

Bedienungsanleitung

qPCRsoft auto

Software für Real-Time PCR-Thermocycler



Hersteller Analytik Jena GmbH+Co. KG
Konrad-Zuse-Str.1
07745 Jena · Deutschland
Telefon + 49 3641 77 70
Fax + 49 3641 77 92 79
E-Mail info@analytik-jena.de

Service Analytik Jena GmbH+Co. KG
Konrad-Zuse-Str. 1
07745 Jena · Deutschland
Telefon + 49 3641 77 7407
Fax + 49 3641 77 7449
E-Mail service@analytik-jena.de

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

Ausgabe E (05/2023)
Ausführung der
Technischen
Dokumentation Analytik Jena GmbH+Co. KG

Inhalt

1	Überblick über qPCRsoft auto	7
1.1	Installation von qPCRsoft auto	7
1.2	Starten und Beenden von qPCRsoft auto	9
1.3	Das Hauptfenster von qPCRsoft auto	10
1.3.1	Übersicht der Menübefehle	11
1.3.2	Übersicht der Werkzeuge in der Werkzeugleiste	14
1.3.3	Bestandteile des Projektextplorers	17
1.3.4	Projektoberfläche mit Projektfenster	19
1.3.5	Hilfe	20
1.3.6	Versionsnummer des Programms	20
2	Projekte und Vorlagen verwalten.....	21
2.1	Projekt neu anlegen oder öffnen	22
2.2	Vorlage speichern.....	23
2.3	Projekt speichern	23
2.4	Analysen importieren/exportieren.....	23
2.5	Projektvorlage aus Transfer-Datei erzeugen.....	24
2.6	Multigen-/Multiplatten-Analyse ausführen	24
2.7	Projektfenster schließen	24
2.8	Drucken.....	24
3	Einstellungen für ein Real-Time PCR-Experiment.....	26
3.1	Allgemeine Informationen zum Projekt eingeben	26
3.2	PCR-Protokoll erstellen	27
3.2.1	Eingaben im Programmkopf.....	29
3.2.2	Übersicht qPCR-Protokolltabelle	29
3.2.3	Neuen Temperaturschritt einfügen / Temperaturschritt löschen	30
3.2.4	Zieltemperatur, Haltezeit und Heiz-/Kühlraten eingeben.....	31
3.2.5	Schleifen definieren	31
3.2.6	Inkrement/Dekrement für Temperatur und Haltezeit eingeben	32
3.2.7	Fluoreszenzmessung vereinbaren	32
3.2.8	Schmelzkurve anfügen	33
3.2.9	Graphische Anzeige und Programmierung des PCR-Protokolls	35
3.3	Parameter für Fluoreszenzmessung festlegen	36
3.3.1	Scanbereich manuell festlegen	38
3.3.2	Farbkompensation wählen	39
3.4	Probentabelle bearbeiten	41
3.4.1	Probeneigenschaften im Layout eingeben.....	43
3.4.2	Probeneigenschaften in der Probentabelle eingeben.....	45
3.4.3	Probeneigenschaften im Projektextplorer anzeigen.....	47
3.4.4	Probenlayout für ein Multiplex-Assay eingeben.....	47
3.4.5	Probenlayout für ein Singleplex-Assay eingeben.....	48
3.4.6	Automatische Verdünnungsreihen/Replikate erzeugen.....	50
3.4.7	Gruppen definieren	52
3.4.8	Layout-Vorschau	53
3.4.9	Layout kopieren.....	54
3.4.10	Layout in Excel exportieren oder importieren.....	55
3.4.11	Übersicht der Funktionen zum Erstellen und Editieren eines Plattenlayouts.....	56
4	Monitoring.....	58
4.1	PCR-Protokoll starten	58
4.2	Anzeigeoptionen für das Monitoring	59
4.2.1	Voreinstellung für die Monitoring-Anzeige	60
4.2.2	Anzeige im Projektfenster Monitoring anpassen	61

4.2.3	Messergebnisse für einzelne Wells ein- und ausblenden.....	61
4.3	PCR-Lauf überwachen.....	63
4.4	Produktakkumulationskurven anzeigen und Ct-Werte berechnen.....	64
4.5	Schmelzkurven anzeigen und Schmelztemperatur T_m berechnen.....	66
4.6	Fluoreszenzdaten exportieren	67
5	Auswertung	70
5.1	Allgemeine Funktionen im Projektfenster Auswertung.....	71
5.1.1	Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen	71
5.1.2	Proben für Auswertung aktivieren/deaktivieren.....	73
5.1.3	Fluoreszenzdaten aus einer Auswertung exportieren.....	74
5.1.4	Funktionen in der Ergebnistabelle.....	75
5.1.5	Ergebnisse exportieren	76
5.2	Absolute Quantifizierung	77
5.2.1	Auswertung für eine absolute Quantifizierung neu anlegen	77
5.2.2	Parameter für die absolute Quantifizierung einstellen	78
5.2.3	Fluoreszenzkurven für die absolute Quantifizierung anzeigen.....	80
5.2.4	Durchschnittliche Ct-Werte oder durchschnittliche Konzentrationen anzeigen	81
5.2.5	Standardkurve und Ergebnisse einer absoluten Quantifizierung anzeigen	82
5.2.6	Berechnungsergebnisse exportieren	84
5.2.7	Standardkurve in ein Experiment importieren	85
5.2.8	Auswertung einer absoluten Quantifizierung löschen	86
5.3	Relative Quantifizierung	86
5.3.1	Auswertung für eine relative Quantifizierung neu anlegen.....	86
5.3.2	Parameter für die relative Quantifizierung einstellen.....	87
5.3.3	Fluoreszenzkurven für die relative Quantifizierung anzeigen	89
5.3.4	Normalisierte relative Konzentrationen anzeigen	90
5.3.5	Standardkurven und Ergebnisse einer relativen Quantifizierung anzeigen	90
5.3.6	Standardkurve für die relative Quantifizierung importieren.....	93
5.3.7	Auswertung einer relativen Quantifizierung löschen.....	93
5.4	DeltaDeltaCt-Methode ($\Delta\Delta Ct$ -Methode).....	93
5.4.1	Auswertung für eine $\Delta\Delta Ct$ -Methode neu anlegen	93
5.4.2	Parameter für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode einstellen	94
5.4.3	Fluoreszenzkurven für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode anzeigen.....	96
5.4.4	Normalisierte relative Expression oder relative Quantität anzeigen	97
5.4.5	Berechnungsmodus für die Normierte Expression wählen.....	98
5.4.6	Validierungskurven und Werte anzeigen.....	99
5.4.7	Auswertung einer $\Delta\Delta Ct$ -Methode löschen	102
5.5	Schmelzkurvenanalyse	102
5.5.1	Neue Schmelzkurvenanalyse anlegen	102
5.5.2	Parameter für die Schmelzkurvenanalyse einstellen	103
5.5.3	Fluoreszenzkurven/Schmelzkurven anzeigen	105
5.5.4	Schmelztemperaturen anzeigen	106
5.5.5	Ergebnistabelle für die Schmelzkurven anzeigen.....	107
5.5.6	Schmelzkurvenanalyse löschen.....	108
5.6	Genotypisierung	108
5.6.1	Auswertung für eine Genotypisierung neu anlegen.....	108
5.6.2	Parameter für die Genotypisierung einstellen.....	109
5.6.3	Optionen für die Genotypisierung spezifizieren	111
5.6.4	Fluoreszenzkurven, Scatterplott und Balkendiagramm anzeigen	112
5.6.5	Werte zur Genotypisierung anzeigen	114
5.6.6	Genotypisierung löschen	116
5.7	POS/NEG-Analyse im Endpunkt	116
5.7.1	Endpunktanalyse starten	117
5.7.2	Parameter für die Endpunktanalyse einstellen	118
5.7.3	Ergebnis in der Endpunktanalyse anzeigen.....	119

6	Multigen-/Multiplatten-Analyse	123
6.1	Multigen-/Multiplatten-Analyse starten	123
6.2	Das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse.....	123
6.3	Übersicht der Menübefehle	124
6.4	Übersicht der Werkzeuge in der Werkzeugleiste	125
6.5	Hilfefunktion	125
6.6	Dateiverwaltung Multigen-/Multiplatten-Analyse.....	125
6.6.1	Neue Multigen-/Multiplatten-Analyse anlegen	125
6.6.2	Gespeicherte Multigen-/Multiplatten-Analyse öffnen.....	125
6.6.3	Multigen-/Multiplatten-Analyse speichern	126
6.6.4	Multigen-/Multiplatten-Analyse schließen	126
6.6.5	Multigen-/Multiplatten-Analyse drucken	126
6.7	Projektdateien laden	126
6.8	Projektdateien für Multigen-/Multiplatten-Analyse aktivieren/deaktivieren	127
6.9	Proben für Multigen-/Multiplatten-Analyse aktivieren/deaktivieren	127
6.10	Interplatten-Standards für Multigen-/Multiplatten-Analyse definieren	129
6.11	Threshold und PCR-Effizienzen für Multigen-/Multiplatten-Analyse festlegen	129
6.12	Auswertung Multigen-/Multiplatten-Analyse	132
6.12.1	Parametereinstellung für die Multigen-/Multiplatten-Analyse	132
6.12.2	Ergebnisanzeige der Multigen-/Multiplatten-Analyse.....	133
7	MIQE-Dokumentation	138
8	Funktionen im Menü Extras	140
8.1	Gerät initialisieren.....	140
8.2	Farbmodule bearbeiten	140
8.3	Gerät mit PC verbinden.....	141
8.4	Allgemeine Einstellungen im Programm qPCRsoft auto	141
9	Benutzerverwaltung	147
9.1	Grundlegende Einstellungen für Kennwort, Anmeldung und Logout	147
9.2	Benutzerprofile verwalten / Benutzergruppen	148
9.3	Kennwort ändern	152
10	Optionales Modul 21 CFR Part 11.....	153
10.1	Freischaltung.....	153
10.2	Audit Trail.....	155
10.3	Login-Überwachung.....	156
10.4	Digitale Signaturen	157
10.4.1	Ein Dokument signieren.....	157
10.4.2	Signaturen anzeigen	158
11	Anhang A - Kurzanleitung.....	160
12	Anhang B - Kommunikationsdaten aufzeichnen.....	166
13	Anhang C – Projektvorlage aus Transfer-Datei erzeugen (LIMS)	167
14	Anhang D – Einträge im Audit Trail	168
15	Anhang E – Verfügbare Farbmodule und detektierbare Farbstoffe.....	179

1 Überblick über qPCRsoft auto

Mit der qPCRsoft auto Software lassen sich PCR- und Real-Time PCR-Experimente erstellen und durchführen. Dieses Kapitel beschreibt den grundsätzlichen Aufbau und die Anordnung der Bedienelemente der Software.

Einen schnellen Einstieg in die Bedienung von qPCRsoft auto bietet die Kurzanleitung (→ Abschnitt "Anhang A - Kurzanleitung" S. 160).

Beschriebene Software-Version

Die vorliegende Beschreibung orientiert sich an der Version qPCRsoft auto 1.2.

Unterstützte Geräte

Das Programm unterstützt die Gerätesteuerung und Datenauswertung folgender Geräte:

- qTOWER³ auto
- qTOWER³ 84 auto

Wird der Real-Time PCR-Cycler in einer automatisierten Anlage verwendet, dann steuert die Anlagensoftware die Durchführung der Real-Time PCR-Experimente. In diesem Fall wird qPCRsoft auto für die Auswertung und Analyse der Experimente verwendet. Die Schnittstellen für die Anlagensoftware und den Hardware-Anschluss legen Sie im Fenster **Optionen / Automatisierung** fest. Mit einem PC können bis zu 4 Geräte gleichzeitig mit qPCRsoft auto gesteuert werden. Für jedes Gerät wird dabei eine eigene Programminstanz von qPCRsoft auto verwendet.

Wenn der Real-Time PCR-Thermocycler als Stand-alone Gerät verwendet und über einem PC gesteuert wird, werden das qPCR-Protokoll und der qPCR-Lauf direkt mit qPCRsoft auto definiert und gestartet.

Hinweis: Diese Anleitung enthält Abbildungen mit Layouts von Mikrotiterplatten mit 96 Wells des qTOWER³ auto. Beim qTOWER³ 84 auto werden die Layouts entsprechend auf 384 Wells erweitert, alle anderen Funktionalitäten der Software sind gleich.

1.1 Installation von qPCRsoft auto

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

Sie können bis zu 4 Real-Time PCR-Thermocycler von einem PC aus steuern. Für jedes Gerät muss eine Programminstanz von qPCRsoft auto installiert werden. Während der Installation konfigurieren Sie jede Programminstanz für ein bestimmtes Gerät. Die Konfiguration einer Instanz können Sie nachträglich in der qPCRsoft.ini-Datei editieren.

Systemanforderungen für die Installation

Für die Verwendung von qPCRsoft auto 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	mindestens 300 MB

Schnittstellen USB 2.0

Installationsvorgang

qPCRsoft auto wird auf CD geliefert.

1. Legen Sie die CD in das Laufwerk ein. Im Normalfall wird jetzt das Eingangsfenster der Installation automatisch geöffnet.
Anderenfalls starten Sie die Datei "setup.exe" auf der CD.
Es öffnet sich ein Auswahldialog zur Installation der Gerätetreiber bzw. zur Ansicht der PDF-Dateien der Handbücher.
2. Aktivieren Sie Ihre Sprachversion.
3. Klicken Sie auf **[Installieren]**.
Es beginnt die Installationsroutine.
4. Folgen Sie den weiteren Anweisungen des Installationsprogramms. Geben Sie während der Installation die Seriennummer des Gerätes entsprechend dem Typenschild ein.
5. Schalten Sie das Gerät am Netzschalter ein. Starten Sie qPCRsoft auto.
 - ✓ Die Programminstanz für das Gerät ist installiert. Auf dem Desktop wird das Start-Icon von qPCRsoft auto mit der Seriennummer des Gerätes angezeigt.

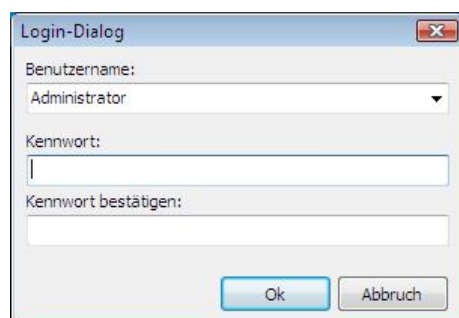
Hinweis

Die Software 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

Nach der Programminstallation **muss** ein Administrator-Passwort vergeben und damit ein Administrator festgelegt werden.

1. Starten Sie das Programm qPCRsoft auto.
2. Legen Sie im Fenster **Login** das Administrator-Passwort fest.



3. Richten Sie die Benutzerkonten ein.
Wird die Benutzerverwaltung nicht gewünscht, deaktivieren Sie diese unter **Extras ▶ Optionen** auf der Karte **Benutzerverwaltung**.

qPCRsoft.ini-Datei editieren

Um die Konfiguration einer Programminstanz von qPCRsoft auto nachträglich an ein Gerät anzupassen, müssen Sie die Datei qPCRsoft.ini in der Installation der Programminstanz ändern.

Suchen Sie die Datei qPCRsoft.ini in der betreffend Installation und öffnen Sie die Datei mit einem Texteditor. Folgende Parameter können Sie editieren:

Parameter	Wert / Bedeutung	
Mode	Single	Es ist nur eine Programminstanz auf dem PC installiert, d.h. nur ein Thermocycler ist mit dem PC verbunden.
	Multi	Mehrere Thermocycler werden von einem PC mit jeweils einer eigenen Programminstanz gesteuert.
Connection	USB	Der Thermocycler ist über die USB-Schnittstelle mit dem PC verbunden.
	TCP	Der Thermocycler ist über Ethernet verbunden.
ID	Seriennummer des Thermocyclers	
IP	IP-Adresse Power-Modul (nur relevant bei TCP/Ethernet)	

1.2 Starten und Beenden von qPCRsoft auto

- Starten von qPCRsoft auto
1. Schalten Sie das Gerät ein.
 2. Zum Starten von qPCRsoft auto für ein ausgewähltes Gerät klicken Sie auf das qPCRsoft auto Desktop-Icon mit der Seriennummer des Gerätes.
 - ✓ Die Oberfläche von qPCRsoft auto wird angezeigt.

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

Hinweis:



Beim ersten Programmstart muss ein Administrator mit Passwort festgelegt werden. Nur der Administrator kann die weiteren Benutzerkonten einrichten und editieren oder die Benutzerverwaltung für die weitere Verwendung deaktivieren.

Hinweis:

Beim ersten Programmstart müssen die im Gerät installierten Farbmodule angemeldet werden (→ Abschnitt "Farbmodule bearbeiten" S. 140). Die Liste der verfügbaren Farbmodule finden Sie auf der Analytik Jena Webseite <https://www.analytik-jena.com> und im Anhang dieser Bedienungsanleitung (→ Abschnitt "Anhang E – Verfügbare Farbmodule" S. 179).

Automatisierung aktivieren

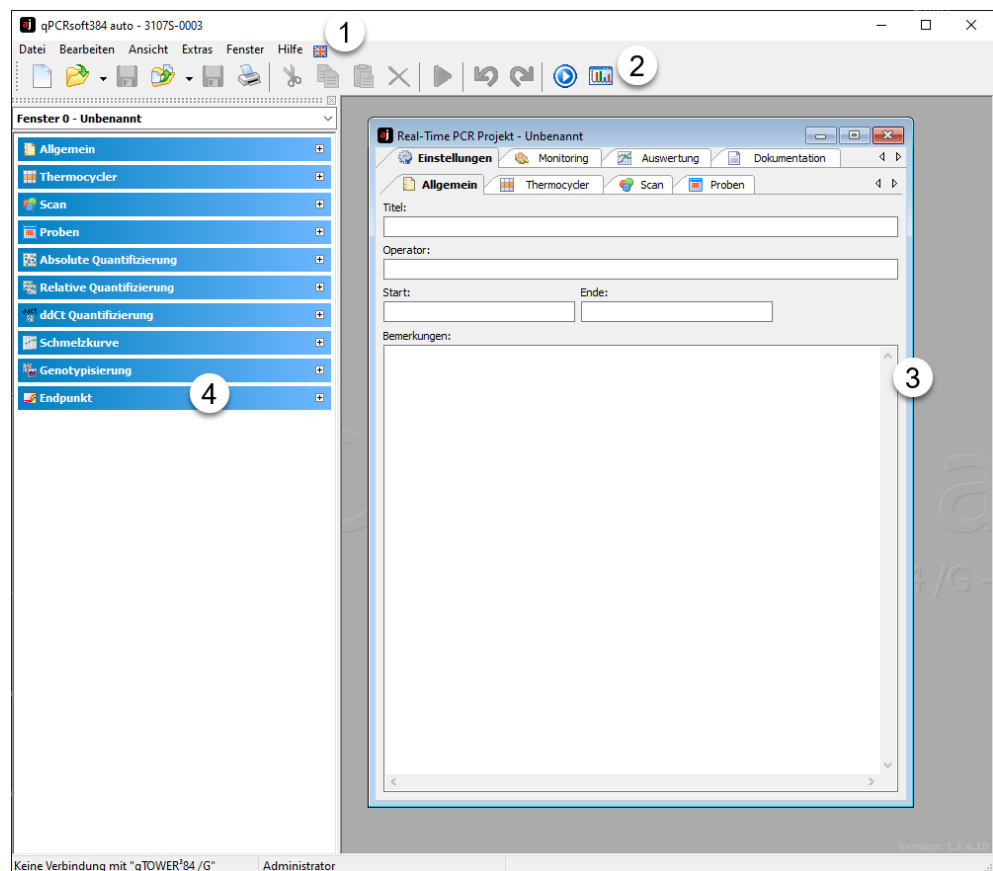
Mit der Aktivierung der Automatisierung verbinden Sie den Thermocycler mit der Anlage und lassen ihn über die Anlagensoftware steuern.

- Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste.
 - ✓ Das Gerät wird mit der Anlage verbunden und automatisch gesteuert.
- Alternativ können Sie beim Start von qPCRsoft auto die Automatisierung starten. Aktivieren Sie dafür im Fenster **Optionen / Automatisierung** die Option **Automatisierung bei Software-Start aktivieren** (→ "Allgemeine Einstellungen im Programm" S. 141).
- Um das Gerät wieder mit qPCRsoft auto zu steuern, klicken Sie auf .

Beenden von qPCRsoft auto

1. Beenden Sie das Programm qPCRsoft auto, indem Sie den Menübefehl **Datei ▶ Beenden** aufrufen.
2. Sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht gespeicherte Projekte geöffnet, erscheint ein Programmhinweis.
3. Klicken Sie auf **[Ja]**, wenn Sie die Projekte speichern wollen. Speichern Sie die Projekte im Standardfenster **Speichern unter**.
4. Beenden Sie qPCRsoft auto, indem Sie noch einmal den Menübefehl **Datei ▶ Beenden** aufrufen.

1.3 Das Hauptfenster von qPCRsoft auto



Hauptfenster von qPCRsoft auto

Nach Start von qPCRsoft auto öffnet sich das Hauptfenster mit folgenden Bereichen:

Menüleiste (1)	Die Menüleiste enthält die Menübefehle zum Beispiel zum Öffnen, Bearbeiten und Speichern von Projekten, zur Verwaltung von Benutzerprofilen, zur Einstellung von grundsätzlichen Softwareoptionen und die Hilfefunktion.
Werkzeugleiste (2)	In der Werkzeugleiste sind Befehle zum Bearbeiten von Projekten angeordnet. Die in der Werkzeugleiste angebotenen Befehle ändern sich teilweise je nach Kontext.

Projektexplorer (3)	Im Projektexplorer geben aufklappbare Menüpunkte eine schnelle Übersicht der wichtigsten Informationen zum jeweils geöffneten Projekt.
Projektoberfläche (4)	In der Projektoberfläche werden Projekte bearbeitet. Sobald ein neues Projekt angelegt oder ein bestehendes Projekt geladen wird, öffnet sich ein Fenster, in dem alle für das Projekt relevanten Einstellungen vorgenommen werden können.

1.3.1 Übersicht der Menübefehle

Die Menüleiste ist kontextsensitiv und wird den Programmaufgaben angepasst. Für die aktuelle Anzeige der Arbeitsoberfläche nicht erforderliche Menüpunkte werden automatisch ausgeblendet. In qPCRsoft auto stehen folgende Menübefehle zur Verfügung:

Statischer Teil		
Menü	Funktion	Beschreibung
Datei	Neu	Öffnet ein neues Projekt.
	Vorlage öffnen	Öffnet eine Vorlage.
	Projekt öffnen	Öffnet ein Projekt.
	Autom. gespeichertes Projekt öffnen	Öffnet ein automatisch zwischengespeichertes Projekt.
	Vorlage speichern	Speichert eine Vorlagendatei im qPCRsoft auto Standard-Ordner.
	Vorlage speichern unter	Speichert eine Vorlagendatei in einem beliebigen, frei wählbaren Ordner.
	Projekt speichern	Speichert eine Projektdatei im qPCRsoft auto Standard-Ordner.
	Projekt speichern unter	Speichert eine Projektdatei in einem beliebigen, frei wählbaren Ordner.
	Analysen importieren	Öffnet eine Analysendatei.
	Analysen exportieren	Speichert eine Analysendatei.
	Import LIMS	Liest eine Transfer-Datei ein, mit welcher die Software von einem anderen Programm, z.B. LIMS, konfiguriert werden kann.
	MultiGene	Startet die Auswertung Multi Gene zur Analyse von Experimenten, die mehrere PCR-Platten und mehrere Gene umfassen.
	Schließen	Schließt eine Vorlage oder ein Projekt.
Alle schließen	Schließt alle geöffneten Projekte oder Vorlagen.	
Drucken	Druckt ein Projekt oder eine Vorlage.	
Beenden	Schließt die Software.	
Bearbeiten	Rückgängig	Macht die letzte ausgeführte Textänderung rückgängig (bis zu 10 Schritte).

	Wiederholen	Stellt die letzte gelöschte Textänderung wieder her (bis zu 10 Schritte).
	Ausschneiden	Schneidet einen markierten Textbereich aus.
	Kopieren	Kopiert einen aktiven bzw. markierten Textbereich in die Zwischenablage.
	Einfügen	Fügt einen in die Zwischenablage kopierten Text ein.
	Löschen	Löscht einen aktiven bzw. markierten Textbereich.
	Alles markieren	Markiert einen kompletten Textbereich.
	Benutzerverwaltung	Öffnet das Fenster zum Erstellen von Benutzerprofilen. (Nur verfügbar, wenn die Benutzerverwaltung aktiviert ist.)
Ansicht	Projektexplorer	Schaltet die Ansicht des Projektexplorers im Hauptfenster an oder aus.
	Toolbar	Schaltet die Ansicht der Werkzeugleiste im Hauptfenster an oder aus.
Scan	Farbkompensation bearbeiten	Öffnet das Fenster zum Erstellen von Dateien zur spektralen Farbkompensation.
Extras	Geräteinitialisierung	Setzt das angeschlossene Gerät in den Ausgangszustand zurück.
	Geräteidentifikation	Angeschlossenes Gerät ermitteln.
	Farbmodule bearbeiten	Öffnet das Fenster zur Konfiguration des Systems mit Farbfiltermodulen.
	Transportsicherung	Bereitet das Gerät für den Transport vor.
	Optionen	Öffnet das Fenster, in dem allgemeine Grundeinstellungen der Software vorgenommen werden.
Fenster	Horizontal anordnen	Projektfenster nebeneinander anordnen.
	Vertikal anordnen	Projektfenster untereinander anordnen.
	Überlappend	Projektfenster versetzt hintereinander anordnen.
Hilfe	Inhalt	Öffnet die Hilfe.
	Info	Zeigt Informationen zur Software an.

Variabler Teil

Menüpunkt	Befehl	Funktion
Cycler	Leeren Schritt einfügen	Einen neuen Schritt in das qPCR-Protokoll einfügen.
	Schritt löschen	Einen Schritt einfügen.
	Schritt ausschneiden	Einen Schritt ausschneiden und in die Zwischenablage kopieren.





	Schritt kopieren	Die Parameter in einem Schritt in die Zwischenablage kopieren.
	Schritt einfügen	Kopierten Schritt einfügen.
Scan	Farbkompensation bearbeiten	Das Fenster zum Erstellen von Dateien zur spektralen Farbkompensation öffnen.
Proben	Layout bearbeiten	Probentabelle bearbeiten.
	Layout kopieren	Bereich der Probentabelle kopieren.
	Layout einfügen	Kopierten Bereich der Probentabelle einfügen.
	Layoutvorschau	Detailansicht der Plattenbelegung öffnen.
Monitoring	Start qPCR-Lauf	PCR-Lauf starten.
	Stop qPCR-Lauf	PCR-Lauf beenden.
	Pause qPCR-Lauf	PCR-Lauf unterbrechen.
	Anzeigeoptionen	Darstellungsoptionen der Produkt-Akkumulationskurven anpassen.
	Qbase export	Messwerte als CSV-oder XLS-Datei im qBase-Format (verfügbar nach Ct-Berechnungen) exportieren.
AbsQuant	Abs. Quantifizierung hinzufügen	Neue Auswertung anlegen.
	Abs. Quantifizierung entfernen	Auswertung löschen.
	Optionen Abs. Quantifizierung	Grundeinstellungen zur Auswertung festlegen.
	Automatischer Threshold	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten
	Standardkurve importieren	Gespeicherte Standardkurve importieren.
	Qbase export	Messwerte als CSV-oder XLS-Datei im qBase-Format exportieren.
RelQuant	Rel. Quantifizierung hinzufügen	Neue Auswertung anlegen.
	Rel. Quantifizierung entfernen	Auswertung löschen.
	Optionen Rel. Quantifizierung	Grundeinstellungen zur Auswertung festlegen.
	Automatischer Threshold	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten.
	Standardkurve importieren	Gespeicherte Standardkurve importieren.
DeltaDeltaCt	ddCt Quantifizierung hinzufügen	Neue Auswertung anlegen.
	ddCt Quantifizierung entfernen	Auswertung löschen.


	Optionen ddCt Quantifizierung	Grundeinstellungen zur Auswertung festlegen.
	Automatischer Threshold	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten.
Schmelzkurve	Schmelzkurve hinzufügen	Neue Auswertung anlegen.
	Schmelzkurve entfernen	Auswertung löschen.
	Optionen Schmelzkurve	Grundeinstellungen zur Auswertung festlegen.
	Automatischer Threshold	Threshold automatisch bestimmen.
Genotypisierung	Genotypisierung hinzufügen	Neue Auswertung anlegen.
	Genotypisierung entfernen	Auswertung löschen.
	Optionen Genotypisierung	Grundeinstellungen zur Auswertung festlegen.
	Automatischer Threshold/cut off	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten.
Endpunkt	Endpunkt hinzufügen	Neue Auswertung anlegen.
	Endpunkt entfernen	Auswertung löschen.
	Optionen Endpunkt	Grundeinstellungen zur Auswertung festlegen.
	Auto Threshold/cut off	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Entscheidung POS/NEG
MIQE	MIQE Dokumentation importieren	MIQE- Informationen aus einem anderen Projekt importieren.




















1.3.2 Übersicht der Werkzeuge in der Werkzeugleiste

















Die in der Werkzeugleiste angeordneten Schaltflächen sind zumeist kontextsensitiv. Die Werkzeugleiste wird vom Programm automatisch an den Fensterinhalt angepasst und um Schaltflächen erweitert, wenn diese für die aktuelle Ansicht des Projektfensters notwendig sind. Schaltflächen, die für den aktuellen Inhalt der Arbeitsoberfläche nicht zugänglich sind, werden ausgeblendet.

Sie können die Werkzeugleiste mit dem Menübefehl **Ansicht ▶ Toolbar** ein- und ausblenden.

Schaltfläche	Befehl	Funktion
	Neu	Öffnet ein neues Projekt.
	Vorlage öffnen	Öffnet eine Vorlage.
	Vorlage speichern	Speichert eine Vorlage.
	Projekt öffnen	Öffnet ein Projekt.

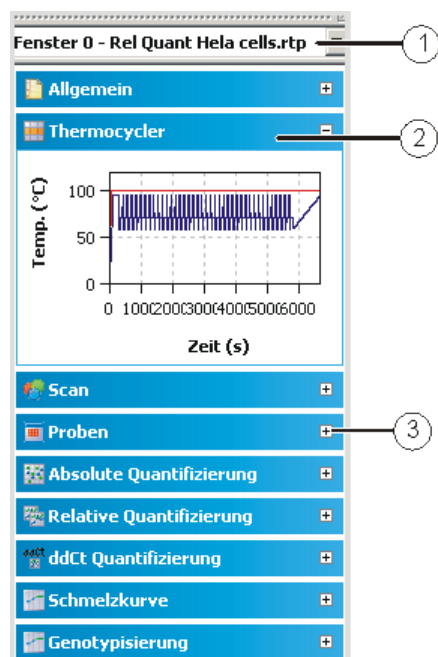
	Projekt speichern	Speichert ein Projekt.
	Projekt drucken	Druckt ein Projekt.
	Rückgängig	Macht die letzte ausgeführte Änderung rückgängig.
	Wiederholen	Stellt die letzte gelöschte Änderung wieder her.
	Ausschneiden	Schneidet einen markierten Bereich aus.
	Kopieren	Kopiert einen aktiven bzw. markierten Bereich.
	Einfügen	Fügt einen in die Zwischenablage kopierten Bereich ein.
	Löschen	Löscht einen aktiven bzw. markierten Bereich.
	MultiGene	Startet die MultiGene- und Multi-Platten-Analyse.
	Start PCR-Protokoll	Startet den PCR-Lauf.
	Englisch	Schaltet zur englischen Sprachversion der Software um.
Thermocycler		
	Schritt einfügen	Fügt einen neuen Schritt ein.
	Schritt löschen	Schritt löschen.
	Schritt ausschneiden	Schneidet einen Schritt aus und kopiert ihn in die Zwischenablage.
	Schritt kopieren	Kopiert die Parameter in einem Schritt in die Zwischenablage.
	Schritt einfügen	Fügt einen kopierten Schritt ein.
Scan		
	Farbkompensation bearbeiten	Öffnet das Fenster zum Erstellen von Dateien zur spektralen Farbkompensation.
Proben		
	Layout bearbeiten	Weist vorgenommene Änderungen der Probentabelle zu.
	Layout kopieren	Kopiert einen Bereich der Probentabelle.
	Layout einfügen	Fügt einen kopierten Bereich der Probentabelle ein.
	Layoutvorschau	Zeigt eine Komplettansicht der Plattenbelegung an.
MIQE		

	MIQE Dokumentation importierten	Importiert MIQE- Informationen aus einem anderen Projekt.
Monitoring		
	Start PCR-Protokoll	Startet den PCR-Lauf.
	Stopp PCR-Protokoll	Beendet den PCR-Lauf.
	Pause PCR-Protokoll	Unterbricht den PCR-Lauf.
		Probenhalter aus dem Gerät herausfahren.
		Probenhalter in das Gerät fahren.
	Optionen	Darstellungsoptionen der Produkt-Akkumulationskurven
	qBase Export	Exportiert Messwerte als CSV- oder XLS-Datei im qBase-Format.
Auswertung/Absolute Quantifizierung		
	Neu	Neue Auswertung anlegen
	Löschen	Auswertung löschen
	Optionen	Öffnet Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung.
	Automatischer Threshold	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten
	Standardkurve importieren	Importiert eine gespeicherte Standardkurve.
	qBase Export	Exportiert Messwerte als CSV- oder XLS-Datei im qBase-Format.
Auswertung/Relative Quantifizierung		
	Neu	Legt eine neue Auswertung an.
	Löschen	Löscht eine Auswertung.
	Optionen	Öffnet Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung.
	Automatischer Threshold	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten
	Standardkurve importieren	Importiert eine gespeicherte Standardkurve.
Auswertung/$\Delta\Delta$Ct-Analyse		
	Neu	Legt eine neue Auswertung an.
	Löschen	Löscht eine Auswertung.

	Optionen	Öffnet Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung.
	Automatischer Threshold	Automatische Bestimmung des Thresholds der Fluoreszenz zur Ermittlung von Ct-Werten
Auswertung/Schmelzkurve		
	Neu	Legt eine neue Auswertung an.
	Löschen	Löscht die aktuelle Auswertung.
	Optionen	Öffnet Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung
	Threshold	Bestimmt automatisch den Threshold.
Auswertung/Genotypisierung		
	Neu	Neue Auswertung anlegen.
	Löschen	Auswertung löschen.
	Optionen	Öffnet Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung.
	Threshold	Bestimmt automatisch den Threshold.
Auswertung/Endpunkt		
	Neu	Neue Auswertung anlegen.
	Löschen	Auswertung löschen.
	Optionen	Öffnet Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung.
	Threshold/Cut off	Automatische Bestimmung des Schwellenwerts der Fluoreszenz zur Entscheidung POS/NEG
Automatisierung		
	Gerät mit der Anlage verbinden (Steuerung über die Anlagen-Software)	
	Gerät von Anlage trennen (Steuerung über qPCRsoft auto)	

1.3.3 Bestandteile des Projektexplorers

Der Projektexplorer bietet über verschiedene Menüs (2) eine schnelle Übersicht des aktuell bearbeiteten Projekts. Einzelne Projekte können über eine Auswahlliste (1) angewählt werden. Die zu den einzelnen Menüs angezeigten Informationen lassen sich mit den Schaltflächen **[+]** und **[-]** (3) ein- oder ausblenden.



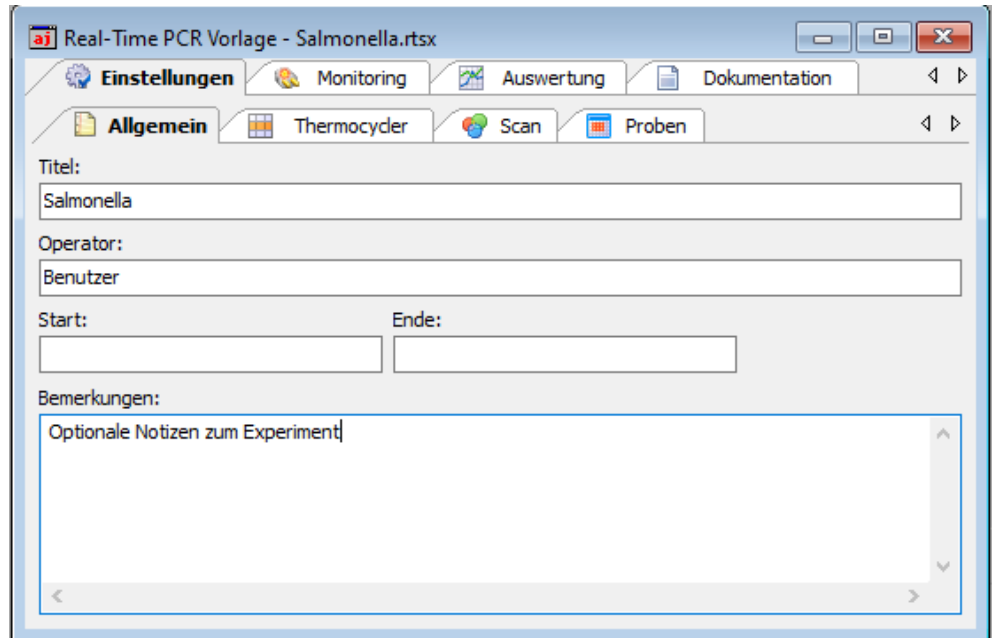
Organisation des Projektexplorers

Menüpunkt	Informationen
Allgemein	Projekttitle, Benutzer, Datum, Uhrzeit und Gerät
Thermocycler	Graphische Anzeige des Verlaufs des PCR-Programms im aktiven Projekt
Scan	Übersicht, welche Farben und welcher Bereich der PCR-Platte gescannt wird.
Proben	Zeigt eine Kurzinfo zum Plattenlayout an. Dient der De(-Aktivierung) der Anzeige der Proben während der Messung und der De(-Aktivierung) der Proben für die Auswertung (→ Abschnitt "Anzeigeoptionen für das Monitoring" S. 59 und "Proben für Auswertung aktivieren/deaktivieren" S. 73). Im Bearbeitungsmodus zum Plattenlayout werden detaillierte Informationen zum angewählten Well gezeigt.
Absolute Quantifizierung	Graphische Anzeige Ct gegen Log Konzentration
Relative Quantifizierung	Graphische Anzeige Ct gegen Log Konzentration
DeltaDeltaCt	Graphische Anzeige dCt(V) gegen Log Konzentration
Schmelzkurve	Graphische Anzeige Schmelzkurve gegen Temperatur
Genotypisierung	Graphische Anzeige dRn-Genotyp-1 gegen dRn-Genotyp-2 als Scatter-Plot oder Balkendiagramm
Endpunkt	Anzeige der Endpunktfloreszenzen als Balkendiagramm für das GOI und die IPC

Sie können den Projektexplorer mit dem Menübefehl **Ansicht ▶ Projektexplorer** ein – und ausblenden.

1.3.4 Projektoberfläche mit 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.



Ansicht eines Projektfensters

Im Projektfenster werden alle Parameter, Messdaten und Auswertungen für eine PCR-Platte gebündelt. Auf den vier oberen Hauptkarten sind die grundlegenden Funktionen angeordnet:

Karte	Funktion
Einstellungen	Enthält alle Funktionen, die für Definition von Real-Time PCR-Läufen notwendig sind.
Monitoring	Enthält verschiedene Werkzeuge zur Überwachung von Real-Time PCR-Läufen.
Auswertung	Umfasst die in die Software implementierten Auswertungsalgorithmen zur Analyse gewonnener Daten.
Dokumentation	Ruft die Eingabemaske zur MIQE-konformen Dokumentation von real-time PCR Experimenten auf.

Diese vier Karten werden ständig angezeigt. In Abhängigkeit von der Auswahl einer Funktionskarte ändert sich das Aussehen des Projektfensters. Um ein Ansicht zu bezeichnen, auf die sich Beschreibungen beziehen, werden die Registerkarten und Listenblätter in der Reihenfolge ihrer Aktivierung aufgeführt und mit einem Schrägstrich getrennt, z.B. Projektfenster **Einstellungen / Thermocycler / Tabelle**.

1.3.5 Hilfe

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

Während der Arbeit in den Projektfenstern können Sie mit der Funktionstaste [F1] den Hilfetext aufrufen.

Das Programm blendet Kurzinformationen zu den Schaltflächen der Symbolleiste ein, wenn Sie den Mauszeiger auf eine Schaltfläche bewegen.

1.3.6 Versionsnummer des Programms

Mit dem Menübefehl **Hilfe ▶ Info** öffnen Sie das Fenster mit Informationen zur Versionsnummer des Programms.

2 Projekte und Vorlagen verwalten

Das Programm qPCRsoft auto speichert alle Experimente in **Projektdateien**. Ein Projekt enthält verschiedene Informationen, die zur Durchführung eines Real-Time PCR-Experiments notwendig sind:

- Beschreibung des Experiments
- PCR-Protokoll
- Scaneinstellungen des optischen Systems
- Plattenbelegung mit detaillierten Informationen zu jeder Probe
- Messergebnisse und entsprechende Auswertungen nach der Durchführung eines Experiments

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

Folgende Dateierweiterungen werden im Programm verwendet:

Erweiterungen für Geräte mit 96er Mikroplattenlayout

Erweiterung	Dateityp	Beschreibung
*.rtpx	real time project file	Projektdatei mit Einstellungen zum PCR-Lauf, Auswertung und Messergebnissen
*.rtsx	real time settings file	Vorlagen mit Einstellungen des PCR-Laufs und der Auswertung
*.mgax	real time multigen analysis file	Multigen- bzw. Multiplatten-Analyse
*.rta	real time analysis file	Exportierte/importierte Analysenparameter eines Projektes

Erweiterungen für Geräte mit 384er Mikroplattenlayout

Erweiterung	Dateityp	Beschreibung
*.rtpx384	real time project file	Projektdatei mit Einstellungen zum PCR-Lauf, Auswertung und Messergebnissen
*.rtsx384	real time settings file	Vorlagen mit Einstellungen des PCR-Laufs und der Auswertung
*.mgax384	real time multigen analysis file	Multigen- bzw. Multiplatten-Analyse
*.rta	real time analysis file	Exportierte/importierte Analysenparameter eines Projektes

2.1 Projekt neu anlegen oder öffnen

Ein Projekt wird jeweils in einem Projektfenster im Bereich der Projektoberfläche des Hauptfensters angezeigt.


Neues Projekt anlegen

Um ein Projekt neu anzulegen, klicken Sie auf  oder rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Neu** auf.

Ein neues Projekt mit Standardvoreinstellungen wird im Projektfenster angelegt.


Neues Projekt auf Grundlage einer Vorlage anlegen

Ein neues Projekt kann mit gespeicherten Voreinstellungen (Vorlage) geöffnet werden:

1. Klicken Sie auf  oder rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Vorlage öffnen** auf.
2. Wählen Sie im Standardfenster zum Öffnen von Dateien die gesuchte Vorlage und bestätigen Sie die Auswahl mit **[OK]**.

Ein neues Projekt mit den Parametereinstellungen der Vorlage wird im Projektfenster angelegt.

Gespeichertes Projekt öffnen

1. Klicken Sie auf  oder rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Projekt öffnen** auf.
2. Wählen Sie im Standardfenster zum Öffnen von Dateien das gespeicherte Projekt und bestätigen Sie die Auswahl mit **[OK]**.

Das Projekt mit den Parametereinstellungen, Messergebnissen und Auswertungen wird im Projektfenster angelegt.

Automatisch gespeichertes Projekt öffnen

qPCRsoft auto ermöglicht die automatische Speicherung des zuletzt ausgeführten Real-Time PCR-Laufes in einen Ordner Ihrer Wahl und vermeidet dadurch Datenverlust durch unvorhergesehene Abbrüche eines PCR-Laufes.

1. Stellen Sie die abgebrochene Messung mit dem Menübefehl **Datei ▶ Automatisch gespeichertes Projekt öffnen** wieder her.
2. Speichern Sie die Datei bei Bedarf unter einem anderen Namen als Projektdatei.

Den Ordner zur Speicherung der Datei können Sie wie folgt ändern:

1. Rufen Sie mit **Extras ▶ Optionen** das gleichnamige Fenster auf.
2. Wechseln Sie auf die Karte **Allgemein**.
3. Klicken Sie auf die Schaltfläche [...] und wählen Sie einen Speicherort aus

Mit Hilfe der Option **Autom. Speicherung** kann die automatische Speicherung ein- und ausgeschaltet werden.

Ansicht der Projekte

Es können mehrere Projekte gleichzeitig geöffnet werden. Jedes wird dabei in einem eigenen Projektfenster dargestellt. Mit den Befehlen des Menüs **Fenster** können Sie die Projektfenster anordnen:


Befehl	Beschreibung
Horizontal anordnen	Die Projektfenster untereinander anzeigen. Je nach Anzahl werden diese ab 4 Projektfenstern in zwei Spalten zusätzlich noch nebeneinander angeordnet.
Vertikal anordnen	Die Projektfenster nebeneinander anzeigen. Ab 4 Projektfenstern erfolgt zusätzlich noch eine Aufteilung in zwei Spalten.
Überlappend	Die Projektfenster hintereinander versetzt anzeigen.

Nur im jeweils aktiven Fenster können Änderungen vorgenommen werden.

2.2 Vorlage speichern

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


1. Rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Vorlage speichern unter** auf.
2. Geben Sie im Standardfenster zum Speichern von Dateien den Namen der Vorlage ein und speichern Sie die Vorlage mit **[OK]**.

Die Änderungen in einer Vorlage speichern Sie mit dem Menübefehl **Datei ▶ Vorlage speichern**. Alternativ klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.

2.3 Projekt speichern

Das Projekt speichern Sie mit allen Parametern des PCR-Laufs, den Fluoreszenzkurven und Auswertungen.

1. Rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Projekt speichern unter** auf.
2. Geben Sie im Standardfenster zum Speichern von Dateien den Namen der Vorlage ein und speichern Sie die Vorlage mit **[OK]**.

Die Änderungen im Projekt speichern Sie mit dem Menübefehl **Datei ▶ Projekt speichern**. Alternativ klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.

Im Fenster **Optionen / Allgemein** (Menübefehl **Extras ▶ Optionen**) können Sie das automatische Speichern von Dateien und weitere Optionen für das Speichern vereinbaren (→ "Allgemeine Einstellungen im Programm" S. 141).

2.4 Analysen importieren/exportieren

Einstellungen für die Auswertungen der Daten eines Projekts können gespeichert (exportiert) werden, um sie später in ein geöffnetes Projekt zu übertragen (importieren). Durch den Import werden die Auswertungen auf das geöffnete Projekt angewendet.

1. Rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Analyse exportieren** auf.
2. Geben Sie im Standardfenster zum Speichern von Dateien den Namen der Analyse ein und speichern Sie die Daten mit **[OK]**.

1. Rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Analyse importieren** auf.
2. Wählen Sie im Standardfenster zum Öffnen von Dateien den Namen der Analyse ein und importieren Sie die Analyse in das aktuelle Projekt mit **[OK]**.

2.5 Projektvorlage aus Transfer-Datei erzeugen

Über den Menübefehl **Datei ▶ Import LIMS** wird aus einer Transfer-Datei eine Projektvorlage erzeugt, mit der ein PCR-Lauf gestartet werden kann (→ Abschnitt "Anhang C – Projektvorlage aus Transfer-Datei erzeugen" S.167).

2.6 Multigen-/Multiplatten-Analyse ausführen



Über den Menübefehl **Datei ▶ MultiGene** wird die Auswertung von Experimenten, für die mehrere PCR-Läufe benötigt wurden und die eine Vielzahl von Genen umfassen, ermöglicht (→ Abschnitt "Multigen-/Multiplatten-Analyse" S. 123).

2.7 Projektfenster schließen

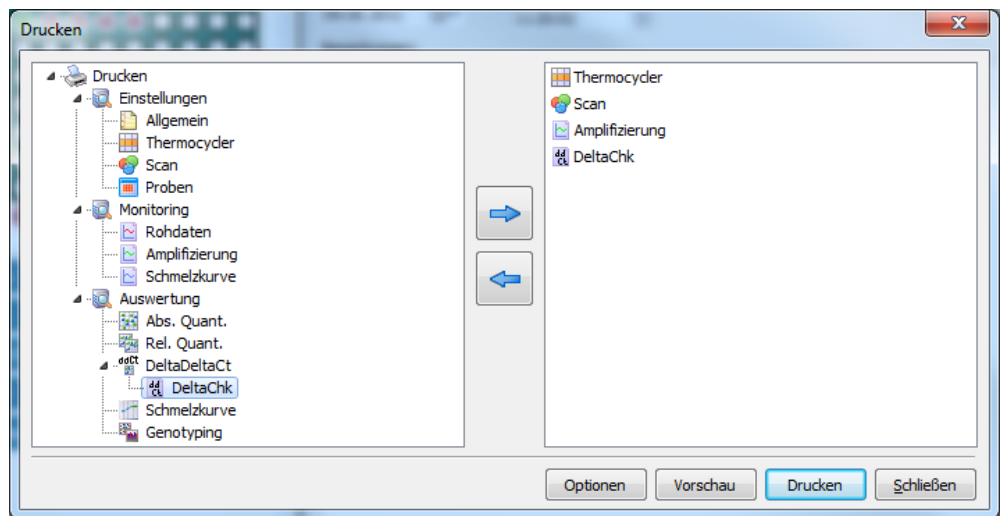
Mit dem Menübefehl **Datei ▶ Schließen** wird das aktive Projektfenster geschlossen. Um alle Projektfenster zu schließen, rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Alle schließen** auf. Wurden in Projektfenstern Veränderungen vorgenommen, die noch nicht gespeichert wurden, erfolgt dazu eine Sicherheitsabfrage.

2.8 Drucken

Für den Ausdruck eines Projektes können die gewünschten Inhalte in einer Auswahlliste spezifiziert werden:

1. Rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Drucken** auf.
2. Organisieren Sie mit den angezeigten Listen die Druckausgabe. Markieren Sie die gewünschten Informationen in der linken Liste und übertragen Sie diese mit  in die rechte Ausdruckliste. Nicht gewünschte Informationen entfernen Sie auf die gleiche Weise mit  aus der Ausdruckliste.
3. Mit **[Drucken]** starten Sie den Ausdruck.

Über **[Optionen]** lässt sich die Druckausgabe konfigurieren, **[Vorschau]** zeigt die Seitenansicht des Druckbildes.





Fenster Drucken

Die einzelnen Druckbausteine sind im Fenster **Drucken** in die Themenbereiche **Einstellungen**, **Monitoring** und **Auswertung** sortiert.

3 Einstellungen für ein Real-Time PCR-Experiment

Für den Beginn eines neuen Projektes legen Sie entweder ein neues Projekt an oder öffnen Sie eine Vorlage:

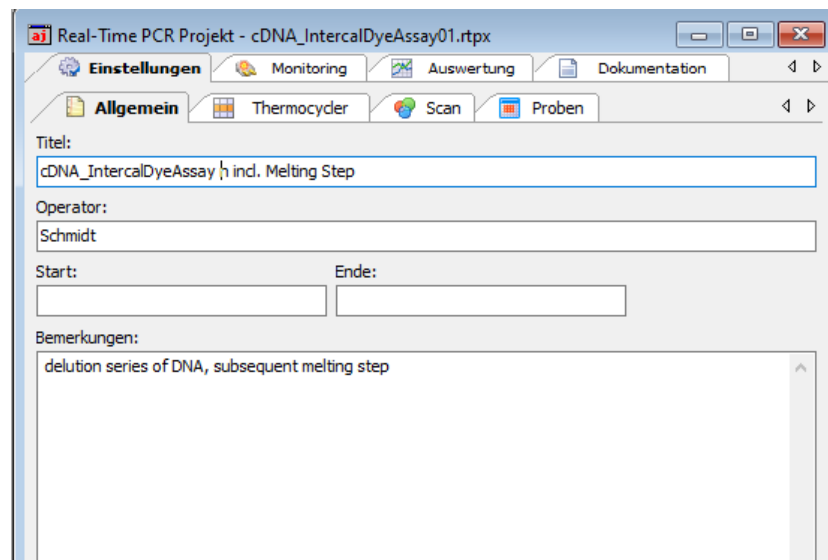
- Legen Sie ein leeres Projekt mit einem Klick  in der Werkzeugleiste an.
- Alternativ öffnen Sie mit  eine Vorlage, um die bereits abgelegten Parameter für das neue Projekt zu nutzen oder zu variieren.

Alle notwendigen Funktionen zum Erstellen eines neuen Projekts sind unter der Karte **Einstellungen** zusammengefasst. Der Karte **Einstellungen** sind weitere Karten der zweiten Ebene zugeordnet:

Registerkarte	Funktion
Allgemein	Eingabe allgemeiner Informationen und Bemerkungen.
Thermocycler	Programmierung von PCR-Protokollen
Scan	Festlegung der zu messenden Farben und Einstellung der Messparameter
Proben	Probentabelle mit detaillierte Informationen zu jeder Probe und Gruppierungen von Experimenten

3.1 Allgemeine Informationen zum Projekt eingeben

Zu jedem Projekt können allgemeine Informationen gespeichert werden. Die Einträge nehmen Sie auf der Karte **Allgemein** vor:



Real-Time PCR-Lauf – Allgemeine Informationen

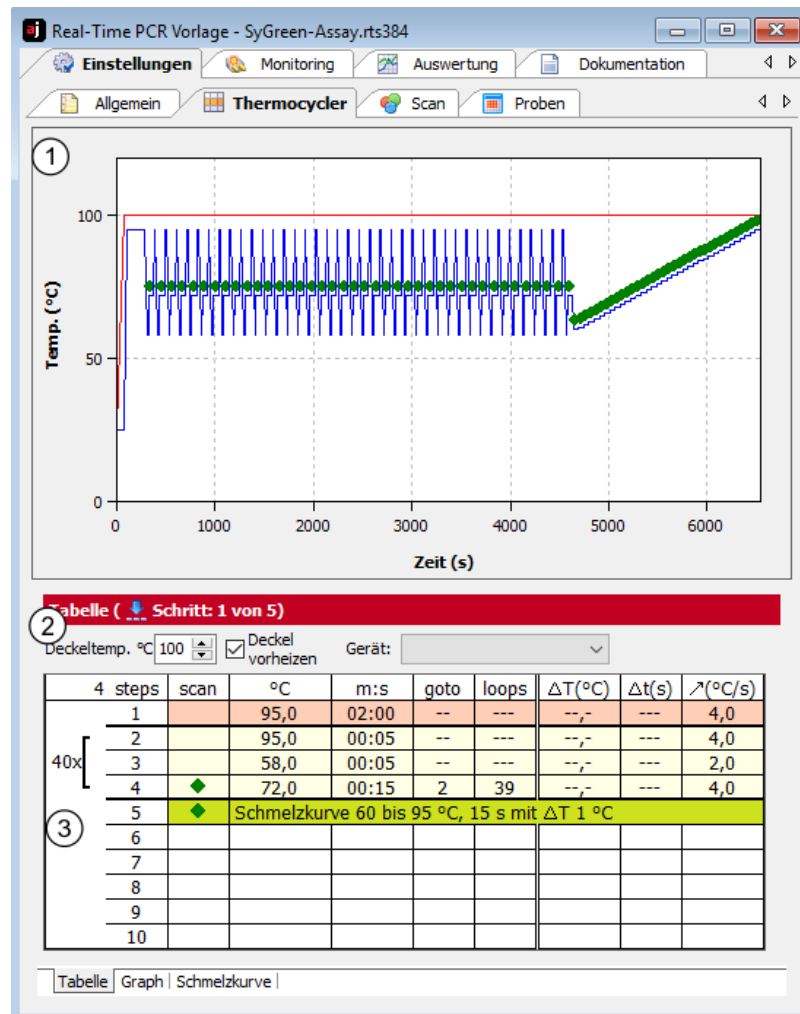
Befehl	Beschreibung
Titel	Titel der Analyse
Operator	Nutzer Bei Verwendung einer Benutzerverwaltung wird der Name des angemeldeten Nutzers automatisch eingetragen.
Start/Ende	Start und Ende des qPCR-Laufes. Bleibt in der Vorlage leer.
Bemerkungen	Eingabe von Bemerkungen

Hinweis:

Für die Texteingabe auf der Karte **Allgemein** können die üblichen Befehle zum Kopieren, Ausschneiden und Einfügen von Texten verwendet werden. Diese Befehle sind im Menü **Bearbeiten** angeordnet.

3.2 PCR-Protokoll erstellen

Für jedes Real-Time PCR-Experiment muss ein qPCR-Protokoll programmiert werden. Alle dazu notwendigen Funktionen sind auf der Projektfenster **Einstellungen / Thermocycler** zusammengefasst. Die Karte gliedert sich in die drei Bereiche: graphische Programmvorschau (1), Programmkopf (2) und Programmtabelle (3).



Programmtabelle zur Erstellung von PCR-Protokollen

Die Programmvorschau illustriert den Verlauf des qPCR-Protokolls. Im Programmkopf sind die Rahmenbedingungen für das qPCR-Protokoll wie die programmierte Deckeltemperatur und der Deckelheizmodus des Thermocyclers definiert. Die Programmierstabelle liefert eine übersichtliche Darstellung der einzelnen Schritte des Programms.






Auf der Karte **Thermocycler** befinden sich drei Listenblätter. Die Reiter zum Umschalten zwischen den Listenblättern befinden sich an der Unterkante des Fensters.

Listenblatt	Funktion
Tabelle	Programmierung eines vollständigen qPCR-Protokolls
Graph	Graphischen Programmierung von qPCR-Programmen
Schmelzkurve	Parametern für die Messung einer Schmelzkurve

PCR-Protokolle editieren

qPCR-Protokolle können in der tabellarischen oder graphischen Darstellung editiert werden.

Zwischen den beiden alternativen Darstellungen wird über die Registerblätter **Tabelle** und **Graph** gewechselt. Zum Bearbeiten eines Schrittes (der jeweils aktive Schritt ist hellrot hinterlegt) kann die entsprechende Funktion aus dem Menü **Cycler** der Menüleiste oder das entsprechende Symbol aus der Werkzeugleiste verwendet werden:

Symbol	Menübefehl (Cycler ▶ ...)	Beschreibung
	Leeren Schritt einfügen	Neuen Schritt nach dem aktiven Schritt einfügen.
	Schritt löschen	Aktiven Schritt löschen.
	Schritt ausschneiden	Aktiven Schritt ausschneiden.
	Schritt kopieren	Aktiven Schritt kopieren.
	Schritt einfügen	Kopierten Schritt nach dem aktiven Schritt einfügen.

3.2.1 Eingaben im Programmkopf

Der Programmkopf enthält Optionen für die Deckelheizung.



Programmkopf des PCR-Programms

Option/Liste	Beschreibung
Deckeltemp.	<p>Deckeltemperatur einstellen.</p> <p>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 Deckel der Reaktionsgefäße zu verhindern.</p>
Deckel vorheizen	<p>Wenn aktiviert, wird der Deckel auf die eingestellte Deckeltemperatur vorgeheizt, bevor das eigentliche PCR-Programm startet.</p> <p>Dieses ist die empfohlene Standardeinstellung, um die Ausbildung eines homogen temperierten Luftkissens zwischen den Probengefäßen zu gewährleisten. Diese führt zu einer besseren Temperaturuniformität zwischen den Proben. Während der Deckel aufheizt, wird der Block auf konstant 25 °C gehalten.</p> <p>Wird die Option deaktiviert, startet das PCR-Programm schon, während der Deckel noch aufheizt.</p> <p>Einstellbare Deckeltemperatur: 30 – 120 °C</p>

3.2.2 Übersicht qPCR-Protokolltabelle

Das qPCR-Protokoll wird in der Programmtabelle des Listenblatts **Tabelle** eingegeben. Eine Tabellenzeile enthält die Parameter eines Temperaturschritts.

In der Programmtabelle ist eine Navigation unter Verwendung der Maus oder über vier Richtungstasten ([←] [→] [↑] [↓]) der Tastatur möglich. Jede Eingabe wird mit der [Enter]-Taste oder mit der Richtungstaste [→] bestätigt. Der Cursor springt dann in das entsprechende Feld der benachbarten Spalte. Steht der Cursor in der letzten Zeile, wird mit [↓] ein weiterer Temperaturschritt eingefügt. Ein Klick mit der Maus auf die nächste leere Zeile fügt ebenfalls einen weiteren Temperaturschritt ein.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\Delta t(s)$	$\nearrow(^{\circ}C/s)$
1		95,0	02:00	--	---	--,-	---	3,0
2		95,0	00:05	--	---	--,-	---	3,0
3		58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
4	◆	72,0	00:15	2	39	--,-	---	3,0
5	◆	Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						
6								
7								
8								
9								
10								



Programmtabelle für einen PCR-Lauf

Folgende Werte werden in die Tabelle eingetragen bzw. aus den Vorgabewerten errechnet:

Wert	Beschreibung
Scan	Wenn markiert, wird während dieses Schrittes eine Messung der Probenfluoreszenz vorgenommen.
Steps	Nummer des Schritts im Temperaturprogramm Wird automatisch durchnummeriert.
°C	Zieltemperatur des Schritts in °C eingeben.
m:s	Haltezeit der Zieltemperatur eingeben.
goto / loop	Schleife mit Anzahl Wiederholungen für einen Zyklus definieren.
$\Delta T(^{\circ}C)$	Inkrement bzw. Dekrement der Zieltemperatur innerhalb des PCR-Laufs eingeben.
$\Delta t(s)$	Inkrement bzw. Dekrement der Haltezeit innerhalb des PCR-Laufs eingeben.
$\nearrow(^{\circ}C/s)$	Heiz- bzw. Kühlrate, um die Zieltemperatur im Temperaturschritt zu erreichen, eingeben.

3.2.3 Neuen Temperaturschritt einfügen / Temperaturschritt löschen

Einen weiteren Temperaturschritt können Sie mit einer der folgenden Funktionen in die Programmtabelle einfügen:

- In der letzten Programmzeile Richtungstaste [**↓**] drücken.
- Menübefehl **Cycler ▶ Leeren Schritt einfügen** wählen.
- Auf  klicken.
- Mit der Maus auf die nächste Zeile unter dem Programm klicken.
Die Gesamtanzahl Schritte und der aktuell bearbeitete Schritt werden im Protokollkopf angezeigt.
- Einen Programmschritt löschen Sie, in dem Sie den Cursor in die Programmzeile setzen und auf  klicken.
Alternativ wählen Sie den Menübefehl **Cycler ▶ Schritt löschen**.

3.2.4 Zieltemperatur, Haltezeit und Heiz-/Kühlraten eingeben

- Tragen Sie in der Spalte "°C" die Zieltemperatur des Temperaturschritts ein.
- Tragen Sie in der Spalte "m:s" die Haltezeit im Format "Minuten:Sekunden" ein (z.B. Haltezeit von einer Dauer von 1 min 20 s: 1:20).
- Für spezielle Anwendungen oder die Übertragung von Protokollen von anderen Geräten kann es notwendig sein die **Heiz- und Kühlraten** anzupassen. Geben Sie die durchschnittliche Heiz- und Kühlrate für jeden einzelnen Schritt in der Spalte " $\lambda(^{\circ}\text{C/s})$ " ein.

Hinweis:

Der Wert in Spalte " $\lambda(^{\circ}\text{C/s})$ " definiert die Geschwindigkeit, mit der die Zieltemperatur erreicht wird. Wenn also mit einer Geschwindigkeit von 4 °C pro Sekunde von Schritt 2 nach Schritt 3 geheizt (oder gekühlt) werden soll, so muss der Wert 4,0 in Schritt 3 eingetragen werden.

Hinweis:

Wenn die Geschwindigkeit im gesamten Protokoll reduziert werden soll, so muss die Heiz- bzw. Kühlrate in allen Schritten angepasst werden. Die Einstellungen sind dann auch nur für dieses Protokoll gültig.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}\text{C})$	$\Delta t(\text{s})$	$\lambda(^{\circ}\text{C/s})$
40x	1	95,0	02:00	--	---	--,-	---	4,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	4,0
	3	58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
	4	72,0	00:15	2	39	--,-	---	4,0
5	Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C							
6								
7								
8								
9								
10								

Tabelle | Graph | Schmelzkurve |

Zieltemperatur, Haltezeit und Heiz-/Kühlraten in PCR-Tabelle eingeben

3.2.5 Schleifen definieren

Sich regelmäßig wiederholende Protokollschrittabfolgen können in **Schleifen** zusammengefasst werden. Eine Schleife wird durch einen Zielschritt für den Rücksprung (**goto**) und die Anzahl Wiederholungen (**loops**) definiert.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}\text{C})$	$\Delta t(\text{s})$	$\lambda(^{\circ}\text{C/s})$
40x	1	95,0	02:00	--	---	--,-	---	4,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	4,0
	3	58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
	4	72,0	00:15	2	39	--,-	---	4,0
5	Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C							
6								
7								
8								
9								
10								

Tabelle | Graph | Schmelzkurve |

Schleife in PCR-Tabelle programmieren

1. Setzen Sie den Cursor auf den letzten Schritt der zukünftigen Schleife (in Beispiel oben Schritt 4).
2. Geben Sie in der Spalte **goto** die Nummer des Zielschritts ein (in Beispiel oben "2").
3. In der Spalte **loops** geben Sie die Anzahl Wiederholungen ein (in Beispiel oben "39").

Nach der Eingabe von Zielschritt und Wiederholungen wird die programmierte Schleife in Form einer Klammer auf der linken Seite der Tabelle dargestellt.

Hinweis:

Die in der Klammer dargestellte Gesamtzahl der Schleifen ergibt sich aus der Zahl der programmierten Wiederholungen plus 1, da die entsprechende Schrittabfolge bis zum Erreichen der Schleife bereits einmal durchlaufen wurde.

3.2.6 Inkremente/Dekremente für Temperatur und Haltezeit eingeben

Durch die Programmierung von Inkrementen/Dekremente können innerhalb einer Schleife Temperatur oder Haltezeit von Zyklus zu Zyklus um einen bestimmten Betrag verändert werden. Diese Technik wird zum Beispiel für die "Touch Down" PCR verwendet.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\Delta t(s)$	$\lambda(^{\circ}C/s)$
40x	1	95,0	02:00	--	---	--,-	---	3,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	3,0
	3	58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
	4	72,0	00:15	2	39	-1,0	5	3,0
5								

Inkremente für Temperatur und Haltezeit eingeben

- Geben Sie im Temperaturschritt, dessen Werte sich innerhalb der Schleife ändern sollen, die gewünschten Änderungen ein. Mit dem Vorzeichen (-) wird ein Dekrement vereinbart, d.h. Temperatur oder Haltezeit verringern sich von Zyklus zu Zyklus um den Betrag. Kein Vorzeichen oder (+) kennzeichnen ein Inkrement, so dass sich der Parameter von Zyklus zu Zyklus um den Betrag erhöht.
- Für eine schrittweise Änderung der Zieltemperatur tragen Sie die Änderung in der Spalte $\Delta T(^{\circ}C)$ ein.
- Für eine schrittweise Änderung der Haltetemperatur tragen Sie die Änderung in der Spalte $\Delta t(s)$ ein.

Hinweis:

Der sich ändernde Schritt muss innerhalb einer Schleife liegen, sonst bleiben die Einträge in den Spalten $\Delta T(^{\circ}C)$ und $\Delta t(s)$ wirkungslos.

Hinweis:

Die Verlängerung der Haltezeit eines Schritts hat einen Einfluss auf die Gesamtlaufzeit eines Protokolls. Ein Programm mit vielen Zyklen und deutlichen Erhöhungen der Haltezeit dauert erheblich länger als ein vergleichbares Programm ohne programmierte Verlängerung.

3.2.7 Fluoreszenzmessung vereinbaren

- Um in einem Temperaturschritt des PCR-Protokolls die Messung der Probenfluoreszenz zu definieren, klicken Sie in die Spalte **scan** des Temperaturschritts. Die aktivierte Messung wird durch eine grüne Raute (◆) angezeigt.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\Delta t(s)$	$\lambda(^{\circ}C/s)$
1		95,0	02:00	--	---	--,-	---	4,0
2		95,0	00:05	--	---	--,-	---	4,0
3		58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
4		72,0	00:15	2	39	--,-	---	4,0
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						
6								
7								
8								
9								
10								

Tabelle | Graph | Schmelzkurve |

Fluoreszenzmessung im PCR-Lauf festlegen

Die Parameter für die Fluoreszenzmessung legen Sie auf der Karte **Scan** fest.

Hinweis:

Wird ein Schritt zur Schmelzkurvenbestimmung eingefügt, ist an diesem Schritt der Scanvorgang automatisch aktiviert. Für alle anderen Schritte des PCR-Protokolls muss die Zuweisung manuell erfolgen.

3.2.8 Schmelzkurve anfügen

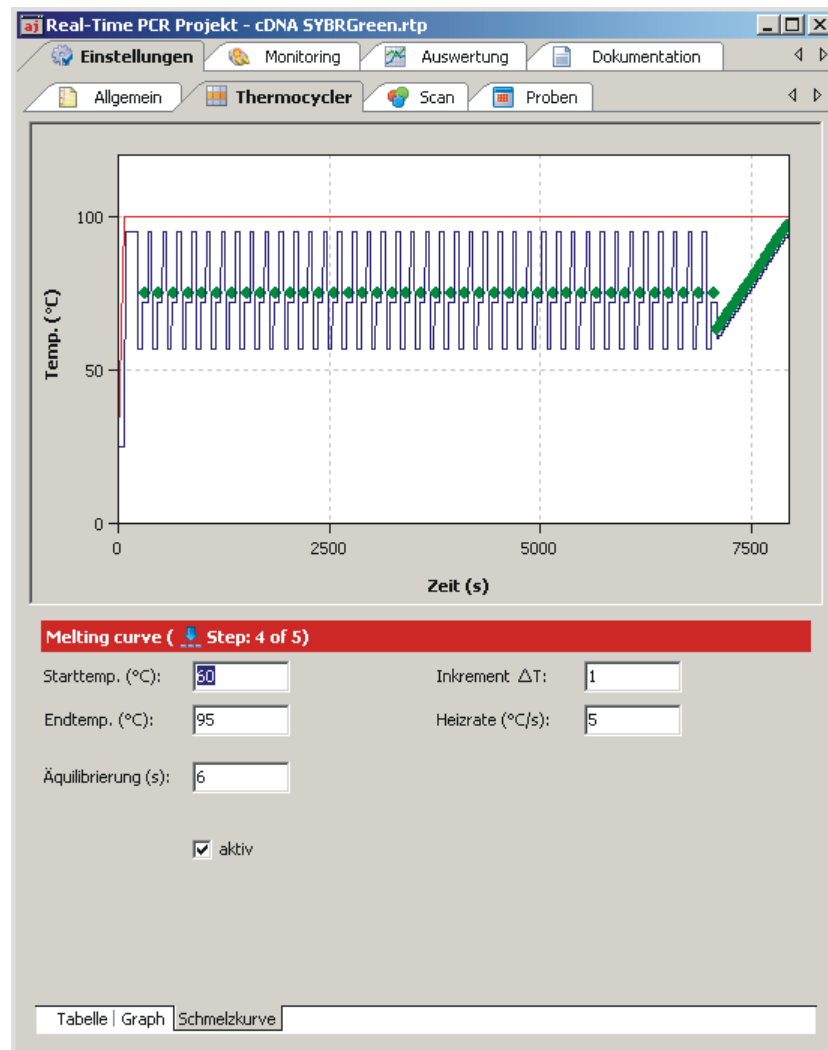
Bei Versuchen mit interkalierenden Farbstoffen empfiehlt es sich die Spezifität der Produkte durch Messung einer Schmelzkurve zu überprüfen. Das Gerät ermöglicht dazu einen entsprechenden Schritt im qPCR-Protokoll zu programmieren.

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\Delta t(s)$	$\lambda(^{\circ}C/s)$
1		95,0	02:00	--	---	--,-	---	4,0
2		95,0	00:05	--	---	--,-	---	4,0
3		58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
4		72,0	00:15	2	39	--,-	---	4,0
5		Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C						
6								
7								
8								
9								
10								

Tabelle | Graph | Schmelzkurve |

PCR-Protokoll mit Schritt zur Schmelzkurvenbestimmung

- Eine **Schmelzkurve** fügen Sie in die Programmtabelle ein, indem Sie auf das Registerblatt **Schmelzkurve** wechseln und dort die Option **aktiv** aktivieren.
 - ✓ Die Schmelzkurve wird an den letzten Temperaturschritt in der Tabelle angefügt.
- Um eine Schmelzkurve aus der Programmtabelle zu entfernen, deaktivieren Sie die Option **aktiv**.
- Die einzelnen Parameter des Schmelzkurvenschritts stellen Sie auf dem Registerblatt **Schmelzkurve** ein:



Registerblatt Schmelzkurve

Folgende Parameter können verändert werden:

Parameter	Beschreibung
Starttemp. (°C)	Starttemperatur der Schmelzkurve
Endtemp. (°C)	Endtemperatur der Schmelzkurve
Äquilibration (s)	Zeit zur Äquilibration der Probe auf eine Temperatur, bevor eine Messung durchgeführt wird
Inkrement ΔT	Abstände in °C zwischen zwei benachbarten Temperaturschritten
Heizrate (°C/s)	Aufheizrate des Blocks
aktiv	Wenn aktiv, wird eine Schmelzkurve an das PCR-Protokoll anfügen.

Bei der Aufnahme der Schmelzkurve ist die Fluoreszenzmessung automatisch aktiv.

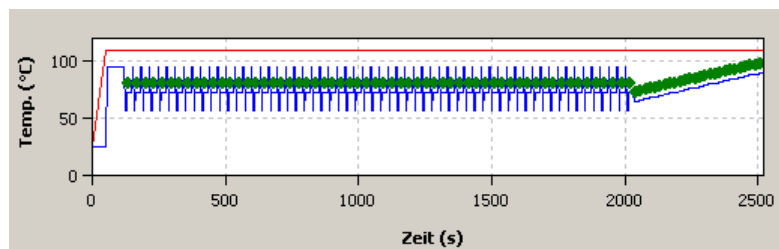
Hinweis:

Soll eine Schmelzkurve ohne vorangegangene Amplifizierung aufgenommen werden, so muss im PCR-Protokoll vor dem Schmelzkurvenschritt ein zusätzlicher Schritt vereinbart werden, bei dem der Block auf die Starttemperatur der Schmelzkurve gebracht und eine

Fluoreszenzmessung vereinbart wird. Die Aufnahme einer Schmelzkurve ohne zumindest einen vorausgehenden Schritt ist nicht möglich.

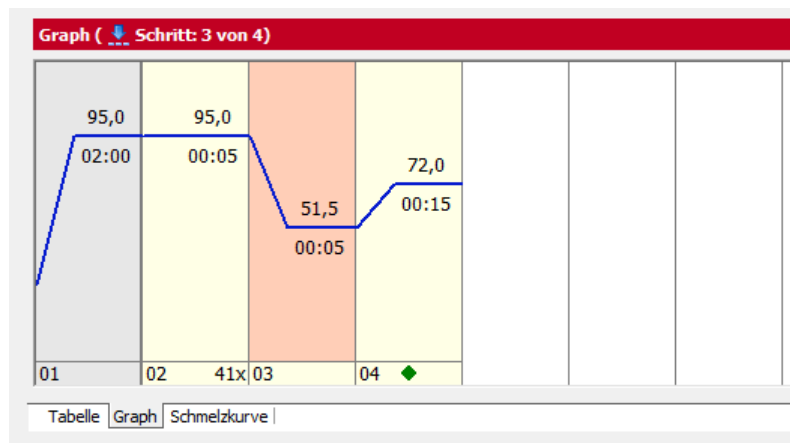
3.2.9 Graphische Anzeige und Programmierung des PCR-Protokolls

Im Projektfenster **Einstellungen / Thermocycler** werden auf den Registerblättern **Tabelle** und **Graph** der Verlauf eines programmierten qPCR-Protokolls graphisch angezeigt. Dabei sind der Temperaturverlauf des Blocks (blaue Linie) und des Heizdeckels (rote Linie) über die Zeit aufgetragen. Die grüne Raute symbolisiert Schritte, an denen die Fluoreszenz gemessen wird.



Graphische Darstellung eines PCR-Protokolls

Programme werden grundsätzlich in der Tabellenansicht erstellt, die eine schnelle Programmierung von neuen Schritten erlaubt und eine zusammenfassende Gesamtübersicht über die Protokollstruktur gibt. Einige Programmieroptionen sind nur in der Tabellenansicht verfügbar. Der graphische Programmiermodus bietet dagegen eine schematische Darstellung des Temperaturprofils und die Möglichkeit Protokolle schnell anzupassen. Zwischen der Tabellenansicht und dem graphischen Modus kann im Projektfenster **Einstellungen / Thermocycler** mit den Reitern **Tabelle** bzw. **Graph** gewechselt werden.



Graphischer Programmiermodus

Grundsätzlich erfolgt die graphische Programmierung auf die gleiche Weise wie in der Programmiertabelle.

- Durch Anklicken eines Schrittes wird dieser für die Bearbeitung aktiviert und hellrot hervorgehoben.
- Im unteren Teil der Anzeige wird die Nummer des entsprechenden Protokollschritts angezeigt. Daneben können in diesem Feld die Anzahl von Wiederholungen in Schleifen (rechts) und Scanvorgänge (Mitte) programmiert werden.

Die Nummer der Wiederholungen ist als Zahl angegeben (z.B. 40x) und kann nach Anklicken mit der linken Maustaste bearbeitet werden.

Geplante Messungen werden durch eine grüne Raute in der Mitte des Feldes angezeigt und können ebenfalls über die linke Maustaste an- oder abgewählt werden.

- Temperaturen und Haltezeiten werden als Zahlenwerte ober- bzw. unterhalb der blauen Linie angegeben, die das jeweilige Temperaturniveau an den einzelnen Schritten zeigt. Durch Klicken mit der linken Maustaste können die Werte geändert werden. Schmelzkurvenschritte erhalten den Zusatz **Melt**. Zusätzlich wird bei Schmelzkurvenschritten noch ein Symbol eines nach oben gerichteten Pfeils (↑) eingeblendet.

Hinweis:

Die Zahl der Wiederholungen in Schmelzkurvenschritten kann nicht verändert werden.

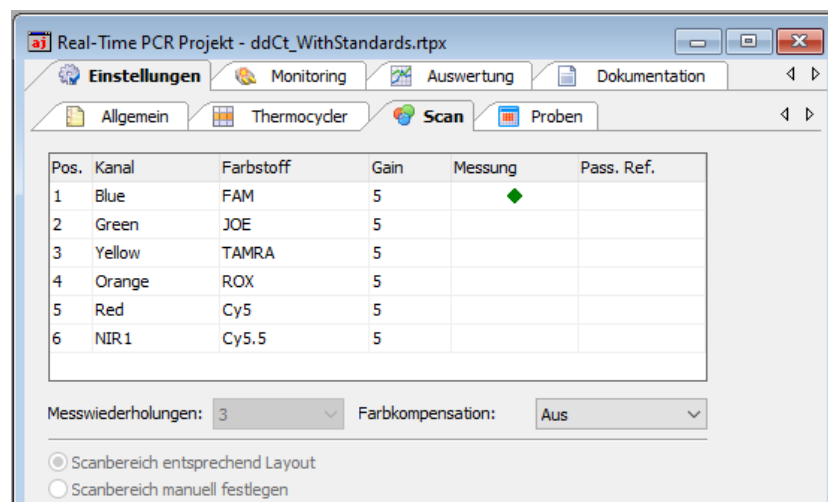
- Der Temperaturwert an jedem Schritt kann mittels der Maus verändert werden. Dazu kann die blaue Linie des Temperaturverlaufs mit gedrückter linker Maustaste nach oben oder unten verschoben werden.

3.3 Parameter für Fluoreszenzmessung festlegen

Die Produktakkumulation wird in der Real-Time PCR durch die Zunahmen von Fluoreszenz gemessen. Folgende Messparameter müssen dafür definiert werden:

- Farbstoffe, die gemessen werden
- Temperaturschritt des qPCR-Protokolls, an dem eine Messung stattfindet
- Bereich der Mikroplatte, der gescannt wird

Die zu messenden Farben werden im Projektfenster **Einstellungen / Scan** definiert.



Projektfenster mit Einstellungen für die Fluoreszenzmessung

Für die Fluoreszenzmessung können bis 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 Karte **Scan** enthält eine Tabelle mit verschiedenen Parametern zur Definition der Scan-Eigenschaften:

Tabellenparameter	Beschreibung
Pos.	Position des Farbmoduls im Gerät
Kanal	Bezeichnung des Farbkanals
Farbstoff	Für den jeweiligen Kanal den zu messende Farbstoff in der Tabelle mittels einer Auswahlliste definieren.
Gain	Signalintensität regulieren. Die Signalintensität ist in Stufen zwischen 0 und 10 einstellbar. Je größer der Wert, desto höher ist das Fluoreszenzsignal im betroffenen Kanal. Standardwert: 5
Messung	Messung des Farbstoffs aktivieren. Eine aktivierte Messung ist mit einer grünen Raute (◆) gekennzeichnet.
Passive Referenz	Bedingt durch die verwendete LED Technologie ist es nicht notwendig eine passive Referenz zu verwenden. Falls dennoch ein Referenzfarbstoff gemessen werden soll, muss in dieser Spalte ein Häkchen gesetzt werden.

Die Angaben zu Position, Kanal und die Auswahlliste an verfügbaren Farbstoffen können in dieser Tabelle nicht verändert werden. Änderungen dieser generellen Einstellungen können nur im Fenster **Farbmodule bearbeiten** vorgenommen werden (→ Abschnitt "Farbmodule bearbeiten" S. 140).

Folgende Auswahllisten und Optionen stehen auf der Karte **Scan** zur Verfügung:

Option	Beschreibung
Messwiederholungen	Anzahl an Wiederholungen der Fluoreszenzmessung eingeben. Mögliche Werte: 1 bis 16, Standardwert: 3
Farbkompensation	Farbkompensation aktivieren (→ Abschnitt "Farbkompensation" S. 39).
Scanbereich entsprechend Layout	Messung der Proben entsprechend der Probenanordnung auf der Karte Proben (→ Abschnitt "Probentabelle bearbeiten" S. 41)
Scanbereich manuell festlegen	Messung der Proben nach manuellen Vorgaben (→ Abschnitt "Scanbereich manuell festlegen" S. 38)

Für jeden Kanal, in dem Sie eine Messung vornehmen wollen, stellen Sie folgende Parameter ein:

1. Wählen Sie in der Spalte **Farbstoff** den zu messenden Farbstoff aus. Klicken Sie in die Zelle und markieren Sie in der sich öffnenden Liste den Farbstoff.

Hinweis:

Die Anzahl gemessener Farbstoffe hat keinen Einfluss auf die Scan-Zeit.

2. Stellen Sie in der Spalte **Gain** die Signalintensität ein.

3. Aktivieren Sie die Fluoreszenzmessung im Kanal in der Spalte **Messung** durch eine grüne Raute (◆).
Kanäle die nicht auf diese Weise markiert sind, werden nicht gemessen.
4. Aktivieren Sie ggf. die Messung eines Referenzfarbstoffes durch Setzen eines (✓) in der Spalte **Pass. Ref.**
5. Geben Sie in im Feld **Messwiederholungen** die Anzahl der Wiederholungen der Fluoreszenzmessungen ein.
Die Standardeinstellung beträgt drei Messwiederholungen.

Hinweis:

Eine Erhöhung der Anzahl von Messwiederholungen verringert die Messwertstreuung, führt aber zu längeren Scanzeiten und damit längeren Protokolllaufzeiten.

6. Wählen Sie eine der Optionen für den **Scan-Bereich** aus (**manuell** oder **entsprechend Layout**).

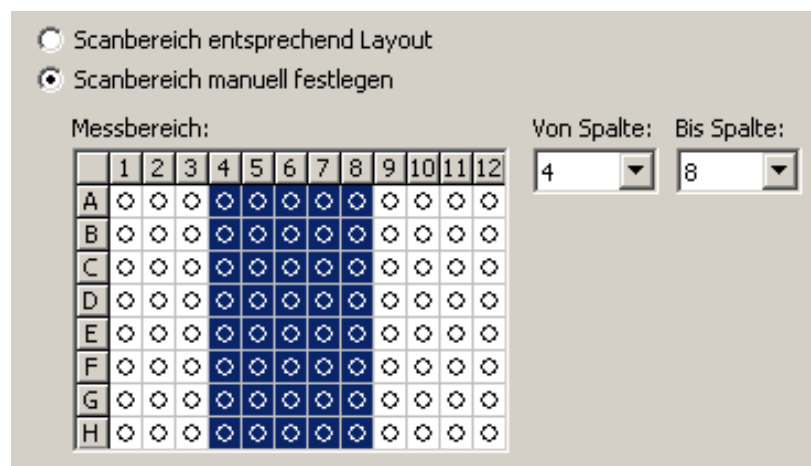
3.3.1 Scanbereich manuell festlegen

Der Scanbereich kann entsprechend des Plattenlayouts in der Probentabelle (→ Abschnitt "Probentabelle bearbeiten" S. 41) oder manuell festgelegt werden. Der Scanbereich wird beim Thermocycler immer spaltenweise festgelegt und muss immer aus zusammenhängenden Spalten bestehen.

1. Für die manuelle Auswahl der Proben markieren Sie auf der Karte **Einstellungen / Scan** die Option **Scan-Bereich manuell** festlegen.
Es öffnet sich eine graphische Darstellung des Probenblocks.
2. Tragen Sie in den Feldern **Von Spalte** und **Bis Spalte** die Anfangs- und die Endspalte des zu scannenden Bereichs ein.

Alternativ können Sie die Spalten auch mit der Maus markieren. Für die Markierung einer Einzelspalte klicken Sie auf die Spalte. Sollen mehrere Spalten markiert werden, so halten sie die linke Maustaste gedrückt und fahren Sie mit dem Cursor über den entsprechenden Bereich.

Aktivierte Spalten sind im Schema blau gekennzeichnet.



Manuelle Einstellung des Scanbereichs

3.3.2 Farbkompensation wählen

Bei Verwendung von mehreren Farbstoffen pro Reaktionsansatz kann es zum Übersprechen der Fluoreszenz kommen, d.h. neben dem gewünschten Farbstoff wird gleichzeitig ein zweiter Farbstoff angeregt und gemessen. Um den Fluoreszenzanteil des zweiten Farbstoffs abzuziehen, steht die Funktion der Farbkompensation auf der Projektkarte **Einstellungen / Scan** zur Verfügung.

qPCRsoft auto bietet 2 Wege, eine Farbkompensation an den Messdaten durchzuführen:

- Nutzung der Standard-Farbkompensation (Standard 1, Standard 2)
Testen Sie, welche der beiden Kompensationen das beste Ergebnis liefert. Wenn die Standardkompensationen kein zufriedenstellendes Ergebnis liefern, müssen Sie eine kundenspezifische Farbkompensation aufnehmen.
- Aufnahme und Auswahl einer kundenspezifischen Farbkompensation (Auswahl)

Farbkompensation: 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.

Farbkompensation:
Standard

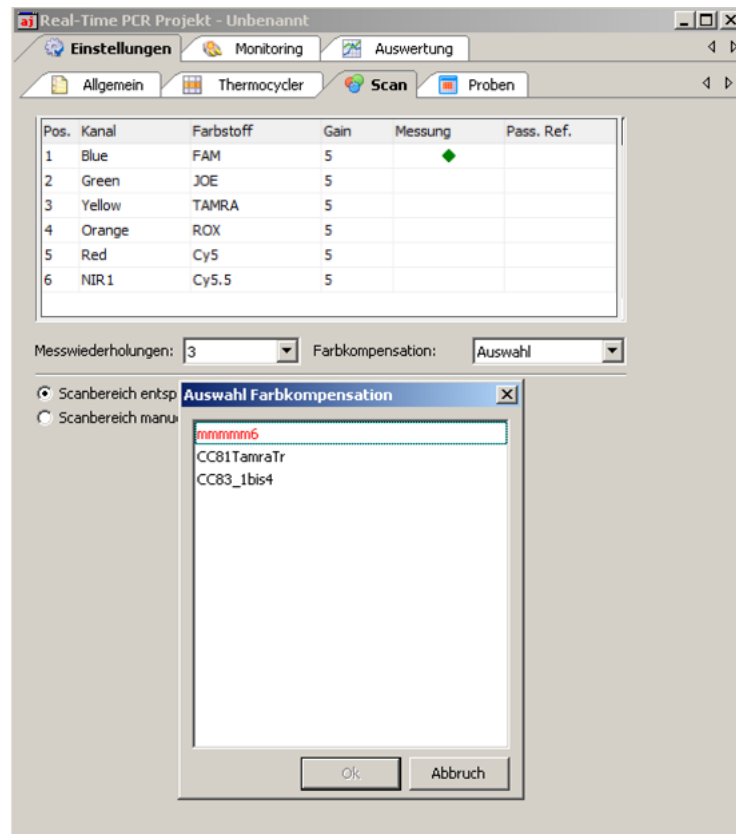
Bei der Standard-Farbkompensation wird eine Kompensationsmatrix auf die Messdaten angewendet, die bei der Gain-Einstellung "5" in allen Farben eine ausreichende Kompensation des Übersprechens ermöglicht.

Für die Nutzung der Standard-Farbkompensationen wählen Sie in der Liste **Farbkompensation** die Option **Standard 1** oder **Standard 2**.

Farbkompensation:
Auswahl

Eine bessere Kompensation wird erreicht, wenn mit den verwendeten Farbstoffen eine Kompensationsmatrix aufgenommen wird (→ "Spektrale Kalibrierung" unten).


Für die Nutzung dieser-Farbkompensation wählen Sie in der Liste **Farbkompensation** 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 auf der Karte **Scan** vorgenommenen Einstellungen passen. Alle nicht gültigen Farbkompensationsdaten erscheinen in roter Schrift und können nicht ausgewählt werden.

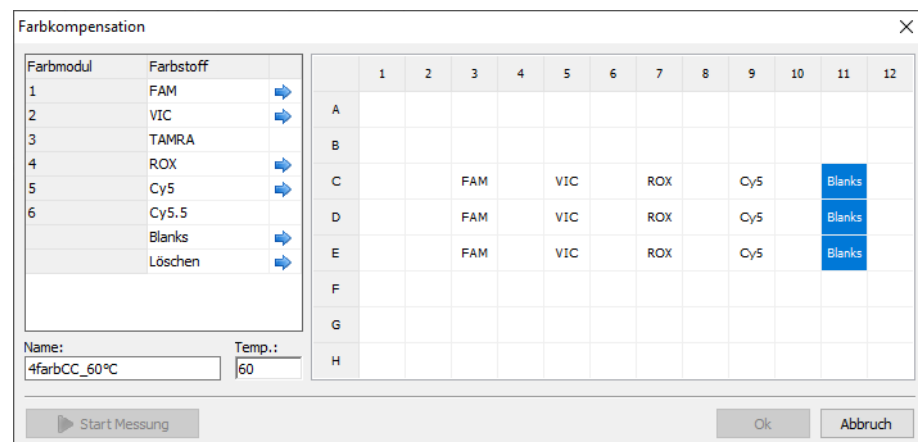


Auswahlfenster der zur Verfügung stehenden Farbkompensation

Durch Auswahl mit der linken Maustaste und Drücken von **[OK]** lässt sich eine Farbkompensation für das aktuelle Projekt aktivieren.

Spektrale Kalibrierung

Mit dem Symbol  oder dem Menübefehl **Scan ▶ Farbkompensation bearbeiten** kann eine neue Farbkompensation durch Messung erstellt werden. Dieser Vorgang wird als spektrale Kalibrierung bezeichnet. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem alle notwendigen Einstellungen vorgenommen werden können. Das Fenster untergliedert sich in eine Auswahlliste für Farbstoffe und ein Plattenschema.



Fenster Farbkompensation zur spektralen Kalibrierung

Für die Aufnahme der Kalibrierdaten müssen die Farbstoffe, für die eine Farbkompensation benötigt wird, einzeln in Lösung vorliegen. Beispielsweise können

die im späteren PCR-Experiment verwendeten Sonden für die Kalibriermessung benutzt werden. Die Farbstoffkonzentration sollte für die Kalibriermessung etwa 0,1 µmol/l betragen.

Im angezeigten Plattenschema werden nun für jeden Farbstoff einzeln die Wells markiert, in denen sich die Kalibrierproben befinden, und der jeweils in der Probe befindliche Farbstoff durch Klick auf den blauen Pfeil den markierten Wells zugewiesen. Die zur Auswahl angebotenen Farbstoffe sind diejenigen, welche auf der Projektkarte **Einstellungen / Scan** ausgewählt wurden.

Für eine exakte Kalibriermessung ist es ratsam, jeden Farbstoff mindestens als Dreifachreplikat anzulegen und Blanks (Proben ohne Farbstoff) zu definieren. Als Blanks können NTC-Lösungen oder mit Pufferlösung gefüllte Wells verwendet werden.

Die Kalibriermessung wird durch Klick auf **[Start Messung]** gestartet.

Hinweis:

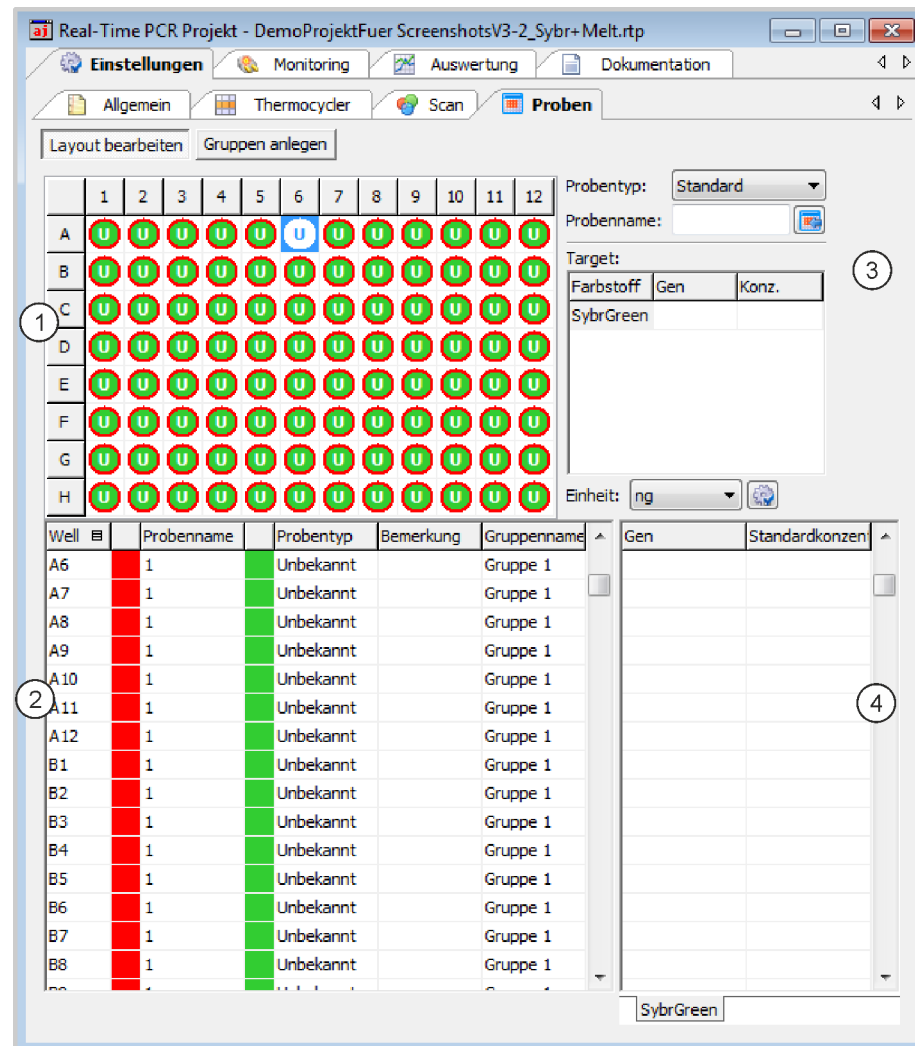
Die Auswahl an verfügbaren Farbstoffen kann in dieser Tabelle nicht verändert werden. Änderungen können nur auf der Projektkarte **Einstellungen / Scan** vorgenommen werden.

Im Namensfeld muss der neuen Farbkompensation ein Name zugewiesen werden und nach Drücken von **[OK]** wird diese in die Auswahlliste übernommen und im entsprechenden Fenster angezeigt. Nicht mehr verwendete Vorlagen können durch **[Entfernen]** gelöscht werden.

3.4 Probentabelle bearbeiten

In der Probentabelle wird definiert, welche Probe sich an welcher Position des Blocks befindet. Diese Angaben sind für die Nutzung der Auswertefunktionen von qPCRsoft auto erforderlich. Dazu kann jede Probe mit ihren Eigenschaften wie Name, Gen, Typ, Konzentration und Farbstoff beschrieben werden. Darüber hinaus können Proben aus verschiedenen experimentellen Ansätzen in Gruppen zusammengefasst werden.

Die nötigen Eintragungen werden auf der Karte **Proben** nach Betätigen der Schaltfläche **[Layout bearbeiten]** vorgenommen. Das entsprechende Fenster gliedert sich in verschiedene Bereiche:



Fenster zur Bearbeitung der Proben-tabelle

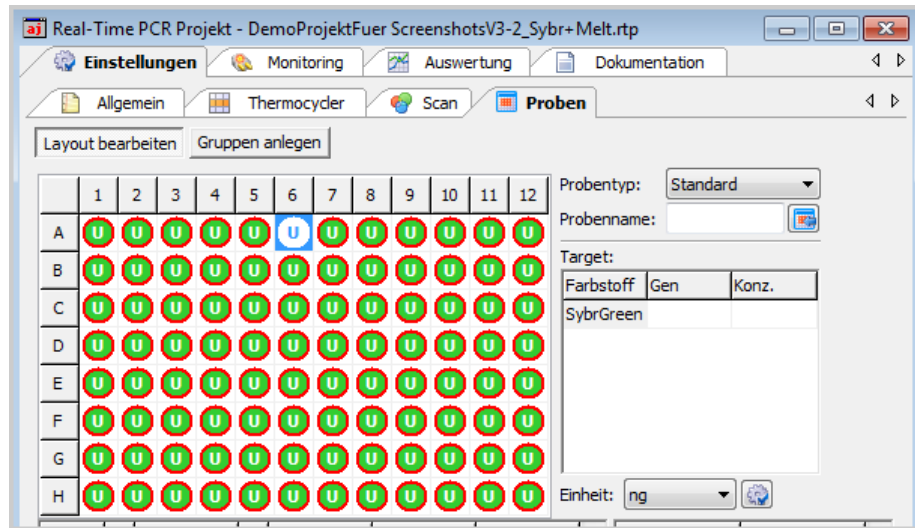
Bereich	Funktion
Layoutansicht (1)	Graphische Anzeige der Well-Belegung auf der Mikroplatte
Proben-tabelle (2)	Zusammenfassung der Informationen zu jeder Probe.
Eingabebereich (3)	Eingabebereich für die Probeneigenschaften: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Probenname ▪ Probentyp ▪ Konzentration von Standardproben ▪ Zuordnung von Farbstoff und analysiertem Gen.
Farbstoffe (4)	Farbstoffe und zugeordnete Gene für jede Probe

Hinweis:

Die Proben-tabelle kann auch noch nach dem Ende des qPCR-Laufs bearbeitet werden.

3.4.1 Probeneigenschaften im Layout eingeben

Die Eigenschaften der Proben in den Wells definieren Sie auf der Projektkarte **Einstellungen / Proben** in der Layout-Ansicht und dem daneben befindlichen Eingabebereich.



Layoutansicht zum Probentyp mit markiertem Well B6

Hinweis

Die Farbkodierung der Wells für die einzelnen Probentypen sowie die Farbe zur Kennzeichnung von Replikaten kann unter **Extras / Optionen** auf der Karte **Farben** editiert werden.

Folgende Probentypen können definiert werden:

Probentyp	Symbol	Definition
Leer		Beschreibt eine leere Position auf der PCR-Platte
Unbekannt	U	Probe unbekannter Konzentration oder Verdünnung (Messprobe)
Standard	S	Probe bekannter Konzentration oder Verdünnung
Kalibrator	K	Probe, deren Zielgen-Expressionslevel als 1 gesetzt wird
No template control (NTC)	N	Kompletter Reaktionsansatz aber ohne Matrizenstrang
Positivkontrolle	+	Positiver Kontrollansatz, bei dem ein Reaktionsprodukt zu erwarten ist
Negativkontrolle	-	Negativer Kontrollansatz, bei dem kein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

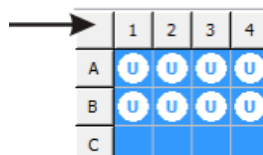
Proben mit identischen Probeneigenschaften (Probenname, Probentyp, gleiche Gen-Farbstoff-Zuweisungen) werden als Replikate betrachtet. Replikate sind zur besseren Übersicht durch einen gleichfarbigen äußeren Ring gekennzeichnet. Die Einzelwerte dieser Proben werden gemittelt und ihr Mittelwert für die weitere Berechnung verwendet.

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

- Markieren Sie die zu bearbeitende Probenposition per Mausklick im Layout. Bei angrenzenden Feldern fahren Sie mit gedrückter linker Maustaste über die entsprechenden Felder. Nicht zusammenhängende Felder markieren Sie per Mausklick bei gedrückter Strg-Taste.

Zeilen oder Spalten markieren Sie mit einem Klick auf die entsprechenden Zeilen- bzw. Spaltenbezeichnung.


Alle Probenposition im Layout markieren Sie, indem Sie auf die linke obere graue Schaltfläche im Layout klicken (zwischen A und 1).



Schaltfläche zum Markieren des gesamten Layouts

- Geben Sie im nebenstehenden Eingabebereich folgende Probenparameter ein:

Parameter	Beschreibung
Probenname	Bezeichnung der Probe
Probentyp	Auswahl des Probentyps (siehe Tabelle oben)
Tabelle Target	
Spalte Gen	In der Zeile des Farbstoffs das damit zu analysierende Gen eintragen.
Spalte Konz.	Für Standards Die Konzentration des zu analysierenden Gens eintragen.


- Weisen Sie die Probeneigenschaften den markierten Positionen mit einem Klick auf  oder durch Drücken der ENTER-Taste zu.


Drücken Sie die Entf-Taste, um einem oder mehreren Wells den Probentyp **Leer** zuzuweisen.

Hinweis:

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

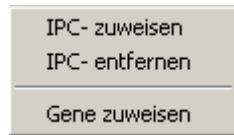
- Mit einem Doppelklick auf ein Well werden eingestellte Probeneigenschaften im Eingabebereich angezeigt.

Sie können die Eingaben editieren und mit einem erneuten Klick auf  oder durch Drücken der ENTER-Taste dem Well wieder zuweisen.

Um diese Probeneigenschaften anderen Wells zuzuordnen, markieren Sie die gewünschten Wells und klicken Sie dann auf  oder drücken Sie die ENTER-Taste.

- Mit Hilfe des Kontextmenüs können Sie den Proben nachträglich Gennamen zuweisen oder für eine Endpunktanalyse Proben, welche keine interne

Positivkontrolle enthalten (IPC-), definieren bzw. löschen. Das Kontextmenü erreichen Sie, indem Sie mit der rechten Maustaste auf das PCR-Plattenschema klicken.



Kontextmenü für das nachträgliche Zuweisen von Gennamen/IPC- - Proben

Die Eingabe eines Probenlayouts wird im Folgenden an einem Beispiel für ein Singleplex-Assay (→ Abschnitt "Probenlayout für ein Singleplex-Assay eingeben" S. 48) und ein Multiplex-Assay (→ Abschnitt "Probenlayout für ein Multiplex-Assay eingeben" S. 47) beschrieben.

3.4.2 Probeneigenschaften in der Probentabelle eingeben

In der Probentabelle können direkt Eintragungen vorgenommen werden:

- Klicken Sie in der Layout-Ansicht auf die gewünschte Position oder direkt in das Feld in der Probentabelle.

Die Zeile in der Probentabelle wird gelb hervorgehoben.

- Geben Sie die Beschreibungen bzw. Werte direkt in die dafür vorgesehenen Zellen ein.

Die Bearbeitung der Probentabelle erfolgt dabei immer zellenweise, eine Mehrfachauswahl und die damit verbundene Zuweisung von Parametern zu mehreren Zellen oder Zeilen gleichzeitig ist nicht möglich.

Well	Probename	Probenotyp	Bemerkung	Gruppenname	Gen	Standardkonz.
A1	Zellkultur 24t	Standard		Group 1	GAPDH	100
A2	Zellkultur 24t	Standard		Group 1	GAPDH	100
A3	Zellkultur 24t	Standard		Group 1	GAPDH	100
A4	Zellkultur 24t	Standard		Group 1	GAPDH	100
A5	Zellkultur 24t	Standard		Group 1	GAPDH	100
A6		Unbekannt		Group 1		
A7		Unbekannt		Group 1		
A8		Unbekannt		Group 1		

Probentabelle zur Eingabe der Probeneigenschaften

Die zu messenden Gene und bei Standardproben auch deren Konzentration sind im zweiten Teil der Probentabelle getrennt nach Farbstoffen zusammengefasst. Jedem Farbstoff ist ein Listenblatt zugeordnet. Die Anzahl der angezeigten Listenblätter hängt davon ab, welche Farbstoffe auf der Projektkarte **Einstellen / Scan** für die Messung aktiviert sind.

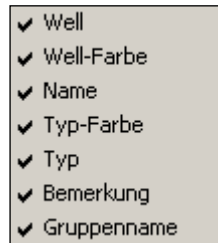
- Geben Sie für jedes Gen die gewünschte Standardkonzentration ein.

Anzeige der Tabelle wählen

Je nach der gewählten Fenstergröße und der Anzahl der zu messenden Farben werden zwei Schaltflächen mit Pfeilen nach links und rechts eingeblendet, mit denen zwischen den verschiedenen Registerkarten gescrollt werden kann.

Die angezeigten Spalten und ihre Reihenfolge in der Probentabelle kann benutzerdefiniert angepasst werden:

- Führen Sie einen Rechtsklick auf eine Spaltenüberschrift aus und markieren Sie im Kontextmenü die gewünschten Spalten.
- Um die Reihenfolge der Spalten zu ändern, klicken Sie im Tabellenkopf auf die Spalte und ziehen Sie mit gedrückter Maus an die gewünschte Position.



Auswahlfeld zur Festlegung der in der Probentabelle angezeigten Spalten

Kurvenfarben wählen

Hinweis: Die globalen Farbeinstellungen sind im Fenster **Optionen / Farbe** (Menübefehl **Extras ▶ Optionen**) möglich. Dort werden die Farben für Wells, Replikate und Probentypen festgelegt.

Die Amplifizierungskurve wird in der graphischen Darstellung mit der in der 2. Spalte der Probentabelle angezeigten Farbe gekennzeichnet. Die Farbe können Sie individuell ändern:

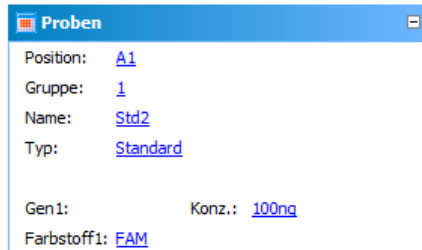
- Führen Sie einen Doppelklick auf die zu ändernde Farbfläche in der Probentabelle aus und wählen Sie die gewünschte Farbe im Fenster **Farbe** aus.
- Um die Farbe für ein Well zurückzusetzen, halten Sie die Umschalt-Taste (⇧) gedrückt und führen Sie gleichzeitig einen Doppelklick auf die Farbfläche aus. Die Farbe wird auf die Voreinstellung im Fenster **Optionen / Farbe** zurückgesetzt.
- Um mehreren Wells die gleiche Farbe zuzuweisen, halten Sie die Strg-Taste gedrückt und führen Sie einen Doppelklick auf die Farbfläche eines Wells aus. Im Fenster **Farben bearbeiten** markieren Sie im Plattenlayout die betreffenden Wells und wählen Sie die gemeinsame Farbe. Mit **[Übernehmen]** weisen Sie die Farbe den Wells zu. Mit **[Zurücksetzen]** werden die Farbänderungen in markierten Wells wieder auf die Voreinstellungen im Fenster **Optionen / Farbe** zurückgesetzt



Fenster Farben bearbeiten zur Farbauswahl der Amplifikationskurven

3.4.3 Probeneigenschaften im Projektextplorer anzeigen

Führen Sie in der Layoutansicht der Projektkarte **Proben** den Mauszeiger über ein Well, so werden dessen Eigenschaften im Projektextplorer unter dem Menüpunkt **Proben** angezeigt.



Projektextplorer Proben mit Ausgabe der Welleigenschaften

3.4.4 Probenlayout für ein Multiplex-Assay eingeben

Im folgenden Beispiel werden im Layout vier Proben und Standards mit jeweils drei Messwiederholungen definiert. Das Gen GAPDH wird mit dem Farbstoff FAM und das Gen c-myc mit dem Farbstoff VIC analysiert. Die beiden Farbstoffe wurden auf der Projektkarte **Einstellungen / Scan** ausgewählt und zur Messung aktiviert. Die angegebenen Probenamen und Standardkonzentrationen sind als Beispiele zu verstehen.

Layout leeren

1. Aktivieren Sie die Schaltfläche **[Layout bearbeiten]**.
2. Leeren Sie das Plattenlayout, um sicher zu gehen, dass keine ungewollten Einträge stehen bleiben:
 - Markieren Sie die gesamte Platte, indem Sie auf die graue Schaltfläche oben links im Layout klicken.
 - Drücken Sie die Entf-Taste auf der Tastatur.


Proben zuweisen

3. Markieren Sie die die drei Wells A1 – A3.
4. Nehmen Sie folgende Einstellungen vor:

Parameter	Eingegebener Wert
Probenname	Sample 1
Probentyp	Unbekannt
FAM	GAPDH
VIC	c-myc

Hinweis:

Die Zuordnung der Gene zum jeweiligen Farbstoff erfolgt entweder durch Eingabe des Gennamens oder durch Auswahl aus der eingblendeten Liste in der Tabelle **Target**.

5. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um den drei Wells die Probeneigenschaften zuzuweisen.
6. Wiederholen Sie Schritt (3) – (5) für die weiteren Proben. Verwenden Sie dabei folgende Parameter:

Wells	Probename	Probentyp	FAM	VIC
A4-A6	Sample 2	Unbekannt	GAPDH	c-myc
B1-B3	Sample 3	Unbekannt	GAPDH	c-myc
B4-B6	Sample 4	Unbekannt	GAPDH	c-myc

Standardproben festlegen

7. Markieren Sie die die drei Wells C1 – C3.
8. Nehmen Sie folgende Einstellungen vor:


Parameter	Eingegebener Wert
Probename	Std 1
Probentyp	Standard

In der Tabelle **Target** nehmen Sie folgende Eintragungen vor:

Farbstoff	Gen	Konz.
FAM	GAPDH	100
VIC	c-myc	50

Hinweis:

Die Spalte **Konz.** in der Tabelle **Target** ist nur beim Probentyp **Standard** zugänglich.

9. Wählen Sie in der Liste **Einheit** eine Konzentrations- oder Masseinheit aus. Folgende Einheiten stehen zur Verfügung: ng, ng/µl, ng/ml, pg/µl, copies, copies/µl, copies/ml, mg/ml, IU/µl, IU/ml oder %.
10. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um den drei Wells die Probeneigenschaften zuzuweisen.
11. Wiederholen Sie Schritt (7) – (10) für die weiteren drei Standards. Verwenden Sie dabei folgende Parameter:

Wells	Probename	Konz.	
		FAM	VIC
C4-C6	Std 2	50	5
D1-D3	Std 3	10	1
D4-D6	Std 4	0,1	0,05

Als Probentyp wählen Sie jeweils die Option **Standard**.

Die Gene ordnen Sie den Farbstoffen wie im Schritt (6) zu.

- ✓ Das Plattenlayout für ein Multiplex-Assay ist fertig.

3.4.5 Probenlayout für ein Singleplex-Assay eingeben

Im folgenden Beispiel werden im Layout vier Proben und vier Standards mit jeweils drei Messwiederholungen definiert. Die Gene GAPDH und c-myc werden mit dem Farbstoff FAM mit Hilfe zweier Sonden analysiert. Der Farbstoff FAM wurden auf der Projektkarte

Einstellungen / Scan ausgewählt und zur Messung aktiviert. Die angegebenen Probenamen und Standardkonzentrationen sind als Beispiele zu verstehen.


Layout leeren

1. Aktivieren Sie die Schaltfläche **[Layout bearbeiten]**.
2. Leeren Sie das Plattenlayout, um sicher zu gehen, dass keine ungewollten Einträge stehen bleiben:
 - Markieren Sie die gesamte Platte, indem Sie auf die graue Schaltfläche oben links im Layout klicken.
 - Drücken Sie die Entf-Taste auf der Tastatur.


Proben zuweisen

3. Markieren Sie die die drei Wells A1 – A3.
4. Nehmen Sie folgende Einstellungen vor:

Parameter	Eingegebener Wert
Probenname	Sample 1
Probentyp	Unbekannt
FAM	GAPDH

5. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um den drei Wells die Probeneigenschaften zuzuweisen.
6. Markieren Sie die die drei Wells A4 – A6.
7. Nehmen Sie folgende Einstellungen vor:

Parameter	Eingegebener Wert
Probenname	Sample 1
Probentyp	Unbekannt
FAM	c-myc

8. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um den drei Wells die Probeneigenschaften zuzuweisen.
9. Wiederholen Sie Schritt (3) – (8) für die weiteren drei Proben. Verwenden Sie dabei folgende Parameter:

Wells	Probenname	Probentyp	Gen /FAM
B1-B3	Sample 2	Unbekannt	GAPDH
B4-B6	Sample 2	Unbekannt	c-myc
C1-C3	Sample 3	Unbekannt	GAPDH
C4-C6	Sample 3	Unbekannt	c-myc
D1-D3	Sample 4	Unbekannt	GAPDH
D4-D6	Sample 4	Unbekannt	c-myc

Standardproben festlegen

10. Markieren Sie die die drei Wells E1 – E3.
11. Nehmen Sie folgende Einstellungen vor:

Parameter	Eingegebener Wert
Probenname	Std1
Probentyp	Standard


In der Tabelle **Target** nehmen Sie folgende Eintragungen vor:

Farbstoff	Gen	Konz.
FAM	GAPDH	100

Hinweis:

Die Spalte **Konz.** in der Tabelle **Target** ist nur beim Probentyp **Standard** zugänglich.

12. Wählen Sie in der Liste **Einheit** eine Konzentrations- oder Masseinheit aus.
 Folgende Einheiten stehen zur Verfügung: ng, ng/µl, ng/ml, pg/µl, copies, copies/µl, copies/ml, mg/ml, IU/µl, IU/ml oder %.

13. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um den drei Wells die Probeneigenschaften den drei Wells zuzuweisen.

14. Wiederholen Sie Schritt (10) – (13) für die weiteren Standards.
 Verwenden Sie dabei folgende Parameter:

Wells	Probenname	Gen	Konz.
E4-E6	Std. 1	c-myc	100
F1-F3	Std. 2	GAPDH	75
F4-F6	Std. 2	c-myc	75
G1-G3	Std. 3	GAPDH	50
G4-G6	Std. 3	c-myc	50
H1-H3	Std. 4	GAPDH	10
H4-H6	Std. 4	c-myc	10

15. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um die Probeneigenschaften den drei Werten zuzuweisen.

Hinweis:

Zusammengehörige Proben müssen den gleichen Probennamen besitzen.


- ✓ Das Plattenlayout für ein Singleplex-Assay ist fertig.

3.4.6 Automatische Verdünnungsreihen/Replikate erzeugen

Werden in einem Experiment Verdünnungsreihen verwendet oder Replikate gemessen, lässt sich die Layout-Erstellung dafür automatisieren.

1. Markieren Sie das Well, bei welchem die Verdünnungsreihe bzw. die Folge der Probenreplikate beginnen soll (Start-Well), oder markieren Sie einen Bereich auf der PCR-Platte für die Verdünnungsreihe bzw. Probenreplikate.

Ohne die Vorgabe eines Bereichs wird die Platte immer automatisch bis an die Ränder aufgefüllt.


- Klicken Sie dazu auf  auf der Projektkarte **EINSTELLUNGEN / Proben** in der Layout-Ansicht.
- Erstellen Sie die Verdünnungsreihe oder erzeugen Sie die Replikate (siehe unten).

Probentyp: Leer

Probenname:

Target:

Farbstoff	Gen	Konz.
FAM		

Einheit: ng 

Schaltfläche für die automatische Erzeugung von Verdünnungsreihen/Replikaten

Im Fenster **Verdünnungsreihen / Replikate** werden Parameter für automatische Verdünnungsreihen und Replikate definiert.

Verdünnungsreihen/Replikate

Verdünnungsreihen

Startkonzentration: Verdünnungsfaktor: Stufen: Replikate:

Start bei Well: spaltenweise zeilenweise

Standardname: FAM JOE TAMRA ROX Cy5 Cy5.5

Gene: IPC:

Replikate

Start bei Well: Probenanzahl: Replikate:

Probenname: spaltenweise zeilenweise

Probentyp: FAM JOE TAMRA ROX Cy5 Cy5.5

Gene: IPC:

Fenster zur Erstellung automatischer Verdünnungsreihen/Replikate

Verdünnungsreihe erzeugen

- Für die Erzeugung einer Verdünnungsreihe definieren Sie die **Startkonzentration**, den **Verdünnungsfaktor** und die Anzahl an Verdünnungsstufen (**Stufen**) und **Replikaten**.
- Bestimmen Sie den Startpunkt (**Start bei Well**) und wählen Sie aus, ob die Eintragung in die Layouttabelle **zeilen-** oder **spaltenweise** erfolgen soll.

Zur Bestimmung des Startpunkts übernimmt das Programm automatisch die gerade aktivierte Position im Layout bzw. die erste Position oben links in einer Gruppe aktivierter Positionen. Der Startpunkt kann aber alternativ auch durch manuelle Eintragung im entsprechenden Feld definiert werden.

3. Vergeben Sie einen Namen für die Standardprobe (**Standardname**) und weisen Sie zu messende Farbstoffe zu (Mehrfachauswahl ist möglich). Der Standardname wird für jedes Replikat um eine Ziffer ergänzt (Std1, Std2, usw.).
4. Aktivieren Sie die Farbstoffe, für die Verdünnungsreihen angelegt werden sollen. Wählen Sie die Gennamen für die Standards. Eine getrennte Behandlung der Farbstoffe (Targets) ist damit möglich.
5. Klicken Sie auf **[Erzeugen]**.
 - ✓ Die Verdünnungsreihe wird durch die Software automatisch angelegt und die entsprechenden Daten im Layout und der Probentabelle angezeigt.

Automatisch Replikate erzeugen

1. Für die automatische Erzeugung von Replikaten geben Sie den Startpunkt (**Start bei Well**), die Anzahl Proben (**Probenanzahl**) und die Anzahl **Replikate** ein.

Zur Bestimmung des Startpunkts übernimmt die Software automatisch die gerade aktivierte Position im Layout bzw. die erste Position oben links in einer Gruppe aktivierter Positionen, der Startpunkt kann aber alternativ auch durch manuelle Eintragung im entsprechenden Feld definiert werden.
2. Vergeben Sie einen **Probennamen** und wählen Sie aus, ob die Eintragung in die Layouttabelle **zeilen-** oder **spaltenweise** erfolgen soll. Der Probenname wird für jedes Replikat um eine Ziffer ergänzt (Test1, Test2, usw.)
3. Legen Sie den **Probentyp** fest.
4. Aktivieren Sie die Farbstoffe, für die Replikate angelegt werden sollen. Wählen Sie für die Proben die Gennamen. Eine getrennte Behandlung der Farbstoffe (Targets) ist damit möglich.
5. Klicken Sie auf **[Erzeugen]**.
 - ✓ Die Replikate werden durch die Software automatisch angelegt und die entsprechenden Daten im Layout und der Probentabelle angezeigt.

3.4.7 Gruppen definieren


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.

Die Gruppen werden im Projektfenster **Einstellungen / Proben** definiert.

1. Betätigen Sie im Projektfenster **Einstellungen / Proben** die Schaltfläche **[Gruppe anlegen]**.

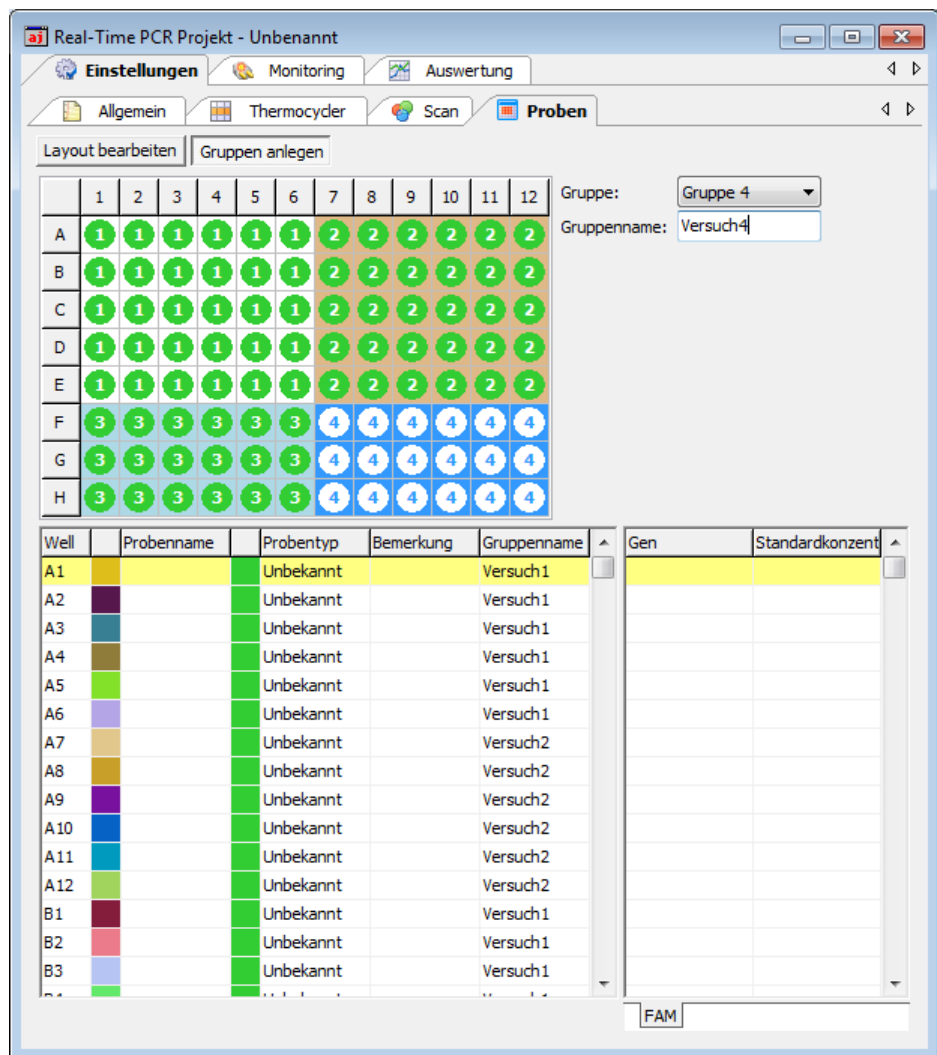
Die Liste **Gruppe** und das Feld **Gruppenamen** werden freigeschaltet. Im Layout sind alle Proben mit 1 gekennzeichnet. Damit sind sie der Gruppe 1 zugeordnet.
2. Markieren Sie im Layout die zu einem Experiment gehörenden Proben. Nebeneinanderliegende Proben markieren Sie mit gedrückter Maustaste, getrennt liegende Proben durch Auswahl mit der linken Maustaste bei gedrückter Strg-Taste.
3. Wählen in der Liste **Gruppe** die nächste Gruppe aus.

4. Tragen Sie im Feld **Gruppenname** die Bezeichnung für das Experiment ein. Der Gruppenname ist frei wählbar.

5. Klicken Sie auf  oder drücken Sie ENTER, um den Proben die Gruppeneigenschaften zuzuweisen.

Die zusammengehörigen Proben werden im Layout mit der Gruppennummer gekennzeichnet.

- ✓ In der Probentabelle werden in der Spalte **Gruppenname** die Bezeichnungen angezeigt.




Well	Probenname	Probenotyp	Bemerkung	Gruppenname	Gen	Standardkonzentration
A1		Unbekannt		Versuch1		
A2		Unbekannt		Versuch1		
A3		Unbekannt		Versuch1		
A4		Unbekannt		Versuch1		
A5		Unbekannt		Versuch1		
A6		Unbekannt		Versuch1		
A7		Unbekannt		Versuch2		
A8		Unbekannt		Versuch2		
A9		Unbekannt		Versuch2		
A10		Unbekannt		Versuch2		
A11		Unbekannt		Versuch2		
A12		Unbekannt		Versuch2		
B1		Unbekannt		Versuch1		
B2		Unbekannt		Versuch1		
B3		Unbekannt		Versuch1		

Probenlayout mit vier Gruppen

3.4.8 Layout-Vorschau

Die Layout-Vorschau gibt einen Gesamtüberblick über die Belegung der PCR-Platte mit Proben und den dazu hinterlegten Informationen.

- Öffnen Sie die Layout-Vorschau mit dem Symbol  in der Werkzeugleiste. Alternativ wählen Sie den Menübefehl **Proben ▶ Layoutvorschau**.

Die Layout-Vorschau wird im Fenster **Plattenansicht** angezeigt.

Die Layout-Vorschau gibt eine Übersicht über folgende Eigenschaften:

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

Bewegt man den Mauszeiger auf eine spezifische Position, werden alle für diese Position bekannten Einstellungen wie der Probenname, der Probentyp, die Gruppe und allen in der Probe zu messenden Gene und Farbstoffe, sowie bei Standards auch deren Konzentration im Detail angezeigt.

	1	2	3	4	5
A	S Zellkultur 24h FAM: GAPDH	S Zellkultur 24h FAM: GAPDH	Zellkultur 24h	Zellkultur 24h	Zellkultur 24h FAM: GAPDH
B	S Zellkultur 24h FAM: GAPDH	S Zellkultur 24h FAM: GAPDH	Position: <u>A2</u> Gruppe: <u>1</u> Name: <u>Zellkultur 24h</u> Typ: <u>Standard</u>		Zellkultur 24h FAM: GAPDH
C	U Zellkultur 24h FAM: MCF-1	U Zellkultur 24h FAM: MCF-1			Zellkultur 24h FAM: MCF-1
D	U Zellkultur 24h FAM: MCF-1	U Zellkultur 24h FAM: MCF-1	Gen1: <u>GAPDH</u> Konz.: <u>100ng</u> Farbstoff1: <u>FAM</u>		Zellkultur 24h FAM: MCF-1



Ausschnitt der Layoutvorschau-Tabelle

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

- Betätigen Sie die Schaltfläche **[Drucken]** im Fenster **Plattenvorschau**, um die Tabelle auf einem Drucker auszugeben.

3.4.9 Layout kopieren

Die Layoutansicht oder Teile davon können kopiert und in das Layout eines anderen Projekts eingefügt werden.

1. Markieren Sie den zu kopierenden Bereich in der Layout-Ansicht mit der Maus.
2. Übertragen Sie mit dem Symbol  in der Werkzeugleiste die Informationen in die Zwischenablage.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **Proben ▶ Layout kopieren** auf.
3. Wählen Sie das Zielprojekt aus.
4. Fügen Sie die Informationen mit dem Symbol  ein.
Alternativ verwenden Sie den Menübefehl **Proben ▶ Layout einfügen**.

Die kopierten Bereiche des Ursprungsprojekts werden an den gleichen Positionen in das Zielprojekt eingefügt.

Die beschriebenen Editiermöglichkeiten beziehen sich auf die graphische Darstellung der PCR-Platte im oberen Teil des Projektfensters. Wenn innerhalb der Layout-Tabelle kopiert und eingefügt werden sollen, so ist dies mit Hilfe der rechten Maustaste bei gleichzeitigem Drücken der Strg-Taste möglich. Auf diese Weise können auch Bereiche innerhalb eines Projektes kopiert werden.

1. Drücken Sie die Strg-Taste und halten Sie diese während des gesamten Vorgangs gedrückt.
2. Markieren Sie durch Drücken der linken Maustaste und Ziehen der Maus die zu kopierenden Zeilen.
3. Drücken Sie die rechte Maustaste und wählen Sie den gewünschten Kopiervorgang aus.

A12			Leer
B1	Std2		Standard
B2	Std2		Standard
B3	Std2		Standard
B4			Leer
B5			Leer

Die Standardproben in den Wells B1,B2 und B3 werden kopiert.

4. Wählen Sie durch Klicken der linken Maustaste die Zeile aus, ab der die kopierten Proben eingefügt werden sollen. Durch Rechtsklick erscheint das Menü zum Einfügen.

A12			Leer
B1	Std2		Standard
B2	Std2		Standard
B3	Std2		Standard
B4			Leer
B5	Std2		Standard
B6	Std2		Standard
B7	Std2		Standard
B8			Leer
B9			Leer

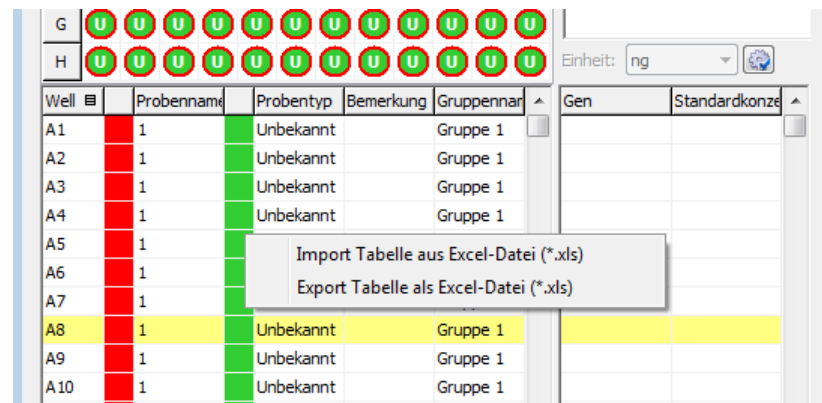
Die Standardproben wurden mit den zugewiesenen Eigenschaften auf die Wells B5,B6 und B7 kopiert.

Beachten Sie, dass im Beispiel durch den gleichen Probenamen damit ein sechsfaches Replikat des Standard Std2 als entstanden ist.

3.4.10 Layout in Excel exportieren oder importieren


Das Layout kann als Excel-Datei (*.xls) exportiert bzw. importiert werden. Die exportierten Daten können in Excel editiert und wieder importiert werden.


- Führen Sie auf die Probentabelle einen Rechtsklick aus.
 Es öffnet sich ein Kontextmenü mit den Menübefehlen **Import table from Excel file (*.xls)** und **Export table to Excel file (*.xls)**.
 Wählen Sie den entsprechenden Menübefehl aus.

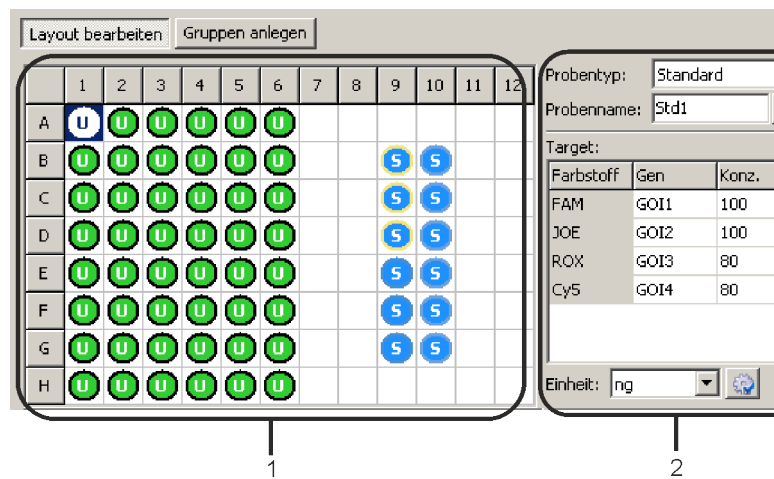


Excel-Export- und Importfunktion für das Probenlayout

3.4.11 Übersicht der Funktionen zum Erstellen und Editieren eines Plattenlayouts

Aktion	Wo	Funktion
Linksklick auf Well	PCR-Plattenschema	Markiert dieses Well
Doppelter Linksklick auf Well	PCR-Plattenschema	Übernimmt die im Well hinterlegten Eingaben in die Editierfelder
Linksklick und ziehen	PCR-Plattenschema	Markiert zusammenhängende Wells
Strg + Linksklick	PCR-Plattenschema	Markiert zusätzlich dieses Well
Strg + Linksklick und ziehen	PCR-Plattenschema	Markiert zusätzlich zusammenhängende Wells
Rechtsklick auf markierte Wells	PCR-Plattenschema	Öffnet Kontextmenü: <ul style="list-style-type: none"> zur Definition von Wells ohne interne Positivkontrolle (IPC-) Gene zuweisen (Es werden die im Editierfeld gezeigten Gennamen den markierten Wells zugewiesen.)
Taste ENTER	Tastatur	Entspricht der Funktion Zuweisen (Symbol  neben Eingabefeld Probenname oder in Symbolleiste)
Taste Entf	Tastatur	Löscht den Inhalt der markierten Wells und fügt Probenotyp leer ein
Taste F5	Tastatur/Editierfeld "Gen"	Löscht das ausgewählte Gen aus der Liste der Gene
Linksklick auf Tabellenkopf Well	Tabelle	Ändert Sortierreihenfolge: zeilenweise, spaltenweise
Rechtsklick auf Tabellenkopf	Tabelle	Öffnet Kontextmenü zur Auswahl der darzustellenden Spalten
Linksklick + ziehen auf Tabellenkopf	Tabelle	Ändert die Reihenfolge der Spalten
Linksklick auf Tabellenzeile	Tabelle	Ermöglicht Eingaben in der gewählten Spalte bzw. Auswahl von Probenotypen

Rechtsklick auf Tabellenzeile	Tabelle	Öffnet Kontextmenü: <ul style="list-style-type: none"> Export der Layouttabelle nach Excel Import eines Layouts von Excel
Strg + Rechtsklick (+ziehen) auf Tabellenzeilen (Strg gedrückt lassen!)	Tabelle	Öffnet Kontextmenü: Kopieren, Ausschneiden, Einfügen, Löschen der Inhalte der markierten Tabellenzeilen
Symbol  unter Target-Tabelle	Editierfeld	Öffnet den Dialog zur automatischen Erstellung von Verdünnungsreihen und Replikaten
Doppelklick auf Farbfläche in Tabellenzeile	Tabelle	Öffnet Fenster Farbe für die Farbauswahl der Amplifizierungskurve.
Umschalttaste und Doppelklick auf Farbfläche	Tabelle	Setzt die Farbeinstellung der Amplifikationskurve wieder auf die Grundeinstellung im Fenster Optionen / Farbe zurück.
Strg+ Doppelklick auf Farbfläche	Tabelle	Öffnet Fenster Farbe bearbeiten . Eine gewählte Farbe kann den Amplifikationskurven mehrerer Wells gleichzeitig zugewiesen werden.



1 PCR-Plattenschema

2 Editierfeld für ausgewählte Probe

Farbstoff	Gen	Konz.
FAM	GOI1	100
JOE	GOI2	100
ROX	GOI3	80
Cy5	GOI4	80

Eingabefelder im Plattenlayout

4 Monitoring







Alle zum Start und zur Verfolgung eines Real-Time PCR-Laufs notwendigen Funktionen sind auf der im Projektfenster **Monitoring** zusammengefasst.

WICHTIG

Nach erfolgreichem PCR-Lauf haben Sie die Möglichkeit, das Projekt zu speichern oder ohne Speichern fortzufahren. Wenn Sie das Projekt speichern, können Sie aus Gründen der Datenintegrität keine Änderungen an den Einstellungen für den PCR-Lauf mehr vornehmen und aus dem Projekt auch keinen neuen PCR-Lauf starten. Wollen Sie mit den gleichen Einstellungen einen weiteren PCR-Lauf starten, müssen Sie zunächst aus dem aktuellen Projekt eine Vorlage erstellen und diese öffnen.

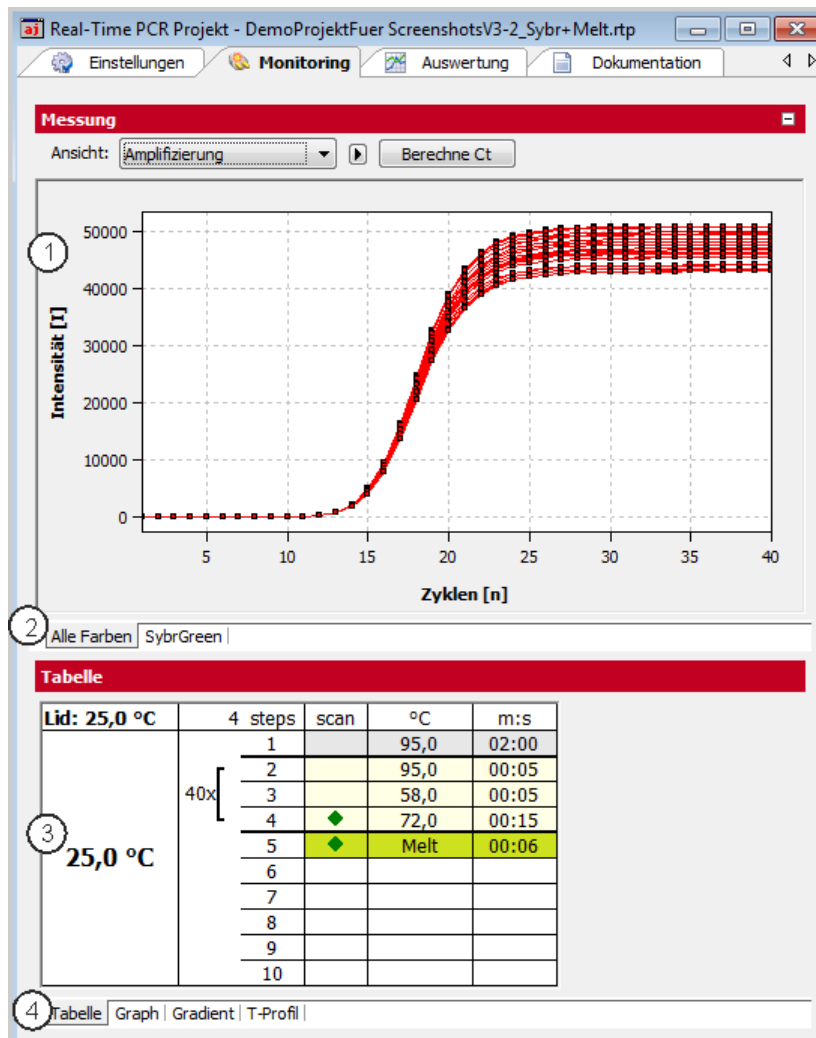
4.1 PCR-Protokoll starten

In der Werkzeugleiste werden die Symbole zum Start des im Projektfenster Einstellungen festgelegten PCR-Protokolls angezeigt.

Symbol	Monitoring ▶	Beschreibung
	Start qPCR-Lauf	PCR-Lauf starten.
	Stopp qPCR-Lauf	Der PCR-Lauf wird abgebrochen und nicht weiter fortgeführt. Die bisher aufgenommenen Daten sind gespeichert und können ausgewertet werden.
	Pause qPCR-Lauf	Der PCR-Lauf wird unterbrochen. Während der Pause blinkt das Symbol. Der PCR-Lauf kann mit einem erneuten Klick auf  weiter fortgeführt werden.
		Lade ein- und ausfahren.
	Anzeigeoptionen	Voreinstellungen für die Monitoring-Ansicht festlegen.

4.2 Anzeigooptionen für das Monitoring

Das Projektfenster **Monitoring** gliedert sich in folgende Bereiche:



Projektfenster Monitoring zum Verfolgen von PCR-Läufen

Bereich	Funktion
Messergebnisse (1)	Stellt die gemessenen Fluoreszenzdaten dar. Aufgetragen wird die Fluoreszenzintensität gegen den Zyklus
Registerkarten Farben (2)	Schaltet zwischen den Fluoreszenzakkumulationskurven um, die für die einzelnen Farbstoffe gemessen wurden.
PCR-Protokoll (3)	Gibt das PCR-Protokoll wieder. Der aktive Schritt ist durch einen grünen Pfeil markiert.
Registerkarten Protokolldarstellung (4)	Schaltet zwischen verschiedenen Darstellungsformen des PCR-Protokolls um (tabellarisch, graphisch, Temperaturprofil).


Im oberen Bereich werden die Fluoreszenzmessungen angezeigt. Auf den verschiedenen Listenblättern kann zwischen der überlagerten Darstellung der Messergebnisse an allen Farbstoffen oder der Anzeige der Einzelfarbstoffe gewählt werden.

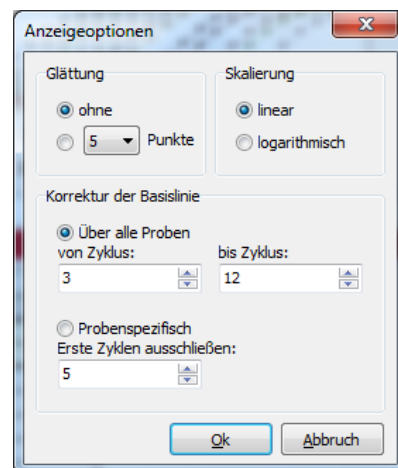
In der Liste **Ansicht** wird zwischen der Ansicht der **Amplifizierung**, **Schmelzkurve** und **Rohdaten** umgeschaltet. Nach Abschluss des PCR-Laufs können für die Amplifizierung die Ct-Werte und für die Schmelzkurve die Tm-Werte berechnet werden, ohne dass eine spezielle Auswertefunktion angelegt werden muss.

Das laufende PCR-Protokoll wird im unteren Bereich der Tabelle des Projektfensters angezeigt. Der aktive Schritt ist während des PCR-Laufs durch einen grünen Pfeil markiert. Auf den verschiedenen Listenblättern kann zwischen der tabellarischen oder graphischen Ansicht des PCR-Protokolls oder dem Temperaturprofil gewählt werden. Die PCR-Protokoll-Ansicht ist im Abschnitt "PCR-Lauf überwachen" S. 63 beschrieben.

4.2.1 Voreinstellung für die Monitoring-Anzeige

Für sämtliche Darstellungen im Projektfenster **Monitoring** gilt, dass zwischen linearer und logarithmischer Skalierung der Daten bei der graphischen Darstellung gewählt werden kann. Außerdem kann die Einstellung zur Basislinienkorrektur verändert werden.

- Rufen Sie den Menübefehl **Monitoring ▶ Anzeigeeoptionen** auf oder klicken Sie in der Werkzeugleiste auf .



Fenster Anzeigeeoptionen zur Voreinstellung der Monitoranzeige

Parameter / Option	Beschreibung
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Messdaten
Skalierung	Auswahl der Skalierung der der Daten (linear oder logarithmisch)

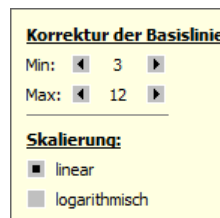
Korrektur der Basislinie	<p>Bei der Korrektur der Basislinie ist zwischen zwei Optionen für die Art der Korrektur zu wählen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Über alle Proben Bei dieser Korrektur wird die Basislinie für jede Probe im gleichen Bereich ermittelt. Die untere und obere Bereichsgrenze ist 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 Erste Zyklen ausschließen eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt. <p>Hinweis: Die <u>Art</u> der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können jedoch die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.</p>
---------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.2.2 Anzeige im Projektfenster Monitoring anpassen

Im Projektfenster **Monitoring** können Sie die voreingestellten Parameter (Menübefehl **Monitoring ▶ Anzeigoptionen**) für die Darstellung der Skalierung und die Bereichsgrenzen für die Basislinienkorrektur anpassen.

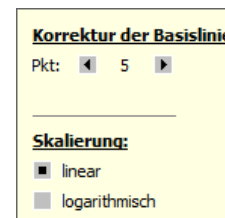
1. Klicken Sie auf die Schaltfläche  über der Graphik.

Es öffnet sich ein Auswahlfeld zum Einstellen der Anzeigoption und Parametereingabe für die Basislinie.



The dialog box titled "Korrektur der Basislinie" has two sections. The first section, "Korrektur der Basislinie", contains two spinners: "Min:" with the value 3 and "Max:" with the value 12. The second section, "Skalierung:", has two radio buttons: "linear" (which is selected) and "logarithmisch".

Parameter für
Basislinienkorrektur
Über alle Proben



The dialog box titled "Korrektur der Basislinie" has two sections. The first section, "Korrektur der Basislinie", contains a spinner labeled "Pkt:" with the value 5. The second section, "Skalierung:", has two radio buttons: "linear" (which is selected) and "logarithmisch".

Parameter für Basislinienkorrektur
Probenspezifisch

Parametereinstellung im Projektfenster Monitoring

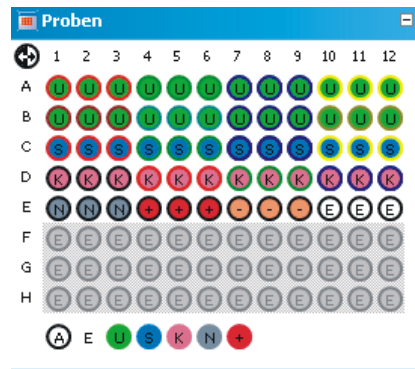
2. Ändern Sie die Grenzen für die Basislinienkorrektur und aktivieren Sie je nach Anzeige der Fluoreszenzkurven die Option **linear** oder **logarithmisch**.

4.2.3 Messergebnisse für einzelne Wells ein- und ausblenden

Die Probenanzeige im Projektfenster **Monitoring** wird über den Menüpunkt **Proben** im Projektextplorer gesteuert. Messergebnisse in den einzelnen Wells können dabei ein- oder ausgeblendet werden.

Hinweis:

Die Auswahl im Projektextplorer hat nur Einfluss auf die Anzeige der Fluoreszenzdaten und nicht auf die Messung.





Projektexplorer Proben

Die Markierung der Probenbelegung entspricht der Kennzeichnung auf der Projektkarte **Proben**. Die Farbcodierung kann unter dem Menüpunkt **Extras ▶ Optionen** im Fenster **Optionen / Farben** eingestellt werden.

Probentyp	Symbol	Definition
Leer	E	Beschreibt eine leere Position auf der PCR-Platte
Unbekannt	U	Probe unbekannter Konzentration oder Verdünnung (Messprobe)
Standard	S	Probe bekannter Konzentration oder Verdünnung
Kalibrator	K	Probe, deren Zielgen-Expressionslevel als 1 gesetzt wird
No template control (NTC)	N	Kompletter Reaktionsansatz aber ohne Matrizenstrang
Positivkontrolle	+	Positiver Kontrollansatz, bei dem ein Reaktionsprodukt zu erwarten ist
Negativkontrolle	-	Negativer Kontrollansatz, bei dem kein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

Aktive Wells sind mit ihrem Probentyp-Symbol gekennzeichnet. Für deaktivierte Wells ist die Position grau gefüllt und die Fluoreszenzdaten werden ausgeblendet. Leere Wells sind mit einem "E" gekennzeichnet. Als Grundeinstellung sind die Messdaten für leere Wells immer ausgeblendet. Zur Kontrolle lassen sich durch Aktivierung der entsprechenden Wells die Messdaten anzeigen. Die Farbgebung für jeden Probentyp ist im Menü **Optionen** frei konfigurierbar.

- Das Umschalten erfolgt mit der Maus. Bei jedem Klick auf ein Well wechselt die Aktivierung.
- Angrenzende Wells schalten Sie um, in dem Sie mit gedrückter Maustaste über die Wells fahren. Nicht zusammenhängende Wells können Sie bei gleichzeitig gedrückter Strg-Taste umschalten.
- Ganze Zeilen und Spalten können durch Klick auf den Buchstaben bzw. Zahl der Zeile [A-H] bzw. Spalte [1-12] invertiert werden.
- Der Aktivierungszustand der Wells der gesamten Platte kann durch Klick auf das Symbol links oben  invertiert werden.
- Zur Aktivierung aller Wells klicken Sie auf das Symbol  unter der Graphik.

- Um nur die Proben eines bestimmten Typs zu aktivieren, klicken Sie auf das entsprechende Symbol unter der Graphik. Mehrere Probentypen können Sie gleichzeitig aktivieren, wenn Sie die Probentypen mit gedrückter Strg-Taste anklicken.

4.3 PCR-Lauf überwachen

Das laufende qPCR-Protokoll wird im unteren Teil der Projektkarte **Monitoring** dargestellt. Grundsätzlich kann dabei über Listenblätter zwischen den drei verschiedenen Darstellungsformen **Graph**, **Tabelle** und **T-Profil** gewählt werden.

Zusätzlich zu den Anzeigen auf den Listenblättern werden in einer Statuszeile weitere Informationen zum Protokoll wie die Plateauzeit, die berechnete Restlaufzeit und in programmierten Schleifen die Schrittnummer und Anzahl an Loops angezeigt.

Schritt: 3 von 3, Loop: 11 von 40, Plateauzeit: 8 s, Restzeit: 27 min

Statuszeile im Projektfenster Monitoring

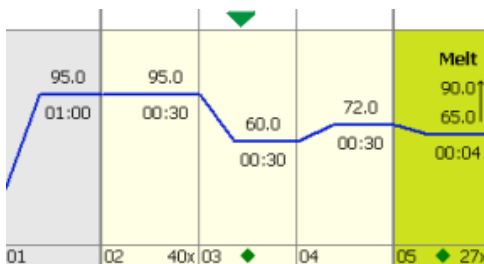
Listenblatt **Tabelle**

Lid: 100.2 °C	3 Steps	scan	°C	m:s
62.1 °C	1		95.0	00:03
	10/40	2	50.0	00:03
	3	◆	72.0	00:10
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
	10			

Projektfenster Monitoring mit Tabelle des PCR-Protokolls

Element	Beschreibung
Lid	Aktuelle Deckeltemperatur
Temperaturanzeige	Aktuelle Blocktemperatur
Steps	Temperaturschritte im PCR-Protokoll Der aktive Schritt ist mit einem grünen Pfeil markiert.
°C	Zieltemperatur des Schritts
m:s	Haltezeit im Format min:s

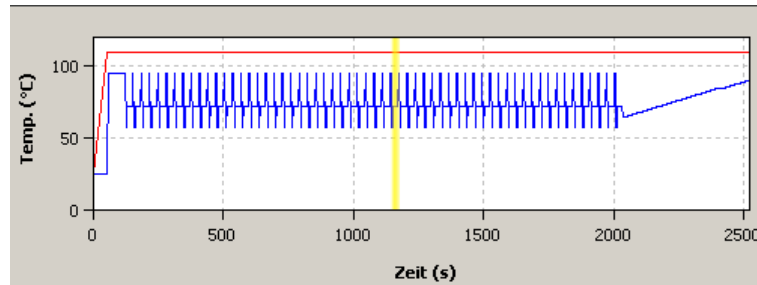
Listenblatt **Graph**



Projektfenster Monitoring mit der graphischen Anzeige des PCR-Protokolls

Das Listenblatt **Graph** beinhaltet die gleichen Elemente der graphischen Darstellung des PCR-Protokolls, wie das Projektfenster **Einstellen / Thermocycler / Graph**. Auch hier wird der aktive Schritt mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet.

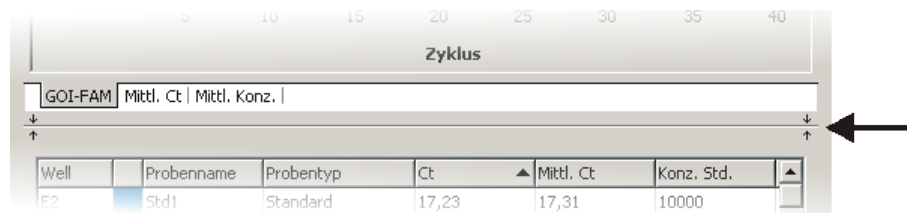
Listenblatt T-Profil



Projektfenster Monitoring mit T-Profil

In der Darstellung des Temperaturprofils zeigt ein gelber Fortschrittsbalken den aktuell ausgeführten Schritt an.

Aufteilung des Fensters zwischen dem Anzeigebereich der Fluoreszenzkurven und der Ergebnistabelle bzw. Standardkurvenanzeige lässt sich über den dazwischen angeordneten Schieberegler einstellen.



Schieberegler zur Einrichtung des Anzeigebereichs

Zu jeder Kurve wird eine Kurzinformation zur Probe eingeblendet, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird.

4.4 Produktakkumulationskurven anzeigen und Ct-Werte berechnen

Die Produktakkumulation wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während des PCR-Laufs im Projektfenster **Monitoring** dokumentiert.

Anzeige der Produktakkumulationskurve

- Wählen Sie Projektfenster **Monitoring** in der Liste **Ansicht** die Option **Amplifizierung** bzw. **Rohdaten** zur Anzeige der Messkurven für die Produktakkumulation.

In der Graphik wird jeweils die Fluoreszenzintensität [I] in relativen Einheiten gegen die Zahl der Zyklen aufgetragen. Die Farbe der jeweils angezeigten Kurve entspricht der in der Proben-tabelle jedem Well zugeordneten Farbe (Projektfenster **Einstellungen / Proben**).

- Die Messergebnisse für die einzelnen Farbstoffe wählen Sie über die entsprechenden Listenblätter aus. Wahlweise werden die Messergebnisse aller Farbstoffe gemeinsam (Listenblatt **alle Farben**) oder nur die Ergebnisse für einen Einzelfarbstoff angezeigt.

Die Anzeigeeoptionen für die Produktakkumulationskurven sind im Abschnitt "Anzeigeeoptionen für das Monitoring" S. 59 beschrieben.

Berechnung der Ct-Werte

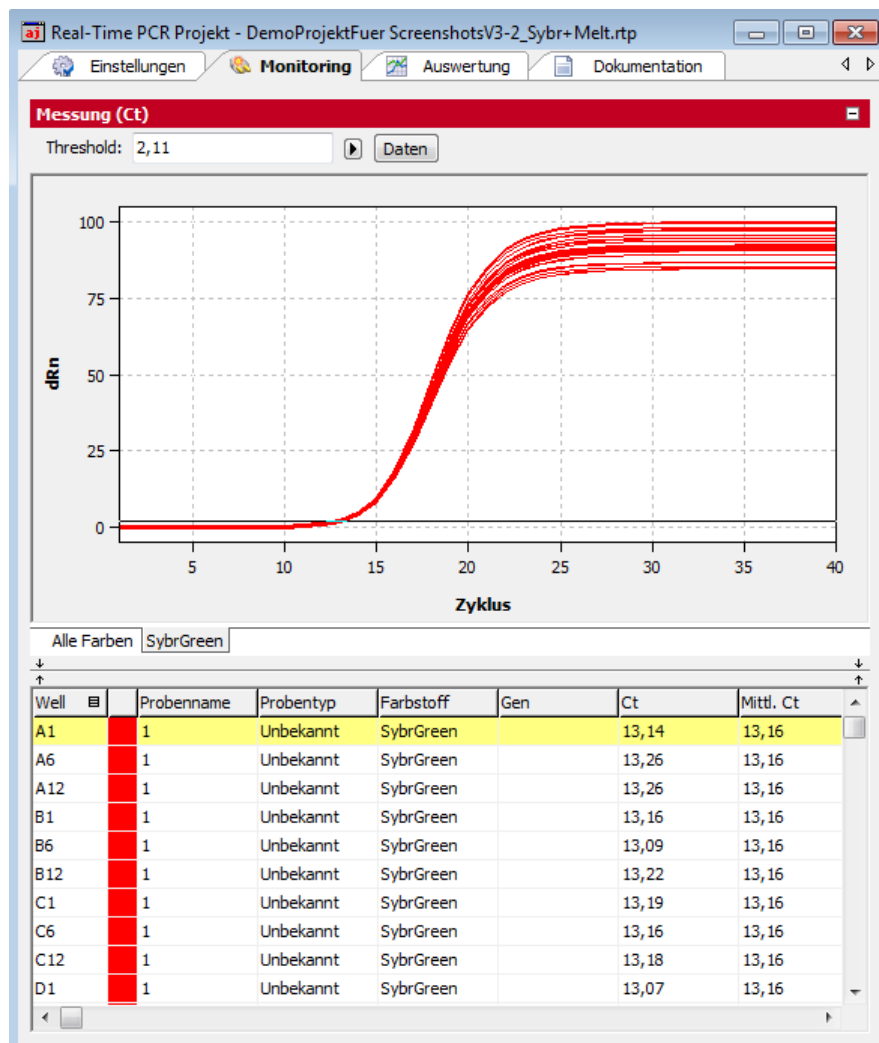
Nach dem PCR-Lauf können aus den Amplifikationskurven direkt die Ct-Werte berechnet werden, ohne eine Auswertung, z.B. **Absolute Quantifizierung**, anlegen zu müssen.

- Wählen Sie in der Liste **Ansicht** die Optionen **Amplifizierung** oder **Rohdaten** und klicken Sie auf **[Berechne Ct]**.

Die Amplifikationskurven werden normalisiert und für die Farbstoffe einzeln oder gemeinsam auf den Listebättern angezeigt. In der Tabelle darunter werden die Ct-Werte der einzelnen Proben und die Mittelwerte der Replikate angezeigt.

Der Threshold-Wert kann für die einzelnen Farbstoffe dem jeweiligen Listenblatt eingestellt werden, wobei die im Fenster **Optionen / Auswertung** eingestellten Parameter berücksichtigt werden.

- Mit einem Klick auf **[Daten]** kehren Sie zur Anzeige der Fluoreszenzintensitäten zurück.



Projektfenster Monitoring mit einer Auswertung der Ct-Werte

4.5 Schmelzkurven anzeigen und Schmelztemperatur T_m berechnen

Anzeige der Schmelzkurven

Der Verlauf der Schmelzkurve nach der PCR kann im Projektfenster **Monitoring** verfolgt werden.

- Für die Anzeige der Schmelzkurven wählen Sie in der Liste **Ansicht** die Option **Schmelzkurve**.

Die Anzeigeeoptionen für die Schmelzkurven sind im Abschnitt "Anzeigeeoptionen für das Monitoring" S. 59 beschrieben.

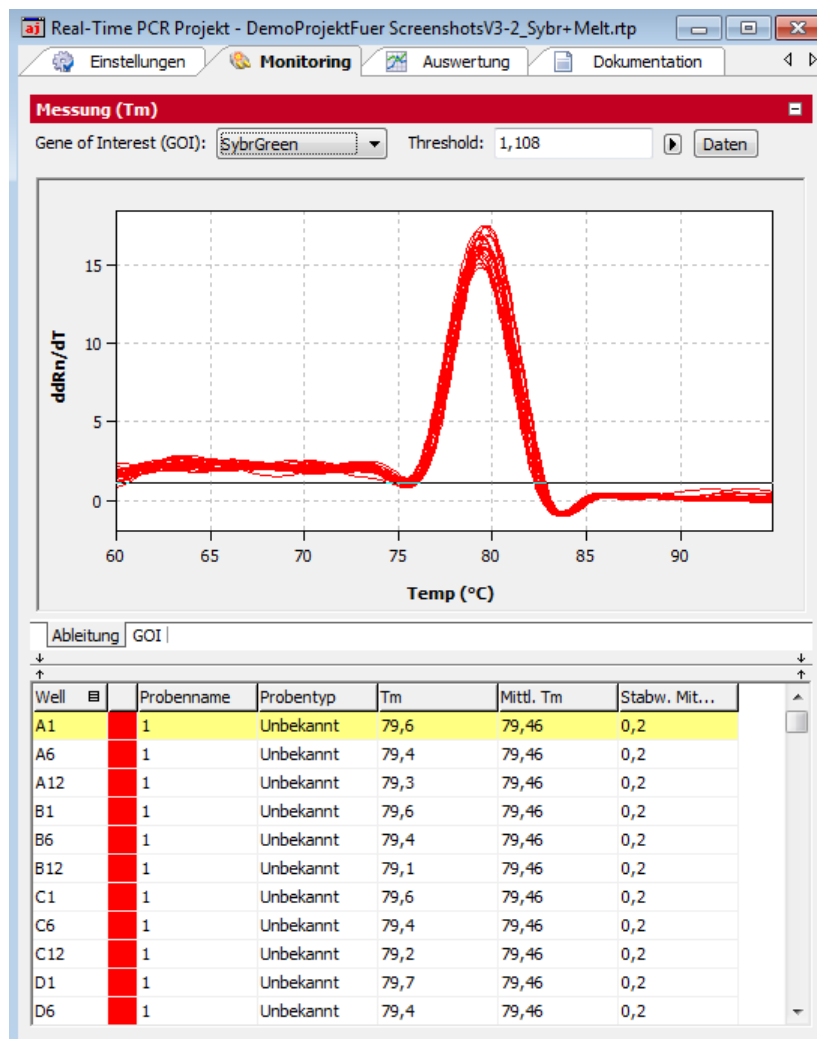
Schmelztemperatur T_m berechnen

Für einen PCR-Lauf mit angeschlossener Schmelzkurve können im Fenster **Monitoring** die Schmelztemperaturen berechnet werden, ohne die Auswertung **Schmelzkurve** anlegen zu müssen.

- Wählen Sie im Projektfenster **Monitoring** in der Liste **Ansicht** die Option **Schmelzkurve**.
- Klicken Sie auf **[Berechne T_m]**.
- Wählen Sie in der Liste **Gene of Interest (GOI)** das zu betrachtende Gen aus.

Unter Berücksichtigung der im Fenster **Optionen / Auswertung** eingestellten Parameter wird die Schmelztemperatur berechnet und das Diagramm und die Ergebnistabelle angezeigt.

- Optional kann auf der Registerkarte **Ableitung** ein Threshold-Wert eingestellt werden, mit dem signifikante Peaks von unwichtigen unterschieden werden können.
- Mit einem Klick auf **[Daten]** kehren Sie zur Anzeige der Fluoreszenzintensitäten zurück.



Projektfenster Monitoring mit einer Auswertung der Schmelztemperatur

4.6 Fluoreszenzdaten exportieren

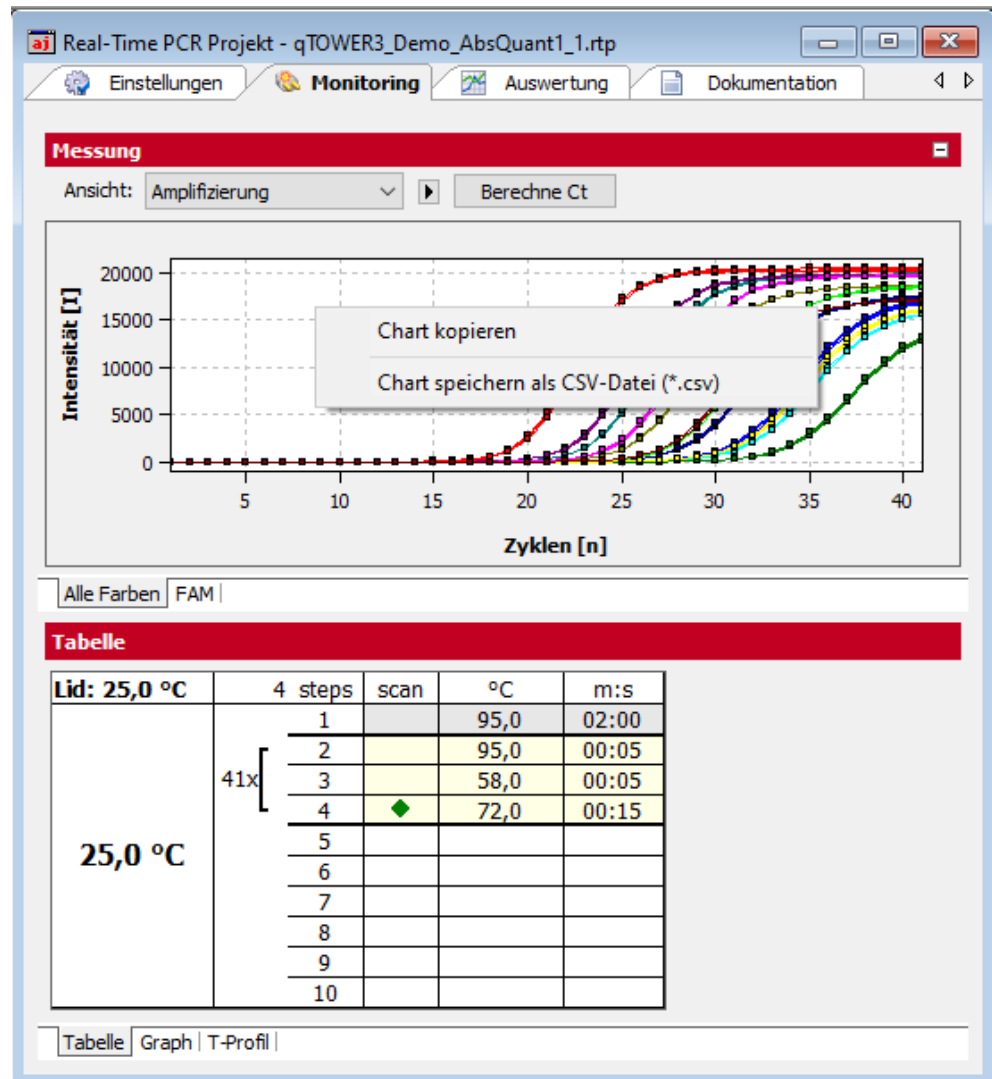
Sie können für einen PCR-Run die bearbeiteten Fluoreszenzdaten für die Auswertung der Amplifikation und Schmelzkurve und die unbearbeiteten Rohdaten als CSV-Datei exportieren.

Fluoreszenzdaten manuell exportieren

Auf der Projektkarte **Monitoring** können Sie die Fluoreszenzdaten im CSV-Format exportieren. Außerdem können Sie hier die graphische Darstellung der Messergebnisse als Hardcopy in die Zwischenablage kopieren und so anderen Programmen zur Verfügung stellen.

- Wechseln Sie auf die Projektkarte **Monitoring** und wählen Sie hier in der Liste **Ansicht** die zu exportierenden Daten.
- Führen Sie auf der Graphik einen Rechtsklick mit der Maus aus.
Es öffnet sich das Auswahlfenster für Export und Hardcopy.
- Klicken Sie auf **Chart kopieren**, um die Graphik in die Zwischenablage zu kopieren.

- Wählen Sie die Option **Chart speichern als CSV-Datei** für den Export der Fluoreszenzdaten.
Es öffnet sich das Standardfenster **Speichern unter**.
Geben Sie einen Namen für die Datei ein und bestätigen Sie die Eingaben mit **[OK]**.
✓ Die Daten werden exportiert.



Kontextmenü für den Export der Fluoreszenzdaten im Projektfenster Monitoring

Fluoreszenzdaten
automatisch exportieren

Den automatischen Export von Fluoreszenzdaten vereinbaren Sie im Fenster **Optionen / Allgemein**. Nach einem PCR-Run werden für jeden Farbstoff 3 Dateien (Amplifikation, Schmelzkurve und Rohdaten) exportiert.

1. Schließen Sie alle Projekte.
2. Rufen Sie mit dem Menübefehl **Extras ▶ Optionen** das gleichnamige Fenster auf.
3. Aktivieren Sie auf der Karte **Allgemein** die Option **Autom. Rohdaten CSV-Export am Ende des Laufs**.
4. Wählen Sie in der Liste **Dateipfad für autom. Speichern (Rohdaten CSV)** den Ordner für die Exportdateien.
✓ Beim nächsten PCR-Run werden die Dateien automatisch exportiert.

Die Dateinamen setzen sich aus folgenden Werten zusammen:

Vorlagenname_Typ_Datum_Uhrzeit_Farbstoff.csv
(z. B. Kit-Vorlage_AD_2020-09-21_1154_FAM.csv)

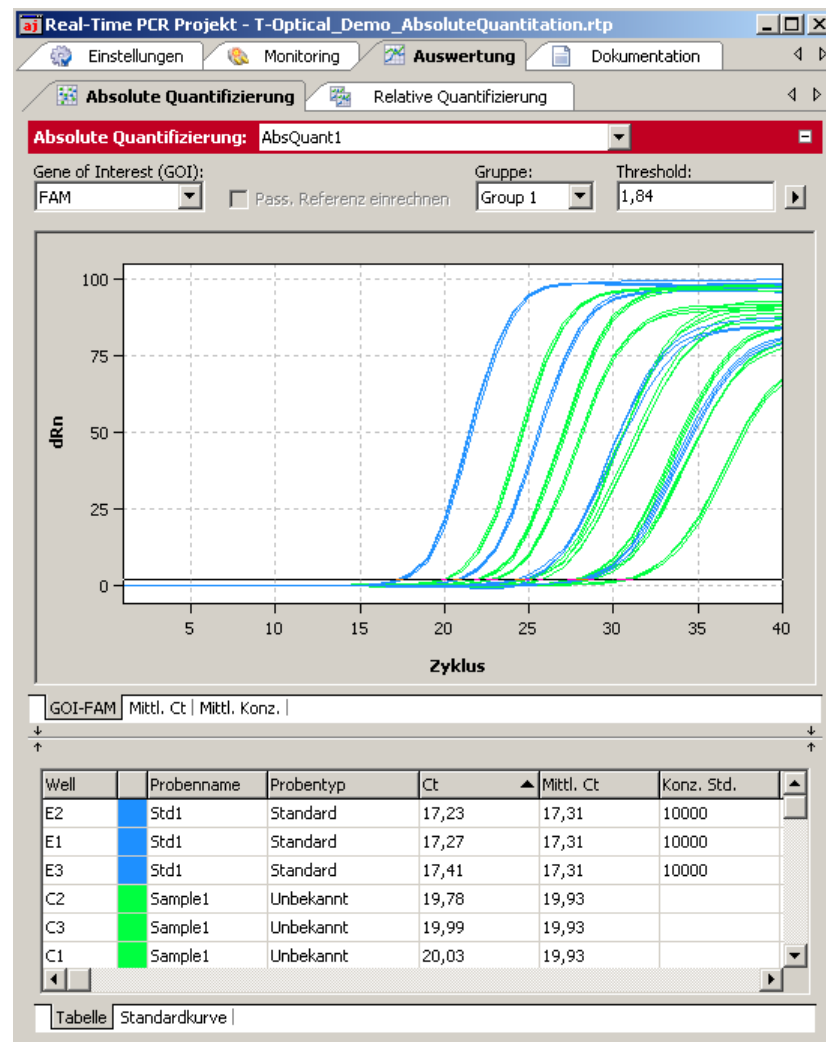
Der Wert "Typ" bezeichnet die exportierten Fluoreszenzdaten:

Typ	Fluoreszenzdaten
AD	Amplification data
MD	Meltig curve data
RD	Raw data

5 Auswertung

Auf der Projektkarte **Auswertung** des Projektfensters sind folgende Methoden zur Auswertung von Real-Time PCR-Experimenten verfügbar:

- Absolute Quantifizierung
- Relative Quantifizierung
- $\Delta\Delta C_t$ -Methode
- Schmelzkurvenbestimmung
- Genotypisierung
- POS/NEG-Analyse im Endpunkt



Projektfenster Auswertung

Die einzelnen Auswertemethoden sind über die untergeordneten Karten erreichbar. Für jede Auswertemethode können verschiedene Auswertungen angelegt werden.

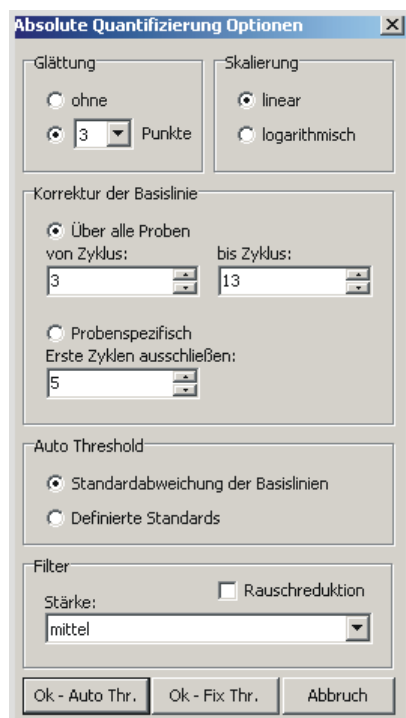
Werkzeugleiste und Menübefehle werden den Erfordernissen der gewählten Methodenkarte angepasst.

5.1 Allgemeine Funktionen im Projektfenster Auswertung

5.1.1 Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen

Für einige Auswerteparameter können Voreinstellungen getroffen werden.


1. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste.
2. Stellen Sie folgende Parameter ein.

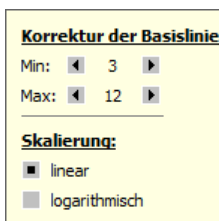


Fenster für Grundeinstellungen zur Auswertung

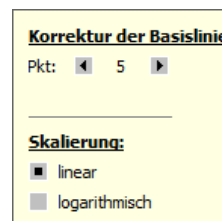
Option	Funktion
Glättung	Einstellung der Glättungsbedingung für die Messdaten
Skalierung	Auswahl der Skalierung der der Daten (linear oder logarithmisch)

Korrektur der Basislinie	<p>Bei der Korrektur der Basislinie ist zwischen zwei Optionen für die Art der Korrektur zu wählen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 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 Erste Zyklen ausschließen eingestellt. Die obere Bereichsgrenze wird für jede Probe separat durch einen Algorithmus ermittelt. <p>Hinweis: Die <u>Art</u> der Basislinienkorrektur lässt sich nur in diesem Dialog einstellen. Im Projektfenster können jedoch die Bereichsgrenzen für die Korrektur angepasst werden.</p>
Threshold	<p>Berechnung des Thresholds als x-fache Abweichung der Standardabweichung der Basislinien (Faktor einstellbar in Extras / Optionen / Auswertung im Hauptmenü) oder aufgrund von definierten Standards, mit dem Ziel den maximalen Wert für das Bestimmtheitsmaß R^2 zu erhalten</p>
Filter	<p>Digitaler Filter zur Glättung der Fluoreszenzkurven, einstellbar in den Stufen schwach, mittel und stark</p>
Rausch- unterdrückung	<p>Verrauschte Kurven, die von der Software nicht als Amplifikationskurven erkannt werden, werden auf 0 gesetzt und es werden keine Ct-Werte ermittelt.</p>
Auto Threshold	<p>Die Threshold-Linie wird durch die Software nach Änderungen in den Grundeinstellungen neu kalkuliert.</p>
Fix Threshold	<p>Die gesetzte Threshold-Linie wird bei Änderungen in den Grundeinstellungen beibehalten.</p>

Je nach verwendeter Analysenmethode stehen darüber hinaus eventuell noch weitere Möglichkeiten für die Einstellung zur Verfügung. Diese werden in den jeweiligen Abschnitten separat erläutert. Für sämtliche Darstellungen auf der Projektkarte **Auswertung** gibt es zusätzlich die Möglichkeit des schnellen Zugriffs auf den Einstellbereich der Basislinie und die Darstellungsoptionen linear und logarithmisch. Dazu kann über den Button mit dem Pfeil nach rechts  im jeweiligen Fenster eine Auswahl für Darstellungsoptionen geöffnet werden.



Parameter für Basislinienkorrektur
Über alle Proben



Parameter für Basislinienkorrektur
Probenspezifisch

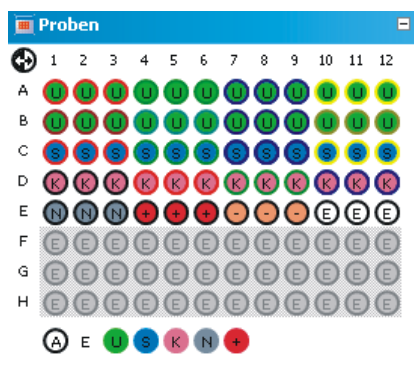
Individuelle Einstellung der Basislinienkorrektur und Skalierung der Fluoreszenzkurven während der Auswertung

5.1.2 Proben für Auswertung aktivieren/deaktivieren

Proben einzelner Wells können im Projektextplorer über den Menüpunkt **Proben** für die Auswertung aktiviert bzw. deaktiviert werden. So können zum Beispiel Ausreißer eliminiert und bei Mittelwerten nicht berücksichtigt werden.

Hinweis:

Die Auswahl im Projektextplorer hat nur Einfluss auf die Auswertung der Fluoreszenzdaten. Es werden keine Messdaten gelöscht.





Projektextplorer Proben zur (De-)Aktivierung der Proben in der Auswertung

Die Markierung der Probenbelegung entspricht der Kennzeichnung auf der Projektkarte **Proben**. Die Farbcodierung kann unter dem Menüpunkt **Extras ▶ Optionen** im Fenster **Optionen / Farben** eingestellt werden.

Probentyp	Symbol	Definition
Leer	E	Beschreibt eine leere Position auf der PCR-Platte
Unbekannt	U	Probe unbekannter Konzentration oder Verdünnung (Messprobe)
Standard	S	Probe bekannter Konzentration oder Verdünnung
Kalibrator	K	Probe, deren Zielgen-Expressionslevel als 1 gesetzt wird
No template control (NTC)	N	Kompletter Reaktionsansatz aber ohne Matrizenstrang
Positivkontrolle	+	Positiver Kontrollansatz, bei dem ein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

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

Aktive und damit in der Auswertung berücksichtigte Wells sind mit ihrem Probenotyp-Symbol gekennzeichnet. In deaktivierten Wells werden die Symbole grau dargestellt und die Fluoreszenzkurven werden ausgeblendet. Leere Wells sind mit einem "E" gekennzeichnet.

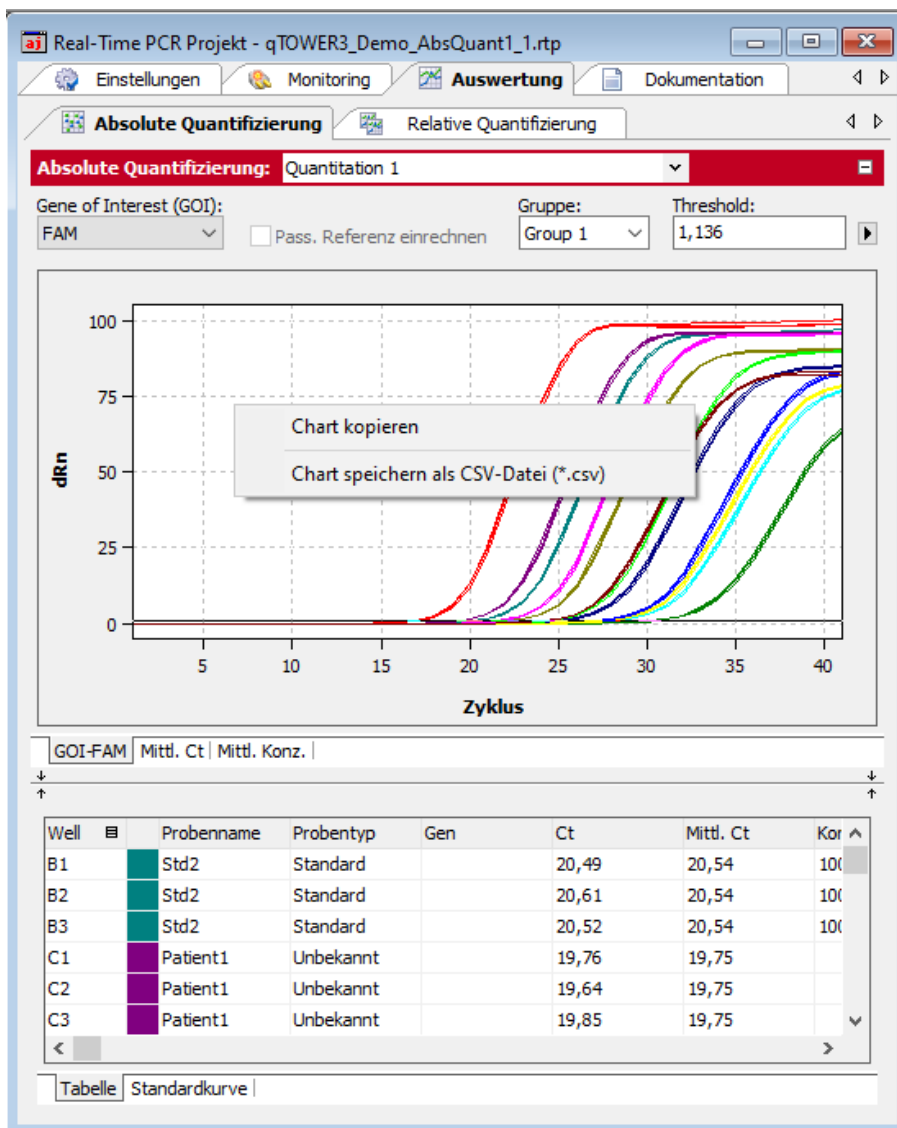
- Das Umschalten erfolgt mit der Maus. Bei jedem Klick auf ein Well wechselt die Aktivierung.
- Nebeneinander liegende Wells schalten Sie um, in dem Sie mit gedrückter Maustaste über die Wells fahren.
- Ganze Zeilen und Spalten können durch Klick auf den Buchstaben bzw. Zahl der Zeile [A-H] bzw. Spalte [1-12] invertiert werden.
- Die ganze Platte kann durch Klick auf  links oben invertiert werden.
- Zur Aktivierung aller Wells klicken Sie auf das Symbol  unter der Graphik.
- Um nur die Proben eines bestimmten Typs zu aktivieren, klicken Sie auf das entsprechende Symbol unter der Graphik. Mehrere Probenotypen können Sie gleichzeitig aktivieren, wenn Sie die Probenotypen mit gedrückter Strg-Taste anklicken.

5.1.3 Fluoreszenzdaten aus einer Auswertung exportieren

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

Hinweis: Auf den Auswertekarten exportieren Sie die für die Auswertung bearbeiteten Fluoreszenzdaten. Die Rohdaten können Sie auf der Projektkarte **Monitoring** exportieren.

- Führen Sie auf der Graphik einen Rechtsklick mit der Maus aus. Es öffnet sich das Auswahlfenster für Export und Hardcopy.
- Klicken Sie auf **Chart kopieren**, um die Graphik in die Zwischenablage zu kopieren.
- Wählen Sie die Option **Chart speichern als CSV-Datei** für den Export der Fluoreszenzdaten. Es öffnet sich das Standardfenster **Speichern unter**. Geben Sie einen Namen für die Datei ein und bestätigen Sie die Eingaben mit **[OK]**.



Fluoreszenzdaten exportieren

5.1.4 Funktionen in der Ergebnistabelle



Für jede Analyse werden die Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst, die über das Listenblatt **Tabelle** aufgerufen werden kann.

Well	Probenname	Probentyp	Ct	Mittl. Ct	Konz. Std.
B1	Std2	Standard	20,58	20,7	1000
B2	Std2	Standard	20,78	20,7	1000
B3	Std2	Standard	20,76	20,7	1000
C1	Sample1	Unbekannt	20,03	19,93	
C2	Sample1	Unbekannt	19,78	19,93	
C3	Sample1	Unbekannt	19,99	19,93	

Ergebnistabelle

Je nach gewählter Analysenmethode enthält die Ergebnistabelle unterschiedliche Datensätze, die Auswahl und Ansicht der angezeigten Spalten kann aber für jede Tabelle gleichermaßen benutzerdefiniert angepasst werden:

- Nach Rechtsklick auf eine Spaltenüberschrift wird ein Auswahlfeld eingeblendet, in dem sich durch An- oder Abwahl einzelne Spalten ein- oder ausblenden lassen.
- Durch Ziehen einer Spaltenüberschrift mit gedrückter linker Maustaste lassen sich Spalten gegeneinander austauschen und so die Anordnung der Spalten verändern.
- Durch Linksklick auf die Ränder der Spaltenüberschriften kann die Spaltenbreite eingestellt werden
- Nach Linksklick auf eine Spaltenüberschrift werden die Daten auf- oder absteigend sortiert (nach Werten bzw. alphabetisch).
- Die Farben der Amplifikationskurven können nach einem Doppelklick auf die Farbfläche in der Tabellenzeile geändert werden.
Mit gedrückter Strg-Taste und Doppelklick öffnen Sie das Fenster **Farbe bearbeiten** zur Einstellung der Farbe für mehrere Wells (→ Abschnitt "Probeneigenschaften in der Proben-tabelle eingeben" S. 45).
- Ein Linksklick auf die Spalte **Well** schaltet zwischen spalten- und zeilenweiser Darstellung der Ergebnisse um. Die spalten- und zeilenweise Darstellung orientiert sich an der Anordnung der Proben im Layout.

Symbol	Bedeutung
	Datenanordnung nach Spalten
	Datenanordnung nach Zeilen

5.1.5 Ergebnisse exportieren

Ergebnistabellen können als Excel-Datei (*.xls) oder "*.csv"-Datei exportiert werden.

- Führen Sie auf die Proben-tabelle einen Rechtsklick aus.
Es öffnet sich ein Kontextmenü mit den Menübefehlen **Tabelle speichern als Excel-Datei (*.XLS)**, **Tabelle speichern als Excel-Datei (*.XLS) und Excel starten** und **Tabelle speichern als CSV-Datei (*.CSV)**
- Wählen Sie den entsprechenden Menübefehl aus.
- Es öffnet sich das Standardfenster SPEICHERN UNTER. Geben Sie einen Namen für die Datei ein und bestätigen Sie die Eingaben mit [OK].

Hinweis:

Benutzerdefinierte Anpassungen der Ergebnistabelle werden beim Export berücksichtigt.

Well	Probenname	Probentyp	Ct	Mittl. Ct	Konz. Std.
B1	Std2	Standard	20,58	20,7	1000
B2	Std2				
B3	Std2				
C1	Sample1				
C2	Sample1	Unbekannt	19,99	19,93	
C3	Sample1	Unbekannt	19,99	19,93	

Tabelle | Standardkurve |




Ergebnis exportieren

Die Exportfunktion zur Weiterverarbeitung der Daten mit qBase+ ist im Abschnitt "Berechnungsergebnisse" S. 84 beschrieben.

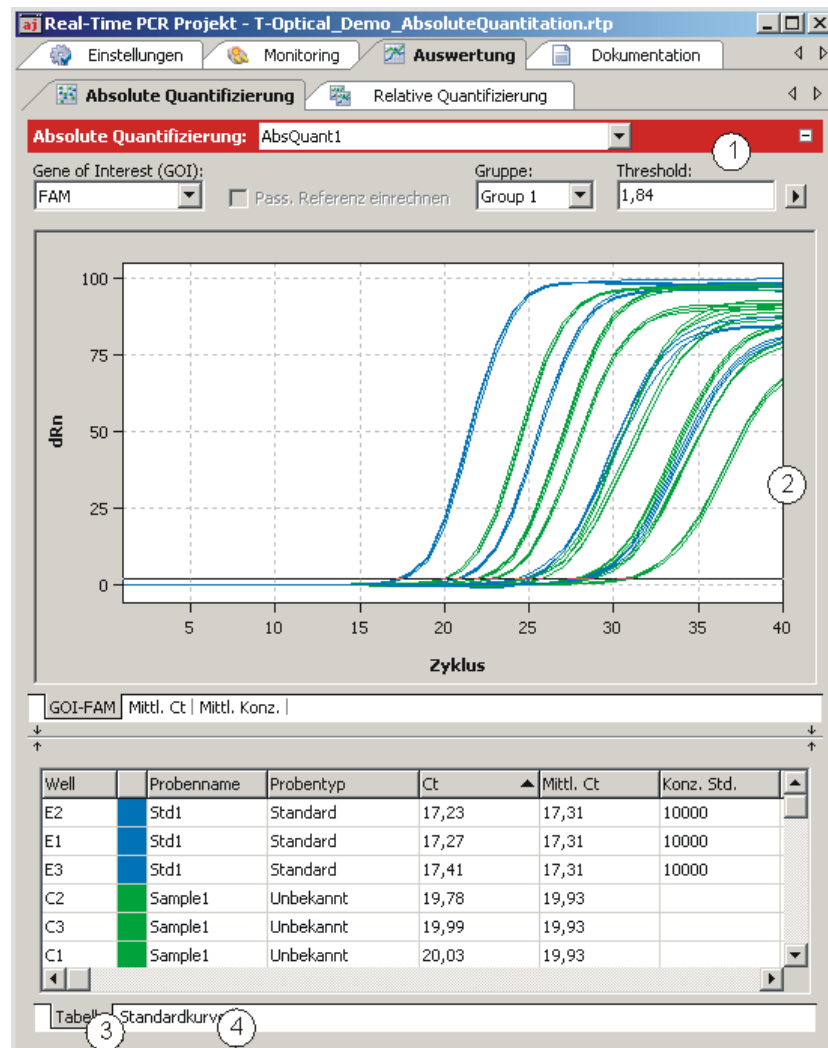
5.2 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung dient zur Ermittlung von absoluten Kopienzahlen in Proben anhand des Vergleichs mit Standards bekannter Konzentrationen.

5.2.1 Auswertung für eine absolute Quantifizierung neu anlegen

1. Wechseln Sie auf die Projektkarte **Auswertung / Abs quant.**
Falls die Karte nicht sichtbar ist klicken Sie auf die Pfeiltasten   in der Kartenzeile. Damit werden die Karten weiter gescrollt.
2. Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **AbsQuant / Abs. Quantifizierung hinzufügen**.
3. Tragen Sie im sich öffnenden Eingabefenster die Bezeichnung für die aktuelle Auswertung ein.

Auf der Karte **Abs.Quant.** werden folgende Anzeigen freigeschaltet:



Fenster zur absoluten Quantifizierung

- Parametereinstellung (1)
- Anzeige der Fluoreszenzkurven (2)
- Anzeige der Ergebnistabelle mit Messwerten (3)
- Anzeige der Standardkurve und der berechneten Koeffizienten (4)


5.2.2 Parameter für die absolute Quantifizierung einstellen



Parametereinstellungen für die absolute Quantifizierung

Stellen Sie folgende Parameter für die absolute Quantifizierung 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 Regressionskurven für die Konzentration angezeigt.
Pass. Referenz einrechnen	Nur wählbar, wenn auf der Projektkarte Einstellungen / Scan ein Farbstoff als passive Referenz definiert wurde. Bei Aktivierung wird die Fluoreszenz des als passive Referenz gesetzten Farbstoffs zur Normierung eingesetzt.
Gruppe	Wurden auf der PCR-Platte mehrere Experimente durchgeführt, ist hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments auszuwählen (→ Abschnitt "Gruppen definieren" S. 52).
Threshold	Threshold-Wert manuell anpassen. Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn). Hinweis: Der Threshold-Wert kann automatisch berechnet oder in der Graphik manuell eingestellt werden (→ siehe auch "Threshold-Wert einstellen" unten).
	Öffnet das Auswahlfenster mit Darstellungsoptionen (→ Abschnitt "Anzeige der Fluoreszenzkurven für die absolute Quantifizierung" S. 80).

Threshold-Wert einstellen


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

Den Threshold-Wert können Sie auf verschiedene Weise einstellen:

- In den allgemeinen Optionen (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71).
- Manuell in den Parametern der jeweiligen Auswertung (siehe Tabelle oben)
- Graphisch in der Darstellung der Fluoreszenzkurven:
In der Graphik verschieben Sie die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor nach oben oder unten, während Sie die linke Maustaste gedrückt halten. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die Ct-Werte in der Probentabelle.

Hinweis:

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

- Automatisch berechnen:
Die automatische Berechnung des Threshold-Wertes lösen Sie mit einem Klick auf das Symbol  aus.
Alternativ können Sie auch den Menübefehl **AbsQuant ▶ Autom. Threshold** aufrufen.

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

Fix Threshold

Der Threshold-Wert wird jeweils neu kalkuliert, wenn Grundeinstellungen zur Analyse verändert werden. In den Optionen zur Analyse kann die Funktion "Fix Threshold" angewählt werden, so dass die Threshold-Linie bei Änderungen in den Grundeinstellungen beibehalten wird (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71).


5.2.3 Fluoreszenzkurven für die absolute Quantifizierung anzeigen

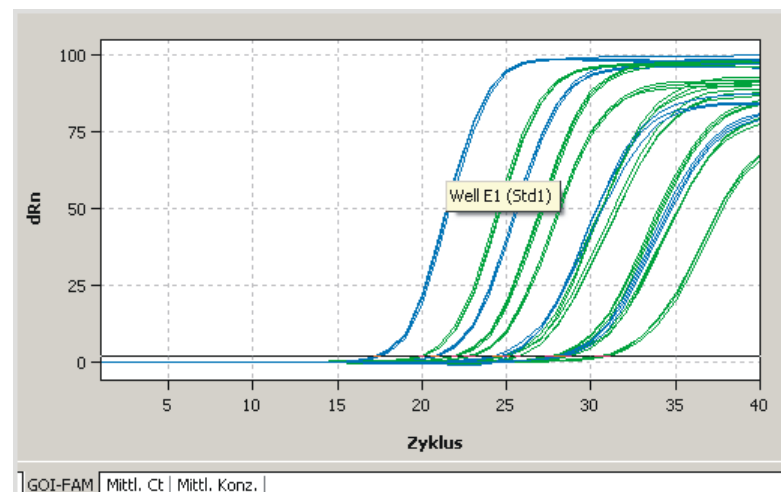
Im Anzeigebereich sind die gemessenen Daten, normiert auf den Wert 100 für die höchste Fluoreszenzintensität, gegen den Zyklus für das ausgewählte Zielgen aufgetragen.

Durch Umschalten auf eine andere Zielgen/Farbstoff-Kombination werden deren Fluoreszenzkurven angezeigt.

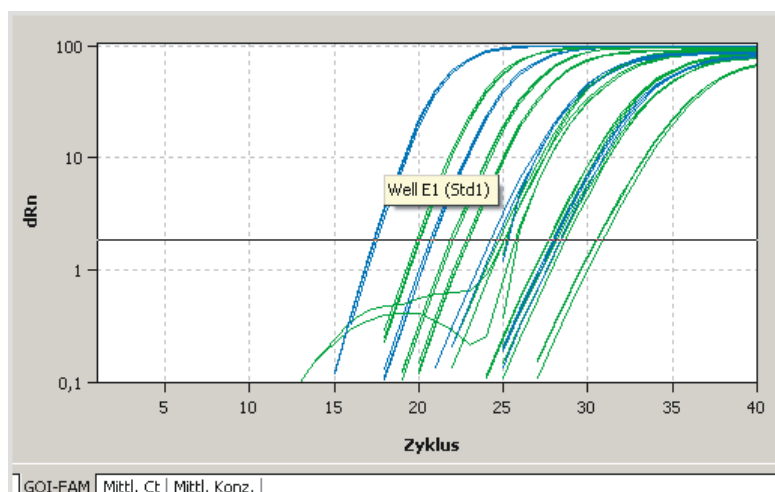
Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Bei beiden Darstellungsformen wird eine Kurzinformation zur Probe eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht.

Darstellungsoption der Graphik umschalten

1. Klicken Sie auf die Schaltfläche  in der Parameterleiste.
Es öffnet sich ein Auswahlfenster für die Darstellungsoptionen.
2. Wählen Sie die Option **Skalierung logarithmisch** bzw. **linear**.
Klicken Sie neben das Auswahlfenster. Die Änderungen werden übernommen.



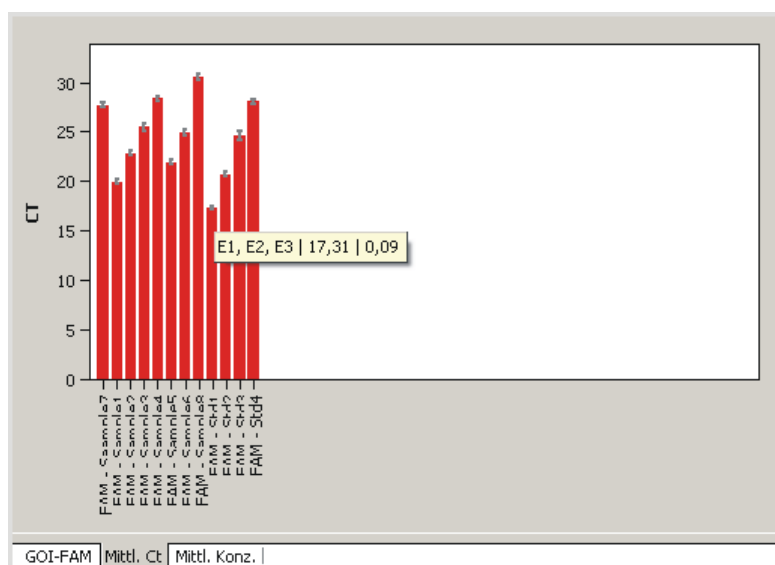
Lineare Darstellung der Fluoreszenzkurve für die absolute Quantifizierung



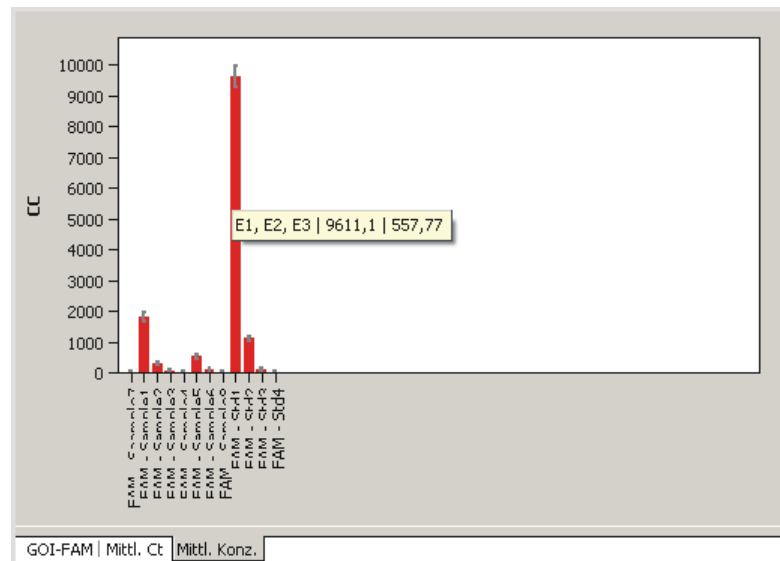
Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurve mit horizontaler Threshold-Linie

5.2.4 Durchschnittliche Ct-Werte oder durchschnittliche Konzentrationen anzeigen

Nach Anwahl des Registerblatts **Mittl. Ct** oder **Mittl. Konz.** wechselt die Anzeige zu einer Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. Der jeweilige Probenname ist unterhalb eines jeden Balkens angegeben. Die Höhe der Balken wird bestimmt durch den berechneten mittleren Ct-Wert oder die berechnete mittlere Konzentration von Replikaten. Zu jedem Balken wird eine Kurzinformation zur Position der Proben, zum Mittelwert und zur berechneten Standardabweichung eingeblendet, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird (mouse-over Funktion). Die Höhe der Standardabweichung wird in Form eines Fehlerbalkens angezeigt. Da bei einer großen Probenanzahl nicht alle Balken gleichzeitig im Diagrammfenster darstellbar sind, kann durch Linksklick auf die Diagrammfläche und Ziehen mit der Maus der Fensterinhalt horizontal verschoben werden.



Balkendiagramm zu durchschnittlichen Ct-Werten von Replikaten



Balkendiagramm zu durchschnittlichen Konzentrationen von Replikaten

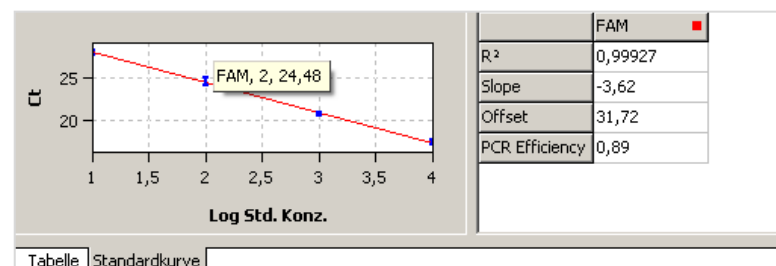
5.2.5 Standardkurve und Ergebnisse einer absoluten Quantifizierung anzeigen

Im unteren Bereich des Projektfensters **Auswertung** kann durch die Listenblätter **Standardkurve** und **Tabelle** zwischen der Anzeige der berechneten Standardkurve und der Probenabelle gewechselt werden.

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 Probenamen und mittlerem Ct-Wert der Replikate angezeigt, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. Im Wertebereich rechts daneben werden folgende berechneten Daten angezeigt:

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

Die Standardkurve und die Werte werden durch die Software qPCRsoft auto automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert.



Standardkurve für die absolute Quantifizierung

In der Ergebnistabelle für die absolute Quantifizierung sind alle Daten und zugehörigen Messwerte für die Proben zusammengefasst.

Well	Probenname	Probentyp	Ct	Mittl. Ct	Konz. Std.
B1	Std2	Standard	20,58	20,7	1000
B2	Std2	Standard	20,78	20,7	1000
B3	Std2	Standard	20,76	20,7	1000
C1	Sample1	Unbekannt	20,03	19,93	
C2	Sample1	Unbekannt	19,78	19,93	
C3	Sample1	Unbekannt	19,99	19,93	

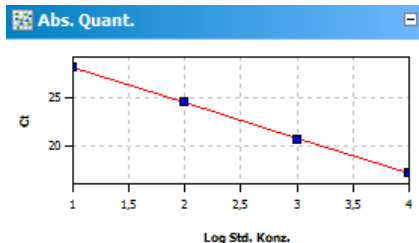
Ergebnistabelle für die absolute Quantifizierung

Für die absolute Quantifizierung enthält die Ergebnistabelle folgende Angaben:

Option	Bedeutung
Well	Position der Probe
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch (nicht veränderbar) eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.
Probenname	Name der Probe
Probentyp	Typ der Probe
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Gen	Name des in der Probe gemessenen Gens
Ct	Ct-Wert der Probe
Mittl. Ct	Durchschnitts-Ct Wert von Replikaten
Konz. Std	Konzentration der Standardprobe*
Mittl. Konz.	Aus der Standardkurve anhand des mittl. Ct-Werts ermittelte Konzentration
Stabw. Ct	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten
%CV Ct	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten
Stabw. Mittl. Konz.	Standardabweichung der mittleren Konzentration

Darstellung im Projektextplorer

Die von der Software berechnete Standardkurve wird in Kurzform auch im Projektextplorer unter dem Punkt **Absolute Quantifizierung** angezeigt. Dargestellt ist die graphische Auftragung der Ct-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus ihrer Konzentration:



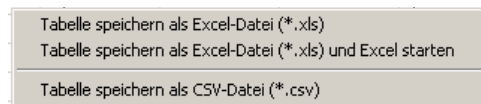
Darstellung der Standardkurve im Projektextplorer

5.2.6 Berechnungsergebnisse exportieren

Der Export von Messwerten und Berechnungsergebnissen aus der Ergebnistabelle ermöglicht es Ihnen, weiterführende Analysen mit Hilfe anderer Softwarelösungen auszuführen.

Excel und CSV


1. Passen Sie die Ergebnistabelle Ihren Anforderungen entsprechend an:
Legen Sie die anzuzeigenden Spalten fest, bestimmen Sie deren Breite und Reihenfolge und nehmen Sie die Sortierung vor (alphabetisch, numerisch, zeilenweise, spaltenweise).
2. Führen Sie auf die konfigurierte Tabelle einen Rechtsklick aus und wählen Sie aus dem erscheinenden Kontextmenü die Exportfunktion (Export als Excel- oder CSV-Datei).



Kontextmenü für den Datenexport

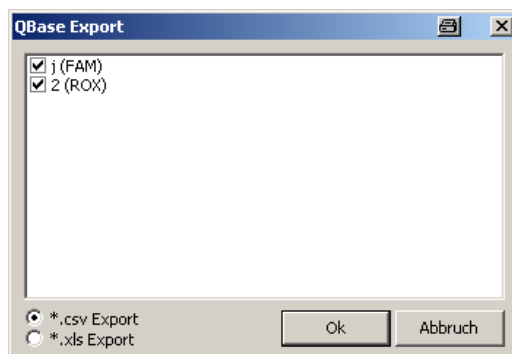
Export nach qBASE+

Das Programm qBASE+ ermöglicht eine komplexere Analyse Ihrer Daten sowie umfangreiche statistische Auswertungen. Nähere Informationen dazu finden Sie unter www.biogazelle.com. Aus dem Auswertemodul "Absolute Quantifizierung" können Sie die mit qPCRsoft auto erzeugten Daten in eine Datei exportieren, welche direkt von qBASE+ gelesen und verarbeitet werden kann.

1. Um die Ergebnisse zu exportieren, klicken Sie auf das Symbol  in der oberen Symbolleiste. Alternativ können Sie den Menüpunkt ABSOLUTE QUANTIFIZIERUNG / qBASE EXPORT wählen.
2. Legen Sie im folgenden Dialogfeld fest, welche Targets Sie exportieren möchten und welches Dateiformat erzeugt werden soll (qBASE+ kann beide Datenformate lesen).

Folgende Informationen werden an qBASE+ übergeben:

- Well
- Probenotyp
- Probenname
- Genname
- Ct-Wert
- Standardkonzentration
- Probe aktiv/inaktiv




Fenster QBase Export für den Datenexport in das Programm qBASE+

Hinweis:

Nur die als GOI definierten Gene werden im Exportdialog angezeigt. Bei Multiplex-Experimenten muss daher für jedes GOI, d.h. für jeden Farbstoff, eine Absolute Quantifizierung angelegt werden. Führen Sie dazu für jedes Gen die in Abschnitt "Auswertung für eine absolute Quantifizierung neu anlegen" S. 77, beschriebenen Schritte (2) – (3) aus.

5.2.7 Standardkurve in ein Experiment importieren

Neben der Möglichkeit eine Standardkurve im Experiment zu messen, ist es mit der Software qPCRsoft auto auch möglich, die Konzentration der Proben anhand einer gespeicherten Standardkurve zu ermitteln. Dazu steht eine Importfunktion zur Verfügung.

1. Öffnen Sie mit dem Symbol  in der Werkzeugleiste das Fenster **Standardkurve importieren**.

Alternativ können Sie auch den Menübefehl **AbsQuant ▶ Standardkurve importieren** aufrufen.


Die der Standardkurve zugrunde liegende mathematische Gleichung und der dazugehörige Farbstoff werden jeweils in den Listenfeldern des Fensters angezeigt.

2. Wählen Sie im Fenster **Standardkurve importieren** eine der Optionen zum Import und nehmen Sie die entsprechenden Einträge vor:

Option	Beschreibung
Aus diesem Lauf importieren	Importiert eine Standardkurve aus dem aktuell geöffneten Projekt. Sind in einem Projekt mehrere Standardkurven gespeichert, werden alle Kurven angezeigt und es kann eine Auswahl vorgenommen werden.
Aus gespeichertem Lauf importieren	Importiert eine Standardkurve aus einem gespeichertem Projekt. Bei mehreren gespeicherten Standardkurven wählen Sie die betreffende 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	Löscht importierte oder eingegebene Standardkurven, sodass diese in der Auswertung keine Anwendung mehr finden.

5.2.8 Auswertung einer absoluten Quantifizierung löschen

Eine nicht benötigte Auswertung kann entfernt werden.


1. Aktivieren Sie die Auswertung, indem Sie deren Name in der Auswerteliste der Methodenkarte auswählen.
2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste. Alternativ wählen Sie den Menübefehl **AbsQuant ▶ Abs. Quantifizierung entfernen**.

Die Auswertung wird entfernt.

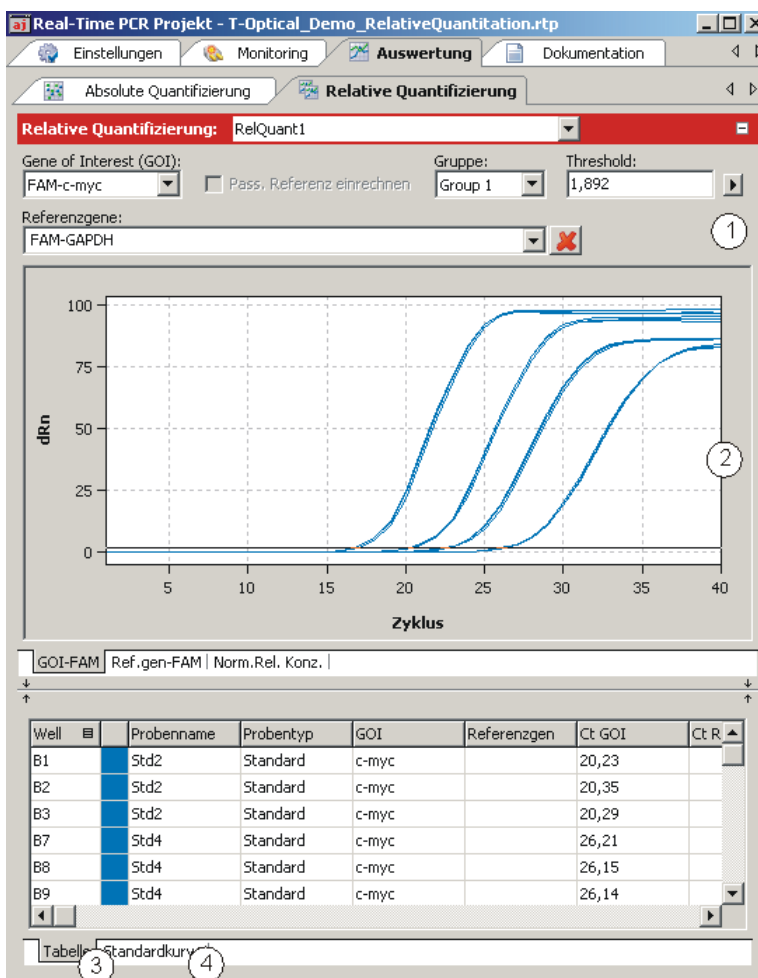
5.3 Relative Quantifizierung

Mittels der relativen Quantifizierung lässt sich das relative Expressionsverhältnis des Zielgens zu einem oder mehreren Referenzgenen (meist Housekeeping-Genen) bestimmen. Ist eine der Proben als Kalibrator definiert, so 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 Ziel- wie auch für das Referenzgen erforderlich, mit deren Hilfe zwei Kalibriergeraden berechnet werden.

5.3.1 Auswertung für eine relative Quantifizierung neu anlegen

1. Wechseln Sie auf die Projektkarte **Auswertung / Rel.Quantifizierung**. Falls die Karte nicht sichtbar ist klicken Sie auf die Pfeiltasten ◀ ▶ in der Kartenzeile. Damit werden die Karten weiter gescrollt.
2. Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste. Alternativ rufen Sie den Menübefehl **RelQuant ▶ Rel. Quantifizierung hinzufügen**.
3. Tragen Sie im sich öffnenden Eingabefenster die Bezeichnung für die aktuelle Auswertung ein.

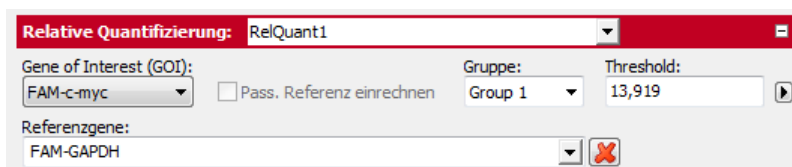
Auf der Karte **Rel. Quant.** werden folgende Anzeigen freigeschaltet:



Fenster zur relativen Quantifizierung

- Parametereinstellung (1)
- Anzeige der Fluoreszenzkurven für das Zielgen und das Referenzgen (2)
- Anzeige der um die Werte ergänzten Ergebnistabelle (3)
- Anzeige der Standardkurven für das Zielgen und das Referenzgen und die berechneten Koeffizienten (4)



5.3.2 Parameter für die relative Quantifizierung einstellen



Parametereinstellungen für die relative Quantifizierung

Folgende Parameter sind für die relative Quantifizierung einzustellen:


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 Regressionskurven für die Konzentration angezeigt. Es kann immer nur ein Zielgen ausgewählt werden.
Referenzgen	Auswahlliste der Referenzgene Im Gegensatz zum Zielgen können mehrere Referenzgene gleichzeitig angewählt werden. Die Zahl der Listenblätter im Anzeigebereich erweitert sich mit jedem Referenzgen entsprechend. Mit dem Symbol  werden alle eingestellten Referenzgene aus der Auswertung entfernt.
Pass. Referenz einrechnen	Nur wählbar, wenn auf der Projektkarte Einstellungen / Scan ein Farbstoff als passive Referenz definiert wurde. Bei Aktivierung wird die Fluoreszenz des als passive Referenz gesetzten Farbstoffs zur Normierung eingesetzt.
Gruppe	Wurden auf der PCR-Platte mehrere Experimente durchgeführt, ist hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments auszuwählen (→ Abschnitt "Gruppen definieren" S. 52).
Threshold	Threshold-Wert manuell anpassen. Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn). Hinweis: Der Threshold-Wert kann automatisch berechnet oder in der Graphik eingestellt werden.
	Öffnet das Auswahlfenster mit Darstellungsoptionen.

Threshold-Wert einstellen

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

Den Threshold-Wert können Sie auf verschiedene Weise einstellen:

- In den allgemeinen Optionen (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71)
- Manuell in den Parametern der jeweiligen Auswertung (siehe Tabelle oben)
- Graphisch in der Darstellung der Fluoreszenzkurven:
In der Graphik verschieben Sie die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor nach oben oder unten, während Sie die linke Maustaste gedrückt halten. 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 Produktakkumulationskurven besser geeignet als die lineare Darstellung.
- Automatisch berechnen lassen:
Die automatische Berechnung des Threshold-Wertes lösen Sie mit einem Klick auf das Symbol  aus.
Alternativ können Sie auch den Menübefehl **RelQuant ▶ Autom. Threshold** aufrufen.

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

Fix Threshold

Der Threshold-Wert wird jeweils neu kalkuliert, wenn Grundeinstellungen zur Analyse verändert werden. In den Optionen zur Analyse kann die Funktion **Fix Threshold** angewählt werden, so dass die Threshold-Linie bei Änderungen in den Grundeinstellungen beibehalten wird (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71).

5.3.3 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. Der Kombination Zielgen/Farbstoff und den Kombinationen Referenzgen/Farbstoff ist jeweils ein Listenblatt zugeordnet, das durch einen Klick auf den untenstehenden Reiter mit Gen/Farbstoff-Bezeichnung aktiviert wird.

Da immer nur eine Zielgen/Farbstoff-Kombination erlaubt ist, werden durch Umschalten auf eine andere Kombination deren Fluoreszenzkurven angezeigt. Die Zahl der zur Auswahl stehenden Listenblätter hängt von der Anzahl der gewählten Referenzgene ab.

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.

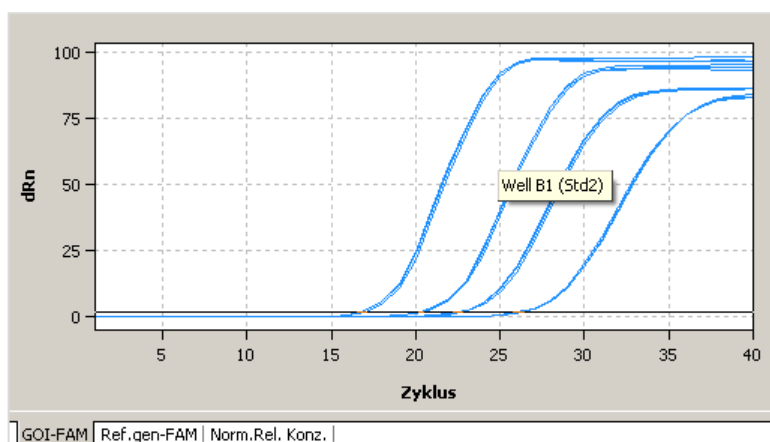
Darstellungsoption der Graphik umschalten

1. Klicken Sie auf die Schaltfläche  in der Parameterleiste.

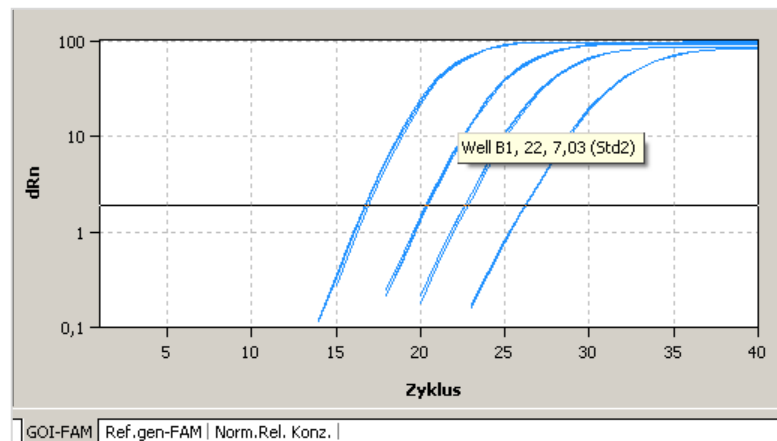
Es öffnet sich ein Auswahlfenster für die Darstellungsoptionen.

2. Wählen Sie die Option **Skalierung logarithmisch** bzw. **linear**.

Klicken Sie neben das Auswahlfenster. Die Änderungen werden übernommen.



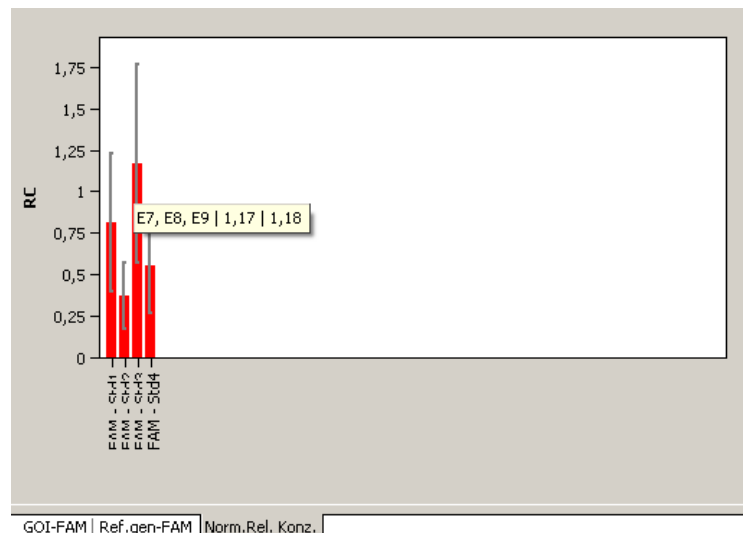
Lineare Darstellung der Fluoreszenzkurve mit horizontaler Threshold-Linie



Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurve mit horizontaler Threshold-Linie

5.3.4 Normalisierte relative Konzentrationen anzeigen

Nach Anwahl des Registerblatts **Norm.rel. Konz.** wechselt die Anzeige zu einer Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. Der jeweilige Probenname ist unterhalb eines jeden Balkens angegeben. Die Höhe der Balken wird bestimmt durch die berechnete normalisierte relative Konzentration von Replikaten. Zu jedem Balken wird eine Kurzinformation zur Position der Proben, zum Mittelwert und zur berechneten Standardabweichung eingeblendet, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. Die Höhe der Standardabweichung wird in Form eines Fehlerbalkens angezeigt. Da bei einer großen Probenanzahl nicht alle Balken gleichzeitig im Diagrammfenster darstellbar sind, kann durch Linksklick auf die Diagrammfläche und Ziehen mit der Maus der Fensterinhalt horizontal verschoben werden.



Balkendiagramm zur Darstellung von normalisierten relativen Konzentrationen

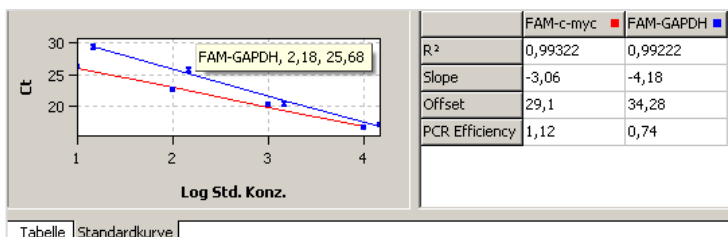
5.3.5 Standardkurven und Ergebnisse einer relativen Quantifizierung anzeigen

Im unteren Bereich des Projektfensters **Auswertung** kann durch die Listenblätter **Standardkurve** und **Tabelle** zwischen der Anzeige der berechneten Standardkurven für das Zielgen und alle ausgewählten Referenzgene und der Probetabelle für die relative Quantifizierung gewechselt werden.

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. Im Wertebereich rechts daneben werden folgende berechneten Daten angezeigt:

- die Bestimmtheitsmaße R^2 der Geradengleichung
- die Steigungen der Standardgeraden
- die Schnittpunkte der Geraden mit der y-Achse bei $x = 0$ (Offset)
- die PCR-Effizienz

Bei der Darstellung mehrerer Standardkurven ist jede Kurve mit einer individuellen Farbe dargestellt. Entsprechend enthält jede Wertetabelle einen Farbcode im Tabellenkopf, der die Zuordnung zur jeweiligen Standardkurve widerspiegelt. Die Standardkurve und die Werte werden durch die Software qPCRsoft auto automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert. Je nach Anzahl der verwendeten Gene ist unter der Tabelle ein Scroll-Balken eingefügt, mit der sich spaltenweise durch die Tabelle navigieren lässt.



Standardkurven für die relative Quantifizierung

In der Ergebnistabelle für relative Quantifizierung sind alle Daten und zugehörigen Messwerte für die Proben zusammengefasst.

Well	Probenname	Probentyp	GOI	Referenzgen	Ct GOI	Ct Referen..
B1	Std2	Standard	c-myc		20,23	
B2	Std2	Standard	c-myc		20,35	
B3	Std2	Standard	c-myc		20,29	
B7	Std4	Standard	c-myc		26,21	
B8	Std4	Standard	c-myc		26,15	
B9	Std4	Standard	c-myc		26,14	

Ergebnistabelle für die relative Quantifizierung

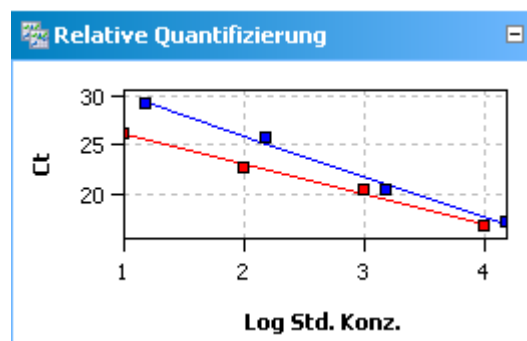
Für die relative Quantifizierung enthält die Ergebnistabelle folgende Angaben:

Spalte	Bedeutung
Well	Position der Probe
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch (nicht veränderbar) eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.
Probenname	Name der Probe
Probentyp	Typ der Probe
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe

GOI	Zielgen (Gene of interest)
Referenzgen	Referenzgen
Ct GOI	Ct-Wert Zielgen
Ct Referenzgen	Ct-Wert Referenzgen
Gen	Name des in der Probe gemessenen Gens
Mittl. Ct GOI	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Zielgens
Mittl. Ct RefGen	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Referenzgens
Konz. Std. GOI	Konzentration des Standards für das Zielgen
Konz. Std RefGen	Konzentration des Standards für das Referenzgen
Mittl. Konz. GOI	Aus der Standardkurve anhand des mittleren Ct-Werts ermittelte Konzentration für das Zielgen
Mittl. Konz. RefGen	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. RefGen	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
%CV Ct GOI	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
%CV Ct RefGen	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

Darstellung im
Projektexplorer


Die von der Software berechneten Standardkurven werden in Kurzform auch im Projektexplorer unter dem Menüpunkt **Relative Quantifizierung** angezeigt. Dargestellt ist die graphische Auftragung der Ct-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus ihrer Konzentration.



Darstellung der Standardkurven im Projektexplorer


5.3.6 Standardkurve für die relative Quantifizierung importieren

Neben der Möglichkeit eine Standardkurve im Experiment zu messen, ist es mit der Software qPCRsoft auto auch möglich, die Konzentration der Proben anhand einer gespeicherten Standardkurve zu ermitteln. Dazu steht eine Importfunktion zur Verfügung.

1. Öffnen Sie mit dem Symbol  in der Werkzeugleiste das Fenster **Standardkurve importieren**.
Alternativ können Sie auch den Menübefehl **RelQuant ▶ Standardkurve importieren** aufrufen.
2. Die weiteren Einstellungen sind analog den Einstellungen zur absoluten Quantifizierung (→ Abschnitt "Standardkurve in ein Experiment importieren" S. 85).

5.3.7 Auswertung einer relativen Quantifizierung löschen




Eine nicht benötigte Auswertung kann entfernt werden.

1. Aktivieren Sie die Auswertung, indem Sie deren Name in der Auswerteliste der Methodenkarte auswählen.
2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **RelQuant ▶ Rel. Quantifizierung entfernen** auf.
Die Auswertung wird entfernt.

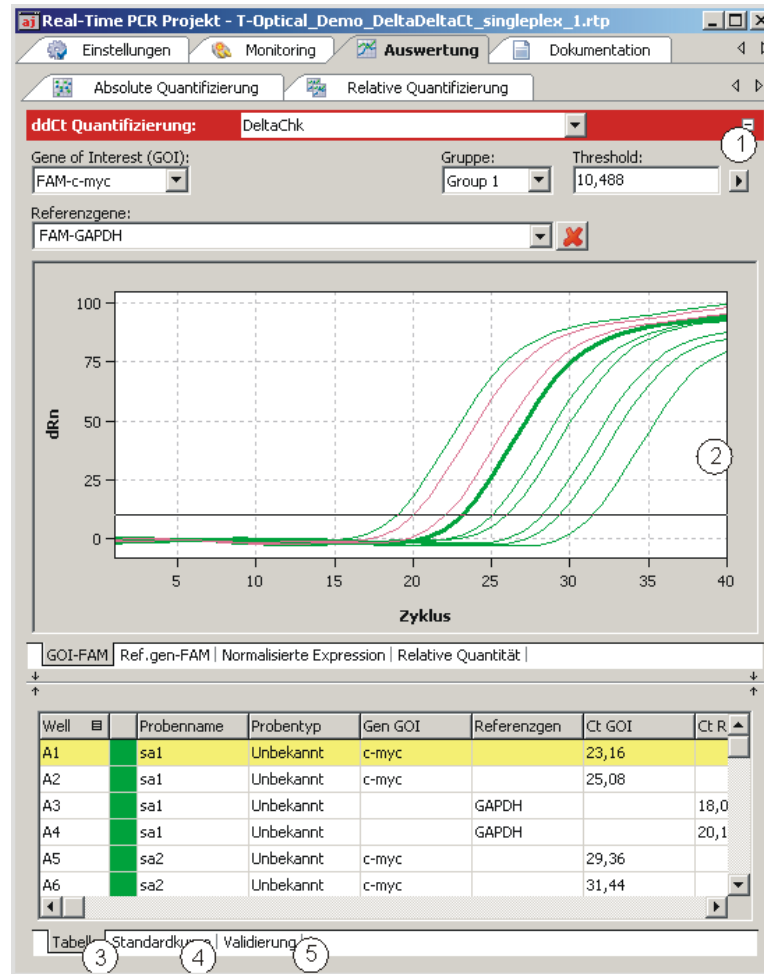
5.4 DeltaDeltaCt-Methode ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode)

Mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode lässt sich das relative Expressionsverhältnis des Zielgens zu einem oder mehreren Referenzgenen (meist Housekeeping-Genen) bestimmen. 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 $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ist es nicht erforderlich, Standardreihen aufzunehmen. Eine Standard-Verdünnungsreihe muss nur definiert werden, wenn die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode im gleichen PCR-Lauf validiert werden soll.

5.4.1 Auswertung für eine $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode neu anlegen

1. Wechseln Sie auf die Projektkarte **Auswertung / ddCt Quantifizierung**.
Falls die Karte nicht sichtbar ist klicken Sie auf die Pfeiltasten   in der Kartenzeile. Damit werden die Karten weiter gescrollt.
2. Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **DeltaDeltaCt ▶ ddCt Quantifizierung hinzufügen**.
3. Tragen Sie im sich öffnenden Eingabefenster die Bezeichnung für die aktuelle Auswertung ein.

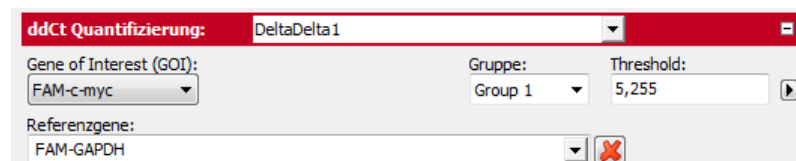
Auf der Karte **DeltaDeltaCt** werden folgende Anzeigen freigeschaltet:



Projektfenster zur $\Delta\Delta Ct$ -Methode



- Parametereinstellung (1)
- Anzeige der Fluoreszenzkurven für das Zielgen und das Referenzgen (2)
- Anzeige der um die Werte ergänzten Ergebnistabelle (3)
- Falls Standards definiert sind, Anzeige der Standardkurve (4) und der Validierungskurve (5) für das Expressionsverhältnis zwischen Zielgen und Referenzgen und die berechneten Faktoren

5.4.2 Parameter für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode einstellen



Parametereinstellungen für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Folgende Parameter sind für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode einzustellen:

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung
Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Kombinationen von gemessenen Farbstoff und zu quantifizierendem Zielgen Es kann immer nur ein Zielgen ausgewählt werden.
Referenzgen	Auswahlliste für die Referenzgene Im Gegensatz zum Zielgen können mehrere Referenzgene gleichzeitig angewählt werden. Die Zahl der Listenblätter im Anzeigebereich erweitert sich mit jedem Referenzgen entsprechend. Mit dem Symbol  werden alle eingestellten Referenz-Gene aus der Auswertung entfernt.
Gruppe	Wurden auf der PCR-Platte mehrere Experimente durchgeführt, ist hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments auszuwählen (→ Abschnitt "Gruppen definieren" S. 52).
Threshold	Threshold-Wert manuell anpassen. Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn). Hinweis: Der Threshold-Wert kann automatisch berechnet oder in der Graphik eingestellt werden.
	Öffnet das Auswahlfenster mit Darstellungsoptionen.

Threshold-Wert einstellen


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

Den Threshold-Wert können Sie auf verschiedene Weise einstellen:

- In den allgemeinen Optionen (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71)
- Manuell in den Parameter der jeweiligen Auswertung (siehe Tabelle oben)
- Graphisch in der Darstellung der Fluoreszenzkurven:
In der Graphik verschieben Sie die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor nach oben oder unten, während Sie die linke Maustaste gedrückt halten. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die Ct-Werte in der Probentabelle.

Hinweis:

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

- Automatisch berechnen lassen:
Die automatische Berechnung des Threshold-Werts starten Sie mit einem Klick auf das Symbol .
Alternativ können Sie auch den Menübefehl **DeltaDeltaCt ▶ Autom. Threshold** aufrufen.

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

Fix Threshold

Der Threshold-Wert wird jeweils neu kalkuliert, wenn Grundeinstellungen zur Analyse verändert werden. In den Optionen zur Analyse kann die Funktion **Fix Threshold** angewählt werden, so dass die Threshold-Linie bei Änderungen in den Grundeinstellungen beibehalten wird (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71).


5.4.3 Fluoreszenzkurven für die $\Delta\Delta Ct$ –Methode anzeigen

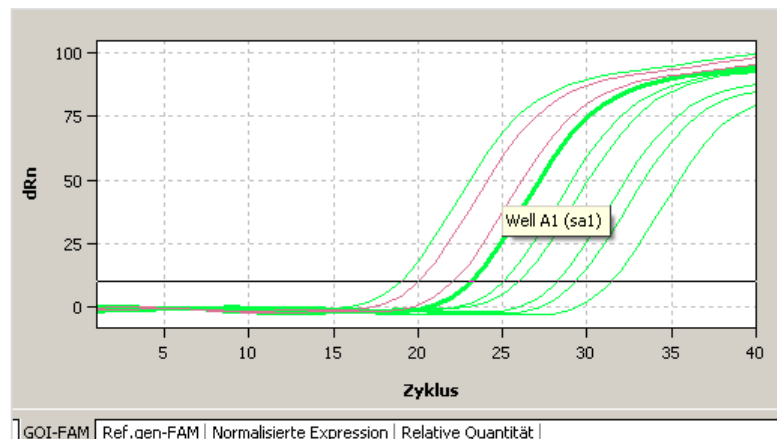
Im Anzeigebereich sind die gemessenen Daten, normiert auf den Wert 100 für die höchste Fluoreszenzintensität, gegen den Zyklus für das ausgewählte Zielgen aufgetragen. Der Kombination Zielgen/Farbstoff und den Kombinationen Referenzgen/Farbstoff ist jeweils ein Listenblatt zugeordnet, dass durch einen Klick auf den untenstehenden Reiter mit den Gen/Farbstoff-Bezeichnungen aktiviert wird.

In der Auswertung kann immer nur ein Zielgen, jedoch mehrere Referenzgene verwendet werden. Die Zahl der zur Auswahl stehenden Listenblätter hängt von der Anzahl der gewählten Gene ab.

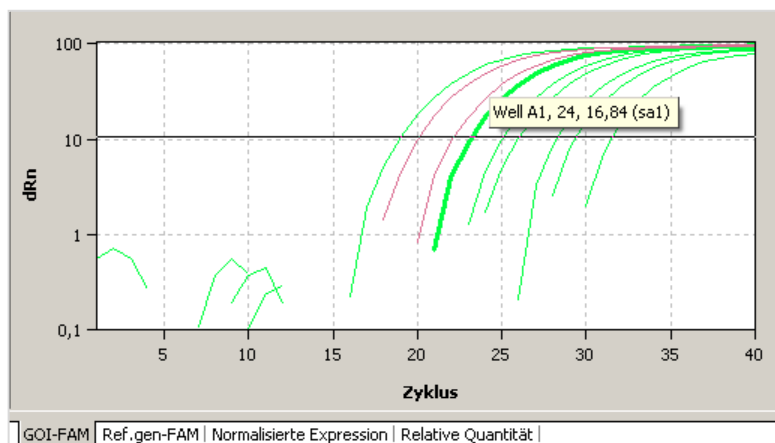
Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Fluoreszenzdaten entweder linear oder logarithmisch dargestellt. Bei beiden Darstellungsformen wird eine Kurzinformation zur Probe eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht.

Darstellungsoption der Graphik umschalten

1. Klicken Sie auf die Schaltfläche  in der Parameterleiste.
Es öffnet sich ein Auswahlfenster für die Darstellungsoptionen.
2. Wählen Sie die Option **Skalierung logarithmisch** bzw. **linear**.
Klicken Sie neben das Auswahlfenster. Die Änderungen werden übernommen.

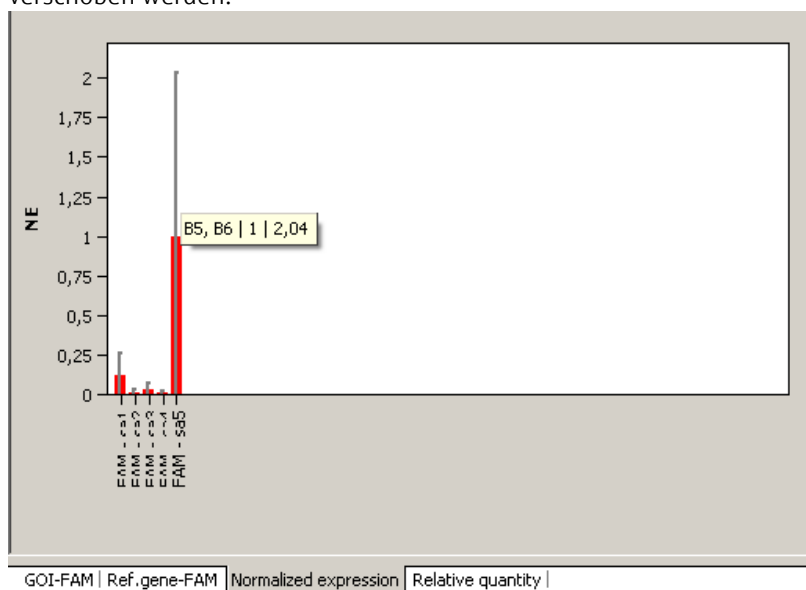


Lineare Darstellung der Fluoreszenzkurve für die $\Delta\Delta Ct$ -Methode

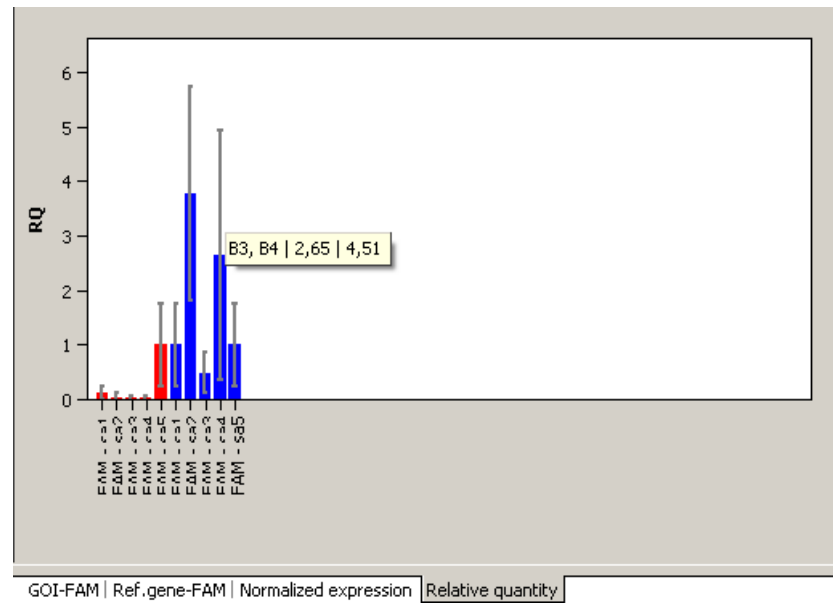
Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurve für die $\Delta\Delta C_t$ -Methode

5.4.4 Normalisierte relative Expression oder relative Quantität anzeigen

Nach Anwahl des Registerblatts **Normalisierte Expression** oder **Relative Quantität** wechselt die Anzeige zu einer Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. Der jeweilige Probenname ist unterhalb eines jeden Balkens angegeben. Die Höhe der Balken wird bestimmt durch die berechnete normalisierte Expression oder die berechnete relative Quantität von Replikaten. Zu jedem Balken wird eine Kurzinformation zur Position der Proben, zum Mittelwert und zur berechneten Standardabweichung eingeblendet, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. Die Höhe der Standardabweichung wird in Form eines Fehlerbalkens angezeigt. In der Darstellung der relativen Quantitäten werden die Ergebnisse für das Zielgen und das Referenzgen farblich getrennt dargestellt. Da bei einer großen Zahl von Proben und mehreren Genen nicht alle Balken gleichzeitig im Diagrammfenster darstellbar sind, kann durch Linksklick auf die Diagrammfläche und Ziehen mit der Maus der Fensterinhalt horizontal verschoben werden.



Balkendiagramm zur normalisierten Expression von Replikaten



Balkendiagramm zur relativen Quantität von Replikaten

5.4.5 Berechnungsmodus für die Normierte Expression wählen

Die Software qPCRsoft auto bietet die Möglichkeit, die Normierte Expression NE nach zwei unterschiedlichen Methoden berechnen zu lassen:

- 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.

Berechnung der normierten Expression NE ohne Effizienzbetrachtung (Livak-Methode)

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

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

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

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

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

Berechnung der normierten Expression NE mit Effizienzbetrachtung (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 $\Delta Ct(\text{GOI}) = Ct(\text{GOI}, \text{Calibrator}) - Ct(\text{GOI}, \text{Sample})$

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

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.

Die Art der Berechnung wird im Fenster **ddCt Optionen** festgelegt.

- Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste. Alternativ rufen Sie den Menübefehl **DeltaDeltaCt ▶ Optionen ddCt Quantifizierung**.
- Aktivieren Sie die Option der gewünschten Berechnungsmethode. Für die Berechnungsmethode nach Pfaffl können die Effizienzwerte automatisch aus Standardkurven (Verdünnungsreihen) für das Ziel- und Referenzgen ermittelt werden (wenn Standards definiert wurden) oder es kann eine manuelle Eingabe in den dafür vorgesehenen Feldern erfolgen.

Fenster ddCt Optionen für die Voreinstellung der Auswertung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode

5.4.6 Validierungskurven und Werte anzeigen

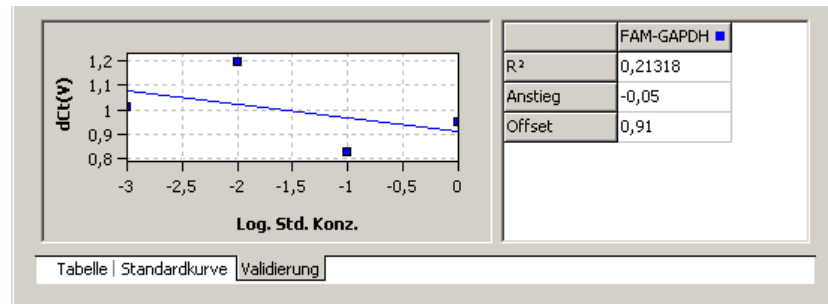
Zur Berechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte ist die Ermittlung einer Validierungskurve nicht notwendig, diese kann jedoch zur Überprüfung der Qualität der Daten herangezogen werden. Voraussetzung zur Erstellung einer Validierungskurve ist die Messung einer Standardreihe verschiedener Verdünnungsstufen vom Zielgen und Referenzgen. Sind für das Zielgen und Referenzgen Standardreihen gemessen, wird in der Anzeige der **Validierungskurven** das Expressionsverhältnis zwischen Zielgen und Referenzgen graphisch dargestellt. Dazu wird für die jeweilige Verdünnungsstufe der mittlere Ct-Wert des Zielgens vom mittleren Ct-Wert des Referenzgens abgezogen und der sich

ergebende $dCt(V)$ Wert gegen den Logarithmus der Konzentration graphisch aufgetragen.

Im Wertebereich rechts daneben werden folgende berechneten Daten angezeigt:

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

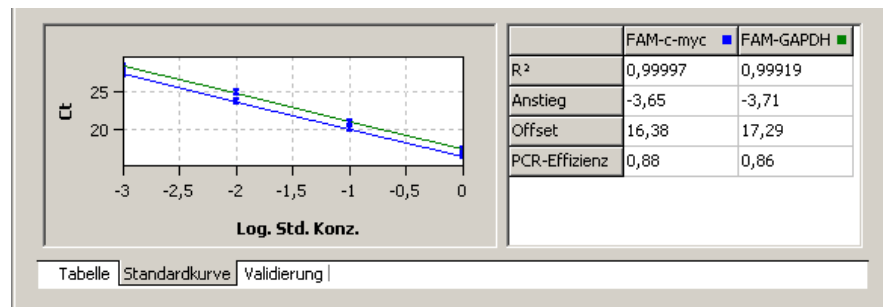
Die Steigung der Geraden sollte einen Wert von $\pm 0,1$ nicht überschreiten. Dann gilt die Annahme, dass die Effizienzen der Amplifikation von Zielgen und Referenzgen etwa gleich sind und die Berechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte valide Daten liefert.



Anzeige der Validierungskurven für die $\Delta\Delta Ct$ Methode

Mit den Registerblättern **Tabelle**, **Standardkurve** und **Validierung** kann zwischen den Anzeigen für die $\Delta\Delta Ct$ -Berechnungen gewechselt werden. Die Validierungskurven und die Werte werden durch das Programm qPCRsoft auto automatisch berechnet und bei Änderungen der Einstellungen aktualisiert. Sowohl in Validierungskurven als auch in Standardkurven sind die jeweiligen Datenpunkte 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.

Bei der Darstellung mehrerer Standardkurven ist jede Kurve mit einer individuellen Farbe dargestellt. Entsprechend enthält jede Wertetabelle einen Farbcode im Tabellenkopf, der die Zuordnung zur jeweiligen Standardkurve widerspiegelt.



Anzeige der Standardkurven für die $\Delta\Delta Ct$ Methode

Well	Probenname	Probentyp	Gen GOI	Referenzgen	Ct GOI	Ct R
A1	sa1	Unbekannt	c-myc		23,16	
A2	sa1	Unbekannt	c-myc		25,08	
A3	sa1	Unbekannt		GAPDH		18,0
A4	sa1	Unbekannt		GAPDH		20,1
A5	sa2	Unbekannt	c-myc		29,36	
A6	sa2	Unbekannt	c-myc		31,44	

Tabelle | Standardkurve | Validierung |

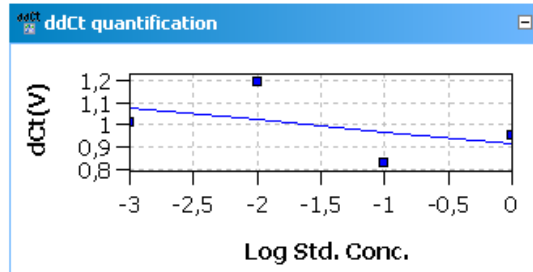
Anzeige der Ergebnistabelle für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode

Für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Quantifizierung enthält die Ergebnistabelle folgende Angaben:

Spalte	Bedeutung
Well	Position der Probe
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch (nicht veränderbar) eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.
Probenname	Name der Probe
Probentyp	Typ der Probe
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	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Zielgens
Mittl. Ct RefGen	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Referenzgens
Stabw. Ct GOI	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
Stabw. RefGen	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
%CV Ct GOI	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Zielgens
%CV Ct RefGen	Variationskoeffizient der Ct-Werte zwischen Replikaten des Referenzgens
dCt GOI	Delta Ct-Wert für Replikate des Zielgens
dCt RefGen	Delta Ct-Wert für Replikate des Referenzgens
RQ GOI	Berechnete relative Menge für Replikate des Zielgens in der Ursprungsprobe
RQ Ref.Gen	Berechnete relative Menge für Replikate des Referenzgens in der Ursprungsprobe
Mittl. RQ RefGen	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

Darstellung im
Projektexplorer


Die von der Software berechneten Validierungskurven werden in Kurzform auch im Projektexplorer unter dem Menüpunkt **DeltaDeltaCt** angezeigt. Dargestellt ist die graphische Auftragung der $dCt(V)$ -Werte gegen den Logarithmus der Konzentration der Proben:



Darstellung der Validierungskurve im Projektexplorer.

5.4.7 Auswertung einer $\Delta\Delta Ct$ -Methode löschen

Eine nicht benötigte Auswertung kann entfernt werden.


1. Aktivieren Sie die Auswertung, indem Sie deren Name in der Auswerteliste der Methodenkarte auswählen.
2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **DeltaDeltaCt ▶ ddCt Quantifizierung entfernen** auf.

Die Auswertung wird entfernt.

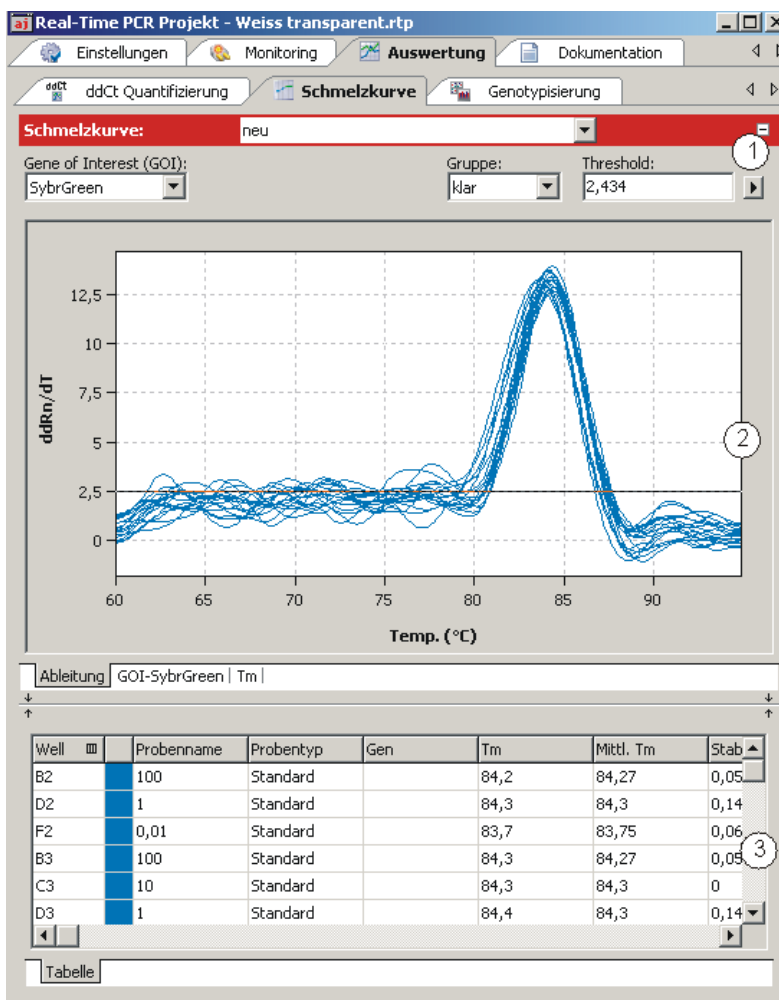
5.5 Schmelzkurvenanalyse

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur im Reaktionsansatz sukzessive 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. Mittels der Schmelzkurvenanalytik kann differenziert werden, ob die Reaktion zur Bildung eines spezifischen PCR-Produkts geführt hat oder ob unspezifische Nebenprodukte wie zum Beispiel Primerdimere entstanden sind.

5.5.1 Neue Schmelzkurvenanalyse anlegen

1. Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **Schmelzkurve ▶ Schmelzkurve hinzufügen**.
2. Tragen Sie im sich öffnenden Eingabefenster die Bezeichnung für die aktuelle Auswertung ein.

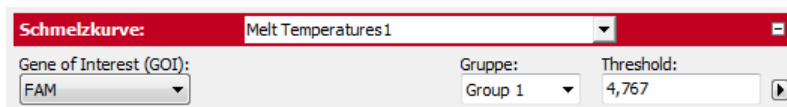
Auf der Karte **Schmelzkurve** werden folgende Anzeigen freigeschaltet:



Fenster zur Schmelzkurvenanalytik

- Parametereinstellung (1)
- Anzeige der Fluoreszenzwerte als Funktion der Temperatur bzw. der ersten Ableitung davon (2)
- Anzeige der Ergebnistabelle (3)


5.5.2 Parameter für die Schmelzkurvenanalyse einstellen



Parametereinstellungen für die Schmelzkurvenanalyse


Stellen Sie folgende Parameter für die Schmelzkurvenanalyse ein:

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswahl

Gene of Interest (GOI)	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombination Als Farbstoff für das Zielgen muss zur Schmelzkurvenanalytik in der Regel ein interkalierender Farbstoff angewählt sein. Entsprechend der Auswahl werden die Fluoreszenzkurven und Regressionskurven für die Konzentration angezeigt.
Gruppe	Wurden auf der PCR-Platte mehrere Experimente durchgeführt, ist hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments auszuwählen (→ Abschnitt "Gruppen definieren" S. 52).
Threshold	Threshold-Wert manuell anpassen. Der Threshold ist nur auf der Karte Ableitung wirksam. Es werden nur solche Kurven ausgewertet, deren Maximum dRn/dT größer als der Threshold ist. Hinweis: Der Threshold-Wert kann automatisch berechnet oder in der Graphik werden eingestellt werden (siehe auch "Threshold-Wert einstellen" unten).
	Öffnet das Auswahlfenster mit Darstellungsoptionen.

Threshold-Wert einstellen Zur korrekten Auswertung muss ein Threshold-Wert für die Schmelzkurven ermittelt werden.

Den Threshold-Wert können Sie auf verschiedene Weise einstellen:

- In den allgemeinen Optionen (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71)
- Manuell in den Parameter der jeweiligen Auswertung (siehe Tabelle oben)
- Graphisch in der Darstellung der Ableitung der Fluoreszenzkurven:
In der Graphik **Ableitung** verschieben Sie die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor nach oben oder unten, während Sie die linke Maustaste gedrückt halten. Gleichzeitig mit dem Verschieben der Threshold-Linie aktualisieren sich die T_m-Werte in der Proben-tabelle.
- Automatische Berechnung:
Die automatische Berechnung des Threshold-Wertes lösen Sie mit einem Klick auf das Symbol  aus.
Alternativ können Sie auch den Menübefehl **Schmelzkurve ▶ Autom. Threshold** aufrufen.

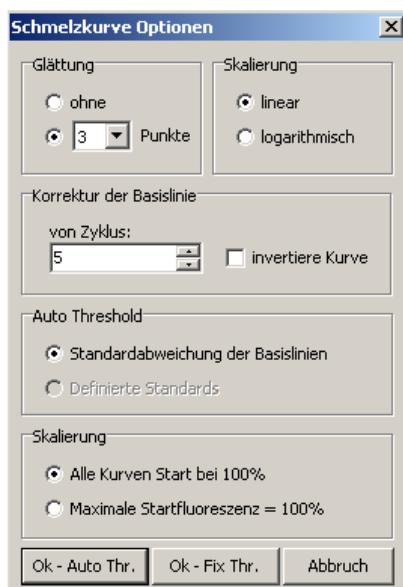
Der sich ergebende Threshold-Wert wird sowohl bei der manuellen Ermittlung als auch bei der automatischen Berechnung im Eingabefeld **Threshold** aktualisiert und angezeigt.

Fix Threshold

Der Threshold-Wert wird jeweils neu kalkuliert, wenn Grundeinstellungen zur Analyse verändert werden. In den Optionen zur Analyse kann die Funktion **Fix Threshold** angewählt werden, so dass die Threshold-Linie bei Änderungen in den Grundeinstellungen beibehalten wird (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71).

5.5.3 Fluoreszenzkurven/Schmelzkurven anzeigen

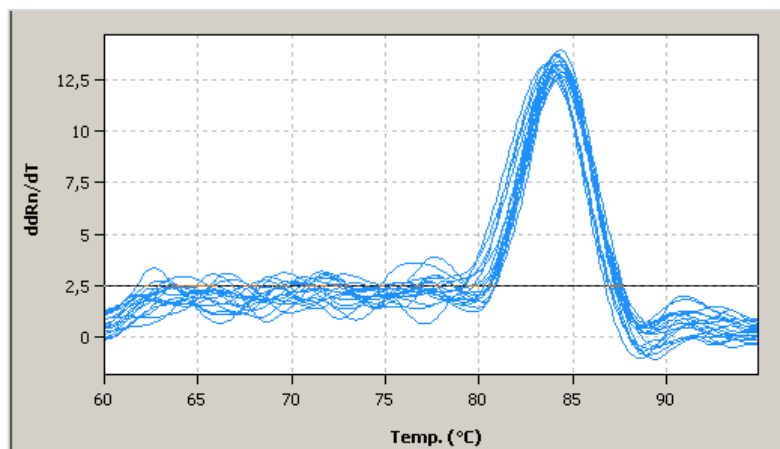
Im Anzeigebereich sind die gemessenen Fluoreszenzkurven, abhängig von den im Fenster **Optionen Schmelzkurve** getroffenen Einstellungen entweder auf den höchsten Fluoreszenzwert oder gemeinsam auf den Sollwert 100 normiert, gegen die Temperatur aufgetragen. Je nach gewählter Darstellungsoption werden die Daten entweder linear oder logarithmisch dargestellt.



Optionen für die Schmelzkurvenanalyse

Für die Proben wird eine Kurzinformation eingeblendet, sobald der Mauszeiger auf einer der Kurven steht.


Die Schmelztemperatur T_m wird durch Bilden der ersten Ableitung der Schmelzkurven aus den Maxima der entstehenden Peaks bestimmt. Zur Auswertung von Fluoreszenzdaten aus Proteinstabilitätsmessungen lassen sich die Schmelzkurven umkehren. Die Umkehrung der Schmelzkurven lässt sich über die Option **invertiere Kurve** aktivieren.

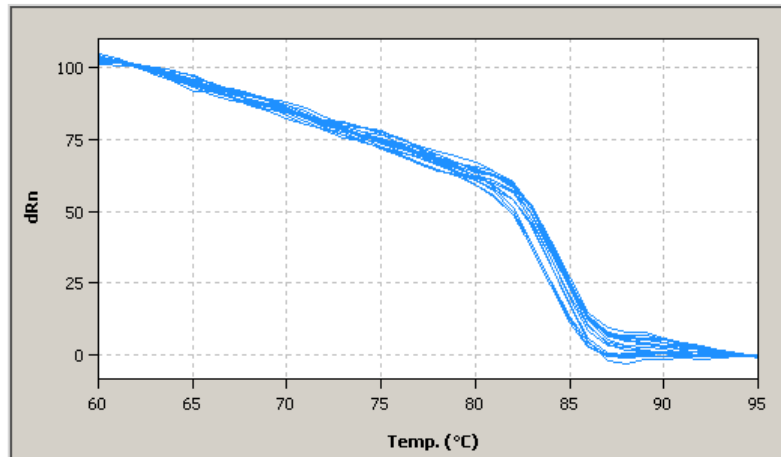


Darstellung der Ableitung der Schmelzkurven mit eingeblendeter Thresholdlinie

Der Wechsel zwischen der Darstellung der Schmelzkurven und der Ableitung erfolgt über die Reiter in der unteren linken Ecke des Anzeigebereiches.

Darstellungsoption der Graphik der Fluoreszenzkurven umschalten

1. Klicken Sie auf die Schaltfläche  in der Parameterleiste.
Es öffnet sich ein Auswahlfenster für die Darstellungsoptionen.
2. Wählen Sie die Option **Skalierung logarithmisch** bzw. **linear**.
Klicken Sie neben das Auswahlfenster. Die Änderungen werden übernommen. Für die Schmelzkurven gibt es keine logarithmische Darstellung.

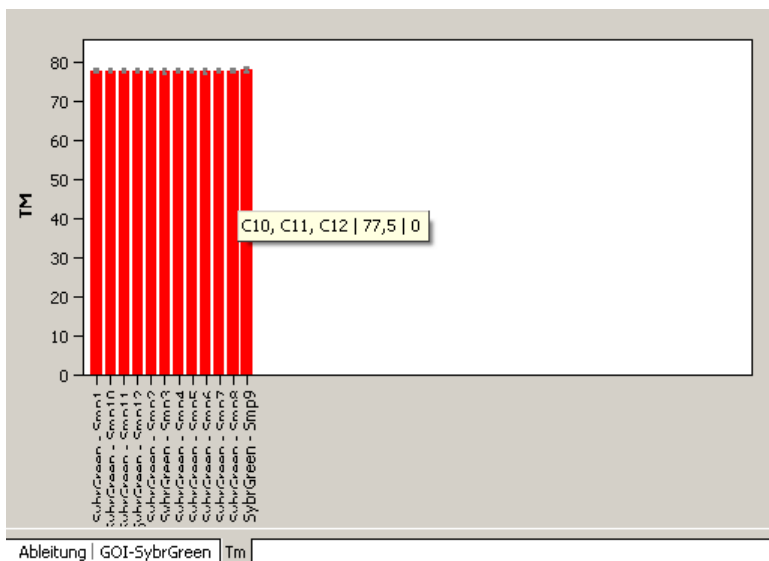


Darstellung der Fluoreszenzkurven (lineare Ansicht)

In der Darstellung der Fluoreszenzkurven wird keine Threshold-Linie eingeblendet.

5.5.4 Schmelztemperaturen anzeigen

Nach Anwahl des Registerblatts **Tm** wechselt die Anzeige zu einer Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. Der jeweilige Probenname ist unterhalb eines jeden Balkens angegeben. Die Höhe der Balken wird bestimmt durch die gemessene Schmelztemperatur für jedes Replikat. Zu jedem Balken wird eine Kurzinformation zur Position der Proben, zum Mittelwert und zur berechneten Standardabweichung eingeblendet, wenn der Mauszeiger darauf gesetzt wird. Die Höhe der Standardabweichung wird in Form eines Fehlerbalkens angezeigt. Da bei einer großen Probenanzahl nicht alle Balken gleichzeitig im Diagrammfenster darstellbar sind, kann durch Linksklick auf die Diagrammfläche und Ziehen mit der Maus der Fensterinhalt horizontal verschoben werden.



Balkendiagramm zur Darstellung der Schmelztemperatur

5.5.5 Ergebnistabelle für die Schmelzkurven anzeigen

In der Ergebnistabelle für Schmelzkurven sind alle Daten und die zugehörigen Messwerte für die Proben zusammengefasst.

Well	Probenname	Probentyp	Gen	Tm	Mittl. Tm	Stab
B2	100	Standard		84,2	84,27	0,05
D2	1	Standard		84,3	84,3	0,14
F2	0,01	Standard		83,7	83,75	0,06
B3	100	Standard		84,3	84,27	0,05
C3	10	Standard		84,3	84,3	0
D3	1	Standard		84,4	84,3	0,14

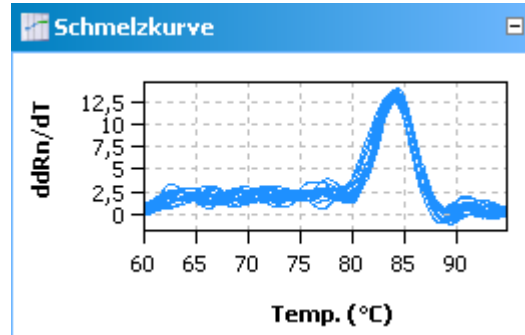
Ergebnistabelle für die Schmelzkurvenanalytik

Für die Schmelzkurvenbestimmung enthält die Ergebnistabelle folgende Angaben:

Spalte	Bedeutung
Well	Position der Probe
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch (nicht veränderbar) eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.
Probenname	Name der Probe
Probentyp	Typ der Probe
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

Darstellung im
Projektexplorer


Die von der Software berechneten Schmelzkurven werden in Kurzform auch im Projektexplorer unter dem Punkt **Melt Curve** angezeigt. Dargestellt ist die graphische Auftragung der ersten Ableitung der Fluoreszenzwerte gegen die Temperatur.



Darstellung der Ableitung der Schmelzkurven im Projektexplorer.

5.5.6 Schmelzkurvenanalyse löschen


Eine nicht benötigte Schmelzkurvenanalyse kann entfernt werden.

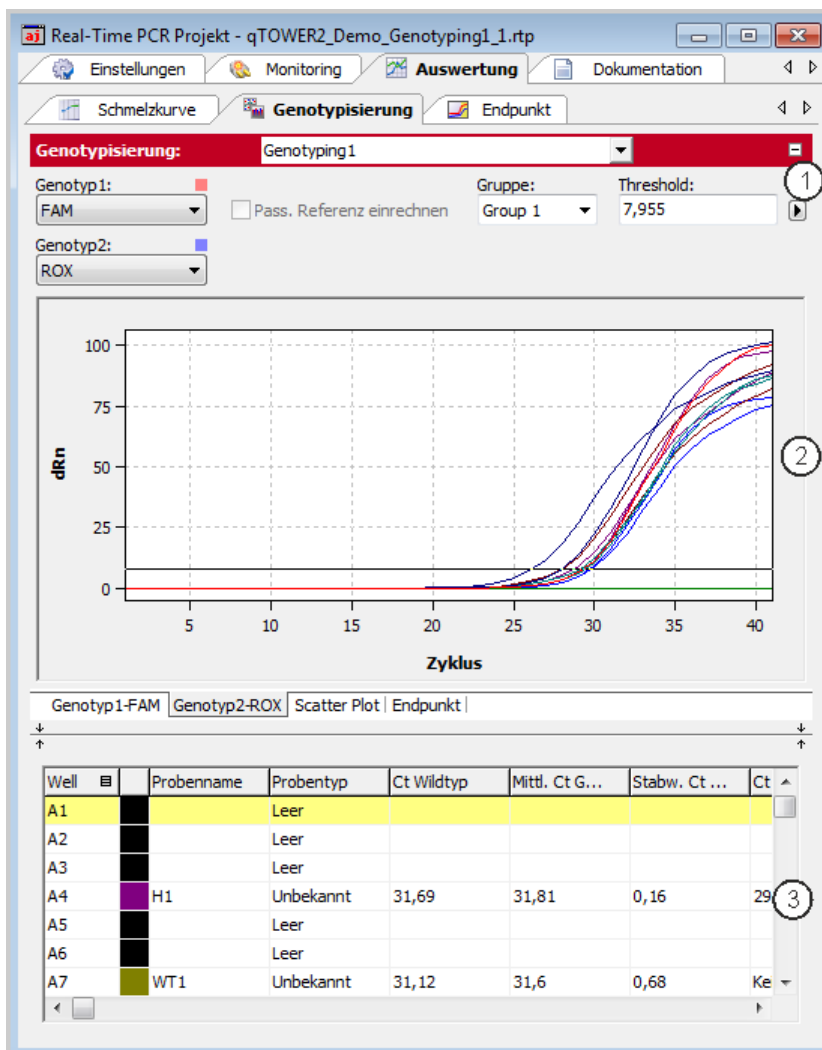
1. Aktivieren Sie die Auswertung, indem Sie deren Name in der Auswerteliste der Methodenkarte auswählen.
2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **Schmelzkurve ▶ Schmelzkurve löschen** auf.
Die Auswertung wird entfernt.

5.6 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.

5.6.1 Auswertung für eine Genotypisierung neu anlegen

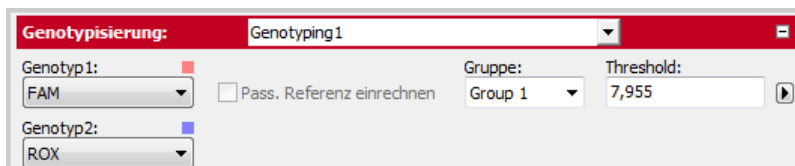
1. Wechseln Sie auf die Projektkarte **Auswertung / Genotypisierung**.
Falls die Karte nicht sichtbar ist klicken Sie auf die Pfeiltasten ◀ ▶ in der Kartenzeile.
Damit werden die Karten weiter gescrollt.
2. Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.
Alternativ wählen Sie den Menübefehl **Genotypisierung ▶ Genotypisierung hinzufügen**.
3. Tragen Sie im Eingabefenster die Bezeichnung für die aktuelle Auswertung ein.
Auf der Karte **Genotypisierung** werden folgende Anzeigen freigeschaltet:



Fenster zur Genotypisierung


- Parametereinstellung zur Festlegung des Thresholds und zur Auswahl des Farbstoffs, mit dem der Genotyp 1 und der Genotyp 2 gemessen wurden (1)
- Anzeige der Fluoreszenzkurven für Genotyp 1 und Genotyp 2, bzw. die Darstellung der Ergebnisse im Scatter-Plot oder als Balkendiagramm (2)
- Anzeige der Ergebnistabelle (3)

5.6.2 Parameter für die Genotypisierung einstellen

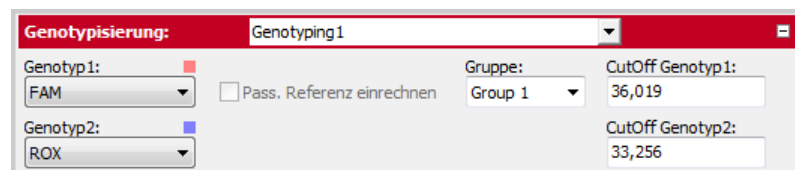


Parametereinstellungen für eine Genotypisierung für die Fluoreszenzkurvenanzeige
 Stellen Sie folgende Parameter sind für die absolute Quantifizierung ein:

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung

Genotyp 1	Auswahlliste des Farbstoffs, mit dem der Genotyp 1 gemessen wurde
Genotyp 2	Auswahlliste des Farbstoffs, mit dem die Genotyp 2 gemessen wurde
Pass. Referenz einrechnen	Nur wählbar, wenn auf der Projektkarte Einstellungen / Scan ein Farbstoff als passive Referenz definiert wurde. Bei Aktivierung wird die Fluoreszenz des als passive Referenz gesetzten Farbstoffs zur Normierung eingesetzt.
Gruppe	Wurden auf der PCR-Platte mehrere Experimente durchgeführt, ist hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments auszuwählen (→ Abschnitt "Gruppen definieren" S. 52).
Threshold	Threshold-Wert manuell anpassen. Der Threshold-Wert muss zwischen 1 und 100 liegen, entsprechend der normierten Darstellung der Fluoreszenzkurven (dRn). Hinweis: Der Threshold-Wert kann automatisch berechnet oder in der Graphik manuell eingestellt werden (→ siehe auch "Threshold-Wert einstellen" unten).
	Öffnet das Auswahlfenster mit Darstellungsoptionen.

Beim Wechsel auf die Ansicht des Scatter-Plots oder des Endpunkt-Balkendiagramms werden statt der Threshold-Eingabe zwei Felder für den Cutoff für Genotyp 1 und Genotyp 2 zur Verfügung gestellt:



Parametereinstellungen für den Scatter-Plot und das Balkendiagramm einer Genotypisierung

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

Den Threshold-Wert können Sie auf verschiedene Weise einstellen:

- In den allgemeinen Optionen (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71)
- Manuell in den Parameter der jeweiligen Auswertung (siehe Tabelle oben)
- Graphisch in der Darstellung der Fluoreszenzkurven:
In der Graphik verschieben Sie die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor nach oben oder unten, während Sie die linke Maustaste gedrückt halten. 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 Produktakkumulationskurven besser geeignet als die lineare Darstellung.

- Automatisch berechnen:
Die automatische Berechnung des Threshold-Wertes lösen Sie mit einem Klick auf

das Symbol  aus.

Alternativ können Sie auch den Menübefehl **Genotypisierung** ▶ **Autom. Threshold** aufrufen.


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

Fix Threshold

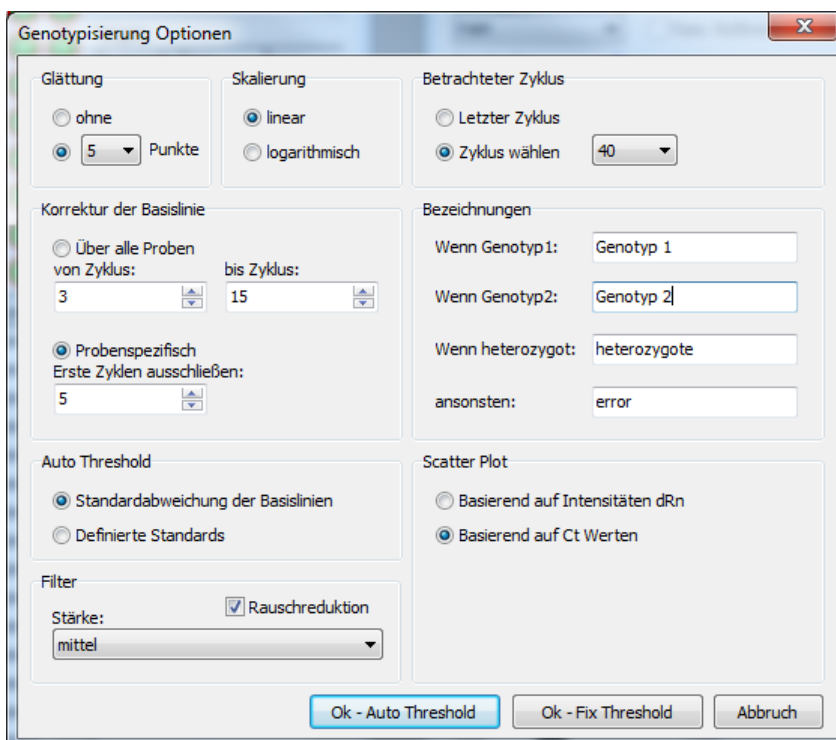
Der Threshold-Wert wird jeweils neu kalkuliert, wenn Grundeinstellungen zur Analyse verändert werden. In den Optionen zur Analyse kann die Funktion **Fix Threshold** angewählt werden, so dass die Threshold-Linie bei Änderungen in den Grundeinstellungen beibehalten wird (→ Abschnitt "Voreinstellungen für die Auswertung vornehmen" S. 71).

5.6.3 Optionen für die Genotypisierung spezifizieren

Für die Genotypisierung stehen spezielle Auswertoptionen zur Verfügung.

- Öffnen Sie mit dem Symbol  in der Werkzeugleiste das Fenster **Genotypisierung Optionen**.

Alternativ können Sie auch den Menübefehl **Genotypisierung** ▶ **Optionen Genotypisierung** aufrufen.




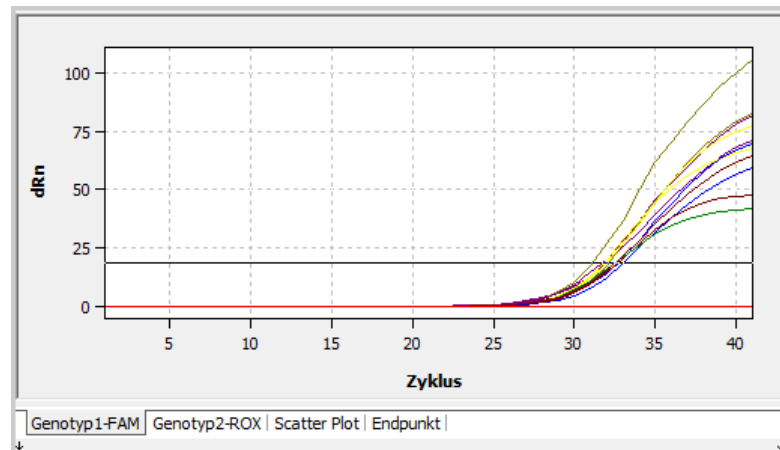
Fenster Genotypisierung Optionen für die Voreinstellung einer Genotypisierung

Option	Beschreibung
Betrachteter Zyklus	Einstellung des zur Auswertung herangezogenen Zyklus. Die kann vorzugsweise der letzte Zyklus (Endpunkt) sein, aber auch jeder andere Zyklus des PCR-Laufs. Der entsprechende Zyklus ist über eine Auswahlliste einstellbar.
Bezeichnungen	Eingabemöglichkeit von eigenen Bezeichnungen für die Kategorien Genotyp 1, Genotyp 2, Heterozygote bzw. ohne Reaktion
Scatter Plot	Erzeugung des Scatter-Plots anhand der Fluoreszenzintensitäten am betrachteten Zyklus bzw. der Ct-Werte

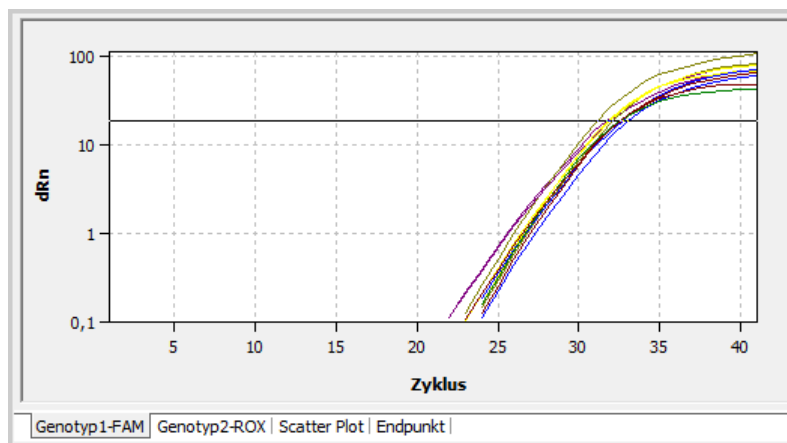
5.6.4 Fluoreszenzkurven, Scatterplott und Balkendiagramm anzeigen

Die jeweils angezeigte Kombination aus Genotyp-1-Farbstoff bzw. Genotyp-2-Farbstoff wird als Eintrag in den Registerblättern in der unteren linken Ecke des Bereiches angezeigt. Für die jeweils aktive Kombination erscheint der Eintrag im Registerblatt weiß hinterlegt. 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.

1. Klicken Sie auf die Schaltfläche  in der Parameterleiste.
Es öffnet sich ein Auswahlfenster für die Darstellungsoptionen.
2. Wählen Sie die Option **Skalierung logarithmisch** bzw. **linear**.
Klicken Sie neben das Auswahlfenster. Die Änderungen werden übernommen.



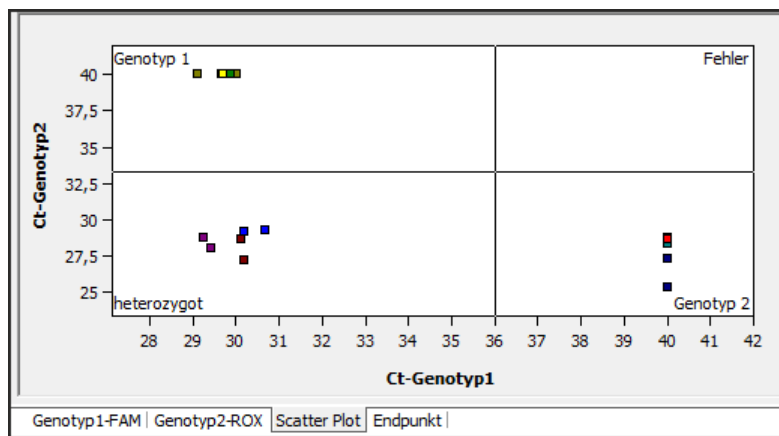
Lineare Darstellung der Fluoreszenzkurve für die absolute Quantifizierung



Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurve mit horizontaler Threshold-Linie

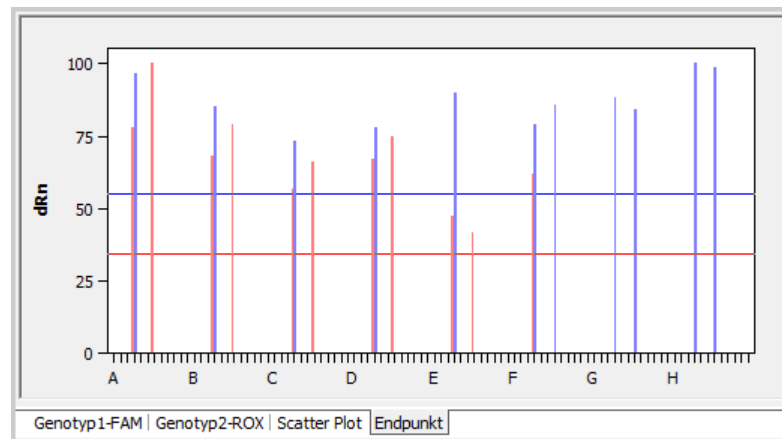
Zur Ermittlung von Ct-Werten für die Auswertung muss ein Threshold-Wert für die Fluoreszenzkurven ermittelt werden. Dieses kann automatisiert erfolgen, ist jedoch im Anzeigebereich auch manuell möglich (→ Abschnitt "Parameter für die Genotypisierung einstellen" S. 109).

Neben der Anzeige der Fluoreszenzkurven steht auch die Anzeige der Ergebnisse als Scatter-Plot oder als Balkendiagramm zur Verfügung. Die Darstellung kann über die zugehörigen Registerblätter unterhalb des Anzeigebereichs aktiviert werden.



Scatter-Plot für eine Genotypisierung

Der Scatter-Plot ist in vier Quadranten für **Genotyp 1**, **Genotyp 2**, **Heterozygote** und **Fehler** unterteilt. Die Proben werden jeweils anhand der gemessenen relativen Fluoreszenz bzw. der Ct-Werte der beiden Farbstoffe einem der Quadranten zugeteilt. Der jeweilige Cutoff zur Zuordnung von Proben wird in der Scatter-Plot Darstellung durch zwei schwarze Linien angezeigt. Nach Anwahl der Linien mit gedrückter linker Maustaste können diese jeweils in ihrer Position verändert und so der Cutoff verändert werden. Alternativ kann der jeweilige Cutoff-Wert für Genotyp 1 und Genotyp 2 auch im Auswahlbereich in den entsprechenden Feldern eingegeben werden (→ Abschnitt "Parameter für die Genotypisierung einstellen" S. 109).



Balkendiagramm für eine Genotypisierung

Im Balkendiagramm sind die gemessenen relativen Fluoreszenzen als Balken aufgetragen. Die X-Achse ist dabei nach den Zeilen des Blocks von A bis H skaliert, d.h. die ersten 12 Proben entsprechen den Positionen A1-A12 im Block, die nächsten zwölf Proben den Positionen B1-B12 usw. Die Einstellung des Cutoffs erfolgt hier durch Verschieben der roten bzw. blauen horizontalen Linie bei gedrückter linker Maustaste nach oben oder unten. Alternativ kann auch bei dieser Darstellung der jeweilige Cutoff-Wert für Genotyp 1 und Genotyp 2 im Auswahlbereich in den entsprechenden Feldern eingegeben werden (→ Abschnitt "Parameter für die Genotypisierung einstellen" S. 109).

Die Cutoff-Werte stellen die Schwellwerte dar, ab denen für eine Probe die Frage nach ihrer Reaktion mit "Ja" beantwortet wird (siehe Tabellenspalten **Reaktion Genotyp 1** und **Reaktion Genotyp 2**).

5.6.5 Werte zur Genotypisierung anzeigen

In der Ergebnistabelle der Genotypisierung sind alle Daten und zugehörigen Messwerte für die Proben zusammengefasst. Je nach ausgewähltem Registerblatt im Anzeigebereich unterscheiden sich die in der Ergebnistabelle dargestellten Spalten. Für die Fluoreszenzkurven gibt es eine zusammenfassende Tabelle, in der die Messdaten beider Farbstoffe verarbeitet sind. Wird die Fluoreszenzintensität am Endpunkt ausgewertet, so unterscheidet sich die Probentabelle für den Scatter-Plot nicht von der des Balkendiagramms. Für die Fluoreszenzkurven sind aber zum Teil andere Daten in der Probentabelle zusammengefasst als für die Scatter-Plot- bzw. Balkendiagramm-Auswertung.

Well	Probename	Probentyp	Genotyp	Reaktion ...	Reaktion ...	Geno
A4	H1	Unbekannt	heterozygote	ja	ja	hete
B4	H1	Unbekannt	heterozygote	ja	ja	hete
C4	H2	Unbekannt	heterozygote	ja	ja	hete
D4	H2	Unbekannt	heterozygote	ja	ja	hete
E4	H3	Unbekannt	heterozygote	ja	ja	hete
F4	H3	Unbekannt	heterozygote	ja	ja	hete
G4	M1	Unbekannt	mutant	nein	ja	muta

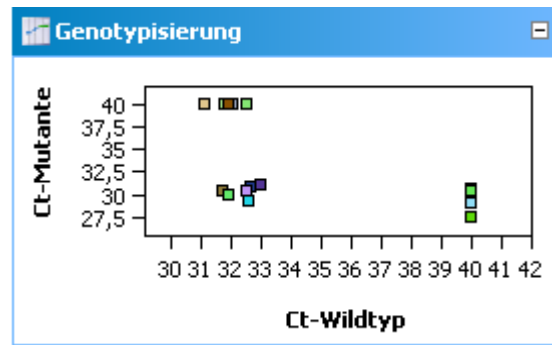
Ergebnistabelle der Genotypisierung

Für die Genotypisierung enthält die Ergebnistabelle folgende Angaben:

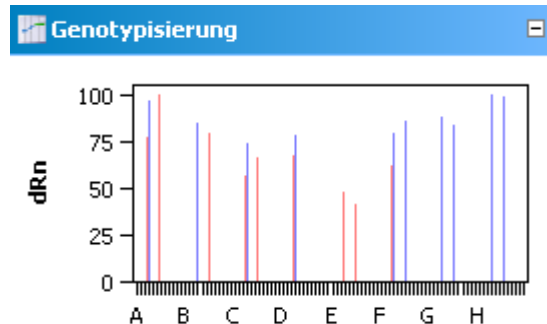
Spalte	Bedeutung
Well	Position der Probe
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch (nicht veränderbar) eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.
Probename	Name der Probe
Probentyp	Typ der Probe
Gruppe	Zuordnung der Probe zu einer experimentellen Gruppe
Ct Genotyp 1	Ct-Wert Genotyp 1
Mittl. Ct Genotyp1	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Genotyps 1
Stabw. Ct Genotyp 1	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Genotyps 1
Ct Genotyp 2	Ct-Wert Genotyp 2
Mittl. Ct Genotyp 2	Durchschnitts-Ct-Wert von Replikaten des Genotyps 2
Stabw. Ct Genotyp 2	Standardabweichung der Ct-Werte zwischen Replikaten des Genotyps 2
Genotyp	Zuordnung der Probe nach Genotyp 1, Genotyp 2, Heterozygot bzw. Fehler
Reaktion Genotyp 1	Ja oder nein, je nach Endpunkt-Fluoreszenz oder Ct-Wert
Reaktion Genotyp 2	Ja oder nein, je nach Endpunkt-Fluoreszenz oder Ct-Wert
Genotyp Replikate	Zuordnung von Replikaten von Proben nach Genotyp 1, Genotyp 2, Heterozygot bzw. Fehler (Symbol "?")
dRn Genotyp 1	Normierte Fluoreszenzintensität der Genotyp-1-Reaktion
Mittl. dRn Genotyp 1	Normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Genotyp-1-Reaktion
Stabw. dRn Genotyp 1	Standardabweichung der normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Genotyp-1-Reaktion
dRn Genotyp 2	Normierte Fluoreszenzintensität der Genotyp-2-Reaktion
Mittl. dRn Genotyp 2	Normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Genotyp-2-Reaktion
Stabw. dRn Genotyp 2	Standardabweichung der normierte Fluoreszenzintensität zwischen Replikaten der Genotyp-2-Reaktion

Darstellung im
Projektexplorer

Der von der Software berechnete Scatter-Plot oder die Endpunktanalyse können wahlweise in Kurzform auch im Projektexplorer unter dem Punkt Genotypisierung angezeigt werden. Der Scatter-Plot ist in vier Quadranten für Genotyp 1, Heterozygote, Genotyp 2 und Fehler unterteilt. Die Proben werden jeweils anhand der gemessenen relativen Fluoreszenz bzw. der Ct-Werte der beiden Farbstoffe einem der Quadranten zugeteilt. Bei der Endpunktanalyse werden die gemessenen relativen Fluoreszenzen als Balkendiagramm aufgetragen. Die Höhe der Balken definiert die Proben als Genotyp 1, Heterozygote, Genotyp 2 oder Fehler.




Darstellung der Ergebnisse der Genotypisierung als Scatter-Plot



Darstellung der Ergebnisse der Genotypisierung als Balkendiagramm

5.6.6 Genotypisierung löschen

Eine nicht benötigte Auswertung kann entfernt werden.


1. Aktivieren Sie die Auswertung, indem Sie deren Name in der Auswerteliste der Methodenkarte auswählen.
2. Klicken Sie auf  in der Werkzeugleiste.
Alternativ wählen Sie den Menübefehl **Genotypisierung ► Genotypisierung entfernen**.

Die Auswertung wird entfernt.

5.7 POS/NEG-Analyse im Endpunkt

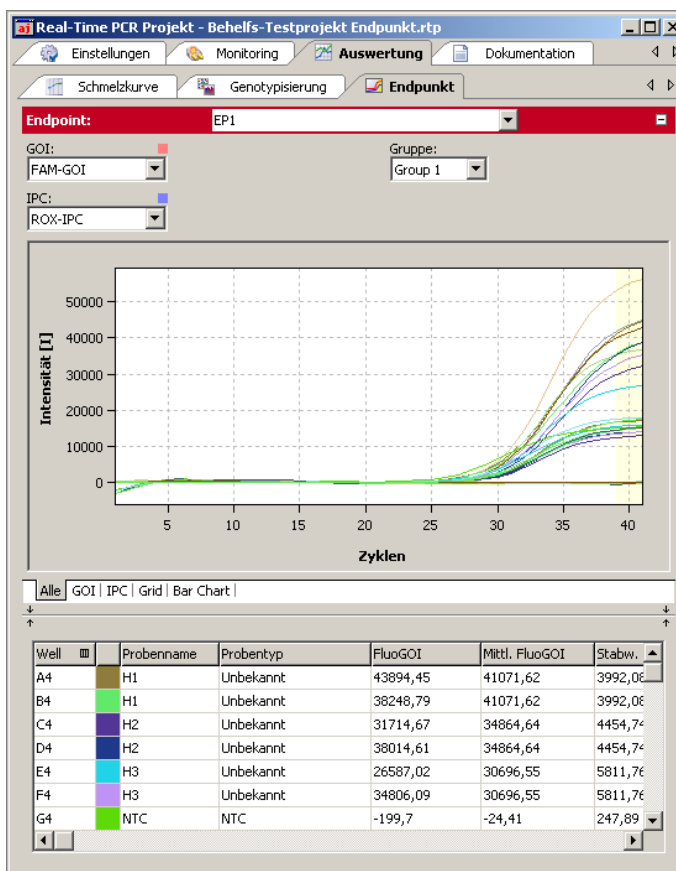
Mit Hilfe der positiv/negativ Analyse (POS/NEG-Analyse) wird ermittelt, ob bestimmte Targets in einer Probe vorhanden sind oder nicht. Die Experimente können dabei als Singleplex- oder Multiplex-Experimente angelegt sein, wobei die Fluoreszenzen der Proben im Endpunkt, also nach der Amplifizierung, ausgewertet werden. Die Position des Endpunktes bezüglich der Zyklen sowie die Anzahl der einzubeziehenden Zyklen können von Ihnen 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 Software berücksichtigt ebenfalls interne Positivkontrollen (IPC), die jeder Probe zur Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen zugesetzt werden können und zu einer Erhöhung der Sicherheit des Ergebnisses führen.

5.7.1 Endpunktanalyse starten

1. Wechseln Sie auf die Projektkarte **Auswertung / Endpunkt**.
2. Klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.
Alternativ rufen Sie den Menübefehl **Endpunkt / Endpunkt hinzufügen**.
3. Tragen Sie im sich öffnenden Eingabefenster die Bezeichnung für die aktuelle Auswertung ein.

Hinweis:

Endpunktanalysen können nur angelegt werden, wenn im Plattenlayout mindestens eine NTC-Probe definiert ist (→ Abschnitt "Probentabelle bearbeiten" S. 41).



Fenster zur Endpunktanalyse

Auf der Karte **Endpunkt** werden folgende Felder angezeigt:

- Parametereinstellung
- Amplifizierungskurven für das ausgewählte GOI und die interne Positivkontrolle IPC in einem Diagramm
- Amplifizierungskurven für GOI und IPC in separaten Diagrammen mit Einstellmöglichkeiten
- Ergebnisdarstellung im PCR-Plattenformat
- Ergebnisdarstellung als Balkendiagramm
- Ergebnistabelle mit Messwerten und Klassifizierung der Proben nach POS, NEG, ??? , CHECK

5.7.2 Parameter für die Endpunktanalyse einstellen



Parametereinstellungen für eine Endpunktanalyse

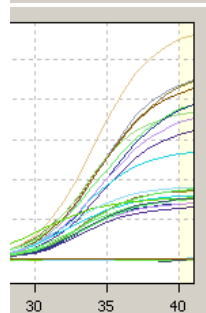
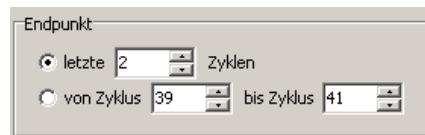
1. Stellen Sie folgende Parameter für die Endpunktanalyse ein:

Option	Beschreibung
Auswahlliste	Auswahl einer für das Experiment angelegten Auswertung
Gene of Interest (GOI)	Auswahl der Zielgen/Farbstoff-Kombination
Interne Positivkontrolle (IPC)	Auswahl des Farbstoffes, mit dem die interne Positivkontrolle detektiert wird
Gruppe	Wurden auf der PCR-Platte mehrere Experimente angelegt, ist hier die Gruppe des zu analysierenden Experiments auszuwählen.
Cutoff	Der Cutoff legt fest, ab welcher Endpunktfluoreszenz eine Probe als positiv gilt.

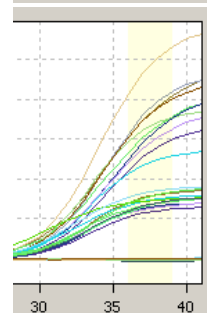
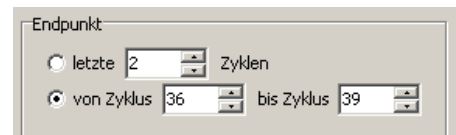
2. Legen Sie fest, welche Zyklen als Endpunkt gelten sollen.

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.

Der gewählte Bereich wird in den Amplifizierungskurven gelblich unterlegt.




Letzte 2 Zyklen markiert



Zyklus 36 bis 39 markiert

Auswahl des Bereichs für die Endpunktanalyse

Cutoff-Werte einstellen


Die Cutoff-Werte für GOI und IPC können Sie manuell einstellen oder automatisch berechnen lassen, wobei verschiedene Methoden in den zugehörigen Optionen  einstellbar sind.

Manuell

- Numerische Vorgabe des Cutoff-Wertes direkt im Eingabefeld **Cutoff** oder in den Optionen
- Verschieben der Cutoff-Linie mit der Maus im Diagramm

Automatisch

- Mit Negativkontrollen(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
- Mit Negativkontrollen (NTC) und interner Positivkontrolle (IPC):
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.

- Die automatische Berechnung der Cutoff-Werte entsprechend der Einstellungen in den Optionen lösen Sie mit einem Klick auf das Symbol  aus.

Alternativ können Sie auch den Menübefehl ENDPUNKT / AUTO THRESHOLD / CUTOFF aufrufen.

Hinweis

Wenn im Plattenlayout keine IPC-Proben definiert sind, steht die Option **mit interner Positivkontrolle IPC und NTC** nicht zur Verfügung. IPC-Proben können auf der Karte **Einstellungen / Proben** durch Markierung der Wells in der Plattendarstellung, Rechtsklick auf die Markierung und Zuweisen der Eigenschaft "IPC" mit Hilfe des Kontextmenüs definiert werden (→ Abschnitt "Probentabelle bearbeiten" S. 41).

5.7.3 Ergebnis in der Endpunktanalyse anzeigen

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 Replikate 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)

Nach dem Anlegen einer Auswertung und bei jeder Veränderung des Cutoff-Wertes bzw. anderer Optionen werden die Analysenergebnisse neu berechnet und die graphischen sowie tabellarischen Darstellungen aktualisiert.

Ergebnistabelle

Well	Probenname	Probentyp	Gruppe	FluoGOI	Mittl. FluoGOI	Stabw. FluoGOI	FluoIPC	Mittl. FluoIPC	Stabw. FluoIPC	Status GOI	Status IPC	Ergebnis Proben	Ergebnis Replikate
A4	H1	Unbekannt	Group 1	43894,45	41071,62	3992,08	17019,34	15944,93	1519,44	POS	POS	POS	POS
B4	H1	Unbekannt	Group 1	38248,79	41071,62	3992,08	14870,52	15944,93	1519,44	POS	POS	POS	POS
C4	H2	Unbekannt	Group 1	31714,67	34864,64	4454,74	12812,05	13328,08	729,78	POS	POS	POS	POS
D4	H2	Unbekannt	Group 1	38014,61	34864,64	4454,74	13844,11	13328,08	729,78	POS	POS	POS	POS
E4	H3	Unbekannt	Group 1	26587,02	30696,55	5811,76	15718,75	14758,92	1357,41	POS	POS	POS	POS
F4	H3	Unbekannt	Group 1	34806,09	30696,55	5811,76	13799,08	14758,92	1357,41	POS	POS	POS	POS
G4	NTC	NTC	Group 1	-199,7	-24,41	247,89	15239,33	16507,95	1794,1	NEG	POS	NEG	NEG
HH	NTC	NTC	Group 1	150,88	-24,41	247,89	17776,58	16507,95	1794,1	NEG	POS	NEG	NEG
A7	WT1	Unbekannt; IPC-	Group 1	55748,83	50011,56	8113,73	-238,58	-213,27	35,8	POS	NEG		
B7	WT1	Unbekannt; IPC-	Group 1	44274,29	50011,56	8113,73	-187,95	-213,27	35,8	POS	NEG		
C7	WT2	Unbekannt; IPC-	Group 1	36536,85	39388,36	4032,65	-246,75	-149,28	137,84	POS	NEG		
D7	WT2	Unbekannt; IPC-	Group 1	42239,87	39388,36	4032,65	-51,81	-149,28	137,84	POS	NEG		
F7	M2	Unbekannt	Group 1	-346,38	-411,01	91,4	15201,38	15105,65	135,39	NEG	POS	NEG	NEG
G7	M2	Unbekannt	Group 1	-475,65	-411,01	91,4	15009,91	15105,65	135,39	NEG	POS	NEG	NEG
H7	M3	Unbekannt	Group 1	-85,52	-85,52	0	17320,61	17320,61	0	NEG	POS	NEG	NEG

Ergebnistabelle der Endpunktanalyse

Für die Endpunktanalyse enthält die Ergebnistabelle folgende Angaben:

Spalte	Bedeutung
Well	Position der Probe
Kurvenfarbe	Jeder Probe wird automatisch (nicht veränderbar) eine Farbe zugeordnet, mit der die entsprechende Fluoreszenzkurve dargestellt wird.
Probenname	Name der Probe
Probentyp	Typ der Probe
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 Bewertung POS/NEG/CHECK der Replikate Replikate

Die Ergebnistabelle zeigt alle berechneten numerischen Werte sowie die Bewertung der Einzelproben und Replikate. Sie können die Tabelle Ihren Anforderungen anpassen indem Sie die anzuzeigenden Spalten festlegen, deren Breite und Reihenfolge festlegen sowie Sortierungen (alphabetisch, numerisch, zeilenweise, spaltenweise) vornehmen. Die so konfigurierte Tabelle kann durch Rechtsklick auf die Tabellenfläche als Excel-Datei oder CSV-Datei exportiert werden (→ Abschnitt "Berechnungsergebnisse exportieren" S. 84).

Tabelle speichern als Excel-Datei (*.xls)
Tabelle speichern als Excel-Datei (*.xls) und Excel starten
Tabelle speichern als CSV-Datei (*.csv)

Kontextmenü für den Datenexport

PCR-Plattendarstellung
(Grid)

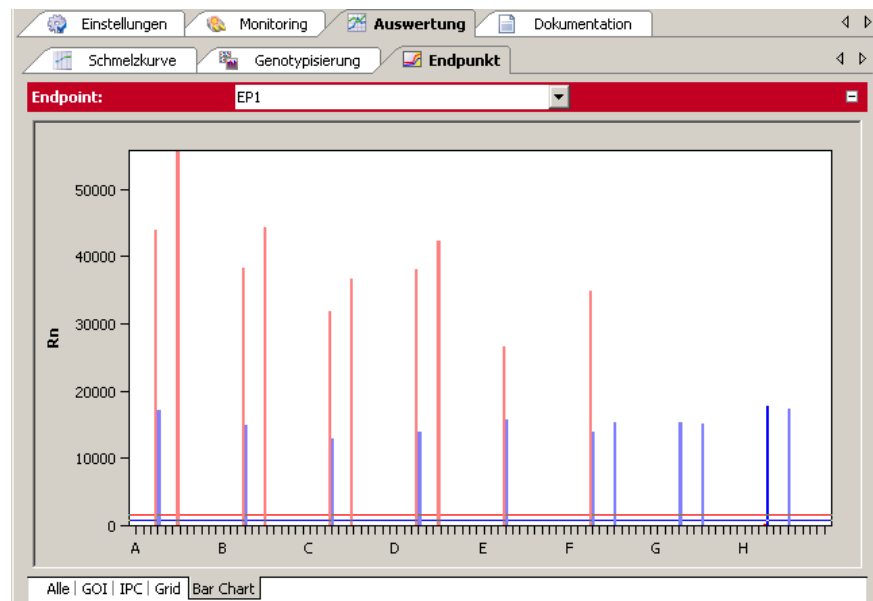
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				Unbek POS				Unbek				
B				Unbek H2 FluoGOI: 31714,67 POS FluoIPC: 12812,05				Unbek				
C				Unbek POS				Unbek				
D				Unbek POS				Unbek				
E				Unbek POS								
F				Unbek POS				Unbek NEG				
G				NTC NEG				Unbek NEG				
H				NTC NEG				Unbek NEG				

Ergebnisse der Enpunktanalyse auf PCR-Platte anzeigen

Für den qTOWER³ 84 sind die Spalten 1 – 24 und Zeilen A – P über Scroll-Balken zugänglich.

Die PCR-Plattendarstellung bietet einen schnellen Überblick über die Ergebnisse für jedes einzelne Well. Die Farben, mit denen positive, negative, fragliche bzw. IPC-Proben dargestellt werden, können Sie unter **Extras / Optionen / Farben** festlegen. Wird der Mauszeiger auf ein Well gehalten, so zeigt die Informationsbox den Probennamen sowie die Endpunktfluoreszenzwerte für GOI und ggf. IPC an.

Balkendiagramm (Bar Chart)



Balkendiagramm für das Ergebnis der Endpunktanalyse

Im Balkendiagramm werden die Endpunktfluoreszenzen von GOI und IPC für alle Wells gemeinsam dargestellt sowie die aktuellen Cutoff-Werte als waagerechte Linie angezeigt. Die roten Linien gelten dabei für das GOI, die blauen für die IPC. Wird der Mauszeiger auf einen Balken gehalten, erscheinen in einer Informationsbox Well, Probenname und Fluoreszenzwerte.


Hinweis

Die Cutoff-Linien können in dieser Darstellung nicht verändert werden, dies muss auf den Reitern GOI und IPC erfolgen.

6 Multigen-/Multiplatten-Analyse

Die Multigen-/Multiplatten-Analyse gewährleistet die Auswertung von Real-Time PCR 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 einem eigenen Fenster, unabhängig von der Oberfläche des qPCRsoft auto Programms ausgeführt. Grundlage zur Multigen-/Multiplatten-Analyse sind durch das Programm qPCRsoft auto gespeicherte Projektdateien. In den jeweiligen Projekten muss eine $\Delta\Delta C_t$ -Analyse angelegt sein, um sie in der Multigen-/Multiplatten-Analyse auswerten zu können.

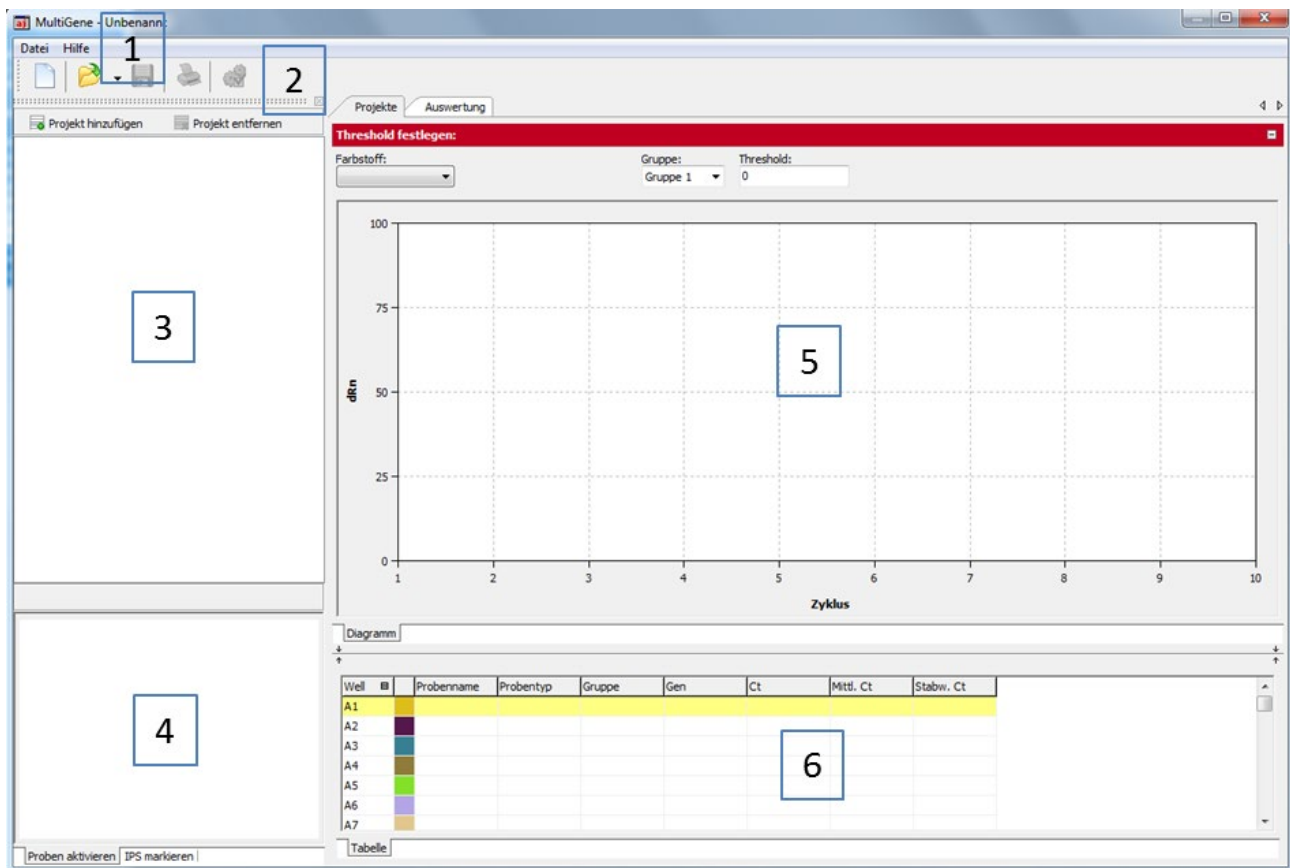
6.1 Multigen-/Multiplatten-Analyse starten

Um die Multigen-/Multiplatten-Analyse zu starten, klicken Sie in der Werkzeugleiste im Hauptfenster der qPCRsoft auto Software auf das Symbol . Das Fenster **MultiGene** zur Multigen-/Multiplatten-Analyse erscheint.

6.2 Das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse

Das Fenster **MultiGene** zur Multigen-/Multiplatten-Analyse hat folgende Bereiche:

Menüleiste (1)	Die Menüleiste enthält die Menübefehle zum Öffnen, Bearbeiten, Speichern und Drucken von Multigen-/Multiplatten-Analyse Dateien und eine Hilfefunktion.
Werkzeugleiste (2)	In der Werkzeugleiste sind Befehle zum Bearbeiten angeordnet.
Projektliste (3)	In der Projektliste werden Projekte verwaltet, deren Daten zur Multigen-/Multiplatten-Analyse herangezogen werden.
Proben (4)	In der Probenanzeige können die Messergebnisse einzelner Proben an- oder abgewählt werden. Nur Daten angewählter (aktiver) Proben werden in die Analyse mit einbezogen und ausgewertet. Darüber hinaus lässt sich im Bereich Proben die Position von Interplatten-Standards (IPS) definieren.
Anzeigebereich (5)	Im Anzeigebereich werden die Fluoreszenzkurven aus den Projektdateien graphisch dargestellt bzw. die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse in Form von Balkendiagrammen angezeigt.
Ergebnistabelle (6)	In der Ergebnistabelle sind die importierten Messergebnisse aus der jeweils angewählten Projektdatei bzw. die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse tabellarisch aufgelistet.








Fenster MultiGene zur Multigen-/Multiplattenanalyse

6.3 Übersicht der Menübefehle

Im Auswertefenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse stehen folgende Menübefehle zur Verfügung:

Menü	Funktion	Beschreibung
Datei	Neue Multigen-/Multiplattenanalyse	Legt eine neue Multigen-/Multiplatten-Analyse an
	Multigen-/Multiplattenanalyse Öffnen	Öffnet eine Multigen-/Multiplatten-Analyse (RTMultiGeneAnalysis file)
	Multigen-/Multiplattenanalyse Speichern	Speichert eine Multigen-/Multiplatten-Analyse (RTMultiGeneAnalysis file) im Standard-Ordner ab
	Multigen-/Multiplattenanalyse Speichern unter	Speichert eine Multigen-/Multiplatten-Analyse (RTMultiGeneAnalysis file) in einem beliebigen, frei wählbaren Ordner ab
	Multigen-/Multiplatten-Analyse Drucken	Druckt die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse
	Schließen	Schließt das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse

6.4 Übersicht der Werkzeuge in der Werkzeugleiste

Schaltfläche	Befehl	Funktion
	Neu	Legt eine neue Multigen-/Multiplatten-Analyse an
	Öffnen	Öffnet eine Multigen-/Multiplatten-Analyse
	Speichern	Speichert eine Multigen-/Multiplatten-Analyse
	Drucken	Druckt eine Multigen-/Multiplatten-Analyse
	Optionen	Erlaubt die Eingabe der Effizienz der PCR-Reaktion für einzelne Zielgene


6.5 Hilfefunktion

Hilfe zur Bedienung der Multigen-/Multiplatten-Analyse erhalten Sie über den Menübefehl **Hilfe ▶ Inhalt**.


Während der Multigen-/Multiplatten-Analyse können Sie mit der Funktionstaste [F1] den Hilfetext aufrufen.

Das Programm blendet Kurzinformationen zu den Schaltflächen der Symbolleiste ein, wenn Sie den Mauszeiger auf eine Schaltfläche bewegen.

6.6 Dateiverwaltung Multigen-/Multiplatten-Analyse

Nach Klick auf  wird die Multigen-/Multiplatten-Analyse in einem separaten Fenster angezeigt und enthält zunächst keine Daten.


6.6.1 Neue Multigen-/Multiplatten-Analyse anlegen

Um eine Multigen-/Multiplatten-Analyse neu anzulegen, klicken Sie auf  oder rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Neu** auf. Eine bereits geöffnete Multigen-/Multiplatten-Analyse wird dabei geschlossen. Wurden Veränderungen vorgenommen, die noch nicht gespeichert waren, erfolgt eine Sicherheitsabfrage.

Hinweis:

Es kann immer nur eine Multigen-/Multiplattenanalyse geöffnet sein.

6.6.2 Gespeicherte Multigen-/Multiplatten-Analyse öffnen

1. Klicken Sie auf  oder rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Multigen-/Multiplatten-Analyse öffnen** auf.

2. Wählen Sie im Standardfenster zum Öffnen von Dateien die gespeicherte Datei und bestätigen Sie die Auswahl mit [OK].


Die Multigen-/Multiplatten-Analyse mit Projektliste, Probenlayout, Messergebnissen und Auswertungen wird angezeigt.

Hinweis: Wenn unter **Extras ▶ Optionen ▶ Datei** der Dateityp "*.mgax" mit der Anwendung qPCRsoft auto verknüpft ist, öffnet sich das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse nach Doppelklick auf die ausgewählte Datei automatisch.

6.6.3 Multigen-/Multiplatten-Analyse speichern

Die Multigen-/Multiplatten-Analyse wird mit allen hinzugefügten Projektdateien und Auswertungen gespeichert.

1. Rufen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Multigen-/Multiplatten-Analyse Speichern unter** auf.
2. Geben Sie im Standardfenster zum Speichern von Dateien den Namen der Analyse ein und speichern Sie die Datei mit [OK].


Änderungen in der Analyse speichern Sie mit dem Menübefehl **Datei ▶ Multigen-/Multiplatten-Analyse speichern**. Alternativ klicken Sie auf das Symbol  in der Werkzeugleiste.

6.6.4 Multigen-/Multiplatten-Analyse schließen

Mit dem Menübefehl **Datei ▶ Schließen** wird das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse geschlossen. Wurden Veränderungen vorgenommen, die noch nicht gespeichert wurden, erfolgt dazu eine Sicherheitsabfrage.

6.6.5 Multigen-/Multiplatten-Analyse drucken

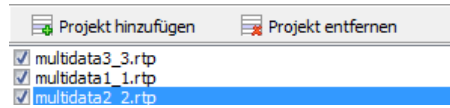
Die Daten und Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse lassen sich mittels der Funktion **Drucken** ausdrucken. Dazu muss eine Analyse angelegt sein.

1. Wählen Sie im Anzeigebereich zur Multigen-/Multiplatten-Analyse die Registerkarte **Auswertung** (→ Abschnitt "Das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse" S. 123).
2. Starten Sie den Ausdruck mit einem Klick auf  oder wählen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Multigen-/Multiplatten-Analyse drucken**.

6.7 Projektdateien laden

Wird eine neue Multigen-/Multiplatten-Analyse gestartet, wird zunächst ein leeres Fenster angezeigt. Um eine entsprechende Analyse durchführen zu können, müssen Projektdateien geladen werden. In den Projektdateien muss eine $\Delta\Delta C_t$ -Analyse angelegt sein, um sie in der Multigen-/Multiplatten-Analyse auswerten zu können.

1. Um eine Projektdatei zu laden, klicken Sie auf die Schaltfläche **[Projekt hinzufügen]**.
2. Wählen Sie im Standardfenster zum Öffnen von Dateien ein oder mehrere gespeicherte Projekte und bestätigen Sie die Auswahl mit [OK]. Geladene Projekte werden in der Projektliste aufgelistet.

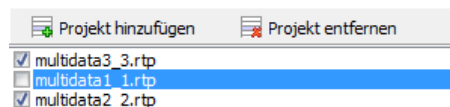


Projektliste für Multigen-/Multiplatten-Analyse

1. Um eine Projektdatei aus der Liste wieder zu entfernen, markieren Sie es in der Liste.
2. Klicken Sie auf die Schaltfläche **[Projekt entfernen]**.

6.8 Projektdateien für Multigen-/Multiplatten-Analyse aktivieren/deaktivieren

In der Projektliste wird neben jedem geladenen Projekt ein Kontrollkästchen angezeigt. Über das Kontrollkästchen ist eine Aus- bzw. Abwahl der Projekte möglich. Nur die Daten aus ausgewählten Projekten werden in der Analyse berücksichtigt.



Projektliste für Multigen-/Multiplatten-Analyse mit de-/aktivierten Projekten

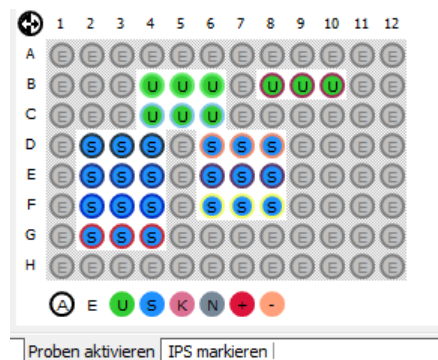
Die Daten abgewählter Projektdateien bleiben im Hintergrund geladen und werden durch erneute Aktivierung des Kontrollkästchens wieder mit in die Analyse einbezogen.

6.9 Proben für Multigen-/Multiplatten-Analyse aktivieren/deaktivieren

Aktivieren Sie im Anzeigebereich zur Multigen-/Multiplatten-Analyse die Registerkarte **Projekte** (→ Abschnitt "Das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse" S. 123). Proben einzelner Wells können in der Probenanzeige unter der Registerkarte **Proben aktivieren** für die Auswertung aktiviert bzw. deaktiviert werden. So können zum Beispiel Ausreißer eliminiert und bei der Berechnung von Mittelwerten nicht berücksichtigt werden.

Hinweis

Die Auswahl der Proben hat nur Einfluss auf die Analyse der Daten, es werden keine Messdaten gelöscht.





Probenbelegung für Multigen-/Multiplattenanalyse

Die Probenbelegung wird aus den geladenen Projektdateien übernommen. Die Farbcodierung kann im Programm qPCRsoft auto unter dem Menüpunkt **Extras ▶ Optionen** im Fenster **Optionen / Farbe** eingestellt werden.

Probentyp	Symbol	Definition
Leer	E	Beschreibt eine leere Position auf der PCR-Platte
Unbekannt	U	Probe unbekannter Konzentration oder Verdünnung (Messprobe)
Standard	S	Probe bekannter Konzentration oder Verdünnung
Kalibrator	K	Probe, deren Zielgen-Expressionslevel als 1 gesetzt wird
No template control (NTC)	N	Kompletter Reaktionsansatz aber ohne Matrizenstrang
Positivkontrolle	+	Positiver Kontrollansatz, bei dem ein Reaktionsprodukt zu erwarten ist
Negativkontrolle	-	Negativer Kontrollansatz, bei dem kein Reaktionsprodukt zu erwarten ist

Aktive und damit in der Analyse berücksichtigte Proben sind mit ihrem Probentyp-Symbol gekennzeichnet. Für deaktivierte Proben werden die Symbole grau dargestellt und die Fluoreszenzkurven werden ausgeblendet. Leere Wells sind mit einem "E" gekennzeichnet.

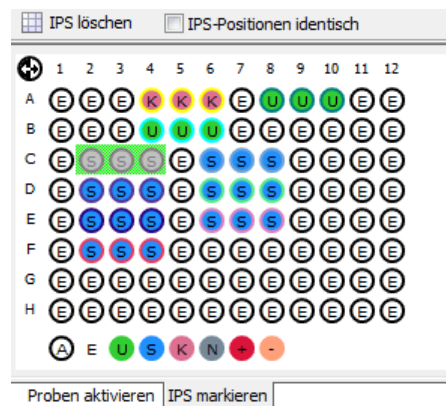
- Das Umschalten erfolgt mit der Maus. Bei jedem Klick auf eine Probe wechselt die Aktivierung.
- Nebeneinander liegende Proben schalten Sie um, in dem Sie mit gedrückter Maustaste über die Wells fahren.
- Ganze Zeilen und Spalten können durch Klick auf den Buchstaben bzw. Zahl der Zeile [A-H] bzw. Spalte [1-12] invertiert werden.
- Die ganze Platte kann durch Klick auf links oben  invertiert werden.
- Zur Aktivierung aller Proben klicken Sie auf das Symbol  unter der Graphik.
- Um nur die Proben eines bestimmten Typs zu aktivieren, klicken Sie auf das entsprechende Symbol unter der Graphik. Mehrere Probentypen können Sie

gleichzeitig aktivieren, wenn Sie die Probenarten mit gedrückter Strg-Taste anklicken.

6.10 Interplatten-Standards für Multigen-/Multiplatten-Analyse definieren

Aktivieren Sie im Anzeigebereich zur Multigen-/Multiplatten-Analyse die Registerkarte **Projekte** (→ Abschnitt "Das Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse" S. 123). In der Multigen-/Multiplatten-Analyse werden Interplatten-Standards (IPS) auf jeder PCR-Platte mitgeführt und die Abweichungen untereinander ermittelt und verrechnet.

1. Zur Definition von Interplatten-Standards wechseln Sie in der Probenanzeige auf die Registerkarte **IPS markieren**.

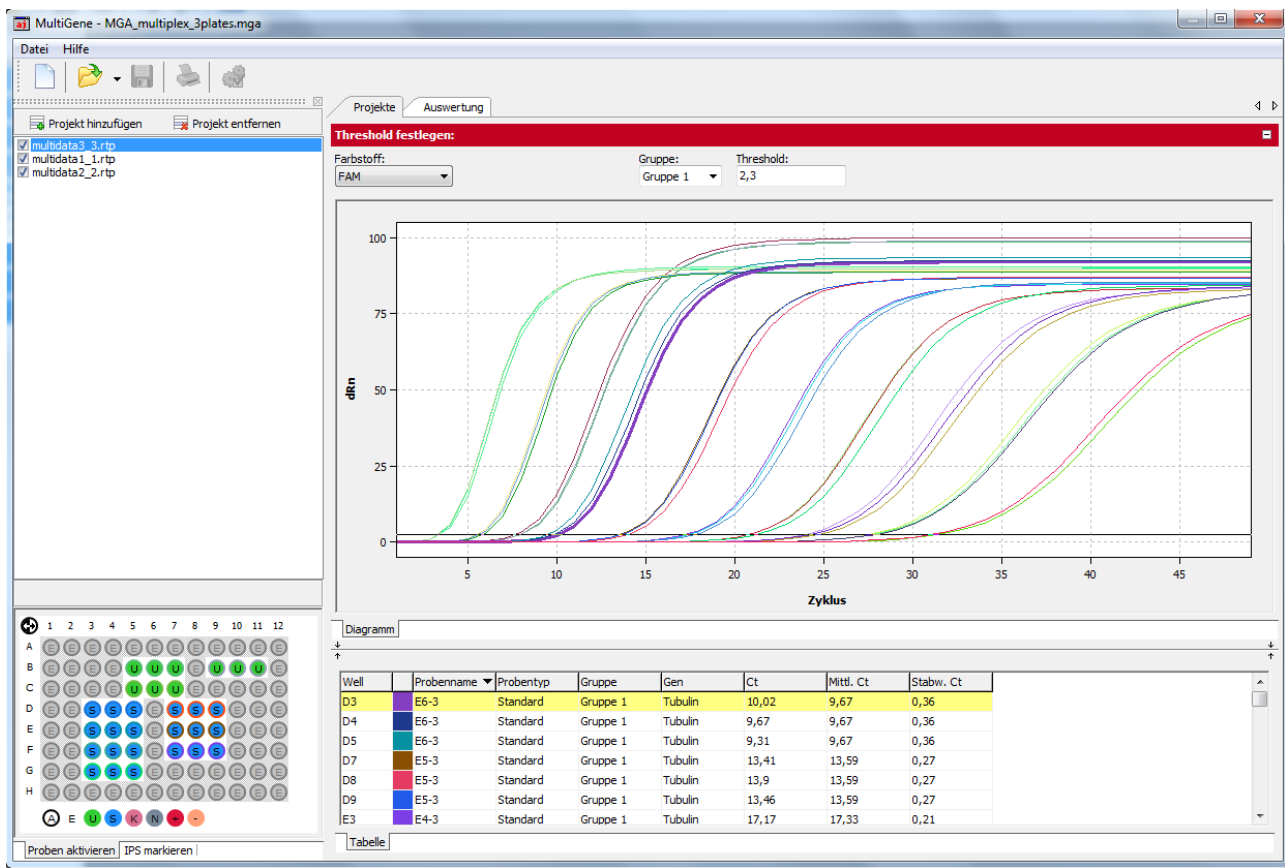


Interplatten-Standards definieren

2. Markieren Sie die IPS-Proben:
 - Markieren Sie durch Drücken der linken Maustaste und Ziehen den Plattenbereich, der Ihre IPS-Proben enthält. Die entsprechenden Proben werden daraufhin grau vor einem grünen Hintergrund angezeigt. Für Proben, die nicht als IPS definierte sind, wird nur das Probenart-Symbol angezeigt. Leere Wells sind mit einem "E" gekennzeichnet. Zur Auswahl von Proben siehe auch Abschnitt "Proben für Multigen-/Multiplatten-Analyse aktivieren/deaktivieren" S. 127.
 - Befinden sich die IPS auf allen Platten in derselben Position, aktivieren Sie das Kontrollkästchen **[IPS-Position identisch]**. Damit wird die Auswahl auf alle geladenen Projekte übertragen.
 - Um die IPS in allen geladenen Projekten zu löschen, klicken Sie auf **[IPS löschen]**.

6.11 Threshold und PCR-Effizienzen für Multigen-/Multiplatten-Analyse festlegen

Nach dem Einladen von Projektdateien werden die entsprechenden Messdaten für das aktive Projekt im Anzeigebereich dargestellt. Das jeweils aktive Projekt erscheint in der Projektliste auf der linken Seite blau unterlegt. Durch Anklicken des Namens in der Projektliste kann ein anderes Projekt aktiviert und so zwischen verschiedenen Projekten gewechselt werden.



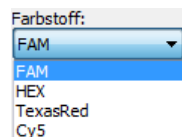
Anzeige von Fluoreszenzkurven und Ergebnissen des aktiven Projekts auf der Registerkarte Projekte

Aus den geladenen Projektdateien werden alle Messergebnisse und Einstellungen übernommen. Im Fenster **MultiGene** zur Multigen-/Multiplatten-Analyse können der Threshold-Wert für jeden Farbstoff und die PCR-Effizienz neu eingestellt werden. Alle weiteren Einstellungen können nicht mehr verändern, das ist nur in den jeweiligen Einzelprojekten in der qPCRsoft auto Software möglich.

Threshold-Wert ändern

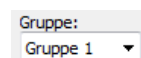
Auf der Registerkarte **Projekte** lässt sich aber der für jeden Farbstoff verändern.

1. Aktivieren Sie das entsprechende Projekt in der Projektliste.
2. Wählen Sie einen Farbstoff in der Liste auf der Registerkarte **Projekte**.



Auswahlliste für Farbstoffe

3. Sind in der Projektdatei verschiedene Gruppen von Proben angelegt, wählen Sie die passende Gruppe in der Liste **Gruppe**.



Liste Gruppe zur Auswahl der Probengruppe


4. Zur Veränderung des Threshold Wertes bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten:
 - Verschieben Sie In der Graphik die schwarze Threshold-Linie mit dem Cursor nach oben oder unten, während Sie die linke Maustaste gedrückt halten.

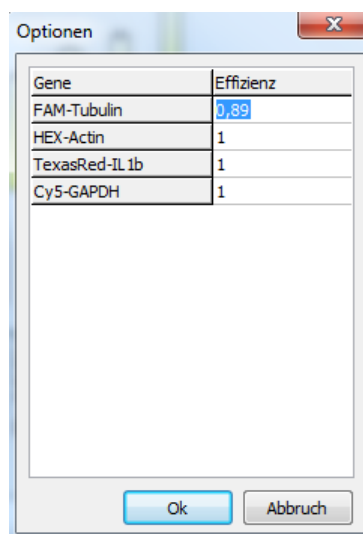
- Geben Sie einen Wert in das Feld **Threshold** ein.

Mit der Veränderung des Thresholds werden die Werte in der unten angezeigten Ergebnistabelle neu berechnet.

PCR-Effizienz ändern

Grundsätzlich wird die PCR-Effizienz aus den eingeladenen Projektdateien übernommen. Es besteht aber die Möglichkeit für die Analyse die PCR-Effizienz für die betrachteten Gene anzupassen.

1. Aktivieren Sie dazu die Registerkarte **Auswertung** im Anzeigebereich und klicken Sie auf die Schaltfläche  in der Werkzeugleiste.
2. Passen Sie im Fenster **Optionen** die PCR-Effizienz für die einzelnen Gene an.

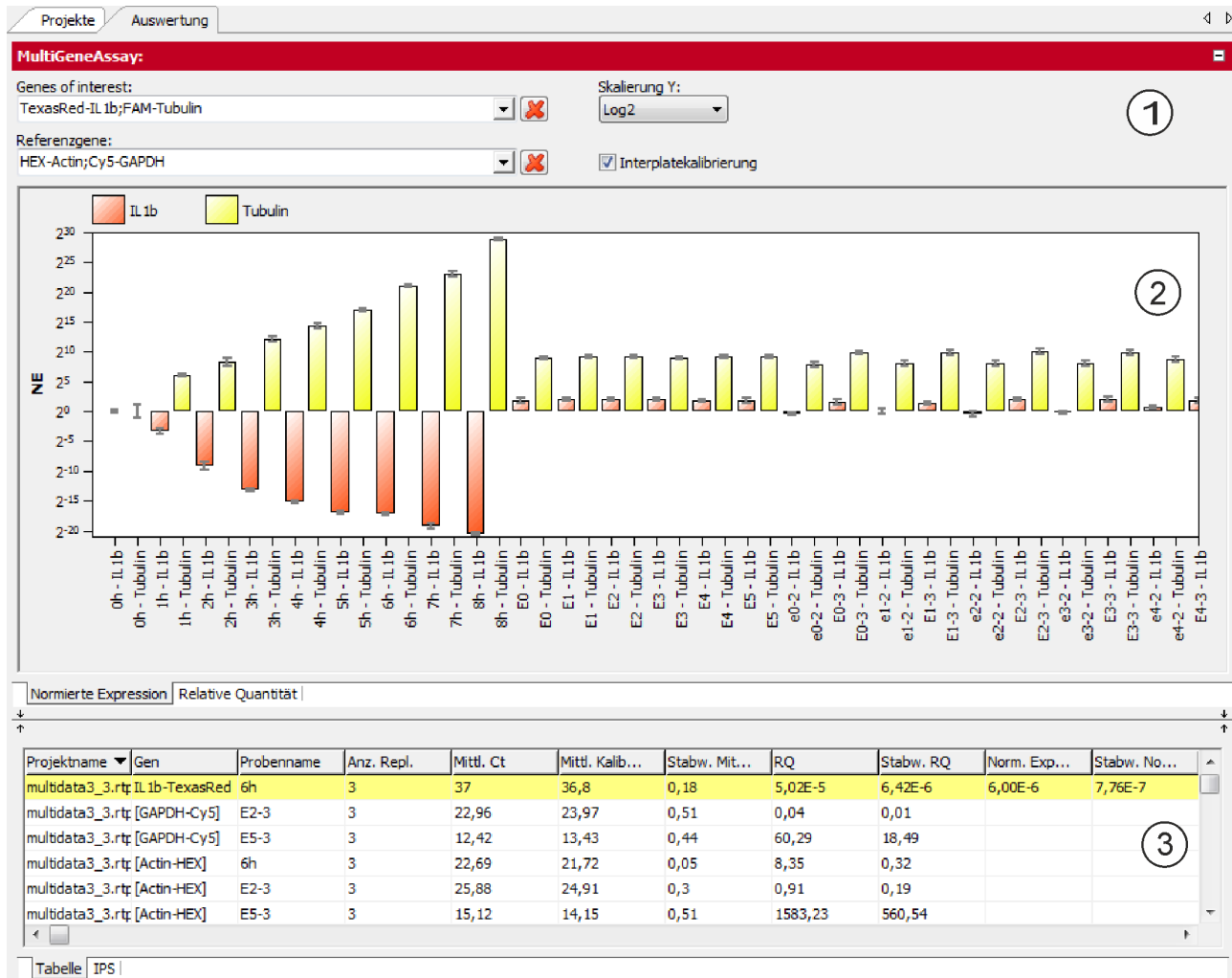


Fenster Optionen zur Anpassung der PCR-Effizienz

3. Geben Sie dazu einen neuen Wert ein und bestätigen Sie Ihre Eingabe mit **[OK]**.

6.12 Auswertung Multigen-/Multiplatten-Analyse

Die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse sind unter der Registerkarte **Auswertung** im Anzeigebereich dargestellt.

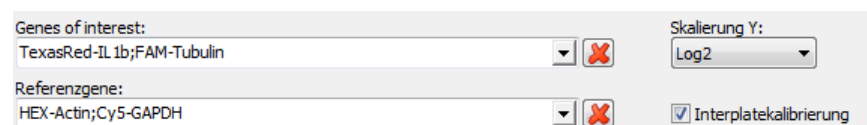


Fenster zur Multigen-/Multiplatten-Analyse

Die Darstellung untergliedert sich in folgende Bereiche:



- Parametereinstellung (1)
- Graphische Ergebnisdarstellung (2)
- Ergebnistabelle mit Messwerten (3)

6.12.1 Parametereinstellung für die Multigen-/Multiplatten-Analyse



Parametereinstellungen für die Multigen-/Multiplattenanalyse

Stellen Sie folgende Parameter für die Multigen-/Multiplatten-Analyse ein:

Option	Beschreibung
Genes of Interest	Auswahlliste der Zielgen/Farbstoff-Kombinationen Es können mehrere Zielgene ausgewählt werden. Mit dem Symbol  werden alle Zielgene aus der Auswertung entfernt.
Referenzgene	Auswahlliste der Referenzgen/Farbstoff-Kombination Es können mehrere Referenzgene ausgewählt werden. Mit dem Symbol  werden alle Referenzgene aus der Auswertung entfernt.
Skalierung Y	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. Ist die Interplattenkalibrierung deaktiviert, so 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

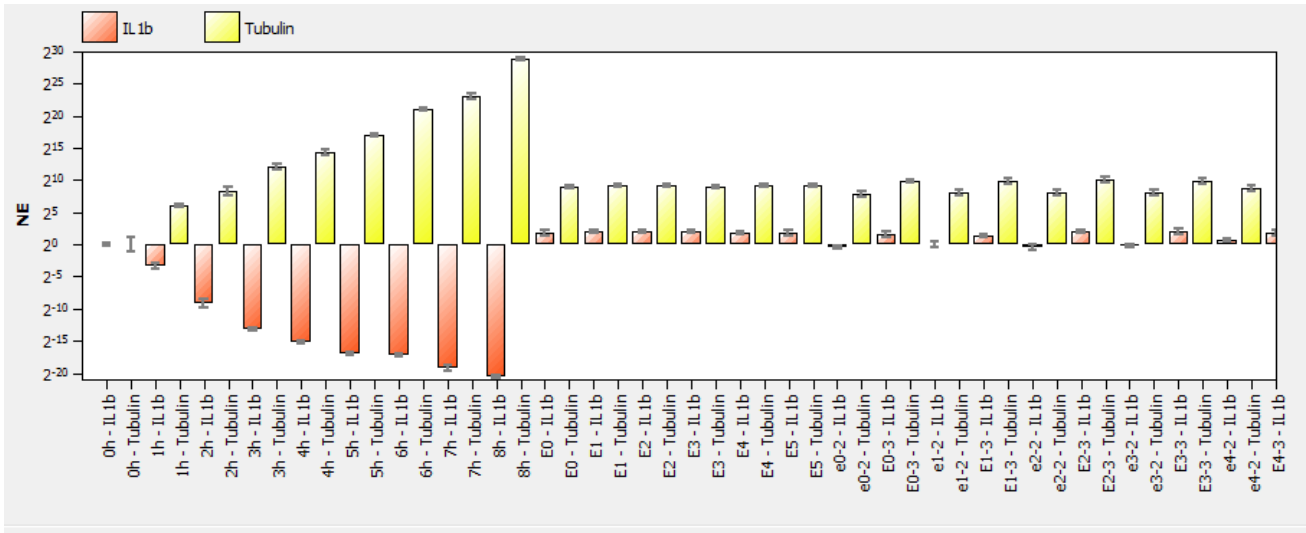
6.12.2 Ergebnisanzeige der Multigen-/Multiplatten-Analyse

Die Ergebnisse der Multigen-/Multiplatten-Analyse werden in Form von Balkendiagrammen angezeigt. Im Registerblatt **Normierte Expression** wird die Expression der ausgewählten Zielgene, normiert auf die Expression der Referenzgene aufgetragen. Im zweiten Registerblatt **Relative Quantität** sind entsprechend Mengen für Ziel- und Referenzgene dargestellt. Der jeweilige Probenname ist unterhalb eines jeden Balkens angegeben. Die Höhe der Balken wird bestimmt durch die berechnete normierte Expression von Replikaten. Zu jedem Balken wird eine Kurzinformation 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. 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. Mittels des Mauseisens lässt sich die Darstellung in der Breite stauchen oder verbreitern. Alternativ können dafür die Pfeiltasten [↑] und [↓] benutzt werden.

Durch Rechtsklick auf die Diagrammfläche können die Ergebnisse in der X-Achse nach Genen oder Probenamen sortiert dargestellt werden.

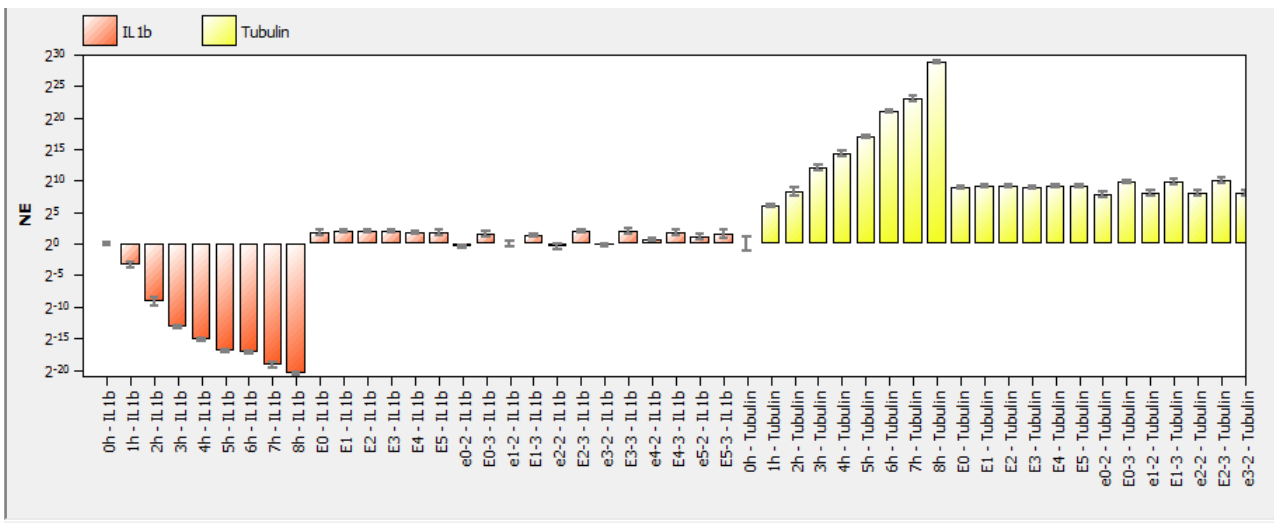
Probenamen
 Gennamen
 Copy Chart
 Save Chart

Kontextmenü für die Sortierung nach Probenamen oder Genen



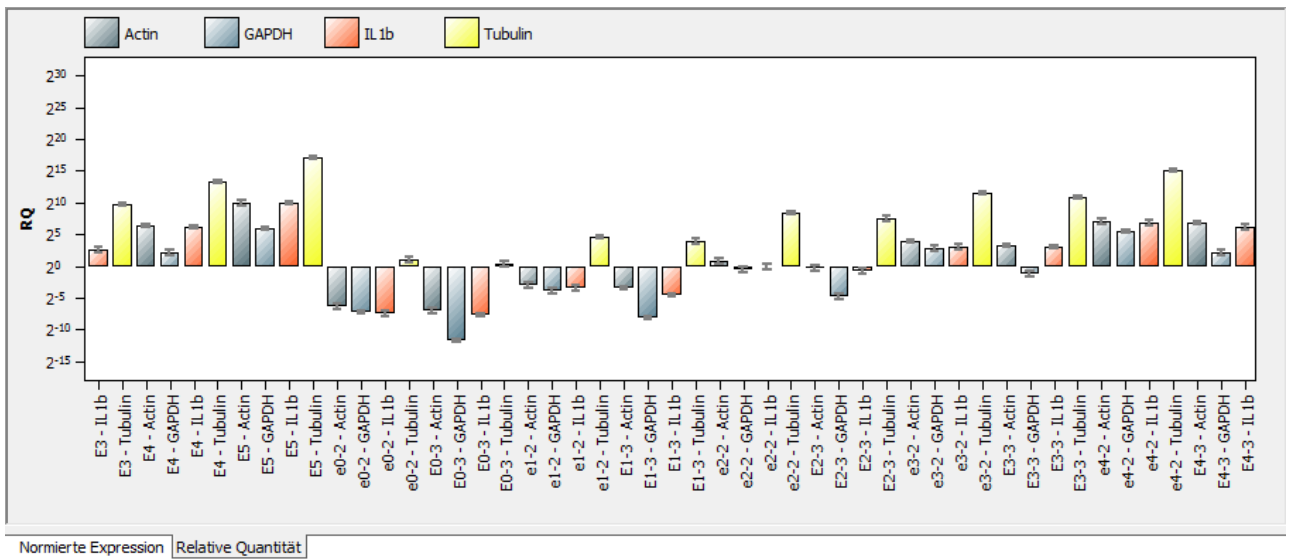
Normierte Expression | Relative Quantität

Darstellung der normierten Expression in Form eines Balkendiagramms, nach Probenamen sortiert

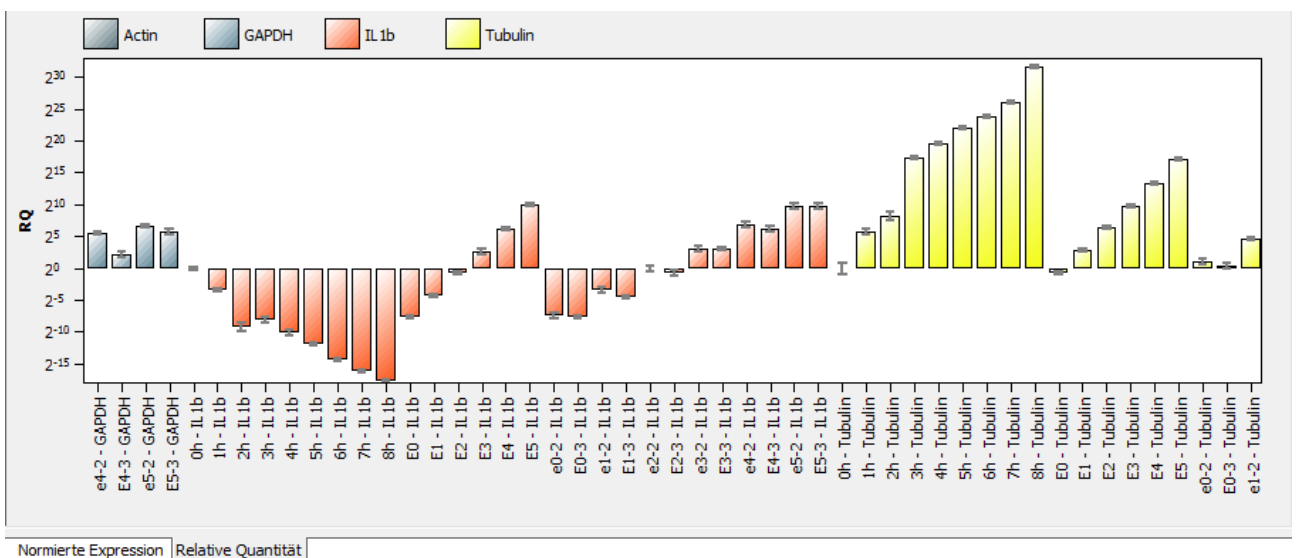


Normierte Expression | Relative Quantität

Darstellung der normierten Expression in Form eines Balkendiagramms, nach Gennamen sortiert



Darstellung der relativen Quantität in Form eines Balkendiagramms (Ausschnitt), nach Probenamen sortiert



Darstellung der relativen Quantität in Form eines Balkendiagramms (Ausschnitt), nach Genamen sortiert

Im Registerblatt **Tabelle** der Ergebnistabelle für Multigen-/Multiplatten-Analyse sind alle Daten und zugehörigen Messwerte für die Proben zusammengefasst.

Projektname	Gen	Probenname ▲	Anz. Repl.	Mittl. Ct	Mittl. Kalib...	Stabw. Mit...	RQ	Stabw. RQ	Norm. Exp...	Stabw. No...
multidata1_1.r.tq	[GAPDH-Cy5]	0h	3	16,28	19,34	0,01	1	0,01		
multidata1_1.r.tq	IL1b-TexasRed	0h	3	20,78	22,52	0,07	1	0,05	1	0,05
multidata1_1.r.tq	[Actin-HEX]	0h	3	22,13	24,78	0,03	1	0,02		
multidata1_1.r.tq	[GAPDH-Cy5]	0h	3	16,28	19,34	0,01	1	0,01		
multidata1_1.r.tq	[Actin-HEX]	0h	3	22,13	24,78	0,03	1	0,02		
multidata1_1.r.tq	Tubulin-FAM	0h	3	27,14	30,59	2,15	1	1,49	1	1,49

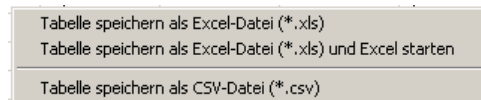
Tabelle | IPS |

Ergebnistabelle für die Multigen-/Multiplatten-Analyse

Für die Multigen-/Multiplatten-Analyse enthält die Ergebnistabelle für die Proben folgende Angaben:

Spalte	Bedeutung
Projektname	Name des geladenen Projekts, in dem sich die jeweilige Probe befindet
Gen	Name des untersuchten Gens
Probenname	Name der Probe
Anz. Repl.	Anzahl der Replikate der Probe
Mittl. Ct	Durchschnitts-Ct Wert der Replikate einer Probe
Mittl. Kalib. Ct	Mit Hilfe der IPS korrigierter mittlerer Ct-Wert der Replikate einer Probe
Stabw. Mit. Kalib. Ct	Standardabweichung des korrigierten mittleren Ct-Wertes der Replikate einer Probe
RQ	Berechnete relative Menge für Replikate des Gens in der Ursprungsprobe
Stabw. RQ	Standardabweichung der berechneten relativen Menge für Replikate des Gens in der Ursprungsprobe
Norm. Exp.	Normierte Expression der Probe
Stabw. Norm. Exp.	Standardabweichung der normierten Expression der Probe

Sie können die Tabelle Ihren Anforderungen anpassen indem Sie die anzuzeigenden Spalten festlegen, deren Breite und Reihenfolge festlegen sowie Sortierungen (alphabetisch, numerisch, zeilenweise, spaltenweise) vornehmen. Die so konfigurierte Tabelle kann durch Rechtsklick auf die Tabellenfläche als Excel-Datei oder CSV-Datei exportiert werden (→ Abschnitt "Berechnungsergebnisse" S. 84).



Kontextmenü für den Datenexport

Im Registerblatt **IPS** der Ergebnistabelle für Multigen-/Multiplatten-Analyse sind die Daten der Interplatten-Standards zusammengefasst.

Projektname	Farbstoff	Mittl. Ct (IPS, Projekt)	Mittl. Ct (IPS, alle Projekte)	Korrekturwert
multidata3_3.rtp	FAM	9,67	8,48	-1,19
multidata3_3.rtp	HEX	11,35	10,38	-0,97
multidata3_3.rtp	TexasRed	8,95	8,75	-0,21
multidata3_3.rtp	Cy5	8,36	9,36	1
multidata1_1.rtp	FAM	5,03	8,48	3,45
multidata1_1.rtp	HEX	7,74	10,38	2,65

Tabelle IPS

Daten der Interplatten-Standards

Für die Multigen-/Multiplatten-Analyse enthält die Ergebnistabelle für die Interplatten-Standards folgende Angaben:


Spalte	Bedeutung
Projektname	Name des geladenen Projekts, in dem sich die angezeigte IPS-Probe befindet

Farbstoff	Farbstoff, mit dem der Ct-Wert der IPS-Probe bestimmt wurde
Mittl. Ct (IPS, Projekt)	Durchschnitts-Ct Wert der IPS-Proben im Projekt (farbstoffabhängig)
Mittl. Ct (IPS, alle Projekte)	Durchschnitts-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

7 MIQE-Dokumentation

Im Jahr 2009 hat eine internationale Expertengruppe um Prof. Steven Bustin Richtlinien zur Publikation von Real-Time PCR Daten erarbeitet (Bustin et al. 2009, Clinical Chemistry 55:4, 611-622). Das grundlegende Ziel ist die Veröffentlichung unvollständiger oder fehlerhafter Real-Time PCR 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, sind unter der Abkürzung "MIQE" (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) bekannt geworden.

Hinweise zum Ausfüllen der MIQE-Dokumentation

1. MIQE besteht aus einem Fragenkatalog zu insgesamt 9 verschiedenen Themenbereichen rund um Real-Time PCR Experimente. In der qPCRsoft auto Software ist unter dem Punkt **Dokumentation** für jeden Themenbereich eine Schaltfläche angelegt, über den der entsprechende Fragenkatalog zum Thema aufgerufen werden kann. Zusätzlich ist eine Schaltfläche **Startseite MIQE** vorhanden, mit dem von jedem Punkt aus man in das MIQE-Hauptmenü zurückspringen kann.
2. Grundsätzlich sollte zunächst durch Auswahl der entsprechenden Option definiert werden, ob in den Experimenten DNA oder RNA aus 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.
3. Nach Klick auf eine Schaltfläche wird der entsprechende Fragenkatalog geöffnet. Die Anzahl der Fragen unterscheidet sich zwischen den jeweiligen Themenbereichen. Der Anwender sollte möglichst viele Fragen beantworten.
4. Ein Teil der Antworten wird aus dem aktuell geöffneten bzw. aktiven Projekt übernommen, insofern die entsprechenden Informationen vorhanden sind.
5. 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.
6. Es ist möglich MIQE-Daten aus anderen Projekten zu importieren. Nach Klick auf  oder Wahl des Menübefehls MIQE ► MIQE Dokumentation importieren in der Werkzeugleiste öffnet sich ein Dialogfenster. Nach Auswahl des entsprechenden Projekts werden gespeicherte MIQE-Daten in das aktuelle Projekt importiert.
7. Der Fragenkatalog lässt sich über die Funktion **Drucken** der qPCRsoft auto Software ausdrucken. Wählen Sie dazu den Punkt **MIQE** unter **Dokumentation** an (→ Abschnitt "Drucken" S. 24). Gedruckt wird immer der vollständige Fragenkatalog.

The screenshot shows a software window titled "Real-Time PCR Projekt - Topical_Demo_Genotyping1_1.rtp". The interface includes a menu bar with "Einstellungen", "Monitoring", "Auswertung", and "Dokumentation". Below the menu is a "MIQE" tab. The main area is divided into two columns. The left column contains a vertical list of buttons: "Startseite MIQE" (with a home icon), "Experimentelles Design", "Angaben zu den Proben", "Nukleinsäureextraktion", "Reverse Transkription" (with a checkmark icon), "Angaben zum qPCR-Target", "qPCR Oligonukleotide", "qPCR Protokoll", "qPCR Validierung", and "Datenanalyse". The right column contains the "Target:" section with radio buttons for "RNA" and "DNA" (selected). Below this is the "MIQE" section, which includes the text: "Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (According to the MIQE guidelines published by S.A. Bustin et. al. in Clinical Chemistry 55:4 (2009) 611-622.)" and a paragraph: "Der Fragebogen ermöglicht es, wichtige und ergänzende Informationen zu diesem real-time PCR-Projekt zu erfassen. Die Information können über die Druckfunktion als MIQE-Report ausgedruckt werden." At the bottom left, there is a "Fortschritt:" section with a progress bar showing 27% completion. A legend at the bottom indicates that pink boxes represent "wichtige Informationen" and white boxes represent "ergänzende Informationen".

Real-Time PCR Projekt - Topical_Demo_Genotyping1_1.rtp

Einstellungen Monitoring Auswertung Dokumentation

MIQE

Startseite MIQE

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 Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

(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 Information können über die Druckfunktion als MIQE-Report ausgedruckt werden.

Fortschritt:

27%

wichtige Informationen

ergänzende Informationen

Startseite der Eingabemaske für MIQE

8 Funktionen im Menü Extras

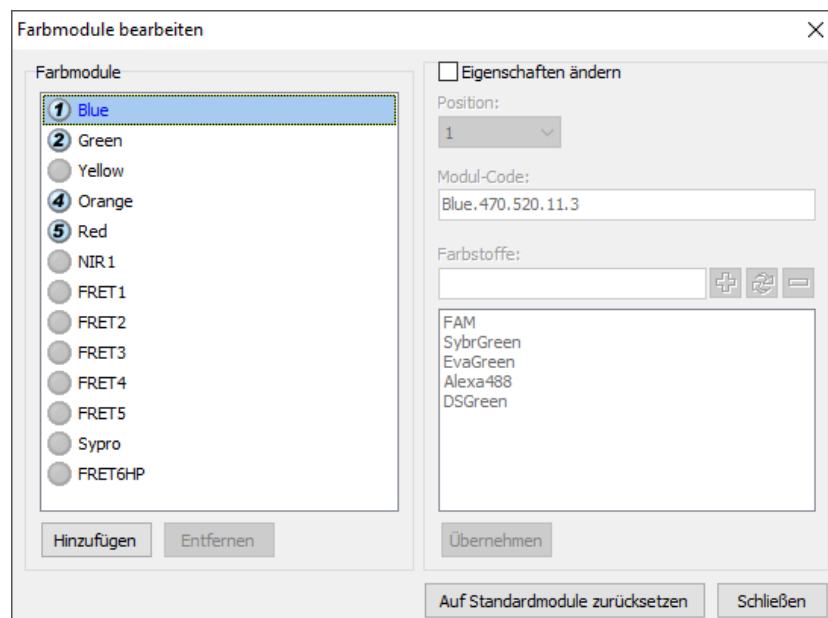
8.1 Gerät initialisieren

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

- Rufen Sie den Menübefehl **Extras ▶ Geräteinitialisierung** auf.

8.2 Farbmodule bearbeiten

Nach Einsetzen der Farbmodule in den Messkopf des Geräts müssen die Farbmodule in der Software spezifiziert werden.



Fenster Farbmodule bearbeiten

1. Rufen Sie den Menübefehl **Extras ▶ Farbmodule bearbeiten** auf.

Es öffnet sich das gleichnamige Fenster. Auf der linken Seite werden alle für Ihr Gerät verfügbaren Farbmodule angezeigt.

2. Wählen Sie aus der Liste das Modul aus, welches Sie im Gerät installiert haben, aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Eigenschaften** und wählen Sie die Position, auf welcher Sie das Modul im Gerät montiert haben. Fügen Sie ggf. noch Farbstoffnamen hinzu, wenn diese noch nicht in die Liste aufgenommen sind. Klicken Sie auf **[Übernehmen]**.

3. Verfahren Sie für jedes Farbmodul, welches Sie montiert haben, auf die gleiche Weise.

Hinweis: Wenn Sie das Gerät in der Herstellerkonfiguration ohne zusätzliche/andere Farbmodule betreiben, nehmen Sie die Einstellungen wie auf der Abbildung oben vor.

4. Wenn Sie ein neues Farbmodul definieren wollen, welches nicht in der Liste der verfügbaren Farbmodule enthalten ist, klicken Sie auf **[Hinzufügen]**. Ein neues Farbmodul mit der Bezeichnung COLOR.000.000.00.0 wird angelegt und Sie können dessen Eigenschaften im angezeigten Dialog definieren.
5. Ein Farbmodul entfernen Sie aus der Liste, in dem Sie es mit dem Cursor markieren und anschließend auf **[Entfernen]** klicken.
6. Die Eigenschaften eines Farbmoduls ändern Sie auf folgende Weise:
 - Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Eigenschaften**.
 - Wählen Sie in der Liste **Position** die Position des Farbmoduls auf dem Träger im Fluoreszenzmesskopf.
 - Geben Sie den Farbstoff ein, der mit dem Farbmodul detektiert wird. Klicken Sie auf **[+]**.
Der Farbstoff wird der darunter stehenden Liste zugeführt.
Einen Farbstoff entfernen Sie, indem Sie ihn in der Liste markieren und auf **[-]** klicken.
 - Mit **[Übernehmen]** weisen Sie die Eigenschaften dem markierten Farbmodul zu.

Hinweis:

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.

8.3 Gerät mit PC verbinden

Das Programm qPCRsoft auto erkennt automatisch, welches Gerät angeschlossen und ob es eingeschaltet ist. Das Gerät kann auch nach dem Start von qPCRsoft auto eingeschaltet werden. 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, können Sie den Menübefehl **Extras ▶ Geräteidentifikation** aufrufen, um das Problem zu lösen.

8.4 Allgemeine Einstellungen im Programm qPCRsoft auto

Allgemeine Einstellungen für qPCRsoft auto werden im Fenster **Optionen** getroffen.

Hinweis:

Die meisten Einstellungen im Fenster **Optionen** erfordern, dass Sie als Administrator in qPCRsoft auto angemeldet sind.

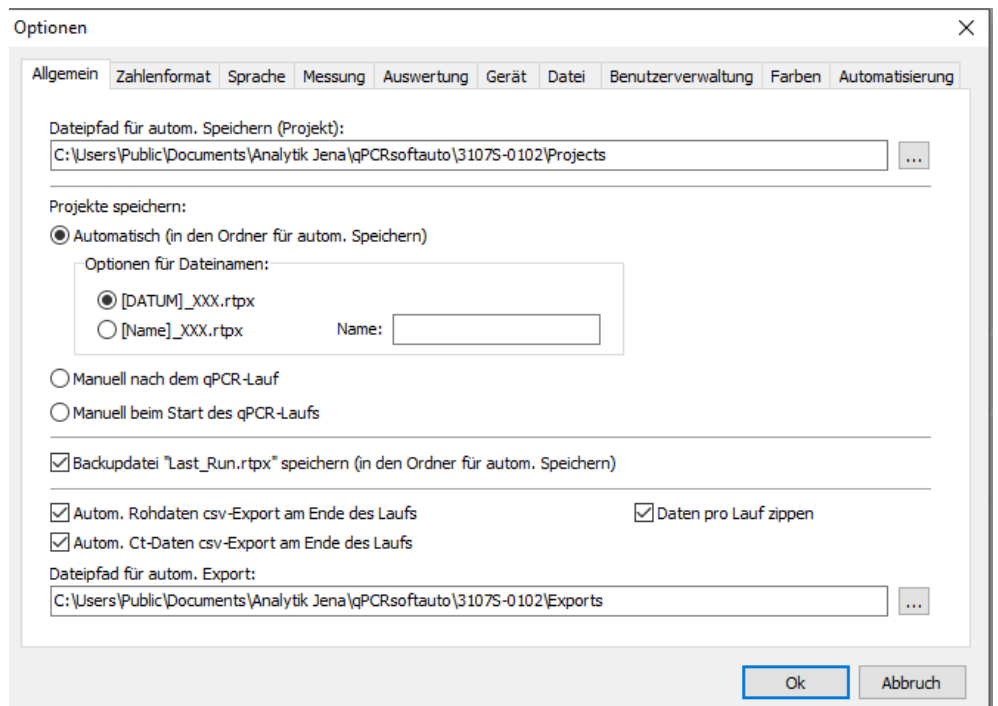
1. Schließen Sie alle Projekte.
2. Rufen Sie mit dem Menübefehl **Extras ▶ Optionen** das gleichnamige Fenster auf.
3. Nehmen Sie auf den Registerkarten die entsprechenden Einstellungen vor.

Karte Allgemein

Auf der Karte **Allgemein** können Sie Optionen für das Speichern und den Export der Projekte festlegen:

Option	Beschreibung
Dateipfad für autom. Speichern (Projekt)	Wenn Sie die Projekte automatisch nach Ablauf des PCR-Laufs speichern wollen, geben Sie hier einen Pfadnamen für die Projekte ein, in dem die Projekte gespeichert werden.
Automatisch (in den Ordner für autom. Speichern)	Projekte automatisch nach Ablauf des PCR-Laufs in den oben festgelegten Ordner speichern. Wenn Sie die Option gewählt haben, wählen Sie eine Option für den Dateinamen aus: [DATUM]_XXX.rtpx Der Dateiname wird aus dem Datum und einer fortlaufenden Nummer generiert. [Name]_XXX.rtpx Der Dateiname wird aus einem frei wählbaren Namen (im Eingabefeld eingeben) und einer fortlaufenden Nummer generiert.
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	Nach dem 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	Sie können 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 Dateipfad für autom. Speichern (Projekt) gespeichert und bei jedem neuen Start eines qPCR-Laufs überschrieben.
Automat. Rohdaten csv-Export am Ende des Laufs	Nach einem qPCR-Lauf werden für jeden Farbstoff jeweils 2 Dateien (Amplifikation und Rohdaten) und ggf. die Schmelzkurve exportiert. Die Dateinamen für die Amplifikation und die Schmelzkurven setzen sich aus folgenden Werten zusammen: Vorlagename_Typ_Datum_Uhrzeit_Farbstoff.csv (Beispiel: Kit-Vorlage_AD_2020-09-21_1154_FAM.csv) Bei der Schmelzkurve entfällt im Dateinamen der Farbstoff: Vorlagename_Typ_Datum_Uhrzeit.csv Der Wert "Typ" bezeichnet die exportierten Fluoreszenzdaten: AD Amplification data MD Melting curve data RD Raw data
Automat. Ct-Daten csv-Export am Ende des Laufs	Nach einem qPCR-Lauf werden die ermittelten Ct-Werte in eine CSV-Datei exportiert. Der Dateiname setzt sich aus folgenden Werten zusammen: Vorlagename_Ct_Datum_Uhrzeit.csv (Beispiel: SyGreen-Assay_Ct_2020-10-23_1501.csv)

Daten pro Lauf zippen	Wenn der automatische Export der Rohdaten oder der Ct-Daten aktiviert wurde, werden die erzeugten CSV-Dateien in einer Zipp-Datei mit der Erweiterung "*.ajq" zusammengefasst und im untenstehenden Dateipfad gespeichert. Die einzelnen CSV-Dateien werden nicht separat gespeichert. Der Dateiname setzt aus folgenden Werten zusammen: Vorlagenname_Datum_Uhrzeit.ajq
Dateipfad für autom. Speichern (Rohdaten csv)	Wenn Sie den automatischen CSV-Export der Rohdaten oder der Ct-Werte aktiviert haben, geben Sie hier den Pfad zum Speichern der Exportdateien ein.



Fenster Optionen / Allgemein mit Funktionen zum automatischen Speichern und Datenexport

Karte Zahlenformat

Auf der Karte **Zahlenformat** legen Sie die Dezimaltrennstellen und die Anzahl Nachkommastellen für die angezeigten Werte fest.

Sprache

Auf der Karte **Sprache** wählen Sie die Sprache der Programmoberfläche.

Messung

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

Option	Beschreibung
Empfindlichkeit	Grundempfindlichkeit des Detektionssystems einstellen Diese Einstellung wirkt sich auf alle Farbstoffe aus und sollte nur verändert werden, wenn besonders schwache oder intensive Proben gemessen werden sollen. Die Standardeinstellung für diesen Wert ist "5".

Messwiederhlg. Farbkomp.	Anzahl Messwiederholungen für die Aufnahme der Farbkompensation eingeben
Negative Werte infolge Farbkompensation anzeigen	Wenn aktiviert, werden auch negative Werte in Folge der Farbkompensation angezeigt, sonst wird stattdessen der Wert "0" ausgegeben.
STC (simulated tube control) aktiv	Wenn aktiviert, 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 Protokolle empfohlen. 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.

Karte Auswertung In den Listenfeldern können Sie jeweils einen Faktor für die quantitativen Auswertungen (**Faktor Quant**), für die Schmelzkurvenanalyse (**Faktor Schmelze**) 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. Dies erleichtert die Bewertung schwacher Fluoreszenzen.

Karte Gerät Auf dieser Karte geben Sie einen Namen für die Datei ein, in welche die Gerätekommunikationsdaten geschrieben werden. Das Aufzeichnen der Daten wird zur Fehlerdiagnostik genutzt (→ Abschnitt "Anhang B - Kommunikationsdaten aufzeichnen" S. 166).

Karte Datei Auf der Karte **Datei** können Sie Dateitypen aktivieren, bei deren Auswahl Datei-Explorer des Betriebssystems das Programm qPCRsoft auto automatisch gestartet und die Datei geöffnet.

Siehe auch Hinweise zu den Dateiformaten in Abschnitt "Projekte und Vorlagen verwalten" S. 21.

Karte Benutzerverwaltung Auf der Karte **Benutzerverwaltung** aktivieren Sie deren Verwendung (→ "Benutzerverwaltung" S. 147).

Wenn Sie die Benutzerverwaltung deaktivieren, erfolgt keine Login-Abfrage beim Programmstart. Die Funktionen für die Einrichtung der Benutzerverwaltung und für die Signatur der Projekte stehen nicht zur Verfügung.

Wenn das Modul 21 CFR Part 11 installiert und aktiviert ist, kann die Benutzerverwaltung nicht deaktiviert werden (→ "Optionales Modul 21 CFR Part 11" S. 153).


Karte Farben Auf der Karte **Farben** legen Sie folgende Farbeinstellungen fest:

- Anzeigefarbe für Probentyp und Replikate im Plattenlayout

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

Karte Automatisierung

Auf der Karte **Automatisierung** legen Sie die Einstellungen für die Steuerung in einer automatisierten Anlage durch Composer bzw. DLL fest.

Option	Beschreibung
Automatisierung bei Softwarestart aktivieren	<p>Der Thermocycler wird bei Start von qPCRsoft auto sofort mit der Anlage verbunden und von dort aus gesteuert.</p> <p>Sie können die Verbindung mit Klick auf die Schaltfläche  in der Werkzeugleiste trennen (→ "Starten und Beenden von" S. 9).</p>
Server IP (eigene)	<p>Schnittstelle zum Composer oder eigene Schnittstelle wählen. Das Feld wird automatisch beim Öffnen des Fensters Optionen aktualisiert.</p>
Task-Port/State-Port	<p>Bei Steuerung mehrerer Geräte über einen PC die entsprechenden Ports wählen. Die Ports müssen in jeder Programminstanz separat eingestellt werden und sich voneinander unterscheiden (z.B. 50001/50002 in der ersten Instanz, 50003/50004 in der zweiten usw.).</p>

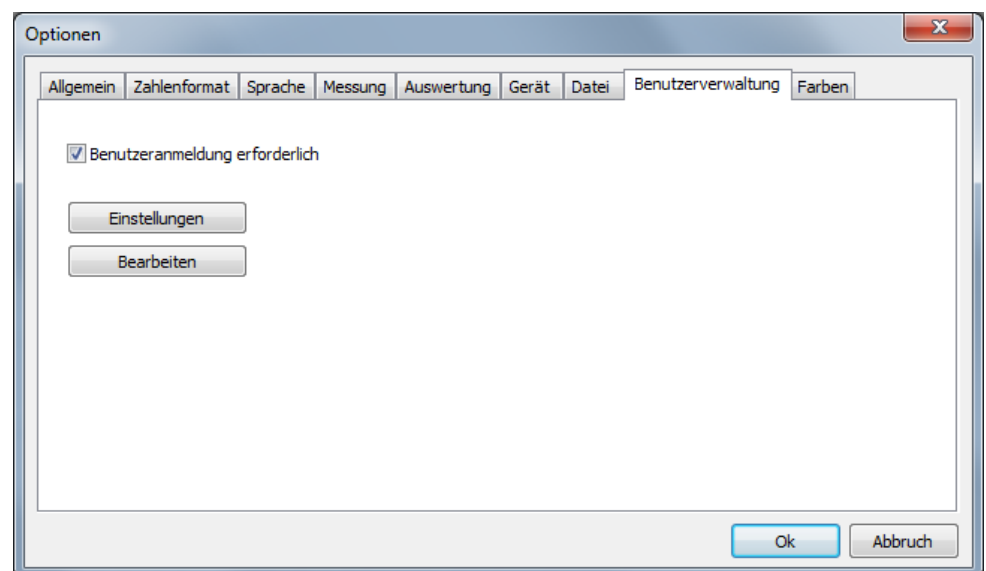
9 Benutzerverwaltung

Hinweis zur allgemeinen
Datensicherheit

Das Lesen und Ändern von durch qPCRsoft auto erzeugten Projekt-, Vorlage-, Auswertungs- und Kommunikationsdateien ist wegen der verwendeten Verschlüsselung nur mittels qPCRsoft auto möglich.

Die Benutzerverwaltung aktivieren Sie im Fenster **Optionen / Benutzerverwaltung**:

Optionen	Beschreibung
Benutzeranmeldung erforderlich	Wenn aktiviert, wird beim nächsten Programmstart die Benutzerverwaltung wirksam. Eine Anmeldung im Programm ist dann nur noch mit gültigem Benutzerprofil 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



Fenster Optionen / Benutzerverwaltung

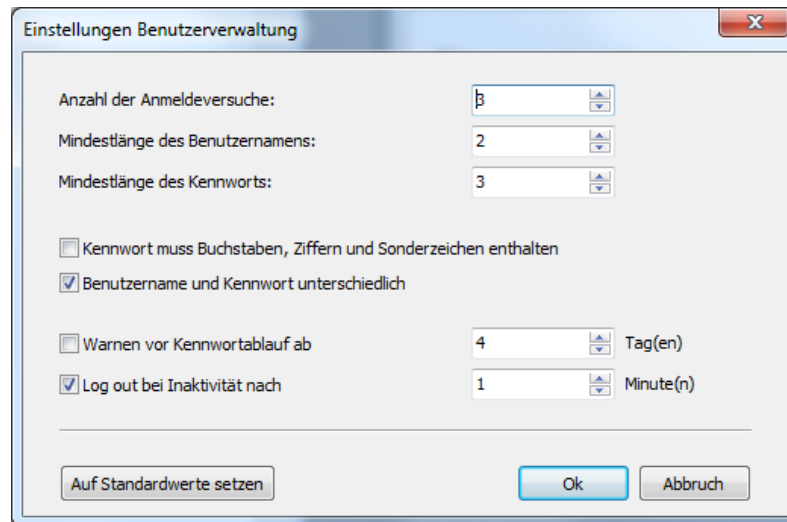
9.1 Grundlegende Einstellungen für Kennwort, Anmeldung und Logout

Um in die grundlegenden Einstellungen, die für alle Benutzer gelten, zu gelangen, rufen Sie den Menübefehl **Extras ▶ Optionen** auf und klicken auf der Karte **Benutzerverwaltung** auf **[Einstellungen]**.

Sie können folgende Einstellungen in der Benutzerverwaltung vornehmen:

- Anzahl der Anmeldeversuche: Wird die erlaubte Anzahl Anmeldeversuche auf ein Benutzerkonto überschritten, 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

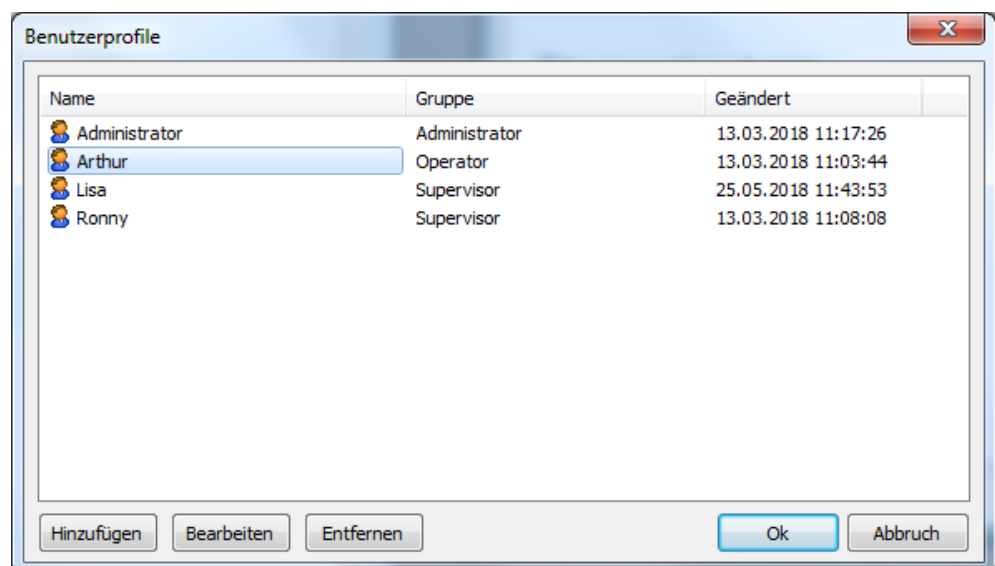
- Warnung vor Ablauf des Kennworts
Der Ablauf des Kennworts wird im Benutzerprofil festgelegt.
- Logout bei Inaktivität: Nach Ablauf der angegebenen Zeit ohne Bewegungen der Maus oder Tastaturanschlägen wird die Programmoberfläche gesperrt und das Login Fenster eingeblendet. Erst nach Eingabe des Kennwortes kann der Benutzer die Oberfläche wieder bedienen. Wird im Login Fenster **[Abbrechen]** gewählt, wird das Programm geschlossen. Ein Wechsel des Benutzers ist an dieser Stelle nicht möglich. Bei aktivem qPCR-Lauf erfolgt kein automatisches Logout.



Generelle Einstellungen in der Benutzerverwaltung

9.2 Benutzerprofile verwalten / Benutzergruppen

Um in die Benutzerverwaltung zu gelangen, rufen Sie den Menübefehl **Extras ▶ Optionen** auf und klicken auf der Karte **Benutzerverwaltung** auf **[Bearbeiten]**.



Benutzerverwaltung mit der Übersicht der angelegten Benutzerprofile

Folgende Funktionen stehen Ihnen in der Benutzerverwaltung zur Verfügung:

Funktion	Beschreibung
[Hinzufügen]	Benutzerprofile anlegen
[Bearbeiten]	Benutzerprofil bearbeiten
[Entfernen]	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
/ bearbeiten

- Klicken Sie auf **[Hinzufügen]**, um ein neues Benutzerprofil anzulegen.
- Um ein vorhandenes Benutzerprofil zu editieren, markieren Sie das Benutzerprofil in der Liste und klicken Sie auf **[Bearbeiten]**.
 - ✓ Das Fenster zur Bearbeitung des Benutzerprofils erscheint.
- Geben Sie folgende Daten ein:

Option	Beschreibung
Karte Allgemein	
Benutzername	Name für die Anmeldung bei Programmstart
Vollständiger Name	Tatsächlicher Name (optional)
Beschreibung	Weitere Beschreibung (optional)
Benutzergruppe	Benutzergruppe zuweisen Die Rechte jedes einzelnen Benutzers können im Rahmen der Benutzergruppe individuell angepasst werden (siehe unten).
Karte Kennwort	
Kennwort	Kennwort eingeben
Kennwort bestätigen	Kennwort wiederholen
Benutzer muss Kennwort bei Anmeldung ändern	Wenn aktiviert, muss der Benutzer beim ersten Anmelden sein Kennwort ändern.
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 ist das Ablaufdatum anzugeben.
Benutzer ist deaktiviert	Das Benutzerprofil wurde automatisch nach mehrmalig fehlgeschlagenen Anmeldeversuchen oder durch einen berechtigten Benutzer gesperrt. Die Anzahl möglicher Anmeldeversuche geben Sie in den Einstellungen ein (→ Abschnitt "Grundlegende Einstellungen für Kennwort, Anmeldung und Logout" S. 147). Der Zeitpunkt der Sperrung wird angezeigt.
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 (→ Abschnitt "Digitale Signaturen" S. 157). Dieses Recht steht nur zur Verfügung, wenn das Zusatzmodul 21 CFR Part 11 freigeschaltet ist.
---------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

The screenshot shows the 'Benutzerprofil' dialog box with the 'Allgemein' tab selected. The 'Kennwort' tab is also visible. The 'Benutzername' field contains 'Arthur', 'Vollständiger Name' contains 'Arthur Engel', and 'Beschreibung' contains 'Laborant'. The 'Benutzergruppe' dropdown is set to 'Operator'. A note below the dropdown states: 'Der Benutzer hat eingeschränkten Zugriff auf grundlegende Programmfunktionen.' At the bottom, there is a button labeled 'Benutzergruppenzugriff bearbeiten', and 'Ok' and 'Abbruch' buttons.

Einstellungen zum Benutzernamen und der zugewiesenen Benutzergruppe

The screenshot shows the 'Benutzerprofil' dialog box with the 'Kennwort' tab selected. The 'Kennwort' field is masked with five dots, and the 'Kennwort bestätigen' field is also masked with five dots. Below these fields are several checkboxes: 'Benutzer muss Kennwort bei neuer Anmeldung ändern' (unchecked), 'Benutzer kann Kennwort ändern' (checked), 'Kennwort läuft nie ab' (checked), 'Benutzer ist deaktiviert' (unchecked), 'Benutzer ist gesperrt' (unchecked), and 'Benutzer kann elektronisch signieren' (unchecked). At the bottom, there are 'Ok' and 'Abbruch' buttons.

Einstellungen zum Kennwort und der Gültigkeit des Benutzerprofils

Benutzergruppen

Folgende Benutzergruppen stehen Ihnen zur Verfügung:

Administrator:

- Hat uneingeschränkte Rechte an allen Programmfunktionen
- Kann Benutzer anlegen, löschen, sperren und entsperren sowie ihnen Rechte zuweisen

- Darf eigenes Kennwort und die der anderen Nutzer ändern
- Kann Benutzerverwaltung in **Extras/Optionen/Benutzerverwaltung** deaktivieren

Supervisor:

- Hat Rechte wie der Administrator, kann jedoch keine Benutzer anlegen und verwalten. Der Administrator kann für jeden als Supervisor angemeldeten Benutzer bestimmte Rechte sperren.

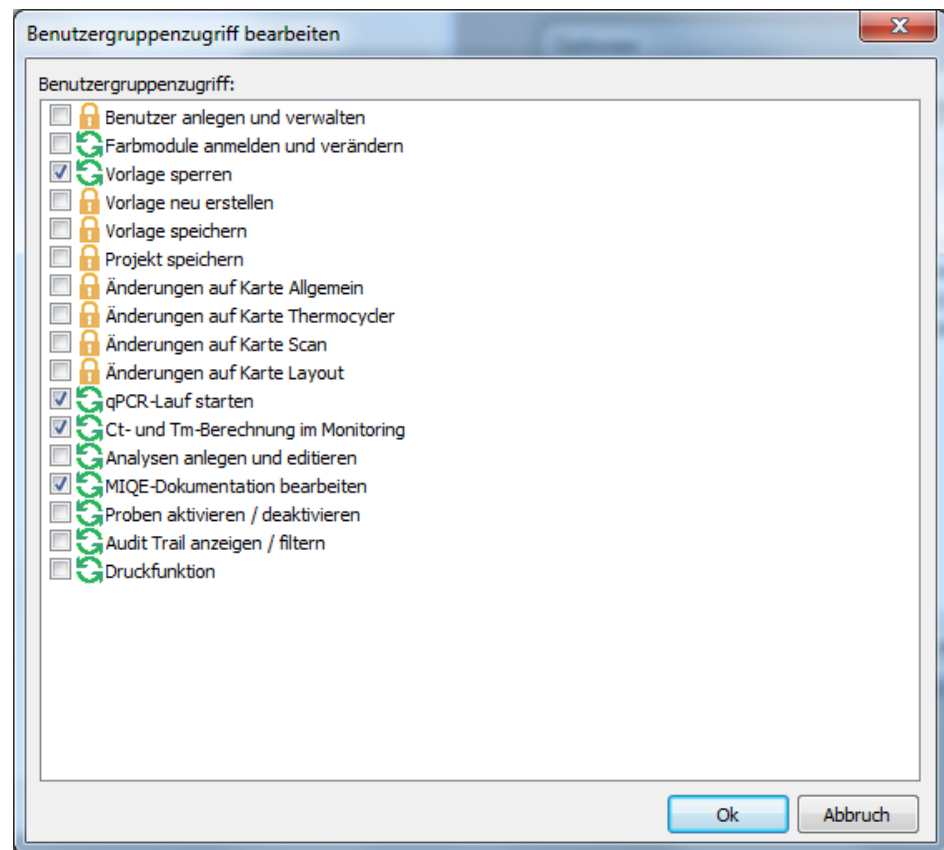
Operator:

Folgende Rechte können einem Operator nicht zugewiesen werden:

- Benutzer anlegen und verwalten
- Erstellen und Speichern von Vorlagen
- Projekte speichern
- Änderungen im Fenster **Optionen** auf den Karten **Allgemein, Thermocycler, Scan, Layout**

Durch diese Auswahl weisen Sie dem Benutzer automatisch eine bestimmte Benutzerrolle und damit voreingestellte Rechte zu, die Sie zusätzlich mit Hilfe der Funktion **Benutzerzugriff 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.

- Klicken Sie im Fenster **Benutzerprofil / Allgemein** auf [**Benutzergruppenzugriff bearbeiten**].
 - ✓ Das gleichnamige Fenster mit den Rechten des gewählten Benutzers erscheint.
- Ist die Checkbox durch ein Häkchen aktiviert, ist dieses Recht für den Benutzer erteilt und er kann die Funktion nutzen.
- Checkboxes mit einem Schloss-Symbol können nicht verändert werden.
- Die Anzahl dieser gesperrten Rechte wird durch die Wahl der Benutzerrolle **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.



Individuelles Benutzerprofil innerhalb einer Benutzergruppe einstellen

9.3 Kennwort ändern

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

1. Öffnen Sie mit dem Menübefehl **Extras ▶ Optionen** das Fenster **Optionen / Benutzerverwaltung**.
2. Öffnen Sie mit **[Bearbeiten]** das Fenster **Benutzerprofile**.
3. Markieren Sie in der Liste Ihr Benutzerprofil und klicken Sie auf **[Bearbeiten]**.
4. Ändern Sie im Fenster **Benutzerprofil / Kennwort** das Kennwort.
5. Bestätigen Sie die Einstellungen mit **[OK]**.

10 Optionales Modul 21 CFR Part 11

Die Software qPCRsoft auto enthält ab Version 1.2 Funktionen, die das Programm kompatibel mit den Erfordernissen der 21 CFR Part 11 machen. Nach kostenpflichtiger Freischaltung stehen Ihnen folgende Funktionen zur Verfügung:

- **Audit Trail** in Vorlagen und Projekten, d.h. Änderungen an den Projekteinstellungen werden kontinuierlich registriert.
- **Login – Überwachung** in der Anmeldeversuche am Programm sowie Änderungen der Benutzereinstellungen gespeichert werden
- **Editoren** zur Auswertung von Audit Trails und Log Files mittels Suchfunktionen inklusive Druckfunktion
- Erstellung und Anzeige **Digitaler Signaturen** in Vorlagen und Projekten mit Überwachung ihrer Gültigkeit
- **Automatisches Logout** bei Inaktivität, Zeit einstellbar

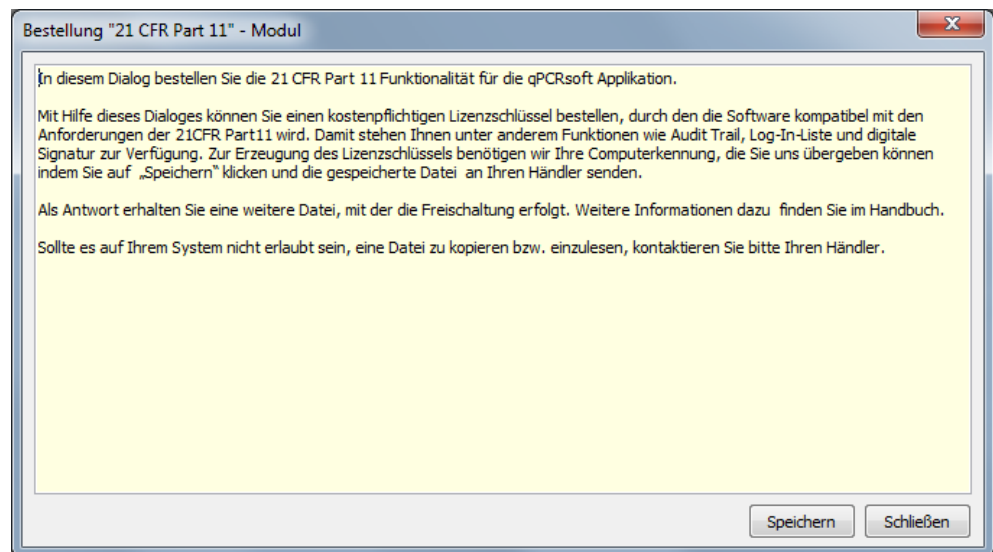
Zur Freischaltung der Funktionen benötigen Sie einen Freischaltcode, den Sie über Ihren Ansprechpartner bzw. Händler bestellen können. Der erworbene Freischaltcode berechtigt Sie, die Software auf einem einzelnen Computer zu nutzen (Einzelplatzlizenz). Soll dieses Zusatzmodul auf mehreren Computern genutzt werden, ist für jeden Computer ein Freischaltcode erforderlich.

10.1 Freischaltung

Die Freischaltung des Moduls erfolgt in zwei Schritten:

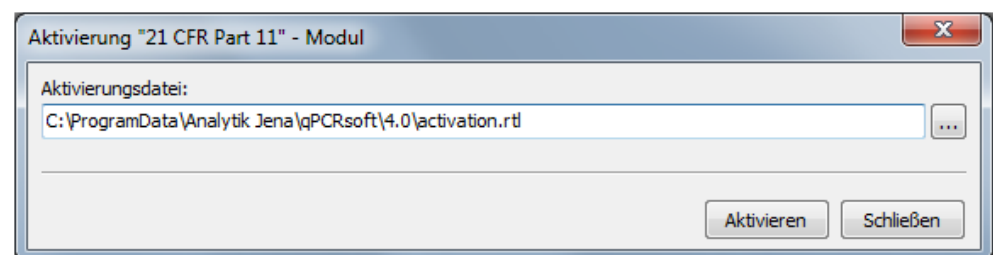
- Senden einer Order-Datei (*.RTO) an Analytik Jena
- Einlesen einer von Analytik Jena zugesandten Aktivierungsdatei (*.RTL)
- Rufen Sie den Menübefehl **Hilfe ▶ Zusatzmodule ▶ Bestellung „21 CFR Part 11“ Modul** auf.
 - ✓ Ein Fenster mit Hinweisen zum weiteren Vorgehen erscheint.

Automatische
Freischaltung



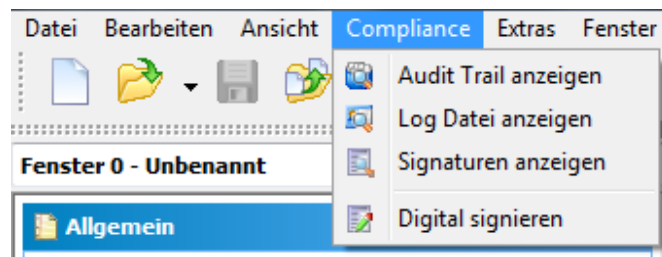
RTO-Datei für die Bestellung des Freischaltcodes erzeugen

- Klicken Sie auf **[Speichern]**.
 - ✓ Es wird eine Datei für die Generierung des Freischaltcodes erzeugt.
- Speichern Sie die Datei mit der Erweiterung "*.rto" unter einem beliebigen Namen auf Ihrem Computer und senden Sie diese Datei per E-Mail an Ihren Händler oder Ansprechpartner.
- Nach Verarbeitung Ihrer Bestellung bei Analytik Jena erhalten Sie eine Datei zur Aktivierung der Funktionen nach 21 CFR Part 11 (Lizenzdatei). Kopieren Sie die Datei auf die Festplatte Ihres Computers.
- Starten Sie qPCRsoft auto und wählen Sie den Menübefehl **Hilfe ▶ Zusatzmodule ▶ Aktivierung „21 CFR Part 11“ Modul**.
- Geben Sie im Fenster **Aktivierung „21 CFR Part 11“ Modul** den Speicherort der Lizenzdatei an und klicken Sie auf **[Aktivieren]**.



RTL-Datei für die Aktivierung einlesen

- ✓ Die erfolgreiche Aktivierung wird durch ein Hinweisfeld angezeigt.
- Nach erfolgter Aktivierung starten Sie die Software neu und prüfen Sie, ob die neuen Funktionen im Menü **Compliance** erscheinen.
 - ✓ Wenn die Funktionen angezeigt werden, ist die Freischaltung erfolgreich abgeschlossen. Sollte die Aktivierung nicht gelingen, kontaktieren Sie Ihren Ansprechpartner oder Händler.



Menü Compliance des "21 CFR Part 11" Moduls

Hinweis zum Datenschutz: Die erzeugte RTO-Datei enthält den Namen des Computers, auf dem die Freischaltung erfolgen soll, sowie die MAC-Adresse der Netzwerkkarte in verschlüsselter Form. Analytik Jena nutzt diese Daten um automatisiert den Freischaltcode für Ihren Computer zu generieren. Die Daten werden verschlüsselt verarbeitet, nicht zu anderen Zwecken verwendet und nicht an Dritte weitergegeben.

Manuelle Freischaltung Sollte es auf Ihrem Computer nicht erlaubt sein, Dateien zu kopieren bzw. zu versenden, steht eine manuelle Freischaltmethode zur Verfügung. Wenden Sie sich dazu an Ihren AJ-Ansprechpartner oder Händler.

10.2 Audit Trail

Im Audit Trail werden Veränderungen der Metadaten in Vorlagen und Projekten mitgeschrieben. Metadaten bestimmen, wie aus den Rohdaten eines qPCR-Laufs die Ergebnisse berechnet und dargestellt werden und beeinflussen damit das Ergebnis des Experiments. Die Rohdaten dagegen bleiben stets unverändert und sind daher nicht Bestandteil des Audit Trails. Werden im Projekt oder der Vorlage Einstellungen verändert, so werden beim Speichern der Datei die neuen Metadaten als Block an die ursprünglichen angehängt. Dieser Vorgang erfolgt automatisch im Hintergrund. Wird ein Projekt öfter geöffnet und bearbeitet, kann der Umfang des Audit Trails stark zunehmen. Es ist nicht möglich, Inhalte des Audit Trails zu löschen.

Audit Trail anzeigen und auswerten

Für die Auswertung des Audit Trails eines Projekts oder einer Vorlage stehen Ihnen Suchfunktionen zur Verfügung, um den u.U. umfangreichen Audit Trail auszuwerten. Damit können Sie Veränderungen der Metadaten gezielt suchen und nachweisen.

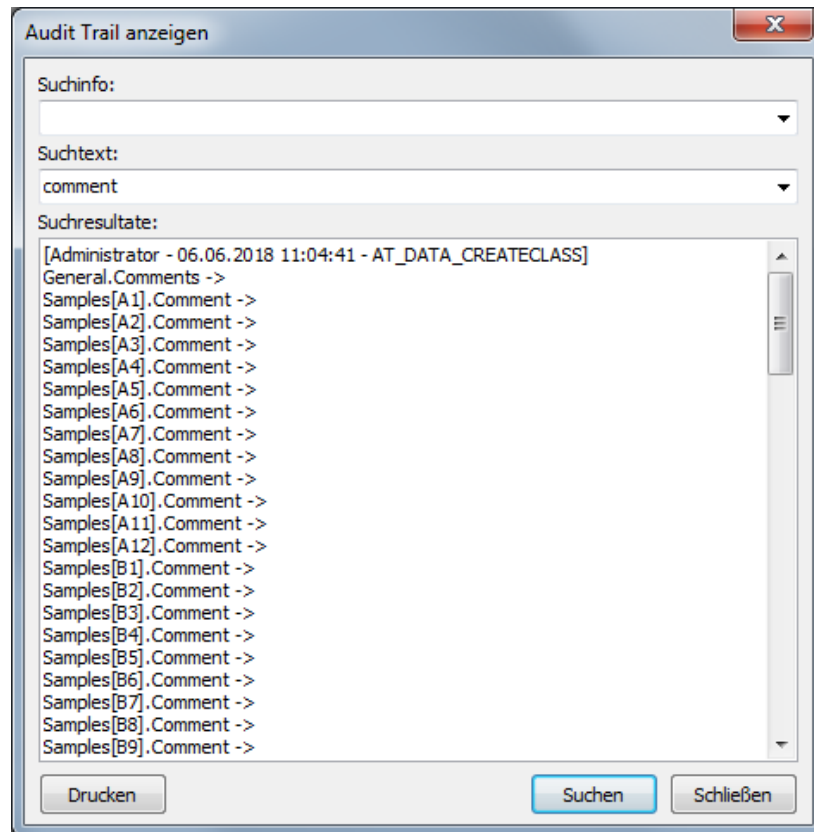
- Rufen Sie den Menübefehl **Compliance ▶ Audit Trail** auf.
- Mit Klick auf **[Suchen]** starten Sie die Suche.
- Mit Klick auf **[Drucken]** wird der im Textfeld dargestellte Inhalt (gesamter Audit Trail oder durch Suche reduzierter Inhalt) ausgedruckt.

Folgende Suchmöglichkeiten sind verfügbar:

- Eingabefelder **Suchinfo** und **Suchtext** leer: Der gesamte Audit Trail wird angezeigt.
- Eintrag im Feld **Suchinfo**: Suche in den Blocküberschriften, d.h. im Text in den eckigen Klammern. Damit lässt sich verfolgen, wann und von wem die Datei erzeugt wurde und wie oft sie bearbeitet wurde.
- Eintrag im Feld **Suchtext**: Suche im Audit Trail. Es kann nach Begriffen gesucht werden, die bestimmte Einstellungen für den qPCR-Lauf, der Ergebnisdarstellung,

der Auswertungen, des Layouts und allgemeiner Informationen charakterisieren. Eine Übersicht über die Begriffe und ihre Bedeutung finden Sie im Anhang D.

Die Eingabefelder speichern einmal verwendete Suchbegriffe und stellen sie über das Drop-Down-Menü zur nochmaligen Anwendung bereit.

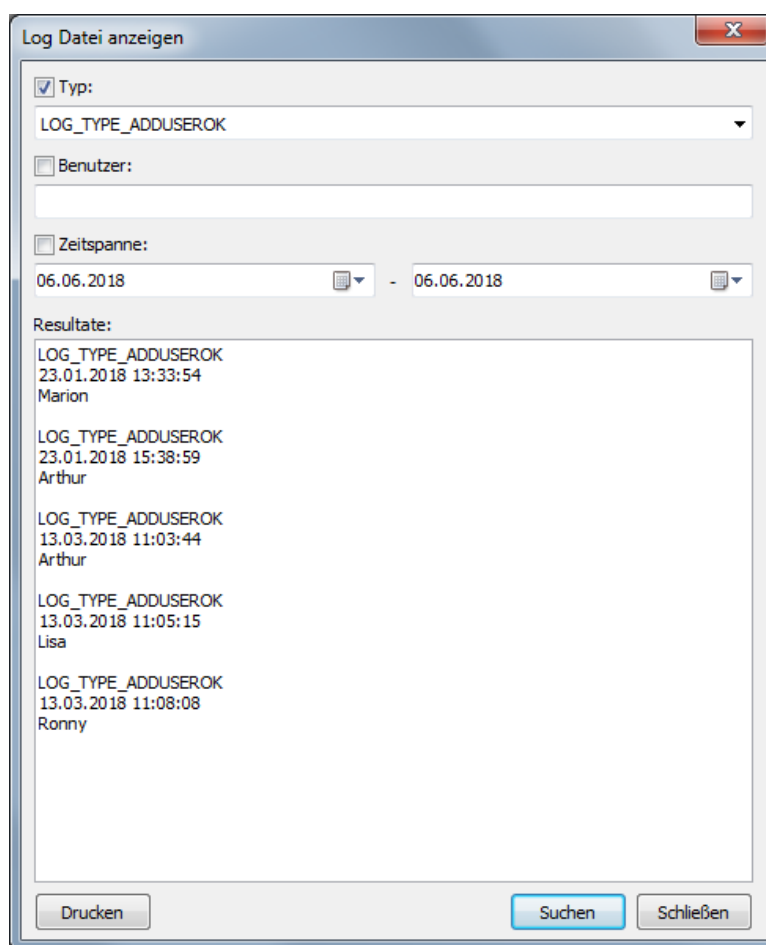


Audittrail eines Projekts mit einer Suche

10.3 Login-Überwachung

Sämtliche Login-Vorgänge in das Programm qPCRsoft auto werden überwacht und in einer Log-Datei verschlüsselt gespeichert, die durch eine Prüfsumme gegen Manipulationen gesichert ist. Diese Datei enthält außerdem Informationen über neu angelegte Benutzer und digitale Signaturen. Das Programm registriert, ob Login und Signaturen erfolgreich waren oder fehlgeschlagen sind. Bei fehlgeschlagenen Operationen wird auch die Ursache angegeben (falsches Kennwort, falscher Benutzername).

- Rufen Sie den Menübefehl **Compliance ▶ Log Datei** auf.
- Schränken Sie die Anzeige durch Aktivierung der Kontrollkästchen und der Auswahl in den entsprechenden Listen ein.
- Die angezeigten Resultate drucken Sie mit einem Klick auf **[Drucken]** aus.



Log-Datei mit Filter

10.4 Digitale Signaturen

10.4.1 Ein Dokument signieren

Registrierte Benutzer, die zusätzlich die entsprechende Berechtigung besitzen, können eine Vorlage oder ein Projekt digital signieren. Die Signatur ist gleichbedeutend mit einer handschriftlichen Unterschrift, da sie eindeutig auf den Ersteller zurückzuführen ist.

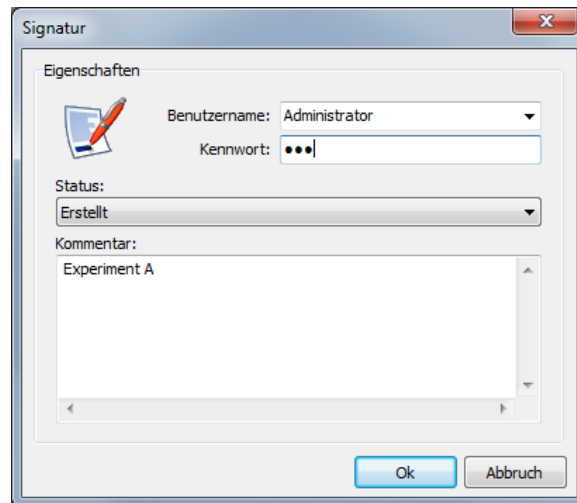
Aktives Dokument
signieren

- Rufen Sie den Menübefehl **Compliance ▶ Digital signieren** auf.
 - ✓ Das Fenster **Signatur** erscheint.
- Nehmen Sie folgende Einstellungen vor:

Parameter	Beschreibung
Benutzername	Auswahl der registrierten Benutzer mit Signaturberechtigung Der im Programm angemeldete Benutzer ist in der Auswahl voreingestellt.
Kennwort	Kennwort des Benutzers eingeben
Status	Auswahl des Signierstatus: Erstellt , Bearbeitet und Freigeben

Kommentar	Zusätzliche Erläuterung zur Signatur Diese Eingabe ist optional.
------------------	---------------------------------------------------------------------

- Bestätigen Sie die Eingaben mit **[OK]**.
 - ✓ Die digitale Signatur wird im Projekt oder der Vorlage gespeichert. Digitale Signaturen sind so lange gültig, wie keine Änderungen am Projekt oder der Vorlage vorgenommen werden.

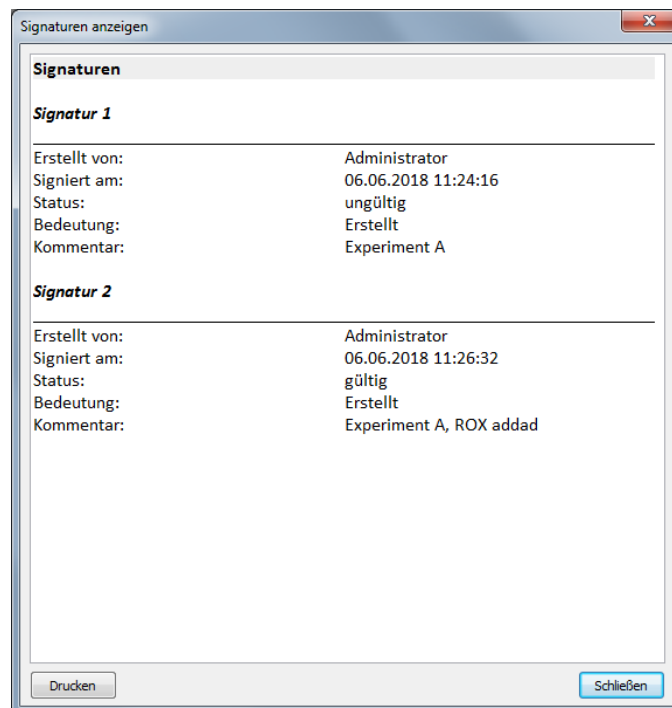


Fenster zum Signieren einer Vorlage oder eines Projektes

10.4.2 Signaturen anzeigen

Sie können die einem Projekt oder einer Vorlage erteilten Signaturen einsehen und ausdrucken.

- Rufen Sie den Menübefehl **Compliance ▶ Signaturen anzeigen** auf.
 - ✓ Das Fenster **Signaturen anzeigen** erscheint. Sie können die Gültigkeit des Datums und den Ersteller der Signatur überprüfen.
- Klicken Sie auf **[Drucken]**, um die angezeigten Daten zu drucken.

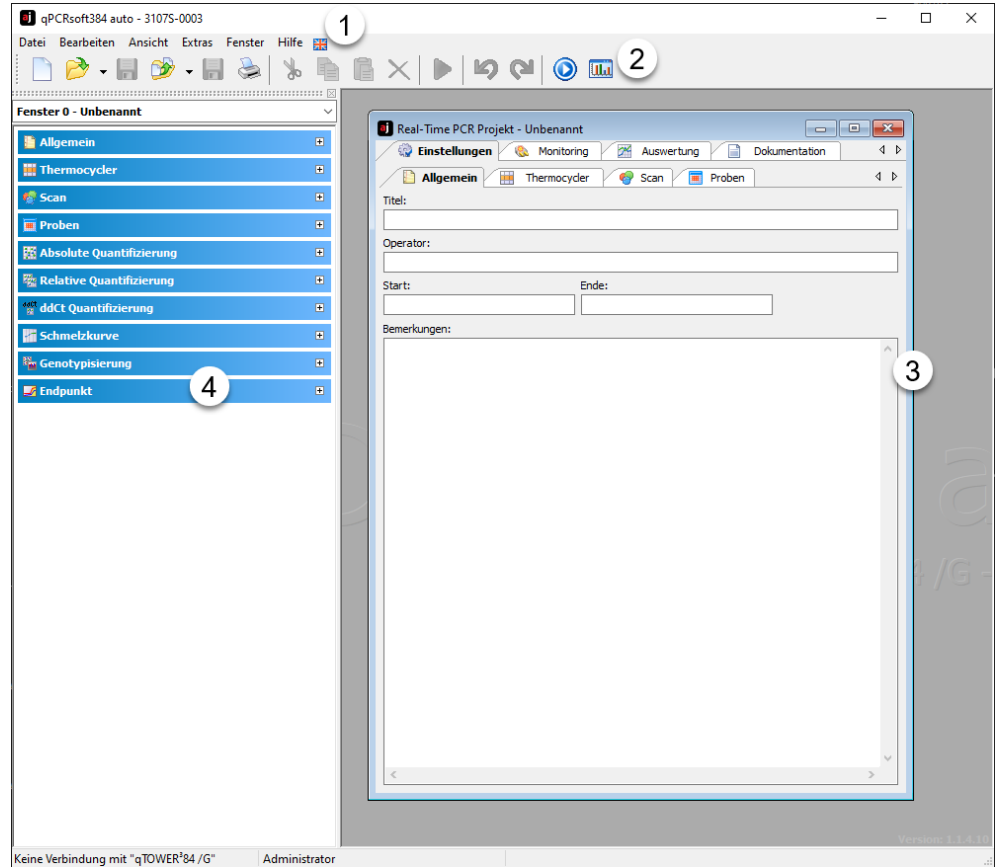


Übersicht über die Signaturen einer Vorlage oder eines Projektes

11 Anhang A - Kurzanleitung


qPCRsoft auto
Hauptfenster

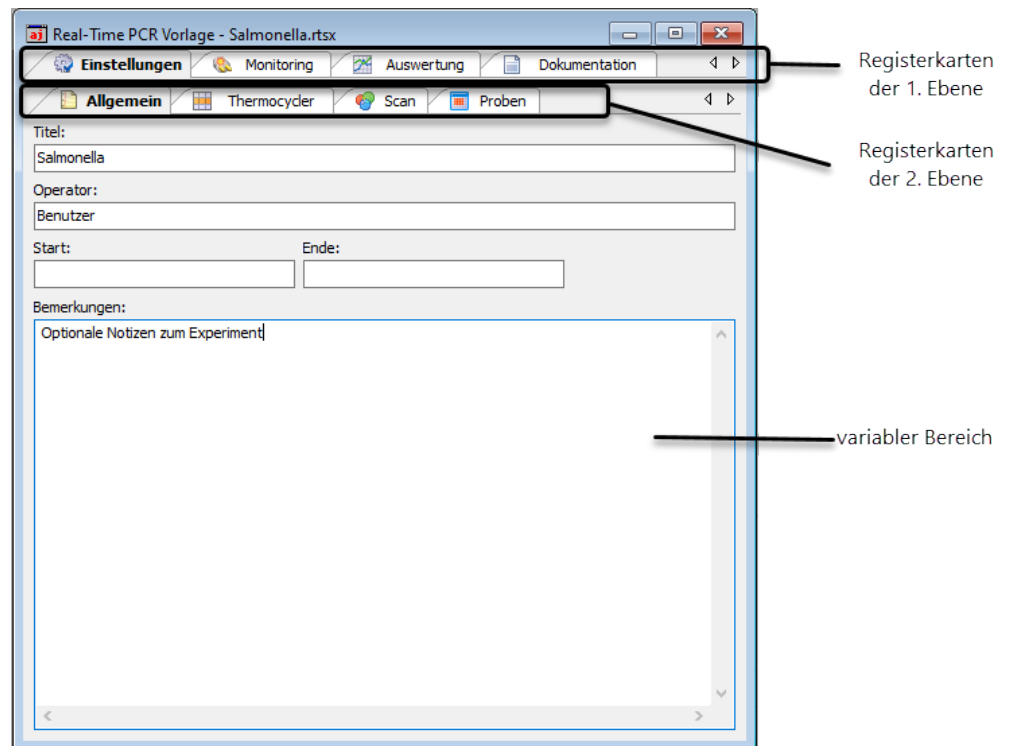
Das Hauptfenster ist unterteilt in: Menüleiste(1), Werkzeugleiste (2), Projekttexplorer (3), Projektoberfläche (4).



Hauptfenster von qPCRsoft auto

Projektfenster
Einstellungen

1. Um ein neues Projekt zu erstellen, wählen Sie den Menübefehl **Datei ▶ Neu** oder auf  in der Toolbar klicken.
Die Menübefehle **Datei ▶ Projekt öffnen** oder **Datei ▶ Vorlage öffnen** werden zum Einladen gespeicherter Dateien verwendet.
2. Aktivieren Sie die Registerkarte **EINSTELLUNGEN**.



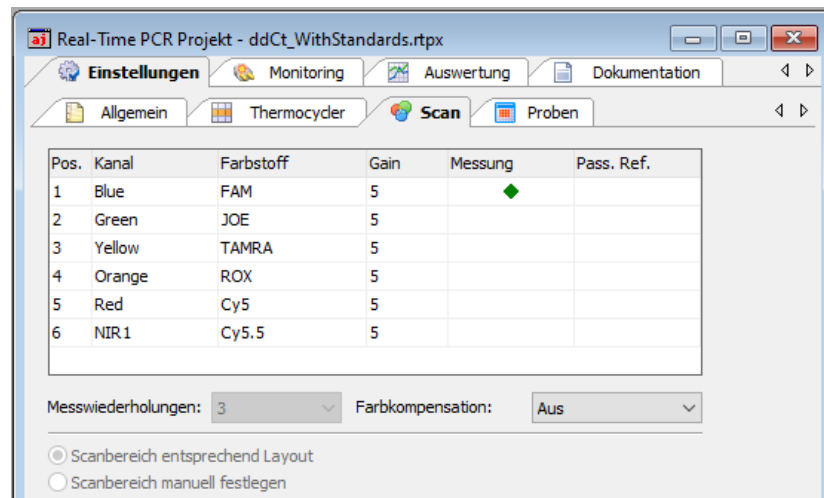
3. Geben Sie allgemeine Informationen zum Projekt auf der Registerkarte **Allgemein** ein.
4. Geben Sie auf der Registerkarte **Thermocycler** das PCR-Protokoll (Temperaturprogramm) ein:


Tabelle (Schritt: 4 von 5)

Deckeltemp. °C: 100 Deckel vorheizen Gerät: qTOWER 84



4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	ΔT(°C)	Δt(s)	λ(°C/s)
40x	1	95,0	02:00	--	---	--,-	---	3,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	3,0
	3	58,0	00:05	--	---	--,-	---	2,0
	4	72,0	00:15	2	39	--,-	---	3,0
5	Schmelzkurve 60 bis 95 °C, 15 s mit ΔT 1 °C							
6								
7								
8								
9								
10								

- Heizdeckeltemperatur festlegen und Vorheizmodus aktivieren oder deaktivieren.
 - Temperatur und Haltezeit für jeden Schritt eingeben.
 - Für Schleifen in der Spalte GOTO Schritt festlegen zu dem zurückgesprungen werden soll und in der Spalte LOOPS Anzahl der Wiederholungen eingeben.
 - Falls notwendig sonstige Optionen wie Temperatur- und Zeitinkremente eingeben oder Heizraten anpassen.
 - Falls erforderlich Schmelzkurvenschritt einfügen und Parameter bestimmen.
 - In Spalte SCAN den Temperaturschritt für die Fluoreszenzmessung festlegen.
5. Wählen Sie auf der Registerkarte **Scan** die Einstellungen für die Fluoreszenzmessung:




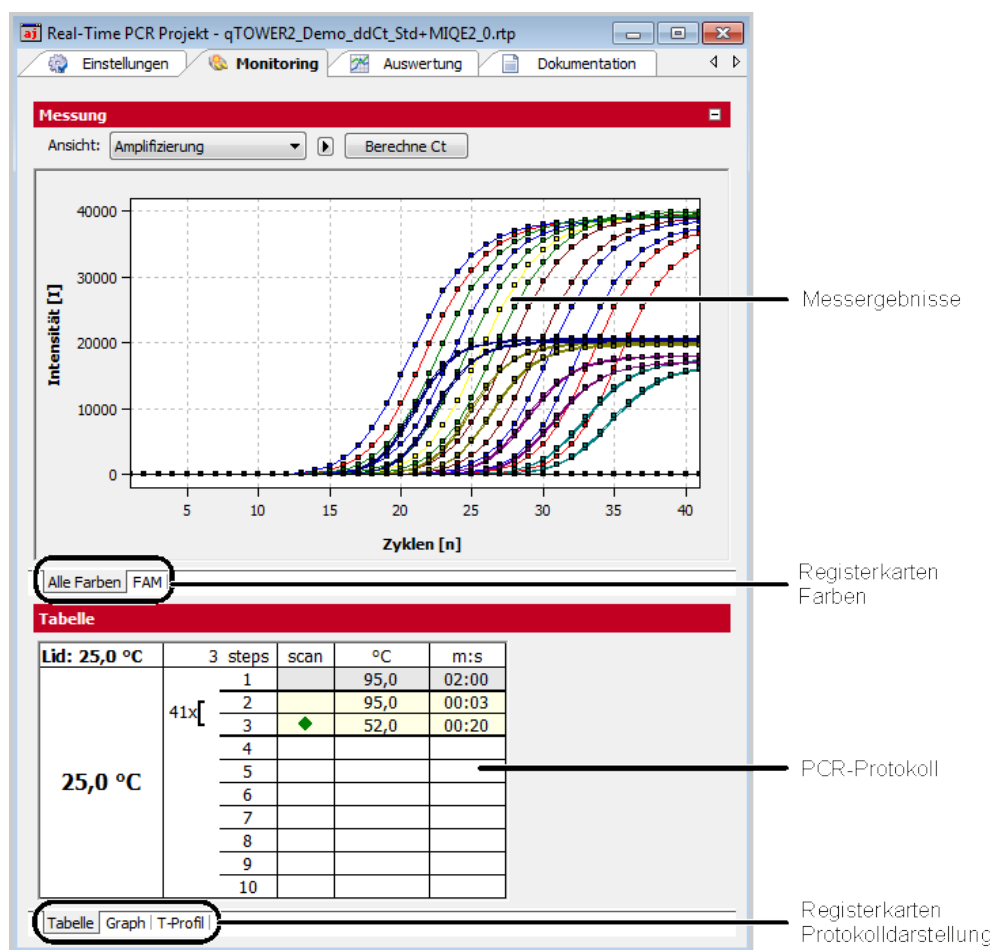
- Raute in der Spalte **Messung** für jeden zu messenden Kanal setzen.
 - Farbstoff in der Spalte zu messenden **Farbstoff** auswählen und LED-Intensität in Spalte **Gain** mittels Zahlenwert festlegen.
 - Für passiven Referenzfarbstoff Häkchen in Spalte **Pass. Ref.** setzen.
 - Anzahl der Messwiederholungen und Scanbereich einstellen.
 - Falls erforderlich spektrale Kompensation aktivieren.
6. Bearbeiten Sie auf der Registerkarte PROBEN das Plattenlayout (kann auch während des Laufs oder danach erfolgen):
- Probenname und Probentyp vergeben.
 - Bezeichnung für zu messendes Gen in der Spalte GEN eintragen.
 - Für Standardproben Konzentration in Spalte KONZ. Eingeben und Mengeneinheit auswählen.
 - Entweder einzelne Position oder mittels gedrückter linker Maustaste Bereich im angezeigten Plattenschema markieren.
 - Eintragungen und Einstellungen der Markierung mit einem Klick auf  in der Werkzeugleiste oder drücken Sie die ENTER-Taste zuweisen.
7. Befinden sich Proben aus mehreren Experimenten auf der Platte die getrennt ausgewertet werden sollen, können Sie innerhalb der Registerkarte **Proben** die Ansicht **Gruppen anlegen** aktivieren:



- Gruppe auswählen und Gruppennamen vergeben.
 - Entweder einzelne Position oder mittels gedrückter linker Maustaste Bereich im angezeigten Plattenschema markieren.
 - Eintragungen und Einstellungen der Markierung über  oder durch Drücken der ENTER-Taste zuweisen.
8. Eine zusammenfassende Gesamtübersicht zum Plattenlayout ist mittels der Layoutvorschau  abrufbar.

Projektfenster
Monitoring

- Der Lauf wird über den Button  gestartet.
- Im **Monitoring**-Fenster werden die Ergebnisse des Laufs in Echtzeit dargestellt.




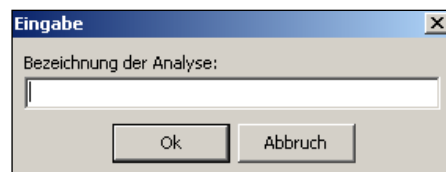
- Bei den Messergebnissen kann zwischen den PCR-Akkumulationskurven, den Rohdaten und den Schmelzkurven umgeschaltet werden.
- Zwischen den verschiedenen Farbstoffen kann mittels der entsprechenden Registerblätter gewählt werden.
- Das PCR-Protokoll kann in tabellarischer, graphischer Form oder als Temperaturprofilverlauf angezeigt werden.
- Nach dem PCR-Lauf können ohne Anlegen einer Auswertung Ct-Werte und ggf. Schmelztemperaturen für alle Proben berechnet werden. Klicken Sie dazu in der

Anzeige der Amplifikationskurven auf die Schaltfläche **[Berechne Ct]** bzw. in der Anzeige der Schmelzkurven auf **[Berechne Tm]**.

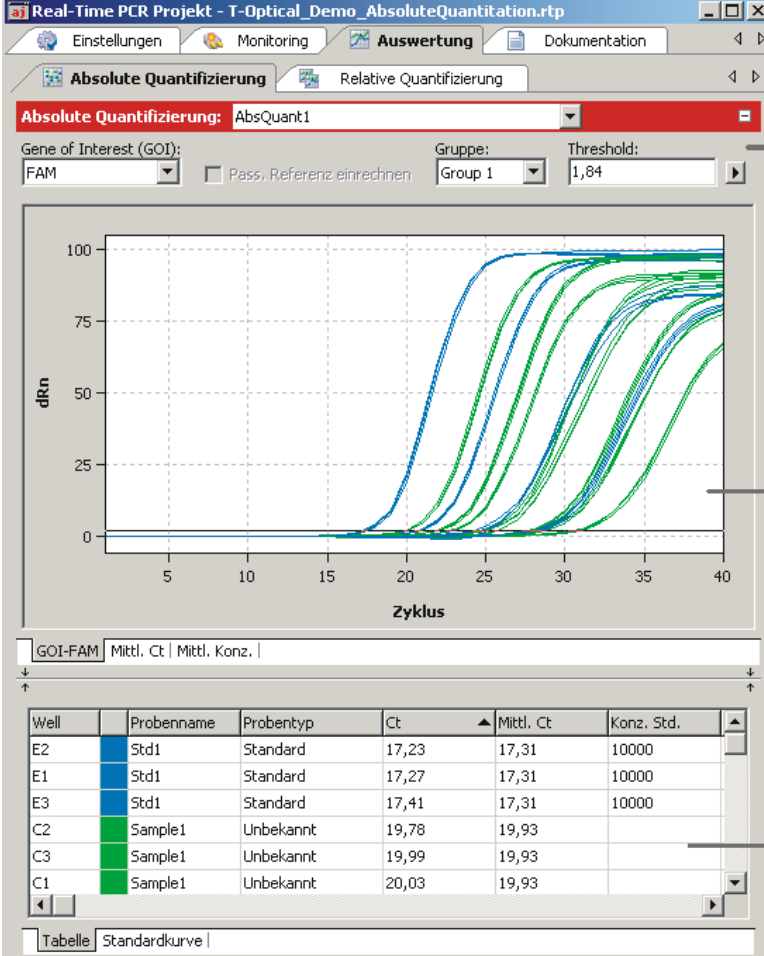
Projektfenster
Auswertung

Unter der Registerkarte **Auswertung** stehen verschiedene Analysemethoden zur Absoluten Quantifizierung, Relativen Quantifizierung, $\Delta\Delta C_t$ -Methode, Schmelzkurvenbetrachtung und Genotypisierung zur Verfügung

- Um eine Analyse zu starten, wählen Sie die entsprechende Registerkarte und klicken dann auf **[Analyse hinzufügen]** in der Toolbar. Diese Schaltfläche ist jeweils mit einem + -Symbol gekennzeichnet (z.B. ).
- Geben Sie im sich öffnenden Eingabefenster einen Name für die Analyse ein (optional):



Alle Analysenfenster untergliedern sich in einen Auswahlbereich für grundsätzliche Einstellungen zur Analyse der Daten, einen graphischen Anzeigebereich für Fluoreszenzkurven und einen Bereich zur Anzeige von Standard- bzw. Validierungskurven bzw. der Ergebnistabelle:



Auswahlbereich

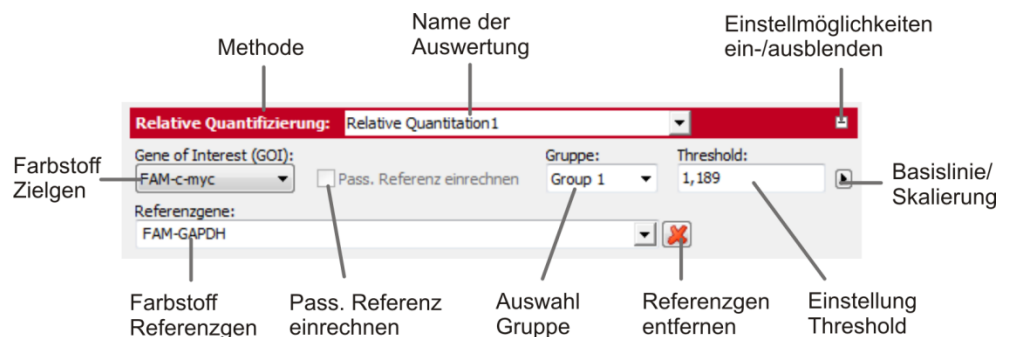
Anzeige der Fluoreszenzkurve

Anzeige Werte & Standardkurven

Well	Probenname	Probentyp	Ct	Mittl. Ct	Konz. Std.
E2	Std1	Standard	17,23	17,31	10000
E1	Std1	Standard	17,27	17,31	10000
E3	Std1	Standard	17,41	17,31	10000
C2	Sample1	Unbekannt	19,78	19,93	
C3	Sample1	Unbekannt	19,99	19,93	
C1	Sample1	Unbekannt	20,03	19,93	

Im Auswahlbereich stehen unterschiedliche Einstellmöglichkeiten zur Verfügung, die je nach Analyse etwas unterschiedlich sein können.

- Auswahl des Zielgens (GOI)
- Falls anwendbar: Einberechnung einer passiven Referenz (z.B. ROX) zur Normalisierung.
- Auswahl zwischen verschiedenen Experimenten (Gruppen)
- Auswahl mindestens eines Referenzgens zur Erstellung von Standard- oder Validierungskurven
- Einstellung der Basislinienkorrektur
- Festlegung des Thresholds (manuell oder automatisch möglich)
- Umschalten zwischen linearer und logarithmischer Anzeige der Fluoreszenzdaten

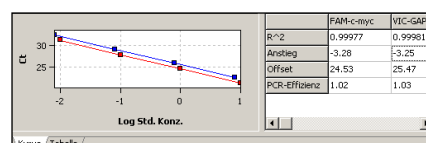


- Im Anzeigebereich werden die ermittelten Fluoreszenzkurven dargestellt.
- Im linearen Anzeigemodus kann die Basislinienkorrektur überprüft werden.
- Im logarithmischen Anzeigemodus kann der Threshold manuell verändert werden. Dazu kann man die Threshold-Linie nach oben oder unten schieben.
- Mittels Registerblättern kann zwischen verschiedenen Farbstoffen umgeschaltet werden.
- Wird der Cursor auf eine Kurve bewegt, wird eine Kurzinformation zur Probe angezeigt.

Im unteren Teil des Analysenfensters werden die Standard- bzw. Validierungskurven graphisch aufgetragen:

- Anzeige der für die Kurven berechneten Werte in Tabellenform
- Umschalten zwischen der Kurvendarstellung und der Ergebnistabelle über Registerblätter

Standard-/Validierungskurven



Ergebnistabelle

Well	Probenname	Probenotyp	Gruppe	GOI	Referenzgen	Ct.G.
A1	Std1	Standard	Gruppe 1	c-myc	GAPDH	21.2
A2	Std1	Standard	Gruppe 1	c-myc	GAPDH	21.1
A3	Std1	Standard	Gruppe 1	c-myc	GAPDH	21.3
A4	Std2	Standard	Gruppe 1	c-myc	GAPDH	24.5
A5	Std2	Standard	Gruppe 1	c-myc	GAPDH	24.4
A6	Std2	Standard	Gruppe 1	c-myc	GAPDH	24.6

- Auswahl der in der Ergebnistabelle angezeigten Spalten nach Klick mit der rechten Maustaste auf eine der Spaltenüberschriften
- Export der Daten nach Mausclick rechts in die Ergebnistabelle als *.csv Dateien

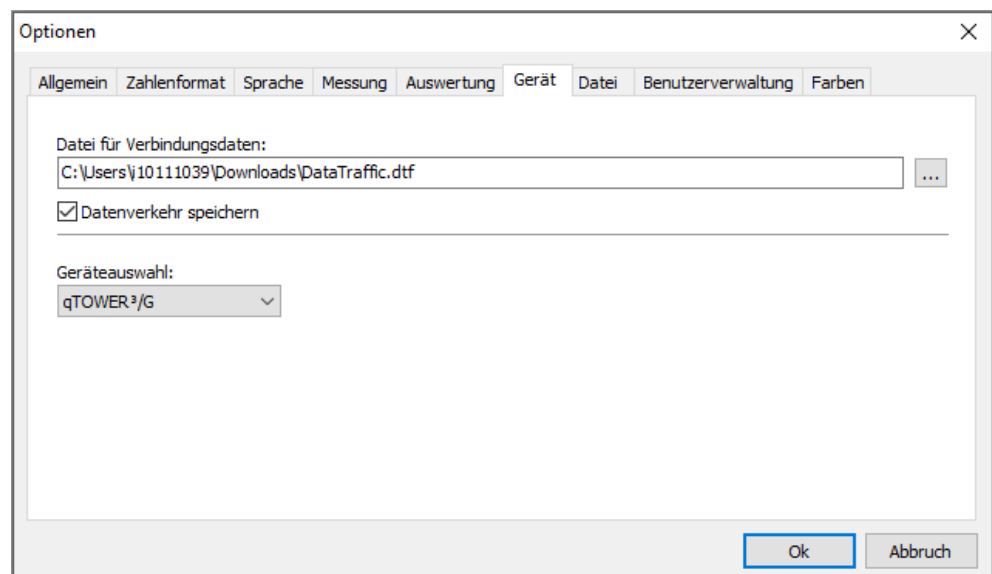
12 Anhang B - Kommunikationsdaten aufzeichnen

Bei Problemen mit Ihrem Gerät können Sie durch den Service aufgefordert werden, die Kommunikationsdaten des Gerätes aufzuzeichnen und an den Service zu senden. Das erleichtert die Ferndiagnose. Zu diesem Zweck muss die Aufzeichnung aktiviert und ein Dateiname zum Speichern der Daten vereinbart werden.

Hinweis:

Zum Aktivieren der Aufzeichnung des Datenverkehrs müssen Sie als Administrator angemeldet sein.

1. Starten Sie qPCRsoft auto.
2. Rufen Sie den Menübefehl **Extras ▶ Optionen** auf und wechseln Sie auf die Registerkarte **Gerät**.
3. Aktivieren Sie die Option **Datenverkehr speichern**.
4. Klicken Sie auf [...] und geben Sie im Fenster **Öffnen** einen Dateinamen ein.
5. Bestätigen Sie die Eingabe mit **[Öffnen]**.



Während des nächsten PCR-Laufs werden die Kommunikationsdaten in diese Datei gespeichert. Senden Sie diese Datei bei Bedarf an den Analytik Jena Service.

13 Anhang C – Projektvorlage aus Transfer-Datei erzeugen (LIMS)

Die Software qPCRsoft auto kann von einem anderen Programm, z.B. einem "Laboratory Information Management System" (LIMS), konfiguriert werden. Das LIMS muss dazu eine Datei erzeugen, die von qPCRsoft auto über die Funktion **Datei ▶ Import LIMS** eingelesen wird. Diese sogenannte Transferdatei besitzt eine festgelegte Struktur, welche bei Interesse von Analytik Jena bereitgestellt werden kann. Mit Hilfe der Transferdatei erzeugt qPCRsoft auto eine Vorlage, mit der sofort ein PCR-Lauf gestartet werden kann.

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

14 Anhang D – Einträge im Audit Trail

Audit-Trail Ausdruck	Bedeutung
[Administrator - 25.06.2018 08:47:00 - AT_DATA_CREATECLASS]	Wann und von wem wurde das Projekt angelegt? Danach folgen die default Audit Trail Daten.
[Administrator - 04.07.2018 11:10:17 - AT_DATA_SAVEPROJECT]	Wann und von wem wurde das Projekt gespeichert? Danach folgen die geänderten Audi Trail Daten.
Allgemein	
DEVICETYPE	Gerätetyp: 3=qTOWER ³
APPVERSION	Verwendete Version von qPCRsoft
FIRMWAREVERSION	Firmwareversion des angeschlossenen Gerätes
DataUser.Name -> Administrator	Eingeloggter Benutzer
DataUser.Level	Allgemeine Benutzerrolle (Administrator, Supervisor, Operator)
DataUser.LevelBits	Zugewiesene Rechte für diesen Benutzer, in Bits codiert
DataUser.Password	Passwort des eingeloggten Benutzers (wird nicht angezeigt)
DataUser.Userdependent	Unbenutzt
General.Title	Eingegebener Titel auf der Karte Allgemein
General.Operator	Operator
General.DateTime	Zeitpunkt der Dateierstellung
General.Comments	Eingegebener Kommentar auf der Karte Allgemein
General.DeviceID	aktuelle DevID aus EEPROM
Thermocycler	

CyclerProgram -> ProgData.BlockType=14;ProgData.LidTemp=100;ProgData.HotStart=True; ProgData.Control=10;ProgData.Standby=False;ProgData.BlockTemp=12;ProgData.MeasTime=10; MeltData.StartTemp=60;MeltData.EndTemp=95;MeltData.Gradient=1;MeltData.Time=16.128; MeltData.Ramp=5;MeltData.Equilibration=6;MeltData.Active=False;StepCount=4;Head.ProgramNumber=1; Head.Gradient=False;Head.ProgramPath=TOP;Head.ProgramName=PCR;Head.ProgramDate.Day=11; Head.ProgramDate.Month=7;Head.ProgramDate.Year=12; Step1.ScanFalse;Step1.Temp=95;Step1.Time=02:00; Step1.Goto=-;Step1.Loops=-;Step1.Templnc=-; Step1.TimeInc=-; Step1.Ramp=5;Step2.ScanFalse;Step2.Temp=95; Step2.Time=00:05;Step2.Goto=-;Step2.Loops=-; Step2.Templnc=-;Step2.TimeInc=-;Step2.Ramp=5; Step3.ScanFalse;Step3.Temp=58;Step3.Time=00:05;Step3.Goto=-;Step3.Loops=-;Step3.Templnc=-; Step3.TimeInc=-; Step3.Ramp=5;Step4.ScanTrue;Step4.Temp=72;Step4.Time=00:15;Step4.Goto=2;Step4.Loops=40; Step4.Templnc=-;Step4.TimeInc=-;Step4.Ramp=5;	Zur Messung verwendetes Programm des Thermocyclers
Fluoreszenzmessung	
ColorModule.Position -> 1	Farbmodulposition 1
ColorModule.Code -> Blue.470.520.11.3	Typ des montierten Farbmoduls
ColorModule.Color -> FAM	Ausgewählter Farbstoff
ColorModule.Gain -> 5	Eingestellter Gain
ColorModule.Meas -> -1	Zur Messung aktiviert (-1) oder nicht aktiviert (0)
ColorModule.Refr -> 0	Als passive Referenz definiert ? Ja (-1), Nein (0)
ColorModule.Position -> 2	Farbmodulposition 2
ColorModule.Code -> Green.515.545.11.2	Typ des montierten Farbmoduls
ColorModule.Color -> JOE	Ausgewählter Farbstoff
ColorModule.Gain -> 5	Eingestellter Gain
ColorModule.Meas -> 0	Zur Messung aktiviert (-1) oder nicht aktiviert (0)
ColorModule.Refr -> 0	Als passive Referenz definiert ? Ja (-1), Nein (0)
ColorModule.Position -> 3	Farbmodulposition 3
ColorModule.Code -> Yellow.535.580.11.2	Typ des montierten Farbmoduls
ColorModule.Color -> TAMRA	Ausgewählter Farbstoff
ColorModule.Gain -> 5	Eingestellter Gain
ColorModule.Meas -> 0	Zur Messung aktiviert (-1) oder nicht aktiviert (0)
ColorModule.Refr -> 0	Als passive Referenz definiert ? Ja (-1), Nein (0)

Anhang D – Einträge im Audit Trail

ColorModule.Position -> 4	Farbmodulposition 4
ColorModule.Code -> Orange.565.605.11.2	Typ des montierten Farbmoduls
ColorModule.Color -> ROX	Ausgewählter Farbstoff
ColorModule.Gain -> 5	Eingestellter Gain
ColorModule.Meas -> 0	Zur Messung aktiviert (-1) oder nicht aktiviert (0)
ColorModule.Refr -> 0	Als passive Referenz definiert ? Ja (-1), Nein (0)
ColorModule.Position -> 5	Farbmodulposition 5
ColorModule.Code -> Red.630.670.11.1	Typ des montierten Farbmoduls
ColorModule.Color -> Cy5	Ausgewählter Farbstoff
ColorModule.Gain -> 5	Eingestellter Gain
ColorModule.Meas -> 0	Zur Messung aktiviert (-1) oder nicht aktiviert (0)
ColorModule.Refr -> 0	Als passive Referenz definiert ? Ja (-1), Nein (0)
ColorModule.Position -> 6	Farbmodulposition 6
ColorModule.Code -> NIR1.660.705.11.1	Typ des montierten Farbmoduls
ColorModule.Color -> Cy5.5	Ausgewählter Farbstoff
ColorModule.Gain -> 5	Eingestellter Gain
ColorModule.Meas -> 0	Zur Messung aktiviert (-1) oder nicht aktiviert (0)
ColorModule.Refr -> 0	Als passive Referenz definiert ? Ja (-1), Nein (0)
Compensation.Name ->	Name der verwendeten Color Compensation
Compensation.Infos[0].Position through Compensation.Infos[5].Position	Informationen über die zur Color Compensation verwendeten Farbmodule, Farbstoffe und Gain für alle 6 Farbmodulpositionen.
Compensation.Infos[0].Color through Compensation.Infos[5].Color	
Compensation.Infos[0].Gain through Compensation.Infos[5].Gain	
Compensation.Matrix[0, 0] through Compensation.Matrix[5,5]	Elemente der Color Compensation Matrix
Scan.Repetitions -> 3	Anzahl der Messwiederholungen
Scan.SpectralCompensation -> 0	Typ der ausgewählten Color Compensation (Off, Standard, Select)
Scan.FromCol -> 1	Start Scanbereich auf Platte
Scan.ToCol -> 12	Ende Scanbereich auf Platte
Scan.ColRangeType -> 1	Scanbereich entspr. Layout (-1) oder manuell (0) festlegen
Layout	
Layout.Code -> Blue.470.520.11.3	Farbmodul, mit dem das folgende Gen gemessen wird
Layout.Infos[A1].Gene through Layout.Infos[H12].Gene	Genname für jedes Well der Platte
Layout.Infos[A1].Concentration through Layout.Infos[H12].Concentration	Standardkonzentration für jedes Well der Platte
Units -> ng	Konzentrationseinheit

Samples[A1].Name through Samples[H12].Name	Probennamen für alle Wells
Samples[A1].Typ through Samples[H12].Typ	Probentyp für alle Wells
Samples[A1].SubTyp through Samples[H12].SubTyp	Proben-Subtyp für alle Wells
Samples[A1].Comment through Samples[H12].Comment	Bemerkung zum jeweiligen Well
Samples[A1].Active through Samples[H12].Active	Well aktiv?
Samples[A1].Marked through Samples[H12].Marked	Well im Explorer markiert?
Groups[A1] -> 0 through Groups[H12]	Zugehörigkeit der Wells zu den Gruppen
GroupNames -> Group 1 through GroupNames -> Group 12	Gruppenamen der 12 möglichen Gruppen
LOCK -> 0	Vorlage gesperrt? Nein (0), Ja (-1)
Ct-Berechnung aus Monitoring	
CtAnalysis.Thresholds -> 0,794712458619839	Threshold, bei dem die Ct-Werte ermittelt wurden
CtAnalysis.Smooth -> -1	Glättung Ja (-1), Nein (0)
CtAnalysis.SmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte
CtAnalysis.Log -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
CtAnalysis.BaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
CtAnalysis.BaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
CtAnalysis.BaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
CtAnalysis.BaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
CtAnalysis.AutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0)
CtAnalysis.AutoThreshold -> 0	Auto Threshold Ja (-1), Nein (0)
CtAnalysis.Filter -> -1	Filter ein(-1), aus (0)
CtAnalysis.FilterOptions -> 2	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2)
CtAnalysis.FilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0)
Tm-Berechnung aus Monitoring	
TmAnalysis.GOI.Color ->	Schmelzkurve GOI
TmAnalysis.GOI.Gene ->	Schmelzkurve Gen
TmAnalysis.Threshold -> 0	Schmelzkurve Threshold
TmAnalysis.Smooth -> -1	Schmelzkurve Glättung ein(-1), aus (0)
TmAnalysis.SmoothMode -> 3	Anzahl Glättungspunkte
TmAnalysis.Log -> 0	Lorarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
TmAnalysis.BaseLineRange.Min -> 1	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches
TmAnalysis.BaseLineRange.Max -> 5	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches
TmAnalysis.AutoThreshold -> 0	Schmelzkurve Auto Threshold ein (-1), aus (0)
TmAnalysis.FlipCurve -> 0	Kurve horizontal spiegeln ein (-1), aus (0)

TmAnalysis.Scaling -> 1	Alle Kurven beginnen bei 100% (0) oder die maximale Fluoreszenz aller Proben ist 100%
Absolute Quantifizierung	
AbsQuantAnalyzes.Smooth -> -1	Glättung Ja (-1), Nein (0)
AbsQuantAnalyzes.SmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte
AbsQuantAnalyzes.Log -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
AbsQuantAnalyzes.BaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
AbsQuantAnalyzes.BaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
AbsQuantAnalyzes.BaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
AbsQuantAnalyzes.BaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
AbsQuantAnalyzes.AutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0)
AbsQuantAnalyzes.AutoThreshold -> 0	Auto Threshold Ja (-1), Nein (0)
AbsQuantAnalyzes.Filter -> -1	Filter ein (-1), aus (0)
AbsQuantAnalyzes.FilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2)
AbsQuantAnalyzes.FilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0)
AbsQuantAnalysis.Description -> Quantitation 1	Titel der Auswertung
AbsQuantAnalysis.Group -> 0	Gültig für Gruppe
AbsQuantAnalysis.REF -> 0	Passive Referenz Ja (-1), Nein (0)
AbsQuantAnalysis.GOI.Color -> FAM	Farbstoff GOI
AbsQuantAnalysis.GOI.Gene ->	Name des GOI
AbsQuantAnalysis.Threshold -> 1,13570592788773	Threshold, bei dem die Ct-Werte ermittelt wurden
AbsQuantAnalysis.FitData.Count -> 4	Anzahl Standards
AbsQuantAnalysis.FitData.M -> -3,67716352286466	Anstieg der Standardgerade
AbsQuantAnalysis.FitData.N -> 28,0638862770259	Intercept der Standardgerade
AbsQuantAnalysis.FitData.R2 -> 0,999236478923372	Bestimmtheitsmaß des linearen Fits
AbsQuantAnalysis.FitData.Extern -> 0	Standardkurve importiert? Ja (-1), Nein (0)
MIQE.TypeInfo -> 1	MIQE Dokumentation für DNA=0 oder RNA=1
LOCK -> 0	Vorlage/Projekt gesperrt? Nein (0), Ja (-1)
Relative Quantifizierung	
RelQuantAnalyzes.GOISmooth -> -1	Glättung GOI, Ja (-1), Nein (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GOISmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte GOI
RelQuantAnalyzes.GOILog -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GOIBaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)

RelQuantAnalyzes.GOIBaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
RelQuantAnalyzes.GOIBaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
RelQuantAnalyzes.GOIBaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
RelQuantAnalyzes.GOIAutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GORSmooth -> -1	Glättung Referenzgen Ja (-1), Nein (0)
RelQuantAnalyzes.GORSmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte Referenzgen
RelQuantAnalyzes.GORLog -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
RelQuantAnalyzes.GORBaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
RelQuantAnalyzes.GORBaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
RelQuantAnalyzes.GORBaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
RelQuantAnalyzes.GORBaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
RelQuantAnalyzes.GORAutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0) Referenzgen
RelQuantAnalyzes.GOIAutoThreshold -> 0	Auto Threshold GOI Ja (-1), Nein (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GORAutoThreshold -> 0	Auto Threshold Referenzgen Ja (-1), Nein (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GOIFilter -> -1	Filter ein (-1), aus (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GOIFilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2), GOI
RelQuantAnalyzes.GOIFilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0), GOI
RelQuantAnalyzes.GORFilter -> -1	Filter ein (-1), aus (0), Referenzgen
RelQuantAnalyzes.GORFilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2), Referenzgen
RelQuantAnalyzes.GORFilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
RelQuantAnalysis.Description -> RelQ	Titel der Auswertung, Relative Quantifizierung
RelQuantAnalysis.Group -> 0	Gültig für Gruppe
RelQuantAnalysis.REF -> 0	Passive Referenz Ja (-1), Nein (0)
RelQuantAnalysis.GOI.Color -> FAM	Farbstoff GOI
RelQuantAnalysis.GOI.Gene ->	Name des GOI
RelQuantAnalysis.GOIThreshold -> 0,794712458619839	Threshold, bei dem die Ct-Werte für GOI ermittelt wurden
RelQuantAnalysis.GOR.Color ->	Farbstoff Referenzgen
RelQuantAnalysis.GOR.Gene ->	Name des Referenzgens
RelQuantAnalysis.GORThreshold -> 50	Threshold, bei dem die Ct-Werte für das Referenzgen ermittelt wurden
RelQuantAnalysis.GOIFitData.Count -> 4	Anzahl Standards, GOI

RelQuantAnalysis.GOIFitData.M -> -3,62354563433653	Anstieg der Standardgerade, GOI
RelQuantAnalysis.GOIFitData.N -> 27,5354442047509	Intercept der Standardgerade, GOI
RelQuantAnalysis.GOIFitData.R2 -> 0,999100282770293	Bestimmtheitsmaß des linearen Fits, GOI
RelQuantAnalysis.GOIFitData.Extern -> 0	Standardkurve GOI importiert? Ja (-1), Nein (0)
RelQuantAnalysis.GORFitData.Count -> 0	Anzahl Standards, Referenzgen
RelQuantAnalysis.GORFitData.M -> 1	Anstieg der Standardgerade Referenzgen
RelQuantAnalysis.GORFitData.N -> 0	Intercept der Standardgerade Referenzgen
RelQuantAnalysis.GORFitData.R2 -> 0	Bestimmtheitsmaß des linearen Fits, Referenzgen
RelQuantAnalysis.GORFitData.Extern -> 0	Standardkurve des Referenzgens importiert? Ja (-1), Nein (0)
Delta-Delta Ct Analyse	
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOISmooth -> -1	Glättung Ja (-1), Nein (0)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOISmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte GOI
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOILog -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIBaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIBaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIBaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIBaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIAutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0), GOI
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORSmooth -> -1	Glättung Referenzgen Ja (-1), Nein (0)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORSmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORLog -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORBaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORBaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORBaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORBaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORAutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIAutoThreshold -> 0	Auto Threshold GOI Ja (-1), Nein (0), GOI
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORAutoThreshold -> 0	Auto Threshold Referenzgen Ja (-1), Nein (0)
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIFilter -> -1	Filter ein (-1), aus (0), GOI
DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIFilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2), GOI

DeltaDeltaCtAnalyzes.GOIFilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0), GOI
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORFilter -> -1	Filter ein (-1), aus (0), Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORFilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2), Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalyzes.GORFilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalysis.Description -> ddCt	Titel der Auswertung, ddCt
DeltaDeltaCtAnalysis.Group -> 0	Gültig für Gruppe
DeltaDeltaCtAnalysis.GOI.Color -> FAM	Farbstoff GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GOI.Gene ->	Name des GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GOIThreshold -> 0,794712458619839	Threshold, bei dem die Ct-Werte für GOI ermittelt wurden
DeltaDeltaCtAnalysis.GOR.Color ->	Farbstoff Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalysis.GOR.Gene ->	Name des Referenzgens
DeltaDeltaCtAnalysis.GORThreshold -> 50	Threshold, bei dem die Ct-Werte für das Referenzgen ermittelt wurden
DeltaDeltaCtAnalysis.EfficiencyCalc -> 0	0- Livak, 1-Pfaffl
DeltaDeltaCtAnalysis.EfficiencyType -> 0	Für Pfaffl: 0-aus Standards, 1-Effizienzen eingeben
DeltaDeltaCtAnalysis.GOIEfficiency -> 1	PCR-Effizienz des GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GOREfficiency -> 1	PCR-Effizienz des Referenzgens
DeltaDeltaCtAnalysis.GOIFitData.Count -> 4	Anzahl Standards, GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GOIFitData.M -> -3,62354563433653	Anstieg der Standardgerade, GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GOIFitData.N -> 27,5354442047509	Intercept der Standardgerade, GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GOIFitData.R2 -> 0,999100282770293	Bestimmtheitsmaß des linearen Fits, GOI
DeltaDeltaCtAnalysis.GORFitData.Count -> 0	Anzahl Standards, Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalysis.GORFitData.M -> 1	Anstieg der Standardgerade Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalysis.GORFitData.N -> 0	Intercept der Standardgerade Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalysis.GORFitData.R2 -> 0	Bestimmtheitsmaß des linearen Fits, Referenzgen
DeltaDeltaCtAnalysis.ValFitData.Count -> 0	Anzahl der Standards, die zur Validierung genutzt werden
DeltaDeltaCtAnalysis.ValFitData.M -> 1	Anstieg der Validierungsgeraden
DeltaDeltaCtAnalysis.ValFitData.N -> 0	Intercept der Validierungsgeraden
DeltaDeltaCtAnalysis.ValFitData.R2 -> 0	Bestimmtheitsmaß des linearen Fits Validierung
Schmelzkurvenanalyse	
MeltCurveAnalyzes.Smooth -> -1	Glättung Ja (-1), Nein (0)
MeltCurveAnalyzes.SmoothMode -> 3	Anzahl Glättungspunkte
MeltCurveAnalyzes.Log -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
MeltCurveAnalyzes.BaseLineRange.Min -> 1	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches
MeltCurveAnalyzes.BaseLineRange.Max -> 5	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches

Anhang D – Einträge im Audit Trail

MeltCurveAnalyzes.AutoThreshold -> 0	Auto Threshold GOI Ja (-1), Nein (0)
MeltCurveAnalyzes.FlipCurve -> -1	Kurve horizontal spiegeln ein (-1), aus (0)
MeltCurveAnalyzes.Scaling -> 0	Alle Kurven beginnen bei 100% (0) oder die maximale Fluoreszenz aller Proben ist 100%
MeltCurveAnalysis.Description -> melt	Titel der Auswertung, Schmelzkurve
MeltCurveAnalysis.Group -> 0	Gültig für Gruppe
MeltCurveAnalysis.GOI.Color -> FAM	Farbstoff GOI
MeltCurveAnalysis.GOI.Gene ->	Name des GOI
MeltCurveAnalysis.Threshold -> 0	Threshold, oberhalb dessen die Schmelztemperaturen ermittelt wurden
Genotypisierung	
GenoTypingAnalyzes.GOISmooth -> -1	Glättung Ja (-1), Nein (0)
GenoTypingAnalyzes.GOISmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte GOI
GenoTypingAnalyzes.GOILog -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
GenoTypingAnalyzes.GOIBaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
GenoTypingAnalyzes.GOIBaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
GenoTypingAnalyzes.GOIBaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
GenoTypingAnalyzes.GOIBaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer GOI)
GenoTypingAnalyzes.GOIAutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0), GOI
GenoTypingAnalyzes.GORSmooth -> -1	Glättung Referenzgen Ja (-1), Nein (0)
GenoTypingAnalyzes.GORSmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte Referenzgen
GenoTypingAnalyzes.GORLog -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
GenoTypingAnalyzes.GORBaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
GenoTypingAnalyzes.GORBaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
GenoTypingAnalyzes.GORBaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
GenoTypingAnalyzes.GORBaseLineRange[1].Max -> -1	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer Referenzgen)
GenoTypingAnalyzes.GORAutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches Ja (-1), Nein (0) Referenzgen
GenoTypingAnalyzes.GOIAutoThreshold -> 0	Auto Threshold GOI Ja (-1), Nein (0), GOI
GenoTypingAnalyzes.GORAutoThreshold -> 0	Auto Threshold Referenzgen Ja (-1), Nein (0), GOI
GenoTypingAnalyzes.GOIFilter -> -1	Filter ein (-1), aus (0), GOI
GenoTypingAnalyzes.GOIFilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2), GOI

GenoTypingAnalyzes.GOIFilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0), GOI
GenoTypingAnalyzes.GORFilter -> -1	Filter ein (-1), aus (0), Referenzgen
GenoTypingAnalyzes.GORFilterOptions -> 1	Filterstärke klein(0), mittel(1), stark(2), Referenzgen
GenoTypingAnalyzes.GORFilterSmooth -> 0	Filter soll geglättet werden, Ja (-1), Nein (0), Referenzgen
GenoTypingAnalyzes.SPType -> 1	Genotyping basiert auf dRn (0), Ct (1)
GenoTypingAnalyzes.EPLast -> -1	Endpunkt ist der letzte Zyklus (1) oder manuelle Eingabe des Endpunktes (0)
GenoTypingAnalyzes.EPCycle -> -1	Endpunktzyklus, manuell festgelegt
GenoTypingAnalyzes.InfoText -> wild type	Textausgabe 1
GenoTypingAnalyzes.InfoText -> mutant	Textausgabe 2
GenoTypingAnalyzes.InfoText -> heterozygote	Textausgabe 3
GenoTypingAnalyzes.InfoText -> error	Textausgabe 4
GenoTypingAnalysis.Description -> Geno	Titel der Auswertung, Genotyping
GenoTypingAnalysis.Group -> 0	Gültig für Gruppe
GenoTypingAnalysis.REF -> 0	Passive Referenz Ja (-1), Nein (0)
GenoTypingAnalysis.GOI.Color -> FAM	Farbstoff GOI
GenoTypingAnalysis.GOI.Gene ->	Name des GOI
GenoTypingAnalysis.GOIThreshold -> 0,794712458619839	Threshold, bei dem die Ct-Werte für GOI ermittelt wurden
GenoTypingAnalysis.GOR.Color ->	Farbstoff Referenzgen
GenoTypingAnalysis.GOR.Gene ->	Name des Referenzgens
GenoTypingAnalysis.GORThreshold -> 50	Threshold, bei dem die Ct-Werte für das Referenzgen ermittelt wurden
GenoTypingAnalysis.SPCutOff0 -> 0	Cutoff Wert 1, Ct
GenoTypingAnalysis.SPCutOff1 -> 0,794712458619839	Cutoff Wert 2, Ct
GenoTypingAnalysis.EPCutOff0 -> 49	Cutoff Wert 1, Zyklus
GenoTypingAnalysis.EPCutOff1 -> 51	Cutoff Wert 2, Zyklus
Endpunktanalyse	
EndPointAnalyzes.Smooth -> -1	Glättung Ja (-1), Nein (0)
EndPointAnalyzes.SmoothMode -> 5	Anzahl Glättungspunkte
EndPointAnalyzes.Log -> 0	Logarithmische Darstellung Ja (-1), Nein (0)
EndPointAnalyzes.BaseLineRange[0].Min -> 3	Untere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
EndPointAnalyzes.BaseLineRange[0].Max -> 15	Obere Grenze des manuellen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
EndPointAnalyzes.BaseLineRange[1].Min -> 5	Untere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)
EndPointAnalyzes.BaseLineRange[1].Max -> 25	Obere Grenze des automatischen Basislinienbereiches (Zyklusnummer)

Anhang D – Einträge im Audit Trail

EndPointAnalyzes.AutoBaseLine -> -1	Automatische Ermittlung des Basislinienbereiches (1), Nein (0), GOI
EndPointAnalysis.Description -> Endp	Titel der Auswertung, Endpunkt
EndPointAnalysis.Group -> 0	Gültig für Gruppe
EndPointAnalysis.GOI.Color -> FAM	Farbstoff GOI
EndPointAnalysis.GOI.Gene ->	Name des GOI
EndPointAnalysis.GOICutOff -> 2040,83542831301	Cutoff Wert für GOI
EndPointAnalysis.IPC.Color ->	Farbstoff der internen Positivkontrolle
EndPointAnalysis.IPC.Gene ->	Genname der internen Positivkontrolle
EndPointAnalysis.IPCCutOff -> 0	Cutoff Wert für interne Positivkontrolle
EndPointAnalysis.OptionCycles -> -1	Endpunktanalyse anhand der Endpunktintensitäten, Ja (-1), Nein (0)
EndPointAnalysis.OptionLastCycles -> 2	Anzahl der letzten Zyklen, die zur Berechnung verwendet werden
EndPointAnalysis.OptionFromCycle -> 38	Startzyklus Endpunktbereich
EndPointAnalysis.OptionToCycle -> 40	Endzyklus Endpunktbereich
EndPointAnalysis.OptionCutOff -> -1	Endpunktanalyse anhand der NTC-Intensitäten, Ja (-1), Nein (0)
EndPointAnalysis.OptionCutOffNTC -> 10	Faktor für Schwellenwert aus NTCs
EndPointAnalysis.OptionCutOffNTC_IPC -> 2	Konfidenzintervalle: (0) 95%; (1) 99%; (2)99,5%; (3)99,7%; (4)99,9%
EndPointAnalysis.OptionCutOffInput -> 0	Cutoff Werte aus Tabelle benutzen, Ja (-1), Nein (0)
MIQE.TypeInfo -> 1	MIQE Dokumentation für DNA=0 oder RNA=1
LOCK -> 0	Vorlage/Projekt gesperrt? Nein (0), Ja (-1)

15 Anhang E – Verfügbare Farbmodule und detektierbare Farbstoffe

Folgende Farbmodule stehen zur Verfügung:

Beschreibung/Bestellnummer	Farbstoffe (Beispiele)
Farbmodul 1, Bestellnummer: 844-00520-0	FAM, SYBR Green, Alexa488
Farbmodul 2, Bestellnummer: 844-00521-0	JOE, HEX, VIC, YakimaYellow
Farbmodul 3, Bestellnummer: 844-00522-0	TAMRA, DFO, Alexa546, NED
Farbmodul 4, Bestellnummer: 844-00523-0	ROX, TexasRed, Cy3.5
Farbmodul 5, Bestellnummer: 844-00524-0	Cy5, Alexa633, Quasar670
Farbmodul 6, Bestellnummer: 844-00525-0	Cy5.5, LightCycler Red
FRET-Modul 1, Bestellnummer: 844-00526-0	FAM (Donor) / TAMRA (Akzeptor)
FRET-Modul 2, Bestellnummer: 844-00527-0	FAM (Donor) / Cy5 (Akzeptor)
FRET-Modul 3, Bestellnummer: 844-00528-0	FAM (Donor) / Cy5.5 (Akzeptor)
FRET-Modul 4, Bestellnummer: 844-00529-0	JOE (Donor) / Cy5 (Akzeptor)
FRET-Modul 5, Bestellnummer: 844-00531-0	FAM (Donor) / ROX (Akzeptor)
Farbmodul Protein 1, Bestellnummer: 844-00530-0	SYPRO Orange