gene Q MDx. Софтуерът запазва функциите си. Това е удобно за демонстрации, анализ на данните и настройване на шаблоните.
- Allow access to this setup screen:** Ако тази опция не е маркирана по време на настройването, този прозорец повече няма да е достъпен. Тази мярка предпазва от неволна промяна на настройките. За да възстановите достъпа ,се свържете с Вашия дистрибутор.
- Port:** Изберете правилния порт, за да позволите комуникацията между компютъра и Rotor-Gene Q MDx.
- Auto-Detect** Ако не сте сигурни кой порт да изберете, натиснете “Auto-Detect” за да търсите за налични портове.

7.6 Меню Analysis

7.6.1 Анализ

След като кликнете “Analysis” се появява прозорецът “Analysis”. Той позволява създаването и показването на анализи. Методът се избира от табовете. Излиза списък с каналите, които могат да се анализират с избрания метод. Множество проби, изследвани на един канал, могат да бъдат анализирани по отделно, ако са настроени като отделни страници в прозореца „Edit Samples”. Анализираните страници са обозначени със зелена чавка. Това означава, че настройките на границата и нормализацията са съхранени за анализа. За да прегледате или анализирате даден канал, кликнете два пъти върху него. Излиза прозорецът за специфични анализи.

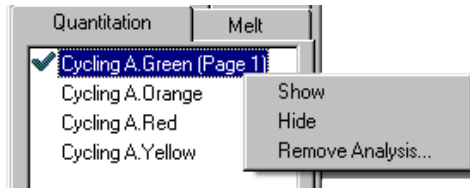


Auto-shrink
window:

Избирането на “Auto-shrink window”
смалява прозореца, когато той не се
използва. Движението на курсора над
него го уголемява отново.

Организиране на работната площ

Когато стартира нов анализ, неговите прозорци се подреждат така, че да отговарят на тези на екрана. Ако са показани много прозорци, това може да е натоварващо. Затворете прозорците, които не ви трябват, след което натиснете “Arrange” от лентата. Прозорците се подреждат автоматично с метода “Smart Tiling”. Иначе, може да изберете друг метод на подредба като кликнете върху стрелката до бутона “Arrange”. Кликването с десния бутон върху името на анализа показва допълнителни опции.



- Show: Показва избрания анализ.
- Hide: Скрива избрания анализ.
- Remove Analysis...: Премахва напълно избрания анализ. Това означава, че всички настройки на нормализацията ще бъдат загубени.

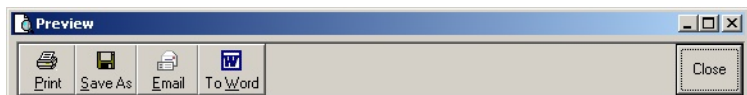
7.6.2 Количествен анализ

Изберете таб “Quantitation” в прозореца “Analysis” и кликнете два пъти върху името на канала или го изберете и натиснете бутона “Show”, за да отворите желания канал. Три прозореца се появяват: главнен екран, стандартна крива и резултати.

Доклади

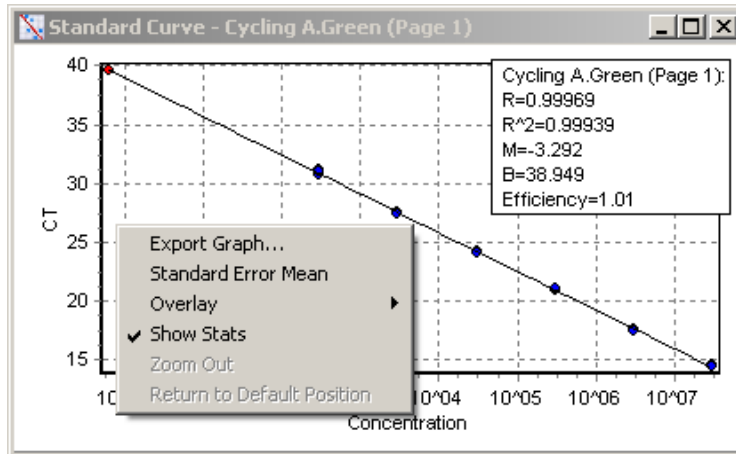
Reports: “Reports” отваря прозореца “Report Browser”, където може да се генерира доклад за текущия анализ. Има 3 опции: стандартен, пълен и кратък доклад. Кликнете два пъти върху желания вариант, за да го отворите в прозореца “Preview”.

След като изкарате доклада, бутоните в горния край на прозореца “Preview” може да бъдат използвани за неговото отпечатване, съхраняване, изпращане или изкарване в Word.



Стандартна крива

Std. Curve: Този бутон отваря прозореца “Standard Curve”. По подразбиране, той се отваря при отварянето на анализа. Ако го затворите, той може да бъде отворен с тази команда.



Стойностите на стандартната крива се пресмятат динамично при промяната на границата, която се постига чрез влачене на граничната линия в главния прозорец.

Сините точки върху кривата бележат пробите, дефинирани като стандарти, докато червените указват непознатите проби.

Забележка: Ако променят стандартите за построяване на стандартната крива, изключването на стандартна проба ще я премахне от сметките за кривата. Премахването на стандарти, с цел увеличаване стойността на R^2 не е научно издържано. Проваленият стандарт трябва да бъде включен в анализа, тъй като е признак, че пробите може да са провалени.

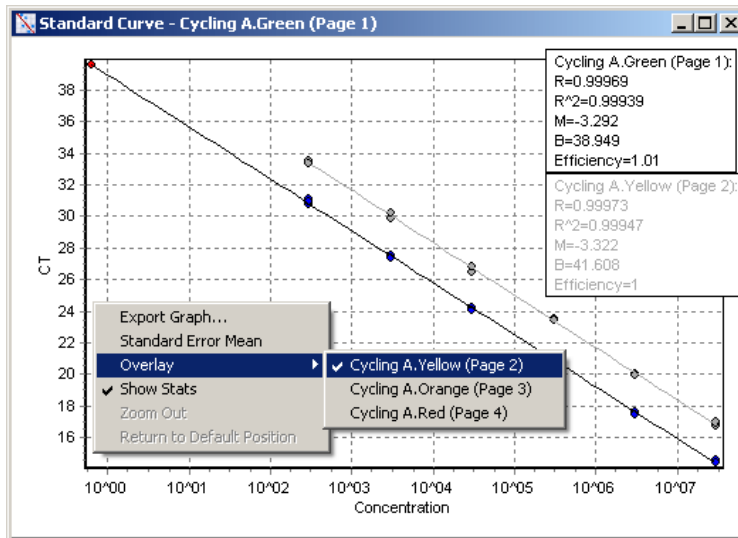
Efficiency: Това е реакционната ефективност на експеримента. Стойността ѝ се обсъжда обстойно на страници 7-29.

R^2 value (correlation coefficient): R^2 (или R^2) стойността е процентът данни в съгласие с хипотезата, че стандартите формират стандартна крива. Ако R^2 стойността е ниска, стандартите се отдалечават от правата линия. Това означава, че резултатите (например изчислените концентрации) може да не са надеждни. Добра стойност за R^2 е около 0.999.

Забележка: Възможно е да се постигне висока R^2 стойност при слаба стандартна линия, ако са използвани по-малко стандарти. R^2 стойността се увеличава за сметка на броя стандарти. За по-надеждни резултати използвайте доверителните интервали на изчислените концентрации като референция.

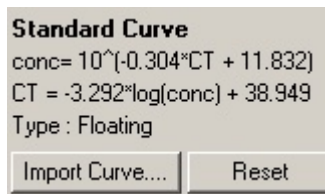
R value (square root of correlation coefficient): R стойността е квадратният корен на R^2 . В общи линии R^2 стойността е полезна при определяне на съотношението.

- M and B:** Наклонът (M) и пресечната точка (B) на стандартната крива се пресмятат автоматично чрез формулата $y = Mx + B$ и се показват в прозореца “Standard Curve”.
- Export Graph...:** Кликването с деснич бутон върху стандартната крива показва възможността за изкарване на графиката (вижте Раздел 8.4).
- Overlay:** При провеждане на няколко количествени анализа в рамките на един опит е възможно стандартните криви да се наложат в един прозорец. Това е удобно, за да се визуализира графично разликата между границите. Това е показано на по-долното изображение.



Пресмятане на стандартната крива

“ $\text{conc} = \dots * C_T + \dots$ ” и “ $C_T = \dots$ ” са 2 версии на уравнението, което се използва, за да свърже C_T стойностите и концентрациите. В публикациите най-често се използва формулата “ $C_T = \dots$ ”. Стандартната крива може да е плаваща (“Floating”) или фиксирана (“Fixed”). Ако тя е плаваща, оптималното уравнение за стандартната крива се изчислява всеки път, когато границата се премества в главния прозорец. Ако кривата е фиксирана, уравнението не се променя, тъй като е внесено от друг анализ.



Внасяне на кривата

Внасянето на стандартна крива позволява да се пресметнат концентрациите, когато в конкретния опит няма стандартна крива и реакционната ефективност не се е променила между два опита. Кривите могат да бъдат внесени от друг канал или от друг опит чрез натискане на “Import Curve”.

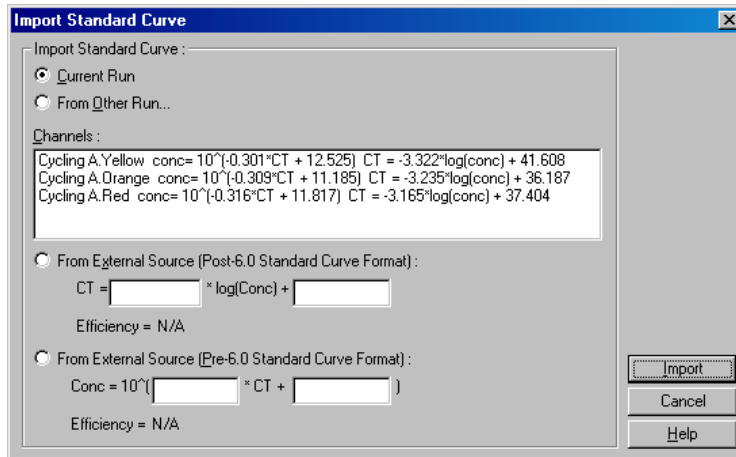
Възможно е стандартната крива да се нагласи, ако се налага. Това означава, че единствено ефективността на стандартната крива се внася в конкретния опит. Дали кривата трябва да бъде нагласена, зависи от използваните реактиви.

За да нагласите стандартната крива, използвайте референция с позната концентрация в новия опит. Дефинирайте референцията като настроите вида на пробата на “Standard” и въведете стойност на концентрацията в прозореца “Edit Samples”. Множество копия от една и съща референция могат да бъдат въведени, за да се подобри точността. Невъзможно е да се дефинират повече от една референтни концентрации

или стандарти. Например, възможно е да има 3 повторения на референция от 1000 копия, но не може да има една референция от 1000 копия и друга от 1000 копия в един и същи опит.

След внасянето на стандартната крива, нейният вид се променя на „Fixed”. Кликнете „Reset”, за да промените вида ѝ обратно на „Floating”.

Изображение на прозореца “Import Standard Curve” е показано по-долу.



Използвайки този прозорец, стандартната крива може да бъде внесена от друг канал, анализиран при същия опит или от друг опит.

Current Run: Когато тази опция е избрана, количествените анализи от други канали на същия опит се подреждат в списък със съответните криви.

From Other Run...: Изкарва диалогов прозорец, от който може да бъде избран и отворен run файл. Ако за този опит е проведен количествен анализ, стандартните криви за всеки от анализираните канали са изброени.

Забележка: Настройките на количествения анализ трябва да бъдат съхранени в run файла.

Channels: Изброява анализираните канали и формулите на кривите им.

From External Source: В тази площ M и B могат да се въведат директно. Това е удобно, когато стойностите са от външен източник, напр. таблица от Excel.

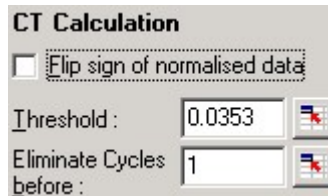
Изчисляване на C_T

Invert raw data: Някои реактиви дават флуоресцентен сигнал, който намалява експоненциално, вместо да нараства. Тези данни могат да бъдат анализирани чрез "Quantitation", но кутиятата "Invert Raw Data" трябва да е маркирана. За всички останали количествени анализа тази опция трябва да остане немаркирана.

Invert Raw Data

C_T Calculation: C_T стойността е броят цикли, когато амплификационната крива пресича границата на детекция. Чрез нагласяването на граничната линия и изчисляването на пресечните точки с всяка от кривите, се пресмятат C_T за всяка проба.

Threshold: За да настроите границата, кликнете върху иконата (мрежа с червена стрелка), задръжте върху графиката и влачете линията. Може да въведете и log стойност. Функцията “Auto-Find Threshold” автоматично определя границата. Ръчното настройване на границата трябва стане в експоненциалната фаза на опита, значително над нивото на фона, за да се избегне шума и под началото на сигналното плато в по-късните цикли.



Eliminate Cycles before: За да настроите, кликнете иконата (мрежа със стрелка) и кликнете и задръжте на графиката и влачете линията на дясно. Това премахва границата за ранните цикли.

Забележка: Това е полезно, когато има шум при ранните цикли, напр. поради смесване на пробите.

Auto-Find Threshold:

Сканира участък от графиката, за да избере гранична стойност, даваща оптимална оценка за концентрациите. Участъкът може да се промени чрез въвеждане на нови горна и долна граници в текстовите полета, които се появяват.

За повечето анализи зададените долна и горна граници са уместни. Обхватът от гранични стойности се сканира, за да изчертае най-точно стандартната крива на базата на пробите, определени за стандарти (напр. където R е най-близка до 1.0).



Резултати

Това отваря прозореца “Quantitation Results”. По подразбиране той се отваря при отварянето на анализ. Ако е затворен, може да се отвори от тук.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)														
Analysis	No.	Colour	Name	Type	Cl	Cl Comment	Given Conc	Calc Conc (c)	% Var	Rep. Cl	Rep. Cl Std	Rep. Cl (95% Cl)	Rep. Calc Conc	Rep. Calc Conc (95%)
Cycling A.Green (Page 1)	1	Red	10e8	Standard		3.73	1.00E+09	7.15E+07	20.1%	3.73		[3.73, 3.74]		7.17E+07 [1.17E+07, 4.29E+08]
Cycling A.Green (Page 1)	2	Red	10e8	Standard		3.74	1.00E+09	7.17E+07	20.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	3	Red	10e8	Standard		3.74	1.00E+09	7.16E+07	20.4%					
Cycling A.Green (Page 1)	4	Orange	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	Orange	10e7	Standard		5.08	1.00E+07	1.47E+07	45.5%					
Cycling A.Green (Page 1)	6	Orange	10e7	Standard		5.50	1.00E+07	1.56E+07	55.5%					
Cycling A.Green (Page 1)	7	Green	10e6	Standard		10.43	1.00E+06	7.72E+05	22.8%	10.30	0.09	[10.15, 10.60]	8.00E+05	[2.62E+05, 2.44E+06]
Cycling A.Green (Page 1)	8	Green	10e6	Standard		10.27	1.00E+06	8.58E+05	14.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	9	Green	10e6	Standard		10.43	1.00E+06	7.71E+05	22.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	10	Green	10e5	Standard		13.45	1.00E+05	9.65E+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	Green	10e5	Standard		13.75	1.00E+05	8.13E+04	18.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	12	Green	10e5	Standard		13.69	1.00E+05	8.40E+04	15.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	13	Blue	10e4	Standard		15.86	1.00E+04	2.24E+04	122.7%	15.46	0.25	[14.04, 16.00]	2.59E+04	[7.80E+03, 8.30E+04]
Cycling A.Green (Page 1)	14	Blue	10e4	Standard		15.54	1.00E+04	2.42E+04	141.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	15	Blue	10e4	Standard		15.18	1.00E+04	3.09E+04	208.8%					
Cycling A.Green (Page 1)	16	Blue	10e3	Standard		21.36	1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24	[20.49, 21.89]	5.85E+02	[9.13E+01, 3.50E+03]
Cycling A.Green (Page 1)	17	Blue	10e3	Standard		20.89	1.00E+03	6.47E+02	26.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	18	Blue	10e3	Standard		21.02	1.00E+03	5.54E+02	40.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	19	Black	10e2	Standard			NEG (Multi Cl)	3.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1)	20	Black	10e2	Standard		23.98	1.00E+02	7.99E+01	20.1%					
Cycling A.Green (Page 1)	21	Black	10e2	Standard			NEG (Multi Cl)	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)							

В прозореца “Quantitation Results” резултатите от опита са обобщени в таблица. След кликване с десния бутон и избиране на “Export to Excel” таблицата се изкарва в Excel. За да копирате данните в съществуваща таблица, изберете опцията “Copy”, отворете таблицата и изберете “Paste”.

Прозорецът “Quantitation Results” включва следните колони.

Analysis	Текущи данни (отчитащ канал и страница с проби).
No.	Номер на пробата.
Color	Дефиниран индивидуален цвят на отделните проби.
Type	Дефиниран тип проби.
Ct	Определена C _T стойност.

Ct Comment	<p>Автоматична бележка за определянето на C_T, в случай, че C_T стойностите са изключени. Възможни са следните флагове:</p> <p>NEG (Multi Ct): Границата пресича кривата на флуоресценция поне два пъти. C_T стойността не може да бъде определена еднозначно.</p> <p>NEG (NTC): Цялостното повишение на флуоресценцията не задоволява условията, дефинирани в "NTC threshold" функцията на менюто "Outlier Removal" (вижте долу). Например, флуоресцентната крива пресича границата, но слабото увеличение на наклона предполага контрола без матрица и не се дава C_T стойност.</p> <p>NEG (R.Eff): Цялостното повишение на флуоресценцията не задоволява условията, дефинирани в "Reaction efficiency threshold" функцията на менюто "Outlier Removal" (вижте долу). Пробите, които не могат да достигнат дадена реакционна ефективност, се изключват и не се дава C_T стойност. Това съобщение се показва единствено, ако съответната функция е активна.</p>
%Var:	<p>Процент на вариация между изчислената и познатата концентрации. $\%Var = \text{Abs}(\text{Calculated}/\text{Given} - 1)$</p>
Rep. Ct:	Среден C_T за всички проби със същото име като тази.
Rep. Ct Std. Dev.:	Стандартно отклонение на C_T стойността на всички проби със същото име като тази.

Rep. Ct 95%
C.I.: Обхват на C_T , който статистически отговаря на 95% от вариацията на C_T стойността. Това е консервативна статистическа величина, която може да се използва като индикатор за качеството. Този обхват може да бъде стеснен чрез извършването на повече повторения или чрез постигането на по-малки вариации между повторенията.

Rep. Calc. Conc: Изчислената концентрация на всички проби със същото име.

Забележка: Това не е средно аритметично на изчислените концентрации. То е геометричното средно, което е математически по-уместно, поради експоненциалната природа на амплификацията в реално време.

Rep. Calc. Conc. Обхват от концентрации, който отговаря на 96% от вариацията в отделните проби, както и в модела за линейна регресия, на който тя е базирана. Представлява обхватът от концентрации, който може да се очаква в 95% от случаите, ако експериментът се повтори многократно при същата вариация. Това е консервативна оценка и обхватът може да е дпста голям поради неизбежната вариация във всеки анализ в реално време. Този обхват може да е голям, ако стандартите се измерят в концентрации, различни от тези на непознатите проби, ако се използват малко повторения или ако има сериозна вариация.

ВАЖНО: Вариациите, съобщени чрез тази величина са неизбежни при експоненциалния процес на PCR в реално време и не се дължат на Rotor-Gene Q MDx. Подобни тестове, извършени на блокови апарати, биха дали по-голяма вариация, поради по-ниската температурна хомогенност на блоковите системи. За да сравните апаратите, съпоставете стандартното отклонение на C_T стойността.

Заблелетка: Повече информация за доверителния интервал може да намерите в Приложение Б.

Забележка: С изключение на Color, Name, Ct и Ct Comment, всяка от колоните може да бъде показана или скрита чрез кликване в прозореца с десния бутон и избиране или отмяна на името на колоната.

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

За удобство, функцията “AutoStat” автоматично изчислява средното, стандартното отклонение и минималните и максималните стойности на желаните проби. Изберете желаните резултати чрез провлачване с левия бутон на мишката, при което стойностите в таблица от дясно на екрана.

На това изображение са анализирани концентрациите на няколко проби.

Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var
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	30286	1.0%

Statistics

Maximum : 28730050
 Minimum : 25142920
 Count : 3

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

Copy

ВАЖНО: Функцията “AutoStat” отчита контекста. Това означава, че където е възможно, дава само информация, която е от полза.

Например:

- Не е възможно да постигнете доверителен интервал от 95% от набор от избрани концентрации, тъй като регресионният модел също трябва да се вземе под внимание.
- За изчислени концентрации се докладва стандартно отклонение "Orders of Magnitude", а не абсолютна стойност. Това е процентна вариация. Напр., стойност от 1.07537 съответства на 7.54% вариация $(278,974 - 322,611) = (300,000 / 1.07537 - 300,000 * 1.07537)$. Абсолютната стойност обезсмисля стандартната крива. Стойността се съобщава при най-ниската концентрация, за да се даде допустима ниска грешка (± 3 copies) или при високата концентрация ($\pm 3,000,000$ copies). По тази причина се съобщава стандартното отклонение “Orders of Magnitude”.
- За изчислени концентрации вместо средното аритметично се използва геометрично. Това е свързано с експоненциалната природа на PCR в реално време. Напр., при двукратни разреждания с 1, 2, 8 и 16 копия, средното трябва да е 4 копия, тъй като е по средата на серията. Средното аритметично, обаче, е 6.75. Средното геометрично е $(1 * 2 * 8 * 16)^{(1/4)} = 4$ к.

Динамична нормализация

Опцията “Dynamic Tube” обикновено е активна и се използва за определяне на средния шум на всяка проба точно преди началото на амплификацията.

Стандартната нормализация взема първите 5 цикъла и ги използва като индикатор за нивото на шума за всяка проба. Всички стойности за пробата се делят на тази стойност, за да се нормализират данните. Това може да е неточно, тъй като за някои проби нивото на шума през първите 5 цикъла може да не е показателно за шума

непосредствено преди амплификация. Динамичната нормализация използва втората производна на следата от всяка проба, за да определи точката на отделяне. След това нивото на шума е осреднено от цикъл 1 до номера на цикъла на отделяне за всяка проба. Това дава възможно най-прецизното околичествяване.

При някои набори от данни фоновата флуоресценция не е постоянна в циклите преди да започне амплификацията. В такъв случай, може да се изключи динамичната нормализация чрез кликуване върху "Dynamic Tube", тъй като тя може да намали прецизността на количествения анализ.

Корекция на наклона на шума

Фоновата флуоресценция (FI) на пробата в идеалния случай остава постоянна преди намножаването. Понякога тя се увеличава или намалява заради използваните реактиви. Това води до неравномерно ниво на шума. Noise slope correction напасва линия за определяне на шума, вместо средна стойност. Избирането на тази опция чрез натискане на бутона "Slope Correct" може да подобри данните от повторенията, ако базовите линии на пробите са видимо наклонени. Noise slope correction подобрява данните при положителен или отрицателен наклон на фона преди точката на отделяне (C_T).

Където наклонът не е постоянен или началните базови цикли показват значително повишение или намаление на сигнала в сравнение с останалата част от кривата, Noise Slope Correction може да доведе до някои нежелани ефекти, като пресичане от страна на негативните контролни криви на прага поради апроксимация на базовата линия като линия с най-добро съвпадение и съответно нормализиране на изходните данни. Вследствие на това, тази функция не винаги подобрява качеството на данните и трябва да се използва само ако кривите по изходните данни са с постоянен наклон.

Корекция на точката на отделяне

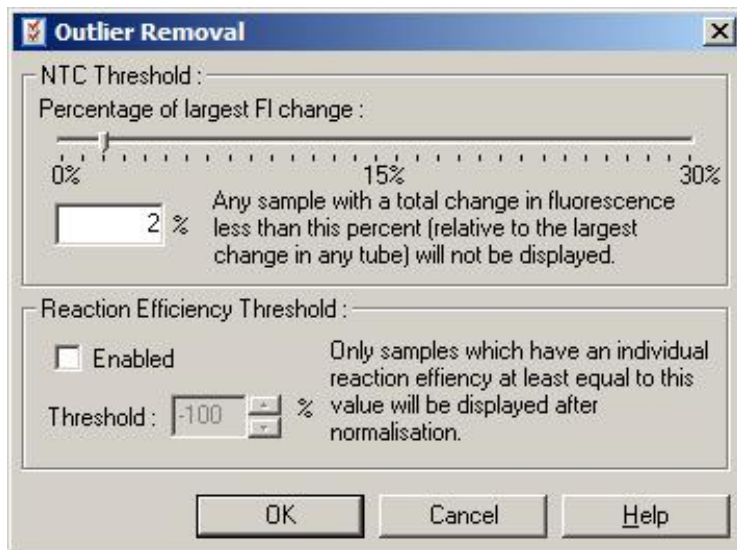
Алгоритъмът на корекция на точката на отделяне може да бъде използван за дефиниране на продължителността на базовата линия, използвана за нормализиране. За да се приложи корекция на точката на отделяне, трябва да бъдат дефинирани два параметъра. Ако точката на отделяне се изчислява чрез “Dynamic Tube“, която е по-ниска от първия параметър, за точка на отделяне се използва вторият параметър. Корекцията на точката на отделяне може да бъде използвана единствено едновременно с нормализиране на “Dynamic Tube“.

Игнорирай първите

Флуоресцентният сигнал от първите цикли на опита може да не е показателен за остатъка от тях. За по-добри резултати първите цикли могат да се пренебрегнат. До 10 цикъла могат да се пренебрегнат. Ако първите цикли, обаче, са подобни на останалите, по-добри резултати ще се получат при инактивиране на “Ignore First“, защото нормализиращият алгоритъм ще работи с повече данни.

Премахване на отклонения

За разграничаване на малки промени във флуоресценцията и същинска реакция в контролата без матрица (NTCs) са налични 2 мерки: “NTC Threshold“ и “Reaction Efficiency Threshold“. “NTC Threshold“ се препоръчва за повечето приложения. Използваният подход трябва да се валидира.



NTC Threshold: Позволява завишени проби или NTCs да бъдат изключени от анализа. Всички проби с промяна под “NTC Threshold” няма да бъдат докладвани и в колоната “CT Comment” ще се покаже “NEG (NTC)”.

Процентът е отнесен към най-голямата максимална промяна във всяка епруветка. Например, ако една проба започне при фон от 2 FI и се повиши до 47 FI, то 45 FI съответства на 100%. “NTC Threshold” от 10% ще приеме всяка проба под 4.5 FI за шум.

Reaction Efficiency Threshold:

“Reaction Efficiency Threshold” е алтернативен метод за изключване на шума от анализа. Този нормализиращ алгоритъм използва техниката за оценка на реакционната специфичност, използвана при сравнителния количествен (виж Секция 7.6.6). Всички проби с реакционна ефективност под

това ниво се изключват и в колоната “CT Comment” ще се изпише “NEG (R.Eff)”.

Ниво от 0% индикира, че по време на експоненциалната фаза не е протекла реакция. 100% индикират, че е протекла напълно ефективна реакция.

Отрицателните проценти означават, че по време на експоненциалната фаза флуоресцентният сигнал намалява.

Настоящите изследвания не са категорични за нивото на ефективност, нужно за за отличаване на същинските реакции от замърсявания и други ефекти. Поради това, препоръчваме да използвате тази функция умерено, с допускането, че всяка същинска реакция ще даде някаква експоненциална фаза и повишение на флуоресценцията. Настройването на стойността над 0% ще изключи проби със слабо, но допустимо повишение на флуоресценцията, докато настройването под 0% ще покаже проби с намаляваща флуоресценция по време на експоненциалната фаза, които би трябвало да се изключат.

Бележка: Ако стойност е изключена чрез една от тези техники, съответната CT стойност в прозореца “Quantitation Results” няма да се покаже. В същия момент, в колоната “Ct Comment” ще се покаже съобщение за изключването. Затова е важно колоната “Ct Comment” да се показва по всяко време.

В долното изображение проби 7, 8 и 9 са изключени заради “Reaction Efficiency Threshold”.

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

Наклон, амплификация, реакционна ефективност

Наклонът (M) на реакцията (показан в прозореца "Standard Curve"), може да се използва за определяне на експоненциалната амплификация и реакционната ефективност, използвайки следните изчисления:

$$\text{Експоненциална амплификация} = 10^{(-1/M)}$$

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

Оптималните стойности за M, експоненциалната амплификация и реакционната ефективност са съответно -3.322, 2, и 1. Реакционната ефективност се показва в доклада (в пълния и стандартния доклад, виж стр. 7-13) и прозореца "Standard Curve".

Наклонът се пресмята като промяната на СТ разделена на промяната на log input (напр., брой копия). 100% ефективност означава удвояване на продукта на всеки цикъл, което дава наклон M -3.322, амплификационен фактор 2, и реакционна ефективност 1.

При M стойност от -3.322, изчисленията са както следва:

$$\text{Експоненциална амплификация: } 10^{(-1/-3.322)} = 2$$

$$\text{Реакционна ефективност: } [10^{(-1/-3.322)}] - 1 = 1$$

Алтернативен пример: M стойност от 3.8 означава, че реакцията има експоненциална амплификация около 1.83 и реакционна ефективност 0.83 (или 83%).

Отместване

Във формула описваща връзката между 2 променливи, отместването се изразява с B ($y = Mx + B$).

Отместването понякога се разглежда като пресечна точка. B представлява C_T за дадена концентрация от 1 единица. Чрез заместване с 1 във формулата:

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

$$C_T = 0 * M + B$$

Резултатът е $C_T = B$

Пресечната точка може да се различава между отделните опити и е по-нестабилно измерване от градиента. Поради това, градиентът се анализира по-често от пресечната точка.

Основен прозорец

Главният прозорец показва амплификационните графики в логаритмичен мащаб.

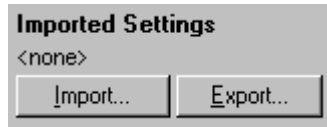
Кликването върху “Linear Scale” в долния край на прозореца променя мащаба от логаритмичен в линеен и обратно. Това превключване променя изгледа, но не и изчисленията. Това може да се потвърди чрез pinpointer инструмента с кликване на графиката с десния бутон и избиране на “Show pinpointer”. В логаритмичен мащаб по-малките стойности са по-видими, докато линейния мащаб способства за преглед на цялата реакция.

Бележка: Амплификационните графики се обновяват в реално време по време на отчитането на Rotor-Gene Q MDx. Това позволява на потребителя да прегледа резултатите веднага след началото на експоненциалния растеж. Могат да се направят предварителни заключения и решения за следващия опит.

Шаблони за количествен анализ

Шаблоните за количествен анализ позволяват изнасянето на настройки за нормализацията и прага в

един *.qut файл. Той може да се внесе и използва в други опити. Виж Раздел 8.1 за повече детайли.



7.6.3 Двойна стандартна права

Анализ на относителна генна експресия с нормализиращ ген може да се направи чрез 2 standard curve метода.

Методът изисква стандартна права за всеки ген. Концентрацията за всеки ген се изчислява от стандартната права. Експресията на желания ген се нормализира към нормализация (конститутивен) ген.

Важно е стандартите и повторенията на пробите да са правилно означени при подготовката на пробите (Виж Раздел 6.1.4). Съответстващите проби трябва да имат еднакви имена при всеки анализ. В мултиплексна реакция, където позициите на изследвания и нормализация ген съвпадат, един набор от дефиниции е достатъчен. Ако правите относителен анализ с нормализиращ ген на един канал (т.е. реакциите са в отделни епруветки с един и същ флуорофор), трябва да се направят две страници с проби. Първата трябва да показва позициите с имената за изследвания ген, а останалите позиции да са без име. Втората трябва да показва позициите на нормализация ген. След това софтуерът ще свърже пробите от двата анализа на базата на имената им.

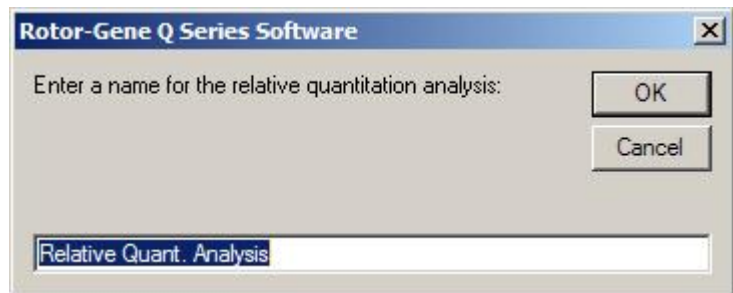
Анализ на експресия чрез двойна стандартна права

Данните първо могат да бъдат анализирани за всеки ген количествено. Иначе резултатите за всеки ген ще се определят автоматично от "Autofind Threshold" инструмента.

1. От прозореца “Analysis” изберете раздела “2 Std Curve (Rel.)”. Натиснете “New Analysis...”.

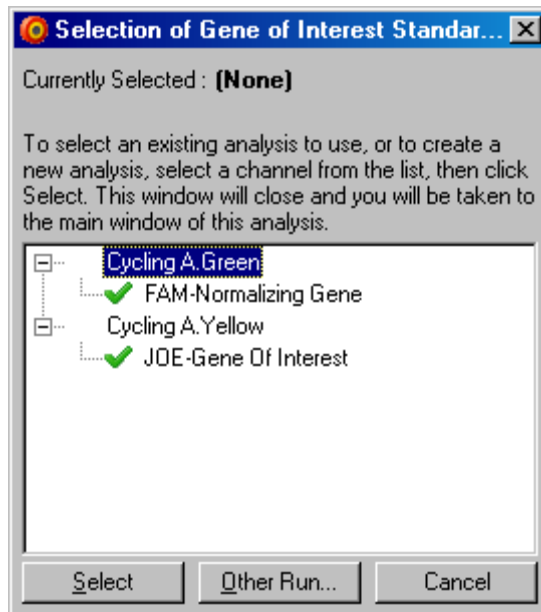
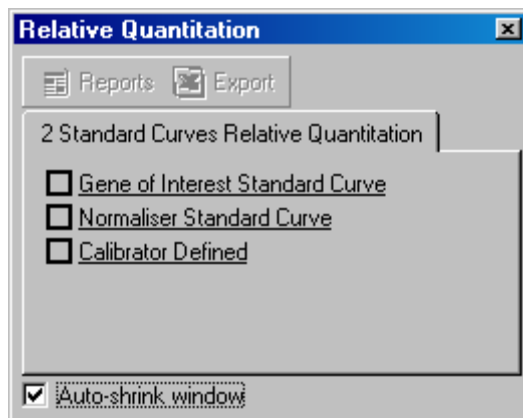


2. Въведете име за анализа.

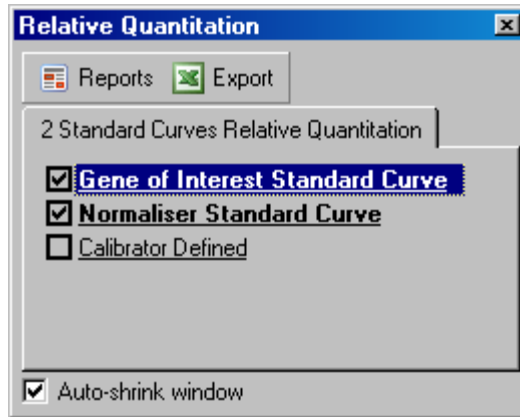


3. Определете страниците за анализа на нормализиращите и изследваните гени. Напр., кликването на “Gene of Interest Standard Curve” изкарва прозореца “Selection of Gene of Interest Standard...”. Изберете страницата, където е количествен изследвания ген. Повторете за нормализиращия ген. При желание, може да се

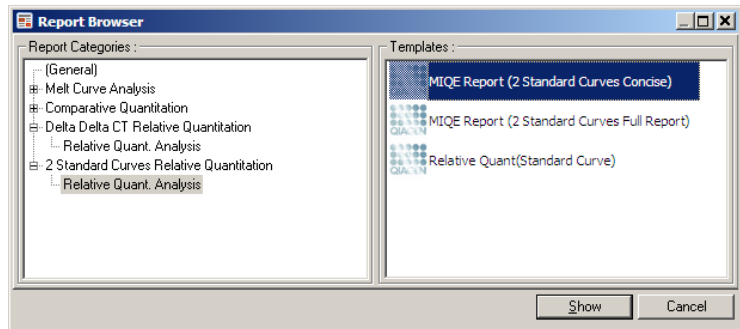
дефинира калибратор. Ако тази опция е избрана, на калибратора е дадена стойност от 1 и всички други концентрации са изчислени спрямо него.



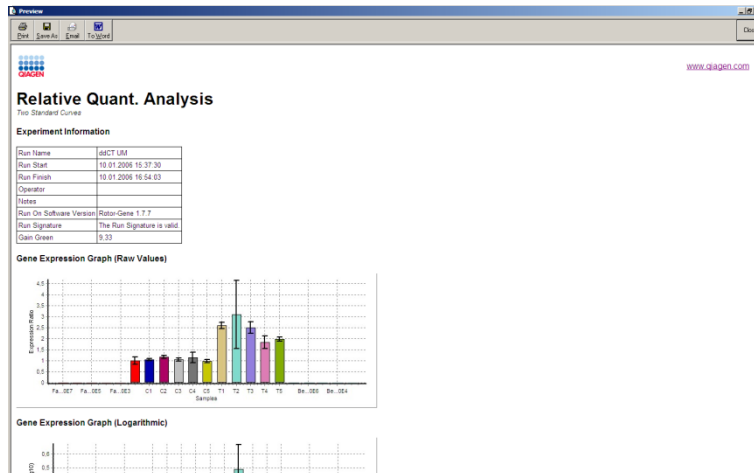
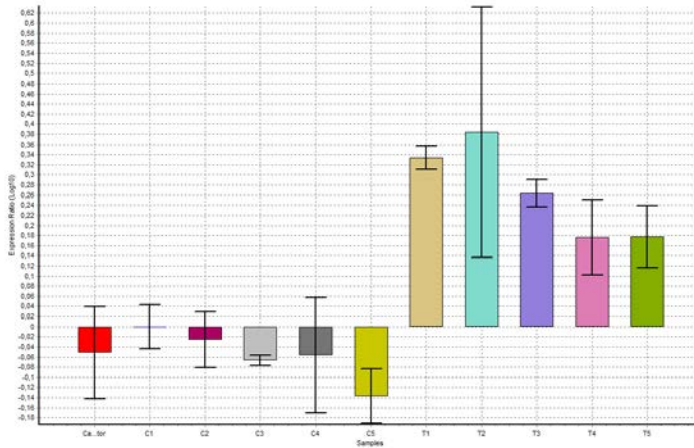
След избирането опциите ще бъдат отбелязани с чавка, както в показано по-долу.



4. Натиснете бутона “Reports”, за да изкарате “Report Browser”. Изберете анализа с правилното име от списъка. Натиснете бутона “Show”, за да изкарате доклада за относително околичествяване. Опцията “Export” изнася резултатите в таблица на Excel. Ако е включен калибратор, резултатите се изчисляват спрямо неговата стойност 1.



5. Показани са концентрациите, взети от стандартните криви за изследвания ген (GOI Conc.) и нормализация ген (Norm. Conc.), както и относителните концентрации. Резултатите могат да се запазят в Word файл.



6. Стойностите за Rel Min и Rel Max values се генерират чрез изчисляване на стандартното отклонение на квотиента от стандартните отклонения на GOI и Нормализатора, при използване на следната формула:

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

където:

$$CV = \frac{s}{X} = \frac{stddev}{meanvalue}$$

7.6.4 Делта делта C_T относителен анализ

Делта делта C_T методът позволява относителен експресионен анализ. Описан е от Livak и Schmittgen (2001)*.

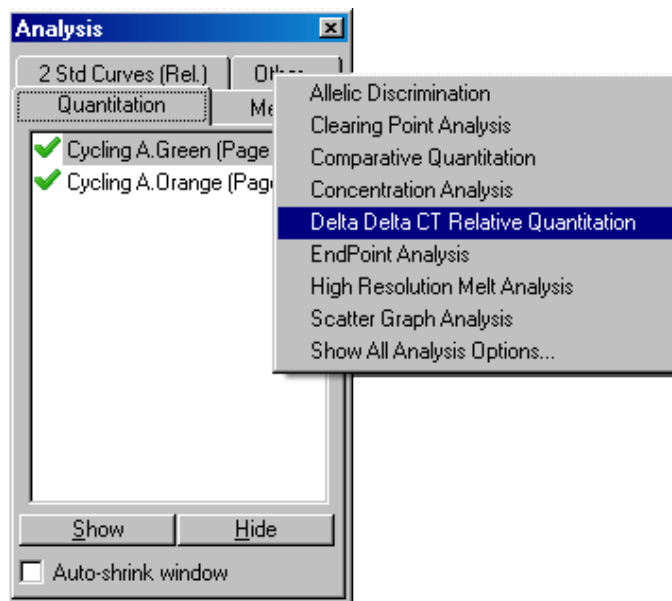
Този метод не изисква включването на стандартни прави при всеки опит. Всяка проба се нормализира за количеството добавена матрица към нормализацията на гена. Тези стойности се нормализират още веднъж спрямо калибратора. Той може да е, например, див тип, нетретирана контрола или time-zero проби.

Важно е амплификационните ефективности за изследваните гени и нормализацията на гена да са идентични и това да е валидирано според препоръките на Livak и Schmittgen.

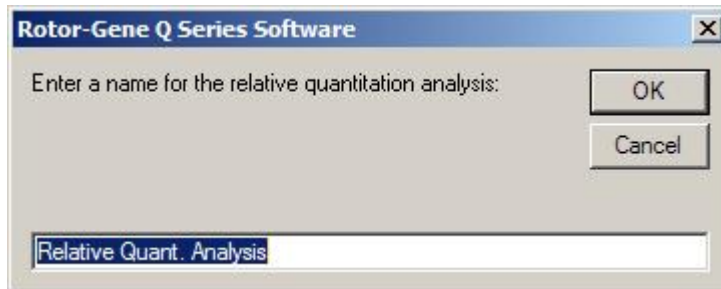
Важно е имената на пробите да са дефинирани правилно в прозореца “Edit Samples”, като едни и същи проби са еднакво наименовани при всеки отделен количествен анализ.

1. Анализирайте данните чрез “Quantitation”. Не е нужно да се построява стандартна права след извършване на валидацията.
2. От раздела “Other” в прозореца “Analysis” изберете “Delta Delta C_T Relative Quantitation”. Изберете “New Analysis”.

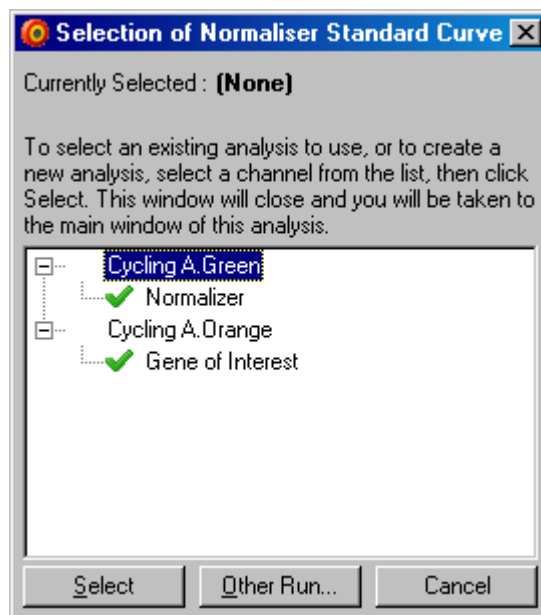
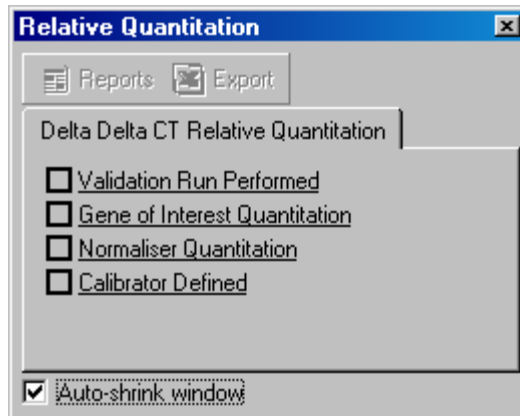
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* **25**, 402.



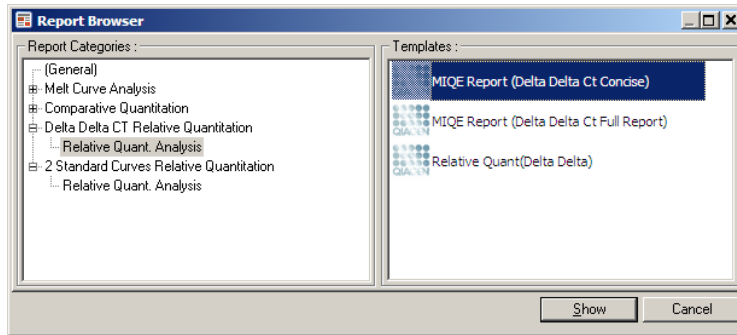
3. Въведете име на анализа.



4. "Validation Run Performed" трябва да е маркирано, за да продължите с анализа. Дефинирайте страниците където са анализирани изследваният и нормализацият ген.



5. Натиснете бутона “Reports”, за да изкарате “Report Browser”. Изберете анализа с правилното име от списъка. Натиснете бутона “Show”, за да изкарате доклада за относително околичествяване. Опцията “Export” изнася резултатите в таблица на Excel. Ако е включен калибратор, резултатите се изчисляват спрямо неговата стойност 1.



Пример с резултати от този анализ е показан по-долу. С_T стойностите за изследвания ген (GOI С_T), С_T за нормализирания ген (Norm. С_T), Делта С_T, Делта Делта С_T, и относителната концентрация (Relative Conc.) са показани. Експресията е отнесена към калибратора, на който е дадена стойност 1. За повече информация относно получаването на Rel Min и Rel Max изчисленията, направете справка с Litvak and Schmittgen (2001).*

C	Replicate Name	GOI С _T	Norm. С _T	Delta С _T	Delta Delta С _T	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	7.39130	
	Dilution 1	28.61	27.92	0.69	-4.12	17.41896	16.47839	18.41322	
	QS 0.1 IU/μl		28.11						
	0.316 IU/μl	37.62	28.10	9.51	4.70	0.03857	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	0.33005	0.28206	0.39325	
	QS4	32.67	28.29	4.38	-0.43	1.34925	1.09820	1.65770	
	QS3	30.07	27.98	2.09	-2.73	6.61982	6.18888	7.08076	
	QS2	26.88	27.64	-0.76	-5.57	47.61474	45.02202	50.35677	
	QS1	24.07	27.10	-3.03	-7.85	230.60440	208.45384	255.10870	

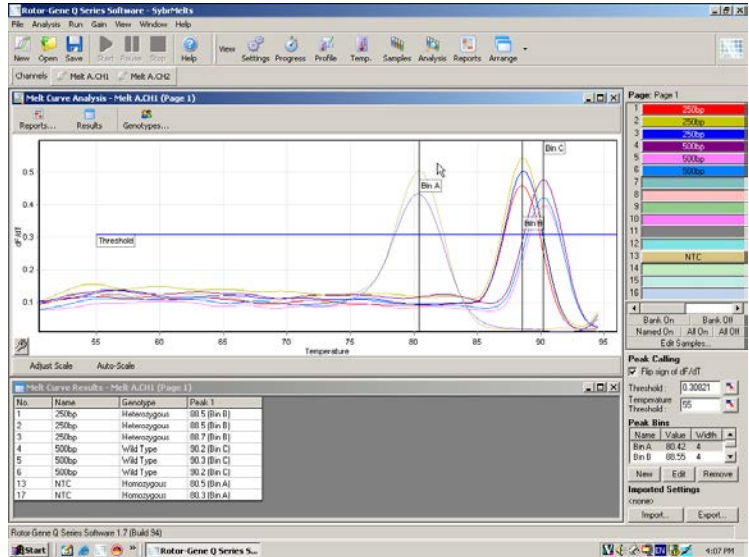
7.6.5 Анализ на топене

Кривата на топене анализира производната на грубите данни след изглаждане. Този анализ често се използва за генотипиране алелна дискриминация. Пиковите на кривата са групирани в бинове и всички пикове под

* 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.


прага се пренебрегват. Биновете могат да картират генотипове чрез командата “Genotypes”.


След приключването на опита, за някои реактиви може да се добави стъпка на топене, за визуализация на дисоциационната кинетика на PCR продуктите. Температурата се увеличава линейно и флуоресценцията за всяка проба се отчита. Типична крива на топене е показана по-долу.



Peak Calling

Flip sign of dF/dT

Threshold : 

Temperature Threshold : 

Peak Bins


Name	Value	Width	
Bin A	80.42	4	▲
Bin B	88.55	4	▼


Imported Settings

<none>

Flip sign of
dF/dT:

Преди да дефинирате пиковете, се уверете, че знакът dF/dT е правилен за набора от данни за положителни пикове.

- Defining peaks:** При топенето пиковите могат да се дефинират и покажат чрез различни методи. Един е автоматичното извикване на всички пикове за всяка проба. Друг е групирането им в бинове, полезно при генотипирането.
- Биновете дефинират област, в която се очакват пикове. Софтуерът за топенето разделя пиковите в групи бинове на базата на пикови стойности в кривата. Биновете могат да се редактират.
- Всеки пи в рамките на дефинирания обхват на бина, ще бъде включен в него. Ако наблизо има два бина, пикът ще попадне в по-близкия.
- Бележка:** Биновете не трябва да се подреждат визуално за оценка на позициите на пиковите. Настройте биновете приблизително, след което използвайте отчетените стойности за по-точни резултати.
- Peak Bins:** Дефинирайте бин от бутона “New Bin” и кликнете и задръжете върху графиката, за да дадете центъра на бина. За добавяне на нов бин повторете процеса. Премахнете бин от бутона “Remove”.
- Threshold:** За задаване на прага (оста y), натснете иконата  и кликнете и задръжете върху графиката и изтеглете праговата линия.

Temperature Threshold: За температурен праг (оста x), натиснете иконата  и кликнете и задръжете върху графиката и изтеглете праговата линия на дясно. Това елиминира прага за по-ниски температури.

Бележка: Това е полезно при наличие на шум при ниските температури.

Доклади

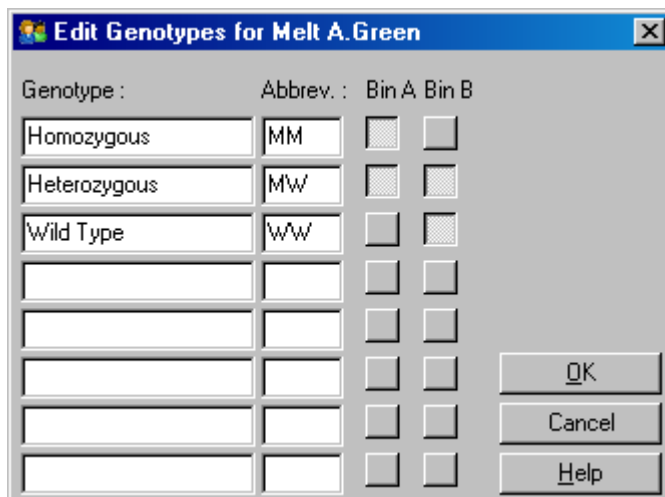
Това отваря “Report Browser”, където могат да се избират доклади за преглед. Може да се генерира доклад според избрания канал или да се генерира многоканален генотипиращ доклад.

Резултати

Това показва прозореца “Melt Curve Results”, в който се виждат пиковете на пробите.

Генотипове

Натиснете “Genotypes...” и изберете генотиповете, както е показано по-долу.

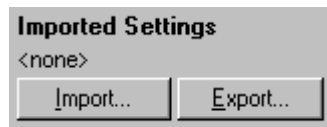


Този прозорец позволява задаването на генотипове според честотата на пиковете в биновете. На изображението е показана стандартната генотипна настройка, където хетерозиготните проби са с два пика, хомозиготните – с пик в първия бина, а дивият тип – с пик във втория. До името на всеки генотип може да се въведе съкращение. Това се използва при отпечатване на многоканални генотипиращи доклади, за лесен прочит на резултатите от множество канали.

За мултиплексен анализ трябва да се зададат генотипове във всеки канал. При двойно-канален FRET анализ, например, където във всеки канал се очакват див тип и хетерозиготи, параметрите на биновете трябва да се настроят за всеки канал. Резултатите ще са под формата на мултиплексен доклад.

Шаблони за анализ на топене

Шаблоните за анализ на топене позволяват изкарване на настройки за нормализация, праг, генотипове и бинове в общ *.met файл. Той може да се вкара и използва при други опити. Виж Раздел 8.1 за подробности.



7.6.6 Сравнителен количествен анализ

Използва се за сравнение на относителната експресия на проби спрямо контрола в опити без стандартна права. Това често се използва при анализ на микрочипове. Warton and coworkers (2004)* дават пример за тази техника.

* 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.

1. За да проведете анализа, изберете "Other" и след това "Comparative quantitation" в прозореца "Analysis". Кликнете два пъти върху желания канал.
2. Изберете контролна проба от падащото меню от дясно на екрана под панела за превключване.
3. Резултатите се изчисляват автоматично и се показват в прозореца "Comparative Quantitation Results" под графиката.

Първите колони в прозореца "Comparative Quantitation Results" показват номера и името на пробите. Колоната "Takeoff" дава точката на отделяне на пробата. Втората производна на амплификационната диаграма дава пикове, съответни на максималната скорост на повишаване на флуоресценцията при реакцията. Точката на отделяне е цикълът, при който втората производна е на 20% от максималното ниво и бележи края на шума и началото на експоненциалната фаза.

Тази графика показва втората производна на амплификационна диаграма с относителните позиции на пика на втората производна и точката на отделяне.



Колоната "Amplification" показва ефективността на пробата. 100% ефективна реакция съответства на стойност 2 за всяка проба, което означава удвояване на ампликона на всеки цикъл. При грубите данни сигналът

трябва да се удвоява при експоненциалната фаза. Например, ако сигналът е бил 50 FI на цикъл 12 и 51 FI на цикъл 13, трябва да се повиши на 53 FI на цикъл 14. Всички стойности на амплификация за всяка проба се осредняват до стойност, която се вижда от дясно на екрана под панела. Колкото повече варират стойностите на амплификация за всяка проба, толкова по-голям ще бъде доверителният интервал (което се вижда от стойността след \pm знака). Доверителният интервал за голям брой проби (N) дава 68.3% вероятност същинската амплификация да попадне в този обхват (стандартно отклонение 1). При удвояване се постига 95.4% доверителен интервал за голямо N.

Повторения на калибратора

Както при делта делта C_T метода, се изисква калибратор и измерванията се отнасят към него. Могат да се анализират повторения на калибратора, тъй като ако много позиции са с едно и също име, ще бъдат използвани осреднените точки на отделяне за тези проби. За да използвате правилно тази функция, се уверете, че повторенията са с еднакви имена.



Средната амплификация се използва за пресмятане на експресия. Напр., проба с ниска стойност на амплификация по-дълго време ще достига даден абсолютен брой копия от проба с по-висока стойност. Колоната "Rep. Conc." на прозореца "Comparative Quantitation Results" дава относителната концентрация. Относителната концентрация на всяка проба, сравнена с калибратора, се изчислява от точката на отделяне и реакционната ефективност. Това е изразено научно.

Бележка: Стойността в “Average Amplification” от дясно на \pm дава стандартното отклонение на средната амплификация, след премахване на далечните стойности. Ако тази стойност е голяма, може да има сериозна грешка в изчислените концентрации.

Относителните концентрации се изчисляват от софтуера по следния начин:

1. Точката на отделяне за всяка проба се изчислява от пиковете на втората производна.
2. Изчислява се средното увеличение в грубите данни след 4 цикъла. Това е стойността на амплификация за пробата.
3. Далечните стойности се изключват като шум на фоновата флуоресценция.
4. Останалите амплификации се осредняват. Това е средната амплификация.
5. Средната точка на отделяне се изчислява за всяко повторение на калибратора.
6. Относителната концентрация за пробата е Амплификация^А (Отделяне-калибратор – Отделяне-проба).
7. Резултатът е представен научно в колоната “Rep. Conc.” на прозореца “Comparative Quantitation Results”.

7.6.7 Алелна дискриминация

Алелната дискриминация използва кинетични данни в реално време от 2 или повече канала за генотипиране. За проведане на този анализ изберете “Other” и след това “Allelic Discrimination” в прозореца “Analysis”. При алелна дискриминация не е достатъчно да кликнете два пъти на даден канал, тъй като този анализ използва няколко канала едновременно. За провеждането му дръжте CTRL и кликвайте върху всеки канал за анализ или провлачете мишката над тези канали. След като маркирате каналите, натиснете “Show”. Списъкът ще се

обнови и ще покаже всички канали на една линия с чавка до тях. Това означава, че всички те ще се използват в един анализ. За да премахнете един или повече от тях, кликнете с десен бутон на анализа и изберете “Remove Analysis...”. Тези канали могат да бъдат включени в друга алелна дискриминация. Един канал може да се използва само за един анализ наведнъж.

Reports: Отваря “Allelic Discrimination Analysis” доклада за преглед.

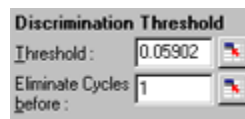
Results: Показва “Allelic Discrimination Results” прозореца. Той се отваря по подразбиране при първоначалното показване на нализа.

Normalization options: Налице са множество опции за оптимизиране на нормализацията:

- Dynamic Tube (динамична нормализация)
- Slope Correct (корекция на наклона)
- Ignore First x cycles (корекция на шума в първите цикли)
- Корекция на точката на отделяне

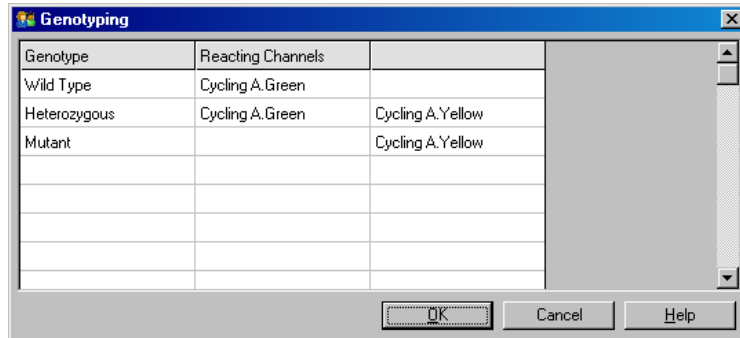
За подробности, виж стр.7-27.

Discrimination Threshold: Въведете стойности за позициониране на прага на дискриминация. Всички криви, преминаващи този праг, се считат за генотипиращи проби. Натиснете иконата от дясно на полето и провлачете прага на графиката, за да настроите ръчно.

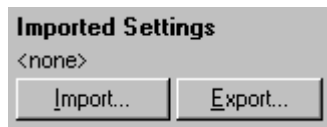


Genotypes: Отваря прозореца “Genotyping”, дефиниращ кой генотип се детектира във всеки канал. Този прозорец позволява отнасянето на генотипове към канали за алелна дискриминация.

В долния пример пробата е хетерозиготна, ако стойностите в канали Cycling A.Green и Cycling A.Yellow пресекат прага.



Allelic analysis templates: Шаблоните за алелен анализ позволяват изнасянето на настройките за нормализация, праг и генотип в общ *.alt файл. Той може да се внесе и използва в други опити. За повече детайли виж Раздел 8.1.



7.6.8 Анализ на корелационната диаграма

Това е метод за генотипиране базиран на относителната експресия на амплификационните графики на 2 канала. Генотипът тук се определя според участъци от корелационната диаграма, а не спрямо

единичен праг. За да проведете този анализ, изберете “Other” и след това “Scatter Graph Analysis” от прозореца “Analysis”.

При анализ на корелационната диаграма не е достатъчно да кликнете два пъти на канал за анализ, тъй като се анализират два канала едновременно. За да проведете този анализ задръжте SHIFT и кликнете за маркиране на каналите или провачете курсора над каналите. След като маркирате каналите, натиснете “Show”.

Списъкът ще се обнови и ще покаже всички канали на една линия с чавка до тях. Това означава, че всички те ще се използват в един анализ. За да премахнете един или повече от тях, кликнете с десен бутон на анализа и изберете “Remove Analysis...”. Тези канали могат да бъдат включени в друг анализ на корелационната диаграма. Един канал може да се използва само за един анализ наведнъж.

Reports: Това показва отчета “Scatter Analysis” за предварителен преглед.

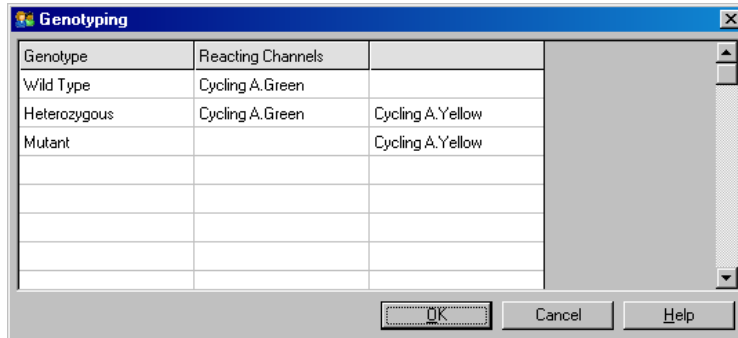
Results: Показва “Scatter Analysis” прозореца. Генотипът за всяка проба се определя от участъците, дефинирани от корелационната диаграма.

Normalization options: Налице са множество опции за оптимизиране на нормализацията на грубите данни:

- Dynamic Tube (dynamic tube normalization)
- Slope Correct (динамична нормализация)
- Ignore First x cycles (корекция на шума в първите цикли)
- Корекция на точката на отделяне

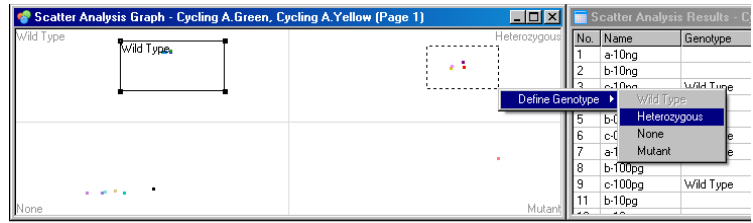
За подробности, виж стр. 7-27.

Genotypes...: Отваря прозореца “Genotyping”, дефиниращ кой генотип се детектира във всеки канал. Тук генотиповете се отнасят на базата на каналите, в които има реакция. Избраните канали ще отбележат ъглите на диаграмата и ще насочват потребителя към приблизителни участъци от нея, които трябва да се дефинират.



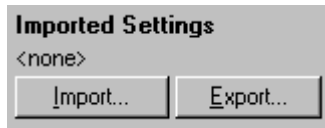
Scatter Graph: Корелационната диаграма показва относителната експресия на 2 избрани канала. Изгледът е нормализиран за отчитане на разликите на повишението във всеки канал и акцентирание върху разликите в експресията между пробите.

За генотипиране потребителят дефинира участъци чрез кликане и влачене върху графиката. Селекцията може да бъде означена според данните от прозореца “Genotyping”.



Scatter graph analysis templates:

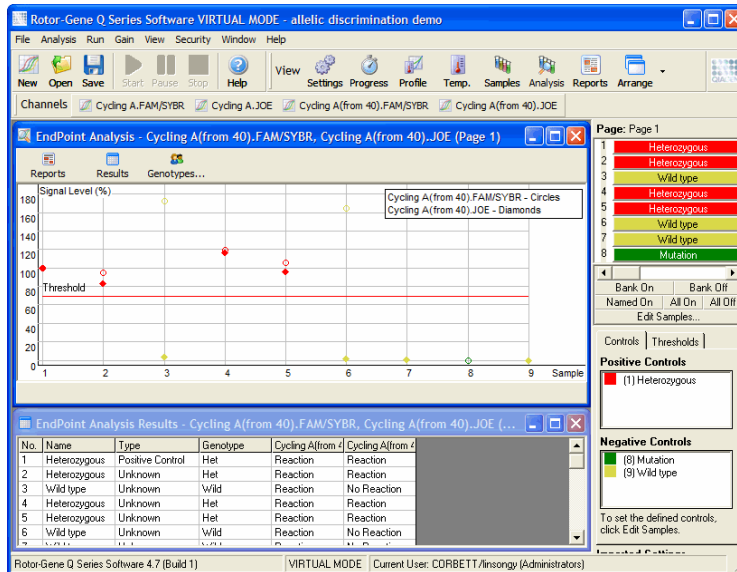
Шаблоните за анализ на диаграмата позволяват изкарване на настройките за генотипа и участъка в общ *.sct файл. Той може да се вкара и използва при други опити. Виж Раздел 8.1 за повече детайли.



7.6.9 EndPoint анализ

EndPoint анализът позволява разграничаване на намножени от ненамножени проби на края на опита. Резултатите са качествени, не количествени.

EndPoint анализът е показан на долното изображение.



EndPoint анализът се доближава до алелната дискриминация по качествените резултати и възможността за задаване на имена на дадени пермутации от реакции в различни канали. При EndPoint анализа, обаче, има само едно отчитане, докато алелната дискриминация отчита на всеки цикъл. Потребителят трябва да посочи положителна и отрицателна контрола, за да улесни анализа. За грубите данни, нивата на сигнала се нормализират спрямо известните контроли за всеки канал. След това потребителят избира процентно сигнално ниво като праг.

Термини при EndPoint анализа

Долу са обяснени някои термини при EndPoint анализа.

Positive control: Проба, чието намножаване е сигурно.

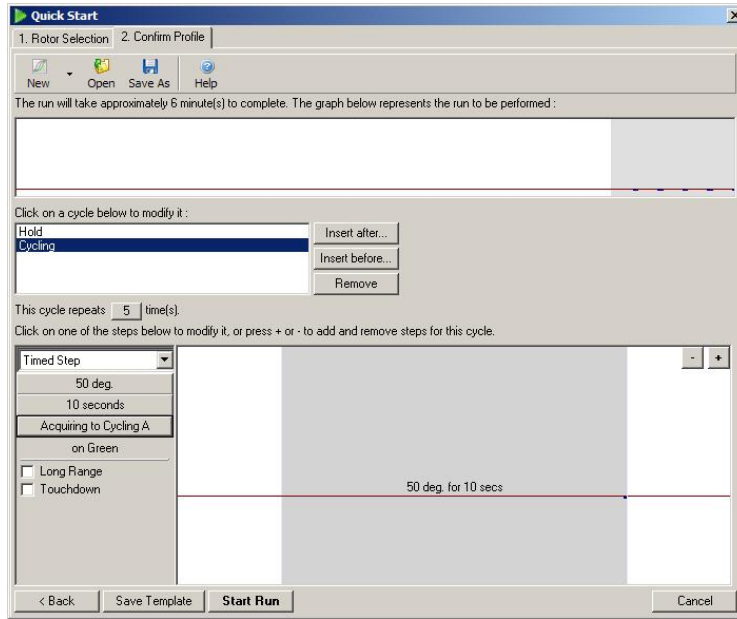
Negative control: Проба, която не би трябвало да се амплифицира. Тя показва типичните фонове нива.

Threshold: Прагът е сигнално ниво, над което пробата е положителна (намножена). Тази настройка трябва да се зададе от потребителя за всеки опит.

Signal level: Процент флуоресцентен сигнал, нормализиран така, че най-силният сигнал на положителните контроли е 100%, а най-ниският сигнал на отрицателната е 0%.

Genotype: Интерпретация на различни реакционни пермутации на различни канали. Например, генотипът „хетрозиготен“ може да бъде отнесен към проби, реагиращи в зеления и жълтия канал. Генотипът може да се използва и за докладване на резултати от реакции в вътрешни контроли. Например, резултатите могат да са “inhibited”, “positive” или “negative” в зависимост от наличието или отсъствието на реакция в дадени канали.

Настройване на профила



За провеждане на EndPoint анализ, създайте профил със задържане при 50°C за няколко минути, а след това цикъл с една стъпка (50°C за 10 секунди), с отчитане на съответния канал. Настройте повторенията на 5, както е показано горе. Тези времена са примерни и може да варират според случая. Колкото повече са повторенията, толкова повече информация има за провеждане на анализа. Той усреднява автоматично всички отчитания до единична стойност. Не се изисква определен брой повторения. Освен ако не се гони много висока точност, 5 повторения са достатъчни.

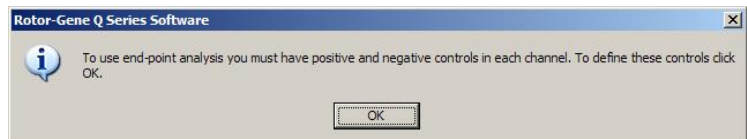
Анализ

EndPoint анализът може да се проведе на множество канали едновременно. За нов анализ кликнете върху раздела "EndPoint", изберете каналите чрез влачене над тях и натиснете "Show".



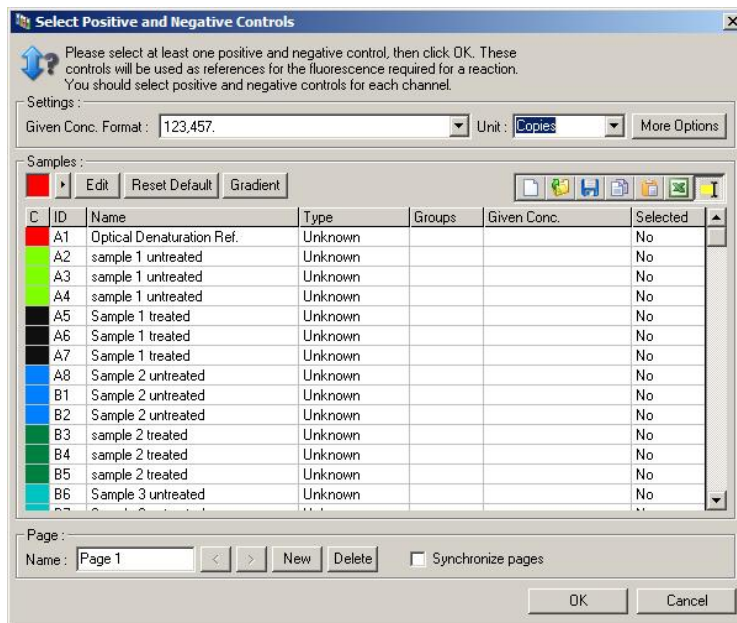
Дефиниране на контролите

При отваряне на When EndPoint анализ за първи път се показва следното съобщение, ако не са дефинирани положителната и отрицателната контроли.



Натиснете “OK”. Появява се прозорецът “Edit Samples”, в който се дефинират контролите. За да дефинирате проба като положителна или отрицателна контрола, кликнете върху клетката за вид на пробата и изберете контролата от падащото меню.

Бележка: Контролите трябва да са отбелязани като “on” в панела отдясно в главния прозорец, за да протече анализът.



Този екран функционира по същия начин като прозореца “Edit Samples” (Раздел 6.1.4).

Нормализация

Нормализацията на данните от EndPoint анализа мащабира всички сигнали в рамките 0–100%. Трябва да са избрани поне една положителна и отрицателна контроли или повече ако се анализират няколко канала и стандартите не са мултиплексни. Трябва да се пуснат по няколко контроли при риск позитивната контрола да не се намножи.

1. За всеки канал се анализират всички позитивни контроли и тази с най-висока флуоресценция се приема за за 100%. Това означава, че при две повторения, една от контролите може да се провали без да навреди на опита.
2. Всички отрицателни контроли се анализират и тази с най-ниска флуоресценция се приема за 0%.

- Грубата флуоресценция на останалите проби се мащабира спрямо най-високата положителна и най-ниската отрицателна контроли.

Например:

Проба	Вид	Флуоресценция
1	Положителна контрола	56.3
2	Положителна контрола	53.0
3	Отрицателна контрола	4.5
4	Отрицателна контрола	4.3
5	Проба	48.1
6	Проба	6.4

Този опит е успешен, тъй като двете положителни и двете отрицателни контроли за близки и са отвъд флуоресценцията на пробите.

Нормализираните стойности са:

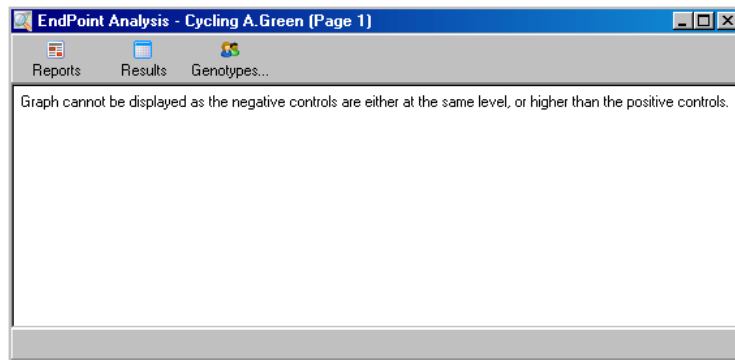
Проба	Вид	Експресия (%)
1	Положителна контрола	100.0
2	Положителна контрола	93.7
3	Отрицателна контрола	0.4
4	Отрицателна контрола	0.0
5	Проба	84.2
6	Проба	4.0

Проба 1 е положителната контрола с най-висока флуоресценция, съответно се приема за 100%. Другата положителна контрола е малко по-ниска. Проба 4, най-ниската отрицателна контрола се приема за 0%. Ясно е, че проба 5 най-вероятно е намножена, докато проба 6 не е.

Бележка: В зависимост от избраните положителна и отрицателна контроли е възможно да се постигнат нива на експресия над 100% и под 0%. Резултат над 100%

може да индикира по-висока експресия на пробата от тази на позитивната контрола. Резултат под 0% означава, че е по-малко вероятно пробата да се е размножила, отколкото негативната контрола да се е размножила. Поради качествения характер на анализа, това не е проблем.

Ако отрицателните контроли дават по-висока флуоресценция от положителните, пробите не са настроени правилно и се появява следното съобщение.



Нормализация в повече канали

Може да се анализират сигнали от повече канали, но подготовката на пробите е по-сложна. EndPoint анализът допуска мултиплекинг, поради което всяка епруветка може да има само една позиция. В момента не е възможно да се анализира разположение, при което една позиция отговаря на положителна контрола в един канал и на отрицателна в друг.

Въпреки, че в прозореца "Edit Samples" се дава само една дефиниция на епруветка, нормализацията става по отделно за всеки канал.

Ако дадена позиция е положителна контрола в поне един канал, тя трябва да е зададена като такава в колона "Type" на прозореца "Edit Samples". Иначе нейният тип трябва да "Sample". Това важи и за отрицателните контроли.

Например, ако дадена проба е положителна контрола в зеления канал, но не и в жълтия, тя пак трябва да е дефинирана като положителна контрола. Тъй като за всеки канал се взима най-високата положителна контрола, ако поне една от тези в жълтия канал се намножи, дефиницията за контрола в зеления канал се игнорира.

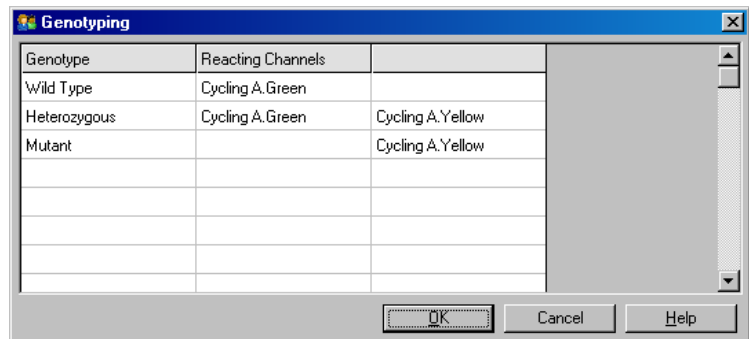
Праг

Прагът се използва за определяне на процента експресия, необходим за реакция във всеки канал. След като контролите са дефинирани, всички канали ще се нормализират в рамките на същата скала от 0-100%. Поради това, само един праг е необходим, дори ако се анализират множество канали.

Кликнете и провлачете праговата линия до стойност между 0 и 100. Прагът не трябва да се прекалено близо до пробите, тъй като това индикира неубедителен опит. Ако разликата между това дадена проба да е обявена като положителна или отрицателна е няколко процента, при повторение на реакцията, пробата може да се появи от другата страна на прага.

Генотипове

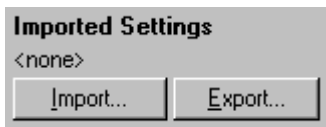
Тази опция отваря прозореца “Genotyping”, където се дефинира кой генотип се детектира във всеки канал.



Този прозорец позволява отнасянето на генотипове към канали. При горния пример пробата е хетерозиготна, ако показанията в канали Cycling A.Green и Cycling A.Yellow преминават прага.

Шаблони за EndPoint анализ

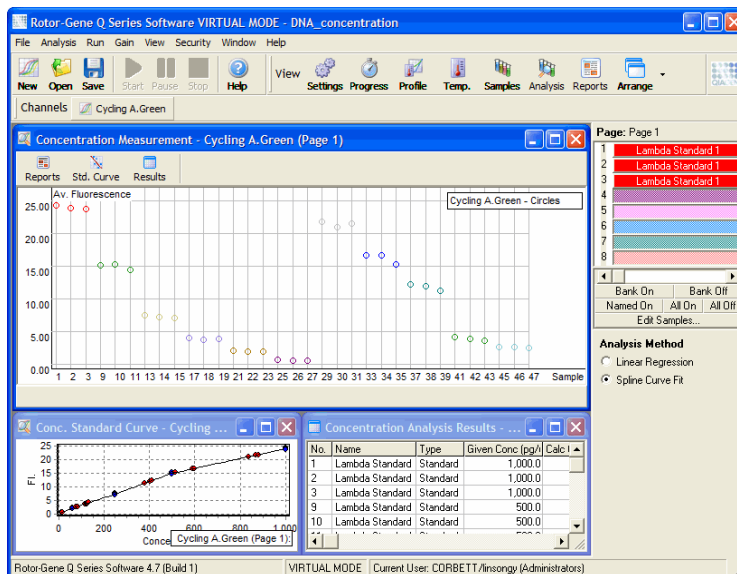
Шаблоните за EndPoint анализ позволяват изнасянето на настройките на генотиповете и прага в общ *.ent файл. Той може да се внесе и използва при други опити. Вижте Раздел 8.1 за повече детайли.



7.6.10 Анализ на концентрацията

Анализът на концентрацията позволява използването на Rotor-Gene Q MDx за измерването на концентрация на ДНК или да придобие показанията на флуорометър.

Долното изображение илюстрира този анализ.



Подготовка на опита

За анализ на концентрации подгответе флуоресцентни стандарти и проби, най-добре в три повторения.

Подготовка на стандартите

За определяне на концентрацията на ДНК за всяка проба се използва стандартна права.

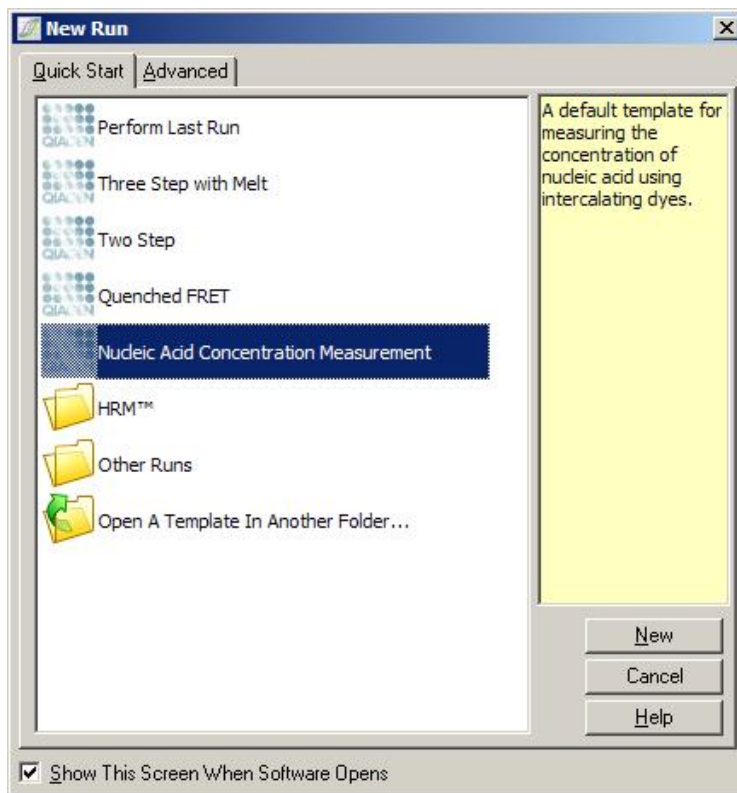
ДНК използвана за стандартната права трябва да е подобна на тази в пробите. Концентрацията на поне една ДНК проба трябва да се определи чрез ултравиолетова спектрофотометрия и тази проба трябва да се използва за стандарт. Минимум 3 стандарта (с повторения) трябва да се използват. ДНК стандартите използвани при флуоресцентна детекция са линейни само в обхвата от 1-100 ng/μl. В тези рамки ако концентрацията на ДНК е наполовина, това се отнася и за флуоресценцията. Доверителните интервали за всяка концентрация извън тази област са много широки, поради нелинейността.

Вид на изследваната ДНК

При измерването на разнообразни форми на ДНК (напр. геномна и плазмидна) се наблюдават разлики. Ето защо, само подобни видове ДНК трябва да се изследват наведнъж и употребата на плазмидна ДНК като стандарт при измерване на геномна ДНК трябва да се избягва.

Настройки на опита

За да настроите опита, изберете “Nucleic Acid Concentration Measurement” от Quick Start интерфейса.



Бележка: Уверете се, че в позиция 1 има положителна контрола като стандарт с висока концентрация. Без положителна контрола софтуерът няма да може да оптимизира увеличението за максимална чувствителност. Това ще се напомня преди всеки опит.

Анализ

Анализът на концентрацията отнася отчетената флуоресценция към концентрация. Налични са два анализни модела. Оптималният анализ зависи от реактивите и приложението.

“Linear Regression” анализира данни чрез допускане на линейна връзка изчисляване на неизвестните на базата на линейния модел. Грешката се определя от отклонението на показанията от линейния модел. Ако

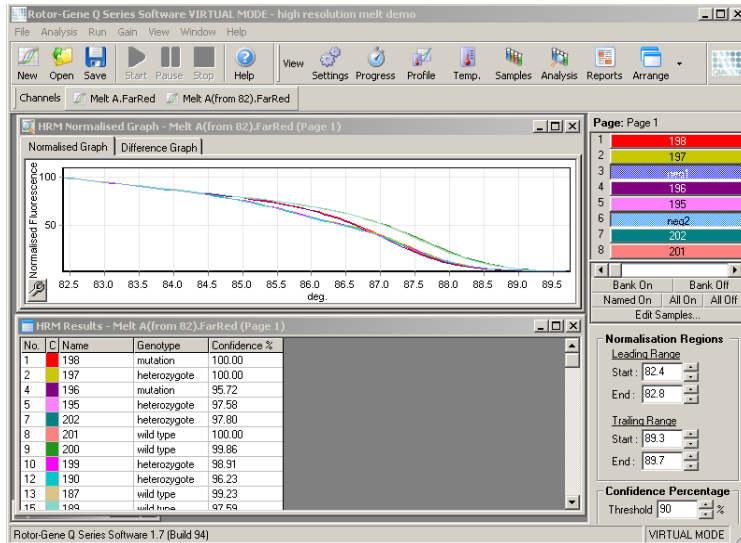
показанията са линейни, това е най-подходящият анализ, тъй като предоставя на потребителя статистически анализ на вариацията (ANOVA).

“Spline Curve Fit” допуска само, че концентрацията нараства с флуоресценцията. Този подход е по-точен за оценка на нелинейни данни, но не може да предостави ANOVA, тъй като не допуска линеен модел.

7.6.11 High Resolution Melt анализ

High resolution melt (HRM) анализът описва пробите на базата на дължина, GC съдържание и комплементарност. HRM анализът се използва при генотипиране, като анализ на генни мутации или SNPs, и епигенетични приложения като анализ на ДНК метилиране. HRM анализът дава точни резултати и спестява разходи от сонди и белязане в сравнение с други методи.

За провеждане на анализа изберете “Other” и след това “High Resolution Melt Analysis” от прозореца “Analysis”. Кликнете два пъти на канала за анализ. Кривите на топене от грубия канал се нормализират чрез осредняване на всички начални и крайни стойности на флуоресценцията и привеждане на крайните стойности на всяка проба към полученото.



Автоматичното извикване се постига чрез кликване върху "Genotypes". Въведете името на генотипа, последвано от номера на пробата, използвана за стандарт, за да извикате непознатите проби автоматично.

The 'HRM Genotypes' dialog box shows a table with 'Genotype' and 'Control' columns. The 'Control' column contains the sample numbers 198, 201, and 197. Below the table are 'Clear', 'OK', 'Cancel', and 'Help' buttons.

Genotype	Control
mutation	198
wild type	201
heterozygote	197

За повече детайли за HRM analysis, виж Раздел 11.

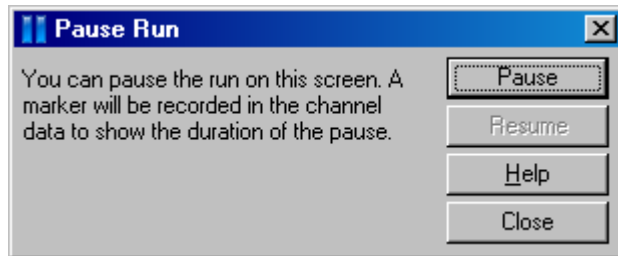
7.7 Меню Run

7.7.1 Стартиране на опит

Тази опция стартира дефинирания температурен профил с текущите настройки на увеличението. Преди началото на опита се появява прозорецът “Profile Run Confirmation”. Показват се графично изображение на температурния профил и настройките на увеличението за всеки канал.

7.7.2 Пауза

Тази опция позволява пауза и продължаване на опита. Това сериозно може да повлияе на резултатите. Поради това, маркер в данните индикира, че опитът е бил спрян и продължителността на паузата. Появява се и съобщение в прозореца “Run Settings” (виж стр. 7.8.1).



ПРЕДУПР



Гореца повърхност

[W18]

При пауза на опита, Rotor-Gene Q MDx няма да се охлади напълно до стайна температура. Внимавайте когато боравите с ротора или епруветките в уреда.

7.7.3 Спиране на опит

Ако тази опция е избрана, ще бъдете попитани за потвърждение за спиране на опита.

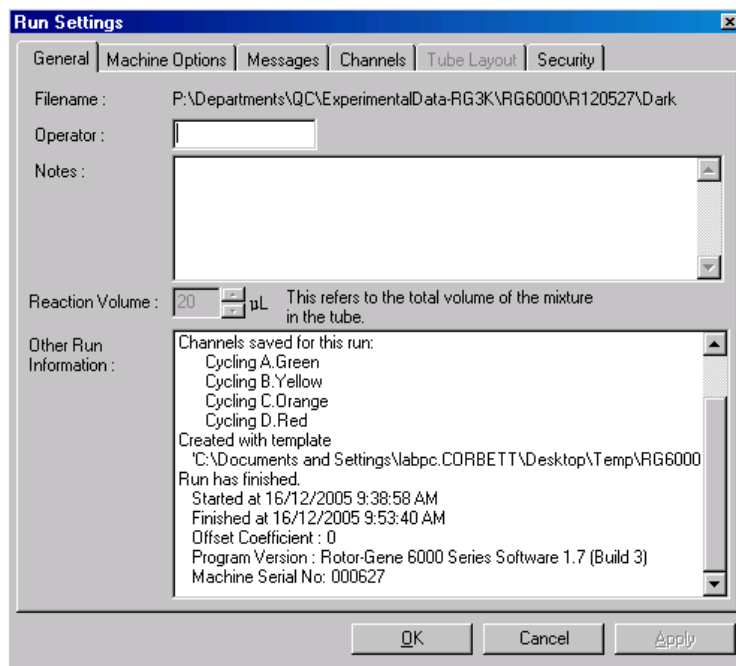
7.8 Меню View

7.8.1 Настройки на опита

Общи

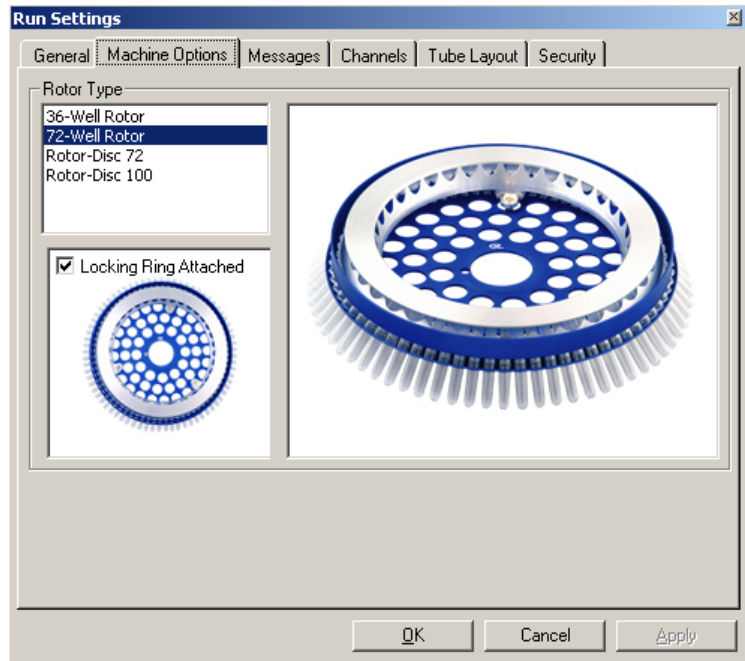
Този прозорец позволява настройката на информация за опита, името на файла, датата на анализ, оператора и всякакви бележки.

Прозорецът съдържа цялата информация, нужна за настройване на опита, освен профила. След края на даден опит, в прозореца се показва следната информация: използвания уред, увеличение, брой на каналите и времето на начало и край.



Опции на уреда

Тази част показва настройките за конфигуриране на Rotor Gene Q MDx.



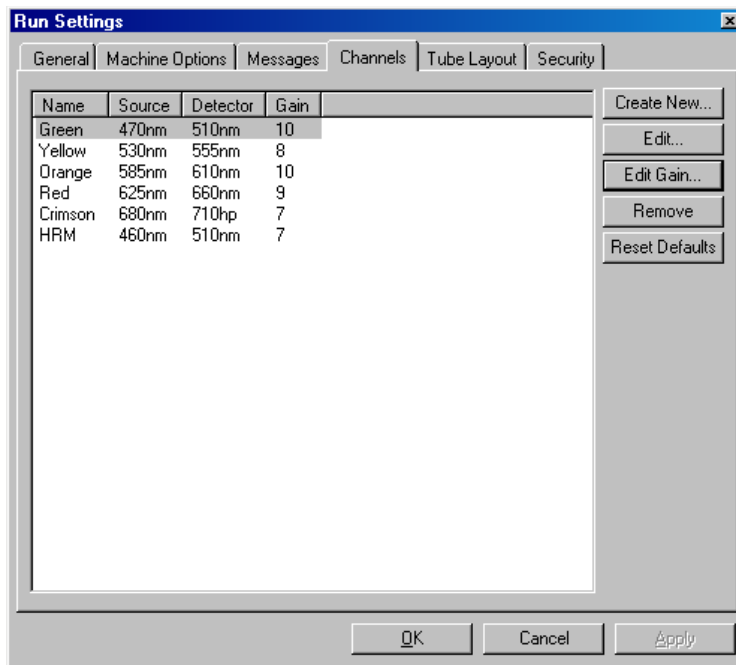
Роторът трябва да се нагласи на този инсталиран в Rotor Gene Q MDx. При отваряне на съществуващ опит, тази настройка ще отрази ротора, инсталиран в по това време.

Съобщения

Тази част показва съобщенията свързани с промени като, пауза или прескачане на цикли по време на опит. То показва и предупрежденията, по време на опита. Тази част трябва да се провери, ако резултати се разминават с очакванията.

Канали

Ако се настрои нов опит, разделът за каналите показва текущата конфигурация на наличните канали. Ако се преглежда съществуващ опит, се дава информация за конфигурацията на каналите, когато се е извършвал опитът. Ако се разместят настройките на канала, те могат да се възстановят чрез кликуване върху бутона "Reset Defaults".



- Name:** Това е името на канала.
- Source:** Задава възбудната дължина на вълната на LED източника.
- Detector:** Задава детекционната на дължината на вълната и вида филтър (nm=band pass, hp=high pass).
- Gain:** Задава увеличението за конкретния канал.
- Create New...:** Позволява създаването на нови канали. Кликването върху "Create New..." отваря прозорец, който иска ново име, източник и детекционен филтър. Филтрите се избират от падащото меню до всеки прозорец.

Channels: Зелен, жълт, оранжев и червен канали са стандартните за 4-канална мултиплексна детекция.

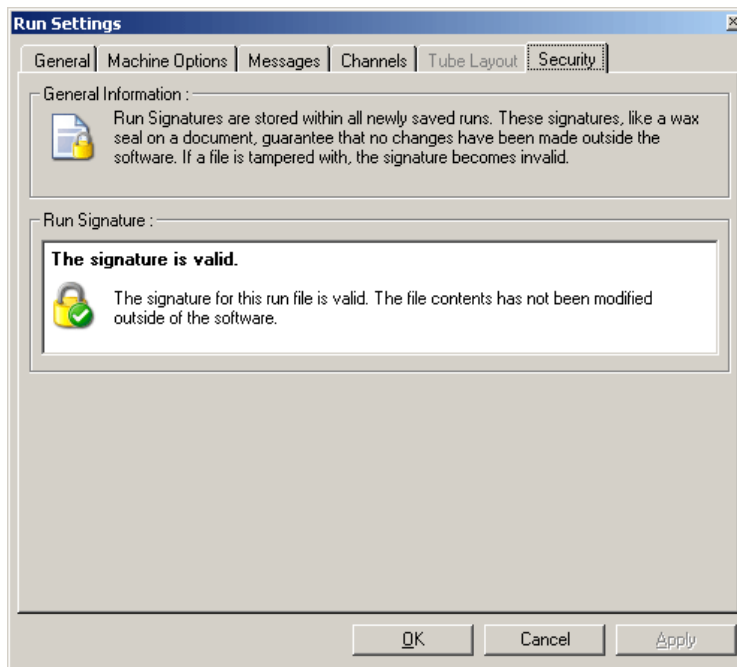
Подреждане на епруветките

Ако използвате 72-ямков ротор, пробите могат да се подредят подобно на 9 x 8 блок. По подразбиране, в този раздел пробите могат да се етикетират последователно (напр., 1, 2, 3...). Това означава, че те са наименовани по реда на поставяне в Rotor-Gene Q MDx. Друг начин за етиктиране може да бъде 1A, 1B, 1C и т.н. Това е удобно, ако образците са пробите се накупват с многоканална пипета.

Сигурност

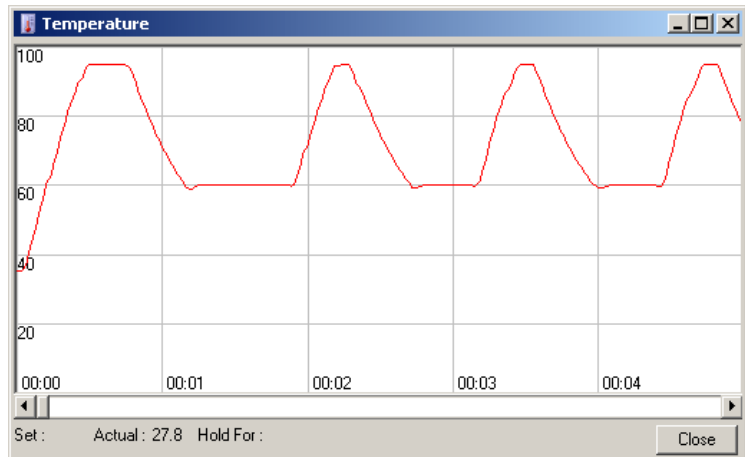
Тук ще намерите информация за сигнатурата на цикопитаъла. Тя е необратим код, който се подновява всеки път, когато файлът се променя. Ако част от файла *.rex се промени извън софтуера, сигнатурата и файлът вече няма да съвпадат. Проверката на сигнатурата е потвърждение, че грубите данни не са модифицирани извън приложението, че профилът не е подменян и че температурната графика е валидна. Сигнатурата предпазва и срещу грешки на файловата система.

Бележка: Ако изпращате *.rex файлове по и-мейл, криптирането може да наруши сигнатурата. За да избегнете това, архивирайте файла.



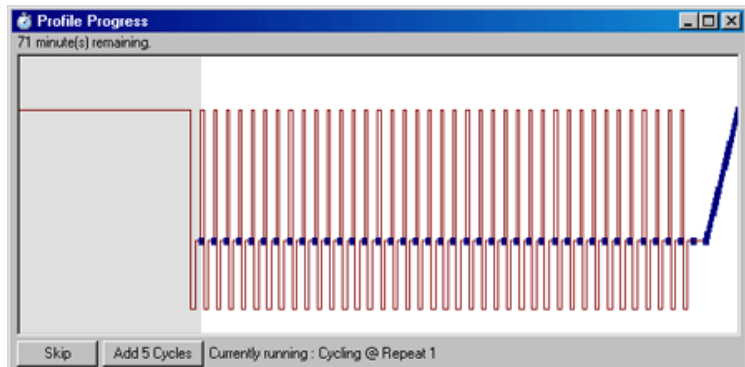
7.8.2 Температурна графика

Изберете “Temperature Graph” от меню “View” или кликнете върху бутона “Temp.”, за да извикате прозореца “Temperature”. Графиката показва температурите по време на циклите. Тя не отразява температурни измервания в реално време. С напредването на опита се виждат “Set”, “Actual” и “Hold” времената за всяка стъпка от програмата. За съществуващ run файл, прозорецът “Temperature” дава температурната история по време на опита. Вертикалната скала показва температура, а хоризонталната – време. Използвайте плъзгача, за да се движите из прозореца “Temperature”.



7.8.3 Прогрес на профила

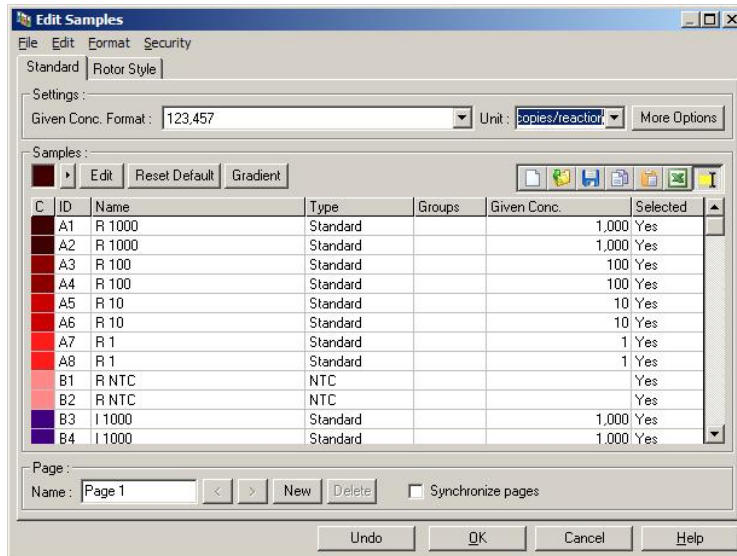
Изберете “Profile Progress” от меню “View” или кликнете върху бутона “Progress”, за да извикате прозореца “Profile Progress”. Той представя графично температурния профил на опита. По време на опит затъмнената част от прозореца показва броя завършили цикли. Има и показание за оставащото време до края на опита.



Skip: “Skip” позволява прескачането на стъпки от цикъла.

Add 5 Cycles: “Add 5 Cycles” добавя 5 повторения към настоящата стъпка на цикъла.

7.8.4 Редактиране на проби

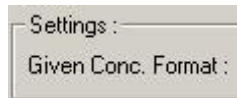


Кликнете върху бутон “Samples”, за да извикате прозореца “Edit Samples”. До него може да се стигне и с кликане с десния бутон върху списъка с проби в дясната част на екрана. Този прозорец е идентичен с прозореца “Edit Samples” от интерфейсите, освен че функциите от лентите с инструменти са налични и от менютата File и Edit.

В горната част на прозореца има черни менюта, File, Edit, Format и Security. Менюто File се използва за създаване на нов (празен) прозорец “Edit Samples”, за отваряне на съществуващ шаблон или за съхранение на имена на проби като шаблони за бъдещо използване. Разширението на тези шаблони е *.smp. Менюто Edit позволява копирането на редове. Менюто Security позволява заключването на пробните дефиниции.

Забележка: Ако имената на пробите са въведени много бързо по време на процеса (напр. с баркод-скенер) това може да доведе до разместени букви в имената на пробите. По тази причина се препоръчва да се избягва

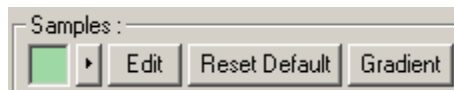
използването на баркод-скенер и ако е възможно имената на пробите да се въвеждат след края на процеса.



Това падащо меню се използва за избиране на подходящ формат за показване на концентрациите. Те се форматират автоматично според избраното място.



Това падащо меню определя единиците за измерване за теста.

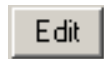


Бутон

Значение

Line style:

Видът на линията може да се промени, за по-добра четимост на графиките на черно-бели принтери. Някои линии могат да се подчертават. За тази функция, кликнете върху бутона с дясна стрелка до бутона Edit.



“Edit” отваря цветовия селектор. Няколко реда могат да се изберат, когато се определя цвят на епруветките.










Натиснете “Reset Default”, за да върнете всички избрани цветни клетки към изходния им цвят.



“Gradient” позволява избирането на градиент от първия до последния цвят. При подготовката на пробите могат да се използват няколко градиента.



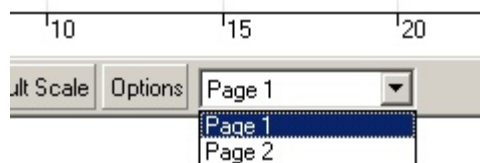
Бутон	Значение
	Иконата "New" изчиства прозореца "Edit Samples" за въвеждане на данни.
	Иконата "Open" извиква диалогова кутия, в която може да бъде избран Rotor-Gene Q MDx файл за вкарване. Бележка: Броят проби в отворения прозорец и вкарвания файл трябва да съвпадат.
	Иконата "Save" извиква диалогова кутия, в която могат да се въведат името и папката, където ще се съхрани копие от текущите пробни дефиниции.
	Иконата "Copy" копира избраните клетки.
	Иконата "Paste" вмъква клетки, избрани с командата Copy в избраната позиция в мрежата.
	Иконата "Excel" извиква диалогова кутия за въвеждане на име и папка, където да се съхрани информацията за пробите. След натискане на "Save", Excel файлът се отваря автоматично.
	Иконата "Append/Overwrite" променя редактирането на клетки в прозореца "Edit Samples". Ако се избере Overwrite, съществуващите данни се презаписват при редактиране. Ако се избере Append, при редактирането новите данни се добавят към съществуващите.

Sample Types: Пробите могат да се дефинират с един от няколко вида, изброени в долната таблица.

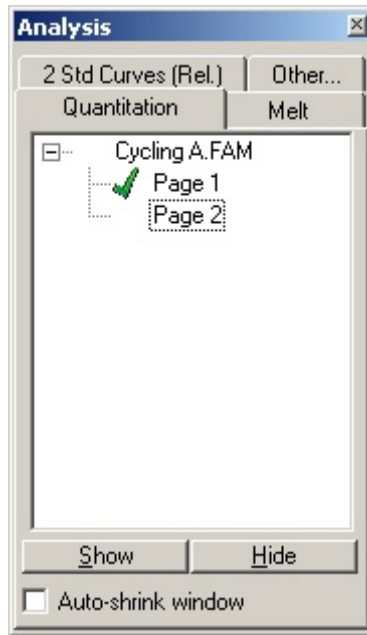
Sample type	Описание
None	Няма проба в тази позиция
NTC	Контрола без матрица
Negative Control	Отрицателна контрола
Positive Control	Положителна контрола
Unknown	Неизвестна проба за анализ
Standard	Стандартните стойности се използват за построяване стандартна крива за изчисляване на неизвестни концентрации
Calibrator (RQ)	На калибратора се дава стойност от 1 и всички други концентрации на проби се смятат спрямо тази проба

Page: Тази функция позволява на потребителя да разполага с различни пробни дефиниции и няколко експеримента в рамките на един опит. Тя е полезна при анализа на различни продукти в различни канали. Използвайте бутоните със стрелки, за да се движите между страниците с пробите. Използвайте бутоните “New” и “Delete”, за да създавате и изтривате страници. Възможно е да имате различни пробни дефиниции за един канал, за създаване на множество стандартни криви без мултиплексинг. Единият канал след това може да се анализира независимо с всеки набор дефиниции. Страниците на могат да се именуваат “Стр. 1”, “Стр. 2” и т.н. или произволно (напр., “Домакия”). Това име се появява в докладите.

При преглед на грубите данни, пробните дефиниции, използвани за показване на данните могат да се изберат от падащото меню до бутона “Options”:

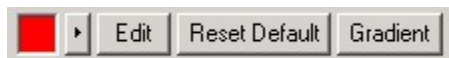


Използваната страница с проби по време на анализ може да се избере в прозореца “Analysis” (виж Раздел 7.6.1).



Given Conc.: Това показва концентрацията за всеки от стандартите. Единиците могат да се определят като десетични или логаритмични. Ако стандартите са серия от разреждания, е необходимо да се въведат само първите 2 стандарта. Чрез натискане на ENTER, програмата автоматично добавя следващото логично разреждане в серията.

Line style: Видът на линията може да се промени, за по-добра четимост на графиките на черно-бели принтери. Някои линии могат да се подчертават. За тази функция, кликнете върху бутона с дясна стрелка до бутона Edit.



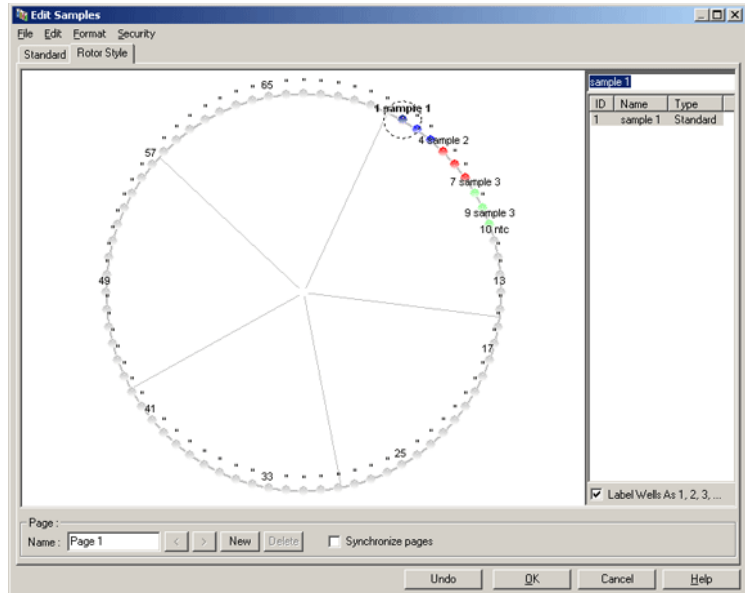
В лентата с инструменти обикновено е посочен стил "Solid". Той може да се промени на "Dashed", "Dotted", "Hairline", "Thin", или "Thick". Когато приключите, натиснете лявата стрелка, за да се върнете към Edit, Reset Default, и Gradient view.



- Multiple row entry:** Ако една и съща информация трябва да се въведе в няколко реда, изберете всички редове и започнете да пишете. Информацията ще бъде въведена във всеки ред. Това работи и при избора на вида проба, цвета или въвеждането на концентрации.
- Sample type hotkey:** За да изберете бързо вида проба, въведете първата му буква. Напр., за да настроите 5 проби за контроли без матрица, ги изберете в една колона и натиснете N за NTC. Всички проби ще бъдат настроени в NTC.
- Save it, reuse it:** Пълно описание на пробата може да се запази като файл (*.smp) и да се зареди за бъдещи опити със същата конфигурация.

Вид ротор

Този раздел в прозореца "Edit Samples" дава алтернатива за въвеждане на имената на пробите. Изберете повторения, като кликнете върху и изтеглите курсора над изображението на ротора. Списъкът от дясно на прозореца ще се обнови. Името на пробата може да се въведе и това ще зададе име за настоящата селекция. Софтуерът разпознава ямките като повторения.

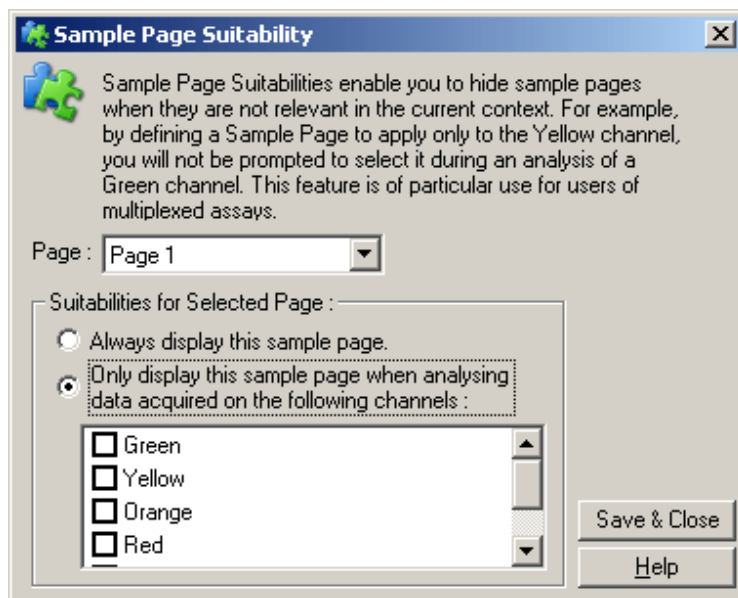


Разделът “Rotor Style” дава скъсена версия на раздела “Standard” и е създаден за бързо да задаване имената и цветовете на пробите. Някои настройки не могат да се дефинират в този раздел, напр. дали пробата представлява стандарт или известна концентрация на всеки стандарт. За тях трябва да се използва стандартния раздел.

Страници с проби

За да отворите прозореца “Sample Page Suitability”, кликнете върху “More Options” в прозореца “Edit Samples” и след това върху “Define Suitabilities”. Прозорецът “Sample Page Suitability” позволява свързването на страници с проби към каналите. Напр., страницата с проби за изследвания ген може да се отнася за зеления канал, а страницата с проби за известния ген може да се отнася за жълтия канал. При този пример, настройването на адекватността на страницата с проби ограничава броя опции за анализ до важните за съответния опит.

Прозорецът “Sample Page Suitability” е показан долу.

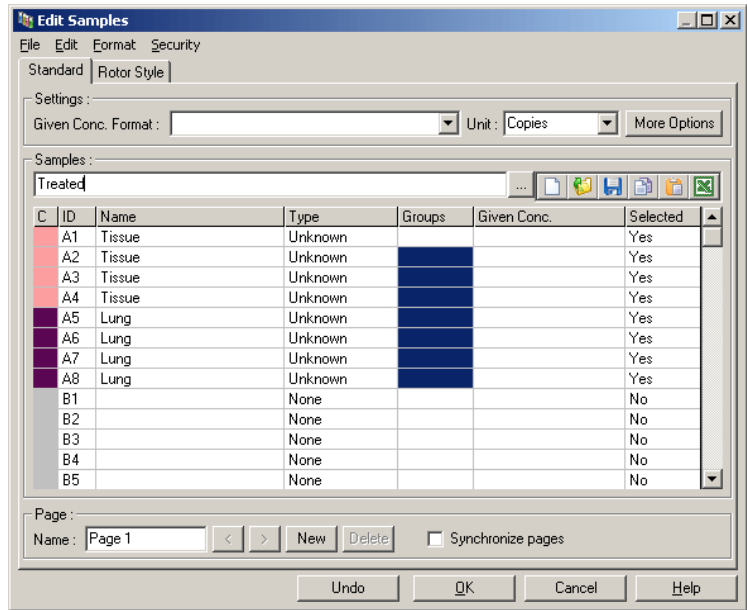


Бележка: Когато настройвате опита, създайте всички страници с проби и адекватността им, и ги запазете като шаблон. Това намалява работата по настройването на всеки опит.

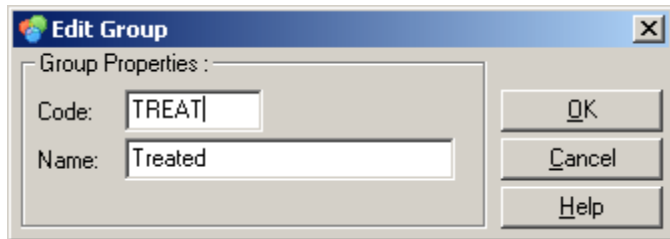
Групи

Групите от проби позволяват изчислението на статистика за група проби. За разлика от повторенията, които трябва да имат идентични имена, пробите могат да имат всякакво име, могат да са разположени навсякъде в ротора и да принадлежат към различни групи.

1. За да дефинирате група, въведете пълното име на групата до пробата и натиснете ENTER.



2. Появява се порзорецът “Edit Group”.

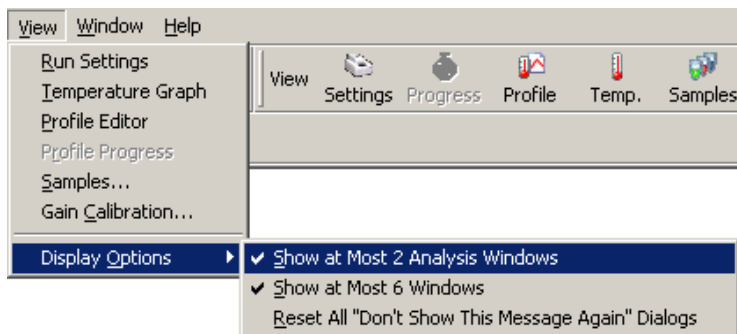


3. Задайте подходящо съкращение и натиснете “OK”. Съкращението може да се използва за настройване на групи. Общите резултати, като средна стойност и 95% доверителни интервали се изчисляват автоматично за групи при анализа.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc [Cop]	Calc Conc [Copie]	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct S/c	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.92				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]	

7.8.5 Опции на изгледа

Менюто за опции на дисплея е показано долу.



Show at Most 2 Analysis Windows: Ако опцията е маркирана, се показват най-много 2 прозореца за анализ. Ако прозорците са повече, може да се наруши четливостта. Маркирането на опцията затваря първия прозорец за анализ и го заменя с последния отворен. Ако опцията не е маркирана, могат да се покажат повече от два прозореца.

Show at Most 6 Windows: За по-добра четимост софтуерът премахва неизползваните прозорци при отваряне на нови. Тази опция е активна поддържа чист екрана на Rotor-Gene Q софтуера. Ако е нужно да видите повече от 6 прозореца едновременно, дезактивирайте опцията.

Reset All “Don't Show This Message Again” Dialogs: При избор, софтуерът ще покаже всички диалогови кутии, където кутийките “Do not display this message again” са маркирани. Те включват съобщения за подозрителни настройки, които по-рано са били скрити. Това може да е полезно за нов потребител, който не е запознат с Rotor-Gene Q MDx или Rotor-Gene Q софтуера.

7.9 Защита на достъпа за софтуера Rotor-Gene Q

Забележка: Тази глава описва защитата на достъпа за софтуера Rotor-Gene Q. Вижте „Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application User Manual“ (Ръководство за потребителя на основното приложение Rotor-Gene AssayManager v1.0) или „Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual“ (Ръководство за потребителя на основното приложение Rotor-Gene AssayManager v2.1) за информация относно съответния софтуер Rotor-Gene AssayManager.

Rotor-Gene Q софтуерът включва функции, които позволяват безопасното му функциониране. Правилно конфигуриран, той може да гарантира следното:

- Достъпът до Rotor-Gene Q MDx или аналитичния софтуер е ограничен по групи
- Модификациите на файловете се записват
- Открива неоторизирани модификации (сигнатури)
- Записване на шаблони за опити
- Предпазване на имената на пробите

Интегриране със сигурността на Windows

С цел голяма проследимост, Rotor-Gene Q софтуерът не управлява сигурността вътрешно. Имена, групи и пароли се управляват чрез вграден модел на Windows (Windows NT Security). Интеграцията позволява

паролата, която дава достъп до мрежови файлове и програми да контролира достъпа и до Rotor-Gene Q софтуера, което редуцира администрацията. В големи организации, например, мрежовите администратори лесно могат да прекратят достъпа на бивши потребители чрез централизираната сигурност.

Ето защо, сигурността на Rotor-Gene Q софтуера е свързана основно с настройване на сигурността на Windows съгласно най-добрите практики.

Предпоставки

За да използвате функциите за сигурност е необходим Windows 10 или Windows 7 Professional edition. Функциите за сигурност не може да се използват с Windows 10 или Windows 7 Home edition, тъй като Home edition не притежава прецизирания модел на достъп, използван от софтуера. Софтуерът трябва да е инсталиран с опцията „Force authentication through Windows domain“ (Принудително удостоверяване през домейн на Windows).

Бележка: Менюто Сигурност няма да се появи, ако сте се свързали през домейн на Linux Samba. Трябва сте с локална връзка или сървър на Windows, за да използвате функциите за сигурност.

7.9.1 Настройки за Windows 7

Този раздел описва как да се настрои системата така, че Rotor Gene Q софтуерът да работи сигурно.

За да използвате функциите за сигурност, софтуерът трябва да се инсталира през опцията “Force authentication through Windows domain”. Това подготвя домейна на Windows за нивото на достъп и е важно за осигуряване на проследимостта и безопасността.

Работа като администратор

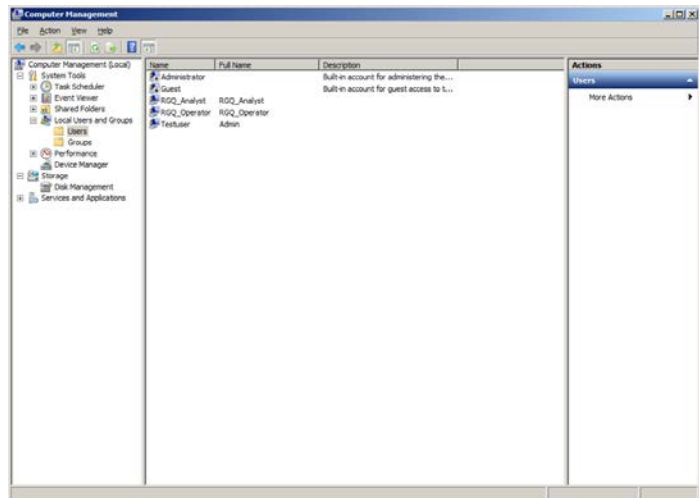
Много потребители работят на компютрите си като администратори, без парола. Това може и да е удобно,

но е невъзможно да се определи кой използва компютъра. Това премахва проследимостта и предотвратява активирането на много от функциите за сигурност на Rotor-Gene Q софтуера. При работа като администратор, всички софтуерни функции са активирани. Това означава, че всички потребители, които не се нуждаят от функции за сигурност имат достъп до всички софтуерни функции.

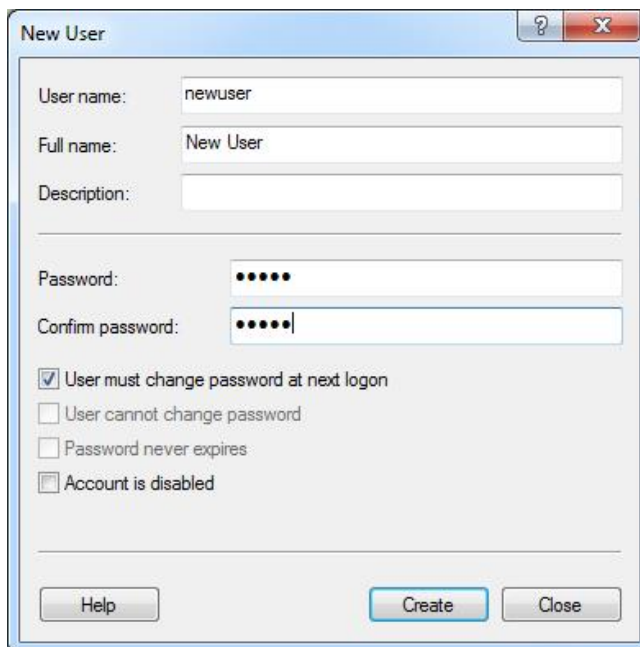
Създаване на нов потребителски акаунт

Създайте потребителски профили за всеки потребител на софтуера. Повторете следните стъпки, докато създадете всички профили.

1. За да създадете нов потребител, изберете “Start/Control Panel/Administrative Tools/Computer Management” (Старт/Контролен панел/Административни инструменти/Мениджмънт на компютъра) и стигнете по менютата до "Local Users and Groups" (Местни потребители и групи) в ляво.
2. В излезлия прозорец, изберете папката “Users”. Кликнете с десния бутон върху десния прозорец и изберете “New User”.



3. Въведете име и парола. По подразбиране, потребителят ще бъде с обикновени правила на достъп. Това означава, че ще може да работи със софтуера, но не и да инсталира нови програми и да променят системните настройки.



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

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

Buttons at the bottom: Help, Create, Close.

4. Кликнете върху "Create". Сега можете да влезете като този потребител.

Определяне на роли на всеки потребител

Сега трябва да определите роли за всеки потребител. Достъпът се разделя на следните зони:

- Rotor-Gene Q Operator (Оператор на Rotor-Gene Q) — може да изпълнява опити, но не и да създава доклади или да прави анализи
- Rotor-Gene Q Analyst (Анализатор в Rotor-Gene Q) — може да анализира данните и да създава доклади, но не изпълнява опити

- Rotor-Gene Q Operator and Analyst (Оператор и анализатор в Rotor-Gene Q) — може да изпълнява и двете роли
- Administrator (Администратор) — може да отключва имената на пробите и да изпълнява всички операции на Анализатора и Оператора
- None (Нищо) — достъп до софтуеъра е отказан

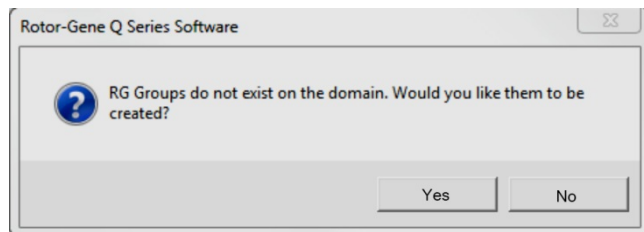
За определяне на роли:

1. Влезте в Windows като администратор или използвайте иконата “Rotor-Gene Q Software Login”, за да отворите софтуеъра и да влезете.



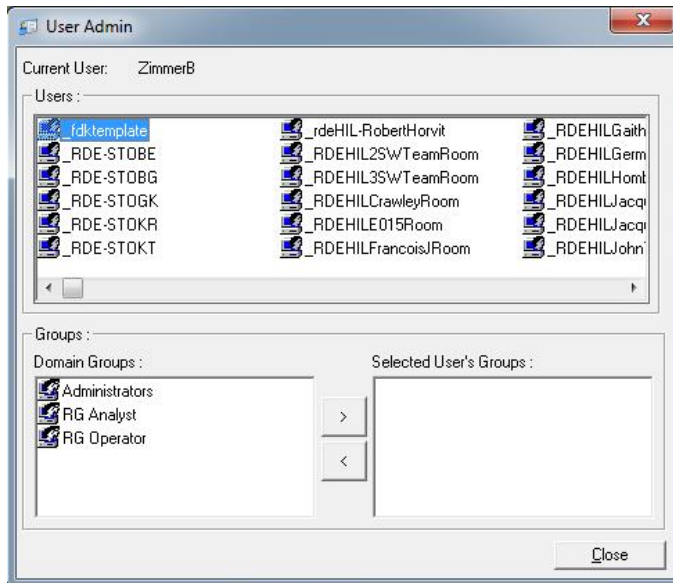
Забележка: За да създадете RG групите със софтуера Rotor-Gene Q е необходимо да работите със софтуера с администраторски права. Това се прави като щракнете с десен бутон на мишката върху иконата на дисктопа и изберете “Run as administrator” в контекстното меню.

2. След отварянето на софтуера, кликнете върху меню “Security”. При неговото първо активиране, Rotor-Gene Q софтуерът конфигурира няколко системни групи, които контролират достъпа до софтуеъра.

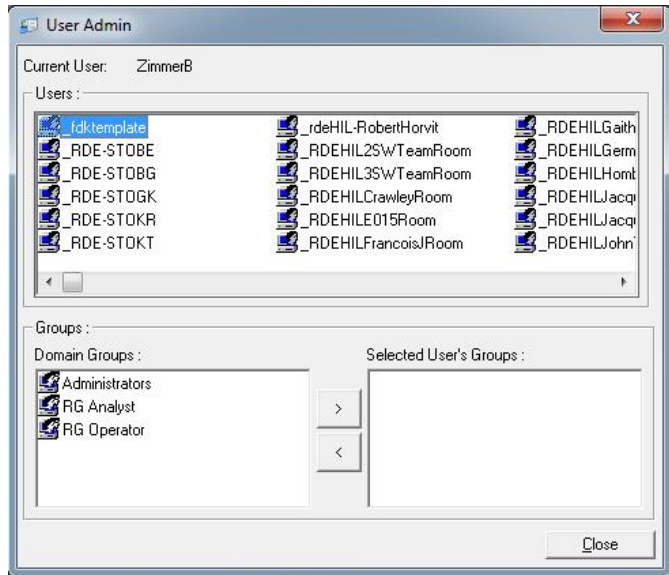


3. Кликнете върху “Yes”. Прозорецът “User Admin” се появява. В горния панел се появяват всички потребители. Някои акаунти се използват от

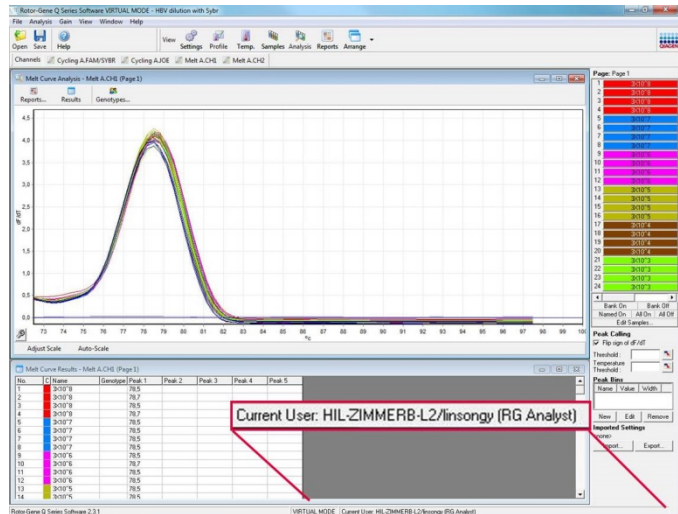
системата и затова ще бъдат непознати. Долният панел показва групите, които са определени за потребителя.



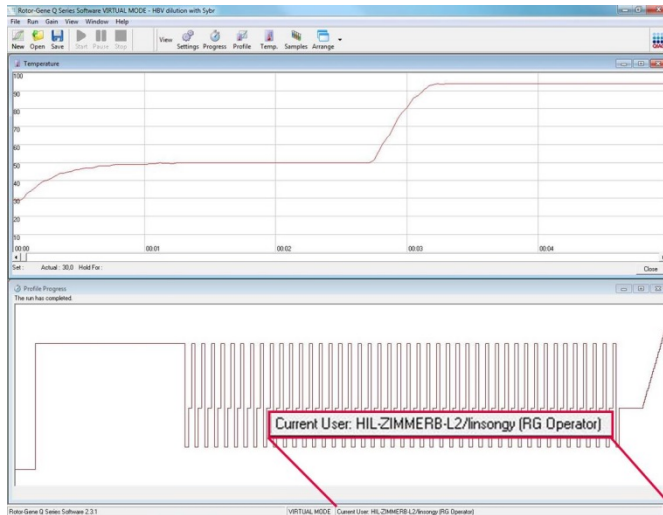
4. За да определите дадена група към потребител, изберете името на потребителя от списъка. Долният панел ще се обнови. Ако потребителят няма групи, той не може да стартира софтуера. В долния пример, за потребителя "linsongy" сме определили групата RG Analyst group чрез избиране на групата от лявата страна и натискане на бутона ">". Групите могат да се премахват, като се изберат и след това се натисне бутона "<".



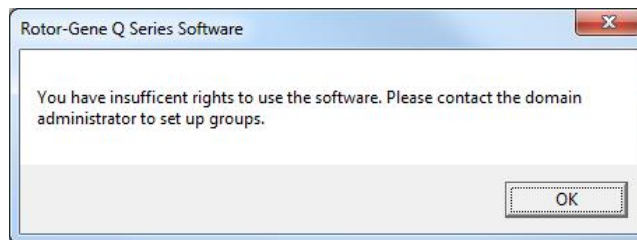
5. Сега се свържете като този потребител. Като RG Анализатор, менюто Run и бутона "Profile" не са достъпни. Съществуващите файлове, обаче, могат да се отварят и анализират, както е показано на изображението. Лентата със статуса показва, че потребителят "linsongy" е RG Анализатор.



- След като се свържете като администратор отново, Като влезете в системата отново като администратор, права за RG оператор могат да бъдат дадени на "linsongy" и правата за RG анализатор могат да бъдат отменени отново. След това, софтуерът трябва да се стартира отново. Лентата за статуса показва, че потребителят "linsongy" принадлежи към групата на RG Оператор.



- Ако се свържете като администратор и премахнете всички групи от потребител "linsongy", следното съобщение ще се появи, когато "linsongy" стартира софтуера.



7.9.2 Конфигурация за Windows 10

Този раздел описва как да настроите системата да изпълнява софтуера Rotor Gene Q по сигурен начин. За да използвате функциите за сигурност, софтуерът трябва да е инсталиран с опцията „Force authentication through Windows domain“ (Принудително удостоверяване през домейн на Windows). Това заявява използване на домейна на Windows за вашето ниво на достъп и идентификационни данни и има решаващо значение за предоставяне на функции за отчетност и сигурност.

Работа като администратор

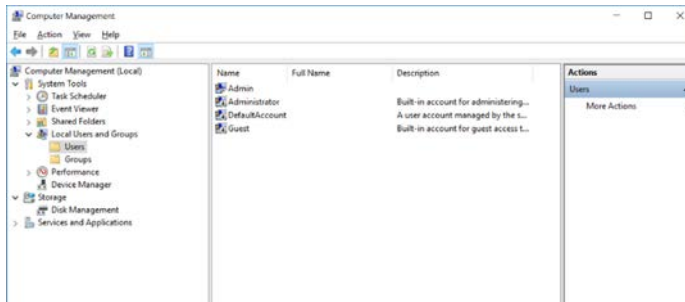
Много потребители работят на компютрите си като администратори, без парола. Това може и да е удобно, но е невъзможно да се определи кой използва компютъра. Това премахва проследимостта и предотвратява активирането на много от функциите за сигурност на Rotor-Genе Q софтуера.

При работа като администратор, всички софтуерни функции са активирани. Това означава, че всички потребители, които не се нуждаят от функции за сигурност имат достъп до всички софтуерни функции.

Създаване на нов потребителски профил

Създайте потребителски профили за всеки потребител на софтуера. Повторете следните стъпки, докато създадете всички профили.

1. За да създадете нов потребител, изберете „Start“ (Старт), въведете „Computer Management“ (Управление на компютъра), натиснете „Enter“ и се придвижете до „Local Users and Groups“ (Локални потребители и групи) отляво.
2. В показалия се прозорец изберете папката „Users“ (Потребители). Щракнете с десния бутон върху десния прозорец и изберете „New User...“ (Нов потребител...).



3. Въведете потребителско име и парола. По подразбиране потребителите се създават с нормални права на достъп. Това означава, че могат да изпълняват софтуера, но не и да инсталират нови програми или да променят системни настройки.

New User

User name: newuser

Full name: New User

Description:

Password: ●●●●●●

Confirm password: ●●●●●●

User must change password at next logon

User cannot change password

Password never expires

Account is disabled

Help Create Close

4. Щракнете върху „Create“ (Създаване). Вече може да влезете като този потребител.

Присвояване на роли към всеки потребител

Сега трябва да присвоите роли към всеки потребител. Достъпът се разделя на следните зони:

- Rotor-Gene Q Operator (Оператор на Rotor-Gene Q) – може да изпълнява цикли, но не може да изготвя отчети или да провежда анализи
- Rotor-Gene Q Analyst (Анализатор в Rotor-Gene Q) – може да анализира данни от цикли и да изготвя отчети, но не може да изпълнява нови цикли
- Rotor-Gene Q Operator and Analyst (Оператор и анализатор в Rotor-Gene Q) – има възможностите и на двете роли
- Administrator (Администратор) – може да отключва имена на проби и да извършва всички операции на анализаторите и операторите
- None (Нищо) – достъпът до софтуера е забранен

Забележка: В Microsoft Windows 10 не може да създавате потребителски групи със софтуера Rotor-Gene Q. Създаването на групи, както и присвояването на потребители към конкретна група, трябва да става в домейна от администратор на домейна. Менюто Run (Опит) е активно. Лентата на състоянието показва, че потребителят „linsongy“ принадлежи към групата RG Operator (Оператор на RG).

7.9.3

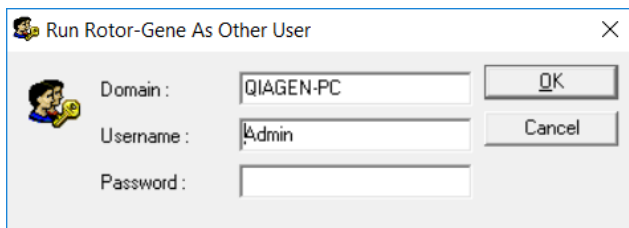
Няколко потребителя на един компютър

За използване на Rotor-Gene Q софтуера от няколко потребителя, създайте акаунт, който няма достъп до софтуера. Влезте в Windows, чрез този акаунт така, че потребителите да не могат да използват анонимно Rotor-Gene Q MDx.

1. Чрез иконата “Rotor-Gene Q Software Login”, потребителите могат да отворят акаунтите си в Rotor-Gene Q софтуера.



2. Въведете потребителското име и паролата (задължително) в прозореца, който се появява.



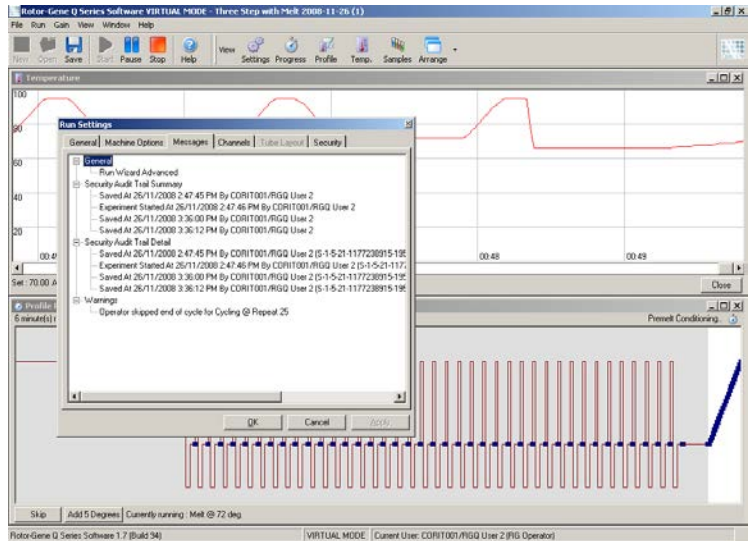
3. Домейнът е или компютъра, на който се логвате, или името на вашата локална мрежа, заедно с името на хоста. Ако не сте сигурни кой домейн трябва да въведете, се обърнете към мрежовия администратор.

Бележка: След като се свържете, всички потребителски файлове ще са достъпни за този потребител. Всеки потребител може да запази файлове в собствената си зона. Това гарантира високо ниво на сигурност.

Бележка: Всеки потребител трябва да се изключва след завършване на опита си, за да не могат други потребители да извършват опит от негово име.

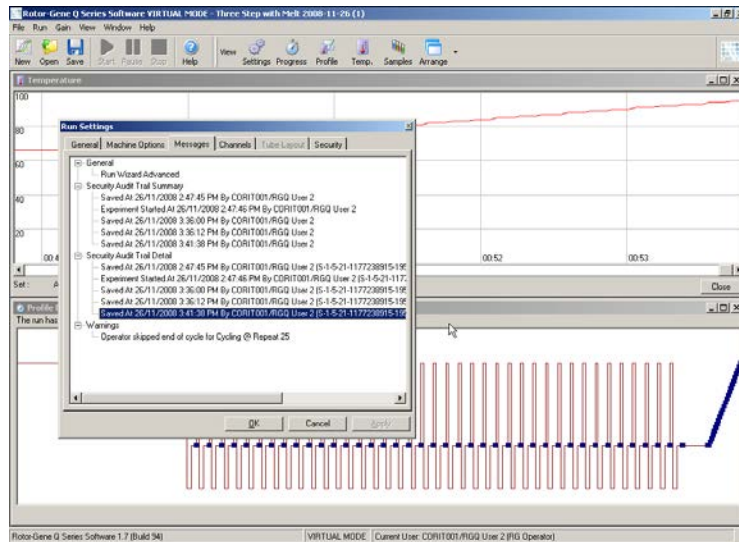
7.9.4 Audit следи

Винаги когато потребител запазва файл, детайлите се запомнят в "Run Settings", в раздела "Messages" като Security Audit Trail Summary и Security Audit Trail Detail.



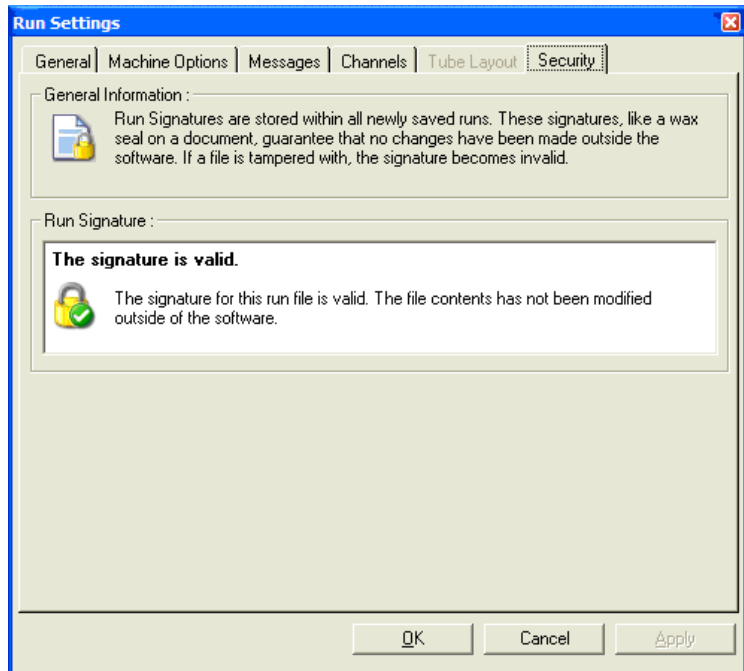
По този начин може да се провери кой е променял съдържанието на даден файл. Security Audit Trail Detail съдържа повече детайли, като уникалния идентификатор на потребителя. Той е важен, за да се избегне създаването на акаунт със същото име на друг компютър и представянето за друг човек. В този случай, името ще е същото, но идентификаторите ще бъдат различни.

Идентификаторът за акаунт CORIT001/RGQ потребител 2, S-1-5-21-1177238915-195, е показан в детайлите.

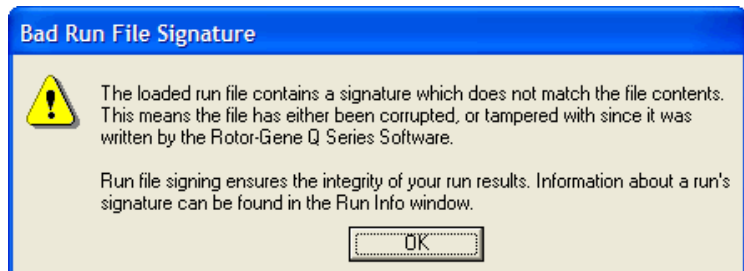


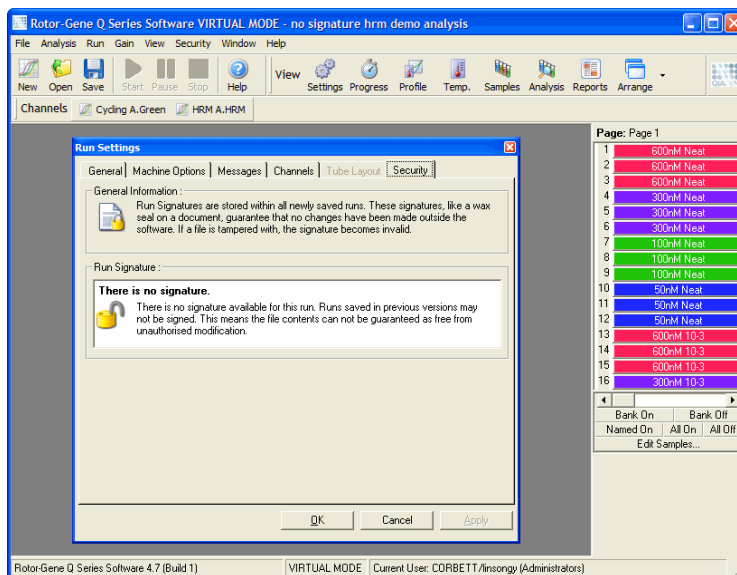
7.9.5 Сигнатури

Проверката се запазва в Rotor-Gene Q run-файла. За да се избегнат нежелани модификации по тези файлове, те трябва да се пазят на сигурно място, достъпно само за определени Windows потребители. Ако, обаче, файловете се съхраняват в споделена зона, сигнатурите осигуряват допълнителна сигурност. Екранът показва раздела “Security” в Run Settings за файл със Сигнатура на опита.



Сигнатурата е дълга дума, която се генерира при всяко запазване на файла и е свързана със съдържанието му. Например, сигнатурата на този файл е 517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081. Ако файлът се отвори в Notepad и се редактира (напр. датата се смени с три дни по-рано), следното съобщение се появява при отваряне на файла.





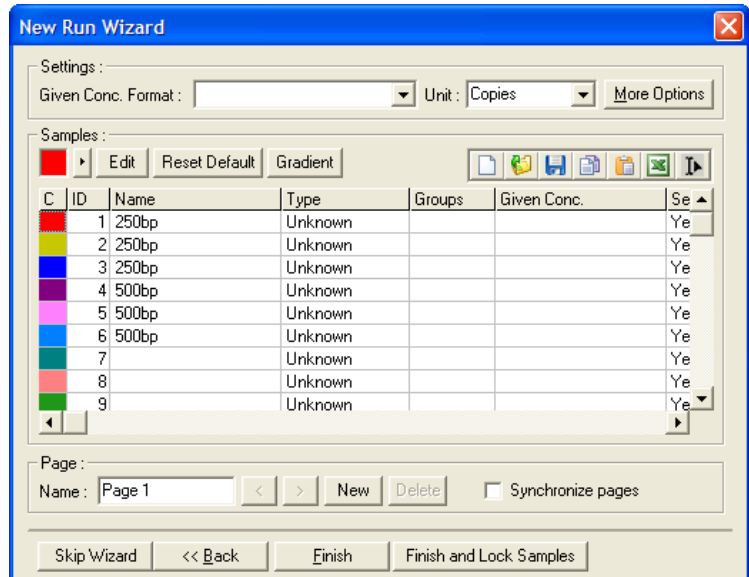
Бележка: Ако файловете се изпращат по и-мейл, сигнатурата може да се наруши. За да избегнете това, архивирайте файла.

7.9.6 Заклучване на проби

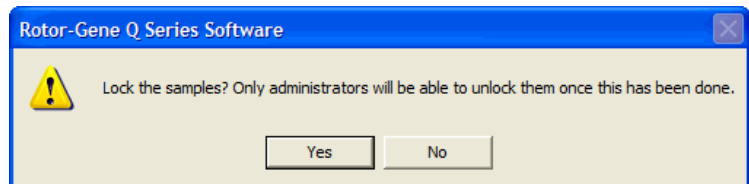
Важно е имената на пробите да не се променят случайно или нарочно, след като потребител стартира опит. Затова, Rotor-Gene Q софтуерът осигурява пробно заключване. Имената на пробите могат да се заключат от всеки потребител, но се отключват само от администратор. Потребители, които работят на компютрите си в режим на администратор, тази опция не е толкова полезна. За да я използвате, компютърът трябва да е конфигуриран сигурно, както е описано в предходните раздели.

Бележка: Ако желаете да заключите проби, не работете със софтуера като администратор. Създайте акаунт като Оператор или Анализатор, и пазете административната парола в тайна. Отключването на файлове ще изисква оторизация от администратора.

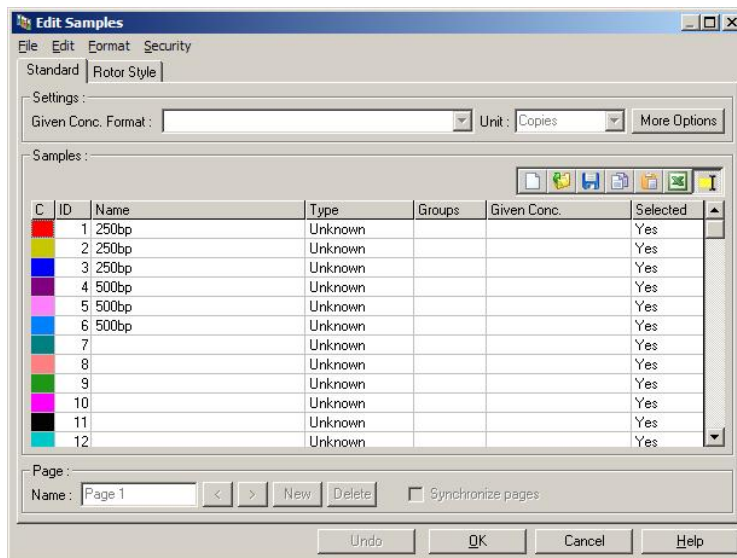
Пробите могат да се заключат преди започването на опит чрез Advanced интерфейса, като кликнете върху “Finish and Lock Samples”.



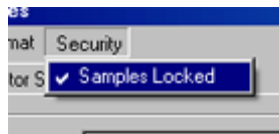
Появява се следното предупреждение. Натиснете “Yes”, за да потвърдите.



След като пробите са заключени, няма да е възможно тяхното редактиране в прозореца “Edit Samples”.



Образци могат да се отключват/заклучват и в прозореца “Edit Samples”. Но само администратор може да отключва вече заключени проби.

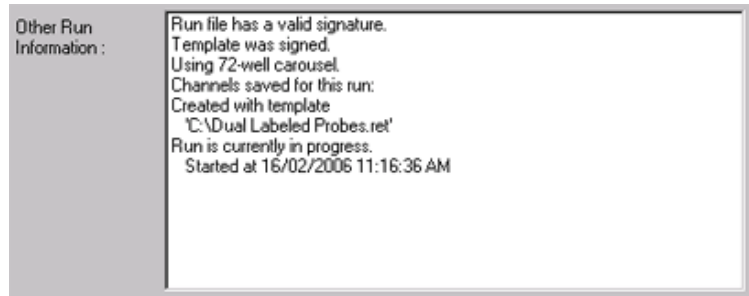


Всяка неоторизирана промяна на файла ще направи Сигнатурата на опита невалидна.

7.9.7 Заклучени шаблони

В момента не е възможно създаването на заключени шаблони (read-only) чрез Rotor-Gene Q софтуера. Но, ако е нужно, може да се зададе изискване всички опити да се изпълняват по определен шаблонен файл. За да се гарантира достъп само за четене до този шаблон, той трябва да се запази на мрежови драйв, където потребителите не могат да модифицират данни. Потребителите могат да работят и да модифицират собствените си профили, докато шаблонът е защитен. За да се проследи кой шаблон е използван, Rotor-Gene Q софтуерът запазва името на шаблонния файл, който

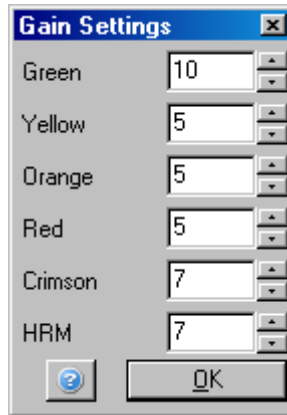
е работил. Тази информация може да бъде изведена от бутона “Settings”, който извиква прозореца “Run Settings”. Информацията за шаблона се съхранява в “Other Run Information”.



7.10 Меню Gain

Кликнете върху менюто Gain, за да видите “Gain Settings” за текущия опит. Това настройва увеличението на канала преди опит. Настройките на увеличението са запазени от последния опит. Те могат да се променят, ако опитът не е започнал или е в начален стадий. Използвайте стрелките нагоре/надолу, до всяко текстово поле, за да промените полетата. След това натиснете “OK”.

Увеличението може да се променя по време на първите цикли. Червена линия ще се появи в съответния канал, където е променено увеличението. Циклите преди промяната ще бъдат изключени от анализа.



7.11 Меню Window

Това меню позволява подреждане на прозорците вертикално, хоризонтално или в каскада. Стрелката от дясно на бутона “Arrange” дава повече опции.

7.12 Функция Help

Когато използвате бутона Help или менюто Help се отваря следното падащо меню.

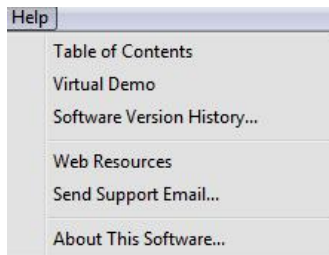


Table of Contents Това дава достъп до функцията Help.

Virtual Demo Това е връзка с уебсайта QIAGEN с интерактивна демонстрация на софтуера.

Software Version History...	Дава кратък преглед на новите характеристики, добавени след пускане на предходно инсталирания софтуер.
Web Resources	Отваря уебсайта на QIAGEN в нов браузър прозорец, където има ценна информация за уредите Rotor-Gene Q MDx и съответните реагенти.
About This Software...	Дава информация за свързаната машина, серийния номер на Rotor-Gene Q MDx и софтуерната версия.

7.12.1 **Send Support E-Mail**

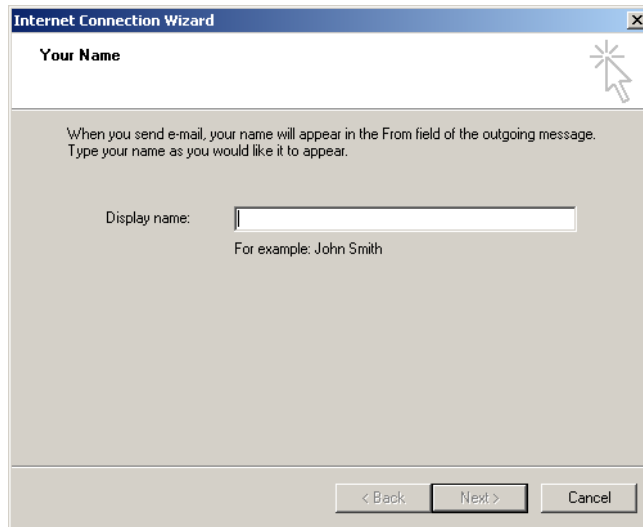
Опцията Send Support Email в менюто Help позволява да изпратите и-мейл на QIAGEN, което включва цялата важна информация от даден опит. Опцията "Save As" ще запази цялата информация във файл, който можете да копирате върху диск или в мрежа, ако нямате достъп до електронна поща на компютъра, свързан с Rotor-Gene Q MDx.

Ако използвате спомагателната имейл функция върху лаптоп компютърът предоставян по желание с Rotor-Gene Q MDx (в зависимост от държавата) за първи път, трябва да конфигурирате настройките на имейла.

Забележка: Можете да използвате данните въведени от IT мениджера на компанията.

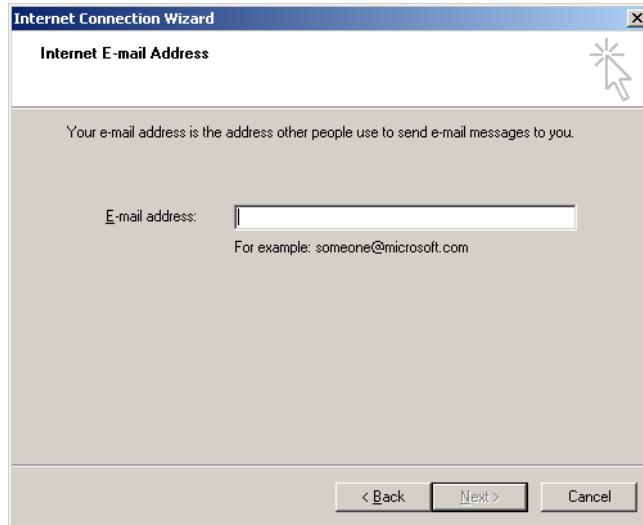
Конфигуриране на имейл настройки

1. Щракнете върху опцията "Send Support Email...". Отваря се следният прозорец.



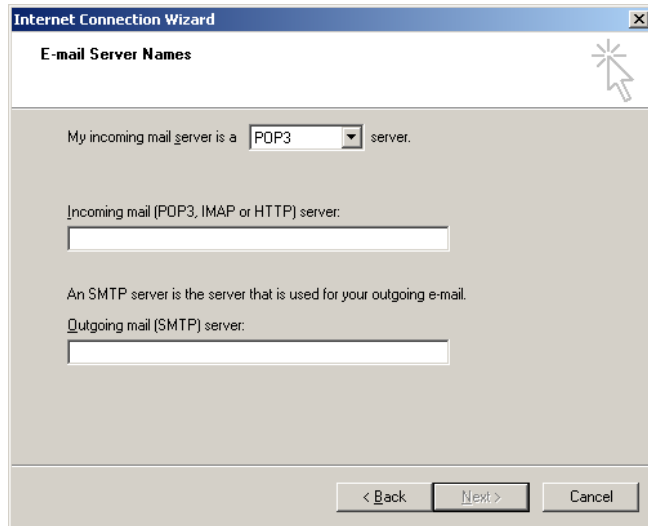
The screenshot shows a window titled "Internet Connection Wizard" with a close button (X) in the top right corner. The main heading is "Your Name". Below the heading, there is a mouse cursor icon. The text reads: "When you send e-mail, your name will appear in the From field of the outgoing message. Type your name as you would like it to appear." Below this text is a label "Display name:" followed by a text input field. Underneath the input field, it says "For example: John Smith". At the bottom of the window, there are three buttons: "< Back", "Next >", and "Cancel".

2. Напишете Вашето име и щракнете върху "Next". Отваря се прозорецът "Internet E-mail Address".

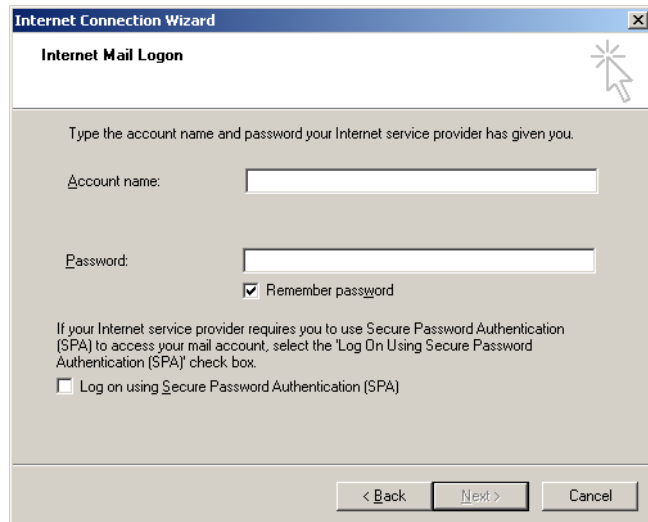


The screenshot shows a window titled "Internet Connection Wizard" with a close button (X) in the top right corner. The main heading is "Internet E-mail Address". Below the heading, there is a mouse cursor icon. The text reads: "Your e-mail address is the address other people use to send e-mail messages to you." Below this text is a label "E-mail address:" followed by a text input field. Underneath the input field, it says "For example: someone@microsoft.com". At the bottom of the window, there are three buttons: "< Back", "Next >", and "Cancel".

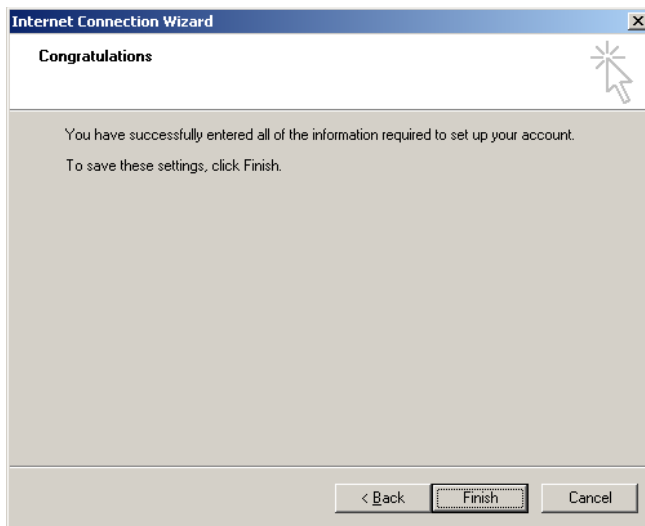
3. Напишете Вашия имейл адрес и натиснете "Next". Отваря се прозорецът "E-mail Server Names".



4. Изберете вида сървър за входяща поща и определете имената на сървърите за входящи и изходящи имейли. След това натиснете “Next”. Отваря се прозорецът “Internet Mail Logon”.



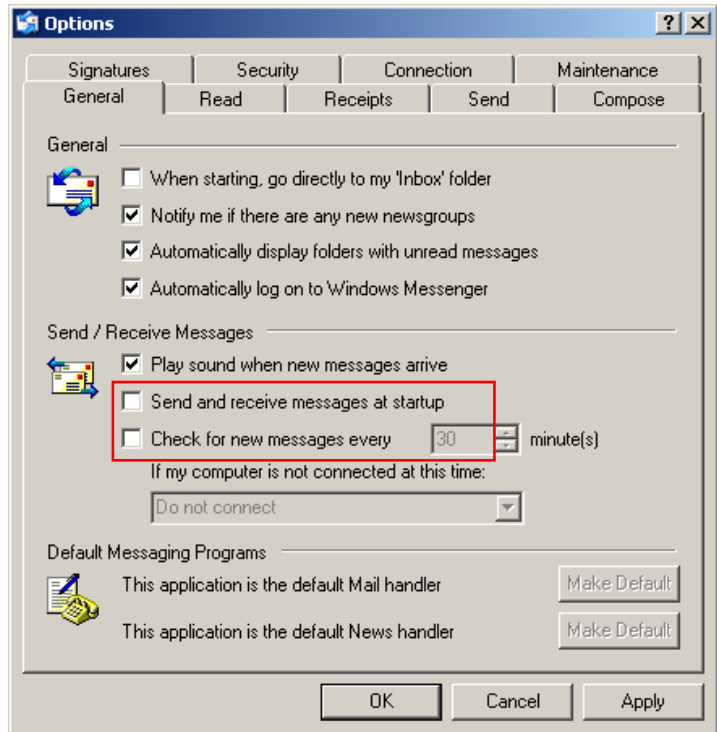
5. Въведете името и паролата на Вашия имейл акаунт, ако Вашият сървър използва защита с парола. След това щракнете върху “Next”. Отваря се прозорецът “Congratulations”.



6. Потвърдете с “Finish”, за да завършите настройката на имейл акаунта.

Настройки в Outlook

1. Отворете “Outlook Express” от менюто Start (Start, All programs, Outlook Express).
2. Изберете Tools и след това Options. Появява се долния прозорец.



Важно: За да избегнете изтеглянето на имейли при PCR опит, деактивирайте въведените по подразбиране стойности в екрана “Send/Receive Messages”.

3. Деактивирайте “Send and receive messages at startup”
4. Деактивирайте “Check for new messages every 30 minutes”.
5. Потвърдете промените с “OK”.

Тази страница умишлено е оставена празна

8 Допълнителни функции

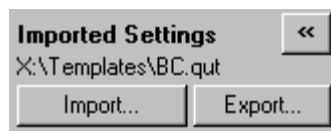
8.1 Анализни шаблони

Някои анализи изискват определянето на прагове, нормализиращи настройки, и настройки на генотипа. Често те се използват многократно при повече експерименти.

Анализните шаблони позволяват на запазването и използването на тези настройки. Това спестява повторното въвеждане и намалява риска от грешка.

Околичествяването, Топенето, Алелната дискриминация, Scatter анализът, и EndPoint анализът поддържат анализните шаблони. Тези анализи позволяват изнасянето на шаблон, уникален за анализа (напр. Количественият анализ позволява внасяне и изнасяне на *.qut файлове, съдържащи настройки за околичествяване).

След внасяне или изнасяне на анализни шаблони, името на шаблона се показва за бъдещи справки.

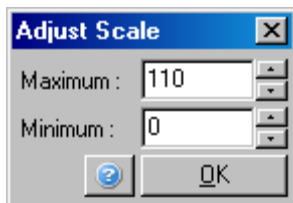


8.2 Отваряне на втори опит

По време на опит, е възможно да се отворят и анализират по-ранни опити. Някои функции като “New” или “Start Run” бутоните не са активни във втория прозорец. Нов опит може да бъде стартиран от първия прозорец след края на първия опит.

8.3 Опции за мащабиране

За да достигнете до „Adjust Scale”, кликнете “Adjust Scale...” в главното меню или кликнете с десен бутон върху диаграмата и изберете “Adjust Scale...” от менюто, което се появява. Излиза прозорец, в който може да се въведе мащаба.



За да достигнете “Auto-Scale”, кликнете “Auto-Scale...” в главното меню или кликнете с десен бутон върху диаграмата и изберете “Adjust Scale...” от менюто, което се появява. “Auto-Scale” напасва мащаба към максимума и минимума от данните.

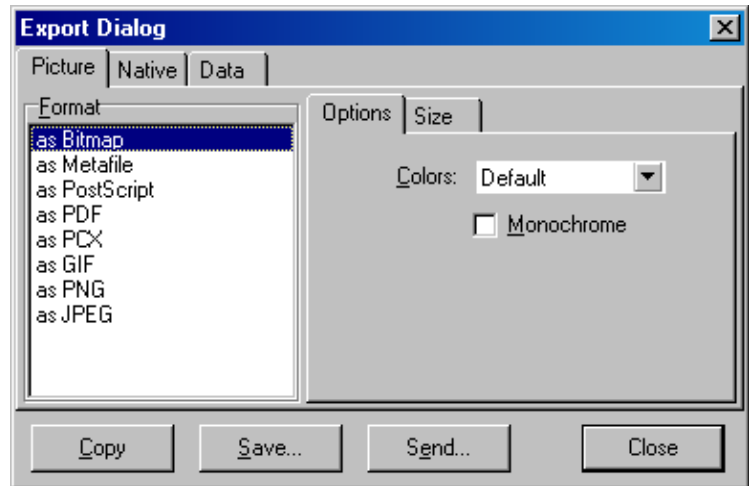
За да достигнете “Default Scale”, кликнете “Default Scale ...” в главното меню или кликнете с десен бутон върху диаграмата и изберете “Default Scale” от менюто, което се появява. “Default Scale” връща мащаба от 0 до 100 флуоресцентни единици.

8.4 Изнасяне на графики

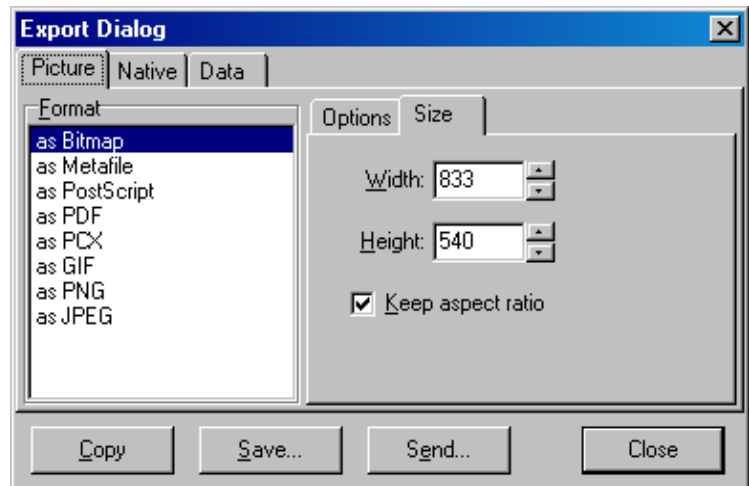
Изнасяне на изображение

Следните стъпки описват запазването на изображение.

1. Натиснете с десния бутон върху изображението и изберете “Export” от менюто, което се появява.
2. Появява се прозорецът “Export Dialog”. Изберете желанния формат от списъка “Format”.



3. Изберете раздела “Size” и задайте размер.



4. Маркирайте кутиятата “Keep aspect ratio”, за да запазите правилните.
5. Натиснете “Save” и изберете име и място за файла в диалоговата кутия, която се появява.

Ако е необходимо изображение с висока резолюция, ние препоръчваме увеличаване размера на изображението или запазването му като Metafile (*.emf, *.wmf). Това е

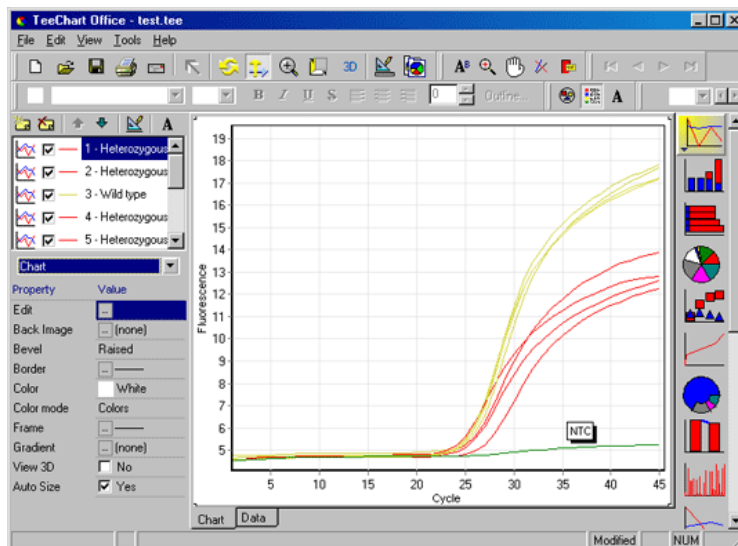
векторно-базиран формат, който може да се отвори в софтуер като Adobe® Illustrator® и да се създаде изображение във всякава резолюция.

Изнасяне в нативен формат

Графиките в на Rotor-Gene Q софтуера използват трета страна TeeChart® компонент, разработен от Steema софтуера. За да запазите графика в нативен формат, изберете раздела “Native” в прозореца “Export Dialog” (виж предишното изображение), и кликнете “Save”. Нативният формат е стандартният TeeChart формат. Това позволява използването TeeChart Office от Steema софтуера . Той е наличен безплатно и се инсталира като част от софтуерния пакет на Rotor-Gene Q. За да достигнете до него, натиснете TeeChart на десктопа.

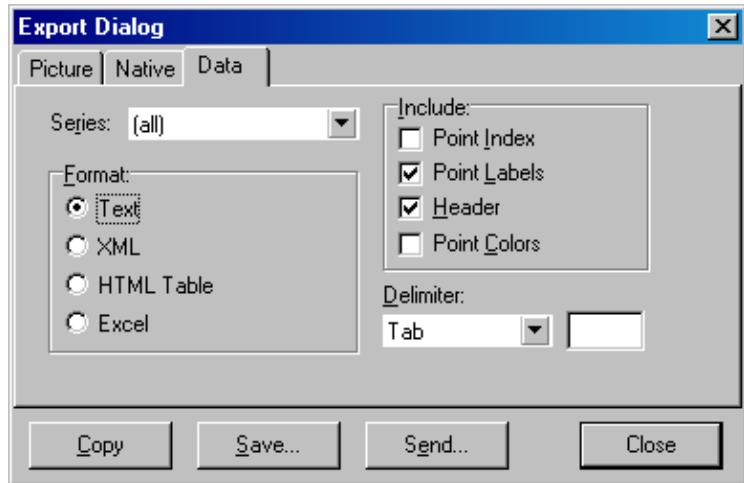


TeeChart Office позволява манипулирането на изнесени графики, включително промяна на цветовете на кривите, анотации, промяна на шрифта и нагласяне на точки.




Изнасяне на данни

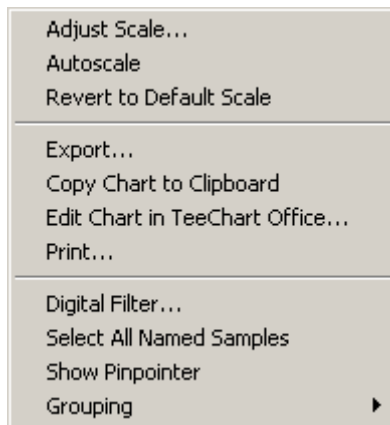
За да изнесете данни в различни формати, изберете раздела “Data” в прозореца “Export Dialog”. Изнесенният файл съдържа грубите данни използвани в графиката.



Изнасянето на грубите данни и анализните данни може да бъде направено и чрез избиране на “Save As” под менюто “File” (виж Раздел 7.5).

8.5 Икона гаечен ключ

Иконата гаечен ключ  се появява в долната лява част на основния прозорец. Кликването ѝ позволява няколко опции. Те могат да бъдат достигнати и чрез натискане с десния бутон върху графиката.



Adjust Scale, Виджте Раздел 8.3.
Autoscale,
Revert to
Default Scale:

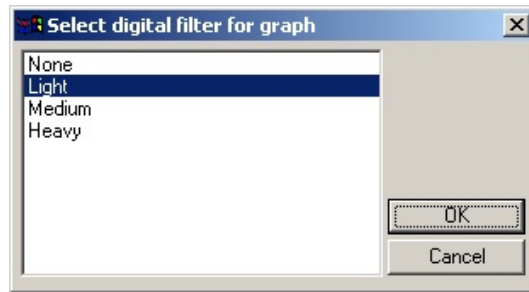
Export...: Запазва графиката в няколко различни формата (Вижте Раздел 8.4).

Copy Chart to Clipboard: Копира графичното изображение.

Edit Chart in TeeChart Office...: Отваря графиката директно в TeeChart Office за редактиране (Вижте Раздел 8.4).

Print: Отпечатва графиката.

Digital Filter...: Модифицира избрания дигитален филтър на графиката. Дигиталният филтър изглажда данните чрез плъзгач прозорец от точки.

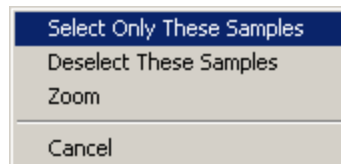


Show Pinpointer: Това отваря прозорец, който показва точните координати на позицията на курсора на мишката.

Grouping: Визуално групира проби с идентични имена. Това е полезно при пълен ротор с проби. Тази опция не повлиява на изчислените стойности.

8.6 Опции за избраното поле

Област от графиката може да бъде селектирана чрез задържане на левия бутон и влачене на курсора. Появяват се следните опции.



Select Only These Samples: Пробите извън селектираната област се изключват.

Deselect These Samples: Всички проби в селектираната област се изключват.

Zoom: Приближава селектираната област от графиката. Натиснете бутона "Default Scale" за да отдалечване.

Тази страница умишлено е оставена празна

9 Процедури по поддръжка

Поддръжката на добрата работа на Rotor-Gene Q MDx е лесна. За оптичната поддръжка трябва да сте сигурни, че лещите на емисионния и детекционния източник са чисти. Това става чрез внимателно почистване с памучен тампон, напоен в етанол или изопропанол*, над лещите.

Бележка: Почиствайте лещите поне веднъж месечно, в зависимост от употребата. Почисвайте и роторната камера.

Пазете работната повърхност чиста и без прах и листове хартия. Входът за въздух на Rotor-Gene Q MDx е отдолу и материали като хартия и прах могат да компрометират работата му.



За да предпазите от натрупване на прах, дръжте капака на затворен, когато уредът не работи.

Ако роторната камера е замърсена, може да бъде почистена чрез избърсване на повърхността с влажен (но не мокър) парцал без власинки, напоен с 0.1% (v/v) разтвор на белина.* Избършете камерата с парцал, напоен с вода за PCR, за да премахнете следите от белина.

* Когато работите с химикали, винаги носете подходящото лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация, се обърнете към подходящите данни за безопасност (SDSs), налични при доставчика на продукта.

Тази страница умишлено е оставена празна

10 Оптичесна температурна верификация

ОТВ е метод, който проверява температурата епруветките в Rotor-Gene Q MDx. Валидирането на тази температура може да бъде важно в сертифицирани лаборатории. ОТВ се извършва при чрез Rotor-Disc OTV Kit (Вижте Приложение С). Тук е дадено само кратко въведение в принципа на ОТВ. ОТВ процедурата е описана в Rotor-Gene Q MDx софтуера. По-детайлно описание, включително за разрешаване на проблеми, се обърнете към наръчника на Rotor-Disc OTV.

10.1 Принцип на ОТВ

ОТП използва оптичните свойства на 3 термохроматични течни кристали (TLC)* като абсолютни температурни референции. Когато се загряват, TLCs стават прозрачни при точно определени температури (50 °C, 75 °C, и 90 °C). Самите TLCs не флуоресцират. Следователно, е необходимо възбудния източник да се покрие с включен флуоресцент, така че точките на преход на TLC да бъдат детектирани от оптичната система на Rotor-Gene Q MDx. TLCs, които са под тяхната точка на преход, са непрозрачни и отразяват светлината. Част от отразената светлина попада близо до детектора и повишава флуоресценцията. Когато температурата в епруветката достигне преходната точка на TLC, кристалът става прозрачен и светлината преминава през пробата, а не се отразява към детектора, което води до намаляване на флуоресценцията. От промените във флуоресценцията се определя точната преходна температура на всеки TLC. Тя се сравнява с температурата от фабричния калибрационен файл за OTV Rotor-Disc, за да се потвърди дали Rotor-Gene Q MDx е в рамките на температурната спецификация.

* Когато работите с химикали, винаги носете подходящото лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация, се обърнете към подходящите данни за безопасност (SDSs), налични при доставчика на продукта.

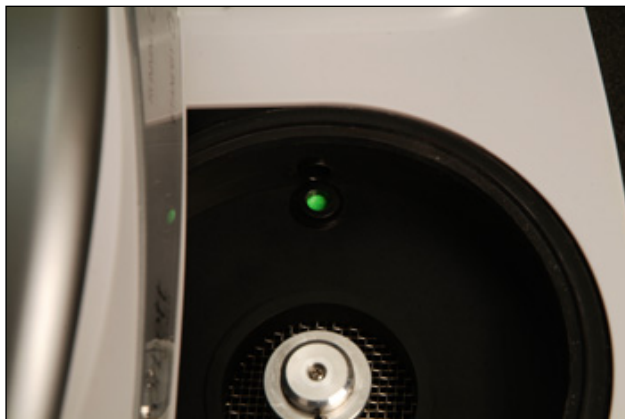
10.2 Компоненти на Rotor-Disc OTV кита

Следните компоненти се изискват за ОТВ:

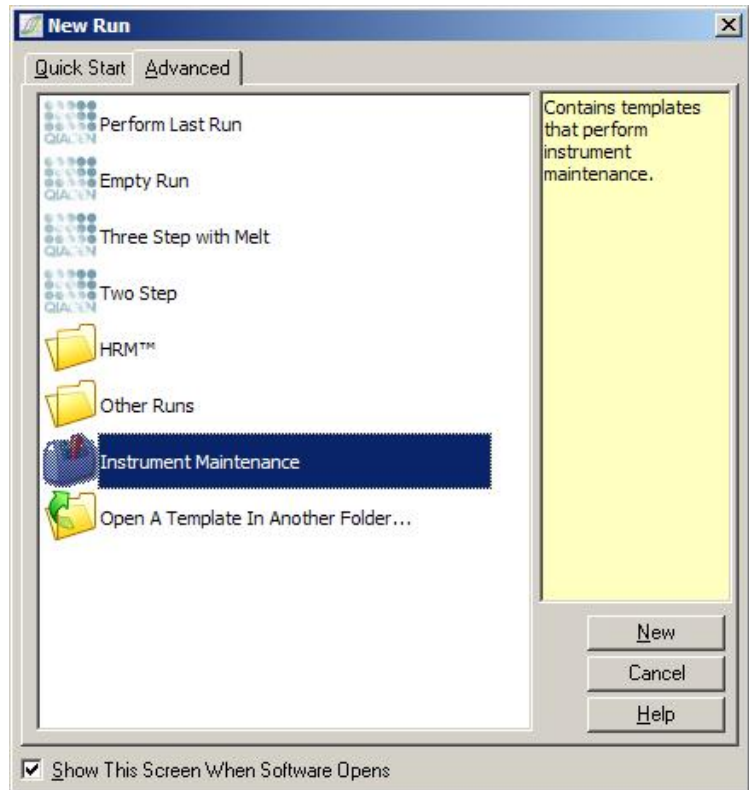
- Rotor-Disc OTV кит, който включва:
 - Запечатан Rotor-Disc 72 OTV Ротор (съд. TLCs)
 - Разсейваща флуоресценцията плака (Rotor-Gene 3000 инструменти or Rotor-Gene Q/6000 инструменти)
 - CD с: OTV Rotor сериен номер и срока на годност (*.txt); OTV шаблонен файл (*.ret); Продуктов лист (*.pdf); фабричен калибрационен файл (*.rex)
 - Продуктов лист
- Rotor-Gene Series Software Version 1.7 или по-нова, с достъпен OTV Rotor интерфейс
- Rotor-Disc 72 Ротор
- Rotor-Disc 72 Заклучващ пръстен

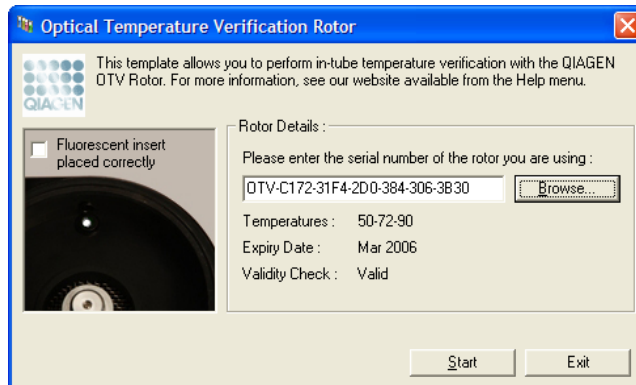
10.3 Пускане на ОТВ

1. Сложете флуоресцентния инсерт над емисионната леща на дъното на Rotor-Gene Q MDx камерата.
2. Сложете OTV Rotor-Disc в Rotor-Disc 72 Rotor. Осигурете с Rotor-Disc 72 Locking Ring. Поставете сглобката в Rotor-Gene Q MDx с щракване. Затворете капака на Rotor-Gene Q MDx.

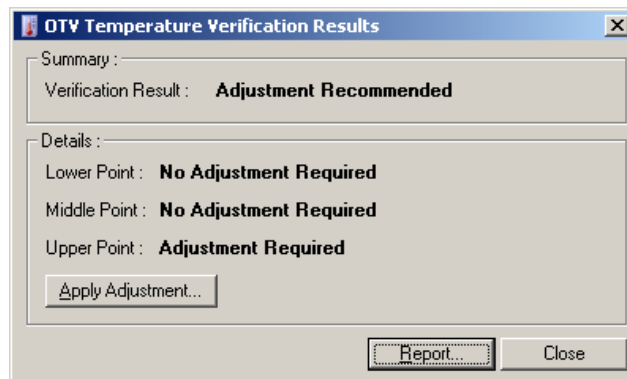


3. Влезте в Advanced wizard от “Advanced” раздела в прозореца “New Run”. Натиснете “Instrument maintenance” и след това “OTV”. Интерфейсът ще ви попита за OTV сериен номер. Той може да се вземе от етикета на OTV Rotor-Disc или от CD чрез натискане на “Browse” и избор на .otv файла от CD. След въвеждане на номера, кликнете “Start”.





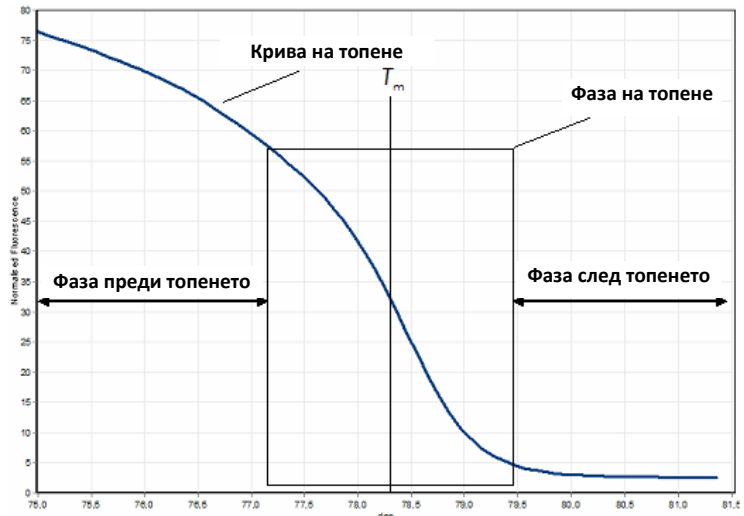
4. Софтуерът пита за име на опита. След това опитът започва.
5. Извършва се серия от стапяния за определяне на термичните характеристики на Rotor-Gene Q MDx.



6. След края на опита софтуерът индикира дали Rotor-Gene Q MDx отговаря на спецификациите.
7. Ако е необходимо настройване, натиснете "Apply Adjustment". Това започва верифициращ опит. След края му не трябва да има нужда от повече настройване. При необходимост от такова, се свържете с местния дистрибутор.
8. Когато Rotor-Gene Q MDx отговаря на спецификациите, може да се прегледа и отпечата доклад на опита.

11 High Resolution Melt анализ

High resolution melt (HRM) анализът е иновативна техника базирана на анализ на топене на ДНК. HRM характеризира ДНК пробите според дисоциационното им поведение при прехода им от двойно верижна ДНК (dsDNA) до едновержна (ssDNA) с повишаване на температурата (виж фигурата долу). HRM уредът отчита флуоресценция с голяма оптична и термична прецизност, което има редица приложения.



Типична HRM диаграма. Кривата на топене маркира прехода от висока флуоресценция на началната фаза, през понижаване във фазата на топене до базови нива в крайната фаза. Флуоресценцията намалява с освобождаване на интеркалираща боя от dsDNA при нейното топене до единични вериги. Средната точка, в която скоростта на промяна на флуоресценцията е най-висока, дава температурата на топене (T_m) на изследваната ДНК.

Преди провеждане на HRM анализ целевата секвенция трябва да се намножи. Това обикновено се прави чрез PCR в присъствието на интеркалиращо флуоресцентно багрило. Багрилото не взаимодейства с ssDNA, но активно се интеркалира в dsDNA, давайки силна флуоресценция. Промяната ѝ може да се

използва за измерване на концентрацията на ДНК по време на PCR, а след това и за директно измерване на термо-индуцираното топене при HRM. По време на HRM, флуоресценцията първоначално е висока, тъй като пробата е dsDNA. Тя намалява с увеличението на температурата и десициацията на ДНК на единични вериги. Наблюдаваното поведение на топене е типично за дадена ДНК проба.

Чрез HRM, Rotor-Gene Q MDx може да характеризира пробите по дължина, GC съдържание и ДНК комплементарност. HRM може да се използва за генотипиране, напр. анализ на инсерции/делеции или еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs) или за скрининг на непознати мутации. Освен това може да послужи за епигенетични анализи за изследването на ДНК метилиране. Може също така да изрази количествено малка част различна ДНК на фона на див тип секвенции с чувствителност до 5%. Това може да се използва за изследване на соматични мутации или промени в статуса на метилиране на CpG островите.

HRM на Rotor-Gene Q MDx обуславя редица приложения, като:

- Откриване на възможни гени за предразположение
- Асоциативни изследвания (сравнение на случай с контроли, генотип с фенотип)
- Определяне на преобладаващи алели в популация или подгрупа
- Скрининг и валидиране на SNP
- Скрининг за загуба на хетерозиготност
- ДНК идентификация
- Характеризиране на хаплотипови блокове
- Анализ на ДНК метилиране
- ДНК картиране
- Идентификация на видове
- Откриване на мутации
- Измерване на ниво на придобити мутации
- HLA типизиране

HRM е по лесно и изгодно в сравнение с генотипирането чрез сонди и за разлика от повечето методи е затворена система, смаляваща риска от замърсяване с PCR продукти. Резултатите са сравними с класически методи като SSCP, DHPLC, RFLP, и ДНК секвениране.

11.1 Инструменти

Rotor-Gene Q MDx осигурява следните термо-оптични възможности необходими за HRM.

- Високо интензивно осветяване
- Чувствителна оптична детекция
- Бързо отчитане
- Fino контролирана температура
- Минимални оптични и термални вариации

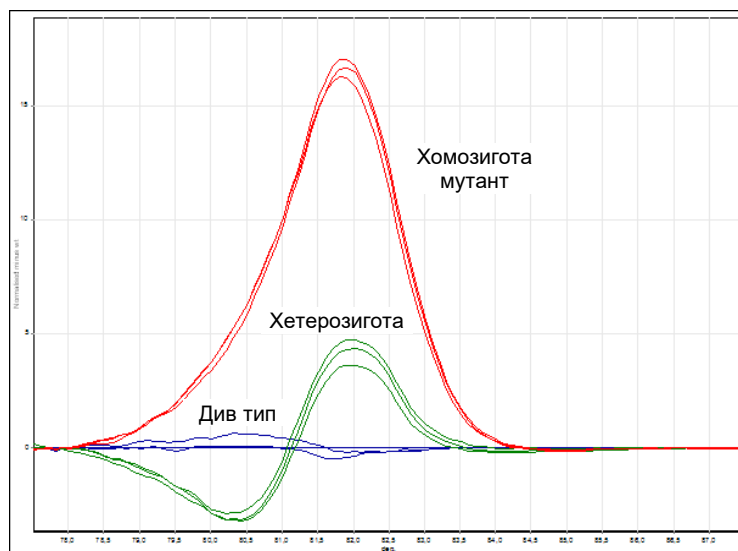
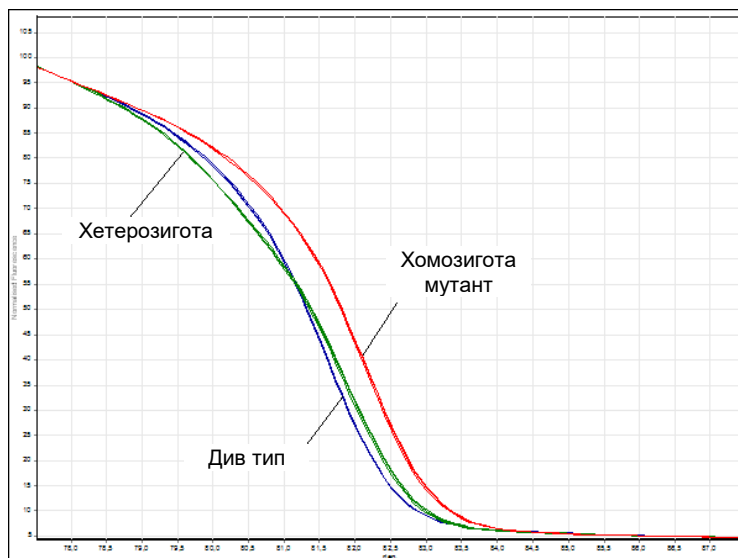
11.2 Химия

QIAGEN предлага Type-it[®] HRM PCR Kit за анализ на SNPs и мутации чрез HRM и EpiTect[®] HRM PCR Kit за анализ на метилиране. И двата кита съдържат трето поколение интеркалиращо багрило EvaGreen. Китовете комбинират оптимизиран HRM буфер и HotStarTaq[®] Plus DNA полимераза за избягване на неспецифични продукти и осигуряване на по-надеждни резултати.

Бележка: Всички QIAGEN HRM китове и реагенти са предназначени за работа само с Rotor-Gene Q за описаните в съответните наръчници приложения.

11.3 Пример за SNP генотипиране

В дадения пример е използван Type-it HRM PCR Kit за HRM анализ за разграничаване между хомозиготен див тип, хомозиготен мутантен и хетерозиготен вариант на човешкия SNP rs60031276. За технически детайли се обърнете към *Type-it HRM PCR Handbook*.

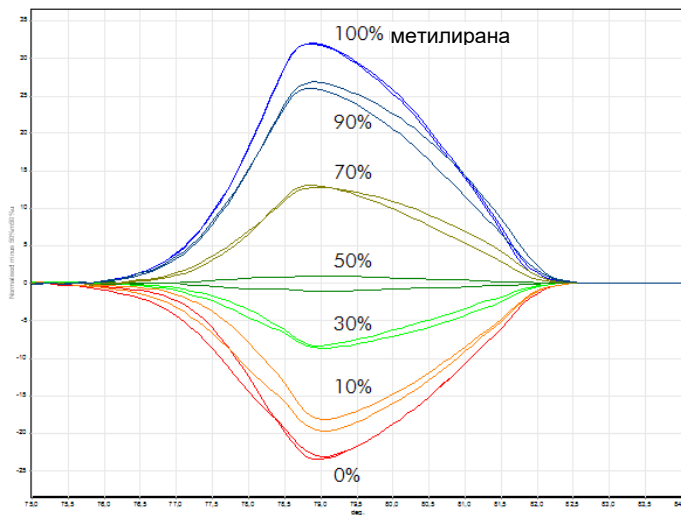
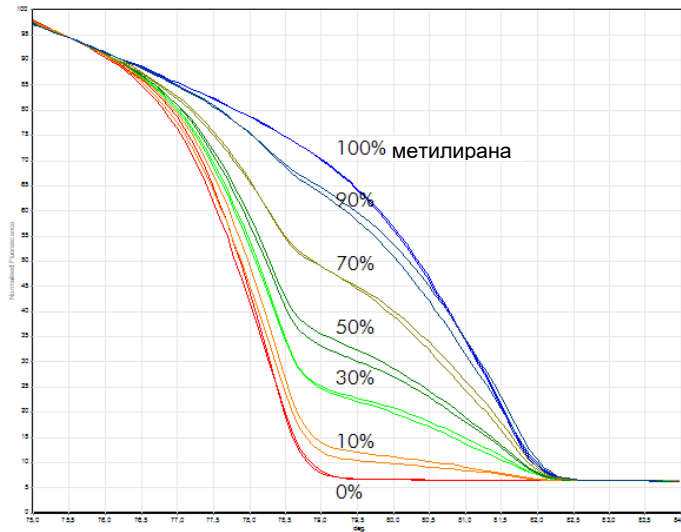


HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)				
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	■	AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	■	unknown	homo AA	99,49
24	■	unknown	homo AA	99,76
28	■	AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	■	unknown	hetero AG	99,49
30	■	unknown	hetero AG	98,47
34	■	GG Human SNP rs60031276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

SNP генотипиране чрез HRM. Човешкият SNP rs60031276 (A в G замяна) в гена PPP1R14B (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B) е анализиран на Rotor-Gene Q използвайки 10 ng геномна ДНК с различен генотип и Type-it HRM Kit. Див тип (AA), хомозиготни мутантни (GG) и хетерозиготни (AG) проби се виждат на стандартна крива на топене диференциална диаграма нормализирана към дивия тип. Генотипове на неизвестните проби са дадени от Rotor-Gene Q софтуера.

11.4 Пример за метилиране

В дадения пример е използван EpiTect HRM PCR Kit за HRM анализ за разграничаване на различни нива на метилирана и неметилирана ДНК. За технически детайли, се обърнете към *EpiTect HRM PCR Handbook*.



Количествен метилирац анализ с HRM. Различни нива на метилирана и неметилирана ДНК-APC (adenomatosis polyposis coli) са анализирани и разграничени чрез HRM анализ Rotor-Gene Q с EpiTest HRM Kit. стандартна крива на топене и диференциална диаграма нормализирана към 50% метилирана проба.

11.5 Насоки за успешен HRM анализ

Успехът на HRM анализа зависи основно от изследваната секвенция. Някои мотиви като hairpin loops и други вторични структури, участващи с високо или ниско GC съдържание или повтори могат да повлияят на резултата. Освен това употребата на стандартизирани китове и оптимизирани протоколи QIAGEN може да преодолее много от потенциалните предизвикателства. Тук са дадени някои прости насоки за успешен анализ.

Анализирайте къси ДНК фрагменти

Анализирайте фрагменти до 250 bp. По-големи продукти също могат да се изследват, но с по-ниска резолюция. Еднонуклеотидните промени, например, имат по-изразен ефект върху топенето при ампликон от 100 bp отколкото при такъв от 500 bp.

Уверете се, че PCR съдържа само специфичния продукт

Проби с артефакти като праймерни димери или неспецифични продукти трудно се интерпретират. Китовете на QIAGEN за HRM анализ осигуряват максимална специфичност без нужда от оптимизация.

Използвайте достатъчно матрица

Анализът на данните от real-time PCR може да е от полза при разрешаване на проблеми с HRM анализа. Амплификацията трябва да даде С_T (граничен цикъл) по-малък или равен на 30 цикъла. Продукти, които се размножават по-късно (поради недостатъчно матрица или деградация) обикновено дават вариращи HRM резултати поради PCR артефакти.

Нормализирайте концентрацията на матрицата

Количеството матрица в реакциите трябва да е постоянно. Нормализирайте стартовите концентрации така, че диаграмите са в рамките на 3 С_T стойности. Това означава началните концентрации да са в един порядък.

Проверете за отклоняващи се диаграми

Преди HRM прегледайте данните от диаграмите внимателно за отклонения в кривите. Графики с лог фаза, която не е стръмна, назъбена е или достига ниско плато в сравнение с другите, са признак за недостатъчна амплификация или прекалено нисък сигнал (напр., при ниска концентрация на праймерите). Слаби реакции могат да бъдат предизвикани от инхибитори или неправилна подготовка. HRM данните от такива проби може да са двузначни или с ниска резолюция. За да избегнете ненадеждни резултати, препоръчваме китовете на QIAGEN за подготовка и HRM анализ.

Поддържайте крайните концентрации на пробите близки

Концентрацията на ДНК фрагмента влияе върху температурата му на топене (T_m). Поради това, концентрациите на пробите трябва да са възможно най-близки. При анализ на PCR продукти се уверете, че всяка реакция е стигнала до плато. При платото всички реакции са намножени до сходни количества независимо от началните концентрации. Слабите реакции, обаче може да не достигнат плато при същото количество поради неправилна подготовка (напр., прекалено ниска праймерна концентрация).

Осигурете хомогенност между пробите

Всички проби трябва да са с еднакъв обем и концентрация на багрилото. Топенето на ДНК се влияе от соли в сместа, поради което количеството на буфера, Mg и други соли трябва да е идентично. Използвайте и идентични епруветки от един производител за да избегнете вариации поради дебелината или автофлуоресцентните им свойства.

Позволете достатъчно отчитане преди и след топенето

Отчитайте HRM данни на разстояние близо 10°C около T_m (виц фигурата на стр. 11-1). Това осигурява достатъчно стойности за ефективна нормализация на кривата и ще даде възпроизводими резултати лесна интерпретация.

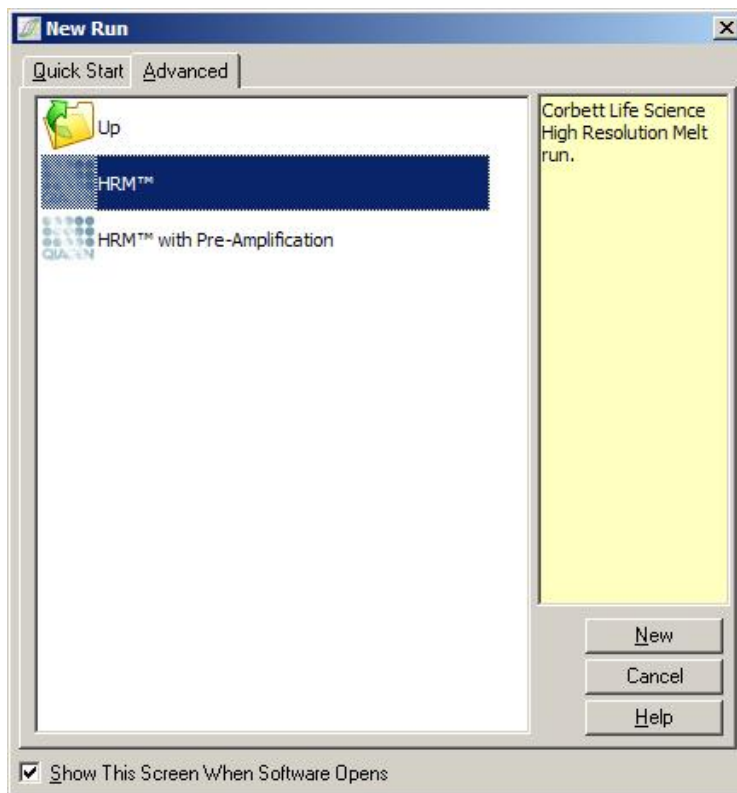
11.6 Подготовка на пробите

При пречистването и съхранението на пробите трябва да се избегне деградацията им. Избягвайте инхибитори като остатъци от етанол. За подобряване на резултатите от HRM препоръчваме използването на сходни количества матрица. Препоръчва се спектрофотометричен анализ на концентрацията и чистотата на ДНК. Препоръчваме китове на QIAGEN за подготовка на пробите.

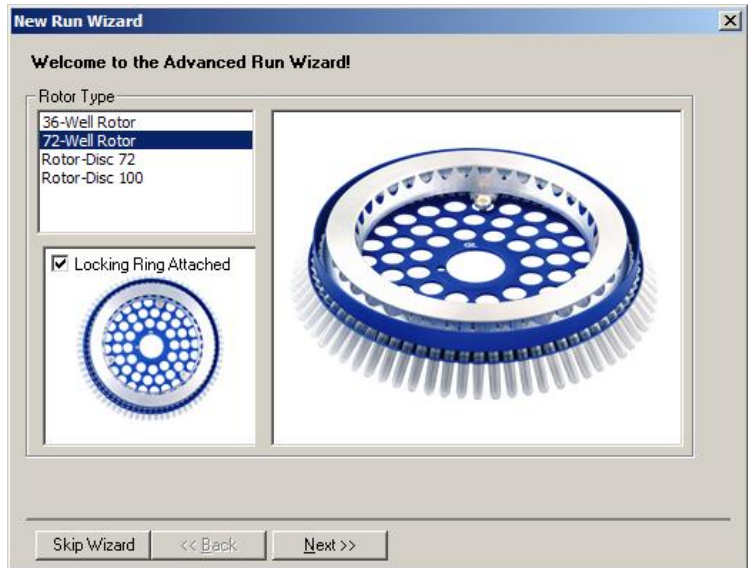
Бележка: При 260 nm една единица абсорбция е равна на 50 µg/ml ДНК. Чистата ДНК има 260 nm към 280 nm отношение от 1.8.

11.7 Подготовка на софтуера

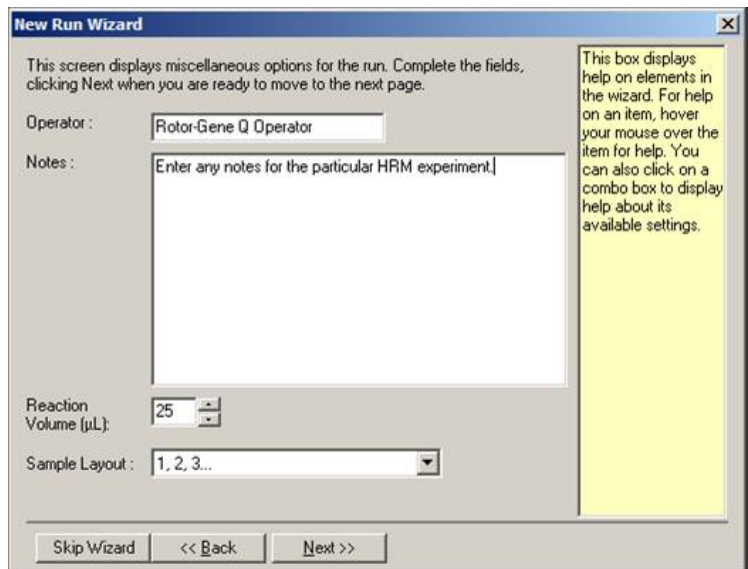
1. Отворете нов гуп файл чрез избиране на “New...” от меню File. Изберете “HRM” в Advanced интерфейса.



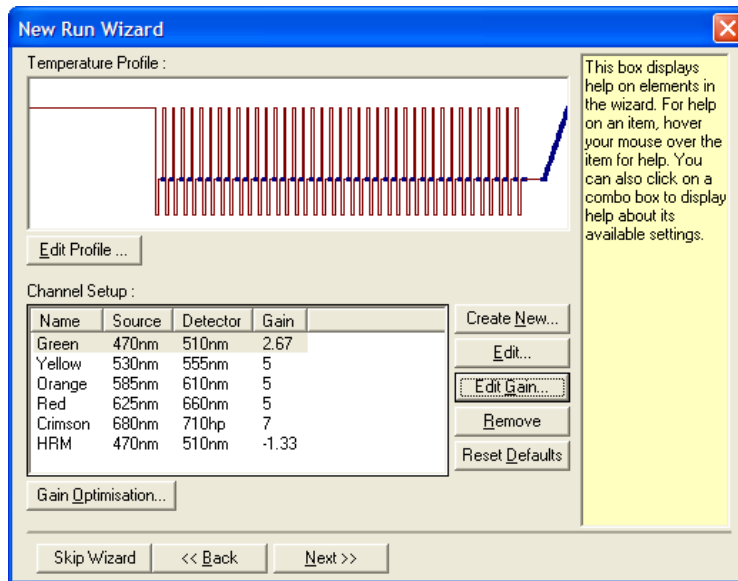
2. Задайте типа ротор (в този пример 72-ямков).
Уверете се, че заключващият пръстен е поставен и че кутиятата "Locking Ring Attached" е маркирана преди да продължите.



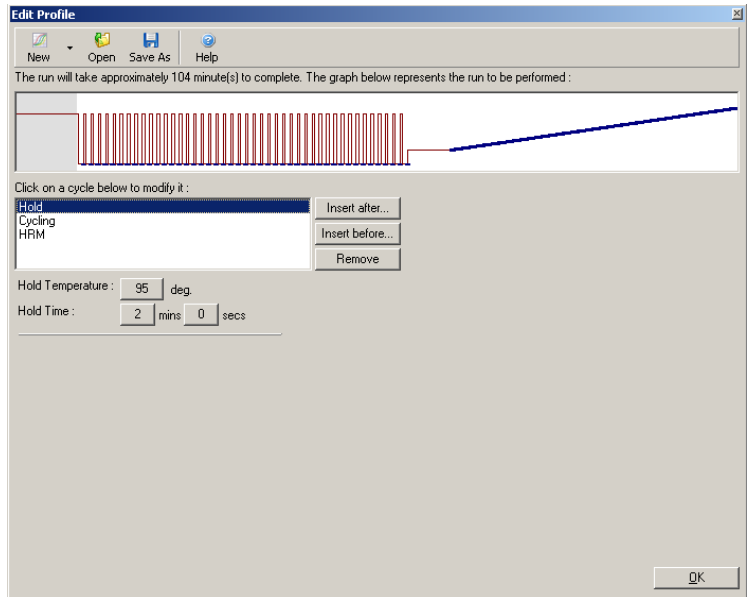
3. Въведете детайлите като име на оператора (по желание) и бележки към опита (по желание). Изберете реакционен обем (задължително) и желаното разположение.



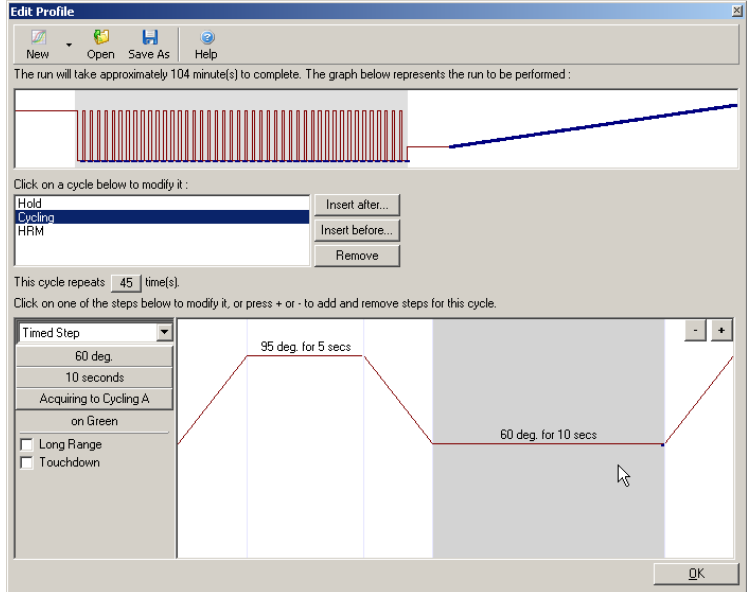
4. Натиснете бутона “Edit Profile...” за да промените времената и температурите на реакцията.



5. Настройте уместно начално задържане. То зависи от вида използвана ДНК полимераза. Туре-it HRM PCR Kit и ЕріТест HRM PCR Kit изискват 5 минутна активация. Стандартната активация е 10 минути.



6. Променете циклите според ампликона.



7. Уверете се, че флуоресценцията ще бъде отчетена. Отчитайте на зеления канал в края на анилинга.

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition)

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red
Yellow

Acquiring Channels :

Name
Green

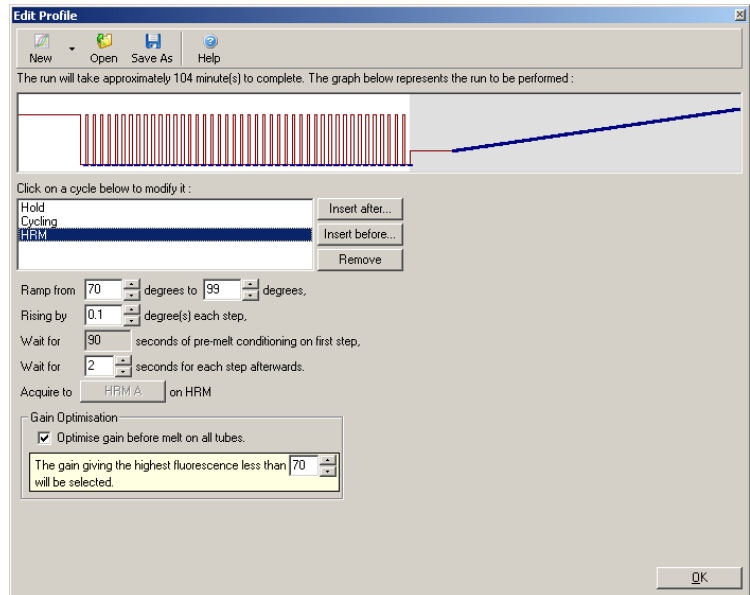
To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >> OK Don't Acquire Help

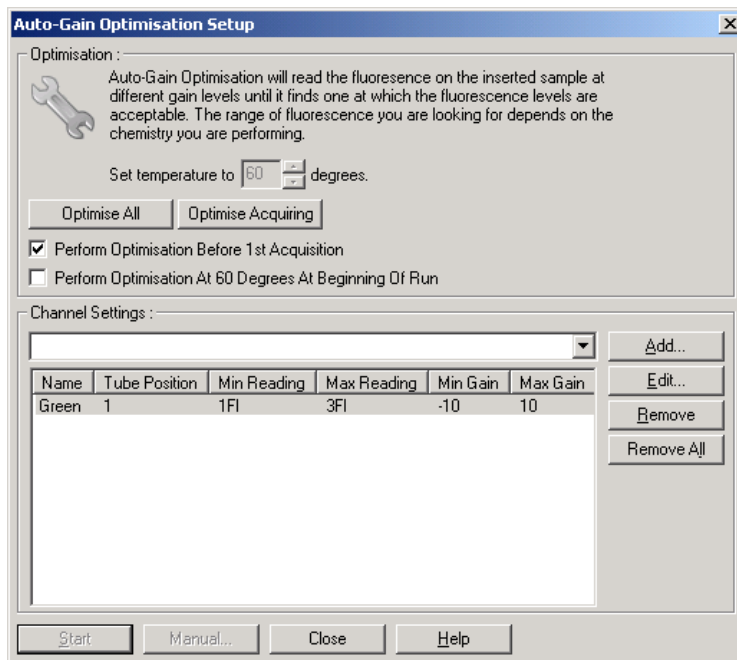
Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM, SybrGreen [®] , alexa488
Yellow	530nm	555nm	JOE, CalGold [®] , CalOrange [®] , TET, Yakima Yellow, VIC [®] , HEX, alexa532
Orange	585nm	610nm	ROX, Redmond Red [®] , alexa568
Red	625nm	660nm	Cy5, Quasar670 [®] , LCRed640 [®]
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 [®] , LCRed705 [®] , alexa680
HRM	460nm	510nm	LCGreen [®]

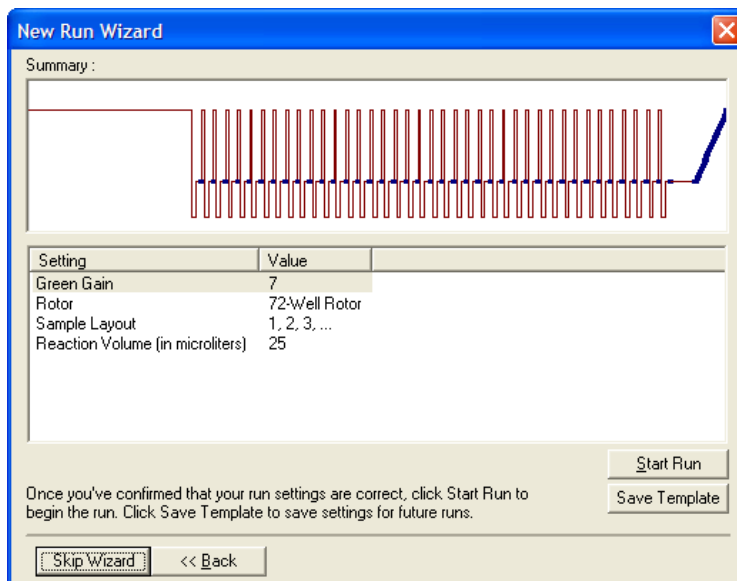
8. Настройте условията на HRM. Модифицирайте ги според ампликона. За първите няколко опита използвайте широк обхват на топене. Използвайте теоретичната T_m като насока. След като сте определили къде ще протече топенето, редуцирайте обхвата до не повече от 10°C . Уверете се че топенето започва 5°C преди първия преход. Стандартната стъпка е настроена на 0.1°C със задържане от 2 секунди на всяка стъпка. Минималната стъпка е 0.05°C с второ задържане на всяка стъпка. Данните се отчитат автоматично HRM канала. Увеличението се оптимизира автоматично. Софтуверът търси оптимално увеличение така, че най-високата отчетена стойност е не повече от 70 единица на скала от 100. Максимумът може да бъде настроен до 100.



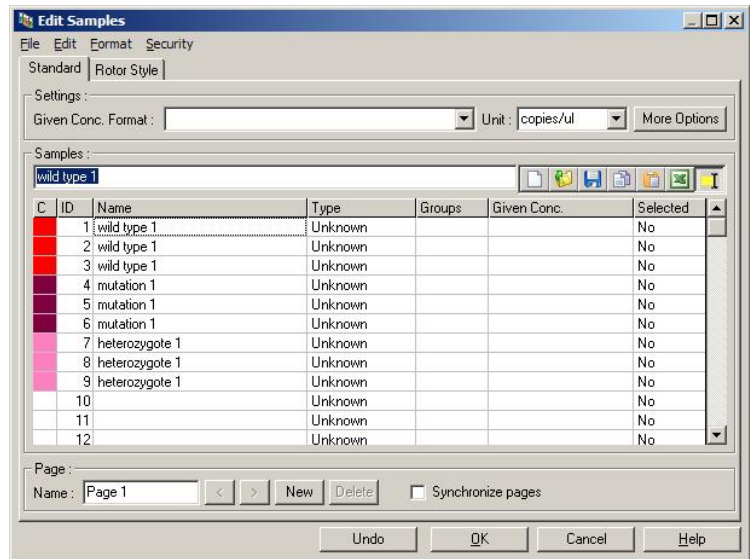
9. По желание: Настройте Auto-Gain Optimisation. Тя се отнася само за амплификацията в реално време и е зададена за зеления канал. Натиснете бутона "Optimize Acquiring" (за да оптимизирате само използваните канали). Най-добре е оптимизацията да се проведе непосредствено преди първото отчитане, затова маркирайте "Perform Optimization Before First Acquisition". Препоръчаният обхват на фоновата флуоресценция за интеркалиращи бои е между 1 и 3 FU. За то промените това, кликнете върху името на канала в списъка и натиснете бутона "Edit".



10. Стартирайте опита от "Start Run" и съхранете run файла на компютъра.



11. Редактирайте имената на пробите (по желание).
Това може да стане преди или след опита.

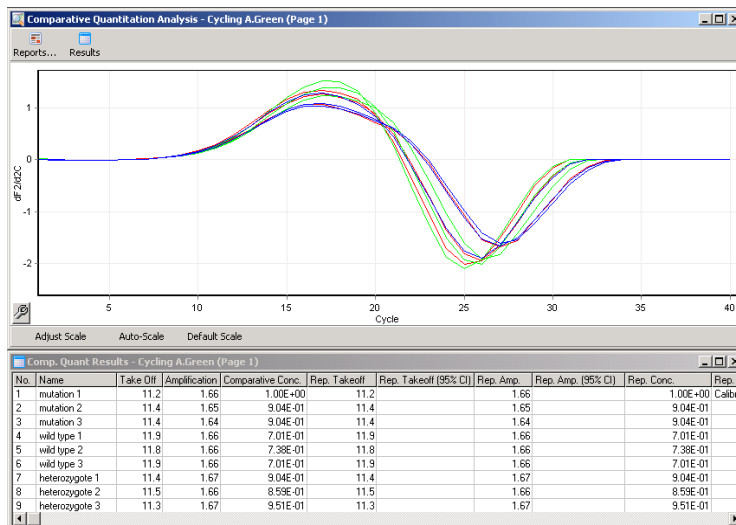


11.8 Анализ на данните от Real-time PCR

Анализът на данните от Real-time PCR преди тези от HRM анализа е с предимства. Данните от Real-time PCR могат да посочат слабите реакции. Изключването на последните от последващия HRM анализ ще подобри цялостната ефективност на HRM анализа, тъй като обратното ще доведе до слаби HRM резултати. Препоръчваме анализирането на количествените данни от Real-time PCR както следва.

1. Анализирайте данните от Real-time PCR чрез опцията “Quantitation” от прозореца “Analysis”. Ако са налице CT стойности от 30 или по-високи, съответните реакции са се намножили твърде късно. Тези проби трябва да се анализират с предубеждение или да бъдат премахнати като отклонения. Късната амплификация обикновено се дължи на прекалено малко матрица и/или силна деградация на пробата.

- Оценете крайната флуоресценция. Ако тя е ниска за някои графики в сравнение с останалите, премахнете тези проби от анализа, дори ако СТ стойностите им са над 30. Ниската крайна флуоресценция може да индикира погрешно количество боя или реакционни компоненти (напр. праймери) или наличие на инхибитори.
- Използвайте опцията “Comparative Quantitation” от прозореца “Analysis”, за да получите реакционната ефективност за всяка проба. Ако тя не е близка до тази на останалите проби или е по-ниска от 1.4, изключете реакцията като отклонение.



Резултати от сравнително околичествяване. Реакционната ефективност се вижда в колоната “Amplification” като стойност до 2 (2 = 100% ефективност).

Бележка: Ако подозирате наличие на праймерни димери или неспецифични продукти, оценете реакциите с производна графика чрез опцията “Melt” от прозореца “Analysis”. Уверете се, че има единичен пик, съответстващ на един продукт. Ако е възможно, пуснете гел за да потвърдите това. Ако има повече продукти, реакцията трябва да се повтори или реоптимизира.

11.9 Анализ на данните от HRM

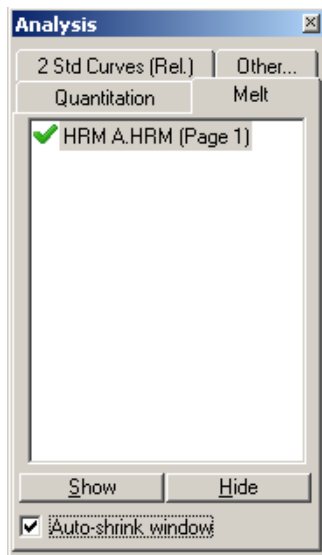
HRM анализът позволява визуално и автоматично извикване на генотиповете. Резултатите могат да са под формата на нормализирана крива на топене и диференциална диаграма. Кривата дава основния изглед на различните генотипове на базата на изместването (за хомозиготи) и промяната на формата (при хетерозиготи).

Диференциалните диаграми подпомагат визуалното тълкуване. Те показват разликите между флуоресценцията на пробата и избрана контрола при всяка температура. Тези графики са алтернатива на разликите между кривите на топене.

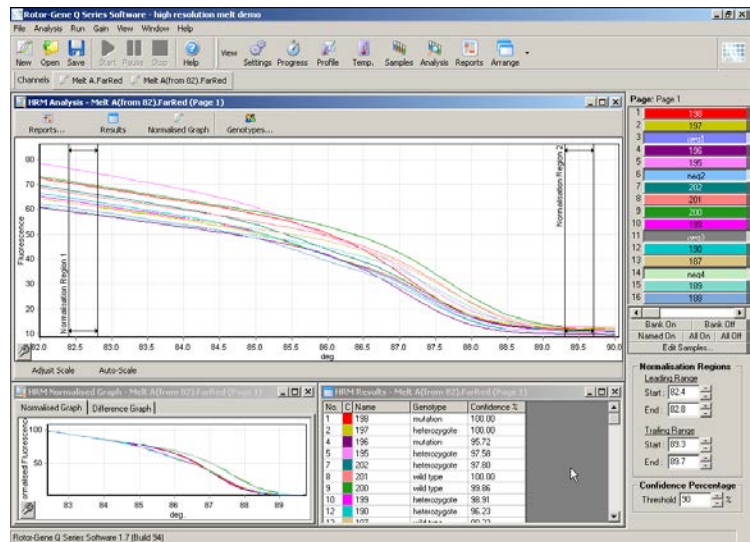
Бележка: Анализът на топенето по първа производна (чрез стандартната опция “Melt” от прозореца “Analysis”) се счита за неуместен за HRM анализа, тъй като всяко извеждане добавя изкуствен шум и прави интерпретацията по-трудна.

Следните стъпки оисват анализа на данните от HRM чрез Rotor-Gene Q софтуера.

1. Изберете опцията “HRM” от прозореца “Analysis”.

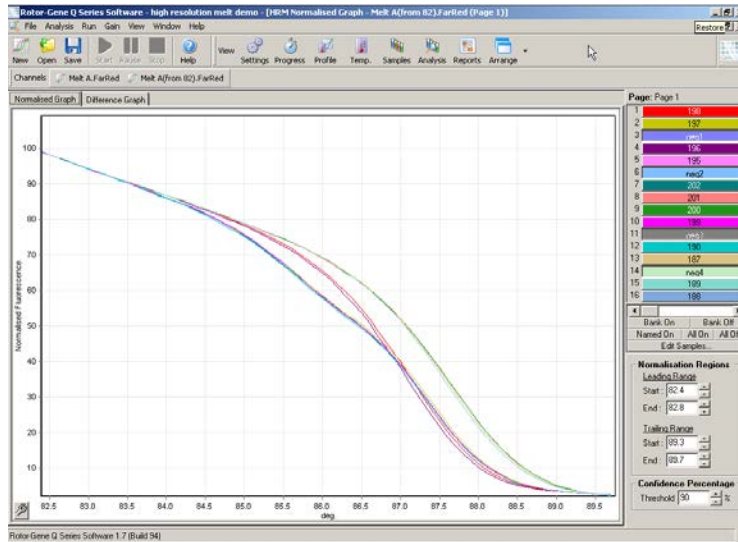


2. Появяват се прозорци с груби данни, нормализирана графика и резултати. В прозореца с грубите данни може да се зададат участъците за нормализация. Нормализацията позволява сравнението на всички всички криви с една съща начална и крайна флуоресценция. Дадени са два курсора на участък, обикновено в краищата на кривата. Данните в рамките на участъка се използват за нормализиране на флуоресценцията (само оста y) за началото (Участък 1) и края (Участък 2) на графиката. Данните извън участъка се игнорират. Настройте участъка да обхваща представителни данни преди и след топенето. Разширяването на участъците (чрез влачене) позволява изчисляването на наклона на базовата линия. За ефективна нормализация избягвайте разширяването на участъците до фазата на стапяне.

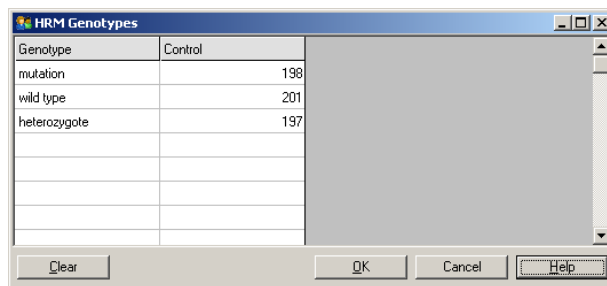


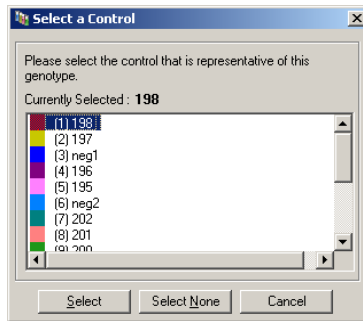
Бележка: Препоръчваме местене на курсорите само за да се избегнат участъци на топене. Местенето им по посока на фазата на топене може да повлияе на изваждането и доверителните проценти.

- Прозорецът “Normalised Graph” показва нормализираните криви. Пробите могат да се прегледат и като диференциални диаграми спрямо контрола.

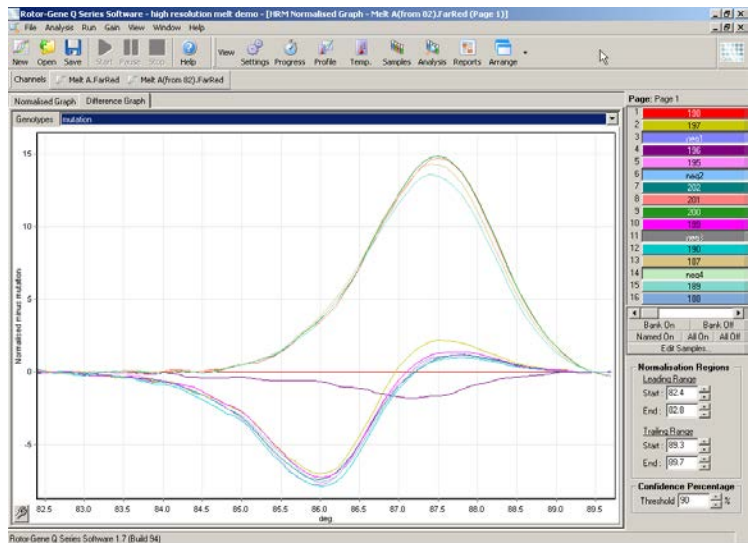


- Натиснете бутона “Genotypes...”, за да дефинирате генотиповете. Въведете име и категория за всеки генотип и изберете представителна проба от списъка.

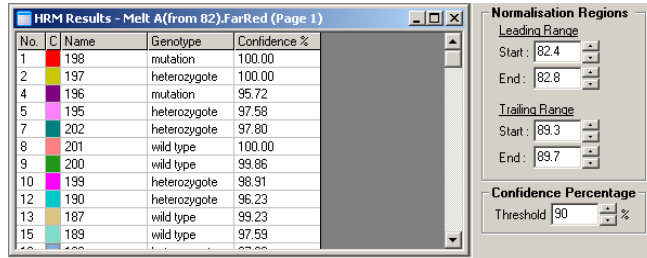




5. Прегледайте диференциалната диаграма чрез избиране на раздела “Difference Graph”. След това изберете референтния генотип от падащото меню в горния край на прозореца. В дадения пример всички проби са представени извадени от средната диаграма за групата “Mutation 1”.



6. Генотиповете се извикват автоматично в прозореца "Results". Дадена е доверителна стойност за проверка на цялостта на тези резултати. Прагът, над който става автоматичното извикване, може да се промени. Пробите под този праг се бележат като вариации, изискващи по-задълбочен анализ.



The screenshot shows a software window titled "HRM Results - Melt A(from 82).FarRed (Page 1)". It contains a table with columns for No., Name, Genotype, and Confidence %. To the right of the table are three control panels: "Normalisation Regions" with "Leading Range" (Start: 82.4, End: 82.8) and "Trailing Range" (Start: 89.3, End: 89.7) settings; and "Confidence Percentage" with a "Threshold" set to 90%.

No.	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

12 Отстраняване на проблемите

12.1 Log архиви

Софтуерът пази немодифициран запис на всеки опит и диагностична информация в Log архиви. Използвайки Help, опцията Send Support Email, може да изпратите имейл с цялата нужна информация на QIAGEN Technical Service (виж Раздел 7.12.1).

За спестяване на място се пазят Log архиви само на последните 60 опита. По-старите Log архиви се презаписват при създаването на нови.

12.2 Отстраняване на проблемите при HRM

Коментари и предложения

Не може да се проведе HRM

Rotor-Gene Q MDx моделът няма функция HRM	Свържете се с местния представител на QIAGEN.
---	--

Няма HRM данни

Неправилна подготовка	Проверете настройките на филтрите.
	Проверете вида на ротора.
	Проверете какви реагенти сте използвали.
	Проверете подготовката на пробите.
	Пуснете положителна контрола (например проба, за която се знае, че ще даде резултат).

Коментари и предложения

Графиките за назъбени

Слаба или липсваща амплификация	Проверете верността на използваните протоколи и реактиви. Препоръчваме китове на QIAGEN за HRM анализ. Проверете подготовката на пробите. Проверете условията на циклите. Проверете началното качество и количество на матрицата. Препоръчваме китове на QIAGEN за подготовка на пробите.
---------------------------------	--

Насищане на графиките

Твърде високо увеличение	Използвайте Auto-Gain Optimisation (виж стр. 6-24).
--------------------------	---

Променени доверителни проценти

Нормализационните участъци са изместени	Местете нормализационните участъци само за да избегнете застъпване на кривата на топене.
---	--

Налице са отклонения

Неправилна подготовка	Проверете използваните реагенти. Уверете се, че епруветките са еднакви.
Наличие на инхибитори в пробите	Уверете се, че за всички проби е използван един местър микс.
Малко или деградирала матрица	Проверете началното качество и количество на матрицата.

12.3 Общи грешки на уреда

Съобщение

Коментари и предложения

Can't open the serial port <COMPORT>

Появява се при стартиране на софтуера, ако той не установява връзка с уреда през настройките COM порт. Често се получава при дефект в кабелите, хлабави кабели, дефектни серии или USB потове, проблем с USB драйвера или проблем с USB-към-serial конвертора.

Свържете или сменете кабела.
Преинсталирайте уместните драйвери.
Стартирайте софтуера във "Virtual Mode" и изберете "Setup/Auto-Detect button" от меню "File" за ресет на COM порта.

Chamber lid open

Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software.

Появява се когато софтуерът регистрира отваряне на капака по време на опита.

Рестартирайте уреда и софтуера.

Chamber lid open

The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue.

Появява се когато потребителя опита да стартира опит при отворен капак.

Затворете капака на камерата и натиснете "Continue".

Communication corrupted

Появява се когато данните, постъпващи от инструмента не отговарят на очакванията.

Необходимо е задълбочено изследване от сервизен специалист на QIAGEN за диагностициране на проблема.

Свържете се с вашия дистрибутор или с QIAGEN Technical Services.

Съобщение

Коментари и предложения

Communication out of sequence

Instrument has received data from the machine that is out of sequence.

Появява се когато данните от инструмента не са поредени правилно.

Необходимо е задълбочено изследване от сервизен специалист на QIAGEN за диагностициране на проблема.

Свържете се с вашия дистрибутор или с QIAGEN Technical Services.

Communication protocol error

A communication protocol error occurred with this run.

Появява се когато конфигурационният протокол не съвпада с очаквания.

Необходимо е задълбочено изследване от сервизен специалист на QIAGEN за диагностициране на проблема с комуникационния порт на уреда.

Detector motor jam, stopped machine

Появява се когато Rotor-Gene Q MDx е включен веднага след доставка при ниски температури.

В този случай оставете уреда да се аклиматизира към стайна температура за поне час преди да го включите.

Ако грешката не изчезва, се свържете с дистрибутора си или с QIAGEN Technical Services.

Fatal hardware malfunction

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.

Появява се когато софтуерът е открил фатална хардуерна малфункция и е активирал предпазна процедура за изключване на уреда.

Веднага изключете инструмента и се свържете с дистрибутора си или с QIAGEN Technical Services.

Съобщение	Коментари и предложения
Machine error 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.	Появява се когато софтуерът е открил грешка в уреда, която не може да се отстрани. Софтуерът е спрял опита. Изпробвайте още един опит. Ако проблемът не се решава, се свържете с дистрибутора си или с QIAGEN Technical Services и прикачете support archive файл.
Machine unplugged 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.	Появява се когато уредът не комуникира със софтура след даден интервал от време. Често причината е грешка в уреда или излишна активност на РС, което води до загуба на пакет. Чести софтуерни причини са натоварване на процесора, като антивирусна активност или сканиране, безжични карти или инфрачервени карти. Спрете или премахнете въпросната натоварваща програма/задача. Рестартирайте уреда и софтуера. Свържете се с дистрибутора си или с QIAGEN Technical Services при персистиращ проблем.
Machine unplugged 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.	Появява при загуба на серийна или USB комуникация с уреда. Свържете наново кабела отзад на компютъра и натиснете бутона "Continue".

Съобщение

Коментари и предложения

Object variable or with block variable not set

Появява се при стартиране на софтуера при развален стандартен шаблонен файл. Това може да се случи при некоректно изключване на софтуера/компютъра, напр. при спиране на тока.

Изтрийте файла **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\normal.ret** и рестартирайте софтуера.

Rotor speed failure

Time out while setting the rotor speed.

Появява се когато софтуерът е опитал да настрои скоростта на въртене и не е могъл да настрои таргетната скорост навреме.

Необходимо е задълбочено изследване от сервизен специалист на QIAGEN за диагностициране на проблема.

Свържете се с вашия дистрибутор или с QIAGEN Technical Services.

Serial port in use

The serial port is currently being used by another application. Close any applications such as communications or synchronization software and then retry."

Появява се когато софтуерът опита да се свърже с уреда през зададения COM порт докато портът се използва от друг софтуер.

Затворете всички приложения за комуникация и синхронизиране и опитайте отново.

Shutdown timeout

The instrument has exceeded the expected time to shutdown. Please reset the machine, and reset the software.

Появява се когато софтуерът е дал команда за спиране на уреда и машината продължава да изпраща данни обратно след определен период от време.

Рестартирайте уреда и софтуера.

Съобщение	Коментари и предложения
<p>Temperature protection activated</p> <p>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.</p>	<p>Появява се когато софтуерът засече опасна висока температура в камерата, което е активирало предпазна процедура.</p> <p>Веднага изключете уреда и се свържете с дистрибутора си или с QIAGEN Technical Services.</p>
<p>Thermistor is open</p> <p>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.</p>	<p>Появява се когато софтуерът установи, че термисторът е отворен и не може да отчете температурата; софтуерът е задействал предпазна процедура за изключване на уреда.</p> <p>Веднага изключете уреда и се свържете с дистрибутора си или с QIAGEN Technical Services.</p>
<p>Unrecoverable errors occurred</p> <p>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.</p>	<p>Появява се по време на опит след като софтуерът е опитал да се възстанови по всички начини и не е успял.</p> <p>Необходимо е задълбочено изследване от сервизен специалист на QIAGEN за диагностициране на проблема.</p> <p>Свържете се с вашия дистрибутор или с QIAGEN Technical Services.</p>

12.4 Съобщения на Rotor-Gene Q софтуера

The Следва списък с предупреждения и други съобщения, които могат да се появят в Rotor-Gene софтуера по време на работа. Всички променливи части съобщенията, като специфични характеристики, са дадени в скоби (напр. < ERROR DESCRIPTION >).

Текст на съобщението

Общи съобщения

- | | | |
|---|--|--|
| 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. | Груби данни от каналите вече съществуват за тази страница. Ако искате да създадете отново тази страница, трябва първо да изтриете грубите данни от каналите чрез бутона Options и след това да опитате отново. |
| 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. | Появил се е сериозен проблем, който налага да се изключи софтуера. След като щракнете върху ОК, текущата Ви работа ще бъде съхранена, а апаратът ще се изключи, ако това е възможно. Ако проблемът продължава да съществува, моля, обърнете се към дистрибутора. |
| 3 | Cannot delete this page. There must always be at least one sample page. | Не може да изтрие тази страница. Винаги трябва да има най-малко една примерна страница. |

Текст на съобщението

- | | | |
|---|--|--|
| 4 | Can't connect to instrument on serial port <COMPORT>. Check the machine is correctly plugged into the back of the computer, then retry | Не може да се свърже с апарата на серийния порт <COMPORT>. Проверете дали апаратът е правилно включен върху задната страна на компютъра, след това опитайте отново |
| 5 | Can't open the serial port <COMPORT> to connect to the instrument. Check you do not have any communications software open, then retry. | Не може да отвори серийния порт <COMPORT>, за да се свърже с апарата. Проверете дали нямате отворен комуникационен софтуер, след което опитайте отново. |
| 6 | Could not save to run because some data on the form was invalid. Please check your entries then try again. | Не можа да съхрани, за да пусне изследване, тъй като някои данни от формуляра бяха невалидни. Моля, проверете направените от Вас въвеждания и след това опитайте отново. |
| 7 | Couldn't save file. Confirm the disk has enough space and that it is free of errors. | Не можа да съхрани файла. Потвърдете, че на диска има достатъчно място и че няма грешки. |
| 8 | E-mail application could not be started. Confirm that it has been correctly installed on your computer. | Не можа да бъде стартирано имейл приложение. Потвърдете, че то е било правилно инсталирано на Вашия компютър. |
| 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. | Установена е грешка по време на изследване: <ERROR DESCRIPTION>. Изследването ще продължи, а съобщение ще бъде включено в съобщенията на "Run Info". |

Текст на съобщението

- | | | |
|----|---|---|
| 10 | Instrument was not detected. Please ensure you have correctly connected the instrument, and that the instrument is turned on. | Не е открит апарат. Моля, уверете се, че сте свързали апарата правилно и че апаратът е включен. |
| 11 | Logging is currently disabled due to a previous error. Archived logs cannot be viewed until the software has been restarted. | В момента свързването е деактивирано поради преходна грешка. Архивираните свързвания не могат да бъдат визуализирани, докато софтуерът не бъде рестартиран. |
| 12 | Not all samples could be normalised as the fluorescent level was too low. | Не всички проби може да бъдат нормализирани, тъй като флуоресцентното ниво беше много ниско. |
| 13 | Only runs performed with the same rotor as the current run may be imported. | Може да се вкарват само изследвания, направени със същия ротор като настоящия. |
| 14 | Please note that log files for the current run will not be available until it has completed. | Моля, обърнете внимание на това, че файлове за свързвани за настоящото изследване няма да има, докато то не завърши. |
| 15 | Please type valid number of times to repeat. It should be more than 0. | Моля, напишете валиден номер за това колко пъти да бъде направено повторение. Цифрата трябва да бъде по-голяма от. |
| 16 | Problem encountered while updating log data. Logging has been disabled, but will be reenabled on the next run. | Открит е проблем при актуализиране на данните за свързването. Свързването е деактивирано, но ще бъде активирано отново при следващото изследване. |

Текст на съобщението

- | | | |
|----|---|--|
| 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. | Подписването на файла на изследването осигурява интегритет на Вашите резултати от изследването. Информация за подписа на изследването може да бъде намерена в прозореца с информация за изследването. |
| 18 | Sample ID is locked. Cannot paste over locked samples. | ID на пробата е заключена. Върху заключени проби не може да се копира. |
| 19 | TeeChart Office has not been installed on this computer. Please re-install the Rotor-Gene software. | TeeChart Office не е инсталиран на този компютър. Моля, инсталирайте отново софтуера Rotor-Gene. |
| 20 | The COM port configured for the instrument is not selected. You must select a COM port. | Няма избран COM порт, конфигуриран за апарата. Трябва да изберете COM порт. |
| 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. | Зареденият файл с изследване съдържа подпис, който не съответства на съдържанието на файла. Това или означава, че файлът е опорочен, или е бил манипулиран след записването му от софтуера Rotor-Gene. |
| 22 | The loaded run file has no signature. The contents of this file cannot be guaranteed. | Зареденият файл с изследване няма подпис . Съдържанието на този файл не може да бъде гарантирано. |
| 23 | The Machine serial number is not valid. Serial numbers must be at least 6 digits long. | Серийният номер на машината е невалиден. Серийните номера трябва да бъдат с най-малко 6 цифри. |

Текст на съобщението

- | | | |
|----|--|--|
| 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. | Апаратът ще бъде охладен до <TEMPERATURE> градуса. Камерата и повърхностите ще продължат да бъдат много горещи при отваряне на машината. Моля, внимавайте и носете защитни ръкавици, ако докосвате някоя от повърхностите или епруветките. |
| 25 | The regional settings for your computer are conflicting. Ensure your currency and numeric decimal placeholders are matching. | Регионалните настройки за Вашия компютър са конфликтни. Уверете се, че Вашата валута и мястото на десетичният знак са съответстващи. |
| 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. | Въведеният в началния екран сериен номер <SERIAL NUMBER1> не съответства на серийния номер <SERIAL NUMBER2>, съхранен в свързания апарат. Сериеният номер на компютъра вече е актуализиран, за да съответства на свързания апарат. |
| 27 | There was a problem communicating with the communication board. You should reboot the computer and then retry. | Има проблем в комуникациите с комуникационното табло. Трябва да стартирате отново компютъра и след това да опитате пак. |
| 28 | There was a timeout attempting to talk to the instrument. Check it is correctly plugged in. | При опита за комуникация с апарата е допуснато прекъсване. Проверете дали е свързан правилно. |

Текст на съобщението

- | | | |
|----|---|---|
| 29 | This feature cannot be used in virtual mode. | Тази характеристика не може да бъде използвана във виртуален режим. |
| 30 | This profile file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. | Този файл за профил е създаден от по-нова версия на софтуера Rotor-Gene. Определени аспекти може да не се заредят правилно. |
| 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. | Този файл за изследване е създаден от по-нова версия на софтуера Rotor-Gene. Определени аспекти от изследването може да не се заредят правилно. |
| 32 | This sample file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. | Този файл за проба е създаден от по-нова версия на софтуера Rotor-Gene. Определени аспекти може да не се заредят правилно. |
| 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. | Този софтуер ще извърши основни симулации на апарата за обучение и с демонстрационна цел. Можете да деактивирате тази настройка през екрана "Setup", достъпен от менюто "File". |
| 34 | This template was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the template may not load correctly. | Този шаблон е създаден от по-нова версия на софтуера Rotor-Gene. Определени аспекти на шаблона може да не се заредят правилно. |

Текст на съобщението

- | | | |
|----|--|---|
| 35 | Unable to load this sample file as tube layouts do not match. Load these samples before starting the run. | Не е възможно да се зареди този файл на проба, тъй като разположението на епруветките не е съответстващо. Заредете тези проби преди да пуснете изследването. |
| 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. | Не е възможно да се отворят комуникациите с апарата, тъй като друго приложение вече използва <COMPORT>. Проверете дали няма пуснато някакво приложение, което използва същия сериен порт, след което опитайте отново. |
| 37 | Unrecoverable errors were encountered while attempting to load the file. The file was not loaded. | Установени са невъзстановими грешки при опита да се зареди файла. Файлът не е зареден. |
| 38 | You cannot stop the program while the run is in progress. | Не можете да спрете програмата, докато е в ход изследване. |
| 39 | You have insufficient rights to use the software. Please contact the domain administrator to set up groups. | Нямате достатъчни права, за да използвате софтуера. Моля, обърнете се към администратора на домена, за да зададе групи. |
| 40 | You must have performed a quantitation analysis to export samples. | Трябва да сте направили количествен анализ, за да експортирате проби. |
| 41 | You must select a COM port before continuing. | Трябва да изберете а COM порт преди да продължите. |

Текст на съобщението

- | | | |
|----|--|--|
| 42 | Your run could not be saved to its default location. On the following window, select an alternative location to save your run. | Вашето изследване не може да бъде съхранено на мястото му по подразбиране. На следващия прозорец изберете алтернативно място, за да съхраните Вашето изследване. |
| 43 | Your settings have been saved. Click OK to close the software. | Вашите настройки бяха съхранени. Щракнете върху ОК, за да затворите софтуера. |
| 44 | You must select a rotor before continuing. | Трябва да изберете ротор преди да продължите. |
| 45 | You cannot start the run until you tick the checkbox to confirm that the locking ring has been attached. | Не можете да започнете изследването докато не поставите отметка в съответното квадратче, за да потвърдите, че е поставен заключващ пръстен. |

Съобщения свързани с Автоматично увеличение

- | | | |
|----|---|--|
| 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. | Корекцията с ръчно увеличение използва каналите, които сте дефинирали във Вашия профил. Тъй като във Вашия профил не сте дефинирали точки на отчитане, не можете да направите корекция с ръчно увеличение. |
| 47 | The temperature you entered was not saved because it was outside the range of the machine. Enter a valid temperature. | Въведената от Вас температура не е съхранена, тъй като е извън диапазона на апарата. Въведете валидна температура. |

Текст на съобщението

Редакторски съобщения

- 48 Please enter a valid group code. Group codes must be a maximum of 5 characters, and contain no spaces or commas. Моля, въведете валиден групов код. Груповите кодове трябва да бъдат с максимум 5 знака, и да не съдържат интервал или запетайка.
- 49 Please enter a valid group name. Group names cannot contain commas or be empty. Моля, въведете валидно групово име. Груповите имена не могат да съдържат запетайки или да бъдат празни..

Съобщения, свързани с оптична денатурираща калибровка

- 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. Не е възможно да се зададе като оптична денатурираща точка поради неуспешна калибрация. Моля, въведете валидна цифра за секундите на задържане. Стойността трябва да е положителна.
- 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. Не е бил уловен пик на топене по време на оптична денатурираща калибрация. Това може да се дължи на неправилно избрана епруветка за калибрация, или на използване на неподходящ за тази проба химикал. Вместо това е пуснат профил "Timed step".

OTV съобщения

- 52 You must enter a valid OTV serial number to perform the run. Трябва да въведете валиден OTV сериен номер, за да направите изследването.

Текст на съобщението

- | | | |
|----|---|--|
| 53 | This temperature verification file has been corrupted. Please uninstall and re-install the Rotor-Gene software to correct this error. | Този файл за температурна проверка е опорочен. Моля деинсталирайте и инсталирайте отново софтуера Rotor-Gene, за да коригирате тази грешка. |
| 54 | This run file is not correctly signed. Results cannot be displayed. | Този файл за изследване не е правилно подписан. Резултатите не може да бъдат показани. |
| 55 | You cannot start until you tick the checkbox to confirm that the fluorescent insert has been placed correctly. | Не можете да започнете, докато не поставите отметка в съответното квадратче, за да потвърдите, че флуоресцентната вложка е правилно поставена. |
| 56 | This rotor has expired. Please contact your distributor to obtain a replacement. | Този ротор е с изтекъл срок на годност. Моля, обадете се на Вашия дистрибутор, за да получите нов. |

Съобщения във връзка със сигурността

- | | | |
|----|--|--|
| 57 | Could not open the Windows user/group manager. | Не можах да отворя Windows администратора за потребител/група. |
| 58 | Could not create groups. | Не можах да създам групи. |
| 59 | Cannot modify access of inbuilt accounts. | Не мога да променя достъпа на вградени акаунти. |

Текст на съобщението

Меню анализ

- | | | |
|----|--|--|
| 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. | Избрали сте само един канал за анализ. За да изберете повече канали, очертайте правоъгълник около каналите, които искате да покажете в прозореца за избор на анализ. |
| 61 | You have selected multiple channels for analysis. This analysis technique only allows single channels to be analysed. | Избрали сте множество канали за анализ. Тази техника дза анализ позволява анализирането само на единични канали. |

Съобщения за измерване на концентрация

- | | | |
|----|---|---|
| 62 | Concentration Measurement performs auto-gain optimisation on the first rotor position. Ensure you have your highest concentration standard in the first rotor position. | “Concentration Measurement” извършва оптимизация на увеличението в първата позиция на ротора. Уверете се, че в първата позиция на ротора е стандартът за най-високата концентрация. |
|----|---|---|

Съобщения за анализ на крайна точка

- | | | |
|----|--|--|
| 63 | To use end-point analysis you must have positive and negative controls in each channel. To define these controls click OK. | За да използвате анализ на крайна точка, трябва да имате положителни и отрицателни контроли за всеки канал. За да дефинирате тези контроли, щракнете върху ОК. |
| 64 | You have not defined any positive controls. You must define positive controls for each channel you are analysing. | Не сте дефинирали никакви положителни контроли. Трябва да дефинирате положителни контроли за всеки канал, който анализирате. |

- | | | |
|----|---|--|
| 65 | You have not defined any negative controls. You must define negative controls for each channel you are analysing. | Не сте дефинирали никакви отрицателни контроли. Трябва да дефинирате отрицателни контроли за всеки канал, който анализирате. |
| 66 | You have not defined any NTC controls. You must define NTC controls for each group. | Не сте дефинирали никакви NTC контроли. Трябва да дефинирате NTC контроли за всяка група. |

Съобщения за HRM анализ

- | | | |
|----|---|--|
| 67 | Genotype <GENOTYPE NAME> does not have a control defined. | Генотип <GENOTYPE NAME> няма дефинирана контрола. |
| 68 | Duplicate genotype combinations are not allowed. | Не се допускат двойни генотипни комбинации. |
| 69 | High resolution melts are not supported on this instrument. Please contact your distributor for more information. | Стапяния с висока резолюция не се поддържат на този апарат. Моля, обърнете се към дистрибутора за повече информация. |

Съобщения за анализ на топене

- | | | |
|----|--|---|
| 70 | The genotypes can not be defined until bins have been placed. Please define all bins and then try again. | Генотипите не могат да бъдат дефинирани, докато не бъдат поставени бинове. Моля, дефинирайте всички бинове и след това опитайте отново. |
| 71 | You must enter an abbreviation for <GENOTYPE NAME> genotype. | Трябва да въведете съкращение за <GENOTYPE NAME> генотипа. |

Съобщения за анализ на корелационна диаграма

- 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.
- Анализът на корелационна диаграма изисква да бъдат избрани точно 2 канала. За да изберете множество канали, очертайте правоъгълник около каналите, които искате да покажете в прозореца за избор на канали, или щракнете върху всеки канал, докато държите натиснат клавиш SHIFT.

Съобщения за количествен анализ

- 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...”
- Характеристиката за автоматично намиран праг изисква да сте дефинирали най-малко 2 избрани стандарта. За да зададете това, щракнете с десен бутон на мишката върху пробата и изберете “Edit Samples...”

13 Речник

Термин	Описание
Acquisition – Отчитане	Събирането на флуоресцентни данни. Всяко отчитане (набор от флуоресцентни данни) от канал се изобразява в като неанализирани данни в прозорец („Raw Channel”). Тези данни се анализират чрез опциите в менюто “Analysis”.
Bins – Бинове	При топенето биновете дефинират участък, където се очаква пик на топене. На базата на наличие на пикове в определени бинове или комбинация от бинове могат да се определят генотипове.
CE-IVD	Съответствие с Европейската директива 98/79/EC за ин-витро диагностични медицински изделия.
Channel – Канал	Каналът се състои от светодиод (LED) с филтър на възбуждане свързан с филтъра на излъчване. LED и възбудния филтър, възбуждат пробата при определена дължина на вълната. Излъчената флуоресценция минава през филтъра на излъчване преди детекцията от фотоумножител.
Gain – Увеличение	Rotor-Gene Q MDx използва фотоумножител за да улавя фотони и да ги превръща в електронен сигнал. Увеличението е настройка, която определя чувствителността на фотоумножителя. Ако то е прекалено високо, сигналът е пренаситен. Ако е прекалено ниско, сигналът не може да се различи от фоновия шум.
Gain оптимизация	Това е процес, който динамично настройва увеличението, като позволява избор на подходяща настройка за оптимална детекция.
Loading block – зареждащ блок	Зареждащите блокове са алуминиеви блокове, налични в различни формати и се използват за поддържане епруветките или Роторните дискове при подготвяне на реакцията, или при запечатване на роторни дискове с Rotor-Disc Heat Sealer.

Термин	Описание
Locking Ring – Заклучващ пръстен	Заклучващите пръстени се поставят на ротора за да предпазят от разхлабване на капачките по време на работа на Rotor-Gene Q MDx. Разхлабените капачки могат да повредят уреда.
Rotor - Ротор	Металният ротор държи епруветките или Роторните дискове в Rotor-Gene Q MDx. Осигурява въртенето на пробите и правилното им подравняване с оптичната сиситема. Роторът е подсигурен от заключващ пръстен.
Rotor-Disc – Роторен диск	Роторните дискове са кръгли платформи от вертикално ориентирани ямки. Налични са 72- и 100- ямкови формати. Роторните дискове се запечатват с Rotor-Disc Heat Sealing Film и Rotor-Disc Heat Sealer.

Приложение А

Технически данни

QIAGEN си запазва правото да промени техническите параметри по всяко време.

Условия на околната среда

Условия на работа

Захранване	100–240 V AC, 50–60Hz, 520 VA (пик) Консумация 60 VA (standby) Флукуациите в напрежението да не надвишават 10% от номиналното напрежение.
Бушони	F5A 250 V бушони
Отделяне на топлина/ терм. товар	Средно: 0.183 kW (632 BTU/час) Пик: 0.458 kW (1578 BTU/час)
Категория на пренапрежение	II
Темп. на въздуха	18 до 30°C (64 до 86°F)
Относителна влажност	10–75% (некондензираща)
Височина	До 2000 m (6500 ft.)
Място на работа	За употреба в закрити помещения
Ниво на замърсяване	2
Екологичен клас	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

Температурна точност	±0.5°C (калибрирана с процедура на Rotor-Disc OTV)
Температурна резолюция	±0.02°C (най-малка програмируема стъпка)
Температурна хомогенност	±0.02°C (стандартно отклонение)

Оптични спецификации

Описание	Спецификация
Възбуден източник	Високо енергийни светодиоди
Детектор	Фотоумножител
Време за отчитане	4 s

FCC декларация

“United States Federal Communications Commission” (USFCC) (in 47 CRF 15. 105) декларира, че потлебителите на този продукт трябва да бъдат уведомен за следните факти и обстоятелства.

“Това изделие отговаря на изискванията на част 15 от FCC: Работата с него трябва да отговаря на следните две условия: (1) Това изделие не може да предизвика вредни смущения, и (2) това изделие трябва да приеме всякакви смущения, включително и такива, които биха могли да причинят нежелано функциониране.”

“Този дигитален апарат от клас Б отговаря на стандарт ICES-0003 на Канада.”

Следните твърдения касаят продуктите в настоящия наръчник, освен ако не е посочено друго. Твърдението за други продукти ще бъде отразено в съпровождащата документация.

Забележка: Това оборудване е било изследвано и е установено, че отговаря на изискванията за дигитално изделие от клас Б, съгласно част 15 на FCC Rules и отговаря на всички изисквания на канадския Interference-Causing Equipment Standard ICES-003 за дигитални апарати. Тези ограничения имат за цел да осигурят надеждна защита от вредни смущения при инсталиране в домашни условия. Това оборудване генерира, използва и може да излъчва радиочестотна енергия и ако не е инсталирано и използвано съгласно инструкциите, може да причини вредни смущения на радиокомуникациите. Няма обаче гаранция, че смущения няма да възникнат при определена инсталация. Ако това оборудване предизвика вредни смущения на радио и телевизинни предавания, което може да се установи чрез включване и изключване на оборудването, потребителят би следвало да направи опит да коригира смущенията, като предприеме една или повече от следните мерки:

- преориентиране или промяна на местоположението на приемащата антена
- повишаване на разстоянието между оборудването и приемника
- свързване на оборудването с изхода на верига, различна от тази, на която е свързан приемникът

Консултирайте се с дилъра или аопитен радио/телевизионен техник.

QIAGEN GmbH Германия не носи отговорност за радио телевизионни смущения, причинени от неоторизирани промени на оборудването или замяна или свързване с кабели и оборудване различни от определените от QIAGEN GmbH, Германия. Отговорен за корекция на смущенията предизвикани от подобна неоторизирана модификация, заместване или свързване, е потребителят.

Декларация за съответствие

Име и адрес на законния производител

QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden

Германия

Може да се заяви актуална Декларация за съответствие от отдела за техническо обслужване на QIAGEN.

Изхвърляне на електрическо и електронно оборудване (WEEE)

Този раздел дава информация за изхвърлянето на електрическо и електронно оборудване от потребители.

Символът с поставен върху кофа за отпадъци кръст (вж. по-долу) показва, че този продукт не трябва да бъде изхвърлян заедно с други отпадъци; Той трябва да се занесе в подходящо за преработка място или в определен център за рециклиране, съгласно местните закони и разпоредби.

Разделното събиране и рециклиране на отпадно електронно оборудване в момента на изхвърлянето му има за цел да съхрани природните ресурси и да гарантира, че продуктът е рециклиран по начин, който предпазва човешкото здраве и околната среда.



Рециклирането може да се осъществи от QIAGEN при поискване и срещу заплащане. В Европейския съюз, съгласно специфичните изисквания на WEEE за рециклиране и когато QIAGEN предоставя нов апарат в замяна, рециклирането се предоставя безплатно за маркирано със знака на WEEE електронно оборудване.

За рециклиране на електронно оборудване, се обърнете към Вашия местен търговски охис на QIAGEN, за да получите необходимия формуляр за връщане. След като формулярът бъде подаден, ще Ви се обадят от QIAGEN или за допълнителна информация, или за определяне на дата за вземане на използваното оборудване, или да Ви направят индивидуална оферта.

Тази страница умишлено е оставена празна

Приложение В

Това приложение дава подробна информация за използваните математични методи.

Количествен анализ

Изчислените концентрации са получени чрез проста линейна регресия, с известните стойности на \log концентарцията (x) и експерименталните стойности C_T (y).

\log концентарциите и C_T на стандартите се използват да изготвяне на следния модел:

$$y = Mx + B$$

Доверителни интервали на изчислените концентрации

Използваме следния доверителен интервал $100(1 - \alpha)\%$ за оценка на ново наблюдение x_0 от стандартната крива.

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

Това е доверителният интервал за концентрацията на една неизвестна проба.

Нека имаме k нови наблюдения при $x = x_0$ и средна стойност \bar{Y}_0 . Тогава,

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

и аргументи подобни на горния дават

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

Тази Формула определя как се получават доверителните интервали за концентрациите на повторения от неизвестни.

За определяне на стандарти могат да се използват потесни доверителни интервали:

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

Смисълът на формулата е, че добавянето на повторения към стандартна индивидуална концентрация намалява ширината на интервала за всички оценки с повишаването на n . Добавянето на множество повторения към неизвестно намалява несигурността от употребата на един стандарт. Това се дължи на факта, че неизвестното не формира част от линейния модел.

Доверителни интервали за C_T стойностите

Допускаме, че грешката при повторенията на C_T стойностите е линейна и нормално разсеяна.

Затова използваме One-Sample t доверителен интервал. Нека μ среданата стойност на C_T за повторенията

$(x_0 \dots x_{n-1})$. Тогава $100(1 - \alpha)\%$ доверителен интервал за C_T стойност μ е:

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

Биихме искали да благодарим на Питър Кук от математическият факултет на Университета NSW, Сидни, Австралия за помощта при проверката на математическите подходи.

Приложение С

Rotor-Gene Q MDx продукти, аксесоари и консумативи

Продукт	Съдържание	Кат. но.
Rotor-Gene Q MDx 2plex	PCR апарат в реално време с 2 канала (зелен, жълт), лаптоп, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM	PCR апарат в реално време и анализатор на топене с висока резолюция с 2 канала (зелен, жълт) плюс HRM канал, лаптоп, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда	9002012
Rotor-Gene Q MDx 5plex	PCR апарат в реално време с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	PCR апарат в реално време и анализатор на топене с висока резолюция с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), плюс HRM канал, лаптоп, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex	PCR апарат в реално време с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), включително лаптоп, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда	9002042

Продукт	Съдържание	Кат. но.
Акcesoари		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Комплектът включва: 2 Rotor-Disc 100 опаковки, Rotor-Disc запечатващо устройство с топлина, Rotor-Disc фил с топло запечатване, Rotor-Disc 100 Rotor и заключващ пръстен, Rotor-Disc 100 зареждащ блок, Rotor-Disc пипетиращо устройство	по заявка
Rotor-Disc 100 (30)	30 индивидуално опаковани диска за 3000 реакции	981311
Rotor-Disc 100 (300)	10 x 30 индивидуално опаковани диска за 30 000 реакции	981313
Rotor-Disc 100 Rotor	За задържане на Rotor-Disc 100 дисковете в Rotor-Gene Q MDx; изисква Rotor-Disc 100 заключващ пръстен	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	За заключване на Rotor-Disc 100 в Rotor-Disc 100 ротора	9018896
Rotor-Disc 100 Loading Block	Алуминиев блок за ръчно и автоматизирано настройване на реакция в Rotor-Disc 100 дискове	9018909
Rotor-Disc Pipetting Aid	Устройство за маркиране на ямки при ръчна настройка на реакция на зареждащ блок Rotor-Disc	9018897
Rotor-Disc Heat Sealer	Устройство за запечатване с топлина за употреба с Rotor-Discs; изисква Rotor-Disc 72 или 100 запечатващ блок	9018898
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	60 филма за запечатване на Rotor-Disc 100 или Rotor-Disc 72 диска	981601
Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	10 x 60 филма за запечатване на Rotor-Disc 100 или Rotor-Disc 72 диска	981604

Продукт	Съдържание	Кат. но.
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Комплектът включва: 3 Rotor-Disc 72 опаковки, Rotor-Disc запечатващо с топлина устройство, Rotor-Disc запечатващ с топлина филм, Rotor-Disc 72 ротор и заключващ пръстен, Rotor-Disc 72 зареждащ блок, Rotor-Disc пипетиращо устройство	по заявка
Rotor-Disc 72 (24)	24 индивидуално опаковани диска за 1728 реакции	981301
Rotor-Disc 72 (240)	10 x 24 индивидуално опаковани диска за 17 280 реакции	981303
Rotor-Disc 72 Rotor	За задържане на Rotor-Disc 72 диска в Rotor-Gene Q MDx; изисква Rotor-Disc 72 заключващ пръстен	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	За заключване на Rotor-Disc 72 в Rotor-Disc 72 ротор	9018900
Rotor-Disc 72 Loading Block	Алуминиев блок за ръчно и автоматизирано настройване на реакция в Rotor-Disc 72 диска	9018910
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 ленти на 4 епруветки и капачки за 1000 реакции	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 ленти на 4 епруветки и капачки за 10 000 реакции	981106
72-Well Rotor	За задържане на ленти, епруветки и капачки, 0,1 ml; изисква заключващ пръстен рот със 72 ямки	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	За заключване на ленти епруветки и капачки, 0,1 ml, в ротора със 72 ямки	9018904

Приложение С

Продукт	Съдържание	Кат. но.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Алуминиев блок за ръчно настройване на реакцията с едноканална пипета в 72 x 0,1 ml епруветки	9018901
Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel	Алуминиев блок за настройване на реакцията с многоканални пипети в 72 x 0,1 ml епруветки	9018902
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 тънкостенни епруветки за 1000 реакции	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 тънкостенни епруветки за 10 000 реакции	981008
36-Well Rotor	За задържане на PCR епруветки, 0,2 ml; изисква ротор с 36 ямки заключващ пръстен	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	За заключване на PCR епруветки, 0,2 ml, в ротора с 36 ямки	9018906
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Алуминиев блок за ръчно настройване на реакцията в стандартна 8 x 12 серия с 96 x 0,2 ml епруветки	9018905
Rotor-Disc OTV Kit	Комплект за оптична температурна верификация на системите Rotor-Gene, включва Rotor-Disc предварително натоварен с термохроматични течни кристали, флуоресцентни вложки, CD с калибрационни файлове; изисква Rotor-Disc 72 ротор и заключващ пръстен или Rotor-Disc 72 начален комплект	981400
Rotor Holder	Неметален статив за сглобяване на епруветки и Rotor-Discs в ротори	9018908

За актуален списък на комплектите QIAGEN, показани за употреба с Rotor-Gene Q MDx, моля, направете справка с www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx.

Приложение D

Клауза за носене на отговорност

QIAGEN няма да има никакви задължения по тази гаранция в случай на поправки или модификации направени от хора извън служебния персонал, освен в случаите, когато компанията е дала писмено съгласие за извършването на такива поправки или модификации.

Всички материали, заменени по настоящата гаранция, ще бъдат с гаранция, чиято продължителност ще бъде равна само на оригиналния период на гаранция, и в никакъв случай след оригиналната дата на изтичане на гаранцията, освен ако няма писмена оторизация от служител на компанията. Изделията за отчитане, за интерфейс и свързания софтуер ще бъдат с гаранция само за периода, определен от оригиналния производител на тези продукти. Представителства и гаранции от хора, включително представители на QIAGEN, които не отговарят или са в противоречие с условията на настоящата гаранция, няма да имат обвързващо действие по отношение на компанията, освен ако не е направено в писмена форма и утвърдено от служител на QIAGEN.

Тази страница умишлено е оставена празна

Индекс

— A —

Adjust scale, 7-2
 Advanced интерфейс, 6-7
 Audit следи, 7-98
 Auto-find threshold, 7-21
 Autoscale, 7-2
 AutoStat, 7-26

— C —

Channels, 3-3
 Correlation coefficient, 7-15
 Crop cycles, 7-3
 Ct Comment, 7-23
 Ct изчисление, 7-19
 Cycling, 6-14

— D —

Default scale, 7-2
 Detection parameters, 3-3
 Dynamic tube normalization, 7-53

— E —

Efficiency, 7-15
 Empty run, 6-8
 EndPoint анализ, 7-56
 контроли, 7-59
 Excitation parameters, 3-3

— F —

Fluorophores detected, 3-3

— G —

Gain optimisation, 6-11
 Gain settings, 7-105
 Genotypes
 allelic discrimination, 7-52
 endpoint analysis, 7-57
 scatter graph analysis, 7-54

— H —

Hold, 6-13
 HRM
 advanced wizard, 6-9
 PCR в реално време, 11-17
 quick start wizard, 6-3
 SNP генотипирание, 11-3
 анализ, 7-67, 11-1, 11-19
 анализ на метилирането, 11-5
 китове, 11-3
 насоки, 11-7
 отстраняване на проблеми, 12-1
 подготовка, 11-9
 софтуер, 11-9
 цикъл, 6-18

— I —

Ignore first, 7-53

— L —

LinReg
 изнасяне към, 7-9
 Log архивиране, 12-1
 Long Range, 6-15

— M —

Maintenance
 advanced wizard, 6-9
 Melt curve analysis
 bins, 7-45
 peaks, 7-45

— N —

Noise slope correction, 7-53
 Normalization, 7-2
 dynamic tube, 7-53
 Nucleic acid concentration
 measurement, 6-3

— O —

Operation
conditions, 1
Outlook, 7-110

— P —

Page, 7-3, 7-5, 7-80
Perform last run, 6-2, 6-8
Port, 4-11, 7-11
Primer-dimers, 11-18

— Q —

Quantitation, 1
Quenched FRET, 6-2
Quick start интерфейс, 6-1

— R —

Rotor
specifications, 5-3
Rotor-Disc 100, 5-3
Rotor-Disc 72, 5-2
Run
настройки, 7-70
пауза, 7-69
старт, 7-69
стоп, 7-69

— S —

Sample types, 7-79
Serial number, 4-11
Specifications
hardware, 2
optical, 3
thermal, 2
Standard curve
export, 7-16
formula, 7-16
overlay, 7-16
Storage, 2
Suitabilities, 7-83

— T —

TeeChart Office, 8-4, 8-6

Templates

adding to advanced wizard, 6-9
adding to quick start wizard, 6-3
allelic discrimination, 7-52
scatter graph analysis, 7-55
Three step with melt, 6-2, 6-9
Threshold, 7-20
Touchdown, 6-15
Transportation, 2
Troubleshooting
HRM, 12-1
Two step, 6-2, 6-9

— V —

Virtual mode, 4-11, 7-11

— A —

Алелна дискриминация, 7-50
Анализ на концентрацията, 7-64
стандарти, 7-65
Анализ на корелационна диаграма, 7-52

— Б —

Безопасност
биологична, 1-5
електрическа, 1-4
механична опасност, 1-8
отровни изпарения, 1-7
поддръжка, 1-9
правилна употреба, 1-2
проби, 1-5
топлинна опасност, 1-9
унищожаване на отпадъците, 1-7
химикали, 1-7

— B —

Версия, 2-2

— Г —

Генотипи
EndPoint анализ, 7-63
анализ на кривата на топене, 7-46

Груби данни от каналите, 7-1
Групи, 7-84

— Д —

Два стандартни метода за крива, 7-34
Делта делта C_T относителен анализ,
7-39

— Е —

Експоненциална амплификация, 7-32
Ефективност, 7-32

— З —

Заклучване
шаблони, 7-104
Заклучване на проби, 7-102
Заклучващ пръстен
36-ямков ротор, 5-1
72-ямков ротор, 5-2
Rotor-Disc 100, 5-3
Rotor-Disc 72, 5-2
Зареждащ блок, 5-4

— И —

Игнорирай първите, 7-29
Измерване концентрацията на
ядрена киселина, 7-64
Изнасяне
графики, 8-2
данни, 8-5
към LinReg, 7-9
нативен формат, 8-4
Изследване
ново, 7-6
отваряне, 7-7
подписи, 7-100
съхранение, 7-7
Икона гаечен ключ, 8-5
Инсталация, 4-1
изисквания към заземяването, 4-2
изисквания към компютърната
система, 4-2
изисквания към
местоположението, 4-1
изисквания към мрежата, 4-2

софтуер, 4-9
хардуер, 4-7

— К —

Канали, 7-71
Кит Rotor-Disc OTV, 10-2
Количествен анализ, 7-13
Корекция на наклона на шума, 7-28
Корекция на точката на отделяне, 7-
29
Крива при анализ на топене, 7-42

— Л —

Лента с инструменти, 7-1

— М —

Мащабиране, 8-2
Меню
Analysis, 7-11
display options, 7-86
File, 7-5
gain, 7-105
help, 7-106
run, 7-69
security, 7-87
view, 7-70
window, 7-106

— Н —

Наклон, 7-32
Нормализация
EndPoint анализ, 7-60
динамична епруветка, 7-27
Нормализация на динамична
епруветка, 7-27

— О —

Околна среда, 1-5
Оперативни процедури
софтуер, 6-1
хардуер, 5-1
Оптимизация на увеличението, 6-24
ръчно настройване, 6-29

Оптичен денатуриращ цикъл, 6-18
Оптична система, 3-3
Оптична температурна верификация,
10-1
Опции на уреда, 7-70
Отстраняване на проблеми, 12-1
Rotor-Gene Q MDx, 12-3
Отчитане, 6-15

— П —

Повторения на калибратора, 7-49
Подготовка на реакция, 5-4
Поддръжка, 7-107, 9-1
Подрезждане на епруветките, 7-73
Потребител
няколко акаунта, 7-97
определяне на роли в Win7, 7-90
присвояване на роли Win7, 7-97
създаване на акаунт в Win7, 7-89
Създаване на профил Win7, 7-95
Превключване между пробите, 7-3
Предназначение, 2-2
Премахване на отклонения, 7-29
Прогрес на профила, 7-75
Прозорец за адекватност на проби, 7-83
Прозорец за настройки, 7-10
Прозорец за подготовка на проби, 6-7
Прозорец за потвърждаване на профила, 6-5
Прозорец за редактиране на проби, 6-31, 7-76
вид ротор, 7-82
Прозорец за редактиране на профила, 6-12
Прозорец на браузер за доклади, 7-13
Прозорец на браузера за отчети, 7-46
Прозорец с браузер за доклади, 7-9
Прозорец с резултати при количествено определяне, 7-21
Прозорец с резултатите от кривата на топене, 7-46

— Р —

Работа
условия, 1-5

Разопаковане, 4-6
Ротор
36-ямков, 5-1
72-ямков, 5-2
Rotor-Disc 100, 5-3
Rotor-Disc 72, 5-2
видове, 5-1
избор, 6-4, 6-9
Роторен диск
запечатване с висока температура, 5-9
подготовка, 5-9

— С —

Сигурност, 7-73, 7-87
конфигурация при Win7, 7-88
Символи, 1-10
Софтуер
версия, 4-13
обновяване, 4-22
Сравнителен количествен анализ, 7-47
Стандартна крива, 7-14
вносяне, 7-17
два стандартни метода за крива, 7-34
изчисление, 7-17
формула, 7-33
съобщение за грешка, 12-3
Съобщения, 7-71

— Т —

Температурна графика, 7-74
Температурна характеристика, 3-1
Техническа поддръжка, 2-1
Топене, 6-17

— У —

Унищожаване на отпадъците, 1-7

— Х —

Хибридизация, 6-17

— Ш —

Шаблини

EndPoint анализ, 7-64, 8-1

Scatter графичен анализ, 8-1
алелна дискриминация, 8-1
анализ на топене, 7-47, 8-1
количествен анализ, 7-33, 8-1

Тази страница умишлено е оставена празна

Australia ■ techservice-au@qiagen.com
Austria ■ techservice-at@qiagen.com
Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com
Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com
Canada ■ techservice-ca@qiagen.com
China ■ techservice-cn@qiagen.com
Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com
Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com
France ■ techservice-fr@qiagen.com
Germany ■ techservice-de@qiagen.com
Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com
India ■ techservice-india@qiagen.com
Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com
Italy ■ techservice-it@qiagen.com
Japan ■ techservice-jp@qiagen.com
Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com
Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com
Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com
The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com
Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com
Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com
Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com
Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com
UK ■ techservice-uk@qiagen.com
USA ■ techservice-us@qiagen.com

Поръчване www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com

