

## BioLink\_PIK3CA-8M\_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 установлен верный режим определения величин Cq: при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот «С1000 Touch» с модулем CFX96 выбрать режим регрессия (regression), при применении амплификатора «ДТпрайм» – геометрический метод. 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.

- 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.

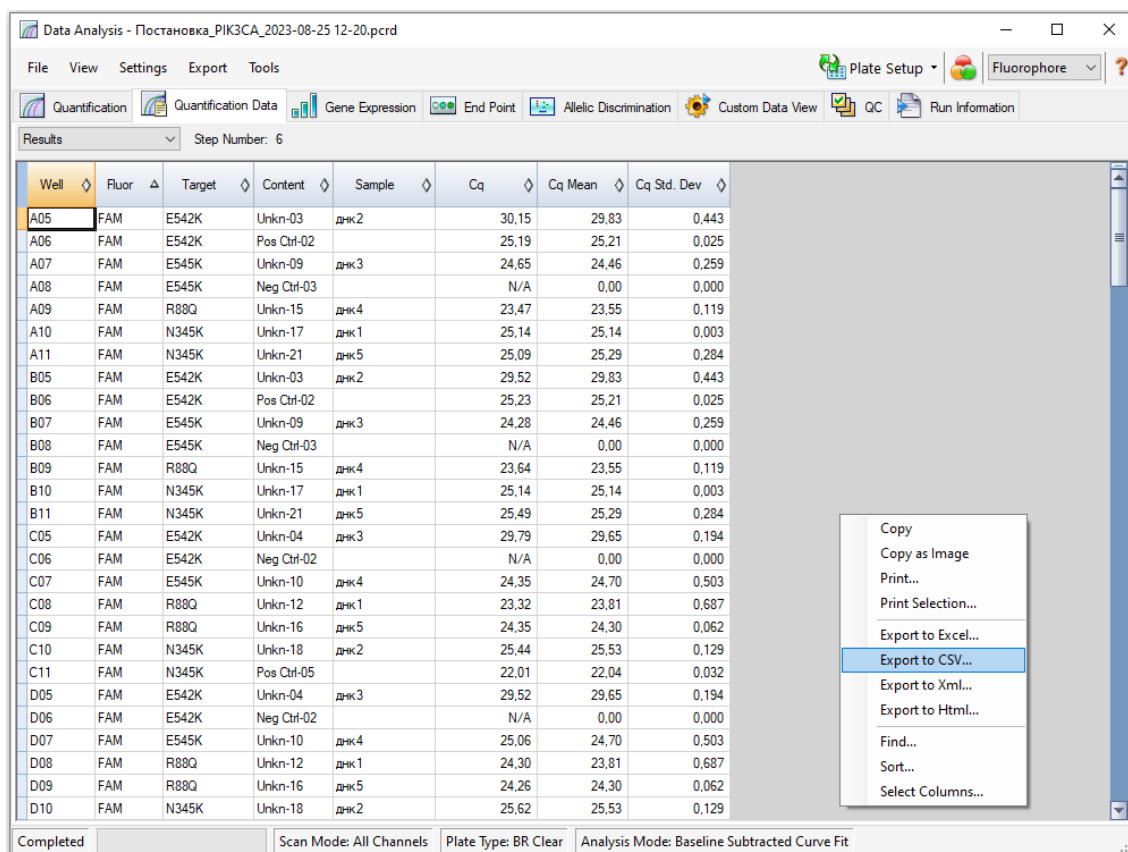


Рис. 1. Сохранение данных из программы Biorad CFX Manager в формате CSV

Если вы не заполнили поля *Sample* и *Target* в программе *Biorad CFX Manager*, далее можно будет отредактировать названия образцов, указать разведения или тип ПЦР в образцах в программе *BioLink\_PIK3CA-8M\_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).

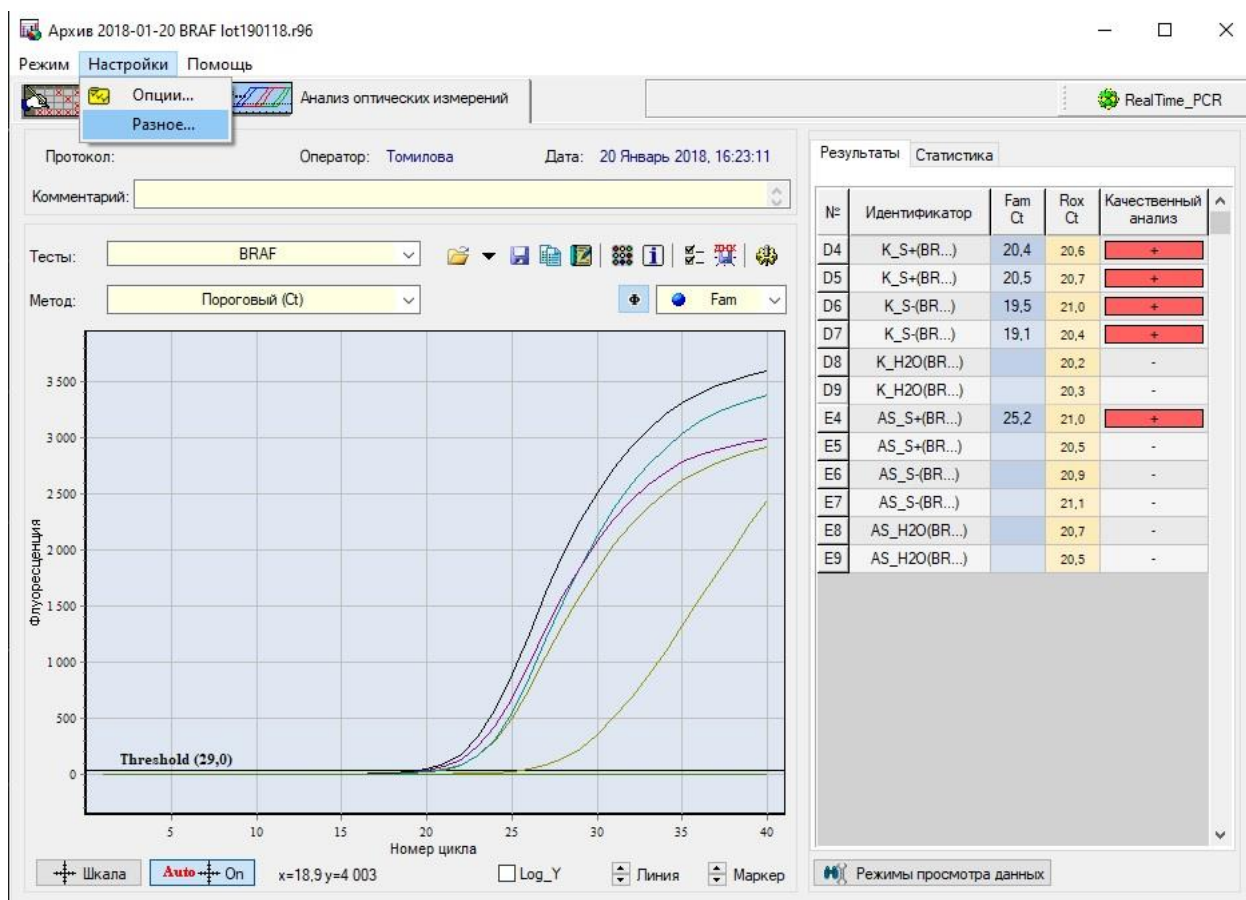


Рис. 2а. Открытие окна Настройки в программе RealTime

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

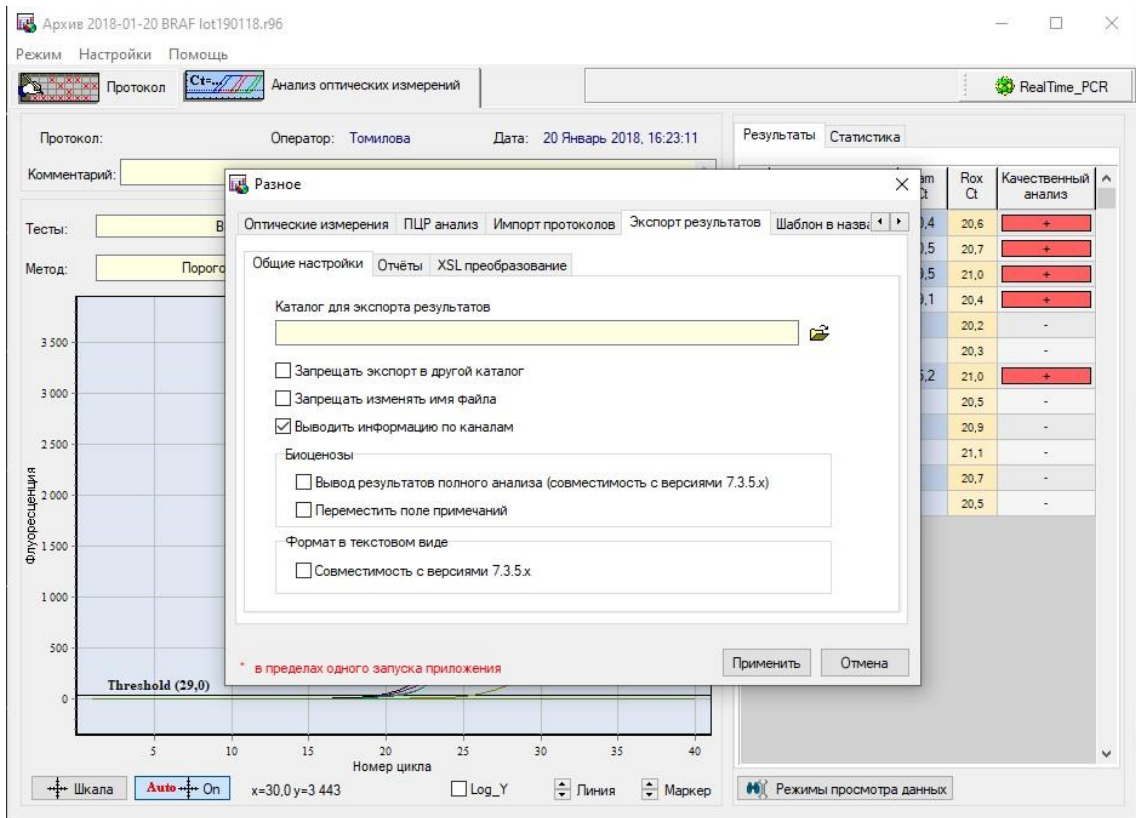


Рис. 26. Настройка вывода результатов в программе RealTime.

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

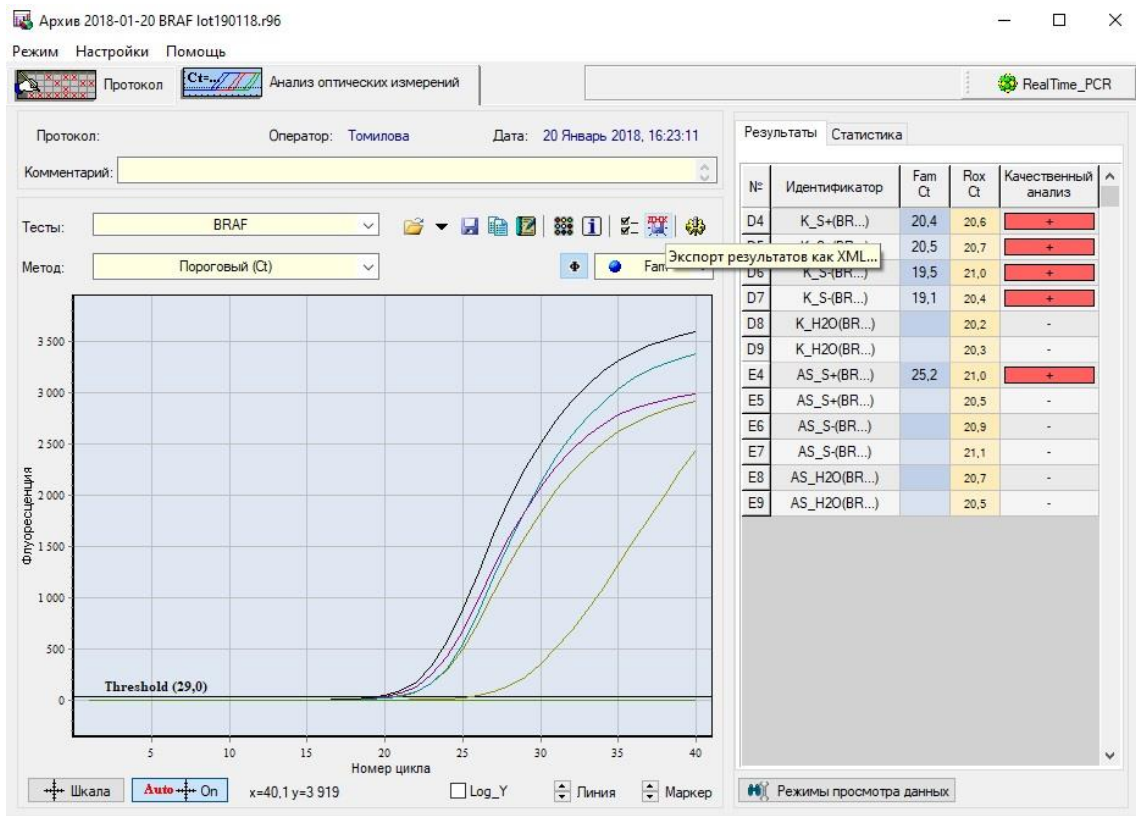




Рис. 2в. Сохранение результатов в программе RealTime.

2. Запустите программу *BioLink\_PIK3CA-8M\_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.

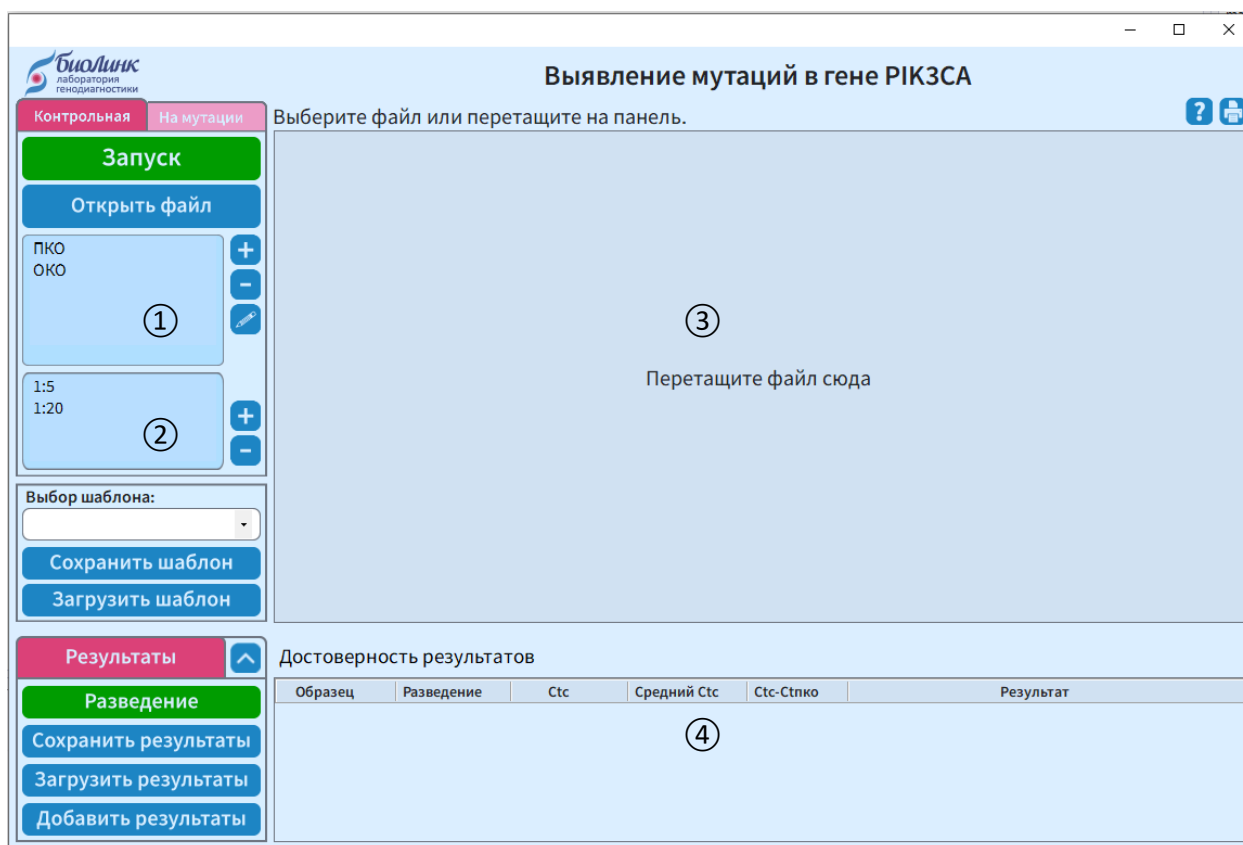


Рис. 3. Интерфейс программы

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. 3).

Программа *BioLink\_PIK3CA-8M\_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-8M\_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.

Валидация\_2023-08-23 19-25-27\_CT046821.csv

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	A01	A02	A03 ДНК1 Смесь №2	A04 ДНК2 Смесь №2	A05 ДНК3 Смесь №2	A06 ДНК4 Смесь №2	A07 ДНК5 Смесь №2	A08 ДНК6 Смесь №2	A09 ОКО Смесь №2	A10 ПКО Смесь №2	A11	A12
B	B01	B02	B03 ДНК1 Смесь №2	B04 ДНК2 Смесь №2	B05 ДНК3 Смесь №2	B06 ДНК4 Смесь №2	B07 ДНК5 Смесь №2	B08 ДНК6 Смесь №2	B09 ОКО Смесь №2	B10 ПКО Смесь №2	B11	B12
C	C01	C02	C03 ДНК1 Смесь №3	C04 ДНК2 Смесь №3	C05 ДНК3 Смесь №3	C06 ДНК4 Смесь №3	C07 ДНК5 Смесь №3	C08 ДНК6 Смесь №3	C09 ОКО Смесь №3	C10 ПКО Смесь №3	C11	C12
D	D01	D02	D03 ДНК1 Смесь №3	D04 ДНК2 Смесь №3	D05 ДНК3 Смесь №3	D06 ДНК4 Смесь №3	D07 ДНК5 Смесь №3	D08 ДНК6 Смесь №3	D09 ОКО Смесь №3	D10 ПКО Смесь №3	D11	D12
E	E01	E02	E03 ДНК1 Смесь №4	E04 ДНК2 Смесь №4	E05 ДНК3 Смесь №4	E06 ДНК4 Смесь №4	E07 ДНК5 Смесь №4	E08 ДНК6 Смесь №4	E09 ОКО Смесь №4	E10 ПКО Смесь №4	E11	E12
F	F01	F02	F03 ДНК1 Смесь №4	F04 ДНК2 Смесь №4	F05 ДНК3 Смесь №4	F06 ДНК4 Смесь №4	F07 ДНК5 Смесь №4	F08 ДНК6 Смесь №4	F09 ОКО Смесь №4	F10 ПКО Смесь №4	F11	F12
G	G01	G02	G03 ДНК1 Смесь №5	G04 ДНК2 Смесь №5	G05 ДНК3 Смесь №5	G06 ДНК4 Смесь №5	G07 ДНК5 Смесь №5	G08 ДНК6 Смесь №5	G09 ОКО Смесь №5	G10 ПКО Смесь №5	G11	G12
H	H01	H02	H03 ДНК1 Смесь №5	H04 ДНК2 Смесь №5	H05 ДНК3 Смесь №5	H06 ДНК4 Смесь №5	H07 ДНК5 Смесь №5	H08 ДНК6 Смесь №5	H09 ОКО Смесь №5	H10 ПКО Смесь №5	H11	H12

Выбор шаблона: standart

Смесь №2  
Смесь №3  
Смесь №4  
Смесь №5

Результаты

Достоверность результатов

Смесь № 2 3 4 5

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








Рис. 4. Интерфейс программы после загрузки файла CSV 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» - 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).


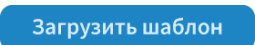
Программа также корректно работает для образцов не имеющих дублей (представленных в единственном экземпляре).

Если панель плашки не содержит необходимой информации, отредактируйте её.

#### 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 (лучше оставить предложенный по умолчанию) 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-8M\_App/SavedPlateLayoutsControl* для вкладки «Контрольная» или *BioLink\_PIK3CA-8M\_App/SavedPlateLayoutsAllele* для вкладки «На мутации» (предлагаются по умолчанию).

7. Нажмите кнопку **Запуск**.

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

Смесь №2 (E542K, H1047L)		Смесь №4 (R88Q, C420R)	
QC FAM	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
QC HEX	<input type="text"/>	QC HEX	<input type="text"/>
QC ROX	<input type="text"/>	QC ROX	<input type="text"/>
Смесь №3 (E545K, H1047R)		Смесь №5 (N345K, Q546K)	
QC FAM	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
QC HEX	<input type="text"/>	QC HEX	<input type="text"/>
QC ROX	<input type="text"/>	QC ROX	<input type="text"/>
TO (E542K)	<input type="text"/>	TO (H1047L)	<input type="text"/>
TO (E545K)	<input type="text"/>	TO (H1047R)	<input type="text"/>
TO (R88Q)	<input type="text"/>	TO (C420R)	<input type="text"/>
TO (N345K)	<input type="text"/>	TO (Q546K)	<input type="text"/>

**Готово**

Рис. 5. Окно параметров для ПЦР на наличие мутаций гена PIK3CA

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


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. 6). Если величины  $C_t$  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  $C_t$  ПКО или  $C_t$  образца в контрольной реакции не определено.

«Не найден» будет выведен в случае, если некорректно указан тип ПЦР в ячейке образца на плашке или если образец с данным типом ПЦР смеси, 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 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 достаточна		
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 достаточна		
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 достаточна		
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 достаточна		
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 достаточна		

Рис. 6. Данные для смеси №2 в таблице результатов (панель ④ на рис. 3).

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 ДНК в образце слишком велика и требует разведения, нажмите на кнопку **Разведение** слева от таблицы. В открывшемся окне (рис. 7) будут представлены расчеты для разведения таких образцов.


Расчет разведения

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





Образец	Сt (C) - Ct (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 .

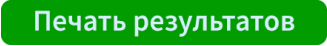
Нажмите кнопку , чтобы программа сгенерировала PDF файл с расчетами разведения.

## 12. Для вкладки «На мутации»:

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

Также для работы с таблицей результатов вы можете использовать следующие кнопки (в правом верхнем углу над панелью  (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="379 1106 1145 1518" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Настройка таблицы</p> <p><b>Активные столбцы</b></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;"></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 , 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.

## 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.

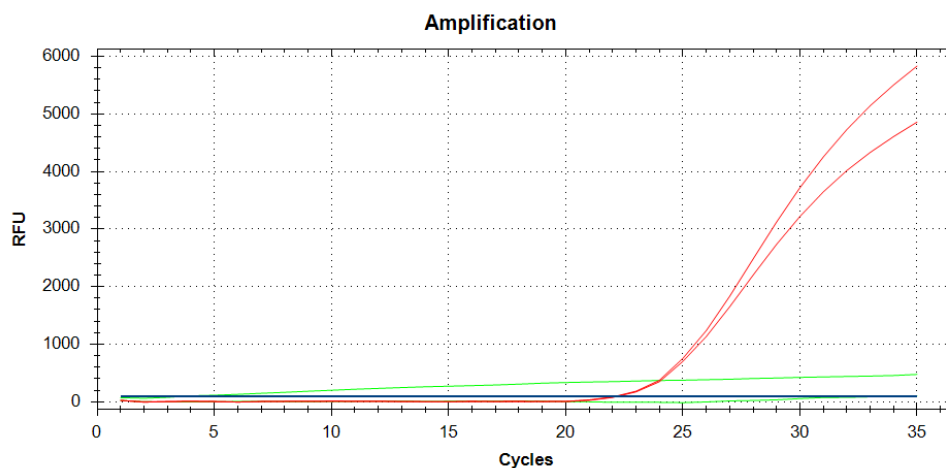


Рис. П-1. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дубляж

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

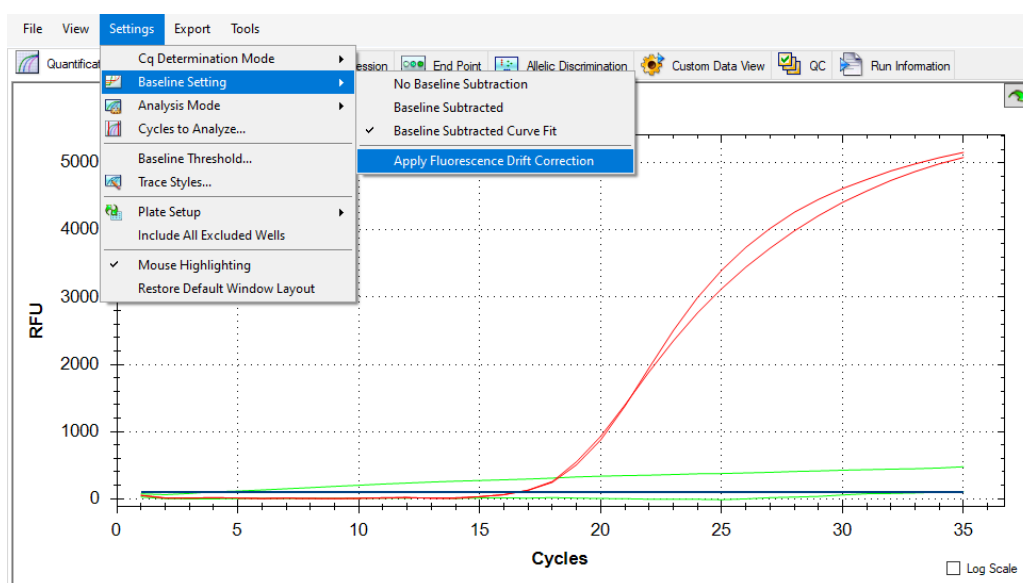


Рис. П-2. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Применение коррекции.

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.

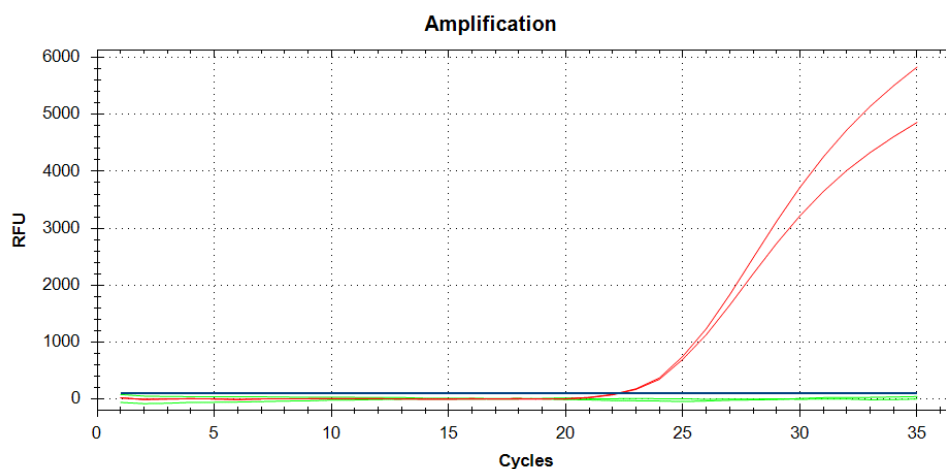


Рис. П-3. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая после коррекции для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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\_PIK3CA-8M\_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.

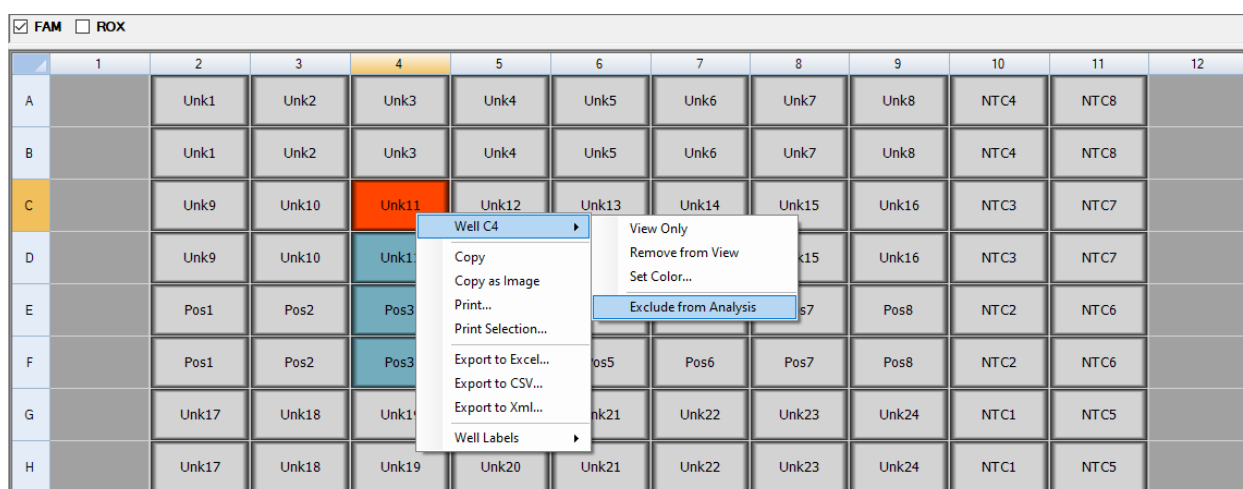


Рис. П-4. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа