1. ВВЕДЕНИЕ 5

1.1 ОПИСАНИЕ СИСТЕМЫ 5

1.2 ИНСТРУКЦИЯ ПО УСТАНОВКЕ ФИЛЬТРОВ 7

2. КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТА 9

2.1 ВВЕДЕНИЕ 9

2.2 ЭКСПРЕСС-РУКОВОДСТВО ПО ЭКСПЕРИМЕНТУ С ОДНИМ ИЛИ НЕСКОЛЬКИМИ КРАСИТЕЛЯМИ 9

2.3 ФАКТОРЫ ЛУНОК 11

2.4 КАЛИБРОВКА ЧИСТЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И ФАЙЛЫ RME 12

3. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ПРОГРАММЫ АМПЛИФИКАТОРА ICYCLER 14

3.1 СТРУКТУРА ПРОГРАММЫ 14

3.1.1 Модуль библиотеки 15

3.1.2. Рабочий модуль 15

3.1.3. Центральный исполнительный модуль 15

3.1.4. Модуль анализа данных 15

3.2 СТРУКТУРА ДАННОГО РУКОВОДСТВА 16

3.3 ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОГЛАШЕНИЯ 16

3.4 ПАРАМЕТРЫ ТЕМПЕРАТУРНОГО ЦИКЛА 16

3.4.1. Диапазон температур и времени задержки 16

3.4.2. Дополнительные возможности программирования 16

4. МОДУЛЬ БИБЛИОТЕКИ 17

4.1. ОКНО ПРОТОКОЛОВ 17

4.2. ОКНО ПРОСМОТРА ОПИСАНИЯ ПЛАНШЕТА 18

4.3. ПРОСМОТР КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПРОБ 20

4.4. ОКНО ПРОСМОТРА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ 21

4.4.1. Открытие сохраненных файлов амплификации и кривых плавления 22

4.4.2. Открытие сохраненного файла калибровки чистых красителей 22

4.4.3. Использование нового файла RME для обработки записанных оптических данных 22

5. РАБОЧИЙ МОДУЛЬ. 24

5.1. ОКНО РЕДАКТИРОВАНИЯ ПРОТОКОЛА 24

5.1.1 Краткое руководство по созданию нового протокола 25

5.1.2 Краткое руководство по редактированию сохраненного протокола 26

5.1.3 Графический дисплей 28

5.1.4 Программирование времени задержки и температуры в рабочем листе протокола 29

5.1.5 Редактирование циклов и шагов в рабочем листе 29

5.1.6 Окно выбора шагов для накопления данных 30

5.1.7 Программирование вариантов протокола в рабочем листе 31
5.1.8 Сохранение протокола 35

5.2. ОКНО РЕДАКТИРОВАНИЯ ОПИСАНИЯ ПЛАНШЕТА 35
5.2.1. Краткое руководство по созданию нового планшета в режиме целого планшета 39
5.2.2. Краткое руководство по редактированию сохраненного планшета в режиме целого планшета 40
5.2.3. Краткое руководство по созданию нового планшета в режиме слоя краски 41
5.2.4. Краткое руководство по редактированию сохраненного планшета в режиме слоя краски 42
5.2.5. Редактирование описания планшета: образцы 43
5.2.6. Выбор и загрузка флюорофоров в режиме целого планшета 48
5.2.7. Выбор флюорофоров в режиме слоя красителя 49

5.3. ОКНО ПРОСМОТРА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПРОБ . 50

5.4 ОКНО ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА 50
5.4.1. Факторы лунок. 51
5.4.2. Калибровка чистыми красителями 56

6. ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МОДУЛЬ 59

6.1 ОКНО ТЕРМОЦИКЛЕРА 59
6.1.1 Редактирование файла исполняемого протокола 60
6.1.2 Показ графика протокола 61
6.1.4 Пауза/стоп 61

6.2 СЕРВИСНЫЙ РЕЖИМ КАМЕРЫ (IMAGING SERVICE) 62
6.2.1 Описание 62
6.2.2 Юстировка маски 63
6.2.3 Проверка ориентации маски 64
6.2.4 Графический файл 64

7. МОДУЛЬ АНАЛИЗА ДАННЫХ 65

Введение 65

7.1 ОКНО СОХРАНЕНИЯ/ПРОСМОТРА ДАННЫХ (VIEW/SAVE DATA) 65
7.1.1 Просмотр планшета 66
7.1.2 Редактирование после исследования 66
7.1.3 Сохранение файлов OPD 67

7.2 ОКНО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПЦР 70
7.2.1 Краткое руководство по сбору и анализу данных количественной ПЦР 70
7.2.2 График амплификации 71
7.2.3 Контекстное меню графика амплификации 72
7.2.4 Экран количественного представления данных ПЦР 78
7.2.5 Выбор режима анализа 78
7.2.6 Выбор флюорофора 79
7.2.7 Выбор пакета данных 79
7.2.8 Выбор лунок 80
7.2.9 Расчет порогового цикла 80
7.2.10 Сохранение результатов анализа аллелей по осям X/Y 82

7.4 ОКНО КРИВОЙ ПЛАВЛЕНИЯ (MELT CURVE) 83
7.4.2 График кривой плавления 84
7.4.3 Контекстное меню графика плавления 85
7.4.4 Таблица данных кривой плавления 86
7.4.5 выбор лунок (Select Wells) 87
7.4.6 Открытие/сохранение установок (Open/Save Settings) 87
7.4.7 выбор флюорофора (Select Fluorophore) 87
7.4.8 Пороговая линия флюоресценции (Peak bar) 87

7.4.9 Линия температуры (Temperature Bar) 88
7.4.10 Редактирование начальных и конечных температур пика плавления (Edit Melt Peak Begin/End Temps). 88
7.4.11 Удаление пиков (Delete Peaks) 88

7.5 ОКНО ДИСКРИМИНАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ (ALLELIC DISCRIMINATION WINDOW)..... 88
7.5.1 Краткое руководство по сбору и анализу данных дискриминации аллелей 89
7.5.2 График дискриминации аллелей (Allelic Discrimination Plot)..... 90
7.5.3 Контекстное меню графика дискриминации аллелей (Allelic Discrimination Plot Context Menu)..... 92
7.5.4 Таблица данных аллелей (Allelic Data Spreadsheet)..... 92
7.5.5 Автоматический/ручной анализ (Automatic/Manual Call)..... 93
7.5.6 Режим Вывода данных (Display Mode)..... 94
7.5.7 Вертикальный порог (Vertical Threshold) 94
7.5.8 Горизонтальный порог (Horizontal Threshold) 94
7.5.9 Нормирование данных (Normalize Data) 95

СЕКЦИЯ 8 96
8.1 Уход за прибором. 96
8.2 Замена ламп..... 96

ПРИЛОЖЕНИЕ A. 97
Технические характеристики прибора..... 97

ПРИЛОЖЕНИЕ B 98
Требования к характеристикам управляющего компьютера..... 98

ПРИЛОЖЕНИЕ C 99
Гарантия 99

ПРИЛОЖЕНИЕ D 100
Термоциклер iQ iCycler (Информация для заказа) 100

ПРИЛОЖЕНИЕ E 101
Сообщения об ошибках и действия по их устранению..... 101

ПРИЛОЖЕНИЕ F..... 109
Возможные ошибки оборудования 109

ПРИЛОЖЕНИЕ G. 111
Описание алгоритмов обработки данных в системе iCycler iQ..... 111

ПРИЛОЖЕНИЕ H 116
Обновление внутреннего программного обеспечения..... 116

ПРИЛОЖЕНИЕ I. 117
Пример калибровки чистыми красителями и файл RME. 117

ПРИЛОЖЕНИЕ J. 119
Импорт информации из предыдущих версий программы iCycler iQ. 119
КОНВЕРТАЦИЯ ИЗ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ 1.440 (1.0)..... 119
КОНВЕРТАЦИЯ ИЗ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ 1.880 (2.1)..... 119
КОНВЕРТАЦИЯ ИЗ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ 1.1370 (2.2)..... 119

ПРИЛОЖЕНИЕ K. 120

K1.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИКОВ 120
K1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАЯКОВ 121
K1.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ПО ОТДЕЛЬНОМУ НУКЛЕОТИДУ (SNP)..... 122

Раздел 2. Интерпретация данных. 123
K2.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИКОВ 123
K2.3. ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАЯКОВ 128
K2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ПО ОТДЕЛЬНОМУ НУКЛЕОТИДУ (SNP)..... 130

ПРИЛОЖЕНИЕ L..... 133
Конфигурации каруселей фильтров и руководство по выбору красителей. 133

1. ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является одним из самых значительных достижений молекулярной биологии. ПЦР ускорила развитие генетики, сделав методы анализа достаточно легкими в исполнении и воспроизводимыми. Развитие технологии в направлении кинетических измерений ПЦР в режиме реального времени означает дальнейшее расширение возможностей метода ПЦР. Анализ ПЦР в режиме реального времени позволяет количественно определить концентрацию матричной ДНК. Кроме того, данный метод уменьшает риск контаминации и уменьшает время исследования, поскольку исключаются некоторые этапы, необходимые для проведения ПЦР традиционным методом. Для мониторинга ПЦР в режиме реального времени применяются различные флюоресцентные красители. Термоциклер **iCycler iQ** обеспечивает оптимальное выполнение ПЦР и других методов, связанных с циклическими изменениями температуры. Высокая скорость нагревания и охлаждения достигается с помощью элемента Пелтье. Надежность и воспроизводимость результатов обеспечивается путем тщательного тестирования температурного блока при сборке прибора.

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени в полной мере использует возможности термоциклера **iCycler iQ**. Система оборудована широкополосным источником света, что позволяет применять разнообразные флюорофоры. Оптические фильтры дают возможность выбрать оптимальные длины волн возбуждения и эмиссии. В результате достигается Высокая чувствительность и избирательность при применении различных красителей. Матрица CCD камеры (прибор с зарядовой связью - ПЗС) в 350000 пикселей позволяет каждую секунду сканировать все 96 лунок планшета. В результате получаемый массив данных отображает процесс амплификации в каждой лунке в каждом термоцикле. Одновременное сканирование дает возможность легко сопоставлять результаты исследования во всех лунках планшета. Кроме того, получение данных в режиме реального времени позволяет контролировать процесс проведения ПЦР. Все эти особенности системы **iCycler iQ** были разработаны для обеспечения удобства в работе и достоверности результатов.

Программное обеспечение системы реализует функции, делающие работу легкой и эффективной. Интерфейс программного обеспечения использует пиктограммы - кнопки, чтобы упростить работу. Все кнопки имеют подсказки, которые могут быть при желании отключены. Программа автоматически обрабатывает данные, полученные при проведении ПЦР, при этом пользователю предоставляется возможность оптимизации обработки результатов.

1.1 ОПИСАНИЕ СИСТЕМЫ

Оптический блок включает систему возбуждения и систему детектирования. Система возбуждения снабжена 50-ваттной вольфрамовой галогенной лампой, тепловым фильтром (стекло, поглощающее инфракрасное излучение), каруселью на 6 фильтров, в которой установлены оптические фильтры и заглушка (бланк), и системой зеркал, позволяющей одновременно освещать весь планшет. Система возбуждения расположена в переднем правом углу оптического блока, с лампой, световой поток от которой проходит справа налево, перпендикулярно к оси инструмента. Световой поток проходит через тепловой фильтр и заданный программой оптический фильтр, и далее падает на 96 лунок планшета через систему зеркал. Этот свет возбуждает молекулы флюоресцирующего красителя в лунках.

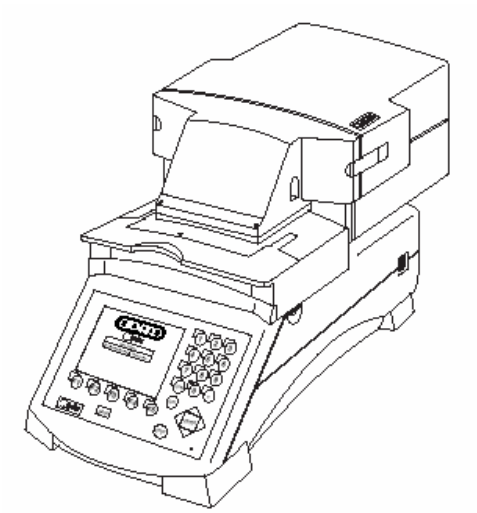


Рис.1-1. Термоциклер iCycler.с установленным оптическим блоком.

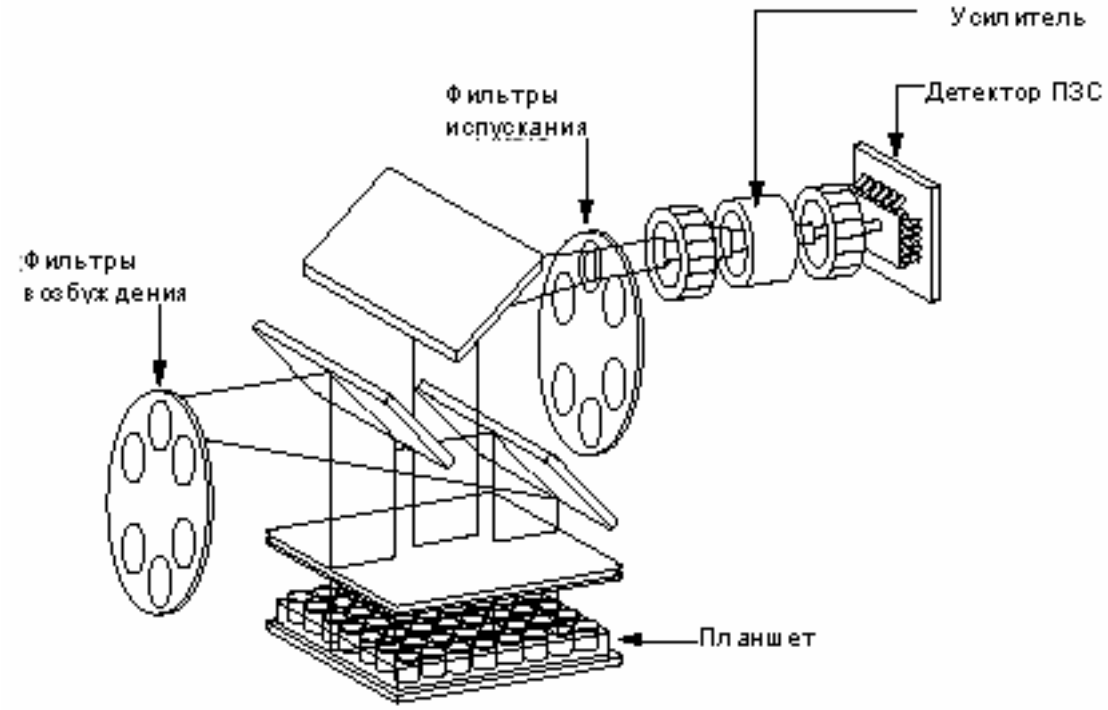


Рис.1-2. Оптическая схема системы детектирования.

Система детектирования занимает заднюю часть оптического блока. Основными компонентами системы являются карусель на 6 эмиссионных фильтров, усилитель изображения и детектор ПЗС. Карусель с эмиссионными фильтрами аналогично карусели с фильтрами в системе возбуждения содержит цветные эмиссионные фильтры и бланк-заглушку. Усилитель отображения повышает интенсивность флюоресценции, не увеличивая уровень электрических помех. Матрица сканера в 350000 пикселей позволяет количественно определять флюоресценцию в лунках. Флюоресцентное свечение из лунок проходит через эмиссионный фильтр и усилитель на детектор.

Замечание. Требования к компьютеру для нормальной работы программного обеспечения приведены в Приложении В.

На правой стороне оптического блока имеются два входа (см. рис.1-3):

• Круглый 9-контактный разъем питания. Через него подается напряжение на оптический блок от источника питания оптической системы.

Замечание. Перед подключением кабеля к этому входу обязательно выключите источник питания.

• Разъем параллельного интерфейса. Используется 25 – контактный кабель, связывающий прибор с компьютером. Компьютер должен иметь совместимый с IEEE 1284, 8-битный параллельный интерфейс (двунаправленный или типа EPP). Через этот интерфейс данные передаются от детектора прибора в компьютер.

В правом заднем углу оптического блока имеется разъем:

• Коаксиальный разъем предназначен для подключения датчика положения рукоятки, размещенной на крышке оптического блока. Когда рукоятка поднимается, диск эмиссионных фильтров перемещается в исходное положение (бланк-фильтр), закрывая от света усилитель и детектор ПЗС.

В левом заднем углу термоциклера имеется 9 – контактный разъем:

• Разъем последовательного интерфейса. Через этот кабель осуществляется управление термоциклирущим блоком от компьютера.

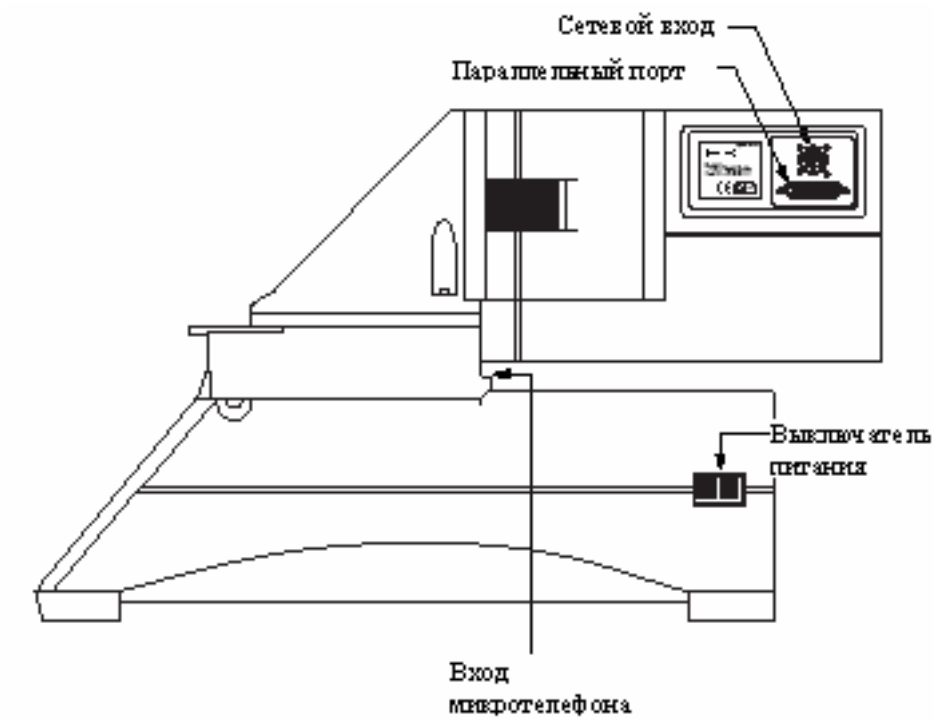


Рис.1-3. Система детектирования: вид сбоку.

1.2 ИНСТРУКЦИЯ ПО УСТАНОВКЕ ФИЛЬТРОВ

Перед началом работы на термоциклере убедитесь, что в приборе установлены необходимые фильтры. Стеклянные фильтры установлены в держателях (см. рис. 1-4). Держатели находятся в каруселях и могут быть заменены. Каждая карусель позволяет установить 6 фильтров. Для правильной работы прибора в каждой карусели должна быть установлена заглушка, чтобы предохранить детектор ПЗС от засветки и повреждения. Первая позиция в карусели отмечена как исходное положение и должна всегда нести непрозрачный бланк-заглушку.

Если прибор переносили, необходимо проверить юстировку маски, как описано в разделе 6.2.2.

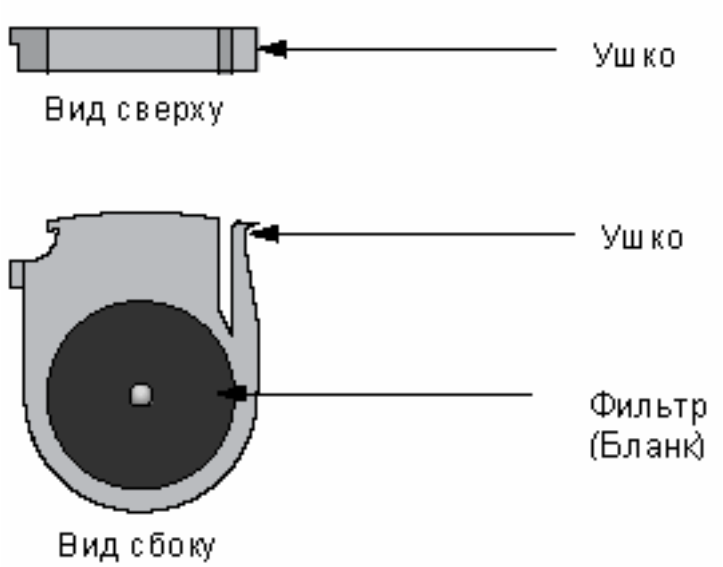


Рис.1-4. Фильтр в держателе.

Для замены фильтра:

1. Отключите питание оптического блока
2. Откройте две защелки на сторонах оптического блока. Сдвиньте кожух назад на 5-8 см, чтобы получить доступ к блоку, где расположены карусели с фильтрами. Снимать блок или отключать кабели не обязательно.
3. Удалите две резиновые крышки на блоке, Вытягивая их прямо вверх. Эти крышки защищают карусели фильтров. Фильтры возбуждения находятся в гнезде на правой стороне, эмиссионные фильтры находятся в гнезде по центру (см. рис. 1-5). Замена фильтров обоих типов производится аналогичным образом.
4. Поверните колеса фильтров в желаемое положение, используя закругленный конец прилагаемого в наборе принадлежностей ключа. При выключенном питании оптического блока карусели фильтров легко могут быть повернуты в любом направлении.
5. Чтобы вынуть фильтр, захватите его пинцетом для удаления фильтров, отожмите ушко и аккуратно вытяните вверх.
6. Для того чтобы вставить фильтр, захватите его пинцетом и опустите в пустое гнездо на карусели. Для фильтров возбуждения ушко фильтра при установке должно быть спереди. Для эмиссионных фильтров ушко фильтра при установке должно указывать направо. Перед установкой резиновых крышек убедитесь, что во всех гнездах карусели находятся фильтры или заглушки.

<u>Замечание</u>. Запишите положение фильтров, чтобы сверить его при установке планшета.

7. После того, как все фильтры установлены, закройте карусели резиновыми крышками.
8. Верните кожух камеры на место и закрепите защелками.

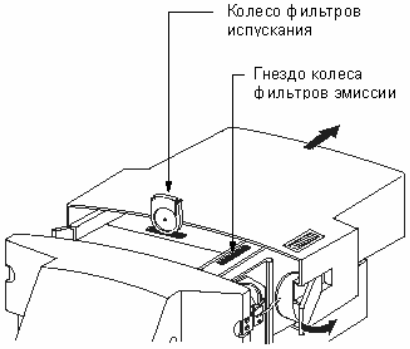


Рис.1-5 Установка фильтра.

2. КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Детектор амплификатора iCycler может одновременно фиксировать свет от 4 флюорофоров в 96 лунках и разделять сигналы от разных красителей. Это позволяет вести наблюдение за 4 амплификациями одновременно в каждой лунке одного планшета.

При каждом шаге сбора данных в реальном времени, флюоресценция от лунок планшета регистрируется при соответствующей паре фильтров. Поскольку для каждого красителя нужна своя пара фильтров, каждый шаг сбора данных может требовать до 4-х считываний в зависимости от числа флюорофоров. Например, если в лунке имеются пробы, меченные красителями FAM, HEX, Texas Red и Cy-5, то при каждом шаге считывания свет из лунки должен быть измерен с использованием 4-х пар соответствующих фильтров. Далее программа выделяет составляющие для каждого отдельного красителя. На основе этих данных для каждого флюорофора строятся графики амплификации и в конце эксперимента автоматически рассчитываются калибровочные кривые, на основе которых и определяются исходные концентрации.

В системе iCycler исследование выполняется в соответствии с **файлом протокола** и **файлом описания планшета**. Эти файлы имеют расширения .tmo и .pts соответственно. Выходной файл данных флюоресценции, из которого выделяются данные по амплификации, кривой плавления и калибровочной кривой, называется **файлом оптических данных** и имеет расширение .opd.

Кроме того, для выполнения каждого эксперимента необходимо определить **факторы лунок** и результаты **калибровки чистыми красителями**, что дает возможность выделить сигналы от отдельных красителей из общего измеренного светового потока. Факторы лунки рассчитываются для каждого отдельного эксперимента, в то время как данные по калибровке чистой краски сохраняются от эксперимента к эксперименту. Эти параметры детально обсуждаются в разделе 5.4. Понимание этих параметров позволит быстро создавать протокол эксперимента и собирать оптическую информацию наилучшим образом.

2.2 ЭКСПРЕСС-РУКОВОДСТВО ПО ЭКСПЕРИМЕНТУ С ОДНИМ ИЛИ НЕСКОЛЬКИМИ КРАСИТЕЛЯМИ

1. Прогрейте камеру в течение 30 мин. Включите прибор, откройте доступ и войдите в программу. Если iCycler или iQ-детектор перемещали после предыдущего эксперимента, откройте Графические функции (IMAGING SERVICES) в главном меню и проверьте юстировку маски (см. раздел 6.2.).
2. Если необходимо, проведите калибровку чистыми красителями. Это требуется для разделения сигналов отдельных красителей. Данная калибровка требуется для каждого флюорофора и соответствующей ему пары фильтров (см. раздел 5.4.2).
3. Приготовьте образцы для ПЦР в 96-луночном планшете Thin Wall (Кат.№ 223-9441). Закройте планшет клейкой оптической лентой (Кат.№ 223-9444), не касаясь ее поверхности руками. Выровняйте поверхность ленты с помощью клиновидного пластикового аппликатора. Оторвите белые полоски по краям ленты. В тех случаях, когда используются отдельные пробирки для образцов или стрипы, необходимо закрыть их соответствующими крышками. **Не забывайте, что для предотвращения деформации пробирок при использовании зеленого антиконденсатного кольца необходимо присутствие не менее 8 пробирок. Если кольца нет, требуется не менее 14 пробирок.**
4. выберите существующий или создайте новый температурный протокол для Выполнения анализа в режиме **Library - View Protocol**. Температурный протокол определяет интервалы времени и необходимые температуры, число циклов, шагов и повторов, а также моменты сбора информации о флюоресценции.
5. Подготовьте и сохраните описание планшета (**PLATE SETUP**) в режиме **Library - View Plate Setup**. В окне формирования описания планшета определите, какие флюорофоры

и в каких лунках будут детектироваться, а также введите тип пробы, ее количество и единицы измерения. Проверьте введенную информацию в таблице просмотра описания планшета (**VIEW PLATE SETUP**). Процесс подготовки описания планшета включает выбор подходящего варианта описания карусели фильтров (**FILTER WHEEL SETUP**). Выберите вариант расположения фильтров, соответствующий истинному расположению фильтров в приборе (см. пункт 5 и Приложение L).

6. Убедитесь, что все флюорофоры могут быть использованы с данным набором фильтров (см. Приложение L).
7. Если предполагается использование внешнего планшета для формирования факторов лунок (см. раздел 2.3), установите планшет для сбора факторов лунок в iCycler. И выведите таблицу выбора протоколов (**VIEW PROTOCOL**) в режиме библиотек и выберите желаемый температурный протокол. Откройте таблицу просмотра описания планшета **(VIEW PLATE SETUP**) и выберите желаемый вариант описания планшета, после чего нажмите кнопку перехода в режим Выполнения анализа **(RUN).**
8. В таблице анализа препарата (**RUN PREP**) проверьте правильность выбора протокола и описания планшета. Введите объем пробы. Укажите тип анализа (количественная ПЦР, кривая плавления или калибровка чистыми красителями) и режим определения факторов лунок. Нажмите кнопку начала анализа (**BEGIN RUN**), рис. 2.1.

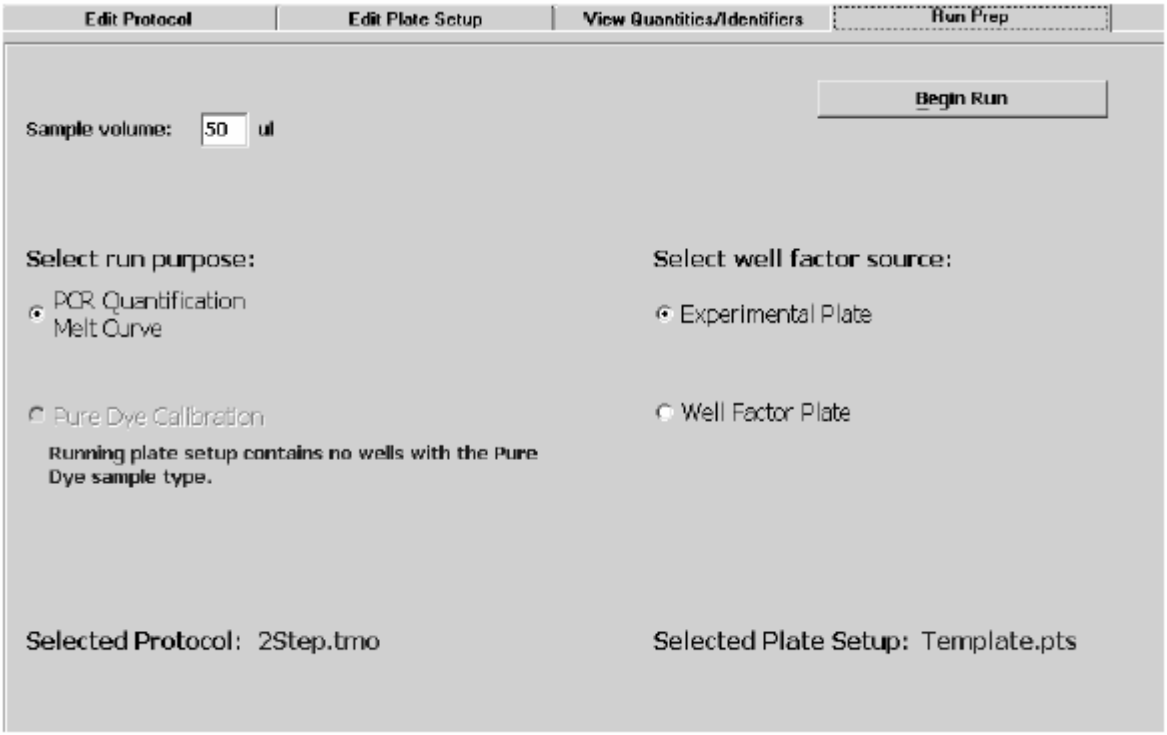


Рис.2-1. Окно запуска Выполнения анализа.

9. Введите имя для файла данных. Данные сохранятся во время выполнения протокола. Проведение анализа начнется только после ввода имени файла данных.
10. Факторы лунки будут определены автоматически после начала анализа, и далее сразу начнется выполнение протокола исследования. Если для определения фактора лунки используется внешний планшет, протокол начнет выполняться в течение 5 мин, внешние факторы лунки будут определены за это время и iCycler перейдет в режим ожидания **(PAUSE MODE**). Удалите планшет для сбора факторов лунок и установите экспериментальный планшет, после чего нажмите кнопку продолжения Выполнения протокола (**CONTINUE RUNNING PROTOCOL**), см. рис. 2.6.
11. После начала записи результатов ПЦР, на экран выводится график количественной ПЦР в окне анализа данных. Во время сбора данных настраивать график количественной

ПЦР нельзя. В промежутках между записью данных программа дает возможность изменить наблюдаемый краситель и размер графика.

2.3 ФАКТОРЫ ЛУНОК

Факторы лунок (WF) используются для компенсации погрешностей пипетирования и системных неоднородностей, что позволяет оптимизировать качество и анализ данных флюоресценции. WF должны быть собраны в начале каждого эксперимента. WF рассчитываются после вращения колес фильтров через все положения, которые используются в процессе проведения ПЦР, и учета света однородного планшета. WF могут быть собраны напрямую от экспериментального планшета или косвенно от внешнего планшета.

Предпочтительно использовать экспериментальный планшет в качестве источника WF. Собранные таким образом WF называются динамическими факторами лунки (**DYNAMIC WELL FACTORS**). Единственное требование к использованию динамических WF состоит в том, чтобы каждая экспериментальная лунка содержала одинаковые концентрации одних и тех же красителей. В каждом слое красителей флюорофоры должен иметь одинаковую концентрацию, однако концентрации разных слоев могут различаться. Например, если все лунки на планшете содержат 50 нмоль флюоресцеина, 100 нмоль HEX, 125 нмоль Texas Red и 200 нмоль Cy5, то можно использовать динамические WF, поскольку состав флюорофоров одинаков во всех лунках. Но если одни лунки содержат 100 нмоль флюоресцеина, а другие 200 нмоль флюоресцеина, динамические WF использовать нельзя. В этом случае используются внешние WF. Сбор динамических WF полностью автоматизирован и начинается после нажатия переключателя экспериментальной плашки в окне анализа препарата (**RUN PREP**), см. рис.2-1.

В большинстве экспериментов с использованием ДНК-связывающих красителей, таких как SYBR-green I или этидиум бромид, применять динамические WF нельзя. Когда матричная ДНК денатурируется, флюоресценция интеркаляторов недостаточна для расчета статистически значимых WF. Возможны три подхода в этой проблеме:

1. *использовать iQ SYBR-green I supermixt (Кат.№ 170-8880), который уже включает флюоресцеин;*

2. *использовать внешний планшет для формирования WF;*

3. *для экспериментов с красителем SYBR-green I ввести в исходную смесь небольшое количество разбавленного раствора флюоресцеина (См. раздел 2.3.2). Этот флюоресцеин будет давать достаточную флюоресценцию при 95°C, так что достоверные WF могут быть рассчитаны, и это не помешает проведению ПЦР.*

Подробное описание подготовки и использования планшетов для формирования WF приведено в разделе, описывающем окно подготовки анализа **RUN PREP** (Раздел 5-4).

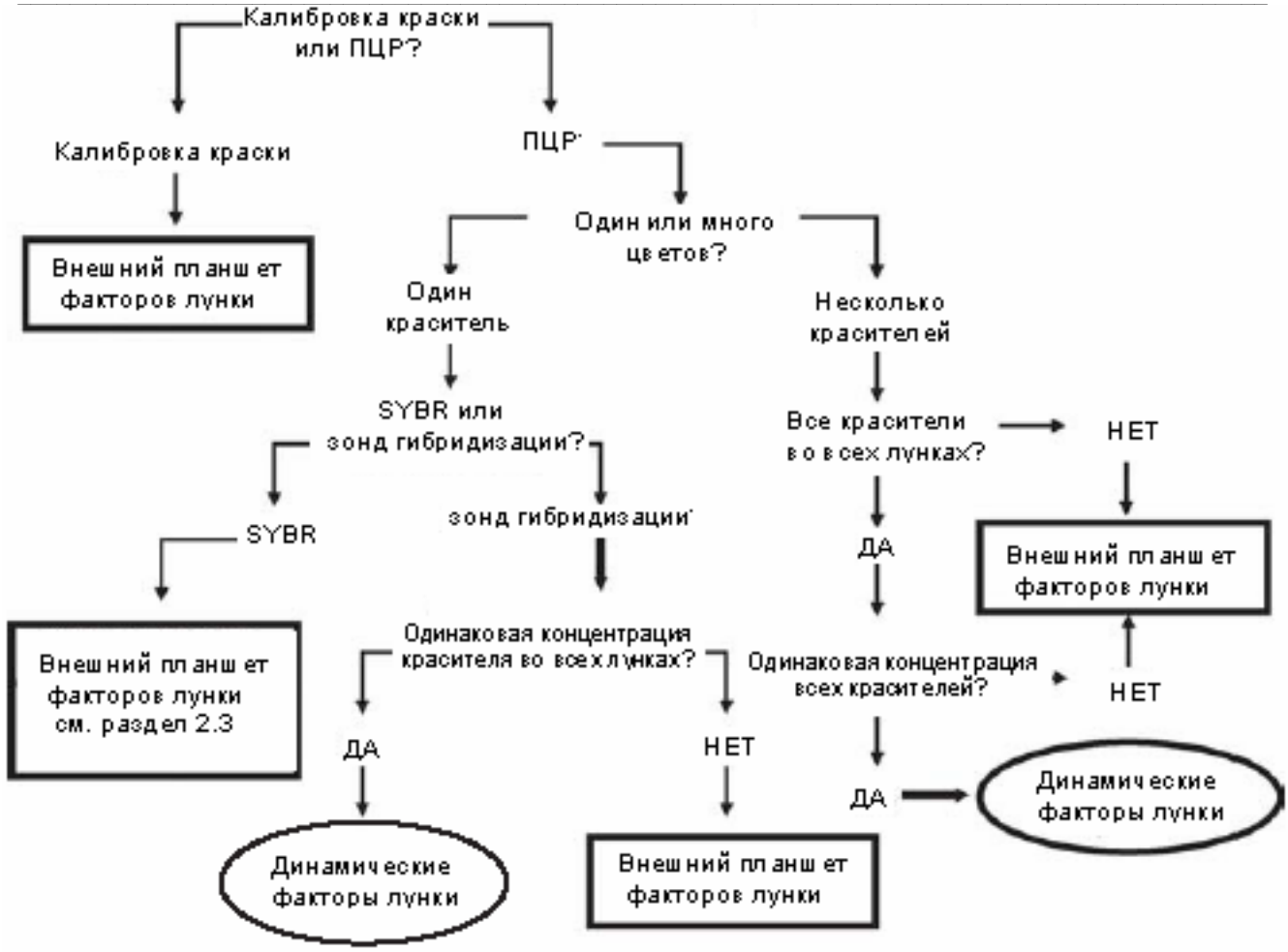


Рис.2-2. Схема выбора варианта формирования факторов лунок WF.

2.4 КАЛИБРОВКА ЧИСТЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И ФАЙЛЫ RME

Для каждого эксперимента, даже с одним флюорофором, требуются результаты калибровки для чистого красителя. В отличие от факторов лунок, которые необходимо определять в начале каждого эксперимента, результаты одной калибровки используются постоянно. Новая калибровка требуется только в том случае, когда в анализ добавляется новая комбинация флюорофоров и фильтров.

Данные калибровки чистой краски используются для разделения общего светового потока на составляющие от каждого красителя. Эти данные собираются с помощью соответствующего протокола (**PURE DYE CALIBRATION** PROTOCOL) на планшете, в лунки которого добавлены калибровочные растворы чистых красителей. Для каждого красителя используется отдельный калибровочный раствор. Результаты калибровки записываются в файл **RME.INI**, находящийся в директории C:\Program Files\Bio-Rad\iCycler\Ini. Данные могут быть собраны по 16 комбинациям красителей и парам фильтров (до 4 красителей и 4 пар фильтров). В конце калибровки данные автоматически записываются в файл RME, по одной записи на каждую комбинацию. После того, как данные записаны в RME-файл, они могут быть использованы во всех последующих экспериментах, в которых используются одинаковые сочетания красителей и пар фильтров. По мере выполнения новых протоколов калибровки RME-файл модифицируется для дополнительных сочетаний красителей и пар фильтров. Если комбинация красителя и пары фильтров, для которой имеется запись в RME-файл, повторяется в последующем протоколе калибровки, новые результаты записываются в RME-файл и старые результаты удаляются.

Если выбирается описание планшета, включающее комбинацию флюорофора и пары фильтров, для которой нет калибровочных данных, то при попытке начать эксперимент будет Выдано соответствующее предупреждение. Дополнительные результаты калибровки должны быть включены в RME-файл перед началом эксперимента. Целесообразно архивировать RME-файлы перед проведением новой калибровки чистыми красителями. Сохраните старые RME-файлы путем переименования или перемещения их из директории C:\Program Files\Bio-Rad\iCycler\Ini. Каждый раз, когда создается файл оптических данных, данные RME, которые были активны во время эксперимента, сохраняются в этот файл. Это позволяет открывать файлы данных на других компьютерах и позволяет сохранить исходные данные RME в ряду последовательных калибровок. Также возможно восстановить RME-данные, которые применялись во время сбора оптических данных, если результаты калибровки чистыми красителями сомнительны или повреждены.

В приложении I имеется пример калибровки чистыми красителями и RME-файла. Детали приготовления планшета для калибровки чистыми красителями и выполнения калибровки приведены в разделе, описывающем окно подготовки к выполнению анализа **RUN PREP** (Радел 5.4).

3. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ПРОГРАММЫ АМПЛИФИКАТОРА iCycler

3.1 СТРУКТУРА ПРОГРАММЫ

Программа iCycler позволяет создавать и выполнять различные протоколы термоциклирования с одновременным сбором и анализом данных флюоресценции от оптического блока. Работа отдельных узлов прибора контролируется различными модулями программы iCycler. Термоциклер iCycler управляется сегментом программы, называемой Протоколы (**PROTOCOLS**). Файлы протоколов представляют собой программы термоциклирования, которые реализуются в процессе работы iCycler. Файлы протоколов также определяют, на каких этапах Выполнения программы будет происходить сбор данных. Файлы протоколов сохраняются с расширениями .tmo. Детали создания файлов протоколов описаны в разделе 5.1.

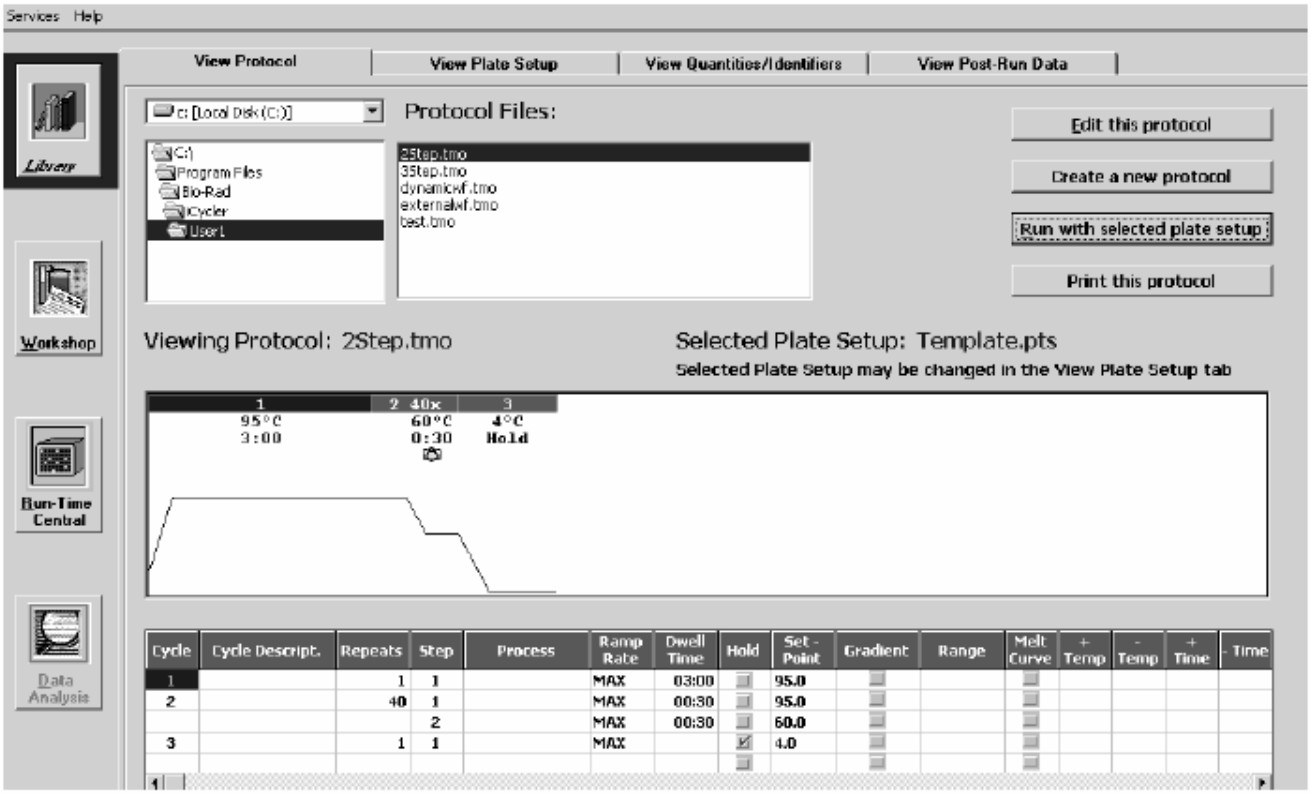


Рис.3-1. Вид рабочего окна.

Работа оптического блока управляется сегментом программы, который называется установка планшета (**PLATE SETUP**). Эта часть программы позволяет определить, для каких лунок будет происходить сбор данных, каков тип пробы находится в каждой лунке (например, стандарт, опытный образец, контроль и т.п.) и используемые красители. Файлы описания планшета сохраняются с расширением .ptc. Детальное описание создания файлов описания планшета приведено в разделе 5.2. Для того чтобы запустить программу термоциклирования и собрать результаты флюоресценции, необходим как файл протокола, так и файл описания планшета.

Программа iCycler организована в виде четырех секций, называемых модулями или блоками. Имеются модуль библиотеки, рабочий модуль, центральный исполнительный модуль и модуль анализа данных. Пиктограммы этих модулей расположены в левой части экрана. Активная пиктограмма имеет выделенные края в отличие от других модулей программы. На рис.3-1 показано окно, открывающееся при входе в программу iCycler. Можно видеть названия модулей программы в левой части экрана, выделенную пиктограмму модуля библиотек и открытое окно модуля библиотек слева. Каждый модуль реализует отдельные функции, описанные ниже.

3.1.1 Модуль библиотеки

Модуль библиотеки содержит файлы протокола, описания планшета и файл данных. В окне библиотеки можно:

- просмотреть файлы протоколов;
- просмотреть файлы описания планшета;
- просмотреть количества и идентификаторы проб для файла описания планшета;
- выбрать файлы данных для просмотра в модуле анализа данных;
- выбрать файлы протоколов для редактирования в рабочем модуле;
- выбрать файлы описания планшета для редактирования в рабочем модуле;
- запустить выполнение амплификации с использованием выбранных файлов протокола и описания планшета.

3.1.2. Рабочий модуль

Рабочий модуль позволяет оперировать с файлами протоколов и файлами описания планшета. Используйте этот модуль для:

- редактирования существующих файлов протоколов;
- редактирования существующих файлов описания планшета;
- создания новых файлов протокола;
- создания новых файлов описания планшетов;
- сохранения новых и отредактированных файлов протокола;
- сохранения новых и отредактированных файлов описания планшетов;
- запуска выполнения анализа с использованием новых или отредактированных файлов протоколов и описания планшетов.

3.1.3. Центральный исполнительный модуль

После того, как параметры анализа определены в разделе подготовки анализа (**RUN PREP**) рабочего модуля, программа iCycler переходит в центральный исполнительный модуль (**RUN TIME CENTRAL MODULE**), в котором отображается ход реакции, включая временные границы эксперимента, текущий цикл, шаг и номер повтора, а также последовательность изменения температуры в блоке термоциклера iCycler.

3.1.4. Модуль анализа данных

В модуль анализа данных можно войти двумя способами:

1. Он открывается автоматически из центрального исполнительного модуля, когда система детектирования iCycler начинает сбор данных флюоресценции, которые анализируются в режиме реального времени.
2. Вы можете открыть сохраненные данные в модуле библиотеки, и эти данные автоматически появятся в модуле анализа данных.

Модуль анализа данных позволяет:

- просматривать результаты эксперимента;
- оптимизировать результаты;
- назначать пороговые циклы для всех стандартов и проб;
- конструировать стандартные кривые;
- определять начальные концентрации проб;

- проводить статистический анализ.

3.2 СТРУКТУРА ДАННОГО РУКОВОДСТВА

В четырех главах приводится описание четырех модулей программы. Каждая глава разделяется на части, соответствующие отдельным окнам модулей.

3.3 ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОГЛАШЕНИЯ

В данном руководстве применяются следующие термины:

- «окно» обозначает представление программы на экране компьютера;
- активные кнопки в верхней части окна называются клавиши (**TABS**);
- текстовое окно обозначает участок окна, в котором можно вводить текст;
- информационное окно означает место в окне, где выводится информация о программе;
- диалоговое окно означает место в окне, где производится выбор опции;
- все активные кнопки напечатаны жирным шрифтом и имеют текстовое описание.

3.4 ПАРАМЕТРЫ ТЕМПЕРАТУРНОГО ЦИКЛА

Файлы протоколов включают информацию, необходимую для управления iCycler. Протокол может состоять из девяти циклов, каждый цикл может содержать до девяти шагов. Каждый шаг определяется заданием необходимой температуры и времени задержки на данной температуре. Цикл определяется заданием времени и температуры для всех шагов и числом повторов. Возможно повторение циклов до 600 раз.

3.4.1. Диапазон температур и времени задержки

- Температура может быть установлена в пределах от 4 до 100°C.
- Время задержки может быть установлено в пределах от 1 сек до 99 мин 59 сек.
- Нулевое время задержки. Когда время задержки при данной температуре равно нулю, iCycler нагревает или охлаждает пробы, пока не будет достигнута заданная температура, и далее сразу начинает обратный процесс для достижения следующей необходимой температуры.

3.4.2. Дополнительные возможности программирования

Для температурных протоколов доступны разнообразные возможности программирования. Они перечислены ниже и подробно описаны в разделе редактирования протокола (Раздел 5.1).

- неограниченная задержка температуры позволяет удерживать выбранную температуру по желанию пользователя сколь угодно долго;
- градиент позволяет запрограммировать воспроизводимый градиент температуры между 1 и 25°C в процессе каждого шага;
- кривая плавления, в этом режиме сбор данных будет проводиться в определенном интервале температур, предназначенном для анализа кривой плавления;
- прирост/снижение температуры определяет периодическое пошаговое повышение или понижение температуры в последовательных циклах;
- увеличение/ уменьшение времени определяет периодическое пошаговое увеличение или уменьшение времени задержки в последовательных циклах;
- изменение скорости нагрева и охлаждения;
- описание и идентификация циклов;
- описание и идентификация шагов цикла.

4. МОДУЛЬ БИБЛИОТЕКИ

Работая в модуле библиотеки, Вы можете проводить эксперименты, используя сохраненные файлы протоколов и описания планшета, просматривать сохраненные файлы протоколов и описаний планшетов, и, кроме того, открывать файлы оптических данных. Количества и идентификаторы (**QUANTITIES AND IDENTIFIERS**) выбранных файлов описания планшета и все записи выбранных файлов оптических данных также доступны в модуле библиотеки. Открытые файлы протоколов и описания планшета могут быть переведены в режим редактирования в рабочем модуле. Там же в рабочем модуле может быть выбран режим создания нового файла протокола или нового описания планшета.

Модуль библиотеки состоит из 4 окон, в которые можно войти, нажав соответствующие закладки.

- Просмотр протокола (**VIEW PROTOCOL**). Позволяет открыть сохраненные файлы протоколов. Выводится информация о температурных параметрах протокола и указывается время сбора и анализа данных (см. рис.4-1);
- Просмотр описания планшетов (**VIEW PLATE SETUP**). Позволяет открыть сохраненные файлы описания планшетов. Выводится информация о расположении отдельных реакционных лунок, типах образцов и флюорофорах, которые предполагается анализировать в каждой лунке (см. рис. 4-2 и 4-3).
- Просмотр количеств и идентификаторов проб (**VIEW QUANTITIES AND IDENTIFIERS**). Показывает информацию, введенную пользователем при создании файла описания планшета (см. рис.4-4).
- Просмотр данных анализа (**VIEW POST-RUN DATA**). Выводит информацию и оптические данные, а также комментарии пользователя из сохраненных файлов. (см. рис. 4-5).

4.1. ОКНО ПРОТОКОЛОВ

Окно просмотра протокола (**VIEW PROTOCOL**) блока библиотеки (**LIBRARY**) появляется в первую очередь после запуска программы iCycler (Рис.4-1). В этом окне можно работать с директорией файлов протокола. Когда имя протокола выделено в директории, в окне выводятся детали протокола.

В нижней части окна показан файл протокола, заданный в поле просмотра протокола графически и в формате рабочего листа (см. рис. 4-1). В окне графического дисплея выводится график функции зависимости температуры реакции (ось Y) от времени (ось X).

В графическом окне:

- шкала над графиком показывает номер цикла;
- цифры под шкалой - заданную температуру для каждого шага в цикле (ось Y на графике) и время задержки для этого шага (ось X на графике);
- появление пиктограммы видеокамеры в начале определенного цикла на графическом дисплее указывает, что в этом шаге будут собраны оптические данные. Пиктограмма желтого цвета указывает, что идет накопление данных амплификации, тогда как пиктограмма зеленого цвета указывает на сбор данных кривой плавления.

Специализированные параметры, такие как автоматическое приращение или снижение температуры и времени задержки не выводятся на дисплей, а существуют только в рабочем листе.

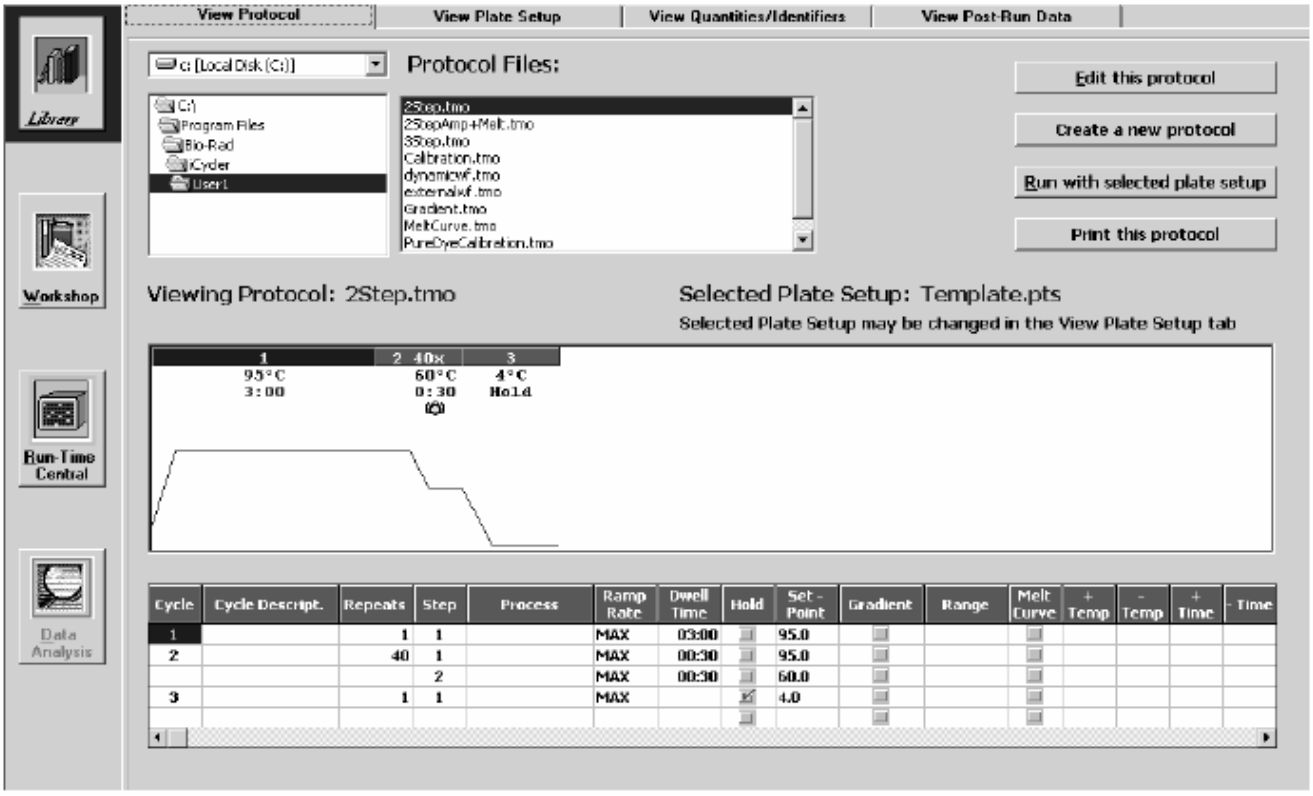


Рис.4-1. Вид окна просмотра протокола в блоке библиотеки.

В верхней части окна выводится следующая информация о файле протокола.

- место сохранения: файлы протокола, показанные здесь, сохранены на диске C:.
- структура директории: файлы протокола, показанные здесь, сохранены в папке User1.
- меню файлов протокола: информационное окно с именами всех файлов протокола в данной директории. Все файлы имеют расширение .tmo.
- диалоговое окно просмотра протокола: здесь показано имя просматриваемого файла.
- диалоговое окно текущего описания планшета: имя загруженного файла описания планшета.

В правой верхней части стороне экрана расположены следующие активные кнопки - пиктограммы.

- Редактирование текущего протокола (**EDIT THIS PROTOCOL**): переводит выбранный файл протокола в окно редактирования протокола в Рабочем модуле, что позволяет редактировать протокол.
- Создание нового протокола (**CREATE A NEW PROTOCOL**): переводит пользователя в окно редактирования протокола в Рабочем модуле для создания нового протокола.
- Выполнение амплификации для выбранного описания планшета (**RUN WITH SELECTED PLATE SET UP**): перемещает выбранные файлы протокола и описания планшета в окно проведения анализа Рабочего модуля для запуска эксперимента.
- Напечатать данный протокол (**PRINT THIS PROTOCOL**): Выводит на принтер область рабочего листа для выбранного протокола.

4.2. ОКНО ПРОСМОТРА ОПИСАНИЯ ПЛАНШЕТА

В этом окне пользователь может просматривать директорию файлов описания планшета. При выделении определенного файла в этой директории на экран выводится описание описания планшета, включая выбранные для наблюдения лунки, типы проб и типы флюорофоров в каждой лунке (Рис. 4-2).

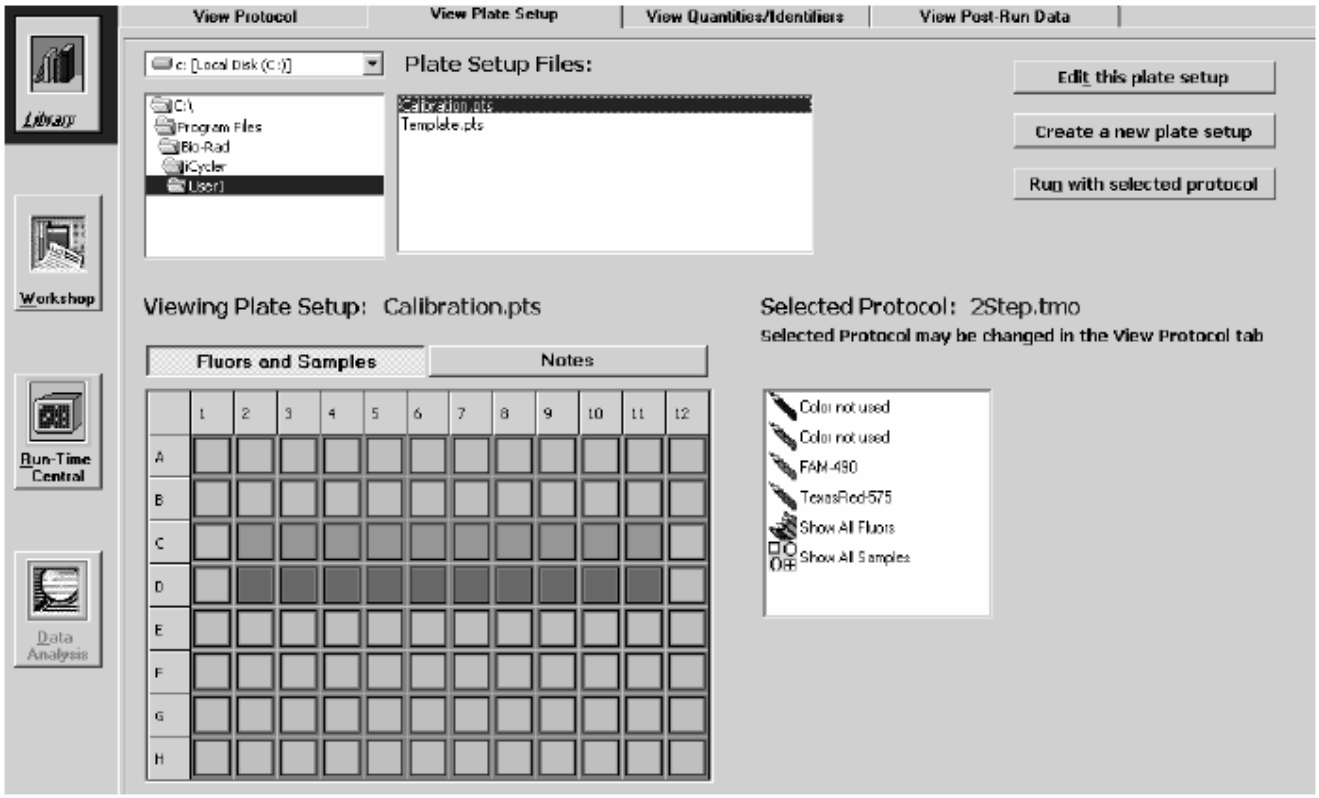


Рис.4-2. Окно просмотра описания планшета, красителей и проб в режиме показа всех красителей.

Верхняя часть окна просмотра описания планшета (**VIEW PLATE SETUP**) аналогична верхней части окна просмотра протокола (**VIEW PROTOCOL**) (сравните рис. 4-1 и 4-2).

В окне просмотра описания планшета показывается следующая информация:

- место сохранения: файлы описания планшета, показанные здесь, сохранены на диске C: в папке User1.
- структура директории: файлы описаний планшетов, показанные здесь, сохранены в папке User1.
- меню файлов протокола: информационное окно с именами всех файлов протокола в данной директории. Все файлы имеют расширение .pts.
- диалоговое окно просмотра описания планшета: здесь показано имя просматриваемого файла.
- диалоговое окно текущего протокола: имя загруженного файла протокола.

Окно просмотра описания планшета имеет следующие активные кнопки.

- Редактирование текущего описания планшета (**EDIT THIS PLATE SETUP**): переводит выбранный файл описания планшета в окно редактирования описания в Рабочем модуле, что позволяет редактировать описания планшета.
- Создание нового описания планшета (**CREATE A NEW PLATE SETUP**): переводит пользователя в окно редактирования описания планшета в Рабочем модуле для создания нового файла, на экран выводится начальная разметка планшета.
- Анализ по заданному протоколу (**RUN WITH SELECTED PROTOCOL**): перемещает выбранные файлы протоколов и описания планшета в окно проведения анализа Рабочего модуля для запуска эксперимента.

В окне имеется также 2 кнопки над изображением планшета.

- Красители и образцы (**FLUORS AND SAMPLES**). В окошке справа показан список всех красителей, применяемых в текущем описании планшета. Если выделить курсором одно из названий, на схеме планшета появляется обозначение типа - образец во всех

лунках, содержащих этот краситель. Если выбрать опцию Показать все красители (**SHOW ALL FLUORS**), лунки на схеме планшета окрашиваются цветами флюорофоров, за которыми будет проводиться наблюдение в процессе эксперимента. Если выбрать опцию Показать все образцы (**SHOW ALL SAMPLES**), лунки на схеме планшета заполняются пиктограммами соответствующих образцов.

- Заметки (**NOTES**). Показываются все комментарии, написанные при установке планшета (см. рис. 4-3).

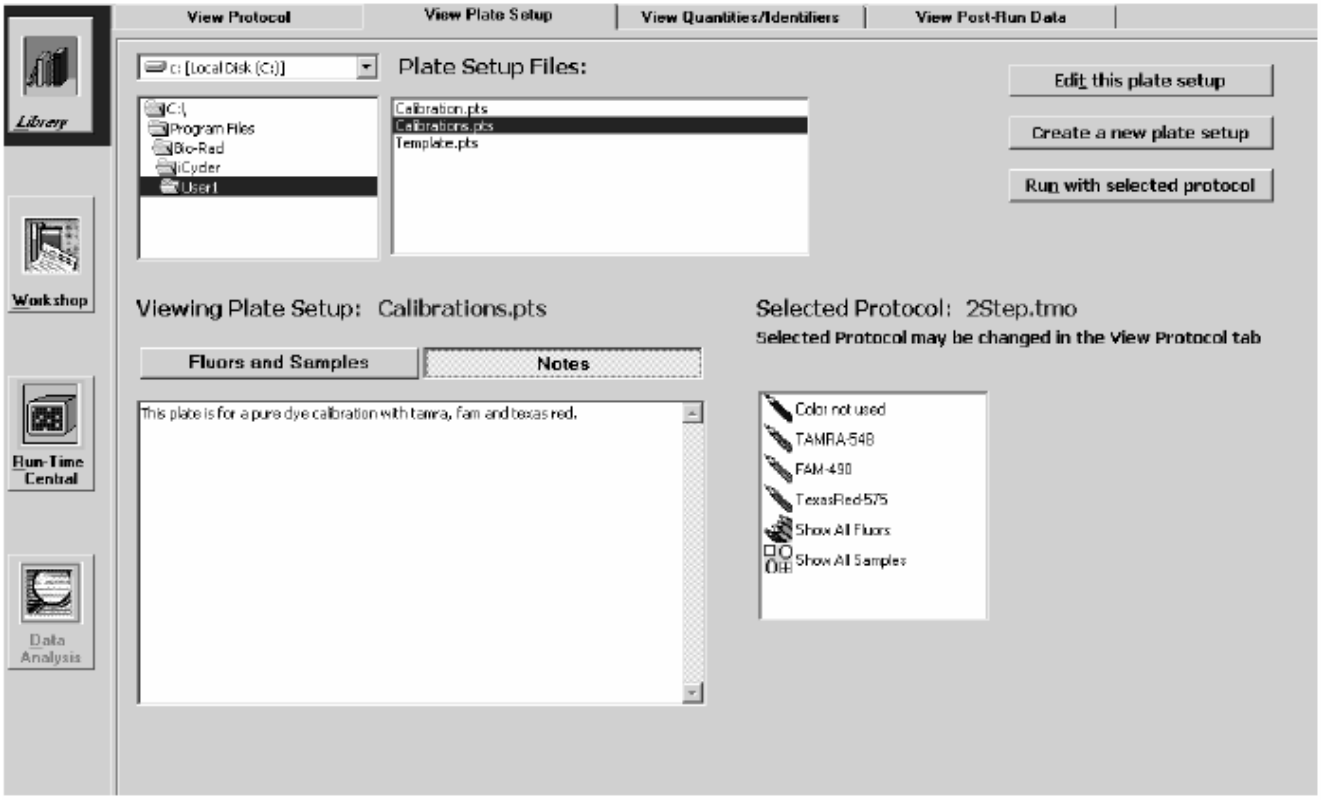


Рис.4-3. Окно просмотра описания планшета в режиме показа комментариев.

4.3. ПРОСМОТР КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПРОБ

В этом окне показываются количества стандартов и идентификаторов для каждой лунки текущего описания планшета. Данные выводятся по каждому слою отдельно.

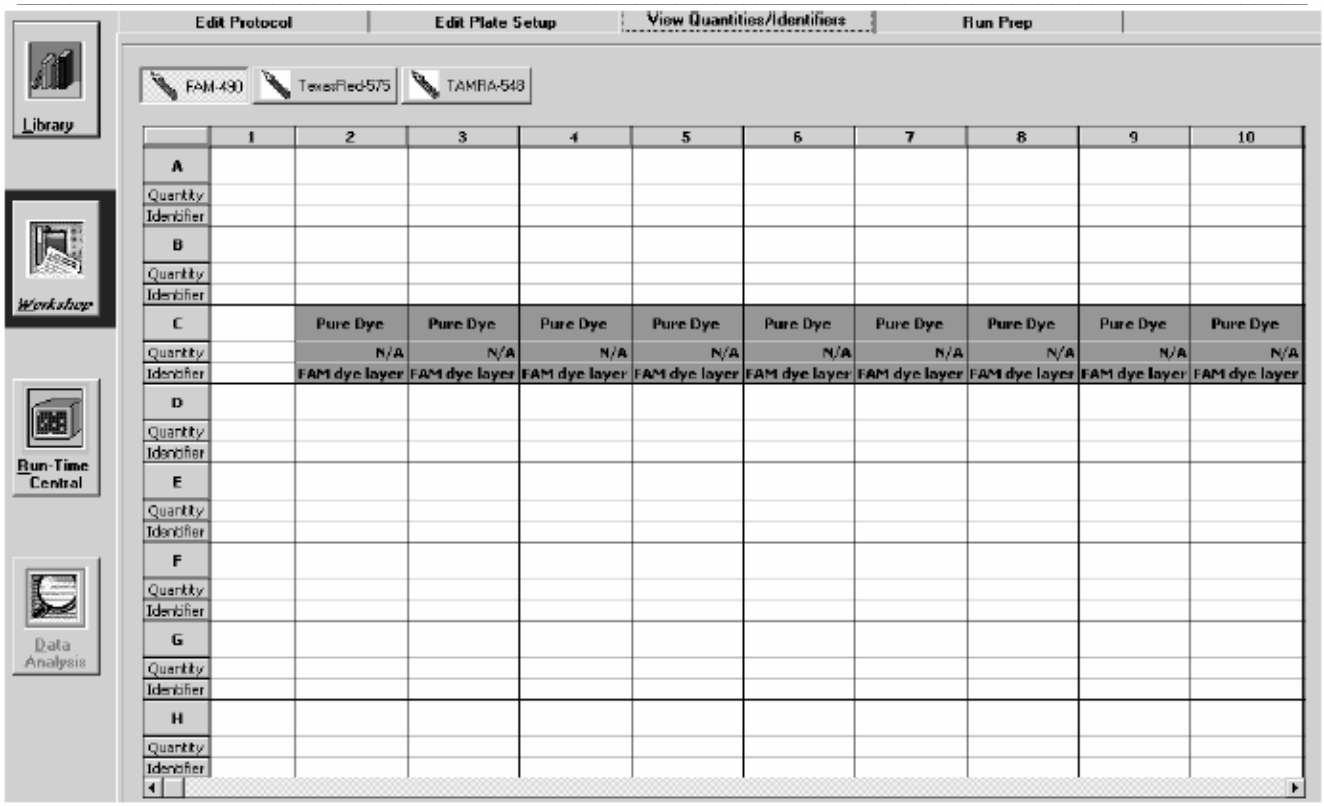


Рис.4-4. Окно просмотра количества стандартов и идентификаторов.

4.4. ОКНО ПРОСМОТРА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Окно просмотра результатов исследования используется для работы с директорией файлов оптических данных. При выделении курсором имени файла на экран выводится следующая информация:

- имя файла показано в информационном окошке (**SELECTED DATA FILE**);
- используемый протокол;
- используемое описание планшета;
- комментарии по ходу исследования – показаны заметки оператора, сделанные по ходу проведения ПЦР;
- выбранный вариант карусели с фильтрами.

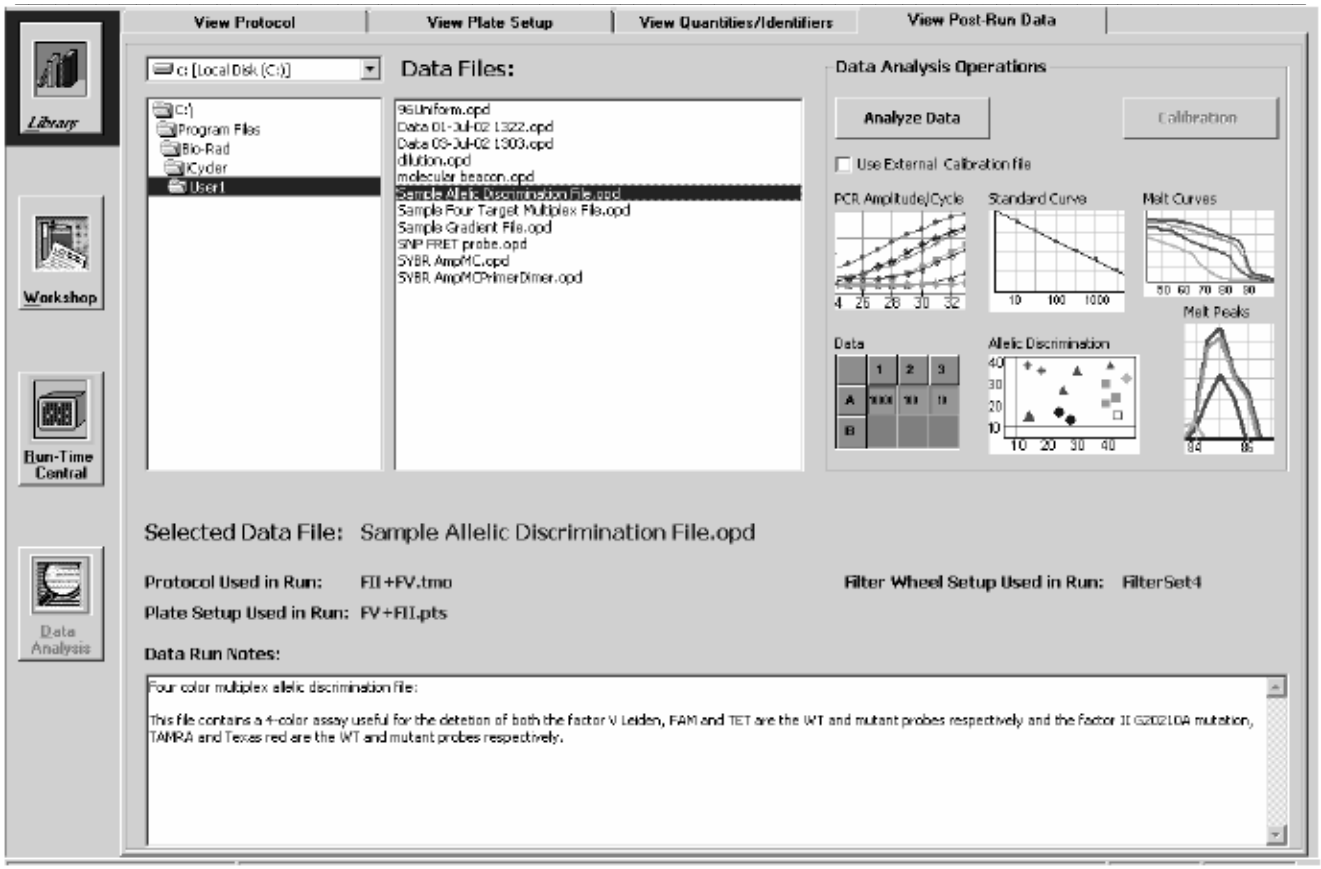


Рис.4-5. Окно просмотра экспериментальных данных.

4.4.1. Открытие сохраненных файлов амплификации и кривых плавления

Для открытия сохраненного файла эксперимента по амплификации или кривой плавления ДНК выберите имя файла в директории и нажмите кнопку анализа данных (**ANALYSE DATA**).

4.4.2. Открытие сохраненного файла калибровки чистых красителей

Если выбранный файл оптических данных является файлом калибровки чистыми красителями, то кнопка калибровки (**CALIBRATION**) будет активной. Если Вы хотите открыть файл калибровки, нажмите эту кнопку.

Замечание: При открытии сохраненного файла калибровки чистыми красителями текущий RME файл будет переписан на основе данных открываемого файла.

Все последующие экспериментальные данные будут собираться и анализироваться с использованием нового RME-файла. Детальное описание файлов калибровки чистыми красителями и RME-файлов приведено в разделе 5.4 и Приложении I.

4.4.3. Использование нового файла RME для обработки записанных оптических данных

После сохранения файла оптических данных, значения RME, записанные вместе с экспериментальными данными, дают возможность экспериментатору анализировать результаты на компьютере, не имеющем RME-данных, или на компьютере с другими данными RME. Каждый раз, когда файл оптических данных открывается в программе iCycler, данные анализируются с применением тех значений, которые были записаны в файле RME.ini в момент сбора оптических данных. Данная особенность защищает пользователя от потери важных экспериментальных данных, если калибровка чистыми красителями была проведена неправильно.

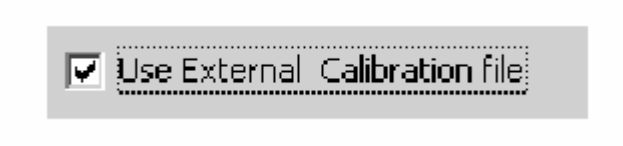


Рис.4-6. Применение файла внешней калибровки.

Для того чтобы применить текущие значения RME к сохраненным данным, выделите имя файла оптических данных в директории и нажмите кнопку с пометкой использовать файл внешней калибровки (USE EXTERNAL CALIBRATION FILE). После этого выделенный файл будет открыт и новые значения RME будут применены к сохраненным данным. Существующие значение RME будут переписаны, если Вы захотите сохранить этот файл снова. Если выйти из программы без сохранения новых данных, старые значения RME будут восстановлены. Оптические данные могут анализироваться многократно с приложением различных файлов RME путем простой замены активного файла RME. Единственный файл RME, который система выбирает в качестве активного, находится в директории C:\Program Files\Bio-Rad\iCycler\Ini.

Замечание. Рекомендуется сохранить копию файла оптических данных под другим именем перед сохранением этого файла с новыми данными RME. Это позволит всегда иметь первоначальную версию для использования в случае необходимости.

5. РАБОЧИЙ МОДУЛЬ.

В рабочем модуле может быть выбран режим создания и редактирования файлов протоколов или описания планшетов. Раздел 5.1 описывает вид окна редактирования протокола (**EDIT PROTOCOL**) и содержит инструкции по созданию и редактированию файлов протокола. Раздел 5.2 описывает структуру окна редактирования описания планшета (**EDIT PLATE SETUP**) и объясняет порядок создания и редактирования файлов описания планшета.

Рабочий модуль состоит из 4 окон, в которые можно войти, нажав соответствующие клавиши.

- Редактирование протокола (**EDIT PROTOCOL**). Позволяет создать, редактировать и сохранить файлы протоколов. Оператор может начать эксперимент по созданному протоколу после его сохранения и по текущему описанию планшета;
- Редактирование описания планшета (**EDIT PLATE SETUP**). Позволяет создать, редактировать и сохранить файлы описания планшета. Оператор может начать эксперимент по созданному описанию планшета после ее сохранения и по текущему протоколу в этом окне.
- Просмотр количеств и идентификаторов (**VIEW QUANTITIES AND IDENTIFIERS**). Показывает информацию, введенную пользователем при создании файла описания планшета по слоям красителей.
- Подготовка к Выполнению анализа (**RUN PREP**). После выбора протокола и описания планшета из библиотеки или рабочего окна, в этом окне подтверждается выбранный файл протокола, описания планшета и другие параметры анализа. Эксперимент начинается, когда пользователь нажимает кнопку Начало анализа (**BEGIN RUN**) в этом окне.

5.1. ОКНО РЕДАКТИРОВАНИЯ ПРОТОКОЛА

В этом окне создаются новые или редактируются существующие протоколы исследования (Рис. 5-1)

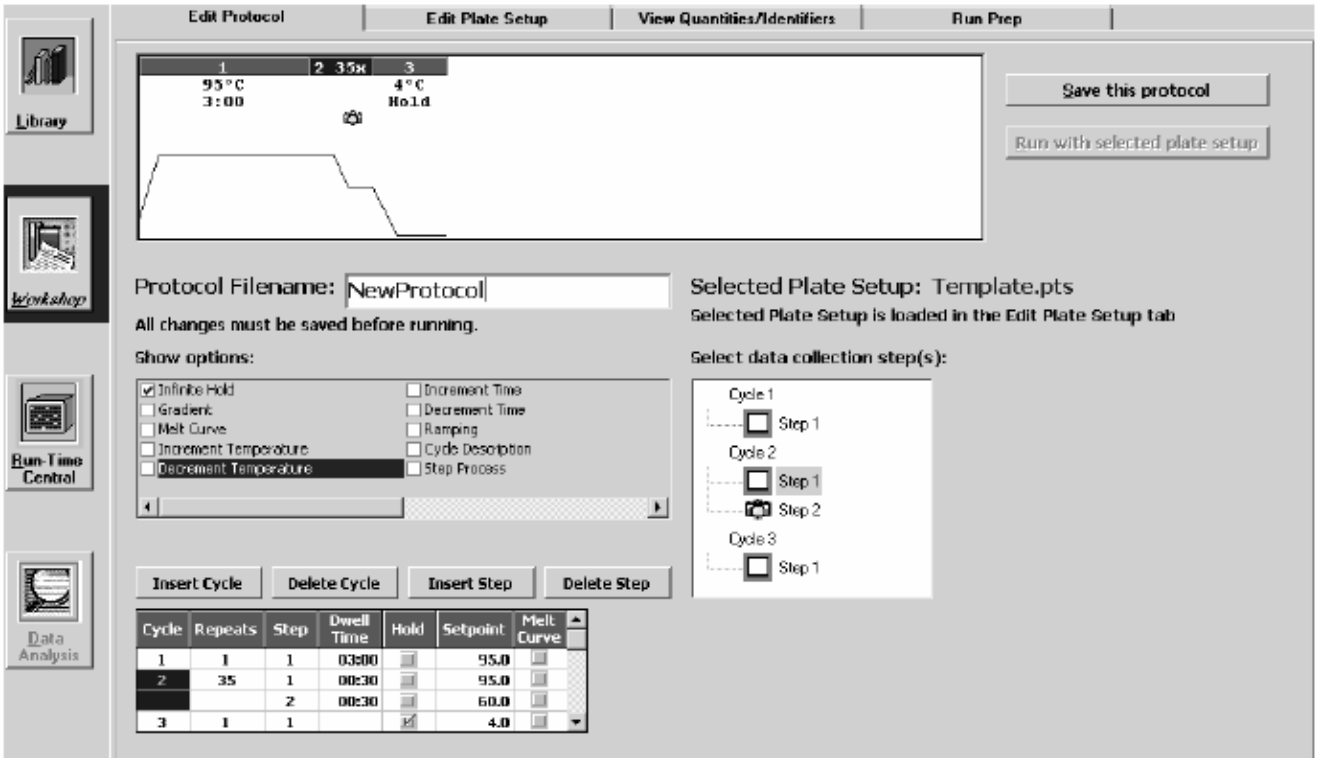


Рис.5-1. Вид окна редактирования протокола в рабочем модуле. Показан минимальный рабочий лист программирования.

В средней трети окна графически представлен текущий протокол исследования. По оси X показаны температуры реакции и по оси Y времена задержки. Реальный температурный протокол показан в приложенном рабочем листе внизу окна.

Данное окно содержит:

- поле списка дополнительных параметров (**SHOW OPTIONS**), которые могут быть включены в протокол;
- текстовое окно с именем файла протокола (**PROTOCOL FILENAME**);
- кнопки Сохранить протокол (**SAVE THIS PROTOCOL**) и Анализ по выбранному описанию планшета (**RUN WITH SELECTED PLATE SETUP**) используются для сохранения изменений в протоколе и для анализа по текущему протоколу соответственно (см. разделы 5.1.8 и 5.4);
- окно выбора шагов сбора данных (**SELECT DATA COLLECTION STEPS**) используется для задания шагов эксперимента, на которых будет проведен сбор оптических данных.

Методика создания новых протоколов исследования и редактирования существующих протоколов приведена в разделах 5.1.1 и 5.1.2. Графический дисплей описан в разделе 5.1.3. Программирование в рабочем листе и спецификация сбора оптических данных детально описана в разделах 5.1.4-5.1.7, и сохранение файлов протокола в разделе 5.1.8.

5.1.1 Краткое руководство по созданию нового протокола

1. В модуле библиотеке выберите кнопку Просмотр Протокола (**VIEW PROTOCOL**).
2. Нажмите кнопку Создать Новый Протокол (**CREATE A NEW PROTOCOL**). Откроется окно редактирования протокола в рабочем модуле.
3. Переместитесь в рабочий лист слева внизу окна и заполните последовательно все параметры термоциклирования. По мере внесения изменений в рабочий лист эти параметры отображаются в графическом представлении в верхней части окна. Редактируемый цикл выделен синим цветом на шкале вверху графика и в рабочем листе.

   - Для изменения установок по умолчанию дважды щелкните мышью по полю времени или температуры.
   - Вставьте новый цикл впереди текущего цикла нажатием кнопки Вставить Цикл (**INSERT CYCLE**) и затем нажатием в любом месте текущего цикла в рабочем листе. Вставьте новый цикл позади последнего цикла нажатием кнопки Вставить Цикл (**INSERT CYCLE**) и затем нажатием в любом месте первой пустой строки внизу рабочего листа. Нажатием правой клавиши мыши на кнопку Вставить Цикл (**INSERT CYCLE**) можно выбрать вставку 1-, 2- или 3-шагового цикла. По окончании ввода отмените выбор (**INSERT CYCLE**).
   - Удаляйте циклы нажатием кнопки Удалить Цикл (**DELETE CYCLE**) и затем нажатием в любом месте этого цикла в рабочем листе. По окончании ввода отмените выбор (**DELETE CYCLE**).
   - Вставьте новый шаг впереди текущего шага нажатием кнопки Вставить Шаг (**INSERT STEP**) и затем нажатием на текущий шаг. Нажатием правой клавиши мыши на кнопку Вставить Цикл (**INSERT STEP**) можно выбрать вставку шага до или после текущего шага. По окончании ввода отмените выбор (**INSERT STEP**).
   - Удаляйте шаги нажатием кнопки Удалить Шаг (**DELETE STEP**) и затем нажатием в любом месте строки, содержащей этот шаг в рабочем листе. По окончании ввода отмените выбор (**DELETE STEP**).
4. Если Вы хотите добавить новые параметры в протокол, сначала активируйте их нажатием на контрольную кнопку рядом с их описанием в окошке Показать Опции (**SHOW OPTIONS**).
   - Неограниченная задержка. В рабочем листе есть столбец, обозначенный как задержка времени **(HOLD**). Нажмите на кнопку задержки (**HOLD)** в любом шаге цикла и введите установочную температуру, которая будет поддерживаться

неограниченное время по желанию пользователя. В столбце задержки появится красная контрольная метка. Выключение задержки производится нажатием курсора мыши на контрольную метку. Программа не позволит устанавливать задержку, если цикл повторяется.

- Градиент. В рабочем листе появляются два новых столбца. Нажмите кнопку Градиент (**GRADIENT**) на желаемом шаге. Границы градиента определяются во втором столбце. Разница температур в модуле термоциклера может быть установлена от 1 до 25°C, температура модуля может находиться в пределах 40-95°C.
- Кривая плавления. В рабочем листе появляются три новых столбца. Нажмите столбец кривой плавления (**MELT CURVE**) на том шаге, когда предполагается записать данные кривой плавления. Укажите последовательные изменения температуры в циклах. Значок камеры зеленого цвета появится на соответствующем шаге в окошке выбор шага для записи данных (**SELECT DATA COLLECTION STEP**).
- Приращение/снижение температуры. Появляются три новых столбца. Определите изменение температуры, первый цикл, на котором произойдет изменение, и частоту повторяемости изменений. Например, чтобы запрограммировать увеличение температуры на 0,2°C, начиная с третьего цикла и дальнейшее увеличение температуры через один цикл, Вы должны ввести 0,2 в столбец **(+ TEMP**), 3 в столбец начало повторов (**BEGIN REPEAT**) и 2 в столбец частоты смены температуры (**HOW OFTEN**).
- Увеличение/уменьшение времени. Появляются три новых столбца. Определите изменение времени, первый цикл, на котором произойдет изменение, и частоту повторяемости изменений. Например, чтобы запрограммировать уменьшение времени на 2 сек, начиная с третьего цикла и дальнейшее уменьшение времени через один цикл, Вы должны ввести 00:02 в столбец **(- TIME**), 3 в столбец начало повторов (**BEGIN REPEAT**) и 2 в столбец частоты изменения (**HOW OFTEN**).
- Скорость нагрева/охлаждения (**RAMPING**). Дважды кликните на столбец RAMPING и выберите MIN или MAX, или непосредственно введите скорость нагрева/охлаждения. Допускается ввод значения в пределах 0,1-3,3°C/сек для шага нагрева и 0,1-2,0°C/сек для шага охлаждения.
- Описание цикла/шага. При выборе этой функции появляется один новый столбец. Выберите одно из имен списка или введите описание непосредственно.

5. В окошке выбор шага для записи данных (**SELECT DATA COLLECTION STEP**) определите циклы, в течение которых данные флюоресценции будут записаны для количественного анализа.
   - Нажмите один раз на окошко камеры, чтобы указать, что данные будут записаны для последующего анализа. В окошке и на экране появится камера с желтой линзой.
   - Для указания, что данные флюоресценции будут собраны и проанализированы в режиме реального времени, нажмите в окне второй раз. Надпись Реальное время (**REAL TIME**) появится рядом с пиктограммой камеры.
   - Для отмены записи данных в данном цикле нажмите в окне третий раз. Пиктограмма камеры исчезнет с экрана.
6. Дважды щелкните мышью на текстовое окно имени файла протокола (**PROTOCOL FILE NAME BOX**) и введите новое имя для протокола.
7. Нажмите кнопку сохранения протокола (**SAVE THIS PROTOCOL**). Появится диалоговое окно, после чего нажмите **SAVE** еще раз.

Замечание. Вы можете сохранить файлы протокола и описания планшета в директорию iCycler или любую поддиректорию в этой директории.

5.1.2 Краткое руководство по редактированию сохраненного протокола

1. В модуле библиотеки выберите кнопку просмотра протокола (**VIEW PROTOCOL**).
2. В верхнем левом углу окна выберите диск, где находятся сохраненные файлы описаний планшетов.

3. Найдите каталог, где хранятся файлы протоколов.
4. Выберите желаемый файл в окне файлов протокола.
5. Нажмите кнопку редактирования протокола (**EDIT THIS PROTOCOL**). Откроется окно редактирования протоколов рабочего модуля.
6. Войдите в рабочий лист в левом нижнем углу окна и заполните порядок термоциклирования. По мере внесения изменений в рабочий лист это изменения отображаются в графическом представлении в верхней части окна. Редактируемый цикл выделен синим цветом на линейке вверху графика и в рабочем листе.
   - Для изменения установок по умолчанию дважды щелкните мышью в поле времени или температуры.
   - Вставьте новый цикл впереди текущего цикла нажатием кнопки Вставить цикл (**INSERT CYCLE**) и затем нажатием в любом месте текущего цикла в рабочем листе. Вставьте новый цикл позади последнего цикла нажатием кнопки Вставить цикл (**INSERT CYCLE**) и затем нажатием в любом месте первой пустой строки внизу рабочего листа. Нажатием правой клавиши мыши на кнопку Вставить цикл (**INSERT CYCLE**) можно выбрать вставку 1-, 2- или 3-шагового цикла. По окончании ввода отмените выбор (**INSERT CYCLE**).
   - Удаляйте циклы нажатием кнопки Удалить цикл (**DELETE CYCLE**) и затем нажатием в любом месте этого цикла в рабочем листе. По окончании ввода отмените выбор (**DELETE CYCLE**).
   - Вставьте новый шаг впереди текущего шага нажатием кнопки Вставить шаг (**INSERT STEP**) и затем нажатием на текущий шаг. Нажатием правой клавиши мыши на кнопку Вставить цикл (**INSERT STEP**) можно выбрать вставку шага до или после текущего шага. По окончании ввода отмените выбор (**INSERT STEP**).
   - Удаляйте шаги нажатием кнопки Удалить шаг (**DELETE STEP**) и затем нажатием в любом месте строки, содержащей этот шаг в рабочем листе. По окончании ввода отмените выбор (**DELETE STEP**).

7. Если Вы хотите добавить новые параметры в протокол, сначала активируйте их нажатием на контрольную кнопку рядом с их описанием в окошке Показать опции (**SHOW OPTIONS**).
   - Неограниченная задержка. В рабочем листе есть столбец, обозначенный как задержка времени **(HOLD**). Нажмите на кнопку задержка (**HOLD**) в любом шаге интересующего Вас цикла и установите значение температуры, которая будет поддерживаться неограниченное время по Вашему желанию. В столбце задержки появится красная контрольная метка. Выключение задержки производится нажатием на контрольную метку. Программа не позволяет устанавливать задержку, если цикл повторяется.
   - Градиент. В рабочем листе появляются два новых столбца. Нажмите кнопку Градиент (**GRADIENT**) на желаемом шаге. Границы градиента определяются во втором столбце. Разница температур в блоке термоциклера может быть установлена от 1 до 25°C, температура блока может находиться в пределах 40-95°C.
   - Кривая плавления. В рабочем листе появляются три новых столбца. Нажмите столбец кривой плавления (**MELT CURVE**) на том шаге, когда предполагается записать данные кривой плавления. Укажите изменения последовательные изменения температуры в циклах. Значок камеры зеленого цвета появится на соответствующем шаге в окошке выбор шага для записи данных (**SELECT DATA COLLECTION STEP**).
   - Приращение/снижение температуры. Появляются три новых столбца. Определите изменение температуры, первый цикл, на котором произойдет изменение, и частоту повторяемости изменений. Например, чтобы запрограммировать увеличение температуры на 0,2°C, начиная с третьего цикла и дальнейшее увеличение температуры через один цикл, Вы должны ввести 0,2 в столбец **(+ TEMP**), 3 в столбец начала повторов (**BEGIN REPEAT**) и 2 в столбец частоты (**HOW OFTEN**).
   - Увеличение/уменьшение времени. Появляются три новых столбца. Определите изменение времени, первый цикл, на котором произойдет изменение, и частоту

повторяемости изменений. Например, чтобы запрограммировать уменьшение времени на 2 сек, начиная с третьего цикла и дальнейшее уменьшение времени через один цикл, Вы должны ввести 00:02 в столбец (**- TIME**), 3 в столбец начала повторов (**BEGIN REPEAT**) и 2 в столбец частоты изменений (**HOW OFTEN**).

- Скорость нагрева/охлаждения (**RAMPING**). Дважды кликните на столбец **RAMPING** и выберите **MIN** или **MAX**, или непосредственно введите скорость нагрева/охлаждения. Допускается ввод значения в пределах 0,1-3,3°С/сек для шага нагрева и 0,1-2,0°С/сек для шага охлаждения.
- Описание цикла/шага. При выборе этой функции появляется один новый столбец. Выберите одно из имен списка или введите описание непосредственно.

8. В окошке выбор шага для записи данных (**SELECT DATA COLLECTION STEP**) определите циклы, в течение которых данные флюоресценции будут записаны для количественного анализа.
   - Нажмите один раз на окошко камеры, чтобы указать, что данные будут записаны для последующего анализа. В окошке и на экране появится камера с желтой линзой.
   - Для указания, что данные флюоресценции будут собраны и проанализированы в режиме реального времени, нажмите в окне второй раз. Надпись Реальное время (**REAL TIME**) появится рядом с пиктограммой камеры.
   - Для отмены записи данных в данном цикле нажмите в окне третий раз. Пиктограмма камеры исчезнет с экрана.
9. Дважды кликните на текстовое окно имени файла протокола (**PROTOCOL FILE NAME BOX**) и введите новое имя для протокола.
10. Нажмите кнопку сохранения протокола (**SAVE THIS PROTOCOL**). Появится диалоговое окно, после чего нажмите **SAVE** еще раз.

Замечание. Вы можете сохранить файлы протокола и описания планшета в директорию iCycler или любую поддиректорию в этой директории.

5.1.3 Графический дисплей

График в верхней части окна редактирования протокола графически представляет программу термоциклирования (Рис. 5-1). Линейка над графиком показывает номер цикла для каждой части протокола; активный цикл, который редактируется, Выделен на экране. Установочная температура и время задержки для каждого шага показано ниже линейки. Необходимо принять к сведению, что размеры экрана монитора не позволяют показать все установки времени и температуры.

Пользователь может расширить ость времени на графике, нажав и удерживая клавишу **Ctrl** с одновременным перемещением курсора по части графика. Отпустив левую кнопку мыши. Можно видеть увеличение оси времени. Используйте линейку прокрутки внизу графика для перемещения по оси времени. Для уменьшения масштаба поместите курсор в любое место графика и нажмите левую кнопку мыши.

Когда выбран режим записи данных (см. Рис.5-1 и раздел 5.1.6), пиктограмма камеры появляется ниже температуры на тех шагах, когда данные будут записаны. Камера с желтой линзой указывает на сбор количественных данных, в то время как камера с зеленой линзой указывает на накопление данных для анализа кривой плавления.

Рис.5-2. Меню содержания для графика протокола.

Если поместить курсор в любом месте графического дисплея и нажать правую кнопку мыши, появляются следующие меню:

- Копировать график (**COPY GRAPH**). Позволяет копировать график в буфер обмена, где график может быть вставлен в другие приложения Windows, такие как текстовый документ или табличный редактор.

- Печать графика (**PRINT GRAPH**). Позволяет вывести распечатку графика на принтере.

5.1.4 Программирование времени задержки и температуры в рабочем листе протокола

В нижней трети окна редактирования протокола (**WORKLIST/EDIT PROTOCOL**) расположен рабочий лист, который показывает все циклы и шаги протокола.

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Hold	Setpoint
1	1	1	03:00		95.0
2	35	1	00:30		95.0
		2	00:30		60.0
3	1	1	00:30		4.0

Рис.5-3. Таблица протокола.

В таблице имеется 5 столбцов, которые должны быть заполнены для каждого протокола:

- Цикл (**CYCLE**) – группа до 9 шагов ПЦР (обозначенных 1-9), которые повторяются. В одном протоколе может быть до 9 циклов (обозначаемых от 1 до 9).
- Повторы (**REPEATS**) – число повторений цикла. Циклы могут повторяться до 600 раз. Число повторов показывается только на первом шаге многошагового цикла.
- Шаг (**STEP**) – фиксация температуры или времени задержки. Каждый цикл может иметь до 9 шагов.
- Время задержки **(DWELL TIME**) - время, когда шаг реакции фиксирован при определенной температуре. Время задержки может колебаться в пределах от 1 сек до 99 мин 59сек.
- Установочная температура (**SETPOINT TEMPERATURE**) – определенная температура, достигаемая на данном шаге реакции. Эта температура может быть в пределах 4,0 - 100,0°C.

5.1.5 Редактирование циклов и шагов в рабочем листе

Циклы и шаги ПЦР в программе термоциклирования могут быть вставлены или удалены с помощью кнопок вставки цикла (**INSERT CYCLE**), вставки шага (**INSERT STEP**), удаления цикла (**DELETE CYCLE**), удаления шага (**DELETE STEP**) в верхней части таблицы.

Рис.5-4. Вставка/удаление циклов или шагов.

Новый цикл может состоять из одного, двух или трех шагов.

- Для вставки цикла:

a. Нажмите кнопку вставки цикла (**INSERT CYCLE**) и появится активное диалоговое окно с выбором 1 шага (**1-STEP**), 2 шагов (**2-STEP**) и 3 шагов (**3-STEP**). Необходимо отметить, что по умолчанию установлен одношаговый цикл.
b. выберите требуемое число шагов. Активное окно исчезнет, и кнопка **INSERT CYCLE** будет выделена.
c. В рабочем листе выберите ячейку в цикле, за которой следует вставленный цикл. Новый цикл будет вставлен в протокол термоциклирования.

d. Отмените выделение кнопки **INSERT CYCLE**.

- Для удаления цикла:
a. Нажмите кнопку удаления цикла (**DELETE CYCLE**). Кнопка будет выделена.
b. В рабочем листе выберите ячейку в цикле, который должен быть удален. Все шаги цикла будут удалены.
c. Отмените выделение кнопки **DELETE CYCLE**.
- Для вставки шага:
a. Нажмите правую клавишу мыши на кнопке вставки шага (**INSERT STEP**) и появится активное диалоговое окно с выбором **До** (**BEFORE**) или **После** (**AFTER**) (По умолчанию установлено **До**). Выберите соответствующую опцию и кнопка **INSERT STEP** будет выделена.
b. В рабочем листе кликните на точку, где нужен новый шаг, до или после выделенного шага.
c. Отмените Выделение кнопки **INSERT STEP**.
- Для удаления шага:
a. Нажмите кнопку **DELETE STEP.** Кнопка станет активной.
b. В рабочем листе выберите ячейку в шаге, подлежащем удалению, и нажмите на нее.
c. Отмените выделение кнопки **DELETE STEP**.

5.1.6 Окно выбора шагов для накопления данных

Окно выбора шагов для накопления данных **(SELECT DATA COLLECTION STEP(S))**находится в правой стороне окна редактирования протокола и позволяет пользователю выбрать шаг или шаги реакции, когда будет происходить накопление данных для анализа в режиме реального времени или для последующего анализа.

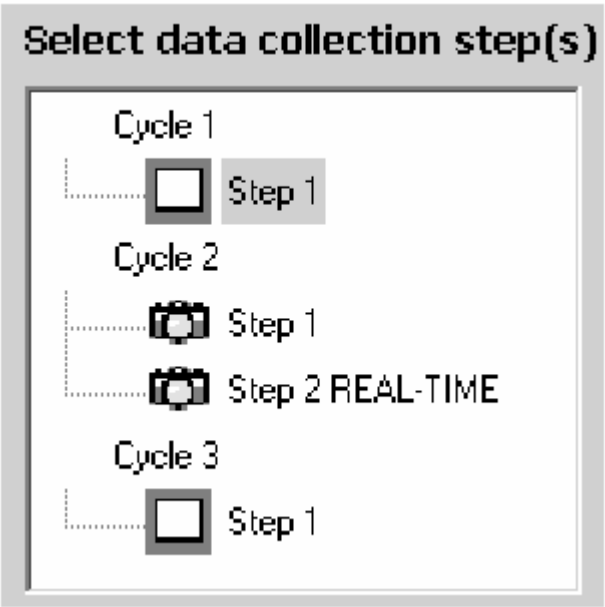


Рис.5-5. выбор шагов для накопления данных.

Определите желаемые шаги, как описано ниже:
- Щелкните мышью один раз на окно камеры в том шаге цикла, когда требуется запись данных. Появляется желтая пиктограмма камеры, что означает сохранение собранных данных для последующего анализа.
- Щелкните мышью повторно на окно камеры и рядом с пиктограммой появится надпись Реальное время (**REAL TIME**), что означает регистрацию и отображение флюоресценции в режиме реального времени.
- Третий щелчок мышью на окне камеры – возвращает его в исходное положение.

- Если Вы программируете цикл кривой плавления, в окне появится пиктограмма камеры зеленого цвета. Она появляется и исчезает при нажатии опции кривой плавления в окне показа опций (**SHOW OPTIONS**).

В дополнение к пиктограмме камеры в окне выбора шагов для накопления данных, такая же пиктограмма появляется на соответствующем шаге графического дисплея наверху окна редактирования протокола. Накопление данных может происходить в течение одного или нескольких шагов реакции и в любом цикле в процессе эксперимента. Однако данные могут быть собраны только в одном цикле в ходе эксперимента. Другое ограничение состоит в том, что может быть установлена только одна желтая камера анализа в реальном времени.

5.1.7 Программирование вариантов протокола в рабочем листе

Для каждого протокола термоциклирования можно установить дополнительные параметры. Для активации установки щелкните мышью на них в окне показа опций (**SHOW OPTIONS**). Каждый раз при активации, один или несколько дополнительных столбцов появляются в рабочем листе. Задать параметр можно путем заполнения этих столбцов необходимой информацией.

Замечание. Для отмены дополнительного параметра необходимо удалить информацию из ячеек в таблице. Пользователь не может отменить параметр в окне показа опций.

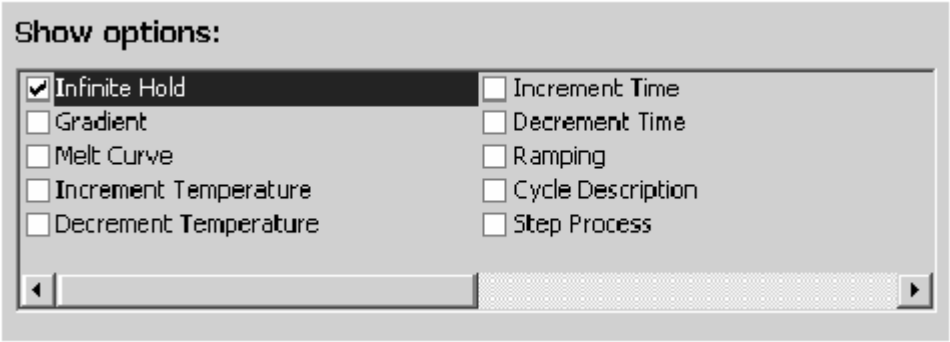


Рис.5-6. Параметры протокола.

Ниже приведено описание дополнительных параметров. Особенности программирования приведены в следующем разделе.

A. Неограниченная задержка (**INFINITE HOLD**). Когда цикл не повторяется, время задержки на любом шаге этого цикла может быть задано как неограниченное. Это означает, что прибор будет сохранять определенную температуру до тех пор, пока выполнение не будет прервано пользователем. Если неограниченное время задержки запрограммировано на любом шаге, отличающемся от последнего шага, при достижении этого шага прибор перейдет в режим паузы (**PAUSE MODE**) и будет поддерживать установленную температуру до тех пор, пока не нажата кнопка **Продолжить Выполнение Протокола (CONTINUE RUNNING PROTOCOL**) в окне термоциклера центрального исполнительного модуля.

Неограниченная задержка может быть запрограммирована следующим образом:

1. Нажмите на кнопку неограниченной задержки (**INFINITE HOLD**) в окне показа опций (**SHOW OPTIONS**). В рабочем листе появится столбец, обозначенный как задержка **(HOLD**).
2. Отметьте окно задержки для шага эксперимента, который Вы хотите сохранять при определенной температуре, и в ячейке **SETPOINT** установите температуру, которая будет поддерживаться неограниченное время по желанию пользователя.

B. Градиент. Температурный градиент может быть запрограммирован в блоке проведения ПЦР на любом шаге протокола. Градиент создается по направлению к передней панели прибора, самая низкая температура поддерживается в ряду H и самая высокая

температура поддерживается в ряду А. Все лунки в каждом ряду имеют одинаковую температуру, так что в любое время на градиентном этапе реакции будут созданы 8 различных температур для каждого ряда лунок.

Разница температур в блоке термоциклера может быть установлена от 1 до 25°С. Градиент получается нелинейным, однако, воспроизводимость его высокая. Температура рядов может находиться в пределах 40-100°С.

Градиент температуры может быть запрограммирован следующим образом:

1. Нажмите на кнопку градиента (**GRADIENT**) в окне отображения опций (**SHOW OPTIONS**). В рабочем листе появятся 2 столбца, и таблица градиента появится в правой части этого окна.
2. Щелкните мышью на желаемый шаг в колонке градиента рабочего листа.
3. Температура, указанная в установочной (**SETPOINT**) ячейке рабочего листа, будет являться самой низкой температурой блока во время шага с градиентом температуры (ряд Н). Введите желаемое различие между самой низкой и самой Высокой температурой в ячейке ранжирования (**RANGE**) таблицы. Градиент будет представлен на экране с температурой для каждого ряда лунок.

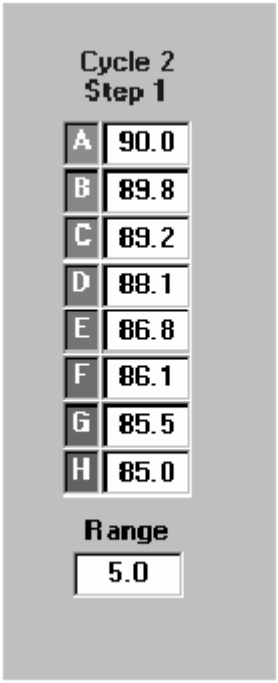


Рис.5-7. Экран градиента.

4. Пользователь может изменить ранжирование в рабочем листе или прямо ввести желаемую разность температур в экране градиента. При нажатии клавиши ввод (**ENTER**) на экране появятся пересчитанные температуры для каждого ряда лунок.
5. Если Вы хотите получить определенную температуру в одном из рядов планшета, Вы можете ввести эту температуру непосредственно в этот ряд на экране градиента и нажать **ENTER**. Температуры в других рядах будут пересчитаны на основании вашего ввода и заданных крайних значений температуры. Вы не можете задать точную желаемую температуру более чем в одном ряду планшета.

С. Кривая плавления (MELT CURVE). Анализ кривой плавления является динамическим инструментом, используемым для измерения температуры плавления (T_m) двухцепочечных молекул ДНК. Дуплексы ДНК могут быть Выявлены или посредством интеркаляции ДНК-связывающих красителей (например, SYBR-green I), или при гибридизации с зондами, меченными флюоресцентными красителями. При применении ДНК-связывающих красителей и неразрезаемых гибридизационных зондов, флюоресценция будет наиболее интенсивна при отжиге двух цепей ДНК. По мере повышения температуры до T_m дуплекса, флюоресценция будет уменьшаться с постоянной скоростью (линейный наклон). В точке T_m произойдет резкое снижения флюоресценции и заметное изменение наклона на графике. Скорость этого изменения определяется при построении графика зависимости первой производной флюоресценции по температуре, взятой с отрицательным знаком (-dF/dT), от температуры. Изменения скорости будут отражаться как пики, представляя T_m двухцепочечных комплексов ДНК.

Три главных приложения для анализа кривой плавления это: количественная характеристика пика (число продуктов амплификации), характеристика сигнальных молекул (beacons), и дискриминация аллелей. Первые два приложения обычно используются для оптимизации ПЦР в реальном времени. Третье приложение, дискриминация аллелей, применяется для определения или различения мутаций ДНК. Определение полиморфизма по конкретному нуклеотиду **(SNP)** – типичный пример исследования по дискриминации аллелей. Одним из способов проведения этого исследования может быть анализ кривой плавления в данной версии программного обеспечения в сочетании с исследованием флюоресцентного резонансного переноса энергии **(FRET).**

Проведение анализа кривых плавления подробно обсуждается в Приложении K. Цикл плавления может происходить после цикла амплификации или проводиться независимо от амплификации. Запрограммировать плавление можно следующим образом:

1. Кривые плавления задаются как повторяемый цикл, содержащий только один шаг. При этом программируется постепенное повышение или понижение температуры с каждым повтором цикла. Цикл можно повторять до 600 раз. В любом количестве повторов температура не может быть ниже 4°C и Выше 100°C во время выполнения протокола исследования.
2. Вставьте новый цикл в протокол в точке, где Вы желаете иметь кривую плавления. Кривые плавления могут быть заданы отдельно или следовать за циклом амплификации.
3. Введите 95°C для установочной температуры и 1:00 для времени задержки. Таким образом запрограммирован начальный шаг денатурации ДНК.
4. Если начальная температура кривой плавления отличается от 95°C, вставьте новый цикл посредством выбора опции **INSERT CYCLE** и нажатия на первую доступную пустую строку. Введите температуру, при которой Вы хотите начать кривую плавления, и 1:00 минуту для времени задержки. Этот шаг нужен для приведения всех последовательностей ДНК к заданной стартовой температуре для начала цикла плавления.
5. Вставьте еще один новый цикл в следующую доступную пустую строку. Этот цикл будет использоваться для получения данных кривой плавления. Щелкните мышью **MELT CURVE** в окне показа опций **(SHOW OPTIONS**). В рабочем листе появятся три новых столбца, обозначенных **Melt Curve, + Temp**, и **– Temp**.
6. Отметьте окошко в столбце **Melt Curve** только в том цикле, где Вы хотите собрать данные кривой плавления. Под номером этого цикла в окне установки сбора данных появится зеленая камера.
7. В ячейке **SETPOINT** введите температуру, при которой Вы хотите начать плавление (4-100°C).
8. Введите повышение (+ Temp) или понижение (- Temp) температуры. Шаг температуры не может быть менее 0,1°C. Замечание: типичное изменение температуры для плавления с SYBR green I для **FRET** составляет 0,3-0,5°C, с начальной температурой 95°C и конечной температурой 25°C.
9. Введите подходящее число повторов в колонку **REPEATS** для этого цикла (2-600 повторов), учитывая начальную/конечную температуру кривой и ранее выбранное изменение температуры на каждом повторе. Например, при стартовой температуре 95°C и конечной температуре 25°C, и шаге температуры в 1,0°C для проведения плавления потребуется 70 повторов. Если ввести неадекватное число повторов для выбранных параметров плавления, окно изменения температуры выделится желтым цветом. При попытке сохранить этот протокол будет выведено сообщение об ошибке. Пользователю необходимо откорректировать одну из переменных плавления, после чего сохранить протокол исследования.
10. Введите подходящее время задержки для сбора данных в колонке **DWELL TIME**. Время задержки на данной температуре может варьировать в зависимости от числа красителей, используемых в данном эксперименте. Минимальные времена задержки для записи данных составляют:

1 краситель = 7 сек
2 красителя = 14 сек
3 красителя = 22 сек
4 красителя = 33 сек

Мы рекомендуем задавать время записи несколько больше минимального, чтобы собрать оптимальное количество информации на каждом повторе (по 10 сек на каждый краситель).

11. При необходимости введите конечный цикл задержки. Нажмите **INSERT CYCLE**, кликните на следующую пустую строку, впишите желаемую температуру в колонку **SETPOINT**, и, наконец, отметьте окно в колонке **HOLD**.

Примечание: для цикла задержки не требуется вводить время задержки.

12. Сохраните протокол, задав имя файла в окне имени протокола **(PROTOCOL FILENAME**) и нажав **SAVE**. Новый протокол будет сохранен под этим именем в папке **iCycler**. Этот протокол можно открыть в любое время нажатием кнопки просмотра протоколов (**VIEW PROTOCOLS**) в библиотеке (**LIBRARY**).

D. Приращение/снижение температуры **(INCREMENT/DECREMENT TEMPERATURE).** Вы можете запрограммировать автоматическое периодическое пошаговое повышение или уменьшение температуры в повторяемых циклах.

Пошаговое повышение или понижение температуры минимально может составлять 0,1°С на цикл. Можно запрограммировать изменение температуры в каждом цикле, начать изменение можно с любого цикла. Максимум изменения температуры ограничен только границами 4С – 100°С.

Запрограммировать изменение температуры можно следующим образом:

1. Нажмите **INCREMENT TEMPERATURE** или **DECREMENT TEMPERATURE** в окне показа опций (**SHOW OPTIONS**). В рабочем листе появляются три новых столбца.
2. Для желаемого повтора введите шаг повышения (в колонку +Temp) или понижения (в колонку –Temp) температуры.
3. Введите номер цикла, в котором должно начаться изменение температуры, в колонку **BEGIN REPEATS**. Обычно это 2-й цикл, но может быть любой цикл.
4. Введите частоту, с которой изменение будет происходить в ряду повторов цикла, в колонку **HOW OFTEN**. Обычно программируется изменение температуры с каждым повтором, и в эту колонку надо ввести 1.

D. Приращение/уменьшение времени (**INCREMENT/DECREMENT TIME**). Вы можете запрограммировать автоматическое периодическое повышение или уменьшение пошагового времени в повторяемых циклах.

Повышение или уменьшение пошагового времени минимально может составлять 0,1сек на цикл. Можно запрограммировать изменение времени в каждом цикле, начать изменение можно с любого цикла. Максимум изменения времени ограничен пределами аппаратуры (99 мин 59 сек).

Запрограммировать изменение времени можно следующим образом:

1. Нажмите **INCREMENT TIME** или **DECREMENT TIME** в окне показа опций **(SHOW OPTIONS**). В рабочем листе появляются три новых столбца.
2. Для желаемого повтора введите шаг повышения (в колонку **+Time**) или понижения (в колонку **–Time**) времени.
3. Введите номер цикла, в котором должно начаться изменение времени, в колонку **BEGIN REPEATS**. Обычно это 2-й цикл, но может быть любой цикл.
4. Введите частоту, с которой изменение будет происходить в ряду повторов цикла, в колонку **HOW OFTEN**. Обычно программируется изменение времени с каждым повтором, и в эту колонку надо ввести 1.

E. Скорость нагрева/охлаждения (**RAMPING**). Скорость нагрева или охлаждения – это та скорость, с которой прибор iCycler изменяет температуру между шагами цикла или между циклами. По умолчанию iCycler меняет температуру с максимально возможной скоростью, но допустимо изменение с меньшей скоростью. Скорость изменения регулируется с шагом 0,1°С/сек, диапазон регулировки составляет 0,1-3,3°С/сек для нагрева и 0,1-2,0°С/сек для охлаждения. Введенное некорректное значение автоматически корректируется в ближайшее корректное значение.

Скорость нагрева/охлаждения может быть запрограммирована следующим образом:

1. Нажмите на кнопку **RAMRING** в окне показа опций (**SHOW OPTIONS).** В рабочем листе появится новая колонка, озаглавленная **RAMP RATE**.
2. Дважды кликните в колонке **RAMP RATE** на строку рабочего листа, где указана температура, до которой будет происходить изменение с желаемой скоростью. Используйте падающее меню для выбора минимальной (**MIN**) или максимальной (**MAX)** скорости или введите требуемое значение в поле. Введенное некорректное значение автоматически исправляется в ближайшее корректное значение.

F. Название цикла/шага (**CYCLE DESCRIPTION/STEP PROCESS**). Вы можете выбрать название из списка или ввести свое собственное название для описания цикла/шага. Описание цикла/шага может быть вставлено в рабочий лист следующим образом:

1. Нажмите кнопку **CYCLE DESCRIPTION** или **STEP PROCESS** в окне показа опций (**SHOW OPTIONS**).
2. Дважды щелкните мышью на ячейке рабочего листа для цикла или шага, который Вы хотите назвать, и выберите название из списка в Выпадающем меню или введите свое название. Замечание: если в процессе программирования допущена ошибка, одно из полей в рабочем листе будет Выделено желтым цветом. Например, если шаг с 30 повторами цикла и временем задержки 40 сек запрограммирован для уменьшения времени на 10 сек, начиная с 5-го цикла и далее уменьшения времени на 10 сек на каждый 2-й цикл, поле в столбце «-Time», содержащее 00:10 будет Выделено желтым цветом, поскольку с 13 цикла время задержки на этом шаге будет меньше нуля. Эта ошибка может быть исправлена при уменьшении декремента до 3 сек или меньше, или путем изменения номера цикла, с которого начинается декремент, на 24-й и более, или путем исправления встречаемости декремента на каждый 6-й цикл.

5.1.8 Сохранение протокола

После окончания составления протокола его необходимо сохранить до начала эксперимента.

- Отредактированные протоколы могут быть сохранены под существующими именами нажатием кнопки сохранения протокола (**SAVE THIS PROTOCOL**). Старый файл при этом будет переписан.
- Отредактированные и новые протоколы могут быть сохранены под новыми именами следующим образом:
  1. Для переименования существующего протокола или наименования нового протокола, дважды кликните левой кнопкой мыши в текстовом окне имени файла для протокола (**PROTOCOL FILENAME**). Текущее имя будет Выделено.
  2. Напечатайте новое имя в текстовом поле.
  3. Нажмите кнопку сохранения протокола (**SAVE THIS PROTOCOL**), появится диалоговое окно сохранения протокола с добавленным расширением .tmo к имени файла.
  4. Нажмите **SAVE** для сохранения протокола под данным именем или выберите **CANCEL** для возврата в рабочий модуль.

5.2. ОКНО РЕДАКТИРОВАНИЯ ОПИСАНИЯ ПЛАНШЕТА

Файл описания планшета содержит информацию о красителях и образцах размещенных в экспериментальном планшете. В окне редактирования описания планшета (**EDIT PLATE SETUP**) рабочего модуля программы iCycler могут быть модифицированы существующие файлы описания планшета и созданы новые файлы. Файл описания планшета включает определение лунок планшета, которые будут наблюдаться в ходе реакции, описание красителей, находящихся в лунках, тип образца и концентрацию стандартов. В последней версии программы iCycler iQ имеются два способа создания спецификации экспериментального планшета с несколькими красителями: режим целого планшета (**WHOLE PLATE**) и режим слоя краски (**DYE LAYER**). Все файлы в предыдущих версиях программы iCycler iQ (1.0, 2.1 и 2.2) создавались в режиме целого планшета.

Режим целого планшета (**WHOLE PLATE MODE**). В этом режиме типы образцов и концентрации всех стандартов предполагаются одинаковыми для каждого слоя красителя. Это означает, что если лунка A1 содержит неизвестную концентрацию по слою красителя FAM, то A1 также не определена по всем другим слоям красителей. Если стандарт, содержащийся в слое H1, находится в 100 копиях в слое красителя FAM, то и другие стандарты в лунке H1, для слоев других красителей, предполагаются имеющими концентрацию в 100 копий.

В режиме целого планшета имеется два режима представления схемы планшета:

- Образцы: загрузка целого планшета (**Samples: Whole Plate Loading).** В этом представлении типы проб в планшете, единицы измерения и концентрации стандартов определены, все идентификаторы установлены.

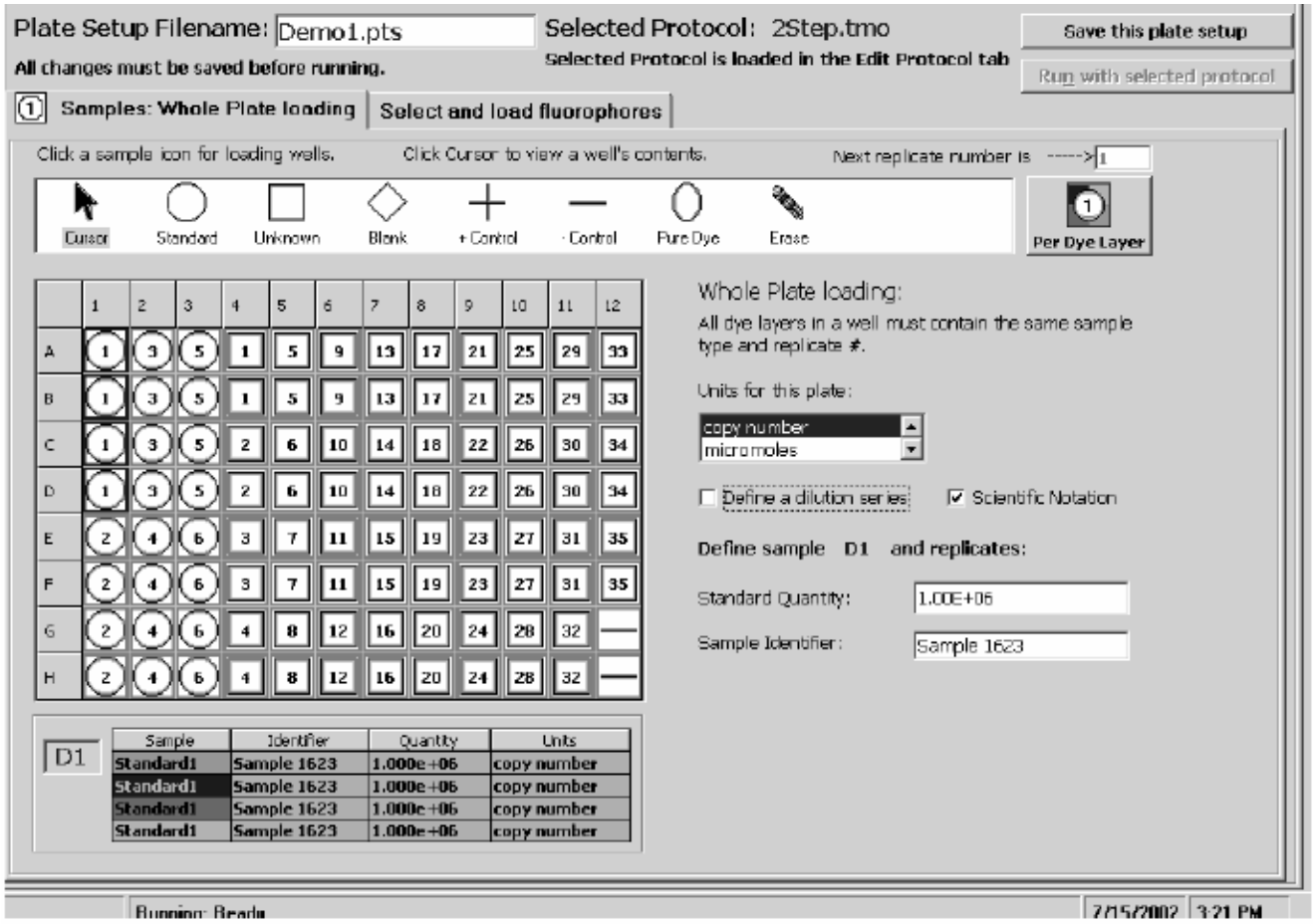


Рис.5-8. Окно редактирования описания планшета в рабочем блоке программы: представление образцов в режиме целого планшета.

- выбор и загрузка красителей **(Select and Load Fluorophores).** В этом окне подходящие красители выбираются из списка красителей, и для них выбирается условный цвет. После этого необходимо задать набор красителей в каждой лунке планшета.

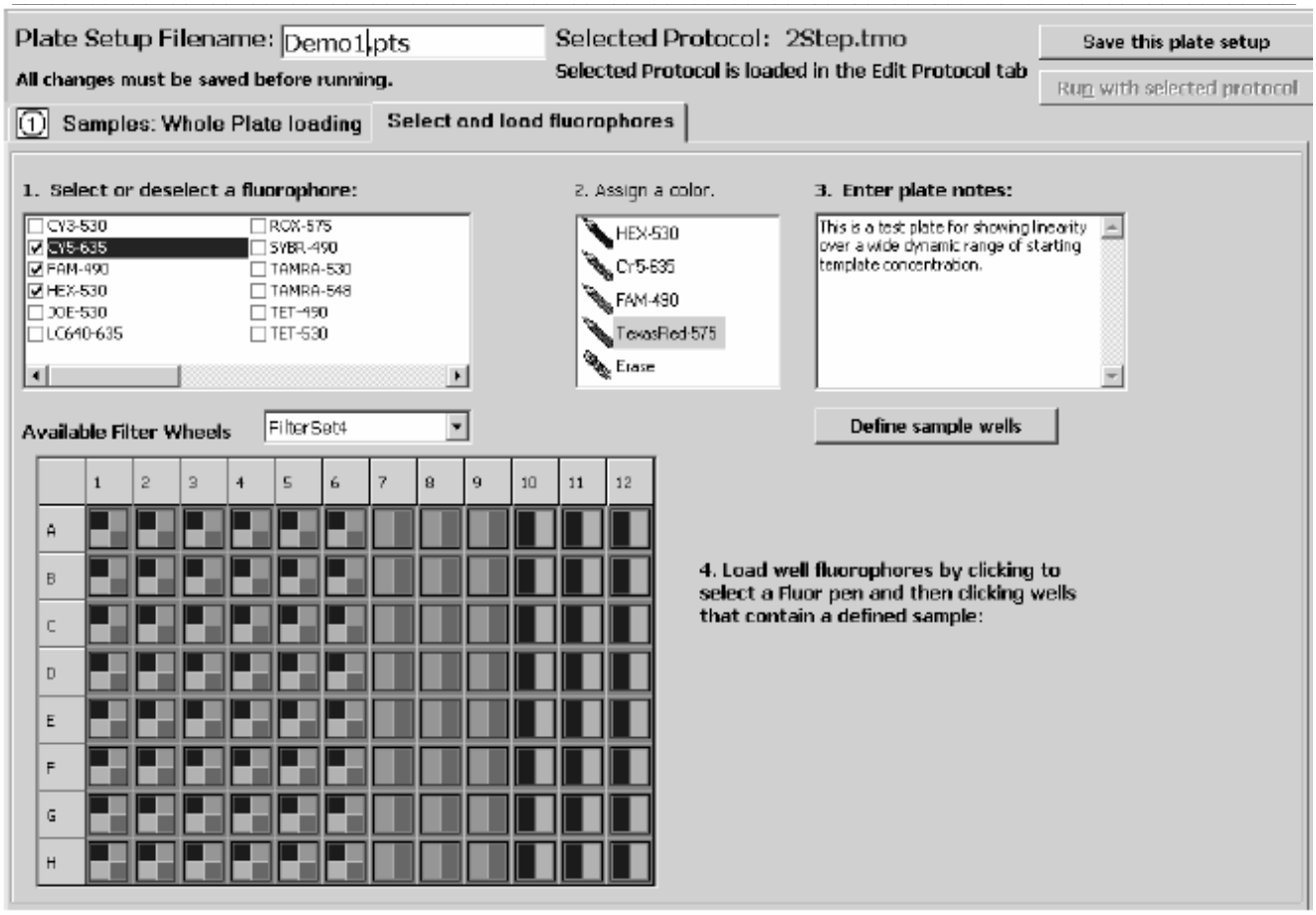


Рис.5-9. Окно редактирования описания планшета в рабочем модуле программы: представление красителей в режиме целого планшета.

- Режим слоя краски (**DYE LAYER MODE).** В этом режиме в одной лунке могут быть разные типы образцов и стандарты в различных концентрациях. Это означает, что, например, лунка A1 может быть задана как положительный контроль для слоя красителя FAM и отрицательный контроль для слоя другого красителя. Также это означает, что, к примеру, стандарт в лунке H1 для слоя красителя FAM может иметь концентрацию, отличающуюся от концентраций других стандартов для слоев других красителей в этой лунке.

В режиме слоя красителя имеются два представления экспериментального планшета.

- Образцы (**SAMPLES**). В этом представлении тип образца показан как определенный слой одного красителя в данный момент времени и тот краситель, который показан на экране, управляется из своего окна. Идентификаторы и концентрации стандартов и единицы для каждой лунки также заданы в окне как один слой красителя в данный момент времени.

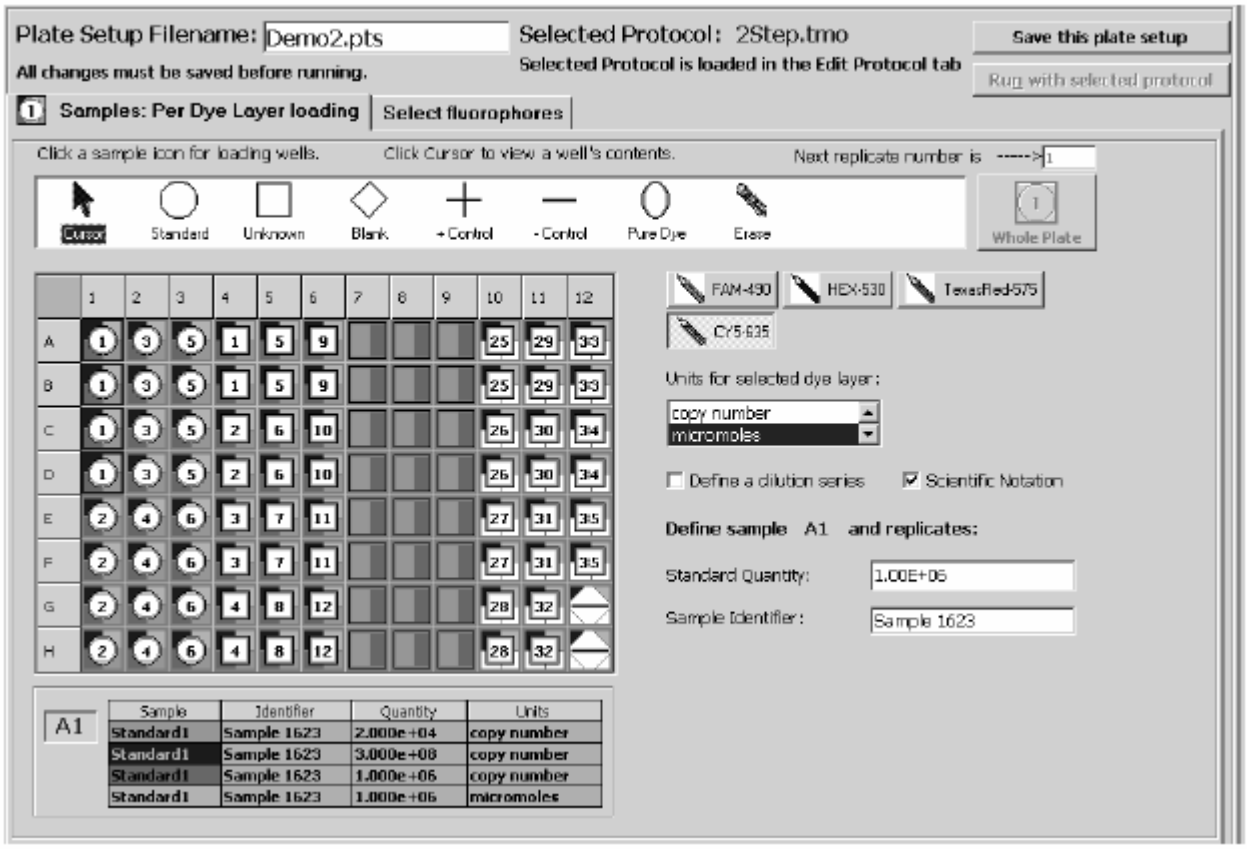


Рис.5-10. Окно редактирования описания планшета в рабочем модуле программы: представление образцов в режиме слоя краски.

- выбор красителей (**SELECT FLYOROPHORES**). В этом окне можно редактировать выбор красителей и назначение цвета.

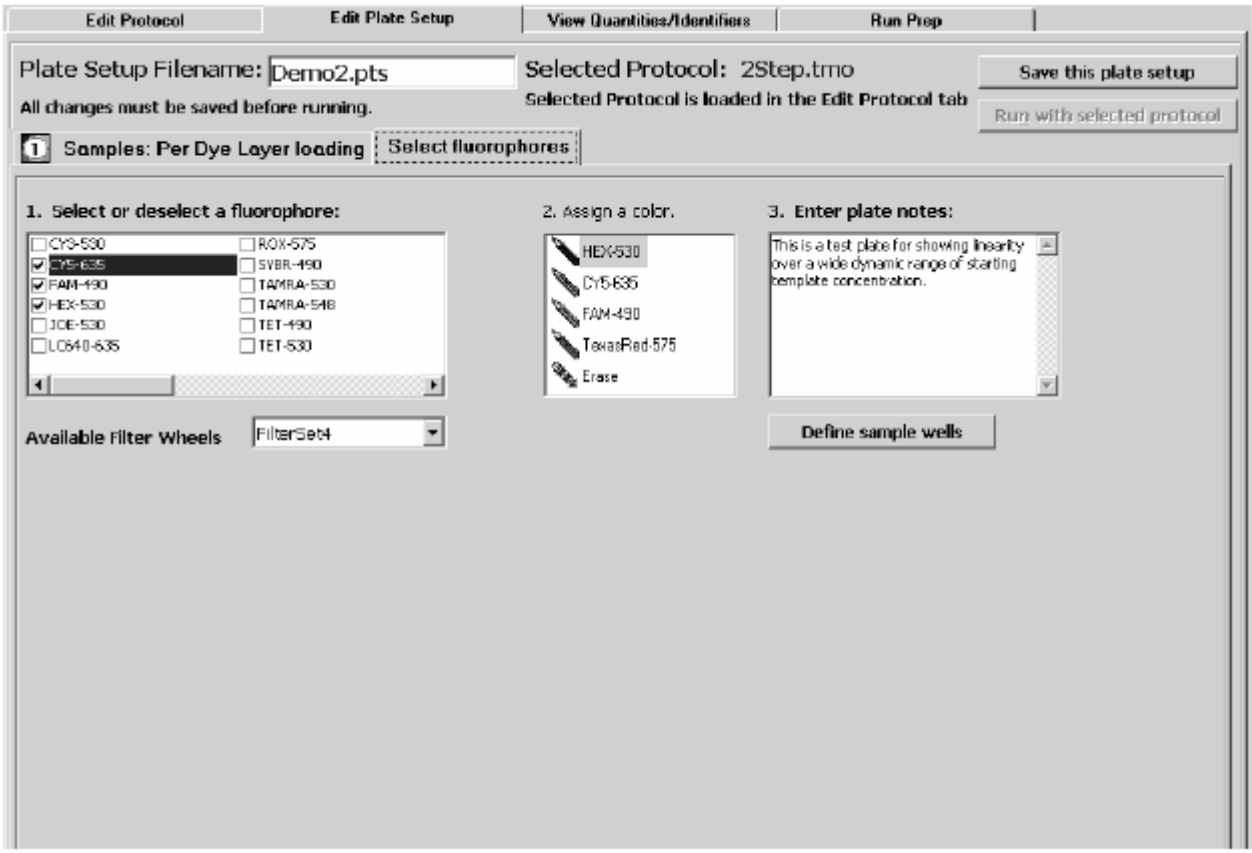


Рис.5-11. Окно редактирования описания планшета в рабочем модуле программы: представление красителей в режиме слоя краски.

Замечание по программированию: Допускается начать описание планшета в режиме целого планшета и затем переключаться на режим послойного программирования, однако нельзя производить программирование в обратном порядке, т.е. начинать в послойном режиме и заканчивать в режиме целого планшета.

Следующая информация применима для всех показанных окон программирования. Нижние две трети окна показывают схему планшета. Если Вы создаете новый файл установки планшета, схема планшета выводится незаполненной. Если Вы редактируете существующий файл, позиции лунок, определенные ранее, будут заполнены на схеме планшета. Наверху в окне расположены:

- Текстовое окно с именем открытого файла установки планшета (**PLATE SETUP FILENAME**).
- Поле с именем выбранного файла протокола (**SELECTED PROTOCOL**).
- Кнопки сохранения установок планшета (**Save this plate setup)** и проведения реакции по выбранному протоколу (**Run with selected protocol)** позволяют сохранить созданный файл и начать амплификацию соответственно.
- Кнопка образцы (**SAMPLES**) открывает окно, содержащее информацию о стандартах и образцах, и о количестве каждого стандарта.
- Кнопка красители (**FLYOROPHORES**) открывает окно, содержащее информацию о применяемой конфигурации карусели фильтров и о красителях, содержащихся в каждой лунке планшета.

5.2.1. Краткое руководство по созданию нового планшета в режиме целого планшета

1. В модуле библиотеки нажмите кнопку просмотра установок планшета (**VIEW PLATE SETUP).**

2. Нажмите на кнопку создания нового описания планшета (**CREATE A NEW PLATE SETUP**). Откроется окно редактирования описания планшета в рабочем модуле программы.
3. Задайте тип образца в каждой лунке. Выберите подходящую пиктограмму из диалогового окна и нажмите на лунку, чтобы задать этот тип.

- Когда Вы определяете, какой стандарт будет в лунке, Вы также должны ввести количество этого стандарта в окошке определения стандартов (**DEFINE STANDARTS**). Если стандарты задаются в последовательных разведениях, можно ввести количество первого стандарта и программа автоматически рассчитает концентрации всех других стандартов.
- Нажмите на верхний левый угол одна для Выделения всех 96 лунок одновременно.
- Нажмите на число или букву, чтобы выделить целый столбец или строку соответственно.
- Перетаскивайте лунки для задания повторяющихся стандартов или опытных образцов.
- Если Вы сделали ошибку, используйте пиктограмму очистить (**ERASE**). Вы можете удалить установки во всех лунках одновременно нажатием на верхний левый угол схемы планшета.
- Вы можете изменить нумерацию стандартов или опытных образцов путем ввода соответствующего номера в окошко, обозначенное **Next Replicate Number Is.**

4. Нажмите кнопку выбора и загрузки флюорофоров (**SELECT AND LOAD FLYOROPHORES**). Появится пакет инструкций для определения красителей в данном эксперименте.
5. выберите одну из возможных установок карусели фильтров в Выпадающем меню, после чего будет показана комбинация красителей.
6. Нажмите на поле рядом с требуемым красителем.
7. Нажмите на цветную пиктограмму для определения цвета красителя.
8. Повторите пункты 6 и 7 для остальных красителей.
9. Нажмите на цветную пиктограмму для первого красителя и далее нажимайте на все лунки, которые должны исследоваться с этим красителем.

- Нажмите на верхний левый угол окна для выделения всех 96 лунок одновременно.
- Нажмите на число или букву, чтобы выделить целый столбец или строку соответственно.
- Перетаскивайте лунки для задания повторяющихся красителей в нескольких лунках.
- Если Вы сделали ошибку, используйте пиктограмму очистить (**ERASE**). Вы можете удалить установки во всех лунках одновременно нажатием на верхний левый угол схемы планшета.

10. Повторите шаг 9 для каждого следующего красителя.
11. Дважды щелкните мышью на текстовое окно описания планшета и введите новое имя для файла описания.
12. Нажмите кнопку сохранения описания планшета (**Save this plate setup)** или кнопку проведения амплификации по выбранному протоколу (**Run with selected protocol),** которые позволяют сохранить созданный файл и начать реакцию соответственно.

5.2.2. Краткое руководство по редактированию сохраненного планшета в режиме целого планшета

1. В блоке библиотеки выберите кнопку просмотра описания планшета (**VIEW PLATE SETUP**).
2. В верхнем левом углу окна выберите диск, где находятся сохраненные файлы описаний планшетов.
3. Найдите каталог, где хранятся файлы описаний планшетов.
4. выберите желаемый файл в окне файлов описания планшета.
5. Нажмите кнопку редактирования описания планшета (**EDIT THIS PLATE SETUP**). Откроется окно редактирования описания планшета рабочего модуля.
6. Определите тип образца в каждой лунке. Выберите подходящую пиктограмму из диалогового окна и затем щелкните мышью на лунку для ее определения.

- Нумерация стандартов и опытных проб будет начинаться с того места, где она закончилась при создании данного файла.
- Можно изменить назначение лунки, нажав на нее после выбора другого типа образца, или очистить лунку с помощью функции **ERASE**.
- Когда Вы определяете, какой стандарт будет в лунке, Вы также должны ввести количество этого стандарта в окошке определения стандартов (**DEFINE STANDARTS**). Если стандарты задаются в последовательных разведениях, можно ввести количество первого стандарта и программа автоматически рассчитает концентрации всех других стандартов.
- Нажмите на верхний левый угол одна для выделения всех 96 лунок одновременно.
- Нажмите на число или букву, чтобы выделить целый столбец или строку соответственно.
- Перетаскивайте лунки для задания повторяющихся стандартов или опытных образцов.
- При необходимости измените нумерацию стандартов или опытных проб путем ввода нового номера в окошко с пометкой следующего репликативного номера (**NEXT REPLICATE NUMBER IS**).

7. Нажмите кнопку выбора и загрузки флюорофоров (**SELECT AND LOAD FLYOROPHORES)** для показа паллеты красителей. Если нет необходимости добавить красители в список, переходите к пункту 12.
8. Выберите одну из конфигураций карусели фильтров в выпадающем меню, и набор красителей будет показан в окне выбора флюорофоров (**SELECT FLYOROPHOPRES**).
9. Нажмите на поле рядом с требуемым красителем.
10. Нажмите на цветную пиктограмму в палитре флюорофоров для задания цвета красителя.
11. Повторите пункты 9 и 10 для оставшихся красителей.
12. Нажмите на цветную пиктограмму первого выбранного красителя и затем нажимайте на все лунки, в которых будет регистрироваться этот краситель.

- Нажмите мышью в верхнем левом углу для выбора всех загруженных лунок одновременно.
- Нажмите на указатель столбца или строки, чтобы отметить целый столбец или строку соответственно.
- Перетаскивайте курсор по лункам для задания одинаковой краски в последовательных лунках.
- При ошибке используйте функцию **ERASE**.

13. Повторите пункт 13 для каждой следующей краски.
14. Если Вы хотите сохранить файл под новым именем, дважды щелкните мышью на текстовое окно описаний планшетов и введите в него новое имя файла.
15. Нажмите кнопку сохранения описания планшета (**Save this plate setup)** или кнопку проведения реакции по выбранному протоколу (**Run with selected protocol),** которые позволяют сохранить созданный файл и начать амплификацию соответственно.

5.2.3. Краткое руководство по созданию нового планшета в режиме слоя краски

1. В блоке библиотеки выберите кнопку просмотра описаний планшетов (**VIEW PLATE SETUP**).
2. Нажмите кнопку создания нового описания планшета (**CREATE A NEW PLATE SETUP**). Откроется соответствующее окно в рабочем модуле программы.
3. Нажмите кнопку программирования по слою краски (**PER DYE LAYER**). Экран выбора флюорофоров откроется автоматически.

Рис.5-12. Кнопка программирования по слою красителя

4. Если требуемые красители не указаны в окне выбора, изменяйте конфигурацию карусели фильтров, пока не появится подходящий список красителей.

5. Нажмите мышью на поле рядом с первым выбранным красителем.
6. Нажмите мышью на цветную пиктограмму для присвоения цвета флюорофора.
7. Повторите шаги 6 и 7 для всех красителей.
8. Нажмите кнопку послойной загрузки красителей (**SAMPLES: PER DYE LAYER LOADING**) для смены окна.
9. Выберите краситель и далее задайте тип пробы в каждой лунке для слоя этого красителя, выбирая подходящую пиктограмму из окна и щелкая мышью на лунку для ее назначения.

- Когда Вы определяете, какой стандарт будет в лунке, Вы также должны ввести количество этого стандарта в окошке определения стандартов (**DEFINE STANDARTS**). Если стандарты задаются в последовательных разведениях, можно ввести количество первого стандарта и программа автоматически рассчитает концентрации всех других стандартов.
- Нажмите на верхний левый угол окна для выделения всех 96 лунок одновременно.
- Нажмите на указатель столбца или строки, чтобы выделить целый столбец или строку соответственно.
- Перетаскивайте лунки для задания повторяющихся стандартов или опытных образцов.
- Если Вы сделали ошибку, используйте пиктограмму очистить (**ERASE**). Вы можете удалить установки во всех лунках одновременно нажатием мыши на верхний левый угол изображения планшета.
- При необходимости измените нумерацию стандартов или опытных проб путем ввода нового номера в окошко с пометкой следующего репликативного номера (**NEXT REPLICATE NUMBER IS**).

10. Повторите предыдущий шаг для всех оставшихся красителей.
11. Дважды щелкните на текстовое окно установок планшета и введите новое имя для файла описания планшета.
12. Нажмите кнопку сохранения установок планшета (**Save this plate setup)** или кнопку проведения реакции по выбранному протоколу (**Run with selected protocol),** которые позволяют сохранить созданный файл и начать реакцию соответственно.

5.2.4. Краткое руководство по редактированию сохраненного планшета в режиме слоя краски

1. В блоке библиотеки выберите кнопку просмотра описаний планшетов (**VIEW PLATE SETUP**).
2. В верхнем левом углу окна выберите диск, где находятся сохраненные файлы описаний планшетов.
3. Найдите каталог, где хранятся файлы описаний планшетов.
4. выберите желаемый файл в окне файлов описаний планшетов (**PLATE SETUP FILES**).
5. Нажмите кнопку редактирования описания планшета (**EDIT THIS PLATE SETUP**). Откроется окно редактирования описаний планшетов рабочего модуля.
6. Если Вы хотите задать дополнительные красители, нажмите **SELECT FLYOROPHORES**. Если нет, сразу переходите к пункту 11.
7. Нажмите на поле рядом с первым выбранным красителем.
8. Нажмите на цветную пиктограмму для присвоения цвета флюорофору.
9. Повторите шаги 7 и 8 для остальных красителей.
10. Нажмите кнопку послойной загрузки красителей (**SAMPLES: PER DYE LAYER LOADING**) для смены окна.
11. Выберите краситель и далее задайте тип пробы в каждой лунке для слоя этого красителя, выбирая подходящую пиктограмму из окна и нажимая на лунку для ее назначения.

- Нумерация стандартов и опытных проб будет начинаться с того места, где она закончилась при создании данного файла.
- Можно изменить назначение лунки, нажав на нее после выбора другого типа образца, или очистить лунку с помощью функции **ERASE**.

- Когда Вы определяете, какой стандарт будет в лунке, Вы также должны ввести количество этого стандарта в окошке количества стандартов (**STANDART QUANTITY**). Если стандарты задаются в последовательных разведениях, можно ввести количество первого стандарта и программа автоматически рассчитает концентрации всех других стандартов.
- Нажмите на верхний левый угол окна для выделения всех 96 лунок одновременно.
- Нажмите на число или букву, чтобы выделить целый столбец или строку соответственно.
- Перетаскивайте лунки для задания повторяющихся стандартов или опытных образцов.
- Если Вы сделали ошибку, используйте пиктограмму очистить (**ERASE**). Вы можете удалить установки во всех лунках одновременно нажатием на верхний левый угол схемы планшета.
- При необходимости измените нумерацию стандартов или опытных проб путем ввода нового номера в окошко с пометкой следующего репликативного номера (**NEXT REPLICATE NUMBER IS**).

12. Повторите предыдущий шаг для всех оставшихся красителей.
13. Если Вы хотите сохранить файл под новым именем, дважды щелкните мышью на текстовое окно описания планшета и введите новое имя для файла установки планшета.
14. Нажмите кнопку сохранения описания планшета (**Save this plate setup)** или кнопку проведения реакции по выбранному протоколу (**Run with selected protocol),** которые позволяют сохранить созданный файл и начать амплификацию соответственно.

5.2.5. Редактирование описания планшета: образцы

В окне редактирования установок планшета (**EDIT PLATE SETUP**) рабочего блока программы, опция образцы (**SAMPLES**) позволит вам определить, какие лунки использовались на планшете, куда были поставлены стандарты, анализируемые пробы, бланки и контроли, а также количество стандартов. Пиктограммы для каждого типа образца выбираются на панели пиктограмм.

Рис.5-13. Пиктограммы образцов.

А. Функции пиктограмм. Панель пиктограмм содержит следующие пиктограммы, которые могут быть использованы для определения типа образца в каждой лунке на схеме планшета (**PLATE LAYOUT**) (Рис. 5-13).

Описание пиктограмм.

Курсор (CURSOR). Используется для выбора определенной лунки на схеме планшета.

Стандарт (STANDART). Используется для определения лунок, которые содержат заранее определенное количество матрицы. Лунки на схеме планшета, заданные как содержащие стандарт, получают последовательные номера по мере их выделения на схеме планшета. Те лунки, где стандарт содержится в одинаковой концентрации, получают одинаковый номер (см. раздел 5.2.3.4). Поле выбора стандартов на правой стороне окна редактирования установок планшета активно, когда активна пиктограмма **STANDART** и выделена лунка, содержащая стандарт. Концентрация матрицы в каждом стандарте должна быть описана в текстовом поле количества **(QUANTITY)** и единицы измерения выбраны из списка в окне единиц **(UNITS LIST)** (см. раздел 5.2.3.3).

Неизвестный (UNKNOWN). Пиктограмма используется для выбора лунок, содержащих неизвестное количество исследуемой матрицы. Лунки в схеме планшета, определенные как неизвестные, получают последовательные номера по мере их выбора. Повторы, куда

исследуемый материал добавляется в одинаковом количестве, получают один и тот же порядковый номер.

Бланк (BLANK). Пиктограмма используется для выбора лунок, в которых нет реакционной смеси.

+Контроль (+CONTROL). Эта пиктограмма позволяет Вам определить те лунки, где содержится образец с той матрицей, которая интересует исследователя. В исследованиях по конечной точке представляется полезным для определения диапазона результатов. Используйте эту пиктограмму, чтобы задать контроли-гомозиготы в дискриминационном анализе аллелей.

-Контроль (-CONTROL). Пиктограмма используется для выбора лунок, куда будут добавлены реакционные смеси, не содержащие один или несколько компонентов. В исследованиях по конечной точке представляется полезным для определения диапазона результатов. Используйте эту пиктограмму, чтобы задать контроли без матричной ДНК в дискриминационном анализе аллелей.

Чистый краситель **(PURE DYE).** Используется для определения лунок, содержащих чистый краситель, при составлении протоколов калибровки чистыми красителями.

Очистить **(ERASE).** Пиктограмма отменяет выбор лунки. Также удаляется спецификация красителя.

B. **Активация и использование пиктограмм панели для определения типа образца***.*

В режиме целого планшета, все слои красителей определяются одновременно, так что если образец определен как неизвестный в одном слое краски, он принимается неизвестным для всех остальных красителей. В режиме слоя краски образцы определяются послойно.

1. Находясь в режиме слоя красителя, выберите флюорофор, В противном случае, пропустите этот пункт.
2. выберите пиктограмму **(ICON)** на панели пиктограмм и активируйте ее (Рис. 5-13). Пиктограмма будет выделена.
3. На схеме планшета определите место образца, Выделяя желаемые лунки. Изображение появится в этих лунках.

Несколько лунок может быть Выделено одновременно следующими способами:

- для выделения целого планшета щелкните мышью в левом верхнем углу;
- для выделения целого столбца щелкните мышью на номер заголовка этого столбца;
- для выделения целой строки щелкните мышью на букву обозначения этой строки;
- для выделения нескольких лунок перетаскивайте курсор над этими лунками.

В этих случаях пиктограммы появятся в соответствующих столбцах, строках или группах лунок. Этот способ задания лунок удобно использовать для спецификации повторяющихся стандартов или образцов. Пиктограммы появляются в полях лунок, когда клавиша мыши отпускается. Если повторно выделить лунку новой пиктограммой, старая пиктограмма будет заменена на новую.

В режиме целого планшета на схеме планшета показываются все типы образцов, ранее заданных в конкретных лунках.

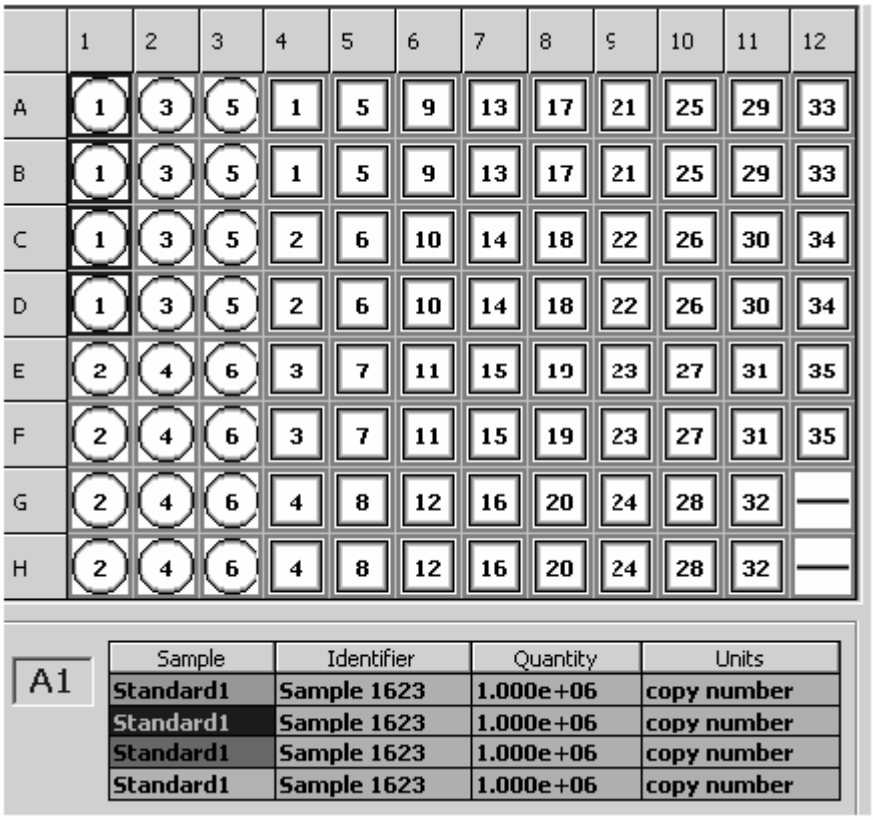


Рис.5-14. Схема планшета в режиме целого планшета.

В режиме слоя красителей поля образцов показывают те типы, которые были заданы для текущего красителя. Лунки, содержащие образцы, заданные в других слоях красителей, кроме текущего, будут выделены цветом, но без представления типа образца.

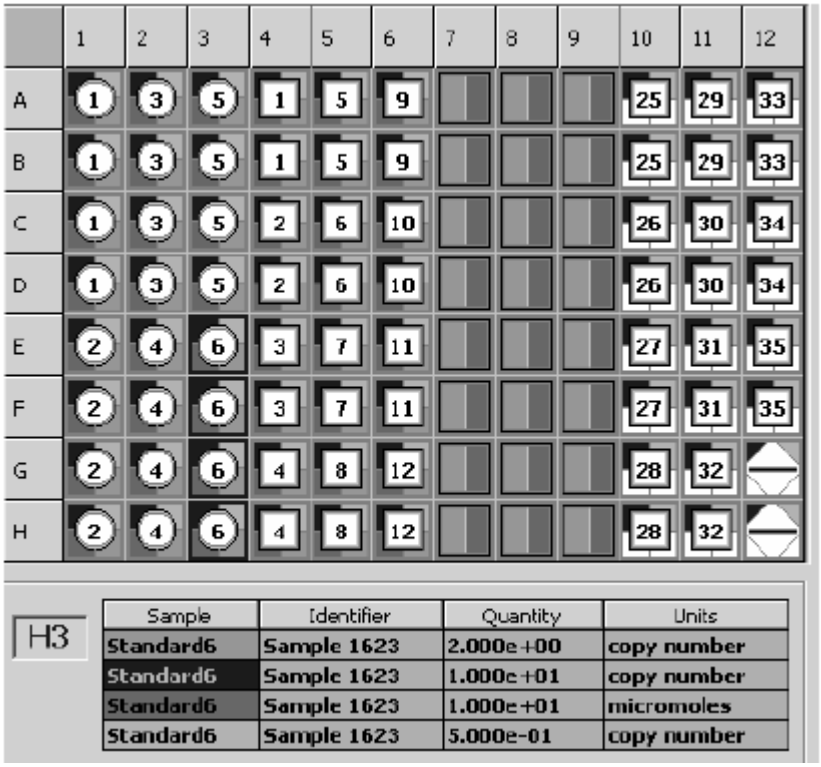


Рис.5-15. Схема планшета в режиме слоя красителя.

C. Назначение количества стандарта, идентификаторов и единиц.

В режиме целого планшета все стандарты в одной и той же лунке предполагаются имеющими одинаковую концентрацию для всех слоев красителей. Если стандарт определен в 100 копий в одном слое, этот стандарт должен иметь 100 копий во всех других слоях этой лунки. В режиме слоя красителя каждый стандарт определяется для каждого слоя отдельно, что позволяет задавать различные концентрации стандартов в одной лунке для каждого слоя красителя.

Количество стандартов может быть введено одновременно с заданием типа образца в лунке, или после этого. Если стандарт применяется в последовательных разведениях, программа автоматически рассчитает все концентрации на основании начальной концентрации и фактора разведения.

Для определения количества стандарта в одной репликативной группе для конкретного эксперимента (если стандарты не разводятся) необходимо:

1. В режиме слоя красителя выбрать флюорофор, или пропустить этот шаг.
2. Нажать на пиктограмму стандартов и установить ее в конкретной лунке или перетащить курсором в несколько лунок.
3. Определить единицы измерения для стандартов.
4. Ввести значение в окно количества стандартов (**STANDART QUANTITY**).
5. Присвоить название стандарту в окне идентификаторов (**IDENTIFIERS**).
6. Повторить шаги 2-5 для каждого нового стандарта.
7. В режиме слоя красителя повторить шаги 1-6 для всех остальных флюорофоров.

По-другому, Вы можете задать положение всех стандартов в лунках, затем определить количество стандартов, идентификаторы и единицы сразу в одной репликативной группе. Для этого:

1. В режиме слоя красителя выбрать флюорофор, или пропустить этот шаг.
2. Нажать на пиктограмму стандартов и установить ее в конкретной лунке или перетащить курсором в несколько лунок.
3. Повторить предыдущий шаг для определения положения всех других стандартов.
4. Нажмите пиктограмму указателя.
5. Нажмите на лунку любого повтора первого стандарта.
6. Выберите тип единицы измерения для стандартов.
7. Ввести значение в окно количества стандартов (**STANDART QUANTITY**).
8. Присвоить название стандарту в окне идентификаторов (**IDENTIFIERS**).
9. Выделите следующий стандарт и повторите шаги 6-8.
10. Если Вы находитесь в режиме слоя краски, повторите шаги 2-9 для всех других красителей.

Для программирования стандартов в серии разведений:

1. В режиме слоя красителей выбрать флюорофор, или пропустить этот шаг.
2. Нажать на пиктограмму стандартов и установить ее в конкретной лунке или перетащить курсором в несколько лунок.
3. Повторить предыдущий шаг для определения положения всех других стандартов.
4. Нажмите пиктограмму указателя после определения положения всех стандартов на схеме планшета.
5. Нажмите на определитель серии разведений (**DEFINE A DILUTION SERIES**) для показа полей спецификации стандартов. Будут показаны номера начальной и конечной лунки, в которых находятся стандарты. Можно вывести некоторые лунки из расчетов, если это необходимо. Для исключенных стандартов расчета концентрации производиться не будет.

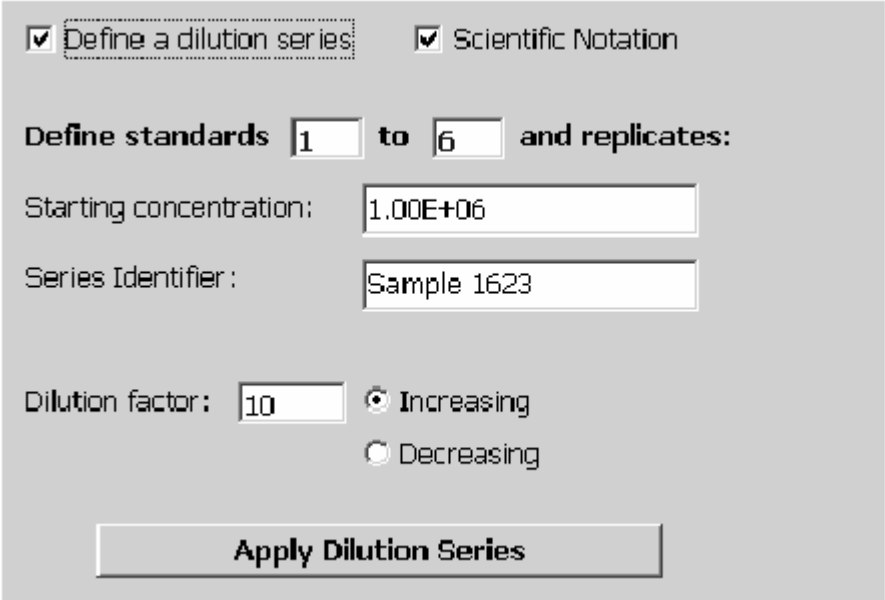


Рис.5-16. Окно расчета серии разведений.

6. Введите концентрацию 1-го стандарта в поле начальной концентрации. Для ввода нажмите кнопку **SCIENTIFIC NOTATION**. В этом режиме значения экспоненты принимаются как положительные, если перед ними не поставлено знака «-».
7. Напишите имя стандарта в окне идентификаторов серии (**SERIES IDENTIFIER**).
8. Введите значение в окне фактора разведения (**DILUTION FACTOR**). По умолчанию установлен фактор 10 для серии 10-кратных разведений.
9. выберите увеличение (**INCREASING**) или уменьшение (**DECREASING**) концентрации в серии разведений начиная с 1-го стандарта.
10. Для расчета и назначения концентраций стандартов в серии разведений нажмите **APPLY DILUTION SERIES**.
11. Находясь в режиме слоя красителя, выберите следующий флюорофор и повторите шаги 1-10.

Замечание по использованию расчета в серии разведений: если стандарты ранжированы в репликативных группах с 1-й по 5-ю, то расчет производится с постоянной кратностью по всему диапазону концентраций. Это означает, что если используется 10-кратный фактор разведения, начиная с 1е10 для 1-й реплики, то программа присвоит значение 10_9 для 2-й реплики, 10_8 для 3-й, 10_7 для 4-й, и 10_6 для 5-й реплики. В случае если ранжированы 1, 2, 3 и 5 стандарты, а 4-й исключен, то программа присвоит значение 10_6 для реплики 5, как будто стандарт 4 имеется в расчетах.

D. Редактирование количества стандартов, идентификаторов и единиц измерения.

В режиме целого планшета все стандарты в каждой лунке предполагаются имеющими одинаковую концентрацию для всех слоев красителей, так что если стандарт определен в 100 копий в одном слое, этот стандарт должен иметь 100 копий во всех других слоях этой лунки. В режиме слоя красителя каждый стандарт определяется для каждого слоя красителей отдельно, что позволяет задавать различные концентрации стандартов в одной лунке для каждого слоя красителей.

Количество стандартов может быть изменено, и после сохранения текущего описания планшета.

Для изменения количества стандартов одной репликативной группы, если не применялся расчет разведений, необходимо:

1. В режиме слоя красителей выбрать флюорофор, или пропустить этот шаг.
2. Нажмите на лунку в группе реплик стандарта для ее редактирования.

3. выберите новые единицы, если необходимо. Если Вы смените единицы для одного стандарта, они изменятся для всех стандартов в данном слое краски (или для всех стандартов планшета в режиме целого планшета).
4. Ввести значение в окно количества стандартов (STANDART QUANTITY), если требуется.
5. При необходимости присвоить название стандарту в окне идентификаторов **(IDENTIFIERS).**
6. Выделите следующий стандарт и повторите шаги 2-5.
7. Если находитесь в режиме слоя красителя, повторите шаги 1-6 для всех других красителей.

• Для редактирования стандартов в серии разведений:

1. В режиме слоя красителя выбрать флюорофор, или пропустить этот шаг.
2. Нажмите на любую лунку в серии стандартов, подлежащих редактированию.
3. Нажмите на определитель серии разведений (**DEFINE A DILUTION SERIES**) для показа полей спецификации стандартов. Будут показаны номера начальной и конечной лунки, в которых находятся стандарты. Можно вывести некоторые лунки из расчетов, если это необходимо. Для исключенных стандартов расчета концентрации производиться не будет.
4. Введите концентрацию 1-го стандарта в поле начальной концентрации. Для ввода нажмите кнопку **SCIENTIFIC NOTATION**. В этом режиме значения экспоненты принимаются как положительные, если перед ними не поставлено знака «-».
5. Напишите новое имя стандарта в окне идентификаторов серии **(SERIES IDENTIFIER)** или оставьте старое имя.
6. При необходимости измените значение в окне фактора разведения **(DILUTION FACTOR).** По умолчанию установлен фактор 10 для серии 10-кратных разведений.
7. Выберите увеличение **(INCREASING)** или уменьшение **(DECREASING**) концентрации в серии разведений начиная с 1-го стандарта.
8. Для перерасчета концентраций стандартов в серии разведений нажмите APPLY **DILUTION SERIES**.
9. Если находитесь в режиме слоя красителя, повторите шаги 1-6 для всех других красителей.

D. Редактирование номеров стандартов и опытных проб.

При определении лунок на схеме планшета, как содержащих стандарты **(STANDARTS**) или опытные пробы (**UNKNOWNS**), эти лунки получают последовательные номера. Нумерация этих лунок может быть изменена по желанию пользователя следующим образом:

1. На панели инструментов выберите **STANDART** или **UNKNOWN** и выделите требуемую пиктограмму.
2. Введите желаемый номер в окно номера следующей реплики **(NEXT REPLICATE NUMBER IS).**
3. выберите требуемую лунку или лунки. Имейте в виду, что при выборе дополнительных лунок они нумеруются на единицу больше, чем номер в предыдущей лунке.

5.2.6. Выбор и загрузка флюорофоров в режиме целого планшета

Вид окна редактирования описания планшета в режиме выбора и загрузки флюорофоров позволяет пользователю выбрать красители и, в режиме целого планшета, выбрать лунки, которые будут исследованы для каждого выбранного красителя.

Ниже приведено подробное описание этой процедуры (см. рис. 5-9).

1. Если Вы создаете новое описание планшета, схема планшета будет не заполнена при открытии окна выбора и загрузки красителей **(SELECT AND LOAD FLYOROPHORES).** При редактировании существующего файла описания планшета некоторые лунки могут быть окрашены одной или несколькими красителями. В любом случае список красителей будет показан в окне выбора красителей. Если выведены не все красители, которые предполагается использовать в эксперименте, можно сменить конфигурацию

карусели фильтров. Подробно конфигурации каруселей фильтров и выбор красителей обсуждаются в Приложении L.

2. В окне списка красителей выберите один из них, отметив поле рядом с названием этого красителя. После выбора остальные имена красителей станут серого цвета. Для отмены выбора нажмите на отмеченное поле еще раз.
3. Далее определите цвет красителя нажатием на одну из цветных пиктограмм. Вы должны выбрать пиктограмму цвета, который еще не использовался **(COLOR NOT USED).**
4. Повторите шаги 2 и 3 до 4-х раз, пока 4 возможных красителя не будут выбраны и для них не будет задан цвет.
5. Теперь можно описать, в каких лунках будет происходить наблюдение, и какие красители в них будут наблюдаться. Нажмите пиктограмму цвета желаемого красителя, при этом названия красителя будет выделено.
6. Отметьте все лунки, в которых будет учитываться поведение выбранного в пункте 5 красителя. При выделении лунки она будет приобретать цвет этого красителя. Для ускорения программирования можно нажать верхний левый угол схемы планшета, чтобы выделить все лунки, в которых будет происходить реакция. Можно выделить столбец или строку нажатием числа или буквы соответственно. Можно также перетаскивать курсор при нажатой левой кнопке мыши через участки схемы планшета, при этом все загруженные лунки будут выделены. В пустой лунке задать краситель нельзя, перед этим должен быть определен тип образца. Для задания типа образца кликните кнопку загрузки образцами всего планшета **(SAMPLES: WHOLE PLATE LOADING)** и следуйте инструкциям, показанным сверху для определения типа образца.
7. Повторите шаги 5 и 6 для каждого следующего красителя.
8. Если Вы хотите поменять красители в определенной лунке, то сначала очистите окно лунки от предустановленных красителей с помощью функции **ERASE**. Используйте этот инструмент аналогично заданию цвета флюорофора. Далее повторите шаги 5 и 6 для остальных красителей.
9. Для заметок используйте поле **NOTES.**
10. Когда все красители определены, дважды кликните на поле имени файла **(PLATE SETUP FILENAME)** в левом верхнем углу окна, введите имя файла и нажмите кнопку сохранения **(SAVE THIS PLATE SETUP).** Откроется стандартное диалоговое окно сохранения, в котором надо нажать **SAVE** еще раз. Для начала эксперимента с текущим файлом протокола, нажмите **RUN WITH SELECTED PROTOCOL**.

Замечание: Вы можете сохранить файл описания планшета и выбранный файл протокола в директорию iCycler или любую поддиректорию этой директории.

5.2.7. Выбор флюорофоров в режиме слоя красителя.

Окно выбора красителей **(SELECT FLYOROPHORES)** в режиме редактирования описания планшета позволяет выбрать те красители, которые будут использованы в эксперименте. Все назначения типа образца и типа красителя делаются в окне послойного описания образцов **(SAMPLES: PER DYE LAYER LOADING)** в режиме редактирования протокола.

Детальное описание процедуры (см.рис. 5-11)

1. Независимо от того, создаете Вы новый файл описания планшета или редактируете существующий файл, при выборе красителей в режиме слоя красителя схема планшета не выводится на экран. В обоих случаях список красителей будет представлен в окне выбора флюорофора **(SELECT OR DESELECT FLYOROPHORES).** Измените конфигурацию карусели фильтров, если не все красители показаны в списке. Подробно параметры колеса фильтров и выбор красителей обсуждаются в Приложении L.

2. В списке красителей выберите один из них, отметив поле рядом с названием этого красителя. После выбора остальные имена красителей станут серого цвета. Для отмены выбора нажмите на отмеченное поле еще раз.

3. Далее определите цвет красителя нажатием на одну из цветных пиктограмм. Вы должны выбрать пиктограмму цвета, который еще не использовался **(COLOR NOT USED).**
4. Повторите шаги 2 и 3 до 4-х раз, пока 4 возможных красителя не будут выбраны и для них не будет задан цвет.
5. Для заметок используйте поле **NOTES.**
6. Когда все красители для данного планшета определены, нажмите поле **SAMPLES: PER DYE LOADING** и послойно определите типы образцов в лунках.

5.3. ОКНО ПРОСМОТРА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПРОБ

Эта кнопка выводит схему планшета в представлении по слоям красителей. В этом окне нельзя редактировать. Окно предназначено для отображения параметров, введенных в режиме SAMPLES окна редактирования установок планшета.

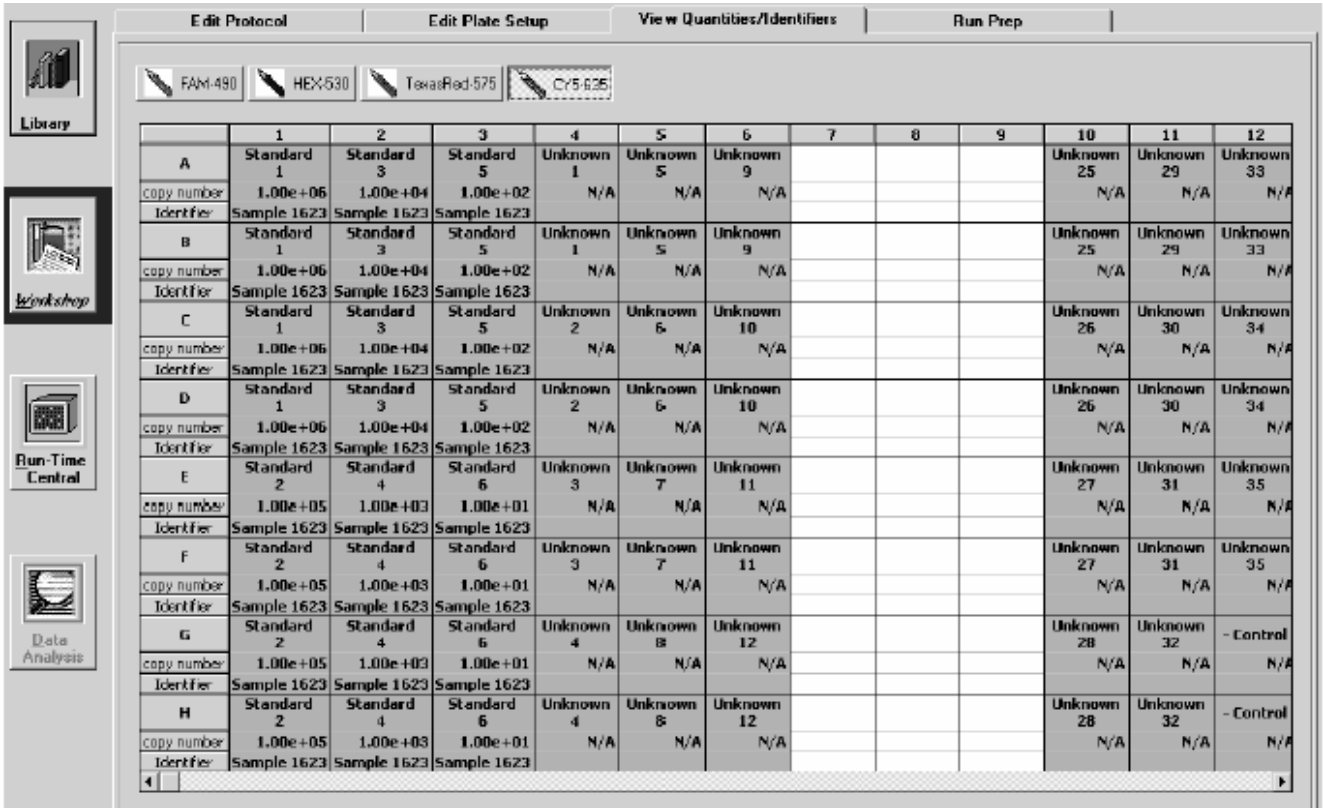


Рис.5-17. Просмотр количеств и идентификаторов.

5.4 ОКНО ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Нажатие кнопок проведения анализа по выбранному описанию планшета (**RUN WITH SELECTED PLATE SETUP**) или выбранному протоколу (**RUN WITH SELECTED PROTOCOL**) из Модуля библиотеки или Рабочего модуля открывает окно подготовки проведения анализа (**RUN PREP**) Рабочего модуля. Прибор начнет проведение ПЦР по выбранному протоколу после нажатия кнопки **BEGIN RUN** в верхней части окна проведения анализа.

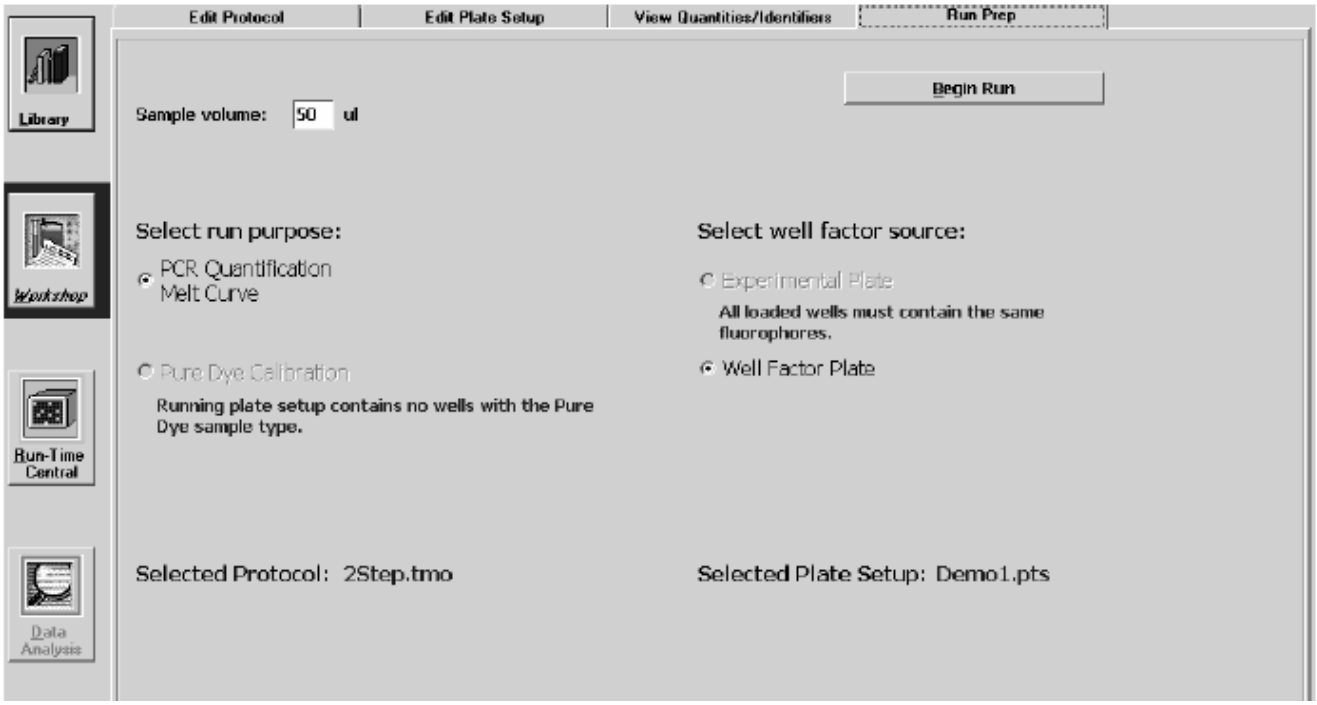


Рис.5-18. Окно проведения анализа.

Описание процедуры:

1. Удостоверьтесь, что в полях протокола и описания планшета записаны требуемые файлы. Если записаны другие файлы, возвратитесь в Модуль библиотеки и выберите нужный протокол из окна просмотра протоколов **(VIEW PROTOCOL)** и/или нужное описание планшета из окна просмотра описаний планшетов **(VIEW PLFTE SETUP)** соответственно.
2. Подтвердите сделанный выбор цели эксперимента. Калибровка чистыми красителями запускается нажатием соответствующей кнопки. Описание процедуры калибровки приведено ниже.
3. Укажите объем образца в каждой лунке.
4. выберите источник формирования факторов лунок. Если применяется внешний планшет, вставьте его в прибор. Если Вы используете динамические факторы лунок, вставьте экспериментальный планшет в прибор.
5. Нажмите кнопку начала анализа **(BEGIN RUN).** Откроется диалоговое окно сохранения **(SAVE).** Введите имя файла оптических данных. Данные будут сохраняться автоматически в процессе эксперимента, если позволяет время в конце цикла сбора данных. При недостатке времени данные будут сохранены только в конце эксперимента.

Замечание: при сбое напряжения в сети во время эксперимента и перезагрузке компьютера собранные в процессе эксперимента данные обычно находятся в файле, созданном во время начала опыта. Теряются данные последнего цикла. В зависимости от стадии цикла, на которой произошел сбой, полученные данные могут также находиться во временном файле с именем **TEMP DATE TIME**, где **DATE** и **TIME** показывают день и время эксперимента. Этот файл находится в папке **USER1.**

5.4.1. Факторы лунок.

Для унификации всех 96 измерительных каналов оптической системы (создания единой измерительной шкалы) вводятся поправочные или нормировочные коэффициенты, так называемые Факторы лунок (Well Factors или WF). С помощью этих коэффициентов рассчитанных для каждой лунки производится выравнивание всех измерительных каналов и минимизация всех неоднородностей системы регистрации и погрешностей дозирования.

Расчет Факторов лунок необходимо производить перед началом каждого эксперимента или в процессе эксперимента. Накопление сигнала в каждом канале производится для каждой пары фильтров (возбуждения и поглощения) используемых в эксперименте.
Предлагаются две схемы определения факторов лунок – непосредственно с экспериментального планшета, так называемый динамический WF, или со вспомогательного планшета.

Наиболее оптимальный и легкий метод расчета WF первый, то есть с использованием экспериментального планшета. Для этого метода необходимо, чтобы экспериментальные лунки содержали равную концентрацию и композицию флюорофоров. Концентрация по каждому красителю должна быть одинакова во всех регистрируемых лунках, тогда как концентрация разных флюорофоров в каждой индивидуальной лунке может быть различной. Например: если во всех экспериментальных лунках содержится по 50 nM fluorescein, 100 nM HEX, 125 nM TexasRed and 200nM Cy5, можно использовать этот планшет для сбора WF. В случае если часть лунок содержит 100 nM fluorescein, а другая часть - 200 nM fluorescein, определение динамических WF с экспериментального планшета невозможно. В этом случае необходимо использовать вспомогательный планшет для определения WF.

Режим сбора данных и расчета Факторов лунок (WF) выбирается в секции меню “**Well-Factor Source**”. Вы должны сделать активным режим “**Experimental Plate**” (динамический WF, задан по умолчанию) или “**Well Factor Plate”** в режиме “**RunPrep**”.

Накопление сигнала и расчет динамических WF производится автоматически после нажатия кнопки “**Begin Run**”, то есть в случае использования вспомогательного планшета его необходимо установить в прибор заранее. При этом программа сама предложит Вам поменять его на экспериментальный планшет после завершения операции определения WF.

В большинстве случаев при использовании свободных интеркалирующих красителей, таких как SybrGreen I или EthBr, WF не может быть определен на экспериментальном планшете, так как флюоресценция данных красителей крайне низка в отсутствии связывания с 2-х цепочечной ДНК.

В этом случае можно использовать один из трех подходов:

- использовать отдельный планшет для формирования WF;
- для экспериментов с красителем SYBR-Green I также можно использовать iQ SYBR-Green supermixt (Кат.№ 170-8880), который уже включает fluorescein;
- в экспериментальный планшет помимо интеркалирующего красителя, добавляется малый объем разведенного раствора fluorescein, обладающего способностью флюоресценции при температуре 95°C. В этом случае динамический WF может быть определен по этому свечению неинтерферирующему с сигналом самой реакции.

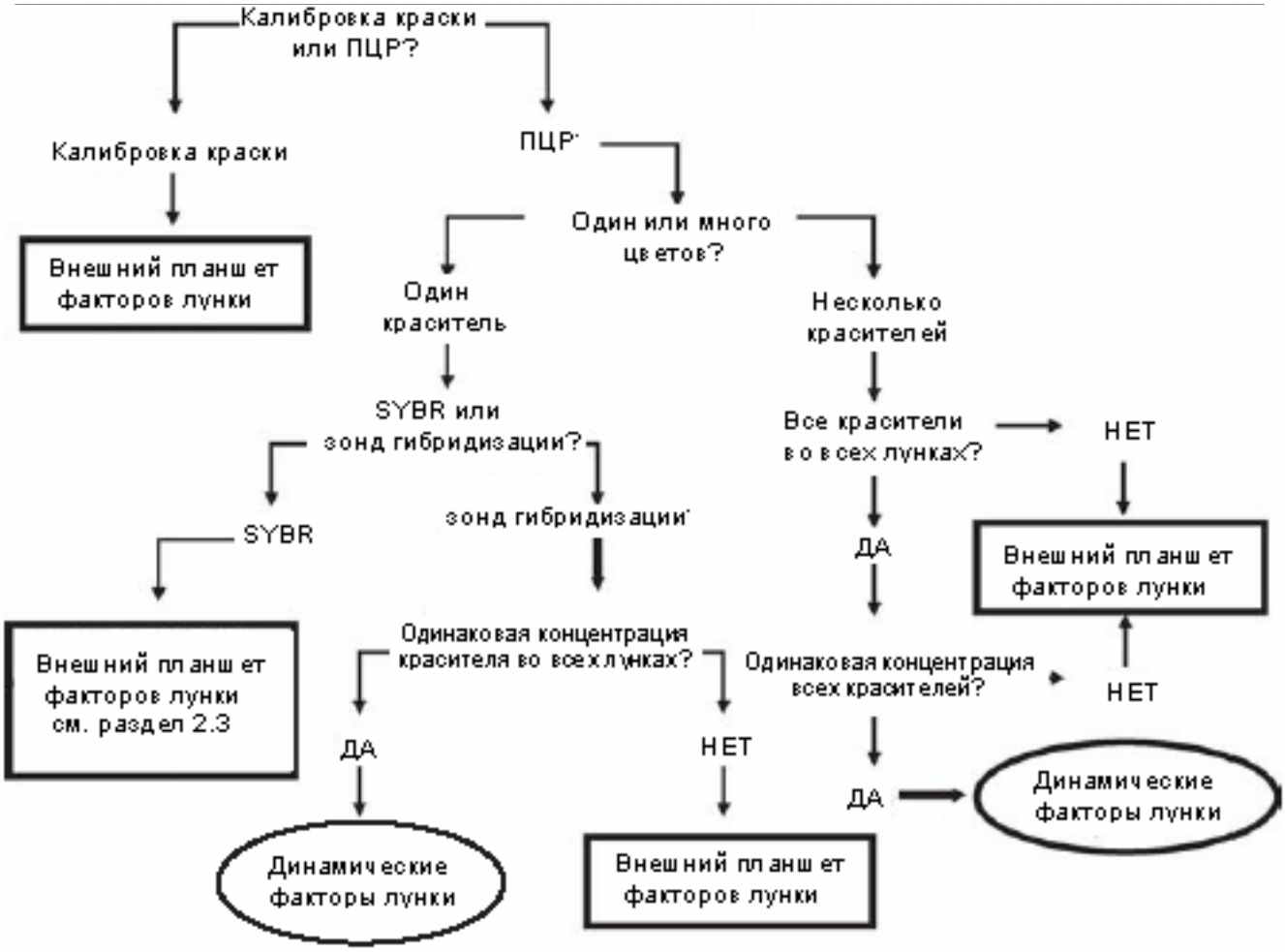


Рис.5-19. выбор способа определения факторов лунок.

A. Источник факторов лунок: экспериментальный планшет.

Динамические WF начинают определяться в момент первого нагрева планшета Выше 90°C. Это в частности важно в случае использования метода детекции с применением зондов, включенных во вторичную структуру (вторичная структура должна быть разомкнута для получения адекватного сигнала). Поскольку измерение сигнала красителя и Расчет WF не происходит до момента нагрева планшета до 90°C, то до этого момента в протоколе эксперимента не может производиться регистрация сигнала от исследуемых образцов.

B. Использование экспериментального планшета для определения факторов лунки.

При выборе алгоритма расчета WF по экспериментальному планшету, программа автоматически вставляет короткий протокол перед 1-м шагом, при котором температура достигает 90°C. Этот протокол **DYNAMICWF.tmo** включает 90 секундный шаг при 95°C. Вы можете учесть это при составлении основного ПЦР протокола. Например, если первый этап термального протокола – 10мин при 95°C, можно изменить его до 8,5 мин. при 95°C – 1,5 мин будут добавлены при вставке короткого протокола для сбора WF.

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint	Melt Curve
1	1	1	00:30	95.0	
2	2	1	00:30	95.0	

Рис.5-20. Протокол динамических факторов лунки.

Во время выполнения этого дополнительного протокола каждая пара фильтров, которая используется в эксперименте, устанавливается в рабочую позицию и система регистрирует оптический сигнал, после чего программа определяет WF.

Во время сбора данных ФЛ на экране отображения выполнения протокола анализа (**RUN TIME CENTRAL**) выводится соответствующее сообщение.

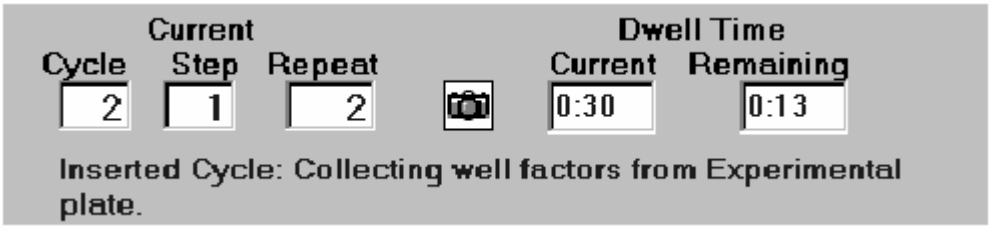


Рис.5-21. Накопление динамических факторов лунки.

Поставляемый фирмой Bio-Rad краситель iQ-SYBR-green supermixt (Кат.№ 170-880 или 170-8882) включает добавку небольшого количества FAM, что позволяет определять динамические ФЛ. Динамические ФЛ можно определить и с помощью других смесей SYBR-green I, приготовленных пользователем, с добавлением флюоресцеина до конечной концентрации 10 нмоль в реакционной смеси. Для этого сначала приготовьте раствор флюоресцеина с концентрацией 1 мкмоль, разведя в 1000 раз калибровочный раствор, содержащий 1 ммоль флюоресцеина (Кат.№ 170-8780) в буфере для ПЦР (10 mM Tris, pH 8.0, 50 mM KCl, 3 mM MgCl2). Затем добавьте 1 часть разведения к 99 частям рабочей смеси (master mix). Например, добавьте 10 мкл 1 мкмоль флюоресцеина к 990 мкл рабочей смеси для получения конечной концентрации красителя 10 нмоль.

Как только сбор и анализ ФЛ заканчивается, полученные значения сохраняются в файле с расширением opd, и программа продолжает выполнение экспериментального протокола.

C. Источник факторов лунок: вспомогательный планшет.

Определение ФЛ с помощью внешнего планшета имеет смысл в том случае, когда экспериментальный планшет включает различные концентрации или типы красителей в отдельных лунках планшета. Например, Вы должны использовать внешний планшет, если некоторые лунки имеют 100 нмоль флюоресцеина, а другие 200 нмоль флюоресцеина, или если некоторые лунки планшета содержат только флюоресцеин, а другие только техасский красный (как в протоколе калибровки чистыми красителями).

Внешние ФЛ определяются не по экспериментальному планшету, а по отдельному планшету, содержащему в каждой лунке такой объем жидкости, который будет использован в эксперименте. Например, если экспериментальный планшет содержит по 50 мкл образца в лунке, то и калибровочный планшет должен содержать по 50 мкл жидкости в каждой лунке. Типы опытного и калибровочного планшетов и способ запечатывания лунок также должны совпадать. Если планируется проведение эксперимента с одним красителем, планшет ФЛ также может содержать этот краситель. Однако требуется определить оптимальную концентрацию этого красителя. Если предполагается наблюдать более одного красителя, необходимо использовать Раствор для определения внешних факторов лунки (Кат. № 170-8794), поставляемый фирмой Bio-Rad. Этот раствор можно применить и для учета ФЛ в экспериментах с одной краской.

D. Подготовка вспомогательного планшета для определения факторов лунок.

При использовании раствора для определения WF **Cat # 170-8794** необходимо учитывать, что это 10X концентрат. Приготовьте раствор с разведением 1:10 в H2O (1 часть раствора и 9 частей бидистиллированной воды).

- Внесите в лунки такой же объем раствора, какой будет использоваться в экспериментальном планшете. Причем достаточно заполнять только те лунки, которые будут измеряться в эксперименте. Например, если в эксперименте используются все лунки 5-го и 6-го ряда, и в них вносится по 50 мкл жидкости, в планшет для определения ФЛ надо внести по 50 мкл разведенного калибровочного раствора в 5-й и 6-й ряды. Закройте планшет оптической пленкой и, если, есть возможность, центрифугируйте планшет для сбора раствора на дне лунок.

- Вы можете использовать **Imaging Services**, чтобы убедиться, что в данном разведении краситель дает сильный, но не насыщенный сигнал при экспозиции в пределах 80-640 ms для каждой пары фильтров.

D. Использование Вспомогательного Планшета для учета факторов лунки.

Отдельный планшет для сбора WF используется в случае, если концентрация флюорофора в лунках экспериментального планшета различна, или при проведении измерения **Pure Dye Calibration** планшета.

- Поместить вспомогательный WF планшет в iCycler и закрыть крышку.
- Выбрать необходимый протокол эксперимента из библиотеки протоколов и файл описания планшета, после чего нажать кнопку **RUN WITH SELECTED PROTOCOL**.
- В окне **RUN PREP** выбрать Внешний Планшет **(EXTERNAL PLATE)** как источник факторов лунки. Установить другие переменные (объем реакционной смеси и тип протокола), требуемые для проведения эксперимента, и нажмать кнопку начала реакции **(BEGIN RUN).** После этого программа автоматически установит трех-цикловый протокол Externalwf.tmo перед началом вашего протокола.

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Hold	Setpoint	Melt Curve
1	3	1	00:10	☐	95.0	☐
		2	00:30	☐	60.0	☐
2	2	1	00:45	☐	60.0	☐
3	1	1		☑	60.0	☐

Рис.5-22. Протокол внешних факторов лунки.

Этот протокол будет термоциклировать вспомогательный планшет три раза между 95°C и 60°C, после чего задержит температуру при 60°C на 45 сек. В это время каждая пара фильтров, выбранная для эксперимента, на короткое время устанавливается в рабочее положение, и происходит регистрация оптических данных, на основании которых рассчитываются факторы лунок WF. Во время сбора данных в центральном исполнительном модуле выводится соответствующее сообщение (Рис.5-23).

Рис.5-23. Порядок накопления внешних факторов лунки.

После расчета внешних WF iCycler делает паузу в работе. Выньте калибровочный планшет из прибора, вставьте планшет для проведения ПЦР и нажмите кнопку продолжения работы (CONTINUE RUNNING PROTOCOL).

Рис.5-24. Вид экрана после сбора внешних факторов лунки.

5.4.2. Калибровка чистыми красителями

Для каждого эксперимента ПЦР, даже в случае использования одного красителя, требуются данные калибровки чистыми красителями. В отличие от факторов лунок, которые необходимо определять в начале каждого эксперимента, результаты одной калибровки используются постоянно. Новая калибровка требуется только в том случае, когда в анализ добавляется новая комбинация красителей и фильтров.

Данные калибровки чистыми красителями используются для разделения общего потока флюоресценции на составляющие от каждого красителя. Эти данные собираются с помощью соответствующего протокола (**PURE DYE CALIBRATION PROTOCOL**) на планшете, в лунки-реплики которого добавлен калибровочный раствор чистого красителя. Для каждого красителя используется соответствующий калибровочный раствор. Полученные в результате калибровки данные записываются в файл RME.INI, находящийся в директории C:\Program Files\Bio-Rad\iCycler\Ini.

Данные калибровки чистыми красителями могут быть собраны для 16 комбинаций красителей и пар фильтров (до 4 красителей и 4 пар фильтров) на один температурный протокол. В конце цикла калибровки данные автоматически записываются в файл RME, одна запись на каждую комбинацию красителя и пары фильтров. После того, как данные записаны в RME-файл, они могут быть использованы во всех последующих экспериментах, в которых используются прокалиброванные сочетания красителей и пар фильтров. По мере выполнения новых протоколов калибровки RME-файл модифицируется для дополнительных сочетаний красителей и пар фильтров. Если комбинация красителя и пары фильтров, для которой имеется запись в RME-файл, повторяется в последующем протоколе калибровки, новые результаты записываются в RME-файл, а старые результаты удаляются.

Если выбирается установка планшета, включающая комбинацию флюорофора и пары фильтров, для которой нет калибровочных данных по чистому красителю, при попытке начать эксперимент будет выдано соответствующее предупреждение. Дополнительные данные калибровки должны быть включены в RME-файл перед началом эксперимента. Целесообразно архивировать RME-файлы перед проведением нового протокола калибровки чистыми красителями. Сохраните старые RME-файлы путем их переименования, или перемещая их из папки C:\Program Files\Bio-Rad\iCycler\Ini.

В Приложении I приводится пример калибровки чистыми красителями и создания файла RME.

А. Приготовление планшета для проведения калибровки чистыми красителями.

Для получения данных калибровки чистыми красителями, позволяющих разделить оптические сигналы от перекрывающихся спектров красителей, необходимо использовать поставляемые фирмой Bio-Rad растворы калибраторов (Кат. № 170-8792). Растворы приготовлены из однократно меченных олигонуклеотидов и поставляются в рабочем разведении. Представляется важным, чтобы все калибровки чистыми красителями проводились без разведения растворов калибраторов. На одном планшете можно провести определение до 4-х различных калибровочных растворов.

1. Внесите по 50 мкл первого калибровочного раствора в 10 лунок.
2. Повторите эту операцию с другими калибровочными растворами (всего до 4-х растворов), внося их в разные лунки.

3. Заклейте планшет прозрачной пленкой и центрифугируйте в течение короткого времени, чтобы осадить все реагенты на дно лунок.
4. Поскольку концентрации и объемы красителей во всех планшетах не совпадают, необходимо приготовить калибровочный планшет для оценки факторов лунки. Приготовьте калибровочный планшет, как описано выше, и поместите его в анализатор.

Для определения интеркалирующих красителей Вы можете приготовить калибровочный раствор ДНК в концентрации 500 пикограмм/мкл и разведение 1:100000 SYBR-green I или 1мкг/мл этидиум бромида.

Б. Проведение протокола калибровки чистыми красителями.

1. Используйте температурный протокол **PureDyeCalibration.tmo** или создайте протокол, содержащий два цикла. Первый цикл должен включать 1 мин при 55°C. Далее следуют 10 повторов 2-го цикла, также при 55°C по 1 мин. Во время 2-го цикла дважды нажмите кнопку камеры, чтобы собрать данные для анализа в режиме реального времени (пиктограмма камеры желтого цвета).

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint
1	1	1	01:00	55.0
2	10	1	01:00	55.0

Рис.5-25. Протокол калибровки чистыми красителями.

2. Создайте файл описания планшета, в котором отмечено положение для каждых 10 лунок с одинаковым красителем, необходимых для калибровки. В показанном на рис. 5-26 примере видно, что калибровочный раствор красителя FAM находится в лунках B2-B11, Texas Red находится в лунках D2-D11, краситель HEX в лунках F2-F11 и Cy5 в лунках H2-H11.

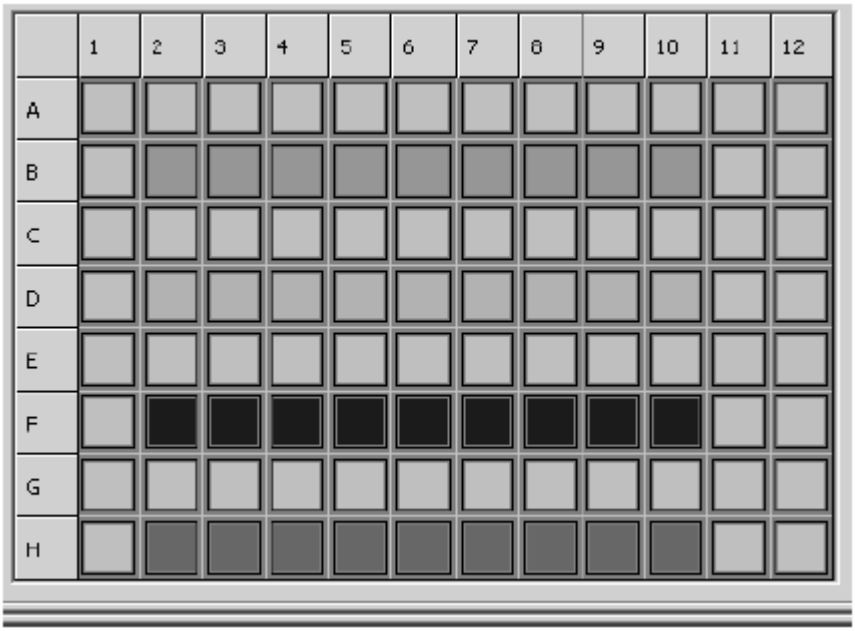


Рис.5-26. Пример установки планшета для калибровки по чистым красителям.

3. При установленной в iCycler плашке для определения факторов лунок, зайдите в блок библиотеки и выберите нужный файл температурного протокола, после чего нажмите **RUN WITH SELECTED PROTOCOL**.
4. В окне проведения анализа (**RUN PREP**) введите объем реагентов для планшета калибровки чистыми красителями. Калибровка будет выбрана автоматически как

задача исследования и внешний планшет будет выбран в качестве источника факторов лунок.

5. Нажмите кнопку начала реакции **(BEGIN RUN**).
6. Введите имя для файла оптических данных и сохраните его **(SAVE**).
7. После этого iCycler проведет короткий цикл с планшетом факторов лунок, запишет оптические данные и рассчитает факторы лунок. Далее прибор сделает остановку в работе.
8. Уберите внешний планшет факторов лунки, вставьте планшет, приготовленный для калибровки и нажмите кнопку **CONTINUE RUNNING PROTOCOL** для продолжения работы.
9. Прибор начнет выполнение протокола калибровки чистыми красителями. Когда необходимый объем информации будет собран, выполнение протокола автоматически прекратится и на экране появится соответствующее предупреждение. Обычно для накопления данных достаточно 4-х циклов. Результаты калибровки будут сохранены в файле RME.ini. Файл opd может быть удален.

6. ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МОДУЛЬ

Вы можете открыть этот модуль автоматически после нажатия кнопки начала анализа (**BEGIN RUN**) в окне **RUN PREP** рабочего модуля, или открыть окно данного модуля программы на экран нажатием соответствующей пиктограммы (**RUN-TIME CENTRAL**). Центральный исполнительный модуль имеет два окна: Термоциклер (**THERMAL CYCLER**) и Сервисный режим камеры (**IMAGING SERVICES**).

6.1 ОКНО ТЕРМОЦИКЛЕРА

Все поля в этом окне предназначены для показа информации и не могут быть отредактированы (Рис. 6-1). На экране имеются три активные кнопки:

- Пауза/Стоп (**PAUSE/STOP**). Используется для остановки исполнения протокола.
- Показать график протокола (**SHOW PROTOCOL GRAPH**)
- Показать карту размещения образцов на планшете (**SHOW PLATE SETUP GRID**).

Эти кнопки позволяют переключать поле в нижней части экрана и показывать работу термоциклера iCycler, или текущие установки планшета с загруженными красителями. Детальное описание этих функций приведено ниже.

Кроме того, из этого окна можно выйти в режим редактирования текущего протокола (см. ниже).

Информационные окна содержат следующие данные:

- Имя файла выполняемого протокола.
- Имя файла текущего описания планшета.
- Время начала эксперимента.
- Расчетное время окончания эксперимента.
- Текущее время задержки. Показано время задержки на данном шаге или на следующем шаге, если в этот момент происходит скачок температуры.
- Остаточное время задержки. Показывается время, которое остается до окончания задержки на данном шаге.
- Текущий цикл, шаг и повтор.

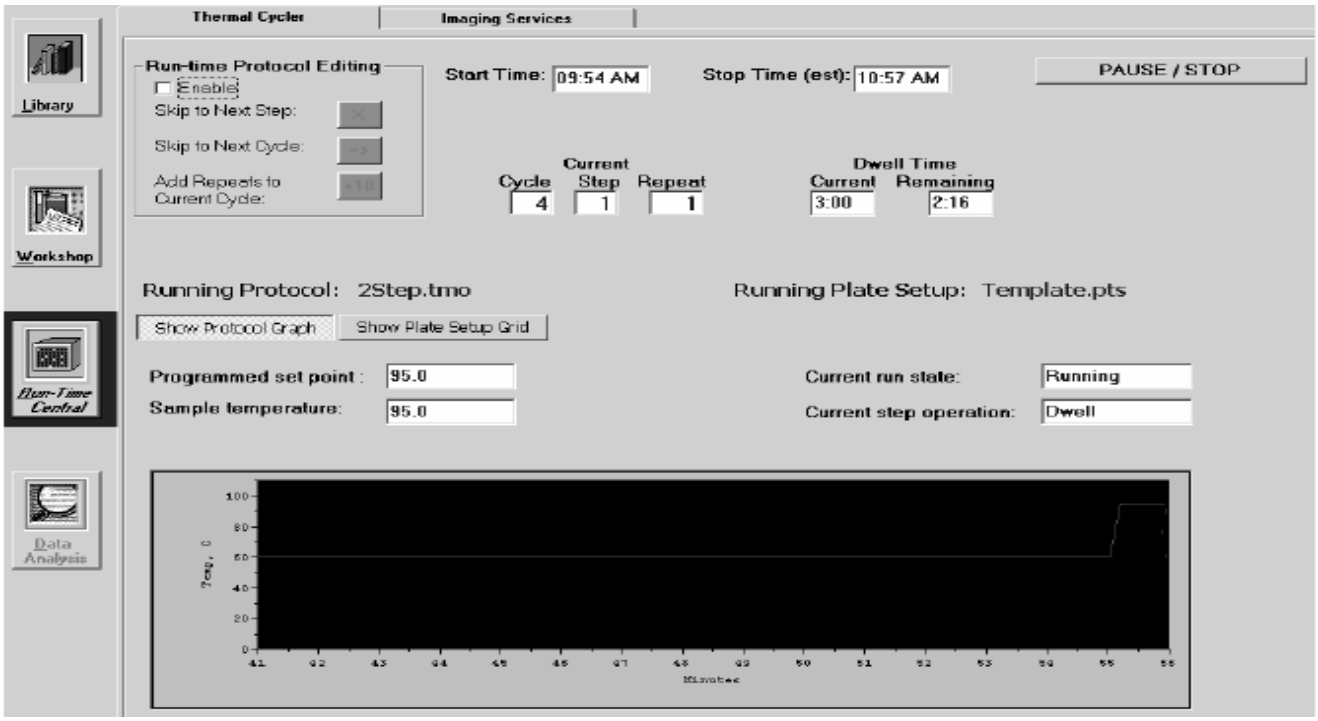


Рис.6-1. Вид окна центрального исполнительного модуля в режиме показа графика протокола.

6.1.1 Редактирование файла исполняемого протокола

Для изменения текущего протокола имеются три возможности: Перейти на следующий шаг (**SKIP TO NEXT STEP**), Перейти на следующий цикл (**SKIP TO NEXT CYCLE**) и Добавить 10 повторов (**ADD 10 REPEATS**). По время исследования эти опции доступны через кнопку Текущий протокол (**RUNNING PROTOCOL**) в центральном исполнительном модуле. Они также перечислены в окне редактирования текущего протокола и доступны через окно **ENABLE** (Рис. 6-2).

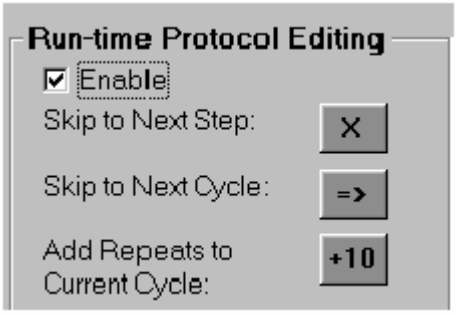


Рис.6-2. Опции редактирования текущего протокола.

A. Переход на следующий шаг.

- Нажмите кнопку **SKIP TO NEXT STEP**, после того как текущий шаг термоциклера достиг установленной температуры. Например, для 2-шагового цикла, включающего 60 мин при 37°C и 30 сек при 95°C, переходите на следующий шаг в любой момент после достижения 37°C, чтобы перевести протокол сразу на шаг с температурой 95°C.
- Для того чтобы выяснить, в каком режиме находится термоциклер в данный момент времени (изменения температуры или задержки на заданной температуре), посмотрите основной вид температурного протокола на приборе или окно термоциклера в центральном исполнительном модуле.

Замечание: при попытке активировать функцию перехода на следующий шаг в то время, когда она недоступна, будет выведено сообщение об ошибке (“**ACTION DENIED**”). Выполнение протокола будет продолжаться без изменений.

B. Переход на следующий цикл.

- Нажмите кнопку перехода на следующий цикл для завершения текущего повтора исполняемого цикла перед скачком температуры, чтобы сразу перейти на следующий цикл. Например, Вы можете использовать эту функцию, когда ваши образцы перешли через порог амплификации, и Вы хотите сразу перейти на стадию плавления.
- Эта функция доступна во время исполнения протокола, во время скачка температуры, и в режиме паузы.

C. Добавление 10 повторов.

- Нажмите кнопку добавления повторов, чтобы присоединить дополнительные повторы к текущему циклу. Эта функция может быть активирована неоднократно, однако общее число повторов не может превышать 600.
- Например, может быть необходимо добавить повторы в эксперименте, когда амплифицируется исходно малое число копий ДНК, чтобы позволить образцам перейти через порог. Если в цикле было 30 повторов, после нажатия кнопки в этом цикле станет 40 повторов.
- Функция добавления повторов может быть использована совместно с функцией перехода на следующий цикл для уменьшения числа повторов в цикле. Нажмите **SKIP TO NEXT CYCLE** во время задержки повтора на установленной температуре, чтобы отменить все оставшиеся повторы текущего цикла, и немедленно нажмите **ADD 10 REPEATS**.
- Например, чтобы уменьшить число повторов с 50 до 25, нажмите **SKIP TO NEXT CYCLE** во время задержки на 5-м повторе, и дважды нажмите **ADD 10 REPEATS**. Таким образом, добавятся 20 повторов к 5 уже пройденным повторам, что и даст требуемые 25 повторов.
- Эта функция доступна во время исполнения протокола, во время скачка температуры, и в режиме паузы.

Замечание: изменения протокола отражаются в окне показа на приборе или в окне термоциклера в центральном исполнительном модуле программы.

6.1.2 Показ графика протокола

При выборе кнопки показа графика протокола (**SHOW PROTOCOL GRAPH**) в нижней части экрана будет показана температурная информация текущего протокола.

- Запрограммированная установочная температура (**PROGRAMMED SETPOINT TEMPERATURE**) и текущая температура (**CURRENT TEMPERATURE**) пробы показана сверху слева. Если выполняется шаг с градиентом температуры, показывается диапазон температур.
- График температуры образца представлен внизу экрана.
- Выполнение текущего шага (**CURRENT STEP OPERATION**). Это поле показывает скачок или инкубацию в текущий момент времени.
- Текущее рабочее состояние (**CURRENT RUN STATE**). Это поле показывает режим, в котором находится iCycler в данный момент: работа, пауза или ожидание.

6.1.3 Показ плана установки плашки

При выборе кнопки показа описания планшета (**SHOW PLATE SETUP GRID**) будет выведена информация о красителях, используемых для проведения эксперимента. Все выбранные красители перечислены вместе с указанием варианта карусели фильтров. Нажмите на цветную пиктограмму данного красителя, чтобы показать лунки, в которых этот краситель имеется, или нажмите просмотр всех красителей (**SHOW ALL FLUORS**) для показа всех красителей одновременно.

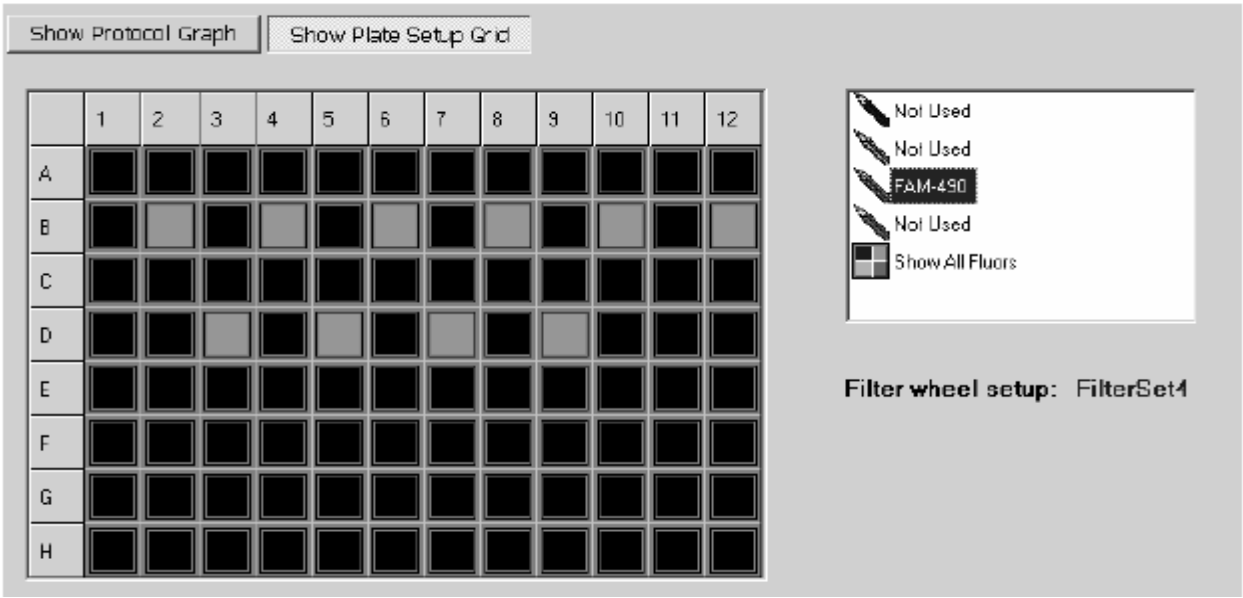


Рис.6-3. Центральное исполнительное окно в режиме показа описания планшета.

6.1.4 Пауза/стоп

При нажатии кнопки Пауза/стоп (**PAUSE/STOP**) Вы можете приостановить выполнение протокола термоциклирования. В случае если iCycler находится в режиме термостата на определенной температуре, это приведет к прерыванию отсчета времени на достигнутой температуре. Прибор будет поддерживать заданную температуру. Нажатие кнопки во время температурного скачка не прервет выполнение этого скачка. Термоциклер Icycler продолжит изменение температуры до следующей заданной протоколом температуры, и перейдет в режим паузы после выхода на эту температуру.

Нажатие **PAUSE/STOP** выводит на экран новое диалоговое окно, в котором можно нажать Продолжить выполнение протокола (**CONTINUE RUNNING PROTOCOL**) для продолжения работы с того момента, когда она была прервана. В окне также имеется опция окончания протокола (**END PROTOCOL**) для выхода из эксперимента на этом этапе.

Если пауза термоциклера продолжается дольше установленного протоколом времени задержки, она появляется в графическом отображении как удлинение этого шага по оси времени. После окончания эксперимента, просмотрите отчет термоциклера iCycler для подтверждения времени паузы (см. руководство пользователя iCycler, раздел 4.3).

6.2 СЕРВИСНЫЙ РЕЖИМ КАМЕРЫ (IMAGING SERVICE)

Основное применение сервисного режима заключается в настройке и юстировке маски, однако возможно и дополнительное применение функций этого режима. Они могут быть использованы для захвата образа экспериментального планшета и проверки поведения флюоресцентного зонда, или для оценки степени завершенности реакции. Используя графический образ экспериментального планшета, пользователь может получить данные флюоресценции для всех 96 лунок планшета.

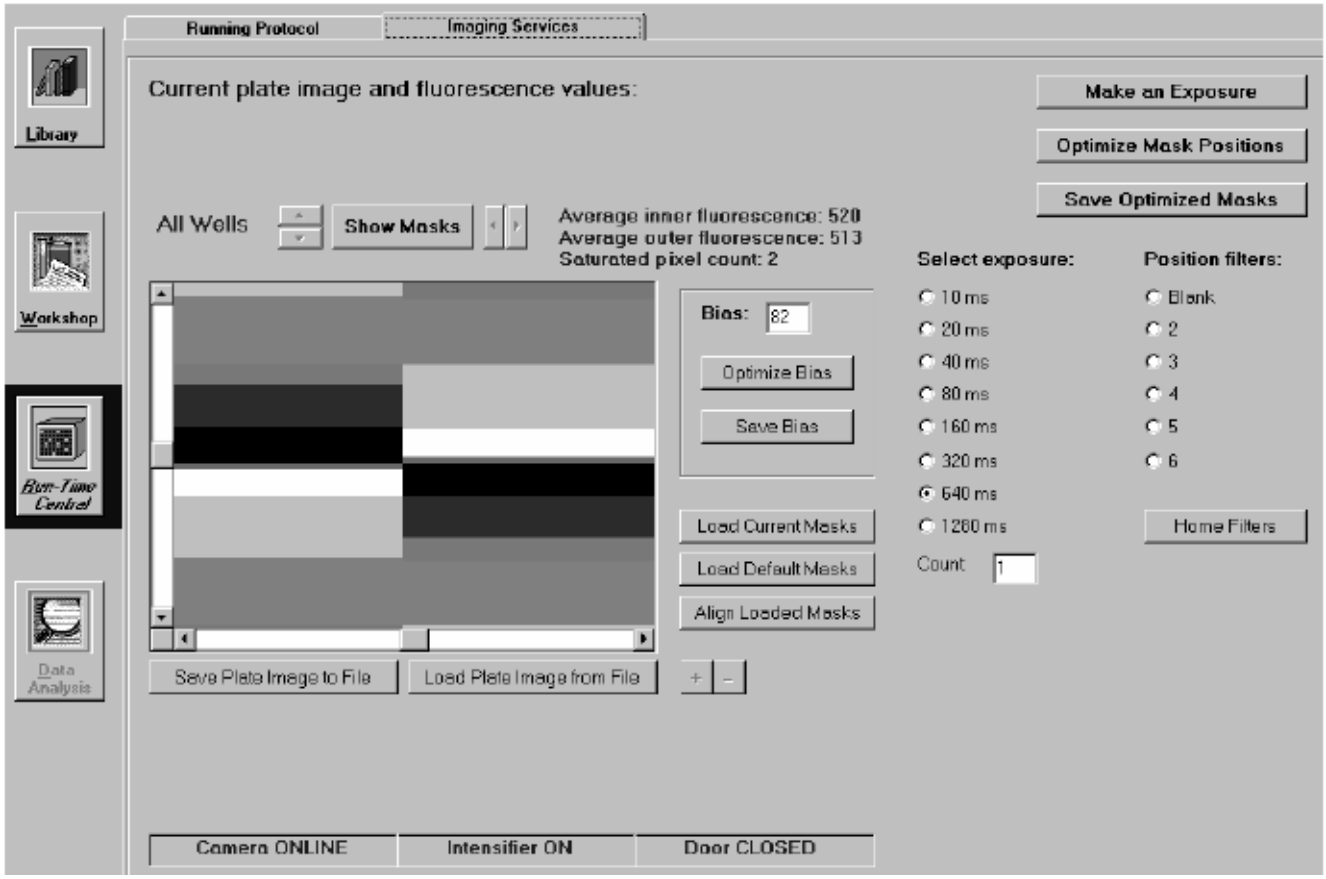


Рис.6-4. Окно сервисного режима камеры.

6.2.1 Описание

- Над графическим образом планшета показаны средние значения флюоресценции внутренней и внешней областей для всех 96 лунок и число пикселей насыщения для изображения планшета. Если выбрать одну из лунок, окружающая маска приобретает голубой цвет, и выводятся значения внутренней и внешней флюоресценции и насыщение этой лунки.
- Стрелки над изображением экрана используются для ручной юстировки маски.
- Имеется набор кнопок – переключателей для установки позиции каруселей с фильтрами и управления длительностью эскпозиции.
- Имеются окна, показывающие состояние iQ оптического модуля (подключение/отключение камеры), состояние усилителя (Включен/Выключен) и положение крышки.
- Кнопка оптимизации смещения **(OPTIMISE BIAS**) запускает автоматическую коррекцию систематической погрешности измерительной системы, результаты коррекции можно сохранить в памяти программы **(SAVE BIAS).**
- Имеется кнопка начала экспозиции **(EXPOSURE)** и окно счета **(COUNT BOX),** позволяющее контролировать число пройденных и усредненных экспозиций перед показом на экране.
- Кнопка оптимизации положения маски **(OPTIMIZE MASK POSITIONS)** запускает процесс автоматического выбора лучшего положения маски и ее подгонку.

- Имеется набор кнопок справа от экрана с изображением, который применяется для ручной юстировки положения маски.
- Графические файлы образов могут быть сохранены из окна сервисного режима или могут быть загружены в это окно.

6.2.2 Юстировка маски

Маска – это программный шаблон, задающий положение изображения каждой из 96 лунок в камере ПЗС, и сохраняемый в файле **mask96.ini.** Маска должна быть настроена при установке системы iQ. После этого юстировка маски требуется только в случае перемещения прибора iCycler, перемещения оптического модуля iQ, или при установке нового программного обеспечения. В практической деятельности, однако, полезно периодически контролировать положение маски.

Каждая индивидуальная маска состоит из двух «концентрических» квадратов. Внутренний квадрат должен быть центрирован по планшету таким образом, чтобы в него попадали все сигналы флюоресценции от лунок. Внешний квадрат окружает внутренний, и все сигналы, собранные по области внешнего квадрата, за исключением области внутреннего квадрата, рассматриваются как фоновые. Система обработки данных сначала рассчитывает разность между данными по внутреннему и внешнему квадратам для каждой лунки (сигнал лунки минус фон) в определенный момент времени.

Программное обеспечение может автоматически установить каждую отдельную маску в оптимальное положение. Существует возможность юстировки маски каждой лунки вручную.

Процедура юстировки масок включает:

- определение смещения детектора;
- захвата имиджа;
- загрузки файла маски;
- подгонки маски;
- сохранения файла маски.

Описание процедуры. Вы должны захватить отображение 96-луночного планшета, который содержит какой-нибудь краситель в каждой лунке. Тип красителя не имеет значения в случае если он совместим с установленной парой фильтров. Можно использовать раствор для расчета внешних факторов лунки в комбинации с любой парой фильтров. В каждой лунке должен быть одинаковый объем и концентрация раствора.

1. Разведите 60 мкл 10х раствора для формирования внешних факторов лунок в 5,4 мл бидистиллированной воды и внесите по 50 мкл 1х раствора в каждую лунку 96-луночного планшета. Заклейте планшет прозрачной пленкой и центрифугируйте короткое время для осаждения всех реагентов, поле чего поместите планшет в iCycler.
2. Войдите в программу iCycler и откройте Графические инструменты **(IMAGING SERVICES).**
3. Нажмите кнопку оптимизации смещения **(OPTIMIZE BIAS)** для начала процесса оптимизации детектора. Когда правильное положение будет достигнуто, окно **BIAS** будет выделено жирным шрифтом и кнопка сохранения **(SAVE BIAS)** станет активной. Сохраните установки, что позволит ускорить процедуру при следующей оптимизации.
4. Нажмите **HOME FILTERS** для установки фильтров возбуждения и эмиссии в исходное положение (фильтры перемещаются одновременно).
5. Переместите фильтры в требуемое положение, в зависимости от используемого флюорофора, нажатием соответствующего переключателя.
6. Нажмите кнопку экспозиции **(MAKE AN EXPOSURE).** На экране появится изображение планшета. Изучите изображение на наличие засвеченных пикселей (находящихся в насыщении), которые показаны красным цетом. Если такие пиксели имеются, уменьшите время и повторите экспозицию. Продолжайте до тех пор, пока засвеченные пиксели не исчезнут с экрана. Увеличьте время экспозиции до появления признаков насыщения, затем снова уменьшите время до их исчезновения, пока не добьетесь точной настройки оптимального времени экспозиции.
7. Откройте файл маски, установив курсор над изображением лунки A1 (верхняя левая лунка), и нажав его, одновременно удерживая клавишу Shift. Или нажмите загрузку

текущих масок (**LOAD CURRENT MASKS**), затем с помощью клавишей-стрелок переместите маски так, чтобы верхняя левая маска приблизительно находилась над лункой A1.

8. Нажмите кнопку оптимизации положения маски **(OPTIMIZE MASK POSITIONS)** и программа начнет поиск наиболее подходящего положения маски и подгонку ее положения. На экране появится соответствующее предупреждние о том, что подгонка маски успешно завершена или в случае сбоя подгонки. Если автоподгонка не удалась, повторите шаги 8 и 9. Если ошибка повторяется, попытайтесь установить маску вручную, как описано ниже.
9. После успешной настройки маски, нажмите кнопку сохранения оптимизированной маски **(SAVE OPTIMIZED MASKS).** Новое положение маски будет автоматически записано в файл **mask96.ini.**

Замечание: чтобы передвинуть индивидуальную маску, сначала щелкните мышью на выбранную лунку, что изменит цвет маски с зеленого на синий. С помощью стрелок теперь можно перемещать только маску синего цвета. Когда выделена одна лунка, ее обозначение, внутреннее и внешнее значения флюоресценции, и количество пикселей насыщения показаны сверху. Для восстановления одновременного перемещения всех масок, щелкните мышью в любом месте, вне масок лунок. Синяя маска снова станет зеленой, информация об этой лунке исчезнет с экрана, стрелки начнут перемещать все маски одновременно.

Ручная настройка положения маски. Если автоподгонка положения маски не удается, это значит, что изображение планшета, скорее всего не совпадает с размерами масок. Программа будет подбирать такой файл маски, который лучше всего подходит для текущего изображения планшета.

1. Изучите размер маски и используйте кнопки «+» и «-», чтобы соответственно увеличить или уменьшить эти размеры.
2. Сделайте предварительную подгонку маски, нажимая клавиши стрелок над изображением планшета. Установите маски так, чтобы большинство лунок были центрированы во внутренних квадратах.
3. Нажмите кнопку подгонки загруженной маски **(ALIGN LOADED MASKS)**. Перед этим необходимо тщательно установить центральные столбцы с помощью стрелок. **Замечание:** маска может быть оптимизирована нажатием **ALIGN LOADED MASKS** повторно, поскольку финальное качество маски является функцией начального качества.
4. Все изменения маски могут быть отменены нажатием установок по умолчанию **(LOAD DEFAULT MASKS).**
5. Окончательно удостоверьтесь, что маска установлены правильно, после чего нажмите кнопку сохранения **(SAVE OPTIMIZED MASKS).**

6.2.3 Проверка ориентации маски

В практической деятельности полезно периодически контролировать положение маски. Нажмите кнопку загрузки текущей маски (**LOAD CURRENT MASKS**) для ее просмотра. Если замечаний нет, закройте экран. Если положение маски Вас не устраивает, нажмите кнопку настройки (**ALIGN LOADED MASKS**) для тонкой подгонки маски, после чего сохраните сделанные изменения (**SAVE OPTIMIZED MASKS**).

6.2.4 Графический файл

Вы можете сохранить изображения (имиджи) планшета нажатием кнопки сохранения в файл (**SAVE PLATE IMAGE TO FILE**) и открыть сохраненные файлы нажатием кнопки загрузки **(LOAD PLATE IMAGES FROM FILE**). Откроется стандартное диалоговое окно Windows, в котором можно выбрать нужные файлы (сохраненные с расширением .isi).

7. МОДУЛЬ АНАЛИЗА ДАННЫХ

Введение

Модуль анализа данных (**DATA ANALYSIS**) – это раздел программы, где происходит представление и анализ полученных данных. При открытии программы iCycler пиктограмма модуля анализа данных (**DATA ANALYSIS**) на экране имеет серый цвет и данный режим программы неактивен. Модуль анализа данных (**DATA ANALYSIS**) открывается автоматически из центрального исполнительного модуля (**RUN-TIME CENTRAL**) во время Выполнения протокола исследования, или Вы можете войти в него, открыв сохраненный файл данных из модуля библиотеки (**LIBRARY**).

Модуль анализа данных состоит из пяти окон:

- Просмотр/сохранение данных (**VIEW/SAVE DATA**)
- Количественная оценка ПЦР (**PCR QUANTIFICATION**)
- Стандартная кривая (**STANDARD CURVE**)
- Кривая плавления (**MELT CURVE**)
- Анализ различий аллелей (**ALLELIC DISCRIMINATION**).

Каждое их этих окон обсуждается в деталях ниже. Во всех окнах, кроме окна просмотра и сохранения данных (**VIEW/SAVE DATA**), кнопка отчетов (**REPORTS**) находится в активном состоянии.

Рис.7-1. Кнопка отчетов.

При нажатии этой кнопки открывается стандартизованный шаблон отчета, соответствующий данному окну программы. Выберите тип отчета, представления данных, место назначения (принтер или файл) для отчета.

7.1 ОКНО СОХРАНЕНИЯ/ПРОСМОТРА ДАННЫХ (VIEW/SAVE DATA)

Это окно графически представляет установки планшетов в трех различных режимах, каждый из которых показывает различную информацию о лунках планшета. В этом окне осуществляется редактирование установок планшета после выполнения протокола. При этом возможно изменение типа образца, идентификатора и количества стандарта в любой лунке планшета. Также можно изменить единицы концентрации для каждого слоя краски. Сохранение файла данных также инициируется в этом окне.

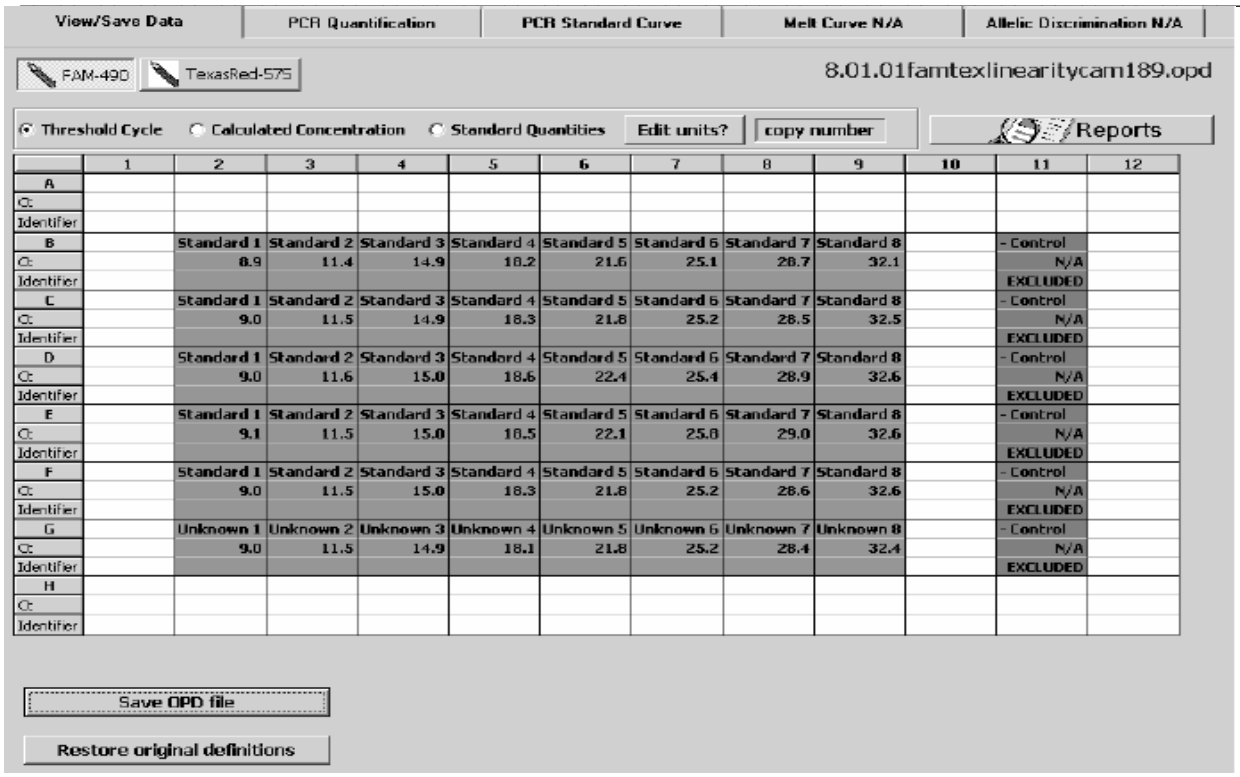


Рис.7-2. Окно просмотра и сохранения результатов (View/Save Data).

7.1.1 Просмотр планшета

В каждом из трех возможных режимов просмотра на экране указан идентификатор лунки и тип образца. Если лунка была исключена из анализа через окно выбора лунок (**SELECT WELLS**), идентификатор заменяется словом «исключен» (**EXCLUDED**).

- Количественные характеристики стандартов (**STANDARD QUANTITIES**). Показывается количество, определенное для каждого стандарта.
- Пороговый цикл **(THRESHOLD CYCLE)**. Этот режим просмотра доступен после вычитания порога ПЦР, перечисляются пороговые циклы для каждого планшета.
- Расчетная концентрация **(CALCULATED CONCENTRATION)**. Этот режим просмотра доступен, если определено достаточно стандартов для построения стандартной кривой и проведена компенсация базовой линии ПЦР. В списке приводятся рассчитанная концентрация каждого опытного образца на экспериментальном планшете вместе с полученными количествами стандартов.

7.1.2 Редактирование после исследования

После окончания эксперимента пользователь может изменить следующие атрибуты лунки:

- Тип образца
- Идентификатор
- Номер дубликата
- Концентрация стандарта

После сделанных изменений происходит повторный анализ данных. Эти изменения сохраняются до новой правки или до нажатия кнопки восстановления первоначальных определений (**RESTORE ORIGINAL DEFINITIONS**). При сохранении файла данных новые атрибуты сохраняются вместе со старыми определениями.

Для редактирования описания лунки:

1. Щелкните левой кнопкой мыши на изображение лунки в схеме планшета. Откроется диалоговое окно редактирования, и положение редактируемой лунки будет отмечено, синим цветом. Текущее описание лунки также будет показано на экране.

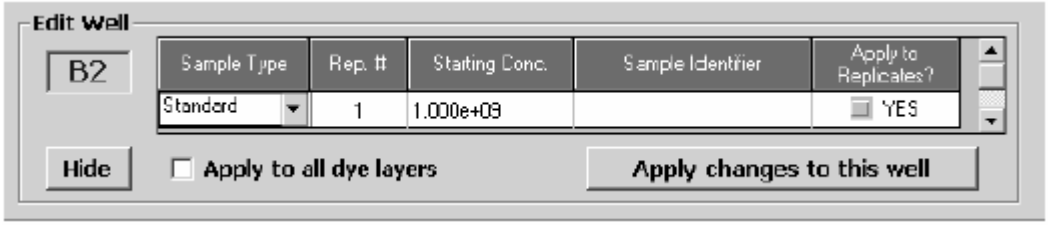


Рис.7-3. Редактирование после эксперимента.

2. Выберите новый тип образца из меню.
3. Введите новый номер дубликата, если необходимо.
4. Если тип образца был изменен на стандарт, введите начальную концентрацию этого стандарта. Если образец остался стандартом, новая начальная концентрация может быть введена при желании.
5. При желании введите новый идентификатор образца.
6. Если образец находится в группе дубликатов, изменения могут быть приложены ко всей группе с помощью нажатия Yes в столбце применения к дубликатам (**APPLY TO REPLICATES?)**
7. Изменения могут быть приложены ко всем слоям красителя данной лунки нажатием соответствующей кнопки (**APPLY TO ALL DYE LAYERS**).
8. Для принятия сделанных изменений и нового анализа файла данных нажмите кнопку **APPLY CHANGES TO THIS WELL**.
9. Чтобы убрать окно редактирования лунки, нажмите кнопку «Спрятать» (**HIDE).**
10. После окончания редактирования сохраните данные. Начальные определения будут сохранены вместе со сделанными изменениями. Нажмите Сохранить OPD-файл (**SAVE OPD FILE**). Откроется окно просмотра и сохранения установок анализа. Кликните **SAVE OPD FILE** в новом окне, откроется стандартное диалоговое окно. Введите новое имя и нажмите **SAVE**, или просто нажмите **SAVE** и перепишите исходный файл.

7.1.3 Сохранение файлов OPD

При сохранении файла данных ПЦР все параметры анализа, включая циклы базовой линии, пороговые значения, часть данных, включенных в анализ, и способ цифровой фильтрации, сохраняются вместе с правкой, сделанной после анализа, редактированием пиков кривой плавления, первоначальными данными, именами файлов температурного протокола и описания планшета, а также именем RME-файла, использованного при анализе данных. В следующий раз при открытии этого файла он будет представлен с новыми установками для всех параметров анализа. Если некоторые лунки исключены из анализа при сохранении файла, они также будут исключены при следующем открытии файла. Однако в любое время эти лунки можно снова включить в анализ с помощью опции **SELECT WELLS**. Первоначальные установки сохраняются при каждом последующем сохранении файла. Также в программу включена функция автосохранения, которая автоматически сохраняет файл данных со всеми сделанными изменениями при выходе из программы или при открытии другого файла данных.

Для сохранения файла данных:

1. В окне просмотра и сохранения данных нажмите **SAVE OPD FILE**. Откроется окно просмотра и сохранения установок анализа (Рис. 7-4).

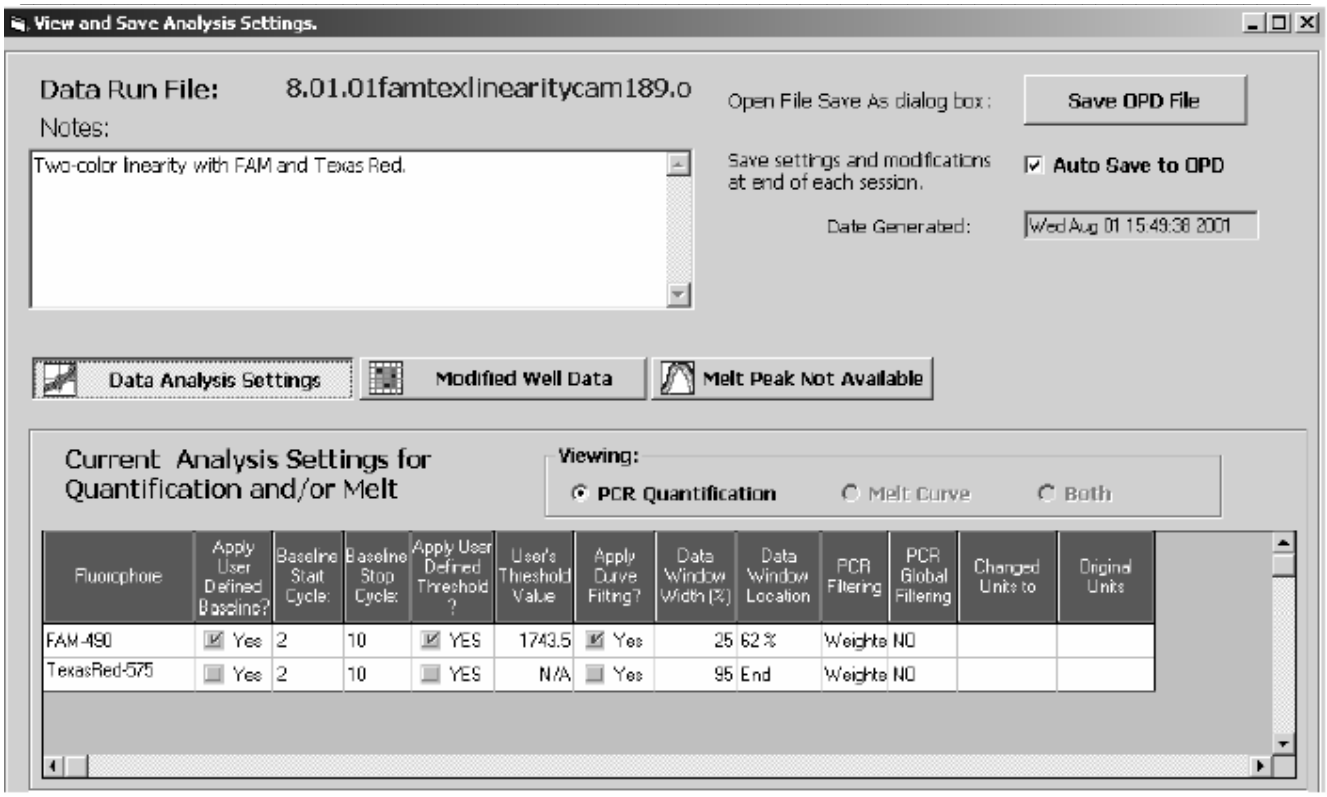


Рис.7-4. Окно просмотра и сохранения установок анализа.

2. В открывшемся окне можно посмотреть параметры анализа данных, которые были сохранены, при нажатии кнопки установок анализа данных (**DATA ANALYSIS SETTINGS**). В нижней части окна откроется таблица, где будут показаны текущие установки всех параметров. При следующем открытии файла все эти установки будут применены для анализа автоматически.

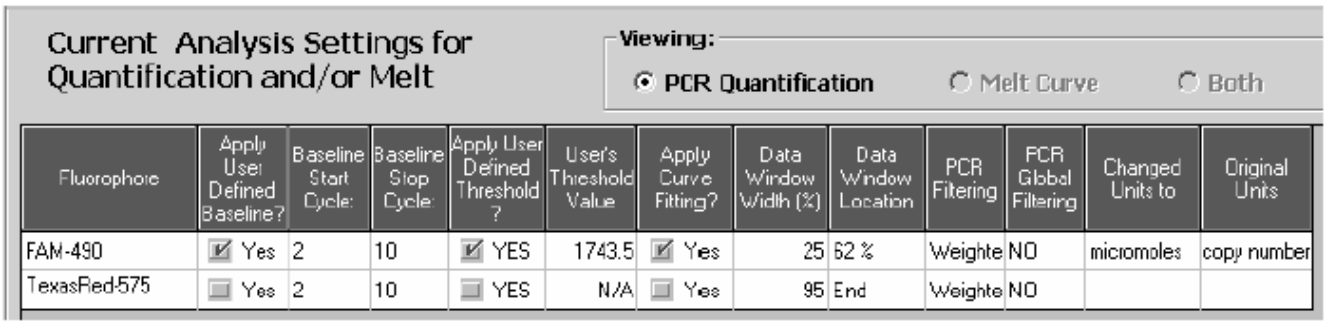


Рис.7-5. Таблица с установками анализа данных.

3. Если редактирование после анализа было сделано в одной или нескольких лунках, эта информация будет сохранена с файлом данных. Нажмите кнопку изменений данных по лункам **(MODIFIED WELL DATA),** чтобы открыть другую таблицу внизу окна. В окне перечислены текущие и первоначальные параметры для каждой модифицированной лунки.

Current Well Data Modifications:

	Fluorophore	Well ID	Sample Type	Replicate Number	Standard Quantity	Sample Identifier
MODIFIED	FAM-490	G2	Unknown	1		
Original			Standard	1	1.000e+09	
MODIFIED	FAM-490	G3	Unknown	2		
Original			Standard	2	1.000e+08	
MODIFIED	FAM-490	G4	Unknown	3		
Original			Standard	3	1.000e+07	

Рис.7-6. Таблица с измененными параметрами лунок.

4. Если изменения сделаны для какого-нибудь пика кривой плавления, эти изменения также сохраняются вместе с исходными значениями. Их можно посмотреть нажатием кнопки модифицированных данных пика плавления **(MODIFIED MELT PEAK DATA).**

Current Melt Peak Modifications:

Fluorophore	Well ID	Melt Temp. Tm	Peak Deleted	Excluded from Total Area	Peak Descriptor	Peak Begin Temp.	Peak End Temp.
SYBR-490	A8	63.5	YES	YES			
SYBR-490	A8	67.5	YES	YES			
SYBR-490	A8	71.0	YES	YES			
SYBR-490	A8	73.5	YES	YES			
SYBR-490	A8	92.5				90.5	94

Рис.7-7. Таблица с измененными данными пиков плавления.

5. Нажмите **SAVE OPD FILE**.
6. Откроется стандартное диалоговое окно **SAVE.** Дайте имя файлу и нажмите **SAVE.**

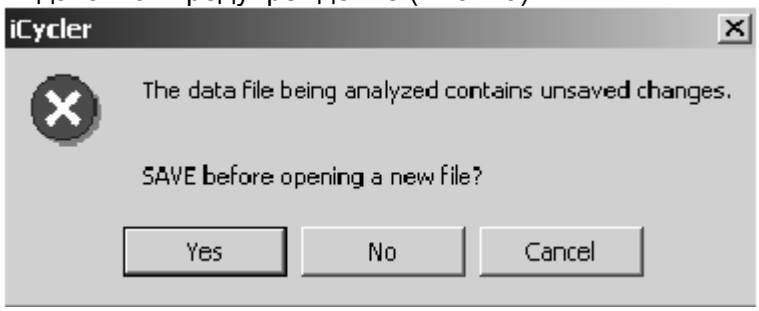
Для использования функции автосохранения:

Активируйте функцию автосохранения нажатием кнопки **AUTO SAVE TO OPD**. Теперь программа будет сохранять файл данных и все параметры анализа каждый раз при закрытии окна или открытии нового файла данных.

☑ Auto Save to OPD

Рис.7-8. Автосохранение.

Если функция автосохранения не активирована, каждый раз перед закрытием программы или перед открытием нового файла данных без сохранения текущего файла данных, будет выдаваться предупреждение (Рис.7-9).



**

Рис.7-9. Предупреждение о возможной потере данных.

Для сохранения открытого файла и параметров анализа, нажмите **Yes,** и откроется стандартное окно диалога сохранения. Выберите имя и нажмите **SAVE.** В противном случае нажмите **No**, после чего откроется новый файл, и все сделанные изменения текущего файла будут потеряны.

7.2 ОКНО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПЦР

В начале второго повтора шага сбора данных в режиме реального времени, пиктограмма анализа данных (**DATA ANALYSIS**) становится активной. В это же время открывается окно количественного представления ПЦР (**PCR QUANTIFICATION**), где показан график амплификации ПЦР с данными первого этапа сбора данных. График амплификации ПЦР будет дополняться в начале каждого повтора с отставанием на один цикл. Например, в начале 4-го повтора шага сбора данных на график добавляются результаты 3-го повтора. По мере накопления данных они отображаются на графике амплификации в режиме компенсации фона. Во время шагов, когда нет накопления данных, можно поменять наблюдаемый флюоресцентный краситель. Все другие параметры анализа доступны только после окончания температурного протокола и накопления всех требуемых данных.

Анализ полученных результатов может быть инициирован открытием сохраненного пакета данных (см. обсуждение окна просмотра сохраненных данных **(VIEW SAVED DATA)** в модуле библиотеки **(LIBRARY)**), или может быть начат после завершения эксперимента. В каждый момент времени может быть открыт только один файл данных.

7.2.1 Краткое руководство по сбору и анализу данных количественной ПЦР

1. Создайте и сохраните файлы протокола и установок планшета в Рабочем модуле **(WORKSHOP)**, или выберите ранее сделанные файлы в Библиотеке **(LIBRARY)**, после чего начните исследование. Присвойте имя файлу данных.
2. График количественной ПЦР начнет отображать данные после второго повтора на шаге сбора данных
3. После завершения протокола убедитесь, что в списке выбора режимов анализа (**SELECT ANALYSIS MODE**) отмечен режим компенсации базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTION**) или режим компенсации базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой (**PCR BASELINE SUBTRACTION CURVE FIT**).
4. Выберите флюоресцентный краситель для анализа.
5. Автоматический анализ данных происходит следующим образом: берутся последние 95% данных, собранных на каждом шаге, и фильтруются средневзвешенным методом. Для экспериментов по амплификации программа выбирает циклы базовой линии для каждой кривой индивидуально с учетом оптимального общего значения порога. Если стандарты определены, Вычисляется стандартная кривая, и концентрации всех неизвестных образцов определяются на ее основе. Для кривых плавления выдается график первой производной, где определяются пики и температуры плавления.
6. Параметры анализа данных также могут быть заданы вручную. Можно отредактировать:

- Циклы базовой линии.
- Порог.
- Приложение метода аппроксимации к данным.
- Лунки, включенные в анализ (**SELECT WELLS**).
- Часть данных, которые будут проанализированы (**SET DATA ANALYSIS WINDOW**).
- Способ цифровой фильтрации.

Если данные были собраны для анализа после прогона программы, Вы можете анализировать эти данные, выбрав массив данных из раскрывающегося окна (см. Раздел 7.2.7).

7. После внесения всех необходимых настроек сохраните файл данных и распечатайте все необходимые отчеты. Все параметры анализа сохранены с файлом данных и при следующем открытии файла данных будут применены автоматически.

7.2.2 График амплификации

График амплификации (**AMPLIFICATION PLOT**) показывает относительную флюоресценцию в каждой лунке в каждом цикле. Информация выводится по каждому красителю поочередно. Каждая кривая представляет одну лунку. Одна точка результатов добавляется в кривую после каждого цикла. Эта точка является расчетным средним всех данных, собранных для этой лунки в данном цикле. При изменении режима анализа результатов (с компенсацией фона, с компенсацией базовой линии ПЦР или с компенсацией базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой) вид графика соответствующим образом меняется. Можно также изменять увеличить размеры графика, соответствующие значения на осях графика установлены.

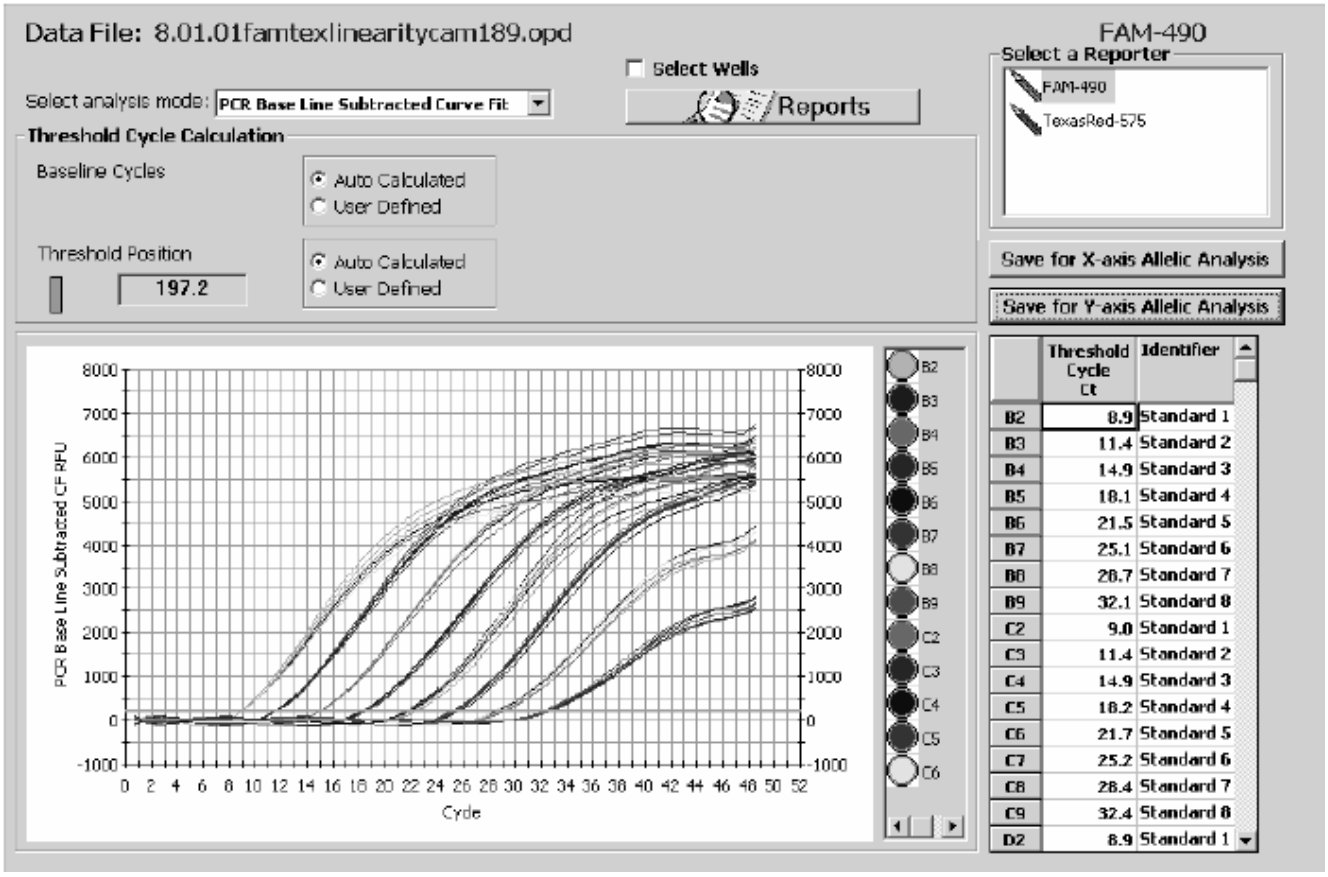


Рис.7-10. График амплификации.

- Для укрупнения графика нажмите **Shift** и «потяните» график, нажимая и удерживая левую кнопку мыши.
- Для уменьшения размеров графика поместите курсор над графиком и нажмите R, или выберите Восстановить размеры (**RESTORE GRAPH**) в контекстном меню. Для пошагового уменьшения нажмите **CONTROL Z.**

Вы можете выбрать для просмотра одну или несколько кривых путем нажатия на схематические изображения соответствующих лунок справа от графика амплификации. Удерживайте **CONTROL**, чтобы выбрать несколько лунок.

7.2.3 Контекстное меню графика амплификации

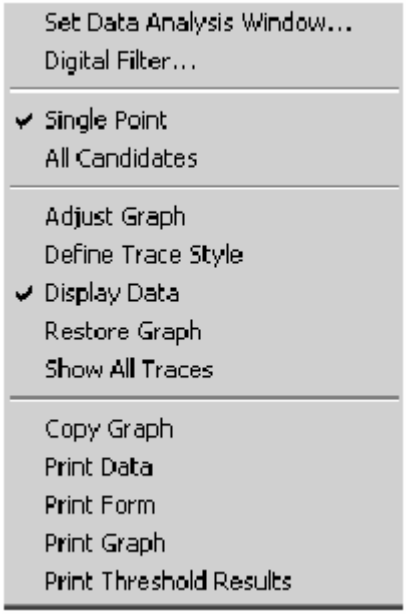


Рис.7-11. Контекстное меню графика амплификации.

Имеется большое количество параметров для представления и анализа данных, которые можно вывести, щелкнув правой кнопкой мыши по графику амплификации. При этом открывается контекстное меню.

А. Установки окна анализа данных. Графики результатов в режиме компенсации базовой линии ПЦР создаются с использованием последних 95% данных, собранных на каждом цикле. Число точек зависит от времени экспозиции и времени задержки на каждом цикле. Можно изменить процентное число использованных точек, выбрать для представления данные в начале цикла, в конце цикла или в любом другом отрезке цикла.

1. Щелкните правой кнопкой мыши по графику количественных результатов ПЦР и выберите Установить окно анализа данных (**SET DATA ANALYSIS WINDOW**) из контекстного меню.
2. Если Вы хотите использовать данные начала цикла (**BEGINNING OF THE CYCLE**) или окончания цикла (**END OF THE CYCLE**), нажмите на соответствующую кнопку и используйте стрелки для выбора процента точек данных. Затем нажмите **OK** для нового анализа экспериментальных данных.
3. Для того чтобы отцентрировать анализ на данных, собранных в определенный период цикла, сначала нажмите среднюю кнопку, чтобы выбрать данные из графика (**PICK WINDOW FROM PLOT**). В окне будут Выведены соответствующие инструкции.

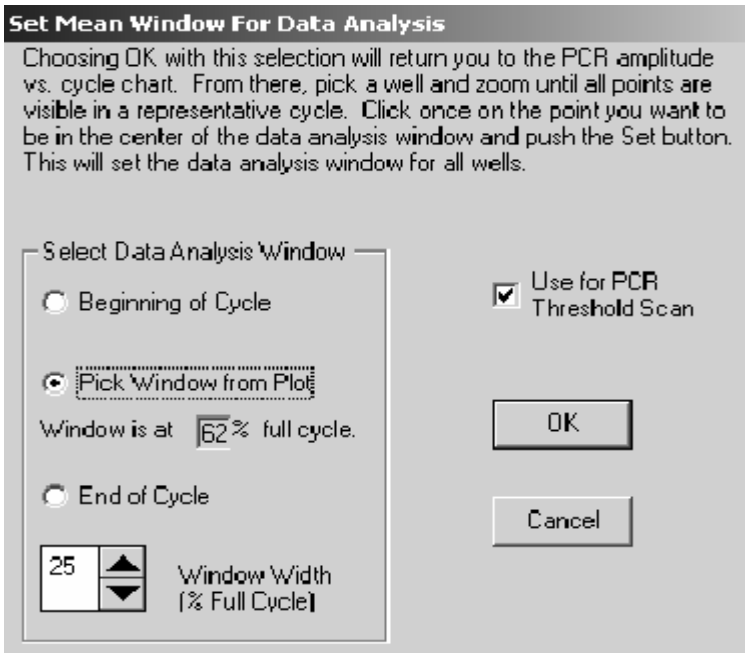


Рис.7-12. Окно установок анализа данных.

4. Используйте стрелки вверх и вниз для установки желаемой ширины окна анализа данных или дважды кликните на него и введите нужную ширину. Например, если Вы выберете 20, то в анализ будет включено по 10% точек данных с одной и с другой стороны от центральной точки. Нажмите OK для возврата в окно графика количественных результатов ПЦР.

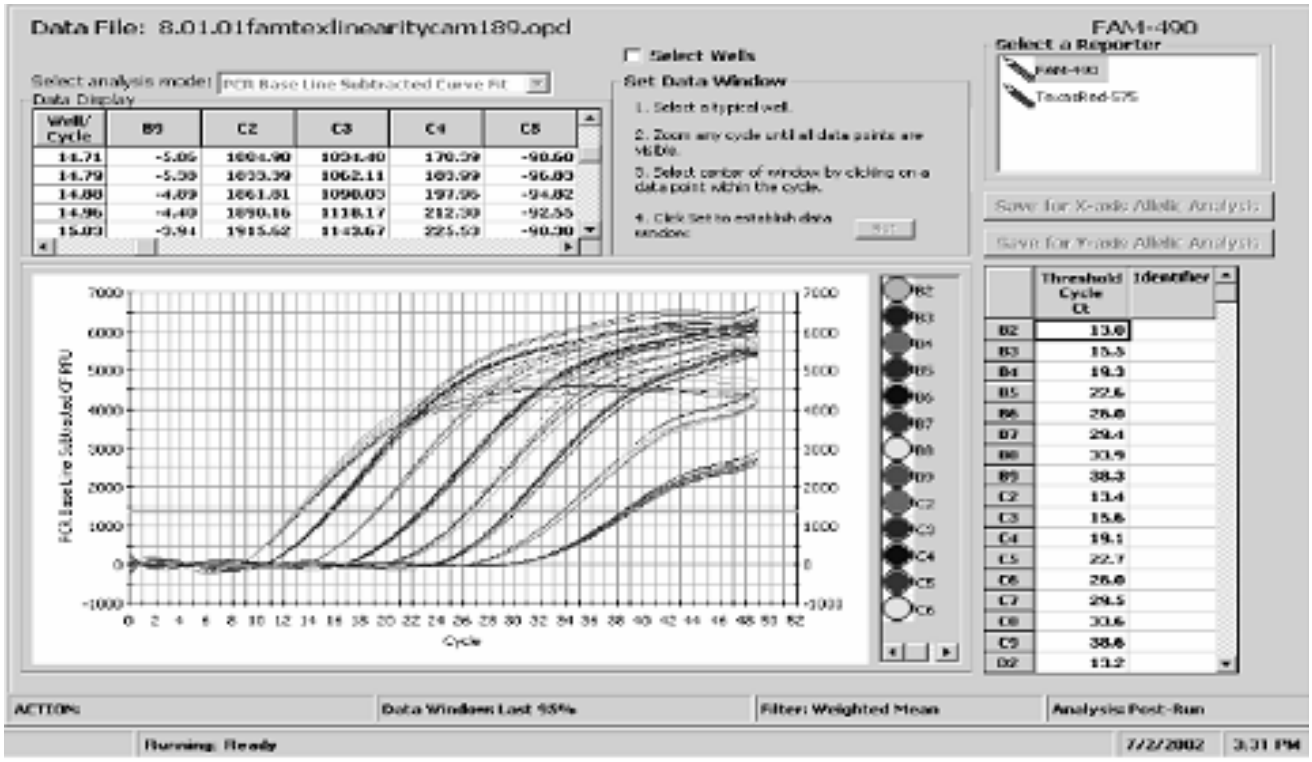


Рис.7-13. Просмотр всей информации.

5. График количественных результатов ПЦР будет выведен на экран в режиме просмотра всей информации, доступной для анализа (**ALL CANDIDATES)**, с показом каждой отдельной точки для каждой лунки. При выводе на экран для просмотра по умолчанию, показываются не отдельные точки, а сглаженная кривая, проведенная через все экспериментальные точки. Для удобства последующего анализа можно описать экспериментальные точки каким-нибудь символом. Символ выбирается из того же контекстного меню нажатием определителя (**DEFINE TRACE STYLE)**. Детально эта процедура обсуждается ниже. Сбоку будет открыта таблица, показывающая отдельные лунки и индивидуальные данные по точкам.
6. Выберите конкретную лунку нажатием на ее схематическое изображение справа от графика. Для увеличения размеров части графика «потяните» ее при нажатой клавише Shift левой кнопкой мыши. Можно увеличивать изображение несколько раз (Рис.7-14).
7. Выберите центральную точку для последующего анализа. При установке указателя мыши на конкретную точку ее значение и номер цикла выделяются в окне показа данных **(DATA DISPLAY BOX).**
8. Нажмите Установить (**SET**) внизу окна для начала пересчета. В приведенном примере график результатов с компенсацией базовой линии ПЦР будет пересчитан с использованием 30 % точек, собранных в середине каждого цикла.
9. Используйте контекстное меню для восстановления графика, показа всех кривых и возврата в режим отдельных точек.

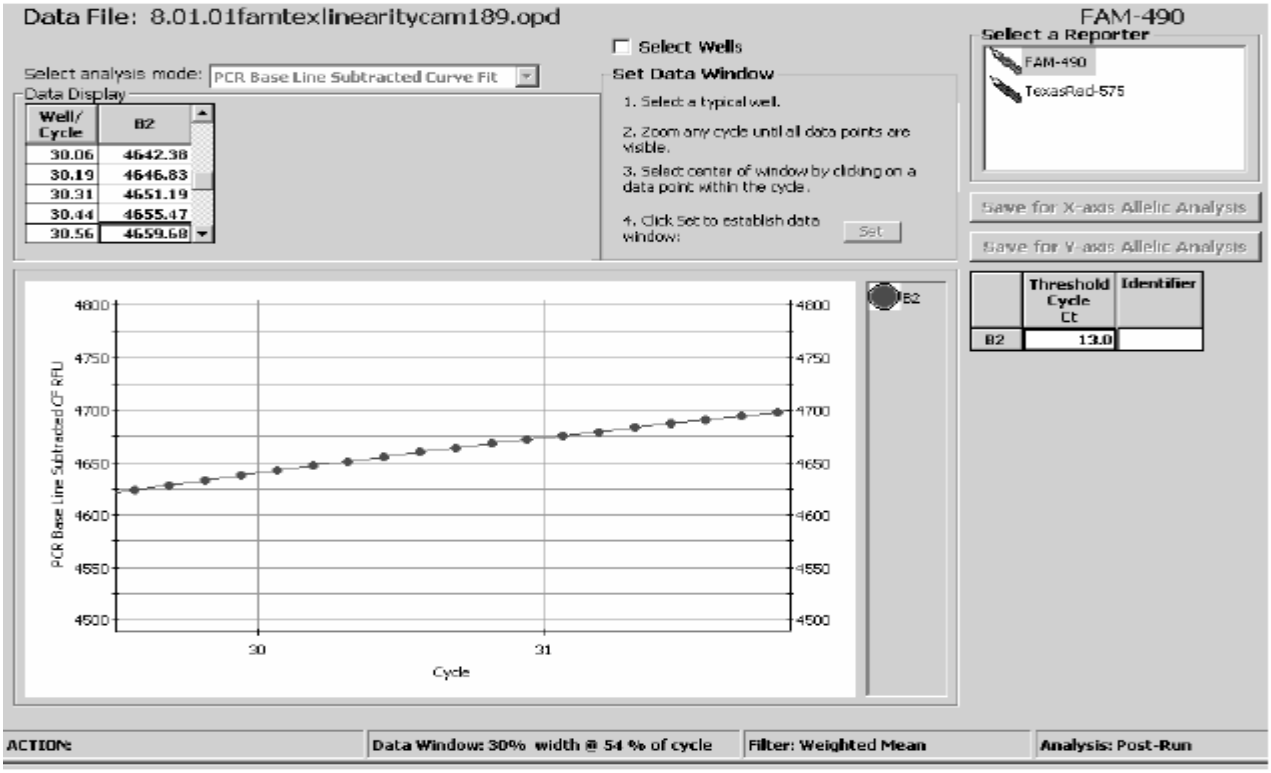


Рис.7-14. Увеличенное окно просмотра.

C. **Цифровой фильтр.** (**DIGITAL FILTER…).**

При выборе цифрового фильтра внутрицикловых данных в контекстном меню имеются 2 режима: режим средневзвешенного значения и режим взвешенного скользящего среднего значения. По умолчанию установлен режим средневзвешенного значения, и только этот режим доступен при распознавании данных.

Средневзвешенное значение определяется по уравнению **Oi =(Ri +c *M)/(1 +c),** где:
Oi – отфильтрованное значение для точки i,
Ri – неотфильтрованное значение для точки i,
c – весовой фактор с установленным по умолчанию значением 2,
M – среднее арифметическое значение для всех точек этой лунки в данном цикле

Взвешенное скользящее среднее определяется как среднее арифметическое точек данных от **i – (w – 1)** до **i**, где **w** является шириной фильтра. Например, если Вы хотите рассчитать 20-ю точку данных (**i = 20**) при ширине фильтра равной 4 (**w = 4**), то берется среднее точек от 17-й до 20-й. 21-я точка рассчитывается как среднее 18-21-й точек, 22-я точка – это среднее точек 19-22-й, и т.д.

Рис.7-15. Установка цифровых фильтров.

Вышеуказанные фильтры применимы только внутри цикла. Общий фильтр, который сглаживает данные в разных циклах, доступен при активации соответствующей кнопки (**ENABLE GLOBAL FILTER).** Общий фильтр работает по следу определенной лунки, учитывая все циклы в одном проходе. Эта опция применима в тех случаях, когда имеются значительные помехи и неровности графика.

C. Отдельная точка (SINGLE POINT). Этот режим представления данных установлен по умолчанию. В данном режиме усредняются все данные, собранные в течение одного шага, и это среднее значение выводится на график. Например, если в течение 3-го повтора цикла амплификации собраны 4 точки данных, среднее этих 4-х точек выводится на график для цикла 3.

D. Все точки (ALL CANDIDATES). В этом режиме показываются все точки данных, собранные в эксперименте. Обычно эта опция используется вместе с окном установок анализа данных, но иногда эта информация важна для оценки протекания ПЦР и гибридизации зондов. В этом режиме опции автоматического анализа данных заблокированы.

E. Корректировка графика (ADJUST GRAPH). При выборе этой функции из контекстного меню Вы можете изменить масштаб графика и перевести его из линейного представления в логарифмическое и наоборот. Вид нового окна показан на рис. 7-16.

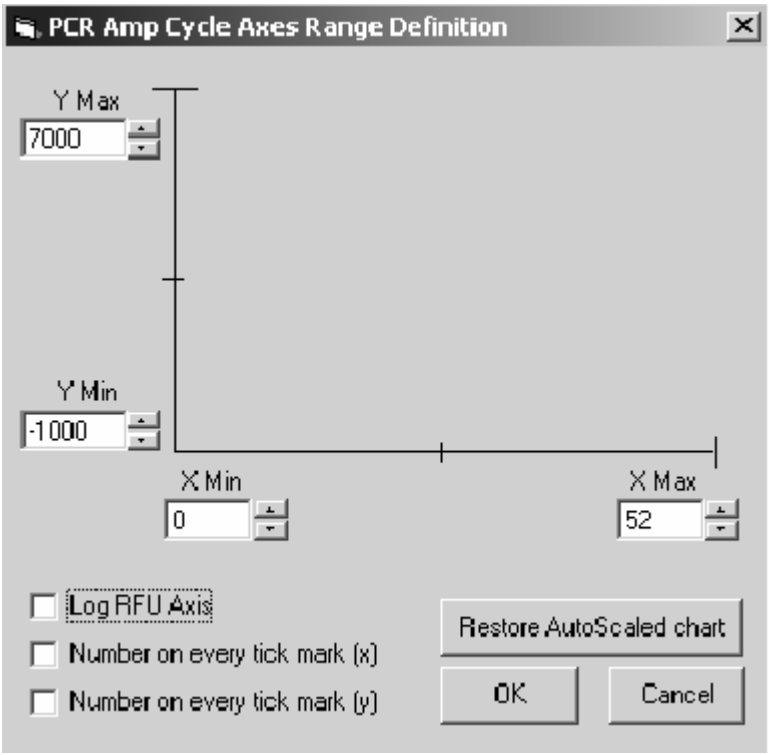


Рис.7-16. Корректировка графика.

- Максимальные и минимальные значения для обеих осей можно ввести непосредственно, дважды щелкнув по ним мышью и удалив старые значения. Также можно использовать стрелки вверх и вниз для обеих осей.
- Вывести полулогарифмический масштаб можно нажатием **LOG RFU AXIS.** Отмена выделения возвращает линейный вид графика.
- Строка **RESTORE AUTOSCALED CHART** восстанавливает значения графика по умолчанию.

E. **Определение стиля кривой (DEFINE TRACE STYLE)**. Эта функция позволяет изменить некоторые параметры графика для удобства пользователя. Для конкретной лунки или группы лунок цвет кривой и любые символы могут быть изменены. Перед

применением сделанных изменений их можно оценить с помощью предварительного просмотра (Рис. 7-17).

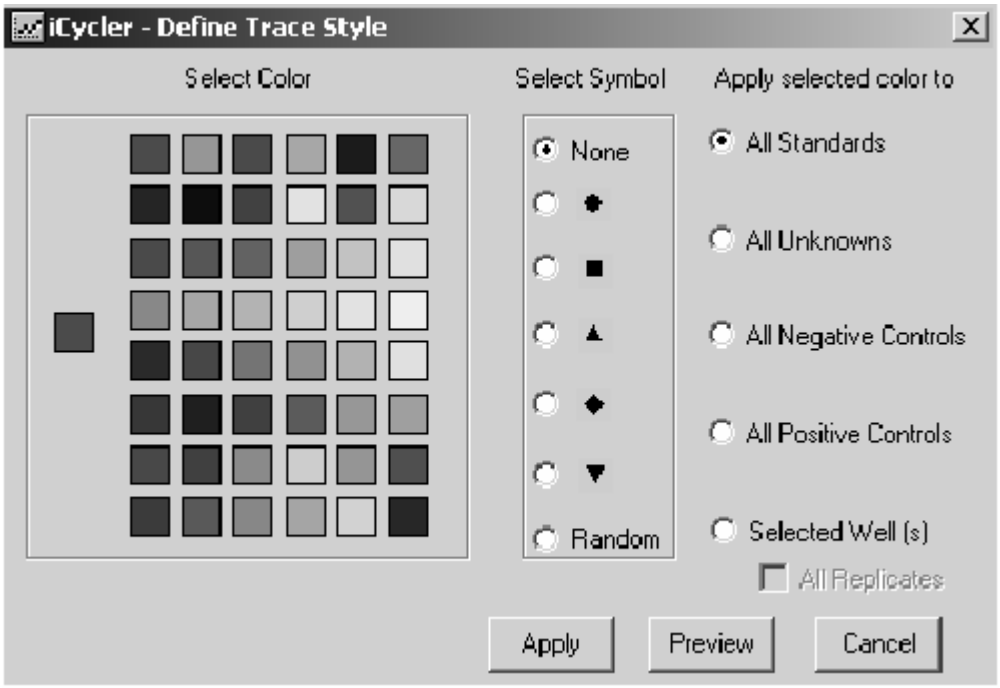


Рис.7-17. Определение стиля экспериментальной кривой.

Для изменения стиля кривой:

1. Щелкните правой кнопкой мыши на график амплификации и выберите определение стиля кривой **(DEFINE TRACE STYLE)** из контекстного меню.
2. Выберите цвет кривой.
3. Выберите тип символа.
4. Выберите тип кривых, которые должны быть изменены (например, все кривые стандартов – **ALL STANDARDS**). Если выбирать отдельные лунки для изменения стиля, нажмите выбор лунок (**SELECT WELLS)** и на дисплей будет выведена репрезентативная решетка планшета.

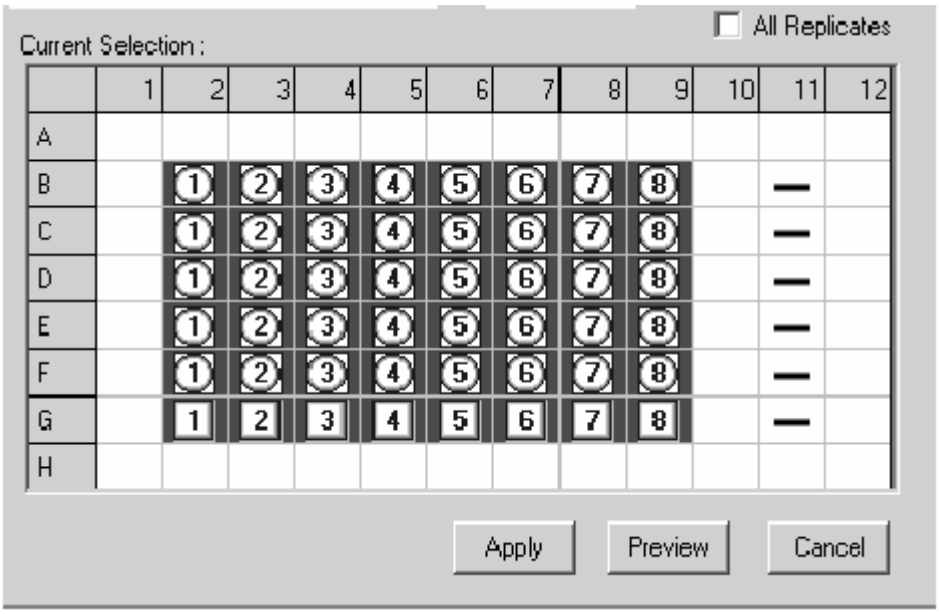


Рис.7-18. Выбор лунки для коррекции стиля кривой.

5. Отметьте на решетке лунки, которые будут изменены. Для изменения целого столбца или строки щелкните левой кнопкой мыши по соответствующему заголовку. Край каждой лунки на решетке будет отмечен выделенным для кривой цветом.
6. Нажмите Просмотр (**PREVIEW**), и если сделанные изменения удовлетворительны, нажмите Применить (**APPLY**). Просмотр выбранного стиля не является обязательным, но после нажатия Применить (**APPLY**) восстановить исходные установки можно только закрыв и заново открыв файл.

G. Показать данные (DISPLAY DATA). Для просмотра данных по каждой лунке щелкните правой кнопкой мыши и в открывшемся контекстном меню выберите **DISPLAY DATA**. Сверху над графиком амплификации появится небольшая таблица. В нем наверху будут показаны номера циклов и сбоку номера лунок. Для перемещения используйте полосу прокрутки. В режиме отдельной точки каждый цикл представлен одной точкой, которая является средним значением всех данных, полученных в этом цикле. В режиме всех точек представлены все данные.

Замечание: Эти данные могут быть скопированы в буфер обмена для прямого импорта в текст и в другие электронные таблицы, для чего надо щелкнуть мышью в левый верхний угол таблицы, после чего следует нажать **Control C** для копирования.

Data Display

Well/ Cycle	B2	B3	B4	B5	B6
28.86	4697.36	5191.41	4433.12	3592.65	2455.59
28.95	4701.63	5203.12	4452.65	3622.47	2492.54
29.06	4706.62	5216.81	4475.54	3657.65	2536.47
29.19	4712.31	5232.38	4501.63	3698.04	2587.40
29.31	4717.89	5247.67	4527.30	3738.06	2638.38

Рис.7-19. Таблица данных амплификации.

H. Восстановить график (RESTORE GRAPH). Используется для восстановления исходного размера графика после изменения его размера. Также размеры можно восстановить, щелкнув мышью по графику амплификации и нажав **R**.

I. Показать все кривые (SHOW ALL TRACES). Используется для восстановления всех кривых, которые были удалены из графика амплификации. Кривые также можно восстановить, щелкнув мышью по графику амплификации и нажав **S**.

J. Копировать график (COPY GRAPH). Копирует график амплификации в буфер обмена для импорта в другие программы.

K. Печатать данные (PRINT DATA). Печатаются данные цикла амплификации.

L. Печатать форму (PRINT FORM). Печатается вся страница.

M. Печатать график (PRINT GRAPH). Печатается только график.

N. Печатать пороговые результаты (PRINT THRESHOLD RESULTS). Печатается пороговый цикл для каждой лунки.

7.2.4 Экран количественного представления данных ПЦР

	Threshold Cycle Ct	Identifier
B1	N/A	Control FV
B2	N/A	Control FV
B3	N/A	Control FV
B4	N/A	Control FV
B5	30.6	Control WT
B6	30.2	Control WT
B7	30.2	Control WT
B8	30.5	Control WT
B9	30.8	Control FII
B10	31.0	Control FII
B11	31.2	Control FII
B12	31.3	Control FII
D1	N/A	NTC
D2	N/A	NTC

После того, как данные были приведены в режим представления результатов с компенсацией базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTION**) или в режим с компенсацией базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой (**PCR BASELINE SUBTRACTION CURVE FIT**), пороговые циклы определяются и представляются в окне показа данных ПЦР вместе с идентификаторами, указанными при установке планшета.

Рис.7-20. Экран количественных данных порогового цикла ПЦР.

7.2.5 Выбор режима анализа

Рис.7-21. Выбор режима анализа.

- Режим представления результатов с компенсацией фона (**BACKGROUND SUBTRACTED**). Данные представлены как относительная флюоресценция каждого красителя после нормирования времени экспозиции и учета факторов лунок (Well Factors). Последующий анализ этих данных не предусмотрен.
- Режим представления результатов с компенсацией базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTED**). Для того чтобы определить пороговые циклы, построить стандартные кривые и определить концентрацию неизвестных образцов, данные должны быть обработаны в режиме компенсации базовой линии ПЦР. График ПЦР в этом режиме определяется путем наиболее оптимального спрямления данных флюоресценции каждой лунки, записанной во время циклов базовой линии. Эти спрямленные данные затем вычитаются из данных, полученных на каждом цикле ПЦР в режиме компенсации фона (**BACKGROUND SUBTRACTED DATA)**, что дает график с компенсацией базовой линии ПЦР. При автоматическом анализе оптимальные циклы базовой линии определяются отдельно для каждой лунки. В ручном режиме пользователь выбирает один набор циклов базовой линии для приложения ко всем кривым ПЦР.
- Режим представления результатов с компенсацией базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой (**PCR BASELINE SUBTRACTION CURVE FIT**). В этом режиме аппроксимация данных производится полиномиальной кривой высокого порядка.

7.2.6 Выбор флюорофора

Выбрать флюорофор для просмотра можно путем выделения его имени в этом окне. После этого название красителя показывается, синим цветом в окне и большими буквами сверху.

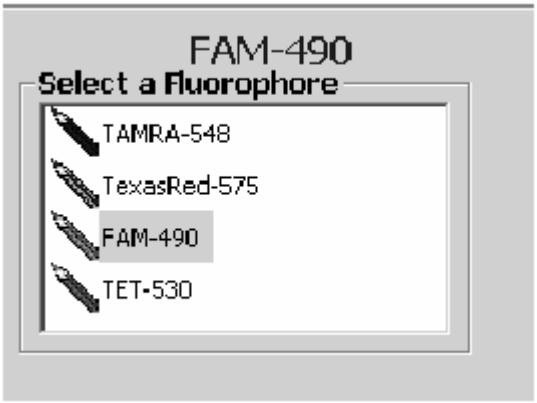


Рис.7-22. Окно выбора флюорофора.

7.2.7 Выбор пакета данных

Если в файле протокола указан более чем один шаг сбора данных, данное окно появится на экране количественной оценки результатов ПЦР. По умолчанию анализируется тот шаг, который задан в режиме реального времени. Для изменения выбора шага анализа используйте самораскрывающееся меню.

Рис.7-23. Выбор пакета данных.

7.2.8 Выбор лунок

Любое число лунок, для которых получены экспериментальные данные, может быть исключено из дальнейшего анализа через опцию выбора лунок **(SELECT WELLS)** в окне анализа. Первоначальные данные сохраняются и исключенные из анализа лунки могут быть включены в анализ по желанию пользователя в любой момент. Исключение лунок из анализа повлияет на расчет порога, и, следовательно, на расчет стандартной кривой и количественный анализ образцов с неизвестной концентрацией матрицы.

Рис.7-24.Кнопка выбора лунок.

Для отбора лунок, включенных в анализ данных, необходимо:

1. В окне количественных данных ПЦР нажмите кнопку «выбрать лунки» (**SELECT WELLS**), чтобы открыть соответствующее окно. Верхний левый угол схемы планшета окрашен в цвет текущего красителя.

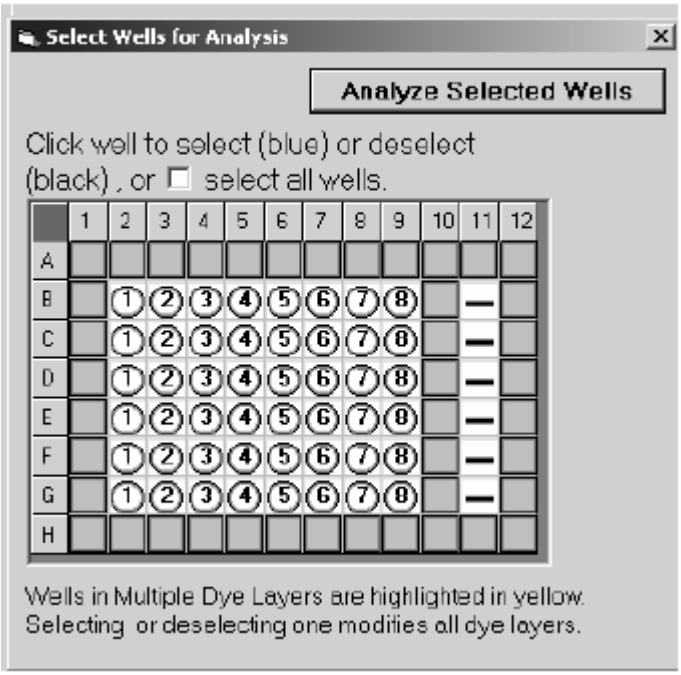


Рис.7-25. Экран выбора лунок.

2. Для исключения из анализа строки или столбца кликните соответствующую букву или номер соответственно. Для исключения из обработки конкретной лунки щелкните мышью по ее изображению. Лунки, исключенные из анализа, показаны черным, тогда как включенные в анализ лунки показаны, синим цветом.
3. После исключения всех требуемых лунок из анализа нажмите кнопку запуска анализа отобранных лунок (**ANALYSE SELECTED WELLS**). Данные будут реорганизованы и пересчитаны в течение нескольких секунд.
4. Для возврата лунок в анализ проведите вышеописанную процедуру в обратном порядке. Можно возвращать лунки в анализ по одной, или по целому ряду (колонке). Также можно нажать кнопку выбора всех лунок (**SELECT ALL WELLS**) для возвращения всех лунок в анализ.
5. Лунки, в которых находится несколько красителей, выделены желтым. выбор или отмена выбора этой лунки распространяется на все красители в ней.

Замечание: Процедура исключения лунок из анализа обратима. Выведенные данные не участвуют только в текущем анализе, поэтому нет необходимости восстанавливать данные перед сохранением файла.

7.2.9 Расчет порогового цикла

После того, как данные обработаны в режиме компенсации базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTION**) или в режиме компенсации базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой (**PCR BASELINE SUBTRACTION CURVE FIT**), появляется окно расчета порогового цикла (**THRESHOLD CYCLE CALCULATION).**

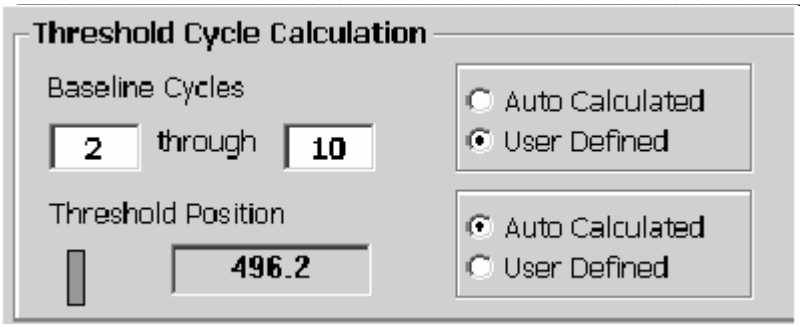


Рис.7-26. Расчет порогового цикла.

По умолчанию циклы базовой линии и пороговый цикл рассчитываются автоматически. Циклы базовой линии определяются индивидуально для каждой кривой ПЦР, например, кривая ПЦР, соответствующая образцу в лунке A1 может иметь циклы базовой линии от 2 до 10, в то время как кривая ПЦР, соответствующая образцу в лунке H12 может иметь циклы базовой линии от 4 до 24.

Автоматический подсчет порогового цикла происходит по одному из двух существующих алгоритмов. Если есть стандартные образцы, определяемые на экспериментальном планшете, то пороговый цикл определяется при максимально возможном коэффициенте корреляции кривых ПЦР, для определяемых образцов и стандартной кривой. Если на планшете нет стандартов или их недостаточно, пороговый цикл определяется путем подсчета второй производной для каждой кривой ПЦР и нахождением точки максимума кривизны. В то время как циклы базовой линии определяются индивидуально для каждой кривой ПЦР, значение порогового цикла должно быть общим для всех образцов.

При автоматическом подсчете последние 95% данных, собранных для каждого цикла, включены в анализ.

При автоматическом подсчете применяется средневзвешенная цифровая фильтрация значений.

Каждый в отдельности или все автоматически полученные результаты могут быть перепроверены вручную. Допускается объединять некоторые параметры автоматического анализа с параметрами анализа вручную. Например, автоматическое определение циклов базовой линии может быть совмещено с определением вручную порогового цикла.

Все данные, включенные в анализ, могут быть модифицированы выбором режима **Set Data Analysis Window**, а тип цифровой фильтрации может быть изменен выбором режима **Digital Filter** из контекстного меню на графике ПЦР-амплификации, как было описано в предыдущей главе этого руководства.

- **Ручное определение циклов базовой линии.** Для того чтобы откорректировать вручную автоматически подсчитанные циклы базовой линии, нужно нажать кнопку **User Defined** расположенную рядом с экраном циклов базовой линии. По умолчанию циклы базовой линии заданы в интервале от 2-го цикла до 10-го цикла. Можно ввести другие значения каждого из этих циклов, а затем нажать **Recalculate Threshold Cycle**s. Нужно отметить, что когда значения пороговых циклов определяются вручную, все кривые ПЦР анализируются при одинаковом диапазоне циклов базовой линии.

Цель правильного подсчета циклов базовой линии состоит в том, чтобы охарактеризовать и откорректировать дрейф флюоресценции фона в процессе проведения эксперимента. В целом, результаты улучшаются, если количество циклов базовой линии увеличивается, включая в себя как можно большее число циклов до того момента, как значения флюоресценции образцов начинают превышать флюоресценцию фона.

- **Ручное определение порога**

Для того чтобы вручную определить порог, нажмите кнопку **User Defined** рядом с расположением отображаемого порога. Определенное последним пользователем значение порога будет воспроизведено. Если это значение ранее не определялось, то по умолчанию порогом считается десятикратное значение среднего стандартного отклонения значений флюоресценции всех образцов в диапазоне циклов базовой линии, добавленное к значению флюоресценции циклов базовой линии. Новый порог может быть задан двумя путями: прямым введением его

численного значения в окно порога Threshold Position или перемещением порога мышью в нужное положение на графике ПЦР. Когда новый порог будет задан, кликните **Reculculate Threshold Cycles** (пересчитать пороговые циклы)**.**
Порог должен быть задан вне зоны экспоненциальной амплификации – в общем случае до точки, когда наклон (крутизна) графика ПЦР-амплификации начинает уменьшаться. Лучше всего это наблюдать в логарифмическом режиме представления результатов ПЦР. Кроме того, логарифмическое представление данных ПЦР может также облегчить идентификацию аномальных лунок или резко отличающихся значений.

7.2.10 Сохранение результатов анализа аллелей по осям X/Y

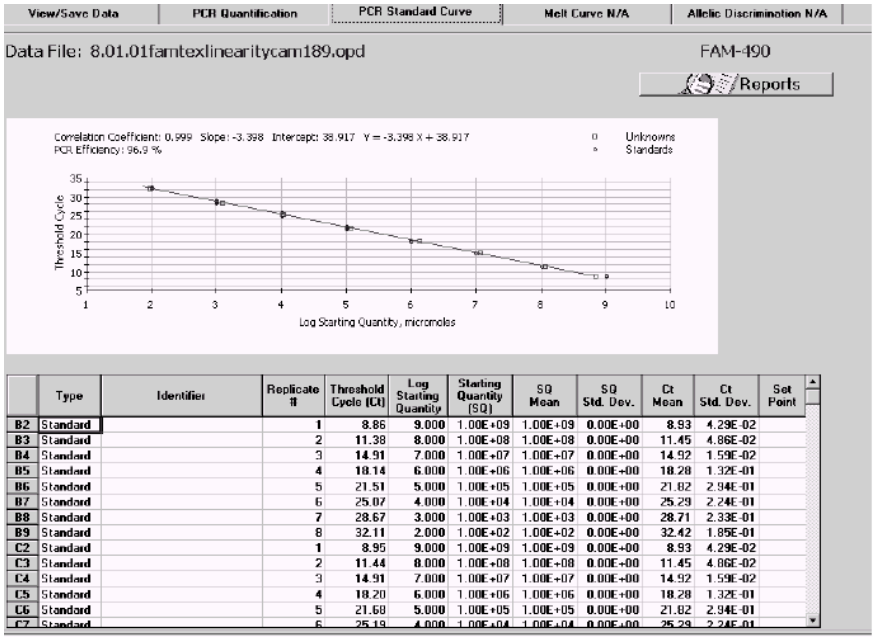
Данные ПЦР, представленные в режиме с компенсации базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTION**) могут быть экспортированы в другое окно для анализа дискриминации аллелей. Существуют 2 функциональных блока в окне количественного представления результатов ПЦР, которые становятся активными, когда режим представления результатов ПЦР меняется на режим компенсации базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTION**) или режим компенсации базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой (**PCR BASELINE SUBTRACTION CURVE FIT**). Одна кнопка посылает данные на ось X, другая на ось Y.

Рис. 7.27. Сохранение анализа дискриминации аллелей по осям X/Y.

Этот материал представлен более подробно в разделе обсуждения окна Дискриминации Аллелей (Allelic Discrimination). Смотрите раздел 7.5.

7.3 ОКНО СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ.

После того, как данные обрабатываются в режиме компенсации базовой линии ПЦР (**PCR BASELINE SUBTRACTION**) или в режиме компенсации базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой (**PCR BASELINE SUBTRACTION CURVE FIT**), создается стандартная кривая. Для просмотра этой кривой выберите режим «Стандартная кривая» (Standard Curve tab).



	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Log Starting Quantity	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.	Set Point
B2	Standard		1	8.86	9.000	1.00E+09	1.00E+09	0.00E+00	8.93	4.29E-02	
B3	Standard		2	11.38	8.000	1.00E+08	1.00E+08	0.00E+00	11.45	4.86E-02	
B4	Standard		3	14.91	7.000	1.00E+07	1.00E+07	0.00E+00	14.92	1.59E-02	
B5	Standard		4	18.14	6.000	1.00E+06	1.00E+06	0.00E+00	18.28	1.32E-01	
B6	Standard		5	21.51	5.000	1.00E+05	1.00E+05	0.00E+00	21.82	2.94E-01	
B7	Standard		6	25.07	4.000	1.00E+04	1.00E+04	0.00E+00	25.29	2.24E-01	
B8	Standard		7	28.67	3.000	1.00E+03	1.00E+03	0.00E+00	28.71	2.33E-01	
B9	Standard		8	32.11	2.000	1.00E+02	1.00E+02	0.00E+00	32.42	1.85E-01	
C2	Standard		1	8.95	9.000	1.00E+09	1.00E+09	0.00E+00	8.93	4.29E-02	
C3	Standard		2	11.44	8.000	1.00E+08	1.00E+08	0.00E+00	11.45	4.86E-02	
C4	Standard		3	14.91	7.000	1.00E+07	1.00E+07	0.00E+00	14.92	1.59E-02	
C5	Standard		4	18.20	6.000	1.00E+06	1.00E+06	0.00E+00	18.28	1.32E-01	
C6	Standard		5	21.68	5.000	1.00E+05	1.00E+05	0.00E+00	21.82	2.94E-01	
C7	Standard		6	25.19	4.000	1.00E+04	1.00E+04	0.00E+00	25.29	2.24E-01	

Рис. 7.28. Окно стандартной кривой

В верхней части диаграммы представлен коэффициент корреляции; коэффициент наклона (slope); смещение (intercept), а также наиболее оптимальная формула аппроксимации и рассчитанная эффективность ПЦР. В нижней части окна расположена таблица, в которой для каждой лунки указаны тип образца, идентификатор, пороговый цикл, вычисленная или введенная стартовая концентрация, а также статистические данные (среднее и стандартное отклонение) для пороговых циклов и вычисленных стартовых концентраций. В столбце **Set point** представлены данные о температуре сбора данных, когда температурный градиент был включен в протокол.

- Данные стандартной кривой могут быть скопированы в буфер обмена для импорта в другие программы, если щелкнуть левой кнопкой мыши в верхний левый угол окна и нажать **Control-C**.
- Чтобы увеличить размеры диаграммы, нажмите Shift и растяните диаграмму мышью при нажатой левой кнопке мыши. Для отмены этой функции нужно нажать кнопку **Control Z**. Альтернативный путь – щелкните правой кнопкой мыши по графику и выберите функцию **Восстановить график (Restore Graph**).
- Щелкнув правой кнопкой мыши на график стандартной кривой, можно вызвать контекстное меню со следующими функциями:

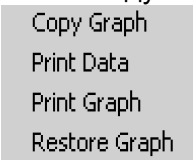


Рис. 7.29. Контекстное меню стандартной кривой.

- Функция Copy graph (копирование графика) скопирует график в буфер обмена
- Функция Print Data (печать данных) распечатает таблицу с данными.
- Функция Print Graph (печать графика) распечатает только график.
- Функция Restore Graph (восстановление графика) может быть активировано только после увеличения графика (zooming in). Это восстановит прежние размеры графика.

7.4 ОКНО КРИВОЙ ПЛАВЛЕНИЯ (MELT CURVE)

В этом окне отображаются данные кривой плавления.

7.4.1 Краткое руководство по сбору и анализу данных кривой плавления

1. Создайте и сохраните протокол и установочные файлы планшета в Workshop или выберите созданный ранее протокол и установочные файлы планшета из библиотеки (Library) и начните выполнение протокола. Выберите имя для файла данных. Протокол кривой плавления может быть запущен самостоятельно или же сразу после выполнения протокола амплификации.
2. После завершения протокола, щелкните левой кнопкой мыши на закладку **PCR View/Save Data** (просмотр и сохранение данных ПЦР). Введите Ваши примечания о выполнении протокола в блок Data Run Notes и щелкните мышью на **Sav**e. Файл с расширением OPD будет сохранен с именем, присвоенным до выполнения протокола.
3. Войдя в закладку Melt Curve (кривая плавления), выберите график **Fluorescence vs. Temperature** (график зависимости флюоресценции от температуры) или график -**dF/dT vs. Temperature** (график зависимости отрицательного значения первой производной флюоресценции от температуры).
4. Вы можете откорректировать вид графика для более ясного представления данных. Чтобы получить доступ к функции корректировки графика, щелкните по нему правой кнопкой мыши.
5. Откорректируйте далее график **-dF/dT vs. Temperature**:

- Переместите мышью пороговую линию флюоресценции, предназначенную для включения и исключения пиков (Peak Bar) в правильное положение, чтобы включить/исключить желаемые пики, и щелкните мышью по **Apply Changes to Melt Peaks** (применить изменения к пикам плавления).

- Щелкните мышью по **Delete melt peaks (**удалить пики плавления), чтобы удалить любые нежелаемые пики и затем щелкните мышью по **Apply Changes to Melt Peaks.**
- Щелкните мышью по **Edit melt peak begin/end temps** (введите начальную/конечную температуру пика плавления), если Вы хотите изменить автоматически выбранные начальную и конечную температуру пиков. Сделайте эти изменения и щелкните мышью по **Apply Changes to Melt Peaks.**

6. Щелкните мышью по **Reports** (отчеты) для получения отчета по данным кривой плавления. Если проведение амплификации сопряжено с получением кривой плавления, отчет будет содержать информацию из прогонов обеих программ.
7. Щелкните мышью по **Open/Save Settings** (открыть/сохранить установки) и затем **Save OPD File** (сохранить OPD-файл), чтобы сохранить файл данных с текущими параметрами анализа.

7.4.2 График кривой плавления

График кривой плавления может быть представлен в двух вариантах. Первый вариант графика – это зависимость флюоресценции от температуры. Такой график строится по Данным флюоресценции, полученным при выполнении протокола кривой плавления.

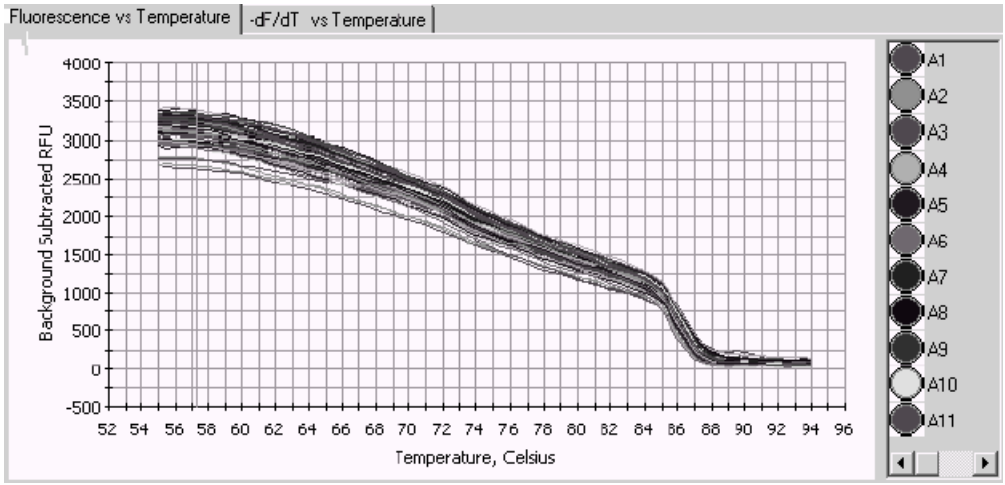


Рис. 7.30. График зависимости флюоресценции от температуры

Второй вариант графика – это зависимость отрицательного значения первой производной флюоресценции от температуры (-dF/dT). По этому графику можно определить температуры пиков плавления.

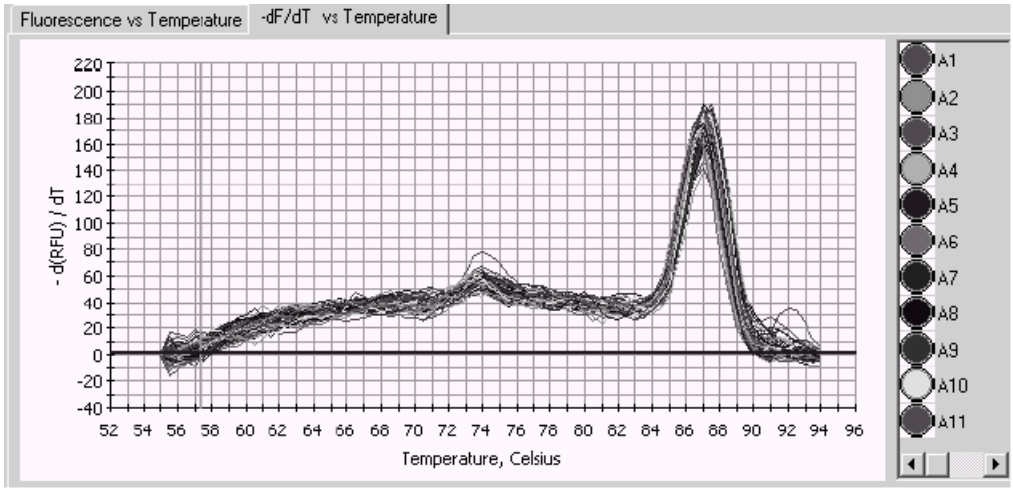


Рис. 7.31. График первой производной.

- Как и на диаграмме ПЦР амплификации, графики кривых плавления показывают за раз результаты флюоресценции только одного флюорофора
- Можно показать график только для одной лунки, щелкнув мышью по схематическому изображению этой лунки в правой части диаграммы. Здесь расположено несколько меток и для того, чтобы вывести на экран графики для нескольких лунок, нужно, нажав и удерживая кнопку **Control**, щелкните мышью на соответствующие схематические изображения лунок справа от графика.
- Чтобы увеличить график, нажмите и удерживайте кнопку **Shift** и при помощи мыши растяните график до нужных размеров.
- Чтобы восстановить размеры графика, выберите **Restore Graph** (восстановить график) из контекстного меню. Пошагово уменьшать график можно, нажимая **Control-Z**.

7.4.3 Контекстное меню графика плавления

Щелкнув правой кнопкой мыши по диаграмме кривой плавления, можно вызвать контекстное меню.

Рис. 7.32. Контекстное меню графика кривой плавления.

A. **Digital Filter (Цифровой фильтр)**. Данные кривой плавления по умолчанию обрабатываются с помощью цифровой фильтрации. Используя этот пункт меню, можно поменять тип фильтрации. Цифровая фильтрация описана в обсуждении окна PCR Quantification. Смотрите раздел 7.2.2.
B. **Adjust Graph (Манипуляции с графиком)**. Эта функция позволяет Вам изменить вид представления графика. Она описана в обсуждении окна PCR Quantification. Смотрите раздел 7.2.2.
C. **Define Trace Styl**e **(Определение стиля траектории).** Эта функция позволяет Вам переделать вид кривых плавления, отслеживать процесс плавления в той форме, которая удобна. Она описана в обсуждении окна PCR Quantification. Смотрите раздел 7.2.2.
D. **Display Data. (Отображение данных).** Эта функция открывает таблицу, в которой для каждой лунки представлены значения в относительных единицах флюоресценции (RFU), полученные в каждой точке температурного диапазона. Эти данные могут быть скопированы в буфер обмена для импорта в другие программы, если щелкнуть мышью в верхний левый угол и затем нажать **Control-C.**

Data Display

Well/ Temp	A3
55.00	0.00
55.50	3.64
56.00	5.97
56.50	5.74
57.00	9.04
57.50	9.55
58.00	9.13
58.50	13.01
59.00	14.49
59.50	18.19
60.00	23.05

Рис. 7.33. Таблица данных графика кривой плавления

E. **Restore Graph (Восстановление графика)**. Эту функцию можно использовать, чтобы восстановить график после изменения его размеров (Zoom). График также может быть восстановлен пошагово нажатием кнопки **Control Z.**
F. **Show All Traces. (Отображение всех графиков).** Эта функция используется для восстановления любого графика, который был удален из диаграммы кривой плавления**.** Эти графики также могут быть восстановлены, щелкнув мышью по диаграмме амплификации и нажав **S**.
G. **Copy Graph (Копирование графика).** Эта функция производится для копирования отображаемого графика кривых плавления в буфер обмена для импорта в другие программы.
H. **Print Data (Печать данных).** Эта функция используется для печати данных кривой плавления.
I. **Print Form (Форма печати).** Эта функция используется для печати целой страницы.
J. **Print Graph (Печать графика).** Эта функция используется для печати только графика.

7.4.4 Таблица данных кривой плавления

Программа автоматически идентифицирует и характеризует все пики над пороговой линией флюоресценции (Peak bar) и затем отображает результаты в таблице.

- Для каждой лунки пики отображаются в порядке убывания температуры плавления.
- Каждому пику присваивается свой идентификационный номер (Peak ID), который начинается с номера лунки, за которым следует номер пика. Например, если существует 6 пиков на графике, соответствующем лунке A1, то пикам присваиваются номера от A1.1 до A1.6.

Data File: 5.21.01SYBRunifcam525a.opd

	Identifier	Peak ID	Melt Temp.	Peak Descriptor	Begin Temp.	End Temp.
A1		A1.1	87.0		83.5	91.0
		A1.2	81.0		80.0	83.0
		A1.3	77.5		77.0	79.5
		A1.4	74.0		71.0	76.5
		A1.5	69.0		65.0	70.5
		A1.6	62.5		60.0	64.5
A2		A2.1	87.0		84.5	90.5
		A2.2	82.0		81.5	84.0
		A2.3	74.5		72.0	80.5
		A2.4	69.5		68.5	71.5

Рис 7.34. Таблица кривой плавления.

- Для каждого пика начальные и конечные температуры регистрируются в таблице вместе с температурами плавления, которые определяются как максимум пика плавления. Температуры начала и конца пика плавления могут быть введены вручную. Существует столбец таблицы для введения описательного имени каждого пика.

Данные могут быть скопированы в буфер обмена для переноса в другие программы, если щелкнуть мышью в левый верхний угол таблицы и нажать **Control-C** на клавиатуре.

7.4.5 выбор лунок (Select Wells)

Экспериментальные данные, соответствующие любой части лунок, могут быть исключены из анализа данных, если щелкнуть левой кнопкой мыши по **Select Wells** (выбрать лунки) в окне **Analysis** (анализ). Все исходные данные всегда будут в сохранности и исключенные из рассмотрения лунки можно вновь вернуть в анализ в любое время. Эта функция была описана выше в обсуждении окна PCR Quantification (количественной оценки результатов ПЦР).

7.4.6 Открытие/сохранение установок (Open/Save Settings)

Данные кривой плавления сохраняются автоматически в конце выполнения протокола в OPD-файле. Каждый следующий раз при сохранении данных, все модификации анализа, включая корректировки температуры пиков плавления и данные об удаленных пиках, будут сохраняться вместе с файлом OPD и в следующий раз, когда файл будет открыт, все модификации будут применены к данным опять. Оригинальные данные всегда будут в сохранности и к ним можно получить доступ, щелкнув левой кнопкой мыши по **Undo All Melt Peak Changes** (отменить изменения для всех пиков плавления). В общем случае, чтобы начать сохранение файла данных, щелкните левой кнопкой мыши по **Open/Save Setting**s (открыть/сохранить установки). В окне View and Save Analysis Savings просмотрите изменения в анализе, щелкнув левой кнопкой мыши по **Modified Melt Peak Data,** а затем щелкнув левой кнопкой мыши по **Save OPD File.** В диалоговом окне **Save** введите при желании новое имя файла и затем щелкните левой кнопкой мыши по **Save.** Эта процедура описана в деталях в обсуждении окна PCR Quantification (количественной оценки результатов ПЦР).

7.4.7 выбор флюорофора (Select Fluorophore)

Данные кривой плавления отображают флюоресценцию только одного флюорофора за раз. Чтобы изменить отображаемый флюорофор, щелкните левой кнопкой мыши по «карандашу», соответствующему требуемому флюорофору в блоке Select Fluorophore (выбор флюорофора).

7.4.8 Пороговая линия флюоресценции (Peak bar)

Только пики, расположенные Выше ***пороговой линии флюоресценции (Peak bar)***, которая представлена в виде синей горизонтальной линии, пересекающей график, включаются в анализ. Изменяя курсором мыши положение ***пороговой линии флюоресценции (Peak bar),*** можно определить, какие пики будут включены в анализ.

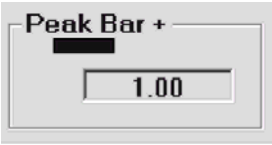


Рис. 7.35. Пороговая линия флюоресценции (Peak bar)

- Чтобы откорректировать положение данной линии, щелкните по ней левой кнопкой мыши и переместите ее при нажатой левой кнопке мыши в нужное положение. Новое значение Высоты пика будет отображено и при этом кнопка Apply Changes to Melt Peaks (применить изменения к пикам плавления) будет активирована
- Нажмите кнопку **Apply Changes to Melt Peaks**, чтобы откорректировать таблицу
- Пикам будут перенумерованы в таблице данных, чтобы отразить изменения

7.4.9 Линия температуры (Temperature Bar)

Температурная шкала удобна для идентификации температуры в любой точке графика. Переместите вертикальную оранжевую линию мышью в желаемую точку и температура в данной точке будет отображена в окне индикации линии температуры (Temperature Bar). Эта линия также используется, чтобы редактировать начальную и конечную температуры пика плавления.

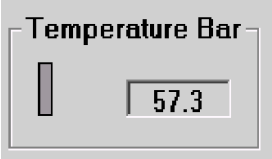


Рис. 7.36. Линия температуры (Temperature Bar)

7.4.10 Редактирование начальных и конечных температур пика плавления (Edit Melt Peak Begin/End Temps)

Вы можете отменить автоматически установленные значения начальной и конечной температуры любого пика плавления.

1. Щелкните левой кнопкой мыши по **Edit Melt Peak Begin/End Temps** (редактирование начальной и конечной температуры пика плавления).
2. Щелкните левой кнопкой мыши по схематическому изображению соответствующей лунки справа от графика.
3. Щелкните левой кнопкой мыши в колонке Begin Temp. (начальных температур) или End Temp. (конечных температур).
4. Переместите оранжевую линию температуры к нужной начальной и конечной температурной точке. Как только Вы закончите перемещение, температура будет скорректирована в соответствующем окне.
5. Щелкните левой кнопкой мыши по **Apply Changes to Melt Peaks** (применить изменения к пикам плавления).
6. Для того чтобы восстановить все графики, правой кнопкой мыши щелкните по графику кривой плавления и выберите из контекстного меню **Show all traces** (показать все графики).
7. Первоначальные температуры начала и конца пика плавления могут быть восстановлены, если щелкнуть левой кнопкой мыши по **Undo All Melt Peak Change**s (отменить все изменения пика плавления).

7.4.11 Удаление пиков (Delete Peaks)

Пики могут быть временно удалены из таблицы и анализа данных.

1. Щелкните левой кнопкой мыши по **Delete Melt Peak**s (удалить пики плавления).
2. Щелкните левой кнопкой мыши по любой ячейке в ряду пиков, чтобы удалить ее. После этого ячейка будет удалена из таблицы. Нумерация сохраненных пиков не изменится.
3. Щелкните левой кнопкой мыши по **Apply Changes to Melt Peaks (**применить изменения к пикам плавления) для завершения удаления пиков. Удаленные пики позже могут быть позже восстановлены для анализа, если щелкнуть левой кнопкой мыши по **Undo All Melt Peak Change**s (отменить все изменения пика плавления).

7.5 ОКНО ДИСКРИМИНАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ (ALLELIC DISCRIMINATION WINDOW)

Это окно полезно для установления генотипов неизвестных образцов при помощи сравнения с известными генотипами. Это может быть использовано для определения различий среди гомозиготных диких типов, гомозиготных мутантов и гетерозиготных индивидуумов и основано либо на сравнении пороговых циклов, либо на значениях флюоресценции в RFU (относительных

единицах флюоресценции). Данные флюоресценции (в единицах RFU) могут быть выбраны из любого цикла в эксперименте. Расчет может быть произведен автоматически, если контроль точно определен, или же расчет может быть сделан полностью вручную.

7.5.1 Краткое руководство по сбору и анализу данных дискриминации аллелей

1. Откройте сохраненный файл протокола и файл установок планшета из библиотеки (Library), после чего щелкните левой кнопкой мыши по **Run with selected protocol** или создайте и сохраните новые файл протокола и файл установок планшета в Workshop и щелкните левой кнопкой мыши по **Run with selected protocol** (запуск с использованием выбранного протокола).

- Автоматический анализ лучше всего работает с гомозиготными контролями для каждого из красителей, хотя программа сделает попытку найти похожие группы и в случае отсутствия контроля.
- В описании планшета используйте пиктограмму **positive control sample type** (тип образца – позитивный контроль), чтобы обозначить гомозиготные контроли.
- Полезно делать пометки в ячейках Identifier (идентификатор) контрольных образцов для каждого из красителей.

2. Выберите имя для файла данных и нажмите левой кнопкой мыши **Sav**e.
3. После окончания составления протокола откройте окно PCR Quantification (количественной оценки результатов ПЦР) и выберите флюорофор. Режим анализа результатов с базовой линии ПЦР или режим с компенсацией базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой должен быть выбран из списка в окне **Select Analysis Mode** (выбрать режим анализа), чтобы задать флюорофоры, соответствующие осям ординат.
4. Если из анализа были исключены какие-то лунки, нужно щелкнуть левой кнопкой мыши на **Select Wells (**выбор лунок) в окне количественной оценки результатов ПЦР (PCR Quantification window).
5. Когда все желаемые корректировки параметров расчета порогового цикла будут сделаны и пороговые циклы будут определены, щелкните левой кнопкой мыши на **Save for x-axis Allelic Analysi**s (сохранение анализа аллелей для оси абсцисс).
6. выберите другой флюорофор.
7. Когда все желаемые корректировки параметров расчета порогового цикла будут сделаны и пороговые циклы будут определены, щелкните левой кнопкой мыши на **Save for y-axis Allelic Analysis** (сохранение анализа аллелей для оси ординат).
8. Щелкните левой кнопкой мыши на элемент **Allelic Discrimination** (дискриминация аллелей). В режиме анализа RFU (анализ значений в относительных единицах флюоресценции) все отзывы базируются на значениях в RFU для каждого флюорофора в отображаемом цикле.

- **Automatic Call** (автоматический вариант анализа) оптимизирует позиции вертикальной и горизонтальной шкал. Генотип каждого неизвестного образца определяется позицией вертикальной и горизонтальной шкал. Вы можете отрегулировать позицию каждой из шкал и затем щелкнуть левой кнопкой мыши по **Recalculate** (пересчитать) и программа переделает определение генотипа, основываясь на новых позициях.
- **Manual Call** (ручной вариант анализа) позволяет проводить определение вручную по графику или таблице.

9. Чтобы проанализировать данные порогового цикла не в RFU, нужно щелкнуть левой кнопкой мыши по кнопке **Threshold Cycle** (пороговый цикл) в окне Display Mode (режим отображения).

- Щелкните левой кнопкой мыши по **Automatic Call** для автоматического расположения вертикальной и горизонтальной шкал. После того, как шкалы будут установлены, генотипы всех неизвестных проб определяются на основе расположения вертикальной и горизонтальной шкал. Вы можете задать расположение любой из шкал и затем, щелкнув левой кнопкой мыши по **Recalculate,** после чего программа проведет новое определение генотипа, основанное на новых расположениях шкал.
- Щелкните левой кнопкой мыши по **Manual Call**, чтобы провести определение вручную по графику или таблице.

10. В любое время все модификации данных по дискриминации аллелей могут быть отменены, если щелкнуть левой кнопкой мыши по **Undo All Changes** (отменить все изменения).
11. Распечатайте **Report** (отчет) и затем щелкните левой кнопкой мыши по элементу **View/Save Data** (просмотр/сохранение данных).
12. Щелкните левой кнопкой мыши по **Save OPD File** и затем в окне View and Save Analysis Settings (просмотр и сохранение установок анализа) щелкните левой кнопкой мыши по **Save OPD File** снова. Дайте файлу имя в диалоговом окне Save (сохранения) и щелкните левой кнопкой мыши по **Save**.

7.5.2 График дискриминации аллелей (Allelic Discrimination Plot)

График дискриминации аллелей строится или по значениям флюоресценции в RFU, или по значениям пороговых циклов для двух различных красителей одновременно.

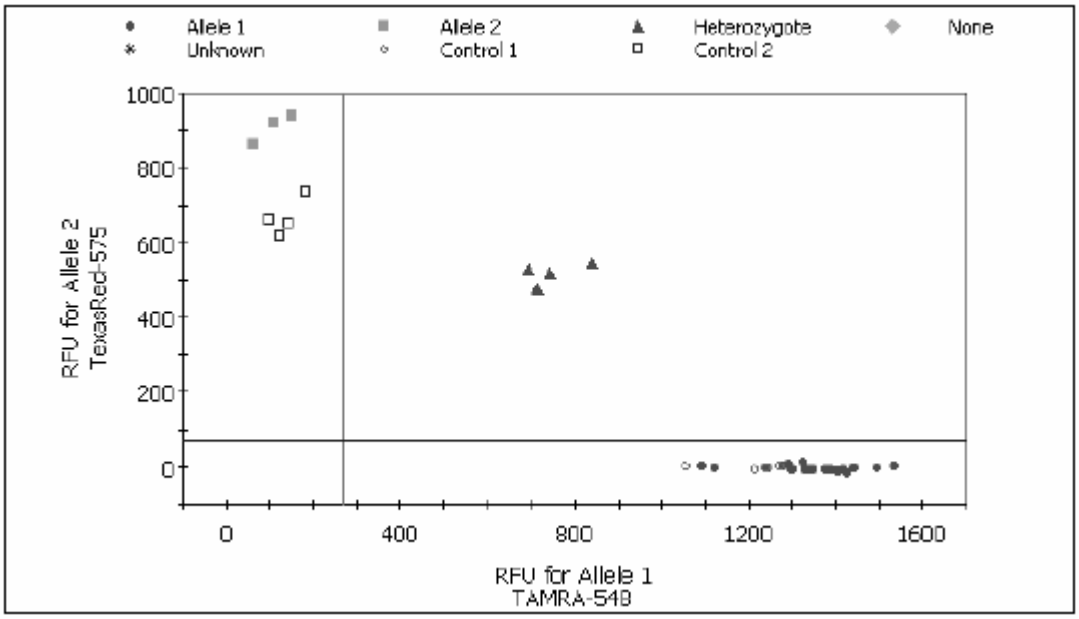


Рис. 7.37. График дискриминации аллелей в виде RFU данных

В режиме **Automatic Call**, две ограничительные линии, одна вертикальная и одна горизонтальная, делят график на 4 сектора: один для каждого из гомозиготных состояний, один для гетерозиготного состояния и нереакционный сектор. Положения этих двух ограничительных линий могут быть отрегулированы в режиме анализа **Automatic Call.** Ограничительные линии не появляются в режиме **Manual Call.**

Определение генотипа для неизвестных образцов может быть осуществлено с помощью построения графика по значениям RFU, причем для одного флюорофора (аллель 1), значения откладываются по оси x, а для другого флюорофора (аллель 2), RFU данные откладываются по оси y. Пример Вы можете увидеть на графике дискриминации аллелей (рис. 7.37).

- Если значения RFU неизвестного образца больше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и больше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип является гетерозиготным.
- Если значения RFU неизвестного образца больше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и меньше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип является гомозиготным по аллели 2 (значения RFU для аллели 2 откладываются по оси y).
- Если значения RFU неизвестного образца меньше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и больше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип является гомозиготным по аллели 1 (RFU значения для аллели 1 откладываются по оси x).

- Если значения RFU неизвестного образца меньше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и меньше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип не может быть определен.

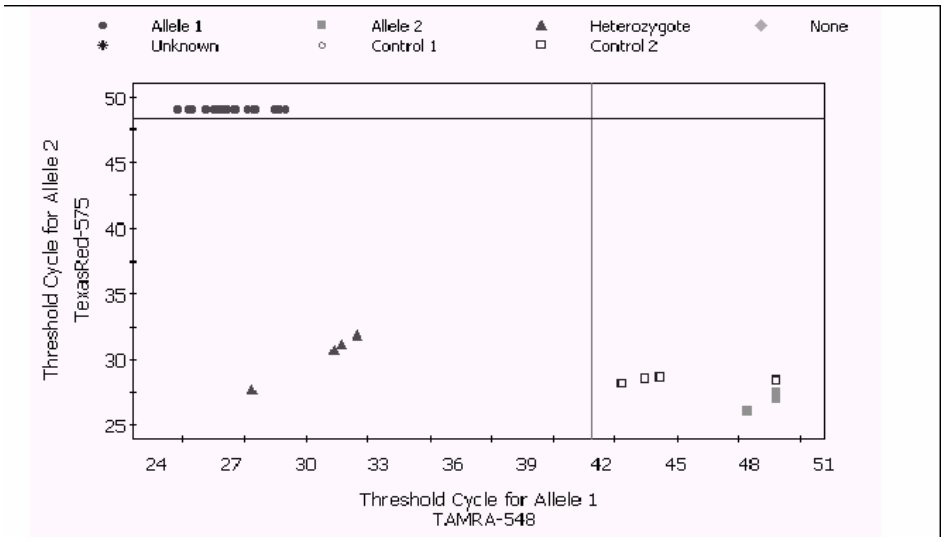


Рис. 7.38. График дискриминации аллелей, в виде значений пороговых циклов.

может быть осуществлено с помощью построения графика по значениям порогового цикла, причем для одного флюорофора (аллель 1), значения порогового цикла откладываются по оси x, а для другого флюорофора (аллель 2), значения порогового цикла откладываются по оси y. Пример Вы можете увидеть на графике дискриминации аллелей (рис. 7.38).

- Если значения порогового цикла неизвестного образца больше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и больше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип не может быть определен. Образцы, не достигающие порога в процессе выполнения протокола, находятся в этом квадранте.
- Если значения порогового цикла неизвестного образца больше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и меньше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип является гомозиготным по аллели 1 (значение порогового цикла аллели 1 откладывается по оси x).
- Если значения порогового цикла неизвестного образца меньше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и больше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип является гомозиготным по аллели 2 (значение порогового цикла аллели 2 откладывается по оси y).
- Если значения порогового цикла неизвестного образца меньше, чем значение горизонтальной ограничительной линии и меньше, чем значение вертикальной ограничительной линии, то генотип является гетерозиготным.

В режиме **Manual Call** график отображает только RFU данные или значения порогового цикла. Ограничительные линии не отображаются и модификации делаются вручную, используя самораскрывающееся меню в колонке Call таблицы данных, или щелкнув левой кнопкой мыши по графику и осуществив перемещения на графике курсором мыши.

Вы можете увеличить график дискриминации аллелей, нажав кнопку **Shift** и одновременно перемещая границу графика мышью. Восстановить график можно, выбрав **Restore Graph (**восстановить график) из контекстного меню (доступного путем щелчка правой кнопкой мыши по графику), другой способ восстановить размеры графика по шагам – нажимать несколько **Control Z.**

7.5.3 Контекстное меню графика дискриминации аллелей (Allelic Discrimination Plot Context Menu)

Это контекстное меню открывается щелчком правой кнопкой мыши по графику дискриминации аллелей.

A. Adjust Graph. (настроить график). Эта функция позволяет отобразить график в различных видах. Это делается так, как было описано в обсуждении окна количественной оценки результатов ПЦР (PCR Quantification), за исключением того, что данные нельзя представить в логарифмическом виде. (См. раздел 7.2.2)

B. Restore Graph (восстановить график). Эта функция используется для восстановления графика после изменения его размеров. График может быть также восстановлен по шагам, нажимая **Control Z**.

C. Copy Graph (копировать график). Эта функция копирует отображаемый график кривой плавления в буфер обмена для его импорта в другие программы.

D. Print Data (печать данных). При помощи этой функции можно распечатать данные кривой плавления.

E. Print Form (печать формы). Это используют, чтобы распечатать целую страницу.

F. Print Graph (печать графика). При помощи этой функции можно распечатать только график.

7.5.4 Таблица данных аллелей (Allelic Data Spreadsheet)

В окне размещена 6-колоночная таблица. Первая колонка включает номера лунок, 2-я и 3-я колонки – это идентификатор, введенный в разделе описания планшета для двух слоев красителей. 4 и 5 колонки содержат RFU данные или данные порогового цикла для обоих слоев красителей. Последняя колонка содержит ответ по генотипу, определенный программой или пользователем.

	ID 2	RFU 1	RFU 2	Call
B1	Control FV	1054.09	2.89	Control 1
B2	Control FV	1271.55	2.48	Control 1
B3	Control FV	1239.70	-1.70	Control 1
B4	Control FV	1211.65	-4.76	Control 1
B5	Control WT	1092.91	2.82	Allele 1
B6	Control WT	1325.19	-7.81	Allele 1
B7	Control WT	1417.26	-5.82	Allele 1
B8	Control WT	1438.73	-2.43	Allele 1
B9	Control FII	184.00	733.32	Control 2
B10	Control FII	144.89	649.84	Control 2
B11	Control FII	123.42	615.49	Control 2
B12	Control FII	98.81	658.90	Control 2
E1		1534.21	2.83	Allele 1
E2		1241.21	-2.96	Allele 1
E3		1342.37	-4.06	Allele 1
E4		1335.66	-3.47	Allele 1
E6		1425.19	-13.33	Allele 1
E7		696.43	528.24	Heterozygote
E8		839.69	547.42	Heterozygote
E9		716.22	477.23	Heterozygote

Рис. 7.39. Таблица аллельных данных

• В режиме **Automatic Call** все определения делаются программой на основе расположения вертикальной и горизонтальной ограничительных линий.

• В режиме **Manual Call** колонка Call («позывной», установленный тип) становится редактируемой при использовании самораскрывающегося меню. Это может быть полезно, если Вы хотите изменить тип образца, например, с неизвестного на положительный контроль.

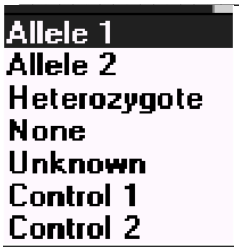


Рис. 7.40. Тип или «позывной» (Call) образца может быть определен в ручном режиме.

• Данные могут быть скопированы в буфер обмена для экспорта в другую программу, если щелкнуть левой кнопкой мыши в верхний левый угол таблицы и нажать **Control C**.

7.5.5 Автоматический/ручной анализ (Automatic/Manual Call)

Выберите вид анализа, щелкнув мышью на одно из этих двух окошек. По умолчанию выбирается автоматический вызов типа (Automatic).

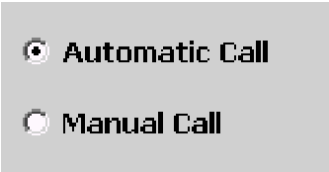


Рис. 7.41. выбор вида анализа.

• Выберите **Automatic Call,** чтобы программа определила неизвестные значения генотипа по положению вертикальной и горизонтальной ограничительных линий и представила эти результаты в таблице данных. Если установлены значения, по крайней мере, трех положительных (гомозиготных) контролей для каждого слоя красителей, положения ограничительных линий базируются на среднем значении и стандартном отклонении пороговых циклов или значениях RFU для контролей. Если количество установленных контролей не достаточно, то положение каждой из ограничительных линий определяется рядом пороговых циклов или значений RFU в выбранных слоях красителей. Положения ограничительных линий могут быть заданы вручную, если переместить их мышью. Щелкните левой кнопкой мыши **Recalculate (**пересчитать) после изменения положения вертикальной и горизонтальной ограничительных линий, и программа определит новые значения генотипа.

• Щелкните левой кнопкой мыши **Manual Call**, чтобы произвести определение генотипа прямо в таблице данных или на графике. Вы можете использовать эту функцию, чтобы изменить данные одной или нескольких лунок на графике или в таблице и затем вернуться в автоматический режим, а программа переместит вертикальную и горизонтальную ограничительные линии, базируясь на новых данных и затем осуществит определение генотипа.

Чтобы выполнить анализ вручную (**manual call**) на графике:

1. Щелкните левой кнопкой мыши **Manual Call.** Будет отображено новое диалоговое окно.

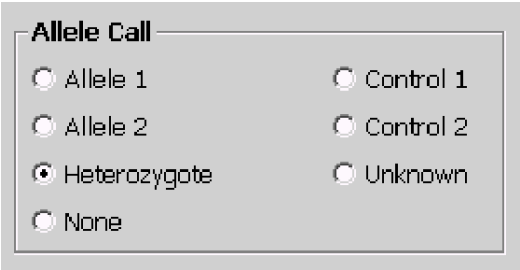


Рис. 7.42. Выбор Manual Call.

2. Выберите один из видов отзыва, щелкнув левой кнопкой мыши в соответствующее положение.
3. На графике, обозначьте мышью лунку или лунки, по которым нужен отзыв.
Когда кнопка мыши будет отпущена, новые определения будут сделаны как на графике, так и в таблице данных.

Чтобы выполнить анализ вручную (**manual calls**) в таблице данных:
1. Щелкните левой кнопкой мыши **Manual Call**
2. Щелкните левой кнопкой мыши по ячейке, соответствующей интересующей Вас лунке в колонке Call таблицы данных. Выберите новый тип образца из самораскрывающегося меню.
3. Заметьте что тип "**unknown**" (неизвестный) может быть выбран только в режиме **Manual Call**.

7.5.6 Режим Вывода данных (Display Mode)

Выберите представление данных, которое должно быть проанализировано, и щелкните на него левой кнопкой мыши.

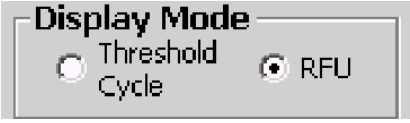


Рис. 7.43. Режим Вывода данных.

При выборе RFU будет представлен режим вывода данных по значениям RFU. При этом RFU данные из любого цикла могут быть проанализированы. Можно поменять цикл, введя новое значение в окно Select Cycle (выбор цикла).

Рис. 7.44. выбор цикла.

7.5.7 Вертикальный порог (Vertical Threshold)

В этом окне (рис. 7.45) показывается текущее положение вертикальной ограничительной линии. Данные в этом окне нельзя редактировать. Положения вертикальной и горизонтальной ограничительных линий определяют значение генотипа неизвестных образцов.

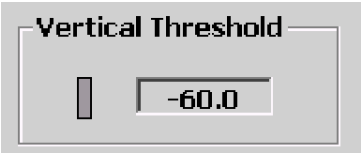


Рис. 7.45. Вертикальный порог.

7.5.8 Горизонтальный порог (Horizontal Threshold)

В этом окне (рис. 7.46) показывается текущее положение горизонтальной ограничительной линии. Данные в этом окне нельзя редактировать. Положения горизонтальной и вертикальной ограничительных линий определяют значение генотипа неизвестных образцов.

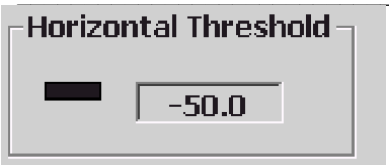


Рис. 7.46. Горизонтальный порог

.

7.5.9 Нормирование данных (Normalize Data)

Когда выбран RFU режим анализа данных, появляется возможность использовать функцию нормирования данных (Normalize Data) (рис. 7.47). RFU данные могут быть нормированы и показаны на графике в интервале от 0 до 1 по обеим осям координат. Данные нормируются по самому большому RFU значению выбранного цикла. Иногда это очень эффективный вариант представления данных (рис. 7.48).

Рис. 7.47. Нормирование данных.

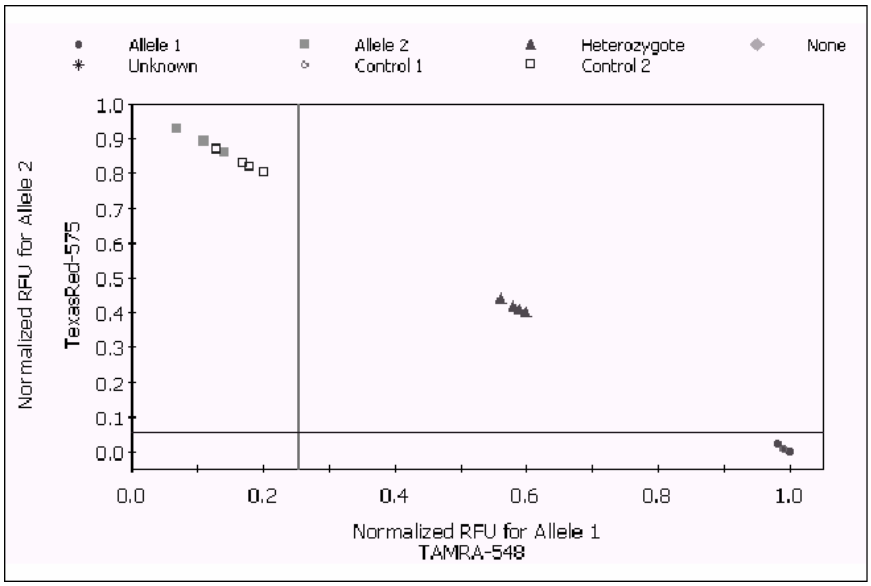


Рис. 7.48. График дискриминации аллелей (Allelic Discrimination Plot), представлен в виде нормированных данных.

Секция 8

Обслуживание прибора

8.1 Уход за прибором.

Будьте осторожны. Не допускайте попадания жидкости на поверхность или внутрь термоциклера iCycler, а также на оптический модуль.
Очистку поверхностей прибора можно производить х/б салфеткой или бумажным полотенцем. В некоторых случаях можно использовать мягкую ткань без волокон, смоченную водой.

8.2 Замена ламп

Перед заменой лампы необходимо выключить прибор и подождать, по крайней мере 15 минут, чтобы охладить прибор.
Лампа расположена на правой стороне Оптического Модуля сразу позади правой защелки (Рис. 8.1). Для замены лампы:

1. Отсоединить кабель питания от Оптического Модуля.
2. Открыть левую и правую защелки.
3. Сдвинуть крышку по направлению заднему отсеку, в котором находится лампа.
4. Нажмите и поверните лампу, после чего извлеките ее из держателя
5. Поднимите лампу и отключите ее от разъема.
6. Установку новой лампы выполняйте в противоположном порядке. Держите новую лампу за внешнюю поверхность отражателя. Не дотрагивайтесь до колбы новой лампы. Проверьте что, пружинная защелка опущена, прежде чем вставлять лампу в держатель. Плотно вставьте лампу в держатель, затем закройте крышку и защелкните защелки.

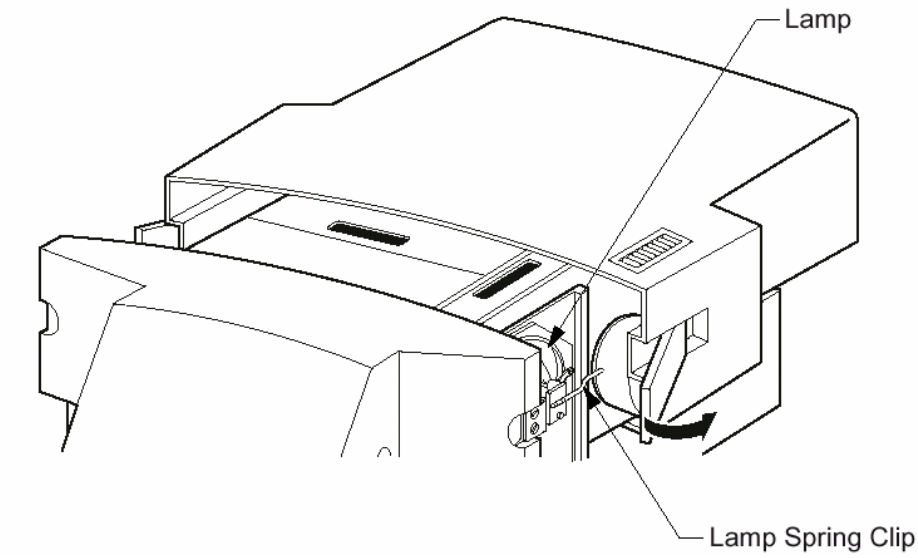


Рис. 8.1.Замена лампы.

Приложение A.

Технические характеристики прибора

Питание

100–250 VAC ± 10% 50–60 Hz
250 VA (max), 95W

Условия эксплуатации

Температура окружающей среды 15–30°C
Температура хранения -20–30°C
Влажность 0–90%, без конденсата

Описание оптического модуля

Размеры

ширина 12.2” (31. cm)
высота 7” (17.8 cm)
глубина 17” (43.2 cm)
Вес 15 lbs (6.8 kg) net max

Источник питания

Размеры

ширина 3.75” (9.5 cm)
высота 2.56” (6.5 cm)
глубина 7.4” (18.8 cm)
Вес 2 lbs (0.9 kg) net max

Интерфейс

Двунаправленный параллельный порт (PC совместимый)

Соответствие стандартам

TUV
CE

Приложение B

Требования к характеристикам управляющего компьютера

Для устойчивой работы оптического модуля iCycler iQ, требуется компьютер со следующими характеристиками:

- IBM-совместимый компьютер с процессором Pentium с частотой не ниже 400 MHz
- Операционные системы Windows 98, Windows 2000, Windows XP, Windows NT (service pack 3) US версии.
- Microsoft Internet Explorer v5.0
- 128 Mb Оперативной памяти
- 6 GB HDD (minimum)
- CD ROM drive
- 1.44 MB 3.5” FDD
- Mouse
- 57.6 KBPS Serial port
- Bi-directional Parallel port (EPP or ESP mode)
- Монитор 1024 x 768 x 256 colors minimum Screen resolution
- IEEE 1284 Parallel Port Cable (m-m)

Рекомендуется следующее оборудование:

- USB интерфейс для подключения принтера
- Цветной принтер с интерфейсом USB
- Модем для подключения к Интернет
- Блок бесперебойного питания с мощностью не менее 1000 VA
- Экранированные кабели для соединения частей системы

Приложение C

Гарантия

Фирма Bio-Rad обеспечивает годовую гарантию iCycler iQ Real Time PCR Detection System в случае дефектов прибора, а также обучение персонала. Если поломки происходят в течение этого срока, Bio-Rad заменяет дефектные части бесплатно.

Тем не менее, следующие дефекты исключаются из гарантии:
1. Дефекты, происходящие по вине оператора.
2. Дефекты, вызванные в результате самостоятельного ремонта или модификации прибора.
3. Использование пробирок, планшетов, или изолирующих материалов, не рекомендованных фирмой Bio-Rad для использования в iCycler iQ Real Time PCR Detection System.
4. Преднамеренного или непреднамеренного использования прибора в нарушение инструкции по эксплуатации.
5. Повреждений вызванных природными бедствиями.
6. Повреждений возникающих при применении неправильных растворов или проб.

Гарантии не действуют в случаи расплавления прибора.
С вопросами и предложениями по сервису, обращайтесь в представительство Bio-Rad Laboratories. Не забудьте сообщить модель и серийный номер вашего прибора.
Для технического обслуживания звонить в местное отделение Bio-Rad или в the U.S. call 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723).

СЕРВИСНАЯ СЛУЖБА

РОССИЯ, МОСКВА, Ленинградский проспект, д.37А, корп.14
ООО "БИО-РАД Лаборатории"
тел. (095)7211404
факс (095)7211412

Приложение D

Термоциклер iQ iCycler (Информация для заказа)

Каталог Номер	Продукт (Описание)
170-8720	iCycler with 96 x 0.2 ml Reaction Module, includes iCycler base with the 96 x 0.2 ml iCycler Reaction Module, In-Sample temperature Probe (0.2 ml tube size), Comprehensive Instruction Manual, Quick Reference Card, PCR tubes, and power cord.
170-8740	iCycler Optical System, includes iCycler Optical Upgrade for 96-well reaction module, optical power supply, basic filter set, iCycler iQ validation solution, software interface CD-ROM, optical quality 96-well PCR plates, communication cables, power cord, instructions.
170-8714	iCycler 0.2 ml Immersion Probe/Sample Cap
223-9441	96-well 200 µl Thin Wall PCR Plates, 25 per box
223-9442	96-well 200 µl PCR Plate Caps, for 223-9441, 300 per box
223-9444	Optical Quality Sealing Tapes, optimized for use with 223-9441, 100 sheets
170-8777	iCycler iQ Filter Set, FAM/SYBR
170-8778	iCycler iQ Filter Set, VIC/HEX/TET/Cy3
170-8779	iCycler iQ Filter Set, Cy3/TAMRA
170-8781	iCycler iQ Filter Set, ROX/TexasRed
170-8782	iCycler iQ Filter Set, Cy5
170-8783	iCycler iQ Filter Set, Ethidium Bromide
170-8792	iCycler iQ Calibrator Dye Solution Set
170-8794	iCycler iQ External Well Factor Solution
170-8793	iCycler iQ FAM Calibrator Solution, 5 per package
170-8795	iCycler iQ HEX Calibrator Solution, 5 per package
170-8797	iCycler iQ Cy5 Calibrator Solution, 5 per package
170-8799	iCycler iQ Texas Red Calibrator Solution, 5 per package

Приложение Е

Сообщения об ошибках и действия по их устранению.

Е.1 Ошибки при запуске программы.

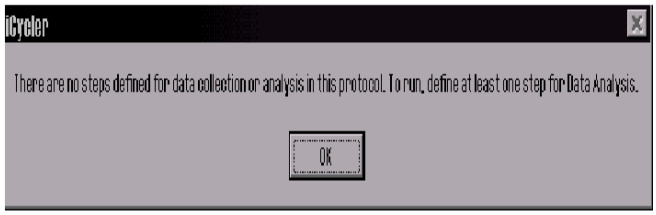
Причина: Не работает параллельный порт компьютера при запущенной программе, в связи с чем детектор не отвечает.
Действия: Включить детектор или проверить соединение параллельного порта компьютера с прибором.

Причина: Программа iCycler загружена, но не «видит» через последовательный порт модуль iCycler.
В этом режиме Вы можете только редактировать протоколы и описания планшетов, руководствуясь данными анализа.
Действия: Прежде чем предпринять какие- либо действия, удостоверьтесь, что базовый модуль правильно подключен к компьютеру и на него подано питание. Попробуйте перезапустить программу еще раз.

Е.2 Протокол работы и протокол библиотеки.

Причина: Текущий Протокол термоциклирования был отредактирован, но изменения, которые были сделаны в этом протоколе, не были сохранены перед тем, как Вы открыли новый протокол и закрыли окно.
Действия: *Только один протокол может быть открыт одномоментно, в связи с чем, Вы должны выбрать какой именно протокол будет активным в данный момент, закрыв оставшиеся или сохранить его в файле протокола. Если Вы изменили, режим без сохранения предыдущего протокола все изменения будут потеряны.*

Причина: Вы создали протокол термоциклирования без анализа данных в реальном времени. Иконка сбора данных была задана, по крайней мере, в одном из шагов (сбор и сохранение данных), но нет шага с желтой иконкой камеры РЕАЛЬНОГО-ВРЕМЕНИ (REAL-TIME) (анализ данных в режиме реального времени).
Действия: Необходимо добавить шаг анализа данных с желтой иконкой камеры (режим РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ) к протоколу термоциклирования, или активировать существующую иконку, чтобы заменить ее на новую желтую иконку.

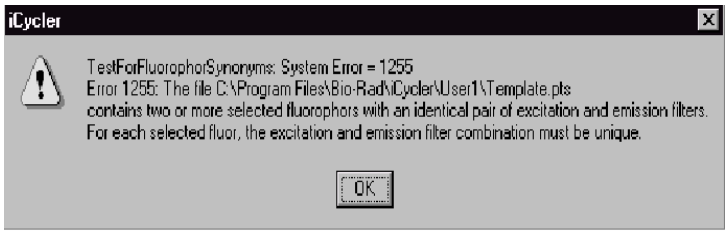


Причина: Нет шага сбора данных или анализа данных в режиме реального времени в протоколе термоциклирования.
Действия: Необходимо добавить шаг сбора данных или анализа данных в режиме реального времени (шаг с иконкой желтая камера), как дополнительный шаг протокола.

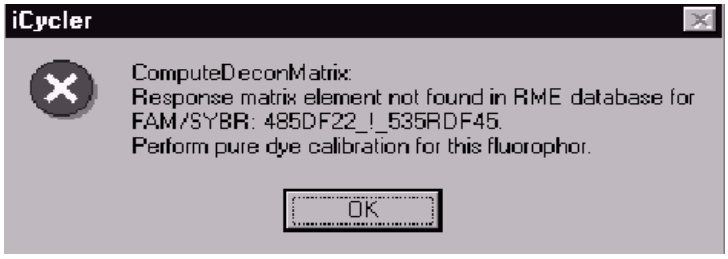
Причина: Текущий открытый файл с описанием планшета был отредактирован, но изменения не сохранились, перед тем как Вы вышли из этого файла или открыли файл с другим описанием планшета.
Действия: Только один файл с описанием планшета может быть активирован в одно и тоже время, поэтому Вы должны выбрать или отказ от редактирования или сохранение этого файла, перед тем как открыть следующий файл с описанием планшета. Если Вы решили закрыть программу все изменения сделанные в этой программе будут потеряны, если Вы их не сохраните.

Причина: Вы пытаетесь просмотреть файл созданный в предыдущей версии программного обеспечения, которая допускала использование двух или более флюорофоров измеряемых на одной и той же паре фильтров. Этот файл не может быть открыт. На пример, FAM490 и TET490 оба были заданы в файле описания планшета. Каждый флюорофор на планшете должен быть связан с уникальной парой фильтров. В этом случае, существуют два флюорофора, которые предполагается измерять на оной паре фильтров (490/520).

Действия: Файл описания планшета должен быть создан заново, так чтобы каждый флюорофор соответствовал уникальной паре фильтров.



Причина: Вы пытаетесь сохранить или запустить файл описания планшета, в котором 2 или более флюорофоров, связаны с одной и той же парой фильтров. В каждом эксперименте должна быть уникальная пара фильтров скомбинированная с каждым флюорофором. В файле с установленным планшетом вызов обоих флюорофоров FAM490 и TET 490 на одном планшете не работает, а также не может быть сохранен и выполнен.
Действия: Редактирование файла описания планшета в окне Protocol Workshop. В режиме редактирования описания планшетов, в листе флюорофоров необходимо активировать кнопку Clear Setup (очистить установку) и начать устанавливать новые значения флюорофоров на планшете. Вы можете выбрать только такие комбинации флюорофоров и пары фильтров, при которых пара фильтров не используется для чтения больше чем одного флюорофора.



Причина: Это случается, в случае если Вы используете версию программы более новую, чем 1.800, пытаясь открыть сохраненные OPD файлы, собранные при использовании версии 1.440.

Действия: Данные с калибровкой чистыми красителями, включенные в RME файл должны иметь вход для FAM/SYBR флюорофоров в комбинации с 485/535 (замененные на 490/530 пару фильтров). RME файл инсталлированный со всеми версиями программ после 1.880 содержит вход для этих комбинаций, но если RME файл стерт, становится невозможным воссоздание правильных значений через протокол калибровки чистыми красителями. Вы должны отредактировать RME файл в редакторе, например в WORD, и добавить следующую строку:
[FAM/SYBR]485DF22_!_535RDF45=4.021013e+003

Причина: Эта ошибка похожа на предыдущую, кроме того, что на одном планшете одна или больше комбинаций флюорофоров с фильтрами будут иными, чем FAM/SYBR с парой фильтров 485/535. В этом случае файл описания планшета вызывает для использования комбинацию флюорофора с фильтрами, для которых данные калибровки с чистым красителем отсутствуют (В нашем примере это Texas Red 575 с парой фильтров 490/530).
Действия: Необходимо сначала произвести калибровку чистым красителем, по результату которой будет оценена желаемая комбинация пары фильтра с флюорофором.

Причина: Вы нажали на кнопку **Pure Dye Calibration** (калибровка чистыми красителями) в окне Run Setup screen, но файл описания планшетов активировал планшет с одной или более лунками имеющими больше чем один флюорофор. В протоколе калибровки чистыми красителями ни одна из лунок не может иметь больше чем один флюорофор.

Действия: Необходимо исправить ошибку в файле описания планшета. Если несколько лунок имеют более одного флюорофора необходимо отредактировать или создать новый файл описания планшета для калибровки чистыми красителями, в котором в каждой лунке будет не больше одного флюорофора.

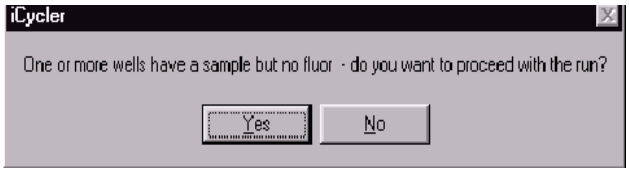
Причина: В файле описания планшета не было определено ни одного флюорофора.

Действия: Определите, по крайней мере, один флюорофор на экспериментальном планшете в файле описания планшета.

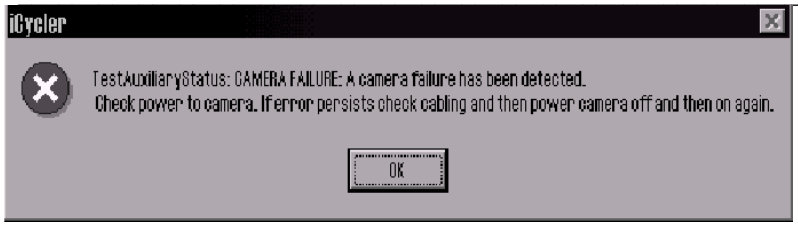
E.3 Run Time Central (Центральное время запуска)

Причина: Вы не используете все выбранные в файле описания планшета флюорофоры.

Действия: Это просто напоминание, проверить Ваше описание планшета. Это не обязательно использовать все определенные вами флюорофоры в каждом эксперименте.

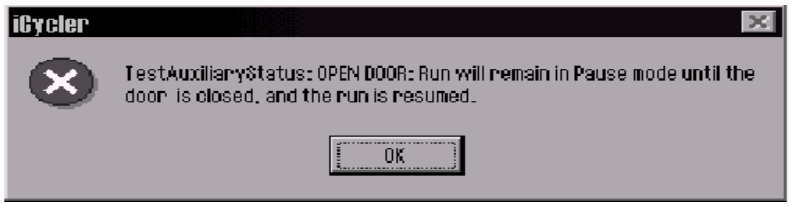


Причина: Вы пытаетесь использовать файл описания планшета, в котором некоторые лунки содержат пробы, но тип флюорофора не определен. В этом случае, данные лунки не будут измеряться.
Действия: Если Вы хотите собрать данные флюоресценции по этим лункам, Вам следует определить для них флюорофор в файле описания планшета в режиме Edit Plate Setup (редакция описания планшета).



Причина: В программе «потерян» сигнал из iQ оптического модуля.

Действия: Необходимо удостовериться, что включен блок питания, и параллельный кабель правильно соединяет детектор с компьютером. Если в течение эксперимента зафиксирована неверная детекция, программа делает паузу в выполнение протокола до тех пор, пока проблема не устранена и не нажата кнопка **Continue Running Protoco**l(**Продолжить Выполнения Протокола**).

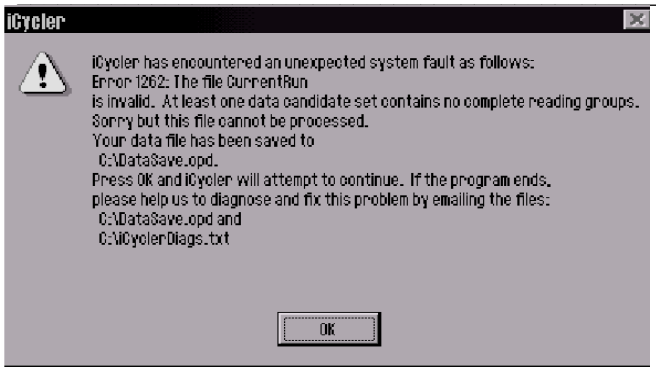


Причина: Во время эксперимента была открыта крышка или крышка была закрыта не полностью.

Действия: Полностью закрыть крышку. Если во время выполнения эксперимента крышка закрыта не полностью, программа останавливает выполнение протокола до тех пор, пока крышка камеры не будет полностью закрыта, и Вы не нажмете кнопку **Continue Running Protoco**l.

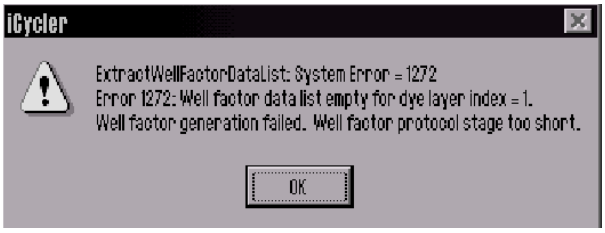
Причина: Слабое или слишком интенсивное свечение запускает систему защиты iQ оптического модуля. Если это случается в течение выполнения протокола программа делает паузу, работа прибора приостанавливается до тех пор, пока свечение не установится в пределах нормы.

Решение. В этом случае Необходимо выключить сначала усилитель CCD камеры, для чего выключить блок питания iQ детектора и затем в обратном порядке все включить. После этого Необходимо нажать на кнопку Continue Running Protocol.
Наиболее вероятные случаи выключения усилителя связаны с каруселями для фильтров и самими фильтрами. Выключение может происходить, в случае если не фильтрованный свет достигает усилителя, поэтому необходимо быть уверенным в том, что каждая позиция в карусели фильтров занята фильтром или заглушкой. Это также может происходить, если фильтры находятся в ошибочной позиции, а не так как это определено установкой карусели фильтров. Необходимо удостовериться в том, что фильтры находятся в правильной позиции на обеих каруселях фильтров, на карусели фильтров поглощения и на карусели фильтров для эмиссии. И, наконец, очень концентрированный раствор флюорофоров может быть причиной запуска системы защиты.



Причина: Шаг сбора данных в протоколе не достаточно долог, по крайней мере, для полного просчета одной группы проб включающей отдельную пару фильтров. Поскольку одна пара фильтров существует для каждого флюорофора на планшете, завершение измерения может потребовать использования 4 наборов фильтров.

Действия: Отредактируйте файл с температурным протоколом и увеличьте время, необходимое для сбора данных для всей группы. Если это случится раньше, чем выполнится амплификационная часть протокола, Вы можете запустить выполнение протокола снова сначала. Если это случится позже, чем выполнится амплификационная часть, результаты будут выше базовой линии, и Вы можете иметь достаточно данных для завершения анализа. Вам следует отредактировать протокол перед тем, как использовать его второй раз. Если это происходит, в то время как программа пытается собрать динамические факторы лунок в начале эксперимента, Вы можете отредактировать Dynamicwf.tmo файл для увеличения времени единичного шага во втором цикле (цикл с иконкой желтая камера). Если Вы решили редактировать Dynamicwf.tmo файл, сначала Вы должны сохранить первый (оригинальный) файл под другим именем и после завершения эксперимента восстановить его. Файл Dynamicwf.tmo можно найти в папке User1. Если это происходит, в то время пока программа пытается собрать внешние факторы лунок, вероятно, это значит, что Well Factor раствор был разведен неправильно и это предельно насыщает детектор, даже если время экспозиции предельно короткое 10ms



Причина: Длительность подсчета шага сбора данных вставленного цикла при благоприятных внешних факторах недостаточен.

Действия: Отредактировать файл Externalwf.tmo протокола температур и удлинить время сбора данных до необходимого (единичный шаг во втором цикле).

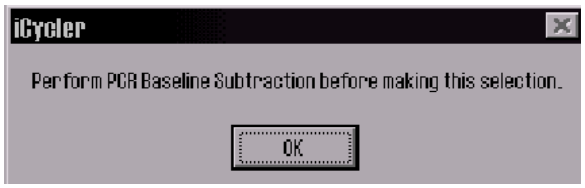
Причина: Одна или более лунок на экспериментальном планшете настолько яркие, что детектор не может сделать картинку в пределах логарифмической кривой (яркость пробы находится в зоне насыщения).

Действия: Если это происходит в начале протокола Необходимо попробовать уменьшить концентрацию флюорофора. Если это происходит ближе к концу протокола, у Вас может быть достаточно данных для того, чтобы закончить анализ и сохранить данные в файле.

Причина: Это сообщение появляется после того, как Вы сделали попытку закончить цикл раньше, чем он должен закончится по протоколу.

Действия: Если Вы хотите закончить выполнение протокола, нажмите Yes, в противоположном случае нажмите No и выполнение протокола дойдет до конца.

E.4 Анализ данных



Причина: Вы пытаетесь увидеть некоторые другие данные анализа до того, как будет получена базовая линия ПЦР. До тех пор, пока не будет вычислена базовая линия ПЦР, никаких других анализов данных не может быть сделано.

***Решение**. Сначала Необходимо вычислить базовую кривую.*

Cause: Не достаточно стандартных пересечений порогового цикла, чтобы подсчитать стандартную кривую.

Действия: Можно попытаться изменить имеющиеся параметра анализа – обычно параметры установки порогового цикла. Если эта проблема не решается, это указывает на плохое качество стандарта и эксперимент необходимо повторить.

E.5 Программа выхода

Причина: Диалоговое окно сохраняет данные автоматически, если Вы попытаетесь выйти из программы без сохранения последних собранных данных или если Вы изменили установочные данные (например, Вы ввели новый RME файл для данных, которые используются в 'Use External Calibration File'.)

Действия: *Сохраните данные файлов перед выходом из программы.*

Причина: Перед закрытием программа пытается перевести модуль термоцайклера iCycler в режим управления с передней панели прибора, что дает Вам возможность редактировать программу протокола ПЦР, но базовый модуль не отвечает.

Действия: Если базовый модуль не подключен – это нормально, нажмите и программа закроется. Если базовый модуль подключен, нажмите на передней панели на строку Remote Host Mode и система выйдет из программы. Если базовый модуль продолжает показывать, что он находится в remote host mode, выключите и снова включите питание. Если сообщение не исчезло, то обратитесь в местный офис Bio-Rad или в службу технического сервиса.

Приложение F

Возможные ошибки оборудования

Ниже приведены возможные дефекты, описанные в sddcamdll.dll файле. Все возможные дефекты представлены в окне названом "SddCamDll." В ниже представленной таблице приведены наиболее часто встречающиеся дефекты и возможные способы их устранения.

Сообщение об ошибке	ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	СПОСОБ УСТРАНЕНИЯ
Невозможно увидеть изображение из буфера памяти (недостаточен объем памяти)	При запуске dll файла буферное изображение локализовано в памяти. Поэтому появляется сообщение о недостаточном объеме памяти.	1. Закройте ваши обращения 2. Перезагрузите компьютер. Примечание: Иногда эта операция может привести к медленной потере работоспособности оперативной памяти. Повторите перезагрузку компьютера
Нет дунаправленного порта nnnh.	Порт включен не с тем адресом, который соответствует файлу установки системы. Если система работала с данной установкой порта, возможны изменения в BIOS или в установках системы.	1.Перезагрузите значения BIOS. 2.После перезагрузки компьютера обратите внимание, был ли изменен адрес порта LPT1.
Отсутствует первое или второе «эхо» команды проверки	Камера неуправляема. Как правило, это вызвано исчезновением питания, или камера повреждена, или это проблема кабелей для подключения	Убедитесь что, камера подключена к питанию. Проверить соединения кабелей Проверить кабели
Не устанавливается время экспозиции для IMGRDY	Команда установки времени экспозиции послана, а камера на команду не отвечает.	Перезагрузить камеру (выключить и включить ее снова).

Таблица ошибок с кодами, возникающими при инициализации прибора и наиболее вероятное их объяснение

Сообщение об ошибке	**ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА**	**СПОСОБ УСТРАНЕНИЯ**
Set CamPort error: -1	Не возможно найти значение ячейки X или У в sdd.ini file (часть алгоритма). sdd.ini файл невозможно найти или этот файл испорчен	sdd.ini file.должен быть переинсталлирован
Set CamPort error: -1,-2	Невозможно установить существование выбранного параллельного порта. Установка порта может быть изменена в BIOS или в другом месте	выбрать новую правильную установку BIOS
Set CamPort error: -3,-4	Тест выбора параллельного порта не работает. Установка порта может быть повреждена в BIOS или в другом месте.	выбрать новую правильную установку BIOS
Set CamPort error: -5,-6	Параллельный порт работает, но камера не отвечает. Может быть поврежден кабель.	1. Проверить включена ли камера. 2. Проверить все соединения кабелей.
Set CamPort error: -7	1. Исчезло значение базового порта (PortBase) из sdd.ini файла. 2. Не возможно найти sdd файл. 3. Файл mask96.ini либо поврежден или его не возможно найти.	Проверить sdd и mask96 файл на диске c:\programfiles\Bio-Rad\iCycler\ini

Приложение G.

Описание алгоритмов обработки данных в системе iCycler iQ

1. Данные флюоресценции могут быть собраны в процессе проведения амплификации или после того, как она завершена. Данные собираются одновременно для всех 96 лунок в течение времени задержки на шаге измерения; количество индивидуальных считываний флюоресцентного сигнала для каждой лунки зависит от времени экспозиции и длительности шага измерения. При длительности шага измерения 30 секунд и времени экспозиции 160 мсек для каждой лунки в каждом цикле может накапливаться до 25 результатов измерений.
2. Данные собираются непрерывно и считываются для двух раздельных областей, определенных для каждой из 96 лунок: внутренний и внешний сигнал. **Внутренний сигнал** – среднее значение флюоресценции для всех пикселей в области, ограниченной внутренней маской лунки. **Внешний сигнал** – среднее значение флюоресценции для всех пикселей в области между внутренней и внешней масками каждой лунки, представляющее фон. Таким образом - **Чистый сигнал** это разность Внутреннего и внешнего сигналов для каждой лунки. Внутренняя и наружная область каждой лунки определяется файлом маски (смотри приложение E). Именно **Чистый сигнал** используется для построения графического представления цикла амплификации ПЦР.
3. По умолчанию, сбор данных начинается при времени экспозиции 640 мсек. Для установки корректного значения времени экспозиции используется следующий алгоритм. Программное обеспечение контролирует в каждом цикле наличие пикселей, находящихся в насыщении. Если их количество превышает некоторое допустимое значение, IQ детектор автоматически уменьшает время экспозиции вдвое. При повторном обнаружении таких точек при следующем измерении, время экспозиции уменьшается вдвое еще раз, и это будет продолжаться каждый раз, пока при измерении будет обнаружено недопустимое количество пикселей, находящихся в насыщении. В конечном счете, все данные нормализуются (пересчитываются) для длительности экспозиции 640 мсек, что составляет, например, удвоенное время сбора данных от 320 мсек и учетверенное время сбора данных от 160 мсек.
4. В начале второго считывания данных, на диаграмме цикла амплификации ПЦР автоматически показываются данные первого считывания.

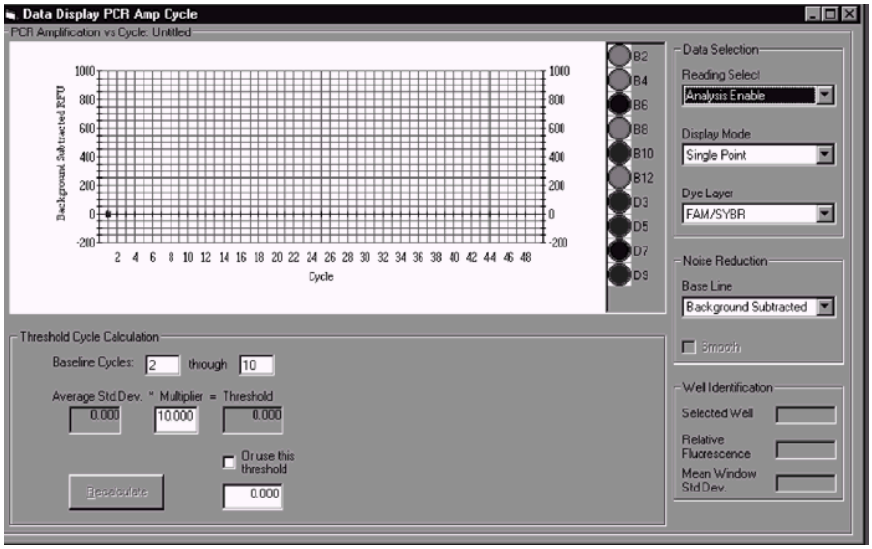


Рис G.1. Диаграмма цикла амплификации ПЦР.

Существуют три вида графического представления результатов: Результаты с компенсацией фона, с компенсацией базовой линии ПЦР, с компенсацией базовой линии ПЦР аппроксимированной кривой.

- Данные с компенсацией (вычитанием) фона, показанные на диаграмме цикла амплификации ПЦР это средние значения последних трех значений **Чистого сигнала** в цикле измерения для каждой лунки. Данные с компенсацией фона также нормализованы (пересчитаны) по постоянному времени экспозиции (640 мсек).
- Данные с компенсацией (вычитанием) базовой линии, показанные на диаграмме цикла амплификации, подсчитаны с использованием базовой линии, которая представлена аппроксимированной линией, построенной по значениям данных с компенсацией (вычитанием) фона для 2 и 10 циклов. Эта линия интерполируется для всех последующих циклов. Все значения пересчитываются и являются результатом вычитания из **Чистого сигнала** для каждого цикла значений, подсчитанных с использованием только что аппроксимированной линии. Эти значения затем наносятся на график для соответствующего номера цикла.
- Данные, с компенсацией базовой линии аппроксимированной кривой рассчитываются аналогично, но базовая линия в данном случае получена в результате аппроксимации полиномом старшего порядка.

5. На основе данных с компенсацией (вычитанием) базовой линии программа определяет пороговую флюоресценцию для эксперимента и затем определит пороговый цикл для каждой лунки. Порогом является уровень флюоресценции, который значительно превышает уровень фоновой флюоресценции измеренной в начальных циклах амплификации.

6. Строится график, использующий логарифмы начальных концентраций матрицы в каждой стандартной лунке против порогового цикла для каждой лунки. Как минимум используется квадратичная линейная регрессия для аппроксимации стандартной кривой по полученным данным. В дальнейшем начальная концентрация для каждой лунки определяется как неизвестная, подсчитанная по стандартной кривой на основе определенного порогового цикла лунки. Если неизвестная была амплифицирована в репликах, то для начальной концентрации также подсчитывается стандартное отклонение.

***Пример**:*
Example: Рассмотрим упрощенный набор данных для лунок A1 и H12. Данные, представленные в этой таблице, это средние значения последнего измерения в указанном цикле.

		A1		**H12**	
Номер Цикла	**Время экспозиции**	**Внутренний сигнал (Inner)**	**Внешний сигнал (Outer)**	**Внутренний сигнал (Inner)**	**Внешний сигнал (Outer)**
1	640	350	118	400	150
2	640	360	129	405	154
5	640	355	122	400	147
10	640	360	125	405	150
15	640	365	125	408	154
20	640	412	135	460	165
25	320	315	69	350	88

A. График для данных с компенсацией (вычитанием) фона построен путем размещения точек, одной координатой которых является **Чистый сигнал** (внутренний сигнал – внешний сигнал), а другой – номер цикла. **Чистый сигнал** для 25цикла был удвоен для приведения его к времени экспозиции 640 мсек.

Номер Цикла	**A1**	**H12**
1	232	250
2	231	251
5	233	253
10	235	252
15	240	254
20	277	295
25	492	524

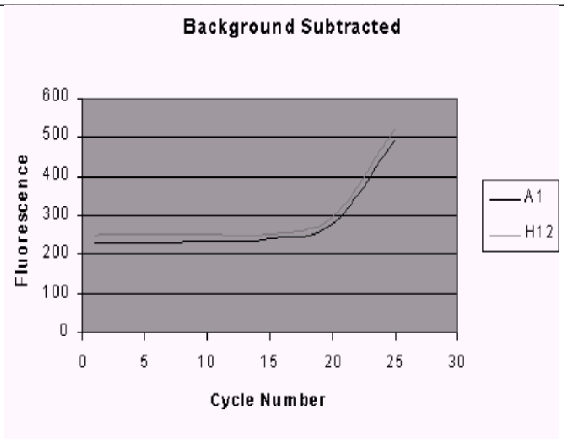


Рис.G.2. График амплификации для данных с компенсацией фона.

B. Первый шаг создания графика амплификации с компенсацией (вычитанием) базовой линии – построение аппроскимированной прямой по значениям Чистого Сигнала для 2 и 10 цикла.

Выражение лучше всего описывающее прямую линию для значений, полученных во 2 и 10 циклах в лунке A1, выглядит следующим образом:

Флюоресценция = Номер цикла * (0.490) + 230.2.

Выражение лучше всего описывающее прямую линию для значений, полученных во 2 и 10 циклах в лунке H12, выглядит следующим образом:

Флюоресценция = Номер цикла * (0.092) + 251.5

C. Теперь можно создать таблицу с реальными значениями флюоресценции, предсказанными значениями на основании выражений для аппроксимации и разностей между предсказанной величиной и реальной. На основании этих данных и строится график амплификации с компенсацией (вычитанием) базовой линии.

	Данные с компенсацией фона		**Предсказанные данные**		**Результирующие данные**	
Номер Цикла	**A1**	**H12**	**A1**	**H12**	**A1**	**H12**
1	232	250	230.7	251.6	-1.3	1.6
2	231	251	231.2	251.7	-0.2	-0.7
5	233	253	232.7	251.9	0.3	1.1
10	235	252	235.1	252.4	-0.1	-0.4
15	240	254	237.6	252.9	2.4	1.1
20	277	295	240.0	253.3	37.04	1.7
25	493	525	242.5	253.8	250.5	271.2

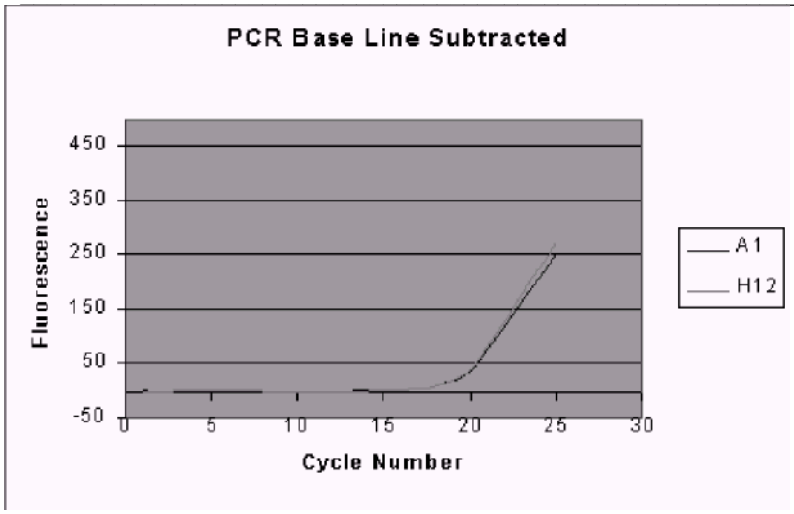


Рис. G.3. График амплификации для данных с компенсацией базовой линии.

D. Следующая операция, выполняемая программой – детекция порога. Первый шаг – подсчет стандартного отклонения значений в интервале между 2 и 10 циклами включительно, рассчитанных с компенсацией базовой линии амплификации. Затем значение стандартного отклонения умножается на коэффициент (по умолчанию на 10), и этот уровень флюоресценции принимается пороговым значением. Предположительно в этом примере среднее стандартное отклонение каждой лунки было 1.2, тогда пороговое значение флюоресценции по умолчанию будет установлено как 12.

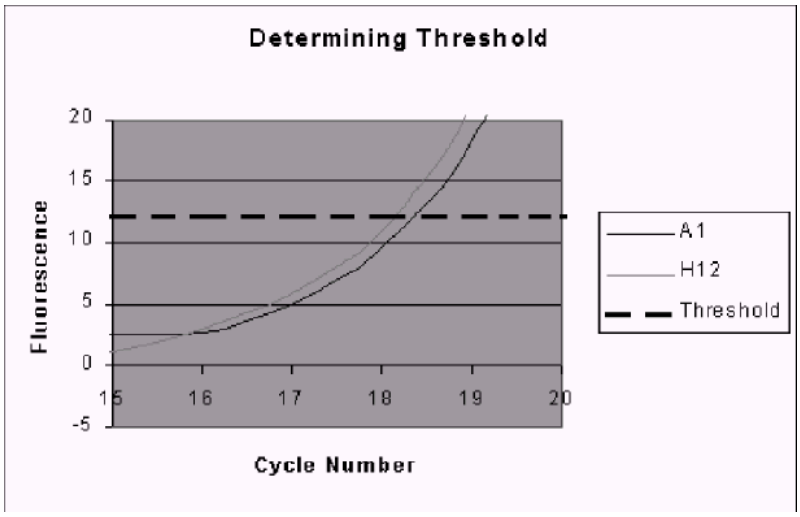


Рис. G.4. Установка уровня порогового значения.

E. Окончательно пороговый цикл определяется путем опускания перпендикуляра из точки пересечения графика амплификации каждой лунки с пороговым уровнем на линию количества циклов. В этом примере программа установила пороговый цикл 18.35 для лунки A1 и 18.12 для лунки H12. См. фигуру G.5 на следующей странице.

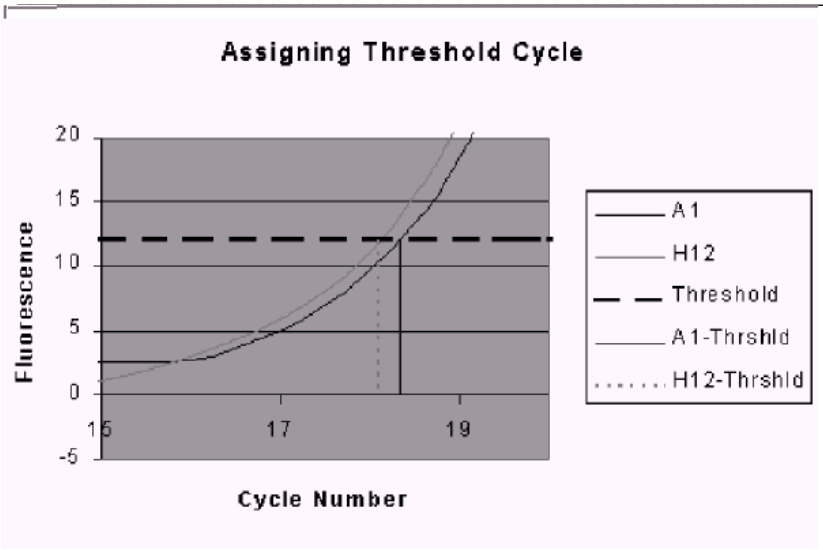


Рис. G.5. Установление порогового цикла.

7. Понятие стандартная кривая.

Стандартная кривая получается из известной пробы. Для построения графика по оси X откладывается логарифм номера копии, а по оси У - номер порогового цикла.
Выражение аппроксимирующей функции и коэффициент корреляции (r) выводится на графике стандартной кривой.

Коэффициент корреляции:

Значение r – это коэффициент корреляции.
Коэффициент корреляции показывает, как хорошо предсказанные на основе выражения для аппроксимации значения согласуются с экспериментальными данными. Или, иными словами, на сколько правильно данные эксперимента подходят к значениям, определенным стандартом.

Коэффициент корреляции имеет значение от 0 до 1. Если не существует связи между предсказанными значениями и реальными значениями тогда коэффициент корреляции равен 0 или очень низкий (вероятность предсказанных значений не выше, чем для случайных цифр). По мере возрастания связи между предсказанными и реальными значениями, коэффициент корреляции возрастает. Если одна величина полностью отражает другую, то коэффициент корреляции равен 1.0. Таким образом, чем выше коэффициент корреляции, тем больше ваши экспериментальные данные подходят к ожидаемым значениям.

Эффективность:

Наклон стандартной кривой прямо связан с эффективностью ваших реакций.
Эффективность может давать вам ценную информацию о химии ваших реакций. Наклон стандартной кривой связан с эффективностью через следующее уравнение:
Эффективность = [10 (-1/slope)] - 1.
Наклон -3.322 представляет эффективность 100%. Высокое абсолютное значение наклона дает выход эффективности меньше чем 100%. Низкое значение даст выход больше чем 100%. В любом случае реакция должна быть оптимизирована. При 100% эффективности матрица удваивается при каждом цикле в течение экспоненциальной амплификации. Несколько факторов влияют на эффективность, например длинна ампликона, содержание G/C оснований в апликоне и вторичная структура. Динамика самой реакции тоже может влиять на эффективность. Вариации динамики могут быть результатом таких факторов как, ферменты, используемые в реакции, не оптимальные концентрации реактивов. Когда выполняются множественные реакции или когда сравниваются относительные кривые как в экспериментах с экспрессией генов, тогда цель – иметь эффективности всех реакций одинаковыми, для того, чтобы их сравнивать.

Приложение Н

Обновление внутреннего программного обеспечения

Bio-Rad постоянно совершенствует термоциклер модели iCycler. Программное обеспечение обновляется, и постоянно предлагаются новые программы. Мы выпускаем обновленные программы, и они доступны в любое время на дискетах. Обьявление о выходе нового программного продукта Вы можете найти на нашем web site www.bio-rad.com.

Внутренне программное обеспечение ICycler обновляется через последовательный интерфейс компьютера. Компьютерный последовательный порт должен поддерживать скорость обмена 57600 бод. Соединение между компьютером и прибором осуществляется через 9 – ти контактный кабель. Обновленное программное обеспечение может быть заказано через Bio-Rad, используя код продукта 170-8737.

Обновление инсталлированных программ.

Обновленные версии программ и приспособлений для их загрузки на дискетах описаны выше. Сначала удостоверьтесь, что последовательный кабель соединяет компьютер и iCycler, а также что все приборы подсоединены к питанию.

1. Включите iCycler, введите имя пользователя.
2. Создайте новую папку на жестком диске компьютера. Задайте имя папки “Upgrade”.
3. Вставьте флоппи диск в дисковод.
4. Откройте директорию флоппи диска и откройте папку Utilities. Откройте папку с именем \Base Unit\Firmware Upgrade и скопируйте файл Upgrade.exe и файл icycupdt.bin в папку Upgrade.
5. Запустите программу Upgrade.exe. Эта утилита загрузит новую версию внутреннего программного обеспечения блока термоцайклера.
6. Когда обновление закончится, на дисплее откроется сообщение, что инсталляция успешно завершена. После этого выключите iCycler и используйте новую версию в работе.

ПРИЛОЖЕНИЕ I.

Пример калибровки чистыми красителями и файл RME.

В файле RME данные калибровки по чистым красителям сгруппированы, прежде всего, по красителям. В группе данных для каждого красителя имеется запись коэффициентов для всех пар фильтров, которые использовались для сбора данных при калибровке. Например, для красителя Texas Red 575 могут быть указаны следующие пары фильтров: 490/530, 530/575, 548/595, 575/620 и 635/680 нм. Каждый последующий краситель, записанный в файл RME, будет иметь пункты, относящиеся к одной или нескольким аналогичным парам фильтров. Ниже приведен пример, где протокол калибровки чистой краски выполнен на красителях FAM-490 и CY5-635. Структура файла RME.ini будет следующей:

[FAM-490]
490/20X_!_530/30M=5.384598e+003
635/30X_!_680/30M=1.565864e+001
[CY5-635]
490/20X_!_530/30M=2.951601e+001
635/30X_!_680/30M=6.064747e+003

Предположим, что следующая калибровка по чистым красителям проведена с использованием красителей FAM-490 и Texas Red 575. Файл RME будет дополнен и примет следующий вид:

[FAM-490]
490/20X_!_530/30M=5.332098e+003
635/30X_!_680/30M=1.565864e+001
575/30X_!_620/30M=3.864038+001
[Texas Red-575]
490/20X_!_530/30M=1.40998e+001
575/30X_!_620/30M=4.737024e+004
[CY5-635]
490/20X_!_530/30M=2.951601e+001
635/30X_!_680/30M=6.064747e+003

Заметьте, что значение для FAM-490 по паре фильтров 490/530 немного изменилось. Это вызвано тем, что при повторном измерении этого красителя на данных длинах волн полученные значения были учтены в файле RME. Значения для Cy5-635 и для FAM-490 не изменились, потому что эти сочетания повторно не тестировались. Были добавлены данные для Texas Red 575 по двум парам фильтров, и для FAM-490 по паре 757/620.

Второй RME-файл пригоден для экспериментов с FAM-490 и Texas Red 575 одновременно или для FAM-490 и Cy5-635 одновременно, или для каждого из этих красителей по отдельности, но не пригоден для экспериментов по Texas Red 575 и Cy5-635 вместе, потому что в файле нет записей по комбинации Texas Red 575 и пары фильтров 635/680 (эта пара используется для регистрации Cy5), и по комбинации Cy5 и пары фильтров 575/620 (эта пара фильтров используется для регистрации Texas Red 575). Прежде чем Texas Red 575 и Cy5 будут использоваться на одном планшете, необходимо провести калибровку по этим красителям. После проведения этой третьей калибровки, файл RME будет иметь следующую структуру:

[FAM-490]
490/20X_!_530/30M=5.632098e+003 – не изменился
635/30X_!_680/30M=1.565864e+001 – не изменился
575/30X_!_620/30M=3.864038+001 – не изменился
[Texas Red-575]

490/20X_!_530/30M=1.40998e+001 – не изменился
575/30X_!_620/30M=4.81645e+004 – пересчитан
635/30X_!_680/30M=2.64573e+000 – новое значение
[CY5-635]
490/20X_!_530/30M=2.951601e +001 – не изменился
635/30X_!_680/30M=6.123537e+003 – пересчитан
575/30X_!_620/30M=4.746395e+001 – новое значение

После третьей калибровки любое сочетание этих трех флюорофоров может быть использовано на одном планшете. Такой же результат, может быть, достигнут, если откалибровать все три флюорофора одновременно.

ПРИЛОЖЕНИЕ J.

Импорт информации из предыдущих версий программы iCycler iQ.

КОНВЕРТАЦИЯ ИЗ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ 1.440 (1.0)

• Файлы данных

Файлы ПЦР в реальном времени, полученные в версии программы 1.440, могут быть открыты в данной версии программного обеспечения, позволяющей работать с несколькими красителями, при наличии файла RME.ini в директории C:\Program Files\Bio-Rad\iCycler\Ini и при наличии в этом файле записи для FAM/SYBR. Правильная форма записи данной записи приведена ниже:

[FAM/SYBR]
485DF22_!_535RDF45=4.021013e+003

При установке программного обеспечения RME-файл с соответствующей записью копируется в вышеуказанную директорию.

Во всех версиях программы, начиная с 2.1.880 данные RME автоматически сохраняются одновременно с оптическими данными в файле OPD, поэтому пользователь может перенести данные для анализа на другой компьютер. Если Вы откроете данные, собранные в версии 1.440, и далее сохраните их в версии 2.1.880, или более поздней, данные RME будут сохранены вместе с первоначальными данными.

Замечание: Если удалить содержимое файла RME.INI, совокупность данных, собранных в программе версии 1.440, будет недоступна до тех пор, пока отсутствующая запись для FAM/SYBR не будет восстановлена. Данное замечание не относится к файлам версии 1.440, которые были открыты и затем сохранены в версии 2.1.880 или более поздней, поскольку значения RME уже вставлены в эти файлы.

• Протоколы термоциклирования

Протоколы термоциклирования, написанные в версии 1.440, будут работать во всех более поздних версиях.

• Описание планшетов

Файлы описания планшетов, созданные в версии 1.440, не могут быть использованы более поздними версиями программы. Они должны быть заново написаны и сохранены в новой версии программы. Файлы версии 1.440 могут быть просмотрены в библиотеке протоколов более поздних версий, но не могут быть запущены или отредактированы. Просмотр или распечатка этих файлов в библиотечном модуле программы облегчает их воссоздание в последующих версиях программы. Если выделить курсором файл установок планшета, созданный в версии 1.440, на экране появится сообщение, что этот файл должен быть обновлен.

КОНВЕРТАЦИЯ ИЗ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ 1.880 (2.1)

Для файлов, созданных в версии 1.880, обновления не требуется.

КОНВЕРТАЦИЯ ИЗ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ 1.1370 (2.2)

Для файлов, созданных в версии 1.1370, обновления не требуется.

ПРИЛОЖЕНИЕ К.

Функции кривой плавления и новые особенности версии 2.3.

Кривая плавления является динамическим инструментом, позволяющим измерять температуру плавления (T_m) двухцепочечных молекул ДНК. Двойные спирали ДНК могут быть визуализированы или посредством включения ДНК-связывающих красителей (например, SYBR green I), или гибридизацией с зондами, меченными флюоресцентными красителями. В случае применения красителей, связывающихся с ДНК, или нерасщепляемыми гибридизационными зондами, флюоресценция наиболее сильна после отжига ДНК. По мере приближения к T_m, флюоресценция уменьшается с постоянной скоростью (постоянный наклон). При достижении T_m происходит резкое снижение флюоресценции и заметное изменение кривой. Скорость изменения определяется на графике первой производной, взятой со знаком минус (-dF/dT), по отношению к температуре. Наибольшая скорость изменения дает видимые пики на графике, указывая на двухцепочечных молекул ДНК.

Когда необходимо использовать данные кривой плавления?

Для кривой плавления имеются три главных приложения: Определение пика (число продуктов амплификации), характеристика молекулярных маяков, и различение аллелей. Два первых приложения обычно используются как руководство для улучшения ПЦР – исследования ДНК в реальном времени. Третье приложение, дискриминация аллелей, применяется для Выявления мутаций ДНК. Одним из возможных типов этого исследования является определение полиморфизма по отдельному нуклеотиду (SNP). Для SNP-анализа можно использовать возможности программы по анализу кривой плавления ДНК в сочетании с исследованием флюоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). Данные приложения детально обсуждаются ниже.

К1.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИКОВ

Хорошо известно, что успешная ПЦР-амплификация в реальном времени зависит от оптимизации многих факторов. Один из наиболее важных факторов – это специфичность праймеров, выбранных для амплификации. Неправильно выбранная пара праймеров может индуцировать образование комплекса праймер-димер и/или амплифицировать другие неспецифические продукты. В свою очередь, эти неспецифические продукты могут значительно уменьшить эффективность амплификации, также как и уменьшить общий динамический диапазон стандартной кривой. Таким образом, идентификация всех продуктов, амплифицированных с помощью данного праймера, может быть полезна для оптимизации ПЦР-исследования в реальном времени.

ДНК-связывающие красители, такие как SYBR green I, обычно используются для неспецифической визуализации амплифицированного продукта. SYBR green I связывается с двухцепочечной ДНК и после этого светится в 50-100 раз ярче, чем свободный краситель. Поскольку красители такого типа связываются с любой двухцепочечной ДНК, их визуализация не позволяет различить различные ДНК, амплифицированные в одной реакции. SYBR green I может быть использован для наблюдения за накоплением продуктов амплификации в реальном времени с использованием конкретной пары праймеров. Число амплифицированных продуктов реакции далее может быть Выявлено с помощью анализа кривых плавления. При температурах ниже T_m для амплифицированного продукта реакции SYBR green I будет связываться с двухцепочечной ДНК и ярко флюоресцировать. При достижении T_m ДНК денатурирует и высвобождает SYBR green I, что приводит к резкому снижению флюоресценции. Уменьшение флюоресценции показывается на графике функции флюоресценции от температуры. Построение графика отрицательной первой производной этих данных от изменения температуры (–dF/dT vs. Temperature) показывает пик плавления, по которому можно определить T_m для каждого амплифицированого продукта реакции. T_m для каждого пика зависит от длины синтезированной ДНК, также как от содержания нуклеотидов G/C в последовательности ДНК. Димеры праймеров, которые обычно короче, плавятся при значительно более низких T_m , чем конечный продукт реакции, и ,следовательно, их можно легко различить. Вторичные или неспецифические продукты реакции могут иметь различную длину и нуклеотидный состав, и следовательно большой диапазон температур плавления.

Идентификация димеров праймеров и неспецифических продуктов по кривой плавления может помочь пользователю понять необычные кривые на графике амплификации. Например, динамический разброс в серии разведений будет в большой степени зависеть от присутствия димеров праймеров. Другие неспецифические продукты также могут влиять на эффективность амплификации. Правильный подбор праймеров для уменьшения образования димеров и подбор температур отжига, чтобы предотвратить амплификацию неспецифических продуктов реакции являются двумя основными путями оптимизации ПЦР в реальном времени. После внесения необходимых изменений в протокол исследование необходимо повторить для того, чтобы убедиться в достижении желаемого эффекта снижения концентрации или в полном отсутствии димеров и других неспецифических продуктов.

K1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАЯКОВ

Флуоресцентно меченные зонды (молекулярные маяки) используются для специфического количественного определения конкретного продукта в ПЦР-исследовании в реальном времени. Анализ кривой плавления может помочь в характеристике молекулярного маяка посредством определения наилучшей температуры для сбора данных.

Молекулярные маяки метятся красителем на 5’-конце и молекулой-гасителем на 3’-конце. В их состав входят последовательность зонда, комплементарная ДНК мишени, и два плеча по 5 или более фланкирующих нуклеотидов с обеих сторон зонда. Плечи не комплементарны к ДНК мишени, но комплементарны друг другу. Когда плечи отжигаются, молекулярный маяк приобретает форму петли, сводя 5’ и 3’ концы молекулы вместе. Это приводит к тому, что флюорофор и гаситель сходятся, и флюоресценция гаснет. Когда же маяк связан с ДНК мишенью, 5’ и 3’ концы максимально разделены, что позволяется определять ДНК по флюоресценции.

Молекулярный маяк и его мишень характеризуются тремя различными T_m: T_m гибрида зонд-мишень, T_m комплементарных плеч зонда и T_m гибрида праймер-мишень. Для чувствительного количественного эксперимента, T_m гибрида зонд-мишень должна быть Выше, чем T_m комплементарных плеч зонда, которая, в свою очередь, должна быть Выше T_m гибрида праймер-мишень. Эти параметры важны для успешной количественной ПЦР в реальном времени. На первом шаге (денатурация при 95°C) молекулярный маяк полностью расплавится и откроется, что выразится в яркой флюоресценции. Когда температура начнет понижаться к точке отжига, для молекулярных маяков предпочтительно сначала связаться с последовательностью мишени. Дальнейшее снижение температуры приведет к закрытию всех несвязавшихся маяков. Это погасит флюоресценцию зонда и уменьшит фоновую флюоресценцию. Наконец, при температуре отжига праймеры присоединяются к ДНК мишеней для начала реакции полимеризации.

Наличие в программном обеспечении анализа кривой плавления может быть использовано для определения температур плавления гибридов зонд-мишень и комплементарных плеч. Это может быть получено в результате проведения двух отдельных реакций: только молекулярные маяки и молекулярные маяки вместе с одноцепочечной ДНК, комплементарной к последовательности зонда. Температура во время Выполнения протокола кривой плавления может уменьшаться с 95°C или повышаться до 95°C, при наблюдении флюоресценции двух реакций. Для реакции с молекулярными маяками, флюоресценция минимальна при низких температурах, поскольку все плечи закрыты. Флуоресценция начинает увеличиваться с повышением температуры, поскольку молекулярные маяки начинают открываться. Когда достигается температура плавления комплементарных плеч, наблюдается резкое увеличение флюоресценции, поскольку все молекулярные маяки открыты и флюорофоры на 5’-концах больше не гасятся.

В реакциях между молекулярными маяками и одноцепочечными комплементами, флюоресценция обычно максимальна при низких температурах. Это точка, при которой зонды связаны с мишенями и флюорофоры максимально отделены от гасителей. По мере увеличения температуры и достижения T_m гибридов зонд-мишень, наблюдается значительное изменение флюоресценции по мере освобождения молекулярных маяков из ДНК мишени.

Кривая плавления может помочь в разработке ПЦР-исследования в реальном времени с молекулярными маяками, путем определения наилучшей температуры, при которой

происходит сбор данных флюоресценции. Наилучшим образом T_m плеч и T_m гибрида зонд-мишень обнаруживаются на графике первой производной, взятой со знаком минус (-dF/dT vs. Temperature). Флуоресцентные данные, образующиеся во время Выполнения протокола амплификации, должны быть записаны при температуре, при которой все несвязанные молекулярные маяки закрыты (ниже T_m плеч), и зонды максимально связаны с ДНК. Таким образом будет достигнуто максимальное отношение сигнал/шум в эксперименте.

K1.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ПО ОТДЕЛЬНОМУ НУКЛЕОТИДУ (SNP)

Определение T_m двухцепочечной молекулы ДНК обычно основано на том, что две цепи ДНК являются комплементарными друг другу. Если одна цепь ДНК содержит мутацию по единственному нуклеотиду (SNP), то двухспиральная структура будет иметь сниженную T_m по сравнению с полностью комплементарной структурой. Кривая плавления выявляет это различие в температурах плавления, что подтверждает SNP, обнаруженную в экспериментах с флюоресцентно меченными зондами. Таким образом становится возможным дифференцировать мутантов и природных гомозигот от гетерозигот а исследованиях по различению аллелей. Следовательно, анализ кривой плавления может быть использован как альтернатива другим методам SNP-детекции, которые используют зонды – молекулярные маяки или гибридизационные зонды связывания по малой спирали ДНК.

Две последовательности гена, различающиеся по одной паре оснований, могут быть Выявлены по кривой плавления с одним флюоресцентным зондом. Для дискриминации аллелей, нуклеотидная последовательность зонда должна точно соответствовать одной аллели (дикого типа), что будет давать T_m намного выше при связывании с этой аллелью, чем при связывании с мутантной аллелью. Зонд будет связываться слабее с мутантной аллелью, имеющей SNP, и T_m этого гибрида окажется сниженной.

Резонансный перенос энергии флюоресценции (FRET) является одним из методов, предложенных для определения SNP по кривой плавления (**1, 2**). Для амплификации обоих аллелей предложен комплект праймеров с внутренней меткой (Texas Red или Cy5) около 3'-конца обратного праймера. Зонд является точной копией амплифицируемой, дикого типа аллелью, и мечен FAM на 3'-конце. Этот же зонд позиционирован для связывания амплифицированной мутантной аллели таким образом, что замена приходится по центру зонда. В результате гибридная ДНК оказывается менее стабильной и различие T_m между диким типом и мутантом может быть Выявлено при анализе кривых плавления.

Анализ кривых плавления может применяться для различения нативных и мутантных гомозигот, или для идентификации гетерозигот. При температурах ниже T_m отжиг зонда пройдет по обеим амплифицированным аллелям. В результате сигнал от Cy5 будет сильнее вследствие FRET от зонда FAM. При достижении T_m для мутантной аллели, зонд отделяется от этой аллели, что видно по значительному снижению флюоресценции и перегибу на графике зависимости флюоресценции от температуры. Следующее заметное снижение флюоресценции будет наблюдаться при достижении T_m для нативной аллели. Изменения наклона на графике зависимости флюоресценции от температуры будут представлены пиками на графике зависимости первой производной, взятой со знаком минус, от температуры. Следовательно, пики на кривой плавления дадут конкретные T_{mo} для наивной и мутантной аллели.

1 Neoh, S-H, Brisco, M J, Firgaira, F A, Trainor, K J, Turner, D R, Morley, A A. Rapid detection of the factor V Leiden (1691 G>A) and haemochromatosis (845G>A) mutation by fluorescence resonance energy transfer (FRET and real time PCR. J Clin Pathol 1999; 52:766–769.

2 Lyon, E, Millson, A, Phan, T, Wittwer, C T. Detection and identification of base alterations within the region of Factor V Leiden by fluorescent melting curves. Mol. Diag.;3:203–210.

Раздел 2. Интерпретация данных.

К2.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИКОВ

Амплификация с интеркаляторами (например SYBR green I) позволяет провести неспецифический количественный анализ ДНК. Следовательно, присутствие неспецифических продуктов во время амплификации может повлиять на общий динамический диапазон стандартной кривой и снизить эффективность реакции. Так, плазмида IL-1b была амплифицирована с SYBR green I в серии 5-кратных разведений начиная с $1x10^4$ копий на лунку до 16 копий на лунку с праймерами, содержащими GGG/CCC перекрытие на 3'-концах. Праймеры были разработаны для образования большого количества димеров, которые создают значительные помехи для амплификации специфического продукта. Как показано на графике амплификации (Рис. 1-К), Высокие концентрации плазмид ($1x10^4$ $2x10^3$)могут быть различены примерно через 2,5 цикла. Большие разведения не могут быть различены. Далее, оказалось, что амплификация наблюдалась в контроле при отсутствии матрицы. В целом, данная стандартная кривая дала коэффициент корреляции 0,95 и наклон = -2,427 (эффективность 158%). Поскольку эффективность оказалась свыше 100%, можно предположить амплификацию и наблюдение в реальном времени более чем одного продукта реакции.

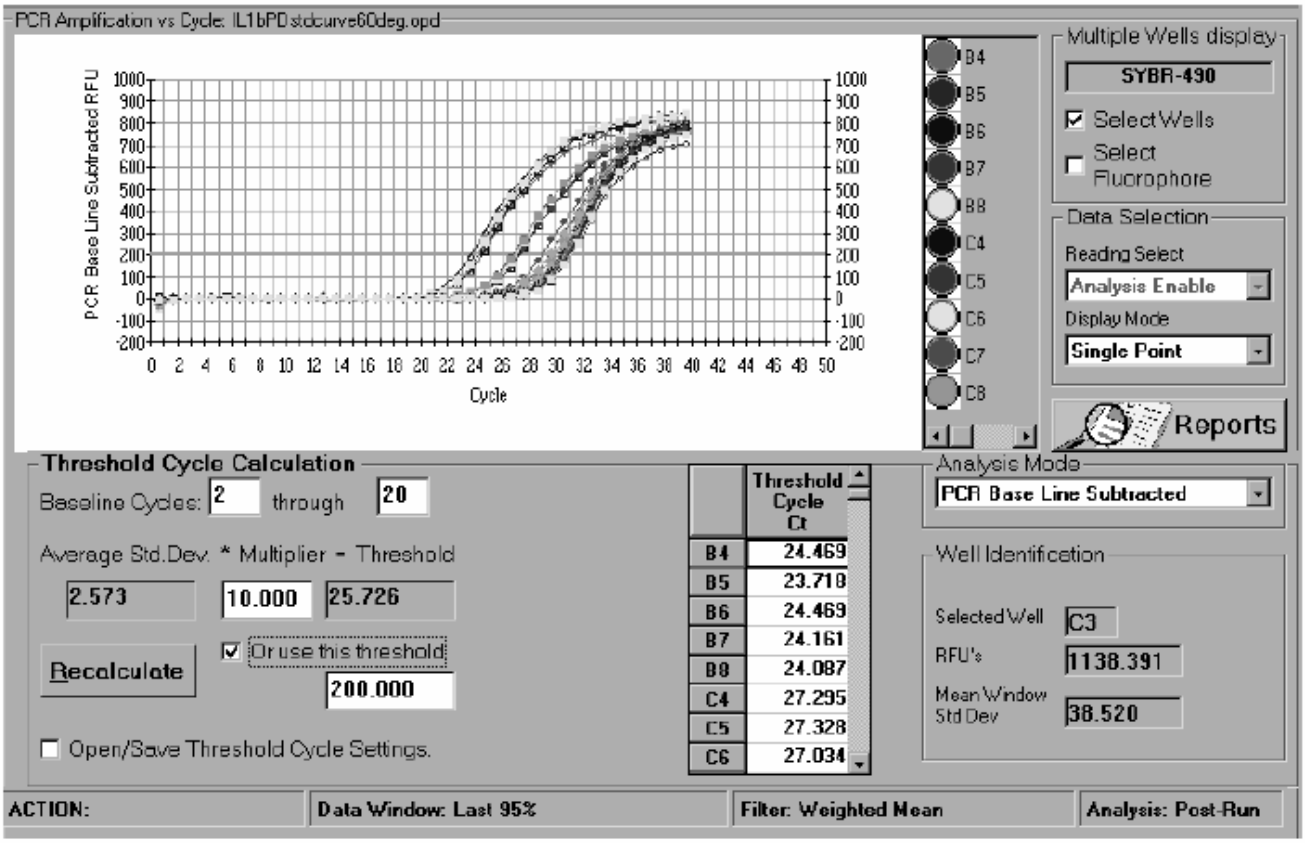


Рис.К-1. Амплификация плазмиды IL-1b в серии 5-кратных разведений с SYBR green I и праймерами, образующими димеры.

Сразу после амплификации была выполнена кривая плавления, чтобы удостовериться в образовании нескольких продуктов этих реакций. Программа iCycler iQ показывает данные, собранные во время анализа кривой плавления в реальном времени, на графике зависимости **флюоресценции от температуры**:

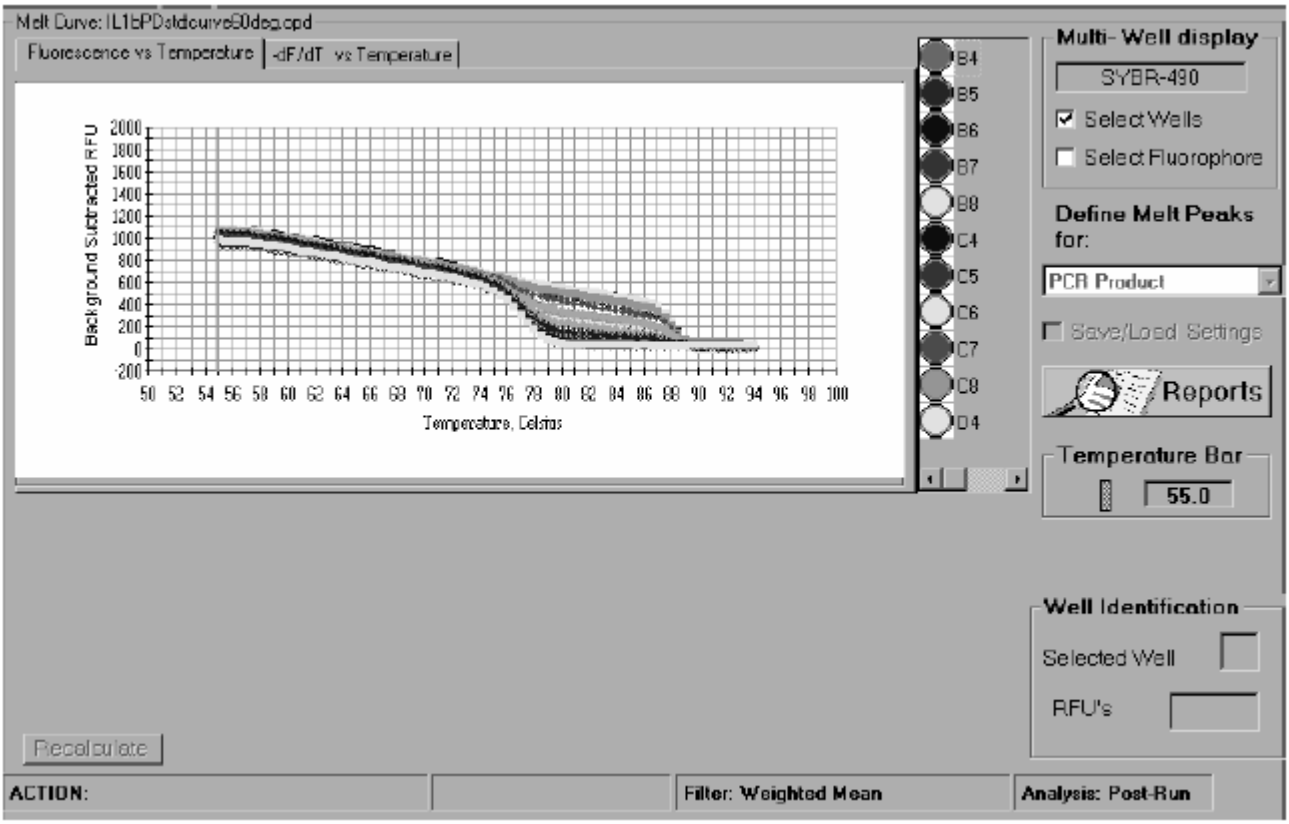


Рис.К-2. График зависимости флюоресценции от температуры, полученный во время Выполнения протокола кривой плавления между 55°С и 95°С (80 повторов, с повышением температуры по 0,5°С за шаг), после амплификации плазмиды IL-1b с SYBR green I.

Рисунок К-2 показывает данные кривой плавления, полученные после амплификации плазмиды IL-1b с SYBR green I в количестве $4x10^2$ копий на лунку в 3 репликах. На основании этих данных построен график первой производной флюоресценции по температуре, взятой со знаком минус, в зависимости от температуры (-dF/dT vs. Temperature). Этот график представлен на рис. К-3 и показывает амплифицированные ДНК как отдельные пики плавления, имеющие специфические температуры плавления (T_m):

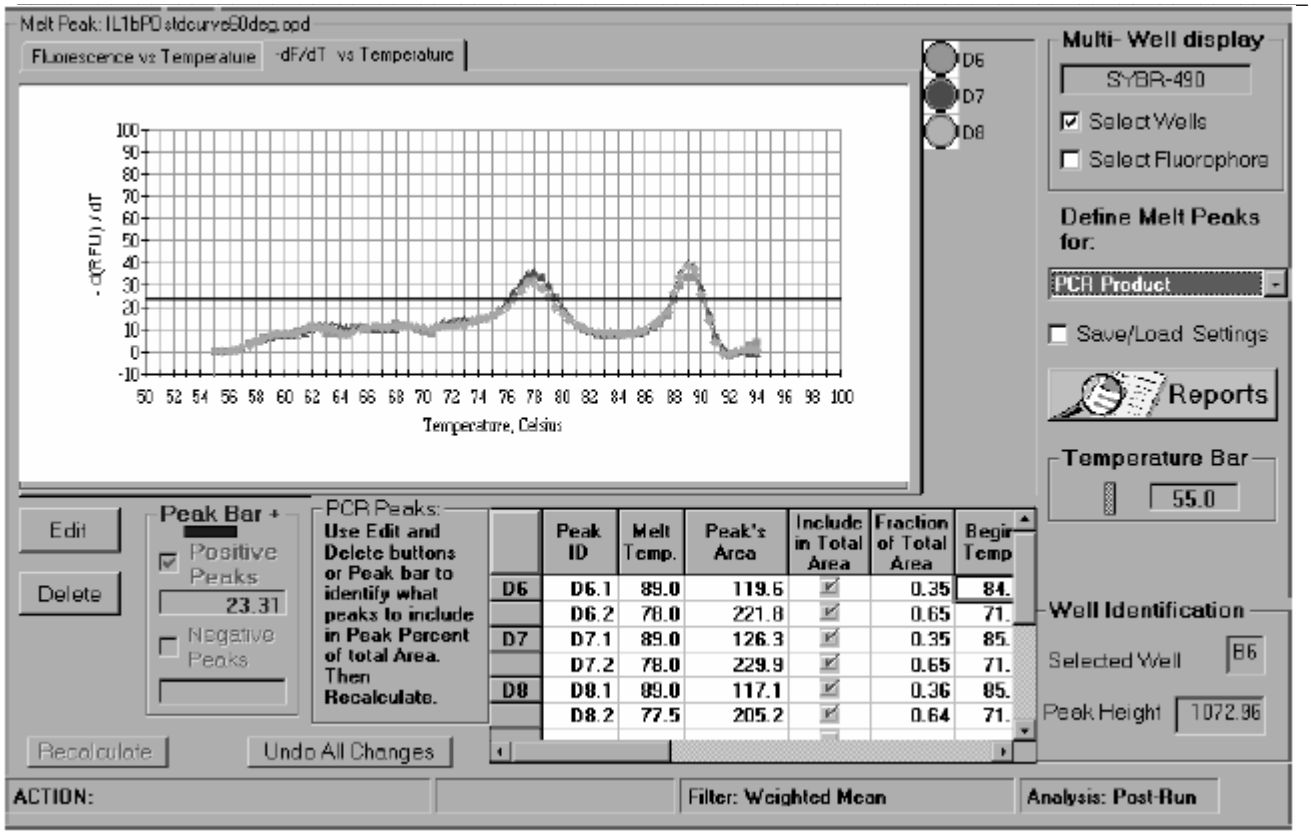


Рис.К-3. График зависимости первой производной флюоресценции по температуре, от температуры, полученный при амплификации плазмиды IL-1b в серии 5-кратных разведений с SYBR green I и праймерами, образующими димеры.

Видно, что имеются два пика на кривой плавления с температурами 89С и 78С. Множественные пики подтверждают наличие различных продуктов реакции амплификации, включая ДНК, которые требовалось получить, и дополнительные неспецифические ДНК. В приведенном выше примере дополнительный неспецифический пик отражает присутствие димеров праймеров, поскольку амплификация была выполнена с использованием праймеров, перекрывающихся по GGG/CCC на 3'-концах. Димеры праймеров обычно плавятся при более низких температурах, чем специфические продукты, поскольку димеры короче. Другие побочные продукты плавятся в широком диапазоне температур в зависимости от их длины и процентного содержания G/C в последовательности ДНК.

На основании информации, полученной при анализе кривой плавления, видно, что за время амплификации образовалось большое количество димеров праймеров (пик 78°С). Результаты кривой плавления по лункам, содержащим контроль с отсутствием матрицы (Рис. К-4), показывают, что вся амплификация в этих лунках вызвана димерами, дающими один пик при 78°С. В целом, присутствие димеров привело к конкуренции за реагенты в ходе реакции амплификации и соответственно к уменьшению динамического диапазона стандартной кривой.

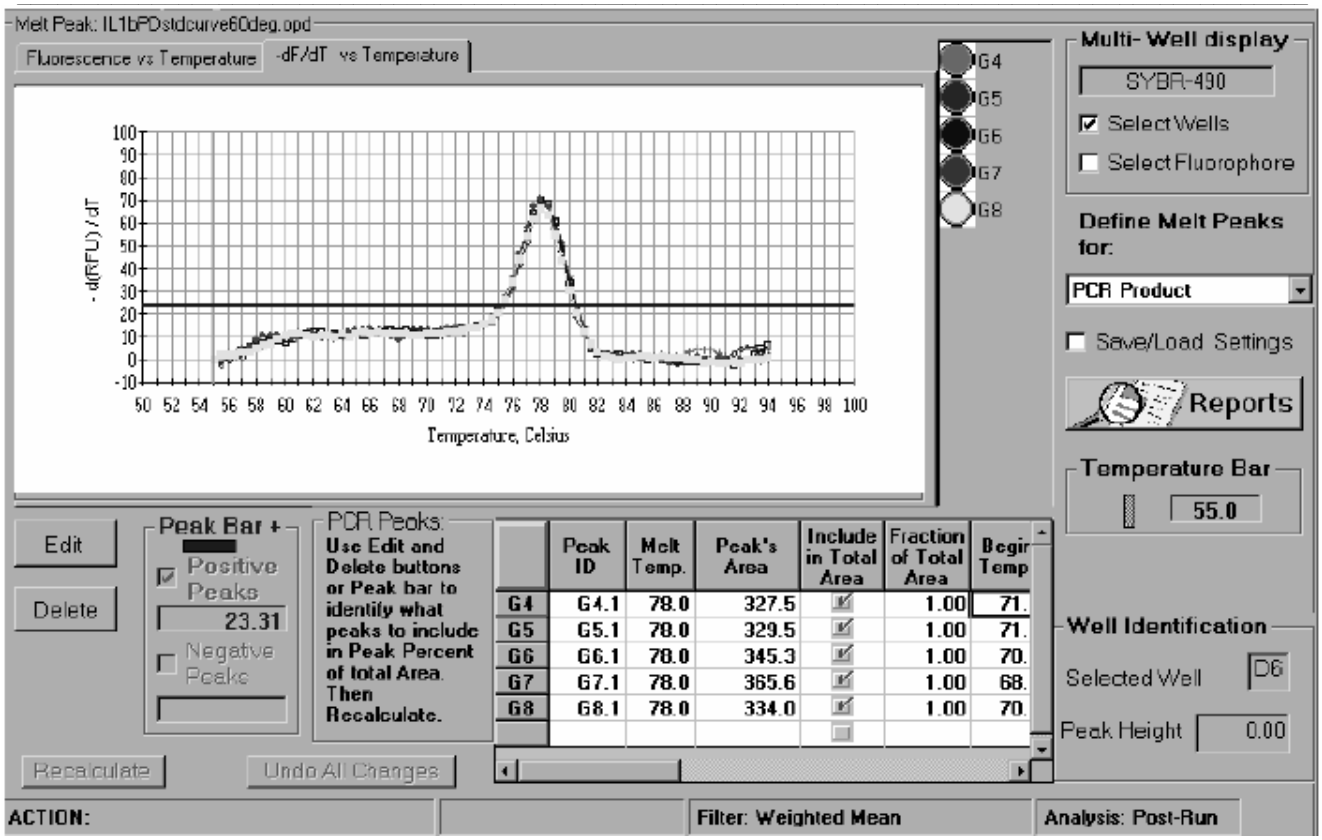


Рис. К-4. Данные кривой плавления, собранные по лункам, не содержащим матрицы, в ходе амплификации плазмиды IL-1b.

В данном примере анализ кривой плавления был применен для того, чтобы выяснить источники ошибок в ходе проведения ПЦР. Выяснено, что образование димеров праймеров являлось основной причиной уменьшения динамического диапазона и эффективности реакции. После изменения нуклеотидного состава праймеров была получена вторая стандартная кривая в серии 10-кратных разведений ($1x10^7$ – $1x10^2$ копий на лунку и контролем с отсутствием матрицы) с красителем SYBR green I (Рис.К-5).

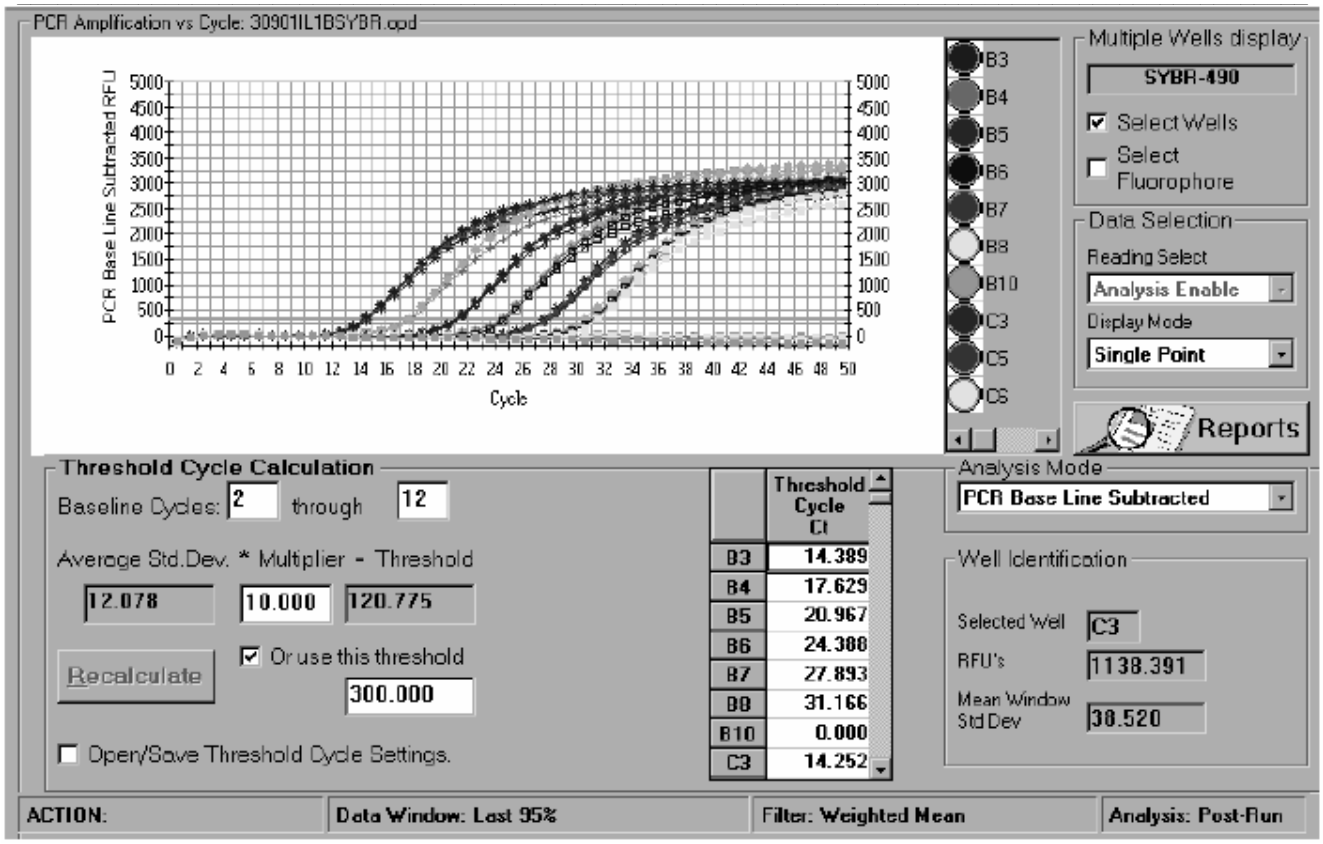


Рис. К-5. Серия 10-кратных разведений плазмиды IL-1b при использовании модифицированных праймеров и SYBR green I.

Стандартная кривая дала коэффициент корреляции 1,00 и наклон = -3,358 (эффективность ~ 100%). Более того, в контрольных лунках с отсутствием матрицы амплификация не наблюдалась. Анализ кривых плавления показал, что во всех лунках, за исключением контрольных, происходило накопление одного продукта амплификации, имеющего T_m 87-87,5°C, что соответствовало T_m требуемого продукта реакции (Рис. К-6).

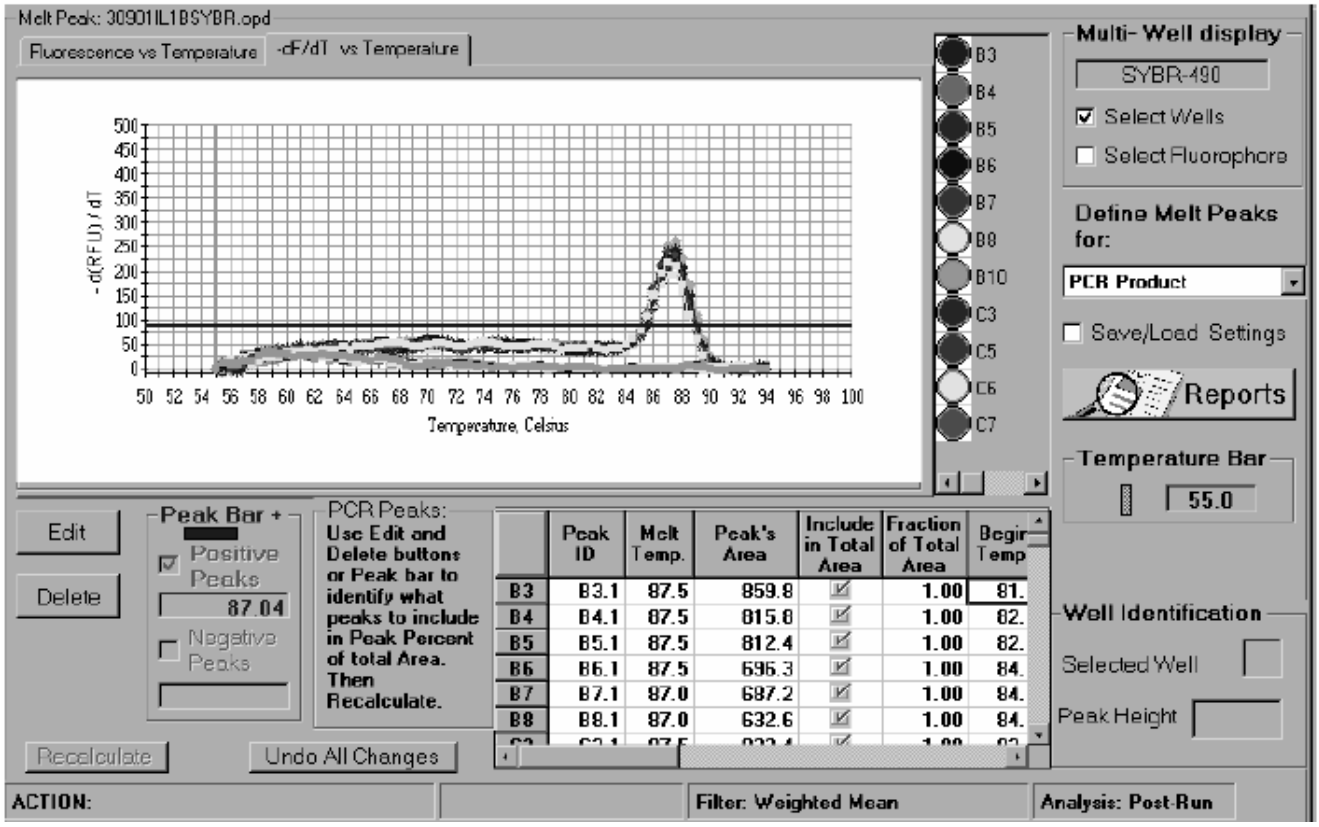


Рис. К-6. Данные привой плавления, полученные в серии 10-кратных разведений плазмиды IL-1b при использовании модифицированных праймеров и SYBR green I. Все лунки дали один продукт амплификации в стандартной кривой. Контроли с отсутствием матрицы не показали амплификации.

В заключение можно сделать вывод, что присутствие димеров праймеров и других неспецифических вторичных продуктов является серьезной помехой оптимальному протеканию реакции и снижает эффективность амплификации и динамический интервал в серии разведений. При уменьшении образования неспецифических продуктов (модификация праймеров, оптимизация температуры отжига и т.п.) стандартные кривые могут быть значительно улучшены. Таким образом, анализ кривой плавления является полезным инструментом для выбора оптимальной схемы эксперимента.

К2.3. ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАЯКОВ

Анализ кривой плавления также может оказаться полезным при разработке чувствительных количественных ПЦР в реальном времени с использованием молекулярных маяков. Кривую плавления можно использовать для оценки конструкции молекулярного маяка, также как для расчета температуры отжига в протоколе амплификации. В данном примере, кривая плавления была получена с молекулярным маяком, меченным FAM и имеющим гаситель DABCYL. Маяк был расплавлен один или в присутствии одноцепочечного комплемента, который связывался с зондирующей областью маяка. Условия ПЦР в этом протоколе состояли в полной денатурации при 95°C в течение 1 мин и последующих плавлениях по 20 сек с понижением температуры на 1°C в каждом последующем цикле, в диапазоне 95-50°C. График зависимости флюоресценции от температуры был построен в режиме реального времени во время эксперимента (Рис. К-7).

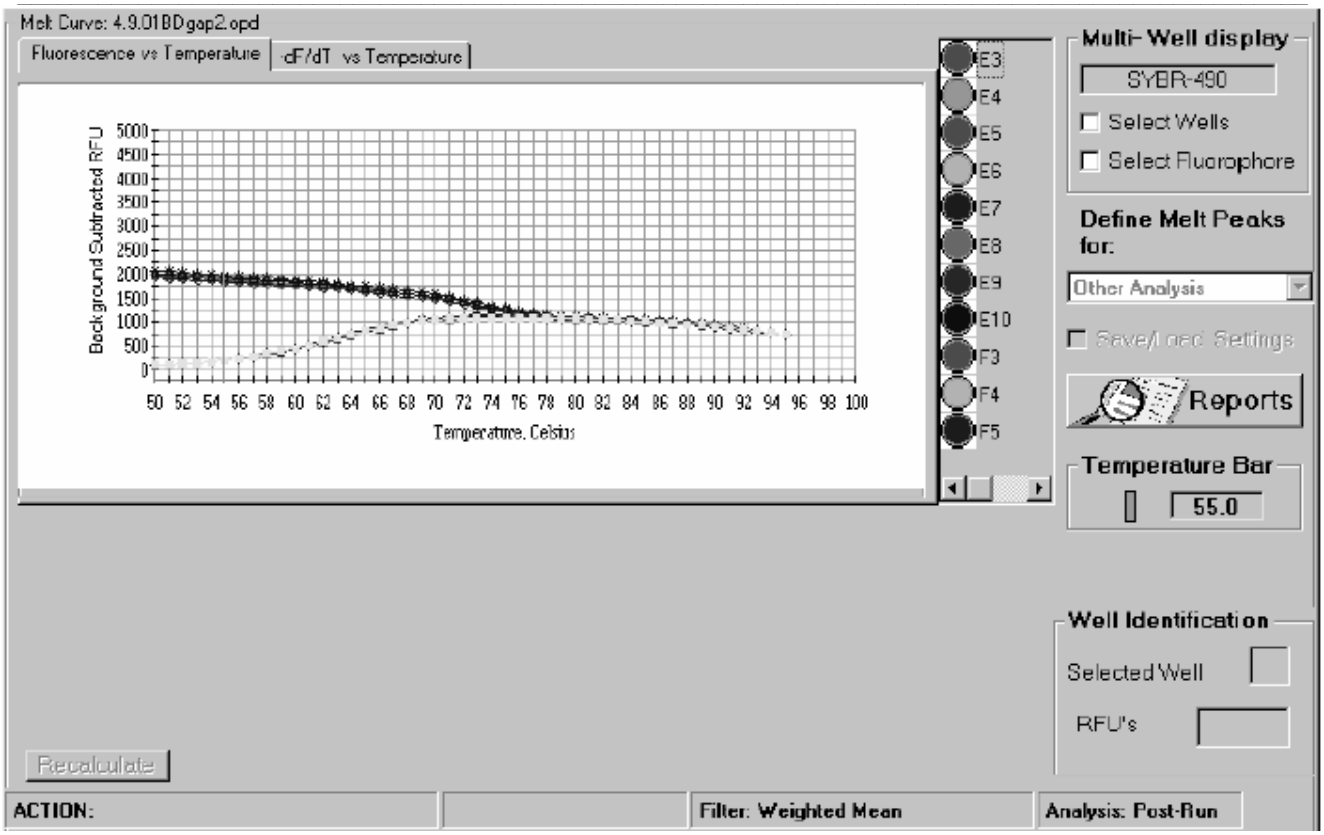


Рис. К-7. График зависимости флюоресценции от температуры для протокола маяка FAM в отдельности или в присутствии одноцепочечной комплементарной матрицы ДНК.

График первой производной флюоресценции по температуре, взятой со знаком минус, в зависимости от температуры (-dF/dT vs. Temperature), позволяет определить, насколько правильно разработан дизайн маяка. На рис. К-8 показаны отдельные пики плавления для маяка и для маяка в смеси с комплементарной матрицей. График показывает, что маяк начинает связываться с матрицей в области 80°C (усиление флюоресценции или положительный пик). При 65°C все доступные матрицы связаны с зондом маяка. Трасса одного маяка дает информацию, что максимальная скорость закрытия плеч маяка начинается при 75°C (затухание флюоресценции или негативный пик). При 53°C все плечи маяка закрыты. Эта информация показывает, что маяк имеет корректную структуру. Он будет связываться с матрицей при температуре около 80°C, до того как плечи не связавшегося маяка закроются при 75°C. Если плечи маяка закрыты, он не может связаться с матрицей. Следовательно, температура, при которой плечи закрываются, должна быть ниже температуры, при которой маяк связывается с матрицей.

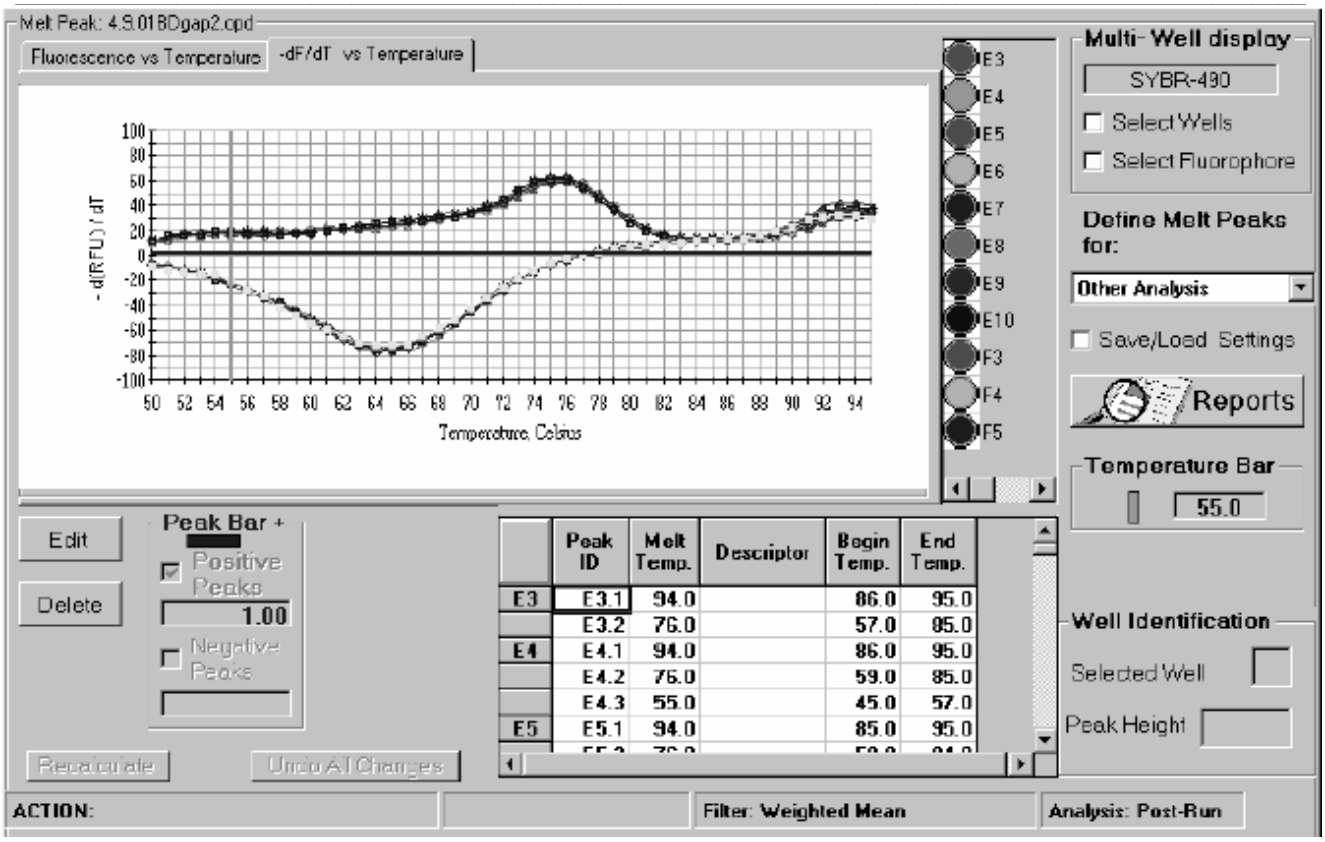


Рис.К-8. График первой производной флюоресценции по температуре, взятой со знаком минус, в зависимости от температуры (-dF/dT vs. Temperature) маяка FAM в отдельности или в присутствии одноцепочечной комплементарной матрицы.

Этот график также может помочь пользователю при выборе подходящей температуры отжига для амплификации. Когда зонд молекулярного маяка отжигается к мишени, общая флюоресценция записывается как данные амплификации. По мере накопления продуктов амплификации флюоресценция продолжает нарастать. Поскольку определяется общая флюоресценция, важно выбрать такую температуру отжига, где флюоресценция связанного с мишенью маяка высока, а фоновая флюоресценция от несвязанного маяка минимальна. На основании данных на Рис. К-8 лучшие температуры отжига находятся в пределах 50-53°С. Все доступные матрицы связаны с зондов при 65°С. Однако, фоновая флюоресценция несвязанного маяка при этой температуре очень Высока. Все плечи маяка закрываются только при температуре 53°С. Таким образом, выбрав температуру отжига 50-53°С, можно записать общую флюоресценцию в основном от маяка, связанного с матрицей, при минимальной фоновой флюоресценции. Из вышеизложенного видно, что анализ кривой плавления является быстрым и простым методом для контроля оптимальной структуры молекулярного маяка, также как для определения наилучшей температуры отжига при амплификации.

К2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ПО ОТДЕЛЬНОМУ НУКЛЕОТИДУ (SNP)

Кривая плавления также является удобным методом анализа полиморфизма по отдельному нуклеотиду (SNP). Имеются работы, описывающие методику флюоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) для SNP-детекции по кривой плавления (1, 2). Данная методика является общепринятой для дискриминации аллелей. На примере, показанном ниже (Рис. К-9 – К-11), векторы, содержащие ген дикого типа супрессора опухолей p53 (Рис.К-9), или доминантно негативного мутанта (Рис.К-10), отличающегося только заменой G/A по нуклеотиду 1017, были амплифицированы поодиночке или в смеси с гетерозиготой в отношении 1:1 (Рис. К-11). Тот же набор праймеров был использован для амплификации генов дикого типа и мутантов. Обратный праймер был мечен внутренней меткой Cy5 около 3’-конца. Зонд, меченный FAM по 3’-концу, где положение 1017 находилось в середине зонда, был

использован для детекции продуктов, ранее амплифицированных с использованием праймера, меченного Cy5. Когда происходила гибридизация зонда FAM с Cy5-меченым продуктом реакции, наблюдалась FRET с FAM на Cy5 при возбуждении красителя FAM. Данный сигнал собирался во время анализа кривой плавления. Когда достигалась T_m зонда, связанного с продуктом амплификации дикого типа или мутанта, зонд высвобождается от мишени и сигнал Cy5 уменьшается. Как видно на рис. K-9 и K-10, имеется сдвиг в 6°C в T_m зонда, связанного с мишенью дикого типа (T_m =67,2°C), в противоположность с зондом, связанным с мутантной мишенью (T_m =61,2°C). Температуры плавления для обоих пиков могут быть различены один от другого в гетерозиготной смеси в отношении 1:1 (Рис.K-11). Это данные показывают, что кривая плавления может быть использована для различения аллелей дикого типа и мутантов при наличии мутации в одной паре оснований.

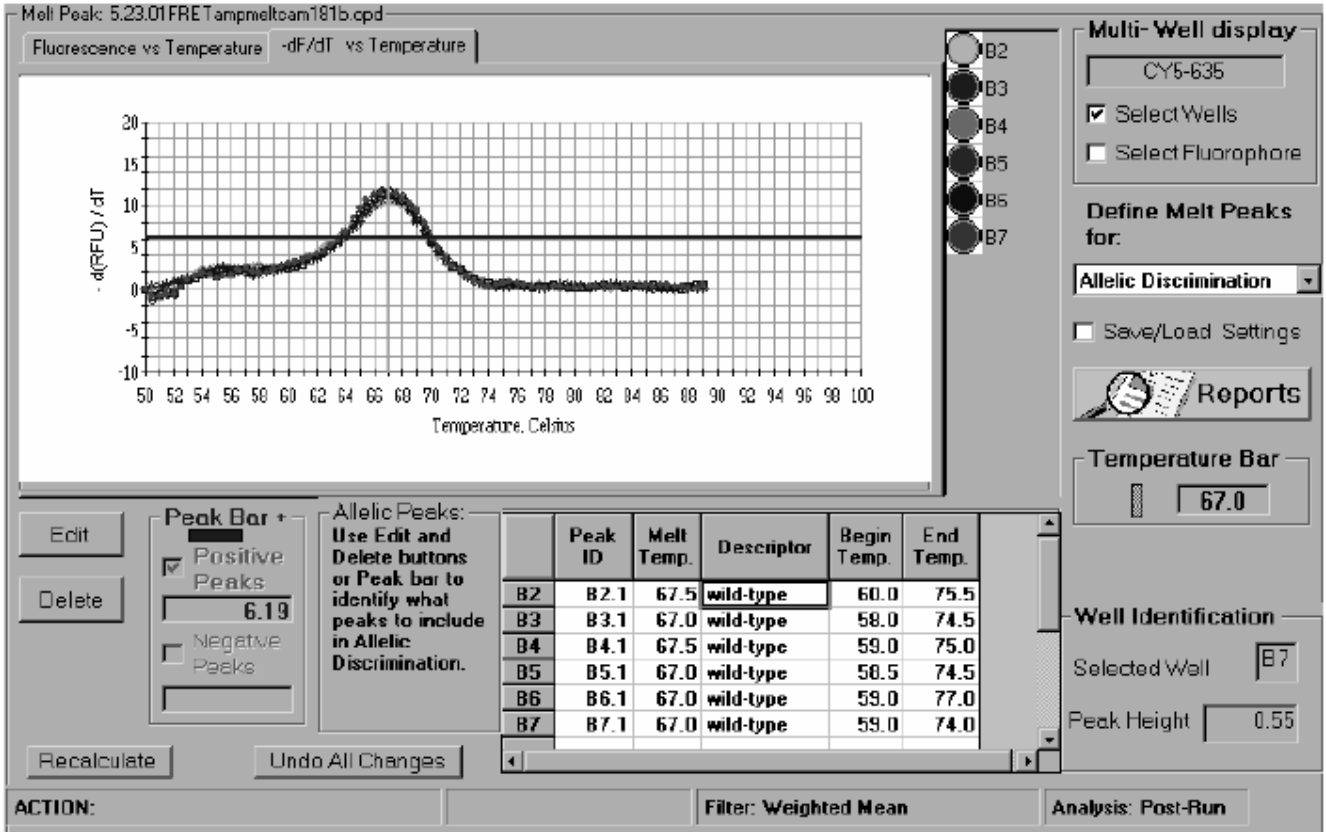


Рис.K-9. График кривой плавления амплифицированного гена p53 дикого типа.

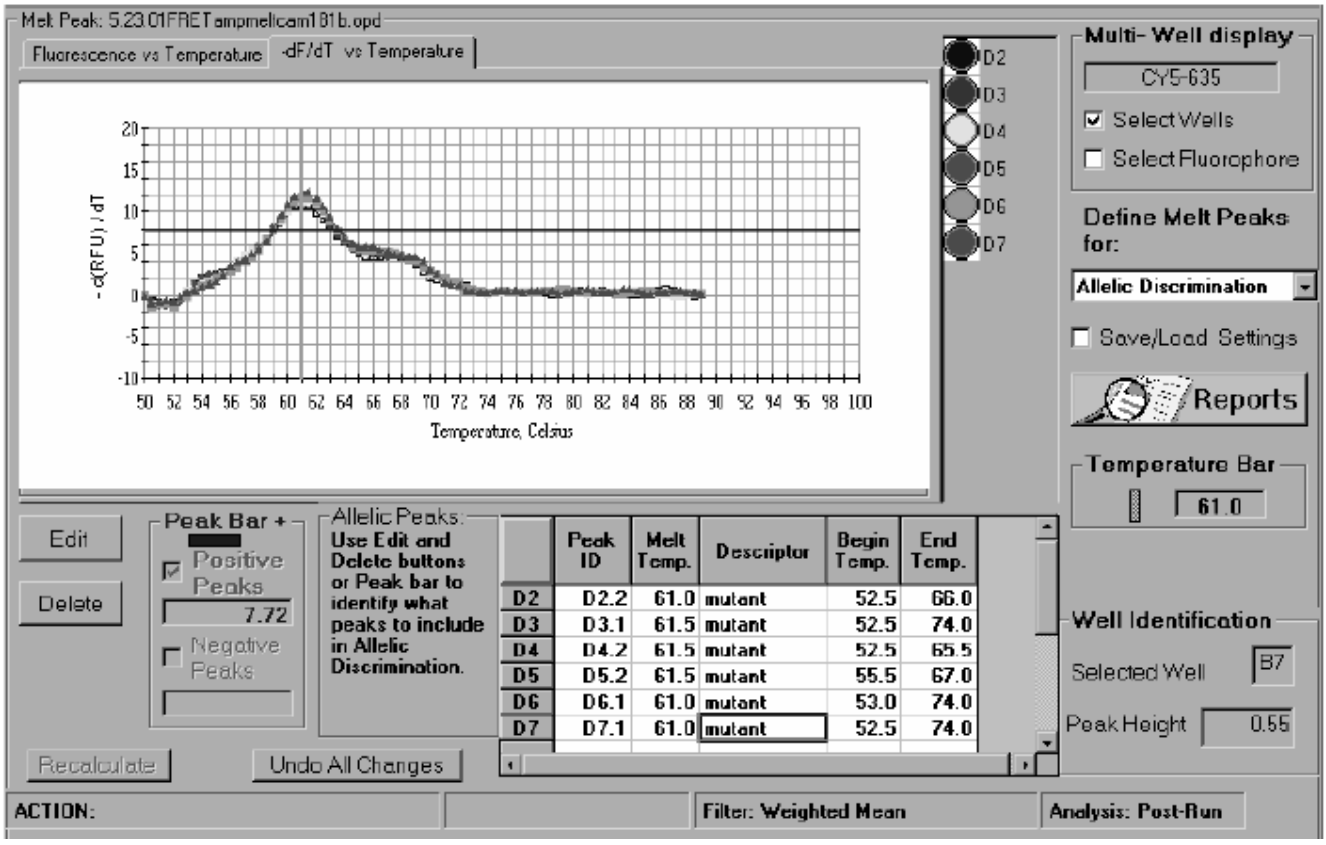


Рис.К-10. График кривой плавления амплифицированного мутантного аллеля p53 (доминантно-негативного).

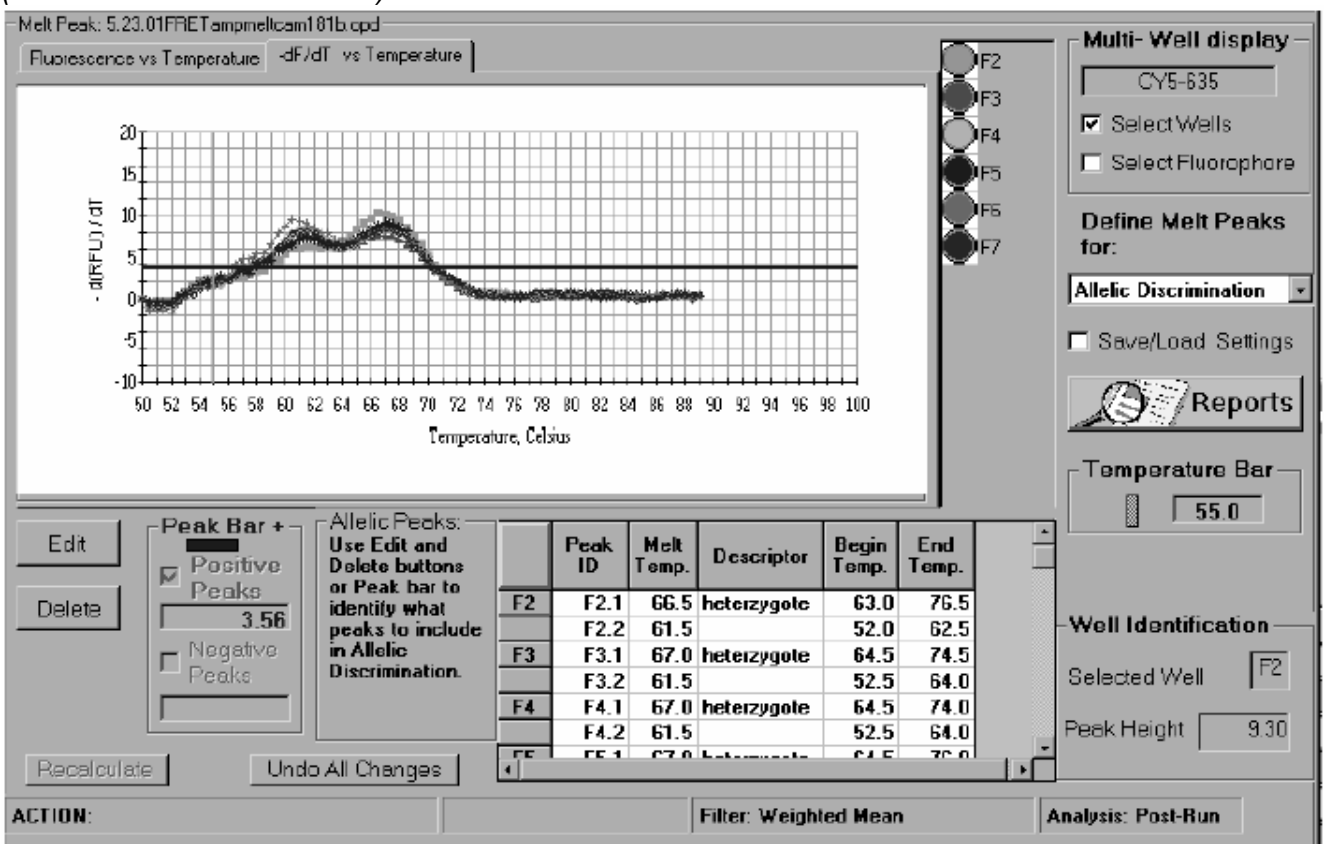


Рис.К-11. График кривой плавления амплифицированной смеси 1:1 дикого типа и мутантной аллели p53 (гетерозиготы)

ПРИЛОЖЕНИЕ L.

Конфигурации каруселей фильтров и руководство по выбору красителей.

Информация в файле конфигурации каруселей фильтров дает указание программному обеспечению, в каком положении устанавливать карусели фильтров возбуждения и испускания, чтобы регистрировать флюоресценцию по каждому красителю. Доступные конфигурации каруселей фильтров – это FilterSet 4 и FilterSet 5. Файлы описания планшетов, созданные в ранних версиях программы, должны быть модифицированы перед использованием в версиях, работающих со многими красителями. Модификация описана в разделе 2.5.3. **Для правильной работы системы очень важно, чтобы фильтры возбуждения и испускания находились в правильных позициях в своих каруселях. Необходимо регулярно проверять положение фильтров.**

В таблицах, приведенных ниже, для каждой текущей конфигурации фильтров даны позиции фильтров, их оптические характеристики, и рекомендуемые красители.

FilterSet 4

ПОЛОЖЕНИЕ	ВОЗБУЖДЕНИЕ	ИСПУСКАНИЕ	РЕКОМЕНДУЕМЫЕ КРАСИТЕЛИ
2	490/20X	530/30M	Fluorescein (FAM),SYBR Green
3	530/30X	575/20M	HEX, TET, VIC, JOE, Cy3
4	545/30X	585/20M	TAMRA/Cy3
5	575/30X	620/30M	Texas Red, ROX
6	635/30X	680/30M	Cy5, LC640

FilterSet5

ПОЛОЖЕНИЕ	ВОЗБУЖДЕНИЕ	ИСПУСКАНИЕ	РЕКОМЕНДУЕМЫЕ КРАСИТЕЛИ
2	490/20X	530/30M	Fluorescein (FAM),SYBR Green
3	530/30X	575/20M	HEX, TET, VIC, JOE, Cy3
4	53030X	620/30M	Ethidium Bromide
5	610/30X	660/20M	LC640
6	660/30X	710/20M	Cy5.5, LC705

Замечание: обозначение 490/20X для фильтра указывает, что этот фильтр пропускает в области 480/500 нм. Первое число, 490, обозначает центральную длину волны пропускания. Второе число, 20, обозначает полосу пропускания для данного фильтра. Буква X указывает на то, что этот фильтр предназначен только для пропускания возбуждающего светового пучка, а буква M – только для пропускания эмиссионного света. Данные фильтры не являются взаимозаменяемыми.

выбор красителя для мультиплексной ПЦР.

Любой краситель, для которого имеется пара фильтров и калибровочный раствор чистого красителя, может быть успешно использован в эксперименте с одним красителем. Однако для эксперимента с несколькими красителями необходимо тщательно продумать их сочетание. Успешный анализ мультиплексной ПЦР в режиме реального времени во многом определяется оптимальной схемой постановки эксперимента, где ведущую роль играет правильный подбор красителей. Основной принцип выбора красителей – чем сильнее отличаются их спектральные характеристики, тем лучше результаты.

Чем надо руководствоваться при подборе флюорофоров:

1. Для каждого красителя, присутствующего на планшете, детектор должен регистрировать флюоресценцию с помощью отдельной пары фильтров. Например,

если на планшете используются три красителя, программа будет регистрировать данные от трех пар фильтров.

2. Красители выбираются из списка флюорофоров в окне редактирования описания планшета Рабочего модуля программы. Названия красителей как правило оканчиваются номером, представляющим длину волны фильтра возбуждения, применяемого для данного красителя. Например, FAM-490 означает, что программа установит карусель фильтров таким образом, чтобы измерять флюоресцеин (FAM) парой фильтров 490/530 нм; Texas Red-575 означает, что будет использована пара 575/620 нм, и т.д. Именно номер в конце названия красителя в сочетании с конфигурацией карусели фильтров используется программой для определения (1) требуемой пары фильтров и (2) положения этой пары.
3. Вы не можете выбрать два красителя, оканчивающиеся одинаковым номером, потому что это означает, что оба красителя будут измеряться одной и той же парой фильтров.
4. Некоторые красители приведены в списке повторно, но с различными концевыми номерами. Это означает, что для каждого из них можно использовать несколько пар фильтров. Заметьте, что RME-данные (результаты калибровки по чистой краске) специфичны для комбинации красителя и пары фильтров, так что если имеется ссылка на TET-490, то эти данные нельзя использовать для TET-530.
5. Некоторые комбинации красителей имеют перекрывающиеся спектры, которые трудно различить в экспериментах с несколькими красителями. Эти комбинации необходимо избегать при планировании опытов. Например, если сигнал от красителя А сильнее улавливается парой фильтров для красителя Б, чем собственный сигнал красителя Б через эту пару фильтров, такая комбинация должна быть исключена из рассмотрения. В качестве примера такой комбинации можно привести HEX и TAMRA. Высокая световая эффективность HEX по сравнению с TAMRA делает сигнал HEX через пару фильтров для TAMRA сильнее, чем собственный сигнал от TAMRA.
6. Мы не проверяли все возможные сочетания красителей, однако рекомендуем в качестве наилучшей комбинации FAM, HEX, Texas Red и Cy5 при планировании экспериментов с несколькими красителями в одной лунке.

Таблица выбора красителей для мультиплексной ПЦР										
	FAM	HEX	TET	JOE	VIC*	Cy3	TAMRA	Texas Red	ROX	Cy5
FAM		+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HEX	+++							+++	+++	+++
TET	+++						++	+++	+++	+++
JOE	++						+	+++	+++	+++
VIC*	+++						+	+++	+++	+++
Cy3	+++							+	+	+++
TAMRA	+++		++	+	+			++	++	+++
Texas Red	+++	+++	+++	+++	+++		++			+++
ROX	+++	+++	+++	+++	+++	+	++			+++
Cy5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

+++ указывает наилучшее сочетание красителей
++ указывает на возможность использования этого сочетания красителей
+ наименее подходящее сочетание красителей