

BioLink_PIK3CA_App

Руководство пользователя

1. Перед использованием программы экспортируйте результаты ПЦР в формате CSV.

Внимание! Перед конвертацией файлов убедитесь, что все кривые в вашем эксперименте имеют характерную S-образную форму. Если есть какие-либо артефакты, для таких образцов необходимо провести дополнительную обработку или исключить их до интерпретации результатов. Подробнее о том, как скорректировать или исключить образцы в программе *Biorad CFX Manager* можно посмотреть в Приложении данного Руководства.

Для этого в программе *Biorad CFX Manager* на вкладке «*Quantification Data*» кликните правой кнопкой мыши в любом месте и выберите «экспортировать в CSV» см. рис. 1.

The screenshot shows the 'Data Analysis - Постановка_PIK3CA_2023-08-25 12-20.pcrd' window. The 'Quantification Data' tab is active, showing a table of results for 20 wells (A05-D10). A right-click context menu is open, highlighting the 'Export to CSV...' option.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A05	FAM	E542K	Unkn-03	днк.2	30.15	29.83	0.443
A06	FAM	E542K	Pos Ctrl-02		25.19	25.21	0.025
A07	FAM	E545K	Unkn-09	днк.3	24.65	24.46	0.259
A08	FAM	E545K	Neg Ctrl-03		N/A	0.00	0.000
A09	FAM	R88Q	Unkn-15	днк.4	23.47	23.55	0.119
A10	FAM	N345K	Unkn-17	днк.1	25.14	25.14	0.003
A11	FAM	N345K	Unkn-21	днк.5	25.09	25.29	0.284
B05	FAM	E542K	Unkn-03	днк.2	29.52	29.83	0.443
B06	FAM	E542K	Pos Ctrl-02		25.23	25.21	0.025
B07	FAM	E545K	Unkn-09	днк.3	24.28	24.46	0.259
B08	FAM	E545K	Neg Ctrl-03		N/A	0.00	0.000
B09	FAM	R88Q	Unkn-15	днк.4	23.64	23.55	0.119
B10	FAM	N345K	Unkn-17	днк.1	25.14	25.14	0.003
B11	FAM	N345K	Unkn-21	днк.5	25.49	25.29	0.284
C05	FAM	E542K	Unkn-04	днк.3	29.79	29.65	0.194
C06	FAM	E542K	Neg Ctrl-02		N/A	0.00	0.000
C07	FAM	E545K	Unkn-10	днк.4	24.35	24.70	0.503
C08	FAM	R88Q	Unkn-12	днк.1	23.32	23.81	0.687
C09	FAM	R88Q	Unkn-16	днк.5	24.35	24.30	0.062
C10	FAM	N345K	Unkn-18	днк.2	25.44	25.53	0.129
C11	FAM	N345K	Pos Ctrl-05		22.01	22.04	0.032
D05	FAM	E542K	Unkn-04	днк.3	29.52	29.65	0.194
D06	FAM	E542K	Neg Ctrl-02		N/A	0.00	0.000
D07	FAM	E545K	Unkn-10	днк.4	25.06	24.70	0.503
D08	FAM	R88Q	Unkn-12	днк.1	24.30	23.81	0.687
D09	FAM	R88Q	Unkn-16	днк.5	24.26	24.30	0.062
D10	FAM	N345K	Unkn-18	днк.2	25.62	25.53	0.129

Рис. 1 Сохранение данных из программы Biorad CFX Manager в формате CSV


Если вы не заполнили поля *Sample* и *Target* в программе *Biorad CFX Manager*, далее можно будет отредактировать названия образцов, указать разведения или тип ПЦР в образцах в программе *BioLink_PIK3CA_App.exe* см. пункт 5 Редактирование шаблона постановки.

2. Запустите программу *BioLink_PIK3CA_App.exe*

3. В зависимости от типа ПЦР в анализируемом эксперименте перейдите на соответствующую вкладку **Контрольная** или **На мутации** слева на панели.

На рис. 2 в окне программы цифрами отмечены следующие панели данных:

①	Список образцов
②	Список разведений (или тип ПЦР для вкладки «На мутации»)
③	Расположение образцов на плашке
④	Таблица результатов

При нажатии на кнопку  откроется файл с руководством пользователя, а при нажатии

на  сгенерируется PDF файл с текущим макетом плашки находящимся на панели ③.

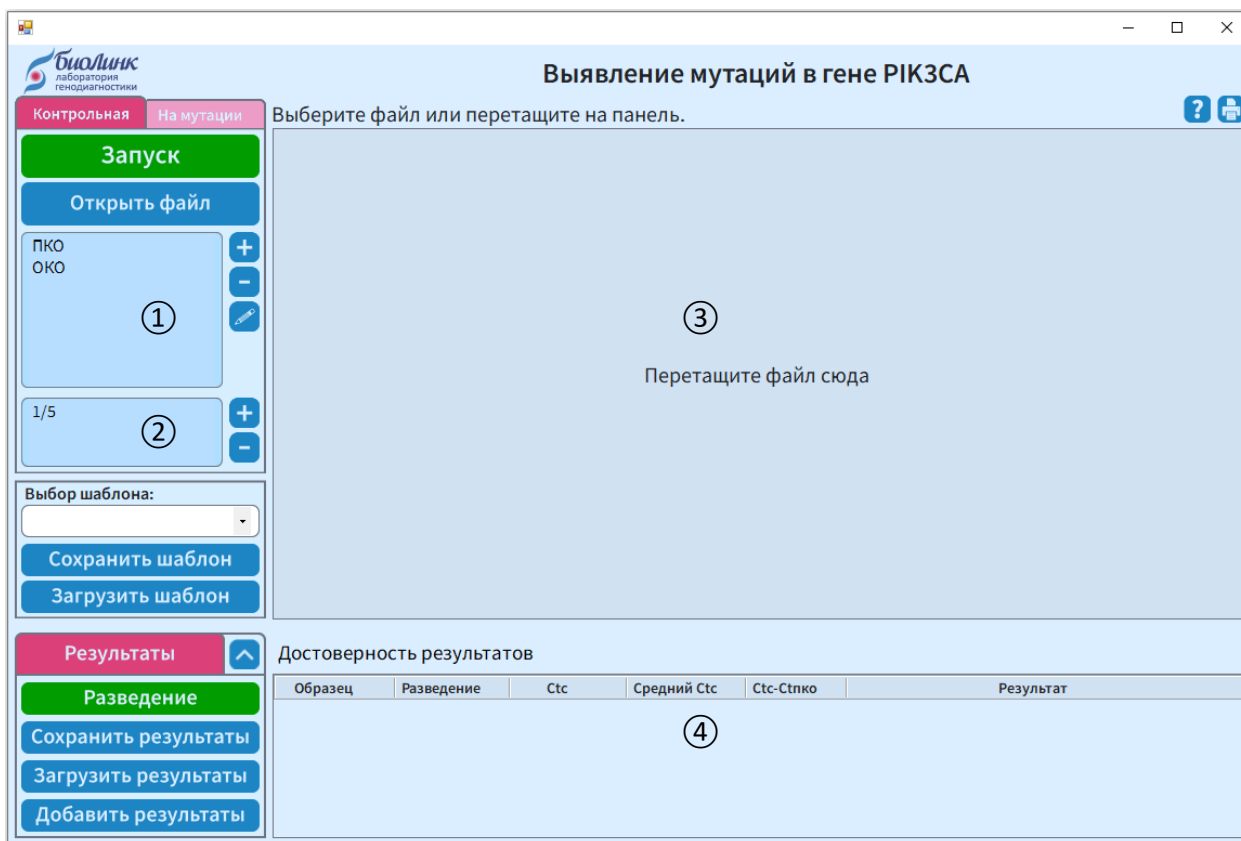


Рис. 2 Интерфейс программы

4. Нажмите на кнопку **Открыть файл** и выберите файл с результатами ПЦР в формате CSV (в имени файла содержится фраза *Quantification Cq Results*).

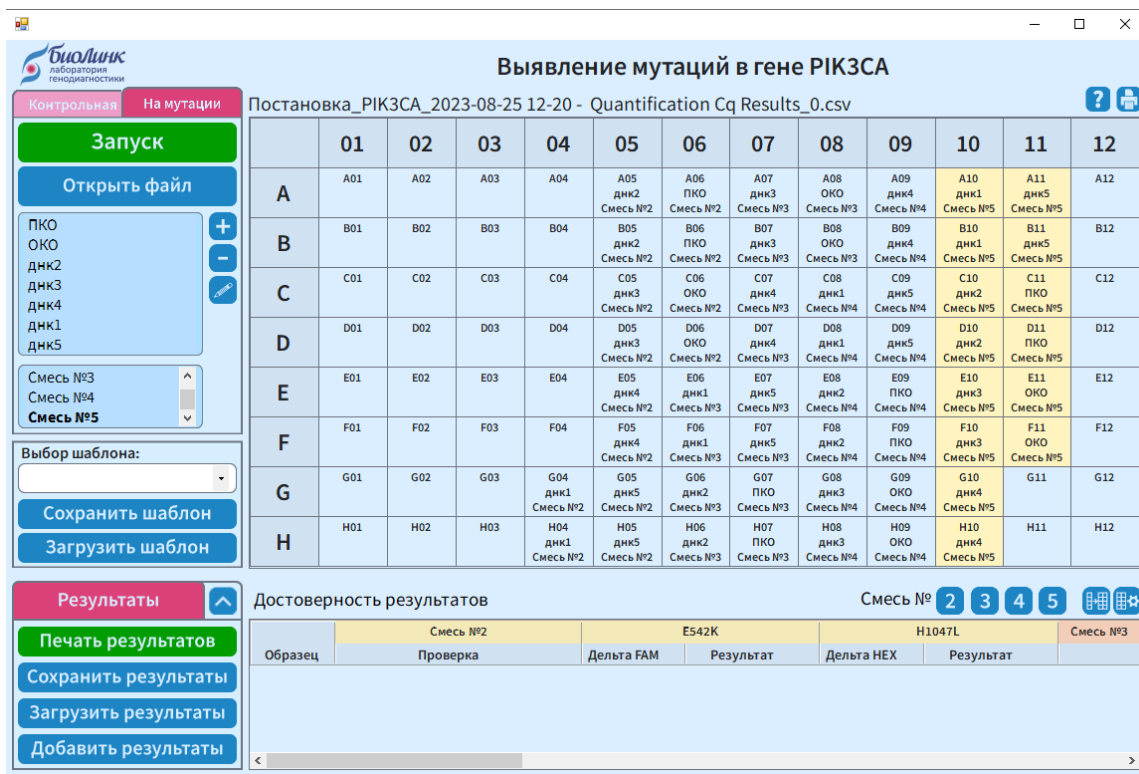
Над панелью плашки отображается название файла, который был открыт, а раскладка плашки с образцами загружается на основе данных взятых из CSV файла (см. рис. 3).

Программа *BioLink_PIK3CA_App.exe* автоматически загружает в используемые ячейки плашки информацию, указанную в полях *Sample* и *Target* из программы *Biorad CFX Manager*. Если поле *Sample* пустое, программа *BioLink_PIK3CA_App.exe* автоматически загрузит вместо него поле *Content*, в котором в программе *Biorad CFX Manager* содержится следующая информация об образцах: *Pos Ctrl*, *NTC*, *Neg Ctrl*, *Unknown*, при этом наименования контролей в *BioLink_PIK3C_App.exe* будет перезаписано следующим образом: *Pos Ctrl* – ПКО, *NTC* и/или *Neg Ctrl*– ОКО.

Для корректной работы программы панель плашки должна выглядеть таким образом, чтобы в ячейках плашки были обязательно указаны названия контрольных образцов ПКО и ОКО (RU Русский), дубли образцов имели одинаковое название ячеек плашек (например, ДНК1 и ДНК1). Кроме того, для вкладки «Контрольная» необходимо указать разведение образцов, а для вкладки «На мутации» - номер смеси (RU Русский) в формате «Смесь №2» (для ПЦР-смеси E542K, H1047L), «Смесь №3» (для ПЦР-смеси E545K, H1047R), «ПЦР-смесь №4» (для ПЦР-смеси R88Q, C420R), «ПЦР-смесь №5» (для ПЦР-смеси N345K, Q546K).

Программа также корректно работает для образцов не имеющих дублей (представленных в единственном экземпляре).

Если панель плашки не содержит необходимой информации, отредактируйте её.



Выявление мутаций в гене PIK3CA
 Постановка_ PIK3CA_2023-08-25 12-20 - Quantification Cq Results_0.csv








	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05 днк2 Смесь №2	A06 ПКО Смесь №2	A07 днк3 Смесь №3	A08 ОКО Смесь №3	A09 днк4 Смесь №4	A10 днк1 Смесь №5	A11 днк5 Смесь №5	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05 днк2 Смесь №2	B06 ПКО Смесь №2	B07 днк3 Смесь №3	B08 ОКО Смесь №3	B09 днк4 Смесь №4	B10 днк1 Смесь №5	B11 днк5 Смесь №5	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05 днк3 Смесь №2	C06 ОКО Смесь №2	C07 днк4 Смесь №3	C08 днк1 Смесь №4	C09 днк5 Смесь №4	C10 днк2 Смесь №5	C11 ПКО Смесь №5	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05 днк3 Смесь №2	D06 ОКО Смесь №2	D07 днк4 Смесь №3	D08 днк1 Смесь №4	D09 днк5 Смесь №4	D10 днк2 Смесь №5	D11 ПКО Смесь №5	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05 днк4 Смесь №2	E06 днк1 Смесь №3	E07 днк5 Смесь №3	E08 днк2 Смесь №4	E09 ПКО Смесь №4	E10 днк3 Смесь №5	E11 ОКО Смесь №5	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05 днк4 Смесь №2	F06 днк1 Смесь №3	F07 днк5 Смесь №3	F08 днк2 Смесь №4	F09 днк3 Смесь №4	F10 днк3 Смесь №5	F11 ОКО Смесь №5	F12
G	G01	G02	G03	G04 днк1 Смесь №2	G05 днк5 Смесь №2	G06 днк2 Смесь №3	G07 ПКО Смесь №3	G08 днк3 Смесь №4	G09 ОКО Смесь №4	G10 днк4 Смесь №5	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04 днк1 Смесь №2	H05 днк5 Смесь №2	H06 днк2 Смесь №3	H07 ПКО Смесь №3	H08 днк3 Смесь №4	H09 ОКО Смесь №4	H10 днк4 Смесь №5	H11	H12

Результаты | Достоверность результатов | Смесь № 2 3 4 5


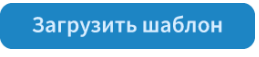
Образец	Смесь №2		E542K		H1047L		Смесь №3
	Проверка	Дельта FAM	Результат	Дельта HEX	Результат		

Рис. 3. Интерфейс программы после загрузки файла CSV или после редактирования шаблона

5. Редактирование шаблона постановки:

- a. Справа на панели ③ (рис. 2), имитирующей плашку, выберите ячейки, информацию для которых Вы хотите отредактировать. Кликните на название столбца или строки, чтобы выделить их целиком. Зажатая клавиша «*Ctrl*» добавляет ячейки к уже выделенным.
- b. Слева на панели ① (рис. 2) из списка выберите тип образца (ОКО, ПКО) или название образца (например, ДНК1). Чтобы добавить новое название образца, нажмите на кнопку  рядом со списком. Чтобы удалить название образца, выберите его в списке и нажмите кнопку . Чтобы переименовать образец, выберите его в списке и нажмите кнопку . При этом название данного образца в шаблоне тоже изменится.
- c. При добавлении нового названия образца откроется новое окошко. Введите название образца и нажмите кнопку  (при этом можно будет сразу добавить следующее название) или кнопку  (при этом окошко закроется). Нажатие клавиши «*Enter*» соответствует кнопке , а комбинация клавиш «*Ctrl + Enter*» соответствует кнопке .
- d. Далее выберите разведение (для вкладки «Контрольная») или тип смеси для вкладки «На мутации») аналогичным образом на панели ② (рис. 2).
- e. Чтобы очистить данные в ячейке, выделите ее и нажмите клавишу «*Delete*» или «*Backspace*».

6. Сохранение/загрузка шаблонов:

- a. Вы можете сохранить созданный шаблон постановки для последующего использования. Для этого нажмите кнопку , выберите путь сохранения и введите имя.
- b. Вы можете загрузить шаблон, нажав на кнопку  или выбрав его из списка. В списке отображаются только шаблоны, сохраненные в папке программы *BioLink_PIK3CA_App/SavedPlateLayoutsControl* для вкладки «Контрольная» или *BioLink_PIK3CA_App/SavedPlateLayoutsAllele* для вкладки «На мутации» (предлагаются по умолчанию).

7. Нажмите кнопку .

8. Программа предложит ввести значения контролей качества (QC) и точек отсечения (ТО) в окно «Параметры». Заполните форму (рис. 4) и нажмите на кнопку **Готово** или клавишу «Enter».

Смесь №2	Смесь №4
QC FAM	QC FAM
QC HEX	QC HEX
QC ROX	QC ROX
TO (E542K)	TO (R88Q)
TO (H1047L)	TO (C420R)

Смесь №3	Смесь №5
QC FAM	QC FAM
QC HEX	QC HEX
QC ROX	QC ROX
TO (E545K)	TO (N345K)
TO (H1047R)	TO (Q546K)

Готово

Рис. 4 Окно параметров для ПЦР на наличие мутаций гена PIK3CA

9. Результаты обсчета будут выведены в таблицу на панели ④ (рис. 2).


В строке «Достоверность результатов» будет выведено сообщение о прохождении или не прохождении контролей («Данные валидны» или «Данные не валидны»). В случае успешного прохождения контролей клинические образцы в таблице результатов будут подсвечены «желтым» цветом (см. рис. 5). Если величины *Ct* контрольных образцов имеют недопустимые значения, то в этой строке будут указаны номера смесей, в которых результат ПЦР является недостоверным.

Если концентрация ДНК в образце была недостаточной в столбце «Проверка» будет выведена строка «Концентрация ДНК не достаточна». Если образец требовал разведение, то в этом столбце для данного образца и смеси будет написано «Необходимо развести образец». При этом в столбцах с названием «Результат» для такой аллель-специфичной реакции будет выведено «Нет результата», как и в случаях если *Ct* ПКО или *Ct* образца в этих реакциях не определено.

«Не найден» будет выведен в случае, если некорректно указан тип ПЦР в ячейке образца на плашке или если такой образец, действительно, отсутствует.

Также в столбцах «Результат» при наведении курсора мыши на ячейку имеются комментарии для расшифровки результата.

Чтобы скрыть панель плашки ③, нажмите кнопку  слева от таблицы.

Результаты анализа валидны. Смесь №2 2 3 4 5  

Образец	Смесь №2				E542K				H1047L				Смесь №3			
	Сt FAM	Сt HEX	Сt ROX	Проверка	Дельта FAM	TO	Результат	Дельта HEX	TO	Результат	Сt FAM	Сt HEX	Сt ROX	Проверка		
ПКО	23,2 23,2	21,4 21,6	18,4 18,4	Прошел	4,8 4,8	5	Положительный	3,0 3,1	3,7	Положительный	20,6 20,7	20,9 20,8	17,9 18,0	Прошел		
ОКО	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	Прошел	-	-	-	-	-	-	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	Прошел		
днк2	30,1 29,5	25,0 25,1	22,3 22,3	Концентрация ДНК достаточна	7,9 7,2	5	Отрицательный	2,7 2,8	3,7	Положительный	24,2 24,1	25,0 25,2	21,3 21,2	Концентрация ДНК д		
днк3	29,8 29,5	25,5 25,1	22,2 22,2	Концентрация ДНК достаточна	7,6 7,3	5	Отрицательный	3,3 2,9	3,7	Положительный	24,6 24,3	24,7 25,1	21,5 21,3	Концентрация ДНК д		
днк4	29,3 29,4	25,1 25,0	22,2 22,1	Концентрация ДНК достаточна	7,1 7,3	5	Отрицательный	2,9 2,9	3,7	Положительный	24,3 25,1	25,7 25,0	21,4 21,7	Концентрация ДНК д		
днк1	29,2 29,4	25,1 25,1	22,0 22,2	Концентрация ДНК достаточна	7,2 7,2	5	Отрицательный	3,1 2,9	3,7	Положительный	24,1 24,3	24,6 24,5	21,4 21,4	Концентрация ДНК д		
днк5	29,6 29,3	25,2 25,2	22,1 22,0	Концентрация ДНК достаточна	7,6 7,3	5	Отрицательный	3,1 3,2	3,7	Положительный	24,5 24,5	25,4 24,2	21,5 21,3	Концентрация ДНК д		

Рис. 5 Данные для смеси №2 в таблице результатов (панель ④ на рис.2).

10. Вы можете сохранить таблицу результатов в программный файл нажав на кнопку **Сохранить результаты**. При нажатии на кнопку **Загрузить результаты** Вы можете выбрать ранее сохраненный файл и открыть таблицу результатов в окне программы. Также можно загрузить несколько файлов на панель результатов нажав кнопку **Добавить результаты**. Каждый последующий добавленный файл дописывается в конец таблицы результатов.

11. Для вкладки **Контрольная**:

Если для одного и того же образца в двух разведениях концентрация ДНК достаточна, то напротив разведения с меньшей ΔCt будет написано: «Концентрация ДНК оптимальна», а напротив другого «Концентрация достаточна».

Если концентрация пробы слишком велика и требует разведения, нажмите на кнопку **Разведение** слева от таблицы. В открывшемся окне (рис. 6) будут представлены расчеты для разведения.

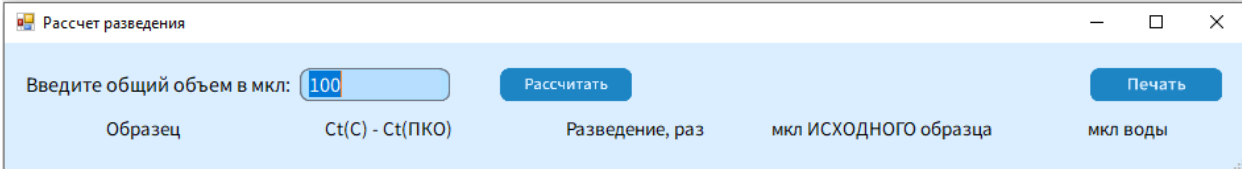




Рис. 6 Окно для расчета разведения

В поле сверху введите нужный конечный объем пробы и нажмите кнопку **Рассчитать**. Нажмите кнопку **Печать**, чтобы программа сгенерировала PDF файл с расчетами разведения.

12. Для вкладки «На мутации»:

Чтобы свернуть/развернуть столбцы «Смесь №2», «Смесь №3», «Смесь №4», «Смесь №5» таблицы результатов используйте кнопки **2**, **3**, **4**, и **5**, соответственно.

Также для работы с таблицей результатов вы можете использовать следующие кнопки (в правом верхнем углу над панелью **4**) (на рис.2):

	<p>Отображение таблицы результатов</p> <p>Скрывает или показывает столбцы в таблице результатов на основании отмеченных галочкой столбцов в «Настройке таблицы результатов».</p>																				
	<p>Настройка таблицы результатов</p> <p>Предлагает выбрать столбцы, которые необходимо отобразить в таблице результатов.</p> <div data-bbox="384 891 1190 1326" style="border: 1px solid gray; padding: 10px;"> <p>Настройка таблицы</p> <p>Активные столбцы</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Смесь №2</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Смесь №3</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Смесь №4</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Смесь №5</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Ct</td> <td><input type="checkbox"/> Ct</td> <td><input type="checkbox"/> Ct</td> <td><input type="checkbox"/> Ct</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Дельта</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Дельта</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Дельта</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Дельта</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> TO</td> <td><input type="checkbox"/> TO</td> <td><input type="checkbox"/> TO</td> <td><input type="checkbox"/> TO</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Результат</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Результат</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Результат</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Результат</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">Готово</p> </div>	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №2	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №3	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №4	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №5	<input type="checkbox"/> Ct	<input type="checkbox"/> Ct	<input type="checkbox"/> Ct	<input type="checkbox"/> Ct	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input type="checkbox"/> TO	<input type="checkbox"/> TO	<input type="checkbox"/> TO	<input type="checkbox"/> TO	<input checked="" type="checkbox"/> Результат	<input checked="" type="checkbox"/> Результат	<input checked="" type="checkbox"/> Результат	<input checked="" type="checkbox"/> Результат
<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №2	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №3	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №4	<input checked="" type="checkbox"/> Смесь №5																		
<input type="checkbox"/> Ct	<input type="checkbox"/> Ct	<input type="checkbox"/> Ct	<input type="checkbox"/> Ct																		
<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта																		
<input type="checkbox"/> TO	<input type="checkbox"/> TO	<input type="checkbox"/> TO	<input type="checkbox"/> TO																		
<input checked="" type="checkbox"/> Результат	<input checked="" type="checkbox"/> Результат	<input checked="" type="checkbox"/> Результат	<input checked="" type="checkbox"/> Результат																		

Чтобы распечатать таблицу результатов нажмите кнопку **Печать результатов**, тогда программа сгенерирует PDF файл, состоящий из столбцов «Образец» и «Результат» для каждой мутации в смесях (E542K, E545K, H1047R, H1047L, R88Q, N345K, C420R, Q546K.), который вы можете сохранить и распечатать.

Приятной работы!

Приложение

Если при открытии файла с результатами ПЦР в программе *Biorad CFX Manager* вы наблюдаете кривые, которые не имеют S-образной формы и находятся выше порогового уровня см. Рис. 8, то необходимо провести коррекцию ниже описанным способом. На графике красные линии имеют S-образную форму и одна из зеленых линий находится ниже порогового уровня. Однако, вторая зеленая линия находится выше порогового уровня и не имеет S-образной формы.

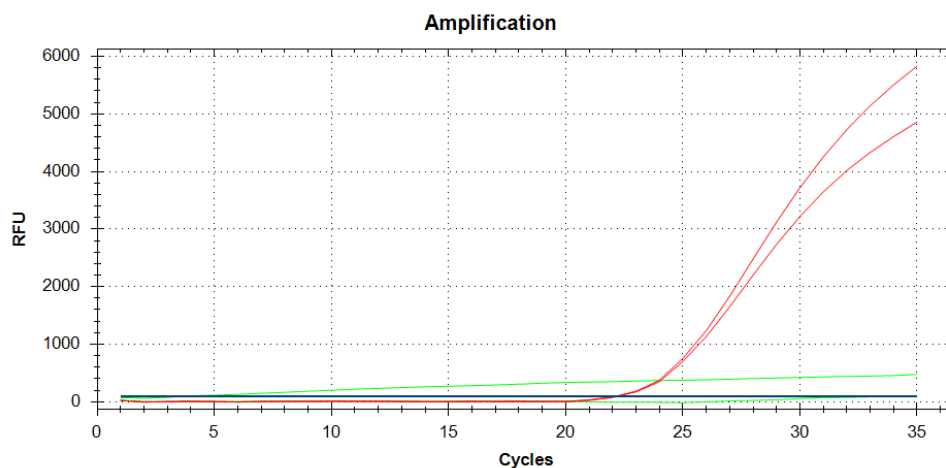


Рис. 8 Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дубляж

Для коррекции в левом верхнем углу программы нажмите *Settings*, выберете *Baseline Settings*, а затем *Apply Fluorescence Drift Correction* как показано на Рис. 9.

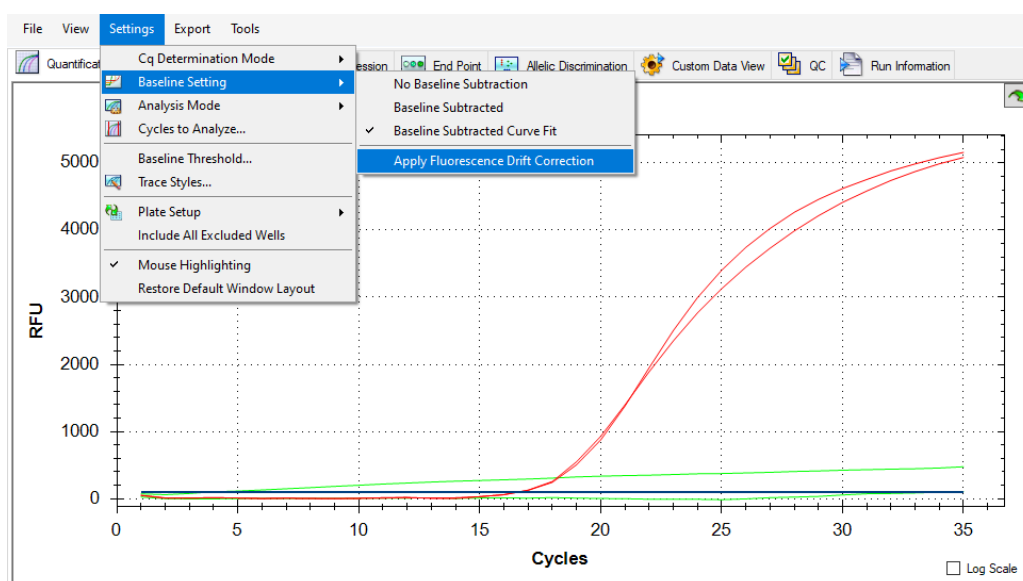


Рис. 9 Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Применение коррекции.

После выполнения данной процедуры ваш график должен принять следующий вид см. Рис. 10. Теперь кривая не имеющая S-образную форму находится ниже порогового уровня.

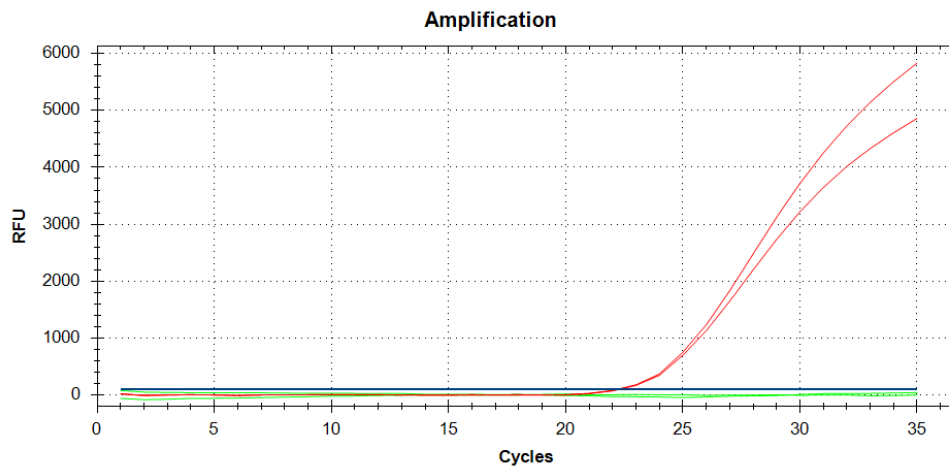


Рис. 10 Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Флуоресцентная кривая после коррекции для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

Если данная процедура не повлияла на расположение кривой относительно линии порогового уровня и кривая по-прежнему не имеет S-образную форму, то необходимо исключить данные образцы из анализа. Это можно сделать до конвертирования данных в CSV формат в программе Biorad CFX Manager или после в программе BioLink_PIK3CA_App см. п. 5 Редактирование шаблона постановки (подпункт e).

В программе Biorad CFX Manager на панели плашки выберите ячейки, соответствующие кривым, которые необходимо исключить. Нажмите правой кнопкой мыши на ячейку и в выпадающем меню первой строки Well «Номер ячейки» выберите Exclude from Analysis см. Рис. 11. Далее переходите к п. 1 данного Руководства.

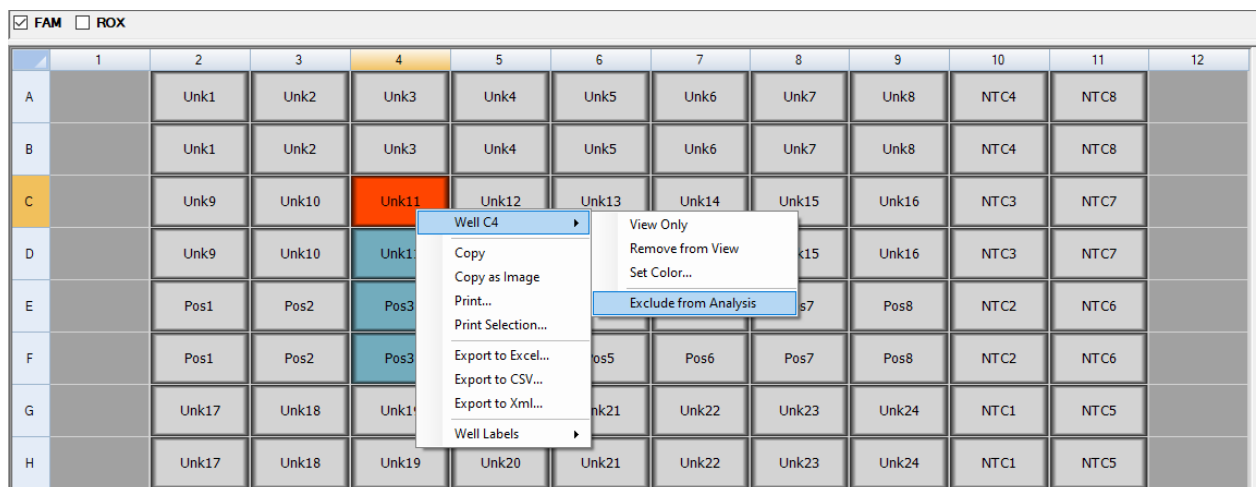


Рис. 11 Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа