

REF DX000

Mx3005P MANUALE D'USO



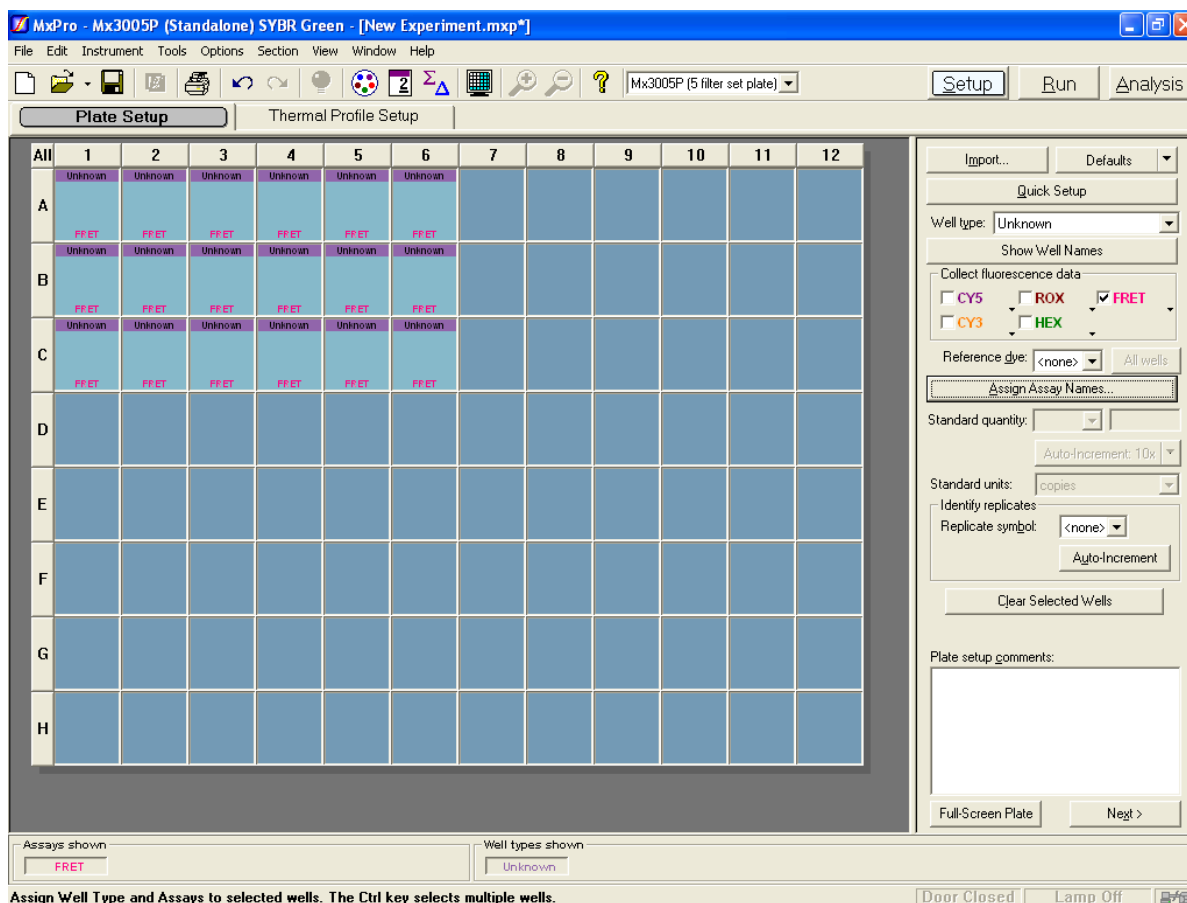
NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Tel (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
SITO INTERNET: www.nlm.it – E-MAIL: info@nlm.it

PROTOCOLLO PER CHIMICA FRET

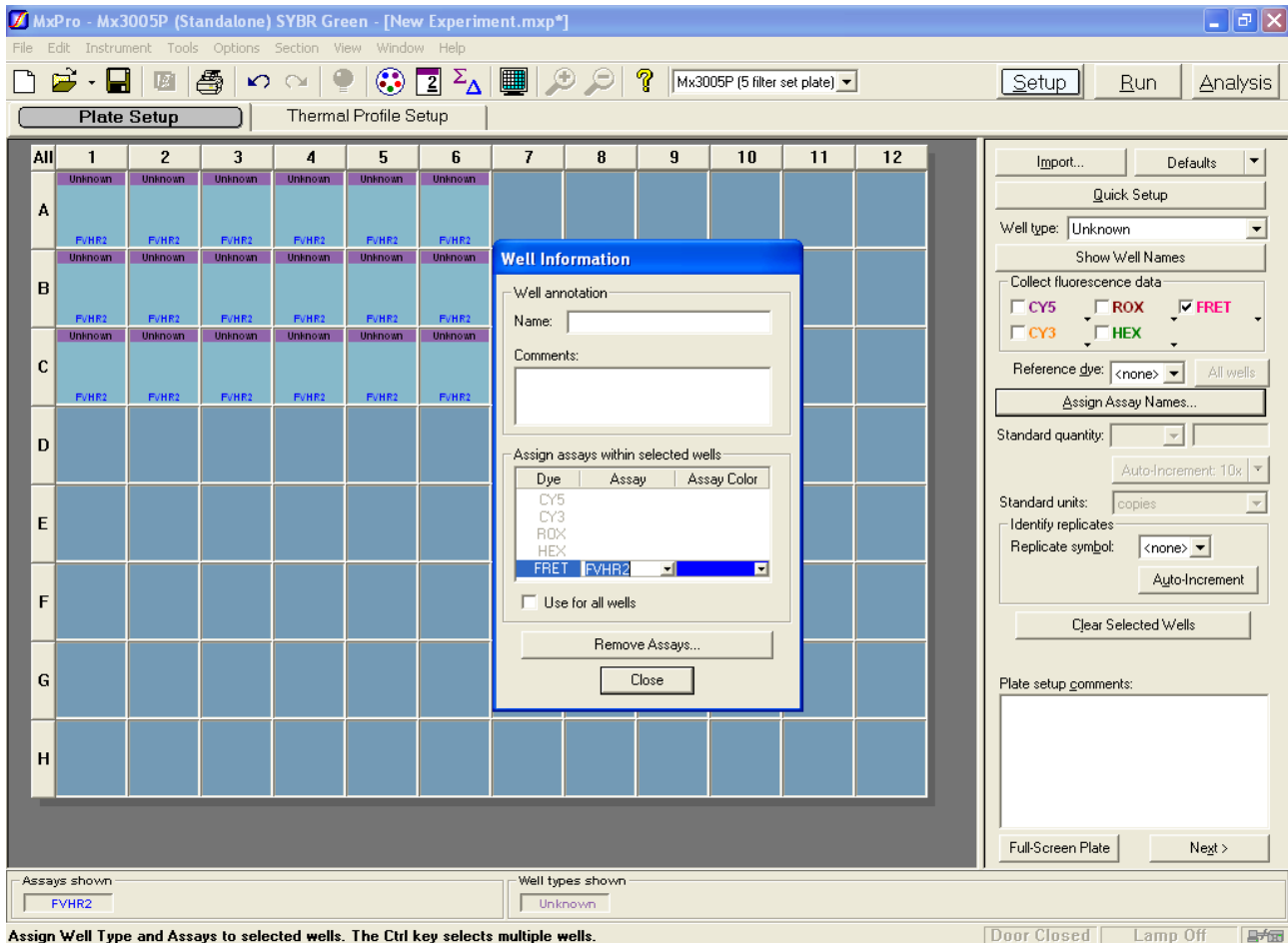
Per utilizzare MX 3005P è necessario accendere lo strumento circa 20 minuti prima del suo utilizzo, per consentire alla lampada di riscaldarsi. Un colore verde e la scritta LAMP ON in basso a destra segnala all'operatore lo status della lampada
Nella finestra "New Option" selezionare "SYBR GREEN with dissociation curve".

A) IMPOSTAZIONE DELLA PIASTRA

1. Selezionare le posizioni della piastra che si utilizzano in seduta.
2. A destra dello schermo selezionare in "Well type" "Unknown" dalla tendina a scomparsa.
3. Se non è mai stato creato il filtro denominato FRET cliccare sull'icona "optics configuration" (simbolo rotondo con cerchi colorati) e selezionare "dyes and filter, spostarsi nella parte destra della finestra (dye definitions), nella casella Name scrivere FRET, alla voce Filter set selezionare FRROX, assegnare un colore a piacere, cliccare su ADD e poi OK.
- ⇒ 4. Se il filtro FRET è già presente, nella parte destra dello schermo, in "Collect fluorescence data", selezionarlo direttamente spuntando la casella corrispondente mentre, se non appare, cliccare sulla piccola freccia nera di uno dei filtri presenti e dal menù a tendina selezionare FRET sostituendolo al filtro iniziale. Verificare che compaia sui pozzetti selezionati (come si vede nella figura sottostante).



- ⇒ 5. Selezionare nella piastra le posizioni che verranno utilizzate per il primo parametro es. FV; a destra dello schermo selezionare “Assign Assay Names” e nella finestra “Well Information” selezionare FRET: dalla tendina assegnare il tipo di saggio per il fattore che si sta analizzando nei pozzetti della piastra selezionati, e assegnare a ciascun fattore un colore diverso (come si vede nella figura sottostante).



5. Per assegnare il nome del campione in ciascun pozzetto della piastra, cliccare 2 volte sul pozzetto stesso e dalla finestra digitare il nome in “Name”.
N.B. Il nome inserito non deve contenere lettere accentate (à,ò,ì,è). Al loro posto utilizzare l’apostrofo (‘)
6. Ripetere i passaggi dal punto 4. per ciascun fattore da analizzare.
7. Una volta ultimata l’impostazione della piastra, per far comparire il nome sul pozzetto cliccare a destra dello schermo su “Show Well Name”.

B) PROFILO TERMICO

1. Selezionare il tasto “Thermal Profile Setup” in alto nello schermo: nella parte destra in “thermal profile design” in modalità “custom agendo direttamente sul grafico e cliccando sulla temperatura ed il tempo si possono variare i parametri per avere il profilo termico richiesto dal kit in analisi.

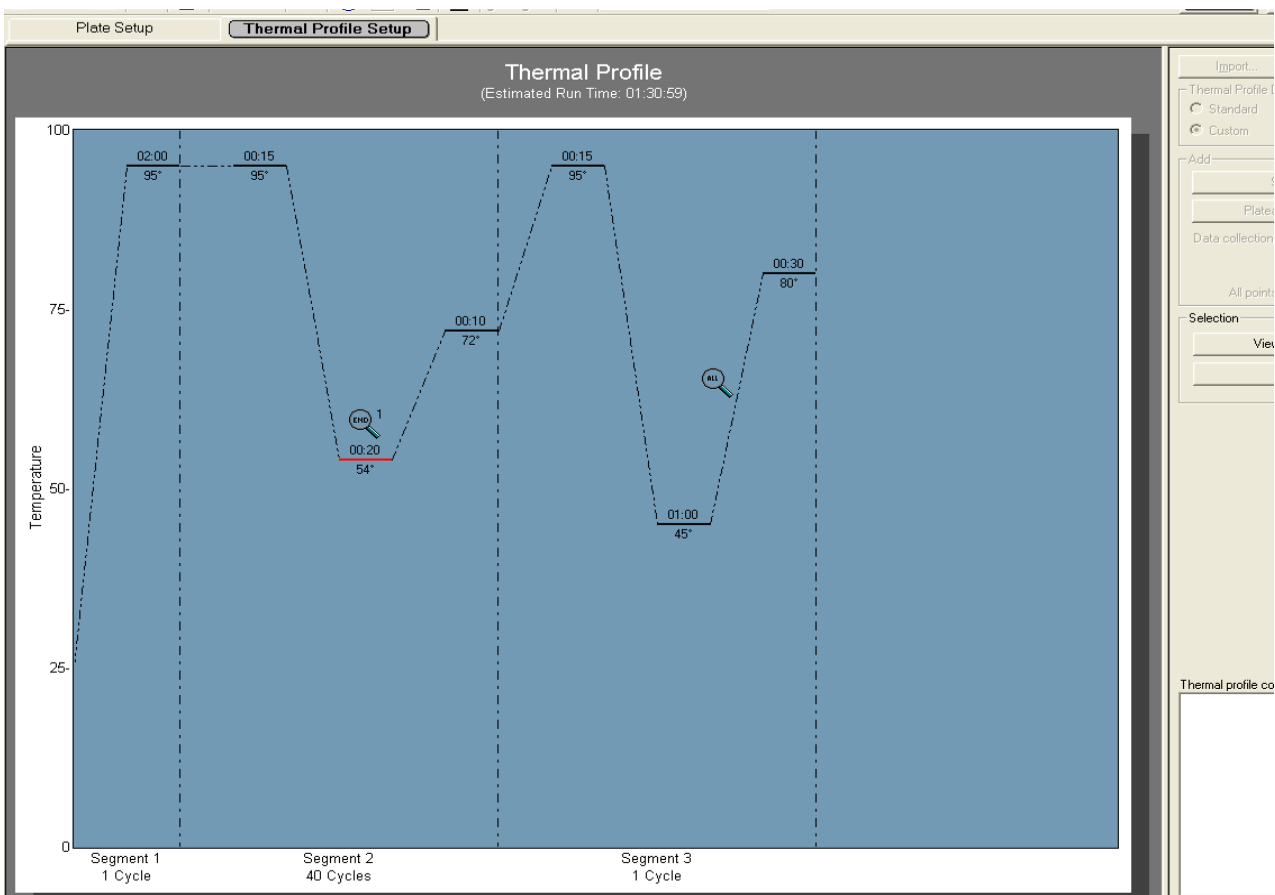
N. B. ⇒ : testo modificato rispetto alla precedente versione
 ⇒ : modified text compared with the previous version

⇒ Per le impostazioni del profilo di PCR si faccia riferimento alla metodica del singolo Kit inserendo i parametri di tempo e temperatura indicati nel grafico dello strumento Eppendorf RealPlex.

N.B. Solo per il codice AA933 FV H1299R si prenda come riferimento il profilo specifico indicato per lo strumento Mx3005P. Per i profili termici che prevedono un “touchdown” nella fase di annealing, cliccando due volte sulla linea della temperatura di appaiamento nei cicli di PCR, si apre la finestra plateau properties, alla voce cycle increments è possibile aggiungerlo con le caratteristiche indicate nella metodica del kit (linea rossa nel grafico)

2. Nel “Segment 2” del profilo termico verificare che la lente (simbolo di acquisizione di segnale) abbia la dicitura “End” e sia posizionata nel secondo step (annealing).
3. Nel “Segment 3” verificare che la lente abbia la dicitura “All” e sia posizionata sulla rampa dallo step 2 allo step 3 (come si vede nella figura sottostante).

⇒ 4. E' anche possibile importare un profilo termico da una seduta che verrà usata come template: per fare questo in alto nello schermo cliccare sul tasto “import” e scegliere il file template dal percorso in cui è salvato.



C) AVVIARE LA SEDUTA

In alto a destra dello schermo cliccando su “Run” si apre una finestra in cui è possibile nominare la seduta ed avviare l’esperimento.

**N. B. ⇒ : testo modificato rispetto alla precedente versione
⇒ : modified text compared with the previous version**

⇒ Inoltre compare a video una piccola finestra che segnala all'operatore lo status della lampada. Il messaggio informa se la lampada è pronta oppure no. Un colore giallo in basso indica che è in fase di riscaldamento, il colore verde indica che è pronta mentre un colore rosso indica che la lampada è spenta e non si può far partire l'esperimento. La seduta può comunque essere avviata anche se la lampada è in fase di riscaldamento ma si consiglia sempre di attendere che il colore sia verde

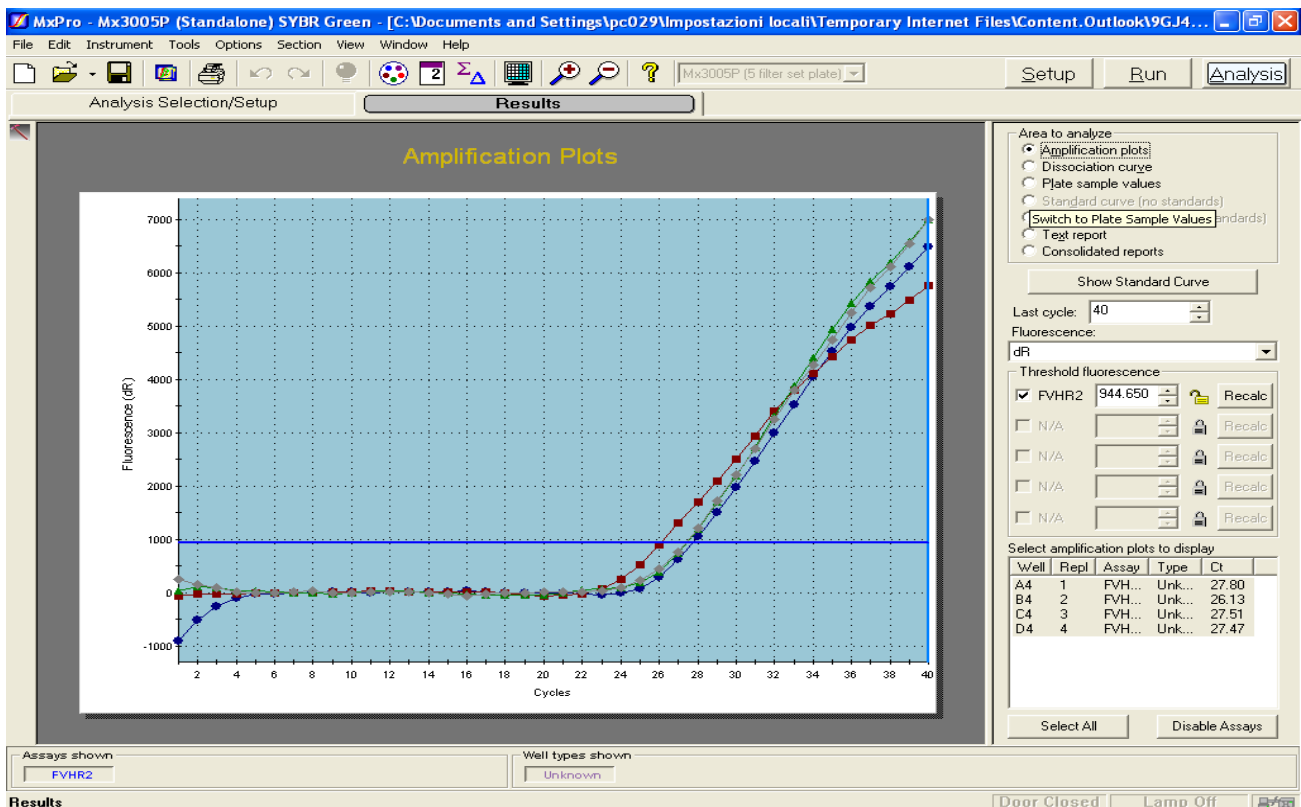
D) MONITORAGGIO SEDUTA

Raw data plots: durante la seduta è possibile monitorare nei diversi pozzetti il grafico di andamento del singolo campione. E' necessario attivare in basso a sinistra i saggi che si vogliono visualizzare.

E) ANALISI DEI DATI

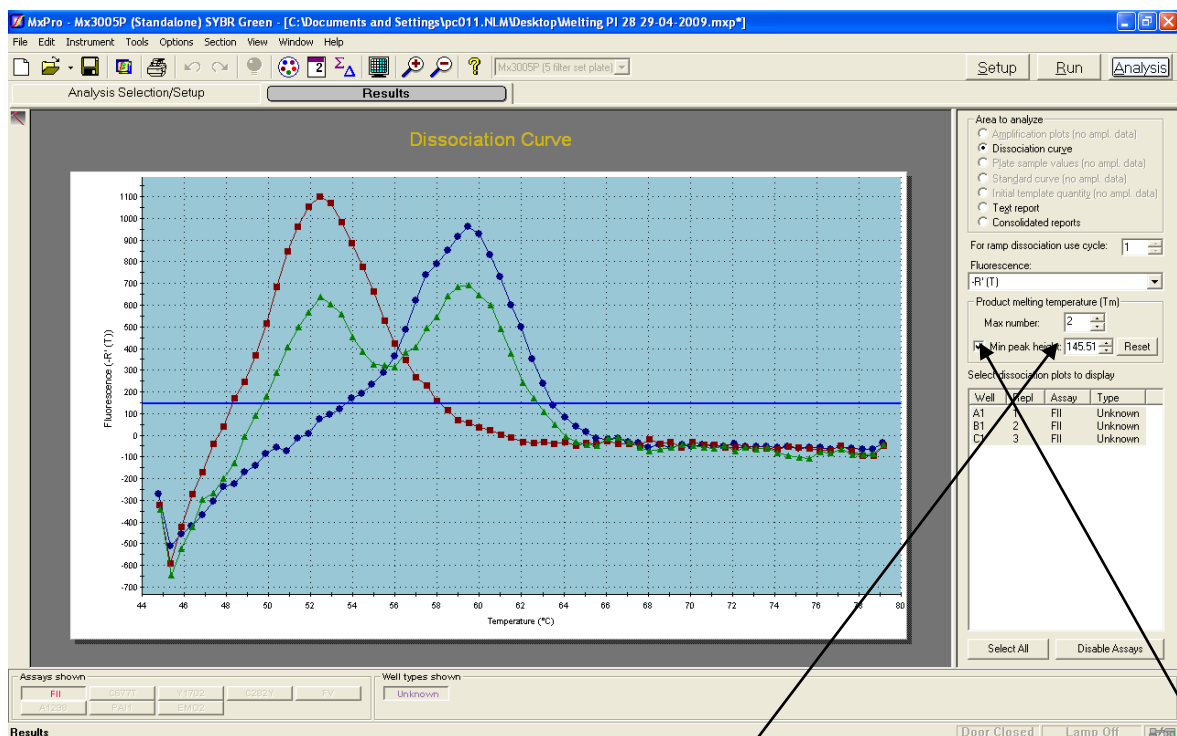
1. Cliccando a destra dello schermo "Analysis" è possibile analizzare i dati. Selezionare i pozzetti e verificare che in basso a sinistra sia attiva la casella per il saggio che si sta valutando.
2. Selezionare "Results" in alto sullo schermo; nella finestra "Area to analyze" compaiono diverse opzioni.

- Selezionando "Amplification plots" si vede il dato grezzo:



N. B. ⇒ : testo modificato rispetto alla precedente versione
 ⇒ : modified text compared with the previous version

- Selezionando “Dissociation Curve” si vede la curva di melting:

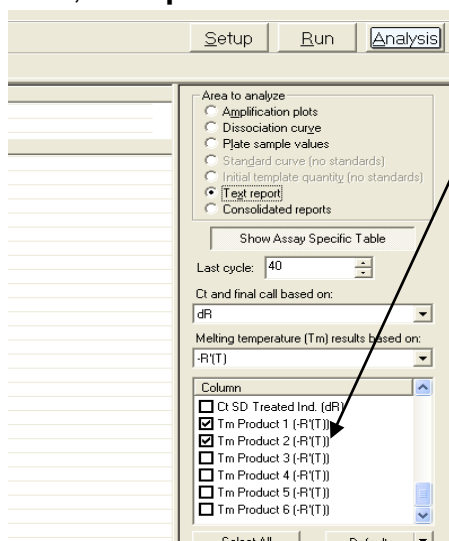


La threshold va posizionata manualmente cliccando a destra sul comando Min peak high: va spostata in base al risultato ottenuto, per eliminare il rumore di fondo ed eventuali picchi aspecifici fuori dal range previsto. Impostare il valore 2 in “Max number”, visibile solo in “Dissociation curve”, per visualizzare nel report entrambi i picchi di temperatura.

N.B. Solo per l’analisi del codice AA978 va impostato Max number 3 poiché sono possibili tre diversi valori di temperatura



- Selezionare “Text report” per vedere i valori dei picchi.
- Nella parte destra della schermata, nella sezione “column” verificare che siano attivate le voci Tm Product 1(-R’(T)) e Tm Product 2(-R’(T)). Anche in questo caso, **solo per il codice AA978 attivare anche la voce Tm Product 3(-R’(T))**



N.B. ⇨ : testo modificato rispetto alla precedente versione
 ⇨ : modified text compared with the previous version

- Per la refertazione utilizzare il programma **MX Coagulaser** seguendo la metodica con codice **DO006**.
- Selezionando "Consolidated Report" è possibile scegliere dall'elenco "Areas to include" i dati da visualizzare nel report finale.

REF DX000

Mx3005P OPERATOR'S MANUAL



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
HEAD OFFICE: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Tel (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
WEB: www.nlm.it – E-MAIL: info@nlm.it

PROTOCOL FOR FRET PROBES CHEMISTRY

Switch on the instrument 20 minutes before its use to allow the lamp to heat up. A green color and the words LAMP ON suggest to the user the status lamp of the instruments.
⇒ In window "New Option" select "SYBR GREEN with dissociation curve".

A) PLATE LAYOUT

1. Select plate positions to be used during the assay.
2. On the right of the screen select in "Well type" "Unknown" from scroll menu.
3. If it has never created the filter named FRET click on the "optics configuration" (symbol round with colored circles) and select "dyes and filter", move to the right of the window (dye-based definitions), in the Name box, write FRET, to the voice Filter Set select FRROX, assign a color you like, click on Add and then OK. If FRET is already present directly select
- ⇒ 4. If FRET filter is still shows, on the right side of the screen, "Collect fluorescence data", click on directly, otherwise if it's not, click on the small black arrow in one of these filters and select FRET from the menu instead of the initial filter. Verify that appear on the selected wells (as shown in the figure below).

The screenshot displays the MxPro software interface for a SYBR Green assay. The main window is titled "MxPro - Mx3005P (Standalone) SYBR Green - [New Experiment.mxp*]". The interface includes a menu bar (File, Edit, Instrument, Tools, Options, Section, View, Window, Help), a toolbar with various icons, and a status bar at the bottom. The central area is divided into two main sections: "Plate Setup" and "Thermal Profile Setup".

The "Plate Setup" section shows a 12x8 grid of wells (rows A-H, columns 1-12). Wells A1 through A6, B1 through B6, and C1 through C6 are highlighted in purple and labeled "FRET". All other wells are labeled "Unknown".

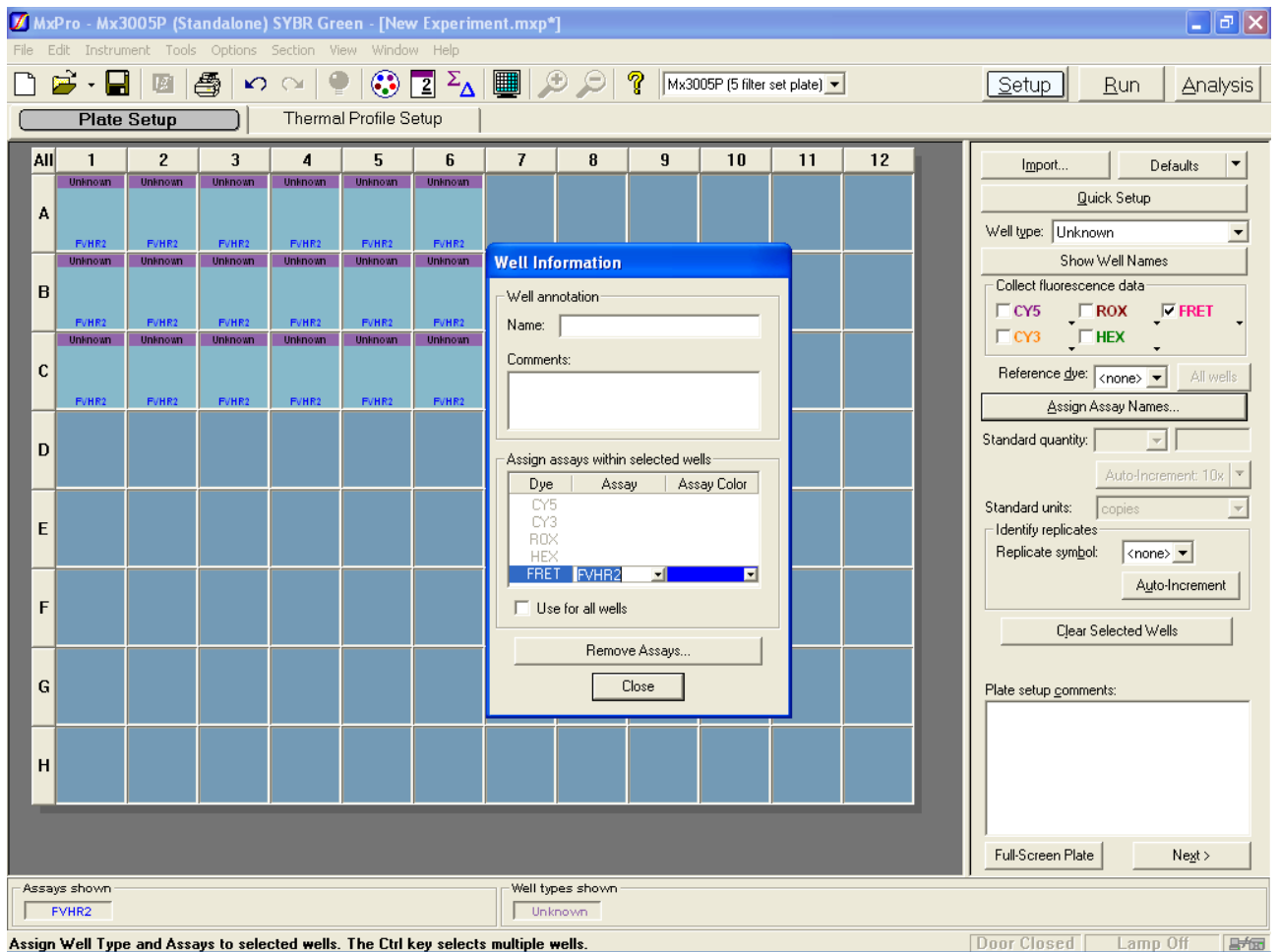
The "Thermal Profile Setup" section on the right contains several configuration options:

- Well type: Unknown
- Show Well Names: [checked]
- Collect fluorescence data: CY5, ROX, FRET, CY3, HEX
- Reference dye: <none>
- Assign Assay Names...: [button]
- Standard quantity: [dropdown]
- Auto-Increment: 10x
- Standard units: copies
- Identify replicates: [checked]
- Replicate symbol: <none>
- Auto-Increment: [button]
- Clear Selected Wells: [button]
- Plate setup comments: [text area]
- Full-Screen Plate: [button]
- Next >: [button]

At the bottom of the interface, there are two status indicators: "Assays shown" (FRET) and "Well types shown" (Unknown). A status bar at the very bottom reads "Assign Well Type and Assays to selected wells. The Ctrl key selects multiple wells." and includes "Door Closed" and "Lamp Off" indicators.

**N. B. ⇒ : testo modificato rispetto alla precedente versione
⇒ : modified text compared with the previous version**

- ⇒ 5. Select on plate the position that will be used for first parameter ex. FV; on the right of the screen select “Assign Assay Names” and in the window “Well Information” select FRET: from the scroll menu choose the assay type to be analyzed and assign to each factor a different color (as shown below).



6. To give a specific name to each plate well, click twice on the well and write the name in “Name” window.
N.B. Name must be wrote without using this letter (à,ò,ì,è), in case use (‘)
7. Repeat from step 4. for each factor to be analyzed.
8. At the end, to view the name on each well click on the right of the screen on “Show Well Name”.

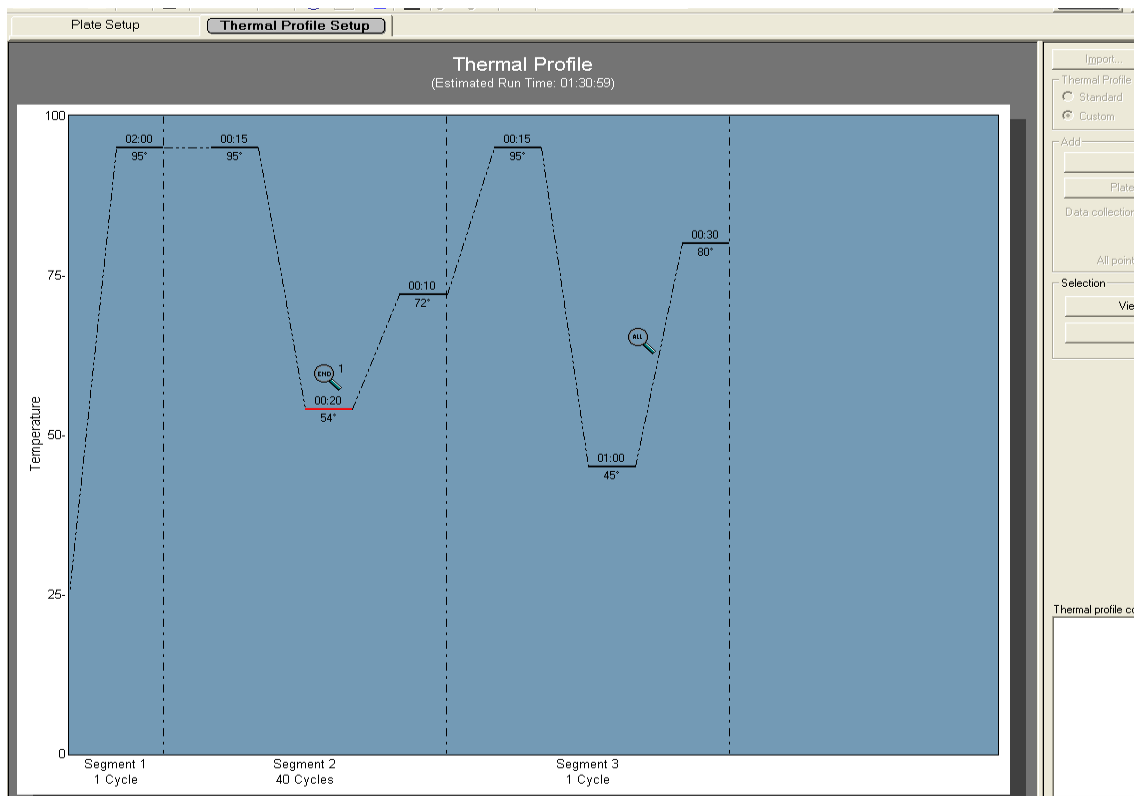
THRMAL PROFILE

1. Select “Thermal Profile Setup” on the top of the screen: on right side in “thermal profile design” it is possible to change directly the parameters by modifying the temperatures and times on the graph as required by the Kit. For setup refer to the specific PCR protocol into the kit by using temp and time values as Eppendorf Realplex graph.

**N. B. ⇒ : testo modificato rispetto alla precedente versione
 ⇒ : modified text compared with the previous version**

N.B. Only for cod.AA933 FV H1299R it must be used the specific profile for Mx3005P. For temperature profiles which require a “touchdown” during the annealing step in the PCR cycles, click twice on temperature line, the “plateau properties” window opens and the touchdown settings can be added at step” cycle increments”

2. In “Segment 2” of thermal profile check that lens (acquiring signal symbol) is labeled by “End” and is positioned on the second step (annealing).
3. In “Segment 3” check that lens is labeled by “All” and is positioned between step 2 and step 3 (as shown below).
- ⇒ 4. It’s also possible to import the thermal profile from saved run stored into PC: for obtain this click on the top of the screen on button “import” and select the right file for import it.



B) ASSAY RUN

On the right top of the screen click on “Run”: a window appears where you can name the assay and start the experiment.

If a warning appears, saying “the lamp is not ready”, it is possible to start the assay anyway.

- ⇒ Moreover it appears on screen a small windows about lamp status: a message inform user if the lamp is ready or not. Yellow color is for warming status, green colour when the lamp is OK and red colour if the lamp is switch off. The run could start even if the lamp is in warming status but we suggest to wait the green colour

**N. B. ⇒ : testo modificato rispetto alla precedente versione
 ⇒ : modified text compared with the previous version**

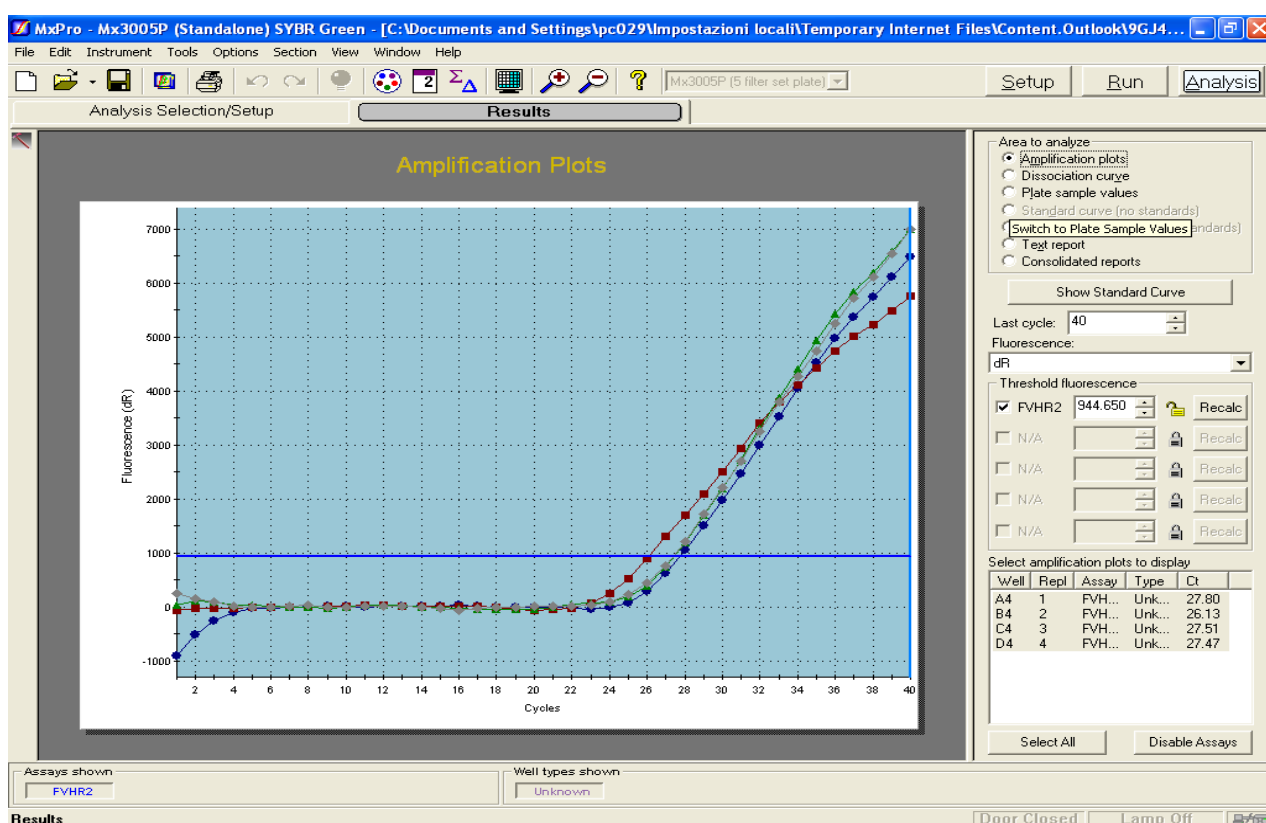
C) ASSAY MONITORING

Raw data plots: during the assay you can see the graph of the sample in each well by activating the function key of the assay to be analyzed on the left bottom of the screen.

D) DATA ANALYSIS

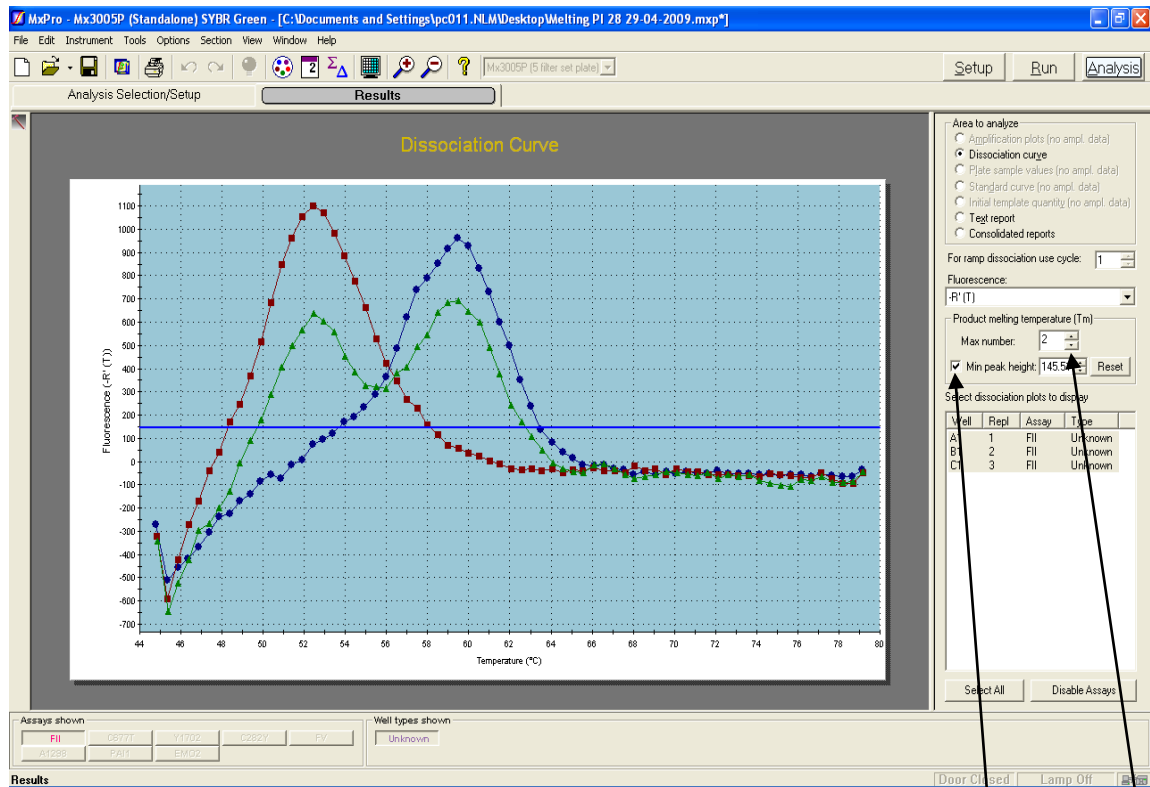
1. To analyze data click on “Analysis” on the right of the screen.
Select wells for each assay and check that the analyzed factor is activated on the left bottom of the window.
2. Select “Results” on the top of the screen; in “Area to analyze” window on the right of the screen some options are present.

- Select “Amplification plots” to see raw data:



N. B. ⇨ : testo modificato rispetto alla precedente versione
⇨ : modified text compared with the previous version

- Select "Dissociation Curve" to see melting curve:

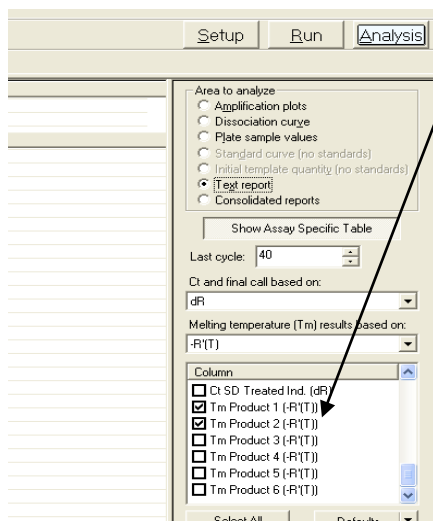


⇒ The instrument selects automatically the threshold, but you can move it to delete the background noise and unspecific peaks by selecting the box Min peak height. In order to view both of the temperature peaks on the report, select number 2 in "Max number" box.

N.B. Only for cod. AA978 it must be set Max number 3 because are possible three different values

- Select "Text report" to view peaks values.

⇒ On right side of the screen, on section "column" verify that appears Tm Product 1(-R'(T)) e Tm Product 2(-R'(T)). **Also in this case, only for cod. AA978, activate the Tm Product 3(-R'(T)).**



- To provide a medical report use the program “**MX Coagulaser**” following instructions for use by reading the manual cod. **DO006**.
- By selecting “Consolidated Report” you can choose among “areas to include” the informations to be shown in the final report.