

## 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 *Ct* используйте логарифмическую шкалу и установите вручную пороговый уровень (threshold level) равным 100.

а) Для экспорта 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.

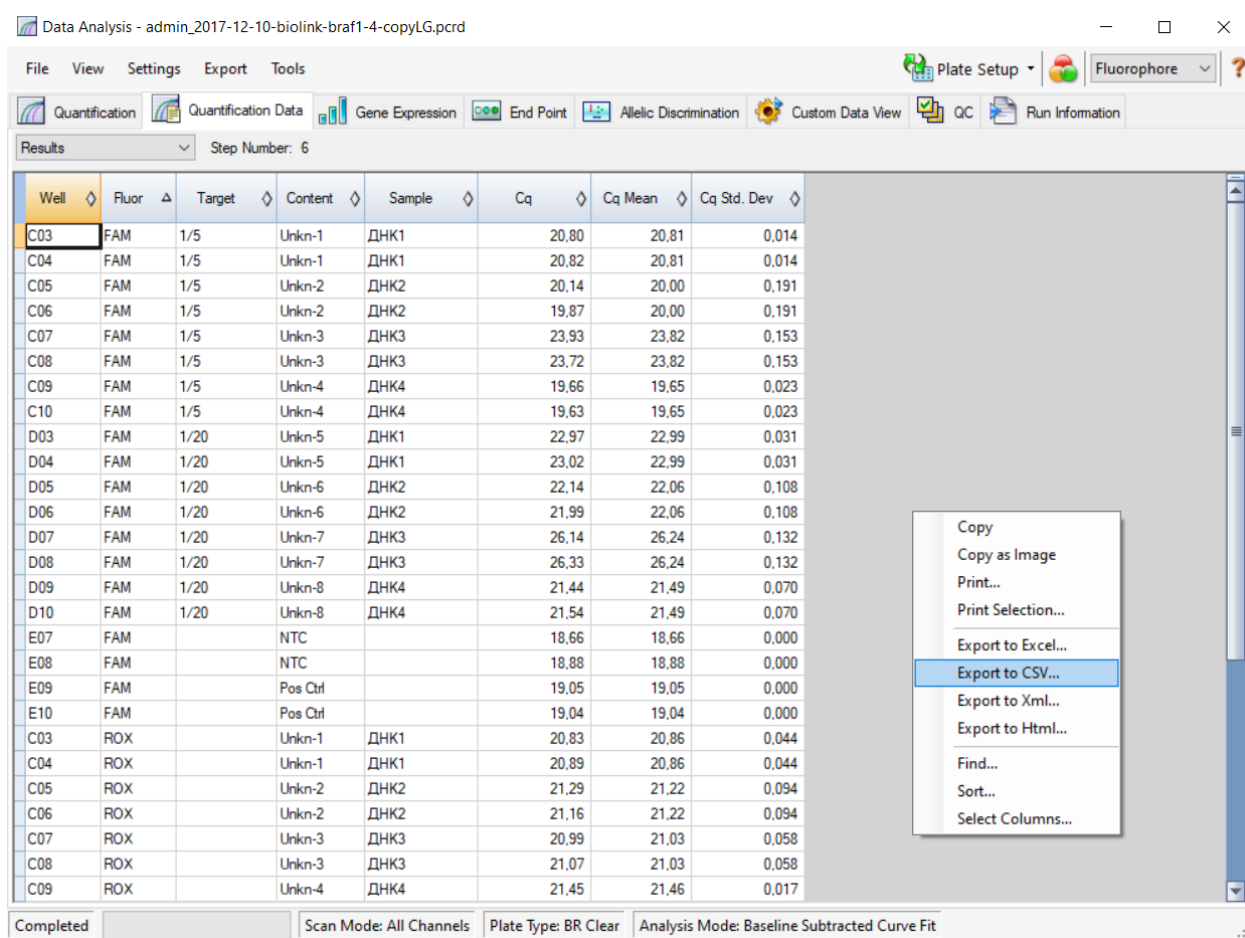


Рис. 1. Сохранение данных из программы Biorad CFX Manager в формате CSV

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\_EGFR-4R\_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).

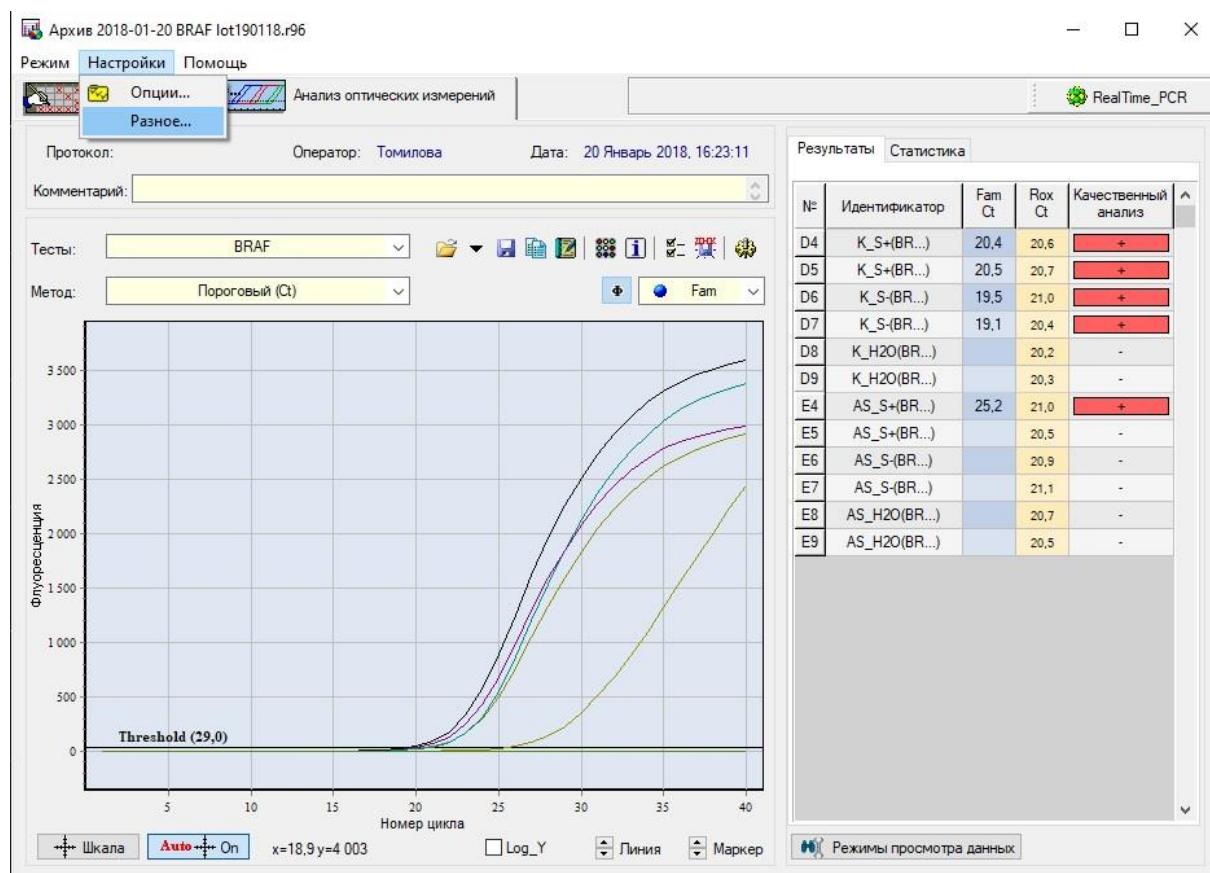


Рис. 2а. Открытие окна Настройки в программе RealTime

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

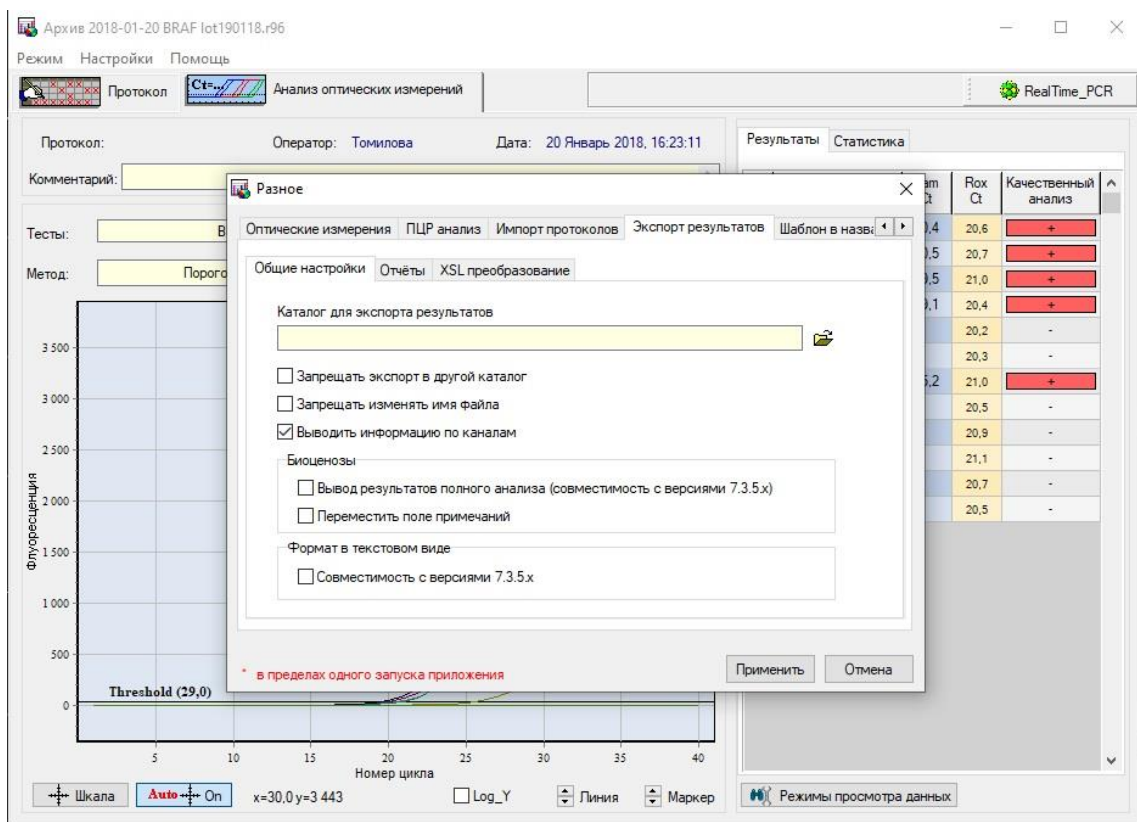


Рис. 26. Настройка вывода результатов в программе RealTime

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

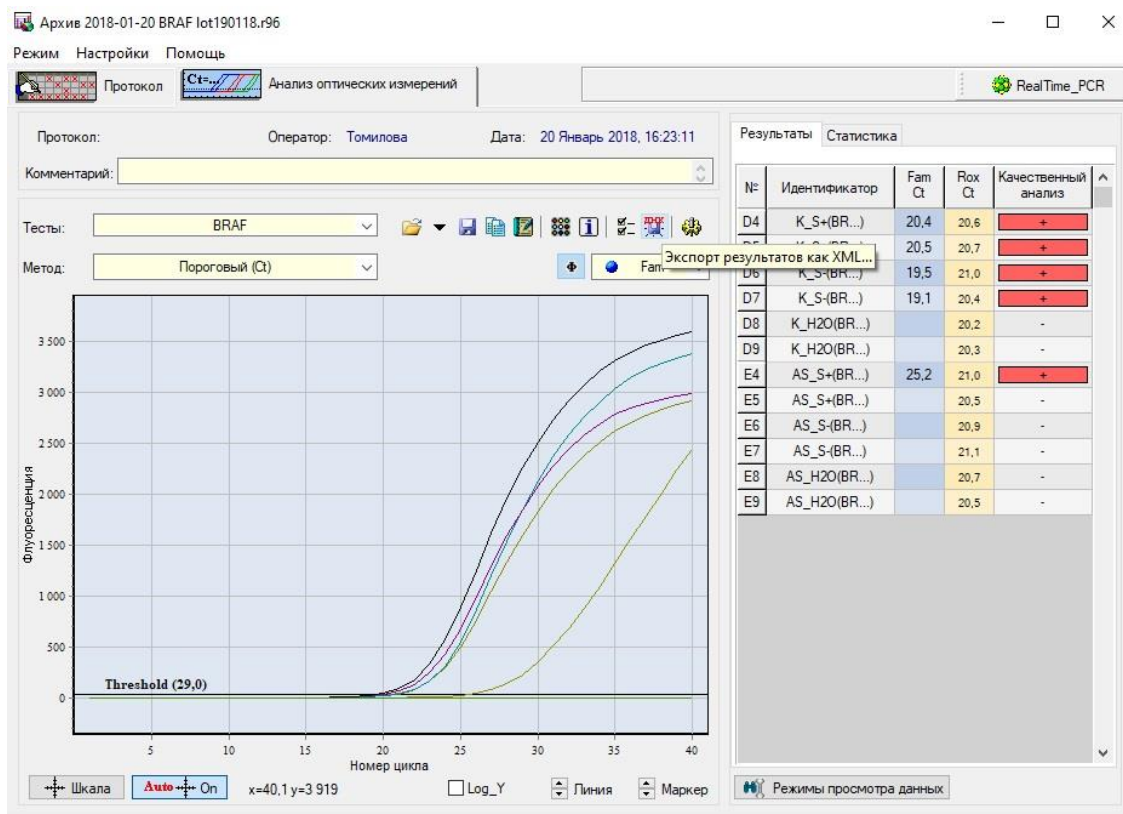




Рис. 2в. Сохранение результатов в программе RealTime

2. Запустите программу *BioLink\_EGFR-4R\_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.

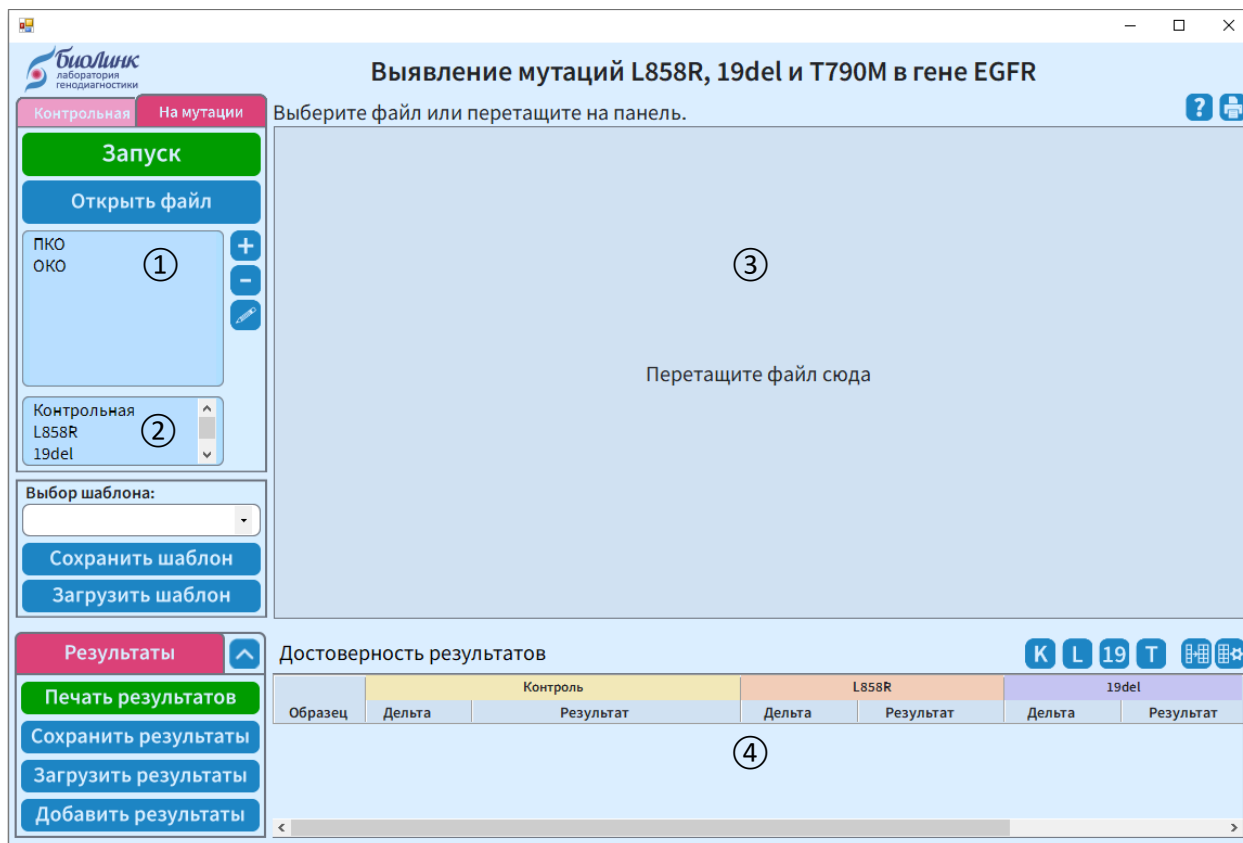


Рис. 3. Интерфейс программы

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\_EGFR-4R\_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\_EGFR-4R\_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\_EGFR-4R\_App.exe* будет перезаписано следующим образом: *Pos Ctrl* – ПКО, *NTC* – ОКО.

**Выявление мутаций L858R, 19del и T790M в гене EGFR**

egfr 287,288,289,290,291,292,293,294,322,340\_2022-10-19 14-45-03\_CT046821 - Quantification Cq Re ? t

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<b>A</b>	A01 287 K	A02 288 K	A03 289 K	A04 290 K	A05 291 K	A06 292 K	A07 293 K	A08 294 K	A09 322 K	A10 340 K	A11 OKO K	A12 PKO K
<b>B</b>	B01 287 K	B02 288 K	B03 289 K	B04 290 K	B05 291 K	B06 292 K	B07 293 K	B08 294 K	B09 322 K	B10 340 K	B11 OKO K	B12 PKO K
<b>C</b>	C01 287 L858R	C02 288 L858R	C03 289 L858R	C04 290 L858R	C05 291 L858R	C06 292 L858R	C07 293 L858R	C08 294 L858R	C09 322 L858R	C10 340 L858R	C11 OKO L858R	C12 PKO L858R
<b>D</b>	D01 287 L858R	D02 288 L858R	D03 289 L858R	D04 290 L858R	D05 291 L858R	D06 292 L858R	D07 293 L858R	D08 294 L858R	D09 322 L858R	D10 340 L858R	D11 OKO L858R	D12 PKO L858R
<b>E</b>	E01 287 del19ex	E02 288 del19ex	E03 289 del19ex	E04 290 del19ex	E05 291 del19ex	E06 292 del19ex	E07 293 del19ex	E08 294 del19ex	E09 322 del19ex	E10 340 del19ex	E11 OKO del19ex	E12 PKO del19ex
<b>F</b>	F01 287 del19ex	F02 288 del19ex	F03 289 del19ex	F04 290 del19ex	F05 291 del19ex	F06 292 del19ex	F07 293 del19ex	F08 294 del19ex	F09 322 del19ex	F10 340 del19ex	F11 OKO del19ex	F12 PKO del19ex
<b>G</b>	G01 287 T790M	G02 288 T790M	G03 289 T790M	G04 290 T790M	G05 291 T790M	G06 292 T790M	G07 293 T790M	G08 294 T790M	G09 322 T790M	G10 340 T790M	G11 OKO T790M	G12 PKO T790M
<b>H</b>	H01 287 T790M	H02 288 T790M	H03 289 T790M	H04 290 T790M	H05 291 T790M	H06 292 T790M	H07 293 T790M	H08 294 T790M	H09 322 T790M	H10 340 T790M	H11 OKO T790M	H12 PKO T790M

**Результаты**

Печать результатов  
Сохранить результаты  
Загрузить результаты  
Добавить результаты

Достоверность результатов

Образец	Контроль		L858R		19del	
	Дельта	Результат	Дельта	Результат	Дельта	Результат








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, и L858R, 19del, T790M (EN Английский) для образцов в ПЦР на мутации, соответственно.


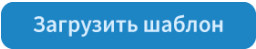
Программа также корректно работает для образцов не имеющих дублей (представленных в единственном экземпляре).

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_EGFR-4R_App/SavedPlateLayoutsControl` для вкладки



«Контрольная» или *BioLink\_EGFR-4R\_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».

ПЦР с контрольной смесью		ПЦР со смесью 19del	
QC ROX	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
QC FAM	<input type="text"/>	TO	<input type="text"/>
ПЦР со смесью L858R		ПЦР со смесью T790M	
QC FAM	<input type="text"/>	QC FAM	<input type="text"/>
TO	<input type="text"/>	TO	<input type="text"/>

**Готово**

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

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 будут подсвечены «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».

«Нет результата» в столбце «Результат» для смесей L858R, 19del, T790M будет выведено только в случаях, когда *St* ПКО или *St* образца в конкретной аллель-специфичной реакции не определено.


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.

Данные пригодны. K L 19 T

Образец	Контроль		L858R		19del		T790M	
	Дельта	Результат	Дельта	Результат	Дельта	Результат	Дельта	Результат
ПКО	-	прошел	1,6   1,6	прошел	4,4   4,8	прошел	5,4   5,8	прошел
ОКО	-	прошел по ROX, прошел по FAM	0,0	прошел по FAM	0,0	прошел по FAM	0,0	прошел по FAM
287	5,8	Концентрация ДНК не достаточна	-	Нет результата	-	Нет результата	-	Нет результата
288	0,8	Концентрация ДНК достаточна	14,9   13,2	Отрицательный	-	Отрицательный	10,3   10,1	Отрицательный
289	-0,2	Концентрация ДНК достаточна	13,6   14,3	Отрицательный	-	Отрицательный	9,6   10,1	Отрицательный
290	1,2	Концентрация ДНК достаточна	13,1   12,4	Отрицательный	-	Отрицательный	9,9   10,6	Отрицательный
291	1,1	Концентрация ДНК достаточна	-	Отрицательный	-	Отрицательный	13,6   13,9	Отрицательный
292	1,6	Концентрация ДНК достаточна	-	Отрицательный	-	Отрицательный	11,7   11,8	Отрицательный
293	-0,4	Концентрация ДНК достаточна	15,9   16,2	Отрицательный	-	Отрицательный	13,3   12,1	Отрицательный
294	-1,3	Концентрация ДНК достаточна	3,7   3,4	Положительный	-	Отрицательный	12,1   11,4	Отрицательный
322	-0,3	Концентрация ДНК достаточна	13,5   14,2	Отрицательный	-	Отрицательный	10,0   11,2	Отрицательный
340	1,2	Концентрация ДНК достаточна	16,9	Отрицательный	-	Отрицательный	9,8   10,0	Отрицательный

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

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	Ct(C) - Ct(ПКО)	Разведение, раз	мкл ИСХОДНОГО образца	мкл воды
---------	-----------------	-----------------	-----------------------	----------

Рис. 7. Окно для расчета разведения





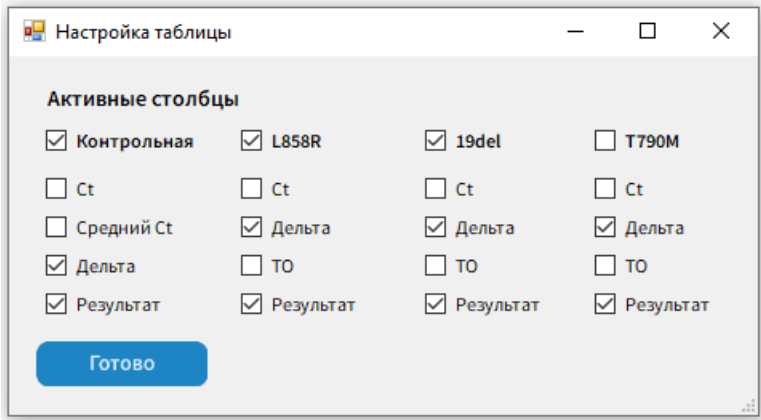
В поле сверху введите нужный конечный объем пробы и нажмите кнопку **Рассчитать**.

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

## 12. Для вкладки «На мутации»:

Чтобы свернуть/развернуть столбцы «Контроль», «L», «19», «T» таблицы результатов используйте кнопки **K**, **L**, **19**, **T**, соответственно (см. также п. 12).

Также 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="541 1111 1305 1529">  </div>

Чтобы распечатать таблицу результатов нажмите кнопку **Печать результатов**, тогда программа сгенерирует PDF файл, состоящий из столбцов «Образец» и «Результат» для каждой смеси (K, L858R, 19del, T790M), который вы можете сохранить и 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.

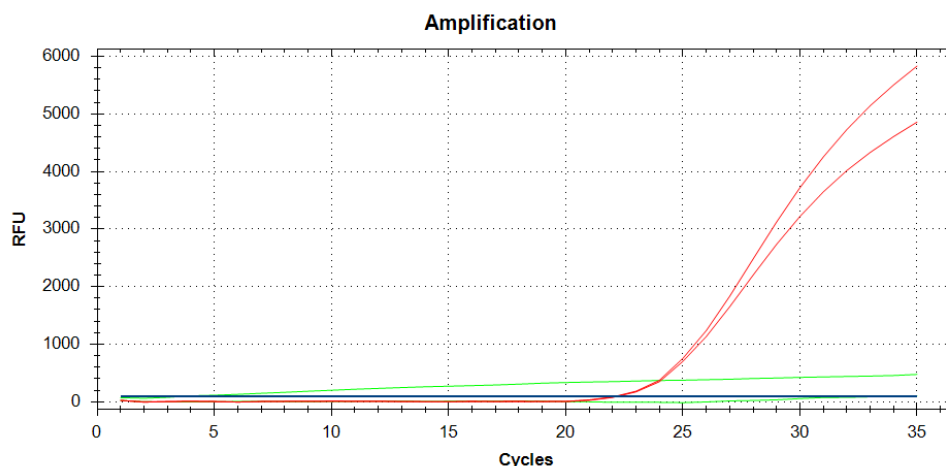


Рис. П-1. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Флуоресцентная кривая для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дубляж

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

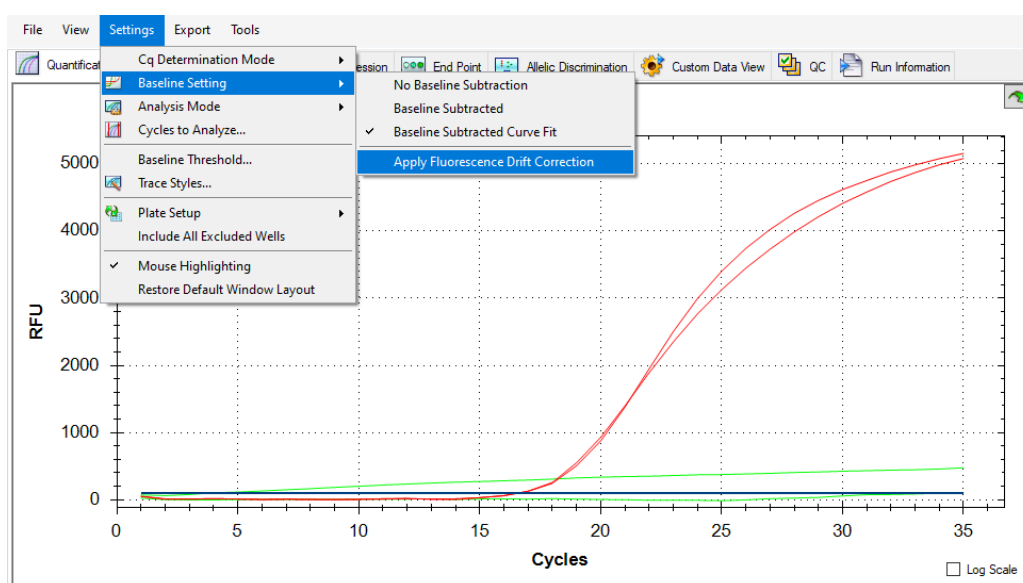


Рис. П-2. Скриншот из программы *Biorad CFX Manager*. Применение коррекции.

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.

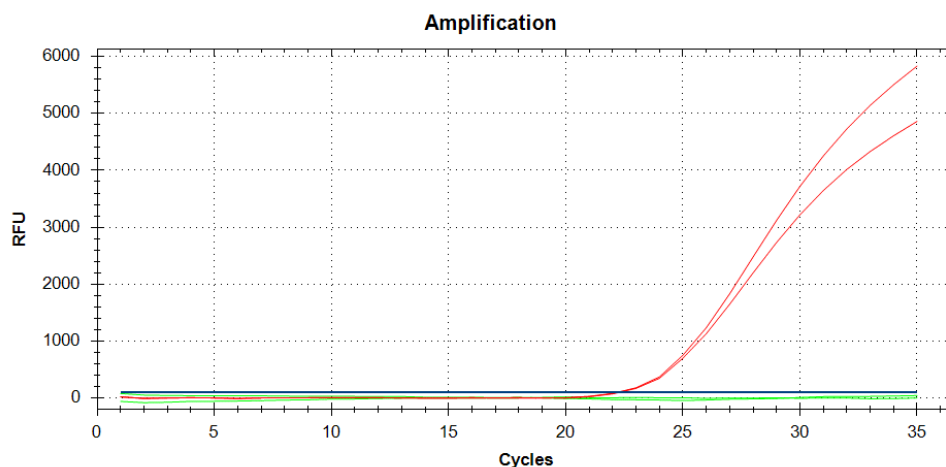


Рис. П-3. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Флуоресцентная кривая после коррекции для 1 клинического образца (зеленым цветом) и ПКО (красным) по каналу FAM в АС ПЦР в дублях

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\_EGFR-4R\_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.

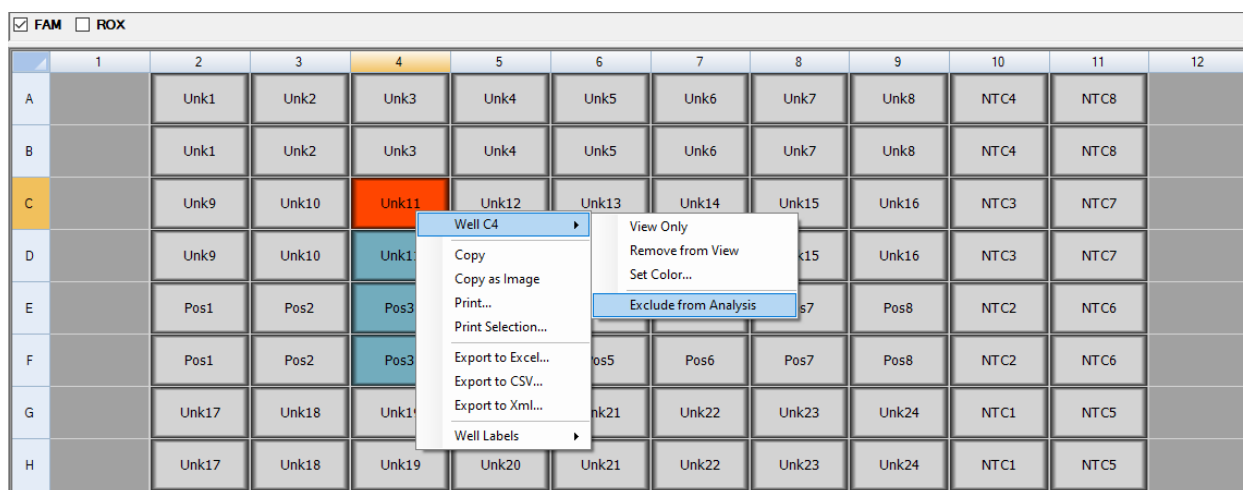


Рис. П-4. Скриншот из программы Biorad CFX Manager. Исключение данных ячейки из дальнейшего анализа