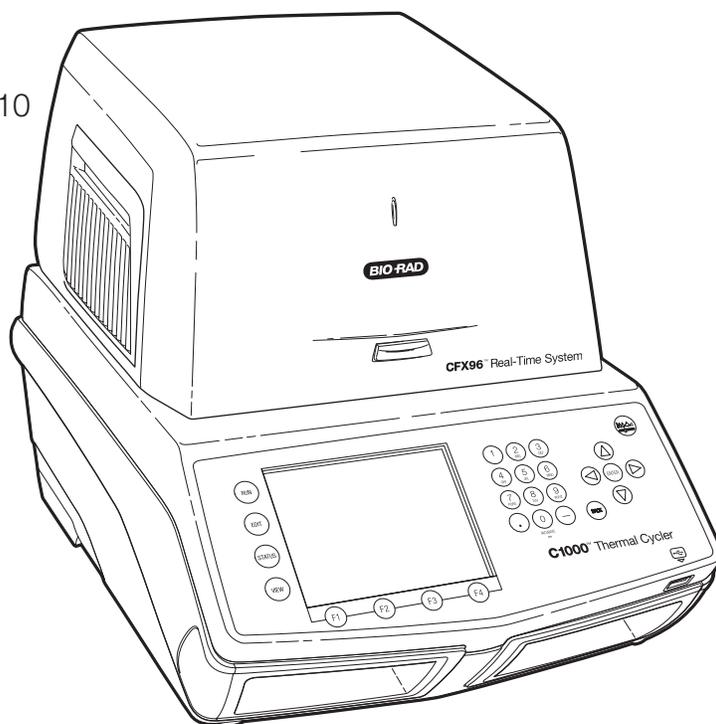


Sistema de Detecção por PCR em Tempo Real CFX96™

Manual de instruções

REF 185-5095-IVD
184-5097-IVD

Revisão do manual: Junho de 2010
Revisão do software: 1.6



BIO-RAD

Copyright ©2010 Bio-Rad Laboratories, Inc. É proibida a reprodução, sob qualquer forma, impressa ou electrónica, sem a autorização por escrito da Bio-Rad Laboratories, Inc.

Excel, Microsoft, PowerPoint, Windows, Windows Vista e Windows 7 são marcas comerciais da Microsoft Corporation. Adobe e Reader são marcas comerciais da Adobe Systems Incorporated. Cy é uma marca comercial das empresas do grupo GE Healthcare. Fluor e Quasar são marcas comerciais da Biosearch Technologies, Inc. SYBR® e Texas Red são marcas comerciais da Invitrogen Corporation. A Bio-Rad Laboratories, Inc. está autorizada pela Invitrogen Corporation a vender reagentes que contenham SYBR® Green I para utilização na PCR em tempo real, apenas para fins de investigação. Outras marcas ou nomes de produtos são marcas comerciais dos respectivos proprietários.

AVISO RELACIONADO COM OS TERMOCICLADORES E SISTEMAS EM TEMPO REAL DA BIO-RAD

A aquisição deste instrumento confere uma imunidade limitada e não transferível contra acções legais para a investigação e desenvolvimento internos do próprio comprador e para utilização no diagnóstico humano in vitro e em todos os outros campos aplicados sob um ou mais dos números de patentes norte-americanas 5,656,493; 5,333,675; 5,475,610 (Apenas reivindicações 1, 44, 158, 160-163 e 167); e 6,703,236 (Apenas reivindicações 1-7), ou reivindicações correspondentes nas suas contrapartidas não norte-americanas, que sejam propriedade da Applied Biosystems Corporation. Nenhum direito é conferido expressamente, por implicação ou estoppel sob qualquer outra reivindicação de patente, tais como reivindicações relativas aos reagentes, kits ou métodos como os métodos de nuclease 5'. Para obter mais informações sobre a aquisição de licenças, contactar o Director de Licenciamento (Director of Licensing), Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Califórnia 94404, EUA.

Este produto está abrangido por uma ou mais das seguintes patentes norte-americanas ou respectivas contrapartidas estrangeiras que sejam propriedade da Eppendorf AG: Números de patentes norte-americanas 6,767,512 e 7,074,367.

Este termociclador em tempo real está licenciado sob a patente norte-americana n.º 6,814,934 e reivindicações correspondentes em qualquer patente canadiana de contrapartida da mesma que seja propriedade da Applied Biosystems Corporation, apenas no campo da investigação, do diagnóstico humano in vitro e em todos os outros campos aplicados, com excepção do diagnóstico in vitro veterinário. Nenhum direito é conferido expressamente, por implicação ou estoppel, a quaisquer patentes relativas a métodos em tempo real, incluindo, embora não de forma exclusiva, os ensaios de 5' nuclease, nem a qualquer patente que reivindique um reagente ou kit.

As placas Hard-Shell® da Bio-Rad estão abrangidas por uma ou mais das seguintes patentes norte-americanas, patentes pendentes ou respectivas contrapartidas estrangeiras que sejam propriedade da Eppendorf AG: Números de patentes norte-americanas 7,347,977, 6,340,589, 6,528,302 e aplicação EUA 2007246858, 20080084004, 20030180192 e 20060120927.

Informações do Manual de Instruções

Este manual contém informações sobre a configuração e operação seguras do Sistema de detecção por PCR em tempo real CFX96™ que ostenta a marca CE-IVD (número de catálogo 1855095-IVD). Para obter mais informações sobre o CFX Manager™ software, consulte o Manual de Instruções do CFX96 e do CFX384 para investigação em ciências da vida (números de catálogo 1855095 e 1855384).

Convenções de escrita utilizadas no presente manual

O manual utiliza as convenções de escrita mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Convenções utilizadas no presente manual

Convenção	Significado
SUGESTÃO:	Apresenta informações e instruções úteis, incluindo informações explicadas mais detalhadamente noutras partes do presente manual.
NOTA:	Apresenta informações úteis, incluindo informações explicadas mais detalhadamente noutras partes do presente manual.
AVISO!	Explica informação muito importante sobre um aspecto que poderá provocar lesões no investigador, danos no instrumento ou originar perda de dados.
X > Y	Selecione X e depois Y numa barra de ferramentas, menu ou janela de software.

Para obter informações sobre as etiquetas de segurança utilizadas no presente manual e no Sistema CFX96, consulte “Conformidade reguladora e de segurança” na página iii.

Bio-Rad Recursos

A Tabela 2 mostra recursos Bio-Rad e como localizar aquilo de que necessita.

Tabela 2. Recursos Bio-Rad.

Recurso	Como contactar
Representantes locais da Bio-Rad Laboratories	Para encontrar informações e contactos locais no website da Bio-Rad, seleccione o seu país na página inicial (www.bio-rad.com). Localize o escritório internacional mais próximo no verso do presente manual.
Notas técnicas e literatura	Navegue até ao website da Bio-Rad (www.bio-rad.com). Digite um item de pesquisa na caixa Search (Procurar) e seleccione Literature (Literatura) para encontrar hiperligações a notas técnicas, manuais e outro tipo de literatura.
Especialistas técnicos	O Departamento de Assistência da Bio-Rad emprega cientistas experientes que fornecem soluções práticas e especializadas aos clientes. Se precisar de contactar a assistência técnica local pelo telefone, contacte o escritório Bio-Rad mais próximo de si. Para obter assistência técnica nos Estados Unidos e Canadá, ligue 1-800-424-6723 (número gratuito) e seleccione a opção de assistência técnica.

Conformidade reguladora e de segurança

Para a operação segura do Sistema de detecção por PCR em tempo real CFX96, recomendamos vivamente que observe as especificações de segurança incluídas nesta secção e ao longo do manual.

O sistema CFX96 foi aprovado para utilização como um equipamento médico de diagnóstico in vitro (IVD).

Etiquetas de aviso de segurança

As etiquetas de aviso presentes no instrumento e no presente manual advertem para fontes de lesões ou danos. Consulte a Tabela 3 para ver o significado de cada etiqueta de aviso de segurança.

Tabela 3. Significado das etiquetas de aviso de segurança.

	ATENÇÃO: Perigo para o ambiente! Este símbolo identifica componentes que podem ficar contaminados com materiais perigosos para o ambiente.
	ATENÇÃO: Perigo! Este símbolo identifica os componentes que poderão causar lesões pessoais ou danos no instrumento se forem incorrectamente manuseados. Sempre que aparecer este símbolo, consulte o manual para obter mais informações antes de continuar.
	ATENÇÃO: Superfície quente! Este símbolo identifica os componentes que poderão causar lesões pessoais devido a aquecimento excessivo se forem incorrectamente manuseados.

Avisos de segurança no instrumento

As etiquetas de aviso mostradas na Tabela 4 estão também presentes no instrumento e referem-se directamente à utilização segura do sistema CFX96.

Tabela 4. Etiquetas de aviso de segurança no instrumento.

Ícone	Significado
	Aviso sobre o risco de lesões corporais ou danos no equipamento. Se o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 for operado antes da leitura do presente manual, tal poderá constituir um risco de lesões pessoais. Para uma utilização segura, não opere este instrumento de formas não especificadas no presente manual. O instrumento deve ser operado apenas por pessoal de laboratório qualificado com formação para utilizar o equipamento eléctrico de forma segura. Os componentes do sistema devem ser sempre manuseados cuidadosamente e com as mãos limpas e secas.
	Aviso sobre o manuseamento de materiais perigosos para o ambiente. Ao manusear amostras perigosas para o ambiente, observe as precauções e directrizes recomendadas e cumpra todas as directrizes locais específicas do seu laboratório e localização.
	Aviso sobre o risco de queimaduras. Um termociclador gera calor suficiente para causar queimaduras graves. Use sempre óculos de segurança ou outro tipo de protecção para os olhos durante a operação. Permita sempre que o bloco de amostras regresse à temperatura de inactividade antes de abrir a tampa e remover as amostras. Proporcione sempre uma folga máxima para evitar queimaduras acidentais na pele.
	Aviso sobre o risco de explosão. Os blocos de amostras podem ficar suficientemente quentes durante a operação normal para que os líquidos entrem em ebulição e expludam.

Especificações e conformidade para uma utilização segura

A Tabela 5 mostra as especificações para a utilização segura do sistema CFX96. Devem ser utilizados cabos blindados (fornecidos) com esta unidade para assegurar a conformidade com os limites FCC da Classe A.

Tabela 5. Especificações para uma utilização segura.

Requisitos para uma utilização segura		Especificações
Temperatura	Utilização em interiores	Temperatura ambiente 15–31°C. Humidade relativa máxima 80%, sem condensação
Altitude		Até 2.000 metros acima do nível do mar

CONFORMIDADE REGULADORA

Este instrumento foi testado e está em conformidade com todos os requisitos aplicáveis das seguintes normas electromagnéticas e de segurança:

- IEC 61010-1:2001 (2.ª Ed.), EN61010-1:2001 (2.ª Ed). Equipamento eléctrico de medição, de comando e de laboratório - Parte 1: Requisitos gerais
- IEC 61010-2-010:2005, EN61010-2-010:2003. Requisitos de segurança de equipamento eléctrico de medição, de comando e de laboratório. Parte 2-010: Requisitos específicos de equipamento de laboratório para aquecimento de materiais

- IEC 61010-2-081:2001+A1, EN61010-2-081:2002+A1. Requisitos de segurança de equipamento eléctrico de medição, de comando e de laboratório. Parte 2-081: Requisitos específicos de equipamento automático e semi-automático de laboratório para análise e outros fins (inclui a Emenda 1)
- EN 61326-1:2006 (Classe A) Equipamento eléctrico de medição, de comando e de laboratório. Requisitos EMC, Parte 1: Requisitos gerais
- EN 61010-2-101. Requisitos de segurança de equipamento eléctrico de medição, de comando e de laboratório. Requisitos específicos de equipamentos médicos para diagnóstico in vitro (IVD)
- EN 61326-2-6 (Classe A) Equipamento eléctrico de medição, de comando e de laboratório. Requisitos EMC. Parte 2-6. Requisitos específicos. Equipamentos médicos para diagnóstico in vitro (IVD)

Este equipamento gera, utiliza e pode radiar energia de rádio-frequência e, se não for instalado e utilizado em conformidade com o manual de instruções, pode provocar interferências nocivas para as comunicações de rádio. A operação deste equipamento em áreas residenciais pode provocar interferências nocivas; nestes casos, o utilizador terá de corrigir a interferência a expensas próprias.

Perigos

O sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 foi concebido para operar em segurança quando utilizado da forma recomendada pelo fabricante. Se o sistema CFX96 ou qualquer um dos componentes associados forem utilizados de uma forma não especificada pelo fabricante, tal poderá comprometer a protecção inerente proporcionada pelo instrumento. A Bio-Rad Laboratories, Inc. não se responsabiliza por quaisquer lesões ou danos causados pela utilização deste equipamento de forma não especificada, nem pelas modificações ao instrumento não realizadas pela Bio-Rad ou por um representante autorizado. A assistência ao sistema CFX96 deve ser levada a cabo apenas por pessoal da Bio-Rad.

Perigos para o ambiente

O sistema CFX96 é um produto de laboratório. No entanto, na presença de amostras perigosas para o ambiente, observe as directrizes seguintes e cumpra todas as directrizes locais específicas do seu laboratório e localização.

PRECAUÇÕES GERAIS

- Use sempre luvas, batas e óculos de segurança com protecções laterais ou óculos de protecção
- Mantenha as mãos afastadas da boca, nariz e olhos
- Cubra totalmente eventuais golpes ou abrasões antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos
- Depois de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos, lave muito bem as mãos com sabão e água antes de sair do laboratório
- Retire relógios de pulso e jóias antes de trabalhar na bancada
- Guarde todo o material infeccioso ou potencialmente infeccioso em recipientes inquebráveis à prova de fuga
- Antes de sair do laboratório, dispa o vestuário de protecção
- Enquanto tiver luvas calçadas, não deve tocar em objectos ou superfícies que possam ser tocados por pessoas sem luvas (por ex., escrever, atender o telefone ou tocar num interruptor de luz)

- Mude de luvas com frequência. Descalce imediatamente as luvas quando estiverem visivelmente contaminadas
- Os materiais que não possam ser devidamente descontaminados não devem ser expostos a materiais potencialmente infecciosos
- Ao concluir uma operação que inclua material perigoso para o ambiente, descontamine a zona de trabalho com um desinfetante adequado (por exemplo, lixívia doméstica diluída a 1:10)

PRECAUÇÕES ESPECÍFICAS

- Todas as amostras de doentes constituem um perigo potencial para o ambiente e devem ser manuseadas de acordo com precauções universais
- Nenhuma substância perigosa para o ambiente são expelidas durante as operações normais deste instrumento

DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES

AVISO! Para evitar choques eléctricos, desligue sempre o instrumento e desligue-o da corrente eléctrica antes de efectuar procedimentos de descontaminação.

As áreas seguintes podem ser limpas com qualquer desinfetante bactericida, virucida ou fungicida de grau hospitalar:

- Tampa exterior e caixa
- Superfície interior do bloco de reacção e poços do bloco de reacção
- Painel de controlo e visor

Para preparar e aplicar o desinfetante, consulte as instruções fornecidas pelo fabricante do produto. Enxague sempre o bloco de reacção e os poços do bloco de reacção várias vezes com água depois de aplicar um desinfetante. Seque muito bem o bloco de reacção e os poços do bloco de reacção depois de enxaguar com água.

AVISO! Não utilize detergentes abrasivos ou corrosivos nem soluções alcalinas fortes. Estes agentes podem riscar as superfícies e danificar o bloco de reacção, comprometendo a precisão do controlo térmico.

ELIMINAÇÃO DE MATERIAL PERIGOSO PARA O AMBIENTE

O sistema CFX96 não contém quaisquer materiais químicos potencialmente perigosos. Elimine os seguintes materiais potencialmente contaminados em conformidade com os regulamentos de laboratório locais, regionais e nacionais:

- Amostras clínicas
- Reagentes
- Recipientes de reacção usados ou outros consumíveis que possam estar contaminados

Perigos químicos

O sistema CFX96 não contém quaisquer materiais químicos potencialmente perigosos.

Perigo de explosão ou inflamabilidade

O sistema CFX96 não apresenta nenhum perigo não comum de inflamabilidade ou explosão quando utilizado de forma correcta conforme especificado pela Bio-Rad Laboratories.

Perigos eléctricos

O sistema CFX96 não apresenta nenhum perigo eléctrico não comum para os operadores desde que seja instalado e operado correctamente, sem modificações físicas, e desde que seja ligado a uma fonte de alimentação com a especificação correcta.

Transporte

Antes de deslocar ou transportar o Termociclador C1000™ ou o módulo de reacção óptico CFX96, devem ser realizados procedimentos de descontaminação. Desloque ou transporte sempre a caixa do termociclador C1000 e o módulo de reacção óptico CFX96 em contentores separados com os materiais de embalagem fornecidos para proteger o instrumento de danos. Caso não seja possível obter contentores adequados, contacte o escritório Bio-Rad da sua zona.

Armazenamento

O sistema CFX96 pode ser armazenado nas seguintes condições:

- Intervalo de temperaturas -20 a 60°C
- Humidade relativa máxima de 80%

Eliminação

O sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 contém materiais eléctricos ou electrónicos; por conseguinte, deve ser eliminado como lixo não separado e deve ser recolhido separadamente em conformidade com a Directiva WEEE (Resíduos de equipamentos eléctricos e electrónicos) da União Europeia 2002/96/CE. Antes da eliminação, contacte o representante Bio-Rad da sua zona para obter instruções específicas nacionais.

Índice

Informações do Manual de Instruções	ii
Bio-Rad Recursos	ii
Conformidade reguladora e de segurança	iii
Perigos	v
Capítulo 1. Instalação do sistema	1
Desembalar o módulo de reacção óptico	1
Requisitos do sistema	1
Visão geral do sistema	2
Configuração do sistema	3
Instalação do CFX Manager Software	6
Ficheiros de software	8
Execução de experiências	8
Capítulo 2. CFX Manager™ Software	11
Janela principal do software	11
Assistente de arranque	15
Painel Detected Instruments (Instrumentos detectados)	16
Janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos)	17
Capítulo 3. Execução de experiências	21
Janela Experiment Setup (Configuração da experiência)	21
Separador Protocol (Protocolo)	22
Separador Plate (Placa)	23
Separador Start Run (Iniciar ciclo)	24
Janela Run Details (Detalhes do ciclo)	26
Capítulo 4. Protocolos	29
Janela Protocol Editor (Editor de protocolos)	29
Controlos do Protocol Editor (Editor de protocolos)	31
Modo de controlo da temperatura	35
Protocol AutoWriter	35
Capítulo 5. Placas	39
Janela Plate Editor (Editor de placas)	39
Janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)	42
Janela Experiment Settings (Definições da experiência)	45
Janela Well Groups Manager (Gestor de grupos de poços)	47
Janela Plate Spreadsheet View (Visualização da folha de cálculo da placa)	49
Capítulo 6. Operação independente	51
Termociclador C1000	51
Criar uma nova experiência	53
Exportação de dados para análise	58
Criação de um ficheiro de dados	60

Capítulo 7. Visão geral da análise de dados	61
Janela Data Analysis (Análise de dados)	61
Separador Quantitation (Quantificação)	65
Definições de análise de dados	67
Selectores de poços	68
Gráficos	70
Folhas de cálculo	71
Capítulo 8. Janelas de análise de dados	73
Separador Quantitation (Quantificação)	73
Separador Quantitation Data (Dados de quantificação)	76
Separador Melt Curve (Curva de fusão)	78
Separador Melt Curve Data (Dados da curva de fusão)	79
Separador End Point (Ponto final)	80
Separador Allelic Discrimination (Discriminação alélica)	81
Separador QC (Controlo de qualidade)	83
Separador Run Information (Informação do ciclo)	84
Relatórios de ficheiros de dados	85
Capítulo 9. Análise de expressão de genes	89
Expressão de genes	89
Configuração de placas para análise de expressão de genes	90
Separador Gene Expression (Expressão de genes)	90
Janela Experiment Settings (Definições da experiência)	96
Estudo de genes	98
Folha de cálculo de dados do estudo de genes	101
Janela Gene Study Report (Relatório de estudo de genes)	103
Capítulo 10. Utilizadores e preferências	105
Iniciar sessão ou seleccionar utilizador	105
Janela User Preferences (Preferências do utilizador)	106
Administração de utilizadores	112
Capítulo 11. Recursos	115
Assistente de calibração	115
Manutenção do instrumento	117
Registo de aplicações	119
Resolução de problemas	120
Especificações técnicas	122
Bibliografia	124

1 Instalação do sistema

Leia este capítulo para obter informações sobre a configuração do CFX96™ real-time PCR detection system:

- Desembalar o módulo de reacção óptico (abaixo)
- Requisitos do sistema (página 1)
- Visão geral do sistema (página 2)
- Configuração do sistema (página 3)
- Instalação do CFX™ Manager software (página 6)
- Ficheiros de software (página 8)
- Execução de experiências (página 8)

Desembalar o módulo de reacção óptico

A remessa do módulo de reacção óptico CFX96 inclui os seguintes componentes:

- Módulo de reacção óptico
- Cabo USB
- CD de instalação do CFX Manager software
- Manual de instruções

Retire todos os materiais de embalagem e guarde-os para utilização no futuro. Se faltarem itens ou se houver itens danificados, contacte o escritório Bio-Rad da sua zona.

Requisitos do sistema

Para operar o sistema CFX96, utilize as fontes de alimentação e os cabos seguintes:

- **Alimentação de entrada.** 100–240 VAC, 50–60 Hz
- **Utilização em interiores.** Temperatura ambiente 15–31°C. Humidade relativa máxima 80%, sem condensação
- **Cabo USB.** Se pretende que o sistema CFX96 seja controlado por computador através de um cabo USB, o cabo fornecido pela Bio-Rad tem um nível de blindagem suficiente para utilização

NOTA: Para obter uma lista completa dos requisitos de segurança e conformidade para este instrumento, consulte “Conformidade reguladora e de segurança” na página iii.

Visão geral do sistema

O sistema CFX96 inclui dois componentes:

- **Módulo de reacção óptico.** Este módulo inclui um sistema óptico para recolha de dados de fluorescência e um termociclador com bloco
NOTA: O número de série do módulo CFX96 encontra-se na retaguarda do instrumento.
- **Base do termociclador C1000™.** A C1000 base apresenta uma interface de utilizador para controlar o sistema quando este se encontra no modo de funcionamento independente (standalone) e um botão de alimentação e portas (ambos no painel traseiro) para ligar a um computador

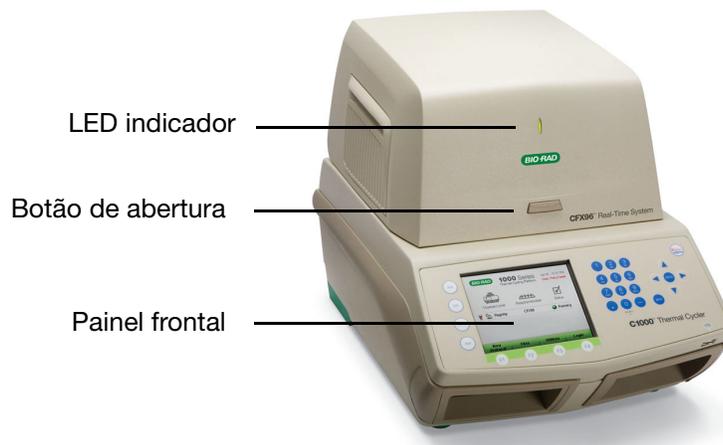


Figura 1. Vista frontal do sistema CFX96.

Quando aberto, o sistema CFX96 apresenta os elementos mostrados na Figura 2.



Figura 2. Vista interior do CFX96 system.



AVISO! Evite tocar na tampa interior ou no bloco: estas superfícies podem estar quentes.

- **Tampa interior com placa de aquecimento.** A tampa de aquecimento mantém a temperatura no topo do consumível para evitar a evaporação das amostras. Evite tocar ou contaminar de outra forma a placa de aquecimento. Nunca insira nada nos orifícios, uma vez que poderá danificar o sistema de vaivém óptico
- **Bloco.** Carregue amostras neste bloco antes do ciclo
- **Botão de fecho.** Prima este botão na parte interior da tampa para fechar a tampa motorizada

AVISO! Evite a contaminação do instrumento por derrames e nunca execute uma reacção com uma tampa de amostra aberta ou com fuga. Para obter informações sobre a limpeza e manutenção gerais do instrumento, consulte “Manutenção do instrumento” (página 117).

O painel traseiro da caixa do C1000 apresenta os seguintes elementos (Figura 3):

- **Interruptor de alimentação.** Prima o interruptor de alimentação para ligar a alimentação do sistema
- **Entrada de alimentação.** Ligue o cabo de alimentação aqui
- **Porta Ethernet.** Ligue um cabo ethernet a registos de ciclos de e-mail e a ficheiros de dados independentes (standalone)
- **Ligações USB.** Utilize estas portas para ligar o sistema CFX96 a um computador ou para ligar um S1000™ thermal cycler

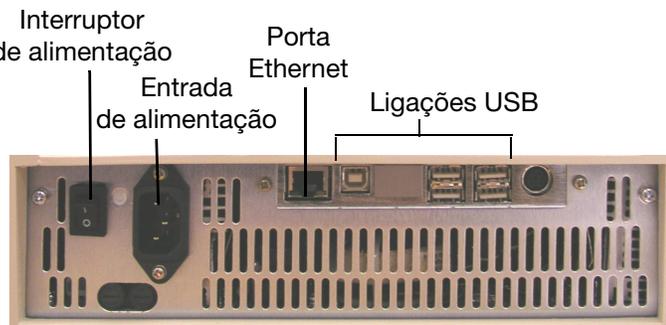


Figura 3. Painel traseiro do termociclador C1000.



AVISO! Evite o contacto com a retaguarda da caixa do C1000 durante a operação.

Configuração do sistema

O sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 deve ser instalado sobre uma superfície limpa, seca e nivelada, com um fluxo de ar frio suficiente para permitir o seu funcionamento correcto. O sistema CFX96 pode ser operado em dois modos: independente (standalone) ou controlado por software. Se o sistema for operado no modo de controlo por software, certifique-se de que existe espaço suficiente para um computador durante a instalação.

Posicione a base do termociclador C1000 de modo que o interruptor de alimentação, localizado no painel traseiro, seja facilmente acessível.

Para inserir o módulo de reacção óptico CFX96 no compartimento do módulo de reacção da caixa do C1000, siga as instruções seguintes:

1. Coloque a caixa do C1000 numa localização adequada com a barra de bloqueio para baixo. Retire os módulos de reacção anteriormente instalados.
2. Levante o módulo de reacção óptico pelas reentrâncias localizadas acima das aberturas de ventilação laterais (Figura 4).

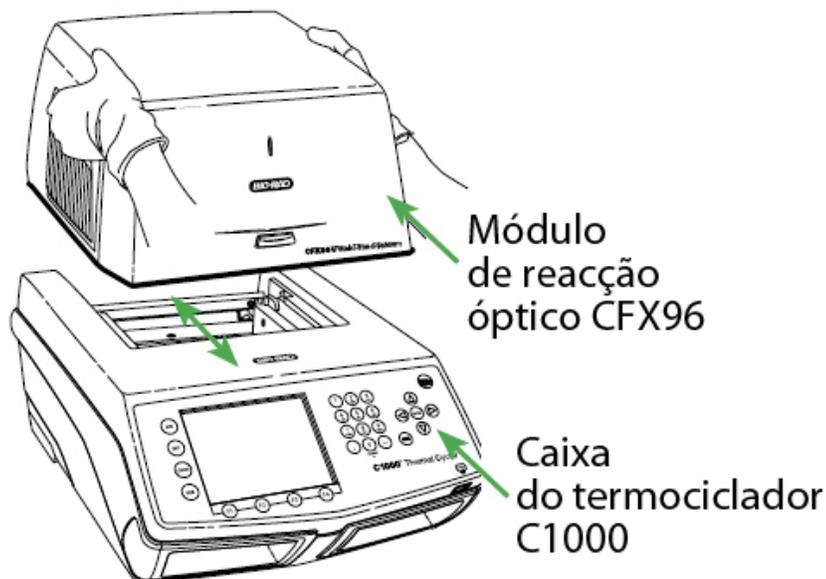


Figura 4. Colocação do módulo de reacção óptico na caixa do C1000.

3. Posicione o módulo no compartimento do módulo de reacção da caixa do C1000, deixando um espaço de cerca de 2 cm na parte frontal. Quando estiver instalado no compartimento da caixa, o módulo óptico deverá cobrir o logótipo Bio-Rad à frente do compartimento da caixa do C1000.

4. Puxe para cima a barra de bloqueio do termociclador C1000 até ficar nivelada com os lados do compartimento do módulo. Esta acção desloca o módulo para a frente, fixando-o no devido lugar (Figura 5).

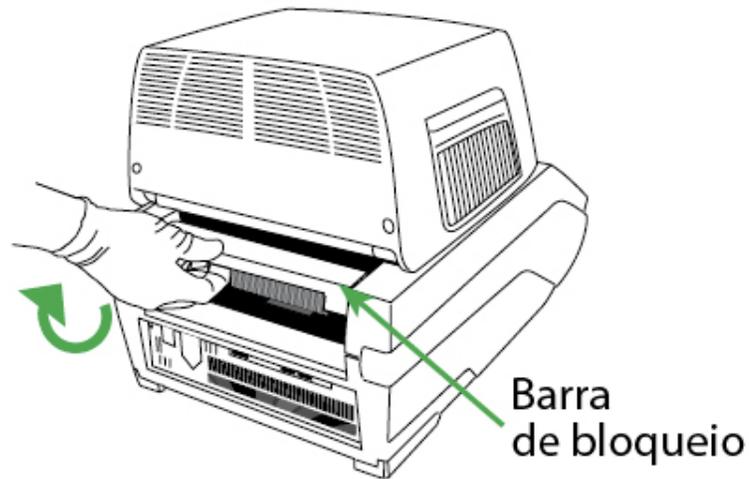


Figura 5. Bloqueio do módulo óptico no devido lugar.

5. Verifique se o módulo está completamente alojado e nivelado na C1000 base. Não deverá existir uma folga entre o módulo e a base; o espaço deve estar nivelado.
6. Ligue o cabo de alimentação à parte traseira da C1000 base (Figura 3 na página 3) e a uma tomada eléctrica de três pinos. Prima o interruptor de alimentação no painel traseiro do termociclador C1000 para iniciar o sistema.

- Siga as instruções no painel frontal do termociclador C1000 para remover o parafuso de transporte vermelho da tampa de aquecimento interior (Figura 6). Rode o parafuso no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio para o retirar do furo.

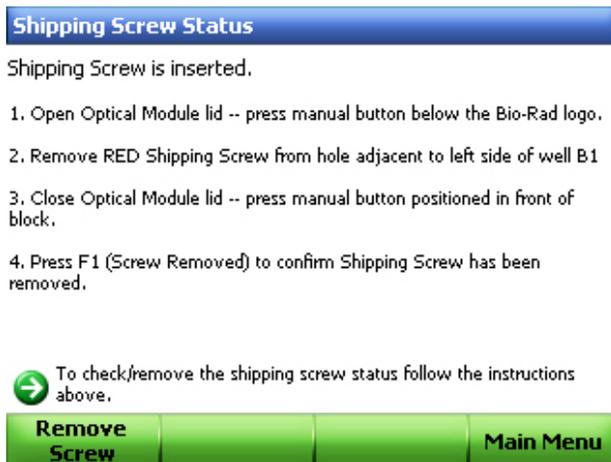


Figura 6. Instruções de remoção do parafuso de transporte.

NOTA: Se o parafuso de transporte não for retirado neste passo, será detectado pelo CFX Manager software. Siga as instruções para remover o parafuso (página 18).

SUGESTÃO: O parafuso de transporte deve ser instalado quando o módulo for transportado. Guarde este parafuso num local seguro para o transporte no futuro.

- Retire a placa de transporte do bloco do termociclador para operar.

Instalação do CFX Manager Software

O CFX Manager software é executado num computador pessoal (PC), sendo necessário para analisar dados do sistema CFX96 e para controlar o sistema CFX96 no modo de controlo por software. A Tabela 6 mostra os requisitos de sistema do computador para o CFX Manager software (versão 1.6 ou superior).

Tabela 6. Requisitos do computador para o CFX Manager software versão 1.6 ou superior.

Sistema	Mínimo	Recomendado
Sistema operativo	Windows XP Professional SP2 e superior ou Windows Vista Home Premium e superior ou Windows 7 Home Premium e superior	Windows XP Professional SP2 e superior ou Windows Vista Professional ou Windows 7 Professional
Unidade	Unidade de CD-ROM	Unidade de CD-RW
Unidade de disco rígido	10 GB	20 GB
Velocidade do processador	2,0 GHz	2,0 GHz
RAM	1 GB de RAM (2 GB para Windows Vista)	2 GB de RAM

Tabela 6. Requisitos do computador para o CFX Manager software versão 1.6 ou superior. (continuação)

Sistema	Mínimo	Recomendado
Resolução do ecrã	1024 x 768 com modo de alta qualidade de cor	1280 x 1024 com modo de alta qualidade de cor
USB	Porta USB 2.0 de alta velocidade	Porta USB 2.0 de alta velocidade

Para instalar o CFX Manager software:

1. Certifique-se de que iniciou sessão com privilégios de administrador. O software deve ser instalado no computador por um utilizador com privilégios de administrador.
2. Insira o CD do CFX Manager software na respectiva unidade do computador.
3. Deverá aparecer automaticamente a página de instalação do software. Faça duplo clique em **Install Software** (Instalar software) na página de instalação do software (Figura 7).

**Figura 7. Ecrã de instalação do software.**

4. Siga as instruções no ecrã para efectuar a instalação. Quando estiver concluída, o ícone do CFX manager software da Bio-Rad aparece no ambiente de trabalho do computador.
5. Se a página de instalação não aparecer automaticamente, faça duplo clique em **(unidade de CD):\Bio-Rad CFX** e, a seguir, abra o ficheiro Readme.txt e siga as instruções nele contidas. Consulte “Instalar o software manualmente” na página 120.

Instalar os controladores

Se o sistema CFX96 for executado no **Modo de controlo por software**, devem ser instalados controladores no computador. Utilize apenas o cabo USB fornecido, o qual tem um nível de blindagem suficiente para evitar a perda de dados.

Para instalar os controladores do sistema:

1. Para ligar a caixa do chassis ao computador, ligue um cabo USB à porta USB 2.0 A localizada na retaguarda da caixa (Figura 3 na página 3) e, em seguida, ligue o cabo à porta USB 2.0 B localizada no computador.

2. Se ainda não estiver ligado, ligue o sistema carregando no interruptor de alimentação localizado na retaguarda da caixa do C1000. Siga as instruções do assistente de detecção de hardware novo **Found New Hardware Wizard**, o qual é lançado depois de o instrumento ser detectado primeiramente pelo computador.
3. No primeiro ecrã seleccione **Yes, this time only** (Sim, só desta vez) para dar ordem ao sistema operativo do Windows para ligar à actualização do Windows para procurar software. Clique em **Next** (Seguinte).
4. Indique ao assistente para instalar o software automaticamente (**Install the software automatically**). Clique em **Next** (Seguinte) para continuar a instalar os controladores.
5. Clique em **Finish** (Terminar) no ecrã de conclusão da instalação do software quando os controladores estiverem instalados.

Ficheiros de software

O CFX Manager software guarda informações sobre experiências em ficheiros específicos (Tabela 7):

Tabela 7. Abra estes tipos de ficheiros com o CFX Manager software.

Tipo de ficheiro	Extensão	Como ver e editar o ficheiro
Protocolo	.prcl	Selecione em Experiment Setup (Configuração da experiência) e edite no Protocol Editor (Editor de protocolos)
Placa	.pltd	Selecione em Experiment Setup (Configuração da experiência) e edite no Plate Editor (Editor de placas)
Dados	.pcrd	Veja e analise na janela Data Analysis (Análise de dados)
Estudo de genes	.mgxd	Veja e analise na janela Gene Study (Estudo de genes)
Ficheiro de pré-dados independente	.zpcr	Contém leituras de fluorescência da operação independente que são convertidas num ficheiro de dados

Execução de experiências

Consumíveis de plástico recomendados

O sistema CFX96 aceita tubos e placas de perfil baixo de 0,2 ml. A Bio-Rad recomenda os consumíveis seguintes para os melhores resultados:

- **MLL-9601.** Placas de 96 poços de perfil baixo, sem saia, com poços transparentes
- **MLL-9651.** Placas de 96 poços de perfil baixo, sem saia, com poços brancos
- **HSP-9601.** Hard-Shell® Placas de 96 poços com saia, com revestimento branco e poços transparentes
- **HSP-9655.** Placas de 96 poços Hard-Shell com saia, com revestimento e poços brancos
- **TLS-0801.** Tiras de 8 tubos de perfil baixo de 0,2 ml, sem tampas, poços transparentes
- **TLS-0851.** Tiras de 8 tubos de perfil baixo de 0,2 ml, sem tampas, poços brancos
- **TCS-0803.** Tiras ópticas planas de 8 tampas, para placas e tubos de 0,2 ml
- **MSB-1001.** Vedantes adesivos Microseal® 'B', opticamente transparentes

Carregar o bloco

Para carregar as reacções no bloco, siga as sugestões abaixo:

- Clique no botão **Open Lid** (Abrir tampa), localizado no separador Start Run (Iniciar ciclo) (consulte “Separador Start Run (Iniciar ciclo)” na página 24), ou prima o botão da tampa na parte da frente do sistema (Figura 1) para iniciar a abertura da tampa motorizada
- Coloque no bloco as tiras de tubos ou microplacas de 0,2 ml com tampas vedadas. Verifique se os tubos estão completamente vedados, para evitar fugas. Para os melhores resultados, carregue volumes de amostra de 10–25 µl para o sistema CFX96

NOTA: Para garantir a precisão da análise de dados, verifique se a orientação das reacções no bloco é exactamente idêntica à orientação do conteúdo dos poços no separador Plate (Placa) do software. Se for necessário, edite o conteúdo dos poços antes, durante ou após o ciclo.

AVISO! Ao operar o sistema CFX96, equilibre sempre as tiras de tubos ou microplacas cortadas nos poços (Figura 8). Por exemplo, se executar uma tira de tubos no lado esquerdo do bloco, execute uma tira de tubos vazia (com tampas) no lado direito do bloco para equilibrar a pressão aplicada pela tampa aquecida. Se a pressão não for equilibrada, as amostras poderão evaporar-se, dando origem a ciclos falhados.

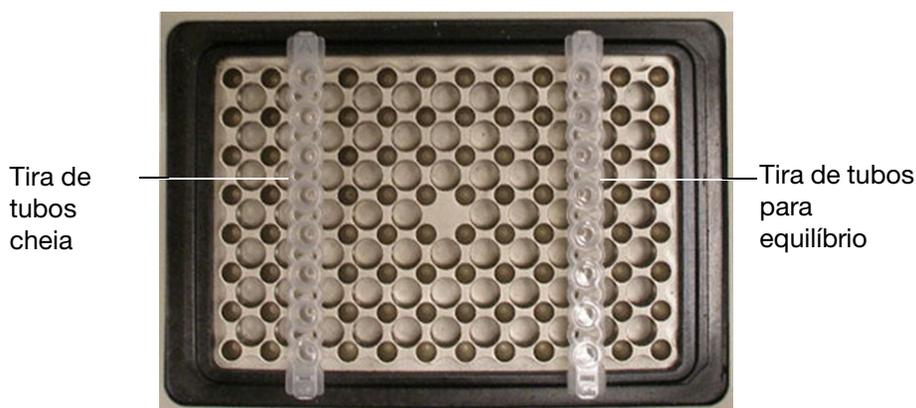


Figura 8. Equilíbrio no bloco as tiras de tubos ou microplacas cortadas.

AVISO! Certifique-se de que nada bloqueia a tampa quando esta se fecha. Embora exista um mecanismo de segurança que impede o fecho da tampa se esta detectar uma obstrução, não coloque nada no caminho da tampa quando esta se está a fechar.

Encerrar o sistema

Para encerrar o sistema CFX96, veja as sugestões seguintes:

- Após um ciclo, clique no botão de abertura da tampa na parte da frente do sistema CFX96 para aceder às amostras carregadas no bloco do termociclador
- Retire as amostras do bloco e clique no botão de fecho da tampa para fechar a tampa do sistema CFX96
- Prima o interruptor de alimentação no painel traseiro do termociclador C1000 para desligar a alimentação do sistema

2 CFX Manager™ Software

Leia este capítulo para obter informações sobre como iniciar o CFX Manager software.

- Janela principal do software (abaixo)
- Assistente de arranque (página 15)
- Painel Detected Instruments (Instrumentos detectados) (página 16)
- Janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos) (página 17)

Janela principal do software

As funcionalidades disponíveis na janela principal do software são apresentadas na Figura 9.

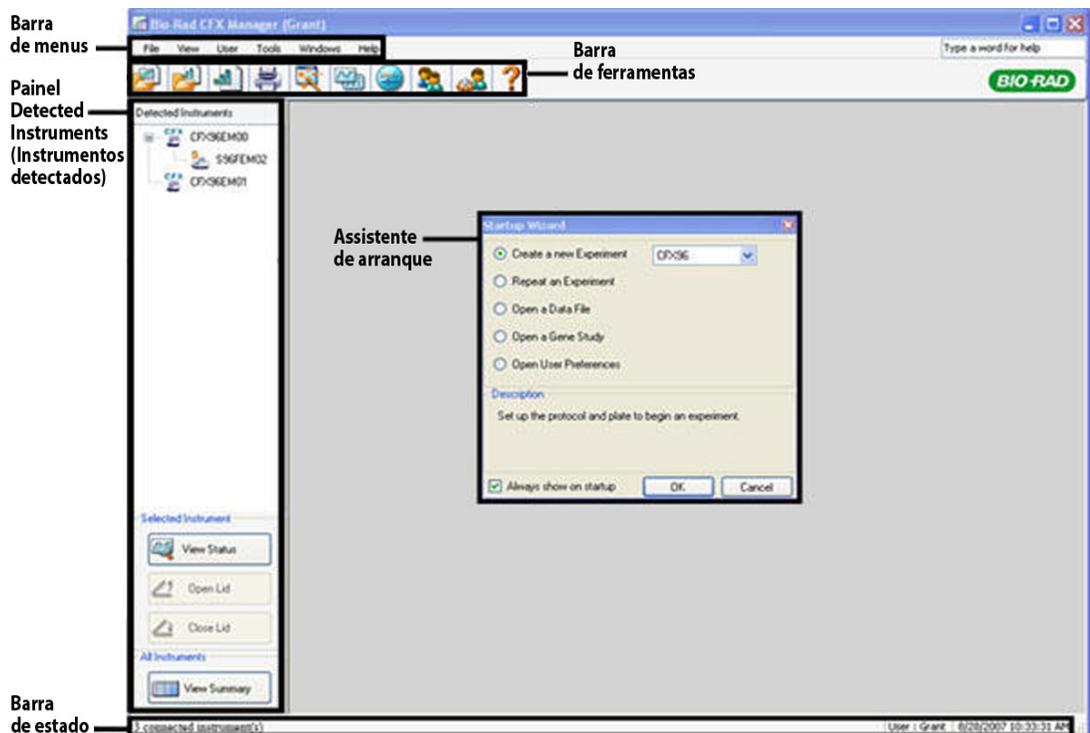


Figura 9. A janela principal do software.

Barra de menus

A barra de menus da janela principal do software apresenta os itens indicados na Tabela 8.

Tabela 8. Itens da barra de menus da janela principal do software.

Item de menu	Comando	Função
File (Ficheiro)	New (Novo)	Criar um novo protocolo, placa, experiência ou estudo de genes
	Open (Abrir)	Abrir ficheiros existentes, incluindo ficheiros de protocolo (.prcl), placa (.pltd), dados (.pcrd) e estudo de genes (.mgxd), além de ficheiros de execução independentes (.zpcr)
	Recent Data Files (Ficheiros de dados recentes)	Ver uma lista dos dez últimos ficheiros de dados visualizados, e seleccionar um para abrir em Data Analysis (Análise de dados)
	Repeat an Experiment (Repetir uma experiência)	Abrir a janela Experiment Setup (Configuração da experiência) com o protocolo e a placa de um ciclo concluído para repetir rapidamente o ciclo
	Exit (Sair)	Sair do programa de software
View (Ver)	Application Log (Registo de aplicações)	Mostrar o registo de aplicações do software
	Run Reports (Relatórios de ciclos)	Seleccionar numa lista um relatório de ciclo para análise
	Startup Wizard (Assistente de arranque)	Abrir o assistente de arranque
	Experiment Setup (Configuração da experiência)	Abrir a janela Experiment Setup (Configuração da experiência)
	Instrument Summary (Resumo do instrumento)	Abrir a janela Instrument Summary (Resumo do instrumento)
	Detected Instruments (Instrumentos detectados)	Mostrar ou ocultar o painel Detected Instruments (Instrumentos detectados)
	Toolbar (Barra de ferramentas)	Mostrar ou ocultar a barra de ferramentas da janela principal do software
	Status Bar (Barra de estado)	Mostrar ou ocultar a barra de estado da janela principal do software

Tabela 8. Itens da barra de menus da janela principal do software. (continuação)

Item de menu	Comando	Função
User (Utilizador)	Select User (Seleccionar o utilizador)	Abrir a janela Select User (Seleccionar o utilizador) para mudar de utilizador de software
	Change Password (Alterar password)	Alterar a password de utilizador
	User Preferences (Preferências do utilizador)	Abrir a janela User Preferences (Preferências do utilizador)
	User Administration (Administração de utilizadores)	Gerir utilizadores na janela User Administration (Administração de utilizadores)
Tools (Ferramentas)	Dye Calibration Wizard (Assistente de calibração de fluorocromo)	Abrir a janela Dye Calibration (Calibração de fluorocromo) para calibrar um instrumento para um novo fluoróforo
	Protocol AutoWriter	Abrir a janela Protocol AutoWriter para criar um novo protocolo
	Ta Calculator (Calculador de temperatura)	Abrir a janela Ta Calculator (Calculador de temperatura) para calcular a temperatura de annealing (hibridização) de preparadores
	View Block Status Log (Ver registo de estado do bloco)	Ver um registo do bloco do termociclador
	Application Data Folder (Pasta de dados de aplicações)	Abrir a pasta Application Data (Dados de aplicações) para ver ficheiros de software
	User Data Folder (Pasta de dados do utilizador)	Abrir a pasta User Data (Dados do utilizador) para ver ficheiros de dados, de placas e de protocolos
	Properties All Instruments (Propriedades de todos os instrumentos)	Ver as propriedades de todos os instrumentos detectados, incluindo números de série
	Zip Data and Log Files (Comprimir ficheiros de dados e de registo)	Escolher e comprimir ficheiros seleccionados num ficheiro zip, para armazenar ou enviar por e-mail
	Options (Opções)	Configurar as definições de e-mail do software

Tabela 8. Itens da barra de menus da janela principal do software. (continuação)

Item de menu	Comando	Função
Windows (Janelas)	Cascade (Em cascata)	Dispor as janelas de software em cascata
	Tile Vertical (Dispor na vertical)	Dispor as janelas de software de cima para baixo
	Tile Horizontal (Dispor na horizontal)	Dispor as janelas de software da direita para a esquerda
	Close All (Fechar todas)	Fechar todas as janelas de software abertas
Help (Ajuda)	Contents (Índice)	Abrir a ajuda do software (Help) para obter mais informações sobre a execução de PCR e PCR em tempo real
	Index (Índice remissivo)	Ver o índice remissivo na Ajuda (Help) do software
	Search (Procurar)	Fazer pesquisas na Ajuda (Help) do software
	Gene Expression Gateway Website	Abrir um website para obter informações sobre a execução de experiências de PCR e PCR em tempo real
	PCR Reagents Website	Ver um website com uma lista de consumíveis Bio-Rad para reagentes PCR e PCR em tempo real
	PCR Plastic Consumables Website	Ver um website com uma lista de consumíveis Bio-Rad para experiências PCR e PCR em tempo real
	Software Updates (Actualizações de software)	Procurar actualizações de software da Bio-Rad
	About (Acerca)	Abrir uma janela para ver a versão do software

Botões da barra de ferramentas

Clique nos botões da barra de ferramentas da janela principal do software (Tabela 9) para aceder rapidamente a comandos de software comuns.

Tabela 9. Botões da barra de ferramentas da janela principal do software.

Botão	Nome do botão	Função
	Abrir um ficheiro de dados	Abrir uma janela do browser para localizar um ficheiro de dados (extensão *.pcrd) e abri-lo na janela Data Analysis (Análise de dados) (página 61)
	Abrir um estudo de genes	Abrir uma janela do browser para localizar um ficheiro de estudo de genes (extensão .mgxd) e abri-lo na janela Gene Study (Estudo de genes) (página 98)

Tabela 9. Botões da barra de ferramentas da janela principal do software.

Botão	Nome do botão	Função
	Criar um novo estudo de genes	Abrir a janela Gene Study (Estudo de genes) (página 98) para adicionar ficheiros e criar um novo estudo
	Imprimir	Imprimir a janela de software actual
	Assistente de arranque	Abrir o assistente de arranque (Startup Wizard) que estabelece a ligação a funções de software comuns (página 16)
	Configuração da experiência	Abrir a janela Experiment Setup (Configuração da experiência) para executar uma experiência (página 21)
	Protocol AutoWriter	Abrir a janela Protocol AutoWriter (AutoWriter de protocolos) para criar um novo protocolo (página 35)
	Seleccionar utilizador	Abrir a janela Select User (Seleccionar o utilizador) para mudar de utilizador de software (consulte “Iniciar sessão ou seleccionar utilizador” na página 105)
	Preferências do utilizador	Abrir a janela User Preferences (Preferências do utilizador) (página 106)
	Ajuda	Abrir a janela da ajuda do software (Help) para obter mais informações sobre a execução de PCR e PCR em tempo real

Assistente de arranque

O assistente de arranque aparece automaticamente quando o CFX Manager software é aberto inicialmente (Figura 9). Caso não seja apresentado, clique no botão do **Assistente de arranque** na barra de ferramentas da janela do software principal.

Opções do assistente de arranque:

- **Create a new Experiment (página 21).** Configurar o protocolo e a placa para iniciar uma nova experiência
- **Repeat an Experiment.** Configurar uma experiência com o protocolo e a placa de um ciclo concluído. Se for necessário, poderá editar a experiência antes de executar o ciclo
- **Open a Data File (página 61).** Abrir um ficheiro de dados para analisar resultados
- **Open a Gene Study (página 98).** Abrir um estudo de expressão de genes com vários ficheiros para analisar resultados de várias experiências de expressão de genes

- **Open User Preferences (página 106).** Abrir a janela User Preferences (Preferências do utilizador) para personalizar as definições de software

Painel Detected Instruments (Instrumentos detectados)

Os instrumentos ligados são apresentados no painel **Detected Instruments** (Instrumentos detectados) (Figura 10). Esta lista mostra cada instrumento como um ícone cuja designação é um número de série (predefinição).

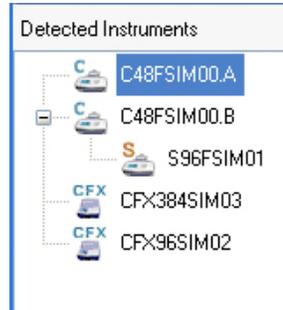


Figura 10. Instrumentos mostrados no painel Detected Instruments (Instrumentos detectados).

Clique com o botão direito do rato no bloco ou ícone do instrumento para seleccionar uma das seguintes opções:

- **View Status (Ver estado).** Abrir a janela Run Details (Detalhes do ciclo) para verificar o estado do bloco do instrumento seleccionado
- **Flash Block Indicator (Indicador de bloco intermitente).** O indicador LED pisca no instrumento
- **Open Lid (Abrir tampa).** Abrir a tampa motorizada do bloco do instrumento seleccionado
- **Close Lid (Fechar tampa).** Fechar a tampa motorizada do bloco do instrumento seleccionado
- **Rename (Mudar o nome).** Mudar o nome do instrumento
- **Properties (Propriedades).** Abrir a janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos)
- **Collapse All (Recolher todos).** Recolher a lista de instrumentos no painel Detected Instruments (Instrumentos detectados)
- **Expand All (Expandir todos).** Expandir a lista de instrumentos no painel Detected Instruments (Instrumentos detectados)

Também é possível controlar um bloco, clicando para tal num ícone de bloco de instrumento no painel Detected Instruments (Instrumentos detectados) e clicando depois num botão no painel Selected Instruments (Instrumentos seleccionados) (Figura 11).

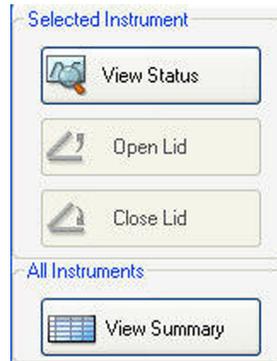


Figura 11. Botões na parte inferior do painel Detected Instruments (Instrumentos detectados).

- Clique em **View Status** (Ver estado) para abrir a janela Run Details (Detalhes do ciclo) e verificar o estado do bloco do instrumento seleccionado
- Clique em **Open Lid** (Abrir tampa) para abrir as tampas motorizadas do instrumento seleccionado
- Clique em **Close Lid** (Fechar tampa) para fechar as tampas motorizadas do instrumento seleccionado
- Clique em **View Summary** (Ver resumo) para abrir a janela Instrument Summary (Resumo do instrumento)

Se for detectado apenas um instrumento, o botão de **View Summary** (Ver resumo) não aparece. Para ver a janela Instrument Summary (Resumo do instrumento) em relação a um único instrumento, seleccione **View > Instrument Summary** (Ver > Resumo do instrumento).

Barra de estado

O lado esquerdo da barra de estado, na parte inferior da janela principal do software, apresenta o estado actual dos instrumentos. Observe o lado direito da barra de estado para ver o nome do utilizador, a data e a hora actuais.

Clique e arraste o canto direito da barra de estado para redimensionar a janela principal.

Janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos)

Para abrir a janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos) e ver informações sobre um instrumento, clique com o botão direito do rato no ícone do instrumento no painel Detected Instruments (Instrumentos detectados) (Figura 10 na página 16).

Separador Properties (Propriedades)

O separador Properties (Propriedades) mostra números de série importantes relativos ao instrumento ligado, incluindo o termociclador e o módulo de reacção. São também mostradas as versões de firmware. O nome predefinido de um instrumento é o número de série do termociclador C1000, o qual aparece em muitas localizações, incluindo o painel Detected Instruments (Instrumentos detectados) (Figura 12).

Para mudar o nome do instrumento com vista a facilitar a sua identificação, siga as instruções seguintes:

- No separador Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos), digite um nome na caixa **Rename** (Mudar o nome) na parte superior do separador Properties (Propriedades) e clique no botão **Rename** (Mudar o nome) para guardar o novo nome

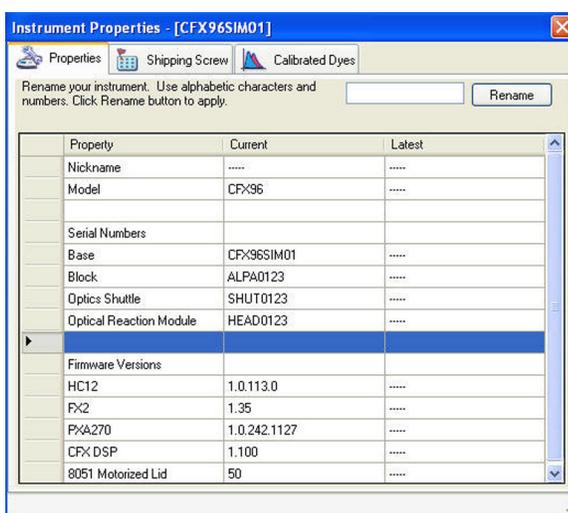


Figura 12. Janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos)

Separador Shipping Screw (Parafuso de transporte)

O separador Shipping Screw (Parafuso de transporte) inclui instruções de instalação e remoção do parafuso de transporte vermelho. Para evitar danificar os módulos de reacção ópticos, instale o parafuso de transporte sempre que transportar o sistema CFX96.

NOTA: Se o parafuso de transporte for detectado pelo software, a janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos) abre-se automaticamente com o separador Shipping Screw (Parafuso de transporte) em primeiro plano. Siga as instruções para remover o parafuso. Não é possível realizar um ciclo com o parafuso de transporte instalado.

A informação incluída neste separador muda consoante o parafuso de transporte esteja instalado ou removido. Por exemplo, para instalar o parafuso de transporte, clique no botão **Install Shipping Screw** (Instalar parafuso de transporte) e siga as instruções apresentadas no separador (Figura 13).

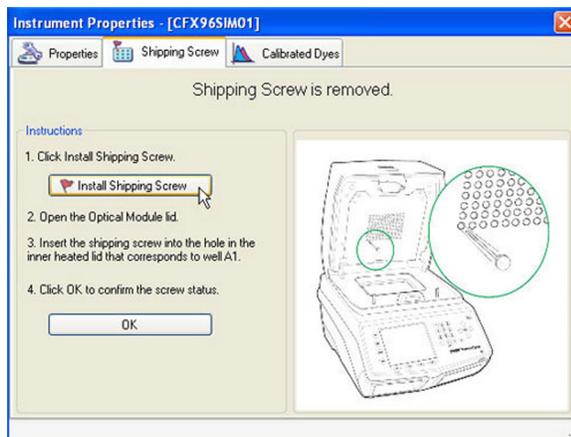


Figura 13. Instruções de instalação do parafuso de transporte.

Separador Calibrated Dyes (Fluorocromos calibrados)

Abra o separador Calibrated Dyes (Fluorocromos calibrados) para ver a lista de placas e fluoróforos calibrados para o instrumento seleccionado (Figura 14). Para ver informações detalhadas de uma calibração, clique no respectivo botão **Info**.

	Fluorophore	Channel	Plate Type	Calibrated By	Date	Errors	Detail
1	Cal FL Gold	1	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
2	Cal FL Gold	1	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
3	Cal FL Red	1	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
4	Cal FL Red	1	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
5	Cy5	4	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
6	Cy5	4	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
7	FAM	1	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
8	FAM	1	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
9	HEX	2	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
10	HEX	2	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
11	Quasar 670	4	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
12	Quasar 670	4	BR White	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
13	Quasar 705	5	BR Clear	Factory	5/30/2007 6:35:53 PM	<input checked="" type="checkbox"/>	Info

Figura 14. Separador Calibrated Dyes (Fluorocromos calibrados) na janela Instrument Properties (Propriedades dos instrumentos).

3 Execução de experiências

Leia este capítulo para obter informações sobre a execução de experiências utilizando o CFX Manager™ software:

- Janela Experiment Setup (Configuração da experiência) (abaixo)
- Separador Protocol (Protocolo) (página 22)
- Separador Plate (Placa) (página 23)
- Separador Start Run (Iniciar ciclo) (página 24)
- Janela Run Details (Detalhes do ciclo) (página 26)

Janela Experiment Setup (Configuração da experiência)

A janela Experiment Setup (Configuração da experiência) proporciona um acesso rápido aos ficheiros e definições necessários para a configuração e execução de uma experiência. Para abrir a janela Experiment Setup (Configuração da experiência), utilize uma das seguintes opções:

- Clique na opção **Create a New Experiment** (Criar uma nova experiência) no assistente de arranque (página 15)
- Clique no botão **Experiment Setup** (Configuração da experiência) na barra de ferramentas principal do software (página 21)
- Seleccione **File > New > Experiment** (Ficheiro > Novo > Experiência) na barra de menus principal do software (página 12)

A janela Experiment Setup (Configuração da experiência) apresenta três separadores:

- **Protocol.** Clique no separador Protocol (Protocolo) para seleccionar um protocolo existente a executar ou editar, ou para criar um novo protocolo na janela Protocol Editor (Editor de protocolos) (página 29)
 - **Plate.** Clique no separador Plate (Placa) para seleccionar uma placa existente a executar ou editar, ou para criar uma nova placa na janela Plate Editor (Editor de placas) (página 39)
 - **Start Run.** Clique no separador Start Run (Iniciar ciclo) (página 24) para verificar as definições do ciclo, seleccionar um ou mais blocos de instrumentos e iniciar o ciclo
- NOTA: Se o protocolo seleccionado actualmente no separador Protocol (Protocolo) não incluir um passo com uma leitura de placa para análise por PCR em tempo real, o separador Plate (Placa) estará oculto. Para ver o separador Plate (Placa),

adicione uma “Plate Read” (Leitura de placa) (página 32) em pelo menos um passo do protocolo

NOTA: Para iniciar uma nova experiência a partir de um ciclo anterior, seleccione **File > Repeat an Experiment** (Ficheiro > Repetir uma experiência) na barra de menus principal do software. A seguir, seleccione o ficheiro de dados (.pcrd) para a experiência que pretende repetir.

A janela Experiment Setup (Configuração da experiência) abre-se com o separador Protocol (Protocolo) em primeiro plano (Figura 15). Para abrir outro separador, clique nesse separador ou clique nos botões **Prev** (Anterior) e **Next** (Seguinte) na parte inferior da janela.

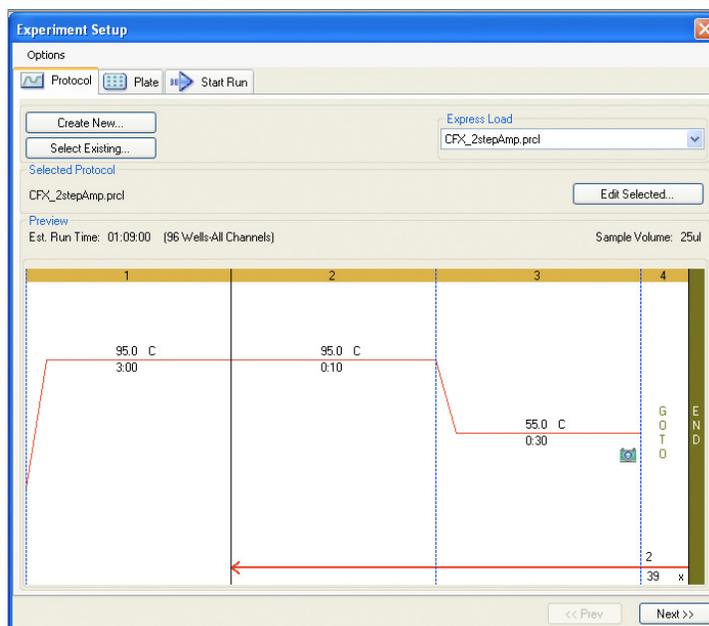


Figura 15. A janela Experiment Setup (Configuração da experiência), incluindo os separadores Protocol (Protocolo), Plate (Placa) e Start Run (Iniciar ciclo).

Separador Protocol (Protocolo)

O separador Protocol (Protocolo) mostra uma pré-visualização do ficheiro de protocolo seleccionado carregado na configuração da experiência (Figura 15). Um ficheiro de protocolo contém as instruções para os passos da temperatura do instrumento e as opções do instrumento que controlam a velocidade de rampa e a temperatura da tampa.

Selecione uma das opções seguintes para seleccionar um protocolo existente, criar um novo protocolo ou editar o protocolo seleccionado actualmente:

- **Botão Create New.** Abrir o Protocol Editor (Editor de protocolos) para criar um novo protocolo
- **Botão Select Existing.** Abrir uma janela do browser para seleccionar e carregar um ficheiro de protocolo existente (extensão .prcl) no separador Protocol (Protocolo)
- **Menu pendente Express Load.** Seleccionar rapidamente um protocolo para carregá-lo no separador Protocol (Protocolo)

SUGESTÃO: Para adicionar ou eliminar protocolos no menu **Express Load** (Carregar rápido), adicione ou elimine ficheiros (extensão .prcl) na pasta **Express Load** (Carregar rápido). Para localizar esta pasta, seleccione **Tools > User Data**

Folder (Ferramentas > Pasta de dados do utilizador) na barra de menus da janela principal do software

- **Botão Edit Selected.** Abrir o protocolo seleccionado actualmente no Protocol Editor

Ciclos End Point Only (Só de ponto final)

Para executar um protocolo que contenha apenas um passo de aquisição de dados de ponto final, seleccione **Options > End Point Only Run** (Opções > Ciclo só de ponto final) em Options (Opções) na barra de menus da janela Experiment Setup (Configuração da experiência). O protocolo de ponto final predefinido, que inclui dois ciclos de 60,0°C durante 30 segundos, é carregado no separador Protocol (Protocolo). Para alterar a temperatura do passo ou o volume de amostra para o ciclo só de ponto final, clique no separador **Start Run** (Iniciar ciclo) e edite a temperatura de passo (**Step Temperature**) ou o volume de amostra (**Sample Volume**).

Separador Plate (Placa)

O separador Plate (Placa) mostra uma pré-visualização do ficheiro de placa seleccionado carregado na configuração da experiência (Figura 16). Numa experiência de PCR em tempo real, o ficheiro de placa contém uma descrição do conteúdo de cada poço, do modo de leitura e do tipo de placa. O CFX Manager software utiliza essas descrições para a recolha e análise de dados.

Selecione uma das opções seguintes para seleccionar uma placa existente, criar uma nova placa ou editar a placa seleccionada actualmente:

- **Botão Create New.** Abrir o Plate Editor (Editor de placas) para criar uma nova placa
- **Botão Select Existing.** Abrir uma janela do browser para seleccionar e carregar um ficheiro de placa existente (extensão .pltd) no separador Plate (Placa)
- **Menu pendente Express Load.** Seleccionar rapidamente uma placa para carregá-la no separador Plate (Placa)

SUGESTÃO: Para adicionar ou eliminar placas no menu **Express Load** (Carregar rápido), adicione ou elimine ficheiros (extensão .pltd) na pasta **Express Load** (Carregar rápido). Para localizar esta pasta, seleccione **Tools > User Data Folder** (Ferramentas > Pasta de dados do utilizador) na barra de menus da janela principal do software.

- **Botão Edit Selected.** Abrir a placa seleccionada actualmente no Plate Editor

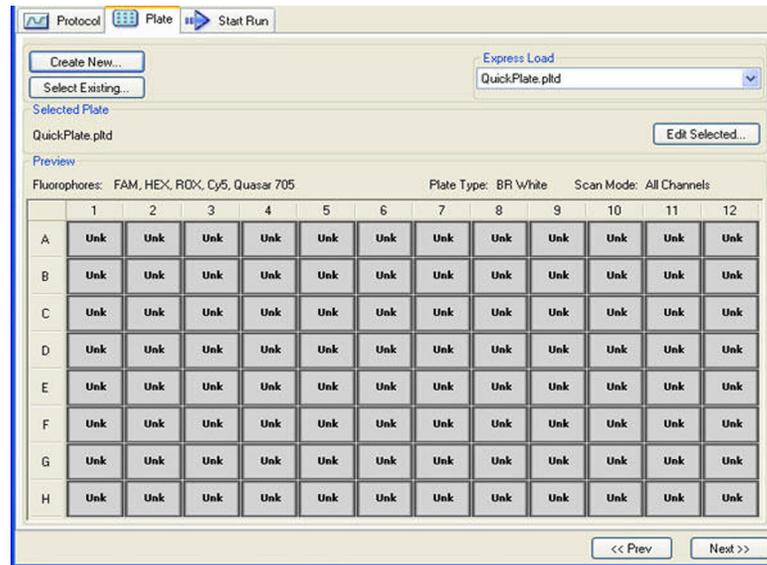


Figura 16. Janela do separador Plate (Placa).

Separador Start Run (Iniciar ciclo)

O separador Start Run (Iniciar ciclo) (Figura 17) inclui uma secção para verificar a informação sobre o ciclo que irá ser iniciado, incluindo os ficheiros de protocolo e placa seleccionados, e uma secção para seleccionar o bloco do instrumento.

- **Painel Run Information (Informação do ciclo).** Ver os ficheiros de protocolo e de placa seleccionados e a definição do modo de leitura (Scan Mode) de aquisição de dados. Introduza notas opcionais sobre a experiência na caixa **Notes** (Notas)

- **Painel Start Run on Selected Block(s) (Iniciar ciclo no(s) bloco(s) seleccionado(s)).** Selecciona um ou mais blocos, edite os parâmetros do ciclo (se necessário) e clique no botão **Start Run** (Iniciar ciclo) para iniciar a experiência

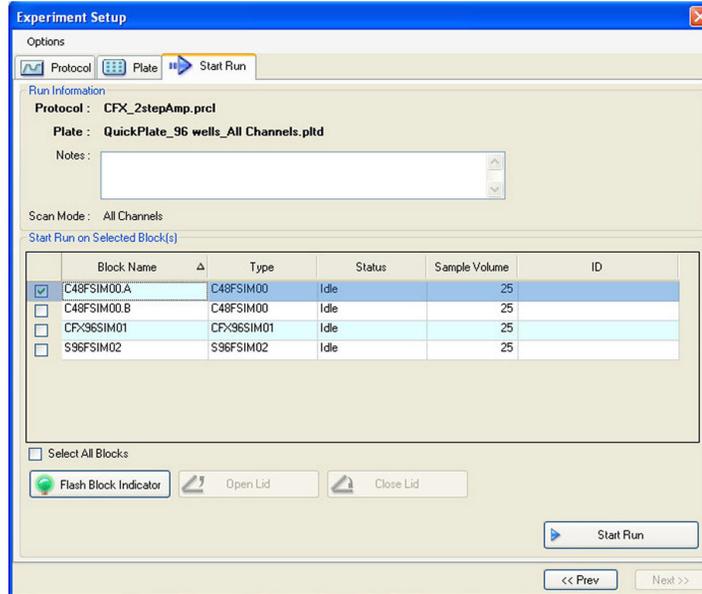


Figura 17. O separador Start Run (Iniciar ciclo).

Para adicionar ou remover parâmetros do ciclo da folha de cálculo no painel **Start Run on Selected Block(s)** (Iniciar ciclo no(s) bloco(s) seleccionado(s)), clique com o botão direito do rato na lista e selecciona uma opção do menu para apresentar. Para seleccionar o valor a alterar, clique no texto dentro da célula para seleccioná-lo e digite na célula, ou selecciona um novo parâmetro no menu pendente. Os parâmetros editáveis incluem:

- **Temperatura da tampa.** Ver a temperatura da tampa. Anula a temperatura predefinida da tampa seleccionando o texto e digitando uma nova temperatura
AVISO! A alteração da temperatura da tampa pode influenciar os resultados e resultar em ciclos falhados.

Botões de controlo do instrumento

Clique nos botões seguintes no separador Start Run (Iniciar ciclo) para operar remotamente os instrumentos seleccionados:

- **Start Run.** Iniciar a experiência nos blocos de instrumentos seleccionados
- **Flash Block Indicator.** O indicador LED pisca nos blocos de instrumentos seleccionados
- **Open Lid.** Abrir a tampa motorizada nos blocos de instrumentos seleccionados
- **Close Lid.** Fechar a tampa motorizada nos blocos de instrumentos seleccionados

Janela Run Details (Detalhes do ciclo)

Ao clicar no botão **Start Run** (Iniciar ciclo), o CFX Manager software sugere que guarde o nome do ficheiro de dados e, a seguir, abre a janela Run Details (Detalhes do ciclo). Analise a informação nesta janela para monitorizar o progresso do ciclo.

- **Separador Run Status (Estado do ciclo).** Verificar o estado actual do protocolo, abrir a tampa, fazer uma pausa num ciclo, adicionar repetições, ignorar passos ou parar o ciclo
- **Separador Real-Time Status (Estado de tempo real).** Ver os dados de fluorescência da PCR em tempo real à medida que são recolhidos
- **Separador Time Status (Estado do tempo).** Ver em ecrã total um temporizador de contagem decrescente para o protocolo

A Figura 18 mostra as funções da janela Run Details (Detalhes do ciclo).

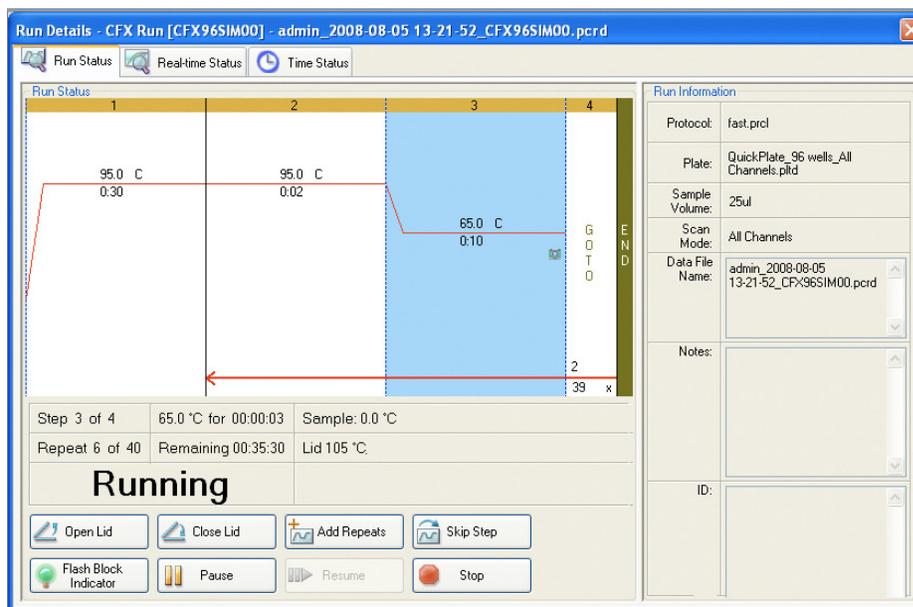


Figura 18. Janela Run Details (Detalhes do ciclo).

Separador Run Status (Estado do ciclo)

O separador Run Status (Estado do ciclo) (Figura 18) mostra o estado actual de um ciclo em curso na janela Run Details (Detalhes do ciclo) e apresenta botões (página 27) para controlar a tampa e alterar o ciclo em curso.

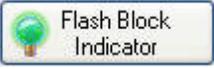
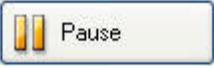
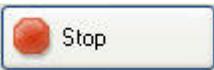
- **Painel Run Status (Estado do ciclo).** Apresenta o progresso actual do protocolo, incluindo o passo actual, a repetição GOTO actual, temperatura do bloco, tempo de espera remanescente para o passo actual, temperatura da amostra, temperatura da tampa e do vaivém
- **Botões de estado do ciclo.** Clique num dos botões para operar remotamente o instrumento ou para interromper o protocolo actual
- **Painel Run Information (Informação do ciclo).** Apresenta detalhes da experiência

BOTÕES DO SEPARADOR RUN STATUS (ESTADO DO CICLO)

Clique num dos botões mostrados na Tabela 10 para operar o instrumento a partir do software, ou para alterar o ciclo em curso.

NOTA: Alterar o protocolo durante o ciclo (por exemplo, adicionar repetições), não altera o ficheiro de protocolo associado ao ciclo. Estas acções são registadas no registo do ciclo (Run Log).

Tabela 10. Botões do estado do ciclo e respectivas funções.

Botão	Função
 Open Lid	<p>Abrir a tampa motorizada nos instrumentos seleccionados</p> <p>AVISO! Abrir a tampa durante um ciclo faz uma pausa no ciclo durante o passo actual e pode alterar os dados.</p>
 Close Lid	Fechar a tampa motorizada nos instrumentos seleccionados
 Add Repeats	Adicionar mais repetições ao passo GOTO actual do protocolo. Este botão só está disponível quando está em execução um passo GOTO
 Skip Step	Ignorar o passo actual do protocolo. Se um passo GOTO for ignorado, o software verifica se pretende ignorar o ciclo GOTO total e avançar para o próximo passo do protocolo
 Flash Block Indicator	O indicador LED pisca no instrumento seleccionado para identificar os blocos seleccionados
 Pause	<p>Fazer uma pausa no protocolo</p> <p>NOTA: Esta acção é registada no registo do ciclo (Run Log).</p>
 Resume	Retomar um protocolo que estava em pausa
 Stop	<p>Parar o ciclo antes da conclusão do protocolo</p> <p>AVISO! Parar prematuramente um ciclo pode alterar os dados e ter como consequência a falha da experiência.</p>

Separador Real-Time Status (Estado do tempo real)

O separador **Real-time Status** (Estado do tempo real) (Figura 19) mostra os dados de PCR em tempo real recolhidos em cada ciclo durante o protocolo após as duas primeiras leituras de placa. Este separador mostra também o selector de poços e texto que descreve o estado do protocolo na parte inferior da janela.

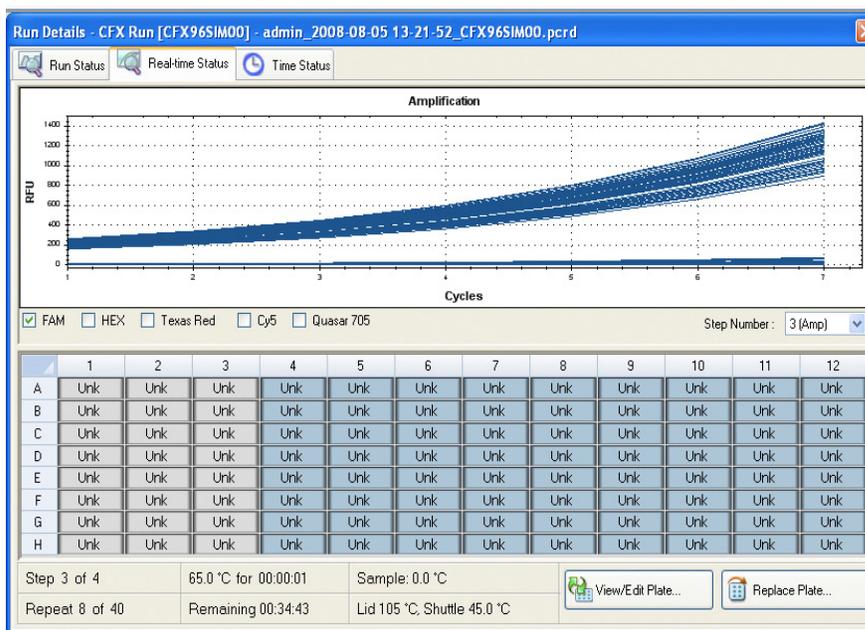


Figura 19. O separador Real-time Status (Estado do tempo real) mostra os dados durante um ciclo.

SUBSTITUIR UM FICHEIRO DE PLACA

Durante um ciclo, substitua o ficheiro de placa clicando no botão **Replace Plate** (Substituir placa) (Figura 19) no separador **Real-time Status** (Estado do tempo real). Selecciona o novo ficheiro de placa (.pltd) na lista do browser Windows.

NOTA: O CFX Manager software verifica o modo de leitura e o tamanho da placa para o ficheiro de placa; estes devem coincidir com as definições do ciclo iniciadas durante a experiência.

SUGESTÃO: A substituição de um ficheiro de placa é especialmente útil se iniciar um ciclo com um ficheiro Quick Plate (Placa rápida) na pasta Express Load (Carregar rápido).

Separador Time Status (Estado do tempo)

O separador **Time Status** (Estado do tempo) mostra um temporizador de contagem decrescente para o ciclo actual.

4 Protocolos

Leia o capítulo seguinte para obter informações sobre a criação e edição de ficheiros de protocolos:

- Janela Protocol Editor (Editor de protocolos) (abaixo)
- Controlos do Protocol Editor (página 31)
- Modo de controlo da temperatura (página 35)
- Protocol AutoWriter (página 35)

Janela Protocol Editor (Editor de protocolos)

Um protocolo dá instruções ao instrumento para controlar os passos da temperatura, a temperatura da tampa e outras opções do instrumento. Abra a janela Protocol Editor (Editor de protocolos) para criar um novo protocolo ou para editar o protocolo actualmente seleccionado no separador Protocol (Protocolo). Depois de criar ou editar um protocolo no Protocol Editor, clique em **OK** para carregar o ficheiro do protocolo na janela Experiment Setup (Configuração da experiência) e executá-lo.

AVISO! Confirme sempre que o protocolo carregado está correcto no separador Start Run (Iniciar ciclo) antes de iniciar o ciclo. Executar um ciclo com o protocolo errado pode alterar os dados ou resultar num ciclo falhado.

Abrir o Protocol Editor (Editor de protocolos)

Para abrir o Protocol Editor (Editor de protocolos), utilize uma das seguintes opções:

- Para criar um novo protocolo, seleccione **File > New > Protocol** (Ficheiro > Novo > Protocolo) ou clique no botão **Create New** (Criar novo) no separador Protocol (Protocolo) (página 22)
- Para abrir um protocolo existente, seleccione **File > Open > Protocol** (Ficheiro > Abrir > Protocolo) ou clique no botão **Open Existing** (Abrir existente) no separador **Protocol** (Protocolo) (página 22)
- Para editar o protocolo actual no separador Protocol (Protocolo), clique no botão **Edit Selected** (Editar seleccionado) no separador Protocol (página 22)

SUGESTÃO: Para alterar as predefinições na janela Protocol Editor, introduza as alterações no separador **Protocol** (Protocolo) na janela **User Preferences** (Preferências do utilizador) (página 106)

Janela Protocol Editor (Editor de protocolos)

A janela **Protocol Editor** (Editor de protocolos) (Figura 20) inclui as funções seguintes:

- **Barra de menus.** Seleccionar definições para o protocolo
- **Barra de ferramentas.** Seleccionar opções de edição do protocolo
- **Protocolo.** Ver o protocolo seleccionado na forma de gráfico (em cima) e como texto (em baixo). Clique na temperatura ou no tempo de espera na visualização de gráfico ou de texto de qualquer passo para introduzir um novo valor
- **Botões do Protocol Editor.** Para editar o protocolo, clique num dos botões à esquerda da visualização de texto

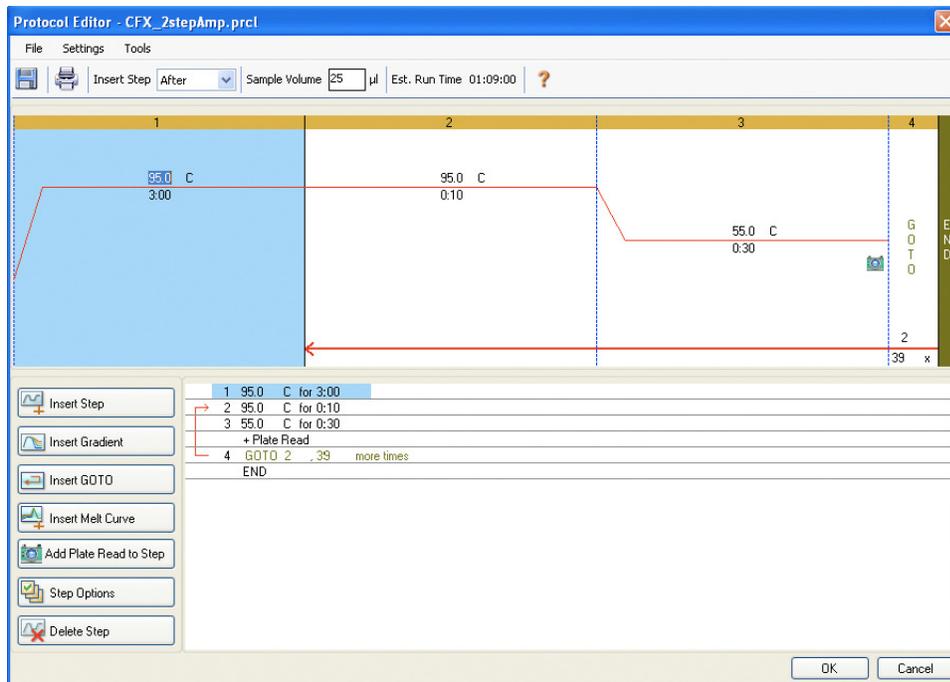


Figura 20. Janela Protocol Editor (Editor de protocolos) com botões de edição de protocolos.

Barra de menus do Protocol Editor (Editor de protocolos)

A barra de menus da janela Protocol Editor (Editor de protocolos) apresenta os itens de menu indicados na Tabela 11.

Tabela 11. Barra de menus do Protocol Editor (Editor de protocolos).

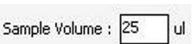
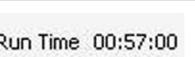
Item de menu	Comando	Função
File (Ficheiro)	Save (Guardar)	Guardar o protocolo actual
	Save As (Guardar como)	Guardar o protocolo actual com um novo nome ou noutra localização
	Close (Fechar)	Fechar o Protocol Editor (Editor de protocolos)
Settings (Definições)	Lid Settings (Definições da tampa)	Abrir a janela Lid Settings (Definições da tampa) para alterar ou definir a temperatura da tampa

Tabela 11. Barra de menus do Protocol Editor (Editor de protocolos). (continuação)

Item de menu	Comando	Função
Tools (Ferramentas)	Gradient Calculator (Calculador de gradiente)	Seleccionar o tipo de bloco para um passo do gradiente.
	Run-time Calculator (Calculador de tempo de execução)	Seleccionar o instrumento e o modo de leitura a utilizar para calcular o tempo de execução previsto na janela Experiment Setup (Configuração da experiência)

A barra de ferramentas da janela Protocol Editor (Editor de protocolos) permite o acesso rápido a funções importantes. A Tabela 12 mostra as funções dos botões da barra de ferramentas do Protocol Editor.

Tabela 12. Botões da barra de ferramentas do Protocol Editor (Editor de protocolos).

Botão e menus da barra de ferramentas	Nome	Função
	Save (Guardar)	Guardar o ficheiro de protocolo actual
	Print (Imprimir)	Imprimir a janela seleccionada
	Insert Step (Inserir passo)	Selecione After (Depois) ou Before (Antes) para inserir um passo relativo ao passo actualmente realçado
	Sample Volume (Volume de amostra)	Introduza um volume de amostra em µl entre 0 e 50. O volume de amostra determina o modo de controlo da temperatura (página 35). Introduza zero (0) para seleccionar o modo de bloco
	Run Time (Tempo de execução)	Ver um tempo de execução previsto com base nos passos do protocolo e na velocidade de rampa
	Help (Ajuda)	Abrir a ajuda (Help) do software para obter mais informações sobre protocolos

Controlos do Protocol Editor (Editor de protocolos)

A janela Protocol Editor (Editor de protocolos) apresenta botões para editar o protocolo na parte inferior esquerda do ecrã. Em primeiro lugar, seleccione e realce um passo do protocolo clicando com o ponteiro do rato. A seguir, clique num dos botões do Protocol Editor (Editor de protocolos) no lado inferior esquerdo da janela. A localização para a inserção de um novo passo (**Before** (antes)) ou (**After** (depois)) do passo seleccionado actualmente é determinada pelo estado da caixa **Insert Step** (Inserir passo) na barra de ferramentas.

Botão Insert Step (Inserir passo)

Para inserir um passo de temperatura antes ou depois do passo seleccionado actualmente:

1. Clique no botão **Insert Step** (Inserir passo).
2. Para alterar a temperatura ou o tempo de espera, clique no valor predefinido na visualização de gráfico ou de texto e introduza um novo valor.

Adicionar ou remover uma leitura de placa

Para adicionar uma leitura de placa a um passo ou para remover uma leitura de placa de um passo:

1. Selecciono o passo clicando no mesmo, na visualização de gráfico ou de texto.
2. Clique no botão **Add Plate Read to Step** (Adicionar leitura de placa a passo) para adicionar uma leitura de placa ao passo seleccionado. Se o passo já contiver uma leitura de placa, o texto do botão muda para **Remove Plate Read** (Remover leitura de placa). Clique para remover uma leitura de placa do passo seleccionado.

Botão Insert Gradient (Inserir gradiente)

Para inserir um passo de gradiente antes ou depois do passo seleccionado actualmente:

1. Para inserir um passo de gradiente de temperatura, clique no botão **Insert Gradient** (Inserir gradiente).
2. Para alterar o intervalo de temperaturas de gradiente, clique na temperatura predefinida na visualização de gráfico ou de texto e introduza uma nova temperatura.
3. Para editar o tempo de espera, clique no valor predefinido na visualização de gráfico ou de texto e introduza um novo tempo.

A Figura 21 mostra o passo de gradiente inserido. As temperaturas de cada fila do gradiente são mostradas no lado direito da janela.

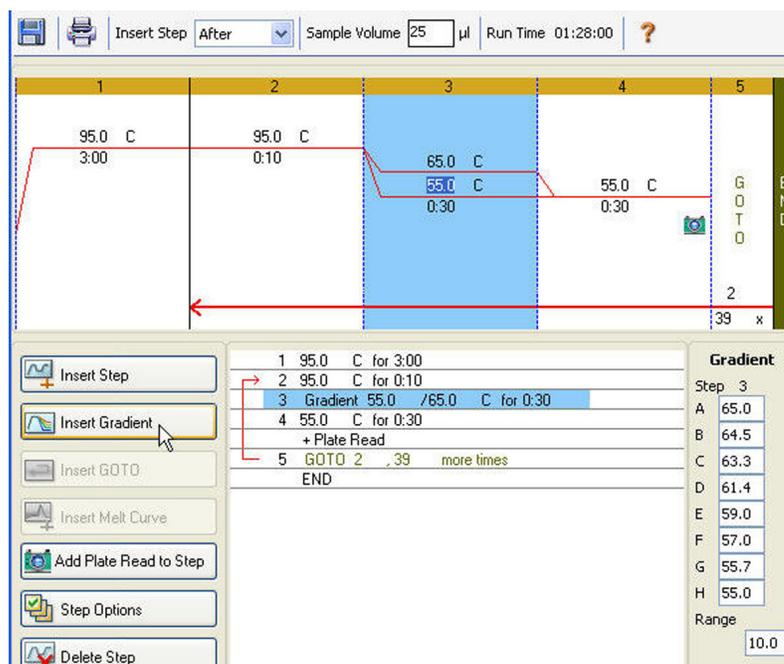


Figura 21. Protocolo com o passo de gradiente inserido.

Botão Insert GOTO (Inserir GOTO)

Para inserir um passo GOTO antes ou depois do passo seleccionado:

1. Clique no botão **Insert GOTO** (Inserir GOTO).
2. Para alterar o número de passo GOTO ou o número de repetições GOTO, clique no número predefinido na visualização de gráfico ou de texto e introduza um novo valor.

A Figura 21 mostra um passo GOTO inserido no final do protocolo. Repare que o ciclo GOTO inclui os passos 2 a 4.

Botão Insert Melt Curve (Inserir curva de fusão)

Para inserir um passo de curva de fusão antes ou depois do passo seleccionado:

1. Clique no botão **Insert Melt Curve** (Inserir curva de fusão).
2. Para alterar o intervalo de temperaturas de fusão ou incrementar o tempo, clique no número predefinido na visualização de gráfico ou de texto e introduza um novo valor. Em alternativa, clique no botão **Step Options** (Opções de passos) para introduzir o intervalo de gradientes na janela Step Options (Opções de passos) (página 34).

NOTA: Não é possível inserir um passo de curva de fusão num ciclo GOTO.

NOTA: O passo de curva de fusão inclui um tempo de espera de 30 segundos no início do passo que não é mostrado no protocolo.

Figura 22 - passo de curva de fusão adicionado após o passo 6.

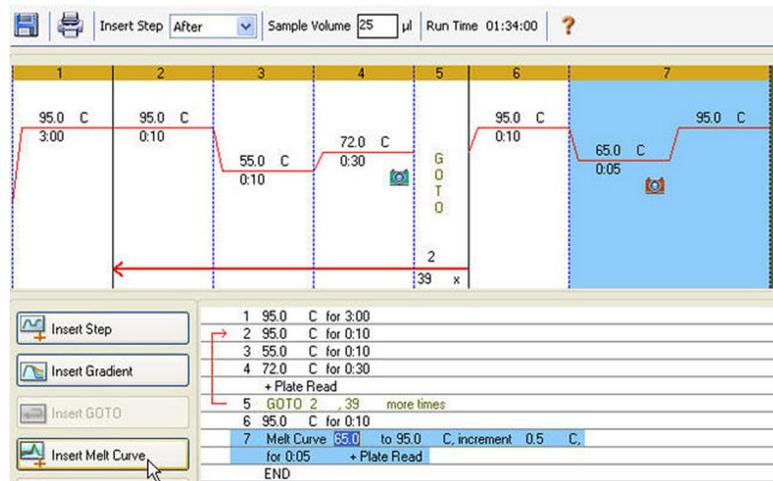


Figura 22. Protocolo com o passo de curva de fusão inserido.

Opções de passos

Para alterar uma opção de passo relativamente ao passo seleccionado:

1. Selecciona um passo clicando no mesmo, na visualização de gráfico ou de texto.
2. Clique no botão **Step Options** (Opções de passos) para abrir a janela Step Options.
3. Para adicionar ou remover opções, introduza um número, edite um número ou clique na caixa de selecção.

SUGESTÃO: Para que um passo fique para sempre em espera (espera infinita), introduza zero (0.00) para o tempo.

A Figura 23 mostra o passo seleccionado com um gradiente de 10°C. Repare que algumas opções não estão disponíveis num passo de gradiente. Um passo de gradiente não pode incluir uma alteração da velocidade de rampa ou incremento.

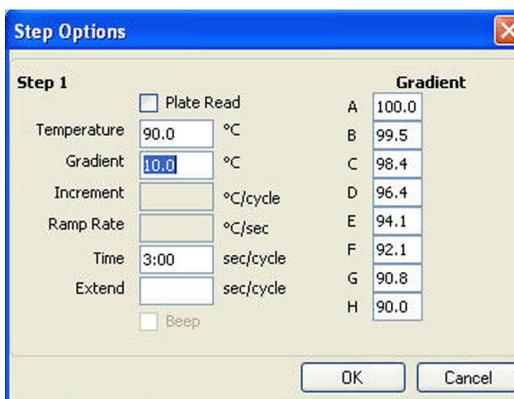


Figura 23. Opção de passo para um gradiente.

A janela **Step Options** (Opções de passos) mostra as opções seguintes que podem ser adicionadas ou removidas dos passos:

- **Plate Read.** Seleccionar a caixa para incluir uma leitura de placa
- **Temperature.** Introduzir uma temperatura alvo para o passo seleccionado

- **Gradient.** Introduzir um intervalo de gradientes para o passo
- **Increment.** Introduzir uma temperatura para incrementar o passo seleccionado; aSavequantidade do incremento é adicionada à temperatura alvo com cada ciclo
- **Ramp Rate.** Introduzir uma velocidade para o passo seleccionado; o intervalo depende do tamanho do bloco
- **Time.** Introduzir um tempo de espera para o passo seleccionado
- **Extend.** Introduzir um tempo de prolongamento do passo seleccionado. O tempo deSaveprolongamento é adicionado ao tempo de espera com cada ciclo
- **Beep.** Seleccionar a caixa para incluir um sinal sonoro (bipe) no fim do passo
SUGESTÃO: Ao introduzir um número que esteja fora do intervalo de opções, oSavesoftware altera o número para a entrada mais próxima dentro do intervalo.

Botão Delete Step (Eliminar passo)

Para eliminar um passo do protocolo:

1. Seccione um passo na visualização de gráfico ou de texto.
2. Clique no botão **Delete Step** (Eliminar passo) para eliminar o passo seleccionado.
AVISO! Esta função não pode ser anulada.

Modo de controlo da temperatura

O instrumento utiliza um de dois modos de controlo da temperatura para determinar o momento em que a amostra atinge a temperatura alvo num protocolo.

Introduza um volume de amostra no editor de protocolos para seleccionar um modo de controlo da temperatura:

- **Modo calculado.** Ao introduzir um volume de amostra entre 1 e 50 µl, o termociclador calcula a temperatura da amostra com base no volume. Este é o modo padrão
- **Modo de bloco.** Ao introduzir um volume de amostra de zero (0) µl, o termociclador regista a temperatura da amostra com sendo igual à temperatura medida do bloco

Protocol AutoWriter

Abra o Protocol AutoWriter para gravar protocolos rapidamente para experiências de PCR e PCR em tempo real. Para abrir o Protocol AutoWriter, seccione uma das seguintes opções:

- Clique no botão do **Protocol AutoWriter** na barra de ferramentas da janela principal do software
- Seccione **Tools > Protocol AutoWriter** (Ferramentas > Protocol AutoWriter) na barra de menus da janela principal do software

Figura 24 - protocolo (parte inferior da janela) gravado pelo Protocol AutoWriter.

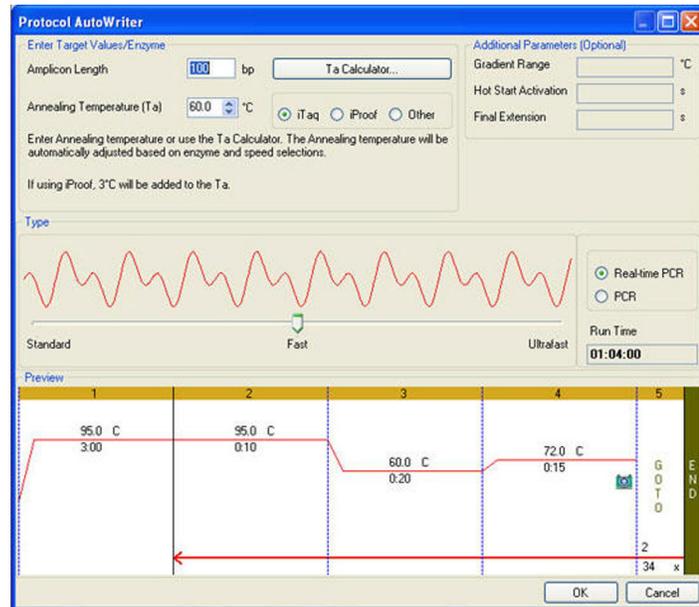


Figura 24. Janela Protocol AutoWriter com um novo protocolo.

Criar um protocolo com o Protocol AutoWriter

A janela Protocol AutoWriter utiliza informações sobre a reacção para gerar automaticamente um ficheiro de protocolo. Siga estes passos para utilizar o Protocol AutoWriter para criar um novo protocolo:

1. Clique no botão do **Protocol AutoWriter** na barra de ferramentas para abrir a janela Protocol AutoWriter.
2. Introduza a **Annealing Temperature (Ta)** (Temperatura de annealing) e o **Amplicon Length** (Comprimento do amplicon) nas caixas do painel Enter Target Values/Enzymes (Introduzir valores alvo/enzimas). Se não conhece a temperatura de annealing para preparadores, clique no botão **Ta Calculator** (Calculador de temperatura) para introduzir as sequências de preparadores e calcular a temperatura de annealing. Para informações sobre os cálculos utilizados no calculador de temperatura, consulte Breslauer et al. 1986.
3. Seleccione um tipo de enzima na lista de opções (**iTaq**, **iProof** ou **Other**).
4. Adicione parâmetros no painel **Additional Parameters (Optional)** (Parâmetros adicionais (opcional)) se pretende adicionar um intervalo de gradientes (Gradient Range), uma temperatura de activação “hot start” (Hot Start Activation) ou um tempo de prolongamento final (Final Extension) ao protocolo.
5. Seleccione uma velocidade de protocolo (Standard (Padrão), Fast (Rápido), Ultrafast (Ultra-rápido) ou, deslocando para tal o cursor vertical deslizante no painel Type (Tipo). Ao deslocar a barra deslizante, o software ajusta o tempo de execução total. Seleccione **Real-time PCR** (PCR em tempo real) para comunicar ao software para recolher dados de fluorescência.

6. Reveja o protocolo no painel Preview (Pré-visualização) e o tempo de execução total. Efectue as alterações necessárias.
7. Clique em **OK** para guardar o novo protocolo, ou clique em **Cancel** (Cancelar) para fechar a janela sem guardar o protocolo.

NOTA: A Bio-Rad Laboratories não garante que a execução de um protocolo gravado na janela Protocol AutoWriter resultará sempre num produto de PCR.

5 Placas

Leia este capítulo para obter informações sobre a criação e edição de ficheiros de placas:

- Janela Plate Editor (Editor de placas) (abaixo)
- Janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (página 42)
- Controlos de carregamento dos poços (página 42)
- Janela Well Groups Manager (Gestor de grupos de poços) (página 47)

Janela Plate Editor (Editor de placas)

Um ficheiro de placa contém parâmetros de execução, tais como o modo de leitura e fluoróforos, e o conteúdo dos poços, e indica ao instrumento a forma como deve analisar os dados. Abra a janela Plate Editor (Editor de placas) para criar uma nova placa ou para editar a placa actualmente seleccionada no separador Plate (Placa). Depois de criar ou editar uma placa no editor de placas, clique em **OK** para carregar o ficheiro da placa na janela Experiment Setup (Configuração da experiência) e executá-lo.

Para executar uma experiência, tem de carregar pelo menos um poço com o tipo de amostra e fluoróforo.

SUGESTÃO: Clique no botão **Plate Loading Guide** (Guia de carregamento de placas) para abrir a respectiva janela de guia de carregamento de placas a partir da barra de ferramentas para ver rapidamente as instruções de carregamento de uma placa.

Abrir o Plate Editor (Editor de placas)

Para abrir a janela Plate Editor (Editor de placas) (Figura 25), utilize uma das seguintes opções:

- Para criar uma nova placa, seleccione **File > New > Plate** (Ficheiro > Nova > Placa) ou clique no botão **Create New** (Criar nova) no separador Plate (Placa) (página 23)
- Para abrir uma placa existente, seleccione **File > Open > Plate** (Ficheiro > Abrir > Placa) ou clique no botão **Open Existing** (Abrir existente) no separador Plate (Placa) (página 23)
- Para editar o protocolo actual no separador Plate (Placa), clique no botão **Edit Selected** (Editar seleccionado) no separador Plate (página 23)
- Para abrir a placa associada a um ficheiro de dados na janela Data Analysis (Análise de dados) (página 61), faça clique em **View/Edit Plate** (Ver/Editar placa) na barra de ferramentas

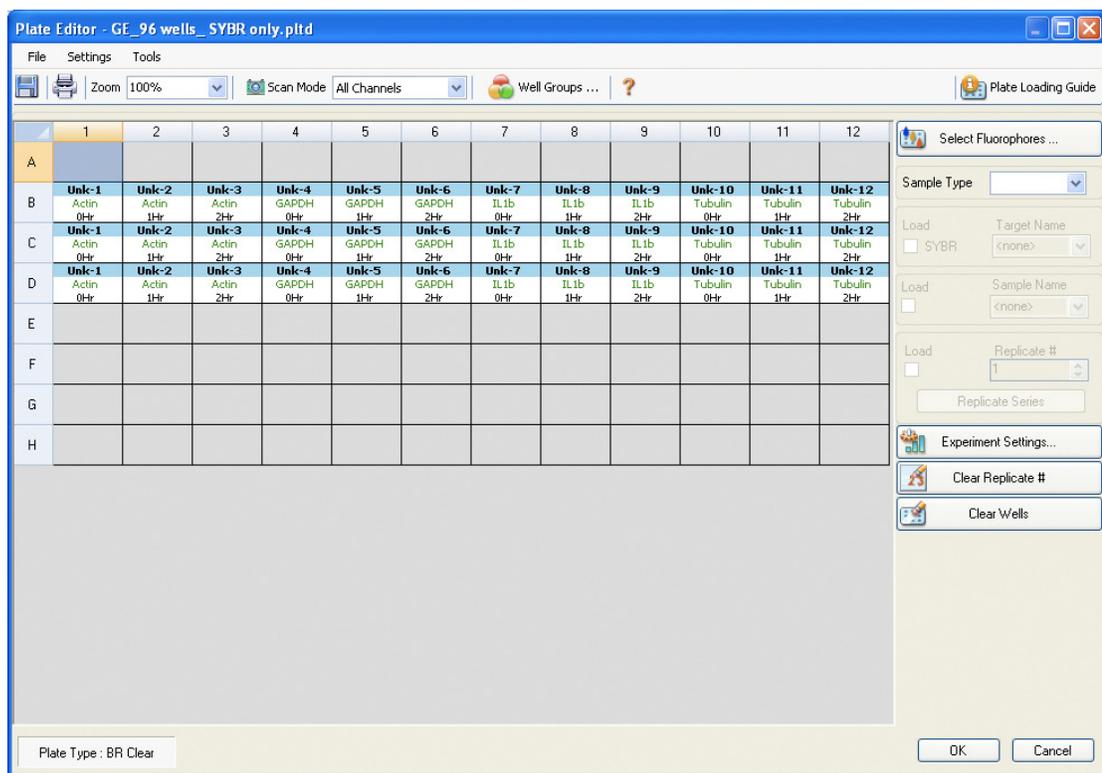


Figura 25. Janela Plate Editor (Editor de placas).

Dimensão e tipo de placa

O software aplica as seguintes definições de placa a todos os poços durante a experiência:

- **Plate Size.** Seleccione um **Plate Size** (tamanho de placa) sob o menu **Settings** (Definições) que represente a dimensão do bloco do módulo de reacção do instrumento. Ao seleccionar o tipo de instrumento, CFX96, na opção do menu pendente no Startup Wizard (Assistente de arranque), irá alterar a dimensão de placa predefinida carregada no separador Plate (Placa) da janela Experiment Settings (Definições da experiência). No Plate Editor (Editor de placas), seleccione a dimensão da placa no menu Settings (Definições) (consulte a Tabela 13 na página 41). A dimensão da placa não pode ser alterada durante ou após a experiência
- **Plate Type.** Seleccione **Clear Wells** (Poços transparentes) ou **White Wells** (Poços brancos) em **Plate Type** (Tipo de placa) sob o menu **Settings** (Definições). Certifique-se de que o fluoróforo que está a ser utilizado na experiência está calibrado para o tipo de placa seleccionado

NOTA: Os instrumentos CFX96 vêm calibrados de fábrica para muitas combinações de marcador fluorescente e placas. A calibração é específica do instrumento, fluorocromo e tipo de placa. Para calibrar uma nova combinação de fluorocromo e tipo de placa num instrumento, seleccione **Tools > Calibration Wizard** (Ferramentas > Assistente de calibração) (consulte “Assistente de calibração” na página 115)

Modo de leitura

O sistema CFX96 excita e detecta fluoróforos em seis canais e utiliza vários modos de leitura de aquisição de dados para recolher os dados de fluorescência durante um ciclo.

Seleccione um destes modos de leitura na barra de ferramentas da janela Plate Editor (Editor de placas):

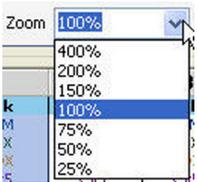
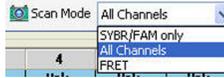
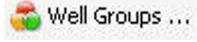
- **All Channels.** Inclui os canais 1 a 5 no sistema CFX96
- **SYBR/FAM only.** Inclui apenas o canal 1 e faculta uma leitura rápida
- **FRET.** Inclui apenas o canal FRET e faculta uma leitura rápida

Barra de ferramentas do Plate Editor (Editor de placas)

A barra de ferramentas do Plate Editor (Editor de placas) faculta o acesso rápido a importantes funções de carregamento de placas:

A Tabela 13 mostra as funções disponíveis na barra de ferramentas do Plate Editor.

Tabela 13. Itens da barra de ferramentas no Plate Editor.

Item da barra de ferramentas	Nome	Função
	Save (Guardar)	Guardar o ficheiro de placa actual
	Print (Imprimir)	Imprimir a janela seleccionada
	Zoom	Aumentar ou diminuir a ampliação na visualização da placa
	Scan Mode (Modo de leitura)	Seleccione um modo de leitura para indicar ao instrumento quais os canais dos quais deve recolher dados de fluorescência durante um ciclo. Seleccione All Channels (Todos os canais) (predefinição), SYBR/FAM only (Apenas SYBR/FAM) ou FRET
	Well Groups (Grupos de poços)	Abrir a janela Well Groups Manager (Gestor de grupos de poços) e configurar os grupos de poços para a placa actual
	Ajuda	Abrir a Ajuda (Help) do software para obter informações sobre as placas
	Plate Loading Guide (Guia de carregamento de placas)	Mostra um guia rápido sobre como configurar uma placa e carregar os poços

Janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)

A janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) mostra os fluoróforos que podem ser seleccionados para carregar nos controlos de carregamento de poços no Plate Editor (Editor de placas). Para abrir a janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos), clique no botão **Select Fluorophores** (Seleccionar fluoróforos) no lado direito do Plate Editor.

NOTA: Os fluoróforos mostrados dependem do modo de leitura; quando estiver seleccionada a opção “SYBR/FAM only” (Apenas SYBR/FAM), apenas os fluoróforos no canal 1 serão apresentados na janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos).

NOTA: Não é possível adicionar ou remover fluoróforos nesta lista; tem de calibrar os novos fluoróforos num instrumento no Calibration Wizard (Assistente de calibração) (página 115). Após a calibração, é adicionado o novo fluoróforo na janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos).

Clique na caixa de selecção **Selected** (Seleccionado) ao lado do nome do fluoróforo para adicionar ou remover os fluoróforos da lista no lado direito da janela Plate Editor.

Neste exemplo, SYBR está seleccionado na lista de fluoróforos disponíveis (Figura 26).

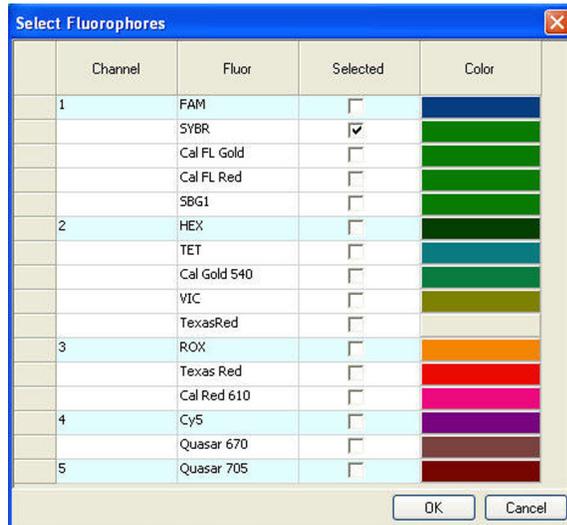


Figura 26. Janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos).

- Clique na caixa **Color** (Cor) ao lado do nome do fluoróforo e seleccione uma nova cor para representar cada fluoróforo na janela Plate Editor (Editor de placas) e nos gráficos Data Analysis (Análise de dados)

NOTA: Antes de iniciar o ciclo, o software verifica se os fluoróforos que especificou na placa estão calibrados para esse instrumento. Não é possível executar uma placa se esta incluir fluoróforos que não tenham sido calibrados nesse instrumento.

Controlos de carregamento dos poços

Um ficheiro de placa contém informações sobre o conteúdo de cada poço carregado com amostra para uma experiência. Após o ciclo, o software liga o conteúdo dos poços aos dados de fluorescência recolhidos durante o protocolo e aplica a análise apropriada na janela Data Analysis (Análise de dados). Por exemplo, os poços carregados com o tipo de amostra padrão são utilizados para gerar uma curva padrão.

Tenha em consideração as seguintes directrizes para o conteúdo dos poços:

- **Target Name.** Um ou mais alvos de interesse (genes ou sequências) em cada poço carregado. Cada alvo está atribuído a um fluoróforo
- **Sample Name.** Um identificador ou condição que corresponde à amostra em cada poço carregado, por exemplo, 0 hr, 1 hr ou 2 hr

Selecione um poço para onde carregar o conteúdo, clicando para tal com o ponteiro do rato na visualização da placa. Mantenha o botão do rato premido e arraste para seleccionar vários poços. Os botões e as listas no lado direito da visualização da placa incluem todas as opções necessárias para carregar os poços (Tabela 14).

Tabela 14. Opções para carregar a placa e os poços no Plate Editor (Editor de placas).

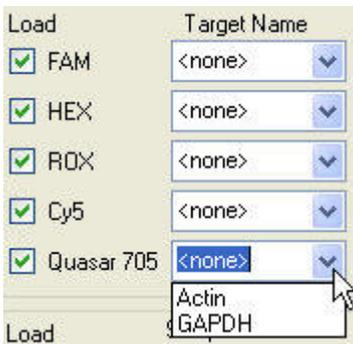
Opção	Função
	<p>Após seleccionar os poços, o tipo de amostra (Sample Type) tem de ser carregado em primeiro lugar. Selecione um tipo de amostra (Sample Type) no menu pendente para carregar nos poços seleccionados, incluindo Unknown (Desconhecido), Standard (Padrão), NTC (no template control), Positive Control (Controlo positivo), Negative Control (Controlo negativo) e NRT (no reverse transcriptase).</p>
	<p>Clique numa caixa Load (Carregar) para adicionar um fluoróforo aos poços seleccionados; cada fluoróforo corresponde ao nome de um alvo. Para adicionar fluoróforos à lista Load (Carregar), selecione-os na janela Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos).</p> <p>Para distinguir entre vários alvos, selecione um nome no menu pendente Target Name (Nome do alvo) e prima a tecla Enter para carregar o nome do alvo no poço. Para adicionar um novo nome de alvo ao menu pendente apenas na placa actual, escreva um nome na caixa pendente e prima a tecla Enter. Para eliminar um nome de alvo, selecione-o, prima a tecla Delete (Eliminar) e prima a tecla Enter.</p>
	<p>Para uma análise de expressão de genes ou para distinguir entre várias amostras, selecione um Sample Name (nome de amostra) no menu pendente para carregar o nome da amostra nos poços seleccionados. Para adicionar um novo nome de amostra ao menu pendente na placa actual, escreva um novo nome na caixa pendente e prima a tecla Enter. Para eliminar um nome de amostra, selecione-o no menu, prima a tecla Delete (Eliminar) no teclado e, em seguida, prima a tecla Enter.</p>
	<p>Para carregar números replicados, os poços seleccionados têm de conter conteúdos de poços idênticos. Caso contrário, o software desactiva este controlo de carregamento. Faça clique na caixa Load (Carregar) para adicionar um Replicate # (N.º de réplica) aos poços seleccionados.</p>

Tabela 14. Opções para carregar a placa e os poços no Plate Editor (Editor de placas).

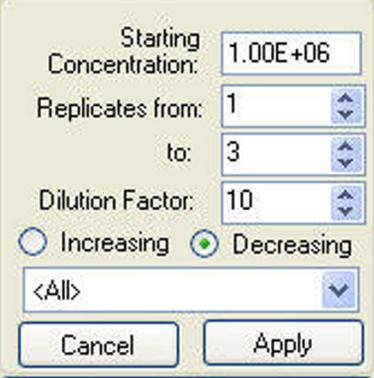
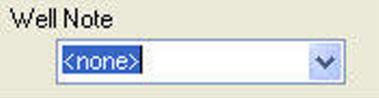
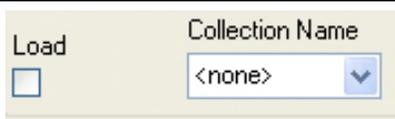
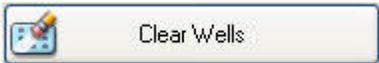
Opção	Função
	<p>No painel Replicate Series (Série de réplicas) pode aplicar uma série de réplicas a um conjunto de poços seleccionados. Para introduzir um tamanho de grupo de réplicas (Replicate Group Size), seleccione um número que representa as amostras (poços) em cada grupo de réplicas. Seleccione Starting Replicate # (N.º de réplica inicial) para adicionar réplicas.</p> <p>Pode carregar grupos de réplicas com números de réplicas da esquerda para a direita (Horizontal) ou de cima para baixo (Vertical).</p>
	<p>Para introduzir uma concentração nos poços seleccionados com o tipo de amostra padrão, edite ou escreva um número na caixa Concentration (Concentração). Para aplicar a concentração a um fluoróforo no poço, seleccione um único fluoróforo no menu pendente (<All>) (Todos) sob a caixa de concentração. Para eliminar uma concentração, seleccione-a, prima a tecla Back Space no teclado e, em seguida, prima a tecla Enter.</p> <p>Selecione vários poços com um tipo de amostra padrão para activar o botão Dilution Series (Série de diluição).</p>
	<p>Clique no botão Dilution Series (Série de diluição) para introduzir uma série de diluição para a concentração de amostras padrão e carregar uma curva padrão.</p> <p>Introduza a concentração inicial (Starting Concentration) para a série de diluição, as (Replicates from) (número de réplica inicial) e to (número de réplica final) e o factor de diluição (Dilution Factor) (quantidade para alterar a concentração em cada grupo de réplicas). Seleccione Increasing (De aumento) para uma série de diluição que aumenta ou Decreasing (De diminuição) para uma série de diluição que diminui. Por fim, seleccione o fluoróforo utilizado para a série de diluição no menu pendente e clique em Apply (Aplicar).</p>
	<p>Selecione Tools > Show Well Notes (Ferramentas > Mostrar notas sobre poço) para mostrar este painel. Para introduzir notas sobre um ou mais poços, seleccione os poços e escreva as notas no menu pendente. Quaisquer notas que adicionar aparecem na folha de cálculo no separador Quantitation Data (Dados de quantificação) (página 76).</p>

Tabela 14. Opções para carregar a placa e os poços no Plate Editor (Editor de placas).

Opção	Função
	<p>Selecione Tools > Show Collection Name (Ferramentas > Mostrar nome da recolha) para mostrar este painel. Para introduzir a informação da recolha de amostras sobre um ou mais poços, selecione os poços e escreva o nome de uma recolha no menu pendente. Qualquer nome de recolha que adicionar aos poços aparece na janela Gene Expression Analysis (Análise da expressão de genes) e permite opções de agrupamento de amostras.</p>
	<p>Clique no botão Experiment Settings (Definições da experiência) na respectiva janela para gerir as listas de Targets (Alvos) e Samples (Amostras) e configurar uma experiência de expressão de genes.</p>
	<p>Clique no botão Clear Replicate # (Limpar réplica n.º) para limpar os números das réplicas nos poços seleccionados.</p>
	<p>Clique no botão Clear Wells (Limpar poços) para limpar permanentemente todo o conteúdo nos poços seleccionados.</p>

Janela Experiment Settings (Definições da experiência)

Para abrir a janela Experiment Settings (Definições da experiência), utilize uma das seguintes opções:

- No Plate Editor (Editor de placas), clique no botão **Experiment Settings** (Definições da experiência)
- Ao analisar dados na janela Data Analysis (Análise de dados), clique no botão **Experiment Settings** (Definições da experiência) no separador Gene Expression (Expressão de genes)

Abra a janela Experiment Settings (Definições da experiência) para ver ou alterar a lista de Targets (Alvos) e Samples (Amostras) (Figura 27) ou definir o grupo de amostras para análise da expressão de genes a analisar se os **Collection Names** (nomes da recolha) tiverem sido adicionados aos poços.

- **Targets.** Uma lista de nomes de alvos para cada reacção de PCR, como um gene ou sequência de interesse. Clique na coluna Reference (Referência) para atribuir genes de referência a uma experiência
- **Samples.** Uma lista de nomes de amostras que indica a origem do alvo, como, por exemplo, uma amostra retirada a 1 hora (1 hr) ou retirada de um indivíduo específico (rato1). Clique na coluna **Control** (Controlo) para atribuir a condição de controlo a uma experiência

Figura 27 - separador Targets (Alvos) com as definições da análise.

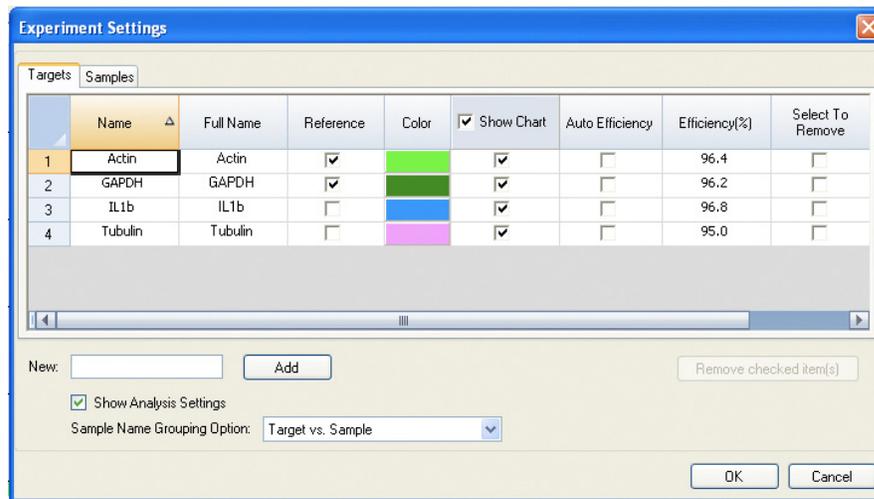


Figura 27. Separador Targets (Alvos) na janela Experiment Settings (Definições da experiência).

A Figura 28 mostra o separador Samples (Amostras) com as definições da análise.

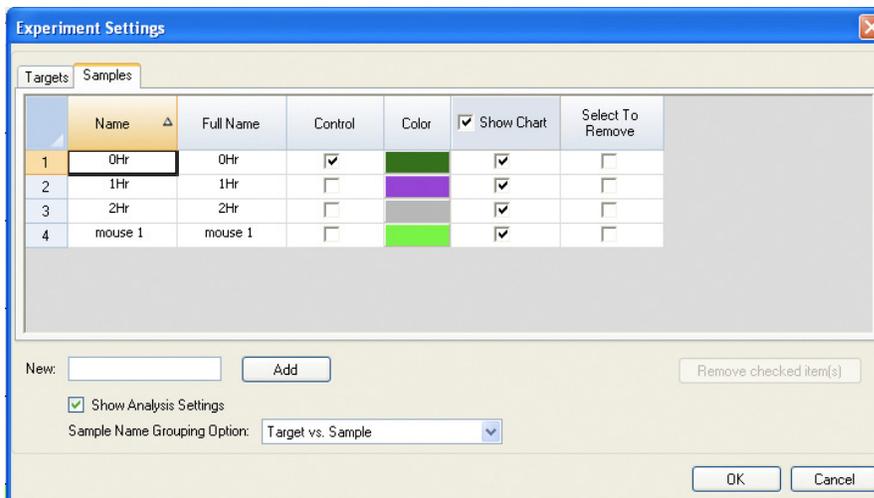


Figura 28. Separador Samples (Amostras) na janela Experiment Settings (Definições da experiência).

Para ajustar as listas nestes separadores, utilize as funções seguintes:

- Para adicionar um nome de alvo ou amostra, escreva um nome na caixa **New** (Novo) e clique em **Add** (Adicionar)
- Para remover um nome de alvo ou de amostra da lista, clique na caixa **Select to Remove** (Seleccionar para remover) nessa fila e clique no botão **Remove checked item(s)** (Remover itens seleccionados)
- Para seleccionar o alvo como uma referência para a análise de dados da expressão de genes, clique na caixa na coluna **Reference** (Referência) ao lado do nome desse alvo
- Para seleccionar a amostra como amostra de controlo para a análise de dados da expressão de genes, clique na caixa na coluna **Control** (Controlo) ao lado do nome dessa amostra

Clique na caixa **Show Analysis Settings** (Mostrar definições da análise) na janela Experiment Settings (Definições da experiência) para ver ou alterar os parâmetros da análise aplicados no separador Gene Expression (Expressão de genes).

Para ajustar os parâmetros do alvo:

- Clique numa célula na coluna **Color** (Cor) para alterar a cor dos alvos incluídos no gráfico Gene Expression (Expressão de genes)
- Introduza um número para a eficiência de um alvo. O software irá calcular a eficiência relativa para um alvo utilizando **Auto Efficiency** (Eficiência automática) se os dados de um alvo incluírem uma curva padrão. Alternativamente, introduza uma eficiência previamente determinada

Para ajustar as definições de uma amostra no separador Samples (Amostras):

- Clique numa cor na coluna **Color** (Cor) para alterar a cor das amostras incluídas no gráfico Gene Expression (Expressão de genes)
- Clique numa caixa na coluna **Show Graph** (Mostrar gráfico) para mostrar a amostra no gráfico Gene Expression (Expressão de genes) utilizando uma cor que esteja seleccionada na coluna **Color** (Cor)

Sample Name Grouping Option (Opção de agrupamento por nomes de amostra)

Carregar os nomes de recolha (**Collection Names**) nos poços permite que as amostras sejam analisadas numa de quatro configurações definidas pela opção de agrupamento por nomes de amostra (Sample Name Grouping Option). Estas opções estão disponíveis no menu pendente no separador Experiment Settings (Definições da experiência).

- Target vs. Sample (Alvo vs. Amostra)
- Target vs. Collection (Alvo vs. Recolha)
- Target vs. Sample_Collection (Alvo vs. Amostra_Recolha)
- Target vs. Collection_Sample (Alvo vs. Recolha_Amostra)

Janela Well Groups Manager (Gestor de grupos de poços)

Os grupos de poços dividem uma placa em subconjuntos de poços que podem ser analisados de forma independente na janela Data Analysis (Análise de dados). Quando os grupos de poços estiverem configurados, seleccione um na janela Data Analysis (Análise de dados) para analisar os dados num grupo independente. Por exemplo, configure grupos de poços para analisar várias experiências executadas numa placa ou para analisar cada grupo de poços com uma curva padrão diferente.

NOTA: O grupo de poços predefinido é **All Wells** (Todos os poços).

Criar grupos de poços

Para criar grupos de poços na janela Well Groups Manager (Gestor de grupos de poços), siga estas instruções:

1. Clique no botão **Well Groups** (Grupos de poços) na barra de ferramentas do Plate Editor (Editor de placas).

2. Clique em **Add** (Adicionar) para criar um novo grupo. O menu pendente mostra o nome do grupo como **Group 1** (Grupo 1) para o primeiro grupo.
3. Para seleccionar os poços que irão constituir o grupo de poços na visualização da placa, clique e arraste o grupo de poços. Os poços seleccionados ficam com a cor azul (Figura 29).
4. (Opcional) Altere o nome do grupo seleccionando o nome do grupo no menu pendente e escrevendo um novo nome.
5. (Opcional) Crie mais grupos de poços repetindo os passos 1 e 2.
6. (Opcional) Elimine os grupos de poços seleccionando o nome do grupo na lista pendente e clicando no botão **Delete** (Eliminar).
7. Clique em **OK** para terminar e fechar a janela, ou clique em **Cancel** (Cancelar) para fechar a janela sem efectuar alterações.

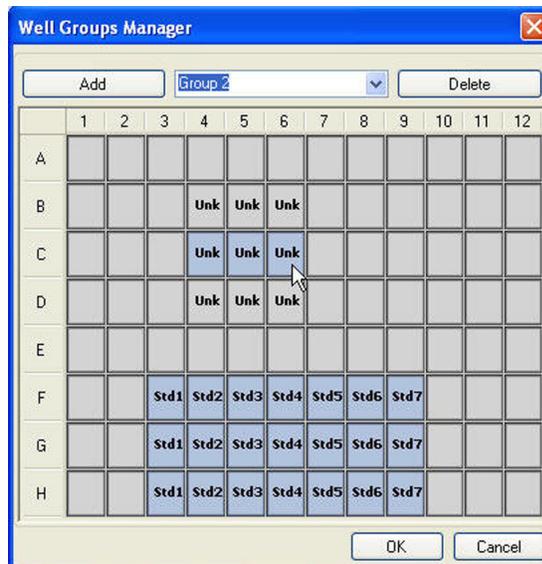
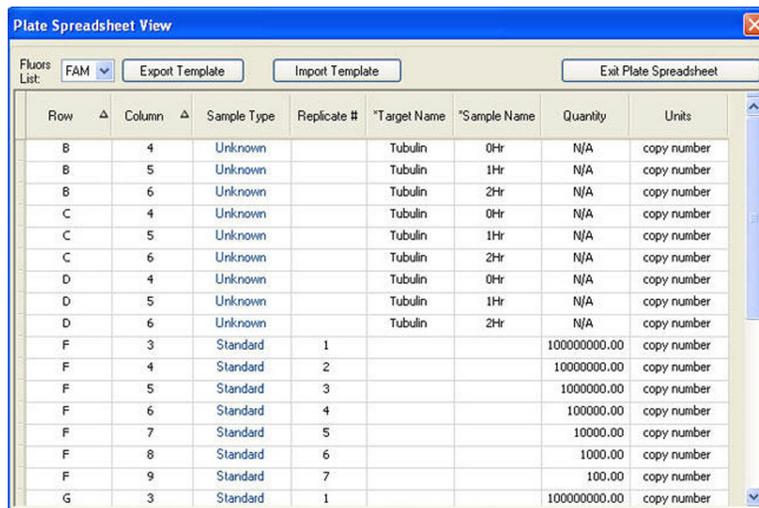


Figura 29. Cor dos poços na janela Well Group Manager (Gestor de grupos de poços).

Janela Plate Spreadsheet View (Visualização da folha de cálculo da placa)

A janela Plate Spreadsheet View (Visualização da folha de cálculo da placa) mostra o conteúdo de uma placa no Plate Editor (Editor de placas). Para abrir a janela Plate Spreadsheet View (Figura 30), seleccione **Tools > Show Spreadsheet View** (Ferramentas > Mostrar visualização da folha de cálculo) na barra do menu do Plate Editor.



Row	Column	Sample Type	Replicate #	*Target Name	*Sample Name	Quantity	Units
B	4	Unknown		Tubulin	0Hr	N/A	copy number
B	5	Unknown		Tubulin	1Hr	N/A	copy number
B	6	Unknown		Tubulin	2Hr	N/A	copy number
C	4	Unknown		Tubulin	0Hr	N/A	copy number
C	5	Unknown		Tubulin	1Hr	N/A	copy number
C	6	Unknown		Tubulin	2Hr	N/A	copy number
D	4	Unknown		Tubulin	0Hr	N/A	copy number
D	5	Unknown		Tubulin	1Hr	N/A	copy number
D	6	Unknown		Tubulin	2Hr	N/A	copy number
F	3	Standard	1			10000000.00	copy number
F	4	Standard	2			1000000.00	copy number
F	5	Standard	3			100000.00	copy number
F	6	Standard	4			10000.00	copy number
F	7	Standard	5			1000.00	copy number
F	8	Standard	6			100.00	copy number
F	9	Standard	7			10.00	copy number
G	3	Standard	1			10000000.00	copy number

Figura 30. Janela Plate Spreadsheet View (Visualização da folha de cálculo da placa).

Abra a visualização da folha de cálculo para importar ou exportar o conteúdo dos poços para o Excel ou outro formato delimitado por separadores:

- Clique em **Import Template** (Importar modelo) para importar o conteúdo dos poços a partir de um ficheiro delimitado por vírgulas
- Clique em **Export Template** (Exportar modelo) para exportar o conteúdo dos poços no formato Excel (formato .csv)

Para ordenar ou editar uma coluna, seleccione-a e utilize os métodos seguintes:

- Ordene a folha de cálculo de acordo com os dados numa coluna, clicando no diamante ao lado do nome da coluna
- Edite o conteúdo de uma coluna que tenha um asterisco (*) no topo, clicando e digitando cada poço

NOTA: Para seleccionar as unidades dos dados da curva padrão na coluna Quantity (Quantidade), abra o Plate Editor (Editor de placas) e seleccione **Settings > Units** (Definições > Unidades) na barra de menus. Após a execução da placa, os dados destes padrões aparecem no gráfico Standard Curve (Curva padrão) do separador Quantitation (Quantificação) da janela Data Analysis (Análise de dados) com as unidades que seleccionar. Abra a visualização da folha de cálculo para importar ou exportar o conteúdo das placas para o Excel ou outro formato delimitado por separadores.

Clique com o botão direito na folha de cálculo para seleccionar uma destas opções a partir do menu de clique direito:

- **Copy.** Copiar a folha de cálculo na totalidade
- **Copy as Image.** Copiar a folha de cálculo como um ficheiro de imagem
- **Print.** Imprimir a folha de cálculo
- **Print Selection.** Imprimir apenas as células seleccionadas

Placas

- **Export to Excel.** Exportar o ficheiro como um ficheiro formatado para Excel
- **Export to Text.** Exportar o ficheiro como um ficheiro de texto
- **Find.** Localizar texto na folha de cálculo
- **Sort.** Ordenar a folha de cálculo seleccionando até três colunas de dados na janela Sort (Ordenar)

6 Operação independente

Leia este capítulo para obter informações sobre a utilização do Sistema de detecção por PCR em tempo real CFX96™ no modo independente (standalone):

- Termociclador C1000™ (abaixo)
- Criar uma nova experiência (página 53)
- Exportação de dados para análise (página 58)
- Criar um ficheiro de dados (página 60)

Termociclador C1000

O sistema CFX96 pode executar experiências de PCR em tempo real sem um computador. Também é possível exportar os dados de fluorescência adquiridos durante um ciclo utilizando uma unidade de memória USB. Pode também optar pelo envio directo dos dados por e-mail para si se a base do C1000 estiver ligada à Internet e se estiver configurada a funcionalidade de e-mail (consulte o Manual de Instruções do termociclador C1000 para obter informações sobre a configuração das definições de e-mail). Os dados requerem o CFX™ Manager software para análise.

O painel de controlo do Termociclador C1000™ dá acesso a todas as funções necessárias para operar o instrumento. A Figura 31 mostra os componentes do painel de controlo:

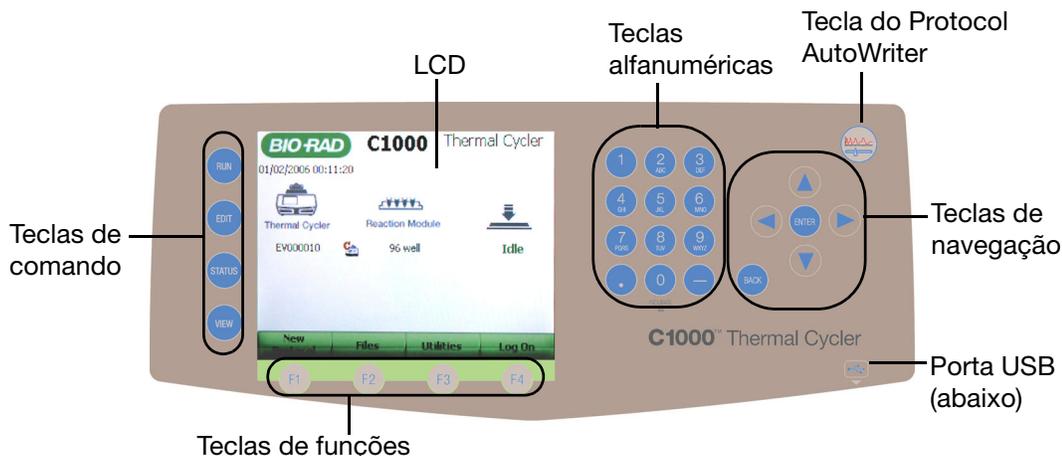


Figura 31. O painel de controlo do termociclador C1000.

O painel de controlo contém cinco conjuntos de teclas cujas funções são mostradas na Tabela 15:

Tabela 15. Funções das teclas do painel de controlo.

Tecla	Função
TECLAS DE COMANDO	
RUN (EXECUTAR)	Seleccionar e executar um protocolo
EDIT (EDITAR)	Seleccionar e alterar um protocolo
STATUS (ESTADO)	Ver o estado de um ou mais protocolos em execução
VIEW (VER)	Alternar entre as visualizações de gráficos e de texto de um protocolo
TECLAS DE FUNÇÕES	
F1, F2, F3 ou F4	Os nomes e as funções das teclas de funções mudam em cada ecrã
TECLAS ALFANUMÉRICAS	
1 a 9	Introduzir números ou letras do alfabeto. Prima uma tecla várias vezes para digitar as letras associadas
0, INCUBAÇÃO	Inserir um zero, ∞ (infinito) ou iniciar a incubação instantânea
ponto decimal (.)	Introduzir um ponto decimal
sinal de menos (-)	Introduzir um sinal de menos
Protocolo AutoWriter	
Tecla do Protocolo AutoWriter	Lançar o Protocolo AutoWriter
TECLAS DE NAVEGAÇÃO	
Seta P/DIREITA	Mover o cursor para a direita
Seta P/ESQUERDA	Mover o cursor para a esquerda
Seta P/CIMA	Mover o cursor para cima
Seta P/BAIXO	Mover o cursor para baixo
ENTER	Confirmar uma definição
BACK	Cancelar uma função. Apagar uma letra, um número ou uma palavra

Menu principal

Quando o sistema CFX96 arranca, executa um auto-teste para verificar as funções e, em seguida, apresenta o menu principal. O menu principal dá acesso a todas as operações do sistema, mostra a data e a hora, o nome do utilizador em sessão, o estado do sistema, o tipo de módulo de reacção e o nome do termociclador e os termocicladores S1000™ ligados.

NOTA: O termociclador C1000 armazena até 20 ciclos de experiências de PCR em tempo real, utilizando a indicação da data/hora nos ciclos. Com 20 ciclos armazenados no C1000, começam a ser eliminados os dados de ciclos mais antigos à medida que são armazenados novos ciclos.

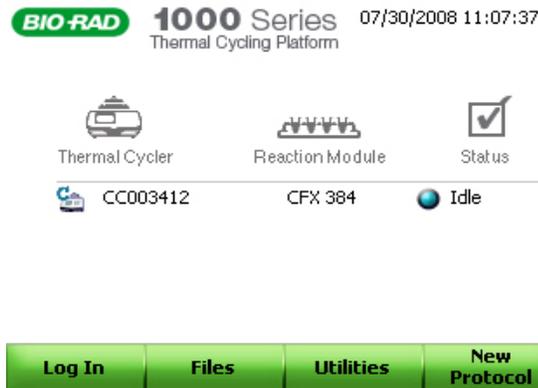


Figura 32. Ecrã de arranque no painel frontal.

Para iniciar as funções no menu principal, prima as teclas de funções associadas (F1 a F4):

- **Log In (F1)**. Iniciar sessão no termociclador C1000. Depois de iniciar sessão, o nome do botão muda para Log Off
- **Files (F2)**. Ver os ficheiros e pastas na biblioteca de ficheiros
- **Utilities (F3)**. Abrir o menu Utilities (Utilitários)
- **New Protocol (F4)**. Criar um novo protocolo

Criar uma nova experiência

1. Seleccione **New Protocol (F4)** no ecrã de arranque para iniciar (Figura 33).

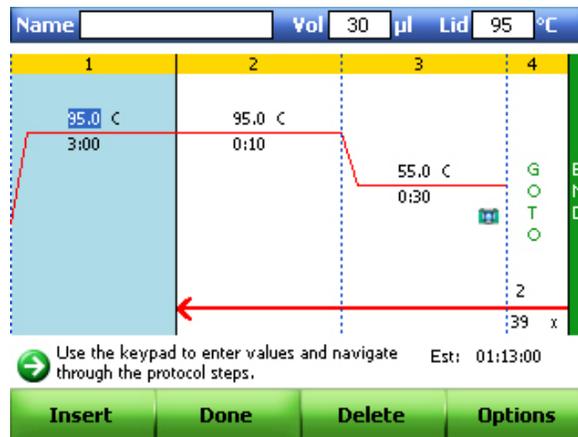


Figura 33. Protocolo predefinido de PCR em tempo real.

2. Para alterar a temperatura alvo e o tempo de espera num passo de temperatura, prima as teclas de setas para navegar entre os passos e para seleccionar um parâmetro (temperatura ou tempo). Prima as teclas alfanuméricas para introduzir um novo número para cada parâmetro que realçar.

SUGESTÃO: Ligue um rato de computador através de uma porta USB na caixa do C1000 para navegar.

3. (Opcional) Para inserir um novo passo, seleccione o botão **Insert** (Inserir) (F1). Para eliminar um passo, seleccione o botão **Delete** (Eliminar) (F3) (Figura 33).

- (Opcional) Para alterar as opções dos passos, seleccione o botão **Options** (Opções) (F4) (Figura 33). Na janela **Step Options** (Opções de passos), seleccione o parâmetro a alterar, incluindo a temperatura e o tempo do passo, ou adicione/remova uma leitura de placa do passo (Figura 34).

Step Options

Step 1

Plate Read

Temperature: 60.0 °C

Gradient Range: 16.0 °C

Increment: °C/cycle

Ramp Rate: °C/sec

Time: 0:30 sec/cycle

Extend: sec/cycle

Beep

Gradient			
A	76.0	I	67.1
B	75.7	J	65.5
C	75.2	K	64.1
D	74.5	L	62.8
E	73.4	M	61.7
F	72.2	N	60.9
G	70.6	O	60.3
H	69.0	P	60.0

OK Cancel Show 96 Gradient

Figura 34. Janela Step Options (Opções de passos).

NOTA: Prima as teclas alfanuméricas para introduzir um **Gradient Range** (Intervalo de gradientes) entre 1 e 24°C.

- O passo **GOTO** dá instruções ao termociclador para repetir um conjunto de passos em loop para criar os ciclos na experiência de PCR. Seleccione um passo **GOTO**; prima as teclas de setas para seleccionar e depois editar o número do passo num passo **GOTO**, ou para alterar o número de repetições.
- (Opcional) Para alterar o volume de amostra predefinido, seleccione a caixa de volume de amostra (**Vol**) (Figura 33 na página 53). Utilize as teclas alfanuméricas para introduzir um novo volume de amostra em microlitros. O volume de amostra que for introduzido determina o modo de controlo da temperatura utilizado durante um ciclo.
- (Opcional) Para alterar a temperatura predefinida da tampa, seleccione a caixa de temperatura da tampa (**Lid**) premindo as teclas de setas (Figura 33 na página 53). Utilize as teclas alfanuméricas para introduzir uma nova temperatura. Para o sistema CFX96, utilize uma temperatura da tampa de 105°C.
NOTA: O aquecimento da tampa evita a condensação nos recipientes de reacção vedados.
- Ao criar um novo protocolo, poderá optar por guardá-lo com um nome. Utilize as teclas de setas para navegar até à caixa **Name** (Nome) do protocolo e prima as teclas numéricas várias vezes para introduzir uma letra ou número até digitar o novo nome do protocolo.
- Prima **ENTER** para aceitar o nome.

Executar o protocolo

- Para iniciar o ciclo, clique em **Done** (Concluído) (F2) na janela do protocolo (Figura 33 na página 53).
SUGESTÃO: Em alternativa, clique na tecla de comando **RUN** (EXECUTAR) para iniciar o ciclo sem guardar ou editar o nome do protocolo.

2. Introduza um nome de protocolo caso ainda não o tenha feito, ou edite o nome anteriormente criado na janela Protocol (Protocolo). Utilize as teclas de setas para seleccionar uma pasta de destino (Figura 35).

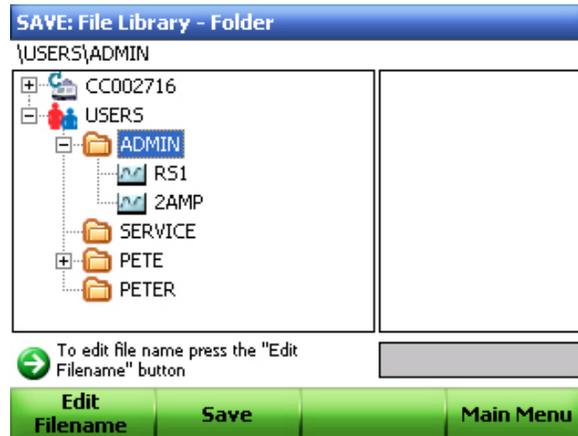


Figura 35. Guardar um protocolo.

3. Clique em **Edit Filename** (Editar nome de ficheiro) (F1). Digite um novo nome na caixa e clique em **Save** (Guardar) (F2) (Figura 36).

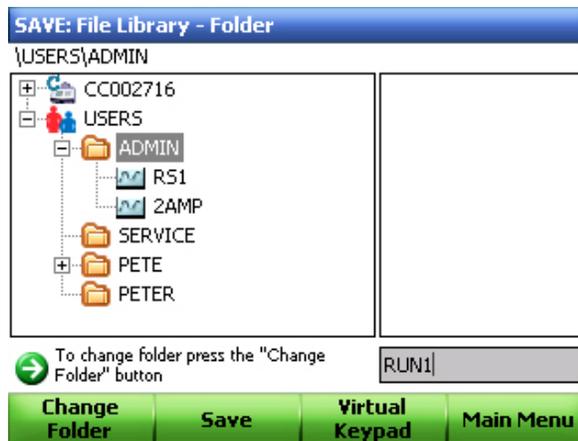


Figura 36. Introdução de um nome de protocolo.

4. Clique em **Run** (Executar) (F2) para continuar a executar o protocolo (Figura 37).

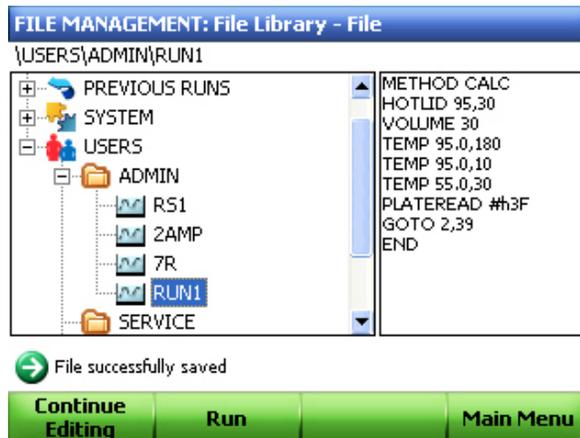


Figura 37. Protocolo correctamente guardado.

5. Edite o **Sample Volume** (volume de amostra) e a **Lid Temperature** (temperatura da tampa). Pode também ser registada uma **Sample ID** (ID de amostra) ou um **User** (utilizador) para o ciclo (Figura 38). Clique em **OK** (F1) para continuar.

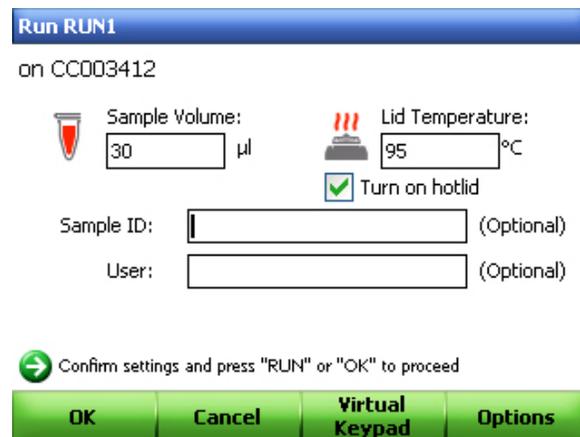


Figura 38. Edição do volume de amostra e da temperatura da tampa.

6. Seleccione um modo de leitura (**Scan Mode**) para recolher dados de fluorescência durante um ciclo (Figura 39).

The screenshot shows a software window titled "Running real time protocol". Inside, there is a section for "Scan Mode" with three radio button options: "All Channels", "SYBR / FAM only" (which is selected and has a dotted border around it), and "FRET". Below this is a text input field for "Data File Name (.zpcr)" containing the text "20080730_111150_CC003412_RTRUN". At the bottom of the window, there is a green arrow icon with the text "Select real time run mode" and three buttons: "OK", "Cancel", and "Edit Name".

Figura 39. Modo de leitura e nome do ficheiro de dados.

Os modos de leitura detectam fluoróforos calibrados nestes canais:

- **All Channels.** Recolhe dados dos canais 1 a 5 no sistema CFX96
- **SYBR/FAM only.** Recolhe dados só do canal 1 e faculta uma leitura rápida
- **FRET.** Recolhe dados só do canal FRET e faculta uma leitura rápida

7. Antes do ciclo, é criado um nome de ficheiro de dados independente predefinido. Se pretende alterar o nome, utilize as teclas de setas para navegar até à caixa **Data File Name** (Nome do ficheiro de dados), e prima as teclas alfanuméricas para introduzir letras ou números até digitar um novo nome do ficheiro de dados (.zpcr).
8. Clique em **OK** (F1) para iniciar o ciclo.

Execução de um protocolo guardado anteriormente

- Para alterar um protocolo existente, prima a tecla **EDIT** (EDITAR) para abrir a biblioteca de ficheiros e seleccionar um protocolo a editar
- Para executar um protocolo existente, prima a tecla de comando **RUN** (EXECUTAR) e seleccione um protocolo guardado anteriormente na biblioteca de ficheiros

Monitorização de um ciclo

Quando se inicia um ciclo, aparece a janela de estado do ciclo. Analise a informação nesta janela para monitorizar o progresso do ciclo.

- **Estado.** Prima a tecla de comando **STATUS** (ESTADO) para verificar o estado actual do protocolo, efectuar uma pausa no ciclo, cancelar um ciclo, ignorar um passo ou aceder ao menu principal (Figura 40)

- **Estado do tempo.** Prima a tecla de comando **VIEW (VER)** para ver um temporizador de contagem decrescente em ecrã total para o protocolo. Prima novamente a tecla **VIEW (VER)** para voltar para o ecrã de estado

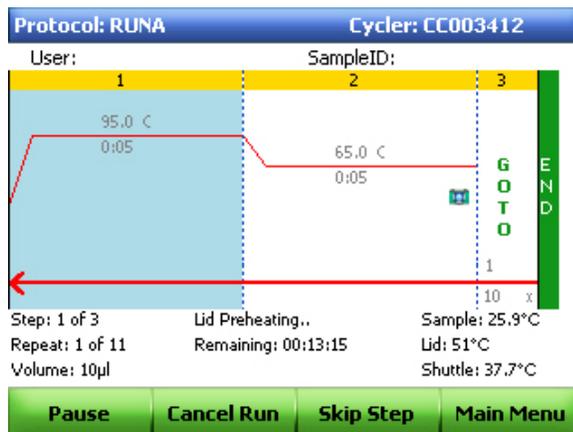


Figura 40. Monitorização do estado do ciclo.

Exportação de dados para análise

Quando o ciclo estiver concluído, os dados de fluorescência terão de ser transferidos para análise para um computador que execute o CFX Manager software. O ficheiro de dados independentes (standalone) é automaticamente guardado na pasta **RT_DATA** localizada na pasta **SYSTEM** (SISTEMA) (Figura 41).

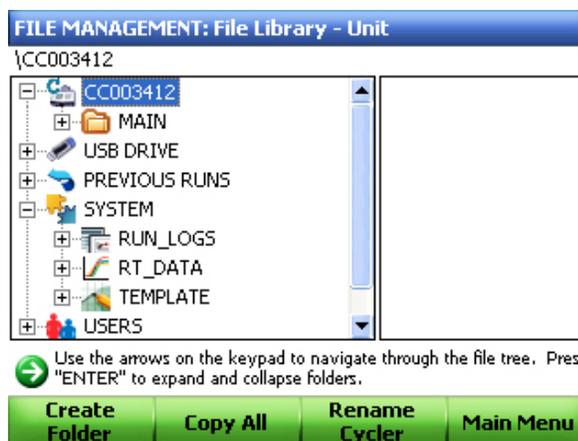


Figura 41. A pasta **RT_DATA** armazena ciclos de PCR em tempo real.

Se tiver sido inserido uma unidade de memória USB na respectiva porta do termociclador C1000, os dados (.zpcr) serão guardados automaticamente no directório de raiz da unidade de memória USB.

Se não houver uma unidade de memória USB inserida no termociclador no final do ciclo, siga as instruções abaixo:

1. Prima o botão **Files** (Ficheiros) (F2) no ecrã principal para aceder às pastas de ficheiros.
2. Navegue até à pasta **RT_DATA** e prima a tecla de seta p/direita para abrir a pasta.
3. Selecciono o ficheiro utilizando as teclas de setas p/cima e p/ baixo.

4. Prima **Export File** (Exportar ficheiro) (F1) para exportar os dados do ciclo (.zpcr) para a unidade de memória USB (Figura 42).

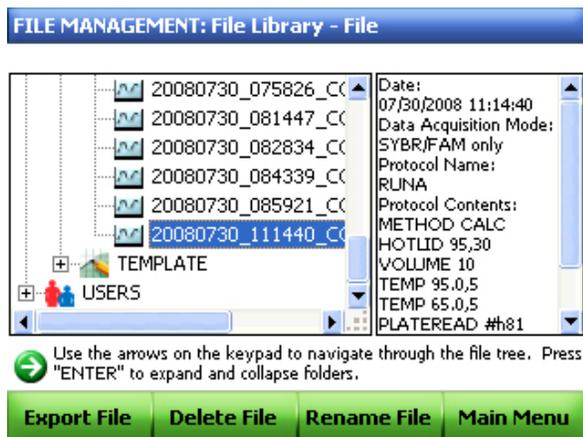


Figura 42. Exportação de dados de um ciclo independente para a unidade de memória USB.

5. Clique em **Yes** (Sim) (F1) para confirmar a exportação.

Pode optar pelo envio directo dos dados por e-mail para si a partir do termociclador C1000 após a conclusão do ciclo, configurando para tal as definições de e-mail (consulte o manual de instruções do termociclador C1000 para obter informações sobre a configuração das definições de e-mail).

Para enviar um e-mail com dados em anexo (.zpcr) no final de um ciclo, siga as instruções abaixo:

1. Seleccione **Options** (Opções) (F4) no ecrã de informações do ciclo (Figura 38 na página 56).
2. Com as teclas de setas, seleccione a opção **Send email notification** (Enviar notificação de e-mail).
3. Clique em **OK** (F1) para voltar para o ecrã de informações do ciclo.
4. Utilizando as teclas de setas, navegue para a caixa **Email Address** (Endereço de e-mail) e utilize as teclas alfanuméricas para introduzir o endereço de e-mail.
5. Clique em **OK** (F1) para continuar a executar o ensaio.

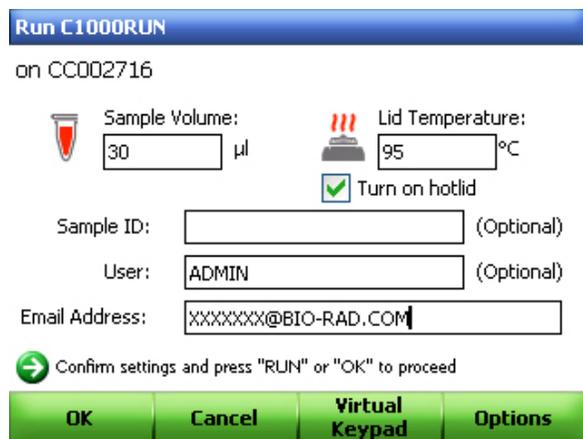


Figura 43. Confirmação da exportação para a unidade de memória USB.

Criação de um ficheiro de dados

Os dados independentes do ciclo (.zpcr) têm de ser convertidos num ficheiro de dados (.pcrd) pelo CFX Manager software para serem analisados. Para criar um ficheiro de dados a partir de um ciclo independente:

1. Clique e arraste o ficheiro .zpcr do directório da unidade de memória USB para a janela principal do software, ou seleccione **Select File > Open > Stand-alone Run** (Seleccionar ficheiro > Abrir > Ciclo independente) nas opções de menu da janela principal do software para seleccionar o nome do ficheiro.
2. Na janela **Run File Processor**, clique no botão **Select Plate** (Seleccionar placa) para importar o nome do ficheiro de placa que o software irá utilizar para criar o ficheiro de dados (Figura 44).

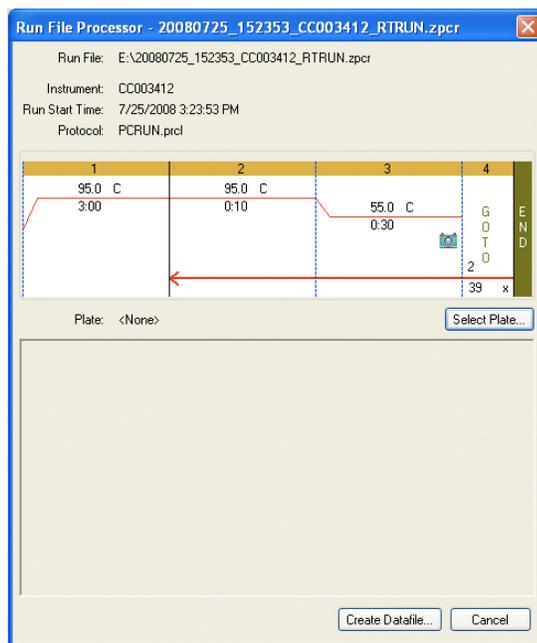


Figura 44. Atribuir um ficheiro de placa.

NOTA: O CFX Manager software verifica o modo de leitura e o tamanho da placa para o ficheiro de placa; estes devem coincidir com as definições actuais do ciclo iniciadas durante a experiência. Carregue um ficheiro Quick Plate (Placa rápida) para aceder rapidamente a dados de todos os poços.

7 Visão geral da análise de dados

Leia este capítulo para obter informações sobre a análise de dados:

- Janela Data Analysis (Análise de dados) (abaixo)
- Separador Quantitation (Quantificação) (página 65)
- Definições de análise de dados (página 67)
- Selectores de poços (página 68)
- Gráficos (página 70)
- Folhas de cálculo (página 71)

Janela Data Analysis (Análise de dados)

Durante a análise de dados, mudar a forma como os dados são apresentados ao alterar o conteúdo dos poços no Plate Editor (Editor de placas) não altera nunca os dados de fluorescência que foram colhidos de cada poço durante o ciclo. Depois de o módulo recolher dados de fluorescência, esses dados já não podem ser eliminados, embora seja possível remover dados visualizados e de análise.

Para alterar o conteúdo dos poços após um ciclo, abra o Plate Editor (Editor de placas) clicando no botão **View/Edit Plate** (Ver/Editar placa) na parte superior da janela Data Analysis (Análise de dados).

SUGESTÃO: Pode adicionar ou editar informações sobre o conteúdo do poço antes, durante ou depois de executar a experiência PCR em tempo real.

É necessário atribuir o modo de leitura e o tamanho da placa antes do ciclo, não podendo esses parâmetros ser alterados após o ciclo.

O CFX Manager™ software efectua o processamento de dados de PCR em tempo real no final de cada ciclo, e abre a janela Data Analysis (Análise de dados) para apresentar esses dados. Escolha um destes métodos para abrir ficheiros de dados existentes na janela Data Analysis (Análise de dados).

- Arraste um ficheiro de dados (extensão .pcrd) sobre a janela principal do software e largue-o
- Seleccione **File > Open > Data File** (Ficheiro > Abrir > Ficheiro de dados) na janela de software principal para seleccionar um ficheiro no browser do Windows
- Clique no botão de **Análise de dados** na barra de ferramentas da janela principal do software para seleccionar um ficheiro no browser do Windows

- Seleccione **File > Recent Data Files** (Ficheiro > Ficheiros de dados recentes) para seleccionar um ficheiro da lista dos dez ficheiros de dados mais recentemente abertos

A janela Data Analysis (Análise de dados) apresenta até nove separadores (Figura 45). Cada separador mostra os dados analisados para um método de análise específico:

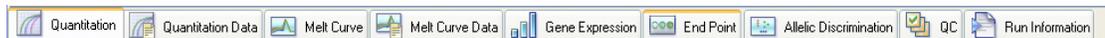


Figura 45. Todos os separadores que podem ser mostrados na janela Data Analysis (Análise de dados).

O software só apresenta um separador na janela Data Analysis (Análise de dados) se os dados forem colhidos no ciclo e se estiverem disponíveis para esse tipo de análise.

Barra de ferramentas de análise de dados

A barra de ferramentas da janela Data Analysis (Análise de dados) permite o acesso rápido a importantes funções de análise de dados. A Tabela 16 mostra as funções dos botões da barra de ferramentas.

Tabela 16. Barra de ferramentas da janela Data Analysis (Análise de dados).

Botão da barra de ferramentas	Nome	Função
	Save (Guardar)	Guardar o ficheiro de dados actual
	Print (Imprimir)	Imprimir a janela seleccionada
	Trace Style (Estilo de traçado)	Abrir a janela Trace Style (Estilo de traçado)
	Report (Relatório)	Abrir um relatório para o ficheiro de dados actual
	View/Edit Plate (Ver/Editar placa)	Abrir o Plate Editor (Editor de placas) para ver e editar o conteúdo dos poços
	Well Groups... (Grupos de poços)	Seleccionar o nome de um grupo de poços no menu pendente. A selecção predefinida é All Wells (Todos os poços)
	Help (Ajuda)	Abrir o site de ajuda (Help) do software para obter mais informações sobre a análise de dados

Barra de menus de análise de dados

A Tabela 17 mostra as funções dos itens da barra de menus.

Tabela 17. Itens da barra de menus da janela Data Analysis (Análise de dados).

Item de menu	Comando	Função
File (Ficheiro)	Save (Guardar)	Guardar o ficheiro
	Save As (Guardar como)	Guardar o ficheiro com um novo nome
	Repeat Experiment (Repetir a experiência)	Extrair o ficheiro da placa e do protocolo da experiência actual para voltar a executá-la
	Exit (Sair)	Sair da janela Data Analysis (Análise de dados)
View (Ver)	Run Log (Registo do ciclo)	Abrir uma janela Run Log (Registo do ciclo) para ver o registo do ciclo de um ficheiro de dados
Settings (Definições)	Analysis Mode (Modo de análise)	Seleccionar o método de subtracção da linha de base para os grupos de poços seleccionados nos dados
	C(t) Determination Mode (Modo de determinação de C(t))	Seleccionar o modo de regressão ou de limiar simples para determinar a forma como são calculados os valores C(t) para cada traçado
	Baseline Thresholds (Limiaries da linha de base)	Abrir a janela Baseline Thresholds (Limiaries da linha de base) para ajustar a linha de base ou o limiar
	Trace Styles (Estilos de traçado)	Abrir a janela Trace Styles (Estilos de traçado)
	View/Edit Plate (Ver/Editar placa)	Abrir o Plate Editor (Editor de placas) para ver e editar a placa
	Mouse Highlighting (Realce do rato)	Activar ou desactivar o realce simultâneo de dados com o ponteiro do rato SUGESTÃO: Se a opção Mouse Highlighting (Realce do rato) estiver desactivada, prima continuamente a tecla Control para activar temporariamente a função de realce
	Display Threshold Values (Mostrar valores de limiar)	Mostrar o valor da linha de limiar no gráfico

Tabela 17. Itens da barra de menus da janela Data Analysis (Análise de dados).

Item de menu	Comando	Função
Tools (Ferramentas)	Reports (Relatórios)	Abrir o relatório deste ficheiro de dados
	Import Fluorophore Calibration (Importar calibração de fluoróforos)	Seleccionar um ficheiro de calibração a aplicar ao ficheiro de dados actual
	Replace Plate (Substituir placa)	Substituir o ficheiro da placa actual na análise de dados
	Export All Data Sheets to Excel (Exportar todas as folhas de dados para Excel)	Exportar todas as visualizações de folha de cálculo de cada separador para um ficheiro formatado para Excel separado
Help (Ajuda)		Abrir a ajuda (Help) do software para obter mais informações sobre a análise de dados

Separador Quantitation (Quantificação)

Cada separador da janela Data Analysis (Análise de dados) apresenta dados em gráficos e folhas de cálculo para um método de análise específico, com um selector de poços para seleccionar os dados que pretende mostrar. A janela Data Analysis (Análise de dados) abre-se com o separador Quantitation (Quantificação) (Figura 46) em primeiro plano. Os dados do gráfico **Amplification** (Amplificação) neste separador devem ser utilizados para determinar as definições correctas de análise para a experiência.

NOTA: O gráfico **Amplification** (Amplificação) mostra a fluorescência relativa (RFU) para cada poço em cada ciclo. Cada traçado do gráfico representa dados de um único fluoróforo num poço.

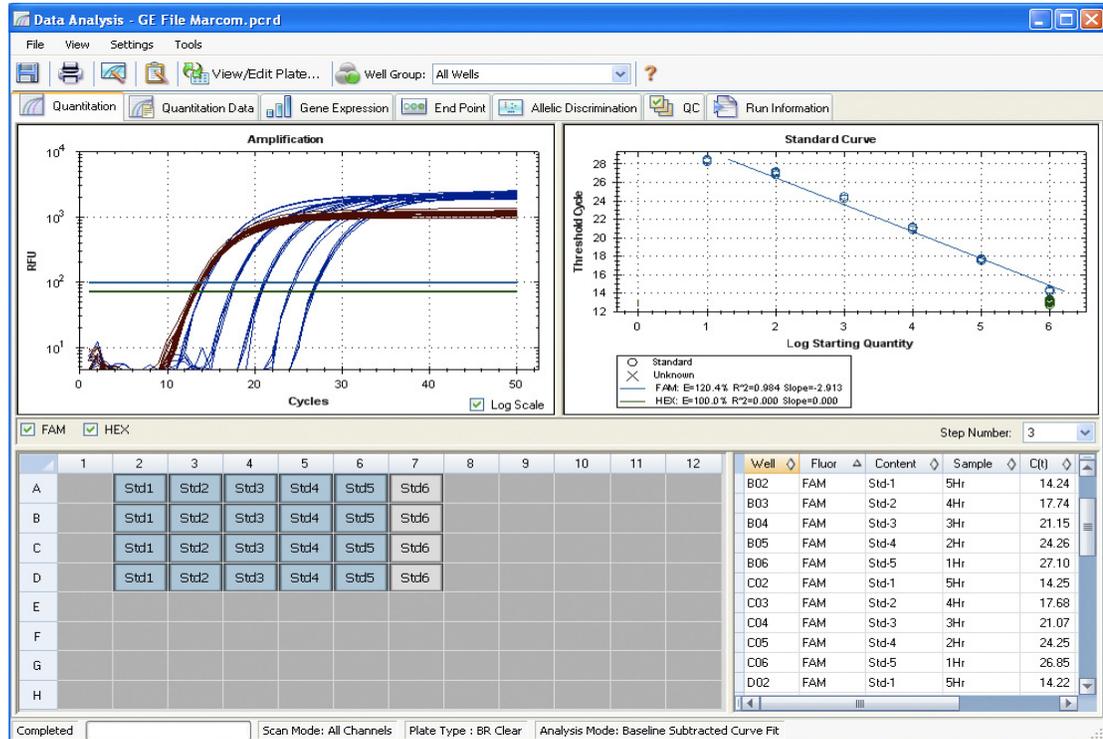


Figura 46. Disposição do separador Quantitation (Quantificação) na janela Data Analysis (Análise de dados).

NOTA: O software liga os dados nos painéis de cada separador de análise de dados. Por exemplo, realçar um poço colocando o ponteiro do rato sobre o poço na vista do selector de poços, realça os dados em todos os outros painéis.

Selector Step Number (n.º de passo)

O Sistema CFX96™ pode adquirir dados de fluorescência em vários passos do protocolo; o software mantém os dados adquiridos a cada passo de forma independente. O software mostra o selector **Step Number** (n.º de passo) abaixo do gráfico Standard Curve (Curva padrão) no separador Quantitation (Quantificação) sempre que um protocolo contiver mais do que um passo de recolha de dados. Ao seleccionar um passo, o software aplica essa selecção a todos os dados mostrados na janela Data Analysis (Análise de dados). A Figura 47 mostra que o número do passo de recolha de dados é **3** para todos os dados.

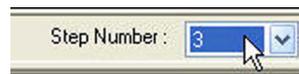


Figura 47. Selecção de número de passo na janela Data Analysis (Análise de dados).

Visualização de grupos de poços em análise de dados

Os poços da placa podem ser agrupados em subconjuntos para análise independente utilizando grupos de poços. Ao criar grupos de poços na janela **Well Groups Manager** (Gestor de grupos de poços) no Plate Editor (Editor de placas) (página 47), aparecem nomes de grupos na janela Data Analysis (Análise de dados) na lista Well Groups (Grupos de poços) na barra de ferramentas.

Por predefinição, o grupo de poços **All Wells** (Todos os poços) é seleccionado quando a janela Data Analysis (Análise de dados) é aberta inicialmente, com os dados em todos os poços com conteúdo mostrados nos gráficos e nas folhas de cálculo.

A Figura 48 mostra o grupo 2 (Group 2) seleccionado no menu Well Groups (Grupos de poços). Só os poços desse grupo de poços aparecem carregados no selector de poços e apenas os dados referentes a esses poços são incluídos nos cálculos de análise de dados.

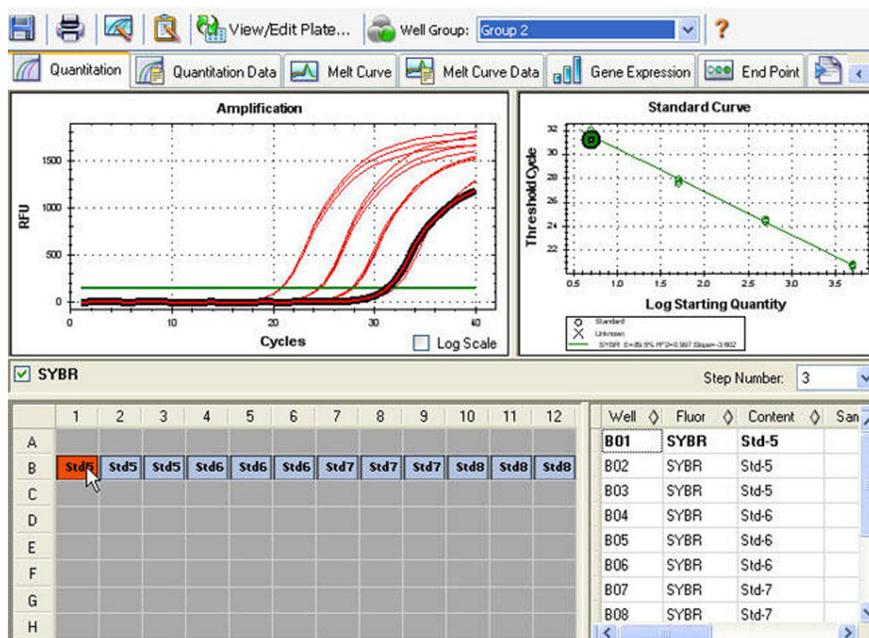


Figura 48. Janela Data Analysis (Análise de dados) com o grupo 2 (Group 2) seleccionado.

Definições de análise de dados

O gráfico **Amplification** (Amplificação) no separador Quantitation (Quantificação) mostra a fluorescência relativa (RFU) para cada poço em cada ciclo. Cada traçado do gráfico representa dados de um único fluoróforo num poço. Estes dados são utilizados para determinar valores $C(t)$ para cada poço por fluoróforo. O software utiliza um de dois modos para determinar os valores $C(t)$:

- **Regressão.** Este modo aplica um modelo de regressão não linear e multivariável a traçados de poços individuais, utilizando posteriormente este modelo para calcular um valor $C(t)$ óptimo
- **Limiar simples.** Este modo utiliza um valor de limiar simples para calcular o valor $C(t)$ com base no ponto de intersecção de limiares de traçados de fluorescência individuais

Ajuste do limiar

No modo de limiar simples, ajuste o limiar de um fluoróforo clicando na linha de limiar no gráfico Amplification (Amplificação) e deslocando o ponteiro do rato na vertical. Em alternativa, especifique um limiar de intersecção exacto para o fluoróforo seleccionado, de acordo com as instruções seguintes:

1. Seleccione **Settings > Baseline Thresholds** (Definições > Limiares da linha de base) na barra de menus para abrir a janela Baseline Thresholds (Limiares da linha de base).
2. Ajuste o limiar de intersecção (Figura 49) para o fluoróforo clicando em **User Defined** (Definido pelo utilizador) e introduzindo um número de limiar.

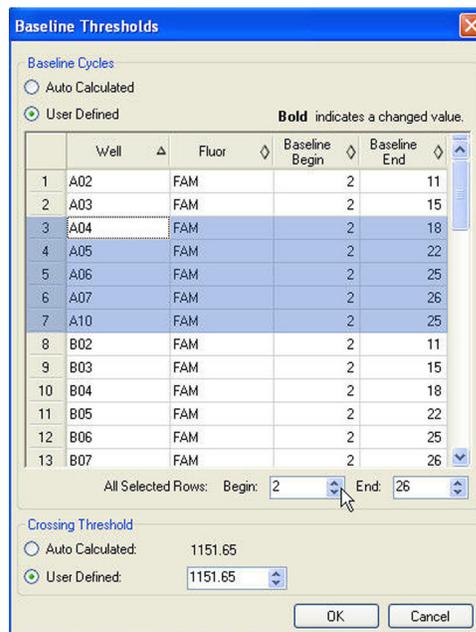


Figura 49. Janela Baseline Thresholds (Limiares da linha de base).

3. Clique em **OK** para confirmar a alteração e fechar a janela.

Definições da linha de base

O software define automaticamente a linha de base individualmente para cada poço. Depois de seleccionar os poços para análise, verifique as definições da linha de base nestes poços. Abra a janela Baseline Thresholds (Limiars da linha de base) (Figura 49) para alterar a linha de base predefinida de poços seleccionados. Para abrir esta janela:

1. Selecciona **Settings > Baseline Thresholds** (Definições > Limiars da linha de base) para abrir a janela Baseline Thresholds (Limiars da linha de base).

Para ajustar o ciclo da linha de base inicial e final para cada poço:

1. No painel Baseline Cycles (Ciclos da linha de base), para seleccionar um ou mais poços, clique no número de fila, clique no canto superior esquerdo para seleccionar todos os poços, prima continuamente a tecla Control para seleccionar vários poços individuais ou prima continuamente a tecla Shift para seleccionar vários poços numa fila.
2. Ajuste o ciclo **Baseline Begin** (Início da linha de base) e **Baseline End** (Fim da linha de base) para todos os poços seleccionados, ou altere o número de ciclo de **Begin** (Início) e **End** (Fim) na parte inferior da folha de cálculo (Figura 49).
3. Clique em **OK** para confirmar a alteração e fechar a janela.

Seleção do modo de análise

Selecione o modo de análise para determinar o método de subtracção da linha de base para todos os traçados de fluorescência. Selecciona **Settings > Analysis Mode** (Definições > Modo de análise) para escolher uma das três opções seguintes:

- **No Baseline Subtraction (Nenhuma subtracção da linha de base).** O software apresenta os dados na forma de traçados de fluorescência relativa. Alguma análise não é possível neste modo de análise
- **Baseline Subtracted (Com subtracção da linha de base).** O software apresenta os dados na forma de traçados com subtracção da linha de base para cada fluoróforo num poço. O software tem de efectuar a subtracção da linha de base dos dados para determinar ciclos de limiar, construir curvas padrão e determinar a concentração de amostras desconhecidas. Para gerar um traçado com subtracção da linha de base, o software ajusta a melhor linha recta através da fluorescência registada de cada poço durante os ciclos da linha de base, e subtrai depois os dados de melhor ajuste dos dados de fundo com subtracção em cada ciclo
- **Baseline Subtracted Curve Fit (Ajuste de curva com subtracção da linha de base).** O software apresenta os dados na forma de traçados com subtracção da linha de base, e o software regulariza a curva com subtracção da linha de base utilizando um filtro de média centrado. Este processo é realizado de modo que cada $C(t)$ fique constante

Selectores de poços

Clique nos poços do selector de poços para mostrar ou ocultar os dados dos gráficos ou das folhas de cálculo na janela Data Analysis (Análise de dados):

- Para ocultar um poço, realce e clique num poço individual. Para mostrar esse poço, realce e clique de novo no poço
- Para ocultar vários poços, clique e arraste os poços que deseja seleccionar. Para mostrar esses poços, clique e arraste de novo os poços

- Clique no canto superior esquerdo da placa para ocultar todos os poços. Clique de novo no canto superior esquerdo para mostrar todos os poços
- Clique no início de uma coluna ou fila para ocultar esses poços. Clique de novo na coluna ou fila para mostrar os poços

Só os poços carregados com conteúdo (introduzidos no Plate Editor) podem ser seleccionados no selector de poços, ficando visível a sua cor se forem seleccionados. Conforme mostrado na Figura 50, o selector de poços mostra os três tipos de poços seguintes:

- **Poços carregados seleccionados (azul).** Estes poços contêm um tipo de amostra **Unk** (desconhecido) carregado. Os dados destes poços aparecem na janela Data Analysis (Análise de dados)
- **Poços carregados não seleccionados (cinzento claro).** Estes poços contêm tipos de amostra **Std** (Padrão) e **Pos**. Os dados de poços não seleccionados não aparecem na janela Data Analysis (Análise de dados)
- **Poços vazios (cinzento escuro).** Estes poços não foram carregados na janela Plate Editor

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
B		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
C		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
D		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6			PosB		
E		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					
F		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					
G		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					
H		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6					

Figura 50. Aparecem três cores de poços num selector de poços.

Exclusão temporária de poços da análise

OPÇÃO DE CLIQUE DIREITO

1. Clique com o botão direito do rato no poço do selector de poços, num traçado de fluorescência ou num ponto esboçado na curva padrão.
2. Nas opções do menu, seleccione **Exclude Well XX from Analysis** (Excluir poço XX da análise).

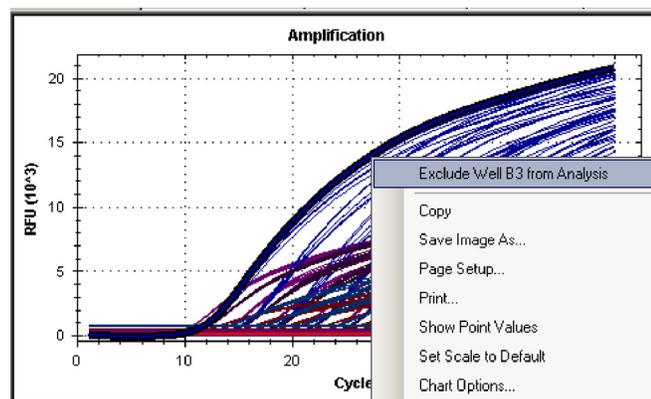


Figura 51. Clique com o botão direito do rato para excluir um poço da análise.

OPÇÕES DO PLATE EDITOR (EDITOR DE PLACAS)

1. Clique no botão **View/Edit Plate** (Ver/Editar placa) na barra de ferramentas da janela Data Analysis (Análise de dados).
2. Seleccione um ou mais poços na visualização do selector de poços.
3. Clique em **Exclude Wells in Analysis** (Excluir poços na análise) (Figura 52) para excluir os poços seleccionados. Esta caixa de selecção encontra-se na parte inferior dos controlos do Plate Editor (Editor de placas), no lado direito da janela.



Figura 52. Caixa de selecção Exclude Wells in Analysis (Excluir poços na análise) na parte inferior do painel.

4. Os poços excluídos são marcados com um asterisco (*) na janela Plate Editor (Editor de placas).

Em alternativa, para remover permanentemente os poços da análise, limpe o conteúdo dos poços no Plate Editor (Editor de placas) clicando no botão **Clear Wells** (Limpar poços).

AVISO! Terá de voltar a introduzir o conteúdo de poços que tenha sido limpo.

Gráficos

Cada gráfico da janela Data Analysis (Análise de dados) apresenta os dados num gráfico diferente e inclui opções de ajuste de dados. Para ampliar uma área do gráfico, seleccione a área clicando e arrastando com o rato. O software redimensiona o gráfico e centra-o na área seleccionada.

Itens comuns de menu de clique direito para gráficos

Todos os gráficos apresentam itens de menu de clique direito. Alguns dos itens disponíveis estão presentes para todos os gráficos, podendo ser utilizados para mudar a forma como os dados são apresentados ou para exportar facilmente os dados a partir de um gráfico (Tabela 18).

Tabela 18. Itens de menu de clique direito para gráficos.

Item	Função
Copy (Copiar)	Copiar o gráfico para a área de transferência
Save Image As... (Guardar imagem como)	Guardar a imagem do gráfico no tipo de ficheiro de imagem seleccionado. Selecciona entre os formatos seguintes: PNG (predefinição), GIF , JPG , TIF ou BMP
Page Setup... (Configuração de página)	Pré-visualizar e seleccionar a configuração da página para impressão
Print... (Imprimir)	Imprimir o gráfico
Show Point Values (Mostrar valores de pontos)	Mostrar os valores dos pontos quando o rato de desloca sobre um ponto do gráfico.
Set Scale to Default (Definir escala para predefinição)	Voltar para a visualização predefinida da escala depois de ampliar o gráfico
Chart Options... (Opções do gráfico)	Abrir a janela Chart Options (Opções do gráfico) para alterar o gráfico, incluindo alterar o título, seleccionar limites para os eixos x e y, mostrar as linhas da grelha e mostrar marcas menores nos eixos

NOTA: Os itens de menu que se aplicam a gráficos específicos são descritos no capítulo seguinte “Janelas de análise de dados” (página 73).

Folhas de cálculo

As folhas de cálculo mostradas em Data Analysis (Análise de dados) incluem opções para ordenar e transferir dados. Ordene as colunas de acordo com um dos métodos seguintes:

- Clique e arraste uma coluna para uma nova localização na tabela seleccionada
- Clique no cabeçalho da coluna para ordenar os dados por ordem ascendente (Ascending) ou descendente (Descending)

Para ordenar até três colunas de dados na janela Sort (Ordenar), siga os passos seguintes:

1. Clique com o botão direito do rato na folha de cálculo para abrir o menu e seleccione **Sort** (Ordenar).
2. Na janela Sort (Ordenar), seleccione o primeiro título de coluna a ordenar. Ordene os dados por ordem ascendente (Ascending) ou descendente (Descending).
3. Para seleccionar mais do que um título de coluna, seleccione o título no menu pendente. Selecciona **Ascending** (Ascendente) ou **Descending** (Descendente) para ordenar a coluna por essa ordem.
4. Clique em **OK** para ordenar os dados, ou clique em **Cancel** (Cancelar) para interromper a acção.

Para realçar os dados nos gráficos associados e no selector de poços, o ponteiro do rato deve manter-se sobre uma célula. Se clicar na célula, poderá copiar o conteúdo para colar noutro programa de software.

Itens comuns de menu de clique direito para folhas de cálculo

Clique com o botão direito do rato em qualquer visualização da folha de cálculo para seleccionar os itens mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Itens de menu de clique direito para folhas de cálculo.

Item	Função
Copy (Copiar)	Copiar o conteúdo dos poços seleccionados para a área de transferência, e colar depois o conteúdo numa folha de cálculo, por ex. Excel
Copy as Image (Copiar como imagem)	Copiar a visualização da folha de cálculo como um ficheiro de imagem, e colar num ficheiro que aceite um ficheiro de imagem, como ficheiros de texto, imagem ou folha de cálculo
Print... (Imprimir)	Imprimir a visualização actual
Print Selection... (Imprimir selecção)	Imprimir a selecção actual
Export to Excel... (Exportar para Excel)	Exportar os dados para uma folha de cálculo Excel
Export to Text... (Exportar para texto)	Exportar os dados para um editor de texto
Export to XML... (Exportar para XML)	Exportar os dados para um ficheiro XML
Export to HTML... (Exportar para HTML)	Exportar os dados para um ficheiro HTML
Find... (Localizar)	Procurar texto
Sort... (Ordenar)	Ordenar os dados em até três colunas

8 Janelas de análise de dados

Leia este capítulo para obter mais informações sobre os separadores da janela Data Analysis (Análise de dados):

- Separador Quantitation (Quantificação) (abaixo)
- Separador Quantitation Data (Dados de quantificação) (página 76)
- Separador Melt Curve (Curva de fusão) (página 78)
- Separador Melt Curve Data (Dados da curva de fusão) (página 79)
- Separador End Point (Ponto final) (página 80)
- Separador Allelic Discrimination (Discriminação alélica) (página 81)
- Separador QC (Controlo de qualidade) (página 83)
- Separador Run Information (Informação do ciclo) (página 84)
- Relatórios de ficheiros de dados (página 85)

Separador Quantitation (Quantificação)

Utilize os dados no separador Quantitation (Quantificação) (Figura 46 na página 65) para definir as condições de análise de dados, incluindo as definições da linha de base para poços individuais e as definições de limiares. O separador Quantitation (Quantificação) apresenta dados nas quatro visualizações seguintes:

- **Gráfico de amplificação.** Mostra as unidades de fluorescência relativa (RFUs) para cada poço em cada ciclo. Cada traçado do gráfico representa dados de um único fluoróforo num poço
- **Curva padrão.** Este gráfico só é mostrado se a experiência incluir poços designados por Sample Type Standard (Tipo de amostra padrão). Mostra uma curva padrão com o ciclo de limiar representado em relação ao registo da quantidade inicial. A legenda mostra a eficiência da reacção (Reaction Efficiency) (E) para cada fluoróforo nos poços com um tipo de amostra padrão
- **Selector de poços.** Selecciona os poços com os dados de fluorescência que pretende mostrar
- **Folha de cálculo.** Mostra uma folha de cálculo dos dados recolhidos nos poços seleccionados

Selector de fluoróforos

Para seleccionar os dados de fluoróforos a apresentar nos gráficos e folhas de cálculo do separador Quantitation (Quantificação), clique no selector de fluoróforos abaixo do gráfico de amplificação (Amplification) (Figura 53). Clique na caixa junto ao nome do fluoróforo para mostrar ou ocultar os dados do fluoróforo na janela de análise de dados.

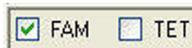


Figura 53. Selector de fluoróforos com FAM seleccionado.

Janela Trace Styles (Estilos de traçado)

Abra a janela Trace Styles (Estilos de traçado) (Figura 54) para ajustar o aspecto dos traçados nos gráficos de amplificação e curva de fusão dos separadores Quantitation (Quantificação) e Melt Curve (Curva de fusão).

Para abrir esta janela, siga os passos seguintes:

1. Selecciona apenas um fluoróforo nas caixas de selecção de fluoróforos.
2. Clique no botão **Trace Styles** (Estilos de traçado) na barra de ferramentas de Data Analysis (Análise de dados), ou seccione **Settings > Trace Styles** (Definições > Estilos de traçado) na barra de menus de Data Analysis (Análise de dados).

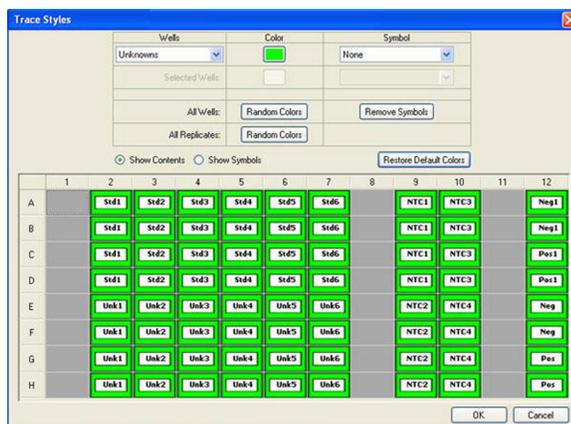


Figura 54. Janela Trace Styles (Estilos de traçado).

Utilize as ferramentas da janela Trace Styles (Estilos de traçado) para ajustar o aspecto dos traçados e pré-visualizar as alterações no selector de poços na parte inferior da janela.

- Seccione um conjunto específico de poços utilizando o selector de poços na parte inferior da janela. Em alternativa, seccione poços que contenham um tipo de amostra no menu pendente na coluna **Wells** (Poços)
- Clique na caixa na coluna Color (Cor) para seleccionar uma cor para os poços
- Seccione um símbolo no menu pendente da coluna Symbol (Símbolo)
- Clique em **Show Contents** (Mostrar conteúdo) para mostrar os tipos de amostra em cada poço, ou clique em **Show Symbols** (Mostrar símbolos) para mostrar os símbolos seleccionados em cada poço

Opção Log Scale (Escala logarítmica)

Clique na caixa **Log Scale** (Escala logarítmica) sob o gráfico de amplificação (Amplification) para ver os traçados de fluorescência numa escala semi-logarítmica, conforme mostrado na Figura 55.

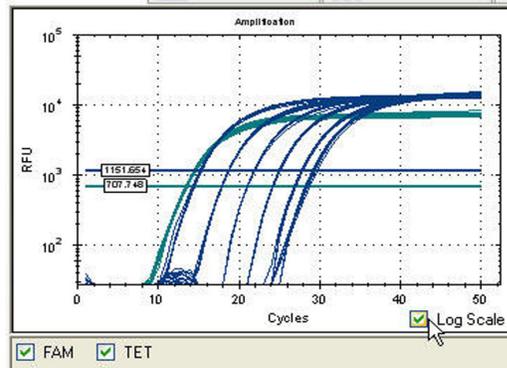


Figura 55. Opção Log Scale (Escala logarítmica) seleccionada no gráfico de amplificação (Amplification).

Gráfico de curva padrão

O software cria um gráfico de curva padrão (Standard Curve) (Figura 56) no separador Quantitation (Quantificação) se os dados incluírem tipos de amostra definidos como padrão (Std) para um fluoróforo na experiência.

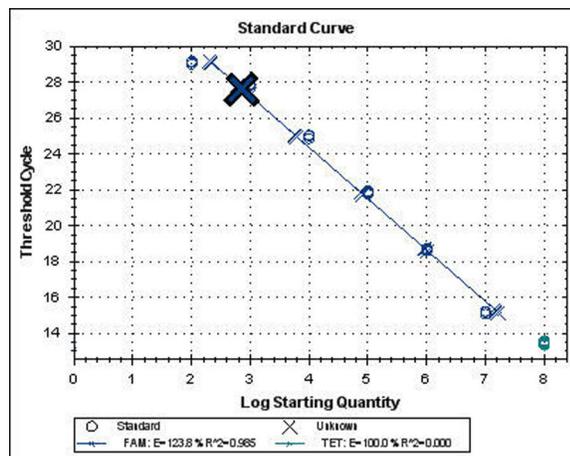


Figura 56. Gráfico de curva padrão.

O gráfico de curva padrão (Standard Curve) mostra a informação seguinte:

- Nome de cada curva (o nome do fluoróforo)
- Cor de cada fluoróforo
- Eficiência da reacção (E). Utilize esta estatística para otimizar uma reacção multiplex e equalizar os dados para uma curva padrão

NOTA: A eficiência da reacção descreve a quantidade do alvo que é produzida com cada ciclo no protocolo. Uma eficiência de 100% significa que está a duplicar o alvo com cada ciclo.

- Coeficiente de determinação, R^2 (escrito como R^2). Utilize esta estatística para determinar até que ponto a linha descreve os dados correctamente (qualidade do ajuste)

Opções de menu de clique direito dos gráficos

Além das opções de menu de clique direito habituais (copiar, imprimir e exportar gráficos), a Tabela 20 mostra as opções de menu disponíveis apenas no gráfico de amplificação (Amplification).

Tabela 20. Opções de menu de clique direito específicas do gráfico de amplificação.

Opção de menu	Função
Show Threshold Values (Mostrar valores de limiar)	Mostrar o valor de limiar para cada curva de amplificação no gráfico
Trace Styles... (Estilos de traçado)	Abrir a janela Trace Styles (Estilos de traçado) para alterar os estilos dos traçados que aparecem nos separadores Quantitation (Quantificação) e Melt Curve (Curva de fusão)
Baseline Thresholds... (Limiars da linha de base)	Abrir a janela Baseline Thresholds (Limiars da linha de base) para alterar a linha de base ou os limiars de cada fluoróforo (as alterações aparecem no gráfico de amplificação (Amplification) no separador Quantitation (Quantificação))

Separador Quantitation Data (Dados de quantificação)

O separador Quantitation Data (Dados de quantificação) mostra folhas de cálculo que descrevem os dados de quantificação recolhidos em cada poço. Selecciona uma das três opções para mostrar os dados em formatos diferentes:

- **Results (Resultados).** Mostra os dados numa folha de cálculo
- **Plate (Placa).** Mostra uma visualização dos dados em cada poço como um mapa de placas
- **RFU.** Escolha esta folha de cálculo para mostrar as quantidades de RFU em cada poço para cada ciclo

SUGESTÃO: Clique com o botão direito do rato para ver opções, incluindo a opção de ordenar

Folha de cálculo de resultados

Selecione uma folha de cálculo **Results** (Resultados) (Figura 57) para ver dados de cada poço na placa.

Well	Fluor	Content	Target	Sample	Threshold Cycle (C(t))	C(t) Mean	C(t) Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean
A02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.39	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
B02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.24	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
C02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.25	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
D02	FAM	Std-1	NGK	5Hr	14.22	14.28	0.081	1.000E+06	6.000	1.00E+06
A02	HEX	Std-1	ACT	5Hr	13.27	13.13	0.101	1.000E+06	6.000	1.00E+06

Figura 57. Separador Quantitation Data (Dados de quantificação) com a folha de cálculo de resultados seleccionada.

NOTA: Todos os cálculos de desvio padrão (Std. Dev) se aplicam aos grupos de réplicas atribuídos nos poços na janela Plate Editor (Editor de placas).
Os cálculos fazem a média do valor C(t) para cada poço no grupo de réplicas.

A folha de cálculo Results (Resultados) inclui o tipo de informação mostrada na Tabela 21.

Tabela 21. Conteúdo da folha de cálculo de resultados.

Informação	Descrição
Well (Poço)	Poço na placa
Fluor	Fluoróforo detectado
Content (Conteúdo)	Tipo de amostra e número da réplica
Target (Alvo)	Nome do alvo de amplificação (gene)
Sample (Amostra)	Descrição da amostra
Threshold Cycle (C(t)) (Ciclo de limiar)	Ciclo de limiar
C(t) Mean (Média de C(t))	A média do ciclo de limiar para o grupo de réplicas
C(t) Std. Dev	Desvio padrão do ciclo de limiar para o grupo de réplicas
Starting Quantity (SQ) (Quantidade inicial)	Estimativa da quantidade inicial do alvo
Log Starting Quantity (Registo quantidade inicial)	Registo da quantidade inicial
SQ Mean (Média SQ)	Média da quantidade inicial
SQ Std. Dev	Desvio padrão da quantidade inicial
Set Point (Ponto de acerto)	Temperatura da amostra no poço para um passo do gradiente
Sample Note (Nota de amostra)	Um ciclo de desnaturação, annealing (hibridização) e extensão, ou um ciclo de passos de annealing (hibridização) e extensão num protocolo

Folha de cálculo Plate (Placa)

Selecione a folha de cálculo **Plate** (Placa) para ver um mapa de placas dos dados de um fluoróforo de cada vez. Selecione cada fluoróforo clicando num separador na parte inferior da folha de cálculo. A Figura 58 mostra a folha de cálculo Plate (Placa) como um mapa de placas.

		1	2	3	4	5	6	7
A	Content		Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6
	C(t)		14.39	17.79	21.20	24.49	27.20	28.54
B	Content		Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6
	C(t)		14.24	17.74	21.15	24.26	27.10	28.39
C	Content		Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6
	C(t)		14.25	17.68	21.07	24.25	26.85	28.41

Figura 58. Folha de cálculo Plate (Placa) no separador Quantitation Data (Dados de quantificação).

Folha de cálculo RFU

Selecione a folha de cálculo **RFU** para ver as leituras de RFU para cada poço adquiridas em cada ciclo da experiência. Selecione os fluoróforos individuais clicando num separador na parte inferior da folha de cálculo. O número do poço aparece no topo de cada coluna, e o número do ciclo aparece à esquerda de cada fila (Figura 59).

Cycle	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B2	B3	B4	B5	B6
1	6.81	2.31	1.23	2.95	-5.79	-10.6	2.05	6.76	-2.89	-14.0	-6.27
2	5.77	1.26	3.96	0.822	-6.22	-5.26	6.28	12.3	1.22	-7.55	-7.71
3	4.08	3.28	1.84	0.687	-5.05	-8.13	5.07	3.10	1.18	-4.50	-6.59
4	2.73	0.204	-1.27	-0.473	3.02	-4.26	2.70	5.57	2.42	-1.25	-2.66
5	2.69	0.220	4.31	1.42	-1.91	1.63	0.275	5.51	2.41	-1.60	-0.366

Figura 59. Folha de cálculo RFU no separador Quantitation Data (Dados de quantificação).

Separador Melt Curve (Curva de fusão)

Abra o separador Melt Curve (Curva de fusão) (Figura 60) para determinar a temperatura de fusão (T_m) de produtos de PCR amplificados. Este separador mostra os dados da curva de fusão nas quatro visualizações seguintes:

- **Melt Curve.** Ver os dados em tempo real para cada fluoróforo como RFUs por temperatura para cada poço
- **Melt Peak.** Ver a regressão negativa dos dados de RFU por temperatura para cada poço
- **Well Selector.** Selecionar poços para mostrar ou ocultar os dados

- **Peak spreadsheet.** Ver uma folha de cálculo dos dados recolhidos no poço seleccionado

NOTA: Esta folha de cálculo mostra apenas um máximo de dois picos para cada traçado. Para ver mais picos, clique no separador **Melt Curve Data** (Dados da curva de fusão) (página 79).

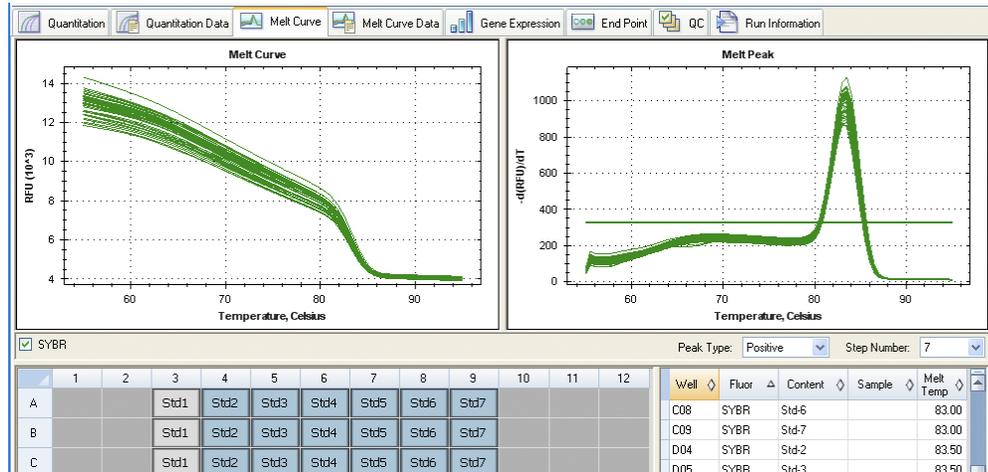


Figura 60. Disposição do separador Melt Curve (Curva de fusão) na janela Data Analysis (Análise de dados).

Ajuste os dados da curva de fusão utilizando um dos métodos seguintes:

- Clique e arraste as barras limite no gráfico Melt Peak (Pico de fusão) para incluir ou excluir picos na análise de dados
- Seleccione **Positive** (Positivo) no menu pendente Peak Type (Tipo de pico) para mostrar os dados de folha de cálculo dos picos acima da linha de limiar de fusão, ou seleccione **Negative** (Negativo) para ver os dados de folha de cálculo dos picos abaixo da linha de limiar de fusão

Separador Melt Curve Data (Dados da curva de fusão)

O separador Melt Curve Data (Dados da curva de fusão) mostra os dados do separador Melt Curve (Curva de fusão) em várias folhas de cálculo que incluem todos os picos de fusão para cada traçado. Seleccione uma das quatro opções para mostrar os dados da curva de fusão em folhas de cálculo diferentes.

- **Melt Peaks.** Mostrar todos os dados, incluindo todos os dados de fusão, para cada traçado
- **Plate.** Mostrar uma vista dos dados e do conteúdo de cada poço na placa, incluindo o conteúdo, o nome da amostra, pico 1 e pico 2
- **RFU.** Mostrar as quantidades de RFU a cada temperatura para cada poço
- **-d(RFU)/dT.** Mostrar a taxa de alteração negativa na RFU à medida que a temperatura (T) muda para cada poço. Esta é o primeiro esboço de regressão para cada poço na placa

Separador End Point (Ponto final)

Abra o separador End Point (Ponto final) para analisar unidades de fluorescência relativa (RFUs) finais para os poços de amostra. O software compara os níveis de RFU de poços com amostras desconhecidas com os níveis de RFU de poços com controlos negativos, e classifica as desconhecidas como Positivo ou Negativo. As amostras positivas apresentam um valor de RFU superior ao valor médio de RFU dos controlos negativos, mais o valor de cutoff.

Para analisar os dados de ponto final, a placa deve conter controlos negativos ou o software não poderá fazer a determinação. Execute um dos dois tipos de protocolos seguintes:

- **Executar um protocolo de quantificação.** Configure um protocolo padrão. Depois de executar a experiência, abra a janela Data Analysis (Análise de dados), ajuste as definições de análise de dados no separador Quantitation (Quantificação) e clique no separador End Point (Ponto final) para escolher um ciclo de ponto final
- **Executar um protocolo só de ponto final.** Carregue o protocolo End Point Only (Só ponto final) no separador Plate (Placa) da janela Experiment Setup (Configuração da experiência), seleccione ou crie uma placa e execute a experiência

O separador End Point (Ponto final) mostra os valores médios de RFU para determinar se o alvo foi amplificado ou não pelo último ciclo (final). Utilize estes dados para determinar se uma sequência alvo específica está presente (positiva) numa amostra. Os alvos positivos apresentam valores de RFU superiores ao nível de cutoff que for definido.

O software apresenta os dados seguintes no separador End Point (Ponto final):

- **Settings.** Ajuste das definições de análise de dados
- **Results.** Mostra os resultados imediatamente após o ajuste das definições
- **Well Selector.** Seleccione os poços com os dados de ponto final que pretende mostrar
- **Folha de cálculo de poços.** Mostra uma folha de cálculo da RFU final recolhida nos poços seleccionados

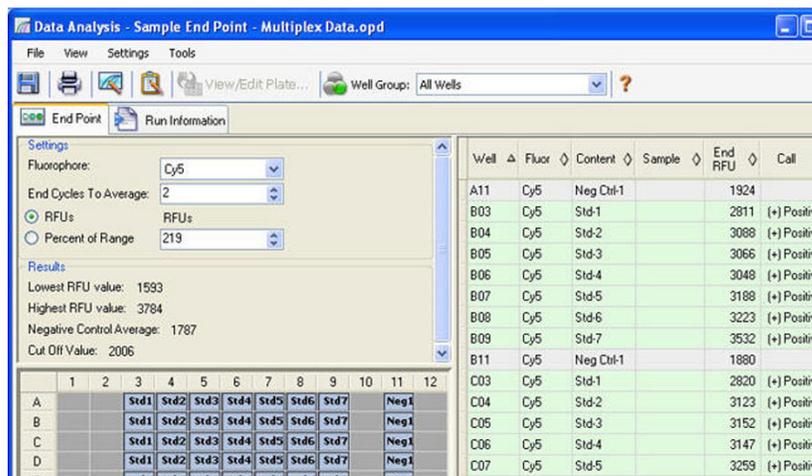


Figura 61. Disposição do separador de análise End Point (Ponto final).

A lista Results (Resultados) inclui a informação seguinte:

- **Lowest RFU value.** O valor de RFU mais baixo dos dados
- **Highest RFU value.** O valor de RFU mais alto dos dados
- **Negative Control Average.** RFU média para os poços que contêm controlos negativos
- **Cut Off Value.** O valor de cutoff é calculado adicionando a tolerância (RFU ou percentagem de intervalo mostrado nas definições) e a média dos controlos

negativos. As amostras com RFUs superiores ao valor de cutoff serão designadas por “Positivas”. Para ajustar o valor de cutoff, altere a RFU ou a percentagem de intervalo

O valor de cutoff é calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{Media de control negativo} + \text{Tolerancia}$$

Selecione uma tolerância de acordo com um dos métodos seguintes:

- **RFUs (predefinição).** Selecione este método para utilizar um valor absoluto de RFU para a tolerância. O valor mínimo de tolerância de RFU é 2. O máximo é o valor absoluto do valor máximo de RFU menos o valor absoluto do valor mínimo de RFU. O valor predefinido de tolerância de RFU é 10% do intervalo total de RFU
- **Percent of Range.** Selecione este método para utilizar uma percentagem do intervalo de RFU para a tolerância. A percentagem de intervalo mínima é 1 por cento. A percentagem de intervalo máxima é 99 por cento. A percentagem de intervalo predefinida é 10 por cento

Ajuste da análise de dados de ponto final

Ajuste a informação mostrada no separador End Point (Ponto final) utilizando os métodos seguintes:

- Escolha um fluoróforo (**Fluorophore**) na lista pendente para ver os dados
- Escolha um valor de **End Cycle to Average** para definir o número de ciclos que o software utiliza para calcular a RFU média de ponto final
- Selecione **RFUs** para ver os dados em unidades de fluorescência relativa
- Selecione **Percentage of Range** (Percentagem de intervalo) para ver os dados como uma percentagem do intervalo de RFU

Separador Allelic Discrimination (Discriminação alélica)

O separador Allelic Discrimination (Discriminação alélica) atribui os genótipos a poços com amostras desconhecidas utilizando a RFU ou C(t) de amostras de controlo positivas (Figura 62). Utilize estes dados para identificar genótipos de amostras, incluindo Alelo 1, Alelo 2, Heterozigoto, Desconhecido, Controlo 1 ou Controlo 2.

NOTA: Os dados de discriminação alélica devem ser provenientes de experiências multiplex.

A análise de discriminação alélica requer o seguinte conteúdo mínimo dos poços:

- Dois fluoróforos em cada poço, com excepção dos poços que contêm controlos positivos, os quais só podem conter um fluoróforo
- Um fluoróforo que seja comum a todos os poços do grupo de poços
- Amostras NTC (no template control) se pretender normalizar os dados

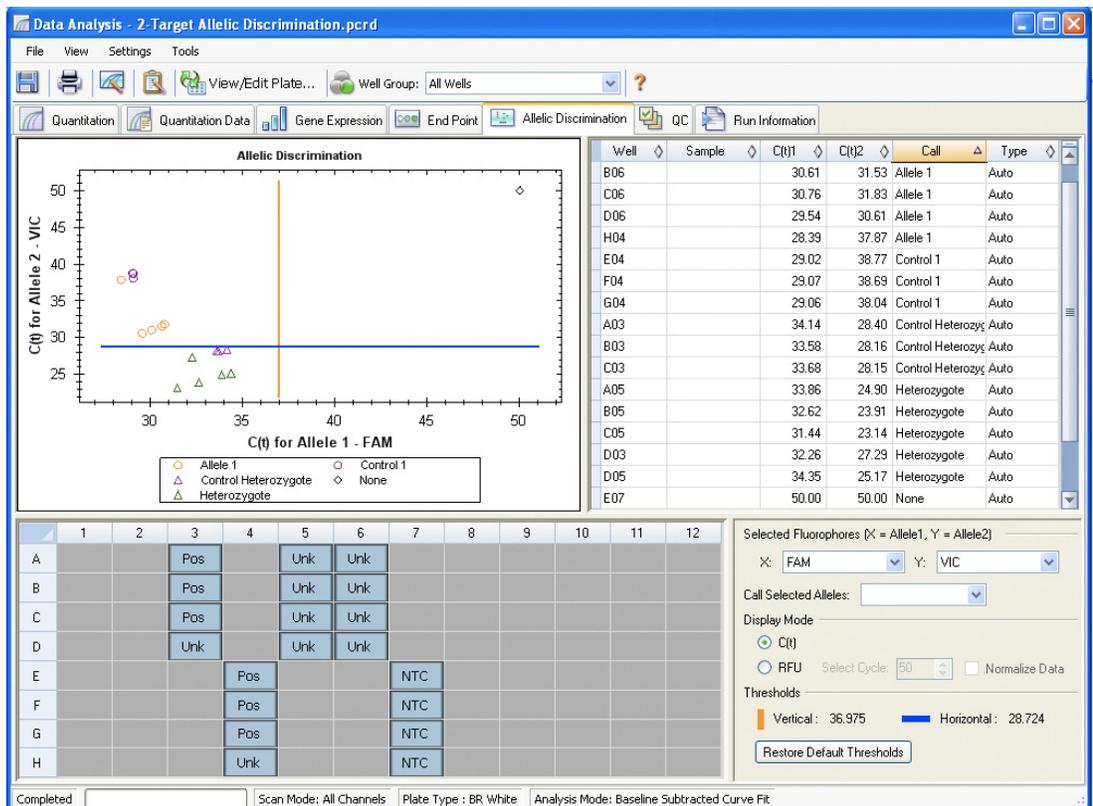


Figura 62. Disposição do separador Allelic Discrimination (Discriminação alélica) na janela Data Analysis (Análise de dados).

Ajuste de dados para discriminação alélica

O software atribui automaticamente um genótipo a poços com amostras desconhecidas com base nas posições das barras limite vertical e horizontal e, a seguir, mostra uma lista de determinação de genótipos na visualização de folha de cálculo. Para a determinação automática de genótipos, o software utiliza controlos positivos (quando disponíveis), ou calcula os limiares. O software toma uma RFU ou C(t) médios para os controlos positivos para definir automaticamente as linhas de limiar para discriminação dos alelos.

Ajuste as posições das barras de limiar clicando e arrastando as mesmas, e o software ajusta automaticamente os cálculos para efectuar novas atribuições de genótipos:

- Se a experiência contiver três controlos na placa, a posição das barras de limiar baseia-se na média e no desvio padrão da RFU ou do C(t) dos controlos
- Se o número de controlos for inferior a três, a posição das barras de limiar é determinada pelos valores do ciclo de limiar ou intervalo de RFU no fluoróforo seleccionado

Ajuste os dados de discriminação alélica utilizando um dos métodos seguintes:

- Clique e arraste as barras de limiar no gráfico Allelic Discrimination (Discriminação alélica) para ajustar as determinações na folha de cálculo
- Selecciona um fluoróforo para cada eixo do gráfico (X: e Y:) nas opções de definições no canto inferior direito da janela

- Para alterar manualmente uma determinação, realce uma fila da folha de cálculo e seleccione uma opção da lista **Call Selected Alleles** (incluindo Allele 1 (Alelo 1), Allele 2 (Alelo 2), Heterozygote (Heterozigoto), None (Nenhum), Unknown (Desconhecido), Control 1 (Controlo 1) ou Control 2 (Controlo 2))
- Clique no botão **Restore Default Thresholds** (Restaurar limiares predefinidos) para voltar a colocar as barras vertical e horizontal na respectiva posição original, indicada pelos números junto das barras
- Seleccione o **Display Mode C(t)** para ver os dados como níveis de limiar. Seleccione o **Display Mode RFU** para ver os dados em unidades de fluorescência relativa no ciclo seleccionado
- Seleccione **Normalize Data** (Normalizar dados) para normalizar os dados de RFU mostrados no gráfico e na folha de cálculo

A normalização altera os dados do gráfico para um intervalo de 0 a 1 em ambos os eixos. Para normalizar os dados, a placa deve conter poços sem quaisquer tipos de amostras NTC (no template control), para Allele 1 e Allele 2 (Alelo 1 e 2). Para esta determinação, os dados de RFU são normalizados para os valores NTC como uma combinação linear de RFUs específicas de Allele 1 e Allele 2 (Alelo 1 e 2). Esta determinação é uma forma eficaz de apresentar dados de RFU.

Os cálculos para RFUs normalizadas seguem as fórmulas apresentadas em Livak et al. (1995).

$$A_1 \text{ normalizado} = \frac{A_1}{A_1 + A_2 + \bar{x}(NTC_{A1 + A2})}$$

Em que:

- A_1 representa RFU para Allele 1 (Alelo 1)
- A_2 representa RFU para Allele 2 (Alelo 2)
- \bar{x} representa a RFU média

$NTC_{A1 + A2}$ representa a soma de RFUs para a amostra NTC de Allele 1 e Allele 2 (Alelo 1 e 2)

Separador QC (Controlo de qualidade)

Abra o separador **QC** (Controlo de qualidade) para avaliar rapidamente a qualidade dos dados da experiência com base nas regras definidas no separador QC (Controlo de qualidade) na janela User Preferences (Preferências do utilizador) (consulte “Separador QC (Controlo de qualidade)” na página 111).

O software apresenta as regras de QC (Controlo de qualidade) aplicadas actualmente e as definições que definem cada regra (Figura 63). A descrição da regra apresenta também os poços que falham uma regra seleccionada.

NOTA: Pode activar ou desactivar regras clicando na caixa de selecção junto à regra na coluna Use Rule (Usar regra).

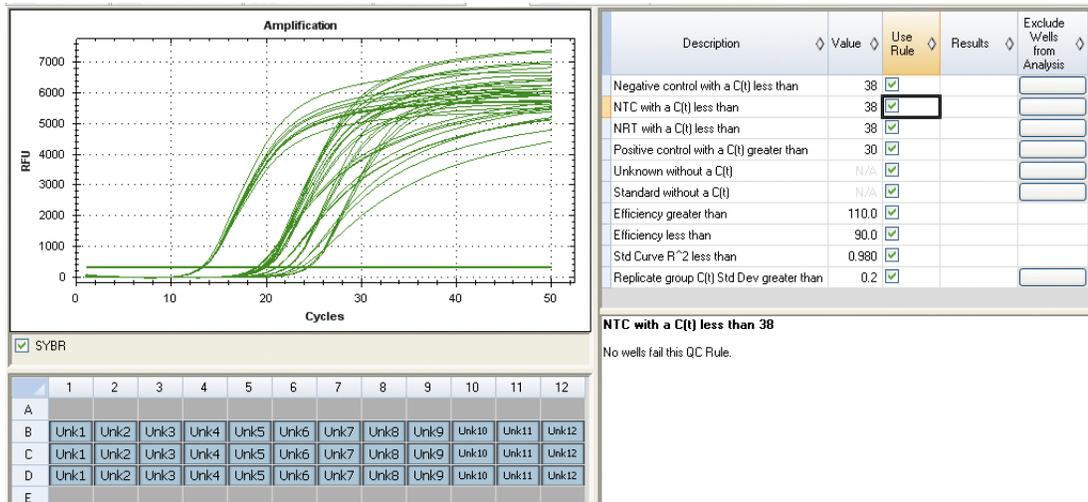


Figura 63. Disposição do separador QC (Controlo de qualidade).

Separador Run Information (Informação do ciclo)

O separador Run Information (Informação do ciclo) (Figura 64) mostra o protocolo e outras informações sobre o ciclo para cada experiência. Pode também utilizar a caixa Notes (Notas) para introduzir e editar as notas do ciclo, ou introduzir e editar a ID de dados do ciclo escrevendo na caixa ID.

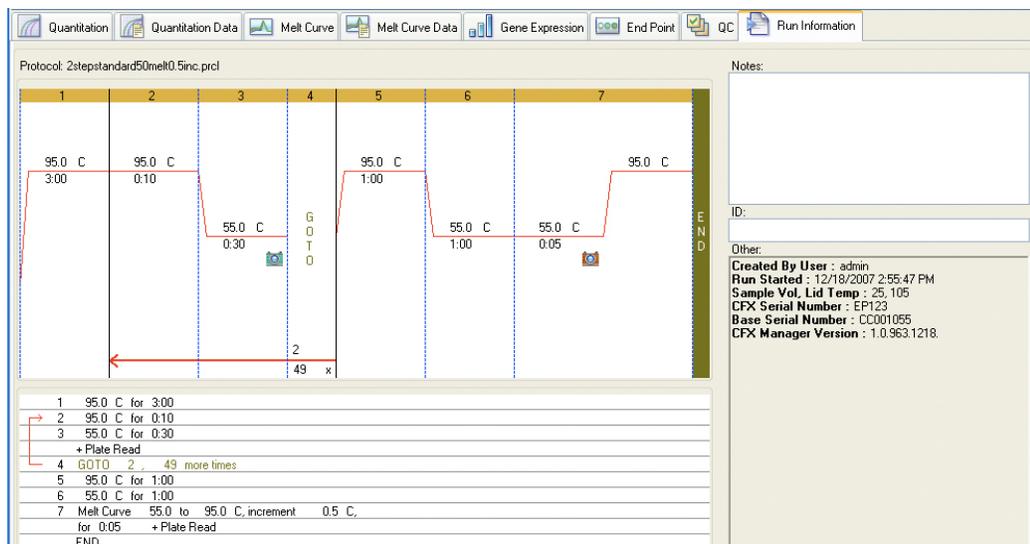


Figura 64. Disposição do separador Run Information (Informação do ciclo) na janela Data Analysis (Análise de dados).

Relatórios de ficheiros de dados

A janela Report (Relatório) (Figura 65) mostra informações sobre o ficheiro de dados actual na janela Data Analysis (Análise de dados). Para abrir um relatório, seleccione **Tools > Reports** (Ferramentas > Relatórios), ou clique no botão de **relatórios** na barra de ferramentas da janela Data Analysis (Análise de dados).

A janela Report (Relatório) mostra as três secções seguintes:

- **Menu e barra de ferramentas.** Seleccionar opções para formatar, guardar e imprimir o relatório ou modelo
- **Lista de opções (canto superior esquerdo da janela).** Seleccionar opções a mostrar no relatório
- **Painel de opções (canto inferior esquerdo da janela).** Introduzir informações sobre uma opção seleccionada
- **Painel de pré-visualização (lado direito da janela).** Pré-visualizar o relatório actual

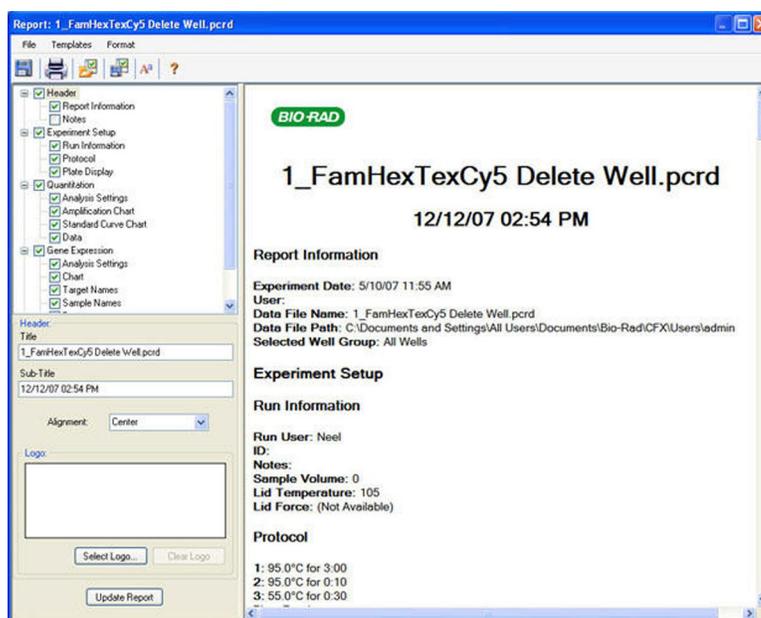


Figura 65. Exemplo de uma janela Report (Relatório) de um ficheiro de dados.

SUGESTÃO: A disposição do relatório pode definir o tipo de informação que aparece em qualquer relatório se o relatório for guardado como um modelo. Seleccione **Template > Save** ou **Save As** (Modelo > Guardar ou Guardar como) para guardar a disposição do relatório actual como um modelo.

Criar um relatório de análise de dados

Para criar um relatório na janela Data Analysis (Análise de dados), siga os passos seguintes:

1. Antes de criar o relatório, efectue os ajustes finais ao conteúdo dos poços, aos poços seleccionados, aos gráficos e às folhas de cálculo na janela Data Analysis (Análise de dados).
2. Clique no botão **Report** (Relatório) na barra de ferramentas da janela Data Analysis (Análise de dados) para abrir a janela Report (Relatório).

3. Altere as opções que pretende incluir no relatório. O relatório abre-se com as opções predefinidas seleccionadas. Clique nas caixas de selecção da lista de opções de relatório para alterar categorias por inteiro ou opções individuais de uma categoria.
 NOTA: Os dados que aparecem no relatório dependem das selecções actuais dos separadores da janela Data Analysis (Análise de dados). Por exemplo, uma experiência de quantificação poderá não conter uma curva padrão, pelo que esses dados não aparecem na janela Data Analysis (Análise de dados) nem no relatório de dados.
4. Clique no botão **Update Report** (Actualizar relatório) para actualizar a pré-visualização do relatório sem quaisquer alterações.
5. Imprima ou guarde o relatório. Clique no botão de **impressão** na barra de ferramentas para imprimir o relatório actual. Selecciona **File > Save** (Ficheiro > Guardar) para guardar o relatório como um ficheiro em formato PDF (ficheiro Adobe Acrobat Reader), MHT (documento Microsoft) or MHTML (documento Microsoft), e selecciona uma localização para guardar o ficheiro. Selecciona **File > Save As** (Ficheiro > Guardar como) para guardar o relatório com um novo nome ou numa nova localização.
6. (Opcional) Crie um modelo de relatório com as informações pretendidas. Para guardar as definições de relatório actuais num modelo, selecciona **Template > Save** ou **Save As** (Modelo > Guardar ou Guardar como). Pode assim carregar o modelo de relatório da próxima vez que quiser criar um novo relatório.

Categorias de relatórios de análise de dados

Um relatório pode incluir qualquer uma das opções das categorias descritas na Tabela 22, consoante o tipo de dados na janela Data Analysis (Análise de dados).

Tabela 22. Categorias de relatórios de análise de dados na lista de opções.

Categoria	Opção	Descrição
Header (Cabeçalho)		
	Report Information (Informação do relatório)	Data da experiência, nome de utilizador, nome do ficheiro de dados, caminho do ficheiro de dados e grupo de poços seleccionado
	Notes (Notas)	Notas sobre o relatório de dados
Experiment Setup (Configuração da experiência)		
	Run Information (Informação do ciclo)	Inclui a data da experiência, o nome de utilizador, o nome do ficheiro de dados, o caminho do ficheiro de dados e o grupo de poços seleccionado
	Protocol (Protocolo)	Visualização de texto dos passos e opções do protocolo
	Plate Display (Mostrar placa)	Mostra uma vista de placa com a informação de cada poço da placa
Quantitation (Quantificação)		
	Analysis Settings (Definições de análise)	Inclui o número de passo quando os dados foram recolhidos, o modo de análise e o método de subtracção da linha de base

Tabela 22. Categorias de relatórios de análise de dados na lista de opções.

Categoria	Opção	Descrição
	Amplification Chart (Gráfico de amplificação)	Cópia do gráfico de amplificação para experiências que incluem dados de quantificação
	Standard Curve Chart (Gráfico de curva padrão)	Cópia do gráfico de curva padrão
	Data (Dados)	Folha de cálculo que mostra os dados de cada poço
Gene Expression (Expressão de genes)		
	Analysis Settings (Definições de análise)	Inclui o modo de análise, dados do gráfico, opção de dimensionamento e erro do gráfico
	Chart (Gráfico)	Cópia do gráfico de expressão de genes
	Target Names (Nomes de alvos)	Gráfico dos nomes
	Sample Names (Nomes de amostras)	Gráfico dos nomes
	Data (Dados)	Folha de cálculo que mostra os dados de cada poço
Melt Curve (Curva de fusão)		
	Analysis Settings (Definições de análise)	Inclui o número do passo de fusão e a definição da barra de limiar
	Melt Curve Chart (Gráfico da curva de fusão)	Cópia do gráfico da curva de fusão
	Melt Peak Chart (Gráfico do pico de fusão)	Cópia do gráfico do pico de fusão
	Data (Dados)	Folha de cálculo que mostra os dados de cada poço
Allelic Discrimination (Discriminação alélica)		
	Analysis Settings (Definições de análise)	Inclui o modo de apresentação, fluoróforos, ciclo, limiares e dados normalizados
	Chart (Gráfico)	Cópia do gráfico de discriminação alélica
	Data (Dados)	Folha de cálculo que mostra os dados de cada poço
End Point (Ponto final)		
	Analysis Settings (Definições de análise)	Inclui fluoróforo, ciclos finais cuja média deve ser calculada, modo, valor mais baixo de RFU, valor mais alto de RFU e valor de cutoff
	Data (Dados)	Folha de cálculo que mostra os dados de cada poço

9 **Análise de expressão de genes**

Leia este capítulo para obter informações sobre a execução de análise de expressão de genes:

- Expressão de genes (em baixo)
- Configuração de placas para análise de expressão de genes (página 90)
- Separador Gene Expression (Expressão de genes) (página 90)
- Janela Experiment Settings (Definições da experiência) (página 96)
- Estudo de genes (página 98)
- Janela Gene Study Report (Relatório do estudo de genes) (página 103)

Expressão de genes

Com a utilização de controlos qualificados de forma rigorosa nas reacções, pode executar uma experiência de expressão de genes para normalizar as diferenças relativas numa concentração alvo entre amostras. Normalmente, os níveis de mensagem para um ou mais genes de referência são utilizados para normalizar os níveis de expressão de um gene pretendido. Os genes de referência têm em conta as diferenças de carregamento ou outras variações representadas em cada amostra, e não devem ser regulados no sistema biológico que está a ser estudado.

Abra o separador Gene Expression (Expressão de genes) para avaliar as diferenças relativas entre reacções de PCR em dois ou mais poços. Por exemplo, pode avaliar os números relativos de genomas virais ou os números relativos de sequências transfectadas na reacção de PCR. A aplicação mais comum para o estudo da expressão de genes é a comparação da concentração de cADN em mais de uma reacção para calcular os níveis de ARN mensageiro de estado fixo.

O software calcula o nível de expressão relativa de um alvo com um dos seguintes cenários:

- Nível de expressão relativa de uma sequência alvo (Alvo 1) em relação a outro alvo (Alvo 2). Por exemplo, a quantidade de um gene relativamente a outro gene sob o mesmo tratamento de amostra
- O nível de expressão relativa de uma sequência alvo numa amostra comparado com o mesmo alvo sob tratamentos de amostra diferentes. Por exemplo, a quantidade relativa de um gene relativamente a si próprio sob condições temporais, geográficas ou de desenvolvimento diferentes

Configuração de placas para análise de expressão de genes

Para efectuar a análise de expressão de genes, o conteúdo dos poços deve incluir o seguinte:

- **Dois ou mais alvos.** Os dois alvos que representam sequências ou genes amplificados diferentes nas amostras
- **Um ou mais alvos de referência.** Pelo menos um alvo tem de ser um alvo de referência para a expressão normalizada. Atribua todos os alvos de referência na janela Experiment Settings (Definições da experiência) (página 45) para analisar os dados no modo Normalized Expression (Expressão normalizada) ($\Delta\Delta C(t)$). As experiências que não contenham uma referência têm de ser analisadas utilizando o modo Relative Expression (Expressão relativa) ($\Delta C(t)$)
- **Amostras comuns.** As reacções têm de incluir amostras comuns (necessárias duas no mínimo) para visualizar os dados em gráfico no separador Gene Expression (Expressão de genes). Estas amostras representam diferentes tratamentos ou condições para cada uma das sequências alvo. Atribua uma amostra de controlo (opcional) na janela Experiment Settings (Definições da experiência) (página 45)

Os requisitos para a configuração da expressão de genes no Plate Editor (Editor de placas) variam consoante o conteúdo das reacções é **PCR uniplexada** com um fluoróforo nas reacções ou **PCR multiplexada** com mais de um fluoróforo nas reacções.

A Figura 66 mostra um exemplo dos conteúdos mínimos dos poços para uma experiência de expressão de genes uniplexada.

Unk	Unk
Target1	Target1
Sample1	Sample2
Unk	Unk
Target2	Target2
Sample1	Sample2

Figura 66. Exemplo do conteúdo de poços numa experiência de expressão de genes uniplexada.

A Figura 67 mostra um exemplo dos conteúdos mínimos dos poços para uma experiência de expressão de genes multiplexada.

Unk	Unk
Target1	Target1
Target2	Target2
Sample1	Sample2

Figura 67. Exemplo do conteúdo de poços numa experiência de expressão de genes multiplexada.

Separador Gene Expression (Expressão de genes)

O separador Gene Expression (Expressão de genes) na janela Data Analysis (Análise de dados) mostra a expressão relativa dos alvos nestas duas visualizações:

- **Gráfico Gene Expression (Expressão de genes).** Mostra os dados de PCR em tempo real como expressão normalizada ($\Delta\Delta C(t)$) ou quantidade relativa ($\Delta C(t)$)

- **Folha de cálculo.** Mostra uma folha de cálculo dos dados de expressão de genes
SUGESTÃO: Clique com o botão direito do rato em qualquer gráfico ou folha de cálculo para ver as opções. Clique no botão **View/Edit Plate** (Ver/editar placa) no Plate Editor (Editor de placas) e altere o conteúdo dos poços na placa.

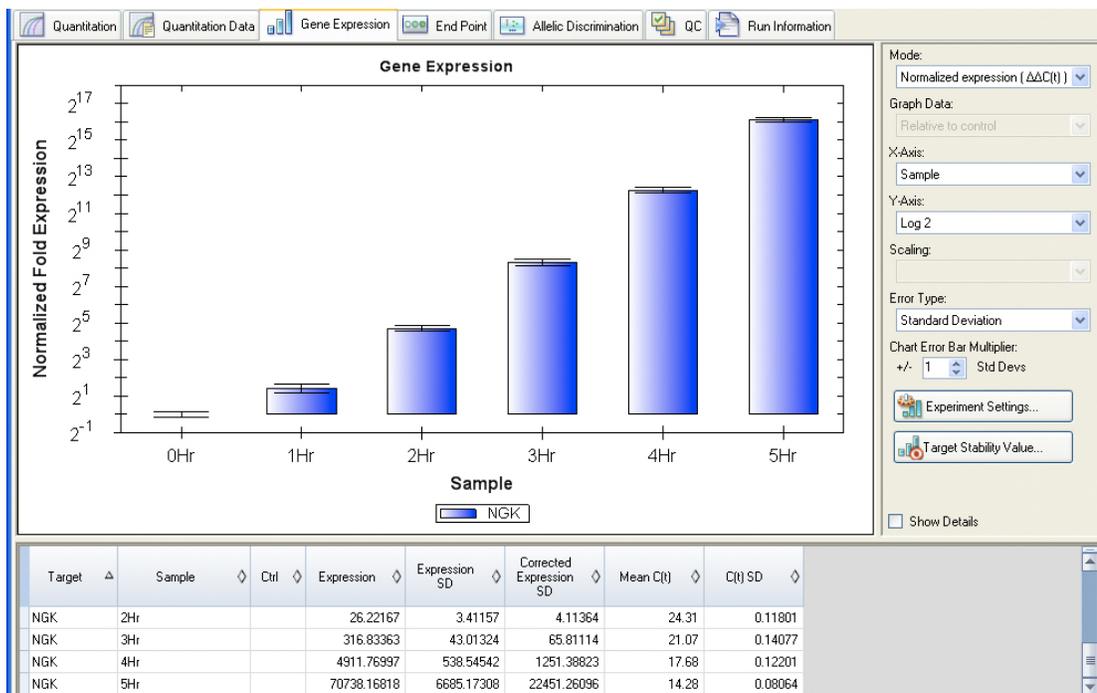


Figura 68. Disposição do separador Gene Expression (Expressão de genes) na janela Data Analysis (Análise de dados).

SUGESTÃO: Clique com o botão direito no gráfico para seleccionar as opções de menu de clique de botão direito. Selecciona **Sort** (Ordenar) neste menu para reordenar os nomes **Target** (Alvo) e **Sample** (Amostra) no gráfico.

Expressão de genes normalizada

Para normalizar os dados, utilize o nível de expressão medida de um ou mais genes de referência (alvos) como um factor de normalização. Os genes de referência são alvos que não são regulados no sistema biológico que está a ser estudado, como actina, GAPDH ou Histone H3.

Para configurar a análise da expressão de genes normalizada ($\Delta\Delta C(t)$), siga as instruções abaixo:

1. Abra um ficheiro de dados (extensão .pcrd).
2. Analise os dados no separador Quantitation (Quantificação) na janela Data Analysis (Análise de dados). Efectue ajustes nos dados, por exemplo alterar o limite e o modo de análise.
3. Clique no separador **Gene Expression** (Expressão de genes).

4. Seleccione um controlo no separador **Samples** (Amostras) na janela **Experiment Settings** (Definições da experiência). Se um controlo for atribuído, o software normaliza as quantidades relativas para todos os genes na quantidade de controlo, que está definida como 1.
5. Seleccione os genes de referência para esta experiência no separador **Target** (Alvo) da janela **Experiment Settings** (Definições da experiência). A análise da expressão de genes requer uma referência entre os alvos nas amostras.
6. Seleccione **Normalized Expression ($\Delta\Delta C(t)$)** (Expressão normalizada) se ainda não estiver seleccionado e, em seguida, visualize os níveis de expressão no separador **Gene Expression** (Expressão de genes).

Quantidade relativa

Selecione **Relative Quantity ($\Delta C(t)$)** (Quantidade relativa) no menu pendente nos controlos do gráfico do separador Gene Expression (Expressão de genes) para executar uma análise de quantidade relativa Relative Quantity ($\Delta C(t)$). Por definição, os dados da quantidade relativa ($\Delta C(t)$) não são normalizados. Este método é utilizado para quantificar amostras que não incluem quaisquer genes de referência (alvos). Normalmente, o investigador confia numa das seguintes considerações ao configurar a experiência:

- Cada amostra representa a mesma quantidade do modelo em cada amostra biológica, possivelmente a mesma massa de ARN ou cADN em cada poço
- Qualquer variação na quantidade de amostra biológica carregada será normalizada após o ciclo por algum método na análise de dados exterior ao software. Por exemplo, o investigador poderá optar por dividir o valor da quantidade relativa pelo factor de normalização, possivelmente a massa de ácido nucleico carregado para cada amostra ou o número de células a partir das quais o ácido nucleico foi isolado

Ajustar dados da expressão de genes

Depois de seleccionar o método de análise, ajuste os dados que visualizar no separador Gene Expression (Expressão de genes) alterando as opções das definições à direita do gráfico.

DADOS DO GRÁFICO

As opções dos dados do gráfico permitem apresentar os dados no gráfico com uma de duas opções:

- **Relative to control.** Coloque os dados em gráfico com o eixo com escala entre 0 e 1. Se atribuir um controlo na experiência, selecione esta opção para visualizar rapidamente a regulação ascendente e descendente do alvo
- **Relative to zero.** Coloque os dados em gráfico com a origem em zero

OPÇÕES DO EIXO X

A opção do eixo x permitem seleccionar os dados do eixo x do gráfico Gene Expression (Expressão de genes):

- **Target.** Seleccione esta opção para colocar em gráfico os nomes dos alvos no eixo x
- **Sample.** Seleccione esta opção para colocar em gráfico os nomes das amostras no eixo x

OPÇÕES DO EIXO Y

A opção do eixo y permite mostrar o gráfico Gene Expression (Expressão de genes) numa de três escalas:

- **Linear.** Selecione esta opção para mostrar uma escala linear
- **Log 2.** Selecione esta opção para avaliar as amostras num intervalo dinâmico extenso
- **Log 10.** Selecione esta opção para avaliar as amostras num intervalo dinâmico muito extenso

OPÇÕES DE DIMENSIONAMENTO (SCALING)

Selecione **Normalized Gene Expression ($\Delta\Delta C(t)$)** (Expressão de genes normalizada) para activar as opções de dimensionamento no gráfico Gene Expression (Expressão de genes). Selecione uma destas opções de dimensionamento para calcular e apresentar os dados da forma que melhor se ajuste à concepção da experiência:

- **Unscaled expression.** Esta opção apresenta a expressão de genes normalizada não dimensionada
- **Highest expression.** Dimensione a expressão de genes normalizada para a mais elevada para cada alvo, dividindo o nível de expressão de cada amostra pelo nível mais elevado de expressão em todas as amostras. Esta opção de dimensionamento utiliza a fórmula Scaled to highest (Dimensionada para a mais elevada)
- **Lowest expression.** Calcule novamente a expressão de genes normalizada para cada alvo, dividindo o nível de expressão de cada amostra pelo nível mais baixo de expressão em todas as amostras. Esta opção de dimensionamento utiliza a fórmula Scaled to lowest (Dimensionada para mais baixa)

ERROR TYPE

Selecione uma opção para o tipo de cálculos de erro (barras de erro) no gráfico Gene Expression (Expressão de genes):

- Standard Error of the Mean (default, SEMs) - Erro padrão da média (predefinição, SEMs)
- Standard Deviation (Std Devs) - Desvio padrão (Std Devs)

CHART ERROR BAR MULTIPLIER

Selecione um multiplicador das barras de erro no gráfico Gene Expression (Expressão de genes). Seleccione um destes números inteiros: 1 (predefinição), 2 ou 3. O tipo de alterações do multiplicador altera-se ao seleccionar Error Type (Tipo de erro):

- SEMs para erro padrão da média
- Std Devs para desvios padrão

TARGET STABILITY VALUE

Abra esta janela sempre que for utilizado mais do que 1 gene de referência. O software calcula dois parâmetros de qualidade para os genes de referência:

- **Coefficient of Variation (CV)** (Coeficiente de variação) das quantidades relativas de genes de referência normalizados. Os valores de CV mais baixos denotam estabilidade mais elevada
- **M-value** (Valor M). A medida da estabilidade da expressão de genes de referência

Opções do menu de clique direito para o gráfico de expressão de genes

Clique com o botão direito no gráfico Gene Expression (Expressão de genes) para seleccionar os itens apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Itens do menu de clique direito.

Item	Função
Copy (Copiar)	Copiar o gráfico para uma área de transferência
Save as Image (Guardar como imagem)	Guardar o gráfico na visualização de gráfico como um ficheiro de imagem. O tipo de imagem predefinido é PNG. As outras selecções para os tipos de ficheiro de imagem incluem GIF, JPG, TIF e BMP
Page Setup... (Configuração de página)	Seleccionar uma configuração de página para impressão
Print... (Imprimir)	Imprimir a visualização do gráfico
Show Point Values (Mostrar valores de pontos)	Mostrar a quantidade relativa de cada ponto no gráfico quando coloca o cursor sobre esse ponto
Set Scale to Default (Definir escala para predefinição)	Definir a visualização do gráfico novamente para as predefinições após ampliar
Chart Options... (Opções do gráfico)	Abrir a janela Chart Options (Opções do gráfico) para ajustar o gráfico
Sort... (Ordenar)	Definir a ordem em que as amostras ou alvos aparecem no eixo x do gráfico
User Corrected Std Devs (Desvios padrão corrigidos pelo utilizador)	Calcular as barras de erro utilizando a fórmula de desvio padrão corrigido
Use Solid Bar Colors (Utilizar cores de barra sólidas)	Apresentar barras sólidas no gráfico
x-axis labels (Etiquetas do eixo x)	Seleccionar para apresentar as etiquetas horizontais ou em ângulo do eixo x

Folha de cálculo Gene Expression (Expressão de genes)

A Tabela 24 descreve as informações apresentadas na folha de cálculo Gene Expression (Expressão de genes).

Tabela 24. Descrição das informações na folha de cálculo no separador Gene Expression (Expressão de genes).

Informação	Descrição
Target (Alvo)	Nome do alvo (gene amplificado) seleccionado na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
Sample (Amostra)	Nome da amostra seleccionada na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
Ctrl	Amostra de controlo, quando o nome da amostra estiver seleccionado como um controlo na janela Experiment Settings (Definições da experiência)

Tabela 24. Descrição das informações na folha de cálculo no separador Gene Expression (Expressão de genes). (continuação)

Informação	Descrição
Expression (Expressão)	Normalized Gene Expression ($\Delta\Delta C(t)$) (Expressão de genes normalizada) ou Relative Quantity ($\Delta C(t)$) (Quantidade relativa) dependendo do modo seleccionado
Expression SEM (or SD) (SEM ou SD da expressão)	Standard Error of the Mean (Erro-padrão da média) ou Standard Deviation (Desvio padrão), dependendo da opção seleccionada
Corrected Expression SEM (or SD) (SEM ou SD da expressão corrigida)	Cálculo do valor corrigido para Standard Error of the Mean (SEM) (Erro-padrão da média) ou Standard Deviation (SD) (Desvio padrão) da expressão relativa, dependendo da opção seleccionada
Mean (C(t)) (Média)	Média do ciclo de limiar
C(t) SEM (or SD) (SEM ou SD)	Standard Error of the Mean (Erro-padrão da média) ou Standard Deviation (Desvio padrão) do ciclo de limiar, dependendo da opção seleccionada

Opção Show Details (Mostrar detalhes)

Ao clicar na caixa de selecção Show Details (Mostrar detalhes), a Tabela 25 também mostra esta informação.

Tabela 25. Informação na folha de cálculo Gene Expression com a opção Show Details (Mostrar detalhes) seleccionada.

Informação	Descrição
Data Set (Conjunto de dados)	Dados de fluorescência de um fluoróforo no ficheiro de dados
Relative Quantity (Quantidade relativa)	Quantidade relativa calculada de amostras
Relative Quantity SD (SD de quantidade relativa)	Desvio padrão do cálculo da quantidade relativa
Corrected Relative Quantity SD (SD de quantidade relativa corrigida)	Desvio padrão calculado da quantidade relativa corrigida
Unscaled Expression (Expressão não dimensionada)	Expressão não dimensionada calculada
Unscaled Expression SD (SD de expressão não dimensionada)	Desvio padrão calculado da expressão não dimensionada
Corrected Unscaled Expression SD (SD de expressão não dimensionada corrigida)	Desvio padrão corrigido da expressão não dimensionada
Expression (Expressão)	Nível de expressão relativa
Wells (Poços)	Número do poço na placa

Janela Experiment Settings (Definições da experiência)

Para abrir a janela Experiment Settings (Definições de experiência), clique no botão **Experiment Settings** no separador Gene Expression (Expressão de genes). Nesta janela, veja ou altere a lista de Targets (Alvos) e Samples (Amostras), selecione os genes de referência, selecione as amostras de controlo ou defina o grupo de amostras da análise de expressão de genes para ser analisado se tiverem sido adicionados nomes de recolha (Collection Names) aos poços (Figura 69).

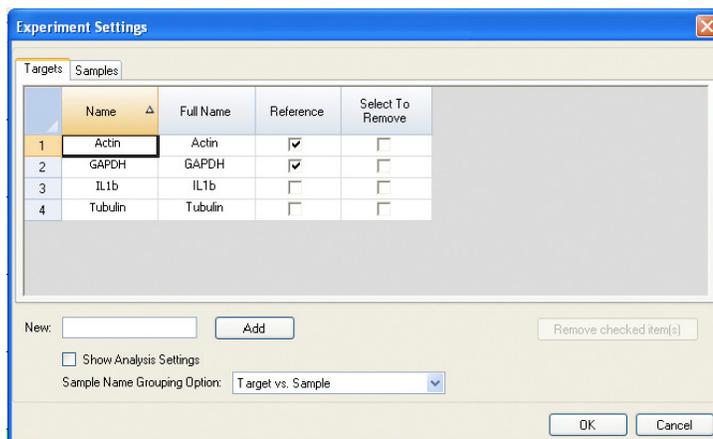


Figura 69. Janela Experiment Settings (Definições da experiência) com o separador Targets (Alvos) seleccionado.

Para ajustar as listas nestes separadores, utilize as funções seguintes:

- Para adicionar um nome de alvo ou amostra, digite um nome na caixa **New** (Novo) e clique em **Add** (Adicionar)
- Para remover um nome de alvo ou de amostra da lista, clique na caixa **Select to Remove Name** (Seleccionar para remover nome) nessa fila e, em seguida, clique no botão **Remove checked item(s)** (Remover itens seleccionados)
- Para seleccionar o alvo como uma referência para a análise de dados da expressão de genes, clique na caixa na coluna **Reference** (Referência) ao lado do nome (**Name**) desse alvo
- Para seleccionar a amostra como amostra de controlo para a análise de dados da expressão de genes, clique na caixa na coluna **Control** (Controlo) ao lado do nome dessa amostra

Sample Name Grouping Option (Opção de agrupamento por nomes de amostra)

Carregar os **Collection Names** (Nomes de recolha) nos poços permite que as amostras sejam analisadas numa de quatro configurações definidas pela Sample Name Grouping Option (Opção de agrupamento por nomes de amostra). Estas opções estão disponíveis no menu pendente no separador Experiment Settings (Definições da experiência).

- **Target vs. Sample (Alvo vs. Amostra)**. Apenas o nome da amostra no poço é utilizado nos cálculos de expressão de genes
- **Target vs. Collection (Alvo vs. Recolha)**. Apenas o nome de recolha do poço é utilizado nos cálculos

- **Target vs. Sample_Collection (Alvo vs. Amostra_Recolha).** O nome da amostra e o nome da recolha são combinados num único nome que é utilizado nos cálculos
- **Target vs. Collection_Sample (Alvo vs. Recolha_Amostra).** O nome da recolha e o nome da amostra são combinados num único nome que é utilizado nos cálculos

Show Analysis Settings (Mostrar definições da análise) em Experiment Settings (Definições da experiência)

Clique na caixa **Show Analysis Settings** (Mostrar definições da análise) na janela Experiment Settings (Definições da experiência) para ver ou alterar os parâmetros da análise aplicados no separador Gene Expression (Expressão de genes):

- Clique numa célula na coluna **Color** (Cor) para alterar a cor dos alvos incluídos no gráfico Gene Expression (Expressão de genes)
- Introduza um número para a eficiência de um alvo. O software irá calcular a eficiência relativa para um alvo utilizando **Auto Efficiency** (Eficiência automática) se os dados de um alvo incluírem uma curva padrão. Alternativamente, introduza uma eficiência previamente determinada

A Figura 70 mostra a eficiência de todos os alvos, que aparece se a opção **Auto Efficiency** (Eficiência automática) estiver seleccionada.

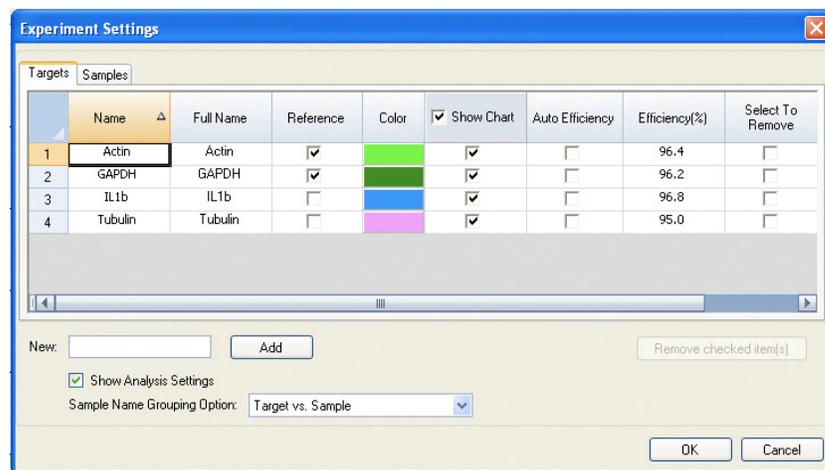


Figura 70. Separador Targets (Alvos) na janela Experiment Settings (Definições da experiência) com Analysis Settings (Definições da análise) seleccionado.

Para ajustar as definições de uma amostra no separador Samples (Amostras):

- Clique numa cor na coluna **Color** (Cor) para alterar a cor das amostras incluídas no gráfico Gene Expression (Expressão de genes)
- Clique numa caixa na coluna **Show Chart** (Mostrar gráfico) para mostrar a amostra no gráfico Gene Expression (Expressão de genes) utilizando uma cor que esteja seleccionada na coluna Color (Cor)

Estudo de genes

Crie um estudo de genes para comparar os dados da expressão de genes de uma ou mais experiências de PCR em tempo real utilizando um calibrador de inter-execução para normalizar os dados entre as experiências. Crie um estudo de genes adicionando dados de um ou mais ficheiros de dados (extensão .pcrd) ao estudo; o software agrupa-os num único ficheiro (extensão .mgxd).

NOTA: Os dados da expressão de genes têm de incluir uma amostra comum em cada ficheiro de dados para criar um estudo de genes. O software utiliza uma amostra comum para normalizar os dados entre experiências. Seleccione os nomes das amostras na janela Experiment Settings (Definições da experiência) (página 45).

NOTA: O número máximo de amostras que podem ser analisadas num estudo de genes está limitado pelo tamanho da RAM e da memória virtual do computador.

Calibração de inter-execução do estudo de genes

Todos os dados no estudo de genes são normalizados pelo calibrador de inter-execução para calcular o valor médio $\Delta C(t)$ mais baixo. Quando os ficheiros de dados no estudo de genes incluem mais do que um calibrador de inter-execução, o calibrador com o valor médio $\Delta C(t)$ mais baixo transforma-se no calibrador de inter-execução dominante. O calibrador dominante é utilizado para ajustar todos os valores $C(t)$ no estudo de genes.

Para localizar o calibrador de inter-execução dominante, o software calcula a média dos valores $\Delta C(t)$ de todos os calibradores de inter-execução de um determinado alvo (gene) e, em seguida, utiliza um algoritmo multi-escalão para determinar o calibrador de inter-execução dominante de todos os dados. O algoritmo para localizar o calibrador de inter-execução dominante inclui a seguinte hierarquia:

1. Defina o calibrador dominante no alvo com o número mais elevado de grupos replicados comuns numa determinada comparação por pares.
2. Se qualquer alvo tiver o mesmo número de grupos replicados comuns, defina o calibrador dominante para o alvo com o intervalo mais baixo de valores $\Delta C(t)$ nas comparações por pares. O intervalo é examinado comparando o valor absoluto da diferença entre o $\Delta C(t)$ máximo e mínimo para os calibradores de inter-execução de um determinado alvo.
3. Se qualquer alvo tiver um intervalo idêntico aos valores $\Delta C(t)$, defina o calibrador dominante para o alvo com o valor absoluto mais baixo da média $\Delta C(t)$ para amostras do calibrador de inter-execução elegíveis.
4. Se qualquer alvo tiver valores absolutos $\Delta C(t)$ de média idênticos, defina o calibrador dominante para o grupo replicado com o valor $\Delta C(t)$ mais baixo.

NOTA: O primeiro ficheiro de dados importado no estudo de genes irá servir sempre como o ficheiro central para comparação de dados por pares durante a calibração de inter-execução.

Janela Gene Study (Estudo de genes)

A janela Gene Study (Estudo de genes) inclui dois separadores:

- **Separador Study Setup (Configuração do estudo).** Clique neste separador para gerir as experiências no estudo de genes. Adicionar ou remover ficheiros de dados num estudo de genes não altera os dados originais nesse ficheiro

- **Separador Study Analysis (Análise do estudo).** Clique neste separador para ver os dados de expressão de genes das experiências combinadas

Figura 71 - janela Gene Study (Estudo de genes).

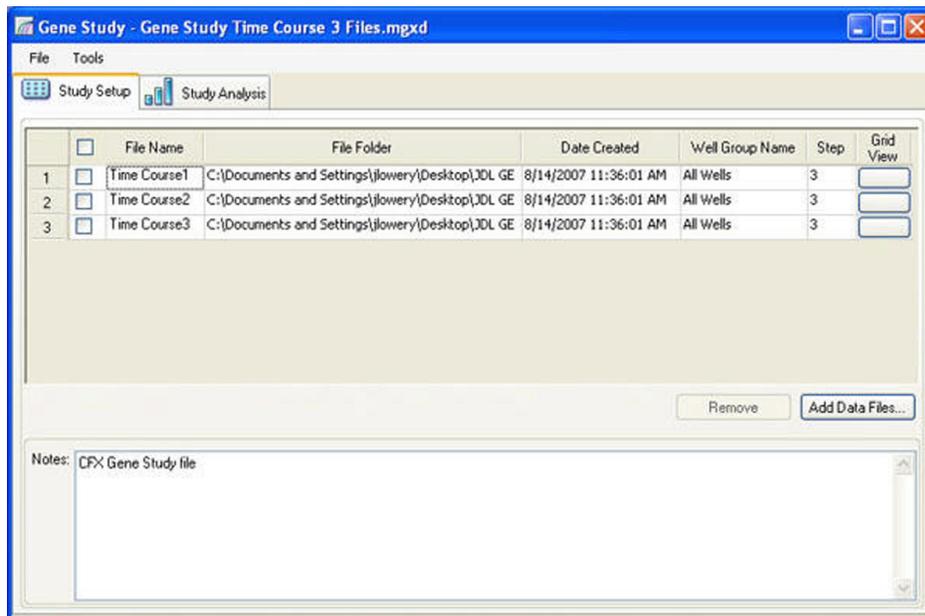


Figura 71. Janela Gene Study (Estudo de genes).

Separador Study Setup (Configuração do estudo)

Antes de importar dados para um estudo de genes, faça o seguinte na janela Data Analysis (Análise de dados):

- Verifique se as amostras que contêm o mesmo conteúdo têm o mesmo nome. Num estudo de genes, o software parte do princípio que os poços com o mesmo nome de alvo e amostra (Target e Sample) contêm as mesmas amostras
- Ajuste a linha de base e o limiar (C(t)) no separador Quantitation (Quantificação) para otimizar os dados em cada experiência antes de os adicionar a um estudo de genes
- Selecciono o grupo de poços que pretende incluir no estudo de genes

O separador Study Setup (Figura 71) (Configuração do estudo) mostra uma lista de todas as experiências no estudo de genes.

- **Adicionar experiências.** Clique no botão **Add Data Files** (Adicionar ficheiros de dados) para seleccionar um ficheiro numa janela do browser. Para adicionar rapidamente experiências a um estudo de genes, arraste os ficheiros de dados (extensão .pcrd) para a janela Gene Study (Estudo de genes)
- **Remover experiências deste estudo de genes.** Selecciono um ou mais ficheiros na lista e clique em **Remove** (Remover)
- **Adicionar notas sobre o estudo de genes.** Escreva na caixa Notes (Notas) para adicionar comentários sobre os ficheiros e análises neste estudo de genes

O separador Study Setup (Configuração do estudo) mostra os ficheiros de dados no estudo de genes, conforme se descreve na Tabela 26.

Tabela 26. Separador Study Setup (Configuração do estudo) na janela Gene Study (Estudo de genes).

Título da coluna	Descrição
File Name (Nome do ficheiro)	Nome do ficheiro de dados da experiência (extensão .pcrd)
File Folder (Pasta de ficheiros)	Directório que armazena o ficheiro de dados para cada experiência no estudo de genes
Date Created (Data da criação)	Data em que os dados do ciclo foram recolhidos
Well Group Name (Nome do grupo de poços)	Nome do grupo de poços que foi seleccionado quando o ficheiro foi adicionado ao estudo de genes SUGESTÃO: para analisar um grupo de poços no estudo de genes, esse grupo de poços tem de ser seleccionado na janela Data Analysis (Análise de dados) antes de importar o ficheiro de dados para o estudo de genes.
Step (Passo)	Passo de protocolo que incluiu a leitura de placa para recolher dados de PCR em tempo real
Grid View (Visualização da grelha)	Abre um mapa das placas com os dados em cada uma das experiências incluídas no estudo de genes

Separador Study Analysis (Análise do estudo)

O separador Study Analysis (Análise do estudo) mostra os dados de todas as experiências adicionadas ao estudo de genes. Abra este separador para analisar os dados e seleccione estas opções para o gráfico Gene Expression (Expressão de genes):

- **Mode.** Seleccione **Normalized Expression ($\Delta\Delta C(t)$)** (Expressão normalizada) ou **Relative Quantity ($\Delta C(t)$)** (Quantidade relativa)
- **Graph Data.** Seleccione **Relative to normal** (Relativo a normal) ou **Relative to control** (Relativo a controlo) no gráfico
- **x-axis options.** Seleccione as etiquetas no eixo x do gráfico, incluindo Sample (Amostra) ou Target (Alvo)
- **y-axis options.** Altere as etiquetas no eixo y do gráfico, incluindo Linear, Log 2 (Registo 2) ou Log 10 (Registo 10)
- **Scaling Options.** Seleccione o valor **Highest** (Mais elevado), **Lowest** (Mais baixo) ou deixe os dados **Unscaled** (Não dimensionados). Esta opção só está disponível quando as amostras não contêm controlos
- **Graph Error.** Seleccione o multiplicador das barras de desvio padrão no gráfico, incluindo ± 1 , 2 ou 3
- **Botão Experiment Settings (Definições da experiência).** Seleccione mostrar opções para alvos e amostras na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
- **Caixa de selecção Show Details.** Clique em **Show Details** (Mostrar detalhes) para adicionar mais colunas de dados ao gráfico

Realçar uma amostra no gráfico Gene Expression (Expressão de genes) realça a célula correspondente na folha de cálculo sob o gráfico (Figura 72).

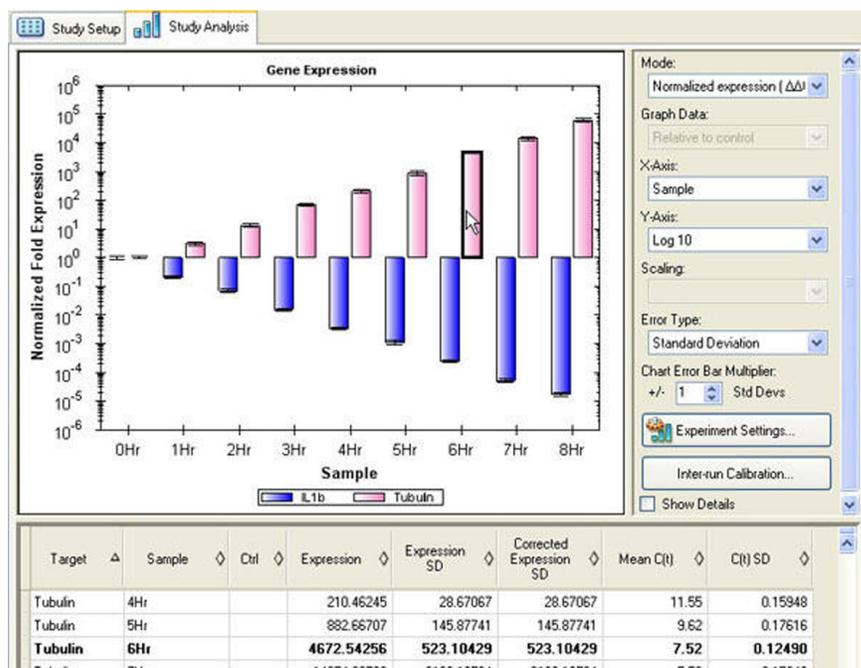


Figura 72. Separador Study Analysis (Análise do estudo) na janela Gene Study (Estudo de genes).

Folha de cálculo de dados do estudo de genes

A folha de cálculo de dados na janela Gene Study (Estudo de genes) mostra a informação sobre cada alvo e amostra no estudo de genes (Figura 72).

A Tabela 27 descreve as informações apresentadas na folha de cálculo Gene Study (Estudo de genes).

Tabela 27. Informações na folha de cálculo no separador Study Analysis (Análise do estudo).

Informação	Descrição
Target (Alvo)	Nome do alvo (gene amplificado) seleccionado na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
Sample (Amostra)	Nome da amostra seleccionada na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
Ctrl	Amostra de controlo, quando o nome da amostra estiver seleccionado como um controlo na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
Expression (Expressão)	Normalized Gene Expression ($\Delta\Delta C(t)$) (Expressão de genes normalizada) ou Relative Quantity ($\Delta C(t)$) (Quantidade relativa), dependendo do modo seleccionado
Expression SEM (or SD) (SEM ou SD da expressão)	Standard Error of the Mean (Erro-padrão da média) ou Standard Deviation (Desvio padrão), dependendo da opção seleccionada

Tabela 27. Informações na folha de cálculo no separador Study Analysis (Análise do estudo). (continuação)

Informação	Descrição
Corrected Expression SEM (or SD) (SEM ou SD da expressão corrigida)	Cálculo do valor corrigido para Standard Error of the Mean (SEM) (Erro-padrão da média) ou Standard Deviation (SD) (Desvio padrão) da expressão relativa, dependendo da opção seleccionada
Mean (C(t)) (Média)	Média do ciclo de limiar
C(t) SEM (or SD) (SEM ou SD)	Standard Error of the Mean (Erro-padrão da média) ou Standard Deviation (Desvio padrão) do ciclo de limiar, dependendo da opção seleccionada

Dados de Show Details (Mostrar dados)

Clique na caixa de selecção Show Details (Mostrar detalhes) para mostrar informações adicionais. A folha de cálculo adiciona a informação nas colunas mostradas na Tabela 28.

Tabela 28. Informação adicionada à folha de cálculo quando a opção Show Details (Mostrar detalhes) está seleccionada.

Informação	Descrição
Data Set (Conjunto de dados)	Dados de fluorescência de um fluoróforo num ficheiro de dados
Relative Quantity (Quantidade relativa)	Quantidade relativa calculada de amostras
Relative Quantity SD (SD de quantidade relativa)	Desvio padrão do cálculo da quantidade relativa
Corrected Relative Quantity SD (SD de quantidade relativa corrigida)	Desvio padrão calculado da quantidade relativa corrigida
Unscaled Expression (Expressão não dimensionada)	Expressão não dimensionada calculada
Unscaled Expression SD (SD de expressão não dimensionada)	Desvio padrão calculado da expressão não dimensionada
Corrected Unscaled Expression SD (SD de expressão não dimensionada corrigida)	Desvio padrão corrigido da expressão não dimensionada
Expression (Expressão)	Expressão relativa
Wells (Poços)	Número do poço na placa

Janela Gene Study Report (Relatório de estudo de genes)

Abra a janela Gene Study Report (Relatório do estudo de genes) para organizar os dados do estudo de genes num relatório. Para criar um relatório do estudo de genes, siga estes passos:

1. Ajuste os dados e gráficos do relatório do estudo de genes conforme necessário antes de criar um relatório.
2. Seleccione **Tools > Reports** (Ferramentas > Relatórios) para abrir a janela Gene Study Report (Relatório do estudo de genes).
3. Clique nas caixas de selecção na lista de opções do relatório para seleccionar e remover opções para seleccionar os dados a apresentar.
4. Clique no botão **Update Report** (Actualizar relatório) para actualizar o painel de pré-visualização do relatório. Este painel mostra o relatório.
5. Imprima ou guarde o relatório. Clique no botão **Print** (Imprimir) na barra de ferramentas para imprimir o relatório actual. Seleccione **File > Save** (Ficheiro > Guardar) para guardar o relatório como um ficheiro em formato PDF (ficheiro Adobe Acrobat Reader), MHT (documento Microsoft) or MHTML (documento Microsoft), e seleccione uma localização para guardar o ficheiro. Seleccione **File > Save As** (Ficheiro > Guardar como) para guardar o relatório com um novo nome ou numa nova localização.

10 Utilizadores e preferências

Leia este capítulo para obter mais informações sobre como gerir os utilizadores do software e suas preferências:

- Iniciar sessão ou seleccionar utilizador (abaixo)
- Janela User Preferences (Preferências do utilizador) (página 106)
- Configurar notificações de e-mail (página 107)
- Administração de utilizadores (página 112)

Iniciar sessão ou seleccionar utilizador

O CFX Manager™ software gere vários utilizadores e suas preferências. O utilizador actual do software com sessão iniciada é apresentado no topo da janela principal do software (Figura 73).

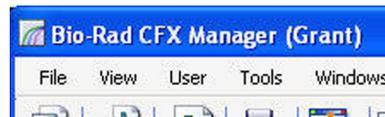


Figura 73. Nome do utilizador apresentado.

O CFX Manager software gere quem inicia sessão no software através da caixa de diálogo Login (Iniciar sessão) (Figura 74). Ao iniciar o software, a caixa de diálogo Login (Iniciar sessão) abre-se automaticamente se houver dois ou mais utilizadores mostrados na janela User Administration (Administração de utilizadores).



Figura 74. Caixa de diálogo Login (Iniciar sessão).

Inicie sessão no software ou mude de utilizador através dos passos seguintes:

1. Abra a caixa de diálogo Login (Iniciar sessão) (se ainda não estiver aberta), clicando para tal no botão de **Seleção do utilizador** na barra de ferramentas ou seleccionando **User > Select User** (Utilizador > Seleccionar utilizador) na barra de menus.

2. Seleccione um nome na lista pendente **User Name** (Nome de utilizador). A predefinição é “Admin” (administrador).
3. Digite uma password na caixa **Password**.
4. Clique em **OK** para fechar a caixa de diálogo Login e abrir o software.
5. Para adicionar um novo nome de utilizador e password, contacte o administrador do software.

Alterar a password

Altere a password de acordo com as instruções seguintes:

1. Seleccione **User > Change Password** (Utilizador > Alterar password) no menu da janela principal do software para abrir a caixa de diálogo Change Password (Alterar password).
2. Introduza a antiga password na caixa Old Password (Password antiga).
3. Introduza a nova password nas caixas New Password (Nova password) e Confirm New Password (Confirmar nova password).
4. Clique em **OK** para confirmar a alteração.

Janela User Preferences (Preferências do utilizador)

O CFX Manager software regista as preferências de cada utilizador que inicia sessão no software. Para alterar as preferências do utilizador, abra a janela User Preferences (Preferências do utilizador) utilizando um dos métodos seguintes:

- Clique no botão **User Preferences** (Preferências do utilizador) na barra de ferramentas da janela principal do software
- Seleccione **User > User Preferences** (Utilizador > Preferências do utilizador) na barra de menus da janela principal do software
- Clique num dos separadores (Figura 75) para ver ou alterar as preferências

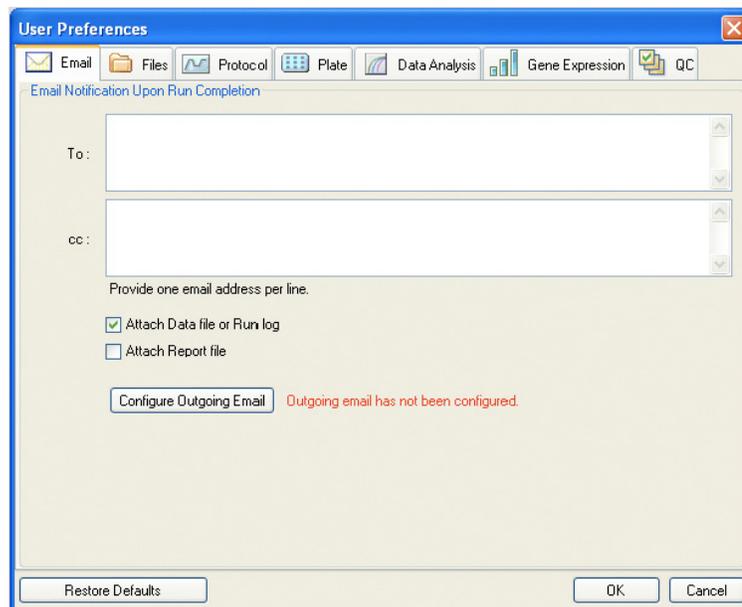


Figura 75. Janela User Preferences (Preferências do utilizador) com separadores.

Separador Email

Selecione o separador **Email** (Figura 75) para introduzir os endereços de e-mail para os quais pretende que seja enviada a confirmação da conclusão do ciclo. O software pode enviar um ficheiro de dados ou um ficheiro de relatório anexados ao e-mail quando as caixas de selecção junto a estas opções estiverem seleccionadas.

CONFIGURAR NOTIFICAÇÕES DE E-MAIL

Clique no botão **Configure Outgoing Email** (Configurar e-mail a sair) para abrir a janela Options (Opções) (Figura 76) para configurar o servidor SMTP e enviar um e-mail de teste do computador. Introduza o seguinte:

- **SMTP Server Name.** O nome do servidor SMTP conforme fornecido pelo fornecedor de serviços de internet
- **Port.** O número de porta do servidor SMTP, conforme fornecido pelo fornecedor de serviços de internet; regra geral, é 25
- **Use SSL.** Utilizar (ou não) Secure Sockets Layer (Camada de Sockets Segura). Alguns servidores SMTP requerem a sua utilização, enquanto que outros não
- **Use Default "From" Address.** Utilizar o endereço "from" (do remetente) predefinido. Geralmente, isto pode ficar no estado predefinido de seleccionado. No entanto, alguns servidores SMTP requerem que todo o e-mail enviado tenha um endereço "from" (do remetente) que seja de um determinado domínio, ou seja <nome>@Sua Empresa.com. Se for o caso, anule a selecção desta caixa de selecção e indique um endereço "from" válido na caixa "From" Address
- **Authentication Required.** Muitos servidores SMTP requerem a autenticação. Se for o caso, selecione esta caixa e indique um nome de utilizador (User Name) e uma Password nos respectivos campos
- **Test email.** Para testar as definições de e-mail, introduza um ou mais endereços de e-mail na caixa de texto **Test Email Address** (Testar endereço de e-mail). Os endereços de e-mail podem ser separados por vírgulas. A seguir, clique no botão **Test Email** (Testar e-mail)

Figura 76. Opções de configuração de e-mail.

NOTA: Alguns servidores SMTP não permitem anexos, e outros permitem anexos apenas até determinado tamanho. Se pretende utilizar o CFX Manager software para enviar ficheiros e/ou relatórios de dados por e-mail, teste a capacidade

do servidor seleccionando a caixa Test Attachment (Testar anexo) e definindo Attachment Size in MB (Tamanho do anexo em MB) como 5 megabytes (MB) ou mais.

Separador Files (Ficheiros)

Selecione o separador **Files** (Ficheiros) para mostrar uma lista das localizações predefinidas para abrir e guardar ficheiros. Clique no botão “...” à direita de cada caixa para abrir uma janela do browser e localizar uma pasta:

- **Default Folder for File Creation.** Selecione uma pasta predefinida onde pretende guardar novos ficheiros. Selecione uma localização para cada tipo de ficheiro (ficheiro de protocolo, placa, dados ou estudo de genes)
- **File Selection for Experiment Setup.** Selecione os ficheiros de protocolo e de placa predefinidos que aparecem ao abrir a janela Experiment Setup (Configuração da experiência)
- **Data File Prefix.** Defina o texto inicial do nome do ficheiro para ficheiros de dados

Separador Protocol (Protocolo)

Selecione o separador **Protocol** (Protocolo) na janela User Preferences (Preferências do utilizador) para especificar as predefinições de um novo ficheiro de protocolo na janela Protocol Editor (Editor de protocolos):

- **Protocol Editor.** Defina as predefinições que aparecem no Protocol Editor (Editor de protocolos). Selecione um volume de amostra predefinido para descrever o volume de cada amostra nos poços e selecione uma temperatura de shutoff da tampa
- **Protocol AutoWriter.** Selecciona as predefinições que aparecem no Protocol AutoWriter

Separador Plate (Placa)

Selecione o separador **Plate** (Placa) na janela **User Preferences** (Preferências do utilizador) (Figura 77) para especificar as seguintes predefinições de um novo ficheiro de placa na janela **Plate Editor** (Editor de placas):

- **Plate Type.** Selecione o tipo de placa predefinido
- **Plate Size.** Selecione o tamanho de placa predefinido
- **Units.** Selecione as unidades utilizadas para descrever a concentração do modelo inicial para poços que contêm padrões
- **Scientific Notation.** Selecione notação científica para ver unidades de concentração nessa notação
- **Scan Mode.** Selecione um modo de leitura predefinido
- **Fluorophores.** Clique nas caixas de selecção para seleccionar os fluoróforos predefinidos que aparecem nos controlos de carregamento de poços do **Plate Editor** (Editor de placas)
- **Libraries.** Introduza os nomes de amostras (em Sample Names) e alvos (em Target Names) utilizados nas experiências. Estes nomes aparecem nas listas do separador

Targets (Alvos) e Samples (Amostras) na janela Experiment Settings (Definições da experiência)

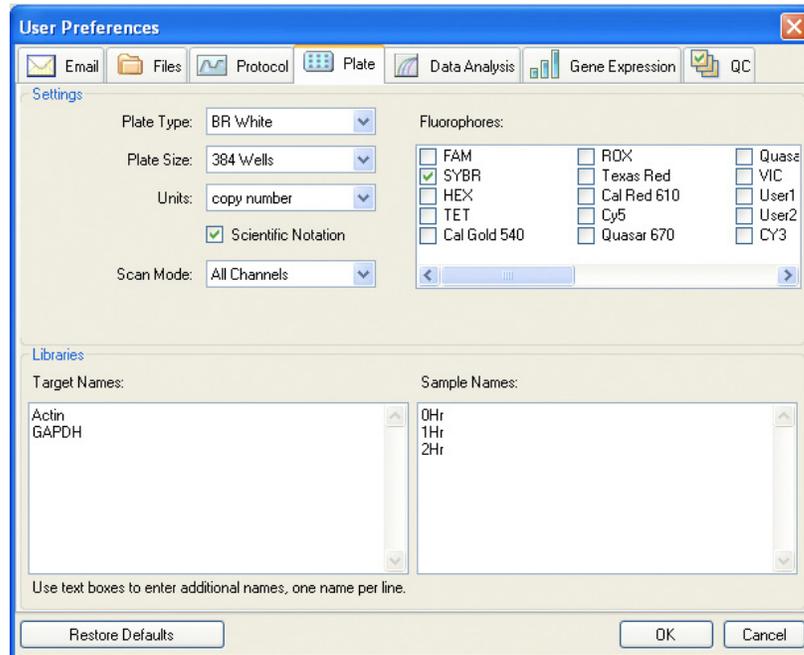


Figura 77. Separador Plate (Placa) na janela User Preferences (Preferências do utilizador).

Separador Data Analysis (Análise de dados)

Selecione o separador **Data Analysis** (Análise de dados) na janela User Preferences (Preferências do utilizador) para alterar as predefinições de dados que aparecem na janela Data Analysis (Análise de dados).

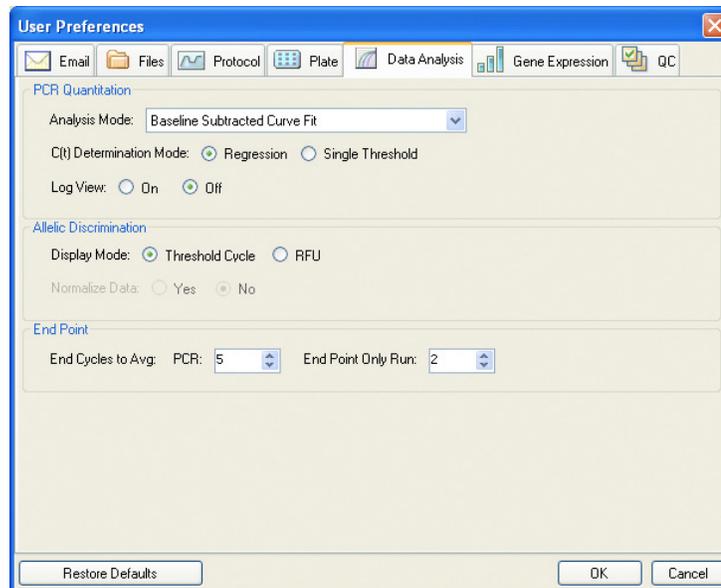


Figura 78. Separador Data Analysis (Análise de dados) na janela User Preferences (Preferências do utilizador).

Para os dados de quantificação, seleccione as definições seguintes:

- **Analysis Mode.** Seleccione o método da linha de base predefinido para o modo de análise. Escolha **Baseline Subtracted Curve Fit** (Ajuste da curva com subtração da linha de base), **No Baseline Subtraction** (Sem subtração da linha de base) ou **Baseline Subtracted** (Com subtração da linha de base)
- **C(t) Determination Mode.** Seleccione entre o modo de regressão (Regression) ou de limiar simples (Single Threshold) para determinar a forma como são calculados os valores C(t) para cada traçado de fluorescência
- **Log View.** Seleccione **On** (Activado) para mostrar um gráfico semi-logarítmico dos dados da amplificação. Seleccione **Off** (Desactivado) para mostrar um gráfico linear

Para os dados de discriminação alélica, seleccione as definições seguintes:

- **Display Mode.** Seleccione **RFU** para mostrar os dados na forma de um gráfico de RFU, ou seleccione **Threshold Cycle** (Ciclo de limiar) para mostrar um gráfico de ciclos de limiares
- **Normalize Data.** Esta selecção só está disponível com RFU seleccionado. Seleccione **No** (Não) para mostrar dados não normalizados. Seleccione **Yes** (Sim) para normalizar os dados para a amostra de controlo

Para os dados de ponto final, seleccione as definições seguintes: Seleccione o número de ciclos finais cuja média deve ser calculada ao calcular os cálculos de ponto final:

- **PCR.** Introduza o número de ciclos para PCR para calcular a média de ciclos finais para dados de quantificação (a predefinição é 5)
- **End Point Only Run.** Introduza o número de ciclos para **End Point Only Run** (Ciclo só de ponto final) para calcular a média de ciclos finais para dados de ponto final (a predefinição é 2)

Separador Gene Expression (Expressão de genes)

Seleccione o separador **Gene Expression** (Expressão de genes) na janela User Preferences (Preferências do utilizador) para especificar as predefinições de um novo ficheiro de dados de expressão de genes:

- **Relative to.** Seleccione um controlo ou zero. Para colocar em gráfico os dados de expressão de genes que originam em 1 (relativo a um controlo), seleccione **Control** (Controlo). Ao atribuir uma amostra de controlo na janela Experiment Setup (Configuração da experiência), por predefinição, o software calcula automaticamente os dados relativos a esse controlo. Seleccione **Relative to zero** (Relativo a zero) para que o software ignore o controlo, que é a selecção predefinida quando nenhuma amostra de controlo é atribuída na janela Experiment Settings (Definições da experiência)
- **X-Axis.** Representar por meio de gráfico o alvo (Target) ou a amostra (Sample) no eixo x
- **Y-Axis.** Representar por meio de gráfico a escala Linear, Log 2 ou Log 10 no eixo y
- **Scaling.** Seleccione uma opção de dimensionamento para o gráfico. Deixe o gráfico sem dimensionar. Em alternativa, escolha uma opção de dimensionamento para dimensionar para o valor mais alto (Highest) ou mais baixo (Lowest)
- **Method.** Definir o modo de análise predefinido, incluindo a expressão normalizada ($\Delta\Delta Ct$) ou a expressão relativa (ΔCt)
- **Error Bar.** Seleccione Std Dev. para o desvio padrão, ou Std. Error Mean para o erro padrão da média
- **Std Devs.** Seleccione o multiplicador do desvio padrão para representar por meio de gráfico as barras de erro. A predefinição é 1. Altere o multiplicador para 2 ou 3

Separador QC (Controlo de qualidade)

Selecione o separador **QC** (Controlo de qualidade) na janela User Preferences (Preferências do utilizador) para especificar as regras de controlo de qualidade a aplicar aos dados no módulo de análise de dados. O software valida os dados de acordo com os testes activados e os valores atribuídos (página 111).

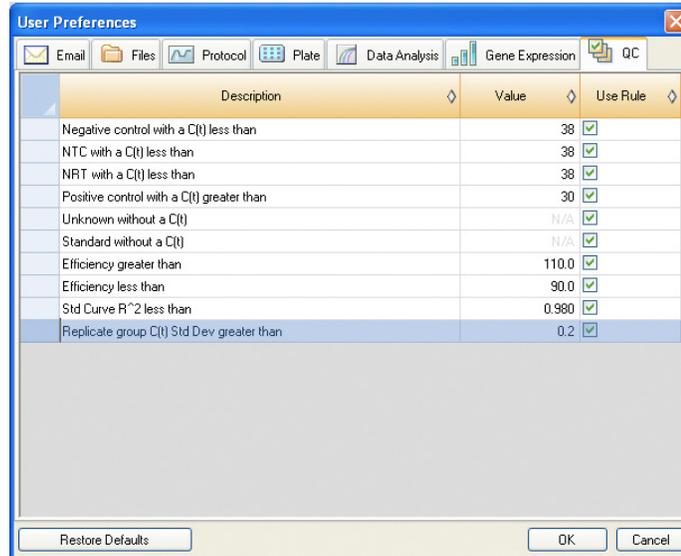


Figura 79. Separador QC (Controlo de qualidade) na janela User Preferences (Preferências do utilizador).

Especifique para adicionar valores de cutoff e para activar as seguintes regras de controlo de qualidade:

- Controlo negativo com C(t) inferior a XX. Introduzir um valor de cutoff de C(t)
- NTC (no template control) com C(t) inferior a XX. Introduzir um valor de cutoff de C(t)
- NRT (no reverse transcriptase control) (sem controlo da transcriptase inversa) com C(t) inferior a XX. Introduzir um valor de cutoff de C(t)
- Controlo positivo com C(t) superior a XX. Introduzir um valor de cutoff de C(t)
- Desconhecido sem C(t)
- Padrão sem C(t)
- Eficiência superior a XX. Introduzir um valor de cutoff da eficiência da reacção que é calculado para a curva padrão
- Eficiência inferior a XX. Introduzir um valor de cutoff da eficiência da reacção que é calculado para a curva padrão
- R² da curva padrão inferior a XX. Introduzir um valor R² de cutoff para a curva padrão
- Desvio padrão da C(t) do grupo de réplicas superior a XX. Introduzir um valor de cutoff do desvio padrão que seja calculado para cada grupo de réplicas

Administração de utilizadores

Abra a janela User Administration (Administração de utilizadores) na janela principal do software:

- Seleccione **Users > User Administration** (Utilizadores > Administração de utilizadores)
- Clique no botão **User Administration** (Administração de utilizadores) na barra de menus

Se iniciar sessão como administrador (Administrator), abra a janela User Administration (Administração de utilizadores) para gerir utilizadores e respectivos direitos:

- **Manage Users.** Adicionar ou remover utilizadores e atribuir uma função a cada um
- **Manage Rights.** Alterar os direitos relativos às funções de utilizadores (Principal, Operator ou Guest)

NOTA: Esta janela só pode ser editada por utilizadores administradores. Os restantes utilizadores só podem visualizá-la.

Para atribuir uma função a cada utilizador, seleccione uma função na lista de funções da janela User Administration (Administração de utilizadores) (Figura 80). Neste exemplo, ao utilizador Guest é atribuído o direito de guardar ficheiros.

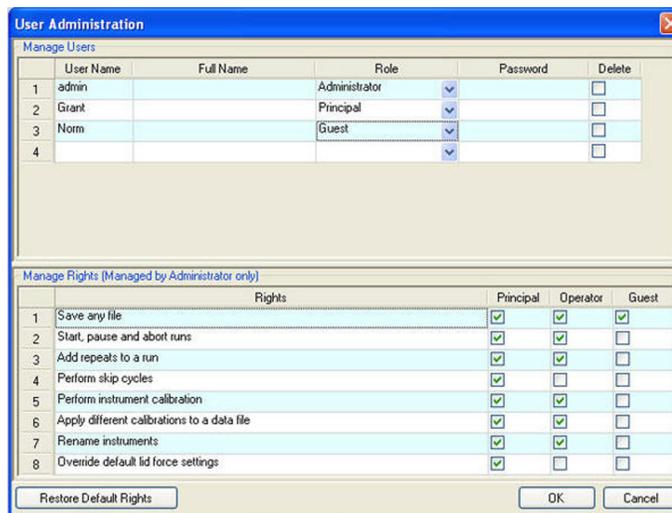


Figura 80. Janela User Administration (Administração de utilizadores) com três utilizadores.

Adicionar e remover utilizadores do software

Só um administrador do software pode adicionar e remover utilizadores. Para adicionar utilizadores do software no painel Manage Users (Gerir utilizadores), siga os passos seguintes:

1. Introduza um nome de utilizador (User Name) para o novo utilizador do software.
2. Seleccione uma função (Role) para o utilizador. Estas funções restringem os direitos de cada utilizador. A predefinição é Principal.
3. (Opcional) Introduza um nome completo (Full Name) e uma password para o novo utilizador do software.

4. Clique em **OK** para abrir uma caixa de diálogo e confirmar que pretende fechar a janela.
5. Clique em **Sim** para fechar a caixa de diálogo e a janela.

Para remover um utilizador do software, siga os passos seguintes:

1. No painel Manage Users (Gerir utilizadores), clique na caixa da lista Delete (Eliminar) para cada utilizador do software que pretende remover.
2. Clique em **OK** para abrir uma caixa de diálogo e confirmar que pretende fechar a janela.
3. Clique em **Sim** para fechar a caixa de diálogo e a janela.

NOTA: A lista de utilizadores do software tem de incluir sempre um administrador.

Atribuir direitos a funções de utilizador

A janela User Administration (Administração de utilizadores) dá acesso a funções e direitos de utilizadores. O software inclui as quatro funções seguintes:

- **Administrator (obrigatório).** Cada utilizador com a função de administrador (Administrator) possui todos os direitos, os quais não podem ser alterados. O administrador pode também adicionar e remover utilizadores do software e alterar os direitos de cada função
- **Principal.** Por predefinição, cada utilizador com a função de principal (Principal) possui todos os direitos
- **Operator.** Por predefinição, cada utilizador com a função de operador (Operator) possui todos os direitos, com excepção de ignorar ciclos e criar um estudo de genes
- **Guest.** Por predefinição, os utilizadores com função de Guest não têm direitos e só podem ler os ficheiros

Para especificar os direitos de cada função, siga os passos seguintes: Só um administrador do software pode alterar os direitos de qualquer função.

1. No painel Manage Rights (Gerir direitos), clique na caixa sob a designação da função para adicionar ou remover esse direito. Clique em um ou mais direitos da lista. Clique em **Restore Default Rights** (Repor direitos predefinidos) para repor todos os direitos de todas as funções na lista predefinida.
2. Clique em **OK** para abrir uma caixa de diálogo e confirmar que pretende fechar a janela.
3. Clique em **Sim** para fechar a caixa de diálogo e a janela.

Para ver a sua função e respectivos direitos actuais, seleccione **User > User Administration** (Utilizador > Administração de utilizadores). Contacte um administrador do software para modificar as definições de utilizador, os direitos e as funções mostrados na janela User Administration (Administração de utilizadores). Um utilizador do nível Principal, Operator ou Guest só pode ver as respectivas definições de utilizador, direitos e funções.

11 Recursos

Leia este capítulo para obter mais informações sobre recursos para o sistema de detecção em tempo real CFX96™:

- Assistente de calibração (abaixo)
- Manutenção do instrumento (página 117)
- Registo de aplicações (página 119)
- Resolução de problemas (página 120)
- Especificações técnicas (página 122)
- Bibliografia (página 124)

Assistente de calibração

O sistema CFX96 é calibrado de fábrica para fluoróforos utilizados habitualmente em placas de poços brancos e poços transparentes (Tabela 29).

Tabela 29. Fluoróforos e canais calibrados de fábrica.

Fluoróforos	Canal
FAM, SYBR® Green I	1
VIC, HEX, TET, CAL Gold Fluor 540	2
ROX, Texas Red, CAL Fluor Red 610	3
Cy5, Quasar 670	4
Quasar 705	5

O sistema CFX96 inclui também um canal dedicado para química FRET; este canal não requer calibração para fluorocromos específicos.

Para abrir o assistente de calibração para calibrar o sistema de PCR em tempo real CFX96:

1. Selecione um instrumento no painel Detected Instruments (Instrumentos detectados).
2. Selecione **Tool > Calibration Wizard** (Ferramenta > Assistente de Calibração) para abrir a janela e calibrar novas combinações de placas e fluorocromos (Figura 81).

Figura 81 - exemplo da janela Dye Calibration (Calibração de fluorocromos).

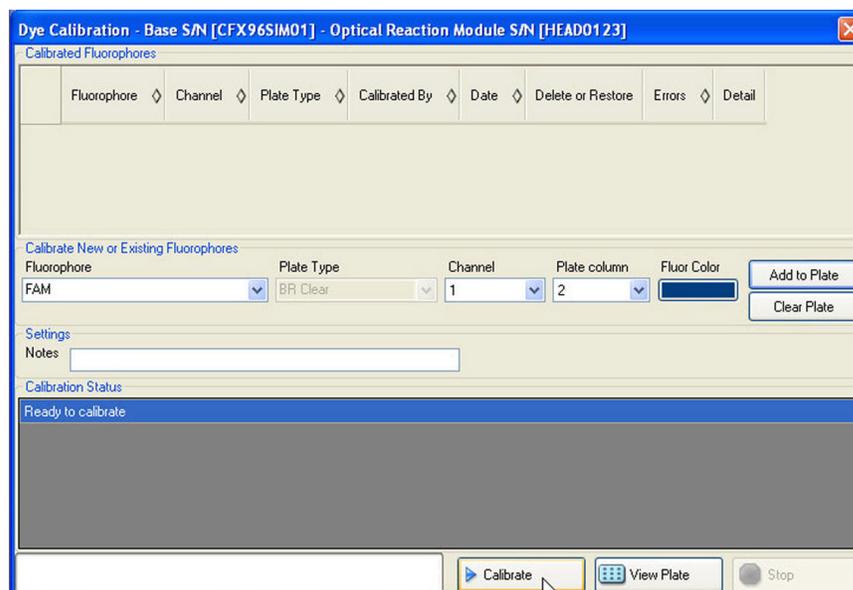


Figura 81. Janela Dye Calibration (Calibração de fluorocromos).

Calibração do sistema CFX96

Para calibrar o sistema CFX96 na janela Dye Calibration (Calibração de fluorocromos):

1. No painel Calibrate New (Calibrar novo) ou Existing Fluorophores (Fluoróforos existentes), na lista pendente selecione o fluoróforo que pretende calibrar. Se o nome do fluoróforo não estiver incluído na lista, digite o nome na caixa e adicione-o à lista.
2. Selecione o tipo de placa. Se o tipo de placa não estiver incluído na lista, digite o tipo na caixa e adicione-o à lista.
3. Selecione um canal para o fluoróforo.
4. Clique em **Add to Plate** (Adicionar à placa) para adicionar o fluoróforo. Para limpar a placa, clique em **Clear Plate** (Limpar placa) para remover todos os fluoróforos.
5. (Opcional) Repita os passos 1–6 para adicionar cada fluoróforo que pretende calibrar para a placa.
6. Quando terminar de adicionar fluoróforos, clique em **View Plate** (Ver placa) para abrir Dye Plate Display. Utilize esta janela como guia para carregar fluorocromos na placa.
7. Prepare uma placa de 96 poços para calibração de fluorocromos, pipetando solução de fluorocromo em cada poço, de acordo com o padrão mostrado no Pure Dye Plate Display. Para cada fluoróforo, encha 4 poços com 50 µl (placa de 96 poços) de solução de fluorocromo de 300 nM. Repare que pelo menos metade da placa contém poços em branco.
8. Para selar a placa, utilize o método que irá ser usado na experiência.
9. Coloque a placa de calibração no bloco e feche a tampa. Em seguida, clique em **Calibrate** (Calibrar), e clique em **OK** para confirmar que a placa se encontra no bloco.

10. Quando o CFX Manager™ software conclui o ciclo de calibração, aparece uma caixa de diálogo. Clique em **Yes** (Sim) para terminar a calibração e abrir o **Dye Calibration Viewer** (Visualizador de calibração de fluorocromos).
11. Clique em **OK** para fechar a janela.

Manutenção do instrumento

O sistema CFX96 inclui um sistema de vaivém óptico sensível e um bloco de amostras que têm de aquecer e arrefecer muito rapidamente. A contaminação destes componentes pode interferir com a ciclagem térmica e a recolha de dados.

AVISO! Nunca permita que a reacção seja executada com uma tampa de amostra aberta ou com fuga. Poderá verificar-se a fuga dos reagentes, os quais poderão revestir o bloco, a tampa interior e a cabeça óptica no sistema de vaivém. A sujidade excessiva pode ofuscar o sinal, e a contaminação por fluorescência pode criar um sinal de fundo excessivo. O sistema de vaivém óptico só deve ser limpo por técnicos da assistência Bio-Rad com a devida formação para o efeito.

Para evitar a contaminação do sistema CFX96, veja as sugestões seguintes:

- Limpe sempre a parte exterior de qualquer recipiente antes de o colocar no bloco
- Nunca execute uma reacção com um vedante que esteja aberto, solto, furado ou que apresente outros danos, uma vez que tal poderá contaminar o bloco, a tampa interior e o sistema óptico
- Nunca execute uma reacção de PCR ou de PCR em tempo real com reagentes voláteis que possam explodir e contaminar o bloco, a tampa interior e o sistema óptico
- Limpe periodicamente o bloco e a tampa interior para evitar a acumulação de sujidade, de material perigoso para o ambiente ou de soluções fluorescentes (página 117)
- Nunca limpe nem toque de outra forma no sistema óptico atrás dos orfícios da placa de aquecimento presentes na tampa interior (Figura 82 na página 118)
- Limpe regularmente a tampa exterior e a base do Termociclador C1000™ (para mais informações, consulte o manual de instruções do termociclador C1000)

Limpeza do módulo de reacção óptico

O bloco do módulo de reacção óptico e a base do Termociclador C1000 devem ser limpos regularmente para remover detritos e sujidade que poderão interferir com o seu funcionamento correcto. Assim que descobrir detritos e líquidos derramados, limpe-os com um pano macio sem fiapos humedecido com água. A limpeza do instrumento permite o seu funcionamento preciso. Para informações mais detalhadas sobre a limpeza da Base do C1000, consulte o manual de instruções do termociclador C1000.

AVISO! Nunca utilize soluções de limpeza corrosivas para o alumínio. Evite riscar a superfície do compartimento do módulo de reacção C1000. Uma superfície riscada e danificada compromete a precisão do controlo térmico.

AVISO! Nunca verta água ou outras soluções sobre o compartimento do módulo de reacção C1000. Os componentes molhados podem provocar choques eléctricos quando o termociclador é ligado à tomada.

Limpe o módulo de reacção óptico CFX96 assim que detectar detritos, sujidade ou contaminação no bloco ou na tampa interior. Qualquer sujidade pode interferir com a capacidade que o bloco tem de alterar rapidamente a temperatura e recolher dados de fluorescência precisos. Para limpar o módulo de reacção, siga as directrizes seguintes. Siga estas sugestões de limpeza:

AVISO! Para evitar choques eléctricos, retire sempre o módulo de reacção da base do termociclador, ou desligue a base da tomada antes de limpar o instrumento.

AVISO! Nunca toque no sistema óptico, localizado atrás dos orfícios da placa de aquecimento na tampa interior (Figura 82), nem permita que soluções entrem em contacto com o mesmo.

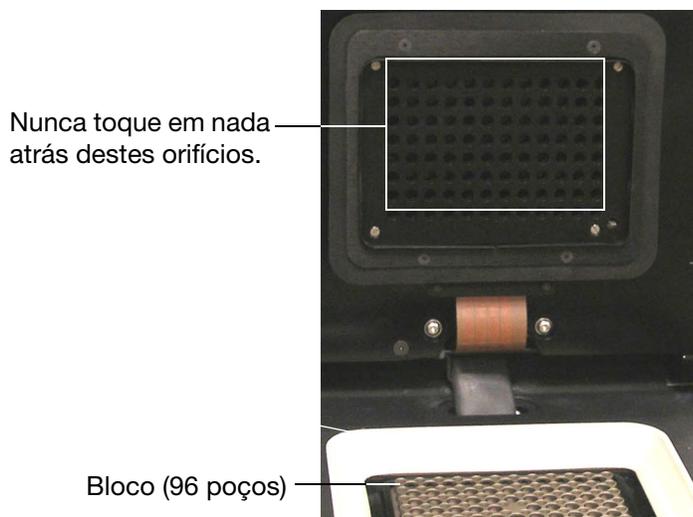


Figura 82. Orifícios da placa de aquecimento na tampa interior.

- **Limpe a superfície exterior.** Utilize um pano húmido para limpar substâncias derramadas na caixa exterior. Se necessário, utilize uma solução suave de sabão e enxague a superfície com um pano limpo. Limpe a tampa para evitar a corrosão
- **Limpe as aletas de refrigeração.** Elimine a poeira com uma escova macia ou um pano húmido. Elimine as camadas de poeira presentes nas aberturas de ventilação com um aspirador. Utilize água e um pano macio sem fiapos para remover os detritos agarrados às aletas. Evite riscar a superfície. Se necessário, utilize uma solução suave de sabão e enxague bem para remover completamente os resíduos. A limpeza das aletas melhora a precisão de aquecimento e arrefecimento das amostras

NOTA: Nunca utilize soluções de limpeza corrosivas para o alumínio, tais como lixívia ou produtos de limpeza abrasivos.

- **A utilização de óleo nos poços não é recomendada.** Se for utilizado óleo, os poços devem ser limpos rigorosa e frequentemente. Elimine o óleo quando este apresentar uma cor não característica ou se estiver sujo. Utilize uma solução de etanol a 95% para limpar o óleo. Não deixe acumular óleo no bloco
- **Limpe os poços do bloco.** Limpe imediatamente os derrames para evitar que sequem. Utilize pipetas descartáveis em plástico com água (recomendado), etanol a 95% ou lixívia diluída a 1:100 em água. Utilize também um pano macio sem fiapos ou uma toalha de papel e água para limpar o bloco. Enxague sempre os poços com água várias vezes para eliminar todos os vestígios de reagentes de limpeza

AVISO! Nunca limpe o bloco com soluções alcalinas fortes (sabão forte, amónia ou lixívia concentrada). Nunca utilize soluções de limpeza corrosivas ou abrasivas.

Este tipo de agentes de limpeza pode danificar o bloco e comprometer a precisão do controlo térmico.

AVISO! Os resíduos de lixívia, etanol ou sabão presentes nos blocos podem corroer os mesmos e destruir os elementos de plástico durante um ciclo. Depois da limpeza, enxague sempre muito bem os poços com água para eliminar todos os vestígios de reagentes de limpeza.

AVISO! Nunca aqueça o bloco depois de adicionar uma solução de limpeza. Aquecer o bloco com solução de limpeza danificará o bloco, o módulo de reacção e a base do termociclador.

- **Limpe a tampa interior.** Utilize água e um pano macio sem fiapos para remover os detritos e soluções da superfície da tampa interior. Nunca utilize detergentes abrasivos ou materiais que possam riscar a superfície. A limpeza da tampa interior melhora a precisão de aquecimento e arrefecimento das amostras

Registo de aplicações

Antes de um novo ciclo, o instrumento inicia um teste de auto-diagnóstico para verificar se está a funcionar de acordo com as especificações. O software regista os resultados deste teste no ficheiro de registo do ciclo e da aplicação. Se detectar um problema em uma ou mais experiências, abra os registos do ciclo e da aplicação para descobrir quando é que o problema começou.

O CFX Manager software regista informações sobre o estado de um instrumento durante um ciclo no **Registo de aplicações** (Figura 83). Utilize estes registos para seguir eventos que ocorrem em instrumentos e no software, e também para a resolução de problemas.

Para abrir o registo de aplicações na janela principal do software, seleccione **View > Application Log** (Ver > Registo de aplicações).

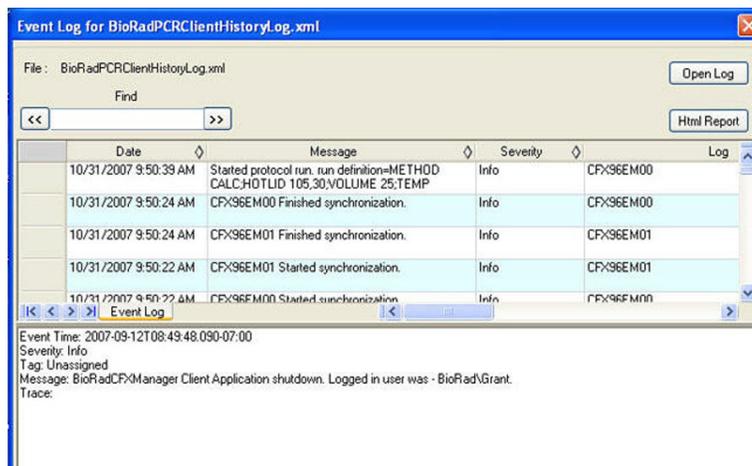


Figura 83. Exemplo de um ficheiro de registo de eventos.

Resolução de problemas

Regra geral, os problemas de comunicação do software e do instrumento podem ser resolvidos reiniciando o computador e o sistema. Certifique-se de guardar o trabalho em curso antes da reiniciação.

NOTA: Verifique se o computador tem suficiente RAM e espaço livre no disco rígido. A RAM mínima é 2 GB, e o mínimo de espaço livre no disco rígido é 20 GB.

Instalar o software manualmente

Se necessário, instale o software manualmente de acordo com as instruções seguintes:

1. Insira o CD do software.
2. Clique com o botão direito no ícone do CD do software e seleccione **Explore** (Explorar) para abrir a janela do CD.
3. Faça duplo clique na pasta **CFX_Manager** para abrir a pasta e, em seguida, faça duplo clique em **setup.exe** para iniciar o assistente de instalação do software.
4. Siga as instruções do assistente para instalar o software e clique depois em **Finish** (Terminar).

Instalar os controladores manualmente

Se necessário, instale os controladores manualmente de acordo com as instruções seguintes:

1. Insira o CD do software. Se não tiver o CD, localize a pasta dos controladores no caminho de ficheiros C:\Program Files\Bio-Rad\Drivers no seu disco rígido.
2. Clique no ecrã de instalação do software do botão **Drivers** (Controladores) (Figura 84).
3. Clique na pasta **BaseUnit** para abri-la.
4. Para computadores com Windows XP, faça duplo clique em **BioRadC1000DriverInstall.exe** para aceder à janela de instalação. Para computadores com Windows Vista, clique com o botão direito do rato em **BioRadC1000DriverInstall.exe** e seleccione **Run as Admin** (Executar como admin) para aceder à janela de instalação.

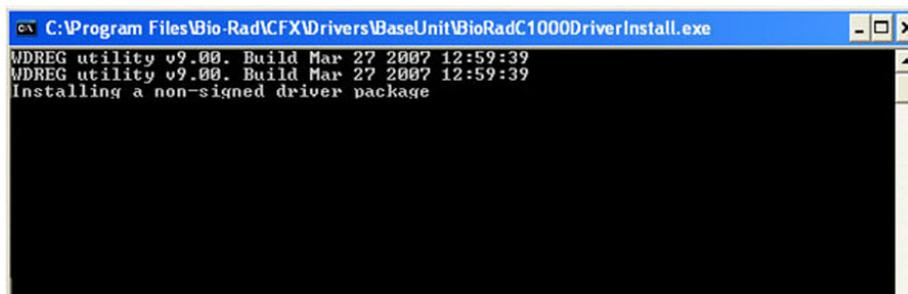


Figura 84. Janela de instalação de controladores.

Quando a instalação estiver concluída, fecha-se a janela de instalação.

Opções de falha de corrente

Se ocorrer uma falha de corrente, o instrumento e o computador encerram. Após uma breve falha de corrente o instrumento retoma a execução de um protocolo, mas o registo de aplicações toma nota da falha de corrente. Consoante as definições do computador e o período de tempo sem energia, o instrumento e o software tentam continuar a funcionar, dependendo do passo do protocolo:

- Se o protocolo se encontrar num passo sem leitura de placa, o protocolo continuará a ser executado assim que o instrumento voltar a receber energia
- Se o protocolo se encontrar num passo com leitura de placa, o instrumento aguarda que o software seja reiniciado e retome a comunicação para recolher os dados. Nesta situação, o protocolo só continua se o software não for encerrado pelo computador. Quando o computador e o software voltam a arrancar, o protocolo continua

Se quiser abrir uma tampa motorizada bloqueada num módulo de reacção para remover as amostras durante uma falha de energia, siga estes passos para remover a placa de bloqueio:

1. Retire o módulo de reacção da caixa do C1000, carregando para tal na barra de bloqueio da base do C1000.
2. Coloque o módulo na parte frontal de uma mesa, de modo que a parte da frente do módulo se projecte 5 cm sobre o bordo da mesa, conforme mostrado na Figura 85.



Figura 85. Configurar o módulo óptico para remover a placa de bloqueio.

3. Com uma chave Allen, retire os dois parafusos grandes sob o bordo dianteiro do módulo de reacção (sob o botão de abertura da tampa). Não retire os dois parafusos pequenos

localizados no bordo dianteiro do módulo. Deverá ouvir a patilha de bloqueio a libertar-se no interior do módulo. A Figura 86 mostra os dois parafusos grandes.



Figura 86. Retire estes parafusos para desbloquear o módulo óptico.

4. Empurre a tampa do módulo de reacção para abri-la. Repare que a patilha (plástico escuro) já não está afixada. Retire as amostras do bloco.
5. Volte a montar o módulo de reacção com a tampa aberta, colocando de novo a patilha de bloqueio e fixando-a com os dois parafusos grandes. A Figura 87 mostra a patilha de bloqueio instalada.

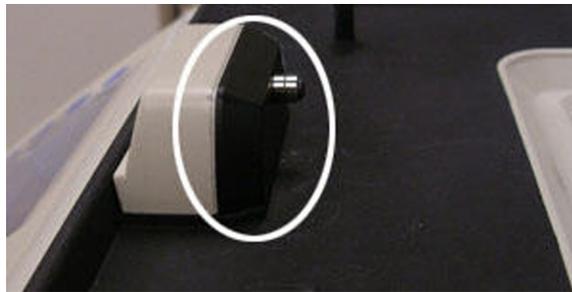


Figura 87. Patilha de bloqueio do módulo óptico.

Especificações técnicas

Dimensões e peso

Tamanho (L x P x A)	33 x 46 x 36 cm (13 x 18 x 14")
Peso	21 kg (47 lb)

Especificações eléctricas

Tensão	100-240 V
Frequência	50-60 Hz
Consumo de energia	850 Watt
Capacidade nominal dos fusíveis	10 A

Condições de operação

Generalidades	Utilização em interiores
Temperatura	Temperatura ambiente de 15-31°C
Humidade	Humidade relativa máxima de 80% (sem condensação)
Altitude	Até 2.000 metros acima do nível do mar
Nível de ruído	Cumprir as especificações 61010-1
Grau de poluição	2
Classe de instalação	2

Termociclador

Caixa	Caixa do C1000
Velocidade máxima de rampa	5°C/seg
Velocidade média de rampa	3,3°C/seg
Amplitude programável do gradiente	1-24°C
Intervalo de variação de gradiente operacional	0-100°C
Método de aquecimento e refrigeração	Peltier
Tampa	Aquece até 105°C

Temperatura

Intervalo	0-100°C
Precisão	±0,2°C do alvo programado a 90°C
Uniformidade	±0,4°C no espaço de 10 seg até atingir 90°C

Óptica

Excitação	6 LEDs com filtro
Detecção	6 fotodíodos com filtro
Intervalo de comprimentos de onda de excitação/emissão	450–730 nm
Sensibilidade	Detecta 1 cópia da sequência alvo no ADN genómico humano
Intervalo dinâmico	10 ordens de magnitude

Software

Sistemas operativos	Windows XP, Windows Vista, Windows 7
Análise multiplex	Até 5 alvos por poço

Sistema

Licenciado para PCR em tempo real	Sim
Capacidade de amostra	96 poços
Tamanho de amostra	1–50 µl (10–25 µl recomendado)
Comunicações	USB 2.0

Bibliografia

Breslauer KJ et al. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Nat Acad Sci* 83, 3746–50.

Livak JL et al. (1995). Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics* 9, 341–342.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9), 2002–2007.

Vandesompele J, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7), 1–12.

Aviso de direitos de autor Minpack (1999) Universidade de Chicago. Todos os direitos reservados

A redistribuição e utilização sob as formas original e binária, com ou sem modificação, são permitidas desde que sejam cumpridas as condições seguintes:

1. As redistribuições do código de origem devem reter o aviso de direitos de autor acima, a presente lista de condições e a seguinte declaração de isenção de responsabilidade.
2. As redistribuições sob forma binária devem reproduzir o aviso de direitos de autor acima, a presente lista de condições e a seguinte declaração de isenção de responsabilidade na documentação e/ou noutros materiais fornecidos com a distribuição.
3. A documentação do utilizador final incluída com a redistribuição, caso exista, deve incluir a seguinte declaração:

Este produto inclui software criado pela Universidade de Chicago, como Operador do Laboratório Nacional de Argonne.



Bio-Rad Laboratories, Inc.
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette, France
Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00
Fax: +33 (0)1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com **USA** 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 01 877 89 01 **Belgium** 09 385 55 11 **Brazil** 55 31 3689 6600
Canada 905 364 3435 **China** 86 20 8732 2339 **Czech Republic** 420 241 430 532 **Denmark** 44 52 10 00 **Finland** 09 804 22 00 **France** 01 47 95 69 65
Germany 089 31 884 0 **Greece** 30 210 777 4396 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 459 6100 **India** 91 124 4029300 **Israel** 03 963 6050
Italy 39 02 216091 **Japan** 03 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 0318 540666 **New Zealand** 0508 805 500
Norway 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 27 861 246 723
Spain 34 91 590 5200 **Sweden** 08 555 12700 **Switzerland** 061 717 95 55 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **United Kingdom** 020 8328 2000