

## BioLink\_NRAS-3R\_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  $C_t$  использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную 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.

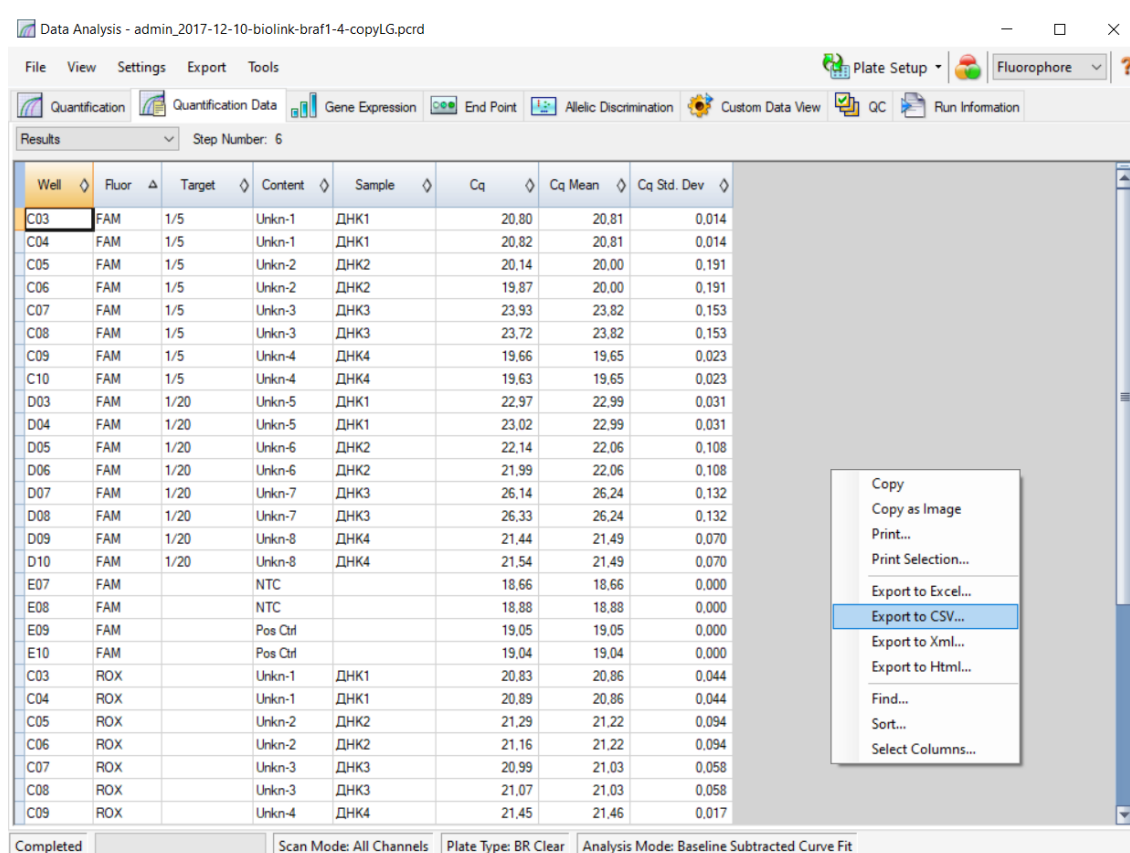


Рис. 1. Сохранение данных из программы *Biorad CFX Manager* в формате CSV

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\_NRAS-3R\_App.exe* см. пункт 5 «Редактирование шаблона постановки».

б) 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).

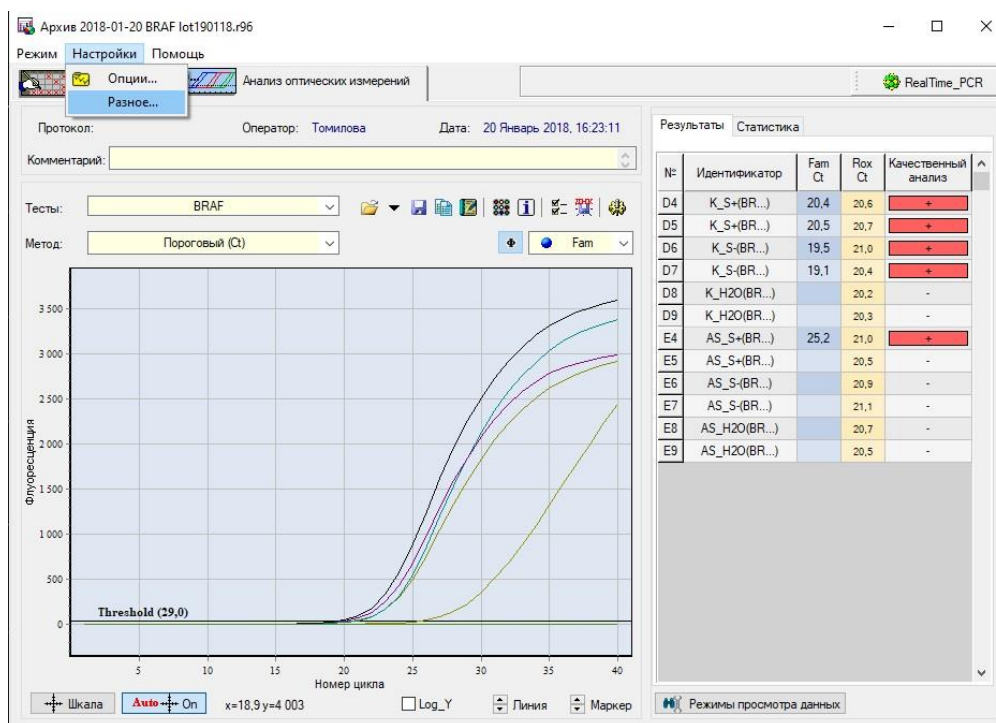


Рис. 2а. Открытие окна Настройки в программе RealTime

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

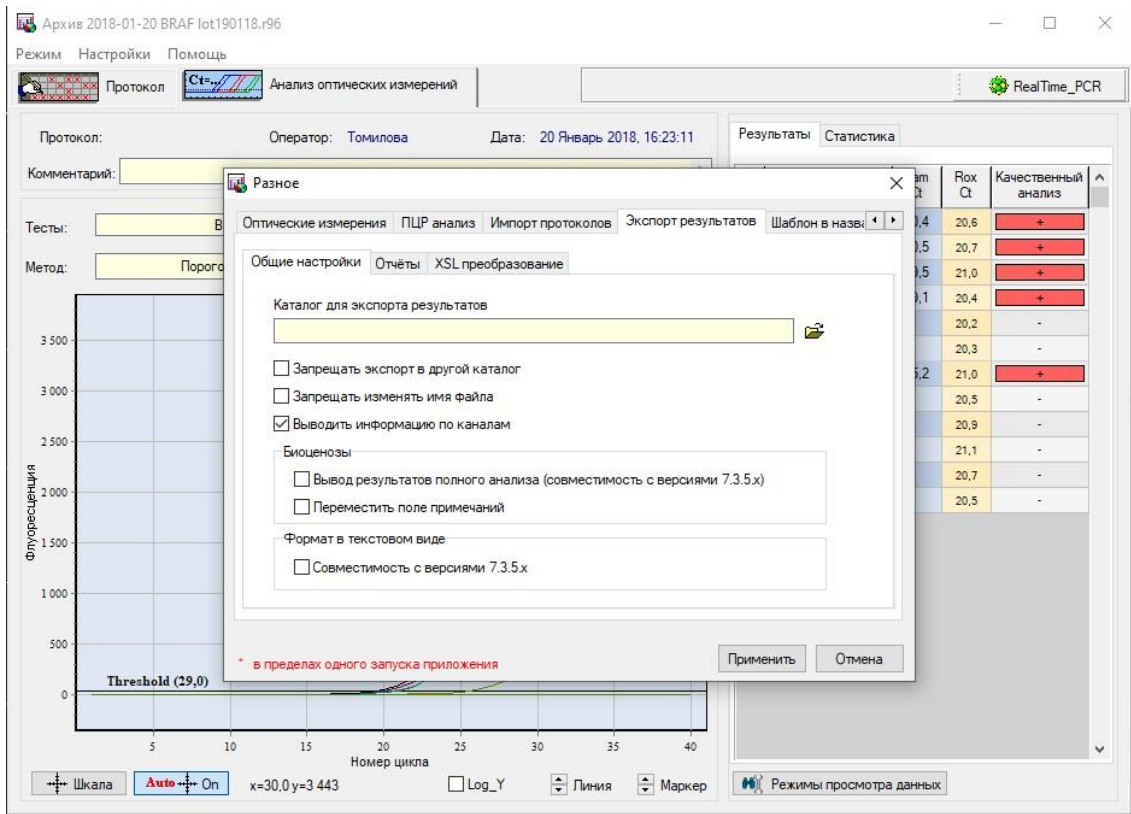


Рис. 26. Настройка вывода результатов в программе RealTime.

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

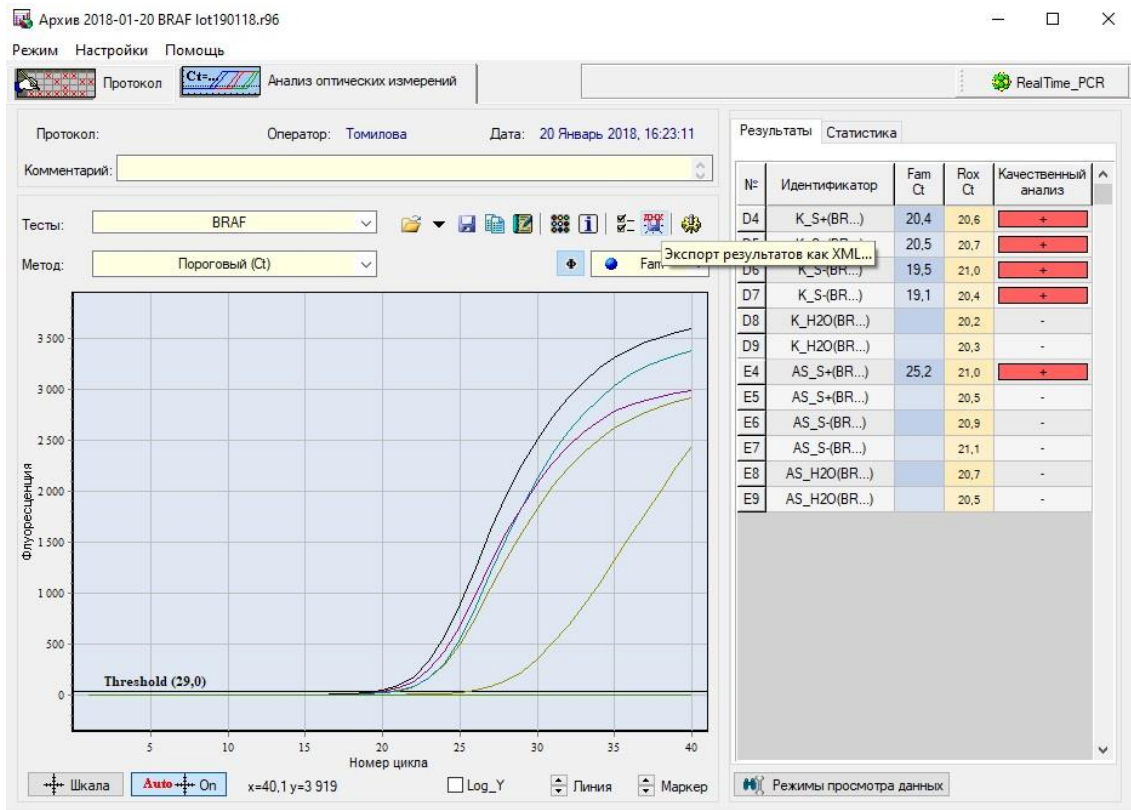




Рис. 2в. Сохранение результатов в программе RealTime.

2. Запустите программу *BioLink\_NRAS-3R\_App.exe*
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 руководством пользователя, а при нажатии на  сгенерируется PDF файл с текущим макетом плашки находящимся на панели ③.

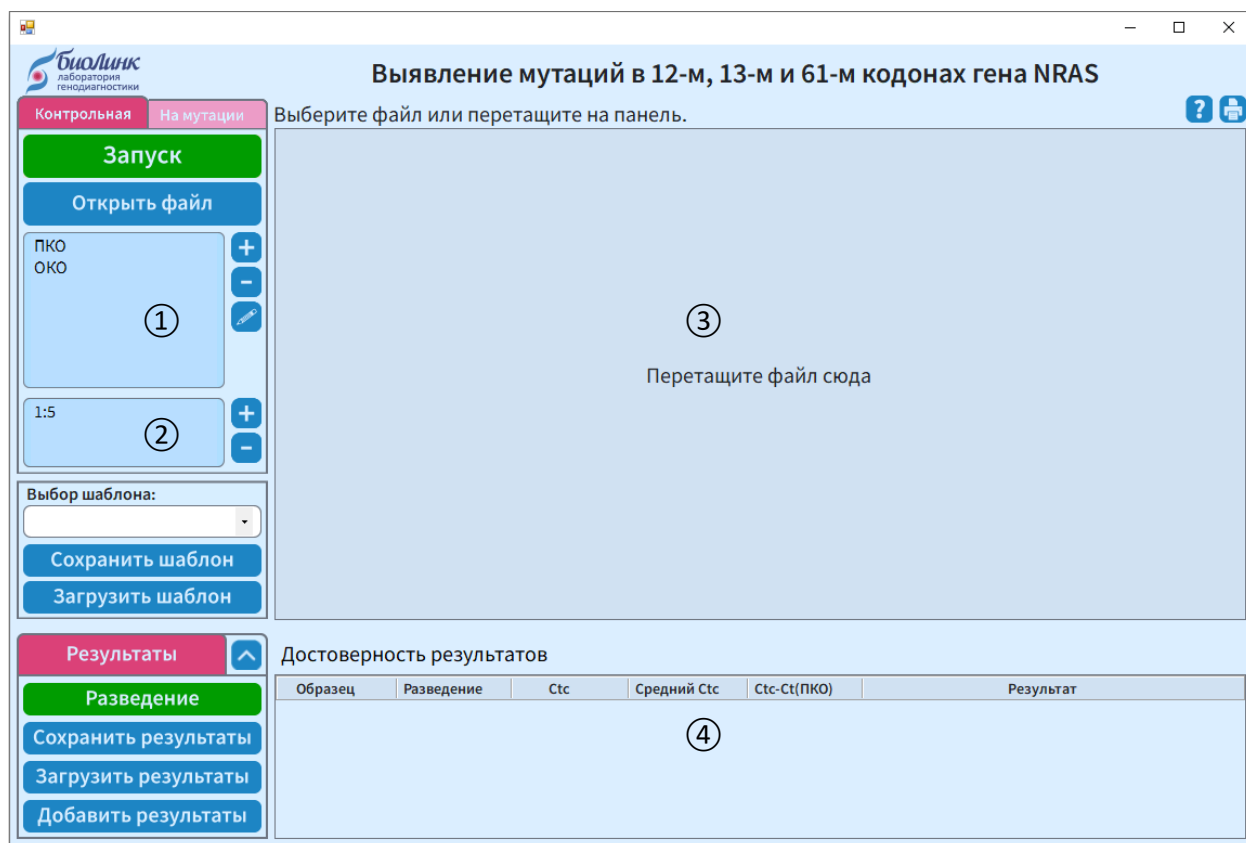


Рис. 3. Интерфейс программы

4. Нажмите на кнопку **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\_NRAS-3R\_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\_NRAS-3R\_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\_NRAS-3R\_App.exe* будет перезаписано следующим образом: *Pos Ctrl* – ПКО, *NTC* – ОКО.

**Выявление мутаций в 12-м, 13-м и 61-м кодонах гена NRAS**

admin\_2020-12-02-NRAS\_all-2-7-27-28-46TomsK-copyLG-changed.csv

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<b>A</b>	A01 2 K	A02 2 K	A03 7 K	A04 7 K	A05 27 K	A06 27 K	A07 28 K	A08 28 K	A09 46 K	A10 46 K	A11 ОКО K	A12 ОКО K
<b>B</b>	B01 2 G	B02 2 G	B03 7 G	B04 7 G	B05 27 G	B06 27 G	B07 28 G	B08 28 G	B09 46 G	B10 46 G	B11 ОКО G	B12 ОКО G
<b>C</b>	C01 2 Q	C02 2 Q	C03 7 Q	C04 7 Q	C05 27 Q	C06 27 Q	C07 28 Q	C08 28 Q	C09 46 Q	C10 46 Q	C11 ОКО Q	C12 ОКО Q
<b>D</b>	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
<b>E</b>	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
<b>F</b>	F01 ПКО K	F02 ПКО K	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
<b>G</b>	G01 ПКО G	G02 ПКО G	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
<b>H</b>	H01 ПКО Q	H02 ПКО Q	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Выбор шаблона: NRAS-02-12-2020

Достоверность результатов

Образец	Контроль				G12/13X		
	Стс	Средний Стс	Дельта	Результат	Ст	Дельта	Т








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

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» - тип смеси в формате К (RU Русский) для образцов в контрольной ПЦР, G и Q (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  (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. 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 , 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\_NRAS-3R\_App/SavedPlateLayoutsControl* для вкладки «Контрольная» или *BioLink\_NRAS-3R\_App/SavedPlateLayoutsAllele* для вкладки «На мутации» (предлагаются по умолчанию).

## 7. Нажмите кнопку .

8. Программа предложит ввести значения контролей качества (QC) и точек отсечения (TO) в окно «Параметры». Заполните форму (рис. 5) и нажмите на кнопку **Готово** или клавишу «Enter».

Параметры

ПЦР с контрольной смесью

QC ROX

QC FAM

ПЦР со смесью G12/13X

QC FAM

TO

ПЦР со смесью Q61X

QC FAM

TO

**Готово**

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

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, результаты для них будут выделены «желтым» цветом (см. рис. 6).

Если концентрация ДНК в образце в контрольной ПЦР была недостаточной или образец требовал разведения или *Ctc* образца не определено, то в графе результат будет написано «Нет результата». Исключение - ситуация, в которой концентрация ДНК в образце не достаточна, но образец сильно положительный, тогда в ячейке результата будет «Положительный».

Результат «Не найден» будет выведен в случае, если некорректно указан тип ПЦР в ячейке образца на плашке.

Также в столбцах «Результат» при наведении курсора мыши на ячейку имеются комментарии для расшифровки результата (не для всех результатов).

Данные пригодны. K G Q

Образец	Контроль				G12/13X				Q61X			
	Стс	Средний Стс	Дельта	Результат	Ст	Дельта	Т0	Результат	Ст	Дельта	Т0	Результат
ПКО	0,0   17,4	-	-	ПКО прошел	22,8   23,6	6,2	7,2	ПКО прошел	22,1   21,9	4,5	6	ПКО прошел
ОКО	0,0   0,0	0,0	-	ОКО прошел по ROX, прошел по FAM	0,0   0,0	-	-	ОКО прошел по RO...	0,0   0,0	-	-	ОКО прошел по ROX, прошел по FAM
2	0,0   19,0	-	1,6	Концентрация ДНК достаточна	28,9   31,8	12,7	7,2	Отрицательный	33,0   0,0	14,0	6	Отрицательный
27	0,0   0,0	0,0	-	Нет результата	34,2   29,1	-	7,2	Нет результата	0,0   0,0	-	6	Нет результата
28	21,9   21,7	21,8	4,4	Концентрация ДНК не достаточна	0,0   29,2	-	7,2	Нет результата	21,5   21,3	0,4   0,5	6	Положительный
46	12,8   12,1	12,5	-4,9	Необходимо развести образец	0,0   0,0	-	7,2	Нет результата	22,3   21,7	-	6	Нет результата
7	21,7   0,0	-	4,3	Концентрация ДНК не достаточна	21,1   21,0	0,6	7,2	Положительный	0,0   30,0	-	6	Нет результата

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

Чтобы свернуть/развернуть столбцы «Контроль», «G12/13X», «Q61X» таблицы результатов используйте кнопки **K**, **G**, **Q**, соответственно (см. также п. 12).

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

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  $\Delta Ct$  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.

Расчет разведения

Введите общий объем в мкл:  **Рассчитать** **Печать**



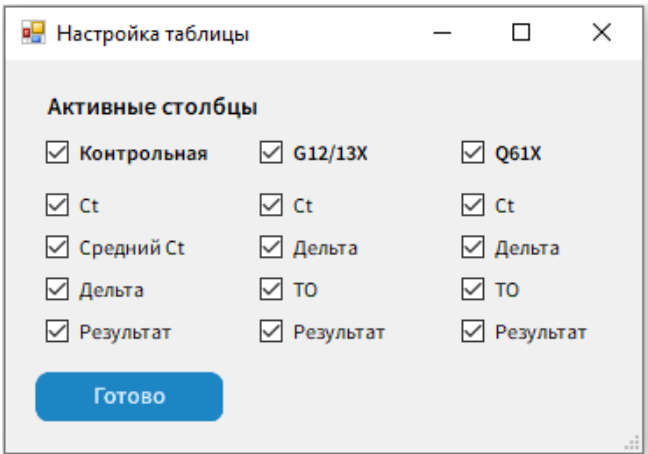
Образец	Ст(С) - Ст(ПКО)	Разведение, раз	мкл ИСХОДНОГО образца	мкл воды
---------	-----------------	-----------------	-----------------------	----------

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»:

Для работы с таблицей результатов используйте 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="598 741 1248 1193"></div>

Чтобы распечатать таблицу результатов нажмите кнопку **Печать результатов**, тогда программа сгенерирует PDF файл, который вы можете сохранить и после 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. 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.

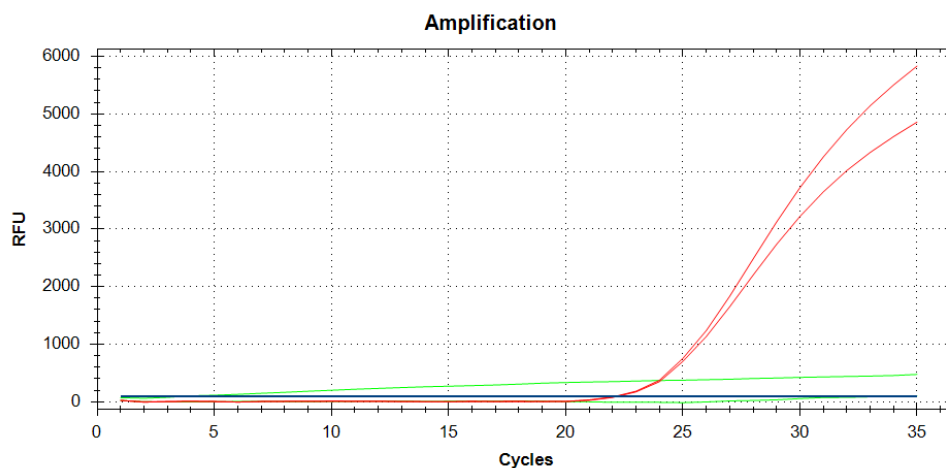


Рис. П-1. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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

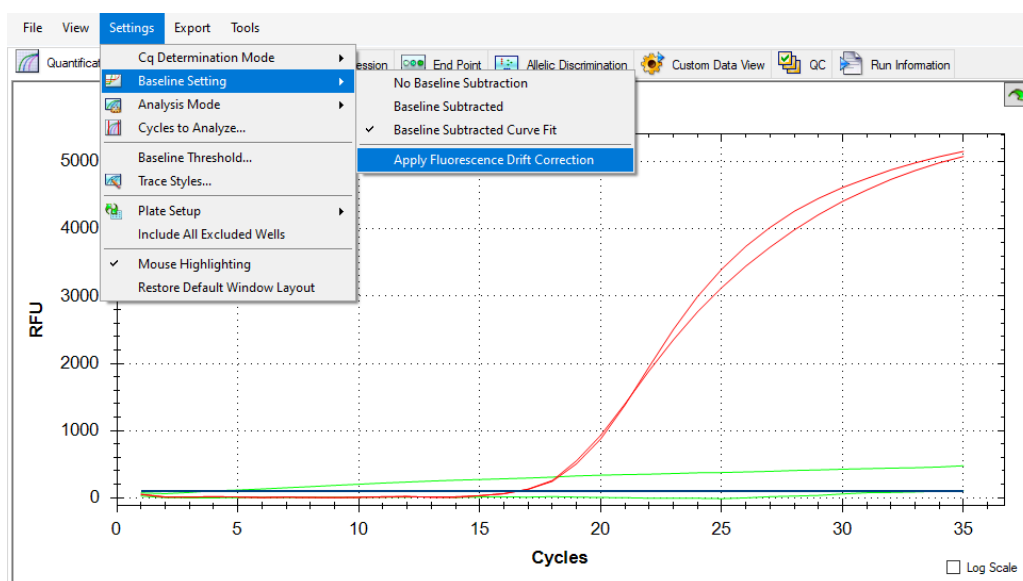


Рис. П-2. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Применение коррекции.

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.

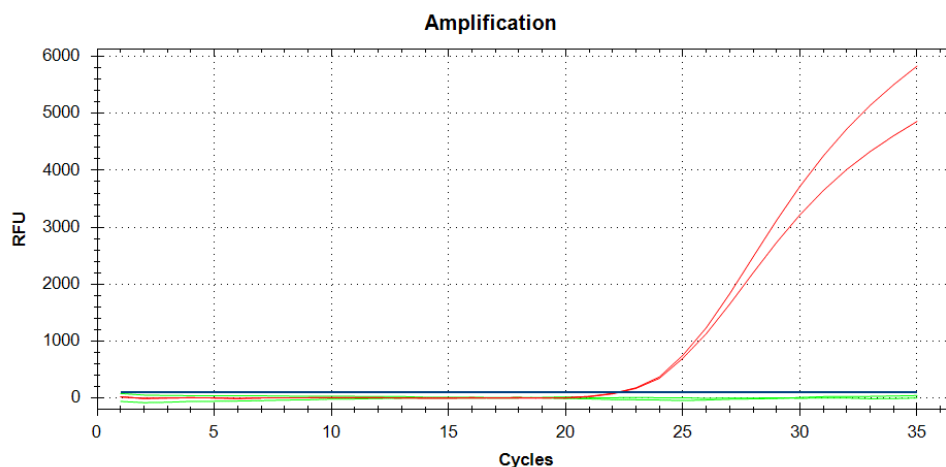


Рис. П-3. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Флуоресцентная кривая после коррекции для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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\_NRAS-3R\_App см. пункт 5 «Редактирование шаблона постановки» (подпункт е).

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.

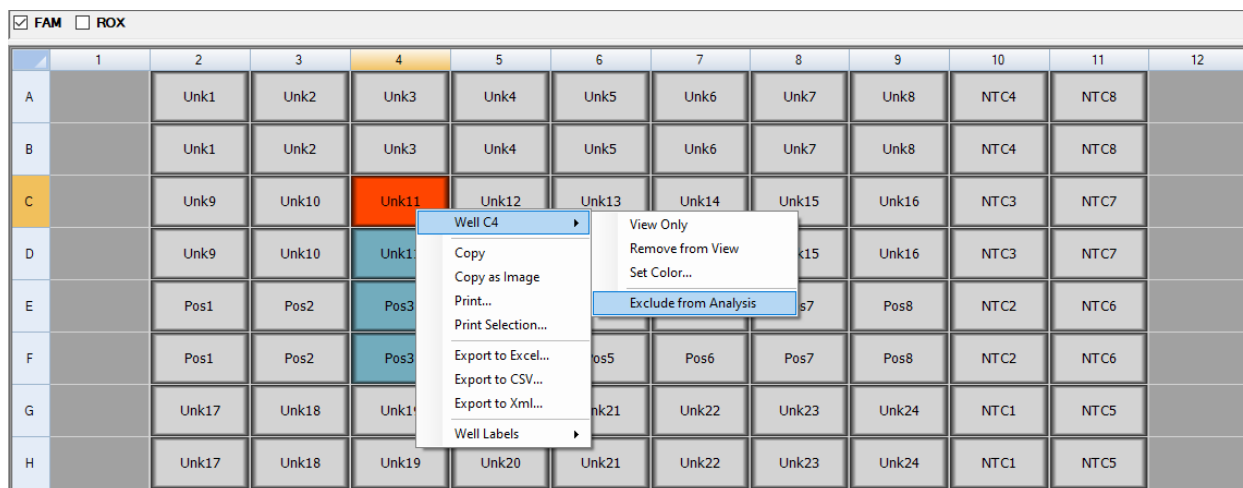


Рис. П-4. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа