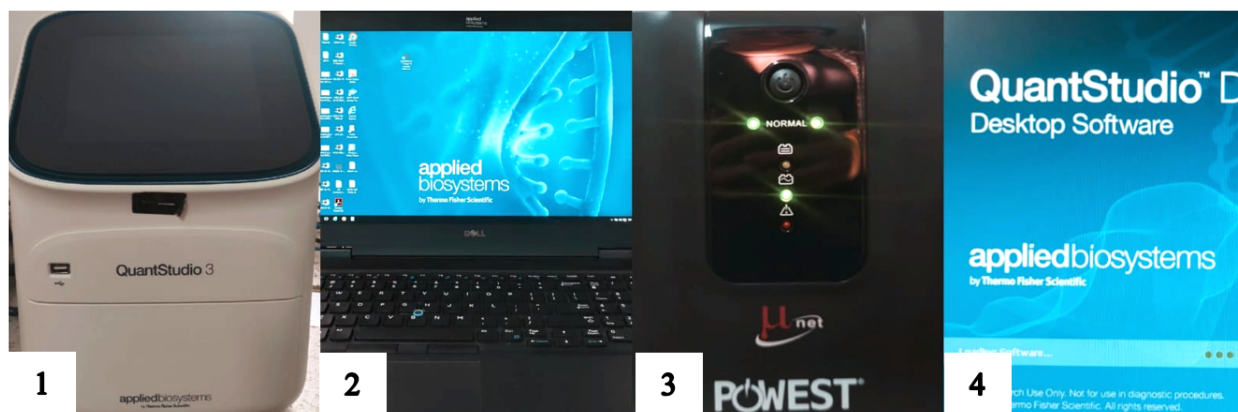


## Instructivo de manejo – QuantStudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)

Elaborado por: VRG, Revisado y aprobado: ISRB. Versión 1 (8-Jun-2024).

El QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, USA) es un termociclador avanzado utilizado para la amplificación y análisis de ADN mediante PCR en tiempo real. Este instructivo está diseñado para guiar a los investigadores del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular (LIBM) de la Universidad del Tolima en el uso adecuado de este equipo, asegurando la precisión y eficiencia en sus experimentos. Lo descrito en el presente instructivo aplica para las condiciones del LIBM.

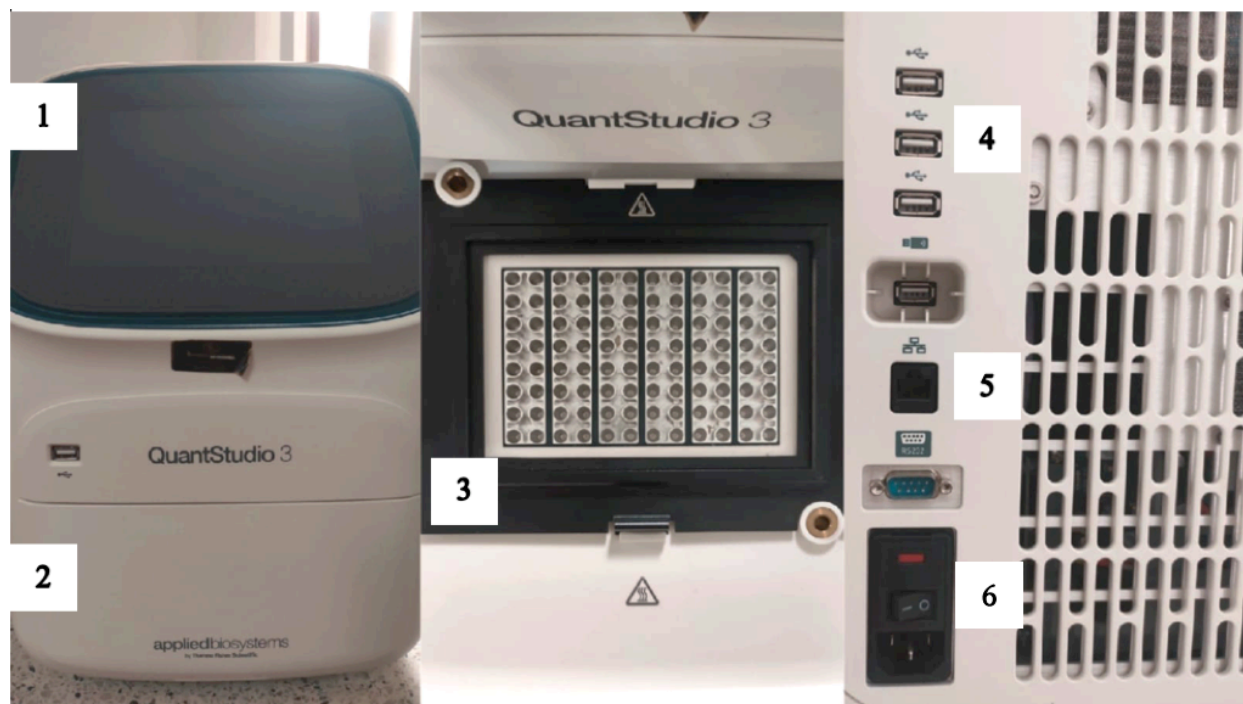
Para los procedimientos de PCR en tiempo real (qPCR), se requerirán los equipos y programas que se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Equipos básicos para el montaje de qPCR. 1. Termociclador QuantStudio 3 (Applied biosystems, USA). 2. Ordenador (DELL, USA). 3. Uninterruptible Power Supply – UPS (Powest, USA), fuente de alimentación ininterrumpida. 4. Software QuantStudio Design and Analysis, instalado en equipo de computo.

El QuantStudio 3 está compuesto de varios componentes internos los cuales son claves para su funcionamiento. Estos componentes incluyen un bloque térmico que proporciona temperaturas precisas y uniformes para la amplificación del ADN, un sistema óptico de detección de fluorescencia que permite la monitorización en tiempo real de la amplificación de los fragmentos de ADN, y un software de control que facilita el análisis y configuración de los experimentos. Finalmente, otros componentes externos del termociclador son:

1. **Pantalla táctil:** Para configurar y monitorear los experimentos.
2. **Puerta del termociclador:** Protege el bloque de reacción.
3. **Bloque de reacción o bloque térmico:** Donde se colocan las muestras.
4. **Puertos USB:** Para transferir datos y actualizar el software.
5. **Conexión de red:** Integración al ordenador.



**Figura 2.** Componentes externos del termociclador. 1. Pantalla táctil. 2. Puerta del termociclador. 3. Bloque de reacción. 4. Puertos USB. 5. Conexión de red. 6. Botón prendido/apagado.

### Encendido del equipo:

Inicialmente nos aseguramos de que el termociclador esté conectado a la UPS, posterior a esto verificar el cable de conexión de red y de energía en la parte posterior del termociclador, y el cable de red esté conectado al computador (Figura 3). Debido a la que disipación del calor del dispositivo se hace por la parte inferior y posterior del mismo se sugiere que la base este despejada al menos en una distancia de 10 cm, lo cual permita la liberación del calor de manera eficiente. Presionar el botón de encendido que está ubicado en la parte de atrás del equipo y posterior a esto encender el computador.

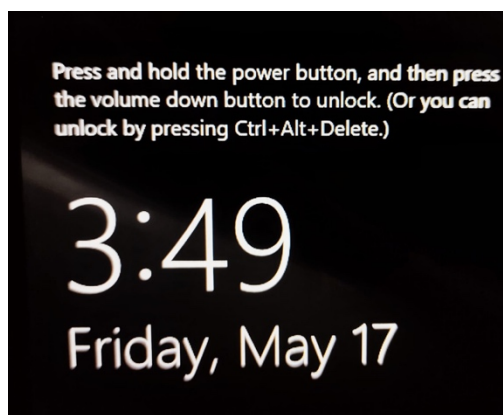
**Importante:** Encender siempre el termociclador antes que el computador, con el fin de que este sea reconocido por el software.



**Figura 3.** Conexiones. 1. Cable de red. 2. Cable de energía. 3. Posición de la conexión de los cables en el termociclador.

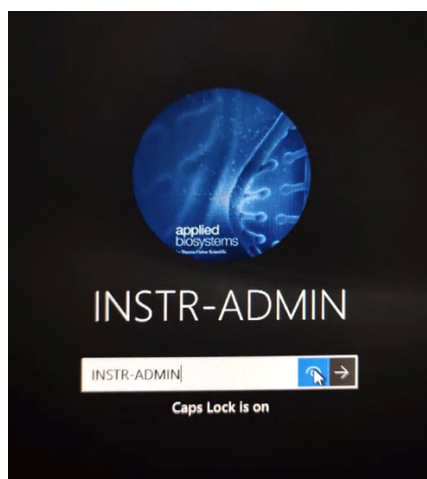
### Configuración del experimento:

Para configurar la maquina y establecer el experimento, inicialmente se debe ingresar al computador. En la pantalla aparecerá un bloqueo el cual se desactiva presionando al mismo tiempo Ctrl+Alt+Delete, como lo muestra en la pantalla del computador:



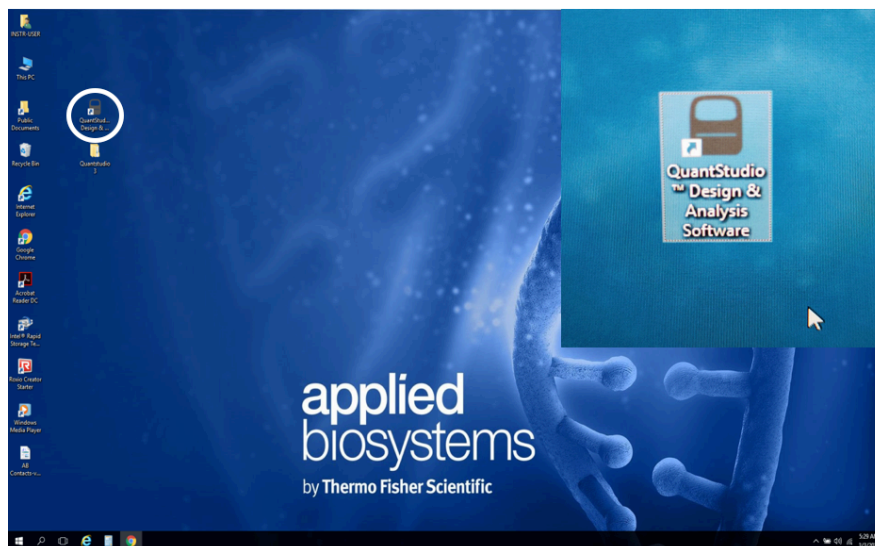
**Figura 4.** Entrada de inicio del computador para desbloquear la pantalla.

Posterior a esto, aparecerá el perfil del usuario del computador y pedirá la introducción de una contraseña, la cual es la misma al nombre del perfil, como se muestra a continuación:



**Figura 5.** Contraseña para ingresar al dispositivo. Nótese que corresponde al mismo nombre de usuario.

Después de esto, aparecerá la pantalla de inicio del computador, en este paso, debemos dirigirnos al acceso directo al programa el cual aparece como 'QuantStudio Design & Analysis Software', este está ubicado en el escritorio (Figura 4.), o si no, podemos dirigirnos al icono de Windows o botón de inicio (esquina inferior izquierda), y dirigirnos a la carpeta de Applied Biosystems (Imagen 5.)



**Figura 6.** Icono del software y ubicación en el escritorio del ordenador.



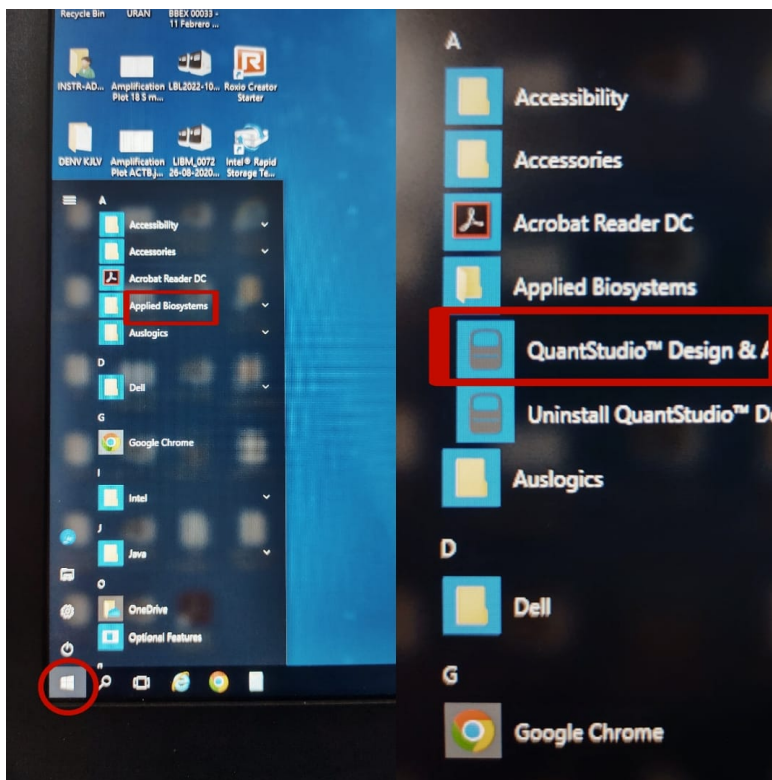


Figura 7. Ubicación del software dentro del entorno de aplicaciones del computador.

Posterior a esto esperamos a que cargue el programa para iniciar la programación del experimento:

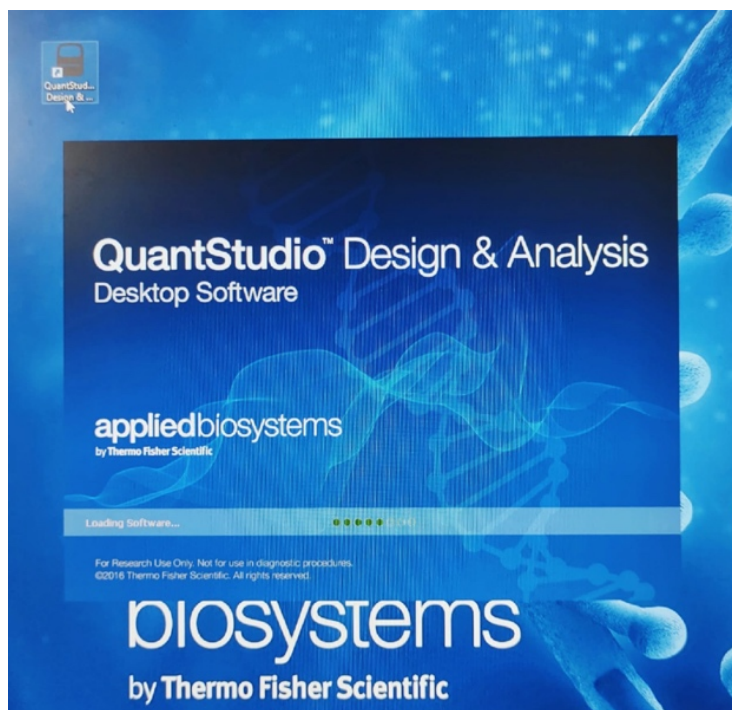


Figura 8. Aviso del software posterior a darle clic al icono del programa.

Cuando estemos en el programa, seleccionamos 'Create New Experiment':

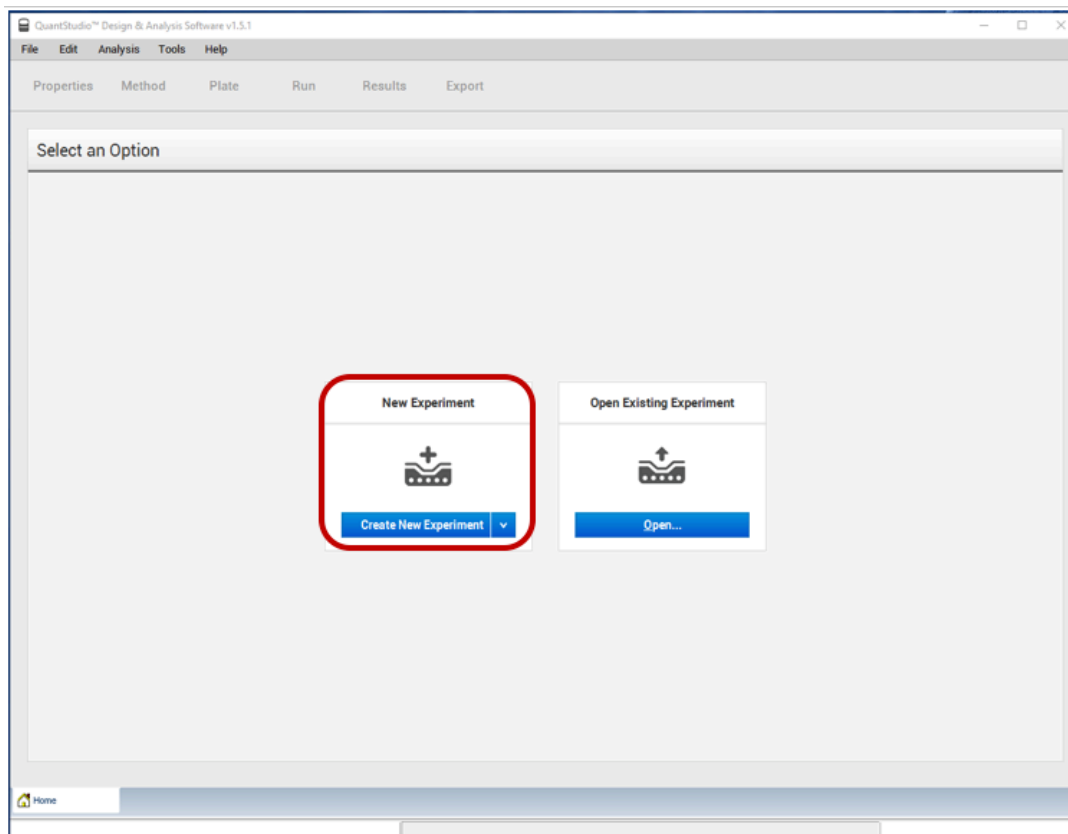


Figura 9. Pantalla inicial del software donde se selecciona la casilla para iniciar la configuración.

*Nota: Si ya se tiene un experimento previamente establecido se da clic en la opción de **Open** con el fin de abrir un experimento que puede servir como plantilla para la configuración. El presente instructivo describe los pasos de un experimento inicial.*

En la pestaña inicial 'Properties' seleccionamos las características generales del experimento, como lo es el instrumento, tipo de bloque, química a utilizar, tipo de experimento y finalmente la velocidad del corrido. Inicialmente, no modificamos la casilla de 'Name', la cual debe anotarse el número correspondiente al experimento (ej: 094112), posterior a esto, la casilla de *username* colocamos las iniciales de nuestro nombre. Se deja el nombre del instrumento '**QuantStudio 3 System**', en el tipo de bloque seleccionamos '**96-Well 0.2 mL Block**':

QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1

File Edit Analysis Tools Help

Properties Method Plate Run Results Export

### Experiment Properties

Name	2024-05-16_094112
Barcode	Barcode - optional
User name	User name - optional
Instrument type	QuantStudio™ 3 System
Block type	96-Well 0.2-mL Block
Experiment type	Standard Curve
Chemistry	TaqMan® Reagents
Run mode	Standard

**Figura 10.** Pestaña 'Properties' acá se modificará se acuerdo a las necesidades del investigador.

Posteriormente seleccione la fluorescencia que va a utilizar 'TaqMan o SYBRGreen' y finalmente en el modo de corrido seleccione 'Fast':

QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1

File Edit Analysis Tools Help

Properties Method Plate Run Results Export

### Experiment Properties

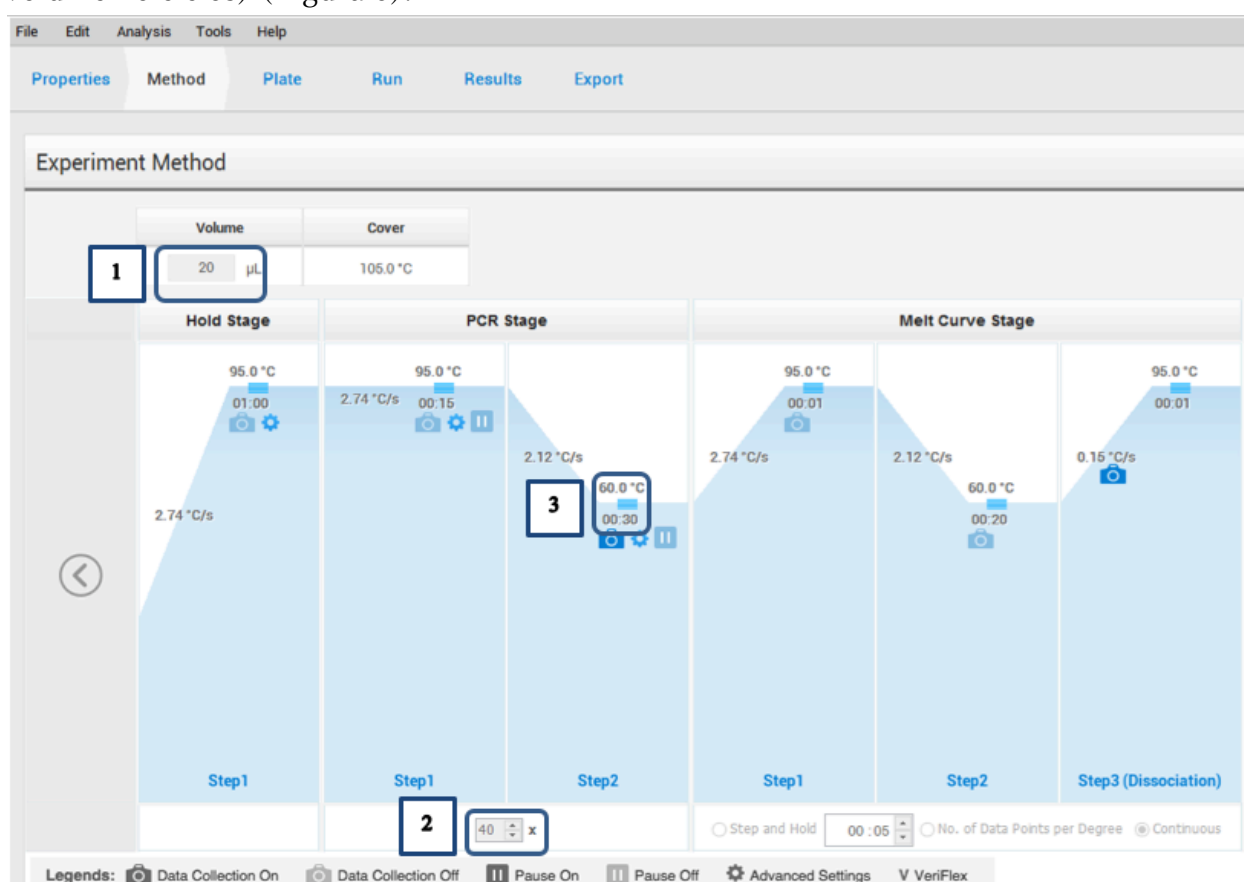
Name	2024-05-16_094112
Barcode	Barcode - optional
User name	User name - optional
Instrument type	QuantStudio™ 3 System
Block type	96-Well 0.2-mL Block
Experiment type	Standard Curve
Chemistry	TaqMan® Reagents
Run mode	Standard
	Fast

**Figura 11.** Selección de química a utilizar (SYBRgreen/TaqMan) y modo de corrido.

**Modo Standard:** Este modo tiene un ciclo de PCR más largo, generalmente alrededor de 2 horas para un programa típico. Está diseñado para obtener resultados con alta precisión y es ideal para muestras que requieren una amplificación más lenta y controlada.

**Modo Fast:** Este modo reduce significativamente el tiempo de ciclo, generalmente a menos de 40 minutos para un programa típico. Está optimizado para ensayos rápidos, permitiendo una mayor eficiencia y rendimiento cuando se necesita un resultado rápido.

En el siguiente paso 'Method', realizamos la configuración de los ciclos, tiempo y temperatura del experimento, en el cual se ajustará según las recomendaciones del fabricante comercial del kit empleado o de las necesidades del investigador. La programación se realiza dando doble clic en la casilla a modificar (Temperatura, tiempo, volumen o ciclos) (Figura 6).

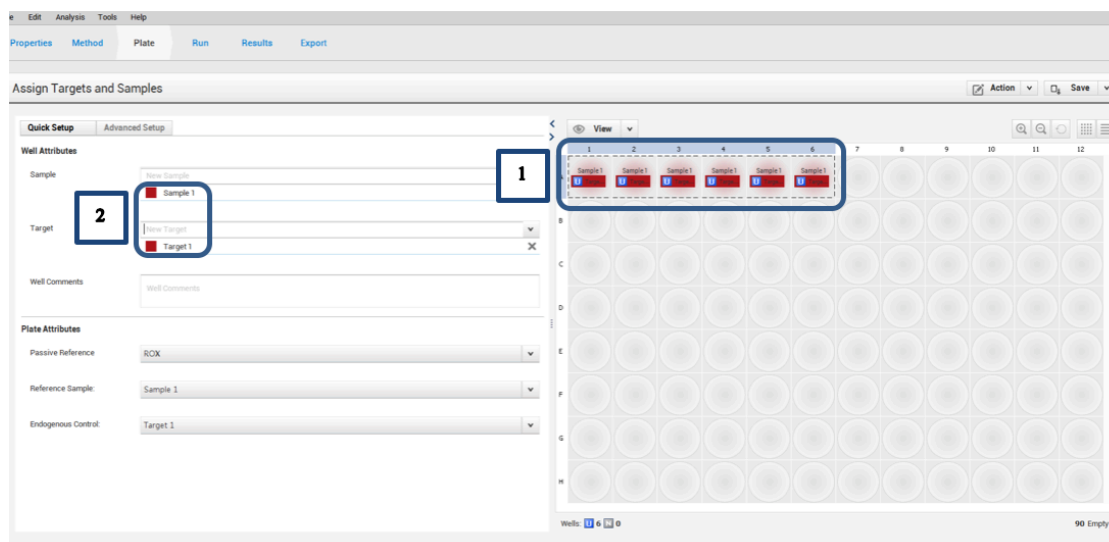


**Figura 12.** Configuración del perfil térmico. 1. Volumen total por cada tubo de 0.2 mL. 2. Número de ciclos. 3. Temperatura y tiempo de cada fase.

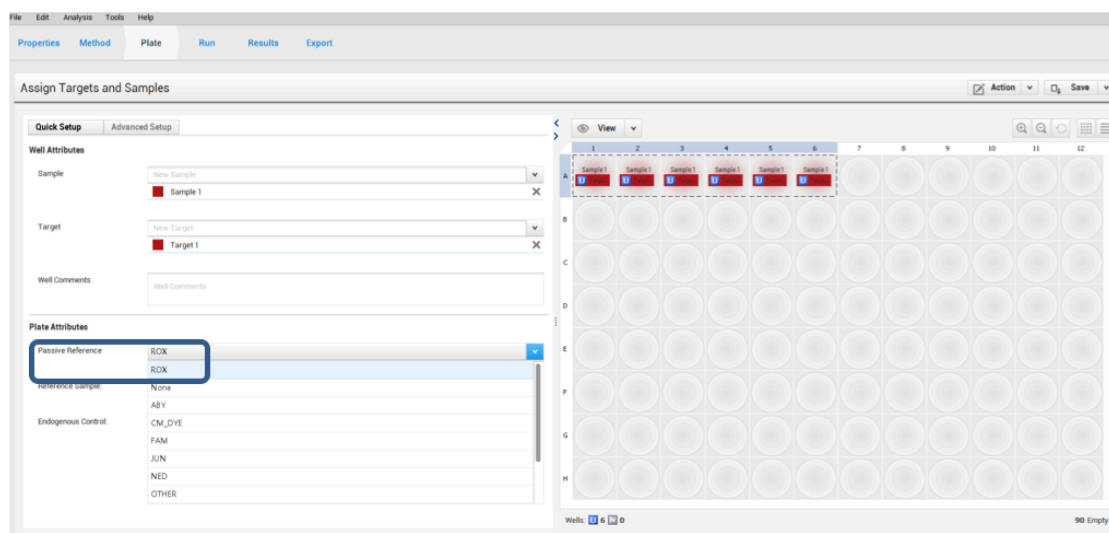
En la siguiente casilla 'Plate', se realiza la configuración de las muestras que se leerán en el bloque de reacción. En esta ventana podrá configurar cuantas muestras se leerán por corrido, así mismo si hay diferentes objetivos/targets, y si hay uso o no del colorante referente pasivo (Figuras 13 y 14). Adicionalmente, se encuentra la opciones de



configuraciones avanzadas, en el cual podrá modificar el cambio de color para cada muestra u objetivo (Figura 15).

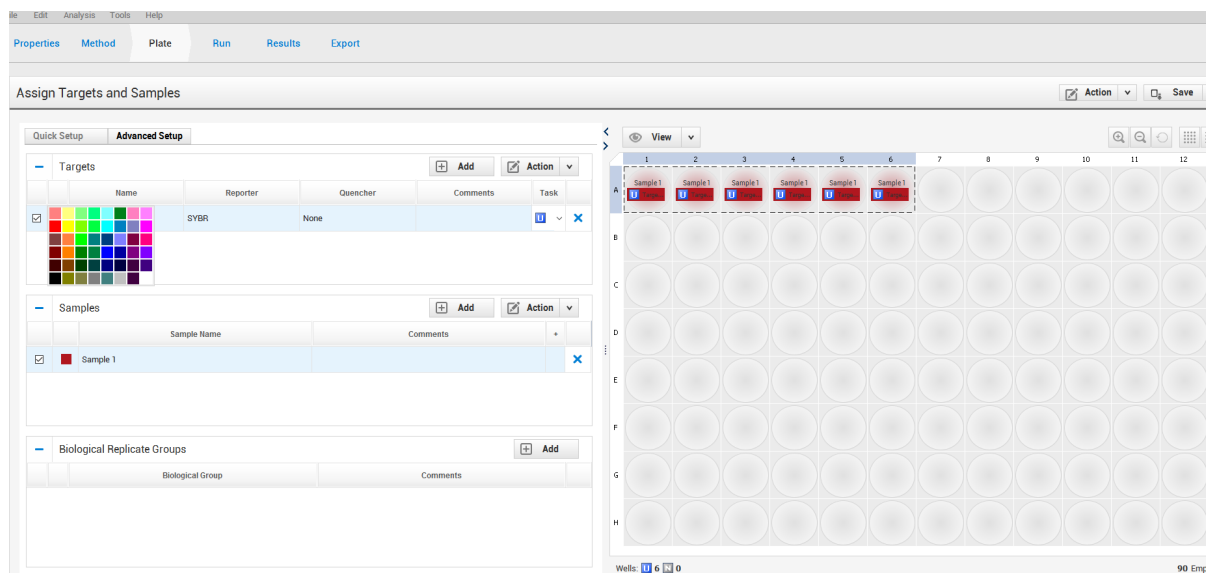


**Figura 13.** En esta ventana podrá realizar la configuración de sus muestras en el termociclador. **1.** Selección de el número de muestras a utilizar en el diagrama de 96 pozos. **2.** En la casilla **Sample** y **Target** seleccione **Target 1** y **Sample 1**, los cuales deben verse seleccionados con color en el diagrama de 96 pozos para el número de muestras correspondientes.



**Figura 14.** Selección del colorante de referencia pasivo, el cual se selecciona de acuerdo a las necesidades del investigador.

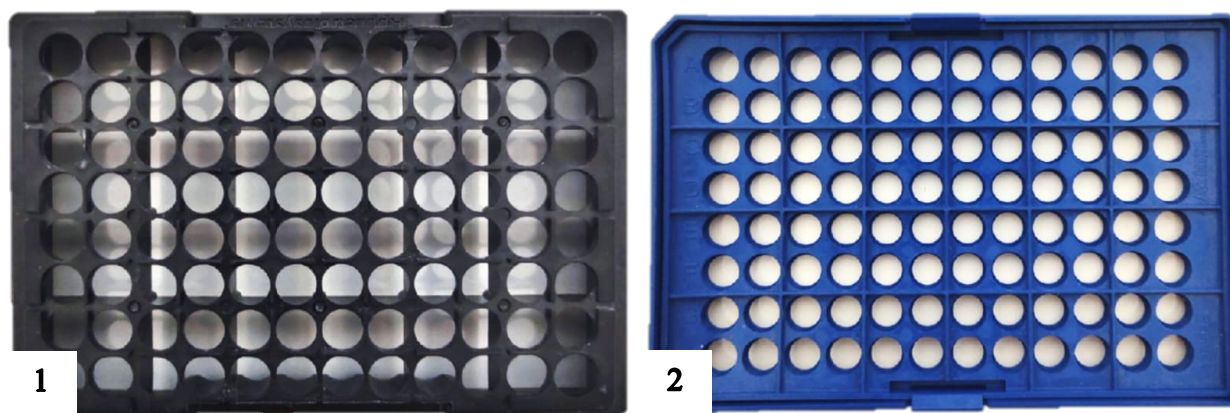
Los colorantes de referencia pasivos se utilizan comúnmente en reacciones de qPCR para normalizar la variación de la señal de fluorescencia no relacionada con la PCR. La normalización de los datos de qPCR utilizando ROX reduce la influencia de la variabilidad entre pozos, como la iluminación desigual, la ligera variación en la óptica y las diferencias en la cantidad de condensación.



**Figura 15.** Configuración avanzada. En esta casilla podemos cambiar el color de las muestras u objetivos si se desea.

### Carga de las muestras:

En el montaje experimental las muestras se pueden insertar en el soporte de 96 tubos proporcionado por la casa comercial, de igual manera, tener en cuenta la utilización de la bandeja de muestras en el momento del montaje en el bloque de reacción (Figura 16).



**Figura 16.** Materiales para el montaje de las muestras. 1. Soporte de muestras. 2. Bandeja de muestras.

Posterior a la configuración del equipo y de realizar el montaje experimental, se procede a ingresar las muestras al termociclador. Para realizar esto debemos dirigirnos a la pantalla del termociclador y darle clic al icono de eyección del bloque de reacción (Figura 17).

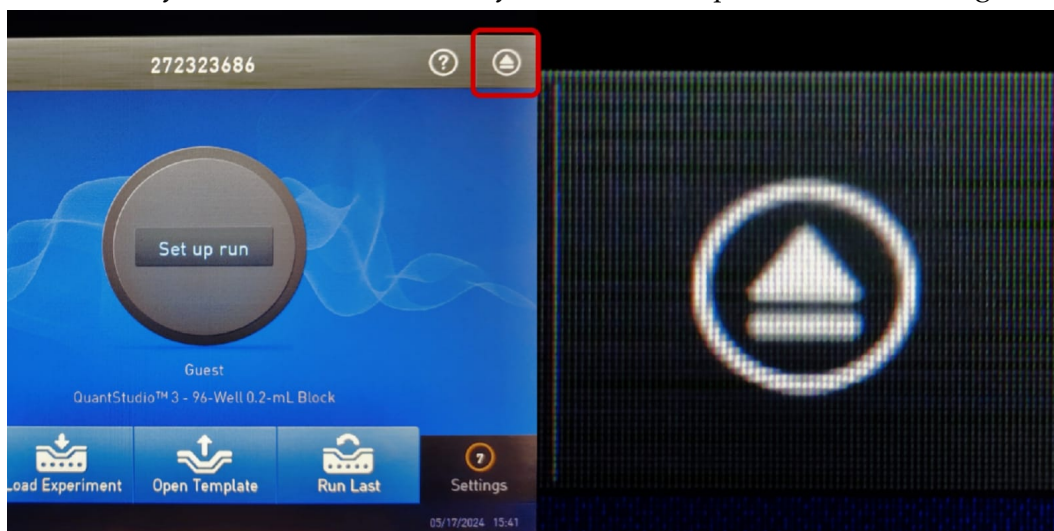


Figura 17. Icono de la pantalla inicial para abrir el bloque de reacción.

Seguido a esto, colocamos la bandeja de muestras en el bloque de reacción, hay que tener en cuenta de siempre colocar la placa para evitar evaporación de las muestras, y asegurar una distribución uniforme del calor entre la placa y el bloque térmico, asimismo, nos permite asegurar un mejor orden de las muestras al momento del montaje (Figura 18).

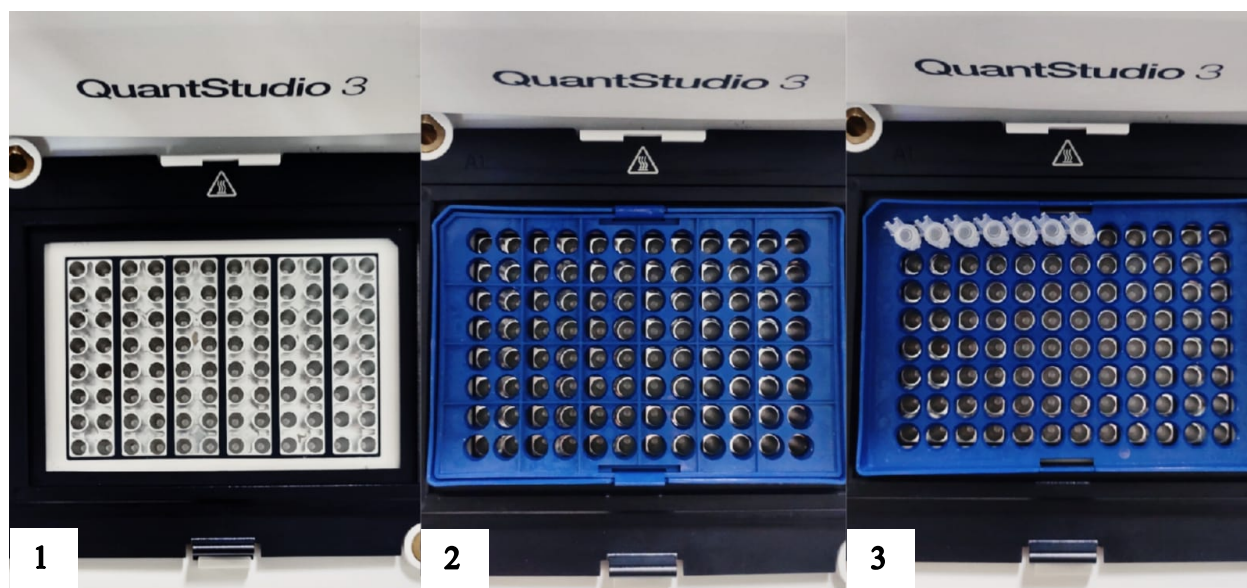


Figura 18. Secuencia para el montaje de las muestras dentro del termociclador. 1. Bloque del termociclador. 2. Introducción de la bandeja de muestras al bloque del termociclador. 3. Inserción de las muestras a la bandeja de muestras.

### Inicio del corrido:

Después de introducir las muestras en el termociclador, nos dirigimos en al programa en el computador para dar inicio al corrido. En la pestaña 'Run', nos aparecerán las muestras seleccionadas con anterioridad y la opción 'START RUN', le damos clic a la flecha hacia abajo, en el cual aparecerá en código del termociclador. Posterior a esto seleccione START RUN para iniciar el corrido (Figura 19).

Seguido a esto, el termociclador comenzará a ejecutar el protocolo. Durante este tiempo, la pantalla mostrará el progreso del ciclo (aprox. 55 min).

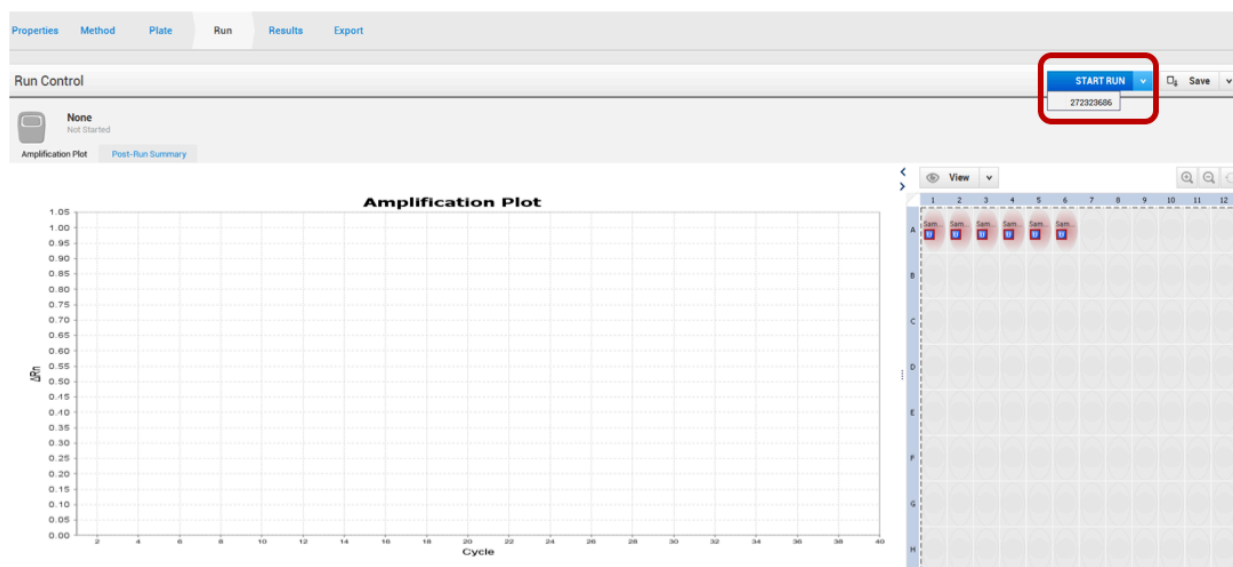


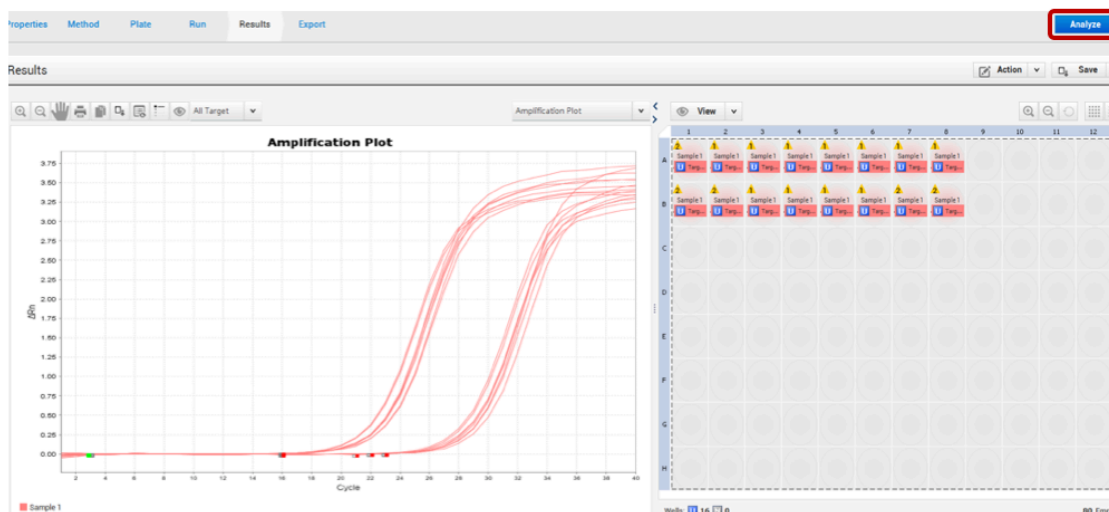
Figura 19. Ubicación del icono START RUN, en el cual aparece el código del termociclador.

### Análisis de Resultados

Al finalizar el corrido, el equipo mostrará una notificación del envío de los datos, darle a la opción 'Done', seguido, extraer la bandeja con las muestras del bloque de reacción con cuidado y descartar las muestras en una caneca roja, y guardar la bandeja de muestras.

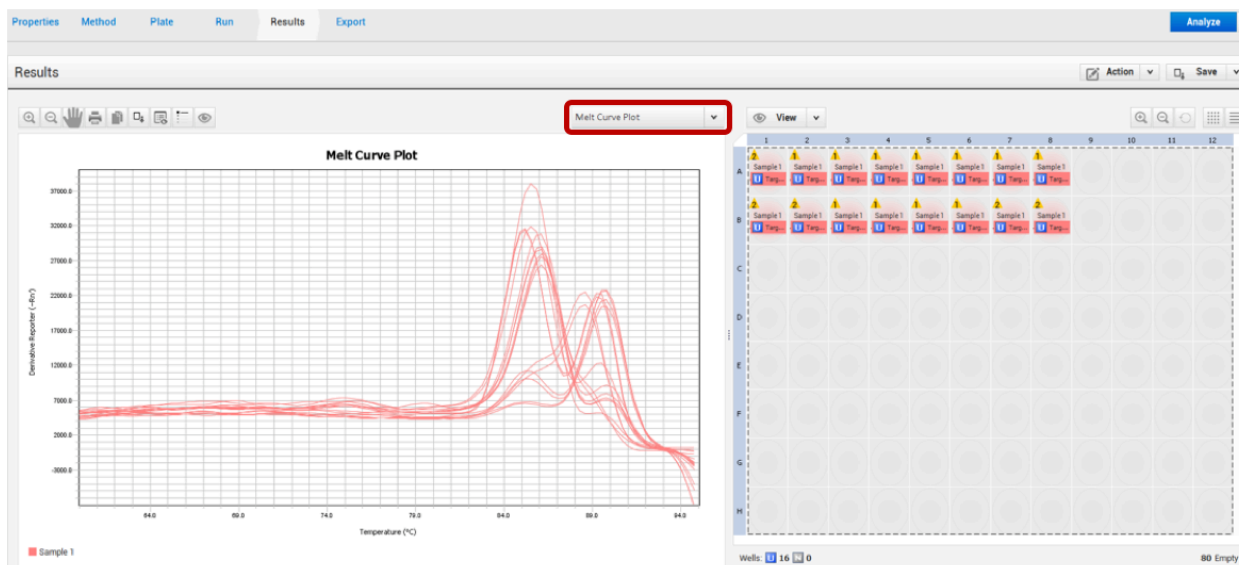
Por medio del software del QuantStudio 3 se enviarán los resultados, accediendo a gráficos de amplificación, curvas de disociación y datos cuantitativos. Esto se realiza, dando clic en el icono 'Analyze' para el analisis de los resultados obtenidos:





**Figura 20.** Resultados obtenidos por el termociclador, en la parte superior se encuentra la casilla ‘Analyze’ para realizar el análisis de los mismos.

Seguido a esto, en el icono de Plot desplegamos las gráficas obtenidas en el experimento:



**Figura 21.** Resultados obtenidos por el termociclador, en la parte superior se encuentra la casilla ‘Analyze’ para realizar el análisis de los mismos.

Para la descargar de las gráficas, damos clic derecho sobre la imagen y posterior a esto ‘Save as’:



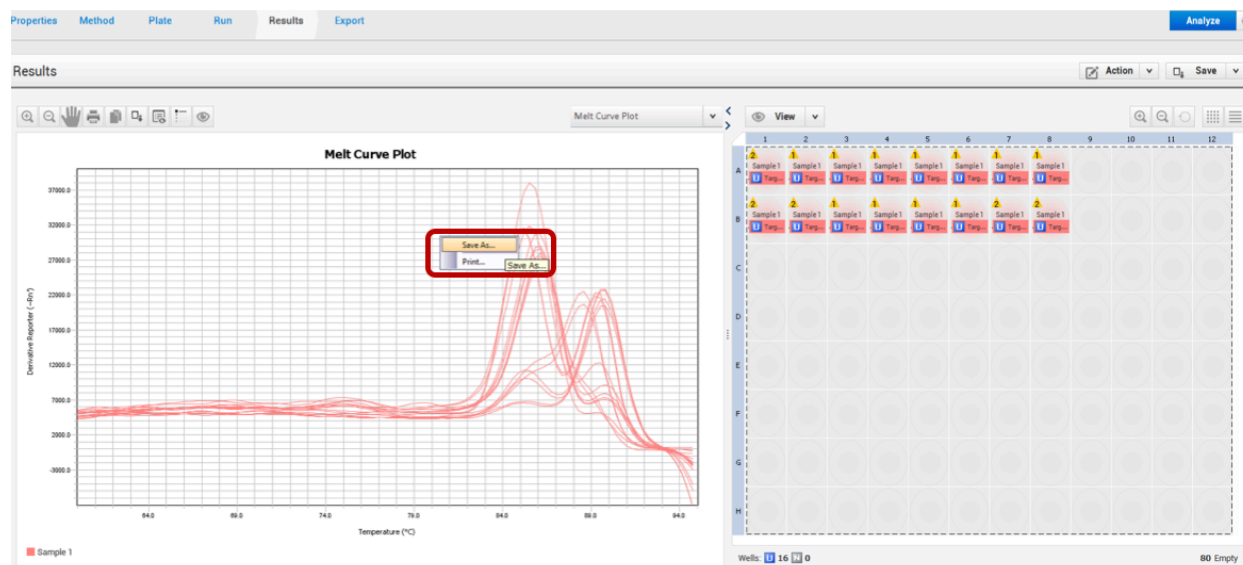


Figura 22. Almacenamiento de gráficas. **Cuadro rojo:** Casilla 'Save as' para el almacenamiento de datos.

Finalizada la descarga de las gráficas, continuamos en la pestaña 'Export', para la descarga de los datos obtenidos en el experimento, en este caso, no aseguramos que el archivo esté en formato .xls, revisemos la localización del archivo y lo guardamos en la carpeta correspondiente del investigador:

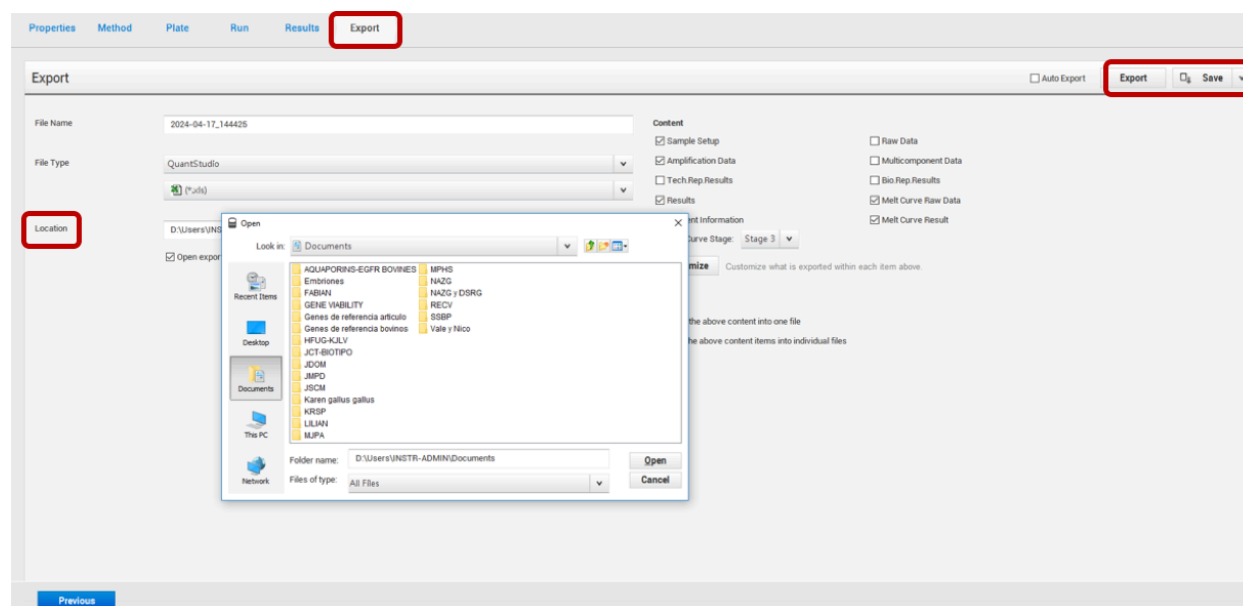
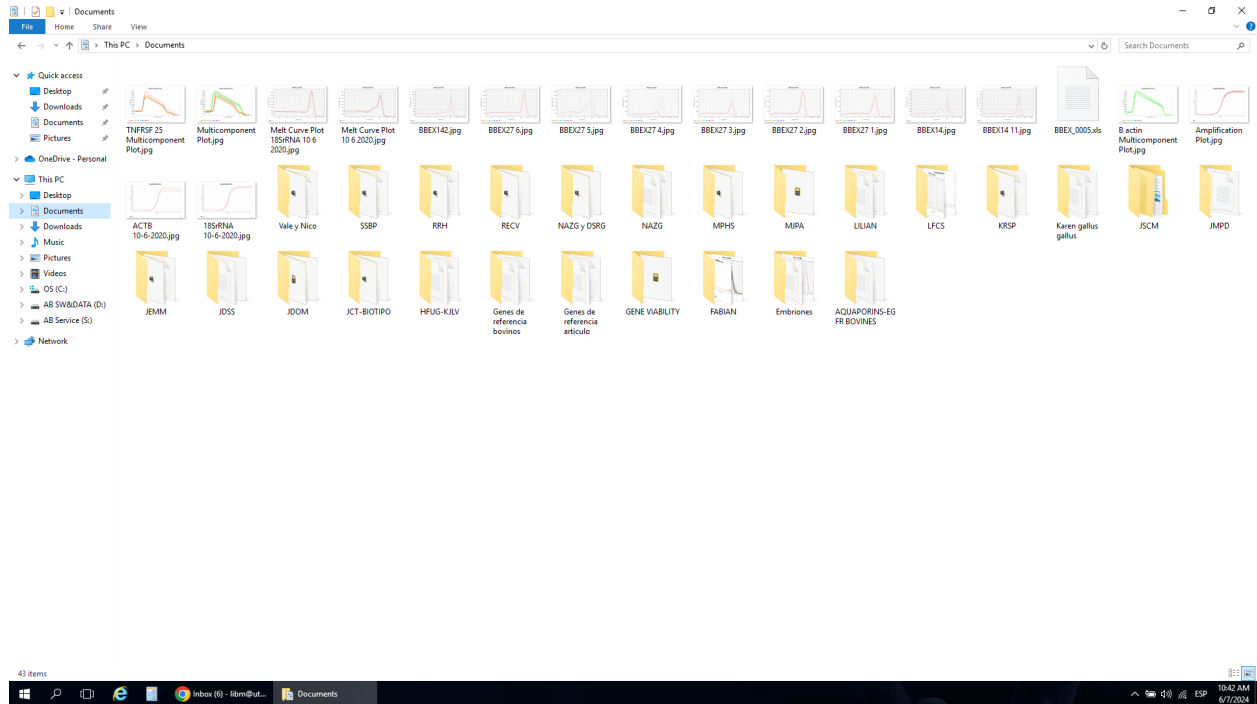


Figura 23. Casilla 'Export'. **Location:** Localización en la cual se guardarán los archivos. **Export/Save:** Botones para exportar y guardar los datos. Asegurarse que se encuentra en su carpeta de experimentos.

Recuerde que todos los experimentos deben almacenarse en la carpeta del investigador correspondiente. Ese archivo lo encontrará entrando al icono de 'INSTR-ADMIN' (Figura 24), y estarán las carpetas de todos los investigadores del laboratorio (Figura 25).



**Figura 24.** Carpeta donde encontrará los experimentos de todos los investigadores.



**Figura 25.** Documentos en el cual se encuentran las carpetas de los investigadores. Si crea uno se recomienda rotularla con sus iniciales.

Finalizado esto damos clic a la opción guardar, cerramos el software e ingresamos al correo para el envío de los resultados. Debe tener en cuenta que el computador requiere la inserción de un adaptador de WiFi USB, la cual le permitirá la conexión a la red de internet (Figura 26).



Figura 26. Adaptador de WiFi para permitir conexión al computador.

### Apagado de los equipos:

Al finalizar el almacenamiento de los experimentos, se debe realizar el apagado de los equipos. Inicialmente, se vuelve a abrir la puerta del termociclador y se retirarán las muestras y la bandeja de las muestras. Para el apagado del termociclador, nos dirigimos al botón de apagado (Figura 2.). Posterior a esto, realizamos el apagado del computador, para esto, nos dirigimos al icono de windows, y seleccionamos 'Shut down':

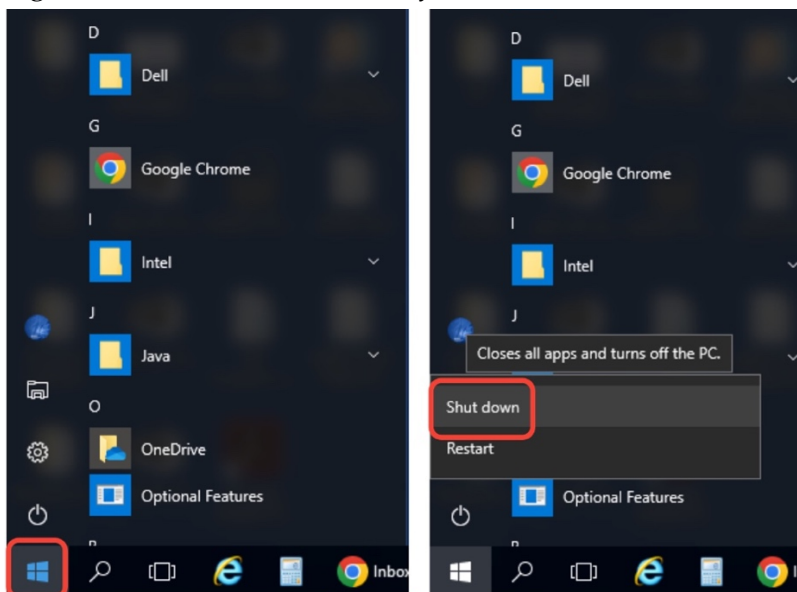


Figura 27. Procedimiento de apagado del computador.

Finalmente, debe asegurarse que los equipos estén efectivamente apagados, los cuales debe colocarle, en el caso del termociclador, la funda, y en el caso del computador,

debidamente cerrado y desconectado (Figura 28). Cualquier duda no dude en comunicarla con el director del laboratorio o los asistentes/auxiliares del mismo.



**Figura 28.** Proceso de desconexión del cable de energía del computador. Como se observa en la figura de la derecha el plug debe quedar desconectado del equipo.