



КвантумДНК

Набор реагентов для количественного определения концентрации ДНК и качественной оценки наличия ингибиторов ПЦР в препарате ДНК человека методом ПЦР- РВ

Номера по каталогу

AS001

AS002

AS003

Руководство к анализу данных, полученных с помощью амплификатора Bio-Rad CFX96

Анализ данных с помощью ПО амплификатора Bio-Rad CFX96

Анализ данных включает этапы:

- первичная обработка результатов;
- контроль качества прохождения ПЦР;
- количественная и качественная оценка образцов.

Первичная обработка данных

После завершения ПЦР следует проанализировать данные с помощью программного обеспечения прибора – **Bio-Rad CFX Manager 3.1**.

- 1 Проанализировать кривые флуоресценции по каналу FAM. Удалить из анализа aberrantные кривые (кривые, которые отличаются от горизонтальной прямой на уровне 0 RFU после десятого цикла и до начала экспоненциальной фазы кривой накопления продукта) (см. рис. 1,2):
 - в поле разметки плашки нажать правой кнопкой мыши на лунку, соответствующую такой кривой;
 - в открывшемся меню выбрать «Лунка ## > Исключить из анализа» (Well ## > Exclude from Analysis).

ВНИМАНИЕ!

НЕОБХОДИМО ИСКЛЮЧИТЬ ИЗ АНАЛИЗА ВСЕ АБЕРРАНТНЫЕ КРИВЫЕ. ЕСЛИ ТАКИЕ КРИВЫЕ НАБЛЮДАЮТСЯ В ОБЕИХ ПОВТОРНОСТЯХ ХОТЯ БЫ ОДНОГО ИЗ СТАНДАРТОВ ДНК, ЭКСПЕРИМЕНТ ПРИЗНАЕТСЯ НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫМ ДЛЯ РЕАГЕНТА, С КОТОРЫМ БЫЛ ПОСТАВЛЕН ДАННЫЙ СТАНДАРТ ДНК. ЕСЛИ ТАКИЕ КРИВЫЕ НАБЛЮДАЮТСЯ ВО ВСЕХ ПОВТОРНОСТЯХ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА, РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ЭТОГО ОБРАЗЦА ПРИЗНАЮТСЯ НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫМИ.

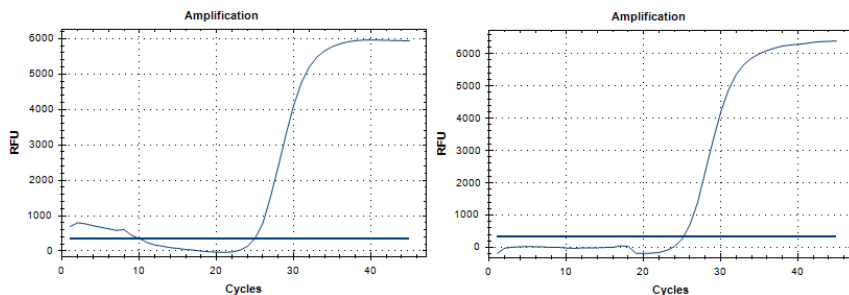


Рисунок 1 – примеры aberrantных кривых флуоресценции (отличаются от горизонтальной прямой на уровне 0 RFU после десятого цикла и до начала экспоненциальной фазы кривой накопления продукта).

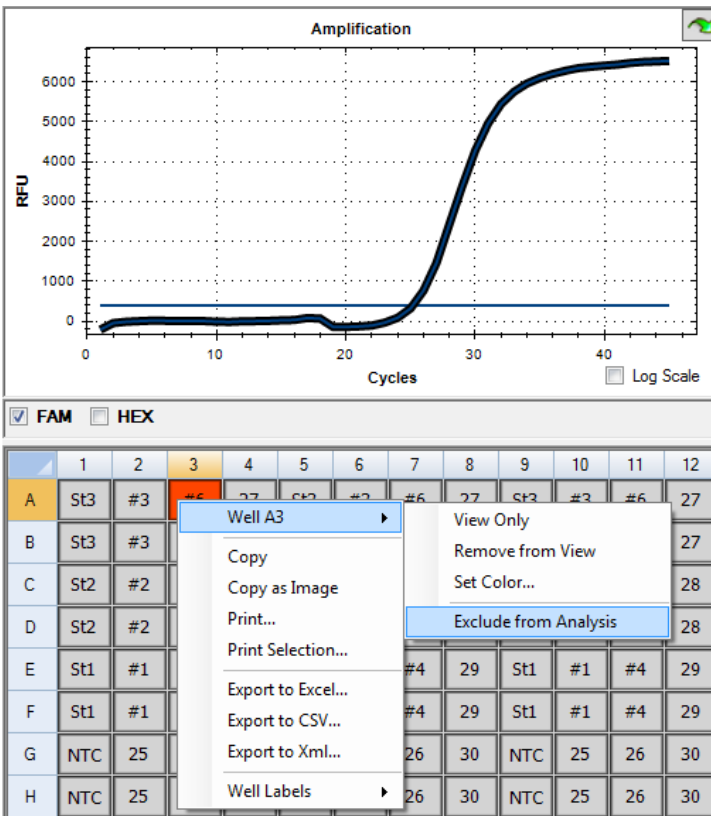


Рисунок 2 – исключение образца с aberrантной кривой флуоресценции из анализа.

- 2 Для канала FAM задать «Циклы базовой линии» (Baseline Cycles):
 - Под полем «Амплификация» (Amplification) оставить галочку только на канале FAM (см. рис. 3, А);
 - в главном меню выбрать «Настройки > Пороговый уровень базовой линии...» (Settings > Baseline Threshold...) (см. рис. 3, Б);
 - в открывшемся окне в разделе «Циклы базовой линии» (Baseline Cycles) выделить все образцы в таблице, щелкнув по синему квадрату в левом верхнем углу этого окна (см. рис. 3, В);
 - в строке «Все выбранные строки:» (All Selected Rows:) в поле «Начало» (Begin:) ввести значение 10, нажать клавишу Enter на клавиатуре (см. рис. 3, Г);
 - выделить любую строку в таблице выше;
 - нажать клавишу ОК.

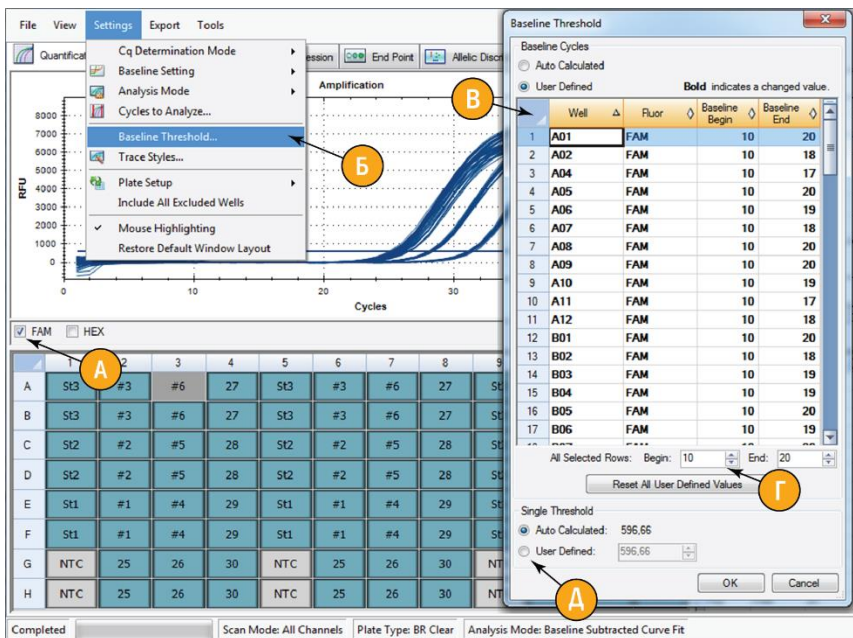


Рисунок 3 – окно «Пороговый уровень базовой линии» (Baseline Threshold).

- В правом верхнем углу выбрать «Режим анализа > Мишень» (Select Analysis Mode > Target) (см. рис. 4, А). Под полем «Амплификация» (Amplification) оставить галочку только на одной мишени (например, 156) (см. рис. 4, Б).

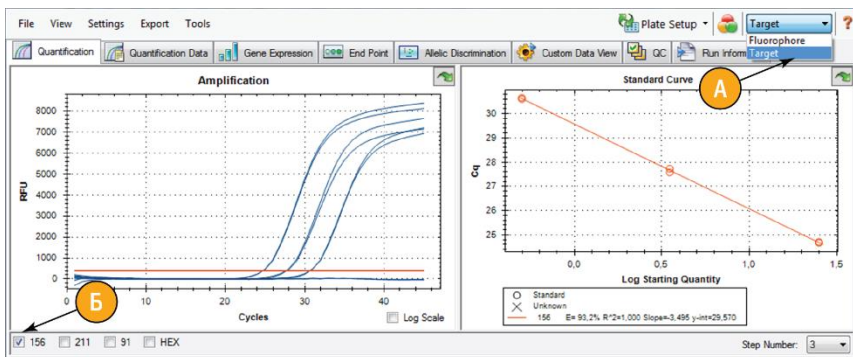


Рисунок 4 – выбор режима анализа «Мишень» (правый верхний угол) и выбор мишени под полем «Амплификация» (Amplification).

- 4 Для всех мишеней (канал FAM: 91, 156, 211; канал HEX) поочередно выставить «Пороговый уровень» (Threshold) на одинаковом уровне, соответствующем середине экспоненциальной фазы кривых накопления продукта (см. рис. 5 для определения порогового уровня):
- выбрать одну мишень (под полем «Амплификация» (Amplification) (см. рис. 4, Б));
 - в главном меню выбрать «Настройки > Пороговый уровень базовой линии...» (Settings > Baseline Threshold...) (см. рис. 3, Б);
 - в открывшемся окне в разделе «Единый пороговый уровень» (Single Threshold) (см. рис. 3, Д) выбрать пункт «Определен пользователем» (User Defined) и ввести значение порогового уровня (значение на оси RFU, определенное по алгоритму (см. рис. 5));
 - нажать клавишу ОК;
 - повторить все пункты для каждой мишени.

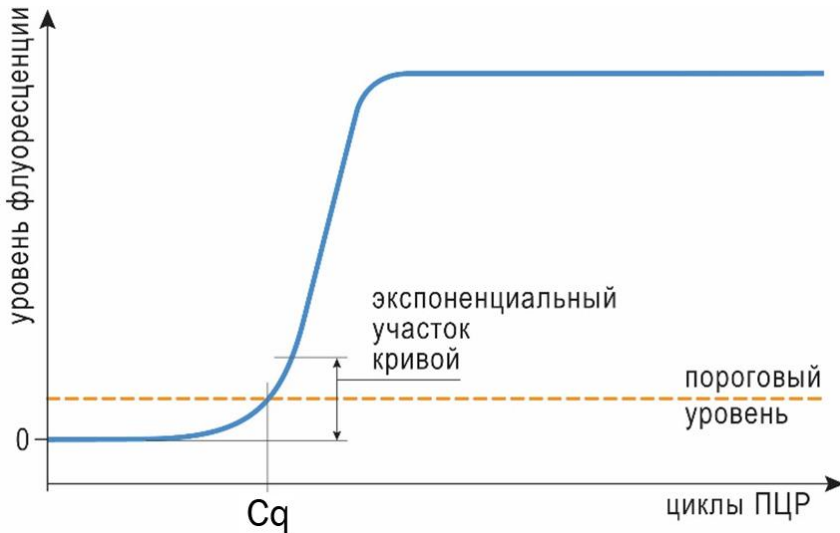


Рисунок 5 – схема нахождения экспоненциального участка кривой накопления продукта, порогового уровня и порогового цикла (Cq).

Контроль качества прохождения ПЦР

Контроль качества прохождения ПЦР включает в себя этапы:

- Анализ контрольного образца без матрицы (НТС).
- Анализ Стандартов ДНК.

Анализ контрольного образца без матрицы (НТС).

Проанализировать сигнал в контрольных образцах НТС по всем мишеням. При отсутствии контаминации значение Cq по мишеням в канале FAM превышает 40 или не определяется; при этом значение Cq внутреннего контроля по каналу HEX меньше 38 (см. рис. 6).

ВНИМАНИЕ!

ЕСЛИ В ОБРАЗЦЕ НТС ПО КАНАЛУ FAM ЗНАЧЕНИЕ $Cq < 40$, РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА ПРИЗНАЮТСЯ НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫМИ ИЗ-ЗА КОНТАМИНАЦИИ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ ПОСТОРОННЕЙ ДНК.

Меры, применяемые при контаминации реакционной смеси посторонней ДНК:

1. Сменить раствор, используемый для разведения ДНК, и воду, используемую для замешивания общей реакционной смеси.
2. Провести дополнительные меры по деконтаминации рабочих зон (сменить комплект автоматических дозаторов, рабочее место; обработать дозаторы и рабочие поверхности деконтаминирующим раствором).
3. Если перечисленные меры не помогают и повторная постановка ПЦР показывает тот же результат, заменить набор реагентов.

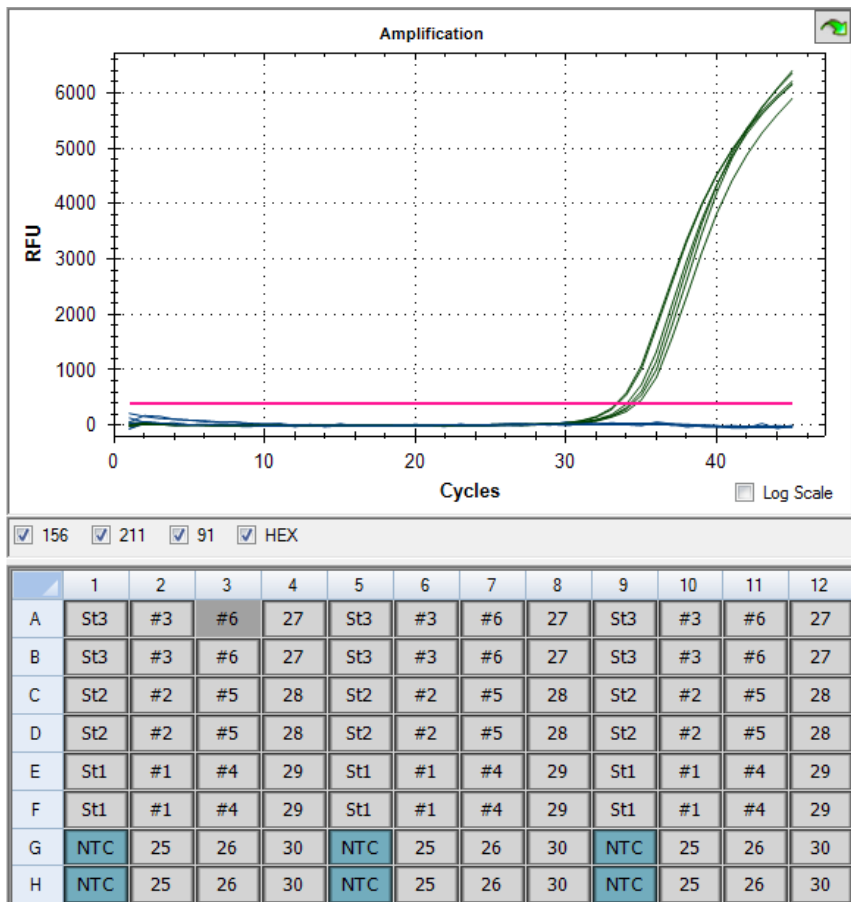


Рисунок 6 – вид графиков реакций NTC при отсутствии контаминации. Зеленым обозначены кривые в канале HEX (внутренний контроль), синим – кривые в канале FAM (измерительные реакции).

Анализ Стандартов ДНК

- 1 Выделить в поле разметки плашки все реакции со Стандартами ДНК. Все реакции со Стандартами должны развиваться в обоих каналах. Допустимо выпадение (отсутствие сигнала) не более чем в одной из двух технических повторностей для каждого Стандарта ДНК. Меры, применяемые при не прохождении реакции со Стандартами ДНК (отсутствует сигнал в двух повторностях одного и более Стандартов):
 - Убедиться в правильности выполнения протокола.
 - Проверить срок годности набора реагентов.
 - Проверить условия хранения.
 - Если перечисленные меры не помогают и повторная постановка ПЦР показывает тот же результат, заменить набор реагентов.
- 2 Оценить эффективность (E) прохождения реакций для каждой мишени и значение R^2 (R^2):
 - в поле «Стандартная кривая» (Standard Curve) приведены автоматически рассчитанные значения этих величин для всех мишеней, отмеченных галочкой под полем «Амплификации» (Amplification) (см. рис. 4, Б).

Эффективность прохождения реакций для каждой мишени (91, 156 или 211) должна быть более 80%, а значение R^2 должно быть не ниже 0.98 (значения рассчитывает ПО амплификатора).

ВНИМАНИЕ!

ЕСЛИ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОХОЖДЕНИЯ ИЗМЕРИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ МЕНЬШЕ 80% ИЛИ ЗНАЧЕНИЕ R^2 НИЖЕ 0.98, РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА ПРИЗНАЮТСЯ НЕ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫМИ ИЗ-ЗА НЕЭФФЕКТИВНОГО ПРОХОЖДЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ РЕАКЦИЙ.

Меры, применяемые при эффективности прохождения измерительной реакции меньше 80% или значение R^2 ниже 0.98:

1. Убедиться, что все мишени (Targets) обозначены корректно (91, 156 или 211) и выбран режим анализа «Мишень» (Target).
2. Если проблема не решена, перейти в режим анализа «Канал» (Fluorophore). Выбрать канал FAM, выставить в нем базовую линию для каждой пары Стандартов ДНК: с 10 цикла по цикл, после которого начинается развитие сигнала для данного Стандарта (см. рис. 7). Вернуться в режим анализа «Мишень» (Target).

Ожидаемые значения цикла, после которого начинается развитие сигнала для каждого Стандарта ДНК:

Стандарт 1: 26-27 цикл;

Стандарт 2: 23-24 цикл;

Стандарт 3: 20-21 цикл.

3. Проверить точность калибровки ПЦР-амплификатора и автоматических дозаторов.
4. Переставить ПЦР, исключив ошибку выполнения протокола. Перед новой постановкой эксперимента все реактивы после размораживания тщательно перемешать 3-4х кратным переворачиванием, а затем импульсным встряхиванием на микроцентрифуге.
5. Если перечисленные меры не помогают, заменить набор реагентов.

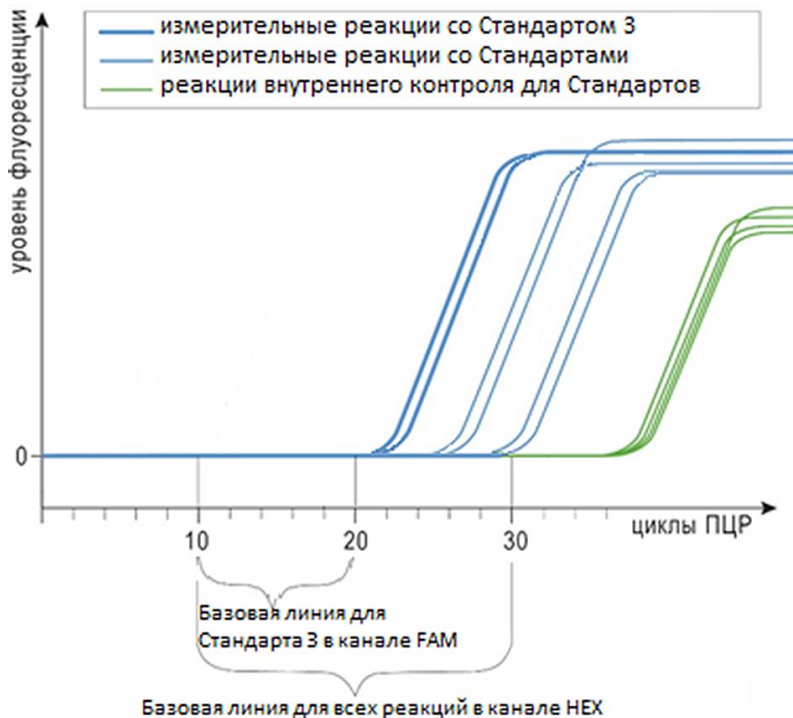


Рисунок 7 – схема выбора базовой линии: в канале FAM – на примере Стандарта 3 (с 10 по 20 цикл); в канале HEX – единая базовая линия (с 10 по 30 цикл).

- 3 Оценить разницу между максимальным и минимальным значениями Cq по каналу HEX для всех реакций со Стандартами ДНК (см. рис. 8, Б):
 - выбрать только мишень HEX (см. рис. 4);
 - в таблице данных отсортировать образцы по Cq , нажав на ромбик рядом с Cq (см. рис. 8, А);
 - вычесть из максимального значения Cq минимальное (из последнего – первое, см. рис. 8, Б). Разница не должна превышать 4 цикла.

ВНИМАНИЕ!

ЕСЛИ ДЛЯ СТАНДАРТОВ ДНК РАЗНИЦА МЕЖДУ МАКСИМАЛЬНЫМ И МИНИМАЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЯМИ CQ В КАНАЛЕ HEX ПРЕВЫШАЕТ 4 ЦИКЛА, ОЦЕНИТЬ СТЕПЕНЬ ИНГИБИРОВАНИЯ ПЦР В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ НЕЛЬЗЯ.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
D09	HEX		Std	St2	33,66	5,00E-01
F09	HEX		Std	St1	33,77	5,00E-01
C09	HEX		Std	St2	33,89	5,00E-01
E09	HEX		Std	St1	33,91	5,00E-01
C01	HEX		Std	St2	33,97	5,00E-01
B05	HEX		Std	St3	34,10	5,00E-01
E05	HEX		Std	St1	34,16	5,00E-01
A09	HEX		Std	St3	34,17	5,00E-01
D05	HEX		Std	St2	34,20	5,00E-01
D01	HEX		Std	St2	34,32	5,00E-01
B01	HEX		Std	St3	34,43	5,00E-01
C05	HEX		Std	St2	34,43	5,00E-01
F01	HEX		Std	St1	34,46	5,00E-01
E01	HEX		Std	St1	34,55	5,00E-01
A05	HEX		Std	St3	34,77	5,00E-01
F05	HEX		Std	St1	34,85	5,00E-01
B09	HEX		Std	St3	34,96	5,00E-01
A01	HEX		Std	St3	35,19	5,00E-01

Рисунок 8 – Анализ качества прохождения контрольных реакций с внутренним контролем.

Меры, применяемые при разбросе значений Cq в канале HEX для Стандартов более 4 циклов:

1. По каналу HEX выставить базовую линию для всех образцов с 10 по 30 цикл (см. рис. 7. Установка базовой линии – см. п. 1.2, выбрать канал HEX).
2. Если это не помогло, а наличие ингибиторов определить необходимо, то переставить ПЦР. Тщательно перемешать общую реакционную смесь перед разнесением на лунки: 5-7х кратным пипетированием объемом $\frac{1}{4}$ общего объема смеси (пипеткой на 1000 мкл).
3. Если перечисленные меры не помогают, заменить набор реагентов.

Количественная и качественная оценка ДНК исследуемых образцов

Количественная и качественная оценка ДНК исследуемых образцов включает этапы:

- Определение эффективной концентрации ДНК.
- Оценка наличия ингибиторов ПЦР.
- Экспорт данных

Определение эффективной концентрации ДНК

При соблюдении требований, указанных в п. 1 «Первичная обработка данных», ПО амплификатора построит калибровочный график и рассчитает эффективную концентрацию ДНК исследуемого образца относительно Стандартов ДНК.

- убедиться, что выбран режим анализа «Мишень». Выбрать одну или несколько мишеней канала FAM (91, 156, 211, под полем «Амплификация» (Amplification) (см. рис. 4));
- в поле разметки плашки выделить исследуемые образцы;
- в поле с таблицей данных в столбце «Нач. кол-во» (SQ) во вкладке «Расчет» (Quantification) отобразятся значения эффективных концентраций каждой технической повторности исследуемых образцов (нг/мкл);
- средние значения эффективных концентраций для повторностей образцов указаны во вкладке «Данные расчета» (Quantification Data) в столбце «Среднее начального количества» (SQ Mean).

Необходимо учесть разведение образца ДНК, если для измерения использовалась разбавленная аликвота образца.

При эффективной концентрации образца выше 300 нг/мкл рекомендуется разбавить аликвоту образца ДНК (отобрать в пробирку 1.5 мл 98 мкл буфера TE или воды, добавить 2 мкл разбавляемого образца, перемешать четырехкратным пипетированием объемом 70 мкл) и повторить измерение, используя в качестве образца разведенную аликвоту.

Оценка наличия ингибиторов ПЦР

Оценить уровень ингибирования ПЦР в образце, сравнив среднее значение C_q для технических повторов внутренней контрольной (канал HEX) исследуемого образца с максимальным значением C_q внутреннего контроля для стандартов ДНК:

- выбрать мишень HEX под полем «Аmplification» (Amplification) (см. рис. 4);
- выделить все лунки со Стандартами ДНК. В поле Amplification найти кривую флуоресценции Стандарта с максимальным значением C_t (см. рис. 7);
- в поле разметки плашки из всех реакций со Стандартами ДНК оставить только лунку, соответствующую этой кривой, и выделить лунки исследуемых образцов;
- проанализировать данные в столбце C_q в поле с таблицей данных: при наличии в образце ингибиторов ПЦР значение C_q внутреннего контроля исследуемого образца превышает максимальное значение C_q внутреннего контроля Стандартов ДНК на 3 цикла или не определяется (см. рис. 9).

Если значение C_q внутреннего контроля исследуемого образца превышает максимальное значение C_q внутреннего контроля Стандартов ДНК на 3 цикла или не определяется, при этом эффективная концентрация ДНК образца более 300 нг/мкл, наличие ингибиторов определить нельзя. Рекомендуется разбавить аликвоту образца ДНК (отобрать в пробирку 1.5 мл 98 мкл буфера TE или воды, добавить 2 мкл разбавляемого образца, перемешать четырехкратным пипетированием объемом 70 мкл) и повторить измерение, используя в качестве образца разведенную аликвоту.

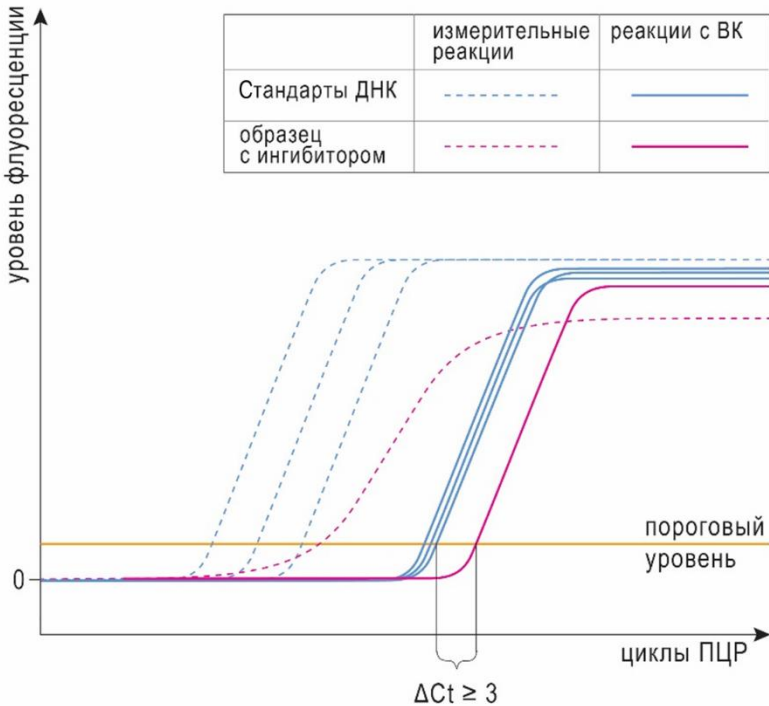


Рисунок 9 – схема сравнения значений C_q внутреннего контроля исследуемого образца и Стандартов ДНК в канале HEX.

Экспорт данных

Для экспорта полученных результатов перейти во вкладку «Данные расчета» (Quantification Data): щелкнув по таблице правой кнопкой мыши, выбрать в выпадающем меню формат, в который экспортируются данные; например, «Экспорт в Excel» (Export to Excel) (см. рис. 10).

File View Settings Export Tools Plate Setup Target

Quantification Quantification Data Gene Expression End Point Allelic Discrimination Custom Data View QC Run Information

Results Step Number: 3

Well	Floor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev
D01	FAM	211	Std-01				0.065	5.000E-01	-0.301	5.00E-01	0.00E+00
D02	FAM	211	Std-01				0.065	5.000E-01	-0.301	5.00E-01	0.00E+00
D03	FAM	211	Std-02				0.243	3.500E+00	0.544	3.50E+00	0.00E+00
D04	FAM	211	Std-02				0.243	3.500E+00	0.544	3.50E+00	0.00E+00
D05	FAM	211	Std-03				0.265	2.500E+01	1.398	2.50E+01	0.00E+00
D06	FAM	211	Std-03				0.265	2.500E+01	1.398	2.50E+01	0.00E+00
D07	FAM	211	Unkn-01				0.132	1.500E-01	-0.824	1.61E-01	1.49E-02
D08	FAM	211	Unkn-01				0.132	1.710E-01	-0.767	1.61E-01	1.49E-02
D09	FAM	211	Unkn-02				0.155	2.179E-01	-0.662	2.02E-01	2.19E-02
D10	FAM	211	Unkn-02				0.155	1.869E-01	-0.728	2.02E-01	2.19E-02
D11	FAM	211	Unkn-03				0.068	1.997E-01	-0.700	1.93E-01	9.19E-03
D12	FAM	211	Unkn-03				0.068	1.867E-01	-0.729	1.93E-01	9.19E-03
E01	FAM	211	Unkn-04				0.149	1.775E-01	-0.751	1.92E-01	2.01E-02
E02	FAM	211	Unkn-04	B 1005	31.68	31.79	0.149	2.058E-01	-0.686	1.92E-01	2.01E-02
E03	FAM	211	Unkn-05	K 1005	31.78	31.66	0.161	1.924E-01	-0.716	2.09E-01	2.36E-02
E04	FAM	211	Unkn-05	K 1005	31.55	31.66	0.161	2.257E-01	-0.646	2.09E-01	2.36E-02
E05	FAM	211	Unkn-06	N 1005	32.15	31.79	0.500	1.484E-01	-0.828	1.96E-01	6.75E-02
E06	FAM	211	Unkn-06	N 1005	31.44	31.79	0.500	2.439E-01	-0.613	1.96E-01	6.75E-02
E07	FAM	211	Unkn-07	10x B	27.05	27.17	0.159	5.296E+00	0.724	4.91E+00	5.46E-01
E08	FAM	211	Unkn-07	10x B	27.28	27.17	0.159	4.524E+00	0.656	4.91E+00	5.46E-01
E09	FAM	211	Unkn-08	10x K	27.34	27.23	0.150	4.333E+00	0.637	4.68E+00	4.93E-01
E10	FAM	211	Unkn-08	10x K	27.13	27.23	0.150	5.030E+00	0.702	4.68E+00	4.93E-01
E11	FAM	211	Unkn-09	10x N	26.99	27.11	0.166	5.528E+00	0.743	5.11E+00	5.94E-01
E12	FAM	211	Unkn-09	10x N	27.23	27.11	0.166	4.688E+00	0.671	5.11E+00	5.94E-01
F04	FAM	211	Unkn-10	old B	30.03	30.02	0.019	6.545E-01	-0.184	6.61E-01	8.73E-03
F05	FAM	211	Unkn-10	old B	30.01	30.02	0.019	6.669E-01	-0.176	6.61E-01	8.73E-03
F06	FAM	211	Unkn-11	old K	30.04	30.18	0.203	6.522E-01	-0.186	5.93E-01	8.44E-02

Context menu for D01:

- Copy
- Copy as Image
- Print...
- Print Selection...
- Export to Excel...
- Export to CSV...
- Export to Xml...
- Export to Html...
- Find...
- Sort...
- Select Columns...

Рисунок 10 – вкладка «Данные расчета» (Quantification Data) и экспорт данных в Excel.

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель: ООО «НОМОТЕК»

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10

Тел.: +7 (495) 988-4083

www.nomotech.ru