PCR Sprint
Temperature Cycling System

MANUALE DI ISTRUZIONI

HYBAID Ltd. - Celbio srl.
Un passo avanti nella biologia molecolare

DATI TECNICI

Numeri di catalogo

Modello PCR Sprint 0,5 ml	HB-SP-05-220
Modello PCR Sprint 0,2 ml	HB-SP-02-220

*Tube Thermistore (da 0.5 ml)	HBPX-TTM05
*Tube Thermistore (da 0.2 ml)	HBPX-TTM02

* N.B.: Questi accessori sono già a corredo dello strumento di riferimento.

Temperatura

Intervallo di temperatura di utilizzo	+4°C - 99°C
Velocità di riscaldamento	3°C/sec
Velocità di raffreddamento	2°C/sec
Precisione del Termistore	±0,1°C
Grado di risoluzione indicato dallo schermo	±0.1°C
Livello di uniformità del blocco	±0.5°C entro 15 sec.
Temperatura del coperchio riscaldato	115°C

Programmazione

Numero di programmi memorizzabili sul Modulo di Controllo	60
Numero di Directories	6
Numero massimo di cicli in un programma	5
Numero massimo di fasi per ciclo	5
Tempo massimo di sosta programmato	9 ore 99 min 99 sec
Possibilità di pausa	sì
Temperature Ramping	sì
Incremento /decremento temporale e di temperatura	sì
Possibilità di riavvio automatico	sì
Calcolo del tempo mancante al termine del programma	sì
Operazioni "Oil free"	sì
Possibilità di Editing durante il funzionamento	sì
Tastiera alfanumerica	sì

Garanzia

La Hybaid Limited garantisce che l'apparecchiatura PCR Sprint Thermal Cycler che avete ricevuto é stata pienamente collaudata ed é conforme alle caratteristiche tecniche pubblicate. La garanzia é valida 36 mesi (*) a condizione che il prodotto sia utilizzato secondo le istruzioni del manuale. Non si accettano responsabilità in caso di perdita o danno derivante da uso inappropriato dell'apparecchio PCR Sprint Thermal Cycler. La responsabilità della Hybaid é limitata alla riparazione o sostituzione dell'unità, o alla restituzione del prezzo di vendita, a sua discrezione. La Hybaid non é responsabile di danni indiretti.
La Hybaid Limited si riserva il diritto di modificare i dati tecnici dell'apparecchio PCR Sprint Thermal Cycler senza preavviso. Ciò ci permetterà di inserire in continuo ulteriori innovazioni.

Hybaid PCR Sprint deve essere utilizzata solo a scopo di ricerca.

Leggete attentamente il manuale di istruzioni prima di utilizzare il PCR Sprint, per assicurarvi di ottenere i migliori risultati dall'utilizzo di questa apparecchiatura.

(*) Tube Thermistor; garanzia 12 mesi

Indice

Capitolo 1: Introduzione
Capitolo 2: Disimballaggio e Installazione
Capitolo 3: Istruzioni per l'utilizzo - parte generale - Operazioni manuali
Capitolo 4: Esecuzione di un programma su PCR Sprint
Capitolo 5: Creazione di un programma su PCR Sprint
Capitolo 6: Funzioni di impostazione
Capitolo 7: Amplificazione riuscita: come ottenere i migliori risultati con Hybaid PCR Sprint
Capitolo 8: Guida veloce all'utilizzo di PCR Sprint

NB : le figure citate hanno il riferimento del Manuale originale inglese

1. Introduzione

Hybaid PCR Sprint é stato progettato per l'esecuzione di protocolli di amplificazione in modo rapido, preciso e "licensed" su un piccolo numero di campioni.
PCR Sprint é dotato di blocchi intercambiabili sub ambient, che consentono di effettuare amplificazioni senza l'utilizzo di olio, con una eccellente uniformità ed un preciso controllo della temperatura.

Il PCR Sprint comprende una unità di controllo (Chassis) ed un blocco intercambiabile.
I blocchi sono di due formati:

Blocco da 0,2 ml: capacità 24 x 0,2 microprovette
Blocco da 0,5 ml: capacità 20 x 0,5 microprovette

I blocchi riscaldanti sono costruiti in alluminio, mediante un processo unico, che assicura il migliore inserimento possibile delle provette nel blocco. Il contatto termico tra le provette e il blocco é eccellente, permettendo un rapido e accurato trasferimento del calore dal blocco ai campioni. Un accurato controllo della temperatura dei campioni é garantito da un programma software Hybaid associato al controllo di un **"campione attivo in provetta" (Active Tube Control).** La provetta che contiene la sonda termistore di controllo della temperatura é in grado di monitorare la temperatura della provetta di un campione di controllo, inviando le informazioni al Modulo di Controllo, allo scopo di controllare in modo preciso la temperatura del blocco, per raggiungere il miglior profilo di cicli di temperatura. Tale scambio di informazioni permette di accelerare la transizione verso la temperatura desiderata, creando un gradiente tra la temperatura della provetta e quella del blocco. Alternativamente, il controllo di un **" simulazione di campione in provetta"(Simulated Tube Control)** può essere utilizzato per reazioni per le quali non é indicato l'uso della provetta contenente la sonda di controllo della temperatura (ad esempio per reazioni < di 20µl). L'algoritmo di controllo della temperatura é simile a quello utilizzato per il "campione attivo in provetta", con la differenza che é basato su valori calcolati su temperature campione piuttosto che su valori reali registrati dal termistore.

PCR Sprint può essere programmata per effettuare qualsiasi reazione a temperatura controllata, da incubazioni ad una sola temperatura, fino a complessi protocolli di cicli di temperatura a più fasi. L'utilizzatore può disporre di due programmi software per il controllo della temperatura:

Velocità' di incremento della temperatura (Advance Edit - Temperature increment)

L'opzione per il controllo della velocità di incremento della temperatura é in grado di controllare in modo preciso la velocità di variazione della temperatura dei campioni (in secondi per grado centigrado). In condizioni normali, i tempi di variazione della temperatura sono molto brevi, minimizzando la possibilità di reazioni aspecifiche. In alcuni casi, tuttavia, può essere vantaggioso limitare la velocità di variazione della temperatura; ad esempio, in caso di utilizzo di brevi oligonucleotidi o di oligonucleotidi degenerati si può limitare la velocità di variazione della temperatura tra la fase di appaiamento e quella di sintesi di DNA, allo scopo di stabilizzare i complessi oligonucleotide/templato.

Incremento temporale (Advance Edit - Time increment)

Questa funzione permette di incrementare la durata di una fase specifica del programma, mano a mano che si procede con i successivi cicli di temperatura. Ad esempio, potrebbe essere vantaggioso, incrementare la durata della fase di sintesi di DNA per compensare la diminuzione dell'attività enzimatica, che si può verificare durante gli ultimi cicli.

il PCR Sprint é in grado di memorizzare fino a 60 programmi. La programmazione e il funzionamento sono semplici, utilizzando la combinazione di uno schermo a cristalli liquidi e di chiavi operative. Durante le operazioni di programmazione lo schermo fornisce informazioni complete, relativamente alla temperatura dei campioni, al numero di cicli effettuati, al tempo stimato per il completamento del programma, ecc.

Il PCR Sprint é fornito con 10 programmi precaricati, e NON cancellabili, nelle posizioni 51--60.
Tali programmi, il cui dettaglio é contenuto nell'appendice III del manuale Originale, possono servire come base di partenza per realizzare programmi personalizzati semplicemente copiandoli ed editandoli sulla posizione desiderata

La precisione e l'uniformità della temperatura in tutto il blocco, in particolare per operazioni che richiedono rapide variazioni di temperatura, sono stati concetti di fondamentale importanza per l'ideazione e lo sviluppo di PCR Sprint. Ogni apparecchiatura é stata testata, utilizzando una sonda termistore in miniatura localizzata all'interno di provette posizionate simultaneamente in diversi punto del blocco, per assicurare che la temperatura richiesta e i tempi di incubazione siano omogenei per tutti i campioni.

Infine PCR Sprint é stato ideato per garantire affidabilità e tranquillità di manutenzione. Hybaid offre continuamente un servizio completo e un supporto tecnico per i suoi prodotti.

Coperchio riscaldato
L'apparecchio può operare con il coperchio riscaldato acceso o spento.
Il coperchio riscaldato consente agli Utilizzatori di evitare l'uso di paraffina od olio minerale per minimizzare l'evaporazione dei campioni.
Il coperchio consente di posizionare una piastra riscaldata a diretto contatto con la parte superiore delle provette, che innalza la temperatura della parte superiore delle provette stesse ad un valore sempre superiore rispetto alla temperatura dei campioni.Ciò minimizza la possibilità di evaporazione.

Il coperchio si apre premendo il pulsante nero; alla chiusura, l'altezza della piastra riscaldante si adegua automaticamente alle provette, esercitando una leggera pressione.

La temperatura é impostata a 115°C
Il coperchio é messo in funzione e disattivato dal programma stesso, ed il tempo di riscaldamento é di circa 3 minuti.

2. Disimballaggio e installazione

Al momento del ricevimento di PCR Sprint, controllate che niente sia stato danneggiato. Il Modulo di Controllo é costituito dai seguenti elementi:

1.PCR Spint Chassis
2. PCR Sprint Blocco (premontato nell'unità)
3. Manuale di Istruzioni
4. Cavo di alimentazione
5. Sonda Tube Thermistor
6. Olio minerale
7. Tubicini di prova

Se qualche articolo é mancante o danneggiato, contattate la Hybaid Limited, o un distributore autorizzato Hybaid.

Il blocco é raffreddato da un ventilatore; lasciate, quindi, almeno 15 cm di distanza tra la presa d'aria di ogni modulo e qualsiasi altro oggetto che potrebbe limitare il flusso dell'aria. Le prese d'aria sono localizzate nella parte inferiore e laterale di ogni unità..
L'apparecchio può essere usato in camera fredda (4°c), ma, a causa del rischio di formazione di condensa che potrebbe danneggiare l'unità, si richiede un certo tempo di equilibrazione (due ore) prima di accendere l'apparecchio. L'apparecchio dovrebbe essere posizionato lontano dalla luce diretta del sole o da forti correnti di aria calda o fredda. I coperchi dei blocchi dovrebbero essere chiusi durante i cicli di variazione di temperatura, in modo da eliminare le influenze dell'ambiente esterno.

3. Istruzioni per l'utilizzo - parte generale

Una volta che PCR Sprint é stato correttamente posizionato nel laboratorio, può essere collegato alla rete di alimentazione elettrica e acceso (la presa di alimentazione e l'interruttore di accensione si trovano sul lato destro del Modulo di Controllo).
Attenzione: prima di utilizzare PCR Sprint per la prima volta, controllate il valore di voltaggio indicato sull'apparecchio (i dettagli sono indicati sull'etichetta riportante il numero di serie e sull'etichetta riportante il valore del fusibile, localizzata vicino alla presa di alimentazione). Il Menu principale, che permette l'accesso a tutte le funzioni operative di PCR Sprint, apparirà sul display. I restanti capitoli di questo manuale di istruzioni sono stati ideati in modo da fare riferimento a ciascuna funzione, per assicurare un accesso veloce alle informazioni più rilevanti.

Dopo l'accensione, la macchina effettua un test di controllo e, se il test ha avuto esito positivo, viene visualizzato il MENU "MAIN"
Questo é il Menu principale, al quale é possibile in ogni momento ritornare premendo il tasto MENU.

Il Menu principale indica lo stato del blocco
Attivo, Inattivo, Interrotto, Attivo(dopo interruzione)
e permette di accedere ai sottomenu RUN, MAN, PROG, SETUP

Utilizzate la freccia di direzione per muovere il cursore attraverso lo schermo, e premete ENTER per avere accesso al menu operativo relativo alle funzioni richieste. Per ritornare al menu principale in qualunque momento, premente MENU. Quando utilizzato in questo modo, il tasto menu serve anche come tasto di cancellazione o di uscita.

FUNZIONE "RUN"
Selezionate RUN per accedere al menu di avvio del programma ed eseguire un programma memorizzato. Selezionate i programmi memorizzati sul Modulo di Controllo (programmi numerati da 1 a 60

Capitolo 4: Esecuzione di un Programma su PCR Sprint.

OPERAZIONI MANUALI
Selezionate MANUAL per effettuare semplici incubazioni a temperatura costante. L'incubazione continuerà fino a quando verrà selezionata una nuova temperatura o un programma. Le operazioni manuali possono anche essere utilizzate per le fasi di pre-incubazione, prima di iniziare un programma di cicli di temperatura. Vedi Capitolo 5: Operazioni Manuali.

FUNZIONI DEL PROGRAMMA
Selezionate PROG per avere accesso al menu di programmazione. Il menu di programmazione indica le opzioni relative ai cicli di temperatura, disponibili all'utilizzatore:
a. EDIT: Elimina un programma memorizzato sul Modulo di Controllo o su una Scheda Dati.
b. NEW: Crea un nuovo programma di cicli di temperatura.
c. VIEW: Mostra un programma già esistente, memorizzato sul Modulo di Controllo o su una Scheda Dati.
d. COPY: Copia un programma memorizzato con un certo numero su un programma definito da un altro numero.

Vedi Capitolo 5: Creazione di un Programma su PCR Sprint.

IMPOSTAZIONE (SET UP)
Il menu SET UP permette all'utilizzatore di modificare i parametri impostati alle istruzioni di riavvio in seguito ad interruzione di energia. In aggiunta, specifica il tipo di blocco inserito, **che deve essere impostato manualmente dall'utilizzatore**

Vedi Capitolo 6: Impostazione di Funzioni.

3.1. Operazioni manuali

Le operazioni manuali su PCR Sprint sono utilizzate per semplici incubazioni a temperatura costante per un periodo di tempo imprecisato. Premete MENU fino a quando appare sullo schermo il menu principale, quindi utilizzate le frecce di direzione verso destre e sinistra per muovere il cursore su MANUAL e premete ENTER (vedi Figura 3). Seguite le indicazioni dello schermo e premete ENTER per specificare la temperatura di incubazione. Muovetevi tra "controllo del blocco" e "controllo di un campione di simulazione in provetta" utilizzando le frecce di direzione destra e sinistra e premete ENTER, quando avete raggiunto l'opzione desiderata. Il campione di controllo é raccomandato per la maggior parte delle incubazioni in provetta, in quanto elimina l'intervallo di tempo che intercorre tra il momento in cui il blocco raggiunge una certa temperatura e il momento in cui la stessa temperatura é raggiunta dal campione.

Premete ENTER per annullare e iniziare le operazioni manuali, o MENU, per uscire e ritornare al menu principale.

Per modificare la temperatura impostata, durante l'esecuzione di una operazione manuale, premete CONTINUE. Potete inserire la nuova temperatura o, premendo MENU, potete mantenere la temperatura originale. Lo schermo che appare durante un'operazione manuale indica la temperatura impostata, il tempo trascorso, la temperatura del blocco e del campione. Le informazioni sulle condizioni operative possono essere visionate premendo il tasto BLOCK. Al termine del periodo desiderato, premete STOP per porre temine all'incubazione.

N.B. L'indicazione ***** riferita ad un campione o ad un blocco di controllo della temperatura, informa che il termistore di controllo della temperatura non é collegato o é difettoso. Controllate la connessione all'unità della provetta di controllo e, se il problema persiste, contattate la Hybaid Limited.

Figura 3.1: Operazioni manuali su PCR Sprint

Muovete il cursore su MANUAL, quindi premete ENTER per selezionare

Usare le frecce per dare il nome al programma e premere ENTER

Inserite la temperatura e premere ENTER

Scegliete la funzione del coperchio (ON od OFF) con la freccia -> e premere ENTER

Spostatevi tra "campione di controllo in provetta" e "controllo del blocco" utilizzando le frecce (direzione destra e sinistra), quindi premete ENTER per selezionare l'opzione desiderata e iniziare l'incubazione

Premete CONTINUE se volete cambiare la temperatura

Selezionate la nuova temperatura. Premete ENTER se corretta, o MENU per ritornare alla temperatura originale

Premete STOP alla fine del tempo di incubazione desiderato.

4. Esecuzione di un programma su PCR Sprint

Per eseguire un programma già memorizzato, selezionate dapprima RUN dal Menu principale. Quindi, seguite le istruzioni indicate sullo schermo per inserire la Directory e il numero di programma (da 1 a 60) e il volume di reazione, se utilizzate la funzione di controllo di un campione di simulazione.
Le provette da microcentrifuga dovrebbero essere distribuite in modo uniforme nel blocco, in modo da ottenere risultati il più omogenei possibile.

4.1. Controllo del campione in provetta

Per reazioni di controllo in provetta, controllate, come prima cosa, che la provetta con la sonda termistore per il controllo della temperatura sia collegata e posizionata nel blocco che deve essere utilizzato (la provetta di controllo deve essere posizionata nel sito A2). Controllate che il volume di olio minerale nella provetta di controllo sia uguale al volume totale della reazione dei vostri campioni (incluso l'olio di copertura della reazione). Se i campioni da utilizzare sono stati conservati in frigorifero o a temperatura ambiente, é indispensabile effettuare una fase di pre-riscaldamento a 35°C per 1 minuto. Ciò assicura che i campioni e la provetta di controllo siano alla stessa temperatura al momento dell'inizio dell'esperimento. Notate che nella provetta di controllo deve essere contenuto soltanto olio minerale (e non una soluzione acquosa di olio minerale). La provetta da microcentrifuga contenente la sonda termistore per il controllo della temperatura dovrebbe essere sostituita periodicamente, in quanto l'uso prolungato potrebbe compromettere l'adattabilità al blocco.

4.2. Simulazione di campione in provetta

Le reazioni di simulazione non richiedono il collegamento della provetta contenente la sonda termistore per il controllo della temperatura, ma deve essere inserito un fattore di calibrazione, quando indicato sul display del menu RUN. Per quanto riguarda le provette, il fattore di calibrazione é rappresentato dal volume totale di reazione, inclusa la copertura di olio minerale.:

Volume totale di reazione 50 ul	
Copertura	30 ul
Volume totale del pozzetto	80 ul
Fattore di calibrazione	800

Il programma verrà avviato non appena i parametri di esecuzione saranno stati inseriti e apparirà la prima pagina dello schermo di esecuzione del programma (vedi Figura 2). Ulteriori informazioni possono essere ottenute visualizzando le tre pagine dello schermo, utilizzando le frecce di direzione verso l'alto e il basso. La prima pagina indica le temperature e i tempi programmati, la temperatura del blocco e dei campioni e la stima del tempo necessario al termine dal programma. Il tempo mancante al termine del programma é calcolato sulla base del tempo totale programmato e dei tempi necessari per passare da una temperatura ad un' altra, con un aggiornamento costante mano a mano che il programma procede. La seconda pagina indica il ciclo e la fase del ciclo attualmente in corso, il numero di cicli effettuati e quelli mancanti al termine e le temperature massime e minime raggiunte durante le fasi programmate. Questa pagina fornisce semplici indicazioni sul programma. L'ultima pagina fornisce una indicazione grafica dell'esecuzione del programma. Simili informazioni sulla situazione degli altri blocchi possono essere visionate in qualsiasi momento, premendo il tasto BLOCK.

Il programma giungerà al termine, a meno che non venga interrotto premendo i tasti PAUSE o STOP. PAUSE mantiene il blocco alla temperatura impostata fino a quando non si preme CONTINUE; STOP interrompe definitivamente il programma. Se nel programma é stata inclusa una fase di mantenimento (HOLD), quando il programma raggiunge questa fase, verrà mantenuta la temperatura indicata con la funzione Hold, fino a quando verrà premuto CONTINUE. Alla fine del programma il blocco ritorna a temperatura ambiente, a meno che non sia stata fissata una temperatura finale di mantenimento.

N.B. L'indicazione ***** riferita ad un campione o ad un blocco di controllo della temperatura, informa che il termistore di controllo della temperatura non é collegato o é difettoso. Controllate la connessione all'unità della provetta di controllo e, se il problema persiste, contattate la Hybaid Limited.

Figura 4.1: Esecuzione di un programma su PCR Sprint

Muovete il cursore su RUN, quindi premete ENTER per selezionare

Scegliete con il cursore la Directory, premete "ENTER", inserite il numero di programma (1-60)

Selezeionateil modo operativo del coperchio riscaldato, e gli allarmi per il caricamento (hot start) e la fine del programma, con le frecce ->, e premere ENTER

Selezionare il tipo di controllo della temperatura con le frecce ->, e premere ENTER (se é stato scelto un controllo di tipo simulato, introdurre il fattore volume ed il n° campioni prima di premere ENTER)

Se é stato scelto il coperchio OFF, il ciclo inizierà subito, se é stato scelto il coperchio AUTO, il ciclo inizierà dopo il preriscaldamento, se é stato scelto il coperchio MANUAL, occorrerà premere ENTER, per iniziare il ciclo

Premete (freccia in alto) per visionare le pagine seguenti

Premete (freccia in alto) per visionare la pagina che riporta i grafici dei dettagli relativi all'esecuzione del programma

Il programma giungerà al termine automaticamente a meno che non vengano premuti i tasti PAUSE o STOP. Per continuare il programma dopo una pausa, premete CONTINUE.

4.3 Coperchio riscaldato

Dopo che é stato selezionato un programma, il coperchio viene preriscaldatoper circa 3 minuti, mentre il blocco é raffreddato a+4°C.

Coperchio riscaldato Auto start:
questa selezione é consigliata per le reazioni con prodotti"robusti" che possono essere incubati durante il preriscaldamento, senza il rischio di originare aspecifici.

Coperchio riscaldato manual start:
questa selezione é consigliata per le reazioni sensibili, dove i reagenti non sopportano l'incubazione a basse temperature , anche per un breve tempo, oppure dove deve errere eliminato il rischio di aspecifici.
Dopo che il programma é stato selezionato, il coperchio si preriscalda, e lo schermo indicherà quando il coperchio ha raggiunto la temperatura desiderata. Dopo aver caricato i campioni, occorrerà premere ENTER per dare inizio al ciclo.
Il coperchio si spegnerà automaticamente se ENTER non viene premuto entro 90 minuti.

Coperchio riscaldato Off
Se é stata selezionata questa opzione, il ciclo inizierà non appena viene premuto ENTER, dopo aver impostato il controllo(e il volume/numero dei campioni)

5. Creazione di un programma su PCR Sprint

Utilizzando il Modulo di Controllo di PCR Sprint, si possono creare programmi di cicli di temperatura a vari livelli di complessità.
I programmi possono essere identificati con un numero (da 1 a 60) e con un nome (fino a 7 caratteri).
Ogni programma é assegnato ad unadelle 6 directory, cui possono essere assegnati i nomi desiderati.
Così come tutte le operazioni di PCR Sprint, la programmazione avviene attraverso il Menu principale. Premete MENU fino a quando appare sul display la videata del menu principale.

Utilizzate le frecce di direzione per muovere il cursore su PROG, quindi premete ENTER per avere accesso al menu di programmazione. Se, in ogni momento, volete interrompere la programmazione, premete MENU o STOP, per ritornare al menu principale. Sono disponibili tre opzioni di programmazione:

1. EDIT. Selezionate EDIT per modificare i dettagli di un programma precedentemente memorizzato o per crearne uno nuovo.

2. NEW. Selezionate NEW per creare un programma completamente nuovo. Notate che se usate l'opzione NEW il nuovo programma verrà automaticamente sovrapposto ad uno già esistente definito con lo stesso numero. Se avete dei dubbi, utilizzate l'opzione EDIT

3. VIEW. Selezionate VIEW per controllare i dettagli di un programma precedentemente memorizzato.

4. COPY. Selezionate COPY per copiare un programma memorizzato su una Scheda Dati su un programma memorizzato sul Modulo di Controllo.

Utilizzate la freccia di direzione a destra per muovere il cursore sull'opzione desiderata, quindi premete ENTER.

Il programma viene impostato seguendo le istruzioni che appaiono sullo schermo (vedi Figura 4). Come prima operazione, inserite la directory cui assegnare il programma
Lo strumento assegna il numero del primo spazio di programma disponibile.
Si può a questo punto assegnare un nome al programma utilizzando le quattro frecce: con quelle verticali si seleziona il carattere, con le orizzontali ci si sposta per un nuovo carattere; selezionare ENTER alla fine del nome

ATTENZIONE: se non vi sono posizioni di programma libere, la macchina chiede se può essere cancellato un programma già esistente.

Per le operazioni programmate su PCR Sprint, esistono tre metodi di controllo della temperatura dei campioni:

1. CONTROLLO CAMPIONE IN PROVETTA
Raccomandato per tutte le reazioni effettuate in provette da microcentrifuga da 0.5 ml. Questo tipo di controllo é basato una sonda termistore di controllo della temperatura, posizionata in una provetta da O.5 ml, fornita di un elemento di connessione. Nella provetta di controllo deve essere presente un volume di olio minerale equivalente al volume totale di reazione dei vostri campioni. La provetta di controllo deve essere posizionata nel sito A2 del blocco. Prima di impostare un programma che prevede l'uso di una provetta di controllo é essenziale comprendere la differenza che intercorre tra il controllo della temperatura tramite un campione di controllo e il controllo della temperatura del blocco, come avviene su una macchina per PCR convenzionale. Con una provetta di controllo, i campioni sono mantenuti alla temperatura programmata, per il tempo impostato. Con il controllo della temperatura del blocco, sia su PCR Sprint, che su una macchina convenzionale, ci sarà inevitabilmente un ritardo tra il momento in cui il blocco raggiunge una certa temperatura e il momento in cui la stessa temperatura é raggiunta dal campione. Così, quando, trasferite un protocollo da una macchina convenzionale con controllo della temperatura del blocco, i tempi di incubazione potrebbero essere ridotti del 50% e, in alcuni casi, la temperatura andrà leggermente modificata.

2. SIMULAZIONE DI CONTROLLO CAMPIONE IN PROVETTA

L'algoritmo per il controllo della temperatura é simile a quello per il campione di controllo in provetta. Tuttavia, con il controllo di un campione di simulazione, la temperatura del blocco necessaria ad eliminare il ritardo con cui i campioni raggiungono una certa temperatura, é basata su valori calcolati, piuttosto che su valori di temperatura monitorati dalla sonda nella provetta di controllo. Considerazioni simili a quelle viste per il campione di controllo, relativamente al trasferimento di protocolli da macchine convenzionali, sono applicabili anche in questo caso. Quando utilizzate un controllo tramite un campione di simulazione, é necessario specificare il fattore di calibrazione all'inizio dell'esecuzione del programma. (Nota: in una versione precedente di PCR Sprint, il fattore di calibrazione veniva indicato come "volume del campione" - SAMPLE VOLUME).

Fattori di calibrazione
Per reazioni in provette da 0.5 ml, utilizzate come fattore di calibrazione il volume totale della reazione, incluso l'olio di copertura; esempio:

Volume totale, incluso l'olio di copertura	50 ul
Fattore di calibrazione	50

Per reazioni effettuate in OmniPlate 96, utilizzate il volume totale di un pozzetto, incluso l'olio di copertura, moltiplicato per 10; esempio:

Volume totale, incluso l'olio di copertura	50 ul
Fattore di calibrazione	500

4. CONTROLLO SUL BLOCCO
Semplice controllo della temperatura del blocco, come su macchine convenzionali a secco. Non raccomandiamo questo metodo di controllo per macchine per PCR.

Visionate le tre opzioni di controllo utilizzando le frecce di direzione a destra e a sinistra e premete ENTER quando appare l'opzione desiderata. A questo punto possono essere impostati i valori dei parametri delle fasi di incubazione. Inserite la temperatura e la durata della prima fase, premendo ENTER, quando avete inserito i valori correttamente. Se desiderate, potete inserite i parametri di velocità di incremento della temperatura (velocità di

incremento della temperatura del campione in sec/°C) e di incremento temporale (tempo aggiunto ad una certa fase ogni volta che questa viene ripetuta).

Continuate ad aggiungere fasi (fino ad un massimo di 5) per completare il primo ciclo. Le fasi verranno raggruppate a costituire un ciclo; dovrete, quindi, specificare il numero di ripetizioni dello stesso ciclo. Per completare il programma, possono essere aggiunti cicli addizionali, fino ad un massimo di 5. Se vengono utilizzate incubazioni a temperatura costante, prima o dopo un ciclo che deve essere ripetuto, programmate l'incubazione come se fosse un ciclo che deve essere ripetuto un sola volta. Il ciclo finale viene specificato premendo ENTER (o la freccia di direzione verso il basso), dando ai parametri tempo e temperatura il valore zero. La fine del programma é specificata inserendo il valore zero ai parametri tempo e temperatura (ENTER o freccia di direzione verso il basso) alla fase 1 del ciclo finale (vedi Figura 4).

Al termine di un ciclo, può essere inserita una temperatura di mantenimento, dopo avere impostato il numero di cicli. Durante il funzionamento del blocco, questa temperatura verrà mantenuta fino a quando non si premerà CONTINUE. Se non é necessaria una temperatura di mantenimento, premete ENTER quando sul display appare 0.00 per questa opzione.

Quando tutti i parametri del programma sono stati impostati, il programma viene memorizzato, o con il numero di programma specificato all'inizio, o con un numero di programma alternativo. Questa possibilità permette di memorizzare il nuovo programma con un altro numero, lasciando il programma originale intatto. Questo permette di modificare un programma esistente, senza poi sovrapporre il nuovo programma a quello già memorizzato.

Figura 5.1: Programmazione su PCR Sprint

Muovete il cursore su PROG e premete ENTER per selezionare

Selezionare EDIT, NEW, VIEW o COPY

Inserite la directory scelta

Inserite il nome del programma

Inserite la temperatura e il tempo e, se desiderate, la velocità di incremento temporale. Utilizzate (freccia di direzione verso destra) per muovervi all'interno del menu, per saltare le funzioni RAMP e INC e procedere alla prossima fase

Continuate, se desiderate, ad aggiungere fasi al ciclo 1 (massimo 5 fasi per ciclo)

Per terminare il ciclo 1, premete ENTER dopo avere impostato il valore zero per ogni parametro (o la freccia di direzione verso il basso)

Inserite il numero di ripetizioni del ciclo 1 e il valore di temperatura di mantenimento, se desiderato.
N.B. Durante il funzionamento, la temperatura di mantenimento sarà mantenuta fino a quando non premerete CONTINUE

Programmate le fasi del ciclo 2 (e i cicli successivi fino ad un massimo di 10) come avete fatto per il ciclo 1

Per terminare il ciclo 2, premete ENTER dopo avere impostato il valore zero per ogni parametro (o la freccia di direzione verso il basso)

Per terminare il programma, premete ENTER dopo avere impostato il valore zero per ogni parametro della fase 1 del ciclo finale.

Inserite un nuovo numero di programma, si volete conservare il programma originale nella memoria di PCR Sprint.

5.1 Advace Edit

Questa funzione consente di creare protocolli complessi, per raggiungere risultati ancora migliori.
Possono essere imostate la velocità di raggiungimento della temperatura selezionata, incrementi e decrementi di tempo e/o di temperatura tra ciclo e ciclo.
Si accede all'Advance edit premendo CONTINUE dopo aver impostato la temperatura della fase in cui si vuole applicare questa funzione.

Velocità di raggiungimento della temperatura
La velocità impostata é 0,00°/sec, cioé la più veloce possibile.
Può essere selezionato un intervallo tra 0,01°/sec e 9,99°/sec.

Incrementi/Decrementi di Tempo /Temperatura
Possono essere impostate variazioni sia di tempertura che di tempo ciclo per ciclo.
Gli incrementi di tempo possono compensare la diminuita attività dell'enzima dopo un certo numero di cicli.
I decrementi di temperatura possono venire impiegati in protocolli "TouchDown", dove la temperatura di annealing é diminuita per cicli successivi.

6. Impostazione delle funzioni

Nel software di PCR Sprint, esistono due funzioni i cui parametri sono già impostati. Se desiderate, tali parametri possono però essere modificati. E' possibile accedere a queste funzioni attraverso il menu SET UP, che appare sullo schermo, dopo avere premuto ENTER, quando il cursore lampeggia su SET UP nel menu principale. Il numero della versione del software della vostra macchina appare sulla parte destra del display nel menu SET UP. Le tre funzioni sono le seguenti:

1. **blocco**
Questa funzione specifica il tipo di blocco che viene utilizzato sul Modulo di Controllo di PCR Sprint. Muovete il cursore su BLOCK , nel menu SET UP, e premete ENTER. Scrivete il tipo di blocco inserito (0,2 o 0,5) e confermate con ENTER

2. **power**
In caso di interruzione di energia elettrica sono disponibili due funzioni. Muovete il cursore dello schermo di SET UP su POWER e premete ENTER. Selezionate RESUME PROGRAM per riprendere un programma dal ciclo in cui é stato interrotto al momento dell'interruzione di energia. Selezionate ABANDON PROGRAM e il programma si interromperà al ciclo in cui é avvenuta l'interruzione di energia. PCR Sprint si riavvia automaticamente quando l'energia riprende, e l'indicazione **INTERRUPTED** appare sul menu principale ad indicare che é avvenuta un'interruzione di energia. Controllate lo stato di funzionamento dei blocchi, premendo il tasto BLOCK e le frecce di direzione verso l'alto. In aggiunta ai soliti tre stati di funzionamento, sarà presente anche una indicazione di interruzione di energia, precisando l'ora a cui é avvenuta l'interruzione, l'ora a cui é avvenuto il riavvio e la fase del programma, per dare una indicazione sulla eventuale riuscita dell'esperimento.

7. Amplificazione riuscita: come ottenere i migliori risultati con Hybaid PCR Sprint

1. Controllate il volume della provetta contenente la sonda termistore per il controllo della temperatura.
Controllate il volume dell'olio minerale nella provetta di controllo (viene fornita una provetta di olio minerale adatto). Non utilizzate soluzioni acquose nella provetta di controllo. Troppo olio nella provetta di controllo, risulterebbe in overshoot di temperatura del campione, troppo poco olio risulterebbe in un ritardo nel raggiungimento di una certa temperatura da parte del campione. Il volume di olio nella provetta di controllo dovrebbe essere uguale a quello delle provette di reazione, incluso l'olio di copertura. Ripetuti overshoot alla temperatura di denaturazione durante i cicli, per esempio, ridurrebbero gradatamente l'attività dell'enzima termostabile, comportando una perdita della resa del prodotto. La posizione corretta della provetta di controllo é A2.

2. Controllate la localizzazione della sonda termistore nella provetta di controllo
Assicuratevi sempre che la sonda per il controllo della temperatura sia localizzata in posizione centrale nella provetta di controllo e sia immersa nel liquido. Se viene spinta verso la parete della provetta, misurerà la temperatura della provetta e non quella del campione.

3. La provetta di controllo é indicata con *****
L'indicazione ***** riferita ad un campione o ad un blocco di controllo della temperatura, informa che il termistore di controllo della temperatura non é collegato o é difettoso. Controllate la connessione all'unità della provetta di controllo e, se il problema persiste, contattate la Hybaid Limited.

4. Controllare l'inserimento della provetta nel blocco
Il blocco PCR Sprint può alloggiare on precisione molti modelli di provette da microcentrifuga da 0.5 ml. La provetta di controllo fornita con PCR Sprint dovrebbe essere cambiata periodicamente, in quando, col tempo, l'adattabilità della provetta al blocco potrebbe essere compromessa. Le provette di reazione dovrebbero essere distribuite uniformemente nel blocco. Se avete deciso di utilizzare una provetta da 0.5 ml diversa da quelle Hybaid, dopo averne verificato l'adattabilità ai blocchi PCR Sprint, rimontate la provetta con la sonda per il controllo della temperatura in questa nuova provetta, in modo da assicurarvi che i campioni e la provetta di controllo siano uniformi.

5. Controllate il programma dopo averlo inserito, utilizzando la funzione VIEW. Avete inserito la corretta combinazione di numero di programma? E' stato inserito il tipo di blocco corretto, utilizzando la funzione BLOCK SET UP?

6. Esecuzione di un programma di controllo di un campione di simulazione.
Per provette, il fattore di calibrazione é uguale al volume totale di reazione, incluso l'olio di copertura.

7. Controllate i valori massimi e minimi di temperatura che vengono raggiunti durante l'esecuzione di un programma; tali valori possono darvi indicazioni di eventuali valori non corretti di temperatura.

8. Interruzione dell'energia durante l'esecuzione di un programma
Sarà indicata dal messaggio *INTERRUPTED* sullo schermo del menu principale. La macchina potrà riavviarsi automaticamente, quando l'energia verrà ristabilita, oppure il programma potrà essere abbandonato, come specificato dall'utilizzatore sullo schermo del menu SET UP. La visione degli schermi per i vari blocchi darà una indicazione dell'ora di interruzione dell'energia e dell'ora di riavvio del programma.

9. Trasferimento di protocollo da una macchina convenzionale con controllo della temperatura del blocco, ad una macchina con controllo della temperatura tramite una provetta di controllo.
Considerate il diverso modo di controllare la temperatura, prima di trasferire direttamente i protocolli. Ad esempio, considerate un protocollo di cicli di temperatura che é costituito da 1 minuto a 95°C, seguito da 1 minuto a 65°C, ripetuto 30 volte. Utilizzando una macchina convenzionale, la temperatura reale del campione sarà 95°C per 30 secondi, ad ogni fase, per un totale di 15 minuti di overall. Per contro, l'utilizzo di provette di controllo permette di avere in un minuto preciso di incubazione ad ogni fase, per un totale di 30 minuti alla temperatura di denaturazione desiderata. Sebbene l'utilizzo di provette di controllo porti ad una esecuzione più accurata del programma, il trasferimento diretto di tale protocollo potrebbe risultare in una resa più bassa, dovuta al fatto che l'esposizione dell'enzima ad alte temperature per tempi significativamente più lunghi, potrebbe ridurne l'attività durante gli ultimi cicli.

Il modo più accurato di trasferire un protocollo é di utilizzare, sul blocco della macchina convenzionale, la provetta di controllo PCR Sprint come sonda di temperatura. Impostate un blocco PCR Sprint su MANUAL, utilizzando la funzione "controllo del blocco", impostando una temperatura arbitraria (per esempio 40°C). Quindi, collegate la prolunga della sonda di controllo della temperatura alla provetta di controllo e inseritela in PCR Sprint. Posizionate la sonda di controllo della temperatura nella cavità corrispondente alla sonda in PCR Sprint e posizionate la provetta in un pozzetto della macchina convenzionale, che sta eseguendo il protocollo richiesto. Dopo un breve periodo di equilibrazione, il display di PCR Sprint indicherà la temperatura del campione, che dovrebbe essere annotata ad intervalli di tempo regolari, per un certo numero di cicli. Questa informazione può, quindi, essere utilizzata per determinare il profilo di temperatura a cui é sottoposto il campione nel blocco della macchina convenzionale, piuttosto che basarsi semplicemente alla temperatura del blocco.

11. Ottimizzazione dei protocolli
In aggiunta alle differenze tra i programmi impostati sulla base di un campione di controllo e quelli impostati considerando il controllo della temperatura del blocco osservati sopra, é importante ottimizzare il protocollo in sé. La flessibilità della programmazione e la possibilità di utilizzo di tre blocchi su PCR Sprint, permettono di ottimizzare i protocolli molto rapidamente. In generale, i protocolli di cicli di temperatura sono costituiti da tre fasi distinte:

a. Denaturazione ad una temperatura elevata (solitamente 90-95°C).

b. Annealing ad una temperatura dipendente dalla temperatura di denaturazione (Tm) degli oligonucleotidi.

c. Attività enzimatica ad una temperatura dipendente dalla temperatura ottimale dell'enzima temostabile che viene utilizzato.

Queste tre fasi sono solitamente ripetute per 30 cicli. La fase di denaturazione, ad ogni ciclo, deve essere sufficiente a denaturare completamente il DNA da amplificare, incluse regioni ricche in G-C. Tuttavia, dovrebbe essere considerato, l'effetto che hanno incubazioni ripetute ad elevate temperature, sull'attività enzimatica. Una lunga fase di denaturazione iniziale (5 minuti, 95°C, prima dell'aggiunta dell'enzima) servirà a denaturare DNA templato complesso e ad alto peso molecolare presente nella reazione, ma per i cicli successivi questa fase potrebbe essere ridotta ad un massimo di 30 sec a 92-95°C.
L'ottimizzazione della fase di denaturazione é il fattore più critico, quando trasferite un protocollo da una macchina convenzionale ad una con campioni di controllo. La temperatura di annealing dipende dalla dimensione e dalla composizione nucleotidica degli oligonucleotidi utilizzati. In generale, varia tra i 50 e i 70°C e, come regola grossolana, dovrebbe essere di 5°C al di sotto della Tm, una approssimazione per la quale può valere la formula:

Tm = 2 X (A+T) + 4 X (G+T)

Siccome una differenza di temperatura di annealing di anche solo 1°
C può avere una ripercussione sulla specificità della reazione, si raccomanda di testare un intervallo di temperature, in modo da ottimizzare la temperatura di annealing per ciascuna combinazione di primer e templato.

La temperatura di sintesi di DNA é largamente dipendente dalla temperatura ottimale dell'enzima scelto, ed é usualmente nell'intervallo da 70 a 75°C (vedi il foglio illustrativo del produttore). Il tempo richiesto dipende dalla lunghezza del prodotto che deve essere sintetizzato. Un tempo di un minuto per chilobase dovrebbe essere più che sufficiente. Molti protocolli ("bifasici") eliminano completamente la fase di allungamento, e si affidano sull'attività enzimatica durante la temperatura di annealing, e durante la transizione tra la temperatura dei annealing e quella di denaturazione.

8. Guida veloce all'uso di PCR Sprint

Sommario, in ordine alfabetico, dei termini utilizzati nella programmazione e nelle operazioni su PCR Sprint.
BLOCCO
Blocco di controllo
La temperatura del blocco é monitorata e controllata da un termistore montato nel blocco. A causa del ritardo tra il momento in cui una certa temperatura é raggiunta dal blocco e il momento in cui la stessa temperatura é raggiunta dal campione, si raccomanda di utilizzare normalmente un campione di controllo in provetta.

Mantenimento
Una fase di mantenimento può essere specificata alla fine di un ciclo. I campioni saranno mantenuti ad una certa temperatura fino a quando verrà premuto il tasto CONTINUE, per ristabilire il programma. Utile per mantenere campioni ad una temperatura costante, mentre si aggiunge un reagente, prima che inizino i cicli di temperatura.
Blocco In SituIl blocco piatto PCR Sprint, utilizzato per effettuare reazioni su un massimo di quatto vetrini da microscopia.

MANUALE
Operazioni manuali
Le operazioni manuali sono utilizzate per semplici incubazioni ad una temperatura costante. Programmate semplicemente la temperatura richiesta e il metodo di controllo della temperatura. L'incubazione procederà alla temperatura desiderata fino a quando il tempo richiesto é scaduto, o fino a quando vengono premuti i tasti PAUSE o STOP, o viene impostata una nuova temperatura (vedi capitolo 5: Operazioni manuali).

Nuova temperatura
Durante una fase di incubazione manuale, può essre impostata una nuova temperatura. Il programma manuale é interrotto e la temperatura del campione cambia rapidamente verso la nuova temperatura impostata.
Il tipo di blocco standard PCR Sprint, per effettuare fino a 48 reazioni in provette da microcentrifuga, o fino a 96 reazioni in una OmniPlate Hybaid.

Interruzione di energia
PCR Sprint ha la facoltà di riavviarsi dopo una interruzione di energia elettrica. Ci sono due opzioni per il riavvio dopo una interruzione di energia:
1. Riprendere il programma dalla fase in cui é avvenuta l'interruzione di energia.
2. Abbandonare il programma alla fase in cui é avvenuta l'interruzione di energia.
Attraverso il menu opzioni può essere impostata una delle due funzioni.

PROG
Operazioni Programmate
SelezionatePROGRAM dal menu principale per avere accesso al menu di programmazione, per impostare un nuovo programma, visionare o eliminare un programma precedentemente memorizzato (vedi Capitolo 6: creazione di un programma su PCR Sprint).

Operazioni programmate Le operazioni programmate sono utilizzate per complesse incubazioni a più fasi, e per l'esecuzione di cicli di temperatura. Sul microprocessore del Modulo di Controllo possono essere memorizzati fino a 18 programmi, e ulteriori programmi possono essere memorizzati sulle Schede Dati. Vedi Capitolo 6 per ulteriori dettagli.

Ramp Rate
Velocità di incremento della temperatura La funzione di incremento della temperatura controlla, in modo preciso, la velocità di cambiamento della temperatura del campione (sec/°C). Utile per limitare la velocità di cambiamento della temperatura per permettere, ad esempio, una parziale fase di allungamento a partire da brevi oligonucleotidi o oligonucleotidi degenerati.

SET UP
Questa funzione permette di modificare i valori di PCR Sprint già impostati (ora, tipo di blocco, opzione di riavvio) (vedi Capitolo 8: Funzioni di impostazione).

Controllo di un campione di simulazione in provetta
Il controllo di un campione di simulazione incorpora un algoritmo che riduce il tempo con cui viene raggiunta una certa temperatura, utilizzando overshoot calcolati con precisione, in ogni fase, sulla base della temperatura del blocco. Le temperature calcolate per il campione e per il blocco sono indicate sul display, durante l'esecuzione del programma. Fate riferimento a pagina 16 per le indicazioni relative ai fattori di calibrazione da utilizzare per i vari tipi di reazione.

Ciclo
Un ciclo di un programma consiste di una o più fasi, fino ad un massimo di 10. Un ciclo può essere ripetuto, per la creazione di cicli di temperatura. Possono essere utilizzati fino a 10 cicli per programma, e i cicli vengono collegati automaticamente uno all'altro.

Fase
Una fase consiste di una temperatura programmata e di un intervallo di tempo. Possono essere impostati, se desiderate, dei valori di incremento temporale e di velocità di variazione della temperatura. Impostate il valore zero per ogni parametro, per specificare l'ultima fase di un particolare ciclo, e impostate zero per ogni parametro dell'ultima fase per indicare l'ultimo ciclo.

Velocità di variazione della temperatura vedi RAMP

Termistore
Un termistore é un resistore la cui resistenza varia in funzione della temperatura. Può, quindi, essere utilizzato come sonda molto precisa per il controllo della temperatura.

TIME INC

Incremento temporale L'incremento temporale può essere utilizzato per aggiungere un intervallo di tempo ad ogni ripetizione di uno specifico ciclo. Ad esempio, un incremento di 10 secondi su una fase di 60 secondi darà un intervallo di tempo di 60, 70, 80, 90 100 ... secondi. Utile, ad esempio, per incrementare il tempo di una fase di incubazione, per tenere conto della perdita di attività di un enzima.

PROVETTA

Campione di controllo in provetta

Questo tipo di controllo software é dipendente da una sonda termistore esterna, localizzata in un provetta da microcentrifuga. Questo permette un accurato monitoraggio e controllo della temperatura della provetta di controllo. Queste informazioni permettono di accelerare la transizione verso la temperatura desiderata creando un gradiente di temperatura tra la temperatura del blocco e quella della provetta.