

Janeiro 2009

Manual de usuário do Rotor-Gene[®] Q



Fabricado por: Qiagen Instruments – Suíça

Importador e Distribuído por: Qiagen Biotecnologia Brasil Ltda

Cadastro ANVISA: 10322259004

Responsável Técnica: Adriana Cremonesi – CRBio 47703/01-D

L 0256B - Revisão 0 de Janeiro de 2010

(Australian TM Corbett Research Pty Ltd); Alexa Fluor[®], Marina Blue[®], SYBR[®], SYTO[®], Texas Red[®] (Molecular Probes, Inc.); BLAST[®] (US National Library of Medicine); CAL Fluor[®] (Biosearch Technologies, Inc.); Cy[®] (GE Healthcare); EvaGreen[®] (Biotium, Inc.); FAM[®], JOE[™], ROX[™], TET[™], VIC[®] (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); LC Green[®] (Idaho Technology, Inc.); LightCycler[®] (Roche Group); Microsoft[®], Windows[®], Excel[®] (Microsoft Corporation); Pentium[®] (Intel Corporation); Quasar[®] (Biosearch Technologies, Inc.); Yakima Yellow[®] (Nanogen, Inc.).

The QIAGEN silver logo is exclusively licensed to Corbett Research Pty Ltd.

NOTICE TO PURCHASER:

The purchase of this product (Rotor-Gene Q, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to certain patents (see details below) surrounding rapid polymerase chain reaction (PCR) methods and instrumentation, the use of SYBR Green I in PCR reactions, melting curve analysis, analysis methods of DNA melting data, specifically high resolution melting (HRM) and others.

The purchase of this product (Rotor-Gene Q, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to one or more of US Patents Nos 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; and U.S. Patent Applications Nos. 2003-0224434 and 2006-0019253 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, for any reagent or kit, or under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party. For information on purchasing licenses for in-vitro diagnostics applications or reagents, contact Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

ADDITIONAL NOTICE TO PURCHASER IN USA, EUROPE, AND AUSTRALIA ONLY:

Practice of the polymerase chain reaction (PCR) process may require a license depending on the reagents and methods applied.

Purchase of this instrument (Rotor-Gene Q) does not itself convey to the purchaser a complete license or right to perform the PCR process. The use of this instrument (Rotor-Gene Q) with Authorized Reagents such as Authorized QIAGEN kits and assays provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents.

Further information on purchasing licenses to practice the PCR process may be obtained by contacting the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA and/or Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA. No right is conveyed expressly, by implication or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods.

For all kits propagating melting curve analysis: The purchase of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. Patent No. 5,871,908 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications with authorized reagents with regard to Melting Curve Analysis. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party.

© 2009 QIAGEN, all rights reserved.

Conteúdo

1. Informações de segurança		9
1.1	Uso adequado	10
1.2	Segurança elétrica	11
1.3	Ambiente	13
1.4	Segurança biológica	14
1.5	Produtos químicos	15
1.6	Eliminação de resíduos	15
1.7	Perigos mecânicos	16
1.8	Perigo de aquecimento	17
1.9	Tradução de advertências e precauções	17
1.10	Símbolos no Rotor-Gene Q	34
2. Introdução		38
2.1	Sobre este manual de usuário	38
2.2	Informações gerais	39
2.2.1	Assistência técnica	39
2.2.2	Declaração de política	39
2.2.3	Administração de versão	39
2.3	Uso destinado do Rotor-Gene Q	40
3. Descrição geral		42

3.1	Performance térmica	42
3.2	Sistema óptico	43
4.	Procedimentos de instalação	46
4.1	Requisitos	46
4.2	Desempacotando o Rotor-Gene Q	47
4.3	Acessórios	47
4.4	Instalação de hardware	48
4.5	Instalação de software	49
4.6	Versão do software	52
4.7	Atualizando o software	54
5.	Procedimentos operacionais – Hardware	55
5.1	Tipos de rotores	55
5.2	Configuração de reação	58
5.3	Configuração do disco Rotor	61
6.	Procedimentos operacionais – Software	66
6.1	Assistente de Início rápido	66
6.1.1	Seleção de rotor	68
6.1.2	Confirmar perfil	69
6.1.3	Salvar execução	70
6.1.4	Configuração de amostra	71
6.2	Assistente avançado	72
6.2.1	Nova janela do assistente de execução 1	74

6.2.2	Nova janela do assistente de execução 2	74
6.2.3	Nova janela do assistente de execução 3	75
6.2.4	Editar perfil	76
6.2.5	Nova janela do assistente de execução 4	94
6.2.6	Nova janela do assistente de execução 5	95
7.	Análise da interface do usuário	97
7.1	Espaço de trabalho	97
7.2	Barra de ferramentas	97
7.3	Ver canais brutos	97
7.4	Alternando amostras	99
7.5	Menu Arquivo	102
7.5.1	Novo	102
7.5.2	Abrir e salvar	103
7.5.3	Relatórios	105
7.5.4	Configuração	105
7.6	Menu de análise	107
7.6.1	Análise	107
7.6.2	Quantificação	108
7.6.3	Duas curvas padrões	124
7.6.4	Quantificação relativa Delta delta Ct	129
7.6.5	Análise da curva derretida	132
7.6.6	Quantificação comparativa	136
7.6.7	Discriminação aléica	139
7.6.8	Análise do gráfico de dispersão	141

7.6.9	Análise do ponto final	144
7.6.10	Análise de concentração	153
7.6.11	Análise de derretimento de alta resolução	156
7.7	Executar menu	157
7.7.1	Iniciar execução	157
7.7.2	Pausar execução	158
7.7.3	Parar execução	158
7.8	Ver menu	158
7.8.1	Executar configurações	158
7.8.2	Gráfico de temperatura	163
7.8.3	Relatório de progresso	164
7.8.4	Editar amostras	165
7.8.5	Mostrar opções	175
7.9	Menu de segurança	176
7.9.1	Configuração	177
7.9.2	Executando múltiplos usuários no mesmo computador	185
7.9.3	Trilhas de auditoria	186
7.9.4	Executar assinaturas	188
7.9.5	Trancando amostras	190
7.9.6	Amostras trancadas	192
7.10	Menu de ganho	193
7.11	Janela do menu	193
7.12	Menu de ajuda	194
7.12.1	Enviar e-mail de suporte	194

8. Funções adicionais	195
8.1 Análise de modelo	195
8.2 Abrindo uma segunda execução	195
8.3 Opções de escalagem	195
8.4 Exportando gráficos	196
8.5 Medidor/Ícone chave	199
8.6 Opções de áreas selecionadas	201
9. Procedimentos de manutenção	204
10. Verificação óptica de temperatura	206
10.1 Princípio OTV	206
10.2 Kit de componentes Rotor disc OTV	206
10.3 Executando um OTV	207
11. Análise de fusão de alta resolução	212
11.1 Instrumentação	214
11.2 Química	214
11.3 Exemplo de genotipagem SNP	214
11.4 Exemplo de análise de metilação	216
11.5 Guias para análise de sucesso HRM	218
11.6 Preparação da amostra	220
11.7 Configuração do software	220
11.8 Análise de dados em tempo real PCR	228
11.9 Análise de dados HRM	230


12. Solução de problemas	236
12.1 Arquivos de log	236
12.2 Configurações regionais do Windows 98	236
12.3 Solução de problemas HRM	237
 13. Glossário	 240
 Apêndice A	 242
Dados técnicos	242
Condições de ambiente	242
Eliminação de resíduos elétricos e eletrônicos	244
 Apêndice B	 246
Quantificação	246
 Apêndice C	 248
Acessórios Rotor-Gene Q	248
 Apêndice D	 253
Cláusula de responsabilidade	253
 Índice	 255


Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

1 Informações de segurança

Antes de usar o Rotor Gene Q, é essencial que você leia este manual de usuário com cuidado e prestar particular atenção às informações de segurança. As instruções e informações de segurança no manual de usuário devem ser seguidas para garantir uma operação segura do instrumento e para manter o instrumento em condições seguras.


Os seguintes tipos de informações de segurança aparecerão através deste manual.

<p>AVISO</p> 	<p>O termo AVISO é usado para informá-lo sobre situações que possam resultar em lesão corporal para você ou outras pessoas.</p> <p>Detalhes sobre essas circunstâncias serão dadas em uma caixa como esta.</p>
--	---


<p>CUIDADO</p> 	<p>O termo CUIDADO é usado para informá-lo sobre situações que possam resultar em estrago ao instrumento ou outro equipamento.</p> <p>Detalhes sobre essas circunstâncias serão dadas em uma caixa como esta.</p>
--	--


A recomendação fornecida neste manual destina-se a completar, não a substituir, os requisitos normais de segurança vigentes no país do usuário.


1.1 Utilização adequada

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w1 O uso impróprio do Rotor Gene Q pode causar lesão corporal ou dano ao instrumento. O Rotor Gene Q somente deve ser operado por pessoa qualificada que tenha sido devidamente treinada. O serviço do Rotor Gene Q deve ser realizado por especialistas de instrumentos de serviço da QIAGEN.</p>
--	---


Realize a manutenção descrita na seção 9. A QIAGEN cobra por reparos necessários devido à manutenção incorreta.


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w2 O Rotor Gene Q é um instrumento pesado. Para evitar lesão corporal ou dano ao instrumento, cuidado ao levá-lo.</p>
--	--


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w3 Não tente mover o Rotor Gene Q durante a operação.</p>
--	--


<p>CUIDADO</p> 	<p>Dano ao instrumento c1 Evite derramar água ou produtos químicos no Rotor Gene Q. Dano de instrumento causado por derramamento de água ou produtos químicos anulará sua garantia.</p>
--	---


Em caso de emergência, desligue o Rotor Gene Q no interruptor atrás do instrumento e desconecte o cabo de energia da tomada.

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w4 Não tente abrir a tampa durante um experimento, ou enquanto o Rotor Gene Q estiver girando. Caso contrário, se você superar a trava da tampa e alcançar dentro, você arrisco contato com partes que estão quentes, elétricas, ou se movendo em alta velocidade, e você pode se machucar e estragar o instrumento.</p>
--	---

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w5</p> <p>Se você precisar parar um experimento rapidamente, desligue a energia do instrumento, e depois abra a tampa. Deixe a câmara esfriar antes de alcançar dentro. Caso contrário você arrisca se ferir ao tocar partes que estejam quentes.</p>
--	---

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w6</p> <p>Se o equipamento for usado de uma maneira não especificada pelo fabricante, a proteção fornecida pelo equipamento pode ser comprometida.</p>
--	--


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w7</p> <p>Papel solto embaixo do Rotor Gene Q interfere com o resfriamento do instrumento. É recomendado que a área abaixo do instrumento seja mantida livre de desordem.</p>
--	---

<p>AVISO</p> 	<p>Dano ao instrumento C2</p> <p>Sempre use uma argola de travamento no rotor. Isso evita que cápsulas saírem dos tubos durante um experimento. Se cápsulas saírem durante um experimento, elas podem danificar a câmara.</p>
--	---

Se você tocar no Rotor Gene Q durante um experimento, enquanto você é carregado de energia estática, em casos mais sérios o Rotor Gene Q pode reiniciar. Entretanto, o software reiniciará o Rotor Gene Q e continuará com o experimento.

1.2 Segurança elétrica

Desconecte o cabo da linha de energia da tomada dos serviços.


<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w8</p> <p>Qualquer interrupção do condutor de proteção dentro ou fora do instrumento ou desconexão do terminal do condutor de proteção poderá tornar o instrumento perigoso. Interrupção intencional é proibida.</p> <p>Voltagens letais dentro do instrumento</p> <p>Quando o instrumento estiver conectado com a linha de energia, terminais podem estar elétricos, e abrir tampas ou remover partes poderá expor partes elétricas.</p>
--	---

Para garantir uma operação segura e satisfatória do Rotor Gene Q, siga as instruções abaixo:


- O cabo de energia deve estar conectado à tomada de energia que tenha protetor de condução (aterrado).
- Não ajuste ou substitua partes internas do instrumento.
- Não opere o instrumento com qualquer cobertura ou partes removidas.
- Se derramar líquido para dentro do instrumento, desligue o instrumento, desconecte da tomada e contate os Serviços Técnicos QIAGEN.


Se o instrumento se tornar eletricamente inseguro, evite que outra pessoa opere, e contate os Serviços Técnicos QIAGEN. O instrumento poderá estar eletricamente inseguro quando:

- O cabo de energia aparentar estar estragado
- Tiver sido armazenado por um período prolongado em condições não compatíveis com as “Condições de armazenamento” mencionadas no Apêndice A.
- Tenha sido submetido a severas condições de stress de transporte.

<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w9</p> <p>O instrumento possui um rótulo de conformidade elétrica que indica a voltagem e a frequência do fornecimento de energia assim como a classificação dos fusíveis. O equipamento somente deve ser operado sob estas</p>
--	--


	condições.
--	------------


<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w10</p> <p>A seleção de voltagem só deve ser trocada por seu distribuidor de vendas ou pessoa autorizada. Usuários não devem tentar trocar a seleção de voltagem. Se fizer isto anulará a garantia.</p>
--	--

<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w11</p> <p>Não mude o interruptor de seleção de voltagem enquanto o instrumento estiver conectado ao conector principal, pois se fizer isto poderá causar danos ao instrumento e/ou queimar o fusível.</p>
--	---


1.3 Ambiente

Condições de operação

<p>AVISO</p> 	<p>Atmosfera explosiva w12</p> <p>O Rotor Gene Q não é destinado para uso em atmosfera explosiva.</p>
--	---

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de explosão w13</p> <p>O Rotor Gene Q é destinado a uso com reagentes e substâncias fornecidas pelos kits QIAGEN. O uso de outros reagentes e substâncias pode causar fogo ou explosão.</p>
--	--

<p>CUIDADO</p>	<p>Dano ao instrumento c3</p> <p>A luz direta do sol pode manchar partes do instrumento e</p>
----------------	---


	<p>causar danos às partes plásticas. O Rotor Gene Q deve ficar localizado fora da luz direta do sol.</p>
---	--

1.4 Segurança biológica


Espécimes e reagentes contendo materiais de fontes biológicas devem ser tratados como potencialmente infecciosos. Utilize procedimentos de laboratório seguros como mencionado em publicações como “*Segurança biológica em laboratórios microbiológicos e biomédicos (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories)*”, HHS (www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm).

Amostras

As amostras podem conter agentes infecciosos. Você deve estar atento ao perigo de saúde apresentado por tais agentes e deve utilizar, armazenar e eliminar tais amostras de acordo com os regulamentos de segurança necessários.

<p>AVISO</p> 	<p>Amostras contendo agentes infecciosos w14</p> <p>Algumas amostras usadas com este instrumento pode conter agentes infecciosos. Manuseie estas amostras com o maior cuidado e de acordo com os regulamentos de segurança necessários.</p> <p>Sempre utilize óculos de segurança, 2 pares de luvas, e um jaleco.</p> <p>O órgão responsável (gerente do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para assegurar que o local de trabalho esteja seguro, e que os operadores do instrumento estejam devidamente treinados e não estejam expostos a níveis perigosos de agentes infecciosos como definido nas Fichas de Dados de Segurança (MSDSs) ou OSHA, ACGIH, ou nos documentos COSHH .</p> <p>Ventilação de vapores e eliminação de resíduos devem estar de acordo com todos os regulamentos de segurança e leis nacionais, estaduais e locais.</p>
--	--


1.5 Produtos químicos

<p>AVISO</p> 	<p>Produtos químicos perigosos w15</p> <p>Alguns produtos químicos usados com este instrumento podem ser perigosos ou se tornar perigosos após a conclusão da execução do protocolo. Sempre use óculos de segurança, luvas e casaco de laboratório.</p> <p>O órgão responsável (gerente do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para assegurar que o local de trabalho esteja seguro, e que os operadores do instrumento não estejam expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas como definido nas Fichas de Dados de Segurança (MSDSs) ou OSHA, ACGIH, ou nos documentos COSHH . Ventilação de vapores e eliminação de resíduos devem estar de acordo com todos os regulamentos de segurança e leis nacionais, estaduais e locais.</p>
--	---

OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Estados Unidos).

ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Estados Unidos).

COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Reino Unido).

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de fogo w16</p> <p>Quando limpar o QIAxcel com desinfetante à base de álcool, deixe as portas do QIAxcel abertas para permitir que vapores inflamáveis dispersem.</p> <p>Limpe o Rotor Gene Q apenas quando os componentes da mesa de trabalho tiverem esfriado.</p>
--	---

Fumaças tóxicas


Se estiver trabalhando com solventes voláteis, ou substâncias tóxicas, você deve fornecer um sistema de ventilação eficiente no laboratório para remover vapores que podem ser produzidos.


1.6 Eliminação de resíduos

Produtos consumíveis e de plástico usados podem conter produtos químicos perigosos ou agentes infecciosos. Tais resíduos devem ser coletados e eliminados de acordo com os regulamentos locais de segurança.

1.7 Eliminação de resíduos


A tampa do Rotor Gene Q deve permanecer fechada durante a operação do instrumento.



<p>AVISO</p> 	<p>Partes Móveis w17</p> <p>Para evitar contato com as partes móveis durante a operação do Rotor Gene Q, o instrumento deve ser operado com a tampa fechada.</p>
--	--

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano material w18</p> <p>Abra e feche a tampa do Rotor Gene Q com cuidado para evitar trancar os dedos ou a vestimenta.</p>
--	--


Rotor

Certifique de que o rotor e a argola de travamento estejam instalados corretamente. Se o rotor ou a argola de travamento mostrar sinais de dano mecânico ou corrosão, não utilize o Rotor Gene Q; contate os Serviços Técnicos QIAGEN.

<p>CUIDADO</p> 	<p>Dano ao instrumento c4</p> <p>O Rotor Gene Q não deve ser usado se a trava da tampa estiver danificada.</p> <p>Certifique-se de que o rotor e a argola de travamento estejam instalados corretamente.</p> <p>Use apenas rotores, argolas de travamento, e consumíveis destinados para uso com o Rotor Gene Q. Dano causado por uso de outro consumível anulará sua garantia.</p>
--	---


<p>AVISO</p> 	<p>Partes Móveis w19</p> <p>Em caso de quebra causada por queda de energia, remova o cabo de energia e espere 10 minutos antes de tentar abrir manualmente a tampa.</p>
<p>AVISO</p> 	<p>Risco de aquecimento w20</p> <p>Para garantir ventilação adequada, mantenha uma distância mínima de 10 cm das laterais e da parte de trás do Rotor Gene Q.</p> <p>Frestas e aberturas que garantem a ventilação do Rotor Gene Q não devem ser cobertas.</p>

1.8 Perigo de aquecimento


<p>AVISO</p> 	<p>Superfície quente w21</p> <p>A câmara do Rotor Gene Q pode alcançar temperaturas acima de 120° C (248° F). Evite tocá-lo quando estiver quente.</p>
--	--

1.9 Traduções de advertências e precauções


Esta subseção contém traduções de advertências e precauções usadas neste manual de usuário. Cada advertência ou precaução tem um número de referência nos quadrados na parte superior direita das caixas.


<p>AVISO</p> 	<p>O termo AVISO é usado para informá-lo sobre situações que podem resultar em lesão corporal para você ou outras pessoas.</p> <p>Detalhes sobre essas circunstâncias são fornecidos em caixas como esta.</p>
--	--

DE	<p>WARNING (WARNUNG)</p> <p>WARNUNG weist auf Situationen und Umstände hin, die zu einer Verletzung des Benutzers oder anderer Personen führen können.</p> <p>Nähere Angaben zu der Art der Gefährdung und der Vermeidung solcher Situationen werden in einem Textfeld wie diesem neben der Warnung gemacht.</p>
FR	<p>WARNING (DANGER)</p> <p>La formule WARNING (DANGER) est utilisée pour avertir des situations pouvant occasionner des dommages corporels à l'utilisateur ou à d'autres personnes.</p> <p>Les détails sur ces circonstances sont données dans un encadré semblable à celui-ci.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal ou dano material w1</p> <p>O uso impróprio do Rotor Gene Q pode causar lesão corporal ou dano ao instrumento.</p> <p>O Rotor Gene Q somente deve ser operado por pessoas qualificadas que tenham sido adequadamente treinadas.</p> <p>Os serviços do Rotor Gene Q somente devem ser realizados por especialistas de Serviço de Campo da QIAGEN.</p>
DE	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Die unsachgemäße Bedienung des Rotor Gene Q kann zu einer Verletzung des Benutzers oder zur Beschädigung des Gerätes führen.</p> <p>Die Bedienung des Rotor Gene Q darf nur durch qualifiziertes Personal, das entsprechend geschult wurde, erfolgen.</p> <p>Die Wartung des Rotor Gene Q darf nur durch Mitarbeiter des QIAGEN Kundendienstes durchgeführt werden.</p>
FR	<p>Risque de dommages corporels et matériels</p> <p>L'utilisation non convenable du Rotor Gene Q peut causer des blessures ou des détériorations de l'instrument.</p> <p>Le Rotor Gene Q ne doit être utilisé que par du personnel qualifié qui a été formé de façon appropriée.</p> <p>Seul un ingénieur du service après-vente QIAGEN est</p>


	autorisé à effectuer des travaux d'entretien sur le Rotor Gene Q.
--	---

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal ou dano material w2</p> <p>O Rotor Gene Q é um instrumento pesado. Para evitar lesão corporal ou dano material, tome cuidado ao levantá-lo.</p>
DE	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Der Rotor Gene ist ein schweres Instrument. Bitte mit Vorsicht heben, um Verletzungen oder einen Schaden am Great zu vermeiden.</p>
FR	<p>Risque de dommages corporels et matériels</p> <p>Le Rotor Gene Q est un instrument lourd. Pour éviter de se blesser ou d'endommager La machine, soulever avec pracaution.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal ou dano material w3</p> <p>Não tente mover o Rotor Gene Q durante a operação.</p>
DE	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Den Rotor Gene Q während eines Laufes nicht bewegen.</p>
FR	<p>Risque de dommages corporels et matériels</p> <p>Ne pas essayer de bouger le Rotor Gene Q pendant son fonctionnement.</p>

AVISO	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w4</p> <p>Não tente abrir a tampa durante um experimento, ou</p>
-------	--


	<p>enquanto o Rotor Gene Q estiver girando. Caso contrário, se você superar a trava da tampa e alcançar dentro, você arrisco contato com partes que estão quentes, elétricas, ou se movendo em alta velocidade, e você pode se machucar e estragar o instrumento.</p>
<p>DE</p>	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes Während eines Laufes oder während der Rotor sich dreht darf die Haube nicht geöffnet werden. Wenn die Haube in diesen Fällen gewaltsam geöffnet wird, besteht Verletzungsgefahr durch elektrische Spannungen, heiße und mechanisch schnell bewegende Teile. Ebenso kann das Gerät Schaden nehmen.</p>
<p>FR</p>	<p>Risque de dommages corporels et matériels L'ouverture de l'appareil pendant une expérience n'est pas autorisée. Si l'ouverture du couvercle de l'appareil est forcée lors d'une expérience, il y a risque de blessure par électrocution, blessure par des pièces de l'appareil chauffées à très haute température et en mouvement. Lors de cette procédure l'appareil lui-même peut-être endommagé.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w5 Se você precisar parar um experimento rapidamente, desligue a energia do instrumento, e depois abra a tampa. Deixe a câmara esfriar antes de alcançar dentro. Caso contrário você arrisca se ferir ao tocar partes que estejam quentes.</p>
<p>DE</p>	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes Wenn ein Experiment plötzlich beendet werden muss, schalten Sie zuerst das Gerät am Hauptschalter aus und öffnen Sie dann die Haube. Lassen Sie die Reaktionskammer abkühlen, bevor sie hineinfassen, da sonst Verletzungsgefahr durch heiße Oberflächen und Teile besteht.</p>
<p>FR</p>	


	<p>Risque de dommages corporels et matériels</p> <p>Si une expérience doit être interrompue de façon subite, veuillez d'abord éteindre l'appareil en utilisant l'interrupteur principal d'alimentation. Lorsque l'appareil est éteint le couvercle de l'appareil peut alors être ouvert. Laissez refroidir la chambre intérieure de l'appareil pour éviter toute brûlure au contact de surfaces ou de pièces très chaudes.</p>
--	--

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w6</p> <p>Se o equipamento for usado de uma maneira não especificada pelo fabricante, a proteção fornecida pelo equipamento pode ser comprometida.</p>
--	--


DE	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Wenn das Gerät in einer von den Herstellerangaben abweichenden Art und Weise verwendet wird, können Schutzvorkehrungen am Gerät in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt sein.</p>
FR	<p>Risque de dommages corporels et matériels</p> <p>Si l'appareil n'est pas utilisé selon les recommandations du constructeur, les mesures de protection fournies par l'appareil peuvent perdre leur efficacité.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano ao instrumento w7</p> <p>Papel solto embaixo do Rotor Gene Q interfere com o resfriamento do instrumento. É recomendado que a área abaixo do instrumento seja mantida livre de desordem.</p>
DE	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Lose Papierseiten oder andere dünnen Materialien unterhalb des Rotor-Gene Q können die Instrumentenkühlung stören. Es wird empfohlen solche Materialien aus dem Bereich rund um den Rotor-Gene zu</p>


	entfernen.
FR	<p>Risque de dommages corporels et matériels</p> <p>Des feuilles de papier volant ou équivalent se trouvant sous le Rotor-Gene Q peuvent perturber le mécanisme de refroidissement de l'appareil. Il est donc conseillé de retirer tout papier pouvant se trouver à proximité de l'appareil.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Risco elétrico w8</p> <p>Qualquer interrupção do condutor de proteção dentro ou fora do instrumento ou falta de conexão do condutor terminal de proteção poderá tornar o instrumento perigoso. Interrupção intencional é proibida.</p> <p>Voltagens letais dentro do instrumento.</p> <p>Quando o instrumento estiver conectado à energia, terminais podem estar com energia, e abrir coberturas ou remover partes pode expor partes de energia.</p>
DE	<p>Gefährdung durch Elektrizität</p> <p>Das Gerät muss zum Betrieb immer geerdet sein. Es ist verboten, die Schutzleiter im Gerät oder in der Netzzuleitung zu trennen oder zu entfernen.</p> <p>Gefährliche Spannung im Gerät</p> <p>Auch in ausgeschaltetem Zustand kann an einigen Stellen im Gerät Netzspannung anliegen, wenn das Gerät am Stromnetz angeschlossen ist. Das Öffnen oder Entfernen von Gehäuseteilen kann diese stromführenden Teile freilegen.</p>
FR	<p>Risque d'électrocution</p> <p>Toute interruption du conducteur de protection à l'intérieur ou à l'extérieur de l'instrument, ou déconnexion Du raccord du conducteur de protection (terre) peut rendre l'instrument dangereux. Il est interdit d'interrompre volontairement ce conducteur.</p> <p>Présence de tensions mortelles dans l'instrument</p> <p>Lorsque l'instrument est relié au secteur, les raccords peuvent être sous tension, et des parties sous tension peuvent être découvertes en ouvrant des capots ou en</p>


	retirant des pièces (à l'exception de celles auxquelles il est possible d'accéder manuellement).
--	--


<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w9</p> <p>O instrumento possui um rótulo de conformidade elétrica que indica a voltagem e a frequência do fornecimento de energia assim como a classificação dos fusíveis. O equipamento somente deve ser operado sob estas condições.</p>
DE	<p>Gefährdung durch Elektrizität</p> <p>Das Instrument besitzt ein Schild mit der Angabe des elektrischen Anwendungsbereichs, das die Spannung und Frequenz des Netzteils und die erforderlichen Sicherungen vorgibt. Das Gerät darf außerhalb der angegebenen Werte nicht benutzt werden.</p>

FR	<p>Risque d'électrocution</p> <p>L'instrument porte une plaque décrivant le voltage, la fréquence du bloc d'alimentation électrique ainsi que les caractéristiques des fusibles de sécurité requis. L'utilisation de l'appareil dans d'autres conditions que celles indiquées par cette plaque n'est pas autorisée.</p>
----	--


<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w10</p> <p>A seleção de voltagem só deve ser trocada por seu distribuidor de vendas ou pessoa autorizada. Usuários não devem tentar trocar a seleção de voltagem. Se fizer isto anulará a garantia.</p>
DE	


	<p>Gefährdung durch Elektrizität</p> <p>Eine Änderung der vorgegeben Spannungseinstellung darf nur von autorisierten Personen und QIAGEN Vertriebspartnern durchgeführt werden. Benutzer dürfen die vorgegebene Spannungseinstellung nicht verändern. Falls dies dennoch geschieht, erlischt die Gerätegarantie.</p>
FR	<p>Risque d'électrocution</p> <p>Un changement de sélection du voltage ne peut être effectué que par un personnel autorisé ou un distributeur agréé. L'utilisateur de l'appareil n'est pas autorisé à changer les paramètres de voltage. Un changement de ces paramètres mettra immédiatement fin à la garantie.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w11</p> <p>Não mude o interruptor de seleção de voltagem enquanto o instrumento estiver conectado ao conector principal, pois se fizer isto poderá causar danos ao instrumento e/ou queimar o fusível.</p>
DE	<p>Gefährdung durch Elektrizität</p> <p>Die Spannungseinstellung darf nicht geändert werden während das Gerät an das Stromnetz angeschlossen ist, da ansonsten das Gerät Schaden nehmen kann und/oder die Sicherung durchbrennt.</p>
FR	<p>Risque d'électrocution</p> <p>Un changement de sélection du voltage ne doit en aucun cas être effectué pendant que l'appareil est branché au secteur. Cela peut endommager l'appareil et faire sauter les fusibles de sécurité.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Atmosfera explosiva w12</p> <p>O Rotor Gene Q não é destinado para uso em atmosfera explosiva.</p>
DE	<p>Explosionsfähige Atmosphären</p> <p>Der Rotor Gene Q darf nicht in explosionsfähigen</p>

	Atmosphären betrieben werden.
FR	Atmosphère explosive Le Rotor Gene Q n'est pas conçu pour fonctionner dans une atmosphère explosive.


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de explosão w13</p> <p>O Rotor Gene Q é destinado para uso com reagentes e substâncias fornecidas com o kit QIAGEN. O uso de outros reagentes e substâncias pode causar fogo ou explosão.</p>
DE	<p>Explosionsgefahr</p> <p>Der Rotor Gene Q ist ausschließlich mit Reagenzien und Substanzen aus de Kits zu benutzen. Die Benutzung von anderen Reagenzien oder Substanzen kann Feuer oder eine Explosion auslösen.</p>
FR	<p>Risque d'explosion</p> <p>Le Rotor Gene Q a été conçu pour l'utilisation des réactifs ET substances fournis par les kits. L'utilisation de réactifs et de substances autres que celles indiquées peut entraîner un risque d'incendie ou d'explosion.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Amostras contendo agentes infecciosos w14</p> <p>Algumas amostras usadas com este instrumento pode conter agentes infecciosos. Manuseie estas amostras com o maior cuidado e de acordo com os regulamentos de segurança necessários.</p> <p>Sempre utilize óculos de segurança, 2 pares de luvas, e um jaleco.</p> <p>O órgão responsável (gerente do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para assegurar que o local de trabalho esteja seguro, e que os operadores do instrumento estejam devidamente treinados e não estejam expostos a níveis perigosos de agentes infecciosos como definido nas Fichas de Dados de Segurança (MSDSs) ou OSHA, ACGIH, ou nos documentos COSHH .</p>
--	---

	Ventilação de vapores e eliminação de resíduos devem estar de acordo com todos os regulamentos de segurança e leis nacionais, estaduais e locais.
DE	<p>Infektiöses Probenmaterial</p> <p>Proben, die mit Hilfe dieses Gerätes prozessiert werden, können infektiöse Agenzien enthalten. Die Probenhandhabung sollte aus diesem Grund mit größter Vorsicht und gemäß den anzuwendenden Sicherheitsbestimmungen erfolgen. Es sollten immer Sicherheitsbrille, zwei Paar Handschuhe und ein Laborkittel getragen werden. Der Betreiber der Anlage ist für die Gewährleistung der Sicherheit am Arbeitsplatz verantwortlich. Er hat sicherzustellen, dass die Bediener des Gerätes ausreichend geschult sind und der Umgang mit infektiösen Agenzien nicht das in den Sicherheitsdatenblättern oder in anderen zu beachtenden Dokumenten festgelegte Ausmaß überschreitet. Bei der Behandlung von Abluft und bei der Abfallbeseitigung sind alle gesetzlichen Regelungen zur Gesundheit und Sicherheit auf nationaler, regionaler und lokaler Ebene zu berücksichtigen.</p>

FR	
----	--


	<p>Echantillons contenant des agents infectieux</p> <p>Certains échantillons utilisés avec cet instrument peuvent contenir des agents infectieux. Manipuler ce type d'échantillon avec le plus grand soin et en accord avec les règles de sécurité requises.</p> <p>Toujours porter des lunettes de protection, deux paires de gants et une blouse de laboratoire.</p> <p>La personne responsable (par exemple le Chef du laboratoire) doit prendre les précautions nécessaires à la sécurité de l'environnement du poste de travail et s'assurer que les opérateurs de l'instrument sont suffisamment formés et non exposés à des quantités dangereuses d'agents infectieux comme défini dans les fiches de données de sécurité ("<i>Material Safety Data Sheets, MSDS</i>") ou des documents "OSHA, ACGIH ou COSHH".</p> <p>L'évacuation des vapeurs et déchets doit être conforme à tous règlements et dispositions légales - au plan national, départemental et local - concernant la santé et la sécurité.</p>
--	--


<p>AVISO</p> 	<p>Produtos químicos perigosos w15</p> <p>Alguns produtos químicos usados com este instrumento podem ser perigosos ou se tornar perigosos após a conclusão da execução do protocolo.</p> <p>Sempre use óculos de segurança, luvas e casaco de laboratório.</p> <p>O órgão responsável (gerente do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para assegurar que o local de trabalho esteja seguro, e que os operadores do instrumento não estejam expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas como definido nas Fichas de Dados de Segurança (MSDSs) ou OSHA, ACGIH, ou nos documentos COSHH .</p> <p>Ventilação de vapores e eliminação de resíduos devem estar de acordo com todos os regulamentos de segurança e leis nacionais, estaduais e locais.</p>
--	---


--	--


DE	<p>Gefährliche Chemikalien</p> <p>Einige der in Verbindung mit diesem Gerät verwendeten Chemikalien sind gesundheitsgefährdend oder können nach Beendigung eines Protokoll-Durchlaufes gesundheitsgefährdend werden.</p> <p>Es sollten immer Sicherheitsbrille, Handschuhe und ein Laborkittel getragen werden.</p> <p>Der Betreiber der Anlage ist für die Gewährleistung der Sicherheit am Arbeitsplatz verantwortlich. Er hat sicherzustellen, dass die Bediener des Gerätes ausreichend geschult sind und nicht gesundheitsgefährdenden Konzentrationen toxischer Substanzen (chemischer oder biologischer) ausgesetzt sind, so wie dies in den Sicherheitsdatenblättern oder in anderen zu beachtenden Dokumenten festgelegt ist.</p> <p>Bei der Behandlung von Abluft und bei der Abfallbeseitigung sind alle gesetzlichen Regelungen zur Gesundheit und Sicherheit auf nationaler, regionaler und lokaler Ebene zu berücksichtigen.</p>
FR	<p>Substances chimiques dangereuses</p> <p>Certaines substances chimiques utilisées avec cet instrument peuvent être dangereuses ou peuvent le devenir après que le protocole ait été effectué.</p> <p>Toujours porter des lunettes de protection, paire de gants et une blouse de laboratoire.</p> <p>La personne responsable (par exemple le Chef du laboratoire) doit prendre les précautions nécessaires à la sécurité de l'environnement du poste de travail et s'assurer que les opérateurs de l'instrument sont suffisamment formés et non exposés à des quantités dangereuses d'agents infectieux comme défini dans les fiches de données de sécurité ("<i>Material Safety Data Sheets</i>, MSDS") ou des documents "OSHA, ACGIH ou COSHH".</p> <p>L'évacuation des vapeurs et déchets doit être conforme à tous règlements et dispositions légales - au plan national, départemental et local - concernant la santé et la sécurité.</p>


AVISO	Risco de fogo w16
-------	-------------------

	<p>Ao limpar o QIAxcel com desinfetante à base de álcool, deixe as portas do QIAxcel abertas para permitir que os vapores inflamáveis dispersem.</p> <p>Limpe o Rotor Gene Q apenas quando os componentes da mesa de trabalho estiverem esfriados.</p>
<p>DE</p>	<p>Feuergefahr</p> <p>Beim Reinigen des QIAxcel mit einem auf Alkohol basierenden Desinfektionsmittel muss die Tür des QIAxcel offen gelassen werden, damit die brennbaren Dämpfe entweichen können.</p> <p>Den Rotor Gene Q nur reinigen, sobald die entsprechenden Module auf der Arbeitsfläche abgekühlt sind.</p>
<p>FR</p>	<p>Risque de feu</p> <p>Lors du nettoyage du QIAxcel avec un désinfectant à base d'alcool, laisser la porte du QIAxcel ouverte pour permettre aux vapeurs inflammables de s'évaporer.</p> <p>Nettoyer le QIAxcel uniquement quand les composants de la table de travail ont refroidi.</p> <p>Nettoyer Le Rotor Gene Q uniquement quand les composants de la table de travail ont refroidi.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Partes Móveis w17</p> <p>Para evitar contato com as partes móveis durante operação do QIAxcel, o instrumento deve ser operado com a tampa fechada.</p>
<p>DE</p>	<p>Bewegliche Geräteteile</p> <p>Um jeglichen Kontakt mit beweglichen Geräteteilen während des Laufes zu vermeiden, darf der QIAxcel nur benutzt werden.</p>
<p>FR</p>	<p>Éléments mobiles</p> <p>Afin d'éviter tout contact avec les éléments mobiles du QIAxcel lorsqu'il est en marche, toujours fermer les portes de l'instrument pour les échantillons et pour la pareil.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de lesão corporal e dano material w18</p> <p>Abra e feche a tampa do Rotor Gene Q com cuidado para evitar trancar os dedos ou a vestimenta.</p>
DE	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Öffnen und schließen Sie die Haube des Rotor-Gene Q vorsichtig, so dass weder Finger noch Kleidungsstücke eingeklemmt werden.</p>
FR	<p>Verletzungsgefahr und Beschädigung des Gerätes</p> <p>Öffnen und schließen Sie die Haube des Rotor-Gene Q vorsichtig, so dass weder Finger noch Kleidungsstücke eingeklemmt werden.</p>

<p>AVISO</p> 	<p>Partes Móveis w19</p> <p>Em caso de quebra causada por queda de energia, remova o cabo de energia e espere 10 minutos antes de tentar abrir manualmente a tampa.</p>
DE	<p>Bewegliche Geräteteile</p> <p>Bei einem durch Stromausfall entstandenen Ausfall des Gerätes das Stromkabel entfernen und 10 Minuten warten bevor der Zentrifugendeckel manuell geöffnet werden kann.</p>
FR	<p>Eléments mobiles</p> <p>Dans le cas d'un arrêt causé par une panne de courant, retirer le câble d'alimentation et attendre 10 minutes avant d'essayer d'ouvrir manuellement le couvercle de la machine.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Risco de aquecimento w20</p> <p>Para garantir ventilação adequada, mantenha uma distância mínima de 10 cm das laterais e da parte de trás do Rotor Gene Q. Frestas e aberturas que garantem a ventilação do Rotor Gene Q não devem ser cobertas.</p>
--	---


DE	<p>Überhitzung des Gerätes</p> <p>Zur Sicherstellung einer ausreichenden Belüftung des Rotor-Gene Q muss ein Mindestabstand von 10 cm an den Seiten und an der Rückseite des Gerätes eingehalten werden. Lüftungsschlitze und –öffnungen des Gerätes nicht abdecken.</p>
FR	<p>Risque de surchauffe</p> <p>Laisser un espace d'au moins 10 cm sur les côtés et à l'arrière du Rotor-Gene Q pour assurer une ventilation efficace.</p> <p>Les grilles et prises d'air assurant la ventilation du Rotor-Gene Q ne doivent pas être couvertes.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Superfície quente w21</p> <p>A câmara do Rotor Gene Q pode alcançar temperaturas acima de 120° C (248° F). Evite tocá-lo quando estiver quente.</p>
DE	<p>Heiße Oberflächen</p> <p>In der Reaktionskammer des Rotor-Gene Q können Temperaturen von mehr als 120°C (248°F) erreicht werden. Vermeiden Sie es die Oberflächen der Kammer zu berühren, solange diese heiß sind.</p>
FR	<p>Surface brûlante</p> <p>La chambre du Rotor-Gene Q peut atteindre des températures supérieures à 120°C (248°F). Eviter de toucher l'intérieur de l'appareil quand il est chaud.</p>


<p>AVISO</p> 	<p>Superfície quente w22</p> <p>Quando pausar uma execução, o Rotor Gene Q não será resfriado completamente para temperatura ambiente. Exerça cautela ao manusear o rotor ou quaisquer tubos no instrumento.</p>
--	---


DE	<p>Heiße Oberflächen</p> <p>Falls ein Experiment angehalten oder abgebrochen wird, wird der Rotor-Gene Q nicht automatisch bis auf Raumtemperatur abgekühlt. In diesem Fall dürfen die Probengefäße und Rotoren in der Reaktionskammer nur mit größte Vorsicht angefasst werden.</p>
FR	<p>Surface brûlante</p> <p>Si une expérience est suspendue, le Rotor-Gene Q ne va pas refroidir complètement jusqu'à température ambiante. Il est alors recommandé de faire preuve de précaution lors du maniement des tubes ou du rotor à l'intérieur de l'appareil.</p>

<p>CUIDADO</p> 	<p>O termo CUIDADO é utilizado para informá-lo sobre situações que possam resultar em dano ao instrumento ou outro equipamento.</p> <p>Detalhes sobre essas circunstâncias são fornecidos em uma caixa como esta.</p>
DE	<p>CAUTION (ACHTUNG)</p> <p>ACHTUNG weist auf Situationen und Umstände hin, die zu einer Beschädigung des Gerätes führen können. Um einen Geräteschaden zu vermeiden, muss die genannte Anleitung unbedingt befolgt werden.</p> <p>Nähere Angaben zu der Art der Gefährdung und der Vermeidung solcher Situationen werden in einem Textfeld wie diesem gemacht.</p>
FR	<p>CAUTION (ATTENTION)</p> <p>Le terme CAUTION (Attention) est utilisé pour signaler les situations susceptibles de provoquer des détériorations de l'instrument ou d'autre matériel.</p> <p>Les détails sur ces circonstances figurent dans un encadré semblable à celui-ci.</p>

<p>CUIDADO</p> 	<p>Dano ao instrumento c1</p> <p>Evite derramar água ou produtos químicos dentro do Rotor Gene Q.</p> <p>Dano causado por derramamento de água ou produtos químicos anulará sua garantia.</p>
<p>DE</p>	<p>Beschädigung des Gerätes</p> <p>Vermeiden Sie es, Wasser oder Chemikalien auf dem Rotor Gene Q zu verschütten. Durch verschüttetes Wasser oder verschüttete Chemikalien verursachte Geräteschäden sind nicht durch die Garantie abgedeckt.</p>
<p>FR</p>	<p>Détérioration de l'appareil</p> <p>Eviter de renverser de l'eau ou des substances chimiques sur le Rotor Gene Q. Tout dommage causé par de l'eau ou des produits chimiques mettra fin à la garantie.</p>


<p>CUIDADO</p> 	<p>Dano ao instrumento c2</p> <p>Sempre use uma argola de travamento no rotor. Isso evita que cápsulas de saírem dos tubos durante um experimento. Se cápsulas saírem durante um experimento, elas podem danificar a câmara.</p>
<p>DE</p>	<p>Beschädigung des Gerätes</p> <p>Jeder Rotor muss mit einem Spannring ("locking ring") gesichert sein. Der Spannring verhindert, dass die Probengefäße während eines Laufes sich aus dem Rotor lösen können. Falls der Spannring nicht verwendet wird können losgelöste Probengefäße einen Schaden am Gerät verursachen.</p>
<p>FR</p>	<p>Détérioration de l'appareil</p> <p>Chaque rotor doit être sécurisé par un anneau de serrage ("locking ring"). L'anneau de serrage évite que des tubes ne quittent le rotor pendant l'expérience. Si l'anneau de serrage n'est pas en place, les tubes peuvent quitter le rotor et endommager l'appareil.</p>




<p>CUIDADO</p> 	<p>Dano ao instrumento c3</p> <p>A luz direta do sol branquear partes do instrumento e causar danos às partes plásticas</p> <p>O Rotor Gene Q deve ficar localizado fora de alcance da luz direta do sol.</p>
<p>DE</p>	<p>Beschädigung des Gerätes</p> <p>Direktes Sonnenlicht kann Teile des Gerätes bleichen und Plastikteile schädigen. Der Rotor Gene Q darf nicht ins direkte Sonnenlicht gestellt werden.</p>
<p>FR</p>	<p>Détérioration de l'instrument</p> <p>La lumière directe du soleil peut décolorer des parties de l'instrument et endommager des parties en plastique. Placer le Rotor Gene Q en dehors de la lumière directe du soleil.</p>

<p>CUIDADO</p> 	<p>Dano ao instrumento c4</p> <p>O Rotor Gene Q não deve ser usado se a tampa estiver quebrada ou se a trava da tampa estiver danificada. Certifique-se de que o rotor e a argola de travamento estejam instalados corretamente.</p> <p>Utilize apenas rotores, argolas de travamento e consumíveis destinados a uso com o Rotor Gene Q. Danos causados por uso com outros consumíveis anulará sua garantia.</p>
<p>DE</p>	<p>Beschädigung des Gerätes</p> <p>Der Rotor-Gene darf nicht betrieben werden, wenn die Sicherung der Haube oder die Haube selber beschädigt sind. Versichern Sie sich immer, dass der Rotor und der Rotor-Spannring korrekt eingesetzt sind. Verwenden Sie nur Rotoren, Rotor-Spannringe und Verbrauchsmaterialien wie Probengefäße mit dem Rotor-Gene Q, die durch den Hersteller des Gerätes zugelassen sind. Für alle Schäden, die aus einer Verwendung nicht zugelassener Materialien resultiert, erlischt die Gerätegarantie.</p>
<p>FR</p>	

	<p>Domage de l'appareil</p> <p>Le Rotor-Gene Q ne doit en aucun cas être utilisé si la fermeture sécurisée de l'appareil ou le couvercle lui-même sont endommagés. Vérifier lors de chaque expérience que le rotor et l'anneau de serrage sont dans leur position correcte. Utiliser exclusivement les rotors, les anneaux de serrage et les tubes de réaction autorisés par le constructeur de l'appareil. La garantie de l'appareil ne couvre aucun dommage provoqué par l'utilisation de matériel autre que celui recommandé par le constructeur de l'appareil.</p>
--	---

1.10 Símbolos no Rotor Gene Q

Símbolo	Localização	Linguagem	Descrição
	Próximo do interruptor de seleção de voltagem principal	Inglês	Símbolo geral de perigo – antes de usar o Rotor Gene Q pela primeira vez, certifique-se de que as configurações principais estejam corretas, veja a seção 4.4.
	Neben dem Schalter für die Spannungseinstellungen	Alemão	Allgemeines Gefahrensymbol. Bevor der Rotor-Gene Q das erste Mal benutzt wird, vergewissern Sie sich das die Spannungseinstellung korrekt ist, siehe Abschnitt 4.4
	À proximité du commutateur de selection du voltage	Francês	Symbole général de danger: avant d'utiliser l'appareil pour la première fois, vérifier que la sélection du voltage est

			correcte, voir Section 4.4.
	Próximo da câmara da amostra, visível quando a tampa está aberta	Inglês	Aviso de superfície quente
	In der Nahe der Probenkammer. Das symbol ist sichtbar, wenn die Haube geoffnet ist.	Alemão	Warnung vor heißen Oberflächen
	A proximité de La chambre de l'appareil. Symbole visible lorsque Le couvercle est ouvert	Francês	Attention, surfaces brûlantes
	Placa de espécime, nas costas do instrumento	Inglês	Símbolo CE
	Plakette auf der Rückseite des Gerätes	Alemão	CE-Zeichen
	Plaque à l'arrière de l'appareil	Francês	Marquage CE
	Placa de espécimes nas costas do instrumento	Inglês	Fabricante
	Plakette auf der Rückseite des Gerätes	Alemão	Hersteller

	Plaque à l'arrière de l'appareil	Francês	Fabricant
	Placa de espécimes nas costas do instrumento	Inglês	Símbolo WEEE para a Europa
	Plakette auf der Rückseite des Gerätes	Alemão	WEEE-Zeichen für Europa
	Plaque à l'arrière de l'appareil	Francês	Marquage WEEE pour l'Europe
	Placa de espécimes nas costas do instrumento	Inglês	Símbolo FCC da Comissão de Comunicação Federal dos Estados Unidos
	Plakette auf der Rückseite des Gerätes	Alemão	FCC Markierung der USA, Validierung durch die Federal Communications Commission
	Plaque à l'arrière de l'appareil	Francês	Marquage FCC des Etats-Unis, validation par la Federal Communications Commission
	Placa de espécimes nas costas do instrumento	Inglês	Símbolo C-Tick para Austrália (identificação do fornecedor N17965/N15148)
	Plakette auf der Rückseite des Gerätes	Alemão	C-Tick-Markierung für Australien (Lieferanten Identifizierung N17965/N15148)
	Plaque à l'arrière de l'appareil	Francês	Marquage C-Tick pour l'Australie (Identification

		s	du fournisseur N17965/N15148)
	Placa de espécimes nas costas do instrumento	Inglês	Símbolo RoHS para China (restrição do uso de certas substâncias de perigo a equipamentos elétricos e eletrônicos)
	Plakette auf der Rückseite des Gerätes	Alemã o	RoHS Markierung für China (Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe in Elektro- und Elektronikgeräten)
	Plaque à l'arrière de l'appareil	Francês	Marquage RoHS pour la Chine (limitation de l'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques)

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

2 Introdução

Obrigado por escolher o Rotor Gene Q. Estamos confiantes que irá se tornar uma parte integrante de seu laboratório.

Antes de usar o Rotor Gene Q, é essencial que você leia este manual de usuário com cuidado e prestar particular atenção às informações de segurança. As instruções e informações de segurança no manual de usuário devem ser seguidas para garantir uma operação segura do instrumento e para manter o instrumento em condições seguras.

2.1 Sobre este manual de usuário

Este manual de usuário fornece informação sobre o QIAgility nas seguintes seções:

1. Informações de segurança
2. Introdução
3. Descrição geral
4. Procedimentos de instalação
5. Procedimentos de instalação – hardware
6. Procedimentos de instalação – software
7. Interface de análise do usuário
8. Funções adicionais
9. Procedimentos de manutenção
10. Verificação óptica de temperatura
11. Análise de fusão de alta resolução
12. Solução de problemas
13. Glossário

Os apêndices contém o seguinte:

- Dados técnicos
- Técnicas mecânicas
- Acessórios do Rotor Gene Q
- Cláusula de responsabilidade

2.2 Informações gerais

2.2.1 Assistência técnica

Na QIAGEN nos orgulhamos da qualidade e disponibilidade de nosso suporte técnico. Nossos departamentos de serviços técnicos são compostos por experientes cientistas com extensa perícia prática e teórica em biologia molecular e no uso dos produtos QIAGEN. Se você tiver qualquer pergunta ou sentir qualquer dificuldade relacionada ao Rotor Gene Q ou produtos QIAGEN em geral, por favor, não hesite em nos contatar.

Os clientes da QIAGEN são a principal fonte de informação em relação aos usos avançados ou especializados de nossos produtos. Essa informação é útil para outros cientistas assim como para os pesquisadores da QIAGEN. Portanto nós o encorajamos a nos contatar se tiver alguma sugestão sobre o desempenho do produto ou novas aplicações e técnicas.

Para assistência técnica e mais informações, ligue para um dos Departamentos de Assistência Técnica QIAGEN ou para o distribuidor local (veja a capa de trás).

Para informações atuais sobre o Rotor Gene Q, visite www.qiagen.com/goto/Rotor-GeneQ.

2.2.2 Declarações de política

É política da QIAGEN melhorar produtos sempre que novas técnicas e componentes se disponibilizam. A QIAGEN se reserva o direito de mudar especificações a qualquer momento.

Em esforço para produzir documentação útil e apropriada, apreciamos seus comentários sobre esta publicação. Por favor, contate os Serviços Técnicos QIAGEN.

2.2.3 Gestão de versões

Este documento é o Manual de Usuário do Rotor Gene Q, versão 1.0.

2.3 Uso destinado do Rotor Gene Q

O instrumento Rotor Gene Q é destinado a realizar ciclo-térmico em tempo real e ponto final, utilizando uma reação em cadeia de polimerase (PCR) e análise de fusão de alta resolução (HRM) em aplicações de biologia molecular assim como para outras aplicações tais como medição de concentração, análise de proteínas e enzimas cinéticas.

O Rotor Gene Q, se usado em combinação com os kits QIAGEN indicados para uso com o instrumento Rotor Gene Q, é destinado para as aplicações descritas nos respectivos manuais dos kits QIAGEN.

Se o instrumento Rotor Gene Q for usado com outros kits que não sejam os kits QIAGEN, é responsabilidade do usuário validar a performance de tais combinações de produtos para qualquer aplicação determinada.

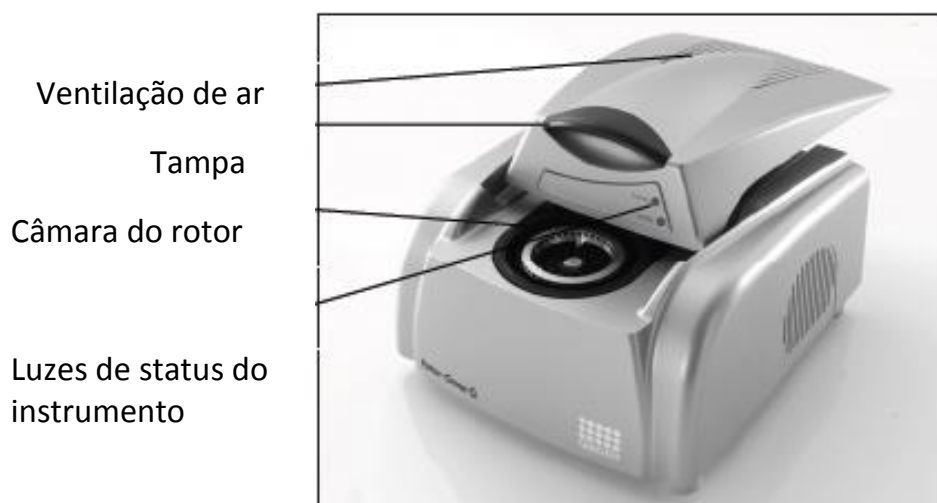
O instrumento Rotor Gene Q é destinado para uso por usuários profissionais, tais como técnicos, físicos treinados em técnicas de biologia molecular e na operação do instrumento Rotor Gene Q.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

3 Descrição geral

O Rotor Gene Q é um instrumento inovador que permite PCR de alta precisão em tempo real, PCR em ponto final, e análise de fusão de alta resolução (HRM). É altamente adequado para uso de análise de expressão de gene, genotipagem, detecção patogênia, e muitas outras áreas de pesquisa.

O software poderoso e amigável do usuário fornece simplicidade para iniciantes assim como uma plataforma experimental aberta para usuários avançados.



3.1 Performance térmica

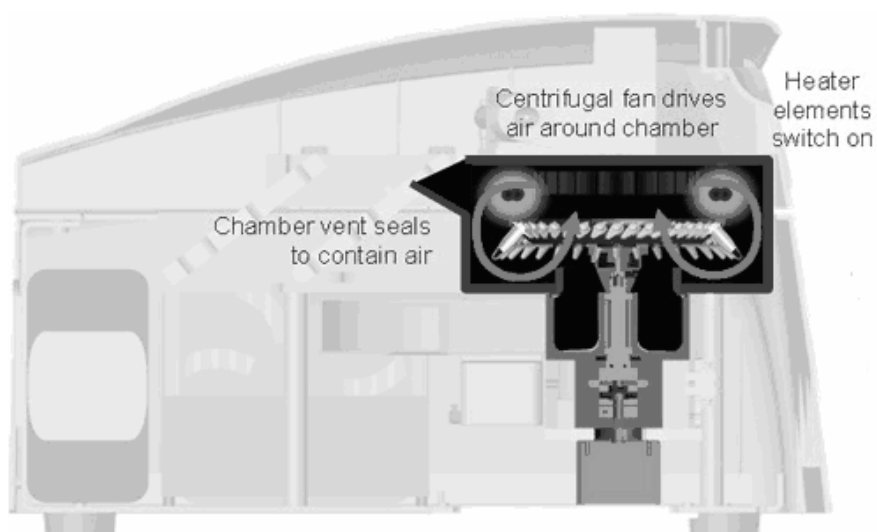
O Rotor Gene Q utiliza um design de aquecimento e resfriamento sofisticados para atingir o máximo das condições de reações. O formato rotativo único garante a melhor uniformidade térmica e óptica entre amostras críticas para análises precisas e confiáveis.

As amostras giram continuamente a 400 rpm durante uma execução. A centrifugação previne a condensação e remove as bolhas de ar, mas não aglomera DNA. Além disso, as amostras não precisam ser giradas para baixo antes de uma execução.

As amostras são aquecidas e resfriadas em um forno de baixa massa de ar. O aquecimento é alcançado por um elemento cromado de níquel na tampa. A câmara é resfriada ao ventilar o ar

para fora através do topo da câmara enquanto o ar ambiente é soprado para cima através da base.

Aquecimento



Resfriamento

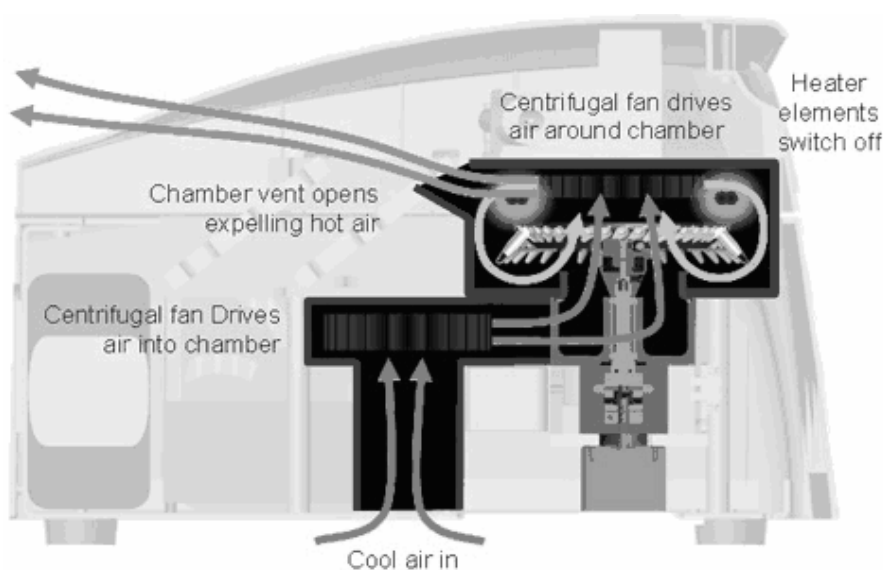


Ilustração dos sistemas de aquecimento e resfriamento

3.2 Sistema óptico

Com a escolha de até 6 fontes de excitação e 6 filtros de detecção combinados com uma trajetória óptica curta e fixa, o Rotor Gene Q

pode ser usado para reações múltiplas, assegurando mínima variabilidade fluorescente entre amostras e eliminando a necessidade de calibragem e compensação.

As amostras são excitadas do fundo da câmara por um diodo que emite luz. Energia é transmitida através das finas paredes na base do tubo. A fluorescência emitida passa por filtros de emissão na lateral da câmara e depois é coletada por um fotomultiplicador. A trajetória óptica fixa garante excitação consistente para cada amostra, o que significa que não há necessidade de usar um corante interno passivo de referência como o ROX.

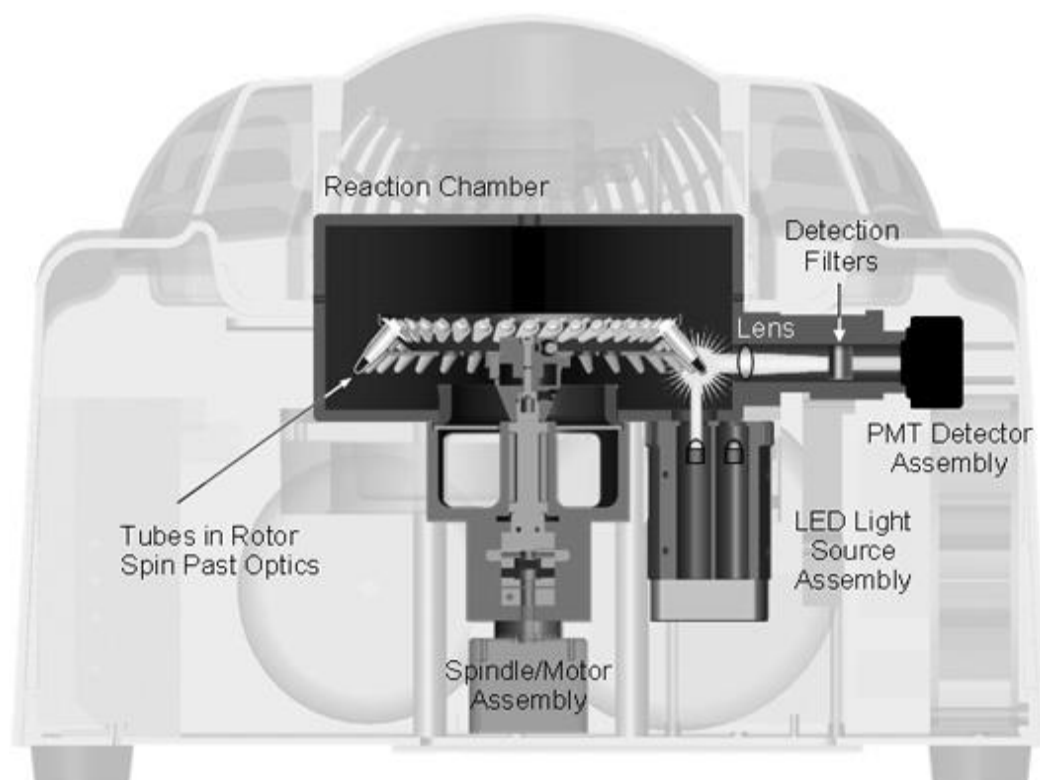


Ilustração do sistema óptico

Canais disponíveis

Canal	Excitação (nm)	Deteção (nm)	Exemplos de fluoróforos detectados
Azul	365+/-20	460+/-20	Marina blue, Edans Brothell Blue, Alexa Fluor 350
Verde	470+/-10	510+/-5	FAM, SYBR, Green I, Fluorescein, EvaGreen, Alexa Fluor 488
Amarelo	530+/-5	557+/-5	JOE, VIC, HEX, TET, CAL Fluor Gold 540, Yakima Yellow
Laranja	585+/-5	610+/-5	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy 3.5, Texas Red, Alexa Fluor 568
Vermelho	625+/-5	660+/-10	Cy5, Quasar 670, LightCycler Red 640, Alexa Fluor 633
Carmesim	680+/-5	712 passe alto	Quasar 750, LightCycler Red 705, Alexa Fluor 680
Fusão de alta resolução	460+/-20	510+/-5	SYBR Green I, SYTO 9, LC Green, LC Green Plus+, EvaGreen

4 Procedimentos de Instalação

4.1 Requisitos

Requisitos de energia

O Rotor Gene Q opera a:

- 100-120V AC a 50/60 Hz, 560 VA (pico)
- 200-240V AC a 50/60 Hz, 560 VA (pico)

Certifique-se que a tensão do Rotor Gene Q seja compatível com a voltagem AC disponível no local da instalação. As flutuações de voltagem do cabo elétrico de suprimento não devem exceder a 10% das voltagens nominais de suprimento.

Requisitos de aterramento

Para proteger os operadores, a QIAGEN recomenda que o Rotor Gene Q seja corretamente aterrado. O instrumento é equipado com 3 cabos condutores de energia AC, que quando conectados a uma adequada tomada AC, aterra o instrumento. Para preservar esta característica de proteção, não opera o instrumento de uma tomada AC que não tenha conexão aterrada.

Requisitos do PC

O computador Laptop, fornecido com o Rotor Gene Q completa os requisitos do software Rotor Gene Q, detalhados na seguinte tabela.

Requisitos de sistema do PC

Descrição	Requisitos mínimos
Sistema operacional	Microsoft Windows XP
Processador	Pentium IV ou maior, de 2 GHz
Memória principal	512 MB RAM
Espaço do disco rígido	10 GB HDD

4.2 Desempacotando o Rotor Gene Q

O Rotor Gene Q é entregue com todos os componentes necessários para montar e executar o instrumento. A caixa também contém uma lista com todos os componentes fornecidos. É recomendado verificar esta lista para garantir que todos os componentes estejam presentes.

A caixa de acessórios fica em cima da embalagem de espuma. A caixa de acessórios contém:

- CD de instalação
- Blocos de carga de tubos de 96 x 0.2 ml
- Blocos de carga de tubos de 72 x 0.1 ml
- Suporte do rotor (desmontado para transporte seguro)
- Rotor de 36 poços (este rotor é de cor vermelha)
- Argola de travamento do rotor de 36 poços.

Os seguintes itens são embalados em cada lado da embalagem de espuma:

- Cabos seriais USB e RS-232
- Conjunto internacional de cabos de energia
- Tubos PCR, 0.2 ml (1000)
- Tiras de tubos e cápsulas de 0.1 ml (1000)

Uma vez que todos estes componentes tenham sido removidos da caixa, remova a embalagem de espuma do topo do Rotor Gene Q. Cuidadosamente remova o Rotor Gene Q da caixa e desembulhe a cobertura de plástico. Abra a tampa deslizando-a para trás. Um rotor de 72 poços (este rotor é de cor azul) e a argola de travamento do rotor de 72 poços estarão dentro.

Uma vez que você tenha desempacotado o Rotor Gene Q, proceda com a instalação.

4.3 Acessórios


Os discos de rotor e acessórios podem ser pedidos separadamente para uso com o Rotor Gene Q. Para mais detalhes, veja o Apêndice C.


4.4 Instalação de hardware

Uma vez que o Rotor Gene Q tenha sido desempacotado, proceda com a instalação, como descrito abaixo:

1. Posicione o Rotor Gene Q em uma superfície nivelada.
2. Certifique-se de há espaço suficiente atrás do instrumento para que a tampa possa ser inteiramente aberta.
3. Certifique-se de que o interruptor na parte de trás do instrumento possa ser alcançado facilmente.
4. Não obstrua a parte de trás do instrumento. Certifique-se de que o cabo de energia possa ser facilmente desconectado se necessário, para desconectar a energia do instrumento.
5. Antes de ligar o Rotor Gene Q, verifique a seleção de voltagem na parte de trás do instrumento.

O interruptor de seleção de voltagem é ajustado pelo seu distribuidor de vendas para uma região específica. Certifique-se de que o ajuste esteja correto para a voltagem local. Se não estiver correto, contate seu distribuidor de vendas para que a seleção de voltagem seja trocada.

<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w10</p> <p>A seleção de voltagem só deve ser trocada por seu distribuidor de vendas ou pessoa autorizada. Usuários não devem tentar trocar a seleção de voltagem. Se fizer isto anulará a garantia.</p>
--	--

<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico w11</p> <p>Não mude o interruptor de seleção de voltagem enquanto o instrumento estiver conectado ao conector principal, pois se fizer isto poderá causar danos ao instrumento e/ou queimar o fusível.</p>
--	---

6. Conecte o cabo USB ou o cabo serial RS-232 fornecido para uma porta USB ou de comunicações na parte de trás do instrumento.
7. Conecte o cabo serial USB ou RS-232 na parte de trás do Rotor Gene Q.
8. Depois, conecte o Rotor Gene Q ao fornecimento de energia. Conecte uma ponta do cabo de energia AC no soquete localizado na parte de trás do Rotor Gene Q e a outra ponta em uma tomada de energia AC.



4.5 Instalação do software

1. Para instalar o software Rotor Gene Q, insira o CD de instalação no drive de CD do computador.
2. Selecione “Install Operating Software” na janela que aparecerá. Siga o assistente de configuração para fácil instalação.



3. Uma vez que o software tiver sido instalado, ligue o Rotor Gene Q, movimentando o interruptor, localizado atrás no lado da mão direita, para a posição de “on” (ligado). Uma luz azul de “standby” na frente do Rotor Gene Q indica que o instrumento está pronto para uso.

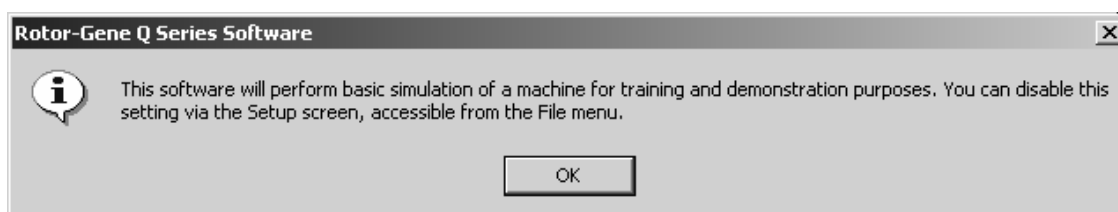


4. Clique duas vezes no ícone desktop do software de série Rotor Gene Q para iniciar o software. Uma janela de “boas vindas”

aparecerá na primeira vez que o software for iniciado, mas não aparecerá nas atualizações do software subsequentes.



- | | |
|--|---|
| Número de série da máquina | Digite o número de série (6 dígitos), que pode ser encontrado na parte de trás do Rotor Gene Q. |
| Porta: | Escolha entre cabo USB ou serial. Se usar um cabo serial, selecione a porta de comunicação apropriada ou clique no botão “Auto-Detect”. |
| Execução em Modo Virtual (para demonstração) | <p>Selecionar esta caixa permite a instalação do software Rotor Gene Q em um computador que não está conectado ao Rotor Gene Q. O software estará completamente funcional e pode simular execuções.</p> <p>Nota: Se esta caixa estiver selecionada e um Rotor Gene Q estiver conectado ao computador, a seguinte mensagem aparece antes de iniciar a execução: “You are about to run in Virtual mode” (“Você está prestes a executar em modo virtual”). Para realizar uma verdadeira execução, a configuração deve ser trocada na janela “Setup” (veja a seção 7.5.4).</p> |
| Iniciar | Quando todas as informações foram entradas, clique em “Begin”. Espere até que a inicialização esteja terminada, o que pode levar alguns segundos. Se o modo virtual foi escolhido a seguinte mensagem aparecerá: |

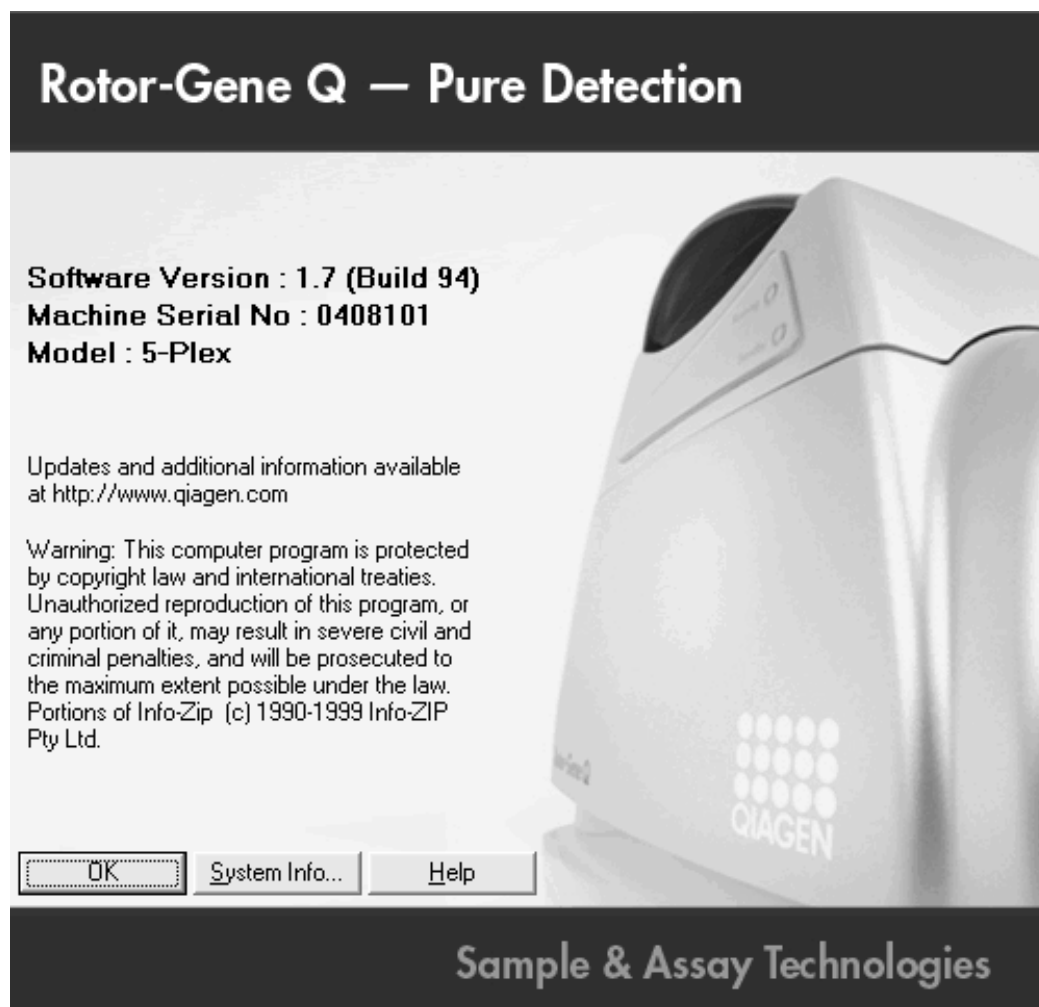


Se a caixa “Run in Virtual mode” não estiver selecionada, o software irá inicializar e abrir automaticamente.

Sair do programa: Ao clicar neste botão, você sairá do programa.

4.6 Versão do software

O desenvolvimento do software Rotor Gene Q é contínuo. Para descobrir o número de sua versão, clique em “Help” e depois “About this software...”.



Esta janela mostra informações gerais sobre o software, incluindo a versão do software e o número de série e modelo do instrumento.

O software pode ser livremente copiado para uso dentro de uma organização que possua o Rotor Gene Q. O software não pode ser copiado e distribuído para outros fora da organização.

4.7 Atualizando o software

Atualizações do software estão disponíveis no web site da QIAGEN em www.qiagen.com/Rotor-Gene, que pode ser acessado no menu “Help” do software. Para baixar o software, é necessário se registrar online.

5 Procedimentos Operacionais - Hardware

Esta seção descreve a operação do Rotor Gene Q.

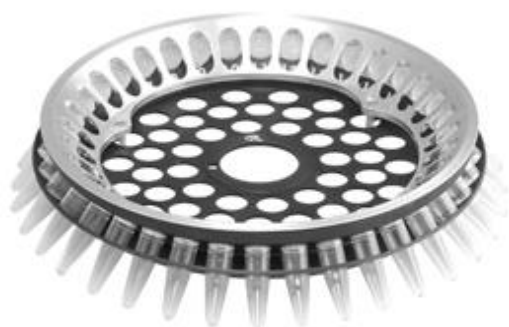
5.1 Tipos de rotores

Primeiro, selecione o tipo de tubo e rotor que será usado. Existem 4 rotores disponíveis para acomodar diferentes tipos de tubos.

Rotor de 36 poços

O rotor de 36 poços é de cor vermelha. O rotor de 36 poços e as argolas de travamento do rotor de 36 poços permitem o uso de tubos de 0.2 ml. Os tubos não precisam ter capas ópticas claras, porque o Rotor Gene Q lê a fluorescência no fundo do tubo ao invés do topo. Tubos com coberturas de cúpulas também podem ser usados.

IMPORTANTE: Use tubos idênticos em uma execução. Não misture diferentes tipos de tubos ou tubos de diferentes fabricantes, pois isso poderá afetar a uniformidade óptica. Recomendamos o uso de tubos da QIAGEN que são especialmente destinados para uso com o Rotor Gene Q (veja o Apêndice C). Tubos de fabricantes alternativos pode autofluorescer o que pode afetar a confiabilidade dos resultados. Além disso, tubos de fabricantes alternativos podem ser maiores em comprimento, resultando em desalinhamento da trajetória óptica do Rotor Gene Q e na reação no tubo.



Rotor de 72 poços

O rotor de 72 poços é da cor azul. O rotor de 72 poços e as argolas de travamento do rotor de 72 poços são usados com tiras de tubos e capas, de 0.1 ml, que podem ser usados para volumes baixos como 10 *ul*. As capas fornecem um selo seguro e confiável.



Disco de rotor de 72 rotores

O disco de rotor de 72 rotores é de cor cinza escuro. O disco de rotor de 72 rotores e as argolas de travamento de 72 rotores permitem o uso do disco de rotor 72. O disco de 72 rotores é um disco com 72 poços para uso de alto rendimento. Para selar o disco de 72 rotores um filme de polímero é aplicado no topo e é selado com aquecimento. O filme é rápido de se aplicar ao topo e previne contaminação ao fornecer um selo forte, durável e à prova de adulteração. Para mais informações sobre o disco de 72 rotores, vê a seção 5.3.



Disco de rotor de 100 rotores

O disco de rotor de 100 rotores é de cor dourada. O disco de rotor de 100 rotores e as argolas de travamento do disco de 100 rotores permitem o uso do disco de 100 rotores. O disco de 100 rotores é um disco com 100 poços para uso de alto rendimento. O disco de 100 rotores é o equivalente rotatório de uma placa de 96 poços mas com 4 poços de referência adicionais. Permite a integração do Rotor Gene Q com o fluxo de trabalho de laboratórios de 96 poços. Os poços extras podem ser convenientemente usado para mais amostras, controle de reações adicional, ou reações de orientações, sem ocupar nenhum das 96 posições de poços padrão. Para compatibilidade do fluxo de trabalho sem corte dos 96 poços, o disco de rotor de 100 poços utiliza 96 placas de poços convencionalmente rotuladas, i.e., A1-A12 até H1-H12. Os 4 poços de referência adicionais são rotulados R1-R4. Para mais informações sobre o disco de 100 rotores, veja a seção 5.3.



Especificações do rotor

Tipo de rotor	Amostra nº	Tipo de tubo	Volume de reação recomendado
Rotor de 36 poços	36	Tubos PCR, de 0.2 ml	15-50 <i>ul</i>
Rotor de 72 poços	72	Tira de tubos e capas de 0.1 ml	10-30 <i>ul</i>
Disco de rotor de 72	72	Disco de 72 rotores	15-25 <i>ul</i>
Disco de rotor de 100	100	Disco de 100 rotores	15-25 <i>ul</i>

Nota: O rotor de 36 poços e o rotor de 72 poços para o Rotor Gene Q não devem ser usados com os instrumentos Rotor Gene 3000 devido a incompatibilidades de alinhamento óptico. Por favor

continue usando os antigos rotores de 36 e 72 posições com o instrumento Rotor Gene 3000.

5.2 Configuração de reação

Reações podem ser preparadas usando o Bloco de carga de 96 tubos de 0.2 ml (para tubos PCR, 0.2 ml), o Bloco de carga de 72 tubos de 0.1 ml (para tira de tubos e capas de 0.1 ml ajustado com uma pipeta de um único canal), o Bloco de carga multicanal de 72 x 0.1 ml (para tira de tubos e capas de 0.1 ajustado com uma pipeta de multicanais), o Bloco de carga do disco de 72 rotores (para o disco de 72 rotores), ou o Bloco de carga do disco de 100 rotores (para o disco de 100 rotores). Todos os blocos são feitos de alumínio e podem ser pré-resfriados.

O bloco de carga de 72 x 0.1 ml suporta 18 tiras de tubos assim como oito tubos de 0.5 ml, que podem ser usados para preparar um máster mix, e até 16 tubos de 0.2 ml, que podem ser usados para ajustar curvas padrões. O procedimento abaixo descreve a configuração da reação usando o Rotor de 72 poços. O mesmo procedimento pode ser usado para configuração de reação usando o Rotor de 36 poços e acessórios apropriados.

1. Posicione a tira de tubos no Bloco de carga e a alíquota dos componentes de reação.



2. Posicione as capas com segurança na tira de tubos e inspecione visualmente para confirmar a vedação.



3. Insira a tira de tubos no Rotor de 72 poços garantindo que cada tubo esteja corretamente no lugar. As amostras não serão ópticamente alinhadas pelo sistema de detecção se não estiverem corretamente posicionadas no rotor. Isso pode resultar em uma redução no sinal de fluorescência adquirido e na sensibilidade de detecção. Um suporte de rotor que permite o fácil carregamento dos tubos é fornecido com o instrumento.



IMPORTANTE: Para alcançar a máxima uniformidade de temperatura, cada posição no rotor deve conter um tubo. Preencher todas as posições no rotor permite a ventilação igual para cada tubo. Mantenha um conjunto de tubos com capas disponíveis que possam ser usados para preencher qualquer posição não usada.

4. Insira a argola de travamento do rotor de 72 poços no rotor de 72 poços, empurrando os 3 pinos pelos buracos de saída do rotor.

A argola de travamento garante que as capas permaneçam nos tubos durante a execução.



5. Insira a montagem na câmara do Rotor Gene Q clicando no lugar usando o pino de localização no eixo do rotor. Para remover, simplesmente empurre para baixo no eixo do rotor para soltar e puxe para fora.



6. Feche a tampa e ajuste o perfil da execução usando o software Rotor Gene Q.

5.3 Configuração do disco rotor

O disco de rotor 72 e o disco de rotor 100 compreendem 72 e 100 poços respectivamente em um disco de um pedaço destinado para alto rendimento. O disco de rotor 72 e o disco de rotor 100 não utilizam capas. Ao invés, um filme de selagem por aquecimento do disco do rotor é aplicado no topo e selado com aquecimento usando o Rotor Disc Heat Sealer. O filme previne a contaminação fornecendo uma selagem forte, durável e à prova de adulteração. A selagem por aquecimento do Disco de rotor é realizada como descrito abaixo.

IMPORTANTE: Por favor leia a folha do produto fornecida com o Rotor Disc Heat Sealer antes de iniciar este procedimento.

1. Ligue o Rotor Disc Heat Sealer usando o interruptor localizado na parte de trás, no lado da mão direita. Uma luz vermelha “Power” iluminará. O Rotor Disc Heat Sealer leva aproximadamente 10 minutos para atingir a temperatura de operação, quando uma luz verde “Ready” iluminar.

Nota: Uma vez que o Rotor Disc Heat Sealer estiver pronto, é mais seguro deixá-lo funcionando constantemente.

2. Insira o disco de rotor no Bloco de carga do disco de rotor usando a posição 1 no disco de rotor e os buracos de guia de tubos no Bloco de carga do disco de rotor.

3. Ajuste as reações no disco de rotor pipetando manualmente ou usando o sistema de manuseio de líquido automatizado do QIAgility.



4. Remova a porção central de uma folha do filme do Rotor Disc Heat Sealing, dobrando levemente o filme no meio, beliscando a peça central, e cuidadosamente arrancando-a fora.
5. Posicione o filme em cima do disco de rotor na orientação correta como mostrado pela etiqueta "SIDE UP". Certifique-se de que a etiqueta "SIDE UP" esteja posicionada no fundo do Bloco de carga do disco de rotor. O buraco central no filme deve deslizar facilmente sobre o cilindro do Bloco de carga do disco de rotor e para cima do disco de rotor.



6. Deslize a montagem para dentro do Rotor Disc Geat Sealing os trilhos de guia ao lado do Bloco de carga do disco de rotor. Certifique-se que o Bloco de carga do disco de rotor esteja empurrado para dentro completamente.



7. Para ativar o mecanismo de selagem, primeiro pressione para baixo a barra anodizada azul no topo da selagem por aquecimento, depois empurre para trás o fragmento preto.



8. Quando o mecanismo de selagem tiver abaixado, uma luz laranja “Sealing” iluminará. Se o bloco de carga do disco de rotor não estiver na posição correta, um som de aviso tocará.
9. Quando a selagem estiver terminada, um som tocará e a luz laranja “Ready” iluminará. Pressione para baixo a barra anodizada azul para levantar e travar o mecanismo de selagem de volta em sua posição original. Não continue com a selagem por mais tempo que o indicado pelo som ou o Disco de rotor pode se deformar.
10. Deslize o Bloco de carga do disco de rotor para fora do Rotor Disc Heat Sealer. Permita que o filme resfrie por aproximadamente 10 segundos, e então gentilmente remova o excesso de filme.
11. Remova o disco de rotor do Bloco de carga de disco de rotor. Carregue o disco de rotor no rotor usando a localização da posição um como um guia para correta orientação.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

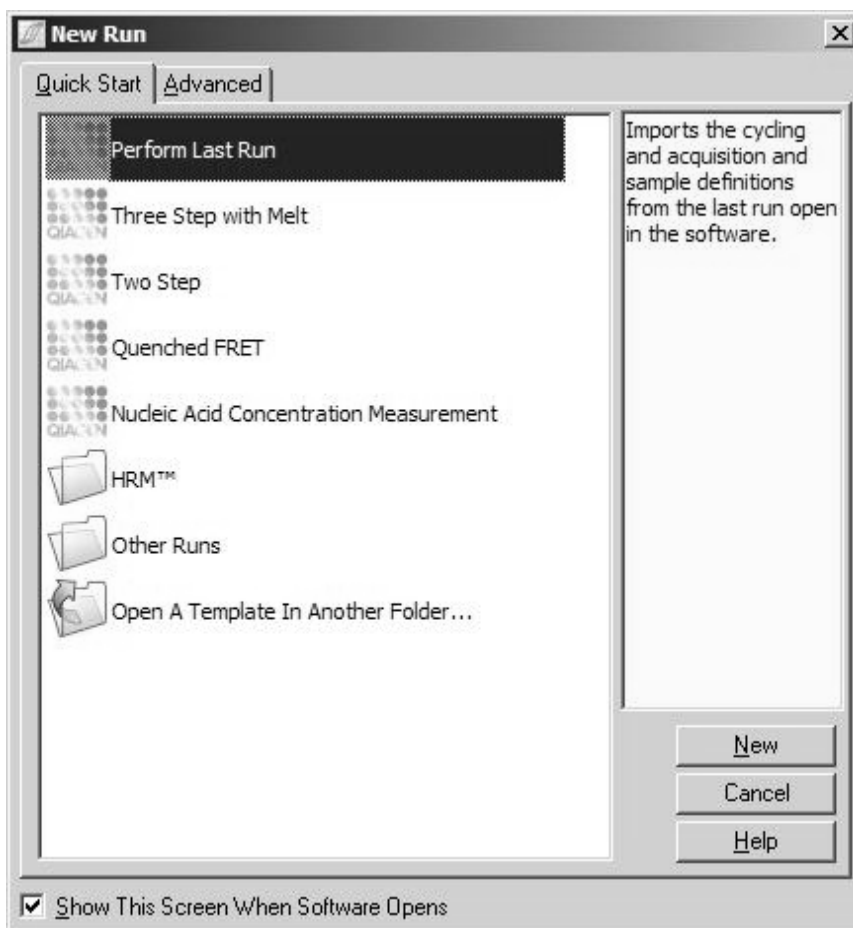
6 Procedimentos operacionais - Software

Novas execuções podem ser ajustadas usando o Quick Star Wizard (Assistente de inicialização rápida) ou o Advanced Wizard (Assistente avançado), que aparecem quando o software é iniciado. O Quick Star Wizard é destinado para permitir ao usuário para iniciar uma execução o mais rápido possível. O Advanced Wizard permite mais opções, tais como configurações de Ganho de Otimização e configurações de volume. Para conveniência, os assistentes possuem um número de modelos com condições de ciclos padrões e canais de aquisição. Para mudar o tipo de assistente, selecione a etiqueta apropriada no topo da janela “New Run”.

6.1 Quick Start Wizard (Assistente de inicialização rápida)

O Quick Star Wizard permite ao usuário iniciar a execução o mais rápido possível. O usuário pode selecionar de um conjunto de modelos geralmente usados e entrar com um mínimo de parâmetros para iniciar. O Quick Star Wizard supõe que o volume da reação é 25 *ul*. Para outros volumes de reações, utilize o Advanced Wizard (veja a seção 6.2).

Como primeiro passo, selecione o modelo desejado para a execução clicando duas vezes no modelo da lista na janela “New Run”.



Realizar última execução

“Realizar última execução” utiliza o ciclo, aquisição, e definições de amostra da última execução aberta no software.

Três etapas com fusão

Este é um perfil de ciclo de três etapas e uma curva de fusão com aquisição de dados no canal verde.

Duas etapas

Este é um perfil de ciclo de duas etapas com dados adquiridos nos canais verde, amarelo, laranja e vermelho.

FRET extinguido

Este é um perfil de ciclo de três etapas e uma curva de fusão. Ao contrário da “Três etapas com fusão”, a aquisição é no final da etapa de recozer.

Medição de concentração de ácido nucléico	Este é um modelo padrão para medir a concentração de ácido nucléico usando corantes intercalados.
HRM:	Esta pasta contém perfis de fusão de alta resolução.
Outras execuções	Esta pasta contém perfis adicionais.

Os perfis de ciclo e aquisição para todos os modelos podem ser alterados usando o assistente.

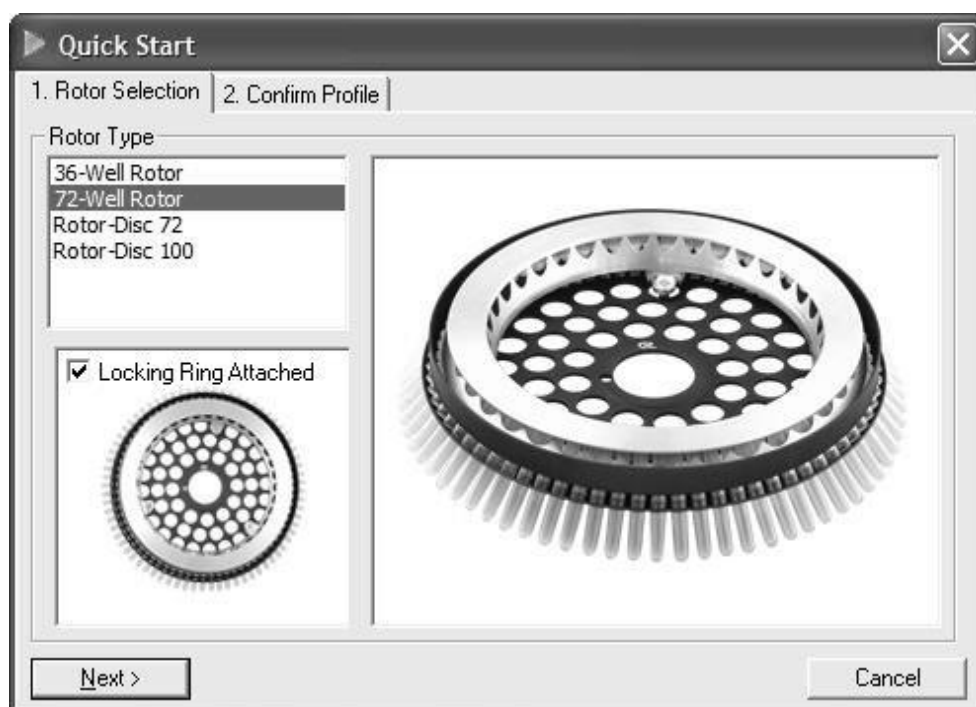
Nota: Modelos definidos pelo usuário podem ser adicionados à lista de modelos no Quick Start Wizard copiando ou salvando arquivos ***.ret** para **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates**. Depois de copiar um arquivo para este caminho, o modelo aparecerá como um ícone na lista. Se você quiser personalizar os ícones para seus modelos, crie uma imagem ***.ico** com o mesmo nome de arquivo do modelo.

Subpastas podem ser criadas para modelos relacionados por grupo. Isso permite organização de modelos que pode ser conveniente se, por exemplo, vários usuários estiverem usando o mesmo instrumento.

6.1.1 Seleção de rotor

Na janela seguinte, selecione o tipo de rotor na lista.

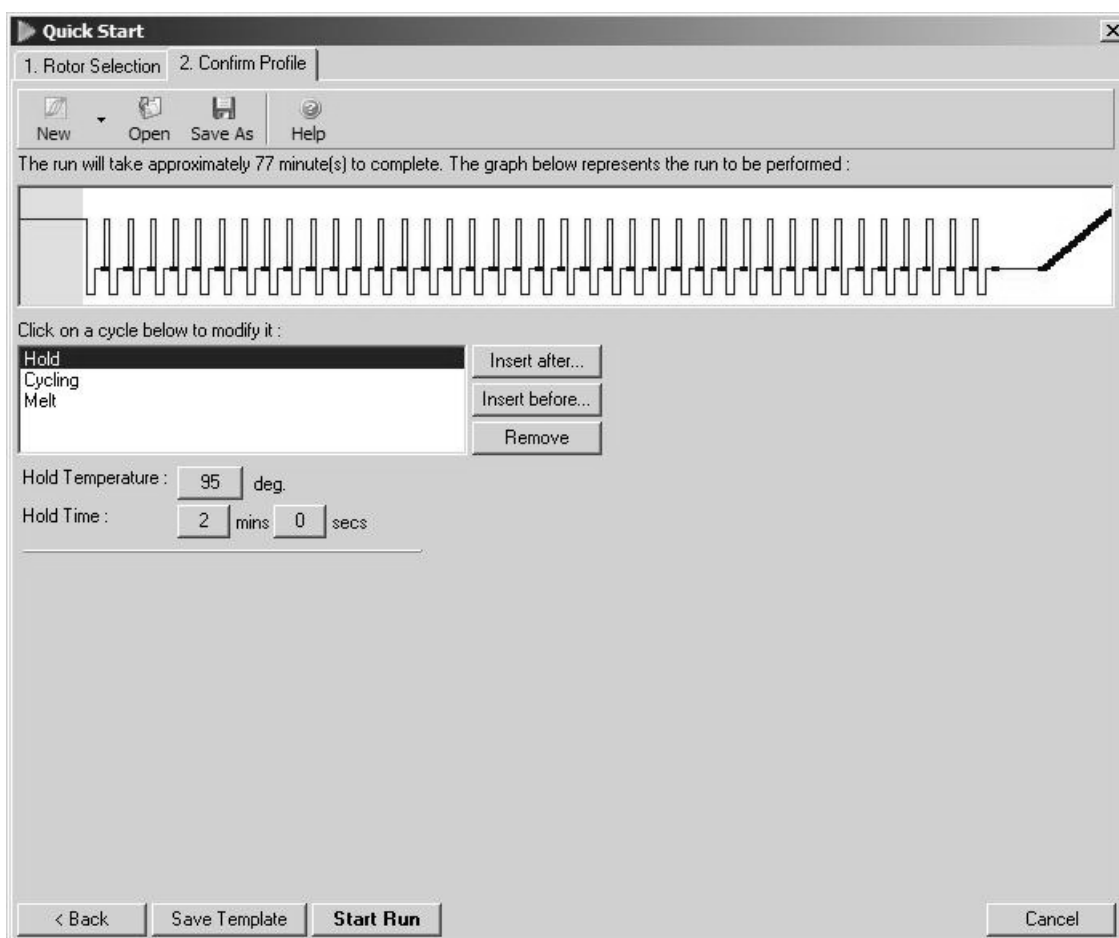
Verifique a caixa “Locking Ring Attached” e depois clique no botão “Next”.



6.1.2 Confirmar perfil

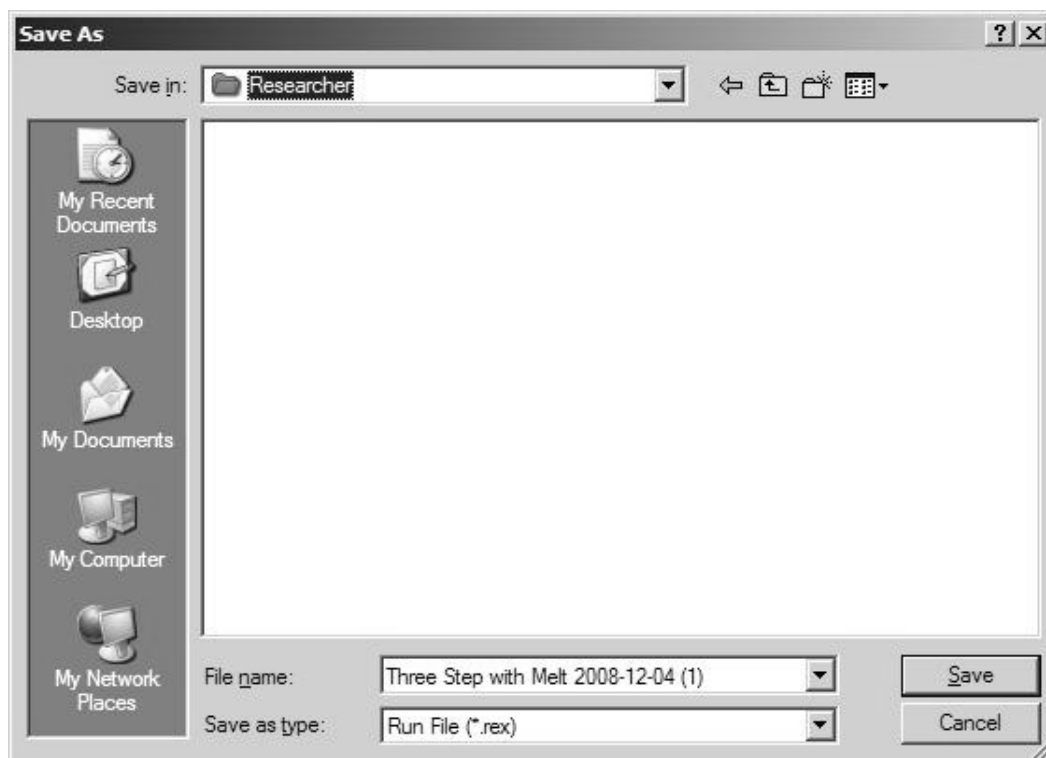
As condições de ciclo e canais de aquisição do modelo escolhido são importadas. Essas podem ser alteradas usando a janela "Edit Profile" (veja a seção 6.2.4).

Para iniciar uma execução, clique no botão "Start Run". Também é possível salvar o modelo antes de iniciar a execução clicando em "Save template".



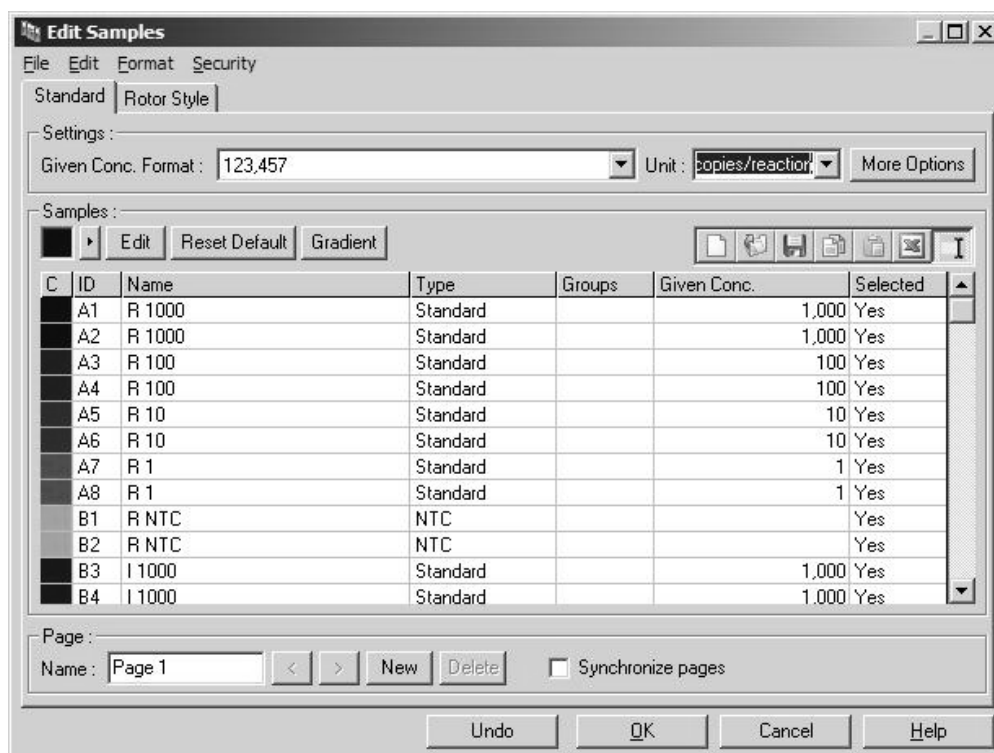
6.1.3 Salvar execução

Após clicar no botão “Start Run”, a janela “Save As” aparecerá. A execução pode ser salva na localização desejada pelo usuário. Para a execução é dada um nome de arquivo que consiste do modelo usado e a data da execução. Um número serial (1,2,tc) também é incluído no nome do arquivo para permitira nomeação automática de numerosas execuções que usam o mesmo modelo no mesmo dia.



6.1.4 Configuração de amostra

Uma vez que a execução tenha começado, a janela “Edit Samples” permite que amostras sejam definidas e descritas.



A janela “Edit Samples” aparece depois que uma execução tenha começado para que o usuário possa usar este tempo para entrar com nomes de amostras. Para informações sobre configurar as definições de amostras na janela “Edit Samples”, veja a seção 7.8.4.

6.2 Advanced Wizard (Assistente avançado)

O Advanced Wizard permite opções que não estão disponíveis no Quick Start Wizard, tais como configurações de Ganho de Otimização e configurações de volumes.

Para usar o Advanced Wizard, selecione um modelo clicando duas vezes no nome do modelo na lista sob a etiqueta “Advanced” na janela “New Run”.



Opções de modelos fornecidas nesta janela são similares às aquelas fornecidas ao usar o Quick Start Wizard (seção 6.1).

Realizar última execução	“Realizar última execução” importa o ciclo, aquisição, e definições de amostra da última execução aberta no software.
Execução vazia	Esta é uma execução vazia que permite ao usuário definir todos os parâmetros do perfil.
Três etapas com fusão	Este é um perfil de ciclo de três etapas e uma curva de fusão com aquisição de dados no canal verde.
Duas etapas	Este é um perfil de ciclo de duas etapas com dados adquiridos no canal verde apenas, para acelerar a execução.
HRM:	Esta pasta 2 perfis de fusão de alta resolução.
Outras execuções	Esta pasta contém perfis adicionais.
Manutenção do instrumento	Este contém o modelo usado durante a Verificação óptica de temperatura (OTV). Para mais informações, veja a seção 10. Este modelo é trancado para garantir que o perfil sempre operará corretamente.

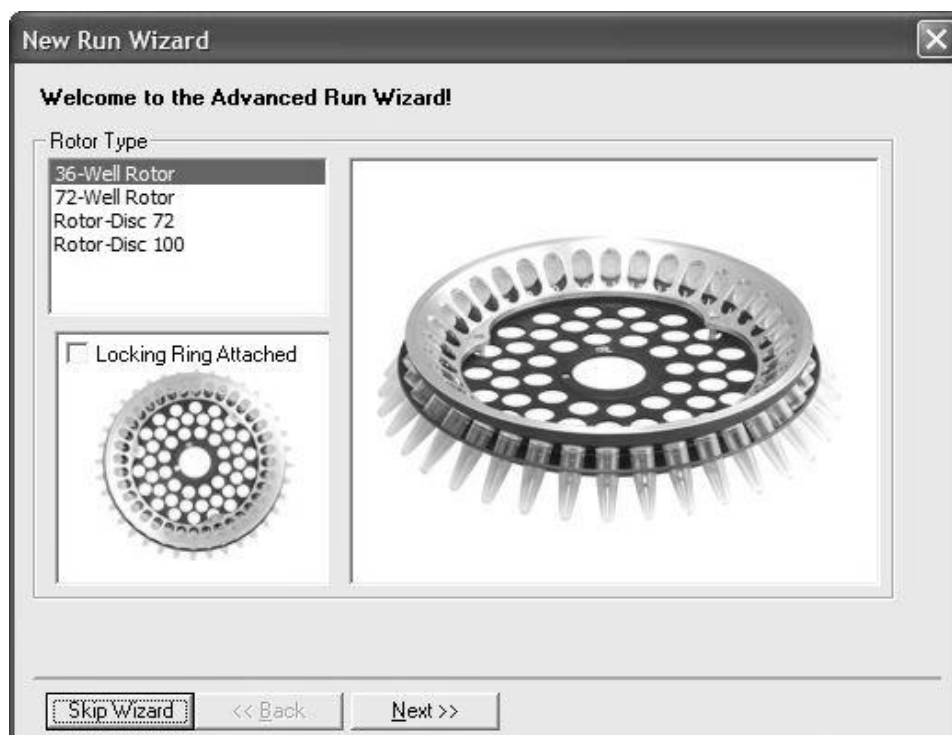
Nota: Modelos definidos pelos usuários podem ser adicionados à lista de modelos copiando ou salvando arquivos *.ret para C:\Program Files\Rotor-GeneQ Software\Templates\. Depois de

copiar um arquivo para este caminho, o modelo aparecerá como um ícone na lista.

6.2.1 Nova janela do assistente de execução 1

Na próxima janela, selecione o tipo de rotor da lista.

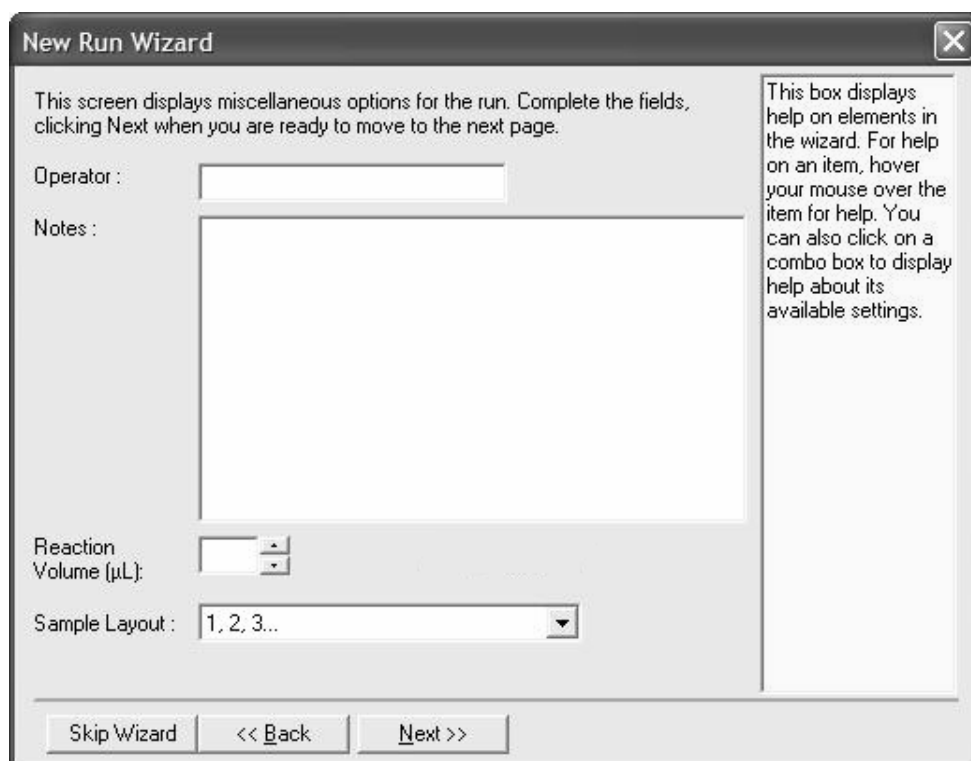
Selecione a caixa “Locking Ring Attached” e clique em “Next” para prosseguir.



6.2.2 Nova janela do assistente de execução 2

Na próxima janela, o nome de usuário e notas sobre a execução podem ser entradas. O volume da reação também deve ser entrada.

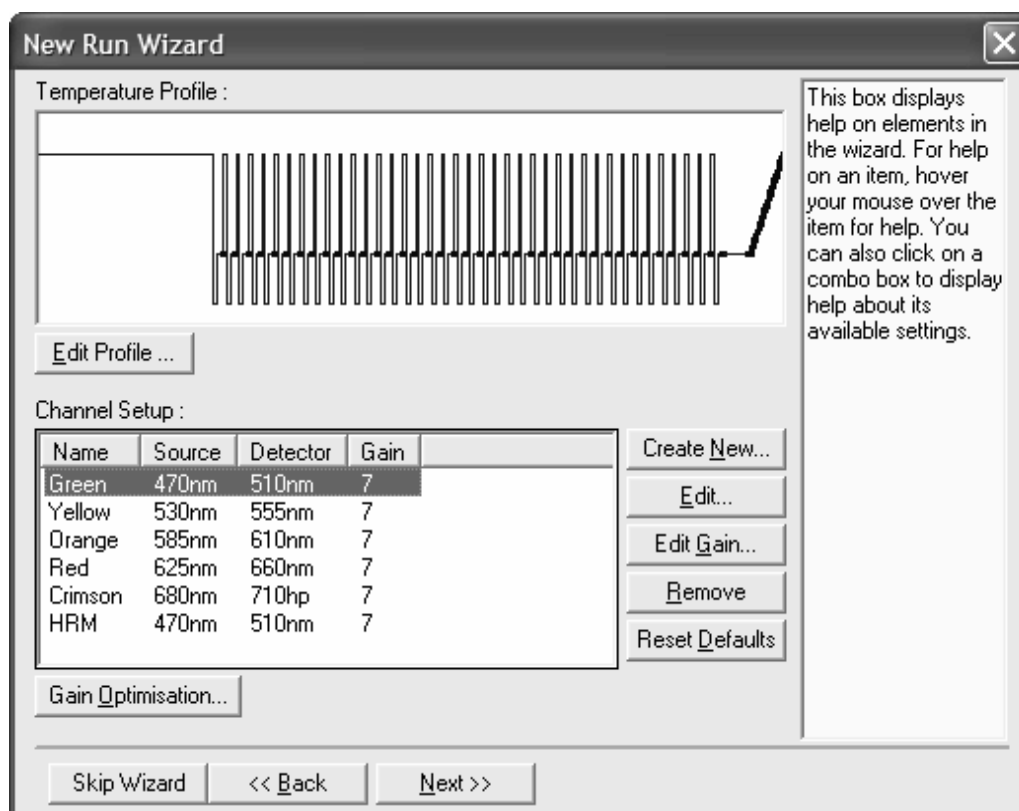
Se o Rotor de 72 poços foi selecionado na janela 1, três opções de “Sample layout” estão disponíveis no menu. “1,2,3...” é a opção padrão. A maioria dos usuários seleciona esta opção. “1 A, 1B, 1C...” devem ser selecionados quando amostras forem carregadas um tiras de tubos de 0.1 ml adjacentes usando uma pipeta multicanal com 8 canais. O layout “A1, A2, A3...” deve ser selecionado se for apropriado.



6.2.3 Nova janela do assistente de execução 3

Nesta janela, o “Perfil da temperatura” e “Configuração de canal” podem ser modificados. Se o botão “Edit Profile...” for clicado, a janela “Edit Profile” aparecerá, permitindo alteração de condições de ciclo e seleção de aquisição de canais. (veja a seção 6.2.4).

Após ajustar o perfil, clique no botão “Gain Optimisation...” para trazer a janela “Gain Optimisation”.



6.2.4 Editar perfil

A janela “Edit Profile” permite que as condições de ciclo e aquisição de canais sejam especificadas. O perfil inicial mostrado é baseado no modelo selecionado ao configurar a execução. O perfil é mostrado graficamente. A lista dos segmentos do perfil aparece abaixo do gráfico mostrado. Esta lista pode incluir Espera, Ciclo, Fusão, ou HRM se o instrumento possuir um canal HRM.

Cada estágio do perfil pode ser editado clicando na área apropriada do gráfico mostrado ou no nome na lista, e depois mudando as configurações que aparecerem.

Inserir depois...

Isso permite a adição de um novo ciclo após o ciclo selecionado.

Inserir antes...

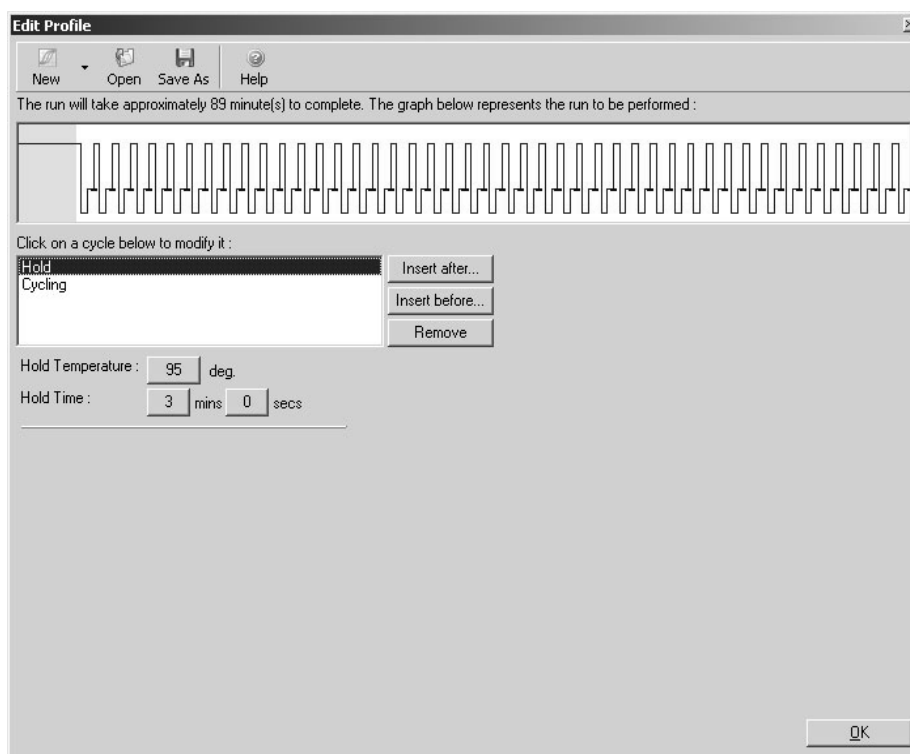
Isso permite a adição de um novo ciclo antes do

ciclo selecionado.

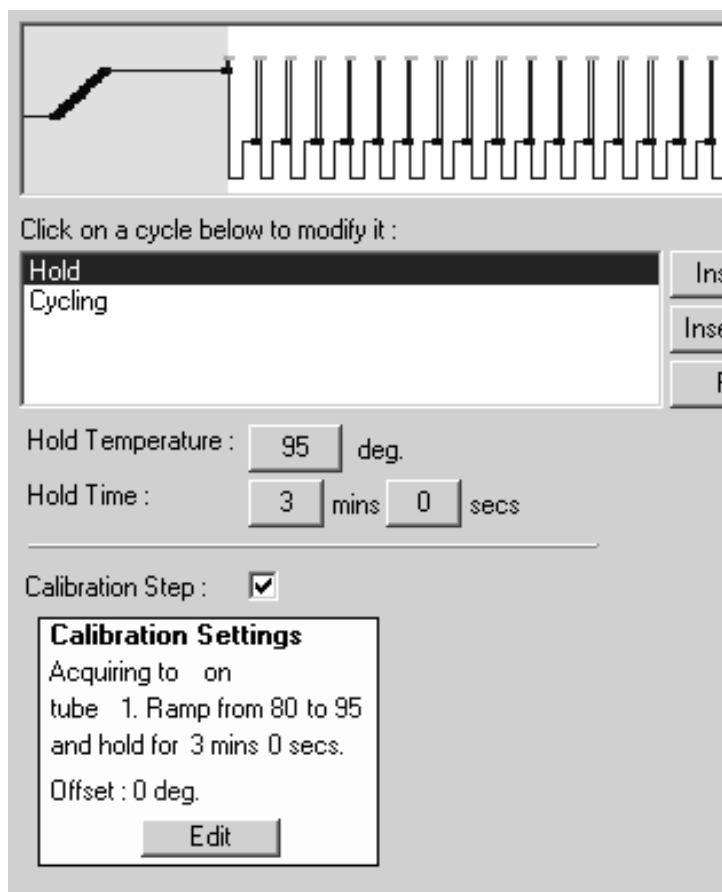
Remover: Isso remove o ciclo selecionado do perfil.

Esperar

Uma espera instrui o Rotor Gene Q a permanecer na temperatura designada por um tempo determinado. Para mudar a temperatura, clique no botão “Hold Temperature” e digite ou utilize a barra de rolagem para selecionar a temperatura desejada. Para mudar a duração da espera, clique nos botões “Hold Time”, “mins”, e “secs”.



Se realizar Ciclo de desnaturalização óptica, uma espera pode ser usada como uma etapa de calibragem. Neste caso, uma fusão de calibragem é realizada antes da espera. Como padrão, isto é configurado na primeira Espera na execução, mas pode ser traçado se requisitado.



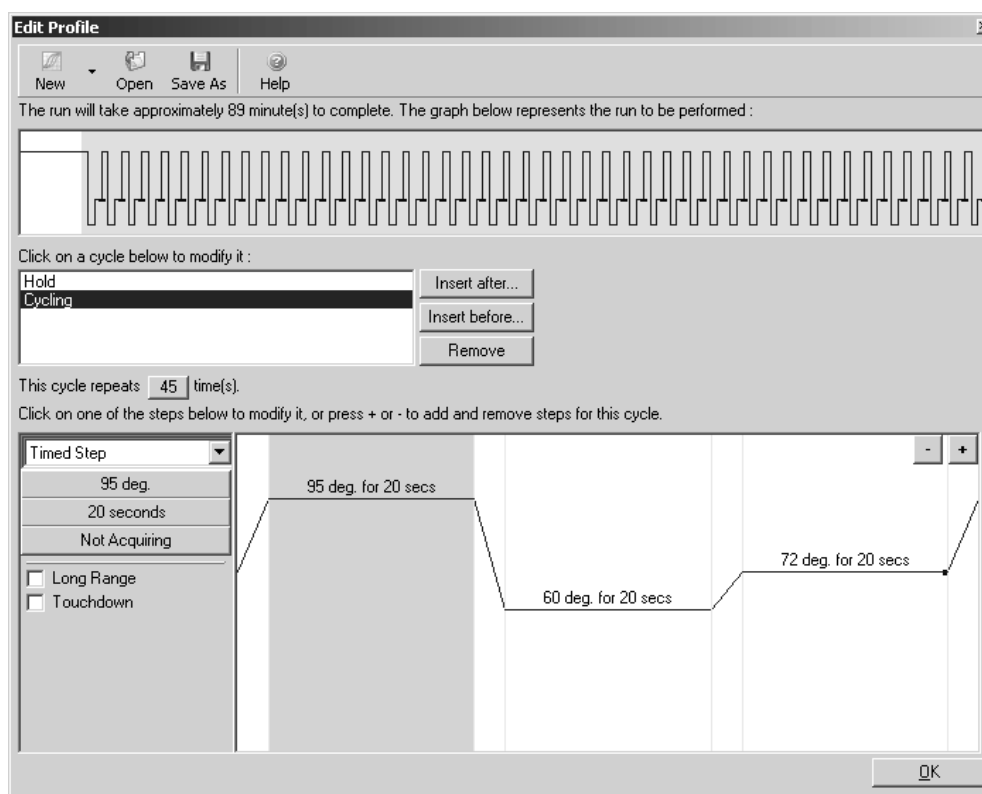
Para mais informações sobre o ciclo de desnaturalização óptica, veja mais abaixo.

Ciclo

O ciclo repeta as etapas de temperatura definidas pelo usuário e tempo, um número específico de tempo. O número de repetições é ajustado usando o botão “This cycle repeats X time(s)”.

Um único ciclo é mostrado graficamente (como mostrado na foto abaixo). Cada etapa do ciclo pode ser alterada. A temperatura pode ser trocada arrastando a linha de temperatura no gráfico para cima ou para baixo. A duração da etapa pode ser trocada arrastando o limite da temperatura no gráfico para a esquerda ou direita. Alternativamente, clique na etapa e use os botões de temperatura e tempo à esquerda do gráfico.

Etapas podem ser adicionadas ou removidas do ciclo usando os botões “-” e “+” no topo direito do gráfico.



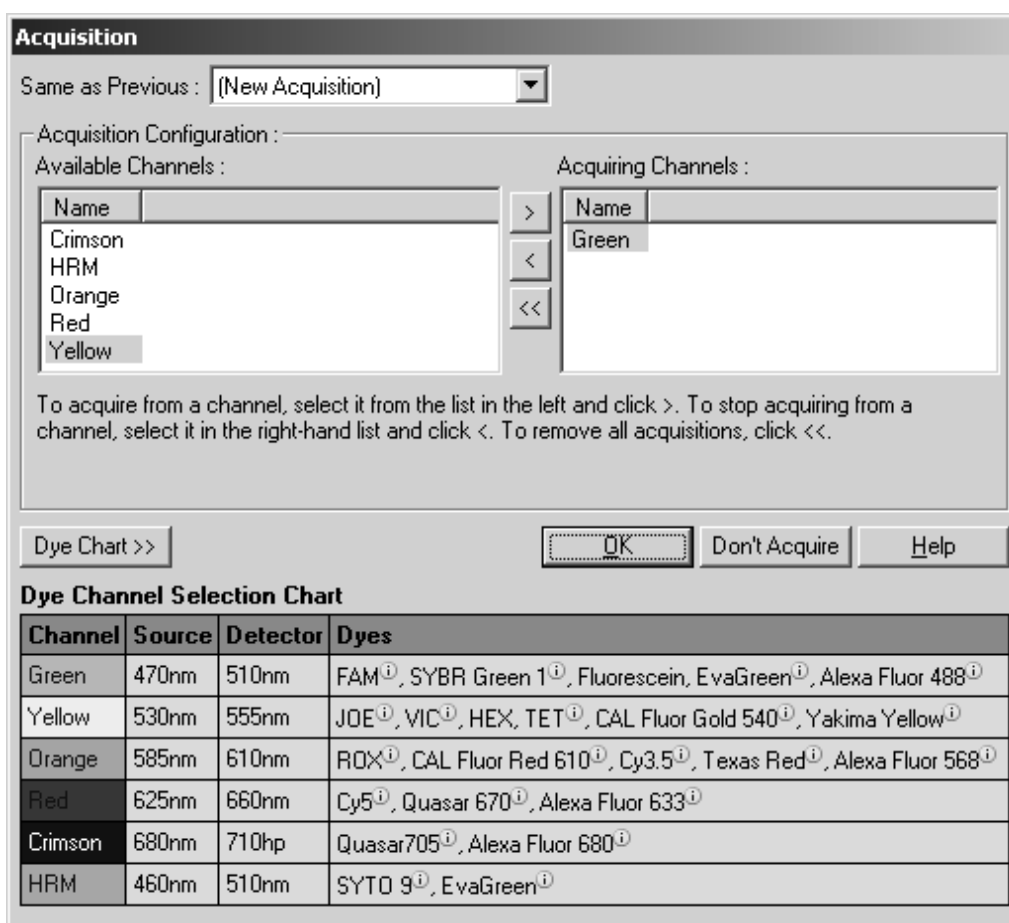
Longo alcance	Selecionar esta caixa aumenta o tempo de espera da etapa selecionada por um segundo com cada novo ciclo.
Abaixar	Selecionar esta caixa diminui a temperatura por um número especificado de graus para um número específico de ciclos iniciais. Isso então é mostrado.


Aquisição



Dados podem ser adquiridos em qualquer canal em qualquer etapa do ciclo. Para ajustar um canal para adquirir dados, clique no botão “Not Acquiring” (se um canal já foi ajustado para adquirir nesta etapa, os canais de adquirir são listados aqui).



Após clicar no botão “Not acquiring”, a janela “Acquisition” aparece.



Para ajustar um canal para adquirir, selecione o canal e mova-o da lista “Available channels” para a lista “Acquiring channels” usando o botão . Para remover um canal selecionado da lista “Acquiring

channels”, use o botão . O botão  remove todos os canais da lista “Acquiring channels”. Clicar no botão “Don’t Acquire” também remove todas aquisições da etapa.

Se mais de uma sequência de ciclo estiver incluída no perfil, os dados adquiridos podem ser anexados com os dados adquiridos de um ciclo anterior. Utilize o menu “Same as Previous” para selecionar a etapa do ciclo para onde os dados devem ser anexados.

O diagrama do canal de seleção de corante ajuda o usuário a decidir qual canal é apropriado para tingir sua intenção de uso. Os corantes mostrados na mesa são aqueles geralmente usados, e não indicam o limite do instrumento.

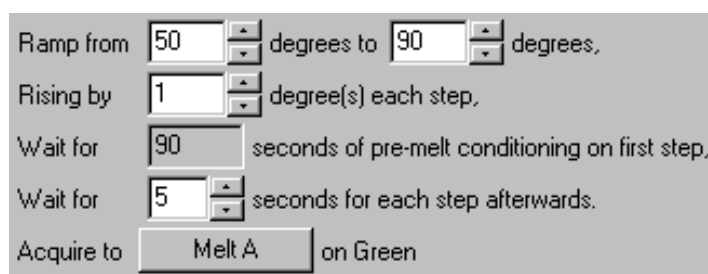
As opções de aquisição descritas acima também se aplicam para as etapas de fusão, exceto que não é possível anexar dados adquiridos usando o menu “Same as Previous”.

Fusão e hibridização

Uma fusão é um declive entre 2 temperaturas, de uma temperatura baixa para uma mais alta. O alcance de temperatura permitido é 35-99º C.

Para configurar uma fusão, especifique a temperatura inicial, a temperatura final, os incrementos da temperatura, o tempo de espera da primeira aquisição de temperatura antes que o declive seja iniciado, o tempo que cada incremento deve ser esperado e os canais de aquisição.

Um declive será gerado entre as 2 temperaturas. Se a temperatura inicial for maior que a temperatura final, o nome da etapa mudará para “Hibridização”. A opção “Acquiring to”, ajustada para Fusão A na tela abaixo pode ser trocada clicando no botão. A janela “Acquisition” aparecerá e os canais podem ser selecionados.



Ramp from 50 degrees to 90 degrees,
Rising by 1 degree(s) each step,
Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step,
Wait for 5 seconds for each step afterwards.
Acquire to Melt A on Green

Ao executar uma fusão padrão a temperatura é aumentada por incrementos de 1º C, esperando 5 segundos antes de cada aquisição. O Rotor Gene Q pode ser configurado para realizar fusões em incrementos de 0.02º C. O tempo mínimo de espera entre as etapas da temperatura varia dependendo do número de graus entre cada etapa.

Fusão de alta resolução

A análise de fusão de alta resolução caracteriza amostras de DNA de duas margens baseado em seu comportamento de dissociação (fusão). É similar à análise clássica de curva de fusão, mas fornece muito mais informações para uma gama maior de aplicações. Amostras podem ser classificadas de acordo com sequência, comprimento, conteúdo GC, ou complementação de margem, para mudanças de um único par de base.

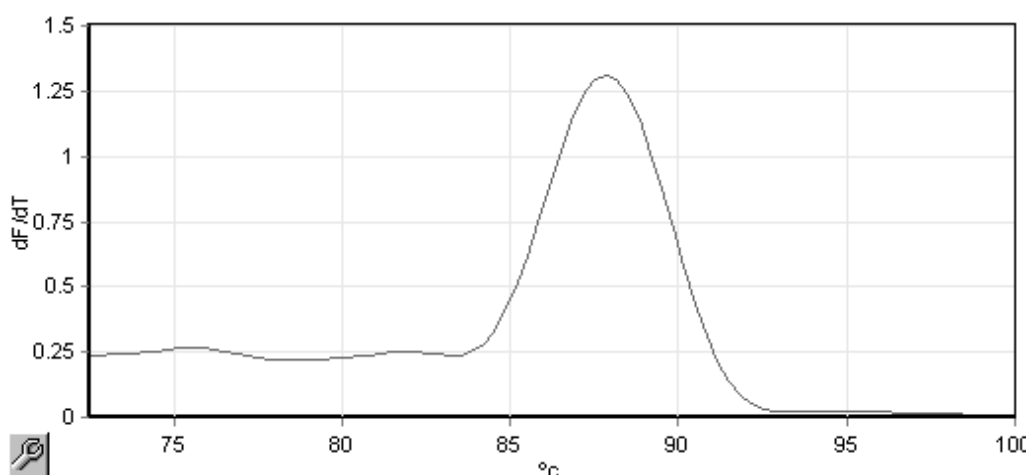
Análise HRM somente pode ser realizada em instrumentos que possuem hardware e software HRM instalados. Os dados são adquiridos utilizando fontes e detectores HRM especializados. Análises HRM também incluem a opção de realizar Ganho de Otimização antes que a fusão inicie. Após realizar HRM, os dados podem ser analisados com o software de análise HRM (Seção 11).

Ciclo de desnaturalização óptica

O ciclo de desnaturalização óptica é uma técnica excitante, disponível no Rotor Gene Q, que realiza análise de fusão em tempo real para determinar o pico da fusão de uma amostra de referência. Isso indica produtos de desnaturalização PCR com maior precisão do que ajustar uma determinada temperatura de desnaturalização para um tempo de espera. Para realizar esta técnica, simplesmente posicione um tubo de referência de produto PCR na posição de tubo 1 do rotor. O tubo de referência

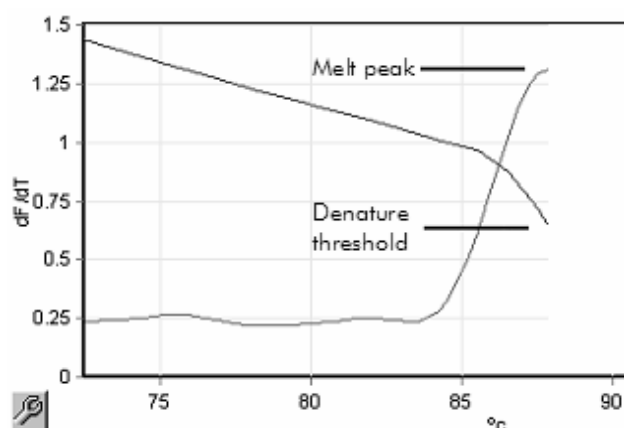
também deve conter uma química de detecção que permite a detecção de dissociação de margens.

Ao aquecer para a temperatura inicial de desnaturalização, uma fusão é realizada no canal verde de 80º C para 95º C, como padrão. Os parâmetros desta fusão inicial podem ser ajustados pelo usuário. A partir deste dado, uma curva de fusão é gerada e automaticamente analisada.



O pico da fusão é referenciado de volta ao dado bruto para obter um limiar de desnaturalização. Depois, cada etapa do ciclo de desnaturalização óptica é aquecida o mais rápido possível e os dados são adquiridos continuamente. Uma vez que o tubo de referência tenha alcançado o nível de fluorescência do limiar de desnaturalização, o instrumento é imediatamente resfriado e prossegue para a próxima etapa programada do ciclo. Um pico não é calculado enquanto o ciclo está se realizando. Ao invés disso, o nível de fluorescência é referenciado para o pico da fusão e este designa o limiar de desnaturalização.

No gráfico seguinte, as leituras brutas de fluorescência e a primeira derivada foram sobrepostas. Isso mostra a correspondência entre o limiar de desnaturalização e o pico da fusão obtidos durante a calibração.



Para realizar um ciclo de desnaturalização óptica, você precisará:

- Um produto pré-amplificado PCR para colocar na posição 1 do rotor. Esta amostra deve conter o mesmo produto PCR das amostras de interesse e uma química de detecção para monitorar a dissociação do produto PCR.
- Um perfil de desnaturalização óptica. Um novo perfil pode ser criado ou um perfil existente pode ser editado (veja detalhes abaixo).

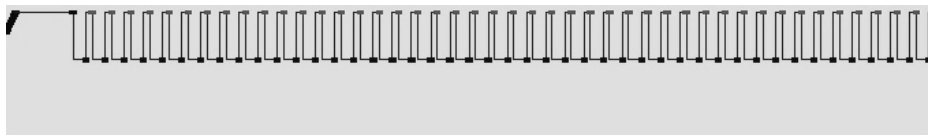
Um ciclo de desnaturalização óptica parece quase idêntico a outros ciclos. As diferenças principais são as etapas de fusão automaticamente inseridas no início do perfil, e o perfil afiado da etapa de desnaturalização durante o ciclo. O ciclo de desnaturalização óptica não necessita de tempo de espera pois a dissociação dos produtos é monitorada a cada ciclo.

Para realizar esta técnica, as seguintes informações sobre a execução são necessárias:


- A temperatura inicial da desnaturalização. É a mesma temperatura da etapa de desnaturalização em um perfil padrão de ciclo.
- A posição do tubo da amostra de PCR que produzirá uma curva de fusão no canal verde.
- Um perfil do ciclo de desnaturalização óptica deve ser definido.

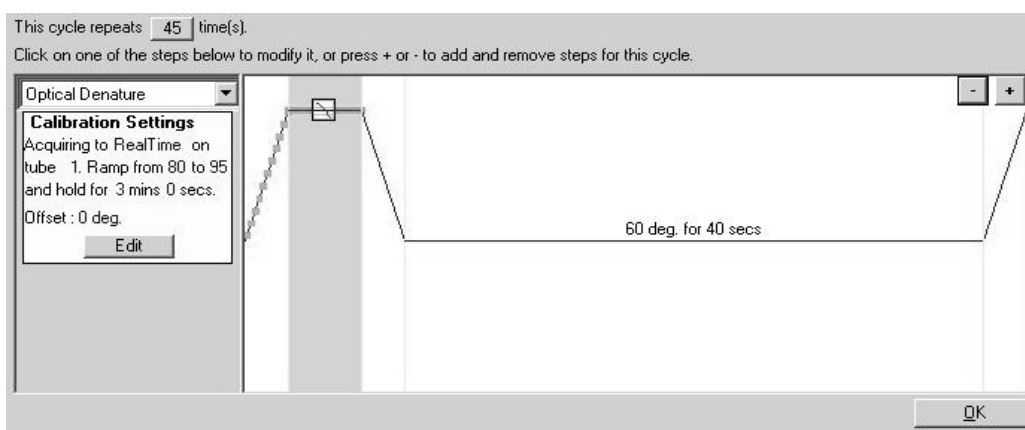
Crie um novo Ciclo de desnaturalização óptica como segue:

1. Abra a janela “Edit profile”. Depois clique em “New”. Na janela que aparecer, clique no botão “Insert After” e selecione “New Cycling” no menu. Selecione uma das etapas de temperatura clicando no gráfico. No menu, troque de “Timed Step” para “Optical Denature”. Um perfil padrão contendo uma etapa de desnaturalização e uma etapa de ciclo de desnaturalização óptica aparecerá.

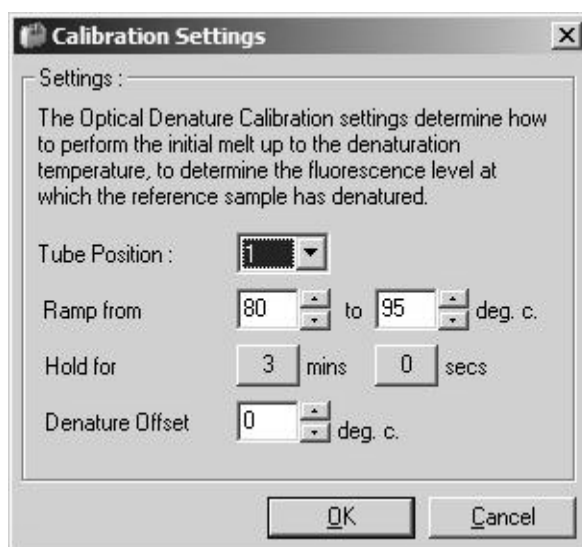


A região em declive ao início da execução representa o processo de calibragem. Os pontos verdes representam as aquisições feitas de cada ciclo durante o aquecimento. Os pontos azuis representam as aquisições ao final da etapa de destemperação a 60º C. Note que enquanto o perfil mostra cada etapa com a mesma temperatura de desnaturalização, este pode não ser o caso. Se a amostra requerer um pouco mais para fundir ao final da execução, o processo de desnaturalização óptica espera pela fusão de acordo com o dado fluorescente, e não de acordo com o tempo. Por esta razão, o indício de temperatura pode variar para cada ciclo.

2. Clique na primeira metade do gráfico com o símbolo de desnaturalização óptica . As informações de “Calibration Settings” aparecerão à esquerda da tela.



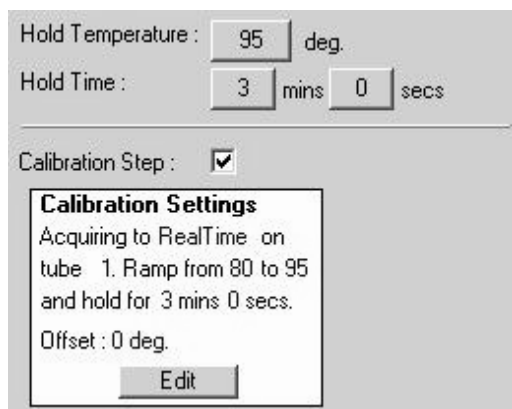
3. As informações de “Calibration Settings” normalmente estão corretas. Para modificar, se necessário, clique em “Edit”. A janela “Calibration Settings” aparecerá.



4. Certifique-se que:

- O tubo indicado em “Tube position” contém um produto PCR que mostrará um pico de fusão no canal verde.
- A temperatura final no declive não queimará a amostra, no entanto será alta o suficiente para permitir que derreta.
- O tempo de espera é suficiente para desnaturizar a amostra.
- O projeto de desnaturização é ajustado apropriadamente. O padrão de 0°C é apropriado para a maioria das fusões. Fusões com transições muito afiadas podem requerir um projeto de desnaturização de -0.5° C para -2° C, como determinado pelo usuário, para garantir que a transição da fusão seja detectada.

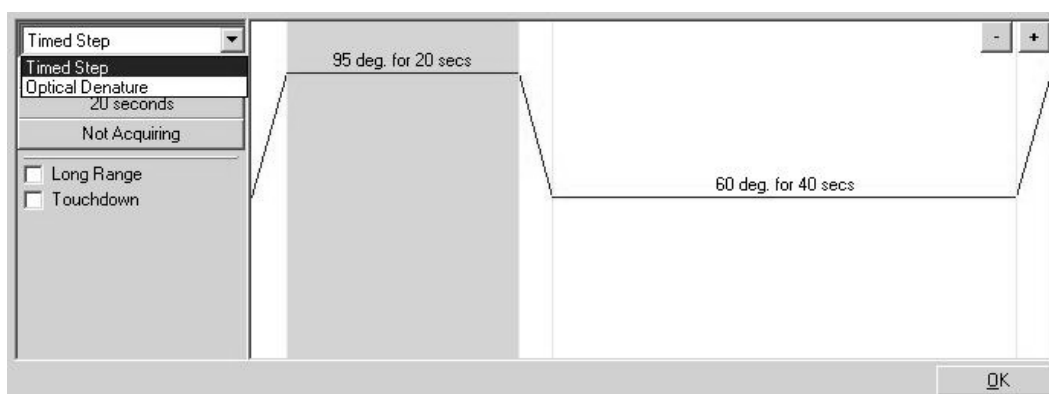
Você também pode definir uma etapa de desnaturização introduzindo uma nova etapa de espera. Clique em “Insert Before” e selecione “New Hold at Temperature” no menu. As configurações de calibragem aparecerão.




As configurações de calibragem são sincronizadas com as configurações de desnaturalização, portanto uma mudança no tempo de espera na etapa de desnaturalização automaticamente atualizará o tempo de espera da calibragem. Isso é porque os processos de calibragem e desnaturalização são equivalentes em Ciclo de Desnaturação óptica.

Trocando uma etapa existente para utilizar o Ciclo de Desnaturação Óptica

Para trocar uma etapa de desnaturalização existente em uma sequência de ciclos, selecione o ciclo na lista na janela "Edit Profile". Depois selecione a etapa de desnaturalização clicando-o no display.



Clique no menu e selecione “Optical Denature”. A temperatura e o tempo de espera são removidos e o ícone “Optical Denature”  é mostrado.

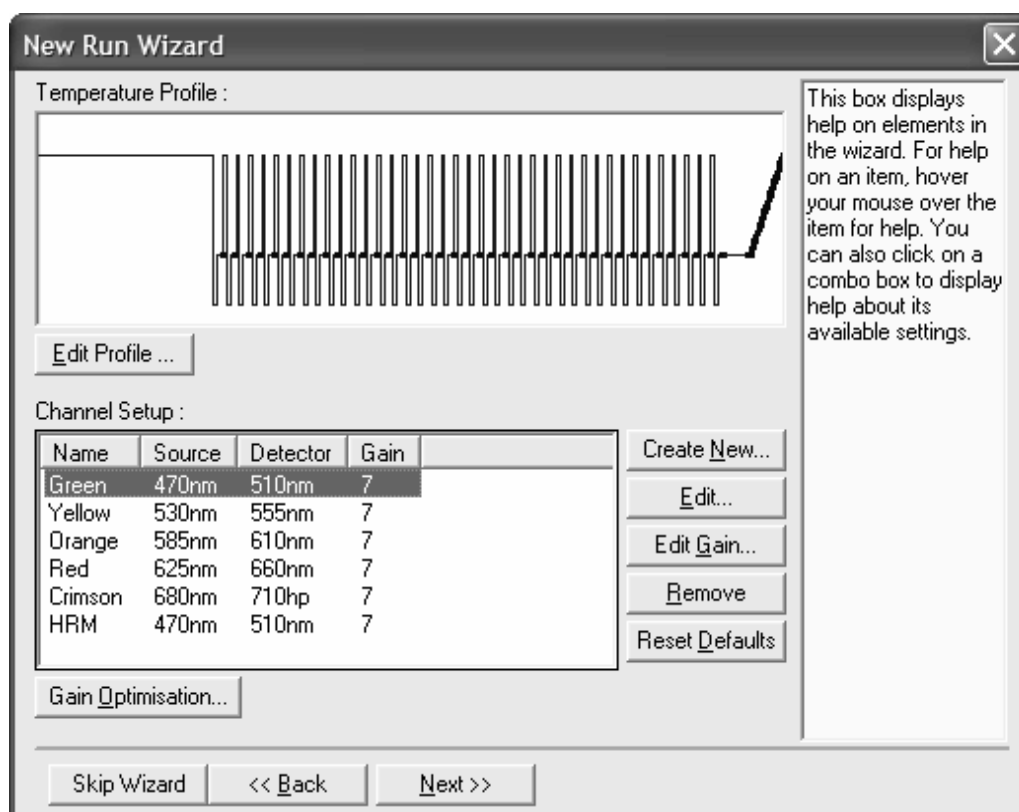
Ganho de Otimização

Ao ajustar uma nova execução, ajuda utilizar a função “Gain Optimization”. Isso permite que você otimize um ganho para um ajuste que fornecerá o alcance desejado de fluorescência inicial em uma temperatura determinada (normalmente a temperatura em que ocorre a aquisição de dados) em cada um dos canais que estejam adquirindo. O alvo do Ganho de Otimização é garantir que todos os dados sejam coletados dentro do alcance dinâmico do detector. Se o ganho for muito baixo, o sinal será perdido em ruídos de fundo. Se for muito alto, todos os sinais se perderam fora de escala (saturado).

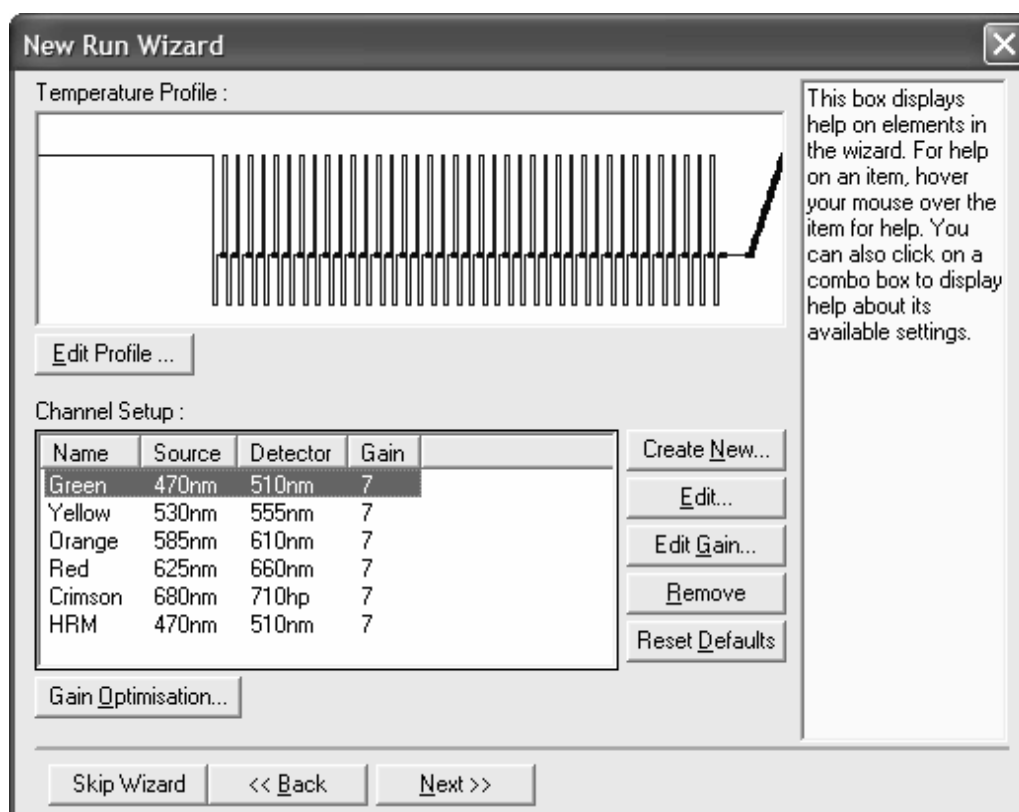
O alcance do ganho para cada canal é -10 até 10, onde -10 é o menos sensível e 10 é o mais sensível.

Ao executar reações pela primeira vez, recomendamos que prepare uma amostra teste contendo todos os componentes da reação. Posicione a amostra teste no Rotor Gene Q e use Ganho de Otimização para determinar a configuração de melhor ganho. Se o ganho escolhido pelo Ganho de Otimização resultar em um sinal fraco então o “Target Sample Range” deve ser aumentado. Se resultar em um sinal que seja saturado então o “Target Sample Range” deve ser diminuído.

Para realizar o Ganho de Otimização, clique no botão “Gain Optimization...” na janela do assistente de nova execução 3 (veja a seção 6.2.3).



A janela “Auto-Gain Optimization Setup” aparece. Essa janela permite otimização ajustando automaticamente as configurações de ganho até que as leituras de todos os canais selecionados caiam para dentro ou para baixo de um certo limiar.



- Ajustar temperatura para: Antes de ler, o Rotor Gene Q será aquecido ou resfriado para combinar com a temperatura especificada. Como padrão, este será o ajuste da temperatura de aquisição.
- Otimizar todos/Otimizar aquisição: "Optimize All" tentará otimizar todos os canais conhecidos pelo software. "Optimize Acquiring" otimizará apenas os canais que são usados no perfil térmico definido na execução (ciclo e fusão).
- Realizar otimização antes da 1ª aquisição: Selecione esta caixa para realizar Ganho de Otimização no primeiro ciclo em que ocorre aquisição de dados. Isso é recomendado para Auto Ganho de Otimização.
- Realizar Otimização em X graus no início da execução: Selecione esta caixa para realizar Ganho de Otimização antes de iniciar a execução. O Rotor Gene Q é aquecido na temperatura especificada, o Ganho de Otimização é realizado, e então o ciclo

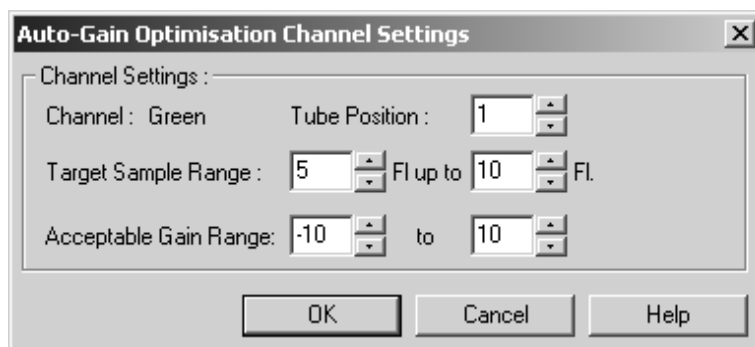
inicia na primeira etapa, normalmente uma etapa de desnaturalização. Esta opção pode ser escolhida se um Ganho de Otimização durante a execução resultar em muito tempo gasto na etapa inicial. Normalmente “Perform Optimization Before 1st Acquisition” é preferível porque o Ganho de Otimização é realizado o mais próximo possível das condições de execução.

Configurações de canal

Este menu permite que canais sejam adicionados. Escolha o canal de interesse e clique em “Add”.

Editar:

Este abre uma janela em que o “Target Sample Range” pode ser ajustado. O “Target Sample Range” é o alcance da fluorescência inicial que deve ser ajustada para a amostra no tubo especificado. Auto Ganho de Otimização lê cada canal usando configurações de ganho no alcance especificado por “Acceptable Gain Range”. Escolhe a primeira configuração de ganho que resulte em uma leitura de fluorescência dentro do “Target Sample Range”. No exemplo mostrado, Auto Ganho de Otimização procura por uma configuração de ganho entre -10 e 10 que dá uma leitura entre 5 e 10 FI no tubo 1. No geral, para intercalar corantes um “Target Sample Range” de 1-3FI é apropriado, enquanto um alcance de 5-10 FI é mais adequado para sondas químicas.



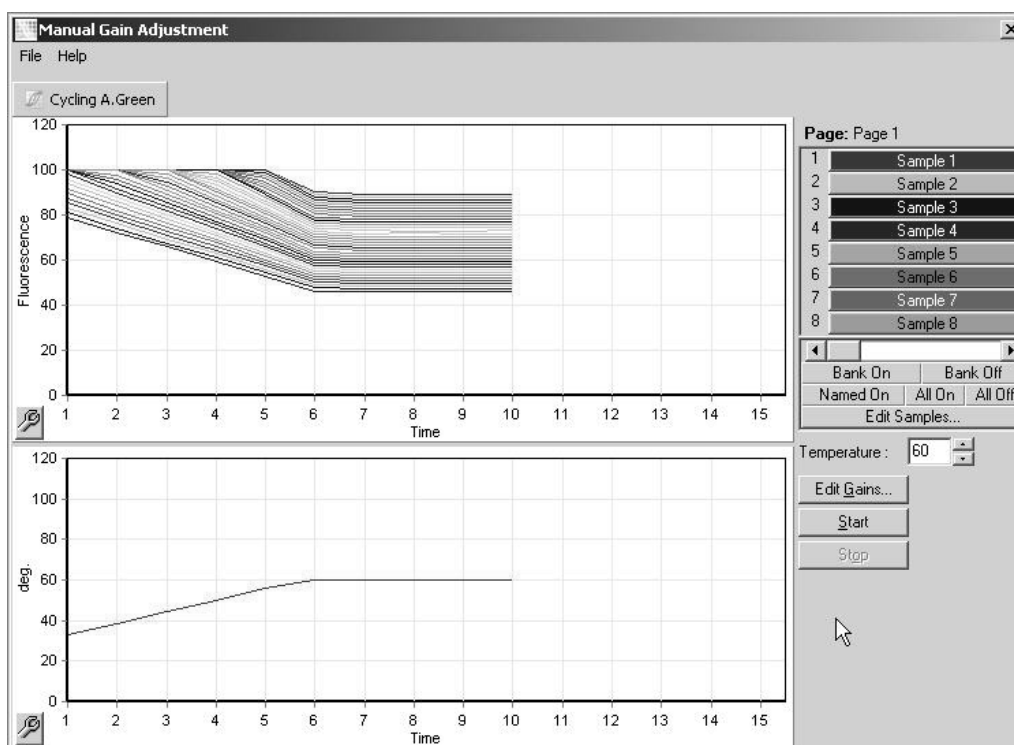
Remover/Remover todos	“Remove” remove os canais marcados. “Remove All” remove todos os canais.
Iniciar	“Start” inicia o Ganho de Otimização. Um ganho é escolhido o que resulta em níveis de sinais de fluorescência dentro do alcance especificado. Se a fluorescência sair fora do alcance especificado, o ganho será ajustado para dar a combinação mais próxima possível.
Manual	Este abre a janela “Manual Gain Adjustment”.
Mudar Ganho durante uma execução	Se o ganho no início da execução for muito alto ou muito baixo, pode ser trocado dentro dos 10 primeiros ciclos. Uma linha vertical aparece onde o ganho foi trocado. Os ciclos antes da mudança são excluídos da análise.

Nota: Ganho de Otimização pode escolher uma configuração que não esteja dentro do alcance especificado. Isso pode ser por causa das mudanças na fluorescência depois da primeira etapa de espera. Entretanto, o resultado de Ganho de Otimização fornece uma boa indicação do nível de fluorescência em que a execução iniciará.

Manual de ajuste de Ganho

Para realizar “Manual de ajuste de Ganho”, clique em “Manual...” na janela “Auto-Gain Optimisation Setup”. A janela “Manual Gain

Adjustment” aparecerá. Esta janela mostra as leituras fluorescentes de qualquer temperatura em tempo real. É usada quando o fundo de uma amostra for desconhecida e portanto o ganho deve ser determinado para garantir que o sinal da amostra seja suficiente para detecção.



Como padrão, todas as amostras são mostradas no display. Amostras podem ser removidas ou adicionadas ao display usando o alternador à direita. O alternador consiste em células coloridas, cada uma corresponde a uma amostra no display. Amostras com células coloridas brilhantes são mostradas, enquanto amostras com células ofuscadas não são mostradas. Amostras podem ser ligadas ou desligadas clicando na célula ou arrastando o ponteiro do mouse por várias células por vez.

Recomendamos que realize o Manual de ajuste de Ganho como se segue:

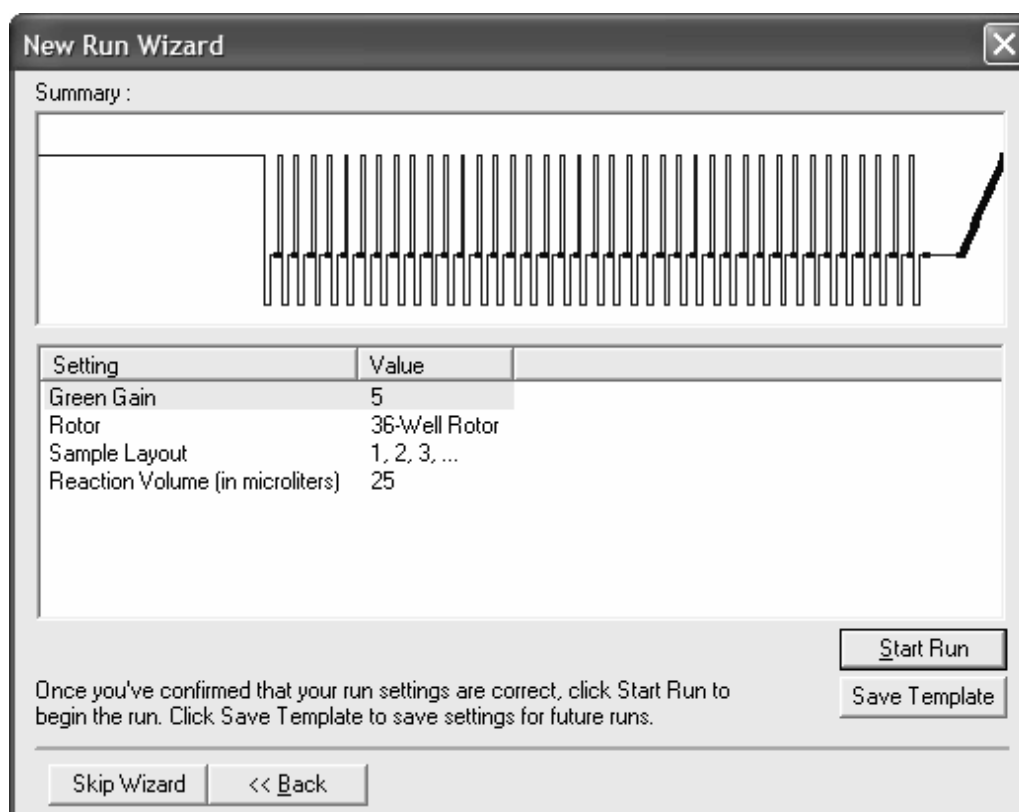
1. Ajuste a temperatura na janela “Manual Gain Adjustment” para a temperatura de aquisição requerida para a execução.

Nota: A temperatura não será ajustada enquanto o Rotor Gene Q estiver operando. Reinicie o Rotor Gene Q para aplicar as mudanças feitas na temperatura.

2. Clique em “Start”. A execução iniciará. A temperatura do Rotor Gene Q é ajustada para a temperatura especificada na janela. Os gráficos na janela começam a mostrar dados.
3. Espere que a temperature estabilize.
4. Note a leitura de fluorescência (FI) do ponto final.
5. Se a leitura do FI não estiver no nível requerido, clique em “Edit Gains...” e edite como necessário. Este processo pode não ser instantâneo, pois o Rotor Gene Q leva 4 segundos para adquirir cada ponto em cada canal, e durante este tempo a interface do usuário é desativada.
6. Repita o processo até que o FI esteja em um nível desejado.
7. Clique em “Stop”. Se a execução ainda estiver adquirindo dados quando o botão “Stop” for clicado, o Rotor Gene Q termina de adquirir primeiro, e depois pára. Este processo pode durar até 5 segundos para cada canal de aquisição.

6.2.5 Nova janela do assistente de execução 4

Esta janela resume a execução. Verifique os parâmetros e se eles estiverem corretos, clique em “Start Run”. Você será pedido para entrar com um nome de arquivo. Você também pode salvar as configurações da execução como um modelo para execuções futuras usando o botão “Save Template”.



6.2.6 Nova janela do assistente de execução 5

Entre com tipos de amostras e descrições nesta janela enquanto a execução estiver em progresso. A funcionalidade desta janela é idêntica à janela “Edit Samples” (seção 7-70). Informações de amostras também podem ser entradas depois que a execução estiver terminada.

O botão “Finish and lock Samples” fecha a tela e evita que os nomes de amostras sejam modificados. Para mais informações sobre isto e outras características de segurança, veja o menu de segurança (Seção 7-81).

New Run Wizard [X]

Settings :
 Given Conc. Format : Unit : Copies

Samples :

C	ID	Name	Type	Groups	Given Conc.	Se ▲
	1	JOE E-3 A	Unknown			Ye
	2	JOE E-3 B	Unknown			Ye
	3	JOE E-3 C	Unknown			Ye
	4	JOE E-3 NTC	Unknown			Ye
	5		Unknown			Ye
	6		Unknown			Ye
	7		Unknown			Ye
	8		Unknown			Ye
	9		Unknown			Ye ▼

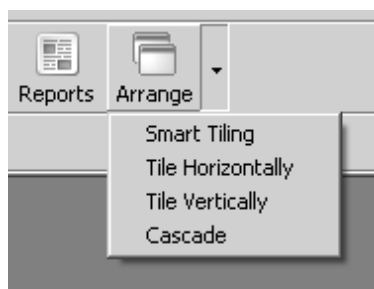
Page :
 Name : ☐ Synchronize pages

7 Análise da interface do usuário

Este capítulo descreve a interface do usuário do software Rotor Gene Q.

7.1 Espaço de trabalho

A área de trabalho é um pano de fundo da janela principal. Nesta área a organização de dados brutos e análise de resultados podem ser abertas. Se várias janelas forem abertas simultaneamente, elas podem ser organizadas clicando no botão “Arrange” na barra de ferramentas. Existem várias opções de arranjos de janela disponíveis que podem ser selecionadas clicando na seta para baixo próximo ao botão “Arrange”.



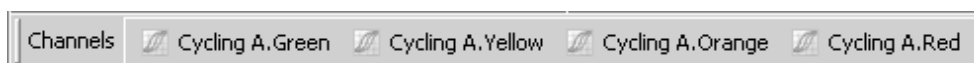
7.2 Barra de ferramentas

Esses botões são atalhos para operações frequentemente usadas. Essas operações também podem ser acessadas no menu.



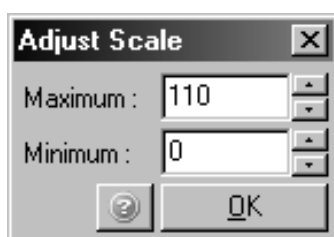
7.3 Ver canais brutos

Clique nesses botões para ver dados brutos (não analisados) de canais particulares na execução.



Quando estiver vendo estes dados, um número de opções estão disponíveis para mudar a apresentação de dados. Os dados brutos também podem ser transformados para facilitar diferentes tipos de análises.

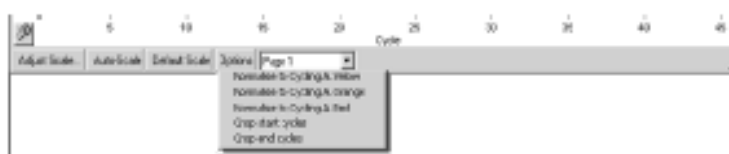
Ajustar escala: Para selecionar “Adjust scale”, clique o botão direito do mouse em cima da janela apropriada. “Adjust scale” traz uma janela em que uma escala pode ser especificada.



Auto escala “Auto escala” tenta arrumar a escala para a leitura máxima e mínima dos dados.

Escala padrão “Escala padrão” reinicia a escala para mostrar unidades de fluorescência de 0 a 100.

Ícone chave de fenda Veja a seção 8.5 para mais informações.



Opções Este mostra o menu mostrado acima, que fornece opções para transformação de dados brutos.

Normalizar para: Este permite normalização de amplificação de dado para dado, de um corante de referência passivo, como o ROX, adquirido em outro canal.

Ciclos iniciais de cultura	Este cria um novo conjunto de canais de dados, em que alguns ciclos iniciais foram removidos. Este será útil se grandes saltos forem observados nos ciclos iniciais, que podem ocorrer ao usar certas químicas.
Cultura e ciclos	Este cria um novo conjunto de canais de dados, em que alguns ciclos finais foram removidos.
Página 1	Este indica a página que está atualmente selecionada para mostrar as parcelas de dados brutos. A janela "Edit Sample" permite a criação de múltiplas definições de amostras. Por exemplo, dados podem ser vistos com espessuras de linhas variantes, definições de amostras, e outras opções mostradas. Isto é particularmente útil se quantificação relativa é realizada em um único canal, porque o outro pode facilmente mudar a visão entre o gene de interesse e as amostras de casa ao definir 2 páginas de amostras.

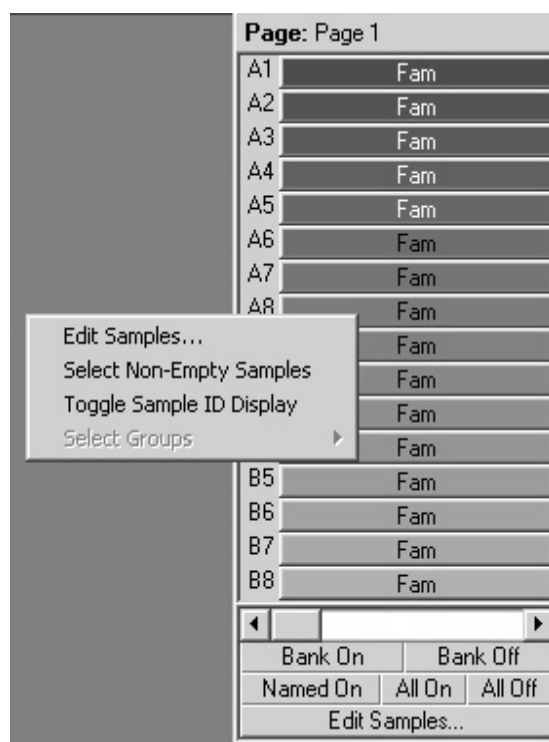
7.4 Amostras alternadas

Do lado direito da mão da janela principal está um alternador, que inclui uma legenda de amostra. Isto consiste em células coloridas, cada uma corresponde a uma amostra no display. O alternador é usado para controlar que amostras podem ser vistas no display. Amostras com uma célula colorida brilhante são mostradas enquanto amostras com uma célula mais fraca não são mostradas. Amostras podem ser ligadas e desligadas clicando na célula ou arrastando o ponteiro do mouse por várias células por vez. Os botões "Bank On" e "Bank Off" escondem ou mostram, respectivamente, todas as amostras atualmente visíveis na lista. A barra de rolagem é usada para mostrar o próximo grupo de amostras.

Nota: O número de amostras mostradas é dinâmica, e depende do espaço disponível na janela.

Ao clicar em “Named On” mostra apenas aquelas amostras que foram dadas um nome. Esta é uma forma rápida de mostrar apenas amostras relevantes. Ao clicar em “All On” ou “All Off” mostra todas ou nenhuma amostra no rotor respectivamente. Pressionando o botão “Edit Samples...” abre a janela “Edit Samples” onde nomes de amostras, tipos, e concentrações padrões podem ser editadas (veja a seção 7.8.4).

O alternador é mostrado abaixo. As opções adicionais mostradas aparecem depois de clicar no botão direito do mouse sobre o alternador.

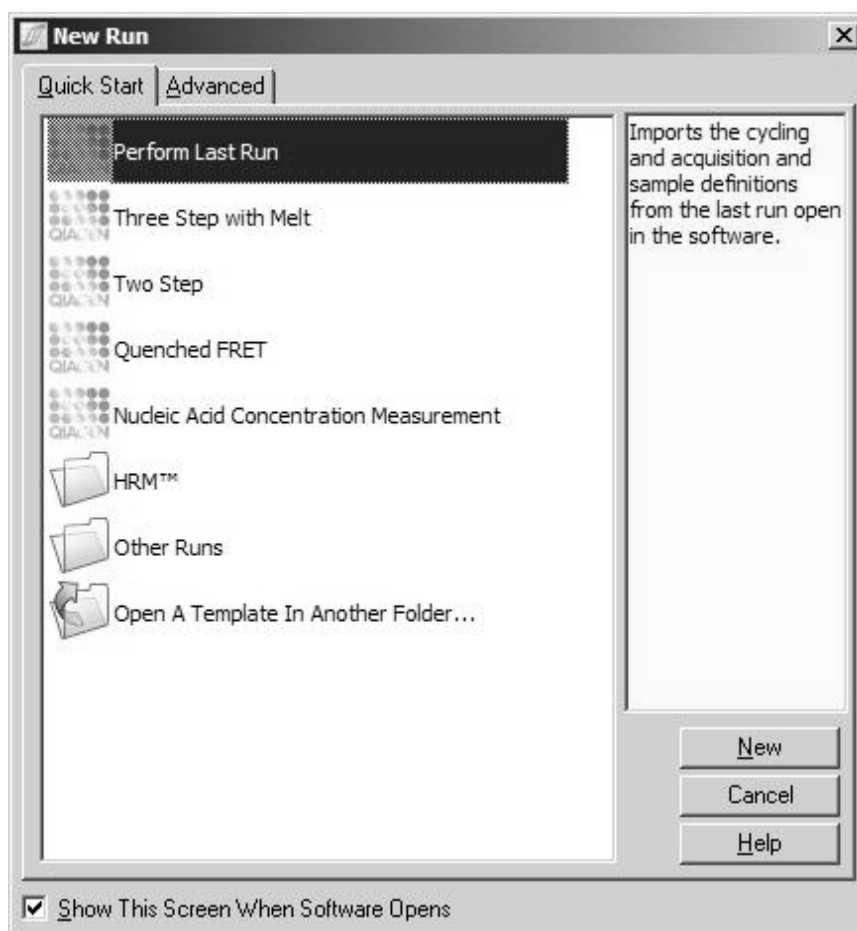


Página	Esta etiqueta no topo do alternador indica a página da amostra que é mostrada. As páginas permitem análises independentes variadas de um conjunto de canais de dados. Por exemplo, voe pode executar duas curvas padrões no canal verde e gerar relatórios independentes. Mais informações para ajustar páginas de amostras estão disponíveis na seção 0.
ID de display do alternador de amostra	Se o rotor de 72 poços for usado, as amostras são mostradas no formato A1 a A8, B1 a B8, etc. A opção “Toggle Sample ID Display” permite ao usuário mudar para uma ordem de amostra numérica (1 a 72).
Selecione amostras não vazias	Esta opção tira a seleção de qualquer amostra que tenha um “Tipo” especificado como “Nenhum” na janela “Edit Samples”. Isso garante que apenas amostras relevantes para a análise são mostradas.
Selecione grupos	Se você tiver grupos definidos, essa característica irá alternar (ligar/desligar) o display das amostras nos grupos. Grupos são coleções arbitrárias de amostras que permitem relatório avançado de estatísticas de resultados. Por exemplo, grupos de amostras de pacientes tratados e não tratados podem ser definidos. Grupos podem ser ajustados na janela “Edit Samples”.

7.5 Menu File (Arquivo)

7.5.1 Novo

Após selecionar “File” e depois “New”, a janela “New Run” aparece. Esta janela fornece modelos normalmente usados organizados sob as etiquetas “Quick Start” e “Advanced”. Uma vez que o modelo é selecionado, o assistente o guia através da configuração da execução e permite modificação de configurações e perfis.



Para informações sobre os modelos fornecidos, veja a seção 6.1 e seção 6.2.

Nova execução

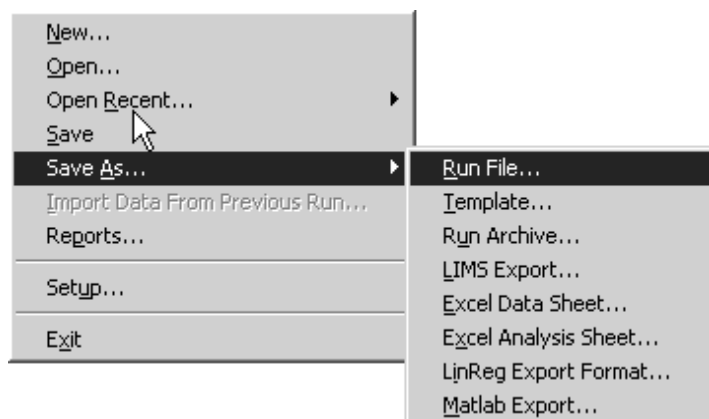
Nova...:	Este inicia a configuração da execução usando o modelo selecionado.
Cancelar:	Este fecha a janela.
Ajuda:	Este abre a ajuda online.
Mostrar esta tela quando o software abrir	Se esta caixa for selecionada, a janela “New Run” é mostrada quando o software for iniciado.

7.5.2 Abrir e salvar

Abrir...: Este abre um arquivo de execução do Rotor Gene Q previamente salvo (*.rex) ou um depósito de execução do Rotor Gene Q (*.rea file).

Abrir recente...: Este mostra os últimos 4 arquivos que tenham sido abertos e salvos.

Salvar: Este salva quaisquer mudanças que tenham sido feitas para um arquivo de execução.



Salvar como...: Use esta função para salvar o arquivo de execução ou dados em vários formatos. Essas opções são listadas abaixo.

Executar arquivo...: Este salva uma cópia do arquivo. O usuário pode mudar o nome e o local onde salvar. Este é o formato padrão.

Modelo...: Este salva a configuração do perfil e configurações associadas mas não o dado da execução. O modelo pode ser usado para iniciar futuras execuções.

Executar arquivo...:	Este salva em um formato de arquivo mais compacto. Salva arquivos neste formato antes de serem enviados por e-mail. Isso reduz o tempo requerido para enviar o arquivo e garante que arquivos não estejam corrompidos por e-mail de clientes.
Folha de dados do Excel...:	Este exporta todos os canais brutos para uma folha de Excel. Apenas as amostras selecionadas são exportadas.
Folha de análise do Excel...:	Este exporta todas as análises na atual execução para uma única folha de Excel.
Formato de exportação LinReg...:	Este exporta todos os canais de dados brutos para um formato que pode ser lido pelo LinReg (uma ferramenta de análise eficiente). Veja “Exporting to LinReg” abaixo para mais detalhes.
Exportação de material de laboratório...:	Este exporta os dados para um formato que pode ser lido pelo pacote científico de material de laboratório (ou sua fonte-aberta equivalente, Octave). Isto pode ser útil para métodos de pesquisa.

Exportando para LinReg

LinReg é uma ferramenta desenvolvida por C. Ramakers and coworkers.*

A ferramenta LinReg está disponível por pedido (e-mail: bioinfo@amc.uva.nl; sujeito: LinReg PCR).

O software Rotor Gene Q permite ao usuário exportar dados brutos em um formato que possa ser importado pela ferramenta de análise LinReg.

1. Abra o arquivo de execução do Rotor Gene Q contendo dados brutos.

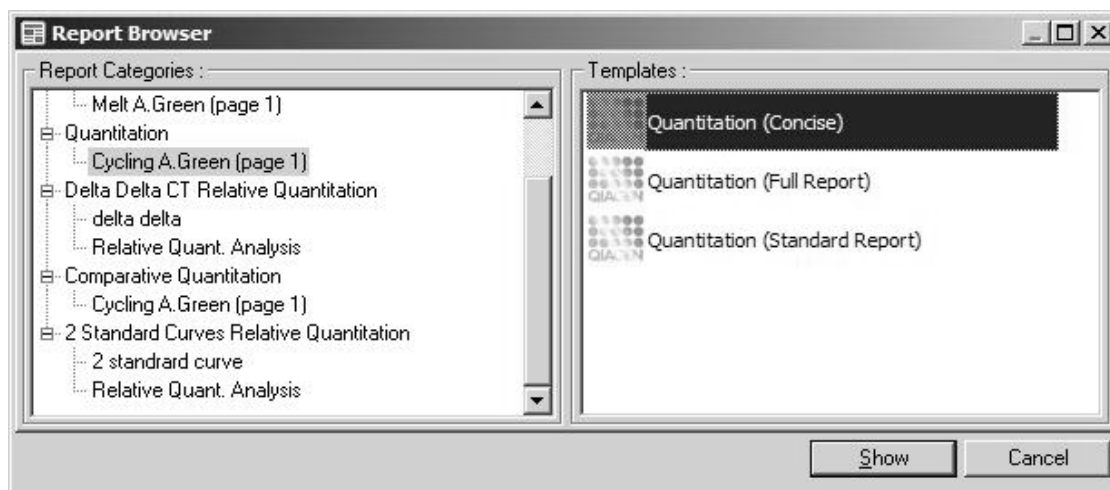
2. Exporte os dados para o formato de exportação LinReg selecionando “Save As...” e depois “LinReg Export Format...”.

* Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62.

3. O Microsoft Excel automaticamente mostra o dado bruto exportado.
4. Inicie a ferramenta LinReg.
5. A ferramenta pede que você selecione a extensão de células onde os dados brutos estão localizados. A ferramenta só pode analisar um canal bruto por vez, portanto uma região apropriada da Folha do Excel deve ser selecionada.

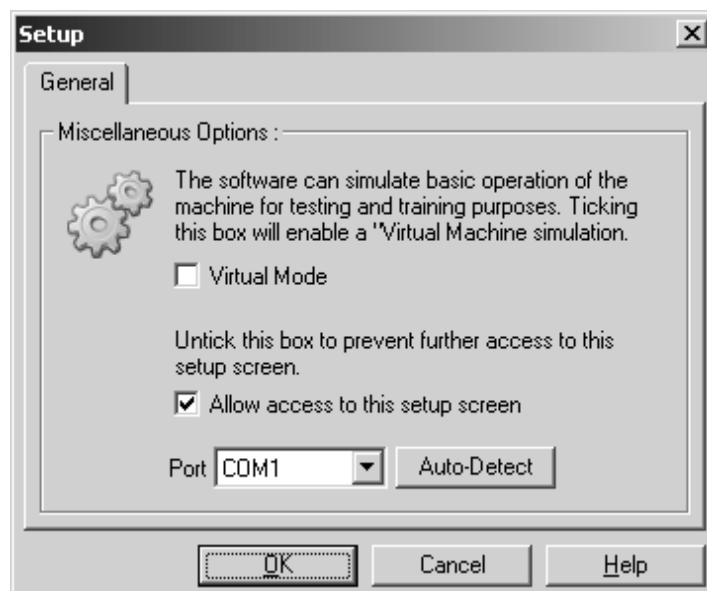
7.5.3 Relatórios

Após selecionar “Reports” a janela “Report Browser” aparecerá. Se os dados já foram analisados o relatório desta análise pode ser mostrada da janela “Report Browser”. Vários tipos de relatórios são oferecidos com vários graus de detalhes.



7.5.4 Configuração

A configuração inicial do Rotor Gene Q deve ser completada durante a instalação. Entretanto, esta opção permite que você mude a configuração de conexão do Rotor Gene Q, se você desejar depois da instalação.

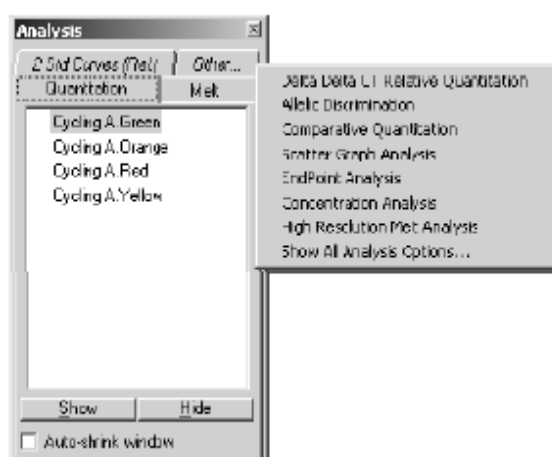


Modo Virtual:	Selecione esta opção se o software for usado sem um Rotor Gene Q conectado. O software retém todas as funções. Este modo é útil para propósitos de demonstração, análise de dados, e configuração dos modelos.
Permite acesso a tela de configuração	Se esta opção não for selecionada durante a configuração, esta janela não poderá mais ser acessada. Esta medida de segurança previne que usuários alterem as configurações. Para reestabelecer acesso, contate seu distribuidor.
Porta	Selecione a porta de comunicação correta para permitir comunicação entre o computador e o Rotor Gene Q. Se você não estiver certo sobre que porta deve selecionar, clique em "Auto-Detect" para procurar todas as portas disponíveis.

7.6 Menu Analysis (Análise)

7.6.1 Análise

Após clicar em “Analysis”, a janela “Analysis” aparecerá. Esta janela permite a criação de novas análises e mostra análises existentes. O método de análise é selecionado usando as etiquetas. Uma lista dos canais que podem ser analisados usando o método selecionado é mostrada. Múltiplas execuções de exames no mesmo canal podem ser analisadas independentemente, desde que tenham sido ajustadas como páginas separadas na janela “Edit Samples”. Páginas que já foram analisadas possuem uma marca verde próxima. Isso significa que ajustes do limiar e de normalização foram salvos para esta análise. Para ver ou analisar um canal, clique duas vezes sobre ele. A janela específica de análise aparece.



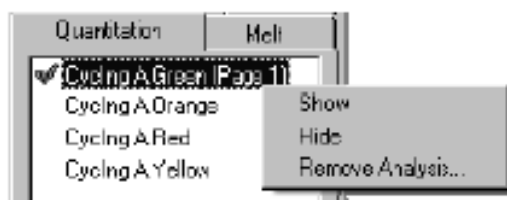
Auto encolher janela

Selecionar “Auto-Shrink Window” encolhe a janela quando não estiver em uso. Mover o cursor sobre a janela aumenta a janela novamente.

Organizando o espaço de trabalho

Cada vez que uma nova análise for iniciada suas janelas são arrumadas para caberem com àquelas que já estão na tela. Se muitas janelas forem mostradas pode ficar incômodo. Feche as janelas que você não precisar, depois clique em “Arrange” na barra de ferramentas. As janelas são automaticamente arrumadas

de acordo com o método “Smart tiling”. Alternativamente selecione outro método de arrumação clicando na seta próxima ao botão “Arrange”. Clicando com o botão direito do mouse no nome de uma análise, também fornece opções adicionais.



Mostrar:	Este mostra a análise selecionada.
Esconder:	Este esconde a análise selecionada.
Remover análise:	Este remove completamente a análise selecionada. Isso significa que qualquer configuração de normalização ou silo de fusão ajustados na análise serão perdidos.

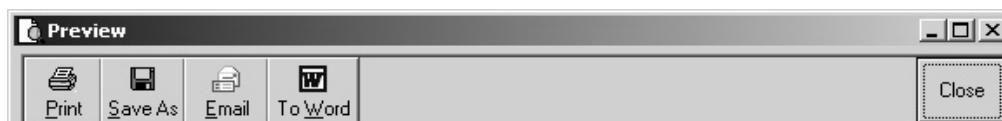
7.6.2 Quantificação

Selecione a etiqueta “Quantitation” na janela “Analysis” e clique duas vezes no nome do canal ou selecione o canal e depois pressione o botão “Show” para abrir o canal de interesse. Três janelas aparecem: a tela principal, a de curva padrão, e os resultados.

Relatórios

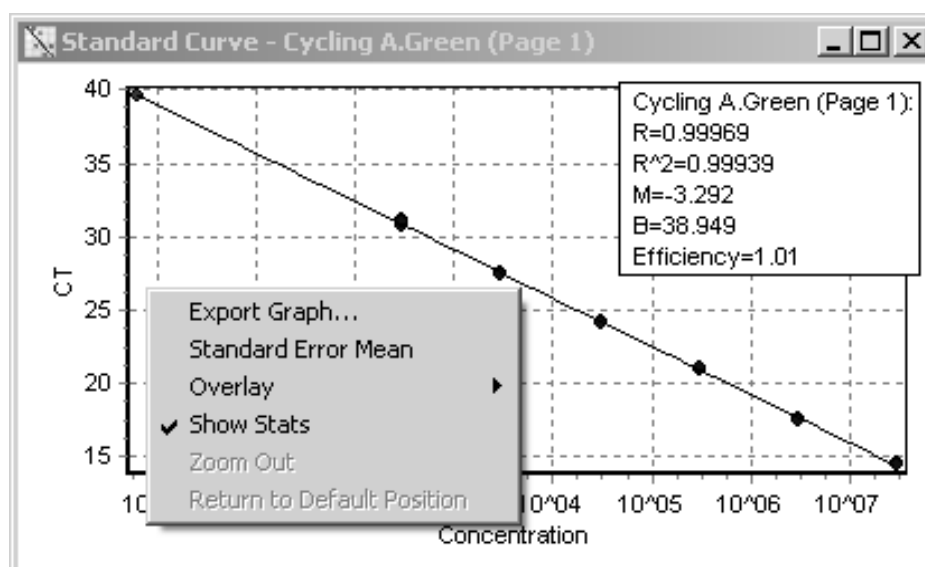
Relatórios	“Reports” abre a janela “Report Browser” onde um relatório da análise atual pode ser gerado. Existem 3 opções: relatório padrão, relatório completo e relatório conciso. Clique duas vezes na opção desejada para abrir o relatório na janela “Preview”.
------------	--

Depois que o relatório foi gerado, os botões no topo da janela "Preview" podem ser usados para imprimir, salvar, ou enviar o relatório por e-mail, ou exportá-lo para o Word.



Curva padrão

Curva padrão: Este botão abre a janela "Standard Curve". Como padrão, esta janela é aberta quando uma análise é aberta. Se você fechar a janela, ela pode ser reaberta usando este comando.



Os valores na curva padrão são recalculados dinamicamente conforme o nível do limiar é variado clicando e arrastando a linha do limiar na janela principal.

Pontos azuis na curva representam as amostras que foram definidas como padrões e pontos vermelhos representam os pontos de dados desconhecidos da amostra.

Nota: Se redefinir padrões para recalcular a curva padrão, alternar a visibilidade da amostra padrão para desligar usando o alternador na direita da tela o removerá do cálculo de curva padrão. Remover padrões do gráfico para aumentar o valor R^2 não é cientificamente válido. Um padrão falho é uma indicação que as amostras também podem ter falhado., e portanto devem ser incluídas nos resultados.

Eficiência	Esta é a eficiência da reação na execução. Este valor é discutido em mais detalhes mais à frente.
Valor R^2 (coeficiente de correlação)	<p>O valor R^2, ou valor R^2 é a porcentagem do dado que é consistente com a hipótese que os padrões formam uma curva padrão. Se o valor R^2 for baixo, então os padrões não encaixam facilmente em uma linha de melhor encaixe. Isso significa que os resultados (i.e., as concentrações calculadas) podem não ser confiáveis. Um bom valor R^2 é aproximadamente 0.999.</p> <p>Nota: É possível alcançar um valor R^2 alto com uma fraca curva padrão se um número insuficiente de padrões tiverem sido executados. O valor R^2 melhora conforme o número de padrões diminui. Para uma indicação mais precisa da confiabilidade dos resultados use os intervalos de confiança nas concentrações calculadas como um guia.</p>
Valor R (raiz quadrada do coeficiente de correlação)	O valor R é a raiz quadrada do valor R^2 . Em geral, o valor R^2 é mais útil para determinar correlação.
M e B	O declive (M) e a interceptação (B) da curva padrão

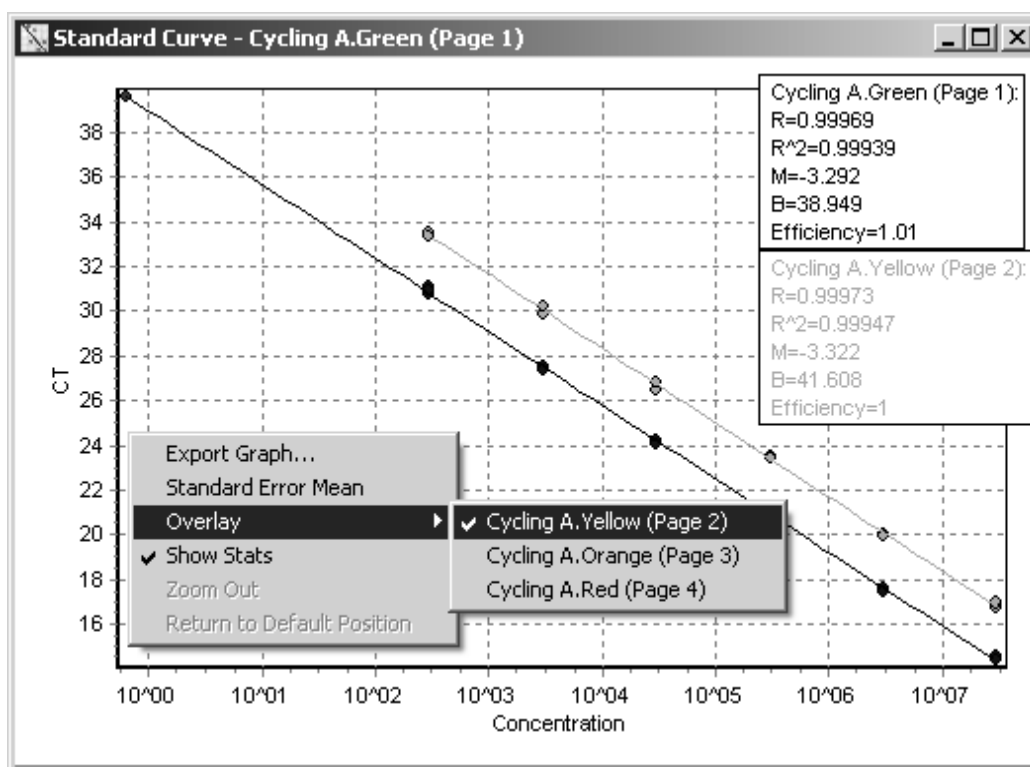
são automaticamente calculados usando a fórmula $y = Mx + B$, e mostrado na janela “Standard curve”.

Exportar gráfico

Clicar com o botão direito do mouse sobre a curva padrão mostra a opção de exportar o gráfico (veja a seção 8.4).

Envoltório

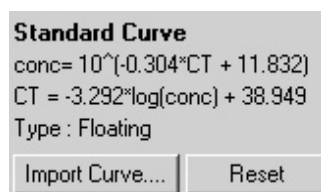
Quando múltiplas execuções de quantificação forem realizadas na mesma execução, é possível envolver as curvas padrões na mesma janela. Isso é útil para ver graficamente a diferença entre diferentes limares. Esta característica é mostrada na tela abaixo.



Cálculo de curva padrão

“conc = ...*Ct +...” e “Ct = ...” são duas versões da equação usada para relacionar valores Ct e concentrações. Em publicações, a fórmula “Ct =...” é geralmente mais usada. A curva padrão pode ser tanto “Flutuante” como “Fixa”. Se for “Flutuante” uma ótima equação para a curva padrão é calculada cada vez que o limiar for

movido na janela principal. Se for “Fixa” a equação não muda porque foi importada de outra execução.



Importar Curva

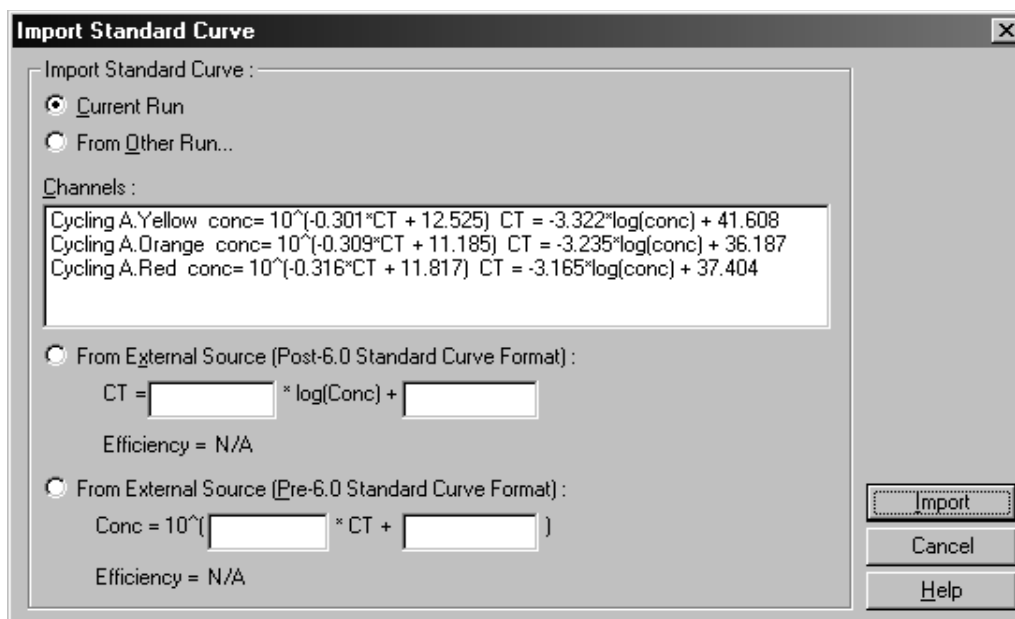
Importar uma curva padrão permite a estimação de concentrações quando uma curva padrão não estiver disponível em uma determinada execução. E a eficiência da reação não variar entre 2 execuções. Curvas podem ser importadas de outro canal ou de outra execução clicando em “Import Curve”.

É possível ajustar a curva padrão, se necessário. Ajustar a curva padrão significa que a única eficiência da fonte da curva padrão é importada para a execução atual. Se a curva padrão deve ser ajustada ou não depende da química usada.

Para ajustar a curva padrão, utilize uma referência na nova execução com uma concentração conhecida. Defina uma referência ajustando o tipo de amostra para “Standard” e entrando com um valor de concentração na janela “Edit Samples”. Múltiplas cópias da mesma referência podem ser entradas para melhorar a precisão. Note que não é possível definir mais de uma concentração de referência ou padrão. Por exemplo, é possível ter 3 referências replicadas de 1000 cópias, mas não é possível ter 1 referência de 1000 cópias e outra com 100 cópias na mesma execução.

Uma vez que a curva padrão tenha sido importada, o tipo de curva padrão muda para “Fixa”. Clique em “Reset” para mudar o tipo de curva padrão para “Flutuante”.

Uma tela da janela “Import Standard Curve” é mostrada abaixo.



Utilizando esta janela, uma curva padrão pode ser importada de outro canal analisada na execução atual ou em outra execução.

Execução atual

Quando esta opção é selecionada, as análises de quantificação em outros canais desta execução são listadas com a curva padrão correspondente.

De outra execução

Selecionar esta opção traz um diálogo em que um arquivo de execução pode ser selecionado para abrir. Se qualquer análise de quantificação for realizada para a execução, curvas padrões são listadas para cada canal analisado.

Nota: As configurações de análise de quantificação foram salvas no arquivo de execução.

Canais

Este lista os canais analisados e suas fórmulas de curva padrão.

De fonte externa

Nesta área, valores M e B podem ser entrados diretamente. Isto é útil em casos em que os valores são de uma fonte externa, assim como a folha do Excel.

Cálculo Ct

Inverter dados brutos

Algumas químicas produzem um sinal fluorescente que diminui exponencialmente ao invés de aumentar. É possível analisar estes dados usando “Quantificação”, mas a caixa “Invert Raw Data” deve ser selecionada. Para todas as outras análises de quantificação, esta opção deve permanecer não selecionada.

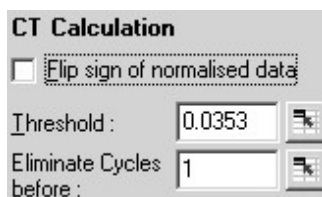


Cálculo Ct

O valor Ct é o número do ciclo no ponto onde a curva de amplificação cruza um limiar de detecção. Ao ajustar uma linha de limiar e calcular a intersecção com cada uma das curvas, o valor Ct para cada amostra é estabilizado.

Limiar

Para ajustar o limiar, clique no ícone (uma grade com uma seta vermelha), depois clique e segure no gráfico e arraste a linha para o nível desejado. Alternativamente, entre com um valor de log. Alternativamente, “Auto-Find Threshold” pode ser usado para determinar automaticamente o limiar. Ao ajustar o limiar manualmente, ele deve ser ajustado na fase exponencial da execução, significativamente acima do nível de fundo para evitar ruído e abaixo do aparecimento de sinais de planalto em ciclos mais a frente.



Eliminar ciclos antes: Para ajustar, clique no ícone (uma grade com uma seta vermelha) e depois clique e segure no gráfico e arraste a linha para a direita. Isso elimina o limiar para números de ciclos baixos.
Nota: Isto é útil quando houver ruído durante os ciclos iniciais, por exemplo, devido a efeitos de mistura de amostras.

Auto-encontrar limiar Esta função examina a região selecionada do gráfico para achar uma configuração de limiar que entrega ótimas estimativas de concentrações. A região selecionada pode ser trocada entrando com margens maiores e menores nas caixas de texto que aparecem.

Para a maioria das análises, as margens padrões maiores e menores são adequadas. A extensão de níveis de limiares são examinados para obter o melhor encaixe da curva padrão baseado nas amostras que foram definidas como padrões. (i.e., onde o valor R é mais próximo de 1.0).



Resultados

Este abre a janela "Quantitation Results". Como padrão, esta janela é aberta quando uma análise é aberta. Se foi fechada, pode ser reaberta usando este comando.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Cope)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Std	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. (95% CI)
1	3<10 ⁻⁸	Standard	14.42	30000000	28255064	5.8%	14.47	0.10	[14.21, 14.73]	27328521	[19019879, 35266705]
2	3<10 ⁻⁸	Standard	14.59	30000000	25142520	16.2%					
3	3<10 ⁻⁸	Standard	14.40	30000000	28730050	4.2%					
4	3<10 ⁻⁷	Standard	17.44	3000000	2422624	14.1%	17.40	0.09	[17.26, 17.69]	3327013	[2517622, 4396613]
5	3<10 ⁻⁷	Standard	17.58	3000000	3103391	3.4%					
6	3<10 ⁻⁷	Standard	17.42	3000000	3467111	15.6%					
7	3<10 ⁻⁶	Standard	20.99	300000	285353	4.9%	20.98	0.06	[20.84, 21.13]	288528	[231158, 355162]
8	3<10 ⁻⁶	Standard	20.92	300000	298898	0.4%					
9	3<10 ⁻⁶	Standard	21.04	300000	275802	8.1%					
10	3<10 ⁻⁵	Standard	24.20	30000	30286	1.0%	24.12	0.07	[23.94, 24.29]	32005	[25827, 39661]
11	3<10 ⁻⁵	Standard	24.06	30000	33276	10.9%					
12	3<10 ⁻⁵	Standard	24.09	30000	32530	8.4%					
13	3<10 ⁻⁴	Standard	27.51	3000	2987	0.4%	27.42	0.09	[27.20, 27.63]	3180	[2427, 4190]
14	3<10 ⁻⁴	Standard	27.40	3000	3223	7.4%					
15	3<10 ⁻⁴	Standard	27.34	3000	3367	12.2%					
16	3<10 ⁻³	Standard	30.76	300	308	2.5%	30.92	0.16	[30.52, 31.32]	274	[189, 397]
17	3<10 ⁻³	Standard	31.08	300	246	18.1%					
18	3<10 ⁻³	Standard	30.93	300	273	9.0%					

Na janela “Quantitation Results”, os resultados da execução são resumidos em uma tabela. Clicando no botão direito do mouse e selecionando “Export to Excel” exporta a tabela para o Excel. O Excel abre automaticamente. Para copiar o dado em uma folha existente, escolha a opção “Copy”, abra a folha e depois selecione “Paste”.

A janela “Quantitation Results” inclui as seguintes colunas.

%Var:	A variação de porcentagem entre a concentração calculada e a conhecida. $\%Var = \frac{Abs (Calculada/Fornecida-1)}{Fornecida}$
Rep. Ct	A média de Ct de todas as amostras com o mesmo nome desta amostra.
Rep. Ct Std. Dev.:	O desvio padrão do valor Ct de todas as amostras com o mesmo nome desta amostra.
Rep. Ct 95% C.I.	Uma extensão Ct que, estatisticamente, conta com 95% de variação no valor Ct. Isto é uma medida estatística conservadora, que pode ser usada como uma medida de qualidade. Esta extensão pode ser estreitada executando mais réplicas ou tendo menos variações nas réplicas.
Rep.Calc.Conc.	A concentração calculada para todas as amostras com o mesmo nome. Nota: Esta não é a única média das concentrações calculadas. É o meio geométrico, que é uma média

matematicamente mais apropriada devido a natureza exponencial de amplificação em tempo real.

Rep.Calc.Conc. 95% C.I.

Uma extensão de concentrações que conta com 95% de variação na amostra individual assim como a regressão linear em que é baseada. Uma interpretação desta medida é que é uma extensão de concentrações que podem ser esperadas 95% do tempo se esta execução for realizada repetidamente com o mesmo montante de variação. Esta é uma estimativa conservadora, e a extensão pode ser bem grande devido a variação inerente em qualquer análise em tempo real. Esta extensão pode ser grande se padrões forem executados com concentrações diferentes das amostras desconhecidas, se um número pequeno de réplicas forem usadas, ou se houver uma variação significativa.

IMPORTANTE: As variações relatadas por esta medida são inerentes ao processo exponencial de amplificação em tempo real e não são devidas ao Rotor Gene Q. Testes similares realizados em ciclos à base de bloco renderiam maiores variações devido à uniformidade de temperatura mais baixa dos sistemas à base de bloco. Para comparar ciclos se desejar, recomendamos comparar o desvio padrão do valor Ct.

Nota: Cada uma das colunas podem ser mostradas ou escondidas clicando com o botão direito na janela e depois selecionando ou tirando a seleção do nome da coluna.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	3x10 ⁸	Standard	14.42		
2	3x10 ⁸	Standard	14.59		
3	3x10 ⁸	Standard	14.40		
4	3x10 ⁷	Standard	17.44		
5	3x10 ⁷	Standard	17.58		
6	3x10 ⁷	Standard	17.42		
7	3x10 ⁶	Standard	20.99		
8	3x10 ⁶	Standard	20.92		
9	3x10 ⁶	Standard	21.04		
10	3x10 ⁵	Standard	24.20		
11	3x10 ⁵	Standard	24.06		
12	3x10 ⁵	Standard	24.09		
13	3x10 ⁴	Standard	27.51		
14	3x10 ⁴	Standard	27.40		
15	3x10 ⁴	Standard	27.34		
16	3x10 ³	Standard	30.76	300	
17	3x10 ³	Standard	31.08	300	
18	3x10 ³	Standard	30.88	300	

☐ Analysis
☒ No.
☐ Colour
☒ Name
☒ Type
☒ Ct
☒ Given Conc (Copies)
☒ Calc Conc (Copies)
☒ % Var
☒ Rep. Ct
☒ Rep. Ct Std. Dev.
☒ Rep. Ct (95% CI)
☒ Rep. Calc. Conc.
☒ Rep. Calc. Conc. (95% CI)

Mais informações detalhadas em intervalos de confiança estão disponíveis no Apêndice B. Gostaríamos de agradecer a Peter Cook do Departamento de Matemática da Universidade de NSW, Sidney, Austrália, cuja ajuda foi inestimável ao verificar as abordagens matemáticas utilizadas.

Para maior conveniência, a característica “Auto-Start” automaticamente calcula a média, desvio padrão e valores mínimos e máximos das amostras de interesse. Selecione os resultados de interesse arrastando com o botão esquerdo do mouse, e os valores são mostrados em uma tabela à direita da tela.

Nesta foto da tela, as concentrações de várias amostras são analisadas.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)				Statistics	
Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie	% Var	Maximum :	28730050
14.42	30000000	28255064	5.8%	Minimum :	25142920
14.59	30000000	25142920	16.2%	Count :	3
14.40	30000000	28730050	4.2%	Mean :	27328521
17.44	3000000	3422624	14.1%	Std. Dev :	1.07537
17.58	3000000	3103391	3.4%	(Orders of Mag.)	
17.42	3000000	3467111	15.6%	Copy	
20.99	300000	285353	4.9%		
20.92	300000	298898	0.4%		
21.04	300000	275802	8.1%		
21.20	300000	30786	1.0%		

IMPORTANTE: A característica “Auto-Start” é ciente do contexto. Isso significa que, onde possível, somente gera informações que forem úteis.

Por exemplo:

- Não é possível obter um intervalo de confiança de 95% de um conjunto de concentrações calculadas porque o modelo de regressão também deve ser levado em consideração.
- O desvio padrão “Orders to Magnitude” é relatado para concentrações calculadas ao invés de um valor absoluto. Esta é uma porcentagem de variação. Por exemplo, um valor de 1.07537 representa 7.54% de variação $(278,974 - 322,611) / (300,000 / 1.07537 - 300,000 * 1.07537)$. Relatar um valor absoluto não faz sentido para uma curva padrão. O valor poderia ser relatado na mais baixa concentração para criar um erro menor percebido (+/- 3 cópias) ou na mais alta concentração (+/- 3,000,000 cópias). Por esta razão o desvio padrão “Orders to Magnitude” é relatado.
- Para concentrações calculadas o meio geométrico é usado ao invés do meio aritmético. Isso conta pela natureza exponencial de PCR em tempo real. Por exemplo, neste caso de diluições de duas dobras com 1,2,8 e 16 cópias, a média deveria ser de 4 cópias, porque é o meio da série de diluição. Entretanto o meio aritmético é de 6.75. O meio geométrico é $(1 * 2 * 8 * 16)^{(1/4)} = 4$ cópias. Mais informações dos meios geométricos podem ser encontrados em <http://mathworld.wolfram.com/GeometricMean.html>.

Normalização dinâmica do tubo

A opção “Dynamic tube” é selecionada como padrão e é usada para determinar a média do plano de fundo de cada amostra antes do início da amplificação.

Normalização padrão simplesmente pega os 5 primeiros ciclos e os usa como um indicador do nível de plano de fundo de cada amostra. Todos os pontos de dados para a amostra são então divididos por este valor para normalizar o dado. Isto pode não ser preciso porque para algumas amostras o nível de plano de fundo sobre os 5 primeiros ciclos pode não ser indicativo do nível de plano de fundo anterior a amplificação. Em contraste, a normalização dinâmica do tubo usa a segunda derivativa de cada traço de amostra para determinar o ponto de partida para cada amostra. O nível de plano de fundo é então medido do ciclo 1 até o número do ciclo de partida para cada amostra. Isto dá os resultados quantificados mais precisos.

Note que para alguns conjuntos de dados, a fluorescência do plano de fundo não é consistente durante os ciclos antes que a amplificação inicie. Nestes casos, pode ser necessário tirar a seleção de normalização dinâmica do tubo clicando em “Dynamic Tube”, pois poderia resultar em quantificação menos precisa.

Correção de declive de ruído

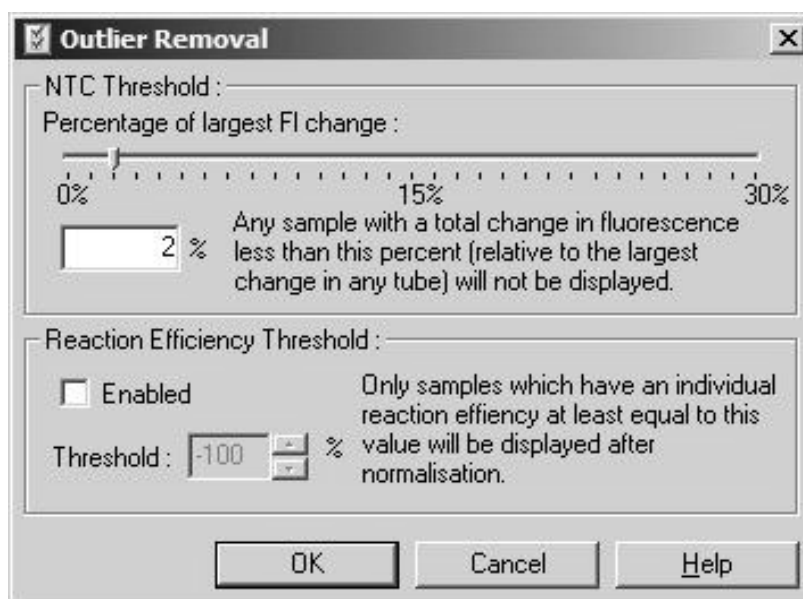
A fluorescência (FI) do plano de fundo de uma amostra deveria idealmente permanecer constante antes da amplificação. Entretanto, às vezes a FI mostra um aumento ou diminuição gradual sobre vários ciclos devido à química usada. Isto produz um nível de ruído enviesado. Correção de desvio de ruído usa uma linha de melhor adaptação para determinar o nível de ruído ao invés de uma média e normaliza para aquela linha. Selecionar esta opção clicando no botão “Slope correct” pode melhorar os dados de réplicas se as bases da amostra estiverem notavelmente declinadas. Correção de declive de ruído melhora os dados quando o plano de fundo de dados brutos são observados de declinam para cima ou para baixo antes do ponto de partida (Ct).

Ignorar primeiro

O sinal de fluorescência dos primeiros poucos ciclos em uma execução podem não ser representativos do resto da execução. Por esta razão, melhores resultados podem ser alcançados se os primeiros poucos ciclos forem ignorados. Até 10 ciclos podem ser ignorados. Entretanto, se os primeiros ciclos parecerem similares aos ciclos subsequentes, melhores resultados serão alcançados ao tirar a seleção “Ignore First” porque o algoritmo de normalização terá mais dados para trabalhar.

Remoção anexada

Para distinguir entre pequenas mudanças na fluorescência e reações genuínas em nenhum controle de modelo (NTCs), duas medidas são fornecidas: “Limiar NTC” e “Limiar de eficiência de reação”. O “Limiar NTC” é recomendado para a maioria das aplicações. A abordagem usada deve ser validada.



Limiar NTC

Isto permite que amostras ou NTCs que tenham uma ligeira direção para cima sejam excluídas da análise. Todas as amostras com uma mudança abaixo do “Limiar NTC” não serão relatadas. A porcentagem é relativa à maior mudança máxima encontrada em qualquer tubo. Por exemplo, se uma amostra começou com um plano de fundo de 2 FI e aumentado para 47 FI, então 45 FI representa 100%. Um “limiar NTC” de 10% consideraria qualquer

amostra menor que 4.5 FI como ruído.

Limiar de eficiência da reação O “Limiar de eficiência da reação” é um método alternativo de ruído excluído da análise. Este algoritmo normalizado utiliza as técnicas de estimativa de eficiência de reação usada em quantificação comparativa (veja a seção 7.6.6). Todas as amostras que não tenham uma eficiência de reação de pelo menos este nível são excluídas. Um nível de 0% indica que, durante a fase exponencial, nenhuma reação ocorreu. 100% indica que uma eficiência de reação completa ocorreu durante a fase exponencial. Porcentagens negativas indicam que durante a fase exponencial, o sinal fluorescente caiu.

Pesquisa atual não é conclusiva nos níveis precisos de eficiência necessária para distinguir reações genuínas de contaminação e outros efeitos. Por esta razão, recomendamos que use esta característica conservadoramente, com a suposição de qualquer amostra com uma reação genuína terão algumas fases exponenciais visíveis com algum aumento em fluorescência. Ajustar este valor para mais de 0% excluirá algumas amostras com ineficientes, mas perceptíveis aumentos em fluorescência, ao passo que ajustar para menos de 0% mostra amostras que diminuem a fluorescência durante a fase exponencial, que deveriam claramente ser excluídas.

Nota: Se um valor for excluído devido a ativação de qualquer dessas técnicas, o valor Ct na janela “Quantitation Results” será rotulada para indicar a exclusão. Na imagem abaixo, as amostras 19, 20 e 22 foram excluídas devido ao “Limiar de Eficiência da reação”.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop
19	3d	Unknown	NEG (R.Eff)	
20	3e	Unknown	NEG (R.Eff)	
22	4a	Standard	NEG (R.Eff)	50.
23	4b	Standard	33.03	50.

Declive, amplificação, eficiência da reação

O declive (M) de uma reação (mostrada na janela “Standard Curve”, pode ser usada para determinar a amplificação exponencial e eficiência de uma reação usando os cálculos seguintes:

Amplificação exponencial = $10^{(-1/M)}$

Eficiência da reação = $[10^{(-1/M)}]-1$

Valores ideais para M , amplificação exponencial, e eficiência da reação são -3.322, 2, e 1, respectivamente. A eficiência da reação é mostrada no relatório (em relatórios completos e padrão) e na janela “Standard Curve”.

O declive é calculado como a mudança em Ct dividido pela mudança na saída de log (e.g., número de cópias). Uma amplificação eficiente de 100% significa o dobro do produto de amplificação em cada ciclo resultando em um volume M de -3.322, um fator de amplificação de 2, e uma eficiência de reação de 1.

Dado um valor M de -3.322, os cálculos são com se seguem:

Amplificação exponencial = $10^{(-1/3.322)} = 2$

Eficiência da reação = $[10^{(-1/3.322)}]-1 = 1$

Como um exemplo alternativo: um valor M de 3.8 significa que a reação possui uma amplificação exponencial de aproximadamente 1.83 e uma eficiência de reação de 0.83 (ou 83%).

Compensação

Em uma fórmula descrevendo a relação entre 2 variáveis, a compensação é expressada com a letra B ($y = Mx + B$). A compensação às vezes também é referida como a interceptação.

B representa o Ct para uma determinada concentração de 1 unidade. Ao substituir 1 na fórmula de concentração como mostrado abaixo:

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

$$C_t = 0 * M + B$$

O resultado é $C_t = B$

A interceptação pode mudar de execução para execução e é uma medida menos estável do que a gradual. Por esta razão, a gradual é analisada mais frequentemente do que a interceptação.

Janela principal

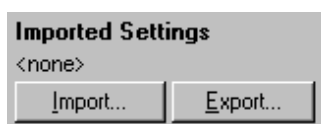
A janela principal mostra os lotes de amplificação em uma escala de log.

Clicar em “Linear Scale” na parte de baixo da janela muda a escala da escala de log para a escala linear e vice-versa. Trocar entre essas escalas apenas altera a mostra dos gráficos, não os cálculos.. Isto pode ser verificado pelo uso da ferramenta indicador de alfinete, clicando com o botão direito no gráfico e selecionando “Show pinpointer”. Usando uma escala de log, menores valores são mais visíveis no gráfico ao passo que uma escala linear facilita a visão da reação inteira.

Nota: Os lotes de amplificação atualizam automaticamente em tempo real assim que o Rotor Gene Q estiver ativamente adquirindo dados durante a execução. Este monitoramento em tempo real de dados permite ao usuário a ver resultados assim que as curvas mostrarem crescimento exponencial. Conclusões preliminares podem ser desenhadas e decisões feitas para a próxima execução.

Análise de quantificação de modelos

Análise de quantificação de modelos permite ao usuário exportar configurações de normalização e limiar em um único arquivo *.qut. Este arquivo pode ser importado e reaplicado em outros experimentos. Veja a seção 8.1 para mais detalhes.



7.6.3 Duas curvas padrão

Análise relativa de expressão de gene usando um gene normalizado pode ser realizada usando 2 métodos de curva padrão.

O método requer uma curva padrão para cada gene. A concentração para cada gene é quantificada de acordo com sua curva padrão. A expressão do gene de interesse é então normalizada com o gene normalizado (normalmente um gene de casa).

É importante que os padrões e réplicas de amostras sejam designadas corretamente durante a configuração da amostra (veja a seção 6.1.4). Em particular, amostras correspondentes devem possuir o mesmo nome em cada análise. Em uma reação múltipla, onde a posição dos tubos do gene de interesse e o gene normalizado são os mesmos, um conjunto de definições de amostras é suficiente. Se realizar análise relativa com um gene normalizado usando um único canal (i.e., reações são executadas em tubos separados usando o mesmo fluóforo), então 2 páginas de amostras devem ser criadas. A primeira deveria rotular as posições do tubo com nomes de amostras para o gene de interesse, com as outras posições deixadas sem nome. A segunda deve rotular as posições usadas para o gene normalizado. O software irá então combinar amostras através das 2 análises baseada em seus nomes.

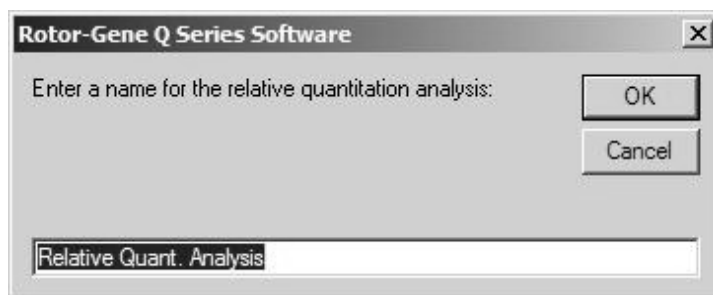
Análise de expressão usando o método de duas curvas padrão

Dados podem primeiro ser analisadas para cada gene usando análise de quantificação. Caso contrário, os resultados para cada gene serão automaticamente determinados usando a ferramenta “Autofind Threshold”.

1. Da janela “Analysis”, selecione a etiqueta “2 std Curve (Rel.)”. Clique em “New analysis...”.



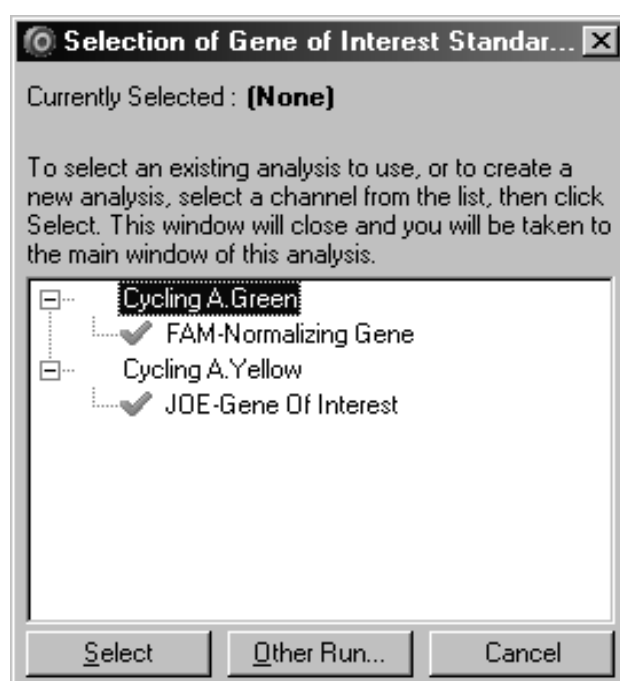
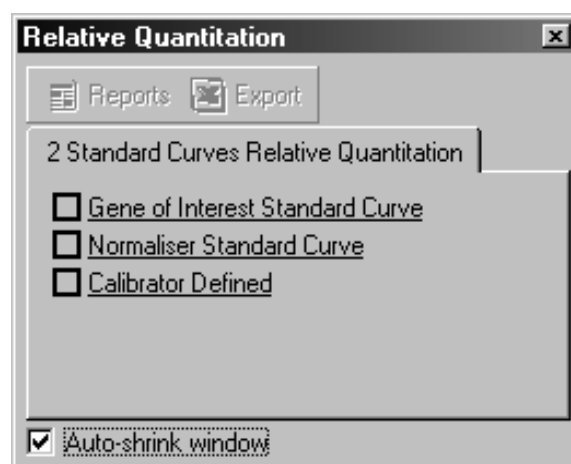
2. Entre com um nome para a análise.



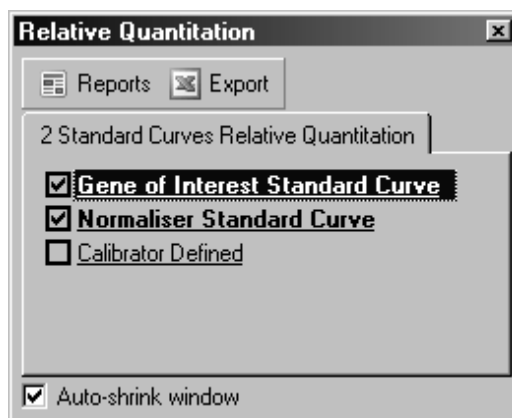
3. Designe as páginas usadas para normalizar análise de genes e análise de genes de interesse. Por exemplo, clicar em “Gene of Interest Standard Curve” traz a janela “Selection of Gene of Interest Standard...”. Selecione a página onde o gene de interesse foi quantificado.

Repita o procedimento para o gene normalizado.

Opcionalmente, um calibrador pode ser definido. Se esta opção for selecionada, ao calibrador é designado um valor de 1 e todas as outras concentrações de amostra são calculadas relativas a esta amostra.

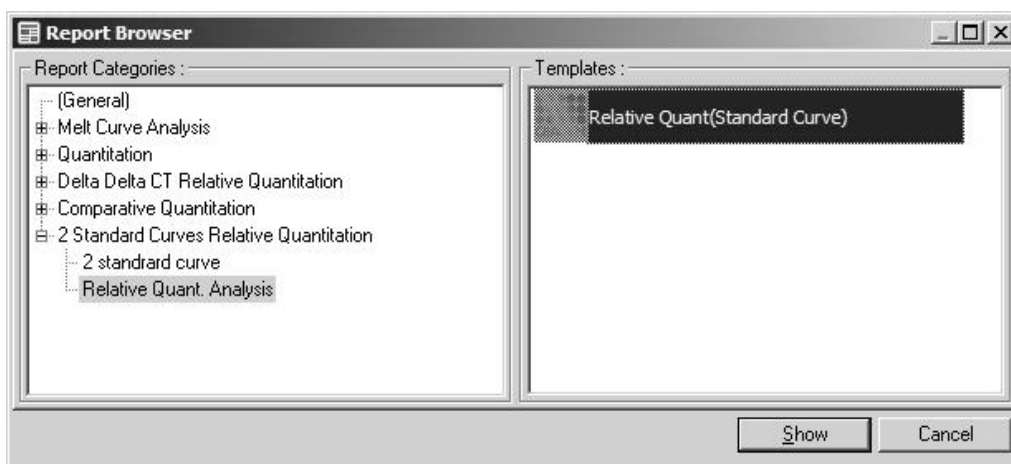


Depois de completar as seleções, as opções serão marcadas com uma marcação como mostrado abaixo.

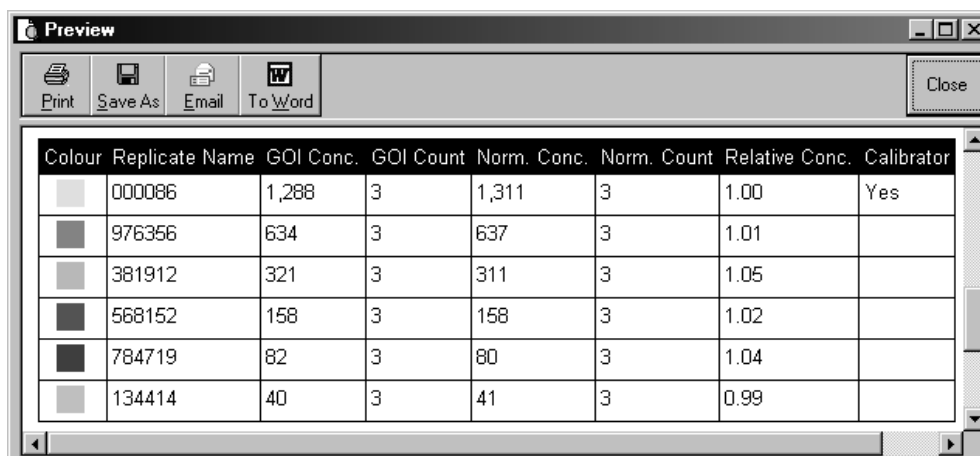


4. Clique no botão “Reports” para mostrar “Report Browser”. Selecione a análise com o nome correto na lista. Clique no botão “Show” para mostrar o relatório de quantificação relativa. A opção “Export” exporta os resultados para uma nova folha do Excel. Se um calibrador estiver incluído, os resultados são calculados relativo à amostra do calibrador, a qual é designado um valor de 1.

5.



6. As concentrações como lidas das curvas padrão para o gene de interesse (GOI Conc.) e o gene normalizado (Nom. Conc.), assim como a concentração relativa (Relative Conc.) são mostradas. Os resultados podem ser salvos como um arquivo de Word.



Colour	Replicate Name	GOI Conc.	GOI Count	Norm. Conc.	Norm. Count	Relative Conc.	Calibrator
	000086	1,288	3	1,311	3	1.00	Yes
	976356	634	3	637	3	1.01	
	381912	321	3	311	3	1.05	
	568152	158	3	158	3	1.02	
	784719	82	3	80	3	1.04	
	134414	40	3	41	3	0.99	

7.6.4 Quantificação relativa Delta delta Ct

O método Delta delta Ct permite análise relativa de expressão de gene. É descrito por Livak e Schmittgen (2001)*.

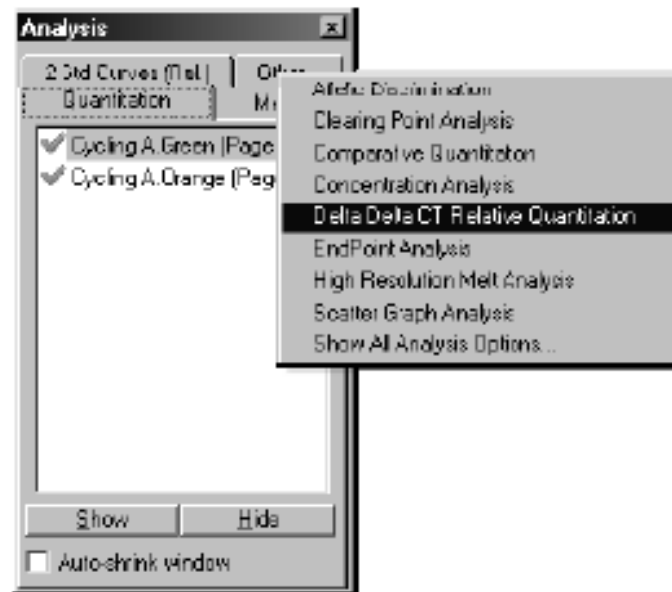
Este método não requer curva padrão para ser incluída em cada execução. Cada amostra é primeiro normalizada para o montante de modelos adicionados por comparação com o gene a ser normalizado. Estes valores normalizados são mais normalizados relativo a um tratamento calibrador. O calibrador poderia ser, por exemplo, de tipo selvagem, de controle não tratado, ou de amostra de tempo zero.

É essencial que as eficiências de amplificação do gene de interesse e do gene a normalizar sejam idênticos e que é validado de acordo com as linhas gerais de Livak e Schmittgen.

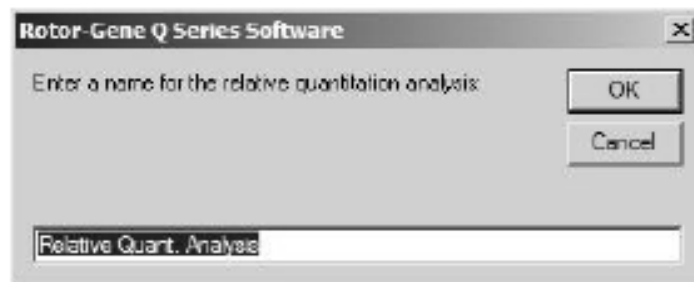
É essencial que os nomes das amostras sejam definidos corretamente na janela "Edit Samples", com as mesmas amostras rotuladas idênticamente em cada análise de quantificação de compostos.

1. Analise os dados usando "Quantitation". Não é necessário executar uma curva padrão, uma vez que a validação tenha sido realizada.
2. Da etiqueta "Other" na janela "Analysis", selecione "Delta Delta Ct Relative Quantitation". Selecione "New Analysis".

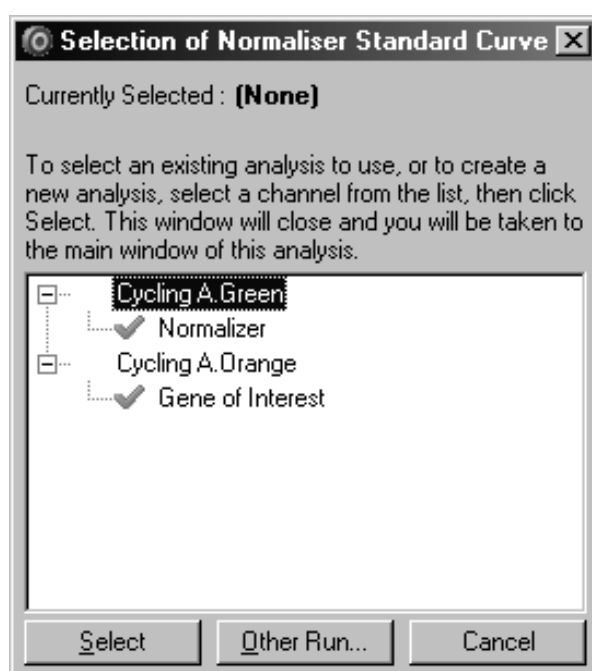
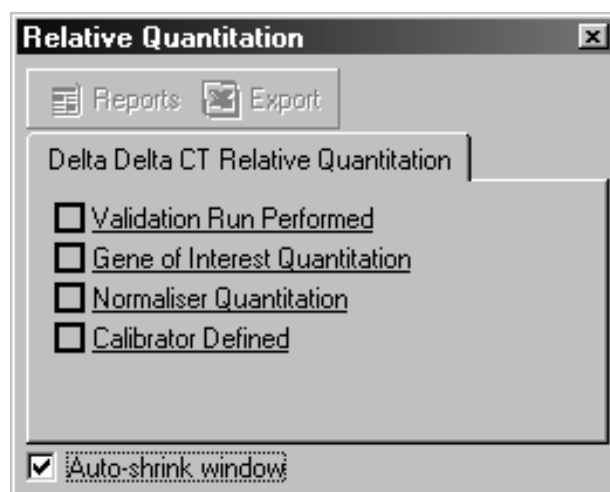
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. Methods 25, 402.



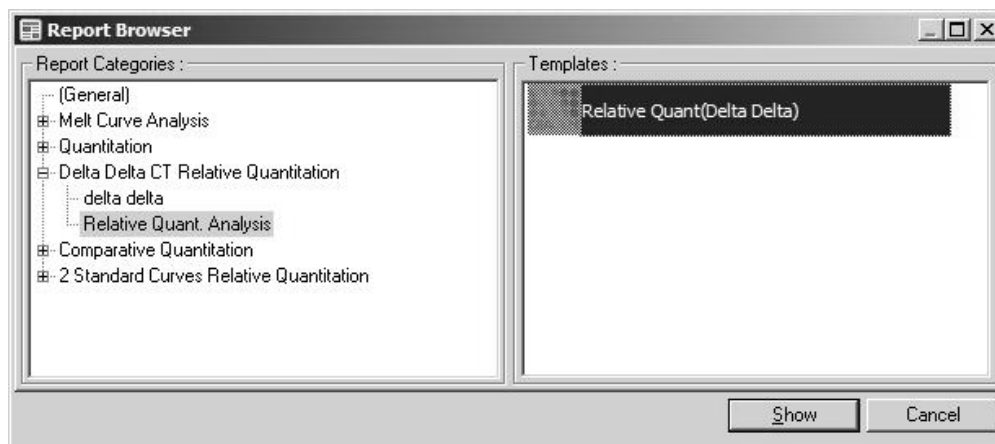
3. Entre com um nome para a análise.



4. “Validação de execução realizada” deve ser verificada para proceder com a análise. Defina as páginas onde o gene de interesse e o gene normalizado tenham sido analisados.



5. Clique no botão “Reports” para mostrar “Report Browser”. Selecione a análise com o nome correto na lista. Clique no botão “Show” para mostrar o relatório de quantificação relativa. A opção “Export” exporta os resultados para uma nova folha do Excel. Se um calibrador estiver incluído, os resultados são relativos à amostra do calibrador, que possui um valor de 1.



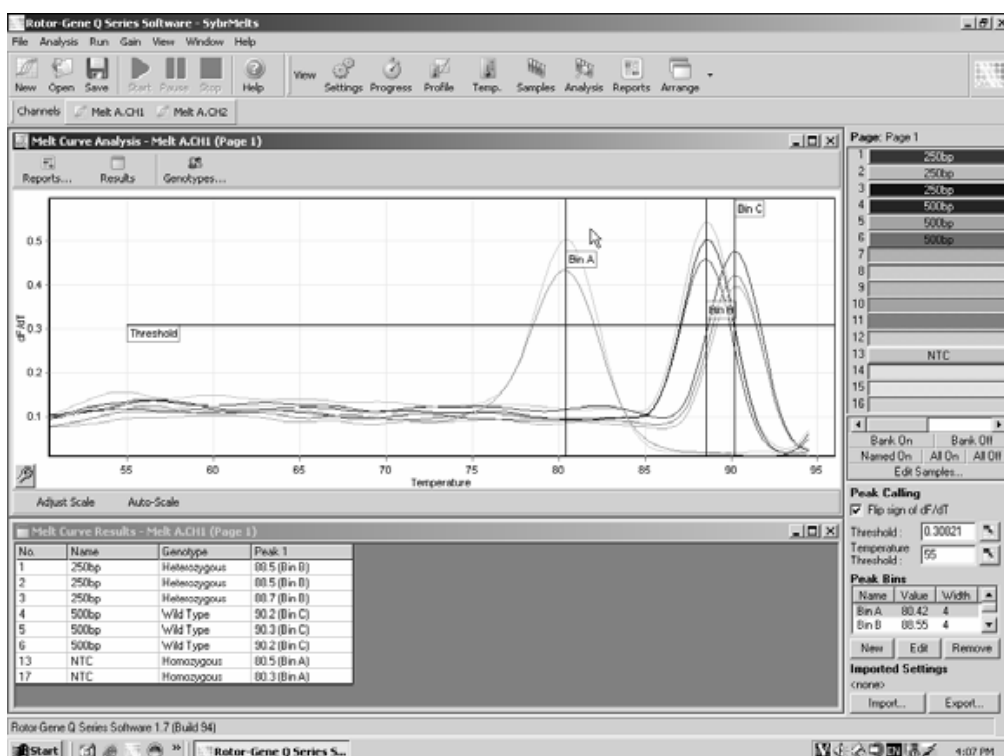
Um exemplo de resultados desta análise é mostrado abaixo. Os valores Ct para o gene de interesse (GOI CT), valores Ct para o gene normalizado (Norm. CT), Delta Ct, Delta Delta Ct, e concentração relativa (Relative Conc.) são mostrados. A expressão pe relativa à amostra de calibrador, ao qual é designado uma expressão relativa de 1.

Colour	Replicate Name	GOI CT	GOI Count	Norm. CT	Norm. Count	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Calibrator
	000086	22.19	3	19.51	3	2.68	0.00	1.00	Yes
	976356	23.28	3	20.55	3	2.72	0.04	0.97	
	381912	24.30	3	21.56	3	2.74	0.06	0.96	
	568152	25.25	3	22.61	3	2.64	-0.04	1.03	
	784719	26.27	3	23.58	3	2.69	0.01	0.99	
	134414	27.31	3	24.66	3	2.65	-0.03	1.02	

7.6.5 Análise de curva de fusão

Análise de curva de fusão analisa os derivados dos dados brutos após o alisamento. Esta análise geralmente é usada para genotipagem e discriminação aléica. Picos nas curvas são agrupados em silos, e todos os picos abaixo do limiar são descartados. Os silos podem ser mapeados para genótipos usando o comando “Genotypes”.

Depois que a execução tiver terminado, para algumas químicas uma etapa de fusão pode ser adicionada para visualizar a dissociação cinética dos produtos amplificados. A temperatura é aumentada em um grau linear e a fluorescência de cada amostra é gravada. Uma análise típica de curva de fusão é mostrada abaixo.



Peak Calling

☒ Flip sign of dF/dT

Threshold : 0.30821

Temperature Threshold : 55

Peak Bins


Name	Value	Width
Bin A	80.42	4
Bin B	88.55	4

New Edit Remove


Imported Settings

<none>

Import... Export...

Sinal de flip de dF/dT	Antes de definir picos, assegure-se de que os sinais dF/dT estejam corretos para o conjunto de dados para dar dar picos positivos.
Definir picos	<p>Em análise de curva de fusão, picos podem ser definidos e relatados usando diferentes métodos. Um é automaticamente ligar todos os picos para cada amostra. O outro é designar picos aos silos, que é útil para genotipagem.</p> <p>Silos definem a área onde os picos são esperados a ocorrer. O software de análise de curva de fusão aglomera picos em grupos de silos, baseado em valores reais de picos na curva. Silos podem ser editados se necessário.</p> <p>Qualquer pico que esteja dentro do alcance definido do silo será designado ao silo. Se existirem dois silos próximos o pico será designado ao silo mais próximo.</p> <p>Nota: Os silos não devem ser posicionados visualmente para estimar posições de pico. Ajuste os silos na área aproximada de interesse, então use os valores reais relatados na tabela de resultados para um resultado mais preciso.</p>
Silos de picos	Para definir um silo, clique no botão “New Bin”, depois clique e segure no gráfico para definir o centro do silo. Para adicionar outro silo, repita o processo. Use o botão “Remove” para deletar silos.
Limiar	Para ajustar o limiar (eixo y), clique no ícone  , depois clique e segure no gráfico e arraste a linha limiar para o nível desejado.

Limiar da temperatura

Para ajustar um limiar de temperatura (eixo x), clique no ícone , então clique e segure no gráfico e arraste a linha de limiar para a direita. Isto elimina a linha de limiar para as temperaturas mais baixas.

Nota: Isto é útil quando existe um ruído no sinal em temperaturas baixas.

Relatórios

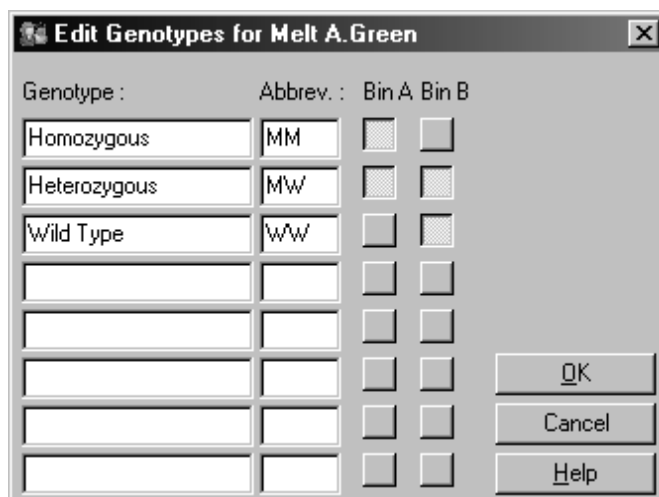
Este abre o “Report Browser” onde um relatório pode ser escolhido para visualização. Um relatório pode ser gerado baseado no canal atualmente selecionado, ou um relatório de multicanais de genotipagem pode ser gerado.

Resultados

Este mostra a janela “Melt Curve Results” que mostra picos de amostras.

Genótipos

Clique em “Genotypes...” e selecione os genótipos, como mostrado abaixo.



Esta janela permite que genótipos sejam designados para a incidência de picos em silos. A configuração de genótipo padrão é mostrada na tela, com amostras heterozigotas tendo 2 picos, amostras homozigotas um pico no primeiro silo, e tipos de amostras silvestres um pico no segundo silo. Uma abreviação pode ser digitada no campo próximo do nome de cada genótipo. Isto é usado ao imprimir relatórios de multicanais de genotipagem, para que todos os resultados de múltiplos canais possam ser facilmente lidos.

Para análises múltiplas, genótipos devem ser ajustados em cada canal. Se, por exemplo, uma análise de canal duplo extinto FRET for executada, onde um tipo silvestre e genotipagem heterozigotas são esperadas em cada canal, os parâmetros dos silos devem ser ajustados para cada canal. Os resultados serão dados em um relatório múltiplo.

Modelos de análise de fusão

Modelos de análise de fusão permite ao usuário exportar normalização, limiar, genótipo, e configurações de silos em um único arquivo *.met. Este arquivo pode ser importado e reaplicado em outros experimentos. Veja a seção 8.1 para mais detalhes.



7.6.6 Quantificação comparativa

Quantificação comparativa compara a expressão relativa de amostras para uma amostra de controle em uma execução quando uma curva padrão não estiver disponível. Isto é frequentemente usado análise de microordem. Warton e coworkers (2004)* fornece um exemplo desta técnica.

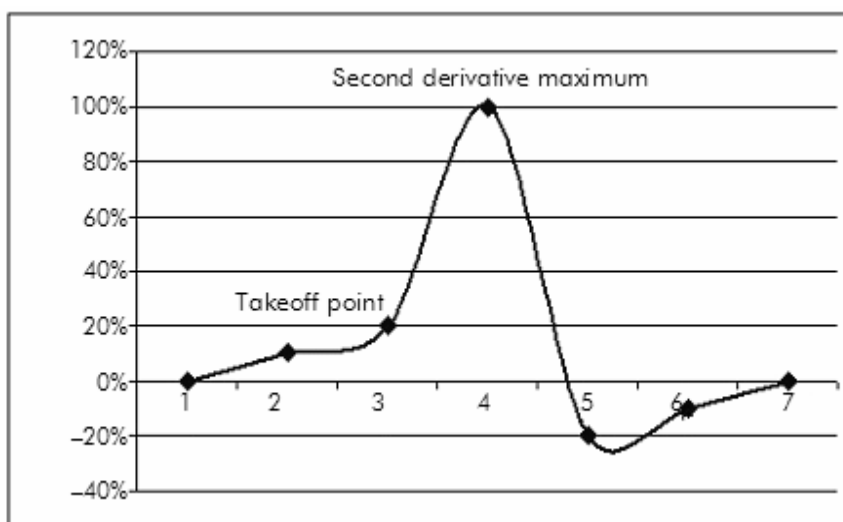
1. Para realizar a análise, selecione “Other” e depois “Comparative Quantitation” na janela “Analysis”. Clique duas vezes no canal para analisar.

* Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A., and Stanley, K.K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* 342, 85.

2. Escolha uma amostra de controle usando o menu no lado da mão direita da tela abaixo do alternador.
3. Os resultados são automaticamente calculados e mostrados na janela “Comparative Quantitation Results” abaixo do gráfico.

A primeira coluna da janela “Comparative Quantitation Results” mostra o número da amostra e nome. A coluna “Takeoff” dá o ponto de partida da amostra. A segunda derivativa do lote de amplificação que produz picos correspondentes ao grau máximo de fluorescência aumentam na reação. O ponto de partida é definido como o ciclo em que a segunda derivativa está a 20% do nível máximo, e indica o fim do ruído e a transição para a fase exponencial.

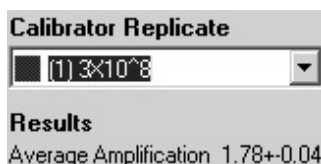
Este gráfico mostra uma segunda derivativa de um lote de amplificação, mostrando as posições relativas do segundo pico derivativo e do ponto de partida.



A coluna “Amplification” fornece a eficiência da amostra. Uma reação 100% eficiente resultaria em um valor de amplificação de 2 para cada amostra, o que significa que a amplificação dobrou em todo ciclo. No dado bruto, o sinal deve dobrar na fase exponencial. Por exemplo, se o sinal for de 50 unidades de fluorescência ao ciclo de 12 e então 51 unidades de fluorescência ao ciclo de 13, deve aumentar para 53 unidades de fluorescência ao ciclo de 14. Todos os valores de amplificação para cada amostra são medidos para produzir o valor de amplificação que é mostrado à direita da tela, abaixo do alternador. Quanto maior a variação entre os valores estimados de amplificação de cada amostra, maior o intervalo de confiança será (indicado pelo valor depois do sinal +/-). O intervalo de confiança, para um número grande de amostra (N), dá uma probabilidade de 68.3% que a verdadeira amplificação da amostra está nesta extensão (1 desvio padrão). Ao dobrar o intervalo +/-, um intervalo de confiança de 95.4% para um grande N é alcançado.

Réplica do calibrador

Assim como no método delta delta Ct uma amostra de calibrador é requisitada e as medidas são relativas a esta amostra do calibrador. Réplicas do calibrador podem ser analisadas desde que, se posições múltiplas de amostras, tenham o mesmo nome, a média dos pontos de partida dessas amostras serão usadas. Para usar esta característica corretamente, certifique-se que réplicas tenham nomes idênticos.



A amplificação média é usada para calcular expressão. Por exemplo, uma amostra com um valor baixo de amplificação demorará mais para alcançar um certo número de cópias absolutas do que uma amostra com um valor de amplificação mais alto. A coluna “Rep. Conc.” da janela “Comparative Quantitation Results” fornece a concentração relativa. A concentração relativa de cada amostra comparada com a amostra do calibrador é calculada baseado no ponto de partida e na eficiência da reação. Isso é expresso em notas científicas.

Nota: O valor mostrado em “Average Amplification” à direita do +/- representa o desvio padrão da média de amplificação, após a remoção dos valores anexos de amplificação. Se este valor for grande, então poderá haver um grande erro total nos valores de concentração calculados.

Concentrações relativas são calculadas pelo software como segue:

1. O ponto de partida de cada amostra é calculado ao olhar para os segundos picos derivativos.
2. A média aumenta em dados brutos de 4 ciclos depois que o ponto de partida é calculado. Este é o valor de amplificação da amostra.
3. Anexos de amplificação são removidos para considerar o ruído na fluorescência do plano de fundo.
4. Tiram-se as médias das amplificações restantes. Esta é a amplificação da média
5. A média do ponto de partida é calculada para cada réplica do calibrador.
6. A concentração relativa de uma amostra é calculada como $\text{Amplification}^{(\text{Calibrator takeoff} - \text{Sample takeoff})}$.

7. O resultado é mostrado em nota científica na coluna “Rep. Conc.” da janela “Comparative Quantitation Results”.

7.6.7 Discriminação aléica

A discriminação aléica usa dado cinético em tempo real de 2 ou mais canais para amostras de genótipo. Para realizar esta análise, selecione “Other” e depois “Alleic Discrimination” na janela “Analysis”. Ao realizar discriminação aléica não é suficiente clicar duas vezes em um canal para analisar porque esta análise é realizada usando canais múltiplos simultaneamente. Para realizar esta análise, ou segure CTRL e clique para marcar cada canal que você deseja analisar, ou arraste o ponteiro do mouse sobre estes canais. Uma vez que os canais desejados tenham sido marcados, clique em “Show”. A lista atualizará para mostrar todos os canais em uma linha, com uma marca ao lado deles. Isso indica que eles serão todos usados em uma análise. Para remover um ou mais destes canais, clique com o botão direito na análise e selecione “Remove analysis...”. Esses canais podem ser incluídos em outras análises de discriminação aléica. Um canal só pode ser usado em uma análise por vez.

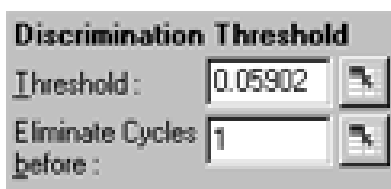
Relatórios:	Este abre o relatório “Alleic Discrimination Analysis” para visualização.
Resultados:	Este mostra a janela “Alleic Discrimination Results”. Esta janela é aberta como padrão quando a análise é primeiro mostrada.
Opções de normalização:	Uma variedade de opções estão disponíveis para otimizar a normalização de dados brutos: <ul style="list-style-type: none">▪ Tubo dinâmico (normalização do tubo

dinâmico)

- Correção de declive (correção de desvio de ruído)
- Ignorar primeiro x ciclos (correção de ruído em ciclos iniciais)

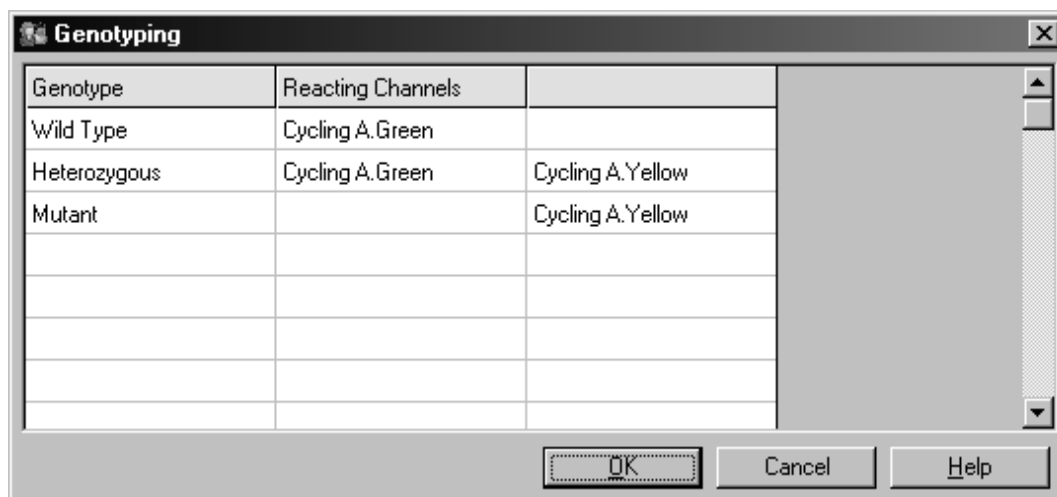
Para mais detalhes, veja a página 122.

Limiar de discriminação: Entre com valores nestas caixas de texto para posicionar o limiar de discriminação. Todas as curvas que passam por este limiar consideram-se amostras de genótipo. Clique no ícone à direita de cada caixa de texto, depois arraste o limiar no gráfico para ajustar estes valores visualmente.

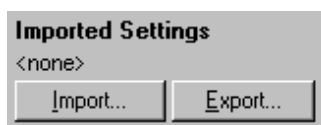


Genótipos: Este abre a janela “Genotyping”, que é usada para definir qual genótipo é detectado em cada canal. Esta janela permite que genótipos sejam designados para canais para análise de discriminação alélica.

No exemplo abaixo, uma amostra é heterozigota se as leituras nos canais de Ciclo A verde e Ciclo A amarelo cruzarem o limiar.



Modelos de análise aléica: Modelos de análise aléica permitem a configuração de exportação de normalização, limiar, e genótipo em um único arquivo *.alt. Este arquivo pode ser importado e reaplicado em outros experimentos. Veja a seção 8.1 para mais detalhes.



7.6.8 Análise do gráfico de dispersão

Análise do gráfico de dispersão permite a genotipagem baseado na expressão relativa dos lotes de amplificação através de 2 canais. Ao contrário da discriminação aléica, o genótipo é decidido baseado nas regiões definidas no gráfico de dispersão ao invés de um simples limiar. Para realizar esta análise, selecione “Other” e depois “Scatter Graph Analysis” na janela “Analysis”.

Ao realizar análise do gráfico de dispersão, não é suficiente clicar duas vezes em um canal para analisar porque esta análise é realizada usando 2 canais simultaneamente. Para realizar esta análise, ou segure SHIFT e clique para marcar os canais a analisar, ou arraste o ponteiro do mouse em cima dos canais. Uma vez que os canais desejados tenham sido marcados, clique em “Show”.

A lista atualizará para mostrar todos os canais em uma linha, com uma marca ao lado deles. Isso indica que eles serão todos usados

em uma análise. Para remover um ou mais destes canais, clique com o botão direito na análise e selecione “Remove analysis...”. Esses canais podem ser incluídos em outras análises de gráfico de dispersão. Um canal só pode ser usado em uma análise por vez.

Relatórios: Este abre o relatório “Scatter analysis” para visualização.

Resultados: Este mostra a janela “Scatter Analysis Result”. O genótipo para cada amostra é determinado pelas regiões definidas pelo usuário no gráfico de dispersão.

Opções de normalização: Uma variedade de opções estão disponíveis para otimizar a maneira em que os lotes de dados brutos são normalizados:

- Tubo dinâmico (normalização do tubo dinâmico)
- Correção de declive (correção de desvio de ruído)
- Ignorar primeiro x ciclos (correção de ruído em ciclos iniciais)

Para mais detalhes, veja a página 122.

Genótipos: Este abre a janela “Genotyping”, que é usada para definir qual genótipo é detectado em cada canal. Nesta janela genótipos podem ser designados baseado nos canais em que uma amostra reage. Os canais selecionados serão usados para rotular os cantos do gráfico de dispersão e guiará o usuário para a área geral do gráfico de dispersão em que regiões devem ser definidas.

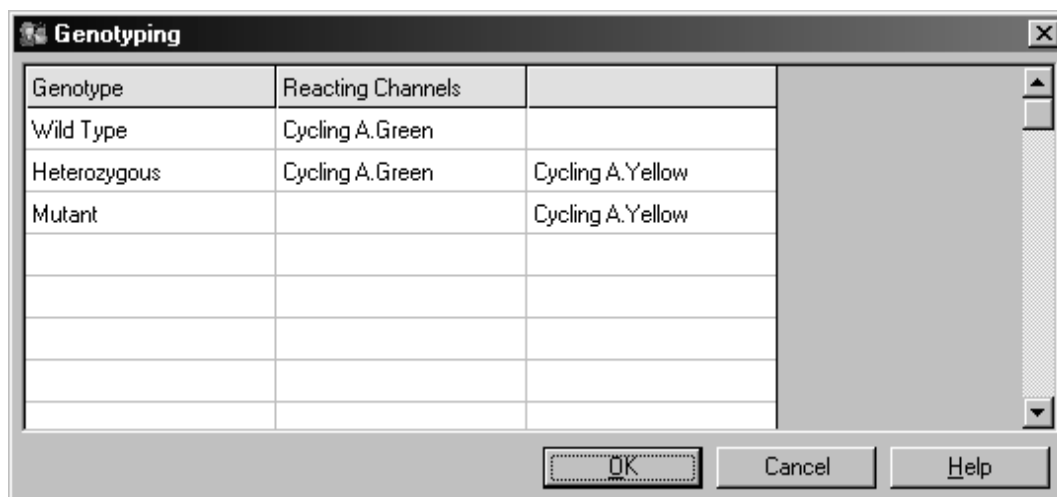
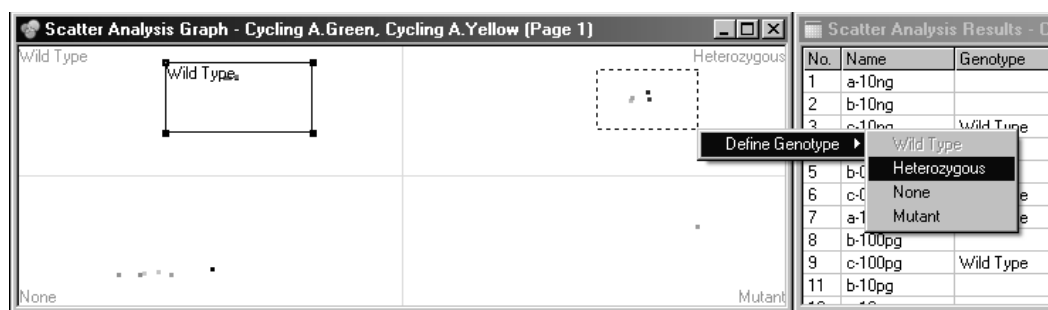


Gráfico de dispersão:

O gráfico de dispersão mostra a expressão relativa dos 2 canais selecionados. A mostra é normalizada para contar diferentes aumentos de dobras em cada canal e log transformado para acentuar as diferenças em expressão entre amostras.

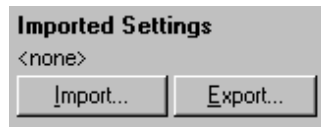
Para realizar esta genotipagem, o usuário define regiões clicando e arrastando uma seleção no gráfico. A seleção pode então ser rotulada baseado nos genótipos configurados na janela "Genotyping".



Modelos de análise de gráfico de dispersão:

Modelos de análise de gráfico de dispersão permitem que configurações de genótipos e

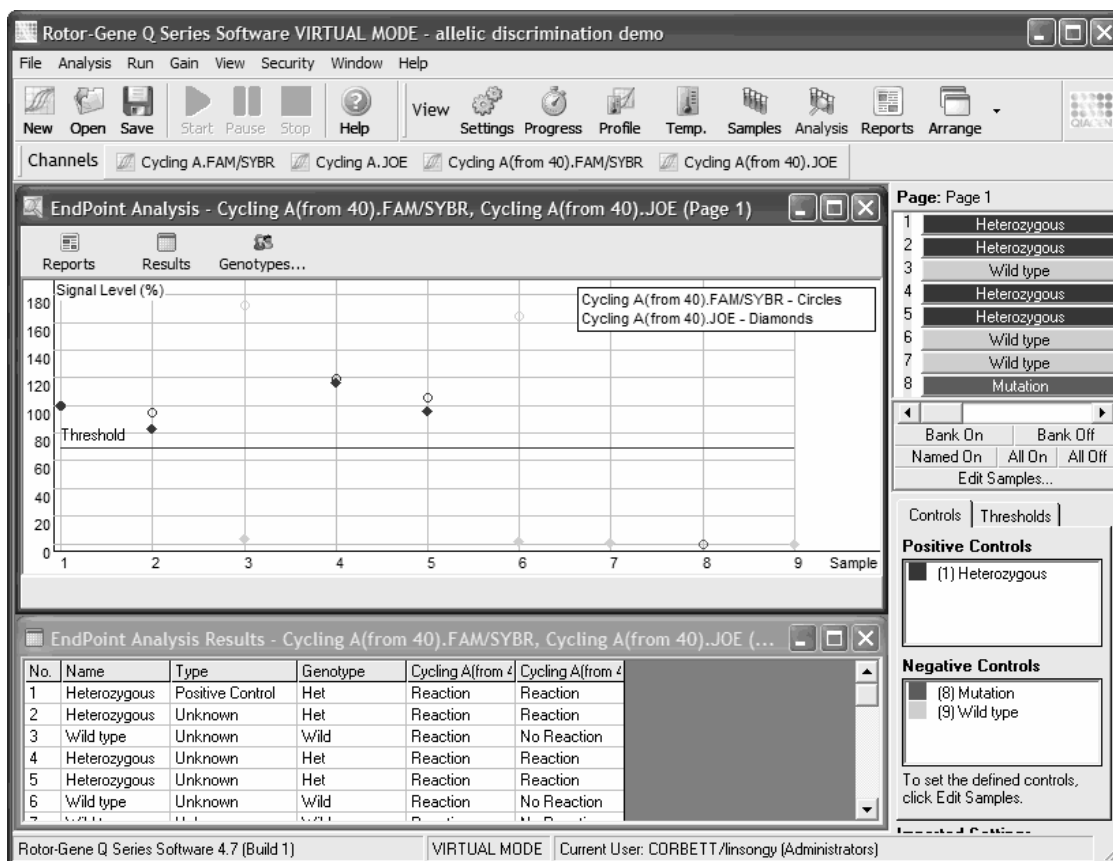
regiões sejam exportadas para um único arquivo ***.sct**. Este arquivo pode ser importado e reaplicado em outros experimentos. Veja a seção 8.1 para mais detalhes.



7.6.9 Análise de ponto final

Análise de ponto final permite discriminação entre amostras amplificadas e não amplificadas ao final da execução. Os resultados são qualitativos (positivo/negativo), não quantitativo.

Análise de ponto final é mostrada nesta tela abaixo.



Análise de ponto final é similar à discriminação alélica, em que os resultados são qualitativos, e que nomes podem ser designados para certas permutações de reações por diferentes canais. Entretanto, em análise de ponto final, apenas uma única leitura está disponível, em contraste com a discriminação alélica, que usa leitura ciclo por ciclo para cada amostra. Isso significa que o usuário deve identificar controles positivos e negativos para facilitar a análise. Para os dados brutos, os níveis de sinal são normalizados relativo aos controles positivos e negativos conhecidos para cada canal. O usuário então seleciona uma porcentagem do nível de sinal como o limiar.

Termos usados em análise de ponto final

Alguns termos usados na análise de ponto final são explicados abaixo.

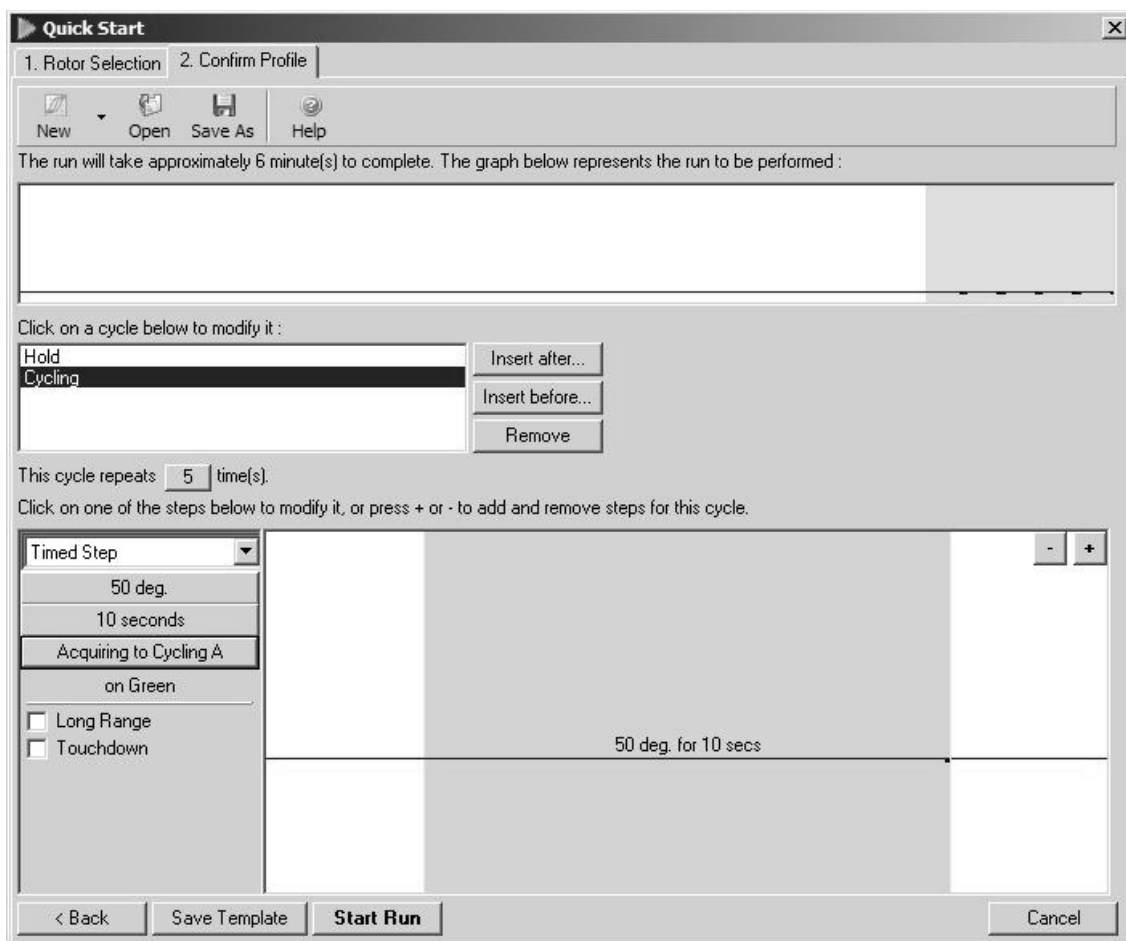
Controle positivo: Esta é uma amostra que é conhecida para amplificar.

Controle negativo: Esta é uma amostra que é conhecida para não amplificar. Este representa o sinal

típico de plano de fundo.

- Limiar:** O limiar é um nível de sinal acima do qual uma amostra se diz positiva (amplificada). Esta configuração deve ser ajustada pelo usuário antes de cada execução.
- Nível de sinal:** Uma porcentagem do sinal fluorescente normalizado para que o maior sinal dos controles positivos seja 100% e o sinal mais baixo dos controles negativos seja 0%.
- Genótipo:** Uma interpretação de diferentes permutações de reações em diferentes canais. Por exemplo, o genótipo heterozigoto poderia ser designado para amostras que reagiram em ambos os canais verde e amarelo. O genótipo pode também ser usado para relatar os resultados de reações com controle interno. Por exemplo, resultados poderiam ser relatados como “inibidos”, “positivo”, ou “negativo”, dependendo se a reação foi vista em certos canais ou não.

Configuração de perfil



Para realizar análise de ponto final, faça um perfil com uma espera à 50º C por vários minutos, então uma etapa de ciclo com uma etapa (50º C por 10 segundos), adquirindo no canal requisitado. Ajuste o número de repetições para 5, como mostrado acima. Estes tempos são apenas um guia, e podem variar para sua aplicação particular. Quanto mais repetições no perfil, mais informação disponível para realizar a análise. A análise automaticamente tirará a média de todas as leituras para atingir um valor único para cada amostra. Não há número específico de repetições requisitadas. A não ser que um nível muito alto de precisão seja requisitado, 5 reptições geralmente são suficientes.

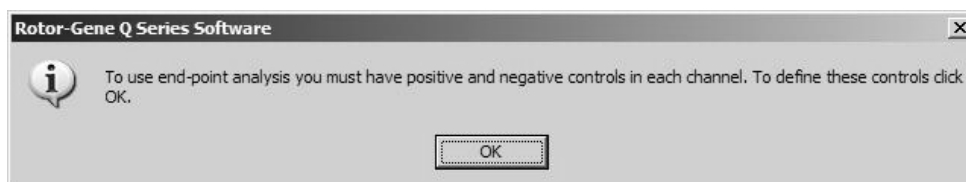
Análise

Análise de ponto final pode ser realizada em um número de canais simultaneamente. Para criar uma nova análise, clique na etiqueta “EndPoint”, selecione os canais arrastando sobre eles o ponteiro do mouse, e depois clique em “Show”.



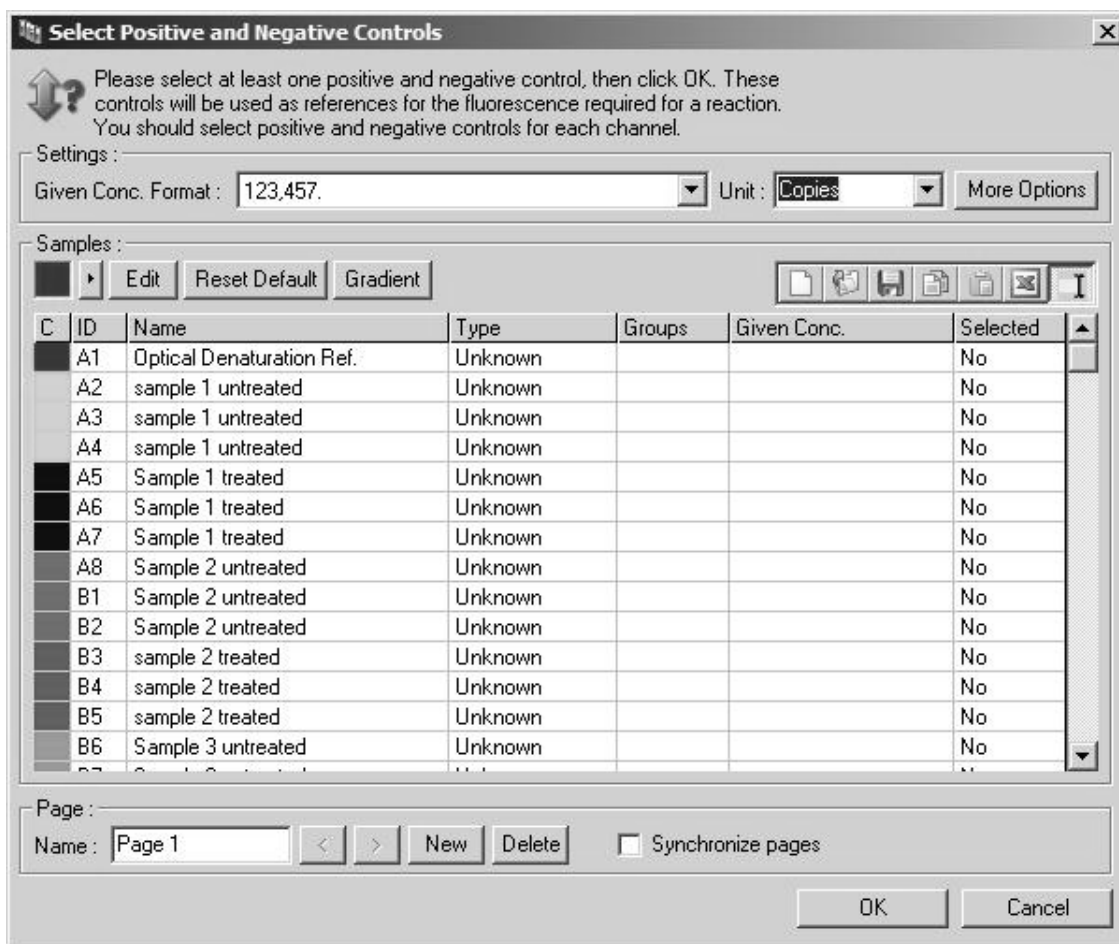
Definir controles

Quando uma análise de ponto final é aberta pela primeira vez, a seguinte mensagem será mostrada se os controles positivo e negativo não tiverem sido definidos.



Clique em “Ok”. A janela “Edit Samples” aparece. , permitindo que os controles positivo e negativo sejam definidos. Para definir uma amostra como de controle positivo ou negativo, clique na célula do tipo amostra, depois selecione o tipo de controle relevante do menu.

Nota: O controle deve ser alternado, usando o alternador no lado da mão direita da janela principal, para realizar a análise.



Esta tela funciona da mesma maneira da janela “Edit Samples” (veja a seção 6.1.4).

Normalização

Normalização de dados de análise de ponto final escala todos os níveis de sinal para um alcance de 0-100%. Pelo menos um controle positivo e um negativo devem ser selecionados, ou mais se analisar múltiplos canais e os padrões não forem múltiplos. Mais de um controle positivo e negativo devem ser executados se houver um risco de que um controle positivo possa não amplificar.

1. Para cada canal, todos os controles positivos são analisados, e o que tiver maior fluorescência é ajustado para ser 100%. Isso significa que se controles duplicados forem executados, um controle positivo pode falhar sem afetar a execução.
2. Todos os controles negativos são analisados, e o que tiver o nível de fluorescência mais baixo é ajustado para 0%.

3. Os valores brutos de fluorescência das amostras restantes são escalados relativos ao controle positivo mais alto e o controle negativo mais baixo.

- 4.

Por exemplo:

Amostra	Tipo	Fluorescência
1	Controle positivo	56.3
2	Controle positivo	53.0
3	Controle negativo	4.5
4	Controle negativo	4.3
5	Amostra	48.1
6	Amostra	6.4

Esta execução foi um sucesso, pois os 2 controles positivos e os 2 controles negativos estão próximos, e estão fora dos valores de fluorescência das amostras.

Os valores normalizados são:

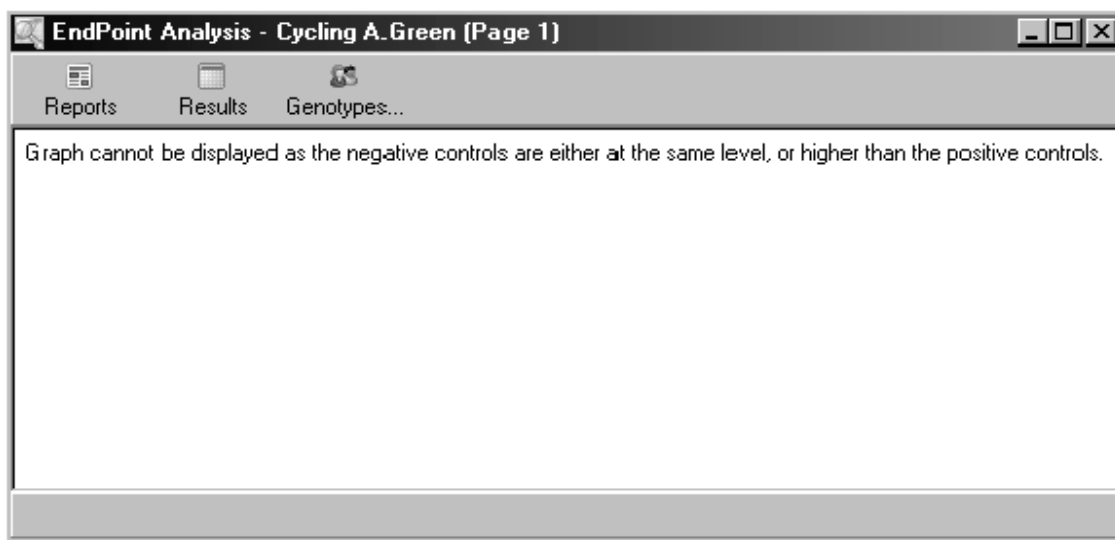
Amostra	Tipo	Expressão (%)
1	Controle positivo	100.0
2	Controle positivo	93.7
3	Controle negativo	0.4
4	Controle negativo	0.0
5	Amostra	84.2
6	Amostra	4.0

A amostra 1 foi o controle positivo com a maior fluorescência, então foi ajustado para 100%. O outro controle positivo foi ligeiramente mais baixo. Amostra 4, o controle negativo mais baixo foi ajustado para 0%. Agora é claro que a amostra 5 tenha provavelmente amplificada, considerando que a amostra 6 provavelmente não amplificou.

Nota: Dependendo dos controles positivo e negativo selecionados é possível alcançar níveis de expressão maiores de 100% ou menores de 0%. Um resultado maior que 100% pode ser interpretado para significar que a amostra é mais expressada do que os controles positivos. Um resultado menor que 0% pode ser interpretado para significar que é menos possível que a amostra

amplificou do que os controles negativos amplificados. Sendo que esta análise é qualitativa, tais resultados não preocupam.

Se os controles negativos em maior fluorescência do que os controles positivos, as amostras foram ajustadas incorretamente e a seguinte mensagem aparece.



Normalização em múltiplos canais

É possível analisar dados de sinais sobre múltiplos canais mas a configuração da amostra é mais complexa. A análise de ponto final aceita que a multiplicação é realizada e então cada tubo só pode ter uma única posição de tubo. Atualmente não é possível analisar uma configuração em que uma posição de amostra seja um controle positivo para um canal e um controle negativo para outro canal.

Apesar de apenas uma definição de amostra por posição de tubo seja dada na janela "Edit Samples", a normalização ocorre independentemente para cada canal.

Se uma posição de tubo for um controle positivo para pelo menos um canal, deve ser especificado como um controle positivo na coluna "Type" da janela "Edit Samples". Caso contrário seu tipo deveria ser "Amostra". Isso também se aplica para os controles negativos.

Por exemplo, se uma amostra for um controle positivo no canal verde, mas não no canal amarelo, a amostra ainda deve ser definida como um controle positivo. Como o maior controle positivo em cada canal é usado, se houver pelo menos um controle positivo no canal amarelo que amplifique, a definição da amostra como um controle do canal verde é ignorado.

Limiar

O limiar é usado para determinar a porcentagem de expressão necessária para uma reação em cada canal. Uma vez que os controles positivo e negativo foram definidos, todos os canais serão normalizados para a mesma escala de 0-100%. Por esta razão, apenas um limiar é necessário, mesmo ao analisar múltiplos canais.

Clique e arraste a linha limiar para uma área entre 0 e 100. O limiar não deveria ficar muito próximo a amostras de qualquer lado da linha porque isso indica que a execução não foi conclusiva. Se a diferença entre uma amostra sendo definida como amplificada ou não amplificada for apenas uma pequena porcentagem, isso significa que se a reação foi repetida, a amostra poderia aparecer do outro lado do limiar.

Genotipos

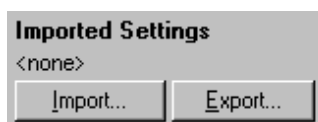
Esta opção abre a janela “Genotyping”, que é usada para definir quais genótipos são detectados em cada canal.



Esta janela permite que genótipos sejam designados para canais. No exemplo acima, uma amostra é heterozigota se as leituras nos canais de Ciclo A verde e Ciclo A amarelo cruzarem o limiar.

Modelos de análise de ponto final

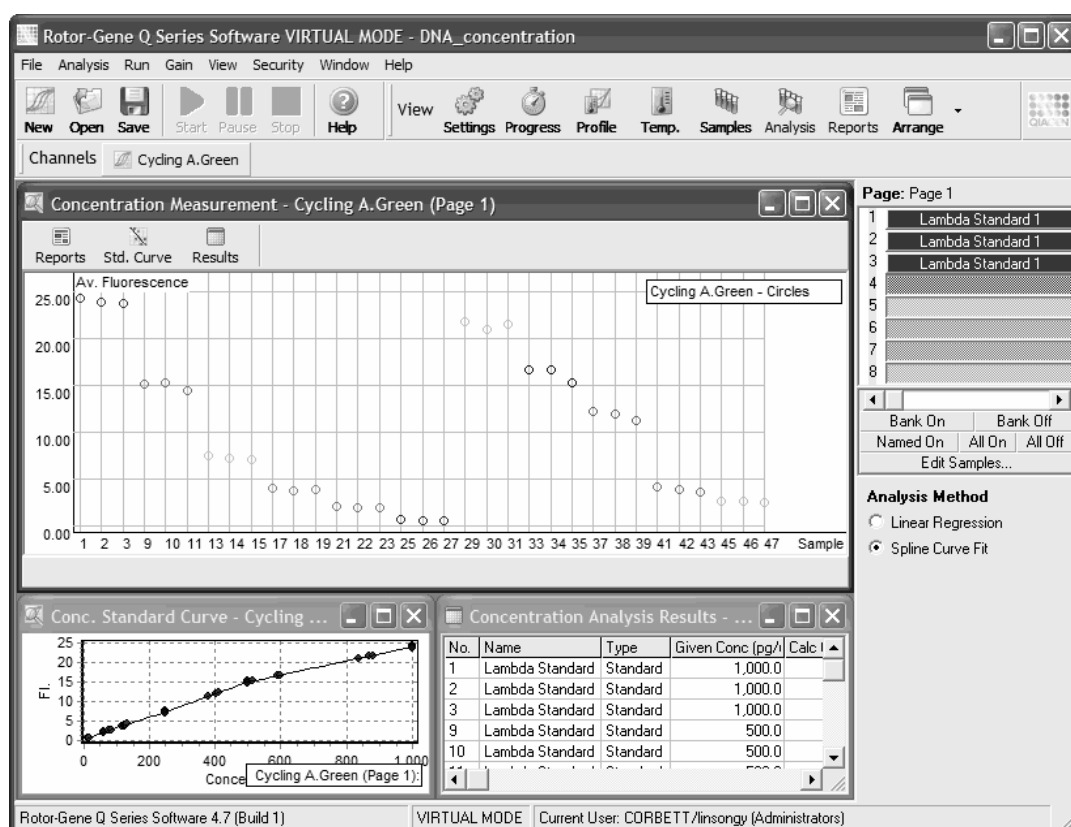
Modelos de análise de ponto final permitem ao usuário exportar configurações de genótipo e limiar para um único arquivo *.ent. Este arquivo pode ser importado e reaplicado em outros experimentos. Veja a seção 8.1 para mais detalhes.



7.6.10 Análise de concentração

Análise de concentração permite que o Rotor Gene Q seja usado para medir concentrações de DNA ou obter leituras fluorométricas.

A tela abaixo mostra esta análise.



Preparando uma execução

Para realizar análise de concentração, primeiro prepara padrões fluorescentes e amostras, idealmente triplicado.

Preparação de padrões

Uma curva padrão é usada para determinar a concentração de DNA de cada amostra medida.

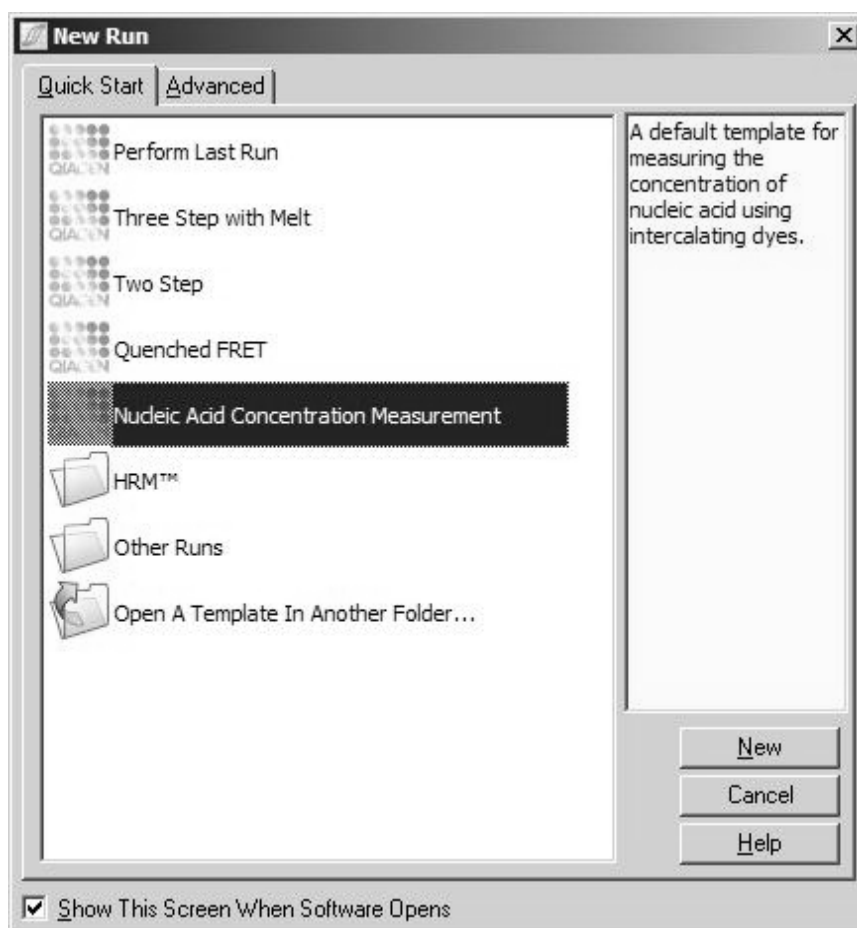
O DNA usado para a curva padrão deve ser de um tipo similar de DNA como das amostras sendo medidas. A concentração de pelo menos uma amostra de DNA deve ser determinada usando espectrofotometria ultravioleta, e esta amostra deve ser usada como a padrão. Um mínimo de 3 padrões (com réplicas) devem ser usados. É importante que padrões de DNA usados em detecção de fluorescência somente são lineares dentro de um alcance de 1-100 ng/*ul*. Dentro deste alcance, se a concentração de DNA for reduzida pela metade, a leitura de fluorescência também será. Os intervalos de confiança para qualquer concentração fora deste alcance são muito amplas devido a não linearidade da química.

Tipo de DNA medido

Diferenças foram observadas na medição de várias formas de DNA (e.g., DNA genômico comparado com DNA plasmídeo). Portanto, apenas tipos similares de DNA devem ser medidos juntos, e o uso de DNA plasmídeo como um padrão deve ser evitado ao medir DNA genômico.

Configuração da execução

Para configurar a execução, selecione “Nucleic Acid Concentration Measurement” no Quick Start Wizard (assistente).



Nota: Certifique-se de que um controle positivo, tal como um padrão de alta concentração seja executado na posição de tubo 1. Sem um controle positivo, o software não será capaz de otimizar configurações de ganho para máxima sensibilidade. Você será solicitado a fazer isso antes de cada execução.

Análise

Análise de concentração opera relacionando o nível de fluorescência ao valor de concentração. Dois modelos de análises estão disponíveis. A análise máxima para escolher depende da química e aplicação.

“Regressão linear” analisa dados assumindo uma relação linear e estimando valores desconhecidos na base de um modelo linear gerado. Determina erros de medição ao examinar o desvio de leituras de um modelo linear.

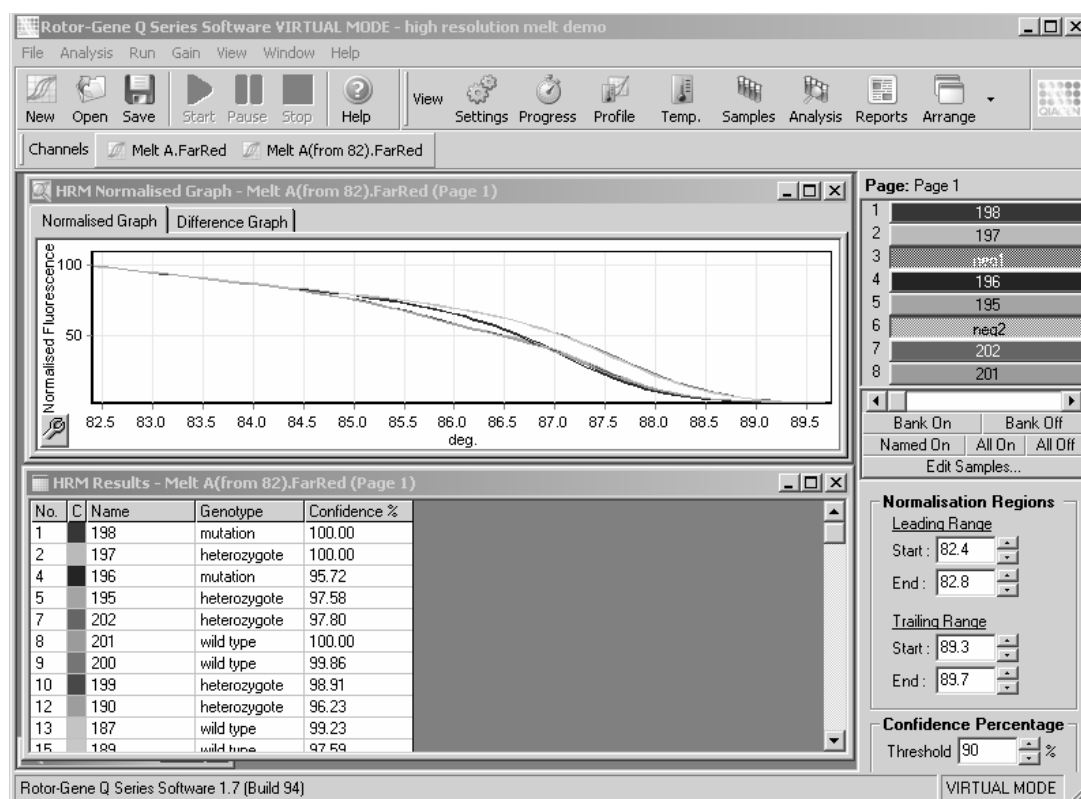
Se as leituras de concentração são lineares, esta é a análise mais adequada porque fornece análise estatística de variação (ANOVA) ao usuário.

“Spline Curve Fit” assume apenas que os valores de concentração aumentam com a fluorescência. Enquanto esta abordagem faz estimativas de dados não lineares mais precisos, não pode fornecer ANOVA, pois não assume um modelo linear.

7.6.11 Análise de fusão de alta resolução

Análise de fusão de alta resolução (HRM) caracteriza amostras baseado em sequência de comprimento, conteúdo GC, e complementaridade. Análise HRM é usada em aplicações de genotipagem, tais como análise de mutações de genes, ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e em aplicações epigenéticas para análise de status de metilação de DNA. Análise HRM fornece resultados precisos e economiza em sondas e custos de rótulos comparado com outros métodos.

Para realizar a análise, selecione “Other”, depois “High Resolution Melt Analysis” na janela “Analysis”. Clique duas vezes no canal para analisar. As curvas de fusão do canal bruto são normalizadas ao tirar a média de todos os valores iniciais e finais de fluorescência e então forçando os pontos finais de cada amostra a serem os mesmos das médias.



O chamamento automático de amostras é alcançado ao clicar em "Genotypes". Entre com o nome do genótipo, seguido pelo número da amostra, que é usado como um controle positivo para chamar amostras desconhecidas automaticamente.

The screenshot shows the "HRM Genotypes" dialog box. It contains a table with the following data:

Genotype	Control
mutation	198
wild type	201
heterozygote	197

At the bottom of the dialog box are buttons for "Clear", "OK", "Cancel", and "Help".

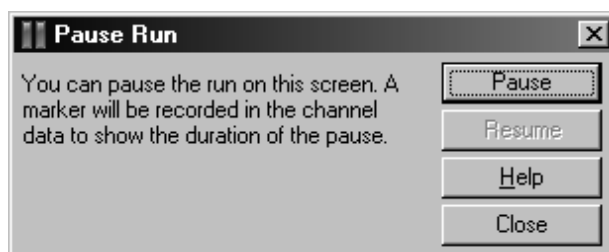
7.7 Menu Run (Executar)


7.7.1 Iniciar execução

Esta opção inicia o perfil da temperatura definida com a atual configuração de ganhos. Antes da execução iniciar a janela “Profile Run Confirmation” aparece. Uma representação gráfica do perfil da temperatura é mostrado com as configurações de ganho para cada canal.

7.7.2 Pausar execução

Esta opção permite que uma execução seja pausada e resumida. Pausar e resumir pode afetar seriamente os resultados de uma execução. Por esta razão, um marcador no dado indicará que a execução foi pausada e o comprimento da pausa. Uma mensagem também é colocada na etiqueta de mensagens da janela “Run Settings”.



<p>AVISO</p> 	<p>Superfície quente w22</p> <p>Quando pausar uma execução, o Rotor Gene Q não será resfriado completamente para temperatura ambiente. Exerça cautela ao manusear o rotor ou quaisquer tubos no instrumento.</p>
--	---

7.7.3 Parar execução

Se esta opção for selecionada uma tela aparecerá pedindo confirmação de que a execução deve ser parada.

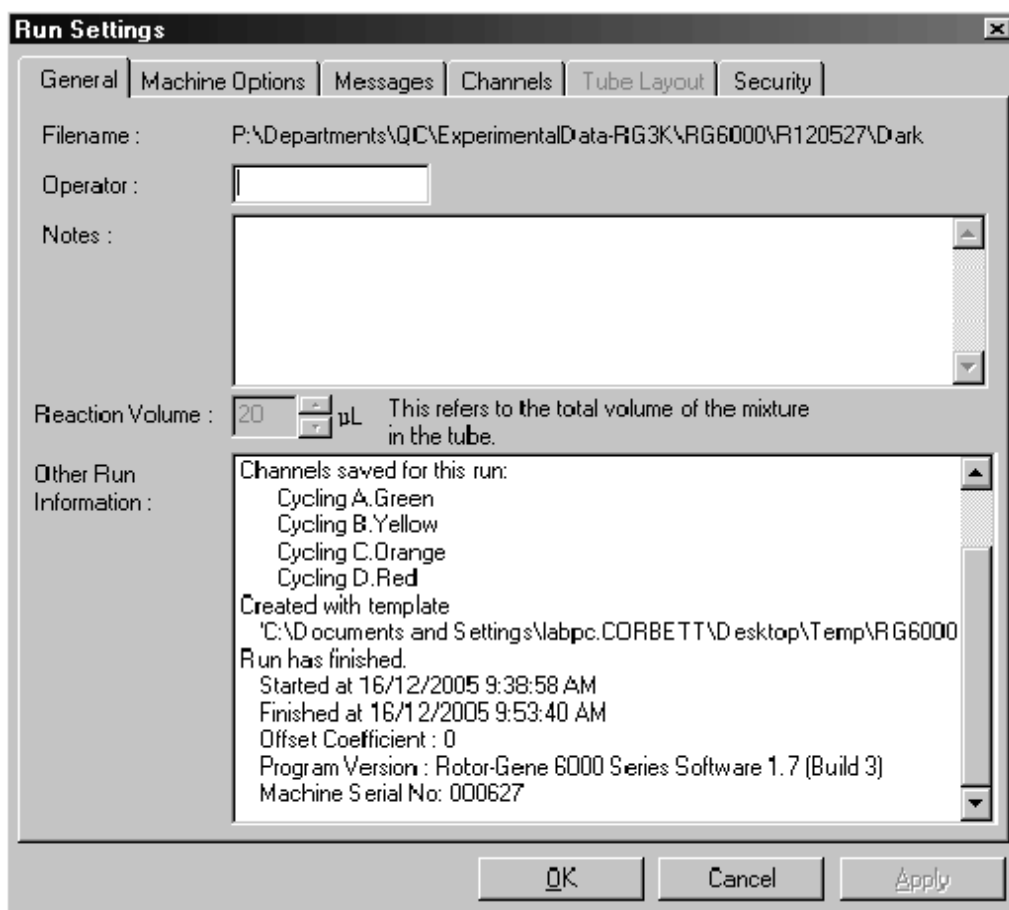
7.8 Menu View (visualização)

7.8.1 Configurações de execução

Geral

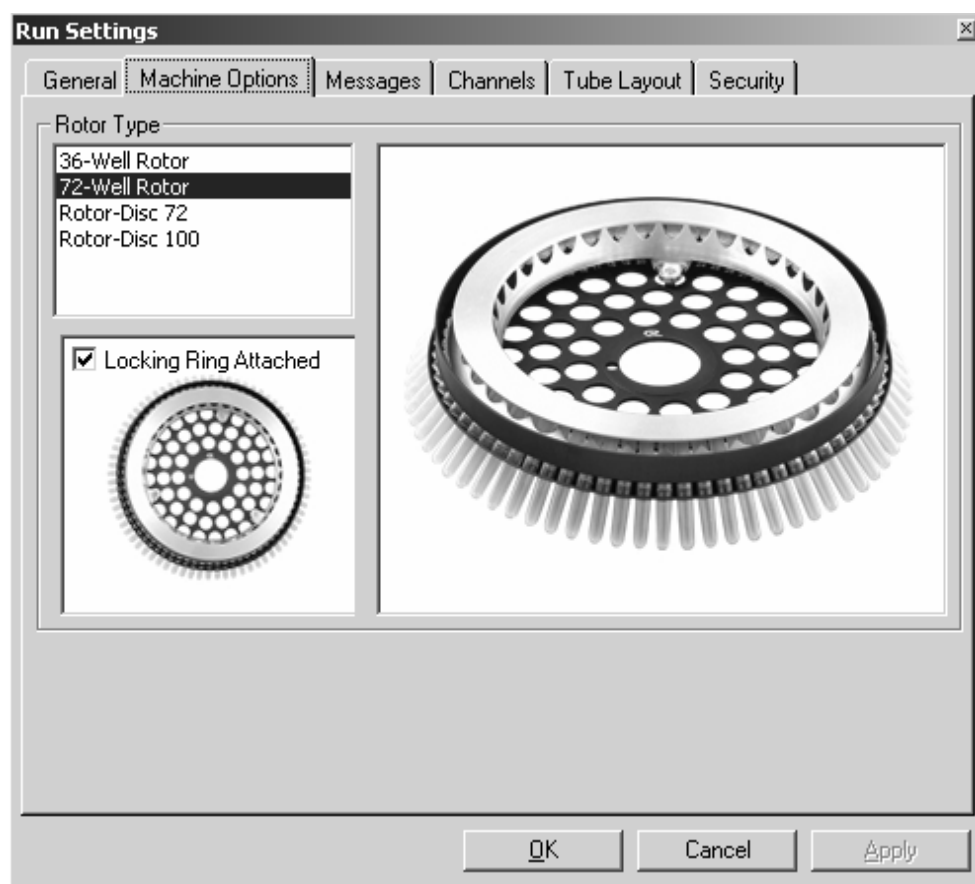
Esta janela permite a configuração das informações da execução, nome do arquivo da execução, analisar data, operador, e quaisquer notas associadas.

A janela contém todas as informações, exceto pelo perfil, requisitado para configurar uma execução. Depois que uma execução tiver terminado, a seguinte informação é mostrada nesta janela: ciclo usado, configurações de ganho, número de canais, e tempo de início e fim.



Opções da máquina

Esta etiqueta mostra ajustes para configuração do Rotor Gene Q.



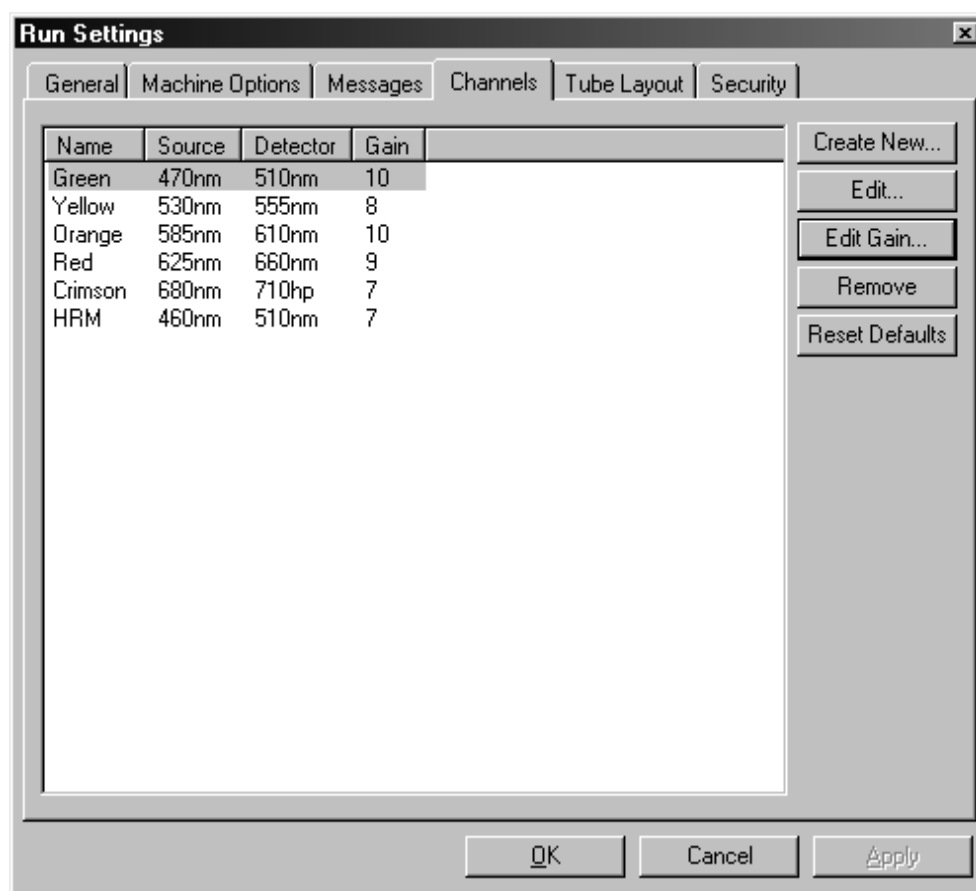
O rotor deve ser ajustado para o Rotor Gene Q atualmente instalado. Se abrir uma execução existente, este ajuste refletirá o rotor que foi instalado no ciclo neste momento.

Mensagens

Esta etiqueta mostra mensagens indicando se o usuário fez mudanças tais como pausar o ciclo ou pular ciclos durante a execução. Também mostra avisos recebidos durante a execução. Esta etiqueta deve ser marcada se os resultados não foram os esperados.

Canais

Se configurar uma nova execução, a etiqueta de canais mostra a configuração atual dos canais disponíveis. Se visualizar uma execução existente, a informação mostrada representa a configuração dos canais quando a execução foi realizada. Se uma execução corromper as configurações do canal, canais padrões podem ser restaurados clicando em “Reset Defaults”.



- Nome:** Este é o nome do canal.
- Fonte:** Este especifica o comprimento da onda de excitação da fonte LED.
- Detector:** Este especifica o comprimento da onda de detecção e o tipo do filtro (nm=band pass, hp = high pass).
- Ganho:** Este especifica o ganho daquele canal em particular.
- Criar novo...:** Esta característica permite a criação de novos canais. Ao clicar em "Create New..." abre uma janela que pede um novo nome, fonte, e filtro de detecção. Os filtros podem ser escolhidos usando um menu próximo de cada janela.

Canais: Canais verde, amarelo, laranja e vermelho são a configuração padrão para a múltipla detecção de 4 canais.

Layout do tubo

Se usar um rotor de 72 poços, as amostras podem ser arrumadas para combinarem proximamente com o rótulo de um bloco de 9 x 8. Como padrão, a etiqueta de layout do tubo permitem que amostras sejam rotuladas sequencialmente (i.e., 1,2,3...). Isso significa que as amostras estão rotuladas consecutivamente na ordem em que elas foram colocadas no Rotor Gene Q. Alternativamente, as amostras podem ser rotuladas como 1 A, 1 B, 1 C, etc. Esta opção pode ser útil se as amostras foram ajustadas com uma pipeta de multicanal.

Segurança

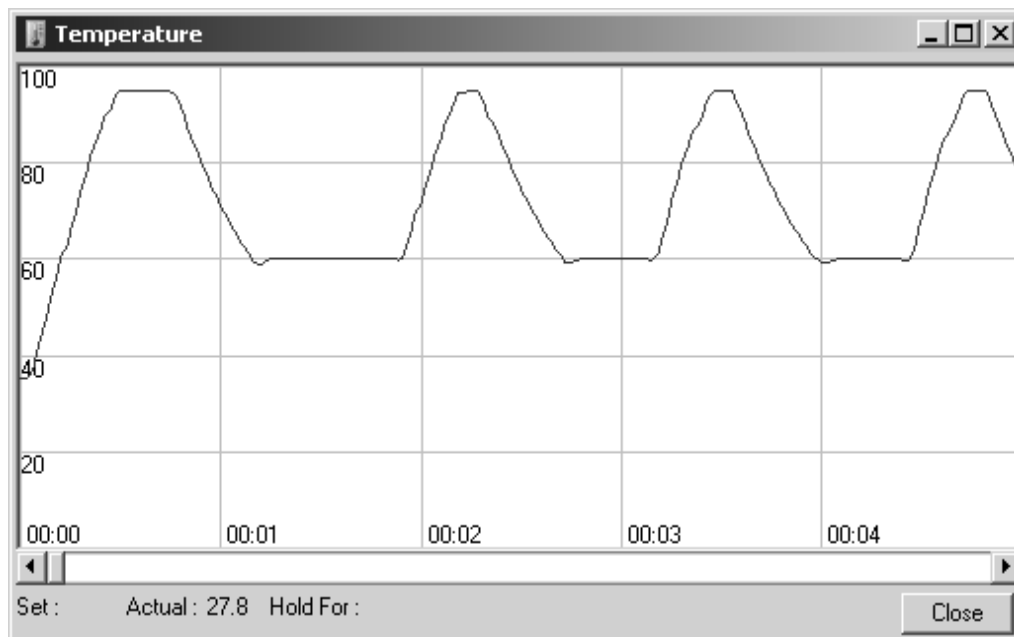
A etiqueta Segurança mostra informações sobre a assinatura da execução. A assinatura da execução é uma chave irreversível que é regenerada toda vez que o arquivo é mudado. Se qualquer seção do arquivo ***.rex** for modificada fora do software, a assinatura e o arquivo não mais combinarão. Verificar a assinatura permite a confirmação de que os dados brutos não foram modificados fora do aplicativo, que o perfil não foi alterado e que o gráfico de temperature é válido. A assinatura também protege contra corrupção tais como erros de sistema de arquivo.

Nota: Se os arquivos ***.rex** forem enviados por e-mail, o processo de encriptação pode invalidar a assinatura. Para evitar isso, zip os arquivos antes de enviar por e-mail.



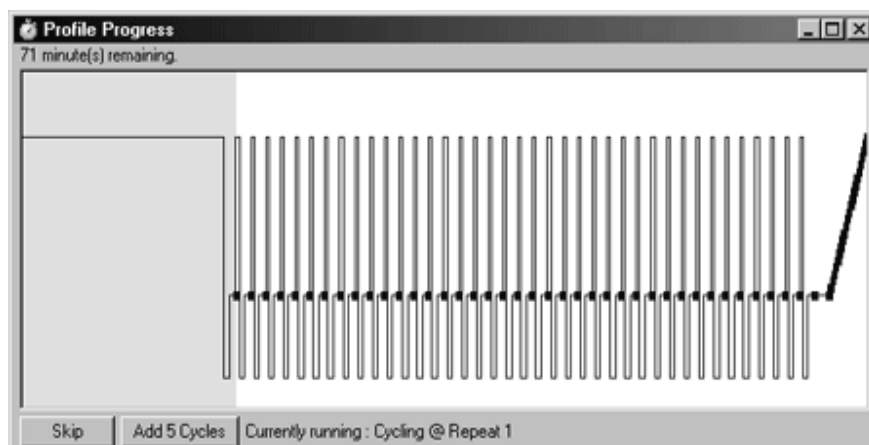
7.8.2 Gráfico de temperatura

Selecione “Temperature Graph” no menu “View”, ou clique no botão “Temp.” para trazer a janela “Temperature”. O gráfico mostra a temperatura das amostras durante a execução. Conforme a execução prossegue, o tempo “Ajustado”, “Atual” e “de espera” são mostrados para cada etapa do programa. Para um arquivo de execução existente, a janela “Temperature” mostra o histórico da temperatura durante a execução. A escala vertical representa temperatura e a escala horizontal representa tempo. Use a barra de rolagem para rolar para trás e para frente na janela “Temperature”.



7.8.3 Progresso do perfil

Selecione “Profile progress” no menu “View” ou clique no botão “Progress” para trazer a janela “Profile progress”. Esta janela mostra uma representação gráfica do perfil térmico associado com a execução. Ao realizar uma execução a porção sombreada da janela indica o número de ciclos que foram completados. Existe também uma estimativa de quantos minutos a execução levará para terminar.

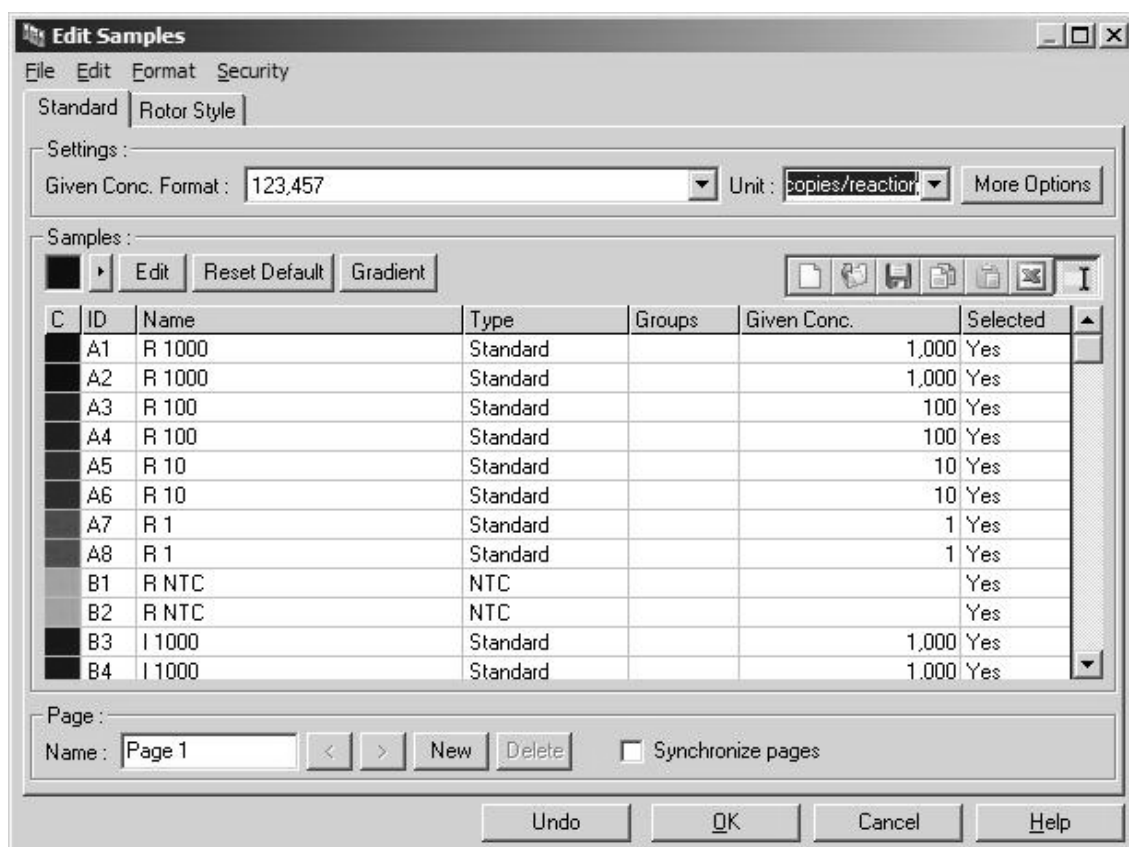


Pular:

“Skip” permite que etapas do perfil sejam puladas.

Adicionar 5 ciclos: “Add 5 cycles” adiciona e repetições da atual etapa do ciclo.

7.8.4 Editar amostras

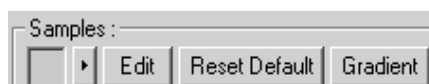


Clique no botão “Samples” para trazer a janela “Edit Samples”. A janela “Edit Samples” também pode ser acessada clicando com o botão direito sobre a lista de amostra na direita da tela. Esta janela tem funcionalidade idêntica à janela “Edit Samples” nos assistentes, exceto que as funções da barra de ferramentas também estão disponíveis no arquivo e em “Edit Menu”.

Quatro menus aparecem no topo da janela, File (Arquivo), Edit (Editar), Format (Formato) e Security (Segurança). O menu File é usado para criar uma nova (em branco) janela Edit Samples, para abrir um modelo de amostra existente, ou para salvar nomes de amostras como um modelo para uso futuro. A extensão destes modelos de arquivos é *.smp. O menu Edit permite que fileiras sejam copiadas e coladas. O menu Security permite que as definições da amostra sejam trancadas.

Formato Conc. Dado: Este menu é usado para escolher o formato adequado para a visualização da concentração. Concentrações são automaticamente formatadas de acordo com o local atualmente selecionado.

Unidade Este menu ajusta as unidades de medição do exame.



Estilo de linha: O estilo da linha pode ser modificado para melhorar a leitura do gráfico em impressoras preto e branco. Algumas linhas podem ser enfatizadas modificando seus estilos. Para acessar esta característica, clique no botão com seta para a direita, próximo ao botão Edit.

Editar: Pressionar “Edit” abre a seleção de cores. Múltiplas fileiras podem ser selecionadas ao designar uma cor para os tubos.

Reiniciar padrão: Clique em “Reset Default” para reiniciar todas as células coloridas selecionadas de volta para seus valores de cores.

Gradiente: “Gradient” permite que um gradiente seja escolhido da primeira para a última cor selecionada. Vários gradientes podem ser definidos em uma configuração de amostra.



Ícone 

O ícone “New” limpa a janela “Edit Samples” em preparação para os dados que entrarão.

Ícone 

O ícone “Open” traz uma caixa de diálogo em que um arquivo do Rotor Gene Q pode ser selecionado para importar.

Nota: O número de amostras na janela Open e o arquivo a ser importado devem combinar.

Ícone 

O ícone “Save” traz uma caixa de diálogo em que o nome e pasta podem ser entrados em que uma cópia das definições atuais da amostra serão salvas.

Ícone 

O ícone “Copy” copia as células selecionadas.

Ícone 

O ícone “Paste” copia as células que foram selecionadas com o comando de copiar na posição atualmente selecionada na grade.

Ícone 

O ícone “Excel” traz uma caixa de diálogo que solicita um nome de arquivo e pasta onde salvar as informações da amostra. Após pressionar “Save”, o arquivo Excel abrirá automaticamente.

Ícone 

O ícone “Append/Overwrite” muda as células editadas na janela “Edit Samples”. Se sobrescrever for selecionado, os dados existentes serão sobrescritos ao editar. Se Anexar for escolhido, novos dados são adicionados ao final dos dados existentes ao editar.

Tipos de amostras:

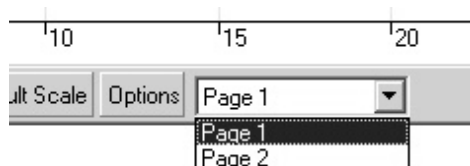
Amostras podem ser definidas com um de vários tipos, listados na tabela seguinte.

Tipo de amostra	Descrição
Nenhuma	Nenhuma amostra nesta posição
NTC	Nenhum modelo de controle
Controle negativo	Controle negativo
Controle positivo	Controle positivo
Desconhecida	Amostra desconhecida para analisar
Padrão	Valores padrões são usados para construir uma curva padrão para calcular concentrações de amostras desconhecidas
Calibrador (RQ)	Um calibrador é designado um valor de 1 e todas as outras concentrações de amostras são calculadas relativas a esta amostra.

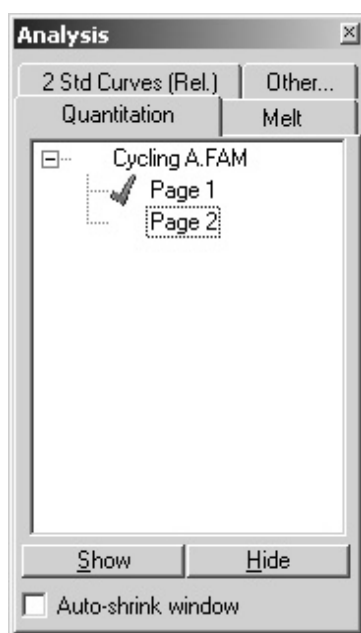
Página:

Esta função permite ao usuário ter diferentes definições de amostras, e também separar experimentos, na mesma execução. Isto é útil para análises de diferentes produtos em diferentes canais. Use os botões de seta para mover entre as páginas de amostras. Use os botões “New” e “Delete” para criar e deletar páginas. É possível ter múltiplas definições de amostras para o mesmo canal, para poder executar múltiplas curvas padrão sem multiplex. Simplesmente defina as amostras de interesse e suas curvas padrão relacionadas em páginas separadas. O único canal pode então ser analisado com cada conjuntos de definições independentemente. Páginas de amostras podem ser rotuladas como “Página 1, Página 2”, etc, ou a elas podem ser dados quaisquer nomes. Este nome aparecerá nos relatórios.

Ao ver os dados brutos, as definições de amostra usadas para mostrar os dados podem ser selecionadas usando o menu próximo ao botão “Options”:



A página de amostra para usar ao realizar uma análise pode ser selecionada na janela “Analysis” (veja a seção 7.6.1).



Conc. Dado:

Este mostra a concentração para cada um dos padrões. As unidades podem ser definidas como número decimal ou de log. Se os padrões são uma série de diluição, é apenas necessário digitar os 2 primeiros padrões. Ao pressionar ENTER, o programa automaticamente adiciona a próxima diluição lógica na série.

Estilo de linha:

O estilo da linha pode ser modificado para melhorar a leitura dos gráficos em impressores preto e branco. Certas linhas podem ser enfatizadas modificando seu estilo. Para acessar esta característica, clique no botão de seta direita próximo ao botão "Edit".



A barra de ferramentas mostrará o estilo padrão "Sólido". Este pode ser mudado para "Tracejado", "Pontilhado", "Fino", "Afilado", ou "Grosso". Ao terminar, clique no botão de seta

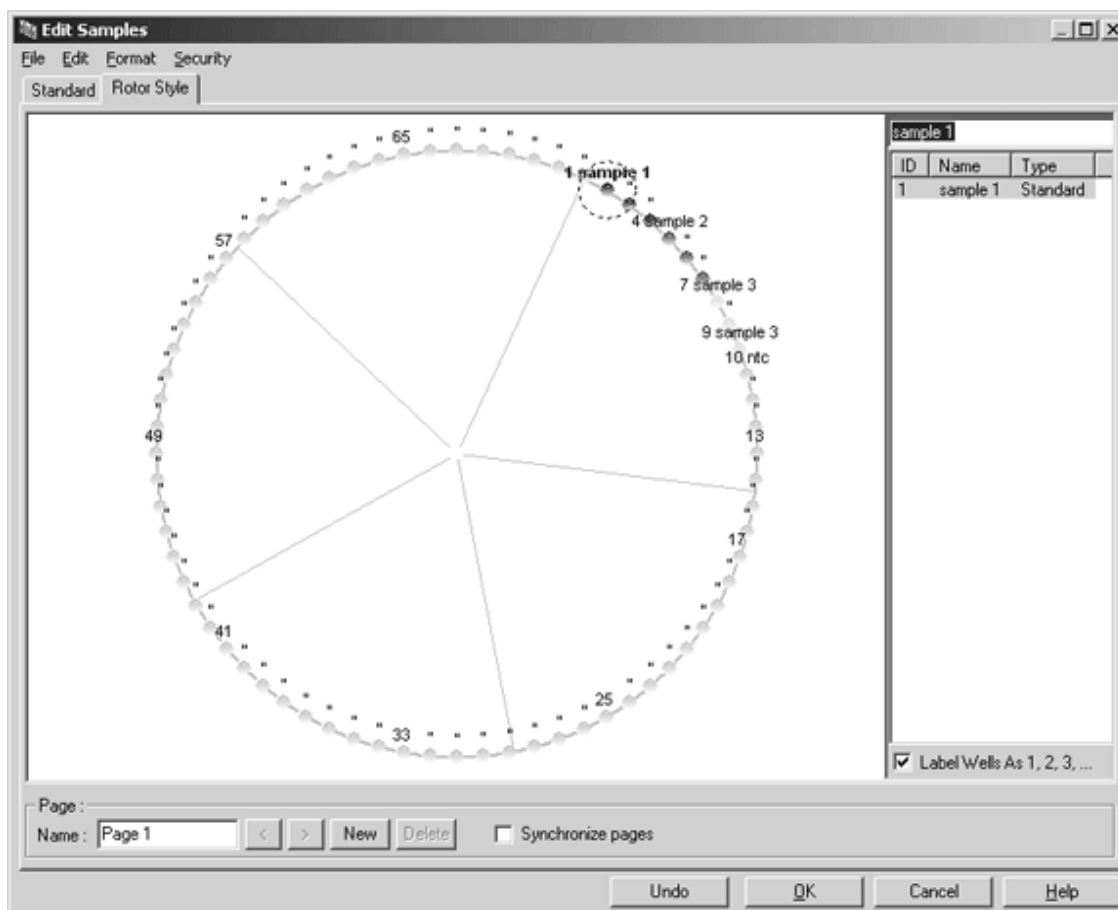
esquerda para retornar para Edit, Reset Default e Gradient View.



Entrada de múltiplas fileiras	Se a mesma informação precisar ser entrada em várias fileiras de uma vez, selecione todas as fileiras, depois inicie a digitar. A informação entrará em cada fileira. Isso também funciona para selecionar tipos de amostras, escolher cores, ou entrar com concentrações.
Chave do tipo de amostra	Para rapidamente escolher um tipo de amostra, entra com a primeira letra do nome. Por exemplo, para ajustar 5 amostras para serem sem controle de modelo, selecione-as na mesma coluna de digitação, depois pressione N para NTC. Todas as amostras serão convertidas para NTC.
Salvar, re-usar	Uma descrição de amostra completa pode ser salva como um arquivo de amostra (*.smp) e carregada em futuras execuções com as mesmas configurações de amostras.

Estilo do rotor

Esta etiqueta na janela "Edit Samples" fornece uma forma alternativa de entrar com nomes de amostras. Selecione réplicas clicando e arrastando o ponteiro do mouse sobre a imagem do rotor. A lista à direita da janela atualizará. O mesmo nome pode ser digitado, e isto irá ajustar o mesmo nome para as seleções atuais. O software reconhece esses poços como réplicas.

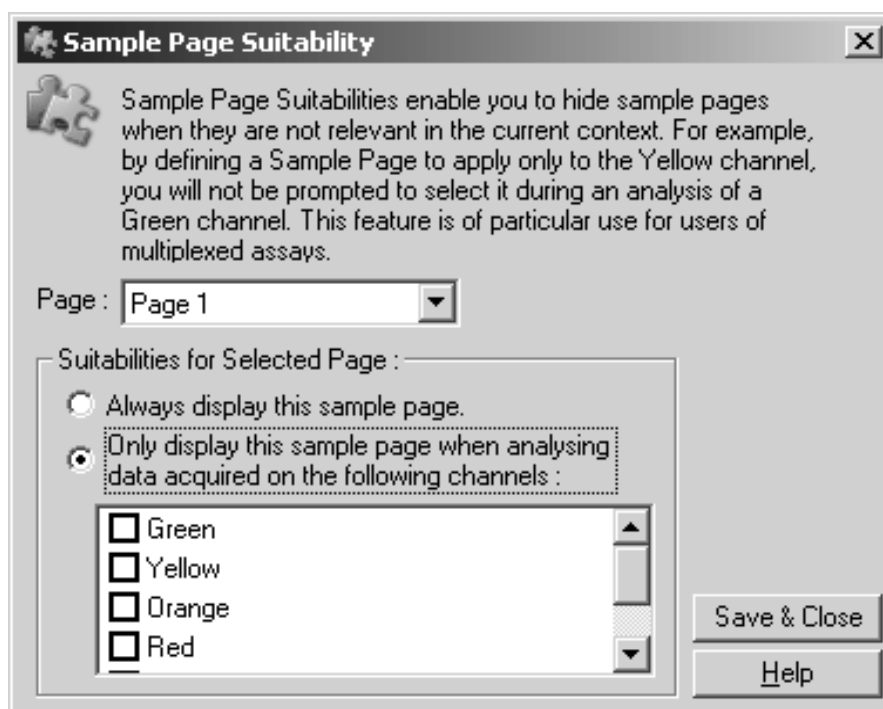


A etiqueta “Estilo do rotor” fornece uma versão de corte da etiqueta “Padrão” e é destinada para usuários que querem configurar nomes de amostras e cores rapidamente. Não é possível definir algumas configurações, tais como se a amostra representa um padrão ou a concentração conhecida de cada padrão, nesta etiqueta. Se estes precisam ser definidos, a etiqueta “Padrão” deve ser usada.

Adequação da página de amostra

Para acessar a janela “Sample Page Suitability”, clique em “More Options” na janela “Edit Samples”, e depois clique em “Define Suitabilities”. A janela “Sample Page Suitability” permite ao usuário combinar páginas de amostra com canais. Por exemplo, a página de amostra para o gene de interesse pode ser aplicada ao canal verde e a página de amostra para o gene caseiro pode ser aplicada ao canal amarelo. Neste exemplo, configurando a adequação da página de amostra reduz o número de opções de análises disponíveis para incluir aquelas relevantes para tal exame.

A janela “Sample Page Suitability” é mostrada abaixo.

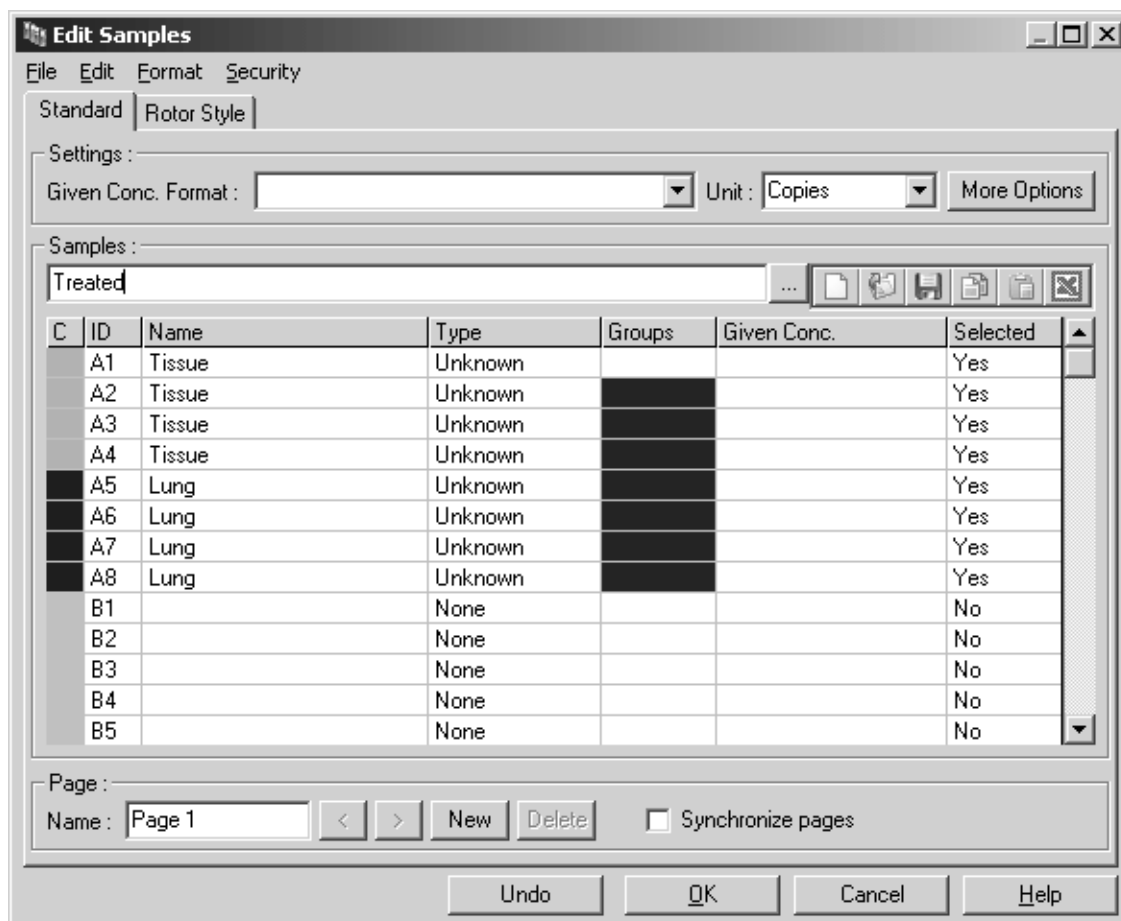


Nota: Ao ajustar um exame, crie todas as páginas de amostras e a adequação das páginas de amostras, depois salve-as como modelos. Isto reduz a quantidade de configurações requisitadas para cada execução.

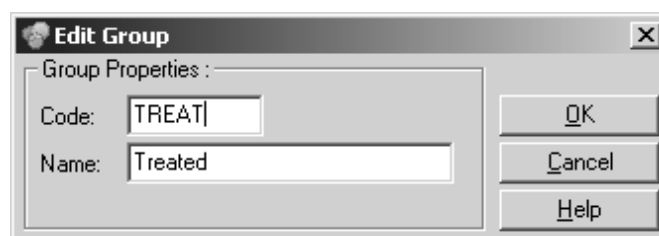
Grupos

Grupos de amostras permitem que estatísticas sejam calculadas para uma coleta arbitrária de amostras. Ao contrário das réplicas, que devem ter nomes idênticos, as amostras podem ter qualquer nome, podem ser posicionadas em qualquer lugar no rotor e podem pertencer a múltiplos grupos.

1. Para definir um grupo, digite o nome completo do grupo próximo de uma amostra e depois pressione ENTER.



2. A janela “Edit Groups” aparece.



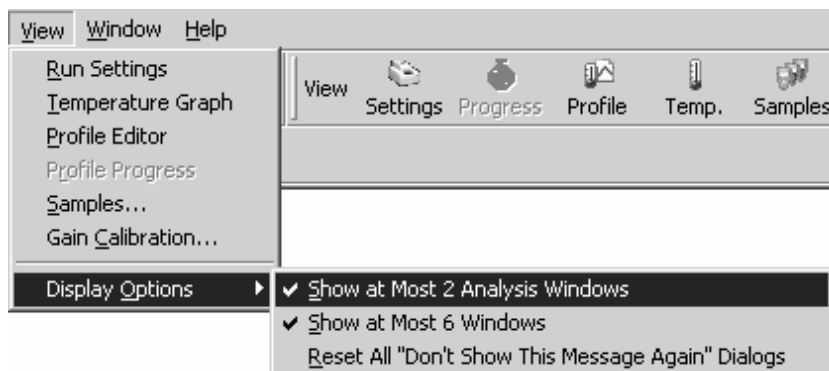
3. Defina uma abreviação adequada, depois clique em “Ok”. A abreviação agora pode ser usada para configurar grupos. Resultados agregados, tais como valores de médias e intervalo de confiança de 95%, são calculados automaticamente para grupos em qualquer análise.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.82	18.82			18.75	0.17	[18.48 , 19.02]	
A2	Tissue	Unknown	18.75							
A3	Tissue	Unknown	18.92							
A4	Tissue	Unknown	18.52							
A5	Lung	Unknown	18.73				18.70	0.09	[18.55 , 18.85]	
A6	Lung	Unknown	18.62							
A7	Lung	Unknown	18.81							
A8	Lung	Unknown	18.63							
A1-A8	Treated	Group					18.72	0.13	[18.62 , 18.83]	

7.8.5 Mostrar opções

O menu de mostrar opções é mostrado abaixo.



- | | |
|---|--|
| <p>Mostrar no máximo 2 janelas de análises:</p> | <p>Se esta opção for selecionada, um máximo de 2 janelas de análises serão mostradas de uma vez. Se múltiplas janelas estiverem abertas, a leitura pode ser afetada. Selecionar esta opção fecha a primeira janela de análise e a substitui com a última janela aberta. Se a opção não for selecionada, mais de 2 janelas de análises podem ser mostradas.</p> |
| <p>Mostrar no máximo 6 janelas:</p> | <p>Para melhorar a leitura, o software remove janelas não usadas quando novas janelas são abertas. Esta opção é permitida como padrão, pois mantém a tela do software Rotor Gene Q limpa. Se for necessário ver mais de 6 janelas de uma vez, desmarque esta opção.</p> |
| <p>Reiniciar todos os diálogos “Não mostrar esta mensagem novamente”:</p> | <p>Se esta estiver selecionada, o software mostrará de novo todas as caixas de diálogo onde a caixa “Não mostrar esta mensagem novamente” estiver selecionada. Isso inclui mensagens sobre configurações suspeitas que possam ter sido ajustadas previamente para não mostrar novamente. Isto pode ser útil para um novo usuário que não está familiarizado com o Rotor Gene Q ou o software Rotor Gene Q.</p> |

7.9 Menu Security (Segurança)

O software Rotor Gene Q inclui características que o permitem operar seguramente. Quando estiver corretamente configurado, o software Rotor Gene Q pode garantir o seguinte:

- Acesso ao Rotor Gene Q ou o software de análise estará restrito aos grupos de usuários
- Modificações nos arquivos de execução são carregadas
- Modificações não autorizadas são detectadas (assinaturas)
- Modelos usados para realizar execuções são carregados
- Nomes de amostras são protegidos

Integração com segurança do Windows

Para fornecer um nível forte de contabilidade, o software Rotor Gene Q não controla a segurança internamente. Grupos de contas, e senhas são todos controlados usando o modelo seguro interno do Windows (Windows NT Security). Integração permite que a mesma senha que fornece acesso à rede de arquivos e programas para controlar o acesso ao software Rotor Gene Q, levando a menor administração. Em maiores organizações, por exemplo, os administradores de rede podem facilmente remover acesso à ex-usuários devido ao modelo de segurança centralizado.

Por esta razão, configurar o software Rotor Gene Q de forma segura primeiramente envolve configuração dos modos de segurança do Windows de acordo com as melhores práticas.

Pré-requisitos

Para usar segurança, você deve estar executando o Windows NT4 Service Pack 6, Windows 2000, ou Windows XP Professional. As características de segurança não podem ser usadas com o Windows XP Home, porque não tem modelo de acesso granulado usado pelo software. O software deve ser instalado com a opção "Force Authentication through Windows NT Logon".

Nota: O menu de segurança não aparecerá se você estiver logado em um domínio Linux Samba. Você deve ter um domínio local ou um servidor do Windows para usar as características de segurança.

7.9.1 Configuração

Esta seção descreve como configurar o sistema para executar o software de segurança do Rotor Gene Q.

Para utilizar as características de segurança, o software deve ser instalado com a opção “Force Authentication throught Windows NT Logon”. Isto consulta o domínio do Windows para seu nível de acesso e credenciais e é essencial para fornecer características de contabilidade e segurança.

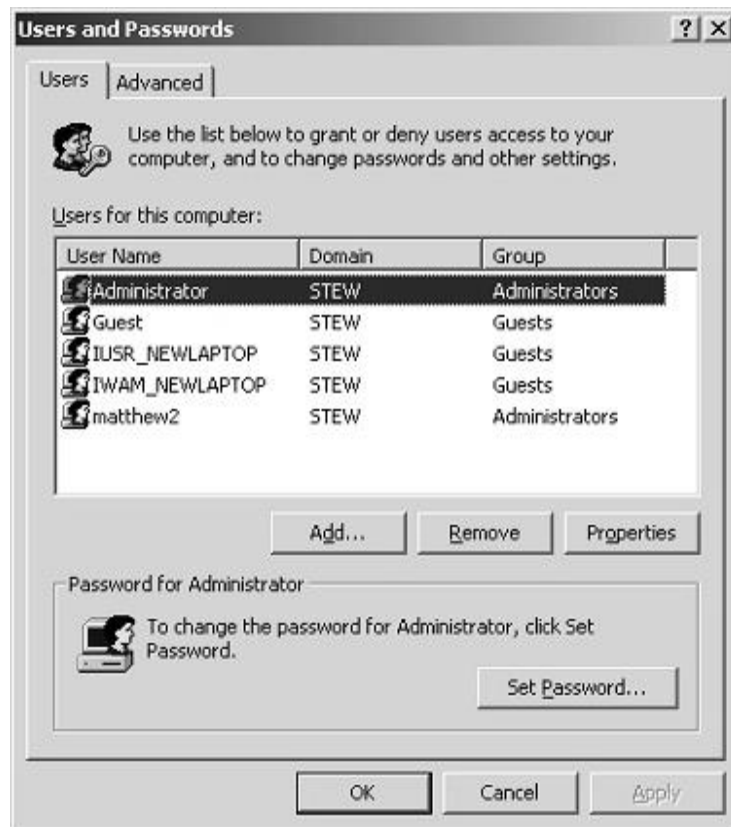
Executando como administrador

Muitos usuários executam seus computadores como um administrador, sem senha. Ao passo que isso é conveniente, se torna impossível determinar quem está usando o computador. Isso elimina contabilidade e previne que muitas medidas de segurança do software Rotor Gene Q sejam ativados. Ao executar como um administrador, todas as características do software são permitidas. Portanto, executar como administrador garante que usuários que não precisam de características de segurança possam acessar todas as características do software.

Criando uma nova conta de usuário

Crie contas de usuários para cada usuário do software. Para cada usuário, repita as etapas abaixo até que todas as contas tenham sido criadas.

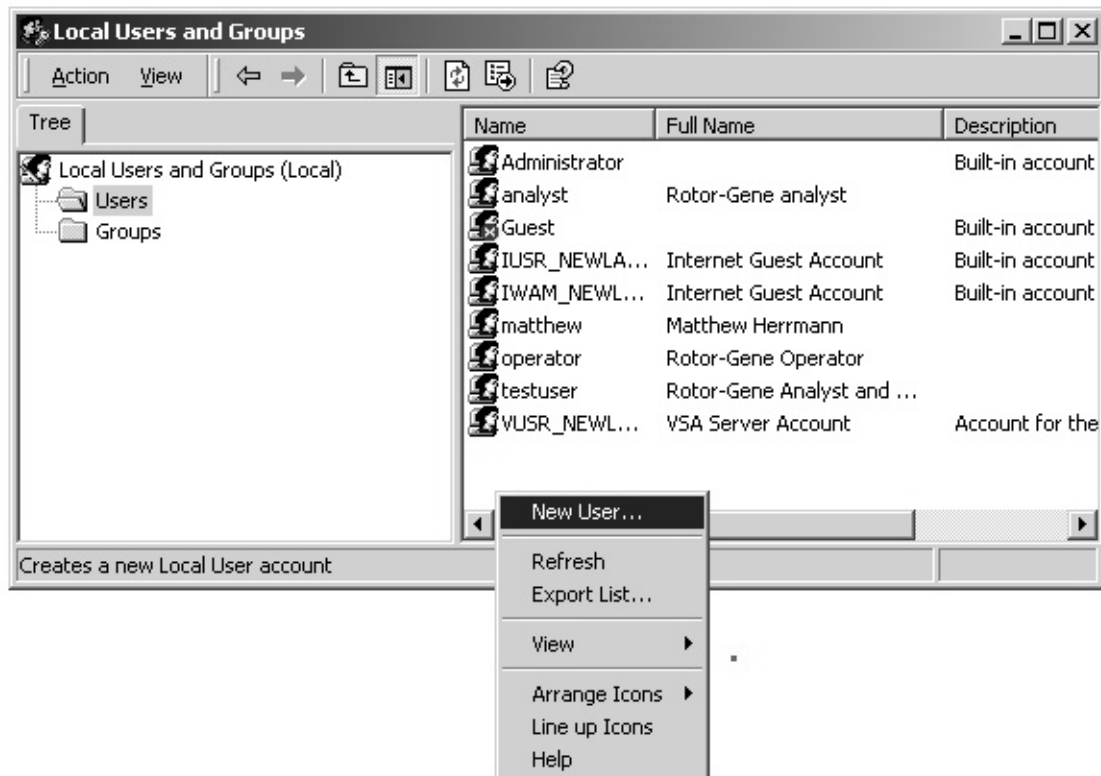
1. Para criar um novo usuário, selecione “Start/Settings/ControlPanel”.
2. Clique duas vezes em “Users and passwords”.



3. Clique na etiqueta “Advanced”, depois clique no botão “Advanced”



4. Na janela que aparecer, selecione a pasta “Users”. Clique com o botão direito na janela da mão direita e selecione “New User”.



5. Entre com um nome de usuário e senha. Como padrão, o usuário será criado com acesso de privilégios normal. Isso significa que eles podem executar o software, mas não instalar novos programas ou mudar configurações de sistema.

The 'New User' dialog box contains the following fields and options:

- User name:** newuser
- Full name:** New User
- Description:** (empty field)
- Password:** (masked with 'xxxx')
- Confirm password:** (masked with 'xxxx')
- ☒ User must change password at next logon
- ☐ User cannot change password
- ☐ Password never expires
- ☐ Account is disabled

At the bottom right, there are 'Create' and 'Close' buttons.

6. Clique em “Criar”. Agora você pode carregar como este usuário.

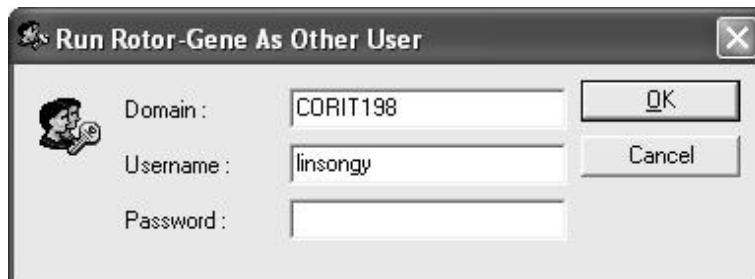
Designando papéis para cada usuário

Agora você deve designar papéis para cada usuário. Acesso é dividido nas seguintes áreas:

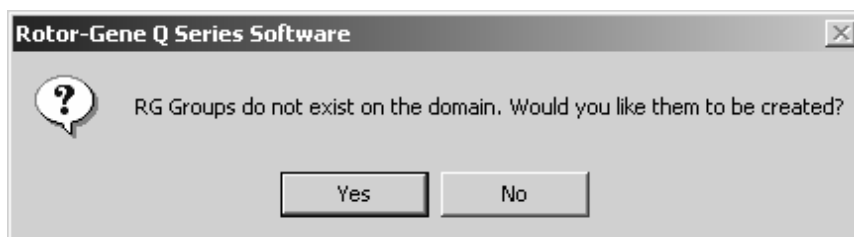
- Operador do Rotor Gene Q – pode realizar execuções mas não pode gerar relatórios ou realizar análise.
- Analista do Rotor Gene Q – pode analisar dados de execução e gerar relatórios mas não pode realizar novas execuções.
- Operador e analista do Rotor Gene Q - tem as capacidades de ambos papéis.
- Administrador – pode destravar nomes de amostras e realizar todas as operações de analistas e operadores.
- Nenhum – acesso ao software é proibido.

Para designar papéis:

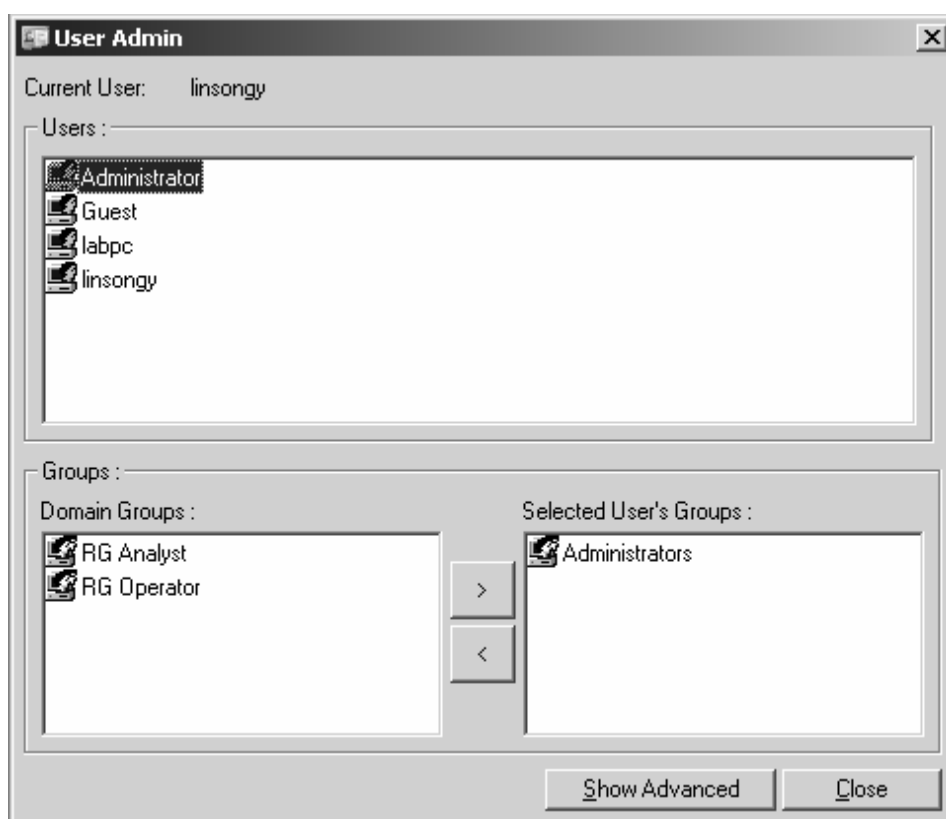
1. Entre no Windows como um administrador, ou use o ícone “Rotor Gene Q Software Login” para abrir o software e logar.



2. Uma vez que o software tenha sido aberto, clique no menu “Security”. Na primeira vez que o menu “Security” for acessado, o software Rotor Gene Q configura um número de grupos de sistema que controlará acesso ao software.

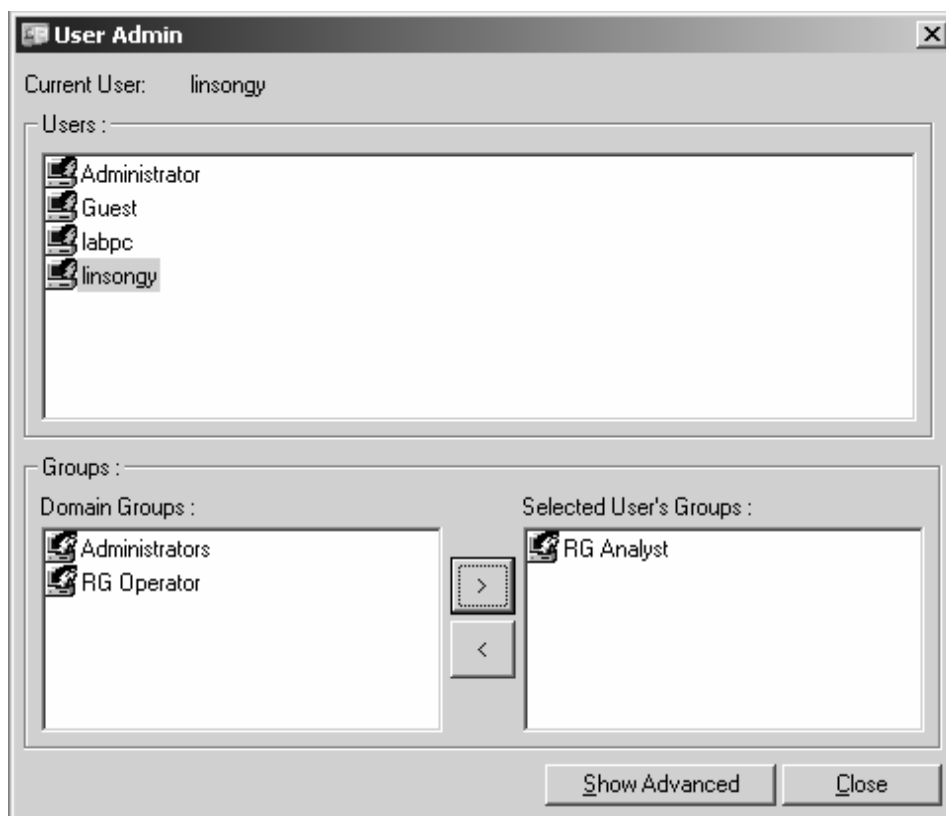


3. Clique em “Yes”. A janela “User Admin” aparece. No topo do painel, todos os usuários do computador são mostrados. Algumas contas são usadas pelo sistema e por isso não serão familiares. O painel no fundo mostra os grupos designados pelo usuário.

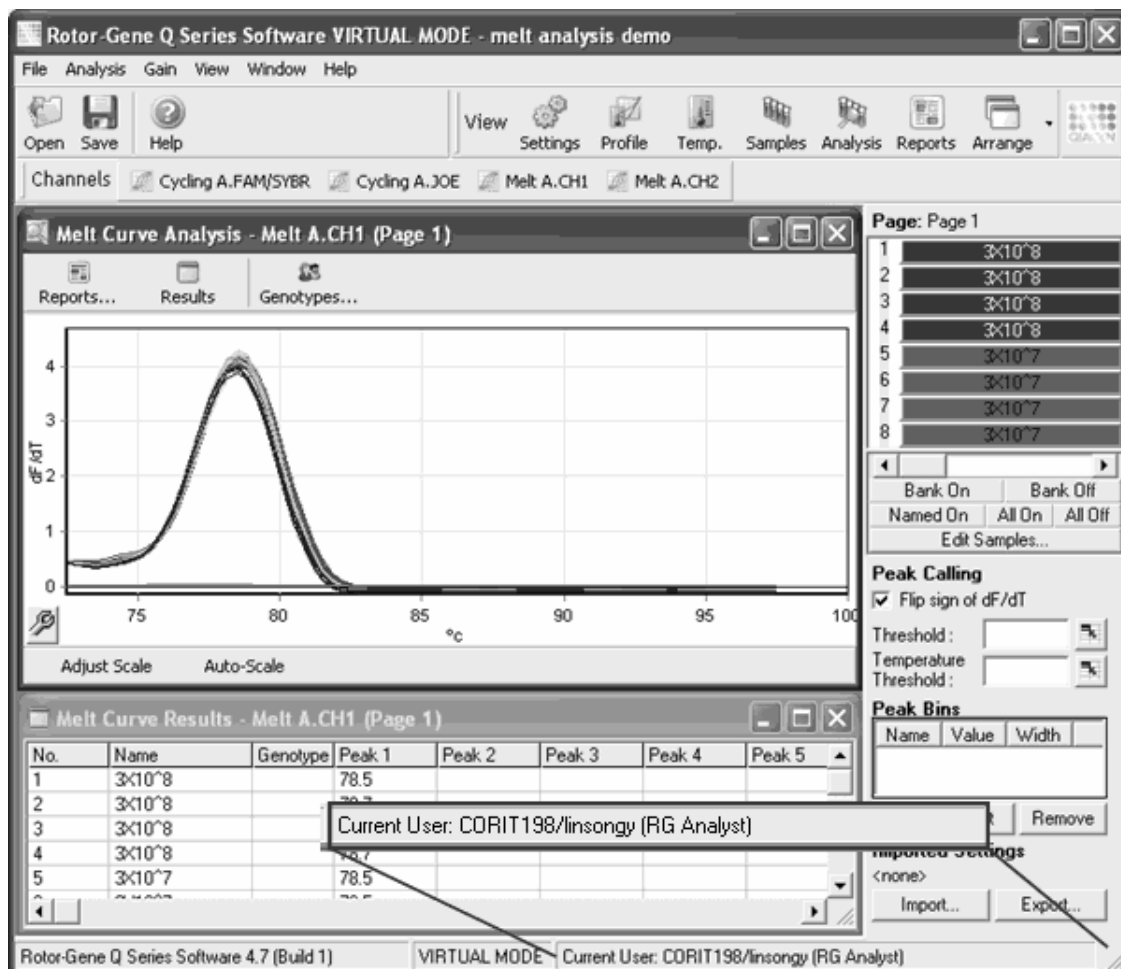


4. Para designar um grupo para o usuário, selecione o nome do usuário na lista. O painel no fundo será atualizado. Se o usuário

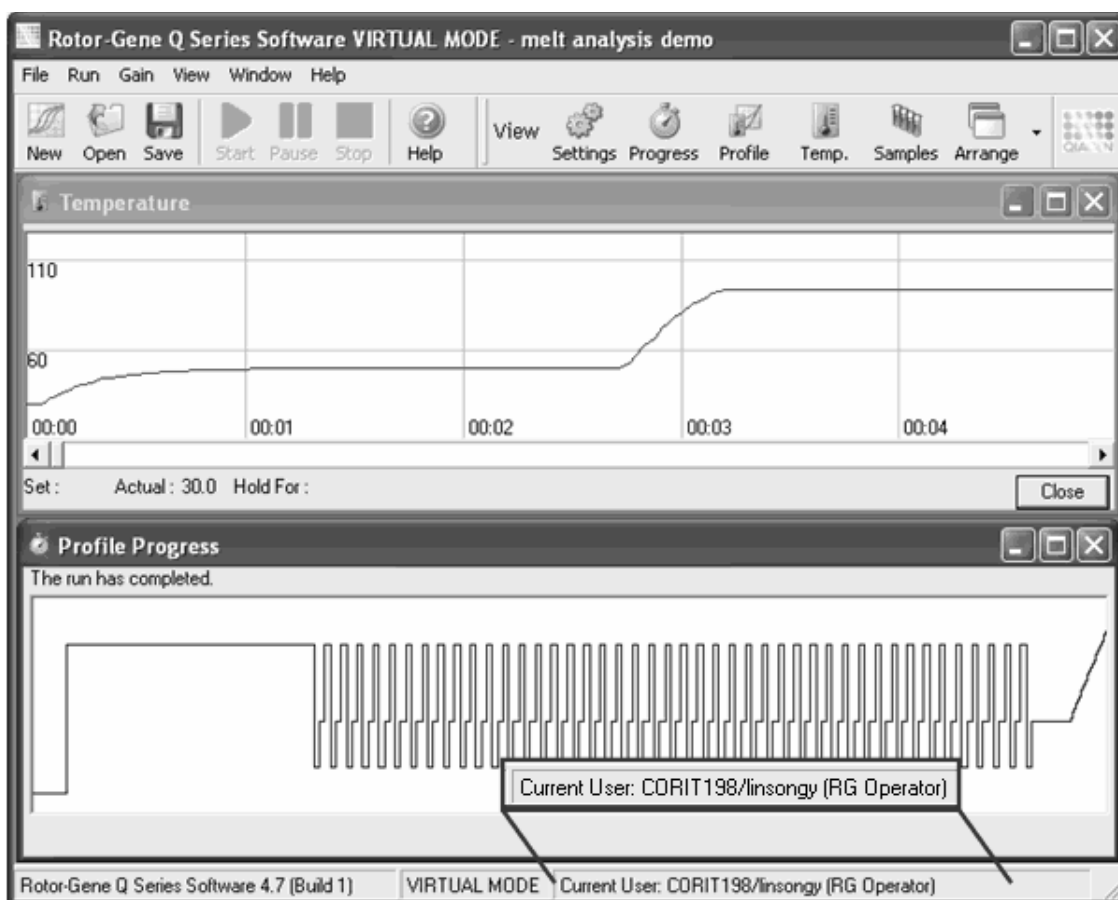
não tiver grupos, eles não podem lançar o software. No exemplo abaixo, nós designamos o usuário “linsongy” para o grupo de analistas RG, selecionando o grupo no lado esquerdo, então clique no botão “>”. Grupos podem ser removidos ao selecioná-los, depois clique no botão “<”.



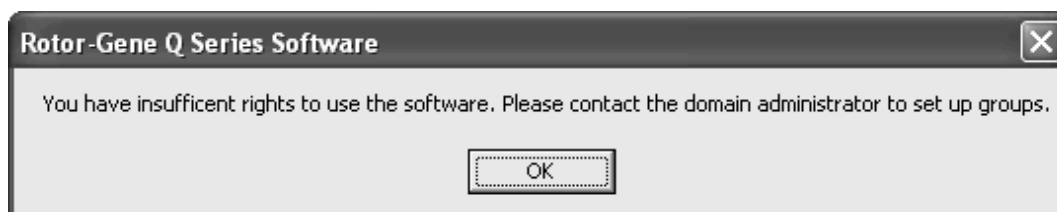
5. Agora entre como este usuário. Como um analista RG, o menu de execução e o botão “Profile” não estão disponíveis. Entretanto, arquivos existentes podem ser abertos e analisados, como mostrado na tela abaixo. A barra de status indica que o usuário “CORIT198/linsingy” é um analista RG.



6. Para entrar como um administrador de novo, os direitos de Operador RG podem ser designados ao “CORIT198/linsongy” e o software pode ser lançado novamente. Neste tempo, o menu de análise e o botão “Reports” estão sumidos, e o menu de execução é habilitado.
7. A barra de status indica que o usuário “CORIT198/linsongy” pertence ao grupo Operador RG.



8. Se você entrar como um administrador e remover todos os grupos do usuário “CORIT198/linsongy”, a seguinte mensagem aparecerá quando “CORIT198/linsongy” abre o software.



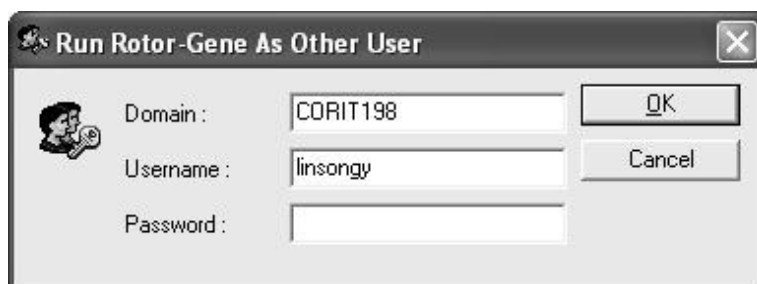
7.9.2 Executar múltiplos usuários no mesmo computador

Para usar o software Rotor Gene Q com múltiplos usuários, crie uma conta de usuário que não tem acesso ao software Rotor Gene Q. Entre no Windows usando esta conta, para que usuários não possam anonimamente acessar o Rotor Gene Q.

1. Usar o ícone “Rotor Gene Q Software Login”, usuários podem abrir suas contas de usuário no software Rotor Gene Q.



2. Entre com o nome de usuário e senha na caixa que aparece.



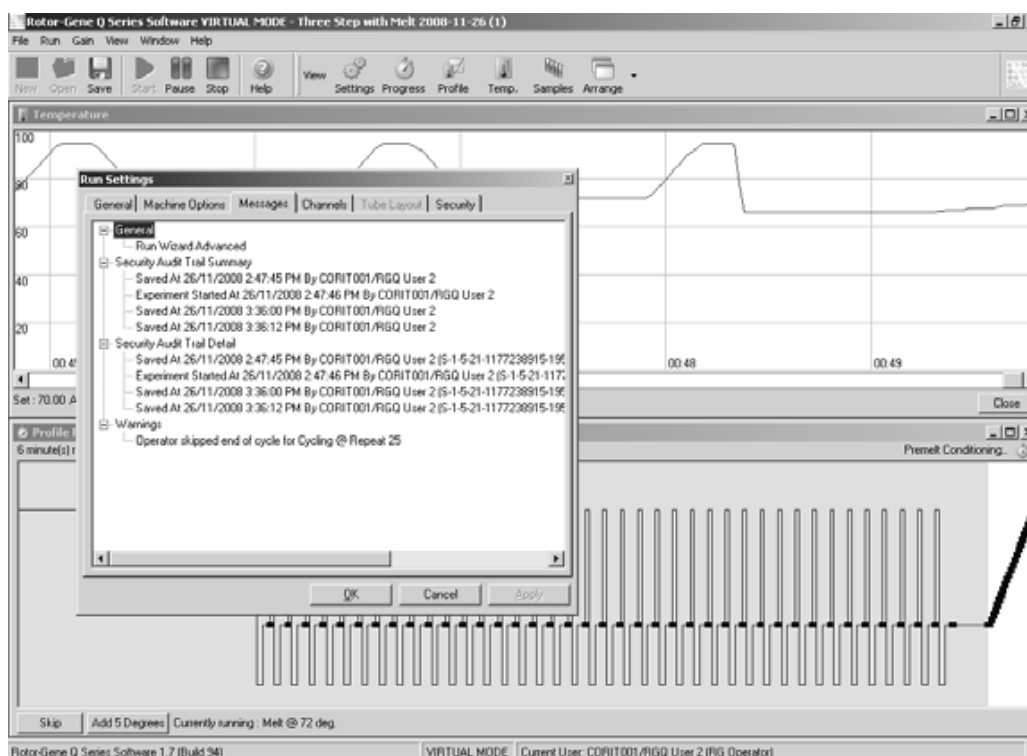
3. O domínio é tanto o computador em que você está logado ou o nome de sua rede local. Consulte seu administrador de rede para saber qual domínio entrar neste campo.

Nota: Após entrar, todos os arquivos do usuário estarão disponíveis para o usuário. Cada usuário pode salvar arquivos em suas própria área. Isso garante um alto nível de segurança.

Nota: Cada usuário deve sair depois que sua execução tenha sido completada para prevenir que outros usuários de realizarem uma execução em seu nome.

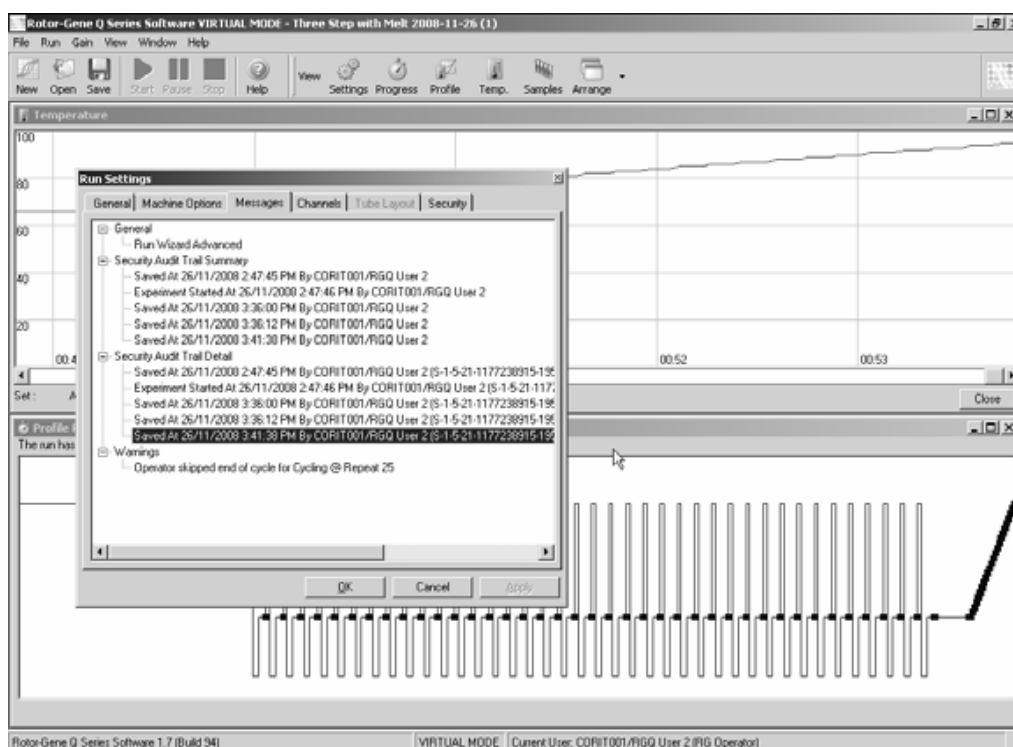
7.9.3 Trilhas de auditoria

Toda vez que um arquivo é salvo por um usuário, seus detalhes são gravados em "Run Settings" sob a etiqueta "Messages" como Sumário de trilhas de auditoria de segurança e Detalhe de trilhas de auditoria de segurança.



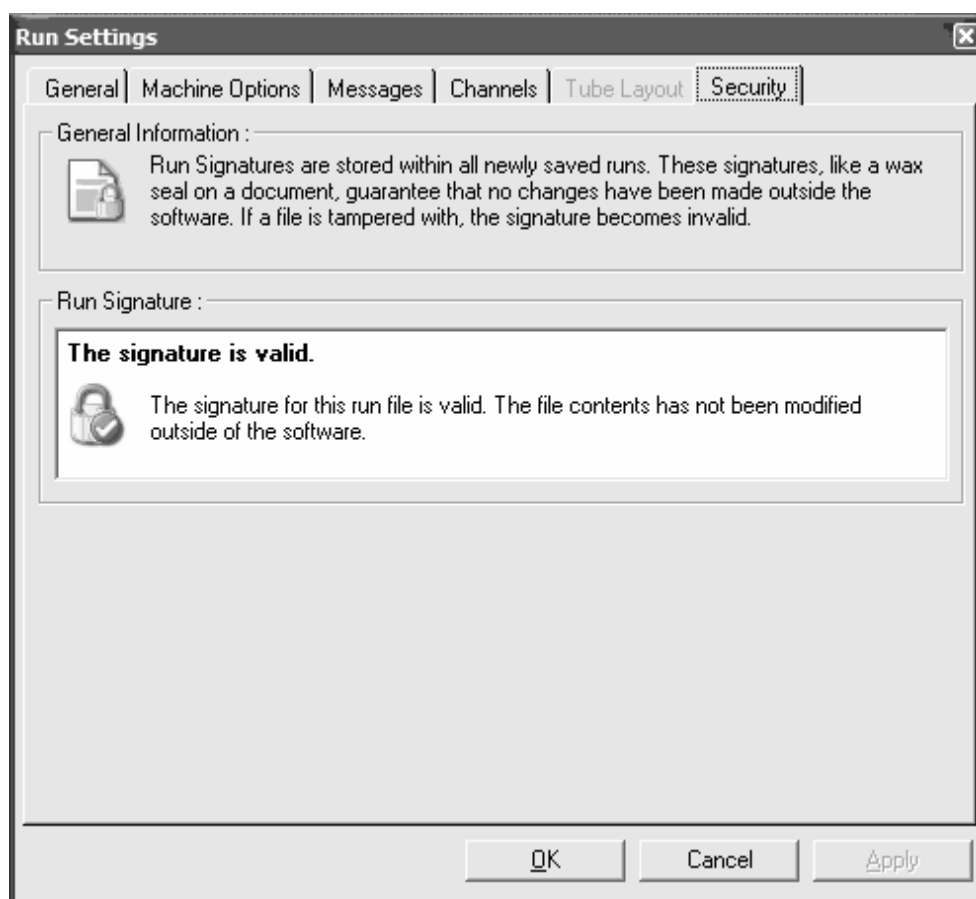
Este pode ser usado para monitorar quem modificou os conteúdos de um arquivo. Os detalhes de trilhas de auditoria de segurança contém mais detalhes, tal como a identificação única do usuário. Este identificador é importante para evitar que um usuário crie uma conta com o mesmo nome em outro computador e portanto impersonando outro usuário. Neste caso, os nomes de usuário serão os mesmos, mas os IDs das contas serão diferentes.

O identificador de conta CORIT001/RGQ Usuário 2, S-1-5-21-1177238915-195, é mostrado em detalhes.

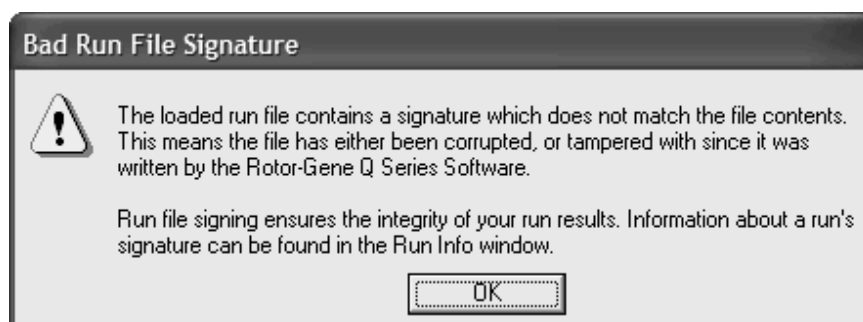


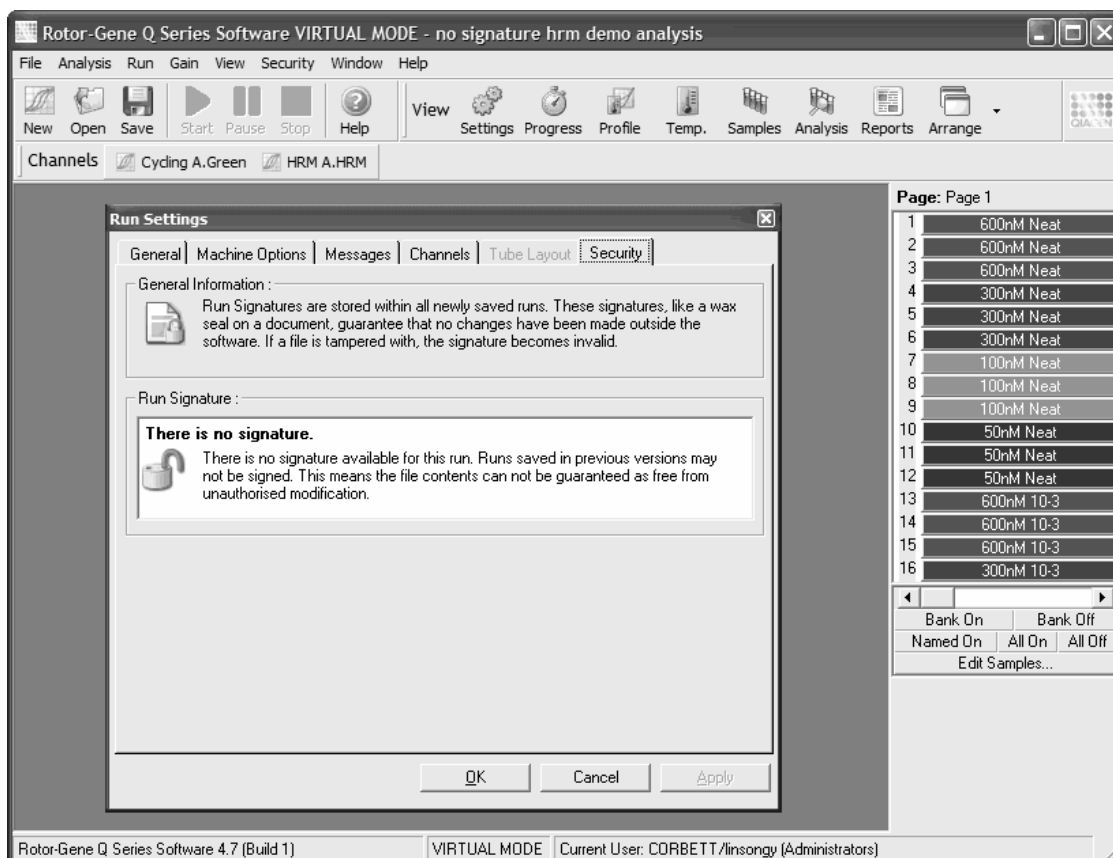
7.9.4 Assinaturas de execução

A trilha de auditoria é armazenada no arquivo de execução do Rotor Gene Q. Para evitar quaisquer modificações indesejadas desses arquivos, eles devem ser mantidos em local seguro acessado apenas por contas designadas pelo Windows. Entretanto, se os arquivos forem armazenados em uma área dividida, Execução de assinaturas fornece segurança extra. A tela mostra a etiqueta “Security” em Run Settings para um arquivo com uma assinatura de execução.



A assinatura de execução é uma palavra longa que é gerada toda vez que um arquivo for salvo e ligado aos conteúdos do arquivo. Por exemplo, a assinatura deste arquivo é 517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081. Se o arquivo for aberto em um Notepad e um Modo de edição for feito (e.g., a data da execução for trocada para 3 dias antes), a seguinte mensagem aparece quando o arquivo for reaberto.





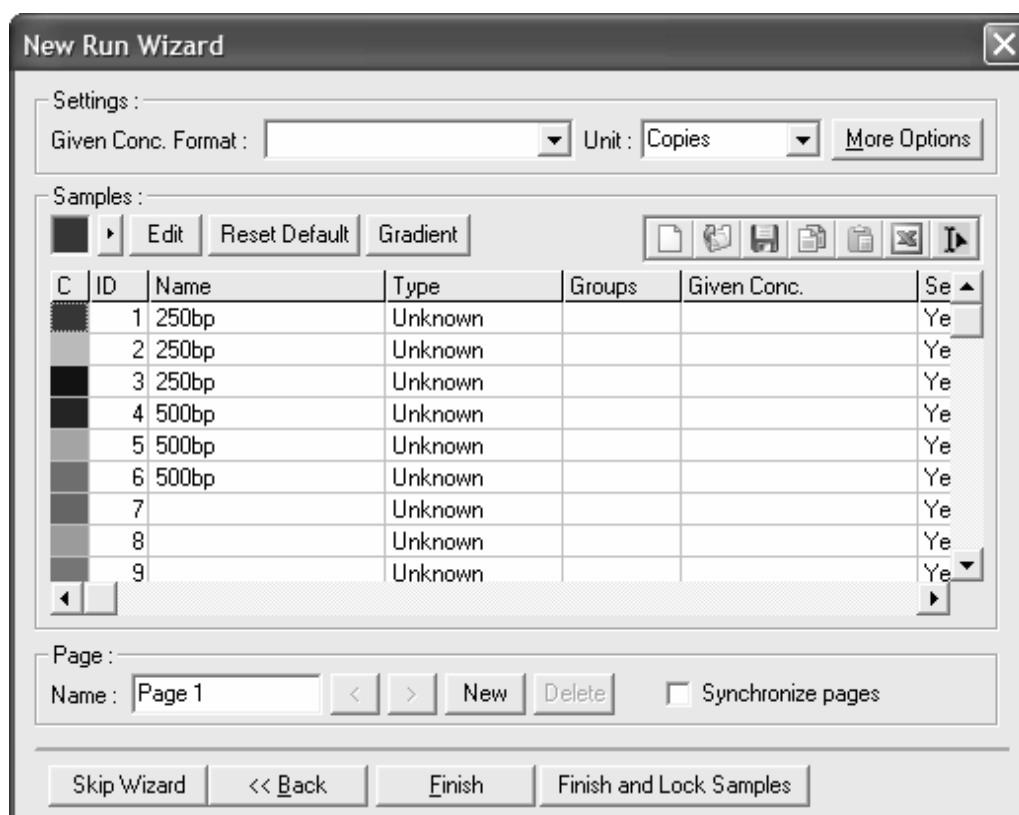
Nota: Se arquivos forem enviados por e-mail, o processo de encriptação pode invalidar a assinatura. Para evitar isso, zip os arquivos antes enviar por e-mail.

7.9.5 Trava de amostra

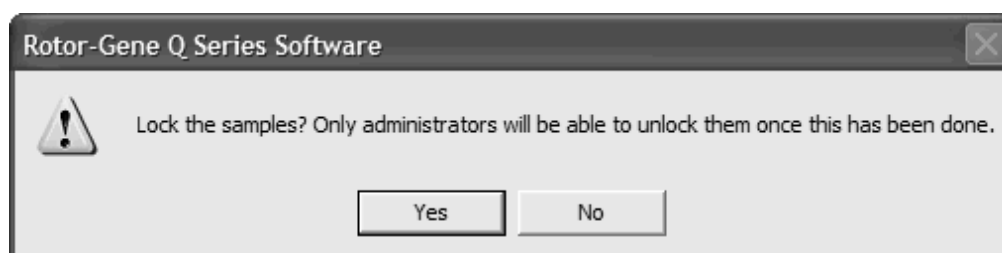
É importante garantir que os nomes de amostra não sejam trocados acidentalmente ou intencionalmente uma vez que o usuário iniciou uma execução. Por esta razão, o software Rotor Gene Q fornece travas de amostras. Nomes de amostras podem ser travados por qualquer usuário, mas só pode ser destravada por um administrador. Para usuários que executam seus computadores em modo administrador, essa opção é de valor limitado. Para usar esta opção, o computador deve ser configurado seguramente como descrito nas seções anteriores.

Nota: Se você deseja travar amostras, não execute o software como um administrador. Crie uma conta com operador RG e grupo de análise RG, e mantenha a senha do administrador secreta. Usuários irão requerir autorização do administrador para destravar arquivos.

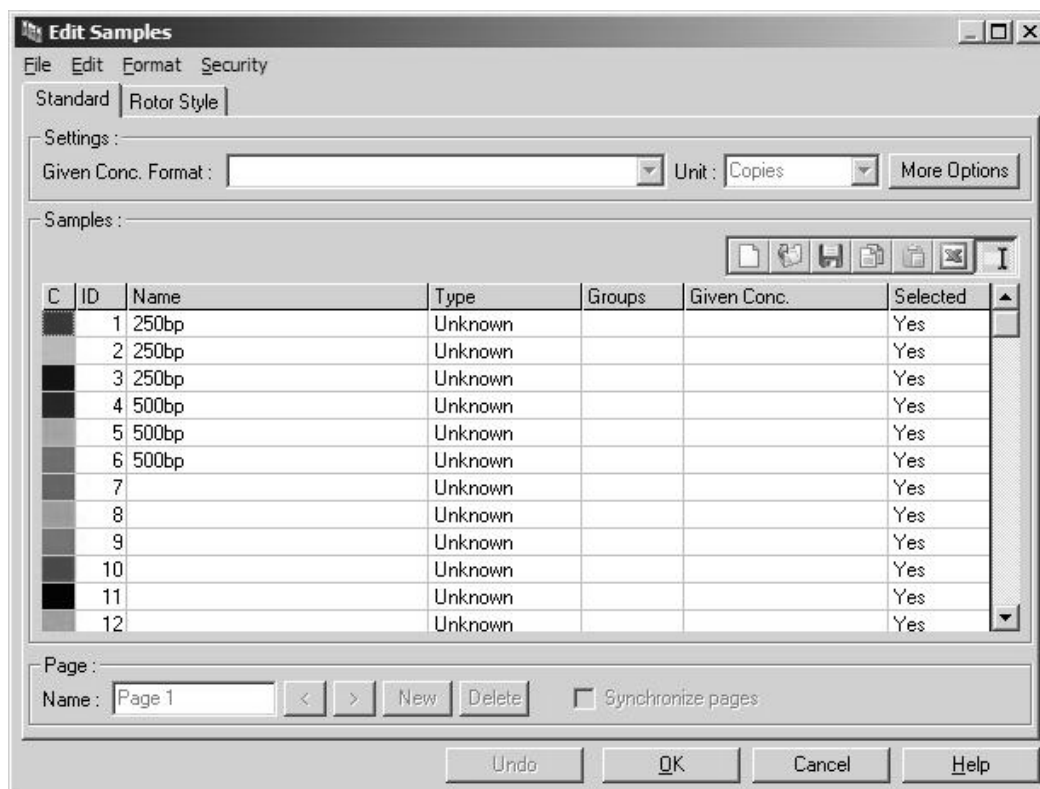
Amostras podem ser trancadas antes de iniciar uma execução ao usar o assistente avançado, clicando em “Finish and Lock Samples”.



O seguinte aviso aparece. Clique em “Yes” para confirmar.



Uma vez que as amostras estejam travadas, não será possível editar amostras na janela “Edit Samples”.



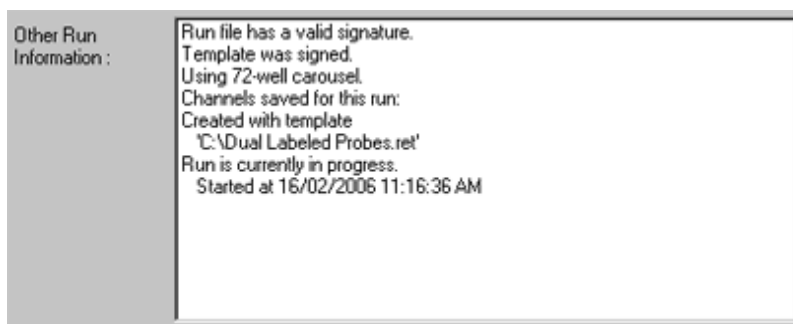
Amostras também podem ser travadas e destravadas na janela “Edit Samples”. Entretanto, apenas um administrador pode destravar amostras uma vez que elas tenham sido travadas.



Qualquer mudança não autorizada ao arquivo invalidará a assinatura da execução.

7.9.6 Modelos travados

Se desejar, pode ser especificado como requisito que todas as execuções são realizadas usando um arquivo de modelo específico. Este modelo pode ser armazenado em um drive de rede onde usuários não podem modificar dados. Usuários ainda podem executar seus próprios perfis. O software Rotor Gene Q armazena o nome do arquivo de modelo que foi executado. Esta informação é acessável clicando no botão “Settings” para acessar a janela “Run Settings”. A informação do modelo é armazenada em outra Informação de execução.

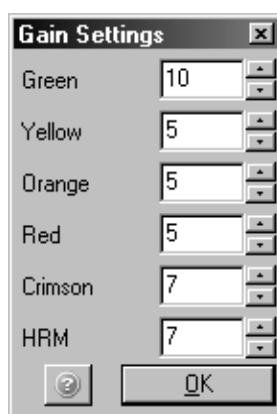


Não é atualmente possível criar arquivos de modelos de leitura apenas usando o software Rotor Gene Q.

7.10 Menu Gain (Ganho)

Clique no menu Gain para visualizar “Gain Settings” para atual execução. Isso ajusta o ganho do canal específico antes da execução. Ajustes de ganho são retidos da última execução. Estes podem ser modificados se a execução ainda não tiver começado ou estiver nos ciclos iniciais. Use as setas para cima e para baixo próxima da caixa de texto para modificar os campos. Depois clique em “Ok”.

O ganho pode ser modificado durante os ciclos iniciais. Uma linha vermelha será desenhada no canal apropriado mostrando onde o ganho foi mudado. Ciclos anteriores à mudança de ganho serão excluídos da análise.



7.11 Menu Window (Janela)

Este menu permite que a janela seja azulejado verticalmente ou horizontalmente, ou arrumado em cascata. Mais opções são acessíveis clicando a seta à direita do botão “Arrange”.

7.12 Menu Help (Ajuda)

Sob o menu Help, “Contents” acessará a ajuda. “What’s new?...” dá um pequeno panorama das novas características adicionadas desde que o software previamente instalado libere. “Website” abrirá o Web Site da QIAGEN em uma nova janela do browse. “About This Software” fornece informação sobre a máquina conectada, lo número serial do Rotor Gene Q, e a versão de software.

7.13 Enviar E-mail de suporte

A opção enviar e-mail de suporte no menu Help permite qie você envie um e-mail de suporte para a QIAGEN incluindo todas as informações relevantes de uma execução. A opção “Save as” salvará todas as informações para um arquivo que você pode copiar para um disco ou pela rede se você não tiver acesso para enviar e-mail no computador executando o Rotor Gene Q.

8 Funções adicionais

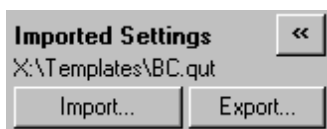
8.1 Modelos de análises

Algumas análises requerem ao usuário a definir limiares, configurações de normalização, e configurações de genótipo. Normalmente estes ajustes são re-utilizados frequentemente em múltiplos experimentos.

Modelos de análise permitem ao usuário salvar e re-utilizar esses ajustes. Isto reduz o esforço de ajustes para reentrar e reduz o risco de erro.

Quantificação, Fusão, Discriminação Alélica, Análise Gráfico de dispersão, e análise de ponto final e suporte modelos de análises. Essas análises permitem ao usuário exportar um modelo único para a análise (e.g., análise de quantificação permite a exportação e importação de arquivos ***.qut** que contém configurações de quantificação).

Depois que um modelo de análise tenha sido importado ou exportado, o nome do arquivo do modelo é mostrado para referências futuras.

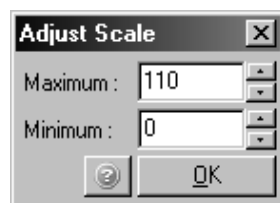


8.2 Abrindo uma segunda execução

Enquanto realiza uma execução, é possível abrir e analisar execuções que foram realizadas antes. Várias funções, tais como os botões “New” ou “Start Run”, não são ativados na segunda janela. Uma nova execução pode ser iniciada da primeira janela uma vez que a primeira execução tenha terminado.

8.3 Opções de escala

Para acessar “Adjust Scale”, clique em “Adjust Scale...” no fundo da janela principal ou clique com o botão direito no gráfico e selecione “Adjust Scale...” no menu que aparecer. Uma escala pode ser manualmente entrada na janela que aparecer.



Para acessar “Auto Escala”, clique em “Auto Scale...” no fundo da janela principal, ou clique com o botão direito no gráfico e selecione “Auto Scale...” no menu que aparecer. “Auto Scale” tenta ajustar a escala a leitura máxima e mínima nos dados.

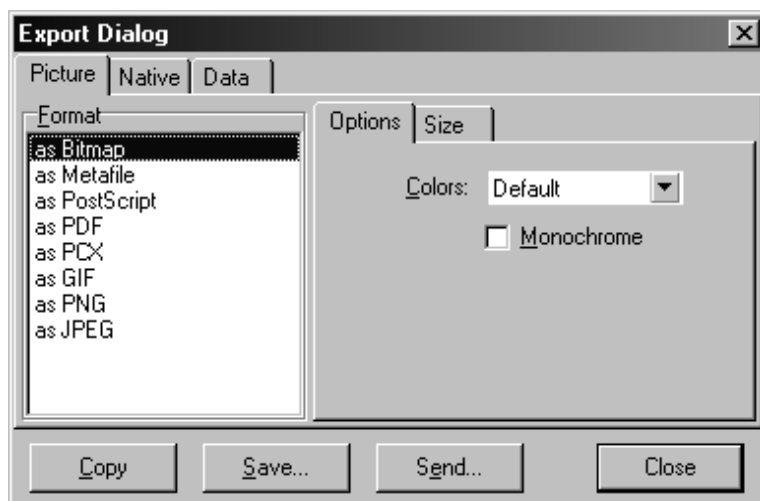
Para acessar “Default Scale”, clique em “Default Scale...” no fundo da janela principal ou clique com o botão direito na gráfico e selecione “Default Scale...” no menu que aparecer. “Default Scale” reinicia a escala para mostrar unidades de fluorescência de 0 a 100.

8.4 Exportar gráficos

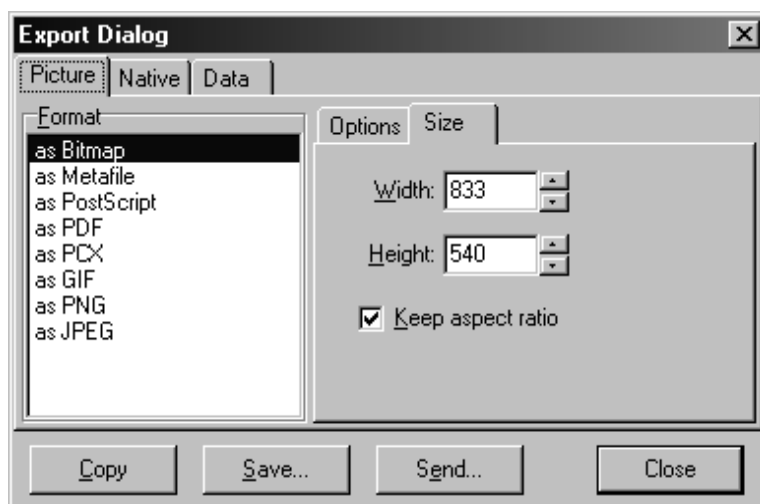
Exportar figura

As etapas seguintes descrevem como salvar uma imagem.

1. Clique com o botão direito na imagem e selecione “Export” no menu que aparecer.
2. A janela “Export Dialog” aparece. Selecione o formato desejado na lista “Format”.



3. Selecione a etiqueta "Size" e especifique o tamanho desejado.



4. Verifique a caixa "Keep aspect ratio" para manter a imagem na proporção correta ao ajustar seu tamanho.
5. Clique em "Save" e selecione o arquivo de nome e localização para o arquivo na caixa de diálogo que aparece.

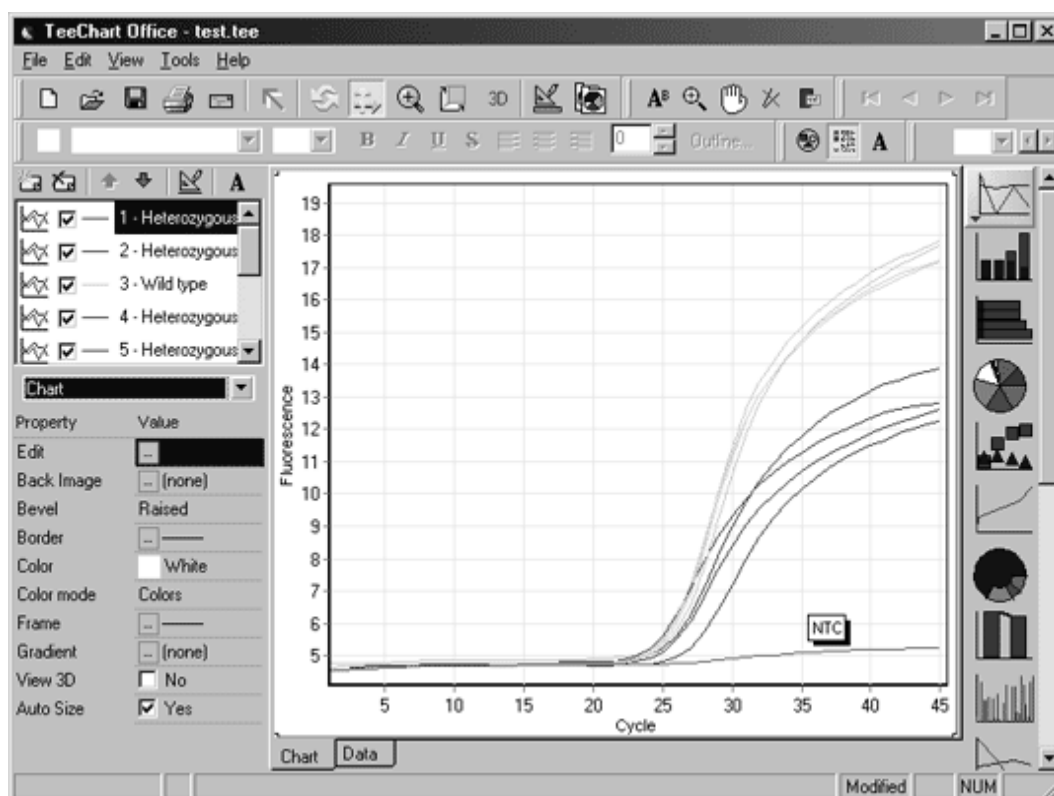
Se uma imagem de alta resolução é requisitada, recomendamos aumentar o tamanho da imagem até que encontre seu requisito ou salvar o gráfico como um Metafile (*.emf, *.wmf). Este é um formato a base de vetor que pode ser aberto no software tal como Adobe Illustrator, permitindo o usuário para criar uma imagem de qualquer resolução.

Formato de exportação nativo

Gráficos no software Rotor Gene Q usa a terceira fração do componente TeeChart desenvolvido por Steema software. Para salvar um gráfico em formato nativo, selecione a etiqueta “Native” na janela “Export Dialog” (veja tela anterior), e depois clique em “Save”. Formato nativo no formato de arquivo TeeChart padrão. Isso permite ao usuário a usar o TeeChart Office da Steema software. TeeChart Office é disponível como um freeware e é instalado como parte do pacote do software Rotor Gene Q. Para acessar o software, clique no ícone TeeChart no desktop.

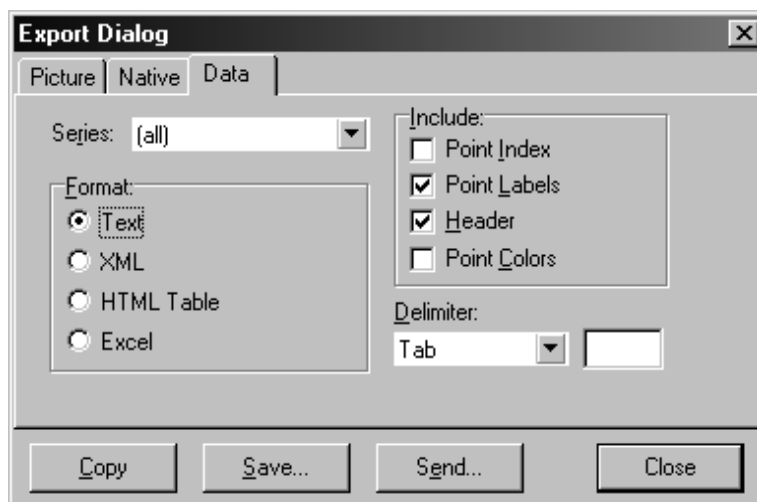


TeeChart Office permite a manipulação de gráficos exportados, incluindo mudança de cores de curvas, adicionar anotações, mudar fontes, e ajustar pontos de dados.




Exportação de dados

Para exportar dados em vários formatos, selecione a etiqueta “Tab” na janela “Export Dialog”. O arquivo exportado contém os pontos de dados brutos usados no gráfico.



Exportando dados brutos e dados de análise também podem ser realizados selecionando “Save as” sob o menu “File” (veja a seção 7.5).

8.5 Ícone chave de fenda

O ícone chave de fenda  aparece no fundo esquerdo na janela principal. Clicando no ícone chave de fenda permite várias opções. Essas opções também podem ser acessadas clicando com o botão direito no gráfico.



Ajustar escala, auto escala,
reverter para escala padrão

Veja a seção 8.3

Exportar...:

Este salva o gráfico em uma variedade e
formatos (veja a seção 8.4)

Copiar gráfico para prancheta;

Este copia a imagem do gráfico para a
prancheta

Editar gráfico no TeeChart Office...:

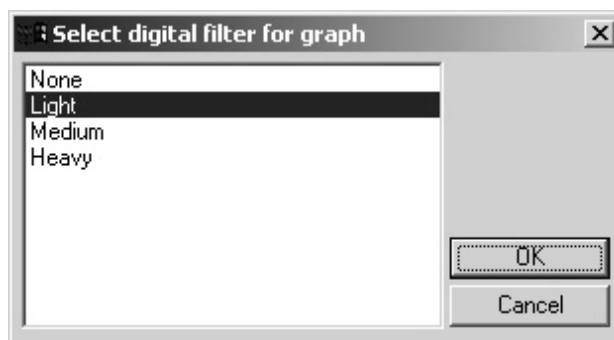
Este abre o gráfico diretamente no
TeeChart Office para editar (veja a seção
8.4)

Imprimir:

Este imprime o gráfico

Filtro digital:

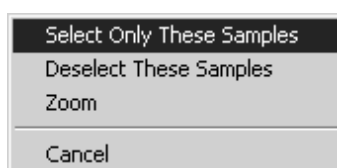
Este modifica o atual filtro digital
selecionado no gráfico. O filtro digital alisa
os dados usando a janela deslizante de
pontos.



- Mostrar apontador:** Este abre uma janela que mostra as coordenadas exatas da posição do ponteiro do mouse.
- Agrupamento:** Este agrupa visualmente amostras que tenham nomes idênticos. Isto pode ser útil em execuções de rotor completas. Selecionando esta opção não afeta valores calculados.

8.6 Opções de áreas selecionadas.

Uma área de um gráfico pode ser selecionada clicando e segurando o botão esquerdo do mouse e arrastando o ponteiro do mouse. As seguintes opções aparecem.



- Selecione opções estas amostras:** Amostras fora da área selecionada são tiradas da seleção.
- Tire a seleção destas amostras:** Todas as amostras na área selecionada são tiradas da seleção.

Zoom

Este amplia a visão da área selecionada do gráfico. Clique no botão “Default Scale” para tirar o zoom.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

9 Procedimentos de manutenção

Manter a performance de trabalho do Rotor Gene Q é fácil. Performance óptica é mantida para assegurar que as lentes, localizada em ambas as fontes de emissão e detecção, estejam limpas. Isto é alcançado limpando gentilmente com cotonete, úmido com etanol, sobre as lentes.

Mantenha a bancada de trabalho limpa e livre de poeira e papéis. A entrada de ar do Rotor Gene Q é ao fundo, e materiais soltos, tais como papel ou poeira comprometem a performance.



Para evitar o acumulo de poeira, mantenha a tampa do Rotor Gene Q fechada quando o instrumento não for usado.

Se a câmara do rotor se tornar contaminada, pode ser limpa ao limpar as superfícies com um pano umedecido sem fiapos (que não esteja pingando) com 0.1% de solução alvejante.*Limpe a câmara com um pano umedecido sem fiapos com água de grau PCR para remover traços de alvejante.

*Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis, e óculos de proteção. Para mais informações, consulte os manuais de material apropriado disponíveis do fornecedor do produto.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

10 Verificação de temperatura óptica

Verificação de temperatura óptica (OTV) é um método que verifica a temperatura interna do tubo no Rotor Gene Q. A validação da temperatura interna do tubo pode ser um procedimento importante em laboratórios certificados. OTV é realizada usando um kit Rotor Disc OTV (veja o apêndice C).

10.1 Princípio OTV

OTV usa as propriedades ópticas de 3 cristais líquidos termocromáticos (TLC)* como referências absolutas de temperatura. Quando aquecida TLC mudam de opacas para transparente em temperaturas muito precisas (50º C, 75º C, e 90º C). TLCs não fluorescem. Portanto, é necessário cobrir a fonte de excitação com uma inserção fluorescente para que os pontos de transição TLC possam ser detectados pelo sistema óptico do Rotor Gene Q. TLCs que estejam abaixo de suas temperaturas de transição são opacas e refletem luz. Algumas luzes refletidas dispersam pelo detector, aumentando a fluorescência. Quando a temperatura interna do tubo atinge o ponto de transição TLC, o TLC se torna transparente, e luz passa através da amostra ao invés de ser refletida para o detector, resultando em aumento de fluorescência. A mudança na fluorescência é usada para determinar a temperatura de transição precisa de cada TLC. A temperatura de transição é comparada com a temperatura relatada pelo arquivo de calibragem de fábrica do OTV Rotor Disc para verificar se o Rotor Gene Q está dentro das especificações de temperatura.

10.2 Componentes do kit Rotor Disc OTV

Os seguintes componentes são requisitados para executar um OTV:

- Um kit Rotor Disc OTV, que inclui:
- Um Rotor Disc 72 OTV Rotor selado (inclui TLCs)

*Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis, e óculos de proteção. Para mais informações, consulte os manuais de material apropriado disponíveis do fornecedor do produto.

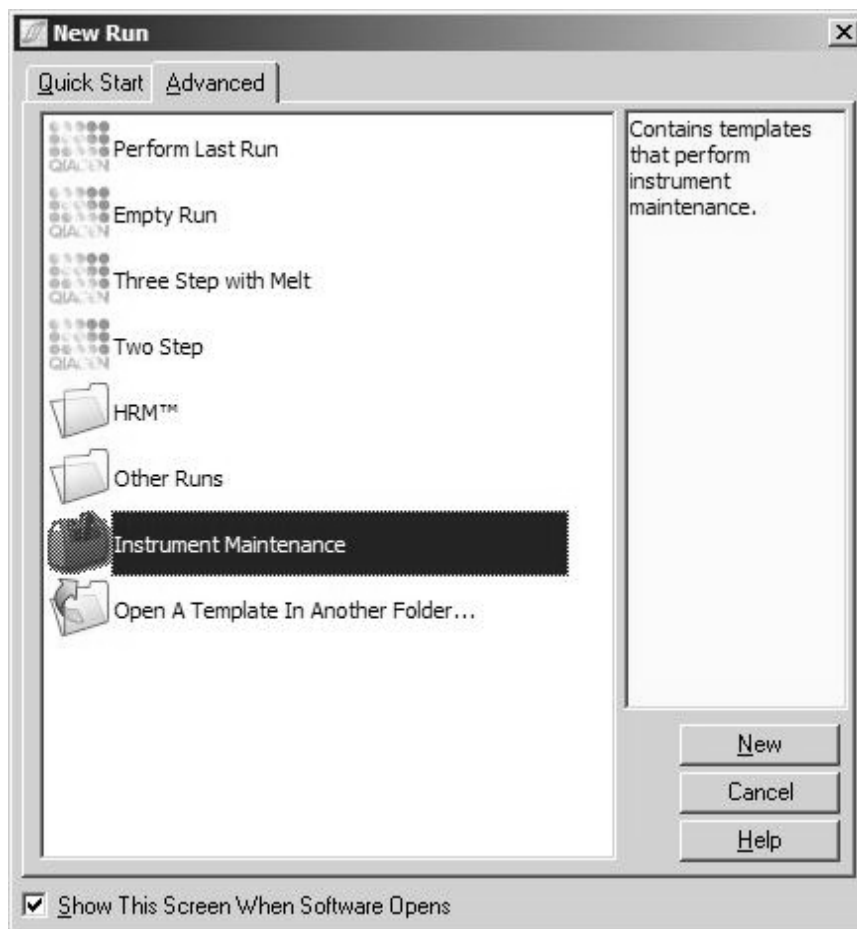
- Inserção de placa fluorescente de dispersão (esta inserção é preta para o instrumento Rotor Gene 3000 ou branco para o Rotor Gene 6000 o Rotor Gene Q).
- Um CD que contém os seguintes arquivos: um número serial e arquivo de data de expiração(*.txt) do OTV Rotor; Arquivo de modelo de teste OTV (*.ret); Manual do produto (*.pdf); arquivo de calibragem de fábrica (*.rex).
- Manual do produto
- Software Rotor Gene Q Series versão 1.7 ou maior, que contém o assistente OTV Rotor fácil de usar.
- Rotor Disc 72 Rotor
- Argolas de travamento do Rotor Disc 72

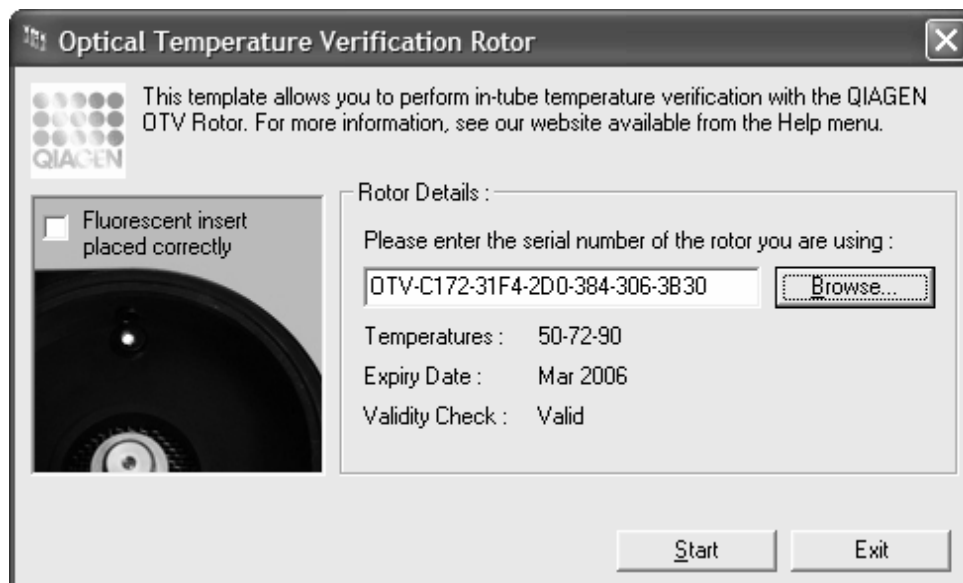
10.3 Executando um OTV

1. Posicione a inserção sobre as lentes de emissão no fundo da câmara do Rotor Gene Q.
2. Posicione o OTV Rotor Disc em um Rotor Disc 72 Rotor. Mantenha segurança com uma argola de travamento Rotor Disc72. Posicione a assembléia dentro do Rotor Gene Q e clique no lugar. Feche a tampa do Rotor Gene Q.



3. Acesse o assistente avançado selecionando etiqueta “Advanced” na janela “New Run”. No assistente avançado, clique em “Instrument Maintenance” e depois em “OTV”. O assistente pede o número serial do OTV. Este número pode ser lido no rótulo no OTV Rotor Disc, ou pode ser importado do CD clicando em “Browse” e escolhendo o arquivo *.otv fornecido no CD. Uma vez que o número for entrado, clique em “Start”.





4. O software então solicita um nome de arquivo para a execução. Depois a execução inicia.
5. A execução realiza uma série de fusões que determinam as características térmicas do Rotor Gene Q.



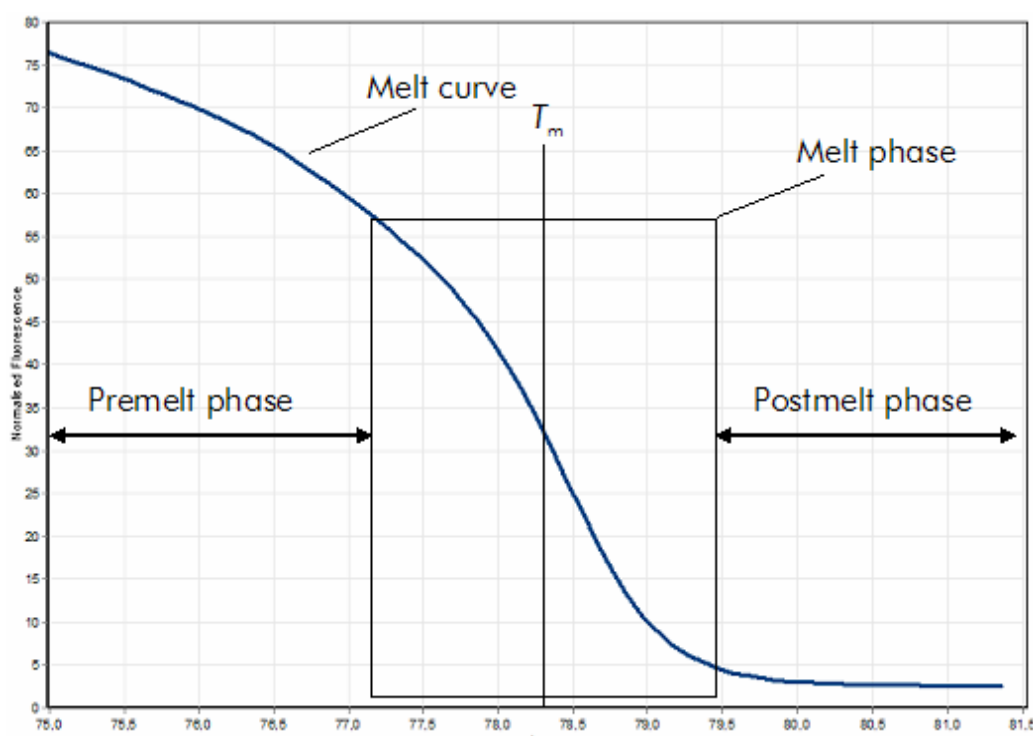
6. Quando a execução for terminada, o software indica se o Rotor Gene Q está dentro das especificações.

7. Se ajustes forem requisitados, o usuário deve clicar em “Apply Adjustment”. Isso solicita ao usuário a realizar uma execução de verificação. Depois que a execução de verificação estiver completa, nenhum ajuste deve ser requisitado. Se mais ajustes forem requisitados, contate seu distribuidor.
8. Quando o Rotor Gene Q estiver dentro das especificações, um relatório da execução pode ser revisto e impresso.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

11 Análise de fusão de alta resolução

Análise de fusão de alta resolução (HRM) é uma técnica inovadora que se baseia em análise de fusão de DNA. HRM caracteriza amostras de DNA de acordo com seu comportamento de dissociação, assim que elas transitam de DNA de cordões duplos (dsDNA) para DNA de cordão único (ssDNA) com temperatura aumentando (veja figura abaixo). Um instrumento HRM coleta sinais fluorescentes com extrema precisão óptica e térmica, criando muitas possibilidades de aplicações.



Uma ação típica de HRM. As ações de curva de fusão de transição da fluorescência alta da fase inicial de pré-fusão, através da diminuição em fluorescência na fase pós-fusão. A fluorescência diminui conforme a intercalação do corante é solto do dsDNA assim que ele se funde com cordão único. O ponto médio da fase de fusão, em que a média de mudança na fluorescência é maior, define a temperatura de fusão (T_m) do DNA sob análise.

Antes de realizar uma análise HRM a sequência alvo deve ser amplificada para um número maior de cópias. Isto geralmente é realizado por PCR na presença de um corante de fluorescência intercalante de dsDNA. O corante não interage com ssDNA, mas intercala ativamente com dsDNA e fluoresce brilhantemente ao ser intercalado. Mudança na fluorescência pode ser usada para medir o aumento de concentração de DNA durante um PCR e

depois para diretamente medir fusão de DNA térmicamente induzida por HRM. Durante o HRM a fluorescência é inicialmente alta porque a amostra inicia como dsDNA. A fluorescência diminui assim que a temperatura aumenta e o DNA se dissocia em cordões únicos. O comportamento de fusão observado é característico de uma determinada amostra de DNA.

Ao usar HRM, o Rotor Gene Q pode caracterizar amostras baseado em sequência de comprimento, conteúdo GC, e sequência complementar de DNA. HRM pode ser usado em aplicações de genotipagem, tais como análise de inserção/deleção ou polimorfismo nucleotídeo único (SNPs), ou para mostrar mutações genéticas desconhecidas. Também pode ser usada em aplicações epigenéticas para detecção e análise de status de metilação de DNA. Também pode ser usado para quantitativamente detectar uma proporção pequena de variantes de DNA em um fundo de sequência do tipo selvagem de aproximação sensível de 5%. Isto pode ser usado, por exemplo, para estudar mutações somáticas adquiridas ou mudanças no estado da metilação de ilhas CpG.

HRM no Rotor Gene Q facilita múltiplas aplicações, incluindo:

- Identificação de predisposição de genes do candidato.
- Estudos associados (casos comparados e controles, genótipo e fenótipo).
- Determinação de prevalência alélica dentro da população ou subgrupo.
- Mostra e validação de SNP.
- Mostra de perda de heterosigosidade.
- Impressão digital do DNA.
- Caracterização de blocos de haplótipos
- Análise de metilação do DNA
- Mapeamento do DNA
- Identificação de espécies
- Descobrimto de mutações
- Determinar a média de mutações somáticas adquiridas

- Tipagem HLA

HRM é mais fácil e tem mais custo-benefício do que o exame de genotipagem à base de sonda e, ao contrário de métodos tradicionais, é um sistema de tubo fechado que previne contaminação com produtos PCR. Os resultados são comparáveis à métodos convencionais tais como SSCP, DHPLC, RFLP, e seqüenciamento de DNA.*

11.1 Instrumentação

O Rotor Gene Q fornece a seguinte demanda de requisitos de capacidade termo-óptica em tempo real para HRM.

- Iluminação de alta intensidade
- Detecção óptica altamente sensível
- Rápida aquisição de dados
- Temperatura de amostra finamente controlada
- Variação térmica e óptica mínima de amostra para amostra

11.2 Química

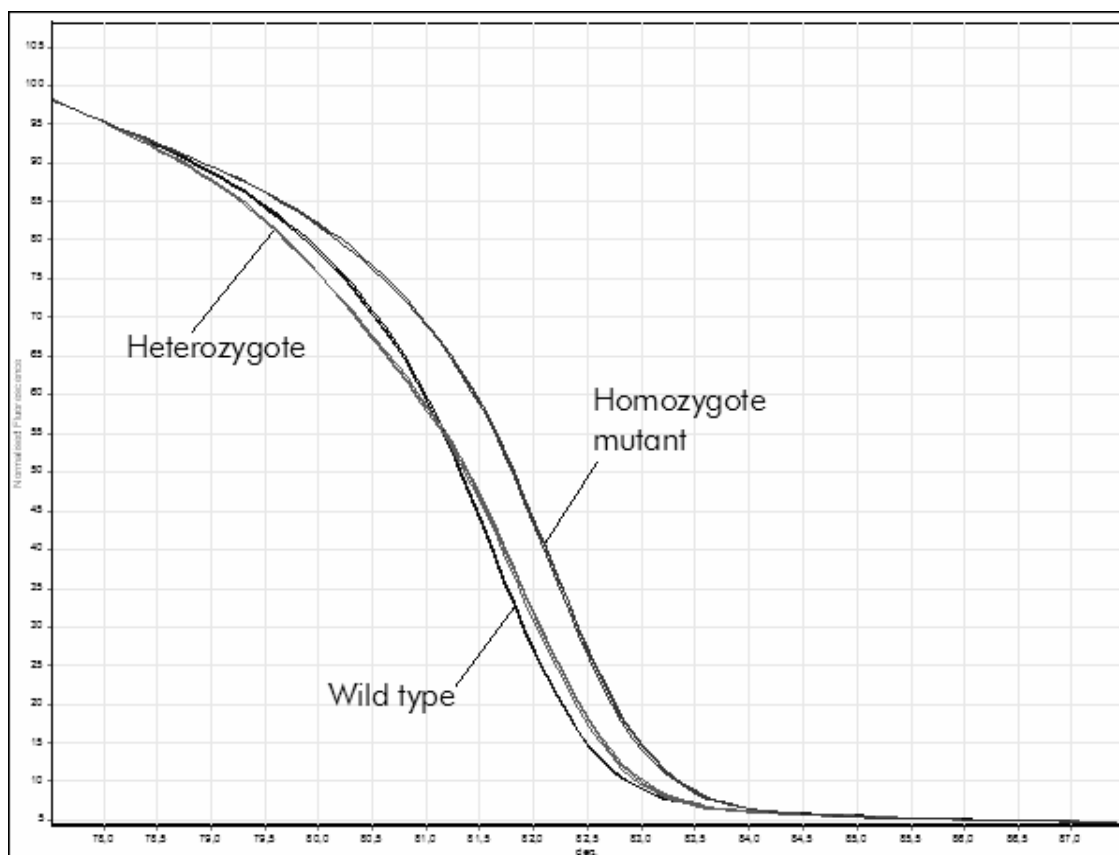
A QIAGEN oferece o kit Type-it HRM PCR para análise de SNPs e mutações usando HRM e o kit EpiTect HRM PCR para análise de metilação usando HRM (disponível em breve). Ambos os kits contém o corante EvaGreen fluorescente intercalante de terceira geração. Os kits combinam Buffer HRM otimizado e HotStar Taq Plus para evitar amplificação de produtos não específicos e fornecer resultados confiáveis.

11.3 Exemplo de genotipagem SNP

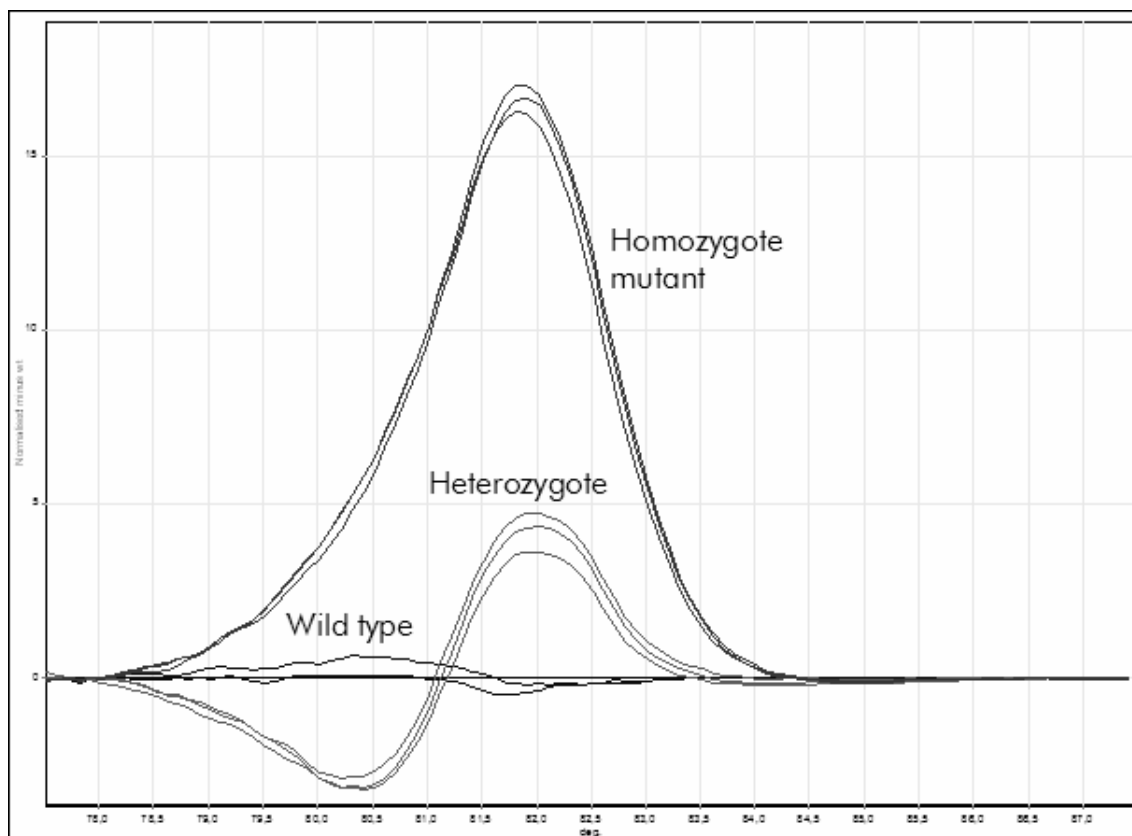
No exemplo mostrado, o kit Typi-it HRM PCR foi usado em análise HRM para diferenciar entre tipo selvagem homozigoto, homozigoto mutante, e formas heterozigotas do SNP humano rs 60031276. Para detalhes técnicos, consulte o manual Type-it HRM PCR.

*White, H. and Potts, G. (2006) Scanner de mutação de análise de fusão de alta resolução. Avaliação do Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 w 384 well LightScanner (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory-Wessex.

A



B



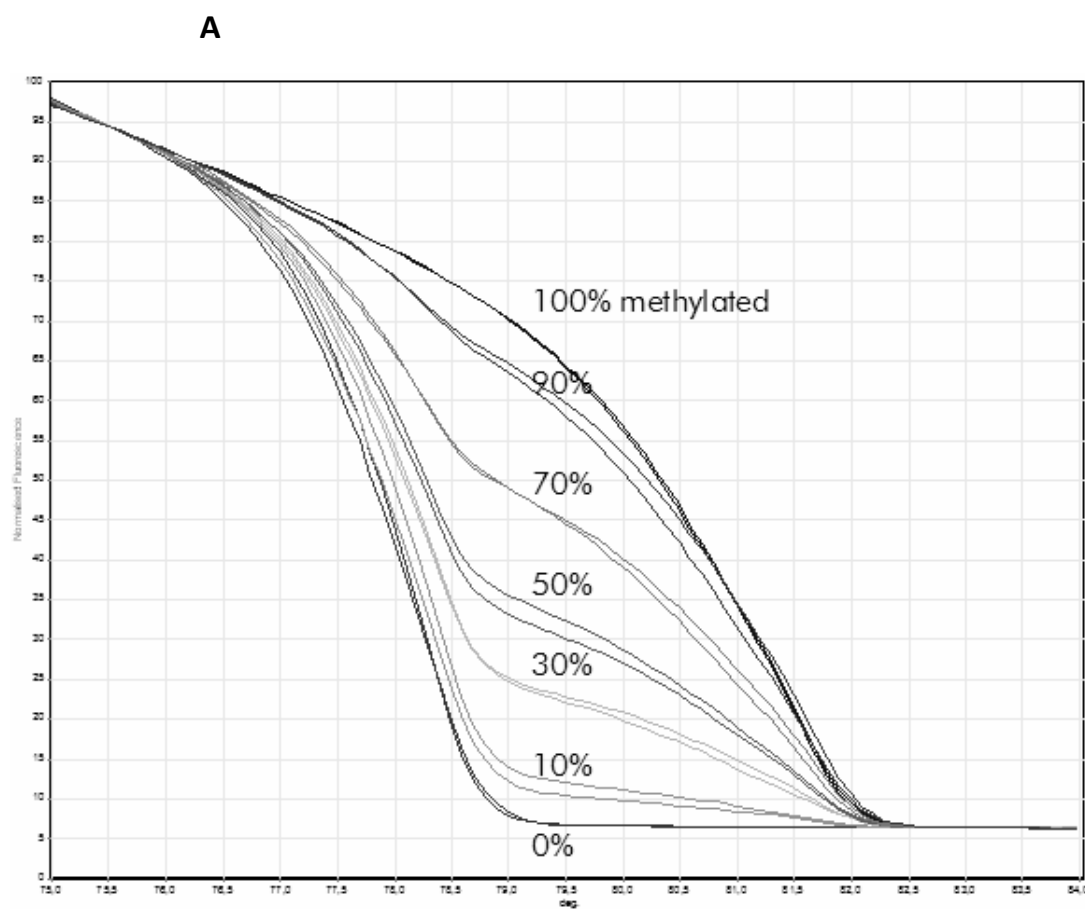
C

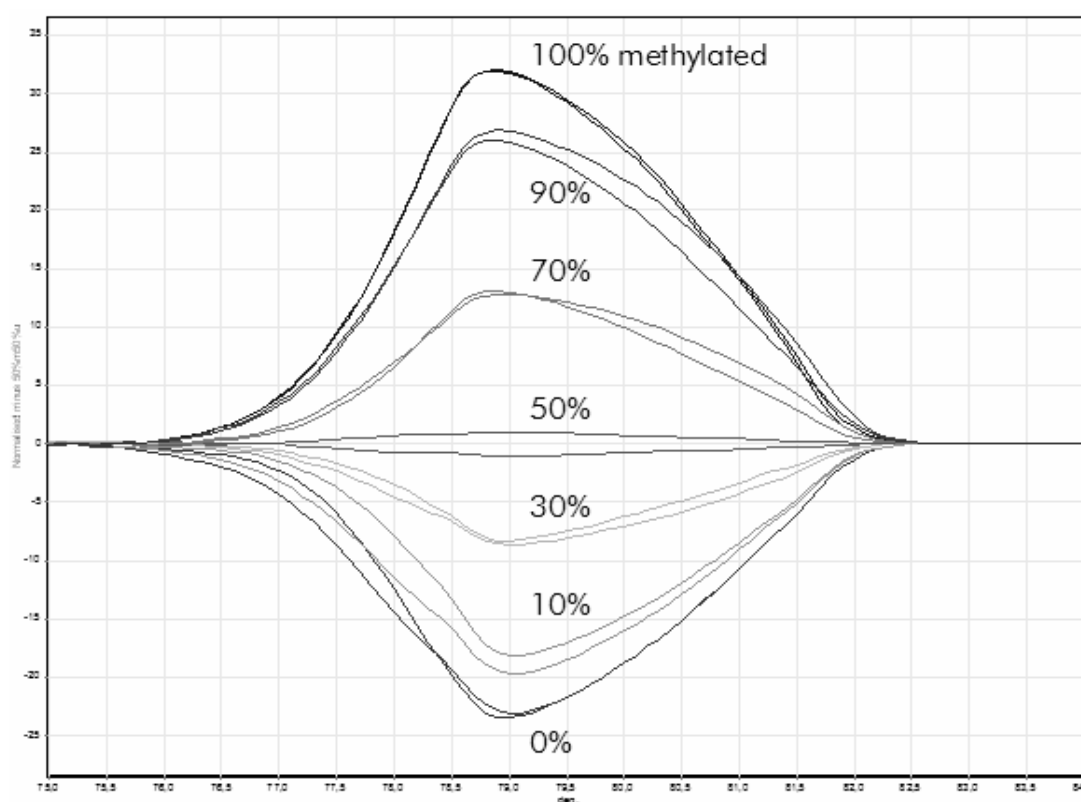
HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)				
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22		AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23		unknown	homo AA	99,49
24		unknown	homo AA	99,76
28		AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29		unknown	hetero AG	99,49
30		unknown	hetero AG	98,47
34		GG Human SNP rs60031276	homo GG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

Genotipagem SNP por HRM. SNP humano rs600031276 (substituição A a G) no gene PPP1R14B (proteína fosfatase 1, subunidade regulatória (inibidora) 14B) foi analisada no Rotor Gene Q usando 10 ng de DNA genômico de diferentes genótipos e o kit Type-it HRM (disponível em breve). Amostras tipo selvagem homozigoto (AA), homozigoto mutante (GG), e heterozigoto (AG) são mostradas em **A** uma curva de fusão padrão nomalizada e **B** uma ação de diferença normalizada para amostras do tipo selvagem. **C** Genotipos para as amostras desconhecidas que foram designadas pelo software Rotor Gene Q.

11.4 Exemplo da análise de metilação

No exemplo mostrado, o kit EpiTech HRM PCR foi usado em análise HRM para discriminar várias proporções de DNA metilado e não metilado. Para detalhes técnicos, consulte o *manual EpiTech HRM PCR*.





Análise quantitativa de metilação por HRM. Várias proporções de DNA-APC metilado e não metilado (acedonomatosis polyposis coli) foram analisados e discriminados por análise de metilação HRM no Rotor Gene Q usando o kit EpiTech HRM (disponível em breve). **A** uma curva de fusão padrão normalizada e **B** uma ação de diferença normalizada para as 50% de amostras metiladas mostradas.

11.5 Guias para sucesso em análise HRM

O sucesso de análise HRM depende muito na sequência determinada sob investigação. Alguns temas de sequência, tais como hairpin loops ou outras estruturas secundárias, regiões localizadas de conteúdo GC incomum alto ou baixo, ou repetição de sequências podem afetar o resultado. Além disso, utilizar os kits padrões e protocolos otimizados da QIAGEN pode superar muitos dos desafios potenciais listados. Algumas simples dicas para ajudar a garantir o sucesso como detalhado abaixo.

Analisar pequenos fragmentos de DNA

Analisar fragmentos não maiores que 250 bp. Produtos maiores podem ser analisados com sucesso, mas geralmente fornecem resolução mais baixa. Isto porque, por exemplo, uma variação de base única possui um maior efeito no comportamento de fusão de um amplicon de 100 bp do que no amplicon de 500 bp.

Assegure-se que o PCR contenha apenas produto específico

Amostras contaminadas com artefatos pós-PCR, tais como princípios dímeros ou produtos não especificados podem fazer resultados HRM difícil de interpretar. Kits da QIAGEN para análise HRM garantem especificação máxima sem necessidade de otimização.

Use modelo de pré-amplificação suficiente

Análise de dados PCR em tempo real podem ser muito úteis para solucionar problemas de análise HRM. Ações de amplificação devem ter um Ct (ciclo limiar) de menos ou igual a 30 ciclos. Produtos que amplificam mais tarde que este (devido a início lento de montante de modelo ou degradação de modelo) tipicamente produzem resultados HRM variáveis devido a artefatos PCR.

Normalizar concentração de modelo

O montante de modelos adicionados na reação deve ser consistente. Normalize as concentrações iniciais para que todas as ações de amplificação estejam dentro dos valores de 3 Ct para a outra. Isto garante que a entrada de concentrações esteja dentro de um alcance de 10 dobras.

Verifique por ações de amplificação anômalas

Antes de executar um HRM, examine os dados de ação de amplificação cuidadosamente por formas de ações de amplificação anormais. Ações com uma fase log-linear que não seja íngreme é recortada, ou que atinja um planalto de sinal baixo comparado com outras reações, podem indicar amplificação fraca, ou um sinal de fluorescência que seja muito baixo (e.g.,isso pode ocorrer se a primeira concentração for muito baixa). Reações fracas podem ser causadas por inibidores de reação ou configuração incorreta da reação. Dados HRM de tais amostras podem ser inconclusivos ou de baixa resolução. Para evitar resultados não confiáveis, recomendamos os kits QIAGEN para preparação de amostra e análise HRM.

Mantenha as concentrações de amostras de pós-amplificação similares

A concentração de um fragmento de DNA afeta sua temperatura de fusão (T_m). Por esta razão, concentrações de amostras de DNA devem ser mantidas o mais similares possível. Ao analisar produtos PCR, certifique-se de que cada reação tenha amplificado

para a fase de planalto. Em planalto, todas as reações terão amplificado para uma extensão similar independentemente de seu montante inicial. Note, entretanto, que reações fracas podem não alcançar o planalto com a mesma quantidade de amplificação devido, por exemplo, a configuração inconsistente de exame (e.g., a primeira concentração foi muito baixa).

Garanta a uniformidade amostra por amostra

Todas as amostras devem ser de volume igual e devem conter a mesma concentração de corante. O comportamento de fusão de DNA é afetado por saltos na mistura de reação, então é importante que a concentração de buffer, Mg, e outros sais sejam o mais uniforme possível em todas as amostras. Similarmente, use apenas tubos de reação idênticos do mesmo fabricante para evitar variações devido a espessura plástica e propriedades de auto-fluorescência.

Pemitir coleta de dados suficiente para as fases de pré-fusão e pós-fusão

Capture pontos de dados HRM por aproximadamente 10° C de alcance, centrado em volta do T_m observado (veja a figura na primeira página deste capítulo). Isto fornece pontos de dados de base suficientes para efetiva normalização da curva e resultará em mais réplicas reproduzíveis e interpretação mais fácil de dados.

11.6 Preparação de amostra

Degradação de amostra deve ser evitada durante a purificação e armazenamento. Evite montantes excessivos de inibidores, tais como de reporte de etanol. Para melhorar os resultados HRM, recomendamos manter o montante de modelos usados consistente entre amostras. Análise espectrofotométrica para determinar a concentração de DNA e pureza é recomendada. Recomendamos os kits QIAGEN para preparação de amostras.

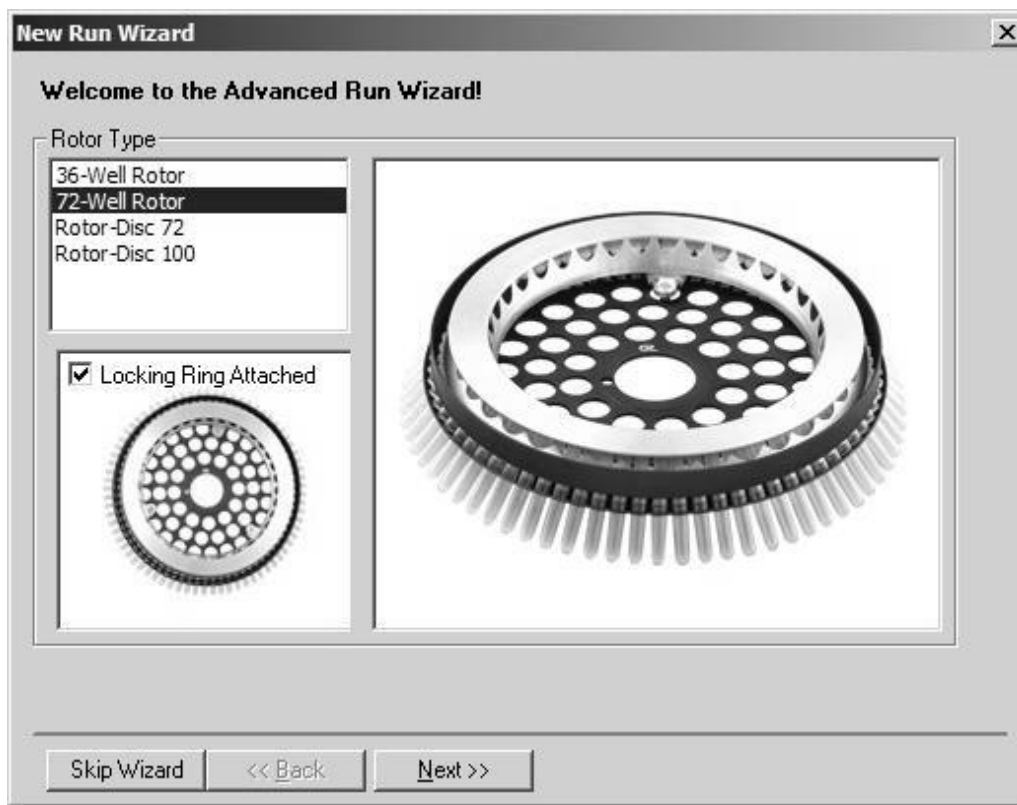
Nota: A 260 nm uma unidade de absorção é igual a 50 *ug*/ml DNA. DNA puro fornecerá uma proporção de 1.8 a 260 nm até 280nm.

11.7 Configuração do software

1. Abra um novo arquivo de execução selecionando “New...” do menu File. No assistente avançado , selecione “HRM”.



2. Ajuste o tipo de rotor (neste exemplo o rotor de 72 poços é usado). Certifique-se de que a argola de travamento esteja no lugar e a caixa “Locking Ring Attached” esteja selecionada antes de prosseguir para a próxima etapa.



3. Ajuste os detalhes da execução. Entre com o nome do operador (opcional) e adiciona qualquer nota sobre o experimento (opcional). Selecione o volume da reação (requisitado) e o layout desejado da amostra.

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

4. Clique no botão “Edit Profile” para modificar tempos e temperaturas da reação.

New Run Wizard

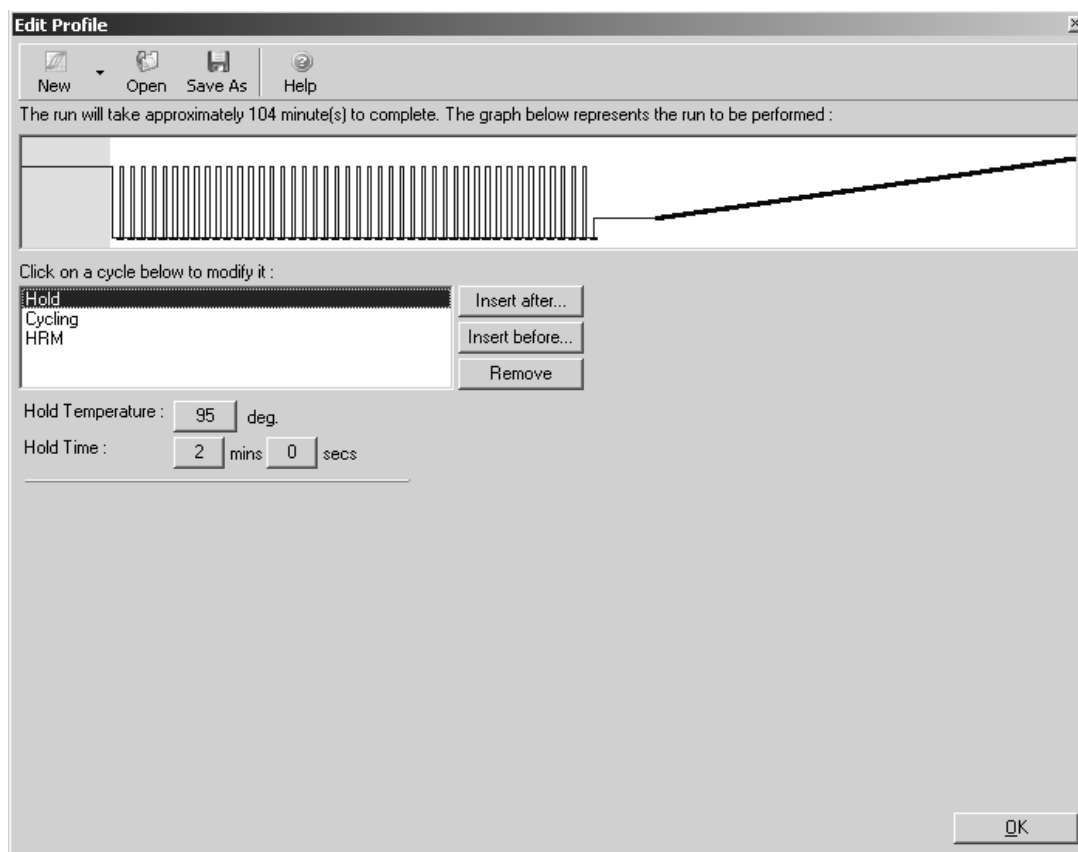
Temperature Profile :

Channel Setup :

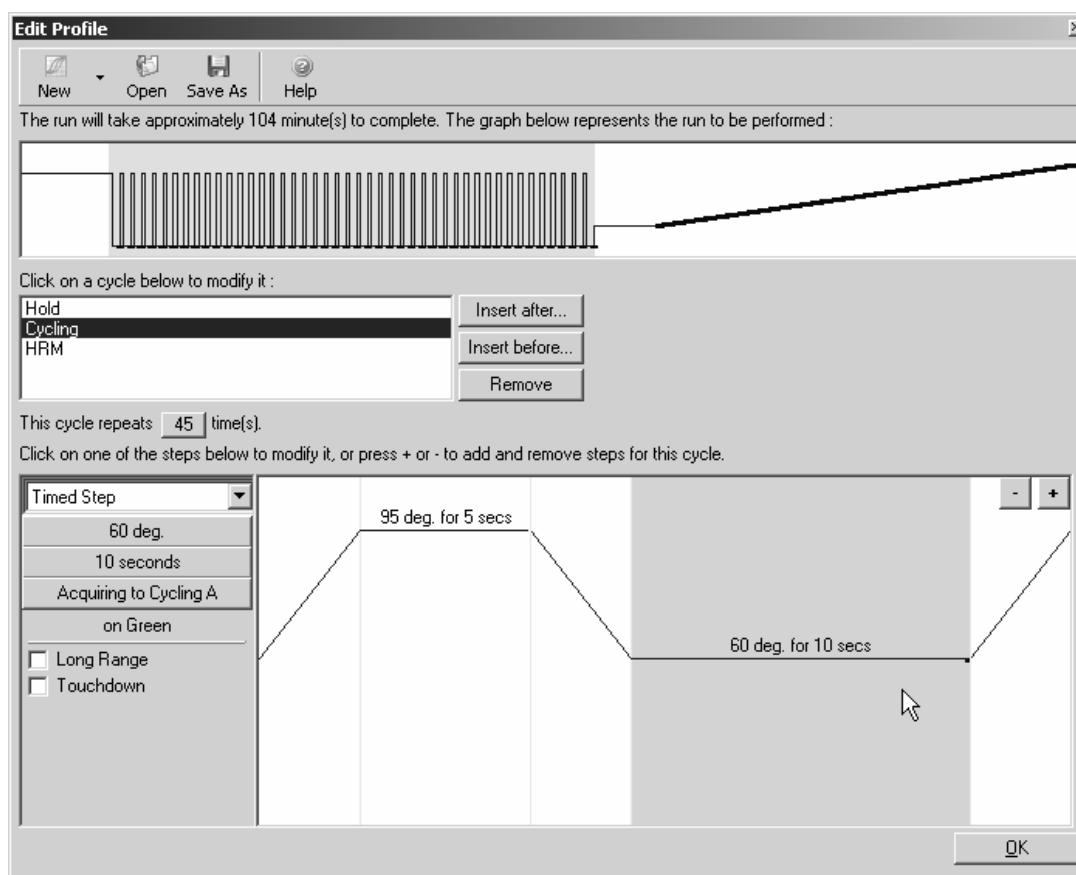
Name	Source	Detector	Gain
Green	470nm	510nm	2.67
Yellow	530nm	555nm	5
Orange	585nm	610nm	5
Red	625nm	660nm	5
Crimson	680nm	710hp	7
HRM	470nm	510nm	-1.33

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

5. Ajuste um tempo de espera inicial apropriado. Este tempo depende do tipo de polimerase de DNA usado. O kit Type-it HRM PCR e o kit EpiTech HRM PCR requerem um tempo de ativação de 5 minutos. O tempo de ativação padrão é de 10 minutos.



6. Modifique o ciclo para se ajustar ao amplicon



7. Assegure-se que dados de fluorescência serão adquiridos. Adquirar dados no canal verde no fim da etapa de cozer.

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition) ▼

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red
Yellow

> < <<

Acquiring Channels :

Name
Green

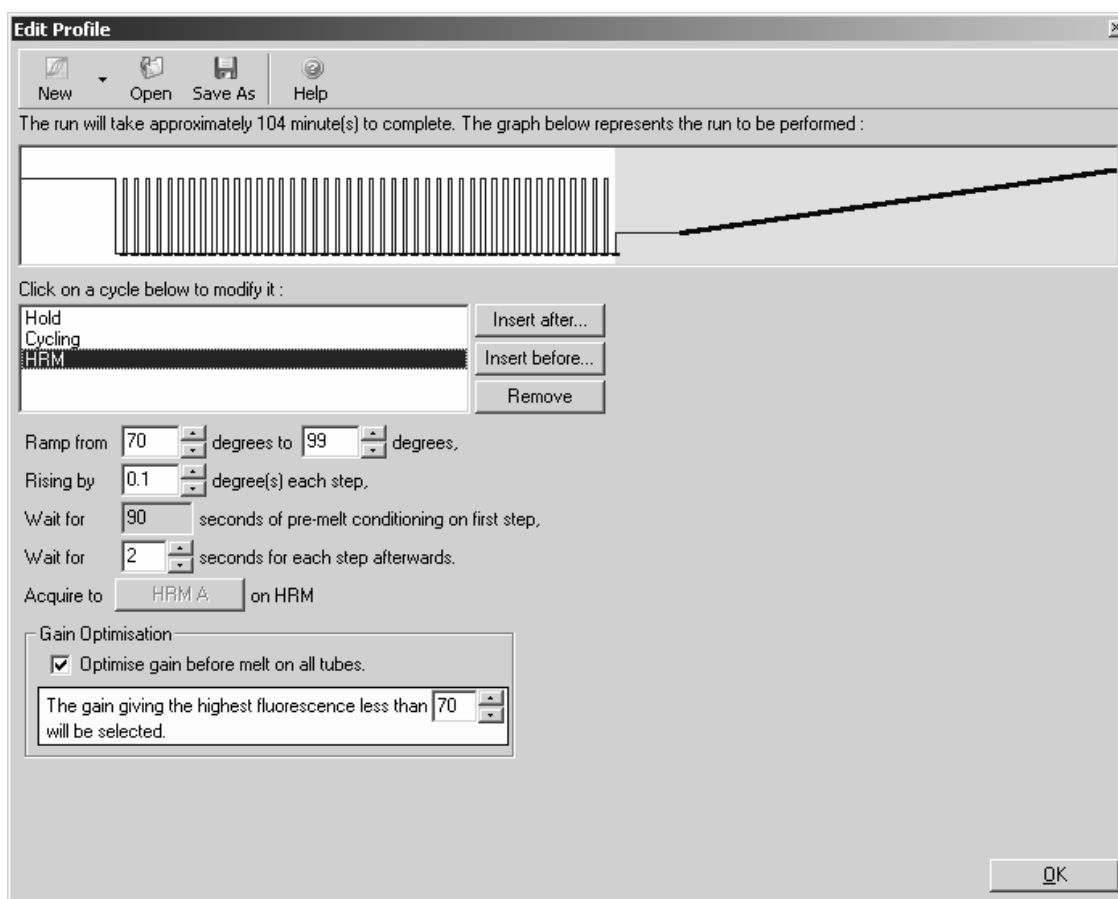
To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

Dye Chart >> OK Don't Acquire Help

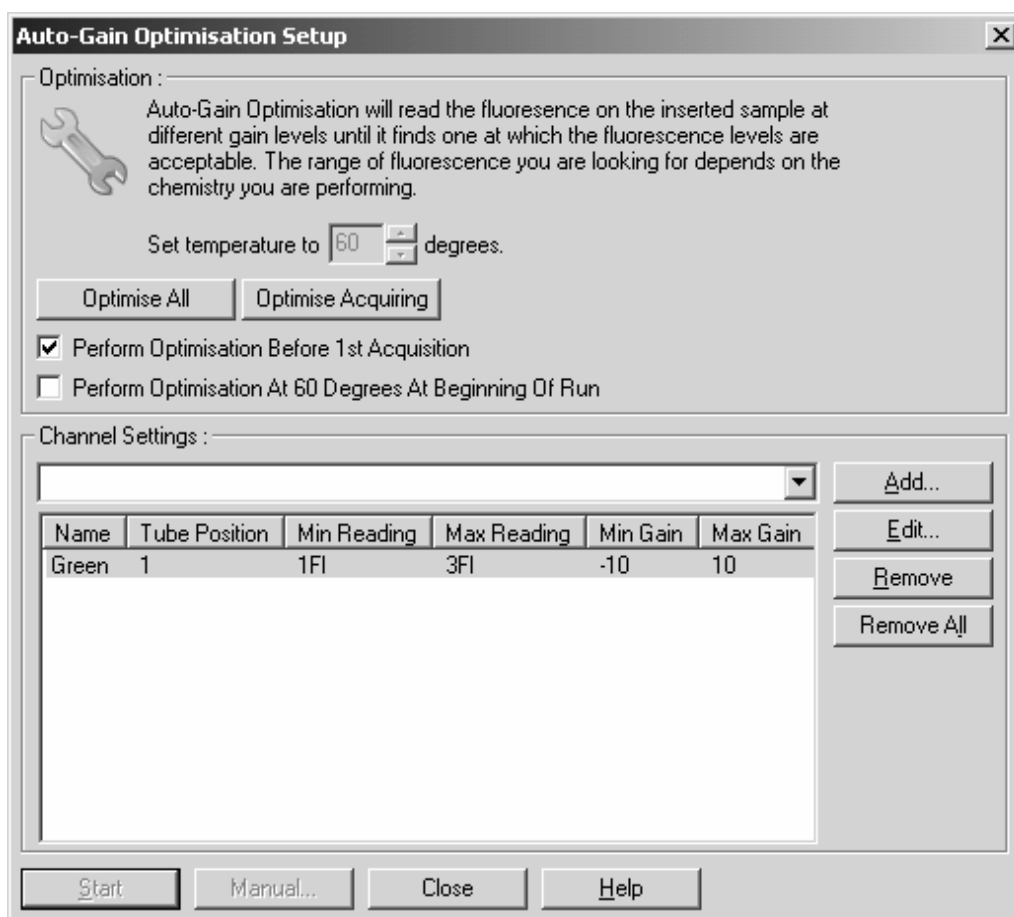
Dye Channel Selection Chart

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

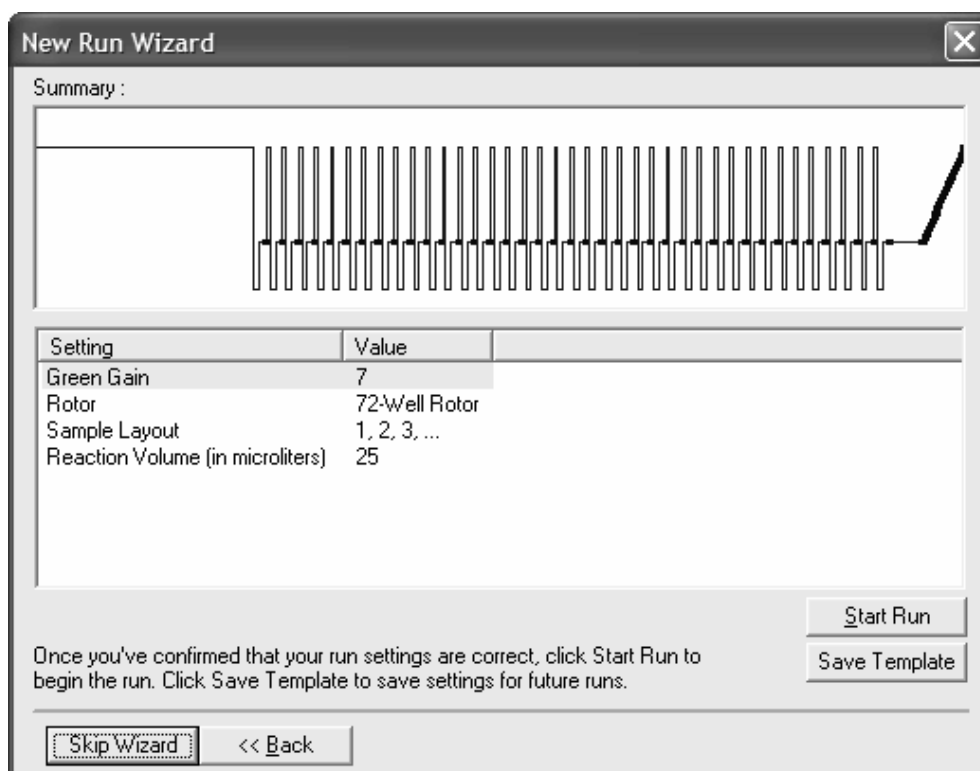
8. Ajuste as condições de execução HRM. Modifique as condições para se adequar ao amplicon. Para o primeiro conjunto de experimentos permita um domínio amplo de fusão. Utilize o T_m teórico como um guia para os alcances adequados. Uma vez que você tenha determinado onde o produto será fundido, reduza o domínio de fusão para não mais que 10^o C. Garanta que o início da fusão ocorra a 5^o C anterior a primeira transição de fusão. A rampa padrão é ajustada para 0.1^o C com uma espera de 2 segundo em cada etapa. A transição mínima de rampa é de 0.5^o C com uma segunda espera em cada etapa. Dados são automaticamente adquiridos ao canal HRM. Otimização automática de ganho é realizada como padrão. O software irá procurar pela configuração de ganho para que o maior valor de fluorescência relatado não seja maior que 70 unidades em uma escala de 100. Note que este pode ser aumentado para o máximo de 100.



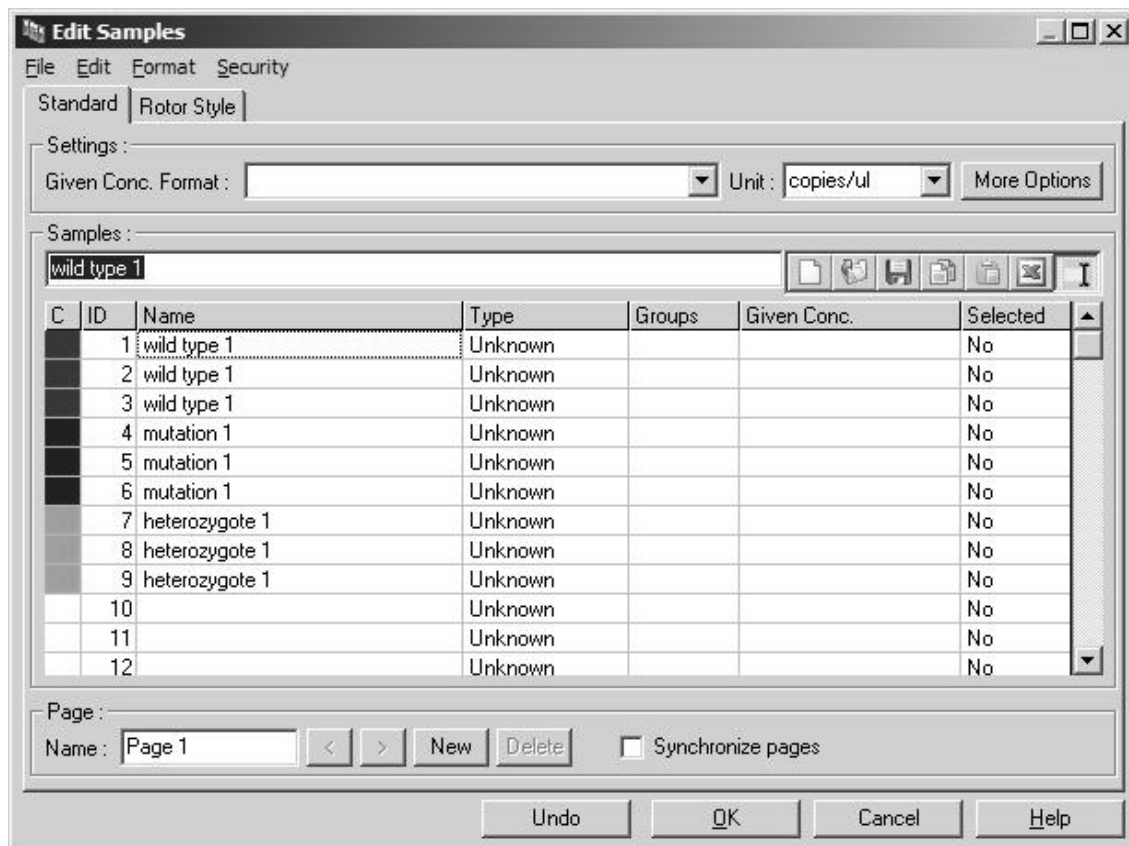
9. Opcional: Ajuste a Auto-Otimização de Ganho. Isso se aplica à etapa de amplificação em tempo real apenas, e é ajustada para o canal verde. Clique no botão “Optimize Acquiring” (para otimizar apenas aqueles canais usados por uma execução). A otimização é melhor realizada antes da primeira etapa de aquisição, portanto selecione a caixa “Perform Optimisation Antes da primeira aquisição”. O alcance da fluorescência do plano de fundo recomendado para corantes intercalados é entre 1 e 3 unidades de fluorescência. Para mudar esta configuração, clique no nome do canal e selecione-o na lista e depois clique no botão “Edit”.



10. Inicie a execução clicando em “Start Run” e salve o arquivo de execução em seu computador.



11. Edite os nomes das amostras (opcional). Nomes de amostras podem ser editadas durante ou depois de uma execução.

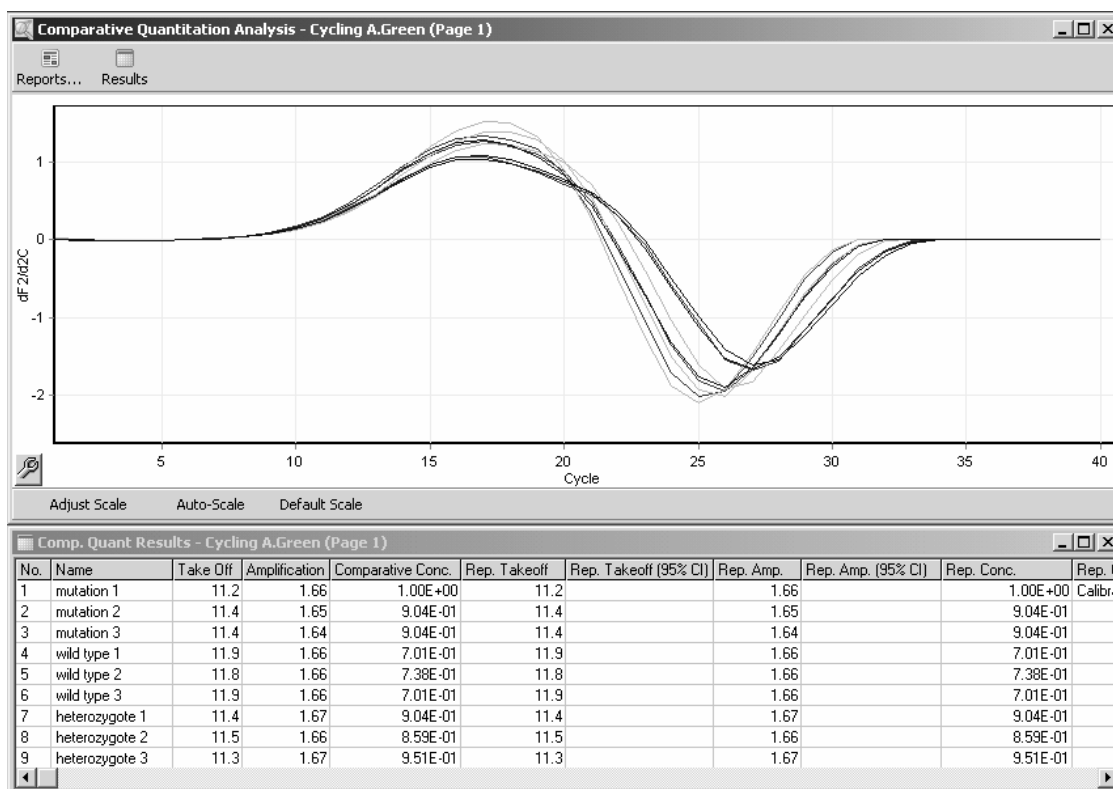


11.8 Análise de dados PCR em tempo real

Análise de dados PCR em tempo real anterior à análise de dados HRM é vantajosa. Dados PCR em tempo real podem ser marcados fracamente ao realizar exames. Identificar estes forasteiros e filtrá-los para fora de sua análise HRM subsequente irá melhorar muito a eficiência geral das análises de HRM, sendo que analisar produtos PCR de fraca qualidade resultará em resultados HRM fracos. Recomendamos analisar dados de PCR quantitativo em tempo real como se segue.

1. Analise o dado em tempo real usando a opção “Quantitation” da janela “Analysis”. Se nenhum valor Ct for de 30 ou maior, as reações correspondentes são consideradas que tenham sido amplificadas muito tarde. Estas amostras devem ser analisadas com suspeição ou devem ser removidas da análise como forasteira. Amplificação tardia é geralmente devido pequena quantidade de modelos iniciais e/ou altos níveis de degradação da amostra.

2. Avalie o nível de fluorescência do ponto final. Se a fluorescência do ponto final em quaisquer das ações de amplificação for baixa comparado com a maioria das ações no conjunto de dados, omita estas amostras da análise mesmo se seus valores Ct forem menores que 30. Baixa fluorescência de ponto final pode indicar montante incorreto de corante, níveis incorretos de componentes de reação (como os primeiros), ou ação de inibidores.
3. Utilize a opção “Comparative Quantitation” da janela “Analysis” para obter a eficiência da reação de cada amostra. Se a eficiência não for similar a outras reações no experimento, ou se for menor que aproximadamente 1.4, omita a reação como uma forasteira.



Resultados de quantificação comparativa. A eficiência da reação é mostrada na coluna “Amplification” com marcação de 2 (2=100% de eficiência)

Nota: Se você suspeitar a presença de dímeros primeiros ou produtos não específicos, avalie a reação desenhando uma ação derivativa usando a opção “melt” da janela “Analysis”. Garanta que exista um único pico, indicativo de um único produto. Se possível, execute um gel para verificar se existe um único produto de amplificação. Se houverem mais de um produto, a reação deve ser repetida ou re-otimizada.

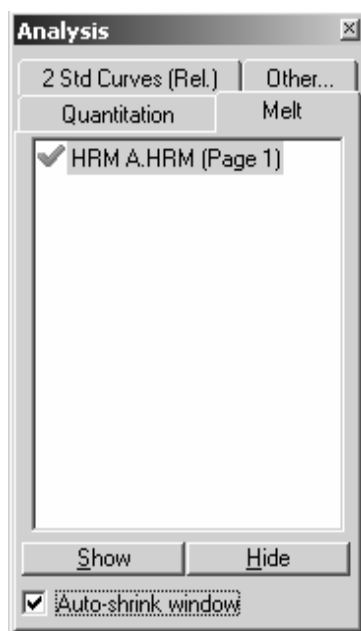
11.9 Análise de dados HRM

Análise HRM habilita tanto chamado visual quanto automático de genótipos. Os resultados podem ser vistos tanto como uma ação de fusão normalizada quanto uma ação diferenciada. Curvas normalizadas fornecem a representação básica dos diferentes genótipos baseados em desvios de curva (para homozigotos) e mudança em formato da curva (para heterozigotos)

Nota: A primeira análise de curva de fusão derivativa (como usado pela opção padrão “Melt” na janela “Analysis”) é considerada inapropriada para análise HRM. Isto é porque qualquer derivação dos dados adiciona ruído adicional e torna a interpretação dos dados mais difícil.

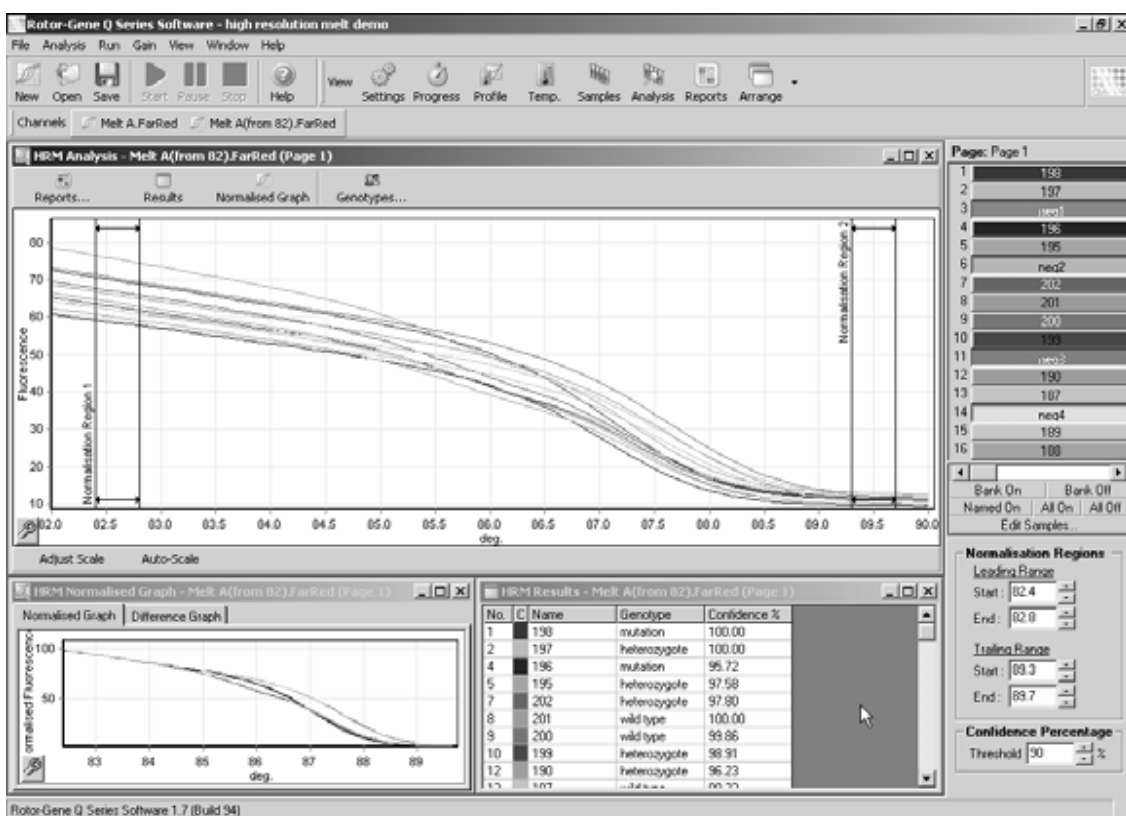
As seguintes etapas descrevem a análise de resultados HRM usando o software Rotor Gene Q.

1. Selecione a opção “HRM” da janela “Analysis”.



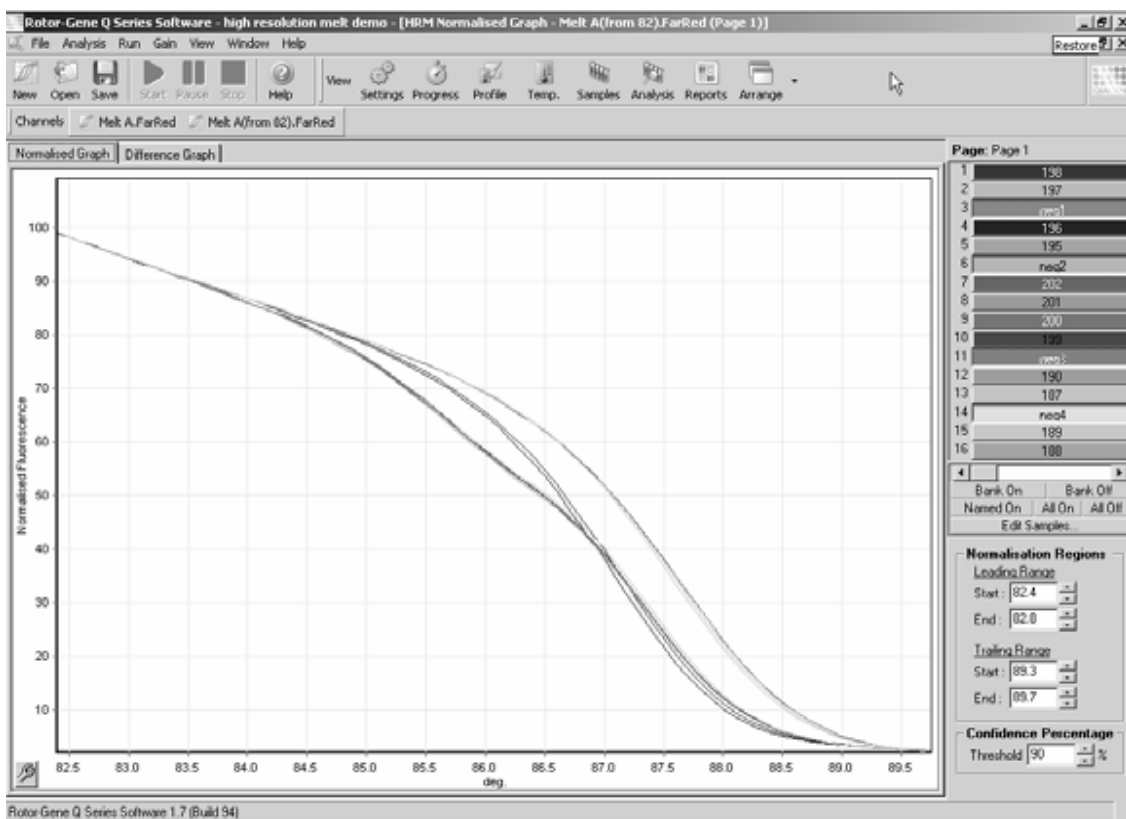
2. Janelas aparecem mostrando os dados brutos, o gráfico normalizado, e os resultados. A janela de dados brutos permite ajustes das regiões de normalização.

A normalização permite que todas as curvas sejam comparadas com o mesmo nível de sinal de fluorescência inicial e final para assistência na interpretação e análise. Dois cursores por região são fornecidos, voltando ao lugar no finais das curvas. Os pontos de dados dentro das regiões são usados para normalizar a fluorescência (do eixo y apenas) para o início (Região 1) e fim (Região 2) da ação de fusão. Dados fora das regiões determinadas são ignorados. Ajuste as regiões para rodear dados base representativos para as fases de pré-fusão e pós-fusão. Alargar as regiões (clcando e arrastando) permite que o software ajuste para a fenda da base. Para garantir que as curvas normalizem efetivamente, evite alargar as regiões de normalização na fase de fusão.



Nota: Recomendamos que os cursores só sejam movidos se você desejar evitar áreas de curva de fusão. Os movimentos dos cursores na fase de transição de fusão podem afetar ações de subtração e porcentagens de confiança.

3. A janela “Normalized Graph” mostra as curvas defusão normalizadas. Amostras também podem ser vistas como uma ação diferenciada contra um dos controles.

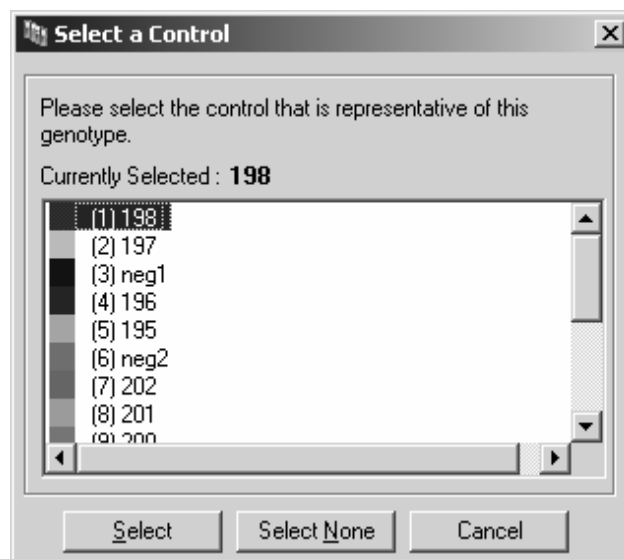


4. Clique no botão “Genotypes...” para definir os genótipos. Insira cada nome de categoria de genótipo e selecione uma amostra representativa de cada amostra da lista.

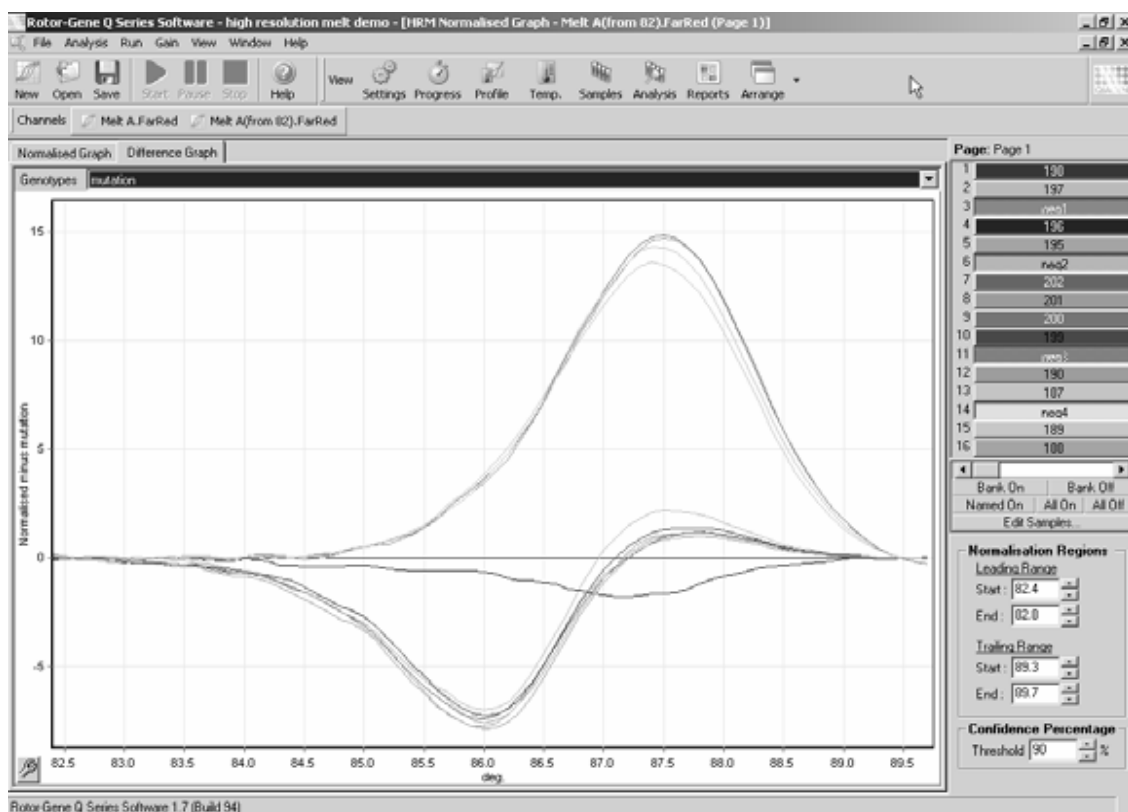
The screenshot shows the 'HRM Genotypes' dialog box. It contains a table with the following data:

Genotype	Control	Sample
mutation		198
wild type		201
heterozygote		197

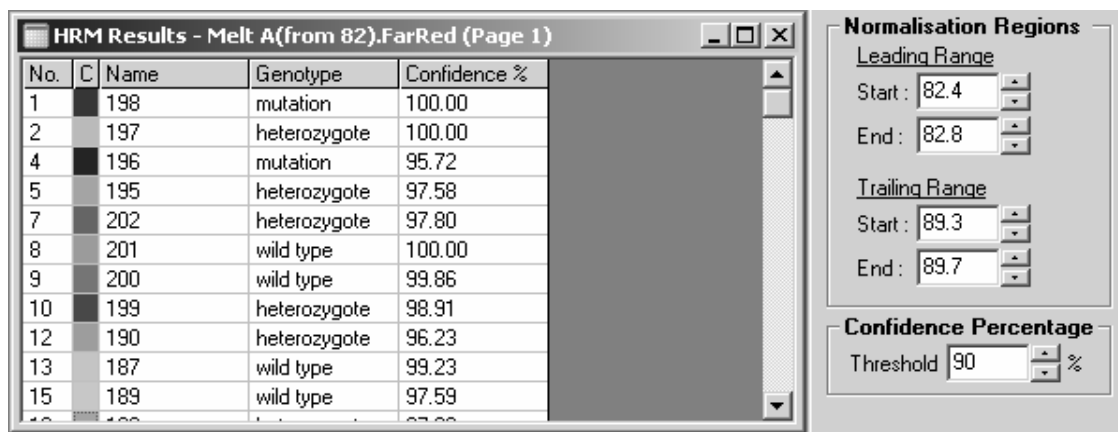
At the bottom of the dialog box, there are buttons for 'Clear', 'OK', 'Cancel', and 'Help'.



5. Veja a ação diferenciada, selecionando a etiqueta “Difference Graph”. Então selecione o genotipo contra o qual você deseja comparar todas as outras amostras usando o menu no topo da janela. No exemplo mostrado, todas as amostras tem ações subtraídas de uma ação média de todas as ações rotulada “Mutation 1”.



6. Genotipos serão chamados automaticamente pelo software na janela “Results”. Um valor de confiança é fornecido como uma verificação de integridade dos resultados chamados automaticamente. O valor limiar, sobre o qual os chamados automáticos são feitos, podem ser editados. Amostras que caíam para baixo do limiar ajustado serão marcadas como uma variação para uma investigação mais profunda ou testar novamente.



No.	C	Name	Genotype	Confidence %
1		198	mutation	100.00
2		197	heterozygote	100.00
4		196	mutation	95.72
5		195	heterozygote	97.58
7		202	heterozygote	97.80
8		201	wild type	100.00
9		200	wild type	99.86
10		199	heterozygote	98.91
12		190	heterozygote	96.23
13		187	wild type	99.23
15		189	wild type	97.59

Normalisation Regions

Leading Range

Start : 82.4

End : 82.8

Trailing Range

Start : 89.3

End : 89.7

Confidence Percentage

Threshold 90 %

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

12 Solução de problemas

12.1 Arquivos de log

O software mantém arquivos não modificados de cada execução, junto com informações de diagnóstico, em seu arquivo de log repositório. Ao usar a Ajuda, opção Enviar e-mail de suporte, você pode enviar um e-mail junto com todas as informações de diagnóstico necessárias para os Serviços Técnicos QIAGEN (veja a seção 7.12.1)

12.2 Configurações regionais no Windows 98

Em alguns computadores, as configurações originais são configuradas de maneira contraditória que causa um conflito dentro do sistema Rotor Gene Q. o problema ocorre quando diferentes ajustes decimais são usados para moedas ou números. Por exemplo, se números são mostrados em um formato “123 456,789” mas moedas são mostradas como “\$ 299,192.20”, então existe um conflito pois o número “20,123” é ambíguo. Em máquinas com Windows 98, isso evita que o software Rotor Gene Q interprete corretamente os números. Este problema não ocorre com o Windows 2000.

Para corrigir esta configuração, siga as seguintes etapas. Os nomes destas opções podem ser diferentes na língua de seu sistema.

1. Clique no menu Iniciar.
2. Clique em Configurações.
3. Clique no Painel de Controle.
4. Clique duas vezes em Configurações Regionais.
5. Clique duas vezes em Opções Regionais.
6. Clique na etiqueta “Números”.
7. Anote o que é usado como símbolo decimal, e o que é usado como o símbolo de dígito de agrupamento. Em um sistema alemão, por exemplo, a vírgula (,) é usada como um símbolo de dígito de agrupamento.

8. Clique na etiqueta "Currency".
9. Mude o símbolo decimal e o símbolo de dígito de agrupamento para serem os mesmos da etiqueta "Números".
10. Clique em "Ok".
11. Retorne ao software Rotor Gene Q.

12.3 Solução de problemas do HRM

Comentários e sugestões

Incapaz de executar HRM

O modelo do Rotor Gene Q não está equipado

Contate seu representante local QIAGEN.

Nenhum dado HRM obtido

Configuração incorreta

Verifique as configurações do filtro.
Verifique se o tipo de rotor está correto.
Verifique se os reagentes corretos foram usados.
Verifique se a reação foi ajustada corretamente.
Execute um experimento de controle positivo (i.e., um exame que é conhecido que dê resultados).

As parcelas parecem recortadas

Amplificação fraca ou inexistente

Verifique se os protocolos e reagentes corretos foram usados. Recomendamos kits QIAGEN para análise HRM.
Verifique se a reação foi ajustada corretamente.
Verifique as condições de ciclo.
Verifique a qualidade e quantidade inicial do modelo. Recomendamos kits QIAGEN para

preparação de amostra.

Parcelas de amplificação ou fusão estão saturadas

Ajuste de ganho muito alto Use Otimização de alto ganho.

Porcentagens de confiança mudaram

Regiões de normalização foram movidas ao clicar e arrastar	Somente mova as regiões de normalização se for necessário para evitar partes de curva de fusão.
--	---

Forasteiros presentes nos dados

Configuração de reação inconsistente	Verifique se os reagentes corretos foram usados. Verifique se os tubos usados são uniformes.
Inibidores presentes na reação	Verifique se o mesmo máster mix foi usado para todas as amostras.
Modelos poucos ou degradados	Verifique a qualidade e quantidade inicial de modelos.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

13 Glossário

Termo	Descrição
Aquisição	Aquisição é a coleta de dados fluorescentes. Cada aquisição (conjunto de dados fluorescentes) de um canal é mostrado no software como dado não analisado em uma janela “Canal Bruto”. Estes dados podem ser analisados usando as opções no menu “Analysis”.
Silo	Em uma análise de fusão, silos são destinados a definir uma região onde um pico de fusão é esperado ocorrer. Genotipos podem ser definidos baseado na presença de picos em certos silos ou combinações de silos.
Canal	Um canal consiste em um diodo emissor de luz (LED) com um filtro de excitação emparelhado com um filtro de emissão. O LED e o filtro de excitação excitam amostras a um determinado comprimento de onda. A fluorescência emitida pelas amostras é passada através do filtro de emissão, antes de ser detectada por uma fotomultiplicadora.
Ganho	O Rotor Gene Q utiliza uma fotomultiplicadora para coletar fótons de fluorescência e convertê-los em sinais eletrônicos. O ganho é um ajuste que determina a sensibilidade da fotomultiplicadora. Se o ganho for ajustado para muito alto, o sinal ficará muito saturado. Se o ganho for ajustado para muito baixo, não é possível diferenciar o sinal do ruído do plano de fundo.
Ganhar Otimização	Ganhar Otimização é um processo que ajusta dinamicamente as configurações de ganho, permitindo que uma configuração apropriada seja selecionada, o que resulta em ótima detecção de sinal.

Bloco de carregamento	Blocos de carregamento são blocos de alumínio disponíveis em diferentes formatos que são usados para segurar tubos ou discos de rotores durante um ajuste de reação. Blocos de carregamento de discos de rotor também são usados com o Rotor Disc Heat Sealer para selar o Rotor Disco com aquecimento.
Argola de travamento	Argolas de travamento que cabem no rotor para evitar que tubos e cápsulas se soltem durante a operação do Rotor Gene Q. Cápsulas e tubos soltos podem causar dano ao instrumento.
Rotor	O rotor de metal segura tubos e discos de rotor no Rotor Gene Q. Permite que amostras rodem na câmara do instrumento e garante que amostras estejam corretamente alinhadas com o sistema óptico. O rotor é seguro com uma argola de travamento.
Disco de rotor	Discos de rotor são placas circulares de poços de reação verticalmente orientados. Formatos de discos de rotor de 72 e 100 reações estão disponíveis. Discos de rotor são selados usando o filme de selagem de aquecimento do Rotor Disc e o Rotor Disco Heat Sealer.

Apêndice A

Dados técnicos

A QIAGEN se reserva o direito de mudar especificações à qualquer tempo.

Condições de ambiente

Condições de operação

Energia	200–240 V AC, 50–60 Hz, 560 VA (pico) 100–120 V AC, 50–60 Hz, 560 VA (pico) (Configurações específicas do país) Consumo de energia 8 VA (aguardo) Fultuações no fornecimento principal de votagem não devem exceder 10% do fornecimento normal de votagem.
Fusível	F5A 250 V fusível
Dissipação de calor / Carga térmica	Pico: 0.493kW ou 1700 BTU/hr Média: 0.197kW ou 680 BTU/hr (depende de perfil)
Categoria de sobretensão	II
Temperatura do ar	18–30°C (64–86°F)
Umidade relativa	10-75% (não condensado)
Altitude	Até 2000 m (6500 pés)
Lugar de operação	Para uso interno apenas.
Nível de poluição	2
Classe ambiental	3K2 (IEC 60721-3-3)

Condições de transporte

Temperatura do ar	–25°C a 60°C (–13°F to 140°F) na embalagem do fabricante.
Humidade relativa	Máximo de 75 %
Classe ambiental	2K2 (IEC 60721-3-2)

Condições de armazenamento

Temperatura do ar	15°C to 30°C (59°F to 86°F) na embalagem do fabricante.
Humidade relativa	Máximo de 75 %
Classe ambiental	1K2 (IEC 60721-3-1)

Dados mecânicos e características de hardware

Dimensões	Largura: 37 cm (14.6 in.) Altura: 27,5 cm (10.8 in.) Profundidade (sem cabos): 42 cm (16.5 in.) Profundidade (porta aberta): 56 cm (22 in.)
Massa	14 kg (31 lb) configuração padrão

Capacidade	Até 100 amostras por execução usando o Rotor Disc 100
Software	O software Rotor Gene Q, fornecido no CD de instalação.

Especificações Térmicas

Descrição	Especificação
Alcance da temperatura	De ambiente até 99° C
Precisão de temperatura	+/- 25° C
Resolução da temperatura	+/- 0.02
Uniformidade da temperatura	+/- 0.01
Tempo de equilíbrio da temperatura	0 s
Taxa da rampa	>15° C de aquecimento >20° C de esfriamento (pico da taxa de rampa, ar)

Especificações Ópticas

Descrição	Especificação
Fontes de excitação	Diodos de emissão de luz de alta energia
Detector	Fotomultiplicadora
Tempo de aquisição	4 s

Resíduos elétricos e de equipamentos eletrônicos (WEEE)

Essa seção fornece informação sobre eliminação de resíduos elétricos e equipamentos eletrônicos por usuários na União Européia.

A diretiva européia 2002/96/EC em WEEE requer eliminação correta de equipamentos elétricos e eletrônicos quando ele chega ao fim de sua vida. O símbolo da lata de lixo com duas linhas cruzadas (veja abaixo) indica que esse produto não deve ser eliminado com outros resíduos; deve ser levado a um local de tratamento aprovado ou para um ponto de coleção designado para reciclagem, de acordo com a legislação local. A separação de coleta e reciclagem de resíduos de equipamentos eletrônicos ao tempo de eliminação ajuda a conservar recursos naturais e assegura que o produto será reciclado de uma maneira que proteja a saúde humana e o ambiente.



A QIAGEN aceita sua responsabilidade de acordo com o requisitadas especificações WEEE e, onde um produto substituto está sendo fornecido pela QIAGEN, fornece livre reciclagem de seus equipamentos eletrônicos marcados como WEEE na Europa. Se um produto substituto não estiver sendo comprado da QIAGEN, reciclagem pode ser fornecida por pedido a um custo adicional. Para reciclar equipamento eletrônico, contate seu vendedor local da QIAGEN para a forma de retorno requerida. Uma vez que a forma foi submetida, você será contactado pela QIAGEN para requisitar informações de acompanhamento para agendar a coleção de resíduos eletrônicos ou para fornecê-lo com uma quota individual.

Apêndice B

Este apêndice descreve as técnicas matemáticas utilizadas em mais detalhes.

Quantificação

Concentrações calculadas são obtidas de um modelos simples de regressão linear, com os valores conhecidos de concentrações de log (x) e os valores experimentais dos valores Ct (y).

As concentrações de log e os valores Ct dos padrões são usados para construir um modelo na forma:

$$Y = Mx + B$$

Intervalos de confiança para concentrações calculadas

Nós usamos o seguinte intervalo de confiança 100(1-a)% para uma estimativa de uma nova observação x_0 da curva padrão.

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Este é o intervalo de confiança para a concentração de um único desconhecido.

Agora suponha que temos mais observações k a $x = x_0$ e nós indicamos sua média por \bar{Y}_0 . Então,

$$\bar{Y}_0 \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_0, \frac{\sigma^2}{k})$$

E argumentos similares ao de cima nos dão

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

A fórmula determina como intervalos de confiança de concentrações de réplicas desconhecidas são determinadas.

Para a estimativa de padrões, um intervalo de confiança mais justo pode ser obtido.

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

A implicação desta fórmula é que adicionando réplicas a uma concentração individual padrão reduz a largura do intervalo para todas as estimativas, assim como n é aumentado. Adicionando um número grande de réplicas a um desconhecido a redução é incerta para aquele padrão único. As réplicas extra reduzem a incerteza devido ao desconhecido da parte que não forma do modelo linear.

Intervalos de confiança para valores Ct

Nós aceitamos que erros em réplicas de valores Ct é distribuído linearmente e normalmente.

Portanto, usamos o Uma amostra t Intervalo de confiança. Deixe que u seja o valor para os valores de réplica Ct.

$(x_0 \dots x_{n-1})$ Então, um intervalo de confiança 100(1-a)% para um valor Ct u é:

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

Apêndice C

Acessórios do Rotor Gene Q

Produto	Conteúdo	Cat. no.
Rotor Gene Q 2 plex	Ciclo PCR em tempo real com 2 canais (verde e amarelo), computador laptop, software, acessórios, 1 ano de garantia nas peças e serviços.	Examine
Rotor Gene Q 2 plex HRM	Ciclo PCR em tempo real e análise de fusão de alta resolução com 2 canais (verde e amarelo), mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios, 1 ano de garantia nas peças e serviços.	Examine
Rotor Gene Q 5 plex	Ciclo PCR em tempo real com 5 canais (verde e amarelo, laranja, vermelho e rubro), mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios, 1 ano de garantia nas peças e serviços.	Examine
Rotor Gene Q 5 plex HRM	Ciclo PCR em tempo real e análise de fusão de alta resolução com 5 canais (verde e amarelo, laranja, vermelho e rubro), mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios, 1 ano de garantia nas peças e serviços.	Examine
Rotor Gene Q 6 plex	Ciclo PCR em tempo real com canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, rubro e azul), computador laptop, software, acessórios, 1 ano de garantia nas peças e serviços.	Examine
Garantia Plus 1 Basica, Rotor Gene Q	2 anos de garantia, todos os serviços, viagem e peças.	9241779

Garantia Plus 2 Basica, Rotor Gene Q	3 anos de garantia, todos os serviços, viagem e peças.	9241780
Kit inicial Rotor Disc 100	O kit inclui: 2 Rotor disc de 100 pacotes, Rotor Disc Heat Sealer, filme de selagem do Rotor Disc, Rotor Disc 100 Rotor e argola de travamento, Bloco de carregamento do Rotor Disc 100, auxílio de pipetagem do Rotor Disc.	Examine
Rotor Disc 100 (30)	30 discos embrulhados individualmente para 3000 reações.	981311
Rotor Disc 100 (300)	10x30 discos embrulhados individualmente para 3000 reações.	981313
Rotor Disc 100 Rotor	Para segurar 100 discos do Rotor Disc no Rotor Gene Q; requer argolas de travamento do Rotor Disc 100.	9018895
Argola de travamento do Rotor Disc 100 Rotor	Para travar um Rotor Disc 100 no Rotor Disc 100 Rotor	9018896
Bloco de carregamento do Rotor Disc 100 Rotor	Bloco de alumínio para configuração de reação manual ou automática no Rotor Disc de 100 discos.	9018909
Auxílio de pipetagem do do Rotor Disc	Ajuda a fazer poços na configuração de reação manual no Bloco de carregamento do Rotor Disc.	9018897
Rotor Disc Heat Sealer	Selagem com aquecimento do instrumento para uso com discos de rotor. Reque Rotor Disc 72 ou Bloco de carregamento 100	9018898
Filme de selagem de aquecimento do Rotor Disc (60)	60 filmes para selagem do Rotor Disc de 100 ou 72 discos	981601

Filme de selagem de aquecimento do Rotor Disc (600)	10x60 filmes para selagem do Rotor Disc de 100 ou 72 discos	981604
---	---	--------

Kit inicial Rotor Disc 72	O Kit inclui: 3 Rotor Disc de 72 pacotes, Rotor Disc Heat Sealer, filme de selagem do Rotor Disc, Rotor Disc 72 Rotor e argola de travamento, Bloco de carregamento do Rotor Disc 72, auxílio de pipetagem do Rotor Disc.	Examinar
Rotor Disc 72 (24)	24 discos individualmente embrulhados para reações 17,280.	981301
Rotor Disc 72 (240)	10x24 discos individualmente embrulhados para reações 17,280.	981303
Rotor Disc 72 Rotor	Para segurar os 72 discos do Rotor Disc no Rotor Gene Q; requer argola de travamento do Rotor Disc 72.	9018899
Argola de travamento do Rotor Disc 72	Para travar um Rotor Disc 72 no Rotor Disc 72 Rotor	9018900
Bloco de carregamento do Rotor Disc 72	Bloco de alumínio para configuração de reação manual ou automática no Rotor Disc de 72 discos.	9018910
Tiras de tubos e cápsulas de 0.1ml (250)	250 tiras de 4 tubos e cápsulas para 1000 reações.	981103
Tiras de tubos e cápsulas de 0.1ml (2500)	10x250 tiras de 4 tubos e cápsulas para 1000 reações.	981106
Rotor de 72 poços	Para segurar tiras de tubos e cápsulas, 0.1 ml; requer argola de travamento do Rotor de 72 poços.	9018903
Argola de travamento do Rotor de 72 poços	Para travar tiras de tubos e cápsulas, 0.1 ml, no Rotor de 72 poços.	9018904
Bloco de carregamento	Bloco de alumínio para configuração	9018901

de tubos de 72x0.1 ml	de reação manual com uma pipeta de um único canal em tubos de 72 x 0.1 ml.	
Bloco de carregamento de tubos de 72x0.1 ml multicanal	Bloco de alumínio para configuração de reação com pipetas multicanais em tubos de 72 x 0.1 ml.	9018902
Tubos PCR, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de paredes finas para 1000 reações.	981005
Tubos PCR, 0.2 ml (10000)	10000 tubos de paredes finas para 10000 reações.	981008
Rotor de 36 poços	Para segurar os tubos PCR, 0.2 ml; requer argola de travamento de Rotor de 36 poços.	9018907
Anel de travamento do Rotor de 36 poços	Para travar os tubos PCR, 0.2 ml no Rotor de 36 poços.	9018906
Bloco de carregamento de tubos de 96x0.2 ml	Bloco de alumínio para configuração de reação manual em um padrão 8x12 exame, usando tubos 96x0.2 ml.	9018905
Kit OTV Rotor Disc	Kit para verificação de temperatura óptica dos sistemas Rotor Gene, inclui um Rotor Gene pré-carregado com cristais líquidos termocromáticos, inserções fluorescentes, CD com arquivos de calibragem; requer Rotor Disc 72 Rotor e argola de travamento ou o kit inicial Rotor Disc 72.	981400
Suporte do Rotor	Suporte de metal levantado para conjunto de tubos e discos de rotor nos rotores.	9018908

Kit EpiTech HRM PCR	Disponível em breve; para identificação de locais de metilação usando HRM.	Examinar
Kit Type-it HRM PCR	Disponível em breve; para identificação de SNPs e mutações usando HRM.	Examinar

Apêndice D

Cláusula de responsabilidade

A QIAGEN pode ser liberada de todas as suas obrigações sob suas garantias em caso de reparos e modificações serem feitos por pessoas que não sejam seus próprios funcionários, exceto em casos em que a Companhia tenha dado seu consentimento por escrito para realizar tais reparos ou modificações.

Todos os materiais trocados sob essa garantia serão garantidos somente pela duração do período da garantia original, e em nenhum caso além da data de expiração original da garantia original, a não ser que tenha sido autorizado por escrito por um administrador da companhia.

Aparelhos de leitura, aparelhos de interação e softwares associados serão garantidos apenas pelo período oferecido pelo fabricante original desses produtos.

Representações e garantias feitas por quaisquer pessoas, incluindo representantes da QIAGEN, que sejam inconsistentes ou estejam em conflito com as condições nessa garantia não obrigarão a Companhia a não ser que tenha sido produzida por escrito e aprovada por um administrador da QIAGEN.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco.

Index

A

Achar limiar automático, 118
Adequação, 175
Ajustar escala, 100
Alternador, 101
Amplificação exponencial, 126
Análise de concentração, 156
Análise de curva de fusão, 135
Análise de gráfico de dispersão, 144
Análise de ponto final, 147
Aquisição, 81
Argola de travamento
Armazenamento, 246
Assistência técnica, 40
Assistente avançado, 73
Assistente de Início rápido, 67
Auditar trilhas, 190
Autoescala, 100
Avisos, 9

B

Barra de ferramenta, 99
Bloco de carregamento, 58

C

Cálculo Ct, 116
Canais brutos, 99
Canais, 46, 163
Ciclo de desnaturalização óptica, 84
Ciclo, 80
Ciclos de cultura, 101
Coeficiente de correlação, 113
Configuração da janela, 107
Configuração de reação, 58
Configurações de ganho, 197
Correção de declive de ruído, 123, 145
Cuidados, 9
Curva padrão, 111

D

Declive, 126
Desempacotando, 48
Disco de rotor
Disco de rotor 100, 56
Disco de rotor 72, 56
Discriminação alélica, 142
Duas etapas, 68, 75

E

Editar janela de amostras, 73, 97, 168
Editar janela de perfil, 71, 78
Eficiência, 112, 126
Eliminação de resíduos 15
Escala padrão, 100
Escala, 199
Especificações
Espera, 79
Estatística automática, 121
Execução

Execução vazia, 74
Exportar

F

Fluorofóros detectado, 46
FRET extinto, 68
Função TeeChart, 202, 204
Fusão, 83

G

Ganhar otimização, 77, 90
Genotipos
Gráfico de temperatura, 166
Grupos, 176

H

Hibridização, 83
HRM

I

Ícone chave de fenda, 203
Ícone chave inglesa, 203
Ignorar primeiro, 124, 145
Instalação, 47
Intended use, 41

J

Janela de adequação de página de amostra, 175
Janela de relatório, 107, 111, 138
Janela de resultados da curva de análise, 138
Janela de resultados de quantificação, 118

K

Kit Rotor Disc OTV, 209

L

Layout do tubo, 165
LinReg

M

Manutenção, 207
Medida de concentração de ácido nucléico, 69
Medida de Concentração de Ácido Nucléico, 156
Mensagens, 163
Menu
Método de duas curvas padrão, 128
Modelos
Modo virtual, 52, 108

N

Normalização de tubo dinâmico, 123, 145
Normalização, 100
Número serial, 52

O

Opções da máquina, 162
Operação

P

Página, 101, 103, 172
Parâmetros de detecção, 46
Parâmetros de excitação, 46
Performance Térmica, 43
Porta, 52, 108
Progresso de perfil, 167

Q

Quantificação comparativa, 139
Quantificação relative Delta delta Ct, 132
Quantificação, 112

R

Realizar última execução, 68, 74
Remoção do forasteiro, 124
Réplica do calibrador, 141

Rotor

S

Segurança
Segurança, 165, 179
Sistema óptico, 45
Software
Solução de problemas, 239
Suporte, 198

T

Tipos de amostras, 170
Transporte, 246
Trava
Três etapas com fusão, 68, 74

U

Usuário

V

Verificação de temperature óptica, 209