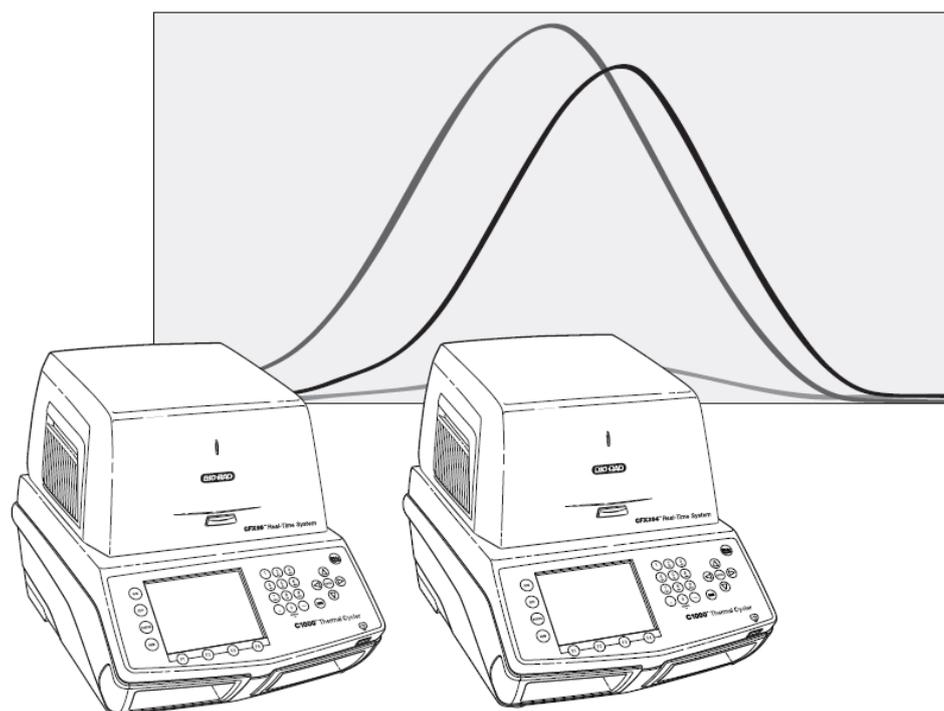

Программное обеспечение Precision Melt Analysis™

Руководство пользователя

Кат. # 184-5025



BIO-RAD

Все права защищены. ©2009 Bio-Rad Laboratories, Inc. Копирование и воспроизведение этого документа в любой иной форме, печатной или электронной, без письменного разрешений Bio-Rad Laboratories, Inc. запрещено.

Excel, Microsoft, Windows, Windows XP, и Windows Vista являются торговыми марками Microsoft Corporation. Adobe и Reader являются торговыми марками Adobe Systems Incorporated. SYBR является торговой маркой Invitrogen Corporation. Компания Bio-Rad Laboratories, Inc. лицензирована Invitrogen Corporation на продажу реагентов, содержащих SYBR Green I, для использования в ПЦР в реальном времени только в исследовательских целях. EvaGreen является торговой маркой Biotium, Inc. Компания Bio-Rad Laboratories, Inc. лицензирована Biotium Inc. на продажу реагентов, содержащих Eva Green, для использования в ПЦР в реальном времени только для исследовательских целей. HRM является торговой маркой Corbett Life Sciences и ее дочерних компаний. LCGreen является торговой маркой Idaho Technologies, Inc. SYTO9 является торговой маркой Invitrogen Corporation. Другие бренды или названия продуктов являются торговыми марками их соответствующих владельцев.

Информация об авторских правах

Амплификаторы компании Bio-Rad Real-time thermal cycler CFX96 или CFX384 лицензированы для проведения ПЦР в реальном времени в рамках патента США No. 6,814,934 В1 компании Apple для использования в исследовательских и любых других областях за исключением ветеринарной диагностики.

Амплификаторы компании Bio-Rad Real-time thermal cycler CFX96 или CFX384 защищены одним или более патентами США, их аналогами или патентными заявками в других странах, принадлежащими Eppendorf AG: патенты США Nos. 6,767, 512 и 7,074,367. Никакие права не передаются, намеренно, косвенно или процессуально, на патенты, покрывающие методы ПЦР или реагенты и наборы реагентов.

Плашки Hard-Shell производства компании Bio-Rad защищены одним или более патентами США, их аналогами или патентными заявками в других странах, принадлежащими Eppendorf AG: патенты США Nos. 7,347,977, 6,340,589, 6,528,302 и патентные заявки США 2007246858, 20080084004, 20030180192 и 20060120927.

Компания Bio-Rad Laboratories, Inc. лицензирована Biotium Inc. на продажу реагентов, содержащих краситель EvaGreen, для использования в ПЦР в реальном времени только в исследовательских целях.

SYBR Green является торговой маркой Molecular Probes, Inc. EvaGreen является торговой маркой Biotium, Inc.

Поддержка компании Bio-Rad

Компания Bio-Rad предоставляет разнообразные ресурсы для исследователей, включая обширные технические ресурсы и широкий спектр методов и приложений в области ПЦР, ПЦР в реальном времени, экспрессии генов и HRM-анализа. В Таблице 1 суммированы ресурсы и поддержка, предоставляемые компанией Bio-Rad.

Таблица 1. Ресурсы Bio-Rad.

Ресурсы и поддержка	Как найти
Региональные представители Bio-Rad Laboratories	Информацию о Вашем региональном представителе и его контактную информацию можно найти на интернет-сайте компании Bio-Rad, выбрав Вашу страну из списка на домашней странице (www.bio-rad.com). Список международных офисов приведен на последней странице этой инструкции.
Технические замечания (Technical Notes) и литература	Посетите сайт компании Bio-Rad (www.bio-rad.com) или Gene Expression Gateway (www.bio-rad.com/genomics). Введите поисковый запрос в строке Search и выберите Literature для поиска ссылок на технические замечания, руководства пользователя и другую литературу.
Технические специалисты	Отдел технической поддержки (Technical Support) компании Bio-Rad укомплектован опытными исследователями для возможности предоставления пользователям высококвалифицированных практических советов. Для технической поддержки по телефону контактируйте с ближайшим к Вам офисом компании Bio-Rad. Для технической поддержки в США и Канаде звоните 1-800-424-6723 (звонок бесплатный) и выберите опцию технической поддержки.

Обозначения, используемые в этом Руководстве пользователя

Обозначения, используемые в этом Руководстве, суммированы в Таблице 2.

Таблица 2. Обозначения, используемые в Руководстве пользователя.

Обозначение	Значение обозначения
ПОДСКАЗКА:	Используется для обозначения полезной информации и инструкций, подробно описанных в других частях руководства
ЗАМЕЧАНИЕ:	Используется для обозначения важной информации, в том числе информации, детально разобранной в других частях руководства
ВНИМАНИЕ!	Используется для обозначения очень важной информации, касающейся возможной потери данных
X > Y	Выберите в панели инструментов, меню или окне программы сначала X , затем – Y .

Оглавление

Поддержка компании Bio-Rad.....	ii
Обозначения, используемые в этом Руководстве пользователя	ii
Глава 1. HRM-анализ.....	1
Введение в HRM-анализ.....	1
Советы для успешного HRM-анализа.....	2
Совместимость красителей	3
HRM-анализ в литературе	4
Глава 2. Программное обеспечение Precision Melt Analysis™.....	6
Совместимость приборов	6
Компоненты программного обеспечения Precision Melt Analysis	6
Установка программного обеспечения.....	7
Защитный ключ.....	9
Калибровка плавления.....	9
Приготовление планшета для калибровки плавления	10
Приготовление планшета для калибровки плавления	10
Глава 3. Знакомство с программой Precision Melt Analysis.....	14
Главное окно программы	14
Startup Wizard	17
Менеджер опций анализа Analysis Options Manager	17
Файлы программы	20
Инструменты помощи программы	20
Подсказки	20
Глава 4. Обзор анализа данных	22
Окно анализа данных Data Analysis	22
Селектор лунок	25
Графики.....	27

Таблицы	27
Просмотр групп лунок в окне анализа данных Data Analysis	28
Выбор номера шага.....	30
Исключение лунок из анализа	30
Глава 5. Анализ данных плавления.....	33
Обработка данных плавления.....	33
Вкладка Precision Melt	34
Вкладка Precision Melt Data	42
Вкладка Melt Curve	47
Вкладка Melt Curve Data	49
Отчет для файлов плавления	51
Глава 6. Анализ исследования плавления Melt Study.....	54
Окно исследования плавления Melt Study.....	54
Вкладка Study Setup	55
Вкладка Study Analysis	56
Окно отчета исследования плавления Melt Study.....	57

Глава 1. HRM-анализ

В этой главе содержится информация об анализе плавления высокого разрешения (**high resolution melt analysis**, HRM-анализ).

- Введение в HRM-анализ (см. ниже)
- Советы для успешного HRM-анализа (стр. 2)
- Совместимость красителей (стр. 3)
- HRM-анализ в литературе (стр. 4)

Введение в HRM-анализ

ПЦР в реальном времени с использованием неспецифических ДНК-связывающих красителей, таких как SYBR Green, обычно включает анализ кривой плавления после проведения ПЦР для подтверждения амплификации единственного продукта или для детекции возможного присутствия праймер-димеров или других нежелательных продуктов амплификации.

Для анализа кривой плавления температура постепенно увеличивается и проводится мониторинг флуоресценции как функция температуры. При возрастании температуры происходит высвобождение флуорофора из денатурированной двухцепочечной ДНК и флуоресценция спадает с существенным изменением в скорости падения при достижении температуры плавления (T_m) двухцепочечной ДНК, то есть теоретической температуры, при которой половина ДНК находится в двухцепочечном, а половина – в одноцепочечном состоянии. Скорость изменения определяется при построении графика первой производной относительной флуоресценции (relative fluorescence, RFU) по температуре $-d(RFU)/d(T)$ от температуры, позволяя выявить пик, который является T_m комплексов двухцепочечной ДНК. Праймер-димеры обычно плавятся при более низкой температуре благодаря их меньшему размеру, делая возможным дискриминацию амплифицированного продукта ПЦР от праймер-димеров и других неспецифических продуктов.

HRM-анализ может рассматриваться как следующее поколение техники анализа кривых плавления. HRM-анализ позволяет генерировать профили кривых плавления, которые достаточно специфичны и чувствительны для разделения нуклеиновых кислот на основании незначительных различий в них, что делает возможным сканирование мутаций, анализ метилирования и генотипирование.

HRM-анализ может использоваться для характеристики образцов на основании их CG-состава и комплементарности последовательностей ДНК. Например, HRM-анализ может быть использован для детекции однонуклеотидных вариаций, таких как однонуклеотидный полиморфизм (**single-nucleotide polymorphism**, SNP) или для выявления неизвестных генетических мутаций. Он также может применяться для количественной детекции незначительной части вариантов ДНК на фоне ДНК «дикого» типа с чувствительностью, достигающей 5%. Этот подход может быть использован, например, для исследования соматических мутаций или изменений в статусе метилирования CpG-«островков».

Генотипирование SNP

Являясь представителем минимальных генетических изменений, детекция и генотипирование SNP подчеркивает чувствительность HRM-анализа. Неизвестные мутации часто являются однонуклеотидными заменами, однако они могут представлять собой и изменения сразу в нескольких нуклеотидах, инсерции и/или делеции. В целом, чем больше изменений в ДНК произошло в результате мутации, тем легче ее идентифицировать с помощью HRM-анализа.

SNP разделяются на 4 класса, приведенные в Таблице 3, и наиболее сложным для типирования является класс 4 (конверсия А>Т).

Таблица 3. Классы SNP (по определению Verner et al., 2001).

Класс SNP	Нуклеотидная замена	Типичный сдвиг Tm кривой плавления	Частота встречаемости (в геноме человека)
1	С/Т или G/A	Существенный (>0.5°C)	64%
2	С/А или G/Т	Существенный (>0.5°C)	20%
3	С/G	Существенный (>0.5°C)	9%
4	А/Т	Очень незначительный (<0.2°C)	7%

Советы для успешного HRM-анализа

Успех HRM-анализа во многом зависит от качества индивидуального продукта амплификации и исследуемой специфической последовательности. Все экспериментальные параметры должны быть контролируемыми и воспроизводимыми между образцами для успешного HRM-анализа.

Рекомендации для проведения успешного HRM-анализа приведены ниже.

1. Анализируйте небольшие ампликоны

Предпочтительным является анализ ампликонов менее 150 п.н., особенно при исследовании сайтов неизвестных полиморфизмов. Детекция неизвестных полиморфизмов возможна и в более длинных ампликонах, однако однонуклеотидные вариации оказывают большее влияние на характеристики плавления 100 п.н. ампликона, чем 600 п.н. ампликона.

2. Анализируйте единственный продукт без примесей

Избегайте последовательностей, которые с высокой вероятностью будут формировать неспецифические продукты или праймер-димеры. Всегда проводите поиск по BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) для проверки специфичности последовательности праймеров. Кроме того, присутствие вторичных структур в одноцепочечных или частично денатурированных ДНК может приводить к плохому разрешению и кластерингу. Последовательность ампликона должна быть проанализирована с помощью программы MFOLD (<http://mfold.bioibfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) для уверенности, что она не будет формировать вторичные структуры в ходе ПЦР.

3. Используйте достаточное количество матрицы в ПЦР

Анализ данных ПЦР в реальном времени может быть исключительно полезным при поиске проблем при HRM-анализе. Образцы должны иметь значение порогового цикла (C_T) менее 30. Продукты, поздно амплифицируемые из-за малого исходного количества матрицы или ее деградации, дают нестабильные результаты при HRM-анализе.

4. Нормализуйте концентрацию матрицы

Количество матрицы, используемой в реакции, должно быть постоянным. Нормализуйте исходную концентрацию таким образом, чтобы все кривые амплификации были в диапазоне 3-ех C(t) друг от друга.

5. Проведите анализ на присутствие aberrантной амплификации

Тщательно проанализируйте данные амплификации на присутствие характерной для aberrантной амплификации формы кривой. Зубчатая кривая в логарифмическо-линейных координатах или кривая, выходящая на меньшее значение плато по сравнению с другими реакциями, может указывать на плохую амплификацию или слишком низкий сигнал флуоресценции для проведения анализа. Неудачная амплификация может быть вызвана присутствием ингибиторов реакции, малым количеством красителя или неправильной постановкой реакции. HRM-анализ для таких образцов может приводить к низкому разрешению и плохому кластерингу.

6. Используйте одинаковые концентрации пост-амплификационных образцов

Минимизация вариаций между реакциями является критическим параметром, и использование одинаковой процедуры подготовки образцов минимизирует эту вариабельность. Поскольку концентрация фрагмента ДНК влияет на его температуру плавления, удостоверьтесь, что каждая реакция достигла плато амплификации. В непригодных для анализа реакциях плато может быть не достигнуто при том же количестве амплифицированного фрагмента из-за вариабельности в постановке реакций.

7. Обеспечьте однородность образцов

Образцы должны быть одинакового объема и с одинаковой концентрацией красителя. Характер плавления ДНК зависит от концентрации солей, поэтому концентрация Mg^{2+} и других солей должна быть максимально близкой в различных образцах.

8. Обеспечьте достаточное количество данных в областях до и после T_m .

Для облегчения интерпретации данных и получения результатов с высокой повторяемостью необходимо обеспечить сбор достаточного количества данных в стационарных фазах. Это легко достигается сбором данных для HRM-анализа в окне $10^{\circ}C$ или более, центр которого находится в точке наблюдаемой температуры плавления T_m амплифицируемого фрагмента.

Совместимость красителей

Интеркаляционные красители третьего поколения, такие как EvaGreen, LCGreen и SYTO9, успешно используются для анализа плавления с высоким разрешением. Эти красители малотоксичны и могут использоваться в более высоких концентрациях в реакциях ПЦР в реальном времени. Использование этих красителей в более высоких концентрациях позволяет достичь более полного насыщения ими двухцепочечной ДНК и уменьшить динамическое перераспределение красителя в неденатурированные области ДНК при ее плавлении. Использование красителей третьего поколения также позволяет достичь более высокой чувствительности и разрешения в профиле плавления благодаря их высокому качеству.

ВНИМАНИЕ! SsoFast EvaGreen supermix не может быть использована для бисульфитно-конвертированной ДНК для анализа метилирования.

HRM-анализ в литературе

Для более полной информации о HRM-анализе смотри в следующие ссылки.

Основы технологии

- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. (2003) High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 49(6):853-60.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. (2004) Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 50(7):1156-64.

Современные методы

- Seipp MT, Durtschi JD, Liew MA, Williams J, Damjanovich K, Pont-Kingdon G, Lyon E, Voelkerding KV, Wittwer CT. (2007) Unlabeled oligonucleotides as internal temperature controls for genotyping by amplicon melting. *J Mol Diagn.* 9(3):284-9.
- Dames S, Margraf RL, Pattison DC, Wittwer CT, Voelkerding KV. (2007) Characterization of aberrant melting peaks in unlabeled probe assays. *J Mol Diagn.* 9(3):290-6.

Онкология (гетерозиготные доминантные мутации и аллельные фракции)

- Margraf RL, Mao R, Wittwer CT. (2008) Rapid Diagnosis of MEN2B Using Unlabeled Probe Melting Analysis and the LightCycler 480 Instrument. *J Mol Diagn.* 10(2):123-8.
- Willmore-Payne C, Holden JA, Chadwick BE, Layfield LJ. (2006) Detection of c-kit exons 11- and 17-activating mutations in testicular seminomas by high resolution melting amplicon analysis. *Mod Path.* 19(9):1164-9.

Инфекционные болезни (гаплоидные геномы)

- Dames S, Pattison DC, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. (2007) Unlabeled probes for the detection and typing of herpes simplex virus. *Clin Chem.* 53(10):1847-54.
- Slinger R, Bellfooy D, Desjardins M, Chan F (2007) High-resolution melting assay for the detection of gyrA mutations causing quinolone resistance in Salmonella enteric serovars Typhi and Paratyphi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:455-458.

HLA-типирование

- Zhou L, Vandersteen J, Wang L, Fuller T, Taylor M, Palais R, Wittwer CT. (2004) High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity. *Tissue Antigens.* 64(2):156-64.

Генотипирование наследственных болезней

- Poulson MD, Wittwer CT. (2007) Closed-tube genotyping of apolipoprotein E by isolated-probe PCR with multiple unlabeled probes and high-resolution DNA melting analysis. *Biotechniques.* 43(1):87-91.
- Seipp MT, Pattison D, Durtschi JD, Jama M, Voelkerding KV, Wittwer CT. (2008) Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting. *Clin Chem.* 54(1):108-15.

Поиск мутаций, ассоциированных с генетическими расстройствами

- Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L. (2007) Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem.* 53(11):1891-8.

- McKinney JT, Longo N, Hahn SH, Matern D, Rinaldo P, Strauss AW, Dobrowolski SF. (2004) Rapid, comprehensive screening of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Genet Metab.* 82(2):112-20.
- Dobrowolski SF, McKinney JT, Amatdi San Filippo C, GiakSim K, Wilcken B, Longo N. (2005) Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene. *Hum Mutat.* 25(3):306-13.

Цитированная литература

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science.* 291: 1304-1351.

Глава 2. Программное обеспечение Precision Melt Analysis™

В этой главе изложена информация по установке программного обеспечения Precision Melt Analysis.

- Совместимость приборов (см. ниже)
- Компоненты программного обеспечения Precision Melt Analysis (стр. 6)
- Установка программы (стр. 7)
- Защитный ключ (стр. 9)
- Калибровка плавления (стр. 9)

Совместимость приборов

Системы для ПЦР в реальном времени CFX96™ и CFX384™ могут использоваться в комбинации с программой Precision Melt Analysis для проведения HRM-анализа и характеристике образцов на основании длин последовательностей, содержания CG-пар и комплементарности ДНК. Программа Precision Melt Analysis может открывать только файлы данных, полученные в экспериментах на системах детекции ПЦР в реальном времени CFX96 или CFX384 с анализом в программе CFX Manager™. Файлы данных ПЦР в реальном времени (.pcrd), получаемые в программе CFX Manager, конвертируются в файлы плавления (.melt) при их открытии в программе Precision Melt Analysis.

ЗАМЕЧАНИЕ: При проведении анализа плавления высокого разрешения с использованием систем CFX96 или CFX384 используйте только режим **SYBR/FAM only** с выбором **SYBR** в качестве флуорофора.

ПОДСКАЗКА: Для получения оптимальных результатов плавления высокого разрешения используйте температурный инкремент 0.2°C между шагами (**Step**) и время задержки (**Hold time**) минимум 10 секунд в протоколе кривой плавления.

Компоненты программного обеспечения Precision Melt Analysis

Комплект поставки программного обеспечения Precision Melt Analysis включает перечисленные ниже компоненты. Если какие-либо из перечисленных ниже компонентов отсутствуют или повреждены, свяжитесь с Вашим локальным представителем Bio-Rad.

- Компакт-диск с программой Precision Melt Analysis
- Два защитных (HASP) ключа
- Руководство пользователя для программного обеспечения Precision Melt Analysis
- Краткий путеводитель по программе Precision Melt Analysis

Комплект поставки также включает набор для калибровки плавления (Melt Calibration Kit, кат. № 1845020), в который входят:

- Стандартная ДНК (Melt Calibration DNA standard)
- Праймера (Melt Calibration Primers)
- SsoFast EvaGreen supermix
- Инструкция набора Melt Calibration для программы Precision Melt Analysis.

Установка программного обеспечения

Программа Precision Melt Analysis предназначена для операционных систем Windows XP или Windows Vista. Таблица 4 содержит требования к системе для установки программы Precision Melt Analysis.

Таблица 4. Системные требования для программы Precision Melt Analysis.

Системные требования	Минимальные	Рекомендованные
Операционная система	Windows XP Professional SP2 или выше, Windows Vista Home Premium или выше	Windows XP Professional SP2 или выше, Windows Vista Home Premium или выше
Привод	CD-ROM	CD-ROM
Жесткий диск	10 Gb	20 Gb
Частота процессора	2.0 GHz	2.0 GHz
RAM	1 Gb (2 Gb для Windows Vista)	2 Gb
Монитор	1024 x 768, True color	1280 x 1024, True color
USB	Порт USB 2.0 High-Speed	Порт USB 2.0 High-Speed
Интернет-браузер	Internet Explorer	Internet Explorer
Программы		Microsoft Office Suite

ЗАМЕЧАНИЕ: Программные обеспечения Precision Melt Analysis и CFX Manager совместимы и могут быть установлены на одном компьютере.

Для установки программного обеспечения Precision Melt Analysis:

1. Программное обеспечение должно быть установлено на компьютер пользователем с правами администратора. Удостоверьтесь, что Вы вошли в систему с правами администратора.
2. Вставьте компакт-диск с программным обеспечением Precision Melt Analysis в CD-ROM. Появится окно установки программы (Рисунок 1).

ЗАМЕЧАНИЕ: Если экран установки программы не появился, дважды щелкните на пиктограмме CD-ROM (CD drive): **Bio-Rad Precision Melt Analysis**. Откройте файл **Readme.txt** и следуйте инструкциям в нем для установки программы вручную.

3. Щелкните **Next** в окне установки программы (Рисунок 1).

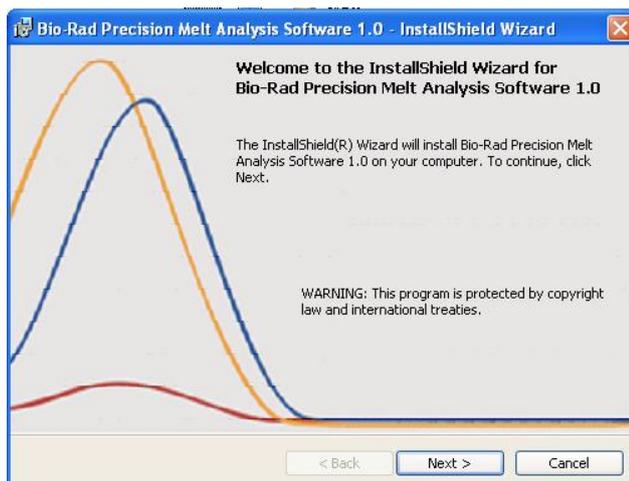


Рисунок 1. Окно установки программы.

4. Для установки программного обеспечения Вы должны принять условия лицензионного соглашения. Щелкните напротив соответствующего поля для принятия условий. Щелкните **Next** (Рисунок 2).

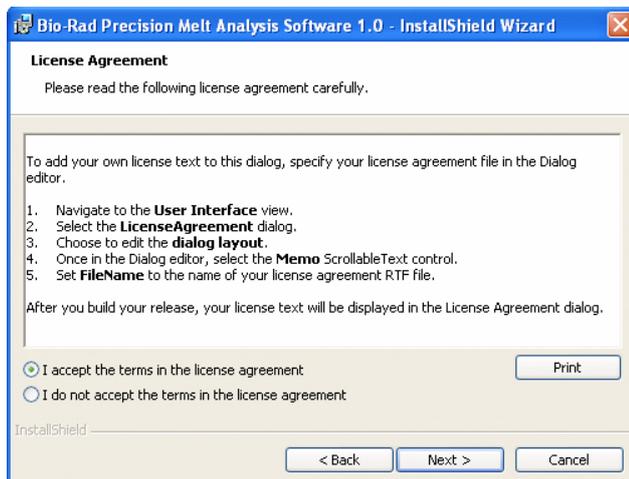


Рисунок 2. Условия лицензионного соглашения.

5. Щелкните **Next** для установки программы в указанную папку по умолчанию (Рисунок 3).

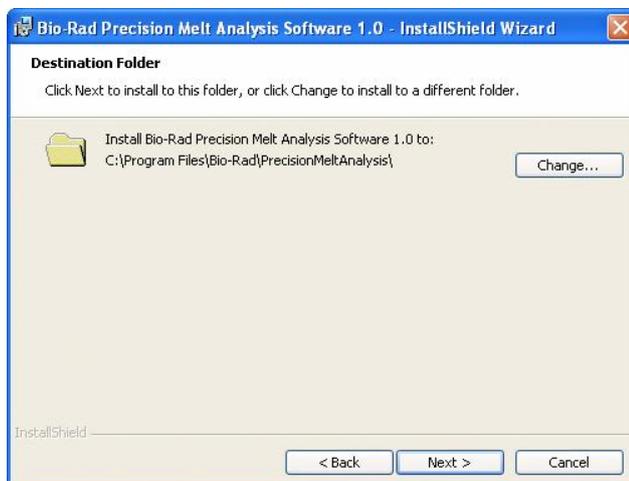


Рисунок 3. Название папки для установки программы.

6. Программа готова к началу установки. Щелкните **Install** для установки программы в указанную папку (Рисунок 4).

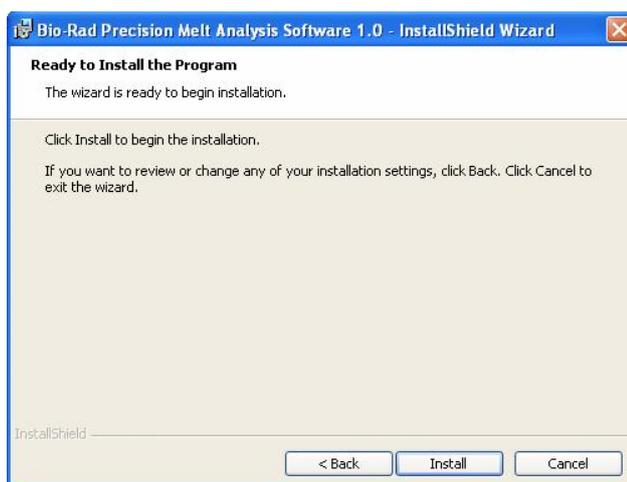


Рисунок 4. Установка программы.

7. По завершению установки, щелкните **Finish** для выхода из программы установки.
8. После установки на рабочем столе компьютера появится пиктограмма Bio-Rad Precision Melt Analysis (Рисунок 5).



Рисунок 5. Пиктограмма программы Precision Melt Analysis на рабочем столе.

ЗАМЕЧАНИЕ: Для удаления программы Precision Melt Analysis используйте функцию Windows **Add/Remove Programs**. Щелкните **Start (Пуск)**, выберите **Settings > Control Panel (Панель управления)**, дважды щелкните **Add/Remove Programs (Установки и удаление программ или Программы и компоненты)** и следуйте инструкциям для удаления программы.

Защитный ключ

Поставляемый защитный (HASP) ключ необходим для использования программы Precision Melt Analysis. Необходимо вставить ключ в USB-порт компьютера, прежде чем запустить программу.

ЗАМЕЧАНИЕ: При утере защитного ключа HASP обратитесь к Вашему локальному представителю компании Bio-Rad.

Калибровка плавления

Прежде, чем программа Precision Melt Analysis сможет проводить анализ данных, полученных с помощью систем ПЦР в реальном времени CFX96 или CFX384, необходимо провести калибровку плавления.

ЗАМЕЧАНИЕ: Калибровка плавления необходима вне зависимости от интеркалирующего красителя, который будет использоваться в экспериментах, включая SYBR™Green.

ПОДСКАЗКА: Следуйте инструкциям в **Melt Calibration Quick Guide** для приготовления планшета для калибровки плавления.

Приготовление планшета для калибровки плавления

Для приготовления планшета для калибровки плавления в Melt Calibration kit (1845020) входят следующие компоненты:

- **10016289.** Melt Calibration DNA Standard
- **10016273.** Melt Calibration primers
- **1725200.** SsoFast™ EvaGreen® supermix

Необходимые дополнительные материалы

В дополнение к поставляемым в составе набора компонентам, для проведения калибровки необходимы следующие материалы:

- Пробирки для проведения ПЦР и вода, свободная от нуклеаз
- **MSB-1001.** Адгезивная пленка Microseal® 'B', оптически прозрачная

Для калибровки системы CFX384:

- **HSP-3805.** Hard-Shell® 384-луночные планшеты (thin-wall, skirted, with clear shell and white wells), для использования с системой CFX384

Для калибровки системы CFX96:

MLL-9601. Multiplate™ 96-луночные планшеты (low-profile, unskirted, natural wells), для калибровки системы CFX96, или

MLL-9651. Multiplate™ 96-луночные планшеты (low-profile, unskirted, with white wells), для использования с системой CFX96

ВНИМАНИЕ! SsoFast EvaGreen supermix стабильна в течение 12 месяцев при хранении в морозильнике с постоянной температурой -20°C защищенной от света. Для удобства SsoFast EvaGreen supermix может храниться при 2-8°C до 6 месяцев. Не рекомендуется подвергать повторным замораживанию и оттаиванию.

Приготовление планшета для калибровки плавления

1. Добавьте необходимые объемы каждого компонента в пробирку подходящего объема (Таблица 5):

Таблица 5. Приготовление реакционной смеси для калибровки плавления.

Компонент	Объем (ul) для системы CFX96	Объем (ul) для системы CFX384
SsoFast™ EvaGreen® supermix	1200	2250
Melt Calibration DNA Standard	120	450
Melt Calibration primers	14.4	27
Вода для ПЦР	1065.6	1773
Всего	2400	4500

2. Закройте крышку пробирки и аккуратно смешайте компоненты реакции на вортексе.

3. Для того, чтобы собрать содержимое пробирки на ее дне и удалить пузырьки воздуха, коротко отцентрифугируйте пробирку.
4. Добавьте реакционную смесь в каждую лунку реакционного планшета:
 - Для системы CFX96, добавьте 20 ul в каждую лунку 96-луночного планшета.
 - Для системы CFX384, добавьте 10 ul в каждую лунку 384-луночного планшета.
5. Заклейте планшет адгезивной пленкой Microseal® 'B'. Отцентрифугируйте планшет для сбора компонентов на дне лунок планшета.

Постановка эксперимента для калибровки плавления

Эксперимент для калибровки плавления выполняется на системах для ПЦР в реальном времени CFX96 или CFX384 с использованием приготовленного планшета для калибровки плавления.

Для генерации файла с данными для калибровки плавления

1. Включите систему для ПЦР в реальном времени CFX96 или CFX384.
2. Дважды щелкните на пиктограмму программы CFX Manager на рабочем столе для ее запуска.
3. Выберите **Create a new experiment** из списка опций в окне **Startup Wizard**. Щелкните **OK** для запуска окна **Experimental Setup**.
4. В закладке **Protocol** выберите **Create New** для открытия редактора протоколов **Protocol Editor**.
5. Создайте следующий протокол (Таблица 6).

Таблица 6. Протокол для калибровки плавления.

Шаг цикла	Температура	Время	Число циклов
Активация фермента	98°C	2 мин.	1
Денатурация	98°C	5 сек.	40
Отжиг/Синтез	55°C	10 сек.	
	95°C	1 мин.	1
	55°C	1 мин.	1
Кривая плавления	70-95°C (с инкрементом в 0.2°C)	10 сек. / шаг	1

6. Щелкните **OK** для сохранения протокола и возвращения в окно **Experimental Setup**.

Или, щелкните на вкладке **Protocol**

Щелкните **Select Existing > Sample Files > Melt Calibration Folder** и выберите протокол

- Melt Calibration Protocol_96 для системы CFX96
 - Melt Calibration Protocol_384 для системы CFX384
7. Щелкните на вкладке **Plate**.
 8. Щелкните **Select Existing > Sample Files > Melt Calibration Folder** и выберите название планшета:

- Melt Calibration Plate_96 wells_Clear или Melt Calibration Plate_96 wells_White для системы CFX96
 - Melt Calibration Plate_384 wells_White для системы CFX384
9. Щелкните на вкладке **Start Run**.
 10. Выберите прибор в списке **Start Run on Selected Blocks** щелчком мыши слева от имени прибора.
 11. Щелкните **Open Lid** и загрузите планшет для калибровки плавления в прибор.
 12. Щелкните **Close Lid**.
 13. Щелкните **Start Run** для запуска программы.
 14. При запросе сохраните данные калибровки плавления как «**Melt Calibration_сегодняшняя дата**».
 15. Когда программа завершена, файл данных автоматически будет показан программой CFX Manager. Удостоверьтесь, что во всех лунках наблюдается схожая амплификация и единственный пик плавления (Рисунок 6).

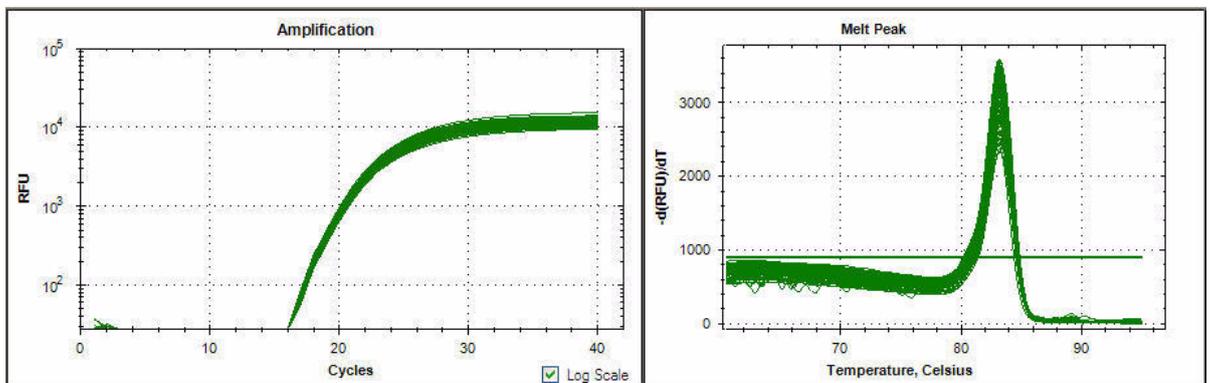


Рисунок 6. Данные калибровки плавления.

Импорт файла калибровки плавления

1. Запустите программу Precision Melt Analysis, для чего дважды щелкните на значке программы на рабочем столе.
2. Щелкните **Tools > Import Melt Calibration** в строке меню (Рисунок 7).

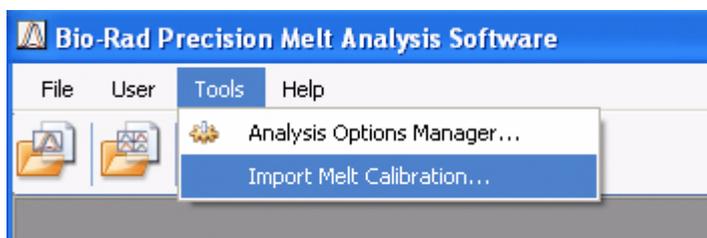


Рисунок 7. Импорт файла калибровки плавления.

3. Выберите файл данных, содержащий данные калибровки плавления (расширение .pcrd), и щелкните **Open**.
4. Появится окно подтверждения успешной калибровки плавления (Рисунок 8).

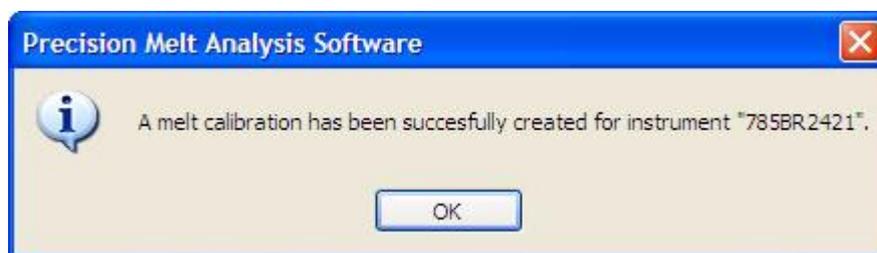


Рисунок 8. Успешная калибровка плавления.

5. Щелкните **OK** для продолжения и использования программы Precision Melt Analysis.

Глава 3. Знакомство с программой Precision Melt Analysis

В этой главе изложена информация, позволяющая начать работать с программой Precision Melt Analysis.

- Главное окно программы (см. ниже)
- **Startup Wizard** (стр. 17)
- Менеджер опций анализа **Analysis Options Manager** (стр. 17)
- Файлы программы (стр. 20)
- Инструменты помощи программы (стр. 20)
- Подсказки (стр. 20)

Главное окно программы

Программа Precision Melt Analysis обрабатывает файлы плавления (.melt) автоматически и открывает окно анализа данных **Data Analysis** для их просмотра. Окно имеет несколько вкладок, включая графический и табличный виды данных и описание лунок.

Перед запуском программы Precision Melt Analysis убедитесь, что защитный (HASP) ключ вставлен в компьютер, и дважды щелкните по значку программы на рабочем столе.

Вместо этого можно выбрать **Bio-Rad > Precision Melt Analysis** в директории **All Programs (Все программы)** меню Windows **Start (Пуск)**.

Начните работу в главном окне программы со знакомства со следующими возможностями (Рисунок 9):

- **Строка меню.** Позволяет выбирать команды программы (стр. 15), такие как создать или открыть файл
- **Панель инструментов.** Щелкните на соответствующей кнопке панели инструментов (стр. 16) для открытия файлов, запуска **Startup Wizard** (стр. 17) или окна менеджера опций анализа **Analysis Options Manager** (стр. 17)

- **Окно Startup Wizard.** Предоставляет доступ к общим командам программы (стр. 17)

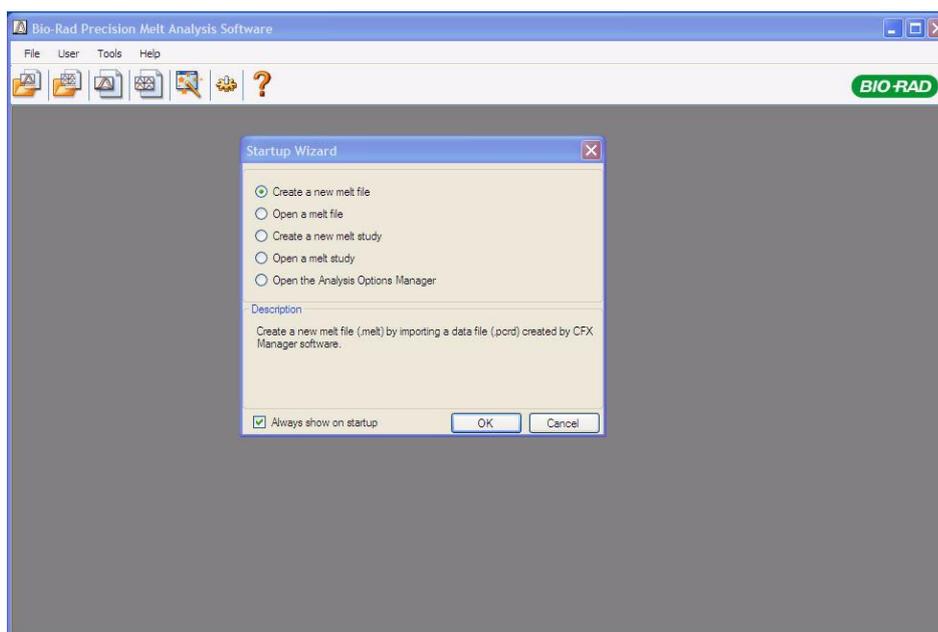


Рисунок 9. Главное окно программы.

Строка меню

Строка меню программы Precision Melt Analysis предоставляет доступ к функциям и командам, перечисленным в Таблице 7.

Таблица 7. Компоненты строки меню главного окна программы.

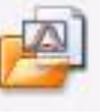
Компонент меню	Команда	Функция
File	New Melt File	Создает новый файл плавления (.melt) из файла данный программы CFX Manager (.pcrd)
	New Melt Study	Создает новый файл исследования плавления (.mlts)
	Open Melt File	Открывает существующий файл плавления (.melt)
	Open Melt Study File	Открывает существующий файл исследования плавления (.mlts)
	Recent Melt Files	Позволяет просмотреть список 10 последних открытых файлов плавления и выбрать файл для открытия в окне анализа данных Data Analysis
	Exit	Выйти из программы
Tools	Analysis Option Manager	Устанавливает параметры анализа
	Import Melt calibration	Импортирует файл данных калибровки плавления (.pcrd), полученный с использованием системы CFX96 или CFX384, для создания файла калибровки (.mcal)
Help	Contents	Открывает раздел помощи программы Help для поиска информации о работе с программой и ее инструментах
	Index	Показывает указатель раздела помощи Help
	Search	Поиск по разделу помощи Help
	About	Вызывает окно для просмотра информации о версии программы

Кнопки панели инструментов

Щелкните на панели инструментов главного окна программы (Таблица 8) для получения быстрого доступа к общим командам программы.

ЗАМЕЧАНИЕ: Для вызова или скрытия панели инструментов выберите **View > Toolbar** в строке меню.

Таблица 8. Кнопки панели инструментов главного окна программы.

Кнопка	Название	Функция
	Startup Wizard	Открывает окно Startup Wizard для выбора общих параметров программы
	Create a New Melt file	Импортирует файл данных системы CFX96 или CFX384 (расширение .prtd) для создания нового файла плавления (расширение .melt)
	Open a Melt file	Открывает окно браузера для выбора существующего файла плавления (расширение .melt) и его открытия в окне анализа данных Data Analysis
	Create a New Melt Study	Открывает окно анализа плавления Melt Study для создания нового анализа плавления
	Open a Melt Study	Открывает окно браузера для выбора существующего файла анализа плавления (расширение .mlts) и его открытия в окне анализа данных Data Analysis
	Analysis Options Manager	Открывает окно менеджера опций анализа Analysis Options Manager
	Help	Открывает раздел помощи программы Help для поиска информации о работе с программой и ее инструментах

Startup Wizard

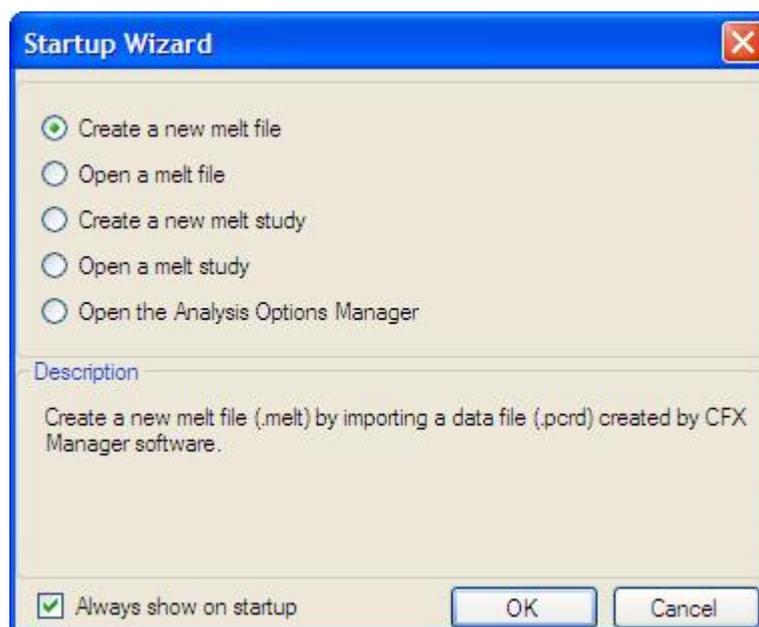


Рисунок 10. Окно Startup Wizard.

Окно **Startup Wizard** автоматически появляется при запуске программы Precision Melt Analysis (Рисунок 10). Если окно не появилось, щелкните **Startup Wizard** в панели инструментов программы.

Опции **Startup Wizard** включают следующее:

- **Create a new melt file (Создать новый файл плавления).** Создает новый файл плавления (.melt), импортируя файл данных (.pcrd), созданный программой CFX Manager
- **Open a melt file (Открыть файл плавления).** Открывает файл плавления для анализа
- **Create a new melt study (Создать новое исследование плавления).** Создает новый файл исследования плавления для анализа результатов нескольких файлов плавления
- **Open a melt study (Открыть исследование плавления).** Открывает файл исследования плавления (.mlts) для проведения анализа
- **Open the Analysis Options Manager (Открыть Analysis Options Manager).** Открывает окно менеджера опций анализа **Analysis Options Manager** для просмотра или модификаций параметров анализа

Менеджер опций анализа Analysis Options Manager

При анализе файлов плавления программа Precision Melt Analysis придерживается заданных параметров. Для изменения этих параметров откройте окно менеджера опций анализа **Analysis Options Manager** (Рисунок 11), используя один из следующих способов:

- Щелкните **Analysis Options Manager** в панели инструментов программы

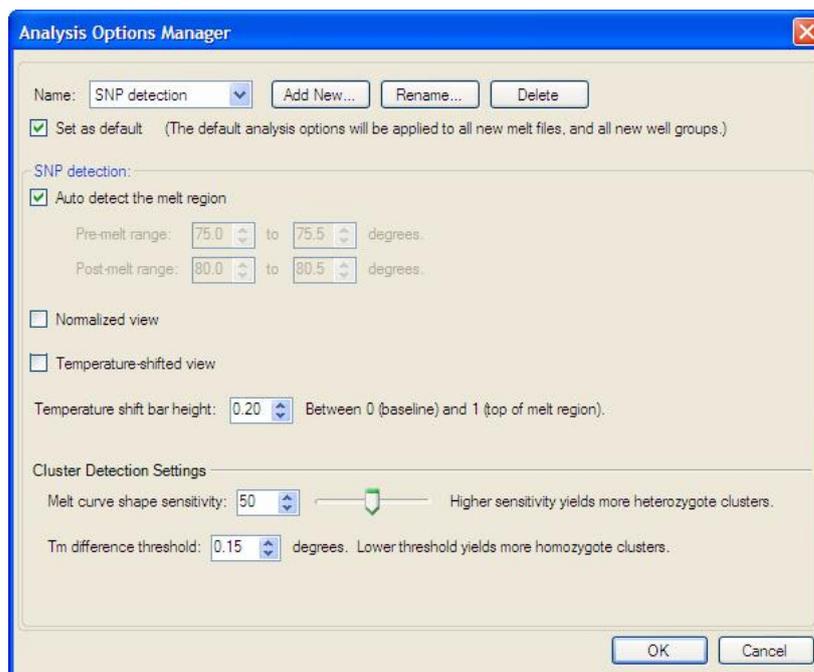


Рисунок 11. Окно Analysis Options Manager.

- Выберите **Tools > Analysis Options Manager** в строке меню главного окна программы

Параметры профиля анализа плавления

Используйте менеджер опций анализа **Analysis Options Manager** для выбора параметров анализа файла плавления в окне анализа данных **Data Analysis**. Пользовательские параметры анализа могут быть сохранены и применяться для анализа различных файлов плавления. Имя текущего профиля параметров анализа показано в выпадающем меню **Name**. На Рисунке 11 показано имя **SNP Detection**. Отметьте поле **Set as default (Использовать по умолчанию)** для применения этих параметров анализа к новым фалам плавления и группам лунок.

Для создания нового профиля параметров анализа:

1. Установите параметры анализа, отмечая соответствующие поля или вводя желаемые значения в текстовых полях в окне **Analysis Options Manager**.
2. Щелкните **Add New**.
3. Введите имя в окне запроса.
4. Щелкните **OK**.

Для переименования профиля параметров анализа:

1. Выберите имя профиля анализа из выпадающего меню **Name**.
2. Щелкните **Rename**.
3. Введите новое имя в окне запроса.
4. Щелкните **OK**.

Для удаления профиля параметров анализа:

1. Выберите имя профиля анализа из выпадающего меню **Name**.
2. Щелкните **Delete**.

Опции анализа

Используйте окно менеджера опций анализа **Analysis Options Manager** для выбора параметров для анализируемого файла плавления.

Auto detect the melt region (Автоматическая детекция области плавления). Выберите эту опцию для автоматического выбора программой областей до и после плавления. Для идентификации этих областей вручную снимите флажок выбора этой опции и введите значения температур в текстовых полях, или используя стрелки вверх-вниз.

Normalized view (Нормализованный вид). Выберите для открытия файла плавления с кривой плавления, показываемой в нормализованном виде во вкладке **Precision Melt**.

Temperature shifted view (Вид со сдвигом температуры). Выберите для открытия файла плавления с температурным сдвигом, примененным к каждой нормализованной кривой флуоресценции по оси температуры (ось x).

Cluster Detection Settings (параметры детекции кластеров)

Задайте параметры детекции кластеров для определения строгости критерия, используемого при кластеринге кривых плавления.

Melt curve Shape Sensitivity (чувствительность к форме кривой плавления)

Чувствительность к форме кривой определяет строгость критерия, используемого при классификации кривых плавления для их отнесения к различным кластерам. Для повышения качества кластеринга увеличьте или уменьшите чувствительность кластеринга, основанного на форме кривой плавления. Введите численное значение или сдвиньте ползунок вправо или влево. Ввод меньшего процентного значения или перемещение ползунка влево уменьшает жесткость отбора и приводит к формированию более гетерогенных кластеров. Ввод большего процентного значения или перемещение ползунка вправо увеличивает жесткость отбора и приводит к формированию менее гетерогенных кластеров.

При необходимости, вручную уменьшите чувствительность для исключения большого числа ложно-положительных точек. Высокое значение чувствительности обычно приводит к формированию большего числа групп, чем низкое значение. Для большинства приложений значение чувствительности к форме кривой при кластеринге, равное 50%, дает приемлемые результаты.

Tm difference Threshold (порог разницы Tm)

Порог разницы Tm задает наименьшее значение в разнице Tm между образцами, на основании которого программа будет относить образцы к различным кластерам. Задайте значение в градусах Цельсия, введя число от 0.05 до 1.00. Более низкие значения приводят к формированию менее гетерологичных кластеров.

При необходимости вручную увеличьте порог разницы Tm для исключения большого числа ложно-положительных точек. Для большинства приложений значение порога разницы Tm по умолчанию, составляющее 0.15 градусов Цельсия, дает приемлемые результаты.

Файлы программы

Программа Precision Melt Analysis использует для сохранения информации об эксперименте специальные форматы файлов (Таблица 9).

Таблица 9. Типы файлов программы Precision Melt Analysis.

Тип файла	Расширение	Как просмотреть и редактировать файл
Данные	.pcrd	Просмотр и редактирование в окне анализа данных Data Analysis
Плавление	.melt	Просмотр и редактирование в окне анализа данных Data Analysis
Калибровка	.mcal	Не может быть просмотрен
Исследование плавления	.mlts	Просмотр и редактирование в окне исследования плавления Melt Study

Инструменты помощи программы

В разделе помощи **Help** программы Precision Melt Analysis доступны следующие инструменты:

- Выберите вкладку поиска **Search** или указателя **Index** для поиска информации
- Откройте раздел **Glossary** для толкования терминов, используемых в программе. Для значений широко используемых терминов обратитесь к глоссариям по ПЦР
- Для многих окон программы, нажмите клавишу **F1** на клавиатуре для вызова справки по этому окну программы.
- Любую страницу раздела **Help** можно вывести на печать, щелкнув правой клавишей мыши и выбрав **Print (Печать)**.

Подсказки

Подсказки и особенности использования программы Precision Melt Analysis приведены ниже:

- Отрыть файл плавления или файл исследования плавления можно, перетащив его из папки в открытое окно программы
- Информацию многих окон программы можно отправить на печать или экспортировать, щелкнув правой кнопкой мыши на графике, таблице или кнопке выбора лунки
- Для изменения размера окна щелкните мышью на его границе и растяните
- Откройте окно **Preferences** для задания параметров по умолчанию, которые активируются при каждом запуске программы
- Для добавления файлов плавления в исследование плавления перетащите их из папки в открытое окно исследования плавления **Melt Study**
- Открывайте несколько файлов плавления и исследования плавления одновременно
- Щелкните **Settings** или **Tools** для доступа к дополнительным функциям

- Для просмотра всей информации, относящейся к одной лунке, из редактора планшета **Plate Editor**, дважды щелкните на лунке для открытия окна информации **Well Info**
- Щелкните правой клавишей мыши на любом графике или таблице для изменения их вида или опций анализа данных
- Выберите группу лунок для просмотра и анализа только этих лунок планшета. Выберите каждую группу лунок по имени в выпадающем меню **Well Group** панели инструментов

Глава 4. Обзор анализа данных

В этой главе изложена информация об анализе данных программы Precision Melt Analysis.

- Окно анализа данных **Data Analysis** (см. ниже)
- Селектор лунок (стр. 25)
- Графики (стр. 27)
- Таблицы (стр. 27)
- Просмотр групп лунок в окне анализа данных **Data Analysis** (стр. 28)
- Выбор номера шага (стр. 30)
- Исключение лунок из анализа (стр. 30)

Окно анализа данных **Data Analysis**

В ходе анализа данных изменение вида представления данных никогда не изменяет данные флуоресценции, полученные для каждой лунки во время реакции. Вы не можете удалить эти данные, однако можете исключить их из показа и анализа.

Используйте один из способов для открытия файла плавления в окне анализа данных **Data Analysis**:

- Перетащите файл плавления (расширение .melt) в главное окно программы
- Выберите **File > New > Melt File** в главном окне программы для выбора файла программы CFX Manager (.pcrd) в окне браузера Windows с его последующей конвертацией в файл плавления (.melt)
- Выберите **File > New > Melt File** в главном окне программы для выбора файла плавления в окне браузера Windows
- Выберите **File > Recent Files** для выбора из списка 10 последних открытых файлов плавления

В окне анализа данных **Data Analysis** данные представлены в форме графиков и таблиц для определенного метода анализа в одной из пяти вкладок (Рисунок 12).

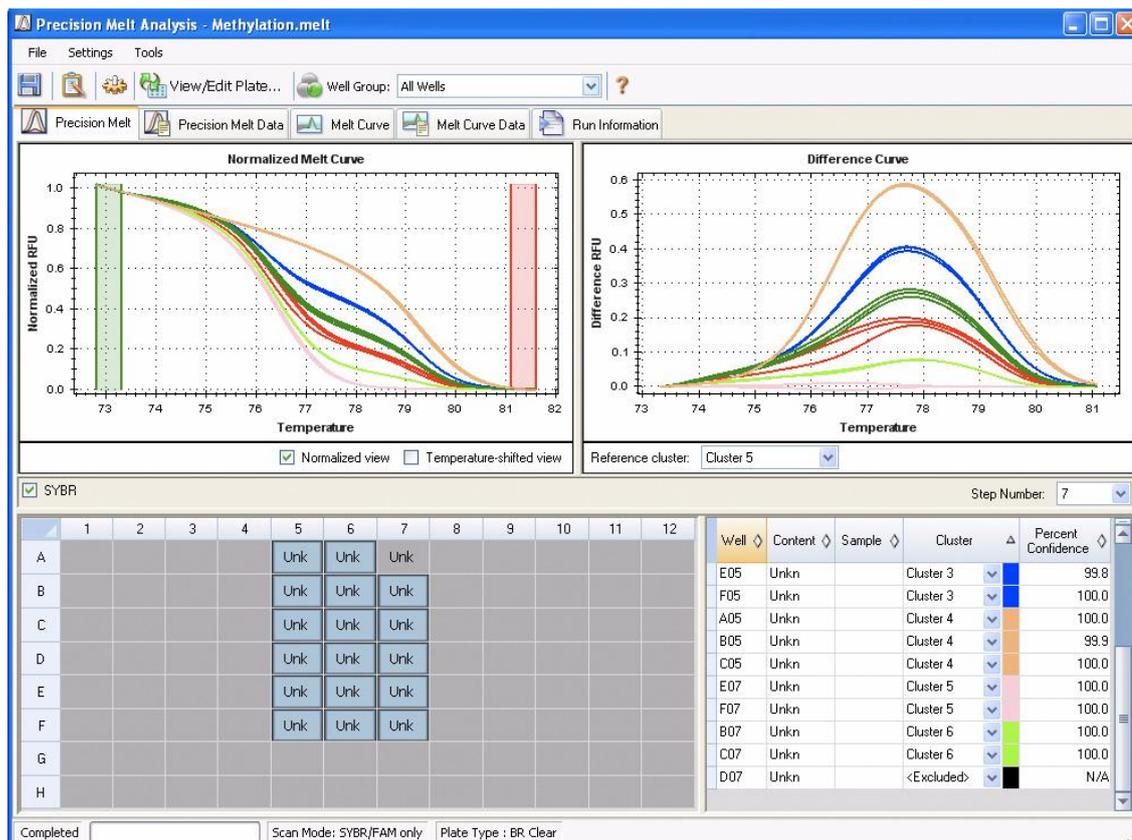


Рисунок 12. Вид вкладки Precision Melt.

Строка меню окна анализа данных

Строка меню окна **Data Analysis** включает следующие опции, перечисленные в Таблице 10.

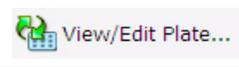
Таблица 10. Опции строки меню окна Data Analysis.

Компонент меню	Команда	Функция
File	Save	Сохраняет файл
	Save As	Сохраняет файл под новым именем
	Close	Закрывает окно анализа данных
Settings	View/Edit Plate	Открывает редактор планшета Plate Editor для просмотра или редактирования планшета
	Mouse Highlighting	Включает или выключает одновременное выделение данных указателем мыши ПОДСКАЗКА: Если Mouse Highlighting выключено, удерживайте кнопку Ctrl клавиатуры для временного включения функции выделения
Tools	Reports	Открывает отчет (Report) для текущего файла данных
	Replace Plate	Заменяет текущий файл планшета в анализе данных

Панель инструментов окна анализа данных

Панель инструментов окна анализа данных **Data Analysis** позволяет получить быстрый доступ к важным функциям анализа данных (Таблица 11).

Таблица 11. Панель инструментов окна анализа данных.

Кнопка панели	Название	Функция
	Save	Сохраняет текущий файл плавления
	Report	Открывает окно отчета Report для текущего файла плавления
	Analysis Options	Открывает окно параметров анализа Analysis Options для их просмотра и редактирования
	View/Edit Plate	Открывает окно редактора планшета Plate Editor для просмотра и редактирования содержания лунок
	Well Group...	Выбор имени группы лунок из выпадающего меню. Параметр по умолчанию – All Wells (Все лунки)
	Help	Открывает помощь программы Help для получения более подробной информации об анализе данных

Вкладки окна анализа данных

Окно анализа данных **Data Analysis** содержит пять вкладок (Рисунок 13). Каждая вкладка содержит данные в виде графиков и таблиц для определенного метода анализа с селектором лунок для выбора данных для просмотра. Окно **Data Analysis** открывается на вкладке **Precision Melt**.



Рисунок 13. Вкладки окна Data Analysis программы Precision Melt Analysis.

Во вкладках показываются данные для кривой плавления из одного эксперимента (протокол и файл планшета, выполненные на одном приборе).

Вкладка Precision Melt. Показывает данные плавления в четырех представлениях: график кривых плавления **Melt Chart**, график кривых различия **Difference Curve**, селектор лунок и таблица данных. Используйте данные этой вкладки для задания условий анализа, включая нормализацию и температурный сдвиг

Вкладка Precision Melt Data. Показывает таблицу данных в различных форматах: результаты (**Results**), графики (**Charts**), просмотр планшета (**Plate View**), первичные данные RFU (**Primary RFU**), нормализованные данные RFU (**Normalized RFU**), данные RFU различий (**Difference RFU**)

Вкладка Melt Curve. Показывает график кривых плавления, график пиков плавления, селектор лунок и таблицу с данными кривой плавления для каждой лунки. Используйте данные этой вкладки для определения температуры плавления (**T_m**) продуктов ПЦР

Вкладка Melt Curve Data. Показывает табулированные данные в различных форматах: пики плавления (**Melt Peaks**), планшет (**Plate**), амплификация (**Amplification**), **RFU** и **-d(RFU)/dT** (данные для пика плавления) в виде таблиц.

Вкладка Run Information. Показывает информацию об эксперименте, включая протокол, опционные заметки, опционный идентификатор (**ID**) и параметры входа пользователя в систему (Рисунок 14). Введите или отредактируйте данные идентификатора для эксперимента в поле **ID**. В разделе **Other** содержится информация о событиях, таких как сообщения об ошибках, которые могли произойти в ходе эксперимента.

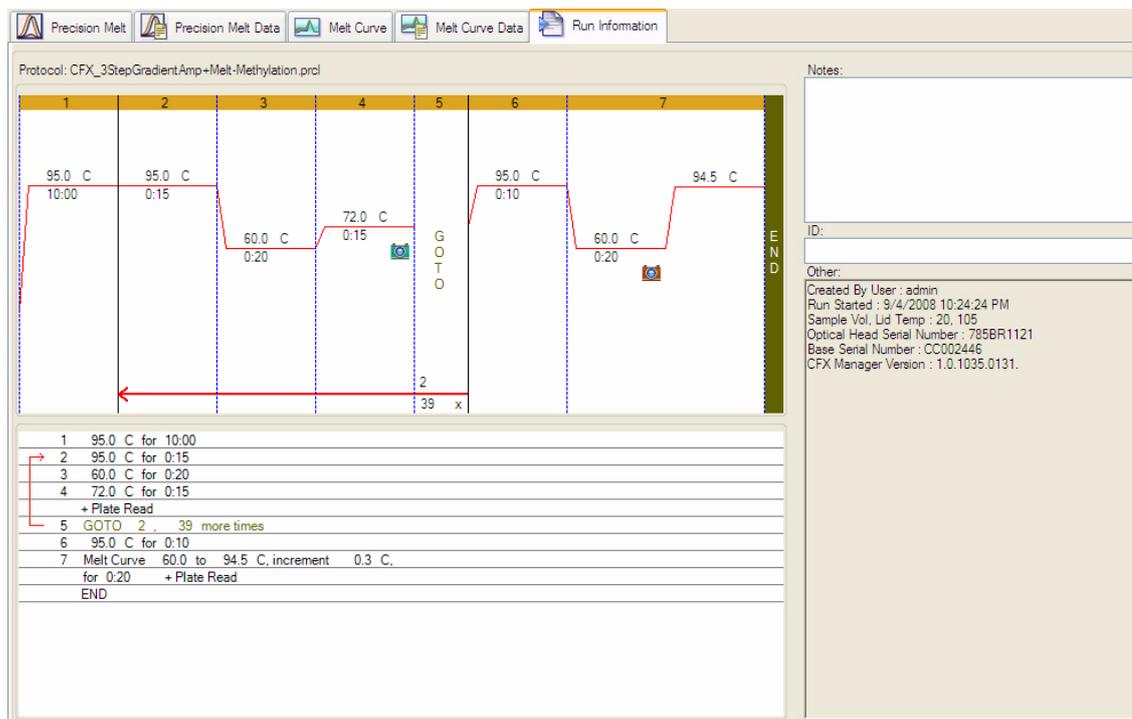


Рисунок 14. Вкладка Run Information окна Data Analysis.

ПОДСКАЗКА: Щелкните правой кнопкой мыши на любом графике, таблице или селекторе лунок для вызова дополнительных опций.

ПОДСКАЗКА: Щелкните **View/Edit Plate** чтобы открыть редактор планшетов **Plate Editor** и изменить содержание лунок.

ЗАМЕЧАНИЕ: Данные, показываемые в различных окнах, связаны между собой. Например, выделение лунки путем помещения на нее курсора мыши в селекторе лунок приведет к выделению данных, относящихся к этой лунке, во всех остальных вкладках.

Селектор лунок

Щелкните на лунку в селекторе лунок для показа или скрытия данных в графиках и таблицах во всех вкладках окна анализа данных **Data Analysis**.

- Для скрытия одной лунки, выделите ее и щелкните на ней. Для включения данных этой лунки снова выделите ее и щелкните на ней мышью
- Для скрытия нескольких лунок, щелкните и выберите мышью, растягивая область выбора. Для включения данных этих лунок снова щелкните и выберите их мышью

- Щелкните на верхнем левом угле планшета для скрытия всех лунок. Щелкните снова на верхнем левом угле планшета для показа данных
- Щелкните на начале ряда или колонки для их скрытия. Щелкните еще раз для включения показа данных лунок колонки или ряда

Только лунки с содержанием, введенным в редакторе планшета **Plate Editor**, могут быть выбраны в селекторе лунок. Как показано на Рисунке 15, селектор лунок может показывать три типа лунок:

- Выбранные и загруженные лунки (синий цвет): Данные по этим лункам показываются на графиках и в таблицах в окне **Data Analysis**
- Не выбранные и загруженные лунки (светло-серый цвет): Данные по этим лункам не показываются на графиках и в таблицах в окне **Data Analysis**
- Пустые лунки (темно-серый цвет): эти лунки не описаны в редакторе планшета **Plate Editor**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk											
B	Unk											
C	Unk											
D	Unk											
E	Unk											
F	Unk											
G	Unk											
H	Unk											

Рисунок 15. В селекторе лунок могут присутствовать лунки различного цвета.

Пункты меню селектора лунок при его вызове правой кнопкой мыши

Щелкните правой кнопкой мыши в любом месте изображения селектора лунок для выбора опций, приведенных в Таблице 12.

Таблица 12. Пункты меню селектора лунок при его вызове правой кнопкой мыши.

Пункт меню	Функция
Copy	Копирует содержание лунки в буфер обмена, включая тип образца (Sample Type) и опционный параметр Replicate # (№ реплики)
Copy as Image	Копирует изображение селектора лунок как изображение
Print...	Вывод на печать изображения селектора лунок
Export to Excel...	Экспортирует данные планшета в таблицу Excel
Export to Text...	Экспортирует данные планшета как текстовый файл
Export to XML...	Экспортирует данные планшета как файл XML

Графики

Каждый график в окне **Data Analysis** показывает данные в различной форме и включает опции коррекции данных. Для увеличения области графика выберите область, щелкнув и растянув ее мышью. Программа изменит размер графика и сцентрирует его вид на выбранной области.

ПОДСКАЗКА: Для возврата к просмотру всего графика щелкните правой кнопкой мыши на графике и выберите **Set Scale to Default** из появившегося меню.

Пункты меню для графиков, вызываемых правой кнопкой мыши

Меню, вызываемое щелчком правой кнопки мыши, доступно для всех графиков. Некоторые из пунктов меню доступны для всех графиков и могут использоваться для изменения представления данных или простого экспорта данных графика (Таблица 13).

Таблица 13. Пункты меню для графиков, вызываемых правой кнопкой мыши.

Пункт меню	Функция
Copy	Копирует график в буфер обмена
Copy Image As...	Сохраняет изображение графика в выбранном формате. Выберите между форматами PNG (по умолчанию), GIF, JPG, TIF или BMP
Page Setup...	Просмотр и выбор параметров страницы перед печатью
Print...	Вывод на печать изображения графика
Show Point Values	Показывает значения для точек при наведении на них курсором мыши
Set Scale to Default	Возвращает к виду графика по умолчанию после увеличения
Chart Options...	Открывает окно опций графика Chart Options для внесения изменений в график, включая название графика, выбор лимитов по осям x и y, показ сетки и дополнительных делений на осях

Таблицы

Таблицы, показываемые в окне **Data Analysis**, включают опции для сортировки и переноса данных в другие программы. Для сортировки колонок используется один из следующих методов:

- Щелкните и перетащите колонку на новое место в выбранной таблице
- Щелкните на заголовке колонки для сортировки данных по нисходящей или по восходящей

Для сортировки до трех колонок данных в окне **Sort** выполните следующее:

1. Щелкните на таблице правой кнопкой мыши для вызова меню и выберите **Sort**.
2. В окне **Sort** выберите название первой колонки для сортировки. Отсортируйте данные по восходящей (**Ascending**) или по нисходящей (**Descending**)
3. Выберите название более чем одной колонки посредством выбора названий колонок в выпадающем меню. Выберите **Ascending** или **Descending** для сортировки данных по восходящей или по нисходящей
4. Щелкните **OK** для сортировки данных или выберите **Cancel** для отмены.

Для выделения данных в таблице и селекторе лунок удерживайте курсор мыши на ячейке таблицы. При щелчке на ячейке возможно копирование ее содержимого, используя **CTRL-C**, с последующей вставкой в другой программе, используя **CTRL-V**.

Пункты меню для таблиц, вызываемых правой кнопкой мыши

Щелкните правой кнопкой мыши на любом месте таблицы для выбора пунктов меню, показанных в Таблице 14.

Таблица 14. Пункты меню для таблиц, вызываемые правой кнопкой мыши.

Пункт меню	Функция
Copy	Копирует содержание выбранных лунок в буфер обмена, которое может быть вставлено в таблицы других форматов, например, Excel
Copy as Image	Копирует таблицу как изображение которое может быть вставлено в файлы, допускающие графическую информацию, например, в текст, изображение или таблицу
Print...	Выводит на печать текущий вид
Print Selection...	Выводит на печать выбранные ячейки
Export to Excel...	Экспортирует данные в таблицу Excel
Export to Text...	Экспортирует данные в текстовый редактор
Export to XML...	Экспортирует данные как файл XML
Export to Html...	Экспортирует данные как файл Html
Find...	Текстовый поиск по таблице
Sort...	Сортировка данных (до трех колонок)

Просмотр групп лунок в окне анализа данных **Data Analysis**

Лунки планшета могут быть сгруппированы для индивидуального анализа групп лунок. Когда создаются группы лунок в окне менеджера групп лунок **Well Groups Manager**, названия групп появляются в окне **Data Analysis** в списке групп лунок **Well Groups** в панели инструментов.

ПОДСКАЗКА: Для вызова редактора лунок **Plate Editor**, щелкните **View/Edit Plate** в панели инструментов окна **Data Analysis**.

По умолчанию при открытии окна **Data Analysis** выбрана группа лунок **All Wells** (все лунки) с показом данных для всех лунок на графиках и в таблицах.

На Рисунке 16 показан выбор группы **Group 1** в меню **Well Groups**. Только лунки из этой группы показываются в селекторе лунок, и только данные для этих лунок включаются в расчеты при анализе данных.

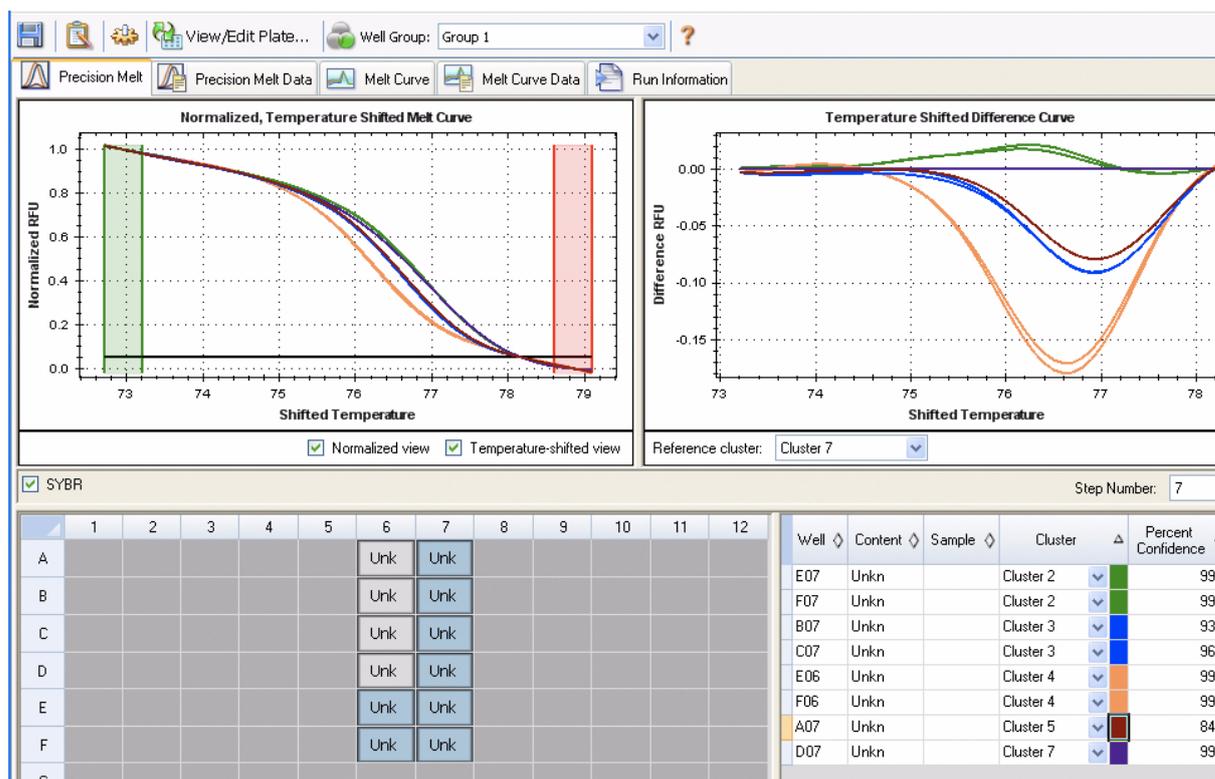


Рисунок 16. Окно Data Analysis при выборе группы лунок Group 1.

Менеджер групп лунок Well Groups Manager

Создайте группы лунок в менеджере групп лунок **Well Groups Manager** для независимого анализа наборов лунок на одном планшете в окне **Data Analysis**. Например, создайте группы для анализа нескольких экспериментов, поставленных на одном планшете. Также можно провести анализ одних и тех же лунок с различными параметрами анализа.

Для вызова менеджера групп лунок откройте редактор планшета **Plate Editor** и щелкните **Well Groups** на панели инструментов (Рисунок 17).

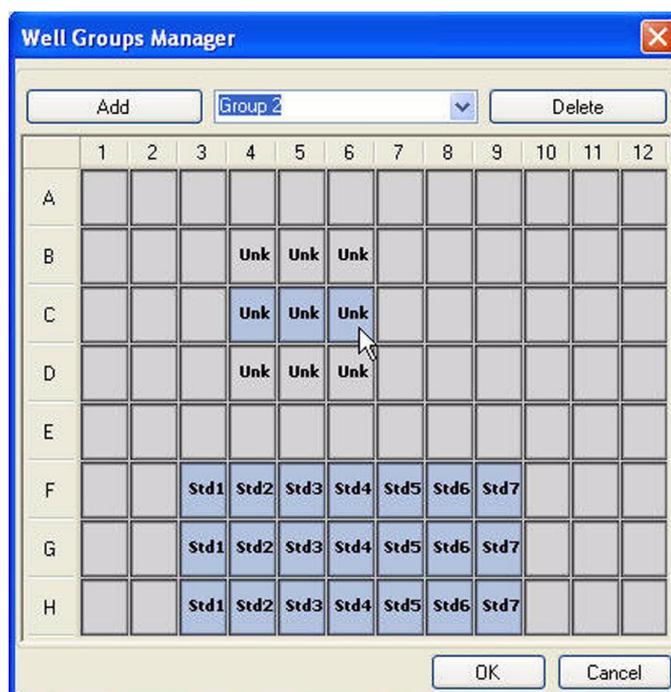


Рисунок 17. Окно Well Groups Manager.

Для создания групп лунок в **Well Groups Manager** следуйте этим инструкциям:

1. Щелкните **Add** для создания новой группы. В выпадающем меню показано имя группы как **Group 1** для первой группы.
2. Выберите лунки, которые составят группу, на изображении планшета. Лунки, входящие в группу, показаны синим цветом, а лунки, не входящие в группу – светло-серым. Для добавления лунок щелкните на лунке, которую необходимо добавить. Для удаления лунки из группы еще раз щелкните на ней. Для добавления или удаления группы лунок щелкните и выделите мышью группу лунок.
3. Создайте остальные группы, повторяя шаги 1 и 2.
4. Для просмотра групп лунок выберите ее имя из выпадающего списка.
5. (Опция) Для изменения имени группы выберите имя группы в выпадающем списке и введите новое имя.
6. (Опция) Для удаления группы выберите имя группы в выпадающем списке и щелкните **Delete**.
7. Щелкните **OK** для завершения и закрытия окна, или щелкните **Cancel** для закрытия окна без внесения изменений.
8. После создания групп их список в окне **Data Analysis** содержится в выпадающем меню **Well Group**.

Выбор номера шага

Системы CFX96 и CFX384 могут получать данные флуоресценции на нескольких шагах протокола. Программное обеспечение запоминает данные, полученные на каждом шаге, независимо друг от друга. Программа Precision Melt Analysis показывает селектор **Step Number** под графиком **Difference Curve** во вкладке **Precision Melt**, если протокол содержит более одного шага сбора данных кривой плавления. При выборе шага этот параметр применяется ко всем данным, показываемым в окне **Data Analysis**. На Рисунке 18 показано, что номер шага сбора данных 7.



Рисунок 18. Выбор номера шага Step Number в окне Data Analysis.

Исключение лунок из анализа

Используйте одну из нескольких опций для временного исключения лунок из анализа.

Исключение единичной лунки из анализа с помощью щелчка правой клавишей мыши.

1. Щелкните правой клавишей мыши в селекторе лунок, на кривой флуоресценции на любом графике или на данных лунки в таблице.
2. Выберите **Exclude Well B7 from Analysis** в опциях меню (Рисунок 19).
3. Исключенные лунки окрашены в темно-серый цвет в селекторе лунок с содержанием лунки, остающимся в ней.

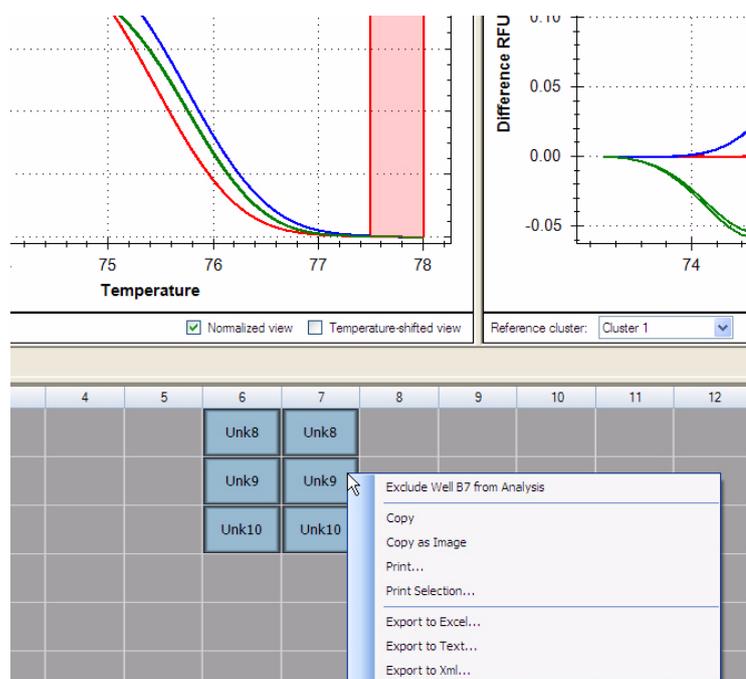


Рисунок 19. Исключение лунки из анализа с помощью щелчка правой клавишей мыши.

4. Отмените выбор опции **Exclude Well from Analysis** в меню, вызываемом щелчком правой клавиши мыши, для возврата лунки в анализ.

Опция редактора планшета Plate Editor для исключения нескольких лунок.

1. Выберите **View/Edit Plate** в панели инструментов окна **Data Analysis**.
2. Выберите одну или несколько лунок в селекторе лунок.
3. Щелкните **Exclude Wells in Analysis** (Рисунок 20) для исключения выбранных лунок. Это поле находится под управляющими кнопками редактора планшета в правой части окна.



Рисунок 20. Поле Exclude Wells in Analysis.

4	5	6	7
Unk-1	Unk-1	*Unk-8	*Unk-8
SYBR	SYBR	SYBR	SYBR
WT	WT	H c/t	H c/t
Unk-2	Unk-2	*Unk-9	*Unk-9
SYBR	SYBR	SYBR	SYBR
OMO mut	OMO mut	C c/c	C c/c
Unk-3	Unk-3	*Unk-10	*Unk-10
SYBR	SYBR	SYBR	SYBR
Het	Het	A t/t	A t/t
Unk-4	Unk-4	*NTC	*NTC
SYBR	SYBR	SYBR	SYBR
C1	C1		

Рисунок 21. Исключенные лунки (помечены *) в редакторе планшета Plate Editor.

На Рисунке 21 несколько лунок исключены из анализа в редакторе планшета **Plate Editor**. Исключенные лунки отмечены звездочкой (*) и окрашены в серый цвет.

В качестве альтернативы, для перманентного исключения лунок из анализа очистите содержание лунок в редакторе планшета **Plate Editor**, щелкнув **Clear Wells**.

ВНИМАНИЕ! Вам придется вновь вводить содержание лунок, которые были очищены.

Глава 5. Анализ данных плавления

В этой главе изложена информация по анализу данных плавления в программе Precision Melt Analysis.

Обработка данных плавления (см. ниже)

Вкладка **Precision Melt** (стр. 34)

Вкладка **Precision Melt Data** (стр. 42)

Вкладка **Melt Curve** (стр. 47)

Вкладка **Melt Curve Data** (стр. 49)

Обработка данных плавления

Программы Precision Melt Analysis строит график зависимости относительной флуоресценции (**RFU**), полученной во время плавления, от температуры. Программа автоматически начинает с первичных данных кривой плавления и далее выполняет следующие действия:

- **Детекция негативных лунок.** Все лунки с обозначением типа образца **NTC** или **Negative Control** (негативный контроль) в редакторе планшета автоматически считаются негативными. Любая лунка с низким начальным RFU также считается негативной. Все лунки, считающиеся негативными, автоматически исключаются из анализа

ЗАМЕЧАНИЕ: Автоматически присвоенный негативный статус лунок может быть изменен путем включения или исключения лунок из анализа кластеров. Это может быть сделано щелчком правой клавишей мыши на данных лунки на любом графике или через выпадающее меню для лунки в таблице данных

ПОДСКАЗКА: Процедура может быть проведена для нескольких лунок сразу, для чего, удерживая клавишу мыши, выберите лунки

- **Нормализация RFU.** Все ненегативные лунки нормализуются по оси RFU (ось y) таким образом, что средняя флуоресценция в области до плавления равна единице, а в области после плавления – 0.
- **Кластеризация.** Программа Precision Melt Analysis автоматически проводит кластеризацию для всех ненегативных лунок
- **Построение кривых различий Difference Curve.** Для облегчения визуальной идентификации кластеров программа генерирует график кривых различий **Difference Curve** на основании данных. Кривая различий показывает разницу между флуоресценцией в лунке и флуоресценцией кривой сравнения. Кривая сравнения получается путем усреднения флуоресценции всех кривых в выбранном кластере сравнения

Вкладка Precision Melt

Используйте данные вкладки **Precision Melt** для задания условий анализа, включая нормализацию и, если требуется, температурный сдвиг. Во вкладке **Precision Melt** данные выводятся в четырех полях (Рисунок 22):

- **График кривых плавления Melt Curve.** Показывает зависимость RFU от температуры для каждой лунки. Каждая кривая представляет данные по одному флуорофору в одной лунке
- **График кривых различий Difference Curve.** Показывает RFU различия (**Difference RFU**), отложенные по оси y, в зависимости от температуры, отложенной по оси x
- **Селектор лунок.** Позволяет выбрать данные для показа
- **Таблица.** В таблице показаны данные для выбранных лунок

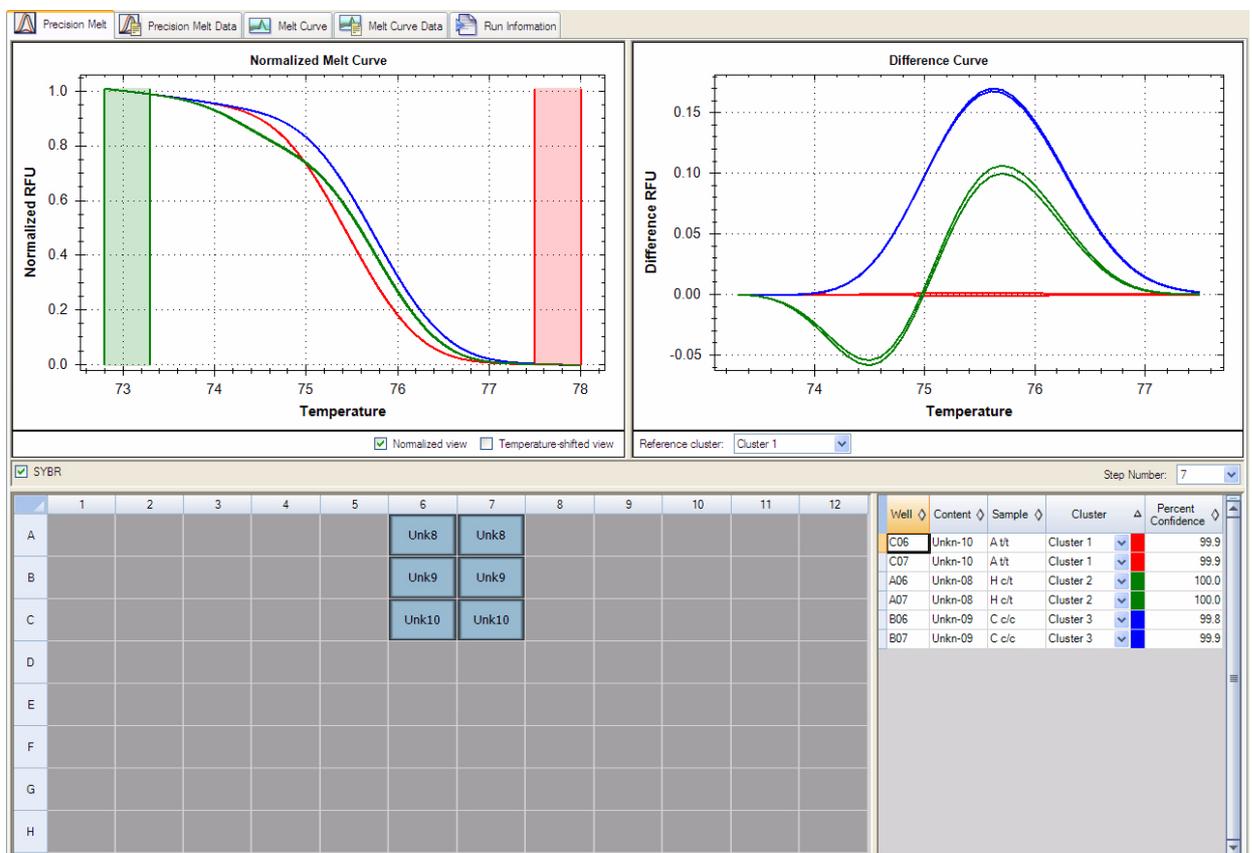


Рисунок 22. Вид вкладки Precision Melt окна Data Analysis.

ЗАМЕЧАНИЕ: Если протокол включает более одного шага сбора данных (пиктограмма камеры), выберите шаг, для которого будут показаны данные, в меню **Step Number** под графиком кривых различий **Difference Curve**.

График кривых плавления Melt Curve

График кривых плавления **Melt Curve** показывает значения RFU в зависимости от температуры для каждой лунки. График кривых плавления **Melt Curve** содержит несколько опций показа данных.

- **Normalized view (Нормализованный вид).** Выберите **Normalized view** под графиком для просмотра нормализованных кривых плавления (Рисунок 23). Изменения вида показываемых данных не изменяет кластеринг данных.

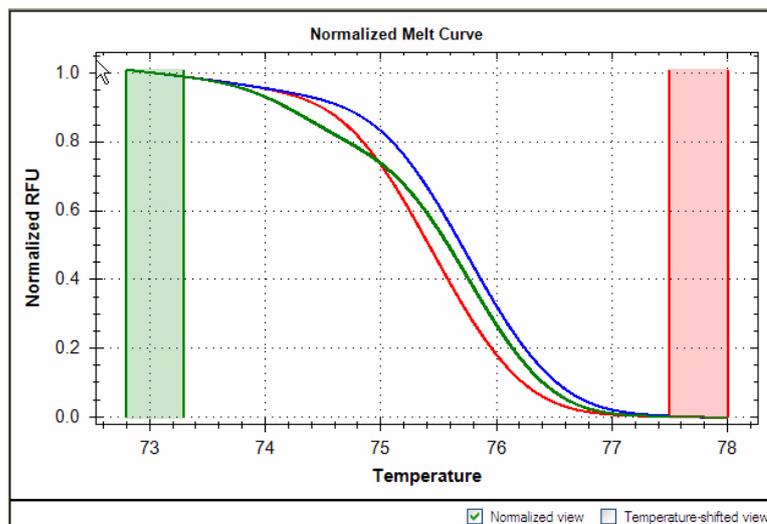


Рисунок 23. Опция **Normalized view** выбрана на графике **Melt Curves**.

- **Настройка областей до и после плавления.** Две пары настраиваемых вертикальных ползунков соответствуют области до (зеленая) и после (красная) плавления, как это показано на Рисунке 24. Область между ползунками является областью плавления.

Области до и после области плавления устанавливаются автоматически программой Precision Melt Analysis. Настройте области до и после плавления, двигая ползунки вправо или влево, для чего наведите курсор на линию и передвиньте ее, удерживая нажатой левую клавишу мыши.

ЗАМЕЧАНИЕ: Изменения температурных областей до и после плавления изменяет кластеринг данных.

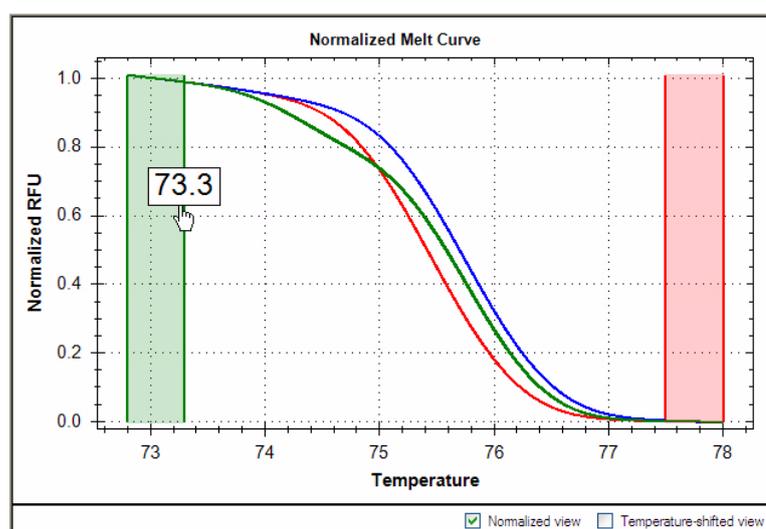


Рисунок 24. Области до и после плавления, выбранные на графике **Melt Curves**.

- **Temperature-shifted view (Вид с температурным сдвигом).** Выберите **Temperature-shifted view** для просмотра кривых плавления и кривых различий с температурным сдвигом (Рисунок 25). Высота черной линии температурного сдвига может быть изменена, для чего переместите ее с помощью мыши вверх или вниз на графике RFU. Высота линии температурного сдвига соответствует

значению по оси **Y**, при котором все кривые плавления пересекутся. Линия показывается только если выбрана опция **Temperature-shifted view**. Значение температурного сдвига по умолчанию задается в окне менеджера опций анализа **Analysis Options Manager**.

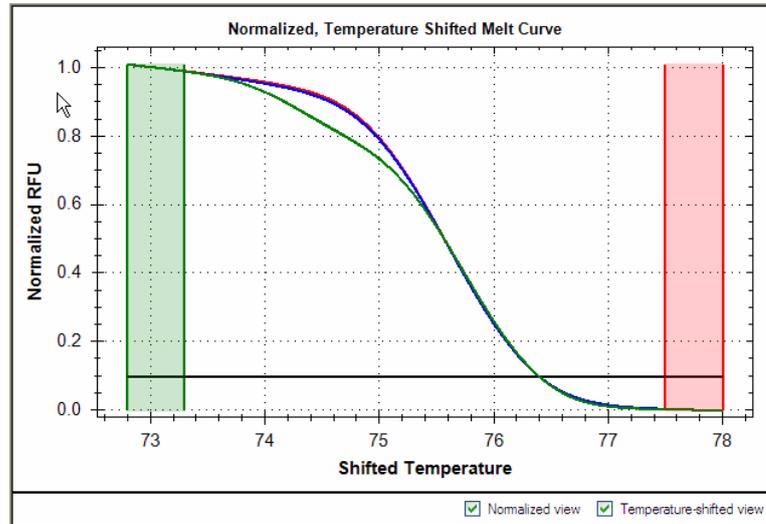


Рисунок 25. Опция Temperature-shifted view выбрана на графике Melt Curves.

ПОДСКАЗКА: Для увеличения любой области графика **Melt Chart** выберите область, щелкнув и растянув ее мышью. Для возврата к просмотру всего графика щелкните правой кнопкой мыши на графике и выберите **Set Scale to Default** из появившегося меню

График кривых различий **Difference Curve**

Для облегчения визуальной идентификации кластеров программа Precision Melt Analysis генерирует кривые различия для каждой лунки (Рисунок 26). График **Difference Curve** показывает различия во флуоресценции между лункой и референсной кривой. Референсная кривая вычисляется как средняя флуоресценция всех кривых для выбранного кластера сравнения. Кластер сравнения (**Reference cluster**) выбирается в меню **Reference cluster** внизу графика кривых различий.

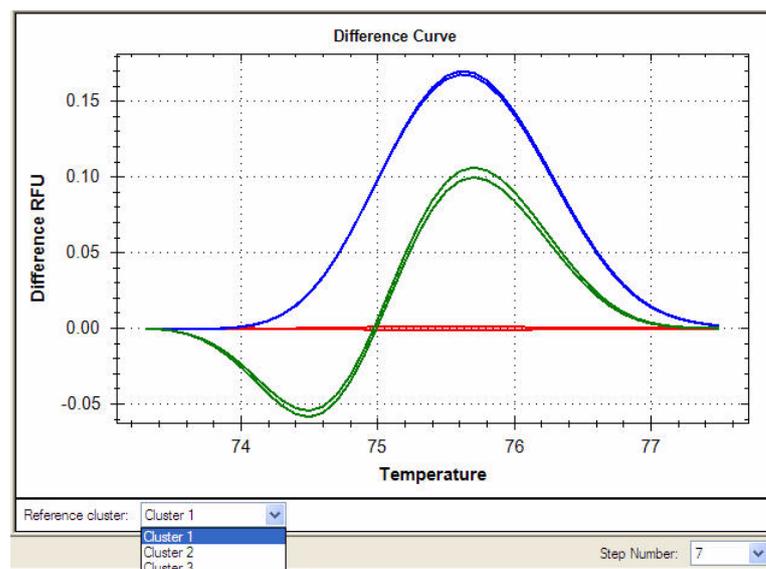


Рисунок 26. Выбор кластера сравнения.

Окно опций анализа Analysis Options

Выберите **Analysis Options** из панели инструментов окна **Data Analysis**. В окне опций анализа **Analysis Options** оптимизируйте результаты кластеринга, увеличивая или уменьшая строгость условий, используемых для классификации данных лунок по различным кластерам (Рисунок 27).

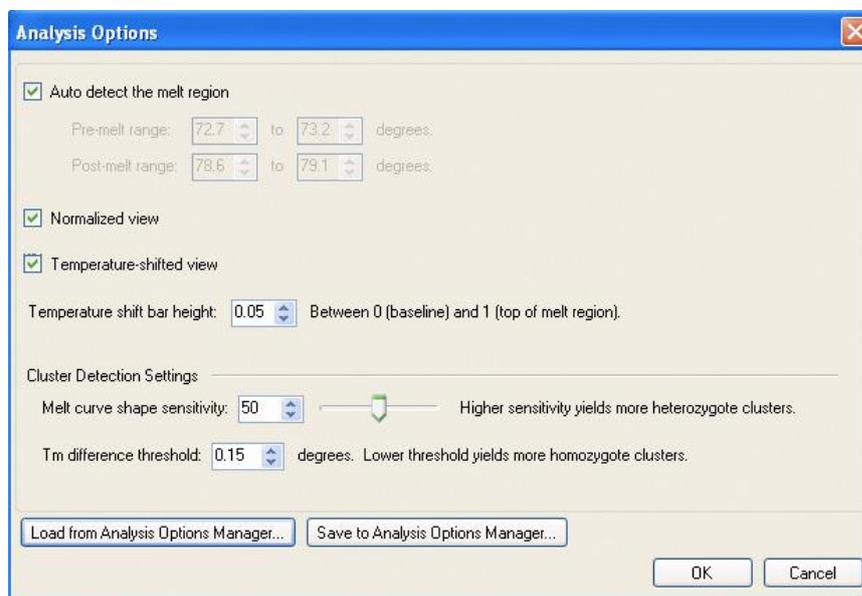


Рисунок 27. Окно менеджера опций анализа Analysis Options.

Выберите параметры для анализа данных файла плавления в окне **Data Analysis**. После изменения параметров щелкните **OK** для возврата в окно **Data Analysis** и применения сделанных изменений. Щелкните **Cancel** для закрытия окна **Analysis Options** без изменений текущих значений параметров.

- **Auto detect the melt region (Автоматическая детекция области плавления).** Выберите эту опцию для автоматического выбора программой областей до и после плавления. Для настройки этих областей вручную снимите флажок выбора этой опции и введите значения температур в текстовых полях или используя стрелки вверх-вниз
- **Normalized view (Нормализованный вид).** Выберите для открытия просмотра данных кривых плавления в нормализованном виде на графике **Melt Curve**
- **Temperature-shifted view (Вид со сдвигом температуры).** Выберите для применения температурного сдвига к каждой кривой нормализованной флуоресценции по оси температуры (ось x)
- **Temperature shift bar height (Высота линии температурного сдвига).** Задайте высоту линии температурного сдвига, вводя число между 0 (базисная линия) и 1 (верх области плавления). Для большинства приложений значение высоты линии температурного сдвига по умолчанию, равное 0.20, позволяет получить приемлемые результаты с кривыми плавления, кластеризующимися в плотные группы

Параметры детекции кластеров **Cluster Detection**

Задайте параметры детекции кластеров для определения строгости условий при кластеринге кривых плавления.

Melt curve Shape Sensitivity (чувствительность к форме кривой плавления)

Чувствительность к форме кривой определяет строгость критерия, используемого при классификации кривых плавления для отнесения к различным кластерам. Для повышения качества кластеринга увеличьте или уменьшите чувствительность кластеринга, основанного на форме кривой плавления. Введите численное значение или сдвиньте ползунок вправо или влево. Ввод меньшего процентного значения или перемещение ползунка влево уменьшает жесткость отбора и приводит к формированию более гетерогенных кластеров. Ввод большего процентного значения или перемещение ползунка вправо увеличивает жесткость отбора и приводит к формированию менее гетерогенных кластеров.

При необходимости вручную уменьшите чувствительность для исключения большого числа ложно-положительных точек. Высокое значение чувствительности обычно приводит к формированию большего числа групп, чем низкое значение. Для большинства приложений значение чувствительности к форме кривой при кластеринге, равное 50%, дает приемлемые результаты.

Tm difference Threshold (порог разницы Tm)

Порог разницы Tm задает наименьшее значение в разнице Tm между образцами, на основании которого программа будет относить образцы к различным кластерам. Задайте значение в градусах Цельсия, введя число от 0.05 до 1.00. Более низкие значения приводят к формированию менее гетерологичных кластеров.

При необходимости вручную увеличьте порог разницы Tm для исключения большого числа ложно-положительных точек. Для большинства приложений значение порога разницы Tm по умолчанию, составляющее 0.15 градусов Цельсия, дает приемлемые результаты.

Профили параметров анализа

Щелкните **Load from Analysis Options Manager (Загрузить из менеджера опций анализа)** для выбора ранее сохраненного профиля параметров анализа из окна **Load Analysis Options**. Щелкните **ОК** для применения параметров анализа.

Щелкните **Save to Analysis Options Manager (Сохранить в менеджере опций анализа)** для сохранения профиля текущих параметров анализа в менеджере опций анализа. Введите имя профиля параметров в текстовой строке в окне **Save Analysis Options** и щелкните **ОК**.

Формирование кластеров вручную

Щелкните правой клавишей мыши на кривой флуоресценции лунки на графике кривых плавления **Melt Curve** или графике кривых разницы **Difference Curve** для изменения ассоциации с кластером или изменения имени кластера (Рисунок 28).

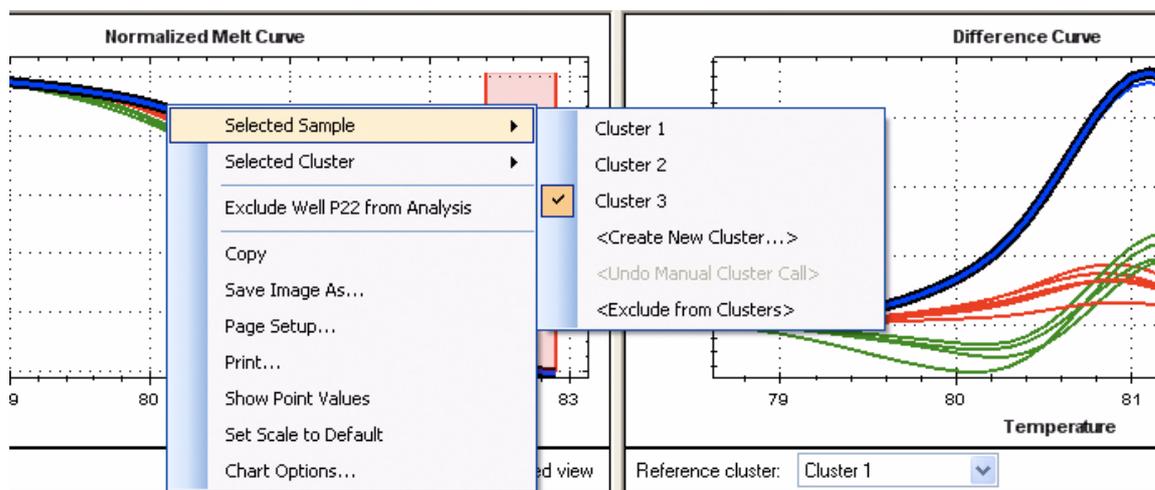


Рисунок 28. Изменение принадлежности к кластеру образца.

ЗАМЕЧАНИЕ: Процедура может быть проведена для нескольких лунок сразу, для чего, удерживая правую клавишу мыши, выберите лунки, растягивая область выбора.

Выберите опции из списка в меню выбранных образцов **Selected Sample**:

- Выберите кластер из списка имен кластеров для включения в него выбранных лунок.
- Выберите **<Create New Cluster>** (**Создать новый кластер**) для включения выбранных лунок в новый кластер. Введите имя нового кластера в окне **Name** и щелкните **ОК**.
- Если автоматическая сортировка лунок была отредактирована ранее, выберите **<Undo Manual Cluster>** (**Отменить формирование кластеров вручную**) для возврата к автоматическому формированию кластеров программой.
- Выберите **<Exclude from Clusters>** (**Исключить из кластеров**) для исключения выбранных образцов из анализа кластеров. Исключенные образцы показываются с пометкой **Excluded** в колонке **Cluster** в таблице данных (Рисунок 29). Исключенные образцы не отображаются на графике нормализованных кривых плавления и графике кривых различий. На графике ненормализованных кривых плавления они отображаются черным цветом. График ненормализованных кривых плавления показывается при отмене выбора поля **Normalized View**.
- Для включения обратно исключенных образцов выберите их на графике ненормализованных кривых плавления с помощью щелчка правой клавишей мыши для одного образца или выделением нескольких образцов мышью при ее нажатой правой клавише, и щелкните **<Include in Clusters>** (**Включить в кластеры**) в выпадающем меню.

Well	Content	Sample	Cluster	Percent Confidence
N23	Unkn-2	Hom 2	<Excluded>	N/A
P22	Unkn-1	Hom 1	Cluster 3	99.7
P23	Unkn-1	Hom 1	Cluster 3	99.8
C21	Unkn-5	Het	Cluster 2	99.1
C22	Unkn-5	Het	Cluster 2	99.6

Рисунок 29. Образец, исключенный из кластеров.

Изменение параметров кластеров

Щелкните правой клавишей мыши на кривой флуоресценции лунки на графике кривых плавления **Melt Curve** или графике кривых разницы **Difference Curve** для изменения параметров кластера (Рисунок 30).

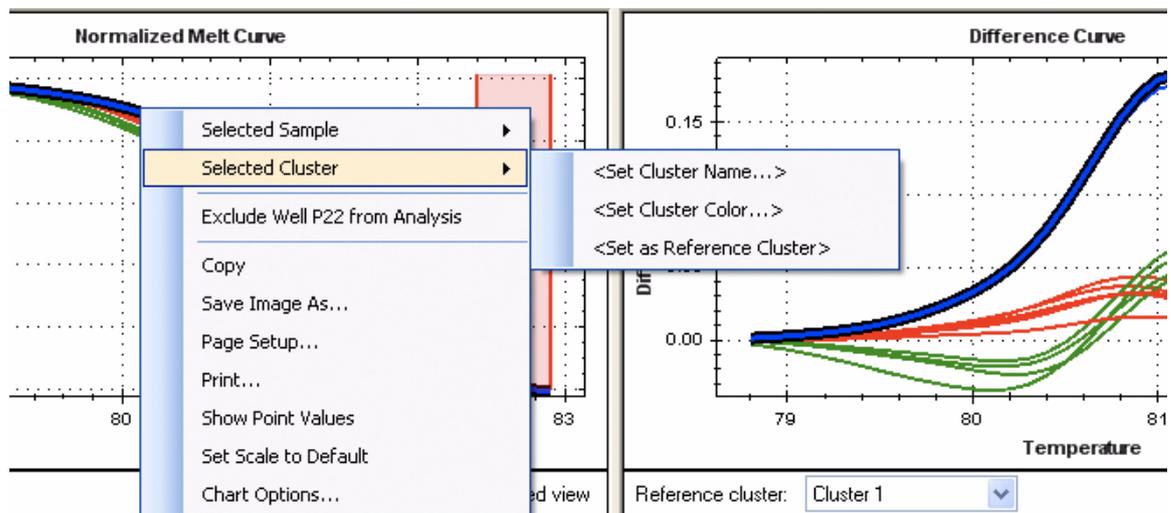


Рисунок 30. Изменение параметров кластеров.

Изменения, сделанные для кластера, применяются ко всем образцам в кластере. Выберите из опций меню **Selected Cluster**:

- Выберите **<Set Cluster Name>** (**Задать имя кластера**) для задания имени кластера. Введите имя кластера в текстовой строке окна **Rename** и щелкните **ОК**
- Выберите **<Set Cluster Color>** (**Задать цвет кластера**) для изменения цвета кривых лунок, относящихся к выбранному кластеру. Выберите новый цвет из предлагаемых вариантов в окне **Color** и щелкните **ОК**
- Выберите **<Set as the Reference Cluster>** (**Определить как кластер сравнения**) для использования выбранного кластера в качестве кластера сравнения при построении графика кривых различий **Difference Curve**

Таблица вкладки Precision Melt

В Таблице 15 суммированы данные, показываемые в таблице в правом нижнем углу вкладки **Precision Melt**.

Таблица 15. Содержание таблицы вкладки Precision Melt.

Информация	Описание
Well	Положение лунки на планшете
Content	Комбинация типа образца Sample Type и номера реплики Replicate # , присвоенных лунке в редакторе планшета Plate Editor
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Cluster	Имя кластера, к которому относится эта лунка
Confidence	Индикатор относительной вероятности принадлежности образца кластеру

ПОДСКАЗКА: Для внесения изменений в категории **Content** и **Sample**, откройте редактор планшета **Plate Editor**, щелкнув на **View/Edit Plate**.

Доверительный уровень

Программа Precision Melt Analysis определяет вероятностное распределение для каждого кластера на основании стандартного отклонения кривых плавления в кластере. Каждому образцу приписывается значение вероятности на основании его сходства со средней кривой, полученной путем усреднения по всем образцам кластера. Доверительное значение является индикатором относительной вероятности того, что образец принадлежит этому кластеру.

Изменение кластеров вручную

Выберите опции из выпадающего меню ячеек колонки **Cluster** таблицы вкладки **Precision Melt** для изменения принадлежности к кластеру или свойств кластера (Рисунок 31).

Well	Content	Sample	Cluster	Percent Confidence
N23	Unkn-2	Hom 2	Cluster 1	99.5
N24	Unkn-2	Hom 2	Cluster 1	99.5
O23	Unkn-4	Hom 2	Cluster 2	99.8
O24	Unkn-4	Hom 2	Cluster 3	99.8
C21	Unkn-5	Het	<Create New Cluster...>	99.1
C22	Unkn-5	Het	<Exclude from Clusters>	99.6
N20	Unkn-7	Het	99.0
N21	Unkn-7	Het	<Set Cluster Name...>	99.5
P22	Unkn-1	Hom 1	<Set Cluster Color...>	99.7
P23	Unkn-1	Hom 1	<Set as Reference Cluster>	99.8

Рисунок 31. Изменение кластеров в таблице.

Опции изменения принадлежности к кластеру включают:

- Выберите имя из списка имен кластеров для включения выбранных лунок в другой кластер
- Выберите **<Create New Cluster>** (**Создать новый кластер**) для включения выбранных лунок в новый кластер. Введите имя нового кластера в окне **Name** и щелкните **ОК**

- Если автоматическая сортировка лунок была отредактирована ранее, выберите **<Undo Manual Cluster> (Отменить формирование кластеров вручную)** для возврата к автоматическому формированию кластеров программой
- Выберите **<Exclude from Clusters> (Исключить из кластеров)** для исключения выбранных образцов из анализа кластеров. Исключенные образцы показываются с пометкой **Excluded** в колонке **Cluster** в таблице данных. Выберите **<Include in Clusters> (Включить в кластеры)** для включения образца обратно в анализ кластеров

Изменения, сделанные для кластера, применяются ко всем образцам в кластере. Опции параметров кластеров включают:

- Выберите **<Set Cluster Name> (Задать имя кластера)** для задания имени кластера. Введите имя кластера в текстовой строке окна **Rename** и щелкните **OK**
- Выберите **<Set Cluster Color> (Задать цвет кластера)** для изменения цвета кривых лунок, относящихся к выбранному кластеру. Выберите новый цвет из предлагаемых вариантов в окне **Color** и щелкните **OK**
- Выберите **<Set as the Reference Cluster> (Определить как кластер сравнения)** для использования выбранного кластера в качестве кластера сравнения при построении графика кривых различий **Difference Curve**

ЗАМЕЧАНИЕ: Вышеописанные изменения могут также быть сделаны на графике.

Вкладка Precision Melt Data

Во вкладке **Precision Melt Data** показывается таблица, описывающая данные плавления, собранные для каждой лунки. Выберите одну из шести опций для просмотра данных в различных форматах.

- **Results (Результаты).** Показывает табулированные данные
- **Charts (Графики).** Показывает множественные графики на одном листе
- **Plate view (Вид планшета).** Показывает данные для каждой лунки в форме планшета.
- **Raw RFU (Первичная RFU).** Показывает значение RFU в каждой лунке для каждой температуры
- **Normalized RFU (Нормализованная RFU).** Показывает значение нормализованной RFU в каждой лунке для каждой температуры
- **Difference RFU (RFU различия).** Показывает значение RFU различия в каждой лунке для каждой температуры

ПОДСКАЗКА: Щелкните на таблице правой клавишей мыши для вызова опций. Отсортируйте данные в любой таблице, для чего щелкните правой клавишей мыши и выберите опцию **Sort**. Щелкните **View/Edit Plate** для вызова редактора планшета **Plate Editor** и измените содержание любой лунки планшета.

Таблица результатов Results

Выберите таблицу результатов **Results** (Рисунок 32) для просмотра данных по каждой лунке планшета.

Well	Content	Sample	Cluster	Percent Confidence	Call Type
C06	Unkn-10	A t/t	Cluster 1	99.9	Auto
C07	Unkn-10	A t/t	Cluster 1	99.9	Auto
A06	Unkn-08	H c/t	Cluster 2	100.0	Auto
A07	Unkn-08	H c/t	Cluster 2	100.0	Auto
B06	Unkn-09	C c/c	Cluster 3	99.8	Auto
B07	Unkn-09	C c/c	Cluster 3	99.9	Auto

Рисунок 32. Вкладка Precision Melt Data с выбранной таблицей результатов.

Таблица результатов включает информацию, перечисленную в Таблице 16.

Таблица 16. Содержание таблицы результатов Results.

Информация	Описание
Well	Положение лунки на планшете
Content	Комбинация типа образца Sample Type и номера реплики Replicate # , присвоенных лунке в редакторе планшета Plate Editor
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Cluster	Имя кластера, к которому относится эта лунка
Percent Confidence	Значение процентной достоверности как мера качества автоматически полученных результатов
Call Type	Автоматический (Automatic) или ручной (Manual). Автоматический означает, что программа отнесла эту лунку к определенному кластеру. Ручной означает, что кластер для лунки был выбран вручную

Таблица графиков Charts

Выберите таблицу графиков **Charts** (Рисунок 33) для просмотра нескольких графиков для всех лунок.

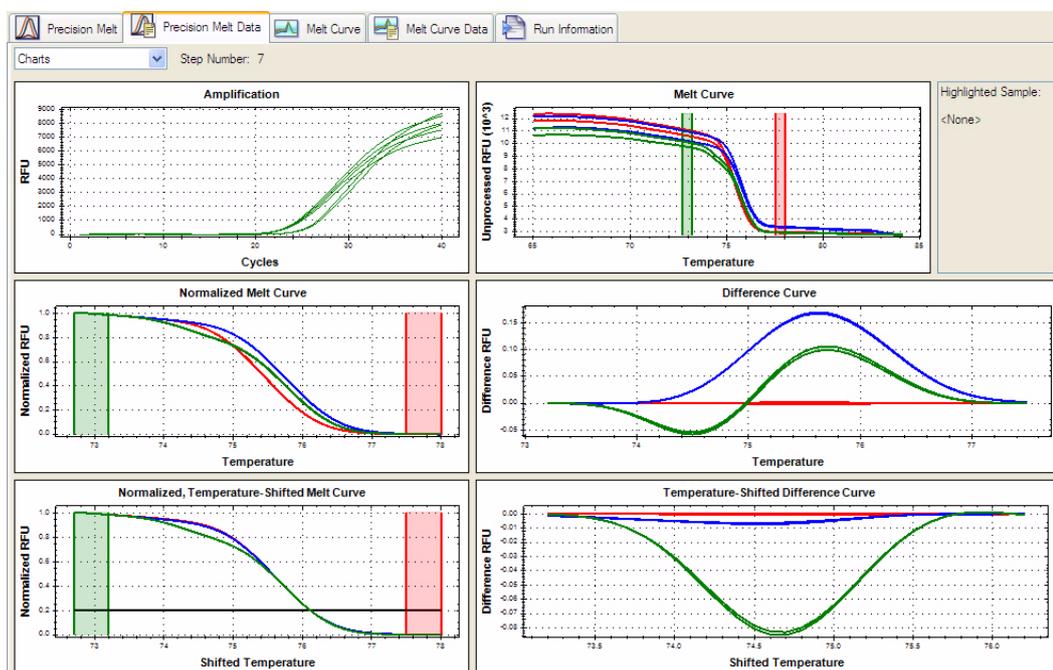


Рисунок 33. Вкладка Precision Melt Data с выбранной таблицей графиков Charts.

Выберите кривую флуоресценции на графике для показа информации, перечисленной в Таблице 17.

Таблица 17. Информация, показываемая для выделенной кривой флуоресценции.

Информация	Описание
Well	Положение лунки на планшете
Content	Комбинация типа образца Sample Type и номера реплики Replicate # , присвоенных лунке в редакторе планшета Plate Editor
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Cluster	Имя кластера

Таблица Plate View

Выберите таблицу планшета **Plate View** для просмотра данных в виде схемы планшета. На Рисунке 34 показан вид таблицы в виде планшета.

		4	5	6	7	8
A	Content		Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample					
	Cluster		Cluster 5	Cluster 3	Cluster 1	
	Color					
B	Content		Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample					
	Cluster		Cluster 5	Cluster 3	Cluster 1	
	Color					
C	Content		Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample					
	Cluster		Cluster 5	Cluster 3	Cluster 1	
	Color					
D	Content		Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample					
	Cluster		Cluster 4	Cluster 2	Exclude from Clusters	
	Color					

Рисунок 34. Таблица планшета во вкладке Precision Melt Data.

Таблица **Plate View** содержит информацию, указанную в Таблице 18, включая выбранный флуорофор на схеме планшета.

Таблица 18. Информация, показываемая для выделенной кривой флуоресценции.

Информация	Описание
Content	Комбинация типа образца Sample Type и номера реплики Replicate # , присвоенных лунке в редакторе планшета Plate Editor
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Cluster	Имя кластера
Color	Цвет кластера

Выберите таблицу **Raw RFU** для просмотра первичных данных флуоресценции для каждой лунки при каждом шаге температуры протокола кривой плавления. Номер лунки показан над каждой колонкой, а температура указана слева от каждого ряда (Рисунок 35).

Temperature	A6	A7	B6	B7	C6	C7
65.00	10680	11264	11196	12136	11812	12350
65.10	10682	11266	11203	12142	11816	12356
65.20	10683	11268	11212	12148	11820	12362
65.30	10686	11270	11222	12156	11825	12368
65.40	10689	11271	11233	12163	11829	12373

Рисунок 35. Таблица Raw RFU во вкладке Precision Melt Data.

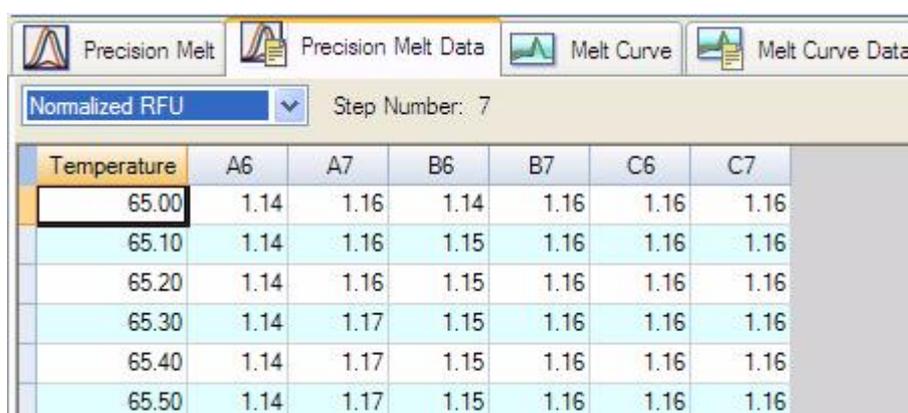
Таблица **Raw RFU** включает информацию, описанную в Таблице 19.

Таблица 19. Содержание таблицы Raw RFU.

Информация	Описание
Номер лунки (A2, A3, A4 и т.д.)	Данные для лунки, приведенные для всех загруженных лунок по их положению
Temperature	Данные для температуры в порядке ее возрастания для всех загруженных лунок

Таблица нормализованных RFU Normalized RFU

Выберите таблицу **Normalized RFU** для просмотра данных нормализованных флуоресценций для каждой лунки. Негативные лунки не отображаются в этой таблице, так как их флуоресценции исключаются из вычисления нормализованных значений (Рисунок 36).



The screenshot shows the 'Precision Melt Data' window with the 'Normalized RFU' tab selected. The table displays data for Step Number 7. The columns are Temperature, A6, A7, B6, B7, C6, and C7. The data points are as follows:

Temperature	A6	A7	B6	B7	C6	C7
65.00	1.14	1.16	1.14	1.16	1.16	1.16
65.10	1.14	1.16	1.15	1.16	1.16	1.16
65.20	1.14	1.16	1.15	1.16	1.16	1.16
65.30	1.14	1.17	1.15	1.16	1.16	1.16
65.40	1.14	1.17	1.15	1.16	1.16	1.16
65.50	1.14	1.17	1.15	1.16	1.16	1.16

Рисунок 36. Вкладка Precision Melt Data, показывающая данные Normalized RFU.

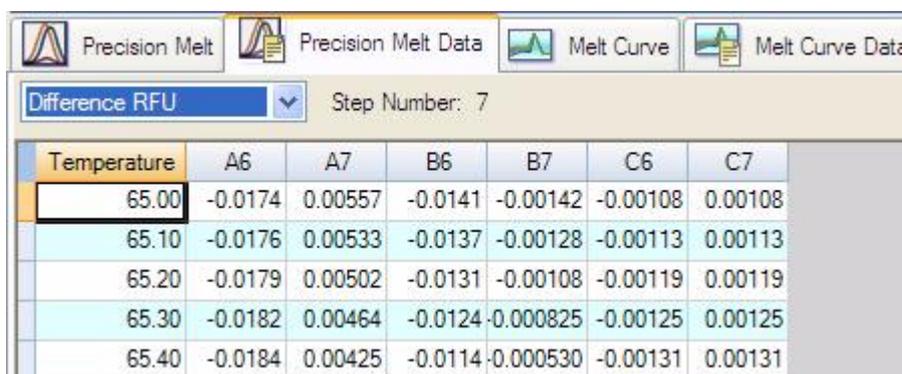
Таблица **Normalized RFU** включает информацию, описанную в Таблице 20.

Таблица 20. Содержание таблицы Normalized RFU.

Информация	Описание
Номер лунки (A2, A3, A4 и т.д.)	Данные для лунки, приведенные для всех загруженных лунок по их положению
Temperature	Данные для температуры в порядке ее возрастания для всех загруженных лунок

Таблица RFU различий Difference RFU

Выберите таблицу **Difference RFU** для просмотра данных по различию флуоресценций для каждой лунки. Негативные лунки не отображаются в этой таблице, так как их флуоресценции исключаются из вычисления значений различия (Рисунок 37).



Temperature	A6	A7	B6	B7	C6	C7
65.00	-0.0174	0.00557	-0.0141	-0.00142	-0.00108	0.00108
65.10	-0.0176	0.00533	-0.0137	-0.00128	-0.00113	0.00113
65.20	-0.0179	0.00502	-0.0131	-0.00108	-0.00119	0.00119
65.30	-0.0182	0.00464	-0.0124	-0.000825	-0.00125	0.00125
65.40	-0.0184	0.00425	-0.0114	-0.000530	-0.00131	0.00131

Рисунок 37. Вкладка Precision Melt Data, показывающая данные Difference RFU.

Таблица **Difference RFU** включает информацию, описанную в Таблице 21.

Таблица 20. Содержание таблицы Difference RFU.

Информация	Описание
Номер лунки (A2, A3, A4 и т.д.)	Данные для лунки, приведенные для всех загруженных лунок по их положению
Temperature	Данные для температуры в порядке ее возрастания для всех загруженных лунок

Вкладка Melt Curve

Во вкладке **Melt Curve** программа Precision Melt Analysis показывает график значений RFU в зависимости от температуры. Для анализа данных пика плавления, для каждого пика устанавливается начальная и конечная температуры. Нижняя граница области пика определяется положением пороговой линии плавления. Действительный пик должен иметь минимальную высоту, соответствующую расстоянию между пороговым значением и высотой наибольшего пика.

Откройте вкладку **Melt Curve** (Рисунок 38) для определения температуры плавления (T_m) амплифицированных продуктов ПЦР. В этой вкладке данные кривой плавления представлены в следующих четырех видах:

- **Melt Curve (Кривая плавления).** Просмотр данных ПЦР в реальном времени для каждого флуорофора как функция RFU от температуры для каждой лунки
- **Melt Peak (Пик плавления).** Просмотр значений производной RFU по температуре со знаком минус $-d(RFU)/dT$
- **Селектор лунок.** Выбор лунок для просмотра или скрытия данных
- **Таблица пиков.** Просмотр таблицы данных для каждой лунки

ЗАМЕЧАНИЕ: В этой таблице показано не более двух пиков для каждой кривой. Для просмотра большего числа пиков щелкните на вкладке Melt Curve Data (стр. 49).

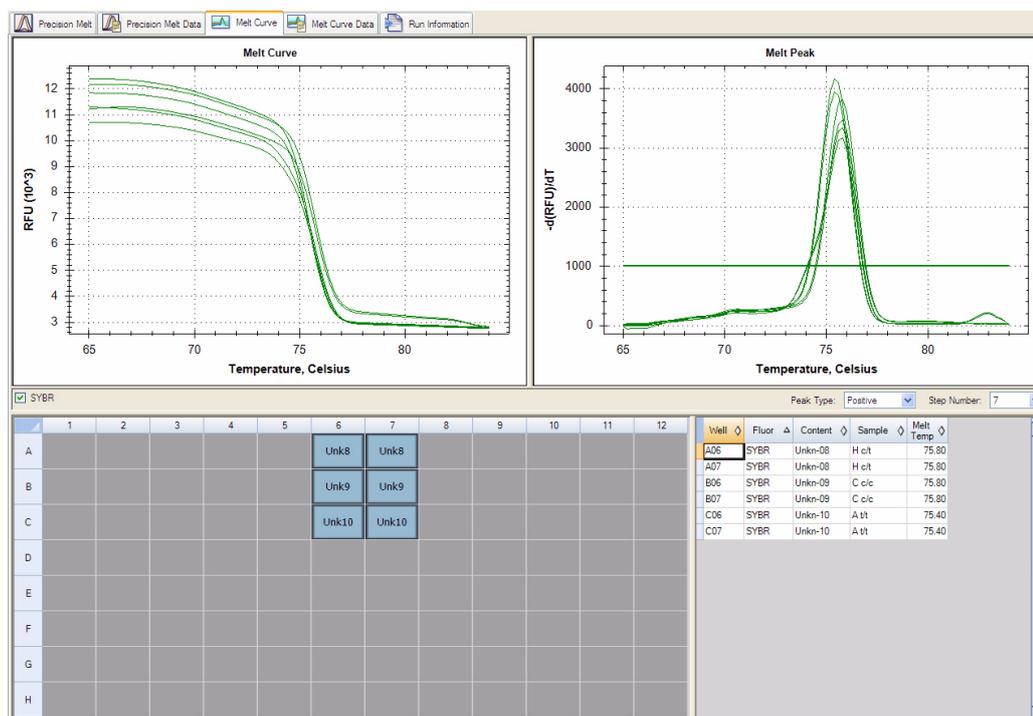


Рисунок 38. Вид вкладки Melt Curve в окне анализа данных Data Analysis.

Настройка данных кривых плавления

Настройте данные кривых плавления одним из следующих способов:

Щелкните и перетащите линию порогового значения на графике **Melt Peak** для включения или исключения пиков из анализа данных.

Для изменения цвета кривых на графиках **Melt Curve** и **Melt Peak**, щелкните на графике и выберите опцию стиля кривых **Trace Style** из меню. Используйте инструменты окна **Trace Style** для настройки вида кривых с предварительным просмотром результатов внесенных изменений в селекторе лунок в нижней части окна

Выберите число в поле номер шага **Step Number** под графиком **Melt Chart** для просмотра данных кривых плавления для другого шага протокола

Выберите лунки в селекторе лунок для просмотра только части данных

Выберите группу лунок для просмотра и анализа данных только части лунок. Группа лунок может быть выбрана по ее имени в выпадающем меню групп лунок **Well Group** в панели инструментов

Таблица вкладки Melt Curve

В таблице 22 показаны типы информации, присутствующей в таблице в правом нижнем углу вкладки **Melt Curve**.

Таблица 22. Содержание таблицы вкладки Melt Curve.

Информация	Описание
Well	Положение лунки на планшете
Fluor	Детектируемый флуорофор
Content	Комбинация типа образца Sample Type и номера реплики Replicate #
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Melt Temp	Температура пика плавления для каждой лунки. В этой таблице приводятся значения только для двух наибольших пиков

Вкладка Melt Curve Data

Во вкладке **Melt Curve Data** показаны данные вкладки **Melt Curve** в нескольких таблицах, которые включают все пики плавления для всех кривых. Выберите один из четырех способов представления данных кривых плавления в таблицах:

Melt Peaks (Пики плавления). Список всех данных, включая пики плавления, для каждой кривой

Plate (Планшет). Список данных и содержания лунок в формате планшета

RFU. Список значений RFU при каждой температуре для каждой лунки

-d(RFU)/dT. Список отрицательных значений изменений RFU при изменении температуры (T). Это производная первого порядка для каждой лунки планшета

Таблица пиков плавления Melt Peaks

Выберите таблицу пиков плавления **Melt Peaks** (Рисунок 39) для просмотра данных для кривой плавления.

Well	Fluor	Content	Target	Sample	Melt Temperature	Peak Height	Begin Temperature	End Temperature
A06	SYBR	Unkn-08		H c/t	75.80	3169.90	71.40	79.00
A07	SYBR	Unkn-08		H c/t	75.80	3342.47	71.40	78.80
B06	SYBR	Unkn-09		C c/c	75.80	3470.42	71.20	78.60
B07	SYBR	Unkn-09		C c/c	75.80	3816.11	71.60	78.60
C06	SYBR	Unkn-10		A t/t	75.40	3945.34	71.20	78.60
C07	SYBR	Unkn-10		A t/t	75.40	4171.06	71.40	80.20

Рисунок 39. Таблица Melt Peaks вкладки Melt Curve Data.

Таблица **Melt Peaks** (Рисунок 39) содержит типы информации, перечисленные в Таблице 23.

Таблица 23. Содержание таблицы Melt Peaks.

Информация	Описание
Well	Положение лунки на планшете
Fluor	Детектируемый флуорофор
Content	Тип образца Sample Type из редактора планшета Plate Editor
Target	Мишень для амплификации (ген)
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Melt Temperature	Температура плавления для каждого продукта, приводимая как один (наибольший) пик в каждом ряду таблицы
Peak Height	Высота пика
Begin Temperature	Температура начала пика
End Temperature	Температура конца пика

Таблица в формате планшета Plate

Выберите таблицу **Plate** (Рисунок 40) для просмотра данных кривых плавления в формате планшета.

		3	4	5	6	7	8
A	Content			Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample						
	Peak 1			79.20	76.20	76.50	
	Peak 2			None	78.90	None	
B	Content			Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample						
	Peak 1			79.20	76.20	76.20	
	Peak 2			None	78.90	None	
C	Content			Unkn	Unkn	Unkn	
	Sample						
	Peak 1			79.20	76.20	76.20	
	Peak 2			None	78.90	None	

Рисунок 40. Таблица Plate вкладки Melt Curve Data.

ЗАМЕЧАНИЕ: Для настройки пиков, идентифицированных программой, скорректируйте пороговую линию на графике пиков плавления **Melt Peak** во вкладке **Melt Peak**.

Таблица **Plate** содержит типы информации, перечисленные в Таблице 24.

Таблица 24. Содержание таблицы Plate.

Информация	Описание
Content	Комбинация типа образца Sample Type (обязательно) и номера реплики Replicate # (опция)
Sample	Описание образца
Peak 1	Первый (наибольший) пик плавления
Peak 2	Второй (меньший) пик плавления

Таблица RFU

Выберите таблицу RFU (**RFU**) для просмотра значений флуоресценции для каждой лунки в каждом цикле во время плавления (Рисунок 41).

Temperature	A5	A6	A7	B5	B6	B7	C5
60.00	9213	8918	9113	8988	9336	9317	9630
60.30	9214	8926	9118	8991	9338	9318	9634
60.60	9214	8933	9123	8993	9340	9319	9638
60.90	9214	8941	9129	8996	9342	9320	9642
61.20	9214	8948	9134	8998	9344	9321	9646
61.50	9215	8956	9140	9001	9346	9322	9650

Рисунок 41. Таблица RFU вкладки Melt Curve Data.

В таблице 25 перечислены типы данных, показанных в таблице RFU.

Таблица 25. Содержание таблицы RFU.

Информация	Описание
Номер лунки (A2, A3, A4 и т.д.)	Положение лунки на планшете для всех загруженных лунок
Temperature	Значение температуры, показанные для ряда с несколькими лунками

Таблица $-d(\text{RFU})/dT$

Выберите таблицу $-d(\text{RFU})/dT$ ($-d(\text{RFU})/dT$) для просмотра данных, показанных на Рисунке 42.

Temperature	A5	A6	A7	B5	B6	B7	C5
60.00	-0.464	-12.5	-9.05	-4.09	-3.32	-1.55	-6.66
60.30	-1.00	-27.0	-19.6	-8.87	-7.18	-3.35	-14.4
60.60	-0.927	-24.9	-18.1	-8.19	-6.63	-3.09	-13.3
60.90	-0.927	-24.9	-18.1	-8.19	-6.63	-3.09	-13.3
61.20	-0.927	-24.9	-18.1	-8.19	-6.63	-3.09	-13.3
61.50	-4.25	-28.2	-20.9	-11.2	-9.79	-6.26	-16.2
61.80	16.4	-7.40	-3.22	7.56	9.91	13.7	1.85

Рисунок 42. Таблица $-d(\text{RFU})/dT$ вкладки Melt Curve Data.

Отчет для файлов плавления

В окне отчета **Report** (Рисунок 43) выводится информация о текущем файле плавления окна **Data Analysis**. Для создания отчета выберите **Tools > Reports** или щелкните **Reports** в панели инструментов окна анализа данных **Data Analysis**.

Окно отчета **Report** содержит четыре части:

Меню и панель инструментов. Позволяет выбрать опции форматирования, сохранения и печати отчета или шаблона отчета

Список опций (верхняя левая часть окна). Позволяет выбрать опции данных и параметры эксперимента, которые будут показаны в отчете

Поле опций (нижняя левая часть окна). Позволяет ввести информацию о выбранных опциях

Предварительный просмотр (правая часть окна). Предварительный просмотр текущего отчета

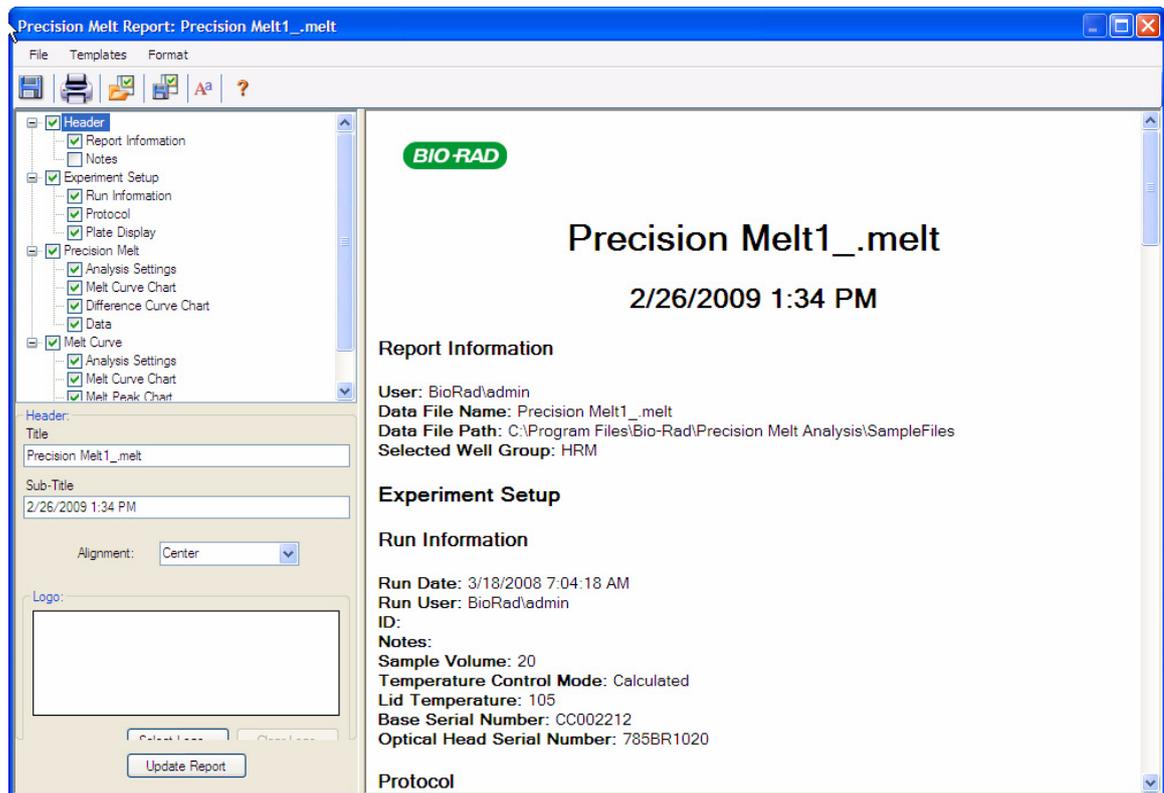


Рисунок 43. Пример окна отчета Report для файла плавления.

ПОДСКАЗКА: Шаблон отчета может задавать категории информации для любого отчета, если сохранить отчет как шаблон (**Template**). Выберите **Template > Save** или **Save As** для сохранения шаблона текущего отчета.

Создание отчета анализа данных

Для создания отчета анализа данных в окне **Data Analysis** сделайте следующее:

1. Выполните окончательную настройку содержания лунок, выбора лунок, графиков и таблиц в окне **Data Analysis** перед созданием отчета.
2. Щелкните **Report** в панели инструментов окна **Data Analysis** для открытия окна отчета **Report**.
3. Выберите опции, которые должны быть включены в отчет. Окно отчета открывается с выбором опций по умолчанию. Щелкните напротив соответствующей опции отчета для настройки включения в отчет всей категории или индивидуальных опций в ней.

ЗАМЕЧАНИЕ: Данные, показываемые в отчете, зависят от текущих настроек во вкладках окна **Data Analysis**.

4. Щелкните **Update Report (Обновить отчет)** для обновления предварительного просмотра отчета.
5. Распечатайте или сохраните отчет. Щелкните **Print** в панели инструментов для отправки отчета на печать.
6. Выберите **File > Save** для сохранения отчета в формате PDF (файл Adobe Acrobat Reader), МНТ (документ Microsoft) или МНТМЛ (документ Microsoft) и выберите место для сохранения файла отчета. Выберите **File > Save As** для сохранения отчета под новым именем или в другом месте.

7. (Опция) Создайте шаблон отчета с выбранными категориями данных. Для сохранения текущих параметров отчета как шаблона выберите **Template >Save** или **Save As**. Это позволяет загружать шаблон отчета при последующем создании нового отчета.

Список опций отчета

В отчет могут быть включены любые опции категорий, описанных в Таблице 26. Поставьте или снимите значок выбора напротив соответствующих полей списка опций для определения информации, которая войдет в отчет.

Таблица 26. Категории отчета анализа данных в списке опций.

Категория	Опции	Описание
Header		
	Report information	Дата эксперимента, имя пользователя, имя файла данных и путь к нему, выбранные группы лунок
	Notes	Заметки к отчету
Experimental Setup		
	Run information	Включает дату эксперимента, имя пользователя, имя файла данных и путь к нему, выбранные группы лунок
	Protocol	Шаги протокола и опций в текстовом виде
	Plate display	Показ информации в каждой лунке в формате планшета
Melt Curve		
	Analysis settings	Включение номера шага плавления и значения параметра пороговой линии
	Melt Curve Chart	Копия графика кривых плавления
	Melt Peak Chart	Копия графика пиков плавления
	Data	Табулированный список данных для каждой лунки

Поле опций отчета

Информация, показываемая в поле опций отчета, которое находится внизу слева в окне отчета **Report**, изменяется в зависимости от выбора опций из списка опций отчета. В этом поле можно ввести информацию, относящуюся к выбранным опциям, выбрать типы информации для показа в отчете или настроить выбранные опции. Щелкните **Update Report (Обновить отчет)** для обновления отчета в поле предварительного просмотра.

Глава 6. Анализ исследования плавления Melt Study

В этой главе представлена информация о проведении анализа исследования плавления **Melt Study** в программе Precision Melt Analysis.

Окно исследования плавления **Melt Study** (см. ниже)

Вкладка **Study Setup** (стр. 55)

Вкладка **Study Analysis** (стр. 56)

Окно отчета исследования плавления **Melt Study** (стр. 57)

Окно исследования плавления Melt Study

Программа Precision Melt Analysis может сравнивать данные кривых плавления из различных экспериментов, проведенных на одном и том же приборе, для чего используется исследование плавления **Melt Study**. Создайте исследование плавления **Melt Study**, добавляя данные из одного или нескольких файлов плавления (расширение .melt) в окно **Melt Study**. Программа Precision Melt Analysis сгруппирует данные в единый файл исследования плавления (расширение .mlts).

ЗАМЕЧАНИЕ: Максимальное число образцов, которые могут быть включены в анализ исследования плавления, лимитируется оперативной и виртуальной памятью компьютера.

Окно **Melt Study** содержит две вкладки. На Рисунке 44 показано окно **Melt Study** со вкладками **Study Setup** и **Analysis Setup**.

- **Вкладка Study Setup.** Щелкните на этой вкладке для управления экспериментами в файле исследования плавления

ЗАМЕЧАНИЕ: Добавление или удаление файлов плавления в исследование плавления **Melt Study** не изменяет данных в этих файлах

- **Вкладка Study Analysis.** Щелкните на этой вкладке для просмотра данных комбинированных экспериментов

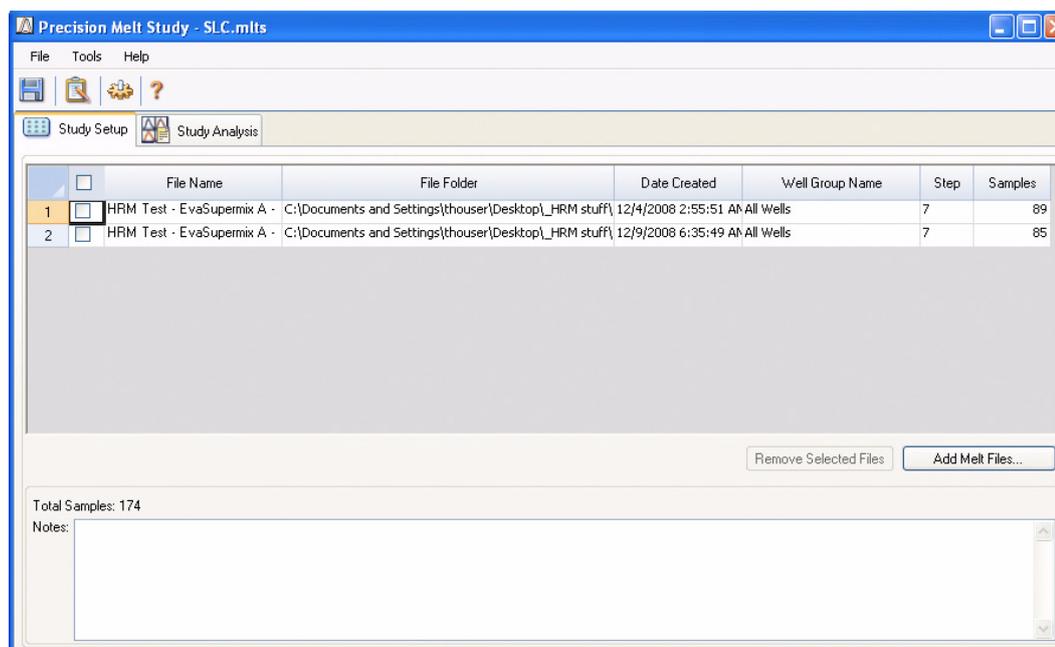


Рисунок 44. Окно Melt Study.

Вкладка Study Setup

Во вкладке **Study Setup** (Рисунок 44) показан список всех экспериментов в исследовании плавления **Melt Study**.

- **Добавление экспериментов.** Щелкните **Add Melt Files** для выбора файла из окна браузера. Для быстрого добавления эксперимента в исследование плавления перетащите файл плавления (расширение .melt) в окно **Melt Study**

ЗАМЕЧАНИЕ: При добавлении файла плавления с несколькими группами лунок выберите группы лунок для добавления в окне **Study Setup**.

- **Удаление экспериментов.** Выберите один или несколько файлов в списке и щелкните **Remove Selected Files**
- **Добавление заметок.** Введите текст в поле **Notes** для добавления комментариев к файлу и анализу в исследовании плавления **Melt Study**

Файлы данных во вкладке **Study Setup** окна **Melt Study** перечислены с указанием информации, перечисленной в Таблице 27.

Таблица 27. Вкладка Study Setup окна Melt Study.

Название колонки	Описание
File Name	Имя файла плавления (расширение .melt)
File Folder	Директория, в которой хранится файл плавления для каждого эксперимента в окне Melt Study
Date Created	Дата получения данных эксперимента
Well Group Name	Имя группы лунок, выбранных при добавлении файла в окно Melt Study
Step	Шаг протокола сбора данных
Samples	Количество образцов

Вкладка Study Analysis

Во вкладке **Study Analysis** показаны данные всех экспериментов, которые добавлены в исследование плавления. Вкладка **Analysis Setup** имеет те же свойства, что и вкладка **Precision Melt Analysis**. Например, при выделении образца на графике **Melt Study** выделяются и соответствующие ячейки таблицы под графиком (Рисунок 45).

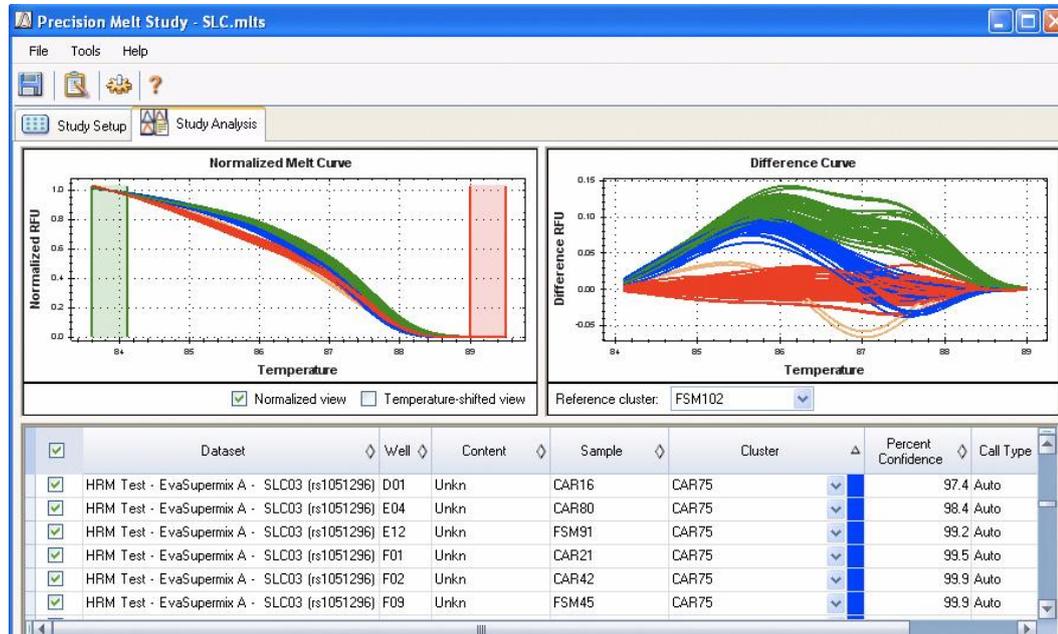


Рисунок 45. Вкладка Study Analysis окна Melt Study.

Таблица данных исследования плавления Melt Study.

В Таблице 28 описана информация, выводимая в таблице **Melt Study**.

Таблица 28. Информация таблицы в окне Study Analysis.

Информация	Описание
Dataset	Данные плавления для одного флуорофора из одного файла плавления
Well	Положение лунки на планшете
Content	Комбинация типа образца Sample Type и номера реплики Replicate # , заданные в редакторе планшета Plate Editor
Sample	Имя образца, присвоенное в редакторе планшета Plate Editor
Cluster	Имя кластера
Percent Confidence	Индикатор относительной вероятности принадлежности образца кластеру
Call type	Автоматически или вручную определенная принадлежность к кластеру

Окно отчета исследования плавления Melt Study

Щелкните **Report** в панели инструментов вкладки **Study Analysis** для вызова окна отчета **Melt Study**. Выберите информацию, относящуюся к исследованию плавления **Melt Study**, которая будет включена в отчет (Рисунок 46).

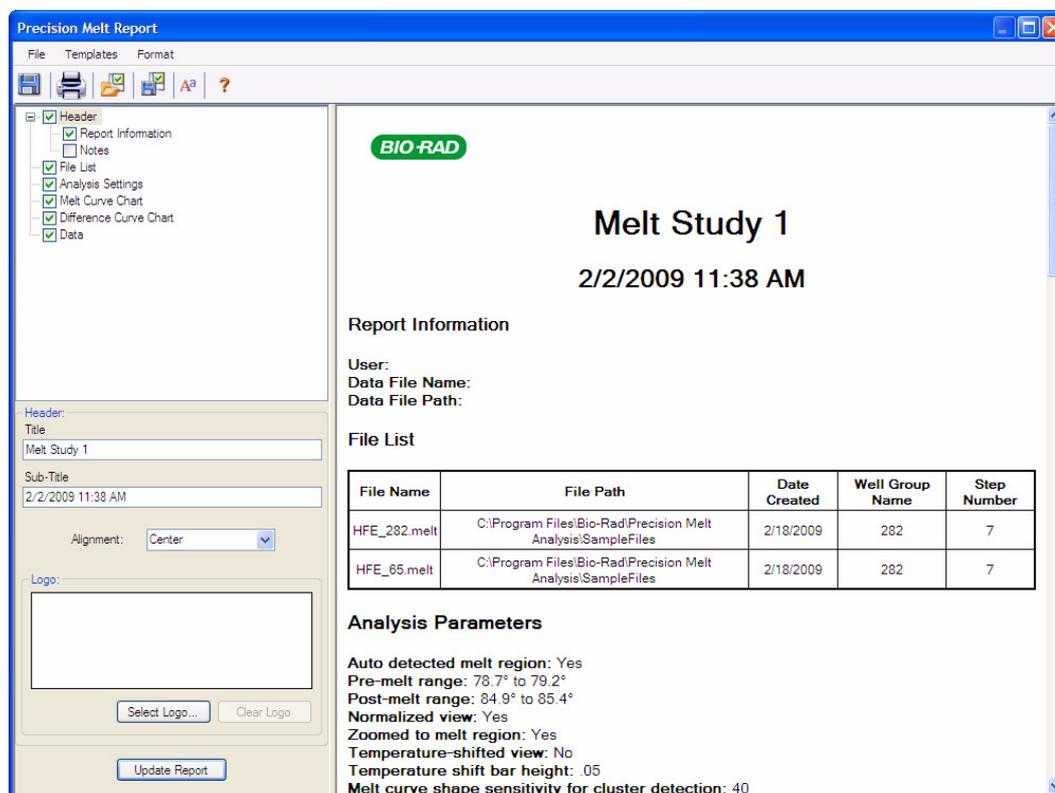


Рисунок 46. Пример окна отчета Report для файла исследования плавления Melt Study.

ПОДСКАЗКА: Шаблон отчета может задавать категории информации для любого отчета, если сохранить отчет как шаблон (**Template**). Выберите **Template > Save** или **Save As** для сохранения шаблона текущего отчета.

Создание отчета исследования плавления Melt Study

Для создания отчета сделайте следующее:

1. Щелкните **Report** в панели инструментов окна **Study Analysis** для открытия окна отчета **Report**.
2. Выберите опции, которые должны быть включены в отчет. Окно отчета открывается с выбором опций по умолчанию. Щелкните напротив соответствующей опции отчета для настройки включения в отчет всей категории или индивидуальных опций в ней.

ЗАМЕЧАНИЕ: Данные, показываемые в отчете, зависят от текущих настроек во вкладках окна **Data Analysis**.

3. Щелкните **Update Report (Обновить отчет)** для обновления предварительного просмотра отчета.
4. Распечатайте или сохраните отчет. Щелкните **Print** в панели инструментов для отправки отчета на печать.
5. Выберите **File > Save** для сохранения отчета в формате PDF (файл Adobe Acrobat Reader), МНТ (документ Microsoft) или МНТМЛ (документ Microsoft) и выберите

место для сохранения файла отчета. Выберите **File > Save As** для сохранения отчета под новым именем или в другом месте.

6. (Опция) Создайте шаблон отчета с выбранными категориями данных. Для сохранения текущих параметров отчета как шаблона выберите **Template > Save** или **Save As**. Это позволяет загружать шаблон отчета при последующем создании нового отчета.

Список опций отчета

В отчет исследования плавления **Melt Study** могут быть включены любые опции категорий, описанных в Таблице 29. Поставьте или снимите значок выбора напротив соответствующих полей списка опций для определения информации, которая войдет в отчет.

Таблица 29. Категории отчета анализа данных в списке опций.

Категория	Опции	Описание
Header		Название, подзаголовок, логотип отчета
	Report information	Дата эксперимента, имя пользователя, имя файла данных и путь к нему, выбранные группы лунок
	Notes	Заметки к отчету
File List		Имя файла данных и путь к нему, дата создания, имя группы лунок, номер шага
Analysis Settings		Включает окно до и после плавления, нормализованный вид, сфокусированный на области плавления, вид при сдвиге температуры, высоту линии сдвига температуры, параметр чувствительность к форме кривой плавления при кластеринге, и параметр пороговой линии
Melt Curve Chart		Копия графика кривых плавления
Difference Curve Chart		Копия графика кривых разностей
Data		Табулированный список данных для каждой лунки

Поле опций отчета

Информация, показываемая в поле опций отчета, которое находится внизу слева в окне отчета **Report**, изменяется в зависимости от выбора опций из списка опций отчета. В этом поле можно ввести информацию, относящуюся к выбранным опциям, выбрать типы информации для показа в отчете или настроить выбранные опции. Щелкните **Update Report (Обновить отчет)** для обновления отчета в поле предварительного просмотра.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com USA 800 4BIORAD Australia 61 02 9914 2800 Austria 01 877 89 01 Belgium 09 385 55 11 Brazil 55 21 3237 9400
Canada 905 364 3435 China 86 21 6426 0808 Czech Republic 420 241 430 532 Denmark 44 52 10 00 Finland 09 804 22 00 France 01 47 95 69 65
Germany 089 318 84 0 Greece 30 210 777 4396 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 36 1 455 8800 India 91 124 4029300 Israel 03 963 6050
Italy 39 02 216091 Japan 03 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 0318 540666 New Zealand 0508 805 500
Norway 23 38 41 30 Poland 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700 Russia 7 495 721 14 04 Singapore 65 6415 3188 South Africa 27 861 246 723
Spain 34 91 590 5200 Sweden 08 555 12700 Switzerland 061 71 7 95 55 Taiwan 886 2 2576 7189 United Kingdom 020 8328 2000