

BioLink_TPMT_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 это не так, необходимо провести дополнительную обработку или исключить данные образцы до интерпретации результатов в программе *BioLink_TPMT_App*. Подробнее о том, как скорректировать или исключить образцы в программе *Biorad CFX Manager* можно посмотреть в Приложении 1 данного Руководства. Для получения величин *Ct* используйте логарифмическую шкалу и установите вручную пороговый уровень 200 для каналов FAM и ROX.

а) Для сохранения результатов в формате CSV в программе *Biorad CFX Manager* на вкладке «*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.

The screenshot shows the 'Data Analysis - TPMT' window in Biorad CFX Manager. The 'Quantification Data' tab is active, displaying a table of results for 19 wells (A03 to A09). A right-click context menu is open over the table, with 'Export to CSV...' highlighted. The table columns include Well, Fluor, Target, Content, Sample, Cq, Cq Mean, and Cq Std. Dev.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A03	FAM	719мм	Unkn-01	ДНК 1	21.56	21.60	0.622
B03	FAM	719мм	Unkn-01	ДНК 1	20.89	21.60	0.622
C03	FAM	719мм	Unkn-01	ДНК 1	21.54	21.60	0.622
D03	FAM	719мм	Unkn-01	ДНК 1	22.41	21.60	0.622
E03	FAM	719мм	Unkn-01	ДНК 1	N/A	0.00	0.000
A04	FAM	719мм	Unkn-02	ДНК 2	20.08	20.18	0.074
A08	FAM	460мм	Unkn-07	ДНК 2	20.85	20.75	0.099
B04	FAM	719мм	Unkn-02	ДНК 2	20.18	20.18	0.074
B08	FAM	460мм	Unkn-07	ДНК 2	20.78	20.75	0.099
F03	FAM	719мм	Unkn-02	ДНК 2	20.26	20.18	0.074
F07	FAM	460мм	Unkn-07	ДНК 2	20.86	20.75	0.099
G03	FAM	719мм	Unkn-02	ДНК 2	20.12	20.18	0.074
G07	FAM	460мм	Unkn-07	ДНК 2	20.84	20.75	0.099
H03	FAM	719мм	Unkn-02	ДНК 2	20.24	20.18	0.074
H07	FAM	460мм	Unkn-07	ДНК 2	20.64	20.75	0.099
C04	FAM	719мм	Unkn-03	ДНК 3	20.57	20.61	0.109
C08	FAM	460мм	Unkn-08	ДНК 3	21.63	21.71	0.093
D04	FAM	719мм	Unkn-03	ДНК 3	20.59	20.61	0.109
D08	FAM	460мм	Unkn-08	ДНК 3	21.81	21.71	0.093
E04	FAM	719мм	Unkn-03	ДНК 3	20.45	20.61	0.109
E08	FAM	460мм	Unkn-08	ДНК 3	21.81	21.71	0.093
F04	FAM	719мм	Unkn-03	ДНК 3	20.74	20.61	0.109
F08	FAM	460мм	Unkn-08	ДНК 3	21.62	21.71	0.093
G04	FAM	719мм	Unkn-03	ДНК 3	20.67	20.61	0.109
G08	FAM	460мм	Unkn-08	ДНК 3	21.68	21.71	0.093
A05	FAM	719мм	Unkn-04	ДНК 4	25.07	25.11	0.101
A09	FAM	460мм	Unkn-09	ДНК 4	26.06	25.92	0.112

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

Если вы не заполнили поле *Sample* в программе *Biorad CFX Manager*, далее можно будет отредактировать названия образцов в программе *BioLink_TPMT_App.exe* см. пункт 4 «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).

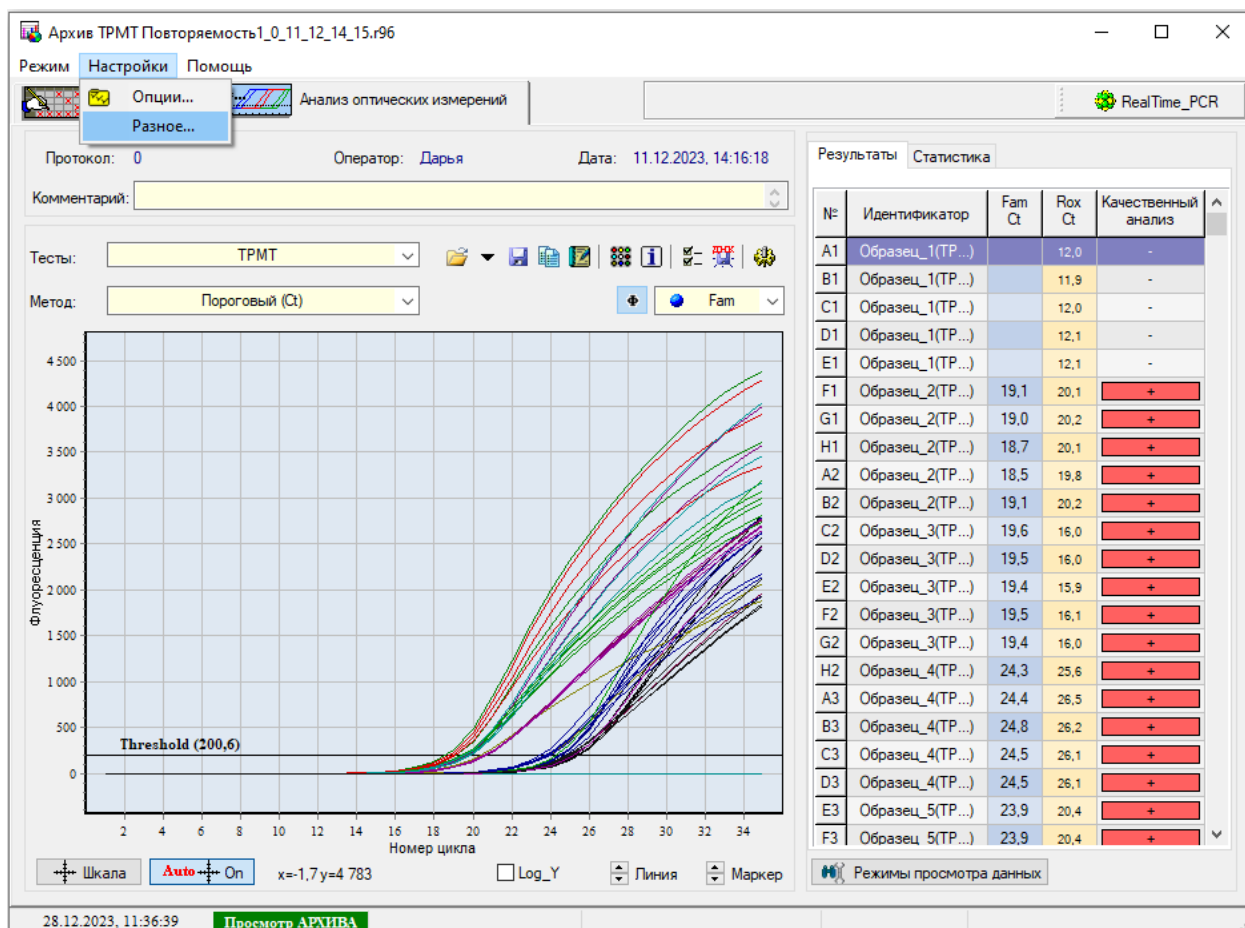


Рис. 2а. Открытие окна Настройки в программе RealTime

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

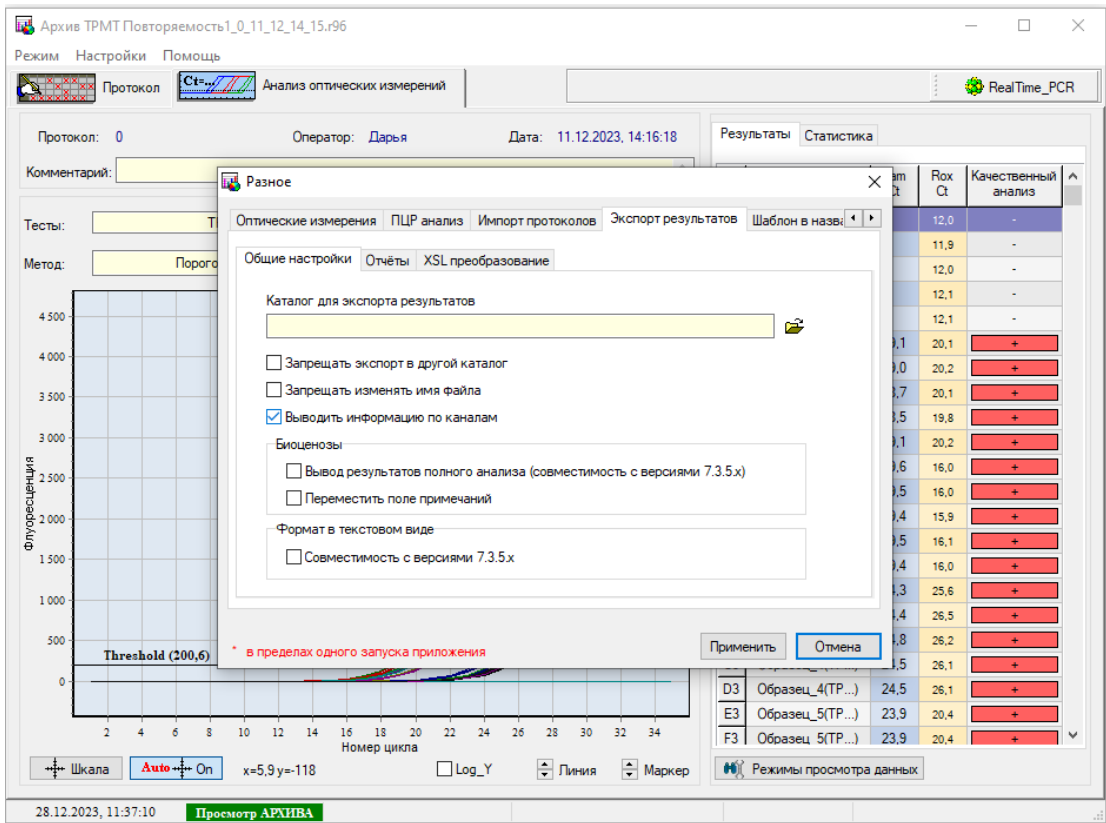


Рис. 26. Настройка вывода результатов в программе RealTime

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

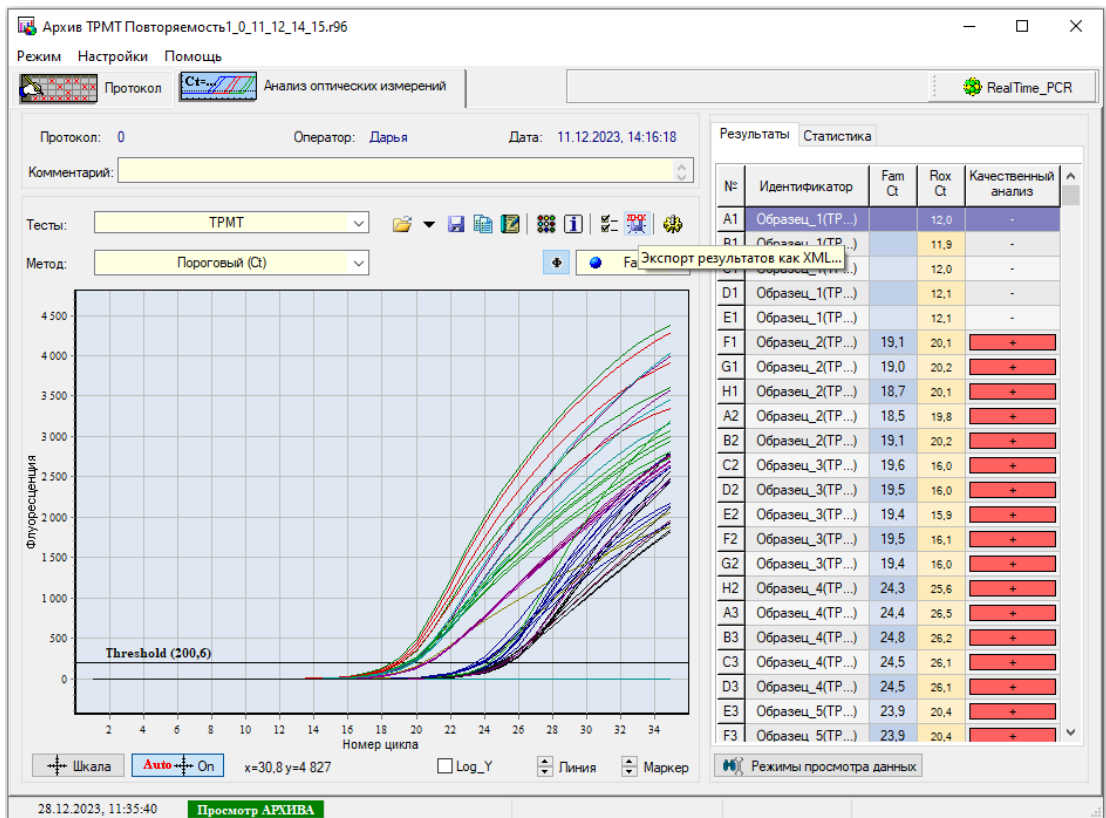


Рис. 2в. Сохранение результатов в программе RealTime

2. Запустите программу *BioLink_TPMT_App.exe*

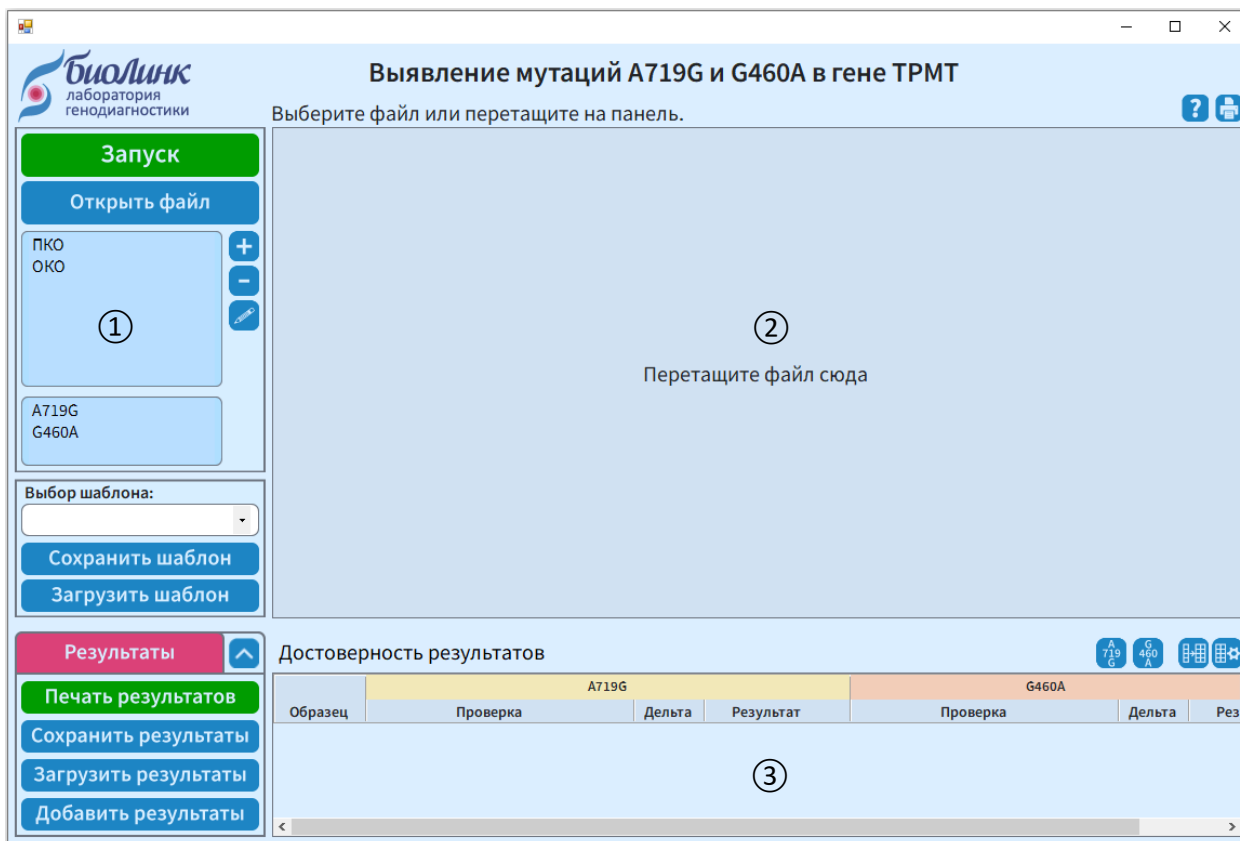




Рис. 3. Интерфейс программы

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

①	Список образцов
②	Расположение образцов на плашке
③	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 ②.

3. 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_TPMT_App.exe* автоматически загружает в используемые ячейки плашки информацию, указанную в полях *Sample* и *Content* из программы *Biorad CFX Manager*. Если поле *Sample* пустое, программа *BioLink_TPMT_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_TPMT_App.exe* будет перезаписано следующим образом: *Pos Ctrl* – ПКО, *Neg Ctrl* (либо *NTC*, если *Neg Ctrl* отсутствует) – ОКО.

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



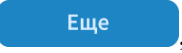

Для корректной работы программы панель плашки должна выглядеть таким образом, чтобы в ячейках плашки были обязательно указаны названия контрольных образцов ПКО и ОКО (RU Русский), а также для всех образцов указан тип аллель-специфичной ПЦР A719G или G460A (EN Английский), соответственно.

Если панель плашки не содержит необходимой информации, отредактируйте её.

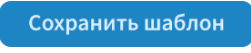

4. Редактирование шаблона постановки:

- а. Справа на панели ② (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.
- б. 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.

- с. 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. Чтобы очистить данные в ячейке, выделите ее и нажмите клавишу «Delete» или «Backspace».

5. 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  и выбрав его из списка.

6. Нажмите кнопку .

7. Программа предложит ввести значения контролей качества (QC_{ROX} , QC_{FAM}) и точек отсечения (TO_{50} , TO_{100}) для каждой аллель-специфичной ПЦР в окно «Параметры». Значения QC_{ROX} , QC_{FAM} , TO_{50} , TO_{100} указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

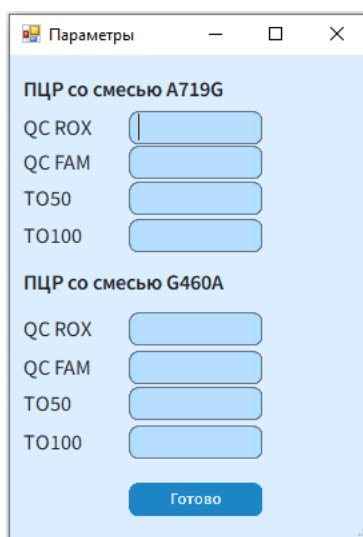


Рис. 5. Окно параметров

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


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


В строке «Достоверность результатов» будет выведено сообщение о прохождении или не прохождении контролей ПКО и ОКО («Данные пригодны» или «Данные не пригодны» или «Данные в ПЦР на мутацию A719G (или G460A) не пригодны!»). В случае успешного прохождения контролей клинические образцы в таблице результатов будут подсвечены «желтым» цветом.

Если концентрация ДНК в образце была недостаточной в столбце «Проверка» будет выведена строка «Концентрация ДНК не достаточна». При этом в столбцах с названием «Результат» для этого образца в данной аллель-специфичной реакции будет выведено «Нет результата», как и в случаях если Ct ПКО в этих реакциях не определено.

Результат «Не найден» будет выведен в случае, если некорректно указан тип ПЦР в ячейке образца на плашке или если такой образец, действительно, отсутствует в одной из аллель-специфичных реакций.


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

Нажмите на кнопку  чтобы развернуть или свернуть столбцы таблицы (подробнее в пункте 10).

Данные пригодны. Контроли пройдены. 



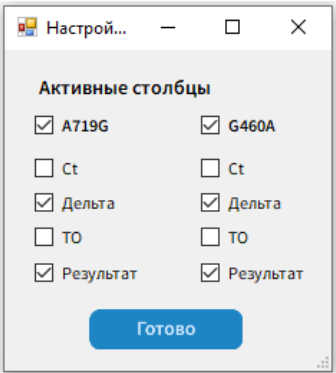
Образец	A719G							G460A						
	Ct _{fam}	Строх	Проверка	Дельта	TO50	TO100	Результат	Ct _{fam}	Строх	Проверка	Дельта	TO50	TO100	Результат
ПКО	20,6	19,8	Прошел по FAM и прошел по ROX	0,8	2	-0,5	Положительный (в гетерозиготе)	20,1	21,1	Прошел по FAM и прошел по ROX	-1,0	0,5	-2	Положительный (в гетерозиготе)
ОКО	0,0	0,0	Прошел по FAM и прошел по ROX	-	-	-	-	0,0	0,0	Прошел по FAM и прошел по ROX	-	-	-	-
ДНК1	0,0	20,1	Концентрация ДНК оптимальна	-	2	-0,5	Отрицательный	0,0	22,3	Концентрация ДНК оптимальна	-	0,5	-2	Отрицательный
ДНК2	21,1	20,1	Концентрация ДНК оптимальна	1,0	2	-0,5	Положительный(в гетерозиготе)	21,3	22,8	Концентрация ДНК оптимальна	-1,5	0,5	-2	Положительный(в гетерозиготе)

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

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

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.

Для работы с таблицей результатов используйте следующие кнопки (в правом верхнем углу над панелью ③ (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> 

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 1

Рекомендации по предобработке данных

Перед экспортом данных обратите внимание на вид графика ПЦР. Если график имеет линейную форму, но при этом пересекает пороговую линию, то низкое значение цикла выхода будет говорить не о высоком содержании ДНК в образце, а о плывущей базовой линии (*baseline drift*). В таком случае нужно сделать коррекцию фона перед экспортом данных. Для этого выбрать действие «*Apply Fluorescence Drift Correction*» в разделе «Settings», «Baseline Setting». Пример приведен на рисунке П-1. В данном примере график красного цвета имеет экспоненциальную фазу, кривые зеленого цвета имеют линейную форму. Одна из зеленых кривых не пересекает пороговую линию, а другая пересекает пороговую линию на одиннадцатом цикле ПЦР. Графики до и после применения функции «*Apply Fluorescence Drift Correction*» показаны, соответственно, слева и справа.

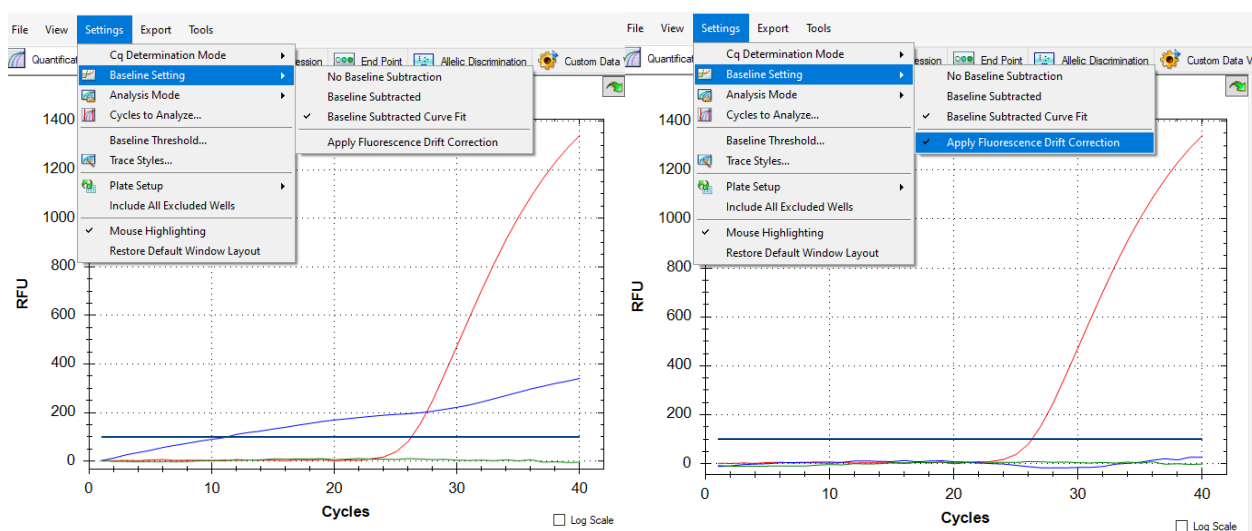


Рис. П-1. Коррекция фона при анализе данных ПЦР.

Если данная процедура не повлияла на расположение кривой относительно линии порогового уровня, 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_TPMT_App* см. п. 4 «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-2. Далее переходите к пункту 1 данного Руководства.

		<input checked="" type="checkbox"/> FAM <input type="checkbox"/> ROX											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6	Unk7	Unk8	NTC4	NTC8		
B		Unk1	Unk2	Unk3	Unk4	Unk5	Unk6	Unk7	Unk8	NTC4	NTC8		
C		Unk9	Unk10	Unk11	Unk12	Unk13	Unk14	Unk15	Unk16	NTC3	NTC7		
D		Unk9	Unk10	Unk11	Unk12	Unk13	Unk14	Unk15	Unk16	NTC3	NTC7		
E		Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5	Pos6	Pos7	Pos8	NTC2	NTC6		
F		Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5	Pos6	Pos7	Pos8	NTC2	NTC6		
G		Unk17	Unk18	Unk19	Unk20	Unk21	Unk22	Unk23	Unk24	NTC1	NTC5		
H		Unk17	Unk18	Unk19	Unk20	Unk21	Unk22	Unk23	Unk24	NTC1	NTC5		

Рис. П-2. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа

Приложение 2

Краткий перечень кнопок основного меню программы *BioLink_TPMT_App*

Кнопки общего назначения	
	Открывает файл с руководством пользователя
	Генерирует PDF файл с текущим макетом плашки
	Если файл загружен на плашку, открывает диалоговое окно для введения параметров необходимых для дальнейшего анализа и начинает анализ
	Открывает диалоговое окно для выбора и загрузки файла с результатами ПЦР, который необходимо проанализировать (файл должен быть в формате .csv или .xml)
Кнопки для редактирования названий образцов	
	Добавляет новое название образца в список образцов
	Удаляет текущее название образца из списка образцов
	Редактирует текущее название образца в списке образцов
Кнопки для работы с шаблонами	
	Сохраняет макет с названиями образцов и их расположением на плашке в системный файл, который потом можно загрузить
	Редактирует панель плашки в соответствии с загруженным шаблоном
Кнопки для сохранения и просмотра результатов	
	Разворачивает таблицу результатов на большую часть программного окна, скрывая панель плашки, список образцов и кнопки для работы с шаблонами
	Сохраняет данные из таблицы результатов в программный файл название которого необходимо задать в открывшемся диалоговом окне
	Загружает данные из выбранного в открывшемся диалоговом окне файла и записывает их в таблицу результатов
	Загружает данные из выбранного в открывшемся диалоговом окне файла и дописывает их в конец таблицы результатов
Кнопки для работы с таблицей результатов	
	Скрывает или показывает столбцы в таблице результатов.
	Предлагает выбрать столбцы, которые необходимо отобразить в таблице результатов.