

## Tutorial para Análise de Metilação no HRM Software v3.1

### 1. Como adicionar/atualizar um arquivo de calibração

Na primeira vez que for analisar um experimento no Software HRM, você terá que adicionar o arquivo de calibração (.eds) gerado durante a calibração HRM do seu instrumento:

1. Abra o HRM Software v3.1 e clique em *Analysis > Select Default Calibration File* (Fig. 1a)

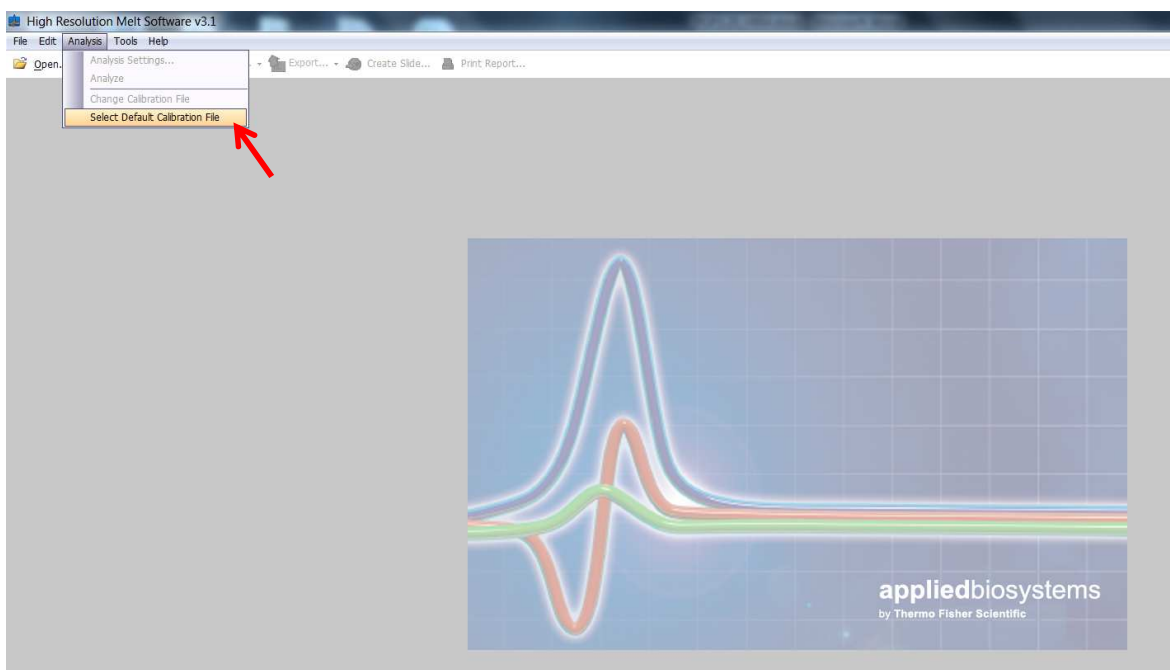


Fig. 1a

2. Em *Block type*, selecione o tipo de instrumento que foi calibrado (Fig. 1b)
3. Clique em *Browse* e busque o arquivo de calibração HRM (.eds) (Fig. 1b)
4. Clique em OK (Fig. 1b)

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

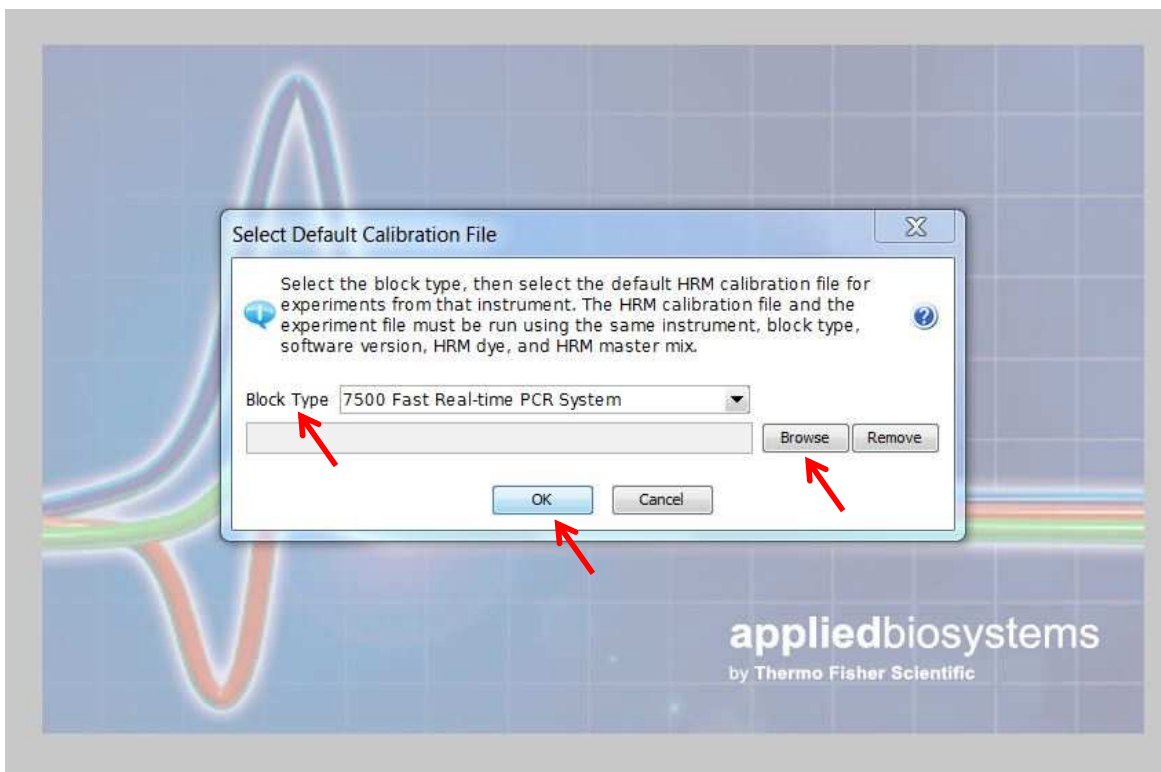


Fig. 1b

Toda vez que realizar nova calibração HRM em seu instrumento, o arquivo de calibração (.eds) no software deverá ser atualizado:

1. Clique em *Analysis > Change Calibration File* (Fig. 1c)
2. Clique em *Browse* para buscar o arquivo de calibração HRM (.eds) e depois clique em OK

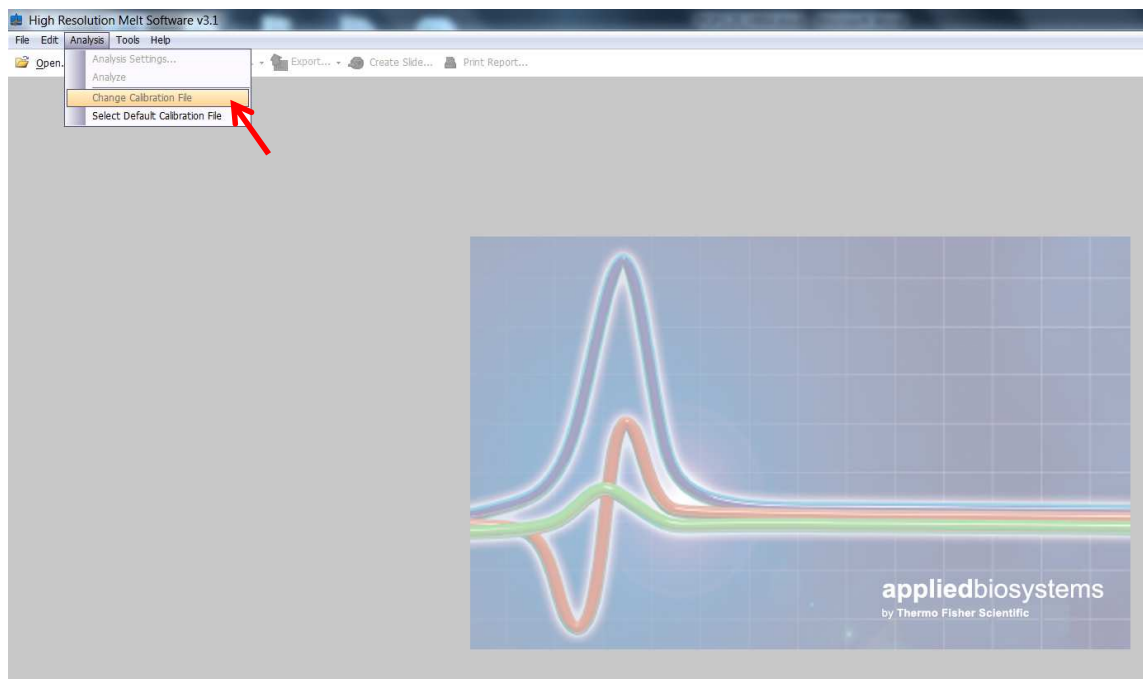


Fig. 1c

## 2. Como analisar um experimento

1. Abra o HRM Software v3.1 e, no menu superior, clique em *File > Open*
2. Selecione o arquivo de corrida (.eds) e clique em OK

No menu ao lado esquerdo, haverá três abas: *Setup*, *Analysis* e *Export* (Fig. 2a)

### 2.1 Setup

Na aba *Setup*, haverá quatro janelas: *Experiment properties*, *Define*, *Assign* e *Run Method* (Fig. 2a).

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

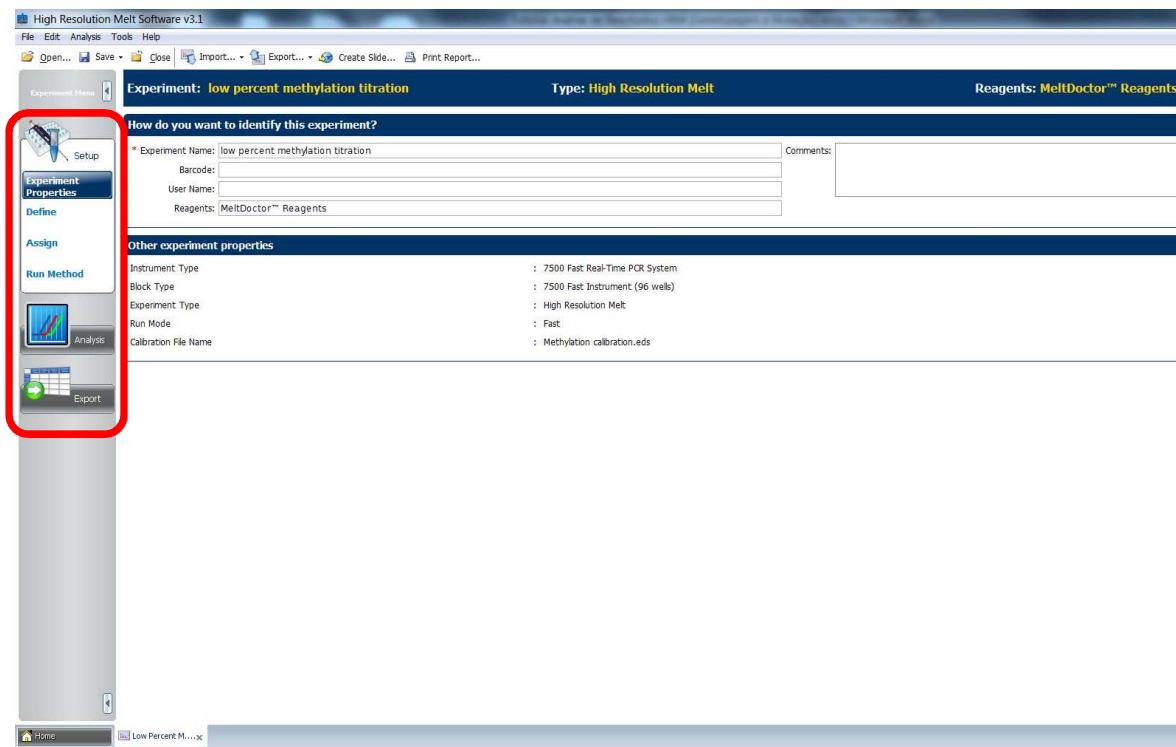


Fig. 2a

### 2.1.1 Experiment Properties

Essa janela já estará preenchida com as informações colocadas no software do instrumento em que o experimento foi corrido (Fig. 2a). Caso necessário:

- 1 *Experiment Name*: modifique o nome do experimento
- 2 *Barcode (opcional)*: modifique ou insira o código de barras da placa
- 3 *User Name (opcional)*: modifique ou insira o nome do usuário
- 4 *Reagents (opcional)*: modifique ou insira informações a respeito dos reagentes
- 5 *Comments (opcional)*: modifique ou insira comentários

### 2.1.2 Define

Essa janela já estará preenchida com as informações de *Targets* e *Samples* colocadas no software do instrumento em que o experimento foi corrido (Fig. 2b). Caso necessário:

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

- 1 *Nome dos Targets/Samples*: clique em cima dos alvos e amostras já existentes e modifique seus nomes. Para os alvos, também é possível modificar o *Reporter* e o *Quencher*
- 2 *Adicione novos Targets/Samples*: clique em *New* e adicione novos alvos e amostras
- 3 *Delete Targets/Samples*: clique em *Delete* para deletar alvos e amostras

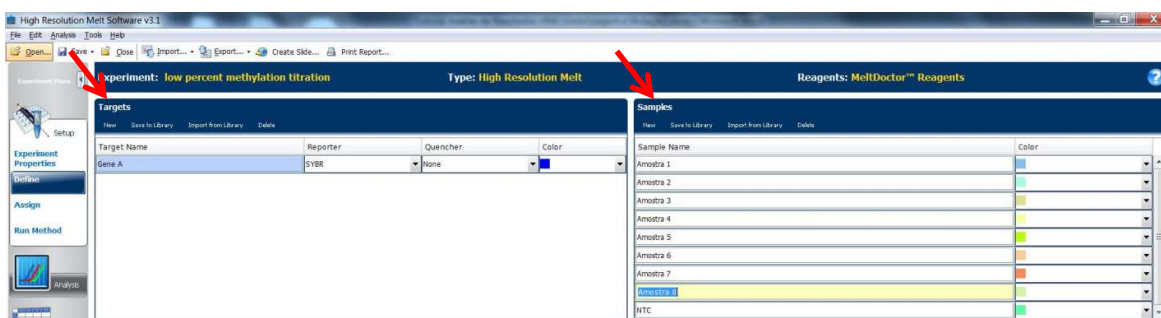


Fig. 2b

### Para definir os controles:

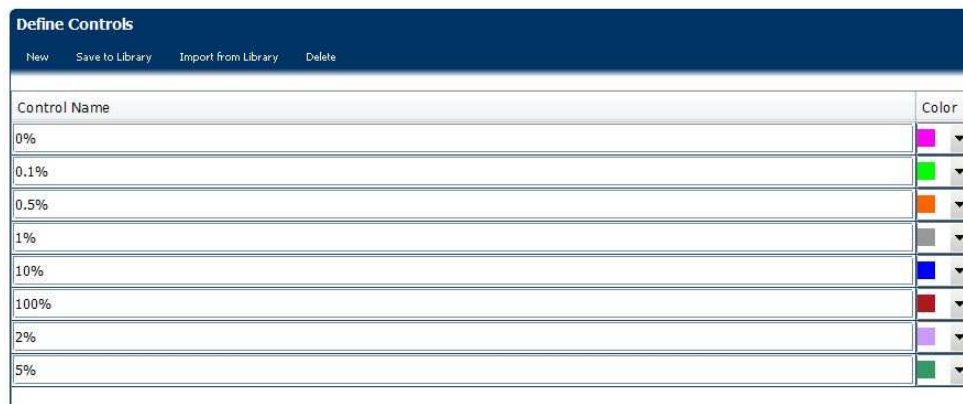
Esse campo deverá ser preenchido no software HRM. O tipo de amostra usada como controle dependerá do tipo de experimento:

- *Experimentos de Metilação* – DNAs controles que contém 0% a 100% de bases metiladas são usados como controle. O software identifica a porcentagem de metilação das amostras desconhecidas (*Unknown*) a partir da comparação com os controles

Nota: dois controles são obrigatórios: um controle contendo 0% de bases metiladas e outro contendo 100% de bases metiladas. Os outros controles (5%, 10%, 20%...) variam de acordo com a faixa de metilação que se quer identificar

1. Clique em *New* para adicionar um novo controle e editar seu nome (ex. 0%)
2. Clique em *Delete* para deletar controles já criados
3. (Opcional) Para salvar essas informações para experimentos posteriores, selecione um controle clicando em cima do nome dele e clique em *Save to Library*
4. (Opcional) Para importar essas informações em experimentos posteriores, clique em *Import from Library* > selecione o controle > clique em *Add Selected Control(s)*

Um exemplo de configuração é mostrado na Fig. 3a



Define Controls	
New	Save to Library
Import from Library	Delete
Control Name	Color
0%	
0.1%	
0.5%	
1%	
10%	
100%	
2%	
5%	

Fig. 3a

### 2.1.3 Assign

Essa janela já estará preenchida com as informações (layout da placa) colocadas no software do instrumento em que o experimento foi corrido (Fig. 3b). Para localizar os controles na placa:

1. Selecione o poço em que o controle foi pipetado (ex. Poço C3) e clique em *assign* para o nome do controle (ex. 100%) (Fig. 3b). Caso necessário, repita para os outros controles

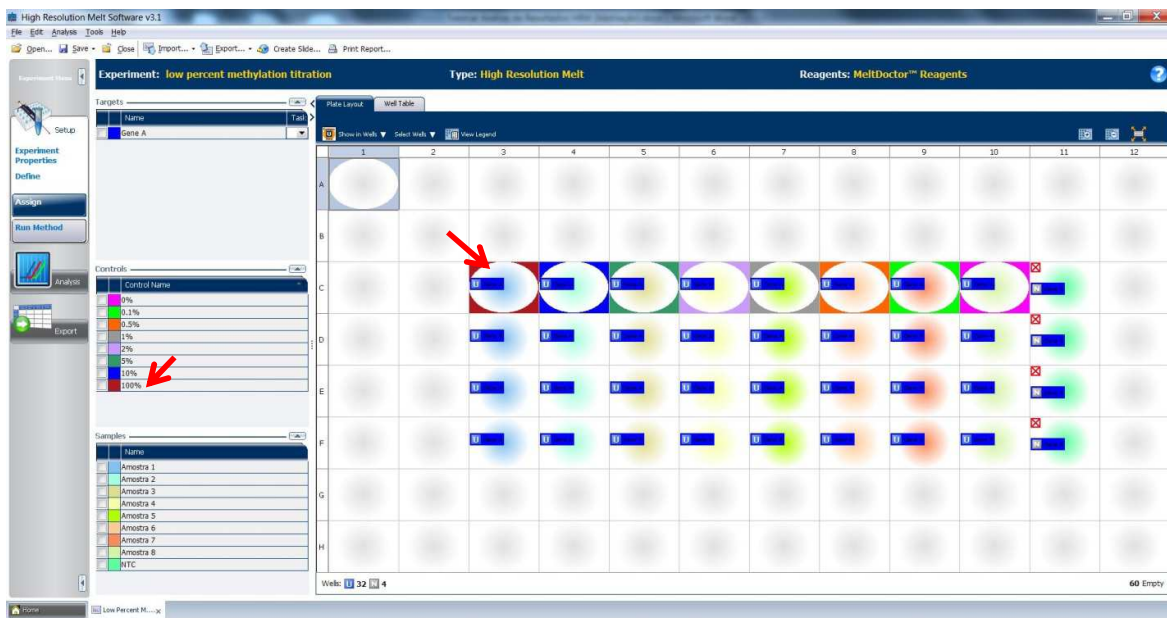


Fig. 3b

### 2.1.4 Run Method

Essa janela já estará preenchida com o protocolo de ciclagem do experimento. Não é possível editar as informações desta janela

## 3. Analysis

Na aba *Analysis*, utilize a janela *High Resolution Melt Plots* para fazer a análise dos resultados (Fig. 4). Quatro gráficos serão analisados: *Raw Melt Curves*, *Derivative Melt Curves*, *Aligned Melt Curves* e *Difference Plot* (Fig. 4)

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

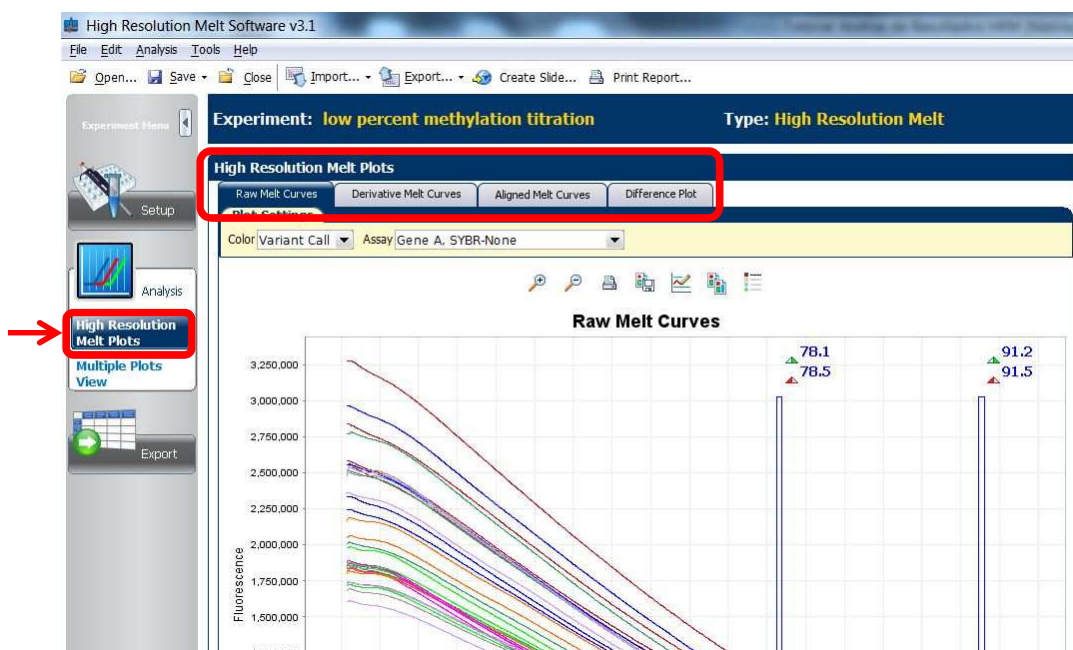


Fig. 4

**Raw Melt Curves:**

Esse gráfico mostra o dado bruto de fluorescência (eixo y) em função da temperatura (eixo x). Os diferentes padrões de melting são representados de acordo com a legenda (Fig. 5a)



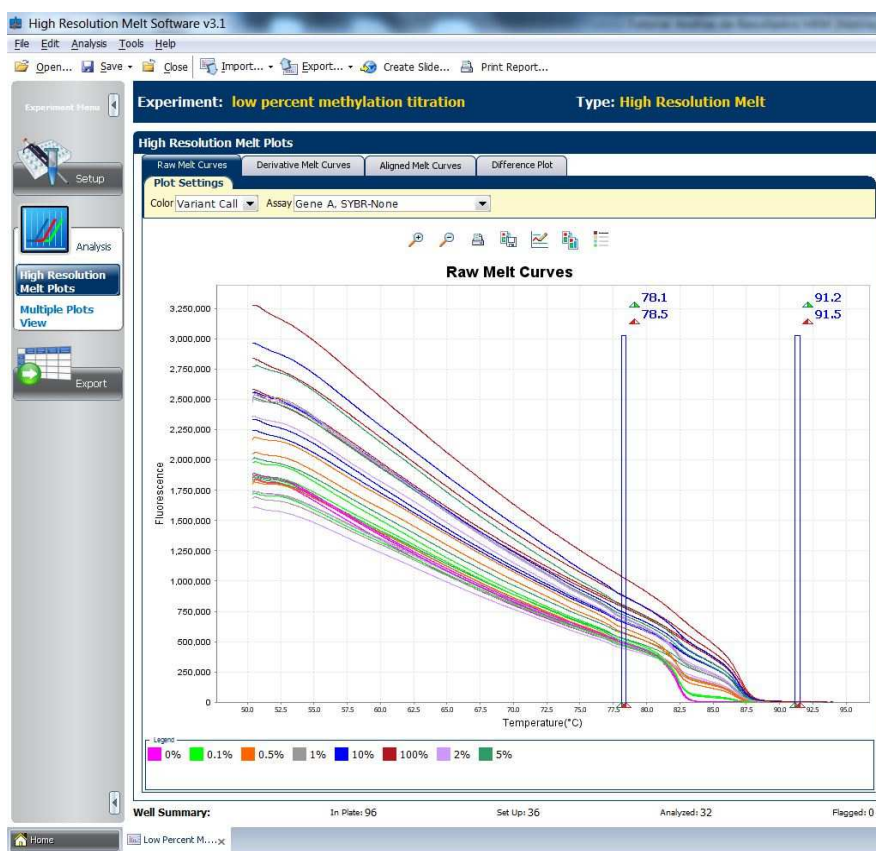


Fig. 5

Derivative Melt Curves:

Esse gráfico mostra o dado de fluorescência derivado (eixo y) em função da temperatura (eixo x) (Fig. 6a)

Se necessário, ajuste as palhetas que definem a região pré-melting (corresponde a 100% de fluorescência) e pós-melting (corresponde a 0% de fluorescência) (Fig. 6a):

1. Posicione o *mouse* em cima de uma das palhetas e arraste para a região desejada. Elas devem ficar próximas às regiões de inflexão da curva (Fig. 6a)
2. Repita este procedimento para o restante das palhetas (Fig. 6a)
3. Clique em *Analyze* (Fig. 6b)

Nota 1: o intervalo recomendado para cada par de palhetas é de 0.5 – 1 grau

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

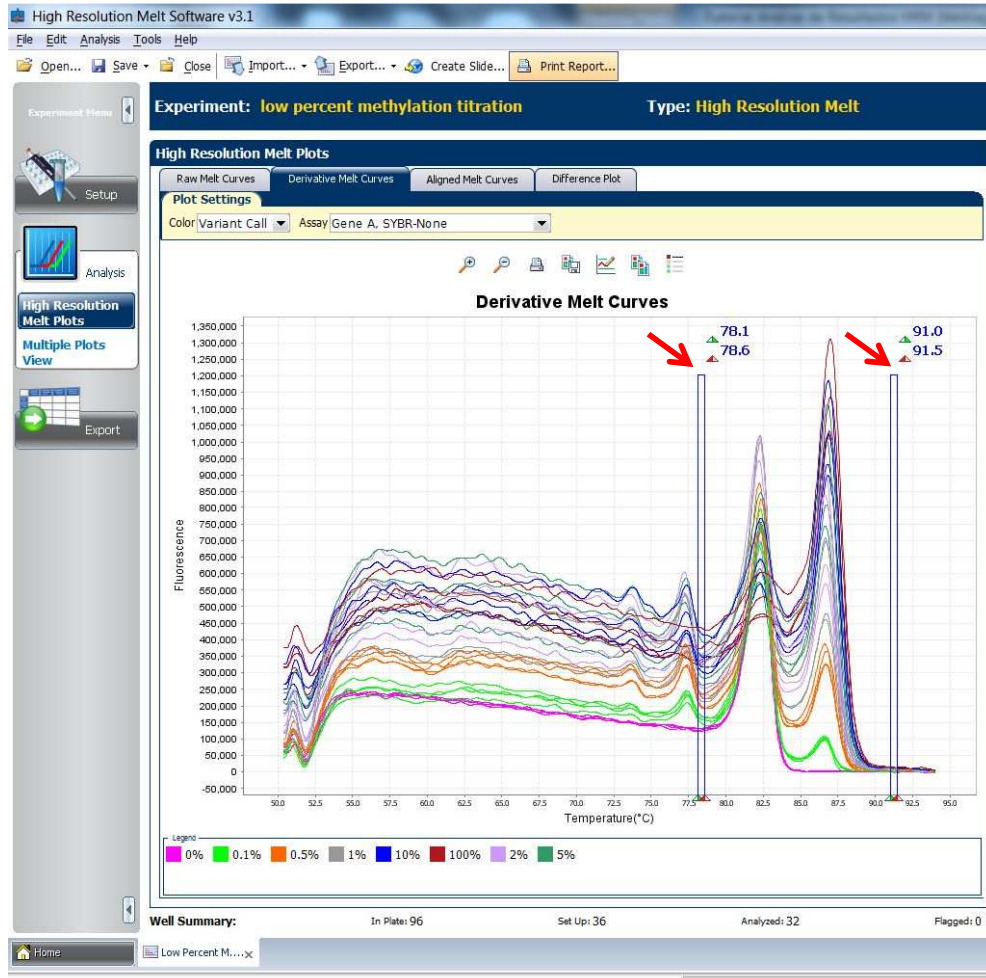


Fig. 6a

Elaborado por: TFE

Revisado por: PKA

Ass.:

Data 16.05.2016



Fig. 6b

**Importante!**

Diferente dos ensaios de Genotipagem e Detecção de Mutações, é esperado nos Ensaios de Metilação a presença de dois picos na curva de melting. A visualização de dois picos indica a presença de uma mistura de sequências metiladas e não metiladas.

As figuras abaixo representam os perfis esperados para as seguintes amostras:

- Controle 0% metilação: pico único deslocado à direita (Fig. 7a)
- Controle 100% metilação: pico único deslocado à esquerda (Fig. 7b)

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

- Controle 10% (e outros valores, com exceção de 0 e 100%): dois picos. O pico com maior altura pode estar deslocado à direita ou à esquerda, dependendo do grau de metilação da amostra (Fig. 7c)

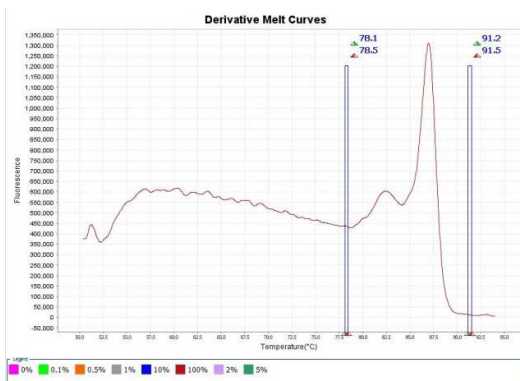


Fig. 7a

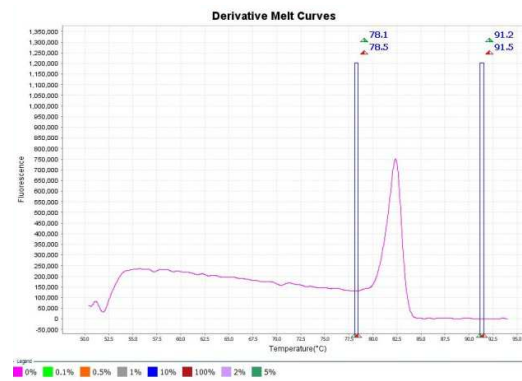


Fig. 7b

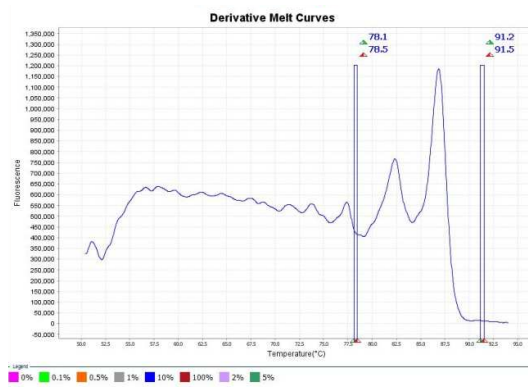


Fig. 7c

Aligned Melt Curves:

Esse gráfico mostra as curvas de melting em relação à porcentagem de fluorescência (0 – 100%) (eixo y) em função da temperatura (eixo x) (Fig. 8). As curvas de melting são alinhadas com o nível de fluorescência estabelecido para as regiões pré-(100%) e pós-(0%) melting

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

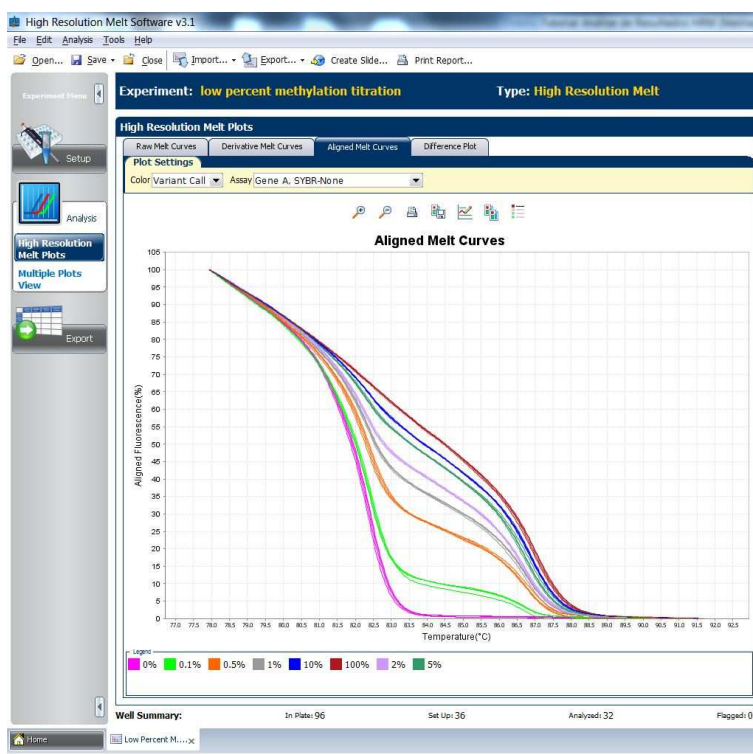


Fig. 8

Difference Plot:

Esse gráfico mostra as curvas de melting alinhadas (eixo y) em função da temperatura (eixo x) utilizando uma amostra como referência (Fig. 9)

Você pode selecionar qualquer amostra como referência (ex. 0%). Após a escolha, o software subtrai a fluorescência da curva referência das outras curvas

Para selecionar a amostra referência:

1. Em *Plot Settings*, clique em *Reference* e selecione a amostra referência (Fig. 9)

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

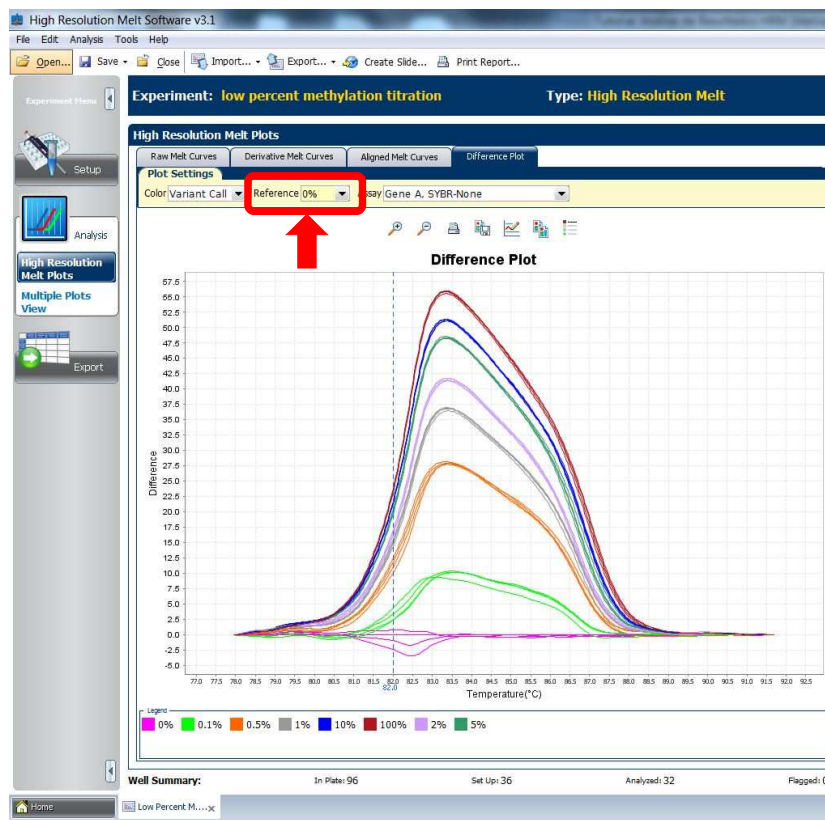


Fig. 9

## 1.1 Análise de Silhouette score

Na aba *Analysis*, ao lado direito dos gráficos, está representado o layout da placa (Fig. 10a). Para analisar os dados de silhouette score:

1. Clique na aba *Well Table* (Fig. 10a)
2. Na coluna Silhouette Score, verifique os valores atribuídos a cada amostra (Fig. 10b)

Nota: o silhouette score deve estar entre 80 e 100

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------



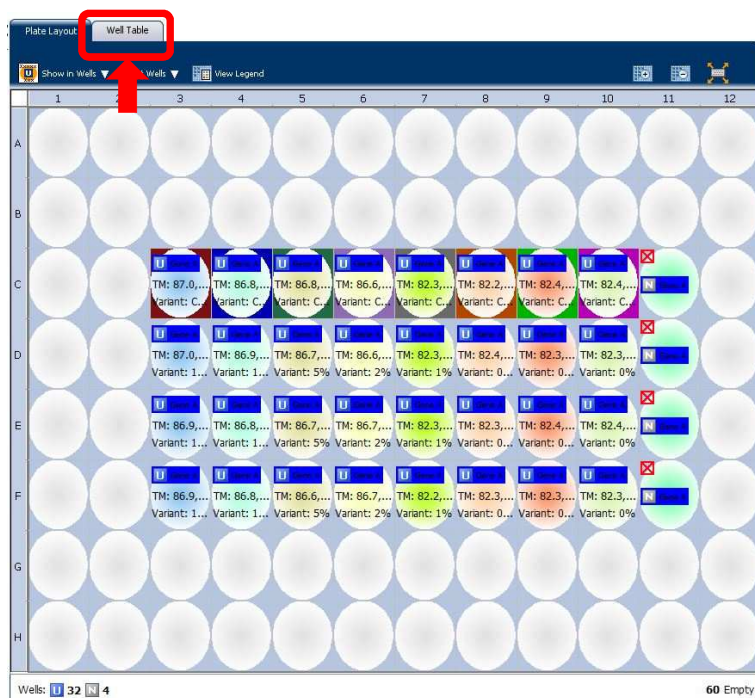


Fig. 10a

Well Table

Show in Table Select Wells Group by Expand All Collapse All

#	Well	Omit	Sample ...	Target ...	Variant ...	Silhouet...	Method	Tm1	Tm2	Tm3	Dyes	T
25	C1											
26	C2											
27	C3		Amostra 1	Gene A	Control-10...	99.4	uto	87.0	82.5		SYBR-None	UI
28	C4		Amostra 2	Gene A	Control-10%	99.0	uto	86.8	82.3	77.4	SYBR-None	UI
29	C5		Amostra 3	Gene A	Control-5%	95.0	uto	86.8	82.3	77.3	SYBR-None	UI
30	C6		Amostra 4	Gene A	Control-2%	98.9	uto	86.6	82.2	77.2	SYBR-None	UI
31	C7		Amostra 5	Gene A	Control-1%	99.0	uto	82.3	86.7	77.3	SYBR-None	UI
32	C8		Amostra 6	Gene A	Control-0.5%	98.2	uto	82.2	86.6	77.3	SYBR-None	UI
33	C9		Amostra 7	Gene A	Control-0.1%	98.9	uto	82.4	86.6		SYBR-None	UI
34	C10		Amostra 8	Gene A	Control-0%	98.5	uto	82.4			SYBR-None	UI
35	C11		NTC	Gene A							SYBR-None	UI
36	C12											
37	D1											
38	D2											
39	D3		Amostra 1	Gene A	100%	99.1	uto	87.0	82.5		SYBR-None	UI
40	D4		Amostra 2	Gene A	10%	99.3	uto	86.9	82.3	77.3	SYBR-None	UI
41	D5		Amostra 3	Gene A	5%	98.7	uto	86.7	82.2	77.2	SYBR-None	UI
42	D6		Amostra 4	Gene A	2%	98.2	uto	86.6	82.2	77.2	SYBR-None	UI
43	D7		Amostra 5	Gene A	1%	98.8	uto	82.3	86.7	77.3	SYBR-None	UI
44	D8		Amostra 6	Gene A	0.5%	97.8	uto	82.4	86.7	77.4	SYBR-None	UI
45	D9		Amostra 7	Gene A	0.1%	99.2	uto	82.3	86.6	77.4	SYBR-None	UI
46	D10		Amostra 8	Gene A	0%	99.0	uto	82.3			SYBR-None	UI
47	D11		NTC	Gene A							SYBR-None	UI
48	D12											
49	E1											
50	E2											
51	E3		Amostra 1	Gene A	100%	99.4	uto	86.9			SYBR-None	UI
52	E4		Amostra 2	Gene A	10%	99.5	uto	86.8	82.3	77.4	SYBR-None	UI
53	E5		Amostra 3	Gene A	5%	98.7	uto	86.7	82.3	77.3	SYBR-None	UI
54	E6		Amostra 4	Gene A	2%	99.1	uto	86.7	82.3	77.3	SYBR-None	UI
55	E7		Amostra 5	Gene A	1%	97.7	uto	82.3	86.7	77.3	SYBR-None	UI
56	E8		Amostra 6	Gene A	0.5%	99.0	uto	82.3	86.7	77.4	SYBR-None	UI
57	E9		Amostra 7	Gene A	0.1%	98.0	uto	82.4	86.6	77.4	SYBR-None	UI
58	E10		Amostra 8	Gene A	0%	97.6	uto	82.4			SYBR-None	UI
59	E11		NTC	Gene A							SYBR-None	UI
60	E12											
61	F1											

Fig. 10b

### 3. Exportar os resultados

Para exportar os resultados, clique na aba *Export* (Fig. 11a) e configure os seguintes parâmetros:

- *Export Data To*: selecione a opção *One File* ou *Separate Files* para determinar se os dados de *Sample Setup*, *HRM Raw*, *HRM Difference* e *Results* serão exportados em um arquivo único ou arquivos separados, respectivamente (Fig. 11a)

- *Export File Location*: clique em *Browse* e escolha o local onde o arquivo exportado ficará salvo no computador (Fig. 11a)

- *Export File Name*: caso necessário, modifique o nome do arquivo (Fig. 11a)

- *File Type*: selecione o formato que o arquivo deve ser exportado (.xls, .xlsx ou .txt) (Fig. 11a)

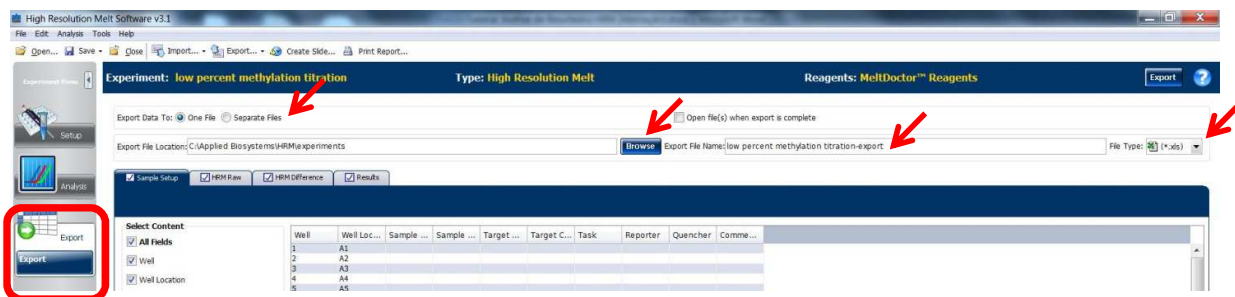


Fig. 11a

Dentro das abas (*Sample Setup*, *HRM Raw*, *HRM Difference*, *Results*), selecione quais dados devem ser exportados (Fig. 11b). Originalmente, todos os campos estarão marcados

Clique em *Export* no campo superior direito (Fig. 11b)

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------



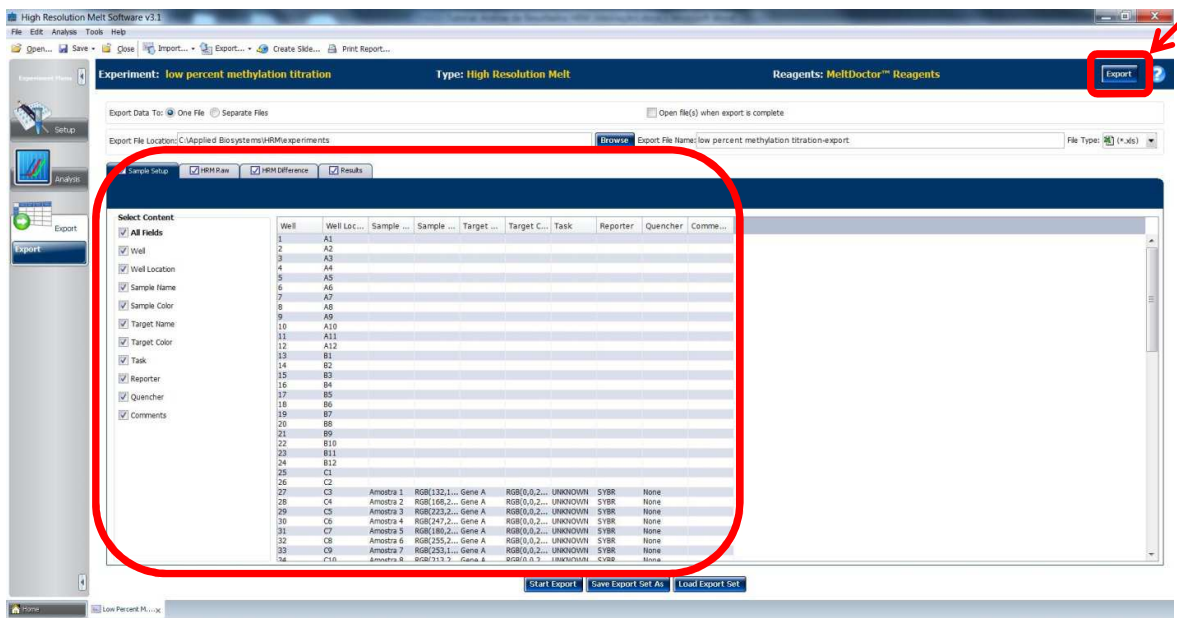


Fig. 11b

Para gerar um relatório dos dados em formato .pdf, no menu superior, clique em *Print Report* (Fig. 12a), selecione os dados a serem incluídos no relatório (Fig. 12b) e depois clique em *Print Report* (Fig. 12b)

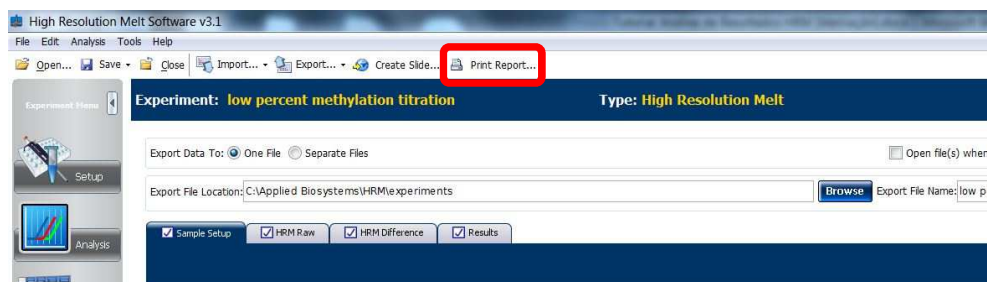


Fig. 12a

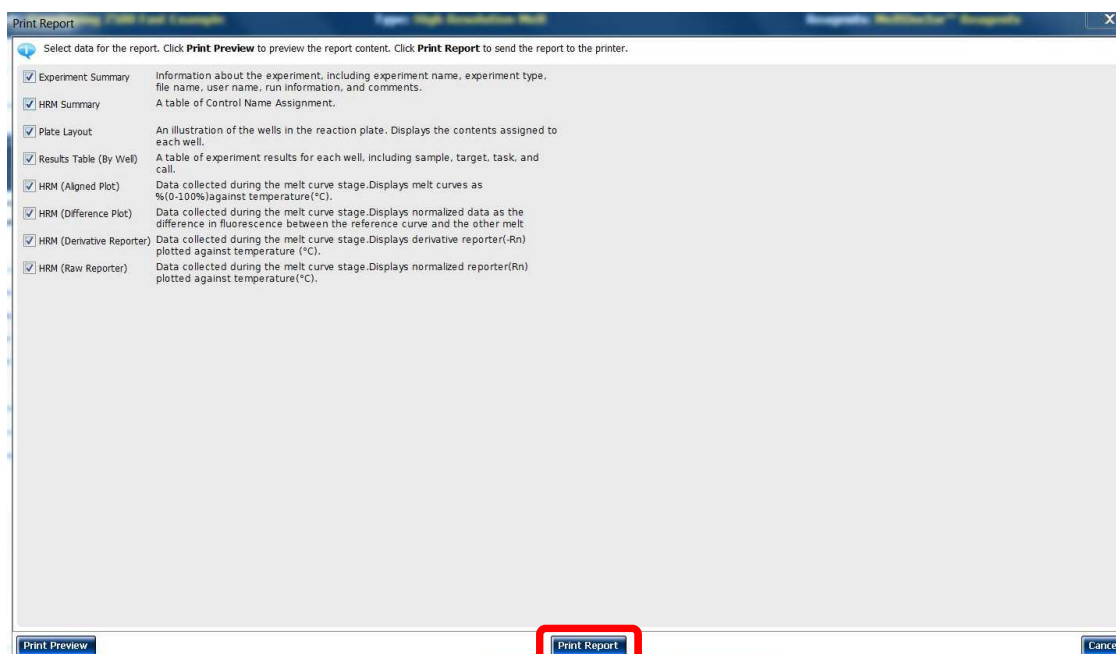


Fig. 12b

Para gerar um arquivo de power point com os gráficos de resultados, no menu superior, clique em *Create Slides* (Fig. 13a), selecione os gráficos a serem incluídos no arquivo (Fig. 13b) e depois clique em *Create Slides* (Fig. 13b)

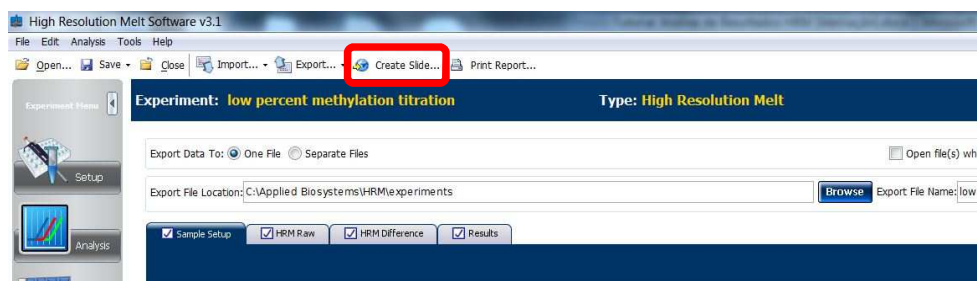


Fig. 13a

Elaborado por: TFE	Revisado por: PKA	Ass.:	Data 16.05.2016
--------------------	-------------------	-------	-----------------

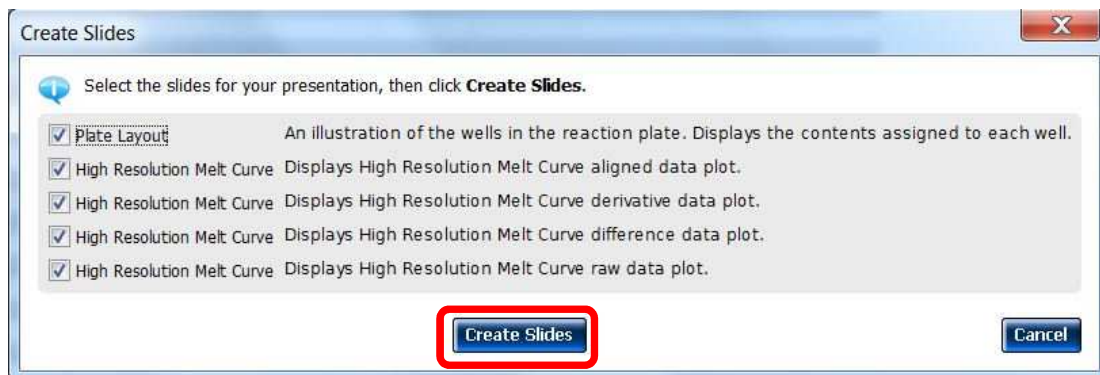


Fig. 13b