



CFX

Hardware e Software



Juliana Giusti
Assessora Científica LSG



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 múltiplas de até 5 targets
- Não requer normalização com referência passiva



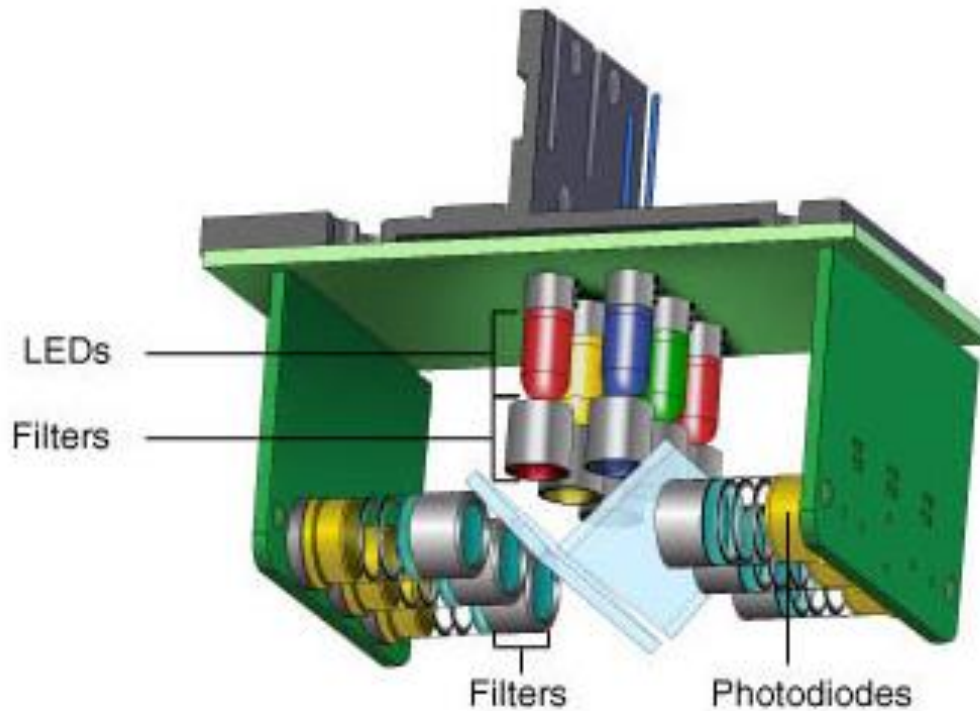
Linha CFX Touch

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

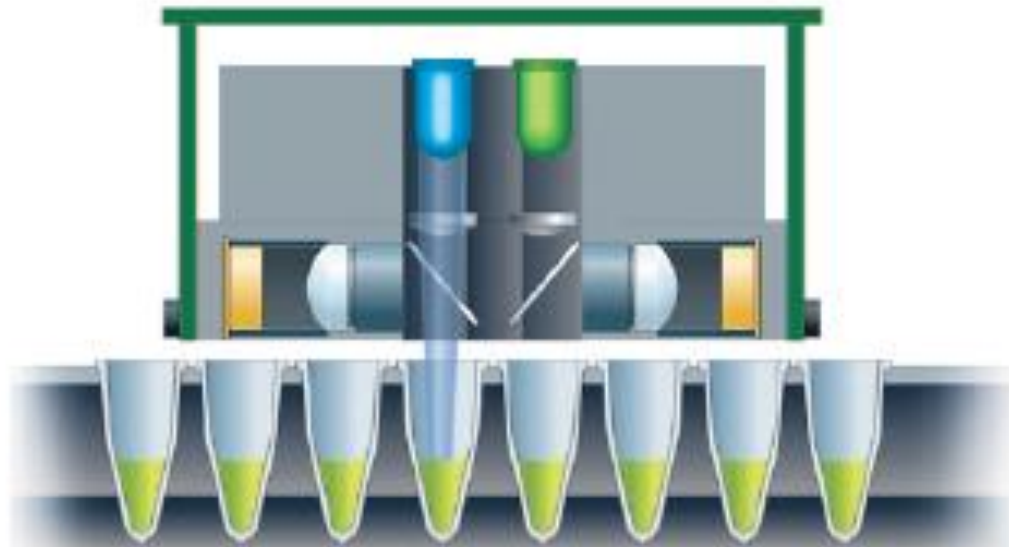
Linha CFX Touch

Como funciona o Sistema Óptico?



Linha CFX Touch

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.



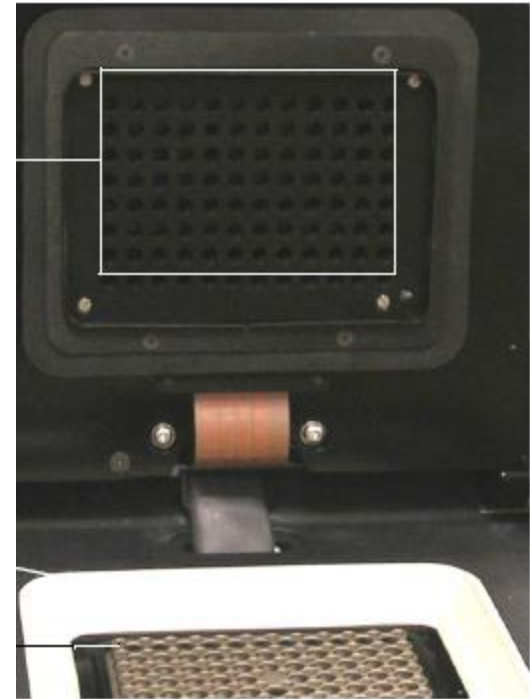
Linha CFX Touch

Manutenção Preventiva:

Não necessita de calibrações periódicas

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

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

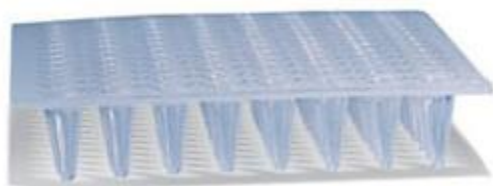




Linha CFX Touch

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**





Gerenciamento de corrida

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

Tipo de Arquivo	Extensão	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 analisar na janela Data Analysis
Corrida PrimePCR	.csv	Contem o protocolo e o layout da placa para PrimePCR
Estudo	.mgxd	Ver e analisar na janela Gene Study
Pré Data Stand Alone	.plrln	Contém os valores de fluorescência convertidos em dados



CFX Manager 3.0

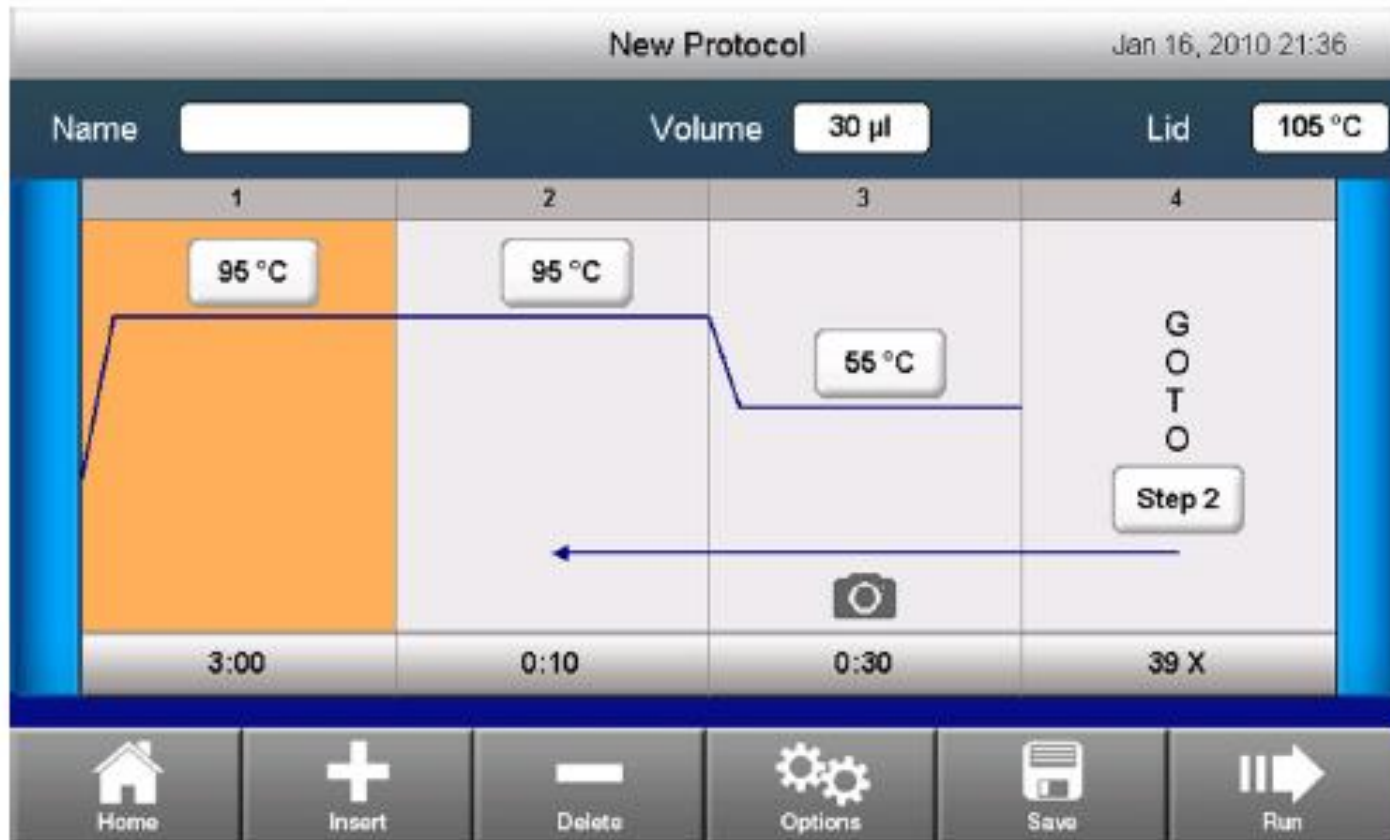
Modo de operação Stand Alone:

Tela inicial



CFX Manager 3.0

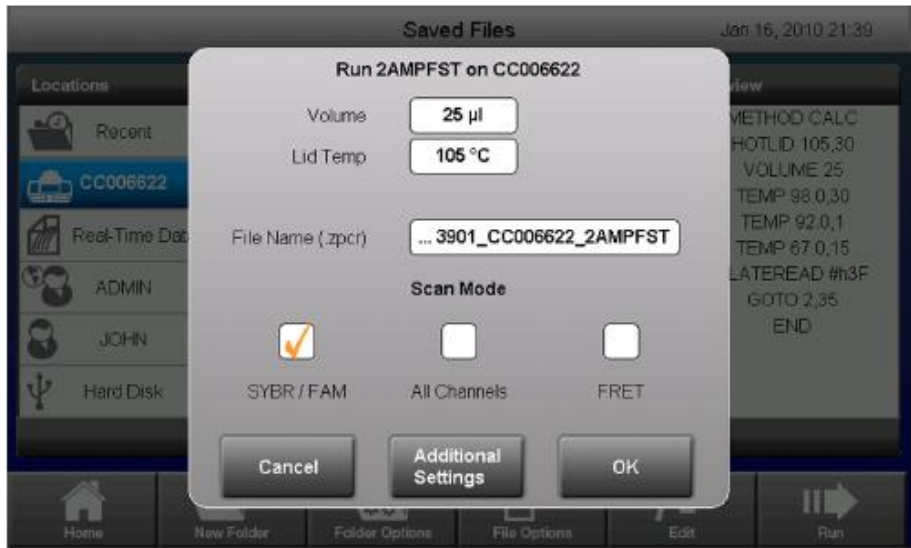
Modo de operação Stand Alone: Criando um protocolo





CFX Manager 3.0

Modo de operação Stand Alone: Criando um protocolo



E se eu quiser usar um já salvo?

Na tela inicial vá para Saved Files

Locations

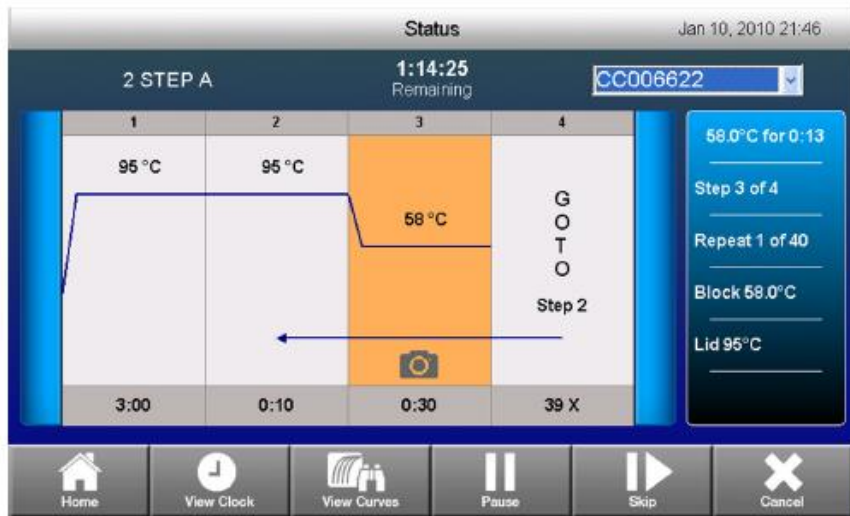
Folders

Arquivo { Run
Edit



CFX Manager 3.0

Modo de operação Stand Alone: Acompanhando a corrida





CFX Manager 3.0

Modo de operação Stand Alone:

Exportando os arquivos via USB

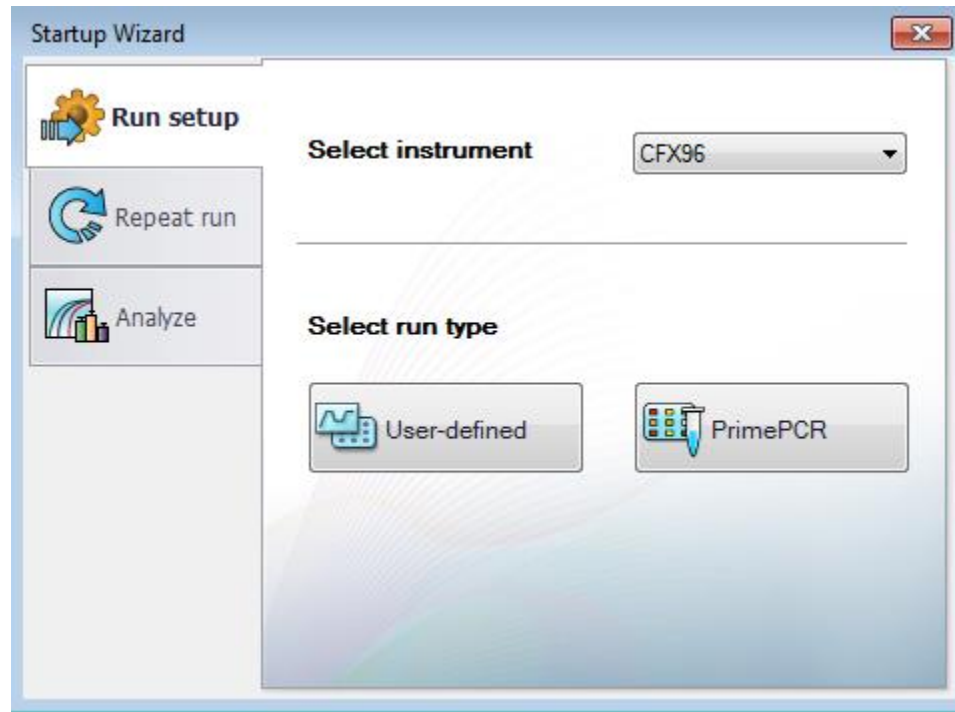




CFX Manager 3.0

Modo de operação gerenciado pelo software:

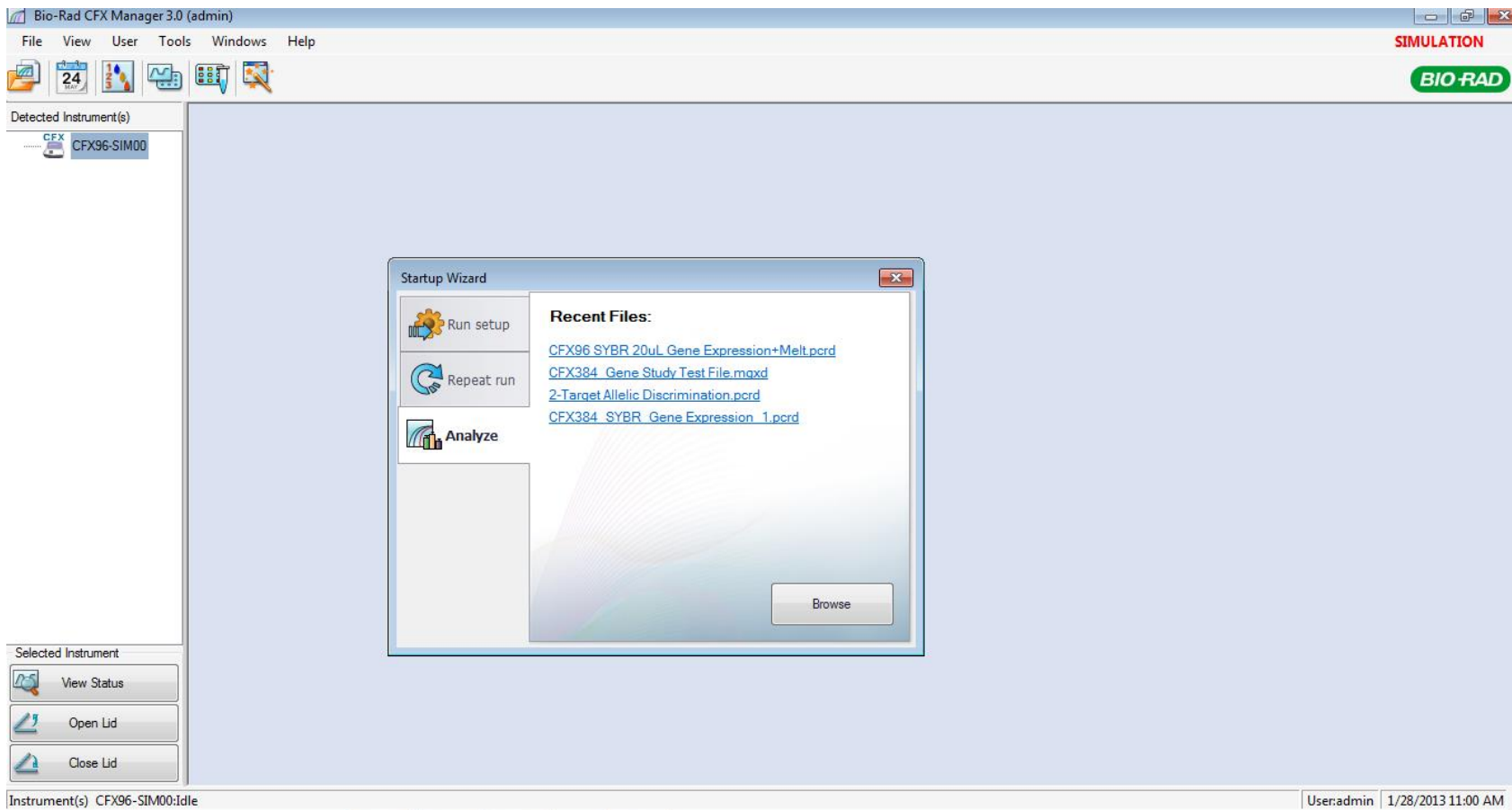
Seteando uma corrida





CFX Manager 3.0

Modo de operação gerenciado pelo software: Tela inicial

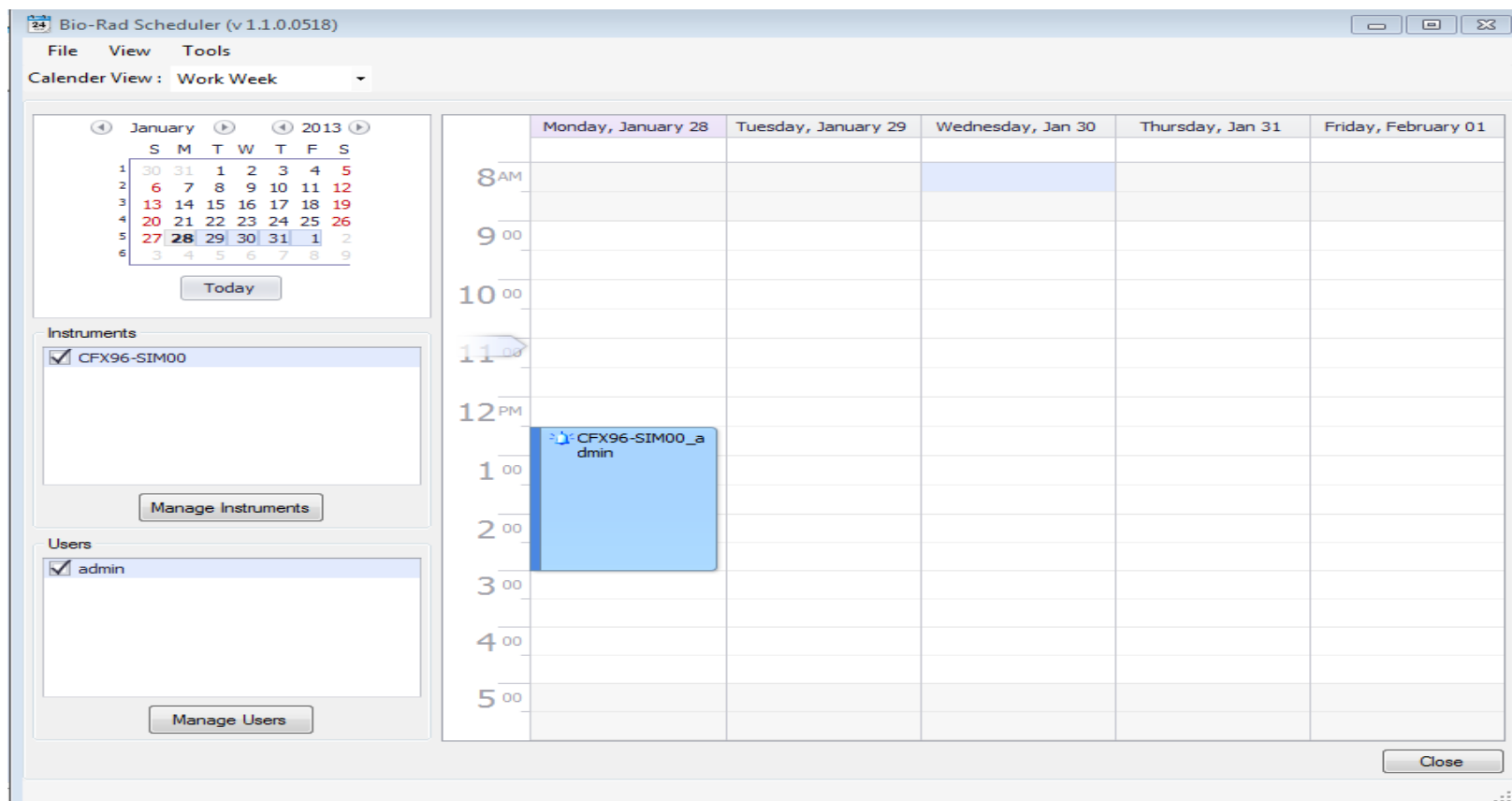




CFX Manager 3.0

Modo de operação gerenciado pelo software:

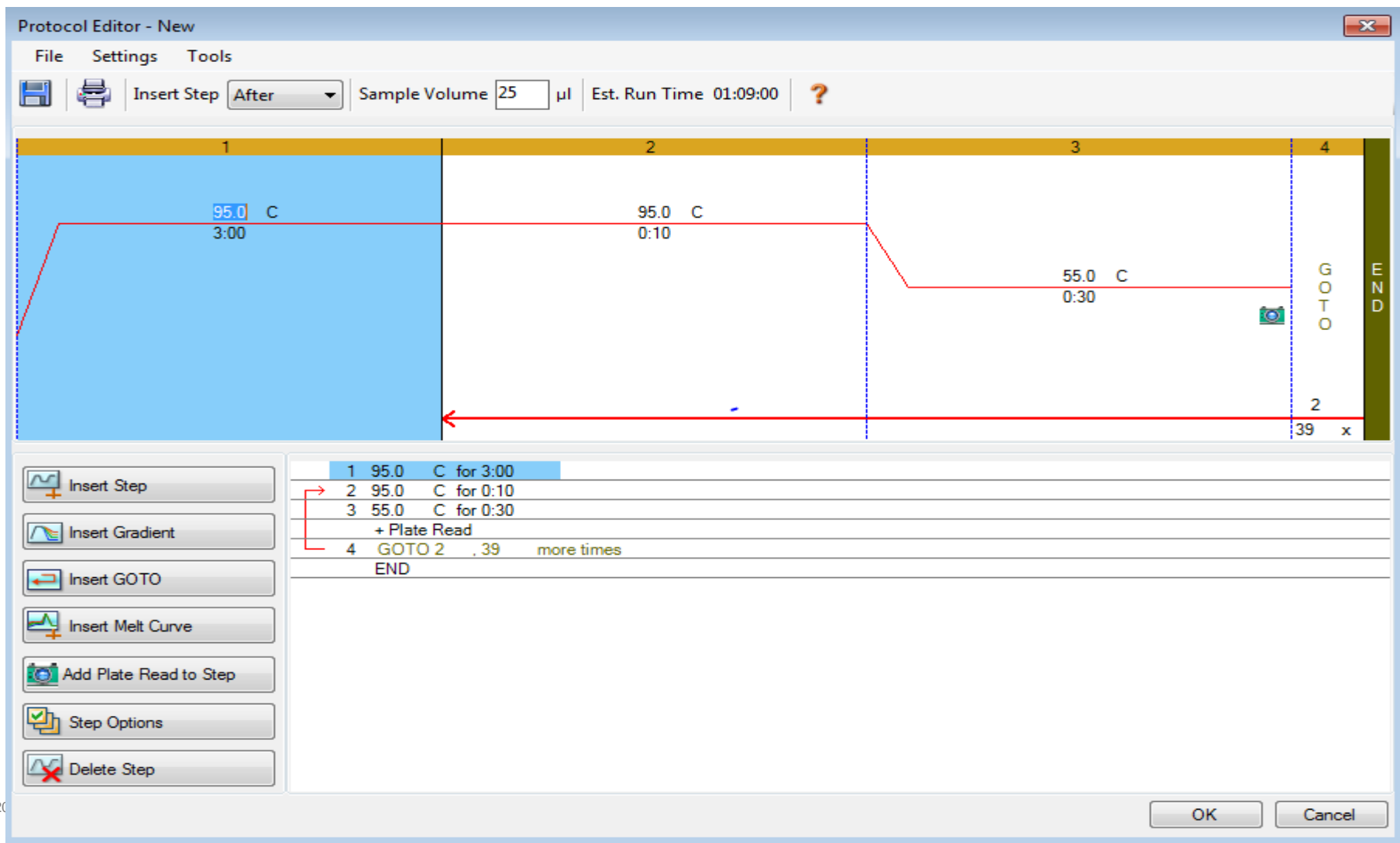
Opção para agendamento do uso do aparelho





CFX Manager 3.0

Modo de operação gerenciado pelo software:





CFX Manager 3.0

Modo de operação gerenciado pelo software:

Plate Editor - QuickPlate_96 wells_All Channels.pltd

File View Settings Editing Tools

Zoom 100% Scan Mode All Channels Well Groups... Trace Styles... ? Plate Loading Guide

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705
B	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705
C	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705
D	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705
E	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705
F	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705	Unk FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705
	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX	Unk FAM HEX

Plate Type: BR Clear

Select Fluorophores...

Sample Type: Unknown

Load FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705

Target Name: <none> <none> <none> <none> <none>

Load Sample Name: <none>

Load Replicate #: 1

Replicate Series

Experiment Settings...

Clear Replicate #

Clear Wells

OK Cancel



CFX Manager 3.0

Modo de operação gerenciado pelo software:

Run Setup

Options

Protocol Plate Start Run

Run Information

Protocol: CFX_2stepAmp.prc1

Plate: QuickPlate_96 wells_All Channels.pltd

Notes:

Scan Mode: All Channels

Start Run on Selected Block(s)

	Block Name	Type	Run Status	Sample Volume	ID/Bar Code
<input checked="" type="checkbox"/>	CFX96-SIM00	CFX96	Idle	25	

☒ Select All Blocks

Flash Block Indicator Open Lid Close Lid

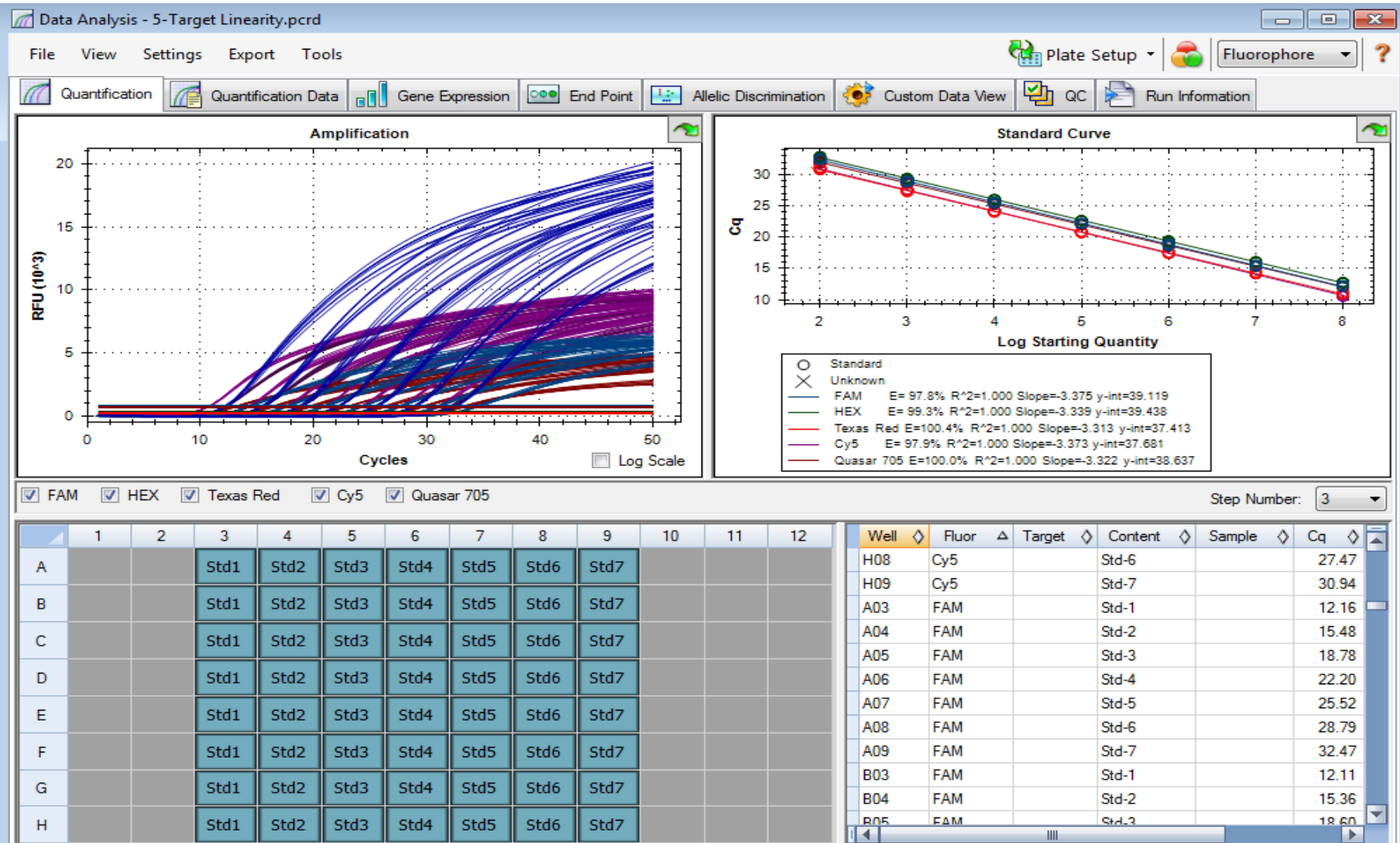
Start Run

<< Prev Next >>



CFX Manager 3.0

Análise dos Resultados:



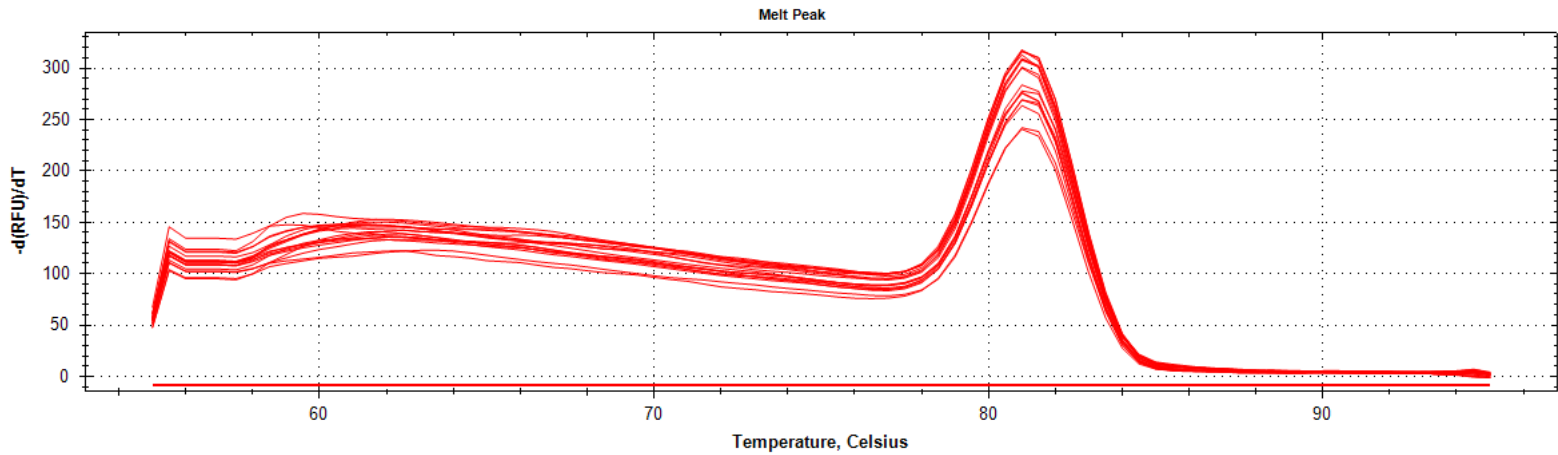


Lembretes

- 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?

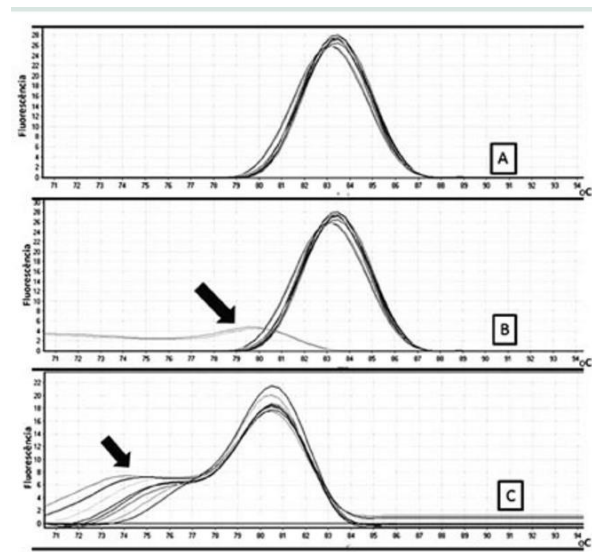
No final da qPCR

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

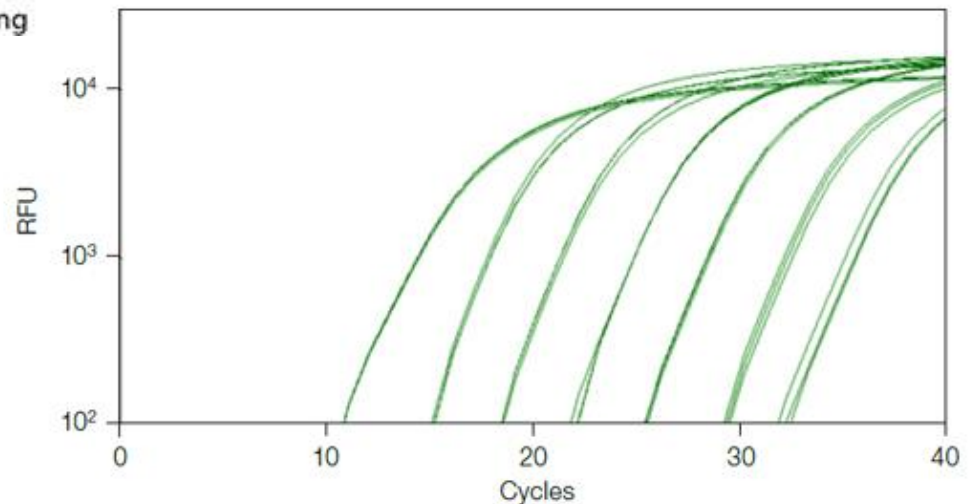
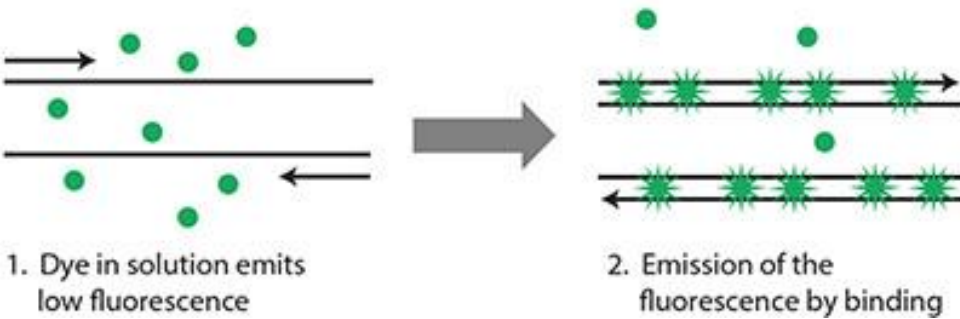
- Genotipagem
- SNPs
- Mutações genéticas desconhecidas
- Análises de metilação
- Discriminação de alelos
- Metilação em ilhas CpG....



Como funciona?

Sybr Green: ligação altamente específica ao DNA dupla-fita

Action of SYBR Green I Dye

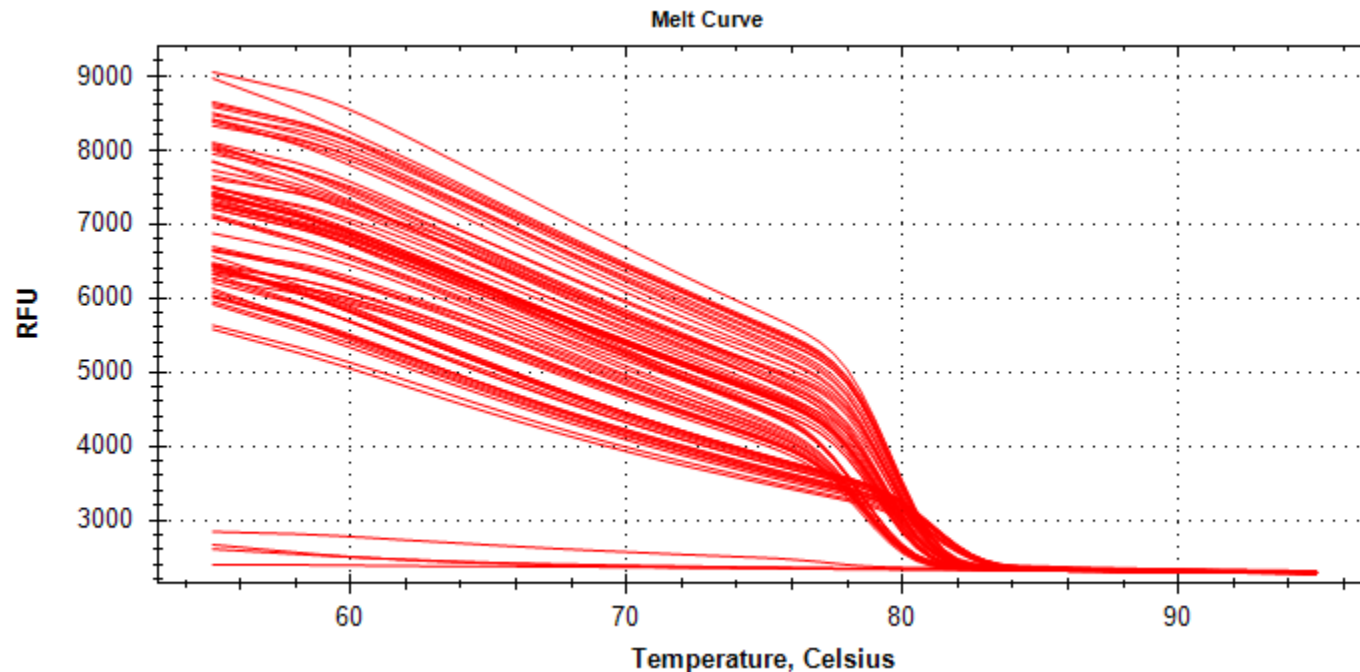




Como funciona?

Durante a curva de melting:

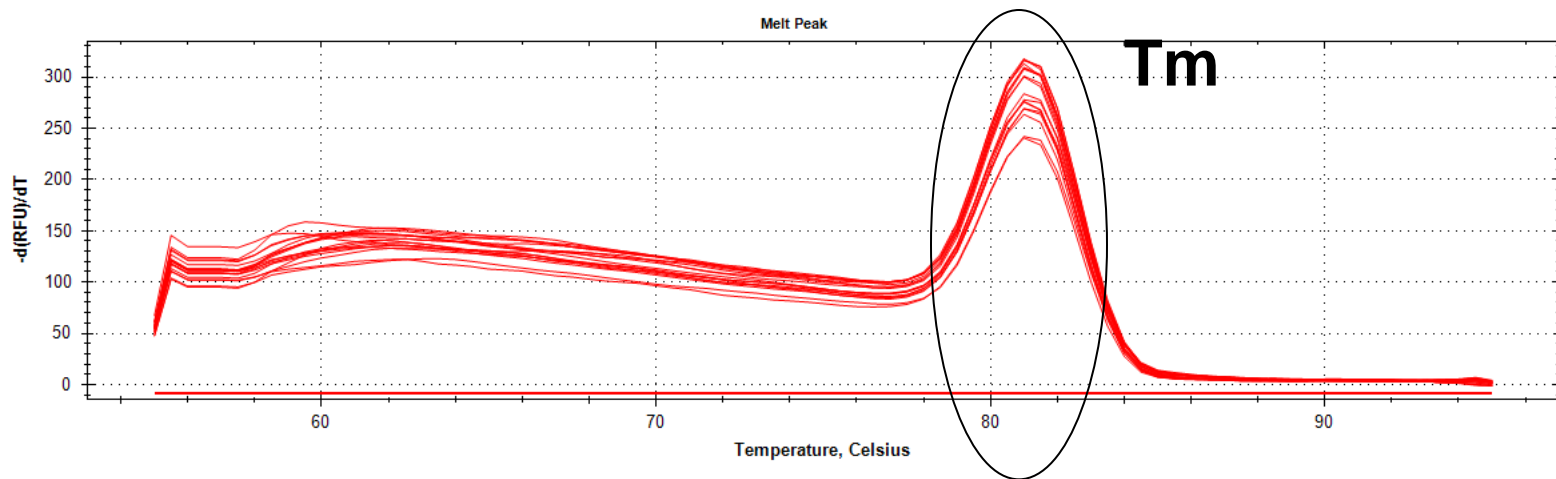
- A temperatura é aumentada gradualmente
- Ocorre denaturação das fitas duplas
- Liberação do fluoróforo
- Cai a fluorescência

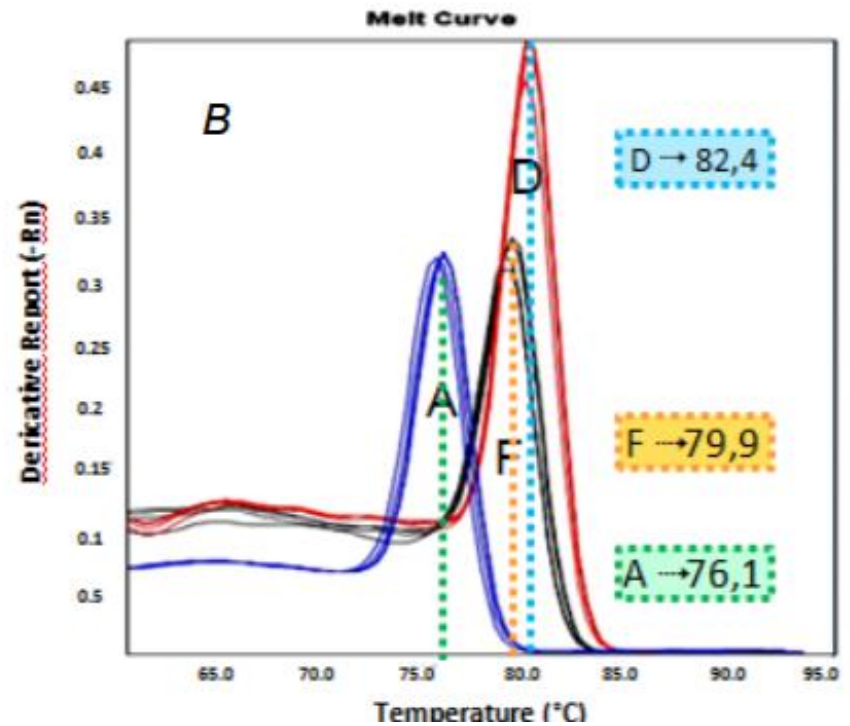
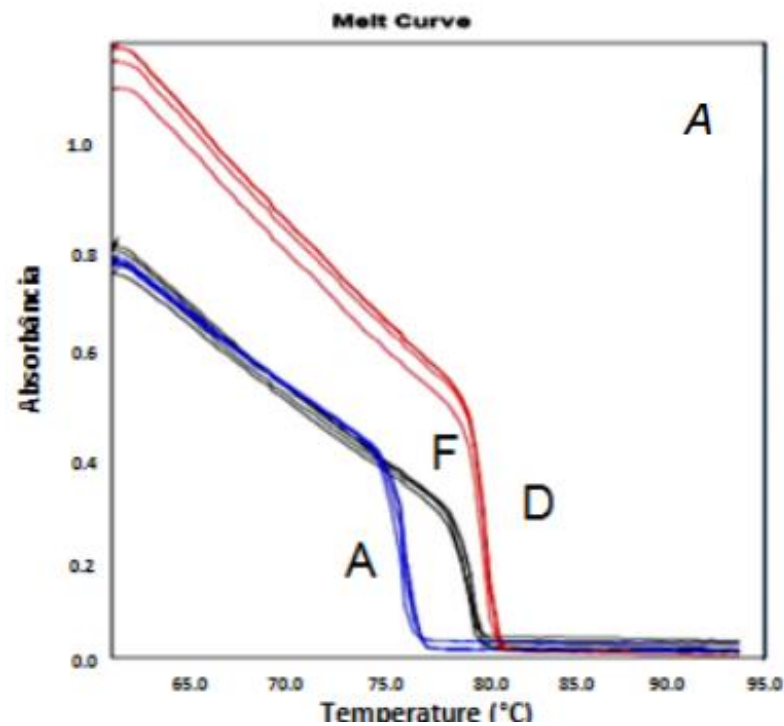


Como funciona?

T_m: 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 T_ms diferentes → picos característicos de cada alvo (*primers* específicos)







Vamos para a prática!!





obrigada !!

