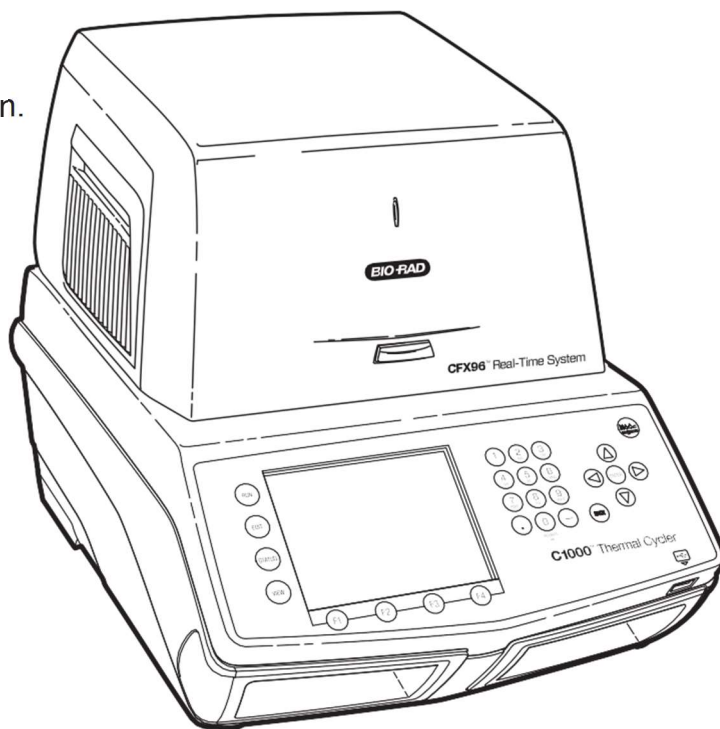


CFX96™ Tikro laiko PGR aptikimo sistema

Naudotojo vadovas

REF 185-5095-IVD
184-5097-IVD

Redakcija: 2010 m. gegužės mėn.
Programinės įrangos versija: 1.6



BIO-RAD

Autorinės teisės© priklauso 2010 Bio-Rad Laboratories, Inc. Platinimas bet kokia forma (spausdintine ar elektronine) be raštiško Bio-Rad Laboratories, Inc. sutikimo, yra draudžiamas.

Excel, Microsoft, PowerPoint, Windows, Windows Vista ir Windows 7 yra Microsoft Corporation prekybiniai ženklai. Adobe ir Reader yra Adobe Systems Incorporated prekybiniai ženklai. Cy yra GE Healthcare group kompanijoms priklausančias prekybinis ženklas. Fluor ir Quasar yra Biosearch Technologies, Inc. prekybinis ženklas.

SYBR® ir Texas Red yra Invitrogen Corporation prekybinis ženklas. Invitrogen Corporation suteikė licenciją Bio-Rad Laboratories, Inc. parduoti reagentus, skirtus tikro laiko PGR moksliniams tyrimams, kurių sudėtyje yra SYBR® Green I. Kiti prekiniai ženklai ar pavadinimai yra atitinkamų turėtojų nuosavybė.

INFORMACIJA APIE BIO-RAD TERMOCIKLERĮ IR TIKRO LAIKO SISTEMAS

Šio instrumento įsigijimas suteikia ribotą neperduodamą imunitetą nuo galimo ieškinio dėl pirkėjo vidaus tyrimų ir naudojimo žmogaus in vitro diagnostiniais tikslais bei kitose taikytinose srityse, pagal vieną ar daugiau JAV patentų numerių: 5,656,493; 5,333,675; 5,475,610 (paraiškos 1, 44, 158, 160-163 ir 167) ir 6,703,236 (paraiškos 1-7) ar atitinkamos paraiškos ne JAV, priklausančios Applera Corporation. Jokia teisė nėra aiškiai, netiesiogiai ar *estoppel* principu perduodama pagal bet kurią kitą patento paraišką, pavyzdžiui, pretenzijas į aparatus, reagentus, rinkinius ar metodus, tokius kaip 5'-nukleazės metodai. Norėdami gauti išsamesnės informacijos apie licenciją įsigijimą, kreipkitės į Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, JAV.

Šis produktas yra patentuotas vienu ar daugiau JAV patentų ar patentų, priklausančių Eppendorf AG: JAV patentų numeriais: 6,767,512 ir 7,074,367.

Šis tikro laiko termocikleris yra licencijuotas pagal JAV patentą, nr. 6,814,934 ir atitinkamus Kanados patentus, priklausančius Applera Corporation, išskirtai moksliniams tyrimams, žmogaus in vitro diagnostikai ir kitoms taikytinoms sritims, išskyrus veterinarijos in vitro diagnostiką. Jokia teisė nėra aiškiai, netiesiogiai ar *estoppel* principu nėra suteikiama jokiems tikro laiko metodų patentams, įskaitant, bet neapsiribojant, 5'-nukleazės tyrimais, ar bet kuriam patentui, apimančiam reagentus ar rinkinius.

Bio-Rad's Hard-Shell® plokštelės yra patentuotos vienu ar keliais JAV patentais, registracijos laukiančiais patentais, ar užsienio patentų atitikmenimis, priklausančiais Eppendorf AG: JAV patentų nr.: 7,347,977, 6,340,589, 6,528,302 ir pritaikymas JAV 2007246858, 20080084004, 20030180192 ir 20060120927.

Informacija apie naudojimo vadovą

Šiame vadove yra pateikiama informacija apie saugų CE-IVD žymą turinčios CFX96™ tikro laiko PGR aptikimo sistemos naudojimą (katalogo numeris 1855095–IVD). Papildomą informaciją apie CFX Manager™ programinę įrangą rasite CFX96 ir CFX384 gyvybės mokslų tyrimų naudotojo vadove (katalogo numeriai 1855095 ir 1855384).

Vadove naudojami terminai

Vadove naudojamų terminų sąrašas pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė. Vadove naudojami terminai.

Terminas	Reikšmė
PATARIMAS:	Pateikiama naudinga informacija ir instrukcijos, įskaitant nuorodas į kitus vadovo skyrius.
PASTABA:	Pateikiama svarbi informacija, įskaitant nuorodas į kitus vadovo skyrius.
ĮSPĖJIMAS!	Pateikta labai svarbi informacija apie operatoriaus sužalojimo, instrumento sugadinimo ar duomenų praradimo riziką.
X > Y	Programinės įrangos lange, įrankių juostoje ar meniu pasirinkite X, tuomet - Y.

Informacija apie saugos etiketes šiame vadove ir ant CFX96 sistemos, pateikta skyriuje “Saugos ir norminių aktų atitiktis”, psl. iii.

Bio-Rad kontaktinė informacija ir dokumentai

2 lentelėje pateikta Bio-Rad kontaktinė informacija ir nuorodos į dokumentus.

2 lentelė. Bio-Rad kontaktinė informacija ir dokumentai

Šaltinis	Susisieki
Vietinis Bio-Rad laboratorijos atstovas	Vietos ir kontaktinę informaciją rasite Bio-Rad tinklalapio pradžios lange pasirinkę savo šalies pavadinimą (www.bio-rad.com). Artimiausią tarptautinį ofisą rasite šio vadovo nugarėlėje pateiktame atstovybių sąraše.
Techniniai dokumentai ir literatūra	Apsilankykite Bio-Rad tinklalapyje (www.bio-rad.com). Paieškos laukelyje įrašykite ieškomą terminą ir pasirinkite parinktį Literature . Paieškos rezultatuose rasite techninius dokumentus, vadovus ir kitą literatūrą.
Techninės dalies specialistai	Bio-Rad techninio aptarnavimo departamente dirba patyręs personalas, kuris padės išspręsti iškilusias technines ar praktines problemas. Norėdami gauti techninę pagalbą telefonu, susisiekite su artimiausiu Bio-Rad atstovybės ofisu. Techninė pagalba JAV ir Kanadoje teikiama telefonu 1-800-424- 6723 (nemokama linija).

Saugos ir norminių aktų atitiktis

Saugaus darbo su CFX96 tikro laiko PGR aptikimo sistema užtikrinimui, griežtai rekomenduojame laikytis šiame vadove pateiktų saugos reikalavimų.

CFX96 sistema yra patvirtinta naudojimui kaip in vitro diagnostinis (IVD) medicinos prietaisas.

Saugos įspėjimų etiketės

Ant instrumento esančiose ir šiame vadove pateiktose įspėjimo etiketėse pateikiami įspėjimai apie galimą sužalojimo ar žalos riziką. Kiekvienos įspėjimo etiketės reikšmė aprašyta 3 lentelėje.

3 lentelė. Saugos įspėjimų etikečių aprašymas.

	DĖMESIO: Biologinis pavojus! Šis simbolis identifikuoja komponentus, kurie gali užsiteršti biologiškai pavojingomis medžiagomis.
	DĖMESIO: Pavojinga! Šis simbolis identifikuoja komponentus, kurie gali sužaloti operatorių ar pakenkti instrumentui, jei su jais bus elgiama netinkamai. Jei matote šį simbolį, prieš tęsdami darbą, perskaitykite papildomą naudotojo vadovo informaciją.
	DĖMESIO: Karštas paviršius! Šis simbolis identifikuoja labai įkaitusius komponentus, kurie gali sužaloti operatorių, jei su jais bus elgiama netinkamai.

Instrumento saugos įspėjimai

4 lentelėje aprašytos saugos įspėjimų etiketės yra ant instrumento ir yra skirtos saugaus CFX96 sistemos naudojimo užtikrinimui.

4 lentelė. Instrumento saugos įspėjimų etiketės

Piktograma	Reikšmė
	Įspėjimas apie asmens sužalojimo ar instrumento sugadinimo riziką. Jei CFX96 tikro laiko PGR aptikimo sistema bus naudojama neperskaičius šio vadovo, atsiras asmens sužeidimo pavojus. Saugaus naudojimo užtikrinimui, nenaudokite instrumento kitu, šiame vadove neaprašytu būdu. Šį instrumentą gali naudoti tik kvalifikuotas, elektros įrangą naudoti apmokytas personalas. Naudojant sistemą, būtinas atidumas. Operatoriaus rankos turi būti švarios ir sausos.

4 lentelė. Instrumento saugos įspėjimų etiketės (tęsinys).

Piktograma	Reikšmė
	Įspėjimas apie biologiškai pavojingų medžiagų tvarkymą. Naudojant biologiškai pavojingas medžiagas, laikykitės rekomenduojamų atsargumo priemonių ir procedūrų bei vietinių taisyklių, taikomų jūsų laboratorijai ir regionui.
	Įspėjimas apie nudegimo riziką. Termocikleris generuoja didelį karštį, todėl gali stipriai nudeginti. Darbo metu dėvėkite apsauginius akinius ar kitą akių apsaugą. Prieš atidarant dangtį ir išimant mėginių bloką, palaukite, kol jis atvės. Visada palaukite maksimalų laiko tarpą, kad išvengtumėte netyčinio nusideginimo.
	Įspėjimas apie sprogimo riziką. Normalaus darbo metu mėginių blokas gali įkaisti tiek, jog sukeltų skysčių virimą ir sproginimą.

Saugaus naudojimo specifikacijos ir atitiktis

5 lentelėje pateikiamos saugaus CFX96 sistemos naudojimo specifikacijos. A klasės FCC ribų atitiktis užtikrinimui, su prietaisu naudokite izoliuotus ir apsaugotus (tiekiamus) laidus.

5 lentelė. Saugaus naudojimo specifikacijos.

Reikalavimai saugiam naudojimui		Specifikacijos
Temperatūra	Naudojimas patalpoje	Aplinkos temperatūra: 15–31°C. Maksimali santykinė drėgmė: 80%, be kondensato.
Aukštis virš jūros lygio		Iki 2000 metrų virš jūros lygio.

NORMINIŲ AKTŲ ATITIKTIS

Atlikus tyrimą, nustatyta, jog šis instrumentas atitinka visus taikytinus šių saugos ir elektromagnetinio suderinamumo standartų reikalavimus:

- IEC 61010-1:2001 (2-a red.), EN61010-1:2001 (2-a red.). Elektrinė matavimo, valdymo ir laboratorinė įranga, 1 dalis: bendrieji reikalavimai.
- IEC 61010-2-010:2005, EN61010-2-010:2003. Saugos reikalavimai elektrinei matavimo, valdymo ir laboratorinei įrangai. Dalis 2-010: Specialieji reikalavimai laboratorinei įrangai, skirtai medžiagų kaitinimui.
- IEC 61010-2-081:2001+A1, EN61010-2-081:2002+A1. Saugos reikalavimai elektrinei matavimo, valdymo ir laboratorinei įrangai. Dalis 2-081: Specialieji reikalavimai automatinei ir pusiau automatinei laboratorinei įrangai, skirtai analizei ir kitiems tikslams (įskaitant 1 priedą).
- EN 61326-1:2006 (A klasė) Elektrinė matavimo, valdymo ir laboratorinė įranga. EMC reikalavimai, 1 dalis: bendrieji reikalavimai.
- EN 61010-2-101. Saugos reikalavimai elektrinei matavimo, valdymo ir laboratorinei įrangai. Specialieji reikalavimai in vitro diagnostinei (IVD) medicinos įrangai.
- EN 61326-2-6 (A klasė) Elektrinė matavimo, valdymo ir laboratorinė įranga. EMC reikalavimai. Dalis 2-6. Specialieji reikalavimai. In vitro diagnostinė (IVD) medicinos įranga.

Ši įranga generuoja, naudoja ir gali spinduliuoti radijo dažnio bangas ir, jei nėra įdiegta ir naudojama pagal naudotojo vadove pateiktas instrukcijas, gali kenksmingai interferuoti komunikaciją radijo bangomis. Šios įrangos naudojimas gyvenamose patalpose gali sukelti pavojingą interferenciją. Tokiu atveju, už padarytą žalą atsako naudotojas.

Pavojus

CFX96 tikro laiko PGR aptikimo sistema veikia saugiai, jei yra naudojama gamintojo nurodytu būdu. Jei CFX96 sistema ar su ja susiję komponentai nėra naudojami gamintojo nurodytu būdu, saugus instrumento naudojimas nėra užtikrinamas. Kompanija Bio-Rad Laboratories, Inc. neatsako už sužalojimus ar gedimus, sukeltus dėl šios įrangos naudojimo nenurodytu būdu ar dėl instrumento modifikacijų, kurias atliko ne Bio-Rad ar įgaliotas atstovas. Techninį CFX96 sistemos aptarnavimą atlikti gali tik Bio-Rad personalas.

Biologinis pavojus

CFX96 sistema yra laboratorijai skirtas produktas. Naudojant biologiškai pavojingas medžiagas, laikytės rekomenduojamų atsargumo priemonių ir procedūrų bei vietinių taisyklių, taikomų jūsų laboratorijai ir regionui.

BENDROSIOS ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Visuomet dėvėkite laboratorinį chalātą, pirštines ir apsauginius akinius su šoniniais skydeliais.
- Rankomis nelieskite burnos, nosies ir akių.
- Prieš darbą su infekcinėmis medžiagomis, pilnai apsaugokite bet kokius kūno įbrėžimus ar nubrozdinimus.
- Po potencialiai infekcinių medžiagų naudojimo, prieš išeinant iš laboratorijos, kruopščiai nusiplaukite rankas muilu ir vandeniu.
- Prieš darbą nusisėkite rankinį laikrodį ir nusiimkite rankų papuošalus.
- Visas infekcines ar galimai infekcines medžiagas laikykite nedūžtančiose sandariose talpose.
- Prieš išeinant iš laboratorijos, nusivilkite apsauginius rūbus.
- Dėvint pirštines, nerašykite, nekalbėkite telefonu, nesinaudokite elektros jungtukais, nelieskite nieko, ką vėliau gali liesti asmenys be apsaugos priemonių.
- Dažnai keiskite pirštines. Jei pirštinės užsiteršė, nedelsiant jas nusiimkite.
- Medžiagas, kurių negalima tinkamai nukenksminti, laikykite atokiai nuo potencialiai infekcinių medžiagų.
- Po biologiškai pavojingų medžiagų naudojimo, darbo vietą nukenksminkite tinkamu dezinfekantu (pvz., 1:10 santykiu skiesto buitinio baliklio tirpalu).

SPECIFINĖS ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Visi pacientų mėginiai yra potencialiai biologiškai pavojingos medžiagos, todėl turi būti tvarkomi laikantis universaliųjų atsargumo priemonių.
- Normalaus šio instrumento naudojimo metu, biologiškai pavojingos substancijos į aplinką nėra išskiriamos.

PAVIRŠIŲ NUKENKSMINIMAS

ĮSPĖJIMAS! Norint išvengti elektros šoko, prieš atliekant nukenksminimo procedūrą, visuomet išjunkite instrumento maitinimo laidą iš elektros lizdo.

Šias dalis galima valyti lignoninės laipsnio baktericidiniu, virucidiniu ar fungicidiniu dezinfekantu:

- Išorinis dangtis ir pagrindinės dalies korpusas.
- Vidinis reakcijos bloko paviršius ir reakcijos bloko šulinėliai.

- Valdymo skydelis ir ekranas

Ruošiant ir naudojant dezinfekantą, laikykitės produkto gamintojo instrukcijų. Po dezinfekanto naudojimo, reakcijos bloką ir reakcijos bloko šulinėlius kelis kartus praplaukite vandeniu. Po praplovimo vandeniu, reakcijos bloką ir reakcijos bloko šulinėlius gerai nusausinkite.

ĮSPĖJIMAS! Nenaudokite abrazyvinių ar ėsdinančių detergentų ar stiprių šarminių tirpalų. Šie agentai gali subraižyti paviršių ir pakenkti reakcijos blokui, galimas temperatūros kontrolės tikslumo praradimas.

BIOLOGIŠKAI PAVOJINGŲ MEDŽIAGŲ IŠMETIMAS

CFX96 sistemoje nėra galimai pavojingų cheminių medžiagų. Šias potencialiai užterštas medžiagas išmeskite laikantis laboratorijos, vietinių, regioninių ir valstybinių taisyklių:

- Klinikiniai mėginiai.
- Reagentai.
- Panaudotos reagentų talpos ar kitos galimai užterštos sąnaudinės medžiagos.

Cheminis pavojus

CFX96 sistemoje nėra galimai pavojingų cheminių medžiagų.

Sprogimo ar užsiliepsnojimo pavojus

CFX96 sistema nekelia jokio neįprasto pavojaus, susijusio su užsiliepsnojimu ar sprogitu, jei yra naudojama tinkamai, kaip nurodo Bio-Rad Laboratories.

Elektros keliamas pavojus

CFX96 sistema nekelia jokio neįprasto elektros šoko pavojaus operatoriui, jei yra įdiegta ir naudojama tinkamai, sistemai nebuvo atliktos fizinės modifikacijos, sistema yra prijungta prie specifikacijas atitinkančio elektros maitinimo.

Transportavimas

Prieš perkeliant ar transportuojant C1000™ termociklerį ar CFX96 optinį modulį, būtina atlikti nukenksminimo procedūrą. C1000 termociklerį ir CFX96 optinį reakcijos modulį perkeldami ar transportuodami atskirose dėžėse, supakuotus naudojant tiekiamas pakavimo medžiagas, kurios apsaugo instrumentą nuo pažeidimų. Jei neturite tinkamos dėžės, susisiekite su Bio-Rad atstovu.

Sandėliavimas

CFX96 sistemą sandėliuokite šiomis sąlygomis:

- Temperatūra ribos: nuo -20 iki 60°C.
- Maksimali santykinė drėgmė: 80%.

Išmetimas

CFX96 tikro laiko PGR aptikimo sistemoje yra elektros ar elektronikos komponentų; ji turi būti išmetama kaip nerūšiuotos atliekos, surenkant atskirai, kaip nurodoma Europos Sąjungos direktyvoje 2002/96/EB dėl atliekų ir elektroninės įrangos bei EEJA direktyvoje. Prieš išmetimą, susisiekite su Bio-Rad atstovu ir pasikonsultuokite dėl taikomų instrukcijų.

Turinys

1 skyrius. Sistemos įdiegimas	1
Optinio reakcijos modulio išpakavimas	1
Sistemos reikalavimai.....	1
Sistemos apžvalga	2
Sistemos įdiegimas	3
CFX Manager programinės įrangos įdiegimas.....	5
Programinės įrangos failai.....	7
Tyrimų vykdymas.....	7
2 skyrius. CFX Manager™ programinė įranga.....	9
Pagrindinis programinės įrangos langas	9
Paleidimo vediklis.....	12
Detected Instruments (aptiktų instrumentų) polangis.....	12
Instrument Properties (instrumento savybių) langas.....	14
3 skyrius. Tyrimų vykdymas	17
Experiment Setup (tyrimo sąrankos) langas	17
Protocol (protokolo) sąsėlė	18
Plate (plokštelės) sąsėlė	19
Start Run (tyrimo vykdymo) sąsėlė	19
Run Details (tyrimo vykdymo informacijos) langas	20
4 skyrius. Protokoliai	25
Protocol Editor (protokolo redagavimo) langas	25
Protocol Editor lango parinktys.....	27
Temperatūros kontrolės režimas	30
Protocol AutoWriter (automatinio protokolo užpildymo) parinktis	30
5 skyrius. Plokštelės	33
Plate Editor (plokštelės redagavimo) langas	33
Select Fluorophores (fluoroforų pasirinkimo) langas.....	35
Šulinėlių turinio parinktys.....	36
Experiment Settings (tyrimo nustatymų) langas.....	38
Well Groups Manager (šulinėlių grupavimo) langas	40
Plate Spreadsheet View (plokštelės skaičiuoklės peržiūros) langas	42
6 skyrius. Darbas autonominiu režimu.....	43
C1000™ termocikleris	43
Naujo tyrimo kūrimas.....	45
Duomenų eksportavimas analizei	49
Duomenų failo kūrimas.....	51

7 skyrius. Duomenų analizės apžvalga	53
Data Analysis (duomenų analizės) langas	53
Quantitation (kiekybinio įvertinimo) sąsaja	56
Duomenų analizės nustatymai	57
Well Selectors (šulinėlių selektoriai)	59
Grafikai	61
Skaičiuoklės	61
8 skyrius. Duomenų analizės langai	63
Quantitation (kiekybinio įvertinimo) sąsaja	63
Quantitation Data (kiekybinio įvertinimo duomenų) sąsaja	66
Melt Curve (lydymosi kreivės) sąsaja	67
Melt Curve Data (lydymosi kreivės duomenų) sąsaja	68
End Point (galutinio taško) sąsaja	68
Allelic Discrimination (alelių diskriminacijos) sąsaja	70
QC (kokybės kontrolės) sąsaja	psl. 72
Run Information (tyrimo vykdymo informacijos) sąsaja	72
Data file reports (duomenų failų ataskaitos)	73
9 skyrius. Genų ekspresijos analizė	77
Genų ekspresija	77
Plokštelės sąranka genų ekspresijos analizei	78
Gene Expression (genų ekspresijos) sąsaja	78
Experiment Settings (tyrimo nustatymų) langas	83
Genų tyrimas	84
Gene Study Data (genų tyrimo duomenų) skaičiuoklė	87
Gene Study Report (genų tyrimo ataskaitos) langas	88
10 skyrius. Naudotojo nuostatos	89
Prisijungimas arba naudotojo paskyros pasirinkimas	89
User Preferences (naudotojo paskyros nuostatų) langas	90
E. pašto pranešimų konfigūravimas	91
Naudotojų paskyrų administravimas	95
11 skyrius. Šaltiniai	97
Kalibracijos vediklis	97
Instrumento priežiūra	99
Programos žurnalas	101
Trikčių aptikimas ir šalinimas	101
Techninės specifikacijos	104
Literatūros nuorodos	105

1 Sistemos įdiegimas

Šiame skyriuje pateikta informacija apie CFX96™ tikro laiko PGR aptikimo sistemos įdiegimą:

- Optinio reakcijos modulio išpakavimas (1 psl.)
- Sistemos reikalavimai (1 psl.)
- Sistemos apžvalga (2 psl.)
- Sistemos įdiegimas (3 psl.)
- CFX Manager™ programinės įrangos įdiegimas (5 psl.)
- Programinės įrangos failai (7 psl.)
- Tyrimų vykdymas (7 psl.)

Optinio reakcijos modulio išpakavimas

CFX96 optinio reakcijos modulio dėžėje yra šie komponentai:

- Optinis reakcijos modulis
- USB laidas
- CFX Manager programinės įrangos įdiegimo CD
- Naudojimo vadovas

Išimkite visas pakavimo medžiagas ir pasidėkite jas vėlesniam panaudojimui. Jei kažkurio komponento nėra arba jis yra pažeistas, susisiekite su Bio-Rad atstovu.

Sistemos reikalavimai

CFX96 sistemos naudojimui būtini laidai ir energijos šaltiniai:

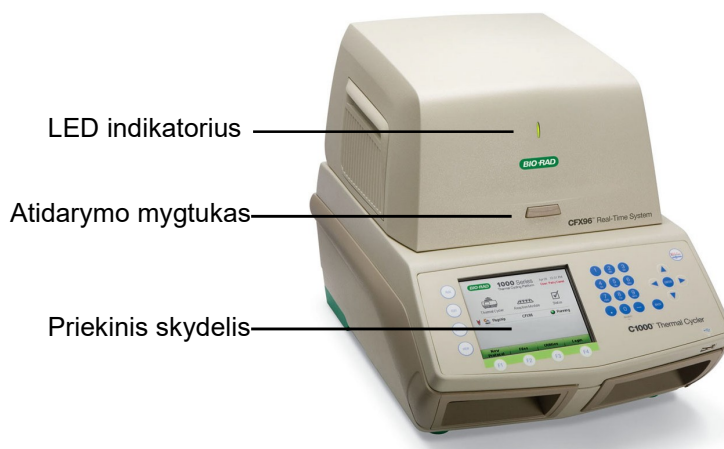
- **Galingumas:** 100–240 VAC, 50–60 Hz
- **Naudojimas patalpoje.** Aplinkos temperatūra: 15–31°C. Maksimali santykinė drėgmė: 80%, be kondensato.
- **USB laidas.** Jei CFX96 sistema bus valdoma kompiuteriu per USB laidą, naudokite Bio-Rad tiekiamą ekranuotą laidą.

PASTABA. Išsamus instrumento saugos ir atitikties reikalavimų sąrašas pateiktas skyriuje “Saugos ir norminių aktų atitiktis”, psl. iii.

Sistemos apžvalga

CFX96 sistemą sudaro du komponentai:

- **Optinis reakcijos modulis.** Šiame modulyje yra optinė sistema, skirta fluorescencijos duomenų surinkimui, ir termociklerio blokas.
PASTABA. CFX96 modulio serijos numeris yra galinėje prietaiso dalyje.
- **C1000™ termociklerio bazė.** C1000 bazėje yra naudotojo sąsaja, skirta sistemos valdymui, įjungimo mygtukas ir jungtys (galiniame skydelyje), skirtos kompiuterio prijungimui.



1 iliustracija. Priekinis CFX96 sistemos vaizdas.

2 iliustracijoje pavaizduoti CFX96 sistemos komponentai, matomi atidarius dangtį.



2 iliustracija. Vidinis CFX96 sistemos vaizdas.

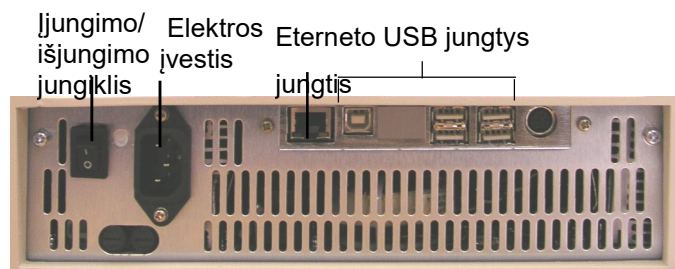


ĮSPĖJIMAS! Nelieskite vidinės dangčio dalies ar bloko - paviršiai gali būti karšti.

- **Vidinė dangčio dalis su kaitinimo plokšte.** Kaitinimo dalis palaiko temperatūrą, taip išvengiant mėginio garavimo. Nelieskite ir kitu būdu neužterškite kaitinimo plokštelės. Niekada nekiškite jokių objektų į skylutes, nes taip galite pažeisti optinę sistemą.
 - **Blokas.** Į šį bloką yra įkeliami mėginiai.
 - **Uždarymo mygtukas.** Šio mygtuko paspaudimu yra uždaromas motorizuotas dangtis.
- ĮSPĖJIMAS!** Instrumento neužterškite išsiliejusiais skysčiais; niekuomet nevykdykite reakcijos neuždarę dangčio, ar jei yra matomas pratekėjimas. Bendrosios instrumento valymo ir priežiūros procedūros yra pateiktos skyriuje “Instrumento priežiūra” (psl. 99).

Galinio C1000 skydelio komponentai (3 iliustracija):

- **Įjungimo / išjungimo jungiklis.** Norėdami įjungti sistemą, paspauskite šį jungiklį.
- **Elektros įvestis.** Maitinimo laido jungtis.
- **Eterneto jungtis** Prijunkite eterneto kabelį registracijos žurnalų ar duomenų failų eksportavimui.
- **USB jungtis.** Šios jungtis yra skirtos CFX96 sistemos prijungimui prie kompiuterio ar S1000™ termociklerio.



3 iliustracija. Galinis C1000 termociklerio skydelis.



ĮSPĖJIMAS! Darbo metu nelieskite galinės C1000 dalies.

Sistemos įdiegimas

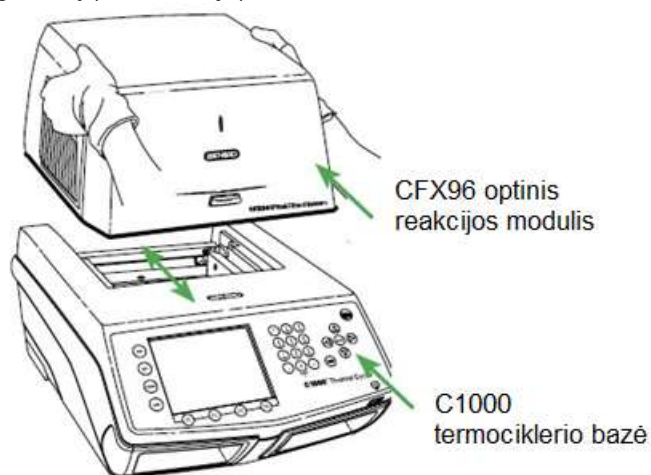
CFX96 tikro laiko PGR aptikimo sistemą statykite ant švaraus, sauso, lygaus paviršiaus, užtikrinant pakankamą vėsaus oro srauto cirkuliavimą. CFX96 sistemą galima naudoti dviem būdais: valdant tiesiogiai ar per programinę įrangą. Jei sistema yra valdoma per programinę įrangą, įdiegimo metu užtikrinkite, kad pakaktų vietos kompiuteriui.

C1000 termociklerį pastatykite taip, jog galiniame skydelyje esantis įjungimo / išjungimo jungiklis būtų lengvai pasiekiamas.

Įkeliant CFX96 optinį reakcijos modulį į C1000 prietaisą, laikykitės šių instrukcijų:

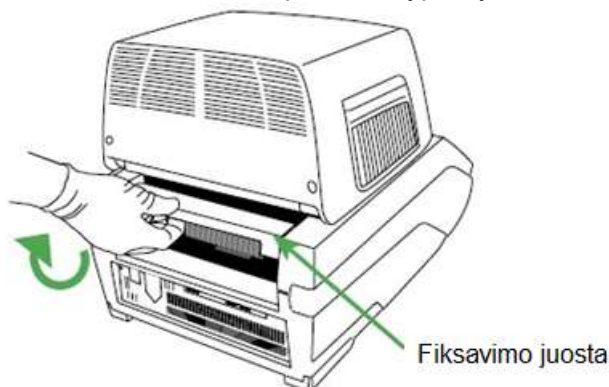
1. C1000 termociklerį pastatykite tinkamoje vietoje. Fiksavimo juosta turi būti nuleista. Nuimkite anksčiau uždėtą reakcijos modulį.

2. Optinį reakcijos modulį laikykite už į korpusą įleistų rankenų, esančių šalia vėdinimo grotelių (4 iliustracija).



4 iliustracija. Optinio reakcijos modulio uždėjimas ant C1000 termociklerio.

3. Modulį įstatykite į C1000 termociklerio reakcijos modulio platformą, priekyje palikdami apie 2 cm erdvės. Tinkamai uždėtas, optinis modulis turi uždengti C1000 termociklerio priekinėje dalyje esantį Bio-Rad logotipą.
4. Užfiksuokite galinėje C1000 termociklerio dalyje esančią užrakto juostą, ją nuleisdami žemyn. Šio veiksmo metu modulis pasislinks į priekį ir užsifiksuos (5 iliustracija).



5 iliustracija. Optinio modulio fiksavimas

5. Patikrinkite, ar modulis yra tinkamai ir tolygiai uždėtas ant C1000 bazės. Tarp modulio ir bazės negali likti jokių papildomų tarpų; tarpai turi būti vienodi.

6. Maitinimo laidą įjunkite į galinėje C1000 bazės gale esančio skydelio jungtį (3 psl., 3 iliustracija) ir į trijų kontaktų elektros lizdą. Norėdami įjungti sistemą, paspauskite įjungimo / išjungimo jungiklį, esantį galiniame C1000 termociklerio skydelyje.
7. Laikydami C1000 termociklerio ekrane pateiktų instrukcijų, atsukite ir išimkite raudoną transportavimo kaištį iš vidinės dangčio dalies (6 iliustracija). Sukdami prieš laikrodžio rodyklę, išimkite kaištį.



6 iliustracija. Transportavimo kaiščio išėmimo instrukcijos.

PASTABA. Jei šiame etape transportavimo kaištis nebus išimtas, apie tai praneš CFX Manager programinė įranga. Kaištį išimkite laikydami instrukcijų (14 psl.).

PATARIMAS. Modulio transportavimo metu šis kaištis turi būti savo vietoje. Šį kaištį išsaugokite, nes ateityje jo gali prireikti.

8. Iš termociklerio bloko išimkite transportavimo plokštelę.

CFX Manager programinės įrangos įdiegimas

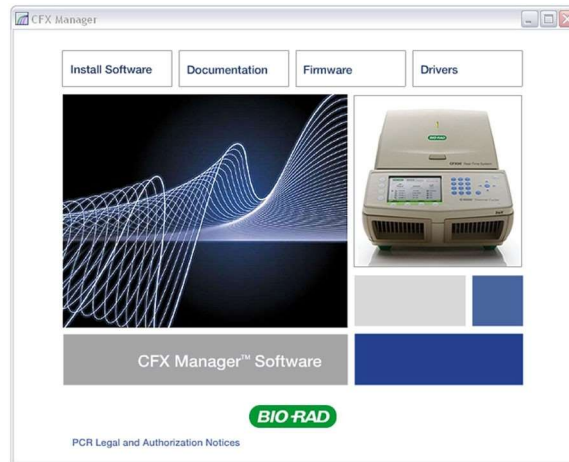
CFX Manager programinė įranga, naudojama asmeniniame kompiuteryje (PC), yra skirta CFX96 sistemos pateiktų duomenų analizei bei CFX96 sistemos valdymui, ją naudojant programinės įrangos valdymo režimu. 6 lentelėje pateikiami CFX Manager programinės įrangos (1.6 ar vėlesnės versijos) reikalavimai kompiuteriui.

6 lentelė. 1.6 ar vėlesnės versijos CFX Manager programinės įrangos reikalavimai kompiuteriui.

Sistema	Bent	Rekomenduojama
Operacinė sistema	Windows XP Professional SP2 ar geriau, Windows Vista Home Premium ar geriau, Windows 7 Home Premium ar geriau.	Windows XP Professional SP2 ar geriau, Windows Vista Professional ar geriau, Windows 7 Professional
Tvarkyklė	CD-ROM tvarkyklė	CD-RW tvarkyklė
Kietasis diskas	10 GB	20 GB
Procesoriaus greitis	2.0 GHz	2.0 GHz
RAM	1 GB RAM (2 GB Windows Vista)	2 GB RAM
Ekrano raiška	1,024 x 768 „true-color“ režimu	1280 x 1024 „true-color“ režimu
USB	USB 2.0 Hi-Speed jungtis	USB 2.0 Hi-Speed jungtis

CFX Manager programinės įrangos įdiegimas:

1. Įsitikinkite, kad Jums yra suteiktos administratoriaus teisės. Programinę įrangą kompiuteryje įdiegti gali tik administratoriaus teises turintis naudotojas.
2. CFX Manager programinės įrangos CD įdėkite į kompiuterio CD diskasukį.
3. Ekrane bus rodomas programinės įrangos paleidimo langas. Dukart spustelėkite parinktį **Install Software** (7 iliustracija).



7 iliustracija. Programinės įrangos įdiegimo langas.

4. Laikydami ekrane pateiktų instrukcijų, užbaikite programinės įrangos įdiegimą. Sėkmingai įdiegus, kompiuterio darbalaukyje bus rodoma Bio-Rad CFX manager programinės įrangos piktograma.
5. Jei paleidimo langas neatsidaro automatiškai, dukart spustelėkite **(CD drive):\Bio-Rad CFX**, tuomet atidarykite Readme.txt failą ir laikykitės jame pateiktų instrukcijų. Skaitykite skyrių "Rankinis programinės įrangos įdiegimas", psl. 101.

Tvarkyklių įdiegimas

Jei CFX96 sistema bus valdoma valdymo programine įranga, kompiuteryje būtina įdiegti tvarkykles. Naudokite tik tiekiamą USB laidą, kuris yra apsaugotas nuo galimo duomenų praradimo.

Sistemos tvarkyklių įdiegimas:

1. Norint C1000 termociklerį prijungti prie kompiuterio, USB laidą įjunkite į USB 2.0 A jungtį, esančią termociklerio galiniame skydelyje (3 iliustracija, 3psl.), tuomet laidą įjunkite į kompiuterio USB 2.0 B jungtį.
2. Jei sistema nėra įjungta, paspauskite C1000 instrumento galinėje pusėje esantį įjungimo / išjungimo jungiklį. Laikykitės atsidariusiame **Found New Hardware Wizard** lange pateiktų instrukcijų.
3. Pirmajame lange paspauskite parinktį **Yes, this time only**. Windows operacinė sistema atsinaujins ir pradės programinės įrangos paiešką. Paspauskite **Next**.
4. Pasirinkite parinktį **Install the software automatically**. Paspaudus **Next**, bus tęsiamas tvarkyklių diegimas.
5. Sėkmingo tvarkyklių įdiegimo patvirtinimo lange paspauskite **Finish**.

Programinės įrangos failai

CFX Manager programinėje įrangoje informacija apie tyrimus yra saugoma specifiniuose failuose (7 lentelė).

7 lentelė. CFX Manager programinės įrangos failų tipai

Failo tipas	Plėtinys	Failo peržiūra ir redagavimas
Protokolas	.prcl	Pasirinkite Experiment Setup lange ir redaguokite Protocol Editor lange
Plokštelė	.pltd	Pasirinkite Experiment Setup lange ir redaguokite Protocol Editor lange
Duomenys	.pcrd	Peržiūra ir analizė Data Analysis lange
Gene E	.mgxd	Peržiūra ir analizė Gene Study lange
Atskiras išankstinių duomenų failas	.zpcr	Pavienės operacijos nuskaityti fluorescencijos duomenys, konvertuoti į duomenų failą.

Tyrimų vykdymas

Rekomenduojamos plastikinės sąnaudinės medžiagos

Su CFX96 sistema galima naudoti ir žemo profilio 0,2 mėgintuvėlius, ir plokšteles. Optimalių rezultatų gavimui Bio-Rad rekomenduoja naudoti šias vienkartinės priemonės:

- **MLL-9601.** Žemo profilio 96 šulinėlių plokštelė be kraštelio skaidriais šulinėliais
- **MLL-9651.** Žemo profilio 96 šulinėlių plokštelė be kraštelio baltais šulinėliais
- **HSP-9601.** Hard-Shell® 96 šulinėlių plokštelė, balta, skaidriais šulinėliais
- **HSP-9655.** Hard-Shell® 96 šulinėlių plokštelė su krašteliu, balta, baltais šulinėliais
- **TLS-0801.** Žemo profilio 0,2 ml 8 mėgintuvėlių juostelė, be kamštelių, skaidriais šulinėliais
- **TLS-0851.** Žemo profilio 0,2 ml 8 mėgintuvėlių juostelė, be kamštelių, baltais šulinėliais
- **TCS-0803.** Optinė, plokščia 8 kamštelių juostelė 0,2 ml mėgintuvėliams ir plokštelėms
- **MSB-1001.** Microseal® 'B' lipni plėvelė, optinė, skaidri

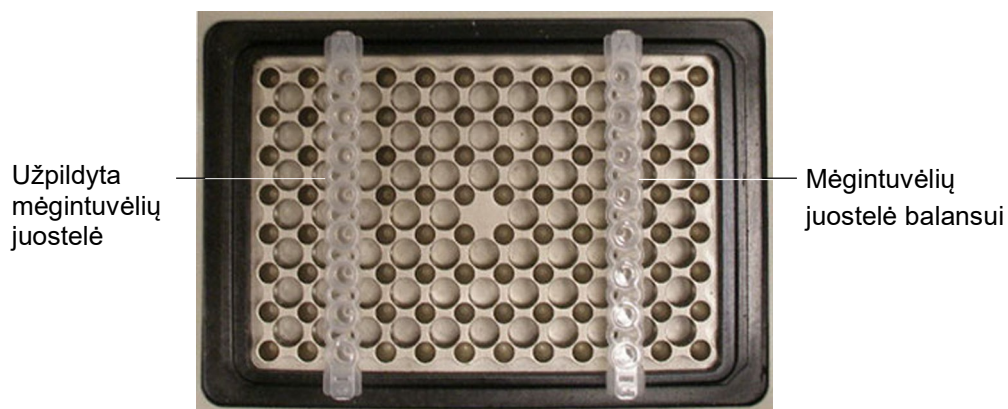
Bloko įkrovimas

Norėdami įkelti reakcijų mišinius į bloką, laikykitės šių rekomendacijų:

- Programinės įrangoje paspauskite Start Run (žr. "Start Run juosta", 19 psl.) juostoje esantį klavišą **Open Lid**, arba paspauskite sistemos priekinėje dalyje esantį dangčio mygtuką (1 iliustracija). Atsidarys motorizuotas dangtis.
- Į bloką sudėkite 0,2 ml mikroplokšteles ar mėgintuvėlių juosteles užkimštais kamšteliais. Užtikrinkite, kad mėgintuvėliai būtų sandarūs, taip išvengiant galimo pratekėjimo. Norint gauti optimalius rezultatus, į CFX96 sistemą įkelkite 10–25 µl tūrio mėginius.

PASTABA. Tikslios duomenų analizės užtikrinimui, patikrinkite, ar reakcijų mišinių išdėstymas bloke atitinka išdėstymą programinės įrangos Plate parinktyje. Jei reikia, prieš, per ar po vykdymo, redaguokite šulinius.

ĮSPĖJIMAS! CFX96 sistemos paleidimo metu visuomet subalansuokite mėgintuvėlių juostelių ar mikroplokštelių paskirstymą šulinėliuose (8 iliustracija). Pavyzdžiui, jei į kairiąją bloko pusę įdėjote vieną mėgintuvėlių juostelę, į dešiniąją pusę įkelkite tuščią mėgintuvėlių juostelę (su kamšteliais), kad būtų subalansuotas dangčio slėgio pasiskirstymas. Nesubalansuotas slėgis gali įtakoti mėginių garavimą ir nesėkmingą tyrimą.



8 iliustracija. Mėgintuvėlių juostelių ar mikroplokštelių pasiskirstymo balansavimas bloke.

ĮSPĖJIMAS! Įsitikinkite, kad dangtis gali užsidaryti be trikdžių. Nors dangtyje yra saugos mechanizmas, kuris stabdo dangčio nusileidimą, jei aptinka trukdį, nieko nedėkite ant dangčio užsidarymo vietos.

Sistemos išjungimas

Jei norite išjungti CFX96 sistemą, atlikite šiuos veiksmus:

- Po tyrimo vykdymo, paspauskite dangčio atidarymo mygtuką, esantį priekinėje CFX96 sistemos dalyje.
- Iš bloko išimkite mėginius ir uždarykite CFX96 sistemos dangtį, paspaudę dangčio uždarymo mygtuką.
- Norėdami išjungti sistemą, paspauskite galiniame C1000 termociklerio skydelyje esantį įjungimo / išjungimo jungiklį.

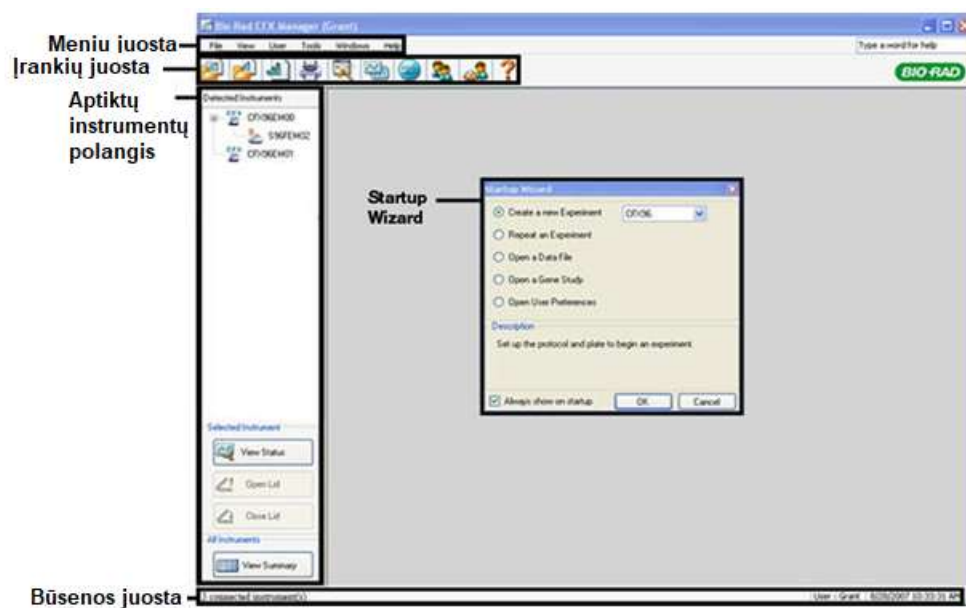
2 CFX Manager™ programinė įranga

Šiame skyriuje pateikta informacija apie CFX Manager programinę įrangą.

- Pagrindinis programinės įrangos langas (9 psl.)
- Paleidimo vediklis (12 psl.)
- Aptiktų instrumentų polangis (12 psl.)
- Instrumento savybių langas (14 psl.)

Pagrindinio programinės įrangos lango savybės pavaizduotos 9 iliustracijoje.

Pagrindinis programinės įrangos langas



9 iliustracija. Pagrindinis programinės įrangos langas.

Menu (menu) juosta

Pagrindinio programinės įrangos lango menu juostos parinktys pateiktos 8 lentelėje.

8 lentelė. Pagrindinio programinės įrangos lango menu juostos parinktys.

Menu parinktis	Komanda	Funkcija
File	New	Naujo protokolo, plokštelės, tyrimo ar genų tyrimo kūrimas
	Open	Egzistuojančių failų, įskaitant protokolų (.prcl), plokštelių (.pltd), duomenų (.pcrd) ir genų tyrimų (.mgxd) failus, atskirus paleidimo failus (.zpcr), atidarymas
	Recent Data Files	Dešimt paskutiniųjų peržiūrėtų duomenų failų peržiūra ir vieno atidarymas duomenų analizės parinktyje
	Repeat an Experiment	Experiment Setup lango su užbaigto tyrimo protokolu ir plokštele atidarymas ir greitas tyrimo pakartojimas
	Exit	Programinės įrangos uždarymas
View	Application Log	Programinės įrangos žurnalo rodymas
	Run Reports	Iš sąrašo pasirinkite ataskaitą, kurią norite peržiūrėti
	Startup Wizard	Paleidimo vediklio atidarymas
	Experiment Setup	Experiment Setup lango atidarymas
	Instrument Summary	Instrument Summary lango atidarymas
	Detected Instruments	Rodomas arba paslėptas Detected Instruments polangis
	Toolbar	Rodoma arba paslėpta pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juosta
	Status Bar	Rodoma arba paslėpta pagrindinio programinės įrangos lango būsenos juosta
User	Select User	Select User lango atidarymas programinės įrangos naudotojo paskyros pakeitimui
	Change Password	Naudotojo slaptažodžio keitimas
	User Preferences	User Preferences lango atidarymas
	User Administration	Naudotojų paskyrų tvarkymas User Administration lange
Tools	Dye Calibration Wizard	Dye Calibration lango atidarymas instrumento kalibravimui naujam fluoroforui
	Protocol AutoWriter	Protocol AutoWriter lango atidarymas naujo protokolo sukūrimui
	Ta Calculator	Ta Calculator lango atidarymas pradmenų anylingo temperatūros apskaičiavimui
	View Block Status Log	Termociklerio bloko žurnalo peržiūra
	Application Data Folder	Application Data aplanko atidarymas programinės įrangos failų peržiūrai
	User Data Folder	Data aplanko atidarymas protokolo, plokštelės ir duomenų failų peržiūrai
	Properties All Instruments	Aptiktų instrumentų savybių (įskaitant serijos numerius) peržiūra
	Zip Data and Log Files	Failų pasirinkimas ir suspaudimas į „zip“ failą saugojimui ar siuntimui e. paštu
	Options	Programinės įrangos e. pašto nustatymų konfigūravimas

8 lentelė. Pagrindinio programinės įrangos lango meniu juostos parinktys.

Meniu parinktis	Komanda	Funkcija
Windows	Cascade	Programinės įrangos langų išdėstymas vienas ant kito
	Tile Vertical	Programinės įrangos langų išdėstymas nuo viršaus iki apačios
	Tile Horizontal	Programinės įrangos langų išdėstymas iš dešinės į kairę
	Close All	Visų programinės įrangos langų uždarymas
Help	Contents	Programinės įrangos pagalbos dėl PGR ir tikro laiko PGR paleidimo parinkties Help atidarymas
	Index	Programinę įrangos parinkties Help turinio peržiūra
	Search	Paieška programinės įrangos Help parinktyje
	Gene Expression Gateway Website	Tinklalapio atidarymas ir informacijos apie PGR ir tikro laiko PGR paleidimo vykdymą paieška jame
	PCR Reagents Website	Tinklalapio su Bio-Rad PGR ir tikro laiko PGR skirtomis sąnaudinėmis medžiagomis ir reagentais atidarymas
	PCR Plastic Consumables Website	Tinklalapio su Bio-Rad PGR ir tikro laiko PGR skirtomis vienkartinėmis priemonėmis atidarymas
	Software Updates	Programinės įrangos atnaujinimas
	About	Lango su programinės įrangos versija atidarymas

Toolbar (įrankių juostos) parinktys

Pagrindinis programinės įrangos lango (9 lentelė) įrankių juostos parinktys yra skirtos greitai prieigai prie bendrųjų programinės įrangos komandų.

9 lentelė. Pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juostos parinktys

Parinktis	Parinkties pavadinimas	Funkcija
	Open a Data File	Atidaromas naršyklės langas duomenų failo (*.pcrd plėtinys) suradimui ir jo atidarymui Data Analysis lange (psl. 53)
	Open a Gene Study	Atidaromas naršyklės langas genų tyrimo failo (*.pcrd plėtinys) suradimui ir jo atidarymui Gene Study lange (psl. 85)
	Create a New Gene Study	Gene Study lango (psl. 85) atidarymas failų pridėjimui ir naujo tyrimo sukūrimui
	Print	Atidaryto programinės įrangos lango spausdinimas
	Startup Wizard	Paleidimo vediklio atidarymas su nukreipimu į bendrąsias programinės įrangos funkcijas (12 psl.)

9 lentelė. Pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juostos parinktys

Parinktis	Parinkties pavadinimas	Funkcija
	Experiment Setup	Experiment Setup lango atidarymas tyrimo vykdymui (psl. 17)
	Protocol AutoWriter	Protocol AutoWriter lango atidarymas naujo protokolo sukūrimui (psl. 30)
	Select User	Select User lango atidarymas programinės įrangos naudotojo paskyros pakeitimui (žr. “Prisiregistravimas ar naudotojo paskyros pasirinkimas”, psl. 89)
	User Preferences	User Preferences lango atidarymas (psl. 90)
	Help	Programinės įrangos pagalbos dėl PGR ir tikro laiko PGR paleidimo lango Help atidarymas

Paleidimo vediklis

Pirmąkart atidarius CFX Manager programinę įrangą, langas Startup Wizard bus rodomas automatiškai (9 iliustracija). Jei šis langas nėra rodomas, paspauskite pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juostos parinktį **Startup Wizard**.

Paleidimo vediklio parinktys:

- **Create a new Experiment (psl. 17).** Protokolo ir plokštelės sąranka naujo tyrimo vykdymui.
- **Repeat an Experiment.** Užbaigto tyrimo protokolo ir plokštelės tyrimo sąranka. Jei reikia, prieš vykdymą, galite redaguoti tyrimo sąranką.
- **Open a Data File (psl. 53).** Duomenų failo atidarymas rezultatų analizei.
- **Open a Gene Study (psl. 84).** Kelių failų genų ekspresijos tyrimo atidarymas kelių genų ekspresijos tyrimų rezultatų analizei.
- **Open User Preferences (psl. 90).** User Preferences lango atidarymas programinės įrangos nustatymų tinkinimui.

Detected Instruments (aptiktų instrumentų) polangis

Detected Instruments polangyje yra rodomi prijungti instrumentai (10 iliustracija). Sąraše instrumentai pateikti su serijos numerio piktograma (numatytasis nustatymas).

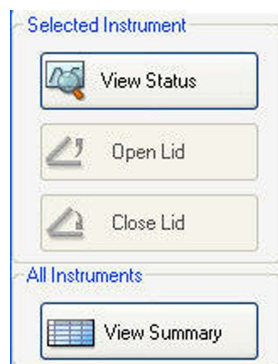


10 iliustracija. Instrumentų sąrašas Detected Instruments polangyje

Dešiniuoju pelės klavišu spustelėkite ant instrumento piktogramos ar bloko ir pasirinkite vieną šių parinkčių:

- **View Status.** Atidaromas Run Details langas pasirinkto instrumento bloko būsenos patikrinimui.
- **Flash Block Indicator.** Instrumento LED indikatoriaus įjungimas.
- **Open Lid.** Pasirinkto instrumento bloko motorizuoto dangčio atidarymas.
- **Close Lid.** Pasirinkto instrumento bloko motorizuoto dangčio uždarymas.
- **Rename.** Instrumento pavadinimo keitimas.
- **Properties.** Instrument Properties lango atidarymas.
- **Collapse All.** Detected Instruments polangio instrumentų sąrašo suskleidimas.
- **Expand All.** Detected Instruments polangio instrumentų sąrašo išskleidimas.

Bloką valdyti galite ir paspaudę ant Detected Instrument polangyje rodomo instrumento piktogramos ir pasirinkę norimą parinktį Selected Instrument polangyje (11 iliustracija).



11 iliustracija. Parinktys Detected Instruments polangio apačioje.

- Pasirinkus parinktį **View Status**, atsidarys Run Details langas su pasirinkto instrumento bloko būsena.
- Pasirinkus parinktį **Open Lid**, atsidarys motorizuotas pasirinkto instrumento dangtis.
- Pasirinkus parinktį **Close Lid**, uždarys motorizuotas pasirinkto instrumento dangtis.
- Pasirinkus parinktį **View Summary**, atsidarys Instrument Summary langas.

Jei yra aptiktas tik vienas instrumentas, parinktis **View Summary** nebus rodoma. Jei norite atidaryti vieno instrumento Instrument Summary langą, pasirinkite **View > Instrument Summary**.

Status (būsenos) juosta

Pagrindinio programinės įrangos lango apačioje esančioje būsenos juostoje yra rodoma dabartinė instrumentų būseną. Dešinėje būsenos juostos dalyje yra rodomas prisijungusio naudotojo paskyros pavadinimas, data ir laikas.

Jei norite pakeisti pagrindinio lango dydį, paspauskite ir tempkite dešinį būsenos juostos kampą.

Instrument Properties (instrumento savybių) langas

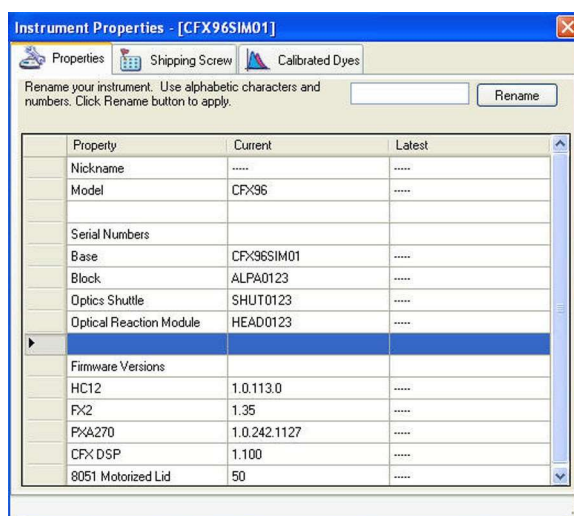
Norėdami atidaryti Instrument Properties langą ir peržiūrėti informaciją apie instrumentą, dešiniuoju pelės klavišu spustelėkite ant instrumento piktogramos Detected Instruments polangyje (10 iliustracija, psl. 13).

Properties (savybių) sąrašas

Properties sąrašelyje yra pateikiamas prijungto instrumento, įskaitant termociklerį ir reakcijos modulį, serijos numeris. Taip pat yra rodomos techninės įrangos versijos. Numatytas instrumento pavadinimas yra C1000 termociklerio serijos numeris, kuris yra rodomas ir Detected Instruments polangyje (1 iliustracija, psl. 12).

Norėdami pervadinti instrumentą, atlikite šiuos veiksmus:

- Instrument Properties sąrašelyje **Rename** įrašykite pavadinimą ir paspauskite mygtuką **Rename**. Naujas pavadinimas bus išsaugotas.



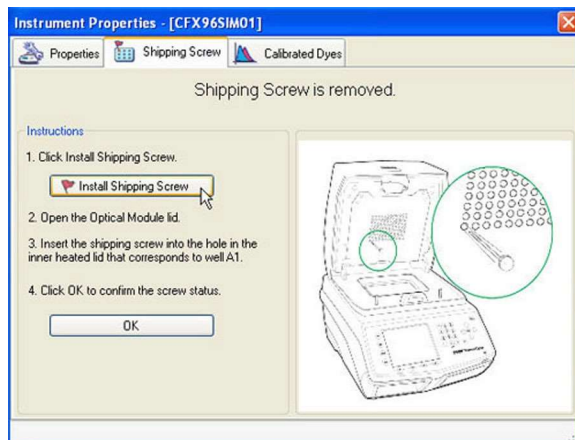
12 iliustracija. Instrument Properties langas

Shipping Screw (transportavimo kaiščio) sąrašas

Shipping Screw sąrašelyje yra pateiktos raudono transportavimui skirta kaiščio įdėjimo ir išėmimo instrukcijos. Siekiant išvengti optinio reakcijos modulio pažeidimo CFX96 sistemos transportavimo metu, įdėkite transportavimo kaištį.

PASTABA. Jei programinė įranga aptiks transportavimo kaištį, automatiškai atsidarys Instrument Properties langas su atverta Shipping Screw sąrašu. Laikydami instrukcijų, išimkite transportavimo kaištį. Jei transportavimo kaištis nebus išimtas, tyrimų vykdyti negalėsite.

Šioje įseleje pateikiama informacija kinta priklausomai nuo to, ar transportavimo kaištis yra išimtas, ar ne. Pavyzdžiui, norėdami įstatyti transportavimo kaištį, paspauskite **Install Shipping Screw** mygtuką ir laikykitės įseleje pateiktų instrukcijų (13 iliustracija).



13 iliustracija. Transportavimui skirto kaiščio įdėjimo instrukcijos.

Calibrated Dyes (kalibruotų dažų) įselė

Calibrated Dyes įseleje galite peržiūrėti pasirinkto instrumento kalibruotų fluoroforų ir plokštelių sąrašą (14 iliustracija). Pasirinkus parinktį **Info**, bus rodoma išsami kalibracijos informacija.

Instrument Properties - [CFX96SIM00]							
	Fluorophore	Channel	Plate Type	Calibrated By	Date	Errors	Detail
1	Cal FL Gold	1	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
2	Cal FL Gold	1	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
3	Cal FL Red	1	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
4	Cal FL Red	1	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
5	Cy5	4	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
6	Cy5	4	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
7	FAM	1	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
8	FAM	1	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
9	HEX	2	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
10	HEX	2	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
11	Quasar 670	4	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
12	Quasar 670	4	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info
13	Quasar 705	5	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	✓	Info

14 iliustracija. Instrument Properties lango Calibrated Dyes įselė.

3 Tyrimų vykdymas

Šiame skyriuje pateikta informacija apie tyrimų vykdymą, naudojant CFX Manager™ programinę įrangą:

- Experiment Setup (tyrimo sąrankos) langas (psl. 17)
- Protocol (protokolo) sąsėlė (psl.)
- Plokštelės sąsėlė (psl. 19)
- Start Run (tyrimo vykdymo) sąsėlė (psl. 19)
- Run Details (tyrimo vykdymo informacija) (psl. 20)

Experiment Setup (tyrimo sąrankos) langas

Experiment Setup lange yra greita prieiga prie tyrimo sąrankos bei vykdymo failų ir nustatymų. Norėdami atidaryti Experiment Setup langą, atlikite vieną šių veiksmų:

- Pasirinkite Startup Wizard lango parinktį **Create a New Experiment** (psl. 12)
- Programinės įrangos įrankių juostoje (psl. 17) pasirinkite parinktį **Experiment Setup**.
- Programinės įrangos įrankių juostoje (psl. 10) pasirinkite **File > New > Experiment**.

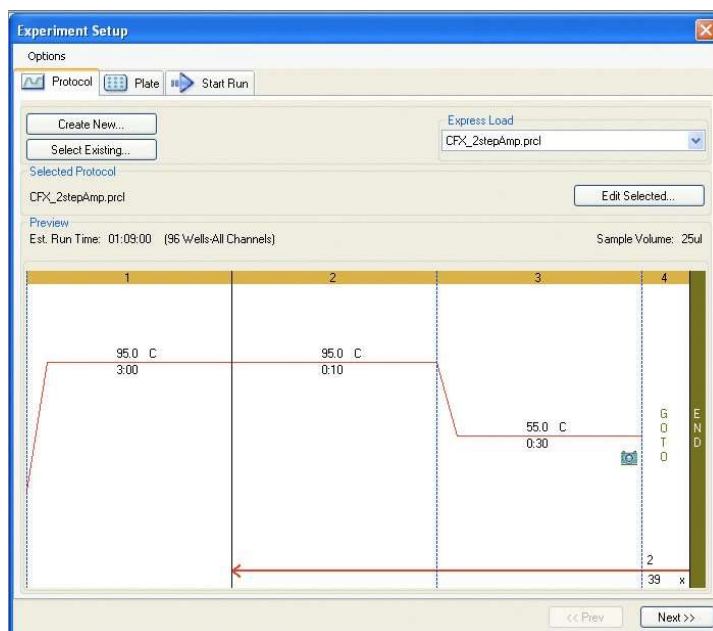
Experiment Setup lange yra trys sąsėlės:

- **Protocol.** Protocol sąsėlėje pasirinkite protokolą, kurį norite vykdyti ar redaguoti arba Protocol Editor lange (psl. 25) sukurkite naują protokolą.
- **Plate.** Plate sąsėlėje pasirinkite plokštelę, kurią norite vykdyti ar redaguoti arba Plate Editor lange (psl. 33) sukurkite naują plokštelę.
- **Start Run.** Start Run sąsėlėje (psl. 19) patikrinkite tyrimo vykdymo nustatymus, pasirinkite vieną ar kelis instrumentų blokus ir pradėkite tyrimo vykdymą.

PASTABA. Jei pasirinktame protokole nėra plokštelės nuskaitymo PGR analizei etapo, Plate sąsėlė nebus rodoma. Jei norite matyti Plate sąsėlę, bent viename protokolo etape pridėkite "Plate Read" (psl. 27) parinktį.

PASTABA. Naują, pagal ankstesnįjį paleidimą atliktąjį, tyrimą pradėkite meniu juostoje pasirinkdami **File > Repeat an Experiment**. Tuomet pasirinkite duomenų failą (.pcrd) tyrimui, kurį norite kartoti.

Experiment Setup langas yra atidaromas Protocol ašselėje (15 iliustracija). Norėdami atverti kitą ašselę, ją paspauskite arba naudokitės lango apačioje esančiais **Prev** ir **Next** klavišais.



15 iliustracija. Experiment Setup langas su Protocol, Plate ir Start Run ašselėmis.

Protocol (protokolo) ašselė

Protocol ašselėje pateikiama pasirinkto protokolo failo, įkelto į tyrimo sąranką, apžvalga (15 iliustracija). Protokolo faile pateikiamos instrumento temperatūros etapo instrukcijos bei temperatūros pokyčio ir dangčio temperatūros valdymo parinktys.

Vieną šių parinkčių pasirinkite egzistuojančiam protokolui, sukurkite naują protokolą arba redaguokite pasirinktą protokolą:

- **Create New mygtukas.** Protocol Editor lango atidarymas naujo protokolo sukūrimui.
- **Select Existing mygtukas.** Atsidarys naršyklės langas egzistuojančio protokolo failo (.prcf plėtinys) pasirinkimui.
- **Express Load išskleidžiamasis meniu.** Greitas protokolo pasirinkimas ir įkėlimas į Protocol ašselę.
PATARIMAS. Norėdami pridėti ar ištrinti protokolus iš **Express Load** meniu, pridėkite ar ištrinkite failus (.prcf plėtinys), esančius **Express Load** aplanke. Norėdami atverti šį aplanką, pagrindinio programinės įrangos lango meniu juostoje pasirinkite **Tools > User Data Folder**.
- **Edit Selected mygtukas.** Pasirinkto protokolo atidarymas Protocol Editor lange.

Tik galutinio taško (end point) tyrimo vykdymas

Jei norite vykdyti protokolą, kuriame yra tik galutinio taško atpažinimo etapas, Experiment Setup lango meniu juostoje pasirinkite **Options > End Point Only Run**. Numatytasis galutinio taško protokolai, kuriame yra du 30 sekundžių 60.0°C ciklai, yra įkeltas į Protocol ašselę. Norėdami pakeisti galutinio taško tyrimo etapo temperatūrą ar mėginio tūrį, pasirinkite **Start Run** ašselę ir redaguokite **Step Temperature** ar **Sample Volume** laukelius.

Plate (plokštelės) ąselė

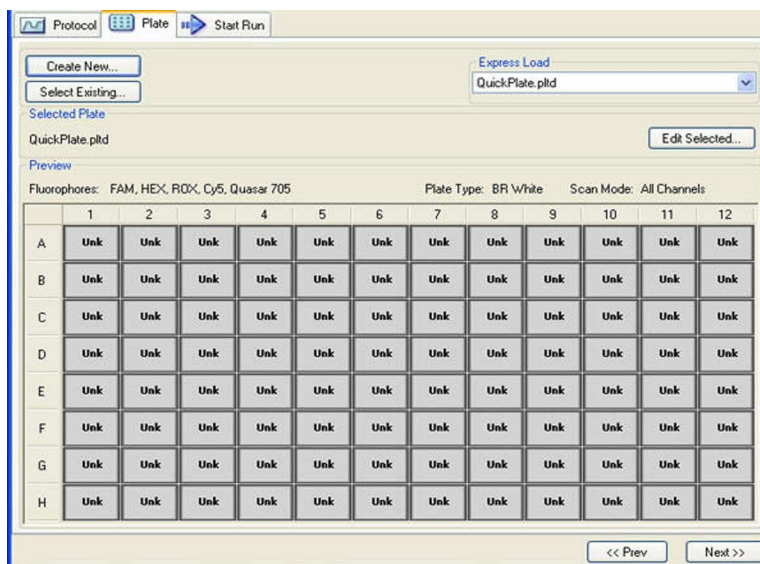
Plate ąselėje pateikiama pasirinktos plokštelės failo, įkelto į tyrimo sąranką, apžvalga (16 iliustracija). Tikro laiko PGR vykdyme, plokštelės faile yra pateikiama kiekvieno šulinėlio turinio informacija, nuskaitymo režimas ir plokštelės tipas. Šiuos duomenis CFX Manager programinė įranga naudoja duomenų surinkimui ir analizei.

Vieną šių parinkčių pasirinkite egzistuojančiai plokštei, sukurkite naują plokštelę arba redaguokite pasirinktą plokštelę:

- **Create New mygtukas.** Plate Editor lango atidarymas naujos plokštelės sukūrimui.
- **Select Existing mygtukas.** Atsidarys naršyklės langas egzistuojančios plokštelės failo (.pltd plėtinys) pasirinkimui.
- **Express Load išskleidžiamasis meniu.** Greitas plokštelės pasirinkimas ir įkėlimas į Plate ąselę.

PATARIMAS. Norėdami pridėti ar ištrinti plokšteles iš **Express Load** meniu, pridėkite ar ištrinkite failus (.pltd plėtinys), esančius **Express Load** aplanke. Norėdami atverti šį aplanką, pagrindinio programinės įrangos lango meniu juostoje pasirinkite **Tools > User Data Folder**.

- **Edit Selected mygtukas.** Pasirinktos plokštelės atidarymas Plate Editor lange.



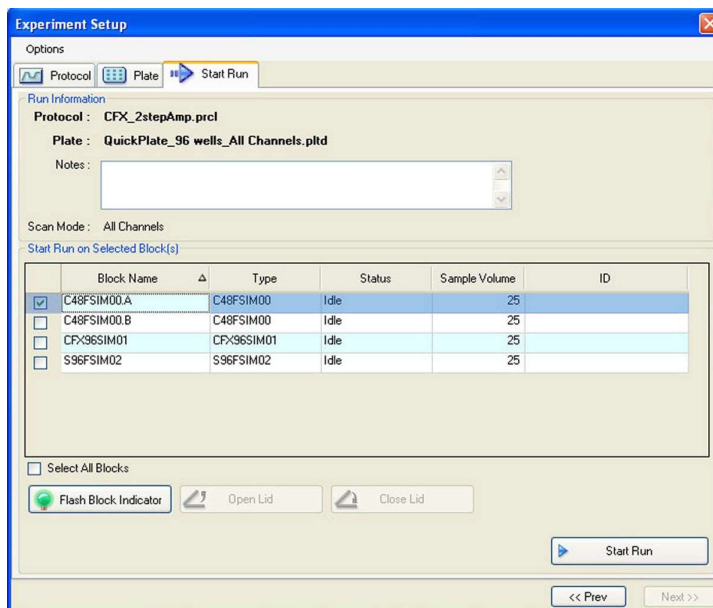
16 iliustracija. Plate ąselė.

Start Run (tyrimo vykdymo) ąselė

Start Run ąselėje (17 iliustracija) galite patikrinti vykdyti ketinamo tyrimo informaciją, įskaitant pasirinkto protokolo ir plokštelės failus bei pasirinkti instrumento bloką.

- **Run Information dalis.** Protokolo failo, plokštelės failo ir duomenų atpažinimo nuskaitymo režime nustatymo peržiūra. Papildomas pastabas dėl tyrimo galite įrašyti laukelyje **Notes**.

- **Start Run on Selected Block(s)** dalis. Pasirinkite vieną ar daugiau blokų, redaguokite tyrimo vykdymo parametrus (jei reikia). Tuomet paspauskite mygtuką **Start Run**, kad pradėtumėte tyrimo vykdymą.



17 iliustracija. Start Run ąselė.

Norėdami pridėti ar pašalinti parametrus iš **Start Run on Selected Block(s)** dalies laukelio, dešiniuoju pelės klavišu spustelėkite ant sąrašo ir pasirinkite norimą parinktį. Vertę galite keisti paspaudžiant ant teksto laukelio ir įrašant norimą vertę arba išskleidžiamajame meniu pasirenkant naują parametą. Redaguojami parametrai:

- **Lid Temperature.** Patikrinkite dangčio temperatūrą. Pasirinkite teksto laukelį ir įrašykite naują temperatūros vertę.
ĮSPĖJIMAS! Dangčio temperatūros keitimas gali paveikti tyrimo rezultatus ir įtakoti nesėkmingą tyrimo paleidimą.

Instrumento valdymo mygtukai

Pasirinkę žemiau aprašytus Start Run ąselės mygtukus, galite nuotoliniu būdu valdyti pasirinktus instrumentus:

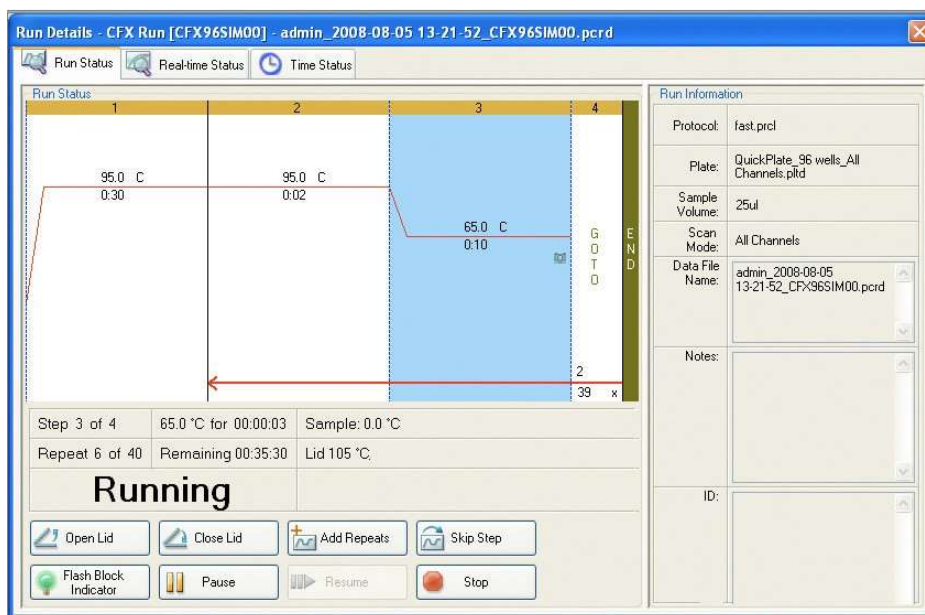
- **Start Run.** Tyrimo vykdymas pasirinktuose instrumentų blokuose.
- **Flash Block Indicator.** Instrumento LED indikatoriaus įjungimas pasirinktuose instrumentų blokuose.
- **Open Lid.** Pasirinkto instrumento bloko motorizuoto dangčio atidarymas.
- **Close Lid.** Pasirinkto instrumento bloko motorizuoto dangčio uždarymas.

Run Details (tyrimo vykdymo informacijos) langas

Paspaudus mygtuką **Start Run**, CFX Manager programinė įranga pasiūlys išsaugoti duomenų failo pavadinimą ir atidarys Run Details langą. Šiame lange galite peržvelgti informaciją ir stebėti tyrimo eigą.

- **Run Status ąselė.** Dabartinės protokolo būsenos patikra, dangčio atidarymas, tyrimo pristabdymas, pakartojimo pridėjimas, etapų praleidimas, tyrimo sustabdymas.
- **Real-Time Status ąselė.** Tikro laiko PGR fluorescencijos duomenų peržiūra.
- **Time Status ąselė.** Laikmatis, protokolo trukmę skaičiuojantis atgaline tvarka.

18 iliustracijoje pavaizduotos Run Details (tyrimo vykdymo informacijos) lango savybės.



18 iliustracija. Run Details langas.

Run Status sąselė

Run Status sąselėje (18 iliustracija) pateikiama dabartinė tyrimo eigos būseną bei dangčio valdymo ir tyrimo eigos keitimo klavišai (psl. 21).

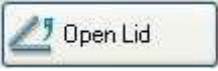
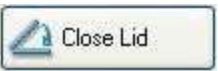
- **Run Status dalis.** Rodomas protokolo progresas, įskaitant vykdomą etapą, GOTO pakartojimą, bloko temperatūrą, laiką, likusį iki vykdomo etapo pabaigos, mėginio temperatūrą, dangčio ir temperatūros pokytį.
- **Run Status klavišai.** Šiais klavišais galite nuotoliniu būdu valdyti instrumentą ar stabdyti vykdomą protokolą.
- **Run Information dalis.** Rodoma išsami tyrimo informacija.

RUN STATUS SĄSELĖS KLAVIŠAI

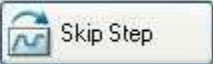
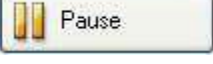
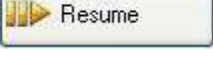
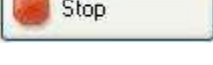
10 lentelėje aprašyti klavišais instrumentą galite valdyti programinėje įrangoje bei keisti vykdomą tyrimą.

PASTABA. Protokolo keitimas, pvz., pakartojimų pridėjimas, vykdymo metu nekeičia protokolo failo, susieto su tyrimo vykdymu. Šie veiksmai bus įrašyti tyrimo vykdymo žurnale.

10 lentelė. Run Status klavišai ir jų funkcijos

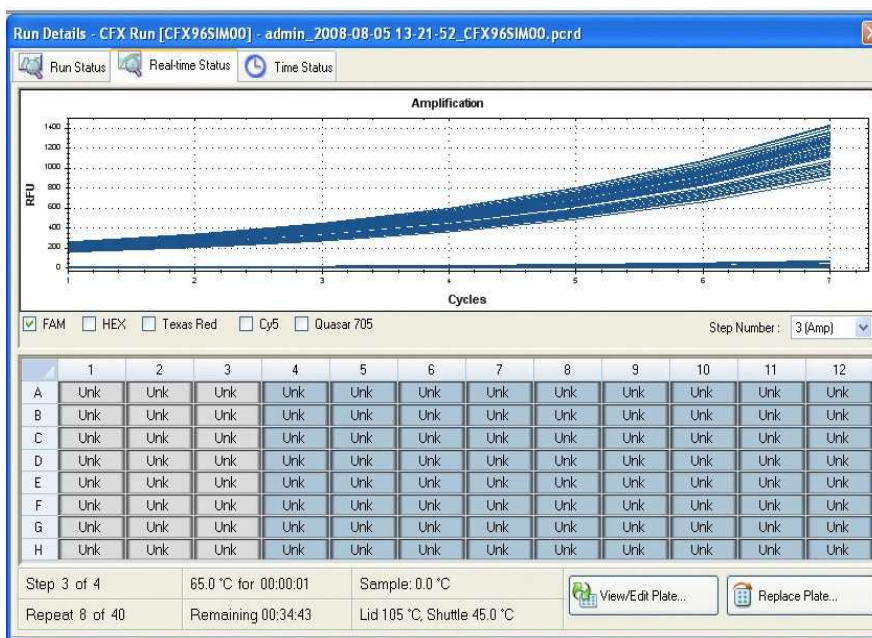
Klavišas	Funkcija
 Open Lid	Pasirinkto instrumento motorizuoto dangčio atidarymas. ĮSPĖJIMAS! Dangčio atidarymas tyrimo vykdymo metu pristabdo vykdymą tyrimo etapą ir gali modifikuoti duomenis.
 Close Lid	Pasirinkto instrumento motorizuoto dangčio uždarymas.

10 lentelė. Run Status klavišai ir jų funkcijos (tęsinys).

Klavišas	Funkcija
 Add Repeats	Pakartojimų pridėjimas protokolo GOTO etape. Šis klavišas yra galimas tik GOTO etapo vykdymo metu.
 Skip Step	Vykdomo protokolo etapo praleidimas. Jei praleisite GOTO etapą, programinė įranga paprašys patvirtinti, ar norite praleisti visą GOTO etapą ir pereiti prie kito protokolo etapo.
 Flash Block Indicator	Instrumento LED indikatoriaus įjungimas pasirinktų blokų identifikacijai.
 Pause	Protokolo pristabdymas. PASTABA. Šis veiksmas bus įrašytas tyrimo vykdymo žurnale.
 Resume	Tęsti pristabdytą protokolą.
 Stop	Stabdyti tyrimo protokolo vykdymą nesulaukus jo pabaigos. ĮSPĖJIMAS! Priešlaikinis tyrimo vykdymo sustabdymas gali įtakoti duomenų pakitimą bei nesėkmingai įvykdytą tyrimą.

Real-Time Status (tikro laiko būsenos) sąsėja

Real-time Status sąsėoje (19 iliustracija) rodomi tikro laiko PGR kiekvieno ciklo duomenys, surinkti protokolo vykdymo metu po pirmųjų dviejų plokštelių nuskaitymo. Šioje sąsėoje taip pat yra rodomas šulinėlių selektorius ir protokolo būsenos duomenys (lango apačioje).

**19 iliustracija. Real-time Status sąsėja su tyrimo vykdymo duomenimis.**

PLOKŠTELĖS FAILO PAKEITIMAS

Tyrimo vykdymo metu, plokštelės failą galite pakeisti paspaudę **Real- time Status** sąselės mygtuką **Replace Plate** (19 iliustracija). Windows naršyklės lange pasirinkite naują plokštelės failą (.pltd).

PASTABA. CFX Manager programinė įranga tikrina nuskaitymo režimą ir plokštelės dydį pagal plokštelės failą; šie parametrai turi sutapti su tyrimo nustatymais.

PATARIMAS. Plokštelės failo pakeitimas yra ypač naudingas, jei tyrimą vykdomė naudodami Quick Plate failą iš Express Load aplanko.

Time Status sąselė

Time Status sąselėje rodomas laikas, likęs iki tyrimo vykdymo pabaigos.

4 Protokolai

Perskaitykite žemiau pateiktus skyrius apie protokolų failų kūrimą ir redagavimą:

- Protocol Editor (protokolo redagavimo) langas (psl. 25)
- Protocol Editor (protokolo redagavimo) lango parinktys (psl. 27)
- Temperatūros kontrolės režimas (psl. 30)
- Protokolo AutoWriter (automatinio užpildymo) funkcija (psl. 30)

Protocol Editor (protokolo redagavimo) langas

Pagal protokolo informaciją instrumentas kontroliuoja etapų temperatūrą, dangčio temperatūrą ir kitas instrumento parinktis. Atidarykite Protocol Editor langą ir sukurkite naują protokolą arba redaguokite Protocol sąsėdėje pasirinktą protokolą. Kuomet protokolas yra sukurtas ar redaguotas Protocol Editor lange, paspauskite mygtuką **OK**, kad protokolo failas būtų įkeltas į Experiment Setup langą.

ĮSPĖJIMAS! Prieš tyrimo vykdymą, įsitikinkite, kad į Start Run sąsėdę įkeltas protokolas yra tinkamas. Tyrimo vykdymas su netinkamu protokolu gali modifikuoti duomenis ir įtakoti nesėkmingą tyrimo vykdymą.

Protocol Editor lango atidarymas

Norėdami atidaryti Experiment Editor langą, atlikite vieną šių veiksmų:

- Jei norite sukurti naują protokolą, pasirinkite **File > New > Protocol** arba paspauskite **Create New** mygtuką Protocol sąsėdėje (psl. 18).
- Jei norite atidaryti egzistuojantį protokolą, pasirinkite **File > Open > Protocol** arba paspauskite **Open Existing** mygtuką Protocol sąsėdėje (psl. 18).
- Jei norite redaguoti pasirinktą protokolą Protocol sąsėdėje, paspauskite **Edit Selected** mygtuką Protocol sąsėdėje (psl. 18).

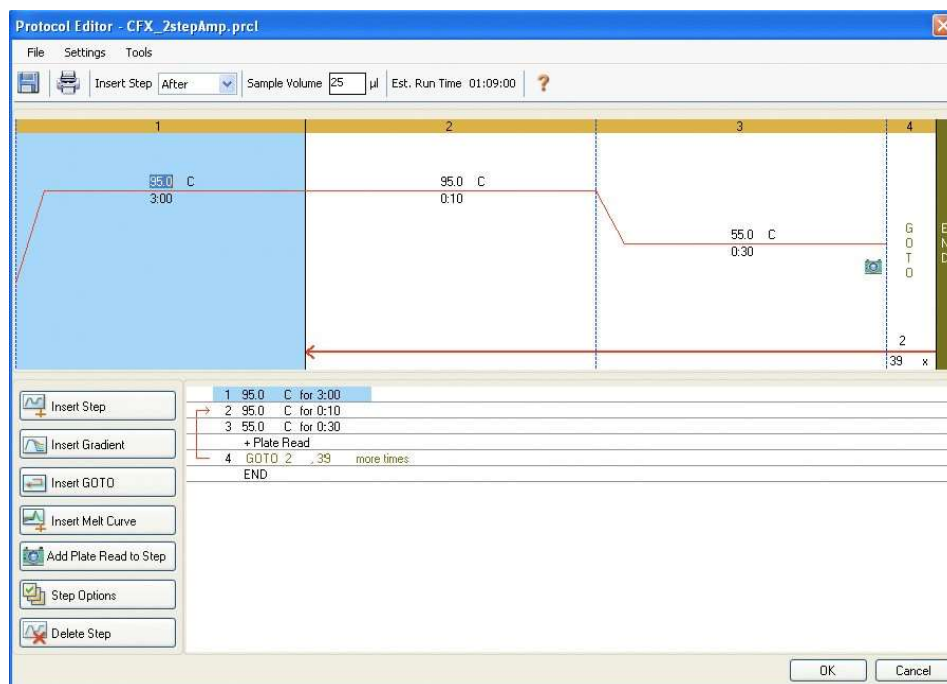
PATARIMAS. Jei norite pakeisti numatytuosius Protocol Editor lango nustatymus, pakeitimus įrašykite **User Preferences** lango **Protocol** sąsėdėje (psl. 90).

Protocol Editor langas

Protocol Editor lango (20 iliustracija) savybės:

- **Menu (meniu) juosta.** Protokolo nustatymų pasirinkimas.
- **Tool (įrankių) juosta.** Protokolo redagavimo parinktys.

- **Protocol.** Protokolo grafinės (viršuje) ir tekstinės (apačioje) informacijos peržiūra. Jei norite pakeisti vertę, paspauskite temperatūros ar laiko laukelį ir įrašykite naują vertę.
- **Protocol Editor mygtukai.** Redaguokite protokolą pasirinkdami tekstinės informacijos kairėje esančius parinkčių mygtukus.



20 iliustracija. Protocol Editor langas.

Protocol Editor lango meniu juosta

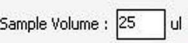
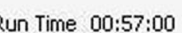
Protocol Editor lango meniu juostos parinktys pateiktos 11 lentelėje.

11 lentelė. Protocol Editor lango meniu juosta

Meniu parinktis	Komanda	Funkcija
File	Save	Atidaryto protokolo išsaugojimas
	Save As	Atidaryto protokolo išsaugojimas nauju pavadinimu ar naujoje paskirties vietoje
	Close	Protocol Editor lango uždarymas
Settings	Lid Settings	Lid Settings lango atidarymas dangčio temperatūros pakeitimui ar nustatymui
Tools	Gradient Calculator	Bloko tipo pasirinkimas gradiento etapui
	Run-time Calculator	Instrumento ir nuskaitymo režimo pasirinkimas tyrimo vykdymo laiko apskaičiavimui Experiment Setup lange

Protocol Editor lango įrankių juostoje yra greitos prieigos prie svarbių funkcijų parinktys. 12 lentelėje aprašomos Protocol Editor įrankių juostos mygtukai.

12 lentelė. Protocol Editor įrankių juostos mygtukai.

Įrankių juostos mygtukai ir meniu	Pavadinimas	Funkcija
	Save	Atidaryto protokolo failo išsaugojimas.
	Print	Pasirinkto lango spausdinimas.
	Insert Step	Pasirinkite After ar Before ir įtraukite etapą prieš ar po pažymėto etapo.
	Sample Volume	Įrašykite mėginio tūrį ml vienetais nuo 0 iki 50. Pagal mėginio tūrį yra nustatomas temperatūros kontrolės režimas (psl. 30). Jei norite pasirinkti bloko režimą, įrašykite nulį (0).
	Run Time	Numatyto laiko, apskaičiuoto remiantis protokolo etapais ir temperatūros pokyčiu, peržiūra.
	Help	Programinės įrangos parinkties Help atidarymas.

Protocol Editor lango parinktys

Protocol Editor lango apačioje kairėje yra protokolo redagavimo mygtukai. Pirmiausia kairiuoju pelės klavišu pasirinkite ir pažymėkite protokolo etapą. Tuomet pasirinkite vieną Protocol Editor mygtukų, esančių lango apačioje, kairėje pusėje. Pasirinkite **Insert Step** ir naujo etapo pridėjimo vietą pasirinkite mygtukais **Before** ar **After**, prieš ar po pasirinkto etapo.

Insert Step mygtukas

Jei norite įterpti temperatūros etapą prieš ar po pasirinkto etapo:

1. Paspauskite **Insert Step** mygtuką.
2. Redaguokite temperatūros vertę ar laiką, paspausdami ant numatytosios vertės grafiniame ar tekstiniame laukelyje, ir įrašykite naują vertę.

Plokštelės nuskaitymo pridėjimas ar pašalinimas

Jei prie etapo norite pridėti ar iš jo pašalinti plokštelės nuskaitymą:

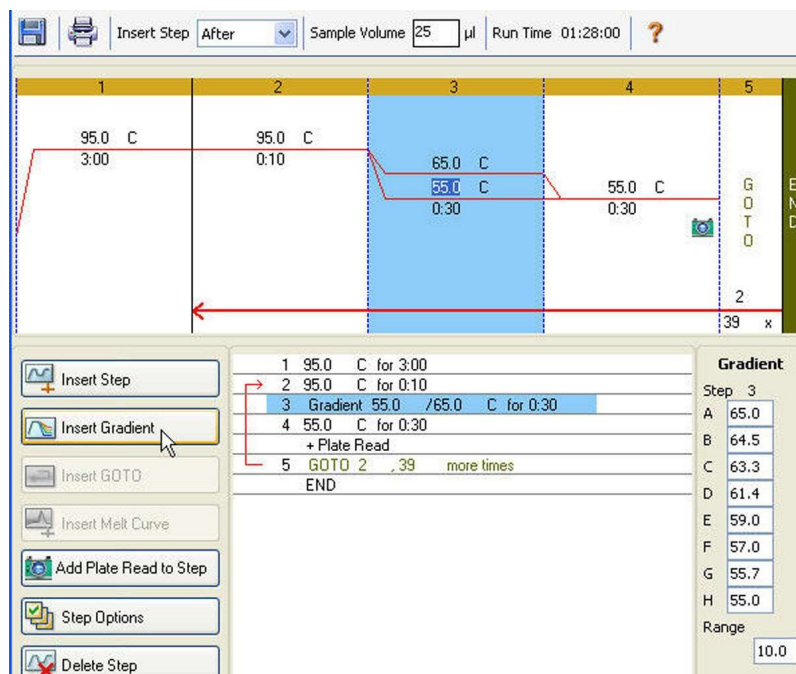
1. Grafinės ar tekstinės informacijos laukelyje paspauskite ir pasirinkite norimą etapą.
2. Paspaudę mygtuką **Add Plate Read to Step**, prie pasirinkto etapo pridėkite plokštelės nuskaitymą. Jei etape jau yra plokštelės nuskaitymas, mygtuko tekstas pasikeis į **Remove Plate Read**. Paspaudus šį mygtuką, iš pasirinkto etapo plokštelės nuskaitymas bus pašalintas.

Insert Gradient mygtukas

Jei norite įterpti gradiento etapą prieš ar po pasirinkto etapo:

1. Temperatūros gradiento etapą galite įterpti paspaudę **Insert Gradient** mygtuką.
2. Redaguokite gradiento temperatūros ribas, paspausdami ant numatytosios temperatūros grafiniame ar tekstiniame laukelyje, ir įrašykite naują vertę.
3. Redaguokite laiką, paspausdami ant numatytosios vertės grafiniame ar tekstiniame laukelyje, ir įrašykite naują laiką.

21 iliustracijoje pavaizduotas įterptas gradiento etapas. Kiekvienos gradiento eilutės temperatūra yra rodoma dešinėje lango pusėje.



21 iliustracija. Protokolas su įterptu gradiento etapu.

Insert GOTO mygtukas

Jei norite įterpti GOTO etapą prieš ar po pasirinkto etapo:

1. Paspauskite **Insert GOTO** mygtuką.
2. Redaguokite GOTO etapo numerį ar GOTO pakartojimų skaičių, paspausdami ant numatytosios vertės grafiniame ar tekstiniame laukelyje, ir įrašykite naują vertę.

21 iliustracijoje vaizduojamas protokolo pabaigoje įterptas GOTO etapas. Atkreipkite dėmesį, kad GOTO ciklas apima nuo 2 iki 4 etapo.

Insert Melt Curve mygtukas

Jei norite įterpti lydymosi kreivės etapą prieš ar po pasirinkto etapo:

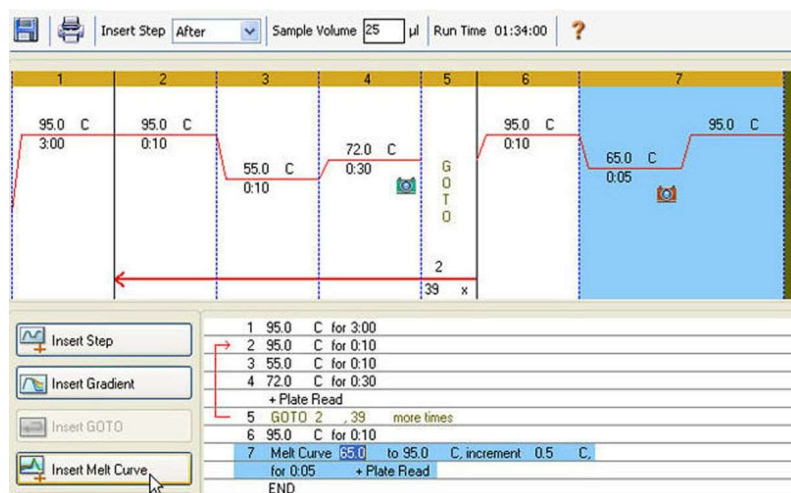
1. Paspauskite **Insert Melt Curve** mygtuką.

2. Redaguokite lydymosi temperatūros ribas ar didėjimo intervalo laiką, paspausdami ant numatytosios vertės grafiniame ar tekstiniame laukelyje, ir įrašykite naują vertę. Taip pat galite paspausti **Step Options** mygtuką ir įrašyti gradiento ribas Step Options lange (psl. 29).

PASTABA. GOTO cikle lydymosi kreivės etapo įterpti negalima.

PASTABA. Lydymosi kreivės etapo pradžioje vyksta 30 sekundžių užlaikymas, kuris nėra pateikiamas protokole.

22 iliustracijoje pavaizduotas lydymosi kreivės etapas pridėtas po 6 etapo.



22 iliustracija. Protokolas su įterptu lydymosi kreivės etapu.

Step Options (etapo parinkčių) langas

Jei norite keisti pasirinkto etapo parinktis:

1. Grafinės ar tekstinės informacijos laukelyje paspauskite ir pasirinkite norimą etapą.
2. Paspauskite **Step Options** mygtuką, atsidarys Step Options langas.
3. Pridėkite ar pašalinkite parinktis įrašydami vertes, jas redaguodami ar pažymėdami žymimuosius laukelius. PATARIMAS. Jei etapą norite tęsti neribotą laiką, laiko laukelyje įrašykite nulį (0.00).

23 iliustracijoje pavaizduotas etapas su 10°C gradientu. Atkreipkite dėmesį, kad gradiento etape galimos ne visos parinktys. Gradiento etape negalima redaguoti temperatūros didėjimo intervalo ar temperatūros pokyčio nustatymo.

The screenshot shows the 'Step Options' dialog box for Step 1. It has a 'Gradient' section with a table of values. The 'Temperature' field is set to 90.0 °C, 'Gradient' to 10.0 °C, 'Increment' to 0.5 °C/cycle, 'Ramp Rate' to 0.5 °C/sec, 'Time' to 3:00 sec/cycle, and 'Extend' to 0.00 sec/cycle. There are checkboxes for 'Plate Read' and 'Beep'. At the bottom, there are 'OK' and 'Cancel' buttons.

Gradient	Value
A	100.0
B	99.5
C	98.4
D	96.4
E	94.1
F	92.1
G	90.8
H	90.0

23 iliustracija. Gradiento etapo parinktys.

Step Options lange yra žemiau išvardintos etapo nustatymų redagavimo parinktys:

- **Plate Read.** Pažymėkite šį laukelį plokštelės nuskaitymo įtraukimui.
- **Temperature.** Įrašykite tikslinę pasirinkto etapo temperatūrą.
- **Gradient.** Įrašykite etapo gradiento ribas.
- **Increment.** Įrašykite pasirinkto etapo temperatūros didėjimo intervalą; intervalas yra pridamas prie tikslinės temperatūros kiekviename etape.
- **Ramp Rate.** Įrašykite pasirinkto etapo temperatūros pokytį; pokytis priklauso nuo bloko dydžio.
- **Time.** Įrašykite pasirinktame etape laikomos temperatūros trukmę.
- **Extend.** Įrašykite pasirinkto etapo pratęsimo laiką. Pratęsimo laikas yra pridamas prie užlaikymo laiko kiekviename cikle.
- **Beep.** Pažymėjus šį laukelį, pasibaigus kiekvienam etapui, pasigirs garsinis signalas. **PATARIMAS.** Jei įrašysite vertę, kuri nepatenka į numatytąsias ribas, programinė įranga šią vertę pakeis į artimiausią galimą vertę.

Delete Step mygtukas

Jei norite ištrinti protokolo etapą:

1. Grafinės ar tekstinės informacijos laukelyje pasirinkite norimą etapą.
2. Pasirinktą etapą ištrinsite paspaudę mygtuką **Delete Step**.
ĮSPĖJIMAS! Šio veiksmo anuliuoti negalima.

Temperatūros kontrolės režimas

Instrumente yra du temperatūros kontrolės režimai, kuomet yra aptinkamas mėginys, pasiekęs tikslinę protokolo temperatūrą.

Protocol Editor lange įrašykite mėginio tūrį ir pasirinkite temperatūros kontrolės režimą:

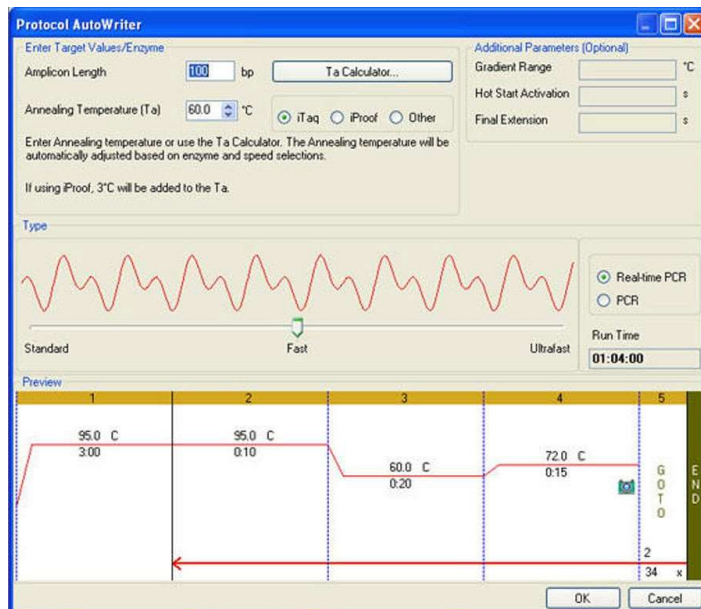
- **Calculated** režimas. Jei įrašytas mėginio tūris yra nuo 1 iki 50 µl, termocikleris mėginio temperatūrą apskaičiuoja remiantis mėginio tūriu. Tai yra standartinis darbo režimas.
- **Block** režimas. Jei įrašytas mėginio tūris yra nulis (0) µl, termocikleris mėginio temperatūrą nustato tokią pat, kaip išmatuota bloko temperatūra.

Protocol AutoWriter parinktis

Protocol AutoWriter funkcija yra skirta greitam PGR ir tikro laiko PGR tyrimų protokolų sudarymui. Norėdami atidaryti Protocol AutoWriter langą, atlikite vieną šių veiksmų:

- Paspauskite pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juostos mygtuką **Protocol AutoWriter**.
- Pasirinkite pagrindinio programinės įrangos lango meniu juostoje **Tools > Protocol AutoWriter**.

24 iliustracijoje vaizduojamas protokolas (lango apačioje), sudarytas naudojant Protocol AutoWriter funkciją.



24 iliustracija. Protocol AutoWriter langas.

Protokolo kūrimas naudojant Protocol AutoWriter funkciją

Protocol AutoWriter lange pagal reakcijos informaciją yra automatiškai sugeneruojamas protokolo failas. Naujo protokolo kūrimas, naudojant Protocol AutoWriter funkciją:

1. Paspauskite įrankių juostos mygtuką **Protocol AutoWriter**. Atsidarys Protocol AutoWriter langas.
2. Target Values/Enzymes polaukio **Annealing Temperature (Ta)** ir **Amplicon Length** laukeliuose įrašykite pageidaujamas vertes. Jei nežinote pradmenų anylingo temperatūros, paspauskite mygtuką **Ta Calculator**, įrašykite pradmenų sekas ir apskaičiuokite anylingo temperatūrą.
3. Parinkčių sąrašė pasirinkite fermento tipą (**iTaq**, **iProof** ar **Other**).
4. Polangyje **Additional Parameters (Optional)** galite pasirinkti Gradient Range, Hot Start Activation temperature ar Final Extension parametrus.
5. Type polangio slankiuoju kursoriumi pasirinkite protokolo greitį (Standard, Fast ar Ultrafast). Slenkant kursorių, programinė įranga iš naujo nustato bendrą tyrimo vykdymo trukmę. Jei pasirinksite parinktį **Real-time PCR**, programinė įranga rinks fluorescencijos duomenis.
6. Preview polangyje peržiūrėkite protokolą ir tyrimo vykdymo trukmę. Jei reikia, atlikite keitimus.
7. Paspaudę **OK**, ir išsaugokite protokolą. Paspaudę **Cancel**, uždarysite langą neišsaugoję protokolo.

PASTABA. Bio-Rad Laboratories negarantuoja, kad Protocol AutoWriter sudaryto protokolo vykdymo metu bus visuomet gaunamas PGR produktas.

5 Plokštelės

Perskaitykite žemiau pateiktus skyrius apie plokštelių failų kūrimą ir redagavimą:

- Plate Editor (plokštelės redagavimo) langas (psl. 33)
- Select Fluorophores (fluoroforų pasirinkimo) langas (psl. 35)
- Šulinėlių turinio parinktys (psl. 36)
- Experiment settings (tyrimo nustatymų) langas (psl. 38)
- Well Groups Manager (šulinėlių grupavimo) langas (psl. 40)
- Plate Spreadsheet View (plokštelės skaičiuoklės peržiūros) langas (psl. 42)

Plate Editor (plokštelės redagavimo) langas

Plokštelės faile yra vykdymo parametrai, pvz., nuskaitymo režimas ir fluoroforai, bei šulinėlių turinio informacija, pagal kurią instrumentas analizuoja duomenis. Atidarykite Plate Editor langą ir sukurkite naują plokštelę arba redaguokite Plate sąsąsėje pasirinktą plokštelę. Kuomet plokštelės failas yra sukurtas ar redaguotas Plate Editor lange, paspauskite mygtuką **OK**, kad plokštelės failas būtų įkeltas į Experiment Setup langą.

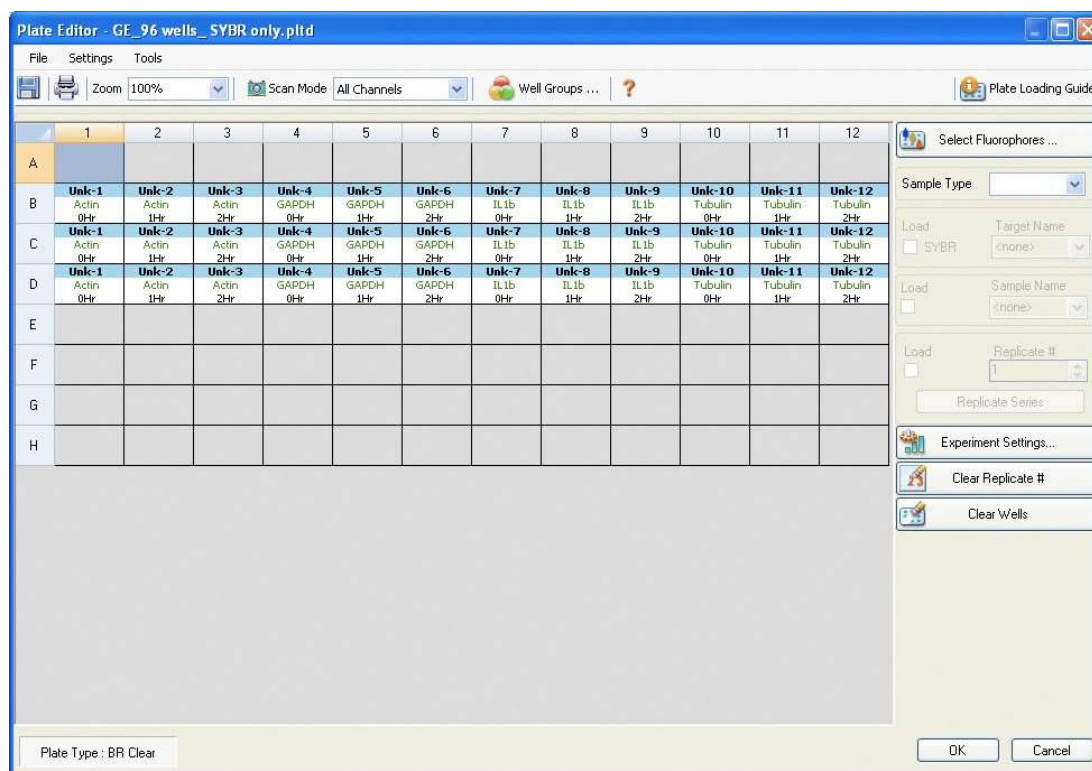
Tyrimo vykdymui, bent vienam šulinėliui būtina nurodyti mėginio tipą ir fluoroforą.

PATARIMAS. Paspaudus mygtuką **Plate Loading Guide**, atsidarys Plate Loading Guide langas su plokštelės įkrovimo instrukcijomis.

Plate Editor lango atidarymas

Norėdami atidaryti Plate Editor langą (25 iliustracija), atlikite vieną šių veiksmų:

- Jei norite sukurti naują plokštelę, pasirinkite **File > New > Plate** arba paspauskite Plate sąsąsės (psl. 19) mygtuką **Create New**.
- Jei norite atidaryti egzistuojančią plokštelę, pasirinkite **File > Open > Plate** arba paspauskite **Open Existing** mygtuką Plate sąsąsėje (psl. 19).
- Jei norite redaguoti pasirinktą plokštelę Plate sąsąsėje, paspauskite **Edit Selected** mygtuką Plate sąsąsėje (psl. 19).
- Jei norite atidaryti su duomenų failu susietą plokštelę Data Analysis lange (psl. 53), paspauskite įrankių juostos parinktį **View/Edit Plate**.



25 iliustracija. Plate Editor langas.

Plokštelės dydis ir tipas

Šiuos plokštelės nustatymus programinė įranga pritaiko visiems šulinėliams:

- **Plate Size. Settings** meniu pasirinkite parinktį **Plate Size**, kurioje pateikiamas instrumento reakcijos modulio bloko dydis. Startup Wizard lango išskleidžiamajame meniu pasirinkus instrumento tipą, CFX96, plokštelės dydis Plate ašelėje pasikeis į numatytąjį. Plate Editor lango Setting meniu (13 iliustracija, psl. 35) pasirinkite plokštelės dydį. Tyrimo vykdymo metu plokštelės dydžio keisti negalima.
- **Plate Type. Settings** meniu parinktyje **Plate Type** pasirinkite **Clear Wells** ar **White Wells**. Užtikrinkite, kad tyrime naudojamas fluoroforas būtų sukalibruotas pasirinktam plokštelės tipui.

PASTABA. Gamybos metu CFX96 instrumentai yra sukalibruojami daugeliui fluorescencinių dažų ir plokštelių kombinacijų. Kalibravimas yra atliekamas specifiskai instrumentui, dažams ir plokštelės tipui. Norėdami sukalibruoti naują dažų ir plokštelės tipo kombinaciją, pasirinkite **Tools > Calibration Wizard** (žr. "Kalibravimo vediklis", psl.97)

Nuskaitymo režimas

CFX96 sistema sužadina ir aptinka fluoroforus šešiuose kanaluose bei naudoja sudėtinio duomenų atpažinimo režimus fluorescencijos duomenų surinkimui tyrimo vykdymo metu.

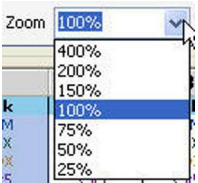
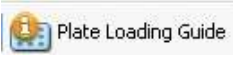
Plate Editor lango įrankių juostoje pasirinkite nuskaitymo režimą:

- **All Channels.** CFX96 sistemos kanalai nuo 1 iki 5.
- **SYBR/FAM only.** Tik 1 kanalas, greitas nuskaitymas.
- **FRET.** Tik FRET kanalas, greitas nuskaitymas.

Plate Editor įrankių juosta

Plate Editor įrankių juostoje yra greitos prieigos prie svarbių funkcijų parinktys. 13 lentelėje aprašomi Protocol Editor įrankių juostos mygtukai.

13 lentelė. Plate Editor lango įrankių juostos parinktys.

Įrankių juostos parinktis	Pavadinimas	Funkcija
	Save	Atidaryto plokštelės failo išsaugojimas.
	Print	Pasirinkto lango spausdinimas.
	Zoom	Plokštelės vaizdo padidinimas arba sumažinimas.
	Scan Mode	Nuskaitymo režimo, pagal kurį instrumentas surinks fluorescencijos duomenis iš tam tikrų kanalų, pasirinkimas. Pasirinkite All Channels (numatytoji parinktis), SYBR/FAM only ar FRET .
	Well Groups	Well Groups Manager lange sugrupuokite plokštelės šulinėlius.
	Help	Programinės įrangos parinktės Help atidarymas.
	Plate Loading Guide	Trumpas gidas apie plokštelės sąranką ir šulinėlių užpildymą.

Select Fluorophores (fluoroforų pasirinkimo) langas

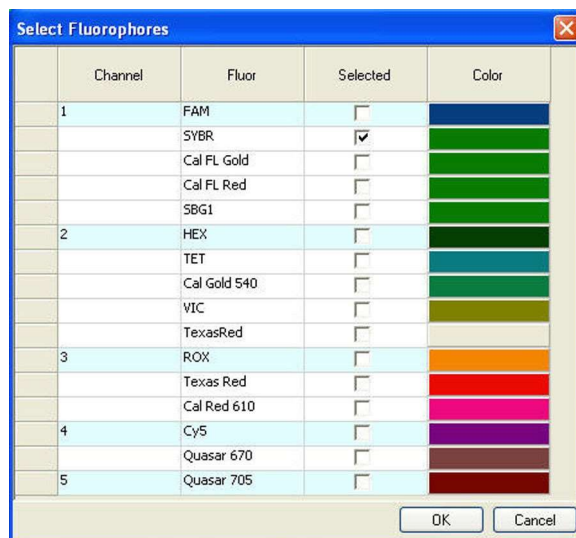
Select Fluorophores lange pateikiami fluoroforai, kuriuos galima pasirinkti ir įkelti į Plate Editor langą. Norėdami atidaryti Select Fluorophores langą, paspauskite dešinėje Plate Editor lango pusėje esantį mygtuką **Select Fluorophores**.

PASTABA. Fluoroforų sąrašas priklauso nuo nuskaitymo režimo; jei yra pasirinkta **SYBR/FAM only** parinktis, Select Fluorophores lange bus rodomi tik 1 kanalo fluoroforai.

PASTABA. Iš šio sąrašo fluoroforų negalima nei ištrinti, nei jų pridėti; turite sukalibruoti naują fluoroforą Calibration Wizard parinktyje (psl. 97). Po kalibravimo, fluoroforas bus matomas Select Fluorophore lange.

Pažymėdami šalia fluoroforo esantį žymimąjį laukelį pavadinimu **Selected**, prie sąrašo pridėsite arba iš jo pašalinsite fluoroforus.

Šiame pavyzdyje pavaizduotas pasirinktas SYBR fluoroforas (26 iliustracija).



26 iliustracija. Select Fluorophores langas.

- Paspauskite šalia fluoroforo esantį mygtuką **Color** ir pasirinkite naują spalvą kiekvienam fluoroforui.

PASTABA. Prieš tyrimo vykdymą, programinė įranga patikrins, ar plokštelėje nurodyti fluoroforai yra sukalibruoti pasirinktame instrumente. Jei plokštelėje bus instrumente nesukalibruotų fluoroforų, tyrimo vykdyti negalėsite.

Šulinėlių turinio parinktys

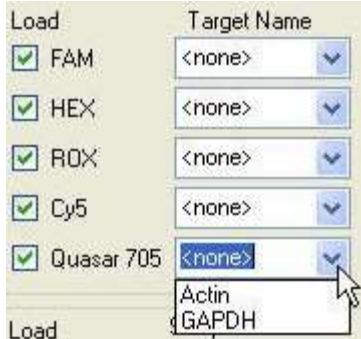
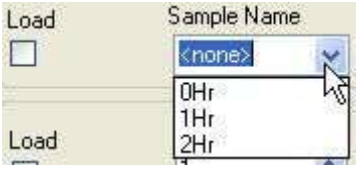
Plokštelės faile yra pateikta informacija apie kiekvieno šulinėlio turinį. Pasibaigus tyrimui, programinė įranga susieja šulinėlio turinį su fluorescencijos duomenimis ir pritaiko atitinkamą analizę Data Analysis lange. Pavyzdžiui, šulinėliams su standartiniais mėginių tipais yra generuojama standartinė kreivė.

Atkreipkite dėmesį į šias parinktis:

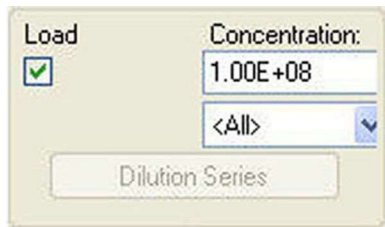
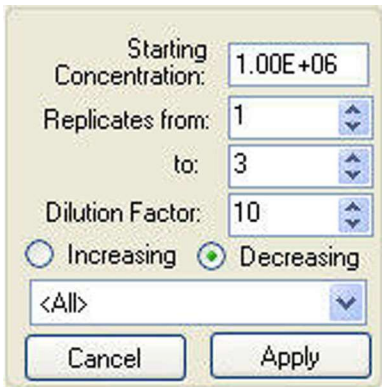
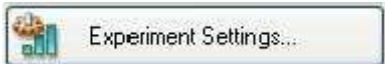
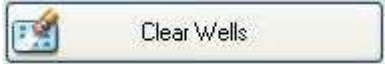
- Target Name.** Vienas ar daugiau taikinių (genų ar sekų) kiekviename šulinėlyje. Kiekvienas taikinytis yra siejamas su vienu fluoroforu.
- Sample Name.** Vienas identifikatorius ar sąlyga, atitinkanti mėginį šulinėliuose, pvz., 0 hr, 1 hr ar 2 hr.

Šulinėlį pasirinkite ant jo paspausdami kairiuoju pelės klavišu. Jei norite pasirinkti kelis šulinėlius, neatleiskite pelės klavišo ir tempkite kursorių per norimus šulinėlius. Dešinėje plokštelės vaizdo pusėje yra visos šulinėlių užpildymo reikalingos parinktys (14 lentelė).

14 lentelė. Plokštelės ir šulinėlių užpildymo parinktys Plate Editor lange.

Parinktis	Funkcija
	Po šulinėlių pasirinkimo, pirmiausia reikia pasirinkti mėginio tipą. Išskleidžiamajame Sample Type meniu pasirinkite mėginio tipą ir įkelkite į pasirinktus šulinėlius (Unknown (nežinomas), Standard (standartinis), NTC (be šablono kontrolės), Positive Control (teigiama kontrolė), Negative Control (neigiama kontrolė) ar NRT (be atvirkštinės transkriptazės)).
	Pažymėkite Load laukelius ir į pasirinktus šulinėlius pridėkite fluoroforą; fluoroforas atitinka taikinio pavadinimą. Į sąrašą fluoroforą įkelkite jį pasirinkdami Select Fluorophores lange. Norint atskirti skirtingus sudėtinius taikinius vieną nuo kito, išskleidžiamajame meniu Target Name pasirinkite pavadinimą ir paspauskite mygtuką Enter. taikinio pavadinimas bus priskirtas šulinėliui. Jei į išskleidžiamąjį meniu norite pridėti naują taikinio pavadinimą plokštei, meniu laukelyje įrašykite pavadinimą ir paspauskite mygtuką Enter. Jei norite ištrinti taikinio pavadinimą, jį pasirinkite, paspauskite mygtuką Delete, tuomet - Enter.
	Genų ekspresijos analizei ar mėginio atskyrimui sudėtiniuose mėginiuose, išskleidžiamajame meniu pasirinkite Sample Name ir įkelkite mėginio pavadinimą pasirinktuose šulinėliuose. Jei norite pridėti naują mėginio pavadinimą į išskleidžiamąjį meniu, meniu laukelyje įrašykite naują pavadinimą ir paspauskite Enter. Jei norite ištrinti mėginio pavadinimą, pasirinkite jį meniu, klaviatūroje paspauskite klavišą Delete, tuomet - Enter.
	Pakartojimų skaičiaus įrašymui, pasirinktų šulinėlių turinys turi būti identiškas. Jei taip nėra, programinė įranga ne leis naudoti šios funkcijos. Pažymėkite žymimąjį laukelį Load ir pasirinkite pakartojimų skaičių pasirinktiems šulinėliams.
	Replicate Series polangyje pakartojimų serijas galite nustatyti pasirinktai šulinėlių grupei. Laukelyje Replicate Group Size pasirinkite kiekvienos grupės mėginių (šulinėlių) skaičių. Pakartojimų pridėjimui, spauskite Starting Replicate #. Pakartojimų grupes galite įkelti naudojantis skaičiais, didėjančiais iš kairės į dešinę (Horizontal) arba iš viršaus į apačią (Vertical).

14 lentelė. Plokštelės ir šulinėlių užpildymo parinktys Plate Editor lange.

Parinktis	Funkcija
	Koncentraciją pasirinktiems šulinėliams su standartinio mėginio tipu įrašykite redaguojant ar įrašant skaitmenis Concentration laukelyje. Jei norite koncentraciją įrašyti vienam fluoroforui šulinėlyje, išskleidžiamajame meniu (<All>) pasirinkite vieną fluoroforą. Jei norite ištrinti koncentraciją, ją pasirinkite, klaviatūroje paspauskite klavišą Back Space, tuomet - Enter. Dilution Series aktyvuosis tuomet, jei pasirinksite kelis šulinėlius su standartinio tipo mėginiais.
	Paspauskite mygtuką Dilution Series ir įrašykite skiedimo seriją standartinių mėginių koncentracijai ir standartinės kreivės įkėlimui. Skiedimo serijos pradinę koncentraciją įrašykite laukelyje Starting Concentration, užpildykite laukelius Replicates from (pakartojimas nuo) ir to (pakartojimas iki) ir laukelyje Dilution Factor įrašykite skiedimo faktorių (kintamoji koncentracija kiekvienoje pakartojimo grupėje). Pasirinkite Increasing didėjančio skiedimo serijai arba Decreasing, mažėjančio skiedimo serijai. Galiausiai, išskleidžiamajame meniu pasirinkite skiedimo serijoje naudojamą fluoroforą ir paspauskite Apply.
	Šis polangis bus rodomas, jei pasirinksite Tools > Show Well Notes. Pasirinkite vieną ar daugiau šulinėlių ir išskleidžiamajame meniu įrašykite pastabas apie šulinėlį ar šulinėlius. Visos įrašytos pastabos bus rodomos Quantitation Data sąsajos skaičiuoklėje (psl. 66).
	Šis polangis bus rodomas, jei pasirinksite Tools > Show Collection Name. Pasirinkite vieną ar daugiau šulinėlių ir išskleidžiamajame meniu įrašykite informaciją apie mėginio paėmimą. Ši informacija bus rodoma Gene Expression Analysis lange ir įgalins mėginių grupavimo parinktis.
	Paspaudus mygtuką Experiment Settings, atsidarys Experiment Settings langas, kuriame galėsite tvarkyti taikinių ir mėginių sąrašus bei atlikti genų ekspresijos tyrimo sąranką.
	Jei norite ištrinti pakartojimų skaičių pasirinktuose šulinėliuose, paspauskite mygtuką Clear Replicate #.
	Jei norite visam laikui ištrinti pasirinktų šulinėlių turinio informaciją, paspauskite mygtuką Clear Wells.

Experiment Settings (tyrimo nustatymų) langas

Norėdami atidaryti Experiment Settings langą, atlikite vieną šių veiksmų:

- Plate Editor lange paspauskite mygtuką **Experiment Settings**.
- Jei analizuojate duomenis Data Analysis lange, paspauskite Gene Expression sąrašą mygtuką **Experiment Settings**.

Experiment Settings lange peržiūrėkite ar keiskite Targets and Samples (27 iliustracija) sąrašą ar nustatykite genų ekspresijos analizės mėginių grupę, jei prie šulinėlių buvo pridėta **Collection Names** parinktis.

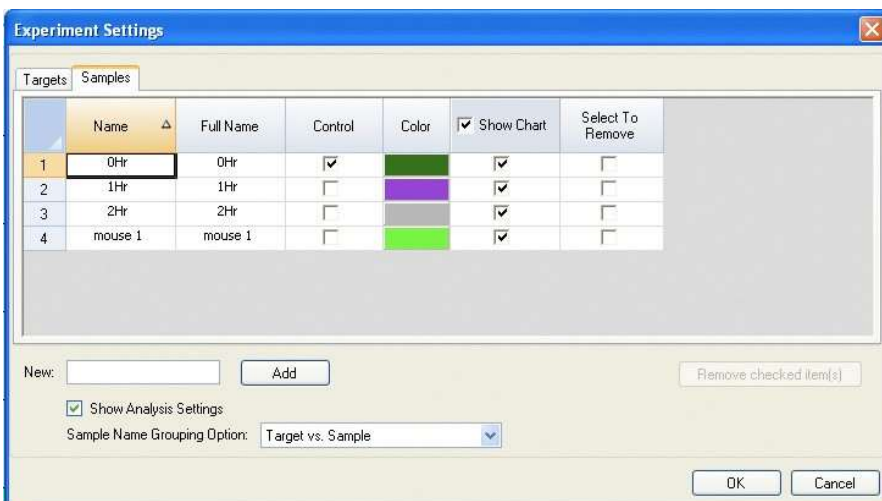
- **Targets.** Kiekvienos PGR taikinių sąrašas (genai ar sekos). Pažymėdami stulpelio Reference laukelius, priskirsite referentinius tyrimo genus.
- **Samples.** Mėginių sąrašas (valandos ar specifinis (mouse1)). Pažymėdami stulpelio Control laukelius, priskirsite kontrolinę tyrimo sąlygą.

27 iliustracijoje pavaizduota Targets sąselė su tyrimo nustatymais.



27 iliustracija. Experiment Settings lango sąselė Targets.

28 iliustracijoje pavaizduota Sample sąselė su tyrimo nustatymais.



28 iliustracija. Experiment Settings lango sąselė Samples.

Naudodami šias funkcijas, galite koreguoti sąrašus:

- Laukelyje **New** įrašykite taikinio ar mėginio pavadinimą ir paspauskite **Add**.
- Taikinį ar mėginį iš sąrašo pašalinti galite pažymėję norimos eilutės laukelį **Select to Remove**, po to - mygtuką **Remove checked item(s)**.
- Jei taikinį norite pasirinkti kaip referentinį genų ekspresijos duomenų analizei, pažymėkite jo eilutės stulpelio **Reference** laukelį.
- Jei taikinį norite pasirinkti kaip kontrolės mėginį genų ekspresijos duomenų analizei, pažymėkite jo eilutės stulpelio **Control** laukelį.

Jei norite peržiūrėti tyrimo parametrus Gene Expression sąsleje, pažymėkite laukelį Experiment Settings lango laukelį **Show Analysis Settings**.

Taikinio parametrų nustatymas:

- Paspaudę stulpelio **Color** langelį, galite pakeisti Gene Expression diagramos taikinių spalvą.
- Įrašykite taikinio veiksmingumą. Programinė įranga apskaičiuos santykinį taikinio veiksmingumą, naudojant **Auto Efficiency** funkciją, jei į taikinio duomenis yra įtraukta standartinė kreivė. Arba įrašykite anksčiau nustatytą veiksmingumą.

Mėginio nustatymai Samples sąsleje:

- Paspaudę stulpelio **Color** spalvą, galite pakeisti Gene Expression diagramos mėginių spalvą.
- Pažymėjus stulpelio **Show Graph** laukelį, mėginys bus rodomas Gene Expression diagramoje tokia spalva, kokią pasirinkote **Color** stulpelyje.

Mėginių grupavimo parinktis

Įrašius pavadinimus šulinėliams, naudojant **Collection Names** funkciją, mėginiai gali būti tiriami viena keturių konfigūracijų, pateikiamų Sample Name Grouping parinktyje. Šias parinktis rasite Experiment Settings sąsleės išskleidžiamajame meniu.

- Target vs. Sample
- Target vs. Collection
- Target vs. Sample_Collection
- Target vs. Collection_Sample

Well Groups Manager (šulinėlių grupavimo) langas

Šulinėlių grupavimas susikirsto plokštelę į šulinėlių pogrupius, kurie Data Analysis lange gali būti analizuojami nepriklausomai vienas nuo kito. Nustačius šulinėlius grupes, Data Analysis lange galite pasirinkti vieną grupę, kurios duomenys bus analizuojami atskirai. Pavyzdžiui, pasirinkite šulinėlių grupes, kurios bus analizuojamos keliuose tyrimo vykdymuose vienoje plokštelėje arba kiekviena šulinėlių grupė bus analizuojama taikant skirtingas standartines kreives.

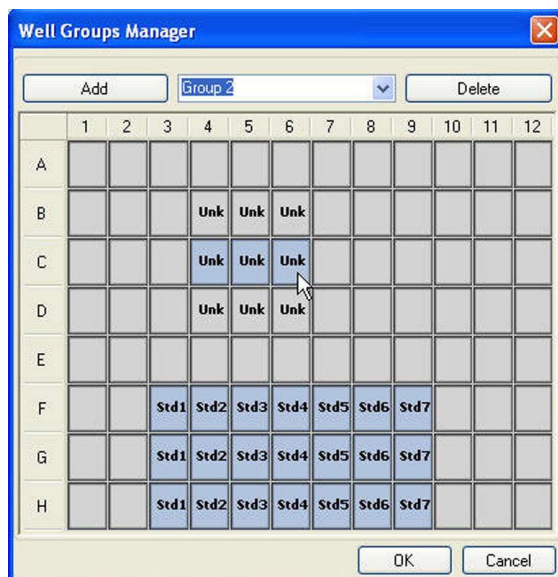
PASTABA. Numatytoji šulinėlių grupavimo parinktis yra **All Wells**.

Šulinėlių grupių nustatymas

Norėdami Well Groups Manager lange sukurti šulinėlių grupes, atlikite šiuos veiksmus:

1. Plate Editor lango įrankių juostoje paspauskite mygtuką **Well Groups**.
2. Jei norite sukurti naują grupę, spauskite **Add**. Išskleidžiamajame meniu pirmosios grupės pavadinimas bus **Group 1**.

3. Grupę kurkite pasirinkdami ir tempdami šulinėlius. Pasirinkti šulinėliai bus rodomi mėlyna spalva (29 iliustracija).
4. (Pasirinktinai) pakeiskite grupės pavadinimą: išskleidžiamajame meniu paspauskite ant grupės pavadinimo ir įrašykite naują pavadinimą.
5. (Pasirinktinai) sukurkite daugiau grupių, atlikdami 1 ir 2 etapo veiksmus.
6. (Pasirinktinai) ištrinkite šulinėlių grupes: išskleidžiamajame meniu pasirinkite grupės pavadinimą ir paspauskite mygtuką **Delete**.
7. Paspaudę **OK**, užbaigsite veiksmą ir uždarysite langą. Paspaudę **Cancel**, langą uždarysite neišsaugoję pakeitimų.



29 iliustracija. Well Groups Manager lange pažymėti šulinėliai.

Plate Spreadsheet View (plokštelės skaičiuoklės peržiūros) langas

Plate Spreadsheet View lange pateikiama Plate Editor lango plokštelės sąranka. Plate Spreadsheet View langą (30 iliustracija) atidarykite Plate Editor meniu juostoje pasirinkdami **Tools > Show Spreadsheet View**.

Row	Column	Sample Type	Replicate #	*Target Name	*Sample Name	Quantity	Units
B	4	Unknown		Tubulin	0Hr	N/A	copy number
B	5	Unknown		Tubulin	1Hr	N/A	copy number
B	6	Unknown		Tubulin	2Hr	N/A	copy number
C	4	Unknown		Tubulin	0Hr	N/A	copy number
C	5	Unknown		Tubulin	1Hr	N/A	copy number
C	6	Unknown		Tubulin	2Hr	N/A	copy number
D	4	Unknown		Tubulin	0Hr	N/A	copy number
D	5	Unknown		Tubulin	1Hr	N/A	copy number
D	6	Unknown		Tubulin	2Hr	N/A	copy number
F	3	Standard	1			10000000.00	copy number
F	4	Standard	2			10000000.00	copy number
F	5	Standard	3			1000000.00	copy number
F	6	Standard	4			100000.00	copy number
F	7	Standard	5			10000.00	copy number
F	8	Standard	6			1000.00	copy number
F	9	Standard	7			100.00	copy number
G	3	Standard	1			100000000.00	copy number

30 iliustracija. Plate Spreadsheet View langas

Skaičiuoklėje galite importuoti ar eksportuoti šulinėlių informaciją į Excel ar alternatyvų formatą:

- Paspaudę **Import Template**, galėsite importuoti šulinėlių informaciją iš CSV failo.
- Paspaudę **Export Template**, galėsite eksportuoti šulinėlių informaciją į Excel failą (.csv formatas).

Rūšiuokite ar redaguokite stulpelių informaciją:

- Skaičiuoklės informaciją galite rūšiuoti pagal datą, paspaudę Date stulpelio antraštės trikampį.
- Stulpelio, kurio antraštėje yra žvaigždutė (*), informaciją redaguoti galite paspaudę ant norimo šulinėlio langelio.

PASTABA. Quantity stulpelyje pasirinkite standartinės kreivės duomenų vienetą - atidarykite Plate Editor langą ir meniu juostoje pasirinkite **Settings > Units**. Po ištyrimo, šių standartų duomenys Data Analysis lango Quantitation sąsėdės standartinės kreivės diagramoje bus rodomi pasirinktais vienetais. Skaičiuoklėje galite importuoti ar eksportuoti plokštelės informaciją į Excel ar alternatyvų formatą.

Dešiniuoju pelės klavišu skaičiuoklėje pasirinkite vieną šių parinkčių:

- **Copy**. Visos skaičiuoklės kopijavimas.
- **Copy as Image**. Skaičiuoklės kopijavimas kaip vaizdo failo.
- **Print**. Skaičiuoklės spausdinimas.
- **Print Selection**. Pasirinktų langelių spausdinimas.
- **Export to Excel**. Failo eksportavimas į Excel formato failą.
- **Export to Text**. Failo eksportavimas į tekstinį failą.
- **Find**. Teksto paieška skaičiuoklėje.
- **Sort**. Skaičiuoklės informacijos rūšiavimas, pasirenkant iki trijų duomenų stulpelių Sort lange.

6 Darbas autonominiu režimu

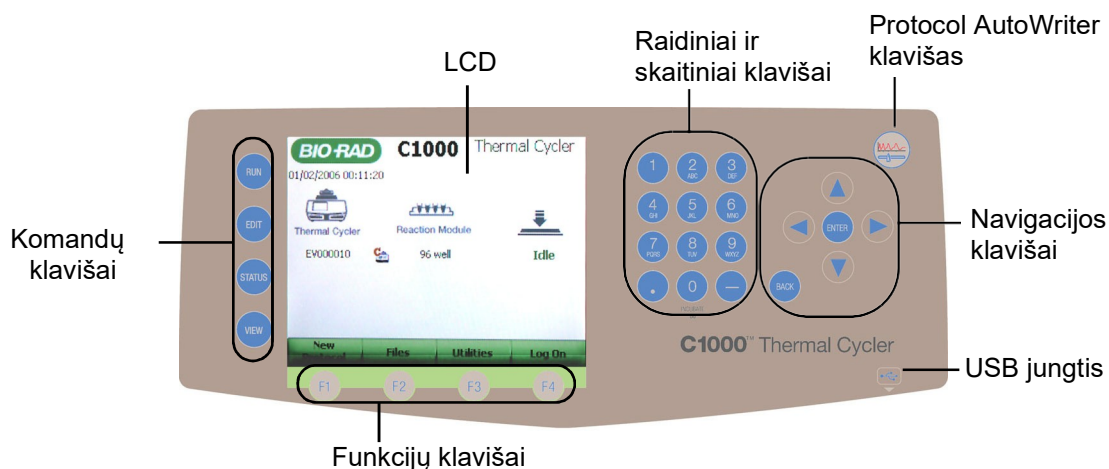
Šiame skyriuje pateikta informacija apie CFX96™ tikro laiko PGR aptikimo sistemos naudojamą autonominiu (angl. stand-alone) režimu.

- C1000™ termocikleris (psl.43)
- Naujo tyrimo kūrimas (psl. 45)
- Duomenų eksportavimas analizei (psl. 49)
- Duomenų failo kūrimas (psl. 51)

C1000™ termocikleris

CFX96 sistemoje tikro laiko PGR tyrimus galima vykdyti ir be kompiuterio. Tyrimo metu gautus fluorescencijos duomenis gali eksportuoti į USB atmintuką. Taip pat duomenis galite tiesiogiai parsisiųsti e. paštu, jei C1000 termocikleris yra prijungtas prie interneto ir jame yra sukonfigūruota elektroninio pašto funkcija (žr. C1000 termociklerio naudotojo vadovą). Duomenų analizės atlikimui yra reikalinga CFX™ Manager programinė įranga.

Naudodamiesi C1000™ termociklerio valdymo skydeliu, galite valdyti visas tyrimo vykdymui būtinas funkcijas. 31 iliustracijoje pavaizduotas valdymo skydelis:



31 iliustracija. C1000 termociklerio valdymo skydelis.

Valdymo skydelyje yra penkios klavišų grupės, kurių funkcijos aprašytos 15 lentelėje.
15 lentelė. Valdymo skydelio klavišų funkcijos.

Klavišas	Funkcija
KOMANDŲ KLAVIŠAI	
RUN	Protokolo pasirinkimas ir vykdymas.
EDIT	Protokolo pasirinkimas ir keitimas.
STATUS	Vieno ar kelių vykdomų protokolų būsenos peržiūra.
VIEW	Grafinio protokolo vaizdo keitimas į tekstinį ir atvirkščiai.
FUNKCIJŲ KLAVIŠAI	
F1, F2, F3 ar F4	Kiekviename lange funkcijų klavišų pavadinimai ir funkcijos yra skirtingi.
RAIDINIAI IR SKAITINIAI KLAVIŠAI	
1-9	Skaičių ar raidžių įrašymas. Klavišą spauskite kelis kartus tol, kol bus rodoma norima raidė.
0, INCUBATE	Nulio įrašymas so arba inkubacijos paleidimas.
taškas (.)	Dešimtainio skaičiaus įrašymui.
minuso ženklas (-)	Minusinio skaičiaus įrašymui.
Protocol AutoWriter	
Protocol AutoWriter klavišas	Protocol AutoWriter įjungimas.
NAVIGACIJOS KLAVIŠAI	
DEŠINIOJI rodyklė	Kursoriaus paslinkimas į dešinę.
KAIRIOJI rodyklė	Kursoriaus paslinkimas į kairę.
AUKŠTYN rodyklė	Kursoriaus paslinkimas aukštyn.
ŽEMYN rodyklė	Kursoriaus paslinkimas žemyn.
ENTER	Pasirinkimo patvirtinimas.
BACK	Atšaukimo funkcija. Raidės, skaičiaus ar žodžio ištrynimasis.

Main Menu (pagrindinio meniu) langas

Po CFX96 sistemos įjungimo, funkcijų patikrinimui yra vykdomas savaiminės patikros testas. Po to ekrane yra rodomas pagrindinis meniu. Pagrindiniame meniu yra prieiga prie visų sistemos operacijų, rodoma data ir laikas, prisiregistravusio naudotojo paskyros pavadinimas, sistemos būsena, reakcijos modulio tipas ir termociklerio pavadinimas bei prijungti S1000™ termocikleriai.

PASTABA. C1000 termocikleriuose yra saugoma iki 20 paskutinių tikro laiko PGR tyrimų. Pasiekus 20 ribą, senieji tyrimų duomenys yra ištrinami ir vietoje jų yra įrašoma naujų tyrimų informacija.



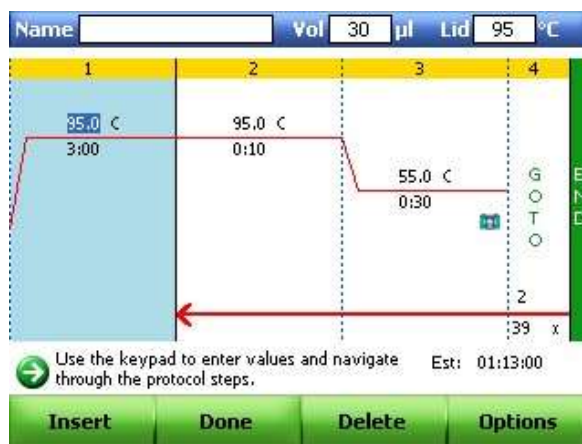
32 iliustracija. Pradžios ekrano vaizdas.

Atitinkamais pagrindinio meniu mygtukais (nuo F1 iki F4) galite pasirinkti norimas funkcijas:

- **Log In (F1).** Prisiregistravimas C1000 termociklerio sistemoje. Paspaudus šį mygtuką, jo pavadinimas pasikeis į Log Off.
- **Files (F2).** Failų ir aplankų peržiūra failų bibliotekoje.
- **Utilities (F3).** Utilities meniu atidarymas.
- **New Protocol (F4).** Naujo protokolo kūrimas.

Naujo tyrimo kūrimas

1. Norėdami pradėti, pradžios ekrane pasirinkite **New Protocol (F4)** (33 iliustracija).



33 iliustracija. Numatytasis tikro laiko PGR protokolas.

2. Jei norite pakeisti tikslinę temperatūrą ir temperatūros užlaikymo nustatymą, parametrus (temperatūros ar laiko) pasirinkite naudodamiesi rodyklių klavišais. Jei norite pažymėtą parametą keisti įrašydami reikšmę, naudokitės skaitiniais ir raidiniais klavišais.
PATARIMAS. Lengvesnei navigacijai ekrane, prie C1000 galite prijungti pelę (į USB jungtį).
3. (Pasirinktinai) Jei norite įtraukti naują etapą, spauskite **Insert (F1)** klavišą. Jei norite ištrinti etapą, spauskite klavišą **Delete (F3)** (33 iliustracija).

- (Pasirinktinai) Jei norite keisti etapo parinktį, spauskite **Options** (F4) klavišą (33 iliustracija). **Step Options** lange pasirinkite keičiamą parametą, įskaitant etapo temperatūrą ir laiką, arba pridėkite ar pašalinkite plokštelės nuskaitymą (34 iliustracija).

Step Options

Step 1

☒ Plate Read

Temperature: 60.0 °C

Gradient Range: 16.0 °C

Increment: °C/cycle

Ramp Rate: °C/sec

Time: 0:30 sec/cycle

Extend: sec/cycle

☐ Beep

Gradient			
A	76.0	I	67.1
B	75.7	J	65.5
C	75.2	K	64.1
D	74.5	L	62.8
E	73.4	M	61.7
F	72.2	N	60.9
G	70.6	O	60.3
H	69.0	P	60.0

OK Cancel Show 96 Gradient

34 iliustracija. Step Options langas.

PASTABA. Skaitiniais ir raidiniais klavišais galite įrašyti gradiento diapazoną nuo 1 iki 24°C.

- Priklausomai nuo **GOTO** etapo nustatymų, termocikleris kartoja etapų ciklus (PGR tyrimo ciklus). Rodykliniais klavišais pasirinkite **GOTO** etapą, redaguokite etapus ar keiskite pakartojimų skaičių.
- (Pasirinktinai) Jei norite keisti numatytąjį mėginio tūrį, pasirinkite mėginio tūrio laukelį (**Vol**) (33 iliustracija, psl. 45). Naują mėginio tūrį (mikrolitrais) įrašykite naudodami skaitinius ir raidinius klavišus. Pagal įrašytą mėginio tūrį yra nustatomas tyrimo temperatūros kontrolės režimas.
- (Pasirinktinai) Jei norite keisti numatytąją dangčio temperatūrą, rodykliniais klavišais pasirinkite dangčio temperatūros (**Lid**) laukelį (33 iliustracija, psl. 45). Naują temperatūros reikšmę įrašykite naudodami skaitinius ir raidinius klavišus. CFX96 sistemai naudojama dangčio temperatūra yra 105°C.
PASTABA. Dangčio kaitinimas užkerta kelią kondensato kaupimuisi reakcijų mėgintuvėliuose.
- Naują protokolą galite išsaugoti nauju pavadinimu. Rodykliniais klavišais pasirinkite **Name** laukelį, tuomet skaitiniais ir raidiniais klavišais įrašykite naujo protokolo pavadinimą.
- Norėdami patvirtinti, spauskite **ENTER**.

Protokolo vykdymas

- Protocol lange paspauskite mygtuką **Done** (F2) (33 iliustracija, psl. 45).
PATARIMAS. Arba galite paspausti komandos klavišą **RUN**, neišsaugant ar neredaguojant protokolo pavadinimo.

2. Protocol lange įrašykite protokolo pavadinimą, jei to dar nepadarytė, arba redaguokite anksčiau sukurtą pavadinimą. Rodykliniais klavišais pasirinkite paskirties aplanką (35 iliustracija).



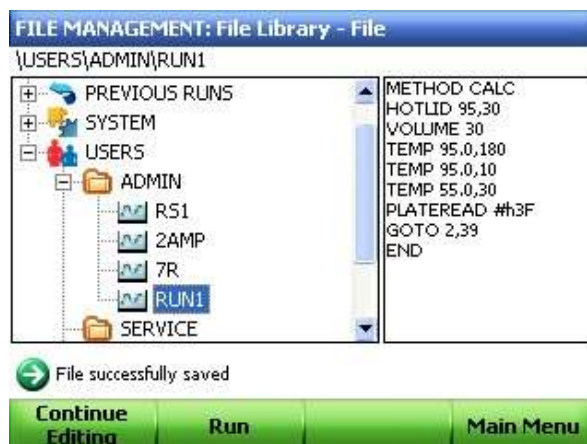
35 iliustracija. Protokolo išsaugojimas.

3. Paspauskite **Edit Filename** (F1). Laukelyje įrašykite naują pavadinimą ir paspauskite **Save** (F2) (36 iliustracija).



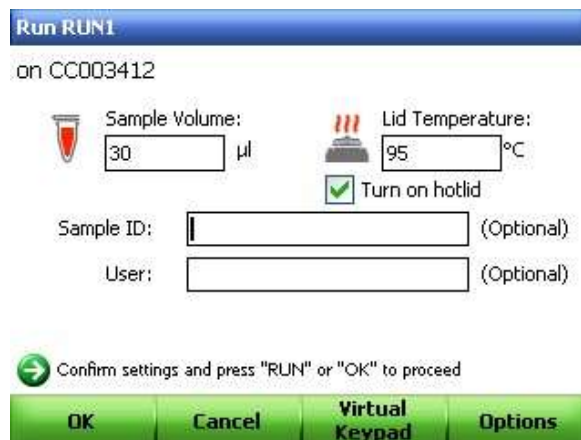
36 iliustracija. Protokolo pavadinimo įrašymas.

4. Protokolo vykdymą pradėkite paspausdami klavišą **Run** (F2) (37 iliustracija).



37 iliustracija. Protokolas sėkmingai išsaugotas.

5. Redaguokite mėginio tūrį (**Sample Volume**) ir dangčio temperatūrą (**Lid Temperature**). Taip pat galima įrašyti mėginio ID (**Sample ID**) ar naudotojo pavadinimą (**User**) (38 iliustracija). Norėdami tęsti, spauskite **OK** (F1).



Run RUN1

on CC003412

Sample Volume: 30 µl

Lid Temperature: 95 °C

☒ Turn on hotlid

Sample ID: (Optional)

User: (Optional)

Confirm settings and press "RUN" or "OK" to proceed

OK Cancel Virtual Keypad Options

38 iliustracija. Mėginio tūrio ir dangčio temperatūros redagavimas.

6. Fluorescencijos duomenų surinkimui tyrimo metu, pasirinkite **Scan Mode** (39 iliustracija).



Running real time protocol

Scan Mode:

☐ All Channels

☒ SYBR / FAM only

☐ FRET

Data File Name (.zpcr)

20080730_111150_CC003412_RTRUN

Select real time run mode

OK Cancel Edit Name

39 iliustracija. Nuskaitymo režimas ir duomenų failo pavadinimas.

Kalibruoti fluoroforai yra aptinkami šiuose kanaluose:

- **All Channels.** Duomenys surenkami nuo 1 iki 5 CFX96 sistemos kanaluose.
- **SYBR/FAM only.** Duomenys surenkami tik 1 kanale, greitas nuskaitymas.
- **FRET.** Duomenys surenkami tik FRET kanale, greitas nuskaitymas.

7. Prieš tyrimo vykdymą yra sukuriamas numatytasis atskiro failo pavadinimas. Rodykliniais klavišais pasirinkite **Data File Name** laukelį, tuomet skaitiniais ir raidiniais klavišais įrašykite naujo duomenų failo (.zpcr) pavadinimą.

8. Norėdami vykdyti protokolą, paspauskite klavišą **OK** (F1).

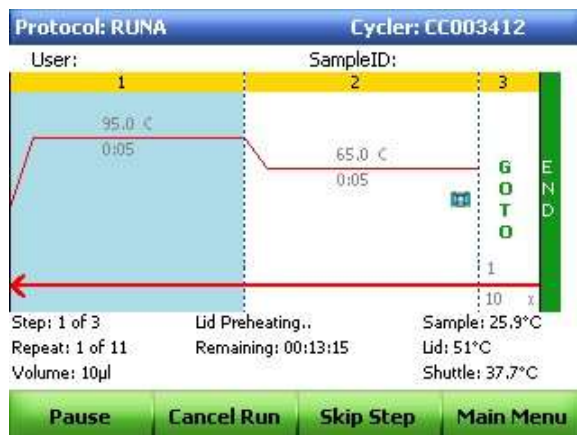
Anksčiau išsaugoto protokolo vykdymas

- Jei norite redaguoti egzistuojantį protokolą, paspauskite klavišą **EDIT**; atsidariusioje failų bibliotekoje pasirinkite protokolą, kurį norite redaguoti.
- Norėdami vykdyti egzistuojantį protokolą, paspauskite komandos klavišą **RUN** ir pasirinkite failų bibliotekoje anksčiau išsaugotą protokolą.

Tyrimo stebėjimas

Tyrimo metu ekrane bus rodomas tyrimo vykdymo būsenos langas. Šiame lange galite peržvelgti informaciją ir stebėti tyrimo eigą.

- **Status.** Paspaudę komandos klavišą **STATUS**, galėsite matyti protokolo būseną, pristabdyti tyrimo vykdymą, atšaukti tyrimo vykdymą, praleisti etapą bei atidaryti pagrindinį meniu (40 iliustracija).
- **Time Status.** Paspaudę komandos klavišą **VIEW**, ekrane bus rodomas laikmatis, rodantis iki protokolo vykdymo pabaigos likusį laiką. Norėdami grįžti į būsenos langą, dar kartą paspauskite klavišą **VIEW**.



40 iliustracija. Tyrimo būsenos stebėjimas.

Duomenų eksportavimas analizei

Pasibaigus tyrimui, fluorescencijos duomenis reikia perkelti į kompiuterį, kuriame yra įdiegta CFX Manager programinė įranga. Atskiras duomenų failas yra automatiškai išsaugomas **SYSTEM** aplanko poaplankyje **RT_DATA** (41 iliustracija).



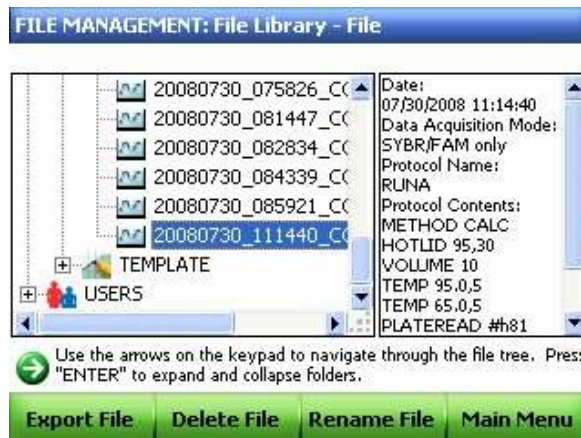
41 iliustracija. Tikro laiko PGR tyrimai išsaugomi RT_DATA aplanke.

Jei į C1000 termociklerio USB jungtį yra įkištas USB atmintukas, duomenys (.zpcr) bus automatiškai išsaugomi pagrindiniame USB atmintuko kataloge.

Jei pasibaigus tyrimui USB atmintukas nėra įkištas į USB jungtį, atlikite šiuos veiksmus:

1. Norėdami atidaryti bylų aplankus, paspauskite mygtuką **Files** (F2).

2. RT_DATA aplanke raskite norimą failą. Failą atidarysite paspaudę dešinės rodyklės klavišą.
3. Failą pasirinkite naudodamiesi rodykliniais klavišais aukštyn/žemyn.
4. Į USB atmintuką tyrimo duomenų failą (.zpcr) eksportuokite paspausdami mygtuką **Export File (F1)** (42 iliustracija).



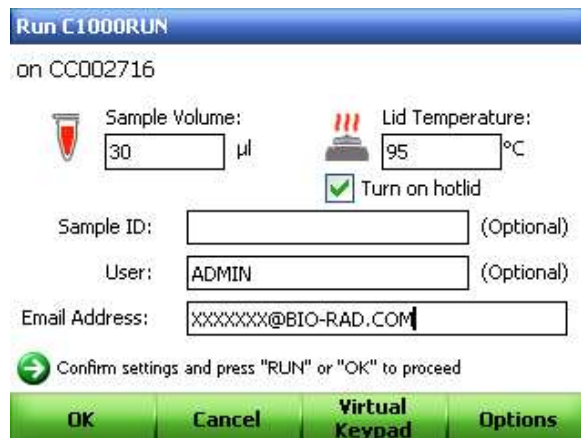
42 iliustracija. Atskiros tyrimo duomenų failo eksportavimas į USB atmintuką.

5. Eksportavimo veiksmo patvirtinimui spauskite mygtuką **Yes (F1)**.

Duomenis iš C1000 termociklerio galite tiesiogiai siųsti elektroniniu paštu, jei yra sukonfigūruoti elektroninio pašto nustatymai (žr. C1000 termociklerio naudotojo vadovą).

Jei norite išsiųsti elektroninį laišką su prikabintais duomenimis (.zpcr), atlikite šiuos veiksmus:

1. Informaciniame Run lange (38 iliustracija, psl. 48) paspauskite mygtuką **Options (F4)**.
2. Naudodamiesi rodykliniais klavišais, pasirinkite parinktį **Send email notification**.
3. Paspaudę **OK (F1)**, grįžite į tyrimo vykdymo informacijos langą.
4. Rodykliniais klavišais pasirinkite **Email Address** laukelį ir skaitiniais ir raidiniais klavišais įrašykite elektroninio pašto adresą.
5. Norėdami tęsti, spauskite **OK (F1)**.

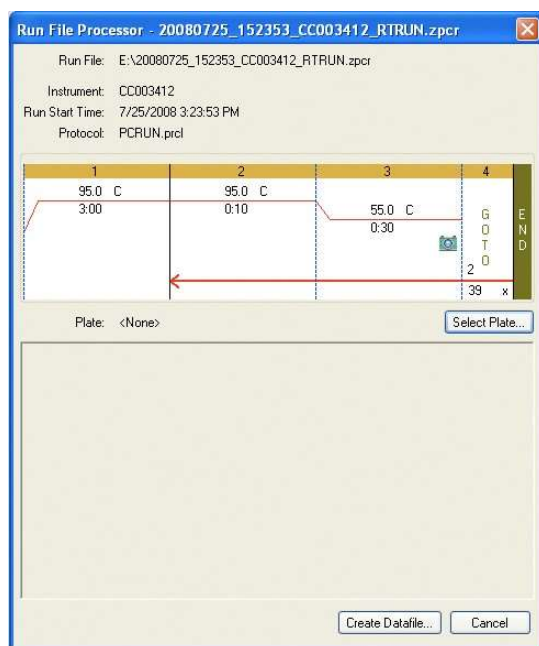


43 iliustracija. Eksportavimo į USB atmintuką patvirtinimas.

Duomenų failo kūrimas

Atskirus tyrimo duomenis (.zpcr) reikia konvertuoti į duomenų failą (.pcrd), kad CFX Manager programinė įranga galėtų juos analizuoti. Tyrimo duomenų failo kūrimas:

1. USB atmintuko kataloge pasirinkite .zpcr failą ir nutempkite jį į pagrindinį programinės įrangos langą arba pagrindinio programinės įrangos lango meniu pasirinkite **Select File > Open > Stand-alone Run** ir failo pavadinimą.
2. **Run File Processor** lange paspauskite mygtuką **Select Plate**. Bus importuotas plokštelės failo pavadinimas, pagal kurį programinė įranga sukurs duomenų failą (44 iliustracija).



44 iliustracija. Plokštelės failo priskyrimas.

PASTABA. CFX Manager programinė įranga tikrina plokštelės failo nuskaitymo režimą ir plokštelės dydį; šie parametrai turi sutapti su tyrimo nustatymais. Jei norite gauti visų šulinėlių duomenis, įkelkite Quick Plate failą.

7 Duomenų analizės apžvalga

Šiame skyriuje pateikta duomenų analizės informacija:

- Data Analysis (duomenų analizės) langas (psl. 53)
- Quantitation (kiekybinio įvertinimo) sąsėja (psl. 56)
- Duomenų analizės nustatymai (psl. 57)
- Šulinėlių selektoriai (psl. 59)
- Diagramos (psl. 61)
- Skaičiuoklės (psl. 61)

Data Analysis (duomenų analizės) langas

Duomenų analizės metu, duomenų rodymo būdo keitimas keičiant šulinėlių turinį Plate Editor parinktyje, nekeičia kiekvieno šulinėlio fluorescencijos duomenų, surinktų tyrimo vykdymo metu. Modulio surinktų fluorescencijos duomenų ištrinti negalima, tačiau pasirinktus duomenis galima pašalinti iš peržiūros ir analizės.

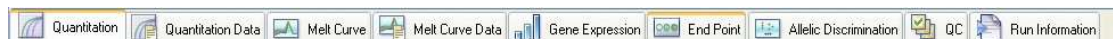
Jei po tyrimo vykdymo norite pakeisti šulinėlių turinį, atsidarykite Plate Editor langą, paspausdami Data Analysis lango viršuje esantį mygtuką **Edit/View Plate**.

PATARIMAS. Pridėti šulinėlių informaciją ar ją keisti galima prieš, per ir po tikro laiko PGR tyrimo vykdymo. Prieš tyrimo vykdymą reikia priskirti nuskaitymo režimą ir plokštelės dydį. Po tyrimo vykdymo šių parametrų nebegalima keisti.

Kiekvieno tyrimo pabaigoje CFX Manager™ programinė įranga automatiškai apdoroja tikro laiko PGR duomenis ir atidaro Data Analysis langą su duomenimis. Norėdami atidaryti egzistuojančius duomenų failus Data Analysis lange, atlikite vieną šių veiksmų:

- Kursoriumi duomenų failą (pcrd. plėtinys) nutempkite į pagrindinį programinės įrangos langą.
- Pagrindiniame programinės įrangos lange pasirinkite **File > Open > Data File** ir Windows naršyklėje pasirinkite failą.
- Pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juostoje paspauskite mygtuką **Data Analysis** ir Windows naršyklėje pasirinkite failą.
- Pasirinkite **File > Recent Data Files** ir failą pasirinkite iš paskutiniųjų atidarytų duomenų failų.

Data Analysis lange gali būti rodoma iki devynių sąsėlių (ilustracija 45). Kiekvienoje sąsėlėje yra rodomi specifinio analizės metodo duomenys:



45 iliustracija. Data Analysis lange gali būti rodomos visos sąsėlės.

Programinė įranga tam tikrą sąsėlę Data Analysis lange rodo tik tuomet, kai tyrimo metu buvo surinkti to tipo analizės duomenys.

Data Analysis (duomenų analizės) lango įrankių juosta

Data Analysis lango įrankių juostoje yra pateikiama greita prieiga prie svarbių duomenų analizės funkcijų. 16 lentelėje pateikiamas įrankių juostos mygtukų funkcijų sąrašas.

16 lentelė. Data Analysis lango įrankių juosta

Įrankių juostos mygtukas	Pavadinimas	Funkcija
	Save	Pasirinkto duomenų failo išsaugojimas.
	Print	Pasirinkto lango spausdinimas.
	Trace Style	Kreivės stiliaus nustatymo lango atidarymas.
	Report	Duomenų failo ataskaitos atidarymas.
View/Edit Plate	View/Edit Plate	Plate Editor lango atidarymas šulinėlių turinio peržiūrai ir redagavimui.
Well Groups ...	Well Groups...	Išskleidžiamajame meniu pasirinkite šulinėlių grupės pavadinimą. Numatytasis pasirinkimas yra All Wells (visi šulinėliai).
	Help	Programinės įrangos parinktės Help atidarymas.

Data Analysis (duomenų analizės) lango meniu juosta

17 lentelėje aprašomos meniu juostos parinkčių funkcijos.

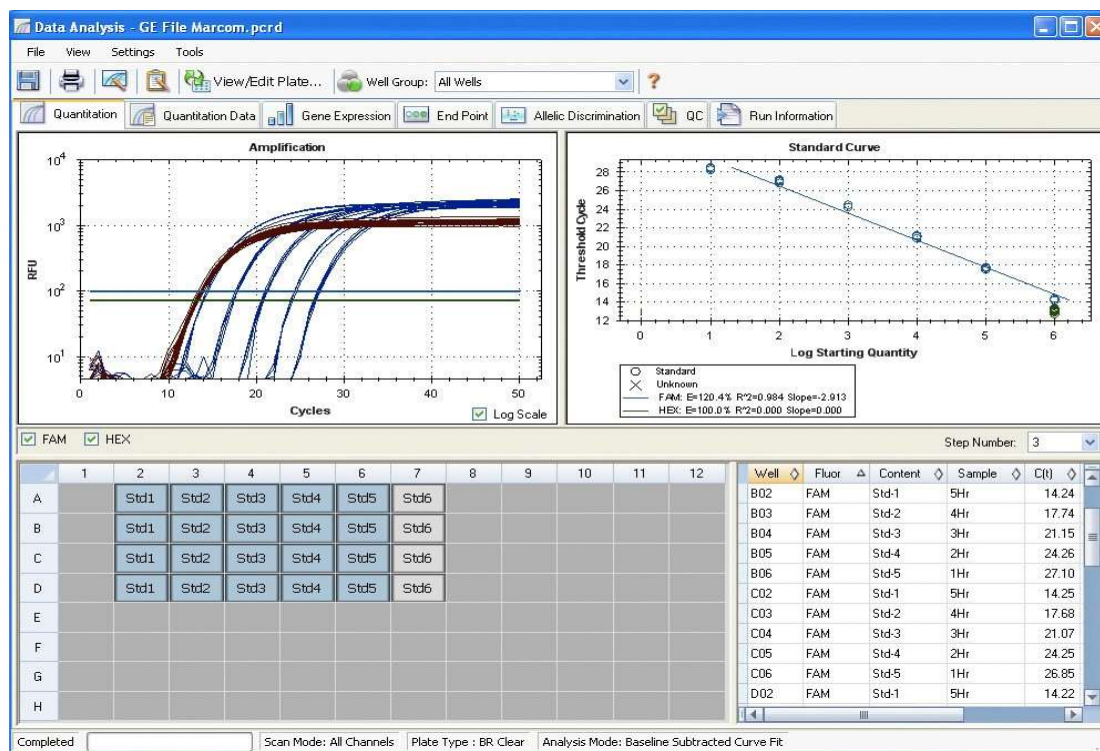
17 lentelė. Data Analysis lango meniu juostos parinktys

Meniu parinktis	Komanda	Funkcija
File	Save	Failo išsaugojimas.
	Save As	Failo išsaugojimas nauju pavadinimu.
	Repeat an Experiment	Tyrimo protokolo ir plokštelės failo atidarymas pakartotiniam tyrimo vykdymui.
	Exit	Data Analysis lango uždarymas.
View	Run Log	Run Log lango atidarymas duomenų failo žurnalo peržiūrai.
Settings	Analysis Mode	Bazinės linijos metodo priskyrimas pasirinktai šulinėlių grupei.
	C(t) Determination Mode	Regression ar Single-Threshold režimo C(t) verčių apskaičiavimui kiekvienai kreivei pasirinkimas.
	Baseline Thresholds	Baseline Thresholds lango atidarymas bazinės linijos ar slenkstinės vertės nustatymui.
	Trace Style	Trace Style lango atidarymas.
	View/Edit Plate	Plate Editor lango atidarymas plokštelės peržiūrai ir redagavimui.
	Mouse Highlighting	Ijungti arba išjungti duomenų žymėjimą pelės kursoriumi. PATARIMAS. Jei Mouse Highlighting funkcija yra išjungta, duomenis žymėti galite paspaudę klavišą Control.
	Display Threshold Values	Slenkstinės vertės linijos rodymas grafike.
Tools	Reports	Atidaryti šio duomenų failo ataskaitą.
	Import Fluorophore Calibration	Kalibracijos failo, kurį norite pritaikyti duomenų failui, pasirinkimas.
	Replace Plate	Esamo plokštelės failo pakeitimas duomenų analizėje.
	Export All Data Sheets to Excel	Visų ąselių skaičiuoklių vaizdo eksportavimas į atskirą Excel formato failą.
Help		Programinės įrangos parinktės Help atidarymas.

Quantitation (kiekybinio įvertinimo) ašelė

Kiekvienoje Data Analysis lango ašelėje yra pateikiami specifinio analizės metodo duomenų grafikai ir skaičiuoklės kartu su šulinėlio selektoriumi norimų duomenų peržiūrai. Data Analysis langas atsidaro su atverta Quantitation ašele (ilustracija 46). Šioje ašelėje esantis **Amplification** grafikas yra naudojamas atitinkamų analizės nustatymų pasirinkimui.

PASTABA. **Amplification** grafike rodoma kiekvieno šulinėlio santykinė fluorescencija (RFU) kiekviename cikle. Kiekviena grafiko kreivė atvaizduoja vieno fluoroforo duomenis viename šulinėlyje.

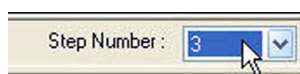


46 iliustracija. Data Analysis lango Quantitation ašelės išdėstymas.

PASTABA. Programinė įranga susieja kiekvienos duomenų analizės ašelės polangių duomenis. Pavyzdžiui, pelės kursoriai pažymėjus šulinėlį, duomenys kituose polanguose taip pat bus žymėti.

Etapo numerio selektorius

CFX96™ sistema priima fluorescencijos duomenis iš sudėtinių protokolų etapų. Programinė įranga išsaugo kiekvieno etapo metu gautus duomenis. Po Standard Curve (standartinės kreivės) grafiku yra rodomas **Step Number** (etapo numerio) selektorius, jei protokolą yra sudarytas iš daugiau nei vieno duomenų surinkimo etapo. Po etapo pasirinkimo, programinė įranga šį pasirinkimą pritaiko visiems duomenims, kurie yra rodomi Data Analysis lange. 47 iliustracijoje vaizduojamas pasirinktas 3 duomenų surinkimo etapo numeris.



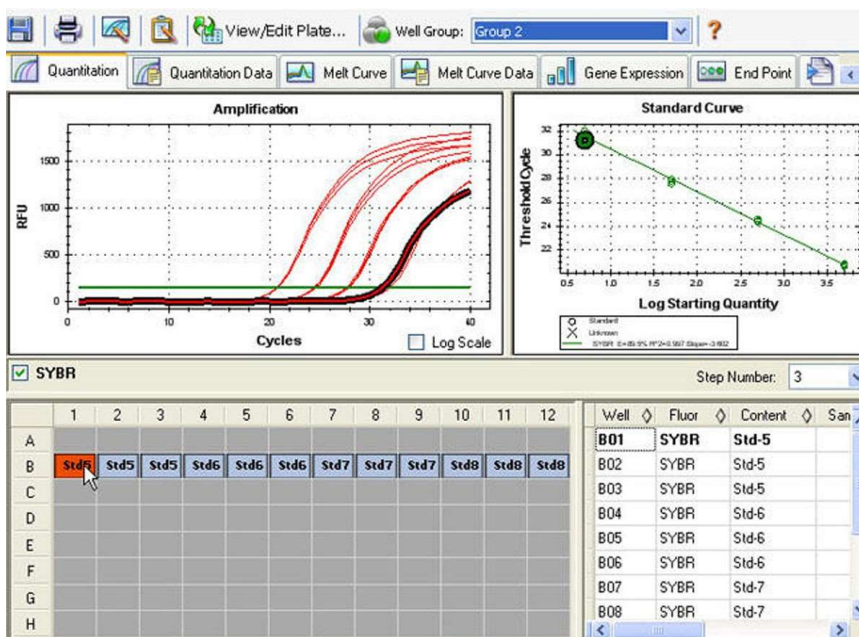
47 iliustracija. Etapo numerio pasirinkimas Data Analysis lange.

Šulinėlių grupių peržiūra Data Analysis lange

Kiekvienos plokštelės šulinėlius galima sugrupuoti į pogrupius nepriklausomai analizei. Sukūrus šulinėlių grupes Plate Editor lange **Well Groups Manager** (psl. 40), grupių pavadinimai Data Analysis lange bus rodomi įrankių juostos parinktyje Well Groups.

Pagal numatytąjį nustatymą, atidarius Data Analysis langą, yra įgalinta **All Wells** parinktis. Grafikuose ir skaičiuoklėse yra rodomi visų šulinėlių duomenys.

48 iliustracijoje vaizduojamas 2 šulinėlių grupės pasirinkimas Well Groups meniu. Šulinėlių selektoriuje yra rodomi tik šios grupės šulinėliai ir tik šie šulinėliai yra įtraukti į analizę.



48 iliustracija. Data Analysis lange pasirinkta 2 šulinėlių grupė.

Duomenų analizės nustatymai

Amplification grafike rodoma kiekvieno šulinėlio santykinė fluorescencija (RFU) kiekviename cikle. Kiekviena grafiko kreivė atvaizduoja vieno fluoroforo duomenis viename šulinėlyje. Šie duomenys yra naudojami C(t) verčių nustatymui kiekvienam šulinėliui pagal fluoroforą. Programinė įranga naudoja vieną iš dviejų C(t) vertės nustatymo būdų:

- **Regresija.** Šiame režime daugialypis, nelinijinis regresijos modelis yra taikomas individualioms šulinėlio kreivėms. Tuomet šis modelis yra naudojamas optimalios C(t) vertės apskaičiavimui.
- **Viena slenkstinė vertė.** Šiame režime C(t) apskaičiavimui yra naudojama viena slenkstinė vertė, remiantis slenkstinės vertės kirtimo tašku individualiose fluorescencijos kreivėse.

Slenkstinės vertės nustatymas

Vienos slenkstinės vertės režime, slenkstinė vertė fluoroforui nustatykite Amplification grafike spustelėdami slenkstinės vertės liniją ir pele slinkdami ją vertikaliai. Arba, nurodykite tikslų pasirinkto fluoroforo slenkstinės vertės kirtimo tašką. Atlikite šiuos veiksmus:

1. Meniu juostoje pasirinkite **Settings > Baseline Thresholds**. Atsidarys Baseline Thresholds langas.
2. Fluoroforo slenkstinės vertės kirtimo tašką nustatykite pažymėję parinktį **User Defined** (ilustracija 49) ir įrašę slenkstinę vertę.

Baseline Thresholds

Baseline Cycles

☐ Auto Calculated

☒ User Defined **Bold indicates a changed value.**

	Well	Fluor	Baseline Begin	Baseline End
1	A02	FAM	2	11
2	A03	FAM	2	15
3	A04	FAM	2	18
4	A05	FAM	2	22
5	A06	FAM	2	25
6	A07	FAM	2	26
7	A10	FAM	2	25
8	B02	FAM	2	11
9	B03	FAM	2	15
10	B04	FAM	2	18
11	B05	FAM	2	22
12	B06	FAM	2	25
13	B07	FAM	2	26

All Selected Rows: Begin: 2 End: 26

Crossing Threshold

☐ Auto Calculated: 1151.65

☒ User Defined: 1151.65

OK Cancel

49 iliustracija. Baseline Thresholds langas.

3. Paspauskite **OK**. Pakeitimai bus išsaugoti ir langas uždarys.

Bazinės linijos nustatymai

Kiekvieno šulinėlio bazinę liniją programinė įranga nustato automatiškai. Pasirinkus šulinėlius analizei, patikrinkite jų bazinės linijos nustatymus. Atidarykite Baseline Thresholds langą (ilustracija 49) ir pakeiskite numatytąją pasirinktų šulinėlių bazinę liniją. Atidarykite šį langą:

1. Meniu juostoje pasirinkite **Settings > Baseline Thresholds**. Atsidarys Baseline Thresholds langas.

Nustatykite kiekvieno šulinėlio bazinės linijos pradžios ir pabaigos taškus:

1. Baseline Cycles polangyje pasirinkite vieną ar daugiau šulinėlių paspaudžiant eilutės numerį, visus šulinėlius - paspaudžiant viršutinį kairįjį kampą, individualius šulinėlius - nuspaudus klavišą Control, ar kelis šulinėlius - eilutėje nuspaudus klavišą Shift.
2. Nustatykite **Baseline Begin** ciklą ir **Baseline End** ciklą pasirinktiems šulinėliams arba pakeiskite **Begin** ir **End** ciklo vertes skaičiuoklės apačioje (ilustracija 49).
3. Paspauskite **OK**. Pakeitimai bus išsaugoti ir langas uždarys.

Analysis Mode (analizės režimo) pasirinkimas

Pasirinkus analizės režimą, bus nustatytas visų fluorescencijos kreivių bazinės linijos substrakcijos metodas. Pasirinkite **Settings > Analysis Mode** ir pasirinkite vieną šių parinkčių:

- **„No Baseline Subtraction“ parinktis.** Programinė įranga duomenis rodys kaip santykinės fluorescencijos kreives. Kai kurios analizės nėra galimos šiame režime.
- **„Baseline Subtracted“ parinktis.** Programinė įranga duomenis rodys kaip bazinės linijos substrakcijos kreives kiekvienam šulinėlio fluoroforui. Programinė įranga atliks bazinės linijos substrakciją, nustatys slenkstinių verčių ciklus, standartines kreives bei nežinomų mėginių koncentraciją. Bazinės linijos substrakcijos kreivės generavimui programinė įranga pritaiko tinkamiausią liniją kiekvieno šulinėlio fluorescencijai, gautai bazinės linijos cikluose, tuomet pritaiko tinkamiausius kiekvieno ciklo duomenis.
- **„Baseline Subtracted Curve Fit“ parinktis.** Programinė įranga duomenis rodys kaip bazinės linijos substrakcijos kreives, bazinės linijos substrakcijos kreivę sušvelninama naudojant vidutinės vertės filtrą. Šio proceso metu kiekviena C(t) yra nekintama.

Well Selectors (šulinėlių selektoriai)

Šulinėlių selektoriuje pasirinkite šulinėlius, kurie bus ar nebus rodomi Data Analysis lango grafikuose ar skaičiuoklėse:

- Jei norite, kad nebūtų rodomas vienas šulinėlis, norimą šulinėlį pažymėkite ir spustelėkite. Jei norite, kad šis šulinėlis būtų rodomas, jį vėl pažymėkite ir spustelėkite.
- Jei norite, kad nebūtų rodomi keli šulinėliai, spustelėkite ir tempkite kursorių per norimus šulinėlius. Jei norite, kad šie šulinėliai būtų rodomi, vėl spustelėkite ir tempkite kursorių per šiuos šulinėlius.
- Jei norite, kad visi šulinėliai nebūtų rodomi, spustelėkite kairįjį viršutinį plokštelės kampą. Jei norite, kad visi šulinėliai būtų rodomi, vėl spustelėkite kairįjį viršutinį plokštelės kampą.
- Jei norite, kad nebūtų rodomi eilutės ar stulpelio šulinėliai, spustelėkite eilutės ar stulpelio pradžią. Jei norite, kad jie būtų rodomi, vėl spustelėkite eilutės ar stulpelio pradžią.

Šulinėlių selektoriuje galima pasirinkti tik šulinėlius su turiniu (įkelti Plate Editor parinktyje). Pasirinkti šulinėliai rodomi kita spalva. Kaip pavaizduota 50 iliustracijoje, šulinėlių selektoriuje pateikiami trys šulinėlių tipai:

- **Pasirinkti, įkelti šulinėliai (mėlyna spalva).** Šiuose šulinėliuose yra įkeltas **Unk** (nežinomas) mėginio tipas. Šių šulinėlių duomenys yra rodomi Data Analysis lange.
- **Nepasirinkti, įkelti šulinėliai (šviesiai pilka spalva).** Šiuose mėgintuvėliuose yra įkelti **Std** ir **Pos** mėginių tipai. Nepasirinktų šulinėlių duomenys nėra rodomi Data Analysis lange.
- **Tušti šulinėliai (tamsiai pilka spalva).** Šie šulinėliai nebuvo įkelti Plate Editor lange.

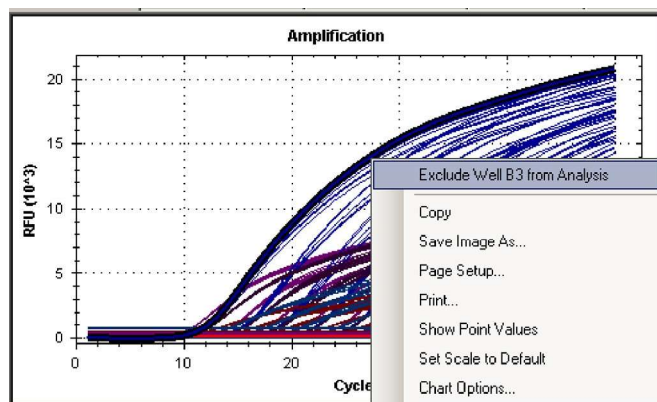
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
B		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
C		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
D		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
E		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					
F		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					
G		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					
H		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					

50 iliustracija. Trys šulinėlių selektoriaus spalvos.

Laikinas šulinėlių pašalinimas iš analizės

DEŠINIOJO PELĖS KLAVIŠO PASPAUDIMAS

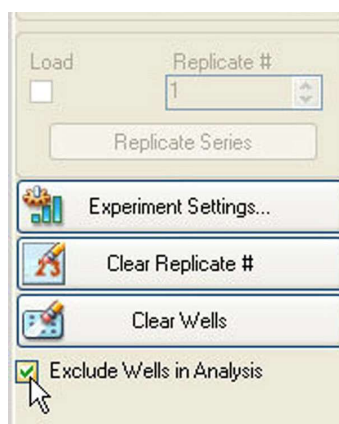
1. Dešiniuuoju pelės klavišu paspauskite šulinėlį šulinėlių selektoriaus lange, fluorescencijos kreivę ar standartinės kreivės tašką.
2. Meniu pasirinkite **Exclude Well XX from Analysis** parinktį.



51 iliustracija. Šulinėlio pašalinimas iš analizės dešiniojo klavišo paspaudimu.

PLATE EDITOR PARINKTIS

1. Data Analysis lango įrankių juostoje paspauskite **View/Edit Plate** mygtuką.
2. Pasirinkite vieną ar kelis šulinėlius.
3. Pasirinkę parinktį **Exclude Wells in Analysis** (ilustracija 52), pašalinsite pasirinktus šulinėlius. Šis žymimasis laukelis yra Plate Editor lango dešinėje pusėje.



52 iliustracija. Šulinėlių pašalinimas pažymėjus žymimąjį laukelį polangio apačioje.

4. Plate Editor lange pašalinti šulinėliai bus pažymėti žvaigždute (*).

Jei šulinėlius iš analizės norite pašalinti visam laikui, ištrinkite šulinėlių turinį Plate Editor lange, paspaudę mygtuką **Clear Wells**.

ĮSPĖJIMAS! Ištrintą šulinėlio turinį reikės įkelti iš naujo.

Grafikai

Kiekviename Data Analysis lango grafike yra rodomi skirtingų diagramų duomenys ir duomenų nustatymo parinktys. Jei norite padidinti grafiko lauką, pasirinkite norimą lauką pele ir tempkite kursorių. Programinė įranga pakeis grafiko dydį ir centrus pasirinktą lauką.

Dešiniu juo klavišu atidaromų meniu parinktys

Visuose grafikuose dešiniu juo klavišu galima atidaryti meniu su parinktimis. Kai kurios parinktys yra galimos visuose grafikuose. Jos yra skirtos duomenų rodymo būdų pasirinkimui ar grafiko duomenų eksportavimui (18 lentelė.)

18 lentelė. Dešiniu juo klavišu atidaromų grafikų meniu parinktys.

Parinktis	Funkcija
Copy	Grafiko kopijavimas į iškarpinę.
Save Image As...	Grafiko vaizdo išsaugojimas pasirinktu vaizdo failo formatu. Galimi šie formatai: PNG (numatytasis), GIF , JPG , TIF ar BMP .
Page Setup...	Peržiūra ir lapo nustatymų pasirinkimas spausdinimui.
Print...	Grafiko spausdinimas.
Show Point Values	Taško vertės rodymas, kuomet pelės kursorius yra užvedamas ant grafiko taško.
Set Scale to Default	Pradinio grafiko vaizdo dydžio rodymas po padidinimo.
Chart Options...	Chart Options lango atidarymas grafiko keitimui, įskaitant pavadinimo keitimą, x ir y ašių ribų nustatymą, tinklėlio rodymo pasirinkimą.

PASTABA. Meniu parinktys, taikomos specifiniams grafikams, yra aprašomos kitame skyriuje - "Duomenų analizės langai" (psl. 63).

Skaičiuoklės

Data Analysis lango skaičiuoklėse pateikiamos parinktys yra skirtos duomenų rūšiavimui ir perkėlimui. Stulpelių rūšiavimo metodai:

- Paspauskite ir tempkite stulpelį į naują pasirinktos lentelės vietą.
- Paspauskite stulpelio antraštę - duomenys bus surūšiuoti didėjimo arba mažėjimo tvarka.

Iki trijų duomenų stulpelių rūšiavimas Sort lange:

1. Dešiniu juo pelės klavišu paspauskite skaičiuoklę ir atsidariusiame meniu pasirinkite parinktį **Sort**.
2. Sort lange pasirinkite pirmojo stulpelio antraštę. Duomenys bus rūšiuojami didėjimo arba mažėjimo tvarka.
3. Išskleidžiamajame meniu pasirinkite daugiau nei vieną stulpelio antraštę. Pasirinkite **Ascending** ar **Descending**.
4. Jei norite, kad duomenys būtų surūšiuoti, spauskite **OK**. jei norite stabdyti rūšiavimą, spauskite **Cancel**.

Virš langelio laikydami kursorių, pažymėkite duomenis susijusiuose grafikuose ir šulinėlių selektoriuje. Jei langelį spustelėsite, galėsite nukopijuoti turinį ir jį įklijuoti į kitą programą.

Dešiniuoju klavišu atidaromų skaičiuoklių meniu parinktys

Dešiniuoju pelės klavišu atidaromų meniu parinktys aprašytos 19 lentelėje.

19 lentelė. Dešiniuoju klavišu atidaromų skaičiuoklių meniu parinktys.

Parinktis	Funkcija
Copy	Pasirinktų šulinėlių turinio kopijavimas į išskarpinę, tuomet - įklijavimas į skaičiuoklę, pvz., Excel.
Copy as Image	Skaičiuoklės vaizdo kopijavimas kaip vaizdo failo ir įklijavimas į atitinkamą failą, pvz., teksto, vaizdo ar skaičiuoklės failą.
Print...	Esamo vaizdo spausdinimas.
Print Selection...	Pasirinkto vaizdo spausdinimas.
Export to Excel...	Duomenų eksportavimas į Excel skaičiuoklę.
Export to Text...	Duomenų eksportavimas į teksto redagavimo failą.
Export to XML	Duomenų eksportavimas į XML failą.
Export to HTML	Duomenų eksportavimas į HTML failą.
Find...	Teksto paieška.
Sort...	Iki trijų duomenų stulpelių rūšiavimas.

8 Duomenų analizės langai

Šiame skyriuje pateikiama informacija apie Data Analysis (duomenų analizės) lango sąsėdas:

- Quantitation (kiekybinio įvertinimo) sąsėda (psl. 63)
- Quantitation Data (kiekybinio įvertinimo duomenų) sąsėda (psl. 66)
- Melt Curve (lydymosi kreivės) sąsėda (psl. 67)
- Melt Curve Data (lydymosi kreivės duomenų) sąsėda (psl. 68)
- End Point (galutinio taško) sąsėda (psl. 68)
- Allelic Discrimination (alelių diskriminacijos) sąsėda (psl. 70)
- QC (kokybės kontrolės) sąsėda (psl. 72)
- Run Information (tyrimo vykdymo informacijos) sąsėda (psl. 72)
- Data file reports (duomenų failų ataskaitos) (psl. 73)

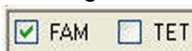
Quantitation (kiekybinio įvertinimo) sąsėda

Quantitation sąsėdoje (ilustracija 46, psl. 56) nustatomos duomenų analizės sąlygos, įskaitant bazinės linijos nustatymą individualiems šulinėliams bei slenkstinės vertės nustatymą. Quantitation sąsėdoje duomenys gali būti pateikiami keturiais būdais:

- **Amplification chart (amplifikacijos grafikas).** Rodomi kiekvieno šulinėlio santykinės fluorescencijos vienetai (RFUs) kiekviename cikle. Kiekviena grafiko kreivė atvaizduoja vieno fluoroforo duomenis viename šulinėlyje.
- **Standard curve (standartinė kreivė).** Šis grafikas rodomas tik tuomet, kai šulinėliai yra priskirti kaip Sample Type Standard. Rodoma standartinė kreivė su slenkstinės vertės ciklu pagal pradžios kiekybiškumo logaritmą. Legendoje pateikiamas kiekvieno fluoroforo šulinėliuose su standartiniu mėginio tipu reakcijos efektyvumas (E).
- **Well Selector (šulinėlių selektorius).** Galima pasirinkti, peržiūrėti tam tikrus šulinėlius su fluorescencijos duomenimis.
- **Spreadsheet (skaičiuoklė).** Rodoma pasirinktų šulinėlių duomenų skaičiuoklė.

Fluorophore Selector (fluoroforų selektorius)

Jei norite pasirinkti fluoroforo duomenis, kurie bus rodomi Quantitation sąsėdos grafikuose, paspauskite žemiau amplifikacijos grafiko esantį fluoroforų selektorių (ilustracija 53). Pažymėkite žymimąjį laukelį šalia fluoroforo pavadinimo, kad fluoroforo duomenys būtų rodomi arba nerodomi duomenų analizės lange.



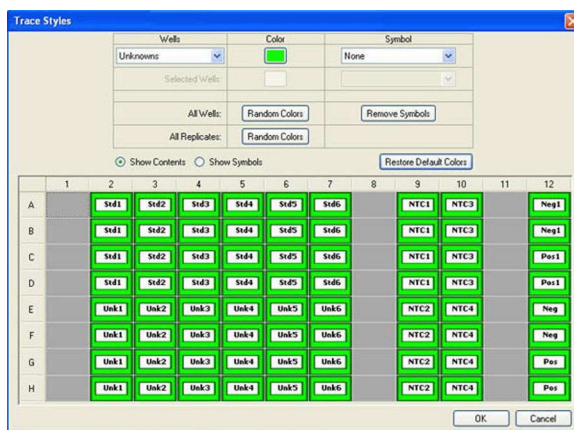
53 iliustracija. Fluoroforų selektorius su pasirinktu FAM.

Trace Styles (kreivės stiliaus) langas

Trace Styles lange (ilustracija 54) galite nustatyti kreivių rodymo būdą amplifikacijos ir lydymosi kreivės grafikuose (Quantitation ir Melt Curve sąselėse).

Atidarykite šį langą:

1. Pasirinkite vieną fluoroforą.
2. Data Analysis įrankių juostoje paspauskite mygtuką **Trace Styles** arba Data Analysis meniu juostoje pasirinkite **Settings > Trace Styles**.



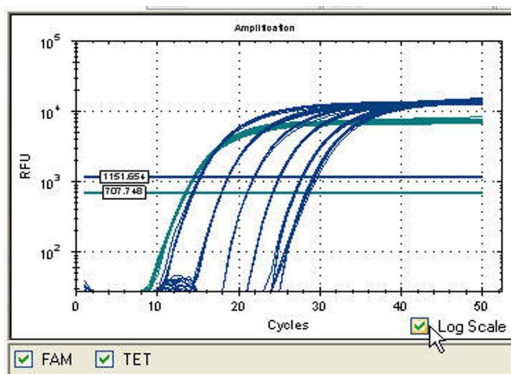
54 iliustracija. Trace Styles langas.

Naudodamiesi Trace Styles lango įrankiais, nustatykite kreivių rodymo būdą ir peržiūrėkite pakeitimus šulinėlių selektoriuje lango apačioje.

- Naudodami šulinėlių selektorių, pasirinkite šulinėlius. Arba šulinėlius su tuo pačiu mėginio tipu pasirinkite išskleidžiamajame **Wells** stulpelio meniu.
- Pažymėkite žymimąjį Color stulpelio laukelį ir pasirinkite šulinėlių spalvą.
- Išskleidžiamajame Symbol meniu pasirinkite simbolį.
- Paspaudus parinktį **Show Contents**, bus rodomas kiekvieno šulinėlio turinys, paspaudus **Show Symbols** - pasirinktas kiekvieno šulinėlio simbolis.

Log Scale (log skalės) parinktis

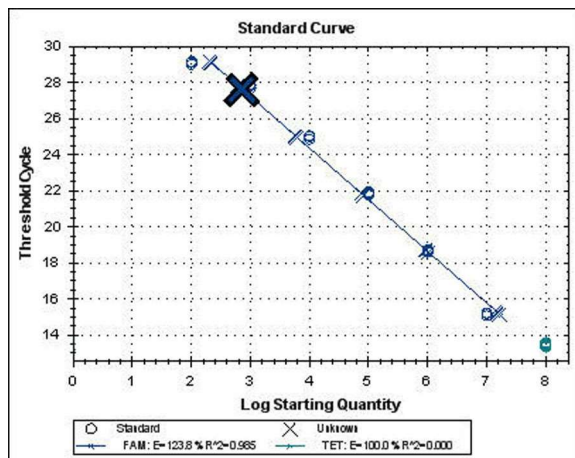
Pažymėję žymimąjį laukelį šalia **Log Scale** Amplification grafiko apačioje galėsite peržiūrėti fluorescencijos kreives log skalėje, kaip pavaizduota 55 iliustracijoje.



55 iliustracija. Amplification grafike pasirinkta parinktis Log Scale.

Standard curve (standartinės kreivės) grafikas

Programinė įranga sugeneruoja standartinės kreivės grafiką (ilustracija 56) Quantitation sąsėlėje, jei duomenyse yra mėginių tipas, nustatytas kaip standartas (Std) vienam tyrimo fluoroforui.



56 iliustracija. Standard curve grafikas.

Standard curve grafike pateikiama informacija:

- Kiekvienos kreivės pavadinimas (fluoroforo pavadinimas).
 - Kiekvieno fluoroforo spalva.
 - Reakcijos efektyvumas (E). Šie statistiniai duomenys yra naudojami sudėtinės reakcijos optimizavimui ir duomenų suvienodinimui standartiniai kreivei.
- PASTABA. Reakcijos efektyvumas - taikinio apdorojimo lygis kiekviename protokolo cikle. 100% efektyvumas reiškia, jog kiekviename cikle taikinyje buvo dvigubintas.
- Nustatymo koeficientas, R₂ (rašomas R²). Šie statistiniai duomenys yra naudojami nustatyti, kokių tikslumu linija atspindi duomenis (pritaikomumas).

Grafiko meniu parinktys (atidaromos dešiniuoju pelės klavišu)

Be įprastų dešiniojo klavišo paspaudimų atidaromų parinkčių, tokių kaip kopijavimas, spausdinimas ar eksportavimas, Amplification grafike yra ir kitų, parinkčių, aprašytų 20 lentelėje.

20 lentelė. Amplification grafiko meniu parinktys (atidaromos dešiniuoju pelės klavišu)

Meniu parinktis	Funkcija
Show Threshold Values	Rodoma kiekvienos amplifikacijos kreivės slenkstinė vertė.
Trace Styles...	Trace Styles lango atidarymas kreivių rodymo būdo keitimui Quantitation ir Melt Curve sąsėlėse.
Baseline Thresholds...	Baseline Thresholds lango atidarymas fluoroforų slenkstinių verčių ar bazinių linijų keitimui (pakeitimai bus rodomi Amplification grafike ir Quantitation sąsėlėje).

Quantitation (kiekybinio įvertinimo) sąsėja

Quantitation Data sąsėje pateikiamos skaičiuoklės su kiekybiniais kiekvieno šulinėlio duomenimis. Duomenų rodymo formatai:

- **Results (rezultatai).** Rodoma skaičiuoklė su duomenų vaizdu.
- **Plate (plokštelė).** Rodoma skaičiuoklė su šulinėlių duomenimis plokštelės vaizde.
- **RFU (santykinės fluorescencijos vienetai).** Rodomos kiekvieno šulinėlio RFU vertės kiekviename cikle. PATARIMAS. Dešiniuojų klavišu paspaudus bet kurią skaičiuoklę, bus rodomos galimos parinktys.

Results skaičiuoklė

Pasirinkę skaičiuoklę **Results** (ilustracija 57), galėsite peržiūrėti kiekvieno plokštelės šulinėlio duomenis.

Quantitation

Quantitation Data

Gene Expression

End Point

Allelic Discrimination

QC

Run Information

Results

Step Number: 3

Well	Fluor	Content	Target	Sample	Threshold Cycle (C(t))	C(t) Mean	C(t) Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean
A02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.39	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
B02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.24	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
C02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.25	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
D02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.22	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
A02	HEX	Std-1	ACT	5Hr	13.27	13.13	0.101	1.000E+06	6.000	1.00E+06

57 iliustracija. Quantitation sąsėje pasirinkta Results skaičiuoklė.

PASTABA. All Std. Dev (standartinės deviacijos) apskaičiavimas yra taikomas kartotinių grupėms, nustatytoms Plate Editor lange. Kiekvienai kartotinių grupei apskaičiuojama vidutinė C(t) vertė.

Results skaičiuoklės informacija pateikta 21 lentelėje.

21 lentelė. Results skaičiuoklės turinys.

Informacija	Aprašymas
Well	Plokštelės šulinėlis.
Fluor	Aptiktas fluoroforas.
Content	Mėginio tipas ir kartotinio numeris.
Target	Amplifikacijos taikinio pavadinimas (genas).
Sample	Mėginio aprašymas.
Threshold Cycle (C(t))	Slenkstinė ciklo vertė.
C(t) Mean	Kartotinių grupės vidutinės slenkstinės vertės ciklo vidurkis.
C(t) Std. Dev	Kartotinių grupės vidutinės slenkstinės vertės ciklo standartinė deviacija.
Starting Quantity (SQ)	Numatytas taikinio pradžios kiekybiškumas.
Log Starting Quantity	Pradžios kiekybiškumo logaritmas.
SQ Mean	Pradžios kiekybiškumo vidurkis.
SQ Std. Dev	Pradžios kiekybiškumo standartinė deviacija.
Set Point	Mėginio temperatūra šulinėlyje gradiento etape.
Sample Note	Vienas denatūracijos, anylingo ir ekstencijos arba anylingo ir ekstencijos etapų ciklas.

Plate skaičiuoklė

Plate skaičiuoklėje pateikiamas vieno fluoroforo duomenų plokštelės vaizdas. Fluoroforus pasirinkite paspausdami įsele skaičiuoklės apačioje. 58 iliustracijoje pavaizduota Plate skaičiuoklė su plokštelės vaizdu.

Quantitation

Quantitation Data

Gene Expression

End Point

Allelic Discrimination

Plate

Output:

☒ Content

☐ Sample

☒ C(t)

☐ Starting Quantity

		1	2	3	4	5	6	7
A	Content		Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6
	C(t)		14.39	17.79	21.20	24.49	27.20	28.54
B	Content		Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6
	C(t)		14.24	17.74	21.15	24.26	27.10	28.39
C	Content		Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6
	C(t)		14.25	17.68	21.07	24.25	26.85	28.41

58 iliustracija. Plate skaičiuoklė Quantitation Data įsele.

RFU skaičiuoklė

RFU skaičiuoklėje pateikiamas RFU nuskaitymas kiekviename šulinėlyje kiekvieno tyrimo ciklo metu. Fluoroforus pasirinkite paspausdami įsele skaičiuoklės apačioje. Kiekvieno stulpelio viršuje yra rodomas šulinėlio numeris, kiekvienos eilutės kairėje - ciklo numeris (iliustracija 59).

Quantitation

Quantitation Data

Gene Expression

End Point

Allelic Discrimination

QC

RFU

Step Number: 3

Cycle	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B2	B3	B4	B5	B6
1	6.81	2.31	1.23	2.95	-5.79	-10.6	2.05	6.76	-2.89	-14.0	-6.27
2	5.77	1.26	3.96	0.822	-6.22	-5.26	6.28	12.3	1.22	-7.55	-7.71
3	4.08	3.28	1.84	0.687	-5.05	-8.13	5.07	3.10	1.18	-4.50	-6.59
4	2.73	0.204	-1.27	-0.473	3.02	-4.26	2.70	5.57	2.42	-1.25	-2.66
5	2.69	0.220	4.31	1.42	-1.91	1.63	0.275	5.51	2.41	-1.60	-0.366

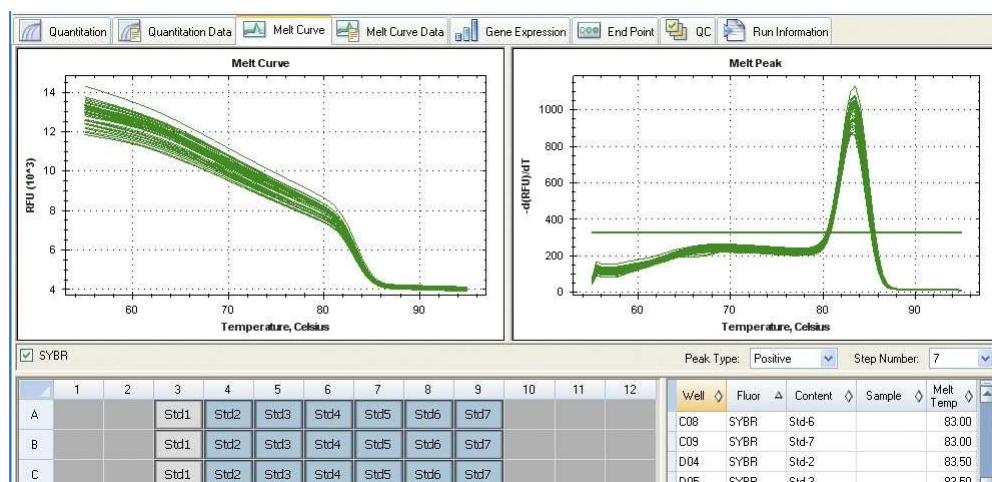
59 iliustracija. RFU skaičiuoklė Quantitation Data įsele.

Melt Curve (lydymosi kreivės) įsele

Melt Curve įsele (iliustracija 60) yra nustatoma amplifikuotų PGR produktų lydymosi temperatūra (T_m). Įsele duomenys gali būti pateikiami keturiais būdais:

- **Melt Curve (lydymosi kreivė).** Kiekvieno fluoroforo duomenų kaip RFU kiekviename šulinėlyje peržiūra realiuoju laiku.
- **Melt Peak (lydymosi pikas).** Neigiamos RFU duomenų regresijos kiekviename šulinėlyje peržiūra.
- **Well Selector (šulinėlių selektorius).** Rodomi arba nerodomi pasirinktų šulinėlių duomenys.
- **Peak spreadsheet (piko skaičiuoklė).** Rodoma pasirinktų šulinėlių duomenų skaičiuoklė.

PASTABA. Šioje skaičiuoklėje rodomi du kiekvienos kreivės pikai. Jei norite matyti daugiau pikų, pasirinkite įsele **Melt Curve Data** (psl. 68).



60 iliustracija. Melt Curve ašelės turinio išdėstymas Data Analysis lange.

Lydimosi kreivės duomenis galite nustatyti atlikdami vieną šių veiksmų:

- Paspauskite ir tempkite slenkstinės vertės juostą Melt Peak grafike, taip pridėdami arba pašalindami pikus iš duomenų analizės.
- Peak Type išskleidžiamajame meniu pasirinkite **Positive**, kad būtų rodomi pikai, esantys virš slenkstinės lydimosi vertės arba **Negative**, kad būtų rodomi pikai, esantys žemiau slenkstinės lydimosi vertės.

Melt Curve Data (lydimosi kreivės duomenų) ašelė

Melt Curve Data ašelėje rodomi lydimosi kreivės ašelės duomenys sudėtinėse skaičiuoklėse, įskaitant kiekvienos kreivės lydimosi pikus. Lydimosi kreivės duomenų skirtingose skaičiuoklėse rodymo būdai:

- **Melt Peaks (lydimosi pikai).** Visi kiekvienos kreivės duomenys, įskaitant visus lydimosi pikus.
- **Plate (plokštelė).** Kiekvieno plokštelės šulinėlio duomenys ir turinys, įskaitant mėginio pavadinimą, 1 piką ir 2 piką.
- **RFU (santykinės fluorescencijos vienetai).** Kiekvieno šulinėlio RFU vertė ties tam tikra temperatūra.
- **-d(RFU)/dT.** Neigiamas RFU kitimo santykis, kuomet šulinėlyje pasikeičia temperatūra (T). Tai yra pirmasis regresijos vaizdas kiekviename plokštelės šulinėlyje.

End Point (galutinio taško) ašelė

End Point ašelėje analizuojama galutinė santykinės fluorescencijos vienetai (RFU) vertė mėginių šulinėliuose. Programinė įranga lygina nežinomų šulinėlių RFU lygį su neigiamos kontrolės šulinėlių RFU ir nežinomą mėginį nustato kaip teigiamą arba neigiamą. Teigiamų mėginių RFU vertė yra didesnė nei vidutinė neigiamų kontrolių RFU vertė plius ribinė vertė.

Galutinio taškų duomenų analizei yra būtinos neigiamos kontrolės. Kitu atveju programinė įranga negalės atlikti skaičiavimo. Vykdykite vieną šių protokolų:

- **Run a Quantitation protocol (kiekybiškumo protokolo vykdymas).** Atlikite standartinio protokolo sąranką. Po tyrimo vykdymo atidarykite Data Analysis langą ir jo ašelėje Quantitation nustatykite duomenų analizės nustatymus. Tuomet paspauskite End Point ašelę ir pasirinkite galutinio taško ciklą.

- **Run an End Point Only protocol (tik galutinio taško protokolo vykdymas).** Į Experiment Setup lango sąselę Plate įkelkite End Point Only protokolą, pasirinkite arba sukurkite plokštelę ir vykdykite tyrimą.

End Point sąselėje rodomos vidutinės RFU vertės skirtos nustatyti, ar taikinyis buvo amplifikuotas paskutiniame (galutiniame) cikle. Šie duomenys yra naudojami nustatyti, ar specifinio taikinio seka yra mėginyje (teigiama). Teigiami taikiniai turi didesnę RFU vertę nei nustatytoji ribinė vertė.

End Point sąselėje rodomi duomenys:

- **Settings (nustatymai).** Duomenų analizės nustatymai.
- **Results (rezultatai).** Rezultatų rodymas iškart po nustatymų keitimo.
- **Well Selector (šulinėlių selektorius).** Šulinėlių su galutinio taško duomenimis rodymas.
- **Well spreadsheet (šulinėlių skaičiuoklė).** Rodoma skaičiuoklė su pasirinktų šulinėlių galutinio taško RFU.

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
A11	Cy5	Neg Ctrl-1		1924	
B03	Cy5	Std-1		2811	(+) Positive
B04	Cy5	Std-2		3088	(+) Positive
B05	Cy5	Std-3		3066	(+) Positive
B06	Cy5	Std-4		3048	(+) Positive
B07	Cy5	Std-5		3188	(+) Positive
B08	Cy5	Std-6		3223	(+) Positive
B09	Cy5	Std-7		3532	(+) Positive
B11	Cy5	Neg Ctrl-1		1880	
C03	Cy5	Std-1		2820	(+) Positive
C04	Cy5	Std-2		3123	(+) Positive
C05	Cy5	Std-3		3152	(+) Positive
C06	Cy5	Std-4		3147	(+) Positive
C07	Cy5	Std-5		3259	(+) Positive

61 iliustracija. End Point sąselės išdėstymas.

Rezultatų sąrašą pateikiama ši informacija:

- **Lowest RFU value (žemiausia RFU vertė).** Žemiausia duomenų RFU vertė.
- **Highest RFU value (aukščiausia RFU vertė).** Aukščiausia duomenų RFU vertė.
- **Negative Control Average (vidutinė neigiamos kontrolės vertė).** Vidutinė šulinėlių su neigiamąja kontrole RFU vertė.
- **Cut Off Value (ribinė vertė).** Apskaičiuota pridėjant nuokrypį (RFU ar nustatytą ribų procentinę išraišką) ir vidutinę neigiamų kontrolių vertę. Mėginiai, kurių RFU yra didesnė nei ribinė vertė, bus nustatyti kaip teigiami. Norėdami pakeisti ribinę vertę, pakeiskite RFU ar ribų procentinę išraišką.

Ribinė vertė apskaičiuojama pagal šią formulę:

$$\text{Ribinė vertė} = \text{vidutinė neigiamos kontrolės vertė} + \text{nuokrypis}$$

Nuokrypį pasirinkite atlikdami vieną šių veiksmų:

- **RFU (numatytais).** Nuokrypio apskaičiavimas naudojant absoliučią RFU vertę. Minimali RFU nuokrypio vertė yra 2. Didžiausia vertė - absoliuti didžiausia RFU vertė minus absoliuti žemiausia RFU vertė. Bendram RFU spektrui numatytoji RFU nuokrypio vertė yra 10%.
- **Percent of Range (procentinė ribų išraiška).** Nuokrypio apskaičiavimas naudojant procentinę RFU ribų vertę. Minimali vertė - 1 procentas. Maksimali procentinė išraiška - 99 procentai. Numatytoji procentinė išraiška - 10 procentų.

Galutinio taško duomenų analizės nustatymai

Pasirinkite informaciją, rodomą End Point ašelėje:

- Išskleidžiamajame meniu pasirinkite **Fluorophore**.
- Pasirinkite **End Cycle to Average** vertę, kad nustatytumėte ciklų skaičių, pagal kurį programinė įranga apskaičiuos vidutinę galutinio taško RFU vertę.
- Pasirinkę **RFUs**, duomenis peržiūrėsite santykinės fluorescencijos vienetais.
- Pasirinkę **Percentage of Range**, RFU duomenis peržiūrėsite procentine išraiška.

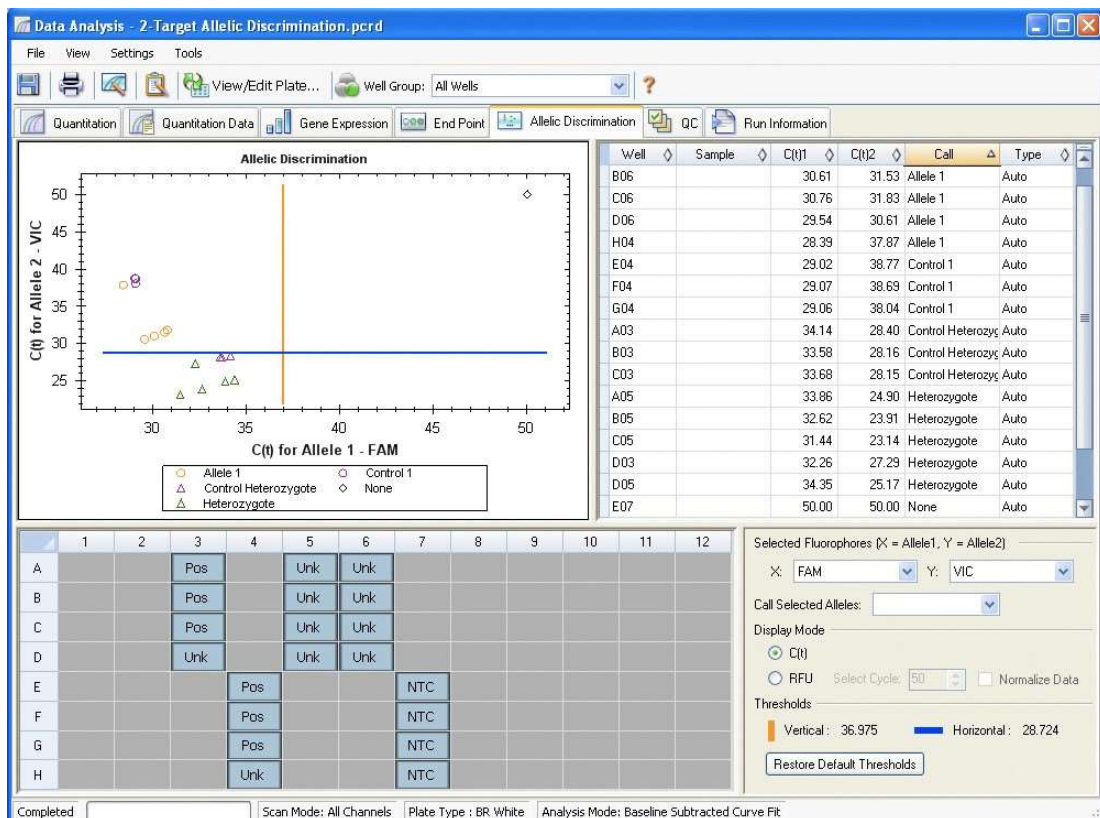
Allelic Discrimination (alelių diskriminacijos) ašelė

Allelic Discrimination ašelėje genotipai yra priskiriami prie šulinėlių su nežinomais mėginių tipais, naudojant teigiamos kontrolės mėginių RFU ar C(t) (ilustracija 62). Šie duomenys yra naudojami genotipų identifikacijai mėginiuose, įskaitant **Allele 1**, **Allele 2**, **Heterozygote**, **Unknown**, **Control 1** ar **Control 2**.

PASTABA. Duomenys alelių diskriminacijai turi būti naudojami iš sudėtinių tyrimų.

Alelių diskriminacijos analizei reikalingas šis minimalus šulinėlių turinys:

- Du fluoroforai kiekviename šulinėlyje, išskyrus šulinėlius su teigiama kontrole, kuomet šulinėlyje yra tik vienas fluoroforas.
- Vienas fluoroforas, kuris yra bendras visiems grupės šulinėliams.
- NTC (be šablono kontrolės) mėginiai, jei reikia atlikti duomenų normalizavimą.



62 iliustracija. Allelic Discrimination ašelės turinio išdėstymas Data Analysis lange.

Duomenų nustatymas alelių diskriminacijai

Programinė įranga automatiškai priskiria genotipų variantus šulinėliams su nežinomais mėginiais, remiantis vertikalinių ir horizontalių slenkstinių verčių linijų pozicijomis. Tuomet skaičiuoklėje pateikia genotipus. Automatiniam genotipų priskyrimui programinė įranga naudoja teigiamas kontroles (jei yra) arba apskaičiuoja slenkstines vertes. Programinė įranga naudoja vidutinę C(t) ar RFU vertę teigiamoms kontrolėms, kad automatiškai nustatytų slenkstinės vertės linijas alelių diskriminacijai.

Slenkstinių verčių linijas nustatykite paspausdami ir jas tempdami. Programinė įranga automatiškai atliks apskaičiavimą naujų genotipų priskyrimui:

- Jei plokštelėje yra trys kontrolės, slenkstinės vertės linija apskaičiuojama remiantis vidutine ir standartine kontrolių RFU ar C(t) deviacija.
- Jei kontrolių yra mažiau nei trys, slenkstinės vertės linijos yra nustatomos pagal RFU ar slenkstinės vertės ciklo verčių ribas pasirinktam fluoroforui.

Alelių diskriminacijos duomenis galite nustatyti atlikdami šiuos veiksmus:

- Paspauskite ir tempkite slenkstinės vertės liniją Allelic Discrimination grafike, taip nustatydami parametrus skaičiuoklėje.
- Nustatymų parinktyse ekrano apačioje dešinėje pasirinkite fluoroforą kiekvienai grafiko ašiai (X: ir Y:).
- Siūlomą variantą galite keisti rankiniu būdu pažymėdami skaičiuoklės eilutę ir pasirinkdami parinktį iš **Call Selected Alleles** sąrašo (Allele 1, Allele 2, Heterozygote, None, Unknown, Control 1 ar Control 2).
- Jei vertikalios ir horizontalios linijas grąžinti į jų pirminę poziciją, spauskite mygtuką **Restore Default Thresholds**.
- Jei norite duomenis peržiūrėti kaip slenkstinių verčių lygius, pasirinkite **C(t) Display Mode**. Jei norite duomenis peržiūrėti santykinės fluorescencijos vienetais pasirinktame cikle, pasirinkite **RFU Display Mode**.
- Jei norite sunormalizuoti grafike ir skaičiuoklėje rodomus RFU duomenis, pasirinkite **Normalize Data**.

Normalizavimas keičia duomenis grafike į ribas nuo 0 iki 1 abiejose ašyse. Duomenų normalizavimui, plokštelėje turi būti šulinėlių su mėginiais be šablono kontrolės (NTC) 1 alelei ir 2 alelei. RFU duomenys yra normalizuojami iki NTC verčių kaip linijinė 1 alelės ir 2 alelės specifinių RFU verčių kombinacija. Šis metodas puikiai tinka RFU duomenų atvaizdavimui.

Normalizuotos RFU vertės apskaičiavimas atliekamas pagal Livak ir kt. formules (1995).

$$Q_{rp} \cdot D_4 \cdot \left(\frac{D_4}{D_4 + D_5} \right) \cdot \left(\frac{D_4}{Q_{WF} \cdot D_4 + D_5} \right)$$

Kai:

- A1 yra 1 alelės RFU
- A2 yra 2 alelės RFU
- $\bar{X}$ yra vidutinė RFU vertė

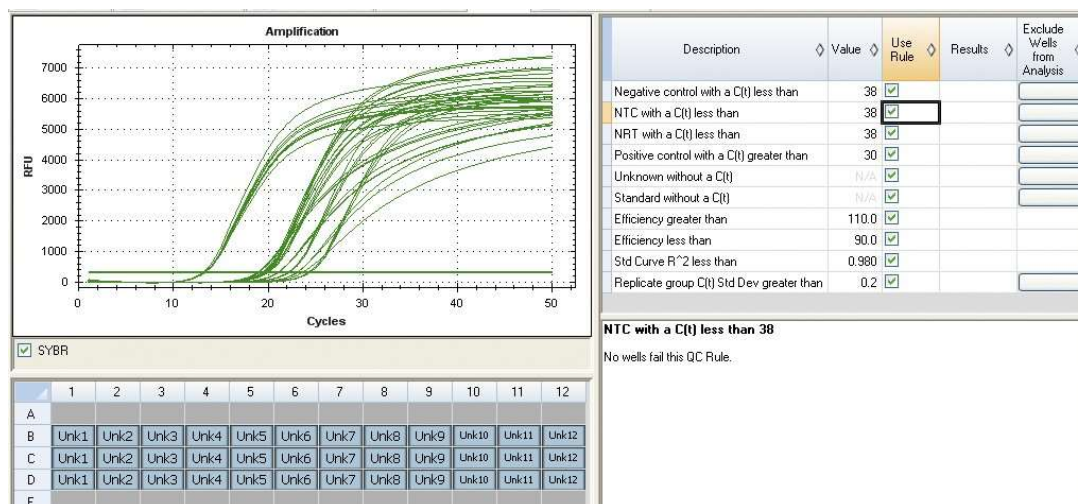
NTCA1 + A2 yra 1 alelės ir 2 alelės NTC mėginio RFU suma.

QC (kokybės kontrolės) ąselė

QC ąselėje yra greita prieiga prie tyrimo duomenų kokybinio vertinimo, remiantis taisyklėmis, nustatytomis naudotojo parinkčių lango QC ąselėje (žr. “QC ąselė”, psl. 94).

Programinė įranga rodo faktines taikomas KK taisykles ir kiekvienos taisyklės nustatymus (ilustracija 63). Taisyklės apibrėžime taip pat yra nurodoma, kurie šulinėliai neatitiko taisyklės.

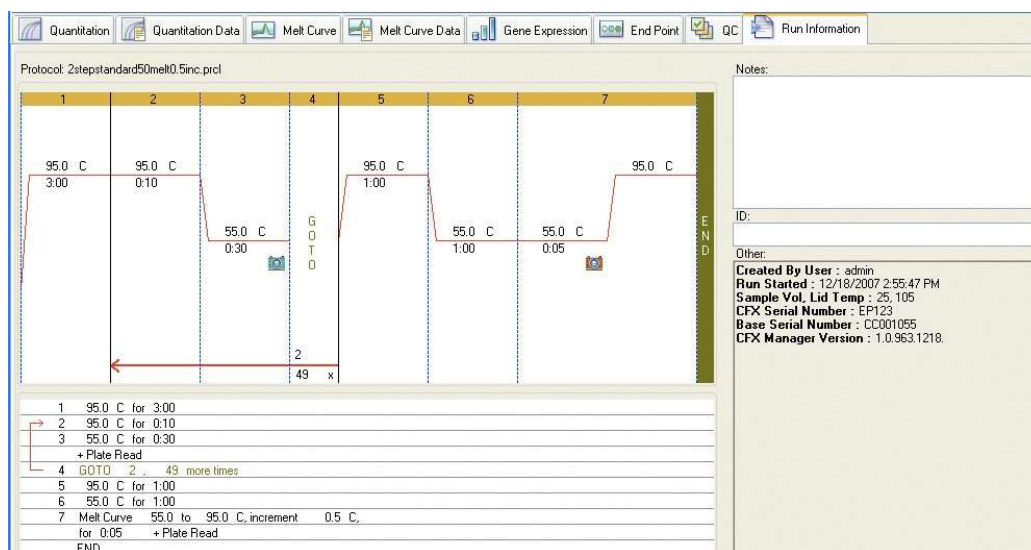
PASTABA. Taisykles galite aktyvuoti ar jas išjungti pažymėdami arba nuimdami žymėjimą nuo šalia taisyklės esančio žymimojo laukelio stulpelyje Use Rule.



63 iliustracija. QC ąselė.

Run Information (tyrimo vykdymo informacijos) ąselė

Run Information ąselėje (ilustracija 64) pateikiamas protokolai ir kita tyrimo vykdymo informacija. Galite įrašyti ar redaguoti pastabas Notes laukelyje arba įrašyti ar redaguoti tyrimo duomenų ID laukelyje ID.



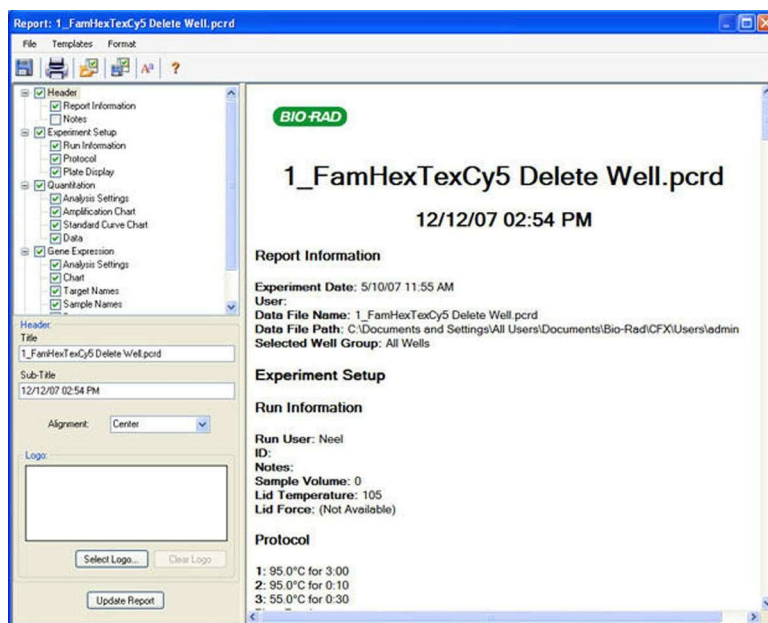
64 iliustracija. Run Information ąselės turinio išdėstymas Data Analysis lange.

Data file reports (duomenų failų ataskaitos)

Report lange (ilustracija 65) pateikiama informacija apie duomenų failą Data Analysis lange. Norėdami atidaryti ataskaitą, Data Analysis lango įrankių juostoje pasirinkite **Tools > Reports**, arba paspauskite mygtuką **Reports**.

Report lange yra šie trys skyriai:

- **Meniu ir įrankių juosta.** Pasirinkite ataskaitos formato, saugojimo ir spausdinimo parinktį.
- **Parinkčių sąrašas (viršutiniame kairiajame lango kampe).** Pasirinkite ataskaitoje rodomas parinktis.
- **Parinkčių polangis (apatiniam kairiajame lango kampe).** Įrašykite pasirinktos parinktės informaciją.
- **Peržiūros polangis (dešinėje lango pusėje).** Ataskaitos peržiūra.



65 iliustracija. Duomenų failo ataskaitos lango pavyzdys.

PATARIMAS. Jei ataskaitą išsaugosite kaip šabloną, pasirinkta rodoma informacija ir išdėstymas bus naudojamas kitose ataskaitose. Jei ataskaitą norite išsaugoti kaip šabloną, pasirinkite **Template > Save** ar **Save As**.

Duomenų analizės ataskaitos kūrimas

Jei Data Analysis lange norite sukurti ataskaitą, atlikite šiuos veiksmus:

1. Prieš ataskaitos kūrimą Data Analysis lange atlikite galutinius šulinėlių turinio, pasirinktų šulinėlių, grafikų ir skaičiuoklių nustatymus.
2. Data Analysis lango įrankių juostoje paspauskite mygtuką **Report**. Atsidarys Report langas.
3. Pakeiskite parinktį, kurias norite įtraukti į ataskaitą. Ataskaita yra atidaroma su numatytomis parinktimis. Pažymėkite žymimuosius laukelius ataskaitos parinkčių sąrašė, jei norite pakeisti kategoriją ar individualias kategorijas parinktį.

PASTABA. Duomenų rodymas ataskaitoje priklauso nuo atliktų pasirinkimų Data Analysis lango ašelėse. Pavyzdžiui, kiekybiniame tyrime gali nebūti standartinės kreivės, todėl šie duomenys nebus pateikti nei Data Analysis lange, nei duomenų ataskaitoje.

4. Jei norite atnaujinti keitimus ataskaitos peržiūros polangyje, spauskite mygtuką **Update Report**.
5. Išsaugokite arba atspausdinkite ataskaitą. Paspaudę įrankių juostos mygtuką **Print**, ataskaitą atspausdinsite. Jei ataskaitą norite išsaugoti PDF (Adobe Acrobat Reader file), MHT (Microsoft document) ar MHTML (Microsoft document) formatu, pasirinkite **File > Save** ir pasirinkite išsaugojimo paskirties vietą. Jei ataskaitą norite išsaugoti nauju pavadinimu ar naujoje paskirties vietoje, pasirinkite **File > Save As**.
6. Galite išsaugoti ataskaitos su norima informacija šabloną. Jei ataskaitos nustatymus norite išsaugoti kaip šabloną, pasirinkite **Template > Save** ar **Save As**. Naujos ataskaitos kūrimui galėsite panaudoti jau sukurtą šabloną.

Duomenų analizės ataskaitos kategorijos

Į ataskaitą galima įtraukti 22 lentelėje aprašytas parinktis kiekvienai kategorijai, priklausomai nuo Data Analysis lange esančių duomenų tipo.

22 lentelė. Duomenų analizės ataskaitos parinkčių sąrašo kategorijos.

Kategorija	Parinktis	Aprašymas
Header		
		Ataskaitos pavadinimas, paantraštė ir logotipas.
	Report Information	Tyrimo data, naudotojo pavadinimas, duomenų failo pavadinimas, duomenų failo paskirties vieta ir pasirinkta šulinėlių grupė.
	Notes	Duomenų ataskaitos pastabos.
Experiment Setup		
	Run Information	Tyrimo data, naudotojas, duomenų failo pavadinimas, duomenų failo paskirties vieta ir pasirinkta šulinėlių grupė.
	Protocol	Protokolo etapai ir parinktys teksto formatu.
	Plate Display	Plokštelės vaizdas su kiekvieno šulinėlio informacija.
Quantitation		
	Analysis Settings	Duomenų surinkimo etapo numeris, analizės režimas ir bazinės linijos substrakcijos metodas.
	Amplification Chart	Tyrimo su kiekybiniais duomenimis amplifikacijos grafiko kopija.
	Standard Curve Chart	Standartinės kreivės grafiko kopija.
	Data	Skaičiuoklė su šulinėlių duomenimis.
Gene Expression		
	Analysis Settings	Analizės režimas, grafikų duomenys, gradacijos parinktis, grafiko klaidos.
	Chart	Genų ekspresijos grafiko kopija.
	Target Names	Taikinių pavadinimų grafikas.
	Sample Names	Mėginių pavadinimų grafikas.
	Data	Skaičiuoklė su šulinėlių duomenimis.
Melt Curve		

22 lentelė. Duomenų analizės ataskaitos parinkčių sąrašo kategorijos (tęsinys).

Kategorija	Parinktis	Aprašymas
	Analysis Settings	Lydymosi etapo numeris ir slenkstinės vertės linijos nustatymai.
	Melt Curve Chart	Lydymosi kreivės grafiko kopija.
	Melt Peak Chart	Lydymosi piko grafiko kopija.
	Data	Skaičiuoklė su šulinėlių duomenimis.
Allelic Discrimination		
	Analysis Settings	Rodymo režimas, fluoroforai, ciklai, slenkstinės vertės ir normalizuoti duomenys.
	Chart	Alelių diskriminacijos grafiko kopija.
	Data	Skaičiuoklė su šulinėlių duomenimis.
End Point		
	Analysis Settings	Fluoroforas, galutinio ciklo vidurkis, režimas, mažiausia RFU vertė, didžiausia RFU vertė ir ribinė vertė.
	Data	Skaičiuoklė su šulinėlių duomenimis.

9 Genų ekspresijos analizė

Šiame skyriuje pateikiama genų ekspresijos analizės informacija:

- Genų ekspresija (psl. 77)
- Plokštelės sąranka genų ekspresijos analizei (psl. 78)
- Gene Expression (genų ekspresijos) sąsėlė (psl. 78)
- Experiment Settings (tyrimo nustatymų) langas (psl. 83)
- Genų tyrimas (psl. 84)
- Gene Study Data (genų tyrimo duomenų) skaičiuoklė (psl. 87)
- Gene Study Report (genų tyrimo ataskaitos) langas (psl. 88)

Genų ekspresija

Naudojant kvalifikuotas kontroles reakcijoms, galite atlikti genų ekspresijos tyrimą, kad sunormalizuotumėte taikinių koncentracijos skirtumus mėginiuose. Paprastai, geno ekspresijos lygio normalizavimui, yra naudojamas vienas ar daugiau referentinių genų. Referentinių genų pagalba yra atsižvelgiama į kiekvieno mėginio skirtumus bei kitas variacijas.

Norėdami įvertinti PGR reakcijų skirtumus dviejuose ar daugiau šulinėlių, atidarykite Gene Expression sąsėlę. Pavyzdžiui, galite vertinti viruso genomų skaičių ar PGR reakcijos transfekcijos sekas. Dažniausiai genų ekspresijos tyrimo metu yra atliekamas daugiau nei vienos reakcijos cDNK koncentracijos palyginimas nekintančios būsenos mRNR lygio nustatymui.

Programinė įranga apskaičiuoja santykinį taikinio ekspresijos lygį šiais būdais:

- Santykinis taikinio sekos (1 taikinio) ekspresijos lygis siejamas su kitu taikiniu (2 taikinis). Pavyzdžiui, vieno geno santykinis kiekis su kitu tokiu pat būdu apdoroto mėginio geno kiekiu.
- Santykinis vieno taikinio sekos ekspresijos lygis viename mėginyje lyginamas su tuo pačiu taikiniu kitu būdu apdorotame mėginyje. Pavyzdžiui, vieno geno santykinis kiekis su tuo paties geno kiekiu esant skirtingoms laiko, geografinėms ar apdorojimo sąlygoms.

Plokštelės sąranka genų ekspresijos analizei

Genų ekspresijos analizės atlikimui, šulinėliuose turi būti:

- **Vienas ar daugiau taikinių.** Du taikiniai su skirtingais amplifikuotais genais ar sekomis.
- **Vienas ar daugiau referentinių taikinių.** Normalizuotai ekspresijai bent vienas taikinytis turi būti referentinis. Experiment settings lange (psl. 38) priskirkite visus referentinius taikinius, kad duomenys galėtų būti analizuojami Normalized Expression režimu ($\Delta\Delta C(t)$). Tyrimai be referentinės medžiagos turi būti analizuojami Relative Expression režimu ($\Delta \geq C(t)$)
- **Bendrieji mėginiai.** Reakcijose privalo būti klinikinių mėginių (mažiausiai du), kad duomenis būtų galima peržiūrėti Gene Expression sąsloje. Šie mėginių taikinių sąlygos turi būti skirtingos. Experiment Settings lange priskirkite kontrolės mėginį (pasirinktinai) (psl. 38)

Genų ekspresijos sąrankos reikalavimai priklauso nuo to, ar reakcijos turinys yra **vienos PGR** su vienu fluoroforu ar **multipleksinės PGR** su daugiau nei vienu fluoroforu.

66 iliustracijoje pateikiamas minimalaus šulinėlių turinio vienos genų ekspresijos tyrimo pavyzdys.

Unk	Unk
Target1	Target1
Sample1	Sample2
Unk	Unk
Target2	Target2
Sample1	Sample2

66 iliustracija. Vienos genų ekspresijos tyrimo šulinėlių turinio pavyzdys.

67 iliustracijoje pateikiamas minimalaus šulinėlių turinio multipleksinės genų ekspresijos tyrimo pavyzdys.

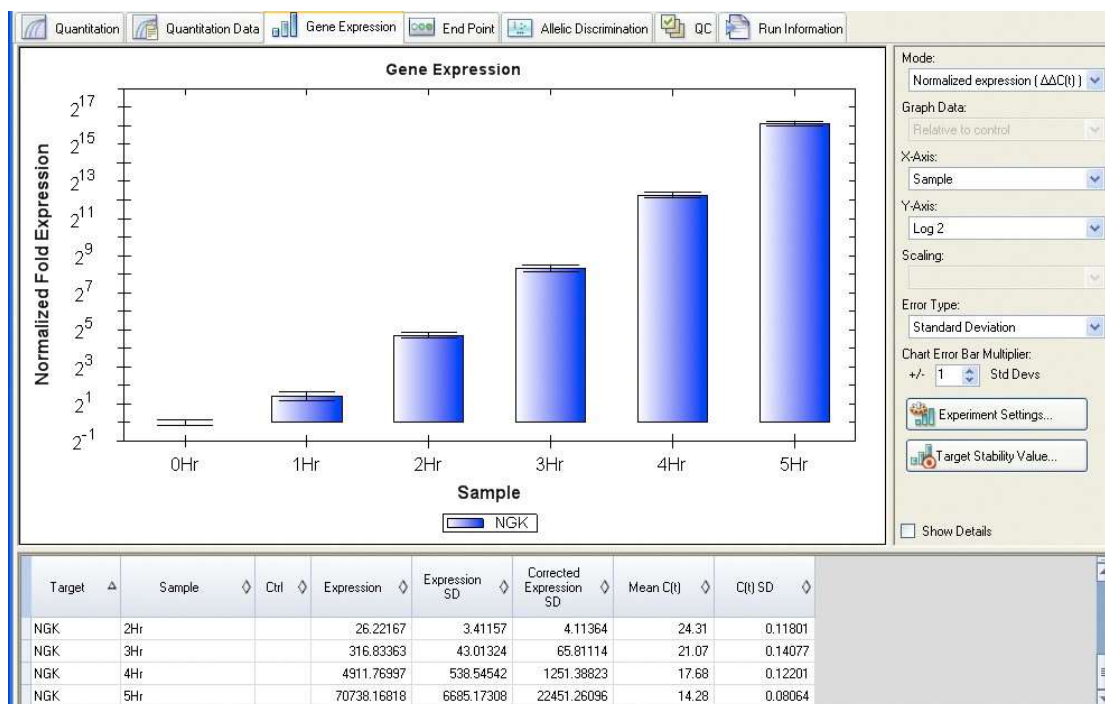
Unk	Unk
Target1	Target1
Target2	Target2
Sample1	Sample2

67 iliustracija. Multipleksinės genų ekspresijos tyrimo šulinėlių turinio pavyzdys.

Gene Expression (genų ekspresijos) sąsloja

Data Analysis lango Gene Expression sąsloje santykinė taikinių ekspresija pateikiama dviem būdais:

- **Genų ekspresijos grafikas.** Tikro laiko PGR duomenys rodomi kaip normalizuota ekspresija ($\Delta \Delta C(t)$) ar santykinis kiekis ($\Delta C(t)$).
- **Skaičiuoklė.** Rodoma genų ekspresijos duomenų skaičiuoklė.
PATARIMAS. Dešiniuoj klavišu paspaudus bet skaičiuoklę ar grafiką, bus rodomos galimos parinktys. Paspaudus mygtuką **View/Edit Plate**, atsidarys Plate Editor langas, kuriame galėsite keisti plokštelės šulinėlių turinį.



68 iliustracija. Gene Expression sąselės turinio išdėstymas Data Analysis lange.

PATARIMAS. Dešiniuoju klavišu paspaudus grafiką, bus rodomos galimos meniu parinktys. Šiame meniu pasirinkus parinktį **Sort**, galėsite pakeisti taikinių ir mėginių pavadinimų eilės tvarką grafike.

Normalizuota genų ekspresija

Duomenų normalizavimui išmatuotas vieno ar kelių referentinių genų (taikinių) ekspresijos lygis yra naudojamas kaip normalizavimo faktorius. Referentiniai genai yra biologinėje tiriamojoje sistemoje nekontroliuojami taikiniai, pvz., aktinas, GAPDH ar histonas H3.

Normalizuotos genų ekspresijos ($\Delta \Delta C(t)$) analizės sąranka:

1. Atidarykite duomenų failą (.pcrd plėtinys).
2. Peržiūrėkite duomenis Data Analysis lango sąselėje Quantitation. Koreguokite duomenis, pvz., slenkstinę vertę ar analizės režimą.
3. Paspauskite **Gene Expression** sąselę.
4. Experiment Settings lango sąselėje **Samples** pasirinkite kontrolę. Priskyrus kontrolę, programinė įranga normalizuoja santykinį kiekį visiems genams pagal kontrolės kiekį, kuris yra nustatytas ties 1.
5. Experiment Settings lango sąselėje Target pasirinkite referentinius genus. Genų ekspresijos analizei reikalinga viena referentinė medžiaga mėginiuose.
6. Pasirinkite **Normalized Expression ($\Delta \Delta C(t)$)** ir Gene Expression sąselėje peržiūrėkite ekspresijos lygius.

Santykinis kiekis

Gene Expression ašelės grafiko parinkčių išskleidžiamajame meniu pasirinkite **Relative Quantity ($\Delta C(t)$)** - prasidės santykinio kiekio analizė ($\Delta C(t)$). Pagal numatytuosius nustatymus, santykinio kiekio ($\Delta C(t)$) duomenys nėra normalizuojami. Šis metodas yra naudojamas kiekybiškumo įvertinimui be referentinių genų (taikinių). Paprastai yra užtikrinama viena šių tyrimo sąlygų:

- Kiekviename mėginyje yra tas pats kiekis šablono, šulinėlyje - galimai ta pati RNR ar cDNA masė.
- Bet koks biologinio mėginio kiekio svyravimas bus normalizuotas po tyrimo naudojant tam tikrą duomenų analizės metodą. Pavyzdžiui, tyrėjas gali padalinti santykinio kiekio vertę pagal normalizavimo faktorių.

Genų ekspresijos duomenų koregavimas

Pasirinkus analizės metodą, Gene Expression ašelėje galite peržiūrėti ir keisti duomenis, keisdami grafiko dešinėje esančias nustatymų parinktis.

GRAFIKO DUOMENYS

Duomenų pateikimo grafike parinktys:

- **Lyginant su kontrole.** Duomenys grafiko ašyje nuo 0 iki 1. Jei tyrime naudojama kontrolė, šioje parinktyje galėsite greitai įvertinti taikinio duomenis.
- **Lyginant su nuliu.** Grafike duomenų pradžia lygi nuliui.

X AŠIES PARINKTYS

X ašies parinktyje galite pasirinkti genų ekspresijos grafiko duomenų rodymo būdus x ašyje:

- **Target (taikiny).** Pasirinkus šią parinktį, taikinių pavadinimai bus rodomi x ašyje.
- **Sample (mėginys).** Pasirinkus šią parinktį, mėginių pavadinimai bus rodomi x ašyje.

Y AŠIES PARINKTYS

Y ašies parinktyje galite pasirinkti genų ekspresijos grafiko duomenų rodymo būdus:

- **Linijinis.** Rodoma linijinė skalė.
- **Log 2.** Mėginių vertinimas plačiose dinaminėse ribose.
- **Log 10.** Mėginių vertinimas labai plačiose dinaminėse ribose.

GRADACIJOS PARINKTYS

Norėdami aktyvuoti gradacijos parinktį genų ekspresijos grafike, pasirinkite **Normalized Gene Expression ($\Delta \Delta C(t)$)**. Pasirinkite vieną šių gradacijos parinkčių duomenų apskaičiavimui ir pateikimui:

- **Negraduota ekspresija.** Pateikiama normalizuota negraduota genų ekspresija.
- **Aukščiausia ekspresija.** Normalizuotos genų ekspresijos gradavimas iki aukščiausio taško kiekvienam taikiniui, atskiriant kiekvieno mėginio ekspresijos lygį pagal aukščiausią visų mėginių ekspresijos lygį. Šioje parinktyje yra naudojama aukščiausios gradacijos formulė.

- **Žemiausia ekspresija.** Normalizuotos genų ekspresijos perskaičiavimas kiekvienam taikiniui, kiekvienam mėginiui išskiriant žemiausią ekspresijos lygį. Šioje parinktyje yra naudojama žemiausios gradacijos formulė.

KLAIDOS TIPAS

Gene Expression grafike pasirinkite klaidos apskaičiavimo tipą (error juostoje):

- Standartinė vidurkio klaida (numatytasis nustatymas, SEMs)
- Standartinė deviacija (Std Dev)

GRAFIKO KLAIDŲ JUOSTOS DAUGIKLIS

Gene Expression grafike pasirinkite klaidos juostos daugiklį: Pasirinkite sveikąjį skaičių: 1 (numatytasis), 2 ar 3. Daugiklio tipas pasikeis, kai pasirinksite klaidos tipą:

- SEMs (standartinė vidurkio klaida)
- Std Dev (standartinė deviacija)

TAIKINIO STABILUMO VERTĖ

Ši langą atidarykite tuomet, kai yra naudojamas daugiau 1 referentinis genas. Programinė įranga referentiniams genams apskaičiuos du kokybės parametrus:

- **Coefficient of Variation (CV) (variacijos koeficientas).** Normalizuotų referentinių genų santykinio kiekio variacijos koeficientą. Žema CV vertė žymi aukštą stabilumą.
- **M-value (M vertė).** Referentinio geno ekspresijos stabilumo matavimą.

Gene Expression grafiko meniu parinktys (atidaromos dešiniuoju pelės klavišu)

Dešiniuoju pelės klavišu atidaromų meniu parinktys aprašytos 23 lentelėje.

23 lentelė. Dešiniuoju klavišu atidaromų meniu parinktys.

Parinktis	Funkcija
Copy	Grafiko kopijavimas į išskarpinę.
Copy as Image	Grafiko vaizdo išsaugojimas vaizdo failo formatu. Numatytasis vaizdo failo formatas yra PNG. Kiti galimi vaizdo failo formatai: GIF, JPG, TIF ir BMP.
Page Setup...	Peržiūra ir lapo nustatymų pasirinkimas spausdinimui.
Print...	Grafiko vaizdo spausdinimas.
Show Point Values	Kiekvieno grafiko taško santykinio kiekybiškumo rodymas (užvedus pelės kursorių ant taško).
Set Scale to Default	Grafiko vaizdo grąžinimas į pirminį vaizdą po padidinimo.
Chart Options...	Grafiko parinkčių atidarymas.
Sort	X ašyje rodomų mėginių ir taikinių eilės tvarkos keitimas.
User Corrected Std Devs	Klaidų apskaičiavimas naudojant koreguotos standartinės deviacijos formulę.
Use Solid Bar Colors	Grafiko juostų paryškinimas.
x-axis labels	X ašies žymų rodymas horizontaliai arba kampu.

Gene Expression (genų ekspresijos) skaičiuoklė

24 lentelėje pateikta Gene Expression skaičiuoklės informacija.

24 lentelė. Gene Expression ąselės skaičiuoklės informacijos aprašymas.

Informacija	Aprašymas
Target	Taikinio pavadinimas (amplifikuotas genas), pasirinktas Experiment Settings lange.
Sample	Mėginio pavadinimas, pasirinktas Experiment Settings lange.
Ctrl	Kontrolinis mėginys, kuomet Sample name yra pasirinktas kaip kontrolė Experiment Settings lange.
Expression	Normalizuota genų ekspresija ($\Delta\Delta C(t)$) ar santykinė kiekybiškumo vertė ($\Delta C(t)$), priklausomai nuo pasirinkto režimo.
Expression SEM (or SD)	Vidutinės ar standartinės deviacijos standartinė klaida, priklausomai nuo pasirinktos parinktės.
Corrected Expression SEM (or SD)	Koreguota ekspresijos vidutinės ar standartinės deviacijos standartinė klaida, priklausomai nuo pasirinktos parinktės.
Mean (C(t))	Slenkstinės vertės ciklo vidurkis.
C(t) SEM (or SD)	Slenkstinės vertės ciklo vidutinės ar standartinės deviacijos standartinė klaida, priklausomai nuo pasirinktos parinktės.

Show Details (išsamios informacijos rodymo) parinktis

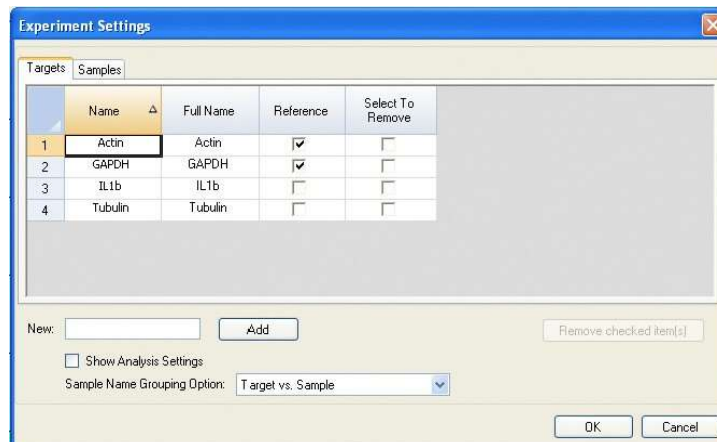
Jei pažymėsite žymimajį laukelį šalia Show Details, bus rodoma 25 lentelėje aprašyta informacija.

25 lentelė. Gene Expression (genų ekspresijos) skaičiuoklės informacija su parinktimi Show Details.

Informacija	Aprašymas
Data Set	Duomenų failo vieno fluoroforo fluorescencijos duomenys.
Relative Quantity	Apskaičiuota santykinė mėginių kiekybiškumo vertė.
Relative Quantity SD	Standartinė apskaičiuotos santykinio kiekybiškumo vertės deviacija.
Corrected Relative Quantity SD	Apskaičiuota standartinė koreguotos santykinio kiekybiškumo vertės deviacija.
Unscaled Expression	Apskaičiuota negraduota ekspresija.
Unscaled Expression SD	Apskaičiuota standartinė negraduotos ekspresijos deviacija.
Corrected Unscaled Expression SD	Koreguota standartinė negraduotos ekspresijos deviacija.
Expression	Santykinis ekspresijos lygis.
Wells	Šulinėlio numeris plokštelėje.

Experiment Settings (tyrimo nustatymų) langas

Experiment Settings langą atidarykite paspausdami Gene Expression sąsėlos mygtuką **Experiment Settings**. Šiame lange galite peržiūrėti ar keisti taikinių ir mėginių sąrašą, pasirinkti referentinius genus, pasirinkti kontrolinius mėginius ar pasirinkti mėginių grupę genų ekspresijos analizei (ilustracija 69).



69 iliustracija. Experiment Settings lango sąsėla Targets.

Naudodami šias funkcijas, galite koreguoti sąsėlių sąrašus:

- Laukelyje **New** įrašykite taikinio ar mėginio pavadinimą ir paspauskite **Add**.
- Taikinį ar mėginį iš sąrašo pašalinti galite pažymėję norimos eilutės laukelį **Select to Remove**, po to - mygtuką **Remove checked item(s)**.
- Jei taikinį norite pasirinkti kaip referentinį genų ekspresijos duomenų analizei, pažymėkite jo eilutės stulpelio **Reference** laukelį.
- Jei taikinį norite pasirinkti kaip kontrolės mėginį genų ekspresijos duomenų analizei, pažymėkite jo eilutės stulpelio **Control** laukelį.

Mėginių grupavimo parinktis

Įrašius pavadinimus šulinėliams, naudojant **Collection Names** funkciją, mėginiai gali būti tiriami viena keturių konfigūracijų, pateikiamų Sample Name Grouping parinktyje. Šias parinktis rasite Experiment Settings sąsėlos išskleidžiamajame meniu.

- **Target vs. Sample.** Genų ekspresijos apskaičiavime bus naudojamas tik šulinėlio mėginio pavadinimas.
- **Target vs. Collection.** Apskaičiavime bus naudojamas tik šulinėlio pavadinimas.
- **Target vs. Sample_Collection.** Apskaičiavime bus naudojama mėginio pavadinimo ir mėginio surinkimo pavadinimo kombinacija.
- **Target vs. Collection_Sample.** Apskaičiavime bus naudojama mėginio surinkimo pavadinimo ir mėginio pavadinimo kombinacija.

Show Analysis Settings (analizės nustatymų rodymo) parinktis Experiment Settings (tyrimo nustatymų) lange.

Jei norite peržiūrėti tyrimo parametrus Gene Expression sąsėlose, pažymėkite laukelį Experiment Settings lango laukelį **Show Analysis Settings**.

- Paspaudę stulpelio **Color** langelį, galite pakeisti Gene Expression diagramos taikinių spalvą.

- Įrašykite taikinio veiksmingumą. Programinė įranga apskaičiuos santykinį taikinio veiksmingumą, naudojant **Auto Efficiency** funkciją, jei į taikinio duomenis yra įtraukta standartinė kreivė. Arba įrašykite anksčiau nustatytą veiksmingumą.

70 iliustracijoje veiksmingumas įrašytas visiems taikiniams (pasirinkus **Auto Efficiency** parinktį).



70 iliustracija. Experiment Settings lango sąsėdės Targets parinktį Analysis Settings.

Mėginio nustatymai Samples sąsėdėje:

- Paspaudę stulpelio **Color** spalvą, galite pakeisti Gene Expression diagramos mėginių spalvą.
- Pažymėjus stulpelio **Show Graph** laukelį, mėginys bus rodomas Gene Expression diagramoje tokia spalva, kokią pasirinkote **Color** stulpelyje.

Genų tyrimas

Sukurkite genų tyrimą ir palyginkite vieno ar kelių tikro laiko PGR tyrimų genų ekspresijos duomenis, naudojant vidinį kalibratorių tyrimų duomenų normalizavimui. Genų tyrimą sukurkite duomenis pridėdami iš vieno ar kelių duomenų failų (.pcrd plėtinys). Programinė įranga duomenis sugrupuos į vieną failą (.mgxd plėtinys).

PASTABA. Kiekviename duomenų faile genų ekspresijoje turi būti bendrasis mėginys. Programinė įranga bendrąjį mėginį naudoja tyrimų duomenų normalizavimui. Experiment Settings lange pasirinkite mėginių pavadinimus (psl. 38).

PASTABA. Maksimalus genų tyrime analizuojamų mėginių skaičius priklauso nuo kompiuterio RAM ir virtualios atminties dydžio.

Genų tyrimo vidinis kalibravimas

Visi genų tyrimo duomenys yra normalizuojami vidine kalibracija, taip apskaičiuojant mažiausią vidutinę $\Delta C(t)$ vertę. Jei genų tyrime yra naudojamas daugiau nei vienas kalibratorius, yra atsižvelgiama į mažiausios vidutinės vertės $\Delta C(t)$ kalibratorių. Šis kalibratorius yra naudojamas visų $C(t)$ verčių nustatymui.

Pagrindinio vidinio kalibratoriaus nustatymui, programinė įranga apskaičiuoja $\Delta C(t)$ verčių vidurkį visiems taikinio (geno) kalibratoriams, tuomet pritaiko daugiapakopį algoritmą ir nustato pagrindinį vidinį kalibratorių visiems duomenims. Pagrindinio vidinio kalibratoriaus nustatymo algoritmo hierarchija:

1. Pagrindinio kalibratoriaus nustatymas taikiniui su didžiausiu bendrų kartotinių grupių skaičiumi, lyginant grupių poras.
2. Jei taikinyje turi tokį pat bendrų kartotinių skaičių, pagrindinis taikinio kalibratorius nustatomas pagal mažiausias $\Delta C(t)$ vertės ribas porų palyginime. Ribos yra nustatomos lyginant taikinio kalibratoriaus absoliučią minimalios ir maksimalios vertės skirtumą.
3. Jei taikinio ribos yra identiškos $\Delta C(t)$ vertei, pagrindinis kalibratorius yra nustatomas pagal taikinį su mažiausia absoliučia vidutine $\Delta C(t)$ verte.
4. Jei taikinio vidutinė vertė yra identiška $\Delta C(t)$ absoliučiai vertei, pagrindinis kalibratorius yra nustatomas pagal kartotinių grupę su mažiausia $\Delta C(t)$ verte.

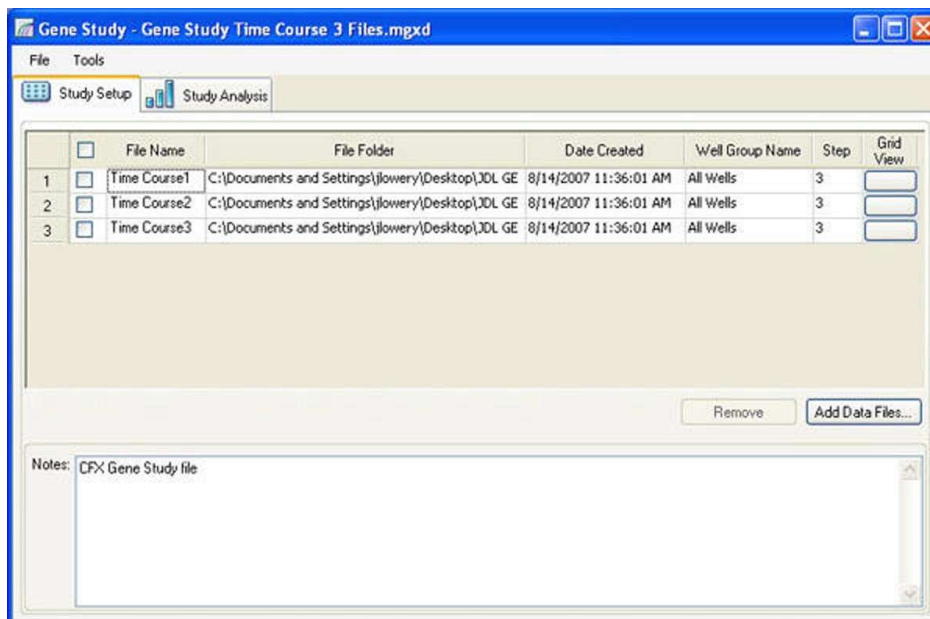
PASTABA. Pirmasis į genų tyrimo langą importuotas failas yra naudojamas kaip pagrindinis failas duomenų porų lyginimui vidinės kalibracijos metu.

Gene Study (genų tyrimo) langas

Gene Study lango sąselės

- **Study Setup (tyrimo sąrankos) sąselė.** Genų tyrimo sąrankos atlikimas. Duomenų failų pridėjimas ar pašalinimas nepakeis originalių failo duomenų.
- **Study Analysis (tyrimo analizės) sąselė.** Šioje sąselėje galite peržiūrėti sudėtinių tyrimų genų ekspresijos duomenis.

71 iliustracijoje pavaizduotas Gene Study langas.



71 iliustracija. Gene Study langas.

Study Setup (tyrimo sąrankos) sąsė

Prieš duomenų importavimą genų tyrimui, Data Analysis lange atlikite šiuos veiksmus:

- Patikrinkite, ar to paties turinio mėginiai yra pavadinti tuo pačiu pavadinimu. Genų tyrimo metu, šulinėlius su tuo pačiu taikinio ar mėginio pavadinimu programinė įranga atpažįsta kaip šulinėlius su tuo pačiu mėginiu.
- Quantitation sąsėlėje nustatykite bazinę liniją ir slenkstinę vertę ($C(t)$), kad optimizuotumėte kiekvieno tyrimo duomenis prieš juos įtraukiant į genų tyrimą.
- Pasirinkite šulinėlių grupes, kurias norite įtraukti į genų tyrimą.

Study Setup sąsėlėje (71 iliustracija) yra rodomas genų tyrimo sąrašas.

- **Tyrimo pridėjimas.** Paspauskite mygtuką **Add Data Files** ir naršyklės lange pasirinkite failą. Tyrimus galite pridėti greitesniu būdu - tiesiog nutempkite failus (.pcrd ekstencija) į Gene Study langą.
- **Tyrimų pašalinimas iš genų tyrimo.** Pasirinkite vieną ar daugiau failų ir paspauskite **Remove**.
- **Pastabų įrašymas.** Notes laukelyje galite įrašyti pastabas ir komentarus apie genų tyrimo failus ir analizę.

Study Setup sąsėlėje yra pateikiami genų tyrimo duomenų failai, kaip aprašyta 26 lentelėje.

26 lentelė. Gene Study lango sąsėlė Study Setup.

Stulpelio pavadinimas	Aprašymas
File Name	Tyrimo duomenų failo (.pcrd plėtinys) pavadinimas.
File Folder	Genų tyrimų duomenų failų išsaugojimo direktorija.
Date Created	Tiriamų duomenų gavimo data.
Well Group Name	Pasirinktos šulinėlių grupės pavadinimas. PATARIMAS. Jei genų tyrime norite analizuoti vieną šulinėlių grupę, šią grupę Data Analysis lange pasirinkite prieš duomenų failo importavimą.
Step	Protokolo etapas su plokštelės nuskaitymu tikro laiko PGR duomenų gavimui.
Grid View	Plokštelės vaizdas su kiekvieno tyrimo duomenimis.

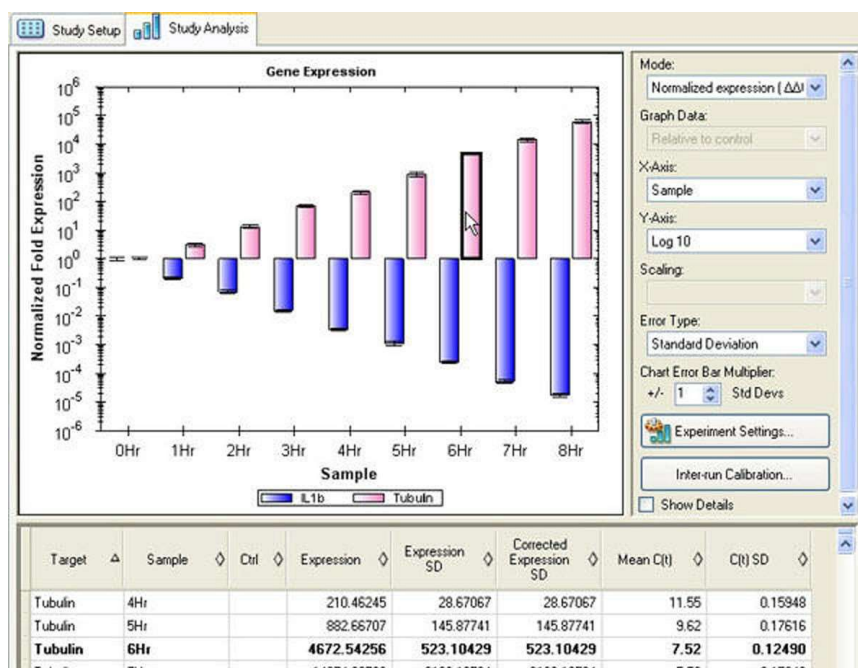
Study Analysis (tyrimo analizės) sąsė

Study Analysis sąsėlėje yra rodomi visų genų tyrimų duomenys. Atverkite šią sąsėlę ir pasirinkite norimas genų ekspresijos grafiko parinktis:

- **Mode (režimas).** Pasirinkite **Normalized Expression ($\Delta \Delta C(t)$)** ar **Relative Quantity ($\Delta C(t)$)**.
- **Graph Data (grafiko duomenys).** Pasirinkite **Relative to normal** ar **Relative to control**.
- **x-axis options (x ašies parinktys).** Pasirinkite grafiko x ašies žymą, įskaitant mėginį ar taikinį.
- **y-axis options (y ašies parinktys).** Keiskite grafiko y ašies žymą, įskaitant linijinę parinktį, Log 2 ar Log 10.
- **Scaling Options (gradacijos parinktys).** Pasirinkite **Highest** vertę, **Lowest** vertę arba palikite parinktį **Unscaled**. Ši parinktis yra galima tik tuomet, kai mėginiuose nėra kontrolės.

- **Graph Error (grafiko klaida).** Pasirinkite grafiko standartinės deviacijos juostų daugiklį, įskaitant ± 1 , 2 ar 3.
- **Experiment Settings (tyrimo nustatymų) mygtukas.** Taikinių ir mėginių parinkčių rodymas Experiment Settings lange.
- **Show Details (išsamios informacijos rodymo) žymimasis laukelis.** Paspauskite **Show Details** ir prie grafiko pridėkite daugiau duomenų stulpelių.

Pažymėjus mėginį Gene Expression grafike, bus pažymėtas atitinkamas skaičiuoklės langelis (ilustracija 72).



72 iliustracija. Gene Study lango ašelė Study Analysis.

Gene Study Data (genų tyrimo duomenų) skaičiuoklė

Gene Study lango duomenų skaičiuoklėje pateikiama informacija apie kiekvieną genų tyrimo taikinį ir mėginį (ilustracija 72).

27 lentelėje pateikta Gene Study skaičiuoklės informacija.

27 lentelė. Study Analysis ašelės skaičiuoklės informacijos aprašymas.

Informacija	Aprašymas
Target	Taikinio pavadinimas (amplifikuotas genas), pasirinktas Experiment Settings lange.
Sample	Mėginio pavadinimas, pasirinktas Experiment Settings lange.
Ctrl	Kontrolinis mėginys, kuomet Sample Name yra pasirinktas kaip kontrolė Experiment Settings lange.
Expression	Normalizuota genų ekspresija ($\Delta\Delta C(t)$) ar santykinė kiekybiškumo vertė ($\Delta C(t)$), priklausomai nuo pasirinkto režimo.
Expression SEM (or SD)	Vidutinės ar standartinės deviacijos standartinė klaida, priklausomai nuo pasirinktos parinktės.

27 lentelė. Study Analysis ąselės skaičiuoklės informacijos aprašymas (tęsinys)

Informacija	Aprašymas
Corrected Expression SEM (or SD)	Koreguota ekspresijos vidutinės ar standartinės deviacijos standartinė klaida, priklausomai nuo pasirinktos parinkties.
Mean (C(t))	Slenkstinės vertės ciklo vidurkis.
C(t) SEM (or SD)	Slenkstinės vertės ciklo vidutinės ar standartinės deviacijos standartinė klaida, priklausomai nuo pasirinktos parinkties.

Show Details Data (išsamios informacijos rodymo) parinktis

Pažymėjus Show Details žymimąjį laukelį, bus rodoma papildoma informacija. Skaičiuoklės informacija bus papildyta stulpeliuose, aprašytuose 28 lentelėje.

28 lentelė. Papildoma informacija, pasirinkus Show Details parinktį.

Informacija	Aprašymas
Data Set	Duomenų failo vieno fluoroforo fluorescencijos duomenys.
Relative Quantity	Apskaičiuota santykinė mėginių kiekybiškumo vertė.
Relative Quantity SD	Standartinė apskaičiuotos santykinio kiekybiškumo vertės deviacija.
Corrected Relative Quantity SD	Apskaičiuota standartinė koreguotos santykinio kiekybiškumo vertės deviacija.
Unscaled Expression	Apskaičiuota negraduota ekspresija.
Unscaled Expression SD	Apskaičiuota standartinė negraduotos ekspresijos deviacija.
Corrected Unscaled Expression SD	Koreguota standartinė negraduotos ekspresijos deviacija.
Expression	Santykinė ekspresija.
Wells	Šulinėlio numeris plokštelėje.

Gene Study Report (genų tyrimo ataskaitos) langas

Gene Study Report lange galite sugeneruoti genų tyrimo duomenų ataskaitą. Norėdami sukurti genų tyrimo ataskaitą, atlikite šiuos veiksmus:

1. Prieš kuriant ataskaitą, nustatykite norimus ataskaitos duomenis ir grafikus.
2. Atidarykite Gene Study ataskaitos langą pasirinkdami **Tools > Reports**.
3. Pažymėkite žymimuosius laukelius ataskaitos parinkčių sąraše, jei norite pasirinkti ar pašalinti parinktis.
4. Jei norite atnaujinti keitimus ataskaitos peržiūros polangyje, spauskite mygtuką **Update Report**.
5. Išsaugokite arba atspausdinkite ataskaitą. Paspaudę įrankių juostos mygtuką **Print**, ataskaitą atspausdinsite. Jei ataskaitą norite išsaugoti PDF (Adobe Acrobat Reader file), MHT (Microsoft document) ar MHTML (Microsoft document) formatu, pasirinkite **File > Save** ir pasirinkite išsaugojimo paskirties vietą. Jei ataskaitą norite išsaugoti nauju pavadinimu ar naujoje paskirties vietoje, pasirinkite **File > Save As**.

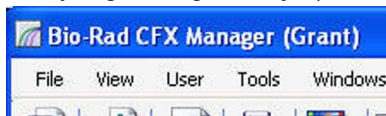
10 Naudotojo nuostatos

Šiame skyriuje pateikiama informacija apie programinės įrangos naudotojų paskyras ir jų nuostatas:

- Prisijungimas arba naudotojo paskyros pasirinkimas (psl. 89)
- Naudotojo paskyros nuostatų langas (psl. 90)
- E. pašto pranešimų konfigūravimas (psl. 91)
- Naudotojų paskyrų administravimas (psl. 95)

Prisijungimas arba naudotojo paskyros pasirinkimas

CFX Manager™ programinėje įrangoje galima sukurti kelias naudotojų paskyras ir pasirinkti atitinkamas jų nuostatas. Programinėje įrangoje prisijungusio naudotojo paskyros pavadinimas yra rodomas pagrindinio programinės įrangos lango viršuje (73 iliustracija).



73 iliustracija. Naudotojo paskyros pavadinimas.

CFX Manager programinė įranga pateikia prisijungimo dialogo langą (74 iliustracija). Įjungus programinę įrangą, automatiškai yra atidaromas prisijungimo dialogo langas (jei User Administration lange yra nustatytos dvi ar daugiau naudotojų paskyrų).



74 iliustracija. Prisijungimo dialogo langas.

Jei norite prisijungti programinėje įrangoje ar pakeisti paskyrą, atlikite šiuos veiksmus:

1. Atidarykite Login dialogo langą (jei neatidarytas), paspausdami įrankių juostos mygtuką **Select User** arba meniu juostoje pasirinkdami **User > Select User**.
2. Išskleidžiamajame **User Name** sąrašė pasirinkite paskyros pavadinimą. Numatytasis nustatymas yra "Admin" (administratorius).
3. **Password** laukelyje įrašykite slaptažodį.
4. Paspaudus **OK**, dialogo langas užsidarys ir atsidarys programinės įrangos langas.

5. Jei norite pridėti naują paskyrą ir slaptažodį, susisiekit su savo programinės įrangos administratoriumi.

Slaptažodžio keitimas

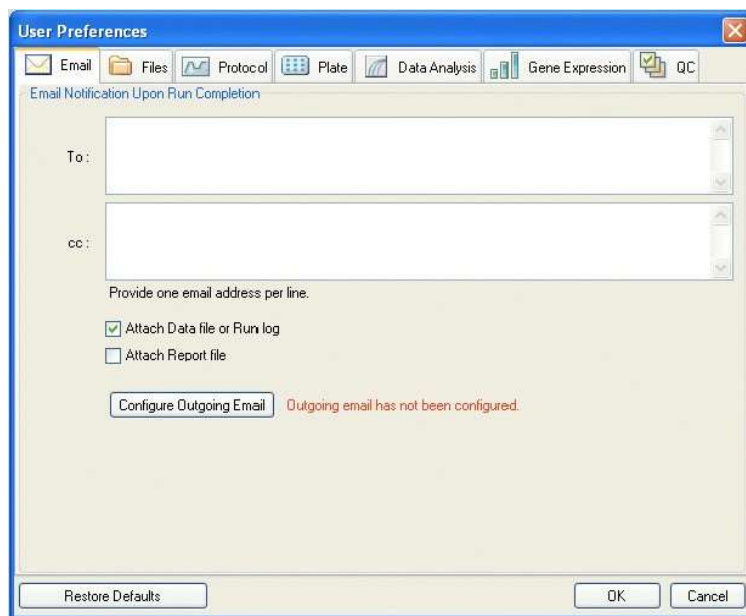
Jei norite pakeisti slaptažodį, atlikite šiuos veiksmus:

1. Pagrindiniame programinės įrangos lange pasirinkite **User > Change Password**. Atsidarys Change Password dialogo langas.
2. Old Password laukelyje įrašykite senąjį slaptažodį.
3. New Password ir Confirm New Password laukeliuose įrašykite naują slaptažodį.
4. Norėdami patvirtinti keitimą, spauskite **OK**.

User Preferences (naudotojo paskyros nuostatų) langas

CFX Manager programinė įranga atsimena kiekvieno prisijungusio naudotojo paskyros nuostatas. Jei norite keisti nuostatas, atidarykite User Preferences langą atlikdami vieną šių veiksmų:

- Paspauskite pagrindinio programinės įrangos lango įrankių juostos mygtuką **User Preferences**.
- Pagrindinio programinės įrangos lango meniu juostoje pasirinkite **User > User Preferences**.
- Lango ašelėse (75 iliustracija) peržiūrėkite ar keiskite nuostatas.



75 iliustracija. User Preferences lango ašelės.

Email (e. pašto) ašelė

Pasirinkę ašelę **Email** (75 iliustracija), galėsite įrašyti elektroninio pašto adresą, kuriuo bus siunčiama informacija apie tyrimo vykdymo užbaigimą. Programinė įranga taip pat gali siųsti prisegtus duomenų failus ar ataskaitų failus, jei šios funkcijos yra įgalintos (pažymint žymimuosius parinkčių laukelius).

E. pašto pranešimų konfigūravimas

Paspaudus mygtuką **Configure Outgoing Email**, atsidarys Options langas (76 iliustracija), kuriame galėsite sukonfigūruoti SMTP serverį ir nusiųsti elektroninį testavimo laišką iš kompiuterio. Įrašykite duomenis:

- **SMTP Server Name.** SMTP serverio pavadinimas.
- **Port.** Jūsų SMTP serverio prievado numeris (paprastai 25).
- **Use SSL.** Secure Sockets Layer naudojimas. Kai kurie SMTP serveriai reikalauja šios funkcijos naudojimo.
- **Use Default "From" Address.** Numatytasis nustatymas, kurio galite nekeisti. Kai kurie SMTP serveriai reikalauja, jog visi išsiųsti laiškai turėtų tam tikro domeno, iš kurio yra siunčiami, adresą, pvz., <pavardė>@JūsųKompanija.com. Tokiu atveju, šio laukelio nežymėkite, o e. pašto adresą įrašykite laukelyje "From" Address.
- **Authentication Required.** Daugelis SMTP serverių reikalauja autentifikacijos. Tokiu atveju, pažymėkite šį laukelį ir įrašykite naudotojo paskyros pavadinimą bei slaptažodį.
- **Test email.** Elektroninio pašto nustatymų patikrinimui, į laukelį **Test Email Address** įrašykite vieną ar daugiau elektroninio pašto adresų. Elektroninio pašto adresus atskirkite kableliu. Tuomet paspauskite klavišą **Test Email**.

76 iliustracija. Elektroninio pašto konfigūravimo parinktys.

PASTABA. Kai kurie SMTP serveriai neleidžia siųsti priedų, kai kurie leidžia siųsti tik tam tikro dydžio priedus. Jei duomenų failų ir ataskaitų siuntimui naudosite CFX Manager programinę įrangą, patikrinkite serverio galimybę siųsti priedus - pažymėkite Test Attachment žymimąjį laukelį ir priedo dydį pakeiskite į 5 ar daugiau megabitų (MB).

Files (failų) ašelė

Files ašelėje pateikiamos numatytosios failų atidarymo ir išsaugojimo paskirties vietos. Paspaudę mygtuką "...", atidarysite naršyklę su aplankais.

- **Default Folder for File Creation (numatytojo aplanko kūrimas failams).** Pasirinkite numatytąjį aplanką, kuriame norite išsaugoti naujus failus. Pasirinkite kiekvieno failo tipo (protokolo, plokštelės, duomenų ar genų tyrimo) paskirties vietą.

- **File Selection for Experiment Setup (failo pasirinkimas tyrimo sąrankai).** Pasirinkite numatytuosius protokolo ir plokštelės failus, kurie yra rodomi Experiment Setup lange.
- **Data File Prefix (duomenų failo prefiksas).** Nustatykite failo ar duomenų failų pavadinimo teksto pradžią.

Protocol (protokolo) sąselė

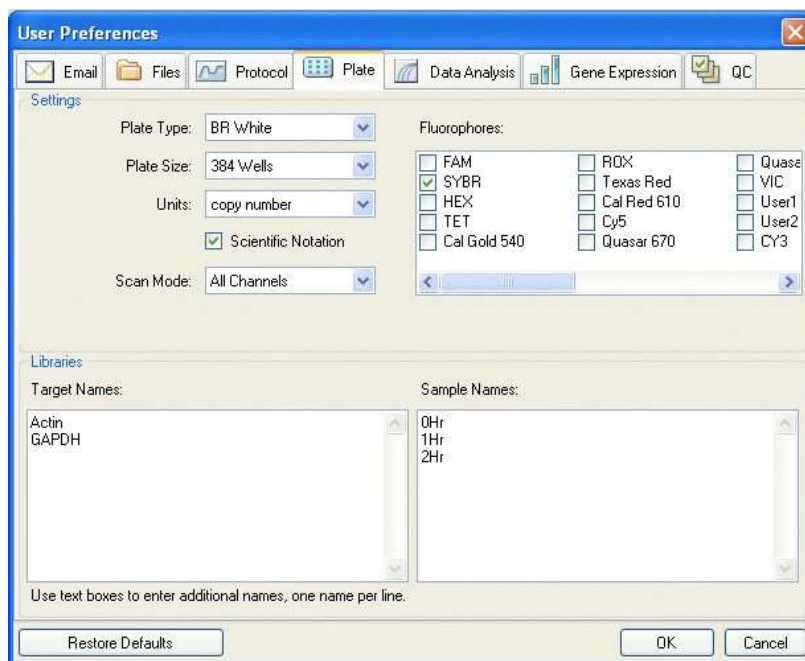
Jei norite pasirinkti numatytuosius nustatymus naujam protokolui, pakeitimus įrašykite **User Preferences** lango **Protocol** sąselėje:

- **Protocol Editor (protokolo redagavimo) parinktis.** Pasirinkite Protocol Editor lange rodomus numatytuosius nustatymus. Pasirinkite numatytąjį mėginių tūrį šulinėliuose ir dangčio temperatūrą.
- **Protocol AutoWriter (automatinio protokolo užpildymo) parinktis** Pasirinkite Protocol AutoWriter lange rodomus numatytuosius nustatymus.

Plate (plokštelės) sąselė

Jei norite pasirinkti numatytuosius nustatymus naujam plokštelės failui, **User Preferences** lange pasirinkite sąselę **Plate**:

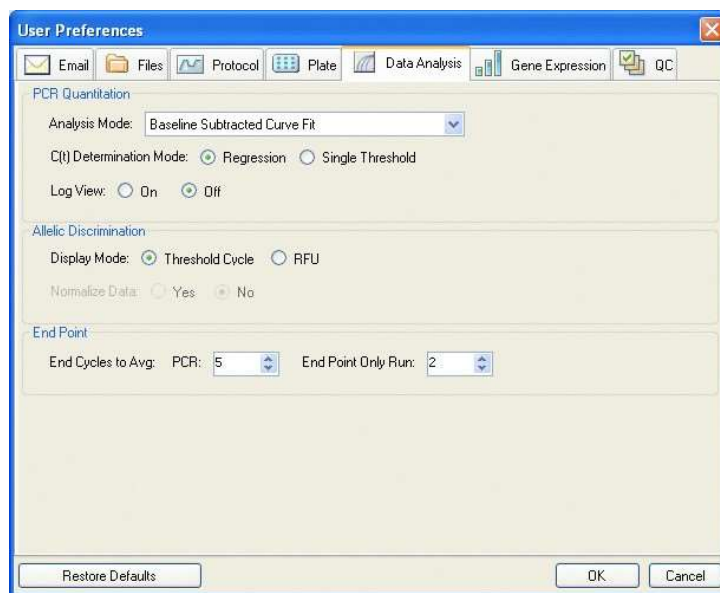
- **Plate Type (plokštelės tipas).** Pasirinkite numatytąjį plokštelės tipą.
- **Plate Size (plokštelės dydis).** Pasirinkite numatytąjį plokštelės dydį.
- **Units (vienetai).** Pasirinkite šulinėlių su standartais pradžios šablono koncentracijos vienetus.
- **Scientific Notation (mokslinis žymėjimas).** Pažymėjus šį laukelį galėsite peržiūrėti koncentracijos žymėjimo vienetus.
- **Scan Mode (nuskaitymo režimas).** Pasirinkite numatytąjį nuskaitymo režimą.
- **Fluorophores (fluoroforai).** Pasirinkite fluoroforus, pažymėdami žymimuosius laukelius šalia numatytųjų fluoroforų Plate Editor lange.
- **Libraries (bibliotekos).** Įrašykite tirtų taikinių ir mėginio pavadinimus. Šie pavadinimai bus rodomi Experiment Settings lango Targets ir Samples sąselėse.



77 iliustracija. User Preferences lango sąselė Plate.

Data Analysis (duomenų analizės) sąsė

Pasirinkite User Preferences lango sąsė **Data Analysis** ir pakeiskite numatytuosius duomenų nustatymus.



78 iliustracija. User Preferences lango sąsė Data Analysis.

Pasirinkite kiekybinių duomenų nustatymus:

- **Analysis Mode.** Pasirinkite numatytąjį analizės režimo bazinės linijos metodą. Pasirinkite Baseline Subtracted Curve Fit, No Baseline Subtraction ar Baseline Subtracted.
- **C(t) Determination Mode.** Regression ar Single Threshold režimo C(t) verčių apskaičiavimui kiekvienai fluorescencijos kreivei pasirinkimas.
- **Log View.** Pasirinkus parinktį **On**, bus rodoma pusiau logaritminis amplifikacijos duomenų grafikas. Pasirinkus **Off**, bus rodomas linijinis grafikas.

Pasirinkite alelinės diskriminacijos duomenų nustatymus:

- **Display Mode.** Pasirinkus parinktį **RFU**, duomenys bus rodomi kaip RFU grafikas, pasirinkus **Threshold Cycle** - kaip slenkstinių verčių ciklų grafikas.
- **Normalize Data.** Ši parinktis yra galima tik pasirinkus RFU parinktį. Pasirinkus **No**, bus rodomi nenormalizuoti duomenys. Pasirinkus **Yes**, duomenys bus normalizuoti pagal kontrolinį mėginį.

Pasirinkite galutinio taško duomenų nustatymus: Pasirinkite galutinių ciklų skaičių galutinio taško apskaičiavimui:

- **PCR.** Įrašykite PGR ciklų skaičių kiekybiškumo duomenų apskaičiavimui (numatytasis nustatymas yra 5).
- **End Point Only Run.** Įrašykite galutinio taško ciklų skaičių galutinio taško duomenų apskaičiavimui (numatytasis nustatymas yra 2).

Gene Expression (genų ekspresijos) sąsė

Jei norite pasirinkti numatytuosius nustatymus naujam genų ekspresijos duomenų failui, pasirinkite **User Preferences** lango sąsė **Gene Expression**:

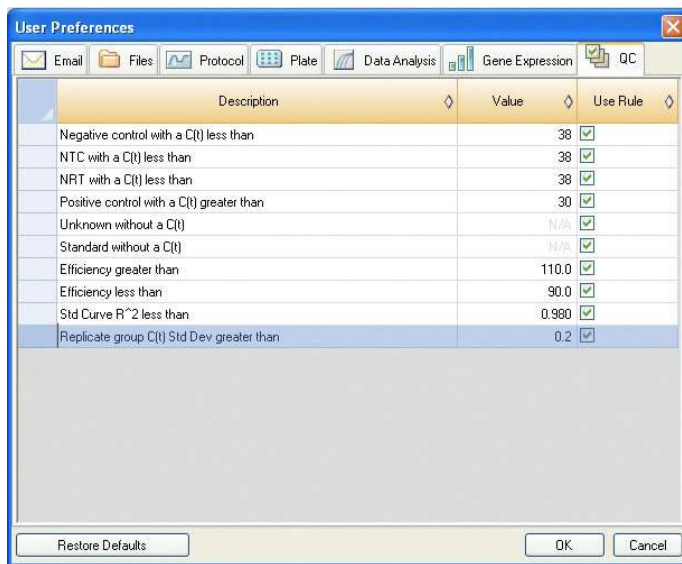
- **Relative to.** Pasirinkite kontrolę arba nulį. Genų ekspresijos duomenų rodymui nuo 1 (lyginant su kontrole), pasirinkite parinktį **Control**. Kuomet priskiriate kontrolinį mėginį

Experiment Setup lange, duomenis programinė įranga automatiškai apskaičiuoja pagal kontrolę. Pasirinkus parinktį **Relative to zero**, programinė įranga ignoruos kontrolę. Tai yra numatytasis nustatymas, kuomet Experiment Settings lange nėra priskiriamas kontrolinis mėginys.

- **X-Axis.** Pasirinkus šią parinktį, mėginys ar taikiny bus rodomas x ašyje.
- **Y-Axis.** Keiskite grafiko y ašies žymas, įskaitant linijinę parinktį, Log 2 ar Log 10.
- **Scaling.** Pasirinkite grafiko gradacijos parinktį. Arba pasirinkite negraduotą grafiką. Galite pasirinkti gradavimą iki aukščiausios arba žemiausios vertės.
- **Method.** Pasirinkite numatytąjį analizės režimą, įskaitant normalizuotos ekspresijos ($\Delta \Delta Ct$) ar santykinės ekspresijos (ΔCt) režimus.
- **Error Bar.** Pasirinkite Std Dev. standartinei deviacijai ar Std. Error Mean - standartinei vidutinės vertės klaidai.
- **Std Devs.** Pasirinkite standartinės deviacijos daugiklį klaidų juostoms. Numatytasis nustatymas yra 1. Daugiklio reikšmę galite keisti į 2 ar 3.

QC (kokybės kontrolės) sąsė

User Preferences lango sąsėje **QC** nurodykite KK taisykles, kurios bus taikomos duomenų analizės modulyje duomenims. Programinė įranga duomenis validuoja pagal įgalintus tyrimus ir priskirtas vertes (psl. 94).



79 iliustracija. User Preferences lango sąsė QC.

Nurodykite ribines vertes ir įgalinkite KK taisykles:

- Negative control with a C(t) less than XX (neigiama kontrolė su C(t), mažesne nei XX). Įrašykite C(t) ribinę vertę.
- NTC (no template control) with a C(t) less than XX (NTC (be šablono kontrolės) su C(t), mažesne nei XX). Įrašykite C(t) ribinę vertę.
- NRT (no reverse transcriptase control) with a C(t) less than XX (NRT (be atvirkštinės transkriptazės kontrolės) su C(t), mažesne nei XX). Įrašykite C(t) ribinę vertę.
- Positive control with a C(t) greater than XX (teigiama kontrolė su C(t), didesne už XX). Įrašykite C(t) ribinę vertę.
- Unknown without a C(t) (nežinoma be C(t)).
- Standard without a C(t) (standartinė be C(t)).
- Efficiency greater than XX (veiksmingumas didesnis už XX). Įrašykite reakcijos veiksmingumo ribinę vertę, apskaičiuojamą standartinei kreivei.

- Efficiency less than XX (veiksmingumas mažesnis nei XX). Įrašykite reakcijos veiksmingumo ribinę vertę, apskaičiuojamą standartinei kreivei.
- Std Curve R² less than XX (standartinė kreivė R² mažesnė nei XX). Įrašykite standartinės kreivės ribinę R² vertę.
- Replicate group C(t) Std Dev greater than XX (kartotinių grupės C(t) standartinė deviacija didesnė už XX). Įrašykite ribinę standartinės deviacijos, kuri bus apskaičiuojama kiekvienai kartotinių grupei, vertę.

Naudotojų paskyrų administravimas

Pagrindiniame programinės įrangos lange atidarykite User Administration langą:

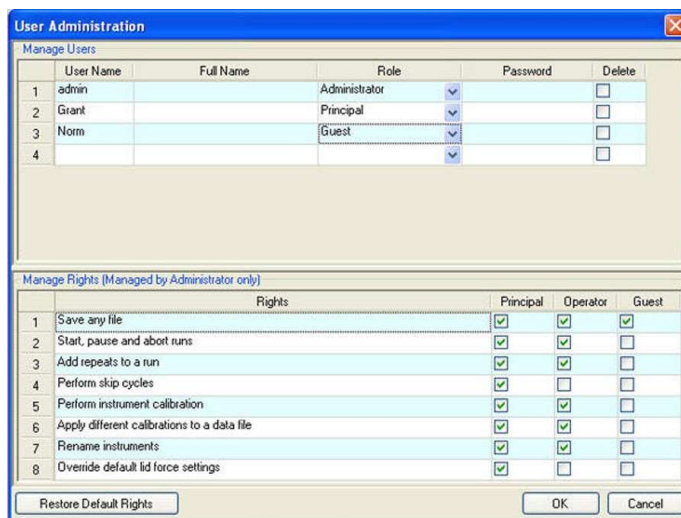
- Pasirinkite **Users > User Administration**.
- Paspauskite meniu juostos mygtuką **User Administration**.

Jei prisijungėte kaip administratorius, atidarykite User Administration langą ir nustatykite naudotojų paskyrų parinktis bei naudotojų teises:

- **Manage Users (naudotojų paskyrų tvarkymas)**. Pridėkite arba pašalinkite naudotojų paskyras, priskirkite naudotojams teises.
- **Manage Rights (naudotojų paskyrų teisių tvarkymas)**. Keiskite naudotojų paskyrų teises (Principal, Operator ar Guest).

PASTABA. Šio lango nustatymus keisti gali tik administratoriaus teises turintis naudotojas. Kiti naudotojai šią informaciją gali tik peržiūrėti.

Naudotojo teises pasirinkite iš User Administration lango sąrašo (ilustracija 80). Šiame pavyzdyje Guest tipo naudotojui yra suteikta teisė išsaugoti failus.



80 iliustracija. User Administration langas su trimis naudotojais.

Programinės įrangos naudotojų paskyrų pridėjimas ir šalinimas

Pridėti ar šalinti paskyras gali tik administratoriaus teises turintis naudotojas. Naujų programinės įrangos naudotojų paskyrų pridėjimas Manage Users polangyje:

1. Įrašykite naują naudotojo vardą (User Name).
2. Nustatykite naudotojo tipą. Kiekvienas naudotojo tipas turi skirtingas teises. Pradinis nustatymas yra Principal.
3. Galite įrašyti naudotojo vardą ir pavardę (Full Name) ir slaptažodį (Password).
4. Paspaudus **OK**, bus rodomas dialogo langas su klausimu, ar tikrai norite uždaryti langą.
5. Paspaudus **Yes**, dialogo langas bus uždarytas.

Jei norite pašalinti programinę įrangos naudotojo paskyrą, atlikite šiuos veiksmus:

1. Manage Users polangio stulpelyje Delete pažymėkite žymimąjį laukelį kiekvienai naudotojo paskyrai, kurią norite pašalinti.
2. Paspaudus **OK**, bus rodomas dialogo langas su klausimu, ar tikrai norite uždaryti langą.
3. Paspaudus **Yes**, dialogo langas bus uždarytas.

PASTABA. Programinės įrangos naudotojų sąrašas visuomet privalo būti viena Administrator paskyra.

Naudotojų paskyrų teisių priskyrimas

User Administration lange galite nustatyti naudotojų tipus ir jiems priskirti atitinkamas teises.

Yra šie keturi naudotojų tipai:

- **Administrator (būtina).** Administrator tipo naudotojas turi visas teises. Šių teisių keisti negalima. Administrator tipo naudotojas gali pridėti ar pašalinti naudotojų paskyras bei keisti kiekvieno naudotojo tipo teises.
- **Principal.** Pagal numatytuosius nustatymus, Principal tipo naudotojas turi visas teises.
- **Operator.** Pagal numatytuosius nustatymus, Operator tipo naudotojas turi visas teises, išskyrus ciklą praleidimą ir genų tyrimo kūrimą.
- **Guest.** Pagal numatytuosius nustatymus, Guest tipo naudotojas gali tik skaityti failus.

Jei norite priskirti tam tikras teises naudotojams, atlikite žemiau aprašytus veiksmus. Bet kurio naudotojo tipo teises keisti gali tik administratoriaus teises turintis naudotojas.

1. Manage Rights polangyje pažymėkite žymimąjį laukelį šalia naudotojo tipo pavadinimo. Pasirinkite vieną ar daugiau teisių iš sąrašo. Jei norite pakeisti visas visų naudotojų tipų teises į numatytąsias, pasirinkite parinktį **Restore Default Rights**.
2. Paspaudus **OK**, bus rodomas dialogo langas su klausimu, ar tikrai norite uždaryti langą.
3. Paspaudus **Yes**, dialogo langas bus uždarytas.

Norėdami peržiūrėti esamus naudotojų tipus ir jų teises, pasirinkite **Users > User**

Administration. Jei norite modifikuoti User Administration lango naudotojų paskyrų nustatymus, teises ir tipus, susisieki su programinės įrangos administratoriumi. Principal, Operator ar Guest tipo naudotojai gali peržiūrėti tik jiems suteiktas teises ir nustatymus.

11 Šaltiniai

Šiame skyriuje pateikiama informacija apie CFX96™ sistemos šaltinius:

- Kalibracijos vediklis (97 psl.)
- Instrumento priežiūra (psl. 99)
- Programos įvykių žurnalas (psl. 101)
- Trikčių paieška ir šalinimas (psl. 101)
- Techninės specifikacijos (psl. 104)
- Literatūros nuorodos (psl. 105)

Kalibracijos vediklis

CFX96 sistema yra gamykliškai sukalibruota bendrai naudojamiems fluoroforams (29 lentelė).

29 lentelė. Gamykliškai sukalibruoti fluoroforai ir kanalai

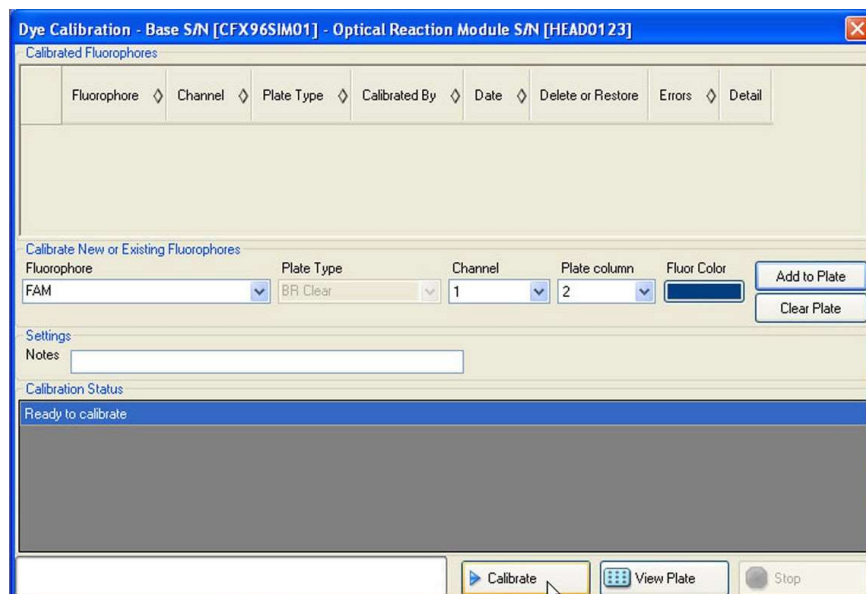
Fluoroforai	Kanalas
FAM, SYBR® Green I	1
VIC, HEX, TET, CAL Gold Fluor 540	2
ROX, Texas Red, CAL Fluor Red 610	3
Cy5, Quasar 670	4
Quasar 705	5

CFX96 sistemoje taip pat yra kanalas, skirtas FRET chemijai; šiam kanalui nereikia specifinių dažų kalibravimo.

Atidarykite kalibracijos vediklio langą:

1. Detected Instruments polangyje pasirinkite instrumentą.
2. Pasirinkite **Tool > Calibration Wizard** ir kalibruokite naujas dažų ir plokštelių kombinacijas (ilustracija 81).

81 iliustracijoje pateikiamas Dye Calibration lango pavyzdys.



81 iliustracija. Dye Calibration langas.

CFX96 sistemos kalibravimas

CFX96 sistemos kalibravimas Dye Calibration lange:

1. Calibrate New ar Existing Fluorophores polangio išskleidžiamajame meniu pasirinkite fluoroforus, kuriuos norite kalibruoti. Jei sąrašė nėra reikiamo fluoroforo pavadinimo, laukelyje įrašykite naujo fluoroforo pavadinimą.
2. Pasirinkite plokštelės tipą. Jei sąrašė nėra reikiamo plokštelės tipo, laukelyje įrašykite naujo tipo pavadinimą.
3. Pasirinkite fluoroforo kanalą.
4. Norėdami pridėti fluoroforą, spauskite **Add to Plate**. Jei norite pašalinti visus plokštelės fluoroforus, spauskite **Clear Plate**.
5. Jei norite pridėti daugiau fluoroforų, pakartokite 1-6 veiksmus.
6. Po fluoroforų pridėjimo, paspauskite **View Plate**. Atsidarys Dye Plate Display langas. Šio lango informacija palengvins dažų įkėlimą.
7. Paruoškite 96 šulinėlių plokštelę dažų kalibravimui. Į kiekvieną šulinėlį dozuokite dažų tirpalą, laikydamiesi Pure Dye Plate Display lange pateikto šablono. Kiekvienam fluoroforui 4 šulinėlius užpildykite 50 µl (96 šulinėlių plokštelėje) 300 nM dažų tirpalo. Atkreipkite dėmesį, kad mažiausiai pusė plokštelės šulinėlių lieka tušti.
8. Užsandarinkite plokštelę.
9. Kalibravimo plokštelę įdėkite į bloką ir uždarykite dangtį. Paspauskite **Calibrate** ir **OK**.
10. Kuomet CFX Manager™ programinė įranga užbaigs kalibracijos vykdymą, ekrane pasirodys dialogo langas. Kalibravimo užbaigimui paspauskite **Yes**. Atsidarys Dye Calibration Viewer langas.
11. Paspaudus **OK**, langas uždarys.

Instrumento priežiūra

CFX96 sistemoje yra jautri optinė sistema ir mėginių blokas, kuris turi labai greitai įkaisti ir atvėsti. Šių komponentų užterštumas gali interferuoti termociklus ir duomenų atpažinimą.

ĮSPĖJIMAS! Niekomet nevykdysite reakcijos neuždarydę dangčio, ar jei yra matomas pratekėjimas. Reagentai gali išsilieti ant bloko dangos, vidinio dangčio paviršiaus ir optinės sistemos galvutės. Teršalai gali slopinti signalą, o fluorescencijos užterštumas gali sustiprinti foninį signalą. Optinę sistemą valyti gali tik kvalifikuoti Bio-Rad inžinieriai.

Venkite CFX96 sistemos užteršimo:

- Prieš dedant į bloką, visuomet nuvalykite bet kokios talpos išorinį paviršių.
- Nevykdysite reakcijos, jei yra pažeistas sandarumas, nes gali įvykti bloko, dangčio ir optinės sistemos užteršimas.
- Nevykdysite PGR reakcijos ar tikro laiko PGR reakcijos su lakiais reagentais, kurie gali sprogti ir užteršti bloką, dangtį ir optinę sistemą.
- Periodiškai valykite bloką ir vidinį dangčio paviršių, kad išvengtumėte biologiškai pavojingų medžiagų, purvo ar fluorescencijos tirpalo likučių kaupimosi (psl. 99).
- Niekada nevalykite ir nelieskite optinės sistemos dalies, esančios už kaitinimo plokštelės (82 iliustracija, psl. 100).
- Išorinį dangčio paviršių ir C1000™ termociklerio bazę reguliariai valykite (išsami informacija pateikta C1000 termociklerio naudotojo vadove).

Optinio reakcijos modulio valymas

Optinis reakcijos blokas ir C1000 termociklerio bazė turi būti valomi reguliariai, nuvalant medžiagų likučius ar purvą, kurie gali interferuoti tinkamą funkcionavimą. Jei matote nuosėdų ar išsipylyusių skysčių, nedelsiant juos nuvalykite vandenyje sumirkyta minkšta šluoste be pūkelių. Reguliariai valant instrumentą užtikrinsite tinkamą jo veikimą. Išsamesnė informacija apie C1000 bazės valymą pateikta C1000 termociklerio naudotojo vadove.

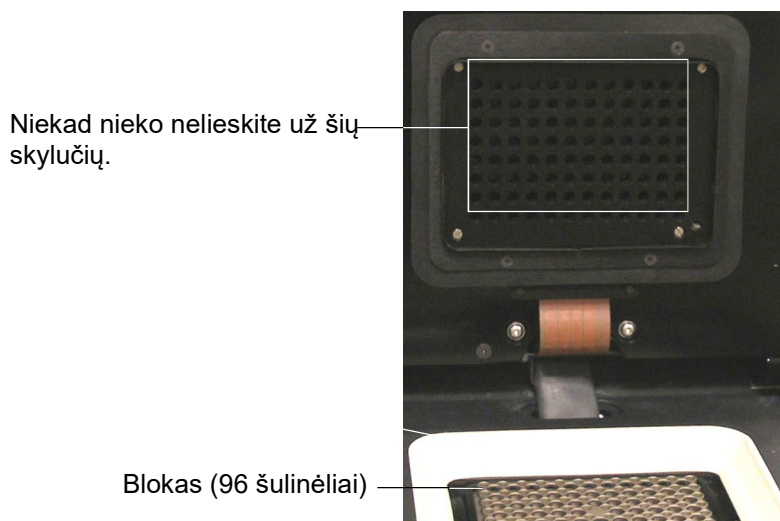
ĮSPĖJIMAS! Nenaudokite valiklių, kurie ėsdina aliuminį. C1000 reakcijos modulio valymui nenaudokite braižančių medžiagų. Paviršiaus įbrėžimai ir kiti pažeidimai gali interferuoti terminės kontrolės tikslumą.

ĮSPĖJIMAS! Į C1000 reakcijos modulį nepilkite vandens ar tirpalų. Šlapi komponentai gali sukelti elektros šoką, įjungus termociklerio maitinimą.

Jei ant CFX96 optinio reakcijos modulio, bloke ar ant vidinio dangčio paviršiaus matote purvo ar medžiagų likučių, nedelsiant nuvalykite. Purvas gali interferuoti bloko temperatūros keitimo greitį ir tikslų fluorescencijos duomenų surinkimą. Laikykitės pateiktų reakcijos modulio valymo gairių. Laikykitės šių valymo rekomendacijų:

ĮSPĖJIMAS! Norint išvengti elektros šoko, prieš valant instrumentą, visada nuimkite reakcijos modulį nuo termociklerio bazės arba išjunkite bazės maitinimą.

ĮSPĖJIMAS! Niekada nelieskite ir neleiskite patekti skysčiams į optinę sistemos dalį už kaitinimo plokštelės (82 iliustracija).



82 iliustracija. Kaitinimo plokštelės skylutės vidinėje dangčio pusėje.

- **Instrumento paviršiaus valymas.** Drėgna šluoste nuvalykite išsiliejimus ant išorinio instrumento paviršiaus. Jei reikia, naudokite švelnaus muilo ir vandens tirpale sudrėkintą šluostę. Norint išvengti korozijos, paviršių nusauskite.
- **Aušinimo sparnuotės valymas.** Dulkes valykite minkštu šepetėliu ar drėgna šluoste. Giliai esančias dulkes susiurbkite dulkių siurbliu. Prie sparnuotes prilipusius nešvarumus nuvalykite vandenyje sudrėkinta šluoste be pūkelių. Venkite paviršiaus braižymo. Jei reikia, pilnam nešvarumų pašalinimui galite naudoti švelnaus muilo tirpalą. Švari aušinimo sparnuotė užtikrina tikslių mėginių kaitinimą ir vėsinimą.
PASTABA. Nenaudokite valiklių, kurie ėsdina aliuminį, pvz., baliklio ar abrazyvinių valiklių.
- **Aliejaus naudojimas šulinėliuose nėra rekomenduojamas.** Jei naudojate aliejų, šulinėliai dažnai turi būti kruopščiai valomi. Pašalinkite aliejų, jei jis pakeičia spalvą ar jame atsiranda nešvarumų. Aliejaus valymui naudokite 95% etanolį. Venkite aliejaus kaupimosi bloke.
- **Bloko šulinėlių valymas.** Išsiliejusias medžiagas nedelsiant išvalykite, kad jos nepridžiūtų. Naudokite vienkartinės plastikines pipetes su vandeniu (rekomenduojama), 95% etanolio ar skiedikliu, skiestu vandeniu santykiu 1:100. Bloką valykite vandenyje sudrėkinta minkšta šluoste be pūkelių ar popieriniu rankšluosčiu. Šulinėlius visada kelis kartus praskalaukite vandeniu, kad pašalintumėte valymo priemonių likučius.

ĮSPĖJIMAS! Niekada nevalykite bloko stipriais šarminiais tirpalais (stipriai šarminiu muilu, amoniaku ar koncentruotu balikliu). Niekada nenaudokite ėsdinančių ar braižančių valymo tirpalų. Šios valymo priemonės gali pakenkti blokui ir temperatūros kontrolės tikslumui.

ĮSPĖJIMAS! Ant bloko paviršiaus likęs baliklis, etanolis ar muilas gali ėsdinti paviršių ir ardyti plastiką. Po valymo, šulinėlius visada kelis kartus praskalaukite vandeniu, kad pašalintumėte valymo priemonių likučius.

ĮSPĖJIMAS! Valant valymo tirpalu niekuomet nekaitinkite bloko. Valymo tirpalas bloko kaitinimo metu gali pažeisti bloką, reakcijos modulį ir termociklerio bazę.

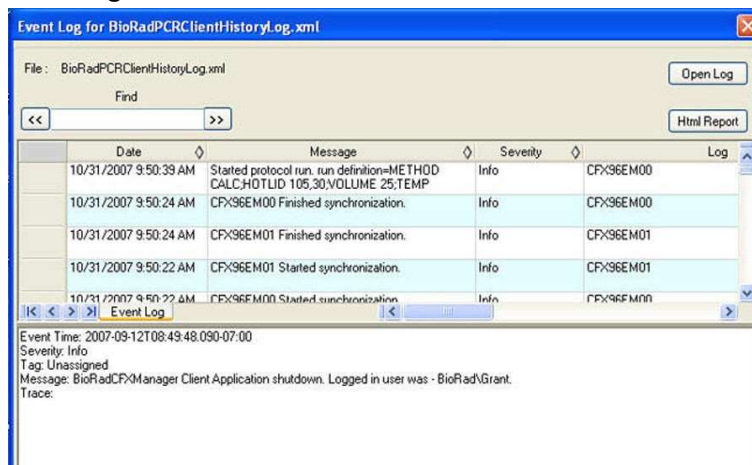
- **Vidinio dangčio paviršiaus valymas.** Nešvarumus nuo vidinio dangčio paviršiaus valykite vandenyje sudrėkinta minkšta šluoste be pūkelių. Nenaudokite abrazyvinių detergentų ar kietų medžiagų, kurios gali subraižyti paviršių. Vidinio dangčio paviršiaus valymas užtikrina tikslių mėginių kaitinimą ir vėsinimą.

Programos žurnalas

Prieš naujo tyrimo vykdymą, instrumentas inicijuoja savipatikros testą. Šio testo rezultatus programinė įranga įrašo Run Log ir Application Log failuose. Jei vieno ar kelių tyrimų vykdymo metu iškilo problemų, atidarykite Run ir Application Log failus ir nustatykite problemos atsiradimo laiką.

Tyrimo vykdymo metu CFX Manager programinė įranga stebi instrumento būseną ir duomenis įrašo faile **Application Log** (ilustracija 83). Šiuose žurnaluose rasite instrumento ir programinės įrangos įvykius, padėsiančius rasti triktis ir gedimus.

Norėdami atidaryti programos žurnalo failą, pagrindiniame programinės įrangos lange pasirinkite **View > Application Log**.



83 iliustracija. Event Log failo pavyzdys.

Trikčių aptikimas ir šalinimas

Dažniausiai programinės įrangos problemas galima išspręsti perkraunant kompiuterį ir sistemą. Prieš perkrovimą, išsaugokite naudojamus failus.

PASTABA. Patikrinkite, ar pakanka kompiuterio RAM ir kietojo disko talpos. Mažiausias RAM kiekis yra 2 GB, mažiausia kietojo disko talpa - 20 GB.

Programinės įrangos įdiegimas rankiniu būdu

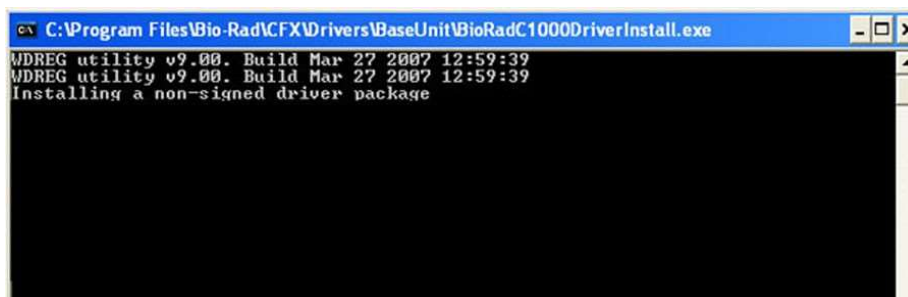
Jei reikia, programinę įrangą galite įdiegti rankiniu būdu:

1. Įdėkite programinės įrangos CD.
2. Dešiniuoju pelės klavišu spustelėkite CD piktogramą ir pasirinkite **Explore**. Atsidarys CD langas.
3. Dukart spustelėkite **CFX_Manager** aplanką, kad jį atidarytumėte ir sukart paspauskite **setup.exe**. Atsidarys įdiegimo vediklis.
4. Laikydami vediklio instrukcijų, įdiekite programinę įrangą ir paspauskite **Finish**.

Tvarkyklių įdiegimas rankiniu būdu

Jei reikia, tvarkykles galite įdiegti rankiniu būdu:

1. Įdėkite programinės įrangos CD. Jei CD neturite, kietajame diske susiraskite tvarkyklių aplanką (C:\Program Files\Bio-Rad\Drivers).
2. Programinės įrangos įdiegimo lange paspauskite mygtuką **Drivers** (ilustracija 84).
3. Atidarykite aplanką **BaseUnit**.
4. Jei naudojate Windows XP, sukart spustelėkite **BioRadC1000DriverInstall.exe**. Atsidarys įdiegimo langas. Jei naudojate Windows Vista, dešiniuoju pelės klavišu spustelėkite **BioRadC1000DriverInstall.exe** ir pasirinkite **Run as Admin**. Atsidarys įdiegimo langas.



84 iliustracija. Tvarkyklės įdiegimo langas.

Baigus įdiegimą, langas uždarys.

Nutrūkus energijos tiekimui

Elektros energijos tiekimo nutrūkimo atveju instrumentas ir kompiuteris išsijungs. Jei elektros tiekimas nutrūko trumpam laikui, instrumentas tęs protokolo vykdymą, o programos žurnale atsiras įrašas apie elektros tiekimo dingimą. Priklausomai nuo kompiuterio nustatymų ir elektros tiekimo nebuvimo trukmės, instrumentas ir programinė įranga bandys tęsti tyrimo vykdymą, priklausomai nuo protokolo etapo:

- Jei vykdomas plokštelės nuskaitymo etapas, atsiradus elektros tiekimui, protokolas bus toliau vykdomas.
- Jei vykdomas plokštelės nuskaitymo etapas, instrumentas lauks, kol persikraus programinė įranga ir tęs komunikaciją duomenų surinkimui. Šiuo atveju protokolas bus tęsiamas, jei programinė įranga nebuvo išjungta. Protokolo vykdymas bus tęsiamas, kai vėl veiks kompiuteris ir programinė įranga.

Jei norite atidaryti užrakintą reakcijos modulio dangtį, kad išimtumėte mėginius, atlikite šiuos veiksmus:

1. Reakcijos modulį nuimkite nuo C1000 bazės pastumdami žemyn C1000 bazės fiksavimo juostą.

2. Modulį pastatykite ant stalviršio taip, kad jo kraštas išsikištų 2 colius nuo stalviršio krašto, kaip pavaizduota 85 iliustracijoje.



85 iliustracija. Ant stalviršio uždėtas optinis modulis.

3. Aliuminio veržliarakčiu atsukite du didelius varžtus, esančius reakcijos modulio priekinėje dalyje (žemiau dangčio atidarymo mygtuko). Dviejų mažų varžtų nenuimkite. Modulyje pasigirs fiksavimo juostos atrakinimo garsas. 86 iliustracijoje pavaizduoti du dideli varžtai.



86 iliustracija. Norėdami atrakinti optinio modulio užraktą, atsukite šiuos varžtus.

4. Atidarykite modulio dangtį. Atkreipkite dėmesį, kad fiksatorius yra atrakintas. Iš bloko išimkite mėginius.
5. Modulį atidarytu dangčiu vėl fiksukite užrakto juosta ir ją prisukite dviem dideliais varžtais. 87 iliustracijoje pavaizduotas fiksatorius yra savo vietoje.



87 iliustracija. Optinio modulio fiksatorius.

Techninės specifikacijos

Matmenys ir svoris

Dydis (P x G x A)	33 x 46 x 36 cm (13 x 18 x 14")
Svoris	21 kg (47 lb)

Elektros specifikacijos

Įtampa	100–240 V
Dažnis	50–60 Hz
Galingumas	850 W
Saugikliai	10 A

Darbo sąlygos

Bendrosios sąlygos	Naudojimas patalpoje
Temperatūra	Aplinkos temperatūra - 15–31°C
Drėgmė	Maksimali santykinė drėgmė - 80% (be kondensato)
Aukštis virš jūros lygio	Iki 2000 metrų virš jūros lygio
Triukšmo lygis	Atitinka 61010-1 specifikacijas
Taršos laipsnis	2
Įdiegimo klasė	2

Termocikleris

Bazė	C1000 bazė
Maksimalus didėjimo greitis	5°C/s
Vidutinis didėjimo greitis	3,3°C/s
Programuojamo gradiento spektras	1–24°C
Operacinis gradiento spektras	0–100°C
Kaitinimo ir vėsinimo metodas	Peltier
Dangtis	Įkaista iki 105 °C

Temperatūra

Ribos	0-100 °C
Tikslumas	±0.2°C užprogramuotam taikiniui prie 90°C
Tolygumas	±0.4°C per 10 s pasiekus 90°C

Optika

Sužadinimas	6 filtruoti LED
Aptikimas	6 filtruoti fotodiodai
Sužadinimo / emisijos bangų ilgių ribos	450–730 nm
Jautrumas	Aptinka 1 taikinio sekos kopiją žmogaus genomo DNR
Dinaminės ribos	10 dydžių tvarka

Programinė įranga

Operacinės sistemos	Windows XP, Windows Vista, Windows 7
Multiplex analizė	Iki 5 taikinių šulinėlyje

Sistema

Licencijuota tikro laiko PGR	Taip
Mėginių talpa	96
šulinėliai	
Mėginio dydis	1–50 µl (rekomenduojamas dydis - 10–25 µl)
Komunikacijos	USB 2.0

Literatūros nuorodos

Breslauer KJ et al. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Nat Acad Sci* 83, 3746–50.

Livak JL et al. (1995). Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics* 9, 341–342.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9), 2002–2007.

Vandesompele J, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7), 1–12.

Minpack pranešimas dėl autorinių teisių (1999), Čikagos Universitetas. Visos teisės saugomos.

Platinimas šia ar kitomis formomis yra leidžiamas tik tuomet, kai yra išpildytos šios sąlygos:

1. Šaltinio kodas arba bet kokios formos binarinė jo išraiška gali būti platinama tik kartu su autorinių teisių pranešimu, sąlygų sąrašu ir atsakomybės apribojimo pranešimu.
2. Bet kokios formos binarinė išraiška gali būti platinama tik kartu su autorinių teisių pranešimu, sąlygų sąrašu ir atsakomybės apribojimo pranešimu dokumente ir (ar) kitoje pateikiamoje medžiagoje.
3. Galutiniam naudotojui pateiktuose dokumentuose turi būti šis pranešimas:

Šis produktas yra tiekiamas su Čikagos Universiteto sukurta programine įranga.



Bio-Rad Laboratories, Inc.
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette,
Prancūzija
Tel. +33 (0)1 47 95 60 00
Faks. +33 (0)1 47 41 91 33
www.bio-rad.com

Tikslus dokumento vertimas į lietuvių kalbą
Vertėja Akvilė Gegelevičienė
Data 2021-01-18
UAB Diamedica
Gėlių g. 2, Avižieniai, Lietuva



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Tinklalapis www.bio-rad.com JAV 800 424 6723 Australija 61 2 9914 2800 Austrija 01 877 89 01 Belgija 09 385 55 11 Brazilija 55 31 3689 6600
Kanada 905 364 3435 Kinija 86 20 8732 2339 Čekijos Respublika 420 241 430 532 Danija 44 52 10 00 Suomija 09 804 22 00 Prancūzija 01 47 95 69 65
Vokietija 089 31 884 0 Graikija 30 210 777 4396 Honkongas 852 2789 3300 Vengrija 36 1 459 6100 Indija 91 124 4029300 Izraelis 03 963 6050
Italija 39 02 216091 Japonija 03 6361 7000 Korėja 82 2 3473 4460 Meksika 52 555 488 7670 Nyderlandai 0318 540666 Naujoji Zelandija 0508 805 500
Norvegija 23 38 41 30 Lenkija 48 22 331 99 99 Portugalija 351 21 472 7700 Rusija 7 495 721 14 04 Singapūras 65 6415 3188 Pietų Afrika 27 861 246 723
Ispanija 34 91 590 5200 Švedija 08 555 12700 Šveicarija 061 717 95 55 Taivanas 886 2 2578 7189 Jungtinė Karalystė 020 8328 2000