



Utilizzo StepOnePlus (Applied Biosystems)

Descrizione

La Real-Time PCR (o qPCR/PCR quantitativa) è una tecnica di biologia molecolare che amplifica e contemporaneamente quantifica una sequenza specifica di DNA o RNA in tempo reale, misurando la fluorescenza prodotta ad ogni ciclo di amplificazione, a differenza della PCR tradizionale che quantifica solo alla fine.

Prima dell'utilizzo

- Prenotazione e tempi: <https://aularioce.unicampania.it/index.php/attrezzature-comuni/gel-doc-real-time-pcr-nanodrop> (rispetta la prenotazione e lascia il tempo per avvio/salvataggio/pulizia).
- Posizionamento e ventilazione: lo strumento deve stare su banco stabile; lascia libere griglie/ventole (niente scatole, fogli, zaini appoggiati vicino o sopra).
- Consumabili compatibili: usa piastre/tubi e sigilli “optical” compatibili StepOnePlus (evita plastiche generiche: possono deformarsi e stressare il coperchio/blocco).

Creazione del run sul software (StepOne Software)

- Accendere lo strumento e il PC
- Login as Administrator
- Password: Administrator
- Aprire StepONE software
- Login as Guest
- In setup selezionare “advanced setup”
- New Experiment / Nuovo esperimento
- Experiment Properties (Proprietà esperimento)
 - Seleziona tipo di esperimento: quantificazione (es. *Standard Curve/Comparative Ct*), *Genotyping/Presence-Absence*, ecc.
 - Seleziona chimica: *TaqMan* o *SYBR* (e, se usi *SYBR*, ricordati di attivare l’opzione per la melt curve)
- Plate Setup (Impostazione piastra)
 - Inserisci nomi campioni e target
 - Assegna il task dei pozzetti (es. *Unknown*, *Standard*, *NTC*, ecc.) in modo coerente con il tuo disegno sperimentale
 - Seleziona il dye/canale corretto (lo StepOnePlus è un sistema 96 pozzetti con lettura “4-color”, tipicamente *FAM/SYBR*, *VIC/JOE*, *NED/TAMRA* e *ROX*)

Impostazioni di acquisizione e analisi (software)

- Verifica in quale step avviene la lettura della fluorescenza (data collection).
- Se previsto dal tuo setup:
 - Include Melt Curve (*SYBR*)
 - Passive reference (*ROX*): impostala solo se richiesta dal kit/metodo (non “a caso”).
 - Baseline/threshold: in assenza di specifiche, lascia Auto durante il run e valuta dopo in analisi.

Caricamento piastra nello strumento (StepOnePlus)

- Apri il coperchio e inserisci la piastra nel verso corretto (attenzione all'orientamento tipo A1/indicatori).
- Assicurati che la piastra sia ben appoggiata e che non ci siano spessori anomali (sigilli troppo rigidi o consumabili non compatibili).
- Chiudi il coperchio: deve andare in lock senza forzare (se oppone resistenza, fermati e controlla piastra/sigillo).
-

Avvio

Prima di "Start":

- Controlla nome file e percorso di salvataggio
- Controlla coerenza tra disegno piastra e ciò che stai caricando fisicamente
- Salva il file esperimento (Save/Save As) e poi avvia il run.

Durante l'utilizzo (monitoraggio "sicuro")

- Non scollegare cavi / non chiudere forzatamente il software durante il run.
- Non spostare lo strumento: niente urti o vibrazioni sul banco (soprattutto durante la corsa).
- Niente oggetti sopra: non usare la macchina come "ripiano" (rischio ostruzione ventole e cadute di liquidi).
- Se compaiono warning/errori:
 - non insistere con tentativi ripetuti "Start"
 - annota messaggio/ora (screenshot se puoi) e avvisa il referente.

Dopo l'utilizzo

- Fine corsa: attendi che la macchina segnali fine run prima di aprire.
- Rimozione piastra: estrai con calma; controlla subito se ci sono gocce o perdita.
- Pulizia:
 - se c'è uno spill sul blocco o nel vano: asciuga subito con panno morbido/lint-free leggermente inumidito (niente abrasivi);
 - evita solventi aggressivi o spruzzi diretti sulla macchina.
- Lasciare la macchina in ordine: coperchio chiuso per proteggere da polvere.
- Salvataggio e chiusura software: salva e chiudi correttamente (non staccare alimentazione/USB "a caldo").

Cose da NON fare

- Non usare consumabili non ottici o non compatibili.
- Non chiudere il coperchio a forza e non bloccarlo se fa resistenza.
- Non lasciare liquidi vicino alla macchina (ghiaccio, becher, bottiglie aperte).
- Non ostruire ventole/griglie e non coprire lo strumento.
- Non improvvisare su calibrazioni/manutenzione: se serve, se ne occupa il personale responsabile

Norme di sicurezza

La centrifugazione è un'operazione complessa che va eseguita con estrema cautela e per questo è importante seguire alcuni accorgimenti. Per ulteriori informazioni si prega di accedere al seguente link <https://www.distabif.unicampania.it/ricerca/sicurezza-in-laboratorio>