


| | | |
|---|------------------------|---|
|  <p>ThermoFisher SCIENTIFIC The world leader in serving science</p> | <p>POP 3.18</p> | <p>Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p> |
|---|------------------------|---|

1. OBJETIVO: Programação de dois experimentos qualitativos, primeiro ensaio de presença/ausência e em segundo ensaio de genotipagem.

2. RESPONSÁVEIS: Todos os coordenadores, estagiários e alunos do Customer Experience Center.

3. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO :

Todos os tipos de experimentos requerem as mesmas tarefas gerais de programação; os seguintes procedimentos se referem a procedimentos gerais.

3.1 – Definir as propriedades do experimento

Abra o software QuantStudio™ Design and Analysis e clique em *Create New Experiment* (Fig. 1)

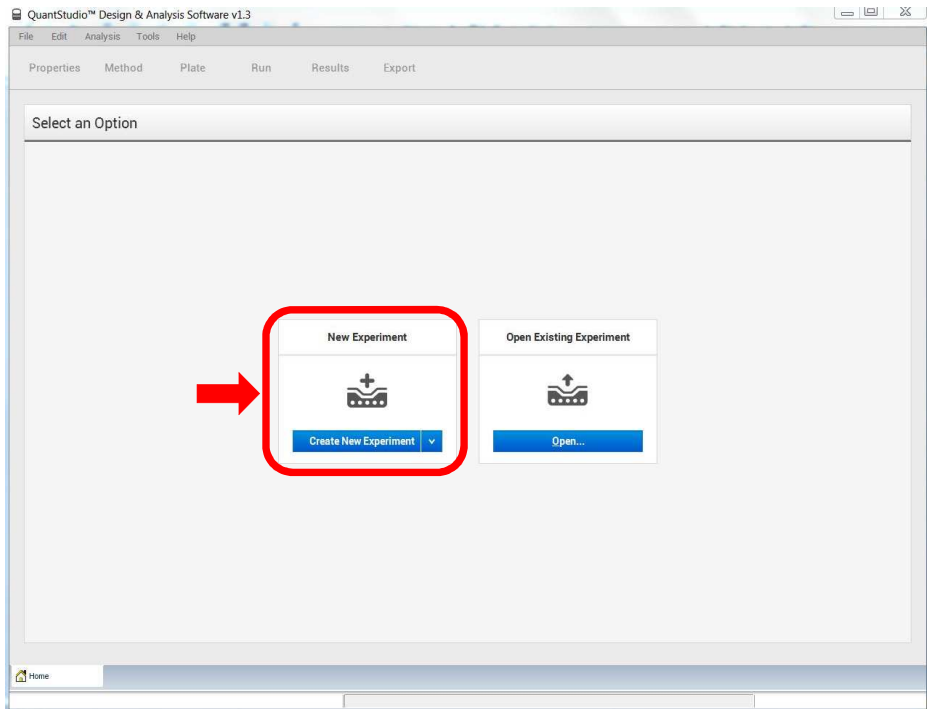


Fig. 1 – Home menu do software QuantStudio Design and Analysis

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|--|-----------------|--|
| ThermoFisher SCIENTIFIC The world leader in serving science | POP 3.18 | Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5 |
|--|-----------------|--|

Ao clicar em *Create New Experiment*, aparecerá o seguinte menu (Fig. 2a). Este menu é dividido em seis abas: *Properties*, *Method*, *Plate*, *Run*, *Results* e *Export*. Siga as abas da esquerda para a direita (Fig. 2a). Dentro de cada aba, siga a orientação de cima para baixo (Fig. 2b).

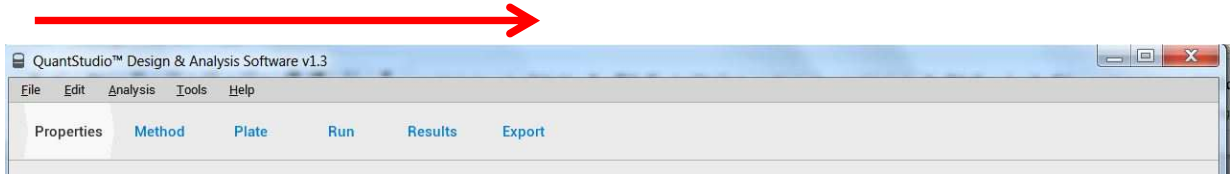


Fig. 2a

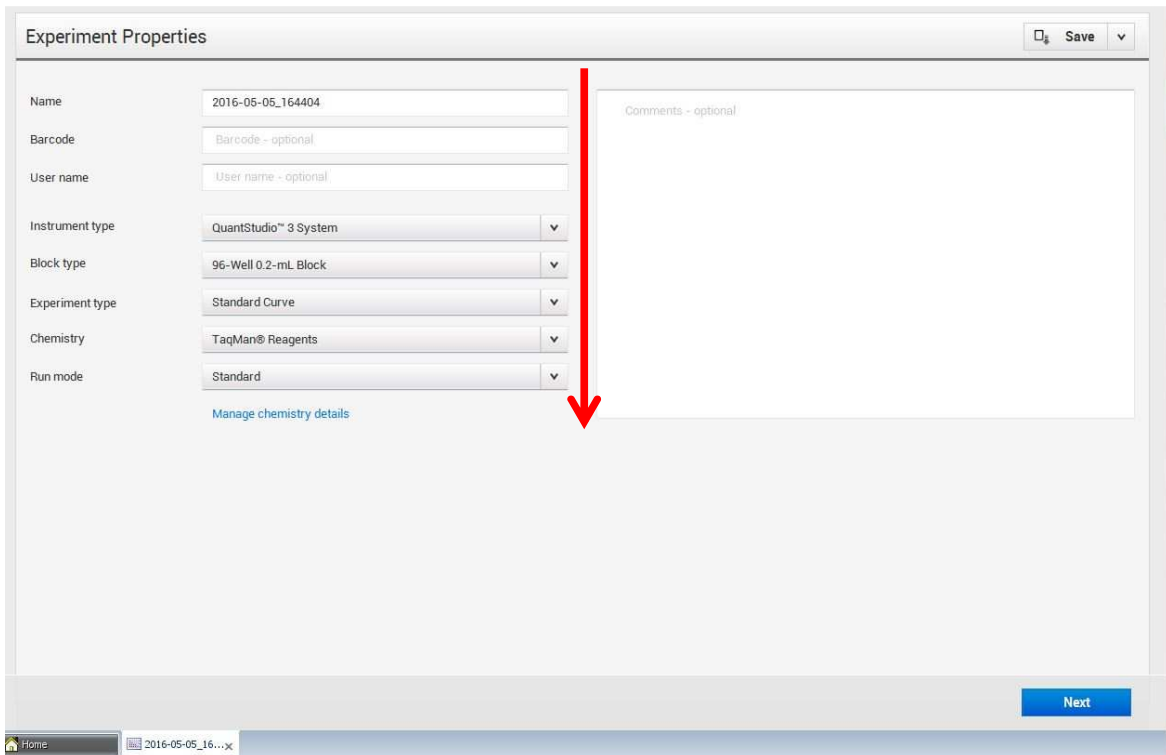



Fig. 2b

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|--|------------------------|---|
|  <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p> | <p>POP 3.18</p> | <p>Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p> |
|--|------------------------|---|

Dentro da aba *Properties*:

1. Preencha as informações da janela *Experiment properties*. Dê um nome único ao experimento no campo *Name* (*não utilizar caracteres especiais como ;,“?/*).

2. Campos opcionais:

- barcode: introdução de um código de barras da placa (com ou sem leitor);
- user name: introdução do nome do usuário para identificar o autor do experimento;
- comments: comentários para descrever o experimento.

3. *Instrument type*: Selecione o tipo de instrumento ao qual o software está conectado

→ QuantStudio™ 3 System

ou

→ QuantStudio™ 5 System

4. *Block type*: Selecione o tipo de bloco do instrumento


→ Se QuantStudio™ 3 System: 96-Well 0.1-mL Block ou 96-Well 0.2-mL Block

→ Se QuantStudio™ 5 System: 96-Well 0.1-mL Block ou 96-Well 0.2-mL Block ou 384-Well Block

5. *Experiment type*: Selecione o tipo de experimento → Standard Curve, Relative Standard Curve, Comparative CT ($\Delta\Delta CT$), Melt Curve, Genotyping, Presence/Absence, Custom

6. *Chemistry*: Selecione o tipo de reagente a ser utilizado no ensaio → TaqMan, SYBR Green ou Other

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|--|------------------------|---|
|  <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p> | <p>POP 3.18</p> | <p>Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p> |
|--|------------------------|---|

Nota: Se selecionar SYBR® Green como reagente, o software automaticamente inclui a realização da curva de dissociação após a ciclagem.

7. *Run mode*: Defina a velocidade da rampa de corrida, *standard* ou *fast* (de acordo com o Master Mix utilizado na reação)

3.2 – Definir o método de corrida

Clique na aba *Method* para definir o volume da reação e o método de corrida (Fig. 3a)



Fig. 3a

1. Coloque o volume de reação para o experimento (ex. 50 µl) (Fig. 3b)
2. Para editar o método de corrida (temperaturas, tempo, velocidade da rampa e alterar o número de ciclos), clique em cima do número e modifique utilizando as setas (Fig. 3b)

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

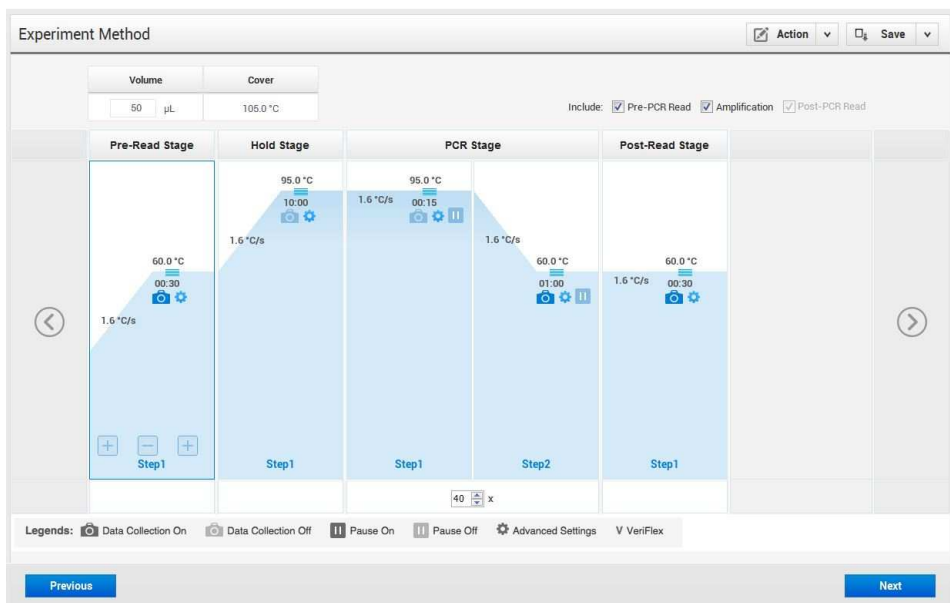



Fig. 3b



3. Para adicionar/remover um estágio, posicione o mouse em cima de um estágio já existente e utilize as setas (+) e (-) para adicionar ou remover um estágio. Você poderá adicionar um estágio de *Holding, Cycling, Melt Curve* ou *Infinite Hold*. Para reverter as configurações, clique em *Actions* e depois em *Revert to Default*

4. Para adicionar/remover um passo, posicione o mouse em cima de um passo já existente e utilize as setas (+) e (-) para adicionar ou remover um passo. Para reverter as configurações, clique em *Actions* e depois em *Revert to Default*

Nota: Sempre se certifique que o perfil termal é apropriado para os seus reagentes olhando na bula das enzimas / MasterMixes.

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|--|------------------------|---|
|  <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p> | <p>POP 3.18</p> | <p>Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p> |
|--|------------------------|---|

5. O símbolo  Data Collection On determina quando a fluorescência é coletada. O símbolo  Data Collection Off indica que a fluorescência não será coletada naquela etapa. Sempre se certifique que a coleta da fluorescência está ligada no momento adequado. Para experimentos de genotipagem, por exemplo, a fluorescência é coletada durante o Pre-read, no passo de extensão (durante a amplificação), e no Post-Read

Nota: Para experimentos de Genotipagem e Presença/Ausência, as seguintes opções de coleta de dados serão habilitadas:

- Pre-PCR Read - coleta dos dados de fluorescência antes da corrida (esses dados são usados para normalizar a fluorescência coletada no post-PCR read)
- Amplification - coleta dos dados de fluorescência a cada ciclo da amplificação
- Post-PCR Read - coleta dos dados de fluorescência após a amplificação

3.3 – Definir a configuração da placa (targets, amostras e grupos biológicos)

Dentro da aba *Plate*, clicar em *Quick Setup* (Fig. 4a)

1. Em *Plate Attributes*, selecione a referência passiva (ex. ROX) (Fig. 4a)
2. Não preencha o campo *Well Attributes*. Ele será preenchido no próximo passo

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

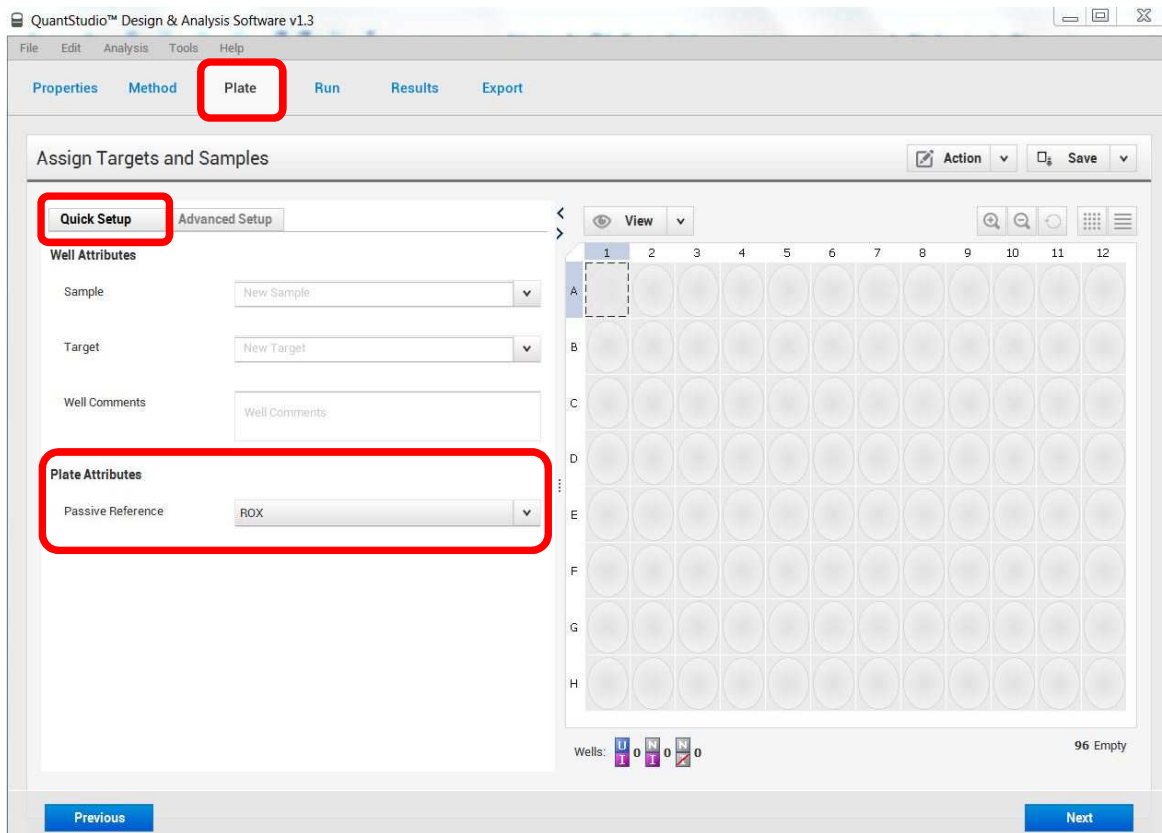


Fig. 4a

Dentro da aba *Plate*, clicar em *Advanced Setup* (Fig. 4b)

1. Na janela *Targets*, especifique o número de ensaios que serão analisados no experimento e as suas respectivas marcações.

Para *Setup* de ensaios de presença/ausência:

Clique no target já existente (Target 1) e defina um nome (ex. Salmonella), selecione o Reporter e Quencher (ex. FAM e MGB) (Fig. 5a). Para adicionar um novo ensaio, clique em *Add*

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

e defina um nome, Reporter e Quencher (ex. IPC marcação VIC e sonda TAMRA) (Fig. 5a). Para apagar targets criados, selecione o target, clique em *Actions* e depois em *Delete Target*.

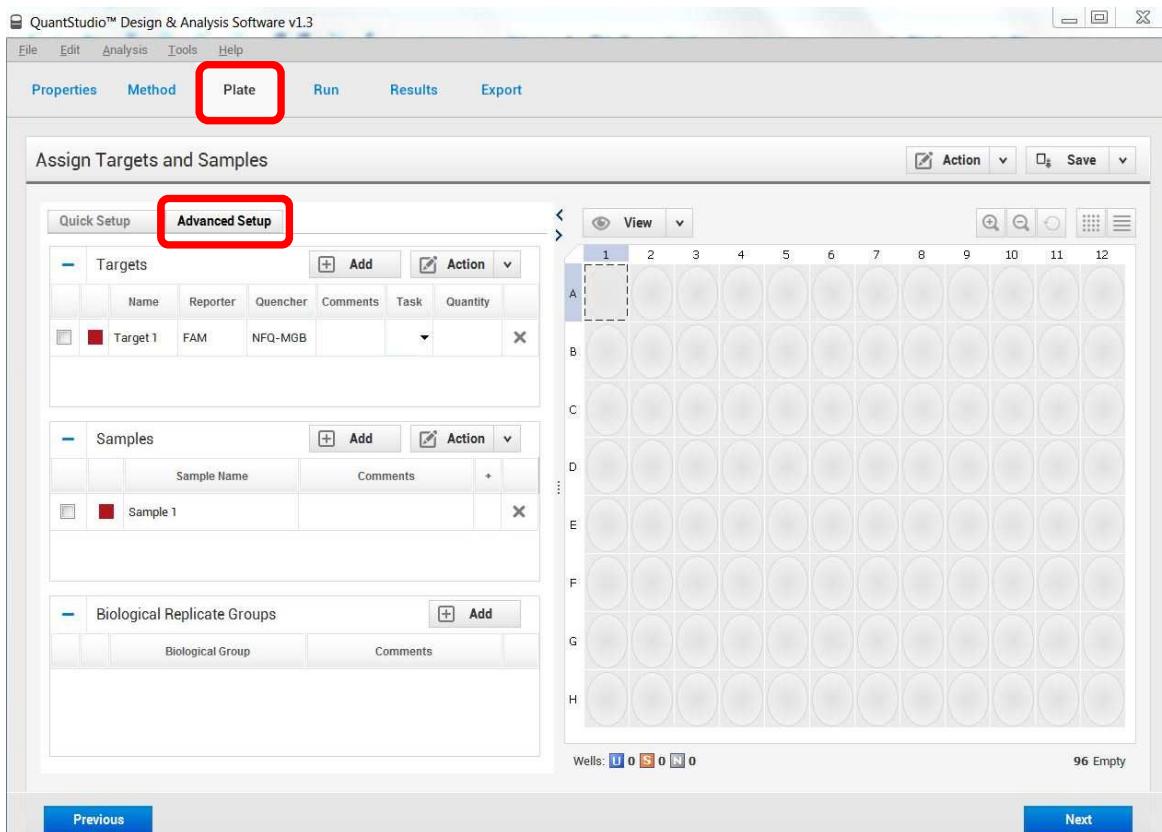


Fig. 4b

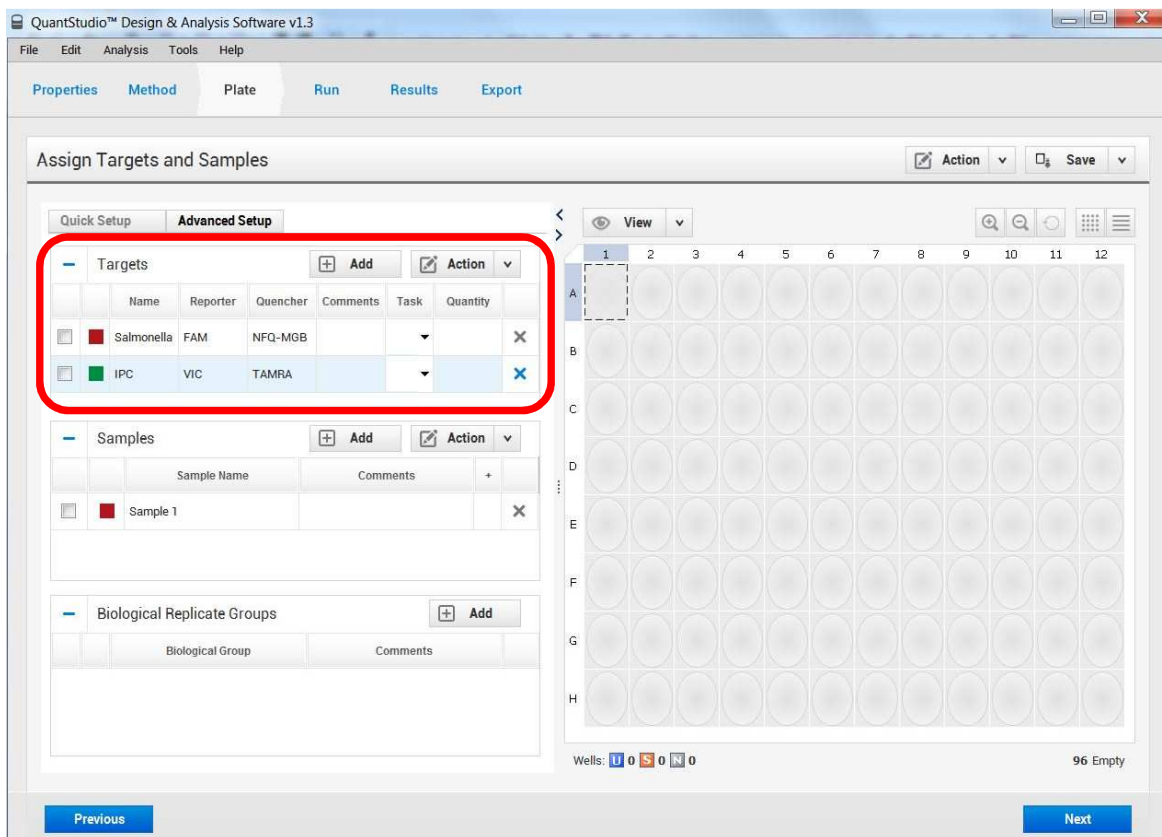



Fig. 5a

Para Setup de genotipagem:

Selecione o ensaio já existente (*SNP Assay 1*) (os retângulos ficarão azuis), em seguida clique em *Action*, depois *Edit*. Introduza as informações do ensaio de genotipagem, como nome do SNP, nomes ou bases correspondentes aos alelos, Reporter e Quencher (ex. Fig. 5b). Depois de editar clique em OK.

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|--|-----------------|---|
|  The world leader in serving science | POP 3.18 | Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5 |
|--|-----------------|---|

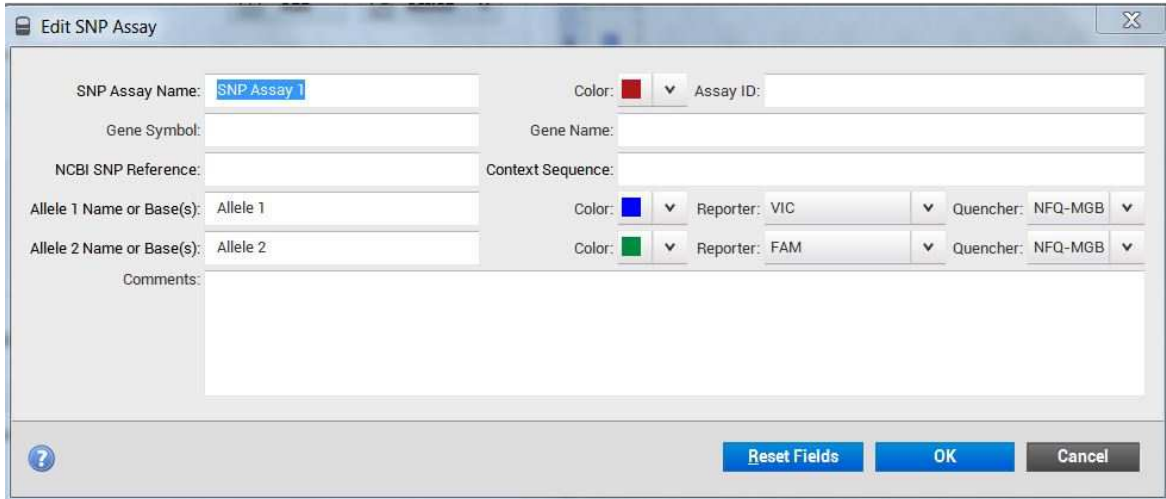



Fig. 5b

Opcional: após editar as informações da janela anterior (Fig. 5b), selecione o ensaio e clique em *Actions*, depois em *Save to Library*. Para importar estas informações em experimentos posteriores, basta clicar em *Actions*, depois em *Import from Library*, selecionar o(s) ensaio(s) e clicar em *Add Selected SNP Assay(s)*. A criação dessa biblioteca evita que tenha que re-escrever a informação de ensaios usados com frequência.

2. Na janela *Samples*, clique em *Add* para adicionar novas amostras. Clique em cima das amostras para nomeá-las (ex: Paciente 1, 2, 3..).

Opcional: Salve para a biblioteca (*Action*, depois *Save to Library*) ou importe amostras da biblioteca usadas em outras corridas (clicando em *Action*, depois *Import from Library*).

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|--|------------------------|---|
|  <p>The world leader in serving science</p> | <p>POP 3.18</p> | <p>Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p> |
|--|------------------------|---|

3.4 – Atribuir os targets e amostras na placa

Ainda dentro da aba *Plate*, selecione os respectivos poços na placa e atribua *Target*, *Sample* e *Task* (Fig. 6).

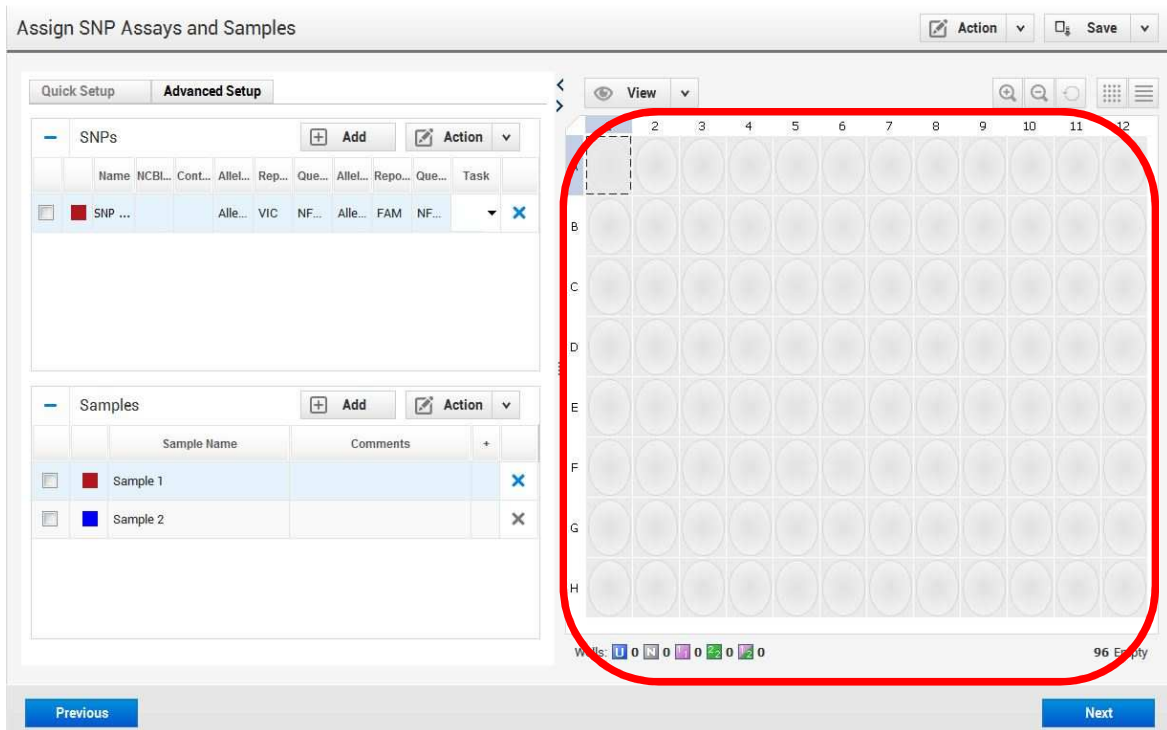





Fig. 6

Para Setup de presença/ausência (exemplo):


1. Para marcação dos NTCs (No Template Controls): Selecione os poços A1, A2 e A3 e clique em *assign* para Salmonella e IPC (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*). Atribua a função (task) desses ensaios nesses poços: Salmonella com a task  (NTC: No Template Control) e IPC com a task  (IPC: Internal Positive Control).

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

| | | |
|---|-----------------|---|
| ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science | POP 3.18 | Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5 |
|---|-----------------|---|

2. Para marcação dos NACs (No Amplification Controls): Selecione os poços B1, B2 e B3 e clique em *assign* para Salmonella (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*) com a *task* **N** e IPC com a *task*  (IPC bloqueado).

3. Para marcação das amostras a serem testadas: Selecione os poços C1, C2 e C3 e clique em *assign* para Salmonella (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*) com a *task* **U** (Unknown: amostra) e IPC com a *task* **I**. Depois, clique em cada poço separadamente (C1) e atribua a amostra → *assign* Paciente 1 (utilize a caixa quadrada ao lado do nome da *sample*).

Repita para os outros poços. É possível alterar o zoom da placa  para visualizar cada poço com detalhe (Fig. 7a).

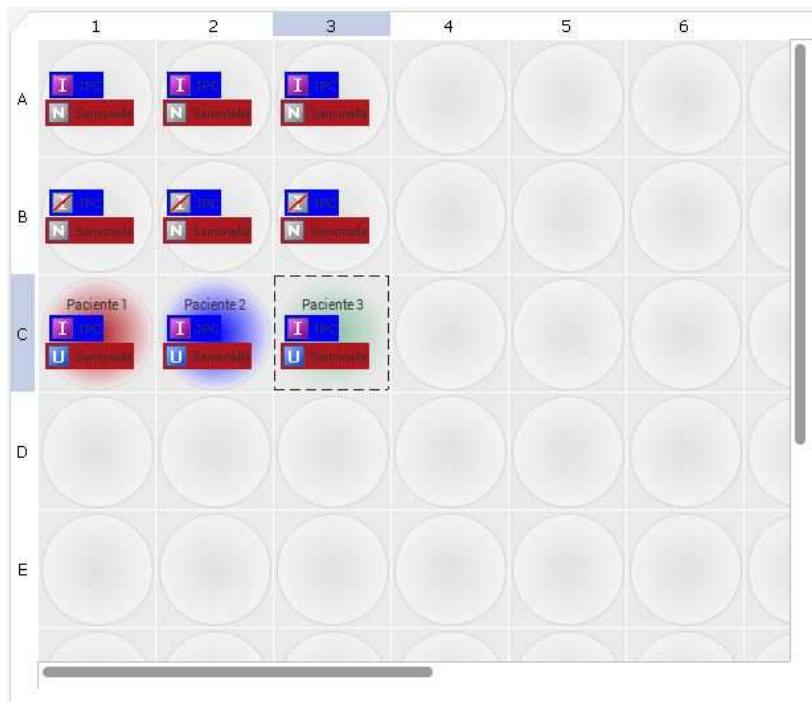




Fig. 7a


| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|


| | | |
|--|------------------------|---|
|  <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p> | <p>POP 3.18</p> | <p>Programação de Experimentos Qualitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p> |
|--|------------------------|---|

Para Setup de genotipagem (exemplo):

1. Selecione os poços A1, A2 e A3 e clique em *assign* para SNP Ensaio 1 (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*) com a *task Negative Control*.

2. Selecione o poço B1 e clique em *assign* para SNP Ensaio 1 (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*) com a *task*  (controle Homozigoto para o alelo 1). Repita o processo para os outros controles (poços B2 e B3).

3. Selecione os poços C1, C2, C3... e clique em *assign* para SNP Ensaio 1 (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*) com a *task*  (Unknown: amostra).

4. Selecione cada poço separadamente (C1) e atribua a amostra → *assign* Paciente 1. Repita o processo para outras amostras. É possível alterar o zoom da placa  para visualizar cada poço com detalhe (Fig. 7b).

5. É possível iniciar uma corrida sem preenchimento prévio dos itens 3.3 e 3.4, podendo estes tópicos serem preenchidos depois de correr o experimento. No entanto, nesse caso, quando terminar a corrida não haverá dados visíveis no gráfico de amplificação (eles aparecerão somente após o preenchimentos dos itens). O preenchimento dos tópicos 3.1 e 3.2 é obrigatório antes do início da corrida.

| | | | |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|
| Elaborado por: TFE | Revisado por: PKA | Ass.: | Data 09.05.2016 |
|--------------------|-------------------|-------|-----------------|

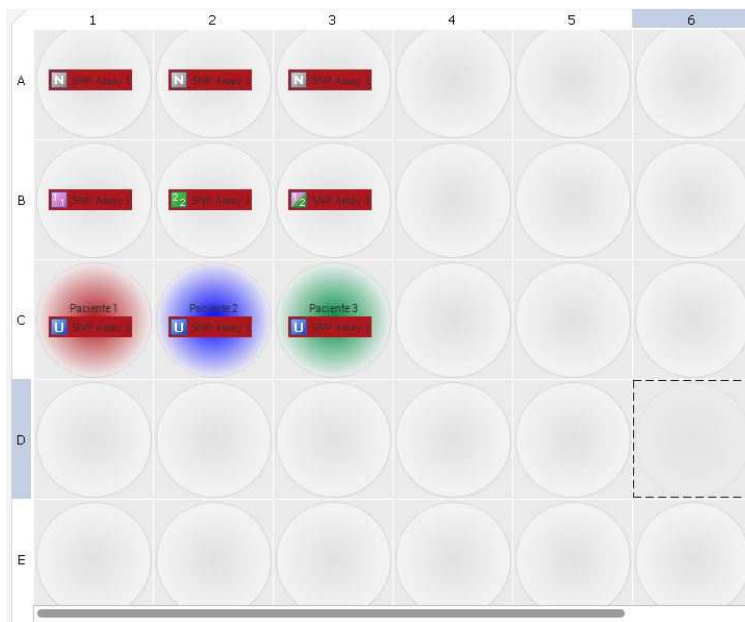


Fig. 7b

5. Para salvar o experimento, clique e selecione no menu superior *Save*, o nome do arquivo corresponde ao nome do experimento já definido (extensão .eds). Para salvar como um template, clique e selecione no menu superior *Save As* (extensão .edt) (Fig. 8).

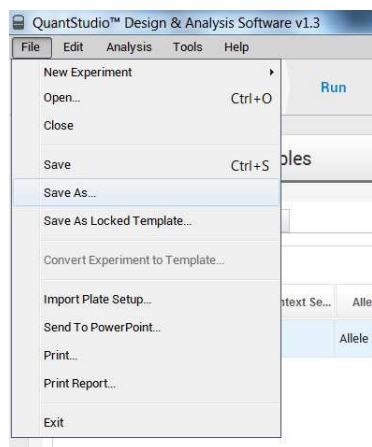


Fig. 8

3.5 – Iniciar a corrida

Dentro da aba *Run*, clique em *Start Run* (Fig. 9) e selecione o nome do instrumento. Toda vez que se inicia uma corrida, obrigatoriamente o software abre uma janela para salvar o experimento (caso não tenha feito no ponto 3.4 – 5). A ciclagem só começa após este procedimento.

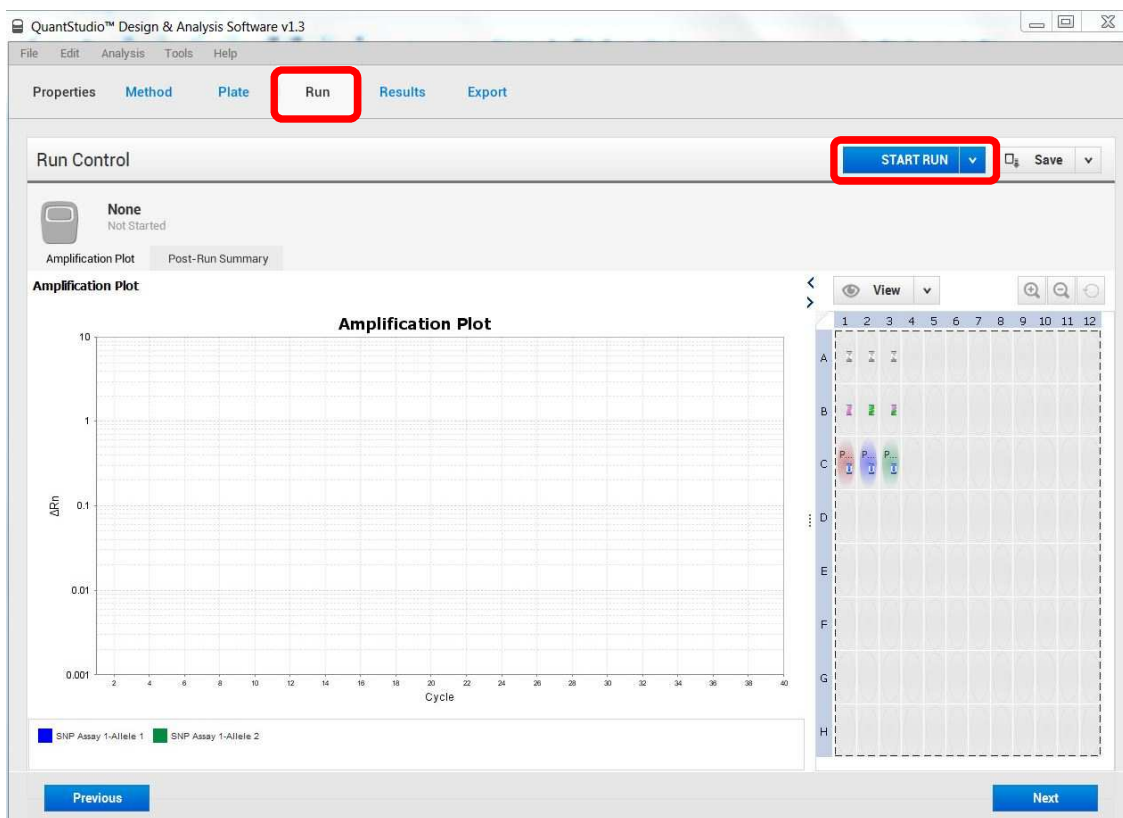


Fig. 9