

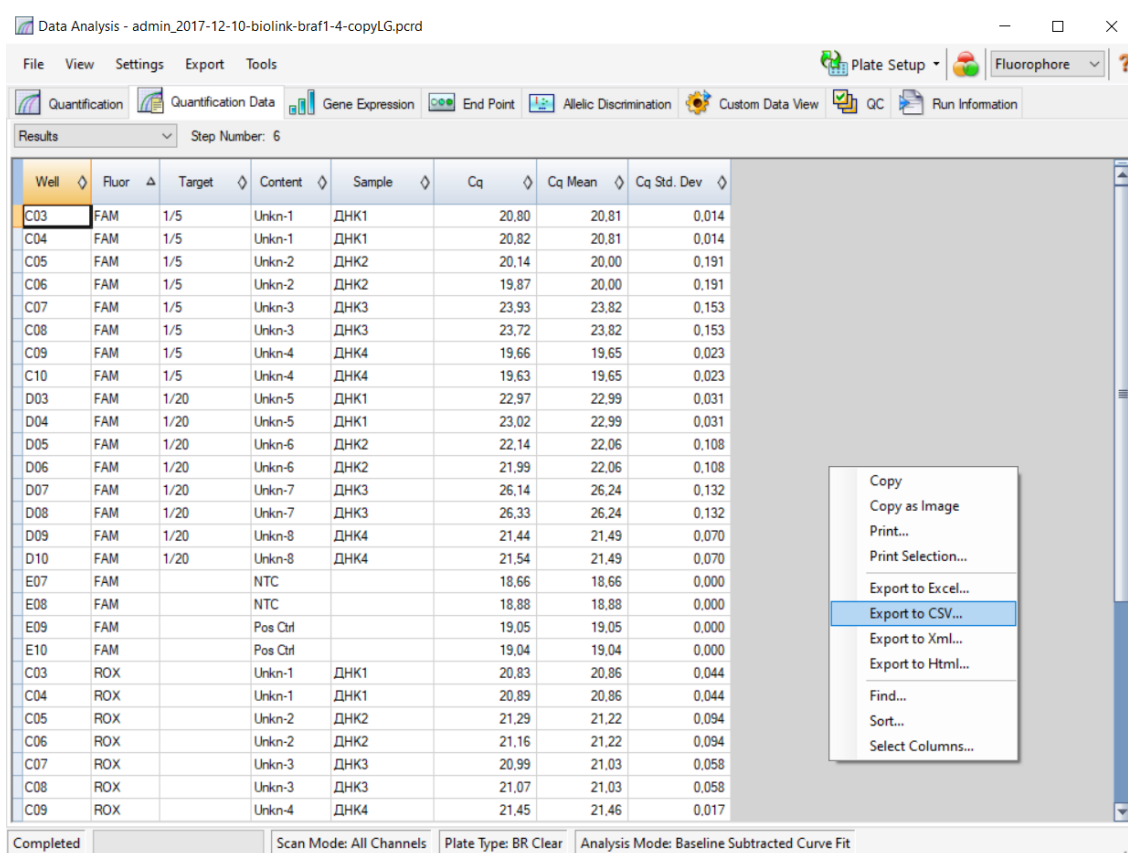
BioLink_BRAF-V600E_App

Руководство пользователя

1. Перед использованием программы экспортируйте результаты ПЦР.

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 получения величин C_t используйте логарифмическую шкалу и установите ручную пороговый уровень 100.

а) Для экспорта данных из программы *Biorad CFX Manager* перейдите на вкладку «*Quantification Data*», кликните правой кнопкой мыши (в любом месте) и выберите «экспортировать в CSV» см. рис. 1. Автоматически сохранятся 2 файла со следующими названиями *Run Information* и *Quantification Cq Results*. Для анализа данных нужно будет использовать второй.



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
C03	FAM	1/5	Unkn-1	ДНК1	20.80	20.81	0.014
C04	FAM	1/5	Unkn-1	ДНК1	20.82	20.81	0.014
C05	FAM	1/5	Unkn-2	ДНК2	20.14	20.00	0.191
C06	FAM	1/5	Unkn-2	ДНК2	19.87	20.00	0.191
C07	FAM	1/5	Unkn-3	ДНК3	23.93	23.82	0.153
C08	FAM	1/5	Unkn-3	ДНК3	23.72	23.82	0.153
C09	FAM	1/5	Unkn-4	ДНК4	19.66	19.65	0.023
C10	FAM	1/5	Unkn-4	ДНК4	19.63	19.65	0.023
D03	FAM	1/20	Unkn-5	ДНК1	22.97	22.99	0.031
D04	FAM	1/20	Unkn-5	ДНК1	23.02	22.99	0.031
D05	FAM	1/20	Unkn-6	ДНК2	22.14	22.06	0.108
D06	FAM	1/20	Unkn-6	ДНК2	21.99	22.06	0.108
D07	FAM	1/20	Unkn-7	ДНК3	26.14	26.24	0.132
D08	FAM	1/20	Unkn-7	ДНК3	26.33	26.24	0.132
D09	FAM	1/20	Unkn-8	ДНК4	21.44	21.49	0.070
D10	FAM	1/20	Unkn-8	ДНК4	21.54	21.49	0.070
E07	FAM		NTC		18.66	18.66	0.000
E08	FAM		NTC		18.88	18.88	0.000
E09	FAM		Pos Ctrl		19.05	19.05	0.000
E10	FAM		Pos Ctrl		19.04	19.04	0.000
C03	ROX		Unkn-1	ДНК1	20.83	20.86	0.044
C04	ROX		Unkn-1	ДНК1	20.89	20.86	0.044
C05	ROX		Unkn-2	ДНК2	21.29	21.22	0.094
C06	ROX		Unkn-2	ДНК2	21.16	21.22	0.094
C07	ROX		Unkn-3	ДНК3	20.99	21.03	0.058
C08	ROX		Unkn-3	ДНК3	21.07	21.03	0.058
C09	ROX		Unkn-4	ДНК4	21.45	21.46	0.017

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 и/или тип ПЦР в образцах в программе *BioLink_BRAF-V600E_App.exe* см. пункт 5 «Редактирование шаблона постановки».

Если вы используете программу *RealTime* от ДНК-Технология, то вам необходимо экспортировать результаты в формате .xml. Для этого в поле меню «Настройки» выберите «Разное» (см. рис. 2а).

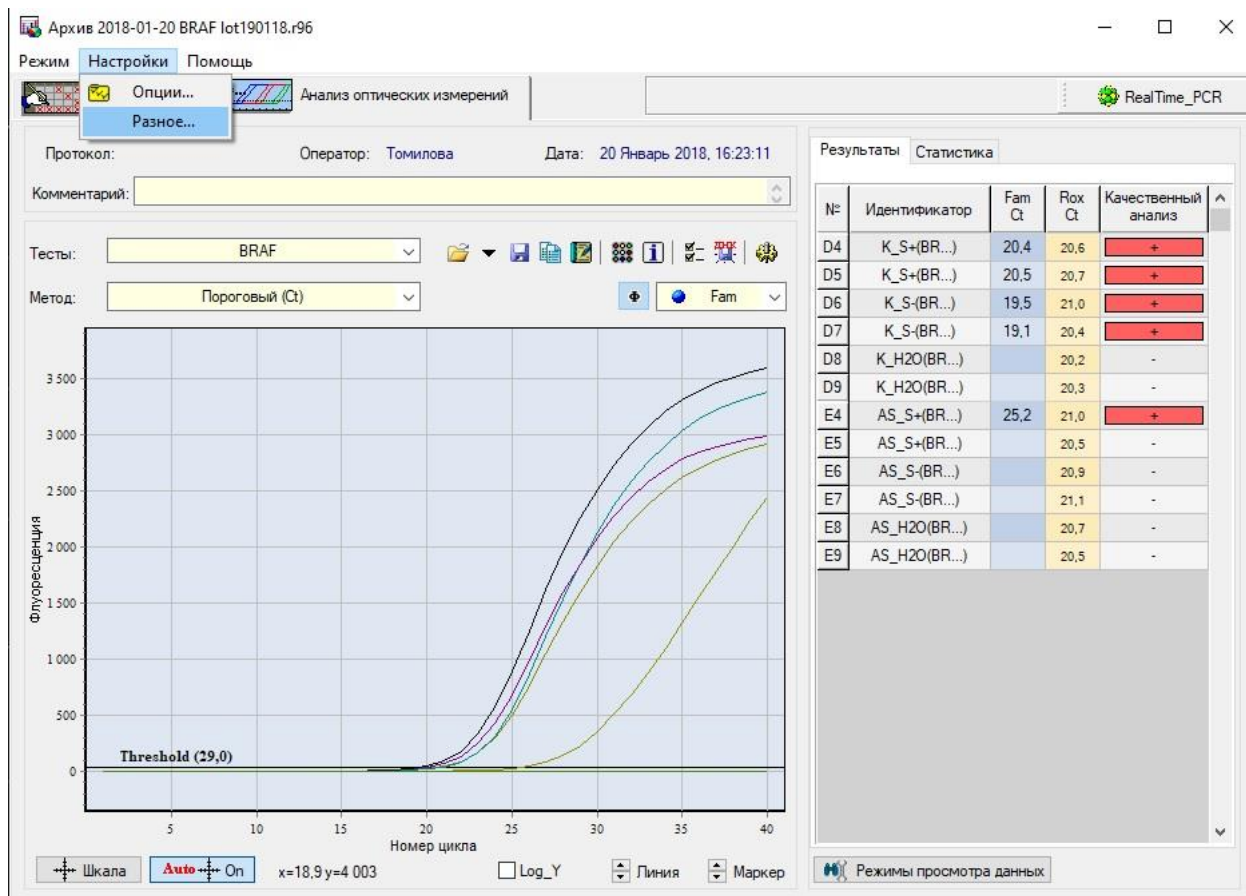


Рис. 2а. Открытие окна Настройки в программе RealTime

В открывшемся окне перейдите на вкладку «Экспорт результатов». Отметьте поле «Выводить информацию по каналам» и нажмите кнопку «Применить» (см. рис. 2б).

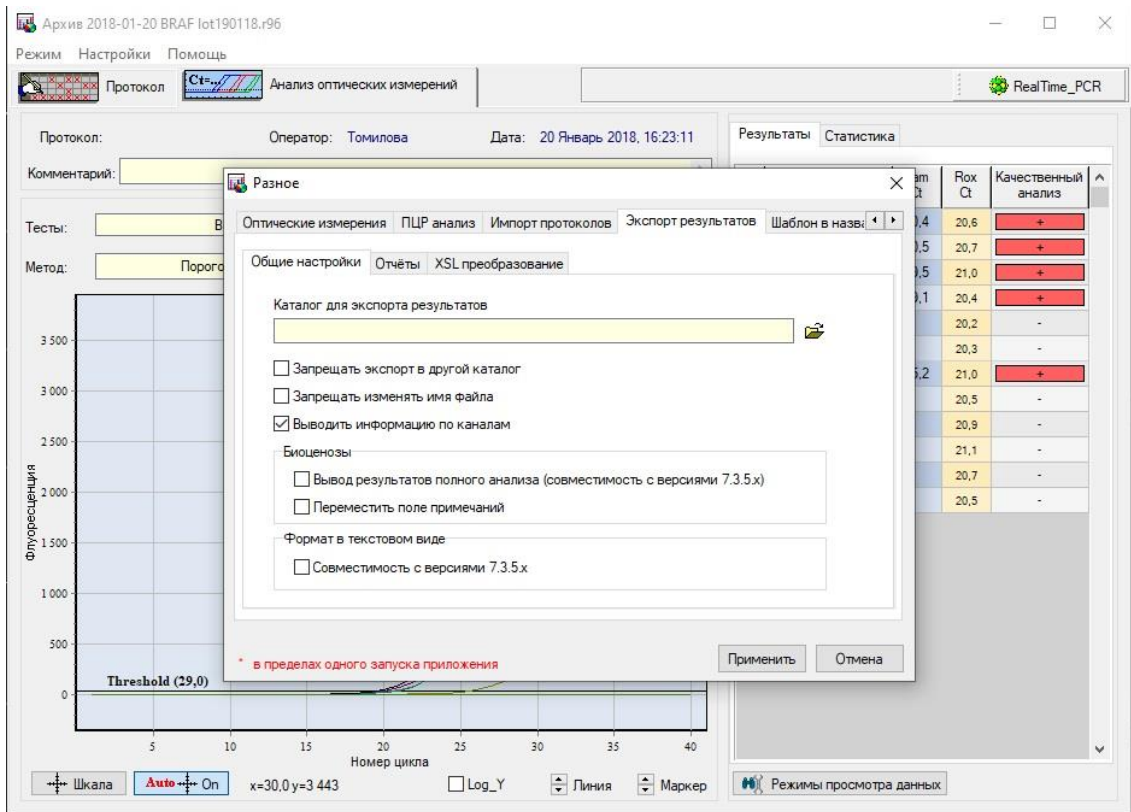


Рис. 26. Настройка вывода результатов в программе RealTime

Для сохранения файла с результатами нажмите на кнопку «Экспорт результатов как XML...» (см. рис. 2в)

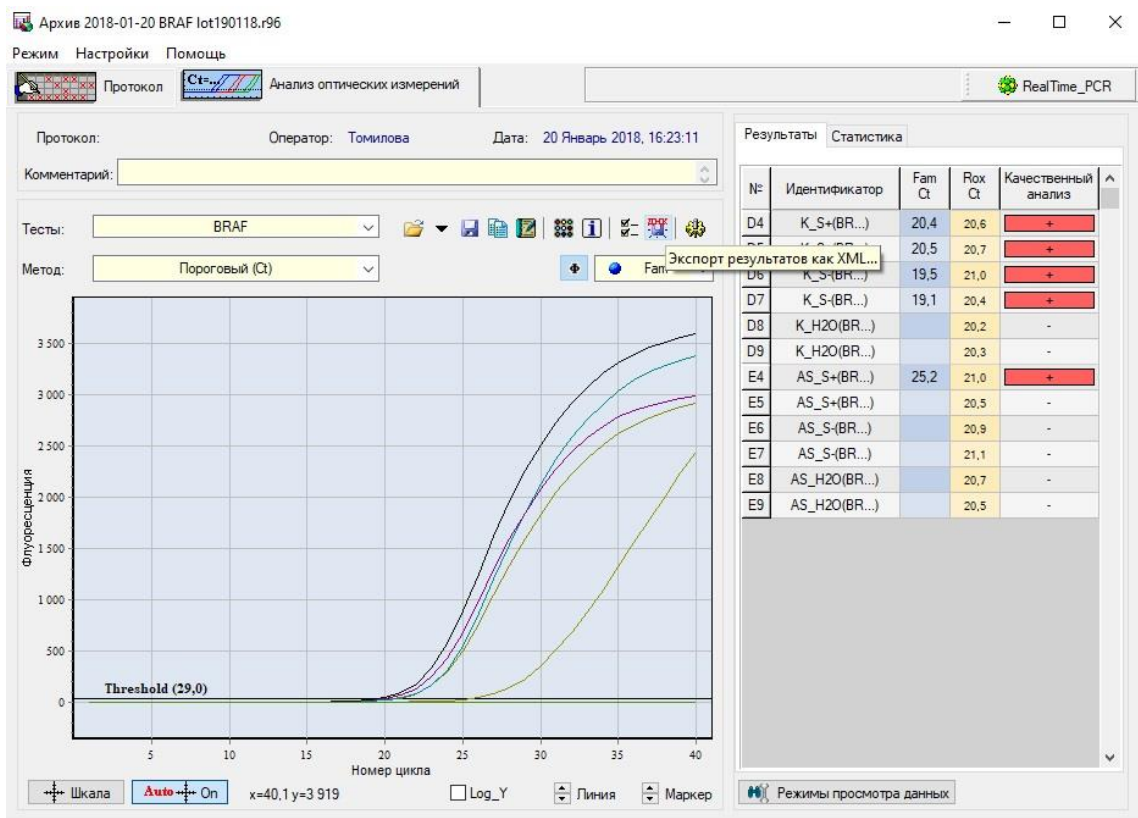


Рис. 2в. Сохранение результатов в программе RealTime

2. Запустите программу *BioLink_BRAF-V600E_App.exe*
3. В зависимости от типа ПЦР в анализируемом эксперименте перейдите на соответствующую вкладку **Контрольная** или **BRAF-V600mut** слева на панели.

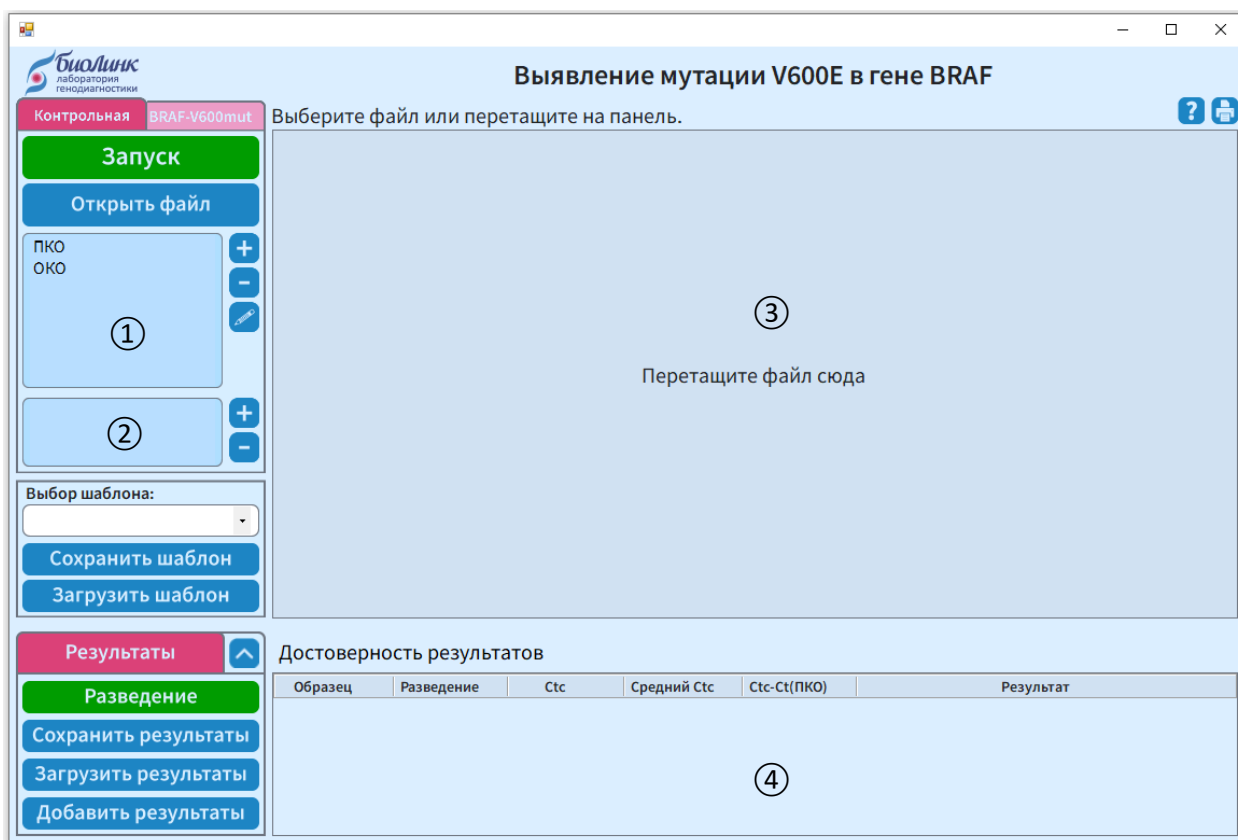




Рис. 3. Интерфейс программы

На рис. 3 в окне программы цифрами отмечены следующие панели данных:

①	Список образцов
②	Список разведений (или тип ПЦР для вкладки BRAF-V600mut)
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.

4. Нажмите на кнопку **Открыть файл** и выберите файл с результатами ПЦР.

Над панелью плашки отображается название файла, который был открыт, а раскладка плашки с образцами загружается на основе данных взятых из файла (см. рис. 4).

Программа *BioLink_BRAF-V600E_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_BRAF-V600E_App.exe* автоматически загрузит вместо него поле *Content*, в котором в программе *Biorad CFX Manager* содержится следующая информация об образцах: *Pos Ctrl*, *NTC*, *Unknown-1*, *Unknown-2* и т.п., при этом наименования контролей в *BioLink_BRAF-V600E_App.exe* будет перезаписано следующим образом: *Pos Ctrl* – ПКО, *NTC* – ОКО.

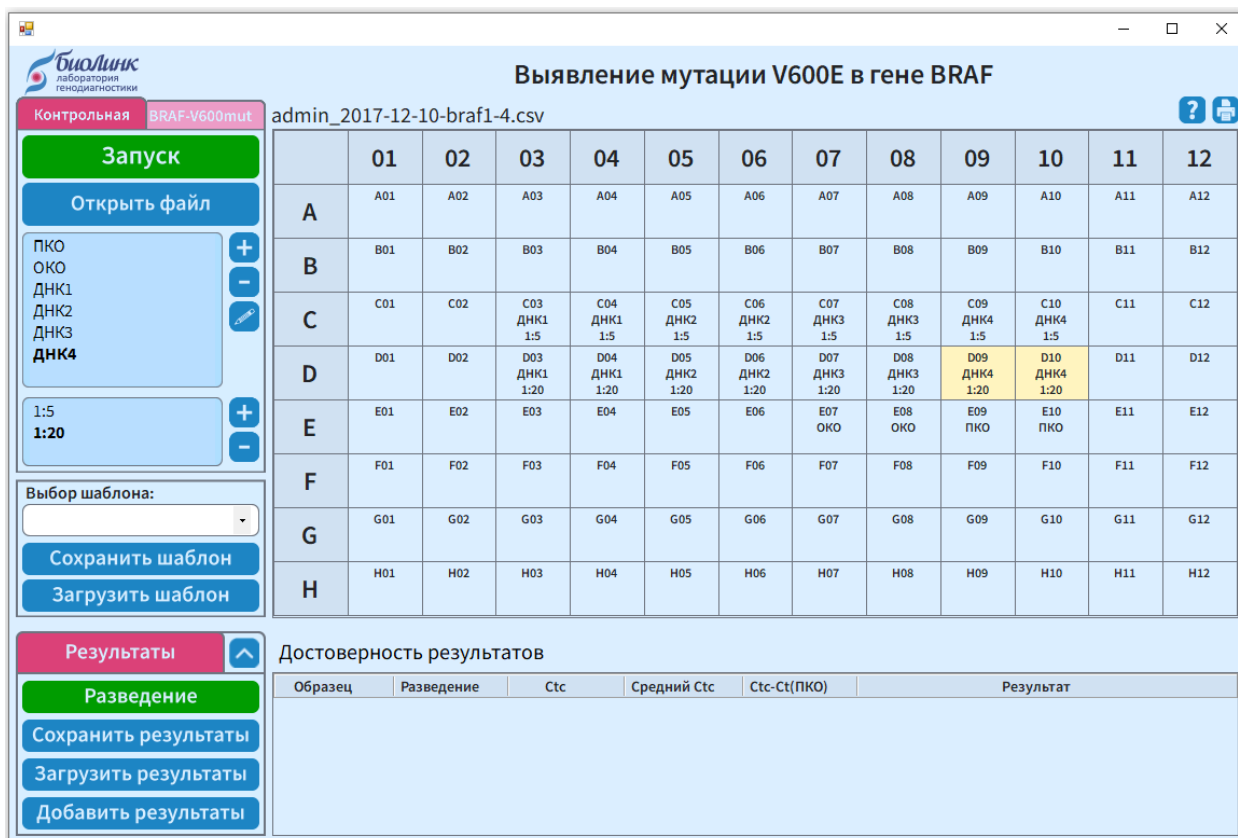


Рис. 4. Интерфейс программы после загрузки файла или после редактирования шаблона (для вкладки *Контрольная*)

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), а дубли образцов имели одинаковое название ячеек плашек (например, ДНК1). Программа также корректно работает для образцов не имеющих дублей (представленных в единственном экземпляре). Кроме того, для вкладки *Контрольная* необходимо указать разведение образцов, а для вкладки *V600mut* тип смеси в формате К (RU Русский) для образцов в контрольной ПЦР и *V600mut* (EN Английский) для образцов в аллель-специфичной ПЦР.

admin_2020-01-13-biolink-braf-mut-6-15LG - Quantification Cq Results_0.csv

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	A01	A02	A03 6 K	A04 6 K	A05 7 K	A06 7 K	A07 8 K	A08 8 K	A09 9 K	A10 9 K	A11	A12
B	B01	B02	B03 10 K	B04 10 K	B05 11 K	B06 11 K	B07 12 K	B08 12 K	B09 13 K	B10 13 K	B11	B12
C	C01	C02	C03 14 K	C04 14 K	C05 15 K	C06 15 K	C07 OKO K	C08 OKO K	C09 ПКО K	C10 ПКО K	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03 6 V600mut	F04 6 V600mut	F05 7 V600mut	F06 7 V600mut	F07 8 V600mut	F08 8 V600mut	F09 9 V600mut	F10 9 V600mut	F11	F12
G	G01	G02	G03 10 V600mut	G04 10 V600mut	G05 11 V600mut	G06 11 V600mut	G07 12 V600mut	G08 12 V600mut	G09 13 V600mut	G10 13 V600mut	G11	G12
H	H01	H02	H03 14 V600mut	H04 14 V600mut	H05 15 V600mut	H06 15 V600mut	H07 OKO V600mut	H08 OKO V600mut	H09 ПКО V600mut	H10 ПКО V600mut	H11	H12






Достоверность результатов

Образец	Контроль			Результат	V600mut	
	Ctc	Средний Ctc	Ctc-Ct(ПКО)		Ct	Дельта

Рис. 5. Интерфейс программы после загрузки файла или после редактирования шаблона (для вкладки «BRAf-V600mut»)

Если панель плашки не содержит необходимой информации, отредактируйте её.

5. Редактирование шаблона постановки:

- Справа на панели ③ (рис. 3), 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.
- Слева на панели ① (рис. 3) 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.
- 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 **Еще**, а комбинация клавиш «Ctrl + Enter» соответствует кнопке **Готово**.

- d. Далее выберите разведение (для вкладки Контрольная или тип смеси (для вкладки BRAF-V600mut) аналогичным образом на панели ② (рис. 3).
- 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 **Сохранить шаблон**, выберите путь сохранения и введите имя.
- b. Вы можете загрузить шаблон, нажав на кнопку **Загрузить шаблон** или выбрав его из списка. В списке отображаются только шаблоны, сохраненные в папке программы *BioLink_BRAF-V600E_App (SavedPlateLayoutsControl* и *SavedPlateLayoutsAllele* для вкладки Контрольная и BRAF-V600mut, соответственно) предложенной по умолчанию.

7. Нажмите кнопку **Запуск**.

8. Программа предложит ввести значения контролей качества (QC) и точки отсечения (TO) в окно «Параметры».

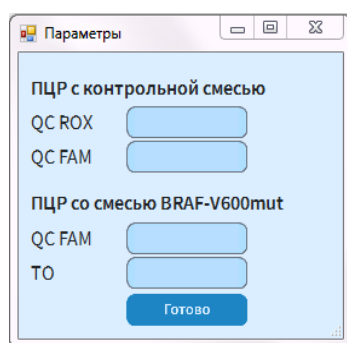




Рис. 6. Окно параметров

Заполните форму (рис. 6) и нажмите на кнопку **Готово** или клавишу «Enter».

9. Результаты обсчета будут выведены в таблицу на панели ④ (рис. 3).

В строке «Достоверность результатов» будет выведено сообщение о прохождении или не прохождении контролей («Данные пригодны» или «Данные не пригодны»). В случае успешного прохождения контролей и достаточной (для того чтобы провести анализ) концентрации ДНК в клинических образцах в таблице результатов такие образцы ПЦР


будут выделены «желтым» цветом (см. рис. 7). Нажмите на кнопку  чтобы развернуть или свернуть столбцы таблицы (подробнее в п. 13).

Данные пригодны. 

Образец	Контроль				V600mut			
	Стс	Средний Стс	Стс-Ст(ПКО)	Результат	Ст	Дельта	Т0	Результат
ПКО	19,3 19,1	19,2	-	ПКО прошел	25,3 25,0	6,0 6,0	6,4	ПКО прошел
ОКО	0,0 0,0	0,0	-	ОКО прошел по ROX, прошел по FAM	0,0 0,0	-	-	ОКО прошел по ROX, пр...
6	22,1 23,0	22,6	3,4	Концентрация ДНК достаточна	34,3 32,2	12,2 9,1	6,4	Отрицательный
7	17,8 17,9	17,8	-1,3	Концентрация ДНК достаточна	0,0 0,0	-	6,4	Отрицательный
8	18,5 18,4	18,5	-0,7	Концентрация ДНК достаточна	19,5 19,3	1,0 0,9	6,4	Положительный
9	20,8 20,5	20,6	1,4	Концентрация ДНК достаточна	0,0 0,0	-	6,4	Отрицательный
10	17,9 18,1	18,0	-1,2	Концентрация ДНК достаточна	20,4 20,0	2,5 1,9	6,4	Положительный
11	18,1 18,3	18,2	-1,0	Концентрация ДНК достаточна	20,1 20,1	2,0 1,8	6,4	Положительный
12	17,9 18,2	18,0	-1,1	Концентрация ДНК достаточна	20,0 20,7	2,1 2,6	6,4	Положительный
13	18,7 18,5	18,6	-0,6	Концентрация ДНК достаточна	21,2 21,1	2,5 2,7	6,4	Положительный
14	18,3 18,1	18,2	-0,9	Концентрация ДНК достаточна	18,7 19,0	0,4 0,9	6,4	Положительный
15	21,4 21,2	21,3	2,1	Концентрация ДНК достаточна	29,9 32,2	8,5 11,0	6,4	Отрицательный

Рис. 7. Таблица результатов (панель ④ на рис. 3).

Также для столбцов «Результат» имеются комментарии, которые отображаются при наведении курсора мыши на ячейку с результатом.

10. Чтобы развернуть таблицу результатов на большую часть программного окна, нажмите кнопку  слева от таблицы.

11. 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.

12. 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. 8) будут представлены расчеты для разведения.

Рис. 8. 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.

13. Для вкладки **BRAF-V600mut**:

Для работы с таблицей результатов используйте следующие кнопки (в правом верхнем углу над панелью ④) (на рис. 3):

	<p>Отображение таблицы результатов Скрывает или показывает столбцы в таблице результатов.</p>								
	<p>Настройка таблицы результатов Предлагает выбрать столбцы, которые необходимо отобразить в таблице результатов.</p> <div data-bbox="683 1151 1193 1532" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>Настройка таблицы</p> <p>Активные столбцы</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Ctc</td> <td><input type="checkbox"/> Ct (V600mut)</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Средний Ctc</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Дельта</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Ctc-Ct(ПКО)</td> <td><input type="checkbox"/> Точка отсечения</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Результат (К)</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Результат (V600mut)</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">Готово</p> </div>	<input type="checkbox"/> Ctc	<input type="checkbox"/> Ct (V600mut)	<input type="checkbox"/> Средний Ctc	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта	<input checked="" type="checkbox"/> Ctc-Ct(ПКО)	<input type="checkbox"/> Точка отсечения	<input checked="" type="checkbox"/> Результат (К)	<input checked="" type="checkbox"/> Результат (V600mut)
<input type="checkbox"/> Ctc	<input type="checkbox"/> Ct (V600mut)								
<input type="checkbox"/> Средний Ctc	<input checked="" type="checkbox"/> Дельта								
<input checked="" type="checkbox"/> Ctc-Ct(ПКО)	<input type="checkbox"/> Точка отсечения								
<input checked="" type="checkbox"/> Результат (К)	<input checked="" type="checkbox"/> Результат (V600mut)								

Чтобы распечатать таблицу результатов нажмите кнопку **Печать результатов**, тогда программа сгенерирует PDF файл, состоящий из столбцов «Образец» и «Результат», который вы можете после распечатать.

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. П-1, 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.

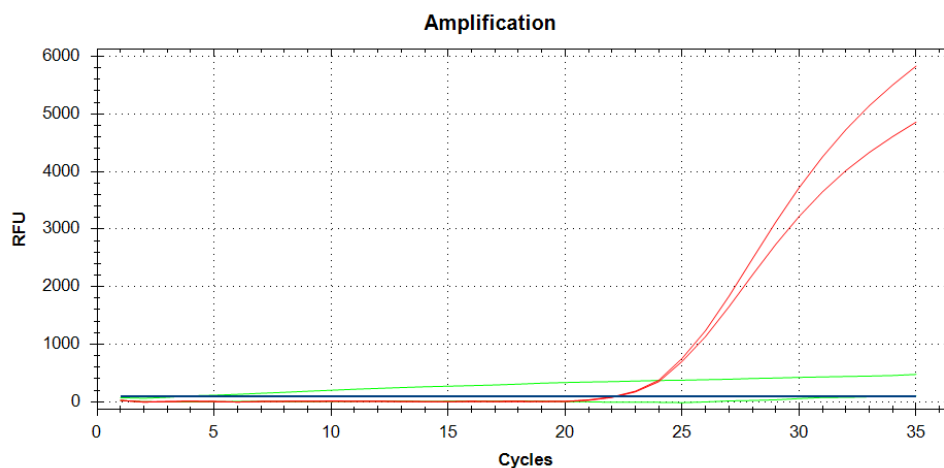


Рис. П-1. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

Для коррекции в левом верхнем углу программы нажмите *Settings*, выберите *Baseline Settings*, а затем *Apply Fluorescence Drift Correction* как показано на рис. П-2.

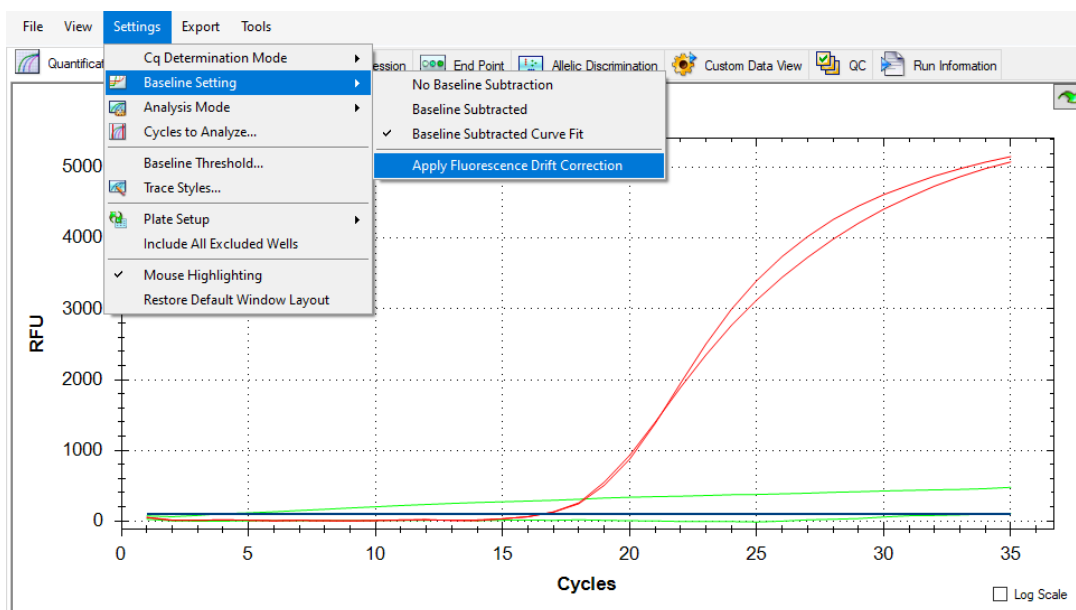


Рис. П-2. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Применение коррекции.

После выполнения данной процедуры ваш график должен принять следующий вид см. рис. П-3. Теперь кривая не имеющая S-образную форму находится ниже порогового уровня.

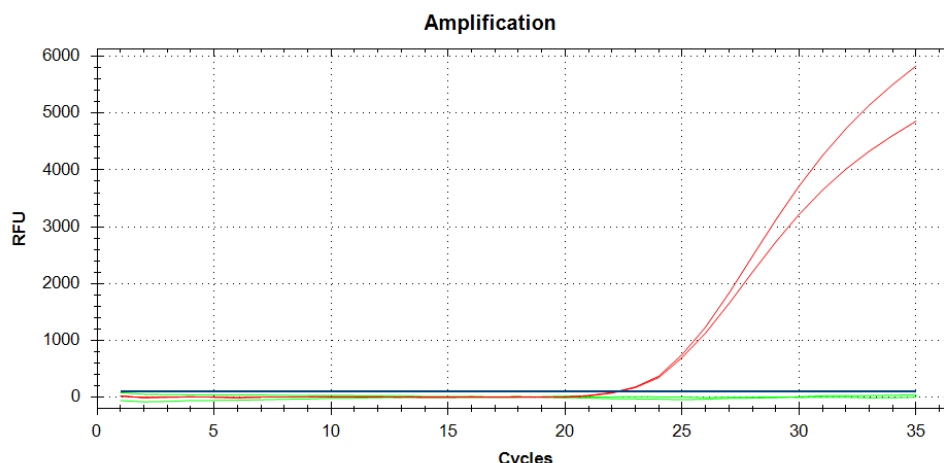


Рис. П-3. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Флуоресцентная кривая после коррекции для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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_BRAF-V600E_App см. пункт 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. П-4. Далее переходите к пункту 1 данного Руководства.

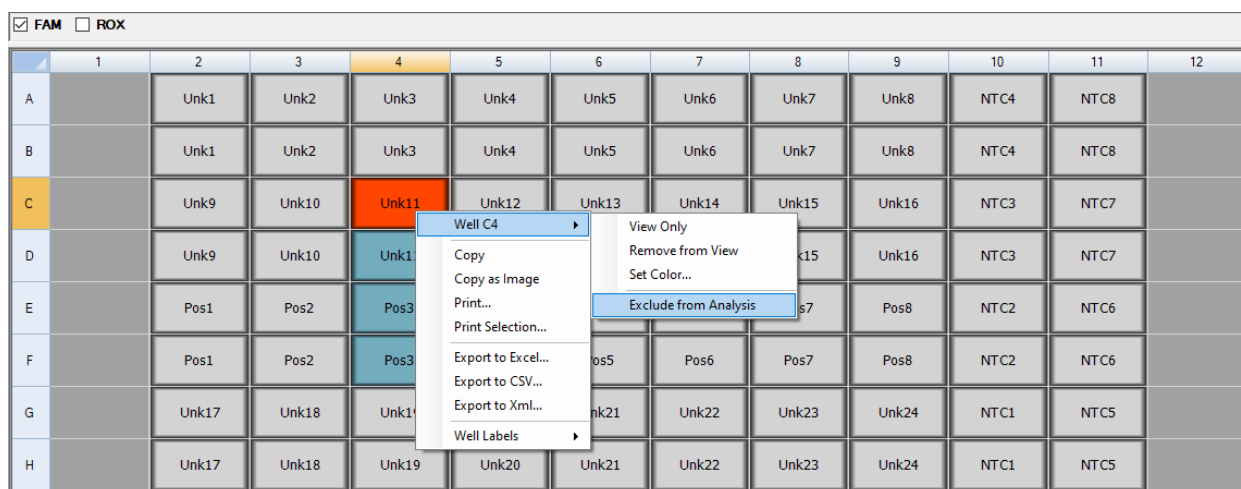


Рис. П-4. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа