 <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p>
--	------------------------	--

1. OBJETIVO: Programação de dois experimentos quantitativos, um ensaio de Quantificação Absoluta/Curva Padrão Relativa e um ensaio de Ct Comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

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)

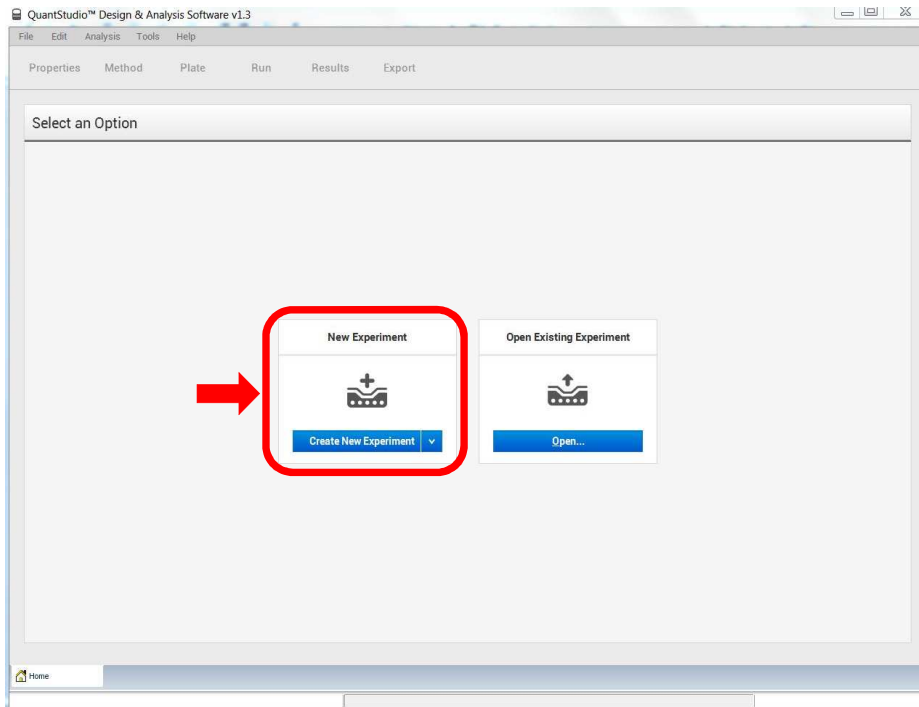


Fig. 1 – Home menu do software QuantStudio Design and Analysis

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

ThermoFisher SCIENTIFIC The world leader in serving science	POP 3.19	Programação de Experimentos Quantitativos 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).

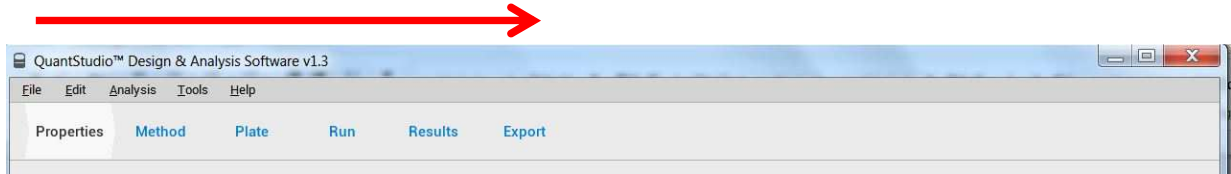


Fig. 2a

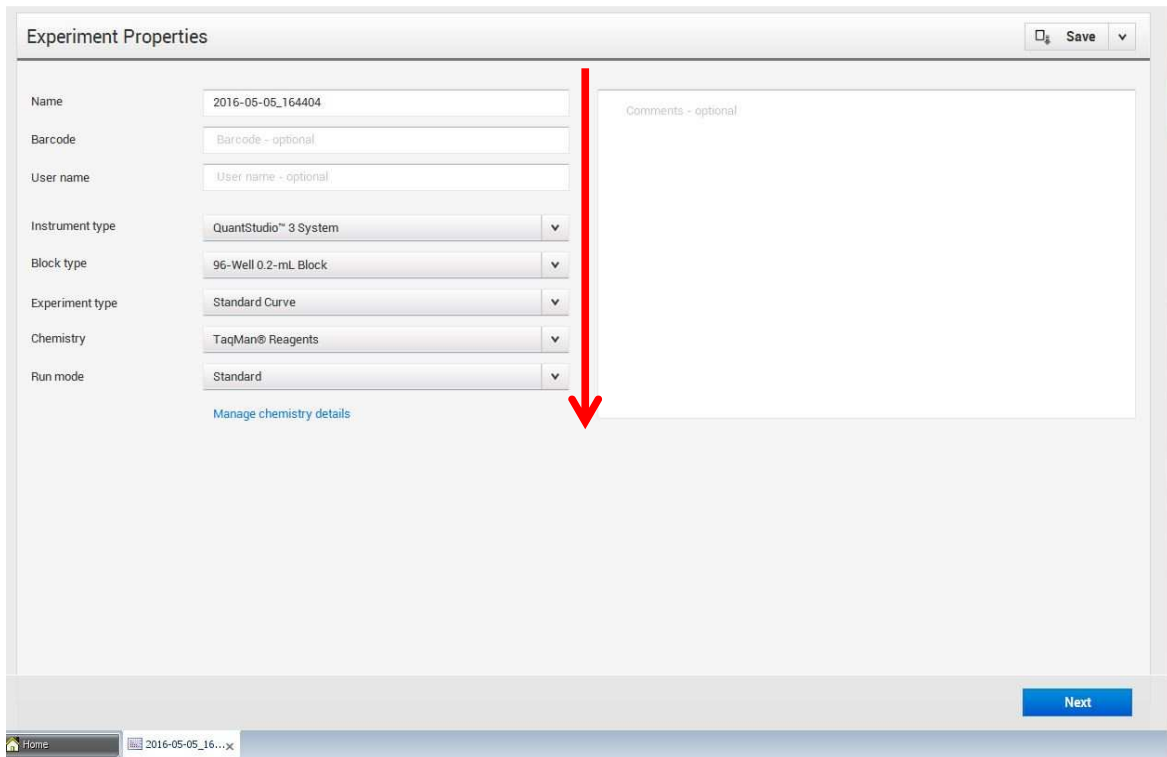



Fig. 2b

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

 <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos 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 na 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 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

 <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos 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 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

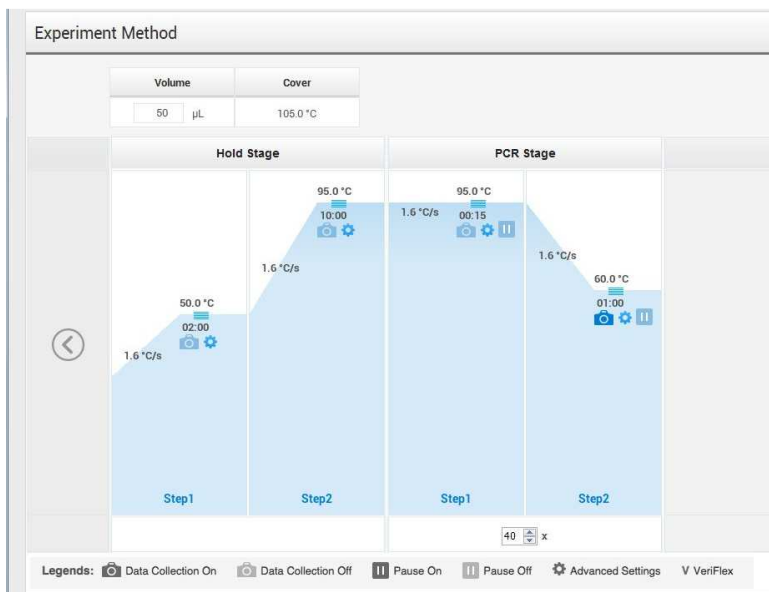



Fig. 3b



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 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

 <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos 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 quantificação, a fluorescência é coletada no passo de extensão (durante 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 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

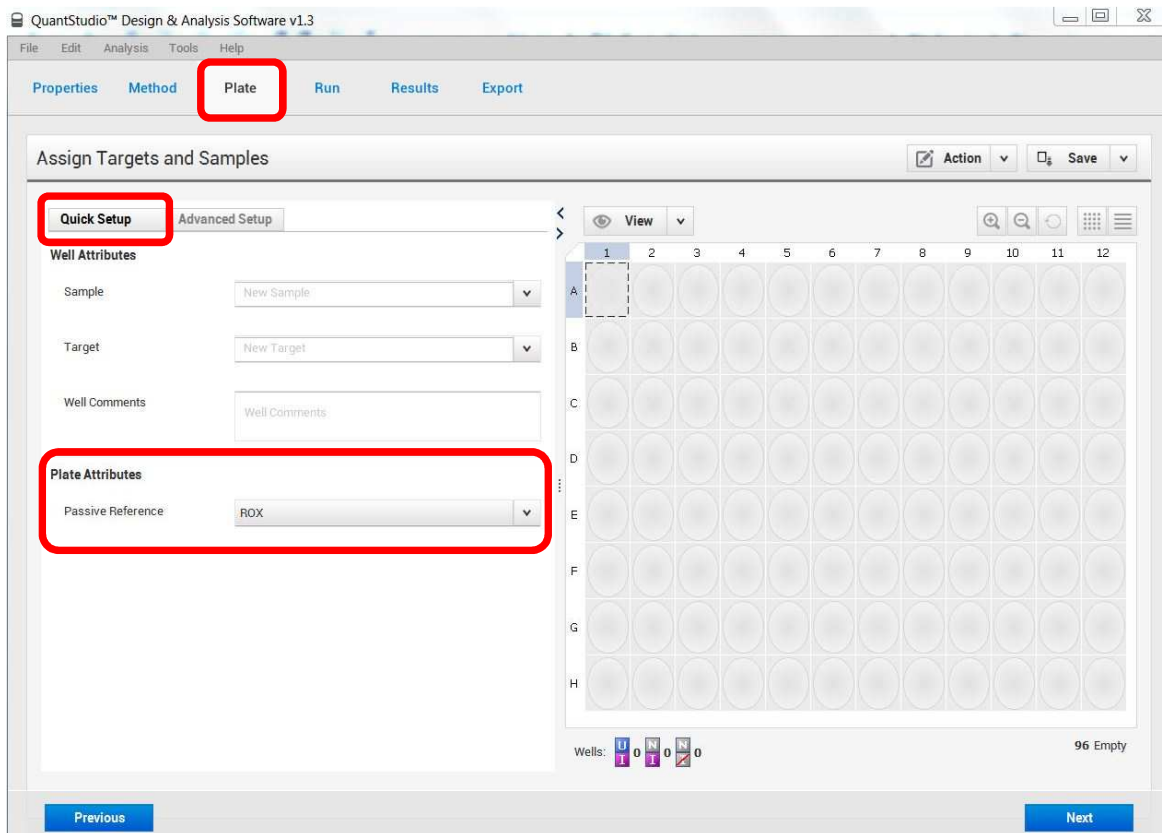


Fig. 4a

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.

Selecione o target já existente e defina o nome (ex. Gene A), selecione o Reporter e Quencher (ex. FAM e MGB) em caso de sonda TaqMan. No caso de SYBR, é só deixar o padrão (Reporter: SYBR e Quencher: none).

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

Clique em *Add* para adicionar novo ensaio (ex. Gene B, marcação FAM e sonda MGB). Para apagar targets criados, selecione o target, clique em *Actions* e depois em *Delete Target*

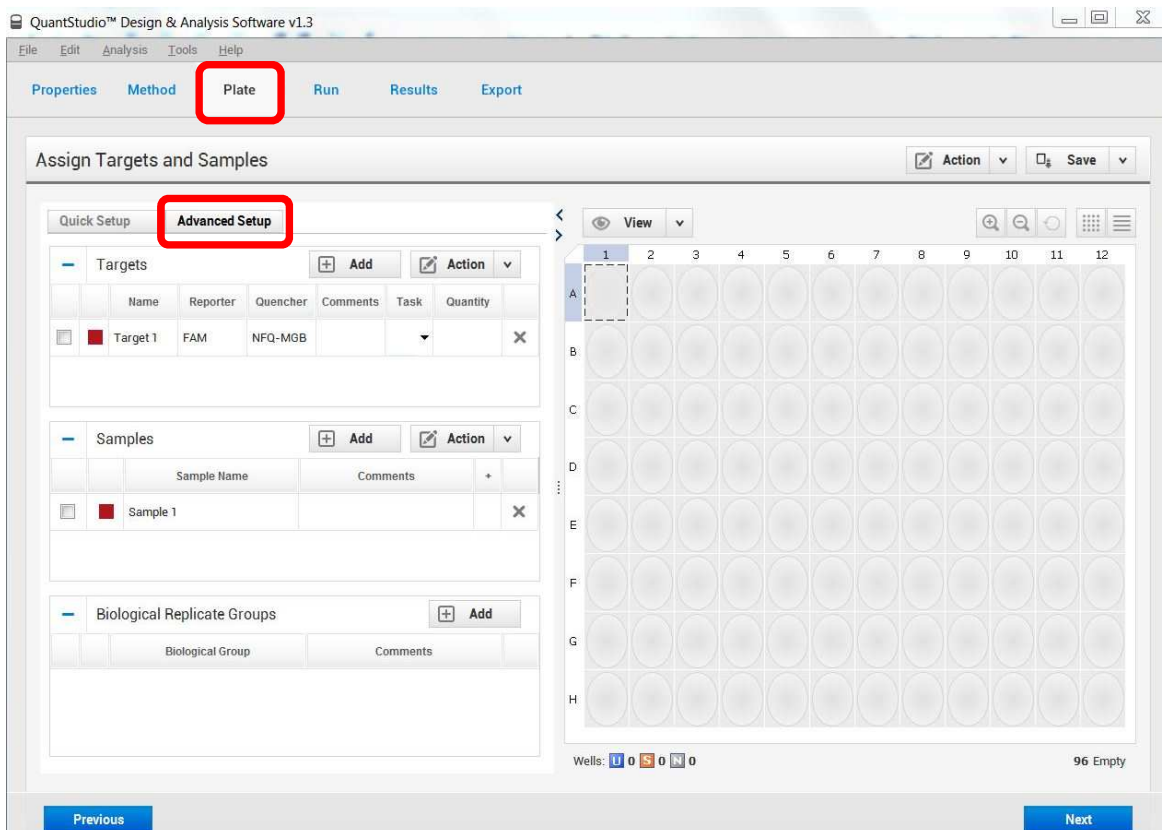



Fig. 4b

Opcional: para salvar as informações dos ensaios, 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*. A criação dessa biblioteca evita que tenha que re-escrever a informação de ensaios usados com frequência.

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

 <p>ThermoFisher SCIENTIFIC The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p>
---	------------------------	--

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 (clcando em *Action*, depois *Import from Library*).

3. (Opcional) Na janela *Biological Replicate Groups*, clique em *Add* para adicionar grupos biológicos. Clique em cima dos grupos para nomeá-los (ex: Controle, Tratamento A...).

3.4 – Atribuir os targets e amostras na placa

Ainda dentro da aba *Plate*, atribua todas amostras e targets aos respectivos poços na placa.

Para Programação de Quantificação Absoluta ou Curva Padrão Relativa:

1. O modo mais direto de programar uma curva padrão/diluição seriada é clicar em *Actions > Define and Set Up Standards* (Fig. 5a).

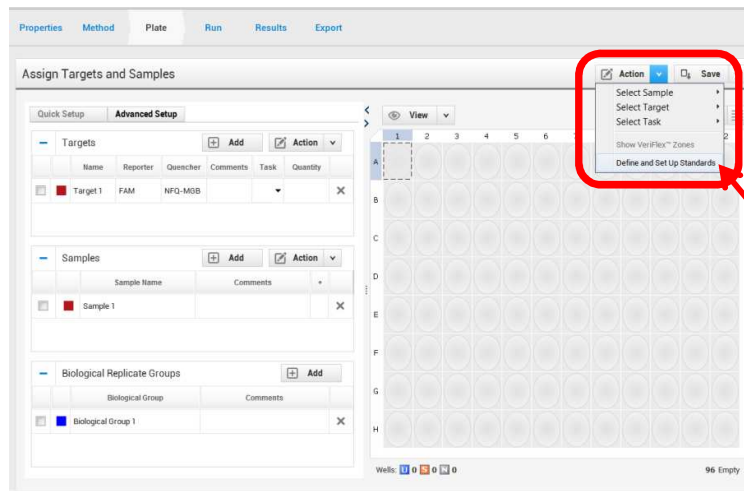



Fig. 5a

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

 <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p>
--	------------------------	--

2. Ao clicar em *Define and Set Up Standards*, abrirá uma janela de programação (Fig. 5b). Preencha os dados de cima para baixo: selecione se a reação está em Singleplex ou Multiplex; depois o alvo da curva/diluição (Gene A e/ou Gene B); preencha quantos pontos tem a sua curva/diluição (lembrando que o mínimo recomendado são 5 pontos de diluição); quantas réplicas técnicas (idealmente triplicata); qual a quantidade inicial (o ponto mais concentrado); e qual o fator de diluição (ex. 1:10).

3. Selecione onde a curva será montada (em quais poços os padrões serão pipetados); o software pode colocar a curva automaticamente (*Automatically Select Wells for Me*) ou o usuário selecionar onde quer montar a curva (*Let Me Select Wells*). Depois, selecione de que forma as réplicas técnicas estão distribuídas: se estão lado a lado – em linha na placa (*Row*), ou uma abaixo da outra – em coluna na placa (*Columns*).

4. Clique em *Apply*. Se não tiver outra curva para montar, clique em *Close*. Caso contrário, repita o processo (desde o 3.4 - 2) e, após montagem de todas as curvas, clique em *Close*.

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

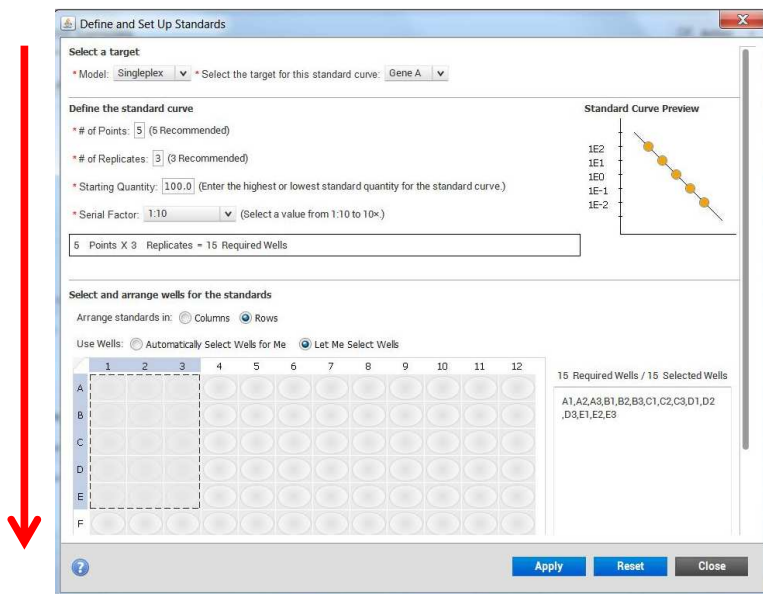





Fig. 5b

5. Selecione os poços F1, F2, F3, G1, G2 e G3 e clique em *assign* para Gene A (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*). Atribua a função (task)  (Unknown: amostra). Repita o processo para os poços F4, F5, F6, G4, G5 e G6 para o Gene B.

6. Selecione os poços H1, H2 e H3 e clique em *assign* para Gene A (utilize a caixa quadrada ao lado do nome do *target*), atribua a função nesses poços como task  (NTC: No Template Control). Repita o processo para Gene B nos poços H4, H5 e H6.

7. Selecione os poços F1 até F6 e atribua a amostra → *assign* Paciente 1 (utilize a caixa quadrada ao lado do nome da *sample*). Repita para outros poços → *assign* Paciente 2. Repita para outros poços. É possível alterar o zoom da placa  para visualizar cada poço com detalhe (Fig. 6).

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

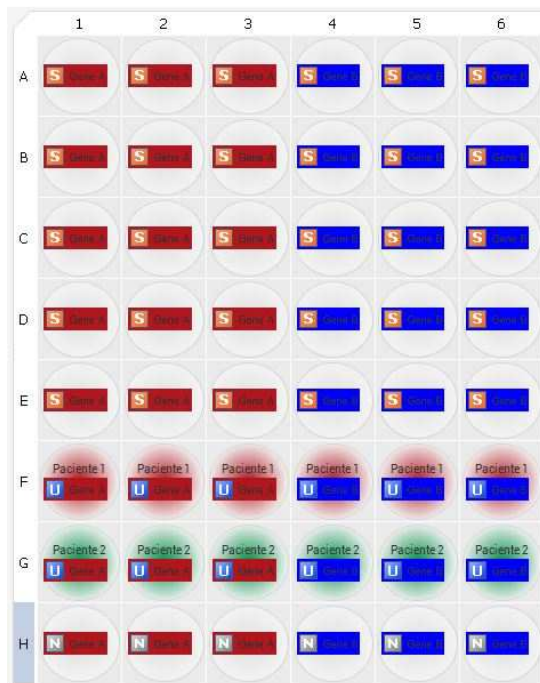



Fig. 6

Para Setup de Comparative CT ($\Delta\Delta CT$):

1. Selecione os poços onde estão os ensaios e as amostras (por ex. de A1 à D3), clique em *assign* para os targets do experimento (ex. Gene A marcado com FAM e Gene B marcado com VIC) com a task **U** (lembre-se: só podemos colocar dois ensaios no mesmo poço, multiplex, caso seja sonda TaqMan com reporter diferentes)
2. Selecione os poços E1, E2 e E3 e clique em *assign* para Gene A e Gene B, atribua a função nesses poços como task **N** (NTC: No Template Control)

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science	POP 3.19	Programação de Experimentos Quantitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5
---	-----------------	--

3. Selecione os poços A1, A2 e A3 e atribua a amostra → *assign* Paciente 1. Repita para outros poços/outras amostras. É possível alterar o zoom da placa  para visualizar cada poço com detalhe (Fig. 7).

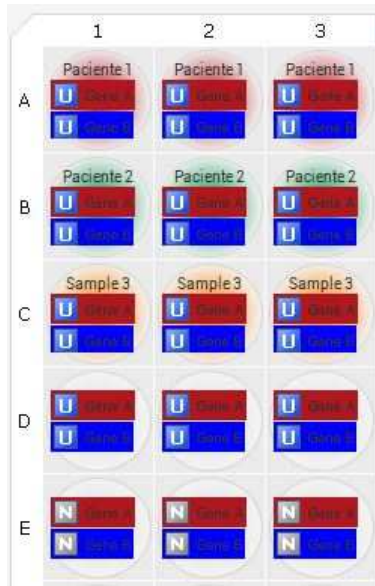



Fig. 7

Nota: 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 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

 <p>ThermoFisher S C I E N T I F I C The world leader in serving science</p>	<p>POP 3.19</p>	<p>Programação de Experimentos Quantitativos no Software QuantStudio™ Design & Analysis v1.3.1 para os equipamentos QuantStudio™ 3 e QuantStudio™ 5</p>
--	------------------------	--

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).

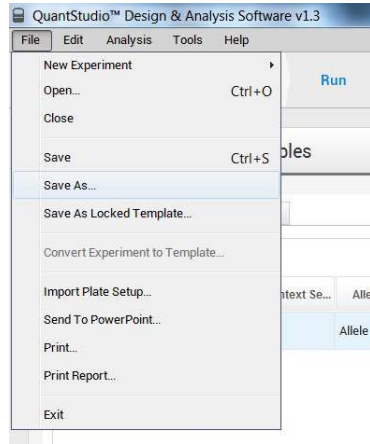


Fig. 8

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.

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 19.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

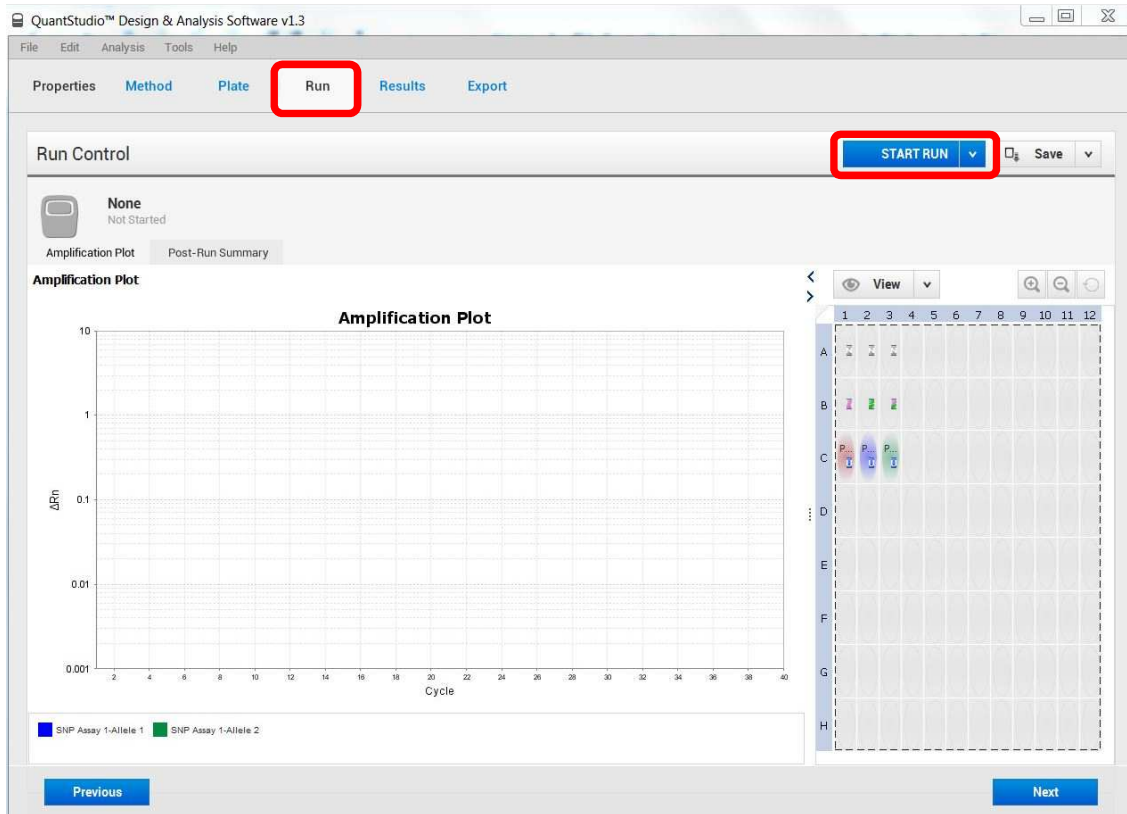


Fig. 9