

SEMESTRÁLNÍ PRÁCE

Kalibrace a limity její přesnosti

Úloha 1 – Lineární kalibrace

Kalibrace kvantitativního stanovení obsahu *Pyrenophora teres* v listových pletivech ječmene

Úvod

Pyrenophora teres je fytopatogenní houba napadající ječmen. V pletivech hostitele je detekována pomocí polymerázové řetězové reakce se specifickými primery. Kvantifikace se provádí metodou PCR v reálném čase na základě kalibrace, která je závislostí tzv. Ct hodnot na koncentraci ředící řady standardů. Ct hodnota je definována jako cyklus, ve kterém dojde ke statisticky významnému růstu fluorescence nad úroveň fluorescence pozadí.

Cílem úlohy je navrhnout a ověřit model přímkové kalibrační závislosti, stanovit limity přesnosti a vyčíslit bodový a intervalový odhad pro analyzované vzorky.

Data

Pro přípravu kalibrační přímky byly použity předem připravené plasmidové standardy, kde cílový úsek DNA byl klonován do komerčně dodávaného pGEM-T Easy plasmidového vektoru. Tyto plasmidové standardy byly sériově ředěny a koncentrace byla ověřena spektrofotometricky. Koncentrace byla přepočítána na počet molekul n . Reakce byly prováděny v přístroji ABI PRISM 7900. Výstup v textovém formátu byl upraven v MS Excel.

Data jsou uvedena v Tabulce 1 a dále v souboru MS Excel: 2.2_Kalibrace_data v listu: lineární kalibrace.

Tabulka 1 - data

Sample Name	log n	Ct	Ct (vzorky z polního pokusu)
EC1	9.30	10.20	25.93
EC1	9.30	10.09	26.47
EC1	9.30	9.99	25.05
EC1	9.30	9.99	22.90
EC1	9.30	9.96	25.31
EC1	9.30	10.17	28.38
EC2	7.30	17.82	31.71
EC2	7.30	17.32	28.54

EC2	7.30	18.28	24.38
EC2	7.30	18.52	31.08
EC2	7.30	19.87	24.97
EC2	7.30	18.72	25.95
EC3	6.30	21.40	26.51
EC3	6.30	19.65	24.18
EC3	6.30	19.21	29.80
EC3	6.30	19.48	25.12
EC3	6.30	20.45	25.29
EC3	6.30	20.59	22.87
EC4	5.30	22.69	22.37
EC4	5.30	22.49	22.63
EC4	5.30	23.02	23.37
EC4	5.30	23.96	26.80
EC4	5.30	23.72	25.48
EC4	5.30	23.74	25.16
EC5	4.30	27.03	25.02
EC5	4.30	28.11	24.97
EC5	4.30	27.25	25.87
EC5	4.30	27.75	23.84
EC5	4.30	28.15	24.40
EC5	4.30	26.93	25.16
EC6	3.30	29.67	29.59
EC6	3.30	32.28	25.62
EC6	3.30	32.38	25.47
EC6	3.30	30.02	25.13
EC6	3.30	31.63	24.87
EC6	3.30	31.13	24.36
EC7	2.30	34.81	24.37
EC7	2.30	36.96	24.92
EC7	2.30	34.35	27.12
EC7	2.30	34.70	
EC7	2.30	34.65	
EC7	2.30	33.33	
EC8	1.30	37.70	
EC8	1.30	36.50	
EC8	1.30	37.25	

EC8	1.30	35.34
EC8	1.30	33.80
EC8	1.30	35.83

Výsledky

Použitý program: QC Expert

▪ Návrh modelu

Je předpokládán lineární model ve tvaru: $y = b_0 - b_1 x$

▪ Odhady parametrů

Proměnná	Odhad	Směr.Odch.	Závěr	p	Spodní mez	Horní mez
Abs	41.55640769	0.374721888	Významný	0	40.80213165	42.31068373
log n	-3.324143693	0.0678625773	Významný	0	-3.460743976	-3.187543409

▪ Statistické charakteristiky regrese

Vícenásobný korelační koeficient R : 0.9905498529
 Koeficient determinace R² : 0.981189011
 Predikovaný korelační koeficient Rp : 0.9591454827
 Střední kvadratická chyba predikce MEP : 1.449156126
 Akaikeho informační kritérium : 17.35257513

▪ Testování regresního tripletu

Data

Indikace vlivných dat

A. Analýza reziduí

Index	Standardní	Jackknife	Predikované	Diag(Hii)	Diag(H*ii)	Cookova vzdál.
1	-0.3934497686	-0.3898060974	-0.4828115016	0.08479532164	0.08787523846	-0.01822690621
2	-0.4913956414	-0.4873057358	-0.6030031949	0.08479532164	0.08959954289	-0.02276433482
3	-0.5804373439	-0.5762075478	-0.7122683706	0.08479532164	0.09149835054	-0.02688926993
4	-0.5804373439	-0.5762075478	-0.7122683706	0.08479532164	0.09149835054	-0.02688926993
5	-0.6071498547	-0.6029348719	-0.7450479233	0.08479532164	0.09212951221	-0.02812675046
6	-0.4201622794	-0.4163699332	-0.5155910543	0.08479532164	0.08830764523	-0.01946438674
7	0.4605650108	0.4565853062	0.5517355372	0.03968253968	0.04411085846	0.009515806007
8	0.02593955123	0.025656238	0.03107438017	0.03968253968	0.03969658663	0.000535941141
9	0.8604204335	0.8579485585	1.030743802	0.03968253968	0.05513787474	0.01777728168
10	1.069040654	1.070741485	1.280661157	0.03968253968	0.06354116603	0.02208761682
11	2.242529395	2.350205245	2.686446281	0.03968253968	0.1446689973	0.04633325196
12	1.242890838	1.250483167	1.48892562	0.03968253968	0.07193203827	0.02567956277
13	0.6785554045	0.674523591	0.8076255904	0.02715121136	0.03688895055	0.009468892506
14	-0.8328046814	-0.829983508	-0.9912151138	0.02715121136	0.04181931015	-0.01162136202
15	-1.212803789	-1.219199593	-1.443495062	0.02715121136	0.05825896141	-0.01692405459
16	-0.9796225183	-0.9791837277	-1.165959639	0.02715121136	0.04744695787	-0.0136701296
17	-0.1418972136	-0.1403771036	-0.1688879347	0.02715121136	0.02757704037	-0.001980102808
18	-0.02098840668	-0.0207591177	-0.0249806784	0.02715121136	0.02716052773	0.000292882446
19	-1.074974846	-1.076837843	-1.275620999	0.02130325815	0.04588920368	-0.01169947016

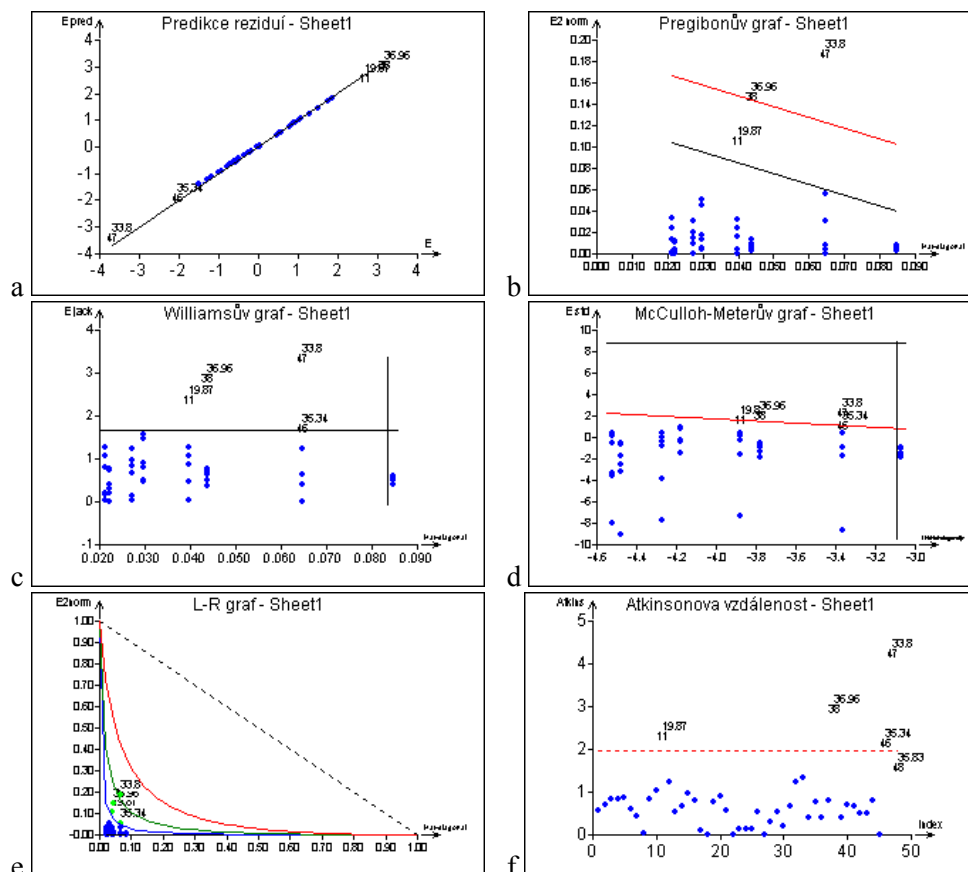
20	-1.247184897	-1.254954389	-1.479974392	0.02130325815	0.05439746653	-0.01357371527
21	-0.7908282621	-0.7875571492	-0.9384379001	0.02130325815	0.03460947735	-0.00860696572
22	0.01855897793	0.01835621021	0.02202304738	0.02130325815	0.02131058636	0.000201986315
23	-0.1880930833	-0.1861089423	-0.2232010243	0.02130325815	0.02205598249	-0.002047107821
24	-0.1708720782	-0.1690582289	-0.202765685	0.02130325815	0.02192445967	-0.00185968331
25	-0.2003570447	-0.1982538087	-0.2378556173	0.02213868003	0.02299203294	-0.00226803147
26	0.7299743843	0.7262147597	0.866595472	0.02213868003	0.03346619584	0.008263272611
27	-0.01084508697	-0.01072657159	-0.01287483981	0.02213868003	0.0221411803	-0.00012276582
28	0.4198639079	0.4160731169	0.4984451089	0.02213868003	0.02588613587	0.004752837916
29	0.7644311039	0.7609250175	0.9075010679	0.02213868003	0.03456081191	0.008653320911
30	-0.2864988437	-0.2836207717	-0.340119607	0.02213868003	0.0238835585	-0.00324315222
31	-0.7927443244	-0.7894916834	-0.9447524752	0.02965747703	0.04291411862	-0.01211468942
32	1.464250414	1.483225721	1.745019372	0.02965747703	0.07488449388	0.02237662061
33	1.550725308	1.575511365	1.848075764	0.02965747703	0.08038422035	0.02369812675
34	-0.4900821948	-0.4859963753	-0.5840551012	0.02965747703	0.03472394242	-0.00748941795
35	0.9021636016	0.9003038856	1.07515282	0.02965747703	0.04682619373	0.01378683076
36	0.4697891306	0.4657733716	0.5598708567	0.02965747703	0.03431305024	0.007179300102
37	0.7832686815	0.779926576	0.9403669725	0.04385964912	0.05661185568	0.01796487801
38	2.656236036	2.855290866	3.188990826	0.04385964912	0.19051474	0.06092284486
39	0.3825407824	0.3789631515	0.459266055	0.04385964912	0.04690136958	0.008773871155
40	0.6874424447	0.6834489276	0.8253211009	0.04385964912	0.05368247626	0.01576702855
41	0.6438850644	0.6397372894	0.7730275229	0.04385964912	0.05247713375	0.01476800606
42	-0.5060297764	-0.5018981267	-0.6075229358	0.04385964912	0.04918215268	-0.01160618753
43	0.4095633092	0.4058276879	0.4971683787	0.06474519632	0.06815566608	0.01417648793
44	-0.6474217377	-0.6432834043	-0.7859044216	0.06474519632	0.07326729719	-0.02240964032
45	0.01319391666	0.01304974121	0.01601607861	0.06474519632	0.06474873564	0.000456689835
46	-1.66917395	-1.703320343	-2.026208129	0.06474519632	0.1213919873	-0.05777623095
47	-3.025638093	-3.343727876	-3.672818222	0.06474519632	0.2508707808	-0.1047284289
48	-1.237571722	-1.244946829	-1.502286735	0.06474519632	0.09588478493	-0.04283689525

B. Analýza vlivu

Index	Atkinsonova vzdálenost	Andrews -Pregibon	st. Vliv na Y [^]	Vliv na param LD(b)	Vliv na rozptyl LD(s)	Celkový vliv LD(b,s)
1	0.5690355198	0.9121247615	-0.118652108	0.01496400887	0.007460027925	0.02216405389
2	0.7113646362	0.9104004571	-0.1483297803	0.02333963584	0.005952589849	0.02893216796
3	0.841142721	0.9085016495	-0.1753903816	0.03256120333	0.004485614092	0.03661459054
4	0.841142721	0.9085016495	-0.1753903816	0.03256120333	0.004485614092	0.03661459054
5	0.8801590342	0.9078704878	-0.1835258453	0.03562605042	0.004043076544	0.03922177847
6	0.607813174	0.9116923548	-0.1267378078	0.017066451645	0.00706640567	0.02384276525
7	0.445121084	0.9558891415	0.09281416202	0.009145523045	0.006444465502	0.01544179945
8	0.02501204554	0.9603034134	0.00521537202	2.90130125E-005	0.01054901902	0.01057742802
9	0.8364066631	0.9448621253	0.1744028453	0.03191134426	0.000558648523	0.03232683885
10	1.0438566655	0.936458834	0.2176591588	0.04925310867	0.000404967664	0.04988605526
11	2.291194859	0.8553310027	0.4777471535	0.2163541332	0.222297127	0.4606835738
12	1.219085273	0.9280679617	0.2541968515	0.06656299483	0.004140193343	0.07162805661
13	0.5404219691	0.9631110494	0.1126857702	0.01340717405	0.002889952099	0.01615239415
14	0.6649749951	0.9581806898	-0.1386568715	0.02019399436	0.000822856543	0.02090306135
15	0.976811269	0.9417410386	-0.2036792294	0.04281684377	0.003155697563	0.04648471398
16	0.7845128106	0.9525530421	-0.163582229	0.02793948466	2.083076681E-008	0.02794846184
17	0.1124688176	0.9724229596	-0.02345136961	0.0005863708275	0.01013033728	0.01070474698
18	0.01663201023	0.9728394723	-0.003468013867	1.282880362E-005	0.01055406723	0.01056662889
19	0.7619266622	0.9541107963	-0.1588726915	0.02623971939	0.0004629163331	0.02682524987
20	0.8879546865	0.9456025335	-0.1851513512	0.03531695072	0.004293919972	0.04009854382
21	0.5572434085	0.9653905226	-0.1161932828	0.01420304298	0.001298395081	0.01539931312
22	0.01298810779	0.9786894136	0.002708207685	7.823288907E-006	0.01055615505	0.01056381542
23	0.1316831184	0.9779440175	-0.02745782828	0.0008035692501	0.009808151896	0.01059559233
24	0.1196187271	0.9780755403	-0.02494222879	0.0006631633188	0.009938192322	0.01058795664
25	0.1430614707	0.9770079671	-0.02983037874	0.0009483372417	0.00970850522	0.01063790567
26	0.524042147	0.9665338042	0.1092703412	0.012586824	0.002114829556	0.01458550403
27	0.007740376424	0.9778588197	-0.001613980055	2.778586539E-006	0.01056108478	0.01056380549
28	0.3002415561	0.9741138641	0.06260469214	0.004164435206	0.007070885657	0.01116442636
29	0.5490893355	0.9654391881	0.1144930411	0.0138029564	0.001636385895	0.0153276493

30	0.2046629267	0.9761164415	-0.04267517025	0.001939076024	0.00885266811	0.01075477916
31	0.6619360697	0.9570858814	-0.1380232117	0.0200386367	0.001274949882	0.02117204161
32	1.243585746	0.9251155061	0.2593055532	0.06833042135	0.01723294393	0.0874607303
33	1.320961097	0.9196157796	0.2754394292	0.0766329542	0.0258489695	0.1050877099
34	0.4074755153	0.9652760576	-0.08496451833	0.007659417497	0.005973793208	0.01351360567
35	0.7548447033	0.9531738063	0.157396001	0.02595050085	0.0002457356123	0.02612028124
36	0.3905198768	0.9656869498	0.08142902328	0.007038281499	0.006298666984	0.01322404997
37	0.8011049041	0.9433881443	0.1670419197	0.0293572668	0.001392382205	0.0305355186
38	2.932824174	0.80948526	0.6115361141	0.3365401445	0.5332960338	0.9238936268
39	0.389253615	0.9530986304	0.08116498945	0.007004073735	0.007616162159	0.01449670681
40	0.7020074768	0.9463175237	0.1463786777	0.02261503615	0.002751723619	0.02513073944
41	0.6571088814	0.9475228662	0.1370166734	0.01984055675	0.003442083561	0.02305003318
42	0.5155267984	0.9508178473	-0.1074947683	0.01225529063	0.005715083556	0.01778376989
43	0.5120877585	0.9318443339	0.1067776789	0.01211569371	0.007224424868	0.0191326297
44	0.8117177965	0.9267327028	-0.1692548607	0.03026903831	0.003384958695	0.03330537581
45	0.01646662592	0.9352512644	0.003433528856	1.257501253E-005	0.01055985749	0.01057217057
46	2.149309971	0.8786080127	-0.4481621092	0.2008423521	0.04176291684	0.2515388275
47	4.21923433	0.7491292192	-0.8797711741	0.6567806821	1.036430686	1.844827885
48	1.570918027	0.9041152151	-0.327559052	0.1105100391	0.003954432967	0.1160180292

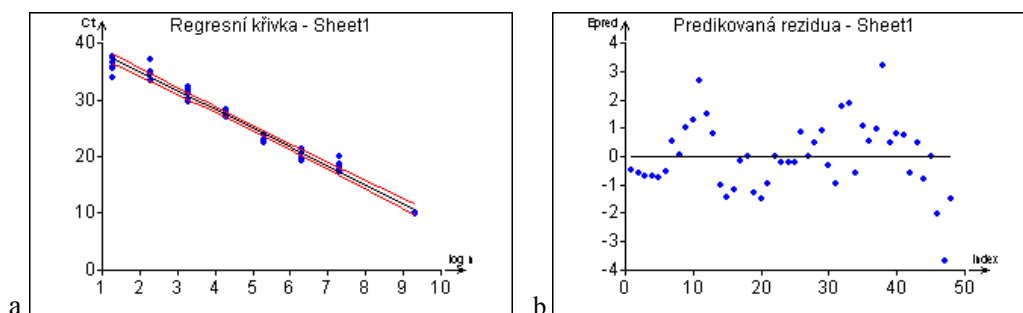
Obrázek 1 - Grafy vlivných bodů: a) Graf predikce reziduí; b) Pregibonův graf; c) Williamskův graf; d) McCulloh-Meeterův graf; e) L-R graf; f) Graf Atkinsonových vzdáleností



Model

Podle obrázku 2 je jedná o lineární závislost, modelem je přímka.

Obrázek 2 - Regresní křivka (a) a Graf predikovaných reziduí (b)



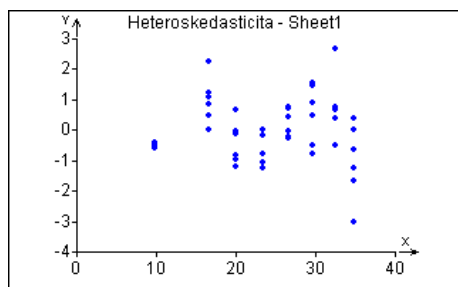
Metoda

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu
 Hodnota kritéria F : 2399.37914
 Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) : 4.051748692
 Pravděpodobnost : 2.418905247E-041
 Závěr : Model je významný

Scottovo kritérium multikolinearity
 Hodnota kritéria SC : -0.5077388729
 Závěr : Model je korektní.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity
 Hodnota kritéria CW : 3.991645297
 Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$: 3.841458829
 Pravděpodobnost : 0.04572639309
Závěr : Rezidua vykazují heteroskedasticitu!

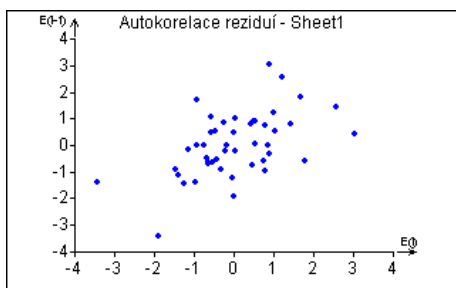
Obrázek 3 - Graf heteroskedasticity



Jarque-Berrův test normality
 Hodnota kritéria JB : 1.92701655
 Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 2)$: 5.991464547
 Pravděpodobnost : 0.3815519461
 Závěr : Rezidua mají normální rozdělení.

Waldův test autokorelace
 Hodnota kritéria WA : 16.59636679
 Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$: 3.841458829
 Pravděpodobnost : 4.623951671E-005
Závěr : Autokorelace je významná

Obrázek 4 - Graf autokorelace reziduí



Durbin-Watsonův test autokorelace

Hodnota kritéria DW : -1

Kritické hodnoty DW 1.43 1.62

Závěr : Rezidua jsou pozitivně autokorelována!

Znaménkový test reziduí

Hodnota kritéria Sg : 2.15512916

Kvantil $N(1-\alpha/2)$: 1.959963999

Pravděpodobnost : 0.03115172844

Závěr : V reziduích je trend!

Na základě kritiky dat, byly vynechány body indikované jako outliery: 11, 38, 46 a 47

▪ Konstrukce zpřesněného modelu

Odhady parametrů

Proměnná	Odhad	Směr.Odch.	Závěr	p	Spodní mez	Horní mez
Abs	41.89159861	0.3006246966	Významný	0	41.28491341	42.49828381
log n	-3.391259318	0.05326539432	Významný	0	-3.498753235	-3.2837654

Statistické charakteristiky regrese

Vícenásobný korelační koeficient R : 0.994859225

Koeficient determinace R^2 : 0.9897448777

Predikovaný korelační koeficient R_p : 0.9778227103

Střední kvadratická chyba predikce MEP : 0.7631661985

Akaikeho informační kritérium : -11.57664829

Na základě analýzy reziduí byly z analýzy vyloučeny ještě body 12, 32 a 48. Byla provedena oprava modelu pro soubor dat bez bodů 11, 12, 32, 38, 46, 47 a 48:

▪ Odhady parametrů

Proměnná	Odhad	Směr.Odch.	Závěr	p	Spodní mez	Horní mez
Abs	42.00382811	0.284418063	Významný	0	41.42853827	42.57911794
log n (copy)	-3.420051589	0.0498306171	Významný	0	-3.520843526	-3.319259652

Statistické charakteristiky regrese

Vícenásobný korelační koeficient R :	0.9958858959
Koeficient determinace R^2 :	0.9917887176
Predikovaný korelační koeficient R_p :	0.9822690261
Střední kvadratická chyba predikce MEP :	0.6055255623
Akaikeho informační kritérium :	-19.8938886

Testování regresního tripletu

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu

Hodnota kritéria F :	4710.56264
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	4.091278558
Pravděpodobnost :	2.731122227E-042
Závěr :	Model je významný

Scottovo kritérium multikolinearity

Hodnota kritéria SC :	-0.4757606523
Závěr :	Model je korektní.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity

Hodnota kritéria CW :	0.2414740717
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa},1)$:	3.841458829
Pravděpodobnost :	0.6231434839
Závěr :	Rezidua vykazují homoskedasticitu

Jarque-Berrův test normality

Hodnota kritéria JB :	0.6251453097
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa},2)$:	5.991464547
Pravděpodobnost :	0.7315624754
Závěr :	Rezidua mají normální rozdělení.

Waldův test autokorelace

Hodnota kritéria WA :	2.408044292
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa},1)$:	3.841458829
Pravděpodobnost :	0.1207130897
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná

Durbin-Watsonův test autokorelace

Hodnota kritéria DW :	-1
Kritické hodnoty DW	1.39 1.6
Závěr :	Pozitivní autokorelace reziduí není prokázána.

Znaménkový test reziduí

Hodnota kritéria Sg :	0.9193092775
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1.959963999
Pravděpodobnost :	0.3579338266
Závěr :	V reziduích není trend.

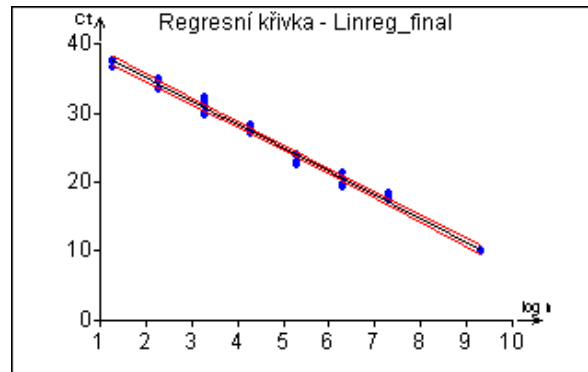
▪ **Výsledný model**

$$y = 42,00 (0,28) - 3,42 (0,05) x,$$

kde $x = \log n$ a $y = Ct$

D = 99,18 %

Obrázek 5 – Kalibrační graf



▪ **Kalibrace**

Parametry kalibračního modelu

Parametr	Odhad	Sm. odchylka	Spodní mez	Horní mez
Abs.	42.00382811	0.284418063	41.42853827	42.57911794
X	-3.420051589	0.0498306171	-3.520843526	-3.319259652

Významnost absolutního členu

Hodnota	Spodní mez	Horní mez	Závěr
42.00382811	41.42853827	42.57911794	Významný

Validace směrnice

Hodnota	Spodní mez	Horní mez	Směrnice=1
-3.420051589	-3.520843526	-3.319259652	Ne

Citlivost metody : -3.420051589

Zvolený faktor K : 3

Vypočítaná sm.odch. slepého signálu : 0.7661451203

▪ **Analýza reziduí**

Reziduální součet čtverců : 22.89215547

Půměrné absolutní reziduum : 0.5929704156

Korelační koeficient : 0.9958858959

Číslo měření	Naměřené X	Naměřené Y	Vypočítané Y	Reziduum	Váha
1	9.3	10.2	10.19734833	0.002651671482	1
2	9.3	10.09	10.19734833	-0.1073483285	1

3	9.3	9.99	10.19734833	-0.2073483285	1
4	9.3	9.99	10.19734833	-0.2073483285	1
5	9.3	9.96	10.19734833	-0.2373483285	1
6	9.3	10.17	10.19734833	-0.02734832852	1
7	7.3	17.82	17.03745151	0.7825484936	1
8	7.3	17.32	17.03745151	0.2825484936	1
9	7.3	18.28	17.03745151	1.242548494	1
10	7.3	18.52	17.03745151	1.482548494	1
11	6.3	21.4	20.4575031	0.9424969047	1
12	6.3	19.65	20.4575031	-0.8075030953	1
13	6.3	19.21	20.4575031	-1.247503095	1
14	6.3	19.48	20.4575031	-0.9775030953	1
15	6.3	20.45	20.4575031	-0.007503095336	1
16	6.3	20.59	20.4575031	0.1324969047	1
17	5.3	22.69	23.87755468	-1.187554684	1
18	5.3	22.49	23.87755468	-1.387554684	1
19	5.3	23.02	23.87755468	-0.8575546843	1
20	5.3	23.96	23.87755468	0.08244531572	1
21	5.3	23.72	23.87755468	-0.1575546843	1
22	5.3	23.74	23.87755468	-0.1375546843	1
23	4.3	27.03	27.29760627	-0.2676062732	1
24	4.3	28.11	27.29760627	0.8123937268	1
25	4.3	27.25	27.29760627	-0.04760627322	1
26	4.3	27.75	27.29760627	0.4523937268	1
27	4.3	28.15	27.29760627	0.8523937268	1
28	4.3	26.93	27.29760627	-0.3676062732	1
29	3.3	29.67	30.71765786	-1.047657862	1
30	3.3	32.38	30.71765786	1.662342138	1
31	3.3	30.02	30.71765786	-0.6976578622	1
32	3.3	31.63	30.71765786	0.9123421378	1
33	3.3	31.13	30.71765786	0.4123421378	1
34	2.3	34.81	34.13770945	0.6722905489	1
35	2.3	34.35	34.13770945	0.2122905489	1
36	2.3	34.7	34.13770945	0.5622905489	1
37	2.3	34.65	34.13770945	0.5122905489	1
38	2.3	33.33	34.13770945	-0.8077094511	1
39	1.3	37.7	37.55776104	0.14223896	1
40	1.3	36.5	37.55776104	-1.05776104	1
41	1.3	37.25	37.55776104	-0.30776104	1

▪ **Kalibrační meze**

c..kritická

d..detekce

q..kvantifikace

Metoda

Yc

Yd

Yq

Metoda podle ISO 11843-2

43.40486708

43.67284308

44.80590605

Přímá metoda analytu

42.80717664

42.84884952

42.89060079

Přímá metoda signálu, IUPAC

42.80717664

43.64063421

44.50555719

Kombinovaná metoda Ebel,Kamm

42.04399553

42.84884401

42.89059528

Metoda K*Sigma z regrese

42.80717664

43.61052517

44.4138737

Metoda K*Sigma, ACS

44.30226347

46.60069883

48.89913419

Metoda

Xc

Xd

Xq

Metoda podle ISO 11843-2

-0.4096543391

-0.4880087127

-0.8193086782

Přímá metoda analytu

-0.2348936886

-0.2470785571

-0.2592863487

Přímá metoda signálu, IUPAC	-0.2348936886	-0.4785910574	-0.7314886968
Kombinovaná metoda Ebel,Kamm	-0.01174468443	-0.2470769482	-0.2592847368
Metoda K*Sigma z regrese	-0.2348936886	-0.4697873772	-0.7046810658
Metoda K*Sigma, ACS	-0.6720469856	-1.344093971	-2.016140957

▪ Kalibrační tabulka

Číslo vzorku	Zpětný odhad	Spodní mez	Horní mez	Nepřímý odhad	Naměřené hodnoty
1	4.699878843	4.704916729	4.694840958	0	25.93
2	4.541986488	4.547097769	4.536875207	0	26.47
3	4.957184903	4.962146629	4.952223178	0	25.05
4	5.585830391	5.590842003	5.58081878	0	22.9
5	4.881162658	4.88614115	4.876184167	0	25.31
6	3.98351538	3.989033882	3.977996879	0	28.38
7	3.009845857	3.016502967	3.003188747	0	31.71
8	3.93673246	3.942294506	3.931170414	0	28.54
9	5.153088381	5.158029516	5.148147246	0	24.38
10	3.194053605	3.200462863	3.187644346	0	31.08
11	4.980576363	4.985533912	4.975618815	0	24.97
12	4.694030978	4.699071228	4.688990729	0	25.95
13	4.530290758	4.535408254	4.525173262	0	26.51
14	5.211567031	5.216508381	5.206625681	0	24.18
15	3.568316965	3.574265387	3.562368542	0	29.8
16	4.936717376	4.941683137	4.931751615	0	25.12
17	4.887010523	4.891987553	4.882033494	0	25.29
18	5.594602189	5.599616854	5.589587524	0	22.87
19	5.740798814	5.745873562	5.735724066	0	22.37
20	5.664776569	5.669817923	5.659735214	0	22.63
21	5.448405564	5.453377652	5.443433475	0	23.37
22	4.445496716	4.450662404	4.440331027	0	26.8
23	4.831455806	4.83644788	4.826463731	0	25.48
24	4.925021646	4.929989871	4.920053421	0	25.16
25	4.965956701	4.970916806	4.960996596	0	25.02
26	4.980576363	4.985533912	4.975618815	0	24.97
27	4.717422438	4.722453398	4.712391478	0	25.87
28	5.310980736	5.31592917	5.306032302	0	23.84
29	5.147240516	5.152181791	5.142299241	0	24.4
30	4.925021646	4.929989871	4.920053421	0	25.16
31	3.629719547	3.635598551	3.623840544	0	29.59
32	4.790520751	4.795525553	4.785515948	0	25.62
33	4.834379738	4.839370957	4.82938852	0	25.47
34	4.933793443	4.938759809	4.928827078	0	25.13
35	5.009815688	5.014768669	5.004862708	0	24.87
36	5.158936246	5.163877271	5.153995221	0	24.36
37	5.156012314	5.16095339	5.151071237	0	24.37
38	4.995196026	5.0001512	4.990240852	0	24.92
39	4.351930875	4.357155991	4.34670576	0	27.12

Závěr úlohy

Bylo provedeno sestavení kalibračního modelu pro stanovení obsahu houby *P. teres* v pletivech hostitele. U 39 vzorků DNA extrahovaných z listů odrůd ječmene z polního pokusu byl na základě měřených hodnot Ct zjištěn obsah houby. Jak hodnoty zpětného (Naszodyho) odhadu, tak hodnoty intervalu spolehlivosti představují hodnoty logaritmu počtu cílových sekvencí, tedy molekul DNA houby. Citlivost metody má hodnotu -3,42, což představuje účinnost reakce 96,2% ($E = 10^{-1/k} - 1$). Limita detekce je y_D (IUPAC) = Ct = 43,8; x_D (IUPAC) = log n = -0,51, tedy n = 0,3 molekuly.

Úloha 2 – Nelineární kalibrace

Stanovení hodnoty Ct z hodnot fluorescence odečítaných během TaqMan real-time PCR

Úvod

TaqMan real-time PCR je polymerázová řetězová reakce prováděná v uspořádání v tzv. reálném čase. Součástí reakce jsou primery, které uvozují úsek DNA, který je pomocí Taq polymerázy množen do detekovatelného množství. Detekce probíhá pomocí CCD kamery, která odečítá míru fluorescence při dané vlnové délce, kterou vyzařuje zářič (v našem případě fluorescenční značka FAM, $\lambda = 525$ nm) navázaný na 5' konci tzv. TaqMan sondy. Tato sonda se na základě komplementarity váže do cíleného úseku DNA ohraničeného výše zmíněnými primery. Na 3' konci obsahuje tzv. zhášec (TAMRA, $\lambda = 580$ nm), kterému zářič předává energii přes Försterův rezonanční přenos energie, a proto není detekována fluorescence při sledované vlnové délce zářiče. Ve chvíli, kdy dojde k navázání primerů a polymeráza syntetizuje komplementární řetězec, dojde díky 5' - 3' exonukleázové aktivitě Taq polymerázy k degradaci sondy. Zářič a zhášec se od sebe oddálí a energie zářiče již není zhášena, ale detekována jako růst fluorescence při sledované vlnové délce zářiče.

U TaqMan real-time PCR se používá další zářič ROX, který slouží jako tzv. pasivní kontrola, pomocí které se detekovaná hodnota fluorescence normalizuje:

$R_n = \text{hodnota fluorescence FAM} / \text{hodnota fluorescence ROX}$

$B_n = \text{hodnota fluorescence pozadí} / \text{hodnota fluorescence ROX}$

Hodnoty R_n jsou vynášeny do grafu proti cyklu PCR. B_n nastavuje program SDS software 2.2 sám nebo je možno ho upravit na základě vizuálního hodnocení průběhu reakcí. Ct hodnota je pak definována jako cyklus, ve kterém dojde ke statisticky významnému vzrůstu fluorescence (R_n) nad úroveň fluorescence pozadí (B_n).

Cílem úlohy je vytvořit kalibrační model pro vybrané standardy (EC1, EC4 a EC8) a exaktním způsobem určit příslušné hodnoty Ct a jejich intervalové odhady.

Data

Pro jednoduchost bylo vybráno vždy jen jedno opakování u vybraných standardů: EC1, EC4 a EC8. Surová data jsou uvedena v souboru 2.2_Kalibrace_data v listu:

ABI7900_multikomponent. Data připravená pro analýzu jsou shrnuta v témž souboru v listu: Nelineární kalibrace a v Tabulce 2. Hodnota B_n byla spočtena jako průměr hodnot B_n pro všechny analyzované vzorky v daném běhu a má hodnotu 1,22.

Tabulka 2 – Data pro nelineární kalibraci

Cyklus	Rn (EC1)	Cyklus	Rn (EC4)	Cyklus	Rn (EC8)
1	0.98266	1	0.91851	1	0.92082
2	0.98715	2	0.92095	2	0.92569
3	0.98906	3	0.91836	3	0.92208
4	0.99567	4	0.92157	4	0.92462
5	1.00874	5	0.92566	5	0.93875
6	1.02246	6	0.93190	6	0.93703
7	1.04537	7	0.93266	7	0.94651
8	1.06961	8	0.93502	8	0.94478
9	1.11544	9	0.94106	9	0.94659
10	1.16684	10	0.93805	10	0.94612
11	1.23094	11	0.93522	11	0.93844
12	1.33554	12	0.96792	12	0.97860
13	1.43702	13	0.96155	13	0.97526
14	1.55466	14	0.95686	14	0.96734
15	1.69425	15	0.96498	15	0.97822
16	1.82547	16	0.95975	16	0.96640
17	1.97178	17	0.95465	17	0.95579
18	2.16737	18	0.97184	18	0.97699
19	2.34045	19	0.99088	19	0.99521
20	2.51779	20	1.00488	20	1.00798
21	2.65884	21	0.99579	21	0.97498
22	2.83943	22	1.02983	22	0.97508
23	3.03117	23	1.08858	23	0.98536
24	3.20153	24	1.16388	24	0.96860
25	3.35284	25	1.28710	25	0.97585
26	3.50558	26	1.42384	26	0.97794
27	3.64744	27	1.60302	27	0.98130
28	3.80652	28	1.81335	28	0.99575
29	3.94602	29	2.02272	29	0.98580
30	4.10224	30	2.23433	30	0.99525
31	4.18291	31	2.45756	31	0.99103
32	4.32150	32	2.70904	32	1.03256
33	4.38958	33	2.92909	33	1.04763
34	4.49559	34	3.10886	34	1.03458
35	4.57656	35	3.32841	35	1.07130
36	4.63768	36	3.50458	36	1.08753
37	4.68151	37	3.63995	37	1.13020
38	4.73820	38	3.77723	38	1.21829
39	4.81010	39	3.94582	39	1.36641
40	4.86723	40	4.07873	40	1.54326

41	4.88487	41	4.21917	41	1.76905
42	4.96455	42	4.34436	42	1.97434
43	4.97090	43	4.44046	43	2.21649
44	5.04719	44	4.52241	44	2.40509
45	5.03650	45	4.59842	45	2.60801

Výsledky

Použitý program: ADSTAT

1. EC1

▪ Návrh modelu

Byla použita kvadratická splinová funkce.

Počet bodů $n = 45$

Počet uzlů $m = 3$

▪ Parametry kalibrace

Koeficienty rovnice : $f[i]*x^2+g[i]*x+h[i]$ pro $k[i-1] < x \leq k[i]$

$k[i]$	$f[i]$	$g[i]$	$h[i]$
1.2000E+01	6.7600E-03	-5.7548E-02	1.0861E+00
2.3000E+01	3.9656E-03	9.5192E-03	6.8368E-01
3.4000E+01	-5.2121E-03	4.3169E-01	-4.1713E+00
4.5000E+01	-2.3409E-03	2.3645E-01	-8.5221E-01

▪ Analýza reziduí

Bod	Měřená hodnota	Predikovaná hodnota	Absolutní reziduum	Relativní reziduum
i	$y_{exp}[i]$	$y_{vyp}[i]$	$e[i]$	$er[i]$
1	9.8266E-01	1.0353E+00	5.2640E-02	5.0845E+00
2	9.8715E-01	9.9803E-01	1.0882E-02	1.0903E+00
3	9.8906E-01	9.7428E-01	-1.4776E-02	-1.5166E+00
4	9.9567E-01	9.6406E-01	-3.1614E-02	-3.2793E+00
5	1.0087E+00	9.6735E-01	-4.1392E-02	-4.2789E+00
6	1.0225E+00	9.8416E-01	-3.8299E-02	-3.8916E+00
7	1.0454E+00	1.0145E+00	-3.0877E-02	-3.0436E+00
8	1.0696E+00	1.0583E+00	-1.1264E-02	-1.0643E+00
9	1.1154E+00	1.1157E+00	2.7806E-04	2.4922E-02
10	1.1668E+00	1.1866E+00	1.9771E-02	1.6662E+00
11	1.2309E+00	1.2710E+00	4.0083E-02	3.1536E+00
12	1.3355E+00	1.3690E+00	3.3416E-02	2.4410E+00
13	1.4370E+00	1.4776E+00	4.0595E-02	2.7473E+00
14	1.5547E+00	1.5942E+00	3.9544E-02	2.4805E+00
15	1.6942E+00	1.7187E+00	2.4475E-02	1.4240E+00
16	1.8255E+00	1.8512E+00	2.5707E-02	1.3887E+00
17	1.9718E+00	1.9916E+00	1.9780E-02	9.9318E-01
18	2.1674E+00	2.1399E+00	-2.7496E-02	-1.2849E+00
19	2.3405E+00	2.2961E+00	-4.4331E-02	-1.9307E+00

20	2.5178E+00	2.4603E+00	-5.7495E-02	-2.3369E+00
21	2.6588E+00	2.6324E+00	-2.6437E-02	-1.0043E+00
22	2.8394E+00	2.8124E+00	-2.6988E-02	-9.5961E-01
23	3.0312E+00	3.0004E+00	-3.0759E-02	-1.0251E+00
24	3.2015E+00	3.1871E+00	-1.4395E-02	-4.5167E-01
25	3.3528E+00	3.3634E+00	1.0594E-02	3.1497E-01
26	3.5056E+00	3.5293E+00	2.3729E-02	6.7233E-01
27	3.6474E+00	3.6848E+00	3.7319E-02	1.0128E+00
28	3.8065E+00	3.8298E+00	2.3266E-02	6.0749E-01
29	3.9460E+00	3.9644E+00	1.8368E-02	4.6333E-01
30	4.1022E+00	4.0886E+00	-1.3674E-02	-3.3445E-01
31	4.1829E+00	4.2023E+00	1.9410E-02	4.6189E-01
32	4.3215E+00	4.3056E+00	-1.5850E-02	-3.6813E-01
33	4.3896E+00	4.3986E+00	8.9753E-03	2.0405E-01
34	4.4956E+00	4.4810E+00	-1.4554E-02	-3.2479E-01
35	4.5766E+00	4.5560E+00	-2.0595E-02	-4.5205E-01
36	4.6377E+00	4.6262E+00	-1.1469E-02	-2.4791E-01
37	4.6815E+00	4.6918E+00	1.0266E-02	2.1880E-01
38	4.7382E+00	4.7527E+00	1.4458E-02	3.0421E-01
39	4.8101E+00	4.8089E+00	-1.2408E-03	-2.5803E-02
40	4.8672E+00	4.8604E+00	-6.8516E-03	-1.4097E-01
41	4.8849E+00	4.9072E+00	2.2346E-02	4.5536E-01
42	4.9646E+00	4.9494E+00	-1.5179E-02	-3.0668E-01
43	4.9709E+00	4.9868E+00	1.5945E-02	3.1973E-01
44	5.0472E+00	5.0196E+00	-2.7554E-02	-5.4892E-01
45	5.0365E+00	5.0477E+00	1.1246E-02	2.2280E-01

Reziduální součet čtverců, RSC : 3.1794E-02
 Průměr absolutních hodnot reziduí, Me : 2.3249E-02
 Průměr relativních reziduí, Mer[%] : 1.257
 Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 8.1524E-04
 Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 2.8552E-02

▪ **Analýza derivací a integrálů**

Bod	Predikovaná hodnota	První derivace	Druhá derivace	Integrál
i	Yvyp[i]	der1[i]	der2[i]	int[i]
1	1.0353E+00	-4.4028E-02	1.3520E-02	0.0000E+00
2	9.9803E-01	-3.0508E-02	1.3520E-02	1.0155E+00
3	9.7428E-01	-1.6988E-02	1.3520E-02	2.0006E+00
4	9.6406E-01	-3.4678E-03	1.3520E-02	2.9686E+00
5	9.6735E-01	1.0052E-02	1.3520E-02	3.9332E+00
6	9.8416E-01	2.3572E-02	1.3520E-02	4.9078E+00
7	1.0145E+00	3.7092E-02	1.3520E-02	5.9060E+00
8	1.0583E+00	5.0613E-02	1.3520E-02	6.9413E+00
9	1.1157E+00	6.4133E-02	1.3520E-02	8.0272E+00
10	1.1866E+00	7.7653E-02	1.3520E-02	9.1773E+00
11	1.2710E+00	9.1173E-02	1.3520E-02	1.0405E+01
12	1.3690E+00	1.0469E-01	1.3520E-02	1.1724E+01
13	1.4776E+00	1.1262E-01	7.9311E-03	1.3146E+01
14	1.5942E+00	1.2056E-01	7.9311E-03	1.4682E+01

15	1.7187E+00	1.2849E-01	7.9311E-03	1.6337E+01
16	1.8512E+00	1.3642E-01	7.9311E-03	1.8122E+01
17	1.9916E+00	1.4435E-01	7.9311E-03	2.0042E+01
18	2.1399E+00	1.5228E-01	7.9311E-03	2.2108E+01
19	2.2961E+00	1.6021E-01	7.9311E-03	2.4325E+01
20	2.4603E+00	1.6814E-01	7.9311E-03	2.6702E+01
21	2.6324E+00	1.7607E-01	7.9311E-03	2.9248E+01
22	2.8124E+00	1.8400E-01	7.9311E-03	3.1970E+01
23	3.0004E+00	1.9194E-01	7.9311E-03	3.4876E+01
24	3.1871E+00	1.8151E-01	-1.0424E-02	3.7970E+01
25	3.3634E+00	1.7109E-01	-1.0424E-02	4.1246E+01
26	3.5293E+00	1.6066E-01	-1.0424E-02	4.4694E+01
27	3.6848E+00	1.5024E-01	-1.0424E-02	4.8302E+01
28	3.8298E+00	1.3981E-01	-1.0424E-02	5.2060E+01
29	3.9644E+00	1.2939E-01	-1.0424E-02	5.5958E+01
30	4.0886E+00	1.1897E-01	-1.0424E-02	5.9985E+01
31	4.2023E+00	1.0854E-01	-1.0424E-02	6.4131E+01
32	4.3056E+00	9.8118E-02	-1.0424E-02	6.8386E+01
33	4.3986E+00	8.7693E-02	-1.0424E-02	7.2739E+01
34	4.4810E+00	7.7269E-02	-1.0424E-02	7.7180E+01
35	4.5560E+00	7.2587E-02	-4.6818E-03	8.1699E+01
36	4.6262E+00	6.7906E-02	-4.6818E-03	8.6290E+01
37	4.6918E+00	6.3224E-02	-4.6818E-03	9.0950E+01
38	4.7527E+00	5.8542E-02	-4.6818E-03	9.5672E+01
39	4.8089E+00	5.3860E-02	-4.6818E-03	1.0045E+02
40	4.8604E+00	4.9178E-02	-4.6818E-03	1.0529E+02
41	4.9072E+00	4.4496E-02	-4.6818E-03	1.1017E+02
42	4.9494E+00	3.9815E-02	-4.6818E-03	1.1510E+02
43	4.9868E+00	3.5133E-02	-4.6818E-03	1.2007E+02
44	5.0196E+00	3.0451E-02	-4.6818E-03	1.2507E+02
45	5.0477E+00	2.5769E-02	-4.6818E-03	1.3011E+02

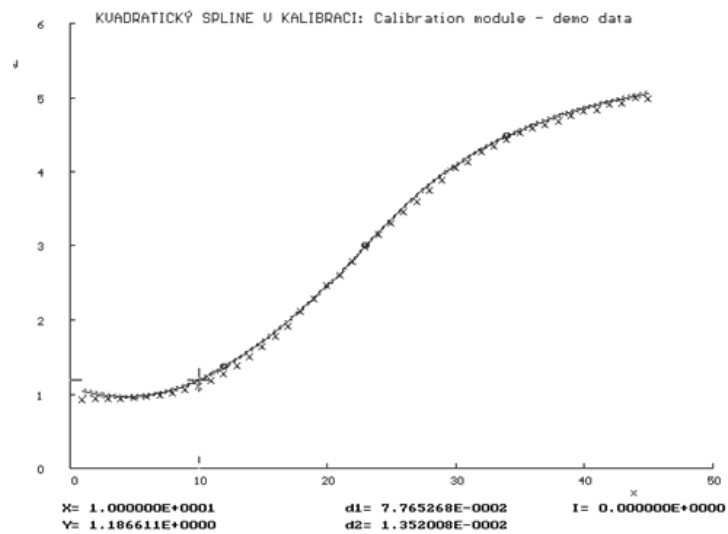
▪ **Kalibrační meze**

Kritická úroveň yc: 1.179456E+00 xc: 9.907108E+00
Limita detekce yd: 1.216587E+00 xd: 1.037386E+01

▪ **Kalibrační tabulka**

Zadaná hodnota	Inverzní odhad	Konfidenční interval	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.220000E+00	1.041499E+01	9.935998E+00	1.082942E+01

Obrázek 6 – Kalibrační křivka



2. EC4

Návrh modelu

Byla použita kvadratická splinová funkce.

Počet bodů $n = 45$

Počet uzlů $m = 7$

Parametry kalibrace

Koeficienty rovnice : $f[i]*x^2+g[i]*x+h[i]$ pro $k[i-1] < x \leq k[i]$

$k[i]$	$f[i]$	$g[i]$	$h[i]$
6.5000E+00	-1.3725E-05	2.2756E-03	9.1516E-01
1.2000E+01	4.4368E-04	-3.6707E-03	9.3449E-01
1.7500E+01	-1.0297E-03	3.1691E-02	7.2232E-01
2.3000E+01	5.4038E-03	-1.9348E-01	2.6926E+00
2.8500E+01	1.6729E-02	-7.1444E-01	8.6836E+00
3.4000E+01	-3.7911E-03	4.5521E-01	-7.9839E+00
3.9500E+01	-5.6977E-03	5.8485E-01	-1.0188E+01
4.5000E+01	-5.2795E-03	5.5182E-01	-9.5354E+00

Analýza reziduí

Bod	Měřená hodnota	Predikovaná hodnota	Absolutní reziduum	Relativní reziduum
i	$y_{exp}[i]$	$y_{vyp}[i]$	$e[i]$	$er[i]$
1	9.1851E-01	9.1743E-01	-1.0817E-03	-1.1790E-01

2	9.2095E-01	9.1966E-01	-1.2895E-03	-1.4022E-01
3	9.1836E-01	9.2187E-01	3.5102E-03	3.8077E-01
4	9.2157E-01	9.2405E-01	2.4816E-03	2.6855E-01
5	9.2566E-01	9.2620E-01	5.4090E-04	5.8400E-02
6	9.3190E-01	9.2832E-01	-3.5740E-03	-3.8499E-01
7	9.3266E-01	9.3053E-01	-2.1264E-03	-2.2852E-01
8	9.3502E-01	9.3352E-01	-1.4973E-03	-1.6039E-01
9	9.4106E-01	9.3739E-01	-3.6677E-03	-3.9126E-01
10	9.3805E-01	9.4215E-01	4.0978E-03	4.3494E-01
11	9.3522E-01	9.4780E-01	1.2581E-02	1.3274E+00
12	9.6792E-01	9.5433E-01	-1.3593E-02	-1.4244E+00
13	9.6155E-01	9.6028E-01	-1.2746E-03	-1.3273E-01
14	9.5686E-01	9.6417E-01	7.3085E-03	7.5802E-01
15	9.6498E-01	9.6600E-01	1.0201E-03	1.0560E-01
16	9.5975E-01	9.6577E-01	6.0140E-03	6.2272E-01
17	9.5465E-01	9.6348E-01	8.8277E-03	9.1624E-01
18	9.7184E-01	9.6074E-01	-1.1102E-02	-1.1556E+00
19	9.9088E-01	9.6719E-01	-2.3685E-02	-2.4489E+00
20	1.0049E+00	9.8446E-01	-2.0423E-02	-2.0746E+00
21	9.9579E-01	1.0125E+00	1.6745E-02	1.6538E+00
22	1.0298E+00	1.0514E+00	2.1581E-02	2.0526E+00
23	1.0886E+00	1.1011E+00	1.2522E-02	1.1372E+00
24	1.1639E+00	1.1729E+00	9.0486E-03	7.7146E-01
25	1.2871E+00	1.2782E+00	-8.8921E-03	-6.9567E-01
26	1.4238E+00	1.4169E+00	-6.9001E-03	-4.8697E-01
27	1.6030E+00	1.5891E+00	-1.3877E-02	-8.7324E-01
28	1.8133E+00	1.7948E+00	-1.8555E-02	-1.0338E+00
29	2.0227E+00	2.0288E+00	6.0524E-03	2.9833E-01
30	2.2343E+00	2.2603E+00	2.5972E-02	1.1490E+00
31	2.4576E+00	2.4843E+00	2.6693E-02	1.0745E+00
32	2.7090E+00	2.7006E+00	-8.4272E-03	-3.1205E-01
33	2.9291E+00	2.9094E+00	-1.9690E-02	-6.7677E-01
34	3.1089E+00	3.1106E+00	1.7439E-03	5.6064E-02
35	3.3284E+00	3.3023E+00	-2.6099E-02	-7.9031E-01
36	3.5046E+00	3.4826E+00	-2.1955E-02	-6.3041E-01
37	3.6400E+00	3.6515E+00	1.1593E-02	3.1749E-01
38	3.7772E+00	3.8091E+00	3.1846E-02	8.3605E-01
39	3.9458E+00	3.9552E+00	9.3802E-03	2.3716E-01
40	4.0787E+00	4.0900E+00	1.1315E-02	2.7664E-01
41	4.2192E+00	4.2142E+00	-4.9522E-03	-1.1751E-01
42	4.3444E+00	4.3278E+00	-1.6529E-02	-3.8193E-01
43	4.4405E+00	4.4309E+00	-9.5735E-03	-2.1606E-01
44	4.5224E+00	4.5234E+00	9.7938E-04	2.1652E-02
45	4.5984E+00	4.6053E+00	6.9112E-03	1.5007E-01

Reziduální součet čtverců, RSC	: 8.1856E-03
Průměr absolutních hodnot reziduí, Me	: 1.0612E-02
Průměr relativních reziduí, Mer[%]	: 0.662
Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 2.3387E-04
Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 1.5293E-02

▪ **Analýza derivací a integrálů**

Bod	Predikovaná hodnota	První derivace	Druhá derivace	Integrál
i	Yvyp[i]	der1[i]	der2[i]	int[i]
1	9.1743E-01	2.2481E-03	-2.7451E-05	0.0000E+00
2	9.1966E-01	2.2207E-03	-2.7451E-05	9.1855E-01
3	9.2187E-01	2.1932E-03	-2.7451E-05	1.8393E+00
4	9.2405E-01	2.1658E-03	-2.7451E-05	2.7623E+00
5	9.2620E-01	2.1383E-03	-2.7451E-05	3.6874E+00
6	9.2832E-01	2.1109E-03	-2.7451E-05	4.6147E+00
7	9.3053E-01	2.5408E-03	8.8736E-04	5.5441E+00
8	9.3352E-01	3.4282E-03	8.8736E-04	6.4760E+00
9	9.3739E-01	4.3155E-03	8.8736E-04	7.4114E+00
10	9.4215E-01	5.2029E-03	8.8736E-04	8.3511E+00
11	9.4780E-01	6.0902E-03	8.8736E-04	9.2960E+00
12	9.5433E-01	6.9776E-03	8.8736E-04	1.0247E+01
13	9.6028E-01	4.9182E-03	-2.0594E-03	1.1204E+01
14	9.6417E-01	2.8587E-03	-2.0594E-03	1.2167E+01
15	9.6600E-01	7.9930E-04	-2.0594E-03	1.3132E+01
16	9.6577E-01	-1.2601E-03	-2.0594E-03	1.4098E+01
17	9.6348E-01	-3.3196E-03	-2.0594E-03	1.5063E+01
18	9.6074E-01	1.0545E-03	1.0808E-02	1.6025E+01
19	9.6719E-01	1.1862E-02	1.0808E-02	1.6988E+01
20	9.8446E-01	2.2670E-02	1.0808E-02	1.7963E+01
21	1.0125E+00	3.3477E-02	1.0808E-02	1.8960E+01
22	1.0514E+00	4.4285E-02	1.0808E-02	1.9991E+01
23	1.1011E+00	5.5093E-02	1.0808E-02	2.1067E+01
24	1.1729E+00	8.8551E-02	3.3458E-02	2.2201E+01
25	1.2782E+00	1.2201E-01	3.3458E-02	2.3424E+01
26	1.4169E+00	1.5547E-01	3.3458E-02	2.4768E+01
27	1.5891E+00	1.8892E-01	3.3458E-02	2.6269E+01
28	1.7948E+00	2.2238E-01	3.3458E-02	2.7958E+01
29	2.0288E+00	2.3532E-01	-7.5823E-03	2.9869E+01
30	2.2603E+00	2.2774E-01	-7.5823E-03	3.2014E+01
31	2.4843E+00	2.2016E-01	-7.5823E-03	3.4387E+01
32	2.7006E+00	2.1257E-01	-7.5823E-03	3.6980E+01
33	2.9094E+00	2.0499E-01	-7.5823E-03	3.9785E+01
34	3.1106E+00	1.9741E-01	-7.5823E-03	4.2796E+01
35	3.3023E+00	1.8601E-01	-1.1395E-02	4.6003E+01
36	3.4826E+00	1.7462E-01	-1.1395E-02	4.9397E+01
37	3.6515E+00	1.6322E-01	-1.1395E-02	5.2965E+01
38	3.8091E+00	1.5183E-01	-1.1395E-02	5.6696E+01
39	3.9552E+00	1.4043E-01	-1.1395E-02	6.0579E+01
40	4.0900E+00	1.2945E-01	-1.0559E-02	6.4603E+01
41	4.2142E+00	1.1890E-01	-1.0559E-02	6.8756E+01
42	4.3278E+00	1.0834E-01	-1.0559E-02	7.3028E+01
43	4.4309E+00	9.7778E-02	-1.0559E-02	7.7408E+01
44	4.5234E+00	8.7219E-02	-1.0559E-02	8.1886E+01
45	4.6053E+00	7.6660E-02	-1.0559E-02	8.6451E+01

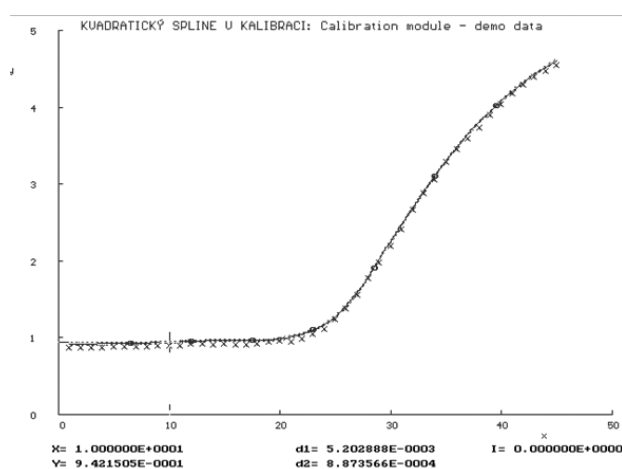
- **Kalibrační meze**

Kritická úroveň yc: 1.012040E+00 xc: 2.098523E+01
 Limita detekce yd: 1.041703E+00 xd: 2.177451E+01

- **Kalibrační tabulka**

Měřený signál	Inverzní odhad	Interval spolehlivosti	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.220000E+00	2.448684E+01	2.419121E+01	2.477452E+01

Obrázek 7 – Kalibrační křivka



3. EC8

Návrh modelu

Byla použita kvadratická splinová funkce.

Počet bodů n : 45

Počet uzlů m : 3

- **Parametry kalibrace**

Koeficienty rovnice : $f[i]*x^2+g[i]*x+h[i]$ pro $k[i-1] < x \leq k[i]$

k[i]	f[i]	g[i]	h[i]
1.2000E+01	9.5098E-05	2.4327E-03	9.1827E-01
2.3000E+01	-2.7084E-04	1.1215E-02	8.6557E-01
3.4000E+01	5.1562E-04	-2.4962E-02	1.2816E+00
4.5000E+01	1.2728E-02	-8.5544E-01	1.5400E+01

▪ **Analýza reziduí**

Bod	Měřená hodnota	Predikovaná hodnota	Absolutní reziduum	Relativní reziduum
i	yexp[i]	yvyp[i]	e[i]	er[i]
1	9.2082E-01	9.2079E-01	-2.6614E-05	-2.8903E-03
2	9.2569E-01	9.2351E-01	-2.1786E-03	-2.3590E-01
3	9.2208E-01	9.2642E-01	4.3396E-03	4.6843E-01
4	9.2462E-01	9.2952E-01	4.8980E-03	5.2694E-01
5	9.3875E-01	9.3281E-01	-5.9434E-03	-6.3715E-01
6	9.3703E-01	9.3629E-01	-7.4460E-04	-7.9527E-02
7	9.4651E-01	9.3995E-01	-6.5556E-03	-6.9744E-01
8	9.4478E-01	9.4381E-01	-9.6638E-04	-1.0239E-01
9	9.4659E-01	9.4786E-01	1.2730E-03	1.3430E-01
10	9.4612E-01	9.5210E-01	5.9826E-03	6.2835E-01
11	9.3844E-01	9.5653E-01	1.8092E-02	1.8915E+00
12	9.7860E-01	9.6115E-01	-1.7448E-02	-1.8153E+00
13	9.7526E-01	9.6560E-01	-9.6634E-03	-1.0008E+00
14	9.6734E-01	9.6950E-01	2.1591E-03	2.2271E-01
15	9.7822E-01	9.7286E-01	-5.3600E-03	-5.5095E-01
16	9.6640E-01	9.7568E-01	9.2791E-03	9.5105E-01
17	9.5579E-01	9.7796E-01	2.2167E-02	2.2666E+00
18	9.7699E-01	9.7969E-01	2.7025E-03	2.7585E-01
19	9.9521E-01	9.8089E-01	-1.4323E-02	-1.4603E+00
20	1.0080E+00	9.8154E-01	-2.6441E-02	-2.6938E+00
21	9.7498E-01	9.8165E-01	6.6697E-03	6.7944E-01
22	9.7508E-01	9.8122E-01	6.1388E-03	6.2563E-01
23	9.8536E-01	9.8025E-01	-5.1139E-03	-5.2169E-01
24	9.6860E-01	9.7952E-01	1.0918E-02	1.1147E+00
25	9.7585E-01	9.7982E-01	3.9717E-03	4.0535E-01
26	9.7794E-01	9.8116E-01	3.2163E-03	3.2781E-01
27	9.8130E-01	9.8352E-01	2.2222E-03	2.2595E-01
28	9.9575E-01	9.8692E-01	-8.8307E-03	-8.9477E-01
29	9.8580E-01	9.9135E-01	5.5477E-03	5.5961E-01
30	9.9525E-01	9.9681E-01	1.5574E-03	1.5624E-01
31	9.9103E-01	1.0033E+00	1.2268E-02	1.2228E+00
32	1.0326E+00	1.0108E+00	-2.1740E-02	-2.1507E+00
33	1.0476E+00	1.0194E+00	-2.8256E-02	-2.7719E+00
34	1.0346E+00	1.0290E+00	-5.6215E-03	-5.4633E-01
35	1.0713E+00	1.0518E+00	-1.9513E-02	-1.8552E+00
36	1.0875E+00	1.1001E+00	1.2543E-02	1.1402E+00
37	1.1302E+00	1.1738E+00	4.3616E-02	3.7157E+00
38	1.2183E+00	1.2730E+00	5.4725E-02	4.2989E+00
39	1.3664E+00	1.3977E+00	3.1262E-02	2.2367E+00
40	1.5433E+00	1.5478E+00	4.5259E-03	2.9241E-01
41	1.7691E+00	1.7234E+00	-4.5693E-02	-2.6514E+00
42	1.9743E+00	1.9244E+00	-4.9956E-02	-2.5959E+00
43	2.2165E+00	2.1509E+00	-6.5621E-02	-3.0509E+00
44	2.4051E+00	2.4028E+00	-2.2795E-03	-9.4867E-02
45	2.6080E+00	2.6802E+00	7.2199E-02	2.6938E+00

Reziduální součet čtverců, RSC : 2.4776E-02
 Průměr absolutních hodnot reziduí, Me : 1.5212E-02
 Průměr relativních reziduí, Mer[%] : 1.188
 Odhad reziduálního rozptylu, $s^2(e)$: 6.3528E-04
 Odhad směrodatné odchylky reziduí, $s(e)$: 2.5205E-02

▪ **Analýza derivací a integrálů**

Bod	Predikovaná hodnota	První derivace	Druhá derivace	Integrál
i	Yvyp[i]	der1[i]	der2[i]	int[i]
1	9.2079E-01	2.6229E-03	1.9020E-04	0.0000E+00
2	9.2351E-01	2.8131E-03	1.9020E-04	9.2214E-01
3	9.2642E-01	3.0033E-03	1.9020E-04	1.8471E+00
4	9.2952E-01	3.1935E-03	1.9020E-04	2.7750E+00
5	9.3281E-01	3.3837E-03	1.9020E-04	3.7062E+00
6	9.3629E-01	3.5739E-03	1.9020E-04	4.6407E+00
7	9.3995E-01	3.7641E-03	1.9020E-04	5.5788E+00
8	9.4381E-01	3.9543E-03	1.9020E-04	6.5207E+00
9	9.4786E-01	4.1445E-03	1.9020E-04	7.4665E+00
10	9.5210E-01	4.3347E-03	1.9020E-04	8.4165E+00
11	9.5653E-01	4.5249E-03	1.9020E-04	9.3708E+00
12	9.6115E-01	4.7151E-03	1.9020E-04	1.0330E+01
13	9.6560E-01	4.1734E-03	-5.4169E-04	1.1293E+01
14	9.6950E-01	3.6317E-03	-5.4169E-04	1.2261E+01
15	9.7286E-01	3.0900E-03	-5.4169E-04	1.3232E+01
16	9.7568E-01	2.5483E-03	-5.4169E-04	1.4206E+01
17	9.7796E-01	2.0066E-03	-5.4169E-04	1.5183E+01
18	9.7969E-01	1.4650E-03	-5.4169E-04	1.6162E+01
19	9.8089E-01	9.2327E-04	-5.4169E-04	1.7142E+01
20	9.8154E-01	3.8158E-04	-5.4169E-04	1.8123E+01
21	9.8165E-01	-1.6011E-04	-5.4169E-04	1.9105E+01
22	9.8122E-01	-7.0179E-04	-5.4169E-04	2.0087E+01
23	9.8025E-01	-1.2435E-03	-5.4169E-04	2.1067E+01
24	9.7952E-01	-2.1223E-04	1.0312E-03	2.2047E+01
25	9.7982E-01	8.1902E-04	1.0312E-03	2.3027E+01
26	9.8116E-01	1.8503E-03	1.0312E-03	2.4007E+01
27	9.8352E-01	2.8815E-03	1.0312E-03	2.4989E+01
28	9.8692E-01	3.9128E-03	1.0312E-03	2.5975E+01
29	9.9135E-01	4.9440E-03	1.0312E-03	2.6964E+01
30	9.9681E-01	5.9753E-03	1.0312E-03	2.7958E+01
31	1.0033E+00	7.0065E-03	1.0312E-03	2.8958E+01
32	1.0108E+00	8.0378E-03	1.0312E-03	2.9965E+01
33	1.0194E+00	9.0690E-03	1.0312E-03	3.0980E+01
34	1.0290E+00	1.0100E-02	1.0312E-03	3.2004E+01
35	1.0518E+00	3.5557E-02	2.5457E-02	3.3042E+01
36	1.1001E+00	6.1014E-02	2.5457E-02	3.4116E+01
37	1.1738E+00	8.6471E-02	2.5457E-02	3.5251E+01
38	1.2730E+00	1.1193E-01	2.5457E-02	3.6472E+01
39	1.3977E+00	1.3739E-01	2.5457E-02	3.7805E+01

40	1.5478E+00	1.6284E-01	2.5457E-02	3.9276E+01
41	1.7234E+00	1.8830E-01	2.5457E-02	4.0909E+01
42	1.9244E+00	2.1376E-01	2.5457E-02	4.2731E+01
43	2.1509E+00	2.3921E-01	2.5457E-02	4.4766E+01
44	2.4028E+00	2.6467E-01	2.5457E-02	4.7041E+01
45	2.6802E+00	2.9013E-01	2.5457E-02	4.9580E+01

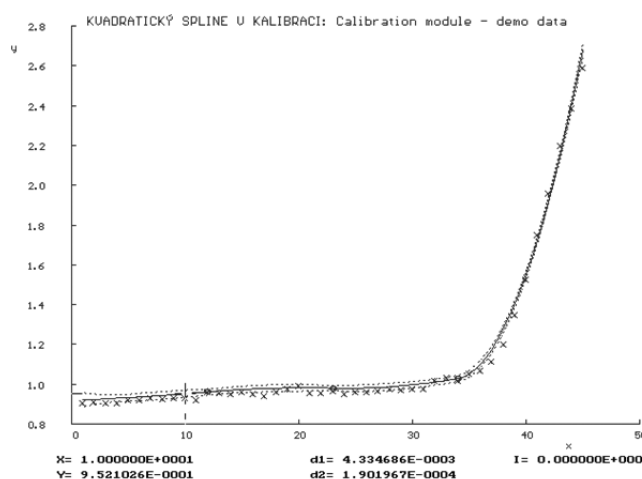
▪ **Kalibrační meze**

Kritická úroveň yc: 1.000686E+00 xc: 3.061636E+01
Limita detekce yd: ----- xd: -----

▪ **Kalibrační tabulka**

Měřený signál	Inverzní odhad	Interval spolehlivosti	
		dolní mez	horní mez
yexp[i]	xvyp[i]	Llxvyp[i]	Luxvyp[i]
1.220000E+00	3.749765E+01	3.712261E+01	3.784100E+01

Obrázek 8 – Kalibrační křivka



▪ **Závěr úlohy**

Bylo provedeno sestavení kalibračních modelů pro exaktní stanovení hodnoty Ct z hodnot odečtu fluorescence během TaqMan real-time PCR u tří bodů kalibrační křivky, u standardů EC1, EC4 a EC8. Hodnoty Ct jsou 10,4, 24,5 a 37,5, resp. Hodnoty pro EC1 a EC8 odpovídají hodnotě Ct odečtené přístrojem, ale hodnota pro EC4 hodnotě stanovené SDS softwarem přístroje neodpovídá. Během řešení úlohy se ukázalo, že klíčovou roli hraje stanovení hodnoty fluorescence pozadí, tedy bodu, pro který se odečítá hodnota Ct. To bude předmětem dalšího testování.