

CFX Hardware e Software



Juliana Giusti Assessora Científica LSG

2012 Life Science Research



Linha CFX Touch

Características do Aparelho:



- Utilização de LED para excitação
- Detecção do sinal por fotodiodos
- Permite gradiente de temperatura
- Não necessita de computador para gerenciar o aparelho
- Reações multiplas de até 5 targets
- Não requer normalização com referência passiva



Linha CFX Touch

O que acompanha o equipamento??

- Módulo óptico
- Cabo USB
- CD instalação do software CFX Manager
- Manual de Instrução
- Guias rápidos sobre o software
- Vídeo tutorial sobre o CFX Manager





Como funciona o Sistema Óptico?







Como funciona o Sistema Óptico?



As the CFX Connect optics shuttle travels across the plate, light is focused directly into the center of each sample well. Side view of the optics shuttle shows the blue LED firing over a well.



Linha CFX Touch

Manutenção Preventiva:

Não necessita de calibrações periódicas

Limpeza externa com pano (se nescessário utilizar solução de sabão neutro)

Limpeza do bloco com água (recomendado), alcool 95% ou solução 1:100 de hipoclorito.





Linha CFX Touch

Plásticos Recomendados para o equipamento:

Placas de 96 well = perfil baixo, parede fina, específica para real time





Strip de tubos = **perfil baixo**, parede fina, específico para real time



Selos e tampas de strip = óticos, transparentes







- Duas formas: Stand alone
 CFX Manager 3.0 software
- Software: Essencial para a análise dos resultados

Tipo de Arquivo	Extenção	Como ver e editar o arquivo
Protocolo	.prcl	Selecionar em Run Setup e editar no Editor de Protocolo
Placa	.pltd	Selecionar em Run Setup e editar no Editor de Placa
Dados	.pcrd	Ver e analizar na janela Data Analysis
Corrida PrimePCR	.CSV	Contem o protocolo e o layout da placa para PrimePCR
Estudo	.mgxd	Ver e analizar na janela Gene Study
Pré Data Stand Alone	.plrn	Contém os valores de fluorescência convertidos em dados





Modo de operação Stand Alone:

Tela inicial



Modo de operação Stand Alone: Criando um protocolo





Modo de operação Stand Alone: Criando um protocolo







Modo de operação Stand Alone: Acompanhando a corrida





Modo de operação Stand Alone:

Exportando os arquivos via USB

		Saved Files	Dec 30, 2010 10:38
Locations	Folders	Files	Preview
Recent	<root></root>	20101230_101322	2_S Date: Dec 30, 2010 10:19
📩 SC005007		20101230_085211	1_S Data File: 20101230_101322_SC0
Real-Time Data		20101225_030044	4_S 05007_RT POWER Data Acq. Mode:
		20101225_024546	5_S SYBR/FAM only Protocol Name.
🔒 АААА		20101225_023156	6_S Protocol Contents:
S RALPH		20101225_021738	8_S Hethod: Calc Lid: 95°C
-		-	
Hame New	Folder Folder Opti	ions File Options	Li III





Modo de operação gerenciado pelo software:

Seteando uma corrida

Startup Wizard		X
Run setup	Select instrument	CFX96 -
Analyze	Select run type	PrimePCR



Modo de operação gerenciado pelo software:





Modo de operação gerenciado pelo software:

Opção para agendamento do uso do aparelho

24 Bio-Rad Scheduler (v 1.1.0.0518)						
File View Tools						
Calender View : Work Week -						
(d) January (b) (d) 2013 (b)		Monday, January 28	Tuesday, January 29	Wednesday, Jan 30	Thursday, Jan 31	Friday, February 01
SMTWTFS						
$ \begin{array}{ccccccccccccccccccccccccccccccccc$	8 ^{AM}					
³ 13 14 15 16 17 18 19						
⁵ 27 28 29 30 31 1 2	9 00					
6 3 4 5 6 7 8 9	-					
Today	10 00					
	10 -					
	1100					
CFX96-SIM00	± ±					
	12 ^{PM}					
		dmin				
	1 00					
Manage Instruments						
	2 00					
Users						
☑ admin	3 00					
	4 00					
	- ³⁰ -					
	E co					
Manage Users	5 00					
						Close



Modo de operação gerenciado pelo software:

Protocol Editor - New					×
File Settings Tools					
📑 🚔 Insert Step After	Sample Volume 25	μl Est. Run Time 01:09:00	?		
1		2		3	4
95.0 C 3:00		95.0 C 0:10		3 55.0 C 0:30	G E O T O 2
			I		39 X
Insert Step	1 95.0 C for 3:00 → 2 95.0 C for 0:10				
Insert Gradient	3 55.0 C for 0:30 + Plate Read 4 GOTO 2 , 39	more times			
Insert GOTO	END				
Insert Melt Curve					
Add Plate Read to Step					
Step Options					
Delete Step					
				ОК	Cancel

Modo de operação gerenciado pelo software:

Plate	Editor - Qu	uickPlate_	96 wells_A	ll Channe	ls.pltd										
File	View	Settings	Editing	g Tools											
	a Zoo	om 100%		- 🔯 s	can Mode	All Chai	nnels	-	👌 Well G	iroups	\land Trace	Styles	?		Plate Loading Guide
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		Select	Fluorophores
A	Unk FAM HEX Texas Red Cy5		Sample Type	Unknown											
B	Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX	Quasar 705 Unk FAM HEX		Load	Target Name <none></none>
	Cy5 Quasar 705		HEX Texas Red	<none></none>											
с	FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	=	V Cy5 Quasar 705	<none> <none></none></none>											
	Unk FAM HEX		Load S	ample Name none> -											
	Texas Red Cy5 Quasar 705		Load R	eplicate #											
	FAM		Ben	icate Series											
E	HEX Texas Red Cy5 Quasar 705		Experim	nent Settings											
	Unk		🕺 Clear	Replicate #											
F	FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705		a a	ear Wells											
	Unk														
	FAM HEX	-													

OK

Cance

Plate Type: BR Clear

201

Modo de operação gerenciado pelo software:

Run Setup								
Options								
Protocol	💷 Plate 🕩 Start F	lun						
Run Informatio	n							
Protocol:	CFX_2stepAmp.prcl							
Plate: QuickPlate_96 wells_All Channels.pltd								
Notes:			*					
			-					
Scan Mode:	All Channels							
- Start Run on S	belected Block(s)							
	Block Name 4	L Type	Run Status	Sample Volume	ID/Bar Code			
CFX96	-SIM00	CFX96	Idle	25				
Select All	Blocks							
🥥 Flash B	lock Indicator	open Lid 🖉 🔼	Close Lid					
					Start Bun			
					<< Prev Next >>			



Análise dos Resultados:





- Equipamento não necessita de calibração
- Movimentação: Sempre colocar Shipping Pin e placa branca
- Abertura e fechamento de tampa: Automatizado (Não forçar o fechamento!!)





High Resolution Melting (HRM)





Curva de dissociação ou Curva de Melting

O que é? Curva de dissociação de fragmentos fita dupla

Quando acontece? No final da qPCR

Objetivo:

Checar se houve formação de um único produto, se produtos inespecíficos também foram formados, dímeros de primer...

Como é feita?

Aumento da temperatura (~60°C até 95°C)



High Resolution Melting (HRM)

A nova geração da Curva de melting

Aplicações

- Genotipagem
- SNPs
- Mutações genéticas desconhecidas
- Analises de metilação
- Discriminação de alelos
- Metilação em ilhas CpG....



Como funciona?

Sybr Green: ligação altamente específica ao DNA dupla-fita







Durante a curva de melting:

- A temperatura é aumentada gradualmente
- Ocorre denaturação das fitas duplas
- Liberação do fluoróforo
- Cai a fluorescência







Tm: temp. na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice

- Dependente da composição do DNA (conteúdo de G+C)
- Distintos fragmentos possuem Tms diferentes picos característicos de cada alvo (*primers* específicos)



















