

# Інструкція з програмування та обробки результатів ПЛР-РЧ для набору діагностичного «Bioscore® Синдром Жильбера» для приладів CFX96™ та QuantStudio™ 5

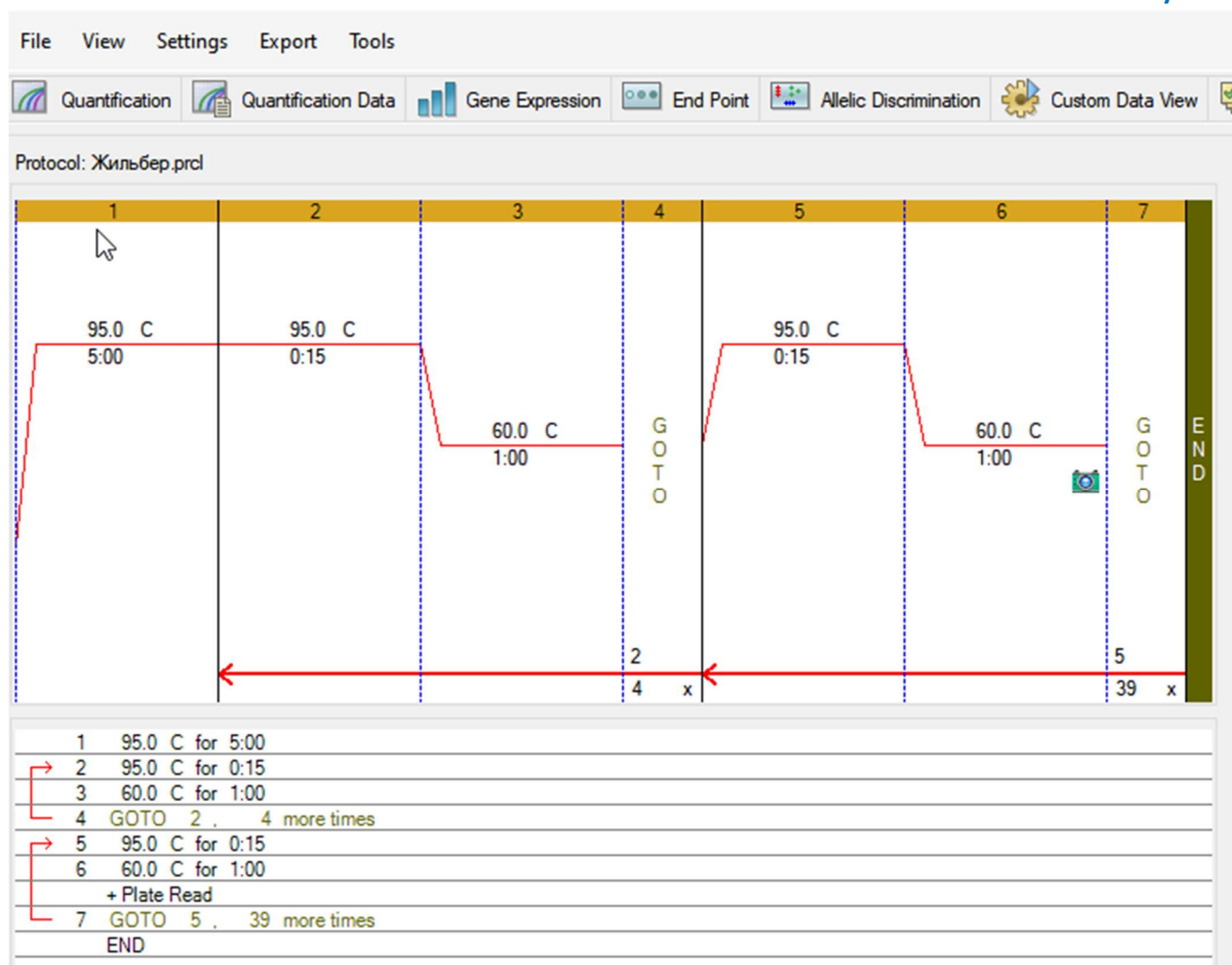
Визначення генотипу методом алельної дискримінації дозволяє встановити генотипи зразків автоматично. У приладах CFX та QuantStudio 5 він ґрунтується на аналізі відносної флуоресценції (RFU/ $\Delta R_n$ ) між двома каналами (Allele 1 - FAM та Allele 2 - VIC).

## CFX96™

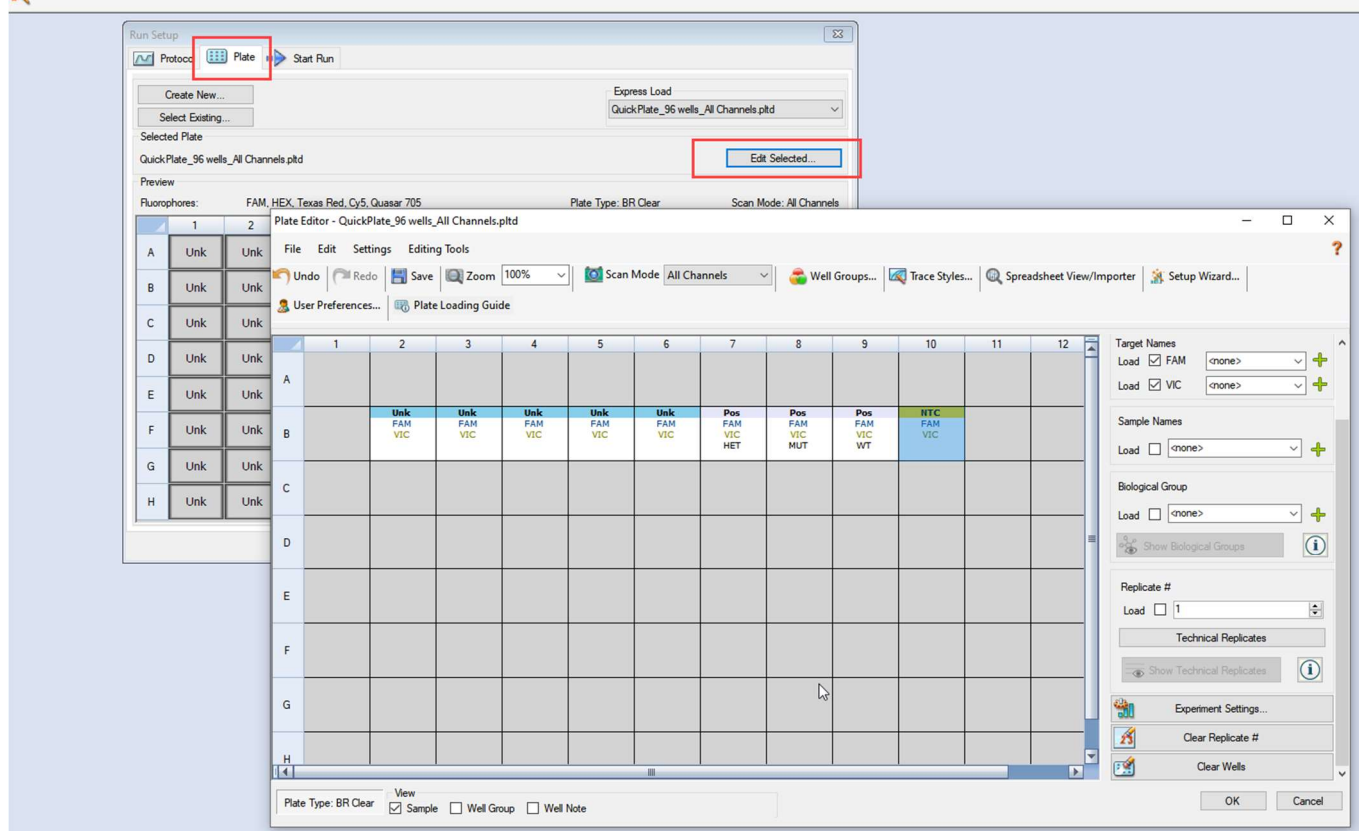
### Програмування приладу

1. Відкрийте Bio-Rad CFX Dx і створіть новий протокол згідно з інструкцією з використання (ІЗВ) «Bioscore® Синдром Жильбера»: *File*→*New*→*Protocol* (Рис. 1).

Рисуюнок 1



2. Перейдіть у вікно *Plate*→*Edit Selected* та налаштуйте планшет, запрограмувавши необхідні лунки та канали флуоресценції. У вкладці *Type Sample* оберіть позначки для контрольних зразків «Positive Control» та «NTC» (Рис. 2).



3. Завантажте реакційні стріпи в прилад та запустіть реакцію - START RUN.

### Облік результатів

Після відкриття експерименту автоматично відображається вкладка із графіком ампліфікації (*Quantification*). Перевірте контрольні зразки візуально. Для цього у лінійному типі шкали оцініть криві ампліфікації, де у гомозиготних зразках висота флуоресценції одного з каналів вище за інший, тоді як у гетерозиготних обидві криві проходять на однаковому рівні. В негативних контрольних зразках – сигнал ампліфікації за каналами FAM та VIC відсутній (Рис. 3).

**Увага!** Якщо у **дослідному** зразку відсутній сигнал за каналом FAM та/або VIC - результат вважається невалідним і аналіз необхідно повторити, починаючи з етапу екстракції нуклеїнових кислот.

Для автоматичного обліку результатів програмним забезпеченням перейдіть у вкладку дискримінації алелів (*Allelic Discrimination*). Переконайтеся, що осі X та Y налаштовані відповідно до флуорофорів: X — FAM, Y — VIC.

Перевірте правильність контрольних зразків:

- контрольний зразок дикого типу має відповідати точці на осі Allele 2 (синій колір);
- контрольний зразок мутантний алель відповідає точці на осі Allele 1 (оранжевий колір);
- контрольний зразок гетерозиготи знаходиться посередині (зелений колір);
- негативний контрольний зразок знаходиться в лівому нижньому куті (чорний колір).

Дослідні зразки відображаються аналогічним чином (Рис. 4).

Рисунок 3

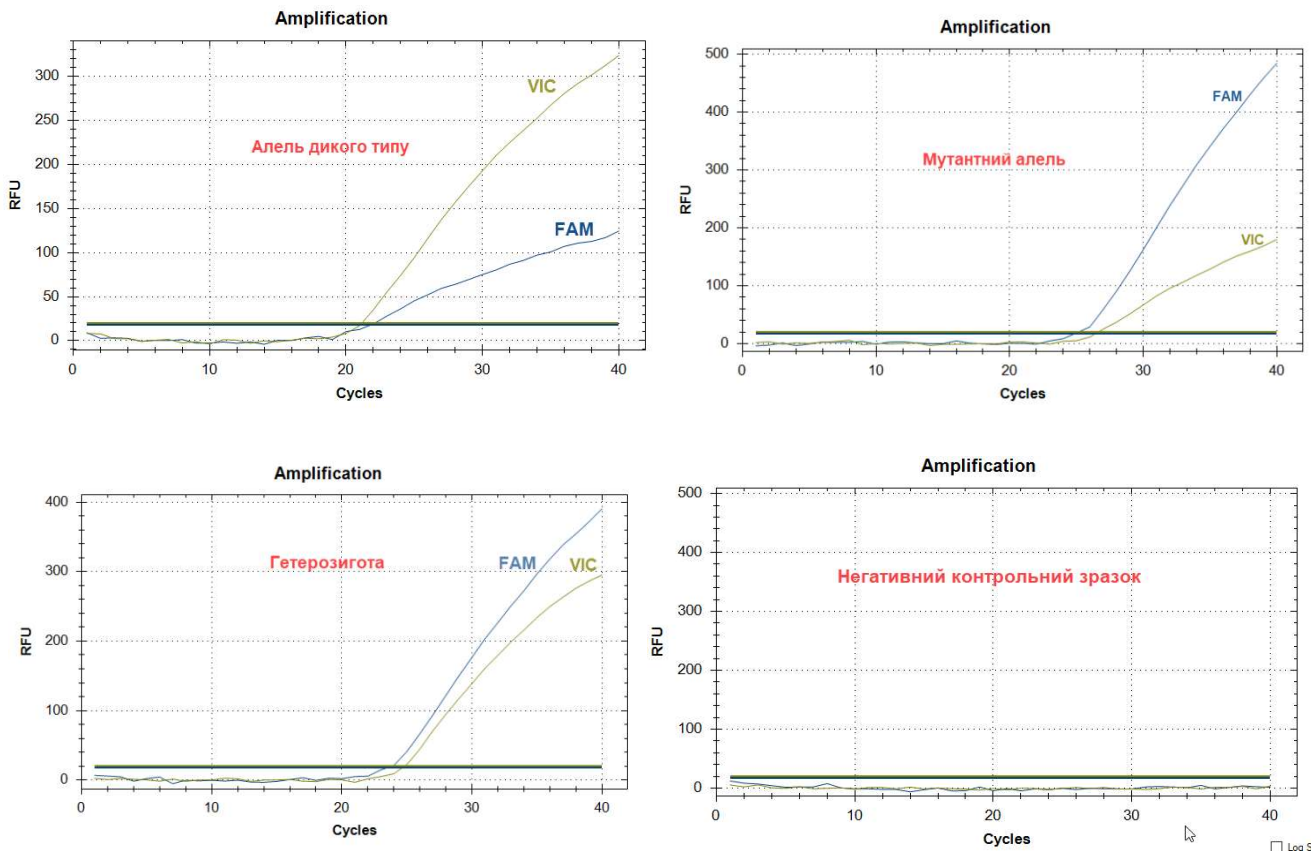


Рисунок 4

The screenshot shows the software interface for Allelic Discrimination. The main window is titled "Allelic Discrimination" and features a scatter plot on the left and a data table on the right.

**Scatter Plot:** The y-axis is labeled "RFU for Allele 2 - VIC" and the x-axis is "RFU for Allele 1 - FAM". Data points are categorized as follows:

- Алель дикого типа (Wild-type allele):** Represented by a blue square at approximately (180, 420).
- Гетерозигота (Heterozygote):** Represented by a green triangle at approximately (200, 220).
- Мутантный алель (Mutant allele):** Represented by an orange circle at approximately (320, 100).
- Негативный контрольный образец (Negative control):** Represented by a black diamond at (0, 0).

**Data Table:**

Well	Sample	Call	Type	RFU1	RFU2
D04		No Call	Auto	5.42	2.96
D05	sample1	Heterozygote	Manual	190	224
D06	sample 2	Allele 1	Manual	311	103
D07	HET	Heterozygote	Auto	383	342
D08	MUT	Allele 1	Auto	616	272
D09	WT	Allele 2	Auto	181	428

**Plate Layout:** A grid showing wells A-H and 1-12. Well D4 is highlighted with a blue background and labeled "Pos". Wells D5 and D6 are labeled "Unk". Wells D7, D8, and D9 are labeled "Pos". Wells D1, D2, D3, D8, D9, E-H, and 10-12 are empty.

**Settings:** The "Selected Fluorophores" section shows X: FAM and Y: VIC. The "Select cycle" is set to 40. The "View call map" checkbox is checked.

Якщо при автоматичній обробці даних негативний чи позитивний контрольний зразок оцінено некоректно або зразок відображається як «х» – результат невизначений\*, то в панелі налаштувань

(*Select cycle*)  оберіть значення  $\geq 35$  циклу.

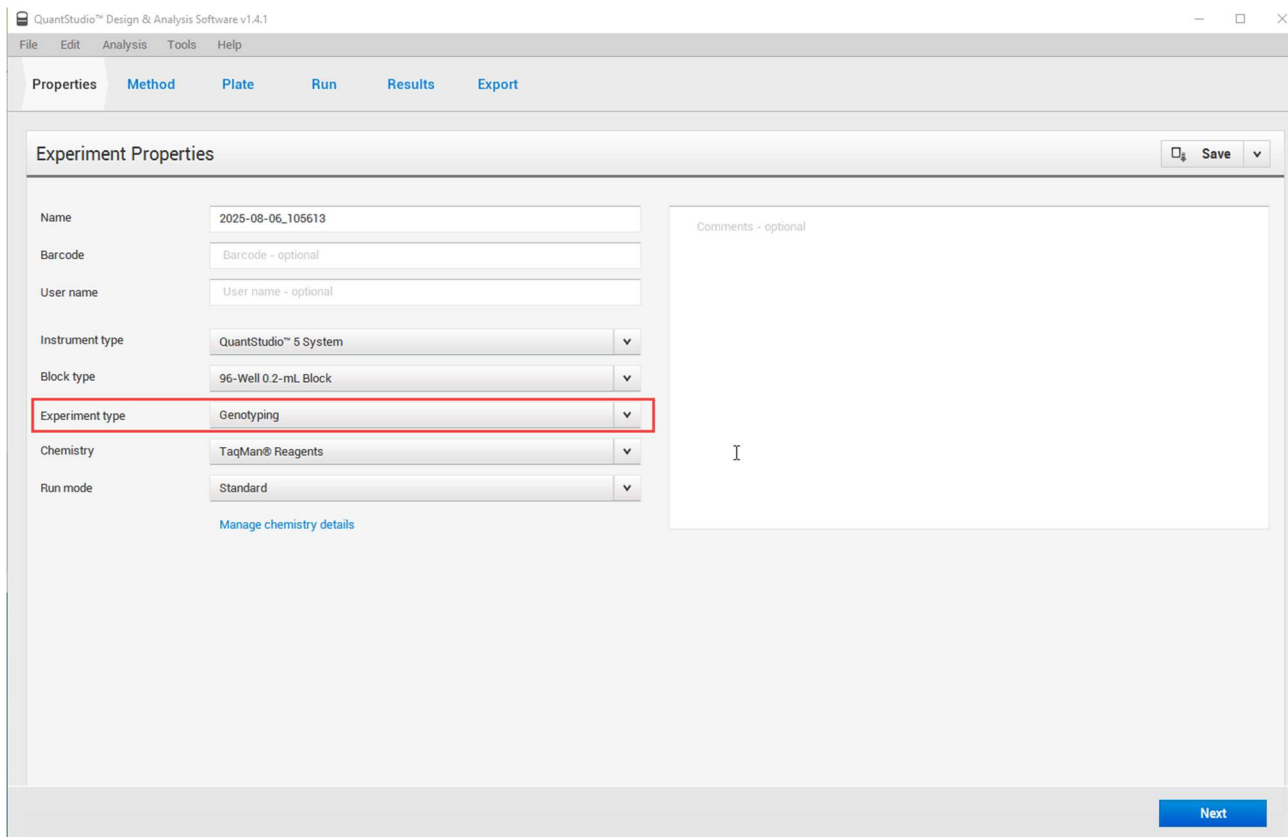
\* *Можливими причинами отримання невизначеного результату для зразка можуть бути неналежний забір біоматеріалу або помилки під час екстракції нуклеїнових кислот.*

- Якщо після внесення змін до налаштувань зразок став визначеним, обов'язково перевірте отриманий результат візуально за кривими ампліфікації у вікні *Quantification*.
- Якщо після виконаних дій результат контрольного зразка досі не відповідає зазначеним вимогам / зразок все ще не визначений, то результат вважається невалідним і потребує повторного проведення.

## Програмування приладу

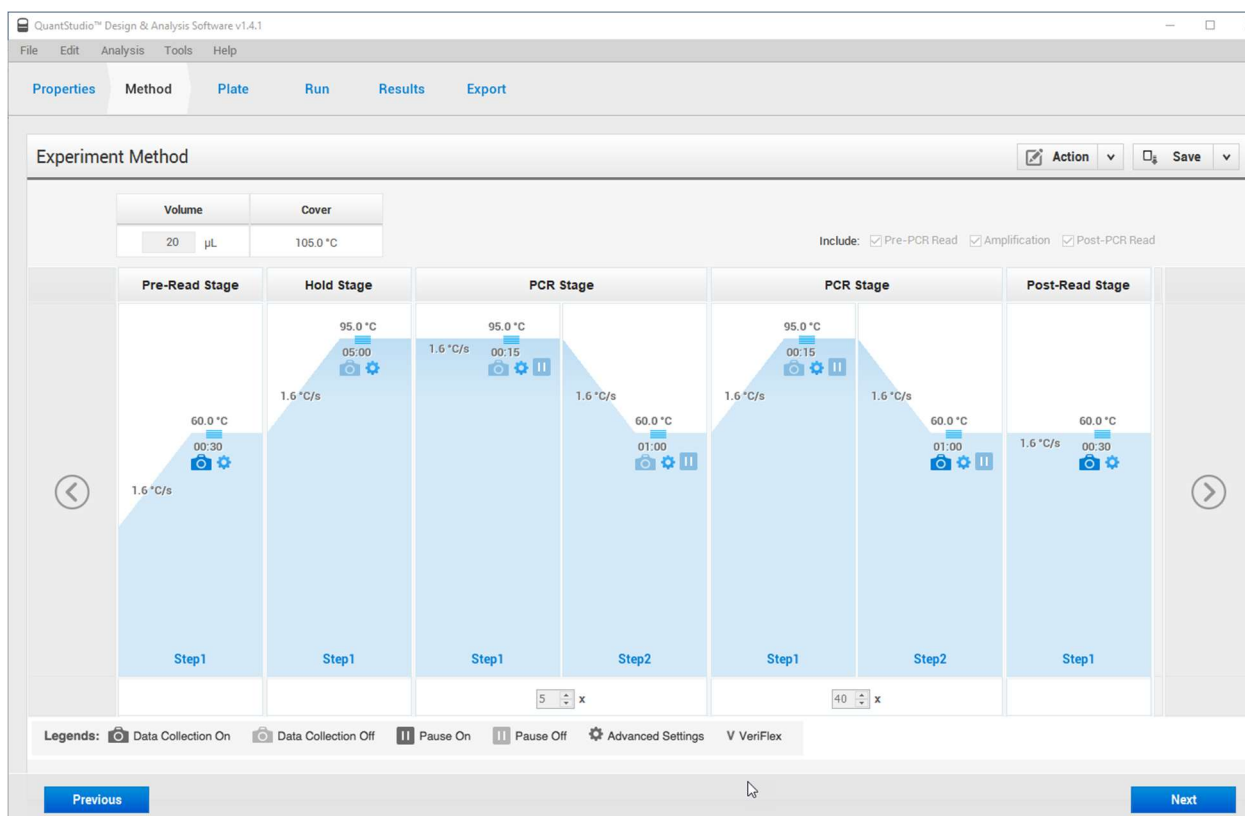
1. Відкрийте QuantStudio™ Design & Analysis Software (посібник базується на версії 1.4.1) і натисніть *Create New Experiment* (Створити новий експеримент).
2. У вкладці **Properties** оберіть тип експерименту для генотипування (*Experiment type: Genotyping*). Інші параметри залишаються за замовчуванням (Рис. 1).

Рисунок 1



3. У вкладці **Method** встановіть об'єм зразка 20 мкл і налаштуйте протокол ампліфікації згідно з інструкцією з використання (ІЗВ) «Bioscog® Синдром Жильбера». (Рис. 2).

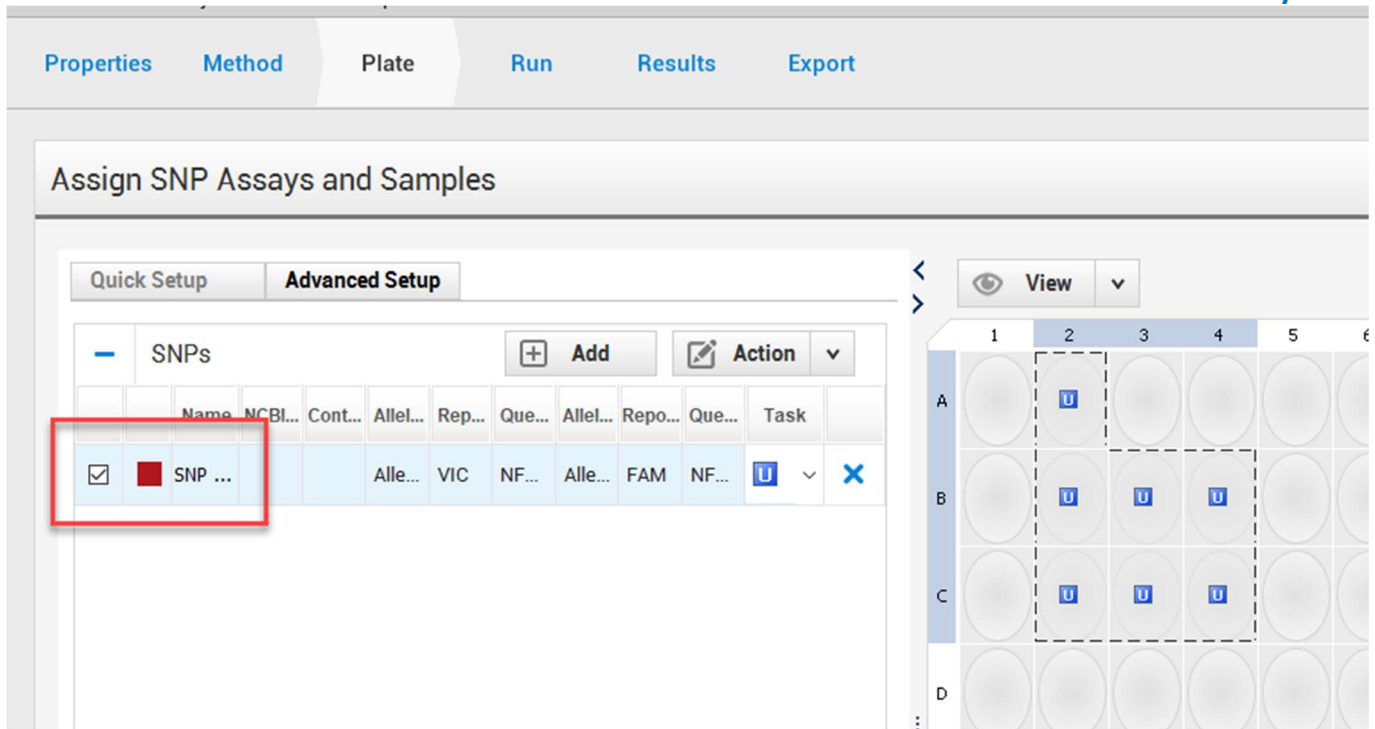
Рисунок 2



#### 4. У вкладці **Plate**

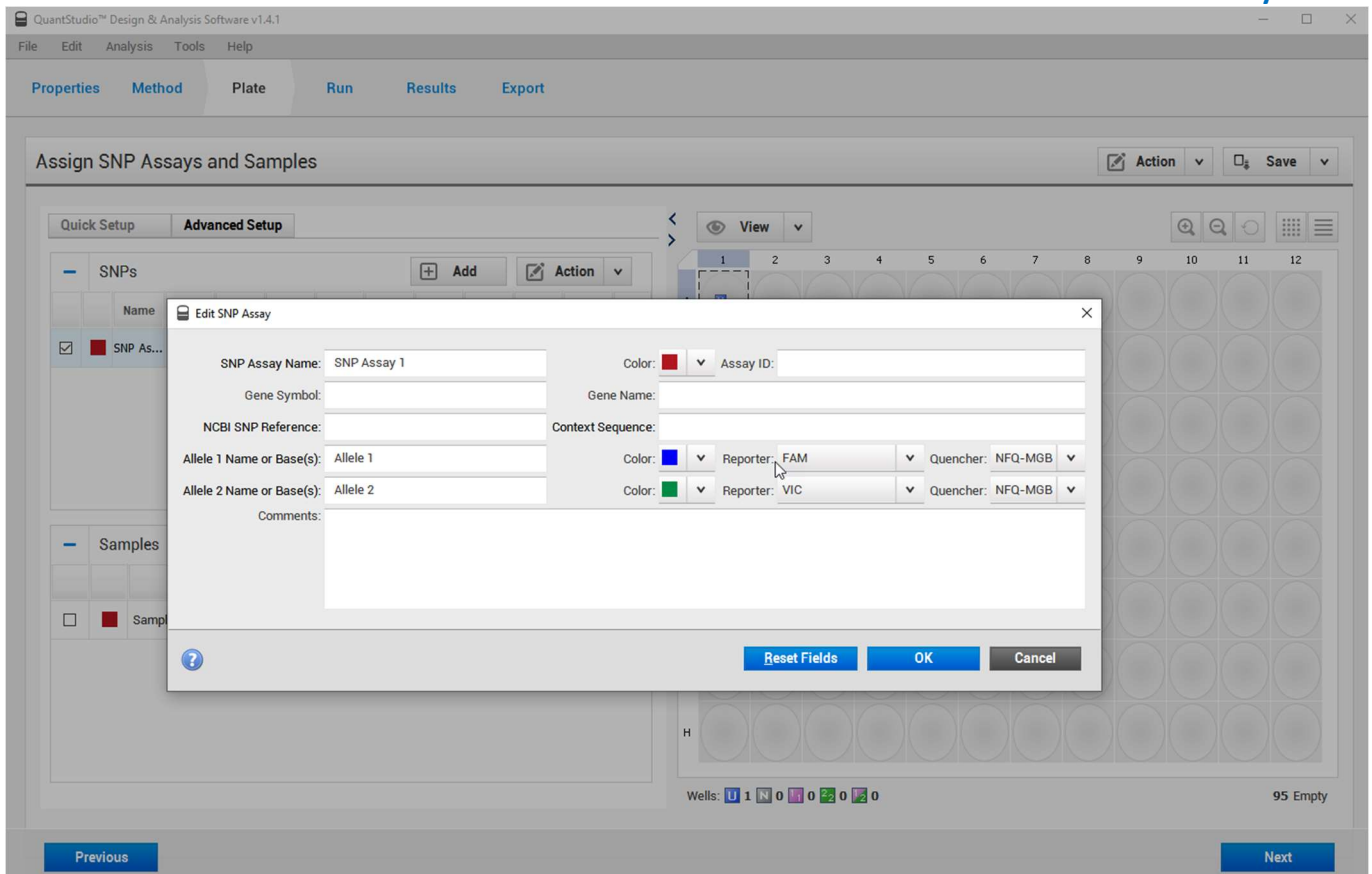
- *Plate - Quick Setup*: відключіть функцію пасивного референтного барвника (*Passive Reference - None*);
- *Plate - Advanced Setup*: у полі планшету оберіть потрібні лунки для аналізу та активуйте для них  **SNP Assay 1** (Рис. 3).

Рисунок 3



- Відкоригуйте канали згідно з ІЗВ. Для цього натисніть *Action > Edit* та оберіть для Allele 1 - FAM, а для Allele 2 - VIC (Рис. 4).

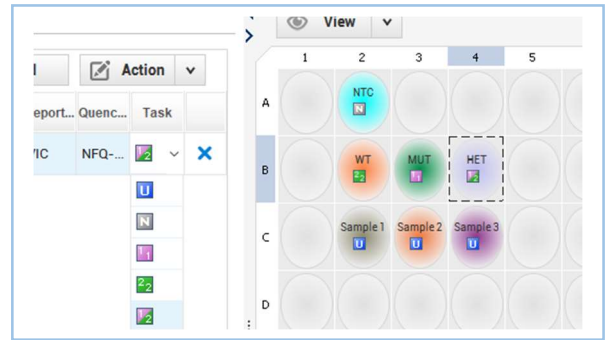
Рисунок 4



## 5. Налаштування зразків

Необхідно виділити лунки зі зразками та у вікні *Task* обрати відповідний тип зразку:

- ПКЗ - All 1 (MUT)
- ПКЗ - All 2 (WT)
- ПКЗ - All 1/All 2 (HET)
- НКЗ (NTC)
- дослідні зразки (Sample)



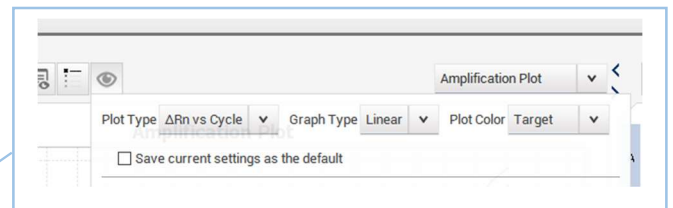
6. Завантажте реакційний планшет / стріпи в прилад QuantStudio 5. Перейдіть у вкладку *Run* і натисніть *START RUN*.

### Облік результатів

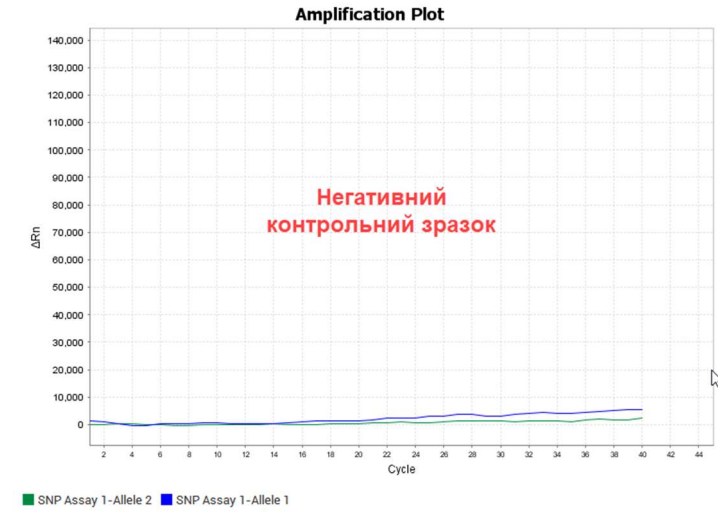
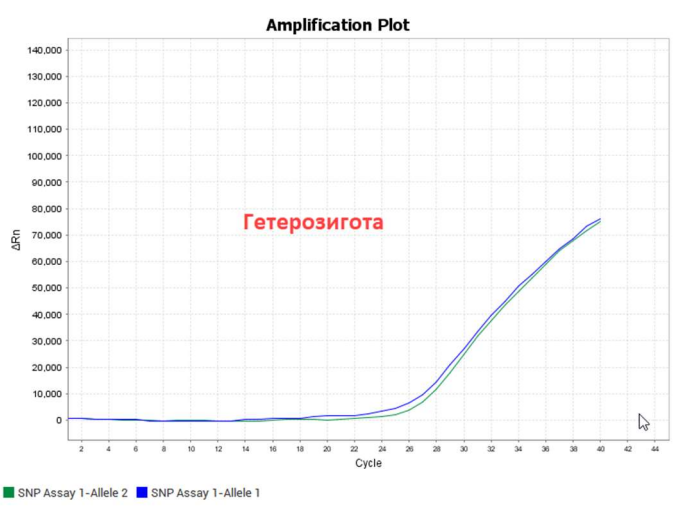
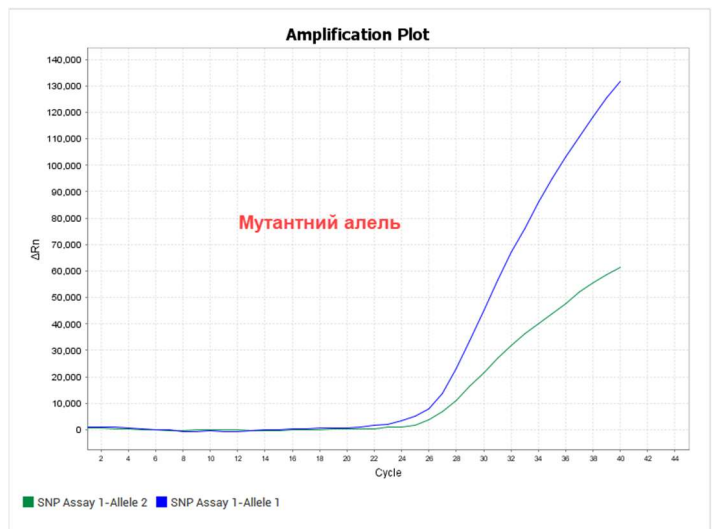
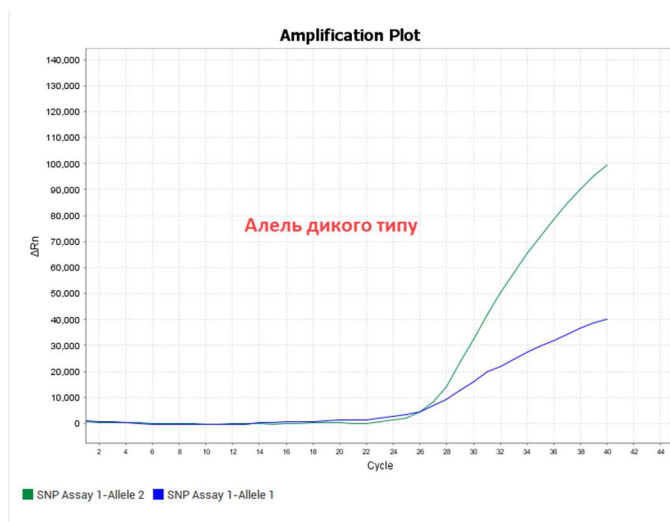
Після запуску або відкриття збереженого експерименту автоматично відображається вкладка із графіком ампліфікації (*Amplification Plot*).

Перевірте контрольні зразки візуально. Для цього

оберіть лінійний тип шкали та оцініть криві ампліфікації, де у гомозиготних зразках висота флуоресценції одного з каналів вище за інший, тоді як у гетерозиготних обидві криві проходять на однаковому рівні. В негативних контрольних зразках – сигнал ампліфікації за каналами FAM та VIC відсутній (Рис. 5).

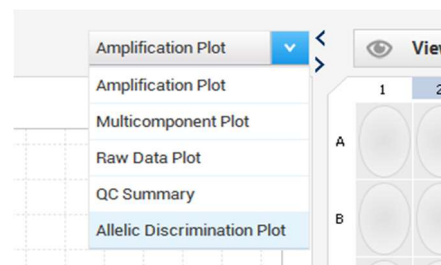


Рисуюнок 5



**Увага!** Якщо у **дослідному** зразку відсутній сигнал за каналом FAM та/або VIC - результат вважається невалідним і аналіз необхідно повторити, починаючи з етапу екстракції нуклеїнових кислот.

Для **автоматичного обліку результатів** програмним забезпеченням перейдіть до вкладки дискримінації алелів (*Allelic Discrimination Plot*).

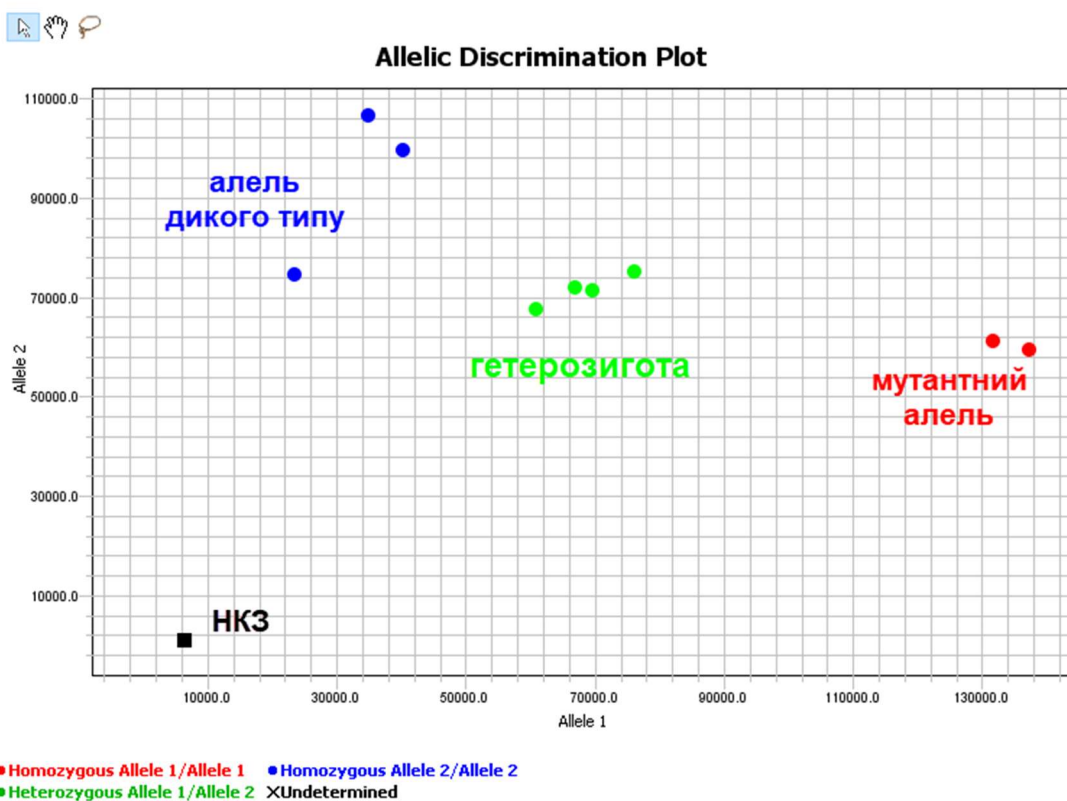


Перевірте правильність контрольних зразків:

- контрольний зразок алель Дикого типу має відповідати точці на осі Allele 2 (синій колір);
- контрольний зразок Мутантний алель відповідає точці на осі Allele 1 (червоний колір);
- контрольний зразок гетерозиготи знаходиться посередині (зелений колір);
- негативний контрольний зразок знаходиться в лівому нижньому куті (чорний колір).

Дослідні зразки відображаються аналогічним чином (Рис. 6).

Рисунок 6



Якщо при автоматичній обробці даних позитивний чи негативний контрольний зразок оцінено некоректно або зразок відображається як «х» – результат невизначений\*, то перейдіть у вікно налаштувань в розділі *Call settings* та виберіть *Analyze Real-Time dRn Data* → *Apply* (Рис. 7).

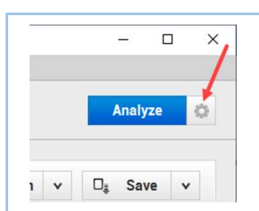
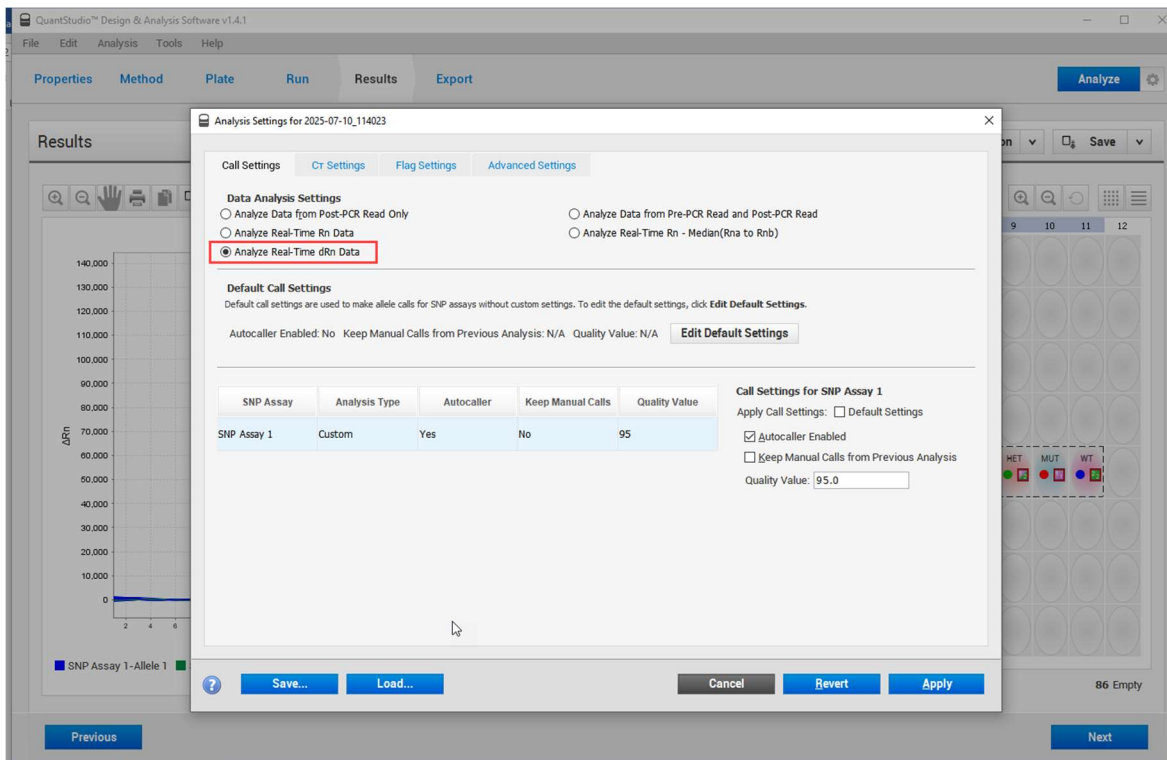


Рисунок 7





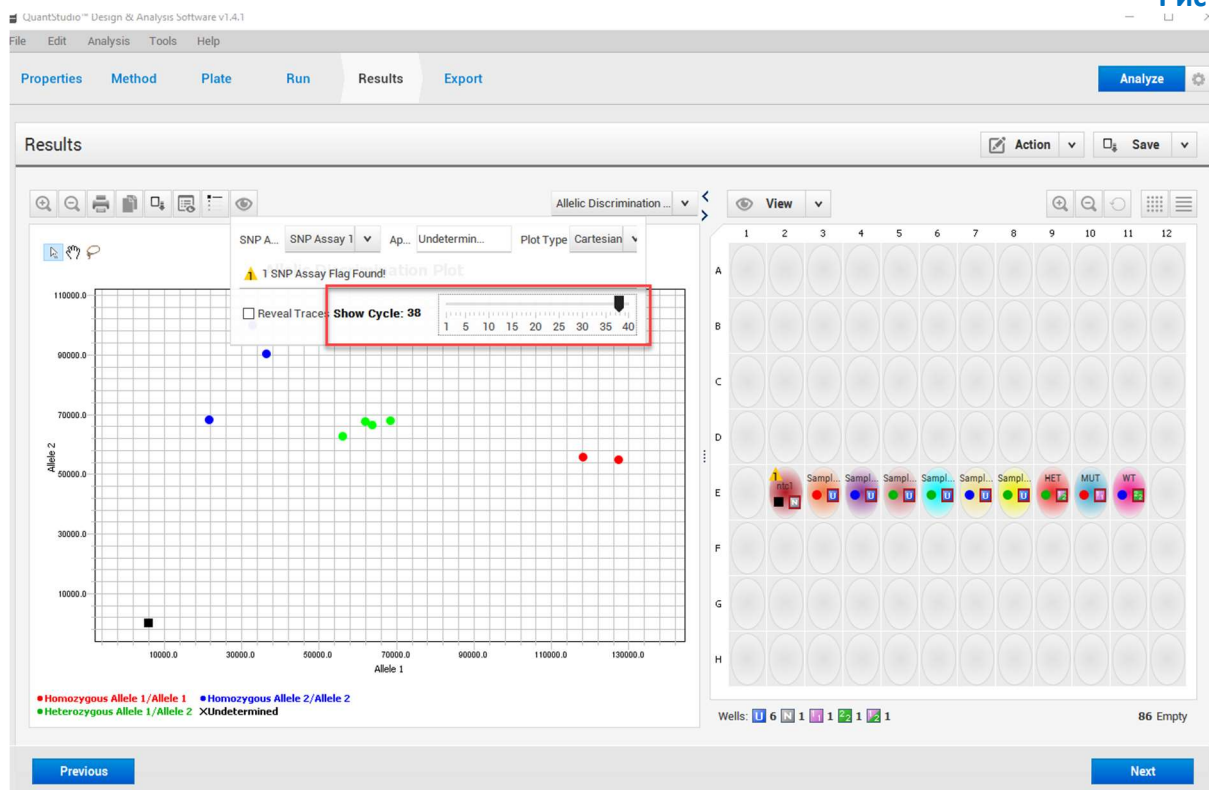
\* *Можливими причинами невизначеного зразка можуть бути неналежний забір біоматеріалу або помилки під час екстракції нуклеїнових кислот.*

Зайдіть в *Show Plot Settings* та оберіть значення  $\geq 35$  циклу (Рис. 8).



- Якщо після внесення змін до налаштувань зразок став визначеним, обов'язково перевірте отриманий результат візуально за кривими ампліфікації у вікні *Amplification Plot*.
- Якщо після виконаних дій результат досі не відповідає зазначеним вимогам / зразок все ще не визначений, то результат вважається невалідним і потребує повторного проведення.

**Рисунок 8**



Щоб переглянути таблицю результатів, змініть режим відображення з панелі лунок планшета на вікно з результатами та налаштуйте вигляд таблиці через меню *View*.

