

Applied Biosystems StepOne™

Real-Time PCR System

Experimentos de Curva Estándar



Introducción

1

Applied Biosystems StepOne™

Real-Time PCR System

Experimentos de Curva Estándar

Diseño del
experimento

2

Preparación de las
reacciones

3

Realización del
experimento

4

Análisis del
experimento

5

© Copyright 2006, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

NOTICE TO PURCHASER: Label License

The StepOne™ Real-Time PCR System is covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, ROX, StepOne, and TAMRA are trademarks of Applied Biosystems o sus subsidiarias en EE.UU. y/o en algunos otros países.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Número de referencia 4377736 Rev. B
06/2010

Contenido

Prólogo	vii
Cómo utilizar esta guía	vii
Cómo obtener más información	viii
Cómo obtener asistencia técnica	x
Convenciones de seguridad utilizadas en este documento	xi
Símbolos en los instrumentos	xiii
Etiquetas de seguridad en los instrumentos	xv
Seguridad general del instrumento	xvi
Seguridad química	xvii
Seguridad de residuos químicos	xix
Seguridad eléctrica	xx
Seguridad de los LED	xxi
Seguridad biológica	xxi
Seguridad de la estación de trabajo	xxii
Estándares de seguridad y compatibilidad electromagnética (EMC)	xxiii
Capítulo 1 Introducción	1
Acerca del sistema StepOne™	2
Acerca de los experimentos de curva estándar	4
Cómo utilizar esta guía	7
Acerca del experimento de ejemplo	8
Flujo de trabajo del experimento de ejemplo	9
Capítulo 2 Diseño del experimento	11
Resumen del capítulo	12
Creación de un nuevo experimento	13
Definición de las propiedades del experimento	16
Definición de los métodos y materiales	18
Configuración de los genes diana	21
Configuración de los estándares	23
Configuración de las muestras	25
Configuración protocolo de termociclado	27
Revisión de la configuración de la reacción	29
Solicitud de materiales para el experimento	35
Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño	38

Capítulo 3	Preparación de las reacciones.	41
	Resumen del capítulo	42
	Preparación de las diluciones de muestras	43
	Preparación de la dilución seriada del estándar	45
	Preparación de la mezcla de reacción	48
	Preparación de la placa de reacción	50
 Capítulo 4	 Realización del experimento	 55
	Resumen del capítulo	56
	Preparación de la reacción	57
	(Opcional) Activación de las notificaciones	59
	Inicio de la reacción	61
	Monitorización de la reacción	64
	Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos	73
 Capítulo 5	 Análisis del experimento	 77
	Resumen del capítulo	78
	 Sección 5.1: Revisión de los resultados	 79
	Análisis del experimento	80
	Visualización de la curva estándar	85
	Revisión de la gráfica de amplificación	88
	Revisión de la tabla de pocillos	93
	Presentación de los datos	96
	 Sección 5.2: Solución de problemas (si es preciso)	 97
	Revisión de las opciones de análisis	98
	Revisión del resumen QC	100
	Omisión pocillos en el análisis	103
	Revisión de la gráfica multicomponente	105
	Revisión de la gráfica de datos brutos	108
 Apéndice A	 Flujos de trabajo alternativos del experimento	 111
	Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)	112
	Flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido)	113
	Flujo de trabajo utilizando moldes	114
	Flujo trabajo para la exportación/importación	115

Bibliografía	117
Glosario	119
Índice alfabético	133

Cómo utilizar esta guía

Finalidad de esta guía	En esta guía, se explica cómo realizar experimentos de curva estándar en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (sistema StepOne™). Esta guía sirve de: • Tutorial, utilizando los datos de los experimentos de ejemplo que se incluyen en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software (software StepOne™). • Guía para realizar sus propios experimentos.
Público	Esta guía está destinada al personal de laboratorio y a los principales investigadores que realizan experimentos de curva estándar con el sistema StepOne.
Suposiciones	En esta guía, se asume lo siguiente: • Está familiarizado con el sistema operativo Microsoft Windows® XP. • Está familiarizado con Internet y los navegadores de Internet. • Sabe cómo manejar muestras de DNA y/o RNA y prepararlas para el PCR. • Sabe almacenar datos, transferir archivos, y copiar y pegar. • Tiene experiencia con redes si tiene pensado integrar el sistema StepOne en el flujo de datos existente de su laboratorio.
Convenciones del texto	En esta guía, se utilizan las siguientes convenciones: • El texto en negrita indica una acción del usuario. Por ejemplo: Escriba 0 y, a continuación, pulse Intro en cada uno de los campos restantes. • <i>El texto en cursiva</i> señala palabras nuevas o importantes y también se utiliza para enfatizar algo. Por ejemplo: Antes de realizar el análisis, prepare <i>siempre</i> una matriz fresca. • El símbolo de la flecha que apunta a la derecha (▶) separa los comandos sucesivos que se seleccionan en un menú desplegable o un menú de acceso directo. Por ejemplo: Seleccione File (Archivo) ▶ Open (Abrir).

Palabras de aviso para el usuario

En la documentación de Applied Biosystems, aparecen dos palabras de aviso para el usuario. Cada palabra implica un nivel concreto de observación o acción, tal y como se describe a continuación:

Nota: Proporciona información que puede ser interesante o útil, pero no es esencial para el uso del producto.

¡IMPORTANTE! Proporciona información que es necesaria para poder utilizar el instrumento correctamente, para poder utilizar un kit de reactivos con precisión o para poder utilizar un producto químico de manera segura.

A continuación, se muestran algunos ejemplos de palabras de aviso para el usuario:

Nota: La función de calibración también está disponible en la consola de control.

¡IMPORTANTE! Para comprobar la conexión del cliente, necesita un identificador de usuario válido.

Palabras de aviso de seguridad

En la documentación del usuario, también aparecen palabras de aviso de seguridad. Para obtener más información, consulte [“Palabras de aviso de seguridad”](#) en la [página xi](#).

Cómo obtener más información

Documentación relacionada

El sistema StepOne incluye la siguiente documentación:

Documento	Núm. ref. inglés	Núm. ref. español
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	4376786	4377729
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>	4376787	—
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments</i>	4376785	4377742
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>	4376784	4377736
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation, Networking, and Maintenance Guide</i>	4376782	4377798
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Quick Reference Card</i>	4376783	4377792
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Site Preparation Guide</i>	4376768	4378359
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help</i>	—	—

Applied Biosystems puede proporcionarle la siguiente documentación auxiliar:

Documento	PN
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol</i>	4376788
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

Nota: Para obtener más documentación, consulte “[Cómo obtener asistencia técnica](#)” en la [página x](#).

Obtención de información de la ayuda del software

La ayuda del software StepOne describe cómo se utiliza cada función de la interfaz de usuario. Para acceder a la ayuda desde el software StepOne, realice una de las siguientes acciones:

- Pulse **F1**.
- Haga clic en  en la barra de herramientas.
- Seleccione **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Para buscar temas de interés en la ayuda:

- Consulte el índice de contenido.
- Busque un tema específico.
- Busque en un índice alfabético.

Envíenos sus comentarios

Applied Biosystems agradece sus comentarios y sugerencias para mejorar sus documentos de usuario. Puede enviar sus comentarios a la dirección de correo electrónico:

techpubs@appliedbiosystems.com

¡IMPORTANTE! Esta dirección sólo sirve para enviar comentarios y sugerencias en relación con la documentación. Para solicitar documentos, descargar archivos PDF u obtener ayuda sobre una cuestión técnica, vaya a **www.appliedbiosystems.com** y, a continuación, haga clic en el vínculo **Support** (Asistencia técnica). (Consulte “[Cómo obtener asistencia técnica](#)” más adelante).

Cómo obtener asistencia técnica

Para acceder a los servicios más recientes y obtener información acerca de la asistencia técnica, vaya a **www.appliedbiosystems.com** y, a continuación, haga clic en el vínculo **Support** (Asistencia técnica).

En la página Support (Asistencia técnica), puede:

- Buscar las preguntas más frecuentes (FAQ)
- Enviar una pregunta directamente al Servicio de asistencia técnica
- Solicitar a Applied Biosystems documentos de usuario, fichas técnicas de solicitud de materiales (MSDS), certificados de análisis y otros documentos relacionados
- Descargar documentos PDF
- Obtener información acerca de la formación del cliente
- Descargar actualizaciones y parches de software

Asimismo, en la página Support (Asistencia técnica) podrá acceder a los números de teléfono y fax para ponerse en contacto con el Servicio de asistencia técnica y las instalaciones de venta de Applied Biosystems en todo el mundo.

¡IMPORTANTE! Cuando se le solicite que lo haga en esta guía o cuando tenga que programar el mantenimiento del instrumento StepOne™ (por ejemplo, el mantenimiento anual planificado o la verificación/calibración de la temperatura), póngase en contacto con el Centro de atención al cliente de Applied Biosystems. Para obtener un número de teléfono o enviar un mensaje de correo electrónico al centro, visite **<http://www.appliedbiosystems.com/support/contact>**.

Convenciones de seguridad utilizadas en este documento

Palabras de aviso de seguridad

En la documentación del usuario de Applied Biosystems, aparecen cuatro palabras de aviso de seguridad en los puntos del documento en los que debe conocer la existencia de peligros importantes. Cada palabra de aviso (**IMPORTANTE**, **PRECAUCIÓN**, **ADVERTENCIA**, **PELIGRO**) implica un nivel de observación o acción particular, tal y como se explica a continuación.

Definiciones

¡IMPORTANTE! Proporciona información que es necesaria para poder utilizar el instrumento correctamente, para poder utilizar un kit de reactivos con precisión o para poder utilizar un producto químico de manera segura.



CUIDADO

Indica una situación potencialmente peligrosa que, de no evitarse, podría causar lesiones leves o moderadas. También puede utilizarse para alertar de prácticas no seguras.



ADVERTENCIA

Indica una situación potencialmente peligrosa que, de no evitarse, podría causar lesiones graves o mortales.



PELIGRO

Indica una situación inminentemente peligrosa que, de no evitarse, tendrá como resultado lesiones graves o mortales. Esta palabra de aviso se limita a las situaciones más extremas.

A excepción de los avisos **IMPORTANTE**, todas las palabras de aviso de seguridad de un documento de Applied Biosystems aparecen con la figura de un triángulo abierto que contiene un símbolo de peligro. Estos símbolos de peligro son idénticos a los que se incorporan en los instrumentos de Applied Biosystems (consulte “[Símbolos de seguridad](#)” en la [página xiii](#)).

Ejemplos

¡IMPORTANTE! Debe crear una hoja de cálculo de entradas de muestras diferente para cada placa de 96 pocillos.



CUIDADO

PELIGRO QUÍMICO. TaqMan® Universal PCR Master Mix puede causar irritaciones en la piel y los ojos. Puede provocar molestias si se ingiere o se inhala. Consulte la ficha técnica de seguridad (MSDS) y siga las instrucciones de manipulación indicadas. Use protectores oculares, vestimenta protectora y guantes apropiados.



ADVERTENCIA

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. Durante el uso de los instrumentos, la cubierta caliente y el bloque de muestras, se pueden alcanzar temperaturas superiores a 100 °C.



PELIGRO

PELIGRO ELÉCTRICO. La continuidad del circuito de toma a tierra es vital para la seguridad. Jamás utilice el sistema con el conductor de toma de tierra desconectado.

Símbolos en los instrumentos

Electricidad Símbolos en los instrumentos

En la siguiente tabla, se describen los símbolos eléctricos que pueden aparecer en los instrumentos de Applied Biosystems.

Símbolo	Descripción	Símbolo	Descripción
	Indica la posición On (Encendido) del interruptor de encendido principal.		Indica un terminal que puede estar conectado a la referencia del retorno de tierra del circuito de señal de otro instrumento. No es un terminal de tierra protegido.
	Indica la posición Off (Apagado) del interruptor de encendido principal.		Este símbolo indica que se debe conectar a tierra un terminal de toma a tierra de protección antes de realizar ninguna otra conexión eléctrica en el instrumento.
	Indica un interruptor de espera por medio del cual se activa la posición Standby (Espera) en el instrumento. Si este interruptor está en la posición de espera, puede haber tensión peligrosa.		Indica que un terminal puede recibir o suministrar tensión o corriente alternante.
	Indica la posición On/Off (Encendido/Apagado) de un interruptor de encendido principal de contrafase.		Indica que un terminal puede recibir o suministrar tensión o corriente alternante o directa.

Símbolos de seguridad

En la siguiente tabla, se describen los símbolos de seguridad que pueden aparecer en los instrumentos de Applied Biosystems. Estos símbolos pueden aparecer en solitario o con un texto que explique el peligro correspondiente (consulte [“Etiquetas de seguridad en los instrumentos”](#) en la [página xv](#)). Estos símbolos de seguridad también pueden aparecer junto a PELIGROS, ADVERTENCIAS y PRECAUCIONES que se incluyen en el texto de este o de otros documentos de ayuda de productos.

Símbolo	Descripción	Símbolo	Descripción
	Indica que debería consultar el manual para obtener más información y proceder con el cuidado correspondiente.		Indica la presencia de piezas móviles y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.
	Indica la presencia de una superficie caliente u otro peligro debido a altas-temperaturas y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.		Indica la presencia de un peligro de descarga eléctrica y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.
			Indica la presencia de un láser en el interior del instrumento y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.

Medio ambiente Símbolos en los instrumentos

El siguiente símbolo se aplica a todos los productos eléctricos y electrónicos de Applied Biosystems que salieron al mercado europeo después del 13 de agosto de 2005.

Símbolo	Descripción
	No tire este producto a la basura municipal normal. Cumpla las ordenanzas municipales sobre residuos correspondientes para reducir el impacto medioambiental de los residuos de equipos eléctricos y electrónicos (WEEE). Clientes de la Unión Europea: Llame a la oficina de atención al cliente local de Applied Biosystems para informarse sobre la recogida de equipos y el reciclaje. Consulte en http://www.appliedbiosystems.com una lista de oficinas de atención al cliente de la Unión Europea.

Etiquetas de seguridad en los instrumentos

Los siguientes símbolos de PRECAUCIÓN, ADVERTENCIA y PELIGRO pueden aparecer en los instrumentos de Applied Biosystems en combinación con los símbolos de seguridad que se han descrito en la sección anterior.

Inglés	Francés
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	ATTENTION Produits chimiques dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	ATTENTION Déchets dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels et la réglementation locale associées à la manipulation et l'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	ATTENTION Surface brûlante.
DANGER High voltage.	DANGER Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	AVERTISSEMENT Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié de Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	ATTENTION Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	DANGER Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau LED de Classe 3B (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Evitez toute exposition au faisceau.

Ubicaciones de los símbolos de advertencia

El sistema StepOne contiene una advertencia en el lugar que se indica a continuación:



Seguridad general del instrumento



ADVERTENCIA

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. Si el instrumento se utiliza de alguna forma que no especifica Applied Biosystems, se pueden producir lesiones personales o daños en el instrumento.

Movimiento y elevación del instrumento



CUIDADO

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. El instrumento sólo puede moverlo y colocarlo el personal o el distribuidor que se especifique en la guía de preparación del emplazamiento correspondiente. Si decide levantar o mover el instrumento después de instalarlo, no intente hacerlo sin la ayuda de otras personas, el uso del equipo de traslado adecuado y las técnicas de elevación correctas. La elevación inapropiada puede causar dolorosas lesiones dorsales, que pueden resultar permanentes. Dependiendo del peso, se podrían necesitar dos personas para mover o levantar un instrumento.

Movimiento y elevación de ordenadores y monitores autónomos



ADVERTENCIA

No intente levantar o mover el ordenador ni el monitor sin la ayuda de otras personas. Dependiendo del peso del ordenador y/o el monitor, se podrían necesitar dos o más personas para moverlos.

Aspectos a tener en cuenta antes de levantar el ordenador y/o el monitor:

- Asegúrese de sujetar el ordenador o el monitor de una forma cómoda cuando los levante.
- Asegúrese de que no hay ningún obstáculo entre el lugar en el que se encuentra el objeto y su lugar de destino.
- No levante un objeto a la vez que gira el torso.
- Mantenga la columna vertebral en una posición neutral mientras levanta el objeto con las piernas.
- Los participantes deben coordinar las labores de elevación y movimiento antes de realizarlas.
- En lugar de levantar el objeto desde la caja del embalaje, incline cuidadosamente la caja hacia un lado y manténgala fija mientras alguien desliza su contenido hacia fuera.

Uso del instrumento

Asegúrese de que todas las personas que utilicen el instrumento:

- Han recibido instrucciones sobre prácticas de seguridad generales para laboratorios y prácticas de seguridad generales para el instrumento.
- Lea y comprenda todas las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) aplicables. Consulte [“Acerca de las fichas técnicas de seguridad de los materiales \(MSDS\)”](#) en la [página xviii](#).

Limpieza o descontaminación del instrumento



CUIDADO

Antes de utilizar un método de limpieza o descontaminación que no sea el que recomienda el fabricante, consulte al fabricante para comprobar que el método propuesto no va a dañar el equipo.

Seguridad química

Advertencia de peligro químico



ADVERTENCIA

PELIGRO QUÍMICO. Antes de manejar algún producto químico, consulte la ficha técnica de seguridad de los materiales (MSDS) que suministra el fabricante y observe todas las precauciones relevantes.



ADVERTENCIA

PELIGRO DE ALMACENAMIENTO QUÍMICO. No recoja ni almacene nunca los residuos en un envase de cristal, pues corre el riesgo de que se rompa o se resquebraje. Las botellas de reactivos y de residuos pueden agrietarse y presentar fugas. Cada botella de residuos deberá asegurarse en un recipiente de seguridad de polietileno de baja densidad con la tapa fija y las asas bloqueadas en posición vertical. Utilice la protección ocular, la vestimenta y los guantes adecuados cuando manipule botellas de reactivos o de residuos.

Directrices de seguridad química

Para reducir al mínimo el peligro de los productos químicos:

- Lea y comprenda las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) que proporciona el fabricante de los productos químicos antes de almacenar, manipular o trabajar con cualquier producto químico o material peligroso. (Consulte “[Acerca de las fichas técnicas de seguridad de los materiales \(MSDS\)](#)” en la [página xviii](#).)
- Minimice el contacto con productos químicos. Utilice un equipo adecuado de protección personal durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, protectores oculares, guantes o vestimenta protectora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Minimice la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con la ventilación adecuada (por ejemplo, una campana extractora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Compruebe periódicamente la ausencia de fugas o salpicaduras. Si se produce una fuga o un derrame, siga los procedimientos de limpieza del fabricante, tal y como se recomienda en la MSDS.
- Cumpla todas las leyes y normativas locales, estatales/provinciales o nacionales en materia de almacenamiento, manipulación y eliminación de productos químicos.

Acerca de las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS)

Los fabricantes de productos químicos incluyen fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) con los productos químicos peligrosos que envían a sus clientes *nuevos*. También incluyen MSDS con el primer envío de un producto químico peligroso a un cliente después de que esa MSDS se haya actualizado. En las MSDS, encontrará la información de seguridad necesaria para almacenar, manipular, transportar y desechar los productos químicos de forma segura.

Cada vez que reciba una MSDS nueva con un producto químico peligroso, no se olvide de reemplazar la MSDS correspondiente en sus archivos.

Obtención de MSDS

Las MSDS de cualquier producto químico de Applied Biosystems están a su disposición de manera gratuita las 24 horas del día. Para obtener MSDS:

1. Vaya a <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html>
2. En el campo de búsqueda de la página de búsqueda de MSDS:
 - a. Escriba el nombre del producto químico, el número de serie u otra información de interés que espere que aparezca en la MSDS.
 - b. Seleccione el idioma que desee.
 - c. Haga clic en **Search (Buscar)**.
3. Para ver, descargar o imprimir el documento que le interesa:
 - a. Haga clic con el botón derecho en el título del documento.
 - b. Seleccione:
 - **Open (Abrir)**: para ver el documento.
 - **Save Target As (Guardar destino como)**: para descargar una versión PDF del documento en el destino que seleccione.
 - **Print Target (Imprimir destino)**: para imprimir el documento.
4. Para enviar una copia de una MSDS por fax o correo electrónico, en la página de resultados de la búsqueda:
 - a. Seleccione **Fax o Email** bajo el título del documento.
 - b. Haga clic en **RETRIEVE DOCUMENTS (Recuperar documentos)** al final de la lista de documentos.
 - c. Introduzca la información requerida.
 - d. Haga clic en **View/Deliver Selected Documents Now (Ver/enviar ahora los documentos seleccionados)**.

Nota: Para obtener las MSDS de productos químicos que no distribuye Applied Biosystems, póngase en contacto con el fabricante del producto químico.

Seguridad de residuos químicos

Peligro de residuos químicos



CUIDADO

RESIDUOS PELIGROSOS. Para obtener información acerca de su manipulación y eliminación, consulte las fichas técnicas de seguridad de los materiales y las normativas locales.



ADVERTENCIA

PELIGRO DE RESIDUOS QUÍMICOS. Los residuos producidos por los instrumentos de Applied Biosystems son potencialmente peligrosos y pueden causar lesiones, enfermedades o la muerte.



ADVERTENCIA

PELIGRO DE ALMACENAMIENTO QUÍMICO. No recoja ni almacene nunca los residuos en un envase de cristal, pues corre el riesgo de que se rompa o se resquebraje. Las botellas de reactivos y de residuos pueden agrietarse y presentar fugas. Cada botella de residuos deberá asegurarse en un recipiente de seguridad de polietileno de baja densidad con la tapa fija y las asas bloqueadas en posición vertical. Utilice la protección ocular, la vestimenta y los guantes adecuados cuando manipule botellas de reactivos o de residuos.

Directrices de seguridad de residuos químicos

Para reducir al mínimo el peligro de los residuos químicos:

- Lea y comprenda las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) proporcionadas por los fabricantes de los productos químicos en el recipiente de residuos antes de almacenar, manipular o eliminar los residuos químicos.
- Disponga de contenedores de residuos principales y secundarios. (Los contenedores principales contienen los residuos inmediatos. Los contenedores secundarios contienen cualquier derrame o fuga del contenedor principal. Ambos contenedores deben ser compatibles con el material de residuo y deben cumplir los requisitos federales, estatales y locales sobre el almacenamiento en contenedores).
- Minimice el contacto con productos químicos. Utilice un equipo adecuado de protección personal durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, protectores oculares, guantes o vestimenta protectora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Minimice la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con la ventilación adecuada (por ejemplo, una campana extractora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Manipule los residuos químicos bajo una campana extractora.
- Después de vaciar el recipiente de residuos, ciérrelo bien con la tapa suministrada.
- Elimine el contenido de la bandeja de residuos y de la botella de residuos conforme a las buenas prácticas de laboratorio y a la normativa local, estatal/provincial o nacional en materia de medio ambiente y salud.

Eliminación de residuos

Si se generan residuos potencialmente peligrosos al utilizar el instrumento, debe:

- Identificar (mediante análisis, si es necesario) los residuos generados por las aplicaciones, los reactivos y los sustratos utilizados en su laboratorio.

- Garantizar la salud y la seguridad de todo el personal de su laboratorio
- Garantizar que los residuos producidos por el instrumento se almacenen, transfieren, transportan y eliminan de acuerdo con todas las normativas locales, estatales/provinciales y/o nacionales.

¡IMPORTANTE! Los materiales radiactivos o que impliquen un peligro biológico pueden requerir una manipulación especial, pudiéndose aplicar limitaciones en materia de eliminación.

Seguridad eléctrica



PELIGRO

PELIGRO DE DESCARGA ELÉCTRICA. Se puede producir una descarga eléctrica grave si se utiliza el sistema StepOne sin haber colocado los paneles de instrumentos. No quite los paneles de instrumentos. Los contactos de alta tensión quedan expuestos al quitar estos paneles del instrumento.

Fusibles



ADVERTENCIA

PELIGRO DE INCENDIO. El uso de fusibles o de una fuente de alimentación de alta tensión incorrectos pueden dañar el sistema de cableado del instrumento y provocar un incendio. Antes de encender el instrumento, compruebe que los fusibles están bien instalados y que la tensión del instrumento se corresponde con la fuente de alimentación del laboratorio.



ADVERTENCIA

PELIGRO DE INCENDIO. Para protegerse contra el riesgo de incendio, sólo cambie los fusibles por otros que sean del tipo y la potencia que se especifica para el instrumento.

Alimentación eléctrica



PELIGRO

PELIGRO ELÉCTRICO. La continuidad del circuito de toma de tierra es vital para la seguridad del equipo. Jamás utilice el equipo con el conductor de toma de tierra desconectado.



PELIGRO

PELIGRO ELÉCTRICO. Utilice cordones eléctricos certificados y bien configurados para el suministro eléctrico de la instalación.



PELIGRO

PELIGRO ELÉCTRICO. Enchufe el sistema a una toma eléctrica que tenga una toma de tierra adecuada y la capacidad de corriente apropiada.

Potencia de sobretensión

El sistema StepOne se incluye en la categoría II (de sobretensión) de las instalaciones y está clasificado como un equipo portátil.

Seguridad de los LED

Para garantizar un funcionamiento seguro de los LED:

- Un representante de Applied Biosystems debe realizar el mantenimiento del sistema.
- Todos los paneles del instrumento deben estar colocados en el mismo mientras éste está en funcionamiento. Cuando todos los paneles están instalados, no se detecta ninguna radiación. Si se quita algún panel cuando el LED está en funcionamiento (durante una reparación con los interbloques de seguridad desactivados), podría exponerse a emisiones LED superiores a la potencia de la clase **3B**.
- No quite las etiquetas de seguridad ni desactive los interbloques de seguridad.

Seguridad biológica

Peligro biológico general



ADVERTENCIA

PELIGRO BIOLÓGICO. Las muestras biológicas como, por ejemplo, de tejidos, fluidos corporales, agentes infecciosos y sangre humana o de otros animales, pueden transmitir enfermedades infecciosas. Siga todas las normativas locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables. Lleve el equipo de protección adecuado, lo que incluye, entre otras cosas: protección ocular, protección facial, vestimenta/bata de laboratorio y guantes. Todo el trabajo se debe realizar en instalaciones que dispongan del equipamiento adecuado y con el equipo de seguridad apropiado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Los trabajadores deberían recibir formación de acuerdo con los requisitos de la institución o empresa y los requisitos legales aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos. Lea y siga las directrices y/o los requisitos legales aplicables en:

- Las directrices del Departamento de salud y servicios humanos (Department of Health and Human Services) de EE.UU. publicadas en *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (nº 017-040-00547-4; <http://bmbll.od.nih.gov>)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html).
- Los protocolos del programa de seguridad biológica de su empresa o institución para trabajar o manipular materiales potencialmente infecciosos.

Puede encontrar más información acerca de las directrices sobre peligros biológicos en:

<http://www.cdc.gov>

Seguridad de la estación de trabajo

Si configura correctamente la ergonomía de su estación de trabajo, puede reducir o evitar problemas de fatiga, dolor y tensión. Para minimizar o eliminar estos problemas, configure la estación de trabajo para adoptar posiciones neutrales o relajadas cuando esté trabajando.



PELIGRO MUSCULOESQUELÉTICO Y POR MOVIMIENTOS REPETITIVOS. Estos peligros están causados por posibles factores de riesgo, incluidos, entre otros, movimientos repetitivos, posturas incómodas, esfuerzos, mantenimiento de posturas estáticas poco saludables, presión por contacto y otros factores medioambientales de la estación de trabajo.

Para minimizar los riesgos musculoesqueléticos y por movimientos repetitivos:

- Utilice equipos en los que pueda colocarse cómodamente en posiciones neutrales y que permitan acceder de manera adecuada al teclado, el monitor y el ratón.
- Coloque el teclado, el ratón y el monitor de forma que pueda adoptar una postura relajada de la cabeza y el cuerpo.

Estándares de seguridad y compatibilidad electromagnética (EMC)

Estándares de seguridad de EE.UU. y Canadá



El sistema StepOne ha sido probado y cumple el estándar:

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92, “Requisitos de seguridad de equipos eléctricos para la medición, el control y el uso en laboratorios, primera parte: requisitos generales”.

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010, “Requisitos particulares de equipos de laboratorio para el calentamiento de materiales”.

“Estándar de rendimiento 21 CFR 1040.10 y 1040.11 de la Ley de control de radiaciones para la salud y la seguridad de 1968” de la FDA, de la forma que sea aplicable.

Estándar EMC canadiense

Este instrumento ha sido probado y cumple la edición 3 del estándar ICES-001: “Generadores de frecuencias de radio industriales, científicas y médicas”.

Estándares de seguridad y EMC europeos



Seguridad

Este instrumento cumple los requisitos de seguridad europeos (Directiva de baja tensión 73/23/EEC). Este instrumento ha sido probado y cumple los estándares EN 61010-1:2001, “Requisitos de seguridad de equipos eléctricos para la medición, el control y el uso en laboratorios, primera parte: requisitos generales”.

EN 61010-2-010, “Requisitos particulares de equipos de laboratorio para el calentamiento de materiales”.

EN 61010-2-081, “Requisitos particulares para equipos de laboratorio automáticos y semiautomáticos para análisis y otras finalidades”.

EN 60825-1, “Seguridad frente a las radiaciones de los productos láser, clasificación de los equipos, requisitos y guía del usuario”.

EMC

Este instrumento cumple los requisitos de emisiones e inmunidad europeos (Directiva EMC 89/336/EEC). Este instrumento ha sido probado y cumple los estándares EN 61326 (Grupo 1, Clase B) “Equipos eléctricos para la medición, el control y el uso en laboratorios: requisitos EMC”.

Estándares EMC australianos



Este instrumento ha sido probado y cumple el estándar AS/NZS 2064, “Medición de límites y métodos de características de perturbaciones electromagnéticas de equipos de radiofrecuencia industriales, científicos y médicos (ISM)”.

Este capítulo cubre los siguientes temas:

■ Acerca del sistema StepOne™	2
■ Acerca de los experimentos de curva estándar	4
■ Cómo utilizar esta guía	7
■ Acerca del experimento de ejemplo	8
■ Flujo de trabajo del experimento de ejemplo	9

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en  en la barra de herramientas o seleccionado **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Acerca del sistema StepOne™

Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (sistema StepOne™) utiliza reactivos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basados en fluorescencias para proporcionar:

- Detección cuantitativa de las secuencias de ácido nucleico del gen diana (dianas) mediante análisis a tiempo real.
- Detección cualitativa de secuencias de ácido nucleico del gen diana (dianas) mediante análisis a punto final y curva de fusión (melting).

Acerca de la recogida de datos

El sistema StepOne recoge datos brutos de fluorescencia en diferentes puntos de una PCR, dependiendo del tipo de proceso que realice:

Tipo de proceso		Punto de recogida de datos
Procesos en tiempo real	Curva estándar	El instrumento recoge datos después de cada paso de extensión de la PCR.
	Cuantificación relativa	
	C _T ($\Delta\Delta C_T$) comparativos	
Procesos de punto final	Genotipado	El instrumento recoge datos antes y después de la PCR. En los experimentos de genotipado, el software StepOne™ también puede recoger datos durante el proceso (tiempo real), que pueden resultar de ayuda para solucionar problemas.
	Presencia/ausencia	El instrumento recoge datos antes y después de la PCR.

Con independencia del tipo de proceso que se realice, un punto de recogida de datos o una *lectura* constan de tres fases:

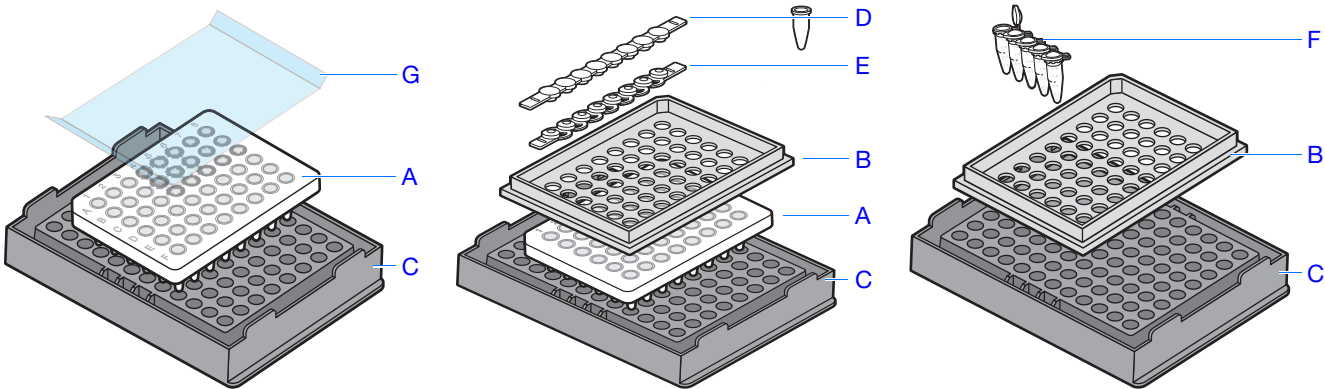
1. **Excitación:** el instrumento StepOne™ ilumina todos los pocillos de la placa de reacción en el instrumento StepOne para excitar los fluoróforos de cada reacción.
2. **Emisión:** la óptica del instrumento StepOne se concentra en la fluorescencia residual que se emite desde los pocillos de la placa de reacción. La imagen resultante que recoge el dispositivo sólo consta de luz que se corresponde con el estrecho rango de longitudes de onda.
3. **Recogida:** el instrumento StepOne crea una representación digital de la fluorescencia residual recogida en un intervalo de tiempo fijado. El software StepOne almacena la imagen fluorescente no analizada para analizarla. Si es necesario, el software realiza lecturas adicionales si lo requieren los reactivos fluorescentes que se utilizan en el experimento.

Después de un proceso, el software StepOne utiliza datos de calibración (espacial, de fluorocromo y de fondo) para determinar la ubicación y la intensidad de las señales fluorescentes en cada lectura, el fluorocromo asociado a cada señal fluorescente y el significado de la señal.

Consumibles admitidos

El sistema StepOne admite los consumibles que se enumeran a continuación. Estos consumibles se utilizan en protocolos o reactivos estándar y rápidos.

Consumible	Número de referencia
• MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates • MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	• 4375816 • 4375323
• MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	• 4358293 • 4323032
• MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps	• 4358297
• MicroAmp™ Fast 48-Well Trays • MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor • MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base	• 4375282 • 4375284 • 4312063



#	Consumible
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps
G	MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film

Notas _____

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- El sistema StepOne, consulte *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help*.

Nota: Para acceder a la ayuda, seleccione **Help** (Ayuda) ► **StepOne Help** (Ayuda de StepOne) desde el software StepOne.

- Experimentos de cuantificación relativa y/o C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo, consulte *Guía de introducción a Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System para experimentos de cuantificación relativa y o comparación de C_T* .
- Experimentos de genotipado, consulte *Guía de introducción a Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System para experimentos de genotipado*.
- Experimentos de presencia/ausencia, consulte *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.

Acerca de los experimentos de curva estándar

Experimentos de PCR en tiempo real

Los experimentos de curva estándar son experimentos de PCR en tiempo real. En los experimentos de PCR en tiempo real:

- El instrumento monitoriza el progreso de la PCR mientras se produce (Kwok y Higuchi, 1989).
- Se recogen datos durante el proceso de PCR.
- Las reacciones se caracterizan por el punto temporal del ciclo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un gen diana (Saiki *et al.*, 1985).

Nota: En esta guía, el término *experimento* se refiere a todo el proceso del experimento, desde su diseño hasta el análisis de los datos.

Acerca de los experimentos de curva estándar

Los experimentos de curva estándar determinan la cantidad absoluta de un gen diana en una muestra. Para conseguir los resultados, se utiliza una curva estándar construida a partir de una dilución seriada de una cantidad conocida.

Componentes

Éstos son los componentes que se necesitan para preparar las reacciones PCR para los experimentos de curva estándar:

- **Muestra:** la muestra en la que la cantidad del gen diana es desconocida.
- **Estándar:** una muestra de una cantidad conocida.
- **Dilución seriada del estándar:** un conjunto de diluciones del estándar (por ejemplo, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) que se utilizan para construir una curva estándar.
- **Replicados:** reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- **Controles negativos:** muestras que contienen agua o tampón en lugar de un molde. Los controles negativos no se deberían amplificar.

Notas

Opciones de la PCR

Al realizar una PCR en tiempo real, puede elegir entre:

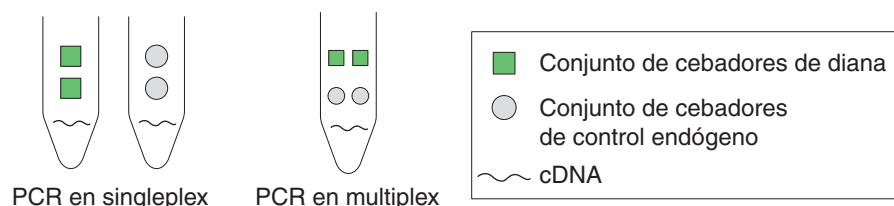
- PCR en singleplex y multiplex (más abajo)
- RT-PCR de 1 y 2 pasos (página 5)

PCR en singleplex y multiplex

Se puede realizar una reacción PCR como una:

- Reacción en singleplex, donde sólo hay un conjunto de cebadores/sonda en el tubo de reacción o pocillo. Sólo se puede amplificar un gen diana o un control endógeno por reacción.
- Reacción en multiplex, donde hay dos o más conjuntos de cebadores/sondas en el tubo de reacción o pocillo. Cada conjunto amplifica un gen diana o un control endógeno específicos.

¡IMPORTANTE! No se pueden utilizar reactivos SYBR® Green para las reacciones en multiplex.



RT-PCR de 1 y de 2 pasos

Se puede realizar una retrotranscripción (RT) y una PCR en una sola reacción (1 paso) o en reacciones distintas (2 pasos). La configuración del reactivo que se utiliza depende de si va a realizar una RT-PCR de 1 o de 2 pasos:

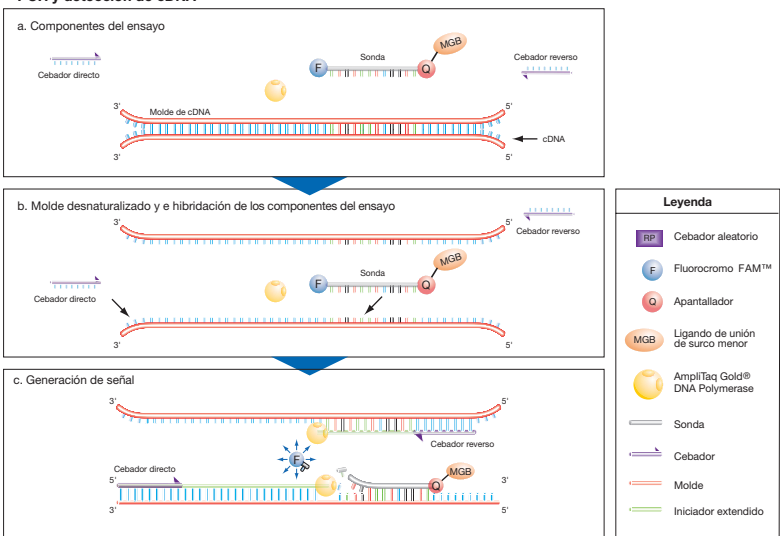
- En las RT-PCR de 1 paso, la RT y la PCR retrotranscripción. Sin embargo, no se puede utilizar una mezcla maestra de PCR rápida (FAST PCR Master Mix) ni la enzima de prevención de contaminación de arrastre, AmpErase® UNG (uracil-N-glucosilasa), para realizar la RT-PCR de 1 paso.
- La RT-PCR de 2 pasos se realiza en dos reacciones distintas: En primer lugar, el RNA total se retrotranscribe en cDNA y, a continuación, el cDNA se amplifica por medio de la PCR. Este método es útil para detectar múltiples transcritos a partir de un sólo molde de cDNA o para almacenar alícuotas de cDNA para utilizarlas posteriormente. La enzima AmpErase® UNG se puede utilizar para evitar la contaminación de arrastre.

Nota: Para obtener más información acerca de AmpErase® UNG, consulte *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Notas

Reactivos Reactivos TaqMan® y SYBR® Green

Applied Biosystems ofrece reactivos TaqMan® y SYBR® Green para utilizarlos en el sistema StepOne. Ambos tipos de reactivos se describen brevemente en la siguiente tabla.

Tipo de reactivo	Proceso
Reactivos o kits TaqMan® Descripción Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica para permitir la detección de un producto de PCR específico cuando se acumula durante los ciclos de PCR. Ventajas • Aumenta la especificidad con una sonda. La hibridación específica entre la sonda y el gen diana genera una señal de fluorescencia. • Proporciona la capacidad de multiplex. • Hay disponibles ensayos optimizados. • Permite realizar ensayos 5' nucleasas durante la PCR. • Se puede utilizar para la RT-PCR de 1 o 2 pasos.	PCR y detección de cDNA  Reactivos SYBR® Green Descripción Los reactivos SYBR Green utilizan el fluorocromo SYBR® Green I, que es un fluorocromo de unión a DNA bicatenario que sirve para detectar productos de PCR cuando se acumulan durante los ciclos de PCR. Ventajas • Económico (no se necesita una sonda). • Permite que los análisis de curvas de fusión midan la T_m de todos los productos de PCR. • Se puede utilizar para la RT-PCR de 1 o 2 pasos. Limitaciones Se une de manera no específica a todas las secuencias de DNA bicatenarias. Para evitar señales positivas falsas, compruebe la formación de un producto no específico utilizando un análisis de gel o de curva de fusión. Paso 1: Con guación de la reación El coloante SYBR® Green I emite una uorescencia cuando se une a DNA bicatenario. Paso 2: Desnaturalización Cuando el DNA se desnatura, se libera el olorante SYBR® Green I y la uorescencia disminuye considerablemente. Paso 3: Poliméización Durante la extensión, los iniciadores se ponen al rojo vivo y se genera el producto de PCR. Paso 4: Poliméización ometada El coloante SYBR® Green I se une al producto bicatenario, lo que produce un aumento neto de la uorescencia que detecta el instrumento.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso de fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

Notas

Otros reactivos

Se pueden utilizar otros reactivos basados en fluorescencia en el sistema StepOne, pero se debe tener en cuenta lo siguiente:

- El software StepOne calcula automáticamente los volúmenes de reacción de los reactivos TaqMan y SYBR Green, pero no lo hace con otros reactivos.
- Se debe diseñar el experimento con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada), en lugar de con el asistente de diseño. (Consulte el [“Flujo de trabajo Advanced Setup \(Configuración avanzada\)” en la página 112.](#))

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de los experimentos de PCR en tiempo real, las opciones de PCR y los reactivos, consulte *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Cómo utilizar esta guía

Esta guía sirve a la vez de tutorial y de guía para realizar sus propios experimentos.

Uso de esta guía como tutorial

Si emplea los datos de los experimentos de ejemplo que se incluyen con el software StepOne, esta guía le puede servir de tutorial para realizar un experimento de curva estándar en el sistema StepOne. Siga los procedimientos que se indican en los capítulos 2 a 5:

Capítulo	Procedimiento
2	Diseñe el experimento con el asistente de diseño del software StepOne.
3	Prepare el experimento con los reactivos y volúmenes que ha calculado el asistente de diseño en el capítulo 2.
4	Realice el experimento en el instrumento StepOne (disposición autónoma o colocada).
5	Analice los resultados.

Para obtener más información, consulte [“Acerca del experimento de ejemplo” en la página 8.](#)

Uso de esta guía con sus propios experimentos

Después de realizar los ejercicios del tutorial de los capítulos 2 a 5, esta guía le puede servir para guiarle por el flujo de trabajo del asistente de diseño para realizar sus propios experimentos de curva estándar. Cada uno de los procedimientos de los capítulos 2 a 5 contiene un conjunto de directrices que ofrecen información acerca de cómo realizar la acción para sus propios experimentos.

Notas

Asimismo, puede utilizar uno de los otros flujos de trabajo que se incluyen en el software StepOne para realizar sus experimentos. En la siguiente tabla, se ofrece un resumen de todos los flujos de trabajo disponibles en el software StepOne.

Flujo de trabajo	Descripción	Véase...
Design Wizard (Asistente de diseño)	Escriba los parámetros del experimento mientras el asistente le guía por los mejores procedimientos.	Capítulo 2
Advanced Setup (Configuración avanzada)	Configure un experimento nuevo basándose en el diseño de su propio experimento. Da flexibilidad de diseño a los usuarios experimentados.	página 112
QuickStart (Inicio rápido)	Realice un experimento nuevo sin información de la configuración de la placa.	página 113
Molde	Configure un experimento nuevo utilizando la información de configuración de un molde.	página 114
Exportación/importación	Importe diseños de experimentos desde archivos de texto ASCII que contienen información de configuración de los experimentos.	página 115

Acerca del experimento de ejemplo

Para ilustrar cómo se realizan los experimentos de curva estándar, esta guía le conduce a través del proceso de diseño, preparación, procesamiento y análisis de un experimento de ejemplo. El experimento de ejemplo representa una configuración típica que puede utilizar para familiarizarse rápidamente con el sistema StepOne.

Descripción El objetivo del experimento de ejemplo de curva estándar es determinar la cantidad de gen RNase P en dos poblaciones.

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Las muestras pertenecen a DNA genómico aislado de dos poblaciones.
- El gen diana es el gen RNase P.
- Se configura una curva estándar para el gen RNase P (diana). El estándar que se utiliza para la dilución seriada del estándar contiene cantidades conocidas del gen RNase P. Dado que se estudia un solo gen diana, sólo se necesita una curva estándar.

Nota: En los experimentos en los que se estudian varios genes diana, se necesita una curva estándar para cada gen diana.

- Se realizan tres replicados de cada muestra y cada punto de dilución en la curva estándar para garantizar su relevancia estadística.
- El experimento está diseñado para una PCR en singleplex, donde todos los pocillos contienen un conjunto de cebadores/sonda para un solo gen diana.

Notas _____

- Las reacciones están preparadas para una RT-PCR de 2 pasos.
- Los conjuntos de cebadores/sonda pertenecen al ensayo de RNase P de Applied Biosystems.

Nota: Human RNase P-MGB-Probe TaqMan® Gene Expression Assay no está disponible. Se puede solicitar como un Custom TaqMan® Gene Expression Assay (PN 4331348). Applied Biosystems no recomienda el uso de fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

Disposición de la placa de reacción

A continuación, se muestra la disposición de la placa de reacción del experimento de curva estándar de ejemplo.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3
C	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
D								
E								
F								

Acerca de los datos del experimento de ejemplo

El archivo de datos del experimento de ejemplo se instala con el software StepOne. Encontrará el archivo del experimento de ejemplo en su ordenador:

<unidad>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

donde <unidad> es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

La figura de la [página 10](#) muestra el flujo de trabajo del experimento de curva estándar de ejemplo.

Notas

Inicio del experimento

Diseño del experimento (Capítulo 2)

1. Cree un nuevo experimento.
2. Defina las propiedades del experimento.
3. Defina los métodos y los materiales.
4. Configure los genes diana.
5. Configure los estándares.
6. Configure las muestras.
7. Configure el método de proceso.
8. Revise la configuración de la reacción.
9. Solicite materiales para el experimento.
10. Finalice el flujo de trabajo del asistente de diseño.

Preparación de las reacciones (Capítulo 3)

1. Prepare las diluciones de muestras.
2. Prepare la dilución seriada del estándar.
3. Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana.
4. Prepare la placa de reacción.

Realización del experimento (Capítulo 4)

1. Prepare el proceso.
2. Active las opciones de notificación.
3. Inicie el proceso.
4. Monitoree el proceso.
5. Descargue la placa del instrumento y transfiera los datos.

Análisis del experimento (Capítulo 5)

Sección 1, revisión de los resultados:

1. Analice.
2. Revise la pantalla Standard Curve (Curva estándar).
3. Revise la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación).
4. Revise la tabla de pocillos.
5. Publique los datos.

Sección 2, Solución de problemas (si es necesario):

1. Revise las opciones de análisis; ajuste la línea basal y la línea umbral.
2. Revise la pantalla QC Summary (Resumen QC).
3. Omita pocillos.
4. Revise la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
5. Revise la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos).

Fin del experimento

Notas _____

2

Diseño del experimento

Este capítulo cubre los siguientes temas:

■ Resumen del capítulo	12
■ Creación de un nuevo experimento	13
■ Definición de las propiedades del experimento	16
■ Definición de los métodos y materiales	18
■ Configuración de los genes diana	21
■ Configuración de los estándares	23
■ Configuración de las muestras	25
■ Configuración protocolo de termociclado	27
■ Revisión de la configuración de la reacción	29
■ Solicitud de materiales para el experimento	35
■ Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño	38

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en  en la barra de herramientas o seleccionado **Help** (Ayuda) ► **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

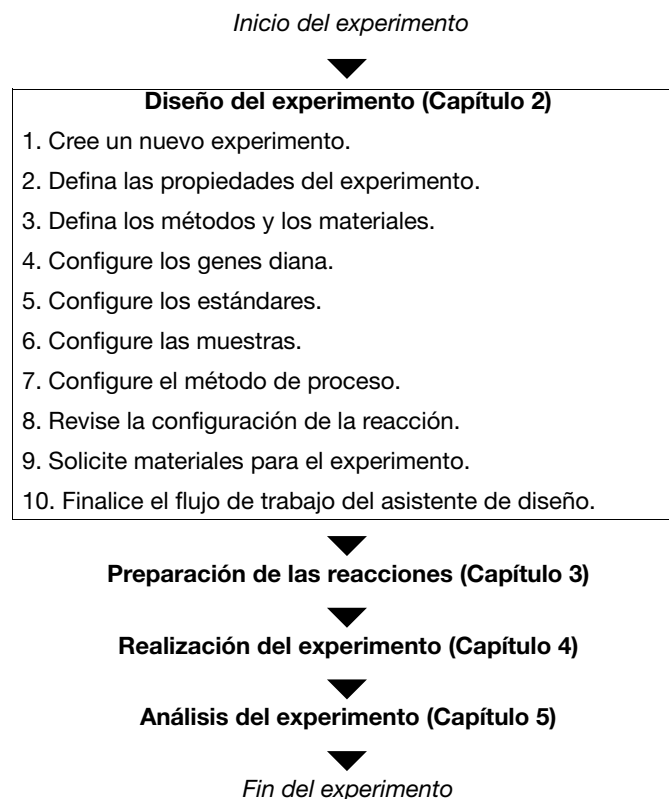
Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo utilizar el asistente de diseño en el software StepOne™ para configurar el experimento de curva estándar de ejemplo. El asistente de diseño le guiará por los mejores procedimientos recomendados por Applied Biosystems a medida que vaya introduciendo los parámetros de diseño del experimento de ejemplo.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para diseñar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Nota: Diseñe el experimento de ejemplo con el flujo de trabajo del asistente de diseño del software StepOne. Cuando diseñe sus propios experimentos, puede seleccionar flujos de trabajo alternativos (consulte [“Uso de esta guía con sus propios experimentos” en la página 7](#)).



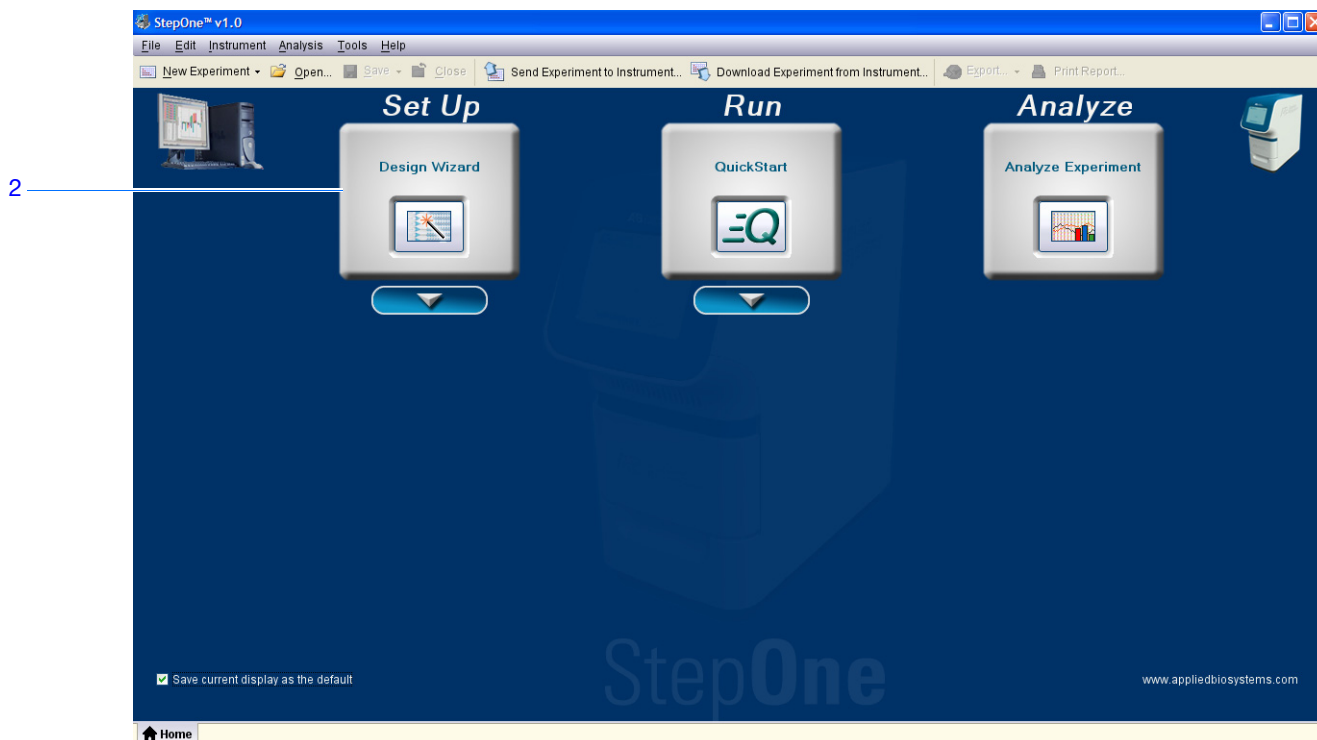
Notas _____

Creación de un nuevo experimento

Cree un experimento nuevo con el asistente de diseño del software StepOne.

Creación de un experimento

1. Haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ► **All Programs** (Todos los programas) ► **Applied Biosystems** ► **StepOne** ► **StepOne v1.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en  **Design Wizard** (Asistente de diseño) para abrir el asistente de diseño.



3. Consulte “[Elementos del software](#)” más adelante para obtener información acerca de la navegación por el asistente de diseño.

Elementos del software

A continuación, se ilustran los elementos del software StepOne para el asistente de diseño.

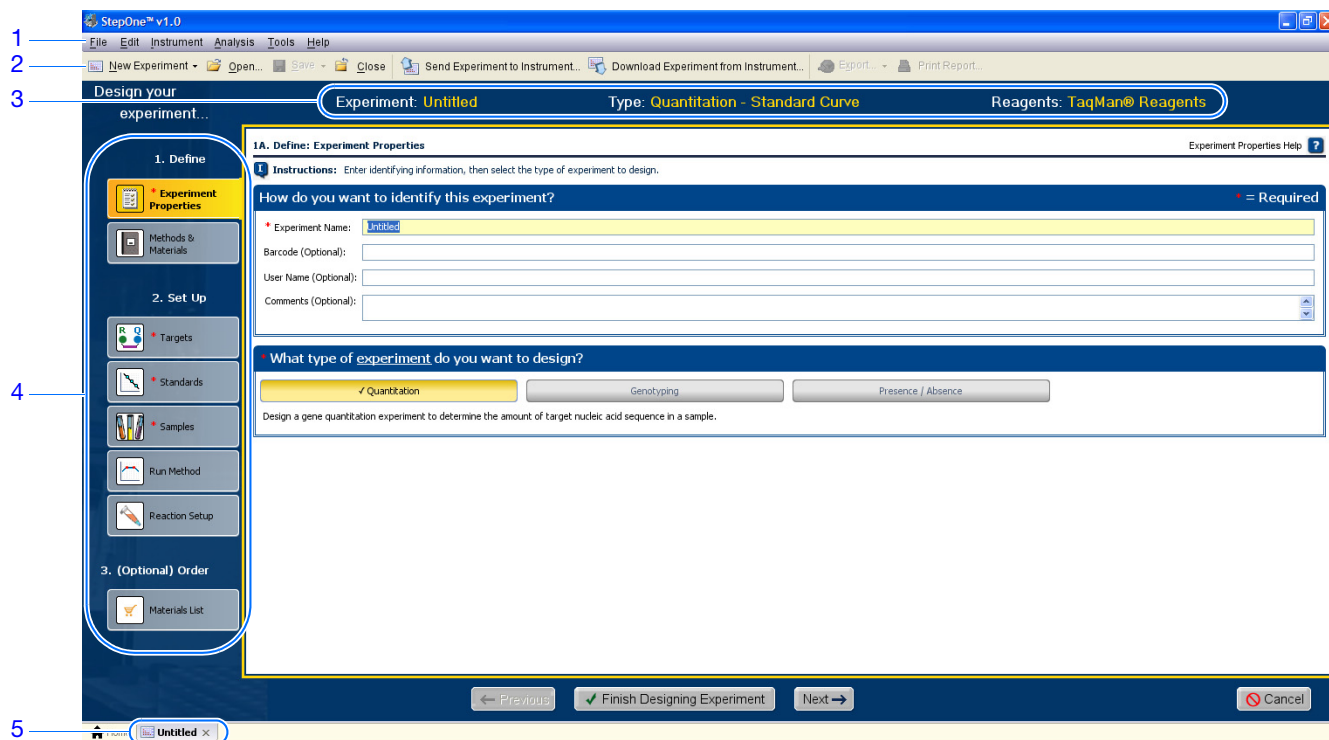
1. Barra de menús: muestra los menús disponibles en el software:
 - File (Archivo)
 - Edit (Edición)
 - Instrument (Instrumento)
 - Analysis (Análisis)
 - Tools (Herramientas)
 - Help (Ayuda)

Notas

2. Barra de herramientas: muestra las herramientas disponibles en el software:
 - New Experiment (Experimento nuevo)
 - Open (Abrir)
 - Close (Cerrar)
 - Send Experiment to Instrument (Enviar experimento a instrumento)
 - Download Experiment from Instrument (Descargar experimento de instrumento)
3. Encabezamiento del experimento: indica el nombre del experimento, el tipo de experimento y los reactivos del experimento abierto.
4. Panel de navegación: ofrece enlaces a todas las pantallas del asistente de diseño:
 - Experiment Properties (Propiedades del experimento)
 - Methods & Materials (Métodos y materiales)
 - Targets (Genes diana)
 - Standards (Estándares)
 - Samples (Muestras)
 - Run Method (Método de proceso)
 - Reaction Setup (Configuración de la reacción)
 - Materials List (Lista de materiales)

Nota: Inicialmente, el asistente de diseño muestra el tipo de experimento Quantitation - Standard Curve (Cuantificación: curva estándar). Las pantallas disponibles de este asistente pueden cambiar si se selecciona otro tipo de experimento. Por ejemplo, la pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa) no aparece hasta que se selecciona el tipo de experimento de curva estándar o C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo.

5. Fichas del experimento: muestra una ficha por cada experimento abierto.



Notas

Definición de las propiedades del experimento

En la pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento), escriba la información de identificación del experimento y, a continuación, seleccione el tipo de experimento que desea diseñar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- El experimento se identifica como un ejemplo.
- Se utiliza una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- El tipo de experimento es de cuantificación.

Pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento)

1. Haga clic en el campo **Experiment Name** (Nombre de experimento) y, a continuación, escriba **Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar).

Nota: El encabezamiento del experimento se actualiza con el nombre del experimento que acaba de escribir.

2. Haga clic en el campo **Barcode** (*Código de barras*) y, a continuación, escriba el código de barras de la placa de reacción PCR. (Sólo en caso de utilizar los códigos de barras con propósitos de control.)
3. Haga clic en el campo **User Name** (Nombre de usuario) y, a continuación, escriba **Example User** (Usuario de ejemplo).
4. Haga clic en el campo **Comments** (Comentarios) y, a continuación, escriba **Standard Curve Getting Started Guide Example** (Ejemplo de la guía de introducción de las curvas estándar).
5. Seleccione **Quantitation** (Cuantificación) en el tipo de experimento.
6. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas _____

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Escriba un nombre para el experimento que sea descriptivo y fácil de recordar. El nombre del experimento se utiliza como nombre de archivo predeterminado del experimento. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Experiment Name (Nombre de experimento).

Nota: No se pueden utilizar los siguientes caracteres en el campo Experiment Name (Nombre de experimento): barra inclinada hacia delante (/), barra inclinada hacia atrás (\), signo mayor que (>), signo menor que (<), asterisco (*), signo de interrogación (?), comillas ("), línea vertical (|), dos puntos (:) o punto y coma (;).

- Utilice MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips, o MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps. Los consumibles FAST (rápidos) se pueden utilizar con reactivos FAST (rápidos) y estándar.
- *(Opcional)* Introduzca un código de barras para identificarlo en la placa de reacción de PCR. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Barcode (Código de barras).
- *(Opcional)* Escriba un nombre de usuario para identificar al propietario del experimento. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo User Name (Nombre de usuario).
- *(Opcional)* Escriba comentarios para describir el experimento. Puede introducir hasta 1000 caracteres en el campo Comments (Comentarios).
- Seleccione **Quantitation** (Cuantificación) en el tipo de experimento.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.
- Consumibles, consulte “Consumibles admitidos” en la página 3.
- Experimentos de cuantificación, consulte *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Definición de los métodos y materiales

En la pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales), seleccione el método de cuantificación, los reactivos, la velocidad de rampa y el molde de PCR que se van a utilizar en el experimento.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Se utiliza el método de cuantificación de curva estándar.
- Se utilizan reactivos TaqMan®.
- Se utiliza la velocidad de rampa estándar en el proceso del instrumento.
- El tipo de molde es gDNA purificado (aislado a partir de dos poblaciones). Antes de utilizar el molde de gDNA, debe extraer el gDNA de un tejido o muestra.

Pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales)

1. Seleccione **Standard Curve** (Curva estándar) como método de cuantificación.
2. Seleccione **TaqMan® Reactives** (Reactivos TaqMan®) para los reactivos.
3. Seleccione **Standard (~2 hours to complete a run)** (Estándar (2 horas aproximadamente para completar un proceso)) para la velocidad de la rampa.
4. Seleccione **gDNA (genomic DNA)** (gDNA (DNA genómico)) para el tipo de molde.
5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

1B. Define: Methods & Materials Methods & Materials Help ?

Instructions: Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.

Which quantitation method are you using?

☒ Standard Curve ☐ Relative Standard Curve ☐ Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)

With the standard curve method, you use standards to determine the absolute quantity of target sequence in a sample.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

☒ TaqMan® Reagents ☐ SYBR® Green Reagents

These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.

Which ramp speed do you want to include in the instrument run?

☒ Standard (~ 2 hours to complete a run) ☐ Fast (~ 40 minutes to complete a run)

For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your real-time PCR reactions.

What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?

☐ cDNA (complementary DNA) ☐ RNA ☒ gDNA (genomic DNA)

You are adding purified gDNA to the real-time PCR reactions. You have already extracted the gDNA from tissue or sample.

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Seleccione **Standard Curve** (Curva estándar) como método de cuantificación. Los experimentos de curva estándar determinan la cantidad absoluta de un gen diana en una muestra. Para conseguir los resultados, se utiliza una curva estándar construida a partir de una dilución seriada del de una cantidad conocida. Para configurar la placa de reacción, el método de curva estándar requiere genes diana, estándares y muestras.
- Seleccione los reactivos que desea utilizar:
 - Seleccione **TaqMan® Reactives** (Reactivos TaqMan®) si desea utilizar estos reactivos para detectar la amplificación y cuantificar la cantidad de gen diana en las muestras. Los reactivos TaqMan se componen de dos cebadores y una sonda TaqMan®. Los cebadores están diseñados para amplificar el gen diana. La sonda TaqMan está diseñada para hibridarse con el gen diana y generar una señal de fluorescencia cuando se amplifica el gen diana.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso de fluorocromo TAMRA™ como notificador ni apantallador con el sistema StepOne™.

Notas

- Seleccione **reactivos SYBR® Green** si desea utilizar estos reactivos para detectar la amplificación y cuantificar la cantidad de diana en las muestras. Los reactivos SYBR Green se componen de dos cebadores y un SYBR Green. Los cebadores están diseñados para amplificar el gen diana. El SYBR Green genera una señal de fluorescencia cuando se une a DNA bicatenario. El SYBR Green suele formar parte de la mezcla maestra SYBR Green que se añade a la reacción. Si utiliza un SYBR Green:

Active la casilla de verificación **Include Melt Curve** (Incluir curva de fusión) para realizar un análisis de curva de fusión del gen diana amplificado.

Seleccione **Standard** (Estándar) para la velocidad de la rampa. Applied Biosystems no dispone de una mezcla maestra FAST (rápida) para reactivos SYBR Green.

Nota: Se pueden utilizar otros reactivos basados en fluorescencia en el sistema StepOne; sin embargo, debe diseñar su experimento con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) en lugar de con el asistente de diseño. Consulte [“Flujo de trabajo Advanced Setup \(Configuración avanzada\)” en la página 112](#).

- Seleccione la velocidad de rampa apropiada para el proceso del instrumento:
 - Seleccione **Fast (~40 Minutes to Complete a Run)** (Rápido (aproximadamente 40 minutos para completar un proceso)) si utiliza reactivos rápidos para las reacciones PCR.
 - Seleccione **Standard (~2 Hours to Complete a Run)** (Estándar (aproximadamente 2 horas para completar un proceso)) si utiliza reactivos estándar para las reacciones PCR (incluidos reactivos SYBR Green y reactivos TaqMan estándar).
- Seleccione el molde de PCR apropiado:
 - Seleccione **cDNA (complementary DNA)** (cDNA (DNA complementario)) si va a realizar una RT-PCR de 2 pasos y ya ha realizado la retrotranscripción para convertir el RNA en cDNA. Se añade DNA complementario a las reacciones PCR.
 - Seleccione **RNA** si va a realizar una RT-PCR de 1 paso. Se añade el RNA o mRNA total a las reacciones PCR.
 - Seleccione **gDNA (genomic DNA)** (gDNA (DNA genómico)) si ya ha extraído el gDNA de un tejido o una muestra. Se añade DNA genómico purificado a las reacciones PCR.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.
- El uso de otros métodos de cuantificación, consulte *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- Los reactivos TaqMan y SYBR Green, consulte *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Reagent Guide*.

Notas

- La PCR, incluidas las PCR en multiplex y singleplex y las RT-PCR de 1 y 2 pasos, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Configuración de los genes diana

En la pantalla Targets (Dianas), escriba el número de dianas que desea cuantificar en la placa de reacción PCR y, a continuación, configure el ensayo para cada diana.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Se cuantifica un gen diana en la placa de reacción.
- Se activa la casilla de verificación Set Up Standards (Configurar estándares). Cuando se activa esta casilla de verificación, el software muestra automáticamente la pantalla Standards (Estándares) después de completar la pantalla Targets (Dianas). En la pantalla Standards (Estándares), se puede configurar una curva estándar para el ensayo diana (consulte “[Configuración de los estándares](#)” en la [página 23](#)).
- El ensayo Target 1 (Diana 1) está configurado para el gen diana que está estudiando. Para el experimento de ejemplo, es el gen RNase P.

Pantalla Targets (Dianas)

1. Haga clic en el campo **How many targets do you want to quantify in the reaction plate?** (¿Cuántas dianas desea cuantificar en la placa de reacción?) y, a continuación, escriba **1**.

Nota: El número de filas de la tabla de ensayos diana se actualiza con el número que escriba.

2. Active la casilla de verificación **Set Up Standards** (Configurar estándares) para configurar estándares para el ensayo diana.

Nota: La casilla de verificación Set Up Standards (Configurar estándares) está activada de manera predeterminada.

3. Configure el ensayo Target 1 (Diana 1):
 - a. Haga clic en la celda **Enter Target Name** (Escribir nombre de diana) y, a continuación, escriba **RNase P**.
 - b. En el menú desplegable Reporter (Notificador), seleccione **FAM** (predeterminado).
 - c. En el menú desplegable Quencher (Apantallador), seleccione **NFQ-MGB** (predeterminado).
 - d. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

Notas

4. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Nota: Deje en blanco el campo (Optional) Enter Gene Name ((Opcional) escriba el nombre del gen). Puede buscar el identificador del gen/ensayo para solicitar los materiales (consulte “[Solicitud de materiales para el experimento.](#)” en la página 35).

2A. Set Up: Targets

Instructions: Enter the number of targets to quantify in the reaction plate, then set up the assay for each target.

Set Up Targets

* How many **targets** do you want to quantify in the reaction plate? 1

For each target **assay** in the reaction plate, select whether to set up **standards**, enter a target name, select the **reporter** and **quencher** to use to detect the target, and select a **target color**. Optionally, enter a gene name, find Applied Biosystems gene expression assays, then select an assay to fill in the **Assay ID**.

Set Up Standards	* Enter Target Name	Reporter	Quencher	Color	(Optional) Enter Gene Name and Click "F..."	Assay ID
☒	RNase P	FAM	NFQ-MGB			

3a 3b 3c 3d

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Active la casilla de verificación **Set Up Standards** (Configurar estándares). Applied Biosystems recomienda configurar una curva estándar para cada ensayo diana en la placa de reacción.
- Identifique cada ensayo diana con un nombre y un color únicos. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Target Name (Nombre de diana).
- Seleccione el fluorocromo del notificador utilizado en el ensayo diana:
 - Seleccione **FAM** si el fluorocromo FAMTM está unido al extremo de 5' de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
 - Seleccione **JOE** si el fluorocromo JOETM está unido al extremo de 5' de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
 - Seleccione **VIC** si el fluorocromo VIC[®] está unido al extremo de 5' de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
 - Seleccione **SYBR** si utiliza fluorocromo SYBR[®] Green para detectar DNA bicatenario.
- Seleccione el apantallador utilizado en el ensayo diana:
 - Seleccione **NFQ-MGB** si la sonda TaqMan que está utilizando porta como apantallador (quencher) una molécula no fluorescente, NFQ-MGB.

Notas

- Seleccione **None** (Ninguno) si se utiliza SYBR Green.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador ni apantallador con el sistema StepOne™.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Targets (Dianas), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Configuración de los estándares

En la pantalla Standards (Estándares), escriba el número de puntos y replicados de todas las curvas estándar de la placa de reacción. Para cada curva estándar, escriba la cantidad inicial y seleccione el factor de dilución seriada.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Se configura una curva estándar para el gen diana (RNase P). El estándar que se utiliza para la dilución seriada del estándar contiene cantidades conocidas del gen RNase P. Dado que se estudia un solo gen, sólo se necesita una curva estándar.
- Se utilizan cinco puntos en la curva estándar.
- Se utilizan tres replicados para cada punto. Los replicados son reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- La cantidad inicial es 10.000 copias y el factor de dilución es 1:2.

Pantalla Standards (Estándares)

1. Haga clic en el campo **How many points do you need for each standard curve?** (¿Cuántos puntos necesita por cada curva estándar?) y, a continuación, escriba **5**.
2. Haga clic en el campo **How many replicates do you need for each point?** (¿Cuántos replicados necesita para cada punto?) y, a continuación, escriba **3**.
3. Defina el rango de cantidades de estándar para el ensayo de RNase P:
 - a. Haga clic en el campo **Enter Starting Quantity** (Escriba cantidad inicial) y, a continuación, escriba **10000**.
 - b. En el menú desplegable Select Serial Factor (Seleccionar el factor de dilución), seleccione **1:2**.
4. Revise el panel Standard Curve Preview (Vista previa de la curva estándar). La curva estándar tiene los siguientes puntos: 10000, 5000, 2500, 1250 y 625.
5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Configure una curva estándar para cada diana de la placa de reacción. Los genes diana se definen previamente en la pantalla Targets (Dianas) (“Configuración de los genes diana” en la página 21).
- Escriba el número de puntos para cada curva estándar de la placa de reacción. Applied Biosystems recomienda al menos cinco puntos de dilución por cada curva estándar.
- Escriba el número de reacciones idénticas (replicados) para cada punto de la curva estándar. Applied Biosystems recomienda tres replicados para cada punto.
- Dado que el rango de cantidades de estándar afecta a la eficiencia de los cálculos de la amplificación, estudie cuidadosamente el rango de cantidades de estándar que es apropiado para su ensayo:
 - Para obtener medidas más precisas de la eficiencia de la amplificación, utilice un amplio rango de cantidades de estándar, de entre 5 y 6 logaritmos. Si especifica un amplio rango de cantidades para los estándares, debe utilizar un producto de PCR o un molde altamente concentrado como, por ejemplo, un clon de cDNA.
 - Si tiene una cantidad limitada de molde de cDNA y/o si el gen diana es transcrito de un número de copia bajo, o se sabe que está en un rango determinado, puede que sea necesario un rango menor de cantidades de estándar.
- El factor de dilución seriada sirve para calcular las cantidades en todos los puntos de la curva estándar. Si la cantidad inicial es la cantidad más alta, seleccione un factor de dilución como, por ejemplo, 1:2, 1:3, etc. Si la cantidad inicial es la cantidad menor, seleccione un factor de concentración como, por ejemplo, 2X, 3X, etc.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Standards (Estándares), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

- La eficiencia de la amplificación, consulte *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

Configuración de las muestras

En la pantalla Samples (Muestras), escriba el número de muestras, replicados y controles negativos que va a incluir en la placa de reacción, escriba los nombres de las muestras y, a continuación, seleccione las reacciones de muestra/diana que va a configurar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Se utilizan dos muestras: DNA genómico procedente de dos poblaciones. Las muestras contienen cantidades desconocidas del gen diana (RNase P).
- Se utilizan tres replicados. Los replicados son reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- Se utilizan tres controles negativos. Las reacciones de control negativo contienen agua en lugar de la muestra y no se deberían amplificar.

Pantalla Samples (Muestras)

1. Haga clic en el campo **How many samples do you want to test in the reaction plate?** (¿Cuántas muestras desea analizar en la placa de reacción?) y, a continuación, escriba **2**.

Nota: El número de filas de la tabla de muestras se actualiza con el número que escriba.

2. Haga clic en el campo **How many replicates do you need?** (¿Cuántos replicados necesita?) y, a continuación, escriba **3**.
3. Haga clic en el campo **How many negative controls do you need for each target assay?** (¿Cuántos controles negativos necesita para cada ensayo diana?) y, a continuación, escriba **3**.
4. Configure la muestra 1:
 - a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **pop1** (para la población 1).
 - b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.
5. Configure la muestra 2:
 - a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **pop2** (para la población 2).
 - b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.
6. Seleccione **All Sample/Target Reactions** (Todas las reacciones de muestra/diana) para probar todos los genes diana en todas las muestras.

Notas

7. En el panel Well Count (Número de pocillos), confirme que hay:
 - 6 pocillos desconocidos **U**
 - 15 pocillos estándar **S**
 - 3 pocillos de control negativo **N**
 - 24 pocillos vacíos
8. En la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa):
 - a. En el menú desplegable Arrange Plate by (Ordenar placa por), seleccione **Rows** (Filas) (predeterminado).
 - b. En el menú desplegable Place Negative Controls (Colocar controles negativos), seleccione **Upper Left** (Superior izquierda) (predeterminado).
9. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

2C. Set Up: Samples

Instructions: Enter the number of samples to test in the reaction plate, enter the number of sample/target reaction replicates, enter the number of negative controls, enter sample names, then select the sample/target reactions to set up.

Set Up Samples * = Required

1. How many **samples** do you want to test in the reaction plate?

2. How many identical reactions (**replicates**) do you need?

3. How many **negative controls** do you need for each target assay?

For each sample in the reaction plate, enter a sample name and select a sample color.

Enter Sample Name	Color
pop1	■
pop2	■

4. Which **sample/target reactions** do you want to set up?

6.

7. **Well Count**

U 6 - Unknown **S** 15 - Standard **N** 3 - Negative Control **24** - Empty

View Plate Layout

8a. Arrange Plate by: Rows

8b. Place Negative Controls in: Upper Left

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNA...	N RNA...	N RNA...	pop1 U RNA...	pop1 U RNA...	pop1 U RNA...	pop2 U RNA...	pop2 U RNA...
B	pop2 U RNA...	S RNA... 1E4	S RNA... 1E4	S RNA... 1E4	S RNA... 5E3	S RNA... 5E3	S RNA... 5E3	S RNA... 2.5E3
C	S RNA... 2.5E3	S RNA... 2.5E3	S RNA... 1.25E3	S RNA... 1.25E3	S RNA... 1.25E3	S RNA... 625	S RNA... 625	S RNA... 625
D								
E								
F								

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Identifique cada muestra con un nombre y un color únicos. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Sample Name (Nombre de muestra).
- Escriba el número de reacciones idénticas (replicados) que desea configurar. Applied Biosystems recomienda tres replicados para cada reacción de muestra.
- Escriba el número de reacciones de control negativo que desea configurar. Applied Biosystems recomienda tres reacciones de control negativo por cada ensayo diana.
- Seleccione la combinación de reacciones de muestra/diana deseada:
 - Seleccione **All Sample/Target Reactions** (Todas las reacciones de muestra/diana) para probar todos los genes diana de todas las muestras.

- Seleccione **Specify Sample/Target Reactions** (Especifique reacciones de muestra/diana) para especificar los genes diana que se van a probar en cada muestra.

Nota: En el asistente de diseño, cada reacción de PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo diana.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Samples (Muestras) , acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Configuración protocolo de termociclado

En la pantalla Run Method (Método de proceso), revise el volumen de la reacción y el perfil térmico del método de proceso predeterminado. Si es necesario, puede editar el método de proceso predeterminado o sustituirlo por otro de la biblioteca Run Method (Método de proceso).

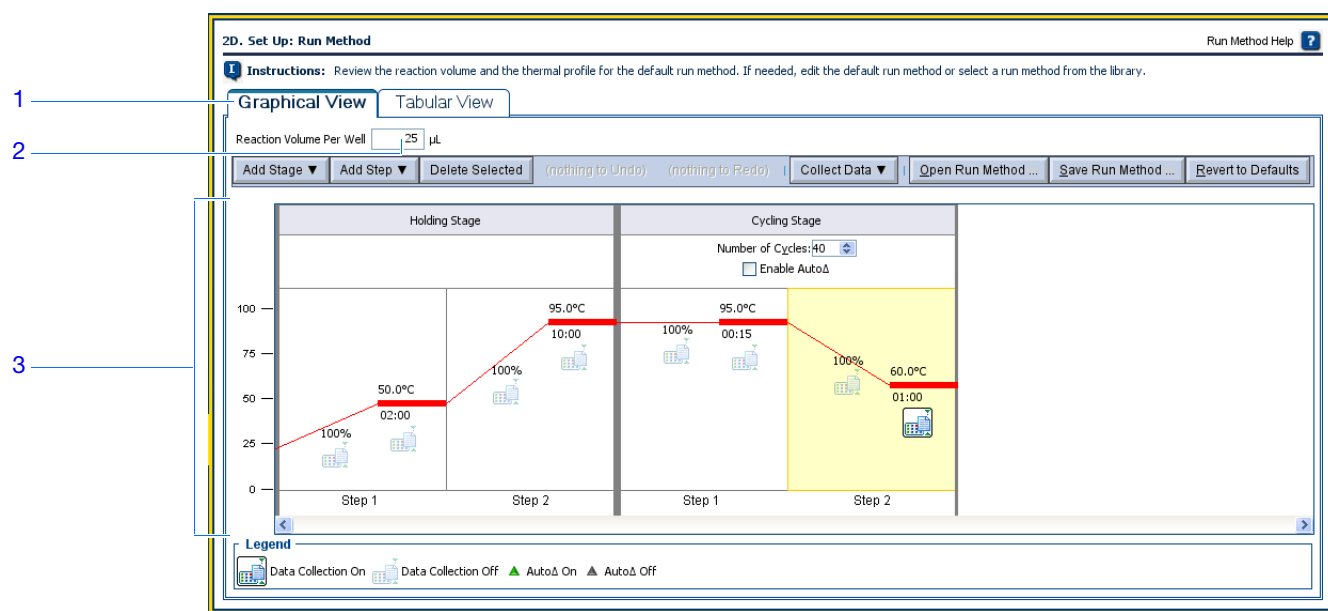
Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, se utiliza el método de proceso predeterminado con un cambio: El volumen de la reacción por pocillo se cambia de 20 µL a 25 µL.

Revisión de la pantalla Run Method (Método de proceso)

1. Haga clic en la ficha **Graphical View** (Vista gráfica) (predeterminada) o **Tabular View** (Vista tabular).
2. Haga clic en el campo **Reaction Volume Per Well** (Volumen de reacción por pocillo) y, a continuación, escriba **25 µL**.
3. Asegúrese de que en el perfil térmico aparecen las fases de espera y cíclicas que se indican a continuación.
4. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas



Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Escriba un número entre 10 y 30 para el volumen de reacción/pocillo. El sistema StepOne admite volúmenes de reacción de entre 10 y 30 μL .
- Revise el perfil térmico:
 - Asegúrese de que el perfil térmico es apropiado para los reactivos.
 - Si va a realizar una RT-PCR de 1 paso, incluya un paso de retrotranscripción.

Si el experimento necesita un perfil térmico diferente, modifique el perfil térmico o cambie el método de proceso por otro de la biblioteca Run Method (Método de proceso). La biblioteca Run Method (Método de proceso) está incluida en el software StepOne.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la biblioteca Run Method (Método de proceso) o acerca de la pantalla Run Method (Método de proceso), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Notas

Revisión de la configuración de la reacción

En la pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción), seleccione el tipo de ensayo (si utiliza reactivos TaqMan) y, a continuación, revise los volúmenes calculados para preparar las reacciones PCR, las series de dilución estándar y las diluciones de muestras. Si es necesario, puede editar el volumen de reacción, el volumen de reacción de exceso, las concentraciones de componente, la concentración estándar y/o la concentración de muestra diluida.

¡IMPORTANTE! Realice estos pasos para cada ensayo diana de la placa de reacción.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Se utiliza un ensayo de RNase P de Applied Biosystems.
- El volumen de reacción por pocillo es 25 μL .
- El volumen de reacción de exceso es del 10%.
- Los componentes de la reacción son:
 - TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2 $\times$) o TaqMan[®] 2 $\times$ Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG
 - Mezcla del ensayo de RNase P (20 $\times$)
 - Muestra o estándar
 - Agua
- La concentración estándar en la solución madre es de 20.000 copias/ μL .
- La concentración de la muestra diluida es de 6,6 ng/ μL .
- La concentración de la solución madre de la muestra es de 100 ng/ μL .

Pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción)

Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción).

1. Seleccione la ficha **Reaction Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de reacción) (predeterminada).
2. En el panel Select Target (Seleccionar diana), seleccione **RNase P**.
3. En el menú desplegable Assay Type (Tipo de ensayo), seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido).
4. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **25 μL** .
5. Asegúrese de que en el campo Excess Reaction Volume (Volumen de reacción en exceso) muestra **10%**.
6. En el panel Reactions for RNase P (Reacciones para RNase P):
 - a. Asegúrese de que en el campo Master Mix Concentration (Concentración de mezcla maestra) aparece **2.0 $\times$** .

Notas

- b. Asegúrese de que en el campo Assay Mix Concentration (Concentración de mezcla de ensayo) aparece **20.0X**.
- c. Revise los componentes y los volúmenes calculados para las reacciones PCR:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2.0X)	12,5
Mezcla de ensayo (20.0X)	1,3
Muestra (10X) o estándar	2,5 [‡]
H ₂ O	8,8
Volumen total	25,0

[‡] El volumen de la muestra o estándar se limita al 10% del volumen total de la reacción.

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select Target: **RNase P**

Assay Type: **Inventoried/Made to Order** | Reaction Volume Per Well: **25** µL | Excess Reaction Volume: **10** % | **Print Reaction Setup**

Reactions for RNase P

Master Mix Concentration: **2.0** × | Assay Mix Concentration: **20.0** ×

Component	Volume (µL) for 1 Reaction
Master Mix (2.0×)	12.5
Assay Mix (20.0×)	1.3
Sample (10×) or Standard	2.5
H ₂ O	8.8
Total Volume	25.0

Standard Dilution Series for RNase P

Standard Concentration in Stock: **100.0** ng per µL

Dilution Point	Source	Source Volume (µL)	Diluent Volume (µL)	Total Volume (µL)	Standard Concentration (ng/µL)
1 [100.0]	Stock	4.5	6.8	11.3	40.0

Notas

7. En el panel Standard Dilution Series for RNase P (Dilución seriada del estándar para RNase P):
 - a. Haga clic en el campo **Standard Concentration in Stock** (Concentración estándar en solución madre) y, a continuación, escriba **20000**.
 - b. Haga clic en el campo de las unidades y, a continuación, escriba **copies** per μL (copias por μL).
 - c. Revise los volúmenes calculados para preparar la dilución seriada del estándar:

Punto de dilución	Origen	Volumen de origen (μL)	Volumen de diluyente (μL)	Volumen total (μL)	Concentración estándar (copias/ μL)
1 [10.000,0]	Solución madre	3,6	14,5	18,2	4000,0
2 [5.000,0]	Dilución 1	9,1	9,1	18,2	2000,0
3 [2.500,0]	Dilución 2	9,1	9,1	18,2	1000,0
4 [1.250,0]	Dilución 3	9,1	9,1	18,2	500,0
5 [625,0]	Dilución 4	9,1	9,1	18,2	250,0

7a

7b

7c

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select Target: RNase P

Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 25 μL | Excess Reaction Volume: 10 % | Print Reaction Setup

Total Volume: 25.0

Standard Dilution Series for RNase P

Standard Concentration in Stock: 20000 copies per μL

Dilution Point	Source	Source Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume (μL)	Standard Concentration
1 [10,000]	Stock	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 [5,000]	Dilution 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 [2,500]	Dilution 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 [1,250]	Dilution 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 [625]	Dilution 4	9.1	9.1	18.2	250.0

Complete la ficha Sample Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de muestra).

1. Seleccione la ficha **Sample Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de muestra).
2. Haga clic en el campo **Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)** (Concentración de muestra diluida (10X por mezcla de reacción)) y, a continuación, escriba **6.6**.

Notas

- En el menú desplegable de la unidad, seleccione **ng/μL** (predeterminado).
- Revise los volúmenes calculados para las diluciones de la muestra:

Nombre de la muestra	Concentración de solución madre (ng/μL)	Volumen de muestra (μL)	Volumen de diluyente (μL)	Volumen total de muestra diluida (μL)
pop1	100,0	1,0	14,2	15,2
pop2	100,0	1,0	14,2	15,2

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations Reaction Setup Help ?

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix): ng/μL Print Reaction Setup

Sample Name	Stock Concentration (ng/μL)	Sample Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume of Diluted Sample (μL)
pop1	100.0	1.0	14.2	15.2
pop2	100.0	1.0	14.2	15.2

Imprima las instrucciones de la configuración de la reacción.

Imprima las instrucciones detalladas de la configuración de la reacción y, a continuación, guárdelas para el [Capítulo 3, "Preparación de las reacciones."](#)

- Haga clic en **Print Reaction Setup** (Imprimir configuración de reacción).

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations Reaction Setup Help ?

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

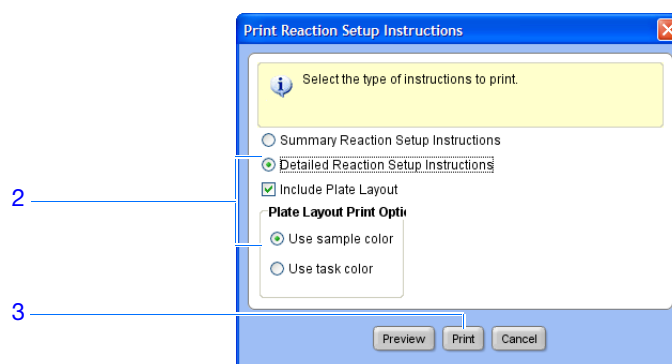
Reaction Mix Calculations **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix): ng/μL Print Reaction Setup

- En el cuadro de diálogo, seleccione:
 - Detailed Reaction Setup Instructions** (Instrucciones detalladas de la configuración de la reacción)
 - Include Plate Layout** (Incluir disposición de la placa)
 - Use sample color** (Utilizar color de muestra)

Notas _____

3. Haga clic en **Print (Imprimir)**.



4. En el cuadro de diálogo Print (Imprimir), seleccione la impresora y las opciones de impresión y, a continuación, haga clic en **OK (Aceptar)**.

5. Haga clic en **Next (Siguiente) >**.

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Si utiliza reactivos TaqMan, seleccione el tipo de ensayo que va a utilizar:
 - Seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido) si utiliza Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays (en inventario o fabricados bajo pedido) o Applied Biosystems Custom TaqMan® Gene Expression Assays.
 - Seleccione **Custom** (Personalizado) si va a diseñar sus propios ensayos con el software Primer Express®.
- Escriba un número entre 10 y 30 para el volumen de reacción/pocillo. El sistema StepOne admite volúmenes de reacción de entre 10 y 30 µL.
- Incluya el volumen de reacción en exceso para contabilizar la pérdida que se produce durante el pipeteado. Applied Biosystems recomienda un volumen de reacción en exceso de al menos el 10%.
- Revise las concentraciones de la mezcla de reacción para cada diana: Si es necesario:
 - Para los reactivos TaqMan, modifique las concentraciones de la mezcla maestra y la mezcla de ensayo.
 - Para los reactivos SYBR Green, modifique las concentraciones de la mezcla maestra, el cebador directo y el cebador reverso.
 - Para la RT-PCR de 1 paso, modifique la concentración de retrotranscriptasa.
- Revise los componentes de la mezcla de reacción para cada diana:
 - Si va a utilizar reacciones PCR Fast (rápidas), asegúrese de utilizar una mezcla maestra Fast (rápida) en las reacciones PCR.
 - Si va a utilizar reacciones PCR estándar, asegúrese de utilizar una mezcla maestra estándar en las reacciones PCR.
 - En la RT-PCR de 1 paso, asegúrese de incluir retrotranscriptasa en las reacciones PCR y utilizar un tampón específico.

Notas

- Revise los cálculos de la dilución seriada del estándar para cada diana. Si es necesario, modifique la concentración estándar en la solución madre (incluidas las unidades).

Nota: En el campo de las unidades de Standard Concentration in Stock (Concentración estándar en solución madre), puede seleccionar **ng** o **µg** en el menú desplegable o introducir otra unidad en el campo (por ejemplo, **copies** (copias), **IU** [unidades internacionales], **nmol**, **pg**, etc). La tabla se actualiza de la manera correspondiente.

- Revise los cálculos de la dilución de muestra para cada muestra. Si es necesario, modifique la concentración de muestra diluida (incluidas las unidades) y la concentración de solución madre.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.
- Los ensayos de Applied Biosystems se refieren a:
 - *TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*.

Notas _____

Solicitud de materiales para el experimento.

En la pantalla Materials List (Lista de materiales), revise la lista de materiales que se recomiendan para preparar para la placa de reacción PCR.

Opcionalmente, puede solicitar los materiales recomendados a la tienda de Applied Biosystems. Cree una cesta de la compra, añada productos a la lista de la compra y, a continuación, inicie la sesión para enviar su pedido. Para acceder a la tienda de Applied Biosystems, debe tener una conexión a Internet ilimitada.

Nota: El software StepOne recomienda los materiales que debe solicitar de acuerdo con el diseño del experimento. Se da por hecho que se va a diseñar el experimento, solicitar los materiales y luego preparar (Capítulo 3) y procesar (Capítulo 4) la placa de reacción cuando reciba los materiales.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, los materiales recomendados son:

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) o TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
- Ensayo de RNase P de Applied Biosystems

Nota: Human RNase P-MGB-Probe TaqMan® Gene Expression Assay no está disponible. Se puede solicitar como un TaqMan® Gene Expression Assay personalizado (PN 4331348). Applied Biosystems no recomienda el uso de fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

Pantalla Ordering Materials (Solicitud de materiales)

1. Busque el ensayo diana en la tienda de Applied Biosystems:
 - a. Asegúrese de que el ordenador está conectado a Internet.
 - b. Haga clic en el campo **Enter Gene Name** (Escriba nombre de gen), escriba **RNase P** y, a continuación, haga clic en **Find Assay** (Buscar ensayo).
 - c. En el cuadro de diálogo Find Assay Results (Buscar resultados de ensayo), seleccione su ensayo.
 - d. Haga clic en **Apply Assay Selection** (Aplicar selección de ensayo).
2. Complete el panel Experiment Materials List (Lista de materiales del experimento):
 - a. En el menú desplegable Display (Visualización), seleccione **All Items** (Todos los elementos) (predeterminada) y, a continuación, revise los materiales recomendados. Si es necesario, utilice la barra de desplazamiento situada a la derecha para ver todos los elementos.
 - b. Active la casilla de verificación junto a cada uno de los siguientes elementos:
 - MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate

Notas

- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) o TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
- Ensayo de RNase P de Applied Biosystems

Nota: Para obtener más información acerca de un elemento específico, haga clic en el vínculo del número de referencia para conectarse a la tienda de Applied Biosystems. En la página de inicio, escriba el número de referencia en el campo Search (Búsqueda) y, a continuación, haga clic en **Go (Ir)**.

- Haga clic en **Add Selected Items to Shopping List** (Añadir elementos seleccionados a la lista de la compra).
- Compruebe si la lista de la compra del experimento contiene los materiales deseados y que las cantidades son correctas y, a continuación, haga clic en **Order Materials in List** (Solicitar materiales de la lista).

3A. (Optional) Order: Materials List Materials List Help ?

Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.

Find Assay

Enter Gene Name: Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.

Experiment Materials List

Display:

☐ Check All	Item	Part Number	Description
☒	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate	4375816	The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating. An optically clear adhesive film used to seal the samples into the

Experiment Shopping List (3 items)

Shopping Basket Name

☐ Check All	Item	Part Number	Quantity
☐	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction ...	4375816	1
☐	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	4375928	1

- En el cuadro de diálogo, Order Materials - Log In (Solicitar materiales – Inicio de sesión), escriba el nombre de usuario y la contraseña de la tienda de Applied Biosystems y, a continuación, haga clic en **Login and Submit** (Iniciar la sesión y enviar).

Nota: Si no tiene cuenta en la tienda de Applied Biosystems, haga clic en **Register Now** (Registrarse ahora) para crear una cuenta.

Notas _____

4

5. Después de realizar el pedido, haga clic en **Finish Designing Experiment** (Finalizar el diseño del experimento).

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- Confirme que el ordenador tiene una conexión a Internet ilimitada.
- Applied Biosystems recomienda las siguientes versiones de navegadores y Adobe® Acrobat® Reader para utilizar el sitio web de Applied Biosystems:

Sistema operativo del escritorio	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 98/NT/2000	v6.x o posterior	v6.x o posterior	v4.0 o posterior
Macintosh® OS 9 o posterior	v6.x o posterior	v5.2 o posterior	v4.0 o posterior

Nota: Asegúrese de que se han activado las cookies y Java Script para que el sitio web funcione correctamente.

- Seleccione todos los materiales que necesite para el experimento y añádalos a la lista de la compra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Materials List (Lista de materiales), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Notas

Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño

Para finalizar el flujo de trabajo del asistente de diseño, revise la disposición de la placa y, a continuación, seleccione una opción de salida.

Acerca del experimento de ejemplo

El software StepOne selecciona automáticamente ubicaciones para los pocillos en la placa de reacción. En el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Los pocillos se colocan tal y como se muestra a continuación.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNase P	N RNase P	N RNase P	pop1 U RNase P	pop1 U RNase P	pop1 U RNase P	pop2 U RNase P	pop2 U RNase P
B	pop2 U RNase P	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 2.5E3
C	S RNase P 2.5E3	S RNase P 2.5E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 625	S RNase P 625	S RNase P 625
D								
E								
F								

- El experimento se guarda tal y como está y se cierra.

Nota: Para el experimento de ejemplo, no realice el proceso en este momento.

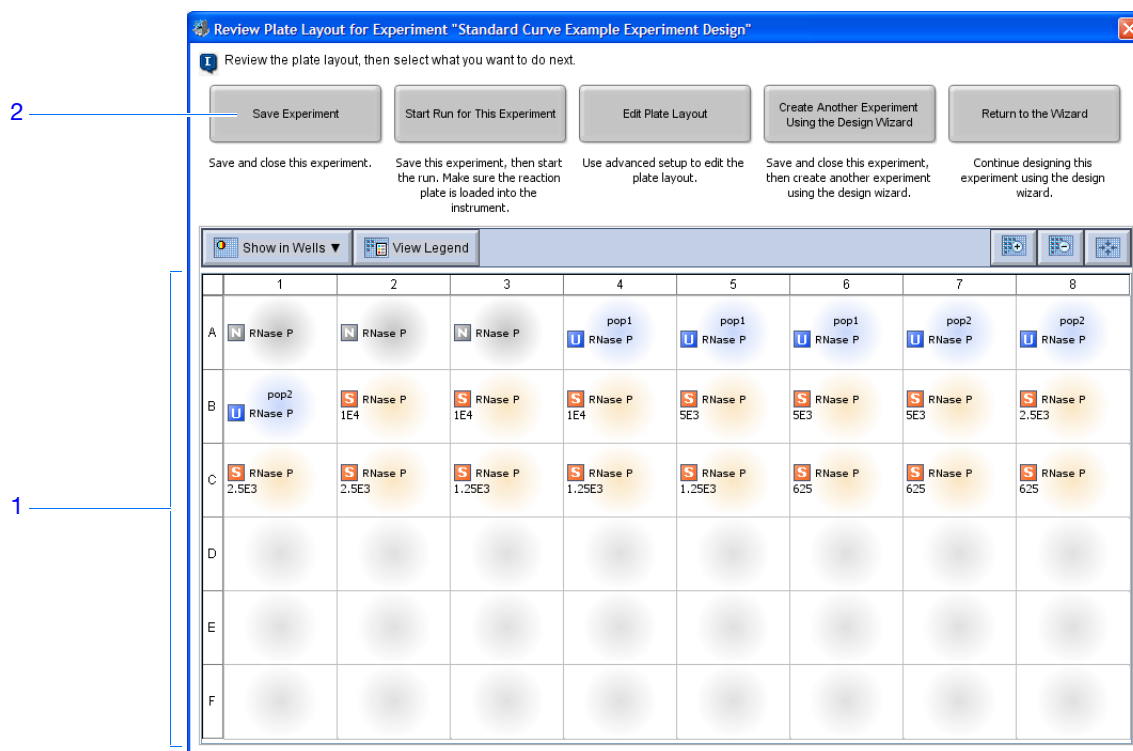
Finalización del asistente de diseño

- En la ventana Review Plate for Experiment (Revisar placa para el experimento), revise la disposición de la placa. Asegúrese de que hay:
 - 6 pocillos desconocidos **U**
 - 15 pocillos estándar **S**
 - 3 pocillos de control negativo **N**
 - 24 pocillos vacíos

Nota: Si la disposición de la placa es incorrecta, haga clic en **Return to the Wizard** (Volver al asistente) y compruebe los valores que ha introducido.

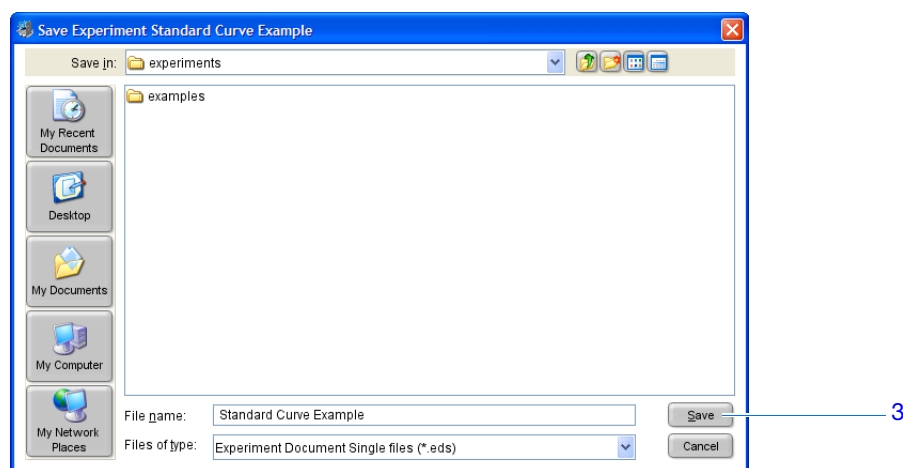
- Haga clic en **Save Experiment** (Guardar experimento).

Notas



- En el cuadro de diálogo Save Experiment (Guardar experimento), haga clic en **Save** (Guardar) para aceptar la ubicación y el nombre de archivo predeterminados. El experimento de ejemplo se guarda y se cierra, y regresa a la pantalla de inicio.

Nota: De manera predeterminada, el experimento de ejemplo se guarda en la carpeta Applied Biosystems\StepOne System\experiments.



Notas

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar:

- En la ventana **Review Plate for Experiment** (Revisar placa para el experimento), seleccione la opción de salida apropiada:
 - Haga clic en **Save Experiment** (Guardar experimento) si desea guardar y cerrar el experimento sin realizar ningún otro cambio ni iniciar el proceso.
 - Haga clic en **Start Run for This Experiment** (Iniciar proceso para este experimento) si desea guardar el experimento e iniciar el proceso. Asegúrese de que la placa de reacción está cargada en el instrumento.
 - Haga clic en **Edit Plate Layout** (Editar disposición de placa) si desea utilizar el flujo de trabajo **Advanced Setup** (Configuración avanzada) para modificar la disposición de la placa.
 - Haga clic en **Create Another Experiment Using the Design Wizard** (Crear otro experimento con el asistente de diseño) si desea guardar y cerrar el experimento y, a continuación, crear otro experimento con el asistente de diseño.
 - Haga clic en **Return to the Wizard** (Regresar al asistente) si desea regresar al experimento para realizar cambios con el asistente de diseño.
- De manera predeterminada, los experimentos se guardan en la carpeta **Applied Biosystems\StepOne System\experiments**. Para cambiar:
 - La ubicación en la que se guarda un experimento específico, desplácese a la ubicación deseada con el cuadro de diálogo **Save Experiment** (Guardar experimento).
 - La ubicación en la que se guardan los experimentos de manera predeterminada, seleccione **Tools (Herramientas) ▶ Preferences** (Preferencias) y, a continuación, seleccione la ficha **General** (predeterminada). En el campo **Default Data Folder** (Carpeta de datos predeterminada), desplácese a la ubicación deseada.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca del uso del flujo de trabajo **Advanced Setup** (Configuración avanzada), consulte [“Flujo de trabajo Advanced Setup \(Configuración avanzada\)”](#) en la página 112.

Notas _____

3

Preparación de las reacciones

Este capítulo cubre los siguientes temas:

■ Resumen del capítulo	42
■ Preparación de las diluciones de muestras	43
■ Preparación de la dilución seriada del estándar	45
■ Preparación de la mezcla de reacción	48
■ Preparación de la placa de reacción	50

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en  en la barra de herramientas o seleccionado **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

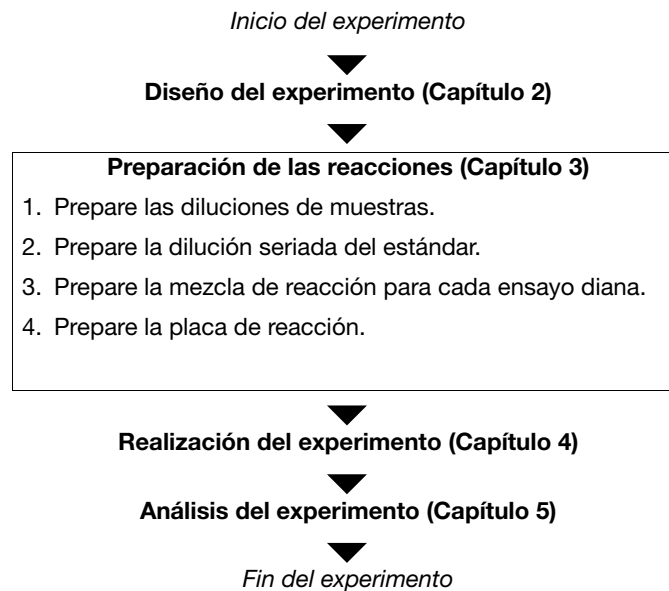
Notas

Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo preparar las reacciones de PCR para el experimento de curva estándar de ejemplo y se ofrecen directrices para preparar las reacciones PCR para su propio experimento de curva estándar.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para preparar las reacciones PCR para el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.



Notas _____

Preparación de las diluciones de muestras

Realice diluciones de las muestras antes de añadir las muestras a la mezcla de reacción final. Diluya las muestras con los volúmenes que ha calculado el software StepOne™ (“Complete la ficha Sample Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de muestra).” en la página 31).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Las diluciones de muestras son necesarias porque el volumen de muestras se limita al 10% del volumen total de la reacción en el software StepOne. El volumen total de la reacción es de 25 µL/reacción, por lo que el volumen de muestras es de 2,5 µL/reacción.
- La concentración de solución madre es de 100 ng/µL. Después de diluir la muestra de acuerdo con la tabla Sample Dilutions Calculations (Cálculos de diluciones de muestras), la muestra tendrá una concentración de 6,6 ng/µL. Esto supone una concentración de 10X cuando se añaden 2,5 µL al volumen de mezcla de reacción final de 25 µL. Hay una concentración de 1X en la reacción final.
- Los volúmenes calculados en el software son:

Nombre de la muestra	Concentración de solución madre (ng/µL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de diluyente (µL)	Volumen total de muestra diluida (µL)
pop1	100,0	1,0	14,2	15,2
pop2	100,0	1,0	14,2	15,2

Materiales necesarios

- Agua para diluir la muestra
- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Solución madre de muestras
- Agitador
- Centrífuga

Preparación de las diluciones de muestras

- Etiquete un tubo de microcentrífuga diferente para cada muestra diluida:
 - Población 1**
 - Población 2**
- Añada el volumen de agua requerido (diluyente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de la muestra	Volumen de diluyente (µL)
1	Población 1	14,2
2	Población 2	14,2

Notas

3. Añada el volumen de solución madre de muestras requerido (diluyente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de la muestra	Volumen de muestra (µL)
1	Población 1	1,0
2	Población 2	1,0

4. Agite cada muestra diluida entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos.
5. Coloque las muestras diluidas en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar:

- Podría necesitar diluciones de muestras porque el volumen de las muestras se limita al 10% del volumen total de la reacción en el software StepOne. Debe realizar diluciones de muestras antes de añadir las muestras a la mezcla de reacción final.
- Para conseguir un rendimiento óptimo de los TaqMan® Gene Expression Assays o los Custom TaqMan® Gene Expression Assays, utilice entre 10 y 100 ng de molde de cDNA por 20 µL de reacción. Para reactivos rápidos, Applied Biosystems recomienda 10 ng.
- Utilice tampón TE o agua para diluir la muestra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de los ensayos de Applied Biosystems, consulte:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Notas _____

Preparación de la dilución seriada del estándar

Prepare la dilución seriada del estándar con los volúmenes que calcula el software StepOne (“[Complete la ficha Reaction Mix Calculations \(Cálculos de la mezcla de reacción\).](#)” en la página 29).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar de ejemplo:

- La concentración estándar en la solución madre es de 20.000 copias/μL.
- Los volúmenes calculados en el software son:

Punto de dilución	Origen	Volumen de origen (μL)	Volumen de diluyente (μL)	Volumen total (μL)	Concentración estándar (copias/μL)
1 [10.000,0]	Solución madre	3,6	14,5	18,2	4000,0
2 [5.000,0]	Dilución 1	9,1	9,1	18,2	2000,0
3 [2.500,0]	Dilución 2	9,1	9,1	18,2	1000,0
4 [1.250,0]	Dilución 3	9,1	9,1	18,2	500,0
5 [625,0]	Dilución 4	9,1	9,1	18,2	250,0

Materiales necesarios

- Agua para diluir los estándares
- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Solución madre de estándar
- Agitador
- Centrífuga

Preparación de la serie de dilución estándar para el ensayo de RNase P

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga diferente para cada estándar:
 - RNase P Std. 1
 - RNase P Std. 2
 - RNase P Std. 3
 - RNase P Std. 4
 - RNase P Std. 5

Notas

2. Añada el volumen de agua requerido (diluyente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de estándar	Volumen de diluyente que se debe añadir (µL)
1	RNase P Std. 1	14,5
2	RNase P Std. 2	9,1
3	RNase P Std. 3	9,1
4	RNase P Std. 4	9,1
5	RNase P Std. 5	9,1

3. Prepare la dilución 1 en el tubo RNase P Std. 1:

- Agite la solución madre entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente el tubo.
- Con una punta de pipeta nueva, añada 3,6 µL de solución madre al tubo RNase P Std. 1.
- Agite el tubo Std. 1 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.

4. Prepare la dilución 2 en el tubo RNase P Std. 2:

- Con una punta de pipeta nueva, añada 9,1 µL de la dilución 1 al tubo RNase P Std. 2.
- Agite el tubo Std. 2 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.

5. Prepare la dilución 3 en el tubo RNase P Std. 3:

- Con una punta de pipeta nueva, añada 9,1 µL de la dilución 2 al tubo RNase P Std. 3.
- Agite el tubo Std. 3 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.

6. Prepare la dilución 4 en el tubo RNase P Std. 4:

- Con una punta de pipeta nueva, añada 9,1 µL de la dilución 3 al tubo RNase P Std. 4.
- Agite el tubo Std. 4 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.

7. Prepare la dilución 5 en el tubo RNase P Std. 5:
 - a. Con una punta de pipeta nueva, añada 9,1 μL de la dilución 4 al tubo RNase P Std. 5.
 - b. Agite el tubo Std. 5 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
8. Coloque los estándares en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar:

- Los estándares son esenciales para realizar un análisis preciso de los datos del proceso.
- Cualquier error o imprecisión a la hora de realizar las diluciones afecta directamente a la calidad de los resultados.
- La calidad de las pipetas y las puntas, y el cuidado que se tenga a la hora de medir y mezclar las diluciones, afecta a la precisión.
- Utilice tampón TE o agua para diluir el estándar.

Notas _____

Preparación de la mezcla de reacción

Prepare la mezcla de reacción con los componentes y volúmenes que ha calculado el software StepOne (“[Complete la ficha Reaction Mix Calculations \(Cálculos de la mezcla de reacción\)](#).” en la página 29).

Nota: El software calcula todos los componentes de las reacciones PCR. Sin embargo, para preparar la mezcla de reacción de esta sección, incluya únicamente la mezcla maestra, la mezcla del ensayo y agua. Añada la muestra o el estándar cuando prepare la placa de la reacción (consulte “[Preparación de la placa de reacción](#)” en la página 50).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Los componentes de la mezcla de reacción son:
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) o TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - Mezcla del ensayo de RNase P (20X)
 - Agua
- Los volúmenes calculados en el software son:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2X)	12,5
Mezcla de ensayo (20X)	1,3
H ₂ O	8,8
Volumen total	22,6

Nota: En este momento, no se añade la muestra ni el estándar.

Materiales necesarios

- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Componentes de la mezcla de reacción (enumerados arriba)
- Centrífuga

Notas _____

Preparación de la mezcla de reacción



CUIDADO

PELIGRO QUÍMICO. TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) puede causar irritaciones en la piel y los ojos. Puede provocar molestias si se ingiere o se inhala. Consulte la ficha técnica de seguridad (MSDS) y siga las instrucciones de manipulación indicadas. Use protectores oculares, vestimenta protectora y guantes apropiados.



CUIDADO

PELIGRO QUÍMICO. TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG puede causar irritaciones en la piel y en los ojos. Puede provocar molestias si se ingiere o se inhala. Consulte la ficha técnica de seguridad (MSDS) y siga las instrucciones de manipulación indicadas. Use protectores oculares, vestimenta protectora y guantes apropiados.

1. Etiquete un tubo del tamaño apropiado para la mezcla de reacción: **Mezcla de reacción de RNase P**.
2. Para el ensayo de RNase P, añada los volúmenes requeridos de cada componente al tubo:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción	Volumen (µL) para 24 reacciones (más un exceso del 10%)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) o TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12,5	330,0
Mezcla del ensayo de RNase P (20X)	1,3	34,3
Agua	8,8	232,3
Volumen total de la mezcla de reacción	22,6	596,6

3. Para mezclar la mezcla de reacción, pipete suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape el tubo.
4. Centrifugue brevemente el tubo para quitar las burbujas de aire.
5. Coloque la mezcla de reacción en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Notas

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar:

- Si el experimento incluye más de un ensayo diana, prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana de manera separada.
- Incluya un volumen de exceso en los cálculos para compensar la pérdida que se produce durante las transferencias de reactivos. Applied Biosystems recomienda un volumen de exceso de al menos el 10%.
- Incluya todos los componentes requeridos.
- Prepare los reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Mantenga la mezcla del ensayo protegida de la luz, en el refrigerador, hasta que esté listo para usarla. Una exposición excesiva a la luz puede afectar a las sondas fluorescentes.
- Antes de utilizarlo:
 - Agite a la botella para mezclar bien la mezcla maestra.
 - Agite la mezcla del ensayo para resuspenderla y, a continuación, centrifugue brevemente el tubo.
 - Para descongelar las muestras congeladas, colóquelas en hielo. Una vez descongeladas, agite las muestras para resuspenderlas y, a continuación, centrifugue los tubos brevemente.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la preparación de la mezcla de reacción, consulte el protocolo apropiado para los reactivos que está utilizando en las reacciones PCR:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Preparación de la placa de reacción

Prepare las reacciones para cada grupo de replicados y, a continuación, transfíralas a la placa de reacción. Utilice la disposición de la placa que se muestra en el software StepOne.

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar de ejemplo:

- Se utiliza una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- El volumen de la reacción es de 25 µL/pocillo.
- La placa de reacción contiene:
 - 6 pocillos desconocidos **U**
 - 15 pocillos estándar **S**
 - 3 pocillos de control negativo **N**
 - 24 pocillos vacíos

Notas _____

- Se utiliza la disposición de la placa que genera automáticamente el software StepOne:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3
C	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
D								
E								
F								

Materiales necesarios

- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Mezcla de reacción de RNase P (de la [página 49](#))
- Agua
- Estándares (de la [página 45](#))
- Muestras (de la [página 43](#))
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- Centrífuga

Preparación de la placa de reacción

- Prepare las reacciones de control negativo para el gen diana:
 - A un tubo del tamaño apropiado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de agua que se indican a continuación.

Tubo	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (μL)	Volumen de agua (μL)
1	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	8,3

- Para mezclar la reacción, pipete suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape el tubo.
- Centrifugue brevemente el tubo para quitar las burbujas de aire.
- Añada 25 μL de la reacción de control negativo a los pocillos apropiados de la placa de reacción.

Notas

2. Por cada grupo de replicados, prepare las reacciones estándar:

- a. A tubos del tamaño adecuado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de estándar que se indican a continuación.

Tubo	Reacción estándar	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (μL)	Estándar	Volumen de estándar (μL)
1	RNase P Std 1	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	RNase P Std 1	8,3
2	RNase P Std 2	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	RNase P Std 2	8,3
3	RNase P Std 3	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	RNase P Std 3	8,3
4	RNase P Std 4	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	RNase P Std 4	8,3
5	RNase P Std 5	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	RNase P Std 5	8,3

- b. Para mezclar las reacciones, pipete suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape los tubos.
- c. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.
- d. Añada 25 μL de la reacción estándar a los pocillos apropiados de la placa de reacción.

3. Por cada grupo de replicados, prepare las reacciones para los elementos desconocidos:

- a. A tubos del tamaño adecuado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de muestras que se indican a continuación.

Tubo	Reacción desconocida	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (μL)	Muestra	Volumen de muestra (μL)
1	Pop1 de RNase P	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	pop1	8,3
2	Pop2 de RNase P	Mezcla de reacción de RNase P	74,6	pop2	8,3

Notas _____

- b. Para mezclar las reacciones, pipete suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape los tubos.
 - c. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.
 - d. Añada 25 µL de la reacción desconocida (muestra) a los pocillos apropiados de la placa de reacción.
4. Selle la placa de reacción con película adhesiva óptica.
 5. Centrifugue brevemente la placa de reacción para quitar las burbujas de aire.
 6. Hasta que esté preparado para realizar el proceso, coloque la placa de reacción en hielo en un sitio oscuro.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar:

- Procure utilizar los consumibles adecuados.
- Asegúrese de que la colocación de las reacciones PCR se corresponde con la disposición de la placa que se muestra en el software StepOne. Puede:
 - Aceptar la disposición de la placa que genera automáticamente el software.
 - o
 - Utilizar el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para cambiar la disposición de la placa en el software.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La preparación de la placa de reacción, consulte el protocolo apropiado para los reactivos que está utilizando en las reacciones PCR:
 - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- Los consumibles, consulte [“Consumibles admitidos” en la página 3](#).
- El uso del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para cambiar la disposición de la placa, consulte [“Flujo de trabajo Advanced Setup \(Configuración avanzada\)” en la página 112](#).

Notas

Notas _____

4

Realización del experimento

Este capítulo cubre los siguientes temas:

■ Resumen del capítulo	56
■ Preparación de la reacción	57
■ (Opcional) Activación de las notificaciones.....	59
■ Inicio de la reacción	61
■ Monitorización de la reacción.....	64
■ Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos	73

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en  en la barra de herramientas o seleccionado **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

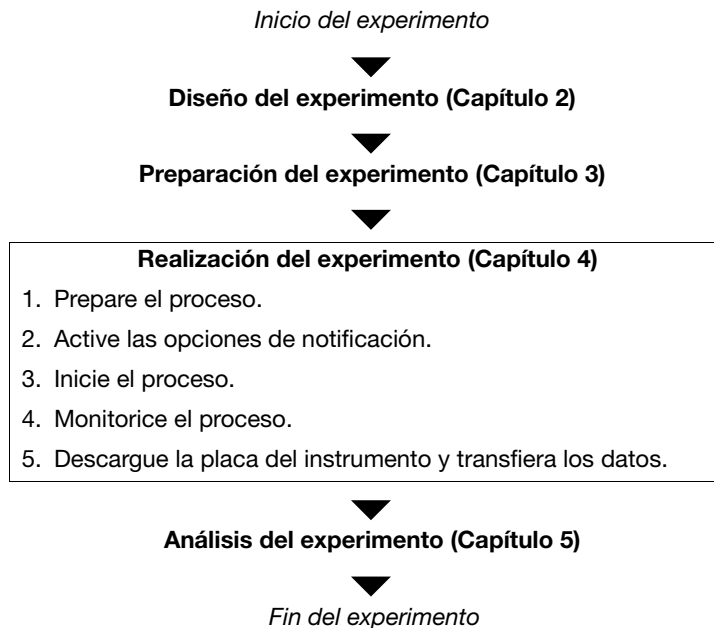
Notas

Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo realizar un proceso en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para realizar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.



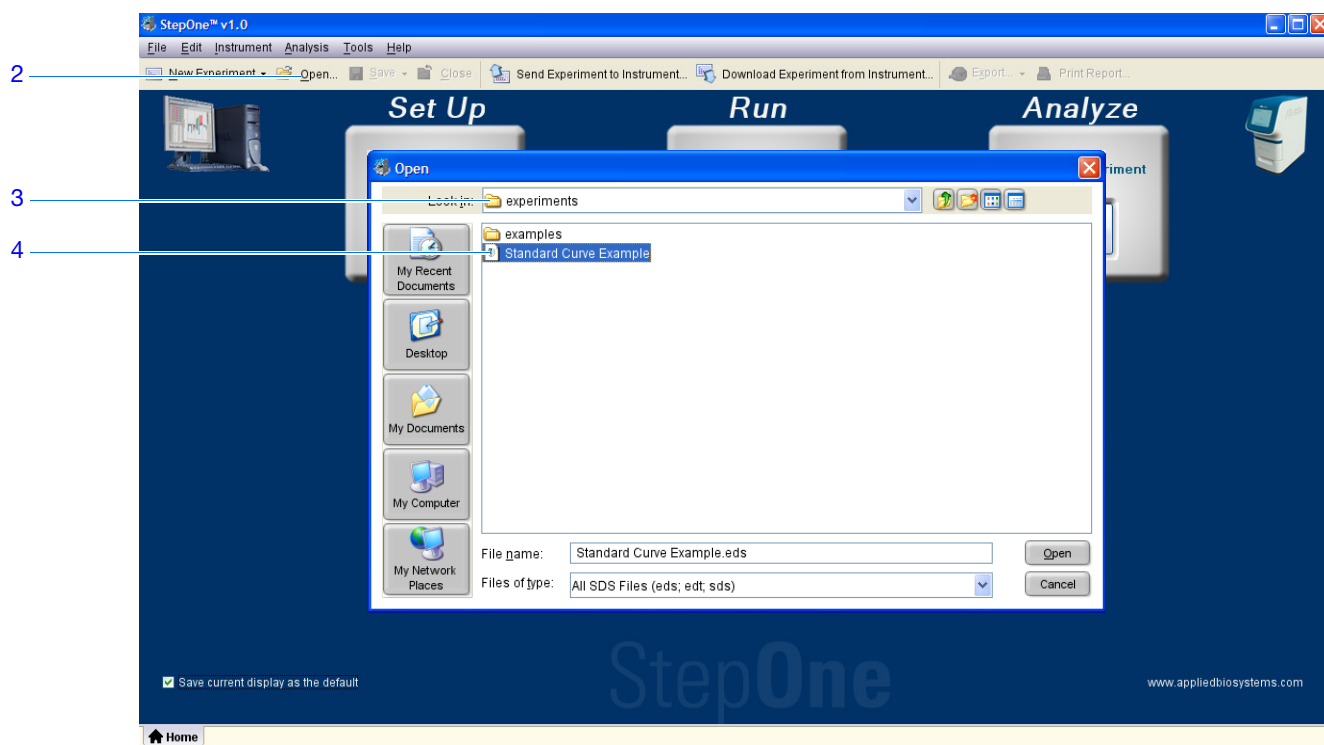
Notas _____

Preparación de la reacción

Para preparar el proceso, abra el experimento y cargue la MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate en el instrumento StepOne™.

Apertura del experimento de ejemplo

1. Si aún no se está ejecutando el software StepOne™, haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▶ **All Programs** (Todos los programas) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Open** (Abrir).
3. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), desplácese hasta la carpeta **experiments** (experimentos) (predeterminada).
4. Haga doble clic en **Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar) para abrir el archivo del experimento de ejemplo que ha creado en el [Capítulo 2](#).



Notas

Carga de la placa de reacción de reacción



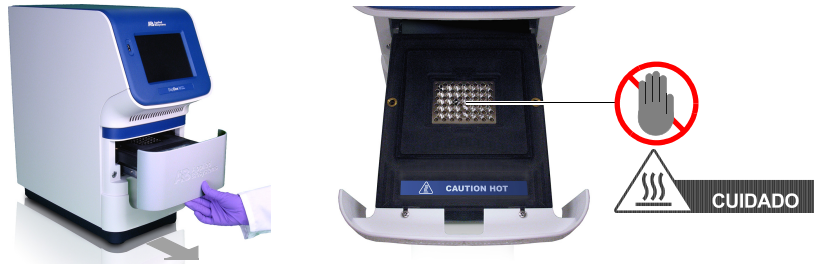
CUIDADO

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. Durante el uso del instrumento, la temperatura del bloque de muestras puede superar los 100 °C. Si el instrumento se ha utilizado recientemente, mantenga las manos alejadas de él hasta que el bloque de muestras alcance la temperatura ambiente.



¡IMPORTANTE! Lleve guantes sin polvo para manejar la placa de reacción.

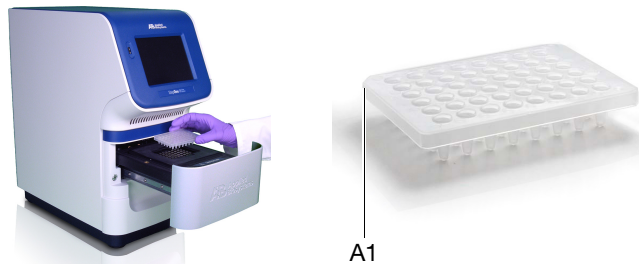
1. Abra el cajón del instrumento.



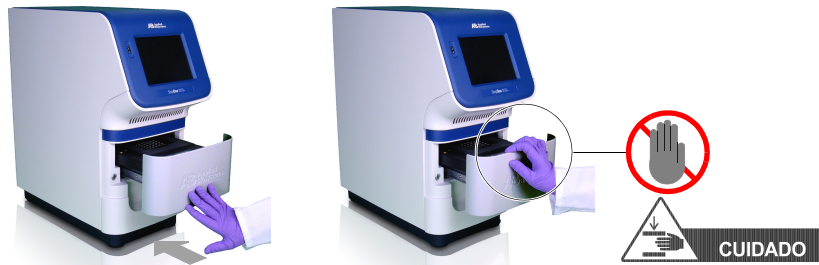
2. Coloque las reacciones en el bloque de muestras.

La orientación de la placa de reacción depende del tipo de consumible que se utilice:

- Si utiliza una placa de reacción, coloque el bloque de muestras con el pocillo A1 en la esquina posterior izquierda.
- Si utiliza tiras de tubos de reacción, colóquelas en el bloque de muestras.



3. Cierre cuidadosamente el cajón del instrumento.



Notas _____

(Opcional) Activación de las notificaciones

Active las opciones de notificación para que el software StepOne le avise por correo electrónico del momento en que el instrumento StepOne comienza y completa el proceso, o si se produce algún error en el proceso. La activación de la función de notificación es opcional y no afecta al rendimiento del sistema StepOne™ ni a la duración del proceso.

¡IMPORTANTE! La función de notificación sólo está disponible si el ordenador que utiliza está ejecutando el instrumento StepOne y está conectado a una red Ethernet.

Nota: El sistema de notificación también está disponible en los ordenadores que monitorizan un instrumento StepOne de manera remota. Para obtener más información acerca de la monitorización remota, consulte [“Monitorización remota” en la página 69](#).

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de ejemplo, el software StepOne está configurado para enviar notificaciones a tres usuarios (científico, supervisor y técnico de mycompany.com) cuando el sistema StepOne termina el proceso y si encuentra algún error durante la operación. El servidor SMTP de ejemplo (www.mycompany.com) está configurado para el cifrado SSL (Secure Sockets Layer) y, para utilizarlo, se requiere autenticación.

Configuración de las opciones de notificación

1. En el software StepOne, haga clic en  **Run (Proceso)** en la columna de navegación.
2. Haga clic en  **Notification Settings (Opciones de notificación)**.
3. Seleccione **Enable Notifications (Activar notificaciones)**.
4. Seleccione los eventos que desencadenarán las notificaciones:
 - a. Seleccione **Instrument Error (Error del instrumento)**.
 - b. Seleccione **Run Completed (Proceso completado)**.
5. En el campo Enter e-mail addresses for notifications (Escriba las direcciones de correo electrónico para las notificaciones), escriba: **scientist@mycompany.com, supervisor@mycompany.com, technician@mycompany.com**.
6. En el campo Outgoing Mail Server (SMTP) (Servidor de correo saliente (SMTP)), escriba **smtp.mycompany.com**.
7. Ajuste las opciones de autenticación:
 - a. Seleccione **No** en Server requires authentication (El servidor requiere autenticación).
 - b. En el campo User Name (Nombre de usuario), escriba **supervisor**.
 - c. En el campo Password (Contraseña), escriba **password**.

Notas

The screenshot shows the 'Notification Settings' window. On the left, a vertical list of numbers (3, 4, 5, 6, 7a, 7b, 7c) has lines pointing to specific fields in the window:

- 3** points to the 'Enable Notifications:' radio buttons, where 'Yes' is selected.
- 4** points to the 'Select the events to generate notifications:' section, where 'Instrument Error' and 'Run Completed' are checked, and 'Run Started' is unchecked.
- 5** points to the text area for 'Enter e-mail addresses for notifications:', which contains the example email addresses: 'scientist@mycompany.com, supervisor@mycompany.com, technician@mycompany.com'.
- 6** points to the 'Outgoing Mail Server (SMTP):' text field, which contains 'smtp.mycompany.com'.
- 7a** points to the 'Server requires an encrypted connection?' radio buttons, where 'No' is selected.
- 7b** points to the '(Server Authentication) User Name:' text field, which contains 'ExampleUser'.
- 7c** points to the '(Server Authentication) Password:' text field, which contains masked characters '*****'.

Directrices del proceso

Si configura el sistema StepOne para la notificación automática:

- El sistema StepOne debe estar configurado para su uso en red. Consulte *Guía de instalación de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- Determine los eventos de los que quiere recibir una notificación:
 - **Instrument Error** (Error del instrumento): el sistema StepOne envía por correo electrónico a los destinatarios todos los errores que se producen en el instrumento StepOne durante cada proceso.
 - **Run Started** (Proceso iniciado): el proceso StepOne envía un correo electrónico a los destinatarios cada vez que el instrumento inicia un proceso.
 - **Run Completed** (Proceso completado): el proceso StepOne envía un correo electrónico a los destinatarios cada vez que el instrumento completa un proceso.
- Obtenga las direcciones de correo electrónico en las que desea recibir notificaciones.

¡IMPORTANTE! Separe las direcciones con una coma (,).

- Póngase en contacto con el administrador del sistema o con el departamento de informática para obtener:
 - La dirección de red de un servidor de protocolo de transferencia de correo simple (SMTP) en la LAN
 - Un nombre de usuario y contraseña para el servidor, si son necesarios para el acceso
 - La configuración de SSL (Secure Sockets Layer) del servidor (activada o desactivada)

Notas _____

Inicio de la reacción

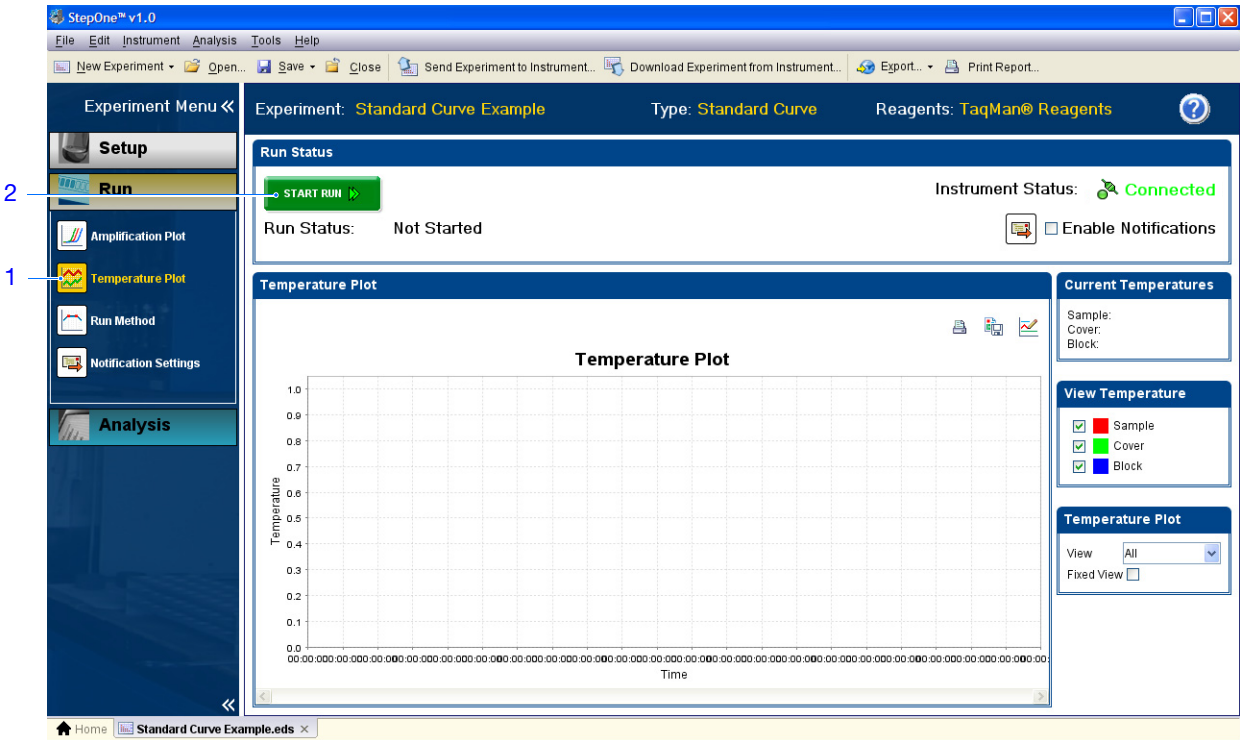
Inicie el proceso de acuerdo con la disposición del instrumento StepOne. La forma en la que hay que iniciar el proceso depende de la disposición del sistema StepOne:

Disposición	Descripción	Consulte...
Conectada	El cable amarillo del sistema StepOne conecta el ordenador al instrumento StepOne	"Inicio en disposición colocalizada" más abajo
Autónoma	- El ordenador y el instrumento StepOne no están conectados, o - El ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red.	"Inicio en disposición autónoma" en la página 62

Inicio en disposición colocalizada

Realice este procedimiento si el ordenador está conectado directamente al instrumento StepOne por medio del cable del sistema StepOne.

- En el software StepOne, haga clic en  **Temperature Plot** (Gráfica de temperatura).
- Haga clic en **START RUN** (Iniciar proceso) .



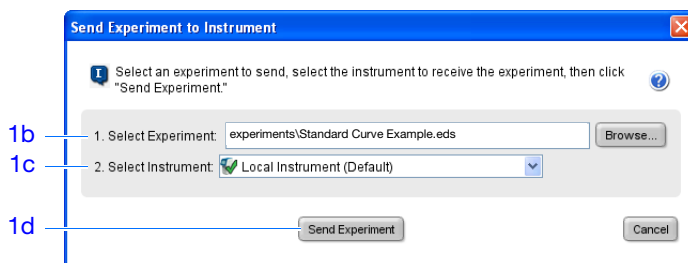
Notas

Inicio en disposición autónoma

Realice este procedimiento si el ordenador y el instrumento StepOne *no están* directamente conectados por medio del cable amarillo del sistema StepOne.

1. Si el ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red, realice los [pasos 1a a 1f](#). De lo contrario, vaya al [paso 2](#).

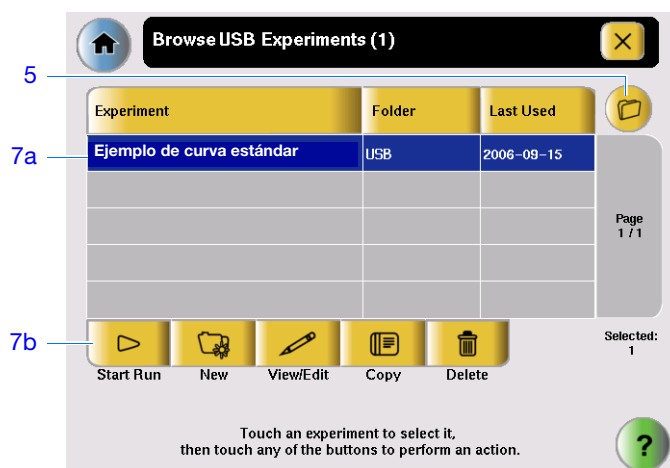
- a. En el software StepOne, haga clic en  **Send Experiment to Instrument** (Enviar experimento a instrumento).
- b. En el cuadro de diálogo Send Experiment to Instrument (Enviar experimento a instrumento), haga clic en **Browse** (Examinar), seleccione el archivo **Standard Curve Example.eds** y, a continuación, haga clic en **Open** (Abrir).
- c. Seleccione el instrumento StepOne en el menú desplegable Select Instrument (Seleccionar instrumento).
Si no aparece su instrumento StepOne, configúrelo para la monitorización, tal y como se explica en *Guía de instalación de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- d. Haga clic en **Send Experiment** (Enviar experimento) para enviar el experimento al instrumento StepOne a través de la red.



- e. Cuando se le solicite, haga clic en **OK** (Aceptar) para cerrar el mensaje de confirmación.
 - f. Vaya al [paso 6](#).
2. Si el instrumento StepOne no está conectado al ordenador, realice los [pasos 2a a 2d](#) para utilizar una unidad USB para transferir el experimento.
 - a. Conecte la unidad USB a uno de los puertos USB del ordenador.
 - b. En el software StepOne, seleccione  **Save** (Guardar) ► **Save As** (Guardar como).
 - c. En el cuadro de diálogo Save (Guardar), desplácese a la unidad USB y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar).
 - d. Extraiga la unidad USB del ordenador y, a continuación, conéctela al puerto USB del instrumento StepOne.



3. Toque la pantalla táctil del instrumento StepOne y, a continuación, toque .
4. En la pantalla del menú principal, toque **Browse Experiments** (Buscar experimentos).
5. En la pantalla Browse Methods (Métodos de búsqueda), toque  (Folders) (Carpetas).
6. En la pantalla Choose an Experiment Category (Elija una categoría de experimento):
 - Toque **USB** si ha transferido el experimento a una unidad USB.
 - Toque **Default** (Predeterminado) si ha enviado el experimento a través de una conexión de red.
7. En la pantalla Browse USB/Default Experiments (Buscar USB/experimentos predeterminados):
 - a. Toque **Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar) para seleccionar el experimento.
 - b. Toque  **Start Run** (Iniciar proceso).



8. En la pantalla Run Parameters (Parámetros de proceso):
 - a. Toque el campo **Reaction Volume** (Volumen de reacción), utilice el teclado para escribir **25 μ L** y, a continuación, toque **Done** (Finalizado).

Notas

b. Toque **Start Run (Iniciar proceso)**.

Experiment Parameters

8a

Reaction Volume:

25

uL

Cover Temperature:

105.0

°C

Experiment Name:

Example_Experiment

8b

Start Run Now

Touch each field then use the keyboard to edit the contents. When you are finished, touch Start Run.

?

Monitorización de la reacción

Monitoree el progreso desde un ordenador que ejecute el software StepOne o desde la pantalla táctil del instrumento StepOne. La forma en la que monitorice el proceso depende de la disposición del sistema StepOne:

Disposición	Descripción	Consulte...
Conectada	El cable del sistema StepOne conecta el ordenador al instrumento StepOne.	“Disposición conectada” más abajo
Autónoma (en red)	El ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red.	“Monitorización remota” en la página 69
Autónoma (básica)	El ordenador y el instrumento StepOne no están conectados.	“Monitorización autónoma” en la página 72

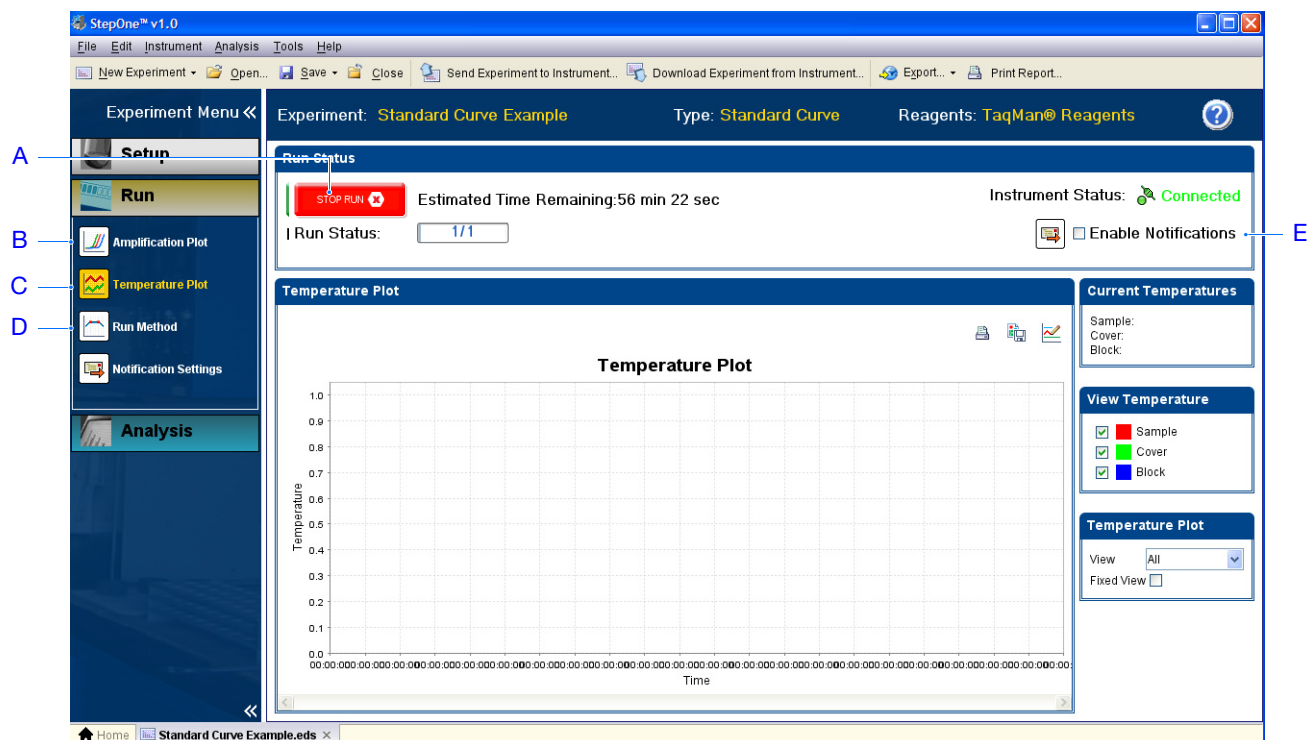
Notas

Disposición conectada

Si el ordenador está directamente conectado al instrumento StepOne por medio del cable del sistema StepOne, puede ver el progreso del proceso en tiempo real de la forma que se describe a continuación. Durante el proceso, observe periódicamente las tres gráficas disponibles en el software StepOne para detectar posibles problemas.

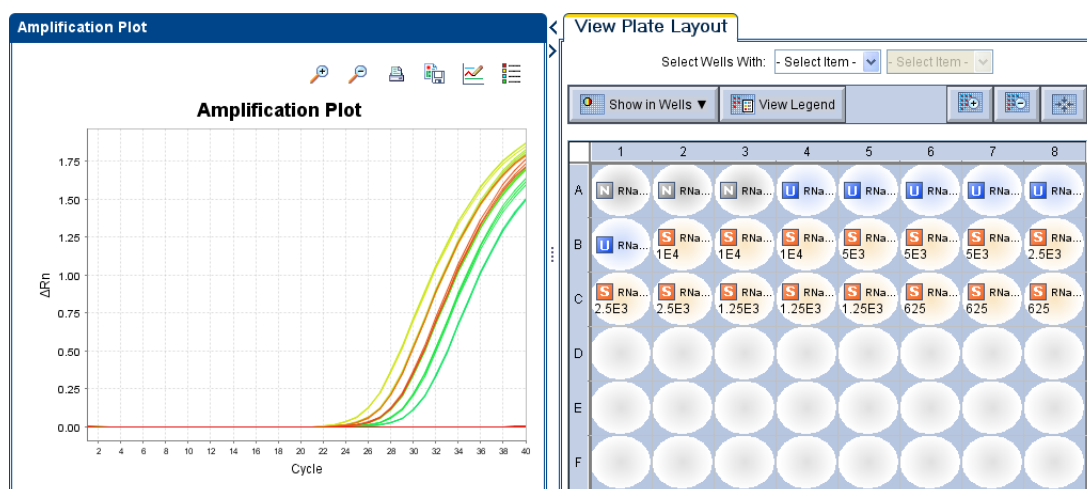
#	Para...	Acción
A	Detener el proceso	1. En el software StepOne, haga clic en STOP RUN (Detener proceso). 2. En el cuadro de diálogo Stop Run (Detener proceso), haga clic en una de las siguientes opciones: – Stop Immediately (Detener inmediatamente) para detener el proceso inmediatamente. – Stop after Current Cycle/Hold (Detener después de ciclo actual/espera) para detener el proceso después del ciclo o la espera actual. – Cancel (Cancelar) para continuar el proceso.
B	Ver los datos de amplificación en tiempo real	Seleccione  Amplification Plot (Gráfica de amplificación). Consulte “Acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)” en la página 66.
C	Ver los datos de la temperatura del proceso en tiempo real	Seleccione  Temperature Plot (Gráfica de temperatura). Consulte “Acerca de la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura)” en la página 67.
D	Ver el progreso del proceso en la pantalla Run Method (Método de proceso)	Seleccione  Run Method (Método de proceso). Consulte “Acerca de la pantalla Run Method (Método de proceso)” en la página 68.
E	Activar/desactivar las opciones de notificación	Active o desactive la opción Enable Notifications (Activar notificaciones).

Notas



Acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)

La pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) permite ver la amplificación de las muestras a medida que el instrumento StepOne recoge datos de fluorescencia durante un proceso. Si se configura un método para recoger datos en tiempo real, en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) aparecen los datos de los pocillos seleccionados en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa). La gráfica presenta la fluorescencia de fluorocromo normalizada (DRn) frente al número de ciclos. La siguiente figura muestra la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) cuando aparece durante el experimento de ejemplo.



La pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) es útil para identificar y examinar amplificaciones anormales. Una amplificación anormal puede incluir lo siguiente:

- Fluorescencia incrementada en los pocillos de control negativo.
- Ausencia de fluorescencia detectable en un ciclo esperado (determinada a partir de experimentos similares anteriores utilizando los mismos reactivos en las mismas condiciones).

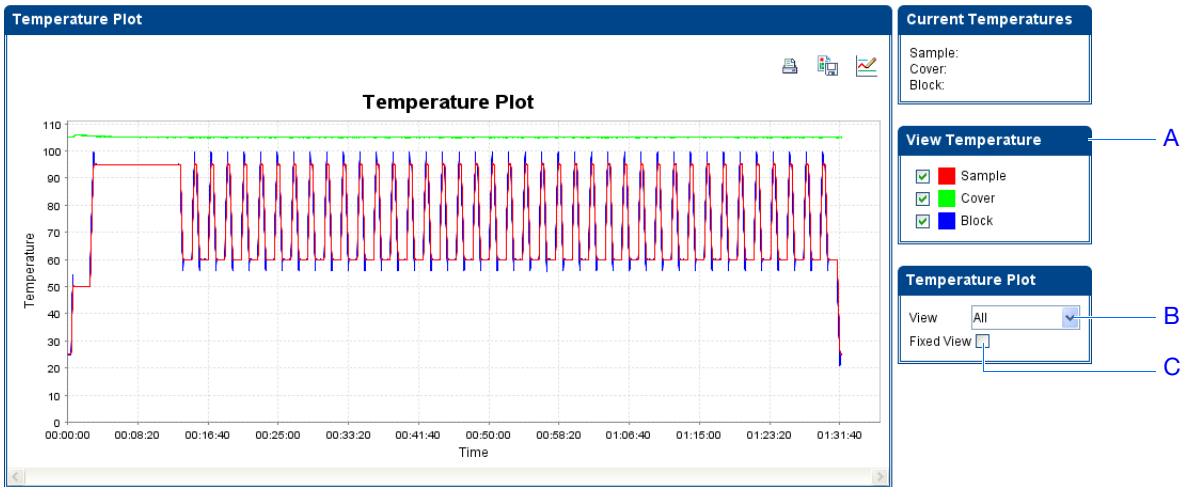
Si se observa una amplificación anormal o una completa ausencia de señal, solucione el error de la forma que se explica en la ayuda del software StepOne (haga clic en  en la barra de herramientas o seleccione **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne)).

Nota: Para ver los datos de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione los pocillos que desea ver en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).

Acerca de la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura)

Durante un proceso, la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) muestra las temperaturas del bloque de muestras, la cubierta caliente y las muestras (calculadas) en tiempo real. La siguiente figura muestra la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) cuando aparece durante el experimento de ejemplo.

	Para...	Acción
A	Añadir/quitar gráficas de temperatura	Seleccione Sample (Muestra), Heated Cover (Cubierta caliente) o Sample Block (Bloque de muestras) para cambiar la presencia de los datos asociados en la gráfica.
B	Cambiar el tiempo que se muestra por gráfica	Seleccione View (Ver) ▶ (duración).
C	Restringir el eje Y de la gráfica	Seleccione Fixed View (Vista fija).



Notas _____

La pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) puede ser útil para identificar averías del hardware. Al monitorizar la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura), observe las gráficas Sample (Muestra), Heated Cover (Cubierta caliente) y Sample Block (Bloque de muestras) para detectar algún comportamiento anormal.

- En general, las gráficas Sample (Muestra) y Block (Bloque) deberían ser más o menos un espejo la una de la otra. Una desviación significativa de las gráficas puede indicar un problema.
- La gráfica Heated Cover (Cubierta caliente) debería mantener la temperatura constante que se especifica en el método. Cualquier desviación de la temperatura constante puede indicar un problema.

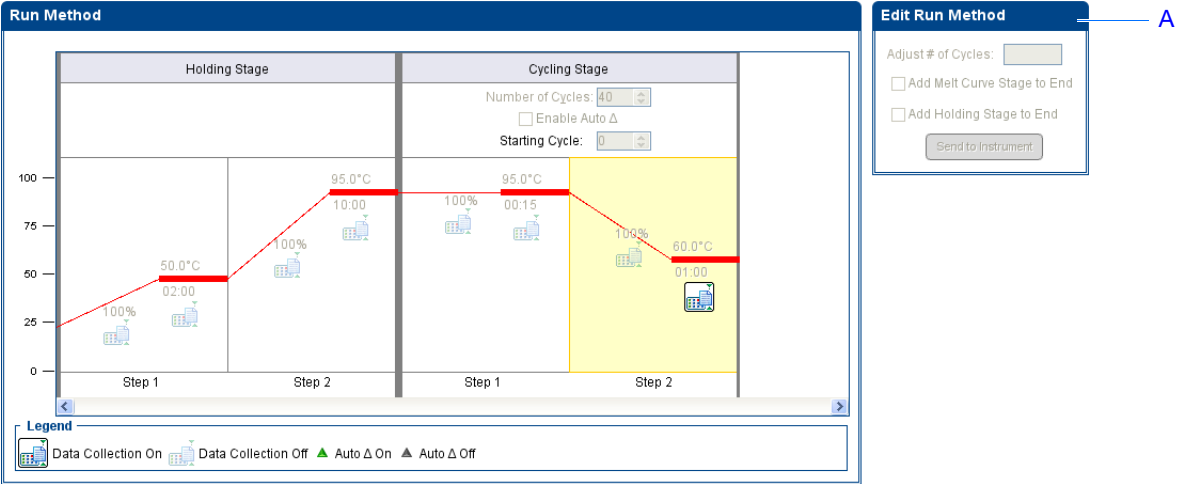
Si observa una gráfica de temperatura anormal, solucione el error de la forma que se explica en la ayuda del software StepOne (haga clic en  en la barra de herramientas o seleccione **Help** (Ayuda) ► **StepOne Help** (Ayuda de StepOne)).

Nota: La temperatura de las muestras que se indica en el grupo Current Temperatures (Temperaturas actuales) es un valor estimado.

Acerca de la pantalla Run Method (Método de proceso)

Después de comenzar el proceso, el sistema StepOne muestra su progreso en la pantalla Run Method (Método de proceso). La vista informa del progreso del proceso en referencia con el perfil térmico del método. La siguiente figura muestra la pantalla Run Method (Método de proceso) cuando aparece durante el experimento de ejemplo.

	Para...	Acción
A	Cambiar el método de proceso (añadir ciclos, una espera o una curva de fusión)	1. En el panel de navegación, haga clic en  Run Method (Método de proceso). 2. En la pantalla Run Method (Método de proceso), haga cualquiera de las siguientes acciones: – Escriba el número de ciclos que se van a aplicar a la fase cíclica. – Seleccione Add Melt Curve Stage to End (Añadir fase de curva de fusión al final) si desea añadir una fase de curva de fusión al final del proceso. – Seleccione Add Holding Stage to End (Añadir fase de espera al final) si desea añadir una fase de espera al final del proceso. 3. Haga clic en Send to Instrument (Enviar a instrumento).



Nota: Si aparece una alerta, haga clic en el error para obtener más información y solucionar el problema tal y como se explica en la ayuda del software StepOne (haga clic en [?](#) en la barra de herramientas o seleccione **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne)).

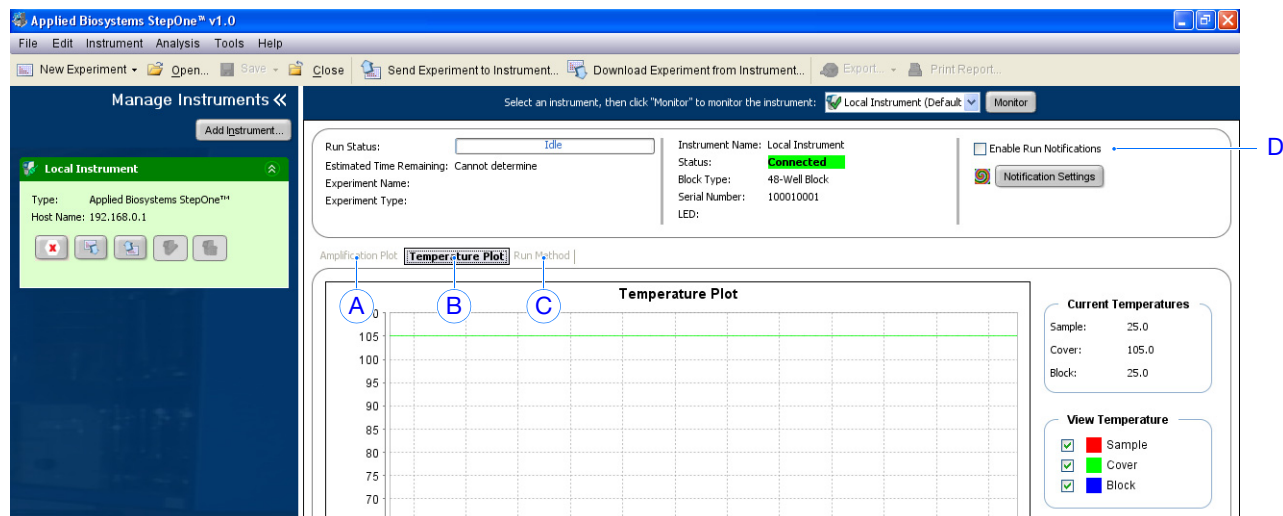
Monitorización remota

Si el instrumento StepOne está conectado a una red, puede utilizar la función de monitorización remota del software StepOne para ver el progreso del proceso en tiempo real desde cualquier ordenador de la red.

¡IMPORTANTE! Los ordenadores en red no pueden controlar el instrumento StepOne, sólo monitorizarlo.

#	Para...	Acción
A	Ver los datos de amplificación en tiempo real	Haga clic en Amplification Plot (Gráfica de amplificación). Consulte “Acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)” en la página 66.
B	Ver los datos de la temperatura del proceso en tiempo real	Haga clic en Temperature Plot (Gráfica de temperatura). Consulte “Acerca de la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura)” en la página 67.
C	Ver el progreso del proceso en la pantalla Run Method (Método de proceso)	Haga clic en Run Method (Método de proceso). Consulte “Acerca de la pantalla Run Method (Método de proceso)” en la página 68.
D	Activar/desactivar las opciones de notificación	Active o desactive la opción Enable Notifications (Activar notificaciones). Consulte “(Opcional) Activación de las notificaciones” en la página 59.

Notas _____



Para monitorizar el instrumento StepOne de manera remota:

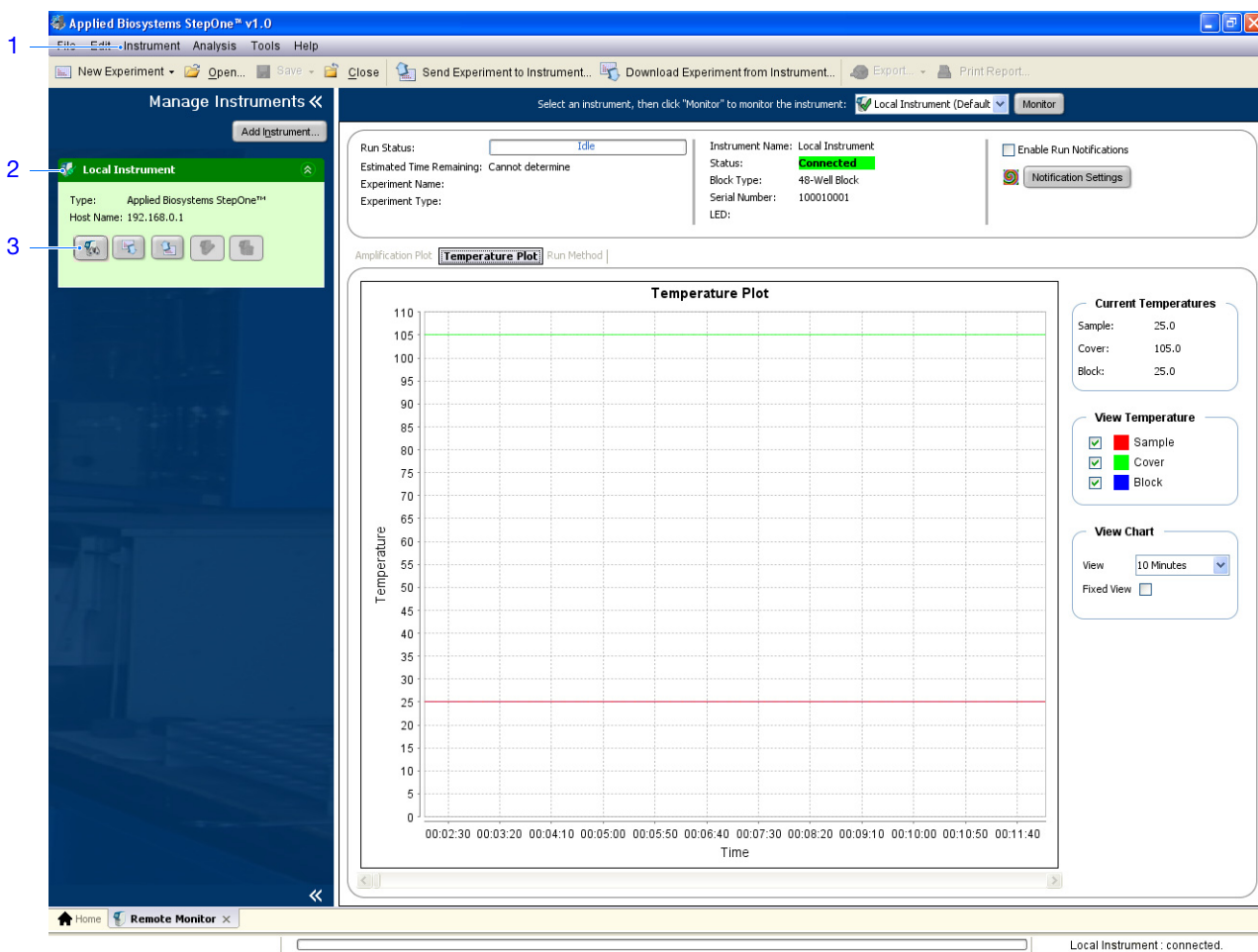
1. En el software StepOne, seleccione **Instrument** (Instrumento) ► **Remote Monitor** (Supervisor remoto).
2. En la barra de navegación, seleccione el instrumento StepOne.

Si en la barra de navegación no aparece el instrumento StepOne:

- a. Haga clic en **Add Instrument** (Añadir instrumento).
- b. Haga clic en el campo **Instrument Name** (Nombre de instrumento) y, a continuación, escriba el nombre del instrumento.
- c. Haga clic en el campo **Host Name** (Nombre de host) y, a continuación, introduzca la dirección IP del instrumento.
- d. Haga clic en **Save & Exit** (Guardar y salir).

Nota: Para obtener más información acerca de la configuración del instrumento StepOne para el uso en red o la monitorización remota, consulte la *Guía de instalación de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

3. Haga clic en  (Start monitoring this instrument) (Comenzar a monitorizar este instrumento) para su instrumento.

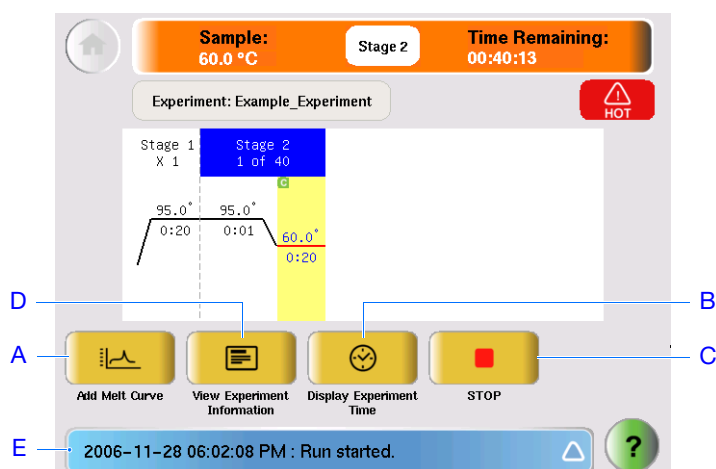


Notas

Monitorización autónoma

Si ha comenzado el proceso desde el instrumento StepOne, puede ver el progreso de dicho proceso desde la pantalla táctil. La pantalla Run Method (Método de proceso) muestra el método del experimento y resalta los pasos del perfil térmico a medida que el instrumento va realizándolos.

#	Para...	Acción
A	Añadir una fase de disociación al proceso	Toque  (Add Dissociation Curve) (Añadir curva de disociación) y, a continuación, toque OK (Aceptar).
B	Ver el tiempo que queda en el proceso	Toque  Display Method Time (Ver tiempo de método) y, a continuación, toque  para regresar a la pantalla Run Method (Método de proceso).
C	Detener el proceso	Toque  Stop (Detener) y, a continuación, toque: Stop (Detener) para detener el proceso después de que el instrumento StepOne complete el ciclo o la espera actual. Abort (Abortar) para detener el proceso inmediatamente.  para continuar el proceso sin ningún cambio.
D	Ver información del experimento	Toque  View Method Information (Ver información del método) y, a continuación, toque  para regresar a la pantalla Run Method (Método de proceso).
E	Ver el registro de errores	Toque la barra de estado para ver el registro de errores.



Notas

Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos

Cuando el instrumento StepOne muestre la pantalla Run History (Historial del proceso), descargue la placa de reacción del instrumento StepOne y transfiera los datos del experimento al ordenador para analizarlos.

Descarga de la placa de reacción

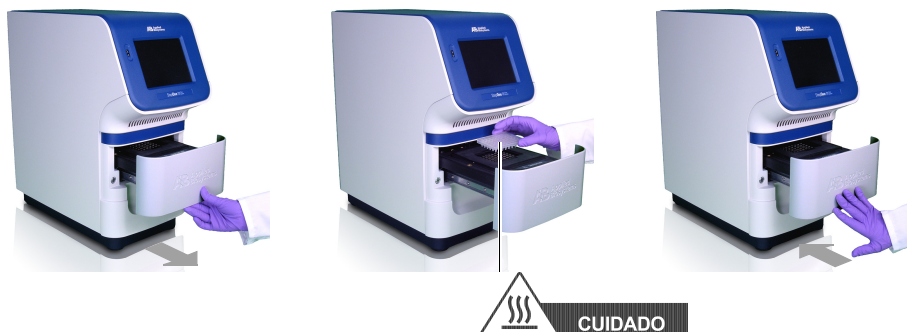


CUIDADO

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. Durante el uso del instrumento, la temperatura del bloque de muestras puede superar los 100 °C. Mantenga las manos alejadas hasta que la bandeja de muestras alcance la temperatura ambiente.

Nota: Cuando el instrumento StepOne complete un proceso, el sistema guardará los detalles en el historial de procesos, que permanece en el sistema hasta que el sistema completa otro proceso.

1. Cuando aparezca la pantalla Run Report (Informe de proceso) en la pantalla táctil del instrumento StepOne, toque .
2. Abra el cajón del instrumento.
3. Saque la placa de reacción del bloque de muestras.
4. Cierre con cuidado el cajón del instrumento.



¡IMPORTANTE! No apague el instrumento StepOne después de un proceso. El instrumento activa automáticamente un modo de hibernación cuando no se está utilizando.

Notas

Selección de un método de transferencia de datos

Transfiera el experimento al ordenador para analizarlo, de acuerdo con la disposición del sistema StepOne:

Disposición	Descripción	Consulte...
Conectada	El cable del sistema StepOne conecta el ordenador al instrumento StepOne.	“Transferencia de datos colo cada” más abajo
Autónoma (en red)	El ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red.	“Transferencia de datos remota” en la página 74
Autónoma (básica)	El ordenador y el instrumento StepOne no están conectados.	“Transferencia de datos autónoma” en la página 75

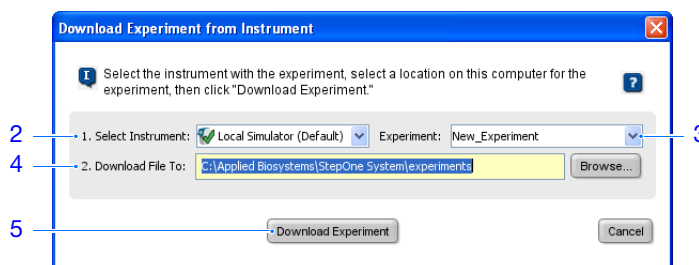
Transferencia de datos colo cada

Si el ordenador está conectado directamente al instrumento StepOne por medio del cable del sistema StepOne, no hay que hacer nada. El software StepOne transfiere automáticamente los datos del experimento al instrumento StepOne después del proceso.

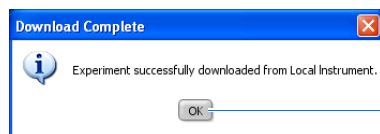
Transferencia de datos remota

Si el ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red Ethernet, envíe el experimento al instrumento StepOne a través de la red:

1. En el software StepOne, haga clic en  **Download Experiment from Instrument** (Descargar experimento del instrumento).
2. En el cuadro de diálogo Download Experiment from Instrument (Descargar experimento del instrumento), seleccione **Select Instrument** (Seleccionar instrumento) ▶ *<su instrumento>*.
3. Seleccione **Experiment** (Experimento) ▶ **Standard** (Estándar) **Curve Example** (Ejemplo de curva).
4. En el campo Download File (Descargar archivo), haga clic en **Browse** (Examinar), seleccione una carpeta en la que recibir los datos del experimento y, a continuación, haga clic en **Select** (Seleccionar).
5. Haga clic en **Download Experiment** (Descargar experimento) para descargar el experimento desde el instrumento StepOne al ordenador a través de la red.



6. Cuando se le solicite, haga clic en **OK** (Aceptar) para cerrar el mensaje de confirmación.



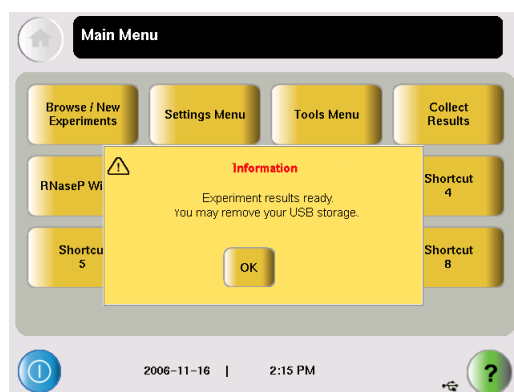
Transferencia de datos autónoma

Si el ordenador no está conectado al instrumento StepOne, utilice la unidad USB para transferir el experimento al instrumento:

1. Si aún no está conectada al instrumento, conecte una unidad USB al puerto USB.



2. Toque la pantalla táctil del instrumento StepOne para activarla y, a continuación, toque .
3. En el menú principal, toque **Collect Results** (Recoger resultados) para guardar los datos en la unidad USB.
Si el instrumento StepOne no encuentra la unidad USB, toque **OK** (Aceptar), espere 30 segundos y, a continuación, vuelva a tocar **Collect Results** (Recoger resultados).
4. Cuando aparezca un mensaje que le informa de que los datos se han transferido correctamente, toque **OK** (Aceptar).



5. Extraiga la unidad USB del instrumento StepOne y, a continuación, conéctela al puerto USB del ordenador.
6. En el escritorio del ordenador, utilice el explorador de Windows para abrir la unidad USB.

Notas

7. Copie el archivo Standard Curve Example.eds en:

`<unidad>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments`

donde `<unidad>` es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software de StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

5

Análisis del experimento

Este capítulo cubre los siguientes temas:

■ Resumen del capítulo	78
■ Sección 5.1 Revisión de los resultados	79
■ Sección 5.2 Solución de problemas (si es preciso)	97

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en ⓘ en la barra de herramientas o seleccionado **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

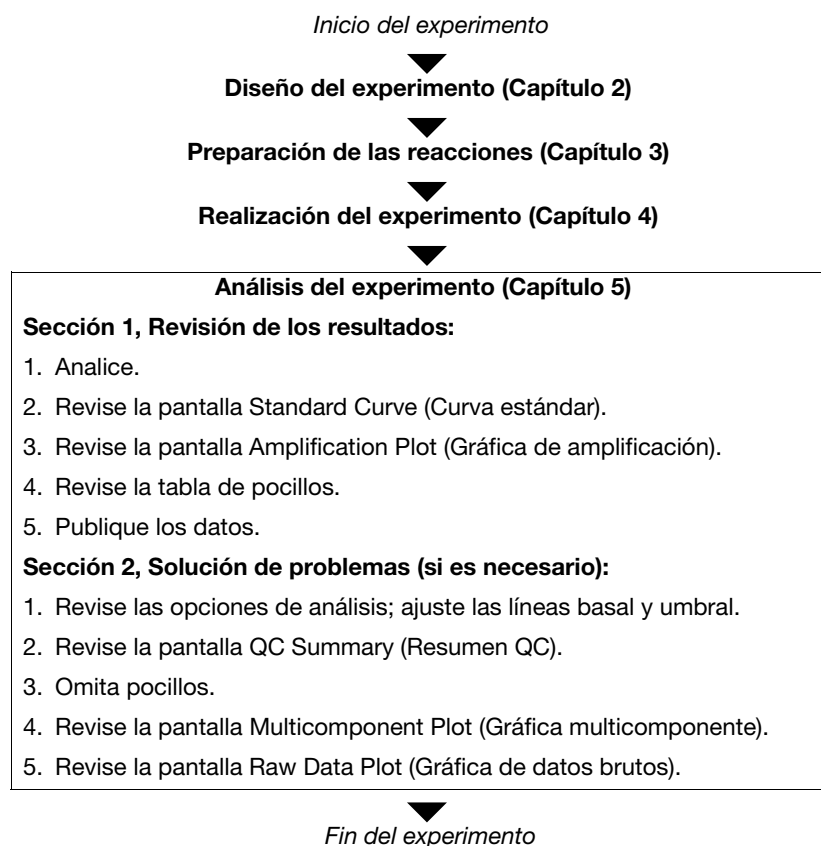
Notas

Resumen del capítulo

El software StepOne™ analiza los datos mediante el método de cuantificación de curva estándar. En la primera sección de este capítulo, se explica cómo revisar los datos analizados mediante varias de las pantallas de análisis y cómo presentar los datos. Si los resultados son cuestionables, en la Sección 2 de este capítulo se explican algunos pasos para solucionar los problemas.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para analizar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.



Sección 5.1 Revisión de los resultados

Esta sección cubre los siguientes temas:

■ Análisis del experimento	80
■ Visualización de la curva estándar	85
■ Revisión de la gráfica de amplificación	88
■ Revisión de la tabla de pocillos	93
■ Presentación de los datos	96

Notas _____

Análisis del experimento

El software StepOne analiza el experimento y muestra los resultados en las pantallas de análisis (por ejemplo, en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), QC Summary (Resumen QC), etc.)

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar de ejemplo, utilice el archivo de datos que se instala con el software StepOne. Este archivo de datos se ha creado con los mismos parámetros de diseño que se indican en el [Capítulo 2](#) y luego se ha procesado y analizado en un instrumento StepOne™.

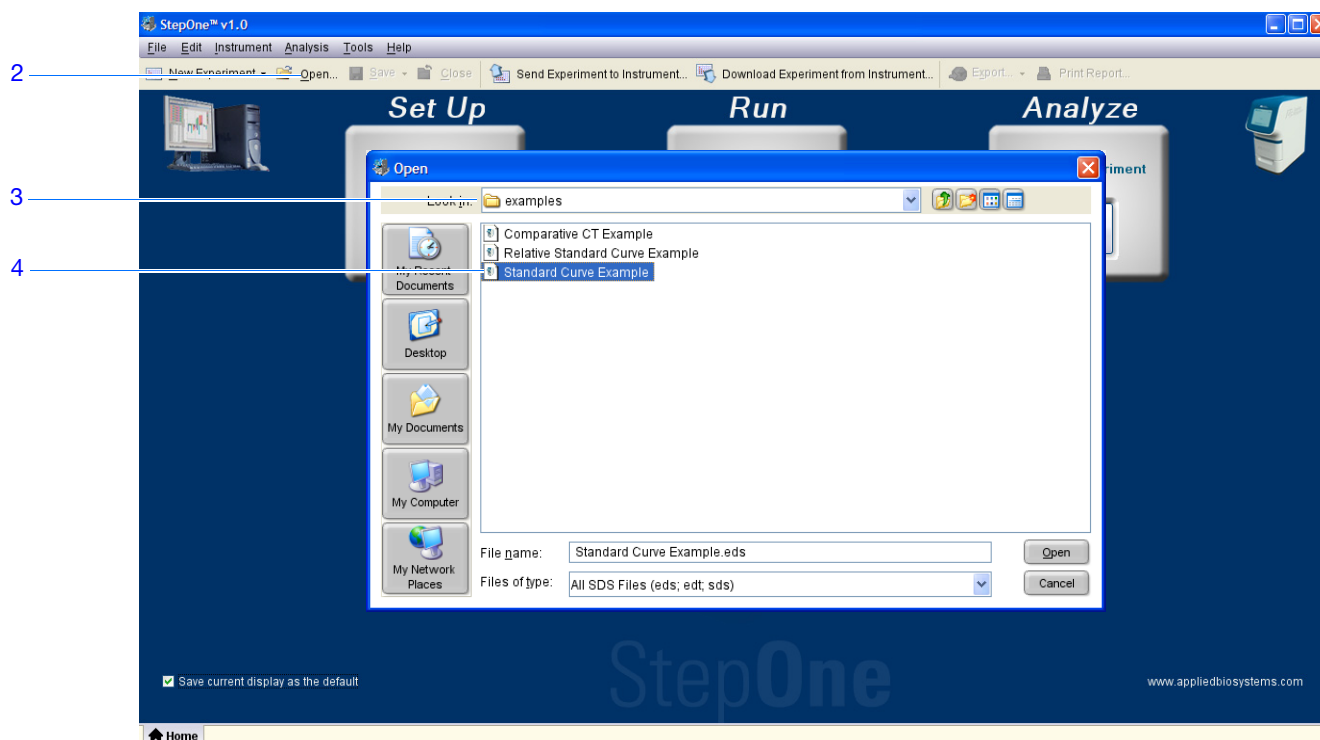
Encontrará el archivo de datos del experimento de ejemplo en su ordenador:

<unidad>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

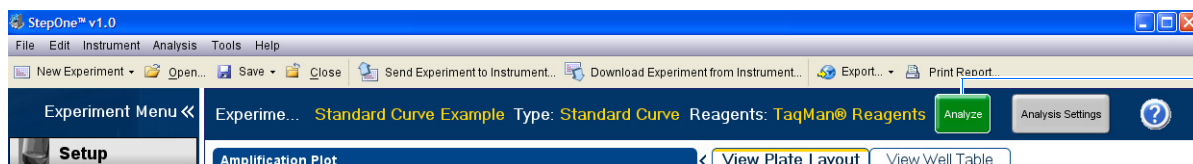
donde <unidad> es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software de StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

Análisis del experimento de ejemplo

1. Si aún no se está ejecutando el software StepOne, haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▶ **All Programs** (Todos los programas) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Open** (Abrir).
3. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), desplácese hasta la carpeta **examples** (ejemplos).
4. Haga doble clic en **Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar) para abrir el archivo de datos del experimento de ejemplo.



5. Haga clic en **Analyze** (Analizar). El software analiza los datos utilizando las opciones de análisis predeterminadas.



6. Consulte “Elementos del software” más adelante y “Consejos de desplazamiento” en la página 83 para obtener información acerca de cómo desplazarse por las pantallas de análisis.

Directrices Cuando analice su propio experimento de curva estándar:

- Inmediatamente después de una reacción, el software StepOne analiza automáticamente los datos utilizando las opciones de análisis predeterminadas y, a continuación, muestra la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) en el ordenador.
- Para volver a analizar los datos, seleccione todos los pocillos de la disposición de la placa y, a continuación, haga clic en **Analyze** (Analizar).

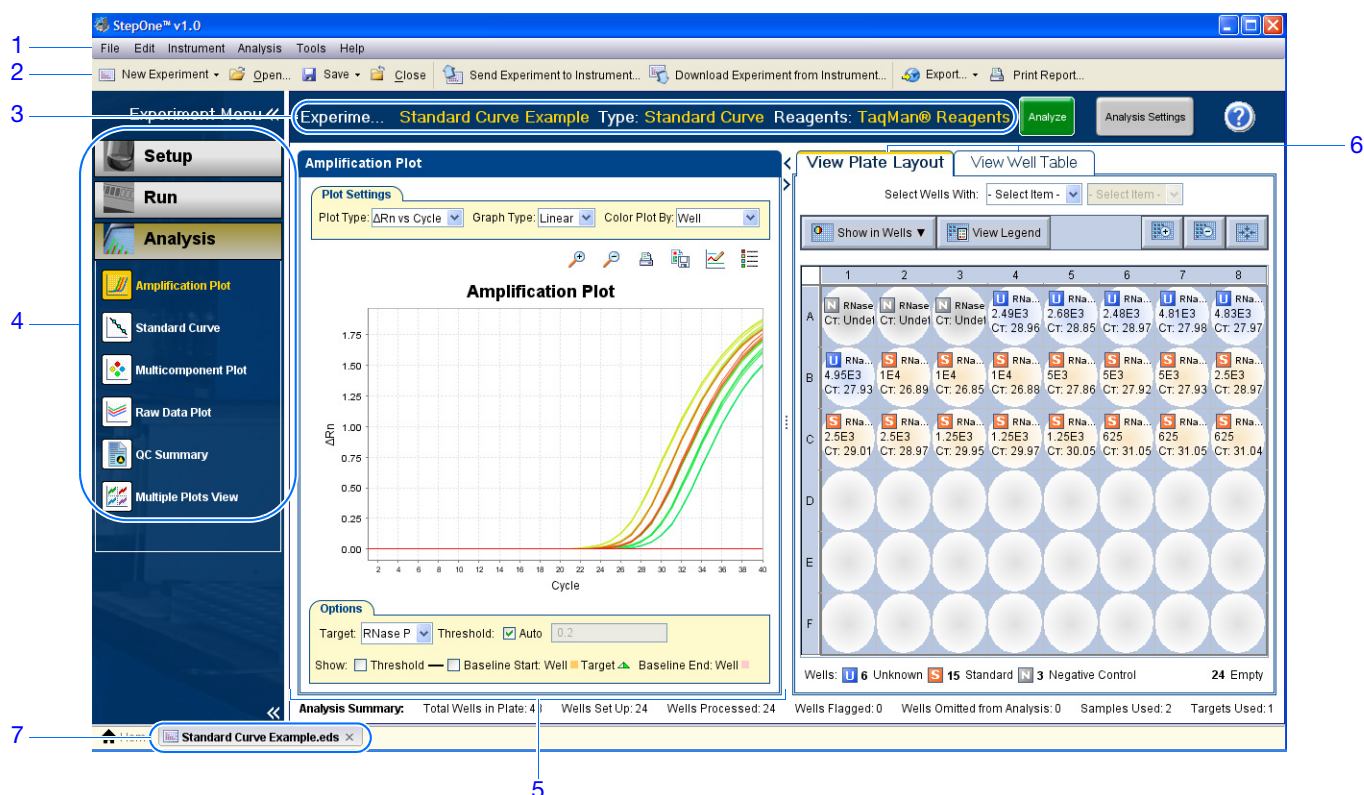
Notas

Elementos del software

A continuación, se ilustran los elementos del software StepOne de las pantallas de análisis.

1. Barra de menús: muestra los menús disponibles en el software:
 - File (Archivo)
 - Edit (Edición)
 - Instrument (Instrumento)
 - Analysis (Análisis)
 - Tools (Herramientas)
 - Help (Ayuda)
2. Barra de herramientas: muestra las herramientas disponibles en el software:
 - New Experiment (Experimento nuevo)
 - Open (Abrir)
 - Save (Guardar)
 - Close (Cerrar)
 - Send Experiment to Instrument (Enviar experimento a instrumento)
 - Download Experiment from Instrument (Descargar experimento de instrumento)
 - Export (Exportar)
 - Print Report (Imprimir informe)
3. Encabezamiento del experimento: indica el nombre del experimento, el tipo de experimento y los reactivos del experimento abierto.
4. Panel de menús del experimento: incluye vínculos a las siguientes pantallas del software:
 - Pantallas de configuración
 - Pantallas de proceso
 - Pantallas de análisis:
 - Gráfica de amplificación
 - Curva estándar
 - Gráfica multicomponente
 - Gráfica de datos brutos
 - Resumen QC
 - Vista de múltiples gráficas
5. Panel de gráficas: muestra la pantalla de análisis seleccionada para el experimento abierto.
6. Fichas de visualización: muestra la disposición de la placa o la tabla de pocillos del experimento abierto.
7. Fichas del experimento: muestra una ficha por cada experimento abierto.

Notas _____

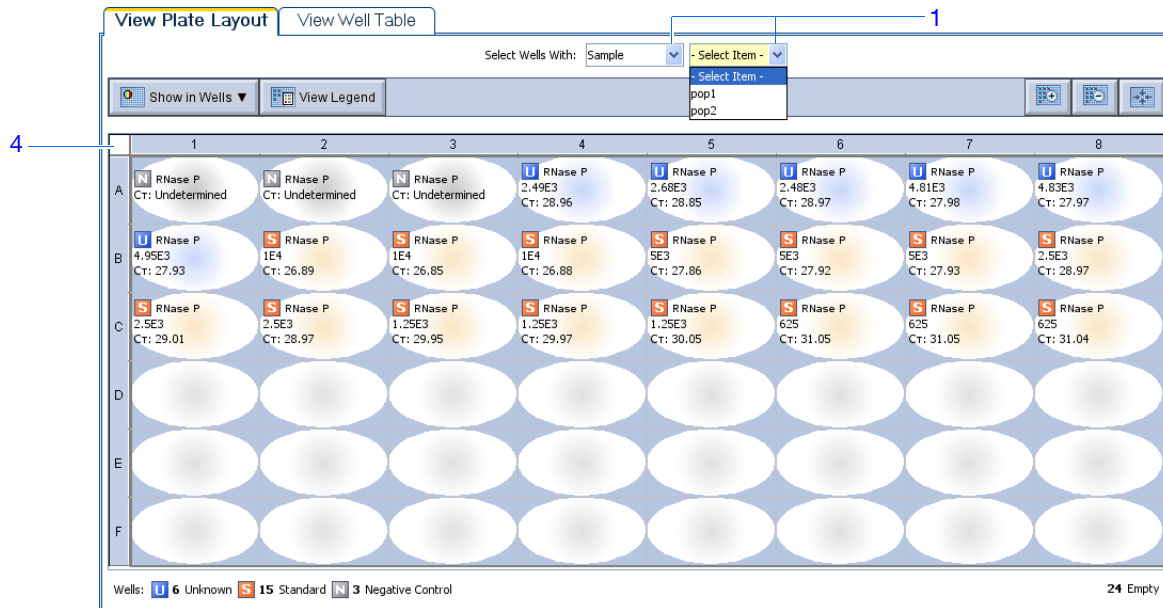


Consejos de desplazamiento

Cómo seleccionar pocillos

Para ver pocillos específicos en las pantallas de análisis, seleccione los pocillos en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa) de la siguiente manera:

1. Para seleccionar pocillos de un tipo específico, utilice los menús desplegables Select Wells With (Seleccionar pocillos con): Seleccione **Sample** (Muestra), **Target** (Diana) o **Task** (Tarea) y, a continuación, seleccione el nombre de la muestra, el gen diana o la tarea.
2. Para seleccionar un solo pocillo, haga clic en él en la disposición de la placa.
3. Para seleccionar varios pocillos, haga clic y arrastre el ratón por encima de los pocillos deseados, pulse **CTRL+clic**, o pulse **Mayús+clic** en la disposición de la placa.
4. Para seleccionar los 48 pocillos, haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa.

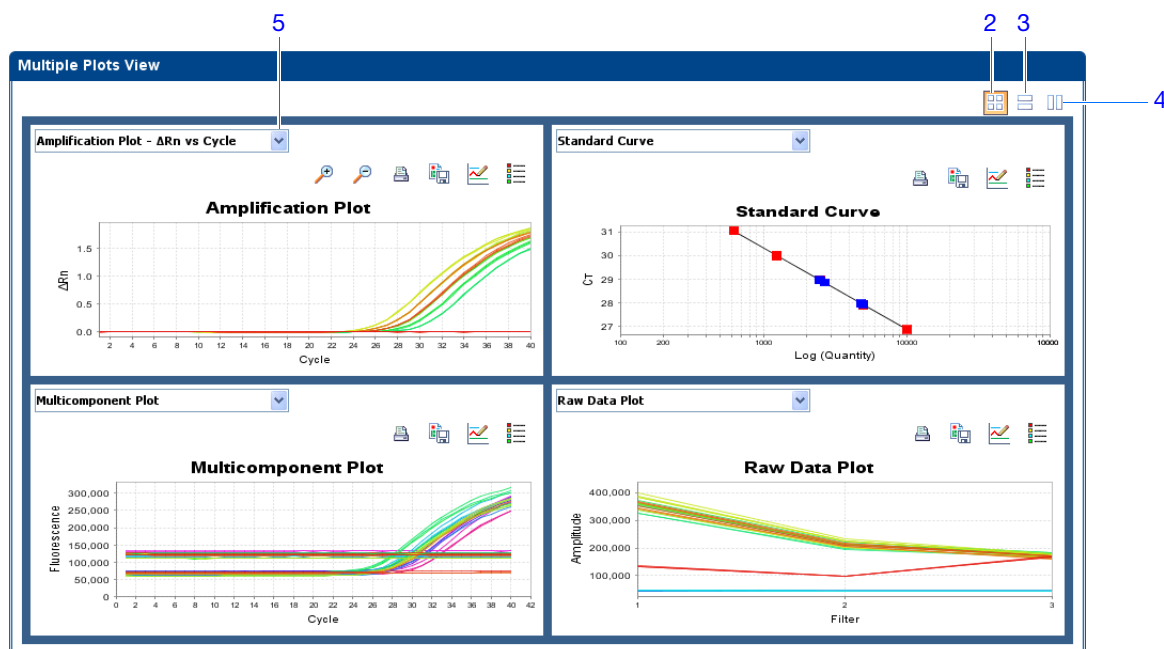


Cómo ver múltiples gráficas

Utilice la pantalla Multiple Plots para ver simultáneamente hasta cuatro gráficas. Para desplazarse por la pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas):

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ► **Multiple Plots View** (Vista de múltiples gráficas).
2. Para ver cuatro gráficas, haga clic en **Show plots in a 2 × 2 matrix** (Mostrar gráficas en una matriz de 2X2).
3. Para ver dos gráficas en filas, haga clic en **Show plots in two rows** (Ver gráficas en dos filas).
4. Para ver dos gráficas en columnas, haga clic en **Show plots in two columns** (Ver gráficas en dos columnas).

- Para ver una gráfica específica, seleccione la gráfica en el menú desplegable situado encima de la visualización de cada gráfica.



Visualización de la curva estándar

La pantalla Standard Curve (Curva estándar) muestra la curva estándar de las muestras designadas como estándares. El software StepOne calcula la cantidad de un gen diana desconocido a partir de la curva estándar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de ejemplo de la curva estándar, se puede revisar la pantalla Standard Curve (Curva estándar) para los siguientes valores del coeficiente de regresión:

- Pendiente/eficiencia de amplificación
- Valor R^2 (coeficiente de correlación)
- Valores C_T

Visualización de la curva estándar

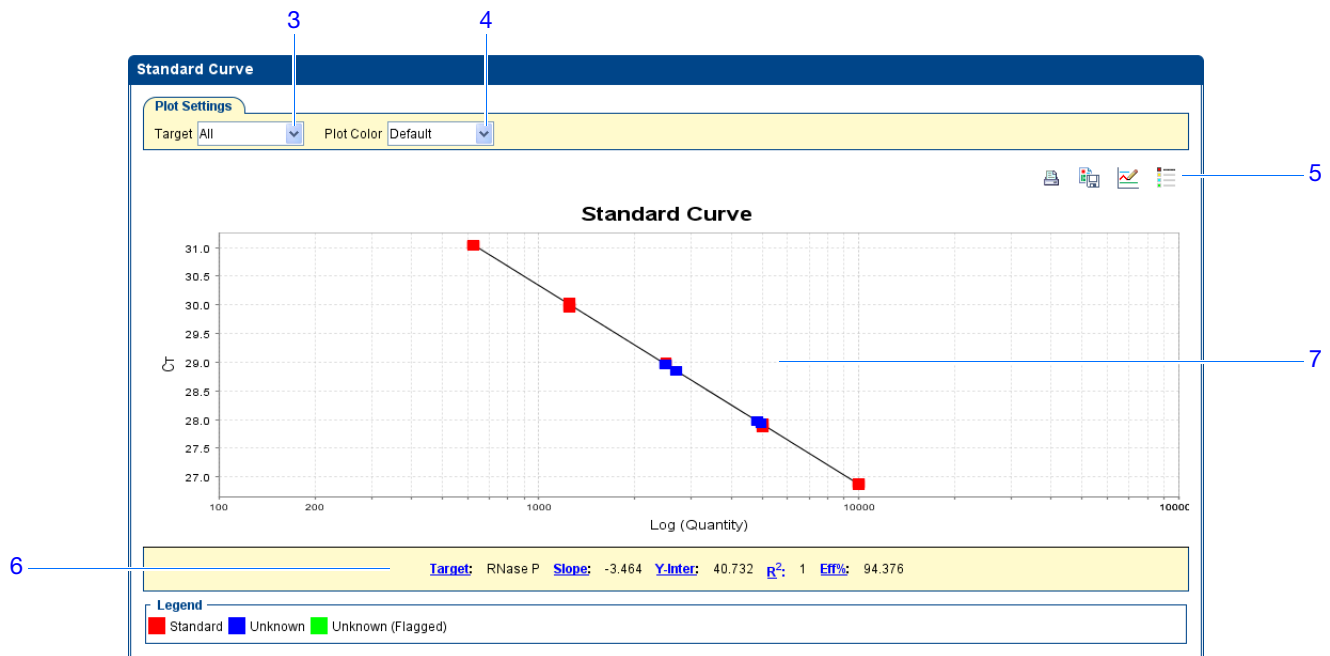
- En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ► **Standard Curve** (Curva estándar).

Nota: Si en la pantalla Standard Curve (Curva estándar) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

- Para ver los 48 pocillos en la pantalla Standard Curve (Curva estándar), haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).

Notas

3. En el menú desplegable Target (Diana), seleccione **All** (Todas).
4. En el menú desplegable Plot Color (Color de gráfica), seleccione **Default** (Predeterminado).
5. Haga clic en  **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).
6. Observe los valores que se muestran bajo la curva estándar. En el experimento de ejemplo, los valores del gen diana (RNase P) se encuentran en rangos aceptables:
 - La pendiente es $-3,464$.
 - El valor R^2 es 1.
 - La eficiencia de amplificación (Eff%) es del 94,376%.
7. Compruebe si todas las muestras están en la curva estándar. En el experimento de ejemplo, todas las muestras (puntos azules) están dentro de la curva estándar (puntos rojos).



8. Compruebe los valores C_T :
 - a. Haga clic en la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).
 - b. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Replicado).
 - c. Fíjese en los valores de la columna C_T . En el experimento de ejemplo, los valores C_T están dentro del rango esperado (>8 y <35).

8a

8b

8c

#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	Quantity
RNase P													
1	A1	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	0	0.617	0		
2	A2	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	0	0.563	-0		
3	A3	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	0	0.583	0.005		
RNase P - 10000.0													
4	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.890259	26.874556	0.021	2.422	1.851	10.0
5	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.85095	26.874556	0.021	2.464	1.874	10.0
6	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.882454	26.874556	0.021	2.459	1.873	10.0
RNase P - 1250.0													
7	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.949043	29.989813	0.053	2.208	1.622	1.0
8	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.9701	29.989813	0.053	2.229	1.643	1.0
9	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	30.050293	29.989813	0.053	2.176	1.601	1.0
RNase P - 2500.0													
10	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.97373	28.981377	0.021	2.264	1.705	2.0
11	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.005375	28.981377	0.021	2.338	1.71	2.0
12	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.965023	28.981377	0.021	2.28	1.698	2.0
RNase P - 5000.0													
13	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.860065	27.904566	0.039	2.413	1.834	5.0
14	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.921917	27.904566	0.039	2.391	1.818	5.0
15	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.931719	27.904566	0.039	2.366	1.801	5.0
RNase P - 625.0													
16	C6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	31.05255	31.04659	0.01	2.074	1.499	1.0

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar, fíjese en:

- **Valores de pendiente/eficiencia de amplificación:** la eficiencia de la amplificación se calcula utilizando la pendiente de la recta de regresión en la curva estándar. Una pendiente próxima al $-3,3$ indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. Factores que afectan a la eficiencia de la amplificación:
 - Rango de cantidades de estándar: para obtener mediciones más precisas de la eficiencia, utilice un amplio rango de cantidades de estándar, de entre 5 y 6 registros. (10^5 a 10^6).
 - Número de replicados estándar: para obtener mediciones más precisas de la eficiencia, incluya replicados para reducir los efectos de las imprecisiones del pipeteado.
 - Apantalladores de la PCR: los apantalladores de la PCR de la reacción pueden reducir la eficiencia de la amplificación.
- **Valores R^2 (coeficiente de correlación):** el valor R^2 mide la proximidad del ajuste entre la recta de regresión y los puntos de datos C_T individuales de las reacciones estándar. El valor 1,00 indica un ajuste perfecto entre la recta de regresión y los puntos de datos. Es deseable que el valor R^2 sea $>0,99$.
- **Valores C_T :** el ciclo umbral (C_T) es el número de ciclo de PCR en el que el nivel de fluorescencia alcanza la línea umbral. Es deseable que el valor C_T sea >8 y <35 . Si el valor C_T es <8 , eso indica que en la reacción hay demasiada molde. Si el valor C_T es >35 , eso indica que en la reacción hay poca cantidad de diana; si los valores C_T son >35 , es de esperar que haya una desviación estándar mayor.

Si el experimento no cumple las directrices anteriores, solucione los problemas de la siguiente forma:

Notas

- Omite pocillos (consulte “[Omisión pocillos en el análisis](#)” en la página 103).
O
- Vuelva a realizar el experimento.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Standard Curve (Curva estándar), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.
- La eficiencia de la amplificación, consulte *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

Revisión de la gráfica de amplificación

En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), se muestra la amplificación de todas las muestras de los pocillos seleccionados. Hay disponibles tres gráficas:

- **ΔR_n vs Cycle** (ΔR_n y ciclo): ΔR_n es la magnitud de la señal de fluorescencia normalizada que genera el proceso de PCR y son los datos a partir de los cuales se calcula C_T . En esta gráfica, ΔR_n se muestra en función del número de ciclo. La gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares y para ver los valores de la línea umbral y de la línea basal del proceso.
- **R_n vs Cycle** (R_n y ciclo): R_n es la fluorescencia de fluorocromo del notificador normalizada. En esta gráfica, R_n se muestra en función del número de ciclo. La gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares.
- **C_T vs Well** (C_T y pocillo): el ciclo del umbral (C_T) es el número de ciclo de PCR en el cual el nivel de fluorescencia alcanza la línea umbral. En esta gráfica, C_T se muestra en función de la posición del pocillo. La gráfica sirve para localizar amplificaciones con valores atípicos.

Cada gráfica se puede ver de las siguientes formas: lineal o log10.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, hay que revisar la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) para buscar:

- Valores correctos de la línea umbral y de la línea basal
- Valores atípicos

Revisión de la gráfica de amplificación

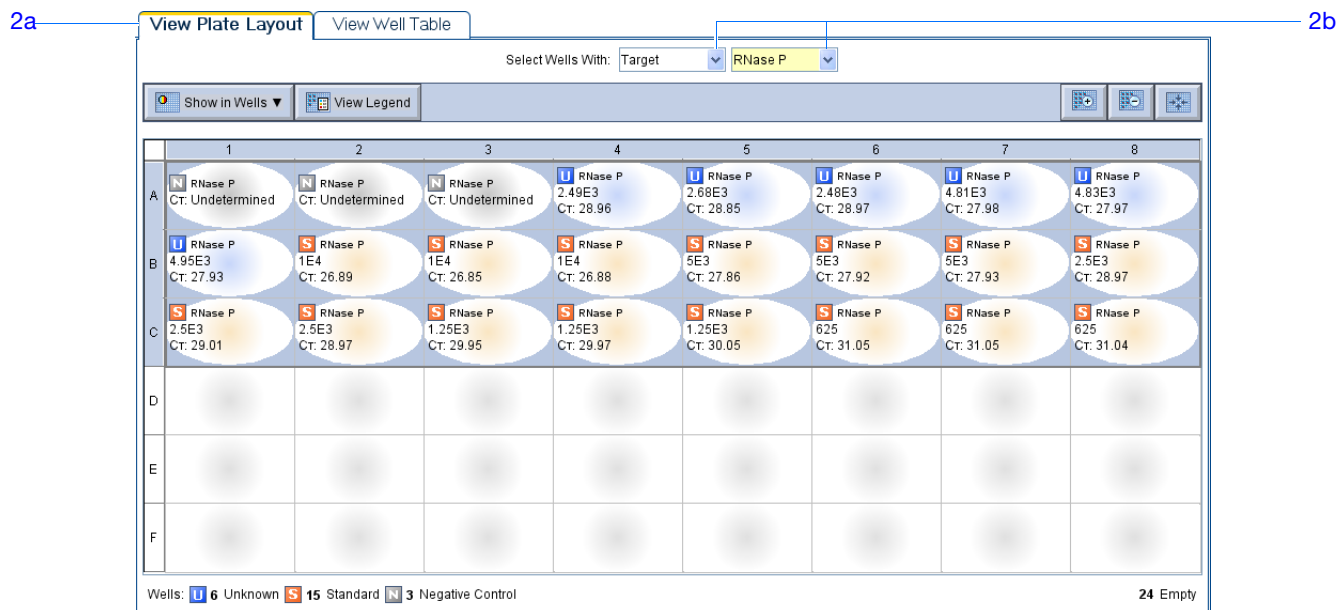
1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ►  **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Observe los pocillos de RNase P en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación):
 - a. Haga clic en la ficha **View Plate Layout** (Ver disposición de placa).

Notas _____

- b. En los menús desplegables Select Wells With (Seleccionar pocillos con), seleccione **Target** (Diana) y, a continuación, **RNase P**.



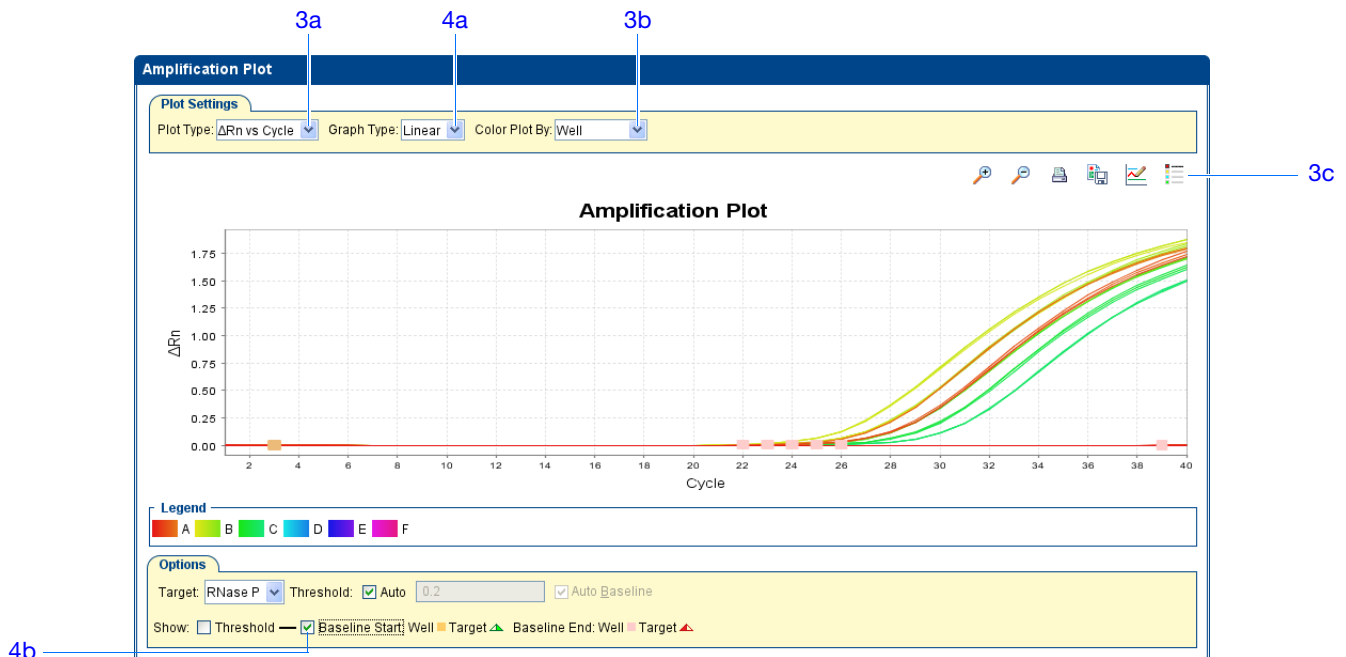
3. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación):

- En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione ΔR_n vs Cycle (R_n y ciclo).
- En el menú desplegable Color Plot By (Colorear gráfica por), seleccione **Well** (Pocillo).
- Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

4. Observe los valores de la línea basal:

- En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Linear** (Lineal).
- Active la casilla de verificación **Baseline** (Línea basal) para ver el comienzo y el final del ciclo.
- Compruebe que la línea basal está ajustada correctamente. En el experimento del ejemplo, la línea basal se ajusta antes de que se inicie la amplificación.

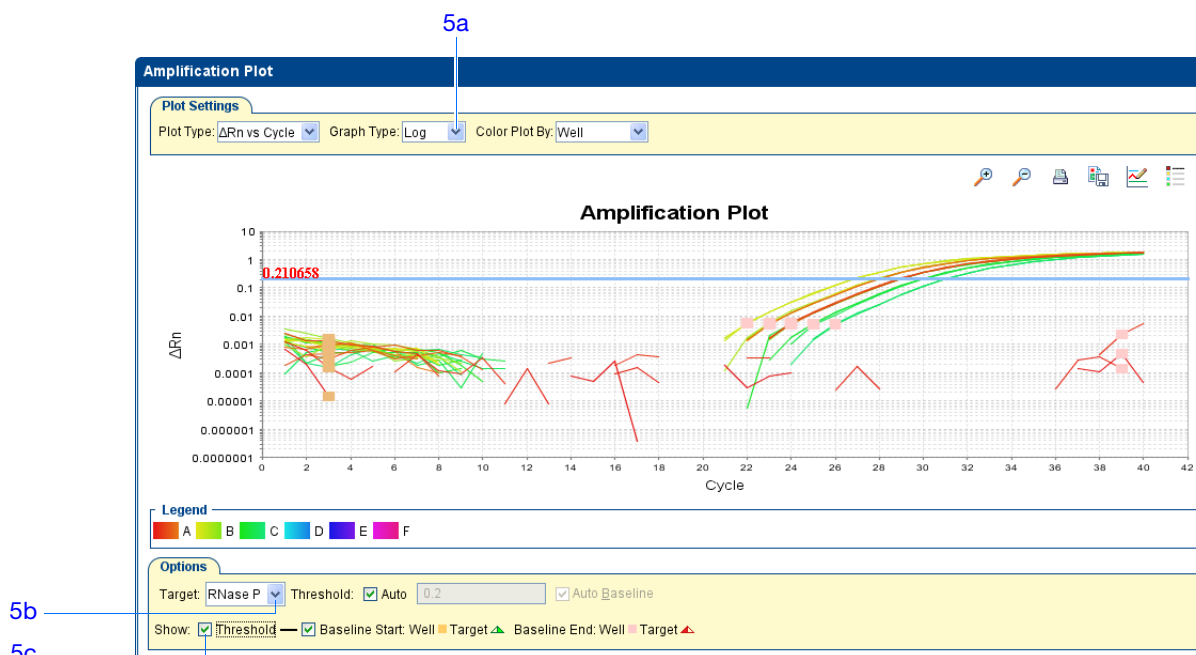
Notas



5. Observe los valores de la línea umbral:

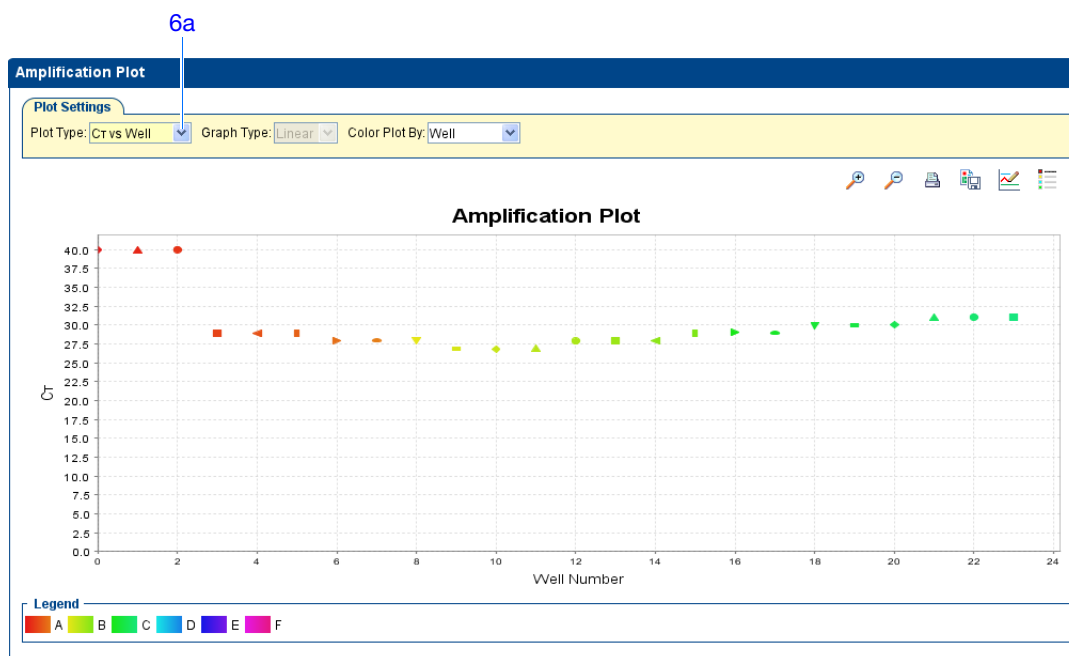
- En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Log** (Registro).
- En el menú desplegable Target (Diana), seleccione **RNase P**.
- Active la casilla de verificación **Threshold** (Umbral) para ver la línea umbral.
- Compruebe que el umbral se haya alcanzado correctamente. En el experimento de ejemplo, la línea umbral está en la fase exponencial.

Notas _____



6. Busque cualquier valor atípico:

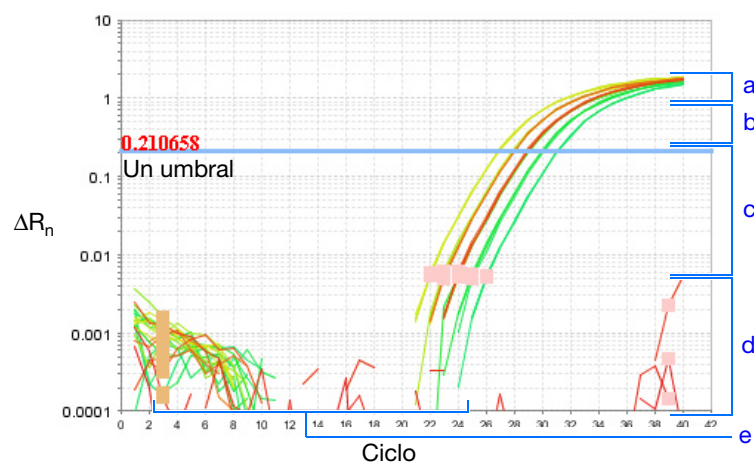
- En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione C_T vs Well (C_T y pocillo).
- Busque pocillos fuera de la curva de amplificación. En el experimento de ejemplo, no hay valores atípicos para RNase P.



Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar, fíjese en:

- Los valores correctos de la línea basal y la línea umbral: el software StepOne calcula automáticamente los valores de líneas basal y umbral dando por hecho que los datos tienen una gráfica de amplificación *típica*. Las gráficas de amplificación típicas poseen:
 - a. Una fase de meseta
 - b. Una fase lineal
 - c. Una fase exponencial (geométrica)
 - d. Ruido de fondo
 - e. Una línea basal



¡IMPORTANTE! Los errores en el experimento (por ejemplo, errores de contaminación o pipeteado) pueden producir curvas de amplificación atípicas que pueden derivarse en cálculos incorrectos de los valores de líneas basal y umbral por parte del software StepOne. Por lo tanto, Applied Biosystems recomienda examinar la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) y revisar los valores de líneas basal y umbral asignados a cada pocillo después del análisis.

- Valores atípicos

Si el experimento no cumple las directrices anteriores, solucione los problemas de la siguiente forma:

- Ajuste manualmente la línea basal y/o la línea umbral (consulte [“Revisión de las opciones de análisis” en la página 98](#)).

O

- Omite pocillos (consulte [“Omisión pocillos en el análisis” en la página 103](#)).

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), acceda al software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Revisión de la tabla de pocillos

En la tabla de pocillos, se muestran datos de cada pocillo de la placa de reacción, incluidos:

- El nombre de la muestra, el nombre del gen diana, la tarea y los fluorocromos
- El ciclo del umbral calculado (C_T), la fluorescencia normalizada (R_n) y los valores de cantidades
- Comentarios
- Avisos

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, hay que fijarse en lo siguiente en la tabla de pocillos:

- Valores de cantidades
- Avisos
- Valores C_T (incluida la desviación estándar de C_T)

Revisión de la tabla de pocillos

1. En el panel Experiment Menu (Menú de experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) y, a continuación, la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).

Nota: Si en la tabla de pocillos no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Utilice el menú Group By (Agrupar por) para agrupar los pocillos por una categoría específica. Para el experimento de ejemplo, agrupe los pocillos por replicado, aviso o valor C_T .

Nota: Sólo se puede seleccionar una categoría a la vez.

- a. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Replicado). El software agrupa los pocillos de replicados: controles negativos, estándares y muestras. En el experimento de ejemplo, fíjese en que los valores de cantidades de cada grupo de replicados son similares.

Nota: En el experimento de ejemplo, las columnas Quantity (Cantidad), Quantity Mean (Media de cantidad) y Quantity SD (SD de cantidad) se han movido de sus lugares originales al principio de la tabla de pocillos. Para mover una columna, haga clic y arrastre su encabezado.

Notas

2a

View Plate Layout

View Well Table

Select Wells With:

- Select Item -

- Select Item -

Show in Table ▼ Group By ▼

Expand All Collapse

#	Well	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD
RNase P													
1	A1				☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
2	A2				☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
3	A3				☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
RNase P - 10000.0													
4	B2	10,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0
5	B3	10,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0
6	B4	10,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0
RNase P - 1250.0													
7	C3	1,250			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0
8	C4	1,250			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0
9	C5	1,250			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0
RNase P - 2500.0													
10	B8	2,500			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0
11	C1	2,500			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0
12	C2	2,500			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0
RNase P - 5000.0													
13	B5	5,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0
14	B6	5,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0
15	B7	5,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0
RNase P - 625.0													
16	C6	625			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	
17	C7	625			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	

- b. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Flag** (Avisos). El software agrupa los pocillos con y sin avisos. En el experimento de ejemplo, no hay ningún pocillo marcado.

2b

View Plate Layout

View Well Table

Select Wells With:

- Select Item -

- Select Item -

Show in Table ▼

Group By ▼

Expand All

Collapse

#	Well	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	Quantity	C
Unflagged Wells														
1	A1	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined			0	0.617	0	
2	A2	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined			0	0.563	-0	
3	A3	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined			0	0.583	0.005	
4	A4	☐		pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	28.962868	28.928793	0.065	2.296	1.72	2,494.306	
5	A5	☐		pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	28.853785	28.928793	0.065	2.344	1.764	2,681.857	
6	A6	☐		pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	28.96972	28.928793	0.065	2.313	1.739	2,482.971	
7	A7	☐		pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	27.976233	27.958857	0.024	2.366	1.796	4,805.449	
8	A8	☐		pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	27.96848	27.958857	0.024	2.355	1.789	4,830.276	
9	B1	☐		pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	27.931858	27.958857	0.024	2.426	1.796	4,949.284	
10	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0.021	2.422	1.851	10,000	
11	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0.021	2.464	1.874	10,000	
12	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0.021	2.459	1.873	10,000	
13	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0.039	2.413	1.834	5,000	
14	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0.039	2.391	1.818	5,000	
15	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0.039	2.366	1.801	5,000	
16	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0.021	2.264	1.705	2,500	
17	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0.021	2.338	1.71	2,500	
18	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0.021	2.28	1.698	2,500	
19	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0.053	2.208	1.622	1,250	
20	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0.053	2.229	1.643	1,250	
21	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0.053	2.176	1.601	1,250	
22	C6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0.01	2.074	1.400	625	

Notas

- c. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione C_T . El software agrupa los pocillos por el valor C_T : bajo, medio, alto y sin determinar. En el experimento de ejemplo, los valores C_T están dentro del rango esperado (>8 y <35).

2c

#	Well	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	Quantity
Low (Ct less than 24)													
Medium (Ct from 24 to 30)													
1	A4	☐		pop1	RNase P	UNI:OWN	FAM-NFQ-MGB	28.962868	28.928793	0.065	2.296	1.72	2,494.306
2	A5	☐		pop1	RNase P	UNI:OWN	FAM-NFQ-MGB	28.853785	28.928793	0.065	2.344	1.764	2,681.857
3	A6	☐		pop1	RNase P	UNI:OWN	FAM-NFQ-MGB	28.96972	28.928793	0.065	2.313	1.739	2,482.971
4	A7	☐		pop2	RNase P	UNI:OWN	FAM-NFQ-MGB	27.976233	27.958857	0.024	2.366	1.796	4,805.445
5	A8	☐		pop2	RNase P	UNI:OWN	FAM-NFQ-MGB	27.96848	27.958857	0.024	2.355	1.789	4,830.276
6	B1	☐		pop2	RNase P	UNI:OWN	FAM-NFQ-MGB	27.931858	27.958857	0.024	2.426	1.796	4,949.284
7	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0.021	2.422	1.851	10,000
8	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0.021	2.464	1.874	10,000
9	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0.021	2.459	1.873	10,000
10	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0.039	2.413	1.834	5,000
11	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0.039	2.391	1.818	5,000
12	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0.039	2.366	1.801	5,000
13	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0.021	2.264	1.705	2,500
14	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0.021	2.338	1.71	2,500
15	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0.021	2.28	1.698	2,500
16	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0.053	2.208	1.622	1,250
17	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0.053	2.229	1.643	1,250
High (Ct greater than 30)													
18	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0.053	2.176	1.601	1,250
19	C6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0.01	2.074	1.499	625
20	C7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0.01	2.074	1.499	625

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar, agrupe los pocillos por:

- **Replicado:** el software agrupa los pocillos por replicado: controles negativos, estándares y muestras. Fíjese en las columnas Quantity (Cantidad) para asegurarse de que los valores de cantidades de cada grupo de replicados son similares. Eso indica una gran precisión.
- **Aviso:** el software agrupa los pocillos marcados y no marcados. El aviso indica que el software ha encontrado un error en el pocillo marcado. Para leer una descripción de los avisos del software StepOne, consulte [“Revisión del resumen QC” en la página 100](#).
- **Valores C_T :** el ciclo del umbral (C_T) es el número de ciclo de PCR en el que el nivel de fluorescencia alcanza la línea umbral. Es deseable que el valor C_T sea >8 y <35 . Si el valor C_T es <8 , eso indica que en la reacción hay demasiado molde. Si el valor C_T es >35 , eso indica que en la reacción hay poca cantidad de diana; si los valores C_T son >35 , es de esperar que haya una desviación estándar mayor.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la tabla de pocillos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Presentación de los datos

Hay distintas formas de presentar los datos del experimento:

- Guardando la gráfica como un archivo de imagen
- Imprimiendo la gráfica
- Imprimiendo la disposición de la placa
- Creando diapositivas
- Imprimiendo un informe
- Exportando datos

Para obtener más información acerca de estos procedimientos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Sección 5.2 Solución de problemas (si es preciso)

Esta sección cubre los siguientes temas:

- Revisión de las opciones de análisis 98
- Revisión del resumen QC 100
- Omisión pocillos en el análisis 103
- Revisión de la gráfica multicomponente 105
- Revisión de la gráfica de datos brutos 108

Notas _____

Revisión de las opciones de análisis

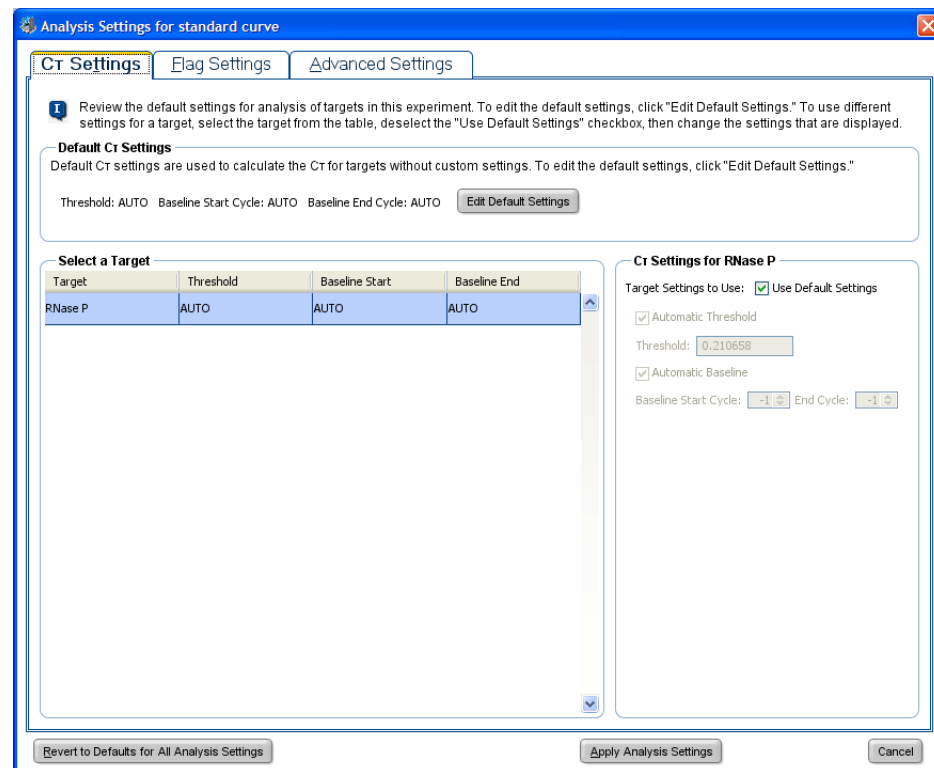
El cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis) muestra las opciones de análisis del ciclo del umbral (C_T), los avisos y las opciones avanzadas. Si las opciones de análisis predeterminadas del software StepOne no son adecuadas para el experimento, puede cambiarlas en el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis) y, a continuación, volver a analizar el experimento.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, se utilizan las opciones de análisis predeterminadas sin ningún cambio.

Revisión de las opciones de análisis

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis).
2. Haga clic en **Analysis Settings** (Opciones de análisis) para abrir el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis).
3. En el experimento de ejemplo, se utilizan opciones de análisis para cada ficha:
 - C_T Settings (Opciones de C_T)
 - Flag Settings (Opciones de avisos)
 - Advanced Settings (Opciones avanzadas)



Notas

Directrices de análisis

A menos que ya haya determinado cuál son las opciones óptimas para el experimento, utilice las opciones de análisis predeterminadas en el software StepOne. Si las opciones predeterminadas no son adecuadas para el experimento, puede cambiar:

- **C_T Settings** (Opciones de C_T): utilice esta ficha para ajustar manualmente la línea umbral y la línea basal. Si ajusta manualmente las líneas umbral y basal, Applied Biosystems recomienda lo siguiente:

Opción	Recomendación
Línea umbral	Introduzca un valor para la línea umbral de manera que: • Esté por encima del fondo. • Esté por debajo de las regiones de meseta y lineal de la curva de amplificación. • Esté dentro de la fase exponencial de la curva de amplificación.
Línea basal	Seleccione los valores Start Cycle (Iniciar ciclo) y End Cycle (Terminar ciclo) antes de que comience la amplificación.

- **Flag Settings** (Opciones de avisos): utilice esta ficha para:
 - Ajustar la sensibilidad para que se marquen más o menos pocillos.
 - Cambiar los avisos que aplica el software StepOne.
- **Advanced Settings** (Opciones avanzadas): utilice esta ficha para cambiar las opciones de línea basal pocillo a pocillo.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de las opciones de análisis, acceda al software StepOne pulsando **F1** cuando se abra el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis).

Notas

Revisión del resumen QC

La pantalla QC Summary (Resumen QC) muestra una lista de avisos del software StepOne, e incluye la frecuencia y ubicación de esos avisos en el experimento abierto.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, hay que revisar la pantalla QC Summary (Resumen QC) para saber si los datos del experimento han desencadenado algún aviso. En el experimento de ejemplo, no se ha desencadenado ningún aviso.

Revisión del resumen QC

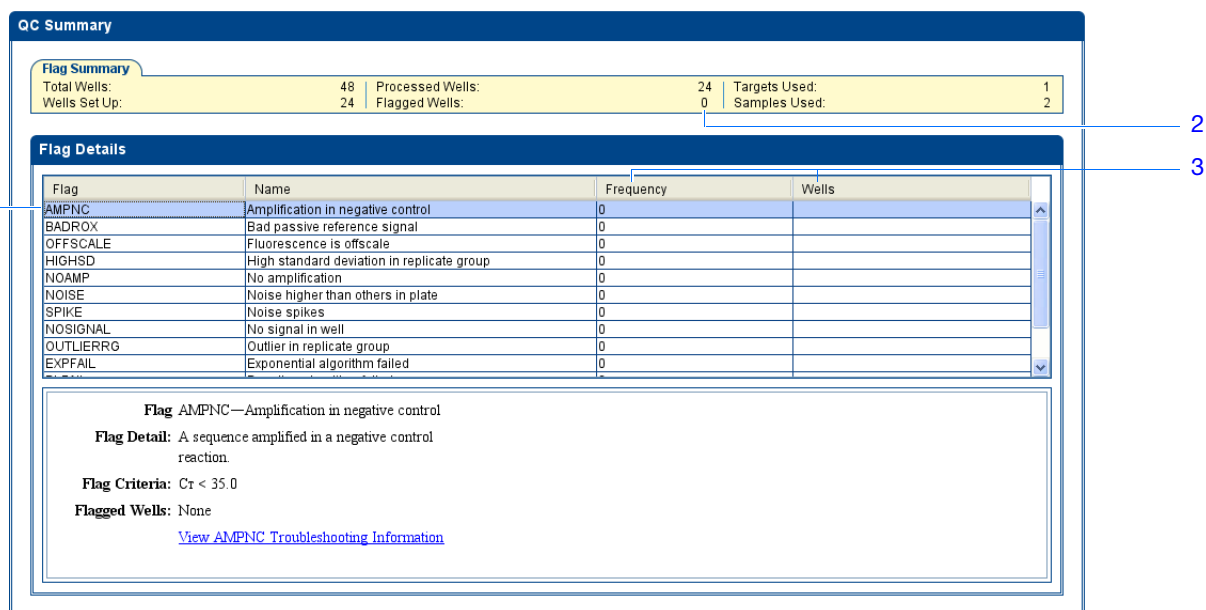
1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ►  **QC Summary** (Resumen QC).

Nota: Si en la pantalla QC Summary (Resumen QC) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Revise el resumen de avisos. En el experimento de ejemplo, no hay ningún pocillo marcado.
3. En la tabla Flag Details (Detalles de aviso), observe las columnas Frequency (Frecuencia) y Wells (Pocillos) para determinar qué avisos aparecen en el experimento. En el experimento de ejemplo, en la columna Frequency (Frecuencia) se muestra 0 en todas las columnas.

Nota: Un valor 0 en la columna Frequency (Frecuencia) indica que el aviso no aparece en el experimento.

4. (Opcional) Haga clic en cada fila de avisos para ver información detallada acerca del aviso.



QC Summary

Flag Summary

Total Wells:	48	Processed Wells:	24	Targets Used:	1
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	0	Samples Used:	2

Flag Details

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	

Flag AMPNC—Amplification in negative control

Flag Detail: A sequence amplified in a negative control reaction.

Flag Criteria: Cr < 35.0

Flagged Wells: None

[View AMPNC Troubleshooting Information](#)

Posibles avisos En los experimentos de curva estándar, los datos del experimento pueden desencadenar los avisos que se indican a continuación.

Si en el experimento no aparece un aviso, su frecuencia será 0. Si la frecuencia es >0, eso significa que el aviso aparece en algún lugar del experimento; la posición del pocillo se indica en la columna Wells (Pocillos).

aviso	Descripción
AMPNC	Amplificación en control negativo
BADROX	Señal de referencia pasiva incorrecta
BLFAIL	Error del algoritmo de línea basal
CTFAIL	Error del algoritmo C_T
EXPFAIL	Error del algoritmo exponencial
HIGHSD	Desviación estándar alta en el grupo de replicados
NOAMP	No hay amplificación
NOISE	Ruido mayor que otros en la placa
NOSIGNAL	No hay señal en el pocillo
OFFSCALE	La fluorescencia está fuera de la escala
OUTLIERRG	Valor atípico en el grupo de replicados
SPIKE	Picos de ruido
THOLDFAIL	Error en el algoritmo de la línea umbral

Notas _____

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar:

- Haga clic en cada indicador de la tabla Flag Details (Detalles de avisos) con una frecuencia >0 para ver información detallada acerca del indicador. Si es necesario, haga clic en el vínculo de solución de problemas para saber cómo corregir el indicador.
- Puede cambiar las opciones de los indicadores:
 - Ajustar la sensibilidad para que se marquen más o menos pocillos.
 - Cambiar los avisos que aplica el software StepOne.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla QC Summary (Resumen QC) o de las opciones de avisos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Notas _____

Omisión pocillos en el análisis

Errores experimentales pueden causar que algunos pocillos se amplifiquen de manera insuficiente o no se amplifiquen. Estos pocillos suelen producir valores C_T que difieren significativamente de los valores medios de los pocillos de replicados asociados. Si se incluyen en los cálculos, estos valores atípicos pueden dar lugar a mediciones erróneas; para garantizar la precisión, omita los valores atípicos del análisis.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, no hay valores atípicos; no es necesario quitar ningún pocillo del análisis.

Omisión de pocillos

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ►  **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione **C_T vs Well** (C_T y pocillo) en el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica).
3. Seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).
4. En la tabla de pocillos:
 - a. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Replicado).
 - b. Fíjese si en el grupo de replicados hay algún valor atípico (asegúrese de que presentan un aviso). En el experimento de ejemplo, no hay ningún valor atípico.

Notas _____

3

4a

View Plate Layout View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Table Group By Expand All Collapse

#	Well	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Cr	Cr Mean	Cr SD
RNase P													
1	A1				☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
2	A2				☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
3	A3				☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
RNase P - 10000.0													
4	B2	10,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0
5	B3	10,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0
6	B4	10,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0
RNase P - 1250.0													
7	C3	1,250			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0
8	C4	1,250			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0
9	C5	1,250			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0
RNase P - 2500.0													
10	B8	2,500			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0
11	C1	2,500			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0
12	C2	2,500			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0
RNase P - 5000.0													
13	B5	5,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0
14	B6	5,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0
15	B7	5,000			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0
RNase P - 625.0													
16	C6	625			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0
17	C7	625			☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar, fíjese bien si en los grupos de replicados hay valores atípicos. Si es necesario, quite manualmente los valores atípicos con la tabla de pocillos:

1. En el panel Experiment Menu (Menú de experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ►  **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione **C_T vs Well** (C_T y pocillo) en el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica).
3. Seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).
4. En la tabla de pocillos:
 - a. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Replicado).
 - b. Fíjese si en el grupo de replicados hay algún valor atípico (asegúrese de que presentan un aviso).
 - c. Active la casilla de verificación **Omit** (Omitir) que hay junto a los pocillos con valores atípicos.
5. Haga clic en **Analyze** (Analizar) para volver a analizar los datos del experimento sin los pocillos con valores atípicos.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la omisión de pocillos del análisis, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**. En la ayuda, busque los temas relacionados con la omisión de pocillos:

1. Haga clic en la ficha **Search** (Buscar).
2. Escriba **omit well** (omisión de pocillos).
3. Haga clic en **List Topics** (Ver temas).
4. Haga doble clic en los temas que desee leer.

Revisión de la gráfica multicomponente

La pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) muestra la contribución espectral completa de cada fluorocromo de un pocillo seleccionado durante el tiempo que dura la reacción de PCR.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) hay que fijarse en:

- Fluorocromo ROX™ (referencia pasiva)
- Fluorocromo FAM™ (notificador)
- Picos, depresiones y/o cambios repentinos
- Amplificación en pocillos de control negativo

Revisión de la gráfica multicomponente

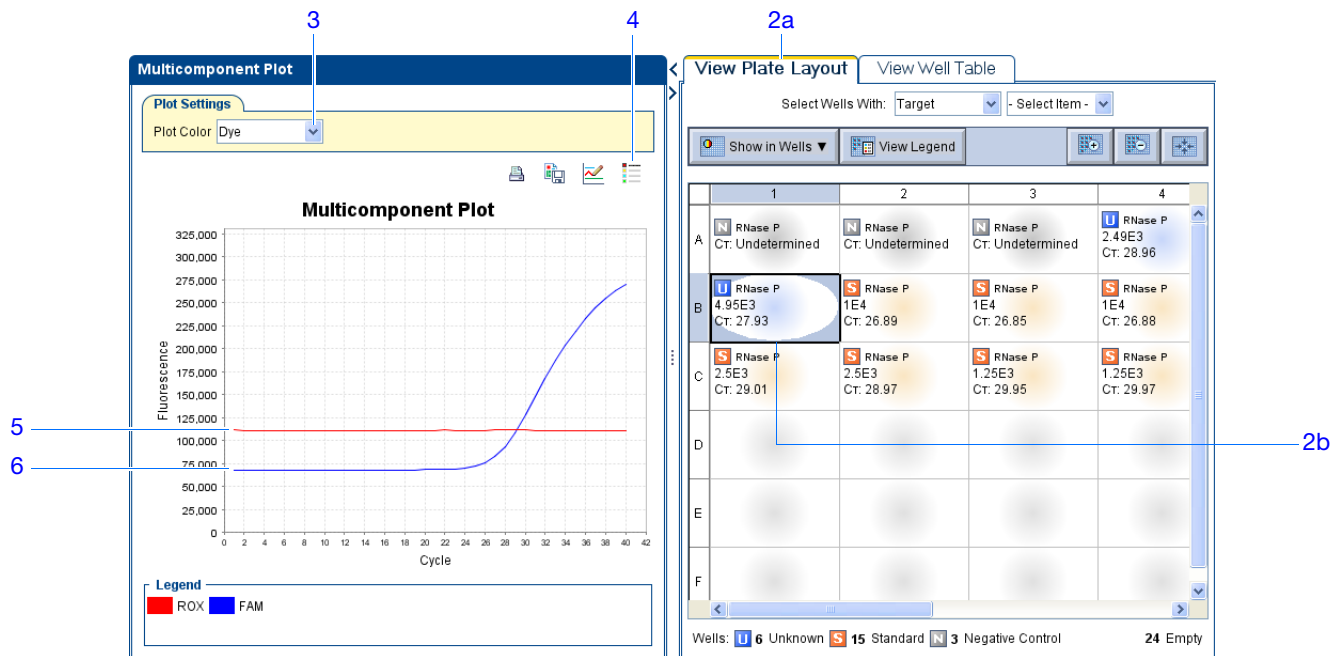
1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ►  **Multicomponent Plot** (Gráfica multicomponente).

Nota: Si en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

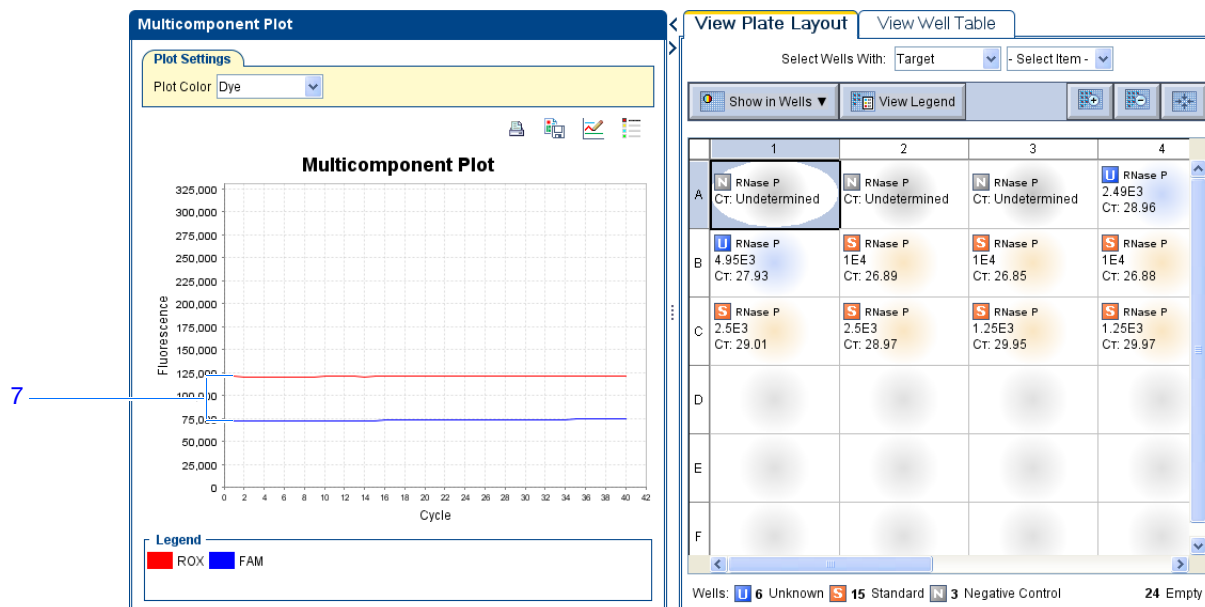
2. Muestre un solo pocillo a la vez en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente):
 - a. Haga clic en la ficha **View Plate Layout** (Ver disposición de placa).
 - b. Seleccione un pocillo en la disposición de la placa; el pocillo se muestra en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
3. En el menú desplegable Plot Color (Color de gráfica), seleccione **Dye** (Fluorocromo).
4. Haga clic en  **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).
5. Compruebe la señal del fluorocromo ROX. En el experimento de ejemplo, la señal del fluorocromo ROX permanece constante a lo largo del proceso de PCR, lo que indica que los datos son típicos.

Notas _____

6. Compruebe la señal del fluorocromo FAM. En el experimento de ejemplo, la señal del fluorocromo FAM aumenta a lo largo del proceso de PCR, lo que indica que la amplificación es normal.



7. Seleccione de uno en uno los pocillos de control negativo y compruebe la amplificación. En el experimento de ejemplo, no hay amplificación en los pocillos de control negativo.



Notas

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar, fíjese en:

- Referencia pasiva: el nivel de fluorescencia del fluorocromo de referencia pasiva debe permanecer relativamente constante a lo largo del proceso de PCR.
- Fluorocromo del notificador: el nivel de fluorescencia del fluorocromo del notificador debería indicar una región plana que se corresponde con la línea basal, seguida por un rápido aumento en la fluorescencia a medida que la amplificación continúa.
- Cualquier irregularidad de la señal: no debería haber ningún pico, depresión ni cambio súbito en la señal fluorescente.
- Pocillos de control negativo: no debería haber ninguna amplificación en los pocillos de control negativo.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en  o pulsando **F1**.

Notas _____

Revisión de la gráfica de datos brutos

En la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), se muestra la señal de fluorescencia no analizada (no normalizada) para cada filtro óptico de los pocillos seleccionados durante cada ciclo de la PCR en tiempo real.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar de ejemplo, hay que revisar la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) para comprobar si hay un aumento estable de la señal (que no hay ninguna depresión ni cambio abrupto) a partir del filtro apropiado.

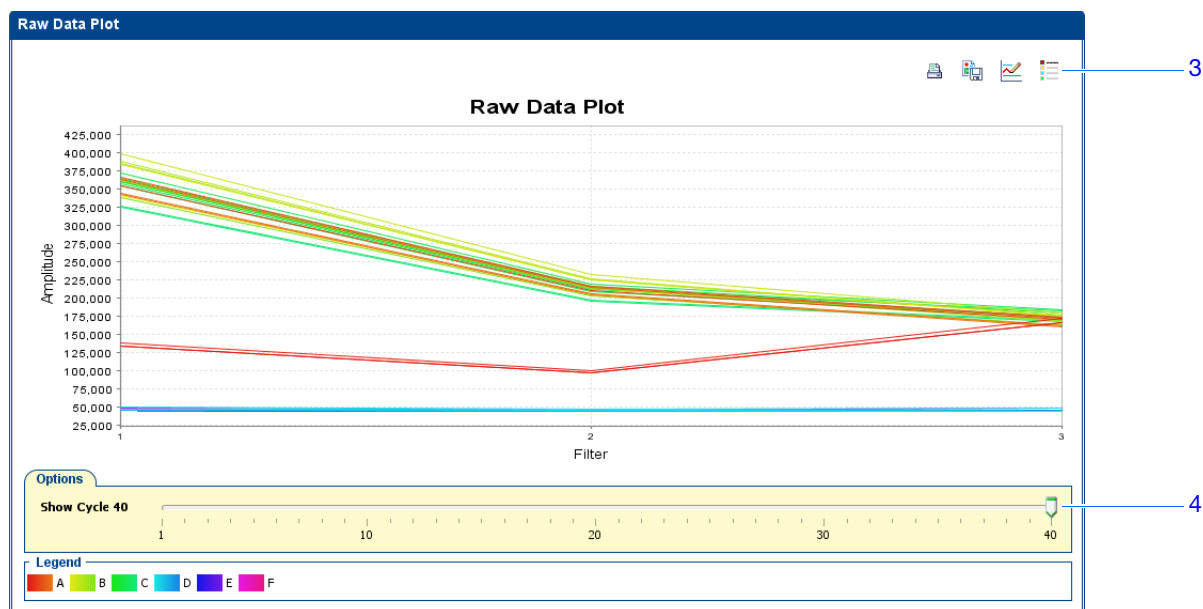
Revisión de la gráfica de datos brutos

1. En el panel Experiment Menu (Menú de experimento), seleccione **Analysis (Análisis)** ►  **Raw Data Plot** (Gráfica de datos brutos).

Nota: Si en la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Para ver los 48 pocillos en la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).
3. Haga clic en  **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).
4. Haga clic y arrastre el puntero Show Cycle (Mostrar ciclo) desde el ciclo 1 al 40. En el experimento de ejemplo, hay un aumento estable en la señal desde el filtro 1, que se corresponde con el filtro del fluorocromo FAM™.

Notas _____



Los filtros del sistema StepOne™ son:

Filtro	Fluorocromo
1	Fluorocromo FAM™
	Fluorocromo SYBR® Green
2	Fluorocromo JOE™
	Fluorocromo VIC®
3	Fluorocromo™ROX

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar, fíjese en lo siguiente para cada filtro:

- Crecimiento característico de la señal
- Depresiones o cambios abruptos

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Notas _____



Flujos de trabajo alternativos del experimento

A

Este apéndice cubre los siguientes temas:

- Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) 112
- Flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido) 113
- Flujo de trabajo utilizando moldes 114
- Flujo trabajo para la exportación/importación 115

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en  en la barra de herramientas o seleccionado **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)

Si crea un experimento de curva estándar con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) del software StepOne™, puede configurar el experimento de acuerdo con el diseño.

1. Configure un nuevo experimento:

- a. Haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▶ **All Programs** (Todos los programas) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
- b. En la columna Set Up (Configurar), haga clic en  **Advanced Setup** (Configuración avanzada).
- c. En el panel de navegación, haga clic en  **Experiment Properties** (Propiedades del experimento) (predeterminado) y, a continuación, escriba las propiedades del experimento de ejemplo.
- d. En el panel de navegación, haga clic en  **Plate Setup** (Configuración de placa) y, a continuación, asigne los genes diana, los estándares y las muestras.
- e. En el panel de navegación, haga clic en  **Run Method** (Método de proceso) y, a continuación, escriba el volumen de la reacción y cambie el perfil térmico como sea preciso.
- f. En el panel de navegación, haga clic en  **Reaction Setup** (Configuración de reacción) y, a continuación, revise los volúmenes calculados para las reacciones PCR, la dilución seriada del estándar y las diluciones de muestras. Edítelos si es preciso.
- g. (Opcional) En el panel de navegación, haga clic en  **Materials List** (Lista de materiales) y, a continuación, seleccione y compre los materiales que necesite para el experimento.

2. Prepare las reacciones PCR:

- a. Prepare el molde.
- b. Prepare las diluciones de muestra.
- c. Prepare la dilución seriada del estándar.
- d. Prepare la Mezcla de reacción.
- e. Prepare la placa de reacción.

3. Realice el experimento:

- a. Cargue la placa en el instrumento.
- b. Inicie la reacción
- c. Descargue la placa del instrumento.

4. Analice los datos.

Notas _____

Flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido)

Si crea un experimento de curva estándar con el flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido), puede procesar las reacciones en el instrumento sin ninguna información de configuración de placa.

1. Prepare las reacciones PCR:
 - a. Prepare el molde.
 - b. Prepare las diluciones de muestras.
 - c. Prepare la dilución seriada del estándar.
 - d. Prepare la Mezcla de reacción.
 - e. Prepare la placa de reacción.
2. Inicie rápidamente el experimento:
 - a. Haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▶ **All Programs** (Todos los programas) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
 - b. En la pantalla Run (Proceso), haga clic en  **QuickStart** (Inicio rápido).
 - c. Seleccione la ficha **Experiment Properties** (Propiedades del experimento) y, a continuación, escriba las propiedades del experimento.
 - d. Seleccione la ficha **Run Method** (Método de proceso) y, a continuación, escriba el volumen de la reacción y cambie el perfil térmico como sea preciso.
3. Realice el experimento:
 - a. Cargue la placa en el instrumento.
 - b. Inicie la reacción
 - c. Descargue la placa del instrumento.
4. Complete la configuración de la placa.
5. Analice los datos.

Notas _____

Flujo de trabajo utilizando moldes

Si crea un molde para un experimento de curva estándar, puede configurar muchos experimentos con la misma información de configuración.

1. Cree un molde:

- a. Haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▶ **All Programs** (Todos los programas) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
- b. Abra un experimento existente o cree uno nuevo tal y como se describe en el [Capítulo 2](#).
- c. Seleccione **File** (Archivo) ▶ **Save As Template** (Guardar como molde).
- d. En el cuadro de diálogo Save As Template (Guardar como molde), escriba un nombre de archivo y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar) para guardar el molde.
- e. Haga clic en  **Close** (Cerrar).

2. Cree un experimento utilizando el molde:

- a. Si aún no está en la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Home** (Inicio).
- b. En la columna Set Up (Configurar), haga clic en  **Template** (Molde).
- c. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), seleccione el molde que ha creado en el [paso 1](#).
- d. Modifique el experimento con las herramientas del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada).
- e. Haga clic en  **Save** (Guardar), escriba un nombre de archivo y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar) para guardar el experimento.

3. Prepare las reacciones PCR:

- a. Prepare el molde.
- b. Prepare las diluciones de muestras.
- c. Prepare la dilución seriada del estándar.
- d. Prepare la Mezcla de reacción.
- e. Prepare la placa de reacción.

4. Realice el experimento:

- a. Cargue la placa en el instrumento.
- b. Inicie el proceso
- c. Descargue la placa del instrumento.

5. Analice los datos.

Notas _____

Flujo trabajo para la exportación/importación

Si crea un experimento de curva estándar con el flujo de trabajo de exportación/importación, puede configurar un experimento nuevo con los datos exportados desde otros experimentos.

1. Haga doble clic en  (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▶ **All Programs** (Todos los programas) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
2. Abra un experimento existente o cree uno nuevo tal y como se describe en el [Capítulo 2](#).
3. Mientras el experimento está abierto, exporte la información de configuración:
 - a. Seleccione **File** (Archivo) ▶ **Export** (Exportar).
 - b. En la ficha Export Properties (Propiedades de exportación), seleccione **Setup** (Configuración).
 - c. Seleccione **One File** (Un archivo) en el menú desplegable.
 - d. Seleccione  (*.txt) en el menú desplegable File Type (Tipo de archivo).
 - e. Seleccione **Open file(s) when export is complete** (Abrir archivos cuando termine la exportación).
 - f. Haga clic en **Start Export** (Iniciar exportación) y, a continuación, haga clic en **Close Export Tool** (Cerrar herramienta de exportación) cuando se le solicite.
4. Utilice el archivo exportado como molde y cree la configuración de placa deseada:
 - a. Con una aplicación de hojas de cálculo (por ejemplo, el software Microsoft® Excel), abra el archivo de texto exportado.
 - b. Sustituya los parámetros del archivo de texto como sea preciso. Cuando haya terminado, guarde el archivo en un formato de texto delimitado por tabuladores.

¡IMPORTANTE! El archivo de texto debe tener el formato correspondiente al formato de la disposición de la placa del software StepOne. Para obtener más información acerca del formato de disposición de la placa, acceda a la ayuda haciendo clic en  en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▶ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

5. Si aún no está en la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Home** (Inicio).
6. En la columna Set Up (Configurar), haga clic en  **Advanced Setup** (Configuración avanzada).

Notas

7. Información de configuración de la importación:
 - a. Seleccione **File** (Archivo) ► **Import** (Importar).
 - b. Haga clic en **Browse** (Examinar), seleccione el archivo *.txt que ha creado en el [paso 4](#) y, a continuación, haga clic en **Select** (Seleccionar).
 - c. Haga clic en **Start Import** (Iniciar importación).
8. Prepare las reacciones PCR:
 - a. Prepare el molde.
 - b. Prepare las diluciones de muestras.
 - c. Prepare la dilución seriada del estándar.
 - d. Prepare la Mezcla de reacción.
 - e. Prepare la placa de reacción.
9. Realice el experimento:
 - a. Cargue la placa en el instrumento.
 - b. Inicie el proceso
 - c. Descargue la placa del instrumento.
10. Analice los datos.

Bibliografía

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

agente de bloqueo del IPC	Reactivo añadido a las reacciones PCR para bloquear la amplificación del control positivo interno (IPC).
AIF	Abreviatura de archivo de información de ensayo (Assay Information File).
alelo	Para un gen diana determinado, cualquiera de las diferentes secuencias que se producen en la población.
amplicón	Segmento de DNA amplificado durante la PCR.
amplificación	Parte del proceso del instrumento, durante el cual la PCR produce la amplificación del gen diana. En los experimentos de cuantificación, los datos de fluorescencia recogidos durante la amplificación se muestran en una gráfica de amplificación y se utilizan para calcular los resultados. Si la amplificación está incluida en el proceso del instrumento StepOne™ para experimentos de genotipado o presencia/ausencia, los datos de fluorescencia recogidos durante la amplificación se muestran en una gráfica de amplificación y se pueden utilizar para solucionar problemas.
apantallador	Molécula unida al extremo de 3' de las sondas TaqMan® para evitar que el notificador emita una señal de fluorescencia mientras la sonda está intacta. Con los reactivos TaqMan®, se puede utilizar un apantallador no fluorescente-unión de ligando de surco menor (NFQ-MGB) como apantallador. Con reactivos SYBR Green, no se utiliza ningún apantallador.
¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.	
apantallador de no fluorescencia-ligando de unión al surco menor (NFQ-MGB)	Moléculas que están unidas al extremo de 3' de las sondas TaqMan®. Si la sonda está intacta, el apantallador no fluorescente (NFQ) evita que el fluorocromo del notificador emita una señal de fluorescencia. Dado que el NFQ no emite ninguna fluorescencia, produce señales de fondo más bajas, lo que se deriva en una mayor precisión en la cuantificación. El ligando de unión al surco menor (MGB) aumenta la temperatura de fusión (Tm) sin aumentar la longitud de la sonda. También permite el diseño de sondas más cortas.
archivo de información de ensayo (AIF)	Archivo de datos del CD que se incluye con cada pedido de ensayo. El nombre de archivo incluye el número del código de barras de la placa. La información del AIF se incluye en un formato delimitado por tabuladores.
asistente de diseño	Función del software StepOne™ que le ayuda a configurar el experimento guiándole a través de los mejores procedimientos para comenzar el diseño del experimento.

AutoΔ	Opción para aumentar o reducir la temperatura y/o el tiempo con cada ciclo posterior de una fase cíclica. Cuando AutoΔ está habilitado, las opciones se indican por medio de un icono en el perfil térmico: • AutoΔ activado: ▲ • AutoΔ desactivado: ▲
biblioteca de dianas	Recogida de dianas en el software StepOne™.
biblioteca de ensayos SNP	Recogida de ensayos SNP en el software StepOne™.
biblioteca de muestras	Recogida de muestras en el software StepOne™. La biblioteca de muestras contiene el nombre de la muestra y el color de la muestra.
calibración espacial	Tipo de calibración del sistema StepOne™ en el que el sistema asigna las posiciones de los pocillos en el bloque de muestras. Los datos de la calibración espacial se utilizan para que el software pueda asociar aumentos de la fluorescencia durante un proceso con pocillos específicos de la placa de reacción.
calibrador	Véase muestra de referencia.
cantidad	En los experimentos de cuantificación, la cantidad de diana en las muestras. La cantidad absoluta puede referirse al número de copias, la masa, la molaridad o la carga viral. La cantidad relativa se refiere a la diferencia entre la cantidad de diana normalizada en la muestra y la cantidad de diana normalizada en la muestra de referencia.
cantidad estándar	Cantidad conocida de la reacción PCR. • En los experimentos de curva estándar, la cantidad conocida de diana. Las unidades de la cantidad estándar pueden ser la masa, el número de copias, la carga viral u otras unidades para medir la cantidad del gen diana. • En los experimentos de curvas estándar relativas, cantidad conocida en el estándar. Por ejemplo, la cantidad estándar puede referirse a la cantidad de cDNA o la cantidad de solución madre. Las unidades no son relevantes en los experimentos de curvas estándar relativas, porque se compensan en los cálculos.
cantidad inicial	Cuando se define una curva estándar o una dilución seriada del estándar, se corresponde con la cantidad mayor o menor.
cantidad normalizada	Cantidad de diana dividida por la cantidad de control endógeno.
cebador directo	Oligonucleótido que flanquea el extremo de 5' del gen diana. El cebador reverso y el cebador directo se utilizan juntos en las reacciones PCR para amplificar el gen diana.
cebador reverso	Oligonucleótido que flanquea el extremo de 3' del gen diana. El cebador reverso y el cebador directo se utilizan juntos en las reacciones PCR para amplificar el gen diana.
ciclo del umbral (C_T)	Número del ciclo de la PCR en el que ΔR _n llega a la línea umbral en la gráfica de amplificación.

coeficientes de regresión	Valores calculados a partir de la recta de regresión de las curvas estándar, incluido el valor R^2 , la pendiente y el punto de intersección y. Los valores del coeficiente de regresión se pueden utilizar para evaluar la calidad de los resultados a partir de los estándares. Véase también curva estándar.
color de diana	Color asignado a un gen diana para identificarlo en la disposición de la placa y las gráficas de análisis.
Concentración de muestra diluida (10X por mezcla de reacción)	Campo del software que aparece en la ficha Sample Dilution Calculations (Cálculos de dilución de muestras) de la pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción). En este campo, escriba la concentración de la muestra que desea utilizar para añadirla a la mezcla de reacción de todas las muestras del experimento. "10X for Reaction Mix" (10X por mezcla de reacción) significa que el software asume que la muestra o el componente estándar de la mezcla de reacción tiene una concentración del 10X. Por ejemplo, si la concentración de las muestras diluidas es 50,0 ng/μL (10X), la concentración de la muestra final de la reacción es 5 ng/μL (1X).
configuración avanzada	Función del software StepOne™ que permite configurar el experimento de acuerdo con el diseño de dicho experimento.
control endógeno	Diana que debería existir a niveles similares en todas las muestras que se están probando. Se utiliza en experimentos de cuantificación relativa y C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo para normalizar las señales de fluorescencia del gen diana que se está cuantificando. También se conoce como gen de mantenimiento.
control interno positivo (IPC)	En los experimentos de presencia/ausencia, un molde de DNA sintético corto que se añade a las reacciones PCR. Se puede utilizar el IPC para distinguir los resultados negativos auténticos de las reacciones afectadas por los apantalladores de PCR, una configuración incorrecta del ensayo o un fallo del reactivo o el instrumento.
control negativo (NC)	En los experimentos del sistema StepOne™, tarea asignada a los genes diana o los ensayos de SNP en los pocillos que contienen agua o tampones en lugar de un molde de muestras. En los pocillos de control negativo, no se debería producir ninguna amplificación del gen diana.
control negativo sin amplificación (NAC)	Véase también pocillos de IPC de control negativo bloqueado.
control negativo sin molde	Véase control negativo (NC).
control positivo	En los experimentos de genotipado, la tarea del ensayo de SNP en pocillos que contienen un molde de muestras con un genotipo conocido.
C_T	Abreviatura de ciclo del umbral (Threshold Cycle).
C_T automático	Opción de análisis en la que el software calcula de manera automática las líneas umbral y basal de la gráfica de amplificación. El software utiliza las líneas basal y umbral para calcular el ciclo del umbral (C_T).
C_T manual	Opción de análisis en la que se introduce el valor del umbral y se selecciona si se desean utilizar cálculos de línea basal automáticos o manuales. El software utiliza el valor de la línea umbral que se introduce y la línea basal para calcular el ciclo del umbral (C_T).

curva de disociación	Véase curva de fusión.
curva de fusión	Visualización de los datos recogidos durante la fase de la curva de fusión. Los picos de la curva de fusión pueden indicar la temperatura de fusión (T_m) del gen diana o pueden identificar una amplificación de la PCR no específica. La curva de fusión se puede ver como una comparación del notificador normalizado (R_n) y la temperatura o como una comparación del notificador derivativo ($-R_n'$) y la temperatura.
curva estándar	En los experimentos de curva estándar y cuantificación relativa: • La línea con un ajuste óptimo de una gráfica de valores C_T a partir de las reacciones estándar trazadas sobre cantidades de estándar. Véase también recta de regresión. • Conjunto de estándares que contiene una serie de cantidades conocidas. Los datos de las reacciones de la curva estándar se utilizan para generar la curva estándar. La curva estándar se define por el número de puntos de la serie, el número de replicados estándar, la cantidad inicial y el factor en serie. Véase también dilución seriada del estándar.
delta R_n (ΔR_n)	Abreviatura de notificador normalizado con línea basal corregida (baseline-corrected normalized reporter).
desconocidos	En los experimentos de cuantificación, la tarea del gen diana en pocillos que contienen un molde de muestras con cantidades de diana desconocidas. En los experimentos de genotipado, la tarea del ensayo de SNP en pocillos que contienen un molde de muestras con un genotipo desconocido. En los experimentos de presencia/ausencia, la tarea del gen diana en pocillos que contienen un molde de muestras en la que no se conoce la presencia del gen diana.
diana	La secuencia de ácido nucleico que se desea amplificar y detectar.
dilución seriada del estándar	En los experimentos de curvas estándar y curvas estándar relativas, conjunto de normas que contienen una serie de cantidades conocidas. La dilución seriada del estándar se prepara por medio de estándares de dilución en serie. Por ejemplo, la solución madre estándar se utiliza para preparar el primer punto de dilución, el primer punto de dilución se utiliza para preparar el segundo punto de dilución, etc. Los volúmenes necesarios para preparar una dilución seriada del estándar se calculan mediante el número de puntos de dilución, el número de replicados estándar, la cantidad inicial, el factor en serie y la concentración estándar en la solución madre. Véase también curva estándar.
diluyente	Reactivo utilizado para diluir una muestra o estándar antes de añadirlo a la reacción PCR. El diluyente puede ser agua o un tampón.
disposición de placa	Ilustración de la rejilla de 6×8 pocillos y contenido asignado en la placa de reacción. En el software, puede utilizar la disposición de la placa como una herramienta de selección para asignar el contenido de los pocillos, ver las asignaciones de los pocillos y ver los resultados. La disposición de la placa se muestra en las pantallas Design Wizard (Asistente de diseño), Advanced Setup (Configuración avanzada), de protocolo de termociclado y de análisis. La disposición de la placa se puede imprimir, incluir en un informe, exportar y guardar como una diapositiva para una presentación.

disposición autónoma	Disposición del sistema en la que el instrumento StepOne™ <i>no</i> está conectado a un ordenador por medio del cable amarillo del sistema StepOne™. En su lugar, se utiliza una unidad USB () para transferir datos entre los componentes del sistema StepOne™. En esta disposición, el instrumento StepOne™ se controla por medio de la pantalla táctil del instrumento.
disposición conectada	Disposición del sistema en la que el instrumento StepOne™ está conectado directamente a un ordenador colocado por medio del cable del sistema StepOne™ amarillo. En esta disposición, el instrumento StepOne™ está controlado por medio del software StepOne™ del ordenador colocado.
DNA de la muestra (10X)	Componente de reacción que se muestra en la pantalla Reaction Setup (Configuración de la reacción). El software asume que el DNA de muestra que se añade a la Mezcla de reacción está en una concentración del 10X. Por ejemplo, si el volumen de la reacción es de 20 µL, el volumen calculado de la muestra de la reacción 1 es 2 µL.
EFF%	Véase eficiencia de amplificación (EFF%).
eficiencia de amplificación (EFF%)	Cálculo de la eficiencia de la amplificación de la PCR. La eficiencia de la amplificación se calcula utilizando la pendiente de la recta de regresión en la curva estándar. Una pendiente próxima al -3,3 indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. Factores que afectan a la eficiencia de la amplificación: • Rango de cantidades de estándar: para obtener medidas de la eficiencia más exactas y precisas, utilice un amplio rango de cantidades de estándar, de 5 a 6 registros (multiplicado por 10^5 a 10^6). • Número de replicados estándar: para obtener mediciones de la eficiencia más precisas, incluya replicados para reducir los efectos de las imprecisiones del pipeteado. • Apantalladores de la PCR: los apantalladores de la PCR en la reacción pueden reducir la eficiencia de la amplificación.
ensayo	En el sistema StepOne™, reacción PCR que contiene cebadores para amplificar un gen diana y un reactivo para detectar el gen diana amplificado.
ensayo SNP	Se utiliza en los experimentos de genotipado. Es una reacción PCR que contiene cebadores para amplificar el SNP y dos sondas para detectar diferentes alelos.
ensayos bajo pedido	Los ensayos de genomas TaqMan® que se fabrican cuando se solicitan. Sólo se envían los ensayos que cumplen las especificaciones de control de calidad de la fabricación.
ensayos inventoriados	Ensayos de genomas TaqMan® fabricados previamente, que cumplen las especificaciones de control de calidad y que se guardan en el inventario.
estándar	Muestra que contiene cantidades de estándar conocidas. Las reacciones estándar se utilizan en experimentos de cuantificación para generar curvas estándar. Véase también curva estándar y dilución seriada del estándar.

experimento	Se refiere al proceso completo de realización de un proceso con el sistema StepOne™, incluida la configuración, el proceso y el análisis. Tipos de experimentos que se pueden realizar con el sistema StepOne™ : • Cuantificación : curva estándar • Cuantificación : cuantificación relativa • Cuantificación: C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo • Curva de fusión • Genotipado • Presencia/ausencia
experimento de punto final	Experimento en el que los datos de fluorescencia que se recogen en una lectura posterior a la PCR se utilizan para calcular resultados para experimentos de genotipado o presencia/ausencia.
factor de dilución	Véase factor en serie.
factor en serie	Valor numérico que define la secuencia de cantidades en la curva estándar. El factor en serie y la cantidad inicial sirven para calcular la cantidad estándar de cada punto de la curva estándar. Por ejemplo, si la curva estándar se define con un factor en serie de 1:10 o 10, la diferencia entre 2 puntos adyacentes cualquiera en la curva se multiplica por 10.
fase	Componente del perfil térmico. Una fase consta de uno o varios pasos.
fase cíclica	Fase del perfil térmico que se repite. Si la fase cíclica se utiliza para realizar la PCR, se denomina fase de amplificación.
fase de curva de fusión	Fase del perfil térmico con un incremento de temperatura para generar una curva de fusión.
fase de espera	Fase del perfil térmico que incluye uno o varios pasos. Por ejemplo, puede añadir una fase de espera al perfil térmico para activar enzimas, para desactivar enzimas o para incubar una reacción.
fluorocromo del sistema	Fluorocromo fabricado por Applied Biosystems y precalibrado en el sistema StepOne™. Fluorocromos del sistema: • Fluorocromo FAM™ • Fluorocromo JOE™ • Fluorocromo™ ROX • Fluorocromo SYBR® Green • Fluorocromo VIC® ¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

fluorocromo personalizado	Fluorocromo que no fabrica Applied Biosystems. Puede utilizar fluorocromos personalizados para realizar experimentos de PCR en tiempo real en el sistema StepOne™. Antes de utilizar fluorocromos personalizados, realice una calibración del fluorocromo personalizado.
	¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.
fluorocromo puro (Pure Dye)	Reactivo que contiene el fluorocromo fluorescente. Los fluorocromos puros se utilizan para realizar una calibración de fluorocromo puro en el sistema StepOne™. Véase también fluorocromo del sistema.
gen de housekeeping o ubicuo	Véase control endógeno.
gráfica de amplificación	Visualización de los datos recogidos durante la fase cíclica de la amplificación de la PCR. Se puede ver como: • Notificador normalizado con línea basal corregida (ΔR_n) comparado con el ciclo • Notificador normalizado (R_n) comparado con el ciclo • Ciclo del umbral (C_T) comparado con el pocillo
gráfica de datos brutos	Visualización de la amplitud de la fluorescencia de los pocillos seleccionados de todos los filtros. Muestra la amplitud de la fluorescencia de todos los puntos de recogida de datos del proceso.
gráfica de discriminación alélica	Visualización de los datos recogidos durante la lectura posterior a la PCR. La gráfica de discriminación alélica es una gráfica de la señal de notificación normalizada procedente de la sonda del alelo 1 que se ha trazado a partir de la señal de notificación normalizada procedente de la sonda del alelo 2.
gráfica de temperatura	Visualización de temperaturas de la muestra, la cubierta del instrumento y el bloque de instrumento durante el proceso del instrumento.
gráfica multicomponente	Visualización de los datos recogidos durante la fase cíclica de la PCR en tiempo real. La gráfica multicomponente muestra la fluorescencia de todos los ciclos del proceso.
grupo de replicados	Conjunto de reacciones idénticas de un experimento.
identificador de ensayo	Valor asignado por Applied Biosystems a los TaqMan® Gene Expression Assays y los TaqMan® SNP Genotyping Assays.
identificador refSNP	Número que identifica el identificador de agrupamiento de SNP (refSNP) de referencia. Lo genera dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database of Nucleotide Sequence Variation o Base de datos de polimorfismos nucleótidos únicos de variación de secuencia nucleótida). Se puede utilizar para buscar en el almacén de Applied Biosystems un Applied Biosystems SNP Genotyping Assay. También se denomina número rs.

intersección y	Coeficiente de regresión calculado a partir de la recta de regresión en la curva estándar. La intersección y indica el ciclo del umbral esperado (C_T) para una muestra con una cantidad igual a 1 (por ejemplo, 1 ng/ μ L).
IPC	Abreviatura de control positivo interno (Internal Positive Control). Además, en los experimentos de presencia/ausencia, es la tarea del gen diana de IPC en pocillos que contienen el molde de IPC.
IPC bloqueado	En los experimentos de presencia/ausencia, tarea asignada al gen diana de IPC en los pocillos que contienen un agente de bloqueo de IPC en lugar de un molde de las muestras. Véase también pocillos de IPC bloqueados por control negativo.
IPC+	Llamada de presencia/ausencia cuando el control interno positivo (IPC) es correcto.
lectura de punto final	Véase lectura posterior a la PCR.
lectura posterior a la PCR	Se utiliza en los experimentos de genotipado y presencia/ausencia. Es la parte del proceso del instrumento que se produce después de la amplificación. En los experimentos de genotipado, los datos de fluorescencia que se recogen durante la lectura posterior a la PCR se muestran en la gráfica de discriminación alélica y se utilizan para realizar llamadas de alelos. En los experimentos de presencia/ausencia, los datos de fluorescencia que se recogen durante la lectura posterior a la PCR se muestran en la gráfica de presencia/ausencia, y se utilizan para realizar llamadas de detección. También se denomina lectura de punto final.
lectura previa a la PCR	Se utiliza en los experimentos de genotipado y presencia/ausencia. Es la parte del proceso del instrumento que se produce antes de la amplificación. Los datos de fluorescencia que se recogen durante la lectura previa a la PCR se utilizan para normalizar los datos de fluorescencia posteriores a la lectura.
línea basal	En la gráfica de amplificación, línea ajustada a los niveles de fluorescencia de un rango de ciclos definido. Si se utiliza una opción de análisis de línea basal manual, Applied Biosystems recomienda seleccionar los primeros ciclos de la PCR para determinar la línea basal.
línea basal automática	Opción de análisis en la que el software calcula los valores de inicio y fin de la línea basal para la gráfica de amplificación. El software utiliza las líneas basal y umbral para calcular el ciclo del umbral (C_T).
línea basal manual	Opción de análisis en la que se introducen los valores de inicio y fin de la línea basal para la gráfica de amplificación. El software utiliza las líneas basal y umbral para calcular valores C_T .
método C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo	Método de cuantificación para experimentos de cuantificación. Con el método C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo, se utilizan los resultados de una muestra de referencia y un control endógeno para determinar cantidades relativas de un gen diana en las muestras.
método de cuantificación	En los experimentos de cuantificación, el método que se utiliza para determinar la cantidad de diana en las muestras. En los experimentos de cuantificación, hay tres tipos de métodos de cuantificación disponibles: curva estándar, C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo y cuantificación relativa.

método de curva estándar	Método de cuantificación para experimentos de cuantificación. Con el método de curva estándar, los resultados de los estándares se utilizan para determinar cantidades absolutas de un gen diana en las muestras.
método de la cuantificación relativa	Método de cuantificación para experimentos de cuantificación. Con el método de la cuantificación relativa, se utilizan los resultados de los estándares, una muestra de referencia y un control endógeno para determinar las cantidades relativas de un gen diana en las muestras.
método de proceso	Definición del volumen de reacción y el perfil térmico del proceso del instrumento.
mezcla de cebador	Componente de reacción PCR que contiene el cebador directo y el cebador reverso diseñados para amplificar el gen diana.
mezcla de cebadores/sonda	Componente de reacción PCR que consta de cebadores diseñados para amplificar el gen diana y una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.
mezcla de ensayos	Componente de reacción PCR de los Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays y los TaqMan® SNP Genotyping Assays que consta de cebadores diseñados para amplificar un gen diana y una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.
mezcla de reacción	Solución que contiene todos los componentes necesarios para procesar la reacción PCR, excepto el molde (de muestra, estándar o de control).
mezcla de sondas	Componente de reacción PCR que contiene una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.
molde	Ácido nucleico que se añade a la reacción PCR. El molde recomendado varía en función del tipo de experimento.
monitorización remota	Función del software que permite ver el estado de un instrumento en red, enviar experimentos al instrumento y descargar experimentos de procesos en el ordenador.
muestra	El molde que se está probando.
muestra de referencia	En experimentos de cuantificación relativa y C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo, la muestra que se utiliza como base de los resultados cuantitativos relativos. También se denomina calibrador.
Muestra o estándar (10X)	Componente de reacción que se muestra en la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la muestra de reacción) de la pantalla Reaction Setup (Configuración de la reacción). El software asume que la muestra o el estándar que se añade a la Mezcla de reacción está en una concentración del 10X. Por ejemplo, si el volumen de la reacción es de 20 µL, el volumen calculado de la muestra o estándar de la reacción 1 es 2 µL.
nombre de experimento	Introducido durante la configuración del experimento, es el nombre que se utiliza para identificar el experimento. Los nombres de los experimentos no pueden superar los 100 caracteres y no pueden incluir ninguno de los siguientes caracteres: barra inclinada hacia delante (/), barra inclinada hacia atrás (\), signo mayor que (>), signo menor que (<), asterisco (*), signo de interrogación (?), comillas ("), línea vertical (), dos puntos (:) o punto y coma (;).

notificador	Fluorocromo fluorescente que se utiliza para detectar la amplificación. Si se utilizan reactivos TaqMan®, el fluorocromo del notificador se une al extremo de 5'. Si se utilizan reactivos SYBR® Green, el fluorocromo del notificador es SYBR® Green.
notificador derivado ($-R_n$)	Se muestra en el eje y de la curva de fusión. La señal del notificador derivado es el primer derivado negativo de la fluorescencia normalizada del notificador.
notificador normalizado (R_n)	Señal de fluorescencia que emite el fluorocromo del notificador normalizado a la señal de fluorescencia de la referencia pasiva.
notificador normalizado con línea basal corregida (ΔR_n)	La magnitud de la señal de fluorescencia normalizada que genera el notificador durante la amplificación de la PCR. $\Delta R_n = R_n$ (punto final) – R_n (línea basal), donde R_n = notificador normalizado.
número rs	Véase identificador refSNP.
omitir pocillo	Acción que se realiza después del análisis para omitir uno o varios pocillos de todos los análisis antes de volver a analizar los datos.
pantalla táctil	Visor del instrumento que se toca para controlarlo.
paso	Componente del perfil térmico. Los pasos se definen por la temperatura, el tiempo, la rampa y el estado de recogida de datos. En las fases cíclicas, los pasos también se definen por medio del estado AutoΔ.
PCR en tiempo real	Proceso de recogida de datos de fluorescencia durante la amplificación de la PCR. Los datos de la PCR en tiempo real sirven para calcular los resultados de los experimentos de cuantificación o para solucionar los problemas de los resultados de los experimentos de genotipado o presencia/ausencia.
pendiente	Coeficiente de regresión calculado a partir de la recta de regresión en la curva estándar. La pendiente indica la eficiencia de la amplificación de la PCR para el ensayo. Una pendiente de $-3,3$ indica una eficiencia de amplificación del 100%. Véase también eficiencia de amplificación (EFF%).
perfil térmico	Protocolo de termociclado que especifica la temperatura, el tiempo, la rampa y los puntos de recogida de datos de todos los pasos y fases del proceso del instrumento.
pocillos de IPC de control negativo	En los experimentos de presencia/ausencia, pocillos que contienen un molde de IPC y un tampón o agua en lugar de un molde de muestras en la reacción PCR. El molde de IPC es el único que se debería amplificar en los pocillos de IPC de control negativo, porque la reacción no contiene ningún molde de muestras. Véase también IPC+.
pocillos de IPC de control negativo bloqueado	En los experimentos de presencia/ausencia, pocillos que contienen un agente de bloqueo del IPC en lugar de un molde de muestras en la reacción PCR. No se debería producir ninguna amplificación en los pocillos de IPC de control negativo bloqueado, porque la reacción no contiene ningún molde de muestras y la amplificación del IPC está bloqueada. También se denomina "control negativo sin amplificación" (NAC).
punto	Un estándar en una curva estándar. La cantidad estándar de cada punto de la curva estándar se calcula en base a la cantidad inicial y el factor en serie.

QuickStart (Inicio rápido)	Función del sistema StepOne™ que permite realizar el experimento sin introducir la información de configuración de la placa.
química	Véase reactivos.
rampa	La velocidad a la que cambia la temperatura durante el proceso del instrumento. Excepto en el caso del paso de la curva de fusión, la rampa se define como un porcentaje. En el caso del paso de la curva de fusión, la rampa se define como un incremento de la temperatura. En el gráfico del perfil térmico, la rampa se indica por medio de una línea diagonal.
reacción de la muestra/diana	Combinación de la muestra y el ensayo diana en una reacción PCR. En el asistente de diseño, cada reacción PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo diana.
reacción del ensayo SNP/muestra	Combinación de la muestra y el ensayo SNP en una reacción PCR. Cada reacción PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo SNP.
reactivos	Los componentes de la reacción PCR que se está utilizando para amplificar el gen diana y detectar la amplificación. Tipos de reactivos utilizados en el sistema StepOne™: • Reactivos TaqMan® • Reactivos SYBR® Green • Otros reactivos
Reactivos SYBR® Green	Componente de reacción PCR que consta de dos cebadores que están diseñados para amplificar el gen diana y el fluorocromo SYBR® Green para detectar DNA bicatenario.
Reactivos TaqMan®	Componentes de reacción PCR que constan de cebadores diseñados para amplificar el gen diana y una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.
rechazar pocillo	Acción que realiza el software durante el análisis para quitar uno o varios pocillos de un análisis posterior si se aplica un aviso específico al pocillo.
recogida de datos	Proceso durante la utilización del instrumento en el que un componente del instrumento detecta datos de fluorescencia en cada pocillo de la placa de reacción. El instrumento transforma la señal en datos electrónicos y los datos se guardan en el archivo del experimento. Los puntos de recogida de datos se indican por medio de un icono en el perfil térmico: • recogida de datos activada:  • recogida de datos desactivada: 
recta de regresión	En los experimentos de curva estándar y cuantificación relativa, la línea que mejor se ajusta a partir de la curva estándar. Fórmula de la recta de regresión: $C_T = m [\text{registro (Cant)}] + b$ donde m es la pendiente, b es el punto de intersección y, y Cant es la cantidad estándar. Véase también coeficientes de regresión.

referencia pasiva	Fluorocromo que produce una señal de fluorescencia. Dado que la señal de referencia pasiva debería ser uniforme en todos los pocillos, se utiliza para normalizar la señal del fluorocromo del notificador para justificar las fluctuaciones de fluorescencias causadas por diferencias menores entre pocillos en concentraciones o en volumen. La normalización de la señal de referencia pasiva permite obtener datos de gran precisión.
replicados	Número total de reacciones idénticas que contienen componentes idénticos y volúmenes idénticos.
retrotranscriptasa	Componente de reacción PCR que convierte el RNA en cDNA. La retrotranscriptasa se añade a la reacción PCR para realizar un RT-PCR de 1 paso.
R_n	Abreviatura de notificador normalizado (Normalized Reporter).
serie	Véase dilución seriada del estándar.
SNP	Abreviatura de polimorfismo nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism). El SNP puede constar de una diferencia base o una indel (inserción/borrado).
tarea	Tipo de reacción realizada en el pocillo para el gen diana o el ensayo SNP. Tareas disponibles en los experimentos del sistema StepOne™: • Desconocida • Control negativo • Estándar (experimentos de curvas estándar y curvas estándar relativas) • Control positivo (experimentos de genotipado) • IPC (experimentos de presencia/ausencia) • IPC bloqueado (experimentos de presencia/ausencia)
temperatura de fusión (T_m)	Punto en la curva de fusión en el que se produce un pico en los niveles de fluorescencia que sirve para indicar que el DNA bicatenario amplificado se disocia en DNA monocatenario.
tipo de experimento	El tipo de experimento que se realiza con el sistema StepOne™: • Curva estándar • C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo • Cuantificación relativa • Curva de fusión (no disponible en el asistente de diseño) • Genotipado • Presencia/ausencia El tipo de experimento que seleccione afecta a las pantallas de configuración, proceso y análisis.
T_m	Abreviatura de temperatura de fusión (T _m o Melting Temperature).
umbral	Nivel de fluorescencia por encima de la línea basal y dentro de la región de crecimiento exponencial de la gráfica de amplificación. La línea umbral se puede determinar automáticamente (véase C _T automático) o se puede ajustar manualmente (véase C _T manual).

umbral del ciclo	Véase ciclo del umbral (C_T).
valor atípico	Para un conjunto de datos, un punto de dato que es significativamente más pequeño o grande que los demás.
valor R^2	Coeficiente de regresión calculado a partir de la recta de regresión en la curva estándar. El valor R^2 indica la proximidad del ajuste entre la recta de regresión de la curva estándar y los puntos de datos C_T individuales de las reacciones estándar. El valor 1,00 indica un ajuste perfecto entre la recta de regresión y los puntos de datos.
velocidad de la rampa	Velocidad a la que se produce la rampa de temperatura durante el protocolo de termociclado del instrumento. Las velocidades de rampa disponibles son rápida y estándar.

Índice alfabético

A

ADVERTENCIA, descripción [xi](#)

analizar experimento

analizar [80](#)

directrices [81](#), [87](#), [92](#), [95](#), [99](#), [102](#), [104](#), [107](#), [109](#)

flujo de trabajo [78](#)

omitir pocillos [103](#)

para obtener más información [88](#), [92](#), [95](#), [99](#), [102](#), [105](#), [107](#), [109](#)

presentar los datos [96](#)

ver opciones de análisis [98](#)

ver pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) [88](#)

ver pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) [105](#)

ver pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas) [84](#)

ver pantalla QC Summary (Resumen QC) [100](#)

ver pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) [108](#)

ver pantalla Standard Curve (Curva estándar) [85](#)

ver tabla de pocillos [93](#)

Applied Biosystems

asistencia técnica [x](#)

comentarios del cliente acerca de la documentación [ix](#)

contacto [x](#)

Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System.

Véase sistema StepOne.

asistencia técnica, contacto [x](#)

asistente de diseño

elementos del software [13](#)

finalizar [38](#)

pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento) [16](#)

pantalla Materials List (Lista de materiales) [35](#)

pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales) [18](#)

pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción) [29](#)

pantalla Run Method (Método de proceso) [27](#)

pantalla Samples (Muestras) [25](#)

pantalla Standards (Estándares) [23](#)

pantalla Targets (Dianas) [21](#)

aviso [95](#)

aviso AMPNC [101](#)

aviso BLFAIL [101](#)

aviso CTFAIL [101](#)

aviso EXPFAIL [101](#)

aviso HIGHSD [101](#)

avisos

en experimentos de curva estándar [101](#)

opciones de análisis [99](#)

ayuda en línea. *Consulte* Sistema de ayuda

B

biblioteca [28](#)

biblioteca Run Method (Método de proceso) [28](#)

C

cargar placa de reacción [58](#)

categoría de instalación [xx](#)

categoría de sobretensión (potencia) [xx](#)

comentarios del cliente, acerca de los documentos de Applied Biosystems [ix](#)

consejos de desplazamiento

seleccionar pocillos [83](#)

ver múltiples gráficas [84](#)

consumibles [17](#)

admitidos [3](#)

Véase también materiales necesarios. [3](#)

control negativo, componente de experimento [4](#)

convenciones del texto [vii](#)

convenciones utilizadas en esta guía [vii](#)

crear nuevo experimento [13](#)

CT [95](#)

D

datos

acerca de la recogida de datos [2](#)

experimento de ejemplo [7](#), [9](#), [80](#)

presentar [96](#)

transferir [73](#)

descargar placa de reacción [73](#)

dianas

configurar [21](#)

directrices de diseño [22](#)

diluciones de muestras

preparar [43](#)

volúmenes calculados [32](#), [43](#)

directrices

análisis [81](#), [87](#), [92](#), [95](#), [99](#), [102](#), [104](#), [107](#), [109](#)

diseño [17](#), [19](#), [22](#), [24](#), [26](#), [28](#), [33](#), [37](#), [40](#)

eliminación de residuos químicos [xix](#)

preparación [44](#), [47](#), [50](#), [53](#)

proceso [60](#)

seguridad de residuos químicos [xix](#)
 seguridad química [xvii](#)
 diseñar experimento
 configurar dianas [21](#)
 configurar estándares [23](#)
 configurar método de proceso [27](#)
 configurar muestras [25](#)
 crear nuevo [13](#)
 definir métodos y materiales [18](#)
 definir propiedades del experimento [16](#)
 directrices [17](#), [19](#), [22](#), [24](#), [26](#), [28](#), [33](#), [37](#), [40](#)
 elementos del software [13](#)
 finalizar flujo de trabajo del asistente de diseño [38](#)
 flujo de trabajo [12](#)
 para obtener más información [18](#), [20](#), [23](#), [24](#), [27](#), [28](#),
 [34](#), [37](#), [40](#)
 revisar configuración de reacción [29](#)
 solicitar materiales [35](#)
 disposición autónoma
 inicio [62](#)
 monitorización [72](#)
 monitorización remota [69](#)
 transferencia de datos remota [74](#)
 transferir datos [75](#)
 disposición conectada
 inicio [61](#)
 monitorización [65](#)
 transferir datos [74](#)
 documentación, relacionada [viii](#)

E

eficiencia de amplificación [24](#), [25](#), [87](#), [88](#)
 elementos del software
 asistente de diseño [13](#)
 pantallas de análisis [82](#)
 eliminación de residuos, directrices [xix](#)
 ensayos en inventario [33](#)
 ensayos fabricados bajo pedido [33](#)
 ensayos personalizados [33](#)
 ergonomía, seguridad [xxii](#)
 estación de trabajo [xxii](#)
 estándares
 casilla de verificación Set Up Standards (Configurar
 estándares) [21](#), [22](#)
 componente de experimento [4](#)
 configurar [23](#)
 diluir [45](#)
 directrices de diseño [24](#)
 EMC [xxiii](#)
 reacciones estándar [52](#)
 seguridad [xxiii](#)
 estándares de compatibilidad electromagnética.
 Consulte Estándares EMC
 estándares de seguridad [xxiii](#)
 estándares EMC [xxiii](#)
 etiquetas de seguridad, en instrumentos [xv](#)

experimento de ejemplo
 analizar [78](#)
 datos [9](#)
 descripción [8](#)
 diseño [12](#)
 flujo de trabajo [10](#)
 nombre [16](#)
 preparar [42](#)
 proceso [56](#)
 experimentos de curva estándar
 acerca de [4](#)

F

flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración
 avanzada) [7](#), [8](#), [20](#), [40](#), [53](#), [112](#)
 flujo de trabajo de exportación/importación [8](#), [115](#)
 flujo de trabajo de inicio rápido [8](#)
 flujo de trabajo de molde [8](#), [114](#)
 flujo de trabajo del inicio rápido [113](#)
 flujos de trabajo
 Advanced Setup (Configuración avanzada) [112](#)
 experimento de ejemplo [10](#)
 Exportación/importación [8](#), [115](#)
 Molde [8](#), [114](#)
 QuickStart (Inicio rápido) [8](#), [113](#)
 flujos de trabajo alternativos del experimento. Véase
 flujos de trabajo.
 formación, información acerca de [x](#)

G

gráfica de amplificación, típica [92](#)

I

iconos de peligro. *Consulte* símbolos de peligro, en
 instrumentos
 imprimir instrucciones de la configuración de la
 reacción [32](#)
 indicador BADROX [101](#)
 indicador NOAMP [101](#)
 indicador NOISE [101](#)
 indicador NOSIGNAL [101](#)
 indicador OFFSCALE [101](#)
 indicador OUTLIERRG [101](#)
 indicador SPIKE [101](#)
 indicador THOLDFAIL [101](#)
 iniciar proceso
 disposición autónoma [62](#)
 disposición conectada [61](#)

L

línea basal
 ajustar manualmente [99](#)
 valores correctos [92](#)

M

materiales necesarios 43, 45, 48, 51
 mezcla de reacción
 volúmenes 48
 volúmenes calculados 30
 movimiento repetitivo, seguridad xxii
 movimiento y elevación, seguridad xvi
 MSDS
 descripción xviii
 obtención xviii
 MSDS, obtener x
 muestras
 configurar 25
 diluciones 43
 directrices de diseño 26
 reacciones de muestras (desconocidas) 52

O

omitir pocillos 103
 opciones de análisis
 avanzadas 99
 aviso 99
 CT 99
 línea basal 99
 umbral 99
 ver 98
 opciones de notificación 59
 otros reactivos basados en fluorescencia 7

P

palabras de aviso para el usuario, descripción viii
 pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)
 monitorización durante un proceso 66
 ver después de proceso 88
 pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento) 16
 pantalla Materials List (Lista de materiales) 35
 pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales) 18
 pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 105
 pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas) 84
 pantalla QC Summary (Resumen QC) 100
 pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 108
 pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción) 29
 pantalla Run Method (Método de proceso) 27
 monitorización durante un proceso 68
 pantalla Samples (Muestras) 25
 pantalla Standards (Estándares) 23
 pantalla Targets (Dianas) 21
 pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) 67
 pantallas de análisis
 consejos de desplazamiento 83
 elementos del software 82

pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) 88
 pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 105
 pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas) 84
 pantalla QC Summary (Resumen QC) 100
 pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 108
 pantalla Standard Curve (Curva estándar) 85
 tabla de pocillos 93
 PCR en multiplex 5, 21
 PCR en singleplex 5, 21
 Peligro xxi
 PELIGRO, descripción xi
 peligros. *Consulte* seguridad
 perfiles de residuos, descripción xix
 placa de reacción
 cargar 58
 descargar 73
 disposición 38
 preparar 50
 molde. véase muestras.
 pocillos
 control negativo 26, 38, 50
 desconocidos 26, 38, 50
 estándar 26, 38, 50
 omitir 103
 seleccionar 83
 PRECAUCIÓN, descripción xi
 preparar el proceso 57
 preparar experimento
 diluciones de muestras 43
 directrices 44, 47, 50, 53
 flujo de trabajo 42
 mezcla de reacción
 preparar 48
 para obtener más información 44, 50, 53
 placa de reacción 50
 dilución seriada del estándar 45
 presentar datos 96

R

reactivos
 otros basados en fluorescencia 7
 SYBR Green 6
 TaqMan 6
 reactivos SYBR Green 6, 20, 22, 33, 109
 reactivos TaqMan 6, 19, 20, 22, 33, 109
 realizar experimento
 activar opciones de notificaciones 59
 alertas 69
 directrices 60
 flujo de trabajo 56
 iniciar 61
 para obtener más información 59, 69, 70
 preparar 57
 monitorizar 64

transferir datos 73
 replicado, componente de experimento 4
 residuos biológicos peligrosos, manipulación xx
 residuos radioactivos, manipulación xx
 resultados, interpretar 79
 RT-PCR de 1 paso 5, 20, 21, 28, 33
 RT-PCR de 2 pasos 5, 9, 20, 21

S

seguridad
 antes de usar el instrumento xvi
 convenciones xi
 directrices xvii, xix
 eléctrica xx
 ergonomía xxii
 estación de trabajo xxii
 estándares xxiii
 mover y levantar el instrumento xvi
 mover/levantar xvi
 movimiento repetitivo xxii
 peligros biológicos xxi
 química xvii
 residuo químico
 residuos químicos xix
 uso del instrumento xvi
 seguridad de residuos químicos xix
 seguridad eléctrica xx
 seguridad química xvii
 seleccionar pocillos 83
 dilución seriada del estándar
 componente de experimento 4
 preparar 45
 volúmenes calculados 31
 símbolos de peligro. *Consulte* símbolos de peligro, en instrumentos
 símbolos de peligro. *Consulte* símbolos de seguridad, en instrumentos
 símbolos de seguridad, en instrumentos xiii
 símbolos, seguridad xiii
 sistema de ayuda, acceso ix
 sistema StepOne
 consumibles 3
 distribuciones 61, 64, 74
 filtros 109
 reactivos 6
 recogida de datos 2
 solicitar materiales 35
 solución de problemas
 ajustar línea basal 99
 ajustar umbral 99
 avisos 101
 omitir pocillos 103
 ver opciones de análisis 98
 ver pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 105

ver pantalla QC Summary (Resumen QC) 100
 ver pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 108

monitorizar proceso
 disposición autónoma 72
 disposición autónoma (remota) 69
 disposición conectada 65
 pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) 66
 pantalla Run Method (Método de proceso) 68
 pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) 67
 suposiciones de uso de esta guía vii

T

tabla de pocillos 93
 transferir datos 73

U

umbral
 ajustar manualmente 99
 valores correctos 92
 usar esta guía
 como tutorial 7
 con sus propios experimentos 7
 uso del instrumento, seguridad xvi

V

valores atípicos. Véase omitir pocillos.
 velocidad de la rampa 18, 20

Worldwide Sales and Support

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at www.appliedbiosystems.com.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

Headquarters

850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Phone: +1 650.638.5800
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

06/2010