Florina Iustina Ionescu
Digitally signed by Florina Iustina Ionescu
T=Director financiar contabil, C=RO, S=ARAD, L=ARAD, O=Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Arad, OU=Comitet director, E=ionescuscm@yahoo.ro, SERIALNUMBER=201104209FII1, G=Florina Iustina, SN=Ionescu, CN=Florina Iustina Ionescu
Certificare autenticitate
Computerul meu
2021.05.22 09:41

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest BIOTEC

CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego. Zaragoza (Spain)
Tel. (+34) 976 520 354
Fax (+34) 976 106 268
certest@certest.es
www.certest.es

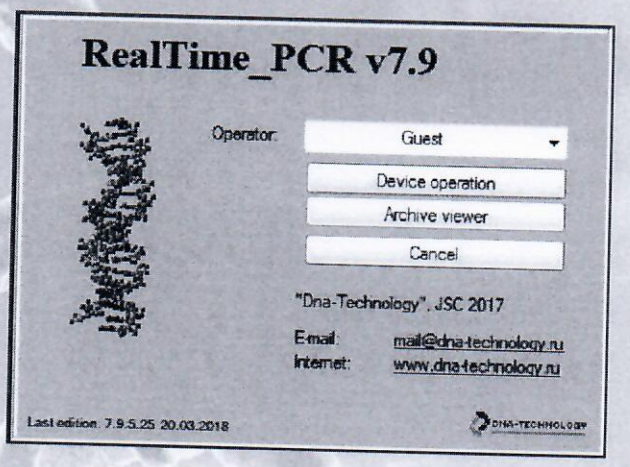
CSQ MED

VIASURE/OM-DTMe/0719EN

CerTest
BIOTEC

VIASURE

Kituri de detectare Real Time PCR



Manual de Utilizare

Real Time PCR

Partea 2

Îndrumări privind software-ul termociclului de detectare a DTlite

DNA-Technology, Research & Production LLC

Cuprins

1 Introducere 5
2 Domeniul și condițiile de utilizare 5
2.1 Domeniul software-ului RealTime_PCR 5
2.2 Principalele caracteristici ale RealTime_PCR 5
2.3 Cerințe PC 6
3 Pregătirea pentru lucru 6
3.1 Instalarea software-ului RealTime_PCR 6
3.2 Modernizare software. 6
3.3 Pregătirea instrumentului pentru funcționare. 6
3.4 Descrierea meniului software-ului RealTime_PCR 7
3.5 Rularea software-ului RealTime_PCR 14
4 Funcționarea dispozitivului 16
4.1 Modul de funcționare a dispozitivului 16
4.1.1 Alocarea modului 16
4.1.2 Funcționarea în modul de operare al dispozitivului 18
4.1.3 RULARE 18
4.1.4 Test 19
4.1.5 Crearea/editarea testelo ..... r 20
4.1.5.1 Crearea unui test nou cu ajutorul opțiunii Creare/ Editare test 20
4.1.5.2 Editarea unui test 20
4.1.5.3 Testarea Parametrilor 20
4.1.5.4 Crearea unui test nou utilizând Copierea opțiunii grupare a testelor 25
4.1.5.5 Modul de testare multiplă 26
4.1.6 Programul de amplificare 28
4.1.6.1 Crearea și editarea programelor de amplificare 28
4.1.6.2 Crearea unui nou program de amplificare 29
4.1.6.3 Editarea programului de amplificare 40
4.1.6.4 Salvarea programului de amplificare. 41
4.2 Crearea unui protocol al plăcii 41
4.2.1 Informații generale despre protocolul plăcii 41
4.2.2 Crearea unui protocol de plăci utilizând opțiunea Test 43
4.2.3 Înregistrarea protocolului manual privind placa, linie cu linie 45
4.2.4 Amplasarea eprubetelor în matricea unității termice 46
4.2.5 Pornirea programului de amplificare 47
4.2.6 Utilizarea opțiunii „Oprirea dispozitivului după RULARE" 50
4.2.7 Rularea programului de amplificare 51
5 Modul vizualizatorului de arhivare 57
5.1 Alocarea modului 57
5.2 Deschiderea RUN (RULARE) cu date de măsurare optică 58
5.3 Stabilirea parametrilor de analiză 59
5.3.1 Informații despre RULARE 59
5.3.2 Reglarea afișajului și procesarea rezultatelor măsurării 60
5.3.3 Crearea raportului 68
5.3.4 Exportarea datelor 71
6 Setări și diagnosticări ale instrumentului 72
6.1 Verificarea setărilor geometrice ale unității optice și a purității godeurilor 72
6.2 Măsurarea înălțimii eprubetei 77
6.3 Setarea expunerii măsurătorilor optice 77
6.4 Compensarea culorilor în DTPrime și DTLite 79
6.4.1 Activarea compensării semnalului 79
6.5 Diagnosticarea instrumentului 80
7 Setări utilizator 81
8 Parametrii setărilor de analiză 83
9 Situații de urgență 85
Anexa 1.Glosar de termeni de bază 87
Anexa 2.Tipuri de analiză (sunt reprezentate doar cele de bază) 88

1 Introducere

Software-ul RealTime_PCR este conceput pentru a controla detectarea termociclurilor DTPrime și DTLite.

Software-ul Real_Time PCR permite crearea unei RUN (RULĂRI) și analizarea rezultatelor măsurătorilor optice.

Software - ul RealTime_PCR este conceput pentru utilizare în laboratoarele clinice. De aceea, funcțiile de gestionare a instrumentului și setările de analiză a rezultatelor sunt simplificate cât mai mult posibil. În același timp, dacă dorește, utilizatorul poate modifica parametrii de funcționare a instrumentului și analiza datelor cu ajutorul setărilor suplimentare ale software-ului RealTime_PCR.

2 Domeniul de aplicabilitate și condițiile de utilizare

2.1 Domeniul de aplicabilitate a software-ului RealTime_PCR

Software-ul este conceput pentru a controla funcționarea termociclurilor de detectare DTprime și DTLite (denumite în continuare dispozitive din seria DT).

Următoarele operațiuni sunt efectuate utilizând software-ul RealTime_PCR:

1. crearea protocolului plăcii;
2. crearea și editarea testelor;
3. crearea, lansarea și monitorizarea programului de amplificare;
4. analiza datelor măsurătorilor optice;
5. raport privind analiza datelor;
6. verificarea setărilor geometrice și optice ale instrumentului;
7. setarea și diagnosticarea instrumentului.

2.2 Principalele caracteristici ale RealTime_PCR

1. Software-ul este conceput pentru a controla funcționarea instrumentelor din seria DT. Interfața software-ului se adaptează automat la tipul instrumentului selectat.
2. Există două moduri de software implementate în ferestre independente: **Funcționarea dispozitivului** și **Vizualizarea arhivei** permit lucrul simultan cu instrumente (crearea/pornirea/analizarea RULĂRII curente) și analizarea rezultatelor RULĂRII anterioare).
3. Posibilitatea de a lucra cu mai multe instrumente în același timp: Software-ul RealTime_PCR este lansat într-o fereastră separată pentru a controla fiecare dintre instrumentele incluse - **„modul multiwindow (multi-ferestre)”.** Acest mod permite monitorizarea simultană a funcționării mai multor instrumente.
4. În cazul imposibilității de a porni modul multiwindow, este posibilă și opțiunea de a lucra în **„modul cu o singură fereastră”**. Acesta este modul software-ului RealTime_PCR, care permite lucrul cu mai multe dispozitive într-o fereastră a acestuia. Poate fi util în laboratoare cu mai multe

dispozitive, care nu pot fi conectate simultan la calculator. În acest caz, dispozitivele sunt pornite prin intermediul software-ului RealTime_PCR, apoi sunt deconectate de la software și rulează autonom.

5. Posibilitatea introducerii unui gradient de temperatură, vertical sau orizontal, pe matrice pentru un instrument cu matrice solidă.
6. Posibilitatea de a seta în mod independent temperatura pentru fiecare din cele șase secțiuni pentru instrument cu o matrice formată din 6 secțiuni.
7. Posibilitatea introducerii unui gradient vertical sau a unei setări independente a temperaturii fiecăreia dintre cele trei secțiuni pentru instrument cu o matrice formată din 3 secțiuni.
8. Două metode alternative pentru analiza curbei de acumulare a ADN-ului în timpul PCR: **Prag (Ct)** și **Geometric (Cp)**, care se bazează pe abordări diferite pentru determinarea ciclului indicator al amplificării. În mod implicit, la analizarea măsurătorilor optice, RealTime_PCR utilizează metoda Geometrică (Cp)

2.3 Cerințe PC

Cerințele PC sunt descrise în secțiunea 1.5 din partea I a manualului de utilizare.

3 Pregătirea pentru lucru

3.1 Instalarea software-ului RealTime_PCR.

Procedura este descrisă în secțiunea 3.3 din partea I a manualului de utilizare.

3.2 Modernizarea software-ului

Software-ul RealTime_PCR se actualizează constant prin tehnologia ADN. Cea mai recentă versiune a software-ului RealTime_PCR poate fi descărcată pe site-ul: http://www.dna-technology.ru/eng/support/

Este recomandat să urmăriți actualizările și să utilizați cea mai recentă versiune a software-ului RealTime_PCR

3.3 Pregătirea instrumentului pentru funcționare.

Înainte de prima punere în funcțiune a instrumentului, trebuie să fie verificate setările geometrice ale unității optice a instrumentului, precum și puritatea godeurilor, înălțimea eprubetelor care se măsoară și trebuie setată expunerea măsurătorilor optice.

- Valorile optime de expunere trebuie să fie furnizate de producătorul de kituri. Când utilizați kiturile de tehnologie ADN, setările din fabrică sunt optime. Atunci când se utilizează kiturile diferiților producători într-un laborator, valoarea expunerii trebuie monitorizată înainte de fiecare începere a programului de amplificare.
- Măsurarea înălțimii eprubetelor trebuie efectuată în cazul utilizării eprubetelor de înălțimi

diferite într - un laborator.

- ❖ Verificarea purității godeurilor termice unitare trebuie realizată periodic într - un laborator, pentru a exclude posibilitatea obținerii unor rezultate fiabile, ca o cauză a creșterii fluorescenței de fond.

Setările geometrice ale unității optice și expunerea instrumentului sunt verificate o dată în timpul procedurii de instalare. Este posibil să fie nevoie să modificați aceste setări atunci când schimbați un producător de kituri comerciale și, de asemenea, în cazul în care este menționat în instrucțiunile pentru kituri sau dacă aveți dubii, setările instrumentului sunt corecte.

3.4 Descrierea meniului software-ului RealTime_PCR

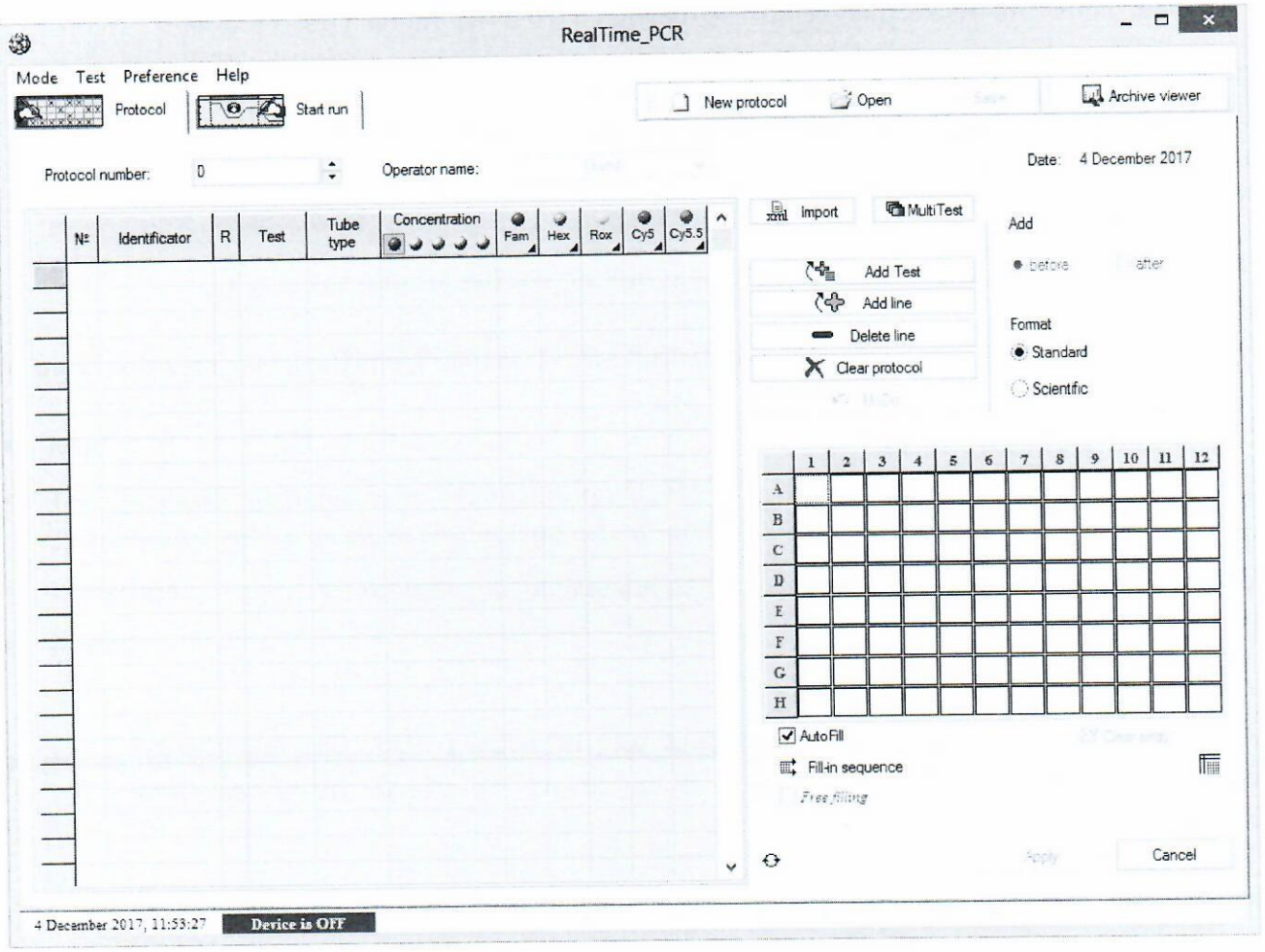
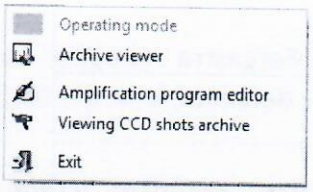


Fig. 1 Fereastra RealTime_PCR în modul de operare al Dispozitivului. Meniul

principal al software-ului RealTime_PCR (Fig. 1) este format din patru secțiuni:

- **Mod**
- **Test** (această secțiune este destinată funcționării în modul „Operare dispozitiv". În modul „Vizualizator arhivă" această secțiune nu este disponibilă)
- **Preferință**
- **Ajutor**

1. Secțiunea **Mod** este concepută pentru a controla funcționarea software-ului și include următoarele comenzi:



❖ **Mod de operare** - comanda este activă în modul *Vizualizator arhivă* și este destinată comutării în modul *Operare dispozitiv*.

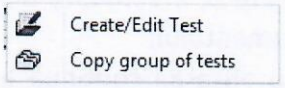
❖ **Vizualizator arhivă** - comanda este activă în modul *Operare dispozitiv* și este destinată comutării la modul *Vizualizator arhivă*.

❖ **Editor de programe de amplificare** - deschide fereastra *Editorului de programe de amplificare*.

❖ **Vizualizarea arhivei de instantanee CCD** - deschide fereastra *Vizualizarea arhivei de instantanee CCD,* care permite vizualizarea video a unei matrice cu eprubete de testare pentru fiecare măsurare, cu condiția ca după pornirea programului de amplificare un câmp *Vizualizarea imaginii video actuale* să fi fost marcat în *Imaginea curentă*.

❖ **Ieșire** - ieșiți din acest mod de operare a software-ului cu închiderea ferestrei corespunzătoare.

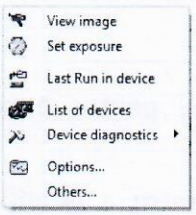
2. Secțiunea **Test** este destinată creării și editării testelor și include următoarele comenzi (această secțiune este destinată funcționării în modul „Operare dispozitiv"; în modul „Vizualizator arhivă" această secțiune nu este prezentă):



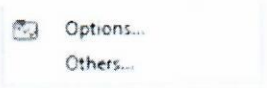
❖ **Creare/Editare test** - afișează fereastra de *Creare/Editare* test pentru a crea un test nou sau a edita un test existent.

❖ **Copiere grup de teste -** afișează fereastra pentru a copia testele operatorului, specificate în partea stângă a ferestrei sau din fișierele cu parametri de testare pentru software-ul Real_Time PCR (fișiere ini-, care sunt furnizate de producătorul kiturilor) operatorului selectat în partea dreaptă a ferestrei (sau tuturor operatorilor).

3. Secțiunea **Preferințe** este destinată afișării și editării setărilor instrumentului. Modul de „Funcționare a instrumentului" include următoarele comenzi:



În modul „vizualizare arhivă" această secțiune arată astfel:



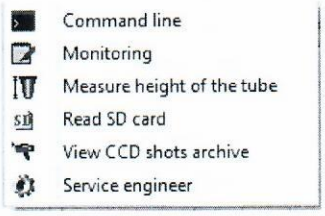
❖ **Vizualizare imagine** - afișează Fereastra *Imagine* în procesul de configurare și diagnosticare a instrumentului (descriere detaliată, la p. 65, secțiunea 6 Setări și diagnosticare a instrumentului).

❖ **Expunere setare** - afișează fereastra *Expunere setare* în procesul de configurare și diagnosticare a instrumentului (descriere detaliată, la p. 65, secțiunea 6 Setări și diagnosticare a instrumentului).

❖ **Ultima rulare în dispozitiv** - citirea rezultatelor măsurătorilor optice de la ultima rulare a instrumentului.

❖ **Lista dispozitivelor** - afișează fereastra *Lista dispozitivelor* cu scopul de a le conecta sau deconecta.

❖ **Diagnosticarea dispozitivului -** sub-meniul **Preferințe,** destinat întreținerii serviciilor și diagnosticării funcționării diferitelor sisteme ale instrumentului:



- *Linie de comandă* - afișează fereastra în care se efectuează diagnosticarea componentelor optice, temperaturii, motorului și afișajului instrumentului;
- *Monitorizare* - deschide fereastra pentru afișarea continuă a informațiilor de serviciu necesare pentru diagnosticarea funcționării instrumentului;
- *Măsurarea înălțimii eprubetei* - începe procedura de măsurare a înălțimii eprubetelor, menținând în același timp valoarea obținută pentru lucrările ulterioare efectuate cu instrumentul;
- *Citirea cardului SD* - afișează fereastra în scopul diagnosticării funcționării cardului SD;

❖ *Vizualizarea arhivei de instantanee CCD* - deschide fereastra *Vizualizarea arhivei de instantanee CCD,* care permite vizualizarea filmării unei matrice cu eprubete de testare pentru fiecare măsurare, cu condiția ca după pornirea programului de amplificare un câmp de *Vizualizare a imaginii* să fi fost marcat în *Imaginea curentă.*

- *Inginer de service* - afișează fereastra destinată calibrării optice a instrumentului (utilizată de inginerul de service);

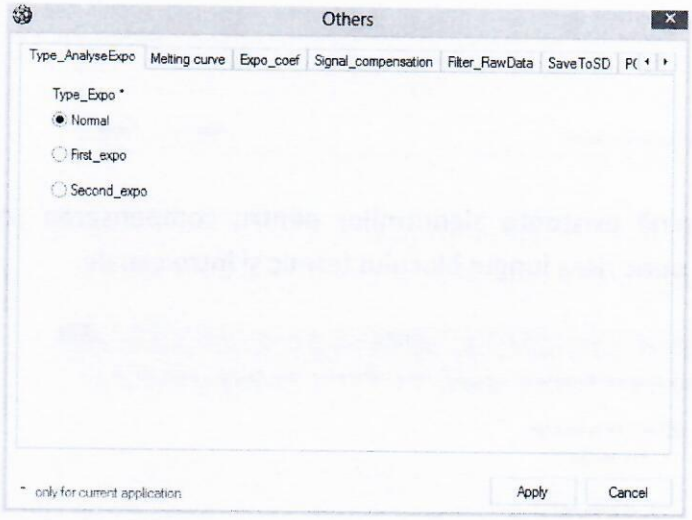
❖ **Opțiuni** - afișează fereastra *Opțiuni* pentru a configura setările utilizatorului și setările parametrilor de analiză.

❖ **Altele** - afișează fereastra *Altele* pentru a modifica parametrii analizei măsurătorilor optice și pentru a regla lucrul cu datele.

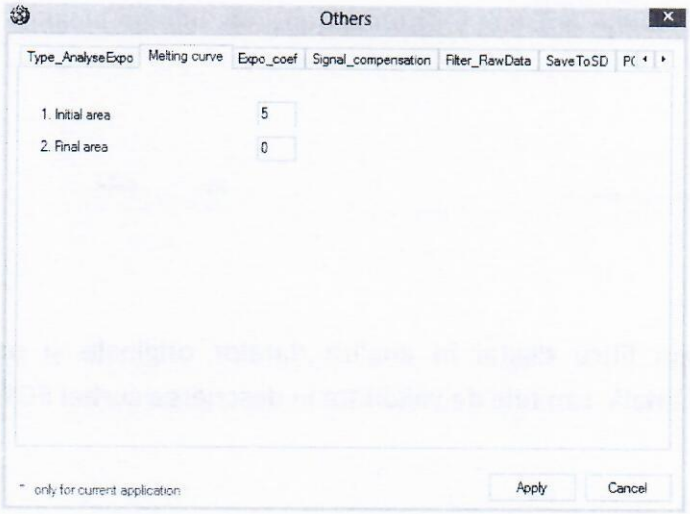
Setările pentru lucrul cu datele de măsurare optică efectuate în mod implicit sunt optime pentru lucrul cu kituri comerciale.

Atenție! Aceste setări sunt stocate în fișierele de sistem ascunse și nu se modifică la actualizarea software-ului RealTime_PCR.

Tipul _AnalyseExpo: Selectarea tipului de „împletitură" a datelor optice la atingerea nivelului de saturație: legarea celor două expuneri sau selectarea uneia dintre acestea.



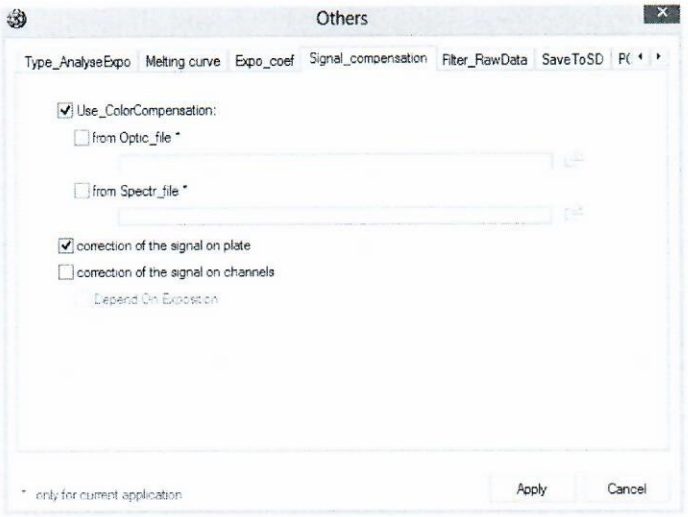
Curba de topire: Stabiliți zonele de „netezire" ale profilului de topire.



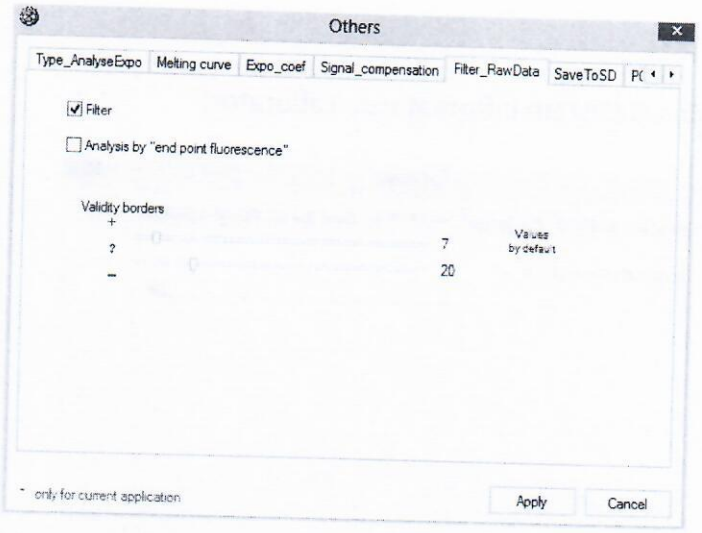
Expo_coef: factor care determină de câte ori a doua expunere este mai mică decât prima.



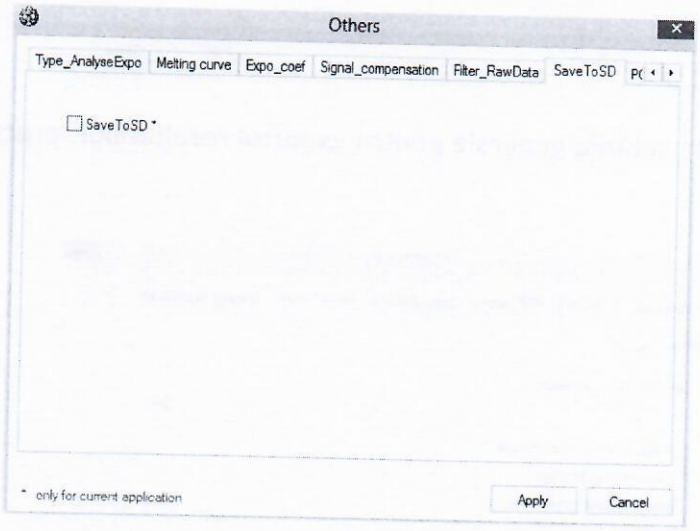
Signal_compensation: determină existența algoritmilor pentru compensarea „culorii" între canalele optice, corectarea semnalului optic de-a lungul blocului termic și între canale.



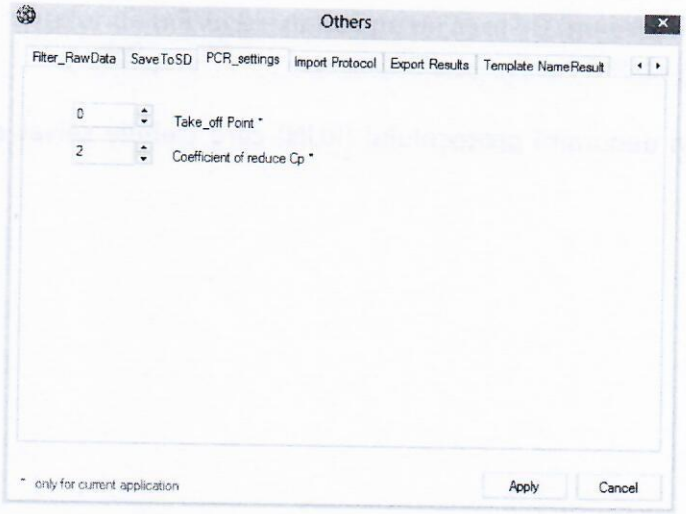
Filter_RawData: prezența unui filtru digital în analiza datelor originale și utilizarea unei analize suplimentare pe „construcția" finală. Limitele de validitate în descrierea curbei PCR cu sigmoid



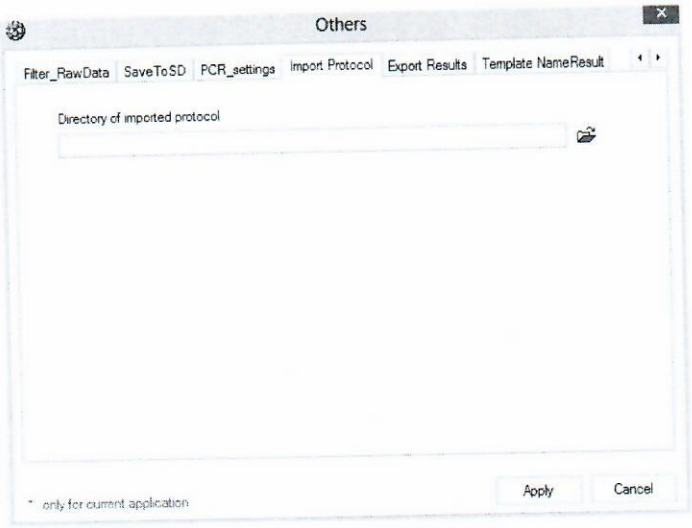
Salvare în SD: salvarea datelor de măsurare optică pe un card SD (nu este recomandată)



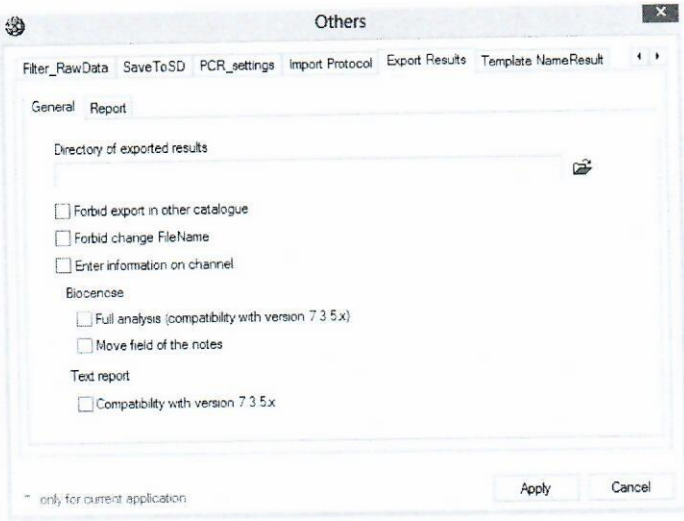
PCR_settings: definesc limita din stânga căutării „Punctului de preluare" în cazul analizei PCR. Coeficient de reducere a Cp în raport cu localizarea maximului celui de-al doilea derivat în sigmoidul PCR.



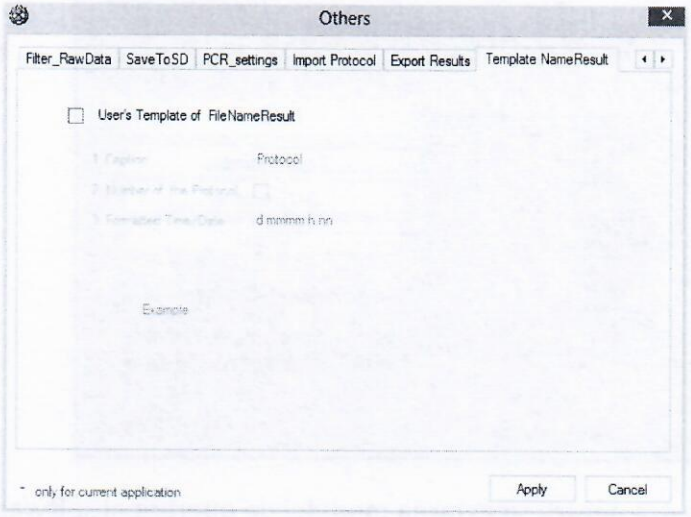
Protocolul de import (RUN) din LIS (Sistem Informatic de Laborator)



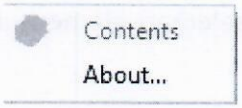
Rezultate export: sunt definite setările generale pentru exportul rezultatelor, precum și caracteristicile rezultatului raportului în LIS



Template NameResult: setarea denumirii protocolului (RUN) care trebuie salvat conform unui model predefinit.



4. Secțiunea Help (Ajutor) este destinată afișării ajutorului despre software-ul RealTime_PCR și descrierii versiunii sale actuale:



3.5 Rularea software-ului RealTime_PCR

Software-ul RealTime_PCR poate fi lansat în două moduri:

1. Utilizați meniul **Start** al sistemului de operare Windows:

   Start ‹ **All** Programs ‹**RealTime_PCR** ‹ **RealTime_PCR**

2. Utilizați  pictograma de pe desktop (când software-ul este instalat, această pictogramă este plasată automat pe Desktop).

După lansarea software-ului, pe ecran va apărea o fereastră pentru selectarea modului de operare al software-ului (Fig. 2).

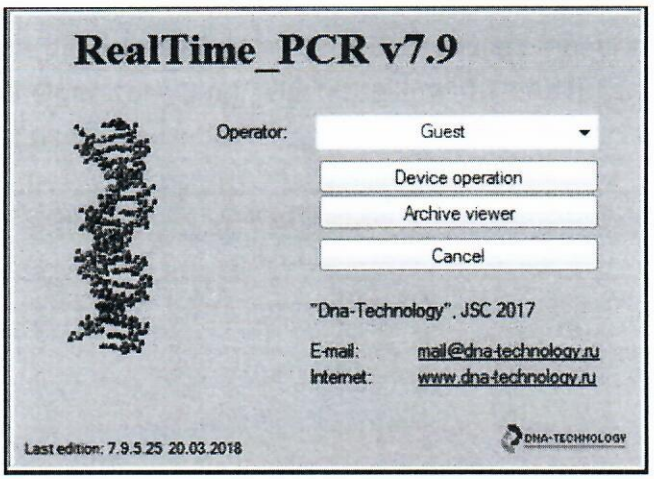


Fig. 2 Fereastra pentru selectarea modului de operare al software-ului.

În această fereastră pot fi efectuate următoarele acțiuni:

1. Selectați un operator existent sau adăugați un operator nou.

Selectați un operator existent din **lista Operator**. Pentru a adăuga un operator nou, selectați elementul **Adăugare operator** din **lista Operator**. Când selectați elementul **Adăugare operator**, pe ecran apare fereastra **Adăugare operator** (Fig. 3).

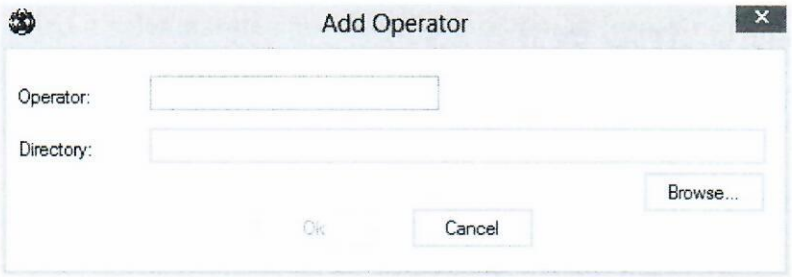


Fig. 3 Fereastra Adăugare Operator

În această fereastră, trebuie să completați câmpurile **Operator** și **Director**. Introduceți numele operatorului în câmpul **Operator**.

Trebuie să specificați calea către directorul de lucru al operatorului pe hard disk-ul calculatorului în câmpul **Directory**. Pentru a selecta un folder, puteți utiliza butonul **Browse**. În timp ce lucrați cu acest operator, toate fișierele (protocoale de plăci, programe de amplificare, RULĂRI) vor fi stocate în folderul specificat, cu excepția cazului în care se indică altfel.

Apăsați butonul **OK** pentru a salva datele specificate și a reveni la fereastră pentru selectarea modului de operare a software-ului.

Notă: Se recomandă să nu se creeze un folder de lucru al operatorului pe hard disk-ul sistemului, în loc să se utilizeze orice alte discuri dure ale unui calculator pentru stocarea fișierelor. În timp ce lucrați cu instrumentul sub operatorul **Guest**, RULĂRILE vor fi stocate în mod implicit în folderul software RealTime_PCR. Se recomandă să selectați alte foldere la pornire.

2. Alegeți unul dintre cele două moduri posibile de lucru cu software-ul: Mod de **Operare dispozitiv,** care vă permite să:

- creați și editați teste;
- creați și editați programe de amplificare;
- creați și editați protocoale de plăci pentru următoarea RULARE;
- monitorizați progresul programului de amplificare;
- efectuați diagnosticarea și setările instrumentului.

Modul **Vizualizator arhivă**, care permite:

- analiza datelor măsurătorilor optice din RULĂRILE anterioare;
- rapoarte de formulare cu privire la rezultatele măsurătorilor.

Notă: Este posibil să lucrați simultan în două moduri (de exemplu, analiza datelor obținute mai devreme în timpul executării programelor de amplificare de către instrumente sau analiza preliminară a datelor obținute în timpul rulării curente).

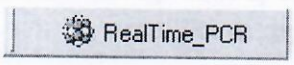
4 Funcționarea dispozitivului

4.1 Modul de funcționare a dispozitivului

4.1.1 Alocarea modului

Modul de funcționare a dispozitivului software-ului RealTime_PCR are rolul de a crea protocoalele plăcii, de a crea/copia teste, de a crea programe de amplificare, de a realiza amplificarea utilizând instrumentele din seria DT și de a configura parametrii tehnici ai instrumentului. (Fig.4)

Pentru a comuta în acest mod, puteți utiliza una dintre următoarele metode:

1. Selectați modul **Operare dispozitiv** atunci când lansați RealTime_PCR
2. Selectați **Modul de operare** din meniul **Mod** din fereastra **Vizualizator Arhive**.
3. Faceți clic pe butonul 

din fereastra **Vizualizator Arhive**.

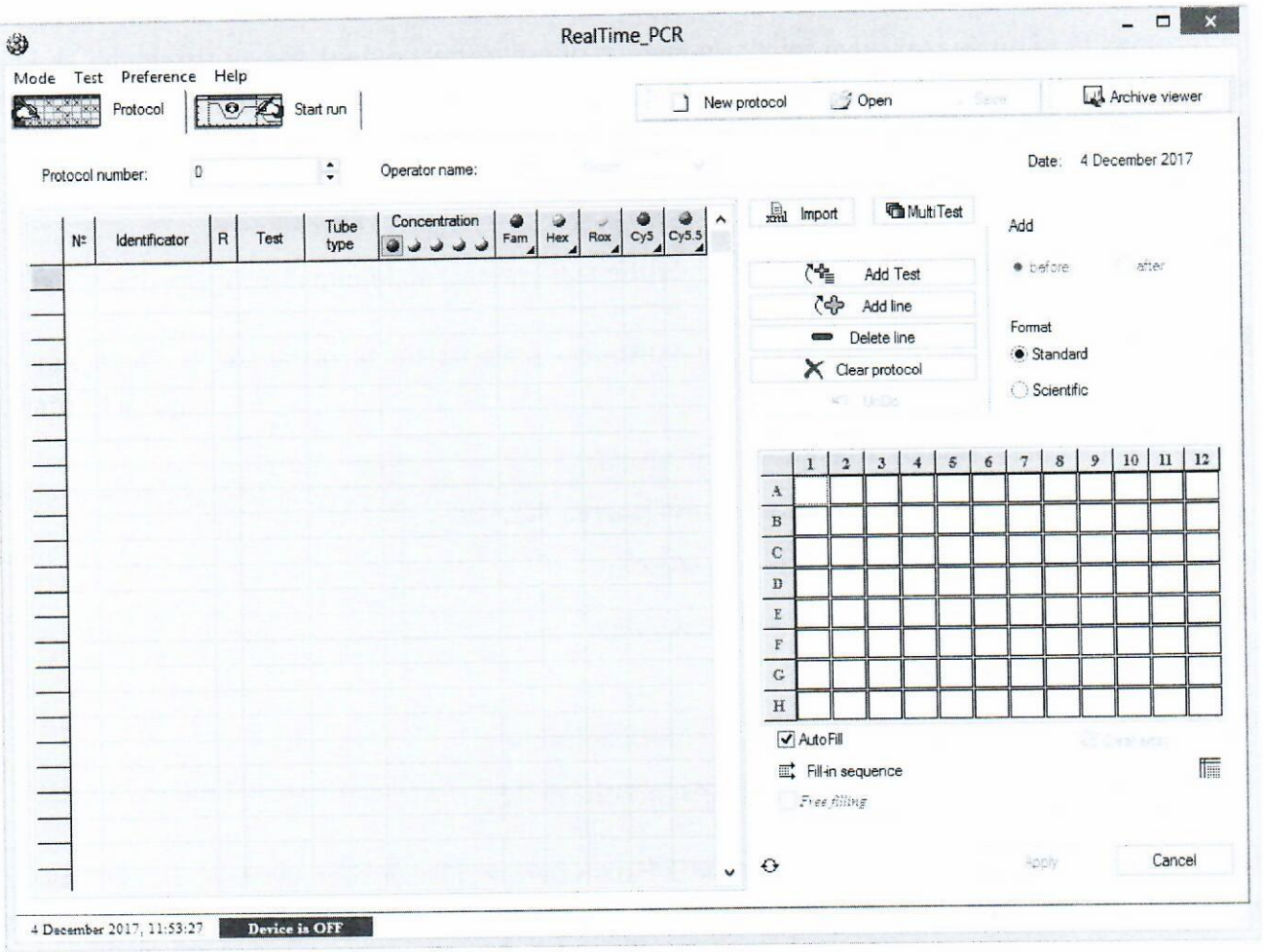


Fig. 4 RealTime_PCR în modul de Operare dispozitiv

Pe ecran apare o fereastră de dialog **Lista dispozitivelor**, cu o listă de instrumente conectate la calculator (Fig. 5).

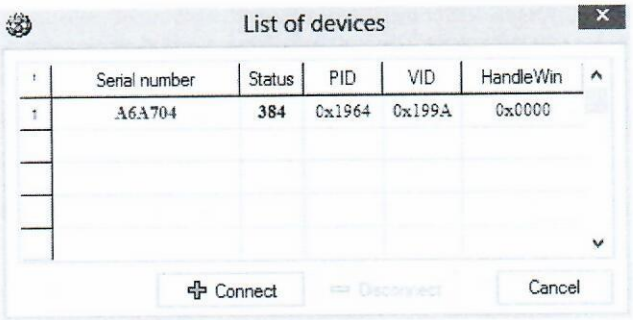


Fig. 5 Lista din fereastra dispozitivelor

Pentru a lucra cu un instrument specific, selectați-l din listă și apoi apăsați butonul Connect. Software-ul RealTime_PCR este gata să lucreze cu instrumentul selectat.

În modul multiwindow pentru a lucra cu fiecare instrument, software-ul RealTime_PCR este lansat într-o fereastră separată printr-una dintre metodele descrise la secțiunea 2.2, punctul 3. Acest mod permite monitorizarea simultană a funcționării mai multor instrumente.

Notă: În cazul în care nu pot fi conectate simultan mai multe instrumente la calculator, este posibil să lucrați cu aceste instrumente printr-un mod cu o singură fereastră. În modul cu o singură fereastră, după pornirea programului de amplificare în instrument, deconectați instrumentul cu ajutorul butonului Disconnect și conectați un alt instrument.

4.1.2 Funcționarea în modul de Operare a dispozitivului

Constă în următoarele etape:

1. Crearea **unui protocol al plăcii** și setarea parametrilor de amplificare.
2. Pornirea programului de amplificare.

4.1.3 RULAREA

Când lucrați cu instrumente din seria DT în fiecare zi, este necesar să creați a. RULAREA include următoarele informații:

1. Ținte care trebuie stabilite (una sau mai multe, în funcție de scopul kitului)
2. Denumirea (identificatorii) probelor
3. Regimul de temperatură a amplificării (program de amplificare).
4. Tipul analizei rezultatelor.
5. Tipuri de fluorofori (coloranți fluorescenți) utilizați pentru anumite ținte (țintă specifică, control intern etc.).
6. Volumul amestecului de reacție.
7. Tipuri de probe utilizate: probe necunoscute, controale, probe de calibrare („standarde"), cantitatea și concentrația lor (pentru „standarde").
8. Amplasarea probelor pe matricea blocului termic
9. Dacă este necesar, utilizați setări suplimentare.

După finalizarea programului de amplificare, analiza de date conține informații despre măsurători optice în plus față de setările menționate mai sus și stocate ca fișier în folderul operatorului, cu excepția cazului în care se indică altfel.

Pentru a vizualiza analiza datelor după finalizarea amplificării, faceți clic pe fișierul salvat.

Atunci când sunt utilizate kituri comerciale și sunt efectuate studii similare, parametrii RULĂRILOR sunt standard și diferă unul de celălalt, de obicei în ceea ce privește numărul de probe și plasarea lor în unitatea termică a instrumentului.

Pentru a simplifica procedura de creare a RULĂRII, se recomandă salvarea parametrilor standard ai RULĂRII sub forma unui **Test**.

4.1.4 Test

Setul tuturor parametrilor RULĂRII, necesari pentru efectuarea PCR și analiza ulterioară a rezultatelor, este descris ca test.

Testul include următorii parametri ai RULĂRII:

1. Ținte care trebuie stabilite (una sau mai multe, în funcție de scopul kitului)
2. Regimul de temperatură a amplificării (program de amplificare).
3. Tipul analizei rezultatelor.
4. Tipuri de fluorofori (coloranți fluorescenți) utilizați pentru anumite ținte (țintă specifică, control intern etc.).
5. Volumul amestecului de reacție.
6. Date privind numărul probelor de control, standardelor și concentrațiilor acestora din urmă.

RULAREA poate consta într-unul sau mai multe teste având un program de amplificare și un tip de analiză.

Testul poate fi creat o dată și rămâne în lista de teste disponibile pentru un anumit operator, pentru a fi utilizat în lucrul zilnic.

Pentru a adăuga un test la lista de teste a operatorului, procedura de creare a unui test utilizând opțiunea **Creare/Editare**
pentru testarea care trebuie efectuată sau utilizând procedura **Copiere grup de teste**.

Copierea unui grup de teste implică prezența fișierelor cu parametri pentru RULARE (fișiere ini-, furnizate de compania DNA-Technology). Atunci când creați un test utilizând un fișier ini, ultima etapă de lucru este constituirea unui formular de rezultate cu ajutorul Formularului de răspuns

La crearea unei RULĂRI, este suficient să indicați **Testul** în fereastra **Add test** (toți parametrii necesari vor fi încărcați automat), numărul de probe care urmează să fie examinate și plasarea lor în unitatea termică a instrumentului.

RULAREA poate fi creată fără a utiliza opțiunea **Testare**; în acest caz, informațiile vor fi introduse în câmpurile de protocol al plăcii, manual. Atunci când operează în acest mod, operatorul nu poate selecta tipul de analiză. Tipul implicit de analiză pentru o astfel de creație a RULĂRII este **Calitativă**.

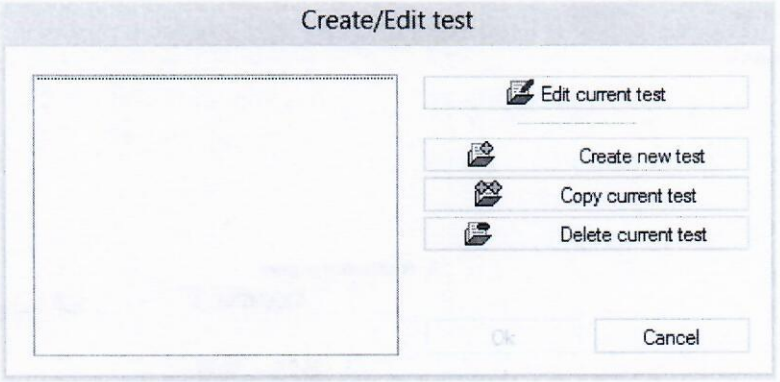
Atenție! Nu se recomandă crearea unui protocol fără utilizarea procedurii de **Testare**, deoarece fereastra **Parametrilor de analiză** nu va fi activă, iar coeficienții de calibrare optică a dispozitivului nu vor fi utilizați (a se vedea secțiunea 6.4)

4.1.5 Crearea/editarea testelor

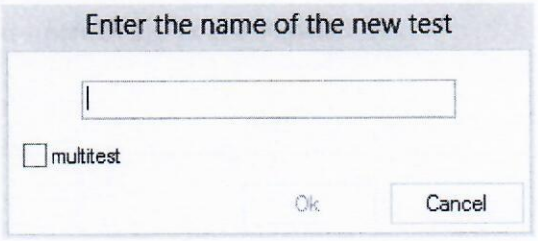
4.1.5.1 Crearea unui test nou cu opțiunea Creare/Editare test

1. Pentru a crea un test nou, faceți clic pe meniul **Test** din fereastra RealTime_PCR și alegeți comanda **Creare/editare test**.

   În fereastra apărută, faceți clic pe **Creare test nou.**



2. Apoi introduceți denumirea noului test în următoarea fereastră; dacă este necesar, activați opțiunea mod multi-test (consultați secțiunea **Mod multi-test**) și faceți clic pe butonul **OK**.



3. Apare fereastra Test. Introduceți parametrii de testare în câmpurile corespunzătoare din fereastra Test (consultați secțiunea **Parametrii de testare**).
4. Apăsați butonul OK pentru a salva parametrii specificați și ieșiți din fereastra Test.

4.1.5.2 Editarea unui test

1. Pentru a edita testul în fereastra **Creare/Editare test,** selectați testul și faceți clic pe **Editare test actual.** Apare fereastra Test (Fig. 6).
2. Modificați câmpurile necesare în fereastra Test (consultați secțiunea **Parametrii de testare**).
3. Apăsați butonul OK pentru a salva parametrii specificați și ieșiți din fereastra Test.

4.1.5.3 Parametrii de testare

Descrierea și parametrii de testare sunt indicați în fereastra **Test** (Fig. 6)

Lista derulantă **Test** este destinată selectării unui test. Când selectați un element de pe lista din fereastra **Test** se afișează parametrii testului selectat.

În câmpul **Descriere**, se recomandă să specificați scopul și caracteristicile testului.

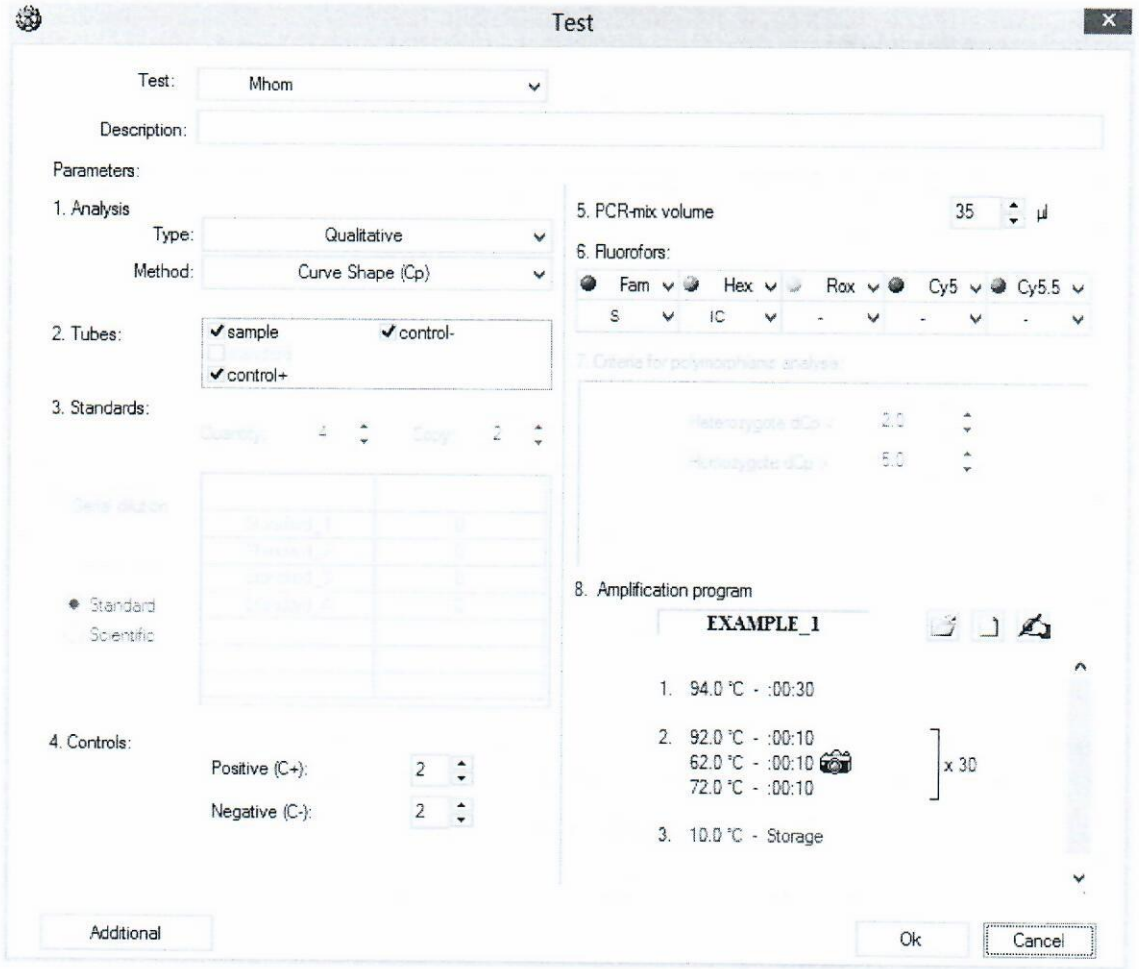


Fig. 6 Fereastra Test.

Apoi specificați **parametrii** de Testare necesari pentru realizarea PCR și analizarea rezultatelor.

Notă: Dacă sunt utilizate kituri comerciale, parametrii necesari sunt specificați în instrucțiunile de utilizare a kiturilor.

Descrierea parametrilor:

❖ **Analiză**

În secțiunea **Analiză**, selectați **tipul** Analiză și opțiunile **Metodei** de analiză.

- ***Tip***

Pentru mai multe informații despre tipurile de analiză, consultați Anexa 2.

- ***Metodă***

Următoarele metode sunt implementate în software:

- ***Geometric (Cp)*** - determinarea ciclului indicatorului pe baza analizei matematice a formei curbei de amplificare.
- ***Prag (Ct)*** - determinarea Ct (*ciclu prag*). Această metodă se bazează pe efectuarea unei linii de prag și determinarea numărului de cicluri pentru fiecare probă, în care curba de amplificare traversează linia de prag.

Notă: Pentru a modifica valoarea ciclului de prag, apăsați butonul **Suplimentar** și schimbați-l în fereastra deschisă**Parametrii analizei**" punctul 2. Valoarea pragului ... ". Valoarea liniei de prag poate fi modificată și utilizând mouse-ul în fereastra de reprezentare grafică.

Pentru mai multe informații despre opțiunile avansate, consultați „**Parametrii analizei**".

❖ Eprubete

Tipurile de probe care vor fi utilizate în analiză ar trebui marcate.

- ***Probă*** - proba de testare;
- ***Standard*** - probă de calibrare necesară pentru analiza cantitativă;
- ***Control +*** - probă de control pozitiv;
- ***Control -*** - probă de control negativ.

❖ Standarde

Atunci când alegeți tipul de analiză **Cantitativ cu standarde**, este necesar să descrieți probele de calibrare utilizate („standarde").

Pentru aceasta, trebuie furnizate următoarele informații:

- Completați câmpul ***Cantitate*** - indicați numărul de concentrații diferite de probe de calibrare („standarde").
- Completați câmpul ***Copiere*** - indicați numărul de repetări pentru fiecare concentrație de probe de calibrare („standarde").
- Completați tabelul cu valori „standarde" (specificați denumire și concentrația fiecărui „standard").

Numărul de rânduri din tabel corespunde numărului de variante de "standarde". Pentru fiecare „standard" trebuie să specificați un nume (implicit acesta este „Standard_1", „Standard_2" etc.) și să specificați valoarea (concentrația „standardului"). Unitățile (copii, pictograme, IU) pot fi selectate din lista verticală din bara de titlu a coloanei din dreapta a tabelului.

Tabelul valorilor poate fi completat manual sau automat. Pentru umplere automată, apăsați butonul **Diluare serială**; în fereastra apărută, completați câmpurile **Valoarea inițială** și **Pasul de diluare** și faceți clic pe butonul **Aplicare**.



Datele din tabelul valorilor „standardelor" pot fi prezentate în două formate: standard și științific. Selectați formatul de prezentare utilizând **Formatul** de comutare.

Exemplu. Scrierea numerelor în format standard și științific (într-un format științific, gradul de 10 (ordine) al numărului este indicat după litera „E").

Standard	Științific
5	5,00E+00
15	1.50E+01
250	2.50E+02
9.500	9.50E+03
18.500.000	1.85E+07

❖ Comenzi

În secțiunea **Comenzi**, este necesar să se indice numărul de eprubete utilizate în test cu probe de control.

- ***Pozitiv (C+)*** - numărul de eprubete cu probe de control pozitive.
- ***Negativ (C-)*** - numărul de eprubete cu probe de control negative.

Notă: Numărul eprubetelor cu probe de calibrare și control, dacă este necesar, poate fi modificat în timpul compilării protocolului plăcii (consultați Secțiunea 4.2 Crearea unui protocol de plăci).

❖ Volumul amestecului PCR

În câmpul **volum amestec PCR**, este necesar să se indice volumul amestecului de reacție fără a ține cont de volumul de ulei sau parafină (dacă este utilizat).

Pentru performanța cea mai eficientă și precisă a regimurilor de amplificare a temperaturii, în instrument se folosește o metodă „activă" pentru controlul temperaturii amestecului de reacție într-o eprubetă. Metoda se bazează pe aplicarea unui model matematic al eprubetei de reacție și necesită o indicație exactă a volumului amestecului de reacție.

❖ Fluorofori

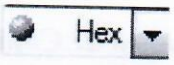
În tabelul **Fluorofori**, fluoroforul și scopul său trebuie să fie selectate și indicate din listele derulante pentru reînceperea pentru fiecare canal, în momentul analizării rezultatelor:

Ținta specifică - semnalul principal, specific.

IC - semnal de la proba internă de control.

Dacă nu se utilizează un canal, selectați în tabelul **Fluorofori** elementul **Nu a fost detectat**.

Dacă se folosește un kit care conține colorant R6G, atunci când se creează (se editează) un test în canalul HEX, alegeți 

din lista derulantă 

Atunci când alegeți tipul de analiză denumit **Analiza polimorfismelor (2 godeuri)** sau **Analiza polimorfismelor (MC)** sau **Analiza polimorfismelor (MC)**, este necesar să specificați alela pentru semnalul fluoroforilor (implicit aceasta este „a" și „b").

❖ Criterii pentru analiza polimorfismelor:

Secțiunea este activă atunci când este selectat tipul de analiză: **Analiza polimorfismelor (2 godeuri)** sau **Analiza polimorfismelor (MC) auto** sau **Analiza polimorfismelor (MC)**.

Atunci când cercetăm **Analiza polimorfismelor (2 godeuri)**, rezultatele sunt evaluate prin prezența și mărimea curbelor de amplificare relativă a deplasării înregistrate într-o eprubetă pentru doi fluorofori (dCp sau dCt).

În **Analiza polimorfismelor (MC)**, tipul de topire, interpretarea rezultatelor se bazează pe corespondența temperaturilor de topire ale godeurilor de semnal cu temperaturile indicate în câmpul **Criterii pentru analiza polimorfismelor**.

Pentru tipul **Analizei polimorfismelor (MC)**, interpretarea rezultatelor se bazează pe compararea caracteristicilor curbelor de topire de referință conținute în fișierul bibliotecii și a curbelor de topire obținute în experimentul de față.

❖ Programul de amplificare

În secțiunea **Program de amplificare**, trebuie specificat un program de amplificare într-unul din următoarele moduri:

- selectați salvarea anterioară în programul de amplificare a unității utilizând butonul  ,
- creați un nou program de amplificare cu ajutorul butonului  ,
- editați programul de amplificare curent utilizând butonul  .

Programul de amplificare selectat va fi afișat în această secțiune. Pentru mai multe informații despre crearea unui program de amplificare, consultați secțiunea 4.1.6 „Crearea și editarea programelor de amplificare".

❖ Suplimentar

Când apăsați butonul **Additional,** se deschide fereastra **Parametrii analizei.**

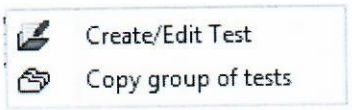
Consultați descrierea parametrilor suplimentari ai analizei în secțiunea 8 **«Parametrii analizei»**

Atenție! Această secțiune este destinată doar utilizatorilor avansați. În cele mai multe cazuri, nu este necesară modificarea valorilor implicite ale parametrilor de analiză. Modificarea parametrilor de analiză este stocată în software și poate duce la interpretarea incorectă a analizei datelor obținute.

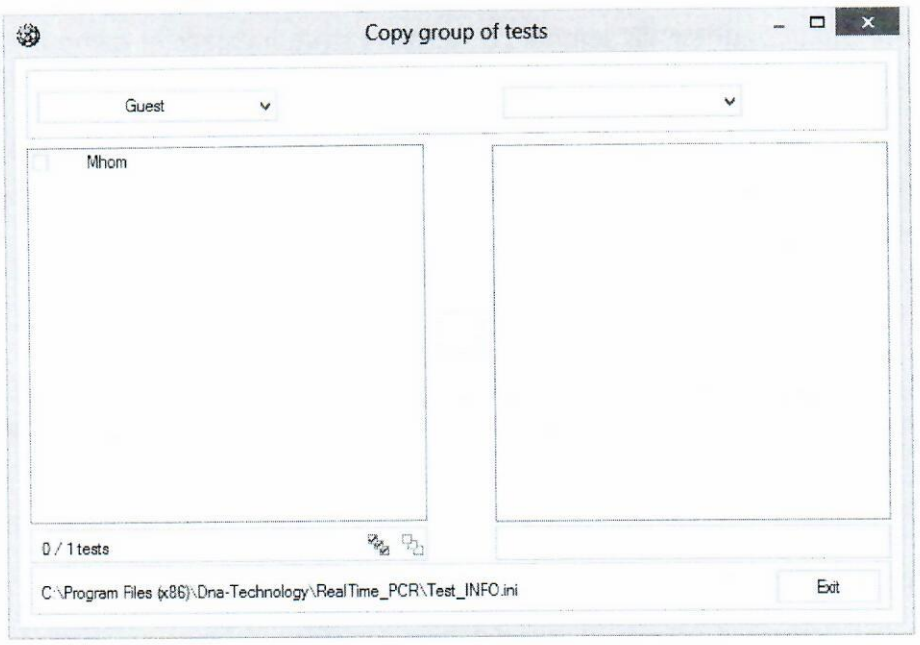
4.1.5.4 Crearea unui nou test utilizând opțiunea de Copiere a grupului de teste

Crearea unui test este posibilă și utilizând fișiere cu parametri de testare pentru software-ul Real_Time PCR, dacă acestea sunt furnizate de un producător de kituri (fișierele ini- sunt furnizate prin tehnologia DNA). Fișierele cu parametrii de testare conțin deja toate informațiile necesare care sunt introduse în fereastra **Test**. În momentul copierii testelor, informațiile sunt salvate în lista testelor operatorului.

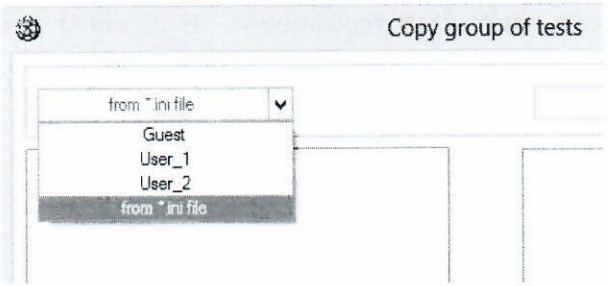
În meniul principal al software-ului **RealTime_PCR** selectați bara de **testare**:



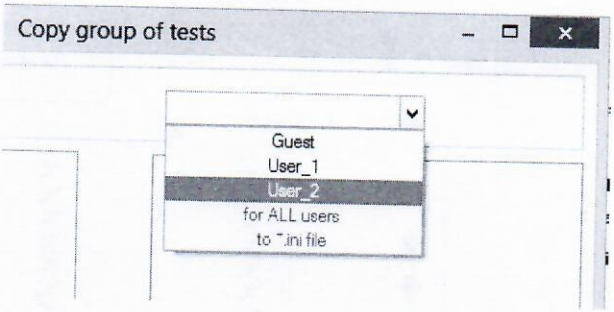
Faceți clic pe **Copiere grup de teste** din lista derulantă. Se deschide fereastra **Copiere grup de teste**.



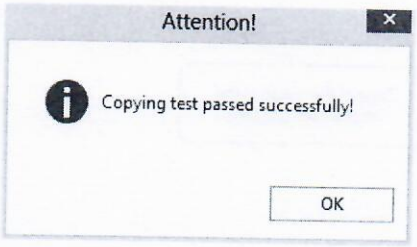
În partea stângă a ferestrei deschise, selectați elementul „din * **.ini file**"



1. În fereastra deschisă selectați fișierul ini- dorit, faceți clic pe „Open"
2. În partea dreaptă a ferestrei „Copiere grup de teste", selectați operatorul care va utiliza acest test.



Faceți clic pentru a alege testul de interes din lista din stânga sau selectați toate testele cu ajutorul butonului și faceți clic pe . După aceea, testul trebuie să se mute în lista din dreapta și va fi afișat următorul mesaj:

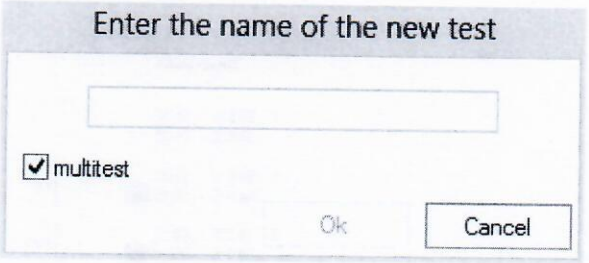


4.1.5.5 Modul multi-test

Modul multi-test **este** opțiunea care permite combinarea mai multor teste într-o singură RULARE cu același program de amplificare și același tip de analiză, creând **studii de lot**.

Modul multi-test poate fi utilizat pentru următoarele **tipuri de analiză: Analiza polimorfismelor (MC), elativă**
și **Calitativă**.

În timp ce se creează o **analiză de lot** (consultați secțiunea 4.1.5 Crearea unui test nou utilizând opțiunea Creare/Editare test), opțiunea mod **multi-test** trebuie activată:



În fereastra deschisă **Test** (Fig. 7) operatorul poate selecta toate testele create anterior, din care operatorul selectează pentru a forma o listă de noi **analize de lot**. Lista de teste a acestei **analize a lotului** în ordinea necesară este afișată în fereastra de **teste Locație** (Fig. 8).

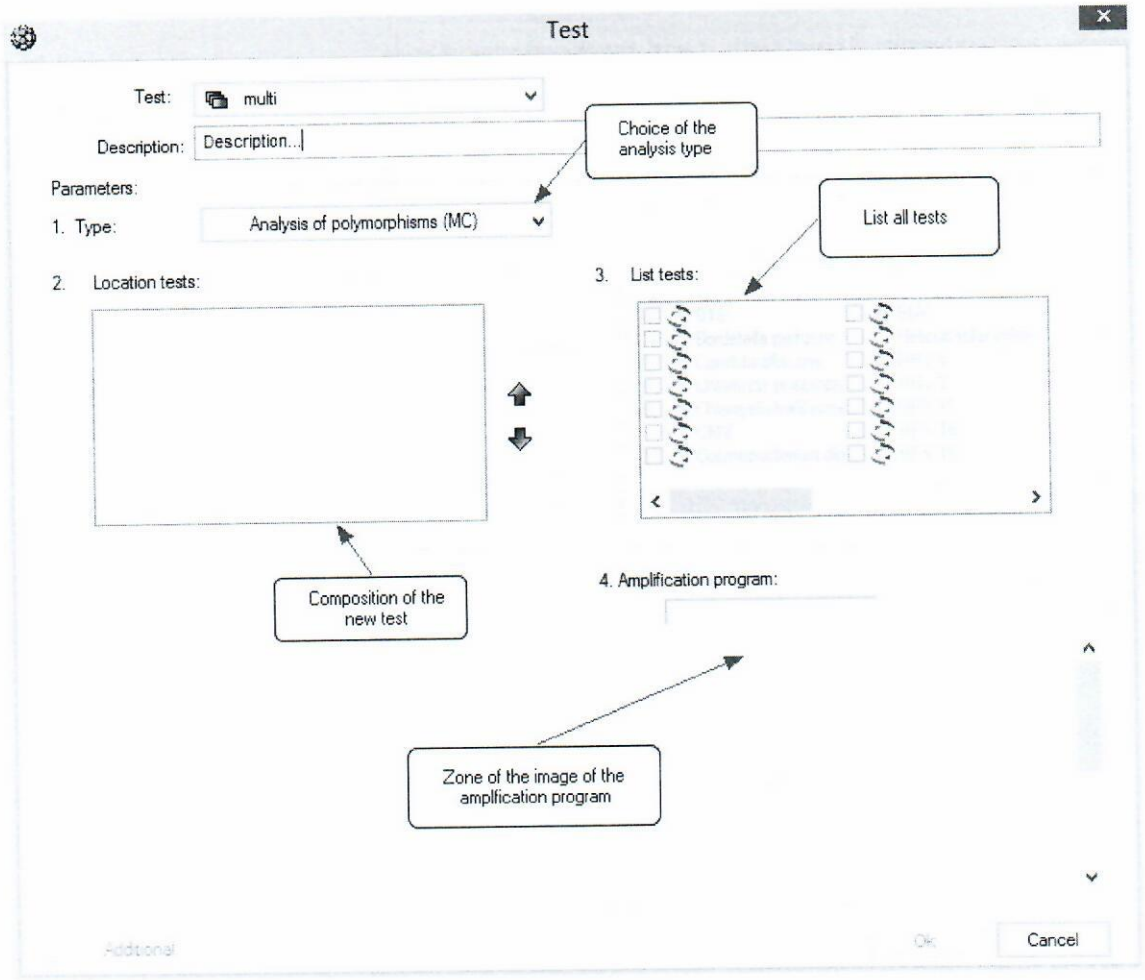


Fig. 7 Fereastra de testare multi-test

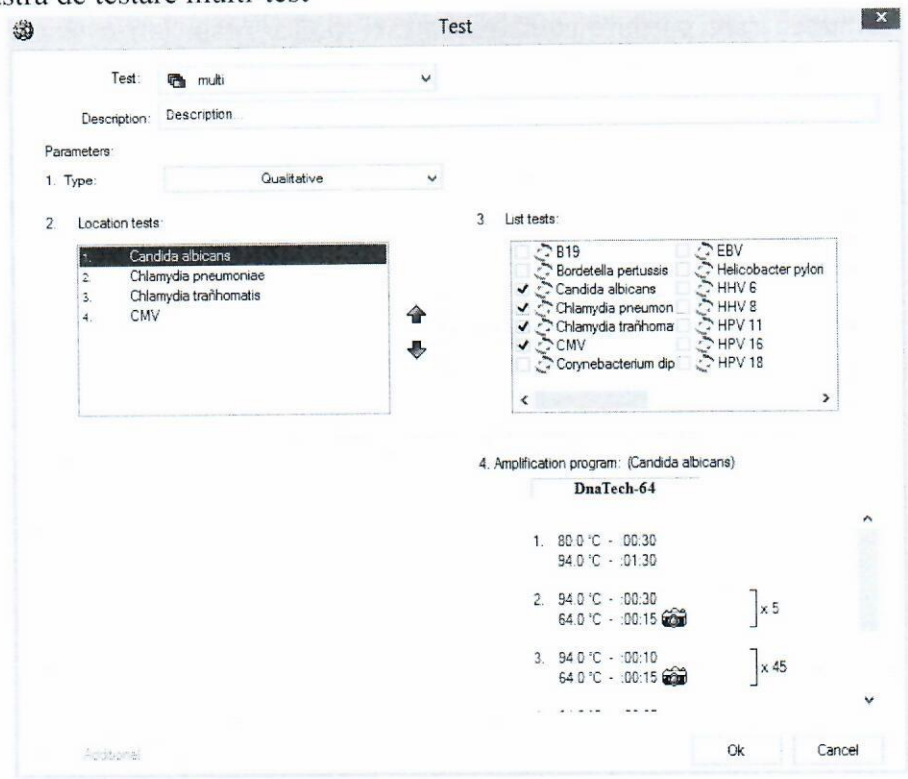
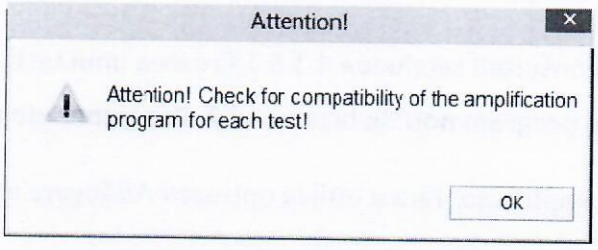


Fig. 8 Fereastra de testare în mod multi-test. Crearea unei analize.

Testele selectate ar trebui să aibă același program de amplificare. Dacă se adaugă un test cu un alt program de amplificare, va apărea un mesaj de avertizare.



După crearea unei noi liste de analiză a loturilor, faceți clic pe OK. Testul creat va fi salvat în lista testelor operatorului și va fi marcat cu o pictogramă

Când se creează o RULARE pentru studiile pe loturi, operatorul marchează numărul de probe dintr-o fereastră **Adăugare test**, există o indicație a numărului de eprubete pentru fiecare probă între paranteze (Fig. 9).

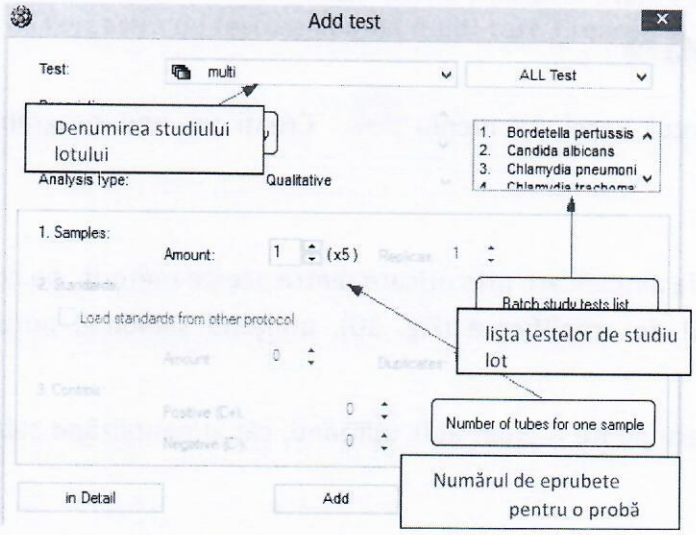


Fig. 9 Fereastra **Adăugare test** atunci când lucrați cu analiza lotului

4.1.6 Programul de amplificare

4.1.6.1 Crearea și editarea programelor de amplificare

Când utilizați opțiunea **Copiere grup de teste**, programul de amplificare este încărcat automat în software.

La crearea unui test cu opțiunea **Creare/Editare test**, programul de amplificare este introdus de operator.

Când se creează o RULARE fără ajutorul unei opțiuni de **Adăugare test**, programul de amplificare este creat de operator sau adăugat din lista de programe create anterior chiar înainte de fiecare pornire a RULĂRII.

4.1.6.2 Crearea unui nou program de amplificare

Există o opțiune de a crea un nou program de amplificare în diferite etape ale software-ului **RealTime_PCR:**

1. Când creați (editați) un test cu opțiunea **Creare/editare test:**

- Deschideți fereastra **Test** (consultați secțiunea 4.1.5.1 Crearea unui test).
- Apăsați butonul **Creare program nou** de la punctul **8. Programul de amplificare**.

2. Când creați un program de amplificare fără a utiliza opțiunea Adăugare test:

- Selectați o filă **Pornire rulare** în fereastra **RealTime_PCR**.
- Apăsați butonul **Creare nou**.

3. Când lucrați în **editorul de programe de Amplificare**:

Programul de amplificare creat va fi disponibil pentru selecție înainte de începerea RULĂRII

- Selectați o filă **Pornire rulare** în fereastra **RealTime_PCR**
- Apăsați butonul Edit
- Apoi selectați elementul Barei de meniu Creați un nou program în **editorul programului Amplificare**
  fereastră

Când creați un nou program de amplificare prin oricare dintre aceste metode, pe ecran apare o fereastră de **șablon pentru programul de amplificare** (Fig. 10). utilizând șablonul, puteți specifica structura programului de amplificare.

Un nou program de amplificare poate fi creat atât utilizând, cât și neutilizând șablonul programului de amplificare.

❖ **Crearea unui nou program de amplificare utilizând șablonul programului de amplificare**

Pentru a crea un nou program de amplificare utilizând un șablon, se vor parcurge următoarele etape:

1. Alegeți o comandă **Creare program nou**. După aceea, se va deschide o fereastră a **Editorului de program de amplificare** și o fereastră de șablon a **programului de amplificare**. Fereastra **șablonului programului de amplificare** (Fig. 10) arată schematic părțile programului de amplificare: blocuri de două și trei trepte ale ciclurilor de temperatură, moduri de preîncălzire și stocare.

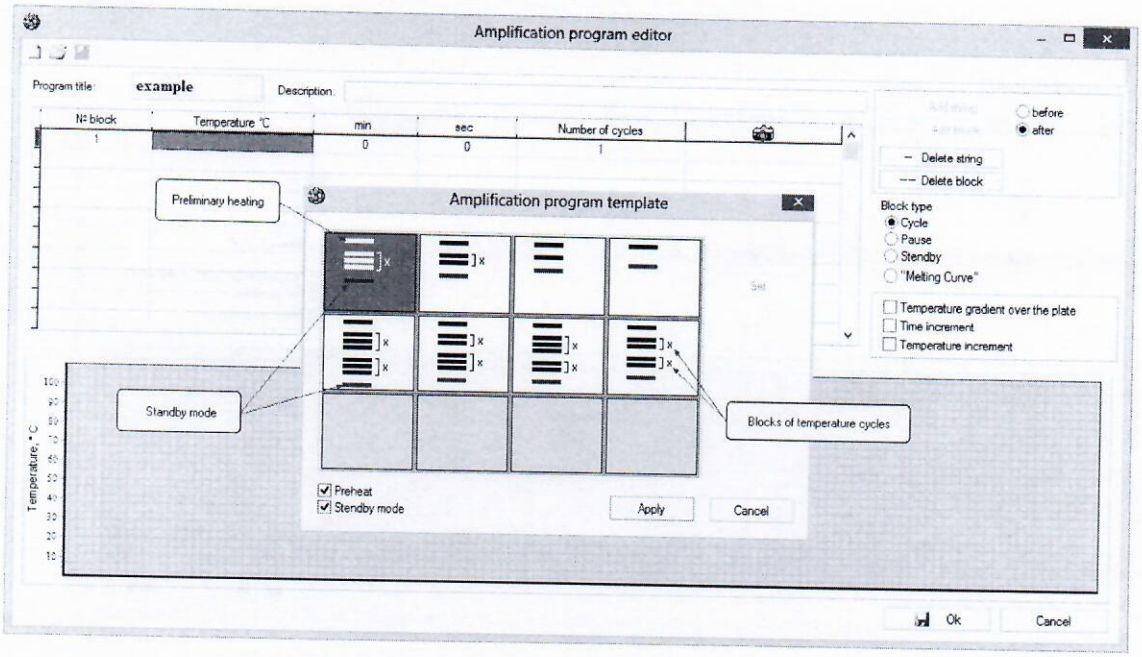


Fig. 10 Fereastra șablonului programului de amplificare

2. Selectați șablonul care se potrivește cel mai bine cu structura.
3. Dacă este necesar, adăugați **moduri de Preîncălzire și Standby** (activați opțiunile corespunzătoare).
4. După selectarea celui mai potrivit șablon, apăsați butonul **Apply (Aplicați)**.

   Informațiile specificate de șablon vor fi afișate în fereastra **Editorul programului de amplificare** (Fig. 11).

5. Editați programul de amplificare:

- Introduceți denumirea programului în câmpul **Titlul programului** (**NOTĂ!** Litere și numere strict latine, fără spații și simboluri)
- Dacă este necesar, completați câmpul **Descriere.**
- Modificați datele necesare în tabelul programului de amplificare.

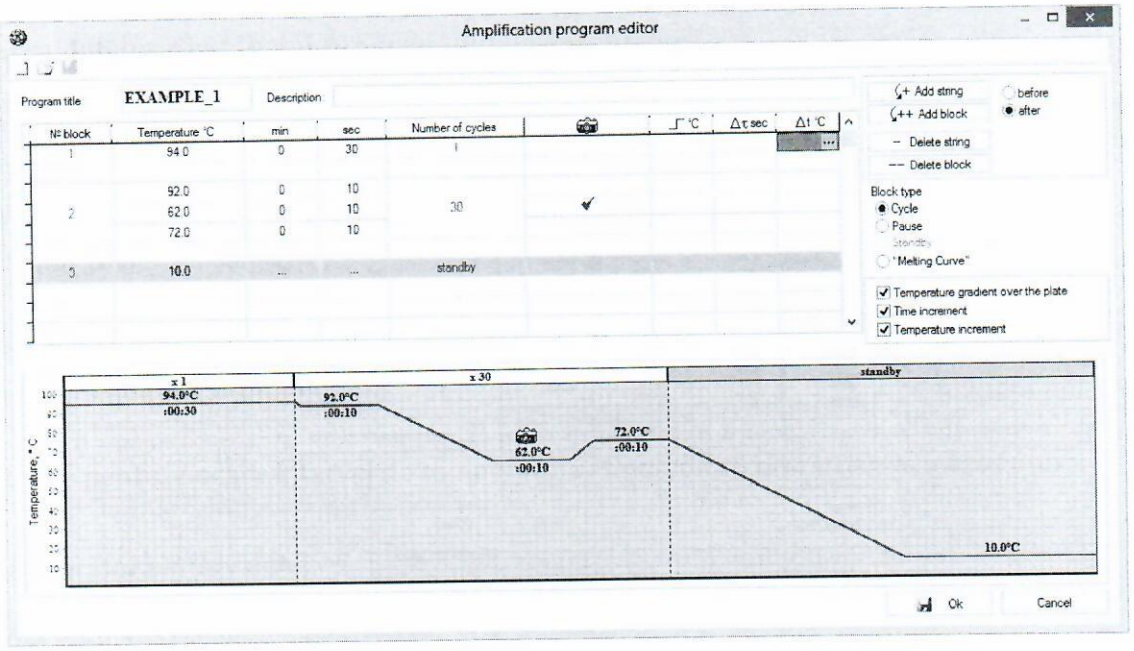


Fig. 11 Fereastra editorului de programe de amplificare

Modificarea datelor din tabelul programului de amplificare

Fiecare rând din tabel corespunde unui interval de temperatură al programului de amplificare. Intervalele de temperatură pot fi combinate în blocuri. Numărul de rânduri din bloc determină numărul intervalelor de temperatură în această etapă a programului. În tabel, blocurile sunt separate unele de altele prin linii goale.

Adăugarea (+ Add string) și eliminarea (– Delete string) intervalului de temperatură este activ doar după finalizarea editării altor linii.

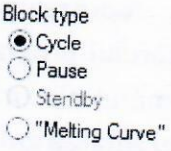
În fiecare linie pentru fiecare interval de temperatură, se modifică următoarele informații:

- temperatura intervalului - (Temperature °C);
- lungimea intervalului - (min) și (sec);
- prezența măsurătorilor optice - (📷).

Atenție! O singură măsurătoare optică este permisă într-un bloc. Câmpurile goale din program nu sunt permise atunci când introduceți valorile de temperatură și timp, cu excepția blocurilor **Pause** și **Standby**.

Adăugarea și ștergerea blocurilor se realizează cu ajutorul butoanelor (++ Add block) și (-- Delete block).

Tipul de bloc trebuie specificat pentru fiecare bloc.



1. **Ciclu** (specificat implicit la crearea unui bloc) - stabilește modul de repetare a programului în această etapă a funcționării sale până la un număr specificat de cicluri;
2. **Pauză** - pauze în modul de executare a programului;
3. **Standby** - setează temperatura de stocare după executarea programului;

   Atenție! Modul „Standby" poate fi setat doar la sfârșitul programului.
4. **Curba de topire** - permite obținerea de profiluri de topire pentru estimarea lungimilor și compoziției fragmentelor amplificate.

   Selectarea **Curbei de topire** permite crearea blocului de temperatură implicit al unui interval de temperatură, cu o temperatură inițială de 90°C, numărul de cicluri egal cu 100 și crescut în fiecare ciclu de temperatură de -0,5°C. Setările inițiale ale blocului „Curba de topire" pot fi editate utilizând creșterea de temperatură.

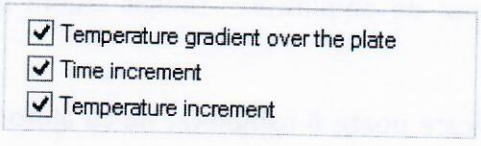
Numărul de cicluri trebuie specificat pentru fiecare bloc.

№ block	Temperature °C	min	sec	Number of cycles	
1	94.0	0	30	1	
2	92.0	0	10	30	
	62.0	0	10		✓
	72.0	0	10		
3	10.0	...	...	standby	

Dacă este necesar, parametrii de adăugare pot fi specificați pentru fiecare interval de temperatură:

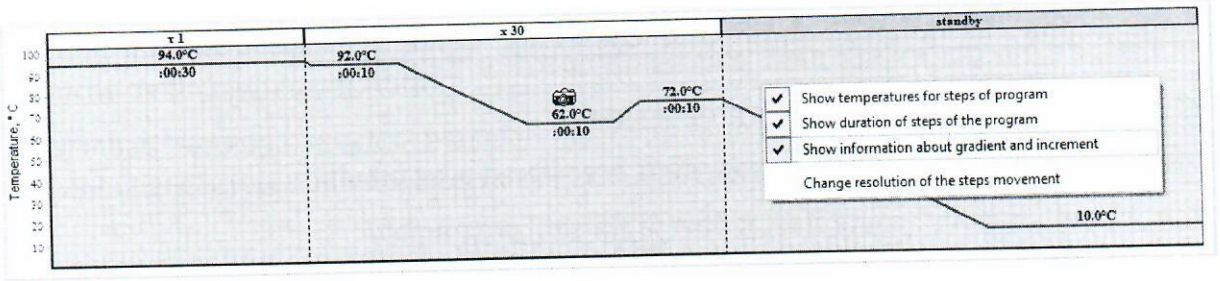
- gradient de temperatură peste placă (scădere de temperatură în toată matricea), afișat în tabelul de amplificare din coloana indicată de ⌐ °C;
- creștere interval de timp, afișată în tabelul de amplificare din coloana indicată de Δτ sec
- creșterea temperaturii, afișată în tabelul de amplificare din coloana indicată de Δt °C

Pentru a afișa parametrii specificați în tabel, activați opțiunile corespunzătoare:



Editarea acestor parametri este descrisă în secțiunile respective din acest manual.

În timpul creării/editării programului de amplificare, **reprezentarea grafică a programului de amplificare** este afișată în partea de jos a ferestrei **Editorului programului de amplificare**. Odată cu orice modificare din intervalul valorilor temperaturii, numărul blocurilor de temperatură, numărul de cicluri, modificarea tipului de bloc etc. sunt afișate în reprezentarea grafică a programului de amplificare.



Intervalul de temperatură poate fi modificat prin editarea imaginii grafice a programului de amplificare. Pentru a realiza acest lucru, aduceți cursorul mouse-ului pe intervalul de temperatură (cursorul mouse-ului devine) și, în timp ce țineți apăsat butonul stâng al mouse-ului, mutați (în direcția verticală) intervalul de temperatură la temperatura necesară.

Reprezentarea grafică a programului de amplificare poate fi modificată utilizând meniul contextual, care poate fi deschis prin intermediul butonului dreapta al mouse-ului și conține următoarele elemente:

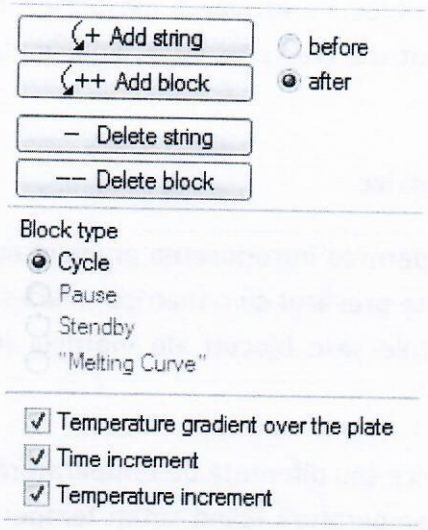
- Afișați temperatura pentru etapele programului
- Afișați durata etapelor programului
- Afișați informații despre gradient și creștere (scăderea temperaturii în matrice, creșterea în funcție de timp și temperatură)
- Schimbați rezoluția mișcării etapelor (apare o fereastră cu una dintre cele trei valori ale distribuției discrete a mutării intervalelor: 1°C, 0.5°C, 0.1°C).

❖ Crearea unui nou program de amplificare fără a utiliza șablonul programului de amplificare

Pentru a crea un nou program de amplificare fără a utiliza un șablon, respectați următoarele etape:

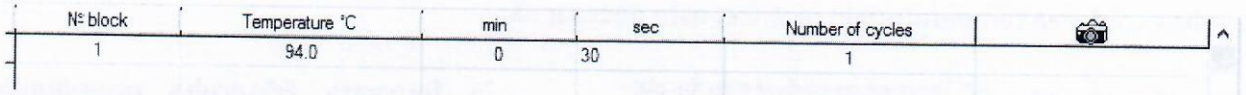
1. Alegeți o comandă **Creare program nou**. După aceea, **se va deschide o fereastră a Editorului de program de amplificare și o fereastră a șablonului de program de amplificare.**
2. Apăsați butonul **Anulare** din **fereastra șablonului de program de amplificare.**
3. Introduceți denumirea programului de amplificare în câmpul **Titlu program.**
4. Dacă este necesar, completați câmpul **Descriere.**
5. Completați tabelul cu programul de amplificare, similar creării unui program de amplificare utilizând un șablon.

Notă: Tabelul cu programul de amplificare poate fi completat fie cu ajutorul butoanelor de editare din dreapta tabelului, fie prin intermediul tastaturii.



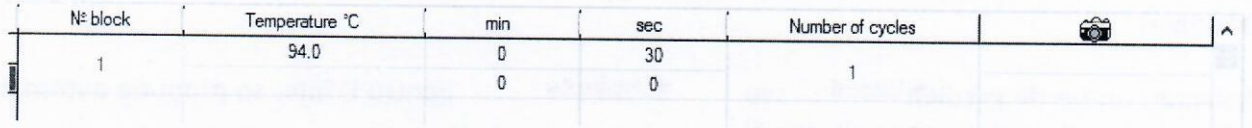
Completarea tabelului programului de amplificare cu ajutorul tastaturii:

Pentru a completa tabelul programului de amplificare cu ajutorul tastaturii, este necesar să completați câmpurile de temperaturi și ore (minute, secunde). Introducerea fiecărei noi valori finalizate prin apăsarea tastei <Enter>.



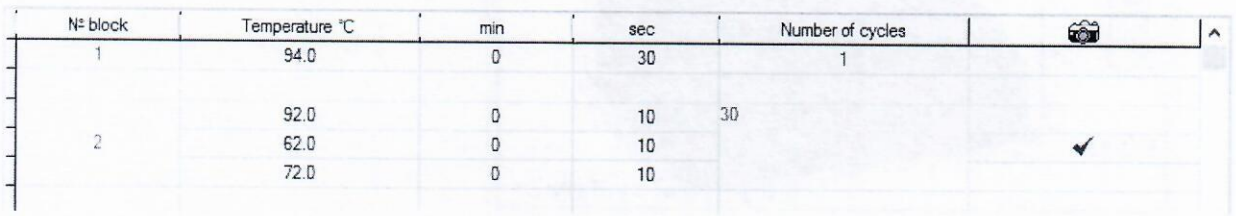
№ block	Temperature °C	min	sec	Number of cycles	
1	94.0	0	30	1	

După introducerea tuturor parametrilor (temperatură, minute și secunde) a liniei curente, apare automat o nouă linie a aceluiași bloc cu câmpuri goale pentru înregistrare.



№ block	Temperature °C	min	sec	Number of cycles	
1	94.0	0	30	1	
		0	0		

Pentru a finaliza blocul, apăsați tasta <Enter> fără a introduce temperatura și ora în noua linie. După aceea, editarea valorii numărului de cicluri din bloc devine activă. Apăsând tasta <Enter> pentru a introduce o nouă valoare, „Numărul de cicluri" se termină și trece la un bloc nou.



№ block	Temperature °C	min	sec	Number of cycles	
1	94.0	0	30	1	
	92.0	0	10	30	
2	62.0	0	10		✓
	72.0	0	10		

În continuare, se specifică tipul fiecărui bloc, se activează măsurători optice și, dacă este necesar, se indică schimbarea temperaturii într-o matrice, creșterea intervalului de timp și a temperaturii (consultați temele aferente).

- **Gradient de temperatură în matrice**

Folosirea gradientului de temperatură permite introducerea gradientului de temperatură orizontal sau vertical în matrice dacă instrumentul este prevăzut cu o matrice solidă sau, în mod independent, pentru a regla temperatura fiecăruia dintre cele șase blocuri ale matricei (4 x 4), dacă instrumentul este prevăzut cu pseudo-blocuri.

Valoarea maximă a gradientului în matrice sau diferența de temperatură dintre diferitele zone este de ± 10°C. Astfel, utilizând o diferență de temperatură (când setați temperaturi diferite în blocuri), se pot utiliza șase profiluri de temperatură diferite cu o începere a RULĂRII, ce permite reacții simultane cu parametri de temperatură diferiți.

Gradientul de temperatură (schimbare lină, orizontală sau verticală a temperaturii în bloc) este utilizat în laboratoarele științifice pentru a optimiza profilele de temperatură.

Pentru a indica scăderea temperaturii în matrice, este necesar să:

1. Activați opțiunea ☑ Temperature gradient over the plate în fereastra **Editorului programului de amplificare**.
2. Deschideți fereastra din rândul corespunzător al tabelului cu ajutorul programului de amplificare utilizând butonul  . **Utilizați gradientul de temperatură** (Fig. 12) (exemplu pentru DTprime).
3. Selectați un tip de gradien ◉ Vertical sau ◉ Horizontal pentru DTlite, se propune automat **utilizarea gradientului de temperatură)**.

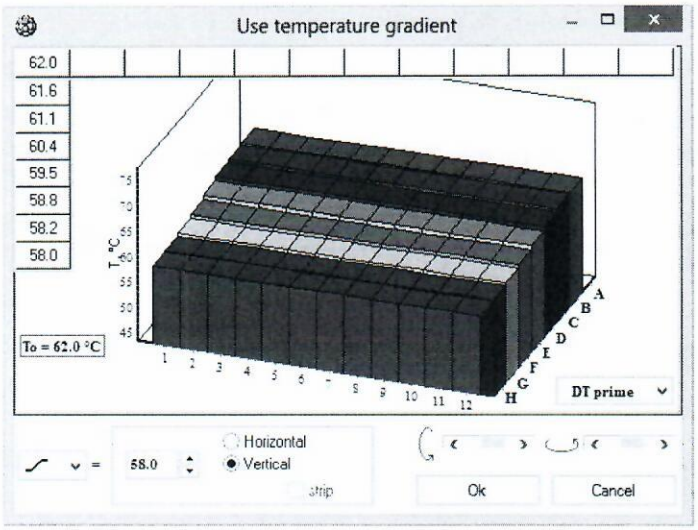
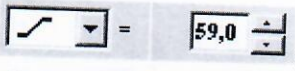


Fig.12 **Utilizarea gradientului de temperatură** (Gradient vertical)

4. Pentru a introduce un gradient în ferestrele  selectați un simbol de gradient și introduceți temperatura marginii frontale a matricei atunci când selectați un gradient vertical sau marginea dreaptă a matricei atunci când selectați un gradient orizontal.

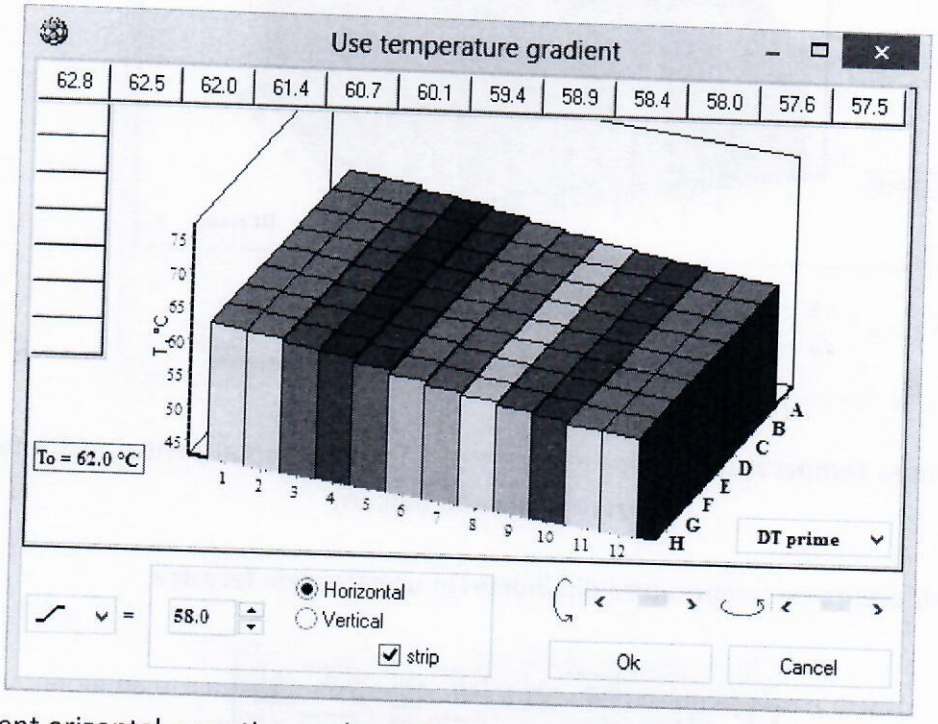


Fig. 13 Gradient orizontal cu opțiunea „bandă"

Dacă alegeți Selectarea unui gradient orizontal,opțiunea  poate fi setată utilizând în acest caz câmpul matricei 8x8 cu o liniaritate îmbunătățită a gradientului (zona colorată din Fig. 13).

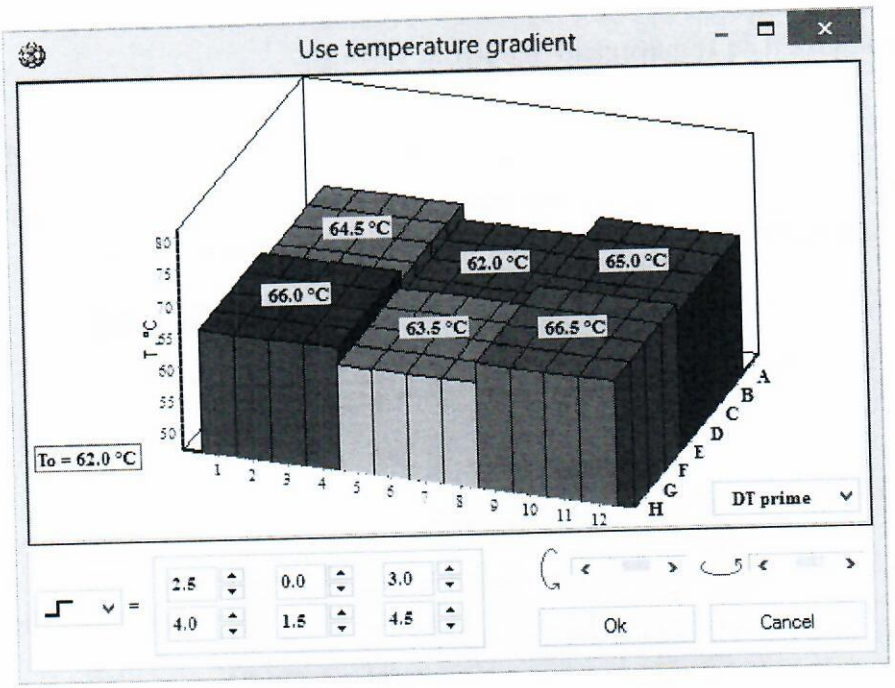
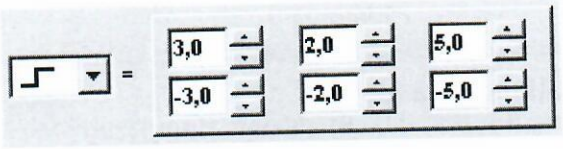


Fig. 14 Scăderea temperaturii în blocurile pentru DTprime (numai pentru instrumentele cu pseudo blocuri)

Pentru a introduce diferența de temperatură din blocuri în următoarele ferestre



selectați simbolul diferenței și introduceți valoarea acesteia în raport cu temperatura intervalului pentru fiecare pseudo bloc al matricei (Fig. 14).

5. Faceți clic pe **OK** pentru a finaliza înregistrarea; în caz contrar, faceți clic pe **Anulare**.

- **Creșterea în timp**

Utilizarea creșterii în timp permite schimbarea unei **durate a** intervalului de temperatură dat pentru fiecare ciclu ulterior, cu valoarea unei creșteri date.

Pentru a seta creșterea în timp:

1. Activați opțiunea ☑ Time increment în fereastra **Editorului programului de amplificare**.
2. Utilizând butonul Δτ sec ... deschideți fereastra din rândul corespunzător al tabelului cu programul de amplificare **Creștere utilizare** (Fig. 15).

3. Activați opțiunea **Utilizare creștere interval de timp** (câmpul de înregistrare a creșterii în timp devine Δτ = 0 , sec).
4. Introduceți creșterea în timp.
5. Faceți clic pe **OK** pentru a finaliza înregistrarea, în caz contrar, faceți clic pe **Anulare.**

În cursul editării valorii creșterii, durata intervalului de temperatură este recalculată automat pentru fiecare ciclu ulterior și este afișată grafic ca o dependență de numărul ciclului.

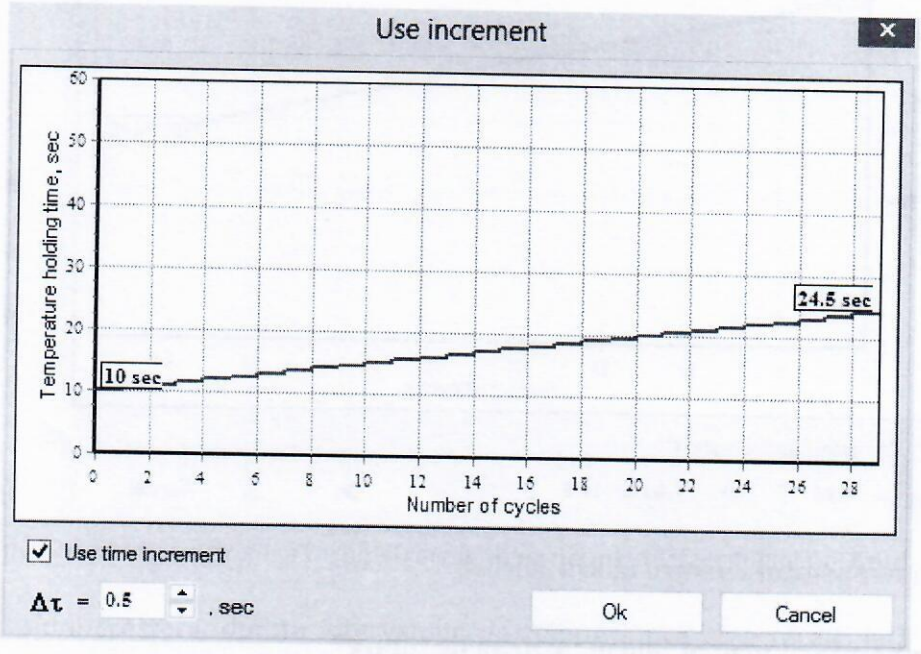


Fig. 15 Creșterea timpului

Creșterea temperaturii pentru blocul „Ciclu"

Utilizare creșterea temperaturii pentru a crea un bloc „Ciclu", care permite modificarea **valorii** acestei temperaturi în matrice pentru a efectua intervalele de temperatură pentru fiecare ciclu ulterior cu valoarea creșterii specificate.

Pentru indicarea creșterii temperaturii:

1. Activați opțiunea ☑ Temperature increment în fereastra **Editorului programului de amplificare**.
2. Cu ajutorul butonului Δt °C ... deschideți fereastra din rândul corespunzător al tabelului cu programul de amplificare **Utilizare creștere** (Fig. 16) pentru a edita creșterea de temperatură
3. Activați opțiunea **Utilizare creștere a temperaturii.**

4. Introduceți valoarea creșterii în funcție de temperatură Δt = 0,40 °C sau intervalul de temperatură pentru ciclul final al blocului (creșterea va fi calculată automat) Tend = 51.8 °C.
5. Faceți clic pe **OK** pentru a finaliza înregistrarea, în caz contrar, faceți clic pe **Anulare.**

În cursul editării valorii creșterii, temperatura intervalului este recalculată automat pentru fiecare ciclu ulterior și este afișată grafic ca o dependență de numărul ciclului.

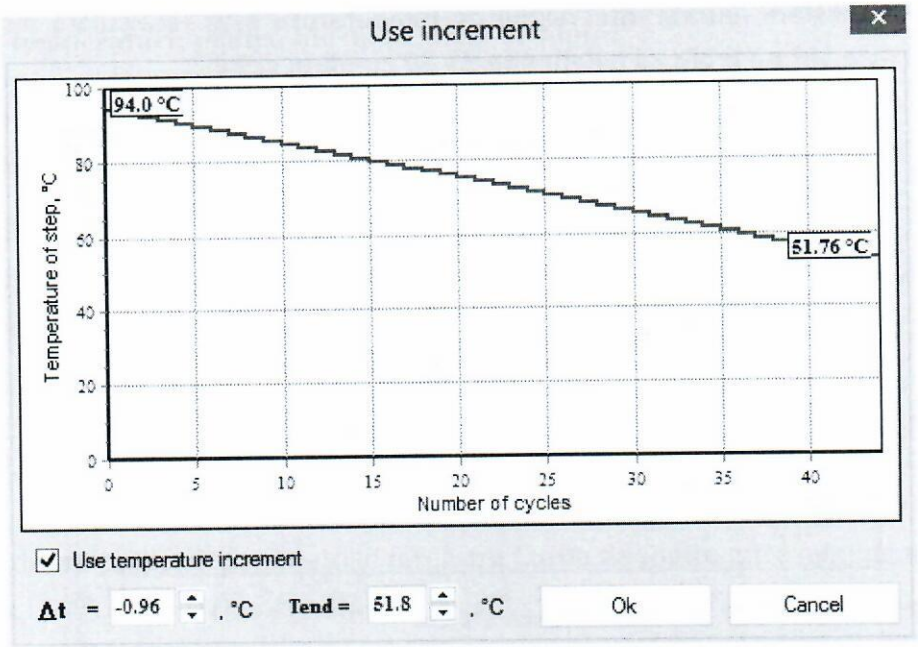


Fig. 16 Creșterea temperaturii pentru blocul „Ciclu"

- **Creșterea temperaturii pentru blocul „Curba de topire"**

Utilizarea creșterii temperaturii la crearea blocului „Curba de topire" permite editarea parametrilor inițiali ai acestui bloc.

Pentru asta, procedați după cum urmează:

1. Activați opțiunea ☑ Temperature increment în fereastra **Editorului programului de amplificare**.
2. Cu ajutorul butonului Δt °C deschideți fereastra din rândul corespunzător al tabelului cu programul de amplificare **Curba de topire** (Fig. 17) pentru a edita parametrii inițiali ai acestui bloc.
3. Setați trei dintre cei patru parametri în fereastra **Curba de topire** (de exemplu, temperatura inițială ☑ 90.0 To, °C, creșterea temperaturii ☑ -0.50 dT, °C și numărul de cicluri ☑ 100). Al patrulea parametru va fi calculat automat.
4. Faceți clic pe Apply pentru a finaliza înregistrarea; altfel, faceți clic pe Cancel.

În cursul editării parametrilor ferestrei curbei de topire, temperatura intervalului este recalculată automat pentru fiecare ciclu ulterior și este afișată grafic ca o dependență de numărul ciclului.

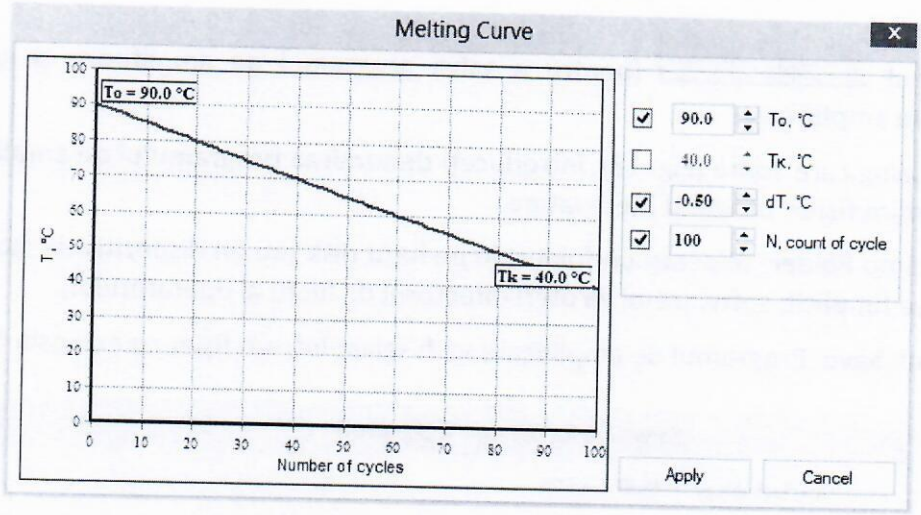


Fig. 17 Creșterea temperaturii pentru blocul „Curba de topire"

4.1.6.3 Editarea programului de amplificare

Editați programele de amplificare existente în diferite etape ale **software-ului RealTime_PCR:**

1. În momentul creării și editării testelor:

- Deschideți fereastra **Test**.
- Apăsați butonul **Editare** în secțiunea **Programul de amplificare**.

2. Înainte de a porni programul de amplificare:

- Selectați o filă **Pornire rulare** în fereastra **RealTime_PCR**.
- Apăsați butonul **Edit** Edit

3. Când lucrați în editorul de programe de amplificare:

- Selectați elementul din **fereastra editorului de programe de Amplificare:** - Deschideți programul de pe hard disk sau de pe un dispozitiv de stocare a datelor.

Pentru a edita programul de amplificare, efectuați următoarele acțiuni:

1. Alegeți comanda **Editare program**, apoi se va deschide **Fereastra de program de amplificare**.
2. Editați programul de amplificare, similar cu crearea unui program de amplificare utilizând un șablon.

4.1.6.4 Salvarea programului de amplificare

Pentru a salva programul de amplificare:

1. Apăsați butonul Ok (pentru a salva programul de amplificare și ieșire) **Editorul programului de amplificare.**
2. În caseta de dialog care apare (Fig. 18), introduceți **denumirea programului de amplificare creat în câmpul Denumire fișier**, utilizând litere latine.
3. Utilizând un câmp **Folder**, selectați un folder de pe hard disk sau un dispozitiv de stocare a datelor pentru a-l salva (implicit, software-ul va oferi directorul de lucru al operatorului).
4. Apăsați butonul **Save**. Programul de amplificare va fi salvat într-un fișier cu extensia *.rta.

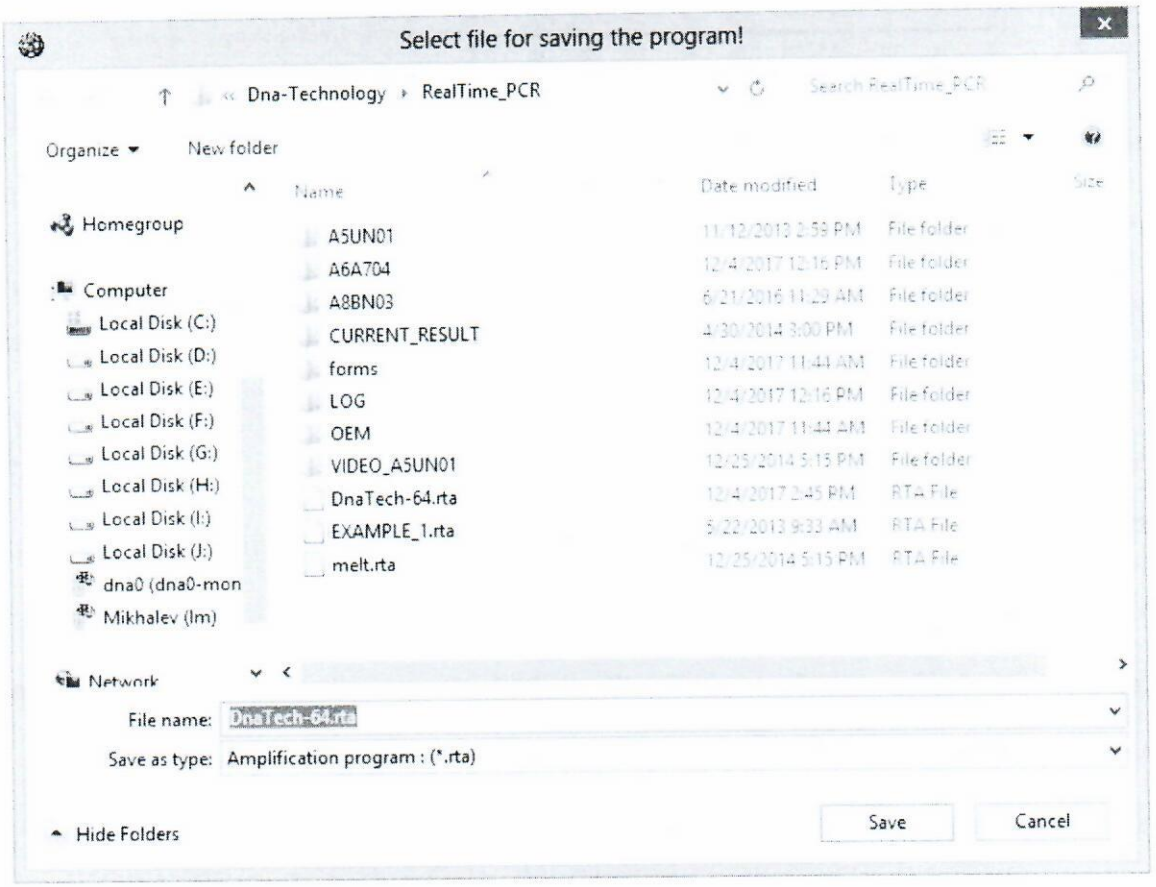


Fig. 18 Salvarea programului de amplificare.

4.2 Crearea unui protocol alplăcii.

4.2.1 Informații generale despre protocolul plăcii.

Înainte de amplificare, este necesar să completați protocolul plăcii (Fila **Protocol** în fereastra **RealTime_PCR**).

Protocolul plăcii include următoarele componente:

1. Informații despre analiză:

- identificatorul (descrierea) fiecărei eprubete,
- tipul fiecărei eprubete,
- numărul de duplicate din fiecare probă,
- concentrația probelor de calibrare (pentru studii cantitative),
- fluorofor utilizat (colorant fluorescent) și scopul său,
- program de amplificare.
- amplasarea eprubetelor în unitatea termică a dispozitivului,

2. Informații suplimentare:

- numărul de protocol al plăcii,
- numele operatorului,
- data analizei.

Datele protocolului plăcii sunt afișate într-un tabel, fiecare linie conținând informații despre o singură eprubetă (Fig. 19).

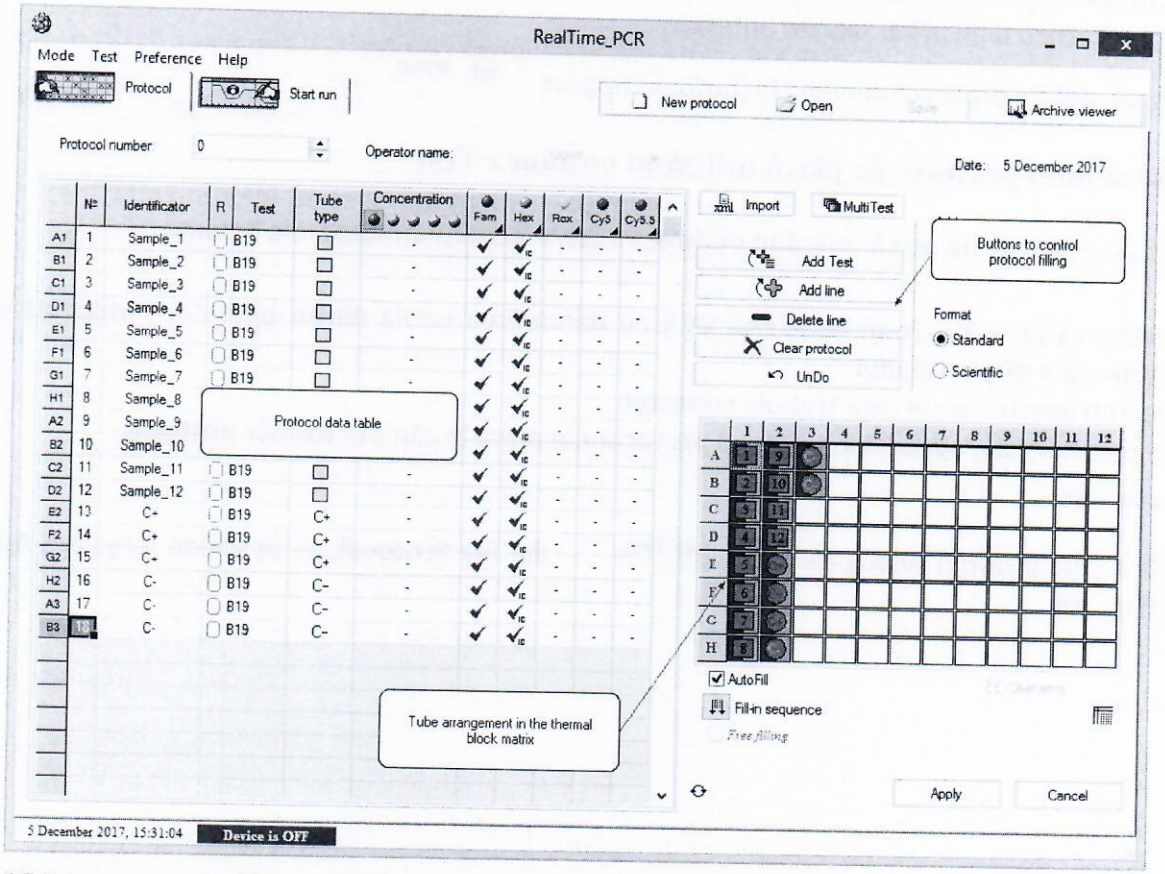
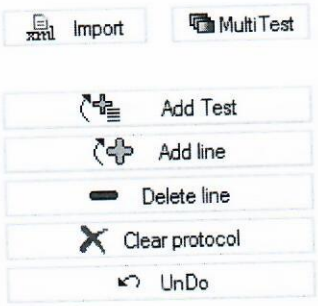


Fig. 19 Fereastra „RealTime_PCR", fila protocolului plăcii

Locația eprubetelor în unitatea termică a dispozitivului este afișată schematic în partea din dreapta jos a ferestrei „RealTime_PCR" (Fig. 19).

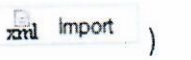
Editarea protocolului plăcii se realizează cu ajutorul butoanelor situate în dreapta tabelului:



Protocolul plăcii poate fi completat în următoarele moduri:

1. Utilizând opțiunea **Test** cu parametrii standard salvați ai analizei.

   Testele (create utilizând opțiunile **Creare/editare** sau **Copiere grup de teste**) sunt disponibile pentru operatorul care le-a creat și pot fi accesate apăsând butonul **Adăugare test**.

2. Prin completarea manuală a protocolului plăcii, linie cu linie.
3. Utilizați protocoalele plăcii salvate anterior.
4. Importați datele protocolului din LIS (butonul Import 

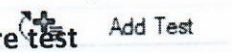
)

4.2.2 Crearea unui protocol de placă utilizând opțiunea Test

Pentru a crea un protocol de placă utilizând opțiunea Test, efectuați următoarele acțiuni:

1. Conectați-vă la software-ul RealTime_PCR cu denumirea unuia dintre operatori, utilizând modul de **Funcționare a dispozitivului**
   și selectați instrumentul care trebuie conectat.
2. Dacă este necesar, specificați numărul protocolului plăcii în câmpul **Număr protocol**

3. Faceți clic pe butonul **Adăugare test** 

din **fila Protocol.** Se deschide fereastra **Adăugare test** (Fig. 20).

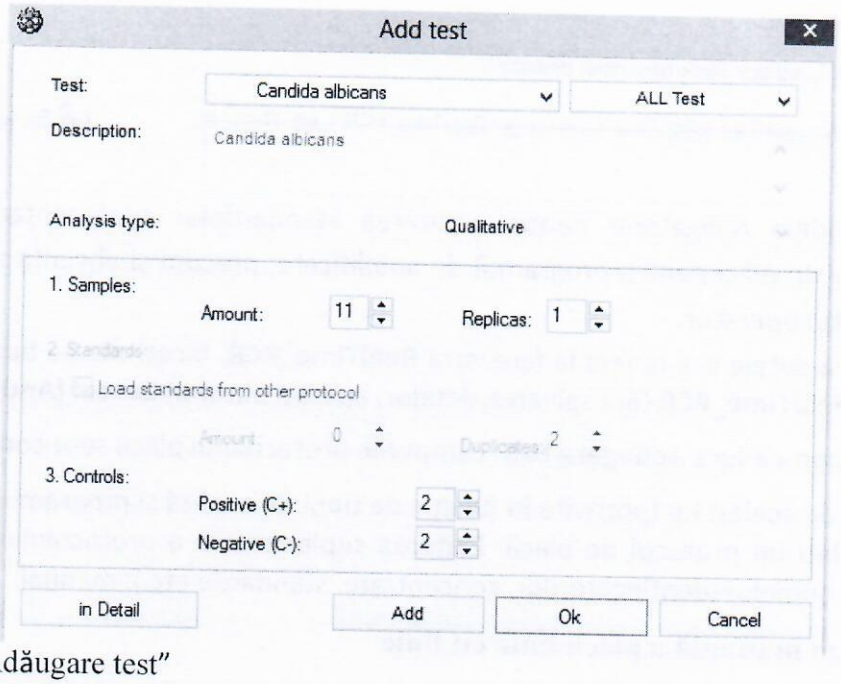
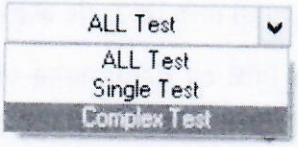


Fig. 20 Fereastra „Adăugare test"

4. Din lista derulantă **Test** (localizată în dreapta) selectați tipul de test: **Simplu** (pentru teste cu o singură eprubetă), **Complex** (pentru teste cu mai multe eprubete) sau **Toate testele**.

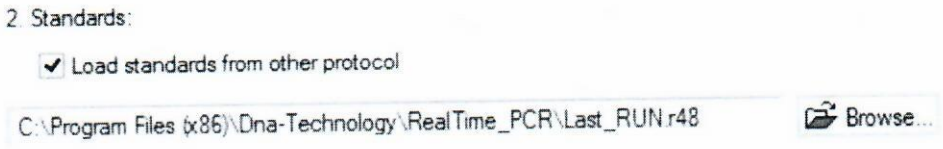


5. Lista derulantă situată în stânga va afișa testele tipului selectat.
6. Selectați o denumire a testului din lista derulantă **Test**. Când testul este selectat, parametrii testului selectat sunt afișați în fereastră.
7. Specificați numărul de probe de testare și numărul de replici pentru fiecare probă din secțiune **Mostre**.
8. Specificați numărul de eprubete cu probe de control din secțiunea **Comenzi**.
9. Când efectuați analiza cantitativă, specificați numărul de probe de calibrare și numărul de repetări ale fiecărei probă în secțiunea **Standarde**.

Notă: În timpul analizei, este posibil să utilizați „standarde" dintr-o altă RULARE (pentru mai multe detalii, consultați secțiunea **Standarde suplimentare**). Pentru a face acest lucru:

- activați opțiunea **Standarde de încărcare din alte RULĂRI;**
- cu ajutorul butonului **Browse**, deschideți fereastra de selectare a fișierelor cu standarde suplimentare;
- selectați RULAREA dorită.

Calea către fișierul selectat va fi afișată în opțiunea **Standarde**.



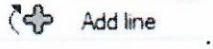
Atenție! Condiția obligatorie pentru utilizarea standardelor suplimentare este identitatea protocoalelor de plăci pentru programul de amplificare, precum și absența modificărilor în lista testelor acestui operator.

10. Pentru a salva datele și a reveni la fereastra **RealTime_PCR,** faceți clic pe butonul **OK**. Pentru a reveni la fereastra **RealTime_PCR** fără salvarea datelor, apăsați butonul **Cancel (Anulare).**
11. Când utilizați procedura **Adăugare test**, câmpurile protocolului plăcii sunt completate automat.
12. Doar testele de același tip (potrivite în funcție de tipul de analiză și programul de amplificare) pot fi adăugate într-un protocol de placă. Editarea suplimentară a protocolului plăcii este posibilă (schimbarea numelor identificatorilor, concentrare, standarde etc.), manual.

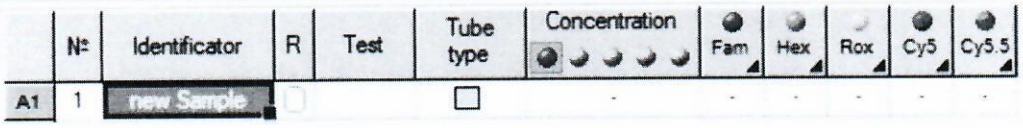
4.2.3 Completarea manuală a plăcii linie cu linie

În această opțiune, toate informațiile din câmpurile protocolului plăcii sunt introduse manual. Prin crearea protocolului de placă linie cu linie, este imposibil să se modifice tipul de analiză a datelor. Va fi utilizat automat un tip de analiză calitativă.

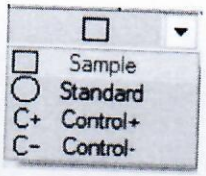
Pentru a umple manual protocolul plăcii, efectuați următoarele acțiuni:

1. Conectați-vă la software-ul RealTime_PCR cu denumirea unuia dintre operatori, utilizând modul de **Funcționare a dispozitivului** și selectați instrumentul care trebuie conectat.
2. Dacă este necesar, specificați numărul protocolului plăcii în câmpul **Număr protocol**.
3. Pentru a adăuga o nouă linie (descrierea noii eprubete), apăsați butonul **Adăugare linie** 

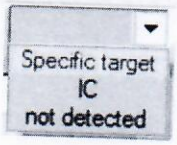
4. Următoarele date din linie pot fi editate:



- ***Nr.*** (numărul eprubetei). Se completează automat la adăugarea unei noi linii. Dacă este necesar, datele pot fi editate.
- ***Identificator*** (denumire scurtă a probei) - o descriere arbitrară a eprubetei, cum ar fi numele pacientului, numărul probei etc.
- ***R*** (adăugarea duplicatelor). De fiecare dată când apăsați un buton din rândul corespunzător, în câmpul R este creată o linie aferentă, cu o descriere identică a eprubetei (duplicat). Crearea duplicatelor este posibilă după introducerea tuturor informațiilor despre eprubetă. Pentru a schimba informațiile despre blocul de duplicate, trebuie modificată „linia antet" a blocului de duplicate.
- ***Tip eprubetă.*** Următoarele tipuri trebuie selectate din lista derulantă: Probă, Standard, Control + sau Control.



- ***Concentrație.*** Completat cu tipul ***Standard*** de eprubetă. Este necesar să se indice concentrația probei de calibrare.
- ***Fam, Hex, Rox, Cy5 și Cy5.5*** *(pentru un instrument cu 5 canale)* - alegeți din lista derulantă scopul fluoroforului (țintă specifică, IC, nedetectată).



Câmpul ***Test*** rămâne necompletat.

La crearea RULĂRII în acest fel, tipul de analiză este Calitativ.

Odată finalizat programul de amplificare, se pot face următoarele modificări asupra protocolului plăcii: tipul de analiză, valorile calibratoarelor, tipul eprubetelor, duplicatele, identificatorii.

Atenție! Nu completați un protocol de placă fără a utiliza procedura de **testare** (utilizând opțiunile **Creare/editare** sau **Copiere grup de teste**), deoarece fereastra de **Parametrii de analiză** (consultați secțiunea 8 din acest manual) nu va fi activă, iar coeficienții de calibrare optică a dispozitivului nu vor fi utilizați.

4.2.4 Amplasarea eprubetelor în matricea unității termice

După completarea câmpurilor de protocol cu plăci cu datele eprubetelor, este necesar să se specifice locația eprubetelor în unitatea termică a dispozitivului. Eprubetele pot fi plasate în matrice automat sau manual.

La umplerea protocolului plăcii prin oricare dintre metodele de mai sus, eprubetele sunt plasate automat în matricea unității termice.

Cu ajutorul butonului Fill-in sequence alegeți ordinea de umplere: pe rânduri sau pe coloane (Fig. 21)

Eprubetele pot fi plasate manual într-o ordine deliberată. Pentru a face acest lucru, dezactivați tasta AutoFill modul, apăsați

Free filling modul, ștergeți câmpul matricei utilizând butonul Clear array , așezați toate eprubetele în matrice utilizând cursorul mouse-ului.

Butonul este destinat afișării unei imagini grafice a unei ferestre matrice. Această imagine poate fi tipărită sau salvată într-un fișier.

Pentru diferite tipuri de dispozitive, aranjarea schematică a eprubetelor va fi diferită. Aceasta depinde de numărul de eprubete din matrice.

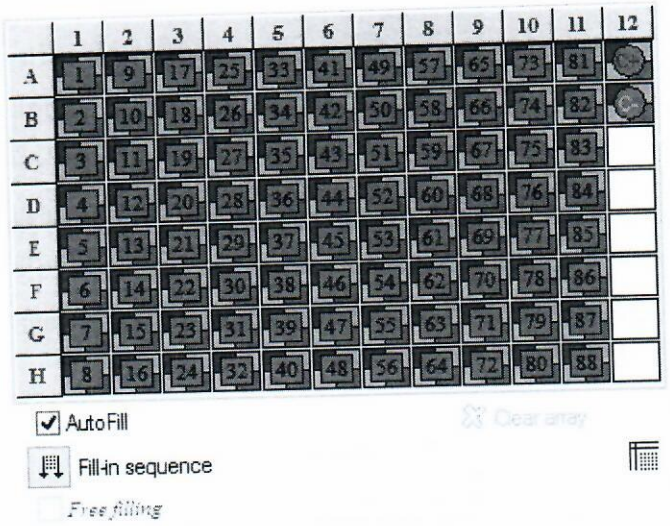


Fig. 21 Dispunerea schematică a eprubetelor în matricea unității termice

Pentru a edita și porni programul de amplificare, apăsați butonul **Apply (Aplicați)**.

După ce faceți clic pe butonul **Apply (Aplicați)** software-ului trece automat la **Pornirea rulării.**

4.2.5 Pornirea programului de amplificare

Porniți programul de amplificare din fila **Pornirea rulării** din fereastra **RealTime_PCR** după crearea unui protocol de placă (consultați „Crearea unui protocol de placă").

În mod implicit, fila afișează programul introdus de operator la **crearea/editarea testului**. La crearea unui test cu **fișiere ini**-, programul necesar este încărcat automat (Fig. 22).

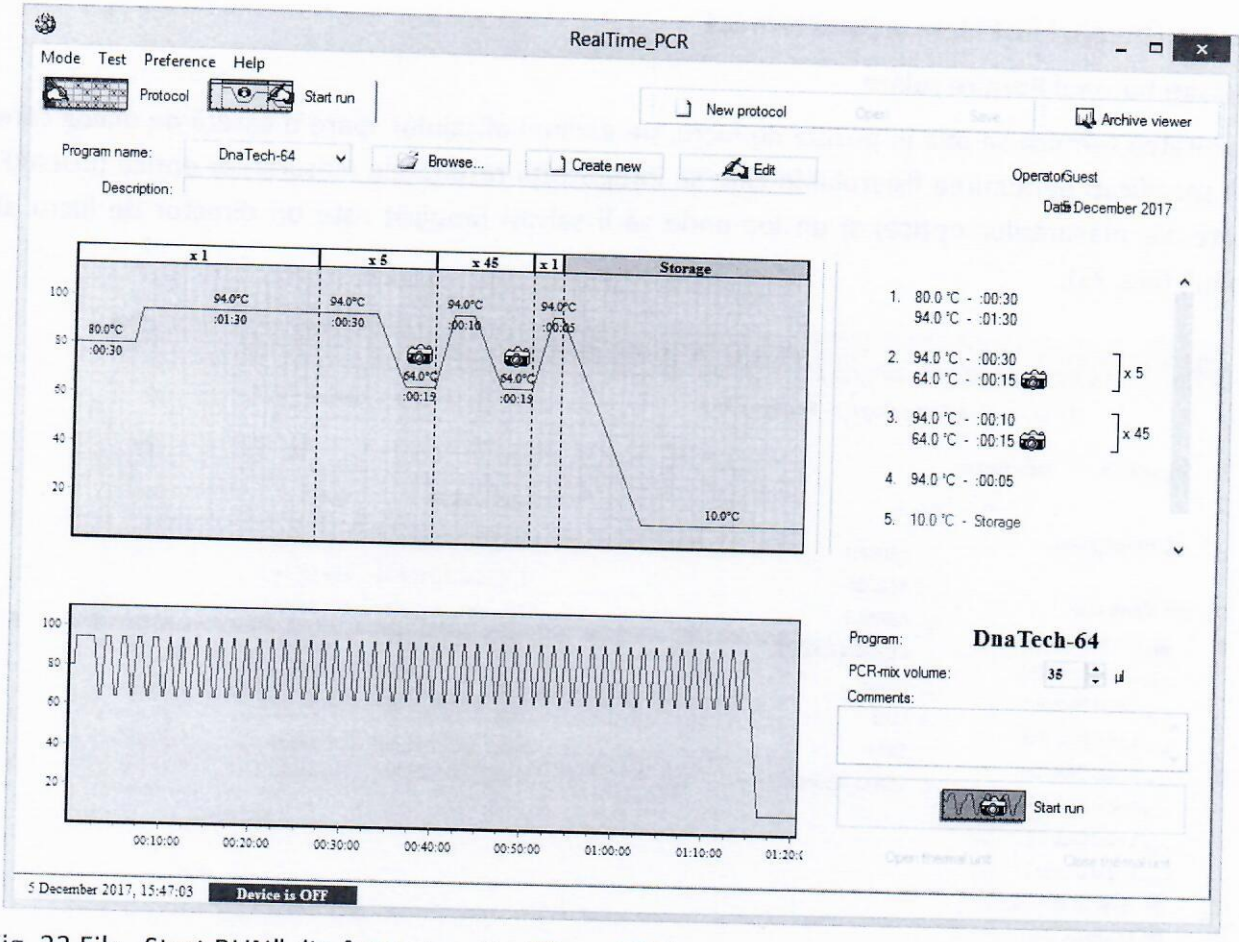


Fig. 22 Fila „Start RUN" din fereastra „RealTime_PCR"

La crearea unui protocol de placă utilizând opțiunea **Adăugare test**, nu este necesară editarea parametrilor în această fereastră.

Dacă protocolul plăcii a fost creat manual linie cu linie, în această fereastră selectați un program de amplificare dintr-o amplificare creată anterior, editați unul dintre cele create anterior sau creați unul nou și specificați volumul amestecului de lucru în eprubete.

- Creați un nou program de amplificare (butonul Create new).
- Editați programul de amplificare curent (butonul Edit).
- Selectați un program de amplificare din lista derulantă (lista prezintă ultimele 10 programe utilizate). Program name: DnaTech-64
- Încărcați programul de amplificare de pe hard disk (butonul Browse...).

După selectarea unui program de amplificare, acesta va fi afișat în diferite reprezentări: o imagine grafică, o reprezentare a textului și un profil de temperatură al programului de amplificare.

1. Dacă este necesar, editați **volumul PCR-mix** într-o eprubetă.
2. Completați câmpul **Comentarii**, dacă este necesar.
3. Apăsați butonul **Deschidere unitate termică** pentru inițializarea acestuia.

4. Apăsați butonul **Închidere unitate termică**
5. Apăsați butonul **Pornire rulare**.

După ce unitatea termică se află în poziția de lucru, pe ecranul afișajului apare o casetă de dialog care solicită să specificați denumirea fișierului în care să înregistrații rezultatele măsurărilor optice (RULARE cu rezultate ale măsurărilor optice) și un loc unde să îl salvați (implicit este un director de lucru al operatorului) (Fig. 23).

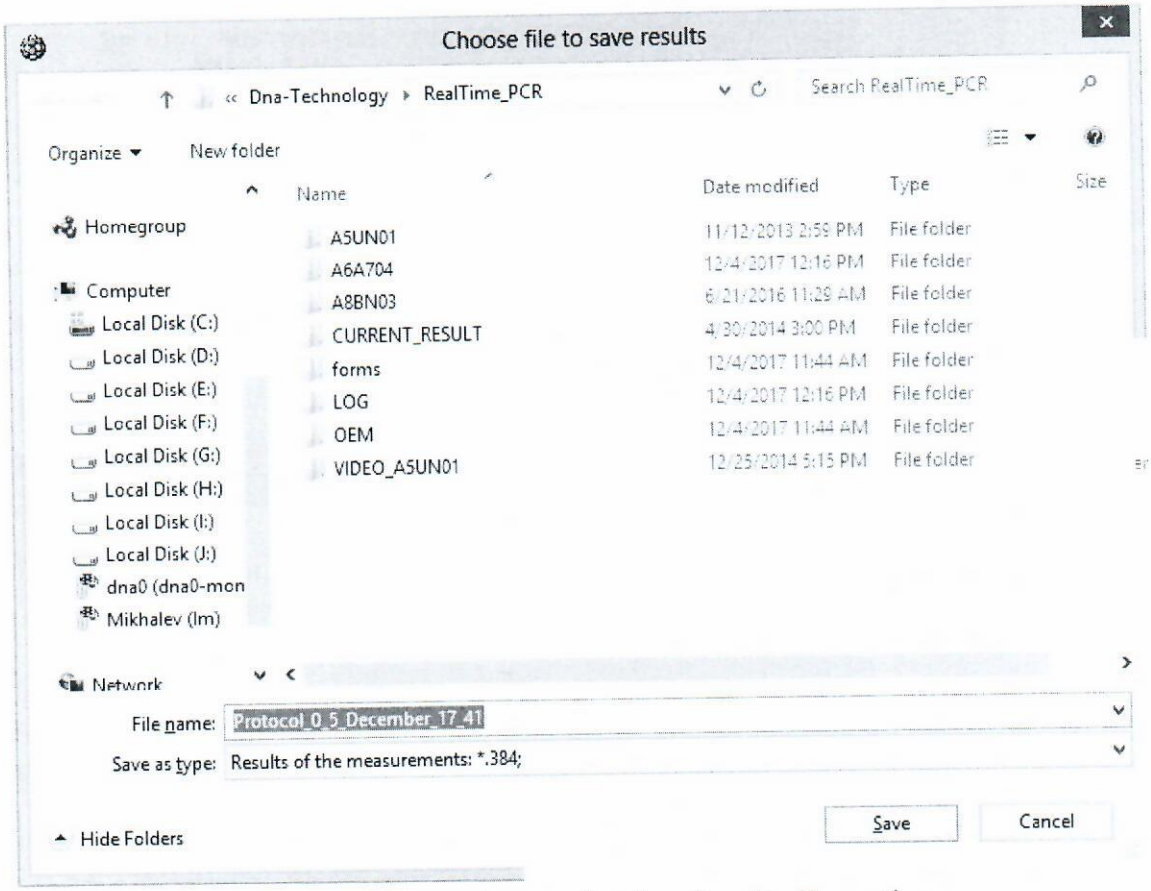


Fig. 23 Selectarea unui fișier pentru a salva rezultatele măsurătorilor optice.

6. Selectați directorul pentru a salva RULAREA (în cazul în care acesta diferă de directorul implicit).
7. **Denumire fișier**: introduceți denumirea sub care va fi salvată RULAREA cu rezultatele măsurătorilor optice (sunt de acord cu denumirea unică a fișierului propusă de software sau creați o altă denumire a fișierului).
8. **Tipul fișierului**: formatul de salvare a datelor va fi specificat cu următoarele extensii: (r48,*.r96, *.384).

După ce faceți clic pe butonul Save (Salvare), software-ul RealTime_PCR procesează în modul de executare a programului de amplificare în timp ce salvați rezultatele măsurătorilor optice în fișier.

În linia de stare a software-ului, una dintre următoarele stări reprezintă starea dispozitivului:

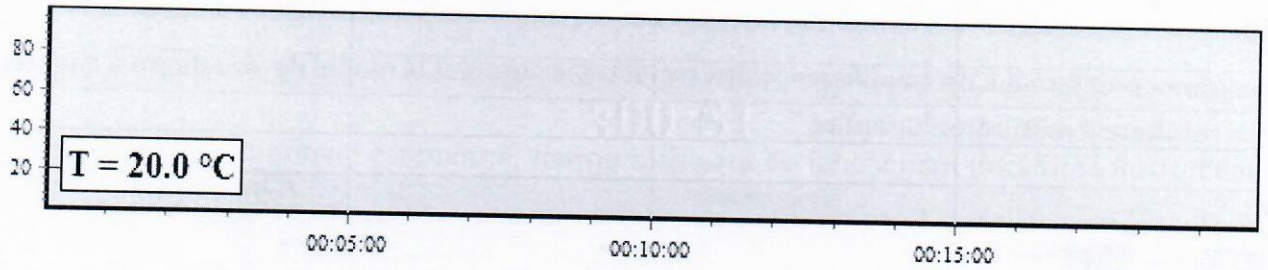
Device is OFF - dispozitivul este oprit sau nu este conectat la calculator.

Device is ON - dispozitivul este pornit, dar nu este gata de funcționare (încălzirea instrumentului timp de cel puțin 5 minute).

Device is ON - dispozitivul este pornit și este gata de utilizare.

Notă! Activarea programului de amplificare este posibilă cu starea „pozitivă" a dispozitivului - „Dispozitivul este PORNIT" (indicator verde sau galben pe linia de stare a software-ului). În cazul stării „negative" a dispozitivului - „Dispozitivul este OPRIT" (indicatorul roșu), va fi afișat un mesaj potrivit căruia dispozitivul nu este conectat (oprit).

Atenție! Dacă ați apăsat butonul Start RUN (Pornire RULARE) în timpul încălzirii (indicatorul galben este pornit pe Device is ON linia de stare), în fereastra **profilului Temperatură** va fi afișat un mesaj intermitent pentru continuarea procesului de încălzire a dispozitivului:



Pe ecranul dispozitivului va fi afișat un mesaj similar. După încheierea încălzirii, dispozitivul va trece automat la modul de execuție al programului de amplificare.

4.2.6 Utilizarea opțiunii de Oprire a dispozitivului după RULARE

Dacă este necesară o funcționare autonomă a dispozitivului cu oprirea automată a acestuia (trecerea la modul de repaus) după finalizarea programului de amplificare, efectuați următoarele:

1. În fereastra de **rulare** activați următoarea opțiune:

   ☑ Turn off device after the run

2. Închideți software-ul apăsând  în colțul din dreapta sus al ferestrei sale.
3. După finalizarea programului de amplificare, dispozitivul procesează într-un mod de repaus și indică prin LED-ul intermitent al butonului meniului OSD (doar pentru dispozitivul DTPrime).

Atenție! Dispozitivul se va comuta în modul de repaus doar dacă opțiunea **Oprire dispozitiv după ce rularea** este activată și programul de amplificare executat în acesta se încheie în modul **Holding**.

În cazul în care se închide software-ul RealTime_PCR (în timpul lucrului autonom al dispozitivului), calculatorul a rămas pornit, fișierul cu rezultatele măsurătorilor optice va fi salvat în directorul ales, iar operatorul va fi disponibil pentru vizualizarea acestuia după ce se încheie programul de amplificare.

Notă! În cazul în care închiderea software-ului RealTime_PCR (în timpul lucrului autonom al dispozitivului) calculatorul a fost oprit, fișierul cu rezultatele măsurătorilor optice nu va fi salvat în directorul ales. RULAREA poate fi descărcată pe calculator prin opțiunea **Ultima rulare pe dispozitiv** din meniul **Preferințe** al ferestrei software **RealTime_PCR**.

4.2.7 Rularea programului de amplificare

Dacă programul de amplificare începe cu succes, fila **Pornire rulare** a ferestrei **RealTime_PCR** este înlocuită de o filă **Running** (Fig. 24). După începerea programului de amplificare, dispozitivul nu necesită intervenția utilizatorului. Dacă dorește, în timpul execuției programului, operatorul poate schimba afișarea proceselor curente și poate schimba și programul de amplificare (doar pentru utilizatorii avansați).

După finalizarea programului de amplificare, software-ul trece automat la modul de vizualizare a analizei datelor cu rezultatele măsurătorilor optice.

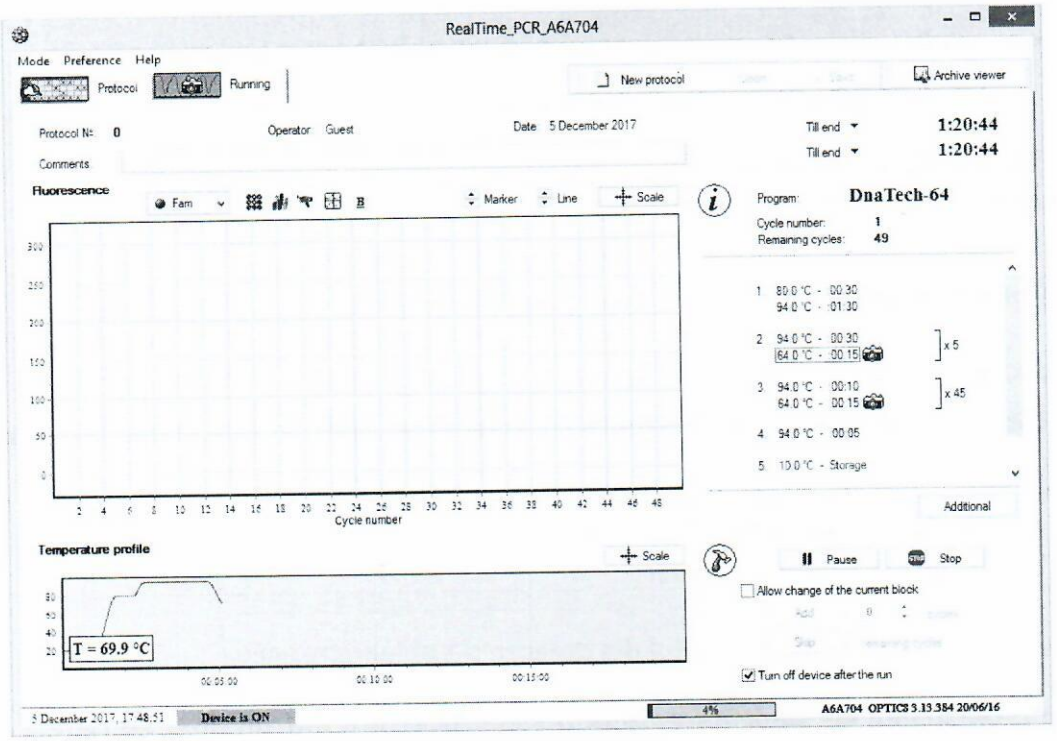
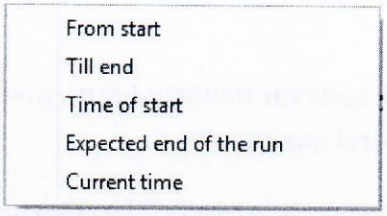


Fig. 24 Fila de **Rulare în curs** a ferestrei RealTime_PCR Partea superioară a filei

afișează informații generale despre RULAREA curentă:

- Număr RULARE;
- numele operatorului;

- data;
- comentați cu privire la RULAREA care, dacă doriți, poate fi suplimentată în procesul de execuție a programului;
- două câmpuri în colțul din dreapta al ferestrei, unde pot fi selectați următorii parametri de timp pentru afișare din lista verticală:



În partea centrală a filei, este afișat un grafic al valorilor fluorescente: curbele de acumulare de ADN în fiecare eprubetă din coordonatele „Nivel de fluorescență - numărul ciclului de amplificare".

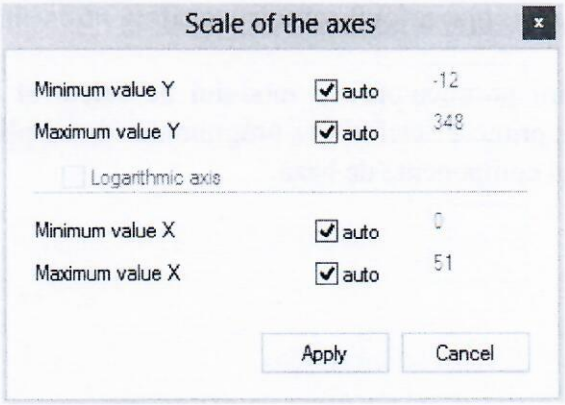
Alegerea canalului de fluorescență pentru afișarea valorilor fluorescenței pe grafic se realizează cu lista derulantă:



Pentru a controla modul de afișare a graficului și analiza detaliată a datelor, se pot utiliza următoarele elemente:

Marker - butoane pentru modificarea dimensiunii markerilor; Line - butoane pentru creșterea/micșorarea grosimii liniilor;

Scale - buton pentru afișarea casetei de dialog pentru modificarea scării axelor:



- **Locația și culoarea** butonului **eprubetelor**: prin această opțiune, culoarea eprubetelor, precum și vederea tipului și numerotării lor pot fi modificate.

- **Distribuția măsurătorilor optice pe** butonul **plăcii** arată o reprezentare grafică a valorilor curente ale măsurărilor optice pe un ciclu dat în coordonate tridimensionale (Fig. 25).

În **Distribuția măsurătorilor optice pe** fereastra **plăcii** puteți vedea valoarea canalului de fluorescență selectat Fam pentru fiecare ciclu 18.

Utilizând butoanele săgeată situate în partea de jos a ferestrei, măriți și micșorați într-un plan orizontal sau vertical.

Fereastra poate fi redimensionată fixând cursorul mouse-ului pe marginea ferestrei până când apare săgeata dublă și mișcând chenarul cu ajutorul mouse-ului.

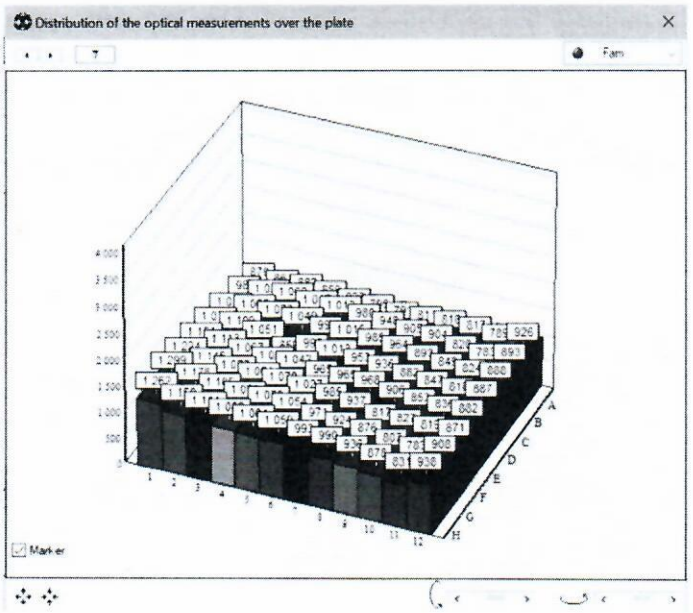


Fig. 25. **Distribuția măsurătorilor optice pe** fereastra **plăcii**

- Butonul pentru **Imagine curentă** este destinat să afișeze fereastra cu imaginea câmpului matricei cu eprubete pe acest ciclu pentru o anumită măsurare (Fig. 26).

B - butonul este prevăzut pentru pornirea/oprirea modului de calcul al componentei de bază (de fundal) pentru fiecare eprubetă cu „primele" cicluri ale programului de amplificare. Toate măsurătorile sunt realizate după deducerea acestei componente de bază.

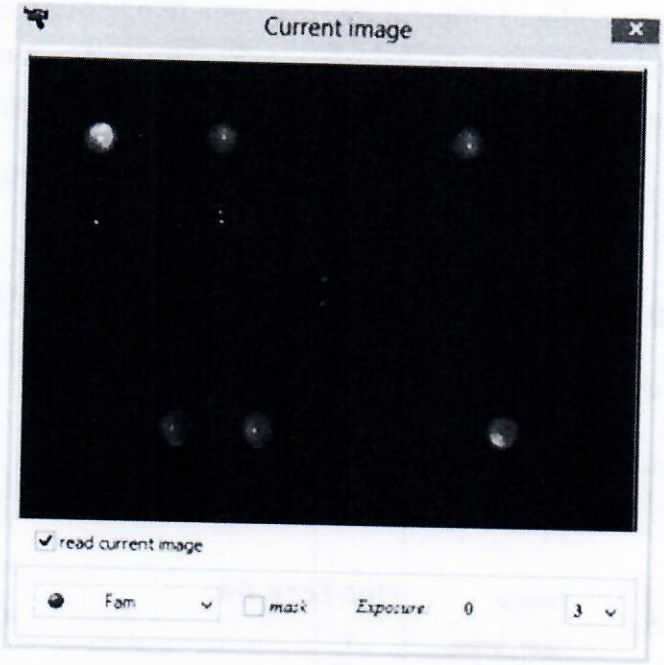
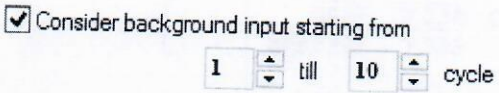


Fig. 26 Fereastra imaginii curente

Notă (pentru utilizatorii avansați). Pentru a specifica limitele primelor cicluri, selectați elementul **Opțiuni** ... din meniul **Preferințe** al ferestrei **RealTime_PCR**. În fereastra **Opțiuni** apărută, selectați o filă **Achiziție de date optice** , activați opțiunea **Alegerea înregistrării fundalului pornind de la** și indicați limitele ciclurilor din ferestrele corespunzătoare.



- **Schimbarea reprezentării** butonului de **date optice** este destinată să afișeze o vedere cu mai multe ferestre ale curbelor (fiecare curbă cinetică este afișată în propria fereastră. Consultați Fig. 27).

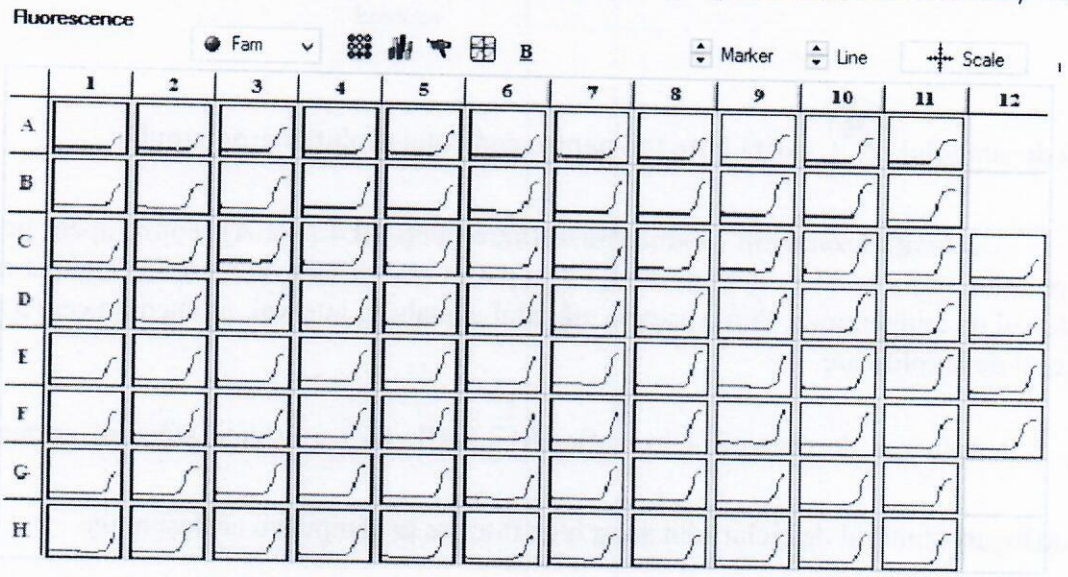


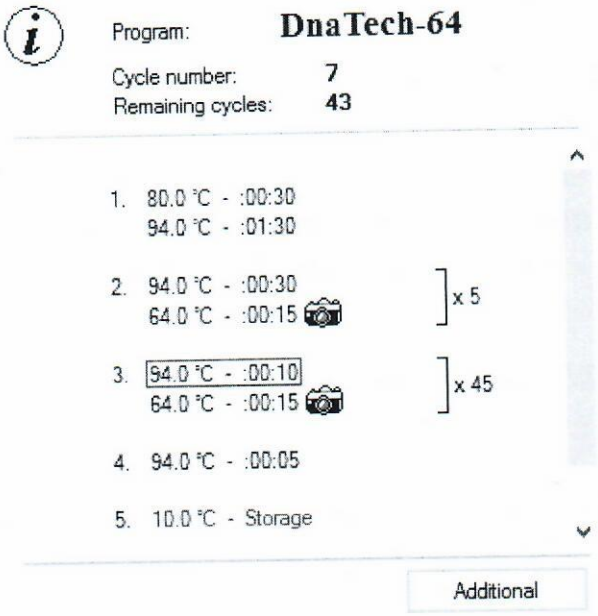
Fig. 27 Vedere cu mai multe ferestre a curbelor

În partea de jos a filei, este afișat **profilul Temperatură** (diagrama temperaturii matricei față de timpul programului de amplificare). Intervalele de temperatură cu măsurători optice sunt evidențiate în roșu, momentele măsurătorilor optice sunt afișate prin aprinderea pictogramei din diagramă.

În dreapta deasupra câmpului cu diagrama, se află butonul Scale pentru afișarea casetei de dialog pentru modificarea scării axelor.

În zona indicată de simbolul este afișat progresul informațiilor despre programul de amplificare:

- denumirea programului de amplificare;
- numărul ciclului curent;
- numărul de cicluri rămase până la sfârșitul programului
- parametrii programului de amplificare.



În zona indicată de simbolul , există butoane pentru controlul evoluției programului:

Pause - activați/dezactivați modul Pauză (întrerupeți RULAREA). Pauza apare pe primul interval de temperatură după pornirea acestui mod. Când pauza este dezactivată, are loc imediat o trecere la următorul interval de temperatură, fără a aștepta sfârșitul actualului interval, moment în care a avut loc o pauză în procesul de amplificare.

Stop - terminarea de urgență a execuției RULĂRII, fără a aștepta sfârșitul normal al acesteia.

Add - adăugați numărul de cicluri din acest bloc înscrise în câmpul cu același nume

Skip - treceți peste ciclurile rămase până la sfârșitul execuției blocului.

Atenție! Aceste operațiuni pot fi efectuate doar cu opțiunea ☑ Allow change of the current block activată.

Pentru a opri automat instrumentul după executarea programului de amplificare, activați opțiunea ☑ Turn off device after the run

În timpul execuției programului de amplificare, bara de progres a procesului de rulare continuă este afișată pe linia de stare 61%.

În timpul măsurătorilor optice (până la sfârșitul programului de amplificare), dacă este necesar, mergeți la fila **Protocol** și editați protocolul de măsurare - protocolul plăcii: numărul, tipul, locația eprubetelor (cu excepția programului de amplificare). Când reveniți la fila **Rulare continuă** după modificarea protocolului plăcii, vi se va solicita salvarea protocolului plăcii sau eliminarea modificărilor.

Notă (pentru utilizatorii avansați): În timpul măsurătorilor optice, este posibilă modificarea setărilor modurilor de măsurare și reprezentare a datelor. Pentru aceasta, este necesar să selectați elementul**Opțiuni ...** în meniul **Preferințe** al ferestrei **RealTime_PCR**. În fereastra apărută, denumită **Opțiuni**, selectați o filă de **Achiziție date optice**

Se pot modifica următorii parametri:

- ***Afișare date calibrate*** - arată datele măsurătorilor optice, luând în considerare compensarea uniformității optice a matricei.
- ***Utilizare metodă de normalizare DT*** - aplicați metoda de normalizare DT pentru a calibra măsurătorile optice.
- **Alegerea înregistrării intrării de fundal pornind de la** - componenta de fundal pentru fiecare eprubetă este calculată în funcție de primele cicluri (indicate). Toate măsurătorile sunt realizate după deducerea acestei componente de fundal.
- ***Reglare automată a expunerii*** - selectarea automată a valorii de expunere a măsurătorilor optice (indisponibil temporar)
- ***Număr de expuneri pentru o măsurătoare*** - numărul de măsurători (1-4) în același canal optic: Fam, Hex.

După terminarea programului de amplificare, pe ecran apare o fereastră cu un mesaj prin care programul intră în modul **Holding** (Fig. 28).

În acest caz, pe graficul de temperatură al dependenței matricei apare o inscripție intermitentă **Holding** ... și un marker cu temperatura de stocare față de timpul programului de amplificare.

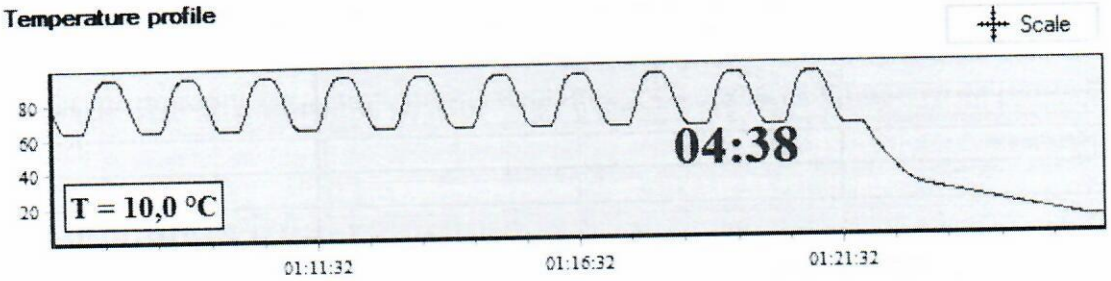


Fig. 28 Indicarea modului **Holding**

Când este atinsă temperatura de stocare, pe ecran apare o fereastră care indică faptul că programul de amplificare și-a încheiat execuția și trece la modul de stocare (Fig. 29).

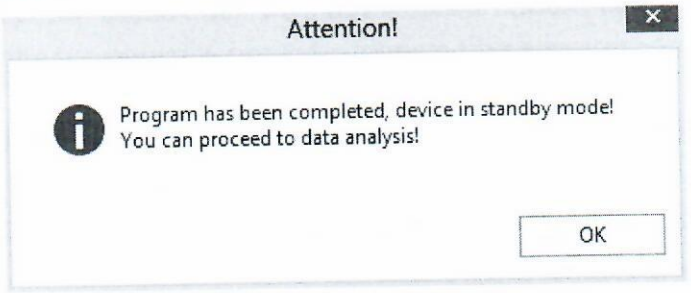


Fig. 29 mesaj despre finalizarea procesului de amplificare.

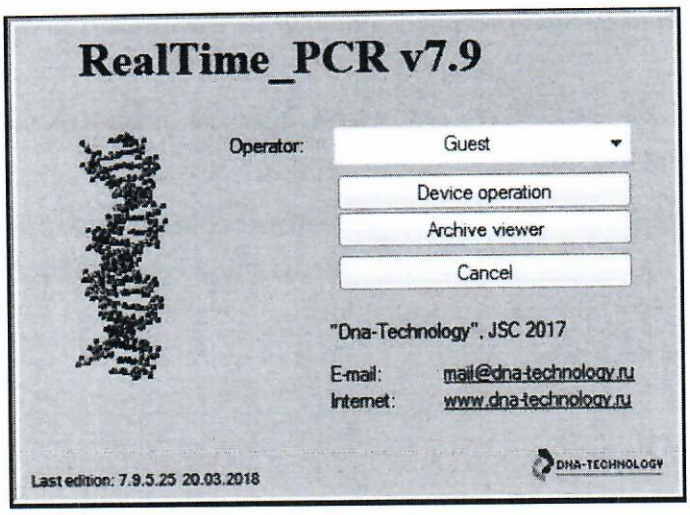
Când **faceți clic pe** butonul **OK** , software-ul **RealTime_PCR** trece în modul **Vizualizator arhivă** (fila **Analiza datelor**).

5 Arhiva modului vizualizatorului

5.1 Alocarea modului

Modul **Vizualizator arhivă** al software-ului **RealTime_PCR** este destinat analizei datelor RULĂRILOR cu rezultate ale măsurărilor optice și crearea de rapoarte cu privire la rezultatele analizei (Fig. 30). Pentru a deschide fereastra **Arhivă,** puteți utiliza una dintre următoarele opțiuni:

1. Selectați modul **Vizualizator arhivă** atunci când executați software-ul **RealTime_PCR**



2. Selectați elementul **Vizualizator arhivă** în meniul **Mod** din fereastra **RealTime_PCR**

3. Faceți clic pe butonul Archive viewer din fereastra **RealTime_PCR**.

4. Faceți dublu clic pe orice fișier RULARE salvat în calculator (tip de fișier *.r48, *.r96, *.384). În acest caz, RULAREA cu rezultatele măsurătorilor optice va fi deschisă imediat.

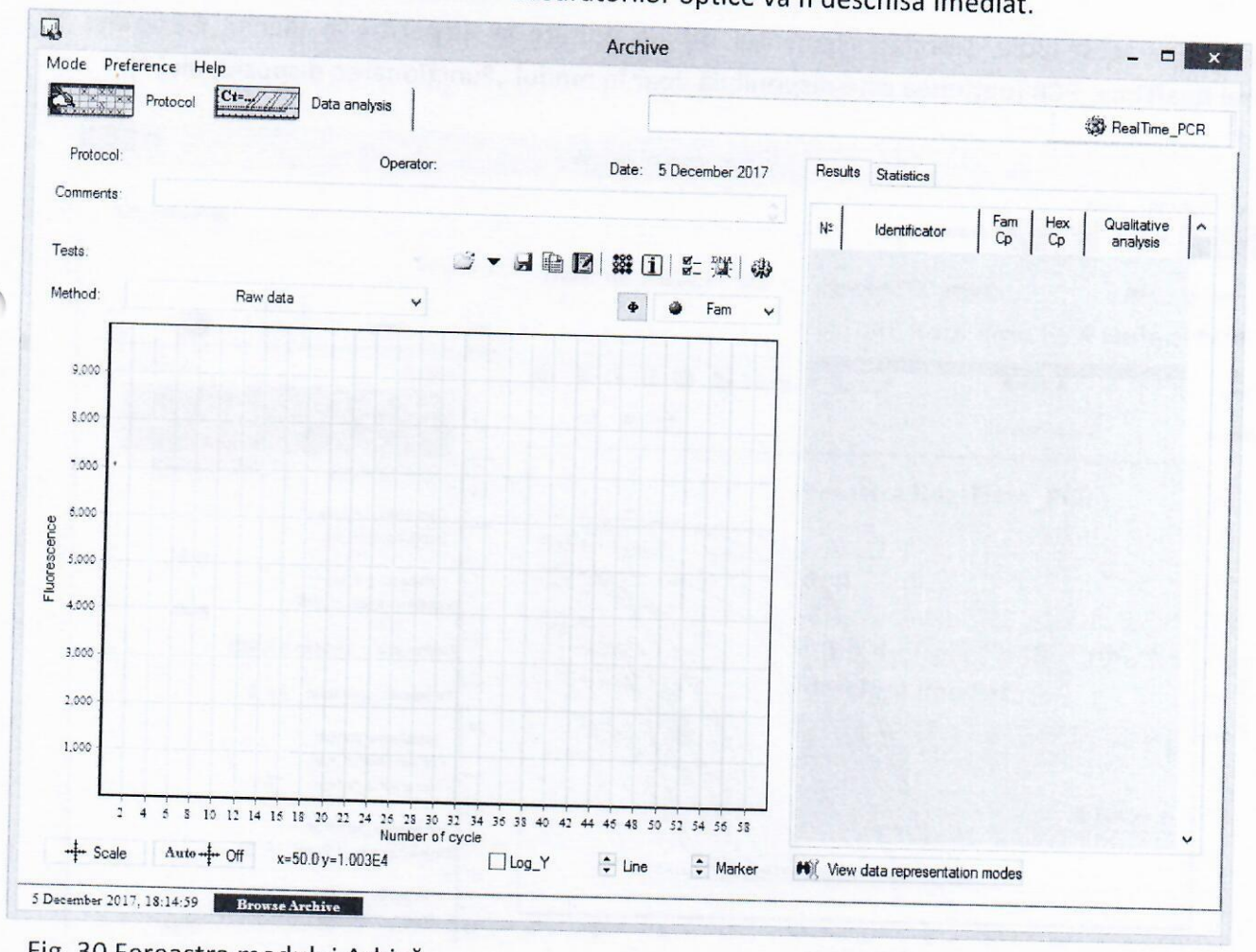


Fig. 30 Fereastra modului Arhivă

5.2 Deschiderea RULĂRII cu date de măsurare optică.

După finalizarea programului de amplificare, software-ul trece automat în modul de vizualizare a analizei datelor cu rezultatele măsurătorilor optice (Fig. 31).

RULAREA cu datele de măsurare optică este stocată în folderul operator și poate fi deschisă pentru vizualizare în fereastra Arhivare.

RULAREA poate fi deschisă prin mai multe moduri:

- Faceți dublu clic pentru a deschide fișierul RUIARE, care este stocat în calculator, cu rezultatele măsurătorilor optice (tip de fișier *.r48, *.r96, *.384)

- în fereastra **„Arhivă”** faceți clic pe butonul din fila **Analiză date** și selectați fișierul RULARE necesar în fereastra **„Deschidere fișier de rulare”**.

Dacă din anumite motive, comunicarea calculatorului cu dispozitivul este întreruptă în timpul executării programului de amplificare, există posibilitatea de a citi datele de pe dispozitivul care a fost inițiat ultima dată.

Pentru a face acest lucru, selectați elementul **Ultima pornire în dispozitiv** în meniul **Preferințe** al **ferestrei RealTime_PCR (opțiunea este disponibilă doar în modul „Funcționarea dispozitivului** ”).

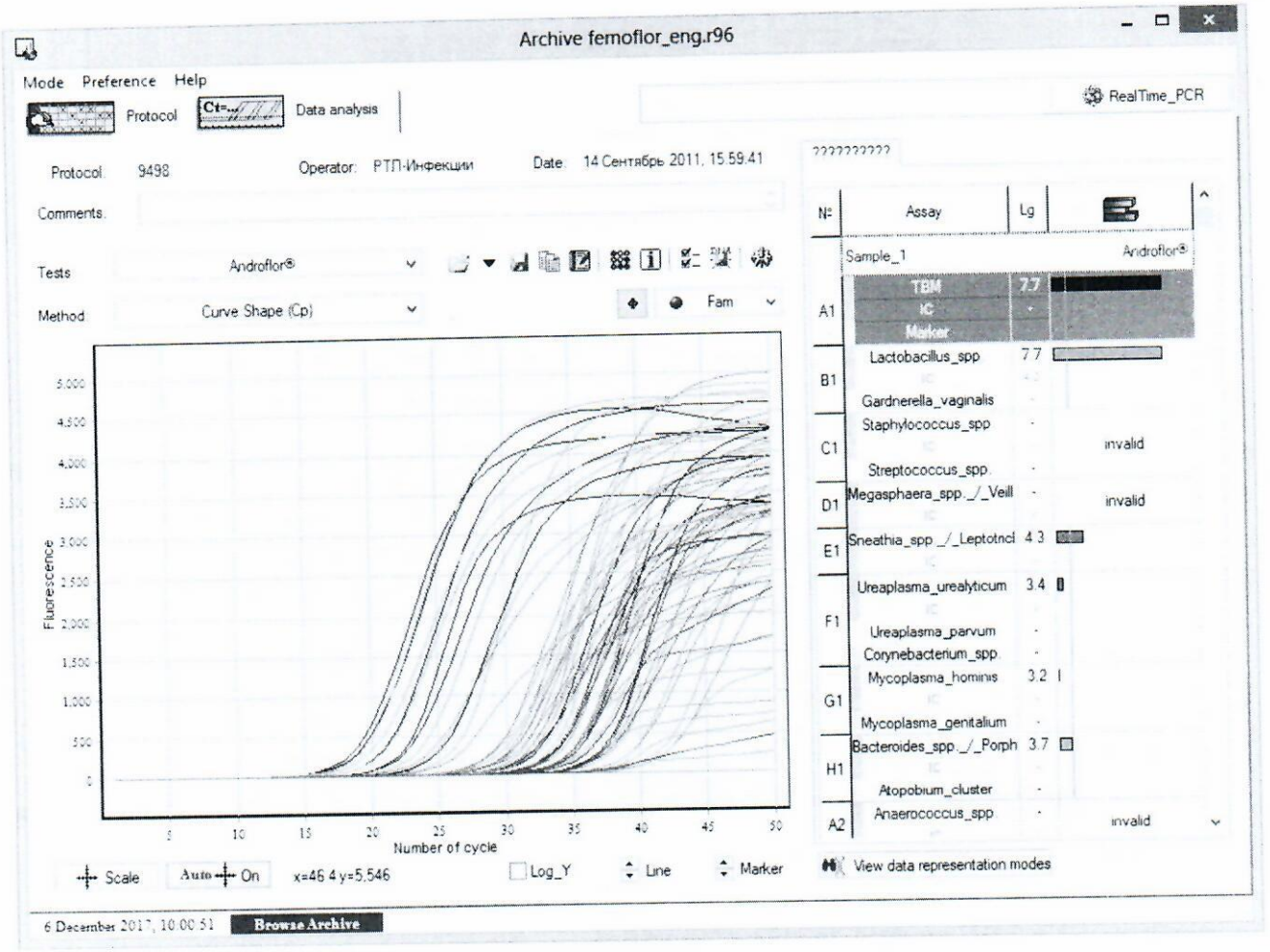


Fig. 31 Fila „ **Analiza** datelor” din RULARE

5.3 Setarea parametrilor de analiză

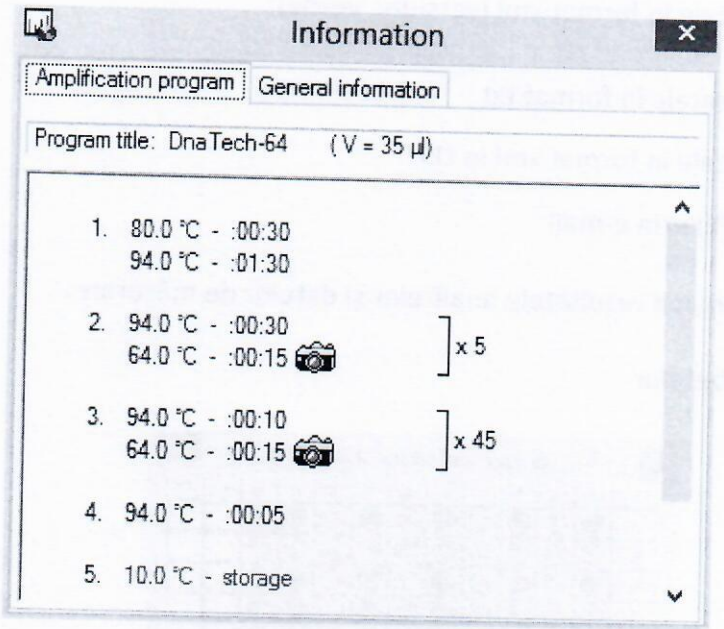
5.3.1 Informații despre RULARE

În fereastra **Arhivă** sunt furnizate următoarele informații despre RULARE:

1. Datele despre RULARE (numărul RULĂRII, numele operatorului, data și ora achiziției de date optice, comentarii cu privire la RULARE). Datele despre RULARE sunt afișate în partea de sus a ferestrei.
2. Date suplimentare despre RULARE (denumirea fișierului RULĂRII, denumirea programului de amplificare, parametrii programului de amplificare, volumul amestecului de lucru din eprubetă).

Pentru mai multe informații despre protocol, faceți clic pe butonul **Informații despre programul de amplificare**, care deschide fereastra **Informații**. Fereastra conține două file:

- Fila cu **programul de amplificare** conține denumirea programului de amplificare, parametrii acestuia și volumul amestecului de lucru din eprubetă.
- Fila cu **Informații generale** conține calea către fișierul RULARE, denumirea sa, seria și codul de bare al plăcii;



5.3.2 Reglarea afișajului și procesarearezultatelor măsurării.

Bara de instrumente de bază:

 , unde

1. - deschideți RULAREA + selectați din cele mai recente 10 RULĂRI
2. - salvați RULAREA
3. - raport de laborator al analizei PCR
4. - raport medical de cercetare aplicată (fișă de răspuns)
5. - locația și culoarea eprubetelor
6. - Informații despre RULARE
7. - modificarea parametrilor analizei de date
8. - exportarea rezultatelor ca XML în LIS

9. - prezentarea panoului de instrumente

Panoul de instrumente:

1. - deschiderea și salvarea RULĂRILOR măsurătorilor:

   - deschideți fișierul de rulare

   - salvați RULAREA

   - exportați rezultatele în format xml (versiune veche)

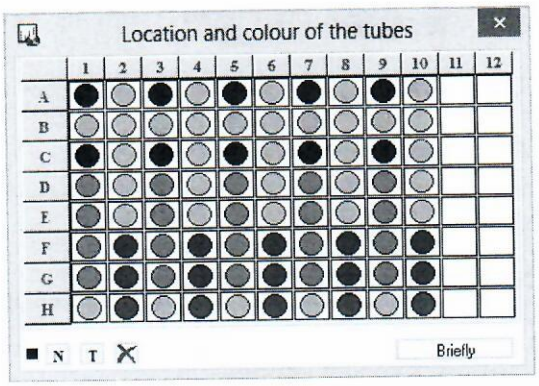
   - exportați rezultatele în format txt

   - Exportați rezultatele în format xml în LIS

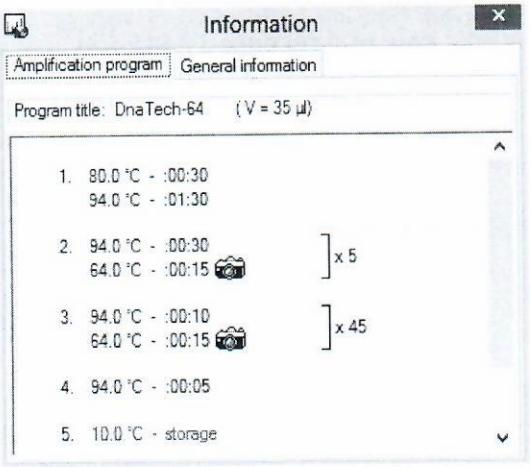
   - trimiterea RULĂRII prin e-mail

2. - informații generale privind rezultatele analizelor și datelor de măsurare:

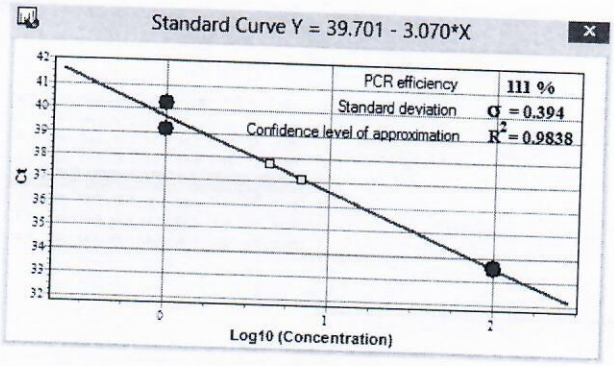
- locația și culoarea eprubetelor



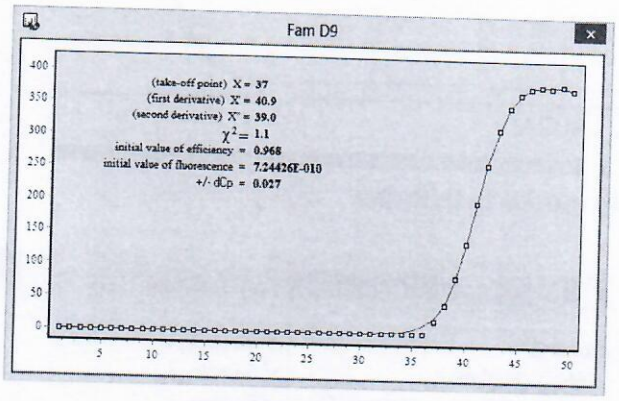
- Informații despre RULARE: program de amplificare, denumirea fișierului RULĂRII, seria dispozitivului etc.



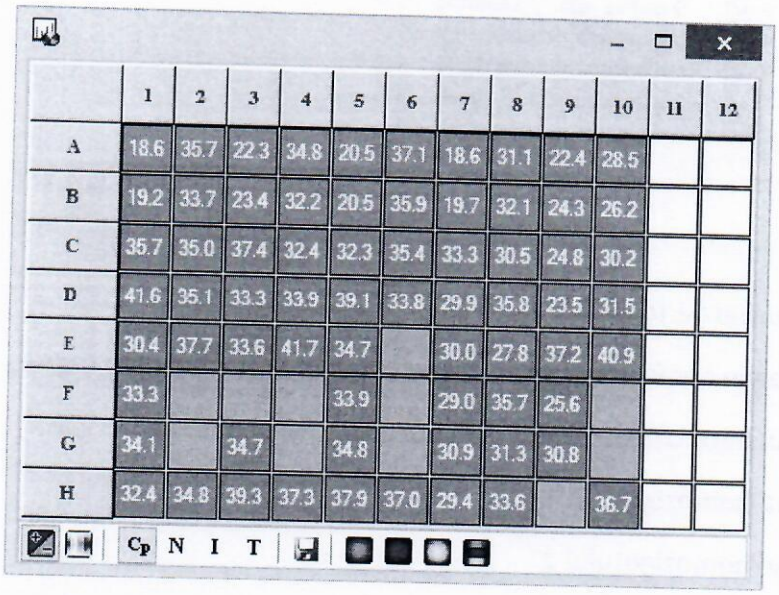
- curba standard pentru analiza cantitativă



- parametri de montare sigmoid PCR



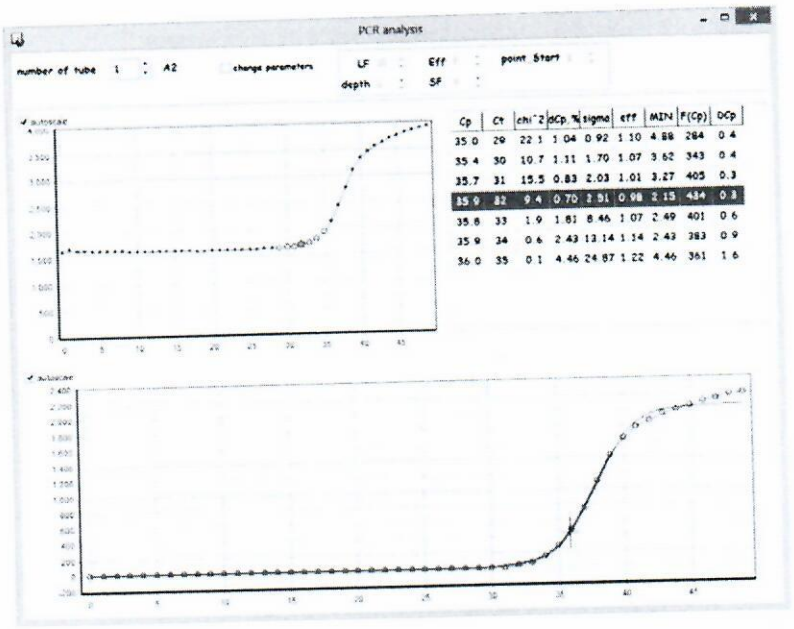
- rezultatele analizei în funcție de locația din unitatea termică



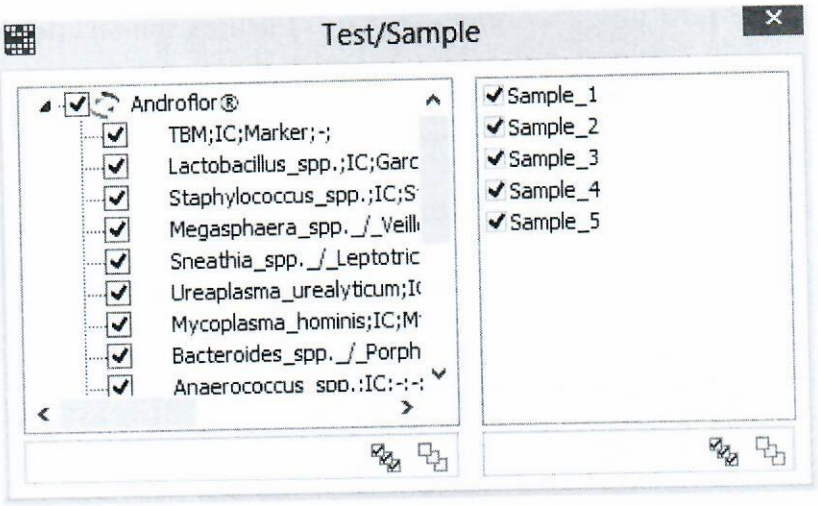
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18.6	35.7	22.3	34.8	20.5	37.1	18.6	31.1	22.4	28.5		
B	19.2	33.7	23.4	32.2	20.5	35.9	19.7	32.1	24.3	26.2		
C	35.7	35.0	37.4	32.4	32.3	35.4	33.3	30.5	24.8	30.2		
D	41.6	35.1	33.3	33.9	39.1	33.8	29.9	35.8	23.5	31.5		
E	30.4	37.7	33.6	41.7	34.7		30.0	27.8	37.2	40.9		
F	33.3				33.9		29.0	35.7	25.6			
G	34.1		34.7		34.8		30.9	31.3	30.8			
H	32.4	34.8	39.3	37.3	37.9	37.0	29.4	33.6		36.7		

Cp N I T

- parametrii analizei curbelor PCR



- afișarea eprubetelor în modul Test/Probă



3. - analiza profilului curbei de topire:

- aduce colorarea în conformitate cu rezultatul analizei profilului de topire
- arată rezultatul heterozigotului
- arată rezultatul homozigotului 1
- arată rezultatul homozigotului 2
- arată un rezultat „îndoielnic"
- prezintă marcajul de temperatură - prezintă limite de temperatură
- prezintă standarde de referință (pentru analiza corespunzătoare)

4. - selectarea canalului optic (opțiunea 2):

   - fam

   - hex

   - rox

   - cy5

   - cy5.5

   - toate canalele

5. - Altele:

   - calcularea PCR „negativ"

6. - prezintă panoul de studii privind tipul de analiză: studii de bază (universitare) + studii care sunt prezente în RULAREA actuală.

Cu ajutorul mouse-ului se pot trage panouri suplimentare necesare pentru lucru, în orice loc al ferestrei de lucru a software-ului, după care bara de instrumente poate fi eliminată.

Următoarele elemente pot fi utilizate pentru a schimba modul în care rezultatele sunt afișate în fereastra Arhivă:

Fam - fereastra pentru selectarea canalului de fluorescență afișat (utilizând lista derulantă).

Scale - butonul afișează o fereastră suplimentară **Scala axelor** pentru reglarea manuală a scării pe axele X și Y.

Auto Off - buton de reglare automată a scării.

Log_Y - opțiunea de afișare a graficului pe o scală semilogaritmică (se recomandă oprirea opțiunii de montare care este situat în colțul din dreapta deasupra graficului).

Marker - butoane pentru modificarea dimensiunii markerilor.

Line - butoane pentru creșterea/micșorarea grosimii liniilor.

- buton pentru a selecta eprubetele afișate și culorile acestora (**locația și culoarea eprubetelor)**. Afișează o fereastră suplimentară pentru efectuarea acestei operațiuni (Fig. 32).

Dacă este necesar, selectați culoarea și numărul de linii din graficul de fluorescență, apăsați butonul (în fereastra **RealTime_PCR** fila **Rulare continuă** sau în fereastra **Arhivă** din fila **Analiză date**). În fereastra deschisă **Locația și culoarea eprubetelor**, este afișată matricea unității termice. Culoarea

eprubetei corespunde culorii liniei de pe grafic. Numărul de eprubete corespunde numărului de linii afișate în grafic.

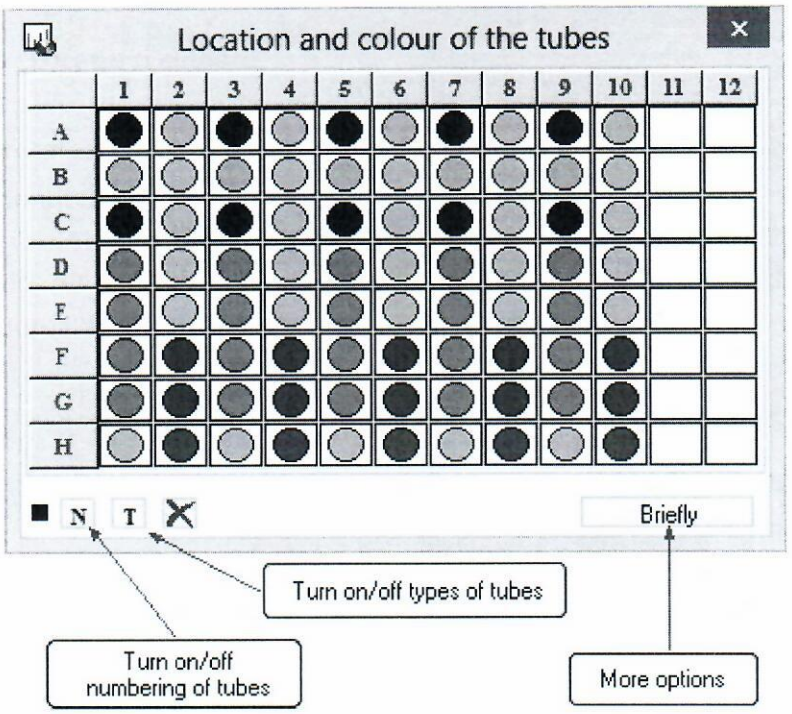
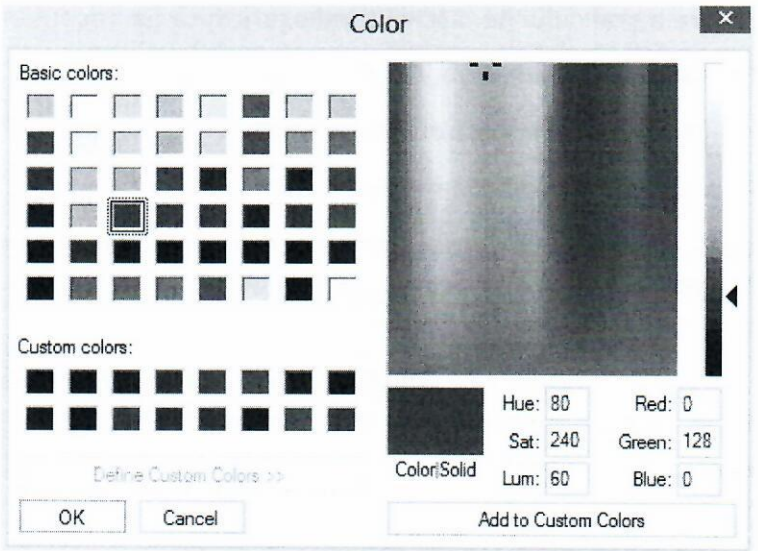


Fig. 32 Fereastra **„Locație și culoare"**

Pentru a afișa numerotarea eprubetelor conform RULĂRII, apăsați butonul N; pentru a afișa tipul de eprubete, apăsați butonul T.

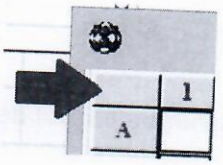
Pentru a schimba culoarea eprubetei, faceți clic dreapta pe eprubeta selectată, în fereastra deschisă **Culoare** selectați culoarea dorită și apăsați **OK**.



Pentru a selecta sau deselecta eprubeta, faceți clic pe butonul stânga al mouse-ului pe eprubeta selectată.

Este posibil să selectați un grup de coloane sau rânduri de eprubete, pentru aceasta, efectuați următoarele:

- faceți clic pe celula zero din coloana 1 2 3 sau rândul A B C respectiv,
- selectați zona (selectați zona ținând apăsat butonul stâng al mouse-ului),
- selecția „inversă" (arată eprubetele ascunse și le ascunde pe cele afișate) - faceți clic pe pătratul din stânga sus a tabelului pentru a le arăta pe cele ascunse sau a ascunde eprubetele afișate.



Pentru a șterge întregul câmp al matricei unității termice, utilizați butonul ☒

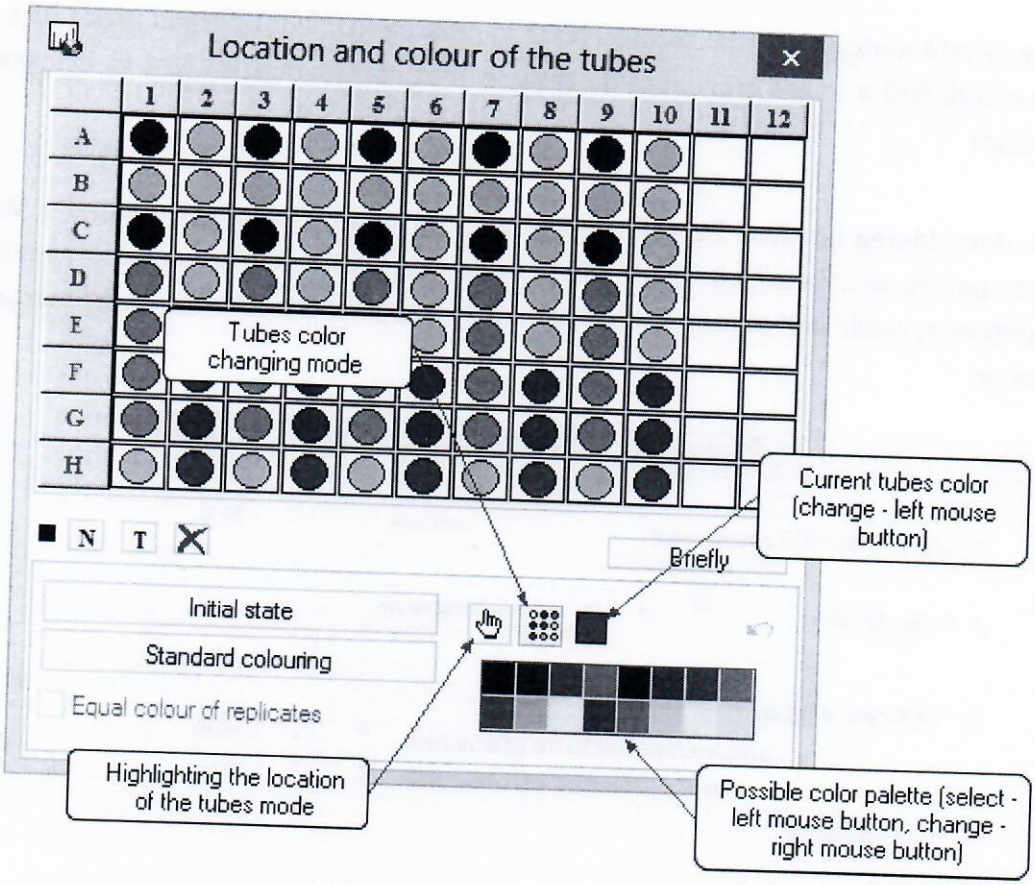


Fig. 33 Fereastra extinsă „**Locația și culoarea eprubetelor**"

Pentru a accesa butoanele suplimentare de control al culorii și locația eprubetelor, apăsați **Scurt** butonul și apoi **în Detaliu**.

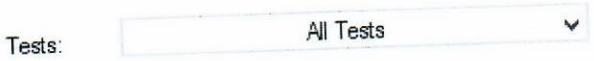
În fereastra mărită, apar butoane suplimentare, cu ajutorul cărora este posibil:

- să reveniți la starea inițială (locația inițială și paleta de culori a eprubetelor),

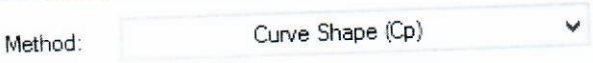
- să desemnați o culoare arbitrară a eprubetelor,
- să desemnați aceeași culoare pentru duplicate,
- să selectați culoarea eprubetei din setul de culori presetat,
- să anulați ultima schimbare de culoare.

Dacă este necesar, selectați metoda pentru prelucrarea rezultatelor măsurătorii

Vizualizați rezultatele setărilor fie în modul Toate testele, fie selectând un test din lista derulantă:



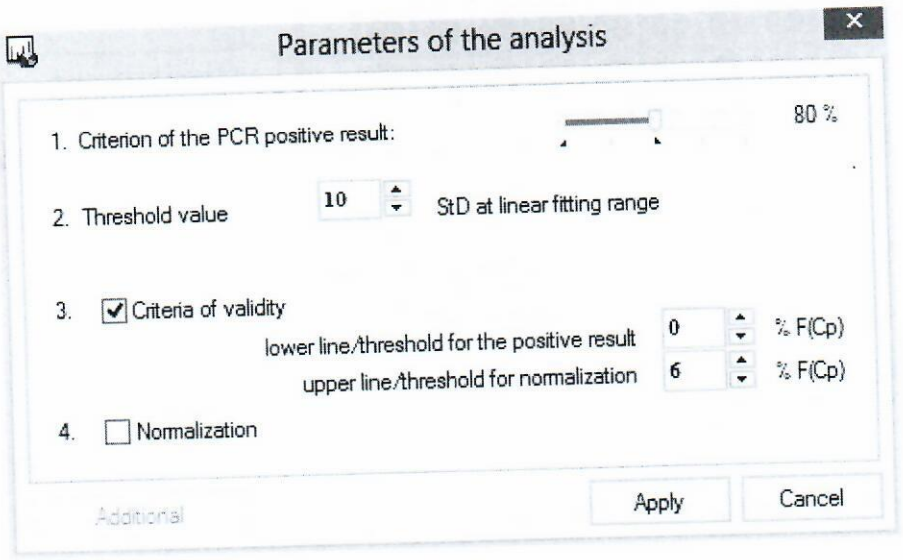
Următoarele elemente pot fi utilizate pentru a schimba modul de procesare a rezultatelor:



- selectarea metodei de analiză.

În mod implicit, este afișată metoda de analiză specificată la crearea RULĂRII utilizând procedura **Test**. Dacă RULAREA este creată fără a utiliza procedura de **testare**, metoda Geometrică **(Cp)** va fi specificată în câmpul corespunzător.

- buton pentru deschiderea ferestrei **Parametrii analizei** (consultați „Parametrii **analizei**"). Valorile implicite sunt optime pentru munca zilnică. Când efectuați cercetări științifice și pentru o analiză mai detaliată a datelor obținute, modificați parametrii prestabiliți pentru procesarea rezultatelor măsurărilor optice și analiza datelor.



Modificarea parametrilor este eficientă doar în cadrul RULĂRII în cauză.

- butonul este destinat pornirii/opririi montării (**netezirea**) curbelor PCR.

Opțiunea de **montare** este aplicabilă doar după scăderea liniei „de bază" pentru probele în care au fost găsite fragmente de ADN dorit (pentru eprubete „pozitive"). Butonul nu este activ atunci când selectați metoda de analiză **Zona inițială** și atunci când alegeți tipul de analiză **Curba de topire**.

5.3.3 Crearea raportului

Prin rezultatele analizei măsurătorilor, este posibilă generarea unui raport.

Raportul include următoarele date:

1. Informații de analiză:
   - data analizei,
   - Număr RULARE,
   - operatorul,
   - denumirea fișierului cu rezultatele,
   - comentariu cu privire la RULARE,
   - descrierea programului de amplificare,
   - volumul amestecului de reacție,
   - descrierea setărilor de analiză.
2. Rezultatele analizei sunt afișate sub forma unui tabel.

În raport pot fi adăugate următoarele date:

1. Grafic de fluorescență pentru fiecare fluorofor.
2. Date statistice pentru o serie de duplicate.
3. Graficul curbei standard
4. Amplasarea eprubetelor în matricea unității termice.

Pentru a crea un raport pe baza rezultatelor analizei, efectuați următoarele acțiuni:

1. Apăsați butonul  din fila **Analiza datelor** din fereastra **Arhivă**. Fereastra **Raport** este deschisă (Fig. 34).

   Cu ajutorul comenzilor corespunzătoare, sunt disponibile următoarele opțiuni:  - așezați pagina în fereastra de previzualizare în întregime.

    - așezați pagina în fereastra de previzualizare în funcție de lățime.

- aranjați două pagini în fereastra de previzualizare.

32 % - schimbați scala ferestrei de previzualizare.

2. Selectați datele pe care să le includeți în raport:

- ✓ Fam
- Hex
- Rox
- Cy5
- Cy5.5

_ Fam/Hex/Rox/Cy5/Cy5.5 - adăugați curbe de fluorescență pentru canalele de fluorescență corespunzătoare;

_ ✓ Statistics of the replicate - includeți date statistice privind seria de duplicate din raport.

_ ✓ "Standard Curve" - includeți un grafic al „curbei standard" în raport (opțiunea este activă pentru tipurile de analize **Cantitative cu standarde și GMI**).

_ ✓ Location of the tubes - afișați locația eprubetelor în matricea unității termice din raport.

_ ✓ External standards - includeți datele standardelor suplimentare în raport

_ ✓ B&W - afișați raportul în alb și negru

_ ✓ Report on Samples - includeți afișarea rezultatelor grupate pe probe în raport

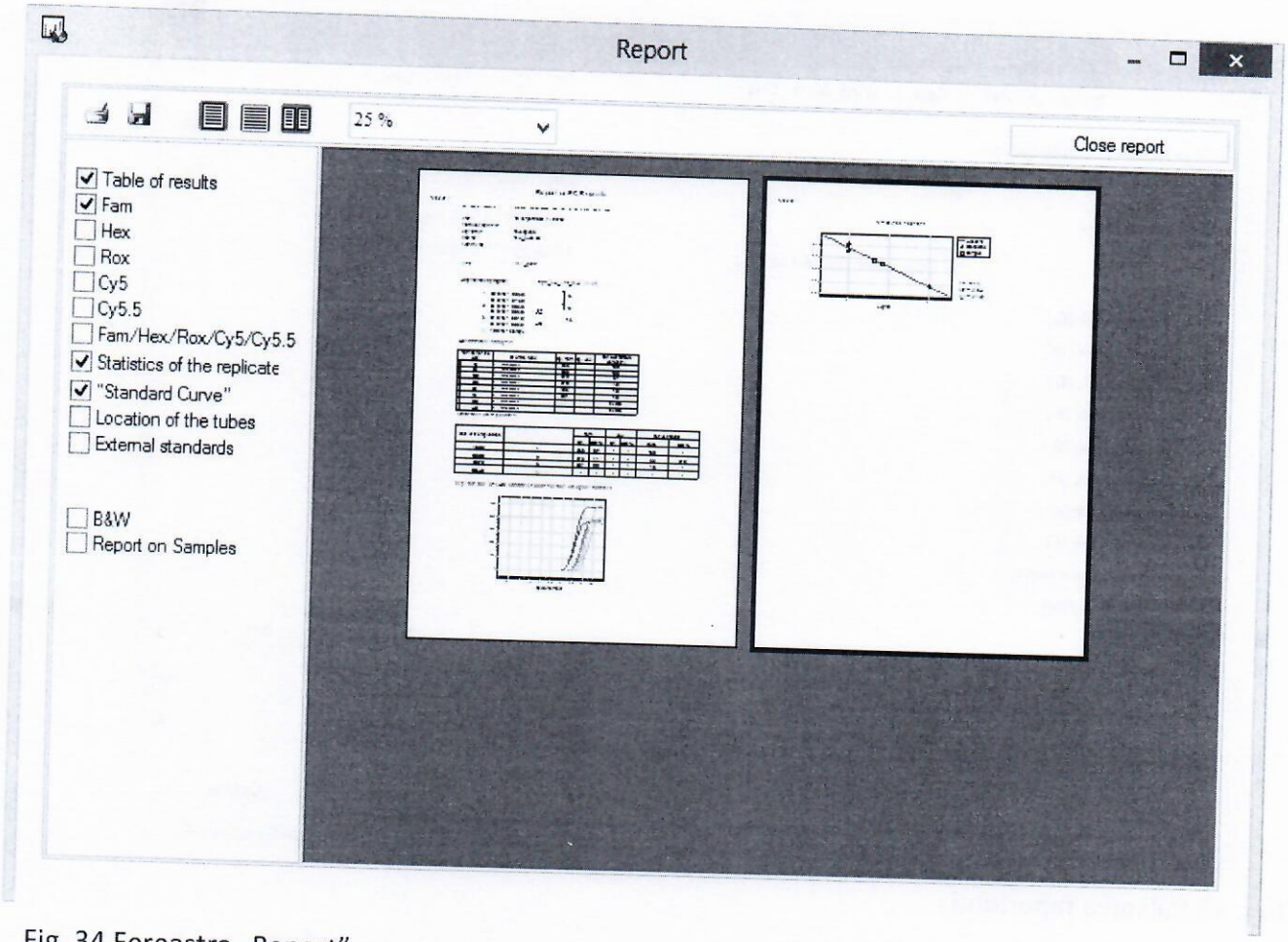
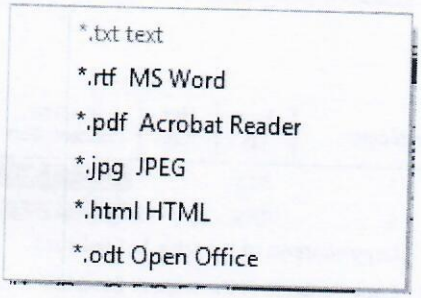


Fig. 34 Fereastra „Raport"

3. Apăsați acest buton pentru a tipări formularul.
4. Apăsați butonul pentru a salva raportul într-un fișier pe calculator.

- Selectați formatul de fișier care trebuie salvat:



- În fereastra deschisă **Salvarea rezultatelor analizei ca ...** specificați o denumire a fișierului și selectați un folder de pe hard disk în care va fi salvat (Fig. 35). După ce faceți clic pe butonul **Salvare**, fișierul va fi salvat în directorul specificat.

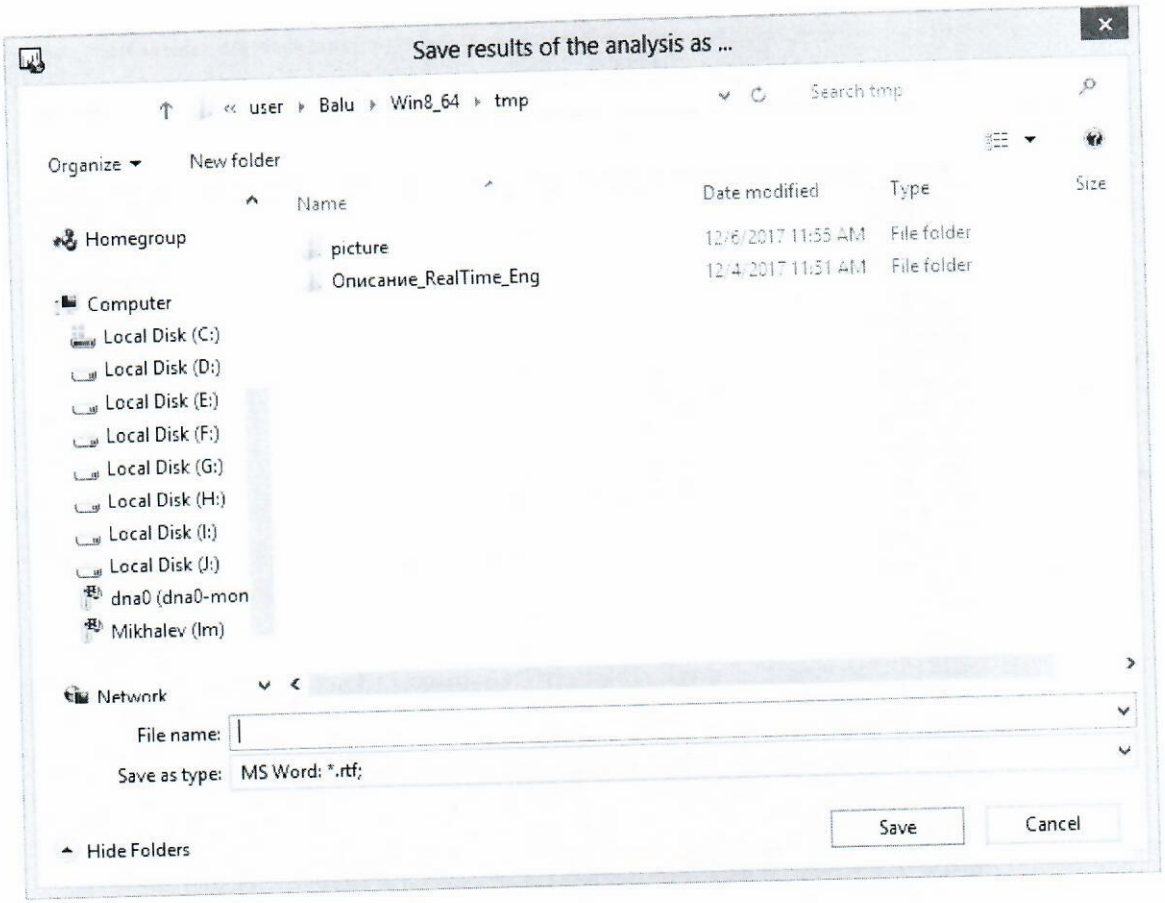
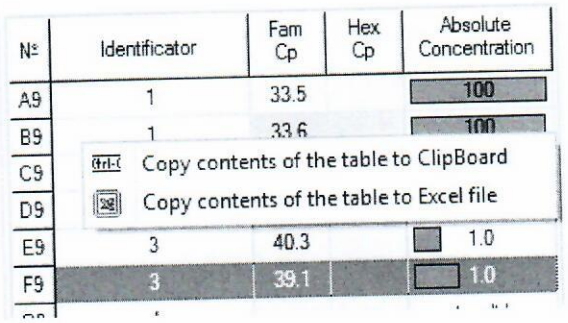


Fig. 35 Salvarea raportului

5.3.4 Exportarea datelor

Exportați datele pentru transfer în LIS utilizând butonul **Exportarea rezultatelor ca XML**. Va fi generat un raport în format XML care conține rezultatele calculate în formă numerică.

De asemenea, rezultatele măsurătorilor pot fi exportate sub forma unui tabel Excel sau copiate în clipboard. Pentru a face acest lucru, în fereastra „**Arhivă**" din fila „Analiza datelor" faceți clic dreapta pe „antetul" tabelului „Rezultate".



Alegeți modul de export al datelor:

- Copy contents of the table to ClipBoard - copiați în clipboard.

Copy contents of the table to Excel file -copiați în Excel. Dacă selectați această opțiune, se deschide fereastra „Explorer", unde vi se va solicita să alegeți cum și unde să salvați fișierul de date Excel.

6 Setări și diagnosticări ale instrumentului.

Setările parametrilor tehnici ai dispozitivului și diagnosticarea acestuia sunt efectuate în **Modul de funcționare a dispozitivului**.

Utilizând software-ul RealTime_PCR, se pot verifica și seta următorii parametri:

- se verifică setările geometrice ale unității optice a dispozitivului,
- este verificată puritatea godeurilor,
- este setată înălțimea eprubetelor,
- sunt setate măsurătorile optice.

6.1 Verificarea setărilor geometrice ale unității optice și a purității godeurilor.

Când porniți dispozitivul pentru prima dată după transport sau orice mișcare, se recomandă să verificați setările geometrice ale unității optice. Pentru aceasta, se vor efectua următoarele etape:

1. Selectați elementul **Vizualizare imagine** în meniul **Preferințe** al ferestrei **RealTime_PCR**
2. În fereastra deschisă **Vizualizare imagine** (Fig. 36) cu lista derulantă Fam selectați canalul de măsurare **Fam**.
3. Setați valoarea de expunere necesară în fereastra **Expunere** pentru a obține suficiente niveluri de semnal optic în intervalul 1000 ... 3000 (valoarea scalei la obținerea valorilor digitale ale semnalelor de fluorescență în fereastra **Digitizarea semnalului**).
4. Apăsați butonul View... .
5. Asigurați-vă că este bifată caseta Show mask .
6. Analizați imaginea rezultată.

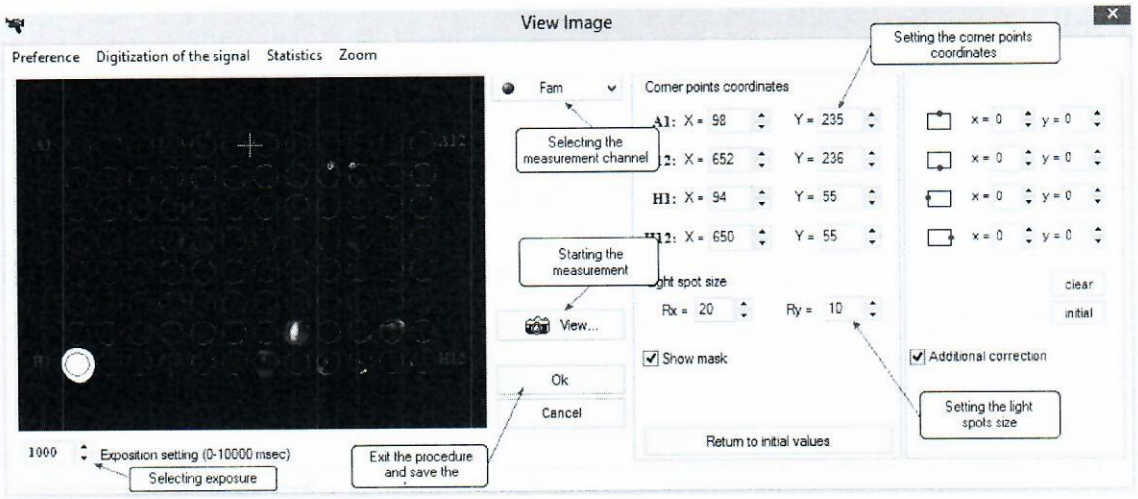


Fig. 36 Fereastră pentru verificarea și corectarea setărilor geometrice ale dispozitivului

În imaginea rezultată, contururile care indică limitele zonei măsurate (cercuri roșii) nu trebuie să depășească punctul luminos.

Dacă centrul pixelului care constituie punctul luminos se află în cercul roșu, se ia în considerare în timpul măsurării. Pixelii ale căror centre se află în afara graniței cercului roșu nu vor fi luate în considerare (Fig. 37).

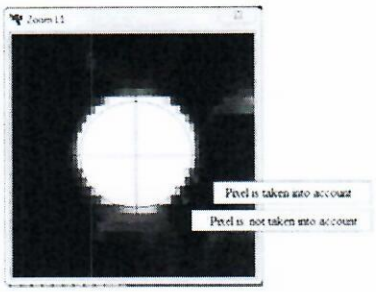


Fig. 37 Zona de măsurare pentru semnalele de fluorescență

Dacă cercurile sunt compensate în raport cu punctele de lumină, este necesar să se corecteze geometria imaginii optice.

7. Pentru a corecta geometria imaginii optice în fereastra de previzualizare a Imaginii, selectați punctul de corectat cu butonul stânga al mouse-ului. Pentru o corecție mai exactă, apăsați butonul **Zoom**. Va apărea o fereastră care mărește imaginea punctului selectat.
8. Corectați coordonatele punctelor de colț și dimensiunea punctului de lumină modificând valorile din ferestrele corespunzătoare.

   Notă! Pentru a anula modificările efectuate, apăsați butonul **Reveniți la valorile inițiale**.

9. Apăsați butonul 

pentru reefectuarea măsurării.
10. Apăsați butonul **OK** pentru a salva noi setări geometrice

11. Selectați succesiv canalele rămase ale dispozitivului și setând în același mod valoarea expunerilor, repetați aceste măsurători pentru fiecare dintre ele, controlând poziția măștii de măsurare și împrăștierea nivelurilor de semnal optic.

    Atenție! Reglarea poziției măștii de măsurare se realizează doar în canalul Fam; în timpul acesteia, poziția măștii de măsurare se reglează automat în celelalte canale.

12. În cazul în care este exprimată curbura imaginii pentru dispozitivul cu 384 godeuri, continuați corecția și setați decalajul coordonatelor centrale (Fig. 38). Coordonatele centrale sunt centrele laturilor formării perimetrului. În timpul corecției de compensare, punctul central, ale cărui coordonate se corectează în acel moment, este indicat în imagine cu o cruce verde  .

    Pentru a introduce coordonatele de offset ale câmpurilor corespondente, bifați ☑ Additional correction

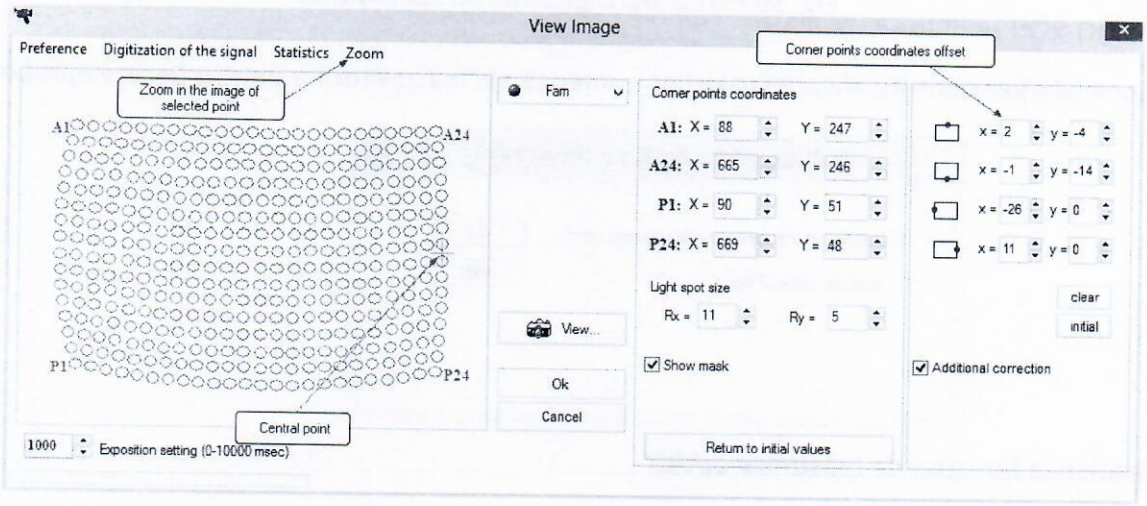


Fig. 38 Fereastră pentru reglarea setărilor geometrice ale dispozitivului, care reglează deplasarea coordonatelor punctelor centrale.

Pentru a reseta coordonatele decalate la poziția zero, apăsați butonul [clear], revenind la valorile anterioare, apăsați butonul [initial].

13. Pentru a obține valorile digitale ale semnalelor de fluorescență, selectați opțiunea **Digitizarea semnalului** pentru afișarea unei ferestre suplimentare **Digitizarea semnalului** (Fig. 39).

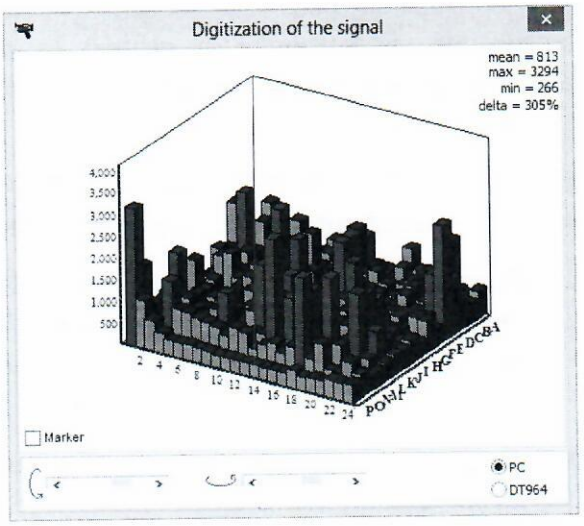


Fig. 39 Fereastra **Digitalizarea semnalului**

Opțiunea **Marker** permite afișarea valorilor numerice ale măsurătorilor pentru fiecare eprubetă.

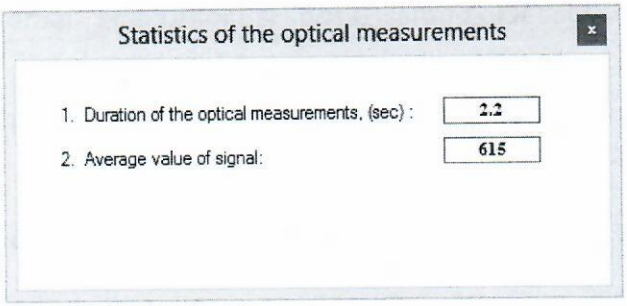


Fig. 40 **Statistica** ferestrei de **măsurare optică**

Selectarea opțiunii **Statistici** deschide fereastra **Statistici de măsurare optică** (Fig. 40) cu indicarea duratei de timp a măsurătorilor optice și a valorii medii a semnalului video al canalului selectat.

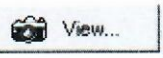
14. Repetați pasul 5-8 pentru măsurarea canalelor **Hex, Rox** și **Cy5** pentru a vă asigura că setările sunt corecte.

Curățenia godeurilor unității termice este indicată de absența punctelor luminoase de pe imaginea godeurilor goale la verificarea setărilor geometrice ale unității optice.

Pentru verificarea curățeniei godeurilor și lipsa semnalelor secundare optice reflectate, efectuați următoarele:

1. Închideți unitatea termică, asigurându-vă că nu există tuburi în godeuri.

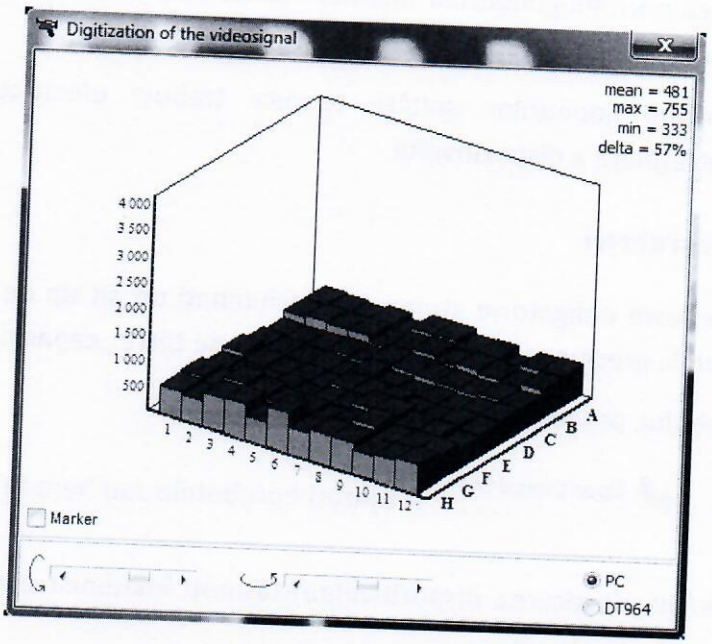
2. Deschideți fereastra Vizualizare Imagine (Preferință/Vizualizare imagine), alegeți Digitalizarea semnalului și deschideți această fereastră, setați expunerea.

3. Apăsați butonul 

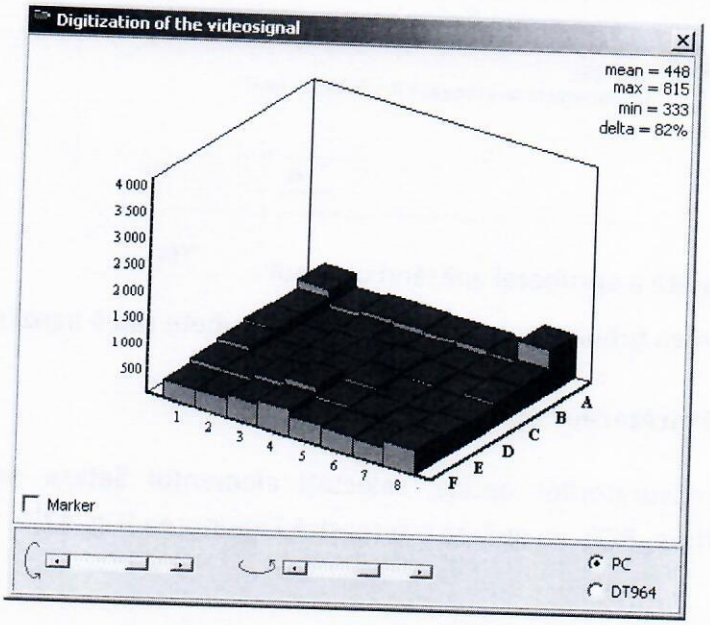
, începeți procesul de măsurare optică pe canalul FAM

(selectat implicit).

4. Asigurați-vă că nivelurile de semnal optic pentru godeurile goale din fereastra de digitalizare a semnalului video (consultați fig. 41) nu depășesc 1500 de unități convenționale; în caz contrar, curățați godeurile luminoase și repetați măsurarea.



a)



b)

Fig. 41 Vederea dispozitivelor godeurilor goale DTprime (a) și DTlite (b).

5. Alegeți succesiv canalele de repaus ale dispozitivului și setați valorile expunerii (de două ori

mai mari decât valorile expunerii de lucru), repetați aceste măsurători pentru toate canalele (apăsând butonul View... și controlul nivelurilor semnalelor optice din fereastra de digitalizare a semnalului video).

Notă! Se recomandă verificarea purității godeurilor imediat înainte de a pune eprubete cu probe de PCR, dacă există posibilitatea de contaminare.

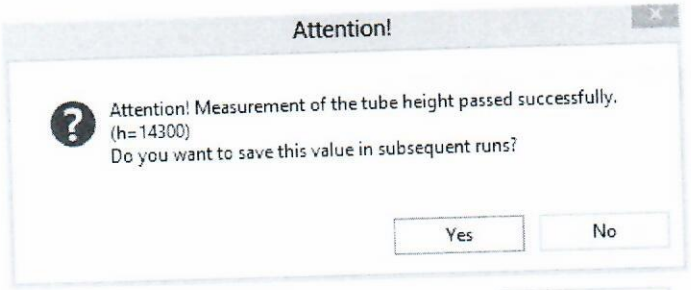
Verificarea periodică a purității godeurilor unității termice trebuie efectuată de operator în conformitate cu regulile de întreținere a dispozitivului.

6.2 Măsurarea înălțimii eprubetei

Măsurarea înălțimii eprubetei este obligatorie atunci când schimbați un alt tip de eprubetă sau benzi sau când există dubii cu privire la presiunea necesară pe eprubeta de către „capacul cald".

Pentru a măsura înălțimea tubului, procedați după cum urmează:

- faceți clic pe butonul Open thermal unit și așezați eprubetele sau benzile uniform pe matricea unității termice;
- selectați Preferințele/Diagnosticarea dispozitivului/Măsurați înălțimea eprubetelor și așteptați mesajul:



- salvați înălțimea măsurată a eprubetei apăsând butonul Yes

Atenție! Când măsurați înălțimea tubului, așezați cel puțin 32 eprubete sau 4 benzi uniform pe placă.

6.3 Setarea expunerii măsurătorilor optice

Pentru a seta expunerea măsurătorilor optice, selectați elementul **Setare expunere** din meniul **Preferințe** ale ferestrei **RealTime_PCR**. Va apărea o fereastră **Expunerea** (Fig. 42).

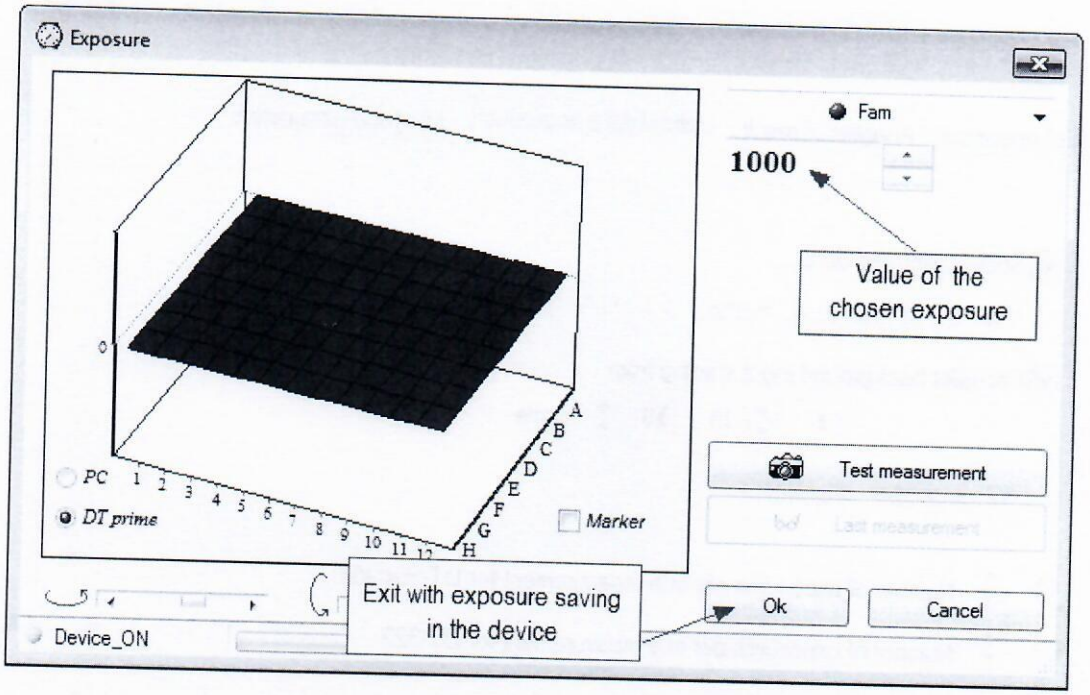


Fig. 42 Fereastra pentru setarea expunerii măsurătorilor optice.

Parametrii de expunere din fabrică ale măsurătorilor optice sunt optime pentru lucrul cu kituri DNA - Technology. Modificarea parametrilor de expunere sunt necesare doar în cazul în care kit-urile diferă de DNA-Technology originale.

Dacă este necesar, setați valoarea de expunere pentru fiecare canal. Este obligatoriu să setați expunerea măsurătorilor optice pentru toate canalele, selectându-le secvențial în fereastră cu săgețile din colțul din dreapta sus al ferestrei **Expunere**.

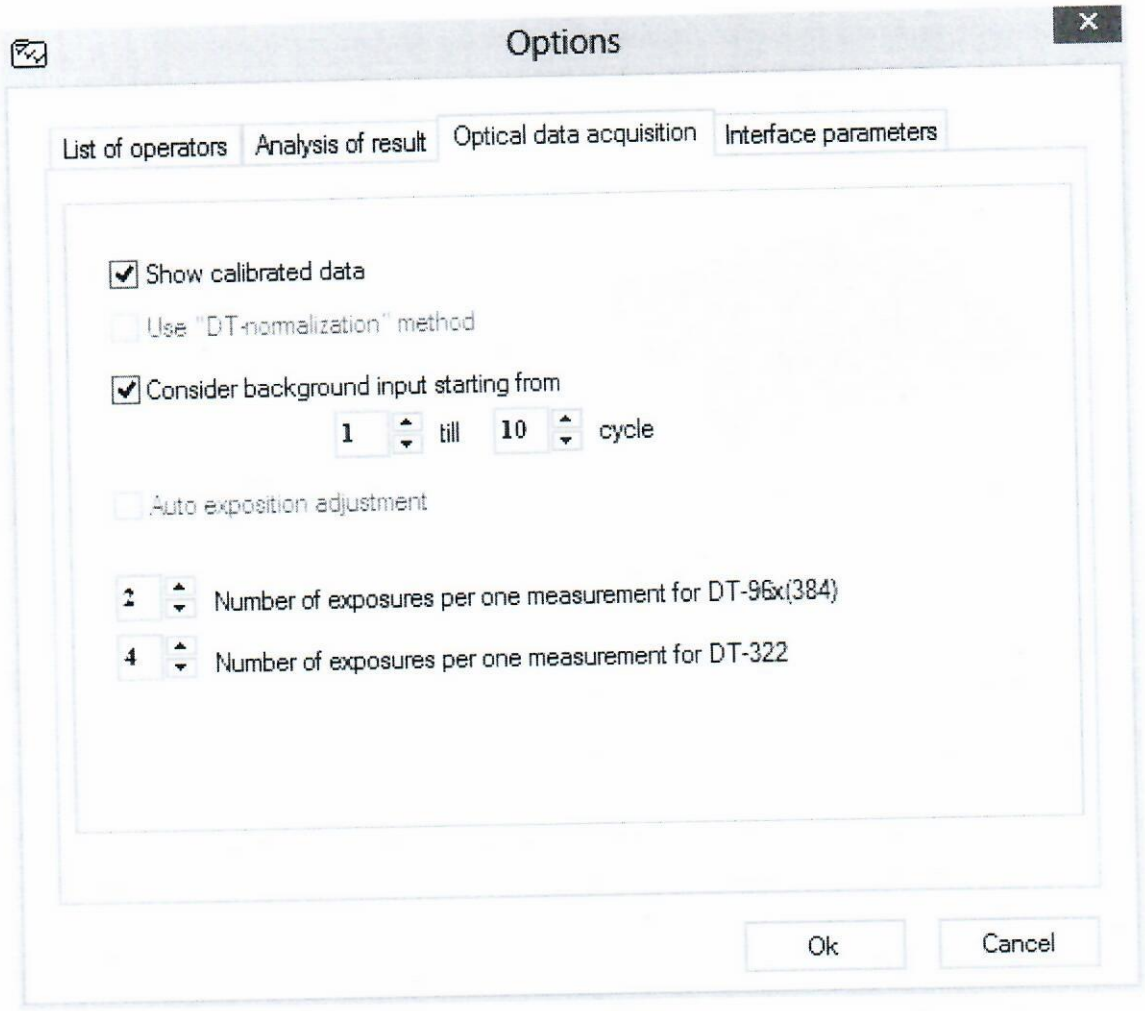
Dacă există o sursă de fluorescență, efectuați o măsurare de testare, apăsând butonul Test measurement, în urma căreia o imagine grafică a valorilor curente ale măsurătorilor optice în coordonate tridimensionale va fi afișată în partea stângă a ferestrei.

Butoanele cu săgeți de dedesubtul diagramei permit rotirea imaginii în planurile orizontale și verticale, opțiunea **Marker** permite afișarea valorilor numerice pentru fiecare eprubetă.

Notă! Culoarea roșie a coloanei indică faptul că valoarea fluorescenței din această unitate termică este peste nivelul liniar de măsurare.

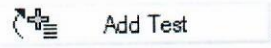
Pentru a extinde domeniul optic, fiecare măsurătoare poate conține de la 1 la 2 expuneri pentru DTprime și DTlite (aceasta din urmă este de cinci ori mai scurtă decât prima). În acest caz, timpul maxim de expunere este setat în fereastra **Expunere**.

Numărul expunerilor poate fi reglat în meniu **Preferințe/Opțiuni/Achiziție de date optice**:



6.4 Compensarea culorilor în DTprime și DTlite

Efectul încrucișat, rezultat dintr-o suprapunere parțială a spectrelor de absorbție și de emisie a coloranților fluorescenti, este eliminat prin metoda software. În acest scop, în memoria dispozitivului sunt stocate matricile coeficienților optici și spectrali obținuți prin calibrarea dispozitivului cu coloranți fluorescenți puri.

Atenție! Compensarea culorii funcționează doar dacă RULAREA este completată, utilizând procedura 

ceea ce înseamnă că fiecărei eprubete îi corespunde un test specific, care precizează compoziția coloranților incluși în kitul de testare utilizat. În caz contrar, compensația nu va fi efectuată corect.

6.4.1 Activarea compensării semnalului

Compensarea culorilor este activată în mod implicit, după cum se poate verifica selectând opțiunea **Altele ...** din meniu
Preferințe.

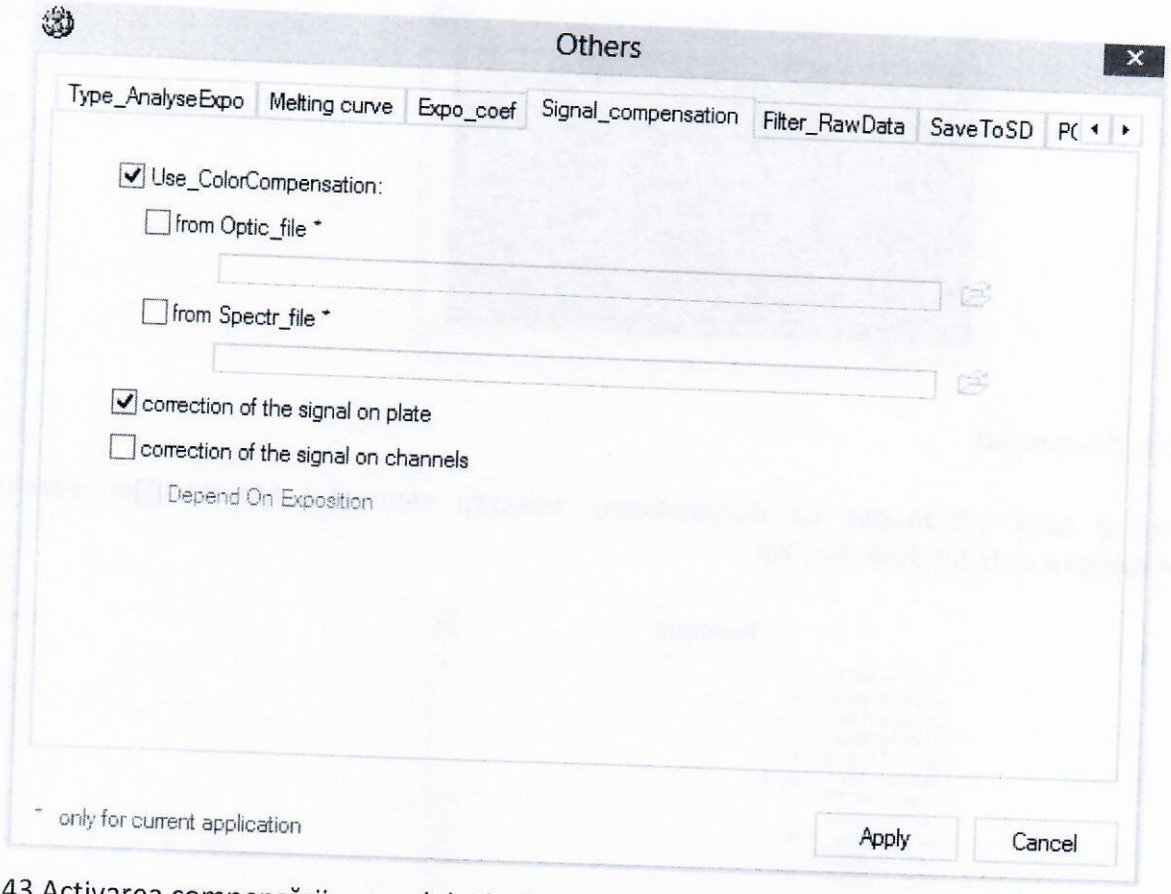


Fig. 43 Activarea compensării semnalului în fereastra Altele.

În fereastra deschisă **Altele** din fila **Compensarea semnalului** trebuie să fie activată opțiunea **Use_ColorCompensation**. Dacă această opțiune este dezactivată, compensarea culorii nu va fi utilizată.

6.5 Diagnosticarea instrumentului

Dispozitivul este diagnosticat de un inginer de service în timpul procedurii de instalare și întreținere.

Atenție! Nu este recomandat să se utilizeze aceste opțiuni privind serviciile de diagnosticare de către utilizatorul final.

Pentru a diagnostica funcționarea dispozitivului, selectați **Diagnosticarea dispozitivului** din meniul **Preferințe** Fereastra software **RealTime_PCR**:

- Pentru a introduce comenzile de diagnosticare ale dispozitivului, selectați elementul **Linie de comandă**. Se va deschide fereastra **Șir de comandă** (Fig. 44). Butoanele V T M D sunt destinate selecției controlerului, a cărui diagnosticare trebuie efectuată.



Fig. 44 Șir de comenzi

– Pentru a afișa informațiile de diagnosticare, selectați elementul **Monitorizare**. Fereastra **Monitorizare** va fi deschisă (Fig. 45)

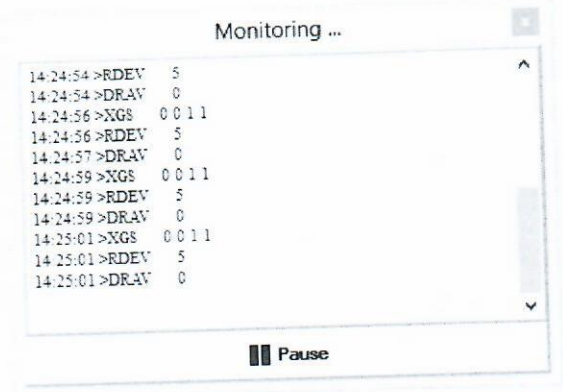


Fig. 45 Monitorizarea

7 Setările utilizatorului

Într-un software **RealTime_PCR** este posibilă salvarea setărilor individuale pentru fiecare utilizator (operator) al software-ului: numele operatorului, un folder pentru salvarea fișierelor, stilul fontului, stilul de prezentare a ferestrei (doar pentru sistemul de operare Windows XP).

Pentru a schimba setările utilizatorului, deschideți fereastra **Opțiuni ...** (selectați elementul **Opțiuni ...** din meniul
Preferințe).

Fila **Lista operatorilor** din fereastra **Opțiuni** (Fig.46) este concepută pentru a efectua următoarele acțiuni: adăugarea, editarea și ștergerea operatorilor, alocarea unui folder pentru salvarea fișierelor.

– Pentru a adăuga un operator nou, utilizați butonul **Add (Adăugare)**.

- Pentru a edita operatorul selectat în listă, utilizați butonul **Change (Schimbare)**.
- Pentru a elimina operatorul selectat din listă, utilizați butonul **Delete (Ștergere)**.

După ce faceți clic pe butoanele **Adăugare** sau **Schimbare** , se va deschide **fereastra Adăugare operator**, în care specificați/editați **numele operatorului** și **directorul** (folderul) pentru salvarea fișierelor (pentru mai multe detalii, consultați „Pornirea RULĂRII").

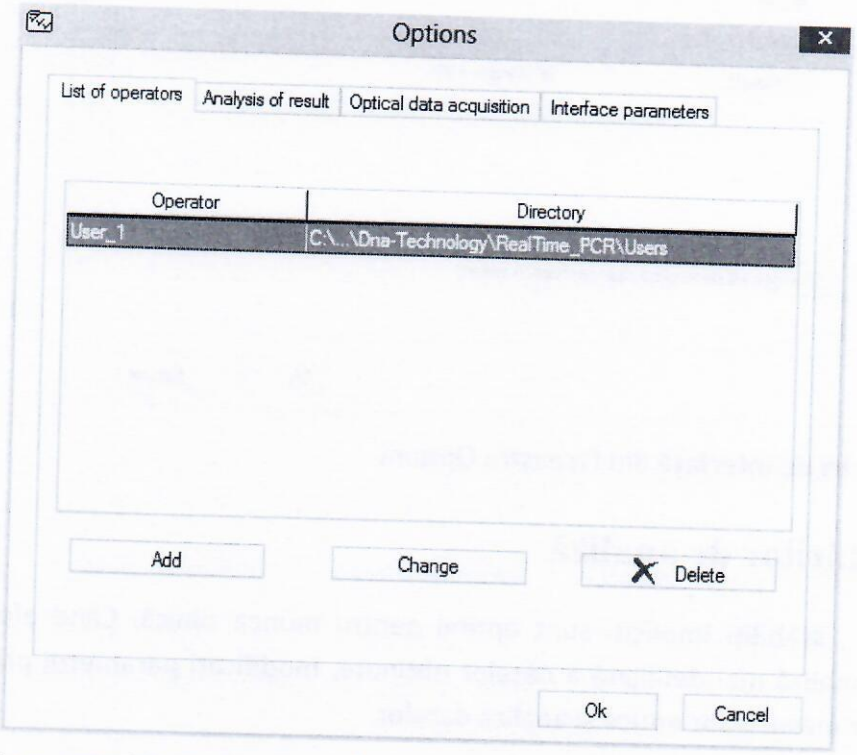


Fig. 46 Lista filei operatorilor din fereastra Opțiuni

Fila Parametri de interfață (Fig. 47) este concepută pentru selectarea fontului software-ului și a limbii.

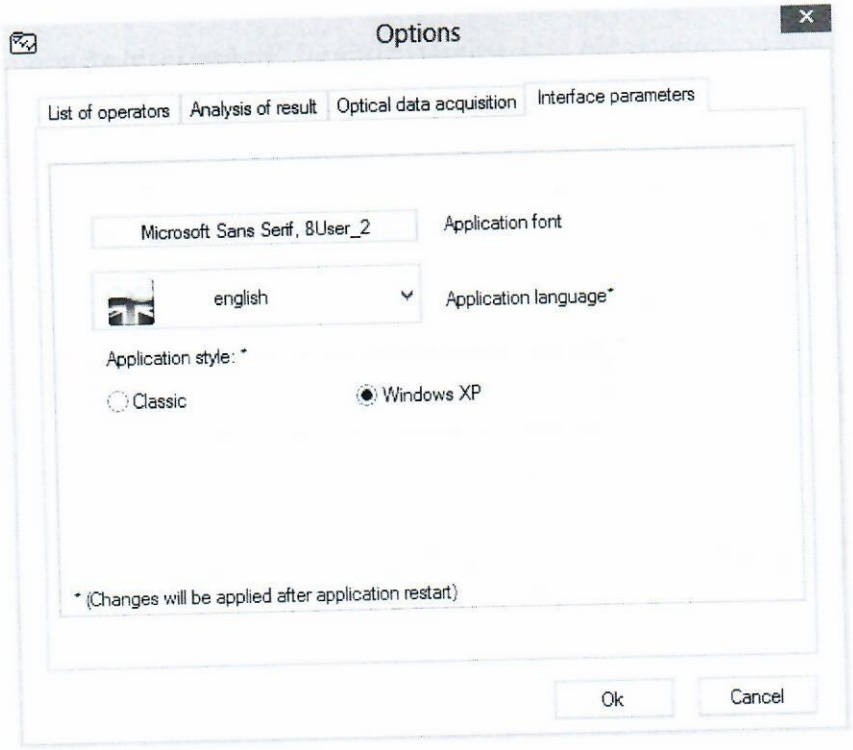


Fig. 47 Fila **Parametri de interfață** din fereastra Opțiuni

8 Parametrii setărilor de analiză

Parametrii de analiză , stabiliți implicit, sunt optimi pentru munca zilnică. Când efectuați cercetări științifice și pentru o analiză mai detaliată a datelor obținute, modificați parametrii prestabiliți pentru procesarea rezultatelor măsurărilor optice și analiza datelor.

Atenție! **Când lucrați cu kituri comerciale, setările de analiză și termociclu trebuie solicitate de la producătorul kitului.**

Modificarea parametrilor este disponibilă în diferite etape ale software-ului:

1. Când adăugați/editați teste (butonul **Adiditional** al ferestrei **Test**).
2. Când creați o RULARE (elementul **Opțiuni** din meniul **Preferințe,** fila **Analiza rezultatelor**).
3. Când porniți și executați programul de amplificare (elementul **Opțiuni** din meniul **Preferințe,** filele **Analiza rezultatelor** și **Măsurători optice**).
4. Când analizați rezultatele măsurătorilor (fila **Analiza datelor**, butonul **Schimbarea parametrilor analizei datelor**) - doar pentru RULAREA analizată.

În acest caz, este afișată fereastra **Parametrii analizei** (Fig. 48) și sunt disponibile următoarele setări:

- **Criteriul rezultatului pozitiv al PCR** (în intervalul de la 60 la 100%) permite schimbarea sensibilității la rata de creștere a produselor PCR. Prin scăderea valorii acestui parametru, se pot realiza vizualizarea și calcularea curbelor mai puțin înclinate.

- **Valoarea pragului** permite stabilirea unui nivel de prag de fluorescență la determinarea ciclului indicatorului (este luată în considerare în metoda pragului de analiză a curbelor).

- **Criteriile de validitate** ale rezultatelor sunt parametrii care permit reglarea condițiilor de calcul a curbei prin metoda geometrică de analiză:

pragul rezultatului pozitiv este limita inferioară; pragul de normalizare a datelor este limita superioară.

- **Normalizare:** utilizarea metodei „normalizării amplitudinii".

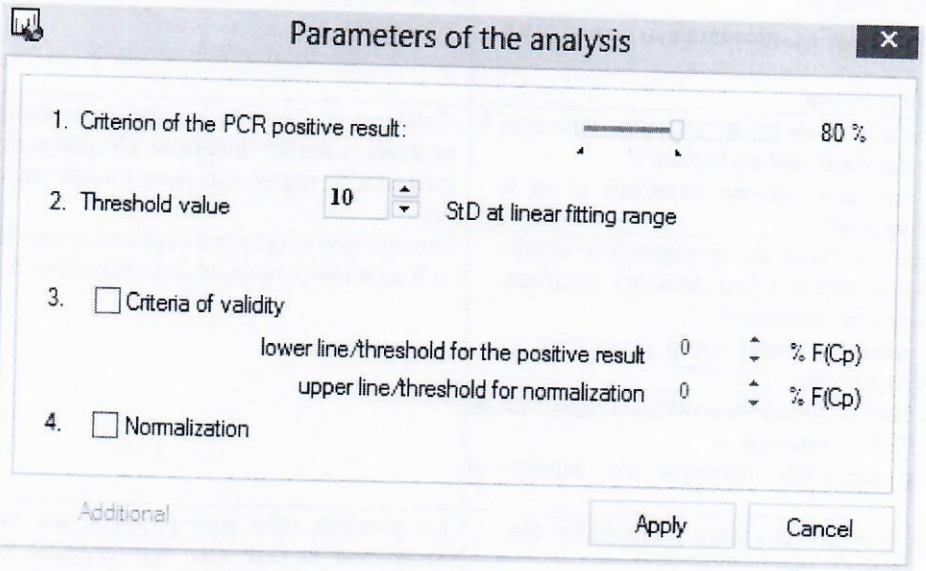


Fig. 48 Parametrii ferestrei de analiză

Metoda de analiză este selectată în faza de creare a testului sau direct în fereastra Analiza măsurărilor optice.

Metodele de prag (Ct) și geometrice (Cp) pentru analiza curbei de acumulare de ADN în timpul PCR se bazează pe abordări diferite pentru determinarea ciclului indicatorului de amplificare.

- **Metoda Pragului (Ct)** se bazează pe efectuarea unei linii de prag care este paralelă cu linia X și determinarea numărului de cicluri (ciclu de prag), la care curba de amplificare a acestei eprubete traversează linia pragului. Ciclul de prag este una dintre variantele ciclurilor indicatorilor.
- **Metoda geometrică (Cp)** se bazează pe o analiză matematică a formei curbei de acumulare de ADN în timpul PCR.

În mod implicit, atunci când analizează măsurători optice, RealTime_PCR utilizează metoda Geometrică (Cp). În cazul situațiilor non-standard, când curba de amplificare diferă semnificativ de ADN-ul clasic

curba de acumulare în cursul PCR (sigmoid), este posibil să se analizeze rezultatele utilizând metoda Prag (Ct), care, în astfel de cazuri, oferă o estimare mai bună.

Alături de rezultatele procesate (deducerea liniei de referință, potrivirea), atunci când se analizează rezultatele măsurărilor optice, este posibilă vizualizarea ***datelor brute***, selectând poziția corespunzătoare din lista derulantă a metodelor de analiză.

9 Situații de urgență

⊗	Atenție! A apărut o defecțiune la inițializarea dispozitivului! Încercați să repetați operațiunea selectată ...	Identificarea dispozitivului a eșuat la conectarea la calculator. Este necesar să repetați procedura de conectare la instrument...
⊗	Atenție! A apărut o eroare la citirea măștii optice a instrumentului ... Trebuie să reporniți aplicația!	A apărut o eroare la citirea parametrilor de setare din instrument. Este necesar să repetați procedura de conectare la instrument ...
⊗	Atenție! A apărut o eroare la citirea blocului de parametri din instrument ... Trebuie să reporniți aplicația!	
⊗	Atenție! Este detectată o valoare de expunere incorectă la citirea blocului de parametri din instrument ... Este necesar să verificați valorile expunerii și să le corectați dacă este necesar!	Validarea blocului de parametri din instrument a evidențiat prezența valorilor incorecte ale parametrilor individuali ai factorilor de reglaj: expunere, coordonatele geometriei optice etc. Este necesar să corectați acești parametri și să-i salvați din nou în instrument. Contactați asistența tehnică a producătorului.
⊗	Atenție! O valoare incorectă de coordonată a setării geometrice a imaginii optice a fost detectată la citirea blocului de parametri din instrument ... Este necesar să verificați valorile setării geometrice și să corectați dacă este necesar!	
⊗	Atenție! Este detectată o valoare incorectă a compensării de coordonate ale reglării geometrică ... Este necesar să contactați inginerul de service al producătorului!	
⊗	Atenție! A apărut o eroare la citirea protocolului din instrument ... Este necesar să repetați procedura de citire!	La pornirea unui nou protocol sau la conectarea la un instrument în care este deja executat protocolul, respectiv citirea/scrierea protocolului a eșuat. Trebuie să repetați procedura de citire/scriere.
⊗	Atenție! A apărut o eroare la scrierea protocolului în instrument ... Este necesar să repetați procedura de scriere!	
!	Atenție! Este detectată o valoare incorectă a coeficienților de neuniformitate optică ... Este necesar să contactați inginerul de service al producătorului!	Validarea coeficienților optici ai instrumentului a evidențiat prezența unor valori incorecte. Trebuie să contactați departamentul de asistență tehnică al producătorului.
!	Atenție! Este detectată o valoare incorectă a coeficienților de neuniformitate spectrală ... Este necesar să contactați inginerul de service al producătorului!	
!	Atenție! A fost detectată o valoare incorectă a coeficienților de neuniformitate inegală ... Este necesar să contactați inginerul de service al producătorului!	
⊗	Atenție! A apărut o eroare la scrierea datelor protocolului pe instrument!	A apărut o eroare la scrierea datelor pe instrument la nivelul cardului SD. Trebuie să repetați scrierea pentru procedura instrumentului.
⊗	Atenție! Gradientul/diferența de temperatură nu corespunde blocului de temperatură al instrumentului! Este necesar să se facă modificări corespunzătoare în	Gradientul de temperatură/diferența în programul de amplificare încărcat în instrument nu corespunde unității de temperatură a instrumentului sau NU poate corespunde

	programului de amplificare ...	(în cazul instrumentelor vechi, informațiile despre blocul termic lipsesc). Este necesar să se facă modificări adecvate în programul de amplificare ...
!	Atenție! Este posibil ca gradientul/diferența de temperatură să nu corespundă blocului de temperatură al instrumentului! Doriți să continuați programul?	
!	Atenție! Sunt detectate valori incorecte ale setărilor geometrice ... Continuați procedura de salvare?	Validarea setărilor geometrice din procedura „Imagine previzualizată" a relevat prezența unor valori incorecte.
!	Atenție! Probleme la alegerea filtrelor de culori (MBUSY) ...	În timpul achiziționării imaginii optice în procedura „Previzualizare imagine", a existat o defecțiune a instrumentului atunci când a fost selectat filtrul de culoare. Repetați procedura pentru citirea imaginii optice.
!	Atenție! Sunt detectate valori incorecte ale valorilor de expunere ... Continuați procedura de salvare?	Validarea valorilor de expunere în procedura „Expunerea măsurătorilor" a relevat prezența valorilor incorecte.
!	Atenție! În timpul executării programului, au fost găsite erori la stocarea valorilor de măsurare în fișierul de rezultate. Este necesar să se ia în considerare ultima execuție din instrument (elementul corespunzător din meniu) imediat după executarea programului în instrument!	În timpul executării protocolului, au fost detectate erori în procedura de înregistrare a datelor de măsurare optică într-un fișier cu rezultate. Este necesar să citiți ultimul început în instrument imediat după executarea programului în instrument.
!	Atenție! Au existat probleme la citirea părții de date ale măsurărilor optice din instrument! După finalizarea programului de amplificare, este necesar să citiți ultima pornire pe instrument ...	
⊗	Atenție! A avut loc o oprire de urgență a programului!	În timpul executării programului de amplificare în instrument, a avut loc o oprire de urgență a programului. Trebuie să contactați asistența tehnică a producătorului și să furnizați fișiere jurnal (dacă este posibil).
⊗	Atenție! A fost detectată o urgență în instrument!	La sfârșitul programului de amplificare în instrument, a fost detectată o situație de urgență. Trebuie să contactați asistența tehnică a producătorului și să furnizați fișiere de jurnal (dacă este posibil).
!	Nu se poate descărca protocolul! S-a constatat o discrepanță între lista de teste și testul din protocol!	La crearea unui protocol și la utilizarea unui protocol deja existent ca șablon, se verifică lista testelor pentru operator și lista testelor din protocolul șablon.
!	Atenție! A fost detectată o inconsecvență între lista curentă de teste și lista de teste din ultima rulare! Verificați numele operatorului sub care ultima rulare a fost citită...	La citirea ultimei rulări, instrumentul a descoperit o neconcordanță în testele din protocolul de citire și lista de teste ale operatorului curent, în cadrul căreia procedura de citire a ultimei rulări este începută.
!	Atenție! Blocul nu este în stare de funcționare!	Este necesar să se efectueze procedura de deschidere/ închidere a blocului termic.

Atenție! În cazul în care contactați serviciul de asistență pentru clienți, specificați următoarele:

1. Conținutul exact al mesajului de eroare.
2. RULAREA în timpul căruia se produce o situație de urgență.
3. Fișiere jurnal care sunt localizate în C:\Program Files (x86)\Dna-Technology\RealTime_PCR\LOG



Anexa 1. Glosarul termenilor de bază

Termociclu, instrument, dispozitiv - dispozitivul destinat reacției în lanț a polimerazei (PCR); este un termostat programabil capabil să încălzească și să răcească o eprubetă cu un amestec de reacție conform unui anumit program.

Amplificarea ADN - creșterea multiplă a cantității de ADN.

Probă analizată - material biologic destinat cercetării.

Probă de control intern (control intern, IC) - ADN sau ARN adăugat la proba analizată pentru a monitoriza performanța corectă a tuturor operațiunilor în timpul analizei. Dacă nu există ADN sau ARN în probă, controlul intern trebuie amplificat (în caz contrar, rezultatul analizei este considerat nevalid).

Histograma măsurătorilor optice - reprezentarea grafică a valorilor curente ale măsurătorilor optice în coordonate tridimensionale.

Duplicat (duplicate) - un set paralel cu două sau mai multe reacții absolut identice. Este utilizat pentru a media efectul factorilor aleatori asupra rezultatului.

Identificator - o denumire unică a eprubetei de reacție.

Vopsele intercalante - substanțe care luminează fluorescent intens atunci când sunt legate cu ADN sau ARN cu două catene (de exemplu, bromură de etidiu, SYBR Green I)

Analiză calitativă - determinarea prezenței sau absenței acizilor nucleici ai organismului care urmează să fie detectat în proba de testare.

Analiză cantitativă - determinarea concentrației de acizi nucleici din organismul detectat în proba de testare.

Cinetica acumulării ADN - reprezentarea grafică a procesului de acumulare a produselor de amplificare a ADN-ului (ampliconi).

Curba de topire - o diagramă de fluorescență față de temperatură la încălzirea (sau răcirea) amestecului de reacție după terminarea PCR.

Marker - valoarea numerică a unui parametru

Matrice - dispunerea certă a elementelor în spațiu

Mod multi-test - opțiunea care permite combinarea mai multor teste într-o singură analiză cu același program de amplificare și același tip de analiză.

Program de amplificare - un program care specifică modul de efectuare a reacției de amplificare.

Diluții **ADN sau ARN** - diluții consecutive de probă de ADN sau ARN

Montare - netezirea datelor experimentale.

Colorant fluorescent - compus chimic capabil să lumineze fluorescent eficient. Poate absorbi energia de lumină de o anumită lungime de undă (lungimea de undă de excitație) și o poate emite la o altă lungime de undă (lungimea de undă a radiației).

Fluorofor -vopsea fluorescentă.

Expunerea măsurătorilor - parametru care reglează sensibilitatea sistemului optic al dispozitivului.

Anexa 2. Tipuri de analiză (sunt reprezentate doar cele de bază)

Atunci când creați teste și lucrați cu diferite tipuri de analiză, setările analizei și setările dispozitivului sunt solicitate de producătorul de kituri.

.. Analiză calitativă

Analiza calitativă permite determinarea prezenței sau absenței fragmentului de ADN țintă în probă.

Pentru a efectua o analiză calitativă (Fig. 49) este necesar să selectați o **analiză calitativă** din lista derulantă **Tip de analiză** atunci când creați un Test. În cazul creării unei RULĂRI manuale fără a utiliza opțiunea **Test**, acest tip de analiză este utilizat în mod implicit.

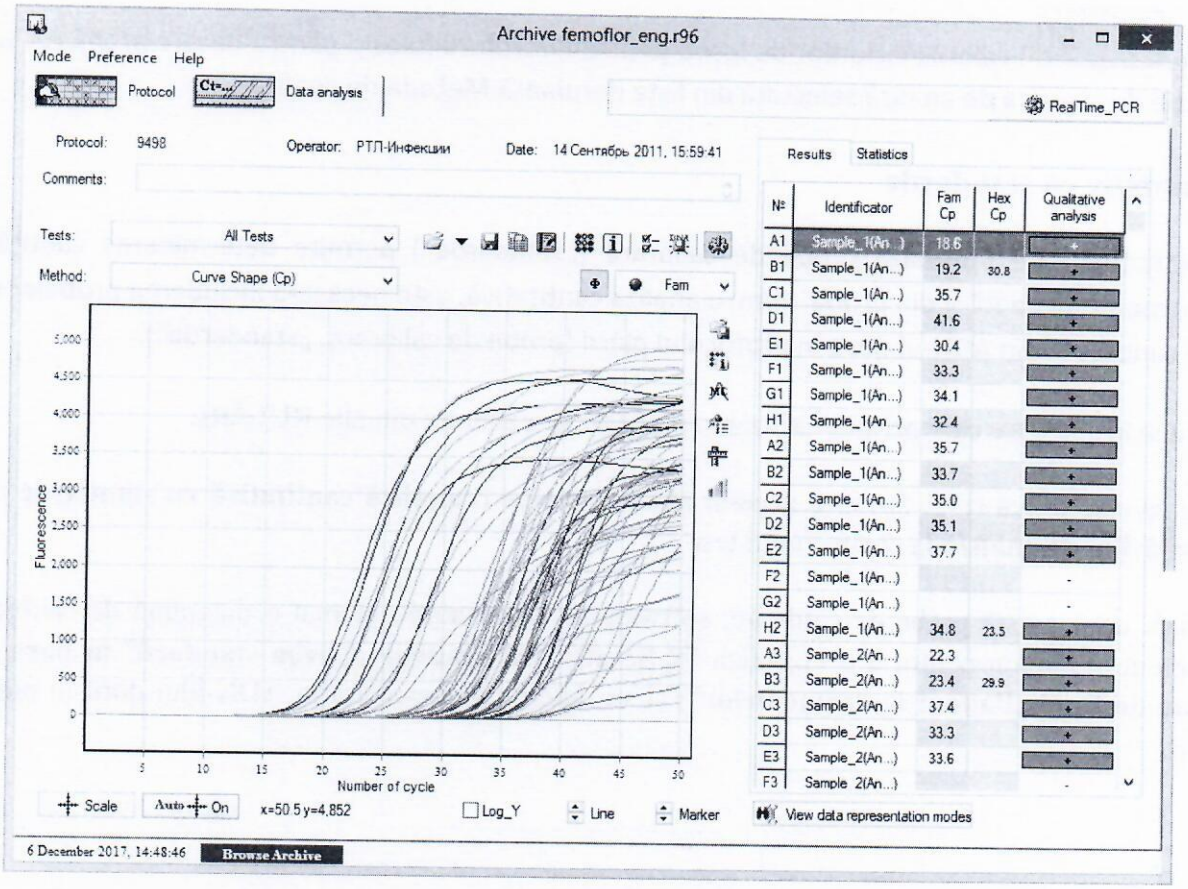


Fig. 49 Tip de analiză „calitativă"

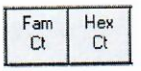
În prima și a doua coloană din fila **Rezultate**, sunt indicate numerele eprubetelor și identificatorii acestora. Alegerea tipului de numerotare (după locația în unitatea termică sau în funcție de numărul din protocolul plăcii), precum și afișarea „culorii" eprubetei, se realizează cu ajutorul butonului **Vizualizare moduri de reprezentare a datelor** de sub tabel:

Rezultatele unei analize calitative sunt afișate într-o coloană denumită **Analiza calitativă** sub forma următoarelor valori:

+ - există fragmente din ADN-ul dorit în probă (se înregistrează creșterea exponențială a semnalului pentru canalul *Elemente specifice*).

- nu există fragmente din ADN-ul dorit în probă (nu există o creștere exponentială a semnalului pentru canalul specific, în cazul utilizării unei probe de control intern (IC), o creștere exponențială a semnalului pentru canalul *IC*).

invalid - rezultatul nesigur (atunci când se utilizează IC - nu există o creștere exponențială a semnalului, atât pentru canalul *Elemente specifice* , cât și pentru *canalul IC*).

În coloanele 

: valorile ciclurilor de ieșire pentru fluoroforii folosiți pentru fiecare probă (Ct sau Cp - în funcție de metoda de analiză selectată din lista derulantă **Metoda** de analiză).

2. Cantitativ cu standarde

Analiza cantitativă care utilizează probe de calibrare („standarde") permite determinarea cantității dorite a fragmentului de ADN din probă. Pentru analiza cantitativă, este necesară includerea probelor cu o cantitate cunoscută din ADN-ul dorit în protocolul plăcii (probe de calibrare, „standarde").

Există opțiune în software care permite utilizarea probelor de calibrare din alte RULĂRI.

Pentru analiza cantitativă (Fig. 50) este necesar să se selecteze o **analiză cantitativă cu standarde** din lista derulantă **Tip de analiză** la crearea unui test.

După analiză, dacă există probe de calibrare, software-ul va construi automat o diagramă de calibrare (puteți face clic pe buton pentru a o vizualiza **Se afișează graficul „Curba standard" în bara de instrumente de bază „Panoul instrumentelor"**) și va determina concentrația ADN-ului dorit în probe necunoscute.

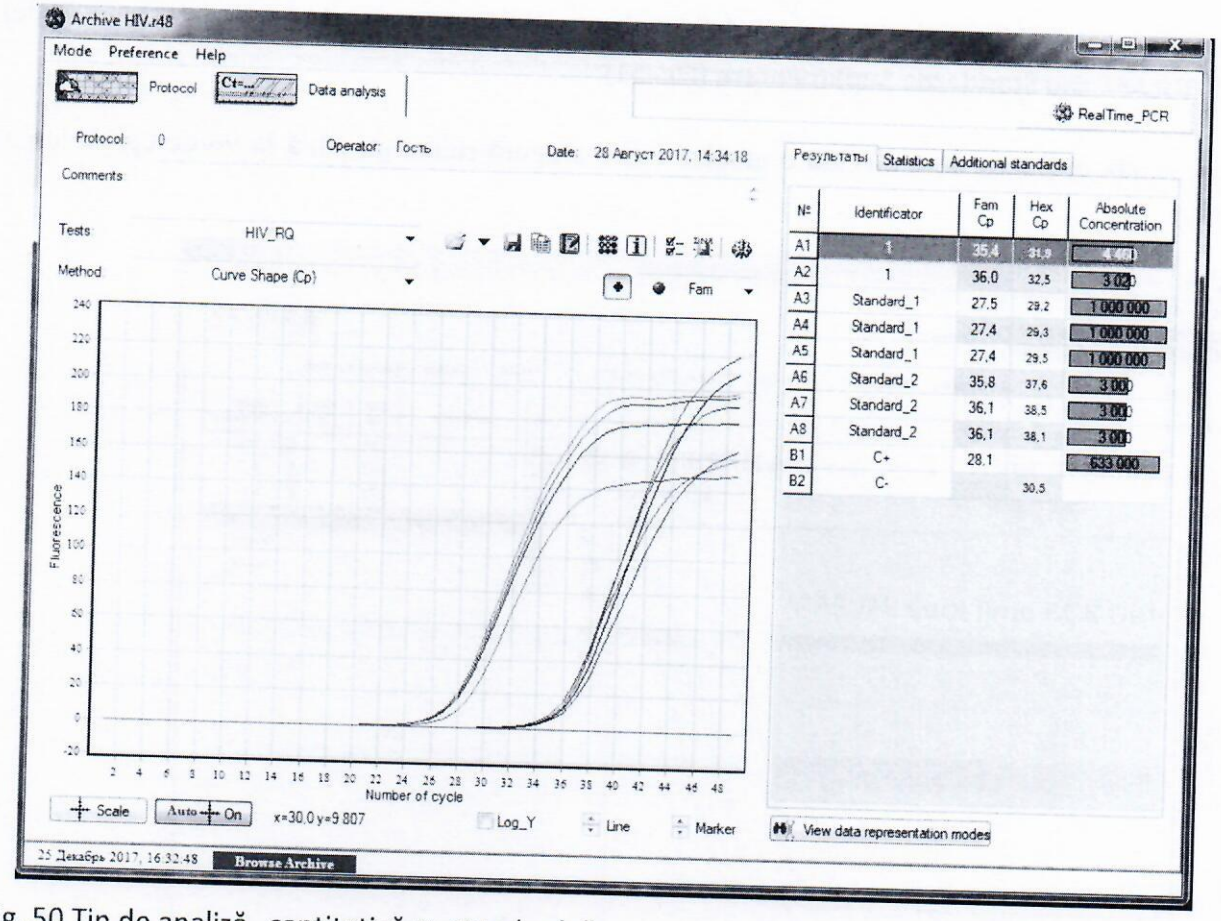


Fig. 50 Tip de analiză „cantitativă cu standarde"

Când se utilizează opțiunea de adăugare a probelor de calibrare din altă RULARE, este necesar să se efectueze următoarele acțiuni:

- continuați cu fila **Standarde suplimentare** din fereastra modului **Arhivă**,
- faceți clic pe butonul , selectați fișierul cu RULAREA corespunzătoare (tip de fișier * .r48, * .r96, * .384), ale cărui „standarde" vor fi utilizate ca standarde suplimentare. Pentru mai multe informații, accesați **Standarde suplimentare.**

Rezultatele analizei cantitative sunt afișate într-o coloană denumită **Concentrație absolută.**

În coloane | Fam Ct | Hex Ct | : valorile ciclurilor „caracteristice" pentru fluoroforii utilizați pentru fiecare probă (Ct sau Cp - în funcție de metoda de analiză selectată din lista derulantă **Metoda** de analiză).

Interpretarea rezultatelor analizei se realizează în conformitate cu instrucțiunile de utilizare a kitului utilizat.

❖ **Standarde suplimentare**

Pentru analiză, este posibil să folosiți „standarde" (probe cu conținut cunoscut al concentrației inițiale) dintr-o altă RULARE sau **Standarde Suplimentare** (Fig. 51).

În acest caz, există opțiunea de a efectua o analiză într-o singură rulare cu până la 96 de eprubete cu probe necunoscute.

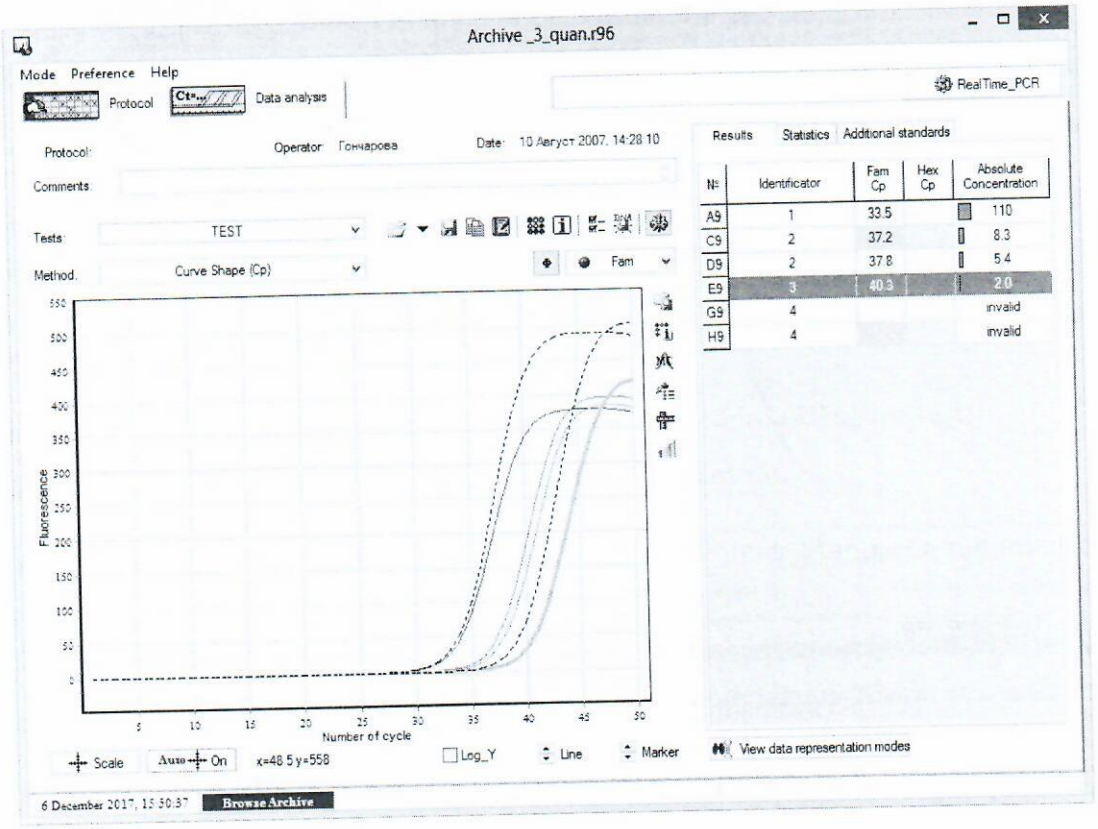


Fig. 51 Afișarea standardelor suplimentare la selectarea tipului de analiză „Cantitativă cu standarde"

Atenție! O condiție obligatorie pentru utilizarea standardelor suplimentare este identitatea RULĂRII (program de amplificare, tip de test).

Se pot adăuga standarde suplimentare:

- în stadiul creării unui protocol de placă utilizând procedura **Adăugare test;**
- în faza analizei rezultatelor din fila **Standarde suplimentare.**

Informațiile despre standarde suplimentare sunt afișate în fila **Standarde suplimentare**.

❖ Curba standard

Următoarele date sunt afișate în fereastra **Curba standard** (consultați Fig. 52):

- sistem de coordonate (axa X este logaritmul concentrației probei **Log10 (Concentrație)** , axa Y este valoarea lui Ct sau Cp);

- probe de calibrare (indicate prin ●);
- probe studiate (indicate prin ⊕
- „curba standard";
- eficiența PCR, abaterea standard, fiabilitatea aproximării.

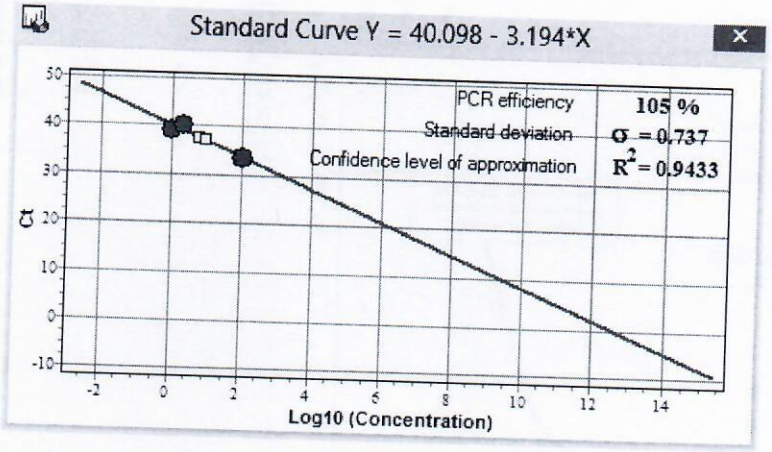


Fig. 52 Fereastra Curba standard la selectarea tipului de analiză „Cantitativă cu standarde"

Notă! Programul construiește linia dreaptă a formularului Y = A * x + B din punctele probelor de calibrare ●, pentru care este cunoscută concentrația și valoarea lui Ct (sau Cp). Ecuația dreptei rezultate este indicată în denumirea **ferestrei Curbei standard.**

Pe linia dreaptă construită, probele investigate sunt afișate sub formă de pictograme, în conformitate cu valoarea obținută a Ct (Cp). Pe baza concentrației găsite Log10, software-ul calculează concentrația probelor analizate.

Calitatea aproximării „Curbei standard" este reprezentată de **nivelul de încredere al aproximării** și de valorile **abaterii Standard**.

3. Analiza relativă

Analiza relativă face posibilă estimarea cantității fragmentului de ADN dorit în probele de testare în raport cu eprubeta „bază". Valoarea concentrației relative a eprubetei „bază" este unu. Când se efectuează o analiză relativă, se presupune că eficiența PCR pentru toate probele este aceeași. Oricare dintre probe poate fi selectată ca „bază".

Pentru a efectua o analiză relativă (Fig. 53), selectați o **Analiză relativă** din lista derulantă **Tip de analiză** atunci când creați un Test.

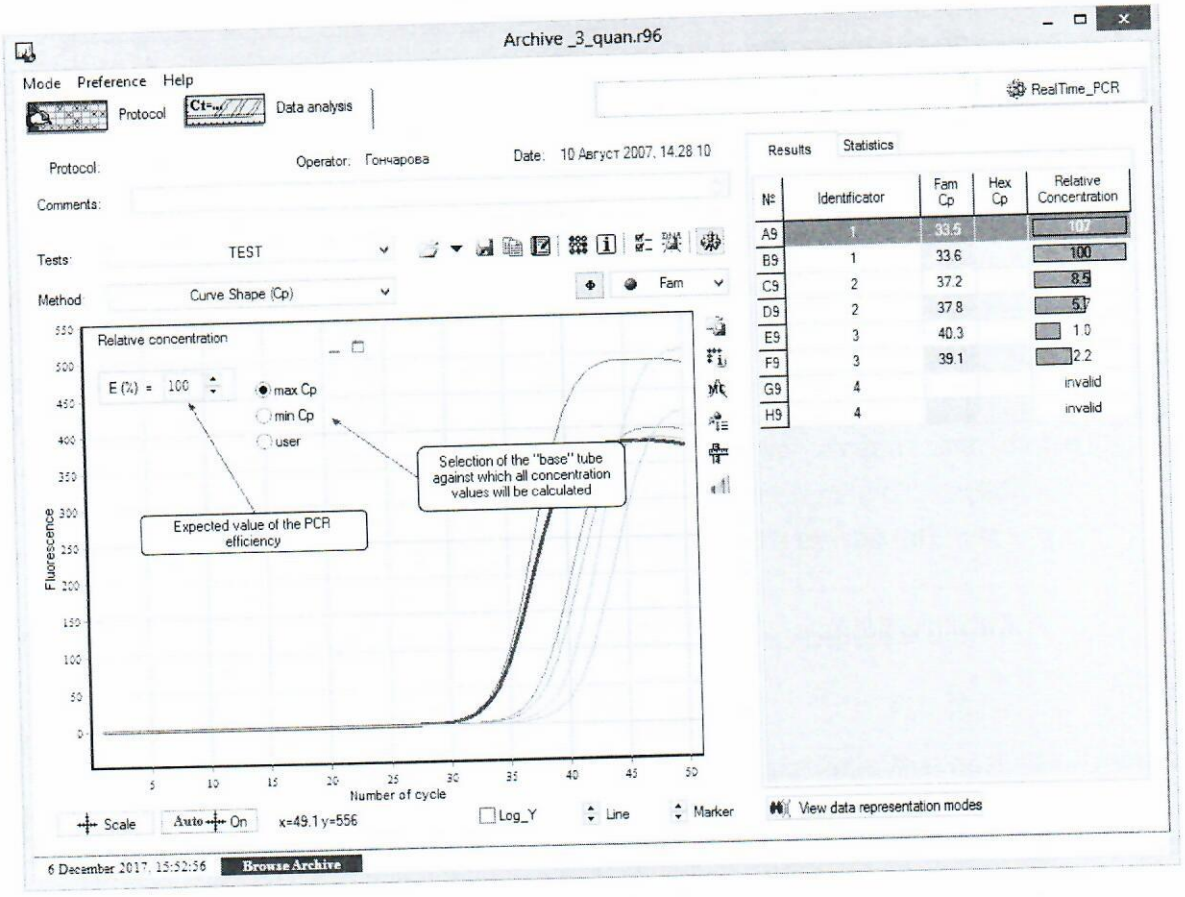


Fig. 53 Tip de analiză "relativă".

Pentru a selecta o probă de bază, procedați după cum urmează:

- deschideți fereastra **Concentrație relativă**, situată în colțul din stânga sus al graficului de fluorescență (faceți clic pe pictograma ☐);
- în fereastra deschisă, denumită **Concentrație relativă** alegeți una dintre

următoarele valori: ◉ max Ct - o probă cu o valoare maximă a Ct (sau Cp),

○ min Ct - o probă cu o valoare minimă a Ct (sau Cp), ◉ user - o probă arbitrară.

Când opțiunea **User** este activată, apar două liste suplimentare:

A1 ▾ - selectarea eprubetei de bază;

Fam ▾ - selectarea canalului de măsurare optică pentru eprubeta de bază.

În mod implicit, concentrația relativă este calculată presupunând o eficiență de 100% a reacției PCR.

Dacă sunt cunoscuți indicatorii de titrare ai probelor individuale, rezultatul valorilor concentrației relative poate fi corectat prin modificarea valorii coeficientului de eficiență utilizând câmpul E (%) = 100.

Rezultatele analizei relative sunt afișate într-o coloană denumită **Concentrația relativă,** ca o concentrație relativă a fragmentelor amplificate (ampliconi) din fiecare eprubetă în raport cu eprubeta aleasă ca bază.

În coloanele Fam Ct | Hex Ct : valorile ciclurilor „caracteristice" pentru fluoroforii folosiți pentru fiecare probă (Ct sau Cp - în funcție de metoda de analiză selectată din lista derulantă, denumită **Metoda** de analiză).

4. Detectarea multiplexului

etectarea multiplexului în această secțiune înseamnă tipurile de reprezentare a datelor. Pentru toate RULĂRILE în care este prezent PCR-ul clasic, este posibil să selectați tipul de prezentare **Detectare multiplex** dintre tipurile de analiză. (Fig. 54) Informațiile referitoare la toate canalele din fiecare eprubetă prezintă informațiile unei analize calitative, cantitative sau, respectiv, relative. Acest tip de prezentare este conceput pentru a funcționa în modul multi-canal și permite detectarea a până la cinci fragmente de ADN specifice simultan.

Notă! Pentru a efectua o analiză relativă, selectați o **Detectare Multiplex** din lista derulantă **Tip de analiză** atunci când creați un test.

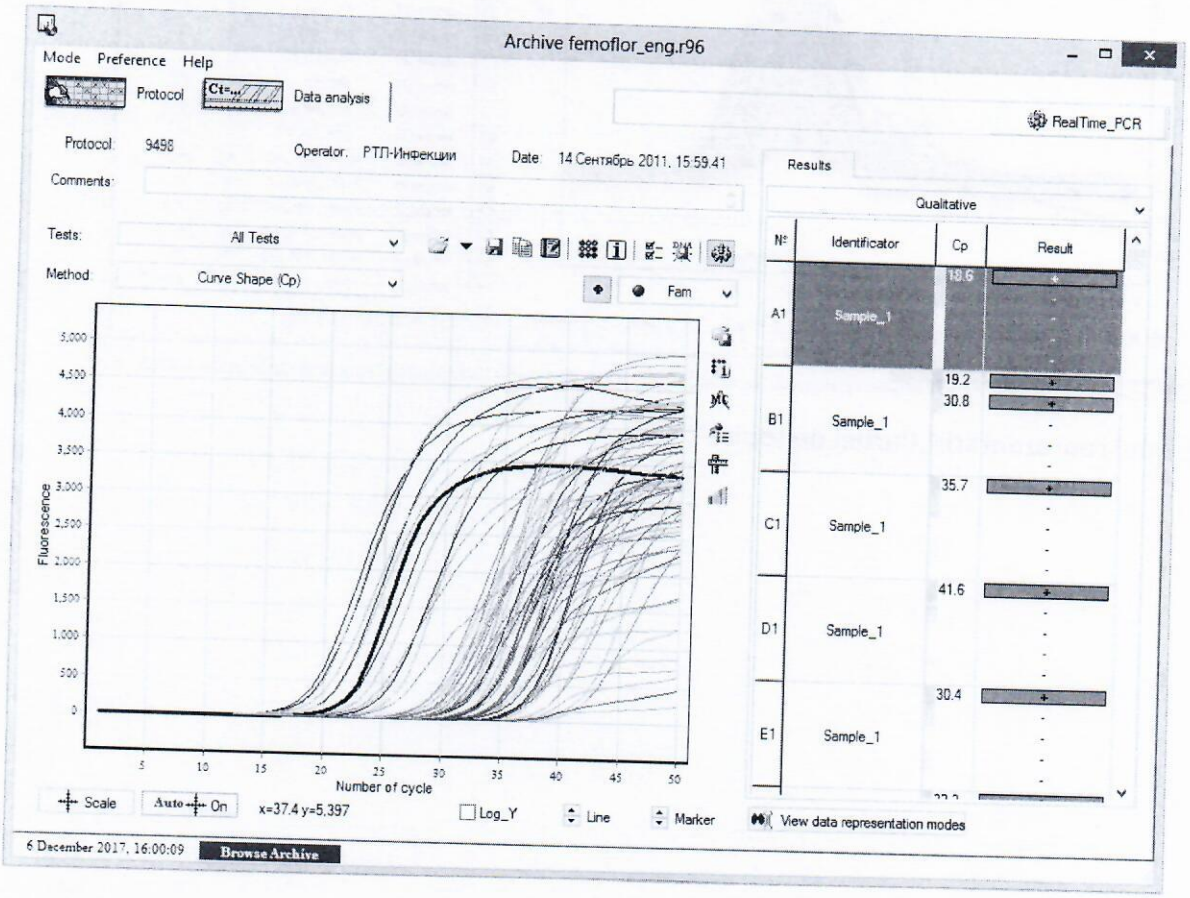
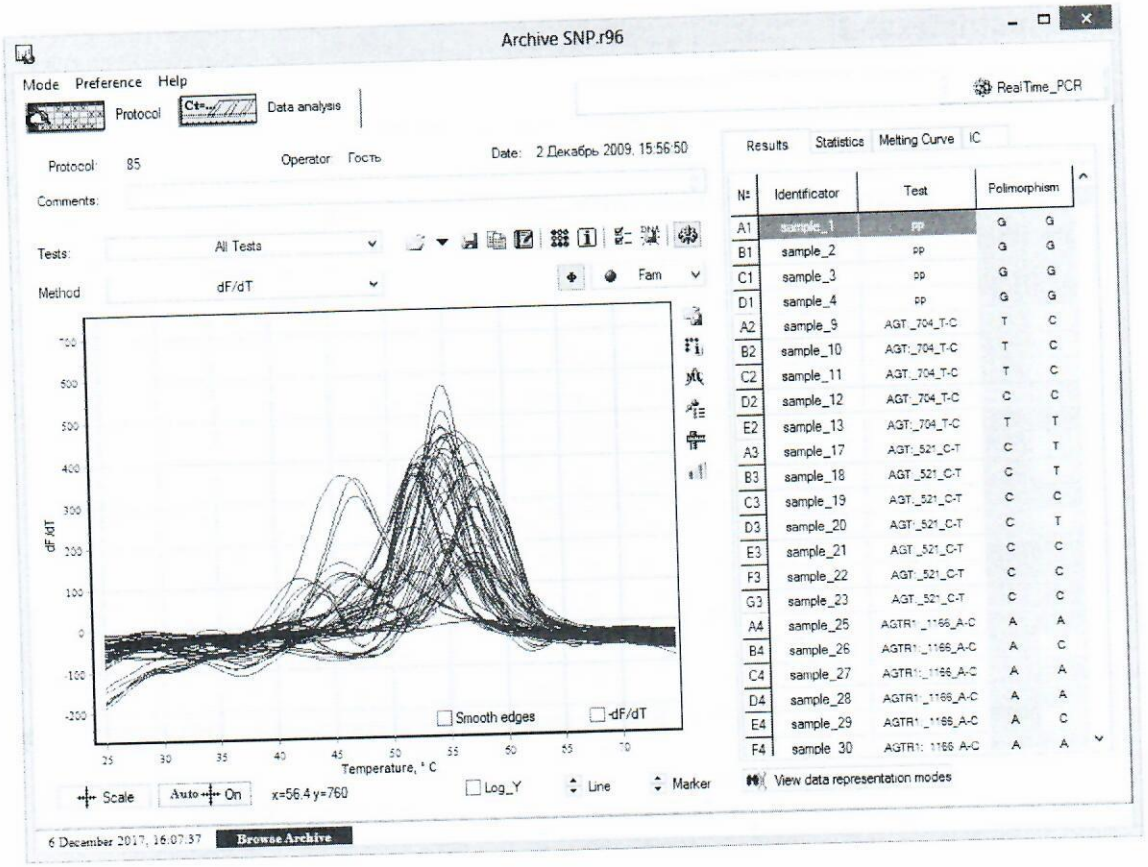


Fig. 54 Tipul de reprezentare « **Detectare** multiplex»

5. Curba de topire

Pentru toate RULĂRILE în care este prezentă procedura de „topire" a godeurilor, selectați tipul de reprezentare a **Curbei de topire** din elementul corespunzător de tipuri de analiză care permite estimarea valorilor temperaturii limită de topire, pentru analiza viitoare a polimorfismelor genetice. (Fig. 55)

Notă! Pentru a efectua o analiză a **Curbei de topire (MC)**, selectați **Analiza polimorfismului (MC)** aferentă din lista derulantă **Tip de analiză** atunci când creați un test.



№	Identificator	Test	Polimorphism	
A1	sample_1	pp	G	G
B1	sample_2	pp	G	G
C1	sample_3	pp	G	G
D1	sample_4	pp	G	G
A2	sample_9	AGT_704_T-C	T	C
B2	sample_10	AGT_704_T-C	T	C
C2	sample_11	AGT_704_T-C	T	C
D2	sample_12	AGT_704_T-C	C	C
E2	sample_13	AGT_704_T-C	T	T
A3	sample_17	AGT_521_C-T	C	T
B3	sample_18	AGT_521_C-T	C	T
C3	sample_19	AGT_521_C-T	C	C
D3	sample_20	AGT_521_C-T	C	T
E3	sample_21	AGT_521_C-T	C	C
F3	sample_22	AGT_521_C-T	C	C
G3	sample_23	AGT_521_C-T	C	C
A4	sample_25	AGTR1_1166_A-C	A	A
B4	sample_26	AGTR1_1166_A-C	A	C
C4	sample_27	AGTR1_1166_A-C	A	A
D4	sample_28	AGTR1_1166_A-C	A	A
E4	sample_29	AGTR1_1166_A-C	A	C
F4	sample_30	AGTR1_1166_A-C	A	A

Fig. 55 Tipul reprezentării „Curbei de topire"

Producător: DNA-Technology, Research & Production, LLC
20 Zheleznodorozhnaya Street, Protvino,
Regiunea Moscova, Rusia, 142281
Telefon/fax: +7(4967) 31-06-70
E-mail: protvino@dna-technology.ru
http://www.dna-technology.ru

Vânzător: DNA-Technology, LLC
125Zh Varshavskoe highway, bld. 6,
Moscova Rusia, 117587
Telefon/fax: +7(495) 640-17-71
e-mail: sales@dna-technology.ru

Asistență clienți:

Telefon: 8 800 200-75-15 (gratuit pentru Rusia) E-mail: hotline@dna-technology.ru

Consultați Formularul de feedback pe site-ul DNA-Technology http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Departamentul de servicii:

Telefon: +7(4967) 31-14-67, +7(4967) 31-06-71 (ex. 3126)

E-mail: service@dna-technology.ru

Reprezentant autorizat în UE:

OBELIS S.A

Adresa înregistrată:

General Wahis Boulevard, 53

1030 Brussels,

Belgia

Tel: +32.2,732.59.54

Fax: +32.2,732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

http://www.obelis.net

Versiunea 04. Adoptată la 18.01.2019