

**REF** DX007

# CFX MANUALE D'USO

CE

IVD



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](http://www.nlm.it) – E-MAIL: [segreteria@nlm.it](mailto:segreteria@nlm.it)

## Sommario

|  |          |
|--|----------|
| <b>PROTOCOLLO PER CHIMICA FRET .....</b>             | <b>2</b> |
| <b>RUN SETUP .....</b>                               | <b>2</b> |
| PROTOCOLLO.....                                      | 2        |
| Creare un nuovo protocollo .....                     | 2        |
| Selezionare/modificare un protocollo esistente ..... | 3        |
| PIASTRA.....   | 3        |
| Creare una nuova piastra .....                       | 3        |
| Selezionare/modificare una piastra esistente .....   | 4        |
| INIZIO DELLA SEDUTA.....                             | 4        |
| <b>ANALISI DEI DATI.....</b>                         | <b>5</b> |

## PROTOCOLLO PER CHIMICA FRET

- Accendere il PC e lo strumento CFX; aprire il programma Bio-Rad CFX Manager Software.
- Nella finestra selezionare *Create new run* e scegliere il modello di CFX.
- Cliccare OK.
- Si apre la pagina *Run Setup*

## RUN SETUP

### PROTOCOLLO

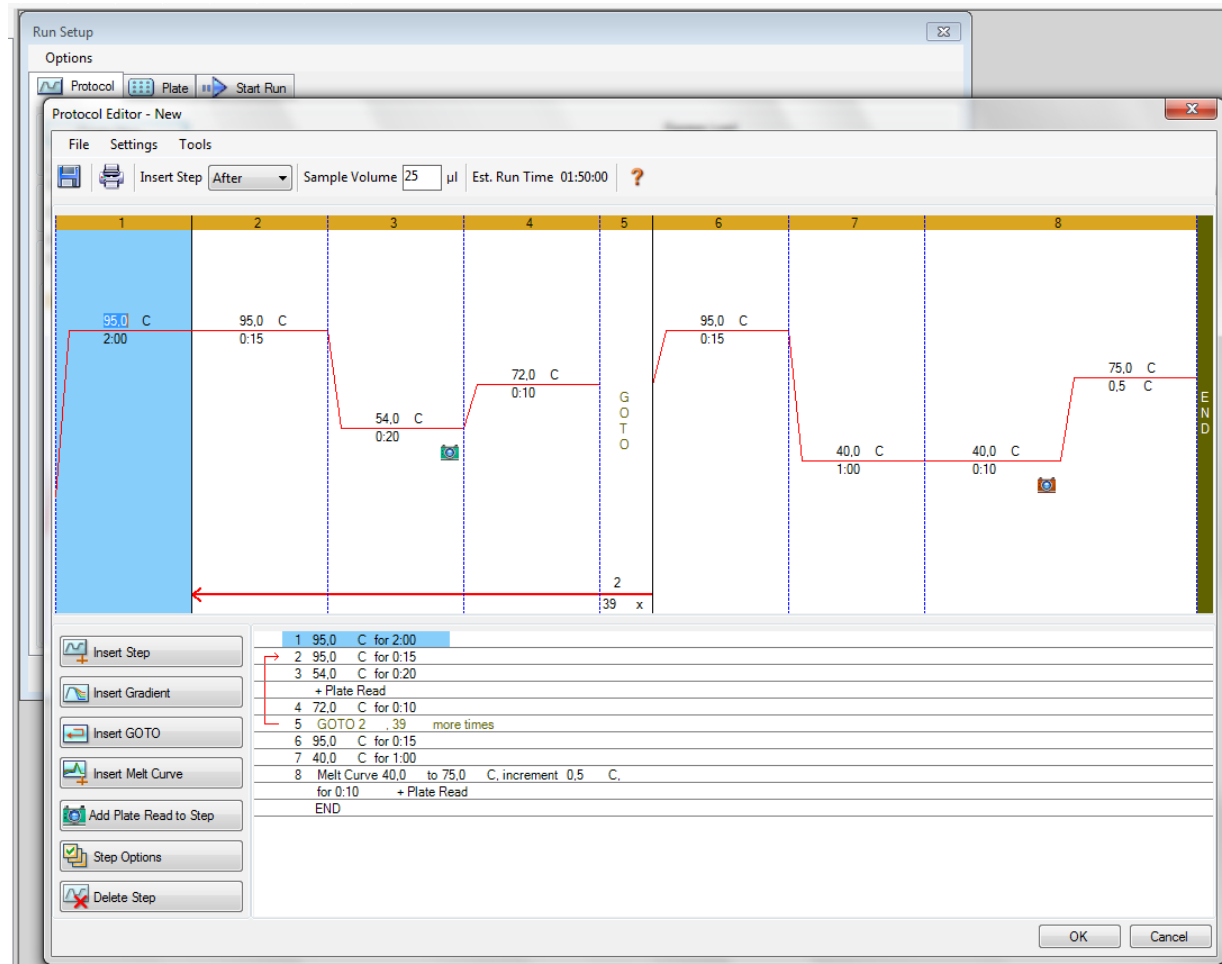
E' possibile creare un nuovo protocollo o selezionare/modificare un protocollo già esistente.

#### Creare un nuovo protocollo

- *Protocol* → *create New*
- Si apre la nuova finestra *Protocol Editor – new*
- Inserire il volume della reazione nella casella *Sample Volume*
- Aggiungere uno step o una curva di melting, cliccando *Insert Step* o *Insert Melt Curve* nella parte sinistra della finestra. Lo step verrà aggiunto in posizione successiva allo step selezionato
- E' possibile modificare le temperature e le durate degli steps dal grafico o nel riassunto scritto sotto, con un doppio clic su di essi.
- Per i profili di temperatura che richiedono il "touchdown" durante lo step di annealing nei cicli di PCR, selezionare lo step di annealing e cliccare *Step Options* a sinistra; si apre una nuova finestra dove scrivere lo specifico incremento o decremento di temperatura alla voce *Increment °C/cycle*
- Controllare che, negli steps di annealing in PCR e nella curva di melting, il simbolo della macchina fotografica sia presente nel grafico e la scritta + *Plate Read* sia presente nel testo. In caso contrario, aggiungerli cliccando *Add Plate Read to Step* (vedi figura 1).
- Cliccare OK. Salvare il nuovo protocollo.

## Selezionare/modificare un protocollo esistente

- E' possibile importare un profilo termico dai profili salvati e conservati nel PC (\*.prcl): per ottenere ciò, cliccare *Select Existing* nella pagina *Protocol, Run Setup*.
- Se si vuole modificare un protocollo esistente, cliccare *Select Existing* e *Edit Select*. Procedere quindi come descritto sopra.



**ATTENZIONE:** Fare riferimento al profilo termico di indicato nella metodica specifica di ciascuna prodotto. Il profilo indicato nell'immagine NON è specifico e deve essere considerato solo come esempio.

## PIASTRA

Selezionare *Plate* nella finestra *Run Setup*.

E' possibile creare una nuova piastra o selezionare/modificare una piastra esistente.

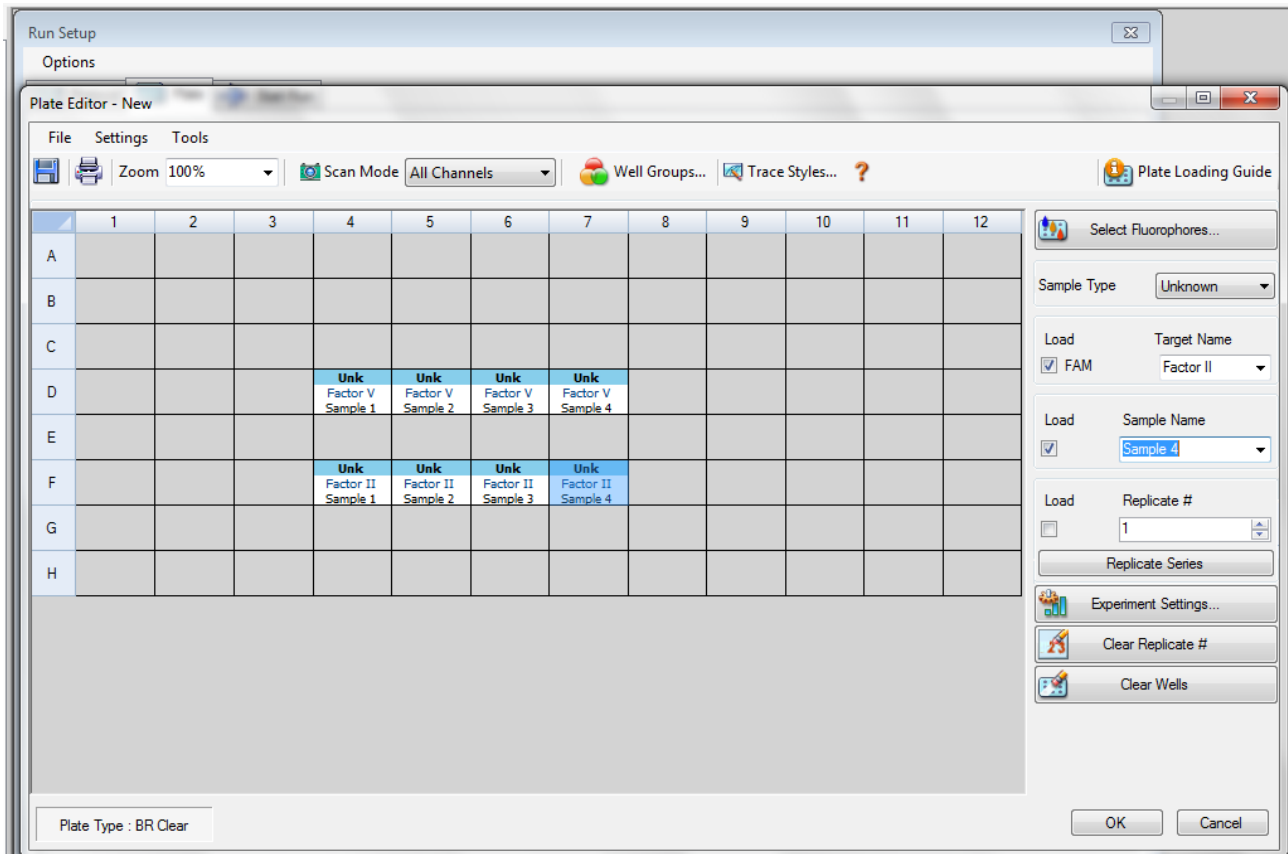
### Creare una nuova piastra

- *Plate* → *create New*
- Si apre la finestra *Plate Editor - new*
- Selezionare *Scan Mode* → *All channels*
- Cliccare *Select Fluorophores* per scegliere i fluorofori e selezionare solo il canale *FAM*
- Selezionare i pozzetti
- Impostare *Sample Type* → *Unknown*
- Scrivere in *Target Name* il nome della mutazione e cliccare *load* per associare il fluoroforo ai pozzetti.

- Scrivere in *Sample Name* il nome del campione e cliccare *load* per associare il nome ai pozzetti.
- *Cliccare OK. Salvare la piastra.*

### Selezionare/modificare una piastra esistente

- E' possibile importare una piastra dai profili salvati e conservati nel PC (\*.prcl): per ottenere ciò, cliccare *Select Existing* nella pagina *Plate*.
- Se si vuole modificare una piastra esistente, cliccare *Select Existing* e *Edit Select*. Procedere quindi come descritto sopra.



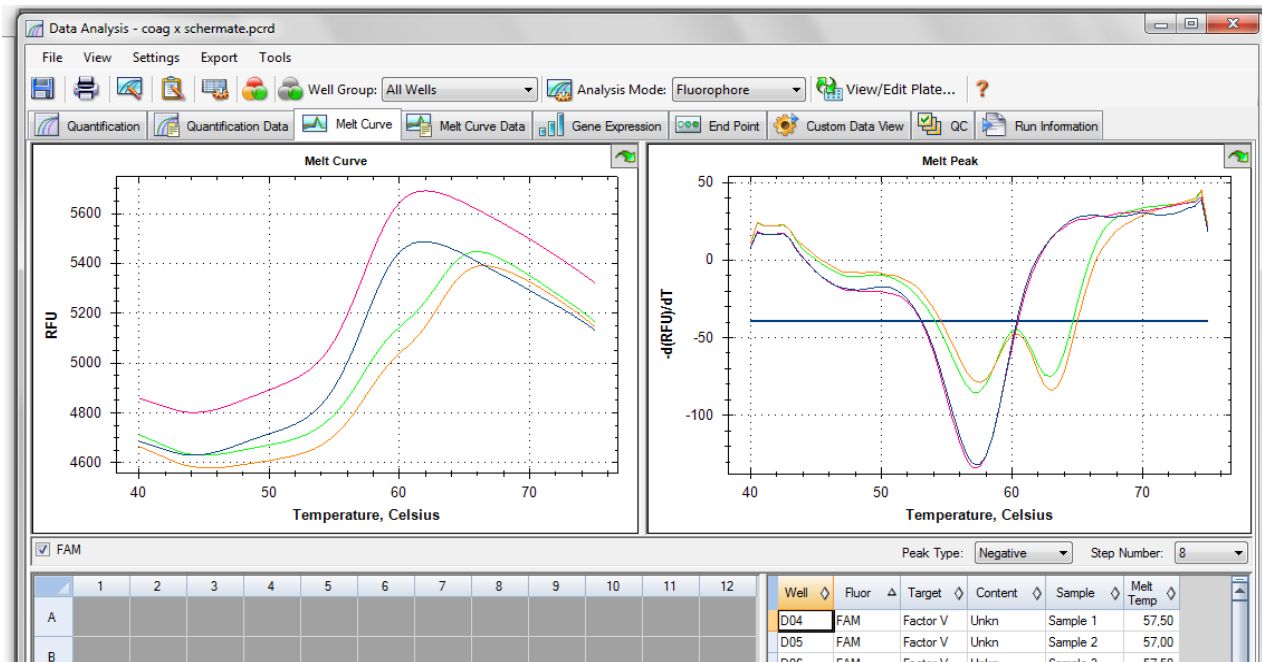
### INIZIO DELLA SEDUTA

- Selezionare nella pagina *Run Setup*, *Start Run*.
- Lo strumento è ora pronto per lavorare. Preparare le piastre/strips con i campioni e le mix.
- Aprire il coperchio cliccando il pulsante *Open Lid* e sistemare la piastra/strip nello strumento; chiudere il coperchio cliccando il pulsante *Close Lid*.
- Cliccare *Start Run* per iniziare la seduta.
- Si apre la finestra *Run Details*. Spostarsi nella pagina *Real Time Status* per monitorare l'andamento del dato grezzo della seduta.
- La sessione di lavoro dura circa 2 ore.

## ANALISI DEI DATI

Al termine della seduta di lavoro, automaticamente si apre la finestra *Data Analysis*. Selezionare *Melt Curve* per l'analisi dei dati. Si apre una nuova finestra dove vengono visualizzati i grafici della seduta. I grafici a sinistra mostrano il dato grezzo della curva di melting, i grafici a destra mostrano l'analisi  $-d(RFU)/dT$  con i picchi delle curve di melting.

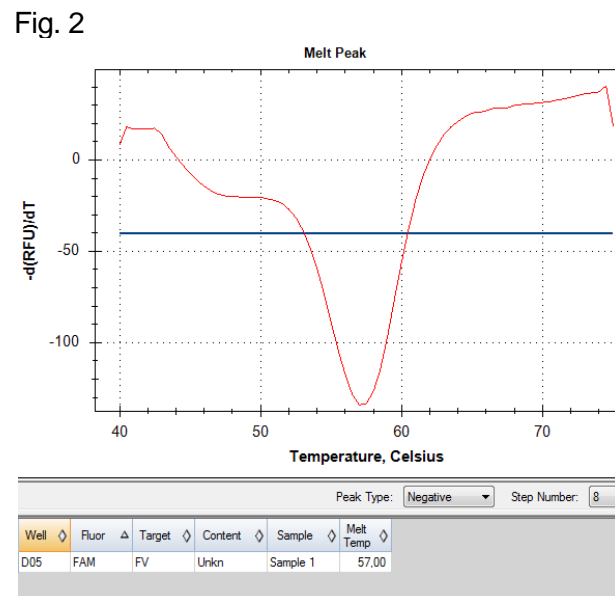
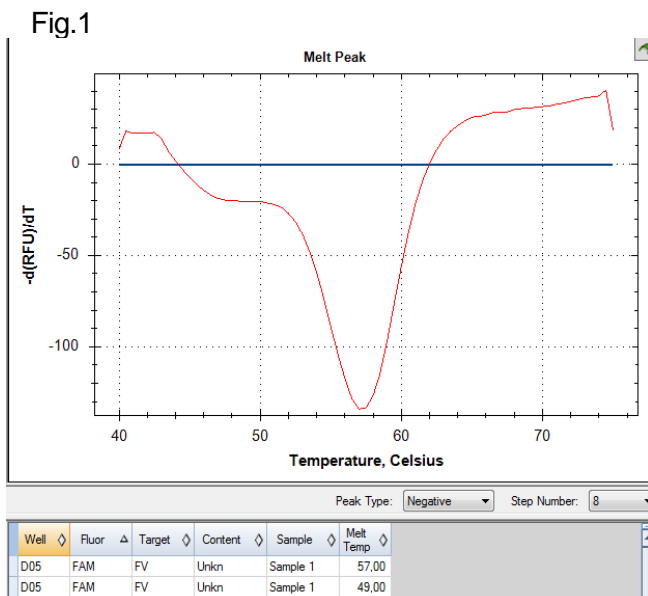
- . Selezionare *Peak Type* → *Negative*



Lo strumento seleziona automaticamente la threshold (linea blu) ma può essere spostata a piacimento per eliminare il rumore di fondo e/o picchi aspecifici.

### Example:

- ❑ fig. 1 (threshold = 0) ⇒ tipizzazione sbalgiata (campione eterozigote)
- ❑ fig. 2 (threshold = -40) ⇒ tipizzazione corretta (campione omozigote)



Se differenti bersagli (per esempio differenti fattori della coagulazione) sono processati insieme nella stessa seduta, raccomandiamo di analizzarli separatamente.

- Analizzare i picchi di melting per ogni campione, selezionando i singoli pozzetti della piastra.

Ogni campione può avere:

- Un singolo picco  $XX \pm Z^{\circ}\text{C}$  per campioni omozigoti mutati
- Un singolo picco  $YY \pm Z^{\circ}\text{C}$  per campioni Wild Type
- Un doppio picco per campioni eterozigoti

**Non considerare i picchi che cadono fuori dall'intervallo di temperatura.**

- Per creare un report selezionare *Tools*, quindi *Reports*. Scegliere Melt Curve → Melt Peak Chart e Melt Curve → Data al fine di ottenere i risultati finali.
- Per ogni campione segnare manualmente il genotipo corretto.

**REF** DX007

# CFX OPERATOR'S MANUAL

CE

IVD



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

## Sommario

|   |           |
|---|-----------|
| <b>PROTOCOL FOR FRET PROBES CHEMISTRY .....</b> | <b>8</b>  |
| <b>RUN SETUP .....</b>                          | <b>8</b>  |
| PROTOCOL .....                                  | 8         |
| Create a new protocol.....                      | 8         |
| Select/modify existing protocol.....            | 9         |
| PLATE .....                                     | 9         |
| Create a new plate .....                        | 9         |
| Select/modify existing plate .....              | 10        |
| START RUN.....                                  | 10        |
| <b>DATA ANALYSIS .....</b>                      | <b>11</b> |

## PROTOCOL FOR FRET PROBES CHEMISTRY

- Turn on the PC and the CFX Instrument; open the program Bio-Rad CFX Manager Software
- In the window click *Create new run* check boxes and choose the model of CFX.
- Click OK
- *Run Setup* window will open

## RUN SETUP

### PROTOCOL

It is possible to create a new protocol or select/modify an existing one.  
For setup refer to the specific protocol in the Appendix of this manual

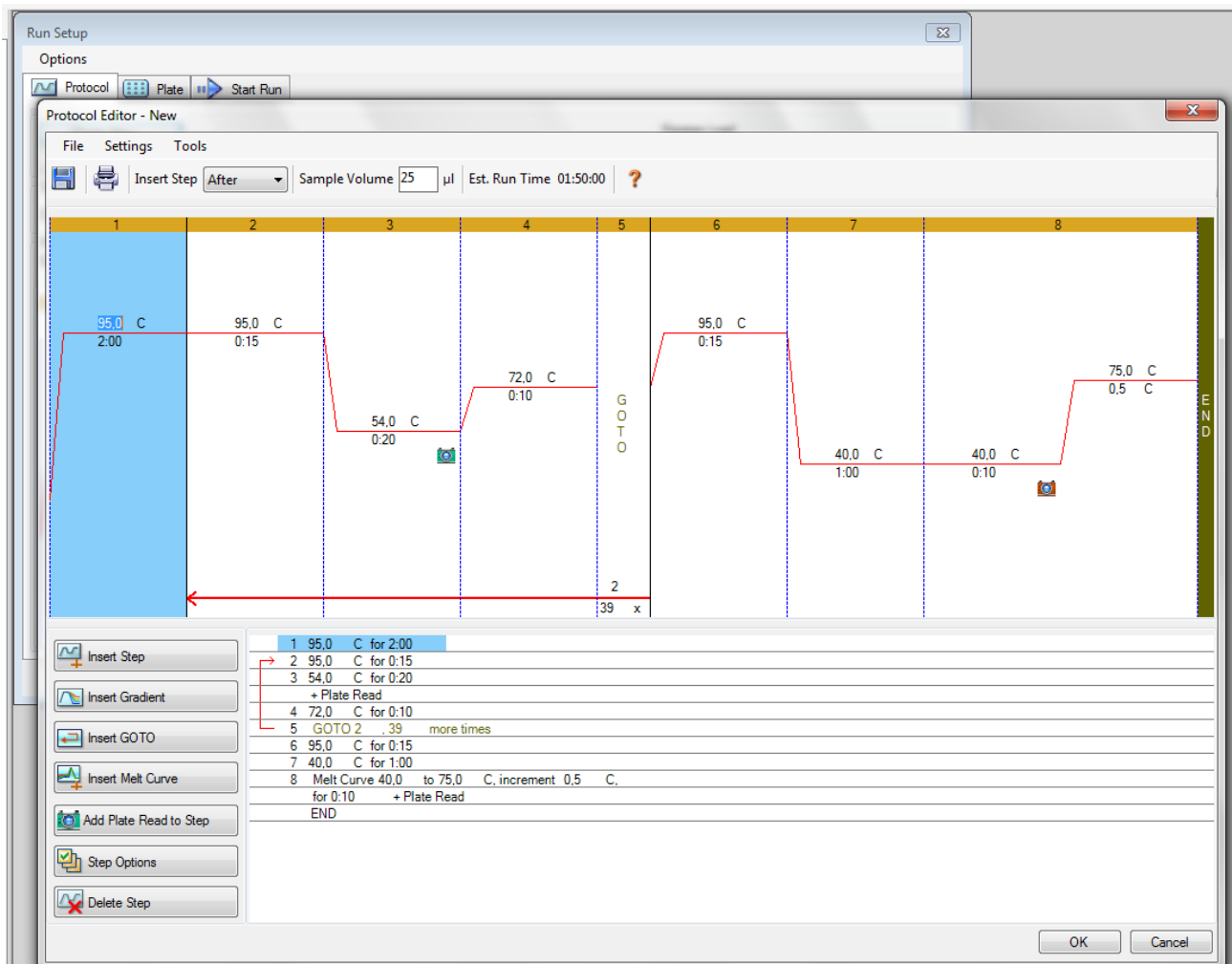
#### Create a new protocol

- *Protocol* → *create New*
- It will open a new window *Protocol Editor - new*
- Type the reaction volume in the *Sample Volume* box
- Add a step or the melt curve by clicking on *Insert Step* or *Insert Melt Curve* on the left of the window. The step will be placed in the position next to the selected step.
- It is possible to modify the temperatures and times on the graph or in the test below with a double click on them.
- For temperature profiles which require a “touchdown” during the annealing step in the PCR cycles, select the step line, then click on *step option* on the left. Step option window will open. Write the specific increase/decrease of temperature in the line *Increment °C/cycle*
- Check that the *camera symbol* (on the graph) or the written + *Plate Read* (in the test), are positioned on the second step of the amplification cycles and on the Melt curve. Otherwise add it by clicking on *Add Plate Read to Step* (see figure 1)
- Click OK. Save the new protocol.



## Select/modify existing protocol

- It's possible to import the thermal profile from saved profile (\*.prcl) stored into PC: to obtain this click on Select Existing in the protocol page.
- If you want to modify an existing protocol click on Select Existing and then click Edit Select. Proceed as explained in the previous chapter.



**WARNING:** Refer to the temperature profile shown in the specific Instruction for Use of each product. The profile shown in the picture is NOT specific and should be considered only as example.

## PLATE

Move into the *plate* page of the Run setup window

It is possible to create a new plate or select/modify an existing one.

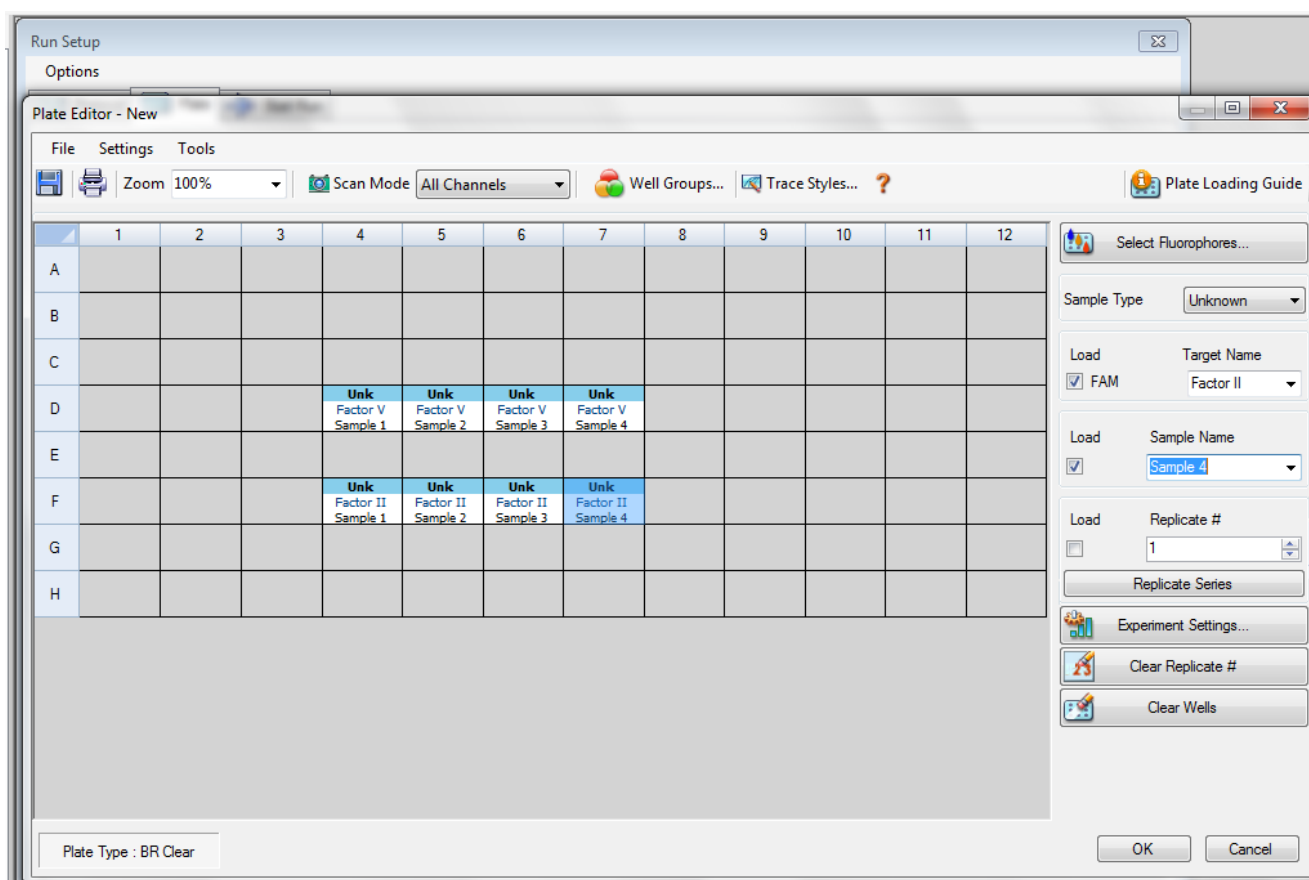
### Create a new plate

- *Plate* → *create New*
- It will open a new window *Plate Editor - new*
- Select Scan Mode → All channels
- Click Select Fluorophores button to choose fluorophores and select only FAM channel

- Select wells.
- Choose *Sample Type* → *Unknown*
- Type *Target Name* and click *Load* check boxes to load fluorophores.
- Type *Sample Name* and click *Load* check boxes to load Name
- Click OK. Save the new plate.

### Select/modify existing plate

- It's possible to import the plate from saved profile (\*.pltd) stored into PC: to obtain this click on *Select Existing* in the plate page.
- If you want to modify an existing plate click on *Select Existing* and then click *Edit Select*. Proceed as explained in the previous chapter.



### START RUN

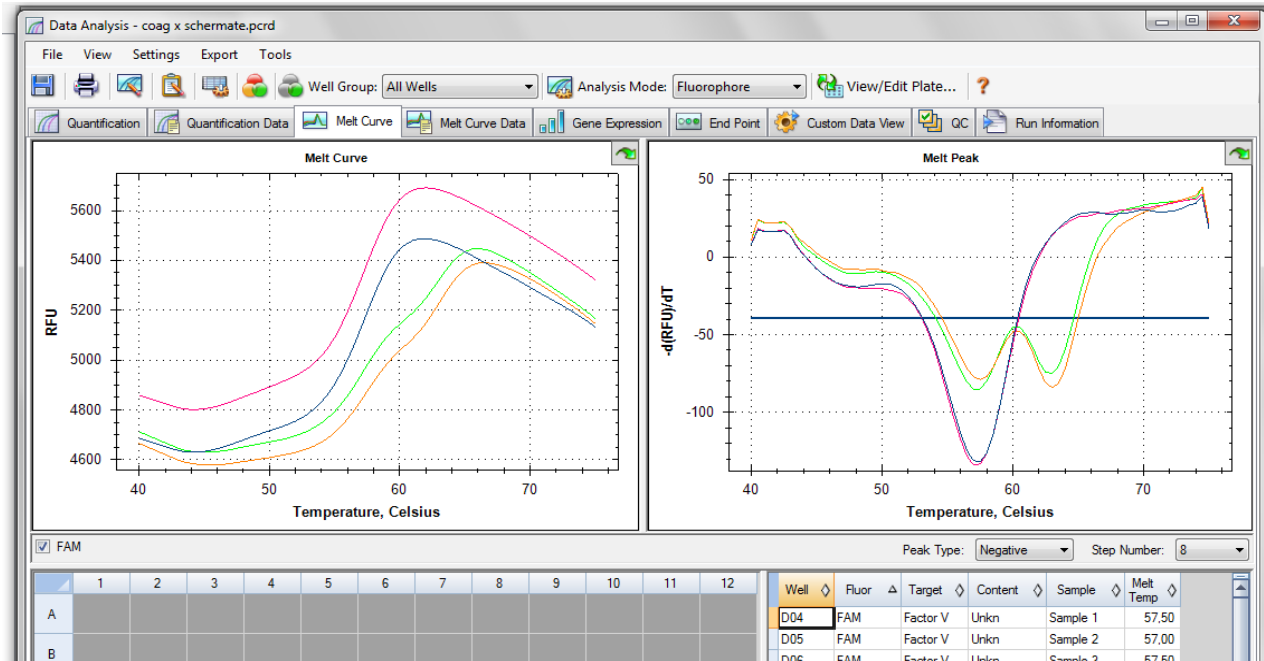
- Move into the *Start Run* page of the Run setup window
- The instrument is now ready to work. Prepare the plate/strip with samples and mix.
- Open the Lid by clicking on *Open Lid*, place the plate/strip in CFX instrument and close the Lid by clicking on *close Lid*
- Press *Start Run* to begin.
- *Run Details* window will open. Move in *Real Time status* page: you can monitor the Raw data plots during the assay.
- The session will take about 2 hours.

# DATA ANALYSIS

The window Data Analysis will open automatically at the end of the session.

Move in *Melt Curve* page for the data analysis: a window with the graphic analysis of the assay will be displayed. The graph on the left shows the raw data of the melting-curve, the graph on the right shows  $-d(RFU)/dT$  analysis, with *Melt Peak*.

- Select *Peak Type* → *Negative*



- The instrument selects automatically the threshold (blu line), but you can move it to delete the background noise and unspecific peaks.

### Example:

- ❑ fig. 1 (threshold = 0) ⇒ incorrect typing (heterozygous sample)
- ❑ fig. 2 (threshold = -40) ⇒ correct typing (homozygous sample)

Fig.1

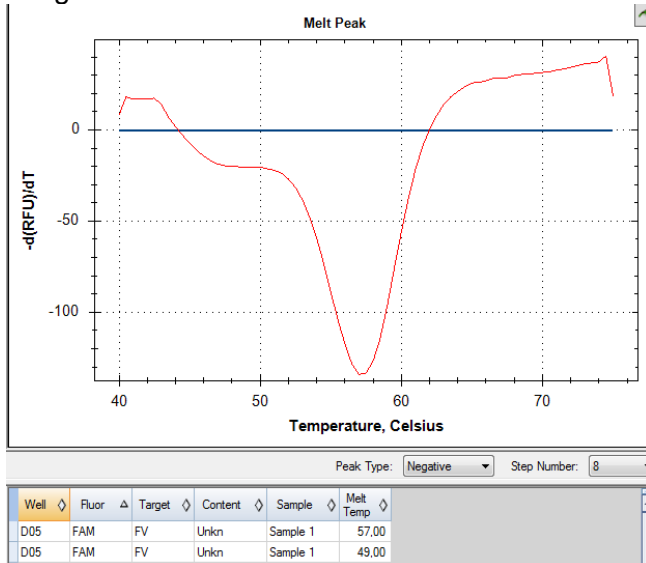
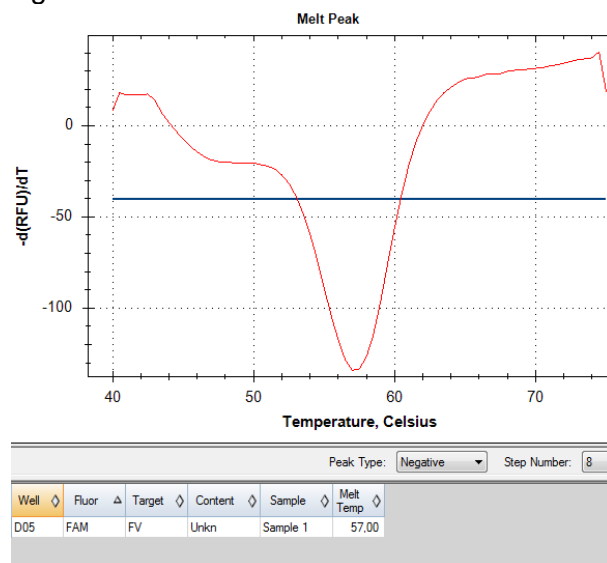


Fig. 2



If different target (for example different coagulation factors) are tested in the same run we recommend to do the analysis separately.

- Analyze the *Melt Peak* for each sample selecting the wells of the plate.

Each sample could have:

- a single peak at  $XX \pm Z^{\circ}\text{C}$  for homozygous mutant samples
- a single peak at  $YY \pm Z^{\circ}\text{C}$  for wild-type samples
- a double peak for heterozygous samples

**Do not consider peaks out of the temperature range.**

- Create a Report (Tools → Reports). Select Melt Curve → Melt Peak Chart and Melt Curve → Data in order to obtain the final results.
- For each sample mark manually the correct genotype