



Istruzioni per l'uso della

Gamma di lettori Infinite 200 PRO

Infinite M Nano

Infinite Lumi

Infinite M Nano+

Infinite M Plex

Infinite F Nano+

Infinite F Plex



Documento n.: 30218661

2022-07

Versione n.: 1.4



30218661 00



ATTENZIONE
PRIMA DI UTILIZZARE LO STRUMENTO, È NECESSARIO LEGGERE
ATTENTAMENTE LE ISTRUZIONI FORNITE NEL PRESENTE
DOCUMENTO E SEGUIRLE RIGOROSAMENTE.

Nota

La redazione del presente documento è stata curata con la massima attenzione per evitare errori nel testo o nei diagrammi, tuttavia, Tecan Austria GmbH declina qualsivoglia responsabilità per eventuali errori che si dovessero riscontrare nello stesso.

È consuetudine di Tecan Austria GmbH apportare migliorie ai prodotti non appena siano disponibili nuovi componenti e tecniche. Tecan Austria GmbH, pertanto, si riserva il diritto di modificare le caratteristiche tecniche in qualsiasi momento tramite verifiche, convalide e autorizzazioni adeguate.

Apprezzeremo ogni osservazione in merito al presente documento.



Produttore

Tecan Austria GmbH
Untersbergstr. 1A
A-5082 Grödig, Austria
Tel. +43 62 46 89 33
Fax +43 46 72 770
E-mail: office.austria@tecan.com
www.tecan.com

Informazioni sul copyright

Il contenuto di questo documento è proprietà di Tecan Austria GmbH e non può essere copiato, riprodotto o ceduto a terzi senza previa autorizzazione scritta.

Copyright © Tecan Austria GmbH

Tutti i diritti riservati.

Stampato in Austria

Dichiarazione di conformità UE

Consultare l'ultima pagina delle presenti Istruzioni per l'uso.

Nota sulle istruzioni per l'uso

Istruzioni originali. Il presente documento descrive i lettori per micropiastre multifunzione della gamma Infinite 200 PRO Esso è destinato a fungere da guida di riferimento e a fornire istruzioni per l'uso. Questo documento include informazioni su:

- installazione dello strumento
- uso dello strumento
- pulizia e manutenzione dello strumento

Note sulle schermate

Il numero di versione visualizzato nelle schermate potrebbe essere diverso da quello della versione rilasciata correntemente. Le schermate vengono sostituite solo in caso di modifica dei contenuti relativi all'applicazione.

Marchi registrati

I nomi dei seguenti prodotti e tutti i marchi, registrati e non, citati nel presente documento sono utilizzati unicamente a scopo identificativo e restano di esclusiva proprietà dei rispettivi titolari:

- Infinite®, i-control™, magellan™, NanoQuant Plate™, Tecan® e il logo Tecan sono marchi registrati di Tecan Group Ltd., Männedorf, Svizzera
- Windows® e Excel® sono marchi registrati di Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- ChromaGlo™ Dual-Luciferase®, Enliten® e NanoBRET™ sono marchi registrati di Promega Corporation Madison, Wisconsin, USA
- Starna® è un marchio registrato di Starna Scientific Limited, 5254 Fowler Road, Hainault, Essex IG6 3UT Inghilterra, Regno Unito
- BRET2™, DeepBlueC® e PerkinElmer® sono marchi registrati di PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Avvertenze, precauzioni e note

Nel presente documento vengono utilizzati vari tipi di avvertimenti, i quali mettono in evidenza informazioni importanti o segnalano all'utente situazioni potenzialmente pericolose. Gli avvertimenti che compaiono in questo documento sono i seguenti:



Nota
Fornisce informazioni utili.



CAUTELA
INDICA CHE IL MANCATO RISPETTO DELLE ISTRUZIONI PUÒ CAUSARE DANNI ALLO STRUMENTO O PERDITA DEI DATI.



ATTENZIONE
INDICA CHE IL MANCATO RISPETTO DELLE ISTRUZIONI PUÒ CAUSARE GRAVI LESIONI PERSONALI, MORTE O DANNI ALL'ATTREZZATURA.



ATTENZIONE
QUESTO SIMBOLO INDICA LA POSSIBILE PRESENZA DI MATERIALE BIOLOGICAMENTE PERICOLOSO. È NECESSARIO SEGUIRE LE ADEGUATE PRECAUZIONI RELATIVE ALLA SICUREZZA DI LABORATORIO.



ATTENZIONE
QUESTO SIMBOLO INDICA LA POSSIBILE PRESENZA DI MATERIALI INFIAMMABILI E IL RISCHIO DI INCENDI. È NECESSARIO SEGUIRE LE ADEGUATE PRECAUZIONI RELATIVE ALLA SICUREZZA DI LABORATORIO.



ATTENZIONE

EFFETTI NEGATIVI SULL'AMBIENTE ASSOCIATI AL TRATTAMENTO DEI RIFIUTI.

- **NON SMALTIRE APPARECCHIATURE ELETTRICHE ED ELETTRONICHE COME RIFIUTI URBANI INDIFFERENZIATI**
- **EFFETTUARE UNA RACCOLTA DIFFERENZIATA DEI RIFIUTI ELETTRICI ED ELETTRONICI**



SOLO PER I RESIDENTI IN CALIFORNIA:

ATTENZIONE

QUESTO PRODOTTO PUÒ ESPORRE L'UTENTE A SOSTANZE CHIMICHE COME IL PIOMBO, CHE NELLO STATO DELLA CALIFORNIA È CONSIDERATO U

N MATERIALE CHE PUÒ CAUSARE CANCRO, DIFETTI CONGENITI O ALTRI DANNI RIPRODUTTIVI.

PER ULTERIORI INFORMAZIONI, VISITARE IL SITO:

WWW.P65WARNINGS.CA.GOV/PRODUCT.

Simboli

	Produttore
	Data di fabbricazione
	Marcatura CE
	La marcatura UKCA (United Kingdom Conformity Assessed) posta sull'etichetta dimostra che il prodotto rispetta la normativa vigente in Gran Bretagna.
	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Numero di serie
	Unique Device Identification (UDI) (Identificatore univoco del dispositivo) Il simbolo UDI sull'etichetta fa riferimento al supporto di memorizzazione dei dati.
	Etichetta USB
	Simbolo WEEE
	Simbolo Cina RoHS
	MARCHIO DI CERTIFICAZIONE TÜV SÜD

Indice

1. Sicurezza	9
1.1 Sicurezza dello strumento	9
2. Descrizione generale	11
2.1 Strumento	11
2.1.1 Utilizzo previsto	11
2.1.2 Multifunzionalità	12
2.1.3 Volumi di riempimento	12
2.1.4 Prestazioni	13
2.1.5 Facilità d'uso	13
2.1.6 Pulsante di controllo integrato nello strumento	13
2.1.7 Vista posteriore	14
2.2 Software	15
2.3 Iniettori (opzionali)	15
2.3.1 Modalità di misurazione dell'iniettore	15
2.3.2 Schema del modulo iniettore	16
2.3.3 Opzioni pompe d'iniezione	16
2.3.4 Flaconi di stoccaggio e supporti per flaconi	16
2.3.5 Porta-iniettori	17
2.4 Tecniche di misurazione	19
2.4.1 Fluorescenza	19
2.4.2 Assorbanza	21
2.4.3 Luminescenza	21
2.5 Ottica	23
2.5.1 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite M)	23
2.5.2 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite F)	28
2.5.3 Sistema di polarizzazione di fluorescenza (solo per Infinite F Plex)	32
2.5.4 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite M)	33
2.5.5 Sistema di misurazione dell'assorbanza (modelli Infinite M)	34
2.5.6 Sistema di rilevamento della luminescenza	37
2.5.7 Alloggiamento per cuvetta (modelli Infinite M)	39
3. Installazione	43
3.1 Disimballaggio e ispezione	43
3.1.1 Procedura di disimballaggio	43
3.2 Rimozione dei fermi per il trasporto	45
3.3 Trasporto e stoccaggio	46
3.3.1 Trasporto	46
3.3.2 Stoccaggio	46
3.4 Requisiti di alimentazione	46
3.5 Accensione dello strumento	47
4. Utilizzo dello strumento	49
4.1 Introduzione	49
4.2 Caratteristiche operative generali	50
4.2.1 Avviamento dello strumento	50
4.3 Opzioni generali	50
4.4 Definizione delle slitte portafiltri (modelli Infinite F)	52
4.4.1 Informazioni sui filtri	52
4.4.2 Slitta portafiltri e orientamento dei filtri	52
4.4.3 Installazione di un filtro personalizzato	54
4.4.4 Definizione filtri	56

4.5	Ottimizzazione delle misurazioni di fluorescenza	60
4.5.1	Parametri dello strumento.....	60
4.5.2	Ottimizzazione Z (misurazioni FI Cima solo su modelli Infinite M)	61
4.5.3	Modalità rapporto FI.....	65
4.6	Misurazioni FP	67
4.6.1	Polarizzazione di fluorescenza	67
4.6.2	Intervallo del bianco di misurazione	67
4.6.3	Impostazioni del fattore G	67
4.6.4	Misurazione con un fattore G non calibrato	68
4.6.5	Misurazione con una calibrazione simultanea del fattore G	68
4.6.6	Misurazione con un fattore G calibrato	69
4.6.7	Misurazione con un fattore G manuale	70
4.6.8	Calcolo dei parametri della polarizzazione di fluorescenza	71
4.7	Ottimizzazione delle misurazioni di assorbanza	72
4.7.1	Parametri di misurazione	72
4.7.2	Modalità rapporto di assorbanza.....	72
4.8	Letture multiple per pozzetto.....	73
4.8.1	Tipologia di MRW	73
4.8.2	Dimensione di MRW	74
4.8.3	Bordo MRW	75
4.8.4	Visualizzazione dei risultati in MS Excel	76
4.8.5	Funzionalità varie del software per MRW	76
4.9	Ottimizzazione delle misurazioni di luminescenza.....	77
4.9.1	Tempo d'integrazione	77
4.9.2	Attenuazione del livello di luminosità	77
4.10	Misurazioni con iniettori	78
4.10.1	Riempimento iniziale e lavaggio del lettore Infinite	78
4.10.2	Lavaggio	83
4.10.3	Prima di avviare una misurazione con gli iniettori.....	87
4.10.4	Modalità di misurazione con iniettori (i-control).....	88
4.11	Misurazioni del bianco	93
4.12	Misurazioni con cuvetta	94
4.12.1	Striscia per cuvetta	94
4.12.2	Spostamenti della cuvetta.....	94
4.12.3	Esempi di utilizzo della cuvetta con i-control.....	94
4.13	Esempi i-control	100
4.14	Conclusione di una sessione di misurazione	104
4.14.1	Disconnessione dello strumento	104
4.14.2	Spegnimento dello strumento	104
5.	Funzioni dello strumento	105
5.1	Introduzione	105
5.2	Specifiche dello strumento.....	106
5.3	Intensità di fluorescenza e fluorescenza a risoluzione temporale (TRF).....	108
5.3.1	Definizione del limite di rilevamento.....	108
5.3.2	Fluoresceina (Intensità di fluorescenza dall'alto) Cima	108
5.3.3	Fluoresceina (Intensità di fluorescenza dal basso) Fondo	109
5.3.4	Europio (Fluorescenza a risoluzione temporale).....	109
5.4	Polarizzazione di fluorescenza (FP) - (solo per Infinite F Plex).....	110
5.5	Assorbanza	111
5.6	Luminescenza in modalità "glow"	112
5.6.1	Luminescenza "glow" con ATP	112
5.7	Luminescenza in modalità "flash"	113

5.8	Luminescenza a doppio colore (ad es. BRET)	113
5.9	Misurazioni istantanee	114
5.10	Funzionalità cuvetta (solo modelli Infinite M)	114
5.10.1	Specifiche della cuvetta	114
5.11	Specifiche dell'iniettore	115
5.11.1	Compatibilità con i reagenti dell'iniettore	115
5.12	Accessori di misurazione	117
5.12.1	Filtri raccomandati (solo modelli Infinite F)	117
5.12.2	Tipi di micropiastre raccomandati	117
5.12.3	Rilevamento della luminescenza	121
6.	Controllo qualità	123
6.1	Test di controllo qualità periodici	123
6.2	Specifiche - Criteri Pass/Fail	124
6.3	Specifiche - Istruzioni per il test	125
6.3.1	Fluorescenza Cima	125
6.3.2	Fluorescenza Fondo	129
6.3.3	Fluorescenza a risoluzione temporale	132
6.3.4	Polarizzazione di fluorescenza (solo Infinite F Plex)	134
6.3.5	Luminescenza di tipo "glow"	136
6.3.6	Accuratezza di assorbanza	137
6.3.7	Accuratezza della lunghezza d'onda di assorbanza	137
6.3.8	Flatness di base dell'assorbanza (Modelli Infinite M)	138
6.3.9	Flatness di base dell'assorbanza (Modelli Infinite F)	138
6.3.10	Cuvetta ad assorbanza (solo modelli Infinite M)	139
7.	Pulizia e manutenzione	141
7.1	Introduzione	141
7.2	Fuoriuscite di liquidi	142
7.3	Pulizia e manutenzione dell'iniettore	143
7.3.1	Manutenzione quotidiana	143
7.3.2	Manutenzione settimanale/periodica	143
7.4	Disinfezione dello strumento	145
7.4.1	Soluzioni per la disinfezione	145
7.4.2	Procedura di disinfezione	145
7.4.3	Certificato di sicurezza	146
7.4.4	Smaltimento	146
7.4.5	Smaltimento del materiale d'imballaggio	147
7.4.6	Smaltimento del materiale operativo	147
7.4.7	Smaltimento dello strumento	147
8.	Risoluzione dei problemi	149
	Indice alfabetico	153
	Assistenza clienti Tecan	155

1. Sicurezza

1.1 Sicurezza dello strumento

1. Al momento di utilizzare il prodotto, seguire sempre le precauzioni di sicurezza basilari per ridurre il rischio di infortuni, incendi o scosse elettriche.
2. Leggere e comprendere tutte le informazioni presenti nelle Istruzioni per l'uso. La mancata lettura e comprensione di tali istruzioni, così come l'inosservanza delle stesse, può comportare un cattivo funzionamento o un danneggiamento dello strumento, oltre che lesioni al personale operativo.
3. Attenersi a tutte le indicazioni con la dicitura AVVERTENZA e CAUTELA riportate nel presente documento.
4. Non aprire in alcun caso l'alloggiamento di Infinite 200 PRO se lo strumento è collegato a una fonte di alimentazione elettrica.
5. Le micropiastre vanno inserite nello strumento sempre con delicatezza e senza forzare.
6. Infinite 200 PRO è progettato come strumento da laboratorio professionale destinato a un uso generale. Adottare adeguate precauzioni relative alla sicurezza di laboratorio, come indossare indumenti protettivi e applicare procedure approvate per la sicurezza in laboratorio.

CAUTELA

I FILE DI DEFINIZIONE PIASTRA FORNITI INSIEME ALLO STRUMENTO SONO STATI CREATI DA TECAN AUSTRIA GMBH CON LA MASSIMA ACCURATEZZA.

ABBIAMO ADOTTATO TUTTE LE NECESSARIE PRECAUZIONI PER GARANTIRE CHE LE ALTEZZE DELLE PIASTRE E LE PROFONDITÀ DEI POZZETTI CORRISPONDANO AI RISPETTIVI TIPI DI PIASTRA. TALE PARAMETRO VIENE UTILIZZATO PER DETERMINARE LA DISTANZA MINIMA TRA LA PARTE SUPERIORE DELLA PIASTRA E IL SOFFITTO DELLA CAMERA DI MISURAZIONE. INOLTRE, TECAN AUSTRIA HA AGGIUNTO UN'ULTERIORE DISTANZA DI SICUREZZA MINIMA PER EVITARE CHE LA CAMERA DI MISURAZIONE SI DANNEGGI A CAUSA DI PICCOLE VARIAZIONI NELL'ALTEZZA DELLA PIASTRA. TALE DISTANZA NON INFLUISCE SULLE PRESTAZIONI DELLO STRUMENTO.

GLI UTENTI DEVONO ASSICURARSI CHE IL FILE DI DEFINIZIONE PIASTRA SELEZIONATO CORRISPONDA ALL'EFFETTIVA PIASTRA IN USO.

GLI UTENTI DEVONO INOLTRE PRESTARE ATTENZIONE CHE NELLA PARTE SUPERIORE DELLA PIASTRA NON SIANO PRESENTI POTENZIALI FONTI DI CONTAMINAZIONE FLUORESCENTI O LUMINESCENTI. TENERE PRESENTE CHE ALCUNI SIGILLANTI PER PIASTRE LASCIANO UN RESIDUO APPICCIOSO CHE VA COMPLETAMENTE RIMOSSO PRIMA DI INIZIARE LE MISURAZIONI.



CAUTELA

PRIMA DI AVVIARE LE MISURAZIONI, ACCERTARSI CHE LA MICROPIASTRA SIA INSERITA CORRETTAMENTE NELLA POSIZIONE A1. IL POZZETTO A1 DEVE TROVARSI IN ALTO A SINISTRA.



**CAUTELA**

**PER GARANTIRE UN FUNZIONAMENTO OTTIMALE DEGLI STRUMENTI
TECAN RACCOMANDIAMO UN INTERVALLO DI MANUTENZIONE DI 6
MESI.**

Si presuppone che, sulla base della propria esperienza professionale, il personale addetto all'uso dello strumento abbia familiarità con le precauzioni di sicurezza necessarie per maneggiare prodotti chimici e sostanze tossiche.

Rispettare le seguenti normative e direttive:

1. Leggi nazionali sulla protezione in ambito industriale
2. Norme sulla prevenzione degli infortuni
3. Schede dei dati di sicurezza dei produttori dei reagenti

**ATTENZIONE**

**A SECONDA DELLE APPLICAZIONI, ALCUNE PARTI DELLO
STRUMENTO POTREBBERO ESSERE STATE A CONTATTO CON
MATERIALE INFETTIVO/A RISCHIO BIOLOGICO. ASSICURARSI CHE
LO STRUMENTO VENGA UTILIZZATO ESCLUSIVAMENTE DA
PERSONALE QUALIFICATO. IN CASO DI INTERVENTI MANUTENTIVI
O QUALORA LO STRUMENTO VADA RICOLLOCATO O SMALTITO,
ESEGUIRE SEMPRE LA DISINFEZIONE COME DA ISTRUZIONI
RIPORTATE NEL PRESENTE MANUALE.**

2. Descrizione generale

2.1 Strumento

Infinite 200 PRO di Tecan è un lettore multifunzione per micropiastre progettato come soluzione di prima fascia per il settore delle scienze biologiche. Infinite 200 PRO garantisce alte prestazioni per quasi tutte le applicazioni correlate alla lettura di micropiastre e alla ricerca. Inoltre, è compatibile con sistemi robotizzati.

La gamma Infinite 200 è realizzata in base al modello tecnologico del ben noto lettore Infinite e include sei diverse configurazioni. Segue un elenco delle sei configurazioni, con le rispettive funzionalità e opzioni:

Funzionalità	Configurazioni con monocromatore (M)				Configurazioni con filtro (F)	
	M Nano	M Nano+	Lumi	M Plex	F Nano+	F Plex
Assorbanza - monocromatore	x	x		x		
Assorbanza - filtro					x	x
Fluorescenza - monocromatore		x		x		
Fluorescenza - filtro					x	x
Fluorescenza - lettura dall'alto (Cima)		x		x	x	x
Fluorescenza - lettura dal basso (Fondo)		x		x	x	x
Polarizzazione di fluorescenza - filtro						x
Luminescenza			x	x		x
Opzioni						
1 iniettore	x	x	x	x	x	x
2 iniettori	x	x	x	x	x	x
Cuvetta	x	x		x		
Piastra NanoQuant	x	x		x	x	x

2.1.1 Utilizzo previsto

Infinite 200 PRO è stato progettato come strumento da laboratorio professionale destinato a un uso generale. Supporta tutte le comuni micropiastre contenenti da 6 a 384 pozzetti e conformi alle norme ANSI/SBS (vedere 5.12.2 Tipi di micropiastre raccomandati per ulteriori informazioni).



Nota

È necessaria la convalida da parte dei responsabili operativi. Infinite 200 PRO è stato convalidato in base a una serie limitata di saggi. I responsabili operativi sono tenuti a garantire che il lettore Infinite 200 PRO venga convalidato per ogni saggio specifico effettuato con lo strumento.

2.1.2 Multifunzionalità

Il lettore Infinite supporta le seguenti tecniche di misurazione, in base alla configurazione selezionata:

- Intensità di fluorescenza (FI) dall'alto (Cima)
- Intensità di fluorescenza (FI) dal basso (Fondo)
- Intensità di fluorescenza a risoluzione temporale (TRF)
- Trasferimento di energia per risonanza della fluorescenza (FRET)
- Fluorescenza in modalità "flash" (con iniettori)
- Polarizzazione di fluorescenza (FP)
- Assorbanza
- Assorbanza (con iniettori)
- Assorbanza in cuvette
- Luminescenza in modalità "glow"
- Luminescenza in modalità "flash"
- Trasferimento di energia per risonanza della bioluminescenza (BRET)

Le tecniche descritte in precedenza consentono di effettuare misurazioni con tutte le micropiastre standard contenenti da 1 a 384 pozzetti conformi alle ANSI/SBS (ANSI/SBS 1-2004; ANSI/SBS 2-2004, ANSI/SBS 3-2004 and ANSI/SBS 4-2004). Il passaggio tra le diverse tecniche di misurazione, o tra i diversi formati di piastra, avviene in modo completamente automatico tramite software. Per passare da una modalità di lettura all'altra, tra quelle supportate dal lettore Infinite, non è necessario riconfigurare manualmente l'ottica.

2.1.3 Volumi di riempimento

CAUTELA

LE SEGUENTI MICROPIASTRE POSSONO ESSERE PROCESSATE ESCLUSIVAMENTE CON I VOLUMI DI RIEMPIMENTO SPECIFICATI DI SEGUITO:

- | | | |
|--------------------------|----|---------|
| • PIASTRE A 6 POZZETTI | <= | 2000 µL |
| • PIASTRE A 12 POZZETTI | <= | 1200 µL |
| • PIASTRE A 24 POZZETTI | <= | 1000 µL |
| • PIASTRE A 48 POZZETTI | <= | 400 µL |
| • PIASTRE A 96 POZZETTI | <= | 200 µL |
| • PIASTRE A 384 POZZETTI | <= | 100 µL |

L'IMPIEGO DI VOLUMI DI RIEMPIMENTO SUPERIORI A QUELLI INDICATI PUÒ COMPORTARE UNA FUORIUSCITA DI LIQUIDI, CON CONSEGUENTE RISCHIO DI CONTAMINAZIONE CROCIATA. INOLTRE, LO SVERSAMENTO DI LIQUIDI PUÒ CAUSARE DANNI AL DISPOSITIVO (AD ES., CONTAMINAZIONE DELL'OTTICA O DEL MORSETTO DI CENTRAGGIO).

SE IL VOLUME DI ESERCIZIO SPECIFICATO NEL FILE DI DEFINIZIONE PIASTRA (PDFX) È INFERIORE AI VOLUMI SOPRA ELENCATI, PER EVITARE FUORIUSCITE È OPPORTUNO UTILIZZARE I VOLUMI DI RIEMPIMENTO PIÙ PICCOLI (AD ES., LE PIASTRE A 384 POZZETTI CORNING HANNO UN VOLUME DI ESERCIZIO DI SOLI 80 µL).

PER I FLUIDI CHE HANNO UNA VISCOSITÀ INFERIORE RISPETTO A QUELLA DELLE SOLUZIONI ACQUOSE, IL VOLUME DI RIEMPIMENTO DEVE ESSERE ULTERIORMENTE OTTIMIZZATO DURANTE LA CONVALIDA DEL METODO.



2.1.4 Prestazioni

Il lettore Infinite è stato progettato in conformità ai requisiti relativi agli strumenti da laboratorio destinati a un uso generale.

L'utente ha la possibilità di accedere a una serie di parametri che consentono di ottimizzare i risultati delle misurazioni in base a: configurazione specifica, tipo di analisi (saggi su cellule o omogenei), tipo di micropiastre, volumi erogati per pozzetto e velocità di erogazione.

2.1.5 Facilità d'uso

I lettori Infinite dotati di monocromatore offrono una flessibilità senza precedenti in quanto a selezione della lunghezza d'onda per le misurazioni dell'intensità di fluorescenza e dell'assorbanza. Qualunque lunghezza d'onda viene facilmente regolata all'interno dell'intervallo specificato tramite software. Oltre alle misurazioni di una singola lunghezza d'onda, è possibile registrare spettri di assorbimento e di fluorescenza. La misurazione dello spettro non è soggetta alle restrizioni dovute alla frequenza di taglio dei filtri.

I lettori Infinite dotati di filtro offrono un'elevata flessibilità per la personalizzazione delle misurazioni di fluorescenza e assorbimento; le slitte contenenti filtri interferenziali per fluorescenza e assorbimento sono facilmente accessibili all'utente.



Nota

Le istruzioni riportate nel presente documento vanno seguite in modo scrupoloso. In caso contrario, potrebbe verificarsi un danneggiamento dello strumento o un'esecuzione scorretta delle procedure, e la sicurezza dello strumento non sarebbe più garantita.

2.1.6 Pulsante di controllo integrato nello strumento

Il lettore Infinite dispone di un pulsante di controllo integrato che consente di controllare i movimenti delle piastre senza che vi sia bisogno di un collegamento al software. Alla pressione del pulsante **Plate In/Out** (Inserimento/estrazione piastra), il sistema riconosce automaticamente la posizione corrente del porta-piastre, quindi procede a inserire la piastra nello strumento oppure a estrarla.



Pulsante **Plate In/Out**
(Inserimento/estrazione piastra)

Figura 1: Pulsante integrato nel lettore Infinite. Il pulsante **Plate In/Out** è collocato nell'angolo anteriore destro del coperchio superiore.

2.1.7 Vista posteriore

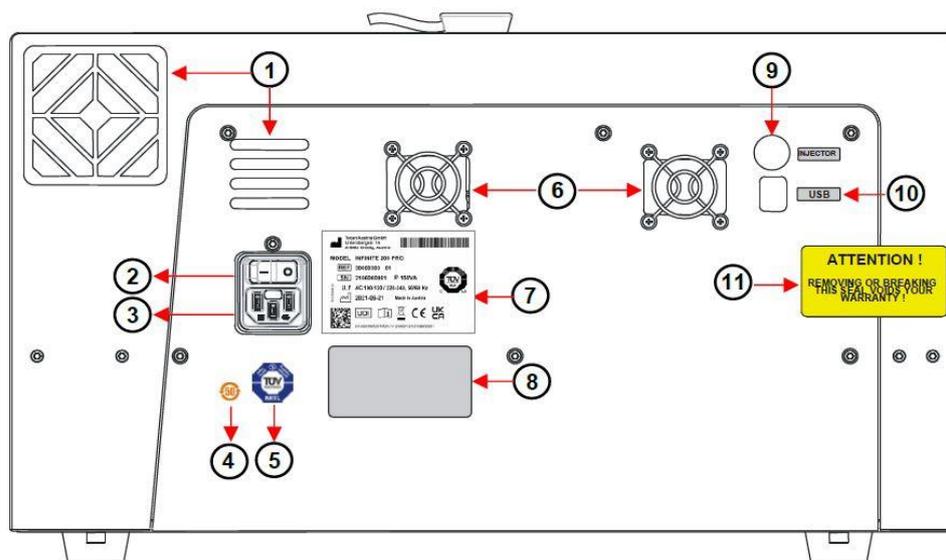


Figura 2: Pannello posteriore

1	Ventola dello strumento	
2	Interruttore di alimentazione di rete	
3	Presa di alimentazione di rete	
4	Etichetta: simbolo Cina RoHS	
5	Etichetta: Associazione di controllo tecnico (TÜV)	
6	Ventola dell'alimentatore	
7	Targhetta di identificazione	
8	Etichetta: Opzioni/configurazione	
9	Connessione iniettore	
10	Connessione USB	
11	Marchio di garanzia	<p style="text-align: center;">ATTENZIONE LA RIMOZIONE O ROTTURA DI QUESTO SIGILLO RENDE NULLA LA GARANZIA!</p>

**CAUTELA**

SOLO I TECNICI DELL'ASSISTENZA TECAN SONO AUTORIZZATI AD APRIRE LO STRUMENTO. LA RIMOZIONE O ROTTURA DEL SIGILLO DI GARANZIA RENDE NULLA LA GARANZIA.

2.2 Software

Il lettore Infinite viene fornito in abbinamento al software **i-control** necessario per il funzionamento dello strumento, inoltre include un file Help e Istruzioni per l'uso cartacee. Il software si presenta sotto forma di archivio autoestraente salvato sul supporto di memorizzazione del software. (Per informazioni sui requisiti di sistema, consultare le Istruzioni per l'uso del software **i-control**. Le Istruzioni per l'uso di **i-control** sono reperibili sul supporto di memorizzazione del software.)

È possibile utilizzare il software **Magellan** per controllare il lettore Infinite al fine di sfruttare la funzione avanzata di riduzione dei dati. Magellan offre tutte le funzionalità necessarie per soddisfare i requisiti della norma FDA 21 CFR parte 11 per la gestione dei record elettronici e delle firme elettroniche (per ulteriori informazioni, contattare il rappresentante Tecan locale).

2.3 Iniettori (opzionali)

In via opzionale, il lettore Infinite può essere dotato di un modulo iniettore comprendente una o due pompe a siringa (XE-1000, Tecan Systems) collocate in una scatola separata, che alimentano uno o due iniettori ad ago.

Gli aghi degli iniettori sono progettati per iniettare liquido in qualsiasi tipo di micropiastra conforme ai requisiti SBS, in cui la dimensione dei pozzetti è uguale o superiore a quella di una piastra SBS standard a 384 pozzetti.



Figura 3: Scatola dell'iniettore con supporti per flaconi

2.3.1 Modalità di misurazione dell'iniettore

Gli iniettori del lettore Infinite possono essere utilizzati con le seguenti modalità:

- Intensità di fluorescenza dall'alto e dal basso
- Fluorescenza a risoluzione temporale
- Assorbanza
- Luminescenza in modalità "flash"
- Luminescenza in modalità "glow"
- Luminescenza a doppio colore

Poiché la posizione di misurazione non coincide con quella dell'iniettore, tra l'iniezione e la lettura intercorre un breve ritardo (circa < 0,5 sec.).

Per ulteriori dettagli su come impostare l'esecuzione di una misurazione con gli iniettori, consultare il capitolo 4.10.4 Modalità di misurazione con iniettori (i-control).

2.3.2 Schema del modulo iniettore

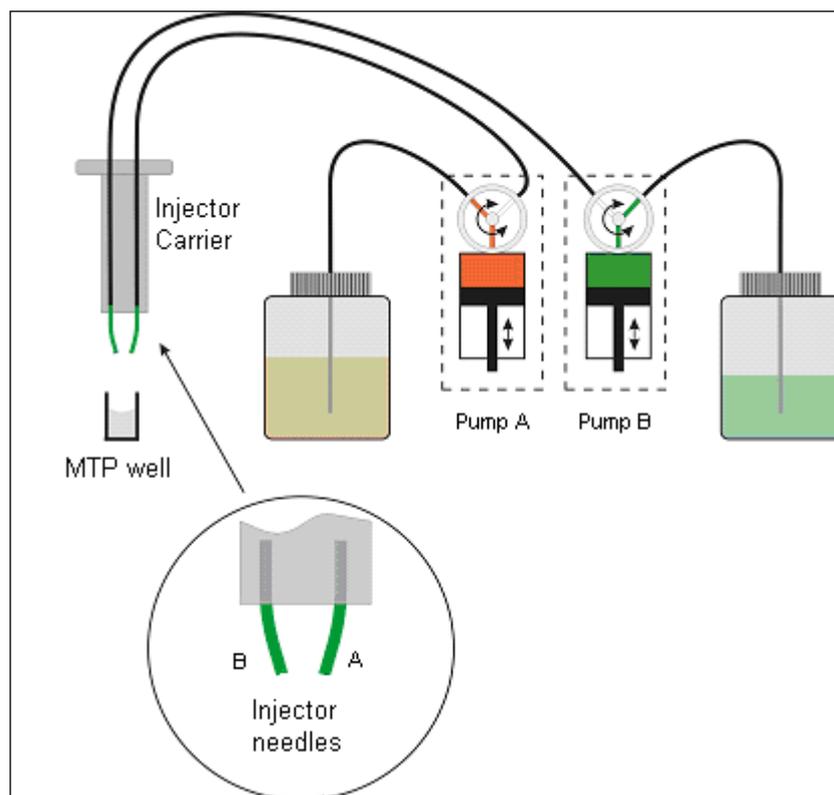


Figura 4: Rappresentazione schematica del modulo iniettore

2.3.3 Opzioni pompe d'iniezione

Il lettore Infinite può essere equipaggiato con un massimo di due pompe (vedere la precedente Figura 4):

- la pompa A alimenta l'ago A dell'iniettore
- la pompa B alimenta l'ago B dell'iniettore

Il lettore Infinite può essere equipaggiato con una sola pompa (A) o con due pompe (A e B).

- **Opzione iniettore unico (una pompa):** Un lettore Infinite dotato di una sola pompa consente l'iniezione in qualsiasi tipo di micropiastra conforme ai requisiti SBS, in cui la dimensione dei pozzetti è uguale o superiore a quella di una piastra SBS standard a 384 pozzetti.
- **Opzione iniettore doppio (due pompe):** Alcune applicazioni, come la misurazione delle reazioni di luminescenza in modalità flash o il doppio saggio con geni reporter, prevedono l'iniezione di due liquidi diversi nello stesso pozzetto, pertanto, Tecan Austria offre una versione a due iniettori.

2.3.4 Flaconi di stoccaggio e supporti per flaconi

La scatola iniettori può accogliere fino a due flaconi da 125 ml.

La versione con iniettori include nella fornitura un set standard di flaconi composto da:

- Un flacone da 125 ml e uno da 15 ml per l'**opzione iniettore unico** (una pompa) o
- Un flacone da 125 ml e due da 15 ml per l'**opzione iniettore doppio** (due pompe).

La versione con iniettori include fino a due supporti per flaconi concepiti per tubi di diverse dimensioni e diversi volumi. I flaconi e i tubi contenenti i fluidi da

iniettare possono essere fissati saldamente al supporto mediante fermagli flessibili in PVC. I tubi della siringa d'iniezione possono essere inseriti in un ago al carbonio che arriva fino al fondo del recipiente, per garantire un'aspirazione ottimale anche di piccoli volumi di fluido.



Figura 5: Supporti per flaconi

2.3.5 Porta-iniettori

Il porta-iniettori, comprendente gli aghi di iniezione, può essere facilmente rimosso dallo strumento per effettuare il riempimento iniziale o il lavaggio del sistema e per ottimizzare la velocità di iniezione.



Figura 6: Porta-iniettori

Il porta-iniettori deve essere inserito correttamente nello strumento nel momento in cui l'iniettore viene utilizzato per una misurazione o semplicemente per la distribuzione del liquido nella piastra. Rimuovere l'iniettore dummy e inserire il supporto nell'alloggiamento dell'iniettore. Spingere delicatamente il supporto nell'alloggiamento dell'iniettore fino a quando non si sente un clic.

Lo strumento contiene un sensore iniettore, il quale verifica che il porta-iniettori sia inserito correttamente per effettuare le operazioni di **iniezione ed erogazione**.

Se il porta-iniettori non è inserito correttamente, il sensore non potrà riconoscerlo e non sarà possibile procedere con la distribuzione o con l'iniezione.

Le operazioni di lavaggio e riempimento iniziale risulteranno invece ugualmente

abilitate, pertanto è opportuno assicurarsi sempre che il porta-iniettori sia in posizione di manutenzione per il lavaggio e il riempimento iniziale.

Tutti gli strumenti forniti sono predisposti per l'installazione di un iniettore, ma è necessario fare un upgrade in base all'applicazione che si intende utilizzare.



CAUTELA

IL PORTA-INIETTORI DEVE TROVARSI IN POSIZIONE DI MANUTENZIONE NEL MOMENTO IN CUI SI EFFETTUANO LE OPERAZIONI DI LAVAGGIO E RIEMPIMENTO INIZIALE.

LE PROCEDURE DI RIEMPIMENTO INIZIALE E DI LAVAGGIO NON DEVONO ESSERE ESEGUITE CON L'INIETTORE INSERITO NELLO STRUMENTO!

Figura 7: Inserimento del porta-iniettori nell'alloggiamento iniettori



CLICK



CAUTELA

SE IL PORTA-INIETTORI NON È INSERITO CORRETTAMENTE NELL'ALLOGGIAMENTO, IL SENSORE NON SARÀ IN GRADO DI RILEVARE LA PRESENZA DELL'INIETTORE. DI CONSEGUENZA, VERRANNO ABILITATI IL LAVAGGIO E IL RIEMPIMENTO INIZIALE, CON CONSEGUENTE RISCHIO DI DANNEGGIAMENTO DELLO STRUMENTO.

2.4 Tecniche di misurazione

Nelle sezioni successive viene fornita un'introduzione alle tecniche di misurazione del lettore Infinite nella versione full optional. Sono state apportate alcune semplificazioni per motivi di sinteticità. Per ulteriori informazioni, consultare i documenti di riferimento.

2.4.1 Fluorescenza

Il lettore Infinite offre la tecnica base di misurazione della fluorescenza e alcune varianti ancora più sofisticate:

- Intensità di fluorescenza (FI) (o semplicemente Fluorescenza)
- Trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza (FRET)
- Fluorescenza a risoluzione temporale (TRF)
- Polarizzazione di fluorescenza (FP) (solo per Infinite F Plex)

La tecnica FI può anche essere utilizzata per il trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza (FRET). Per alcune applicazioni correlate alla lettura di micropiastre, la tecnica FRET semplifica la preparazione dei saggi, quindi offre dei vantaggi in più rispetto a FI e TRF. Queste ultime sono più indicate per i saggi di legame effettuati con il metodo **mix and measure**. A differenza della FP, la tecnica FRET prevede che entrambi i partner di legame siano etichettati in modo appropriato. Inoltre, con la FRET è possibile utilizzare le etichette TRF per accrescere la sensibilità, e, in questo caso, si parlerà di HTRF (TRF omogenea).

La TRF non va confusa con le misurazioni del tempo di vita della fluorescenza.

Le molecole fluorescenti emettono luce a una lunghezza d'onda ben precisa nel momento in cui vengono colpite da una luce a lunghezza d'onda più corta (shift di Stokes). In particolare, una singola molecola fluorescente può emettere un fotone di fluorescenza (quanto di luce). Si tratta di una parte dell'energia che è stata assorbita in precedenza (eccitazione elettronica) e non rilasciata abbastanza rapidamente sotto forma di energia termica.

Il tempo medio che intercorre tra l'eccitazione e l'emissione è chiamato tempo di vita della fluorescenza. Per molte specie di molecole fluorescenti, il tempo di vita della fluorescenza è nell'ordine di alcuni nanosecondi (fluorescenza immediata). Dopo l'eccitazione, l'emissione di fluorescenza avviene con una certa probabilità (resa quantica), che dipende dalla specie di molecole fluorescenti e dalle condizioni ambientali.

Per informazioni dettagliate sulle tecniche e le applicazioni della fluorescenza, vedere:

Principles of Fluorescence Spectroscopy di Joseph R. Lakowicz, Plenum Press.

A) Intensità di fluorescenza (FI)

In molte applicazioni che prevedono l'uso di micropiastre, si misura l'intensità dell'emissione di fluorescenza per determinare la quantità di complessi fluorescenti etichettati. In questi saggi, è necessario controllare sperimentalmente altri fattori che influiscono sull'emissione di fluorescenza. La temperatura, il valore del pH, l'ossigeno disciolto, il tipo di solvente, ecc. possono influenzare in modo determinante la resa quantica della fluorescenza e, quindi, i risultati della misurazione.

B) Trasferimento di energia per risonanza della fluorescenza (FRET)

Alcune applicazioni che prevedono l'uso di micropiastre utilizzano una sofisticata strategia di doppia etichettatura. L'effetto ottenuto con la tecnica FRET consente di rilevare la vicinanza di due complessi etichettati in modo diverso e di calcolare

la quantità di entrambi. Per questo motivo, questa tecnica è particolarmente adatta ai saggi di legame.

In pratica, si tratta di una misurazione dell'intensità di fluorescenza di uno dei due complessi fluorescenti etichettati (accettore). Tuttavia, l'accettore non è suscettibile alla lunghezza d'onda di eccitazione propria della sorgente luminosa utilizzata. Invece, l'accettore può ricevere energia di eccitazione dall'altro complesso fluorescente etichettato (donatore) se entrambi i complessi sono vicini tra loro. Presupposto fondamentale è che la lunghezza d'onda di eccitazione sia applicata al donatore. In secondo luogo, lo spettro di emissione del donatore deve sovrapporsi allo spettro di eccitazione dell'accettore (condizione di risonanza). Nonostante ciò, il trasferimento dell'energia di eccitazione dal donatore all'accettore avviene senza emissione di radiazioni.

Alcune applicazioni basate su FRET utilizzano coppie idonee appartenenti alla famiglia delle proteine fluorescenti, come le GFP/YFP (proteina fluorescente verde/gialla, (rif. **Using GFP in FRET-based applications** di Brian A. Pollok e Roger Heim – trends in Cell Biology [Vol.9] Febbraio 1999). Un quadro generale viene fornito nell'articolo: **Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research** di J. Szöllösi, et al. in Cytometry 34, pag. 159-179 (1998).

Altre applicazioni basate su FRET traggono vantaggio dall'uso di etichette TRF come donatori. Ad esempio, cfr. **High Throughput Screening** – Marcel Dekker Inc. 1997, New York, Basilea, Hong Kong, sezione 19 Homogeneous, Time-Resolved Fluorescence Method for Drug Discovery di Alfred J. Kolb, et al.

C) Fluorescenza a risoluzione temporale (TRF)

La tecnica TRF si applica a una classe di etichette fluorescenti (utilizza chelati di lantanidi come l'europio, [rif. **Europium and Samarium in Time-Resolved Fluoroimmunoassays** di T. Ståhlberg, et. al. - American Laboratory, dicembre 1993 pag. 15]), alcuni dei quali hanno una durata della fluorescenza superiore a 100 microsecondi. Il lettore Infinite usa come sorgente luminosa una lampada flash allo xeno, con una durata del flash molto più breve rispetto al tempo di vita della fluorescenza di queste specie. Ciò consente di misurare l'emissione di fluorescenza in un determinato momento, quando la luce diffusa e la fluorescenza immediata sono già svanite (tempo di latenza). Pertanto, lo sfondo può essere notevolmente ridotto mentre la sensibilità viene migliorata.

La tecnica TRF è quindi particolarmente vantaggiosa nel caso dei saggi che utilizzano più etichette con diversi tempi di vita della fluorescenza.

D) Polarizzazione di fluorescenza (FP)

La polarizzazione di fluorescenza (FP) misura la mobilità rotazionale di un complesso fluorescente etichettato. La FP è quindi particolarmente adatta ai saggi di legame, perché il movimento rotatorio delle molecole più piccole può essere rallentato drasticamente quando queste si legano a una molecola più grande.

Le misurazioni della polarizzazione di fluorescenza si basano sul rilevamento della depolarizzazione dell'emissione di fluorescenza dopo l'eccitazione di una molecola fluorescente mediante luce polarizzata. Una molecola fluorescente può essere paragonata a un'antenna. Tale molecola può assorbire energia se, e solo se, la polarizzazione della luce di eccitazione corrisponde all'orientamento dell'antenna. Durante il tempo di vita della fluorescenza, ovvero il tempo in cui una molecola rimane nello stato eccitato, delle piccole molecole si diffondono in modo relativamente rapido con movimento rotatorio. Quindi si ri-orientano prima di emettere il loro fotone. Di conseguenza e a causa della natura casuale della diffusione, una luce di eccitazione polarizzata linearmente si tradurrà in una luce di emissione meno polarizzata. Pertanto, un valore di mP elevato denota una rotazione lenta della molecola etichettata, il che significa che probabilmente si è

verificato il legame. Un valore di mP elevato denota invece una rotazione rapida della molecola etichettata, il che significa che probabilmente il legame non si è verificato.

Il risultato della misurazione FP viene calcolato in base a due misurazioni dell'intensità della fluorescenza effettuate in successione. Le due misurazioni differiscono per l'orientamento reciproco dei filtri polarizzatori, in quanto uno è posizionato dietro al filtro di eccitazione, l'altro davanti al filtro di emissione. Elaborando le due serie di dati, è possibile calcolare in che misura l'etichetta fluorescente ha cambiato orientamento nell'intervallo di tempo intercorso tra l'eccitazione e l'emissione.

2.4.2 Assorbanza

L'assorbanza quantifica l'entità dell'assorbimento di una luce monocromatica trasmessa attraverso un campione. L'assorbanza viene definita come:

$$A = \text{LOG}_{10} (I_0 / I_{\text{CAMPIONE}}),$$

Dove I_{CAMPIONE} è l'intensità della luce trasmessa, I_0 è l'intensità della luce non assorbita dal campione. L'assorbanza viene misurata in unità di densità ottica (OD)

Pertanto, 2.0 OD corrisponde a un assorbimento pari a $10^{2.0}$ o moltiplicato per 100 (1% di trasmissione),

1.0 OD corrisponde a un assorbimento pari a $10^{1.0}$ o moltiplicato per 10 (10% di trasmissione), e

0.1 OD corrisponde a un assorbimento pari a $10^{0.1}$ o moltiplicato per 1,26 (79,4% di trasmissione).

Se il campione contiene una sola specie assorbente in questo stretto intervallo di lunghezze d'onda, la correzione dell'assorbimento di fondo (A) è proporzionale alla corrispondente concentrazione di quella specie (legge di Lambert-Beer).

2.4.3 Luminescenza

Chemiluminescenza o bioluminescenza di tipo "glow"

Il lettore Infinite consente di effettuare la misurazione della chemiluminescenza o bioluminescenza di tipo "glow". Nella modalità "glow", il saggio emette luce per un tempo molto più lungo di un minuto. Sono disponibili substrati luminescenti che emettono un segnale sufficientemente stabile per ore.

Ad esempio, è possibile misurare la luminescenza per determinare l'attività di un complesso etichettato come enzimatico (-perossidasi, -fosfatasi). L'emissione di luce è prodotta dalla decomposizione di un substrato luminescente ad opera dell'enzima. In caso di eccesso di substrato, si può presumere che il segnale luminescente sia proporzionale alla dimensione del complesso etichettato come enzimatico. Come per tutti i saggi enzimatici, il controllo delle condizioni ambientali è d'importanza fondamentale (temperatura, valore del pH).

Per gli aspetti pratici dei saggi in luminescenza, vedere il seguente esempio:

Bioluminescence Methods and Protocols, ed. R.A. LaRossa, Methods in Molecular Biology 102, Humana Press, 1998

Trasferimento di energia per risonanza della bioluminescenza (BRET)

Il metodo BRET si avvale di una tecnologia di analisi avanzata, non distruttiva, basata su cellule, perfettamente adatta alle applicazioni proteomiche, incluse la ricerca relativa ai recettori e la mappatura delle vie di trasduzione del segnale. Il rilevamento BRET si basa sul trasferimento di energia tra proteine di fusione contenenti *Renilla luciferasi* (Rluc) e un mutante della proteina fluorescente verde (Green Fluorescent Protein - GFP). Il segnale BRET è generato dall'ossidazione di p.a. Deep Blue C, un derivato della celenterazina che massimizza la

risoluzione spettrale per ottenere una sensibilità superiore. Questa tecnologia di analisi di saggi omogenei fornisce una piattaforma semplice, robusta e versatile, con applicazioni nella ricerca accademica di base e nella ricerca applicata.

Luminescenza di tipo "flash"

Nei saggi in luminescenza di tipo flash, la misurazione viene eseguita solo durante l'erogazione del reagente attivatore o dopo un breve ritardo (per informazioni sulle misurazioni di luminescenza in modalità flash con il lettore Infinite, vedere anche 2.3.1 Modalità di misurazione dell'iniettore).

Negli ultimi anni, i substrati luminescenti sono stati migliorati in modo tale da garantire un segnale più stabile. Nei cosiddetti saggi in luminescenza di tipo flash, il segnale luminescente è distribuito in un ampio arco temporale (ad es., emivita di 30 min.)

2.5 Ottica

2.5.1 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite M)

Segue una breve descrizione dell'ottica del sistema di misurazione della fluorescenza dall'alto (Cima) e dal basso (Fondo) nei modelli Infinite M.

Il sistema si compone di:

- Sistema della sorgente luminosa
- Doppio monocromatore di eccitazione
- Ottica di misurazione della fluorescenza dall'alto
- Doppio monocromatore di emissione
- e rilevamento della fluorescenza

Le frecce continue indicano il percorso della luce di eccitazione; le frecce tratteggiate indicano il percorso della luce emessa.

Per semplificare la rappresentazione, il **Sistema di monitoraggio flash** (vedere sezione Monitoraggio del flash, pag. 26) non è stato incluso nell'illustrazione.

Ciascun monocromatore, (2) e (4), è costituito da due reticoli. Le figure sottostanti ne mostrano i dettagli in una rappresentazione schematica.

Schema intensità di fluorescenza dall'alto

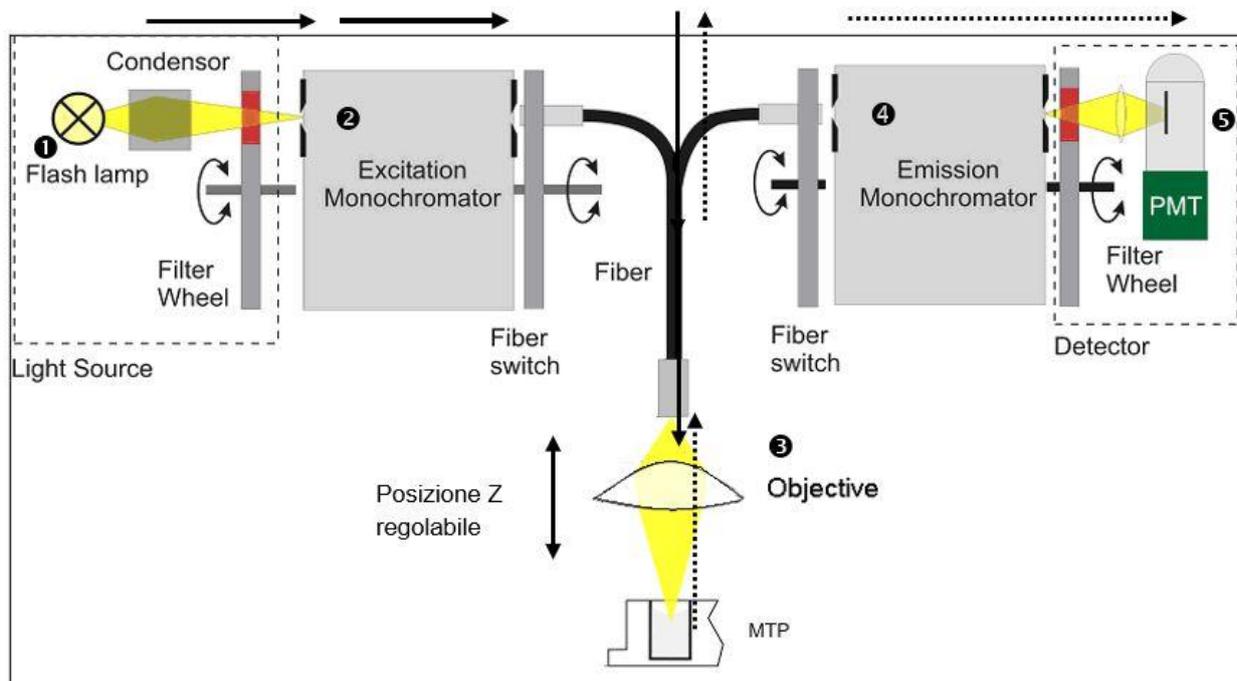


Figura 8: Ottica fluorescenza dall'alto

Schema intensità di fluorescenza dal basso

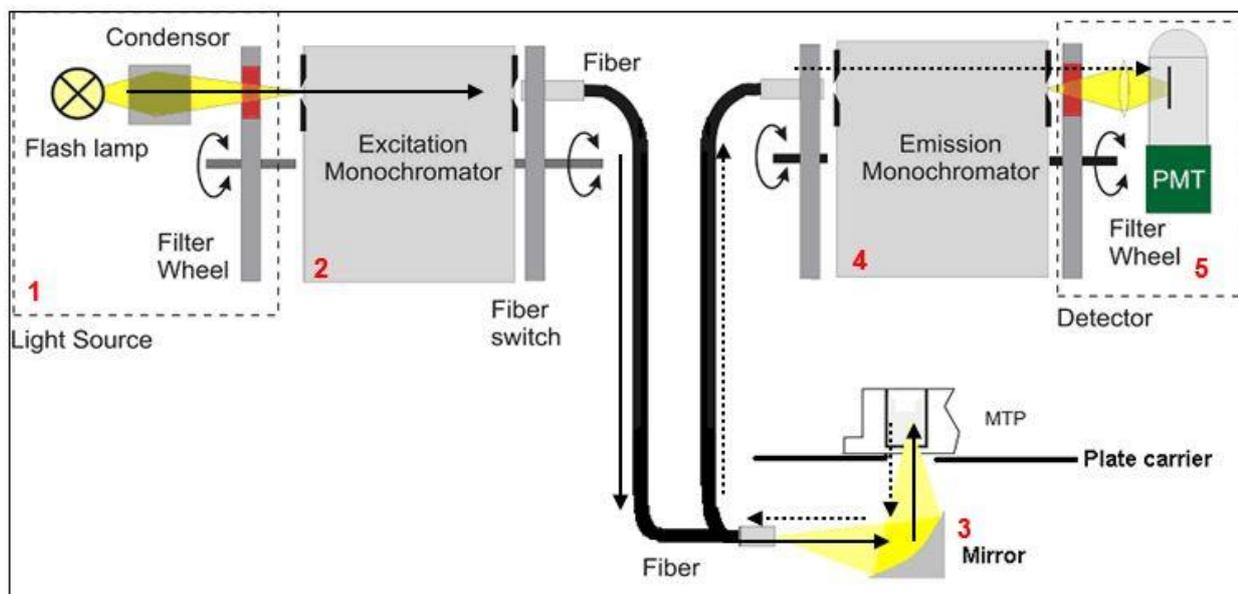


Figura 9: Ottica fluorescenza dal basso

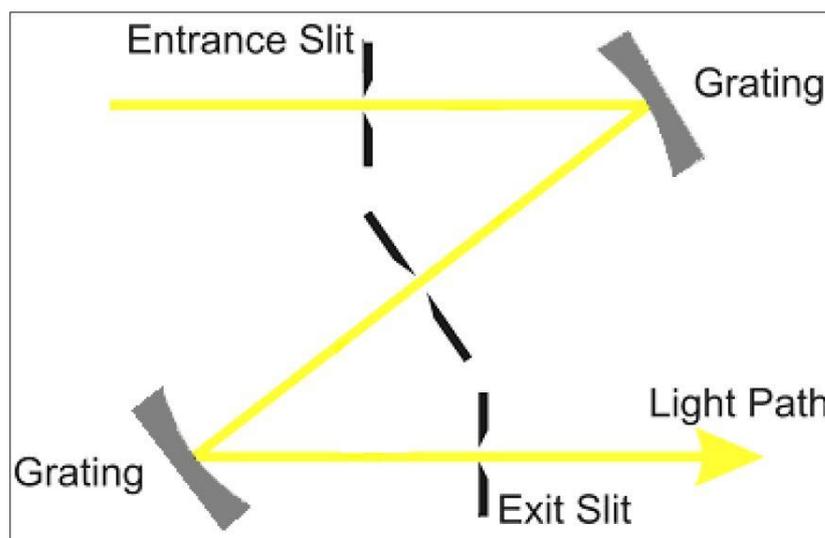


Figura 10: Rappresentazione dettagliata dell'unità doppio monocromatore di eccitazione e di emissione

Sistema sorgente luminosa per intensità di fluorescenza

Generalmente, per le applicazioni in fluorescenza è necessario utilizzare un intervallo specifico di lunghezze d'onda di eccitazione, oltre che una sorgente luminosa ad eccitazione pulsata (Fluorescenza a risoluzione temporale [TRF]).

Nei modelli Infinite M, il sistema sorgente luminosa include i seguenti componenti:

- Lampada flash
- Condensatore ottico
- Ruota portafiltri
- Doppio monocromatore di eccitazione
- Fascio di fibre ottiche
- Monitoraggio della lampada flash

Lampada flash

Nel modello Infinite M si utilizza una lampada ad arco allo xeno a scarica di gas e a energia elevata (lampada flash). Il flash penetra attraverso un piccolo spazio tra due elettrodi. Il bulbo della lampadina contiene xeno inserito ad alta pressione. La durata del flash è di pochi microsecondi. La frequenza del flash è di 40 Hz.

Nel modello Infinite M si usa una lampada flash per le misurazioni di fluorescenza e assorbanza, anche se la luce pulsata è necessaria solo per la tecnica TRF. I principali vantaggi di questo singolare tipo di lampada sono:

Alta intensità dall'ultravioletto (UV) profondo al vicino infrarosso (IR)

Tempo di vita molto lungo

Molte applicazioni, un solo tipo di lampada

Nessun pre-riscaldamento richiesto

Condensatore

Il condensatore ottico in silice fusa focalizza la luce del flash sulla fenditura di ingresso del monocromatore di eccitazione.

Ruota portafiltri

Tra il condensatore e il monocromatore di eccitazione è posta una ruota portafiltri. La ruota portafiltri contiene filtri ottici specifici per lunghezza d'onda, necessari per bloccare gli ordini di diffrazione indesiderati prodotti dai reticoli ottici. I filtri vengono impostati automaticamente.

Doppio monocromatore di eccitazione

Sia nelle applicazioni di fluorescenza che di assorbanza, il doppio monocromatore di eccitazione viene utilizzato per selezionare le lunghezze d'onda desiderate tra quelle rientranti nello spettro della lampada flash. L'intervallo di riferimento è compreso tra 230 e 850 nm (versione con potenziamento spettrale) per la misurazione dell'intensità di fluorescenza, e tra 230 nm e 1000 nm per la misurazione dell'assorbanza.

In molti casi, gli spettri di emissione di fluorescenza non dipendono dall'esatta lunghezza d'onda di eccitazione; pertanto, per ottenere un segnale di fluorescenza totale massimo, sarebbe opportuno utilizzare un'ampia larghezza di banda di eccitazione.

Per i modelli Infinite M, la larghezza di banda del monocromatore è < 9 nm per lunghezze d'onda di > 315 nm e < 5 nm per lunghezze d'onda di ≤ 315 nm.

Di seguito è riportata una descrizione più dettagliata del funzionamento di un monocromatore.

Descrizione del funzionamento di un monocromatore

Il monocromatore è un dispositivo ottico che consente di selezionare una qualunque lunghezza d'onda all'interno di un determinato spettro ottico. Il suo metodo di funzionamento può essere paragonato a quello di un filtro ottico sintonizzabile, in quanto consente di regolare sia la lunghezza d'onda che la larghezza di banda.

Un monocromatore è costituito da una fenditura di ingresso, un elemento dispersivo e una fenditura di uscita. L'elemento dispersivo diffrange la luce dello spettro ottico e la proietta sulla fenditura di uscita. L'elemento dispersivo può essere un prisma di vetro o un reticolo ottico. I moderni monocromatori, come quelli utilizzati nei modelli Infinite M, sono progettati con reticoli ottici.

Mediante la rotazione del reticolo ottico attorno al suo asse verticale, lo spettro si sposta verso la fenditura di uscita, attraverso la quale passa soltanto una piccola parte dello spettro (passa banda). Ciò significa che, quando la luce bianca illumina la fenditura di ingresso del monocromatore, attraverso la fenditura di

uscita passa soltanto la luce con una lunghezza d'onda specifica (luce monocromatica). La lunghezza d'onda di questa luce è determinata dall'angolo di rotazione del reticolo ottico. La larghezza di banda è determinata dalla larghezza della fenditura di uscita. La larghezza di banda è definita come larghezza a metà altezza (full width at half maximum - FWHM).

I monocromatori bloccano le lunghezze d'onda indesiderate, che in genere corrispondono a 10^3 . Ciò significa che, quando il monocromatore è impostato per una luce con una lunghezza d'onda di 500 nm e il rilevatore rileva un segnale di 10.000 conteggi, la luce con lunghezze d'onda diverse crea un segnale di soli 10 conteggi. Per le applicazioni nell'intervallo di fluorescenza, questo blocco spesso non è sufficiente, poiché la radiazione fluorescente da rilevare è generalmente molto più debole rispetto alla luce di eccitazione. Per ottenere un blocco di livello più elevato, si procede a collegare due monocromatori in serie, ovvero la fenditura di uscita del primo monocromatore funge contemporaneamente da fenditura di ingresso del secondo monocromatore. Questo dispositivo prende il nome di doppio monocromatore. In questo caso, il conteggio dei blocchi raggiunge un fattore di 10^6 , un valore tipicamente ottenuto dai filtri interferenziali.

Nei modelli Infinite M è installato un doppio monocromatore sia sul lato di eccitazione che sul lato di rilevamento. Ciò consente una facile selezione delle lunghezze d'onda di eccitazione e fluorescenza senza limitazioni dovute alla frequenza di taglio dei filtri.

Fascio di fibre ottiche

La luce proveniente dalla fenditura di uscita del monocromatore di eccitazione converge in un fascio di fibre ottiche, che guida la luce verso l'ottica di misurazione dall'alto o l'ottica di misurazione dal basso. L'estremità inferiore di ciascun fascio di fibre funge da sorgente luminosa con un colore specifico. In entrambi i casi, una piccola parte della luce viene sempre guidata verso il diodo di monitoraggio della lampada flash.

Monitoraggio del flash

L'energia luminosa dei singoli flash può variare leggermente. Per tenere conto di queste variazioni, un fotodiodo al silicio controlla l'energia di ogni singolo flash. I valori risultanti dalla misurazione della fluorescenza e dell'assorbanza vengono compensati di conseguenza.

Ottica di misurazione della fluorescenza dall'alto/dal basso (Cima/Fondo)

La luce del flash entra nell'ottica e il condensatore la focalizza sulla fenditura di ingresso del monocromatore di eccitazione. La lunghezza d'onda della luce di eccitazione viene selezionata all'interno del monocromatore. Dopo aver superato il monocromatore, la luce di eccitazione converge in un fascio di fibre, che la guida verso la testina di misurazione Cima o Fondo. La luce viene quindi focalizzata sul campione dal sistema di lenti Cima/Fondo.

La radiazione fluorescente viene nuovamente raccolta dal sistema di lenti Cima/Fondo, converge nei fasci di fibre fluorescenti e viene guidata al sistema di rilevamento.

L'ottica di misurazione della fluorescenza dall'alto è costituita dai seguenti componenti:

- Sistema di lenti per rilevamento dell'intensità di fluorescenza Cima
- Fascio di fibre fluorescenti
- L'ottica di misurazione dal basso è costituita dai seguenti componenti:
- Specchio di fluorescenza Fondo
- Fascio di fibre fluorescenti

Sistema di lenti per rilevamento dell'intensità di fluorescenza Cima

Il lato di uscita del fascio di fibre funge da sorgente luminosa con un colore specifico. Il sistema di lenti posto all'estremità del fascio di fibre di eccitazione Cima è progettato per focalizzare la luce di eccitazione sul campione e anche per raccogliere la radiazione fluorescente e focalizzarla nuovamente sul fascio di fibre fluorescenti.

Le lenti dell'obiettivo sono realizzate in silice fusa. Questo materiale garantisce un'elevata trasmissione dei raggi UV e un bassissimo livello di autofluorescenza.

Dimensione spot di eccitazione

La dimensione della sezione trasversale del fascio di fibre determina il diametro del beam waist (minimo delle dimensioni trasverse del fascio gaussiano), ovvero la dimensione dello spot nel pozzetto della micropiastra. Nella serie M, il diametro di spot è di circa 3 mm per l'ottica Cima e 2 mm per l'ottica Fondo.

Fascio di fibre fluorescenti Cima e Fondo

Il fascio di fibre inserito nella testina di misurazione Cima/Fondo contiene un misto omogeneo di fibre di eccitazione e di emissione. Le fibre di emissione guidano la radiazione fluorescente alla testa del monocromatore di emissione, dove un sistema di lenti focalizza la luce sulla fenditura di ingresso del monocromatore di emissione.

Specchio di fluorescenza Fondo

Il lato di uscita del fascio di fibre funge da sorgente luminosa con un colore specifico. Il sistema di lenti posto all'estremità del fascio di fibre di eccitazione Fondo è progettato per focalizzare la luce di eccitazione sul campione e anche per raccogliere la radiazione fluorescente e focalizzarla nuovamente sul fascio di fibre fluorescenti.

Posizionamento Z (fluorescenza Cima solo su modelli Infinite M)

L'altezza dell'obiettivo al di sopra del campione può essere regolata utilizzando la funzione Posizione Z. Poiché la luce di eccitazione viene riflessa dal liquido del campione, la regolazione in posizione Z aiuta a ottimizzare il rapporto segnale/rumore. Per ulteriori informazioni sul posizionamento Z, consultare il capitolo 4.5.2 Ottimizzazione Z (misurazioni FI Cima solo su modelli Infinite M).

Rilevamento dell'intensità di fluorescenza

Il sistema di rilevamento della fluorescenza viene utilizzato per entrambe le modalità di misurazione: fluorescenza dall'alto (Cima) e al di sotto dei pozzetti della micropiastra (Fondo).

La radiazione fluorescente è focalizzata sulla fenditura di ingresso del monocromatore di emissione. Una volta superato il monocromatore, la luce viene focalizzata sul rilevatore (PMT). Tra il monocromatore e il PMT è posta una ruota portafiltri.

Il sistema di rilevamento della fluorescenza è costituito dai seguenti componenti:

- Doppio monocromatore di emissione
- PMT ruota portafiltri
- Rilevatore PMT

Doppio monocromatore di emissione

Analogamente al doppio monocromatore di eccitazione, il doppio monocromatore di emissione viene utilizzato per selezionare qualsiasi lunghezza d'onda del segnale di fluorescenza.

Agisce come un filtro regolabile per discriminare la dispersione di luce di eccitazione e la fluorescenza aspecifica. Grazie al potenziamento spettrale, lo strumento consente la selezione in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 280 e 850 nm. La larghezza di banda è 20 nm.

PMT ruota portafiltri

La ruota portafiltri contiene filtri ottici specifici per lunghezza d'onda, necessari per bloccare gli ordini di diffrazione indesiderati prodotti dai reticoli ottici. I filtri vengono impostati automaticamente.

Rilevatore PMT

Un tubo fotomoltiplicatore (PMT) viene utilizzato per rilevare i bassi livelli di luce tipicamente associati alla fluorescenza. Il PMT dei modelli Infinite M con potenziamento spettrale ha una sensibilità che si estende nel vicino infrarosso (NIR) pur avendo una bassa corrente di buio. I circuiti elettronici effettuano la conversione da analogico a digitale della corrente di uscita del PMT. La regolazione del guadagno del PMT consente la misurazione di un'ampia gamma di concentrazioni in domini di concentrazione inferiori o superiori. Per ulteriori dettagli, vedere la Sezione 4.5.1 Parametri dello strumento.

2.5.2 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite F)

I seguenti componenti costituiscono il sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza dello strumento in versione Infinite F:

- Sorgente luminosa
- Ottica di misurazione della fluorescenza
- Sistema di rilevamento della fluorescenza

Il sistema di rilevamento della fluorescenza Cima è illustrato nella Figura 11, il sistema Fondo nella Figura 12. Le frecce continue indicano il percorso della luce di eccitazione; le frecce tratteggiate mostrano il percorso della luce emessa.

Schema intensità di fluorescenza dall'alto

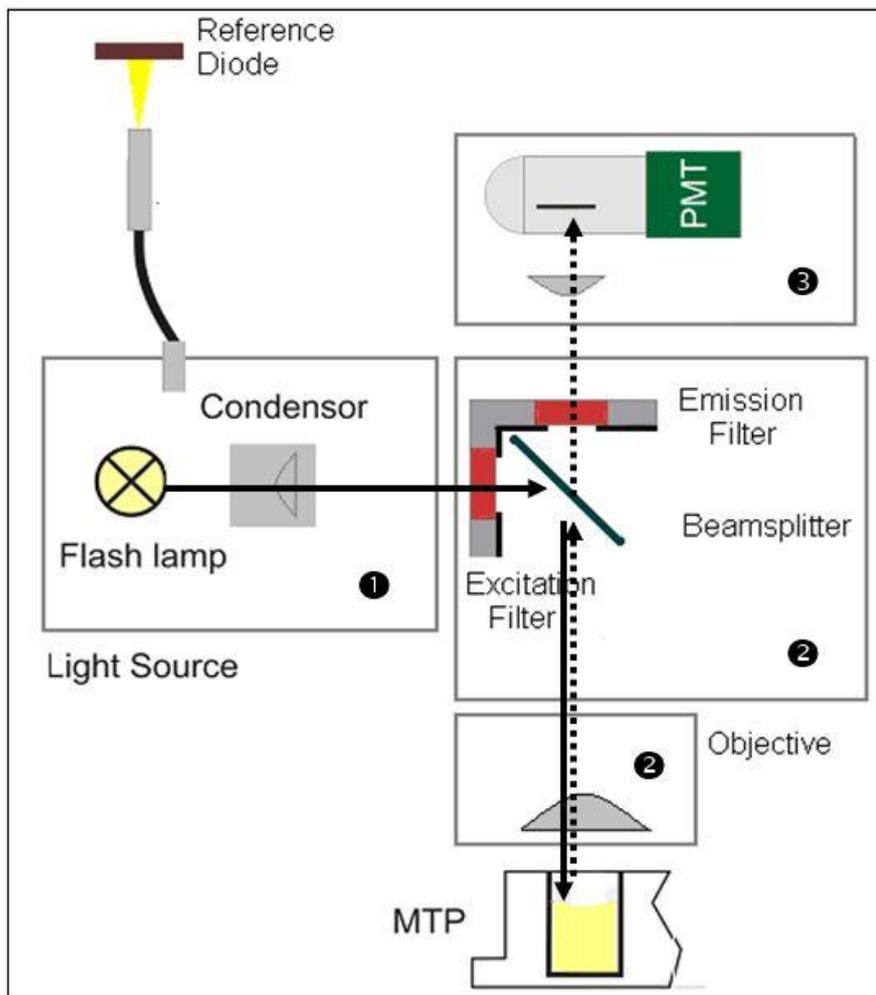


Figura 11: Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza dall'alto nei modelli Infinite F

Schema intensità di fluorescenza dal basso

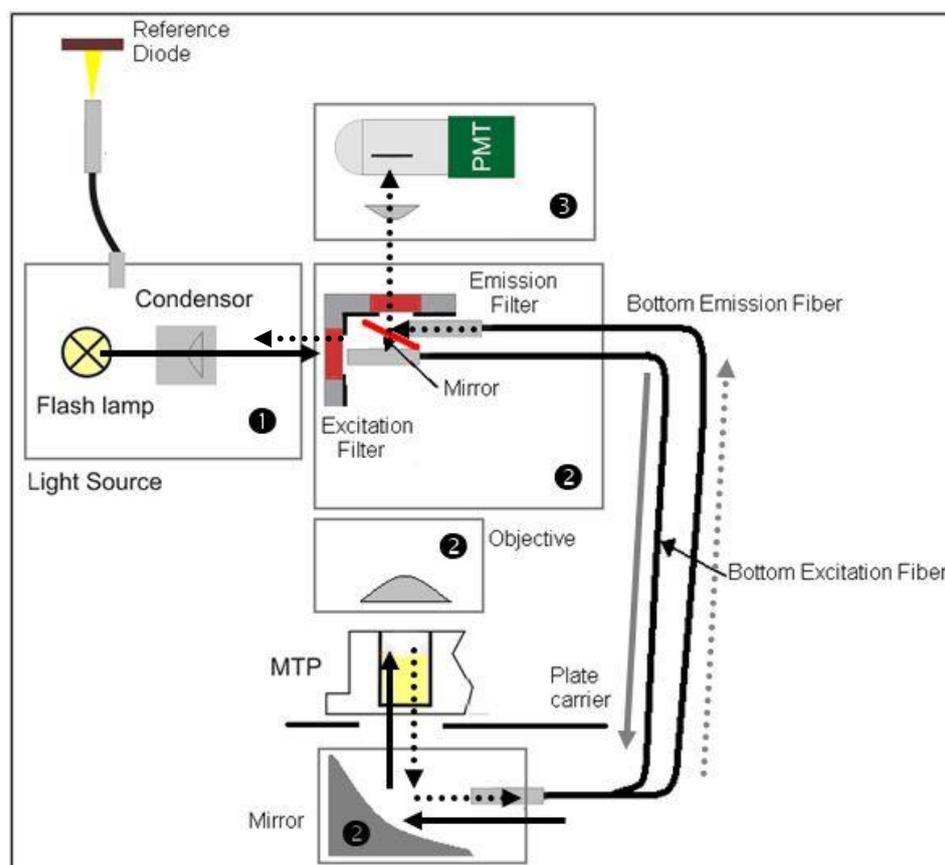


Figura 12. Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza dal basso nei modelli Infinite F

Sistema della sorgente luminosa

La luce del flash entra nell'ottica venendo focalizzata attraverso una fenditura contenente il filtro. Questa apertura funge da sorgente luminosa con un colore specifico.

Nei modelli Infinite F il sistema sorgente luminosa include i seguenti componenti:

- Lampada flash
- Condensatore ottico
- Filtri di eccitazione
- Monitoraggio della lampada flash

Lampada flash

Nel modello Infinite F si utilizza una lampada ad arco allo xeno a scarica di gas e a energia elevata (lampada flash). Il flash penetra attraverso un piccolo spazio tra due elettrodi. Il bulbo della lampadina contiene xeno inserito ad alta pressione. La durata del flash è di alcuni microsecondi.

La frequenza del flash è di 40 Hz.

Nel modello Infinite F si usa una lampada flash per le misurazioni di fluorescenza e assorbanza, anche se la luce pulsata è necessaria solo per la tecnica TRF. I principali vantaggi di questo singolare tipo di lampada sono:

- Alta intensità dall'ultravioletto (UV) profondo al vicino infrarosso (IR)
- Tempo di vita molto lungo
- Molte applicazioni, un solo tipo di lampada
- Nessun pre-riscaldamento richiesto

Condensatore

I condensatori ottici focalizzano la luce attraverso la fenditura di ingresso dell'ottica di fluorescenza.

Filtro di eccitazione

I filtri passa-banda specifici per lunghezza d'onda servono a selezionare la gamma di lunghezze d'onda di interesse all'interno dell'intero spettro della luce di eccitazione proveniente dalla lampada flash. I filtri sono installati in slitte rimovibili e possono essere cambiati direttamente dall'utente.

Monitoraggio del flash

L'energia luminosa dei singoli flash può variare leggermente. Per tenere conto di queste variazioni, un fotodiode al silicio controlla l'energia di ogni singolo flash. I valori risultanti dalla misurazione della fluorescenza e dell'assorbanza vengono compensati di conseguenza.

Ottica di misurazione della fluorescenza dall'alto

La luce del flash entra nell'ottica venendo focalizzata prima su una fenditura e poi sul filtro di eccitazione. A seconda della lunghezza d'onda misurata, uno specchio semitrasparente (50%) o uno speciale specchio dicroico riflette la luce e la dirige verso la micropiastre. Il sistema di lenti dell'obiettivo focalizza la luce sul campione.

La misurazione dell'emissione di fluorescenza viene effettuata al di sopra del pozzetto. L'obiettivo intercetta la radiazione fluorescente, che viene quindi guidata attraverso lo specchio appropriato e focalizzata sulla fessura di uscita ai fini del rilevamento.

Sistema di lenti dell'obiettivo

L'obiettivo è progettato per intercettare la radiazione fluorescente emessa da un pozzetto, focalizzarla sulla fessura di uscita e dirigerla verso il sistema di rilevamento.

Le lenti dell'obiettivo sono realizzate in silice fusa. Questo materiale garantisce un'elevata trasmissione dei raggi UV e un bassissimo livello di autofluorescenza.

Selezione degli specchi - fluorescenza Cima (solo su modelli Infinite F)

Il modello Infinite F è dotato di un porta-specchi che ospita uno specchio al 50% e uno specchio dicroico che riflette la luce a 510 nm.

Il vantaggio dello specchio al 50% è che funziona con qualsiasi combinazione di lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione. Tuttavia, in questo modo si perde il 50% della luce di eccitazione indirizzata al campione e, successivamente, il 50% della luce di emissione proveniente dal campione.

Gli specchi dicroici funzionano in base alla lunghezza d'onda e sono progettati per riflettere quasi per intero un determinato intervallo di lunghezze d'onda. Gli specchi dicroici hanno elevate proprietà di riflessione della luce di eccitazione e di trasmissione della luce di emissione e, solitamente, offrono un migliore rapporto segnale-rumore rispetto agli specchi al 50%.

Disponibili per piastre contenenti fino a 384 pozzetti.



Nota

Lo specchio dicroico deve corrispondere alla lunghezza d'onda selezionata per eccitazione ed emissione della fluorescenza.

Tipo di specchio	Riflesso (eccitazione)	Trasmissione (emissione)
Specchio al 50%	230 – 900 nm	230 – 900 nm
Dicroico 510 (ad es. fluoresceina)	320 – 500 nm	520 – 780 nm

In base alle lunghezze d'onda specificate nello script di misurazione, lo specchio dicroico viene selezionato automaticamente se sia la lunghezza d'onda di eccitazione che quella di emissione corrispondono all'intervallo specificato per lo specchio in oggetto. Se la lunghezza d'onda di eccitazione o di emissione non corrisponde agli intervalli dello specchio dicroico, per la misurazione viene selezionato automaticamente lo specchio al 50%.

Ottica di misurazione della fluorescenza dal basso (Fondo)

La luce del flash entra nell'ottica venendo focalizzata prima su una fenditura e poi sul filtro di eccitazione. Il fascio di fibre di eccitazione Fondo guida la luce alla sonda ottica Fondo, ovvero a uno specchio ellittico che focalizza la luce sul pozzetto attraverso il fondo della micropiastra. La luce emessa viene focalizzata sulla fibra di eccitazione Fondo, che dirige la luce su uno specchio, attraverso il filtro di emissione e fino al sistema di rilevamento della fluorescenza.

Rilevamento della fluorescenza

Filtro di emissione

I filtri passa-banda specifici della lunghezza d'onda servono a discriminare i segnali di fluorescenza aspecifici provenienti dalla luce di emissione specifica del campione interessato. I filtri sono installati in slitte rimovibili e possono essere cambiati direttamente dall'utente.

I filtri per fluorescenza possono essere utilizzati indifferentemente come filtri di eccitazione o di emissione, a seconda delle esigenze di misurazione.

Nei modelli Infinite F, il diametro di spot è di circa 2 mm.

Rilevatore PMT

Un tubo fotomoltiplicatore (PMT) viene utilizzato per rilevare i bassi livelli di luce generalmente associati alla fluorescenza. Per ulteriori dettagli, vedere la sezione Rilevamento dell'intensità di fluorescenza, pag. 27.

2.5.3 Sistema di polarizzazione di fluorescenza (solo per Infinite F Plex)

Per i dettagli tecnici, consultare il capitolo 2.5.2 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite F).

L'Infinite F Plex, versione di Infinite F per le misurazioni della polarizzazione di fluorescenza (FP), viene fornito in abbinamento alla slitta portafiltri FP standard. La slitta portafiltri contiene filtri e polarizzatori per eccitazione ed emissione, rispettivamente a 485 e 535 nm, e può essere utilizzata, ad esempio, nelle applicazioni FP con impiego di fluoresceina.

Per ulteriori dettagli sull'installazione dei polarizzatori e dei filtri FP, consultare il capitolo 4.4 Definizione delle slitte portafiltri (modelli Infinite F).

2.5.4 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite M)

Per le misurazioni dell'assorbanza si utilizza un percorso ottico simile a quello usato per l'eccitazione della fluorescenza. Il modulo di misurazione dell'assorbanza si trova sotto al porta-piastre e misura la luce trasmessa attraverso il campione. Prima di procedere alla misurazione della micropiastre, viene eseguita una misurazione di riferimento: in questo momento il porta-piastre si trova al di fuori della traiettoria del fascio di luce (vedere anche 2.4.2 Assorbanza).

Il sistema di misurazione dell'assorbanza è illustrato nella Figura 13 ed è costituito dai seguenti componenti:

- Sorgente luminosa
- Ottica di assorbanza
- Unità di rilevamento dell'assorbanza

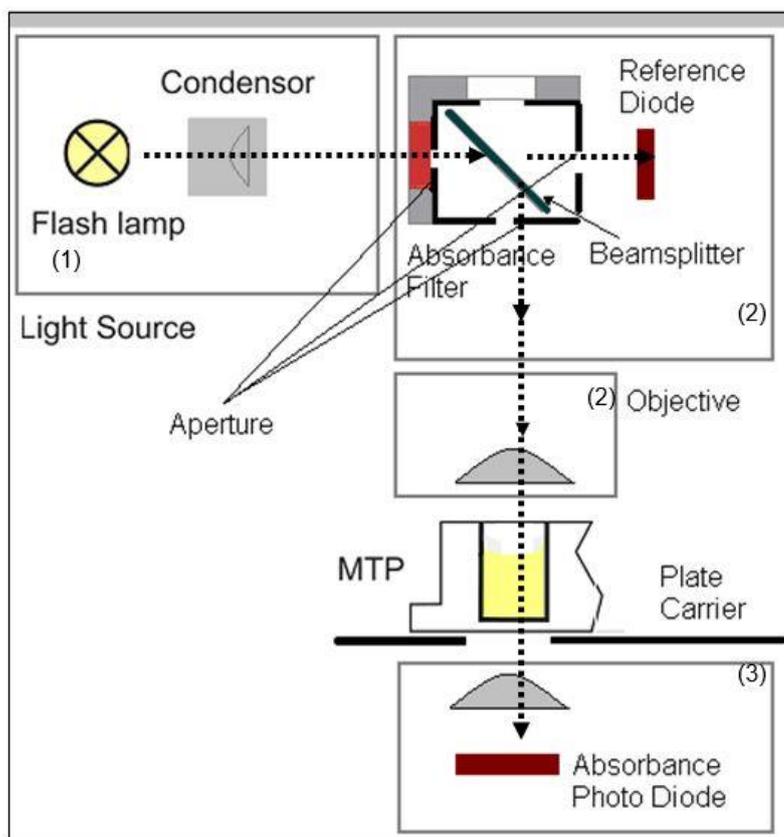


Figura 13: Sistema di misurazione dell'assorbanza dei modelli Infinite F

Sistema della sorgente luminosa

Il sistema sorgente luminosa dell'assorbanza è simile al sistema di rilevamento della fluorescenza dall'alto (Cima).

Filtro passa-banda

Nelle applicazioni di assorbanza, per selezionare le corrette lunghezze d'onda all'interno dello spettro della lampada flash, è necessario impiegare dei filtri ottici di tipo passa-banda. I filtri sono montati in slitte rimovibili.

Filtro d'assorbanza

Le misurazioni dell'assorbanza richiedono l'impiego di filtri passa-banda relativamente stretti (2 - 10 nm) con pendenza ripida.

Ottica di assorbanza

Il porta-specchi è nella posizione di rilevamento dell'assorbanza. Due piccole fenditure formano un fascio di luce stretto e più collimato rispetto a quello dell'eccitazione di fluorescenza.

La luce focalizzata attraverso il liquido erogato viene leggermente rifratta in corrispondenza delle interfacce tra aria, liquido e fondo della piastra. Per ottenere una misurazione affidabile in caso di presenza di menisco, una lente di focalizzazione raccoglie i raggi luminosi che potrebbero essere stati rifratti troppo lontano dall'asse ottico.

La dimensione dello spot del fascio di luce di assorbanza è di 0,5 mm (diametro).

Rilevamento dell'assorbanza

Per la misurazione del fascio di luce viene usato un fotodiodo in silicio. È sensibile a un'ampia gamma di lunghezze d'onda. Il fotodiodo è particolarmente idoneo per i livelli di luce rilevati nelle misurazioni di assorbanza fino a 4 OD.



Nota

Per la misurazione dell'assorbanza degli acidi nucleici in piccoli volumi (2 µl) usare la piastra Tecan NanoQuant.™.

Con questo dispositivo è possibile effettuare la misurazione su 16 diversi campioni in una volta sola.

Per ulteriori informazioni, contattare il proprio distributore locale Tecan o visitare il sito www.tecan.com.

2.5.5 Sistema di misurazione dell'assorbanza (modelli Infinite M)

Per le misurazioni dell'assorbanza si utilizza un percorso ottico simile a quello usato per l'eccitazione della fluorescenza.

Il sistema di misurazione dell'assorbanza si compone di:

- sorgente luminosa
- monocromatore di eccitazione
- ottica di assorbanza MTP
- Modulo di misurazione dell'assorbanza MTP

I condensatori ottici focalizzano la luce sui filtri di eccitazione e poi sulla fenditura di ingresso del monocromatore di eccitazione. A questo punto, un fascio di fibra guida la luce dal monocromatore di eccitazione all'ottica di assorbanza MTP, che focalizza la luce sui pozzetti. Il modulo di misurazione dell'assorbanza MTP si trova sotto al porta-piastre. Questi moduli misurano la luce trasmessa attraverso il campione.

Prima di procedere alla misurazione della micropiastra (MTP), viene eseguita una misurazione di riferimento: in questo momento il porta-piastre si trova al di fuori della traiettoria del fascio di luce.

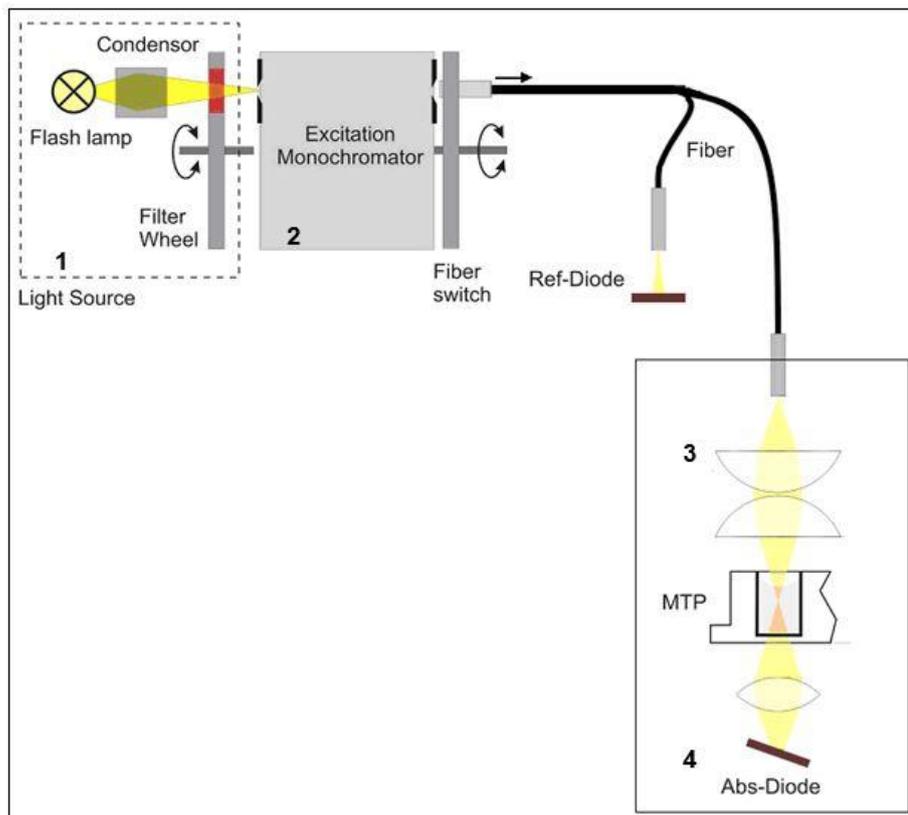


Figura 14. Ottica di misurazione dell'assorbanza per modelli Infinite M

Per ulteriori dettagli riguardanti la sorgente luminosa (1) e il monocromatore di eccitazione (2), fare riferimento a Sistema sorgente luminosa per intensità di fluorescenza, pag. 24.

Ottica di assorbimento MTP

Un fascio di fibra guida la luce dal sistema monocromatore di eccitazione all'ottica di assorbimento MTP.

L'ottica di assorbimento è costituita da una coppia di lenti che focalizzano il fascio di luce sul pozzetto della micropiastre.

Lo spot del fascio di luce di assorbimento ha un diametro di 0,7 mm.

Rilevamento dell'assorbanza MTP

Per la misurazione della luce trasmessa viene usato un fotodiodo in silicio. È sensibile a un'ampia gamma di lunghezze d'onda. Il fotodiodo è particolarmente idoneo per i livelli di luce rilevati nelle misurazioni di assorbimento fino a 4 OD.



Nota

Per la misurazione dell'assorbanza degli acidi nucleici in piccoli volumi (2 µl) usare la piastra Tecan NanoQuant.™.

Con questo dispositivo è possibile effettuare la misurazione su 16 diversi campioni in una volta sola.

Per ulteriori informazioni, contattare il proprio distributore locale Tecan o visitare il sito www.tecan.com

Correzione della lunghezza del cammino ottico

I lettori Infinite dotati di monocromatore dispongono della funzione di **correzione della lunghezza del cammino ottico**, utile per correggere i valori di assorbanza rilevati misurando i campioni nelle micropiastre. La lunghezza del cammino ottico viene corretta a 1 cm, in modo da poter confrontare i risultati di misurazione con quelli letti mediante cuvette o per eseguire analisi quantitative di campioni in base al loro coefficiente di estinzione.

Secondo la legge di Lambert-Beer, la quantità di luce assorbita è proporzionale alla concentrazione del campione e alla lunghezza del percorso compiuto dalla luce che lo attraversa. A differenza di una cuvetta standard, in cui il percorso corrisponde a 1 cm, il percorso della luce in una micropiastra è sconosciuto e dipende dal volume di riempimento dei pozzetti. Per le soluzioni acquose, la lunghezza del cammino ottico può essere calcolata dai valori di assorbanza dell'acqua, registrati nell'intervallo di lunghezze d'onda del vicino infrarosso (da 900 nm a 1000 nm) utilizzando una cuvetta e la rispettiva micropiastra.



Nota

il grado di assorbimento dell'acqua dipende dalla temperatura. Assicurarsi che tutte le misurazioni vengano eseguite esattamente alla stessa temperatura.



Nota

Un assorbimento di luce compreso tra 900 e 1000 nm da parte dei componenti del saggio, interferisce con la correzione del cammino ottico.



Nota

Tenere presente che le caratteristiche della soluzione tampone (concentrazione di sale), dei solventi organici, del menisco e della piastra possono influenzare la misurazione della correzione del cammino ottico.



CAUTELA

I CAMPIONI TORBIDI POSSONO DAR LUOGO ALL'ACCORCIAMENTO DEL PERCORSO STIMATO A CAUSA DELLA DISPERSIONE DELLA LUCE. LA CORREZIONE DEL CAMMINO OTTICO CON CUVETTE NON SARÀ SUFFICIENTE PER COMPENSARE QUESTO EFFETTO.

La **lunghezza del cammino ottico** di un campione viene calcolata come segue:

$$\text{Cammino ottico}_{\text{Campione}} = (A_{TW} - A_{RW}) / (A_{\text{Acqua}}) * 1 \text{ cm}$$

A_{TW} = Assorbimento del campione acquoso alla lunghezza d'onda di test

A_{TW} = Assorbimento del campione acquoso alla lunghezza d'onda di riferimento

A_{Acqua} = A_{TW} meno A_{RW} dell'acqua in una cuvetta da 1 cm (= fattore di correzione)

Il cammino ottico calcolato è infine utilizzato per correggere l'assorbanza del campione (A_{Campione}) alla lunghezza d'onda specifica del colore a 1 cm ($A_{\text{CampioneCorretto}}$):

$$A_{\text{CampioneCorretto}} = A_{\text{Campione}} / \text{Cammino ottico}_{\text{Campione}}$$

2.5.6 Sistema di rilevamento della luminescenza

Il sistema di rilevamento della luminescenza del lettore Infinite è costituito dai seguenti componenti:

- Ottica di luminescenza
- Unità di rilevamento (PMT per il conteggio del singolo fotone)

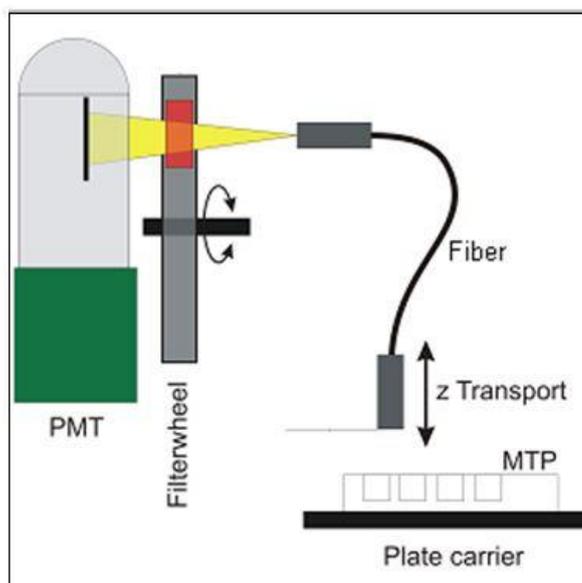


Figura 15: Luminescenza del sistema ottico

Il fascio di fibra a luminescenza guida la luce dal campione fino all'unità di rilevamento (PMT) attraversando una ruota portafiltri. Il PMT per il conteggio dei fotoni (tubo fotomoltiplicatore) è progettato per applicazioni in chemiluminescenza e bioluminescenza e fornisce un ampio intervallo dinamico. Il rumore eccezionalmente basso e l'elevata sensibilità consentono il rilevamento di livelli di luce molto bassi.

Il software regola automaticamente la posizione Z del fascio di fibre di luminescenza fissato sul supporto dell'ottica, basandosi sul file di definizione piastra selezionato. Poiché la luce viene rifratta sulla superficie del liquido campione, la regolazione della posizione Z consente di massimizzare il rapporto segnale-rumore e di ridurre al minimo la diafonia.

Ottica di luminescenza

Nella modalità di misurazione della luminescenza, il lettore Infinite dispone di una micropiastra a posizione fissa e una testina di misurazione della luminescenza mobile (vedere Figura 15: Luminescenza). Lo spessore della piastra viene definito selezionando nel software il tipo di piastra corrispondente (vedere le Istruzioni per l'uso di i-control).

Fibra

Una fibra di vetro guida la luce dal campione all'unità di rilevamento. La fibra è concepita per misurare le piastre contenenti da 6 a 384 pozzetti.

Ruota portafiltri

Davanti alla finestra del PMT è posta una ruota portafiltri che alloggia i filtri in 6 posizioni diverse e si sposta in corrispondenza del canale di luminescenza richiesto. La sensibilità del sistema di rilevamento rende necessario attenuare la luce con un alto livello di luminescenza; pertanto, la ruota portafiltri può anche posizionare sull'uscita della fibra selezionata un filtro a densità neutra.

Posizione ruota portafiltri	Filtro
Posizione 1	Lumi Verde*
Posizione 2	Lumi Magenta*
Posizione 3	Filtro a densità neutra OD2
Posizione 4	Nessuna attenuazione
Posizione 5	Rosso NB **
Posizione 6	Blu2 NB **

* raccomandata per saggi BRET² e saggi ChromaGlo - Luciferase

** raccomandata per saggi NanoBRET™

Il filtro a densità neutra OD2 attenua la luce ad alta intensità di un fattore 100 (corrispondente a un'assorbanza di 2 OD). I valori risultanti vengono automaticamente ridimensionati per corrispondere ai conteggi al secondo e di conseguenza vengono mostrati nei risultati forniti dal software.

Vedere Figura 16 - Figura 19 per informazioni sugli spettri di trasmissione dei filtri per luminescenza.

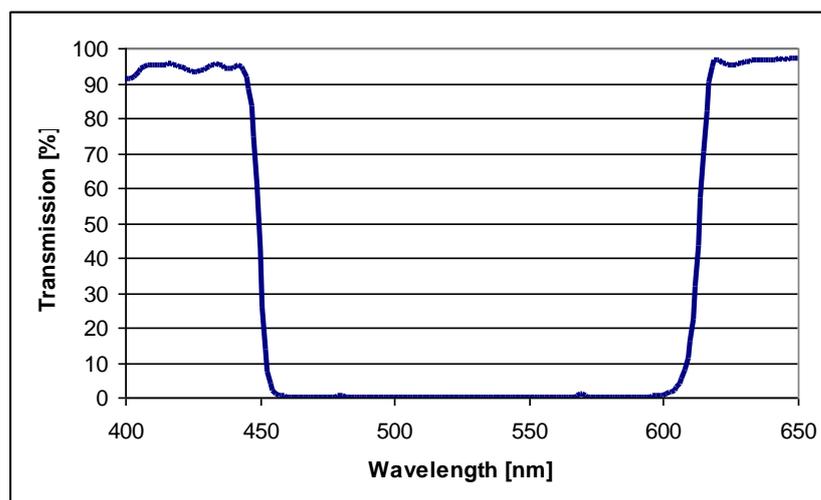


Figura 16: Spettro di trasmissione del filtro **Lumi Magenta**

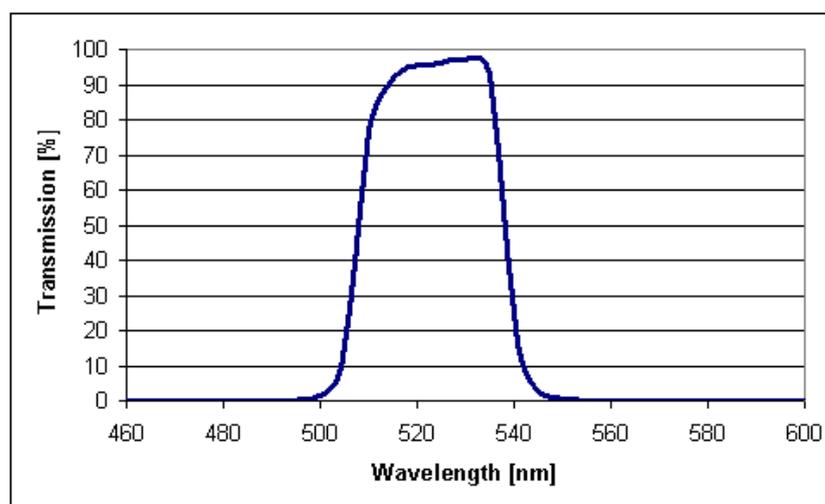


Figura 17: Spettro di trasmissione del filtro **Lumi Verde**

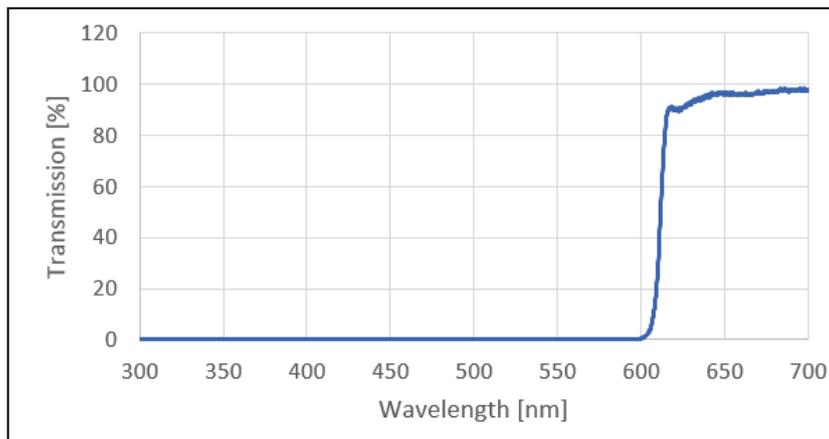


Figura 18: Spettro di trasmissione del filtro **Rosso NB**

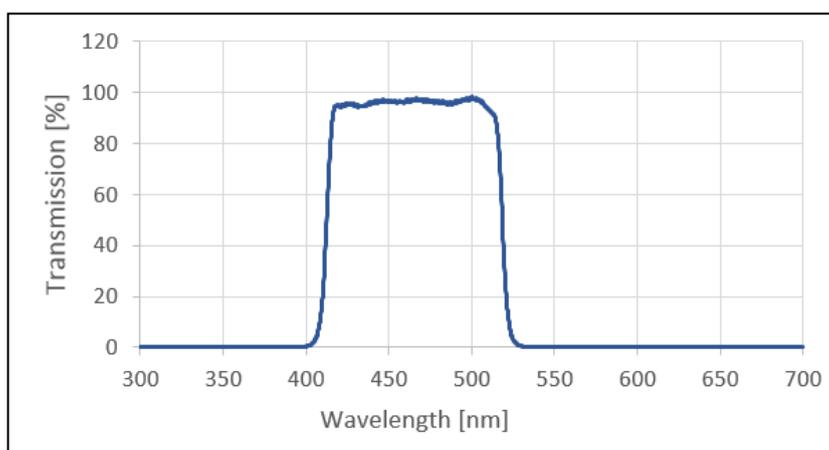


Figura 19: Spettro di trasmissione del filtro **Blu2 NB**

2.5.7 Alloggiamento per cuvetta (modelli Infinite M)

In via opzionale, i modelli Infinite M possono essere dotati di un alloggiamento per cuvetta per le misurazioni dell'assorbanza.

Per misurare l'assorbanza utilizzando l'alloggiamento per cuvetta dei modelli Infinite M, si usa un percorso ottico simile a quello dell'eccitazione di fluorescenza.

Il sistema di misurazione dell'assorbanza si compone di:

- sorgente luminosa
- monocromatore di eccitazione
- modulo di misurazione con cuvetta ad assorbanza
- Modulo per micropiastre ad assorbanza

I condensatori ottici focalizzano la luce sui filtri di eccitazione e poi sulla fenditura di ingresso del monocromatore di eccitazione. A questo punto, un fascio di fibra guida la luce dal monocromatore di eccitazione all'ottica di assorbanza della cuvetta, che focalizza la luce sulla cuvetta. Il modulo di misurazione con cuvetta ad assorbanza è collocato proprio dietro all'alloggiamento della cuvetta. Un fotodiodo al silicio misura la luce trasmessa attraverso il campione. Prima di procedere alla misurazione della cuvetta, viene eseguita una misurazione di riferimento in rapporto all'aria: in questo momento l'alloggiamento per cuvetta si trova al di fuori della traiettoria del fascio di luce.

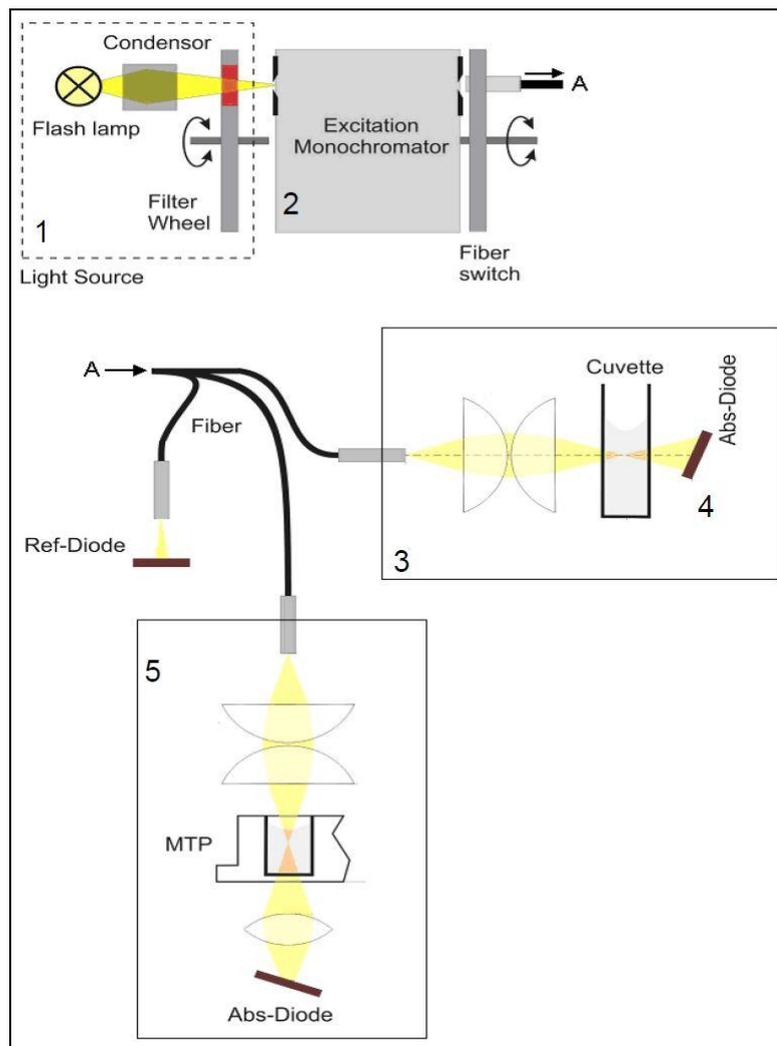


Figura 20: Ottica del modulo di assorbimento dei modelli Infinite M, incluso l'alloggiamento per cuvetta. La figura mostra anche il percorso compiuto dalla luce nel modulo di micropiastre per assorbimento (5).

Per ulteriori dettagli riguardanti la sorgente luminosa (1) e il monocromatore di eccitazione (2) consultare il capitolo 2.4.1 Fluorescenza/A) Intensità di fluorescenza (FI).



Nota

L'alloggiamento per cuvetta è disponibile esclusivamente per i modelli Infinite M. Questa opzione non è disponibile per i modelli Infinite F. Nei modelli Infinite F, è possibile eseguire le misurazioni in cuvetta posizionando un adattatore per cuvette Tecan sul porta-piastre.

Ottica di assorbimento cuvetta

Un fascio di fibra guida la luce dal sistema monocromatore di eccitazione all'ottica di assorbimento della cuvetta.

L'ottica è costituita da una coppia di lenti che focalizzano il fascio di luce sulla cuvetta.

Nel punto focale, il diametro di spot del fascio di luce di assorbimento è di 1,9 mm.

Cuvetta di rilevamento dell'assorbanza

Per la misurazione della luce trasmessa viene usato un fotodiode in silicio, che è sensibile a un'ampia gamma di lunghezze d'onda. Il fotodiode è particolarmente idoneo per i livelli di luce rilevati nelle misurazioni di assorbanza inferiori a 4 OD. I valori misurati che risultano superiori a 4 OD vengono contrassegnati con **OVER** (troppo pieno) nella scheda dei risultati.

Tipi di cuvetta

L'alloggiamento per cuvetta è compatibile con le seguenti cuvette:

Tipo di cuvetta	Larghezza x Profondità	Altezza massima (coperchio incluso)	Volume di riempimento	Esempio
Cuvette standard	12,5 x 12,5 mm	55 mm	2 ml	Hellma 110 QS, 10 mm*
Cuvette semi macro	12,5 x 12,5 mm	55 mm	1 ml	Hellma 108-QS, 10 mm*
Cuvette micro	12,5 x 12,5 mm	55 mm	0,5 ml	Hellma 104.002 QS, 10 mm*
Cuvette ultra-micro	12,5 x 12,5 mm	55 mm	100 µl	Hellma 105.202, 10 mm*

Non è possibile usare cuvette con una finestra di misura < 2 mm (diametro).



CAUTELA

USARE SEMPRE UN VOLUME DI RIEMPIMENTO VALIDO. ASSICURARSI CHE IL LIVELLO DEL LIQUIDO NELLA CUVETTA SUPERI I 20 MM (IN ALTEZZA). SE IL CAMMINO OTTICO DELLA CUVETTA NON È RIEMPITO DI LIQUIDO PER LA SUA INTERA LUNGHEZZA, I RISULTATI DI MISURAZIONE POTREBBERO ESSERE ERRATI.



CAUTELA

L'ALLOGGIAMENTO PER CUVETTA DEI MODELLI INFINITE M NON È ADATTO A CUVETTE CON UNA FINESTRA DI MISURAZIONE < 2 MM (DIAMETRO) E UN'ALTEZZA CENTRALE INFERIORE A 15 MM.

* Hellma GmbH & Co. KG, Germania; www.hellma-worldwide.com

Inserimento della cuvetta

Il supporto della cuvetta è fissato saldamente al porta-cuvetta e consente di inserire ed estrarre la cuvetta. Il porta-cuvetta è parte integrante dello strumento e non può essere rimosso.

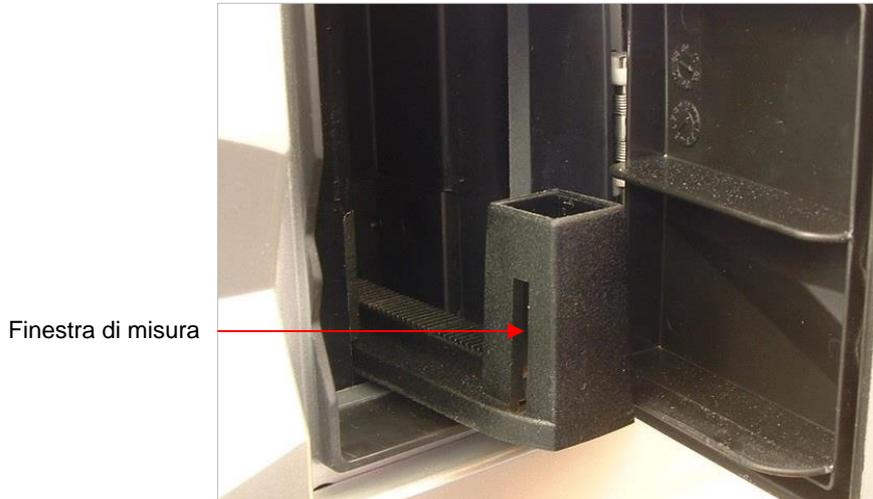


Figura 21: Alloggiamento per cuvetta dei modelli Infinite M

La cuvetta va inserita in modo tale che la finestra di misura della cuvetta si allinei con la finestra di misura del supporto della cuvetta:

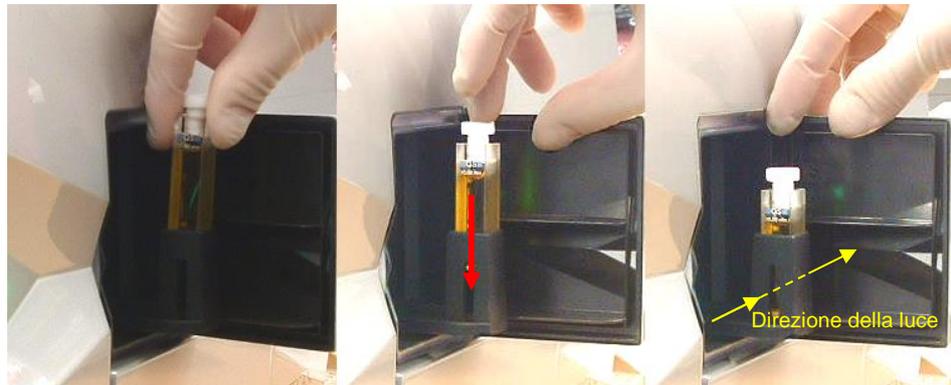


Figura 22: Come inserire la cuvetta nel suo supporto

3. Installazione

3.1 Disimballaggio e ispezione

La confezione ricevuta alla consegna contiene i seguenti componenti:

- CAVO USB 2.0 A/B 1,8 m nero con custodia in ferrite
- Supporto di memorizzazione del software per i modelli Infinite F/Infinite M
- Rapporto di qualità OOB (Out-Of-Box)
- Dispositivo di fermo per il trasporto (montato)
- Istruzioni per l'uso
- Protocollo di test finale

La confezione dei modelli Infinite F include inoltre i seguenti componenti:

- Scatola degli accessori
- Anello di bloccaggio dei filtri (8)
- Attrezzo per l'assemblaggio dei filtri
- Pinzette in plastica
- Slitta portafiltri

L'imballaggio del modulo iniettore per 1 iniettore contiene i seguenti componenti:

- Supporto flaconi
- Becher per riempimento iniziale
- Flacone da 125 ml marrone
- Iniettore dummy (montato)
- Vaschetta degli scarti
- Flacone da 15 ml

Il secondo iniettore include i seguenti componenti:

- Supporto flaconi
- Becher per riempimento iniziale
- Vaschetta degli scarti
- Flacone da 15 ml



CAUTELA

IL LETTORE INFINITE È STATO TESTATO CON IL CAVO USB INCLUSO NELLA FORNITURA. TECAN AUSTRIA NON PUÒ GARANTIRE IL CORRETTO FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO IN CASO DI UTILIZZO DI UN CAVO USB DIFFERENTE.

3.1.1 Procedura di disimballaggio

1. Prima di procedere all'apertura, ispezionare visivamente la confezione per verificare che non sia danneggiata.
Segnalare immediatamente la presenza di danni.
2. Per l'installazione dello strumento, scegliere una superficie piana, orizzontale, non soggetta a vibrazioni, al riparo dalla luce diretta del sole e priva di polvere, solventi e vapori acidi. Lasciare almeno 10 cm di distanza tra la parte posteriore dello strumento e la parete o altri eventuali dispositivi. Assicurarsi che non vi sia il rischio di urti accidentali quando il porta-piastre è estratto dallo strumento. Assicurarsi che l'interruttore di rete e il cavo di rete siano sempre accessibili e liberi da ostruzioni.

3. Mettere la confezione in posizione verticale e aprirla.
4. Estrarre lo strumento dalla confezione e collocarlo nella posizione scelta.
Estrarre lo strumento con cura assicurandosi che sia tenuto da entrambi i lati.
5. Ispezionare visivamente lo strumento per individuare l'eventuale presenza di componenti allentati, piegati o rotti.
Segnalare immediatamente la presenza di danni.
6. Confrontare il numero di serie impresso sul pannello posteriore dello strumento con il numero di serie della bolla d'accompagnamento.
Segnalare senza indugio l'eventuale presenza di divergenze.
7. Controllare che siano presenti tutti gli accessori indicati nella bolla d'accompagnamento.
8. Conservare il materiale di imballaggio e i fermi (vedere sezione successiva) per un eventuale trasporto futuro.



ATTENZIONE

IL LETTORE INFINITE È UNO STRUMENTO DI PRECISIONE E, COMPLETO DI TUTTI GLI ACCESSORI, PESA CIRCA 16 KG.



CAUTELA

IL COPERCHIO DEL LETTORE INFINITE PUÒ SOPPORTARE UN CARICO MASSIMO DI 16 KG, TUTTAVIA IL CARICO DEVE ESSERE DISTRIBUITO UNIFORMEMENTE SULL'INTERA SUPERFICIE DEL COPERCHIO.



CAUTELA

IL CARICO MASSIMO DEL PORTA-PIASTRE È DI 100 G. UN CARICO SUPERIORE PUÒ CAUSARE DANNI ALLO STRUMENTO CON CONSEGUENTE NECESSITÀ DI INTERVENTI DI RIPARAZIONE.



CAUTELA

LASCIARE ALMENO 10 CM DI DISTANZA TRA LA PARTE POSTERIORE DELLO STRUMENTO E LA PARETE O ALTRI EVENTUALI DISPOSITIVI.



CAUTELA

LO STRUMENTO DEVE ESSERE POSTO AL RIPARO DALLA LUCE DIRETTA DEL SOLE. UN'ILLUMINAZIONE SUPERIORE A 500 LUX PUÒ COMPROMETTERE I RISULTATI DELLE MISURAZIONI DI LUMINESCENZA.

3.2 Rimozione dei fermi per il trasporto



CAUTELA

RIMUOVERE I FERMI PRIMA DI UTILIZZARE LO STRUMENTO.

Lo strumento viene fornito con il porta-piastre bloccato in posizione, in modo da evitare che si danneggi. Prima di poter utilizzare lo strumento, è necessario rimuovere i fermi per il trasporto attenendosi alla seguente procedura:

1. Assicurarsi che lo strumento sia scollegato dall'alimentazione di rete.
2. Aprire lo sportello del vano porta-piastre.
3. Rimuovere le viti ed estrarre il porta-piastre manualmente.



4. Rimuovere le viti dai fermi per il trasporto.



5. Rimuovere i fermi dal porta-piastre.



6. Conservare i fermi per un eventuale trasporto futuro.



CAUTELA

CONSERVARE IL MATERIALE DI IMBALLAGGIO E I FERMI PER UN EVENTUALE TRASPORTO FUTURO. IL LETTORE INFINITE DEVE ESSERE SPEDITO SOLO CON L'IMBALLAGGIO ORIGINALE E I FERMI INSTALLATI.

3.3 Trasporto e stoccaggio

3.3.1 Trasporto

Il lettore Infinite deve essere spedito esclusivamente nell'imballaggio originale e con i fermi installati. Prima di essere spedito, lo strumento deve essere accuratamente disinfettato (vedere 7.4 Disinfezione dello strumento).

3.3.2 Stoccaggio

Prima di procedere allo stoccaggio dello strumento, è necessario sciacquare gli iniettori seguendo una procedura di lavaggio (vedere 4.10.1 Riempimento iniziale e lavaggio del lettore Infinite). Per lo stoccaggio dello strumento, scegliere una superficie piana, orizzontale, non soggetta a vibrazioni, al riparo dalla luce diretta del sole e priva di polvere, solventi e vapori acidi.

Specifiche per lo stoccaggio

Temperatura	da - 20 °C a 60 °C	da -4 °F a 140 °F
Umidità relativa	< 80 % senza formazione di condensa	

3.4 Requisiti di alimentazione

Lo strumento si adatta in automatico alla tensione di alimentazione, pertanto non è necessario apportare modifiche all'intervallo di tensione. Controllare le specifiche di tensione sul pannello posteriore dello strumento e assicurarsi che la tensione fornita allo strumento sia corretta rispetto alle specifiche.

L'intervallo di tensione corrisponde a 100-120/220-240 V.

Se la tensione non è corretta, rivolgersi al proprio distributore.



CAUTELA

NON UTILIZZARE LO STRUMENTO SE L'IMPOSTAZIONE DELLA TENSIONE NON È CORRETTA. IN CASO CONTRARIO, ALL'ACCENSIONE LO STRUMENTO RIMARRÀ DANNEGGIATO.



AVVERTENZA

LE ISTRUZIONI RIPORTATE NEL PRESENTE DOCUMENTO VANNO SEGUITE IN MODO SCRUPOLOSO. IN CASO CONTRARIO, POTREBBE VERIFICARSI UN DANNEGGIAMENTO DELLO STRUMENTO O UN'ESECUZIONE SCORRETTA DELLA PROCEDURA, E LA SICUREZZA DELLO STRUMENTO NON SAREBBE PIÙ GARANTITA.

3.5 Accensione dello strumento



CAUTELA

DOPO L'INSTALLAZIONE E PRIMA DI ACCENDERE LO STRUMENTO PER LA PRIMA VOLTA, LASCIARLO A RIPOSO PER ALMENO 3 ORE, IN MODO DA EVITARE LA FORMAZIONE DI CONDENSA E IL RISCHIO DI CORTOCIRCUITI.

1. Assicurarsi che il computer sia spento (OFF) e che l'interruttore dell'alimentazione di rete situato sul pannello posteriore dello strumento sia in posizione OFF.
2. Collegare il computer allo strumento utilizzando il cavo di interfaccia USB fornito.
3. Inserire il cavo di alimentazione nella presa di alimentazione di rete (dotata di messa a terra) situata sul pannello posteriore dello strumento.
4. Tutti i dispositivi collegati devono essere approvati ed elencati come da IEC 60950-1 (Direttiva sulla sicurezza delle apparecchiature per la tecnologia dell'informazione) o in conformità alle norme locali equivalenti.
5. Accendere lo strumento utilizzando l'interruttore di alimentazione di rete situato sul pannello posteriore dello strumento.



CAUTELA

IL LETTORE INFINITE È STATO TESTATO CON IL CAVO USB INCLUSO NELLA FORNITURA. TECAN AUSTRIA NON PUÒ GARANTIRE IL CORRETTO FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO IN CASO DI UTILIZZO DI UN CAVO USB DIFFERENTE.



CAUTELA

NON SOSTITUIRE I CAVI DI ALIMENTAZIONE SCOLLEGABILI CON CAVI DALLE CARATTERISTICHE NON IDONEE.

4. Utilizzo dello strumento

4.1 Introduzione

Il funzionamento del lettore Infinite è affidato a un software di comando installato su personal computer. È possibile utilizzare il software **i-control** o **Magellan** per l'interfaccia utente. Per ulteriori dettagli, vedere le relative Istruzioni per l'uso del software. Questa breve introduzione è intesa a fornire un quadro generale dei parametri e del funzionamento dello strumento. Include suggerimenti su come ottimizzare i parametri dello strumento in base alle applicazioni utilizzate.

È stato fatto tutto il possibile per garantire un funzionamento corretto dello strumento anche nel caso in cui i parametri predefiniti non siano appropriati per una particolare applicazione, con un'importante eccezione:



CAUTELA

AL MOMENTO DI INSERIRE UNA MICROPIASTRA NEL PORTA-PIASTRE, ASSICURARSI SEMPRE CHE NEL SOFTWARE SIA STATO SELEZIONATO IL CORRETTO FILE DI DEFINIZIONE PIASTRA (ALTEZZA DELLA PIASTRA) PRIMA DI PROSEGUIRE.

L'ALTEZZA MASSIMA DELLA PIASTRA È DI 23 MM (COMPRESO IL COPERCHIO).



CAUTELA

PRIMA DI AVVIARE LE MISURAZIONI, ACCERTARSI CHE LA POSIZIONE A1 DELLA MICROPIASTRA SIA INSERITA CORRETTAMENTE. IL POZZETTO A1 DEVE TROVARSI IN ALTO A SINISTRA.



CAUTELA

SE IL PORTA-PIASTRE È MOLTO SPORCO, IL MECCANISMO A MOLLA POTREBBE NON FUNZIONARE CORRETTAMENTE E CAUSARE UN POSIZIONAMENTO ERRATO. RIVOLGERSI AL CENTRO DI ASSISTENZA LOCALE.



CAUTELA

NELL'UTILIZZARE IL LETTORE INFINITE, OPERARE SEMPRE IN CONFORMITÀ ALLE LINEE GUIDA GLP (GOOD LABORATORY PRACTICE - BUONA PRATICA DI LABORATORIO).



CAUTELA

SULLA PARTE RETROSTANTE DEL LETTORE INFINITE È PRESENTE UNA VENTOLA CHE ASPIRA L'ARIA. IL FILTRO DELL'ARIA DEVE ESSERE CONTROLLATO OGNI 4 SETTIMANE E VA SOSTITUITO SE SPORCO. IL FILTRO DELL'ARIA VA SOSTITUITO OGNI 6 MESI.

4.2 Caratteristiche operative generali

Il lettore Infinite dispone di alcune funzioni e opzioni generali, che non sono associate a una tecnica di misurazione specifica.

4.2.1 Avviamento dello strumento

Prima di accendere lo strumento, verificare che il cavo di interfaccia USB sia collegato.

Accensione dello strumento

L'accensione dello strumento non comporta alcuna procedura di inizializzazione.

Collegamento allo strumento

Quando il software si collega allo strumento, viene stabilita una comunicazione tra lo strumento e l'interfaccia utente.

I passaggi sono i seguenti:

- Inizializzazione delle ruote portafiltri OS (solo modelli M).
- Inizializzazione della ruota portafiltri di luminescenza.
- Inizializzazione del meccanismo di posizionamento Z dell'ottica di luminescenza.
- Inizializzazione del porta-piastre.
(Il porta-piastre non viene estratto automaticamente).
- Vengono visualizzate le versioni correnti di firmware e software.
- Lo strumento è pronto per l'uso.

4.3 Opzioni generali

Le seguenti opzioni possono essere selezionate indipendentemente dalla tecnica di misurazione applicata.



Nota

Per mantenere la temperatura a un livello costante e garantire una condizione termica uniforme su tutta la piastra, è necessario che quest'ultima venga inserita in posizione di incubazione.

Se durante la fase di agitazione viene utilizzata la funzione di riscaldamento, la temperatura può variare leggermente.

Controllo della temperatura

Alcuni saggi richiedono una temperatura di esercizio ben precisa. Il lettore Infinite può impostare una temperatura specifica all'interno di un intervallo specifico, garantire una condizione termica uniforme su tutta la piastra e mantenere la temperatura costante e al di sopra della temperatura ambiente. Le ventole di raffreddamento principali interrompono la ventilazione.

Per riscaldare la camera di misurazione è necessario del tempo. Osservare la schermata relativa al controllo della temperatura. Se non viene incubata esternamente, lasciare che la micropiastra si stabilizzi prima di avviare la misurazione.

Intervallo di temperature: da 5 °C sopra la temperatura ambiente a 42 °C

Misurazioni cinetiche

Il software i-control consente di effettuare misurazioni ripetute di una piastra a intervalli di tempo regolari. L'intensità del segnale di fluorescenza può ridursi notevolmente in un arco di tempo più lungo, soprattutto se si usano piccoli volumi. In base alla quantità di liquido evaporato, il menisco si posizionerà più in basso, compromettendo leggermente la messa a fuoco. Solitamente i pozzetti posti negli angoli evaporano più rapidamente, seguono quelli ai bordi della micropiastra. Nelle misurazioni di fluorescenza, la diminuzione del segnale può anche derivare dal fenomeno noto come photobleaching (fotodecadimento).

Agitazione micropiastra

Il lettore Infinite consente di utilizzare due modalità di agitazione: lineare e orbitale. L'ampiezza di agitazione è compresa tra 1 e 6 mm a incrementi di 0,5 mm. La frequenza è una funzione dell'ampiezza. La durata dell'agitazione è compresa tra 1 e 1.000 secondi.

Multi-etichettatura

Il software **i-control** offre una funzione base di multi-etichettatura. È possibile modificare fino a quattro serie di parametri dello strumento. Le corrispondenti misurazioni della piastra saranno eseguite nell'ordine selezionato. Ad esempio, se si usano più etichette fluorescenti, è possibile selezionare diverse combinazioni di filtri. È possibile impostare una misurazione multi-etichettatura utilizzando una striscia piastra con/senza una **parte della piastra** e fino a 10 strisce di misurazione (lunghezza d'onda fissa di assorbanza, scansione di assorbanza, intensità di fluorescenza, scansione dell'intensità di fluorescenza, luminescenza).

4.4 Definizione delle slitte portafiltri (modelli Infinite F)

4.4.1 Informazioni sui filtri

Filtri per fluorescenza

I filtri ottici (di tipo passa-banda) posti in una slitta portafiltri sono appositamente progettati per le misurazioni di fluorescenza. I valori di reiezione di banda e larghezza di banda dei filtri di fluorescenza sono ottimizzati per ottenere il massimo grado di sensibilità.

Rivolgersi a TECAN per informazioni in merito a filtri diversi da quelli forniti con le slitte portafiltri.

Filtri d'assorbanza

Solitamente i filtri passa-banda usati per eseguire le misurazioni dell'assorbanza con i lettori di micropiastre hanno una larghezza di banda di 10 nm. Pertanto, non è consigliabile utilizzare filtri di fluorescenza per le misurazioni dell'assorbanza, in quanto la larghezza di banda (FWHM) è generalmente superiore a 10 nm. Ciò potrebbe causare un errore nel rilevamento del segnale luminoso o restituire valori di OD bassi durante la misurazione di coloranti con picchi stretti.

4.4.2 Slitta portafiltri e orientamento dei filtri

Slitta portafiltri

La slitta portafiltri del modello Infinite F include una componente di eccitazione e una di emissione. La slitta portafiltri consente all'utente di operare con quattro coppie di filtri di eccitazione/emissione indipendenti, che possono essere impostati sulle posizioni 1 e 4. Le informazioni relative ai filtri inseriti vengono salvate sul microchip integrato.

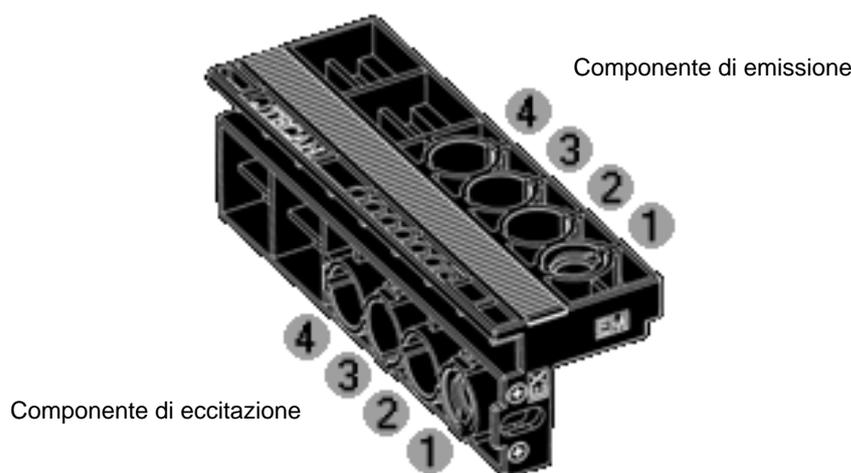


Figura 23: Modelli Infinite F: Slitta dei filtri

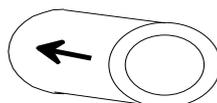
Tipi di filtri



CAUTELA

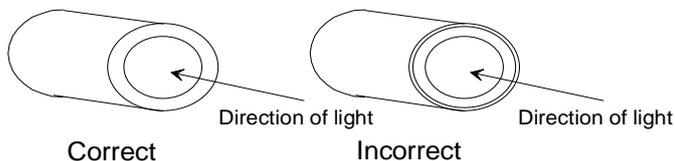
ESISTONO DUE TIPI DI FILTRO. PER ENTRAMBI I TIPI, È IMPORTANTE CHE LA LUCE CHE ATTRAVERSA IL FILTRO VIAGGI NELLA GIUSTA DIREZIONE. PRIMA DI INSERIRE UN NUOVO FILTRO, PRESTARE LA MASSIMA ATTENZIONE AL TIPO DI FILTRO E ALLA DIREZIONE DELLA LUCE CHE ATTRAVERSA LA SLITTA PORTAFILTRI.

Filtri con freccia sul lato:



La luce deve viaggiare nella direzione indicata dalla freccia.

Filtri senza freccia sul lato:



L'estremità del filtro con bordo scanalato in metallo deve essere rivolta verso il lato opposto rispetto alla sorgente luminosa.

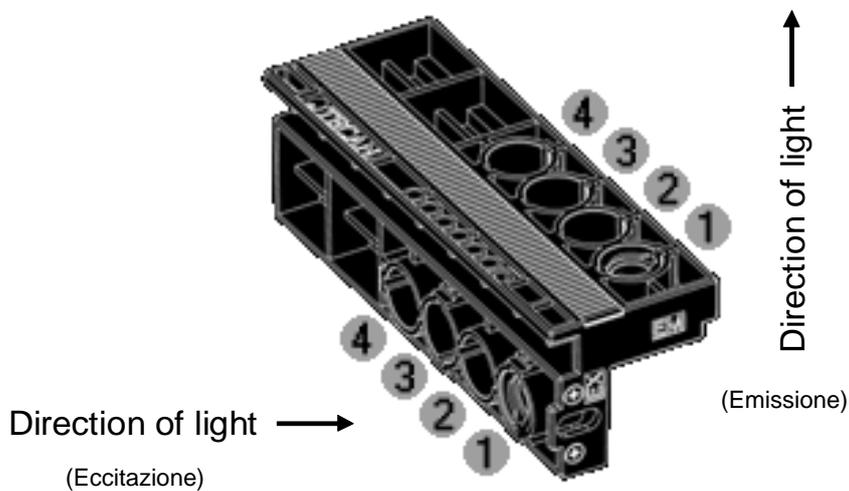


Figura 24: Modelli Infinite F: Slitta portafiltri - Direzione della luce

Posizione dei filtri polarizzatori



Nota

Per le misurazioni della polarizzazione di fluorescenza effettuate con Infinite F Plex, sono necessari due filtri identici di eccitazione e di emissione, da abbinare ai polarizzatori nelle posizioni 1 e 2 o 3 e 4.

La slitta portafiltri del lettore Infinite F Plex può essere equipaggiata con un massimo di due diverse coppie di filtri polarizzatori di fluorescenza, poiché ogni misurazione della polarizzazione di fluorescenza richiede due identici filtri di eccitazione e di emissione, che vengono abbinati ai polarizzatori nelle posizioni 1 e 2 o 3 e 4.

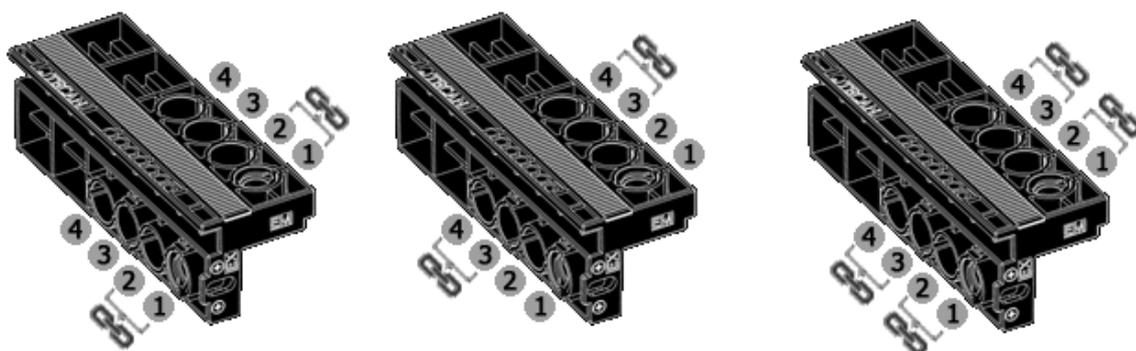


Figura 25: Infinite F Plex: Slitta portafiltri e posizioni dei filtri polarizzatori di fluorescenza e dei polarizzatori.

4.4.3 Installazione di un filtro personalizzato

Per l'installazione di un nuovo filtro, utilizzare l'attrezzo di assemblaggio filtri contenuto nella cassetta degli accessori. Per l'installazione dei polarizzatori, utilizzare le pinzette in plastica morbida.

Rimozione del filtro

Allineare l'attrezzo di assemblaggio alla tacca dell'anello di arresto. Ruotare l'attrezzo e rimuovere l'anello di arresto estraendolo dal vano filtro.



Anello di arresto

Capovolgere il porta-filtro per far scivolare il filtro fuori dal vano filtro. Non utilizzare l'attrezzo di assemblaggio filtri per la rimozione dei filtri.

Montaggio di un filtro personalizzato

L'inserimento di un nuovo filtro (e polarizzatore) nella slitta deve essere effettuato come indicato di seguito.



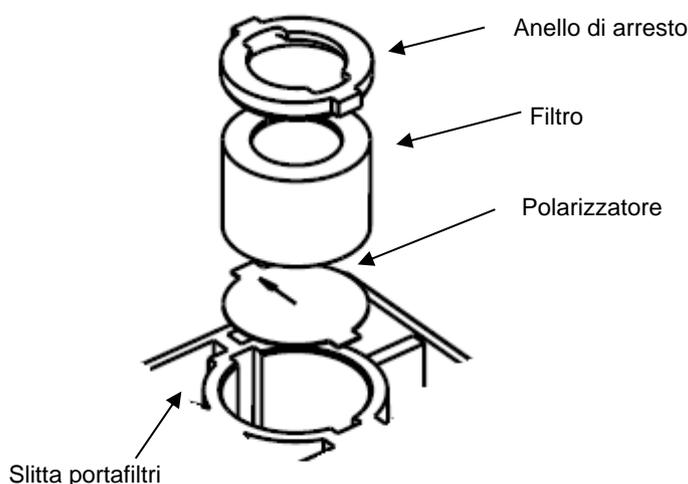
Nota

Assicurarsi che i filtri siano inseriti correttamente (vedere Tipi di filtri). Per garantire il buon funzionamento dello strumento, gli anelli di arresto vanno riutilizzati non più di 5 volte.



CAUTELA

FARE ATTENZIONE A INSERIRE I POLARIZZATORI E I FILTRI NELLA SLITTA PORTAFILTRI QUANDO SI ESEGUE LA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA.



CAUTELA

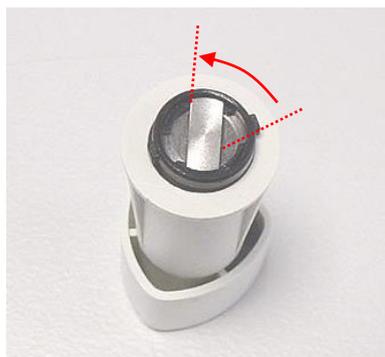
I FILTRI SONO COMPONENTI OTTICI DI PRECISIONE, PER CUI È NECESSARIO MANEGGIARLI PRENDENDOLI DAI LATI, BISOGNA FARE ATTENZIONE A NON GRAFFIARLI E NON VANNO CONSERVATI A FACCIA IN GIÙ IN UN CASSETTO. UNA VOLTA INSTALLATI NELLA SLITTA, I FILTRI SONO RELATIVAMENTE BEN PROTETTI, MA BISOGNA ADOTTARE LA MASSIMA CAUTELA NEL MANEGGIARLI O CONSERVARLI.

Per installare un filtro personalizzato, attenersi alla seguente procedura:

Se necessario, inserire delicatamente un polarizzatore sul lato di eccitazione ed emissione della slitta portafiltri utilizzando delle pinzette, facendo attenzione a non graffiarlo e a non lasciare impronte su di esso.

Inserire delicatamente il filtro nell'apertura, facendo attenzione a non graffiarlo e a non lasciare impronte sul filtro.

Collocare l'anello di arresto all'estremità dell'attrezzo di assemblaggio del filtro e ruotarlo in modo che non si sganci.



Attrezzo di assemblaggio filtri
con anello di arresto

Utilizzando l'attrezzo di assemblaggio filtri, spingere l'anello di arresto nel vano filtro e premerlo con decisione fino a portarlo in posizione.

Ruotare l'attrezzo fino a che la tacca dell'anello di arresto risulti allineata con l'estremità dell'attrezzo stesso, quindi rimuovere l'attrezzo.

Se dopo l'inserimento dei filtri richiesti alcune aperture rimangono inutilizzate (ad es. la parte di emissione di un filtro d'assorbanza), è necessario montare dei filtri dummy nei fori ancora aperti.

4.4.4 Definizione filtri



CAUTELA

QUALSIASI MODIFICA AI FILTRI INSERITI NELLA SLITTA DEVE ESSERE EFFETTUATA DA PERSONALE ADEGUATAMENTE FORMATO!

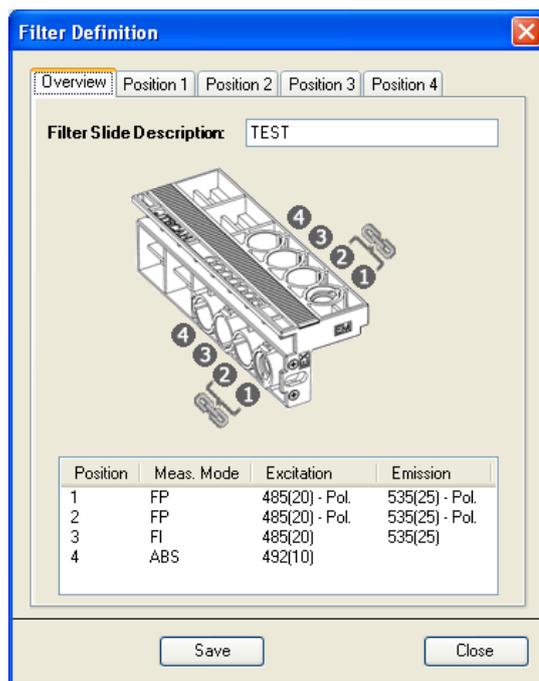
LO STRUMENTO È IN GRADO DI RICONOSCERE SLITTE PORTAFILTRI CUI CORRISPONDONO IMPOSTAZIONI PREDEFINITE, PER CUI SI SCONSIGLIA DI TENTARE DI MODIFICARE I VALORI RELATIVI AI FILTRI.

TUTTAVIA, SE I FILTRI NELLA SLITTA SONO STATI CAMBIATI (DA UN TECNICO DELL'ASSISTENZA) O SE SI VUOLE UTILIZZARE UNA NUOVA SLITTA PERSONALIZZATA E PRIVA DI IMPOSTAZIONI PREDEFINITE, È NECESSARIO PROVVEDERE ALLA DEFINIZIONE DELLA SLITTA PORTAFILTRI.*

***A SECONDA DELLA FREQUENZA DI UTILIZZO E DELLE CONDIZIONI AMBIENTALI, I FILTRI OTTICI POSSONO DETERIORARSI NEL TEMPO E AVERE UNA DURATA LIMITATA.**

Per definire un filtro (una coppia di filtri), procedere come illustrato qui di seguito:
Selezionare l'opzione Filter Definitions (Definizione filtri) dal menu Settings (Impostazioni).

Comparirà una finestra di dialogo che mostra una scheda riepilogativa e quattro schede in cui impostare la definizione dei filtri:



Overview (Panoramica): La scheda Overview riporta i dati relativi alla slitta portafiltri attualmente in uso.

Filter Slide Description (Descrizione della slitta portafiltri): In questo campo è possibile inserire la descrizione della slitta portafiltri, altrimenti la descrizione sarà generata automaticamente.



Nota

Per la descrizione della slitta portafiltri non è consentito l'uso di caratteri speciali (spazio, ?, \$, %, ,, /, ecc.), ad eccezione del carattere _.



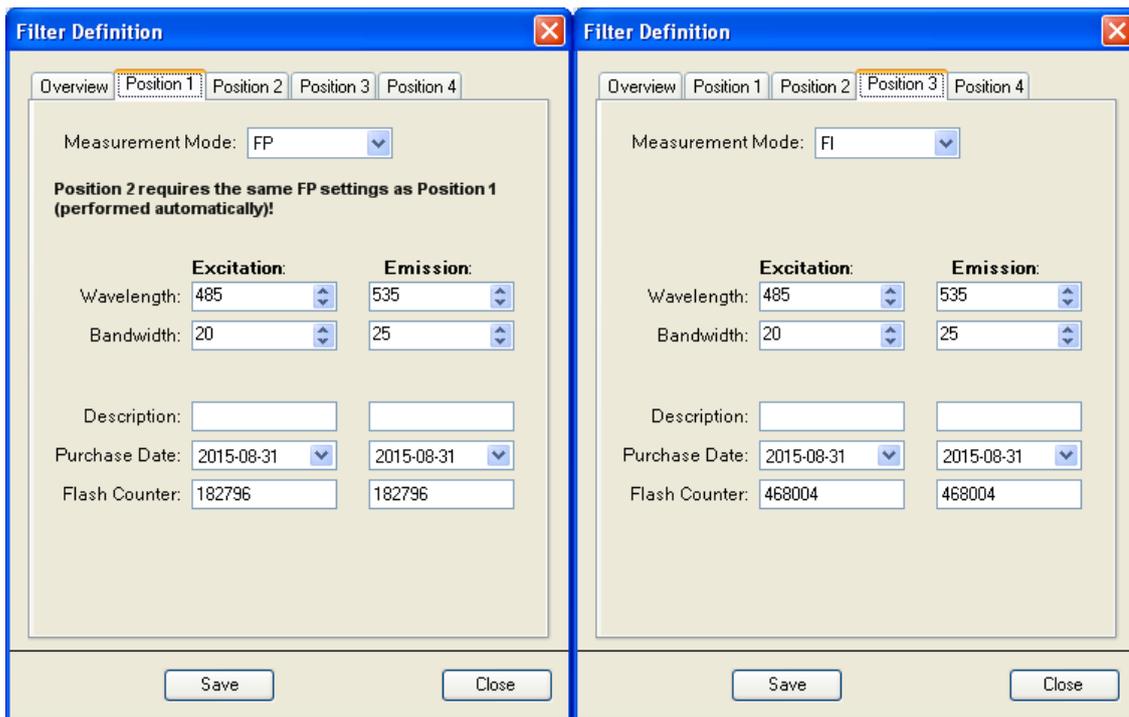
CAUTELA

LA DESCRIZIONE DELLA SLITTA PORTAFILTRI È PARTE DEL VALORE CHIAVE FATTORE G. IN CASO DI INSERIMENTO MANUALE, EVITARE DI USARE LA STESSA DESCRIZIONE PER LE DIVERSE SLITTE PORTAFILTRI.

Posizione 1 - 4: Editor della definizione filtri per i filtri inseriti nelle posizioni 1, 2, 3 e 4.

Selezionare la posizione appropriata per i filtri e inserire la nuova lunghezza d'onda, larghezza di banda e modalità di misurazione per ciascun nuovo filtro:

Measurement Mode (modalità di misurazione): selezionare dall'elenco a tendina **FI** per l'intensità di fluorescenza, **ABS** per l'assorbanza, **FP** per la polarizzazione di fluorescenza e **Empty (vuoto)** per le posizioni senza filtro



Filter Definition (Position 1 selected)

Measurement Mode: FP

Position 2 requires the same FP settings as Position 1 (performed automatically)!

	Excitation:	Emission:
Wavelength:	485	535
Bandwidth:	20	25
Description:		
Purchase Date:	2015-08-31	2015-08-31
Flash Counter:	182796	182796

Buttons: Save, Close

Filter Definition (Position 3 selected)

Measurement Mode: FI

	Excitation:	Emission:
Wavelength:	485	535
Bandwidth:	20	25
Description:		
Purchase Date:	2015-08-31	2015-08-31
Flash Counter:	468004	468004

Buttons: Save, Close



Nota

Nella modalità di polarizzazione di fluorescenza, il filtro in Posizione 1 deve avere le stesse impostazioni del filtro in Posizione 2 e viceversa. Nella modalità di polarizzazione di fluorescenza, il filtro in Posizione 3 deve avere le stesse impostazioni del filtro in Posizione 4 e viceversa. Queste impostazioni sono automatiche.



CAUTELA

ASSICURARSI CHE LA SLITTA PORTAFILTRI CONTENGA I POLARIZZATORI, OLTRE CHE I FILTRI DEFINITI PER LA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA.

Wavelength (lunghezza d'onda): Inserire la lunghezza d'onda del filtro selezionandola dal seguente intervallo:

- (1) Modalità intensità di fluorescenza: da 230 a 850 nm (eccitazione) e da 280 a 850 nm (emissione)
- (2) Polarizzazione di fluorescenza: da 300 a 850 nm (eccitazione) e da 330 a 850 nm (emissione)
- (3) Modalità assorbanza: da 230 a 1000 nm

Larghezza di banda: inserire la larghezza di banda (nm) del filtro

(4) Confermare i nuovi valori dei filtri facendo clic su **Save (Salva)**. Una volta chiusa la finestra di dialogo Filter Definition (Definizione filtri), il sistema è pronto a raccogliere dati con i nuovi filtri.

Description (Descrizione): In questo campo l'utente può inserire le proprie note concernenti il filtro, ad es. nome del filtro, applicazione, ecc.



Nota

Per la descrizione della slitta portafiltri non è consentito l'uso di caratteri speciali (spazio, ?, \$, %, ., /, ecc.), ad eccezione del carattere _.

Purchase Date (Data di acquisto): In questo campo l'utente può inserire la data di acquisto o di installazione del filtro.

Flash Counter (Contatore di flash): Monitora il numero di flash che attraversano il filtro. Il numero indicato dal contatore di flash fornisce all'utente soltanto delle informazioni supplementari riguardo al filtro in uso. Questo numero viene salvato sul microchip della slitta portafiltri, insieme ad altre informazioni sul filtro.

Quando il filtro viene sostituito, queste informazioni vanno perse, a meno di annotare manualmente l'ultimo numero indicato dal contatore di flash.

Quando si installa un filtro nuovo, il contatore deve essere impostato su 0. Se il filtro è usato, inserire l'ultimo numero di flash conteggiato dal contatore, se disponibile.

**CAUTELA**

SI CONSIGLIA DI ANNOTARE L'ULTIMO NUMERO DI FLASH INDICATO DAL CONTATORE PRIMA DI SOSTITUIRE UN FILTRO, ALTRIMENTI LE INFORMAZIONI ANDRANNO PERSE.

**CAUTELA**

INSERIRE LA SLITTA PORTAFILTRI SOLO SE LO STRUMENTO È ACCESO E COLLEGATO.

4.5 Ottimizzazione delle misurazioni di fluorescenza

I risultati delle misurazioni di fluorescenza possono essere ottimizzati sia regolando i parametri dello strumento, sia selezionando i materiali appropriati.

4.5.1 Parametri dello strumento

Impostazione del guadagno

Il sistema di rilevamento della fluorescenza dei lettori Infinite si basa su un metodo di conversione analogico-digitale (DAC: convertitore digitale/analogico) del segnale PMT. L'impostazione del guadagno regola l'amplificazione del segnale PMT durante la conversione della radiazione fluorescente in corrente elettrica. Per assicurare la linearità e un corretto rapporto segnale-rumore (S/N), il DAC necessita di un adeguato intervallo di corrente PMT in ingresso. Pertanto, il guadagno deve essere impostato in modo tale che le letture dei pozzetti a concentrazione più alta risultino il più precise possibile. A seguire, le letture dei pozzetti a concentrazione più bassa si separano dallo sfondo, per quanto lo consenta il livello del rumore di fondo.



Nota

Se a uno dei pozzetti interessati è assegnato OVER (overflow - traboccamento), è possibile ridurre manualmente il guadagno o selezionare un'opzione di guadagno automatico (vedere le Istruzioni per l'uso del software).

Proprietà del PMT

È possibile selezionare il guadagno dell'intensità di fluorescenza in un intervallo compreso tra 1 e 255. Le prestazioni del PMT dipendono dalla tensione di alimentazione. I PMT del lettore Infinite hanno una tensione nominale compresa tra 300 e 1250 V. Il rapporto tra le impostazioni del guadagno del lettore Infinite e l'alimentazione di tensione è descritto nella Equazione 1. La destinazione d'uso del PMT del lettore Infinite prevede un'impostazione del guadagno compresa tra 60 e 255. È possibile selezionare impostazioni di guadagno inferiori a 60, ma il PMT non è progettato per tensioni di alimentazione inferiori a 300 V, pertanto Tecan non si assume alcuna responsabilità per quanto riguarda i risultati di misurazioni effettuate con il lettore Infinite in base a impostazioni del guadagno inferiori a 60.

$$U = \frac{\text{Gain}}{255} * 1250 \text{ V}$$

Equazione 1:

Dove U è la tensione, Gain è l'impostazione del guadagno selezionata, 255 è il massimo guadagno possibile e 1250 V è la massima tensione di alimentazione del PMT.

Esempio:

Un guadagno pari a 100 corrisponde a una tensione di alimentazione di 490 V:

$$U = \frac{100}{255} * 1250 = 490 \text{ V}$$

Equazione 2:

4.5.2 Ottimizzazione Z (misurazioni FI Cima solo su modelli Infinite M)

Una funzione molto utile dei modelli **Infinite M** è la procedura di ottimizzazione Z. L'ottimizzazione Z è disponibile solo per le misurazioni FI Cima dei modelli Infinite M. Nel caso di analisi particolari, questa procedura deve essere eseguita una volta, al fine di determinare la distanza di lavoro ottimale tra il campione nella piastra e l'ottica di fluorescenza.

Per determinare la posizione Z, selezionare una delle seguenti opzioni:

(1) **Manual (Manuale):**

Con l'opzione **Manual**, è possibile inserire nella striscia di misurazione un valore numerico corrispondente alla posizione Z. La posizione Z predefinita per l'inserimento manuale corrisponde a 20.000 µm.

(2) **Calculated from well (Calcolo da pozzetto):**

Con l'opzione **Calculated from well**, i modelli **Infinite M** identificano automaticamente la posizione Z del segnale massimo nel pozzetto selezionato, per consentire ulteriori misurazioni.

(3) **Same as (Uguale a)** per misurazioni multi-etichettatura:

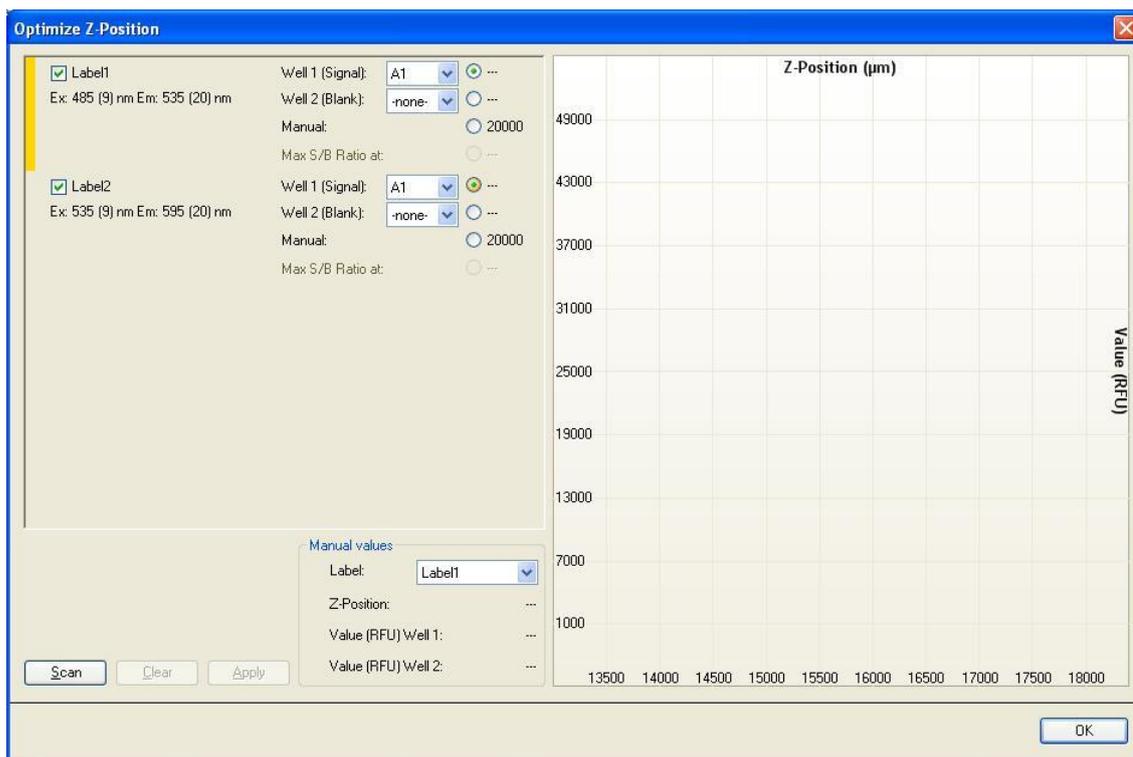
Con l'opzione **Same as**, i modelli **Infinite M** utilizzano automaticamente la stessa posizione Z di un'etichetta definita in precedenza.

Ad es., in uno script con 2 etichette FI Cima denominate Etichetta 1 ed Etichetta 2, la posizione Z dell'Etichetta 1 può essere utilizzata anche per l'Etichetta 2 selezionando l'opzione **Same as = Label 1 (Uguale a = Etichetta 1)**.

(4) **Instrument → Z-Position (Strumento Posizione Z):**

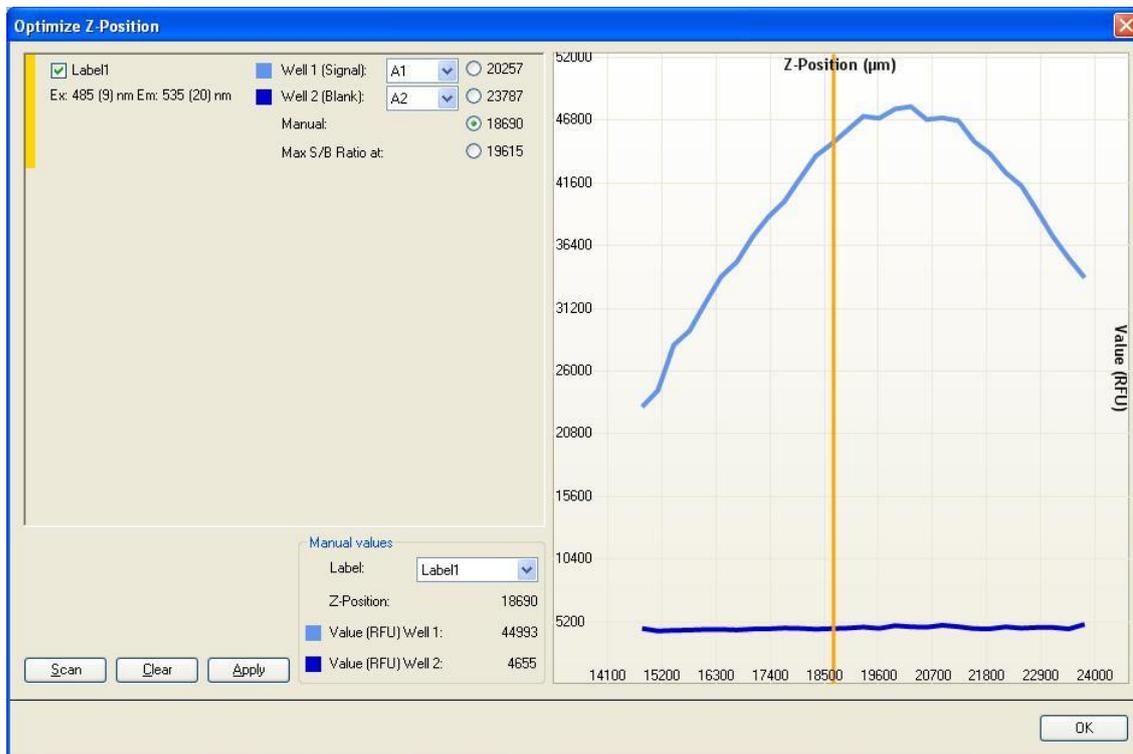
Selezionando la funzione **Z-position (Posizione Z)** dal menu dello strumento, l'utente può determinare la posizione Z appropriata facendo riferimento a un grafico che mostra i pozzetti utilizzati per il posizionamento Z. Il valore selezionato viene applicato alle misurazioni successive.

Selezionare **Z-Position (Posizione Z)** dal menu **Instrument (Strumento)**:



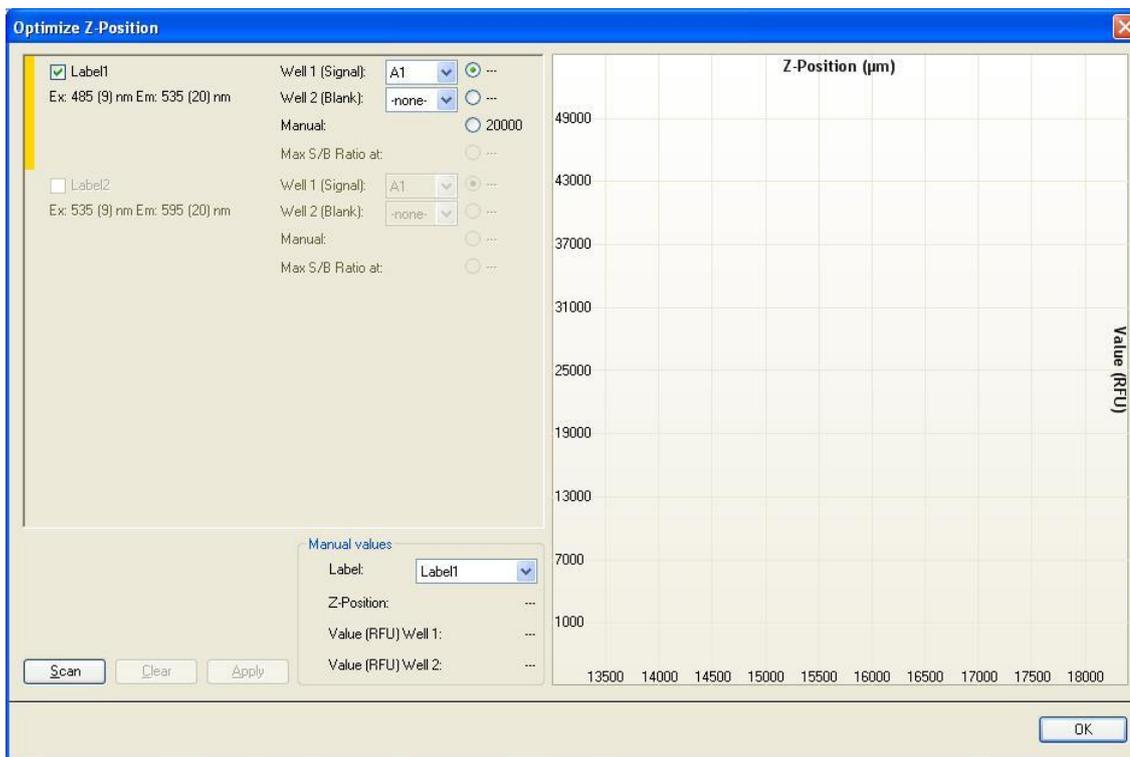
Selezionare l'etichetta o le etichette per le quali va eseguita l'ottimizzazione della posizione Z. È possibile determinare la posizione Z ottimale per un massimo di 4 etichette in contemporanea.

La selezione delle etichette/il numero di etichette, dipendono dallo script di misurazione precedentemente definito in i-control. In aggiunta, se la posizione Z di una delle etichette è stata definita come **Same as**, l'etichetta in questione verrà visualizzata, ma non potrà essere selezionata per l'ottimizzazione Z:

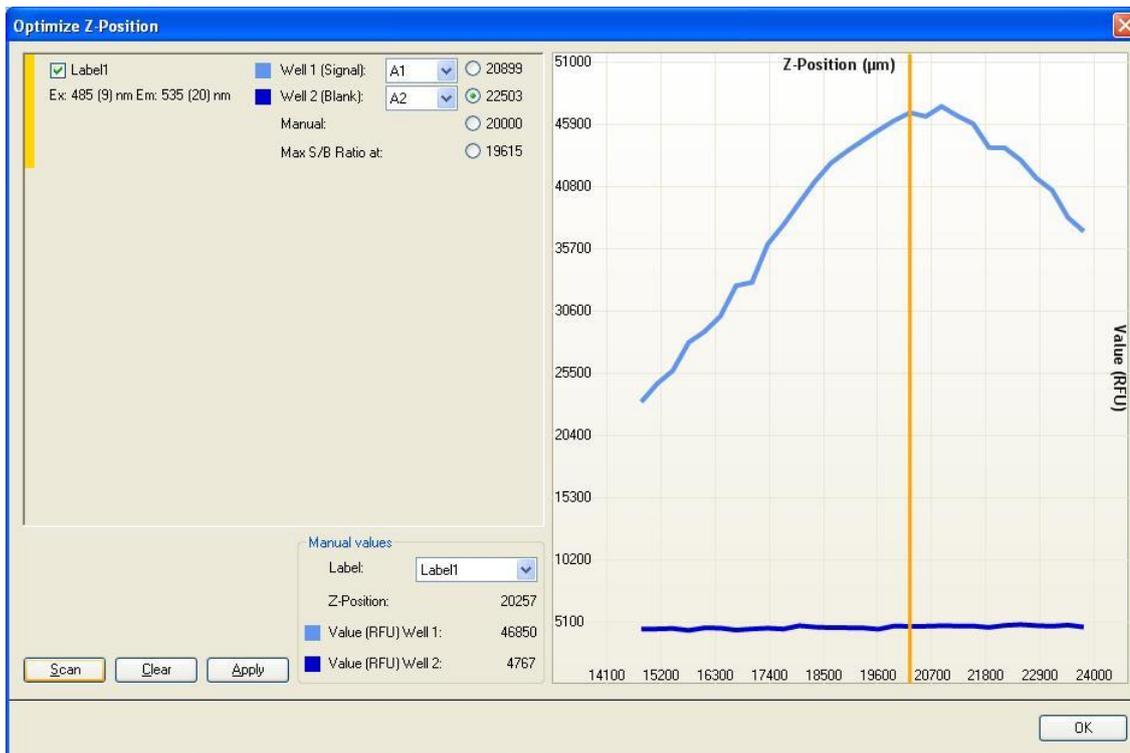


L'ottimizzazione della posizione Z può essere eseguita per ciascuna etichetta selezionata utilizzando uno o due pozzetti appartenenti all'intervallo di piastre

specificato. Selezionare il pozzetto (i pozzetti) e fare clic su **Scan (Scansione)** per avviare l'ottimizzazione Z:



L'opzione posizionamento Z **Max S/B Ratio (Massimo rapporto segnale/bianco)** prevede la misurazione di due pozzetti, uno contenente un fluoroforo d'interesse (segnale) e l'altro contenente una soluzione tampone (bianco). Entrambi i pozzetti vengono scansionati, quindi la curva del segnale e la curva del bianco risultanti dalla scansione vengono mostrate nel grafico. La posizione Z ora può essere impostata al massimo rapporto segnale/bianco (S/B):

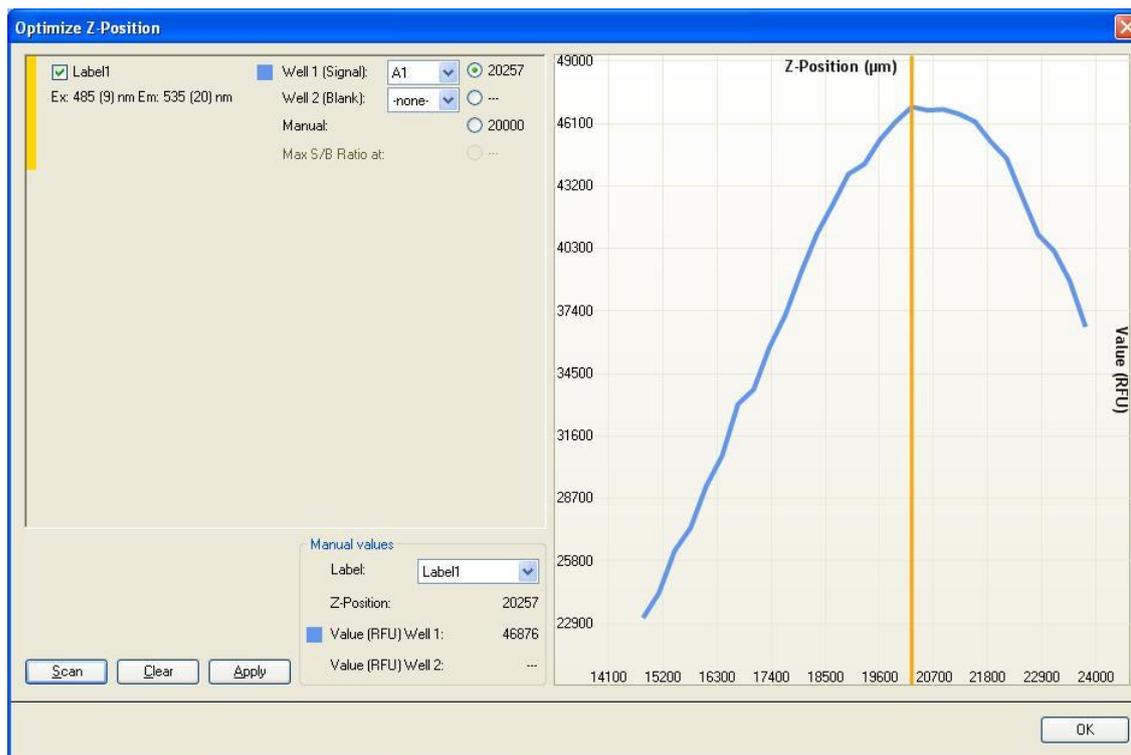




Nota

Se si utilizza l'opzione Massimo rapporto S/B, viene prima misurato il pozzetto contenente il campione, selezionando un guadagno ottimale, quindi lo stesso identico valore di guadagno viene applicato alla seconda misurazione, eseguita con il pozzetto bianco. Di conseguenza, si può fare un confronto diretto tra la curva del segnale e quella del bianco.

Per ciascuna etichetta selezionata, la posizione Z può essere definita manualmente. La barra verticale gialla visualizzata nella finestra del grafico, può essere spostata nella pozione Z desiderata.



Fare clic su **Apply (Applica)**, in modo che la posizione Z selezionata venga applicata automaticamente allo script di i-control e utilizzata per le misurazioni successive.

Impostazioni del flash

Le misurazioni istantanee con 1 flash (lettura) per pozzetto sono possibili per tutti i tipi di piastre; tuttavia, a bassi livelli di luce, la precisione della misurazione dipende dal tempo di lettura durante il quale è possibile ricevere il segnale di fluorescenza.



Nota

Aumentare il numero di flash (letture) per pozzetto, finché il rumore dei pozzetti BIANCHI non viene più migliorato, oppure fin quando il tempo di misurazione di ciascun pozzetto non si prolunghi in modo inaccettabile.

Per quanto riguarda la fluorescenza immediata, aumentare il tempo di integrazione predefinito non è di alcuna utilità, perché il rilevatore non riceverà più alcun segnale quando il flash sarà scomparso.

Parametri di temporizzazione per fluorescenza a risoluzione temporale

Per la TRF, i parametri di integrazione del segnale devono essere regolati in base all'etichetta. Un tempo di latenza ritarda l'inizio del tempo di integrazione del segnale in rapporto al flash precedente. I parametri di temporizzazione TRF possono essere definiti con la seguente procedura:

La durata di fluorescenza dell'etichetta può fungere da punto di riferimento sia per il tempo di integrazione che per il tempo di latenza.

Regolazione approssimativa: con la correzione del tempo di integrazione, riduce il tempo di latenza per massimizzare il rapporto segnale/sfondo (S/B).

Regolazione precisa: con la correzione del tempo di latenza, prolunga il tempo di integrazione e verifica se il rapporto S/B migliora ulteriormente.

Regolazione precisa opzionale: con la correzione di uno dei due parametri di temporizzazione, è possibile modificare l'altro parametro e verificare se il rapporto S/B migliora ulteriormente.

Tempo di pausa

È possibile impostare un tempo di pausa prima di procedere alla misurazione di un pozzetto. A causa del continuo movimento di arresto e ripartenza del porta-piastre, può accadere che il menisco del liquido erogato vibri ancora durante l'integrazione del segnale. Ciò può dar luogo a un'oscillazione dei valori misurati. È stato riscontrato questo effetto in piastre da 96 pozzetti e in pozzetti più grandi. In particolare, questo aspetto è fondamentale nel caso delle misurazioni dell'assorbanza.

4.5.3 Modalità rapporto FI

Modalità rapporto

È possibile effettuare misurazioni per singolo pozzetto per un numero massimo di 4 etichette. Questa modalità di misurazione è nota come **modalità rapporto**. Tenere presente che non viene calcolato alcun **rapporto** dopo tale misurazione. La scheda dei risultati in formato Excel mostra i dati grezzi. Gli ulteriori calcoli devono essere effettuati dall'utente.

Tempo di commutazione dei filtri (modelli Infinite F)/ Tempo di commutazione delle lunghezze d'onda (modelli Infinite M)

I modelli Infinite F sono dotati di due filtri, e possono effettuare il passaggio da un filtro all'altro entro 250 ms nel caso in cui le etichette selezionate siano misurate con lo stesso guadagno. In caso contrario, il tempo di commutazione è di 400 ms. In questo caso è necessario modificare il livello di alta tensione agendo sul PMT. L'alta tensione applicata al PMT ha bisogno di tempo per stabilizzarsi.

I modelli Infinite M prevedono l'uso di due lunghezze d'onda e possono effettuare il passaggio da una lunghezza d'onda all'altra entro 150 ms nel caso in cui le etichette selezionate siano misurate con lo stesso guadagno, e a patto che non siano coinvolti punti di commutazione del fascio luminoso (OS) (vedere Tabella 1: per informazioni sui punti di commutazione). In caso contrario, il tempo di commutazione è di 400 ms. In questo caso è necessario modificare il livello di alta tensione agendo sul PMT. L'alta tensione applicata al PMT ha bisogno di tempo per stabilizzarsi. È necessario spostare la ruota portafiltri dei filtri divisori di fascio.

	Lunghezza d'onda di eccitazione	Lunghezza d'onda di emissione
Punto di commutazione OSF 1	316 nm	401 nm
Punto di commutazione OSF 2	386 nm	621 nm
Punto di commutazione OSF 3	561 nm	-

Tabella 1: Punti di commutazione OSF (filtro divisore di fascio) (modelli Infinite M)

Esempio:

Fura-2: Questa applicazione prevede una commutazione filtro/lunghezza d'onda tra 340 e 380 nm sul lato di eccitazione. L'emissione è misurata a circa 510 nm. La commutazione filtro di eccitazione/lunghezza d'onda non include la commutazione OS, pertanto la commutazione avviene entro 150 ms per i modelli Infinite M e 250 ms per i modelli Infinite F.

4.6 Misurazioni FP

4.6.1 Polarizzazione di fluorescenza

La polarizzazione di fluorescenza (FP, P) viene definita dalla seguente equazione:

$$P = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + I_{\perp})}$$

Equazione 3:

dove I_{\parallel} e I_{\perp} corrispondono rispettivamente all'intensità di emissione della luce polarizzata parallelamente e perpendicolarmente al piano di eccitazione. La polarizzazione è una grandezza adimensionale, generalmente espressa in mP.

Per avviare una misurazione FP, la striscia del programma deve includere un **Blank range (Intervallo del bianco)** di misurazione valido e impostazioni del **Fattore G** valide.

4.6.2 Intervallo del bianco di misurazione

La riduzione del bianco di misurazione viene eseguita automaticamente ad ogni misurazione della polarizzazione di fluorescenza; il valore medio dei rispettivi pozzetti bianchi verrà sottratto dal valore di ciascun campione (vedere 4.6.8).

Nella casella di gruppo **Measurement (Misurazione)**, selezionare **Blank range** facendo clic su **Change (Modifica)**, quindi selezionare i pozzetti riempiti con il bianco (campione) di misurazione.

4.6.3 Impostazioni del fattore G

L'equazione fornita per il calcolo della polarizzazione della fluorescenza presuppone che il sistema di rilevamento abbia la stessa sensibilità sia per la luce polarizzata parallela che per quella perpendicolare. Generalmente non è così, ed è necessario correggere l'intensità della luce parallela o perpendicolare ricorrendo al cosiddetto **Fattore G**. Il fattore G compensa le differenze esistenti nei componenti ottici della misurazione parallela e della misurazione perpendicolare.

Il fattore G è il fattore di correzione che può essere determinato per la lunghezza d'onda del fluoroforo misurando un campione con un valore di polarizzazione noto. Un elemento importante per qualunque misurazione della polarizzazione di fluorescenza è una buona calibrazione dello strumento, che consenta di ottenere un fattore G.



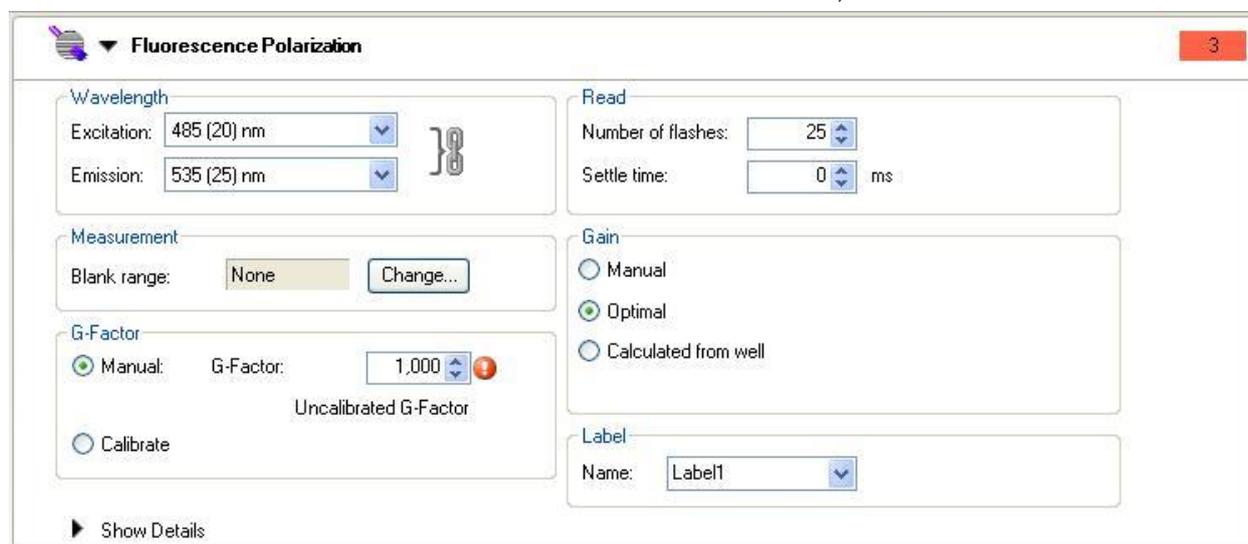
CAUTELA

ASSICURARSI CHE LA SLITTA PORTAFILTRI CONTENGA I POLARIZZATORI, OLTRE CHE I FILTRI DEFINITI PER LA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA. LE MISURAZIONI EFFETTUATE SENZA POLARIZZATORI RESTITUIRANNO UN FATTORE G ERRATO E DATI DI MISURAZIONE INATTENDIBILI.

4.6.4 Misurazione con un fattore G non calibrato

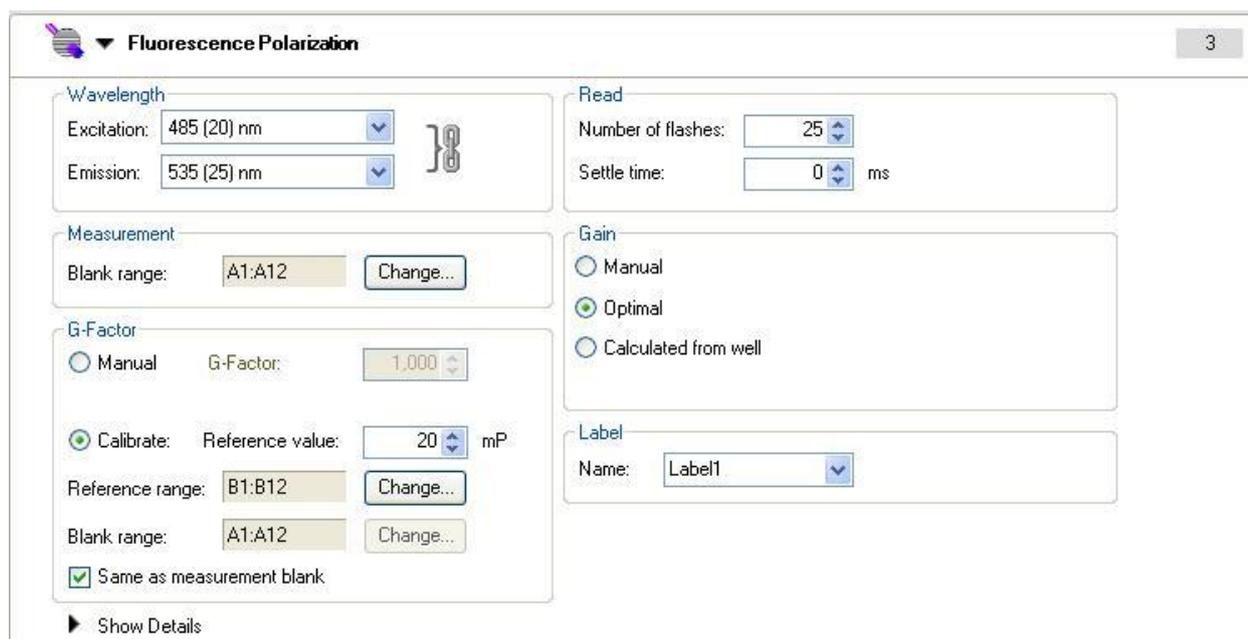
Se non è disponibile alcun fattore G calibrato, sarà visualizzato il valore predefinito di 1, che sarà contrassegnato come **Uncalibrated G-Factor (Fattore G non calibrato)**. Per abilitare la misurazione, confermare questo valore o selezionarne un altro facendo clic sulle frecce su e giù o inserendo un valore nel campo **G-Factor**.

Per indicazioni sulla calibrazione del fattore G, vedere 4.6.5.



The screenshot shows the 'Fluorescence Polarization' control panel. The 'Wavelength' section has Excitation at 485 (20) nm and Emission at 535 (25) nm. The 'Read' section has Number of flashes at 25 and Settle time at 0 ms. The 'Measurement' section has Blank range set to 'None'. The 'G-Factor' section has 'Manual' selected with a value of 1,000, which is labeled as 'Uncalibrated G-Factor'. There is a red warning icon next to the value. The 'Gain' section has 'Optimal' selected. The 'Label' section has Name set to 'Label1'. A 'Show Details' button is at the bottom left.

4.6.5 Misurazione con una calibrazione simultanea del fattore G



The screenshot shows the 'Fluorescence Polarization' control panel. The 'Wavelength' section has Excitation at 485 (20) nm and Emission at 535 (25) nm. The 'Read' section has Number of flashes at 25 and Settle time at 0 ms. The 'Measurement' section has Blank range set to 'A1:A12'. The 'G-Factor' section has 'Calibrate' selected with a Reference value of 20 mP. The Reference range is 'B1:B12' and the Blank range is 'A1:A12'. There is a checked box for 'Same as measurement blank'. The 'Gain' section has 'Optimal' selected. The 'Label' section has Name set to 'Label1'. A 'Show Details' button is at the bottom left.

Se si seleziona **Calibrate (Calibrare)**, il sistema determina il fattore G per i parametri di misurazione correnti e lo utilizza per la successiva misurazione FP. Per eseguire la calibrazione del fattore G, occorre definire:

Reference value (Valore di riferimento): selezionare un valore di polarizzazione per il riferimento utilizzato, ad es. 20 mP per una soluzione di fluoresceina a 1 nM in 0,01 M di NaOH.

Reference range (Intervallo di riferimento): fare clic su **Change (Modifica)** e selezionare i pozzetti riempiti con il riferimento.

Blank range (Intervallo del bianco): fare clic su **Change (Modifica)** e selezionare i pozzetti riempiti con il bianco di riferimento. Selezionare **Same as measurement blank (Uguale al bianco di misurazione)** se il bianco di riferimento è uguale al bianco di misurazione.



Nota

Se si riempiono più pozzetti con riferimenti di polarizzazione e bianchi di riferimento, il sistema calcolerà i valori medi e, di conseguenza, il risultato della calibrazione sarà più accurato.

Memorizzazione del fattore G

Il fattore G calcolato viene automaticamente memorizzato sul disco rigido del computer. Ciascuna voce del fattore G è associata alla selezione di una coppia di filtri e alla descrizione di una slitta portafiltri. Per ogni combinazione di coppie di filtri e ogni descrizione della slitta portafiltri esiste un solo fattore G, a meno che la stessa coppia di filtri non sia stata utilizzata con diverse slitte portafiltri e quindi memorizzata in abbinamento alle descrizioni di queste ultime.



CAUTELA

LA DESCRIZIONE DELLA SLITTA PORTAFILTRI È PARTE DEL VALORE CHIAVE FATTORE G. EVITARE DI USARE LA STESSA DESCRIZIONE PER LE DIVERSE SLITTE PORTAFILTRI, IN QUANTO IL RILEVAMENTO DEL FATTORE G POTREBBE RISULTARNE COMPROMESSO.

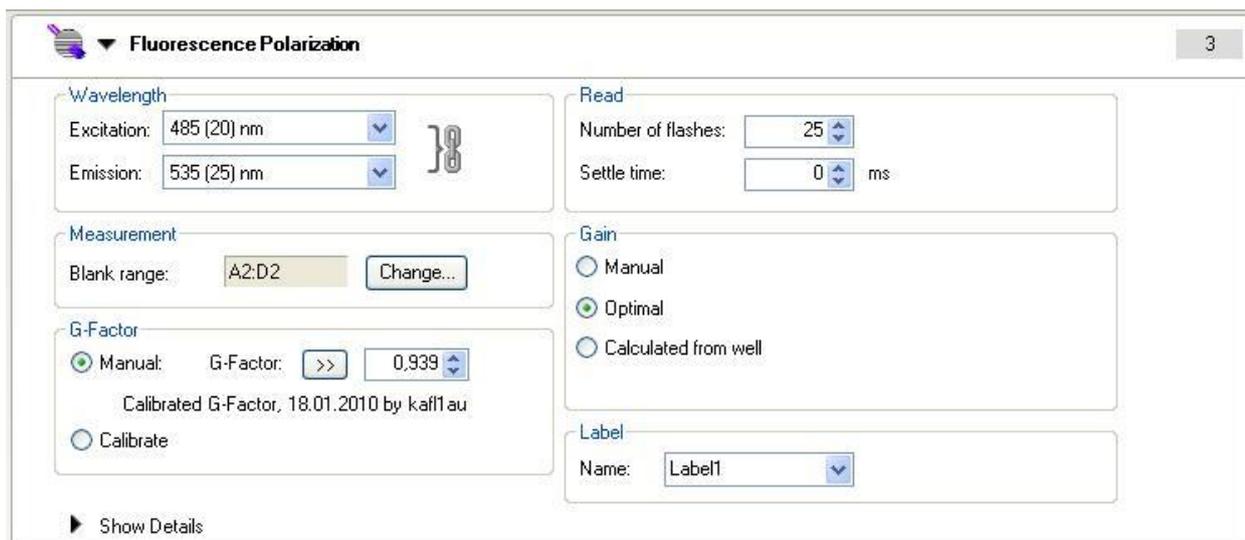
4.6.6 Misurazione con un fattore G calibrato



Nota

Una volta calibrato, il fattore G viene visualizzato sullo schermo e può essere utilizzato immediatamente se corrisponde alla coppia di lunghezze d'onda Ex/Em e alla descrizione della slitta portafiltri.

Un fattore G calibrato verrà visualizzato automaticamente o potrà essere caricato facendo clic sul pulsante >> solo se corrisponde alla coppia di filtri di polarizzazione della fluorescenza selezionata e alla descrizione della slitta portafiltri.

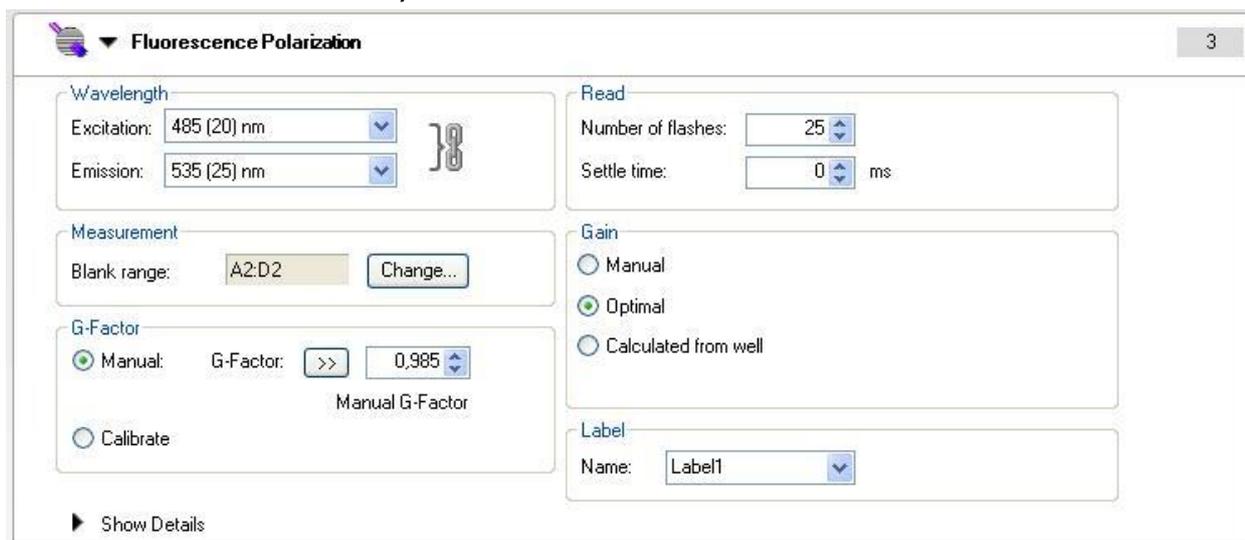


The screenshot shows the 'Fluorescence Polarization' control panel. Under the 'Wavelength' section, 'Excitation' is set to 485 (20) nm and 'Emission' to 535 (25) nm. The 'Read' section shows 'Number of flashes' at 25 and 'Settle time' at 0 ms. In the 'Measurement' section, 'Blank range' is A2:D2. The 'G-Factor' section has 'Manual' selected, with a value of 0,939. Below this, it says 'Calibrated G-Factor, 18.01.2010 by kaff1au'. The 'Gain' section has 'Optimal' selected. The 'Label' section shows 'Name' as Label1. A 'Show Details' button is at the bottom left.

Il fattore G calibrato è contrassegnato come **Calibrated G-Factor (Fattore G calibrato)** con data e firma.

4.6.7 Misurazione con un fattore G manuale

Se il fattore G visualizzato non corrisponde al valore calibrato (ad es., il fattore G è stato modificato manualmente o caricato con un metodo), il valore corrispondente sarà contrassegnato come **Manual G-Factor (Fattore G manuale)**.



This screenshot is similar to the previous one, but the 'G-Factor' section now shows 'Manual' selected with a value of 0,985. Below the value, it says 'Manual G-Factor'. The 'Calibrate' radio button is now unselected. All other settings remain the same.

Il fattore G calibrato può essere ripristinato facendo clic sul pulsante >> posto a sinistra del fattore G visualizzato.



Nota

La regolazione del fattore G tramite il pulsante >> è possibile solo se è disponibile un fattore G calibrato per la lunghezza d'onda corrispondente.

4.6.8 Calcolo dei parametri della polarizzazione di fluorescenza

Fattore G:

$$G = \frac{(1 + P_{ref})(\overline{RFU}_{ref}^{cross} - \overline{RFU}_{buf}^{cross})}{(1 - P_{ref})(\overline{RFU}_{ref}^{par} - \overline{RFU}_{buf}^{par})}$$

P_{ref} ... Polarization value of reference [P]

\overline{RFU}_{ref} ... Averaged relative fluorescence units of reference

\overline{RFU}_{buf} ... Averaged relative fluorescence units of buffer

Riduzione del bianco:

Da ciascun valore viene sottratto il valore medio dei rispettivi pozzetti bianchi.

$$\Delta RFU^{par} = \begin{cases} RFU_{ref}^{par} - \overline{RFU}_{buf}^{par} \\ RFU_{buf}^{par} - \overline{RFU}_{buf}^{par} \\ RFU_{smp}^{par} - \overline{RFU}_{blk}^{par} \\ RFU_{blk}^{par} - \overline{RFU}_{blk}^{par} \end{cases} \quad \text{for each well}$$

$$\Delta RFU^{cross} = \begin{cases} RFU_{ref}^{cross} - \overline{RFU}_{buf}^{cross} \\ RFU_{buf}^{cross} - \overline{RFU}_{buf}^{cross} \\ RFU_{smp}^{cross} - \overline{RFU}_{blk}^{cross} \\ RFU_{blk}^{cross} - \overline{RFU}_{blk}^{cross} \end{cases} \quad \text{for each well}$$

Intensità:

L'intensità della luce parallela e perpendicolare viene calcolata utilizzando le seguenti formule:

$$I^{par} = G * \Delta RFU^{par}$$

$$I^{cross} = \Delta RFU^{cross}$$

Polarizzazione:

$$P = \frac{I^{par} - I^{cross}}{I^{par} + I^{cross}}$$

Anisotropia:

$$A = \frac{I^{par} - I^{cross}}{I^{par} + 2 * I^{cross}}$$

Intensità totale:

$$I_{tot} = I^{par} + 2 * I^{cross}$$

4.7 Ottimizzazione delle misurazioni di assorbanza

4.7.1 Parametri di misurazione

Impostazioni del flash

Le misurazioni istantanee con 1 flash (lettura) per pozzetto sono possibili per tutti i tipi di piastre; tuttavia, a bassi livelli di luce, la precisione della misurazione dipende dal tempo di lettura durante il quale è possibile ricevere il segnale di fluorescenza.



Nota

Aumentare il numero di flash (letture) per pozzetto, finché il rumore dei pozzetti BIANCHI non viene più migliorato, oppure fin quando il tempo di misurazione di ciascun pozzetto non si prolunghi in modo inaccettabile.

Tempo di pausa

È possibile impostare un tempo di pausa prima di procedere alla misurazione di un pozzetto (aspetto fondamentale per le misurazioni dell'assorbanza). A causa del continuo movimento di arresto e ripartenza del porta-piastre, può accadere che il menisco del liquido erogato vibri ancora durante l'integrazione del segnale. Ciò può dar luogo a un'oscillazione dei valori misurati. È stato riscontrato questo effetto in piastre da 96 pozzetti e in pozzetti più grandi.

4.7.2 Modalità rapporto di assorbanza

Modalità rapporto

Per mezzo della scheda **Standard** di i-control, è possibile effettuare misurazioni per singolo pozzetto per un numero massimo di 4 etichette. Questa modalità di misurazione è nota come **modalità rapporto**. Tenere presente che non viene calcolato alcun **rapporto** dopo tale misurazione. La scheda dei risultati in formato Excel mostra i dati grezzi. Gli ulteriori calcoli devono essere effettuati dall'utente.

Per mezzo della scheda **Applications (Applicazioni)** di i-control, in abbinamento alla piastra NanoQuant, tutti i dati grezzi relativi a **Quantifying Nucleic Acids (Quantificazione degli acidi nucleici)** e **Labeling Efficiency (Efficienza di labeling)** vengono calcolati automaticamente dal software Excel per determinare la concentrazione o il rapporto. I valori possono essere utilizzati per ulteriori calcoli, se lo si desidera.

Tempo di commutazione delle lunghezze d'onda (modelli Infinite M)/dei filtri (modelli Infinite F)

I modelli Infinite F possono effettuare la commutazione tra due filtri adiacenti entro 250 ms.

I modelli Infinite M possono effettuare la commutazione tra due lunghezze d'onda entro 150 ms.

Per indicazioni sulle condizioni di utilizzo, vedere 4.5.3 Modalità rapporto FI.

4.8 Letture multiple per pozzetto

Il software i-control consente di eseguire letture multiple per pozzetto (MRW) in modalità di assorbanza, fluorescenza Cima e fluorescenza Fondo.

Le funzioni Multiple Reads per Well (letture multiple per pozzetto) possono essere attivate su una striscia di programma di assorbanza o intensità di fluorescenza spuntando la casella di controllo **Multiple Reads per Well (Letture multiple per pozzetto)** (vedere Figura 26 sotto).

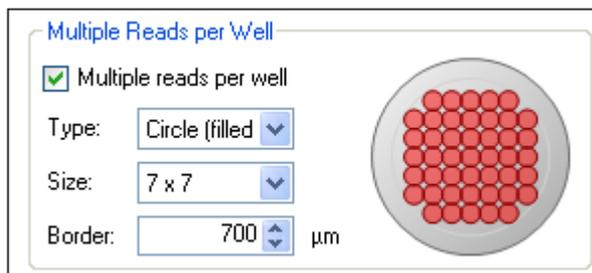


Figura 26: Letture multiple per pozzetto



Nota

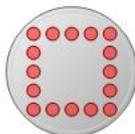
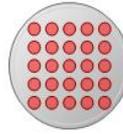
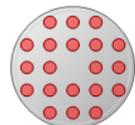
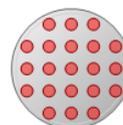
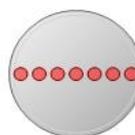
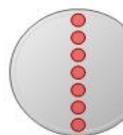
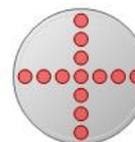
La funzione Multiple Reads per Well è disponibile solo per le modalità di lettura a lunghezza d'onda fissa di assorbanza, intensità di fluorescenza dall'alto e intensità di fluorescenza dal basso. La funzione non è disponibile per le misurazioni mediante scansione.

4.8.1 Tipologia di MRW

Le tipologie di MRW definiscono lo schema in base al quale sarà eseguita la misurazione. Il software consente di scegliere tra sette diverse tipologie di MRW:

- Quadrato
- Quadrato (pieno)
- Cerchio
- Cerchio (pieno)
- Linea X
- Linea Y
- Linea XY

Esempi di schema:

Quadrato:**Quadrato (pieno):****Cerchio:****Cerchio (pieno):****Linea X:****Linea Y:****Linea XY:**

4.8.2 Dimensione di MRW

La dimensione MRW determina il numero di punti da misurare in un pozzetto. A seconda del tipo di micropiastra e di strumento, Infinite F o Infinite M, è possibile selezionare la **dimensione** in un intervallo compreso tra un minimo di 1 x 1 punti e un massimo di 15 x 15 punti. Il diametro dei singoli punti di misurazione corrisponde al diametro teorico del fascio di luce, che viene calcolato in corrispondenza del punto focale (vedere Tabella 2).

Modalità di misurazione	Modelli Infinite M	Modelli Infinite F
Intensità di fluorescenza dall'alto (Cima)	3 mm	2 mm
Intensità di fluorescenza dal basso (Fondo)	2 mm	2 mm
Assorbanza (ottica della micropiastra)	0,7 mm	0,5 mm

Tabella 2: *Diametro teorico del fascio di luce calcolato nel punto focale.*

Di conseguenza, la tipologia di MRW visualizzata nel software è solo una rappresentazione riassuntiva dello schema di misurazione. Quando si misurano campioni reali, lo schema può variare e la sovrapposizione dei singoli punti di misurazione può essere leggermente diversa rispetto a quella dello schema visualizzato. Si consiglia pertanto di ottimizzare i parametri Multiple Reads per Well (Lecture multiple per pozzetto) per ogni nuova applicazione.

4.8.3 Bordo MRW

In aggiunta alle funzioni **Size (Dimensione)** e **Type (Tipologia)**, la funzione **Border (Bordo)** consente all'utente di impostare una determinata distanza tra il fascio di luce e la parete del pozzetto della micropiastra (distanza in μm). Come già indicato nel capitolo 4.8.2, il software visualizza solo una rappresentazione riassuntiva dello schema di misurazione. Il bordo viene calcolato in base al diametro teorico del fascio di luce. Tuttavia, quando si misurano campioni liquidi, il tipo e la quantità del liquido presente in un pozzetto contribuiscono a determinare il diametro del fascio di luce.

Inoltre, anche il tipo di piastra (ad es. il materiale del fondo della micropiastra) influenza le caratteristiche del fascio di luce. Pertanto, durante la misurazione di un campione reale, il bordo teorico visualizzato nel software potrebbe non corrispondere al bordo effettivo. Per questo motivo, si consiglia vivamente di ottimizzare i parametri **Multiple Reads per Well (Letture multiple per pozzetto)** per ogni nuova applicazione. Assicurarsi che il bordo selezionato garantisca una distanza sufficiente tra il fascio di luce e la parete del pozzetto della micropiastra.



CAUTELA

TUTTE LE SPECIFICHE RELATIVE AD ASSORBANZA E INTENSITÀ DI FLUORESCENZA FORNITE IN QUESTO DOCUMENTO SONO VALIDE SOLO PER MISURAZIONI A PUNTO SINGOLO (UN PUNTO DI MISURAZIONE PER POZZETTO). LE SPECIFICHE NON SONO VALIDE PER L'OPZIONE MULTIPLE READS PER WELL (LETTURE MULTIPLE PER POZZETTO).



CAUTELA

IL SOFTWARE VISUALIZZA SOLO UNA RAPPRESENTAZIONE RIASSUNTIVA DELLO SCHEMA DI MISURAZIONE. PERTANTO, È OPPORTUNO OTTIMIZZARE I PARAMETRI MULTIPLE READS PER WELL (LETTURE MULTIPLE PER POZZETTO) PER OGNI NUOVA APPLICAZIONE. ASSICURARSI CHE IL VALORE DI BORDATURA SELEZIONATO SIA SUFFICIENTE AD EVITARE UNA SOVRAPPOSIZIONE TRA IL FASCIO DI LUCE E LA PARETE DEL POZZETTO DELLA MICROPIASTRA.



CAUTELA

UN VALORE DI BORDATURA TROPPO PICCOLO POTREBBE RESTITUIRE RISULTATI DI MISURAZIONE ERRATI A CAUSA DELLA SOVRAPPOSIZIONE TRA IL FASCIO DI LUCE E LA PARETE DEL POZZETTO DELLA MICROPIASTRA.

4.8.4 Visualizzazione dei risultati in MS Excel

La scheda dei risultati in MS Excel generata dal software i-control visualizza una rappresentazione grafica schematica (**Multiple Reads per Well – Alignment (Lectture multiple per pozzetto – Allineamento)**); vedere Figura 28) dei punti di misurazione. A ogni punto di misurazione viene assegnato un numero. I risultati sono presentati sotto forma di elenco: numero dei punti di misurazione in rapporto al valore del risultato (OD o RFU; vedere la Figura 27:

Rappresentazione grafica dell'allineamento (linea XY, 3 x 3), che mostra un esempio di risultato ottenuto con una misurazione di fluorescenza). Inoltre, vengono visualizzati la deviazione standard (**Stdev**) e il valore medio (**Mean**) dei punti di misurazione/del pozzetto:

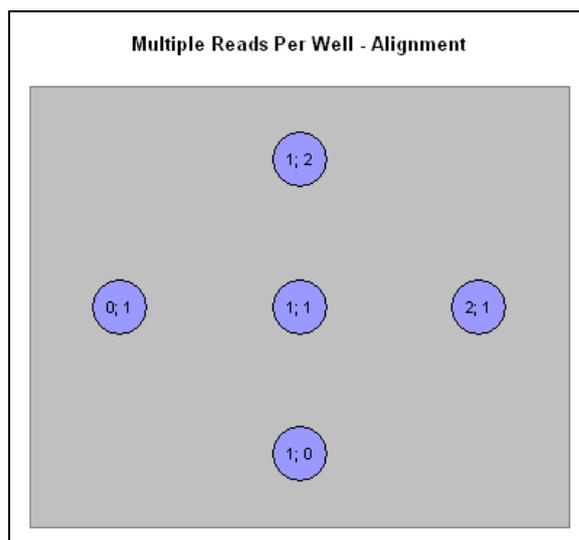


Figura 27: Rappresentazione grafica dell'allineamento (linea XY, 3 x 3)

Well	Mean	StDev	1,2	2,1	1,1	0,1	1,0
A1	30	4	26	35	29	27	31
A2	28	3	28	31	23	28	30
A3	28	6	31	31	27	18	32
B1	33	5	29	35	30	41	30
B2	36	4	40	36	30	37	35
B3	32	8	30	41	22	29	39
C1	30	6	28	35	21	31	36
C2	35	5	30	36	31	37	41
C3	38	7	40	41	25	40	41

Figura 28: Esempio di elenco dei risultati in formato MS Excel generato da i-control.

4.8.5 Funzionalità varie del software per MRW

La funzionalità MRW è disponibile esclusivamente per le modalità di misurazione **assorbanza, intensità di fluorescenza dall'alto (Cima) e intensità di fluorescenza dal basso (Fondo)**.

La funzionalità MRW non è attiva durante la misurazione di pozzetti singoli.

La **lunghezza d'onda di riferimento** (localizzata sulla striscia di assorbanza) non è selezionabile in combinazione con la funzione **Multiple Reads per Well (Lectture multiple per pozzetto)**.

4.9 Ottimizzazione delle misurazioni di luminescenza



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

4.9.1 Tempo d'integrazione

A livelli di luce molto bassi, il PMT non è in grado di produrre in modo continuativo la corrente di uscita necessaria per effettuare una conversione affidabile da analogico a digitale. Invece, genera una sequenza di impulsi la cui frequenza media può essere misurata utilizzando un contatore. A livelli di luce così bassi, il vantaggio della tecnica di conteggio dei fotoni è che i criteri di selezione dell'altezza dell'impulso consentono di discriminare il rumore elettronico.

A livelli di luce molto bassi, i conteggi misurati al secondo sono proporzionali all'intensità della luce. L'aumento del tempo di misurazione per pozzetto produce valori più accurati per effetto dell'impulso irregolare dei fotoni (statistiche dei fotoni). Il rumore fotonico (rumore shot) non può essere ridotto tecnicamente.



Nota

Il rapporto segnale-rumore (S/N) può essere ottimizzato aumentando il tempo di integrazione. Aumentando il tempo di integrazione di un fattore 10, il rapporto S/N migliora approssimativamente di un fattore 3.

4.9.2 Attenuazione del livello di luminosità

Quando si utilizza la tecnica del conteggio dei fotoni, è necessaria l'attenuazione dei livelli più alti di luminescenza (> 10.000.000 di conteggi al secondo). In questo caso, troppi fotoni entrano contemporaneamente nel rivelatore di luminescenza e non è possibile percepirli come impulsi in uscita distinti. I tassi di conteggio rimarrebbero addirittura indietro rispetto ai valori rilevati a livelli di luminosità inferiori.

Pertanto, i valori >10.000.000 conteggi al secondo (senza attenuazione) sono riportati come **INVALID (NON VALIDI)** sulla scheda dei risultati.

Il sistema ottico di luminescenza del lettore **Infinite** può attenuare i livelli di luminosità di un fattore fisso di 1 (nessuno) o 100 (2 OD). Di conseguenza, l'intervallo di misurazione utilizzabile includerà livelli di luminosità più elevati (<1.000.000.000 di conteggi al secondo).

4.10 Misurazioni con iniettori

4.10.1 Riempimento iniziale e lavaggio del lettore Infinite



CAUTELA

IL PORTA-INIETTORI DEVE TROVARSI IN POSIZIONE DI MANUTENZIONE NEL MOMENTO IN CUI SI EFFETTUANO LE OPERAZIONI DI LAVAGGIO E RIEMPIMENTO INIZIALE.

LE PROCEDURE DI RIEMPIMENTO INIZIALE E DI LAVAGGIO NON DEVONO ESSERE ESEGUITE CON L'INIETTORE INSERITO NELLO STRUMENTO!

La fase di riempimento iniziale (priming) e la fase di pulizia (lavaggio) del sistema iniettore devono essere eseguite esternamente allo strumento.

Per queste procedure, il porta-iniettori viene rimosso dallo strumento e messo in posizione di manutenzione nella scatola iniettori.

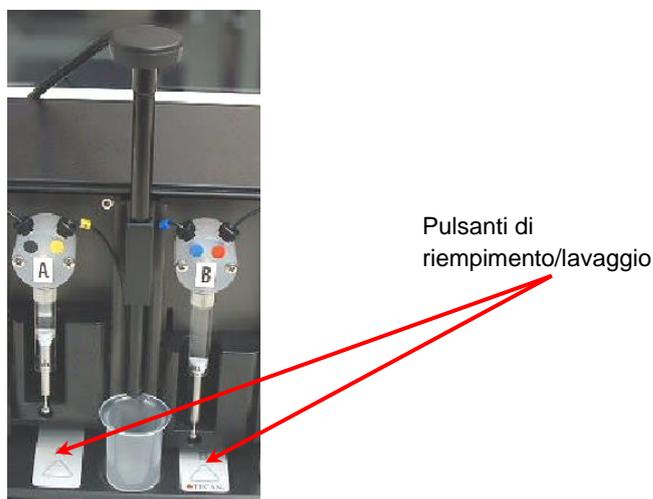


Figura 29: Scatola iniettori con iniettori in **posizione di manutenzione**; gli iniettori vengono rimossi dall'alloggiamento del porta-iniettori e inseriti nel supporto del sistema porta-iniettori.

Per le fasi di priming e di lavaggio del sistema iniettore, viene fornita un'impostazione predefinita per la velocità di iniezione e il volume di erogazione. Se necessario, è possibile modificare i parametri di priming nella finestra di controllo iniettore del software i-control.

Il volume di riempimento iniziale dipende dalla lunghezza del tubo. Sono disponibili due tipi di tubi per l'iniettore: **lungo**: 105 cm, e **corto**: 80 cm.

Il volume minimo per il riempimento iniziale è di 700 µl per gli iniettori con tubo corto e di 850 µl per gli iniettori con tubo lungo.

**CAUTELA**

NON TOCCARE GLI AGHI DEGLI INIETTORI. POTREBBERO FACILMENTE PIEGARSI O DISALLINEARSI, CAUSANDO PROBLEMI DI INIEZIONE O DANNI ALLO STRUMENTO.

SE IL PORTA-INIETTORI NON È INSERITO CORRETTAMENTE NELL'ALLOGGIAMENTO, IL SENSORE NON POTRÀ RILEVARE LA PRESENZA DELL'INIETTORE. DI CONSEGUENZA, VERRANNO ABILITATI IL LAVAGGIO E IL RIEMPIMENTO INIZIALE, CON CONSEGUENTE RISCHIO DI DANNEGGIAMENTO DELLO STRUMENTO. OLTRE A QUESTO, LE OPERAZIONI DI EROGAZIONE E INIEZIONE NON SARANNO POSSIBILI.

Riempimento iniziale (priming)

Prima di poter utilizzare il sistema di iniezione, è necessario procedere al riempimento iniziale (priming) per rimuovere tutta l'aria e riempire completamente il sistema con il liquido.

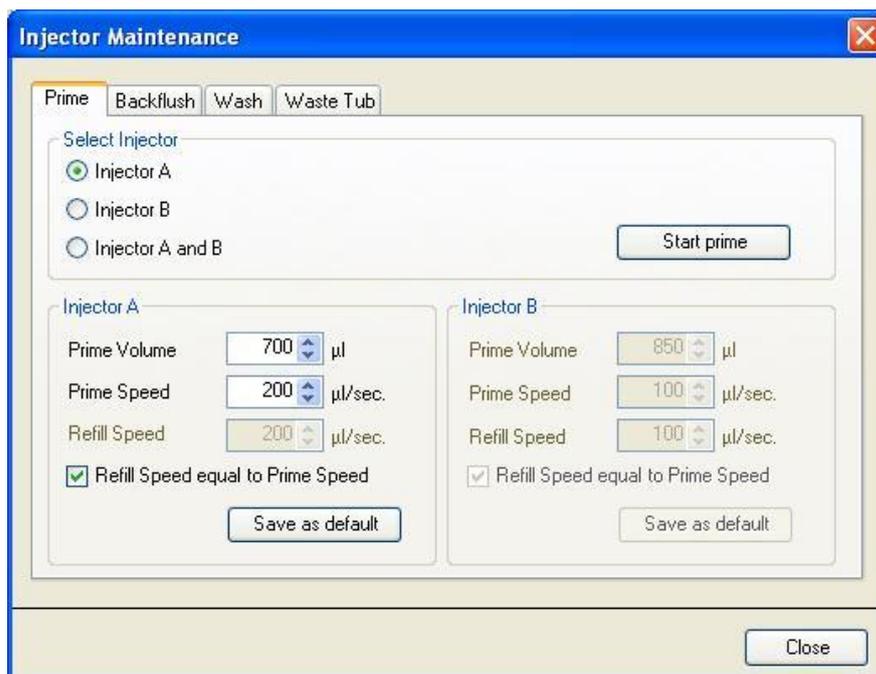
Si consiglia di eseguire un lavaggio prima del priming.

Il priming può essere eseguito utilizzando il software i-control o i pulsanti fisici presenti sulla scatola iniettori:

1. Riempire i flaconi di stoccaggio con i reagenti necessari e inserire il tubo/i di alimentazione. Assicurarsi che il tubo o i tubi raggiungano il fondo del flacone.
2. Rimuovere l'iniettore dall'alloggiamento del porta-iniettori e inserirlo nella posizione di manutenzione della scatola iniettori.
3. Posizionare un contenitore vuoto sotto all'iniettore.

Procedura di riempimento iniziale (i-control):

1. Regolare i parametri nella scheda **Prime (Riempimento)** della finestra di dialogo **Injector Maintenance (Manutenzione iniettore)** del menu **Settings (Impostazioni)**.
2. Avviare la procedura di priming facendo clic su **Start prime (Avvio riempimento)** nella finestra di dialogo Injector Maintenance (Manutenzione iniettore).
3. Ispezionare visivamente le siringhe per escludere la presenza di bolle d'aria. Dopo il priming, le eventuali bolle d'aria formatesi devono essere rimosse per garantire la buona riuscita dell'operazione di iniezione.



4. Selezionare uno dei due iniettori, **Injector A (Iniettore A)** o **Injector B (Iniettore B)**, oppure **Injector A and B (Iniettori A e B)**.
5. Selezionare il **Prime Volume (Volume di priming)**
(700 -60000 µl – tubo corto)
(850 -60000 µl – tubo lungo)
6. Selezionare la **Prime Speed (Velocità di priming)**
(100 - 300 µl/sec).
7. Selezionare la **Refill Speed (Velocità di riempimento)**
(100 - 300 µl/sec.) oppure
Refill Speed equal to Prime Speed
(Velocità di riempimento uguale a velocità di priming).
8. Avviare la procedura facendo clic sul pulsante **Start prime**.
9. Fare clic sul pulsante **Save as default (Salva come impostazioni predefinite)** per salvare le impostazioni selezionate associandole al corrispondente pulsante fisico (A o B) sulla scatola iniettori. In caso di avvio della procedura di priming tramite i pulsanti fisici, il sistema utilizzerà queste impostazioni.
10. Selezionare **Close (Chiudi)** per uscire dalla finestra di dialogo

Procedura di riempimento iniziale (pulsante fisico):

La procedura di priming può anche essere eseguita senza utilizzare il software. I parametri di priming possono essere salvati direttamente sull'iniettore facendo clic su **Save as Default** nella scheda **Prime** della finestra di dialogo **Injector Maintenance** del software i-control (nel menu **Settings**, fare clic su **Injectors... (Iniettori...)**) per far comparire la finestra di dialogo **Injector Maintenance**). Premere il pulsante **Prime/Wash (Riempimento/Lavaggio)** presente sulla scatola iniettori per avviare la sequenza di riempimento utilizzando i parametri predefiniti, (vedere Figura 29: **Scatola iniettori con iniettori in posizione di manutenzione**, pag. 78). L'iniettore deve essere collegato **allo** strumento e lo strumento deve essere acceso. Avviare la procedura di riempimento premendo il pulsante **Prime/Wash** per meno di 3 secondi.

Ispezionare visivamente le siringhe per escludere la presenza di bolle d'aria. Dopo il priming, le eventuali bolle d'aria formatesi devono essere rimosse per garantire la buona riuscita dell'operazione di iniezione.

Al termine di una procedura di riempimento ben riuscita, reinserire l'iniettore nello strumento. Chiudere completamente il coperchio del modulo pompe prima di avviare una misurazione. Gli iniettori sono ora pronti per l'uso.

Quando si avvia a una misurazione con l'operazione di **iniezione** o **erogazione**, 5 µl di liquido vengono erogati in un contenitore monouso posto sul porta-piastre prima che la procedura di **iniezione** o **erogazione** abbia inizio. Questa fase di erogazione iniziale garantisce che le condizioni di iniezione/erogazione siano le medesime per tutti i pozzetti.



CAUTELA

CHIUDERE COMPLETAMENTE IL COPERCHIO DEL MODULO POMPE (SCATOLA INIETTORI) PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE.

Backflush dei reagenti

Dopo che è stata eseguita la procedura di backflush, il volume morto del sistema di iniezione (aghi degli iniettori, siringhe, valvole e tubi) è di circa 100 µl per ciascuna siringa. La funzione del backflush è di restituire il reagente inutilizzato ai flaconi di stoccaggio.

La velocità di iniezione può essere regolata tramite il software, per consentire una buona miscelazione dei reagenti. La velocità di iniezione ottimale dipende dai parametri di analisi, come ad esempio il grado di viscosità dei liquidi, il formato della piastra, nonché il comportamento dei liquidi durante la misurazione.

Con il backflush, i reagenti rimasti nelle tubazioni vengono ripompato nei flaconi di stoccaggio. Si può compiere questa operazione prima del lavaggio del sistema iniettore, per ridurre al minimo il volume morto.

Prima di eseguire la procedura di **Backflush**:

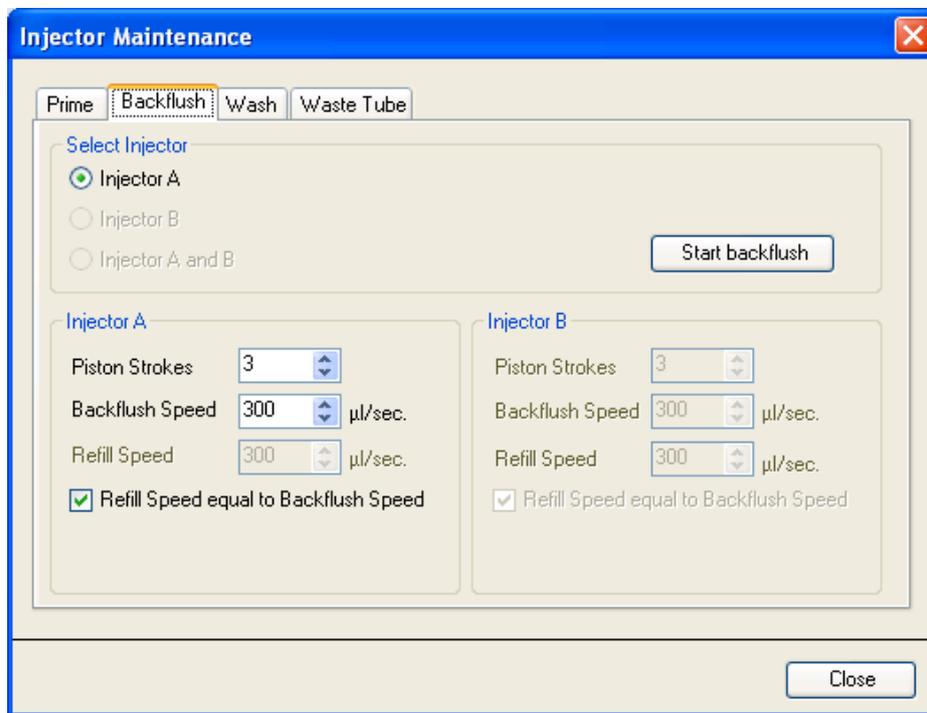
Rimuovere il porta-iniettori dallo strumento e inserire l'iniettore nella posizione di manutenzione della scatola iniettori.

Inserire il tubo di alimentazione nell'apposito flacone di stoccaggio.

Procedura di backflush (i-control):

Regolare i parametri nella scheda **Backflush** della finestra di dialogo **Injector Maintenance (Manutenzione iniettore)** del menu **Settings (Impostazioni)**.

Avviare la procedura di backflush del reagente facendo clic su **Start backflush (Avvio backflush)**.



1. Selezionare uno dei due iniettori **Injector A** o **Injector B** oppure **Injector A and B** (solo gli iniettori **sottoposti a priming** possono essere utilizzati per il **backflush**).
2. Selezionare le **Piston Strokes (Corse del pistone)** (1 – 60; 1 corsa corrisponde a 1 ml)
3. Selezionare la **Backflush Speed (Velocità di backflush)** (100 – 300 µl/sec)
4. Selezionare la **Refill Speed (Velocità di riempimento)** (100 – 300 µl/sec.) oppure **Refill Speed equal to Backflush Speed (Velocità di riempimento uguale a velocità di backflush)**.
5. Fare clic su **Start backflush (Avvio backflush)** per dare inizio alla procedura di backflush del reagente.
6. Fare clic su **Close (Chiudi)** per uscire dalla finestra di dialogo



CAUTELA

IL PORTA-INIETTORI DEVE ESSERE IN POSIZIONE DI MANUTENZIONE NEL MOMENTO IN CUI SI EFFETTUA L'OPERAZIONE DI BACKFLUSH. NON ESEGUIRE IL BACKFLUSH SE L'INIETTORE È ALL'INTERNO DELLO STRUMENTO!

4.10.2 Lavaggio

Prima che lo strumento venga spento, è consigliabile eseguire una procedura di lavaggio per pulire il sistema iniettore.

Il lavaggio può essere eseguito utilizzando il software i-control o i pulsanti fisici presenti sulla scatola iniettori:

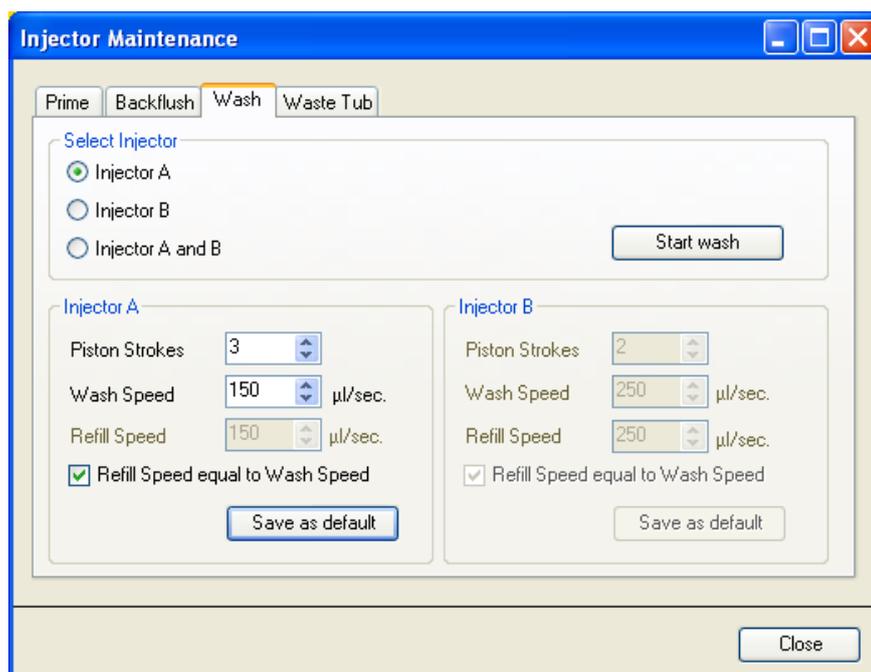
Prima di eseguire la procedura di lavaggio:

1. Riempire i flaconi di stoccaggio con i reagenti di lavaggio appropriati (acqua distillata, etanolo al 70%, ecc.) e inserire i tubi di alimentazione. Assicurarsi che i tubi raggiungano il fondo del flacone.
2. Rimuovere l'iniettore dall'alloggiamento del porta-iniettori e inserirlo nella posizione di manutenzione della scatola iniettori.
3. Posizionare un contenitore vuoto sotto all'iniettore.

Procedura di lavaggio (i-control):

Regolare i parametri nella scheda **Wash (Lavaggio)** della finestra di dialogo **Injector Maintenance (Manutenzione iniettore)** del menu **Settings (Impostazioni)**.

1. Avviare la procedura di lavaggio facendo clic sul pulsante **Start wash (Avvio lavaggio)**.



2. Selezionare uno dei due iniettori **Injector A** o **Injector B** oppure **Injector A and B**.
3. Selezionare le **Piston Strokes (Corse del pistone)**
(1 – 60; 1 corsa corrisponde a 1 ml)
4. Selezionare la **Wash Speed (Velocità di lavaggio)**
(100 – 300 µl/sec)
5. Selezionare la **Refill Speed (Velocità di riempimento)**
(100 – 300 µl/sec.) oppure
Refill Speed equal to Wash Speed
(**Velocità di riempimento uguale a velocità di lavaggio**).

6. Fare clic su **Start wash (Avvio lavaggio)** per dare inizio alla procedura di lavaggio.
7. Fare clic su **Close (Chiudi)** per uscire dalla finestra di dialogo.

Procedura di lavaggio (pulsanti fisici):

La procedura di lavaggio può anche essere eseguita senza utilizzare il software. I parametri di lavaggio possono essere salvati direttamente sull'iniettore facendo clic su **Save as Default** nella scheda **Wash** della finestra di dialogo **Injector Maintenance** del software i-control (nel menu **Settings**, fare clic su **Injectors...** per far comparire la finestra di dialogo **Injector Maintenance**). Premere il pulsante **Prime/Wash (Riempimento/Lavaggio)** presente sulla scatola iniettori per avviare la sequenza di lavaggio utilizzando i parametri predefiniti. (Vedere Figura 29: Scatola iniettori con iniettori **in posizione di manutenzione**, pag. 78). L'iniettore deve essere collegato **allo** strumento e lo strumento deve essere acceso. Avviare la procedura di lavaggio tenendo premuto il pulsante Prime/Wash per più di 3 secondi.



CAUTELA

IL SUPPORTO INIETTORE DEVE TROVARSI IN POSIZIONE DI MANUTENZIONE NEL MOMENTO IN CUI SI EFFETTUA IL LAVAGGIO. NON ESEGUIRE IL LAVAGGIO SE L'INIETTORE È ALL'INTERNO DELLO STRUMENTO!



CAUTELA

ASSICURARSI DI ESEGUIRE UNA PROCEDURA DI LAVAGGIO FINALE CON ACQUA DISTILLATA E SVUOTARE IL SISTEMA INIETTORE. PER MANTENERE LO STRUMENTO IN CONDIZIONI OTTIMALI E GARANTIRNE LA DURATA, RIEMPIRE IL SISTEMA INIETTORE CON LIQUIDO (ACQUA) PRIMA DI SPEGNERLO.



CAUTELA

CONSULTARE LE ISTRUZIONI DEL RISPETTIVO KIT DI REAGENTI PER OTTENERE INFORMAZIONI SU COME RIMUOVERE COMPLETAMENTE IL SUBSTRATO DALLE TUBAZIONI



CAUTELA

È FONDAMENTALE PRESERVARE L'INTEGRITÀ DEGLI INIETTORI, PERCHÉ UN EVENTUALE DANNEGGIAMENTO POTREBBE COMPROMETTERE L'ACCURATEZZA DI EROGAZIONE E PROVOCARE DANNI ALLO STRUMENTO.



Nota

Gli aghi degli iniettori possono essere cambiati sostituendo il porta-iniettori insieme ai tubi corrispondenti.

**CAUTELA****IL PULSANTE (O I PULSANTI) SULLA SCATOLA INIETTORI HA DUE FUNZIONI:**

- **PREMERE IL PULSANTE PER MENO DI 3 SECONDI PER AVVIARE LA PROCEDURA PRIME (RIEMPIMENTO).**
- **PREMERE IL PULSANTE PER PIÙ DI 3 SECONDI PER AVVIARE LA PROCEDURA WASH (LAVAGGIO).**
- **I PARAMETRI DEVONO ESSERE IMPOSTATI NEL SOFTWARE I-CONTROL.**

Vaschetta degli scarti

Quando si avvia a una misurazione con l'operazione di **iniezione** o **erogazione**, 5 µl di liquido vengono erogati in un contenitore monouso posto sul porta-piastre prima che la procedura di **iniezione** o **erogazione** abbia inizio.

Questa fase di erogazione iniziale garantisce che le condizioni di iniezione/erogazione siano le medesime per tutti i pozzetti. Questa speciale fase di erogazione dipende dalla modalità di riempimento selezionata sull'iniettore o sulla striscia di erogazione (vedere il capitolo 4.10.4 Modalità di misurazione con iniettori per indicazioni dettagliate).

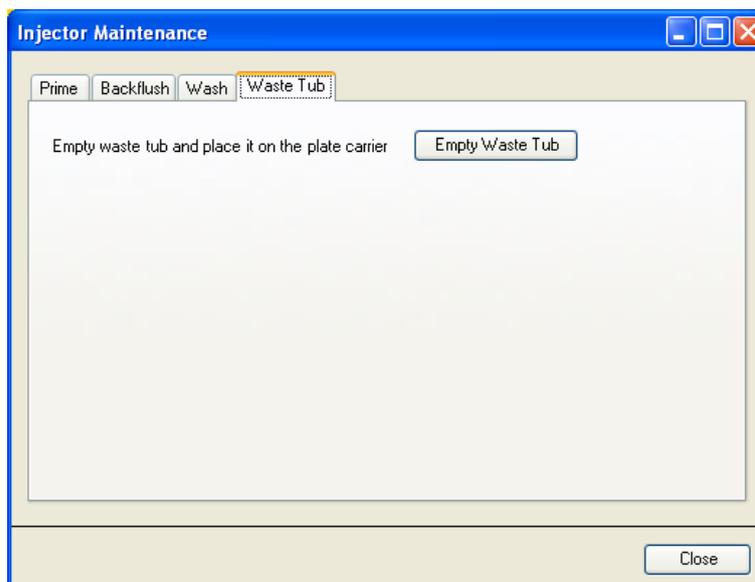
Se si usa la modalità di riempimento **standard**, a ogni riempimento segue una fase di erogazione. Se si usa la modalità **refill for every injection (riempimento ad ogni iniezione)**, il riempimento viene eseguito una sola volta all'inizio della misurazione.

Il contenitore monouso per rifiuti (vaschetta degli scarti) deve quindi essere svuotato di tanto in tanto. Il volume di riempimento massimo è di 1,5 ml. Un contatore interno controlla i volumi di liquido erogati; il software avvisa l'utente quando è il momento di svuotare la vaschetta degli scarti.



Figura 30: Vaschetta degli scarti sul porta-piastre.

Procedura di svuotamento della vaschetta degli scarti (i-control):



Fare clic sul pulsante **Empty Waste tub (Svuota vaschetta degli scarti)** e il porta-piastre verrà estratto automaticamente. Rimuovere la vaschetta e svuotarne il contenuto, quindi riposizionarla sul porta-piastre. Il software i-control avvisa l'utente quando è il momento di svuotare nuovamente la vaschetta.



CAUTELA

POSIZIONARE LA VASCHETTA DEGLI SCARTI SUL PORTA-PIASTRE PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE CON L'OPERAZIONE DI INIEZIONE E/O EROGAZIONE.



CAUTELA

SI CONSIGLIA DI SVUOTARE LA VASCHETTA DEGLI SCARTI PRIMA DI INIZIARE UNA MISURAZIONE E DI SVUOTARLA ALMENO UNA VOLTA AL GIORNO.



AVVERTENZA

I MATERIALI DI SCARTO (MICROPIASTRE) UTILIZZATI NEI PROCESSI SVOLTI CON IL LETTORE INFINITE POSSONO ESSERE ASSOCIATI A RISCHI BIOLOGICI.

GESTIRE LE MICROPIASTRE USATE, GLI ALTRI DISPOSITIVI A PERDERE E TUTTE LE SOSTANZE UTILIZZATE IN CONFORMITÀ ALLE DIRETTIVE INERENTI LE CORRETTE PRATICHE DI LABORATORIO.

INFORMARSI CIRCA I PUNTI DI RACCOLTA IDONEI E I METODI DI SMALTIMENTO APPROVATI NEL PROPRIO PAESE, STATO O REGIONE.

4.10.3 *Prima di avviare una misurazione con gli iniettori*

Prima di dare inizio alla misurazione, assicurarsi che:

- I tubi siano puliti. In caso contrario, consultare il capitolo 4.10.1 Riempimento iniziale e lavaggio del lettore Infinite per ulteriori dettagli sulla procedura di pulizia del sistema iniettore.
- I tubi dell'iniettore siano correttamente inseriti e fissati nei flaconi di stoccaggio.
- Il sistema iniettore sia stato riempito. Non è possibile avviare una misurazione senza prima eseguire la procedura di riempimento iniziale (priming).

Durante il priming del sistema:

- Prima di eseguire il priming con i reagenti appropriati, verificare che i tubi non presentino perdite, ispezionandoli visivamente o utilizzando un fluido non pericoloso.
- Prima di eseguire il priming con i reagenti appropriati, verificare che i tubi non siano attorcigliati, ispezionandoli visivamente o utilizzando un fluido non pericoloso.
- Assicurarsi che gli aghi degli iniettori non siano piegati.
- Se per qualche motivo si rende necessario sostituire i tubi, dopo la sostituzione non dimenticare di eseguire il lavaggio e il priming prima di avviare una misurazione.

4.10.4 Modalità di misurazione con iniettori (i-control)

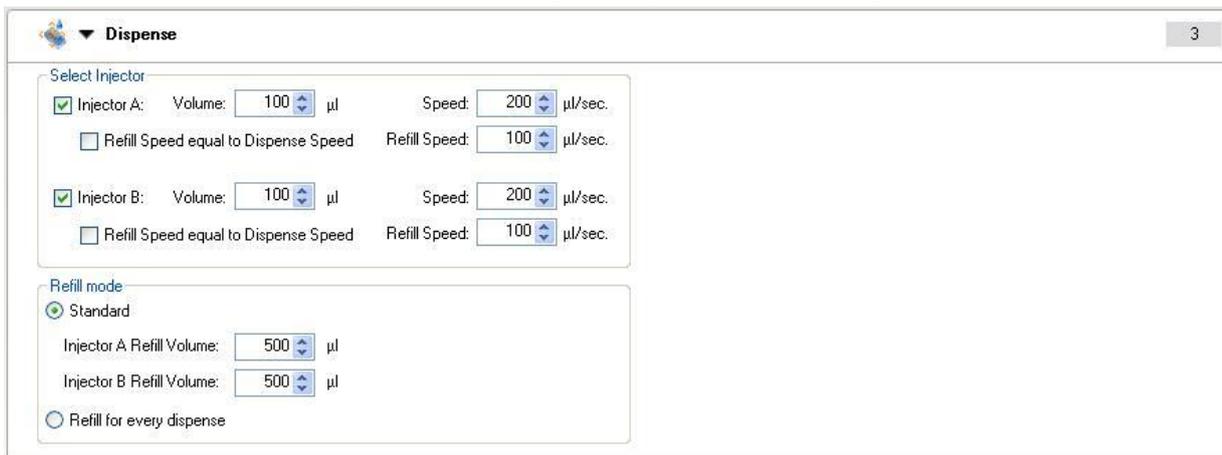
Sono disponibili due modalità di misurazione con iniettore:

Erogazione: La modalità di erogazione consente di distribuire il liquido nei pozzetti selezionati procedendo di piastra in piastra.

Iniezione: Questa modalità va utilizzata in combinazione con una striscia di misurazione. L'operazione di iniezione procede per singolo pozzetto.

Modalità Erogazione

Le impostazioni di erogazione possono essere regolate tramite il software:



Dispense (Erogazione)

Select Injector (Selezione iniettore): è possibile selezionare Injector A (iniettore A) e/o Injector B (iniettore B).

Speed (Velocità): La velocità di iniezione deve essere compresa tra 100 e 300 µl/sec per ciascun iniettore.

Selezionare la **Refill speed (Velocità di riempimento)** di ciascun iniettore in un intervallo compreso tra 100 e 300 µl/sec., oppure selezionare **Refill Speed equal to Dispense Speed (Velocità di riempimento uguale a velocità di erogazione)**.

Selezionare la modalità di riempimento **Standard** se il riempimento deve essere effettuato quando la siringa è vuota (vengono eseguiti più passaggi di erogazione prima del riempimento). Il riempimento avviene dopo l'erogazione di circa 800 µl).

Selezionare **Refill for every dispense (Riempimento ad ogni erogazione)** per eseguire il riempimento ad ogni fase di erogazione.

Utilizzo della striscia di erogazione

The screenshot shows the software interface for configuring a plate and its dispensing parameters. It is divided into three main sections:

- Plate (1):** Shows the plate definition as "[GRE96fb_chimney] - Greiner 96 Flat Black". There is a checkbox for "Plate with cover" and a "Details..." button. A link "Use a part of the plate" is also visible.
- Part of Plate (2):** Displays a 12x8 grid of wells (A-H, 1-12). Wells A1-A5 are highlighted in yellow, while all other wells are blue. A "Details..." button is present.
- Dispense (3):** Contains settings for two injectors:
 - Select Injector:**
 - Injector A:** Volume: 100 µl, Speed: 200 µl/sec. Refill Speed equal to Dispense Speed, Refill Speed: 100 µl/sec.
 - Injector B:** Volume: 100 µl, Speed: 200 µl/sec. Refill Speed equal to Dispense Speed, Refill Speed: 100 µl/sec.
 - Refill mode:**
 - Standard**
 - Injector A Refill Volume: 500 µl
 - Injector B Refill Volume: 500 µl
 - Refill for every dispense

Plate (Piastra)	Selezionare il tipo appropriato di piastra
Part of the plate (Porzione di piastra)	Opzionale; Selezionare i pozzetti da riempire
Dispense (Erogazione)	Impostare i parametri di erogazione. Se vengono selezionati entrambi gli iniettori, tutti i pozzetti vengono riempiti prima con l'iniettore A e poi con l'iniettore B. Se si usa la striscia di erogazione, non è necessaria una striscia di misurazione aggiuntiva.
Dispense volume (Volume di erogazione)	Il volume di iniezione dipende dal tipo di micropiastra. I file di definizione piastra includono il cosiddetto volume di esercizio, che corrisponde al volume massimo da erogare nella micropiastra selezionata. Pertanto, occorre accertarsi che le impostazioni relative al volume di esercizio del file di definizione piastra siano corrette. Il volume di erogazione massimo corrisponde a 800 µl/striscia di erogazione. In caso sia necessario erogare un volume superiore a 800 µl (ad es., per piastre a 6 pozzetti), si dovrà fare ricorso a più strisce di erogazione.

Modalità Iniezione

Le impostazioni di iniezione possono essere regolate tramite il software:

Iniezione

Select Injector (Selezione iniettore):

è possibile selezionare Injector A (iniettore A) o Injector B (iniettore B). Non è possibile selezionare entrambi gli iniettori per un'unica striscia. Per eseguire la misurazione con due iniettori, è necessario utilizzare due strisce iniettore.

Speed (Velocità): La velocità di iniezione deve essere compresa tra 100 e 300 µl/sec per ciascun iniettore.

Selezionare la **Refill speed (Velocità di riempimento)** di ciascun iniettore in un intervallo compreso tra 100 e 300 µl/sec. O selezionare **Refill Speed equal to Injection Speed (Velocità di riempimento uguale a velocità di iniezione)** spuntando l'apposita casella.

Selezionare la modalità di riempimento **Standard** se il riempimento deve essere effettuato quando la siringa è vuota (vengono eseguiti più passaggi di iniezione prima del riempimento. Il riempimento avviene dopo l'erogazione di circa 800 µl). Selezionare **Refill for every injection (Riempimento ad ogni iniezione)** per eseguire il riempimento ad ogni fase di iniezione.

Injection volume (Volume di iniezione)

Il volume di iniezione dipende dal tipo di micropiastra. I file di definizione piastra includono il cosiddetto volume di esercizio, che corrisponde al volume massimo da iniettare nella micropiastra selezionata. Pertanto, occorre accertarsi che le impostazioni relative al volume di esercizio del file di definizione piastra siano corrette. Il volume di iniezione massimo corrisponde a 800 µl/striscia di iniezione. In caso sia necessario iniettare un volume superiore a 800 µl (ad es., per piastre a 6 pozzetti), si dovrà fare ricorso a più strisce di iniezione.

Utilizzo della striscia di iniezione

The screenshot shows the following configuration details:

- 1 Plate:** Plate definition: [GRE96fb_chimney] - Greiner 96 Flat Black. Plate with cover.
- 2 Part of Plate:** A 12x8 grid of wells. Wells A1-A5 are highlighted in yellow.
- 3 Well:** (Empty section)
- 4 Injection:**
 - Select Injector:**
 - Injector A:** Volume: 100 µl, Speed: 200 µl/sec. Refill Speed equal to Injection Speed. Refill Speed: 100 µl/sec.
 - Injector B:** Volume: 100 µl, Speed: 200 µl/sec. Refill Speed equal to Injection Speed. Refill Speed: 100 µl/sec.
 - Refill mode:**
 - Standard:** Injector A Refill Volume: 500 µl, Injector B Refill Volume: 500 µl.
 - Refill for every injection.
- 5 Absorbance (Well-wise):**
 - Wavelength:** Measurement: 400 nm (9). Reference.
 - Read:** Number of flashes: 25, Settle time: 0 ms.
 - Multiple Reads per Well:** Multiple reads per well.
 - Label:** Name: Label1.

Plate (Piastra)	Selezionare il tipo appropriato di piastra.
Part of the plate (Porzione di piastra)	Opzionale; selezionare i pozzetti da riempire
Well (Pozzetto)	La striscia pozzetto è obbligatoria L'iniezione è possibile solo in abbinamento a una striscia pozzetto . Questa striscia garantisce che l'iniezione nelle strisce successive sia eseguita per singolo pozzetto.
Iniezione	Impostare i parametri di iniezione. È possibile selezionare un solo iniettore per striscia. Se bisogna utilizzare entrambi gli iniettori o se un unico iniettore deve eseguire due iniezioni, è necessario inserire una striscia di iniezione supplementare.
Measurement strip (Striscia di misurazione) (Esempio: assorbanza)	È obbligatorio usare almeno una striscia di misurazione in combinazione con la striscia di iniezione. La posizione della striscia (delle strisce) di misurazione (prima e/o dopo la striscia di iniezione) dipende dall'applicazione, pertanto può essere selezionata dall'utente.

**Nota**

Assicurarsi che il valore del volume di esercizio indicato nel file di definizione della piastra sia superiore al valore del volume utilizzato per l'iniezione.

Striscia Attesa

È possibile inserire nella procedura una striscia **Wait (Attesa) [timer]** (ritardo o tempo di pausa).


▼ **Wait (Timer)**

Timer

Wait time: (hh:mm:ss)

Options

Wait for injection

Ignore wait at last kinetic cycle

Wait time (Tempo di attesa)	Selezionare la durata nel formato hh:mm:ss nell'intervallo compreso tra 00:00:01 e 23:59:59
Options (Opzioni)	<p>Se viene selezionata l'opzione Wait for injection (Attesa per l'iniezione), il tempo di attesa include il tempo di iniezione.</p> <p>Se l'opzione Wait for injection (Attesa per l'iniezione) NON viene selezionata, il tempo di attesa sarà aggiunto al tempo di iniezione.</p>

4.11 Misurazioni del bianco

Tramite il software è possibile eseguire la cosiddetta misurazione del bianco (**Blanking**). L'opzione **Blanking** è disponibile nel menu **Instrument (Strumento)** solo se è stato aperto uno script di misurazione con cuvetta. Quando si seleziona **Blanking** nel menu **Instrument**, viene attivata una misurazione di assorbanza con cuvetta inserita nel proprio alloggiamento, basata sui parametri (lunghezza d'onda, numero di flash, tempo di pausa) dello script corrente. L'utente deve inserire la cuvetta con il bianco (contenente, ad es., una soluzione tampone) e avviare la misurazione. I dati relativi al bianco vengono quindi riportati in un foglio di calcolo in formato Excel. I dati vengono anche memorizzati nel software e possono essere applicati alle successive misurazioni con cuvetta eseguite con gli stessi parametri. I dati relativi al bianco vengono automaticamente sottratti se si spunta la casella di controllo **Apply Blanking (Applica Blanking)** nella striscia **Absorbance** o **Absorbance Scan (Scansione in assorbanza)**.

I dati del bianco rimangono memorizzati nel software fino all'esecuzione di altre misurazioni del bianco o fin quando il software non viene chiuso. Tenere presente che, quando viene avviata una nuova misurazione del bianco, i dati di blanking memorizzati verranno sovrascritti senza alcun messaggio di avviso. Inoltre, i suddetti dati saranno eliminati senza alcun messaggio di avviso al momento della chiusura del software.



CAUTELA

ALL'AVVIO DI UNA NUOVA MISURAZIONE DEL BIANCO, I DATI DI BLANKING VERRANNO SOVRASCRITTI SENZA ALCUN MESSAGGIO DI AVVISO. I SUDDETTI DATI SARANNO ELIMINATI SENZA ALCUN MESSAGGIO DI AVVISO AL MOMENTO DELLA CHIUSURA DEL SOFTWARE I-CONTROL.

4.12 Misurazioni con cuvetta

4.12.1 Striscia per cuvetta

Per eseguire una misurazione con cuvetta, è necessaria una striscia per **Cuvette**



Figura 31: Striscia per cuvetta

Per alcune applicazioni potrebbe rendersi necessario combinare una misurazione su micropiastra con una misurazione in cuvetta. Il software i-control consente quindi l'utilizzo di una striscia per cuvetta e di una striscia piastra nello stesso script di misurazione. La misurazione della cuvetta deve essere posizionata prima della misurazione della micropiastra. Per eseguire una misurazione accurata della micropiastra, lo sportello della cuvetta deve essere chiuso. Pertanto, il software non consente all'utente di utilizzare una striscia **Move cuvette OUT (Estrazione cuvetta)** prima della misurazione della micropiastra (vedere anche il capitolo 4.12.3).

4.12.2 Spostamenti della cuvetta

La cuvetta può essere inserita ed estratta agendo sui pulsanti di **inserimento cuvetta** ed **estrazione cuvetta** oppure selezionando **Cuvette in/Cuvette out (Inserimento/Estrazione cuvetta)** nella finestra di dialogo **Strumento/Spostamenti**.



Figura 32: Pulsanti **Estrazione e Inserimento cuvetta**

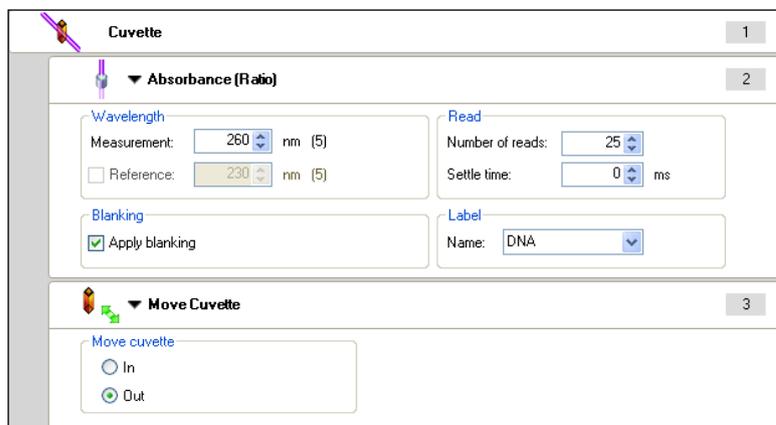
4.12.3 Esempi di utilizzo della cuvetta con i-control

Esempio 1:

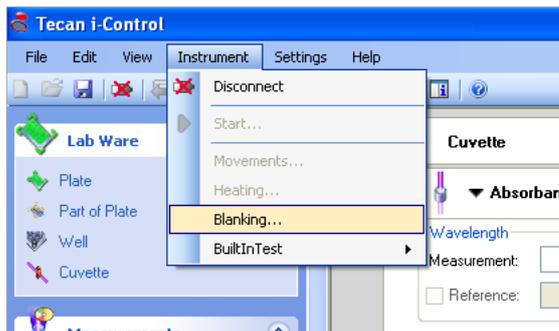
Esempio di utilizzo della funzione **Blanking** per la misurazione di un campione di DNA:

Preparare la cuvetta con il tampone di diluizione del campione

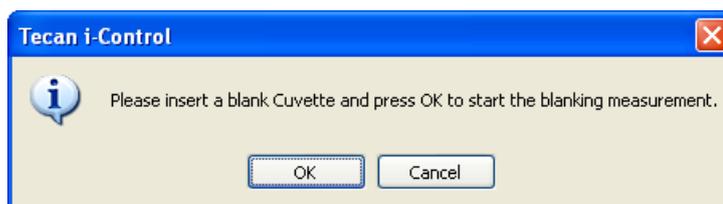
Impostare la misurazione del DNA nel software i-control:



Selezionare **Z-Position (Posizione Z)** dal menu **Instrument (Strumento)**:

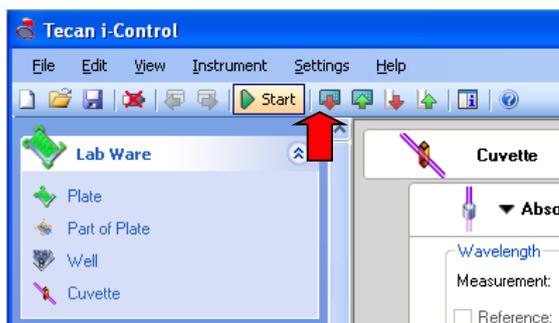


Lo strumento viene inizializzato e il supporto della cuvetta viene estratto. L'utente è invitato a inserire la cuvetta con il bianco:



Inserire la cuvetta con il bianco e fare clic su **OK** per avviare la misurazione del bianco. I dati del bianco misurati vengono visualizzati in un foglio di calcolo Excel. Il supporto della cuvetta viene estratto.

Rimuovere la cuvetta del bianco. Preparare la cuvetta del campione e posizionarla sul supporto per cuvetta. Avviare la misurazione facendo clic su **Start (Avvio)**:

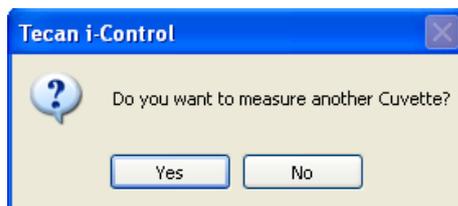


Il supporto della cuvetta viene inserito nello strumento e la misurazione ha inizio. I dati di misurazione (Value [Valore]), così come i dati del bianco (Blank[Bianco]) e delle misurazioni differenziali (Diff) vengono riportati su un foglio di calcolo Excel:

Esempio di visualizzazione dei dati dopo la misurazione di due cuvette:

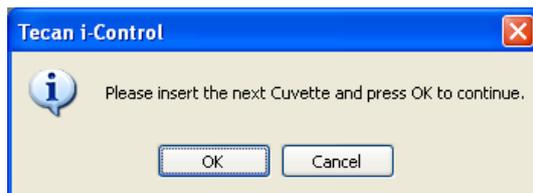
Info: Blank data from: 20.03.2006 15:34:31				
	Value	Blank	Diff	
Cuv: 1	1.032	0.054	0.978	
Cuv: 2	1.409	0.054	1.355	

Una volta completata la misurazione della prima cuvetta (Cuv: 1), compare il seguente messaggio:



Fare clic su **No** per terminare la misurazione.

Fare clic su **Yes** per continuare:

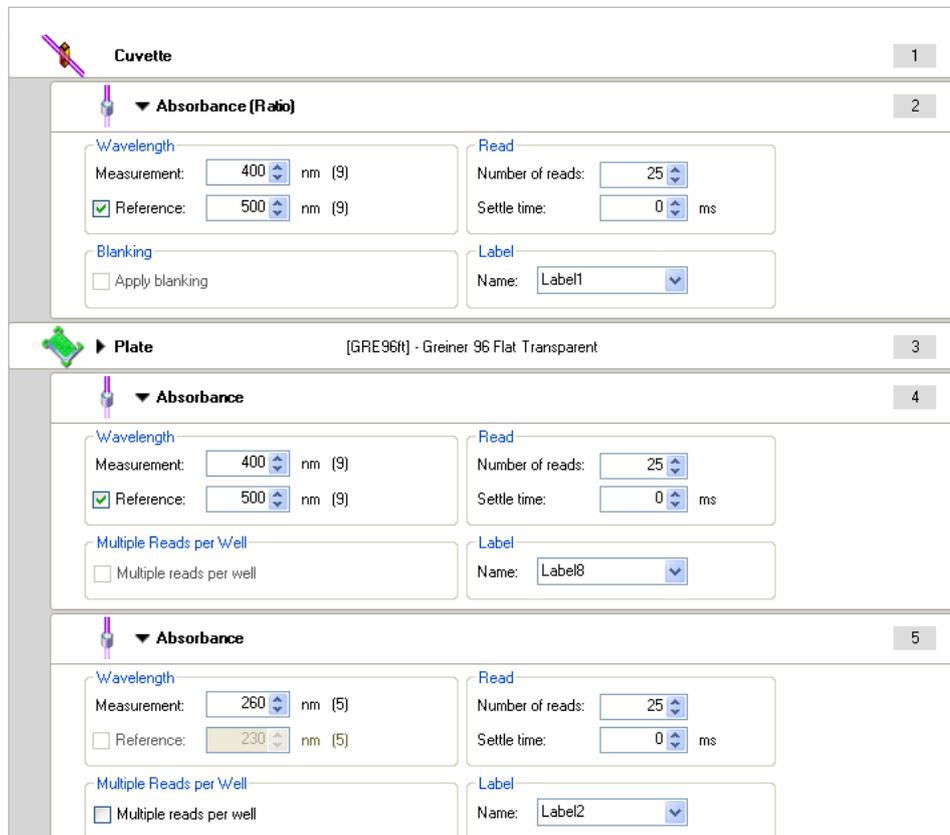


Inserire la successiva cuvetta contenente il campione e fare clic su **OK** per continuare la misurazione.

Esempio 2:

Combinazione di misurazione su micropiastra e misurazione in cuvetta:

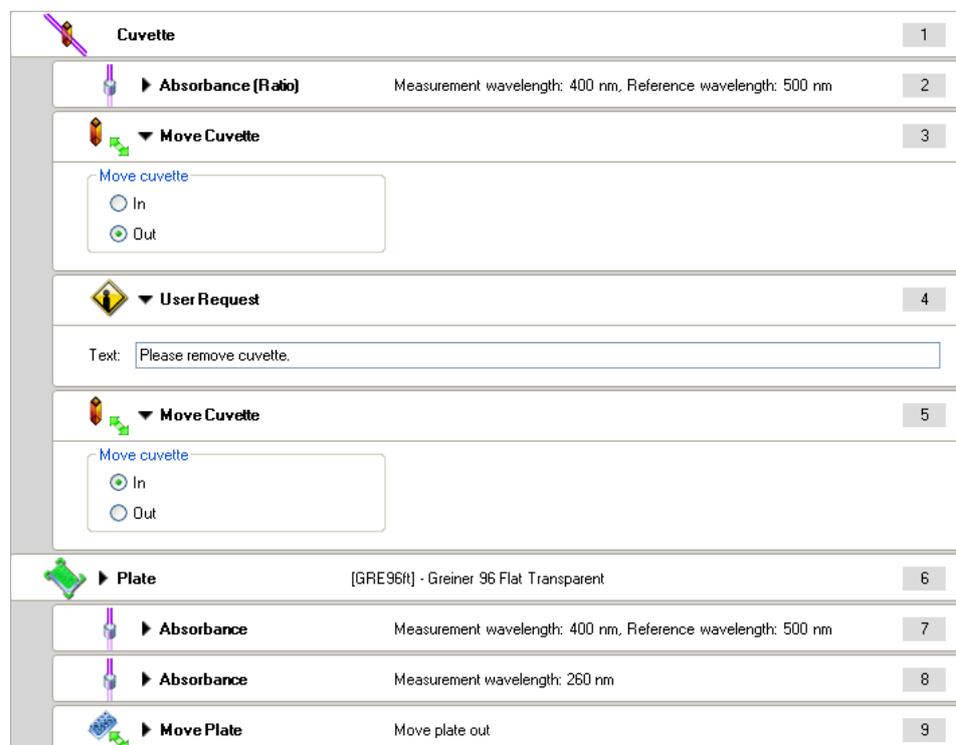
Per alcune applicazioni potrebbe rendersi necessario confrontare i dati misurati su una micropiastra con i dati misurati in una cuvetta. L'esempio che segue mostra come impostare questa misurazione in generale:



<p>Cuvette (Cuvetta)</p>	<p>Necessaria per misurazioni in cuvetta.</p>
<p>Striscia di assorbanza (cuvetta)</p>	<p>È possibile utilizzare fino a 4 strisce di assorbanza a lunghezza d'onda fissa. La lunghezza d'onda di riferimento è selezionabile solo se si utilizza una striscia di assorbanza a lunghezza d'onda fissa. Apply blanking (Applica Blanking) è disabilitato quando viene selezionata una lunghezza d'onda di riferimento. Selezionare i parametri di misurazione appropriati (lunghezza d'onda, numero di flash e tempo di pausa)</p>
<p>Plate (Piastra)</p>	<p>Necessaria per misurazioni su piastra. Selezionare un tipo di piastra appropriato per la misurazione.</p>
<p>Part of Plate (Porzione di piastra) (non illustrata)</p>	<p>Opzionale. Utilizzare la striscia part of plate se si intende misurare solo una porzione della piastra.</p>
<p>Absorbance strip (Striscia di assorbanza) (micropiastra)</p>	<p>È possibile utilizzare fino a 10 strisce di assorbanza a lunghezza d'onda fissa. La lunghezza d'onda di riferimento è abilitata solo per la prima striscia di assorbanza. La lunghezza d'onda di riferimento è disabilitata per le strisce di assorbanza da 2 a 10. Selezionare i parametri di misurazione appropriati (lunghezza d'onda, numero di flash e tempo di pausa) per l'applicazione in uso.</p>

Esempio 3:

Uso della striscia **Move Cuvette OUT (Estrazione cuvetta)** per la misurazione combinata di micropiastra e cuvetta:



Cuvette (Cuvetta)	Necessaria per misurazioni in cuvetta
Absorbance strip (Striscia di assorbanza) (cuvetta)	È possibile utilizzare fino a 4 strisce di assorbanza a lunghezza d'onda fissa. La lunghezza d'onda di riferimento è selezionabile solo se si utilizza una striscia di assorbanza a lunghezza d'onda fissa. Apply blanking (Applica Blanking) è disabilitato quando viene selezionata una lunghezza d'onda di riferimento. Selezionare i parametri di misurazione appropriati (lunghezza d'onda, numero di flash e tempo di pausa)
Move Cuvette (Out) (Estrazione cuvetta)	Il supporto della cuvetta viene estratto .
User Request (Richiesta utente)	La richiesta utente interrompe la misurazione e consente quindi di rimuovere la cuvetta dall'alloggiamento per cuvetta. Se si conferma la richiesta, la misurazione prosegue.
Move Cuvette (In) (Inserimento cuvetta)	Il supporto della cuvetta viene inserito.
Piastra	Necessaria per misurazioni su piastra. Selezionare un tipo di piastra appropriato per la misurazione.
Part of Plate (Porzione di piastra) (non illustrata)	Opzionale. Utilizzare la striscia part of plate se si intende misurare solo una porzione della piastra.

Striscia di assorbanza (micropiastra)	<p>È possibile utilizzare fino a 10 strisce di assorbanza a lunghezza d'onda fissa. La lunghezza d'onda di riferimento è consentita solo sulla prima striscia di assorbanza. La lunghezza d'onda di riferimento è disabilitata per le strisce di assorbanza da 2 a 10.</p> <p>Selezionare i parametri di misurazione appropriati (lunghezza d'onda, numero di flash e tempo di pausa) per l'applicazione in uso.</p>
Move Plate (Sposta piastra)	<p>Opzionale. Per estrarre automaticamente la micropiastra dallo strumento al termine della misurazione, selezionare Move plate OUT.</p>

4.13 Esempi i-control

Esempio 1: Saggio Dual-Luciferase® (Promega Corp.)

Per conoscere i dettagli relativi al saggio, collegarsi al sito www.promega.com.

	▶ Plate	
	Well	
	▶ Injection	Injector A, Volume: 100, Speed: 200
	▶ Wait (Timer)	Wait: 00:00:02 (hh:mm:ss)
	▶ Luminescence (Ratio)	Attenuation: NONE
	▶ Injection	Injector B, Volume: 100, Speed: 200
	▶ Wait (Timer)	Wait: 00:00:02 (hh:mm:ss)
	▶ Luminescence (Ratio)	Attenuation: NONE
	▶ Move Plate	Move plate out

Plate (Piastra)	Selezionare il tipo appropriato di piastra. Per le misurazioni della luminescenza, sono consigliate le micropiastre bianche. Per questo esempio è stata selezionata una piastra bianca da 96 pozzetti.
Part of the plate (Porzione di piastra)	(Non illustrata); questa opzione può essere selezionata se si intende processare solo una porzione della piastra.
Well (Pozzetto)	Obbligatorio per misurazioni con injection (iniezione)
Injection (1)	L'iniettore A inietta 100 µl a una velocità di 200 µl/sec., modalità di riempimento: standard
Wait (Timer) (Attesa [timer])	Tempo di attesa 2 sec.
Luminescence (1)	Misurazione della luminescenza con tempo di integrazione di 10 sec., attenuazione nessuna
Injection (2)	L'iniettore B inietta 100 µl a una velocità di 200 µl/sec., modalità di riempimento standard
Wait (Timer) (Attesa [timer])	Tempo di attesa 2 sec.
Luminescence (2)	Misurazione della luminescenza con tempo di integrazione di 10 sec., attenuazione nessuna
Move Plate (Sposta piastra)	La piastra viene estratta una volta terminati i pozzetti



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

Esempio 2: Kit di rilevamento della bioluminescenza del sistema di analisi dell'ATP Enliten® per ATP (Promega Corp.)

Per conoscere i dettagli relativi al saggio, collegarsi al sito www.promega.com.

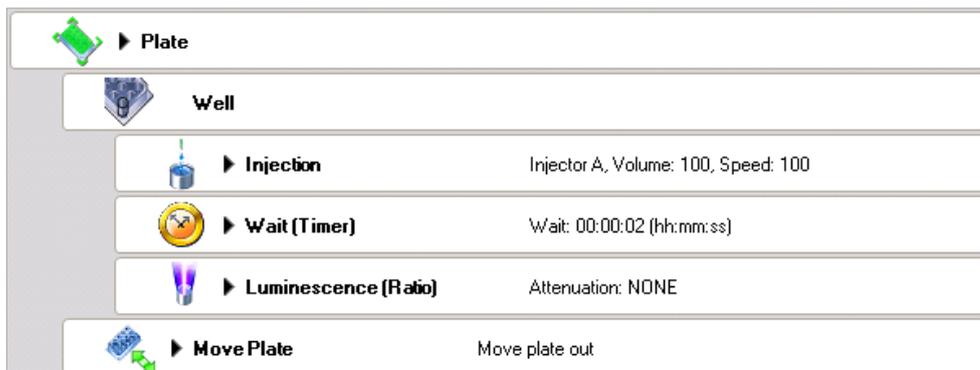


Plate (Piastra)	Selezionare il tipo appropriato di piastra. Per le misurazioni della luminescenza, sono consigliate le micropiastre bianche. Per questo esempio è stata selezionata una piastra bianca da 96 pozzetti.
Part of the plate (Porzione di piastra)	(Non illustrata); questa opzione può essere selezionata se si vuole processare solo una porzione della piastra.
Well (Pozzetto)	Obbligatorio per misurazioni con injection (iniezione)
Iniezione	L'iniettore A inietta 100 µl a una velocità di 100 µl/sec., modalità di riempimento: standard
Wait (Timer) (Attesa [timer])	Tempo di attesa 2 sec.
Luminescence (Luminescenza)	Misurazione della luminescenza con tempo di integrazione di 10 sec., attenuazione nessuna
Move Plate (Sposta piastra)	La piastra viene estratta una volta terminati i pozzetti.



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

Esempio 3: Misurazione di sonde sensibili al Ca²⁺ – Fura-2

 ▼ Plate	1
Plate definition: [GRE96fb] - Greiner 96 Flat Black	Details...
<input type="checkbox"/> Plate with cover	Use a part of the plate
 Well	2
 ▶ Kinetic Cycle	20 cycles
3	
 ▶ Kinetic Condition	Handling for cycle 5
4	
 ▶ Injection	Injector A, Volume: 20, Speed: 200
5	
 ▶ Fluorescence Intensity (Ratio)	Excitation wavelength: 380 nm, Emission wavelength: 510 nm
6	
 ▶ Fluorescence Intensity (Ratio)	Excitation wavelength: 340 nm, Emission wavelength: 510 nm
7	
 ▶ Move Plate	Move plate out
8	

Plate (Piastra)	Selezionare il tipo appropriato di piastra. Per le misurazioni della fluorescenza, sono consigliate le micropiastre nere. Per questo esempio è stata selezionata una piastra nera da 96 pozzetti.
Part of the plate (Porzione di piastra)	(Non illustrata); questa opzione può essere selezionata se si vuole processare solo una porzione della piastra.
Well (Pozzetto)	Obbligatorio per misurazioni con injection (iniezione)
Kinetic Cycle (Ciclo cinetico)	Selezionare il numero di cicli necessari
Kinetic condition (Condizione cinetica)	Questa striscia consente di eseguire delle operazioni un'unica volta all'interno di un'esecuzione cinetica in un determinato ciclo. La striscia di iniezione sottostante viene processata solo una volta nel ciclo selezionato.
Injection (Iniezione)	L'iniettore A inietta 20 µl con una velocità di 200 µl/sec., modalità di riempimento: non selezionabile; l'iniezione viene eseguita al ciclo 5 (definito dalla striscia della condizione cinetica)
Fluorescence Intensity (Intensità di fluorescenza) (1)	Selezionare i parametri appropriati per la prima etichetta: Excitation wavelength (Lunghezza d'onda di eccitazione): 380 nm, Emission wavelength (Lunghezza d'onda di emissione): 510 nm; number of flashes (numero di flash): 25; integration time (tempo d'integrazione): 40; gain (guadagno): manual (manuale)
Fluorescence Intensity (Intensità di fluorescenza) (2)	Selezionare i parametri appropriati per la seconda etichetta: Excitation wavelength (Lunghezza d'onda di eccitazione): 340 nm, Emission wavelength (Lunghezza d'onda di emissione): 510 nm; number of flashes (numero di flash): 25; integration time (tempo d'integrazione): 40; gain (guadagno): manual (manuale)
Move Plate (Sposta piastra)	La piastra viene estratta una volta terminati i pozzetti

Esempio 4: Misurazione di sonde sensibili al Ca²⁺ – Indo-1

 ▶ Plate	1	
 Well	2	
 ▶ Kinetic Cycle	20 cycles	3
 ▶ Kinetic Condition	Handling for cycle 5	4
 ▶ Injection	Injector A, Volume: 20, Speed: 200	5
 ▶ Fluorescence Intensity (Ratio)	Excitation wavelength: 340 nm, Emission wavelength: 410 nm	6
 ▶ Fluorescence Intensity (Ratio)	Excitation wavelength: 340 nm, Emission wavelength: 480 nm	7
 ▶ Move Plate	Move plate out	8

Plate (Piastra)	Selezionare il tipo appropriato di piastra. Per le misurazioni della fluorescenza, sono consigliate le micropiastre nere. Per questo esempio è stata selezionata una piastra nera da 96 pozzetti.
Part of the plate (Porzione di piastra)	(Non illustrata); questa opzione può essere selezionata se si vuole processare solo una porzione della piastra.
Well (Pozzetto)	Obbligatorio per misurazioni con injection (iniezione)
Kinetic Cycle (Ciclo cinetico)	Selezionare il numero di cicli necessari
Kinetic condition (Condizione cinetica)	Questa striscia consente di eseguire delle operazioni un'unica volta all'interno di un'esecuzione cinetica in un determinato ciclo. La striscia di iniezione sottostante viene processata solo una volta nel ciclo selezionato.
Iniezione	L'iniettore A inietta 20 µl con una velocità di 200 µl/sec., modalità di riempimento: non selezionabile; l'iniezione viene eseguita al ciclo 5 (definito dalla striscia della condizione cinetica)
Fluorescence Intensity (Intensità di fluorescenza) (1)	Selezionare i parametri appropriati per la prima etichetta: Excitation wavelength (Lunghezza d'onda di eccitazione): 340 nm, Emission wavelength (Lunghezza d'onda di emissione): 410 nm; number of flashes (numero di flash): 25; integration time (tempo d'integrazione): 40; gain (guadagno): manual (manuale)
Fluorescence Intensity (Intensità di fluorescenza) (2)	Selezionare i parametri appropriati per la seconda etichetta: Excitation wavelength (Lunghezza d'onda di eccitazione): 340 nm, Emission wavelength (Lunghezza d'onda di emissione): 480 nm; number of flashes (numero di flash): 25; integration time (tempo d'integrazione): 40; gain (guadagno): manual (manuale)
Sposta piastra	La piastra viene estratta una volta terminati i pozzetti.

4.14 Conclusione di una sessione di misurazione

4.14.1 *Disconnessione dello strumento*

Quando si effettua la disconnessione, la comunicazione tra lo strumento e il computer si interrompe.



Nota

Rimuovere la micropiastra e/o la cuvetta prima di scollegare lo strumento dal computer.

4.14.2 *Spegnimento dello strumento*

Al momento dello spegnimento, il funzionamento dello strumento si interrompe immediatamente. Generalmente si dovrebbe scollegare lo strumento prima di spegnerlo. Nell'improbabile eventualità di un errore materiale imprevisto, lo spegnimento immediato dello strumento ridurrà il rischio di possibili danni.

5. Funzioni dello strumento

5.1 Introduzione



Nota

Tutte le specifiche sono soggette a modifiche senza preavviso.

Il lettore Infinite completo di tutti gli accessori consente di effettuare i seguenti tipi di misurazioni:

Tipo di misurazione	Descrizione
Intensità di fluorescenza Cima/Fondo	Vedere 5.3 Intensità di fluorescenza e fluorescenza a risoluzione temporale (TRF)
Fluorescenza a risoluzione temporale	Vedere 5.3 Intensità di fluorescenza e fluorescenza a risoluzione temporale (TRF)
Polarizzazione di fluorescenza	Vedere 5.4 Polarizzazione di fluorescenza (FP) - (solo per Infinite F Plex)
Assorbanza	Vedere 5.5 Assorbanza
Luminescenza in modalità "glow"	Vedere 5.6 Luminescenza in modalità "glow"
Luminescenza a doppio colore	Vedere 5.8 Luminescenza a doppio colore (ad es. BRET)
Luminescenza in modalità "flash"	Vedere 5.7 Luminescenza in modalità "flash"

Tutte le micropiastre standard contenenti da 6 a 384 pozzetti conformi alle seguenti norme sono idonee a essere processate con uno qualsiasi dei metodi sopra indicati:

- ANSI/SBS 1-2004;
- ANSI/SBS 2-2004;
- ANSI/SBS 3-2004 e
- ANSI/SBS 4-2004.

Lo strumento è in grado di eseguire misurazioni cinetiche.

La lettura potrebbe essere limitata a una porzione della micropiastro.

5.2 Specifiche dello strumento

Nella tabella sottostante vengono elencate le specifiche tecniche dello strumento:

Parametri	Caratteristiche
Informazioni generali	
Misurazione	Controllata da software
Interfaccia	USB
Gestione dei filtri:	
Modelli Infinite F	Scambio filtri esterno
Modelli Infinite M	Selezione della lunghezza d'onda tramite monocromatore – non sono necessari filtri
Micropiastre idonee alla misurazione	Piastre contenenti da 6 a 384 pozzetti (Formati standard SBS)
Definizione piastra	Tramite software di scansione
Controllo della temperatura	Da 5 °C sopra la temperatura ambiente fino a 42 °C
Agitazione piastra	Agitazione lineare e orbitale, ampiezza selezionabile in un intervallo compreso tra 1 e 6 mm, a incrementi di 0,5 mm
Sorgente luminosa	Lampada flash allo xeno a energia elevata, durata: 10 ⁸ flash
Ottica	Lenti in silice fusa
Rilevatori:	
Fluorescenza	PMT con potenziamento spettrale; PMT sensibile all'infrarosso
Luminescenza	Tubo fotomoltiplicatore conteggio di buio basso elettronica di conteggio dei fotoni
Assorbanza	Fotodiodo in silicio
Alimentazione	Adattamento automatico: 100 – 120 V/220 – 240 V, 50-60 Hz
Consumo di energia	150 VA

Parametri	Caratteristiche	
Dati fisici		
Dimensioni esterne:		
strumento in versione base	Larghezza:	425 mm 16,73 pollici
	Altezza:	253 mm 9,96 pollici
	Profondità:	457 mm 17,99 pollici
Modulo pompe	Larghezza:	250 mm 9,84 pollici
	Altezza:	155 mm 6,10 pollici
	Profondità:	156 mm 6,14 pollici
Peso:		
Modelli Infinite F	14 kg	
Modelli Infinite M	15,8 kg	
Modulo pompe	3,4 kg	
Dati ambientali		
Temperatura ambiente:		
Funzionamento	da 15 °C a 30 °C	(da 59 °F a 86 °F)
Inattività	da -20 °C a 60 °C	(da -4 °F a 140 °F)
Umidità relativa:		
Funzionamento	< 80 % senza formazione di condensa	
Categoria di sovratensione	II	
Uso	Strumento da laboratorio per uso generale	
Livello di rumore	< 60 dBA	
Grado d'inquinamento	2	
Metodo di smaltimento	Rifiuto elettronico (rifiuto infetto)	

5.3 Intensità di fluorescenza e fluorescenza a risoluzione temporale (TRF)

Parametri	Caratteristiche
Gamma di lunghezze d'onda - modelli Infinite M	Eccitazione: 230 - 850 nm Emissione: 280 - 850 nm
	valori selezionabili a incrementi di 1 nm
Gamma di lunghezze d'onda - modelli Infinite F	Eccitazione ed emissione: 230 - 850 nm
Filtro standard	Non applicabile – i filtri dello strumento sono a scelta dell'utente

Impostazione del guadagno	Valori	Intervallo di misurazione
Manuale	1 - 255	0 - 60.000 RFU
Ottimale	automatico	0 - 60.000 RFU
Calcolato da pozzetto	automatico	0 - 60.000 RFU

Parametri TRF	Caratteristiche
Tempo d'integrazione	10 - 2000 μ s
Tempo di latenza	0 - 2000 μ s

5.3.1 Definizione del limite di rilevamento

Il limite di rilevamento corrisponde alla concentrazione di fluoroforo in cui il segnale sottratto dal fondo equivale a 3 volte la deviazione standard del rumore di fondo.

Quando si seleziona 1 flash per pozzetto, il porta-piastre non si ferma nella posizione di misurazione. L'uso di più flash per pozzetto può migliorare il limite di rilevamento, ma il tempo totale di misurazione sarà più lungo.

5.3.2 Fluoresceina (Intensità di fluorescenza dall'alto) Cima

Tipo di piastra (numero di pozzetti)	96
Volume di erogazione	200
Numero di flash (letture) per pozzetto	25
Limite di rilevamento della fluoresceina [pM]	< 20 pM
Uniformità con 25 nM di fluoresceina	CV < 3 %
Riproducibilità con 25 nM di fluoresceina	< 2 %

5.3.3 Fluoresceina (Intensità di fluorescenza dal basso) Fondo

Tipo di piastra (numero di pozzetti)	96
Volume di erogazione	200
Numero di flash (letture) per pozzetto	25
Limite di rilevamento della fluoresceina [pM]	100 pM
Uniformità con 25 nM di fluoresceina	CV < 3 %
Riproducibilità con 25 nM di fluoresceina	< 2 %

5.3.4 Europio (Fluorescenza a risoluzione temporale)

Tipo di piastra (numero di pozzetti)	96
Volume di erogazione	200
Numero di flash (letture) per pozzetto	25
Limite di rilevamento dell'europio (Modelli Infinite F)	< 150 fM
Limite di rilevamento dell'europio (Modelli Infinite M)	< 5 pM (valore tipico)

5.4 Polarizzazione di fluorescenza (FP) - (solo per Infinite F Plex)



Nota

*L'opzione **Polarizzazione di fluorescenza** è disponibile esclusivamente per i modelli Infinite F Plex. Questo modulo non può essere installato su altri modelli di lettore Infinite.*

Parametri	Caratteristiche
Intervallo di lunghezza d'onda	Eccitazione: 300 – 850 nm
	Emissione: 330 – 850 nm
Filtro standard	Configurazione impostazioni predefinite della slitta portafiltri Ecc 485 (20) nm Posizione sulla slitta portafiltri di eccitazione: Ecc1: 485 (20) - luce parallela Ecc2: 485 (20) - luce perpendicolare Em 535 (25) nm Posizione sulla slitta portafiltri di emissione: Em1: 535 (25) - luce parallela Em2: 535 (25) - luce parallela

Impostazione del guadagno	Valori	Intervallo di misurazione
Manuale	1 - 255	0 - 60.000 RFU
Ottimale	automatico	0 - 60.000 RFU
Calcolato da pozzetto	automatico	0 - 60.000 RFU

Parametri FP	Caratteristiche
Tempo d'integrazione	20 - 2000 μ s
Tempo di latenza	0 - 2000 μ s
Precisione FP (solo modelli Infinite F)	< 5 mP a 1 nM di fluoresceina

5.5 Assorbanza

Parametri	Tipo di strumento	Caratteristiche
Intervallo di lunghezza d'onda	Modelli Infinite F	230 – 1000 nm
	Modelli Infinite M	230 – 1000 nm Non sono necessari filtri, selezione possibile a incrementi di 1 nm
Intervallo di misurazione	Entrambi i modelli	0 – 4 OD

Le seguenti specifiche sono valide per i modelli Infinite con un intervallo di lunghezze d'onda comprese tra 300 – 700 nm.

Tipo di piastra (numero di pozzetti)	96
Accuratezza 0 – 2 OD	$< \pm (1\% + 10 \text{ mOD})$
Accuratezza 2 – 3 OD	$< \pm 2,5 \%$
Flatness di base	$\pm 10 \text{ mOD (1 sigma)}$
Modelli Infinite M	
Accuratezza della lunghezza d'onda	$\leq \pm 1,5 \text{ nm } \lambda > 315 \text{ nm};$ $\leq \pm 0,8 \text{ nm } \lambda \leq 315 \text{ nm}$
Modelli Infinite F	
Accuratezza della lunghezza d'onda	A seconda dei filtri utilizzati

Le specifiche sono valide per le misurazioni eseguite con 25 flash (letture) per pozzetto.

5.6 Luminescenza in modalità "glow"



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

Per il rilevamento della luminescenza si utilizza la tecnica di conteggio dei fotoni.

Parametri	Caratteristiche
Intervallo di lunghezza d'onda	380 – 600 nm
Intervallo dinamico lineare	6 ordini di grandezza
Tempo d'integrazione/pozzetto	100 – 20000 ms
% diafonia (piastra nera)	< 0,01 %
Intervallo di misurazione	> 6 ordini di grandezza 8 ordini di grandezza (intervallo dinamico esteso)
Attenuazione della luminosità	100 (filtro di attenuazione OD2), 1 (nessuna attenuazione)

5.6.1 Luminescenza "glow" con ATP

Tipo di piastra (numero di pozzetti)	96
Volume totale erogato [μ l]	200
Tempo d'integrazione/pozzetto [ms]	1000
Limite di rilevamento dell'ATP	3 fmol/pozzetto



CAUTELA

LE SPECIFICHE SONO VALIDE SOLO SE LO STRUMENTO È POSIZIONATO IN UN LUOGO CON ILLUMINAZIONE INFERIORE A 500 LUX.

5.7 Luminescenza in modalità "flash"



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

Per il rilevamento della luminescenza si utilizza la tecnica di conteggio dei fotoni.

Parametri	Caratteristiche
Intervallo di lunghezza d'onda	380 – 600 nm
Intervallo di misurazione	> 6 ordini di grandezza 8 ordini di grandezza (intervallo dinamico esteso)
Tempo d'integrazione/pozzetto	100 – 20000 ms
% diafonia (piastra nera)	< 0,01 %
Attenuazione della luminosità	100 (filtro di attenuazione OD2), 1 (nessuna attenuazione)
Limite di rilevamento dell'ATP	< 80 amol/pozzetto



CAUTELA

LE SPECIFICHE SONO VALIDE SOLO SE LO STRUMENTO È POSIZIONATO IN UN LUOGO CON ILLUMINAZIONE INFERIORE A 500 LUX.

5.8 Luminescenza a doppio colore (ad es. BRET)



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

Parametri	Caratteristiche
Lunghezza d'onda integrata:	Vedere 2.5.4 Sistema di misurazione dell'intensità di fluorescenza (modelli Infinite M)
Tempo d'integrazione:	100 - 20000 ms. Sono possibili diversi tempi di integrazione per ciascuna lunghezza d'onda.
Tipo di piastra:	Micropiastre comprendenti da 96 a 384 pozzetti
Intervallo dinamico	6 decadi logaritmiche

5.9 Misurazioni istantanee

Le misurazioni **istantanee** sono le misurazioni eseguibili con il lettore Infinite nel modo più rapido possibile. Per queste misurazioni viene utilizzato un solo flash (numero di flash).

Tempo di misurazione per piastre a 96 pozzetti (FI, TRF, Assorbanza): < 20 sec.

Tempo di misurazione per piastre a 384 pozzetti (FI, TRF, Assorbanza): < 30 sec.

(Esclusi inserimento/estrazione della piastra)

5.10 Funzionalità cuvetta (solo modelli Infinite M)



Nota

L'opzione Cuvetta è disponibile esclusivamente per i modelli Infinite M. Questo modulo non può essere installato sui modelli Infinite F.

L'opzione cuvetta consente di eseguire la misurazione dell'assorbanza in modalità lunghezza d'onda fissa e scansione.

Parametri	Caratteristiche
Intervallo di lunghezza d'onda	230 – 1000 nm (non sono necessari filtri, selezione possibile a incrementi di 1 nm)
Intervallo di misurazione	0 – 4 OD

5.10.1 Specifiche della cuvetta

Le seguenti specifiche sono valide per misurazioni con lunghezza d'onda compresa tra 300 - 700 nm, numero di flash 25:

Cuvetta	Hellma 110-QS, 10 mm
Accuratezza 0 – 2 OD	< ± (1% + 18 mOD)
Accuratezza 2 – 3 OD	< ± 2,5 %
Riproducibilità 0 – 2 OD	< ± (1% + 10 mOD)
Riproducibilità 2 – 3 OD	< ± 2,5 %
Linearità 0 – 2 OD	$R^2 > 0,998$
Flatness di base	± 10 mOD (1 sigma)



CAUTELA

L'ALLOGGIAMENTO PER CUVETTA DEL MODELLO INFINITE M NON È ADATTO A CUVETTE CON UNA FINESTRA DI MISURAZIONE < 2 MM (DIAMETRO) E UN'ALTEZZA CENTRALE INFERIORE A 15 MM.

5.11 Specifiche dell'iniettore

Parametri	Caratteristiche
Accuratezza	< 10% per un volume di iniezione di 10 µl
	< 2% per un volume di iniezione di 100 µl
	< 0,7% per un volume di iniezione di 450 µl
Precisione	< 10% per un volume di iniezione di 10 µl
	< 2% per un volume di iniezione di 100 µl
	< 0,7% per un volume di iniezione di 450 µl

5.11.1 Compatibilità con i reagenti dell'iniettore

Il sistema iniettore dei modelli Infinite F e Infinite M è realizzato con i seguenti materiali:

- Teflon (PTFE): tubo, tappo della valvola, guarnizione
- KelF: corpo della valvola
- SC05: aghi iniettore

Per la compatibilità con i reagenti, consultare l'elenco riportato di seguito. La lettera **A** indica una buona compatibilità con il sistema iniettore. Le sostanze chimiche classificate con la lettera **D** non devono essere utilizzate con gli iniettori Infinite. In caso contrario, il sistema iniettore ne sarà gravemente danneggiato.

Sostanze chimiche con classificazione A	Sostanze chimiche con classificazione D
Acido acetico < 60%	Butilammina
Acetonitrile	Tetracloruro di carbonio (secco)
Cloroformio	Etere dietilico
Dimetileformamide	Etanolammina
Etanolo	Etilendiammina
Esano	Furfurolo
Metanolo (alcol metilico)	Acido fluoridrico
Acido solforico, diluito (Concentrazione ≤ 1 N)	Monoetanolammina
Tetraidrofurano	Idrossido di potassio (potassa caustica)
Acqua, deionizzata	Ipclorito di potassio
Acqua, distillata	Idrossido di sodio
Acqua, dolce	Ipclorito di sodio
	Acido solforico concentrato

**CAUTELA**

LE INFORMAZIONI RIPORTATE IN QUESTA TABELLA SONO STATE FORNITE A TECAN AUSTRIA DA FONTI ATTENDIBILI E DEVONO ESSERE UTILIZZATE ESCLUSIVAMENTE COME GUIDA NELLA SELEZIONE DELLE APPARECCHIATURE, AL FINE DI GARANTIRE LA CORRETTA COMPATIBILITÀ CHIMICA. PRIMA DELL'INSTALLAZIONE DEFINITIVA, TESTARE L'APPARECCHIATURA CON LE SOSTANZE CHIMICHE E NELLE CONDIZIONI SPECIFICHE DELL'APPLICAZIONE CHE SI INTENDE UTILIZZARE.

**AVVERTENZA**

SE DURANTE L'UTILIZZO DOVESSERO VERIFICARSI VARIAZIONI A LIVELLO DI COMPORTAMENTO CHIMICO, DOVUTE A FATTORI COME TEMPERATURA, PRESSIONE E CONCENTRAZIONE, CIÒ POTREBBE CAUSARE GUASTI ALLO STRUMENTO, ANCHE NEL CASO IN CUI QUEST'ULTIMO ABBA SUPERATO UN TEST INIZIALE. NE POTREBBERO DERIVARE LESIONI GRAVI. DURANTE LA MANIPOLAZIONE DI SOSTANZE CHIMICHE, ADOTTARE LE DOVUTE PRECAUZIONI E/O INDOSSARE DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE APPROPRIATI.

5.12 Accessori di misurazione

5.12.1 Filtri raccomandati (solo modelli Infinite F)

Rivolgersi al più vicino rivenditore autorizzato Tecan per informazioni sui filtri raccomandati. I filtri progettati per un diverso tipo di strumento potrebbero non funzionare correttamente se installati sui modelli Infinite F.



Nota

Se i valori massimi di eccitazione ed emissione di una specie fluorescente sono quasi equivalenti, non dovrebbero essere convertiti direttamente in lunghezze d'onda centrali per i filtri di fluorescenza.

Per fornire uno sfondo accettabile, solitamente è necessario discriminare tra i valori soglia superiori per le lunghezze d'onda di eccitazione e i valori soglia inferiori per le lunghezze d'onda di emissione. Questo compromesso dipende dalle proprietà bloccanti dei filtri. Per molte molecole fluorescenti il segnale può essere migliorato dalla larghezza di banda del filtro lontano dall'altra lunghezza d'onda centrale.

5.12.2 Tipi di micropiastre raccomandati



CAUTELA

PER EVITARE CHE LO STRUMENTO SI DANNEGGI E CHE IL CAMPIONE FUORIESCA, ASSICURARSI CHE IL TIPO DI MICROPIASTRA CHE SI INTENDE UTILIZZARE PER LA MISURAZIONE CORRISPONDA AL FILE DI DEFINIZIONE PIASTRA (PDFX) SELEZIONATO.

In caso di elevata sensibilità alla fluorescenza, generalmente vengono consigliate le micropiastre nere. Per basse concentrazioni di etichette TRF, sono da preferire le micropiastre bianche. È possibile verificare se le piastre bianche sono più adatte ricorrendo alle lunghezze d'onda di eccitazione UV.

Si sconsiglia di utilizzare volumi inferiori a un terzo del volume massimo. Se si utilizzano volumi inferiori, verificare che sia disponibile un tipo di piastra adatto.

Al fine di garantire una prestazione ottimale della lettura in fluorescenza dal basso (Fondo), si consiglia di utilizzare piastre nere con fondo trasparente.

È possibile misurare tutte le micropiastre standard contenenti da 6 a 384 pozzetti (altezza massima della piastra 23 mm compreso il coperchio) conformi alle seguenti norme:

- ANSI/SBS 1-2004,
- ANSI/SBS 2-2004;
- ANSI/SBS 3-2004 e
- ANSI/SBS 4-2004.

Al momento dell'installazione del software operativo (i-control o Magellan), vengono installati dei file di definizione piastra predefiniti. I numeri d'ordine delle micropiastre sono riportati nell'elenco sottostante. Ordinare le micropiastre presso il fornitore locale di micropiastre.

Produttore / Nome Pdfx	N. cat.		N. disegno
Greiner			
GRE6ft	657 160	657 185	AC-9909
GRE12ft	665 180	665 102	AC-9910
GRE24ft	662 160	662 102	AC-9911
GRE48ft	677 180	677 102	AC-9912
GRE96ft	655 101	655 161	AC-9701
GRE96fb_chimney	655 079 655 086	655 077 655 076	AC-65507x
GRE96fw_chimney	655 073 655 083	655 074 655 075	AC-65507x
GRE96ut	650 101 650 161 650 160	650 180 650 185	AC-6501xx
GRE96vt	651 101 651 161	651 160 651 180	AC-6511xx
GRE384fb	781 079 781 086 781 077	781 076 781 094 781 095	AC-0205
GRE384ft	781 061 781 101 781 162 781 185	781 186 781 165 781 182	AC-0205
GRE384fw	781 073 781 080 781 074	781 075 781 097 781 096	AC-0205
GRE384sb	784 209		AC-8808
GRE384st	784 201		AC-8808
GRE384sw	784 207		AC-8808
GRE96ft_metà area	675 161 675 101	675 801	AC-675801
GRE96fw_metà area	675 074 675 075	675 094 675 095	AC-675801
GRE96fb_metà area	675 077 675 076	675 097 675 096	AC-675801
Corning			
COS6ft	3506	3516	DWG00673
COS12ft	3512	3513	DWG00674
COS24ft	3524 3526	3527	DWG01261
COS48ft	3548		DWG00676

Produttore / Nome Pdff	N. cat.		N. disegno
COS96fb	3916 3915	3925	DWG00120
COS96ft	3370	3628	DWG00120
COS96fw	3362 3912	3922	DWG00120
COS96rt	3360 3367 3788	3795 3358	DWG01123
COS96ft_metà area	3690 3695	3697	DWG00122
COS384fb	3708 3709	3710	DWG00679
COS384ft	3680 3700	3701 3702	DWG00679
COS384fw	3703 3704	3705	DWG00679
COR96fb fondo trasparente	3631		DWG00678
COR96fw fondo trasparente	3632		DWG00678
COR96fb metà area	3694		DWG00123
COR96fw metà area	3693		DWG00123
COR96fb metà area fondo trasparente	3880		DWG01471
COR96fw metà area fondo trasparente	3883		DWG01471
COR96fc trasparente ai raggi UV	3635		DWG00678
COR96fc metà area trasparente ai raggi UV	3679		DWG00678
COR384fb fondo trasparente	3711		DWG00682
COR384fw fondo trasparente	3706		DWG00682
COR384fc trasparente ai raggi UV	3675		DWG01479
Nunclon			
NUN96ft	439 454 442 404 475 094	269 620 269 787	MTP-0001
NUN384ft	242 765 242 757 164 688	464 718 265 196	MTP-0002
NUN384fb	264 556 164 564	460 518	MTP-0002

Produttore / Nome Pdfx	N. cat.		N. disegno
NUN384fw	264 572 164 610	460 372	MTP-0002
NUN96ut	143 761 163 320 262 170	262 162 475 434 449 824	MTP-0003
NUN96fb_LumiNunc FluoroNunc	137 101 137 103 237 105 237 107	237 108 437 111 437 112	MTP-0004
NUN96fw_LumiNunc FluoroNunc	136 101 136 102 236 105 236 107	236 108 436 110 436 111	MTP-0004
BD Falcon			
BD24_FluoroBlok	351155 351156	351157 351158	MTP-0005
BD96_FluoroBlok	351161 351162	351163 351164	MTP-0006
Tecan			
TEC96fb: Tecan 96 nera a fondo piatto	30122298		—
TEC384fb: Tecan 384 nera a fondo piatto	30122299		—
TEC96fw: Tecan 96 bianca a fondo piatto	30122300		—
TEC384fw: Tecan 384 bianca a fondo piatto	30122301		—
TEC24ft_cell: Tecan 24 colture cellulari trasparente a fondo piatto	30122302		—
TEC48ft_cell: Tecan 48 colture cellulari trasparente a fondo piatto	30122303		—
TEC96ft_cell: Tecan 96 colture cellulari trasparente a fondo piatto	30122304		—
TEC384ft_cell: Tecan 384 colture cellulari trasparente a fondo piatto	30122305		—
TEC96fb_cell_clear: Tecan 96 colture cellulari nera a fondo piatto, fondo trasparente	30122306		—
TEC384fb_cell_clear: Tecan 384 colture cellulari nera a fondo piatto, fondo trasparente	30122307		—

Produttore / Nome Pdfx	N. cat.	N. disegno
NanoQuantPlate	—	MTP-0007
PerkinElmer		
PE96fw_OptiPlate	6005290	http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/6005290
PE96fw_ProxiPlate	6006290	http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/6006290
PE384fg_AlphaPlate	6008350	TechnicalDataSheet_DimensionsOfProxiplate-384Plus
PE384fg_ProxiPlate	6008270	
PE384fw_ProxiPlate	6008280	
PE384fw_OptiPlate	6008290	TechnicalDrawing2: Le dimensioni si applicano alle OptiPlates a 384 pozzetti

Tabella 1: File di definizione piastre e corrispondenti numeri di catalogo

5.12.3 Rilevamento della luminescenza



CAUTELA

ACCENDERE LO STRUMENTO ALMENO 15 MINUTI PRIMA DI AVVIARE UNA MISURAZIONE DELLA LUMINESCENZA. ALCUNI COMPONENTI DEVONO ESSERE PRE-RISCALDATI PER POTER GARANTIRE CONDIZIONI STABILI PER LA MISURAZIONE.

Il lettore Infinite è dotato di un sistema di rilevamento della luminescenza che utilizza la tecnica di misurazione a conteggio del singolo fotone. Tale tecnica è basata su un PMT di luminescenza dedicato con circuiteria di misurazione appropriata. Questa tecnica è altamente resistente al rumore, pertanto è il metodo ideale per eseguire misurazioni a livelli di luce estremamente bassi.

Per una prestazione ottimale durante le misurazioni della luminescenza, si consiglia di utilizzare delle piastre bianche. Per ulteriori dettagli vedere 4.9 Ottimizzazione delle misurazioni di luminescenza.



Nota

I risultati delle misurazioni di luminescenza sono sempre visualizzati in conteggi al secondo (cps).



CAUTELA

LO STRUMENTO DEVE ESSERE POSTO AL RIPARO DALLA LUCE DIRETTA DEL SOLE. UN'ILLUMINAZIONE SUPERIORE A 500 LUX PUÒ COMPROMETTERE I RISULTATI DELLE MISURAZIONI DI LUMINESCENZA.

6. Controllo qualità

6.1 Test di controllo qualità periodici

A seconda dell'utilizzo e dell'applicazione, si consiglia di sottoporre lo strumento a una valutazione periodica presso un centro Tecan Austria.

I test descritti nelle sezioni successive non sostituiscono una valutazione completa da parte del produttore o dei rivenditori autorizzati. Tuttavia, questi test possono essere eseguiti periodicamente dall'utente per verificare alcuni aspetti significativi legati alle prestazioni dello strumento.

I risultati possono essere fortemente influenzati da errori di pipettatura e dall'impostazione dei parametri nello strumento, pertanto si raccomanda di seguire attentamente le istruzioni. L'utente deve determinare gli intervalli appropriati per questi test in base alla frequenza di utilizzo dello strumento.

Si consiglia di adattare questi test e i criteri di accettazione all'applicazione principale di laboratorio. Idealmente questi test devono essere eseguiti con le piastre, il fluoroforo, i tamponi, i volumi utilizzati nel proprio laboratorio e con tutte le impostazioni appropriate (filtri, flash, ritardi, ecc.).



CAUTELA

PRIMA DI AVVIARE LE MISURAZIONI, ACCERTARSI CHE LA POSIZIONE A1 DELLA MICROPIASTRA SIA INSERITA CORRETTAMENTE. IL POZZETTO A1 DEVE TROVARSI IN ALTO A SINISTRA.



CAUTELA

IN QUESTA SEZIONE VIENE SPIEGATO COME CONTROLLARE LE SPECIFICHE DELLO STRUMENTO. SE I RISULTATI DI QUESTI TEST DI CONTROLLO NON RIENTRANO NELLE SPECIFICHE UFFICIALI DELLO STRUMENTO, CONTATTARE IL CENTRO DI ASSISTENZA LOCALE.

6.2 Specifiche - Criteri Pass/Fail



Nota

Tutte le specifiche sono soggette a modifiche senza preavviso.

La tabella sottostante fornisce una panoramica dei criteri Pass/Fail per il test delle specifiche del lettore Infinite.

Specifica	Criteri Pass/Fail
Sensibilità alla fluorescenza Cima	< 20 pM fluoresceina
Uniformità di fluorescenza Cima	CV < 3%
Precisione di fluorescenza Cima	CV < 2 %
Sensibilità alla fluorescenza Fondo	100 pM
Uniformità di fluorescenza Fondo	CV < 3%
Precisione di fluorescenza Fondo	CV < 2%
Sensibilità di fluorescenza a risoluzione temporale (solo modelli Infinite F)	< 150 fM (con diicroico 510) < 3 pM (con specchio al 50%)
Precisione sensibilità fluorescenza a risoluzione temporale (solo modelli Infinite F)	CV < 2%
Precisione FP (solo modelli Infinite F)	< 5 mP
Sensibilità di luminescenza glow	< 3 fmol/pozzetto
Sensibilità di luminescenza flash	< 80 amol/pozzetto
Accuratezza di assorbanza	0 – 2 OD: $\leq \pm 1\% + 10 \text{ mOD}$ 2 – 3 OD: $\leq \pm 2.5\%$
Flatness di base assorbanza (1 sigma)	< $\pm 10 \text{ mOD}$
Accuratezza della lunghezza d'onda di assorbanza	$\leq \pm 1,5 \text{ nm } \lambda > 315 \text{ nm};$ $\leq \pm 0,8 \text{ nm } \lambda \leq 315 \text{ nm}$
Specifiche della cuvetta (solo modelli Infinite M)	Criteri Pass/Fail
Accuratezza di assorbanza	0 – 2 OD: $\leq \pm 1\% + 10 \text{ mOD}$ 2 – 3 OD: $\leq \pm 2.5\%$
Flatness di base assorbanza (1 sigma)	< $\pm 10 \text{ mOD}$

6.3 Specifiche - Istruzioni per il test

6.3.1 Fluorescenza Cima

Per il lettore Infinite dotato della funzione **Fluorescenza Cima**, è possibile effettuare i seguenti test per la verifica delle specifiche:

- Sensibilità
- Uniformità
- Precisione

Queste istruzioni per il test sono valide per il lettore Infinite nelle versioni:

- Infinite F
- Infinite M
- Con potenziamento spettrale

Sensibilità

Effettuare la seguente misurazione per determinare il limite di rilevamento della fluoresceina:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Cima
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 485 (20) nm Modelli Infinite M: 485 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 535 (25) nm Modelli Infinite M: 535 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb

Layout della piastra:

Pipettare nei pozzetti appropriati 200 µl di soluzione in bianco (0,01 M di NaOH) o di soluzione contenente 1 nM di fluoresceina, conformemente al layout della piastra.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 nM di fluoresceina	Bianco	Fluoresceina a 1 nM	Bianco	1 nM di fluoresceina	Bianco						
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Materiale/reagenti:

1 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)
 1 piastra Greiner da 96 pozzetti nera
 Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo del limite di rilevamento (sensibilità):

$$\text{Detection Limit} = \frac{\text{Concentration}_F}{(\text{mean}_F - \text{mean}_B)} * 3 * \text{Stdev}_B$$

Concentration _F	Concentrazione del fluoroforo in unità pM
mean _F	Valore RFU medio dei pozzetti riempiti con fluoroforo
mean _B	Valore RFU medio dei pozzetti riempiti con bianco
stdev _B	Deviazione standard dei valori RFU medi dei pozzetti riempiti con bianco

Il risultato della formula **Limite di rilevamento** definisce la sensibilità in unità pM.

Uniformità

Effettuare la seguente misurazione per determinare l'**uniformità**:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Cima
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 485 (20) nm Modelli Infinite M: 485 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 535 (25) nm Modelli Infinite M: 535 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb

Layout della piastra:

Pipettare nei pozzetti appropriati 200 µl di soluzione in bianco (0,01 M di NaOH) o di soluzione contenente 1 nM di fluoresceina, conformemente al layout della piastra.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 nM di fluoresceina	Bianco										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Materiale/reagenti:

- 1 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
- 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)
- 1 piastra Greiner da 96 pozzetti nera
- Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo dell'uniformità:

$$\text{Uniformity (\%)} = \frac{\text{stdev}_F * 100}{\text{mean}_F}$$

mean _F	Valore RFU medio dei pozzetti riempiti con fluoroforo
stdev _F	Deviazione standard dei valori RFU medi dei pozzetti riempiti con fluoroforo

Il risultato della formula definisce l'uniformità in CV%

Precisione

Effettuare la seguente misurazione per determinare la precisione/riproducibilità:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Cima
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 485 (20) nm Modelli Infinite M: 485 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 535 (25) nm Modelli Infinite M: 535 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb
Porzione di piastra	A1
Cinetica	20 cicli
Tempo di intervallo	Minimo

Layout della piastra:

Pipettare nei pozzetti appropriati 200 µl di soluzione in bianco (0,01 M di NaOH) o di soluzione contenente 1 nM di fluoresceina, conformemente al layout della piastra.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 nM di fluoresceina	Bianco										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Materiale/reagenti:

1 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)
 1 piastra Greiner da 96 pozzetti nera
 Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo della precisione:

$$\text{Precision (CV\%)} = \frac{\text{stdev}_{\text{wellA1}} * 100}{\text{mean}_{\text{wellA1}}}$$

mean _{wellA1}	Valore RFU medio del pozzetto A1 dopo misurazione cinetica di 20 cicli
stdev _{wellA1}	Deviazione standard dei valori RFU medi del pozzetto A1 dopo 20 cicli

Il risultato della formula definisce la precisione in CV%

6.3.2 Fluorescenza Fondo

Per il lettore Infinite dotato della funzione **Fluorescenza Fondo**, è possibile effettuare i seguenti test per la verifica delle specifiche:

- Sensibilità
- Uniformità
- Precisione/ripetibilità

Queste istruzioni per il test sono valide per il lettore Infinite nelle versioni:

- Modelli Infinite F
- Modelli Infinite M
- Con potenziamento spettrale

Sensibilità

Effettuare le seguenti misurazioni per determinare il limite di rilevamento della fluoresceina:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Fondo
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 485 (20) nm Modelli Infinite M: 485 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 535 (25) nm Modelli Infinite M: 535 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb

Layout Piastra

Pipettare nei pozzetti appropriati 200 μ l di soluzione in bianco (0,01 M di NaOH) o di soluzione contenente 25 nM di fluoresceina, conformemente al layout della piastra.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25 nM di fluoresceina	Bianco										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Materiale/reagenti:

25 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)
 1 piastra Greiner μ Clear da 96 pozzetti, nera con fondo trasparente
 Pipetta da 200 μ l + punte

Calcolo del limite di rilevamento (sensibilità):

Vedere 6.3.1 Fluorescenza Cima: Sensibilità.

Uniformità

Effettuare la seguente misurazione per determinare l'uniformità:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Fondo
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 485 (20) nm Modelli Infinite M: 485 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 535 (25) nm Modelli Infinite M: 535 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb

Layout della piastra:

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25 nM di fluoresceina	Bianco										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Volume di riempimento: 200 µl

Materiale/reagenti:

25 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)
 1 piastra Greiner µClear da 96 pozzetti, nera con fondo trasparente
 Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo dell'uniformità:

Vedere 6.3.1 Fluorescenza Cima: Uniformità.

Precisione

Effettuare la seguente misurazione per determinare la precisione/riproducibilità:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Fondo
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 485 (20) nm Modelli Infinite M: 485 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 535 (25) nm Modelli Infinite M: 535 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb
Porzione di piastra	A1
Cinetica	20 cicli
Tempo di intervallo	Minimo

Layout della piastra:

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25 nM di fluoresceina	Bianco										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Volume di riempimento: 200 µl

Materiale/reagenti:

25 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)
 1 piastra Greiner µClear da 96 pozzetti, nera con fondo trasparente
 Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo della precisione:

Vedere 6.3.1 Fluorescenza Cima: Precisione.

6.3.3 *Fluorescenza a risoluzione temporale*

Per il lettore Infinite dotato della funzione **Fluorescenza Cima**, è possibile effettuare i seguenti test per la verifica delle specifiche:

- Sensibilità
- Precisione/ripetibilità

Queste istruzioni per il test sono valide per i modelli Infinite F.

Sensibilità

Effettuare la seguente misurazione per determinare la sensibilità:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Cima
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 340 (35) nm Modelli Infinite M: 340 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 612 (10) nm Modelli Infinite M: 617 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	400
Tempo di latenza	100
Tempo di pausa	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fw

Layout della piastra:

Pipettare nei pozzetti appropriati 200 µl di soluzione in bianco (soluzione potenziante) o di soluzione contenente 1 nM di europio, conformemente al layout della piastra.

<>	1	2	3	4	5	...
A	1 nM di europio	Bianco	Bianco	Bianco	Bianco	
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

Materiale/reagenti:

- 1 nM di europio (B119-100, HVD Live Sciences)
- Soluzione potenziante (=Bianco) (1244-105, HVD Live Sciences)
- 1 piastra Greiner da 96 pozzetti bianca
- Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo del limite di rilevamento (sensibilità):

Vedere 6.3.1 Fluorescenza Cima: Sensibilità.

Precisione

Effettuare la seguente misurazione per determinare la precisione/riproducibilità:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Fluorescenza Cima
Lunghezza d'onda di eccitazione	Modelli Infinite F: 340 (35) nm Modelli Infinite M: 340 nm
Lunghezza d'onda di emissione	Modelli Infinite F: 612 (10) nm Modelli Infinite M: 617 nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	400
Tempo di latenza	100
Tempo tra spostamento e flash	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fw
Part of the plate (Porzione di piastra)	A1
Cinetica	20 cicli
Tempo di intervallo	Minimo

Layout della piastra:

Vedere 6.3.3 Fluorescenza a risoluzione temporale Precisione.

Calcolo della precisione:

Vedere 6.3.1 Fluorescenza Cima: Precisione.

6.3.4 Polarizzazione di fluorescenza (solo Infinite F Plex)

Per il lettore Infinite F Plex dotato della funzione **Polarizzazione di fluorescenza**, è possibile effettuare i seguenti test per la verifica delle specifiche:

- Precisione/ripetibilità

Queste istruzioni per il test sono valide solo per Infinite F Plex:

- Con potenziamento spettrale

Precisione

Effettuare la seguente misurazione per determinare la precisione:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Polarizzazione di fluorescenza
Lunghezza d'onda di eccitazione	485 (20) nm
Lunghezza d'onda di emissione	535 (25) nm
Numero di flash	25
Tempo d'integrazione	40
Tempo di latenza	0
Tempo tra spostamento e lettura	0
Guadagno	Ottimale
Tipo di piastra	GRE96fb
Riferimento da/a	A1 – D1
Bianco di riferimento da/a	A2 – D2
Valore di riferimento	20 mP
Bianco di misurazione da/a	come bianco di riferimento

Layout della piastra:

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 nM di fluoresceina	Bianco										
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Volume di riempimento: 200 µl/pozzetto

Materiale/reagenti:

1 nM di fluoresceina (in 0,01 M di NaOH) (fluoresceina sodica, Sigma F6377)
 0,01 M di NaOH (=Bianco) (granuli di NaOH, Merck articolo n. 6495 o Sigma S8045)

1 piastra Greiner da 96 pozzetti, nera con fondo piatto
 Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo della precisione:

La precisione viene calcolata in base ai pozzetti riempiti con fluoresceina. La precisione corrisponde a una volta la deviazione standard dei valori mP dei pozzetti con fluoresceina.

6.3.5 Luminescenza di tipo "glow"

Per il lettore Infinite dotato della funzione **Luminescenza**, è possibile effettuare i seguenti test per la verifica delle specifiche di sensibilità:

Sensibilità

Effettuare la seguente misurazione per determinare la sensibilità:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Luminescenza
Tempo d'integrazione	1.000 ms
Tempo di pausa	0
Tipo di piastra	GRE96fw
Porzione di piastra	A1 – D10

Layout della piastra:

Pipettare 200 µl di reagenti ATP nei pozzetti appropriati, conformemente al layout della piastra:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bx	ATP	Bx	B	B	B	B	B	B	B		
B	Bx	ATP	Bx	B	B	B	B	B	B	B		
C	Bx	ATP	Bx	B	B	B	B	B	B	B		
D	Bx	ATP	Bx	B	B	B	B	B	B	B		
E												
F												
G												
H												

ATP	2*10 ⁻⁸ M ATP (concentrazione finale nel pozzetto)
B	Bianco (reagente ATP: Tris-EDTA=1:5)
Bx	Bianco (pozzetti utilizzati per il calcolo della diafonia)

Materiale/reagenti:

Kit ATP BioThema (ATP-Kit SL 144-041, BioThema AB)
 1 piastra Greiner da 96 pozzetti bianca
 Pipetta da 200 µl + punte

Calcolo della sensibilità (limite di rilevamento):

$$\text{Detection Limit (fmol / well)} = \frac{2 \cdot 10^{-8} * 3 * \text{Stdev}_B * 0.0002 * \frac{1}{1e^{-15}}}{\text{mean}_{ATP} - \text{mean}_B}$$

$2 \cdot 10^{-8}$	Concentrazione di ATP standard [M]
Stdev_B	Deviazione standard del bianco
mean_{ATP}	Media di pozzetti riempiti con ATP standard
mean_B	Media dei pozzetti bianchi
0,0002	Conversione in mol/pozzetto
$1/1e^{-15}$	Conversione in fmol/pozzetto

Il risultato della formula definisce il limite di rilevamento in fmol/pozzetto.

6.3.6 Accuratezza di assorbanza

Utilizzare la piastra MultiCheck. Per ulteriori dettagli consultare le Istruzioni per l'uso della piastra MultiCheck.

6.3.7 Accuratezza della lunghezza d'onda di assorbanza

L'accuratezza della lunghezza d'onda definisce la deviazione delle lunghezze d'onda di misurazione impostate dalla lunghezza d'onda nominale. Questo test è valido solo per i modelli Infinite M.

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	scansione in assorbanza
Lunghezza d'onda di misurazione da/a	300 – 850 nm
Ampiezza del passo	1 nm
Numero di flash	25
Tempo di pausa	0
Tipo di piastra	Piastra MultiCheck

Materiale/reagenti:

Piastra MultiCheck

Calcolo dell'accuratezza della lunghezza d'onda:

Consultare la scheda dei dati inclusa nelle istruzioni per l'uso della piastra MultiCheck.

$$\text{Wavelength Accuracy} = \text{Max}_t - \text{Max}_m$$

Max_t	massimo teorico
Max_m	massimo misurato

6.3.8 Flatness di base dell'assorbanza (Modelli Infinite M)

Effettuare la seguente misurazione per determinare la flatness di base:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Assorbanza
Lunghezza d'onda di misurazione da/a	300 - 700 nm
Numero di flash	25
Tempo di pausa	0
Tipo di piastra	GRE96ft
Porzione di piastra	A1

Layout della piastra:

Questa misurazione non richiede l'uso di una piastra: porta-piastre deve essere vuoto.

Materiale/reagenti:

Per questo test non sono necessari materiali o reagenti.

Calcolo della flatness di base:

Calcolare la deviazione standard.

6.3.9 Flatness di base dell'assorbanza (Modelli Infinite F)

Effettuare le seguenti misurazioni per determinare la flatness di base con il filtro disponibile:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Assorbanza
Lunghezza d'onda di misurazione	340 nm 405 nm 492 nm 590 nm 620 nm 700 nm
Numero di flash	25
Tempo di pausa	0
Tipo di piastra	GRE96ft
Porzione di piastra	A1
Ciclo cinetico	20, tempo di intervallo minimo

Layout della piastra:

Questa misurazione non richiede l'uso di una piastra: il porta-piastre deve essere vuoto.

Materiale/reagenti:

Per questo test non sono necessari materiali o reagenti.

Calcolo della flatness di base:

Calcolare la deviazione standard su 20 cicli per ciascuna lunghezza d'onda.

6.3.10 Cuvetta ad assorbanza (solo modelli Infinite M)

Per il modello Infinite M dotato della funzione **Cuvetta**, è possibile effettuare il seguente test per la verifica delle specifiche di accuratezza:

Accuratezza

Effettuare la seguente misurazione per determinare la precisione dell'assorbanza:

Parametri di misurazione:

Parametro	Impostazione
Modalità di lettura	Assorbanza
Lunghezza d'onda di misurazione	1) 440 nm 2) 635 nm
Numero di flash	25
Tempo tra spostamento e lettura	0
Tipo di cuvetta	Cuvetta calibrata, ad es. Starna RM-N1N35N + una cuvetta D3

Materiale:

Materiale di riferimento Starna® RM-N1N35N + cuvetta D3
(Per maggiori informazioni, visitare il sito www.starna.co.uk)

Calcolo dell'accuratezza:

Calcolare la deviazione del valore misurato basandosi sul valore di riferimento fornito insieme alla cuvetta calibrata.

7. Pulizia e manutenzione

7.1 Introduzione



CAUTELA

ASSICURARSI CHE LA MICROPIASTRA VENGA RIMOSSA DALLO STRUMENTO PRIMA DI INIZIARE LA PREPARAZIONE PER LA SPEDIZIONE. SE SI LASCIA UNA MICROPIASTRA NELLO STRUMENTO, LE SOLUZIONI FLUORESCENTI POTREBBERO CONTAMINARE LE PARTI OTTICHE E DANNEGGIARE LO STRUMENTO.

Le procedure di pulizia e manutenzione sono importanti per prolungare la durata dello strumento e per ridurre la necessità di interventi di assistenza.

Questa sezione illustra le seguenti procedure:

- Fuoriuscite di liquidi
- Disinfezione dello strumento
- Attestazione di avvenuta disinfezione
- Smaltimento dello strumento e dei materiali



AVVERTENZA

TUTTE LE PARTI DELLO STRUMENTO VENUTE A CONTATTO CON MATERIALI POTENZIALMENTE INFETTI DEVONO ESSERE TRATTATE COME AREE POTENZIALMENTE INFETTE.

SI CONSIGLIA DI ATTENERSI SEMPRE ALLE PRECAUZIONI DI SICUREZZA APPLICABILI (OVVERO INDOSSARE GUANTI NON TALCATI, OCCHIALI E INDUMENTI PROTETTIVI) PER EVITARE IL RISCHIO DI CONTRARRE MALATTIE INFETTIVE DURANTE LE PROCEDURE DI LAVAGGIO O DI REGOLAZIONE DELLO STRUMENTO.

7.2 Fuoriuscite di liquidi

1. SPEGNERE lo strumento
2. Asciugare immediatamente il liquido fuoriuscito con del materiale assorbente.
3. Smaltire il materiale contaminato in modo appropriato.
4. Pulire le superfici dello strumento con un detergente delicato.
5. In caso di fuoriuscita di liquidi a rischio biologico, pulire con B30 (Orochemie, Max-Planck-Str. 27, D70806 Kornwestheim).
6. Asciugare le aree sottoposte a pulizia.



AVVERTENZA

SPEGNERE SEMPRE LO STRUMENTO PRIMA DI RIMUOVERE QUALSIASI TIPO DI LIQUIDO FUORIUSCITO. TUTTI I LIQUIDI FUORIUSCITI DEVONO ESSERE CONSIDERATI POTENZIALMENTE INFETTI. PERTANTO, È NECESSARIO ATTENERSI SEMPRE ALLE PRECAUZIONI DI SICUREZZA APPLICABILI (INCLUSO INDOSSARE GUNATI NON TALCATI, OCCHIALI E INDUMENTI PROTETTIVI) PER EVITARE IL RISCHIO DI CONTRARRE MALATTIE INFETTIVE.

INOLTRE, TUTTI I RIFIUTI DERIVANTI DALLA PROCEDURA DI PULIZIA DEVONO ESSERE CONSIDERATI POTENZIALMENTE INFETTI ED È NECESSARIO ESEGUIRNE LO SMALTIMENTO ATTENENDOSI ALLE ISTRUZIONI FORNITE NEL CAPITOLO 7.4.4 SMALTIMENTO.

SE IL LIQUIDO FUORIUSCITO RIMANE ALL'INTERNO DELLO STRUMENTO, È NECESSARIO RIVOLGERSI A UN TECNICO DELL'ASSISTENZA.



AVVERTENZA

ASSICURARSI CHE LA MICROPIASTRA SIA STATA RIMOSSA DALLO STRUMENTO PRIMA CHE QUESTO VENGA PREPARATO PER LA SPEDIZIONE. SE NELLO STRUMENTO VIENE LASCIATA UNA MICROPIASTRA, LE SOLUZIONI FLUORESCENTI POTREBBERO VERSARSI SULLE PARTI OTTICHE E DANNEGGIARE LO STRUMENTO.

7.3 Pulizia e manutenzione dell'iniettore

La manutenzione necessaria potrebbe variare in funzione dell'applicazione. Per garantire prestazioni ottimali e la massima durata del sistema iniettore, si consiglia di attenersi alle procedure riportate di seguito.



CAUTELA

PER EVITARE CHE I REAGENTI SI MESCOLINO E CHE SI VERIFICHINO UNA CONTAMINAZIONE CROCIATA, LAVARE ACCURATAMENTE L'INTERO SISTEMA INIETTORE OGNI VOLTA CHE SI UTILIZZA UN'APPLICAZIONE CHE RICHIEDE L'USO DI INIETTORI.

7.3.1 *Manutenzione quotidiana*

Se non diversamente specificato dal produttore del kit utilizzato, le seguenti operazioni vanno eseguite almeno una volta al giorno:

- Ispezionare la pompa (le pompe) e i tubi per escludere la presenza di perdite.
- Lavare accuratamente l'intero sistema con acqua distillata o deionizzata dopo ogni utilizzo e quando la pompa non è in uso. La mancata osservanza di tali indicazioni può causare la cristallizzazione dei reagenti. I cristalli, a loro volta, possono danneggiare la guarnizione della siringa e il tappo della valvola e causare così fuoriuscite di liquido.



CAUTELA

NON LASCIARE CHE LE POMPE FUNZIONINO A SECCO PER PIÙ DI QUALCHE CICLO.

7.3.2 *Manutenzione settimanale/periodica*

Il sistema iniettore (tubi, siringhe e aghi di iniezione) deve essere pulito con cadenza settimanale per rimuovere i precipitati ed eliminare la crescita batterica: Attenersi alla seguente procedura per pulire il sistema pompa/iniettore con alcol etilico (EtOH) al 70%:

1. A seconda dell'applicazione utilizzata, sciacquare accuratamente il sistema con una soluzione tampone o con acqua distillata prima di lavarlo con EtOH al 70%.
2. Con le siringhe completamente abbassate, riempire la pompa con EtOH al 70% e attendere 30 minuti.
3. Al termine dei 30 minuti, rimuovere tutto il liquido dalla siringa e dal tubo e raccoglierlo in un contenitore per rifiuti.
4. Lavare il sistema pompa/iniettore con EtOH al 70%
5. Lavare il sistema pompa/iniettore con acqua distillata o deionizzata
6. Riempire il sistema pompa/iniettore con acqua distillata. Al momento dello stoccaggio dello strumento, il percorso dei liquidi va lasciato pieno.
7. Pulire l'estremità degli aghi dell'iniettore con un tampone di cotone imbevuto di alcol etilico al 70% o isopropanolo.



AVVERTENZA

RISCHIO DI INCENDI ED ESPLOSIONE!

**L'ETANOLO È INFIAMMABILE E PUÒ PROVOCARE ESPLOSIONI SE
MANEGGIATO IMPROPRIAMENTE. SEGUIRE LE DOVUTE MISURE
PRECAUZIONALI RELATIVE ALLA SICUREZZA DI LABORATORIO.**

7.4 Disinfezione dello strumento

Tutte le parti dello strumento venute a contatto con campioni biologici, campioni di pazienti, campioni di controllo positivi o materiali pericolosi, devono essere considerate aree potenzialmente infette.



AVVERTENZA

LA PROCEDURA DI DISINFEZIONE DEVE ESSERE ESEGUITA NEL RISPETTO DELLE NORMATIVE NAZIONALI, REGIONALI E LOCALI.



AVVERTENZA

TUTTE LE PARTI DELLO STRUMENTO VENUTE A CONTATTO CON MATERIALI POTENZIALMENTE INFETTI DEVONO ESSERE TRATTATE COME AREE POTENZIALMENTE INFETTE.

SI CONSIGLIA DI ATTENERSI SEMPRE ALLE PRECAUZIONI DI SICUREZZA APPLICABILI (OVVERO INDOSSARE GUANTI NON TALCATI, OCCHIALI E INDUMENTI PROTETTIVI) PER EVITARE IL RISCHIO DI CONTRARRE MALATTIE INFETTIVE DURANTE LA PROCEDURA DI DISINFEZIONE.

Prima dell'invio al distributore per le operazioni di manutenzione, è necessario disinfettare lo strumento e compilare un'attestazione di avvenuta disinfezione. In caso di mancata presentazione della suddetta attestazione, lo strumento potrebbe non essere accettato dal centro assistenza oppure potrebbe essere trattenuto dalle autorità doganali.

7.4.1 Soluzioni per la disinfezione

Lo strumento va disinfettato con la seguente soluzione:

- B30 (Orochemie, Max-Planck-Str. 27; D-70806 Kornwestheim)

7.4.2 Procedura di disinfezione



AVVERTENZA

LA PROCEDURA DI DISINFEZIONE DEVE ESSERE ESEGUITA IN UN LOCALE BEN VENTILATO E DEVE ESSERE AFFIDATA A PERSONALE QUALIFICATO E AUTORIZZATO, CHE INDOSSI GUANTI USA E GETTA NON TALCATI E INDUMENTI E OCCHIALI PROTETTIVI.

Nel caso in cui il laboratorio non disponga di una procedura di disinfezione specifica, per disinfettare le superfici esterne dello strumento attenersi alla seguente procedura.

1. Scollegare lo strumento dall'alimentazione di rete.
2. Scollegare lo strumento da qualsiasi accessorio in uso.
3. Pulire accuratamente tutte le superfici esterne dello strumento con un batuffolo di cotone imbevuto nella soluzione disinfettante.
4. Assicurarsi che la stessa procedura di disinfezione venga seguita per il porta-piastre.
5. Ripetere la procedura di disinfezione anche su tutti gli accessori da riconsegnare.

6. Al termine della procedura di disinfezione, accertarsi di compilare l'attestazione di avvenuta disinfezione.
7. Compilare il certificato di sicurezza e apporlo sulla parte esterna della confezione, in modo che sia ben visibile.

Nel paragrafo 7.4.3 Certificato di sicurezza è riportato un esempio di certificato di sicurezza, il quale deve essere compilato prima che lo strumento venga restituito al centro assistenza per la manutenzione o riparazione.

7.4.3 **Certificato di sicurezza**

Per garantire la sicurezza e la salute del personale, chiediamo gentilmente ai nostri clienti di compilare il **Certificato di sicurezza** (consegnato insieme allo strumento) in duplice copia e di allegarne una copia in cima alla confezione contenente lo strumento riconsegnato (in modo che sia visibile dall'esterno della confezione!). L'altra copia va allegata ai documenti di spedizione prima dell'invio dello strumento al centro assistenza per la manutenzione o riparazione.

Lo strumento deve essere decontaminato e disinfettato in loco presso il responsabile operativo prima dell'invio (vedere 7.4.2 Procedura di disinfezione).

La procedura di decontaminazione e disinfezione deve essere eseguita in un locale ben ventilato e deve essere affidata a personale autorizzato e adeguatamente formato, che indossi guanti usa e getta non talcati e indumenti e occhiali protettivi.

La procedura di decontaminazione e disinfezione deve essere eseguita nel rispetto delle normative nazionali, regionali e locali.

Se non viene fornito il certificato di sicurezza, lo strumento potrebbe non essere accettato dal centro assistenza.

Su richiesta, il centro assistenza locale Tecan invierà una nuova copia del certificato di sicurezza.

7.4.4 **Smaltimento**

Seguire le procedure di laboratorio per lo smaltimento di rifiuti biologicamente pericolosi in conformità alle norme nazionali e locali.

Questa sezione fornisce istruzioni su come smaltire legalmente i rifiuti accumulatisi utilizzando lo strumento.



CAUTELA

**OSSERVARE TUTTE LE NORME FEDERALI, NAZIONALI E LOCALI
RELATIVE ALL'AMBIENTE.**



ATTENZIONE

**DIRETTIVA 2002/96/CE SUI RIFIUTI DI APPARECCHIATURE ELETTRICHE ED
ELETTRONICHE (RAEE)**

**EFFETTI NEGATIVI SULL'AMBIENTE ASSOCIATI AL TRATTAMENTO
DEI RIFIUTI DI APPARECCHIATURE ELETTRICHE ED ELETTRONICHE**

- **NON SMALTIRE APPARECCHIATURE ELETTRICHE ED ELETTRONICHE COME RIFIUTI URBANI INDIFFERENZIATI.**
- **EFFETTUARE UNA RACCOLTA DIFFERENZIATA DEI RIFIUTI ELETTRICI ED ELETTRONICI**

7.4.5 Smaltimento del materiale d'imballaggio

Conformemente alla Direttiva 94/62/CE sugli imballaggi e i rifiuti di imballaggi, il produttore è responsabile dello smaltimento del materiale d'imballaggio.

Restituzione del materiale d'imballaggio

Se non si intende conservare il materiale d'imballaggio per un uso futuro, ad es. per il trasporto o lo stoccaggio, restituire al produttore l'imballaggio del prodotto, i ricambi e i componenti opzionali tramite il tecnico dell'assistenza sul campo.

7.4.6 Smaltimento del materiale operativo



AVVERTENZA

I MATERIALI DI SCARTO (MICROPIASTRE) UTILIZZATI NEI PROCESSI SVOLTI CON LO STRUMENTO, POSSONO ESSERE ASSOCIATI A RISCHI BIOLOGICI.

GESTIRE LE MICROPIASTRE USATE, GLI ALTRI DISPOSITIVI A PERDERE E TUTTE LE SOSTANZE UTILIZZATE IN CONFORMITÀ ALLE DIRETTIVE INERENTI LE CORRETTE PRATICHE DI LABORATORIO.

INFORMARSI CIRCA I PUNTI DI RACCOLTA IDONEI E I METODI DI SMALTIMENTO APPROVATI NEL PROPRIO PAESE, STATO O REGIONE.

7.4.7 Smaltimento dello strumento

Prima di smaltire lo strumento, rivolgersi al più vicino centro assistenza Tecan.



CAUTELA

PRIMA DELLO SMALTIMENTO, DISINFETTARE SEMPRE LO STRUMENTO.

Grado d'inquinamento	2 (IEC/EN 61010-1)
Metodo di smaltimento	Rifiuti contaminati



AVVERTENZA

A SECONDA DELLE APPLICAZIONI, ALCUNE PARTI DELLO STRUMENTO POTREBBERO ESSERE STATE A CONTATTO CON MATERIALE A RISCHIO BIOLOGICO.

- **ASSICURARSI DI TRATTARE QUESTO MATERIALE IN CONFORMITÀ CON LE NORME E GLI STANDARD DI SICUREZZA APPLICABILI.**
- **PRIMA DELLO SMALTIMENTO, DECONTAMINARE SEMPRE TUTTI I COMPONENTI (OVVERO ESEGUIRE PULIZIA E DISINFEZIONE).**

8. Risoluzione dei problemi

N. errore	Testo errore	Descrizione
1	Command is not valid (Comando non valido)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
2	Parameter out of range (Parametro fuori dall'intervallo previsto)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
3	Wrong number of parameters (Numero di parametri errato)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
4	Invalid parameter (Parametro non valido)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
5	Invalid Parameter at pos (Parametro non valido alla pos.)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
6	[prefix] is missing ([prefisso] mancante)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
7	RS485 Timeout at module [module descr] (RS485 Timeout modulo [descr. modulo])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
8	Invalid module number [Nr] (Numero modulo non valido [N.])	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
9	Binary Transfer command: [cmd] at module [n] (Comando di trasferimento binario: [cmd] a livello del modulo [n])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
10	Error at command [cmd] at module [n] (Errore a livello del comando [cmd] a livello del modulo [n])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
11	LID open (Coperchio aperto)	Il coperchio del porta-piastre o della slitta portafiltri sono stati aperti durante la misurazione oppure lo strumento è stato utilizzato in un ambiente molto luminoso (>> 500 LUX). Verificare che il coperchio sia perfettamente chiuso o che l'ambiente non sia troppo luminoso.
12	LUMI FIBER broken (FIBRA LUMI danneggiata)	Guasto hardware del modulo di luminescenza. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.

8. Risoluzione dei problemi

N. errore	Testo errore	Descrizione
13	Z Motor out of Safety-Range (Motore Z fuori dall'intervallo sicuro)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
14	Filter is not defined (Il filtro non è definito)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
15	X drive init error (Errore inizializzazione azionamento X)	Guasto hardware del modulo porta-piastre. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
16	Y drive init error (Errore inizializzazione azionamento Y)	Guasto hardware del modulo porta-piastre. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
17	z drive init error (Errore inizializzazione azionamento Z)	Guasto hardware dell'azionamento Z. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
18	Injector A not available (Iniettore A non disponibile)	Guasto hardware dell'iniettore A. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
19	Injector B not available (Iniettore B non disponibile)	Guasto hardware dell'iniettore B. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
20	Injector Init Error: (Errore inizializzazione iniettore:)	Guasto hardware del modulo dell'iniettore. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
21	Invalid Command: [cmd] (Comando non valido: [cmd])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
22	Invalid Operand: [cmd] (Operando non valido: [cmd])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
23	Invalid Command Sequence: [cmd] (Sequenza di comandi non valida: [cmd])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
24	N/A	N/A
25	Injector not init.: [cmd] (Iniettore non inizializzato: [cmd])	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
26	Plunger Overload: (Sovraccarico del pistone:)	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
27	Valve Overload: (Sovraccarico della valvola:)	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
28	Plunger Move not allowed: (Spostamento del pistone non consentito:)	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.

N. errore	Testo errore	Descrizione
29	Command Overflow (Overflow comando)	Errore non meglio specificato di comunicazione interna. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
30	Prepare: [s]: Gain: [g], Counts: [cts] (Preparazione: [s]: Guadagno: [g], Conteggi: [cts])	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
31	[ERR] at module [mod] (cmd:[cmd]) ([ERR] a livello del modulo [mod] (cmd:[cmd]))	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
32	MTP is in Out-Position (MTP in posizione estratta)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
33	[val] ... not set at (Ratiolabel [n]) ([val] ... non impostato su (etichetta rapporto [n])	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
34	Injectors are not enabled (Iniettori non abilitati)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
35	Invalid Parameter Length (max: [n] char allowed) (Lunghezza parametro non valida (max: [n] caratteri consentiti)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
36	Checksum Error (Errore nella somma di controllo)	Errore di comunicazione dell'interfaccia USB. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza.
37	Init Error at module [mod#] (Errore inizializzazione a livello del modulo [mod#])	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
38	Instrument Initialization Error (Errore di inizializzazione dello strumento)	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
39	Injector A Communication Timeout (Timeout comunicazione con l'iniettore A)	Errore di comunicazione dell'interfaccia iniettore. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza.
40	Injector B Communication Timeout (Timeout comunicazione con l'iniettore B)	Errore di comunicazione dell'interfaccia iniettore. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza.
41	Prime Wash Error (Errore riempimento o lavaggio)	Gli iniettori stanno effettuando il riempimento o il lavaggio. Attendere la conclusione del processo di riempimento o lavaggio.
42	Instrument is locked (Lo strumento è bloccato)	Lo strumento è bloccato a causa di un grave guasto dell'hardware. Per sbloccarlo, è necessario riavviarlo. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza.

N. errore	Testo errore	Descrizione
43	Prepare: [channel]: Wavelength: [lambda] Gain: [g], Counts: [cts] (Preparazione: [canale]: Lunghezza d'onda: [lambda] Guadagno: [g], Conteggi: [cts])	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
44	Steploss Error (Errore di perdita passi)	Guasto all'attuatore. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
45	Sync Scan: Number of EX-Steps does not match EM-Steps (Sincronizzazione scansione: il numero di passi di ecc. non corrisponde al numero di passi di em.)	Errore non meglio specificato nel protocollo di comunicazione strumento - computer. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
46	Handshake timeout at module (Timeout richiesta di connessione a livello del modulo)	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
47	Motor Timeout (Timeout motore)	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
48	[Value] is not in defined a Range ([Valore] non compreso nell'intervallo definito)	Guasto hardware non meglio specificato. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.
49	Sensor is broken (Il sensore è danneggiato)	Guasto del sensore. Segnalare questo errore al più vicino centro assistenza Tecan.

Indice alfabetico

A

Accensione dello strumento	50
Accessori	117
Accuratezza	
Cuvetta ad assorbanza.....	139
Accuratezza della lunghezza d'onda	137
Agitazione	51
Alloggiamento per cuvetta	39
Anisotropia.....	71
Assorbanza.....	21, 111
Filtro d'assorbanza	33
Filtro flatness di base.....	138
Flatness di base	138
Ottica di assorbanza.....	34
Avviamento dello strumento	50

B

Bordo MRW	75
-----------------	----

C

Certificato di sicurezza	146
Conclusione di una sessione di misurazione	104
Condensatore	25, 31
Controllo della temperatura	50
Controllo qualità.....	123
Cuvetta di rilevamento dell'assorbanza.....	41

D

Descrizione generale.....	11
Dimensione di MRW.....	74
Dimensione spot di eccitazione.....	27
Disconnessione	104
Disinfezione	145
Certificato di sicurezza	146

E

Eccitazione	31
Esempi cuvetta	
i-control.....	94
Esempio i-control.....	100

F

Fascio di fibre fluorescenti.....	27
Fattore G non calibrato.....	68
Fattore G:.....	71
Fermi per il trasporto	45
Filtri	
raccomandati	117
Filtro di emissione.....	32
Filtro passa-banda.....	33
Fluorescenza	19
ottica di misurazione della fluorescenza	26
ottica di misurazione della fluorescenza dall'alto	31
Fluorescenza a risoluzione temporale (TRF) ..	20
fotodiodo in silicio	26

FRET	19
Funzionalità del software per MRW	76
Funzioni dello strumento	105

G

Guadagno.....	60
---------------	----

I

i-control e iniettori.....	88
Impostazioni del fattore G	67
Impostazioni del flash.....	64
Iniettori.....	15
Inserimento	
cuvetta	42
Installazione	43
Intensità totale	71
Intensità:.....	71
Intervallo del bianco	67
intervallo di tensione.....	46
Istantanee.....	114
Istruzioni per il test delle specifiche.....	125

L

Lampada flash.....	25
Lecture multiple per pozzetto.....	73
Luminescenza	21
Luminescenza di tipo.....	22
Luminescenza in modalità.....	112

M

Manutenzione	141
Materiale d'imballaggio	
restituzione	147
smaltimento	147
Micropiastre	
tipi raccomandati di.....	117
Misurazioni cinetiche	51
Modalità Erogazione.....	88
Modalità rapporto	65
Monitoraggio del flash	26
Monocromatore	25
Multi-etichettatura.....	51

O

Ottica	23
Ottica dell'alloggiamento per cuvetta	40
Ottica di assorbanza.....	35
Ottica di assorbanza per cuvetta.....	40
Ottica di luminescenza	37
Ottica di misurazione della fluorescenza dal basso (Fondo).....	32
Ottica di misurazione della luminescenza	37
Ottica di misurazione dell'assorbanza.....	35
Ottica fluorescenza dal basso	24
Ottica fluorescenza dall'alto	23
OVER	60

overflow	60	Sistema di misurazione dell'assorbanza	33
P		Sistema di rilevamento della luminescenza	37
Parametri di temporizzazione	65	Smaltimento	
PMT ruota portafiltri	28	materiale d'imballaggio.....	147
Polarizzazione	71	materiale operativo.....	147
Polarizzazione di fluorescenza	67	Strumento.....	146
Precisione		Specchio di fluorescenza Fondo	27
Fluorescenza a risoluzione temporale.....	133	Spegnimento	104
Fluorescenza Cima	128	T	
fluorescenza Fondo.....	131	Tecniche di misurazione.....	19
Polarizzazione di fluorescenza.....	134	Tempo di commutazione dei filtri.....	65
Proprietà del PMT.....	60	Tempo di commutazione delle lunghezze	
R		d'onda	65
Requisiti di alimentazione.....	46	Tempo di pausa.....	65
Riduzione del bianco	71	Tempo d'integrazione	77
Riduzione valore vuoto	67	Tipi di cuvetta	41
Rilevamento dell'assorbanza.....	35	Tipologia di MRW	73
Rilevamento dell'intensità di fluorescenza.....	27	Trasferimento di energia per risonanza di	
S		fluorescenza (FRET).....	19
Sensibilità		U	
Fluorescenza a risoluzione temporale.....	132	Uniformità	
fluorescenza Cima	125	Fluorescenza Cima	126
fluorescenza Fondo.....	129	fluorescenza Fondo.....	130
Luminescenza di tipo	136	Unità di rilevamento della luminescenza.....	37
Sicurezza	9	V	
Sistema della sorgente luminosa.....	30	Visualizzazione dei risultati MRW	76
Sistema di lenti per rilevamento dell'intensità			
di fluorescenza	27		

Assistenza clienti Tecan

Se avete domande sui prodotti Tecan o necessitate di assistenza tecnica, contattate il centro assistenza Tecan locale. Visitate <http://www.tecan.com/> per trovare le informazioni di contatto.

Prima di contattare il servizio assistenza Tecan, preparate le seguenti informazioni, per consentirci di fornirvi assistenza tecnica al meglio delle nostre possibilità (vedere targhetta di identificazione):

- modello del vostro prodotto
- numero di serie (SN) del vostro prodotto
- tipo di software e versione del software (se applicabile)
- descrizione del problema e persona di contatto
- data e orario in cui si è verificato il problema
- azioni che avete già intrapreso per risolvere il problema
- le vostre informazioni di contatto (numero di telefono, fax, indirizzo e-mail, ecc.)

Declaration of Conformity

We, TECAN Austria GmbH herewith declare under our sole responsibility that the product identified as:

Product Type: **Microplate Absorbance Reader**

Model Designation: ***INFINITE 200 PRO***

Article Number(s): **30050303**

Address: Tecan Austria GmbH
Untersbergstr. 1A
A-5082 Grödig, Austria

is in conformity with the provisions of the following European Directive(s) when installed in accordance with the installation instructions contained in the product documentation:

- **EMC Directive**
- **Machinery Directive**
- **RoHS Directive**

is in conformity with the relevant U.K. legislation for UKCA-marking when installed in accordance with the installation instructions contained in the product documentation:

- **Electromagnetic Compatibility (EMC) Regulations**
- **Supply of Machinery (Safety) Regulations**
- **The Restriction of the Use of Certain Hazardous Substances in Electrical and Electronic Equipment Regulations**

The current applicable versions of the directives and regulations as well as the list of applied standards which were taken in consideration can be found in separate CE & UK declarations of conformity.

These *Instructions for Use* and the included *Declaration of Conformity* are valid for all INFINITE 200 PRO instruments with the article numbers listed above. The model designation varies depending on the specific model with different article number.