

**Tutorial para Análise de Ensaio de Genotipagem / Detecção de Mutações 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)

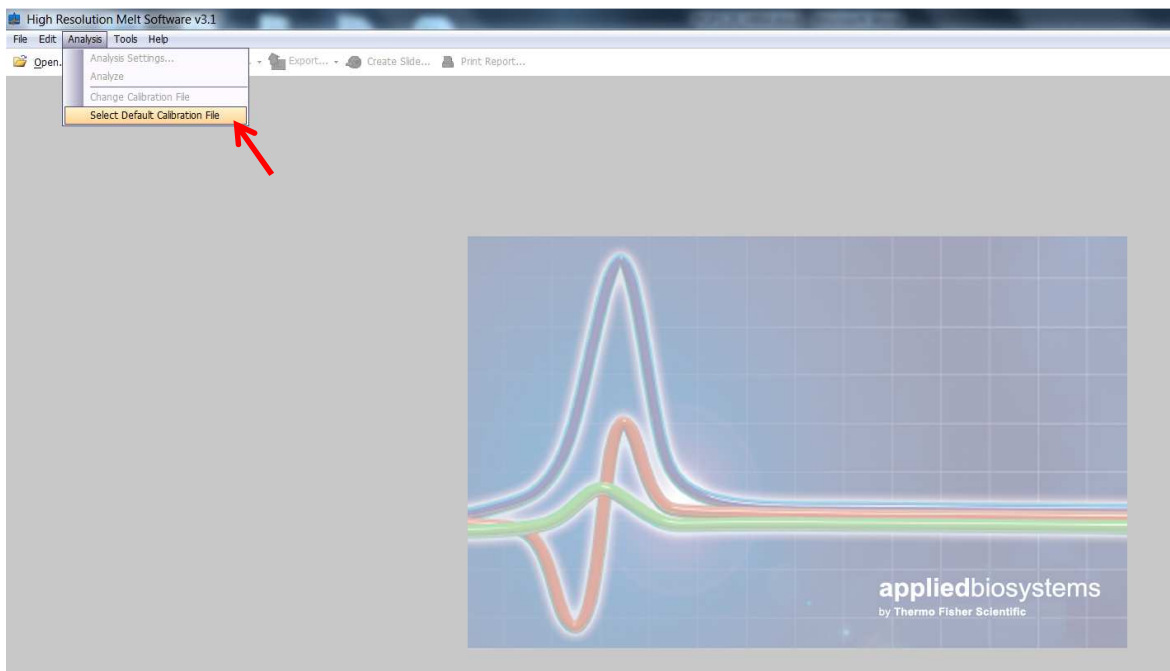


Fig. 1a

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
--------------------	-------------------	-------	-----------------

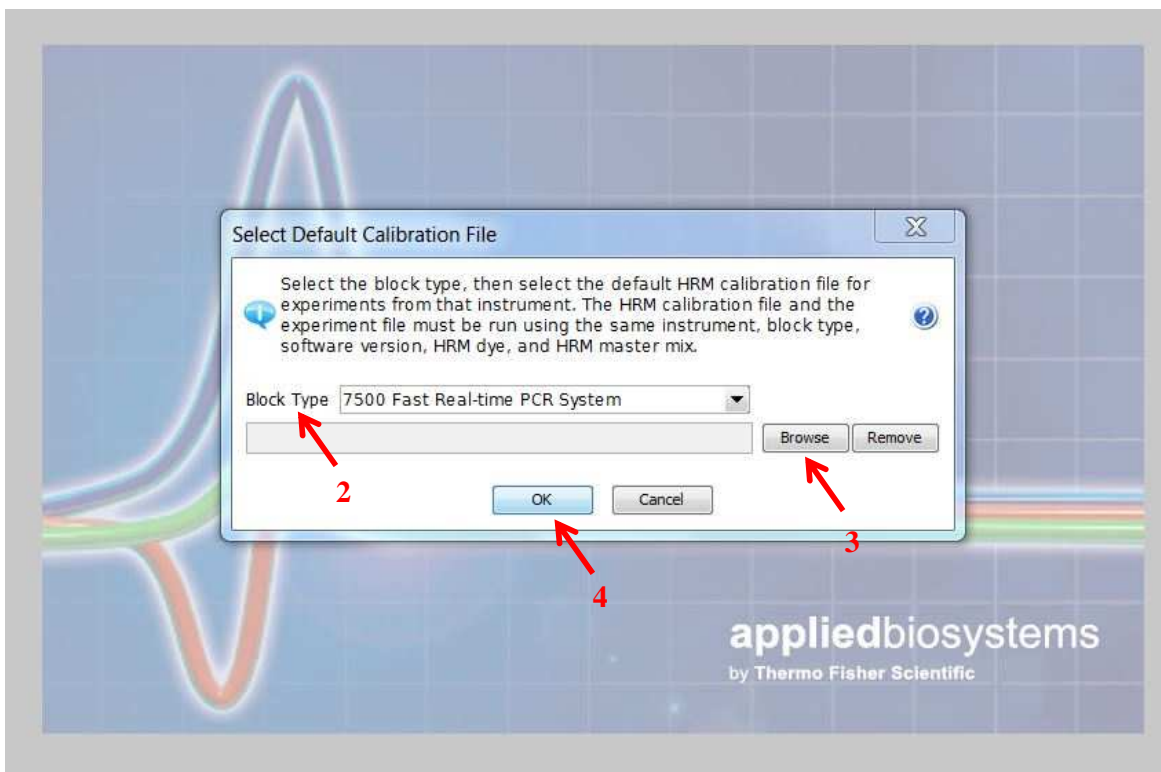


Fig. 1b

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*

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

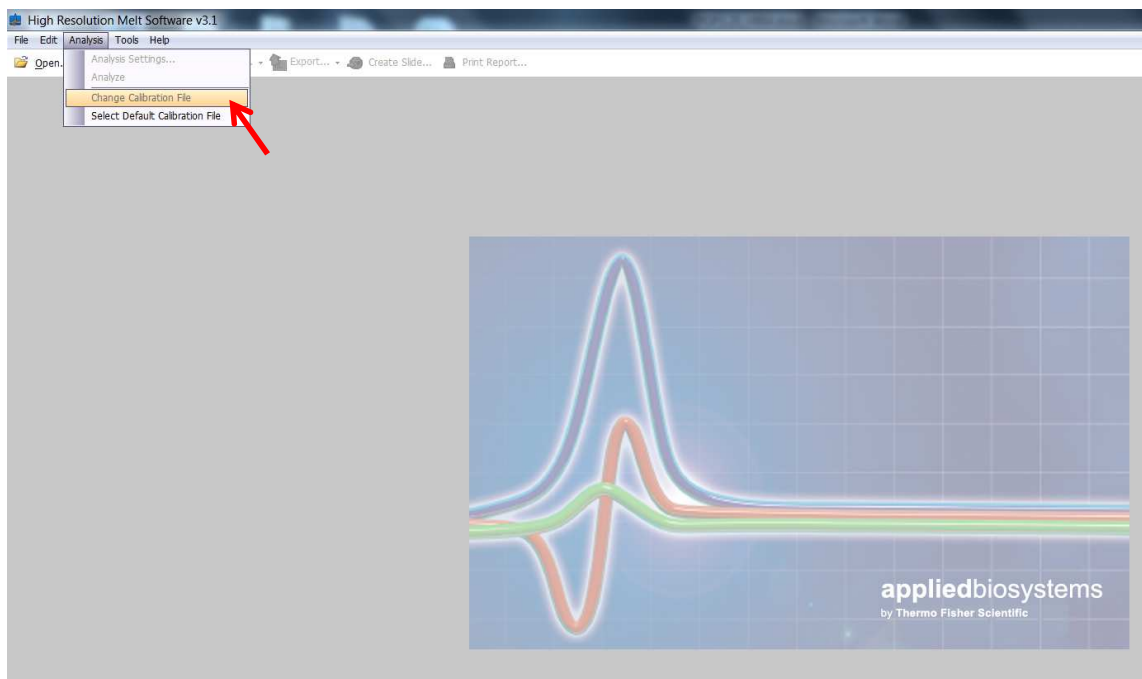


Fig. 1c

## 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
--------------------	-------------------	-------	-----------------

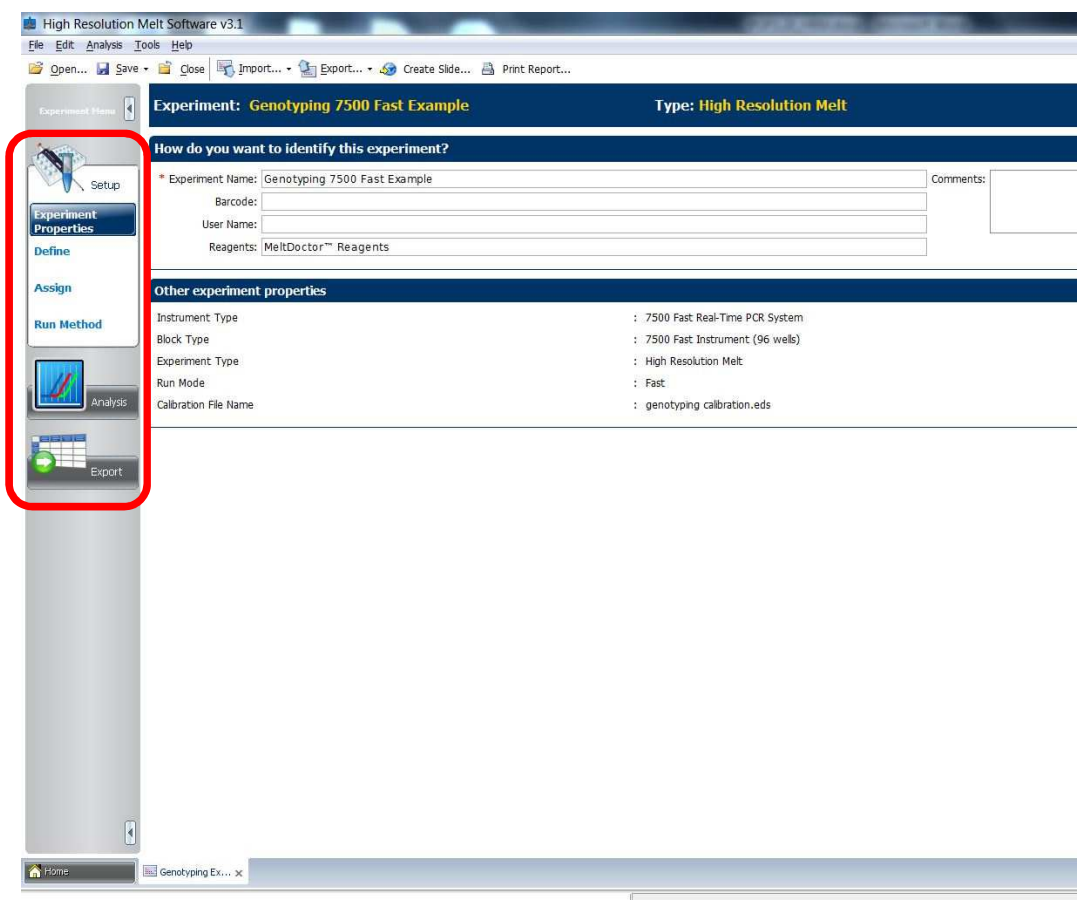


Fig. 2a

### 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:

- 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

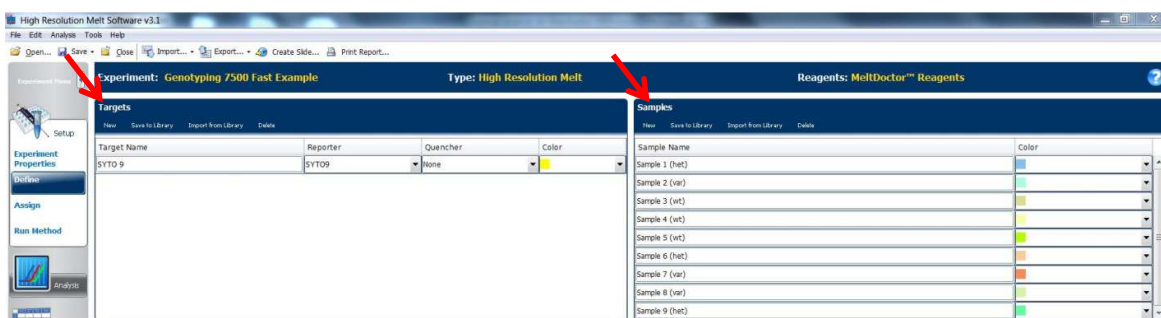


Fig. 2b

### 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 Detecção de Mutações* – uma ou mais amostras *wild type* podem ser usadas como controle. Para as amostras desconhecidas (*Unknown*), o software irá classificá-las como *wild type* (caso o perfil de denaturação seja o mesmo) ou como “variante X” (variante 1, variante 2, variante 3...)
- *Experimentos de Genotipagem* – três amostras são usadas como controle: homocigoto para o Alelo 1, homocigoto para o Alelo 2 e heterocigoto Alelo 1/Alelo 2. O software irá identificar as amostras desconhecidas (*Unknown*) pela comparação com os genótipos conhecidos

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

1. Clique em *New* para adicionar um novo controle e editar seu nome (ex. *Heterozygote*)
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

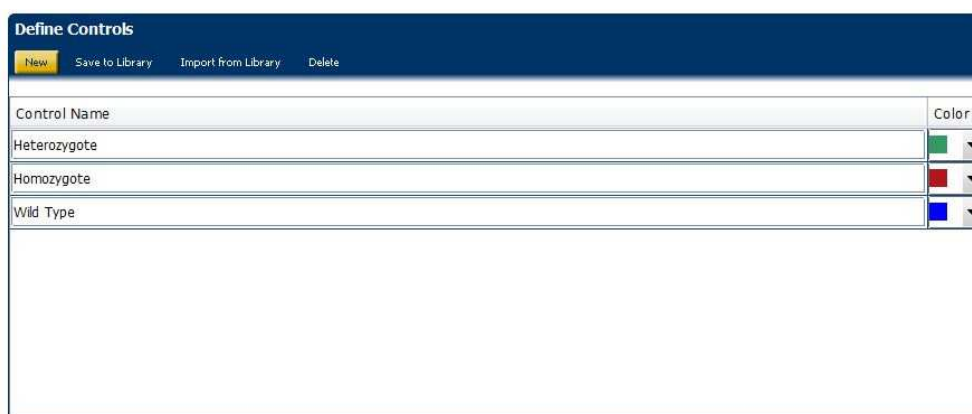


Fig. 3a

### 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 C2) e clique em *assign* para o nome do controle (ex. *Heterozygote*) (Fig. 3b). Caso necessário, repita para os outros controles

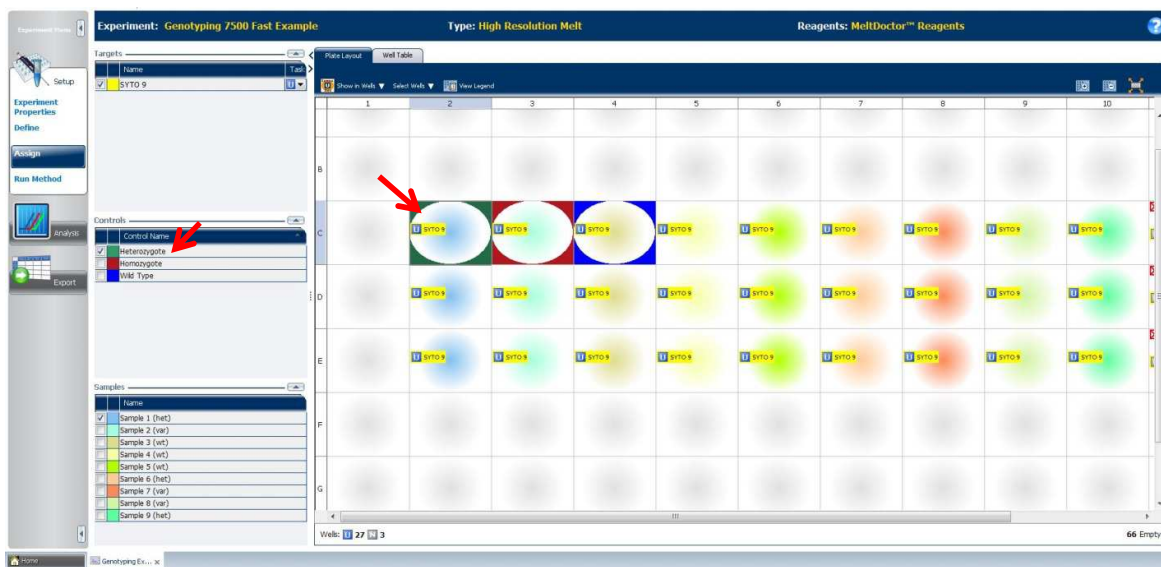


Fig. 3b

### 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
--------------------	-------------------	-------	-----------------

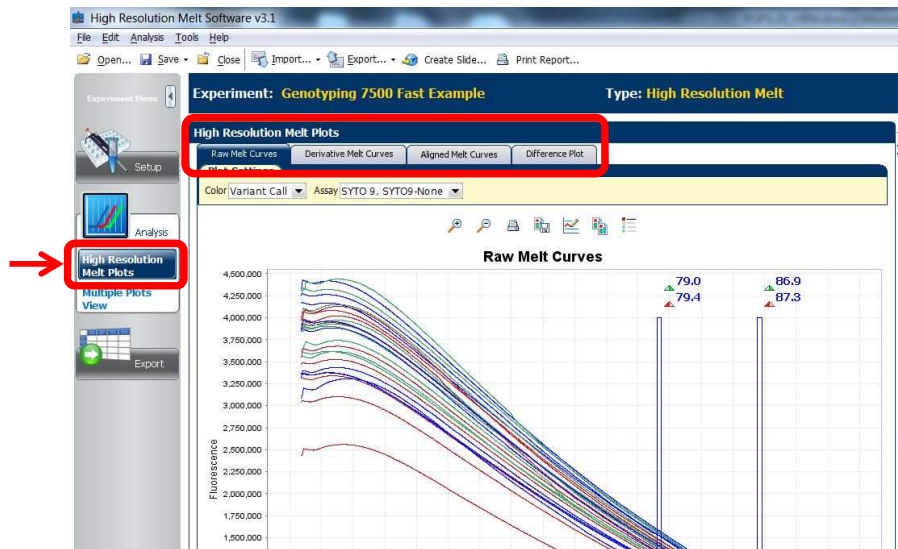


Fig. 4

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)

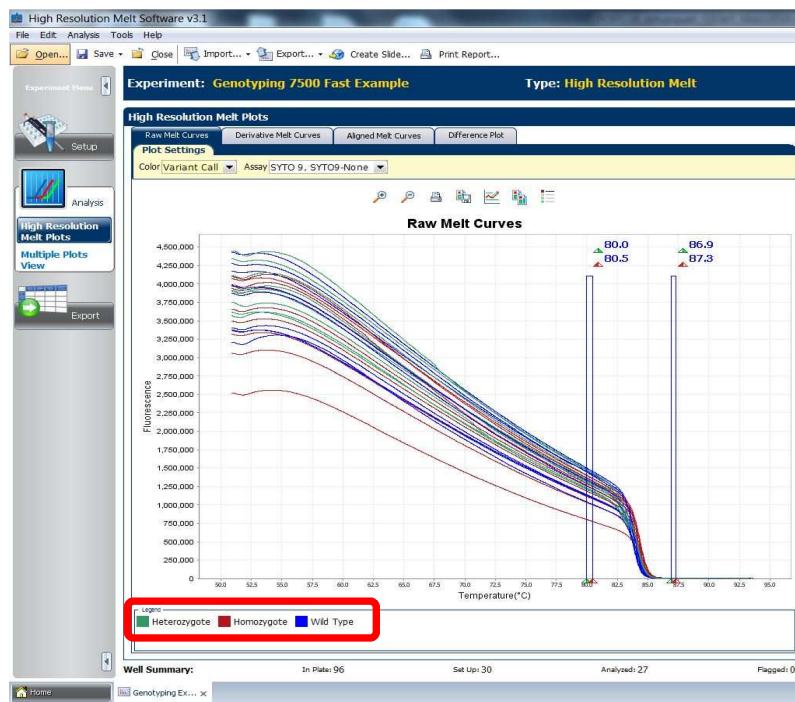


Fig. 5a

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



Utilize as funções logo acima do gráfico (Fig. 5b) para: zoom in (1), zoom out (2), imprimir a figura (3), salvar a imagem do gráfico (formato .jng) (4), alterar as propriedades do gráfico (5), copiar a imagem do gráfico (6) e omitir a legenda (7) (Fig. 5b)

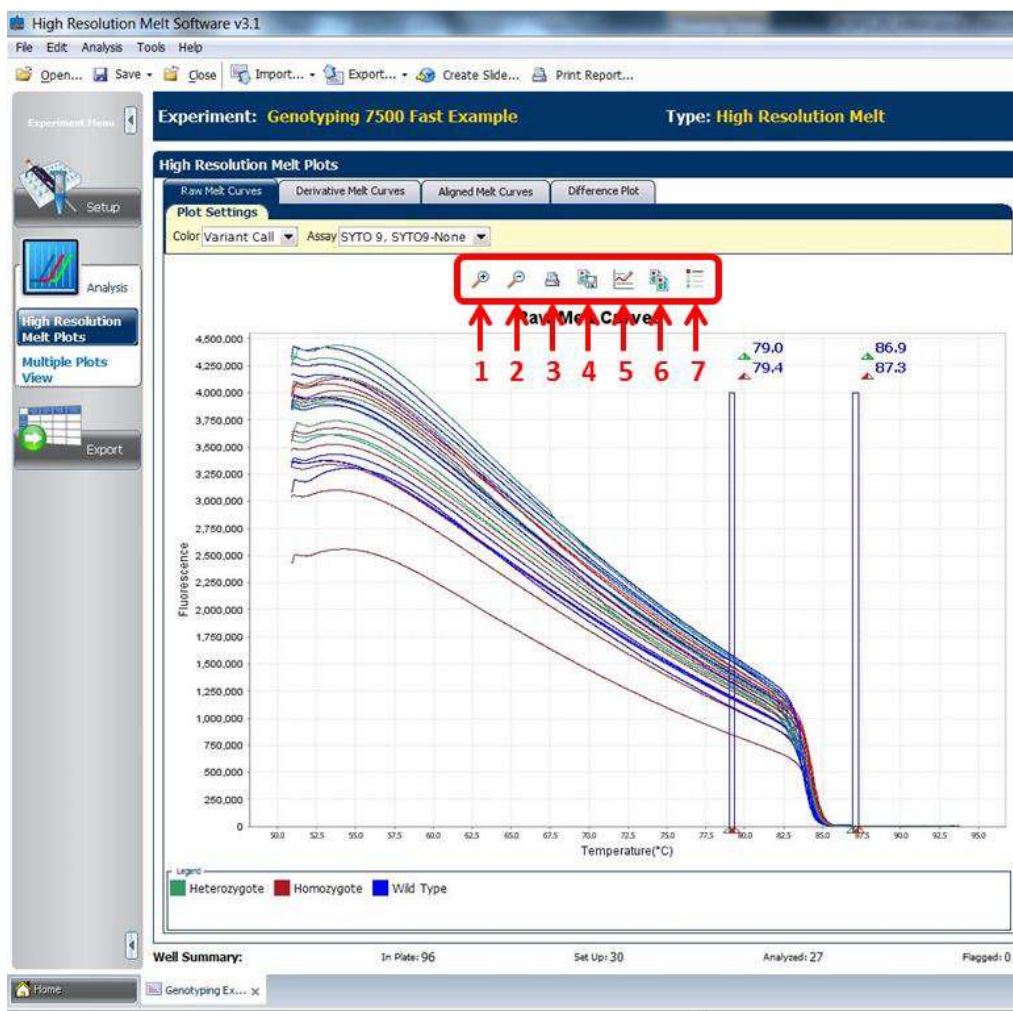


Fig. 5b

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

Derivative Melt Curves:

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

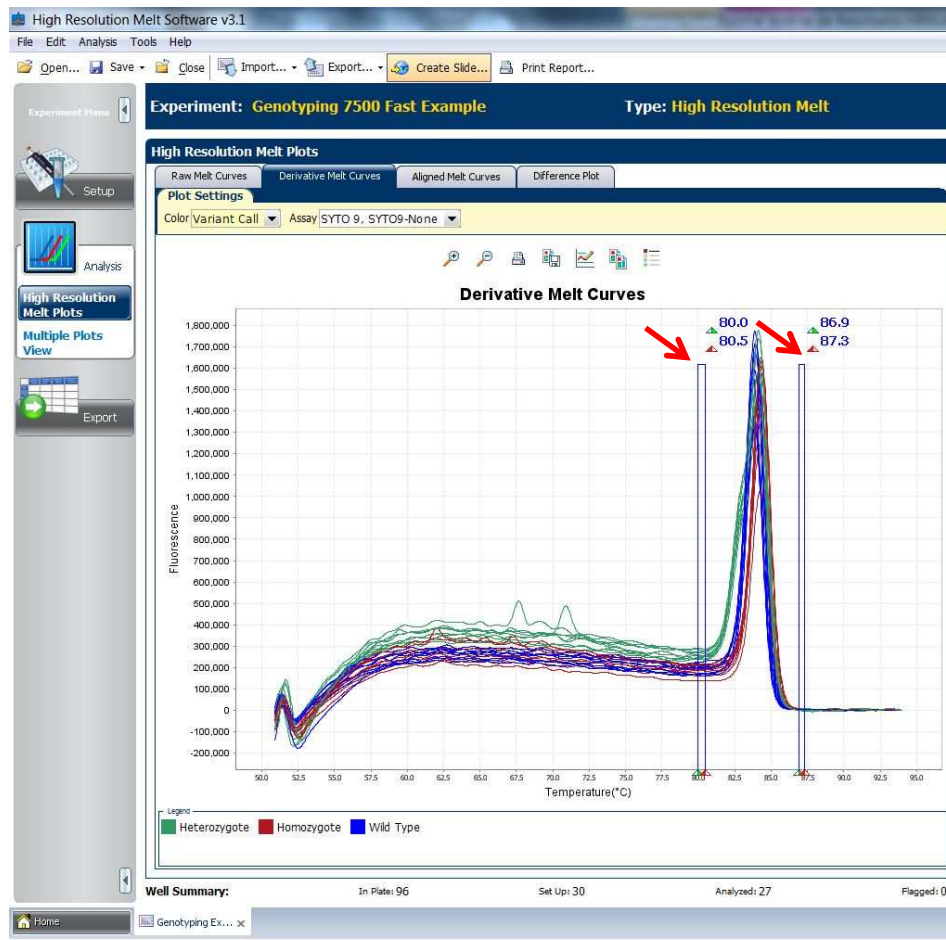


Fig. 6a

Fazer o ajuste das palhetas que definem a região pré-melting e pós-melting, caso necessário:

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)

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

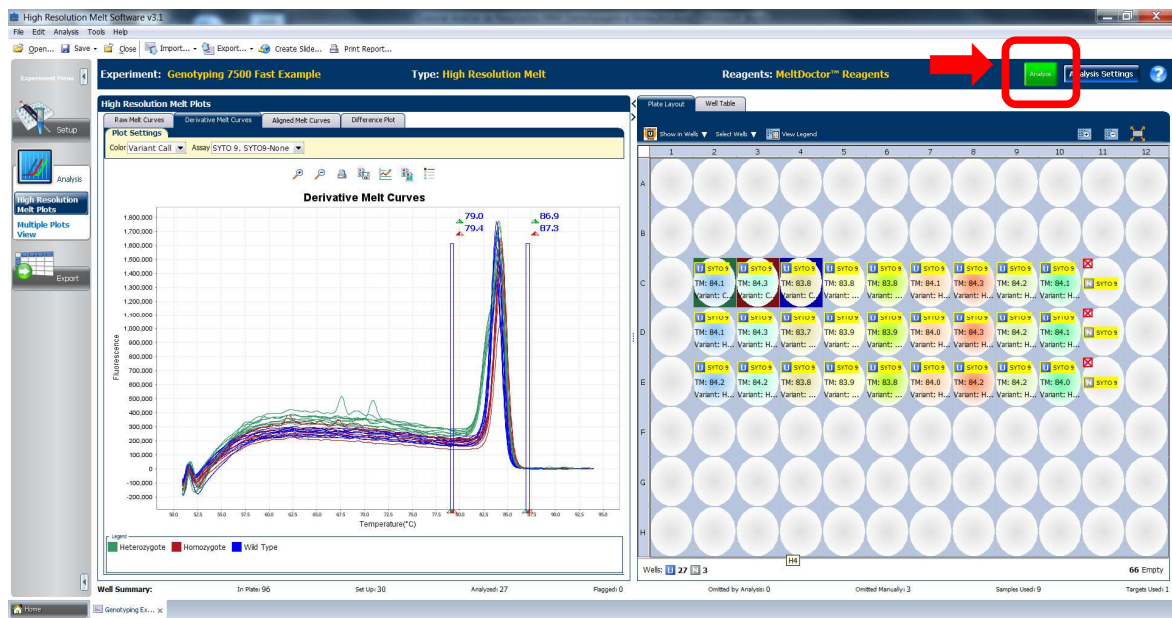


Fig. 6b

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. 7). 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
--------------------	-------------------	-------	-----------------

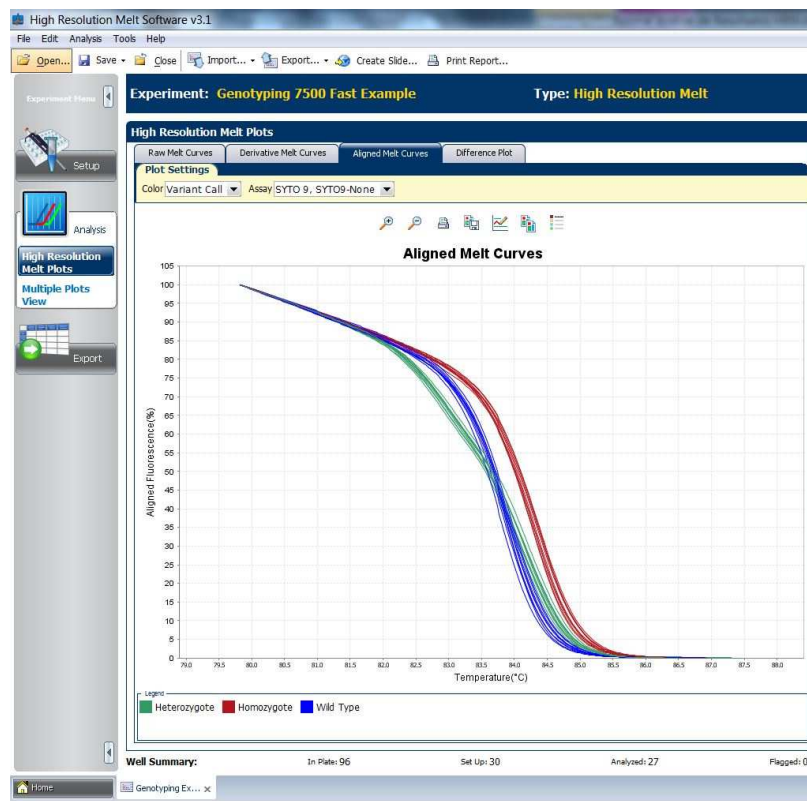


Fig. 7

### Difference Plot:

Esse gráfico mostra as curvas de melting alinhadas (eixo y) em função da temperatura (eixo x) utilizando uma amostra como referência (Fig. 8)

Você pode selecionar a amostra controle (ex. *wild type*) ou qualquer outra amostra como referência. 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. 8)

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

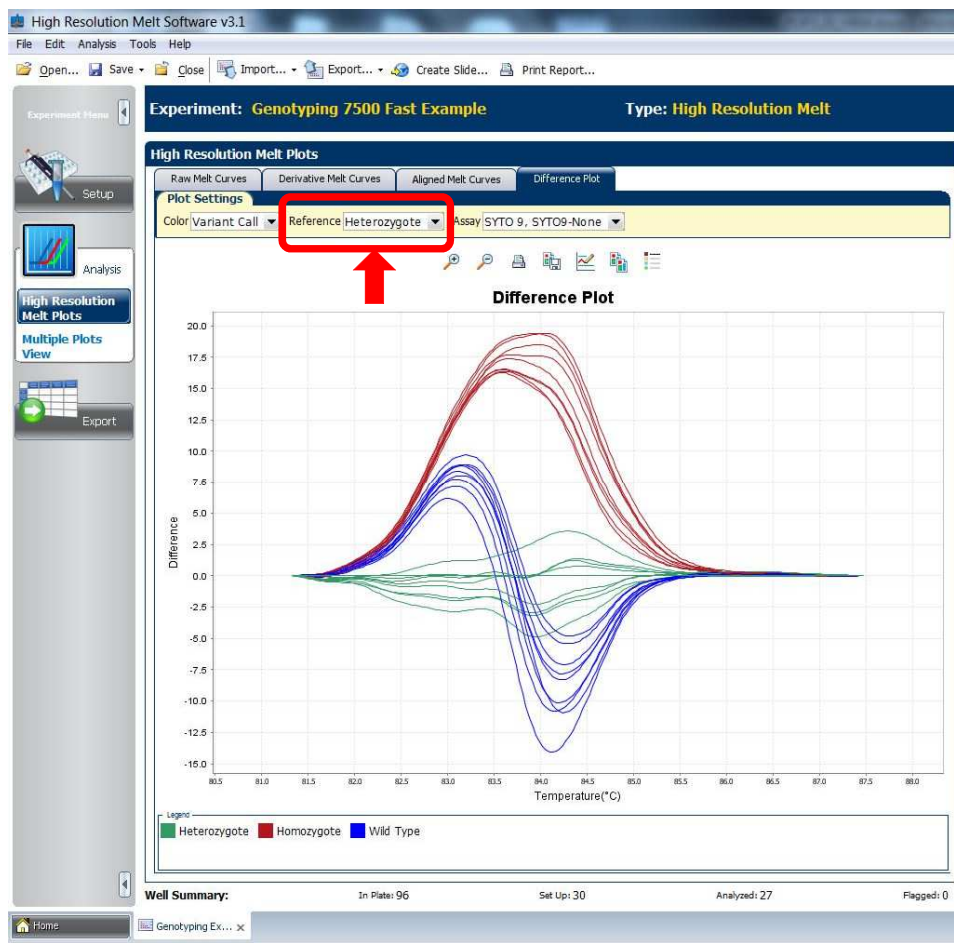


Fig. 8

### 3.1 Análise de Silhouette score

Na aba *Analysis*, ao lado direito dos gráficos, está representado o layout da placa (Fig. 9a). Para analisar os dados de silhouette score:

1. Clique na aba *Well Table* (Fig. 9a)
2. Na coluna *Silhouette Score*, verifique os valores atribuídos a cada amostra (Fig. 9b)

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



Nota: o silhouette score deve estar entre 80 e 100

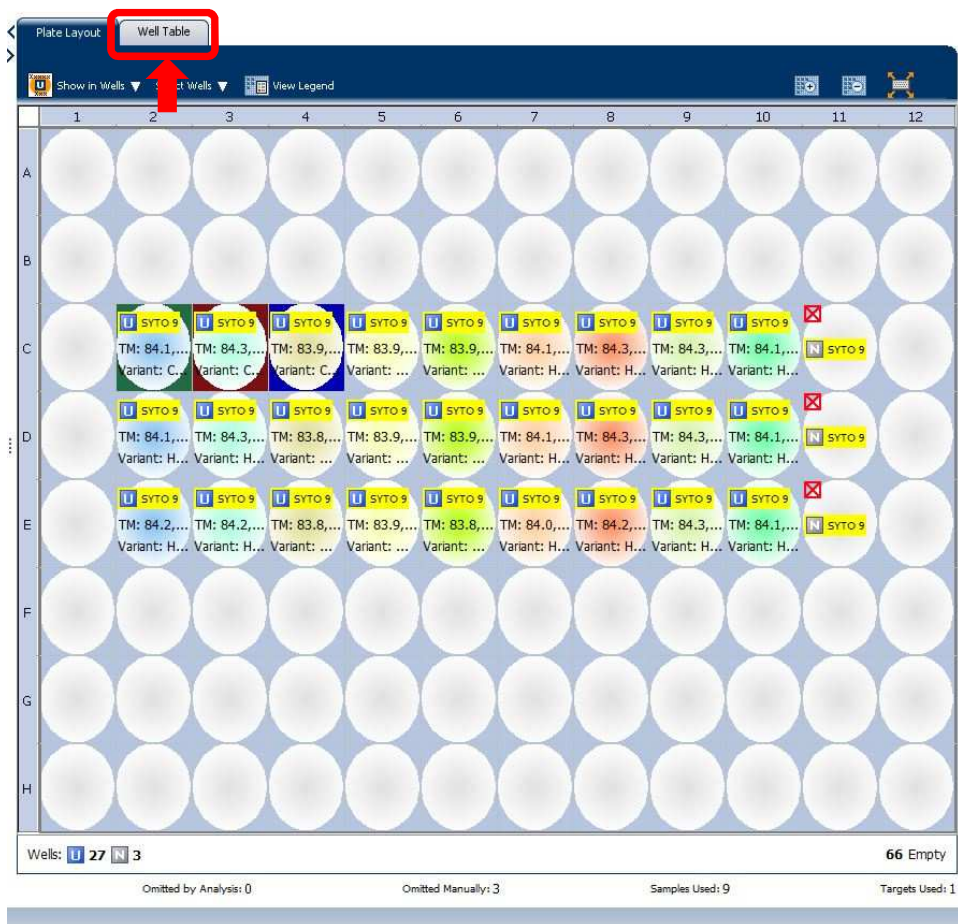


Fig. 9a

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

#	Well	Omit	Sample ...	Target ...	Variant ...	Silhouette Score	Method	Tm1	Tm2	Tm3	Dye
17	B5										
18	B6										
19	B7										
20	B8										
21	B9										
22	B10										
23	B11										
24	B12										
25	C1										
26	C2		Sample 1 (... SYTO 9		Control-He...	96.4	auto	84.1			SYTC
27	C3		Sample 2 (... SYTO 9		Control-Ho...	99.4	auto	84.3			SYTC
28	C4		Sample 3 (... SYTO 9		Control-Wil...	96.2	auto	83.9			SYTC
29	C5		Sample 4 (... SYTO 9		Wild Type	96.2	auto	83.9			SYTC
30	C6		Sample 5 (... SYTO 9		Wild Type	95.2	auto	83.9			SYTC
31	C7		Sample 6 (... SYTO 9		Heterozyg...	97.1	auto	84.1			SYTC
32	C8		Sample 7 (... SYTO 9		Homozygote	99.0	auto	84.3			SYTC
33	C9		Sample 8 (... SYTO 9		Homozygote	99.6	auto	84.3			SYTC
34	C10		Sample 9 (... SYTO 9		Heterozyg...	97.2	auto	84.1			SYTC
35	C11	<input checked="" type="checkbox"/>	SYTO 9								SYTC
36	C12										
37	D1										
38	D2		Sample 1 (... SYTO 9		Heterozyg...	96.5	auto	84.1			SYTC
39	D3		Sample 2 (... SYTO 9		Homozygote	99.1	auto	84.3			SYTC
40	D4		Sample 3 (... SYTO 9		Wild Type	82.5	auto	83.8			SYTC
41	D5		Sample 4 (... SYTO 9		Wild Type	91.0	auto	83.9			SYTC
42	D6		Sample 5 (... SYTO 9		Wild Type	92.7	auto	83.9			SYTC
43	D7		Sample 6 (... SYTO 9		Heterozyg...	96.4	auto	84.1			SYTC
44	D8		Sample 7 (... SYTO 9		Homozygote	99.5	auto	84.3			SYTC
45	D9		Sample 8 (... SYTO 9		Homozygote	99.3	auto	84.3			SYTC
46	D10		Sample 9 (... SYTO 9		Heterozyg...	96.6	auto	84.1			SYTC
47	D11	<input checked="" type="checkbox"/>	SYTO 9								SYTC
48	D12										
49	E1										
50	E2		Sample 1 (... SYTO 9		Heterozyg...	90.3	auto	84.2	70.9		SYTC
51	E3		Sample 2 (... SYTO 9		Homozygote	98.7	auto	84.2			SYTC
52	E4		Sample 3 (... SYTO 9		Wild Type	95.6	auto	83.8			SYTC
53	E5		Sample 4 (... SYTO 9		Wild Type	95.8	auto	83.9			SYTC

Omitted by Analysis: 0      Omitted Manually: 3      Samples Used: 9      Targets Used: 1

Fig. 9b

### 3. Exportar os resultados

Para exportar os resultados, clique na aba *Export* (Fig. 10a) 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. 10a)

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

- *Export File Location*: clique em *Browse* e escolha o local onde o arquivo exportado ficará salvo no computador (Fig. 10a)
- *Export File Name*: caso necessário, modifique o nome do arquivo (Fig. 10a)
- *File Type*: selecione o formato que o arquivo deve ser exportado (.xls, .xlsx ou .txt) (Fig. 10a)

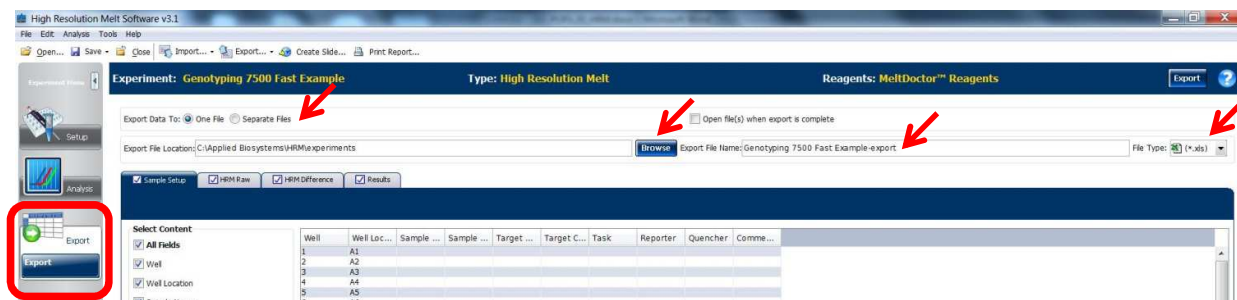


Fig. 10a

Dentro das abas (*Sample Setup*, *HRM Raw*, *HRM Difference*, *Results*), selecione quais dados devem ser exportados (Fig. 10b). Originalmente, todos os campos estarão marcados

Clique em *Export* no campo superior direito (Fig. 10b)

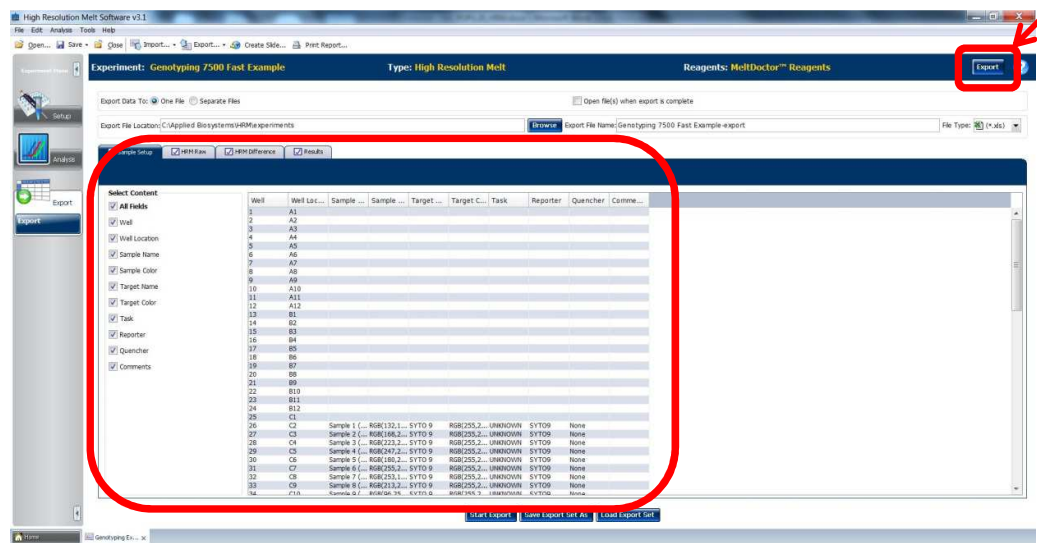


Fig. 10b



Para gerar um relatório dos dados em formato .pdf, no menu superior, clique em *Print Report* (Fig. 11a), selecione os dados a serem incluídos no relatório (Fig. 11b) e depois clique em *Print Report* (Fig. 11b)

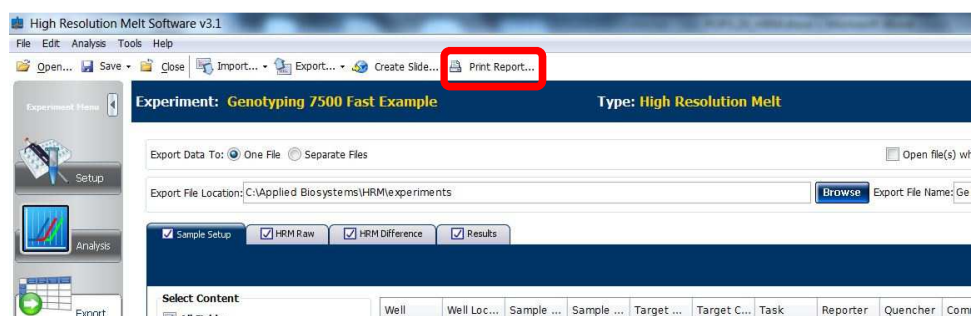


Fig. 11a

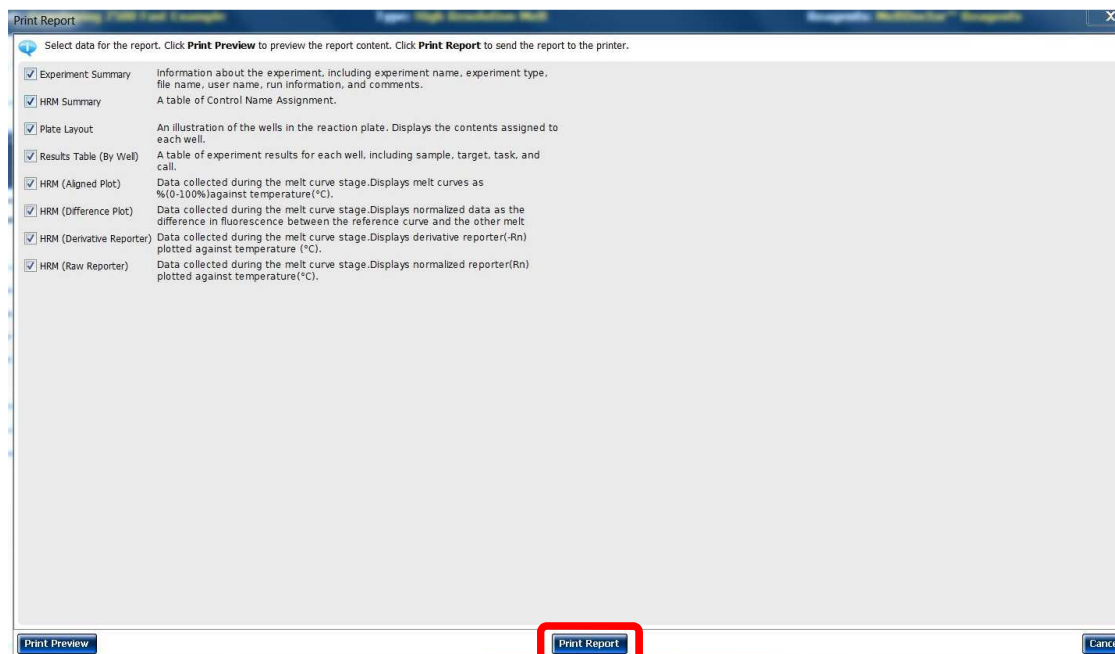


Fig. 11b

Para gerar um arquivo de power point com os gráficos de resultados, no menu superior, clique em *Create Slides* (Fig. 12a), selecione os gráficos a serem incluídos no arquivo (Fig. 12b) e depois clique em *Create Slides* (Fig. 12b)

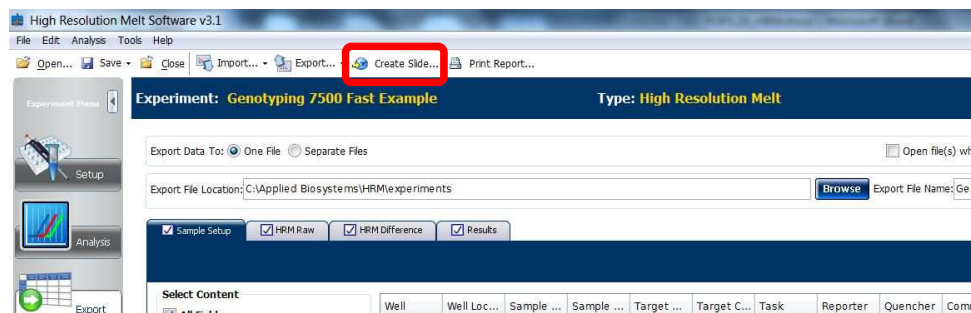


Fig. 12a

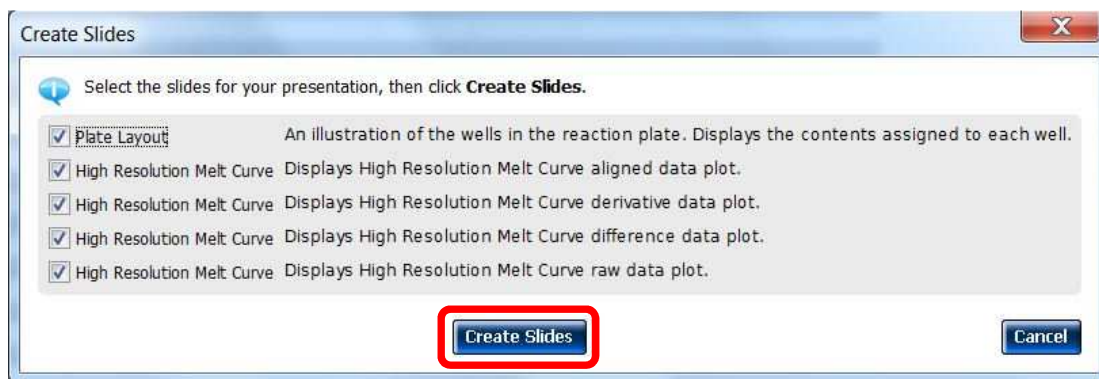


Fig. 12b