

Bedienungsanleitung

qPCRsoft

Software für Real-Time PCR-Thermocycler



Hersteller Analytik Jena GmbH+Co. KG
Konrad-Zuse-Straße 1
07745 Jena / Deutschland
Telefon: +49 3641 77 70
Fax: +49 3641 77 9279
E-Mail: info@analytik-jena.com

Technischer Service Analytik Jena GmbH+Co. KG
Konrad-Zuse-Straße 1
07745 Jena / Deutschland
Telefon: +49 3641 77 7407
Fax: +49 3641 77 9279
E-Mail: service@analytik-jena.com



Für einen ordnungsgemäßen und sicheren Gebrauch diesen Anleitungen folgen. Für späteres Nachschlagen aufbewahren.

Allgemeine Informationen <http://www.analytik-jena.com>

Dokumentationsnummer /

Ausgabe A (09/2023)

Technische Dokumentation Analytik Jena GmbH+Co. KG

© Copyright 2023, Analytik Jena GmbH+Co. KG

Inhaltsverzeichnis

1	Überblick über qPCRsoft	7
1.1	qPCRsoft installieren	7
1.2	qPCRsoft starten und beenden	9
1.3	Programmaufbau von qPCRsoft	11
1.3.1	Projektexplorer Proben	12
1.3.2	Projektfenster	14
1.3.3	Hilfe	16
1.3.4	Informationen zur Software	16
2	Projekte und Vorlagen in qPCRsoft	17
2.1	Übersicht über Dateitypen in qPCRsoft	17
2.2	Projekte und Vorlagen verwalten	18
2.3	Vorlagen aus einem LIMS transferieren	19
2.4	Auswerteparameter importieren und exportieren	19
2.5	Projekt drucken	20
3	Einstellungen für ein qPCR-Experiment	22
3.1	Allgemeine Informationen zum Projekt	22
3.2	qPCR-Programm	23
3.2.1	Optionen für Deckelheizung und Temperatursteuerung im Programmkopf eingeben	24
3.2.2	Temperaturprogramm neu erstellen oder editieren	25
3.2.3	Grafische Anzeige des qPCR-Programms	27
3.2.4	Gradienten programmieren	28
3.2.5	Schmelzkurven programmieren	29
3.3	Fluoreszenzmessung – Projektfenster Einstellungen Scan	30
3.3.1	Fluoreszenzmessung (Scan) einstellen	31
3.3.2	Scanbereich der Fluoreszenzmessung manuell definieren	32
3.3.3	Farbkompensation verwenden	32
3.4	Probenlayout	34
3.4.1	Probeneigenschaften, Probentypen, Replikate	35
3.4.2	Probeneigenschaften im Layoutschema eingeben	36
3.4.3	Probeneigenschaften in der Probentabelle editieren	38
3.4.4	Automatische Verdünnungsreihen und Replikate im Layout erzeugen	39
3.4.5	Probenlayout in Excel exportieren und importieren	40
3.4.6	Probenlayouts zwischen Projekten austauschen	41
3.4.7	Gruppen anlegen	41
3.4.8	Übersicht des Probenlayouts anzeigen	42
3.4.9	Übersicht der Funktionen zum Editieren eines Probenlayouts	43
4	Monitoring	45
4.1	qPCR-Lauf starten und verfolgen	46
4.2	Amplifikationskurven anzeigen und Ct-Werte berechnen	47
4.3	Schmelzkurven anzeigen und Schmelztemperatur T _m berechnen	50
5	Allgemeine Funktionen für Fluoreszenzkurven und Ergebnistabelle	52
5.1	Fluoreszenzdaten exportieren	52
5.2	Ergebnistabellen anpassen	52

5.3	Ergebnistabellen exportieren.....	53
5.4	Farben der Fluoreszenzkurven bearbeiten.....	54
6	Absolute Quantifizierung	56
6.1	Projektfenster und Menü für die absolute Quantifizierung	56
6.2	Auswertung für eine absolute Quantifizierung anlegen oder löschen	57
6.3	Optionen für die absolute Quantifizierung	57
6.4	Parameter für die absolute Quantifizierung editieren	59
6.5	Fluoreszenzkurven für die absolute Quantifizierung anzeigen.....	60
6.6	Mittlere Ct-Werte und Konzentrationen als Balkendiagramme anzeigen.....	60
6.7	Standardkurve für die absolute Quantifizierung anzeigen.....	61
6.8	Standardkurven für eine absolute Quantifizierung in ein Experiment importieren	62
6.9	Ergebnisse einer absoluten Quantifizierung anzeigen.....	62
7	Relative Quantifizierung	64
7.1	Projektfenster und Menü für die relative Quantifizierung.....	64
7.2	Auswertung für eine relative Quantifizierung anlegen oder löschen.....	65
7.3	Optionen für die relative Quantifizierung	65
7.4	Parameter für die relative Quantifizierung editieren	66
7.5	Fluoreszenzkurven für die relative Quantifizierung anzeigen	67
7.6	Normalisierte relative Konzentrationen als Balkendiagramme anzeigen.....	68
7.7	Standardkurve für die relative Quantifizierung anzeigen	69
7.8	Ergebnisse einer relativen Quantifizierung anzeigen.....	69
7.9	Standardkurven für die relative Quantifizierung importieren.....	71
8	DeltaDeltaCt-Quantifizierung (ddCt-Quantifizierung)	72
8.1	Projektfenster und Menü für die ddCt-Quantifizierung	72
8.2	Auswertung für eine ddCt-Quantifizierung anlegen oder löschen	73
8.3	Optionen für eine ddCt-Quantifizierung	73
8.4	Parameter für die ddCt-Quantifizierung editieren.....	75
8.5	Fluoreszenzkurven für die ddCt-Quantifizierung anzeigen.....	76
8.6	Normalisierte relative Expression und relative Quantität als Balkendiagramm anzeigen.....	77
8.7	Standardkurven und Validierungskurven für die ddCt-Quantifizierung anzeigen	78
8.8	Ergebnisse einer ddCt-Quantifizierung anzeigen	79
9	Schmelzkurvenanalyse	80
9.1	Projektfenster und Menü für die Schmelzkurvenanalyse.....	80
9.2	Auswertung für eine Schmelzkurvenanalyse anlegen oder löschen.....	81
9.3	Optionen für die Schmelzkurvenanalyse	81
9.4	Parameter für die Schmelzkurvenanalyse editieren	83
9.5	Fluoreszenzkurven und Schmelzkurve anzeigen	83
9.6	Mittlere Schmelztemperaturen als Balkendiagramme anzeigen	85
9.7	Ergebnisse einer Schmelzkurvenanalyse anzeigen.....	85
10	Genotypisierung	87

10.1	Projektfenster und Menü für die Genotypisierung	87
10.2	Auswertung für eine Genotypisierung anlegen oder löschen	88
10.3	Optionen für eine Genotypisierung	88
10.4	Parameter für die Genotypisierung editieren	90
10.5	Fluoreszenzkurven für die Genotypisierung anzeigen.....	91
10.6	Scatterplot und Balkendiagramm für die Genotypisierung anzeigen.....	92
10.7	Ergebnisse einer Genotypisierung anzeigen	93
11	POS/NEG-Analyse im Endpunkt.....	94
11.1	Projektfenster für eine POS/NEG-Analyse	94
11.2	Auswertung für eine POS/NEG-Analyse anlegen oder löschen.....	95
11.3	Optionen für eine POS/NEG-Analyse.....	95
11.4	Parameter für die POS/NEG-Analyse editieren	97
11.5	Bewertung der Ergebnisse der POS/NEG-Analyse	97
11.6	Ergebnisse im Probenlayout und als Balkendiagramm anzeigen.....	98
11.7	Ergebnisse einer POS/NEG-Analyse.....	99
12	MIQE-Dokumentation	100
13	Multigen-/Multiplatten-Analyse	102
13.1	Dateiverwaltung Multigen-/Multiplatten-Analyse	103
13.2	Projektdateien für eine Multigen-/Multiplattenanalyse wählen	104
13.3	Proben aktivieren und Interplattenstandards markieren.....	104
13.4	Threshold und PCR-Effizienzen für die Multigen-/Multiplatten-Analyse festlegen.....	105
13.5	Auswertung der Multigen-/Multiplatten-Analyse	106
13.5.1	Parameter für die Multigen-/Multiplatten-Analyse editieren.....	107
13.5.2	Ergebnisanzeige der Multigen-/Multiplatten-Analyse	107
14	Funktionen im Menü Extras	110
14.1	Allgemeine Einstellungen im Fenster Optionen	110
14.2	Farbmodule konfigurieren	112
14.3	Geräteauswahl ändern	114
14.4	Gerät initialisieren	114
14.5	Gerät mit PC verbinden	114
15	Benutzerverwaltung	115
15.1	Grundlegende Einstellungen für Kennwort, Anmeldungen und Logout.....	115
15.2	Benutzerprofile und voreingestellte Benutzergruppen	116
15.3	Kennwort ändern.....	118

1 Überblick über qPCRsoft

Die Software qPCRsoft dient der Steuerung von Real-Time PCR-Thermocyclern und der Erstellung und Auswertung von qPCR-Experimenten.

Beschriebene Software-Version	Die vorliegende Anleitung orientiert sich an der Version qPCRsoft 5.0.
Unterstützte Geräte	<p>Die Software qPCRsoft unterstützt die Gerätesteuerung und Datenauswertung der Geräte der qTOWER iris Serie.</p> <p>Mit einem PC können bis zu 4 Geräte gleichzeitig mit qPCRsoft gesteuert werden. Für jedes Gerät wird dabei eine eigene Programminstanz von qPCRsoft verwendet.</p>
Hinweise zur Anleitung	<p>Diese Anleitung enthält Abbildungen mit Probenlayouts von Thermoblöcken mit 96 Wells. Bei Thermoblöcken mit 384 Wells werden die Layouts entsprechend erweitert. Alle anderen Funktionalitäten der Software sind gleich.</p> <p>Folgende typografischen Kennzeichnungen werden verwendet:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Softwarebegriffe sind fett ausgezeichnet. ■ Menüpunkte werden mit einem senkrechten Strich „ “ aneinandergereiht, z.B. Datei Beenden. ■ Im Projektfenster sind die Funktionen auf Tabs (Reitern), die weitere Untertabs enthalten können, aufgeteilt. In diesem Fall sind Tabs und Untertabs ebenfalls mit einem senkrechten Strich aneinandergereiht, z. B. Projektfenster Einstellungen Allgemein. ■ Arbeitsschritte für die Bedienung der Software sind mit einem Dreieck „▶“ gekennzeichnet.

1.1 qPCRsoft installieren

Für die Installation des Programms werden Administratorrechte auf dem Betriebssystem benötigt.

Sie können bis zu 4 qPCR-Thermocycler von einem PC aus steuern. Für jedes Gerät muss eine Programminstanz von qPCRsoft installiert werden. Beim Starten einer Programminstanz werden alle am PC oder über Ethernet angeschlossenen und eingeschalteten qPCR-Thermocycler automatisch gescannt. Es kann dann ein Thermocycler ausgewählt und mit der Programminstanz gesteuert werden. Bei der Nutzung von mehr als 2 Geräten mit einem PC wird der Anschluss über die Ethernet-Schnittstelle empfohlen.

Systemanforderungen für die Installation	Für die Verwendung von qPCRsoft zur Ansteuerung des Real-Time PCR-Gerätes muss Ihr PC die folgenden Mindestanforderungen erfüllen:
--	--

Betriebssystem	Windows 10
Prozessor	Dual Core mit mindestens 4 Threads und 1,2 GHz
RAM	4 GB
Freier Platz auf der Festplatte	Min. 300 MB
Schnittstellen	Min. USB 2.0 oder Ethernet

Installationsvorgang	<p>qPCRsoft wird auf CD oder USB-Stick geliefert.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Die Datei "setup.exe" in der Installation starten und den weitere Aufforderungen der Installationsroutine folgen.
----------------------	---

- ▶ Sprachversion für die Installation aktivieren.
 - ✓ Mit dieser Sprache wird die Installation fortgeführt. Die Software startet mit dieser Sprache voreingestellt, die Einstellung später kann im Programm geändert werden.
- ▶ Bei der ersten Installation einer Programminstanz den Installationspfad wählen. Alle weiteren Instanzen werden in diesem Pfad gespeichert.
- ▶ Den Namen der Programminstanz eingeben.
 - ✓ Diesen Namen erhält der Unterordner der Instanz im Installationspfad. Außerdem wird das Start-Icon auf dem Desktop, falls angelegt, mit diesem Namen bezeichnet.
- ▶ Alle weiteren Installationsanfragen entsprechend abarbeiten.
 - ✓ Die Programminstanz ist installiert. Auf dem Desktop wird das Start-Icon von qPCRsoft angezeigt.

Hinweis

Die Programminstanz ist nur dann ordnungsgemäß installiert, wenn sie einmal unter Administratorrechten gestartet wurde. Bei diesem ersten Start muss ein Passwort für den Programm-Administrator eingegeben werden.

Administrator einrichten

Für jede Programminstanz muss nach der Programminstallation ein Administrator-Passwort vergeben und damit ein Administrator festgelegt werden. Wenn Sie die Benutzerverwaltung nicht verwenden möchten, können Sie die Benutzerverwaltung nach Anmeldung als Administrator deaktivieren.

- ▶ Programminstanz von qPCRsoft über das Start-Icon auf dem Desktop starten.
- ▶ Im Fenster **Geräteauswahl** ein angeschlossenes und eingeschaltetes Gerät oder ein virtuelles Gerät wählen und auf **Auswählen** klicken.
- ▶ Im Fenster **Logging** das Administrator-Passwort festlegen.
- ▶ Unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen** auf dem Tab **Benutzerverwaltung** die Benutzerkonten einrichten oder die Benutzerverwaltung deaktivieren.

Farbmodule konfigurieren

Nach dem ersten Programmstart müssen die im Gerät installierten Farbmodule angemeldet werden.

- ▶ Menüpunkt **Extras | Farbmodule bearbeiten** wählen und die im Gerät vorhandenen Farbmodule konfigurieren.

qPCRsoft.ini-Datei editieren

Für qPCR-Thermocycler, die über TPC/Ethernet verbunden sind, muss in der Datei qPCRsoft.ini der Programminstanz die Netzwerkadresse eingetragen werden.

- ▶ Die Datei qPCRsoft.ini in der betreffend Programminstanz im Installationsordner suchen und mit einem Texteditor öffnen.
- ▶ Im Bereich **[KnownDevices]** das TCP eintragen. Jedes Gerät muss eindeutig mit "KnownDevice" und einer Nummer bezeichnet werden (siehe Screenshot). Die Nummerierung beginnt mit 0. Die Nummern müssen eindeutig, jedoch nicht in aufeinanderfolgend vergeben werden.
- ▶ Im Bereich **[BackUp-KnownDevices]** dient als Back-Up-Bereich. Hier können bspw. Geräte eingetragen werden, die sich aktuell nicht im Netzwerk befinden, deren Adressen jedoch erhalten bleiben sollen.

```

qPCRsoft.ini - Editor
Datei Bearbeiten Format Ansicht Hilfe
[System]
Mode=multi
Connection=TCP

[Device]
ID=3107S-0001
IP=localhost

[KnownDevices]
KnownDevice0=tcp://192.168.1.20#10001
KnownDevice1=tcp://192.168.1.24#10001
KnownDevice2=tcp://192.168.1.21#10001

[BackUp-KnownDevices]
KnownDevice0=tcp://172.16.55.200#10001
KnownDevice1=tcp://172.16.55.201#10001
KnownDevice2=tcp://172.16.55.202#10001

```

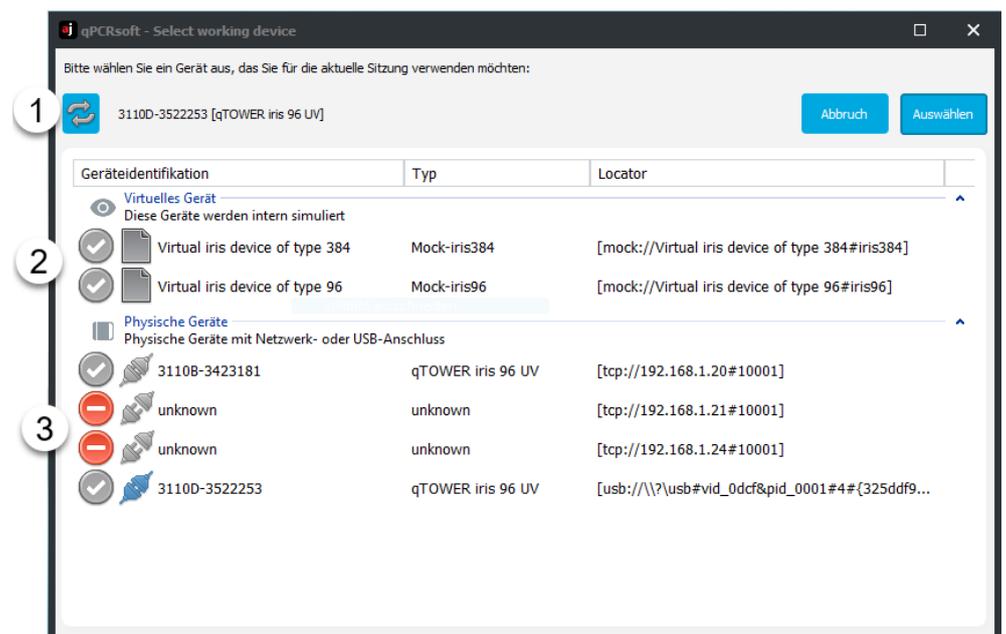
Sehen Sie dazu auch

- 📖 Allgemeine Einstellungen im Fenster Optionen [▶ 110]
- 📖 Farbmodule konfigurieren [▶ 112]

1.2 qPCRsoft starten und beenden

Startfenster mit angeschlossenen Geräten

Nach dem Start einer Instanz von qPCRsoft erscheint das Fenster **Geräteauswahl** mit der Auswahl der angeschlossenen Geräte.



Nr.	Beschreibung
1	Dieses Gerät ist aktuell mit der Programminstanz verbunden.
2	<p>Auswahl der Gerätesimulationen</p> <p>Wenn Sie aus diesem Bereich ein Gerät auswählen, wird die Programminstanz nicht mit einem Gerät verbunden. Die Software ist im vollen Umfang nutzbar, es kann jedoch keine Messung ausgeführt/simuliert werden. Nutzen Sie diese Funktion, wenn Sie Auswertungen an qPCR-Projekten vornehmen oder qPCR-Vorlagen erstellen möchten. Achten Sie dabei darauf, den passenden Gerätetyp auszuwählen.</p>
3	<p>Auswahl der physischen Geräte</p> <p>In diesem Bereich sind alle Geräte aufgeführt, die aktuell direkt mit dem PC über die USB-Schnittstelle verbunden oder in der Datei qPCRsoft.ini als im Netzwerk verfügbar eingetragen sind.</p> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">   3110B-3423181 </div> <p>Das Gerät ist eingeschaltet und kann mit der Programminstanz verbunden werden. Neben dem Symbol wird die Seriennummer des Gerätes zur Identifikation aufgeführt.</p> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">   unknown </div> <p>Das Gerät ist in der Datei qPCRsoft.ini gelistet, aber kann nicht gefunden werden, weil es zum Beispiel nicht eingeschaltet ist. Neben dem Symbol steht "unknown".</p> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">   3110D-3522253 </div> <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">(farbiges Steckersymbol)</p> <p>Dieses Gerät wurde für Verbindung mit der Programminstanz ausgewählt.</p>

qPCRsoft starten

Maximal können 4 Geräte mit eigenen Programminstanzen von einem PC gesteuert werden. Bei Verwendung von mehr als 2 Geräten wird der Anschluss über die Ethernet-Schnittstelle empfohlen.

- ▶ Den qPCR-Thermocycler einschalten.
- ▶ Die Instanz von qPCRsoft mit dem Start-Icon auf dem Desktop starten.
- ▶ Im Fenster **Geräteauswahl** das Gerät auswählen. Wählbare Geräte werden mit ihrer Seriennummer angezeigt.
- ▶ Auf **Auswählen** klicken.
 - ✓ Die Programmoberfläche von qPCRsoft wird angezeigt.

Wenn die Benutzerverwaltung installiert ist, erfolgt eine Abfrage von Benutzernamen und Passwort. Erst bei erfolgreicher Eingabe wird die Programmoberfläche freigegeben.

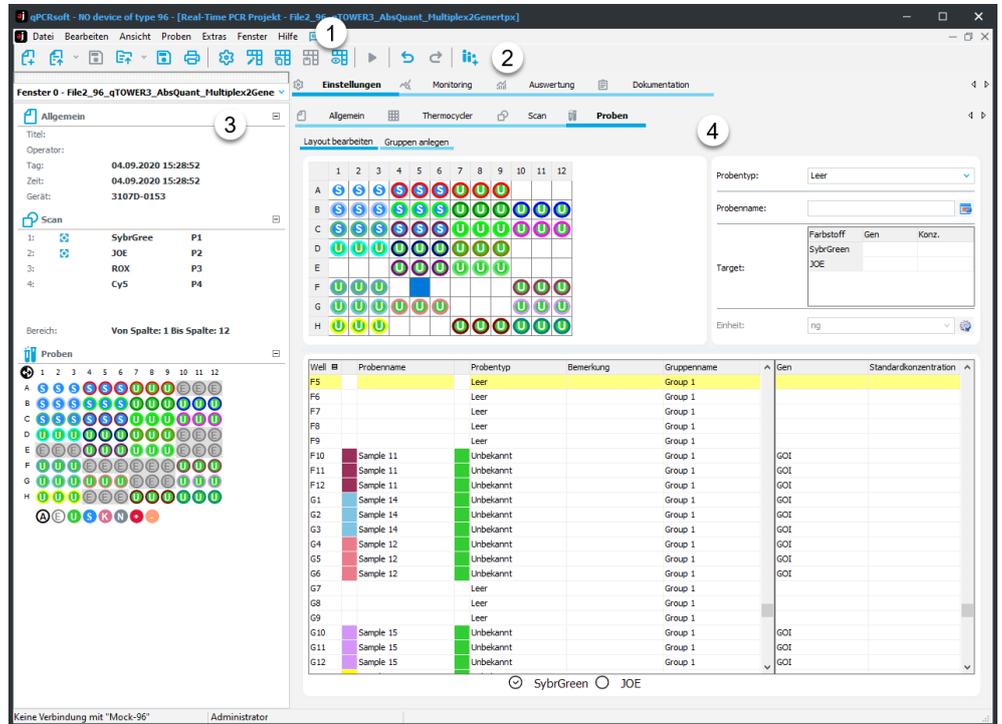
qPCRsoft beenden

- ▶ Zum Beenden den Menüpunkt **Datei | Beenden** wählen.
 - ✓ Wenn zu diesem Zeitpunkt noch nicht gespeicherte Projekte geöffnet, erscheint eine Rückfrage zum Speichern der Änderungen in den Projekten.
- ▶ Projekte mit dem Menüpunkt **Datei | Projekt speichern** speichern.
- ▶ Noch einmal Menüpunkt **Datei | Beenden** wählen.
 - ✓ qPCRsoft wird beendet.

1.3 Programmaufbau von qPCRsoft

Benutzeroberfläche

Nach dem Start von qPCRsoft öffnet sich die Benutzeroberfläche.



Nr.	Element	Beschreibung
1	Menüleiste	Über die Menüpunkte sind die meisten Programmfunktionen zugänglich.
2	Werkzeuggestreife	Die Icons der Werkzeuggestreife sind den wichtigsten Programmfunktionen zugeordnet. Sie ändern sich je nach Kontext. Wenn Sie mit der Maus über ein Icon fahren, erhalten Sie einen Tooltip zur Funktion des Icons.
3	Projekttreiber	Der Projekttreiber ist ein wichtiges Hilfsmittel in qPCRsoft. Hier finden Sie die wichtigsten Informationen zum aktiven Projekt.
4	Projektoberfläche	Auf der Projektoberfläche werden die Projekte bearbeitet. Hier nehmen Sie alle Einstellungen für den Start und die Durchführung des qPCR-Experiments, sowie dessen Auswertung vor.

Menüleiste

Die Menüleiste beinhaltet folgende Funktionen:

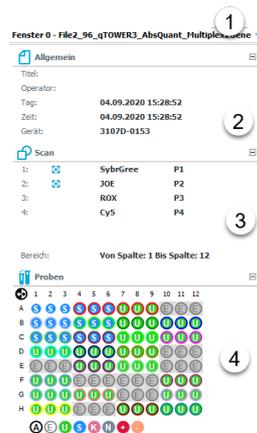
Menü	Beschreibung
Datei	Projekte und Vorlagen verwalten Drucken Multigen-/Multiplattenanalyse starten Daten in ein LIMS exportieren
Bearbeiten	Texte kopieren, einfügen und ausschneiden Änderungen rückgängig machen und wiederherstellen
Ansicht	Projekttreiber ein- und ausblenden
Extras	Gerätefunktionen Optionen für programmweite Einstellungen

Menü	Beschreibung
Fenster	Projektfenster auf der Projektoberfläche anordnen
Hilfe	Hilfe zu qPCRsoft Informationen über die installierte Software Aktivierung des optionalen Programmmoduls „21 CFR Part 11“

Bei Anwahl einer Auswertung eines qPCR-Experiments erscheinen entsprechende Menüs. Diese Menüs und die dazugehörigen Icons sind in dieser Anleitung bei den jeweiligen Auswertungen erläutert.

Projektexplorer

Der Projektexplorer unterstützt Sie bei der Arbeit in den Projekten. In den 3 Bereichen finden Sie wichtige Informationen zum aktiven Projekt.



Nr.	Bereich	Beschreibung
1	Auswahlliste Projekte	Auswahl eines in qPCRsoft geöffneten Projekts Mit der Auswahl aktivieren Sie das Projekt und holen es zur Bearbeitung in den Vordergrund.
2	Allgemein	Informationen zum Titel, Operator, Start- und Endzeitpunkt des qPCR-Laufs und des verwendeten Gerätes
3	Scan	Übersicht, welche Farben und welcher Layoutbereich gescannt wurde
4	Proben	Kurzinformation zum Probenlayout Aktivierung/Deaktivierung der Anzeige der Proben während des qPCR-Laufs Aktivierung/Deaktivierung der Proben während der Auswertung des Experiments Anzeige von detaillierten Informationen zu einer Probe während der Bearbeitung des Plattenlayouts

1.3.1 Projektexplorer Proben

Der Bereich **Proben** im Projektexplorer hilft bei der Orientierung im Probenlayout. Er zeigt eine schematische Darstellung des Probenlayouts, erlaubt Fluoreszenzkurven während des qPCR-Laufs aus- und einzublenden und Ausreißerwerte in der Auswertung zu deaktivieren.

Das Layout erstellen Sie im Projektfenster **Einstellungen | Proben**.

Im Bereich **Proben** im Projektextplorer sind die Wells entsprechend den dort definierten Probenotypen gefärbt. Die programmweit geltenden Farbmarkierungen für die Probenotypen und die Fluoreszenzkurven (farbige Ringe um die Probenotypensymbol) wählen Sie unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Farben**.



Nr.	Bereich	Beschreibung
1	Spalten-/ Zeilenbezeichnungen	Mit Klick auf die Bezeichnungen der Spalten oder Zeilen aktivieren/deaktivieren Sie die gesamte Zeile für die Anzeige oder Auswertung.
2	Probenlayout	Belegung des Thermoblocks mit Proben
3	Icons Probenotypen	Mit Klick auf die Icons können Sie alle Wells eines ausgewählten Probenotyps aktivieren/deaktivieren.

Anzeige der Probenotypen im Layout

Die Probenotypen sind im Layout mit Buchstaben symbolisiert.

Probenotyp	Symbol	Beschreibung
Leer	E	Leere Position im Layout (Empty)
Unbekannt	U	Probe unbekannter Konzentration oder Verdünnung
Standard	S	Probe bekannter Konzentration oder Verdünnung
NTC (No template control)	N	Vollständiger Reaktionsansatz ohne Matrizenstrang
Kalibrator	K (en: C)	Das Zielgen-Expressionslevel dieser Probe wird als 1 gesetzt
Positivkontrolle	+	Positiver Kontrollansatz, bei dem ein Reaktionsprodukt zu erwarten ist
Negativkontrolle	-	Negativer Kontrollansatz, bei dem kein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

Probeneigenschaften eines Wells anzeigen

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über das Probenlayout des Projektfenster **Einstellungen | Proben** fahren, werden die Probeneigenschaften des Wells, über dem der Mauszeiger steht, im Bereich **Proben** angezeigt.



Proben für Anzeige und Auswertung aktivieren/deaktivieren

Im Projektfenster **Monitoring** können Sie während des qPCR-Laufs die Fluoreszenzkurven einzelner Wells ein- und ausblenden, indem Sie die Anzeige im Bereich **Proben** aktivieren oder deaktivieren.

Durch Aktivieren/Deaktivieren einzelner Wells im Bereich **Proben** können Sie die Ergebnisse der ausgewählten Proben in die Auswertung im Projektfenster einbeziehen oder ausschließen. Die Werte werden dabei nicht aus dem Projekt gelöscht und können durch Aktivieren wieder in die Berechnungen einbezogen werden.

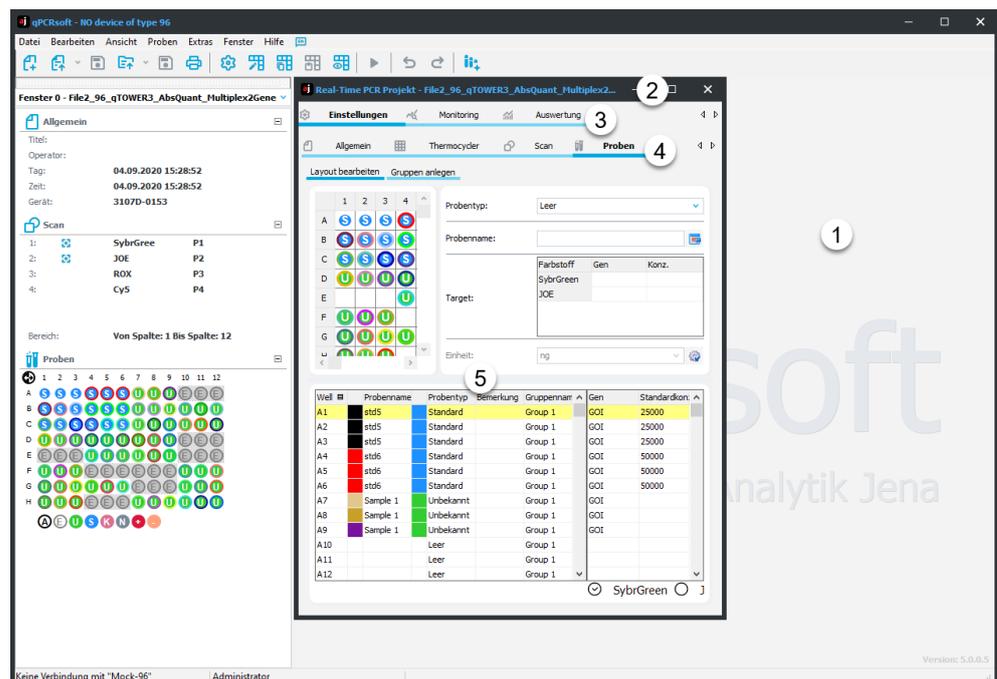
Aktive und damit in der Auswertung berücksichtigte Wells sind mit einem weißen Probenotypsymbol gekennzeichnet. In deaktivierten Wells werden die Symbole grau dargestellt und die Fluoreszenzkurven werden ausgeblendet. Leere Wells sind mit einem "E" gekennzeichnet, in ihnen erfolgt keine Fluoreszenzmessung.

- ▶ Das Umschalten erfolgt mit der Maus. Bei jedem Klick auf ein Well wechselt die Aktivierung.
- ▶ Zum Umschalten nebeneinander liegender Wells mit gedrückter Maustaste über die Wells fahren.
- ▶ Ganze Zeilen und Spalten durch Klick auf den Buchstaben bzw. Zahl der Zeile A ... H bzw. Spalte 1 ... 12 invertieren.
- ▶ Die Aktivierungen des gesamten Layout durch Klick auf das Icon  invertieren. Leere Wells werden bei dieser Auswahl nicht berücksichtigt.
- ▶ Zur Aktivierung des gesamten Layouts, außer der leeren Wells, auf das Icon  unter der Grafik klicken.
- ▶ Zur Aktivierung der Wells eine ausgewählten Probenotyps auf das entsprechende Icon unter dem Layout klicken. Mehrere Probenotypen mit gedrückter Strg-Taste und Mausklick aktivieren.

1.3.2 Projektfenster

Die Projektoberfläche ist nach dem Start des Programms zunächst leer. Erst wenn ein neues Projekt angelegt oder ein gespeichertes Projekt bzw. eine Vorlage geladen wird, öffnet sich ein Projektfenster.

Ein Projekt für ein Experiment umfasst die Einstellungen und Durchführung des qPCR-Laufs, die Definition des Probenlayouts und die Auswertung. Alle nötigen Einstellungen und die ermittelten Fluoreszenzdaten werden zusammen gespeichert und im Projektfenster bearbeitet und verwaltet.



Nr.	Element
1	Projektoberfläche Auf der Projektoberfläche können mehrere Projektfenster gleichzeitig geöffnet werden.
2	Projektfenster
3	Tab-Leiste mit Hauptthemen
4	Tab-Leiste mit Unterthemen Die Leiste erscheint bei Auswahl eines Hauptthemas und gliedert die weiteren Eingaben und Auswertungen.
5	Eingabe- und Anzeigebereich

Hauptthemen

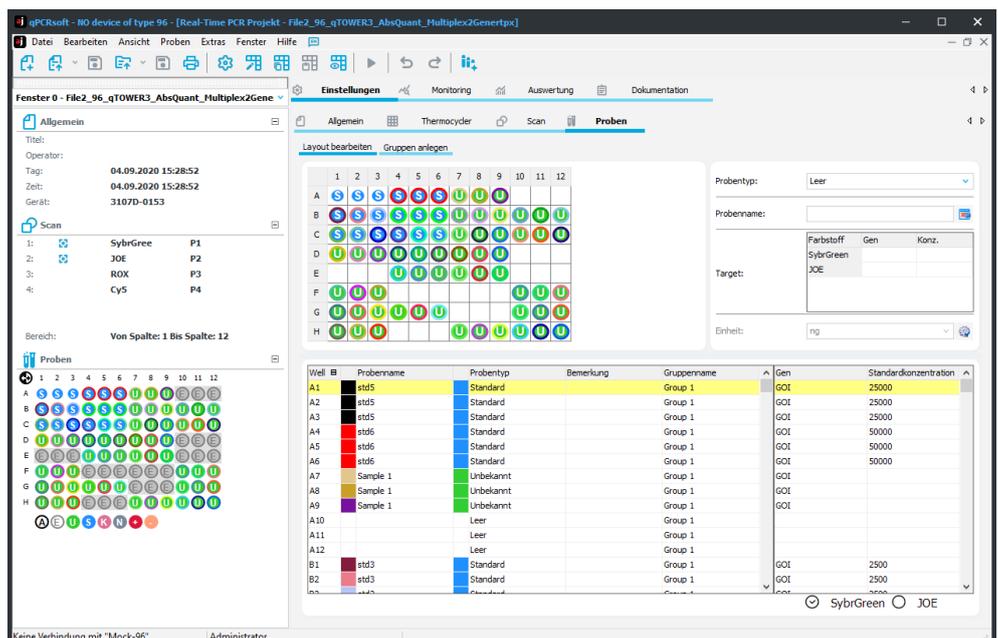
Das Projektfenster enthält 4 Tabs mit den Hauptthemen des Projekts.

Tab	Beschreibung
Einstellungen	Einstellungen für den qPCR-Lauf und für das Probenlayout
Monitoring	Start und Überwachung des qPCR-Laufs Bestimmung von Ct-Werten und Schmelztemperaturen T_m
Auswertung	Auswertelgorithmen zur Analyse gewonnener Daten
Dokumentation	Eingabemaske zur MIQE-konformen Dokumentation von qPCR-Experimenten

Der gewählte Tab ist jeweils dunkelblau unterstrichen. Nach Anwahl eines Tabs kann eine zweite oder dritte Reihe Tabs für die Eingaben der Parameter erscheinen. Auch hier wird der gewählte Tab dunkelblau unterstrichen. Wenn nicht alle Tabs einer Reihe sichtbar sind, können Sie mit den Pfeiltasten $\leftarrow \rightarrow$ am rechten Rand der jeweiligen Leiste durch die Leiste scrollen. Tabellen und Grafiken, die im Fenster nicht vollständig angezeigt werden haben Scrollbalken zur Navigation.

Projektfenster maximieren

Wenn Sie nicht in mehreren Projekten gleichzeitig arbeiten, um z. B. Auswerteparameter zu importieren und exportieren, können Sie die Projektfenster, mit Klick auf das Quadrat rechts in der Titelleiste des Fensters, maximieren. So haben Sie eine übersichtliche Ansicht zur Verfügung. Um ein bestimmtes Projekt auf der Projektfläche zu aktivieren, wählen Sie es in der Liste des Projektexplorers aus.



Aufteilung Grafik- und Tabellenbereiche

Auf dem Tab **Einstellungen | Proben** und auf den Tabs **Auswertung** können Sie den Grafik- und den Tabellenbereich vergrößern oder verkleinern, um eine bessere Ansicht des Bereichs zu erhalten.

- ▶ Den Mauscursor zwischen die beiden Bereiche führen, bis sich der Mauszeiger in einen Doppelpfeil wandelt.
- ▶ Mit gedrückter Maustaste die Bereichsgrenze horizontal verschieben.

1.3.3 Hilfe

Hilfe zur Bedienung von qPCRsoft erhalten Sie über den Menübefehl **Hilfe | Inhalt**.

Das Programm blendet Kurzinformationen zu den Icons in der Werkzeugleiste ein, wenn Sie den Mauszeiger über ein Icon bewegen.

1.3.4 Informationen zur Software

Informationen zur Software, z. B die installierte Version, finden Sie unter dem Menüpunkt **Hilfe | Info**.

2 Projekte und Vorlagen in qPCRsoft

Die Software qPCRsoft speichert alle Experimente in Projektdateien. Ein Projekt enthält verschiedene Informationen, die zur Durchführung eines qPCR-Experiments notwendig sind:

- Beschreibung des Experiments
- Temperatur-Zeit-Programm (PCR-Protokoll) des Thermocyclers
- Scaneinstellungen des optischen Systems
- Probenbelegung des Thermoblocks mit detaillierten Informationen zu jeder Probe (Probenlayout)
- Messergebnisse und entsprechende Auswertungen nach der Durchführung eines Experiments

Alle für die Durchführung eines Experiments notwendigen Grundinformationen, die im Projektfenster **Einstellungen** hinterlegt sind, wie die Beschreibung des Experiments, das PCR-Protokoll, Scaneinstellungen des optischen Systems und die Plattenbelegung, lassen sich als Vorlage abspeichern und für standardisierte Wiederholungen der Experimente nutzen.

2.1 Übersicht über Dateitypen in qPCRsoft

In qPCRsoft werden verschiedene Dateitypen erzeugt.

Vorlagen/Projekte 96er
Thermoblock

Erweiterung	Dateityp	Beschreibung
*.rtpx	real-time project file	Projektdatei mit Einstellungen zum qPCR-Lauf, Auswertung und Messergebnissen
*.rtsx	real-time settings file	Dateiformat für Vorlagen mit Einstellungen zum qPCR-Lauf, ohne Messergebnisse
*.mgax	real-time multi-gen analysis file	Multigen- bzw. Multiplatten-Analyse

Vorlagen/Projekte 384er
Thermoblock

Erweiterung	Dateityp	Beschreibung
*.rtpx384	real-time project file	Projektdatei mit Einstellungen zum PCR-Lauf, Auswertung und Messergebnissen
*.rtsx384	real-time settings file	Dateiformat für Vorlagen mit Einstellungen zum qPCR-Lauf, ohne Messergebnisse
*.mgax384	real-time multi-gen analysis file	Multigen- bzw. Multiplatten-Analyse

Weitere Dateien

Erweiterung	Dateityp	Beschreibung
*.rta	real-time analysis file	Exportierte/importierte Analysenparameter eines Projektes
*.rtprt	print report template	Druckvorlage

2.2 Projekte und Vorlagen verwalten

Projekt neu anlegen	<p>Für ein neues Projekt öffnen Sie ein neues Projektfenster auf der Projektoberfläche von qPCRsoft.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt Datei Neu wählen. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Ein neues Projektfenster erscheint. Sie können die Einstellungen für einen qPCR-Lauf vornehmen und danach starten oder die Einstellungen als Vorlage speichern.
Neues Projekt aus einer Vorlage anlegen	<p>Sie können ein Projekt mit einer Vorlage anlegen.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt Datei Vorlage öffnen... wählen. ▶ Die gesuchte Vorlage wählen und auf Öffnen klicken. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Ein neues Projektfenster mit den Voreinstellungen der Vorlage erscheint. Ergänzen Sie die fehlenden Einträge des Experiments, z. B. das Probenlayout, und starten Sie den qPCR-Lauf.
Projekt speichern	<p>Nach einem qPCR-Lauf können Sie die Daten als Projekt speichern.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Menüpunkt Datei Projekt speichern unter... wählen. ▶ Im Fenster Speichern unter einen Namen für das Projekt eingeben und auf Speichern klicken. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Das Projekt wird gespeichert. <p>Sie können in einem vorhandenen Projekt die Auswertungen editieren und weitere Auswertungen anlegen. Die Änderungen können Sie ebenfalls speichern.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt Datei Projekt speichern wählen. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Die Änderungen werden gespeichert. <p>In einem vorhandenen Projekt starten können Sie keinen weiteren qPCR-Lauf starten. Speichern Sie in diesem Fall aus dem Projekt eine Vorlage und legen Sie mit der Vorlage ein neues Projekt an.</p>
Projekte automatisch speichern und exportieren	<p>Im Fenster Optionen Allgemein können Sie folgende Optionen für das automatische Speichern von Projekten und den automatischen Datenexport definieren:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Automatisches Speichern nach Ende des qPCR-Laufs in einen vorgegebenen Ordner ■ Aufforderung zum Speichern des qPCR-Lauf vor oder nach dem Start ■ Automatischer CSV-Export von Rohdaten, Amplifikationen und Schmelzkurven ■ Automatischer CSV-Export der Ct-Werte
Projekt öffnen	<p>Sie können ein Projekt zur Ansicht öffnen, dessen Auswertungen editieren oder dessen Einstellungen des qPCR-Laufs als Vorlage speichern.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt Datei Projekt öffnen... wählen. ▶ Im Fenster Öffnen die Datei wählen und auf Öffnen klicken. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Das Projektfenster Im Workspace erscheint mit den Daten des gewählten Projekts.
Vorlage erzeugen	<p>Die Einstellungen zum qPCR-Lauf und des Probenlayouts in einem Projektfenster können Sie als Vorlage für weitere Analysen speichern.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Menüpunkt Datei Vorlage speichern unter... wählen. ▶ Im Fenster Speichern unter einen Namen für Vorlage eingeben und auf Speichern klicken.

- ✓ Die Einstellungen für den qPCR-Lauf werden als Vorlage gespeichert.

Sie können in einer vorhandenen Vorlage die Einstellungen editieren und die Änderungen speichern.

- ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt **Datei | Vorlage speichern** wählen.
 - ✓ Die Änderungen werden gespeichert.

Automatisch gespeicherte Backupdatei öffnen

Sie können zusätzlich das Speichern eines laufenden qPCR-Laufs in einer Backupdatei „Last Run“ definieren. Im Fall eines unvorhergesehenen Abbruchs des qPCR-Laufs, werden in dieser Datei alle Messdaten bis zum Abbruch gespeichert. Eine Auswertung dieser Daten ist deshalb noch möglich. Beim nächsten qPCR-Lauf wird die Backupdatei überschrieben. Das Speichern der Backupdatei müssen Sie im Fenster **Optionen | Allgemein** aktivieren.

- ▶ Den Menüpunkt **Datei | Autom. gespeichertes Projekt öffnen...** wählen.
 - ✓ Die wiederhergestellten Daten werden in einem neuen Projektfenster angezeigt.
- ▶ Die Daten unter einem anderen Namen als Projekt speichern.
 - ✓ Die Messdaten bis zum Abbruch des qPCR-Laufs sind gesichert.

Sehen Sie dazu auch

-  Allgemeine Einstellungen im Fenster Optionen [▶ 110]

2.3 Vorlagen aus einem LIMS transferieren

qPCRsoft kann von einem anderen Programm, z.B. einem LIMS (Laboratory Information Management System), konfiguriert werden. Das LIMS muss dazu eine Datei erzeugen, die von qPCRsoft eingelesen wird. Die Struktur der Transferdatei kann bei Interesse von Analytik Jena bereitgestellt werden. Mit Hilfe der Transferdatei erzeugt qPCRsoft eine Vorlage, mit der sofort ein qPCR-Lauf gestartet werden kann.

Zur Übertragung der Ergebnisse des qPCR-Laufs an das LIMS können die unterschiedlichen Exportfunktionen von qPCRsoft genutzt werden, je nachdem, welche Daten vom LIMS erwartet werden.

LIMS-Transferdatei öffnen

- ▶ Menüpunkt **Datei | Import LIMS...** wählen.
- ▶ Die TRF-Datei im Fenster **Öffnen** wählen und auf **Öffnen** klicken.
 - ✓ Die aus der Transferdatei erzeugte Vorlage wird auf der Bedienoberfläche geöffnet. Sie können mit dieser Vorlage einen PCR-Run starten.

2.4 Auswerteparameter importieren und exportieren

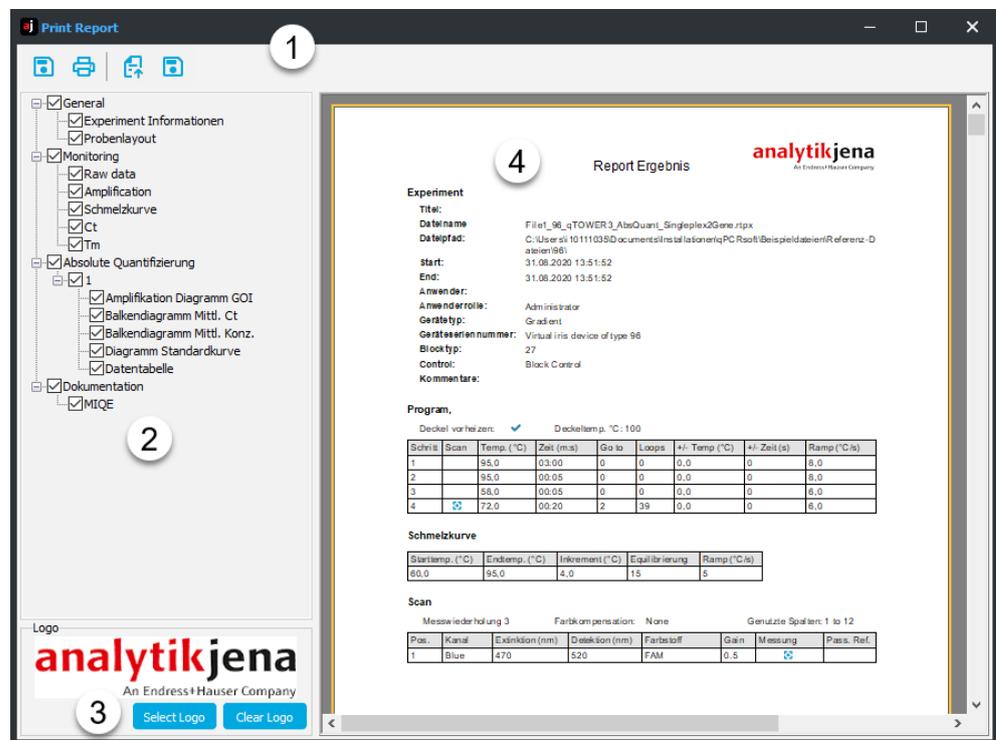
In einer Vorlage können Sie nur die Einstellungen für den qPCR-Lauf und das Probenlayout speichern. Das Speichern von Analyseneinstellungen ist nicht vorgesehen. Wenn Sie die Analysen eines Projekts auf ein anderes Projekt anwenden möchten, müssen Sie einen Ex- und Import der Analysen zwischen den Projekten ausführen.

- ▶ Das Projekt aktivieren, dessen Auswerteparameter in anderen Projekten genutzt werden soll.
- ▶ Den Menüpunkt **Datei | Analysen exportieren...** wählen.
- ▶ Im Fenster **Speichern unter** einen Namen eingeben und auf Speichern klicken.

- ✓ Die Analysenparameter werden gespeichert.
- ▶ Das Projektfenster aktivieren, in welches die Analysenparameter importiert werden sollen.
- ▶ Menüpunkt **Datei | Analysen importieren...** wählen.
- ▶ Im Fenster **Öffnen** die Datei mit den Analysenparameter wählen und auf **Öffnen** klicken.
- ✓ Die Analysen werden auf das Projekt im aktiven Fenster angewendet.

2.5 Projekt drucken

Der Projektreport kann ausgedruckt oder als PDF-Datei gespeichert werden. Im Fenster **Print Report** wählen Sie die Elemente für den Report und starten den Ausdruck.



Nr.	Element	Beschreibung
1	Werkzeugleiste	Funktionen im Fenster Print Report
2	Projektbaum	Auswahl der Elemente für den Ausdruck, geordnet nach den Hauptfunktionen des Projektfensters
3	Logo-Auswahl	Auswahl eines eigenen Firmen-Logos für den Kopf des Ausdrucks Standardmäßig ist das AJ-Logo eingestellt.
4	Vorschau	Druckvorschau der ausgewählten Elemente

Werkzeugleiste des Fensters Report drucken

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über ein Icon fahren, wird Ihnen im Tooltip die Funktion angezeigt.

Icon	Beschreibung
	Report als PDF speichern

Icon	Beschreibung
	Report drucken
	Druckvorlage öffnen
	Druckvorlage speichern
	Report anzeigen Druckvorschau aktualisieren

Report eines Projekts drucken/
speichern

- ▶ In der Werkzeugleiste von qPCRsoft auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt **Datei | Drucken** wählen.
- ▶ Im Projektbaum die Elemente aktivieren, die im Report gedruckt oder gespeichert werden sollen.
- ▶ Optional ein Logo wählen.
- ▶ Auf das Icon  **Report anzeigen** klicken und den Reportinhalt prüfen.
- ▶ Zum Druck auf das Icon  klicken. Im Fenster **Print** die Druckereinstellungen prüfen und auf **OK** klicken.
- ▶ Zum Speichern als PDF auf das Icon  klicken. Einen Dateinamen wählen und auf **Speichern** klicken.
 - ✓ Der Report wird gedruckt oder als PDF gespeichert.

Logo für den Report wählen

Das Logo erscheint im Ausdruck und im PDF auf jeder Seite rechts oben. Sie können das voreingestellte AJ-Logo durch ein eigenes ersetzen. Zulässig sind die Bildformate GIF, JPEG, PNG, BMP, ICO, EMF, WMF, TIF.

- ▶ Auf **Logo auswählen** klicken und das Logo im Fenster **Öffnen** wählen.
 - ✓ Das Logo wird auf den Reportseiten eingefügt.

Mit Klick auf das Icon  **Report anzeigen** können Sie die neuen Reportseiten in der Vorschau prüfen. Um das AJ-Logo wieder herzustellen, klicken Sie auf den Button **Logo zurücksetzen**.

Druckvorlagen verwenden

Sie können Druckvorlagen erzeugen und diese als Voreinstellungen für einen Ausdruck verwenden. So können Sie bspw. ein Logo im Ausdruck festlegen, ohne es bei jedem Druckauftrag erneut wählen zu müssen.

- ▶ Im Fenster **Report drucken** alle Einstellungen im Projektbaum in den Punkten **Allgemein, Monitoring** und **Dokumentation** aktivieren, die immer im Report verwendet werden.
- ▶ Bei Bedarf das Logo wählen.
- ▶ Auf das Icon  klicken, im Fenster **Speichern unter** einen Dateinamen wählen und die Druckvorlage speichern.
 - ✓ Die Druckvorlage wird als RTPRT-Datei gespeichert.
- ▶ Zur Verwendung einer Vorlage auf das Icon  klicken und die Vorlage im Fenster **Öffnen** wählen.
 - ✓ Die Druckvorlage wird geladen und die voreingestellten Elemente im Projektbaum aktiviert. Sie können jetzt die Auswertungen für den Druck aktivieren und weitere Einstellungen vornehmen.

3 Einstellungen für ein qPCR-Experiment

Zu Beginn eines qPCR-Experiments legen Sie entweder ein neues Projekt an oder öffnen Sie eine Vorlage.

Alle notwendigen Funktionen zum Erstellen eines neuen Projekts sind im Projektfenster unter dem Tab **Einstellungen** in einer weiteren Tab-Ebene zusammengefasst.

Tab	Beschreibung
Allgemein	Allgemeine Informationen und Bemerkungen zum qPCR-Experiment
Thermocycler	Programmierung von PCR-Protokollen
Scan	Festlegung der zu messenden Farben und Einstellung der Messparameter
Proben	Probentabelle mit detaillierten Informationen zu jeder Probe und Gruppierungen von Experimenten im Layout

Sehen Sie dazu auch

- 📄 Projekte und Vorlagen verwalten [▶ 18]
- 📄 Projektfenster [▶ 14]

3.1 Allgemeine Informationen zum Projekt

Zu jedem Projekt können allgemeine Informationen gespeichert werden. Die Einträge nehmen Sie im Projektfenster **Einstellungen Allgemein** vor.

Option	Beschreibung
Titel	Titel der Analyse

Option	Beschreibung
Anwender	Benutzer Bei Verwendung einer Benutzerverwaltung wird der Name des angemeldeten Nutzers automatisch eingetragen.
Start Ende	Start und Ende des qPCR-Laufes Diese Daten werden während des qPCR-Laufs automatisch eingetragen und können nicht editiert werden.
Überprüfung	Prüfung der optischen Fasern Überprüfung bei Start der Messung Vor dem Start wird die Funktionalität der Faser geprüft. Wenn eine Faser defekt ist, wird das Experiment nicht gestartet. Überprüfung nach abgeschlossener Messung Nach dem Ablauf des Experiments werden die Fasern geprüft. Werte, die mit defekten Fasern erzeugt wurden, werden nicht ausgewertet.
Bemerkungen	Optionale Bemerkungen zum qPCR-Experiment

Für die Texteingabe können Sie die üblichen Befehle zum Kopieren, Ausschneiden und Einfügen von Texten verwenden. Diese Befehle sind im Menü **Bearbeiten** angeordnet.

3.2 qPCR-Programm

Das PCR-Protokoll für ein qPCR-Experiment programmieren Sie im Projektfenster **Einstellungen | Thermocycler**.

Projektfenster Thermocycler

The screenshot shows the 'Einstellungen | Thermocycler' window. At the top, there are tabs for 'Einstellungen', 'Monitoring', 'Auswertung', and 'Dokumentation'. Below these are sub-tabs for 'Allgemein', 'Thermocycler', 'Scan', and 'Proben'. The main area contains a graph of 'Temp. (°C)' vs 'Zeit (s)'. The graph shows a temperature profile starting at 100°C, dropping to 95°C, then cycling between 95°C and 58°C for 39 loops, followed by a melt step at 72°C, and finally heating to 100°C. A circled '1' is placed on the initial temperature drop. Below the graph is a table with columns: 'steps', 'scan', '°C', 'm:s', 'goto', 'loops', 'ΔT(°C)', 'Δt(s)', and 'λ(°C/s)'. The table shows 4 steps, with step 4 being a melt step at 72.0°C for 00:20. A circled '2' is placed on the 'Deckelmp °C' field (100) and a circled '3' is placed on the table. At the bottom, there are radio buttons for 'Tabelle', 'Graph', 'Gradient', and 'Schmelzkurve', with 'Tabelle' selected.

Tabelle (↓ Schritt: 1 von 5)

Deckelmp °C: 100 Deckel vorheizen

Gerät: qTOWER 7 /G Simulated Tube Control

steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
1		95,0	03:00	--	---	---	---	8,0
2		95,0	00:05	--	---	---	---	8,0
3		58,0	00:05	--	---	---	---	6,0
4		72,0	00:20	2	39	---	---	6,0
5		Melt	00:15					
6								
7								
8								
9								
10								

Tabelle Graph Gradient Schmelzkurve

Nr.	Element	Beschreibung
1	Programmvor-schau	Grafik des programmierten qPCR-Protokolls
2	Programmkopf	Optionen für die Deckelheizung, Temperaturkontrolle und Auswahl des Gerätetyps
3	qPCR-Protokoll	Bereich für die Programmierung des qPCR-Protokoll mit weiteren Anzeigeeoptionen Tabelle Numerische Programmierung Graph Grafische Programmierung Gradient (nur für Geräte mit Gradientenblock) Programmierung eines Temperaturgradienten Schmelzkurve Programmierung der Schmelzkurve

Menü Cyclor und Icons

Bei Auswahl des Tabs **Thermocycler** erscheinen das Menü **Cyclor** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste. Mit den Menüpunkten und Icons editieren Sie die qPCR-Protokollschritte. Einen Schritt markieren Sie, in dem Sie auf seine Zeile klicken. Die Zeile des Schritts färbt sich blau.

Icon	Menü Cyclor	Beschreibung
	Leeren Schritt einfügen	Neuen Schritt vor dem markierten Schritt einfügen
	Schritt löschen	Markierten Schritt löschen
	Schritt ausschneiden	Markierten Schritt ausschneiden
	Schritt kopieren	Markierten Schritt in die Zwischenablage kopieren
	Leeren Schritt einfügen	Kopierten Schritt aus der Zwischenablage nach dem markierten Schritt löschen

3.2.1 Optionen für Deckelheizung und Temperatursteuerung im Programmkopf eingeben

Die im Programmkopf des qPCR-Programms festgelegten Optionen für Deckelheizung und Temperatursteuerung gelten für das gesamte qPCR-Programm.

► Folgende Parameter im Programmkopf eingeben:

Option	Beschreibung
Deckeltemp. °C	Deckeltemperatur einstellen Voreinstellung: 100 °C
Deckel vorheizen	Vorheizen des Deckels aktivieren
Simulated Tube Control	Temperatursteuerung nach berechneter Proben temperatur aktivieren
Gerät	Geräteauswahl Das qPCR-Programm können Sie auch für ein anderes als das im Programm initialisierte Gerät erstellen. In diesem Fall werden die maximalen Heiz- und Kühlraten vom gewählten Gerät voreingestellt.

Die Temperatur des Heizdeckels sollte in der Regel etwas über der maximalen Blocktemperatur liegen, um das Verdunsten von Flüssigkeit aus dem Reaktionsansatz und deren Kondensation an den Wänden oder am Verschluss der Reaktionsgefäße zu verhindern.

Wenn Sie das Vorheizen aktiviert haben, heizt das Gerät bei einem PCR-Lauf zunächst den Heizdeckel auf die vorgegebene Heizdeckeltemperatur, während der Probenblock konstant auf 25 °C gehalten wird. Nach einer sich anschließenden Äquilibrierungsphase von 40 s, in der homogene Temperaturbedingungen über den Block hergestellt werden, startet das PCR-Programm und der Probenblock heizt sich auf. Der Heizdeckel schaltet sich bei einer Temperaturdifferenz größer 75 °C zwischen Block und Heizdeckel automatisch ab, um die Lebensdauer der Peltier-Elemente zu verlängern. Bei diesen geringen Blocktemperaturen ist Probenkondensation am Gefäßdeckel nicht mehr zu erwarten.

Mit aktivierter Option **Simulated Tube Control** wird mit der gemessenen Blocktemperatur die in der Probe herrschende Temperatur vorausberechnet und die Temperatur auf die Probentemperatur geregelt. Diese Methode wird insbesondere für schnelle Programme empfohlen. Wenn die Option deaktiviert ist, wird die Blocktemperatur für die Regelung verwendet. Insbesondere bei hohen Heiz- und Kühlraten und kurzen Haltezeiten kann die tatsächlich in der Probe herrschende Temperatur von der gewünschten Temperatur abweichen.

3.2.2 Temperaturprogramm neu erstellen oder editieren

Die Programmierung des Temperaturprogramms für den Thermocycler erfolgt im Projektfenster **Einstellungen | Thermocycler**.

Programmschritte einfügen und löschen

Für das Verwalten von Programmschritten stehen das Menü **Cycler** und Icons in der Werkzeugleiste zur Verfügung.

- ▶ Programmschritte über Tastatur oder Mausklick an das Ende eines Programmes einfügen: In der letzten Programmzeile die Cursortaste [↵] drücken oder mit der Maus auf die nächste leere Zeile klicken.
 - ✓ Der neue Schritt wird an das Ende des Programms angefügt.
- ▶ Einen Schritt im Programm einfügen: Schritt mit der Maus markieren und auf das Icon  klicken.
 - ✓ Der neue Schritt wird über dem markierten eingefügt.
- ▶ Programmschritt löschen: Schritt mit der Maus markieren und auf das Icon  klicken.
 - ✓ Der Schritt wird aus dem Programm entfernt.

Zieltemperaturen, Haltezeiten und Heiz- und Kühlraten editieren

- ▶ In die einzelnen Zellen des Programmschritts klicken, sodass die Zahlen dunkelblau markiert sind, und folgende Eingaben vornehmen:

Tabellenspalte	Beschreibung
°C	Zieltemperatur für den Thermoblock
m:s	Haltezeit des Temperaturschritts im Format mm:ss Die Haltezeit beginnt, sobald die Zieltemperatur im Block erreicht ist.
λ(°C/s)	Heiz-/Kühlrate des ausgewählten Schritts Voreingestellt sind die maximalen Heiz-/Kühlraten des ausgewählten Gerätes.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
1		95,0	03:00	--	---	--	---	8,0
2		95,0	00:05	--	---	--	---	8,0
3		58,0	00:05	--	---	--	---	6,0
4		72,0	00:20	2	39	--	---	6,0
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						

Schleifen programmieren

Ein typisches PCR-Programm besteht aus sich wiederholenden Schritten für Denaturierung, Annealing (Primeranlagerung) und Extension (Strangverlängerung). Zur Wiederholung von Schritten können Schleifen programmiert werden, die durch einen Zielschritt für den Rücksprung (**goto**) und die Anzahl Wiederholungen (**loops**) definiert werden.

- ▶ Im letzten Schritt einer Schleife im Feld **goto** die Schrittnummer eingeben, auf die das Programm zurückspringen soll.
- ▶ In der Spalte **loops** die Anzahl Durchläufe der Schleife eingeben.
 - ✓ Schritte innerhalb der Schleife werden mit einer Klammer auf der linken Seite der Tabelle gekennzeichnet.

Hinweis

Die Gesamtzahl der Durchläufe ergibt sich aus der Zahl der programmierten Wiederholungen (**loops**) plus 1, da die entsprechende Schrittabfolge bis zum Erreichen der Schleife bereits einmal durchlaufen wurde.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
40x	1	95,0	03:00	--	---	--,-	---	8,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	8,0
	3	58,0	00:05	--	---	--,-	---	6,0
	4		72,0	00:20	2	39	--,-	---
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						

Optional Zieltemperatur und Haltezeit verändern

Optional können Sie in einer Schleife durch die Programmierung von Inkrementen und Dekrementen die Zieltemperatur und die Haltezeit eines Schrittes von Zyklus zu Zyklus um einen definierten Betrag verändern.

- ▶ In die einzelnen Zellen des Programmschritts klicken und folgende Eingaben vornehmen:

Spalte	Beschreibung
ΔT(°C)	Optionales Inkrement/Dekrement für die Zieltemperatur Wenn sich der Schritt innerhalb einer Schleife befindet, erhöht oder verringert sich die Blocktemperatur bei jedem Durchgang um diesen Wert. Ein positiver Wert bezeichnet ein Inkrement (Zunahme) und ein negativer Wert ein Dekrement (Abnahme). Wenn kein Wert eingetragen ist, bleibt die Zieltemperatur bei jedem Durchlauf gleich.
Δt(s)	Optionales Inkrement für die Haltezeit Wenn sich der Schritt innerhalb einer Schleife befindet, erhöht sich die Haltezeit bei jedem Durchgang um diesen Wert. Wenn kein Wert eingetragen ist, bleibt die Haltezeit bei jedem Durchlauf gleich.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
40x	1	95,0	03:00	--	---	--,-	---	8,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	8,0
	3	58,0	00:05	--	---	--,-	---	6,0
	4		72,0	00:20	2	39	-1,0	5
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						

Fluoreszenzmessung

Für das qPCR-Programm müssen Sie in einem Programmschritt eine Fluoreszenzmessung vornehmen.

- ▶ Im Programmschritt in die Spalte **scan** klicken.
 - ✓ Die aktivierte Fluoreszenzmessung wird durch das Icon  symbolisiert.

Die Parameter für die Fluoreszenzmessung definieren Sie unter **Einstellungen | Scan**.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\Delta t(s)$	$\lambda(^{\circ}C/s)$
1		95,0	03:00	--	---	--	---	8,0
2		95,0	00:05	--	---	--	---	8,0
3		58,0	00:05	--	---	--	---	6,0
4		72,0	00:20	2	39	--	---	6,0
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						

Weitere Aktionen

Optional können Sie an ein qPCR-Programm eine Schmelzkurve anfügen oder für gradientenfähige Thermoblocke einen Temperaturgradienten eingeben.

Sehen Sie dazu auch

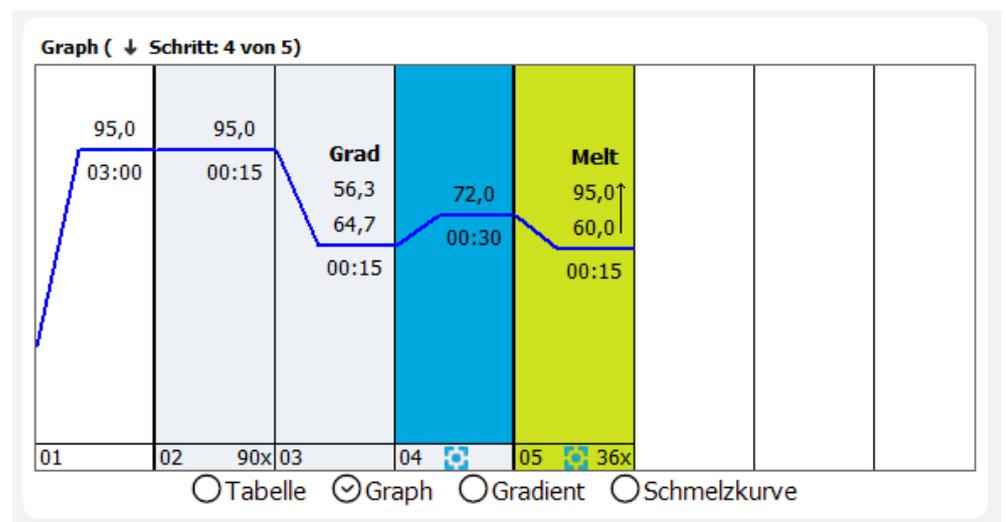
- ▣ Schmelzkurven programmieren [▶ 29]
- ▣ Gradienten programmieren [▶ 28]

3.2.3 Grafische Anzeige des qPCR-Programms

Im Projektfenster **Einstellungen | Thermocycler** wird im oberen Teil der qPCR-Lauf in einem Temperatur-Zeit-Diagramm dargestellt. Die blaue Linie zeigt den Temperaturverlauf des Thermoblocks, die rote Linie den Temperaturverlauf des Heizdeckels. Das Icon markiert den Schritt, an dem die Fluoreszenzmessung stattfindet.

Ansicht Graph

Im unteren Teil des Fensters wird in der Ansicht **Graph** der Temperaturverlauf der Programmschritte abgebildet.



Die grau hinterlegten Schritte gehören zu einer Schleife. Ein Schmelzkurvenschritt ist grün gefärbt. Die blaue Kurve zeigt den Temperaturverlauf. In jedem Schritt werden über der Kurve die Zieltemperatur und unter der Kurve die Haltezeit ausgegeben. In der unteren Zeile der Grafik werden die Schrittnummer, das Icon für die Fluoreszenzmessung und die Anzahl Zyklen einer Schleife angezeigt.

qPCR-Programm in der Grafik editieren

Sie können eingeschränkt das qPCR-Programm in der Ansicht **Graph** ändern, das Editieren des Programms in der Ansicht **Tabelle** ist jedoch komfortabler.

- ▶ Auf die Zahl eines Parameters klicken, z. B. auf eine Zieltemperatur, und den Parameter eingeben.
- ▶ Auf die Kurve in einem Schritt klicken und mit gedrückter Maustaste die Kurve nach oben oder nach unten verschieben. Dadurch ändert sich die Zieltemperatur im Schritt.

In der Ansicht **Graph** können Sie keine Schritte in das Temperaturprogramm einfügen oder löschen und keine Schleifen definieren.

3.2.4 Gradienten programmieren

Sie können die Gradientenfunktion nur mit gradientenfähigen Thermoblöcken/Thermocyclern nutzen.

Bei einem Temperaturgradient wird über den Thermoblock ein Temperaturverlauf während eines Programmschritts gelegt. Dabei verläuft der Temperaturgradient immer entlang der langen Seite des Probenblocks, um möglichst viele verschiedene Temperaturen betrachten zu können.

Der Gradient verläuft von Spalte zu Spalte, also horizontal von links nach rechts. Die höchste Temperatur kann in der ersten oder letzten Spalte liegen. Alle Proben in einer Spalte haben dieselbe Temperatur. Von Spalte zu Spalte liegen aber unterschiedliche Temperaturen an.

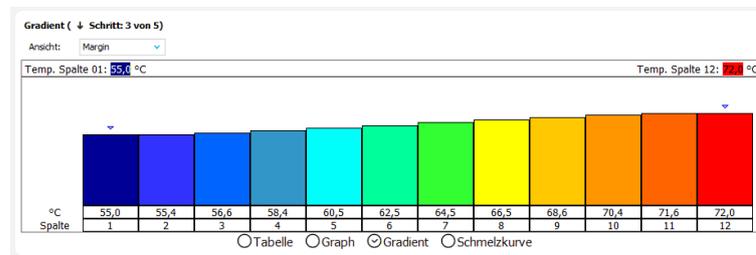
Verwenden Sie die Gradientenfunktion, um z. B. die optimale Annealingtemperatur für neue Primerpaare zu finden. Verteilen Sie die Replikate jeweils über die langen Seiten des Probenblocks, um die Blocktemperatur zu ermitteln, die zum besten Ergebnis führt.

Einen Temperaturschritt mit Gradienten programmieren Sie im Projektfenster **Einstellungen | Thermocycler** in der Ansicht **Gradient**.

Temperaturgradient mit 2 Randtemperaturen

Bei diesem Gradienten wird die Blocktemperaturänderung über die Temperatur der Randspalten definiert.

- ▶ In der Ansicht **Tabelle** in der Programmtabelle den Programmschritt markieren und zur Ansicht **Gradient** wechseln.
- ▶ In der Liste **Ansicht** die Option **Marge** wählen.
- ▶ Für die linke Spalte im Feld **Temp. Spalte 1** die Temperatur eintragen
- ▶ Für die rechte Spalte im Feld **Temp. Spalte 12** (96er Block) bzw. **Temp. Spalte 24** (384er Block) die Temperatur eintragen und mit der Enter-Taste bestätigen.
 - ✓ Die Temperaturverteilung im Block wird berechnet und in der Grafik angezeigt.



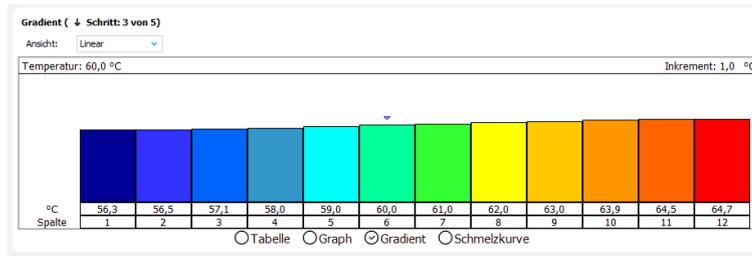
Linearer Gradient

Beim linearen Gradienten wird die Temperatur in der Mitte des Thermoblocks, z. B. bei einem 96er Block Spalte 6, vorgegeben und mit einem Inkrement von Spalte zu Spalte zu einer Seite des Blocks verringert und zur anderen Seite erhöht.

- ▶ In der Ansicht **Tabelle** in der Programmtabelle den Programmschritt markieren und zur Ansicht **Gradient** wechseln.
- ▶ In der Liste **Ansicht** die Option **linear** wählen.
- ▶ Im Feld **Temperatur** die Temperatur der mittleren Blockspalte, im Feld **Inkrement** die Temperaturveränderung eintragen und mit der Enter-Taste bestätigen.

Wenn ein positives Inkrement eingegeben wird, ist die Temperatur in der linken Spalte 1 am niedrigsten und in der Spalte 12 beim 96er Block (24 beim 384er Block) am höchsten. Wenn ein negatives Inkrement mit einem Minus als Vorzeichen eingegeben wird, ist die Temperatur in Spalte 1 am höchsten und in Spalte 12 (24) am niedrigsten.

 - ✓ Die Temperaturverteilung im Block wird berechnet und in der Grafik angezeigt.



Anzeige in der Programmtabelle

Für einen Temperaturgradienten werden in der Spalte °C die beiden Temperaturwerte der linken und rechten Randspalten des Blocks getrennt durch einen Bindestrich angezeigt. Sie können die beiden Temperaturen auch direkt in das Feld eingeben und programmieren dadurch einen Gradienten mit 2 Randtemperaturen.

	4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
	1		62,0-75,0	03:00	--	---	--,-	---	8,0
40x	2		95,0	00:05	--	---	--,-	---	8,0
	3		58,0	00:05	--	---	--,-	---	6,0
	4		62,0-72,0	00:20	2	39	--,-	---	6,0
	5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						
	6								
	7								
	8								
	9								
	10								

3.2.5 Schmelzkurven programmieren

Bei Versuchen mit interkalierenden Farbstoffen empfiehlt es sich, die Spezifität der Produkte durch Messung einer Schmelzkurve zu überprüfen. Sie können den entsprechenden Schritt im Projektfenster unter **Einstellungen | Thermocycler** in der Schmelzkurvenansicht programmieren.

Ansicht Schmelzkurve

Option	Beschreibung
Starttemp. (°C)	Starttemperatur der Schmelzkurve
Endtemp. (°C)	Endtemperatur der Schmelzkurve
Äquilibration (s)	Zeit, in der die Probe auf eine Temperatur angeglichen wird, bevor die Fluoreszenzmessung aufgenommen wird
Inkrement ΔT	Abstände in °C zwischen zwei aufeinanderfolgenden Temperaturschritten
Heizrate (°C/s)	Aufheizrate des Blocks
aktiv	Schmelzkurve an das qPCR-Protokoll anfügen

Schmelzkurve aktivieren

Voraussetzung für die Programmierung der Schmelzkurve ist eine Amplifizierung. Wenn Sie eine Schmelzkurve ohne vorangegangene Amplifizierung aufnehmen möchten, müssen Sie im qPCR-Protokoll vor dem Schmelzkurvenschritt ein zusätzlicher Schritt eingeben, in dem der Block auf die Starttemperatur der Schmelzkurve gebracht und eine Fluoreszenzmessung aktiviert wird. Die Aufnahme einer Schmelzkurve ohne zumindest einen vorausgehenden Schritt ist nicht möglich.

- ▶ Im unteren Bereich des Tabs **Thermocycler** die Ansicht **Schmelzkurve** wählen.
- ▶ Die Parameter entsprechend der Beschreibung oben einstellen.
- ▶ Die Option **aktiv** aktivieren.
 - ✓ Die Schmelzkurve wird an das qPCR-Programm angefügt. Die optische Messung erfolgt an jedem Temperaturschritt der Schmelzkurve.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
1		95,0	03:00	--	---	--,-	---	8,0
2		95,0	00:05	--	---	--,-	---	8,0
3		58,0	00:05	--	---	--,-	---	6,0
4		72,0	00:20	?	30	-1,0	5	6,0
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						

3.3 Fluoreszenzmessung – Projektfenster Einstellungen | Scan

Die Produktamplifizierung wird in der qPCR durch die Zunahme von Fluoreszenz gemessen. Für die Fluoreszenzmessung können, in Abhängigkeit von der Gerätekonfiguration, bis zu 6 Farbkanäle mit verschiedenen Anregungs- und Detektionswellenlängen verwendet werden. Die Parameter der Fluoreszenzmessung gelten für alle Proben im Layout, an denen eine Messung vorgenommen werden soll.

Die Fluoreszenzmessung programmieren Sie im Projektfenster **Einstellungen | Scan**.

Projektfenster Einstellungen | Scan

Pos.	Kanal	Farbstoff	Gain	Messung	Pass. Ref.
1	Blue	FAM	5		
2	Green	JOE	5		
3	Yellow	TAMRA	5		
4	Orange	ROX	5		
5	Red	Cy5	5		
6	NIR1	Cy5.5	5		

Messwiederholungen: 3 Spectral compensation: Aus

Scanbereich entsprechend Layout Scanbereich manuell festlegen

Die Tabelle enthält die Parameter der Scan-Eigenschaften. Die Angaben zu Position, Kanal und die Auswahlliste an verfügbaren Farbstoffen können in dieser Tabelle nicht verändert werden, sie sind abhängig von den im Gerät installierten Farbmodulen. Die installierten Farbmodule müssen Sie im Fenster **Farbmodule bearbeiten** konfigurieren.

Option	Beschreibung
Pos.	Position des Farbmoduls im Gerät
Kanal	Bezeichnung des Farbkanals
Farbstoff	Auswahlliste der für den Farbkanal verfügbaren Farbstoffe
Gain	Signalintensität

Option	Beschreibung
	Die Signalintensität ist in Stufen zwischen 0 und 10 einstellbar. Je größer der Wert, desto höher ist das Fluoreszenzsignal im Farbkanal. Standardwert: 5
Messung	Scan im Farbkanal Eine aktivierter Scan ist mit dem Icon  gekennzeichnet.
Passive Referenz	Messung eines Referenzfarbstoffes Hinweis: Bedingt durch die verwendete LED-Technologie ist es nicht notwendig, eine passive Referenz zu verwenden.

Weitere Optionen im Tab Scan

Option	Beschreibung
Messwiederholungen	Anzahl an Wiederholungen des Scans Die einzelnen Scans werden gemittelt und daraus der Messwert gebildet. Dadurch wird das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Eine zu hohe Anzahl Wiederholungen führt jedoch zu unnötig langen Messzeiten. Mögliche Werte: 1 bis 16, Standardwert: 3
Farbkompensation	Auswahlliste der Farbkompensationen
Scanbereich entsprechend Layout	Scanbereich entsprechend der Probenbelegung auf dem Tab Proben Der Scan erfolgt in allen belegten Wells. In den leeren Wells wird kein Scan registriert.
Scanbereich manuell festlegen	Scanbereich manuell auf dem Tab Scan wählen

Menü Scan und Icon

Bei Auswahl des Tabs **Scan** erscheinen das Menü **Scan** in der Menüleiste und ein Icon zur Bearbeitung der Farbkompensation in der Werkzeugleiste.

Icon	Menü Scan	Beschreibung
	Farbkompensationen bearbeiten	Farbkompensation individuell ermitteln

Sehen Sie dazu auch

-  Farbmodule konfigurieren [▶ 112]
-  Farbkompensation verwenden [▶ 32]

3.3.1 Fluoreszenzmessung (Scan) einstellen

Die Produktamplifizierung wird in der qPCR durch die Zunahme von Fluoreszenz gemessen. Folgende Messparameter müssen dafür definiert werden:

- Farbkäle und Farbstoffe, die für den Scan verwendet werden
- Temperaturschritt des qPCR-Protokolls, an dem ein Scan stattfindet
- Bereich der Mikroplatte, der gescannt wird

Für jeden Farbkanal, mit dem Sie scannen möchten, stellen Sie im Projektfenster **Einstellungen | Scan** die Parameter ein. Die Anzahl ausgewählter Farbkäle/Farbstoffe hat keinen Einfluss auf die Dauer der Messung, die Messung erfolgt mit allen ausgewählten Farbkälen gleichzeitig.

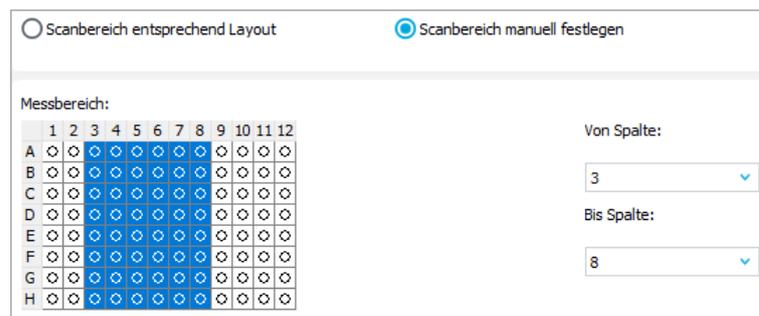
- ▶ In der Zeile des Farbkannels den zu messenden Farbstoff in der Liste auswählen.
- ▶ In der Spalte **Gain** die Signalintensität einstellen.

- ▶ Die Fluoreszenzmessung im Kanal mit Klick in die Spalte **Messung** aktivieren. Die aktivierte Messung wird durch das Icon  symbolisiert.
- ▶ Ggf. die Messung eines Referenzfarbstoffes durch Setzen eines Häkchens  in der Spalte **Pass. Ref.** aktivieren.
- ▶ In der Spalte **Messwiederholungen Farbkompensation** die Anzahl der Wiederholungen der Fluoreszenzmessungen eingeben.
Die Standardeinstellung beträgt 3 Messwiederholungen. Eine Erhöhung der Anzahl von Messwiederholungen verringert die Messwertstreuung, führt aber zu längeren Scanzeiten und damit längeren qPCR-Laufzeiten.
- ▶ Eine der Optionen für die Festlegung des Scanbereichs auswählen (manuell oder entsprechend Layout).
 - ✓ Die Fluoreszenzparameter für den Scan im qPCR-Programm sind jetzt eingestellt. Für die Schmelzkurve erfolgt der Scan bei jedem Temperaturschritt.

3.3.2 Scanbereich der Fluoreszenzmessung manuell definieren

Der Scanbereich wird im Normalfall entsprechend des Plattenlayouts in der Proben-tabelle automatisch festgelegt. Sie können ihn jedoch auch manuell definieren. In diesem Fall wird der Scanbereich des Probenblocks immer spaltenweise festgelegt. Der Scanbereich muss aus zusammenhängenden Spalten bestehen.

- ▶ Im Projektfenster **Einstellungen | Scan** die Option **Scanbereich manuell festlegen** aktivieren.
Eine Grafik des Probenblock-Layouts erscheint.
- ▶ In den Feldern **Von Spalte** und **Bis Spalte** die Anfangs- und die Endspalte des zu scannenden Bereichs eingeben.
- ▶ Alternativ die Spalten im Messbereich mit der Maus markieren. Dafür auf eine Spalte klicken und mit gedrückter Maustaste über den Scanbereich fahren.
 - ✓ Aktivierte Spalten sind im Schema blau gekennzeichnet.



3.3.3 Farbkompensation verwenden

Bei Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe in einer Probe (Multiplexing) kann es zum spektralen Übersprechen der Fluoreszenzen kommen, das durch eine Farbkompensation korrigiert werden kann.

Optionen für die Farbkompensation

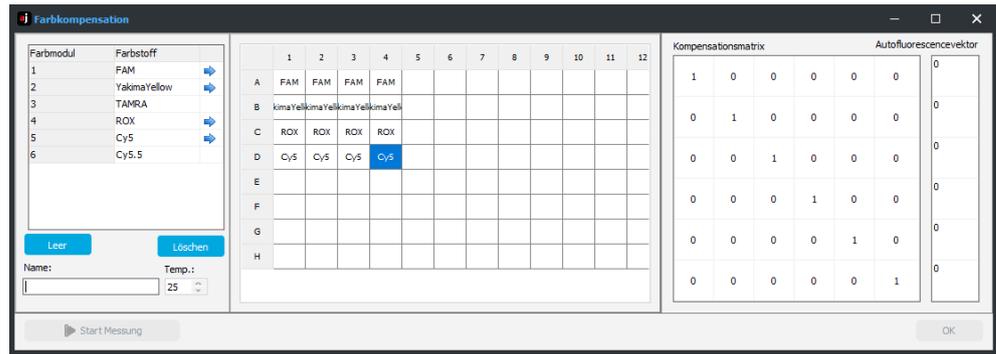
Die geeignete Farbkompensation können Sie im Projektfenster **Einstellungen | Scan** in der Liste **Farbkompensation** auswählen.

Option	Beschreibung
Aus	Die Voreinstellung für die Farbkompensation ist Aus , da für die häufigsten Anwendungen (nur ein aktiver Messkanal oder spektral weit auseinanderliegende Farbstoffe wie z.B. FAM und ROX) die Farbkompensation nicht notwendig ist.
Standard	Bei dieser Farbkompensation wird eine Kompensationsmatrix auf die Messdaten angewendet, die bei der Gain-Einstellung "5" in allen Farben eine ausreichende Kompensation des Übersprechens ermöglicht. Mit den Farbkompensationen Standard 1 und Standard 2 stehen Ihnen 2 verschiedene Matrizen zur Auswahl. Die Eignung der Standard-Farbkompensationen muss im Experiment geprüft werden.
Auswahl	Eigene Farbkompensationen Für die Nutzung eigener-Farbkompensationen wählen Sie in der Liste die Option Auswahl . Es erscheint ein Fenster, in dem bereits aufgenommene Farbkompensationen geöffnet und verwendet werden können. Dabei werden nur die Farbkompensationsdaten in schwarz dargestellt, welche zu den im Tab Scan vorgenommenen Einstellungen passen. Alle nicht gültigen Farbkompensationsdaten erscheinen in roter Schrift und können nicht ausgewählt werden.

Eigene Farbkompensation erzeugen

Zur spektralen Kalibrierung ist eine Messung erforderlich. Dabei müssen die Farbstoffe, für welche eine Farbkompensation benötigt wird, zur Messung aktiviert werden und als Proben einzeln in Lösung vorliegen. Beispielsweise können die im späteren PCR-Experiment verwendeten Sonden für die Kalibriermessungen verwendet werden. Die Farbstoffkonzentration sollte für die Kalibriermessungen etwa 0,1 µM betragen.

- ▶ Die Farbstoffe, für die die Kalibrierung erfolgen soll, mit dem Icon in der Tabelle im Tab **Scan** markieren.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken. Das Fenster **Farbkompensationen bearbeiten** mit dem Plattenschema erscheint.
- ▶ Im Plattenschema für jeden Farbstoff einzeln die Wells markieren, in denen sich die Kalibrierproben befinden. Auf den blauen Pfeil neben dem Farbstoff tippen und damit dem Well diesen Farbstoff zuweisen.
- ▶ Für eine genaue Kalibrierung ist es ratsam, jeden Farbstoff mindestens als Dreifachreplikat anzulegen.
- ▶ Es wird auch empfohlen, Blanks zu verwenden, d. h. Proben, die keine Farbstoffe enthalten. Blanks können entweder Ihre NTC-Proben oder mit Pufferlösung gefüllte Wells sein.
- ▶ Im Feld **Name** eine Bezeichnung für die neue Farbkompensation eingeben.
- ▶ Bei Bedarf im Feld **Temp.** eine Blocktemperatur eingeben oder mit den Tasten einstellen. Mit dem Wert „25“ erfolgt keine Temperierung.
- ▶ Auf **Start Messung** tippen und die Kalibrierung starten.
 - ✓ Die Kalibrierung wird ausgeführt. Nach erfolgreichem Abschluss ist die neue Farbkompensation auf der Seite Scan verfügbar.



Farbkompensation manuell editieren

Wenn die Farbkompensation für Farbstoffkompensationen aus anderen Experimenten bekannt ist, können Sie die Werte manuell in die Kompensationsmatrix oder den Autofluoreszenzvektor eintragen.

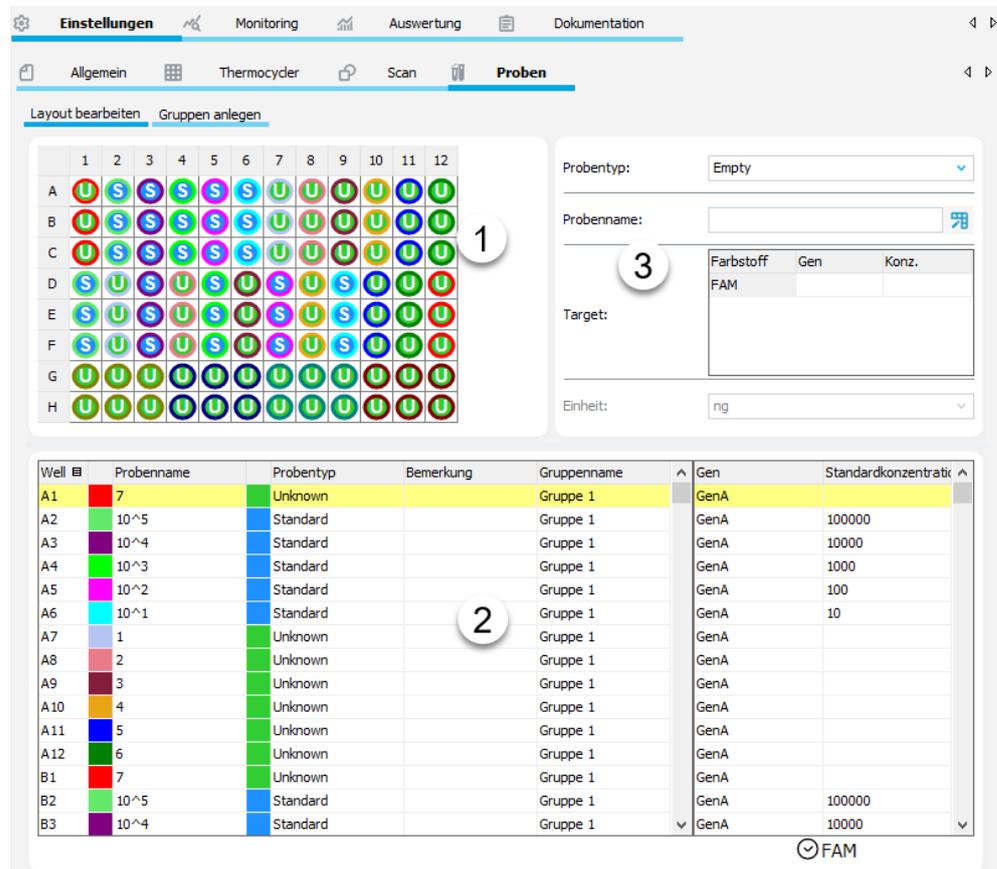
3.4 Probenlayout

Im Probenlayout definieren Sie die Eigenschaften der Proben und deren Position im Probenblock. Jede Probe kann mit ihren Eigenschaften wie Name, Gen, Typ, Konzentration und Farbstoff beschrieben werden.

Wenn Sie verschiedene experimentellen Ansätze in einem Probenlayout platzieren, können Sie diese in Gruppen zusammenfassen.

Das Probenlayout definieren Sie im Projektfenster **Einstellungen | Proben | Layout bearbeiten**.

Projektfenster Einstellungen | Proben



Nr.	Element	Beschreibung
1	Layoutansicht	Graphische Anzeige der Well-Belegung auf dem Probenblock
2	Probentabelle	Zusammenfassung der Informationen zu jeder Probe
3	Eingabebereich	Eingabebereich für die Probeneigenschaften: <ul style="list-style-type: none"> ■ Probenname ■ Probentyp ■ Konzentration von Standardproben ■ Zuordnung von Farbstoff und analysiertem Gen

Menü Proben und Icons

Bei Auswahl des Tabs Proben erscheinen das Menü Proben und weitere Icons in der Werkzeugleiste. Mit den Menüpunkten und Icons editieren Sie das Probenlayout.

Icon	Menü Proben	Beschreibung
	Layout bearbeiten	Layout bearbeiten
	Layout kopieren	Einen markierten Bereich im Layout kopieren
	Layout einfügen	Einen kopierten Bereich im Layout einfügen
	Layoutvorschau	Detailansicht des Layouts öffnen

3.4.1 Probeneigenschaften, Probentypen, Replikate

Die Probeneigenschaften in den Wells des Layout definieren Sie im Projektfenster **Einstellungen | Proben**. Die Proben sind farblich je nach Probentyp markiert. Die Farbkodierung der Wells nehmen Sie unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen** auf dem Tab **Farben** vor. Folgende Probeneigenschaften müssen Sie zuweisen:

- Probentyp
- Probenname
- Farbstoff
- Gen
- Konzentration von Standards
- Einheit bei quantitativen Auswertungen

Probentypen

Im Layout werden die gewählten Probentypen mit einem Symbol gekennzeichnet. Die farbliche Codierung des Symbols ist ebenfalls im Fenster **Optionen | Farben** voreingestellt und kann dort editiert werden.

Probentyp	Symbol	Beschreibung
Leer		Leere Position im Layout
Unbekannt	U	Probe unbekannter Konzentration oder Verdünnung
Standard	S	Probe bekannter Konzentration oder Verdünnung
NTC (No template control)	N	Vollständiger Reaktionsansatz ohne Matrizenstrang
Kalibrator	K (engl. C)	Das Zielgen-Expressionslevel dieser Probe wird als 1 gesetzt
Positivkontrolle	+	Positiver Kontrollansatz, bei dem ein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

Probentyp	Symbol	Beschreibung
Negativkontrolle	-	Negativer Kontrollansatz, bei dem kein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

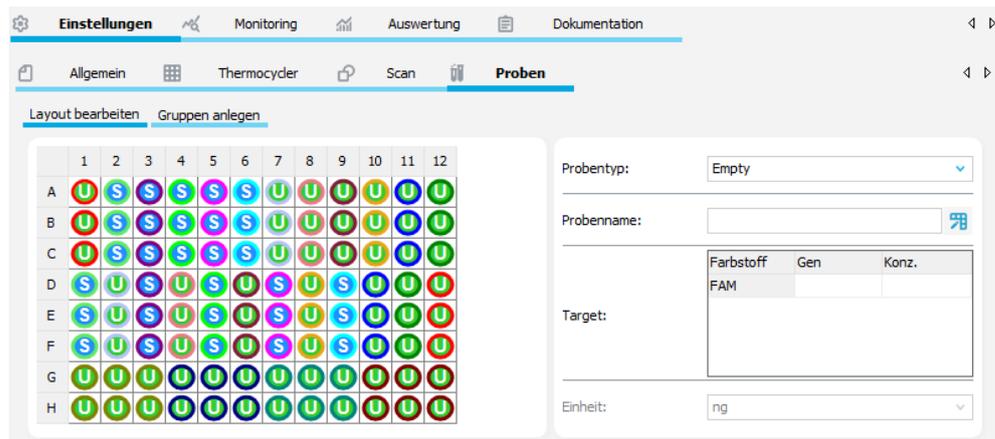
Replikate

Proben mit identischen Probeneigenschaften (Probenname, Probentyp, gleiche Gen-Farbstoff-Zuweisungen) werden als Replikate betrachtet. Die Einzelwerte dieser Proben werden gemittelt und ihr Mittelwert für die weitere Berechnung verwendet.

Bei einem Multiplex-Assay können Proben den gleichen Probennamen und Probentyp besitzen, sich jedoch in den Gen-Farbstoff-Zuweisungen unterscheiden. Diese Proben werden wegen des gleichen Namens als zusammengehörig identifiziert, die Auswertung erfolgt jedoch getrennt.

3.4.2 Probeneigenschaften im Layoutschema eingeben

Das Layoutschema zeigt die Probenbelegung des Thermoblocks. Belegte Plätze sind mit einem farbigen Probentypsymbol gekennzeichnet. Der farbige Ring um das Well entspricht der Farbe der Fluoreszenzkurve in der Grafik während des Monitorings und in den Auswertungen. Sie können die Probenpositionen (Wells) im Layoutschema markieren und ihnen dann die nötigen Eigenschaften in den Listen und der Target-Tabelle rechts neben dem Layout zuweisen.



Probeneigenschaften den Wells zuweisen

- ▶ Wells im Layout markieren:
 - Einzelne Wells mit Mausklick markieren.
 - Bei angrenzenden Feldern mit gedrückter linker Maustaste über die Felder fahren. Nicht zusammenhängende Felder mit Mausklick bei gedrückter Strg-Taste überfahren.
 - Zeilen oder Spalten mit einem Klick auf die entsprechenden Zeilen- bzw. Spaltenbezeichnung markieren. Alle Probenposition im Layout linke obere Schaltfläche zwischen A und 1 markieren.
- ▶ Folgende Probeneigenschaften im Bereich rechts neben dem Layoutschema eingeben:

Option	Beschreibung
Probenname	Bezeichnung der Probe eingeben
Probentyp	Probentyp auswählen
Tabelle Target / Spalte Gen	In der Zeile des Farbstoffs das damit zu analysierende Gen eintragen oder in der Liste auswählen

Option	Beschreibung
Tabelle Target / Spalte Konz.	Für Standards Die Konzentration des zu analysierenden Gens eintragen

- ▶ Auf das Icon  oder die ENTER-Taste drücken.
 - ✓ Die Probeneigenschaften werden den markierten Wells zugewiesen.
- ▶ Wells den Probentyp **Leer** zuweisen: Die Wells markieren und die Entf-Taste drücken.

Hinweis: Die Eingaben für den angewählten Bereich werden erst durch Zuweisung vom Programm übernommen. Eingaben oder Änderungen, die nicht zugewiesen werden, gehen verloren.

Eigenschaften editieren oder auf andere Wells übertragen

- ▶ Auf ein Well doppelklicken.
 - ✓ Die Probeneigenschaften des Wells werden im Eingabebereich angezeigt.
- ▶ Die Eigenschaften editieren und mit erneutem Klick auf das Icon  in das Well übertragen.
- ▶ Weitere Wells markieren und mit Klick auf das Icon die Eigenschaften auf dieses Well übertragen.
 - ✓ Die Probeneigenschaften werden den markierten Wells zugewiesen.

Gennamen nachträglich zuweisen

Sie können einer oder mehrerer Proben nachträglich Gennamen zuweisen.

- ▶ Im Eingabebereich neben dem Probenlayout die Gennamen für die verschiedenen Farbstoffe in die Tabelle eintragen.
- ▶ Eine oder mehrere Proben im Probenlayout markieren.
- ▶ Mit Rechtsklick auf eine der Markierungen das Kontextmenü öffnen und den Punkt **Gene zuweisen** wählen.
 - ✓ Den markierten Proben werden die zuvor eingetragenen Gennamen zugewiesen.

Gennamen aus der Tabellenliste löschen

In der Liste der Tabellenspalte **Gen** sind alle Gennamen aufgelistet, die im Programm **qPCRsoft** vergeben wurden. Nicht mehr benötigte Einträge können Sie zur besseren Übersicht aus der Liste löschen.

- ▶ Gennamen in der Liste auswählen und die Funktionstaste F5 oder die Entf-Taste drücken.
 - ✓ Der gewählte Name wird aus der Liste gelöscht.

Funktionen im Kontextmenü

Mit einem Rechtsklick auf ein Well im Layoutschema öffnen Sie ein Kontextmenü und können folgende Funktionen auf das Well anwenden:

Funktion	Beschreibung
IPC- zuweisen	Für Endpunktanalyse Probe, die keine interne Positivkontrolle (IPC-) enthält, definieren
IPC- entfernen	IPC- einer Probe löschen
Gene zuweisen	Nachträglich Gennamen zuweisen
Farben zuweisen	Farbe der Fluoreszenzkurve in der Grafik festlegen

Sehen Sie dazu auch

-  Farben der Fluoreszenzkurven bearbeiten [▶ 54]

3.4.3 Probeneigenschaften in der Probentabelle editieren

Die im Layoutschema vorgenommenen Einstellungen können Sie in der Probentabelle im unteren Teil des Projektfensters **Einstellungen | Proben | Layout bearbeiten** editieren.

Inhalte der Probentabelle

Spalte	Beschreibung
Well	Bezeichnung des Wells im Layout Mit Klick auf die Icons  und  können Sie die Anzeige in der Tabelle nach Layoutzeilen oder Layoutspalten sortieren.
Farbfeld	Das Farbfeld nach der Spalte Well zeigt die Farbe der Fluoreszenzkurve des Wells.
Probename	Bezeichnung der Probe
Farbfeld	Das Farbfeld vor der Spalte Probentyp symbolisiert den Probentyp.
Bemerkung	Optionale Bemerkung zur Probe
Gruppenname	Zugeordnete Gruppe Wenn keine Gruppen im Layout angelegt sind wird voreingestellt die Bezeichnung „Gruppe 1“ ausgegeben.
Gen	Analysiertes Gen in der Probe
Standardkonzentration	Konzentration einer Probe des Typs Standard

Tabellenanzeige anpassen

Sie können die Tabellenanzeige anpassen und Spalten verschieben oder ausblenden. Die beiden Spalten **Gen** und **Standardkonzentration** sind fest und können nicht verschoben oder ausgeblendet werden.

- ▶ Um Tabellenspalten ein- und auszublenden, auf den Tabellenkopf rechtsklicken und im Kontextmenü alle benötigten Spalten aktivieren.
- ▶ Um die Reihenfolge der Tabellenspalten zu ändern, auf die Spaltenüberschrift klicken und die Spalte mit gedrückter Maustaste an die gewünschte Position verschieben.
 - ✓ Die Tabelle wird entsprechend angepasst.

Tabelle editieren

In die Probentabelle können Sie direkt Eigenschaften eintragen.

- ▶ Im Layoutschema auf ein Well klicken oder direkt in das Feld der Probentabelle klicken.
 - ✓ Die Tabellenzeile des Wells färbt sich gelb.
- ▶ Die Eigenschaften **Probename**, **Bemerkungen** und **Standardkonzentration** direkt im Feld eingeben.
- ▶ Die Eigenschaft **Probentyp** in der Liste im Feld auswählen.
- ▶ Die Eigenschaft **Gen** direkt in das Feld eintragen oder in der Liste auswählen. Die Liste enthält alle Gen-Bezeichnungen die in gespeicherten Projekten und Vorlage verwendet wurden.

Proben in der Tabelle kopieren, ausschneiden, löschen

Sie können in der Tabelle aufeinanderfolgende Proben kopieren und an anderer Stelle in der gleichen Tabelle oder in die Probentabelle eines anderen Projektes einfügen. Für das Kopieren der Proben und das Einfügen müssen Sie während des gesamten Vorganges die **Strg-Taste gedrückt** halten.

- ▶ Strg-Taste drücken und gedrückt halten.
- ▶ Auf die erste zu kopierende Tabellenzeile klicken und mit gedrückter Maustaste die Tabellenzeilen markieren.

- ✓ Die Tabellenzeilen werden blau markiert.
- ▶ Mit Rechtsklick das Kontextmenü öffnen und mit dem Befehl **Kopieren** den Inhalt in die Zwischenablage.
- ▶ Die Tabellenzeile anklicken, ab welcher der Inhalt eingefügt werden soll. Der Inhalt kann auch in die Probenabelle eines anderen Projekts eingefügt werden.
- ▶ Strg-Taste gedrückt halten und mit Rechtsklick das Kontextmenü öffnen und mit dem Befehl **Einfügen** den Inhalt einfügen.
 - ✓ Die Proben werden ab der markierten Zeile in die Tabelle eingefügt. Wenn Sie Proben innerhalb einer Tabelle kopieren, legen Sie Replikate an. Proben mit gleichen Probeneigenschaften (Probentyp, Probenamen, usw.) werden als Replikate betrachtet.

Auf die gleiche Weise können Sie nach dem Markieren von Zeilen über das Kontextmenü auch Proben ausschneiden oder löschen.

3.4.4 Automatische Verdünnungsreihen und Replikate im Layout erzeugen

Wenn Sie im Experiment Verdünnungsreihen für Standards verwenden oder Replikate messen, können Sie diese für das Probenlayout im Fenster **Automatische Erstellung** automatisch erzeugen.

Fenster Automatische Erstellung

Verdünnungsreihen und Replikate anlegen

- ▶ Das Start-Well für die Standards im Layoutschema markieren und auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken.
- ▶ Die Parameter für die Verdünnungsreihe oder Anlage der Replikate eingeben (siehe unten).
- ▶ Auf den Button **Erzeugen** klicken.
 - ✓ Die Standards/Replikate werden in das Layout eingefügt und im Layoutschema und in der Probenabelle angezeigt.

Eingabe für Verdünnungsreihen

Option	Beschreibung
Startkonzentration	Höchste Konzentration in der Verdünnungsreihe (1. Standard)

Option	Beschreibung
Verdünnungsfaktor	Faktor, um den die Konzentration von Stufe zu Stufe verdünnt wird
Stufen	Anzahl Verdünnungsstufen/Standards
Replikate	Anzahl Wiederholungen je Standard mit der gleichen Konzentration und Farbstoff/Genauswahl Aus den Werten der Replikate wird der Mittelwert gebildet und für die weitere Auswertung verwendet.
Start bei Well	Die Wells werden beginnend mit diesem Well aufeinanderfolgend belegt. Dafür die Belegungsrichtung auswählen: spaltenweise oder zeilenweise . Voreingestellt ist das im Layout markierte Well. Die Eingabe kann editiert werden.
Standardname	Name des Standards An den Namen wird die Ziffer 1 angefügt. Mit jeder Verdünnungsstufe wird die Ziffer um 1 erhöht (z. B. Std1, Std2, Std3 ...)
Farbstoffe/Gene	Es können alle Farbstoffe aktiviert werden, für die im Projektfenster Einstellungen Scan die Fluoreszenzmessungen aktiviert wurden. Für jeden aktivierten Farbstoff muss ein Gen gewählt oder eingegeben werden.

Eingabe für Replikate

Option	Beschreibung
Start bei Well	Die Wells werden beginnend mit diesem Well aufeinanderfolgend belegt. Dafür die Belegungsrichtung auswählen: spaltenweise oder zeilenweise . Voreingestellt ist das im Layout markierte Well. Die Eingabe kann editiert werden.
Probenanzahl	Anzahl der Proben
Replikate	Anzahl Wiederholungen je Probe Aus den Werten der Replikate einer Probe wird der Mittelwert gebildet und für die weitere Auswertung verwendet.
Probenname	Name der Proben An den Namen wird die Ziffer 1 angefügt. Mit jeder neuen Probe wird die Ziffer um 1 erhöht (z. B. Sample1, Sample2, Sample3 ...).
Probentyp	Auswahl des Probentyps
Farbstoffe/Gene	Es können alle Farbstoffe aktiviert werden, für die im Projektfenster Einstellungen Scan die Fluoreszenzmessungen aktiviert wurden. Für jeden aktivierten Farbstoff muss ein Gen gewählt oder eingegeben werden.

3.4.5 Probenlayout in Excel exportieren und importieren

Sie können ein Probenlayout in Excel exportieren und wieder zurück importieren, um bspw. die Probenamen in Excel zu editieren.

- ▶ Im Projektfenster **Einstellungen | Proben | Layout bearbeiten** auf die Probentabelle rechtsklicken.
- ▶ Im Kontextmenü den Menüpunkt **Export Tabelle als Excel-Datei (*.xls)** wählen.
- ▶ Im Fenster **Speichern unter** einen Namen wählen und auf den Button **Speichern** klicken.
 - ✓ Das Layout wird als XLS-Datei gespeichert. Sie können es jetzt in Excel öffnen und bearbeiten.

- ▶ Für den Import auf die Probentabelle rechtsklicken und im Kontextmenü den Menüpunkt **Import Tabelle aus Excel-Datei (*.xls)** wählen.
- ▶ Im Fenster **Öffnen** die XLS-Datei des Layouts wählen und auf **Öffnen** klicken.
 - ✓ Das Layout wird in das Projekt importiert.

3.4.6 Probenlayouts zwischen Projekten austauschen

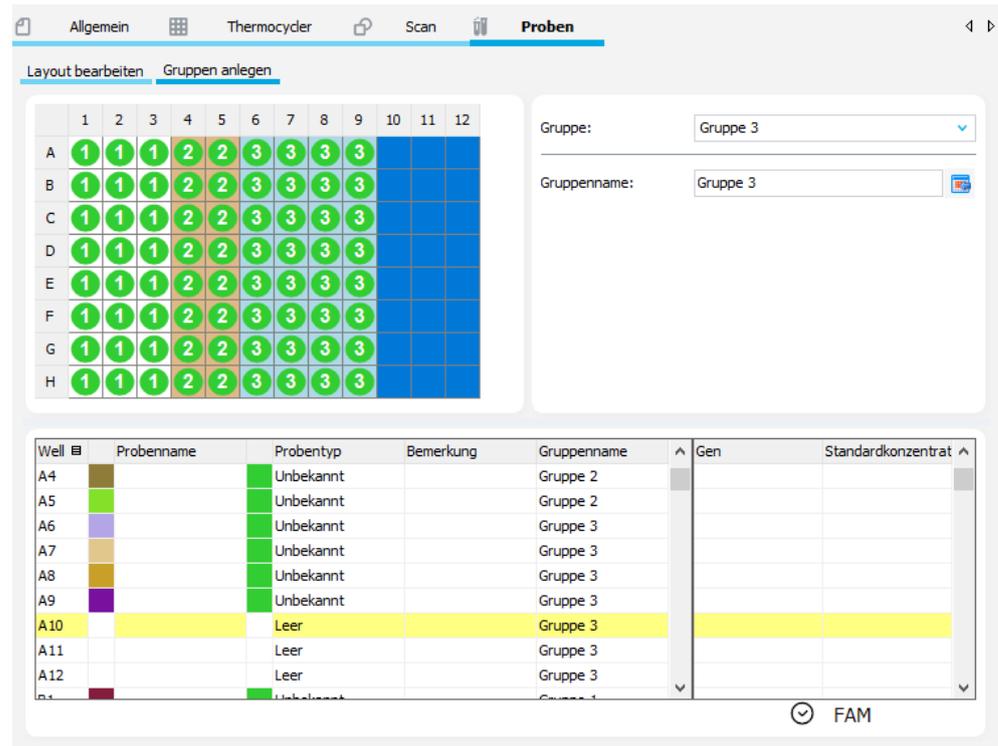
Sie können das Probenlayout eines Projekts oder Teile davon in ein anderes Projekt kopieren.

- ▶ Das Ursprungs- und das Zielprojekt auf der Projektoberfläche öffnen.
- ▶ Den zu kopierenden Bereich im Probenlayout des Ursprungsprojekts mit der Maus markieren.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Proben | Layout kopieren** wählen.
- ▶ Das Zielprojekt aktivieren, auf das Well, welches rechts oben im einzufügenden Bereich liegt, klicken und anschließend auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt **Proben | Layout einfügen** wählen.
 - ✓ Die kopierten Bereiche des Ursprungsprojekts werden an der markierten Position des Zielprojekts eingefügt.

3.4.7 Gruppen anlegen

Auf einer Mikroplatte können mehrere Experimente parallel laufen. Die zu einem Experiment gehörenden Proben werden in einer Gruppe zusammengefasst. Eine Gruppe umfasst dabei eine Schar von Reaktionsansätzen, die später gemeinsam ausgewertet werden. Maximal können 12 dieser Gruppen definiert werden.

- ▶ Im Projektfenster **Einstellungen | Proben** den Tab **Gruppen anlegen** wählen.
 - ✓ Das Probenlayout, die Liste **Benutzergruppe** und das Feld **Gruppenname** werden im oberen Teil des Fensters angezeigt. Im Layout sind zunächst in der Voreinstellung alle Proben der Gruppe 1 zugeordnet und mit „1“ gekennzeichnet.
- ▶ Für die Gruppe 1 im Feld **Gruppenname** einen Namen eingeben.
- ▶ Mit Klick auf das Icon  oder mit der Enter-Taste die Eigenschaften übernehmen.
- ▶ Im Layout die zum nächsten Experiment gehörenden Proben markieren. Nebeneinanderliegende Proben mit gedrückter Maustaste, getrennt liegende Proben durch Anwahl mit der linken Maustaste bei gedrückter Strg-Taste markieren.
- ▶ In der Liste **Gruppe** die nächste Gruppe auswählen, einen neuen Gruppennamen eingeben und mit Klick auf das Icon  oder der Enter-Taste übernehmen.
- ▶ So weiter verfahren, bis alle unterschiedlichen Experimente auf der Platte angelegt sind.
 - ✓ Die zusammengehörigen Proben (Experimente) werden im Layout mit der Gruppennummer und farblich gleich gekennzeichnet. In der Probentabelle werden in der Spalte **Gruppenname** die Bezeichnungen angezeigt.

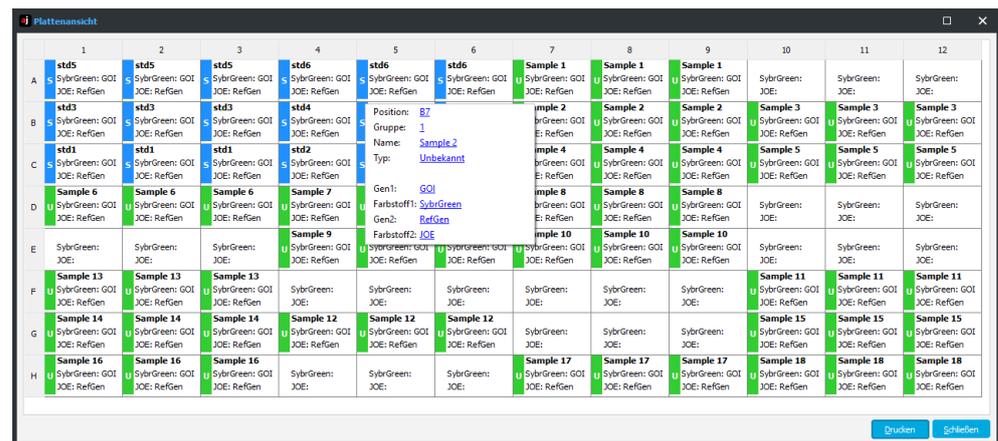


3.4.8 Übersicht des Probenlayouts anzeigen

Die Layout-Vorschau gibt einen Gesamtüberblick über die Belegung im Probenlayout mit Proben und den dazu hinterlegten Informationen.

Layoutvorschau öffnen

- ▶ Die Layoutvorschau mit dem Icon  in der Werkzeugleiste oder dem Menüpunkt **Proben | Layoutvorschau** öffnen.
- ✓ Die Layout-Vorschau wird im Fenster **Plattenansicht** angezeigt.



Die Layout-Vorschau enthält folgende Informationen:

- Position auf der PCR-Platte
- Gene
- Probentyp mittels Farbmarkierung am Rand
- Gruppenzugehörigkeit durch farbigen Unterstrich

Wenn Sie den Mauszeiger auf eine Position im Layout bewegen, werden alle für diese Position bekannten Einstellungen wie der Probennamen, der Probentyp, die Gruppe und allen in der Probe zu messenden Gene und Farbstoffe, sowie bei Standards auch deren Konzentration im Detail angezeigt.

Layoutvorschau drucken

Die Tabelle kann ausgedruckt und zum Beispiel als Vorlage beim Pipettieren der Proben oder zur Dokumentation des Versuches verwendet werden.

- ▶ Auf **Drucken** im Fenster **Plattenansicht** klicken.
- ▶ Im Fenster **Drucken - Layout** den Drucker konfigurieren und den Druck mit **Drucken** starten.
 - ✓ Die Tabelle wird auf einem Drucker auszugeben.

3.4.9 Übersicht der Funktionen zum Editieren eines Probenlayouts

Aktion	Wo	Funktion
Linksklick auf Well	Probenschema	Well markieren
Doppelklick auf Well	Probenschema	Die dem Well zugewiesenen Werte im Eingabebereich neben dem Schema anzeigen
Linksklick + Ziehen	Probenschema	Zusammenhängende Wells markieren
Strg + Linksklick	Probenschema	Zusätzlich dieses Well markieren
Strg + Linksklick + Ziehen	Probenschema	Zusätzlich zusammenhängende Wells markieren
Rechtsklick auf markierte Wells	Probenschema	Öffnet Kontextmenü: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Definition von Wells ohne interne Positivkontrolle (IPC-) ▪ Gene zuweisen: Es werden die im Eingabebereich angezeigten Gennamen den markierten Wells zugewiesen. ▪ Fluoreszenzkurvenfarben zuweisen
Taste Enter	Tastatur	Einem Well die Eigenschaften im Eingabebereich zuweisen, entspricht Icon 
Taste Entf	Tastatur	Den Inhalt der markierten Wells löschen und die Wells auf den Status „leer“ setzen
Taste F5	Tastatur/Editierfeld "Gen"	Das ausgewählte Gen aus der Liste der Gene löschen
Linksklick auf Tabellenkopf Well	Tabelle	Sortierreihenfolge ändern: zeilenweise, spaltenweise
Rechtsklick auf Tabellenkopf	Tabelle	Kontextmenü zur Auswahl der darzustellenden Spalten öffnen
Linksklick + Ziehen auf Tabellenkopf	Tabelle	Reihenfolge der Spalten ändern
Linksklick auf Tabellenzelle	Tabelle	Eingabe/Auswahl in der gewählten Zelle vornehmen
Rechtsklick auf Tabelle	Tabelle	Kontextmenü für den Excel-Export/Import der Layouttabelle
Strg + Rechtsklick (+Ziehen) auf Tabellenzeilen (Strg-Taste gedrückt halten)	Tabelle	Kontextmenü zum Kopieren, Ausschneiden, Einfügen oder Löschen der Inhalte der markierten Tabellenzeilen
Icon 	Eingabebereich	Verdünnungsreihen und Replikate im Layout anlegen

Aktion	Wo	Funktion
Doppelklick auf Farbfläche in Tabellenzeile	Tabelle	Fenster Farbe für die Farbauswahl der Fluoreszenzkurven öffnen
Umschalttaste und Doppelklick auf die Farbfläche	Tabelle	Farbeinstellung zurücksetzen
Strg+ Doppelklick auf die Farbfläche	Tabelle	Fenster Farbe bearbeiten öffnen

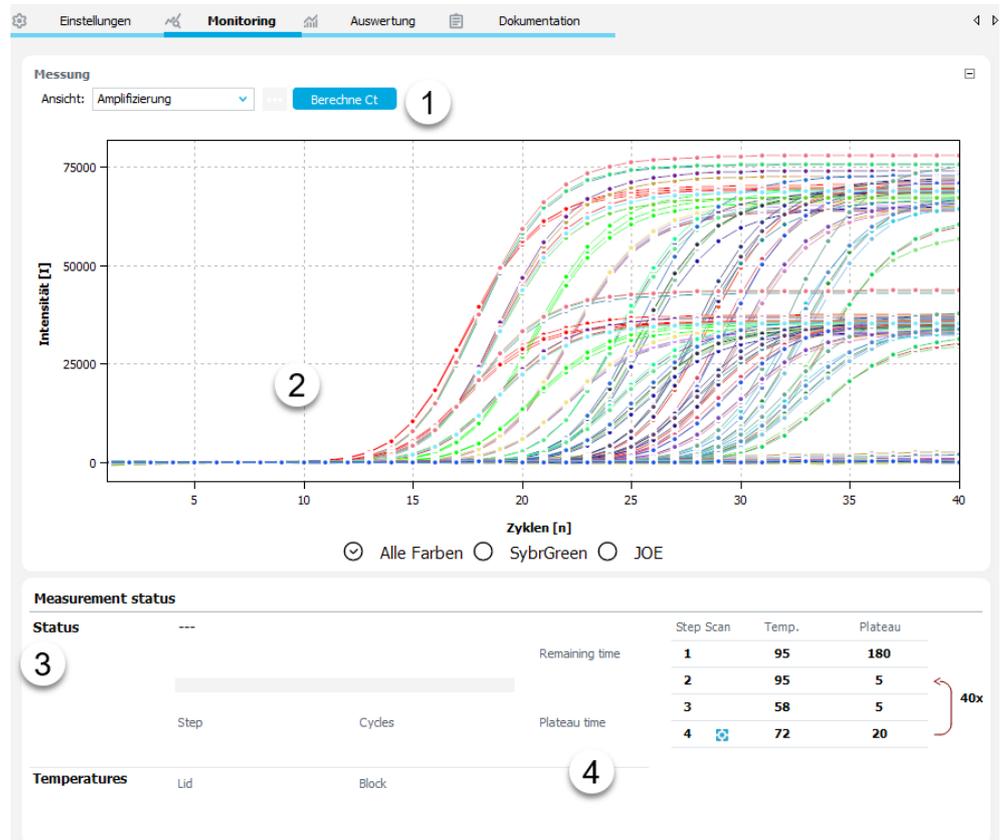
4 Monitoring

Alle zum Start und zur Verfolgung eines qPCR-Laufs notwendigen Funktionen sind im Projektfenster **Monitoring** zusammengefasst.

Nach dem Speichern des Projekts mit einem abgeschlossenen qPCR-Lauf können Sie aus Gründen der Datenintegrität keinen neuen qPCR-Lauf starten. Wenn Sie mit den gleichen Einstellungen einen weiteren qPCR-Lauf starten möchten, erzeugen Sie aus dem Projekt eine Vorlage und verwenden Sie diese.

Wenn ein Projekt nicht nach einem abgeschlossenen qPCR-Lauf gespeichert wurde, können Sie darin einen weiteren qPCR-Lauf starten. Die Fluoreszenzdaten des vorherigen Laufs werden dabei überschrieben.

Projektfenster Einstellungen | Monitoring



Nr.	Element	Beschreibung
1	Ansicht/ Berechne Ct/ Berechne Tm	Auswahl der Ansicht: Rohdaten , Amplifizierung (geglättete und basislinienkorrigierte Fluoreszenzkurven) und Schmelzkurve Berechnung der Ct-Werte und der Schmelztemperatur
2	Fluoreszenz- kurven	Grafische Darstellung der Fluoreszenzkurven Die Fluoreszenzintensitäten werden gegen die Zyklen aufgetragen. Je nach gewählter Option werden Fluoreszenzkurven nach Farbstoffen geordnet oder zusammen dargestellt.
3	Status des qPCR-Laufs	Fortschrittsanzeige während des qPCR-Laufs
4	Temperatur- programm	Temperaturprogramm des Experiments

Menü Monitoring und Icons

Bei Auswahl des Tabs **Monitoring** erscheinen das Menü **Monitoring** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste. Mit den Menüpunkten und Icons starten Sie den qPCR-Lauf und treffen Voreinstellungen für die Berechnung der Ct-Werte und Schmelzkurven.

Icon	Menü Monitoring	Beschreibung
	Start Messung	qPCR-Lauf starten
	Stopp Messung	qPCR-Lauf abbrechen
	Ansichtsoptionen	Optionen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven, der Basislinienkorrektur und der Threshold-Festlegung
		Automatisch den Threshold bestimmen

4.1 qPCR-Lauf starten und verfolgen

qPCR-Lauf starten

- ▶ Parameter für den qPCR-Lauf im Projektfenster **Einstellungen** eingeben oder eine Vorlage mit eingegebenen Parametern öffnen.
- ▶ Mikrotiterplatte oder Tubes befüllen und mit optischer Folie oder Deckeln für die qPCR verschließen.
- ▶ Probenblock entsprechend dem Probenlayout bestücken und den Deckel des Gerätes verschließen.
- ▶ Im Projektfenster auf den Tab **Monitoring** wechseln.
- ▶ Auf das Symbol  klicken oder den Menüpunkt **Monitoring | Start Messung** wählen.
 - ✓ Der qPCR-Lauf startet.

In der Grafik des Tabs **Monitoring** können Sie den Verlauf der Fluoreszenzkurven (Intensität/Zyklen) verfolgen. Unter der Grafik werden die Restlaufzeit, die aktuellen Temperaturen von Thermoblock und Heizdeckel und der gerade durchlaufene Temperaturschritt angezeigt. Im Temperaturprofile markiert ein Balken den aktuellen Schritt.

qPCR-Lauf stoppen

Sie können einen qPCR-Lauf stoppen.

- ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt **Monitoring | Stopp Messung** wählen.
 - ✓ Der qPCR-Lauf wird gestoppt und nicht weiter fortgeführt. Die bisher aufgenommenen Fluoreszenzdaten werden gespeichert und können ausgewertet werden.

Anzeige von Fluoreszenzkurven aktivieren und deaktivieren

Sie können im Projektextplorer im Bereich **Proben** die Anzeige von ausgewählten Fluoreszenzkurven aktivieren oder deaktivieren, um z. B. während des qPCR-Laufs den Verlauf von Kurven eines ausgewählten Probenotyps zu beobachten. Das Deaktivieren hat nur Auswirkungen auf die Anzeige. Für alle im Layout festgelegten Proben werden Fluoreszenzkurven aufgezeichnet. Es erfolgt keine Registrierung von Fluoreszenzwerten an Wells, die mit dem Probenotyp **Leer** gekennzeichnet sind.

Statusanzeigen während des qPCR-Laufs

Während des qPCR-Laufs werden Icons für die Statusanzeige des qPCR-Laufs eingeblendet.

Icon	Gerätestatus
	qPCR-Lauf startet

Icon	Gerätestatus
	Messung wird vorbereitet
	Systemtest erfolgt
	Faseroptik wird geprüft
	Referenzmessung erfolgt
	Messung erfolgt
	Messdaten werden verarbeitet und für die weitere Auswertung bereitgestellt
	qPCR-Lauf ist erfolgreich abgeschlossen
	Fehler während des qPCR-Laufs
	Abbruch des qPCR-Laufs durch Nutzer

Sehen Sie dazu auch

 Projektextplorer Proben [▶ 12]

4.2 Amplifikationskurven anzeigen und Ct-Werte berechnen

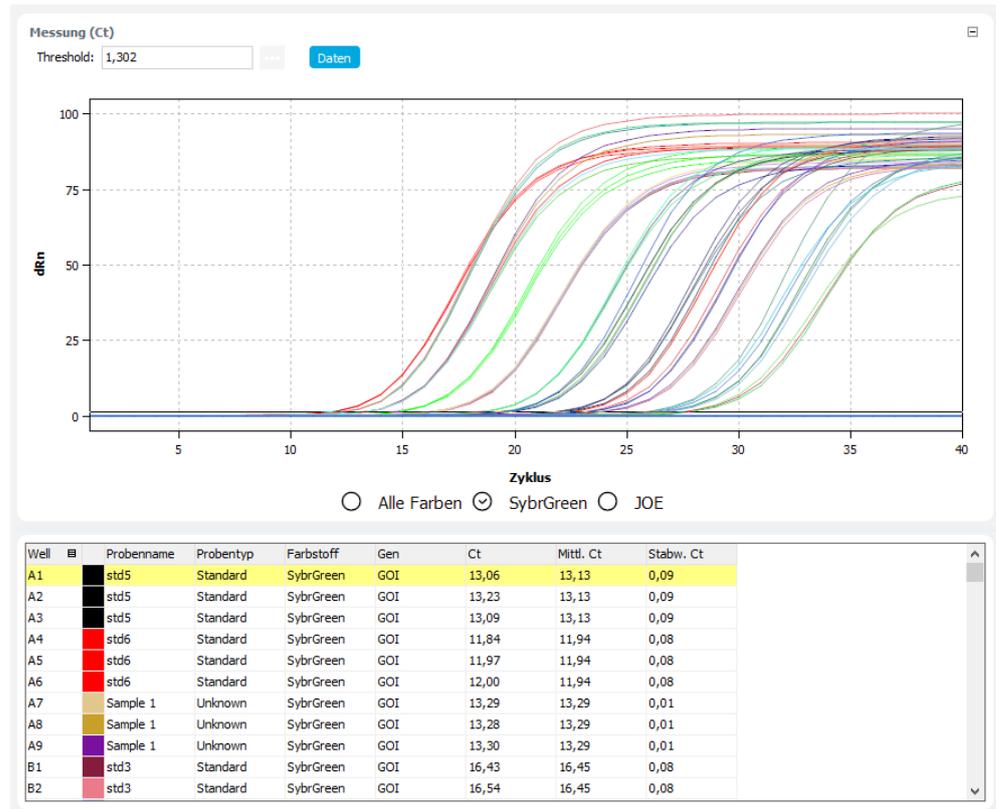
Die Amplifikation wird durch Fluoreszenzmessungen während des PCR-Laufs im Projektfenster **Monitoring** dokumentiert.

Anzeige der Fluoreszenzkurven Sie können sich die mathematisch bearbeiteten Amplifikationskurven oder die Rohdatenkurve anzeigen lassen. Für die mathematische Bearbeitung nehmen Sie die Einstellungen nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste im Fenster **Ansichtsoptionen** vor.

- ▶ Im Projektfenster **Monitoring** in der Liste **Ansicht** die Option **Amplifizierung** oder **Rohdaten** wählen.
 - ✓ In der Grafik wird jeweils die Fluoreszenzintensität [dRn] in relativen Einheiten gegen die Zahl der Zyklen aufgetragen. Die Farbe der jeweils angezeigten Kurve entspricht der in der Probentabelle jedem Well zugeordneten Farbe.
- ▶ Die Fluoreszenzkurven für die einzelnen Farbstoffe mit den Optionen unter der Grafik auswählen. Die Fluoreszenzkurven aller Farbstoffe werden nach Wahl der Option **Alle Farben** angezeigt.

Nach einem Klick auf die Schaltfläche  über den Kurven können Sie die Kurvenskalierung und die Parameter der Basislinienkorrektur ändern.

Mit Rechtsklick auf die Grafik öffnen Sie ein Kontextmenü für den Export der Fluoreszenzdaten in eine CSV-Datei und das Kopieren der Grafik in die Zwischenablage.



Ct-Werte berechnen

Nach dem qPCR-Lauf können aus den Amplifikationskurven direkt die Ct-Werte berechnet werden, ohne eine Auswertung, z.B. eine absolute Quantifizierung, anzulegen.

- ▶ Im Projektfenster **Monitoring** in der Liste **Ansicht** die Option **Amplifizierung** oder **Rohdaten** wählen und auf **Berechne Ct** klicken.
- ▶ Optional den Threshold-Wert für die einzelnen Farbstoffe im Feld **Threshold** über der Grafik manuell einstellen oder mit Klick auf das Icon den Threshold automatisch berechnen.
Bei der automatischen Berechnung werden die Einstellungen unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** verwendet.
 - ✓ Die Amplifikationskurven werden normalisiert und für die Farbstoffe einzeln oder gemeinsam auf den Listentabellen angezeigt. In der Probenliste darunter werden die Ct-Werte der einzelnen Proben und die Mittelwerte der Replikate angezeigt.
- ▶ Mit Klick auf **Daten** wieder in die vorherige Ansicht der Fluoreszenzkurven zurückkehren.

Mit einem Rechtsklick auf die Probenliste öffnen Sie ein Kontextmenü für den Export der Daten in eine CSV-Datei oder eine XLS-Datei.

Ergebnisse für die Berechnung der Ct-Werte anzeigen

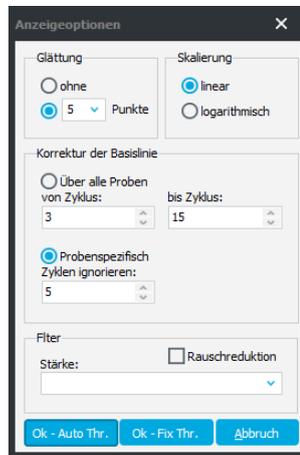
Die Probenliste mit den Ergebnissen wird im unteren Teil des Projektfensters angezeigt.

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.

Spalte	Beschreibung
	Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
Farbstoff	Verwendeter Farbstoff für die Fluoreszenzmessung
Gen	Name des in der Probe gemessenen Gens
Ct	Ct-Wert der Probe
Mittl. Ct	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten
Stabw. Ct	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten

Optionen für die Auswertung der Amplifikationskurven

Im Fenster **Anzeigeoptionen** nehmen Sie die Einstellung für die Anzeige und mathematische Bearbeitung der Fluoreszenzkurven vor. Das Fenster erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Monitoring | Ansichtsoptionen** wählen.



Option	Beschreibung
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven ohne Es erfolgt keine Glättung. Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.
Skalierung	Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)
Filter	Auswahl eines digitalen Filters zur Glättung der Fluoreszenzkurven, einstellbar in den Stufen schwach , mittel und stark
Rauschreduktion	Verrauschte Kurven, die von der Software nicht als Amplifikationskurven erkannt werden, auf 0 setzen und keine Ct-Werte ermitteln
Ok - Auto Thr.	Der Threshold wird entsprechend den Änderungen in diesem Fenster für ein aktuelles Projekt neu kalkuliert. Alle anderen Einstellungen werden ebenfalls übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.
Ok - Fix Thr.	Der im aktuellen Projekt gesetzte Threshold wird unabhängig von Änderungen in diesem Fenster beibehalten. Alle anderen Einstellungen werden übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.

Sehen Sie dazu auch

-  Fluoreszenzdaten exportieren [► 52]
-  Ergebnistabellen exportieren [► 53]

4.3 Schmelzkurven anzeigen und Schmelztemperatur T_m berechnen

Den Verlauf der Schmelzkurven können Sie im Projektfenster **Monitoring** verfolgen.

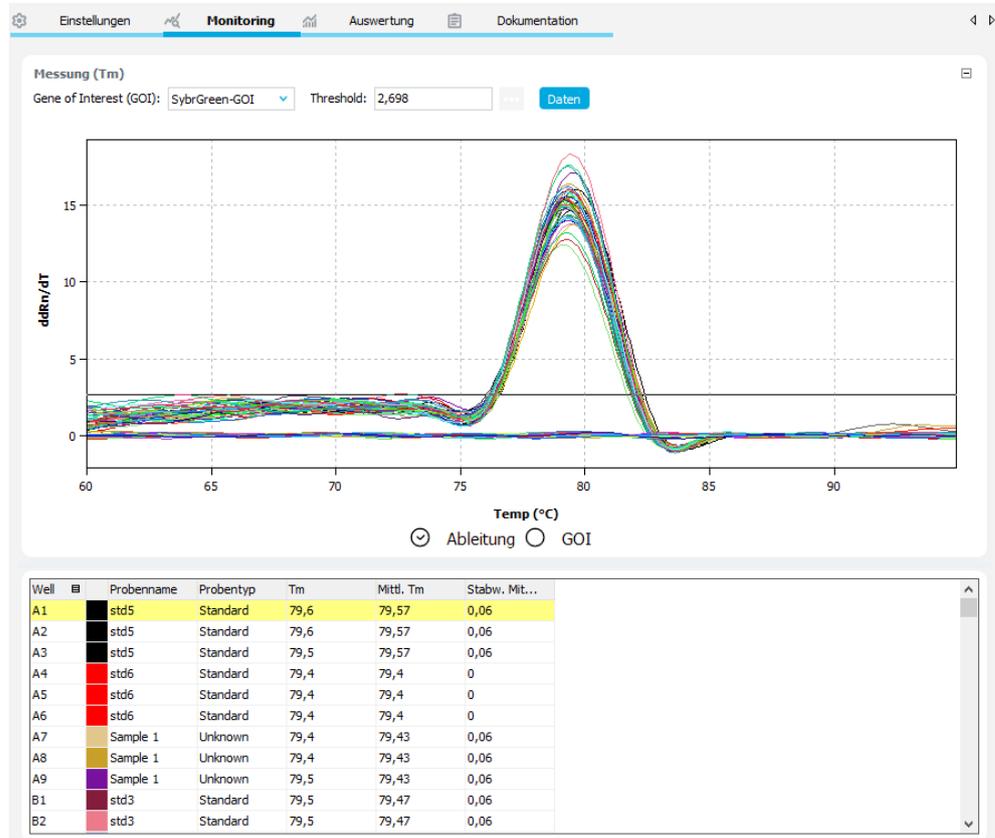
Schmelzkurven und Fluoreszenzkurven anzeigen

- ▶ Im Projektfenster **Ct- und T_m-Berechnung im Monitoring** in der Liste **Ansicht** die Option **Schmelzkurve** wählen und auf **Berechne T_m** klicken.

Die Schmelztemperatur T_m wird aus dem Peakmaximum der ersten Ableitung der Schmelzkurven bestimmt. Die Ableitungen werden im Grafikbereich in der Ansicht **Ableitung** angezeigt.

Die Schmelzkurven werden im Grafikbereich entweder auf den höchsten Fluoreszenzwert oder auf den Sollwert 100 normiert gegen die Temperatur aufgetragen. Diese Einstellungen im Fenster **Ansichtsoptionen** vor, das die gleichen Einstellungen wie das Optionsfenster für die Schmelzkurvenanalysen enthält.

Bei Multiplex-Experimenten können Sie in der GOI-Liste die Zielgen/Farbstoff-Kombination für die Anzeige wählen.



T_m berechnen

Nach dem qPCR-Lauf können aus den Schmelzkurve direkt die T_m-Werte berechnet werden, ohne explizit eine Schmelzkurvenauswertung anzulegen.

- ▶ Im Projektfenster **Monitoring** in der Liste **Ansicht** die Option **Schmelzkurve** wählen und auf **Berechne T_m** klicken.
- ▶ Bei Bedarf die Ansicht und mathematischen Bearbeitungen der Kurven nach Klick auf ändern.
- ▶ In der Liste **Gene of Interest (GOI)** das zu betrachtende Gen auswählen.
 - ✓ Unter Berücksichtigung unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** eingestellten Parameter wird die Schmelztemperatur berechnet und das Diagramm und die Proben-tabelle mit den Ergebnissen angezeigt.

- ▶ Optional auf dem Tab **Ableitung** einen Threshold-Wert einstellen, mit dem signifikante Peaks vom Rauschen unterschieden werden.
- ▶ Mit Klick auf **Daten** wieder in die vorherige Ansicht der Fluoreszenzkurven zurückkehren.

Mit einem Rechtsklick auf die Probentabelle öffnen Sie ein Kontextmenü für den Export der Daten in eine CSV-Datei oder eine XLS-Datei.

Ergebnisse der Schmelztemperaturberechnung anzeigen

Die Probentabelle im unteren Teil des Projektfensters **Monitoring** enthält die ermittelten Schmelztemperaturen.

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird. Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
Tm	Schmelztemperatur der Probe
Mittl. Tm	Durchschnittliche Schmelztemperatur von Replikaten
Stabw. Mittl. Tm	Standardabweichung der durchschnittlichen Schmelztemperatur von Replikaten

Sehen Sie dazu auch

- 📄 Optionen für die Schmelzkurvenanalyse [▶ 81]

5 Allgemeine Funktionen für Fluoreszenzkurven und Ergebnistabelle

Im Projektfenster **Monitoring** und in den Tabs des Projektfensters **Auswertung** werden im oberen Teil des Fensters die Grafiken der Fluoreszenzkurven und im unteren Teil Ergebnistabellen, basierend auf dem Probenlayout, angezeigt. Die Anzeige von Grafiken und Tabellen kann benutzerdefiniert eingerichtet werden. Die Inhalte von Grafiken und Tabellen werden über Kontextmenüs in verschiedene Formate exportiert.

5.1 Fluoreszenzdaten exportieren

Die Daten aus der Fluoreszenzmessung können als CSV-Datei exportiert werden. Außerdem kann die Grafik der Fluoreszenzkurven als Hardcopy in die Zwischenablage kopiert und so anderen Programmen zur Verfügung gestellt werden.

Aus den Grafiken der Tabs im Projektfenster **Auswertung** exportieren Sie die bearbeiteten Fluoreszenzdaten. Die Rohdaten können Sie aus dem Projektfenster **Monitoring** exportieren.

Grafik in die Zwischenablage exportieren

- ▶ Auf die Grafik rechtsklicken.
- ▶ Im Kontextmenü die Funktion **Diagramm kopieren** wählen.
 - ✓ Die Grafik der Fluoreszenzkurven wird in die Zwischenablage kopiert und kann in anderen Anwendungen, z. B. in einer Word-Datei, verwendet werden.

Fluoreszenzdaten als CSV-Datei exportieren

- ▶ Auf die Grafik rechtsklicken.
- ▶ Im Kontextmenü die Funktion **Diagramm speichern** wählen.
- ▶ Im Fenster **Speichern unter** den Dateinamen wählen und mit **Speichern** bestätigen.
 - ✓ Die Fluoreszenzwerte werden in eine CSV-Datei gespeichert.

Fluoreszenzdaten automatisch exportieren

Sie können die Rohdaten automatisch am Ende eines qPCR-Laufs speichern. Die Einstellungen nehmen Sie unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Allgemein** vor.

5.2 Ergebnistabellen anpassen

Die Ergebnistabellen der Analysen befinden sich jeweils im unteren Teil der Tabs des Projektfensters **Auswertung** und im Projektfenster **Monitoring**. Je nach gewählter Analysenmethode enthält die Ergebnistabelle unterschiedliche Datensätze. Die Auswahl und Ansicht der angezeigten Spalten kann für jede Tabelle benutzerdefiniert angepasst werden.

- ▶ Nach Rechtsklick auf eine Spaltenüberschrift können im Kontextmenü einzelne Spalten für die Anzeige aktiviert oder deaktiviert werden.
- ▶ Um die Reihenfolge der Spalten zu ändern, auf einen Spaltenkopf klicken und mit gedrückter Maustaste die Spalte an die gewünschte Position ziehen.
- ▶ Um die Spaltenbreite zu ändern, den Mauszeiger auf den Trennstrich zwischen 2 Spaltenköpfe führen. Nachdem sich der Mauszeiger in einen Doppelpfeil geändert hat, mit gedrückter Maustaste die Trennlinie auf die gewünschte Spaltenbreite verschieben.

- ▶ Um die Daten einer Spalte auf- oder absteigend zu sortieren, auf den Spaltenkopf klicken.
- ▶ Die Farben einer ausgewählten Fluoreszenzkurve mit einem Doppelklick auf die Farbfläche in der Tabellenzeile ändern. Mit gedrückter Umschalttaste und Doppelklick auf die Farbfläche die Farbänderung wieder rückgängig machen.
- ▶ Mit gedrückter Strg-Taste und Doppelklick das Fenster **Farben bearbeiten** für das Zuweisen einer Farbe an mehrere Wells öffnen. Die Funktion des Fensters ist die gleiche, wie für die Einstellungen der Farben über das Probenlayout im Projektfenster **Einstellungen | Proben**.
- ▶ Mit Mausclick auf die Spalte **Well** zwischen spalten- und zeilenweiser Darstellung der Ergebnisse umschalten. Die spalten- und zeilenweise Darstellung orientiert sich an der Anordnung der Proben im Layout.

Sehen Sie dazu auch

- 📖 Probeneigenschaften im Layoutschema eingeben [▶ 36]

5.3 Ergebnistabellen exportieren

Die Proben tabellen mit den Ergebnissen im Projektfenster **Monitoring** und in den Tabs des Projektfensters **Auswertung** können über ein Kontextmenü in XLS- und CSV-Dateien exportiert werden. Benutzerdefinierte Anpassungen werden dabei beim Export berücksichtigt. Folgende Optionen stehen dafür zur Verfügung:

Option	Beschreibung
Speichere Tabelle als Excel-Datei (*.xls)	Ergebnisse als XLS-Datei exportieren
Speichere Tabelle als Excel-Datei (*.xls) und starte Excel	Ergebnisse als XLS-Datei exportieren und die exportierte Datei in Excel öffnen
Speichere Tabelle als CSV-Datei (*.csv)	Ergebnisse als CSV-Datei exportieren

- ▶ Auf die Grafik rechtsklicken.
- ▶ Im Kontextmenü eine Option wählen.
- ▶ Im Fenster **Speichern unter** den Dateinamen eingeben und mit **Speichern** bestätigen.
 - ✓ Der Inhalt der Ergebnistabelle und die Parameter des qPCR-Protokolls werden im gewählten Format gespeichert.

Ct-Werte automatisch exportieren

Sie können die Ct-Werte am Ende eines qPCR-Laufs automatisch in eine CSV-Datei exportieren. Die Einstellungen dafür nehmen Sie unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Allgemein** vor.

5.4 Farben der Fluoreszenzkurven bearbeiten

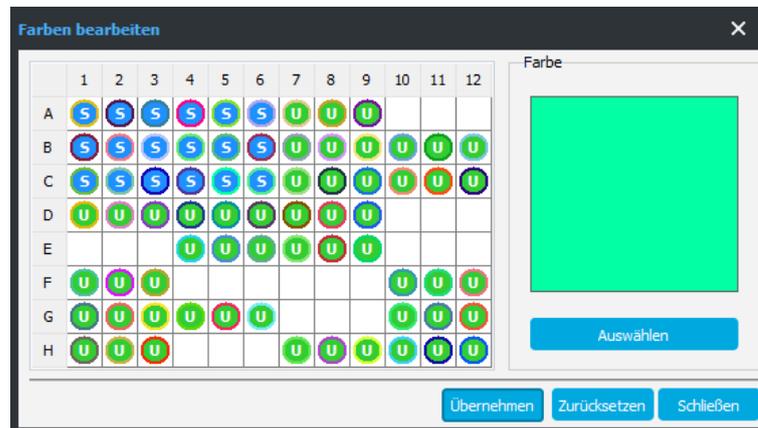
Das Farbschema der Fluoreszenzkurven wählen Sie programmweit im Fenster **Optionen | Farben**. Sie haben dabei die Wahl zwischen Schema für Probentypen, Replikaten oder Wells. Bei Probentypen werden Proben es gleichen Typs mit einer Farbe gekennzeichnet. Bei der Wahl von Replikaten erhalten die Kurven der Replikate einer Probe jeweils die gleiche Farbe. Nach Wells codiert erhält jede Kurve eine andere Farbe.

Sie können die Farbe einzelner Wells ändern, um sie in der Grafik hervorzuheben. Die Einstellungen dazu nehmen Sie entweder im Probenlayout des Projektfenster **Einstellungen | Proben** oder in den Probentabellen im unteren Bereich des Projektfensters vor.

Einstellung im Probenlayout

Im Layoutschema werden die Kurvenfarben als farbiger Ring um das Probentypsymbol der Wells angezeigt. Sie können die Farben von einem oder mehreren Wells im Fenster **Farben bearbeiten** gleichzeitig ändern.

- ▶ Auf das Probenschema mit der Maus rechtsklicken und im Kontextmenü den Punkt **Farben zuweisen** wählen.
- ✓ Das Fenster **Farben bearbeiten** erscheint.



- ▶ Auf den Button **Auswählen** klicken, im Fenster **Farbe** eine Farbe einstellen und mit **Ok** bestätigen.
- ▶ Im Probenlayout des Fensters **Farben bearbeiten** alle Wells markieren, die diese Farbe erhalten sollen, und auf den Button **Übernehmen** klicken.
- ▶ Bei Bedarf weiteren Wells Kurvenfarben zuweisen.
- ▶ Um die Farbänderung rückgängig zu machen, die betroffenen Wells markieren und auf den Button **Zurücksetzen** klicken.
- ▶ Das Fenster **Farben bearbeiten** mit Klick auf den Button verlassen.
- ✓ Die Kurvenfarbe der Probe (Ring) wird aktualisiert.

Einstellung in der Probentabelle

Die Kurvenfarbe wird in der Probentabelle in der Spalte vor dem Probennamen angezeigt. Die Kurvenfarben können Sie auch über diese Farbflächen ändern.

- ▶ Auf die Farbfläche doppelklicken und im Fenster **Farbe** die neue Farbe wählen und mit **Ok** bestätigen.
- ✓ Die neue Farbe ist der Probe zugewiesen.
- ▶ Um die Farbänderung rückgängig zu machen, die Umschalttaste gedrückt halten und erneut auf die Farbfläche doppelklicken.
- ✓ Nach einer Rückfrage wird die Farbänderung rückgängig gemacht.
- ▶ Um in mehreren Wells die Farbe zu ändern, mit gedrückter Strg-Taste auf eine beliebige Farbfläche klicken. Es erscheint das Fenster **Farben bearbeiten**.

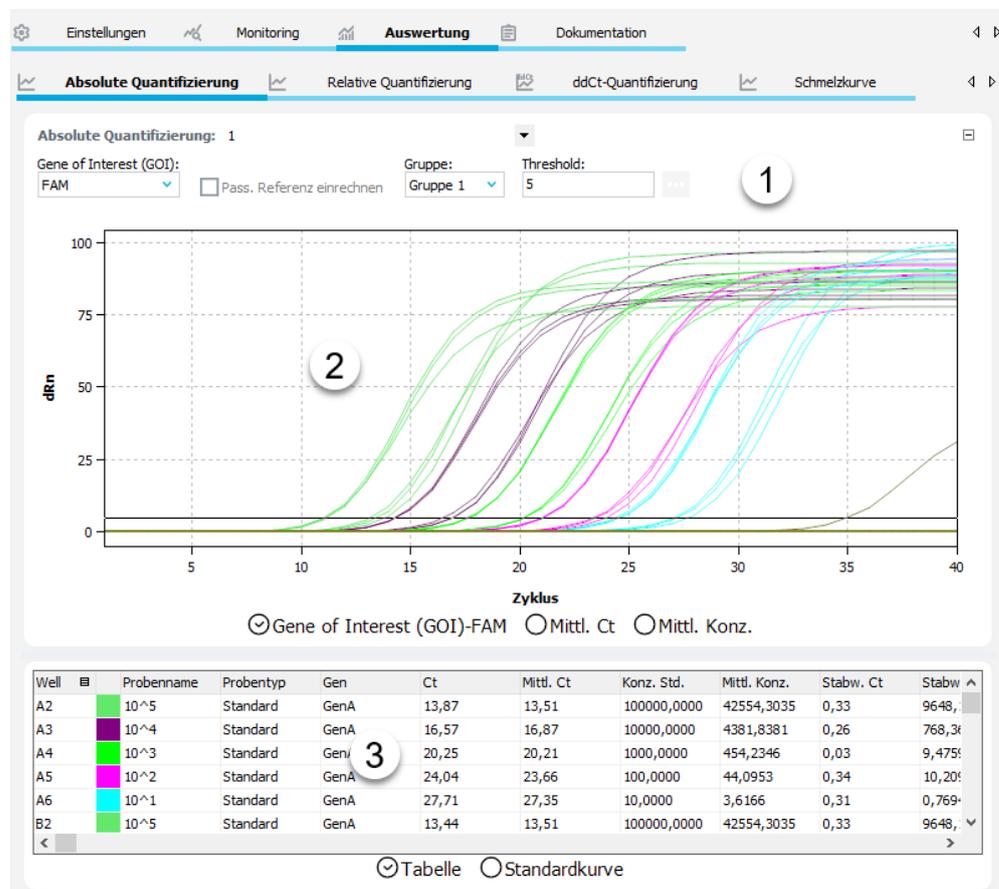
- ▶ Weiter verfahren, wie oben beschrieben.

6 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung dient zur Ermittlung von absoluten Kopienzahlen in Proben anhand des Vergleichs mit Standards bekannter Konzentrationen. Diese Analyse nehmen Sie im Projektfenster **Auswertung | Absolute Quantifizierung** vor. Dabei legen Sie für jedes Gene of Interest im Projektfenster eine separate Auswertung an. Die Auswertungen werden mit dem Projekt gespeichert und können zu einem späteren Zeitpunkt wieder angesehen und weiter bearbeitet werden.

6.1 Projektfenster und Menü für die absolute Quantifizierung

Projektfenster Auswertung | Absolute Quantifizierung



Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter für die absolute Quantifizierung
2	Grafikbereich	Anzeige der Fluoreszenzkurven, der mittleren Ct-Werte und der mittleren Konzentration für einen ausgewählten Farbstoff (Gen)
3	Tabellenbereich	Anzeige der Proben-tabelle mit den Ergebnissen und der Standardkurve des Farbstoffs (Gen)

Menü AbsQuant und Icons

Bei Auswahl des Tabs **Absolute Quantifizierung** erscheinen das Menü **AbsQuant** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste für spezielle Funktionen für die absolute Quantifizierung.

Icon	Menü Abs-Quant	Beschreibung
	Abs. Quantifizierung hinzufügen	Eine Auswertung im Projektfenster einfügen
	Abs. Quantifizierung entfernen	Die aktuelle Auswertung aus dem Projektfenster entfernen
	Abs. Quantifizierung Optionen	Einstellungen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven und für die Ergebnisberechnung
	Autom. Threshold	Automatisch den Threshold für die Berechnung der Ct-Werte bestimmen
	Standardkurve importieren	Standardkurve aus einem gespeicherten oder dem gleichen Projekt in die aktuelle Auswertung importieren

6.2 Auswertung für eine absolute Quantifizierung anlegen oder löschen

Auswertungen anlegen

Um eine Auswertung vornehmen zu können, müssen Sie diese zunächst im Projektfenster mit einem Namen anlegen.

- ▶ Das Projektfenster **Auswertung | Absolute Quantifizierung** öffnen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **AbsQuant | Abs. Quantifizierung hinzufügen** wählen.
- ▶ Im Eingabefenster den Namen für die Auswertung eintragen und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die neue Auswertung ist im Projekt angelegt. Sie können jetzt ein GOI wählen und die weiteren Auswerteparameter editieren. Die Fluoreszenzkurven des GOI (Farbstoffs) werden im Grafikbereich und die Ergebnisse in der Probentabelle darunter angezeigt.

Auswertung entfernen

Eine nicht benötigte Auswertung können Sie entfernen.

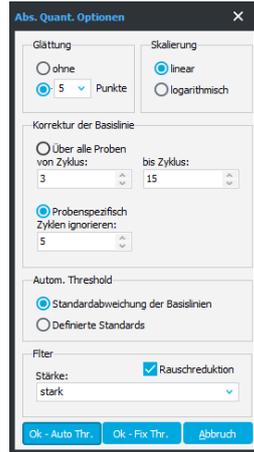
- ▶ Den Namen der Auswertung in der Liste wählen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **AbsQuant | Abs. Quantifizierung entfernen** wählen.
 - ✓ Die Auswertung wird nach einer Rückfrage entfernt.

6.3 Optionen für die absolute Quantifizierung

In den Optionen für die absolute Quantifizierung nehmen Sie die Einstellung der mathematischen Behandlung der Fluoreszenzkurven und Bedingungen für die automatische Threshold-Berechnung vor.

Das Fenster **Abs. Quantifizierung Optionen** erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **AbsQuant | Abs. Quantifizierung Optionen** wählen.

Fenster Optionen Abs. Quantifizierung



Option	Beschreibung
Glättung	<p>Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven</p> <p>ohne Es erfolgt keine Glättung.</p> <p>Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.</p>
Skalierung	<p>Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)</p>
Korrektur der Basislinie	<p>Auswahl der Basislinienkorrektur</p> <p>Über alle Proben Bei dieser Korrektur wird die Basislinie für jede Probe im gleichen Bereich ermittelt. Die untere und die obere Bereichsgrenze sind in den Feldern von Zyklus und bis Zyklus einzustellen.</p> <p>Probenspezifisch Diese Korrektur sollte gewählt werden, wenn die Kurven sehr unterschiedliche Ct-Werte besitzen. Die untere Bereichsgrenze für die Ermittlung der Basislinie wird für alle Proben im Feld Zyklen ignorieren eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt.</p> <p>Hinweis: Die Art der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.</p>
Autom. Threshold	<p>Standardabweichung der Basislinien Berechnung des Thresholds als x-fache Abweichung der Standardabweichung der Basislinien (Faktor einstellbar im Menüpunkt Extras Optionen Auswertung)</p> <p>Definierte Standards Auswahl von Standards mit dem Ziel, den maximalen Wert für das Bestimmtheitsmaß R^2 zu erhalten</p>
Filter	<p>Auswahl eines digitalen Filters zur Glättung der Fluoreszenzkurven, einstellbar in den Stufen schwach, mittel und stark</p>
Rauschreduktion	<p>Verrauschte Kurven, die von der Software nicht als Amplifikationskurven erkannt werden, auf 0 setzen und keine Ct-Werte ermitteln</p>
Ok - Auto Thr.	<p>Der Threshold wird entsprechend den Änderungen in diesem Fenster für ein aktuelles Projekt neu kalkuliert. Alle anderen Einstellungen werden ebenfalls übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.</p>
Ok - Fix Thr.	<p>Der im aktuellen Projekt gesetzte Threshold wird unabhängig von Änderungen in diesem Fenster beibehalten. Alle anderen Einstellungen werden übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.</p>

6.4 Parameter für die absolute Quantifizierung editieren

Die Parameter für die absolute Quantifizierung eines Experiments stellen Sie in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung
Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen Entsprechend der Auswahl werden die Fluoreszenzkurven und Standardkurve angezeigt.
Pass. Referenz einrechnen	Nur wählbar, wenn im Projektfenster Einstellungen Scan ein Farbstoff als passive Referenz definiert wurde. Bei Aktivierung wird die Fluoreszenz des als passive Referenz gesetzten Farbstoffs zur Normierung eingesetzt.
Benutzergruppe	Wenn im Probenlayout mehrere Experimente (Gruppen) angelegt wurden, muss hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments ausgewählt werden.
Threshold	Threshold-Wert manuell einstellen Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn).
...	Skalierung und Basislinieneinstellung der Fluoreszenzkurve wählen

Threshold einstellen

Zur Ermittlung von Ct-Werten für die Auswertung muss ein Threshold-Wert für jedes Experiment ermittelt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Threshold-Wert einzustellen:

- ▶ In den allgemeinen Optionen nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste die Optionen für eine automatische Threshold-Bestimmung einstellen.
- ▶ Den Threshold manuell im Eingabefeld über der Grafik eingeben.
- ▶ In der Grafik die schwarze Threshold-Linie mit gedrückter Maustaste vertikal verschieben. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die Ct-Werte in der Proben-tabelle.

Hinweis: Für das manuelle Setzen des Thresholds im Anzeigebereich ist die logarithmische Darstellung aufgrund der weiteren Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Amplifizierung besser geeignet als die lineare Darstellung.

- ▶ Für die automatische Berechnung auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken. Für die automatische Berechnung wird der unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** eingestellte Faktor und die Einstellungen aus dem Optionsfenster (Icon ) verwendet.

- ✓ Der sich ergebende Threshold-Wert wird sowohl bei der manuellen Ermittlung als auch bei der automatischen Berechnung im Eingabefeld **Threshold** aktualisiert und angezeigt.

6.5 Fluoreszenzkurven für die absolute Quantifizierung anzeigen

Im Anzeigebereich sind die gemessenen Daten, normiert auf den Wert 100 für die höchste Fluoreszenzintensität, gegen den Zyklus für das ausgewählte Zielgen aufgetragen. Bei Auswahl einer anderen Zielgen/Farbstoff-Kombination in der GOI-Liste werden deren Fluoreszenzkurven angezeigt.

Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Bei beiden Darstellungsformen wird eine Kurzinformati- on zur Probe eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht.

Grafik umschalten

- ▶ Auf das Icon  über der Grafik klicken.
- ▶ Im Auswahlfenster die Option **Skalierung logarithmisch** oder **linear** wählen.
- ▶ Neben das Auswahlfenster klicken.
 - ✓ Die Grafik wird neu skaliert. Für die manuelle Einstellung des Thresholds wird die logarithmische Darstellung aufgrund der weiteren Spreizung des frühen expo- nentiellen Bereichs der Amplifizierung empfohlen.

Sehen Sie dazu auch

 Fluoreszenzdaten exportieren [▶ 52]

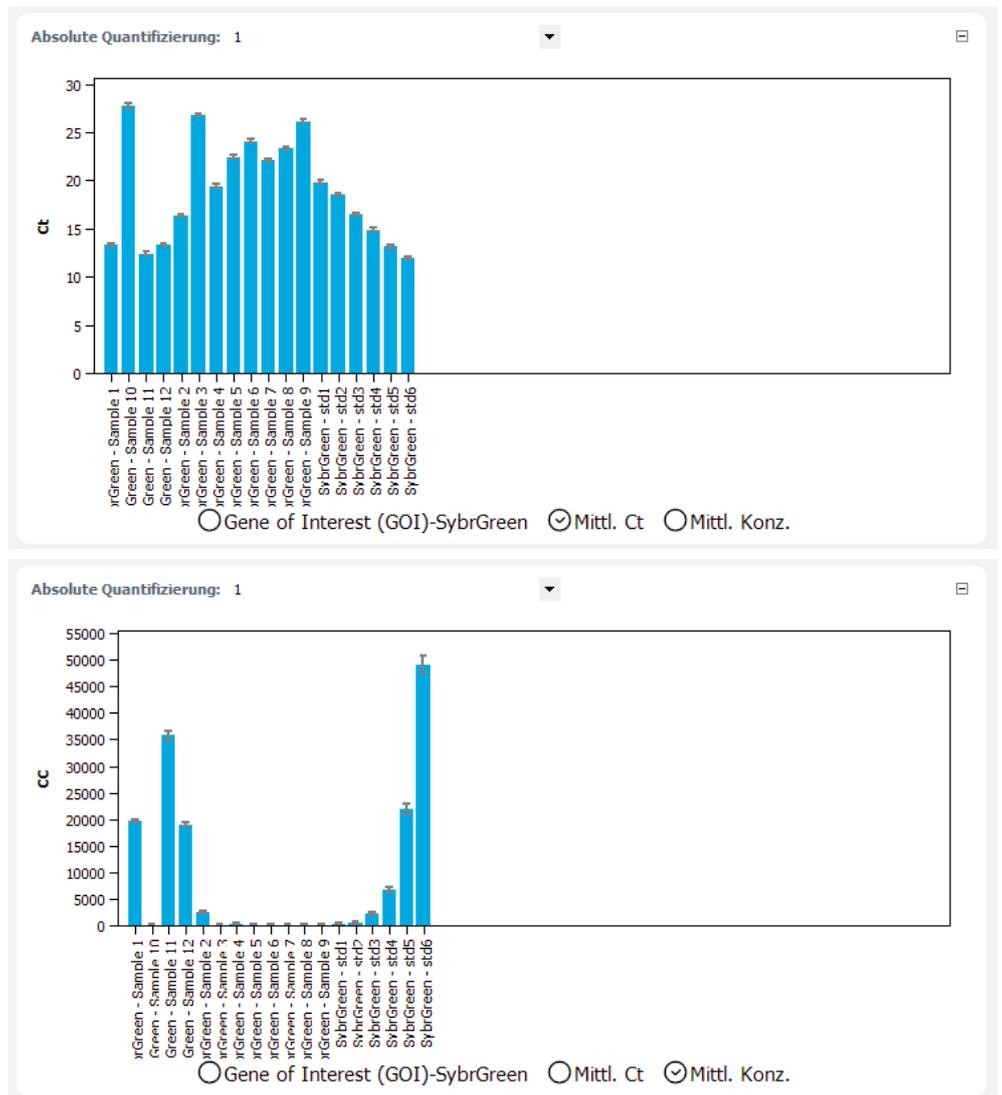
6.6 Mittlere Ct-Werte und Konzentrationen als Balkendiagramme anzeigen

Die Ct-Werte und die Konzentrationen der Proben werden als Balkendiagramme in den entsprechenden Ansichten im Grafikbereich des Projektfensters **Auswertung | Absolute Quantifizierung** angezeigt.

Jede Probe wird mit einem Balken symbolisiert, an dessen unterem Ende der Probenname steht. Die Reihenfolge der Proben im Diagramm ist alphabetisch nach dem Probennamen geordnet. Die Höhe des Balkens entspricht dem mittleren Ct-Wert oder der mittleren Konzentration der Replikate einer Probe. Der Bereich der Standardabweichung wird als grauer Fehlerbalken am Ende des Balkens angezeigt.

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über einen Balken fahren, wird eine Kurzinformati- on zur Position der Replikate im Probenlayout, zum mittleren Ct-Wert und zur mittleren Kon- zentration eingeblendet.

Wenn bei einer großen Probenanzahl nicht alle Probenbalken gleichzeitig angezeigt werden, können Sie mit Klick auf die Grafik und gedrückter Maustaste das Diagramm horizontal verschieben.



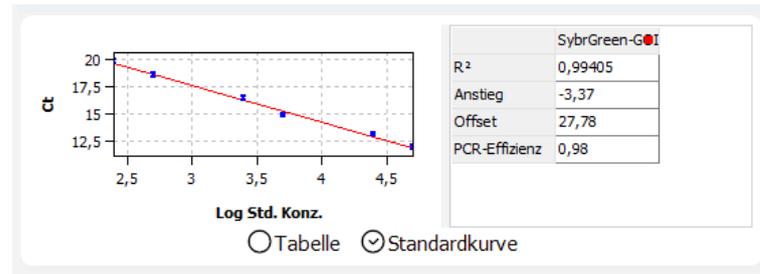
6.7 Standardkurve für die absolute Quantifizierung anzeigen

Die Standardkurve des Experiments für das gewählte GOI befindet sich im unteren Bereich des Projektfensters **Auswertung | Absolute Quantifizierung**.

Für die Darstellung der Standardkurve sind die Ct-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus ihrer Konzentration grafisch aufgetragen. Die jeweiligen Datenpunkte sind mit einem Fehlerbalken versehen, der die Größe der Standardabweichung zwischen Replikaten anzeigt. Zu jedem Datenpunkt wird eine Kurzinformation mit dem Probenamen und mittlerem Ct-Wert der Replikate angezeigt, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. Im Wertebereich rechts daneben werden folgende Daten angezeigt:

- Bestimmtheitsmaß R^2 der Geradengleichung
- Steigung der Standardgerade
- Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse bei $x=0$ (Offset)
- PCR-Effizienz

Die Standardkurve und die Werte werden automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert.



6.8 Standardkurven für eine absolute Quantifizierung in ein Experiment importieren

Sie können für die absolute Quantifizierung Standards im Experiment messen und daraus die Regressionskoeffizienten der Standardkurve berechnen lassen oder Standardkurven aus anderen Experimenten importieren. Das können Experimente aus anderen Projekten oder aus einer anderen Gruppe im gleichen Projekt sein.

- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **AbsQuant | Standardkurve importieren** wählen.
- ▶ Im Fenster **Standardkurve importieren** die Importfunktion wählen und die nötigen Parameter editieren.
 - ✓ Die Standardkurve wird in das Experiment importiert und für die Berechnung der Konzentration verwendet.

Folgende Optionen stehen im Fenster **Standardkurve importieren** zur Verfügung:

Option	Beschreibung
aus diesem Lauf importieren	Standardkurve aus dem aktuell geöffneten Projekt importieren Wenn in einem Projekt mehrere Standardkurven gespeichert sind, werden alle Kurven angezeigt und es kann eine Auswahl vorgenommen werden.
aus gespeichertem Lauf importieren	Standardkurve aus einem gespeichertem Projekt importieren Bei mehreren gespeicherten Standardkurven wählen Sie die Kurve aus der Liste aus.
manuelle Eingabe	Koeffizienten der Standardkurve werden manuell eingegeben Geben Sie die Steigung und den Achsenschnitt für die Gleichung ein: $Ct = \text{Steigung} * \log(\text{Konz}) + \text{Achsenchnitt}$.
Externe Standards löschen	Importierte oder eingegebene Standardkurven löschen Die Auswertungen werden entsprechend zurückgesetzt.

6.9 Ergebnisse einer absoluten Quantifizierung anzeigen

Die Proben-tabelle mit den Ergebnissen wird im unteren Teil des Projektfensters **Auswertung** in der Ansicht **Tabelle** angezeigt.

Well	Probenname	Probentyp	Gen	Ct	Mittl. Ct	Konz. Std.	Mittl. Konz.	Stabw. Ct
A2	10 ⁵	Standard	GenA	13,87	13,51	100000,0000	42554,30	0,33
A3	10 ⁴	Standard	GenA	16,57	16,87	10000,0000	4381,84	0,26
A4	10 ³	Standard	GenA	20,25	20,21	1000,0000	454,23	0,03
A5	10 ²	Standard	GenA	24,04	23,66	100,0000	44,10	0,34
A6	10 ¹	Standard	GenA	27,71	27,35	10,0000	3,62	0,31
B2	10 ⁵	Standard	GenA	13,44	13,51	100000,0000	42554,30	0,33

Tabelle Standardkurve

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird. Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Gen	Name des in der Probe gemessenen Gens
Ct	Ct-Wert der Probe
Mittl. Ct	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten
Konz. Std.	Konzentration der Standardprobe
Mittl. Konz.	Mittlere Konzentration von Replikaten Die Konzentration wird mit dem mittleren Ct-Wert aus der Standardkurve berechnet.
Stabw. Ct	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten
%CV Ct	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten
Stabw. Mittl. Konz.	Standardabweichung der mittleren Konzentration

Sie können die Anzeige der Spalten in der Ergebnistabelle entsprechend ihren Erfordernissen anpassen, indem Sie nach Rechtsklick auf den Tabellenkopf im Kontextmenü die Spaltenanzeige aktivieren. Um die Daten der so konfigurierten Ergebnistabelle in eine Excel- oder CSV-Datei zu exportieren, führen Sie einen Rechtsklick auf die Tabellen aus und wählen Sie den entsprechenden Befehl im Kontextmenü.

Sehen Sie dazu auch

-  Ergebnistabellen exportieren [► 53]
-  Ergebnistabellen anpassen [► 52]

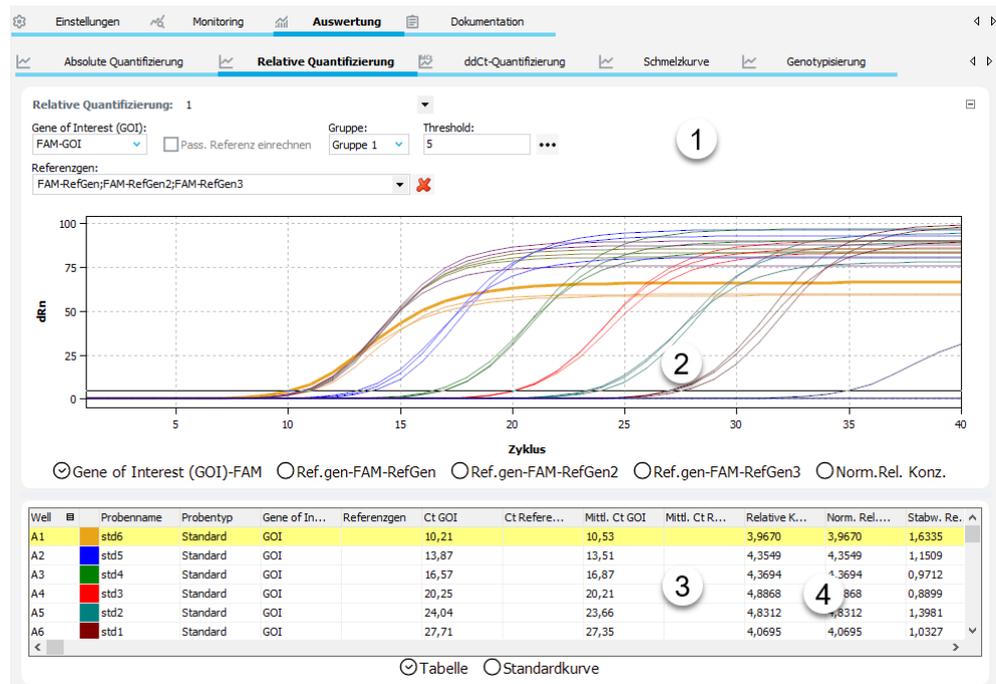
7 Relative Quantifizierung

Mit der relativen Quantifizierung wird das relative Expressionsverhältnis des Zielgens (GOI) zu einem oder mehreren Referenzgenen (meist Housekeeping-Genen) bestimmt. Wenn eine der Proben als Kalibrator definiert ist, wird das Expressionsverhältnis für diese Probe auf 1 gesetzt und die Expressionsverhältnisse aller anderen Proben relativ dazu angegeben. Für eine relative Quantifizierung sind Standardreihen sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen erforderlich, aus denen zwei Kalibriergeraden berechnet werden.

Die relative Analyse nehmen Sie im Projektfenster **Auswertung | Relative Quantifizierung** vor. Für jede Kombination GOI/Referenzgene legen Sie eine eigene Auswertung an. Die Auswertungen werden mit dem Projekt gespeichert und können zu einem späteren Zeitpunkt wieder angesehen und weiter bearbeitet werden.

7.1 Projektfenster und Menü für die relative Quantifizierung

Projektfenster Auswertung | Relative Quantifizierung



Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter für die relative Quantifizierung
2	Grafikbereich	Anzeige der Fluoreszenzkurven des GOI und der Referenzgene und das Balkendiagramm der normierten relativen Konzentration der Proben
3	Tabellenbereich	Anzeige der Proben-tabelle mit den Ergebnissen und der Standardkurven des GOI und der Referenzgene

Menü RelQuant und Icons

Bei Auswahl des Tabs **Relative Quantifizierung** erscheinen das Menü **RelQuant** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste.

Icon	Menü RelQuant	Beschreibung
	Rel. Quantifizierung hinzufügen	Eine Auswertung im Projektfenster einfügen
	Rel. Quantifizierung entfernen	Die aktuelle Auswertung aus dem Projektfenster entfernen
	Rel. Quantifizierung Optionen	Einstellungen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven und für die Ergebnisberechnung
	Autom. Threshold	Automatisch den Threshold für die Berechnung der Ct-Werte bestimmen
	Standardkurve importieren	Standardkurve aus einem gespeicherten oder dem gleichen Projekt in die aktuelle Auswertung importieren

7.2 Auswertung für eine relative Quantifizierung anlegen oder löschen

Auswertungen anlegen

Um eine Auswertung vornehmen zu können, müssen Sie diese zunächst im Projektfenster mit einem Namen anlegen.

- ▶ Das Projektfenster **Auswertung | Relative Quantifizierung** öffnen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **RelQuant | Rel. Quantifizierung hinzufügen** hinzufügen wählen.
- ▶ Im Eingabefenster den Namen für die Auswertung eintragen und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die neue Auswertung ist im Projekt angelegt. Sie können jetzt ein GOI und die Referenzgene wählen und die weiteren Auswerteparameter editieren.

Auswertung entfernen

Eine nicht benötigte Auswertung können Sie entfernen.

- ▶ Den Namen der Auswertung in der Liste wählen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **RelQuant | Rel. Quantifizierung entfernen** wählen.
 - ✓ Die Auswertung wird entfernt.

7.3 Optionen für die relative Quantifizierung

In den Optionen für die relative Quantifizierung nehmen Sie die Einstellung der mathematischen Behandlung der Fluoreszenzkurven und Bedingungen für die automatische Threshold-Berechnung vor.

Das Fenster **Rel. Quant. Optionen** erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **RelQuant | Rel. Quantifizierung Optionen** wählen.

Folgende Einstellungen sind verfügbar:

Option	Beschreibung
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven ohne Es erfolgt keine Glättung. Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.

Option	Beschreibung
Skalierung	Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)
Korrektur der Basislinie	<p>Auswahl der Basislinienkorrektur</p> <p>Über alle Proben Bei dieser Korrektur wird die Basislinie für jede Probe im gleichen Bereich ermittelt. Die untere und die obere Bereichsgrenze sind in den Feldern von Zyklus und bis Zyklus einzustellen.</p> <p>Probenspezifisch Diese Korrektur sollte gewählt werden, wenn die Kurven sehr unterschiedliche Ct-Werte besitzen. Die untere Bereichsgrenze für die Ermittlung der Basislinie wird für alle Proben im Feld Zyklen ignorieren eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt.</p> <p>Hinweis: Die Art der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.</p>
Autom. Threshold	<p>Standardabweichung der Basislinien Berechnung des Thresholds als x-fache Abweichung der Standardabweichung der Basislinien (Faktor einstellbar im Menüpunkt Extras Optionen Auswertung)</p> <p>Definierte Standards Auswahl von Standards mit dem Ziel, den maximalen Wert für das Bestimmtheitsmaß R^2 zu erhalten</p>
Filter	Auswahl eines digitalen Filters zur Glättung der Fluoreszenzkurven, einstellbar in den Stufen schwach , mittel und stark
Rauschreduktion	Verrauschte Kurven, die von der Software nicht als Amplifikationskurven erkannt werden, auf 0 setzen und keine Ct-Werte ermitteln

7.4 Parameter für die relative Quantifizierung editieren

Die Parameter für die relative Quantifizierung eines Experiments stellen Sie in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung
Gene of Interest (GOI)	<p>Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen</p> <p>Entsprechend der Auswahl werden die Fluoreszenzkurven und Standardkurve angezeigt.</p>
Referenzgen	<p>Auswahlliste der Referenzgene</p> <p>Es können mehrere Referenzgene gleichzeitig ausgewählt werden. Für jedes Referenzgen wird ein weiterer Tab im Grafikbereich angezeigt.</p> <p>Mit Klick auf das Icon  werden alle ausgewählten Referenzgene aus der Auswertung entfernt.</p>
Pass. Referenz einrechnen	<p>Nur wählbar, wenn im Projektfenster Einstellungen Scan ein Farbstoff als passive Referenz definiert wurde.</p> <p>Bei Aktivierung wird die Fluoreszenz des als passive Referenz gesetzten Farbstoffs zur Normierung eingesetzt.</p>
Benutzergruppe	Wenn im Probenlayout mehrere Experimente (Gruppen) angelegt wurden, muss hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments ausgewählt werden.

Option	Beschreibung
Threshold	Threshold-Wert manuell einstellen Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn).
...	Skalierung und Basislinieneinstellung der Fluoreszenzkurve wählen

Threshold einstellen

Zur Ermittlung von Ct-Werten für die Auswertung muss ein Threshold-Wert für jedes Experiment ermittelt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Threshold-Wert einzustellen:

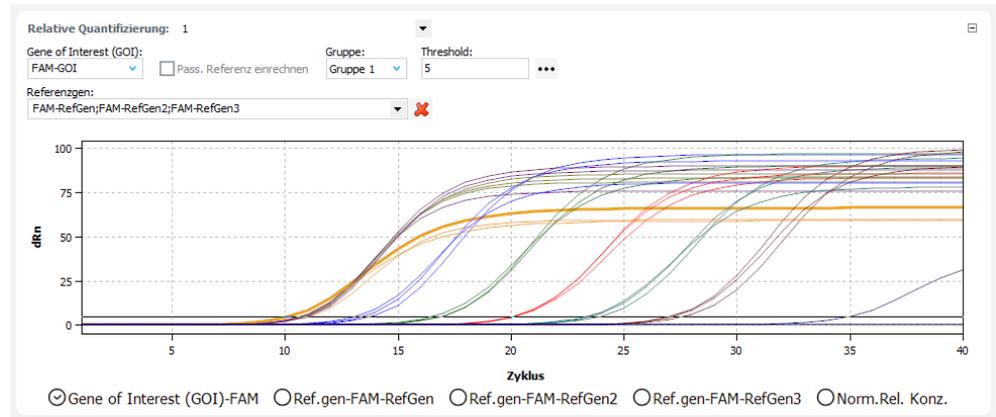
- ▶ In den allgemeinen Optionen nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste die Optionen für eine automatische Threshold-Bestimmung einstellen.
- ▶ Den Threshold manuell im Eingabefeld über der Grafik eingeben.
- ▶ In der Grafik die schwarze Threshold-Linie mit gedrückter Maustaste vertikal verschieben. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die Ct-Werte in der Proben-tabelle.
Hinweis: Für das manuelle Setzen des Thresholds im Anzeigebereich ist die logarithmische Darstellung aufgrund der weiteren Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Amplifizierung besser geeignet als die lineare Darstellung.
- ▶ Für die automatische Berechnung auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken. Für die automatische Berechnung wird der unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** eingestellte Faktor und die Einstellungen aus dem Optionsfenster (Icon ) verwendet.
 - ✓ Der sich ergebende Threshold-Wert wird sowohl bei der manuellen Ermittlung als auch bei der automatischen Berechnung im Eingabefeld **Threshold** aktualisiert und angezeigt.

7.5 Fluoreszenzkurven für die relative Quantifizierung anzeigen

Im Anzeigebereich sind die gemessenen Daten, normiert auf den Wert 100 für die höchste Fluoreszenzintensität, gegen den Zyklus für das ausgewählte Zielgen aufgetragen. Den Kombinationen Zielgen/Farbstoff und Referenzgen/Farbstoff sind jeweils ein Listenblatt zugeordnet.

Bei Auswahl einer anderen Zielgen/Farbstoff-Kombination in der GOI-Liste werden deren Fluoreszenzkurven angezeigt.

Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Bei beiden Darstellungsformen wird eine Kurzinformation zur Probe eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht. Für die manuelle Einstellung des Thresholds wird die logarithmische Darstellung aufgrund der weiten Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Fluoreszenzkurve empfohlen.



Skalierung umschalten

Sie können zwischen linearer und logarithmischer Skalierung der Fluoreszenzkurven wählen.

- ▶ Auf das Icon **...** über der Grafik klicken.
- ▶ Im Auswahlfenster die Option **Skalierung logarithmisch** oder **linear** wählen.
- ▶ Neben das Auswahlfenster klicken.
 - ✓ Die Grafik wird neu skaliert.

Fluoreszenzdaten exportieren

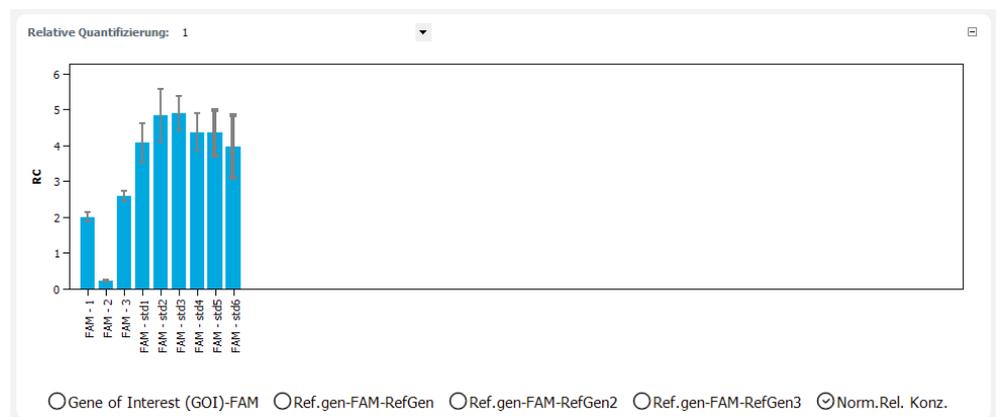
Mit Rechtsklick auf eine Fluoreszenzgrafik können Sie über das Kontextmenü die Fluoreszenzdaten der Proben in eine CSV-Datei exportieren oder die Grafik als Hardcopy in die Zwischenablage speichern.

Sehen Sie dazu auch

Fluoreszenzdaten exportieren [▶ 52]

7.6 Normalisierte relative Konzentrationen als Balkendiagramme anzeigen

Die normalisierte relative Konzentration der Proben wird als Balkendiagramm auf dem Tab **Norm.Rel. Konz.** im Grafikbereich des Projektfensters **Auswertung | Relative Quantifizierung** angezeigt.



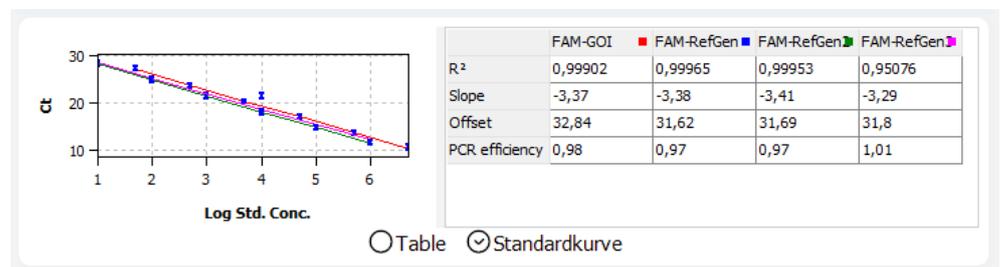
Jede Probe wird mit einem Balken symbolisiert, an dessen unterem Ende der Probenname steht. Die Reihenfolge der Proben im Diagramm ist alphabetisch nach dem Probenamen geordnet. Die Höhe des Balkens entspricht der normalisierten relativen Konzentration der Replikate einer Probe. Der Bereich der Standardabweichung wird als grauer Fehlerbalken am Ende des Balkens angezeigt.

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über einen Balken fahren, wird eine Kurzinformation zur Position der Probe im Probenlayout, zum Mittelwert und zur Standardabweichung eingeblendet.

Wenn bei einer großen Probenanzahl nicht alle Probenbalken gleichzeitig angezeigt werden, können Sie mit Klick auf die Grafik und gedrückter Maustaste das Diagramm horizontal verschieben.

7.7 Standardkurve für die relative Quantifizierung anzeigen

Die Standardkurven des Experiments für das gewählte GOI werden im unteren Bereich auf dem Tab Standardkurve dargestellt.



Für die Darstellung der Standardkurve sind die Ct-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus ihrer Konzentration graphisch aufgetragen. Die jeweiligen Datenpunkte sind mit einem Fehlerbalken versehen, der die Größe der Standardabweichung zwischen Replikaten anzeigt. Zu jedem Datenpunkt wird eine Kurzinformation mit dem Probennamen und mittlerem Ct-Wert der Replikate angezeigt, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. In der Wertetabelle rechts daneben werden folgende berechneten Daten angezeigt:

- Bestimmtheitsmaß R² der Geradengleichung
- Steigung der Standardgerade
- Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse bei x=0 (Offset)
- PCR-Effizienz

Jede Kurve ist mit einer individuellen Farbe dargestellt. Der Farbcode wird im Kopf der Wertetabelle als kleines farbiges Quadrat signalisiert.

Die Standardkurven und die Werte werden automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert.

7.8 Ergebnisse einer relativen Quantifizierung anzeigen

Die Probenliste mit den Ergebnissen wird im unteren Teil des Projektfensters **Auswertung** in der Ansicht **Tabelle** angezeigt.

Well	Probenname	Probentyp	Gene of In...	Referenzgen	Ct GOI	Ct Refere...	Mittl. Ct GOI	Mittl. Ct R...	Relative K...	Norm. Rel....	Stabw. Re...
A1	std6	Standard	GOI		10,21		10,53		3,9670	3,9670	1,6335
A2	std5	Standard	GOI		13,87		13,51		4,3549	4,3549	1,1509
A3	std4	Standard	GOI		16,57		16,87		4,3694	4,3694	0,9712
A4	std3	Standard	GOI		20,25		20,21		4,8868	4,8868	0,8899
A5	std2	Standard	GOI		24,04		23,66		4,8312	4,8312	1,3981
A6	std1	Standard	GOI		27,71		27,35		4,0695	4,0695	1,0327

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.

Spalte	Beschreibung
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird. Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Gene of Interest (GOI)	Zielgen (Gene of Interest)
Referenzgen	Referenzgen
Ct GOI	Ct-Wert Zielgen
Ct Referenzgen	Ct-Wert Referenzgen
Mittl. Ct GOI	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten des Zielgens
Mittl. Ct Ref.Gen	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten des Referenzgens
Konz. Std. GOI	Konzentration des Standards für das Zielgen
Konz. Std. Ref.Gen	Konzentration des Standards für das Referenzgen
Mittl. Konz. GOI	Aus der Standardkurve anhand des mittleren Ct-Werts ermittelte Konzentration für das Zielgen
Mittl. Konz. Ref.Gen	Aus der Standardkurve anhand des mittleren Ct-Werts ermittelte Konzentration für das Referenzgen
Stabw. Ct GOI	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
Stabw. RQ Ref.Gen	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
%CV Ct GOI	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
%CV Ct Ref.Gen	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
Relative Konz.	Relatives (x-faches) Verhältnis der Expression des Zielgens im Vergleich zum Referenzgen
Norm. Rel. Konz.	Relatives (x-faches) Verhältnis der Expression des Zielgens im Vergleich zum Referenzgen, normiert auf die Expression des Kalibrators (wenn definiert)
Stabw. Relative Konz.	Standardabweichung der relativen Konzentration
Stabw. Norm. Rel. Konz.	Standardabweichung der normalisierten relativen Konzentration

Sie können die Anzeige der Spalten in der Ergebnistabelle entsprechend ihren Erfordernissen anpassen, indem Sie nach Rechtsklick auf den Tabellenkopf im Kontextmenü die Spaltenanzeige aktivieren. Um die Daten der so konfigurierten Ergebnistabelle in eine Excel- oder CSV-Datei zu exportieren, führen Sie einen Rechtsklick auf die Tabellen aus und wählen Sie den entsprechenden Befehl im Kontextmenü.

Sehen Sie dazu auch

-  Ergebnistabellen exportieren [► 53]
-  Ergebnistabellen anpassen [► 52]

7.9 Standardkurven für die relative Quantifizierung importieren

Sie können für die relative Quantifizierung Standards im Experiment messen und daraus die Regressionskoeffizienten der Standardkurve berechnen lassen oder Standardkurven aus anderen Experimenten importieren. Das Verfahren für den Import der Standardkurven ist das gleiche wie für absolute Quantifizierung.

Sehen Sie dazu auch

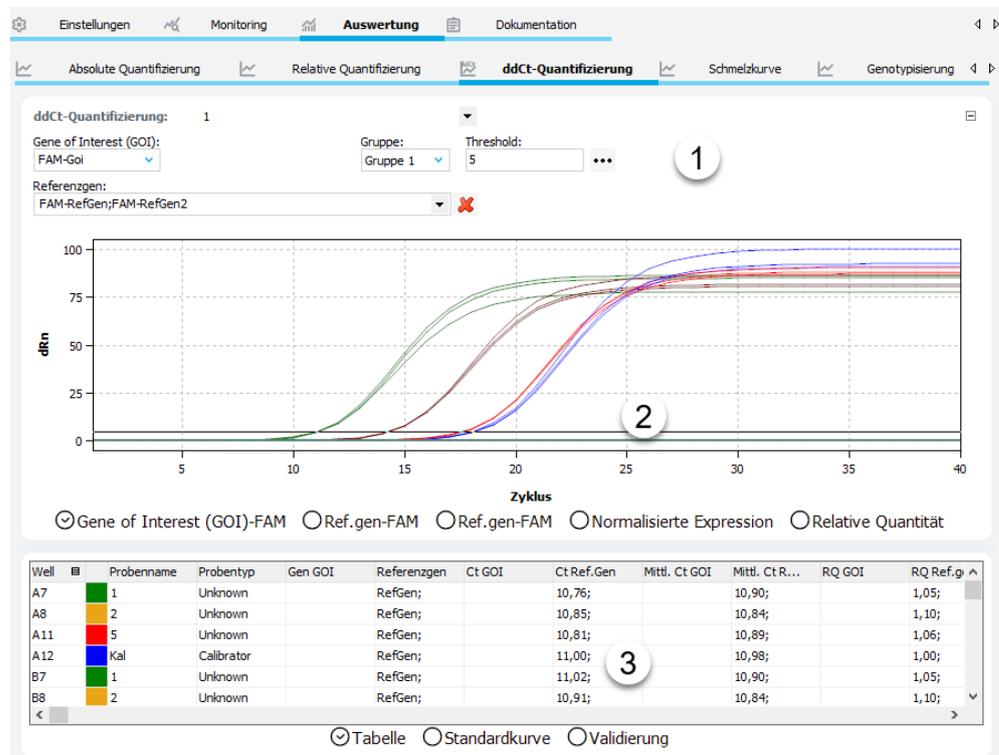
-  Standardkurven für eine absolute Quantifizierung in ein Experiment importieren
[▶ 62]

8 DeltaDeltaCt-Quantifizierung (ddCt-Quantifizierung)

Mit der ddCt -Methode wird das relative Expressionsverhältnis des Zielgens zu einem oder mehreren Referenzgenen (meist Housekeeping-Genen) bestimmt. Dabei muss eine der Proben als Kalibrator definiert sein. Das Expressionslevel der Kalibratorprobe wird auf eins gesetzt und die Expressionslevels der anderen Proben relativ dazu angegeben. Zur Durchführung der ddCt -Methode ist es nicht erforderlich, Standardreihen aufzunehmen. Eine Standard-Verdünnungsreihe muss nur definiert werden, wenn die ddCt -Methode im gleichen PCR-Lauf validiert werden soll.

8.1 Projektfenster und Menü für die ddCt-Quantifizierung

Projektfenster Auswertung | ddCt-Quantifizierung



Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter für die ddCt-Quantifizierung
2	Grafikbereich	Fluoreszenzkurven des GOI und des Referenzgens Balkendiagramme der normalisierten Expression und der relativen Quantität
3	Tabellenbereich	Probentabelle mit den Ergebnissen, Standardkurve und Validierung

Menü DeltaDeltaCt und Icons

Bei Auswahl des Tabs **ddCt-Quantifizierung** erscheinen das Menü **DeltaDeltaCt** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste für spezielle Funktionen für die ddCt-Quantifizierung.

Icon	Menü Delta-DeltaCt	Beschreibung
	ddCt-Quantifizierung hinzufügen	Eine Auswertung im Projektfenster einfügen
	ddCt-Quantifizierung entfernen	Die aktuelle Auswertung aus dem Projektfenster entfernen
	ddCt-Quantifizierung Optionen	Einstellungen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven und für die Ergebnisberechnung
	Autom. Threshold	Automatisch den Threshold für die Berechnung der Ct-Werte bestimmen

8.2 Auswertung für eine ddCt-Quantifizierung anlegen oder löschen

Auswertungen anlegen

Um eine Auswertung vornehmen zu können, müssen Sie diese zunächst im Projektfenster mit einem Namen anlegen.

- ▶ Das Projektfenster **Auswertung | ddCt-Quantifizierung** öffnen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **DeltaDeltaCt | ddCt-Quantifizierung hinzufügen** wählen.
- ▶ Im Eingabefenster den Namen für die Auswertung eintragen und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die neue Auswertung ist im Projekt angelegt. Sie können jetzt ein GOI und die Referenzgene wählen und die weiteren Auswerteparameter editieren.

Auswertung entfernen

Eine nicht benötigte Auswertung können Sie entfernen.

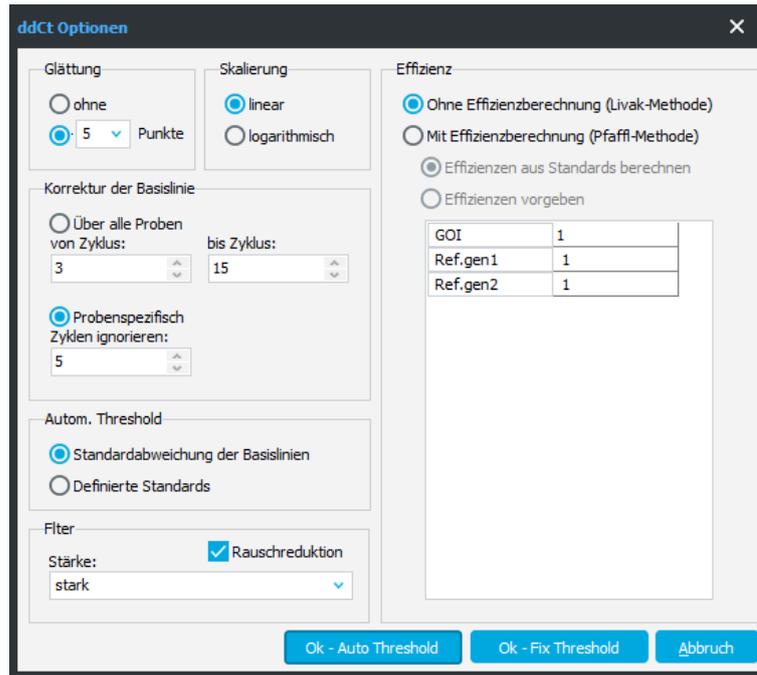
- ▶ Den Namen der Auswertung in der Liste wählen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **DeltaDeltaCt | ddCt-Quantifizierung entfernen** wählen.
 - ✓ Die Auswertung wird entfernt.

8.3 Optionen für eine ddCt-Quantifizierung

In den Optionen für die ddCt-Quantifizierung nehmen Sie die Einstellung der mathematischen Behandlung der Fluoreszenzkurven und Bedingungen für die automatische Threshold-Berechnung vor. Darüber hinaus wählen Sie hier den Berechnungsmodus für die Normierte Expression (NE).

Das Fenster **ddCt-Optionen** erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **DeltaDeltaCt | ddCt-Quantifizierung Optionen** wählen.

Fenster ddCt-Optionen



Option	Beschreibung
Glättung	<p>Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven</p> <p>ohne Es erfolgt keine Glättung.</p> <p>Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.</p>
Skalierung	<p>Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)</p>
Korrektur der Basislinie	<p>Auswahl der Basislinienkorrektur</p> <p>Über alle Proben Bei dieser Korrektur wird die Basislinie für jede Probe im gleichen Bereich ermittelt. Die untere und die obere Bereichsgrenze sind in den Feldern von Zyklus und bis Zyklus einzustellen.</p> <p>Probenspezifisch Diese Korrektur sollte gewählt werden, wenn die Kurven sehr unterschiedliche Ct-Werte besitzen. Die untere Bereichsgrenze für die Ermittlung der Basislinie wird für alle Proben im Feld Zyklen ignorieren eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt.</p> <p>Hinweis: Die Art der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.</p>
Autom. Threshold	<p>Standardabweichung der Basislinien Berechnung des Thresholds als x-fache Abweichung der Standardabweichung der Basislinien (Faktor einstellbar im Menüpunkt Extras Optionen Auswertung)</p> <p>Definierte Standards Auswahl von Standards mit dem Ziel, den maximalen Wert für das Bestimmtheitsmaß R^2 zu erhalten</p>
Filter	<p>Auswahl eines digitalen Filters zur Glättung der Fluoreszenzkurven, einstellbar in den Stufen schwach, mittel und stark</p>
Rauschreduktion	<p>Verrauschte Kurven, die von der Software nicht als Amplifikationskurven erkannt werden, auf 0 setzen und keine Ct-Werte ermitteln</p>
Effizienz	<p>Auswahl Berechnungsvorschriften für die Normierte Expression</p>

Option	Beschreibung
	Ohne Effizienzberechnung (Livak-Methode)
	Mit Effizienzberechnung (Pfaffl-Methode)
Ok - Auto Thr.	Der Threshold wird entsprechend den Änderungen in diesem Fenster für ein aktuelles Projekt neu kalkuliert. Alle anderen Einstellungen werden ebenfalls übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.
Ok - Fix Thr.	Der im aktuellen Projekt gesetzte Threshold wird unabhängig von Änderungen in diesem Fenster beibehalten. Alle anderen Einstellungen werden übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.

Berechnungsvorschrift für die Normierte Expression

Es werden zwei Möglichkeiten angeboten, die Normierte Expression NE zu berechnen:

- Ohne Betrachtung der PCR-Effizienz (Livak-Methode)
- Mit Betrachtung der PCR-Effizienzen von GOI und Referenzgenen (Pfaffl-Methode)

Zur Berechnung der Normierten Expression NE muss eine Probe als Kalibrator definiert werden.

Generell ist die Anwendung der Pfaffl-Methode zu bevorzugen, da die Grundannahme der Livak-Methode gleicher Effizienz bei der Amplifikation des Zielgens und des Referenzgens in der Praxis selten zutrifft und die Berechnung so zu verfälschten Werten führen kann.

Livak-Methode

Bei der Methode nach Livak gilt die Annahme, dass die PCR-Effizienzen von Zielgen (GOI) und Referenzgen (RefGene) gleich sind. Dann gilt:

$$NE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

mit $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Calibrator}) - \Delta Ct(\text{Sample})$

und $\Delta Ct(\text{Sample}) = Ct(\text{GOI}, \text{Sample}) - Ct(\text{RefGene}, \text{Sample})$

$$\Delta Ct(\text{Calibrator}) = Ct(\text{GOI}, \text{Calibrator}) - Ct(\text{RefGene}, \text{Calibrator})$$

Pfaffl-Methode

Bei der Methode nach Pfaffl gehen die für das Zielgen (GOI) und das Referenzgen (RefGene) ermittelten Effizienzen in die Berechnung ein. Die Effizienzen (E(GOI) und E(RefGene)) können aus Verdünnungsreihen berechnet oder der Software vorgegeben werden. Es gilt:

$$NE = \frac{[1+E(\text{GOI})]^{\Delta Ct(\text{GOI})}}{[1+E(\text{RefGene})]^{\Delta Ct(\text{RefGene})}}$$

mit $\Delta Ct(\text{GOI}) = Ct(\text{GOI}, \text{Calibrator}) - Ct(\text{GOI}, \text{Sample})$

und $\Delta Ct(\text{RefGene}) = Ct(\text{RefGene}, \text{Calibrator}) - Ct(\text{RefGene}, \text{Sample})$

8.4 Parameter für die ddCt-Quantifizierung editieren

Die Parameter für die ddCt-Quantifizierung eines Experiments stellen Sie in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung

Option	Beschreibung
Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen Entsprechend der Auswahl werden die Fluoreszenzkurven und Standardkurve angezeigt.
Referenzgen	Auswahlliste der Referenzgene Es können mehrere Referenzgene gleichzeitig ausgewählt werden. Für jedes Referenzgen wird ein weiterer Tab im Grafikbereich angezeigt. Mit Klick auf das Icon  werden alle ausgewählten Referenzgene aus der Auswertung entfernt.
Benutzergruppe	Wenn im Probenlayout mehrere Experimente (Gruppen) angelegt wurden, muss hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments ausgewählt werden.
Threshold	Threshold-Wert manuell einstellen Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn).
...	Skalierung und Basislinieneinstellung der Fluoreszenzkurve wählen

Threshold einstellen

Zur Ermittlung von Ct-Werten für die Auswertung muss ein Threshold-Wert für jedes Experiment ermittelt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Threshold-Wert einzustellen:

- ▶ In den allgemeinen Optionen nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste die Optionen für eine automatische Threshold-Bestimmung einstellen.
- ▶ Den Threshold manuell im Eingabefeld über der Grafik eingeben.
- ▶ In der Grafik die schwarze Threshold-Linie mit gedrückter Maustaste vertikal verschieben. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die Ct-Werte in der Probenabelle.

Hinweis: Für das manuelle Setzen des Thresholds im Anzeigebereich ist die logarithmische Darstellung aufgrund der weiteren Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Amplifizierung besser geeignet als die lineare Darstellung.

- ▶ Für die automatische Berechnung auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken. Für die automatische Berechnung wird der unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** eingestellte Faktor und die Einstellungen aus dem Optionsfenster (Icon ) verwendet.
 - ✓ Der sich ergebende Threshold-Wert wird sowohl bei der manuellen Ermittlung als auch bei der automatischen Berechnung im Eingabefeld **Threshold** aktualisiert und angezeigt.

8.5 Fluoreszenzkurven für die ddCt-Quantifizierung anzeigen

Im Anzeigebereich sind die gemessenen Daten, normiert auf den Wert 100 für die höchste Fluoreszenzintensität, gegen den Zyklus für das ausgewählte Zielgen aufgetragen. Den Kombinationen Zielgen/Farbstoff und Referenzgen/Farbstoff sind jeweils ein Listenblatt zugeordnet.

Bei Auswahl einer anderen Zielgen/Farbstoff-Kombination in der GOI-Liste werden deren Fluoreszenzkurven angezeigt.

Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Bei beiden Darstellungsformen wird eine Kurzinformati- on zur Probe eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht. Für die manuelle Einstellung des Thresholds wird die logarithmischen Darstellung aufgrund der weiten Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Fluoreszenzkurve empfohlen.

Skalierung umschalten

Sie können zwischen linearer und logarithmischer Skalierung der Fluoreszenzkurven wählen.

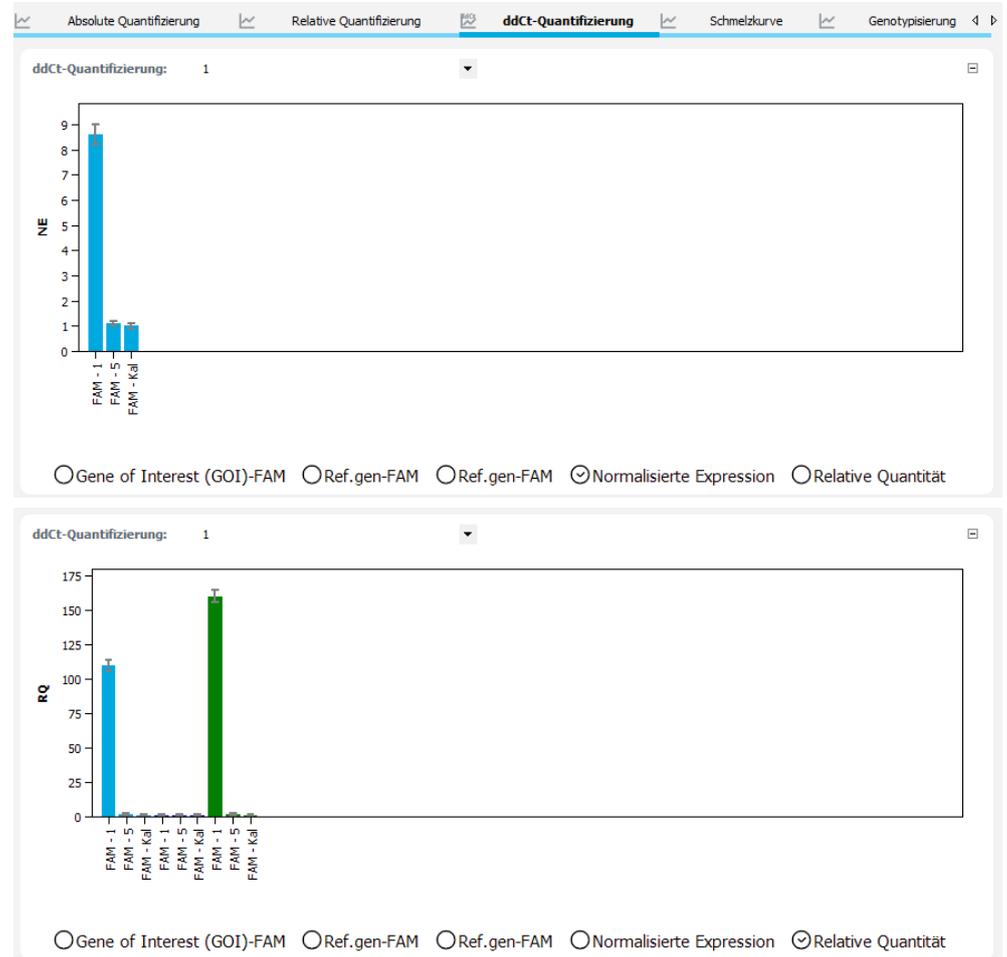
- ▶ Auf das Icon **⋮** über der Grafik klicken.
- ▶ Im Auswahlfenster die Option **Skalierung logarithmisch** oder **linear** wählen.
- ▶ Neben das Auswahlfenster klicken.
 - ✓ Die Grafik wird neu skaliert.

Fluoreszenzdaten exportieren

Mit Rechtsklick auf eine Fluoreszenzgrafik können Sie über das Kontextmenü die Fluoreszenzdaten der Proben in eine CSV-Datei exportieren oder die Grafik als Hardcopy in die Zwischenablage speichern.

8.6 Normalisierte relative Expression und relative Quantität als Balkendiagramm anzeigen

Die normalisierte relative Expression und die relative Quantität der Proben werden als Balkendiagramme auf dem Tabs im Grafikbereich des Projektfensters **Auswertung | ddCt-Quantifizierung** angezeigt.



Jede Probe wird mit einem Balken symbolisiert, an dessen unterem Ende der Probenname steht. Die Reihenfolge der Proben im Diagramm ist alphabetisch nach den Probenamen geordnet. Die Höhe des Balkens entspricht der berechneten normalisierten relativen Expression bzw. der relativen Quantität der Replikate einer Probe. Der Bereich der Standardabweichung wird als grauer Fehlerbalken am Ende des Balkens angezeigt.

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über einen Balken fahren, wird eine Kurzinformation zur Position der Probe im Probenlayout, zum Mittelwert und zur Standardabweichung eingeblendet.

Wenn bei einer großen Probenanzahl nicht alle Probenbalken gleichzeitig angezeigt werden, können Sie mit Klick auf die Grafik und gedrückter Maustaste das Diagramm horizontal verschieben.

8.7 Standardkurven und Validierungskurven für die ddCt-Quantifizierung anzeigen

Zur Berechnung der ddCt-Werte ist die Ermittlung einer Validierungskurve nicht notwendig, sie kann jedoch zur Überprüfung der Qualität der Daten herangezogen werden. Voraussetzung zur Erstellung einer Validierungskurve ist die Messung einer Standardreihe verschiedener Verdünnungsstufen vom Zielgen und Referenzgen. Die aus den Standardreihen resultierenden Validierungskurven und Standardkurven werden im unteren Bereich des Projektfenster **Auswertung | ddCt-Quantifizierung** angezeigt. In beiden Kurvendarstellungen sind die Datenpunkte mit einem Fehlerbalken versehen, der der Größe der Standardabweichung zwischen den Replikaten entspricht. Wenn der Mauszeiger auf einen Datenpunkt gesetzt wird, wird eine Kurzinformation mit dem Probenamen und mittlerem Ct-Wert der Replikate angezeigt.

Validierungskurven

In der Anzeige der Validierungskurven ist das Expressionsverhältnis zwischen Zielgen und Referenzgen grafisch dargestellt. Dazu wird für die jeweilige Verdünnungsstufe der mittlere Ct-Wert des Zielgens vom mittleren Ct-Wert des Referenzgens subtrahiert und der sich ergebende dCt(V) Wert gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Im Wertebereich rechts daneben werden folgende berechneten Daten angezeigt:

- Bestimmtheitsmaß R^2 der linearen Approximation
- Steigung der Approximationsgeraden
- Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse bei $x=0$ (Offset)

Die Steigung der Geraden sollte einen Wert von $\pm 0,1$ nicht überschreiten. Dann gilt die Annahme, dass die Effizienzen der Amplifikation von Zielgen und Referenzgen etwa gleich sind und die Berechnung der ddCt-Werte valide Daten liefert.

Die Validierungskurven und die Werte werden automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert.

Standardkurven

Für die Darstellung der Standardkurven sind die Ct-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus ihrer Konzentration graphisch aufgetragen. In der Wertetabelle werden folgende berechneten Daten angezeigt:

- Bestimmtheitsmaß R^2 der Geradengleichung
- Steigung der Standardgerade
- Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse bei $x=0$ (Offset)
- PCR-Effizienz

Jede Kurve ist mit einer individuellen Farbe dargestellt. Der Farbcode wird im Kopf der Wertetabelle als kleines farbiges Quadrat signalisiert. Die Standardkurven und die Werte werden automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert.

8.8 Ergebnisse einer ddCt-Quantifizierung anzeigen

Die Probenabelle mit den Ergebnissen wird im unteren Teil des Projektfensters **Auswertung** in der Ansicht **Tabelle** angezeigt.

Well	Probenname	Probenotyp	Gen GOI	Referenzgen	Ct GOI	Ct Ref.Gen	Mittl. Ct GOI	Mittl. Ct R...	RQ GOI	RQ Ref.g.
A7	1	Unknown		RefGen;		9,41;		9,54;		1,02;
A8	2	Unknown		RefGen;		9,51;		9,49;		1,05;
A11	5	Unknown		RefGen;		9,48;		9,53;		1,02;
A12	Kal	Calibrator		RefGen;		9,58;		9,56;		1,00;
B7	1	Unknown		RefGen;		9,68;		9,54;		1,02;
B8	2	Unknown		RefGen;		9,54;		9,49;		1,05;

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird. Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name
Probenotyp	Im Probenlayout eingegebener Probenotyp
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Gen GOI	Zielgen (Gene of Interest)
Referenzgen	Referenzgen
Ct GOI	Ct-Wert Zielgen
Ct Ref.Gen	Ct-Wert Referenzgen
Mittl. Ct GOI	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten des Zielgens
Mittl. Ct Ref.Gen	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten des Referenzgens
Stabw. Ct GOI	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
Stabw. RQ Ref.Gen	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
%CV Ct GOI	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
%CV Ct Ref.Gen	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
dCt GOI	Delta Ct-Wert für Replikate des Zielgens
dCt Ref.Gen	Delta Ct-Wert für Replikate des Referenzgens
RQ GOI	Berechnete relative Menge für Replikate des Zielgens in der Ursprungsprobe
Mittl. RQ Ref.Gen	Berechnete relative Menge für Replikate des Referenzgens in der Ursprungsprobe
Mittl. RQ Ref.Gen	Mittlere berechnete relative Menge für Replikate des Referenzgens in der Ursprungsprobe
Norm. Expression	Normalisiertes relatives (x-faches) Verhältnis der Expression des Zielgens in der Probe im Vergleich zum Kalibrator

Sie können die Anzeige der Spalten in der Ergebnistabelle entsprechend ihren Erfordernissen anpassen, indem Sie nach Rechtsklick auf den Tabellenkopf im Kontextmenü die Spaltenanzeige aktivieren. Um die Daten der so konfigurierten Ergebnistabelle in eine Excel- oder CSV-Datei zu exportieren, führen Sie einen Rechtsklick auf die Tabellen aus und wählen Sie den entsprechenden Befehl im Kontextmenü.

9 Schmelzkurvenanalyse

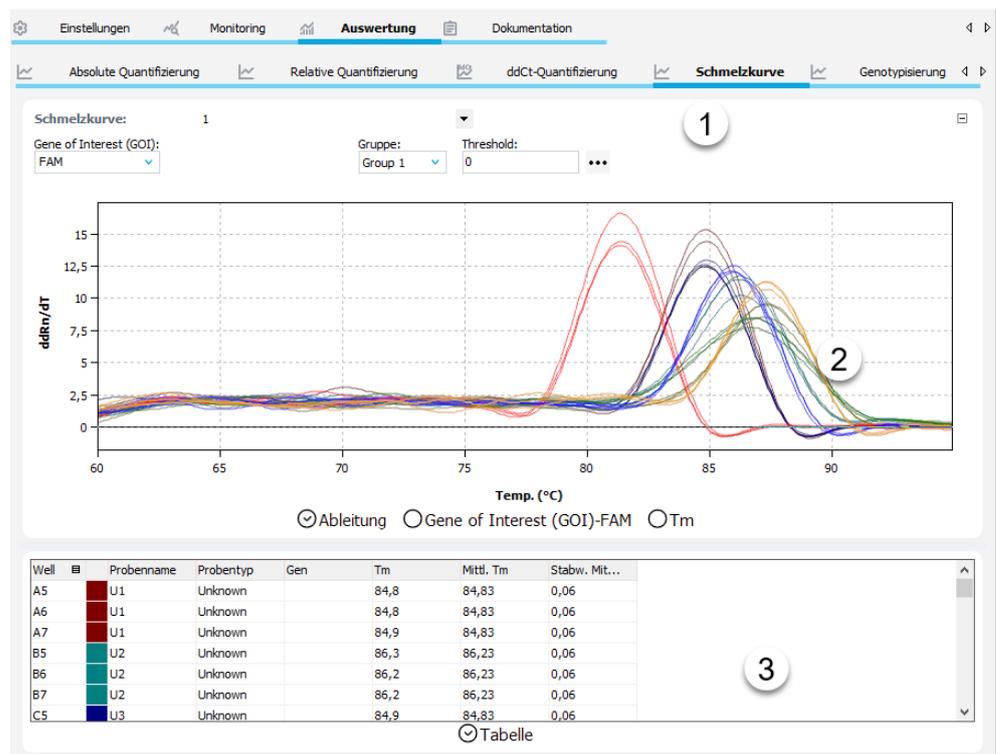
Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur im Reaktionsansatz sukzessiv erhöht, bis es zur Denaturierung des PCR-Produkts kommt. Die Dissoziation des Fragments in Einzelstränge führt zur Freisetzung eines interkalierenden Farbstoffs. Die damit einhergehende Reduktion der Fluoreszenzintensität wird vom Gerät gemessen und protokolliert. Durch Bildung der ersten Ableitung der Fluoreszenzkurve erhält man einen Peak, der den Schmelzpunkt und näherungsweise auch die Konzentration des PCR-Fragments beschreibt. Mit der Schmelzkurvenanalyse kann differenziert werden, ob die Reaktion zur Bildung eines spezifischen PCR-Produkts geführt hat oder unspezifische Nebenprodukte wie zum Beispiel Primerdimere entstanden sind.

Sehen Sie dazu auch

 Projektfenster und Menü für die Schmelzkurvenanalyse [▶ 80]

9.1 Projektfenster und Menü für die Schmelzkurvenanalyse

Projektfenster Auswertung | Schmelzkurve



Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter für die Schmelzkurvenanalyse
2	Grafikbereich	Ableitung und Fluoreszenzkurven des GOI Balkendiagramm der Schmelztemperatur der Proben
3	Tabellenbereich	Probentabelle mit den Ergebnissen

Menü Schmelzkurve und Icons Bei Auswahl des Tabs **Schmelzkurve** erscheinen das Menü **Schmelzkurve** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste mit speziellen Funktionen für die Schmelzkurvenanalyse.

Icon	Menü Schmelzkurve	Beschreibung
	Schmelzkurve hinzufügen	Eine Auswertung im Projektfenster einfügen
	Schmelzkurve entfernen	Die aktuelle Auswertung aus dem Projektfenster entfernen
	Schmelzkurve Optionen	Einstellungen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven und für die Ergebnisberechnung
	Autom. Threshold	Automatisch den Threshold für die Berechnung der Schmelztemperatur bestimmen

9.2 Auswertung für eine Schmelzkurvenanalyse anlegen oder löschen

Auswertungen anlegen Um eine Auswertung vornehmen zu können, müssen Sie diese zunächst im Projektfenster mit einem Namen anlegen.

- ▶ Das Projektfenster **Auswertung | Schmelzkurve** öffnen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Schmelzkurve | Schmelzkurve hinzufügen** wählen.
- ▶ Im Eingabefenster den Namen für die Auswertung eintragen und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die neue Auswertung ist im Projekt angelegt. Sie können jetzt ein GOI und die Referenzgene wählen und die weiteren Auswerteparameter editieren.

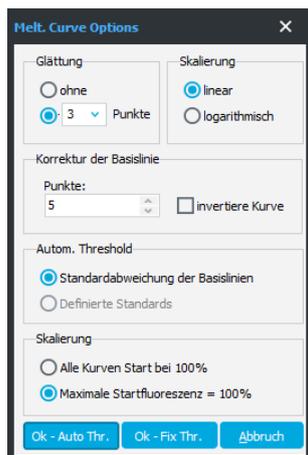
Auswertung entfernen Eine nicht benötigte Auswertung können Sie entfernen.

- ▶ Den Namen der Auswertung in der Liste wählen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Schmelzkurve | Schmelzkurve entfernen** wählen.
 - ✓ Die Auswertung wird nach Rückfrage entfernt.

9.3 Optionen für die Schmelzkurvenanalyse

In den Optionen für die Schmelzkurvenanalyse nehmen Sie die Einstellung der mathematischen Behandlung der Fluoreszenzkurven und Bedingungen für die automatische Threshold-Berechnung vor.

Das Fenster Melt. Curve Options erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Schmelzkurve | Schmelzkurve Optionen** wählen.



Option	Beschreibung
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven ohne Es erfolgt keine Glättung. Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.
Skalierung	Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)
Korrektur der Basislinie	Punkte Hier fehlt noch die Info
invertiere Kurve	Zur Auswertung von Fluoreszenzdaten aus Proteinstabilitätsmessungen können Sie die Schmelzkurven umkehren.
Autom. Threshold	Der Threshold wird nur bei der Ableitung wirksam. Es werden nur Kurven ausgewertet, deren Maximum dRn/dT größer als der Threshold ist. Standardabweichung der Basislinien Berechnung des Thresholds als x-fache Abweichung der Standardabweichung der Basislinien (Faktor einstellbar im Menüpunkt Extras Optionen Auswertung) Definierte Standards Auswahl von Standards, mit dem Ziel den maximalen Wert für das Bestimmtheitsmaß R^2 zu erhalten
Skalierung	Alle Kurven Start bei 100% Alle Fluoreszenzkurven werden so normiert, dass der Startpunkt bei 100 % beginnt. Maximale Startfluoreszenz = 100% Die höchste Startfluoreszenz wird 100 % gleichgesetzt. Alle weiteren Kurven werden entsprechend berechnet.
Ok - Auto Thr.	Der Threshold wird entsprechend den Änderungen in diesem Fenster für ein aktuelles Projekt neu kalkuliert. Alle anderen Einstellungen werden ebenfalls übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.
Ok - Fix Thr.	Der im aktuellen Projekt gesetzte Threshold wird unabhängig von Änderungen in diesem Fenster beibehalten. Alle anderen Einstellungen werden übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.

9.4 Parameter für die Schmelzkurvenanalyse editieren

Die Parameter für die Schmelzkurvenanalyse eines Experiments stellen Sie in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen Als Farbstoff für das Zielgen muss zur Schmelzkurvenanalyse in der Regel ein interkalierender Farbstoff ausgewählt sein. Entsprechend der Auswahl werden die Fluoreszenzkurven angezeigt.
Benutzergruppe	Wenn im Probenlayout mehrere Experimente (Gruppen) angelegt wurden, muss hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments ausgewählt werden.
Threshold	Threshold-Wert manuell einstellen Der Threshold ist nur in der Ansicht Ableitung wirksam. Es werden nur Kurven ausgewertet, deren Maximum dRn/dT größer als der Threshold ist.

Threshold einstellen

Mit dem Threshold-Wert für die Ableitungen der Schmelzkurven können Sie Proben aus der Auswertung ausschließen, deren maximaler Peak kleiner als der vorgegebene Threshold-Wert ist.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Threshold-Wert einzustellen:

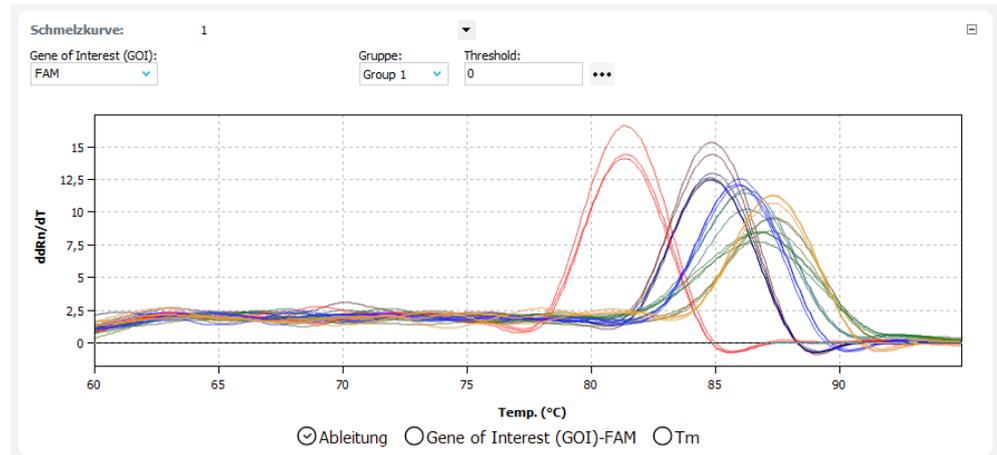
- ▶ In den allgemeinen Optionen nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste die Optionen für eine automatische Threshold-Bestimmung einstellen.
- ▶ Den Threshold manuell im Eingabefeld über der Grafik eingeben.
- ▶ In der grafischen Darstellung der Ableitung die schwarze Threshold-Linie mit gedrückter Maustaste nach oben oder unten verschieben.
- ▶ Für die automatische Berechnung auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken. Für die automatische Berechnung wird der unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** eingestellte Faktor und die Einstellungen aus dem Fenster **Melt. Curve Options** (Icon ) verwendet.
 - ✓ Der sich ergebende Threshold-Wert wird sowohl bei der manuellen Ermittlung als auch bei der automatischen Berechnung im Eingabefeld **Threshold** aktualisiert und angezeigt.

9.5 Fluoreszenzkurven und Schmelzkurve anzeigen

Schmelzkurven anzeigen

Die Schmelztemperatur T_m wird aus dem Peakmaximum der ersten Ableitung der Schmelzkurven bestimmt. Die Graphen werden im Anzeigebereich in der Ansicht **Ableitung** angezeigt.

Zur Auswertung von Fluoreszenzwerten aus Proteinstabilitätsmessungen können Sie die Schmelzkurven mit der Option **invertiere Kurve** im Fenster **Melt. Curve Options** umkehren.

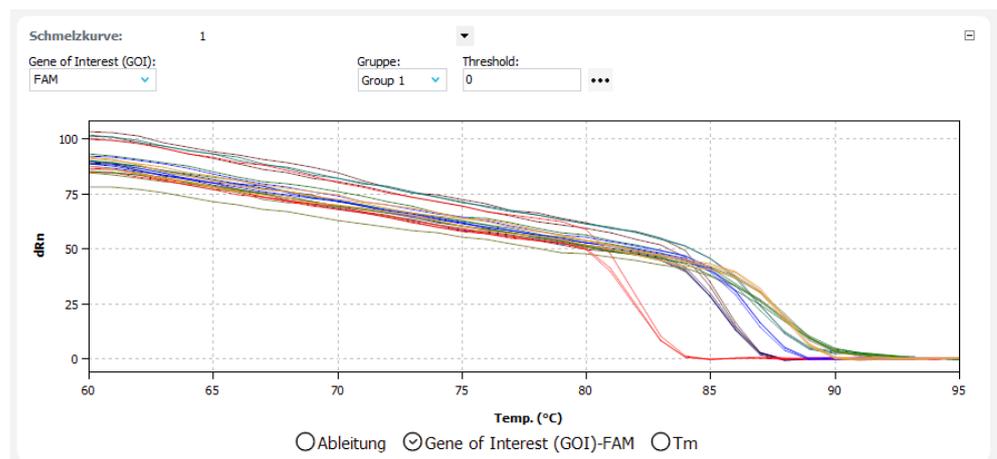


Fluoreszenzkurven anzeigen

Im Anzeigebereich sind die Fluoreszenzwerte, abhängig von den Einstellungen im Fenster, entweder auf den höchsten Fluoreszenzwert oder auf den Sollwert 100 normiert gegen die Temperatur aufgetragen.

Bei Multiplex-Experimenten können Sie in der GOI-Liste die Zielgen/Farbstoff-Kombination für die Anzeige wählen.

Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Wenn Sie den Mauszeiger über eine Kurve führen, wird eine Kurzinformation zur Probe eingeblendet.



Skalierung umschalten

Sie können zwischen linearer und logarithmischer Skalierung der Fluoreszenzkurven wählen.

- ▶ Auf das Icon **☰** über der Grafik klicken.
- ▶ Im Auswahlfenster die Option **Skalierung logarithmisch** oder **linear** wählen.
- ▶ Neben das Auswahlfenster klicken.
 - ✓ Die Grafik wird neu skaliert.

Fluoreszenzdaten exportieren

Mit Rechtsklick auf eine Fluoreszenzgrafik können Sie über das Kontextmenü die Fluoreszenzdaten der Proben in eine CSV-Datei exportieren oder die Grafik als Hardcopy in die Zwischenablage speichern.

Sehen Sie dazu auch

- 📄 Fluoreszenzdaten exportieren [▶ 52]

9.6 Mittlere Schmelztemperaturen als Balkendiagramme anzeigen

Die Schmelztemperaturen der Proben werden als Balkendiagramm in der Ansicht Tm im Grafikbereich des Projektfensters **Auswertung | Schmelzkurve** angezeigt.

Jede Probe wird mit einem Balken symbolisiert, an dessen unterem Ende der Probenname steht. Die Reihenfolge der Proben im Diagramm ist alphabetisch nach dem Probennamen geordnet. Die Höhe des Balkens entspricht der mittleren Schmelztemperatur der Replikate einer Probe. Der Bereich der Standardabweichung wird als grauer Fehlerbalken am Ende des Balkens angezeigt.

Wenn Sie mit dem Mauszeiger über einen Balken fahren, wird eine Kurzinformation zur Position der Replikate im Probenlayout, zur mittleren Schmelztemperatur und zur Standardabweichung eingeblendet.

Wenn bei einer großen Probenanzahl nicht alle Probenbalken gleichzeitig angezeigt werden, können Sie mit Klick auf die Grafik und gedrückter Maustaste das Diagramm horizontal verschieben.



9.7 Ergebnisse einer Schmelzkurvenanalyse anzeigen

Die Probentabelle mit den Ergebnissen wird im unteren Teil des Projektfensters **Auswertung** in der Ansicht **Tabelle** angezeigt.

Well	Probenname	Probentyp	Gen	Tm	Mittl. Tm	Stabw. Mit...
A5	U1	Unknown		84,8	84,83	0,06
A6	U1	Unknown		84,8	84,83	0,06
A7	U1	Unknown		84,9	84,83	0,06
B5	U2	Unknown		86,3	86,23	0,06
B6	U2	Unknown		86,2	86,23	0,06
B7	U2	Unknown		86,2	86,23	0,06
C5	U3	Unknown		84,9	84,83	0,06

Tabelle

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird. Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name

Spalte	Beschreibung
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Gen	Name des in der Probe gemessenen Gens
Tm	Schmelztemperatur der Probe
Mittl. Tm	Durchschnittliche Schmelztemperatur von Replikaten
Stabw. Mittl. Tm	Standardabweichung der durchschnittlichen Schmelztemperatur von Replikaten

Sie können die Anzeige der Spalten in der Ergebnistabelle entsprechend ihren Erfordernissen anpassen, indem Sie nach Rechtsklick auf den Tabellenkopf im Kontextmenü die Spaltenanzeige aktivieren. Um die Daten der so konfigurierten Ergebnistabelle in eine Excel- oder CSV-Datei zu exportieren, führen Sie einen Rechtsklick auf die Tabellen aus und wählen Sie den entsprechenden Befehl im Kontextmenü.

Sehen Sie dazu auch

- Ergebnstabellen exportieren [▶ 53]
- Ergebnstabellen anpassen [▶ 52]

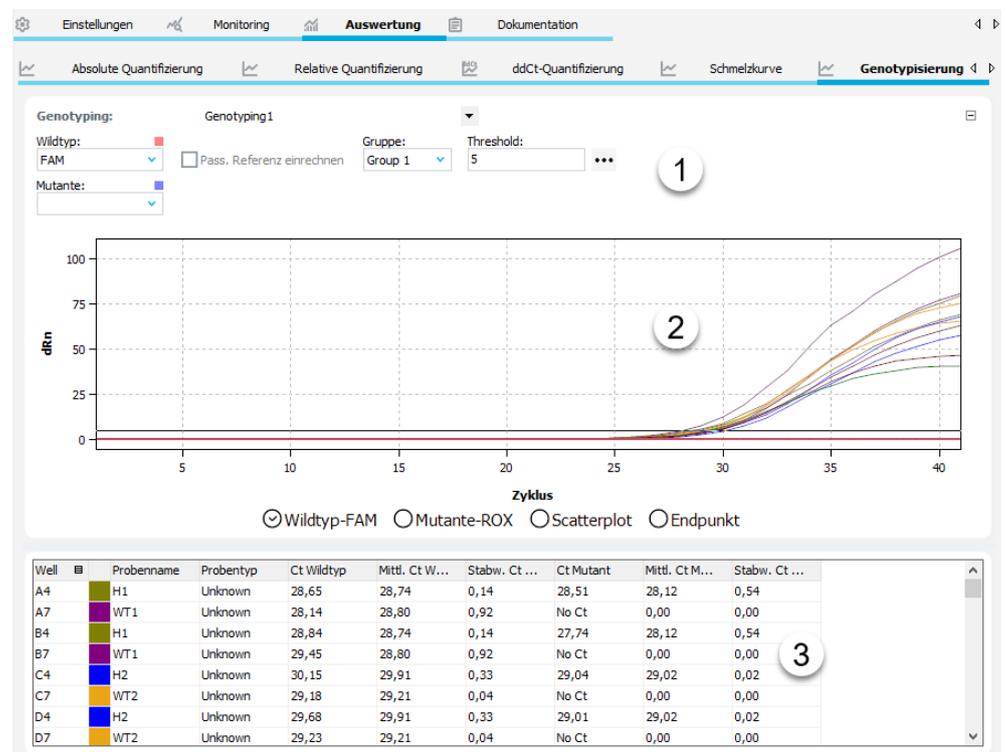
10 Genotypisierung

Die Genotypisierung dient der Ermittlung von Sequenzunterschieden zwischen einer Probe und einem Standard. Der Standard ist als Referenzsequenz (Genotyp 1) definiert, während der genetische Zustand der Probe mit dem Experiment ermittelt werden soll.

Die Genotypisierung deckt auf, welche Allele ein Individuum von seinen Eltern geerbt hat.

10.1 Projektfenster und Menü für die Genotypisierung

Projektfenster Auswertung |
Genotypisierung



Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter für die Genotypisierung
2	Grafikbereich	Fluoreszenzkurven für Genotyp 1 und Genotyp 2 Balkendiagramme und Scatterplot der Ergebnisse
3	Tabellenbereich	Probentabelle mit den Ergebnissen

Menü Genotyping und Icons

Bei Auswahl des Tabs **Genotypisierung** erscheinen das Menü **Genotypisierung** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste für spezielle Funktionen für die Genotypisierung.

Icon	Menü Genotypisierung	Beschreibung
	Genotypisierung hinzufügen	Eine Auswertung im Projektfenster einfügen
	Genotypisierung entfernen	Die aktuelle Auswertung aus dem Projektfenster entfernen
	Genotypisierung Optionen	Einstellungen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven und für die Ergebnisberechnung
	Autom. Threshold	Automatisch den Threshold für die Berechnung der Ct-Werte bestimmen

10.2 Auswertung für eine Genotypisierung anlegen oder löschen

Auswertungen anlegen

Um eine Auswertung vornehmen zu können, müssen Sie diese zunächst im Projektfenster mit einem Namen anlegen.

- ▶ Das Projektfenster **Auswertung | Genotypisierung** öffnen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Genotypisierung | Genotypisierung hinzufügen** wählen.
- ▶ Im Eingabefenster den Namen für die Auswertung eintragen und mit **OK** bestätigen.
 - ✓ Die neue Auswertung ist im Projekt angelegt. Sie können jetzt ein GOI und die Referenzgene wählen und die weiteren Auswerteparameter editieren.

Auswertung entfernen

Eine nicht benötigte Auswertung können Sie entfernen.

- ▶ Den Namen der Auswertung in der Liste wählen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Genotypisierung | Genotypisierung entfernen** wählen.
 - ✓ Die Auswertung wird entfernt.

10.3 Optionen für eine Genotypisierung

In den Optionen für die Genotypisierung nehmen Sie die Einstellung der mathematischen Behandlung der Fluoreszenzkurven und Bedingungen für die automatische Threshold-Berechnung vor. Darüber hinaus wählen Sie hier den Berechnungsmodus für die Normierte Expression (NE).

Das Fenster **Genotypisierung Optionen** erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Genotypisierung | Genotypisierung Optionen** wählen.

Fenster Genotypisierung Optionen

Option	Beschreibung
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven ohne Es erfolgt keine Glättung. Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.
Skalierung	Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)
Korrektur der Basislinie	Auswahl der Basislinienkorrektur Über alle Proben Bei dieser Korrektur wird die Basislinie für jede Probe im gleichen Bereich ermittelt. Die untere und die obere Bereichsgrenze sind in den Feldern von Zyklus und bis Zyklus einzustellen. Probenspezifisch Diese Korrektur sollte gewählt werden, wenn die Kurven sehr unterschiedliche Ct-Werte besitzen. Die untere Bereichsgrenze für die Ermittlung der Basislinie wird für alle Proben im Feld Zyklen ignorieren eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt. Hinweis: Die Art der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.
Autom. Threshold	Standardabweichung der Basislinien Berechnung des Thresholds als x-fache Abweichung der Standardabweichung der Basislinien (Faktor einstellbar im Menüpunkt Extras Optionen Auswertung) Definierte Standards Auswahl von Standards mit dem Ziel, den maximalen Wert für das Bestimmtheitsmaß R^2 zu erhalten
Filter	Auswahl eines digitalen Filters zur Glättung der Fluoreszenzkurven, einstellbar in den Stufen schwach, mittel und stark
Rauschreduktion	Verrauschte Kurven, die von der Software nicht als Amplifikationskurven erkannt werden, auf 0 setzen und keine Ct-Werte ermitteln
Betrachteter Zyklus	Einstellung des zur Auswertung herangezogenen Zyklus

Option	Beschreibung
	Letzter Zyklus Vorzugseinstellung (Endpunkt)
	Zyklus wählen Einen anderen Zyklus des qPCR-Laufs in der Liste einstellen
Bezeichnungen	Eingabemöglichkeit von eigenen Bezeichnungen für die Kategorien Wildtyp, Mutante, heterozygot bzw. ansonsten
Scatterplot	Erzeugung des Scatter-Plots anhand der Fluoreszenzintensitäten am betrachteten Zyklus oder basierend auf Ct-Werten
Ok - Auto Thr.	Der Threshold wird entsprechend den Änderungen in diesem Fenster für ein aktuelles Projekt neu kalkuliert. Alle anderen Einstellungen werden ebenfalls übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.
Ok - Fix Thr.	Der im aktuellen Projekt gesetzte Threshold wird unabhängig von Änderungen in diesem Fenster beibehalten. Alle anderen Einstellungen werden übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.

10.4 Parameter für die Genotypisierung editieren

Die Parameter für die Genotypisierung eines Experiments stellen Sie in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung
Wildtyp	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen des Wildtypes
Mutante	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen der Mutante
Pass. Referenz einrechnen	Nur wählbar, wenn im Projektfenster Einstellungen Scan ein Farbstoff als passive Referenz definiert wurde. Bei Aktivierung wird die Fluoreszenz des als passive Referenz gesetzten Farbstoffs zur Normierung eingesetzt.
Benutzergruppe	Wenn im Probenlayout mehrere Experimente (Gruppen) angelegt wurden, muss hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments ausgewählt werden.
Threshold	Threshold-Wert manuell einstellen Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn).
...	Skalierung und Basislinieneinstellung der Fluoreszenzkurve wählen

Threshold einstellen

Zur Ermittlung von Ct-Werten für die Auswertung muss ein Threshold-Wert für jedes Experiment ermittelt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Threshold-Wert einzustellen:

- ▶ In den allgemeinen Optionen nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste die Optionen für eine automatische Threshold-Bestimmung einstellen.
- ▶ Den Threshold manuell im Eingabefeld über der Grafik eingeben.
- ▶ In der Grafik die schwarze Threshold-Linie mit gedrückter Maustaste vertikal verschieben. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die Ct-Werte in der Proben-tabelle.

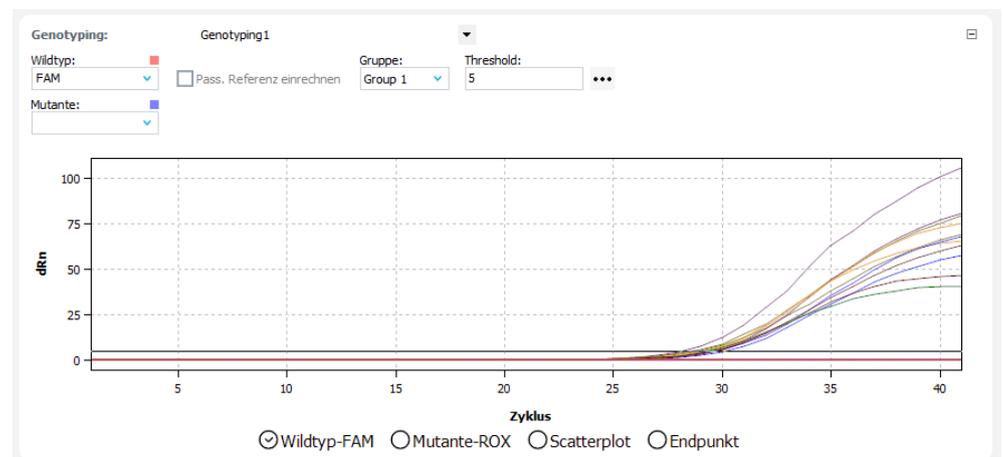
Hinweis: Für das manuelle Setzen des Thresholds im Anzeigebereich ist die logarithmische Darstellung aufgrund der weiteren Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Amplifizierung besser geeignet als die lineare Darstellung.

- ▶ Für die automatische Berechnung auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken. Für die automatische Berechnung wird der unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Auswertung** eingestellte Faktor und die Einstellungen aus dem Optionsfenster (Icon ) verwendet.
 - ✓ Der sich ergebende Threshold-Wert wird sowohl bei der manuellen Ermittlung als auch bei der automatischen Berechnung im Eingabefeld **Threshold** aktualisiert und angezeigt.

10.5 Fluoreszenzkurven für die Genotypisierung anzeigen

Im Grafikbereich werden die Fluoreszenzkurven der Kombinationen Wildtyp/Farbstoff und Mutante/Farbstoff jeweils in einer Ansicht angezeigt.

Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Bei beiden Darstellungsformen wird eine Kurzinformation zur Probe eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht. Für die manuelle Einstellung des Thresholds wird die logarithmische Darstellung aufgrund der weiten Spreizung des frühen exponentiellen Bereichs der Fluoreszenzkurve empfohlen.



Skalierung umschalten

Sie können zwischen linearer und logarithmischer Skalierung der Fluoreszenzkurven wählen.

- ▶ Auf das Icon  über der Grafik klicken.
- ▶ Im Auswahlfenster die Option **Skalierung logarithmisch** oder **linear** wählen.
- ▶ Neben das Auswahlfenster klicken.
 - ✓ Die Grafik wird neu skaliert.

Fluoreszenzdaten exportieren

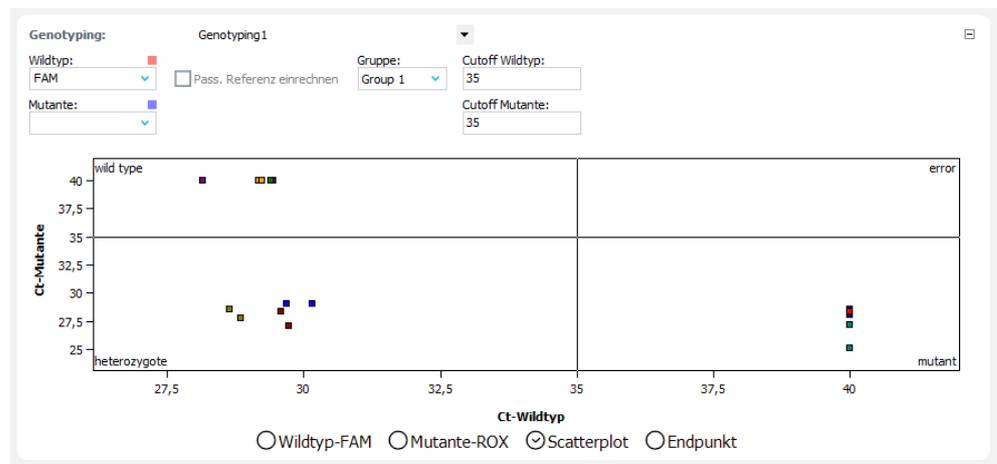
Mit Rechtsklick auf eine Fluoreszenzgrafik können Sie über das Kontextmenü die Fluoreszenzdaten der Proben in eine CSV-Datei exportieren oder die Grafik als Hardcopy in die Zwischenablage speichern.

10.6 Scatterplot und Balkendiagramm für die Genotypisierung anzeigen

Scatterplot anzeigen

Der Scatterplot (Streudiagramm) der Genotypisierung wird in der Ansicht **Scatterplot** angezeigt. Der Scatterplot ist in vier Quadranten für Wildtyp, Mutante, heterozygot und Fehler unterteilt. Die Proben werden jeweils anhand der gemessenen relativen Fluoreszenz bzw. der Ct-Werte der beiden Farbstoffe einem der Quadranten zugeteilt.

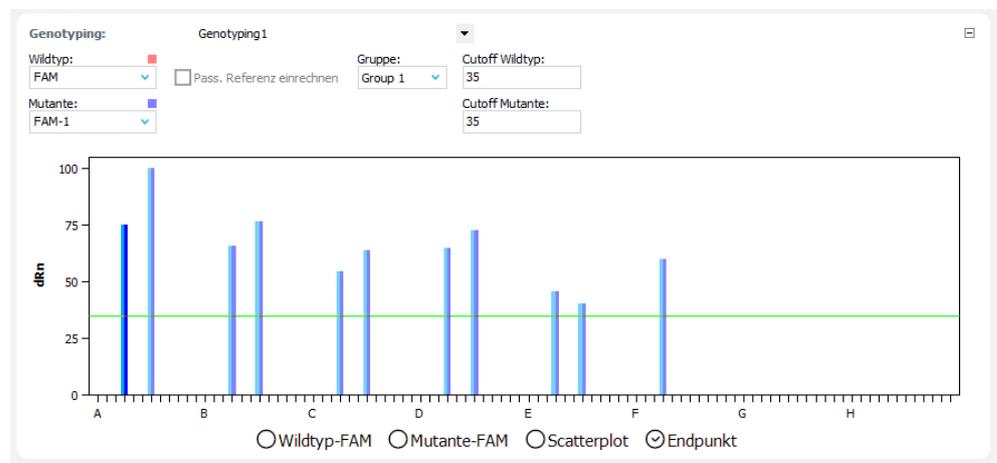
Die Cutoff-Werte sind die Schwellwerte, ab denen für eine Probe die Frage nach ihrer Reaktion mit "Ja" beantwortet wird. Der jeweilige Cutoff zur Zuordnung von Proben wird im Scatterplot durch zwei schwarze Linien angezeigt. Mit gedrückter Maustaste können Sie die Position der Linien verschieben und so den Cutoff verändern. Alternativ geben Sie die Cutoff-Werte für Wildtyp und Mutante in den Auswerteparametern über dem Scatterplot ein.



Balkendiagramm anzeigen

In der Ansicht **Endpunkt** sind die gemessenen relativen Fluoreszenzen als Balken dargestellt.

Bei 96er Thermoblöcken ist die X-Achse dabei nach den Zeilen des Blocks von A bis H skaliert. Die ersten 12 Proben entsprechen den Positionen A1 ... A12 des Blocks, die nächsten 12 Proben den Positionen B1 ... B12 usw. Die Cutoff-Werte können Sie in der Grafik durch Verschieben der horizontalen Linien mit gedrückter Maustaste verändern oder in den Feldern über der Grafik eingeben.



10.7 Ergebnisse einer Genotypisierung anzeigen

In der Ergebnistabelle der Genotypisierung sind alle Daten für die Proben zusammengefasst. Je nach ausgewähltem Tab im Grafikbereich unterscheiden sich die in der Ergebnistabelle dargestellten Spalten. Für die Fluoreszenzkurven gibt es eine zusammenfassende Tabelle, in der die Fluoreszenzdaten beider Farbstoffe verarbeitet sind. Wenn die Fluoreszenzintensität am Endpunkt ausgewertet wird, enthalten die Proben tabellen von Scatterplot und Balkendiagramm die gleichen Daten.

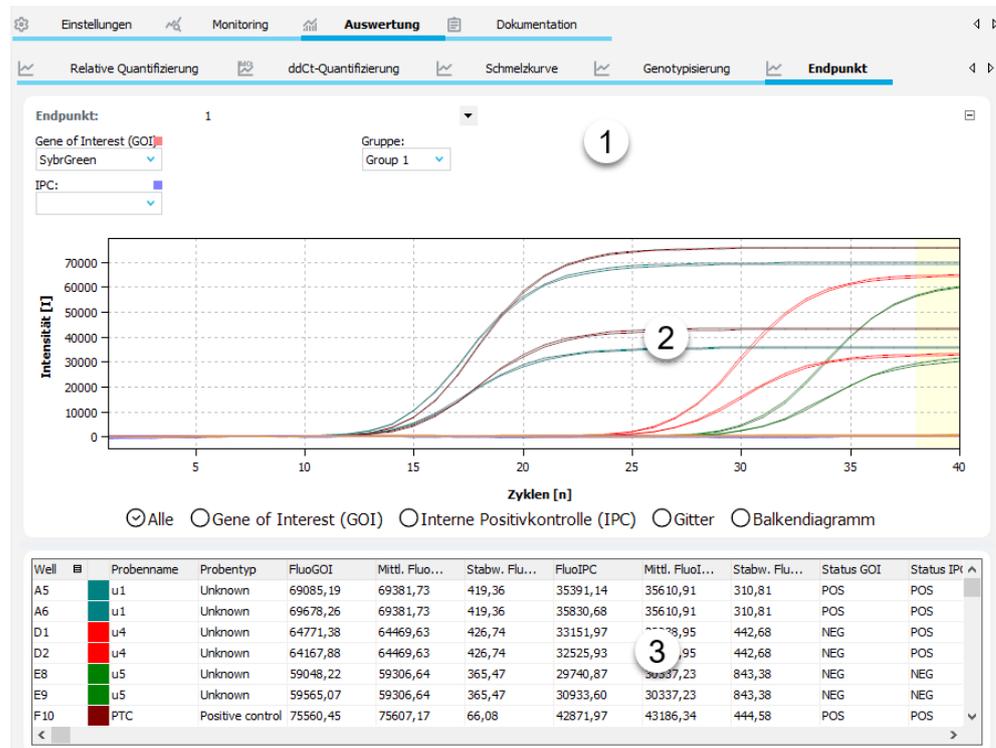
Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Ct Wildtyp	Ct-Wert Wildtyp
Mittl. Ct Wildtyp	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Wildtyps
Stabw. Ct Wildtyp	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Wildtyps
Ct Mutant	Ct-Wert Mutant
Mittl. Ct Mutant	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Mutanten
Stabw. Ct Mutant	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Mutanten
Genotyp	Zuordnung der Probe nach Wildtyp, Mutante, heterozygot oder Fehler „?“
Reaktion Wildtyp	Ja oder Nein, je nach Endpunktfluoreszenz oder Ct-Wert
Reaktion Mutante	Ja oder Nein, je nach Endpunktfluoreszenz oder Ct-Wert
Genotyp Replikate	Zuordnung der Replikate einer Probe nach Wildtyp, Mutante, heterozygot oder Fehler „?“
dRn Wildtyp	Normierte Fluoreszenzintensität der Wildtyp-Reaktion
Mittl. dRn Wildtyp	Normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Wildtyp-Reaktion
Stabw. dRn Wildtyp	Standardabweichung der normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Wildtyp-Reaktion
dRn Mutante	Normierte Fluoreszenzintensität der Mutant-Reaktion
Mittl. dRn Mutante	Normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Mutant-Reaktion
Stabw. dRn Mutante	Standardabweichung der normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Mutant-Reaktion

11 POS/NEG-Analyse im Endpunkt

Mit Hilfe der positiv/negativ Analyse (POS/NEG-Analyse) wird ermittelt, ob bestimmte Targets in einer Probe vorhanden sind oder nicht. Die Experimente können dabei als Singleplex oder Multiplex angelegt sein, wobei die Fluoreszenzen der Proben im Endpunkt, also nach der Amplifizierung, ausgewertet werden. Die Position des Endpunktes bezüglich der Zyklen sowie die Anzahl der einzubeziehenden Zyklen kann eingestellt werden. In der Analyse wird mit Hilfe der Endpunktfluoreszenzen der NTC-Proben ein Cutoff-Wert berechnet, welcher zur Diskriminierung zwischen positiv und negativ für jede einzelne Probe herangezogen wird. Die Auswertung berücksichtigt interne Positivkontrollen (IPC), die jeder Probe zur Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen zugesetzt werden können und zu einer Erhöhung der Sicherheit des Ergebnisses führen.

11.1 Projektfenster für eine POS/NEG-Analyse

Projektfenster Auswertung | Endpunkt



Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter für die POS/NEG-Analyse
2	Grafikbereich	Fluoreszenzkurven der Gen/Farbstoff-Kombinationen und die interne Positivkontrolle IPC Ergebnisanzeige am Probenlayout Balkendiagramme der Ergebnisse
3	Tabellenbereich	Proben-tabelle mit den Ergebnissen

Menü Endpunkt und Icons

Bei Auswahl des Tabs **Endpunkt** erscheinen das Menü **Endpunkt** in der Menüleiste und weitere Icons in der Werkzeugleiste für spezielle Funktionen für die POS/NEG-Analyse.

Icon	Menü Endpunkt	Beschreibung
	Endpunkt hinzufügen	Eine Auswertung im Projektfenster einfügen
	Endpunkt entfernen	Die aktuelle Auswertung aus dem Projektfenster entfernen
	Endpunkt Optionen	Einstellungen für die Anzeige der Fluoreszenzkurven und für die Ergebnisberechnung
	Autom. Cutoff	Automatisch den Cutoff-Wert für die POS/NEG-Analyse bestimmen

11.2 Auswertung für eine POS/NEG-Analyse anlegen oder löschen

Auswertungen anlegen

Um eine Auswertung vornehmen zu können, müssen Sie diese zunächst im Projektfenster mit einem Namen anlegen.

- ▶ Das Projektfenster **Auswertung | Endpunkt** öffnen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Endpunkt | Endpunkt hinzufügen** wählen.
- ▶ Im Eingabefenster den Namen für die Auswertung eintragen und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die neue Auswertung ist im Projekt angelegt. Sie können jetzt ein GOI und die Referenzgene wählen und die weiteren Auswerteparameter editieren.

Auswertung entfernen

Eine nicht benötigte Auswertung können Sie entfernen.

- ▶ Den Namen der Auswertung in der Liste wählen.
- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Endpunkt | Endpunkt entfernen** wählen.
 - ✓ Die Auswertung wird entfernt.

11.3 Optionen für eine POS/NEG-Analyse

In den Optionen für die POS/NEG-Analyse nehmen Sie die Einstellung der mathematischen Behandlung der Fluoreszenzkurven und Bedingungen für die Berechnung der Cutoff-Werte vor.

Das Fenster **Endpunkt Optionen** erscheint, wenn Sie auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Endpunkt | Endpunkt Optionen** wählen.

Fenster Endpunkt Optionen

Option	Beschreibung
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Fluoreszenzkurven
	ohne Es erfolgt keine Glättung.
	Punkte Es erfolgt eine Glättung über die gewählte Anzahl Punkte.

Option	Beschreibung
Skalierung	Auswahl der Skalierung der Fluoreszenzkurven (linear oder logarithmisch)
Korrektur der Basislinie	<p>Auswahl der Basislinienkorrektur</p> <p>Über alle Proben Bei dieser Korrektur wird die Basislinie für jede Probe im gleichen Bereich ermittelt. Die untere und die obere Bereichsgrenze sind in den Feldern von Zyklus und bis Zyklus einzustellen.</p> <p>Probenspezifisch Diese Korrektur sollte gewählt werden, wenn die Kurven sehr unterschiedliche Ct-Werte besitzen. Die untere Bereichsgrenze für die Ermittlung der Basislinie wird für alle Proben im Feld Zyklen ignorieren eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt.</p> <p>Hinweis: Die Art der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.</p>
Endpunkt	<p>letzte ... Zyklen Das Mittel der letzten Anzahl Zyklen als Endpunktfluoreszenz verwenden</p> <p>von Zyklus/bis Zyklus Den Mittelwert der Endpunktfluoreszenzen im ausgewählten Bereich für die Analyse verwenden</p> <p>Standardmäßig wird der Mittelwert der letzten 2 Zyklen für die Analyse verwendet.</p>
Cutoff-Berechnung	<p>mit Negativkontrolle oder NTC Der Cutoff-Wert berechnet sich aus der mittleren Fluoreszenz der NTC-Proben plus dem in Prozent angegebenen Betrag aus der Differenz aus der maximalen Probenfluoreszenz und der Fluoreszenz der NTC-Proben, jeweils im Endpunkt.</p> <p>mit interner Positivkontrolle (IPC) und NTC Für NTC und IPC werden unabhängig Cutoff-Werte berechnet. Dabei wird die Standardabweichung der Fluoreszenz der NTC-Proben sowie der Proben ohne zugesetzte interne Positivkontrolle (IPC) mit einem tabellierten Faktor T, der sich aus dem gewünschten Vertrauensintervall und der Anzahl der Proben ergibt, multipliziert.</p> <p>Cutoffs aus Tabelle nutzen Cutoffs manuell in die Tabelle eintragen</p>
Ok - Auto Cutoff	Der Cutoff-Wert wird entsprechend den Änderungen in diesem Fenster für ein aktuelles Projekt neu kalkuliert. Alle anderen Einstellungen werden ebenfalls übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.
Ok - Fix Cutoff	Der im aktuellen Projekt gesetzte Cutoff-Wert wird unabhängig von Änderungen in diesem Fenster beibehalten. Alle anderen Einstellungen werden übernommen und auf die Fluoreszenzkurven angewendet.

Wenn im Plattenlayout keine IPC-Proben definiert sind, steht die Option mit IPC und NTC nicht zur Verfügung. IPC-Proben können im Projektfenster **Einstellungen | Proben** durch Markierung der Wells in der Plattendarstellung, Rechtsklick auf die Markierung und Zuweisen der Eigenschaft **Interne Positivkontrolle (IPC)** im Kontextmenü definiert werden.

Sehen Sie dazu auch

 Probeneigenschaften im Layoutschema eingeben [▶ 36]

11.4 Parameter für die POS/NEG-Analyse editieren

Die Parameter für die POS/NEG-Analyse eines Experiments stellen Sie in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung
Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen
Interne Positivkontrolle (IPC)	Auswahl des Farbstoffes, mit dem die interne Positivkontrolle detektiert wurde
Benutzergruppe	Wenn im Probenlayout mehrere Experimente (Gruppen) angelegt wurden, muss hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments ausgewählt werden.
Cutoff	Endpunktfluoreszenz, ab der eine Probe als positiv gilt

Auswahl der Zyklen für die Endpunktanalyse

Standardmäßig wird das Mittel der Fluoreszenzdaten der letzten zwei Zyklen als Endpunktfluoreszenz verwendet. Sie können auch mehrere Zyklen am Ende des PCR-Laufes oder einen Bereich von Zyklen innerhalb des PCR-Laufes zur Berechnung definieren.

Die Einstellungen nehmen Sie nach Klick auf  im Fenster **Endpunkt Optionen** vor. Die gewählten Bereiche werden in den Grafiken der Fluoreszenzkurven gelb gekennzeichnet.

Cutoff-Werte einstellen

Die Cutoff-Werte für GOI und IPC können Sie manuell einstellen oder automatisch berechnen lassen, wobei verschiedene Methoden im Fenster **Endpunkt Optionen** einstellbar sind. Nach dem Anlegen einer Auswertung und bei jeder Veränderung des Cutoff-Wertes bzw. anderer Optionen werden die Analyseergebnisse neu berechnet und die graphischen sowie tabellarischen Darstellungen aktualisiert.

Manuell

- ▶ Cutoff-Werte direkt im Eingabefeld Cutoff in den Parametern über der Grafik oder im Fenster **Endpunkt Optionen** eingeben.
- ▶ Cutoff-Linie mit gedrückter Maustaste in der Grafik der Fluoreszenzkurven verschieben.

Automatisch

- ▶ Auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt **Endpunkt | Autom. Cutoff** wählen.
 - ✓ Der Cutoff-Wert wird entsprechend den Einstellungen im Fenster **Endpunkt Optionen** ermittelt.

11.5 Bewertung der Ergebnisse der POS/NEG-Analyse

Für die Bewertung von Einzelproben und Replikaten (POS, NEG, ???, CHECK) liegen folgende Zusammenhänge zugrunde:

Ohne IPC

Endpunktfluoreszenz der Einzelprobe GOI	Ergebnis
> Cutoff (GOI)	POS (positiv)
≤ Cutoff (GOI)	NEG (negativ)

Mit IPC

Endpunktfluoreszenz der Einzelprobe GOI	Endpunktfluoreszenz der Einzelprobe IPC	Ergebnis
> Cutoff (GOI)	> Cutoff (IPC)	POS (positiv)
≤ Cutoff (GOI)	> Cutoff (IPC)	NEG (negativ)
> Cutoff (GOI)	≤ Cutoff (IPC)	??? (fraglich)
≤ Cutoff (GOI)	≤ Cutoff (IPC)	??? (fraglich)

Bewertung bei Replikaten

Als Replikat vorliegende Proben (gleiche Probenamen) werden nur dann als eindeutig POS oder NEG eingeschätzt, wenn alle Replikate der Probe POS oder NEG sind. Ist das nicht der Fall, wird CHECK ausgegeben. Es besteht die Möglichkeit, über den Projektextplorer eventuelle Ausreißerproben zu deaktivieren.

Ergebnisse der einzelnen Replikate	Ergebnis Probe
alle POS	POS (positiv)
alle NEG	NEG (negativ)
sonst	CHECK (prüfen, ggf. Ausreißer eliminieren)

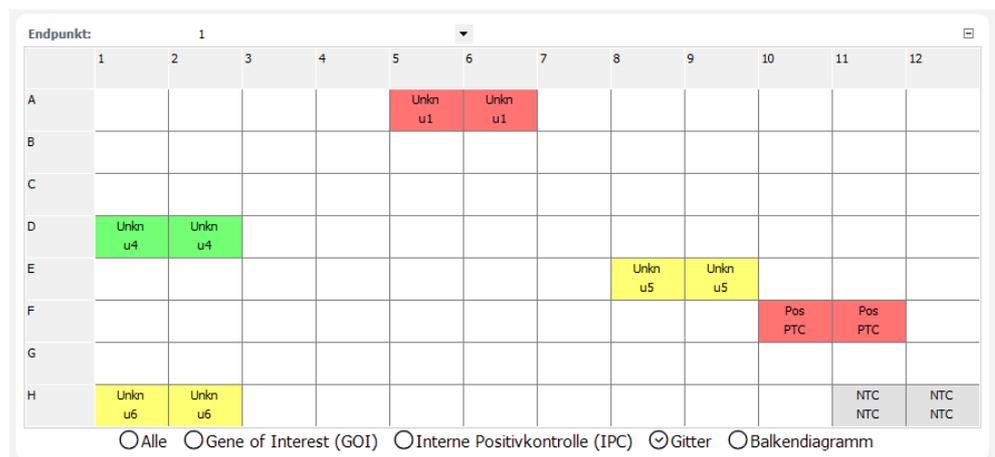
Sehen Sie dazu auch

 [Projektextplorer Proben \[▶ 12\]](#)

11.6 Ergebnisse im Probenlayout und als Balkendiagramm anzeigen

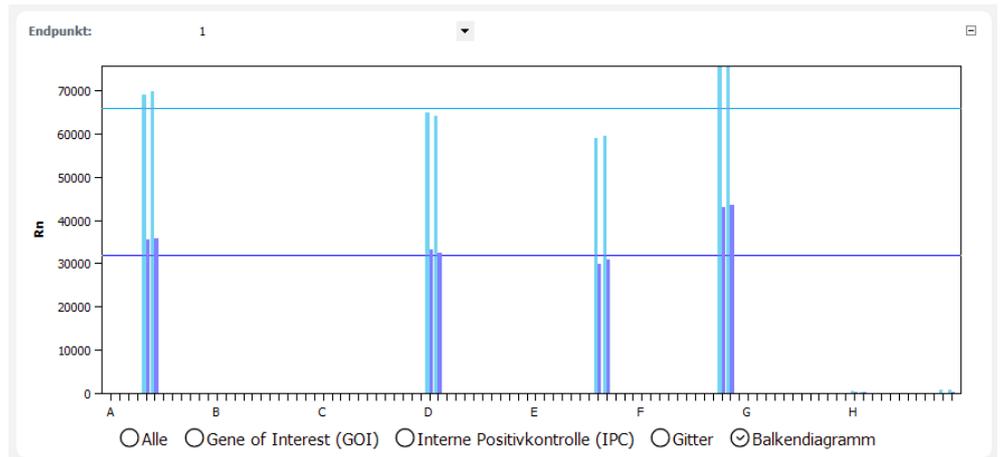
Ergebnisse im Probenlayout

In der Ansicht **Gitter** erhalten Sie einen schnellen Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Wells. Die Farben, mit denen positive, negative, fragliche bzw. IPC-Proben dargestellt werden, können Sie unter **Extras | Optionen | Farben** festlegen. Wenn Sie den Mauszeiger auf einem Well platzieren, wird der Probenname und die Endpunktfluoreszenzwerte für GOI und ggf. IPC angezeigt.



Balkendiagramm

Im Balkendiagramm werden die Endpunktfluoreszenzen von GOI und IPC für alle Wells gemeinsam dargestellt sowie die aktuellen Cutoff-Werte als waagerechte Linie angezeigt. Die hellblauen Linien gelten dabei für das GOI, die dunkelblauen für die IPC. Die Cutoff-Linien können Sie in dieser Darstellung nicht verändern. Wenn Sie den Mauszeiger auf einem Balken platzieren, werden der Probenname und die Endpunktfluoreszenzwerte für GOI und ggf. IPC angezeigt.



11.7 Ergebnisse einer POS/NEG-Analyse

Die Proben-tabelle mit den Ergebnissen wird im unteren Teil des Projektfensters angezeigt.

Well	Probenname	Probentyp	FluoGOI	Mittl. Fluo...	Stabw. Flu...	FluoIPC	Mittl. FluoI...	Stabw. Flu...	Status GOI	Status IPC
A5	u1	Unknown	69085,19	69381,73	419,36	35391,14	35610,91	310,81	POS	POS
A6	u1	Unknown	69678,26	69381,73	419,36	35830,68	35610,91	310,81	POS	POS
D1	u4	Unknown	64771,38	64469,63	426,74	33151,97	32838,95	442,68	NEG	POS
D2	u4	Unknown	64167,88	64469,63	426,74	32525,93	32838,95	442,68	NEG	POS
E8	u5	Unknown	59048,22	59306,64	365,47	29740,87	30337,23	843,38	NEG	NEG
E9	u5	Unknown	59565,07	59306,64	365,47	30933,60	30337,23	843,38	NEG	NEG
F10	PTC	Positive control	75560,45	75607,17	66,08	42871,97	43186,34	444,58	POS	POS

Spalte	Beschreibung
Well	Position der Probe im Probenlayout Mit einem Klick auf den Spaltentitel Well können Sie die Tabelle zeilen- oder spaltenweise entsprechend dem Layout ordnen.
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird. Mit Doppelklick oder gedrückter Strg-Taste und Doppelklick können Sie die Kurvenfarbe ändern.
Probentyp	Im Probenlayout eingegebener Probentyp
FluoGOI	Endpunktfluoreszenz des Zielgens
Mittl. FluoGOI	Mittelwert der Endpunktfluoreszenz von Replikaten des Zielgens
Stabw. FluoGOI	Standardabweichung der Endpunktfluoreszenz von Replikaten des Zielgens
FluoIPC	Endpunktfluoreszenz der IPC
Mittl. FluoIPC	Mittelwert der Endpunktfluoreszenz von Replikaten der IPC
Stabw. FluoIPC	Standardabweichung der Endpunktfluoreszenz von Replikate der IPC
Status GOI	POS , wenn FluoGOI > Cutoff , sonst NEG (für jedes Well)
Status IPC	POS , wenn FluoIPC > Cutoff , sonst NEG (für jedes Well)
Ergebnis Proben	Bewertung POS/NEG/??? für jedes Well
Ergebnis Replikate	Bewertung POS/NEG/CHECK der Replikate

12 MIQE-Dokumentation

Im Jahr 2009 hat eine internationale Expertengruppe um Prof. Steven Bustin Richtlinien zur Publikation von qPCR-Daten erarbeitet (Bustin et al. 2009, Clinical Chemistry 55:4, 611-622). Das grundlegende Ziel ist die Veröffentlichung unvollständiger oder fehlerhafter qPCR-Daten zu vermeiden und die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Versuchen zu gewährleisten. Die entsprechenden Richtlinien regeln Anforderungen hinsichtlich des minimalen Informationsgehalts, der zur Publikation von Daten mindestens notwendig ist. Die Richtlinien sind unter der Abkürzung "MIQE" (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) bekannt geworden.

Hinweise zum Ausfüllen der MIQE-Dokumentation

- MIQE besteht aus einem Fragenkatalog zu insgesamt 9 verschiedenen Themenbereichen rund um qPCR-Experimente. In **qPCRsoft** ist im Projektfenster für jeden Themenbereich ein Button angelegt, über den der entsprechende Fragenkatalog zum Thema aufgerufen werden kann. Zusätzlich ist ein Button **MIQE-Home** vorhanden, mit dem man von jedem Punkt aus in das MIQE-Hauptmenü zurückspringen kann.
- Grundsätzlich sollte zunächst durch Auswahl der entsprechenden Option definiert werden, ob in den Experimenten DNA oder RNA als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Ist die Option **DNA** aktiviert, muss der Fragenkatalog zum Thema Reverse Transkription nicht bearbeitet werden und die entsprechende Schaltfläche ist nicht verfügbar.
- Nach Klick auf einen Button wird der entsprechende Fragenkatalog geöffnet. Die Anzahl der Fragen unterscheidet sich zwischen den jeweiligen Themenbereichen. Der Anwender sollte möglichst viele Fragen beantworten.
- Ein Teil der Antworten wird aus dem aktuell geöffneten bzw. aktiven Projekt übernommen, wenn die entsprechenden Informationen vorhanden sind.
- Die Vollständigkeit der Beantwortung der Fragen wird von der Software durch einen Fortschrittsbalken in % dargestellt. Der MIQE-Fragenkatalog unterscheidet zwischen wichtigen Fragen, die unbedingt beantwortet werden sollten, und ergänzenden Fragen. Die Eingabefelder wichtiger Fragen sind in jedem Themenbereich hellrot unterlegt, ergänzende Fragen weiß. Für den Fortschrittsbalken werden nur die beantworteten wichtigen Fragen durch die Software gewertet. Die Anzahl der Fragen insgesamt unterscheidet sich je nachdem, ob DNA oder RNA als Ausgangsmaterial gewählt wurde. Die Software kann die Qualität der Antworten nicht bewerten. Es obliegt dem Anwender den Fragenkatalog vollständig und mit der notwendigen Sorgfalt zu bearbeiten.
- Es ist möglich, MIQE-Daten aus anderen Projekten zu importieren. Nach Klick auf das Icon  in der Werkzeugleiste oder Wahl des Menübefehls **MIQE | MIQE Dokumentation importieren** öffnet sich ein Dialogfenster. Nach Auswahl des entsprechenden Projekts werden gespeicherte MIQE-Daten in das aktuelle Projekt importiert.
- Der Fragenkatalog kann über den Menüpunkt **Datei | Drucken** ausgedruckt werden. Aktivieren Sie dazu die Option **MIQE** im Projektbaum des Fensters **Drucken**.

Einstellungen Monitoring Auswertung **Dokumentation**

MIQE

MIQE-Home

Experimentelles Design

Angaben zu den Proben

Nukleinsäureextraktion

✓ Reverse Transkription

Angaben zum qPCR-Target

qPCR-Oligonukleotide

qPCR-Protokoll

qPCR-Validierung

Datenanalyse

Target:

RNA

DNA

MIQE

Minimum **I**nformation for Publication of **Q**uantitative Real-Time PCR **E**xperiments

(According to the MIQE guidelines published by S.A. Bustin et. al. in Clinical Chemistry 55:4 (2009) 611-622.)

Der Fragebogen ermöglicht es, wichtige und ergänzende Informationen zu diesem real-time PCR-Projekt zu erfassen. Die Informationen können über die Druckfunktion als MIQE-Report ausgedruckt werden.

Fortschritt 27 %

wichtige Information

13 Multigen-/Multiplatten-Analyse

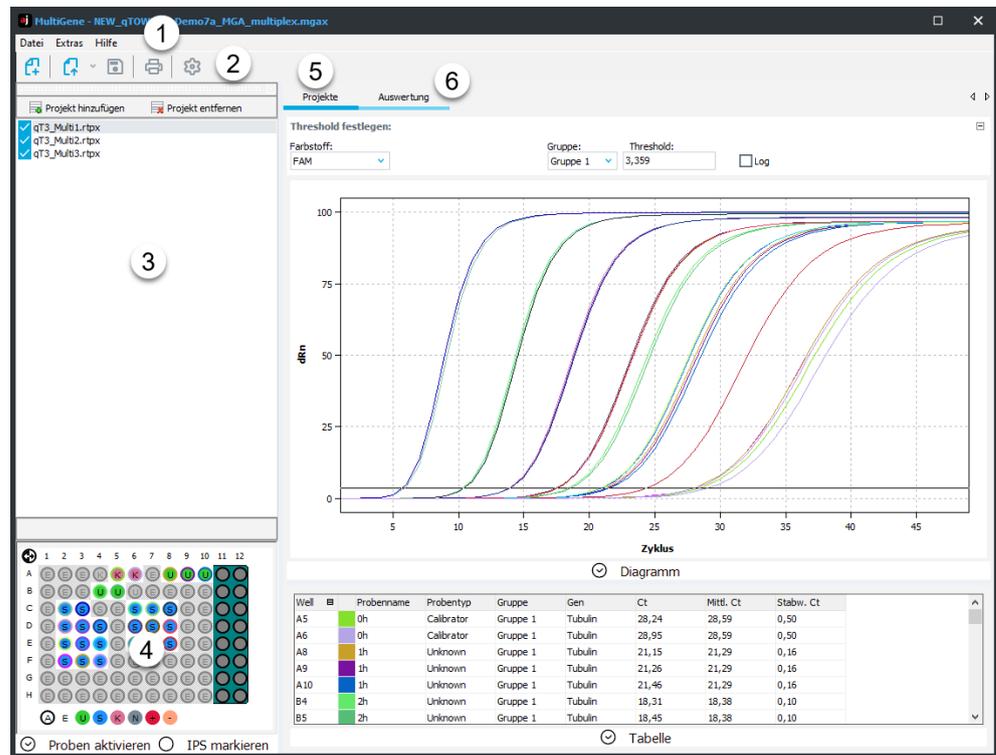
Die Multigen-/Multiplatten-Analyse gewährleistet die Auswertung von qPCR-Daten mehrerer Zielgene gleichzeitig bzw. die Auswertung von Daten aus mehreren Projektdateien, wenn zum Beispiel mehrere PCR-Platten für das Experiment verwendet wurden. Die Multigen-/Multiplatten-Analyse wird als Dialog in einer eigenen Bedienoberfläche, unabhängig vom Programm qPCRsoft ausgeführt. Grundlage der Multigen-/Multiplatten-Analyse sind durch das Programm qPCRsoft gespeicherte Projektdateien. In den jeweiligen Projekten muss eine ddCt-Analyse angelegt sein, um sie in der Multigen-/Multiplatten-Analyse auswerten zu können.

Multigen-/Multiplatten-Analyse starten

- ▶ In der Werkzeugleiste von qPCRsoft auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt Datei | Multi Gene - Multi Plate Assay wählen.
 - ✓ Die Bedienoberfläche MultiGene erscheint.

Sie können eine bereits gespeicherte Auswertung laden oder eine neue Analyse mit dem Laden der Projektdateien starten.

Bedienoberfläche MultiGene



Nr.	Element	Beschreibung
1	Menüleiste	Menüpunkte zum Öffnen, Bearbeiten, Speichern und Drucken der Multigen-/Multiplatten-Analyse und Hilfe
2	Werkzeugleiste	Icons zur Verwaltung der Analyse
3	Projektliste	Verwalten der Projekte der Analyse
4	Probenlayout	Aktivierung und Deaktivierung einzelner Proben für die Analyse Definition der Inter-Plattenstandards (IPS)
5	Tab Projekte	Darstellungen der Fluoreszenzkurven und der Ergebnisse der ddCt-Auswertung des in der Projektliste markierten Projekts

Nr.	Element	Beschreibung
6	Tab Auswertung	Anzeige der Multigen-/Multiplatten-Analyse als Balkendiagramme und Tabelle

13.1 Dateiverwaltung Multigen-/Multiplatten-Analyse

Nach Klick auf das Icon  wird die Bedienoberfläche **MultiGene** angezeigt und enthält zunächst keine Daten. In **MultiGene** kann immer nur eine Analyse erfolgen. Bei einer weiteren Analyse muss eine bereits vorhandene Analyse zunächst geschlossen werden.

Neue Multigen-/Multiplatten-Analyse anlegen

- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Datei | Neues MultiGeneAssay** wählen.
 - ✓ Es wird eine neue Analyse angelegt. Eine bereits geöffnete Multigen-/Multiplatten-Analyse wird dabei geschlossen. Wurden Veränderungen vorgenommen, die noch nicht gespeichert waren, erfolgt eine Rückfrage. Im nächsten Schritt der Analyse müssen Sie die Projektdateien mit ddCt-Auswertungen aus **qPCRsoft** importieren.

Gespeicherte Multigen-/Multiplatten-Analyse öffnen

- ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Datei | MultiGeneAssay öffnen....**
- ▶ Im Fenster **Öffnen** die gespeicherte Datei wählen und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die Multigen-/Multiplatten-Analyse mit Projektliste, Probenlayout, Messergebnissen und Auswertungen wird angezeigt.

Hinweis: Wenn unter **Extras | Optionen | Datei** der Dateityp "*.mgax" mit **qPCRsoft** verknüpft ist, öffnet sich **MultiGene** nach Doppelklick auf die ausgewählte Datei automatisch.

Multigen-/Multiplatten-Analyse speichern

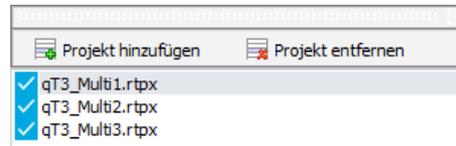
- Die Multigen-/Multiplatten-Analyse wird mit allen hinzugefügten Projektdateien und Auswertungen gespeichert.
- ▶ Den Menüpunkt **Datei | MultiGeneAssay speichern unter...** wählen.
 - ▶ Im Fenster **Speichern unter** einen Dateinamen eingeben und auf den Button **Speichern** klicken.
 - ▶ Änderungen in einer gespeicherten Analyse mit Klick auf das Icon  speichern oder den Menüpunkt **Datei | MultiGeneAssay speichern** Multigen-/Multiplatten-Analyse speichern wählen.
 - ✓ Die Analyse wird gespeichert.

Multigen-/Multiplatten-Analyse drucken

- Sie können Sie Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse drucken.
- ▶ Auf den Tab **Auswertung** wechseln.
 - ▶ Auf das Icon  in der Werkzeugleiste klicken oder den Menüpunkt **Datei | MultiGeneAssay drucken...** wählen.
 - ▶ Mit dem Icon **Optionen** die Druckerparameter wählen und mit dem Icon **Drucken** den Ausdruck starten.
 - ✓ Das Protokoll der Analysenergebnisse wird auf dem gewählten Drucker gedruckt.

13.2 Projektdateien für eine Multigen-/Multiplattenanalyse wählen

Wenn eine neue Multigen-/Multiplatten-Analyse gestartet wird, ist die Bedienoberfläche zunächst leer. Im nächsten Schritt müssen Sie die Projektdateien mit einer ddCt-Analyse aus qPCRsoft laden, um sie in **MultiGene** auszuwerten. Die verwendeten Projekte werden in der Projektliste angezeigt.



Projekte laden

- ▶ Auf den Button **Projekt hinzufügen** klicken.
- ▶ Im Fenster **Öffnen** eine oder mehr Projektdateien wählen und mit Klick auf den Button **Öffnen** in den Workspace laden.
 - ✓ Die Projekte erscheinen in der Projektliste. Die Fluoreszenzkurven und die Ergebnisse der ddCt-Analyse eines in der Liste markierten Projekts werden auf dem Tab **Projekte** angezeigt.

Projekte entfernen

- ▶ Das Projekt in der Liste markieren und auf den Button **Projekt entfernen** klicken.
 - ✓ Das Projekt wird aus der Projektliste gelöscht und ist nicht mehr Bestandteil der Analyse. Wenn die Analyse gespeichert wird, ist dieses Projekt nicht mehr in der MGAX-Datei enthalten.

Projekt deaktivieren

- Statt das Projekt dauerhaft aus der Analyse zu entfernen, können Sie es auch deaktivieren.
- ▶ Mit einem Klick auf das Kontrollkästchen vor dem Projektnamen den Haken entfernen.
 - ✓ Das Projekt wird in der Analyse nicht berücksichtigt, ist aber nach dem Speichern in der MGAX-Datei enthalten.

13.3 Proben aktivieren und Interplattenstandards markieren

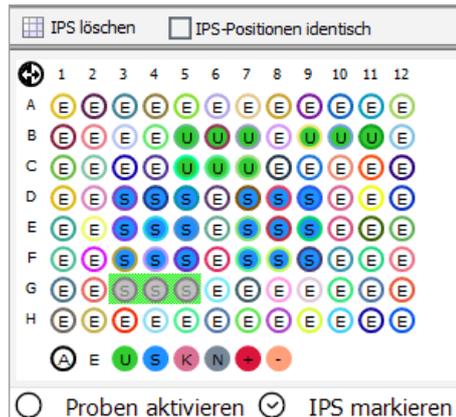
Proben aktivieren/deaktivieren

Sie können in **MultiGene** im Probenlayout auf die gleiche Weise wie im Projektextplorer **Proben** in qPCRsoft für die einzelnen Projekte Proben aktivieren und deaktivieren. Die Probentypen sind auf dem Probenschema von **MultiGene** mit den gleichen Farben und Symbolen wie im Projektextplorer von qPCRsoft gekennzeichnet.

- ▶ Den Tab **Projekte** wählen.
- ▶ In der Projektliste das Projekt markieren.
 - ✓ Die Fluoreszenzkurven und Analysenergebnisse des Projekts werden auf dem Tab **Projekte** angezeigt.
- ▶ Unter dem Probenlayout die Ansicht **Proben aktivieren** wählen.
- ▶ Wie im Projektextplorer **Proben** die Ausreißer deaktivieren.
 - ✓ Die deaktivierten Proben werden in der weiteren Analyse nicht mehr berücksichtigt.

Interplattenstandards markieren

In der Multigen-/Multiplatten-Analyse werden Interplatten-Standards (IPS) in jedem Probenlayout mitgeführt und die Abweichungen untereinander ermittelt und verrechnet.



- ▶ Unter dem Probenlayout die Ansicht **IPS markieren** wählen.
- ▶ Mit der Maus im Layoutbereich markieren, der die IPS-Proben enthält.
 - ✓ Die IPS-Proben werden grau vor einem grünen Hintergrund angezeigt. Für alle übrigen Proben wird nur das Probentyp-Symbol angezeigt. Leere Wells sind mit einem "E" gekennzeichnet.
- ▶ Wenn sich auf allen Platten die IPS-Proben auf der gleichen Position befinden, die Option **IPS-Positionen identisch** aktivieren.
 - ✓ Die Auswahl wird auf alle geladenen Projekte übertragen.
- ▶ Um die IPS in allen geladenen Projekten zu löschen, auf den Button **IPS löschen** klicken.

13.4 Threshold und PCR-Effizienzen für die Multigen-/Multiplatten-Analyse festlegen

Aus den geladenen Projektdateien werden alle Messwerte und Einstellungen übernommen. In **MultiGene** können der Threshold-Wert für jeden Farbstoff und die PCR-Effizienz neu eingestellt werden. Alle weiteren Einstellungen können nicht mehr verändert werden. Das ist nur in den jeweiligen Einzelprojekten in **qPCRsoft** möglich.

Threshold-Wert editieren

Der Threshold-Wert kann für jeden Farbstoff eines geladenen Projekts editiert werden.

- ▶ Den Tab **Projekte** wählen.
- ▶ In der Projektliste das Projekt mit Mausclick markieren.
- ▶ Auf dem Tab **Projekte** in der Liste **Farbstoff** den Farbstoff wählen.
- ▶ Bei Bedarf die Experimentgruppe in der Liste **Gruppe** wählen.
- ▶ Den Threshold im Feld **Threshold** editieren.
- ▶ Alternativ in der Grafik der Fluoreszenzkurven die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor verschieben.
 - ✓ Mit der Veränderung des Thresholds werden die Werte in der Ergebnistabelle neu berechnet.

PCR-Effizienz editieren

Die PCR-Effizienz wird aus den geladenen Projektdateien übernommen. Für die Analyse kann die PCR-Effizienz für die betrachteten Gene angepasst werden.

- ▶ Den Tab **Auswertung** wählen.
- ▶ In der Werkzeugleiste auf das Icon  klicken oder den Menüpunkt **Extras | Optionen** wählen.

- ▶ Im Fenster **Optionen** für die einzelnen Gene die PCR-Effizienz editieren und mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Die Analysenergebnisse werden mit den editierten PCR-Effizienzen neu berechnet.

13.5 Auswertung der Multigen-/Multiplatten-Analyse

Die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse werden auf dem Tab **Auswertung** im Anzeigebereich ausgegeben.

MultiGeneAssay:

Gene of Interest (GOI): FAM-Tubulin;ROX-IL1b

Referenzgen: VIC-Actin;Cy5-GAPDH

Achse: Log10

Interplattenkalibrierung

BAR NE BAR RQ

Projektname	Gen	Probenname	Anz. Repl.	Mittl. Ct	Mittl. Kalib...	Stabw. Mit...
qT3_Multi3.rtpx	[GAPDH-Cy5]	E2-3	3	23,25	22,54	0,49
qT3_Multi3.rtpx	[GAPDH-Cy5]	E5-3	3	12,79	12,1	0,48
qT3_Multi3.rtpx	Tubulin-FAM	6h	3	8,91	7,53	0,18
qT3_Multi3.rtpx	[Actin-VIC]	E5-3	3	15,39	14,43	0,54
qT3_Multi3.rtpx	IL1b-ROX	E2-3	3	23,45	23,02	0,35

Tabelle IPS

Nr.	Element	Beschreibung
1	Parametereinstellung	Auswahl der Analysenparameter
2	Grafikbereich	Balkendiagramme der normalisierten Expression und der relativen Quantität
3	Tabellenbereich	Probentabelle mit den Ergebnissen

13.5.1 Parameter für die Multigen-/Multiplatten-Analyse editieren

Die Parameter Multigen-/Multiplatten-Analyse stellen Sie auf dem Tab **Auswertung** in den Feldern und Listen über der Grafik ein.

Option	Beschreibung
Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen Entsprechend der Auswahl werden die Fluoreszenzkurven und Standardkurve angezeigt.
Referenzgen	Auswahlliste der Referenzgene Es können mehrere Referenzgene gleichzeitig ausgewählt werden. Für jedes Referenzgen wird ein weiterer Tab im Grafikbereich angezeigt. Mit Klick auf das Icon  werden alle ausgewählten Referenzgene aus der Auswertung entfernt.
Skalierung	Auswahl der Skalierung der Y-Achse
Interplattenkalibrierung	Bei aktivierter Interplattenkalibrierung werden die festgelegten IPS-Proben aller Platten miteinander verrechnet* und aus den mittleren Ct-Werten der Replikate die korrigierten mittleren Ct-Werte berechnet (siehe Ergebnistabelle). Die korrigierten mittleren Ct-Werte gehen dann in die Berechnung der relativen Menge sowie der normierten Expression ein. Wenn die Interplattenkalibrierung deaktiviert ist, sind die korrigierten mittleren Ct-Werte gleich den mittleren Ct-Werte.

*Korrekturrechnung

$$Ct_{i,p}^{corr} = Ct_{i,p}^{mess} - \overline{Ct}_p^{IPC} + \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N Ct_p^{IPC}$$

mit

$Ct_{i,p}^{corr}$ korrigierter Ct-Wert für Replikat i auf der Platte

$Ct_{i,p}^{mess}$ gemessener Ct-Wert für Replikat i auf der Platte

\overline{Ct}_p^{IPC} Mittelwert der Ct-Werte der IPS-Proben auf Platte p

$\frac{1}{N} \sum_{p=1}^N Ct_p^{IPC}$ Mittelwert der Ct-Werte auf allen N Platten

13.5.2 Ergebnisanzeige der Multigen-/Multiplatten-Analyse

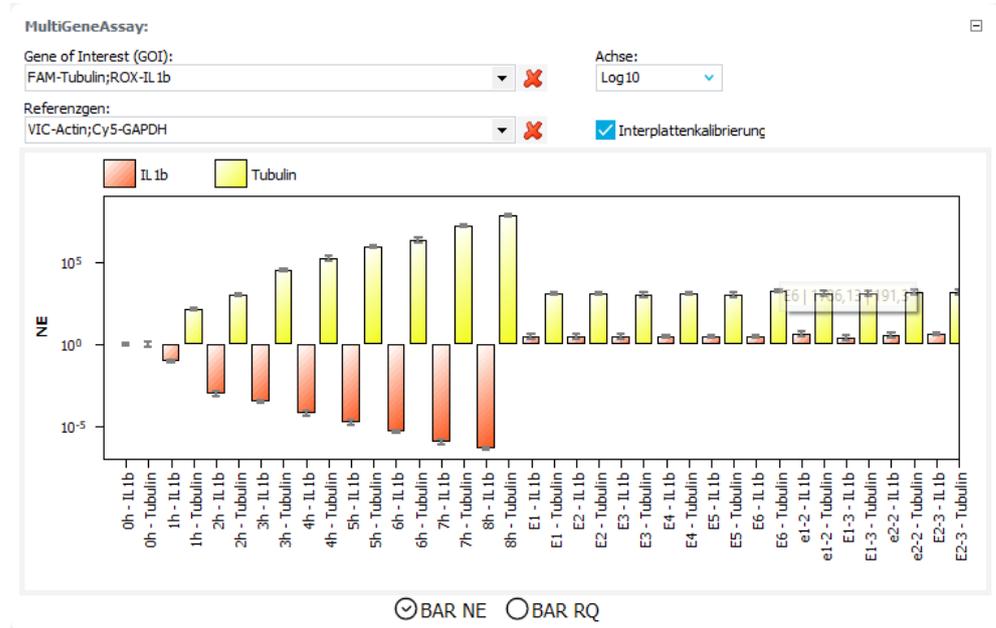
Balkendiagramme

Die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse werden in Form von Balkendiagrammen angezeigt. Da bei einer großen Probenanzahl nicht alle Balken gleichzeitig im Diagrammfenster darstellbar sind, kann durch Linksklick auf die Diagrammfläche und Ziehen der Maus nach links oder rechts der Fensterinhalt horizontal verschoben werden. Drehen des Musrads staucht oder verbreitert die Darstellung in der Breite. Alternativ können Sie dafür die Pfeiltasten [\uparrow] und [\downarrow] benutzen. Der jeweilige Probenname ist unterhalb eines jeden Balkens angegeben. Mit Rechtsklick auf die Grafik öffnen Sie ein Kontextmenü, mit dessen Optionen Sie die Ergebnisse in der X-Achse nach Genen oder Probenamen sortieren können. Außerdem können Sie in diesem Kontextmenü die angezeigten Werte als CSV-Datei exportieren oder die Grafik in die Zwischenablage für andere Anwendungen kopieren.

Ansicht Bar NE

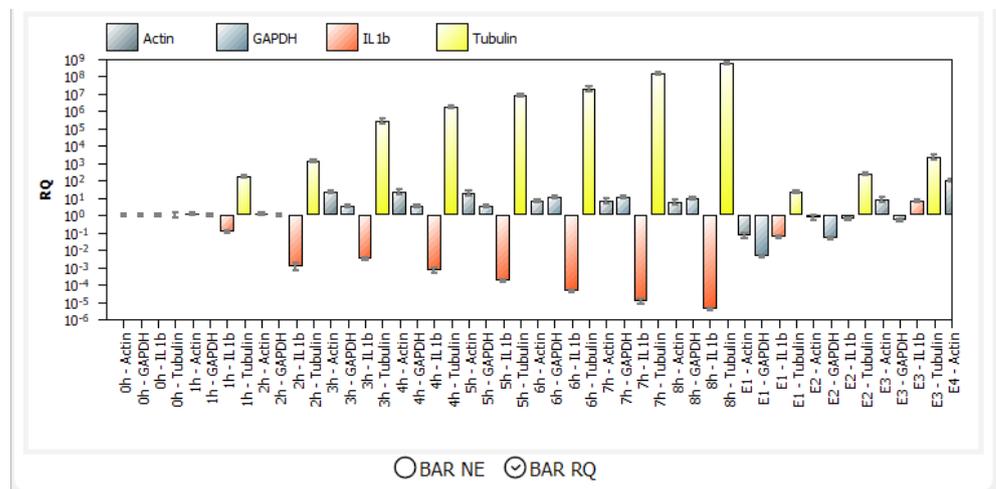
In der Ansicht **BAR NE** wird die Expression der ausgewählten Zielgene, normiert auf die Expression der Referenzgene, aufgetragen. Die Höhe der Balken wird bestimmt durch die berechnete normierte Expression der Replikate. Zu jedem Balken wird eine Kurzin-

formation zum Probennamen, zum Mittelwert und zur berechneten Standardabweichung eingeblendet, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. Die Standardabweichung der normierten Expression wird in Form eines Fehlerbalkens angezeigt. Wenn der Mauszeiger auf einen Balken gesetzt wird, wird eine Kurzinformation zu Probennamen, Mittelwert und berechneter Standardabweichung eingeblendet.



Ansicht Bar RQ

In der Ansicht **BAR RQ** wird die relative Quantität für Ziel- und Referenzgene dargestellt. Die Balkenhöhe entspricht der relativen Quantität der Replikate. Der Fehlerbalken markiert die Größe der Standardabweichung.



Ergebnistabelle

Die Ergebnistabelle für die Multigen-/Multiplatten-Analyse wird in der Ansicht **Tabelle** angezeigt.

Projektname	Gen	Probenname	Anz. Repl.	Mittl. Ct	Mittl. Kalib...	Stabw. Mit...	RQ	Stabw. RQ
qT3_Multi3.rtpx	[GAPDH-Cy5]	E2-3	3	23,23	22,54	0,49	0,05	0,02
qT3_Multi3.rtpx	[GAPDH-Cy5]	E5-3	3	12,79	12,1	0,48	71,09	23,73
qT3_Multi3.rtpx	Tubulin-FAM	6h	3	8,91	7,53	0,18	19626285,59	2498663,05
qT3_Multi3.rtpx	[Actin-VIC]	E5-3	3	15,39	14,43	0,54	1068,95	396,51
qT3_Multi3.rtpx	IL1b-ROX	E2-3	3	23,45	23,02	0,35	0,79	0,19
qT3_Multi3.rtpx	[Actin-VIC]	6h	3	22,77	21,82	0,07	6,39	0,32

Spalte	Beschreibung
Projektname	Name des Projektes
Gen	Name des in der Probe gemessenen Gens
Probenname	Im Probenlayout eingegebener Name
Anz. Repl.	Anzahl Wiederholungen einer Probe
Mittl. Ct	Mittlerer Ct-Wert von Replikaten
Mittl. Kalib. Ct	Mit Hilfe der IPS korrigierter mittlerer Ct-Wert der Replikate einer Probe
Stabw. Mittl. Kalib. Ct	Standardabweichung des korrigierten mittleren Ct-Wertes der Replikate einer Probe
RQ	Relative Menge des Gens für Replikate in der Ursprungsprobe
Stabw. RQ	Standardabweichung der relativen Menge des Gens für Replikate in der Ursprungsprobe
Norm. exp.	Normierte Expression der Probe
Stabw. Norm. Expression	Standardabweichung der normierten Expression der Probe

Interplattenstandards

Die Ansicht IPS fasst die Daten der Interplattenstandards zusammen.

Projektname	Farbstoff	Mittl. Ct (IPS, Projekt)	Mittl. Ct (IPS, alle Projekte)	Korrekturwert
qT3_Multi1.rtpx	FAM	27,83	31	3,16
qT3_Multi1.rtpx	VIC	29,69	31,92	2,23
qT3_Multi1.rtpx	ROX	28,53	30,35	1,83
qT3_Multi1.rtpx	Cy5	28,15	29,72	1,57
qT3_Multi2.rtpx	FAM	32,77	31	-1,77
qT3_Multi2.rtpx	VIC	33,2	31,92	-1,28

Tabelle IPS

Spalte	Beschreibung
Projektname	Name des Projektes
Farbstoff	Farbstoff, mit dem der Ct-Wert der IPS-Probe bestimmt wurde
Mittl. Ct (IPS, Projekt)	Mittlerer Ct-Wert der IPS-Proben im Projekt (farbstoffabhängig)
Mittl. Ct (IPS, alle Projekte)	Mittlerer Ct-Wert der IPS-Proben in allen Projekten (farbstoffabhängig)
Korrekturwert	Ct-Korrekturwert, der für alle Proben des genannten Projektes (1.Spalte) und für den Farbstoff (2.Spalte) gilt

14 Funktionen im Menü Extras

14.1 Allgemeine Einstellungen im Fenster Optionen

Im Fenster **Optionen** nehmen Sie Einstellungen vor, die programmweit angewendet werden.

Fenster Optionen öffnen

Für die meisten Funktionen im Fenster **Optionen** müssen Sie als Administrator im Programm angemeldet sein.

- ▶ Alle Projektfenster in qPCRsoft schließen.
- ▶ Den Menüpunkt **Extras | Optionen** wählen.
 - ✓ Das Fenster **Optionen** erscheint.
- ▶ Auf den einzelnen Tabs die entsprechenden Einstellungen vornehmen und auf Ok klicken.
 - ✓ Die Einstellungen werden programmweit angewendet.

Tab Allgemein

Auf dem Tab **Allgemein** definieren Sie die Optionen für das Speichern und den Export der Projektdaten.

Option	Beschreibung
Ordner für autom. Speichern	Wenn Sie die Projekte (Ergebnisdaten) automatisch nach Ablauf des PCR-Laufs speichern wollen, geben Sie hier einen Pfadnamen ein, in dem die Projekte gespeichert werden.
Automatisch (in den Ordner für autom. Speichern)	<p>Projekte werden automatisch nach Ablauf des PCR-Lauf in den oben festgelegten Ordner gespeichert.</p> <p>Für die Generierung der Dateinamen stehen folgende Optionen zur Verfügung:</p> <p>[DATUM]_XXX Der Dateiname wird aus dem Datum und einer fortlaufenden Nummer generiert.</p> <p>[Name]_XXX Der Dateiname wird aus einem freiwählbaren Namen (im Eingabefeld eingeben) und einer fortlaufenden Nummer generiert.</p> <p>Folgende Ausgabeformate stehen zur Verfügung:</p> <p>RTProject extended file (*.rtpx) Ergebnisdaten in einem qPCRsoft-Projekt speichern</p> <p>RT result bin file (*.ajpcresbin) Ergebnisdaten in einer BIN-Datei speichern</p> <p>RT result xml file (*.ajpcresxml) Ergebnisdaten in einer XML-Datei speichern</p>
Manuell nach dem qPCR-Lauf	Nach dem qPCR-Lauf öffnet sich das Fenster Projekt speichern zur Eingabe des Dateinamens für das Projekt.
Manuell beim Start des qPCR-Laufs	Beim Start des qPCR-Laufs öffnet sich das Fenster Projekt speichern . Der qPCR-Lauf beginnt erst, wenn der Dateiname eingegeben und bestätigt ist.
Backupdatei "Last_Run.rtpx" speichern (in den Ordner für autom. Speichern)	In der Backupdatei können Sie die Daten eines laufenden qPCR-Protokolls sichern. Falls der qPCR-Lauf vorzeitig unterbrochen wird, sind in dieser Datei alle bis zu diesem Zeitpunkt erfolgten Fluoreszenzmessungen aufgezeichnet. Die Backup-Datei wird im Ordner Ordner für autom. Speichern gespeichert und bei jedem neuen Start eines qPCR-Laufs überschrieben.

Option	Beschreibung
autom. rawdata csv export at the end of the run	<p>Nach einem qPCR-Lauf werden für jeden Farbstoff jeweils 2 Dateien (Amplifikation und Rohdaten) und ggf. die Schmelzkurve in eine CSV-Datei exportiert.</p> <p>Die Dateinamen für die Rohdaten und die Amplifikationen setzen sich aus folgenden Werten zusammen: Vorlagename_Typ_Datum_Uhrzeit_Farbstoff.csv (Beispiel: Kit-Vorlage_AD_2023-09-21_1154_FAM.csv)</p> <p>Bei der Schmelzkurve entfällt im Dateinamen der Farbstoff: Vorlagename_Typ_Datum_Uhrzeit.csv (Beispiel: Kit-Vorlage_MD_2023-09-21_1154.csv)</p> <p>Der Wert "Typ" bezeichnet die exportierten Fluoreszenzdaten:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ AD Amplification data ■ MD Melting curve data ■ RD Raw data
autom. ct-data csv export at the end of the run	<p>Nach einem qPCR-Lauf werden die ermittelten Ct-Werte in eine CSV-Datei exportiert. Der Dateiname setzt aus folgenden Werten zusammen:</p> <p>Vorlagename_Typ_Datum_Uhrzeit.csv (Beispiel: SyGreen-Assay_Ct_2023-10-23_1501.csv)</p>
Ordner für autom. Export	<p>Wenn Sie den automatischen CSV-Export der Rohdaten oder der Ct-Werte aktiviert haben, geben Sie hier den Pfad zum Speichern der Exportdateien ein.</p>

Tab Zahlenformat

Auf dem Tab **Zahlenformat** legen Sie die Dezimaltrennstellen und die Anzahl Nachkommastellen für die angezeigten Werte fest.

Tab Sprache

Auf dem Tab **Sprache** wählen Sie die Sprache der Programmoberfläche.

Tab Messung

Auf dem Tab **Messung** stellen Sie grundlegende Optionen für die Fluoreszenzmessung und die Kontrolle der Blocktemperatur ein.

Option	Beschreibung
Empfindlichkeit	<p>Grundempfindlichkeit des Detektionssystems</p> <p>Diese Einstellung wirkt sich auf alle Farbstoffe aus und sollte nur verändert werden, wenn besonders schwache oder intensive Proben gemessen werden sollen.</p> <p>Standardeinstellung: 5</p>
Messwiederholungen Farbkompensation	<p>Anzahl Messwiederholungen für die Aufnahme der Farbkompensation</p>
Negative Werte infolge Farbkompensation anzeigen	<p>Wenn aktiviert, werden auch negative Werte in Folge der Farbkompensation angezeigt, sonst wird stattdessen der Wert "0" ausgegeben.</p>
Simulated Tube Control	<p>Wenn aktiviert, wird mit der gemessenen Blocktemperatur die in der Probe herrschende Temperatur vorausgerechnet und die Temperatur auf die Proben temperatur geregelt. Diese Methode wird insbesondere für schnelle Protokolle und hohe Probenvolumina empfohlen.</p> <p>Wenn deaktiviert, wird die Blocktemperatur entsprechend dem gewählten Temperaturprogramm geregelt. Insbesondere bei hohen Heiz- und Kühlraten und kurzen Haltezeiten kann die tatsächlich in der Probe herrschende Temperatur von der gewünschten Temperatur abweichen.</p>

Tab Auswertung

Auf dem Tab **Auswertung** können Sie in den Listenfeldern jeweils einen Faktor für die quantitativen Auswertungen (**Faktor Quantifizierung**), für die Schmelzkurvenanalyse (**Faktor Schmelzkurve**) und für die Genotypisierung (**Faktor Genotypisierung**) eingeben, der für die automatische Berechnung des Thresholds verwendet wird.

Wenn Sie die Option **Fixierung der Skalierung auf 100%** aktivieren, wird in allen Diagrammen, die normierte Fluoreszenzwerte anzeigen, die Skalierung der Y-Achse (Fluoreszenz, dRn) auf 100% festgesetzt. Es erfolgt keine automatische Skalierung, wenn die angezeigten Kurven kleiner 100% sind. Das erleichtert die Bewertung schwacher Fluoreszenzen.

Tab Gerät

Auf dem Tab **Gerät** aktivieren Sie die Aufzeichnung von Gerätekommunikationsdaten, die für die Fehlerdiagnostik genutzt werden. Bei Problemen können Sie vom AJ-Service aufgefordert werden, diese Daten aufzuzeichnen und an den Service zu senden.

Option	Beschreibung
Log Anwendung (empfohlen)	Log-Datei von qPCRsoft In der Voreinstellung ist diese Aufzeichnung mit der Auswahl Info immer aktiviert. Diese Log-Datei ist klein und kann bei Bedarf schnell weitergegeben werden.
Log Gerätekommunikation	Kommunikation zwischen qPCRsoft und dem Gerät Diese Log-Datei kann sehr groß werden und sollte deshalb nur auf Aufforderung erzeugt werden.
Log Fasercheck Ergebnisse	Wenn in den Projekteinstellungen der Fasertest vor oder nach dem qPCR-Lauf aktiviert ist, werden die Messwerte des Fasertests aufgezeichnet.

Tab Datei

Auf dem Tab **Datei** können Sie Dateitypen aktivieren, bei deren Auswahl Datei-Explorer des Betriebssystems qPCRsoft automatisch gestartet und die Datei geöffnet.

Tab Benutzerverwaltung

Auf dem Tab **Benutzerverwaltung** aktivieren Sie die Verwendung der Benutzerverwaltung. Für diese Funktion benötigen Sie Administratorrechte.

Wenn Sie die Option **Benutzeranmeldung erforderlich** deaktivieren, erfolgt keine Login-Abfrage beim Programmstart. Die Funktionen für die Einrichtung der Benutzerverwaltung stehen nicht zur Verfügung.

Tab Farben

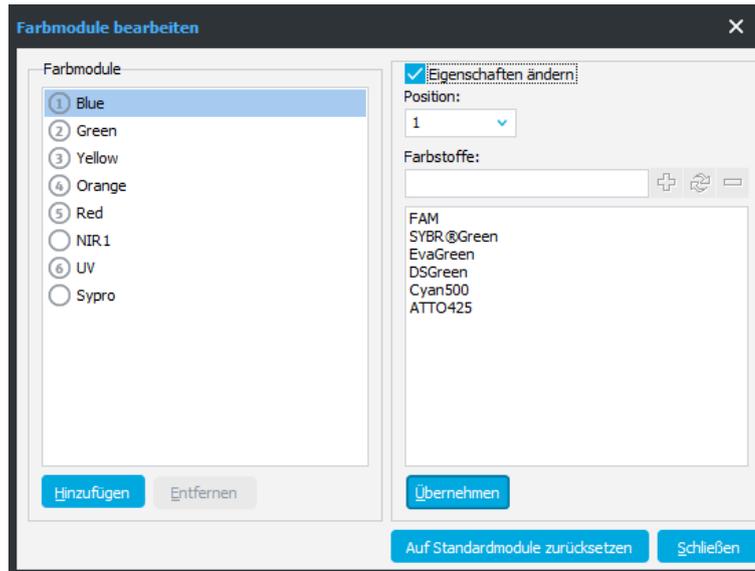
Auf dem Tab **Farben** legen Sie folgende Farbeinstellungen fest:

- Anzeigefarbe für Probenotyp und Replikate im Plattenlayout
- Farbe der Fluoreszenzkurven getrennt nach Probenotyp, Well oder Replikaten
- Farben für die Markierungen von positiven und negativen Bewertungen

Entsprechend der Auswahloption für die Kurvenfarbe Probenotyp, Replikate oder Well werden das entsprechende Farbschema auf die Darstellung der Fluoreszenzkurven angewendet.

14.2 Farbmodule konfigurieren

Nach Einsetzen der Farbmodule in den Messkopf des Geräts müssen die Farbmodule in der Software im Fenster **Farbmodule bearbeiten** spezifiziert werden.



Installierte Farbmodule spezifizieren

- ▶ Menüpunkt **Extras | Farbmodule bearbeiten** wählen.
 - ✓ Das Fenster **Farbmodule bearbeiten** erscheint.
- ▶ Aus der Liste das Modul auswählen, welches im Gerät installiert ist.
- ▶ Die Option **Eigenschaften** aktivieren und die Position wählen, auf welcher das Modul im Gerät montiert ist.
- ▶ Bei Bedarf Farbstoffnamen hinzufügen, wenn diese noch nicht in die Liste aufgenommen sind.
- ▶ Die Einstellungen mit Klick auf den Button **Übernehmen** dem Modul zuweisen.
- ▶ Auf die gleiche Weise mit den weiteren installierten Farbmodulen verfahren.
 - ✓ Die im Gerät installierten Module sind in qPCRsoft verfügbar.

Neue Farbmodule definieren oder Farbmodule löschen

Wenn die Liste nicht ihr Farbmodul enthält, müssen Sie es neu anlegen. Nicht installierte Farbmodule können Sie aus der Liste löschen

- ▶ Neues Farbmodul in die Liste aufnehmen: Auf den Button **Hinzufügen** klicken. Im Eingabefenster im Feld **Modul-Code** den Code des neuen Moduls eingeben. Mit **Ok** bestätigen.
 - ✓ Das neue Modul ist jetzt in der Liste verfügbar.
- ▶ Farbmodul aus der Liste entfernen: Farbmodul in der Liste anklicken. Auf den Button **Entfernen** klicken.
 - ✓ Das Farbmodul wird aus der Liste gelöscht.

Farbstoffe zuweisen

Sie können den Farbmodulen weitere Farbstoffe zuweisen. Ein Farbstoff kann jeweils nur einem Modul zugeordnet werden. Soll er mit einem anderen Modul gemessen werden, so muss er zunächst bei dem ersten Modul entfernt werden.

- ▶ Das Farbmodul in der Liste markieren und die Option **Eigenschaften** aktivieren.
- ▶ Im Eingabefeld **Farbstoffe** den Namen des Farbstoffes eingeben, die mit dem Modul detektiert wird.
- ▶ Auf den Button **+** klicken.
 - ✓ Der Farbstoff wird der darunter stehenden Liste zugefügt.
- ▶ Um einen Farbstoff zu entfernen, den Farbstoff in der Liste markieren und auf den Button **-** klicken.
 - ✓ Der Farbstoff wird aus der Liste entfernt.

- ▶ Auf den Button **Übernehmen** klicken.
 - ✓ Die geänderten Eigenschaften werden Farbm modul zugewiesen.

14.3 Geräteauswahl ändern

Die Auswahl des verbundenen Geräts erfolgt bei Start der Programminstanz. Sie können die Programminstanz nachträglich mit einem anderen Gerät verbinden, ohne das Programm vorher beenden zu müssen.

- ▶ qPCR-Thermocycler einschalten.
- ▶ Menüpunkt **Extras | Geräteauswahl** wählen.
- ▶ Im Fenster **Geräteauswahl** das Gerät auswählen und auf **Auswählen** klicken.
 - ✓ Das ausgewählte Gerät ist mit der Programminstanz verbunden.

14.4 Gerät initialisieren

Bei der Geräteinitialisierung wird der Grundzustand des Geräts hergestellt. Eine Geräteinitialisierung ist nur nach einem Fehlerfall nötig.

- ▶ Den Menüpunkt **Extras | Geräteinitialisierung** wählen.
 - ✓ Das Gerät wird in den Grundzustand versetzt und ist wieder messbereit.

14.5 Gerät mit PC verbinden

qPCRsoft wird beim Start mit einem eingeschalteten Gerät verbunden. Ob eine Verbindung zum Gerät besteht, wird in der linken unteren Ecke der Statuszeile angezeigt.

Falls nach ca. 30 Sekunden keine Verbindung aufgebaut werden kann, wählen Sie den Menüpunkt **Extras | Geräteidentifikation**, um das Problem zu lösen.

15 Benutzerverwaltung

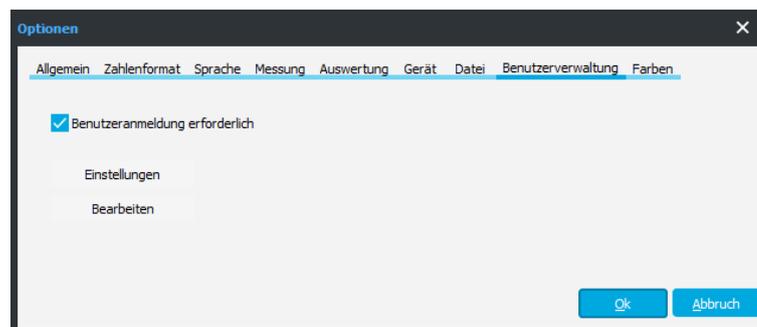
Hinweis zur allgemeinen Datensicherheit

Das Lesen und Ändern der durch qPCRsoft erzeugten Projekt-, Vorlage-, Auswerte und Kommunikationsdateien ist wegen der verwendeten Verschlüsselung nur mit qPCRsoft möglich.

Benutzerverwaltung aktivieren

Die Benutzerverwaltung aktivieren Sie unter dem Menüpunkt **Extras | Optionen | Benutzerverwaltung**.

Option	Beschreibung
Benutzeranmeldung erforderlich	Wenn aktiviert, wird beim nächsten Programmstart die Benutzerverwaltung wirksam. Eine Anmeldung im Programm ist dann nur noch mit gültigem Nutzerprofil möglich. Hinweis: Beim ersten Programmstart nach der Installation wird ein Administrator mit Zugriff auf die Benutzerverwaltung erstellt.
Einstellungen	Einstellungen für Kennwörter, Anmeldungen und Logout
Bearbeiten	Benutzerprofile verwalten



15.1 Grundlegende Einstellungen für Kennwort, Anmeldungen und Logout

Um in die grundlegenden Einstellungen, die für alle Benutzer gelten, zu gelangen, wählen Sie den Menüpunkt **Extras | Optionen** und klicken auf dem Tab **Benutzerverwaltung** auf den Button **Einstellungen**.

Sie können folgende Einstellungen in der Benutzerverwaltung vornehmen:

- Anzahl der Anmeldeversuche
Wenn die erlaubte Anzahl Anmeldeversuche auf ein Benutzerkonto überschritten ist, d.h. schlagen die Versuche fehl, wird das Benutzerkonto deaktiviert und kann nur vom Administrator wieder aktiviert werden.
- Mindestlänge des Benutzernamens und des Kennworts
- Erforderliche Zeichen im Kennwort
- Warnung vor Ablauf des Kennworts
Der Ablauf des Kennworts wird im Benutzerprofil festgelegt.
- Logout bei Inaktivität
Nach Ablauf der angegebenen Zeit ohne Bewegungen der Maus oder Tastaturschlägen wird die Programmoberfläche gesperrt und das Log-In Fenster eingeblendet. Erst nach Eingabe des Kennworts kann der Benutzer die Oberfläche wieder bedienen. Wenn im Login-Fenster auf den Button geklickt wird, wird das Programm geschlossen. Ein Wechsel des Benutzers ist an dieser Stelle nicht möglich. Bei aktivem qPCR-Lauf erfolgt kein automatisches Logout.

15.2 Benutzerprofile und voreingestellte Benutzergruppen

Die Benutzerverwaltung erfolgt im Fenster **Benutzerprofile** mit der Übersicht der angelegten Benutzerprofile. Wählen Sie dafür den Menüpunkt **Extras | Optionen** und klicken Sie auf dem Tab **Benutzerverwaltung** auf den Button **Bearbeiten**.

Folgende Funktionen stehen Ihnen zur Verfügung:

Funktion	Beschreibung
Hinzufügen	Neues Benutzerprofil anlegen
Bearbeiten	Vorhandenes Benutzerprofil bearbeiten
Entfernen	Ein nicht mehr benötigtes Benutzerprofil löschen

Voreingestellt sind diese Funktionen nur für die Benutzer der Gruppe **Administrator** verfügbar, können aber durch Editieren der Benutzerrechte auch einem **Supervisor** zugewiesen werden.

Benutzerprofil hinzufügen/editieren

- ▶ Neues Benutzerprofil anlegen: Im Fenster **Benutzerprofile** auf den Button **Hinzufügen** klicken.
- ▶ Vorhandenes Benutzerprofil editieren: Das Benutzerprofil in der Liste markieren und auf den Button **Bearbeiten** klicken.
 - ✓ Das Fenster zur Bearbeitung des Benutzerprofils erscheint.
- ▶ Die Daten des Benutzerprofils auf den Tabs **Allgemein** und **Kennwort** editieren.
- ▶ Optional den Zugriff auf weitere Funktionen außerhalb der gewählten Benutzergruppe freischalten.
- ▶ Die Einstellung mit Klick auf **Ok** bestätigen.
 - ✓ Das Benutzerprofil wird im Fenster Benutzerprofile angezeigt.

Daten eines Benutzerprofils

Im Fenster **Benutzerprofil | Allgemein** geben Sie den Nutzernamen ein und wählen die Benutzergruppe.

Option	Beschreibung
Benutzername und Kennwort unterschiedlich	Name für die Anmeldung bei Programmstart
Vollständiger Name	Tatsächlicher Name (optional)
Beschreibung	Weitere Beschreibung (optional)
Benutzergruppe	Benutzergruppe zuweisen
Benutzergruppenzugriff bearbeiten	Die Rechte des Benutzers im Rahmen der Benutzergruppe individuell anpassen

Im Fenster **Benutzerprofil | Kennwort** nehmen Sie Einstellungen zum Kennwort vor und deaktivieren das Benutzerprofil.

Option	Beschreibung
Benutzer kann Kennwort ändern / Kennwort bestätigen	Kennwort eingeben und wiederholen
Benutzer muss Kennwort bei neuer Anmeldung ändern	Wenn aktiviert, muss der Benutzer beim ersten Anmelden sein Kennwort ändern.

Option	Beschreibung
Benutzer kann Kennwort ändern	Dem Benutzer ist es erlaubt, sein eigenes Kennwort zu ändern.
Kennwort läuft nie ab	Kennwort ist ohne Zeitbegrenzung gültig. Wenn deaktiviert, das Ablaufdatum angeben.
Benutzer ist deaktiviert	Das Benutzerprofil wurde automatisch nach mehrmalig fehlgeschlagenen Anmeldeversuchen oder durch einen berechtigten Benutzer gesperrt. Der Zeitpunkt der Sperrung wird angezeigt. Die Anzahl möglicher Anmeldeversuche geben Sie im Fenster Optionen Benutzerverwaltung Einstellungen ein.
Benutzer ist gesperrt	Das Benutzerprofil wurde durch einen berechtigten Benutzer gesperrt. Der Benutzername erscheint nicht mehr im Anmeldedialog, der Benutzer bleibt aber angelegt. Der Zeitpunkt der Deaktivierung wird angezeigt.
Benutzer kann elektronisch signieren	Der Benutzer darf ein Projekt elektronisch signieren. Dieses Recht steht nur zur Verfügung, wenn das Zusatzmodul 21 CFR Part 11 freigeschaltet ist.

Benutzergruppen

In qPCRsoft sind folgende Benutzergruppen implementiert:

Benutzergruppe	Rechte
Administrator	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hat uneingeschränkte Rechte an allen Programmfunktionen ▪ Kann Benutzer anlegen, löschen, sperren und entsperren sowie ihnen Rechte zuweisen ▪ Kann die Benutzerverwaltung im Fenster Extras Optionen Benutzerverwaltung deaktivieren
Supervisor	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hat Rechte wie der Administrator, kann jedoch keine Benutzer anlegen und verwalten ▪ Der Administrator kann für jeden als Supervisor angemeldeten Benutzer bestimmte Rechte sperren.
Operator	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kann ein qPCR-Experiment starten und im Projektfenster Monitoring Ct-Werte und Schmelztemperaturen berechnen <p>Folgende Rechte können einem Operator nicht zugewiesen werden:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Benutzer anlegen und verwalten ▪ Erstellen und Speichern von Vorlagen ▪ Projekte speichern ▪ Änderungen im Projektfenster auf den Tabs Allgemein, Thermocycler, Scan und Layout

Durch die Auswahl Benutzergruppe weisen Sie dem Benutzer automatisch eine bestimmte Benutzerrolle und damit voreingestellte Rechte zu, die Sie zusätzlich mit Hilfe der Funktion **Benutzergruppenzugriff bearbeiten** ergänzen oder reduzieren können. Damit können für jeden Benutzer individuelle Rechte festgelegt werden. Es ist so auch möglich, mehrere Administratoren mit unterschiedlichen Rechten einzurichten.

- ▶ Im Fenster **Benutzerprofil | Allgemein** auf den Button **Benutzergruppenzugriff bearbeiten** klicken.
 - ✓ Das Fenster mit den Rechten des gewählten Benutzers erscheint.

Folgende Rechteeinstellungen sind möglich:

- Wenn eine Checkbox durch ein Häkchen aktiviert ist, ist dieses Recht für den Benutzer erteilt und er kann die Funktion nutzen.
- Checkboxes mit einem Schloss-Symbol können nicht verändert werden.

- Die Anzahl gesperrten Rechte wird durch die Wahl der Benutzergruppe Administrator, Supervisor oder Operator festgelegt und nimmt in dieser Reihenfolge zu. Das heißt, dass ein Operator von Beginn an weniger Rechte besitzt als ein Supervisor oder Administrator und ihm auch niemals alle Rechte eingeräumt werden können.
- Ein Administrator besitzt alle Rechte im Programm, die durch Entfernung der Häkchen nur eingeschränkt werden können. Das Recht zum Verwalten und Anlegen von Benutzern kann ihm nicht gesperrt werden, da sonst kein Benutzermanagement mehr möglich wäre.

15.3 Kennwort ändern

Wenn das Ändern des Passworts im Benutzerprofil erlaubt ist, kann ein Supervisor oder Operator in der Benutzerverwaltung sein Profil öffnen und das Kennwort ändern. Zu weiteren Einstellungen hat er dabei keinen Zugriff.

- ▶ Menüpunkt **Extras | Optionen | Benutzerverwaltung** wählen.
- ▶ Auf den Button **Bearbeiten** klicken.
 - ✓ Das Fenster **Benutzerprofile** erscheint.
- ▶ In der Liste das eigene Benutzerprofil markieren und auf den Button **Bearbeiten** klicken.
- ▶ Im Fenster **Benutzerprofil | Kennwort** das neue Kennwort eingeben und bestätigen.
- ▶ Die Einstellungen mit **Ok** bestätigen und alle Fenster schließen.
 - ✓ Das Kennwort ist geändert.