

## ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ

### Программа для оценки относительной экспрессии генов при определении минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми лейкозами

#### Инструкция

1) Ввести исходные данные в Ваш амплификатор перед проведением реакции:

Столбец “Target”:

В столбец “Target” ввести обозначение исследуемого анализата (гена, транскрипта или транслокации; например, 210, 9-21, не используя символ “;” (точка с запятой)); если используется референсный ген, следует вводить его обозначение в столбец “Target” (например, “abl”).

Нужно вводить одно универсальное обозначение референсных генов, даже если этих генов несколько в одной таблице.

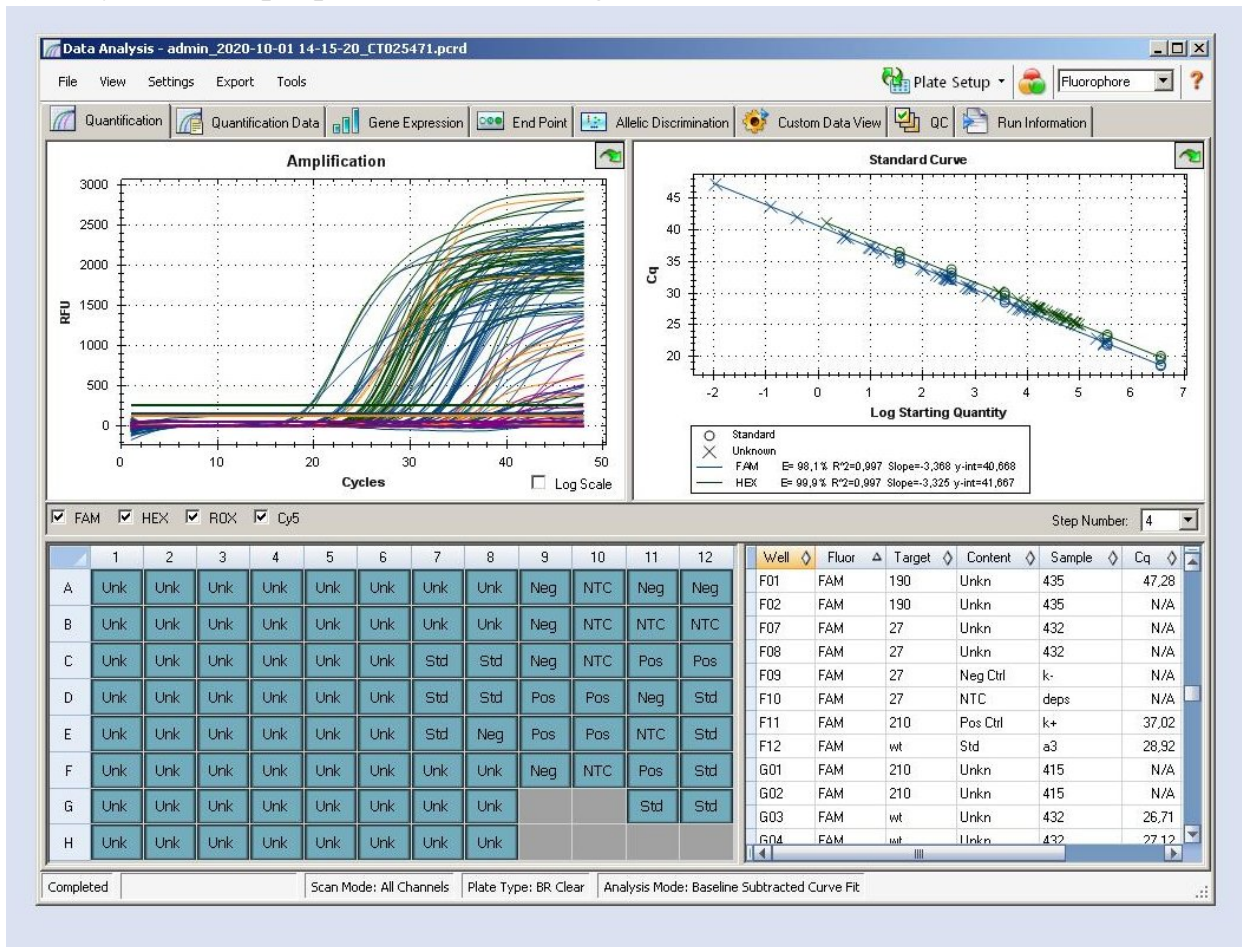
Столбец “Sample”:

В столбец “Sample” ввести обозначение пробы пациента (ячейки этого столбца должны быть одинаковыми в строках с исследованием разных генов одного и того же пациента).

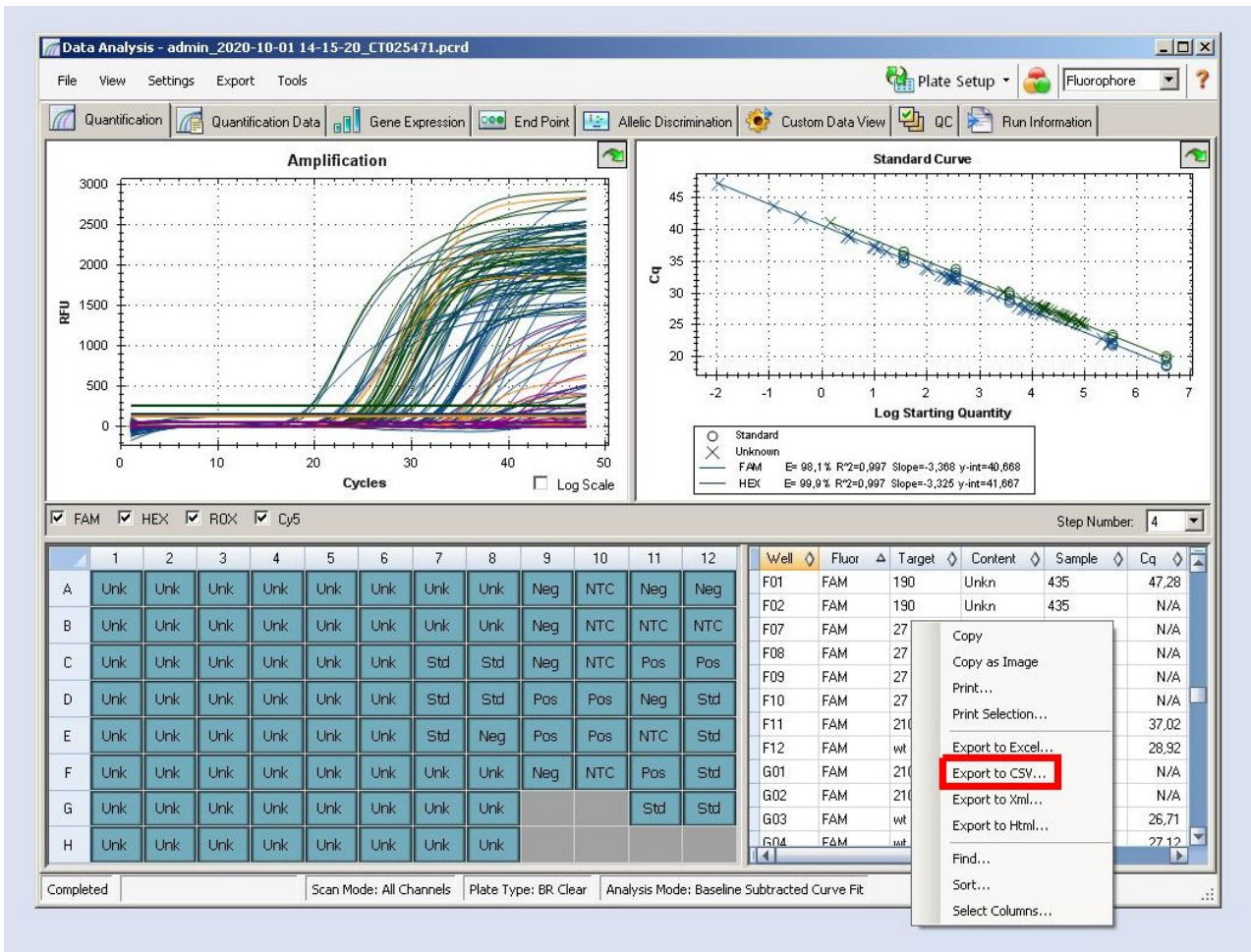
2) Выбрать файл амплификации, такой, как на картинке:



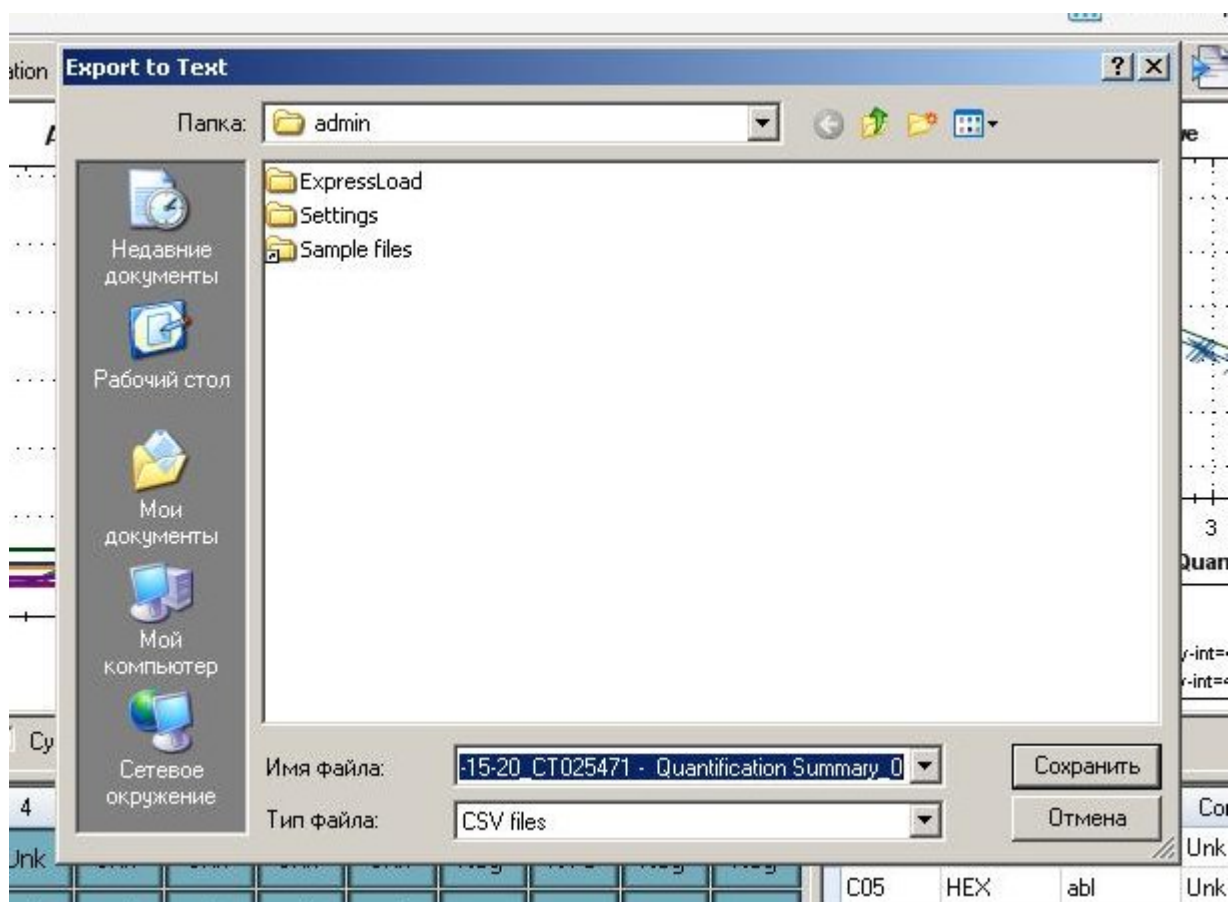
### 3) Запустить в программе CFX Manager:



4) Правой кнопкой мыши нажать на таблицу в нижнем правом углу окошка и выбрать "Export to CSV":



5) Правой кнопкой мыши нажать на таблицу в нижнем правом углу окошка и выбрать "Export to CSV":



Сохранить этот файл. В случае ошибок ввода в амплификатор можно отредактировать этот файл в MS Excel или любом текстовом редакторе.

б) Заполнить форму для расчётов:

## Выбрать файл CSV.

### Перевести файл qPCR в таблицу

(инструкция - в нижней части страницы)

Выберите файл:

Файл не выбран

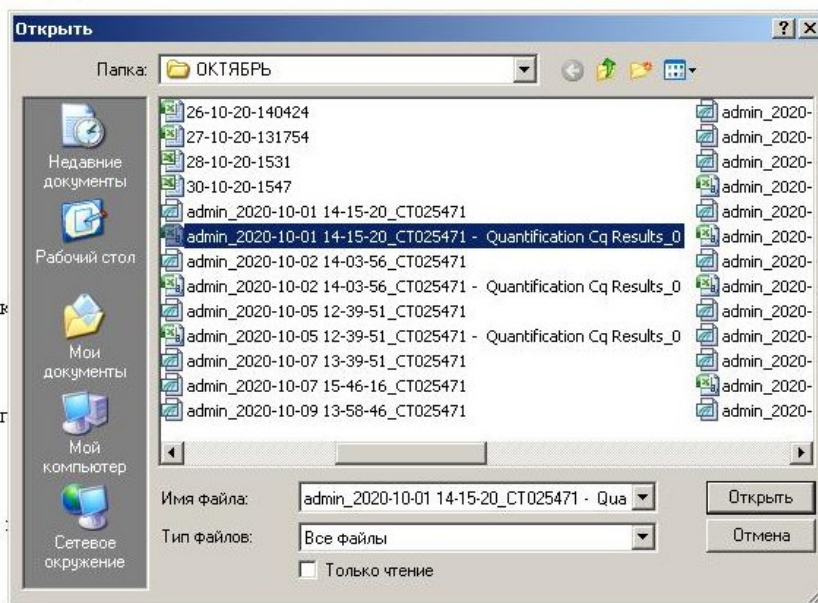
Выберите систему:

Введите референсный ген так, как

Введите обозначение проб "дикого

Введите количество одинаковых :

Определить референсные строки автоматически



## Выбрать систему (например, CFX96).

Перевести файл qPCR в таблицу  
(инструкция - в нижней части страницы)

Выберите файл:  
 Файл не выбран

Выберите систему:

Введите референсный ген так, как указывали в приборе (в столбце Target)

Введите обозначение проб "дикого типа" так, как в таблице (столбец Target)

Введите количество одинаковых исследований каждой пробы

Определить референсные строки автоматически

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P						
1	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological	Cq	Mean	Cq	Std. De	Starting	Q	Log Startin	SQ	Mean	SQ	Std. De	Set	Point	Well	Note
2	B01	FAM	Unkn	433	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	0	60						
3	B02	FAM	1221	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	0	60						
4	B03	FAM	wt	Unkn	431	31,32305	31,32305	0	316,5885	2,500495	316,5885	0	0	0	60						
5	B04	FAM	wt	Unkn	431	31,36669	31,36669	0	307,2042	2,487427	307,2042	0	0	0	60						
6	B05	FAM	evi	Unkn	431	35,37816	35,37816	0	19,33006	1,286233	19,33006	0	0	0	60						
7	B06	FAM	evi	Unkn	431	34,36342	34,36342	0	38,91221	1,590086	38,91221	0	0	0	60						
8	C01	FAM	210	Unkn	431	26,55707	26,55707	0	8464,862	3,92762	8464,862	0	0	0	60						
9	C02	FAM	210	Unkn	431	26,42875	26,42875	0	9247,901	3,966043	9247,901	0	0	0	60						
10	C03	FAM	wt	Unkn	436	31,16061	31,16061	0	354,1069	2,549134	354,1069	0	0	0	60						
11	C04	FAM	wt	Unkn	436	31,31	31,31	0	219,4501	2,504403	219,4501	0	0	0	60						
12	D01	FAM	190	Unkn	431	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	0	60						
13	D02	FAM	190	Unkn	431	41,96944	41,96944	0	0,205371	-0,68746	0,205371	0	0	0	60						
14	F09	FAM	27	Neg Ctrl	k-	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	0	60						
15	F10	FAM	27	NTC	degs	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	0	60						
16	F11	FAM	210	Pos Ctrl	ke	36,02331	36,02331	0	12,38938	1,093049	12,38938	0	0	0	60						
17	F12	FAM	wt	Std	a3	27,91964	27,91964	0	3690	3,567026	3690	0	0	0	60						
18	B01	HEX	abl	Unkn	433	24,07337	24,07337	0	68045,79	4,832801	68045,79	0	0	0	60						
19	B02	HEX	abl	Unkn	433	24,26052	24,26052	0	59666,98	4,775734	59666,98	0	0	0	60						
20	B03	HEX	abl	Unkn	431	25,90273	25,90273	0	18835,6	4,274979	18835,6	0	0	0	60						
21	B04	HEX	abl	Unkn	431	25,86692	25,86692	0	19315,21	4,2859	19315,21	0	0	0	60						
22	C03	HEX	abl	Unkn	436	24,67285	24,67285	0	44668,83	4,650005	44668,83	0	0	0	60						
23	C04	HEX	abl	Unkn	436	25,00788	25,00788	0	35305,72	4,547845	35305,72	0	0	0	60						
24	D01	HEX	abl	Unkn	431	25,93586	25,93586	0	18402,53	4,264878	18402,53	0	0	0	60						
25	D02	HEX	abl	Unkn	431	26,10625	26,10625	0	16327,61	4,212923	16327,61	0	0	0	60						

Если Вы работаете на амплификаторе CFX96 и пользуетесь CFX Manager, при открытии CSV файла в MS Excel у Вас должна отображаться примерно такая картина

## Ввести обозначение референсных генов (например, abl).

**Перевести файл qPCR в таблицу**  
(инструкции - в нижней части страницы)

Выберите файл:  
 | Файл не выбран

Выберите систему:  
 CF396 ▾

Введите референсный ген так, как указывали в приборе (в столбце Target)

Введите обозначение проб "дикого типа" так, как в таблице (столбец Target)

Введите количество одинаковых исследований каждой пробы

Определить референсные строки автоматически

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Q	Log Start	SQ Mean	SQ Std. Dev	Set Point	Well Note		
1																	
2	B01	FAM	12.21	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
3	B02	FAM	12.21	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
4	B03	FAM	wt	Unkn	431	31.32305	31.32305	0	316.5885	2.500495	316.5885	0	0	60			
5	B04	FAM	wt	Unkn	431	31.36669	31.36669	0	307.2042	2.487427	307.2042	0	0	60			
6	B05	FAM	evi	Unkn	431	35.37816	35.37816	0	19.33006	1.286233	19.33006	0	0	60			
7	B06	FAM	evi	Unkn	431	34.36342	34.36342	0	38.91221	1.590086	38.91221	0	0	60			
8	C01	FAM	210	Unkn	431	26.55707	26.55707	0	8464.862	3.92762	8464.862	0	0	60			
9	C02	FAM	210	Unkn	431	26.42875	26.42875	0	9247.901	3.966043	9247.901	0	0	60			
10	C03	FAM	wt	Unkn	436	31.16061	31.16061	0	354.1069	2.549134	354.1069	0	0	60			
11	C04	FAM	wt	Unkn	436	31.31	31.31	0	319.4501	2.504403	319.4501	0	0	60			
12	D01	FAM	190	Unkn	431	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
13	D02	FAM	190	Unkn	431	41.96944	41.96944	0	0.205371	-0.68746	0.205371	0	0	60			
14	F09	FAM	27 Neg Ctrl	k-		NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
15	F10	FAM	27 NTC	deps		NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
16	F11	FAM	210 Pos Ctrl	k+		36.02331	36.02331	0	12.38938	1.093049	12.38938	0	0	60			
17	F12	FAM	wt	Std	a3	27.91964	27.91964	0	3690	3.567026	3690	0	0	60			
18	B01	HEX	abl	Unkn	433	24.07337	24.07337	0	68045.79	4.832801	68045.79	0	0	60			
19	B02	HEX	abl	Unkn	433	24.26052	24.26052	0	59666.98	4.775734	59666.98	0	0	60			
20	B03	HEX	abl	Unkn	431	25.90273	25.90273	0	18835.6	4.274979	18835.6	0	0	60			
21	B04	HEX	abl	Unkn	431	25.86692	25.86692	0	19315.21	4.2859	19315.21	0	0	60			
22	C03	HEX	abl	Unkn	436	24.67285	24.67285	0	44668.83	4.650005	44668.83	0	0	60			
23	C04	HEX	abl	Unkn	436	25.00788	25.00788	0	35305.72	4.547845	35305.72	0	0	60			
24	D01	HEX	abl	Unkn	431	25.93586	25.93586	0	18402.53	4.264878	18402.53	0	0	60			
25	D02	HEX	abl	Unkn	431	26.10625	26.10625	0	16327.61	4.212923	16327.61	0	0	60			
26																	
27																	

## Ввести обозначение проб целевого гена (например, wt – где применимо).

**Перевести файл qPCR в таблицу**  
(инструкции - в нижней части страницы)

Выберите файл:  
 | Файл не выбран

Выберите систему:  
 CF396 ▾

Введите референсный ген так, как указывали в приборе (в столбце Target)

Введите обозначение проб "дикого типа" так, как в таблице (столбец Target)

Введите количество одинаковых исследований каждой пробы

Определить референсные строки автоматически

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Q	Log Start	SQ Mean	SQ Std. Dev	Set Point	Well Note		
1																	
2	B01	FAM	12.21	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
3	B02	FAM	12.21	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
4	B03	FAM	wt	Unkn	431	31.32305	31.32305	0	316.5885	2.500495	316.5885	0	0	60			
5	B04	FAM	wt	Unkn	431	31.36669	31.36669	0	307.2042	2.487427	307.2042	0	0	60			
6	B05	FAM	evi	Unkn	431	35.37816	35.37816	0	19.33006	1.286233	19.33006	0	0	60			
7	B06	FAM	evi	Unkn	431	34.36342	34.36342	0	38.91221	1.590086	38.91221	0	0	60			
8	C01	FAM	210	Unkn	431	26.55707	26.55707	0	8464.862	3.92762	8464.862	0	0	60			
9	C02	FAM	210	Unkn	431	26.42875	26.42875	0	9247.901	3.966043	9247.901	0	0	60			
10	C03	FAM	wt	Unkn	436	31.16061	31.16061	0	354.1069	2.549134	354.1069	0	0	60			
11	C04	FAM	wt	Unkn	436	31.31	31.31	0	319.4501	2.504403	319.4501	0	0	60			
12	D01	FAM	190	Unkn	431	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
13	D02	FAM	190	Unkn	431	41.96944	41.96944	0	0.205371	-0.68746	0.205371	0	0	60			
14	F09	FAM	27 Neg Ctrl	k-		NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
15	F10	FAM	27 NTC	deps		NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	0	60			
16	F11	FAM	210 Pos Ctrl	k+		36.02331	36.02331	0	12.38938	1.093049	12.38938	0	0	60			
17	F12	FAM	wt	Std	a3	27.91964	27.91964	0	3690	3.567026	3690	0	0	60			
18	B01	HEX	abl	Unkn	433	24.07337	24.07337	0	68045.79	4.832801	68045.79	0	0	60			
19	B02	HEX	abl	Unkn	433	24.26052	24.26052	0	59666.98	4.775734	59666.98	0	0	60			
20	B03	HEX	abl	Unkn	431	25.90273	25.90273	0	18835.6	4.274979	18835.6	0	0	60			
21	B04	HEX	abl	Unkn	431	25.86692	25.86692	0	19315.21	4.2859	19315.21	0	0	60			
22	C03	HEX	abl	Unkn	436	24.67285	24.67285	0	44668.83	4.650005	44668.83	0	0	60			
23	C04	HEX	abl	Unkn	436	25.00788	25.00788	0	35305.72	4.547845	35305.72	0	0	60			
24	D01	HEX	abl	Unkn	431	25.93586	25.93586	0	18402.53	4.264878	18402.53	0	0	60			
25	D02	HEX	abl	Unkn	431	26.10625	26.10625	0	16327.61	4.212923	16327.61	0	0	60			
26																	
27																	

Это важно - для значений целевого гена рассчитываются средние значения чисел копий референсных генов и отношения количества ампликонов целевых и референсных генов.

Ввести количество одинаковых исследований каждой пробы: если мы капаем в каждые две лунки одну и ту же пробу с одними и теми же реагентами, чтобы затем рассчитать среднее значение по этим парам лунок, то следует указать 2 (в три лунки - 3 и так далее). Повторов нет – указать 1.

**Перевести файл qPCR в таблицу**  
(инструкция - в нижней части страницы)

Выберите файл:  
 | Файл не выбран

Выберите систему:

Введите референсный ген так, как указывали в приборе (в столбце Target)

Введите обозначение проб "дикого типа" так, как в таблице (столбец Target)

Введите количество одинаковых исследований каждой пробы

Определить референсные строки автоматически

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Cq	Cq Mean	Cq Std	De Starting Q	Log Startir	SQ Mean	SQ Std	De Set Point	Well Note
B01	FAM	wt	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	60	
B02	FAM	wt	Unkn	433	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	60	
B03	FAM	wt	Unkn	431	31,32305	31,32305	0	316,5885	2,500495	316,5885	0	60	
B04	FAM	wt	Unkn	431	31,36669	31,36669	0	307,2042	2,487427	307,2042	0	60	
B05	FAM	wt	Unkn	431	35,37816	35,37816	0	19,33006	1,286233	19,33006	0	60	
B06	FAM	wt	Unkn	431	34,36342	34,36342	0	38,91221	1,900086	38,91221	0	60	
C01	FAM	210	Unkn	431	26,55707	26,55707	0	8464,862	3,92762	8464,862	0	60	
C02	FAM	210	Unkn	431	26,42875	26,42875	0	9247,901	3,966043	9247,901	0	60	
C03	FAM	wt	Unkn	436	31,16061	31,16061	0	354,1069	2,549134	354,1069	0	60	
C04	FAM	wt	Unkn	436	31,31	31,31	0	319,4501	2,504403	319,4501	0	60	
D01	FAM	190	Unkn	431	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	60	
D02	FAM	190	Unkn	431	41,96944	41,96944	0	0,205371	-0,68746	0,205371	0	60	
F09	FAM	27	Neg Ctrl	k-	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	60	
F10	FAM	27	NTC	deps	NaN	0	0	NaN	NaN	0	0	60	
F11	FAM	210	Pos Ctrl	k+	36,02331	36,02331	0	12,38938	1,093049	12,38938	0	60	
F12	FAM	wt	Std	a3	27,91964	27,91964	0	3690	3,567026	3690	0	60	
B01	HEX	abf	Unkn	433	24,07337	24,07337	0	68045,79	4,832801	68045,79	0	60	
B02	HEX	abf	Unkn	433	24,26052	24,26052	0	59666,98	4,775734	59666,98	0	60	
B03	HEX	abf	Unkn	431	25,90273	25,90273	0	18835,6	4,274979	18835,6	0	60	
B04	HEX	abf	Unkn	431	25,86692	25,86692	0	19315,21	4,2859	19315,21	0	60	
C03	HEX	abf	Unkn	436	24,67285	24,67285	0	44668,83	4,650005	44668,83	0	60	
C04	HEX	abf	Unkn	436	25,00788	25,00788	0	35305,72	4,547845	35305,72	0	60	
D01	HEX	abf	Unkn	431	25,93586	25,93586	0	18402,53	4,264878	18402,53	0	60	
D02	HEX	abf	Unkn	431	26,10625	26,10625	0	16327,61	4,212923	16327,61	0	60	

На данной картинке видно, что каждая проба была поставлена дважды, и в некоторых парах соответствующих лунок (отмечены одним цветом, столбец "Well") был проведён анализ референсного гена.