

## BioLink\_KRAS-7M\_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 и вы установили пороговый уровень (threshold level) равным 100 (в соответствии с инструкцией к набору). Если есть какие-либо артефакты, то 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.

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

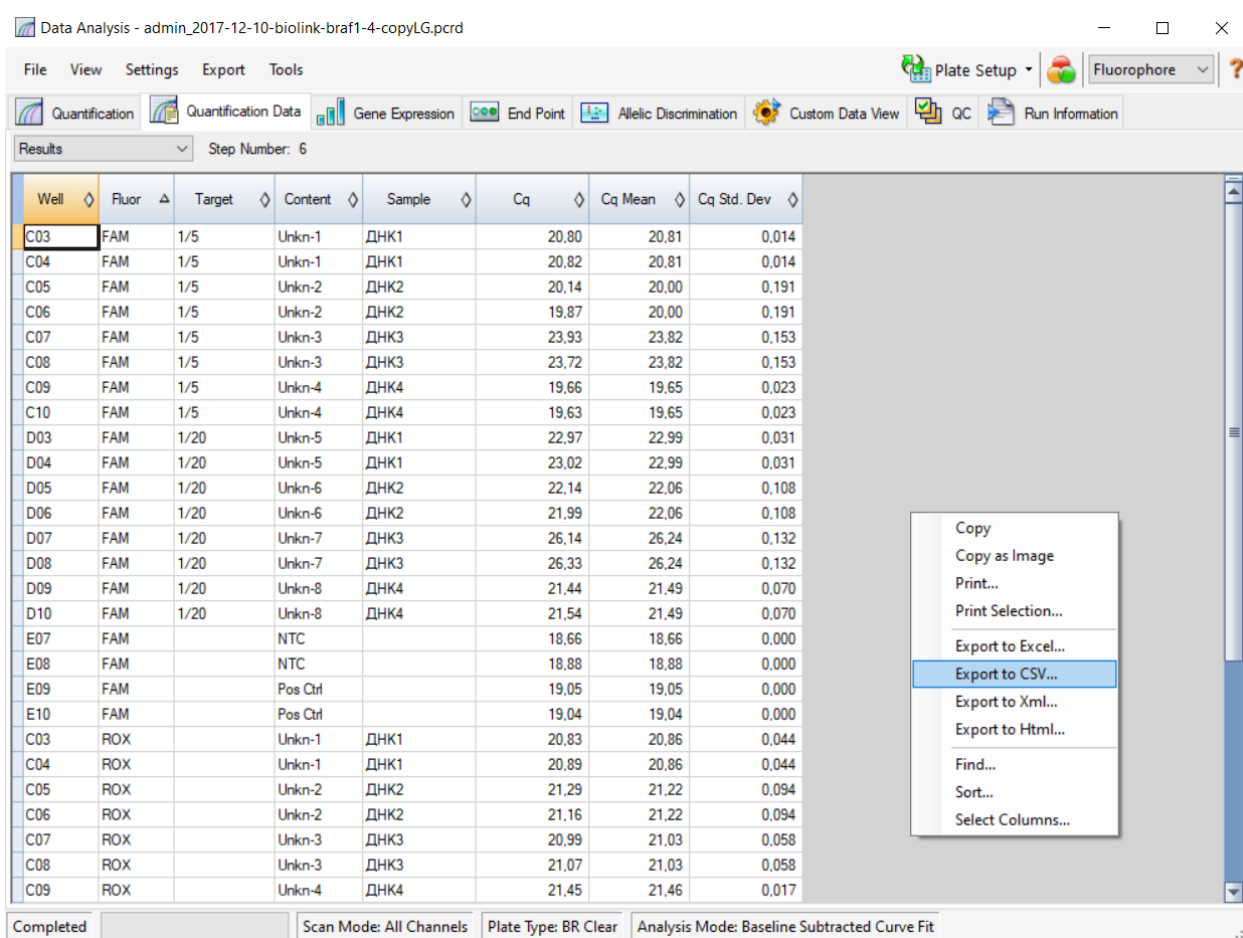


Рис. 1. Сохранение данных из программы Biorad CFX Manager в формате CSV

Если вы не заполнили поля *Sample* и *Target* в программе *Biorad CFX Manager* как представлено на рис. 1, далее можно будет отредактировать названия образцов, указать разведения или тип ПЦР в программе *BioLink\_KRAS-7M\_App.exe* см. пункт 5.

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

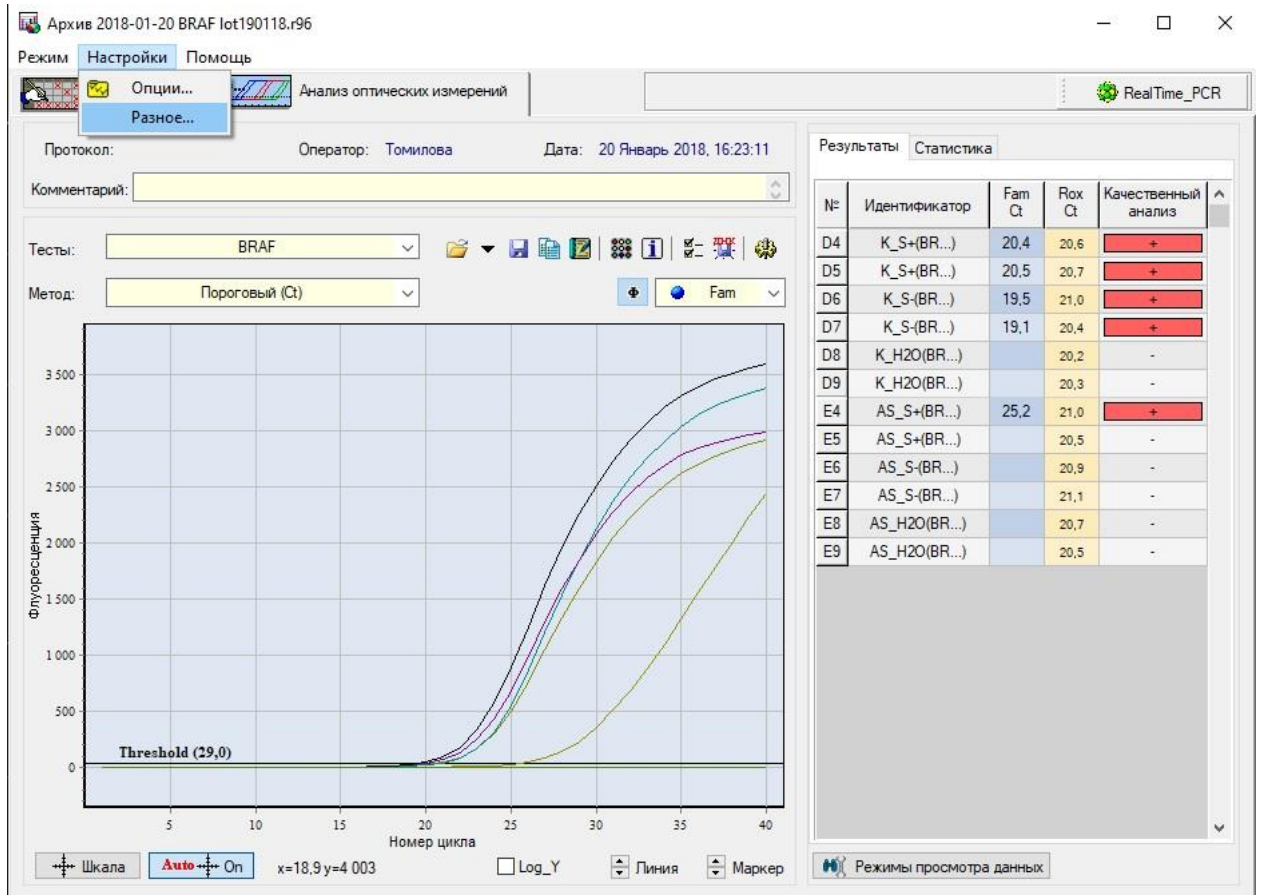


Рис. 2а. Открытие окна Настройки в программе RealTime

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

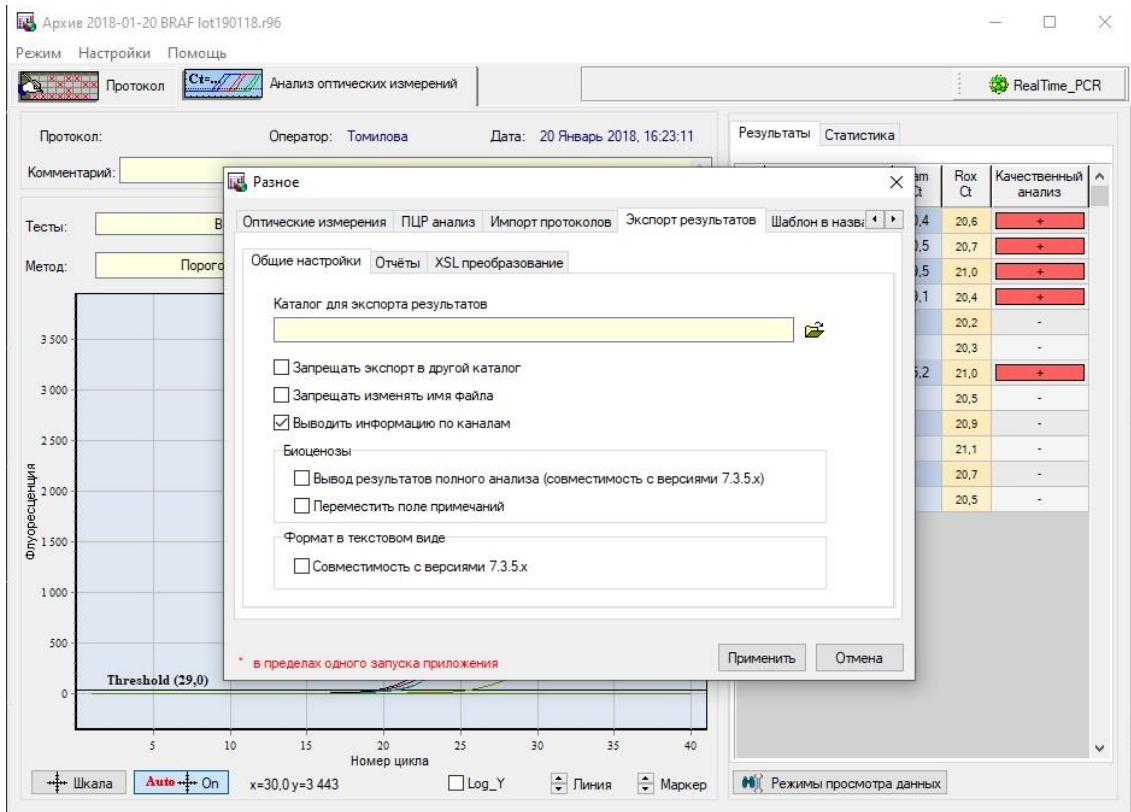


Рис. 26. Настройка вывода результатов в программе RealTime.

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

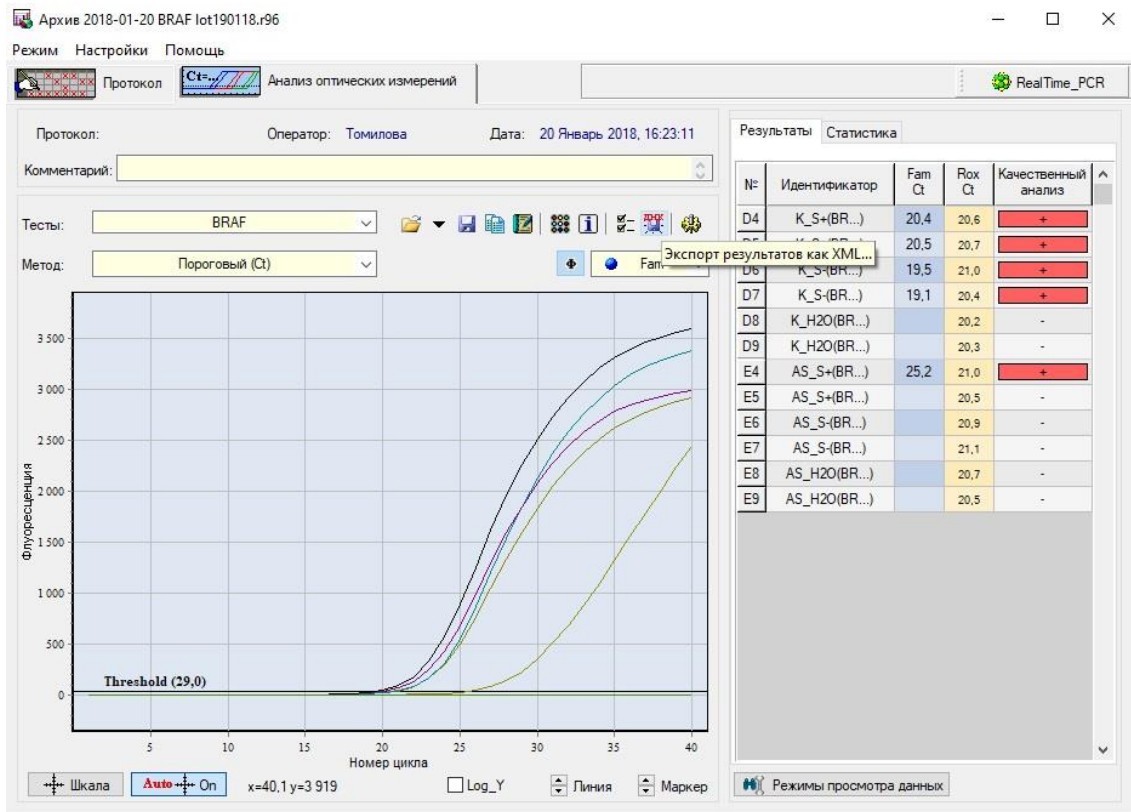




Рис. 2в. Сохранение результатов в программе RealTime.

2. Запустите программу *BioLink\_KRAS-7M\_App* кликнув дважды на файл *BioLink\_KRAS-7M\_App.exe* в папке с программой.

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

На рис. 3 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 данным руководством пользователя, а при нажатии на  сгенерируется PDF файл с текущим макетом плашки находящимся на панели ③.

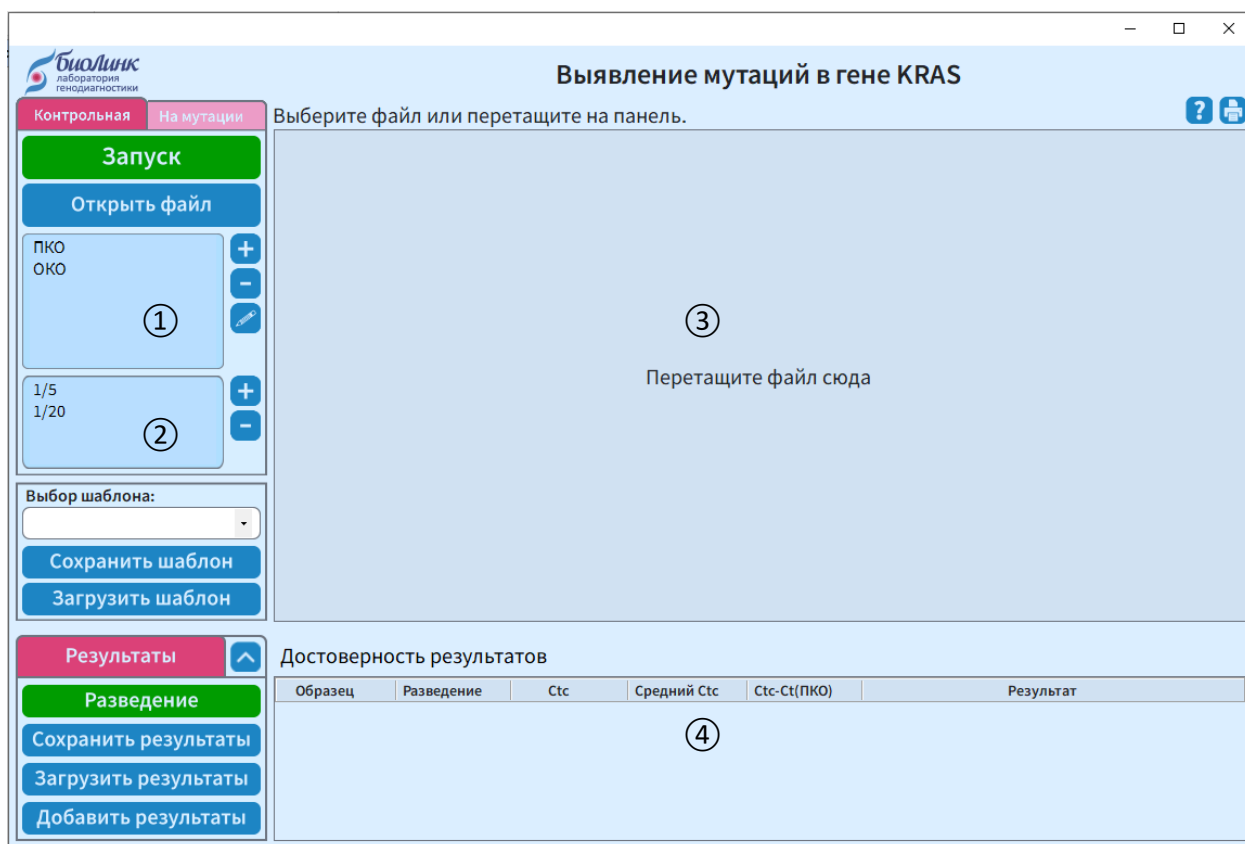


Рис. 3. Интерфейс программы

4. Нажмите на кнопку  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\_KRAS-7M\_App.exe* автоматически загружает в ячейки плашки информацию, указанную в полях *Sample* и *Target* из программы *Biorad CFX Manager*. Если поле *Sample* пустое, программа *BioLink\_KRAS-7M\_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\_KRAS-7M\_App.exe* будет перезаписано следующим образом: *Pos Ctrl* – ПКО, *NTC* – ОКО.

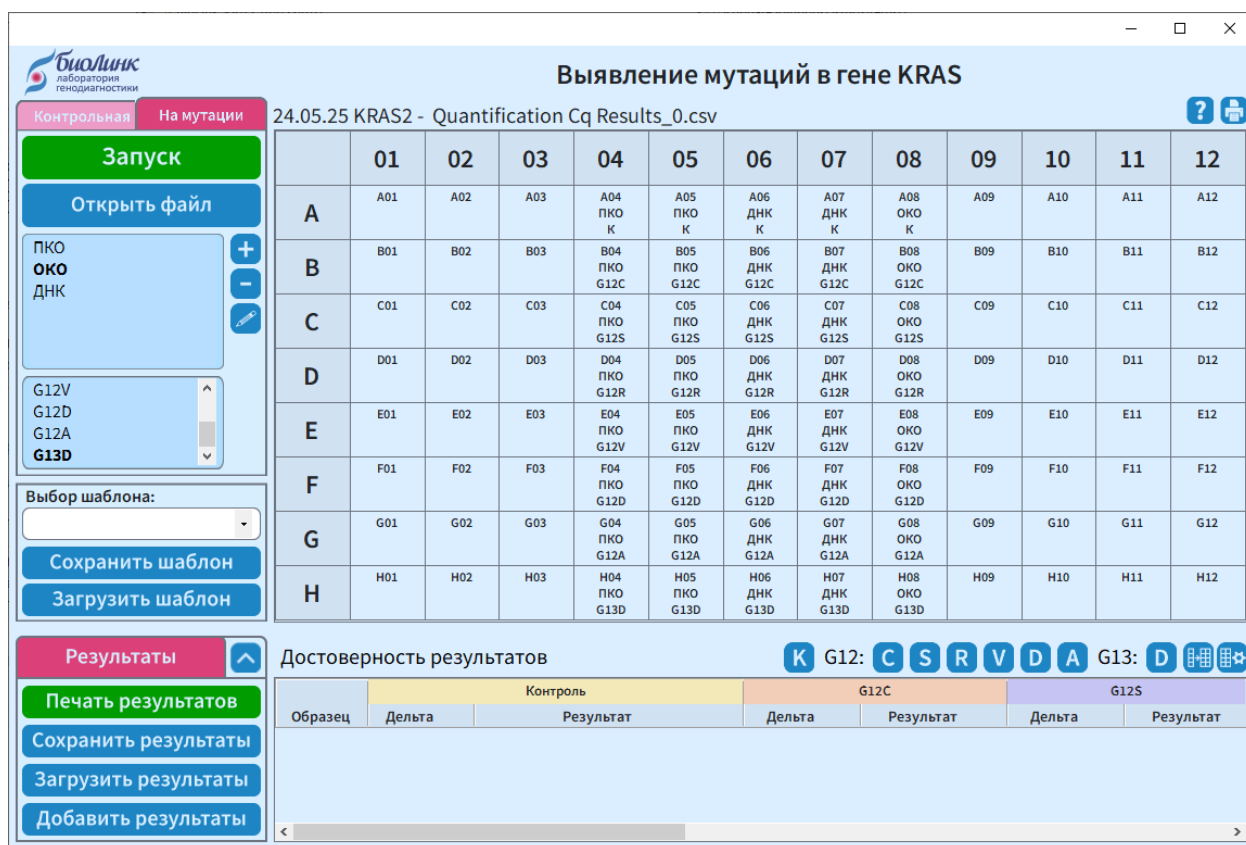


Рис. 4. Интерфейс программы после загрузки файла CSV или после редактирования шаблона

В программе *Biorad CFX Manager* вы можете заполнить поле *Sample* для клинических образцов указав в нем их названия (например, ДНК1), а также поле *Target*, в которой для контрольной ПЦР указать разведения образцов (например, 1:5), а для ПЦР со смесями указать тип ПЦР: К (RU Русский) для образцов в контрольной ПЦР, и G12C/S/R/V/D/A/13D (EN Английский) для образцов в ПЦР на мутации. Тогда при загрузке CSV файла в программу *BioLink\_KRAS-7M\_App.exe* информация об образцах загрузиться автоматически.

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 и ДНК1).

Смеси	ПКО	ОКО
В контрольной ПЦР	ДНК контроль *	Вода для ПЦР
В аллель-специфичной ПЦР	ДНК стандарт **	

\* ДНК контроль содержит ДНК человека без мутаций в гене KRAS





\*\* ДНК стандарт содержит по 5% копий фрагментов ДНК гена KRAS с каждой из мутаций на фоне ДНК человека без мутаций гена KRAS

Кроме того, для вкладки «Контрольная» необходимо указать разведение образцов (в формате 1:5 или 1/20), а для вкладки «На мутации» - тип смеси в формате К (RU Русский) для образцов в контрольной ПЦР, и G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A и G13D (EN Английский) для образцов в ПЦР на мутации, соответственно.

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

Если панель плашки не содержит необходимой информации, отредактируйте её.

#### 5. Редактирование шаблона постановки:

- a. 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.
- b. 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.
- 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 **Готово** (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 «На мутации») 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 (лучше оставить предложенный по умолчанию) и введите имя шаблона.

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\_KRAS-7M\_App/SavedPlateLayoutsControl* для вкладки «Контрольная» или *BioLink\_KRAS-7M\_App/SavedPlateLayoutsAllele* для вкладки «На мутации» (предлагаются по умолчанию).

7. Нажмите кнопку **Запуск**.

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

Заполните форму (рис. 5) и нажмите на кнопку **Готово** или клавишу «Enter».

ПЦР с контрольной смесью		ПЦР со смесью G12V	
QC ROX	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
QC FAM	<input type="text"/>		
ПЦР со смесью G12C		ПЦР со смесью G12D	
QC FAM	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
ПЦР со смесью G12S		ПЦР со смесью G12A	
QC FAM	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
ПЦР со смесью G12R		ПЦР со смесью G13D	
QC FAM	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>

**Готово**

Рис. 5. Окно параметров для ПЦР на наличие мутаций гена KRAS

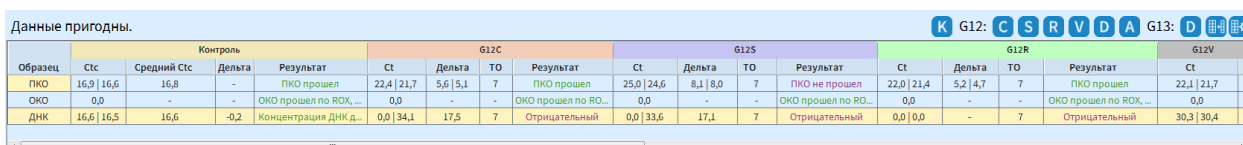
9. Результаты обсчета будут выведены в таблицу на панели ④ (рис. 3).

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

В строке «Достоверность результатов» будет выведено сообщение о прохождении или не прохождении контролей:

Сообщение	Расшифровка
Данные пригодны	Контроли пройдены
Данные не пригодны	Контроли не пройдены

В случае успешного прохождения контролей и достаточной (для того чтобы провести анализ) концентрации ДНК в клинических образцах в таблице результатов такие образцы будут подсвечены «желтым» цветом (см. рис. 6).



Образец	Контроль				G12C				G12S				G12R				G12V	
	Ct	Средний Ct	Дельта	Результат	Ct	Дельта	TO	Результат	Ct	Дельта	TO	Результат	Ct	Дельта	TO	Результат	Ct	
ПКО	16,9   16,6	16,8	-	ПКО прошел	22,4   21,7	5,6   5,1	7	ПКО прошел	25,0   24,6	8,1   8,0	7	ПКО не прошел	22,0   21,4	5,2   4,7	7	ПКО прошел	22,1   21,7	
ОКО	0,0	-	-	ОКО прошел по ROX...	0,0	-	-	ОКО прошел по RO...	0,0	-	-	ОКО прошел по RO...	0,0	-	-	ОКО прошел по ROX...	0,0	
ДНК	16,6   16,5	16,6	-0,2	Концентрация ДНК д...	0,0   34,1	17,5	7	Отрицательный	0,0   33,6	17,1	7	Отрицательный	0,0   0,0	-	7	Отрицательный	30,3   30,4	

Рис. 6. Таблица результатов (панель ④ на рис.3).

В контрольной ПЦР (на вкладке «Контрольная», а также на вкладке «На мутации» для контрольной ПЦР смеси в столбце «Контроль») в столбце результат могут быть выведены следующие варианты:

Образец	Результат
ПКО	Прошел / Не прошел
ОКО	Прошел по ROX / Не прошел по ROX и прошел по FAM/ не прошел по FAM/ не проверен по FAM (Ct ПКО не определено)
Клинический образец	Необходимо развести образец / Концентрация ДНК не достаточна / Концентрация ДНК достаточна / Нет результата (Ct ПКО не определено)* / Не указано разведение ** / Нет ДНК человека пригодной для анализа*** / Есть ингибиторы ПЦР***

\* Если на панели плашки отсутствовал образец с именем ПКО (RU Русский) или Ct ПКО не определено

\*\* Если на плашке под названием образца не указано разведение

\*\*\* Только для вкладки «Контрольная»

В ПЦР на мутации в столбце результат (для аллель-специфичных ПЦР смесей) могут быть выведены следующие варианты:

Образец	Результат
ПКО	Прошел / Не прошел/ Не найден! *
ОКО	Прошел по ROX / Не прошел по ROX и прошел по FAM/ не прошел по FAM/ не проверен по FAM / Не найден! *
Клинический образец	Положительный / Отрицательный / Сомнительный** / Нет результата*** / Не найден*

\* Если на панели плашки отсутствовал образец с именем ПКО/ОКО (RU Русский) или с указанием определенной ПЦР смеси

\*\* Если результат в дублях не совпадает

\*\*\* Если концентрация ДНК в образце недостаточна или образец требовал разведения или  $\Delta C_t$  образца не определено

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

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  $\Delta C_t$  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. 7) будут представлены расчеты для разведения.

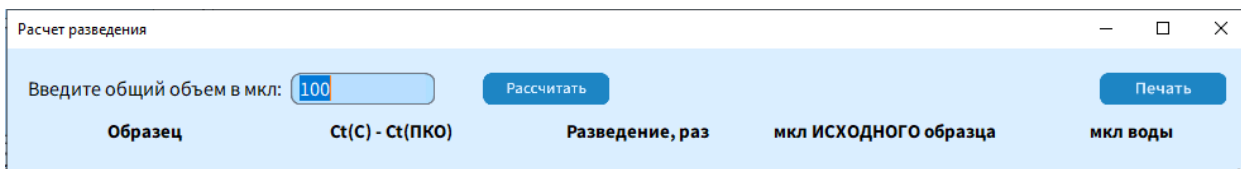





Рис. 7. Окно для расчета разведения

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 «Контроль», «G12C», «G12S», «G12R», «G12V», «G12D», «G12A», «G13D» таблицы результатов используйте кнопки G12: **C, S, R, V, D, A**, и G13: **D**, соответственно.

Также для работы с таблицей результатов вы можете использовать следующие кнопки (в правом верхнем углу над панелью ④ (на рис.3):

 	<p><b>Отображение таблицы результатов</b></p> <p>Скрывает или показывает столбцы в таблице результатов на основании отмеченных галочкой столбцов в «Настройке таблицы результатов».</p>
	<p><b>Настройка таблицы результатов</b></p> <p>Предлагает выбрать столбцы, которые необходимо отобразить в таблице результатов.</p> <div data-bbox="338 1391 1465 1697"> </div>

Чтобы распечатать таблицу результатов нажмите кнопку **Печать результатов**, тогда программа сгенерирует PDF файл, состоящий из столбцов «Образец» и «Результат» для каждой смеси (K, G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D), который вы можете сохранить в формате PDF и 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.

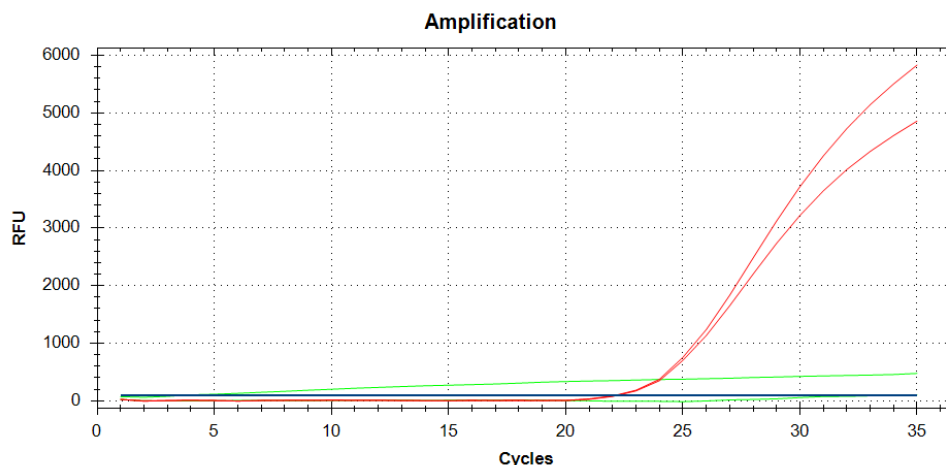


Рис. П-1. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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

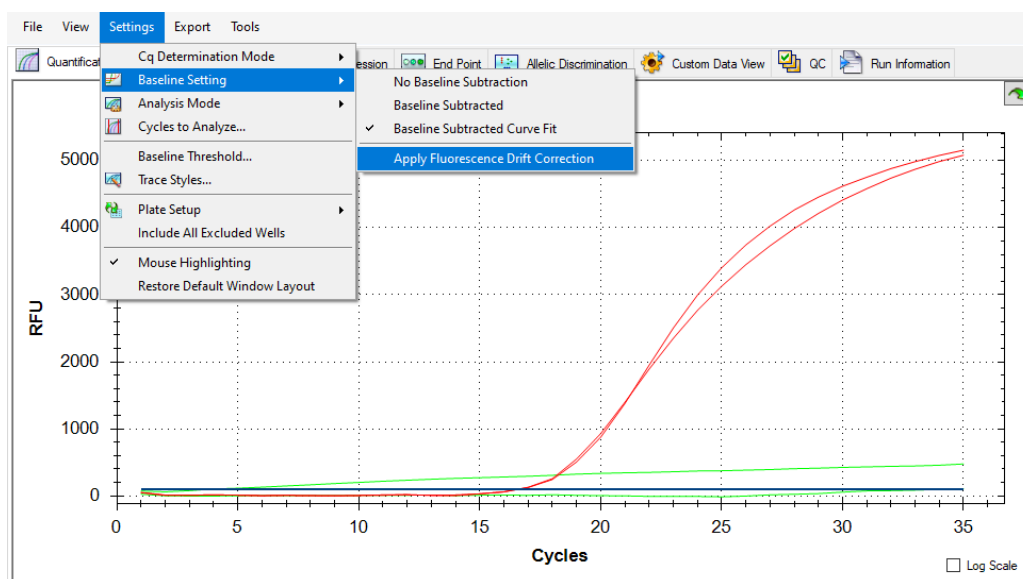


Рис. П-2. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Применение коррекции.

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.

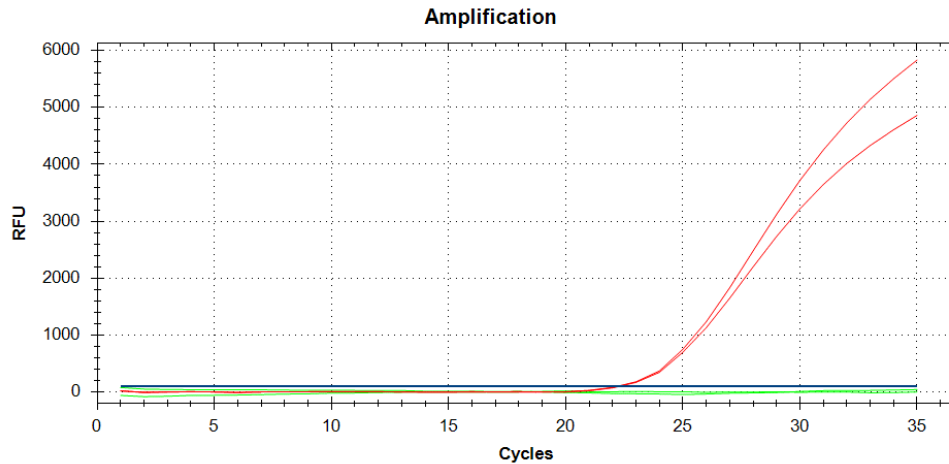


Рис. П-3. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Флуоресцентная кривая после коррекции для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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\_KRAS-7M\_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.

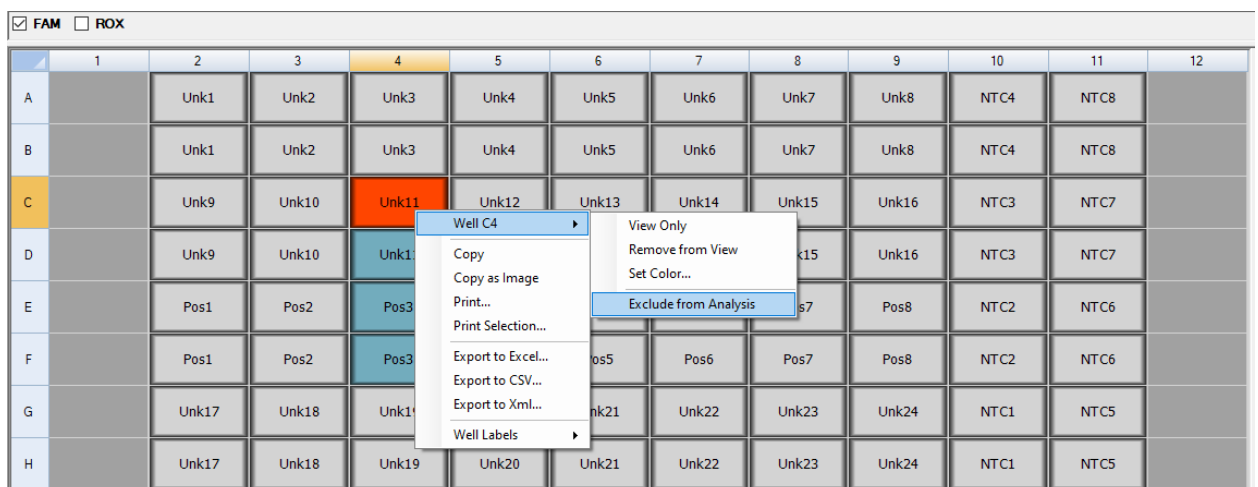


Рис. П-4. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа