


RIDA[®] GENE Color Compensation Kit I

Art. Nr.: PG0001

3 Reaktionen

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

1. Verwendungszweck

Das RIDA®GENE Color Compensation Kit I dient der Farbstoffkalibrierung von multiplex real-time PCR-Läufen auf dem LightCycler® 480. Mit dem RIDA®GENE Color Compensation Kit I kann ein Color Compensation File erstellt werden. Dieser ermöglicht multiplex real-time PCR Läufe von RIDA®GENE real-time PCR Kits auf dem LightCycler® 480 zu analysieren.

2. Erläuterung

Bei einer multiplex real-time PCR kann sich das emittierte Fluoreszenzsignal eines Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes auf einen benachbarten Farbstoffkanal überlagern und in diesem Kanal ein Signal erzeugen (Crosstalk). Der Crosstalk von Fluoreszenzsignalen kann zu falschen Ergebnissen führen, wenn keine Korrektur durch ein Color Compensation File durchgeführt wird. Mit dem Color Compensation File können Farbstoffüberlagerungen zwischen den Farbstoffkanälen kompensiert werden.

3. Packungsinhalt

Tab.1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 3 Color Compensation Läufe)

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Blank	1x 400 µl	weiß
2	Dye 1	1x 400 µl	grün
3	Dye 2	1x 400 µl	gelb
4	Dye 3	1x 400 µl	orange
5	Dye 4	1x 400 µl	rot

4. Reagenzien und ihre Lagerung

- Das RIDA®GENE Color Compensation Kit I muss lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und kann bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden.
- Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

- Vor dem Gebrauch sollte das RIDA[®]GENE Color Compensation Kit I schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Alle Reagenzien während der Herstellung der Color Compensation geeignet kühlen (2 - 8 °C).

5. Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- LightCycler[®] 480I, LightCycler[®] 480II oder LightCycler[®] 480z (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Mikrotiterplatte, Folie)
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern

6. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Reagenzien Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

7. Protokoll zur Erstellung eines Color Compensation Files auf dem LightCycler® 480

7.1 Herstellung der Color Compensation

Für einen Color Compensation Lauf müssen je Farbstoff, inklusive dem Farbstoffhintergrund (Blank), fünf Reaktionen mit je 20 µl des entsprechenden Reagenz in eine Mikrotiterplatte pipettiert werden (s. Abb.1).

Abb.1 Pipettierschema Color Compensation Lauf

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

Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab.2: Herstellung der Color Compensation

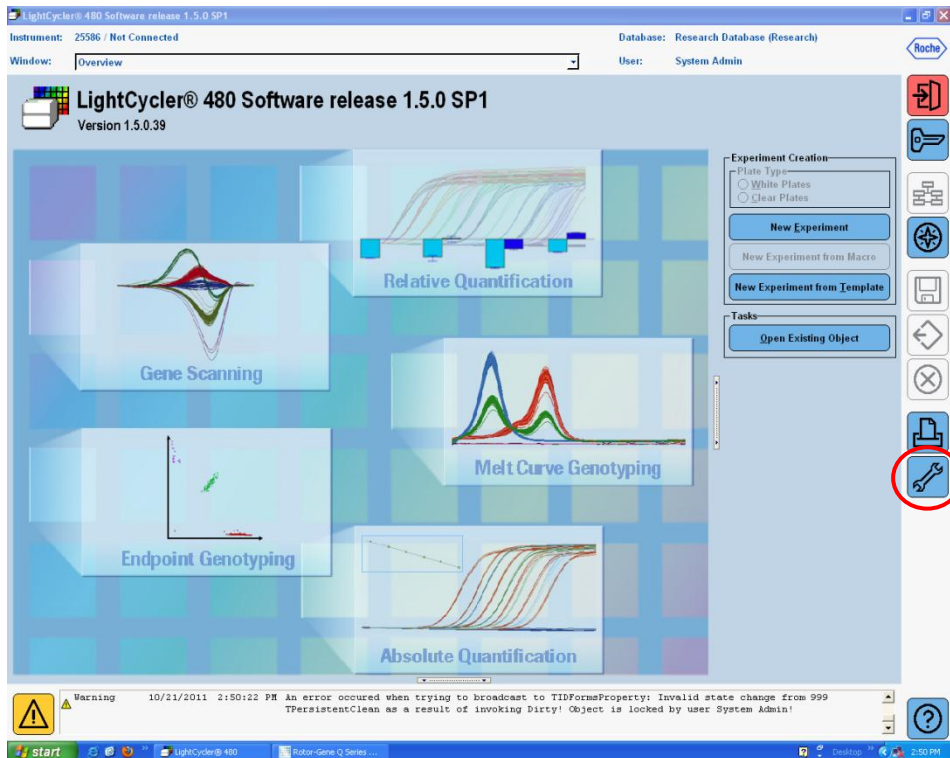
Kit Code	Reagenz	Menge pro Reaktion	Je 20 µl in folgende Wells pipettieren
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10

Die Mikrotiterplatte nach dem Pipettieren mit einer optischen Folie verschließen. Die real-time PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten.

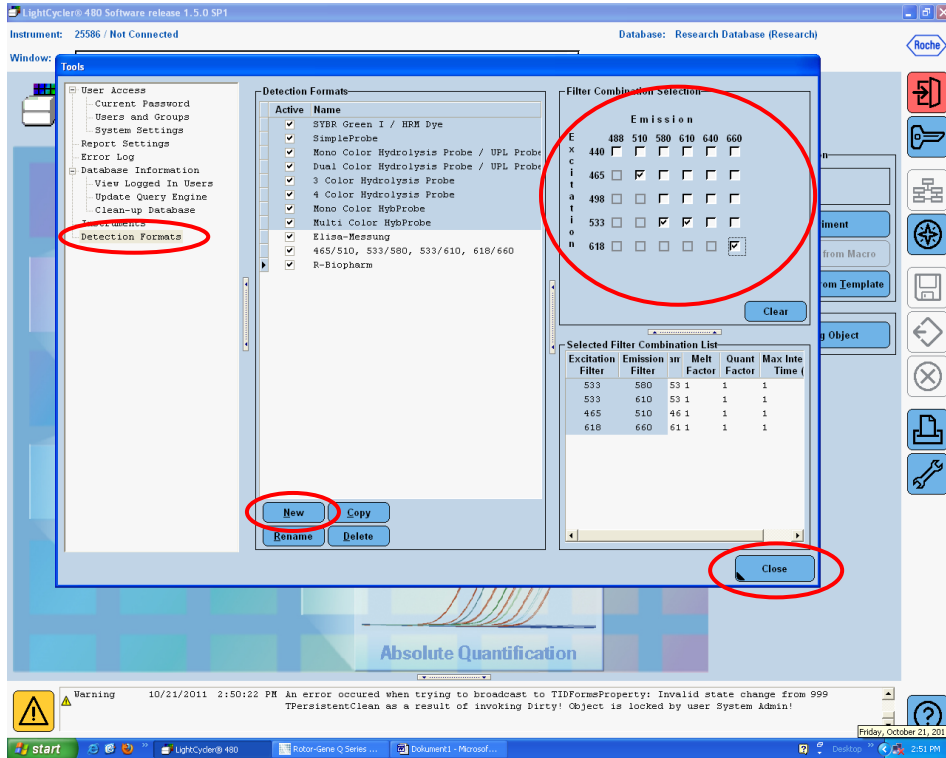
7.2 Geräteeinstellung LightCycler® 480

Hinweis: Die Anmeldung der LightCycler® 480 Software muss als Administrator erfolgen um eine Einstellung des Detektionsformates durchzuführen.

1. Nach dem Öffnen der LightCycler® 480 Software ist es erforderlich, durch Drücken des **“Einstellungen”** Symbols, dass benötigte Detektionsformat zu programmieren.



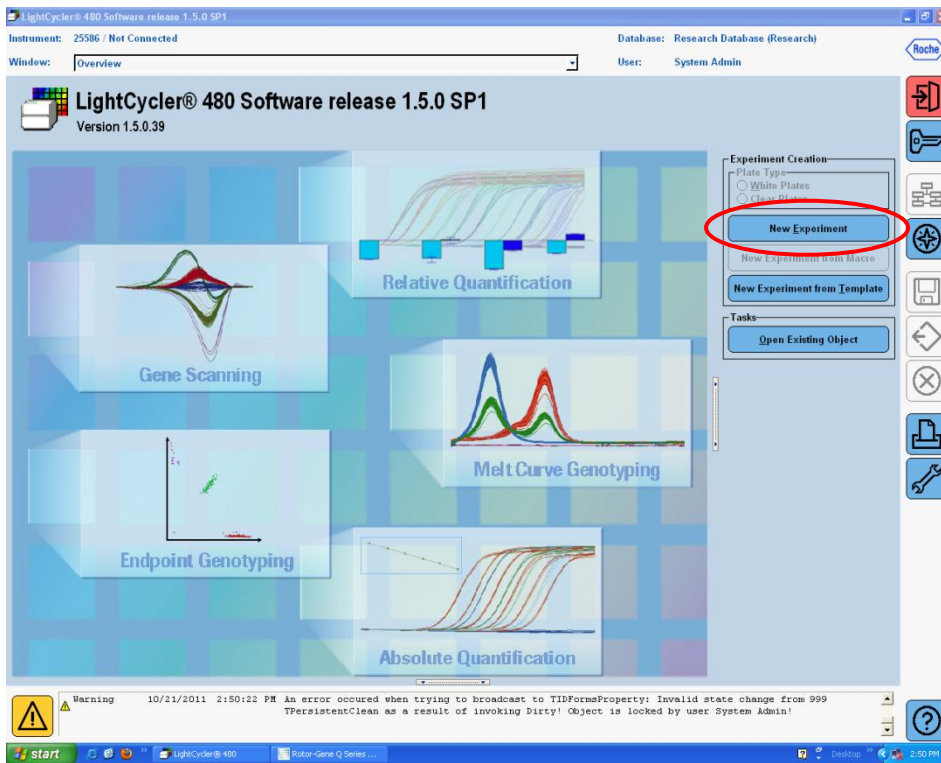
2. Das folgende Fenster öffnet sich. Im Tools Fenster „**Detection formats**“ auswählen. Durch Drücken des Buttons „**New**“ ein neues Detektionsformat anlegen (s. Tab.3) und als „**R-Biopharm**“ abspeichern. Das Tools Fenster durch drücken des Buttons „**Close**“ schließen.



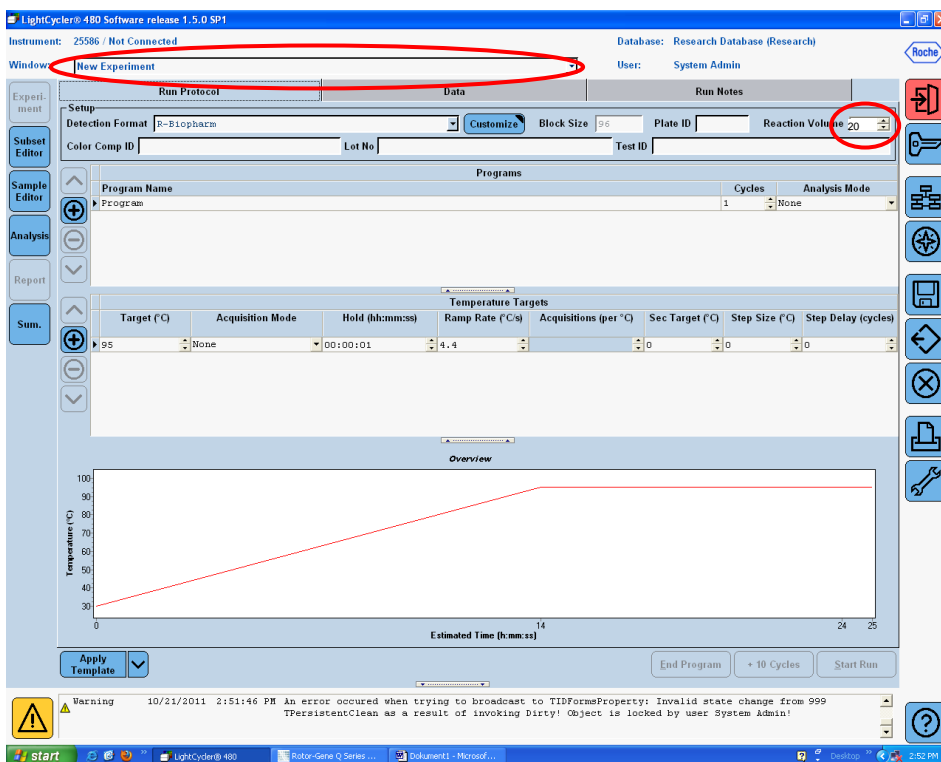
Tab.3: Detection Channels Set-up for LightCycler® 480

Filter Combination		
LightCycler® 480I	LightCycler® 480II	LightCycler® 480z
450 / 500	465 / 510	465 / 510
523 / 568	533 / 580	540 / 580
558 / 610	533 / 610	540 / 610
615 / 670	618 / 660	610 / 670

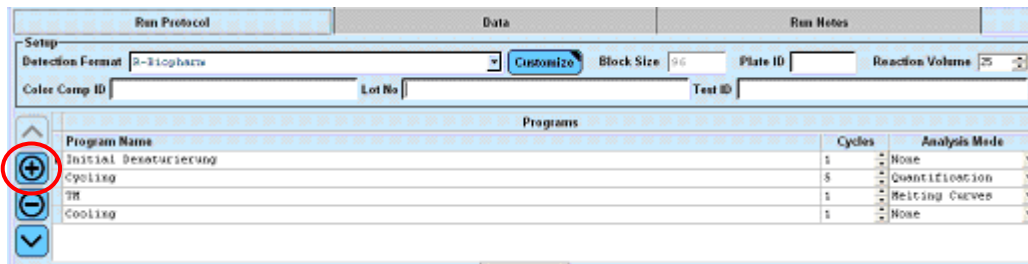
3. Nach der Programmierung des Detektionsformates den Button „New Experiment“ drücken.



4. Das folgende Fenster öffnet sich. Zunächst das Detektionsformat „R-Biopharm“ wählen und ein Reaktionsvolumen von 20 µl eintragen.



5. Den LightCycler® 480 entsprechend des real-time PCR-Profiles (s. Tab.4) programmieren. Die 4 Programmschritte mit dem „Plus“ Symbol erstellen.

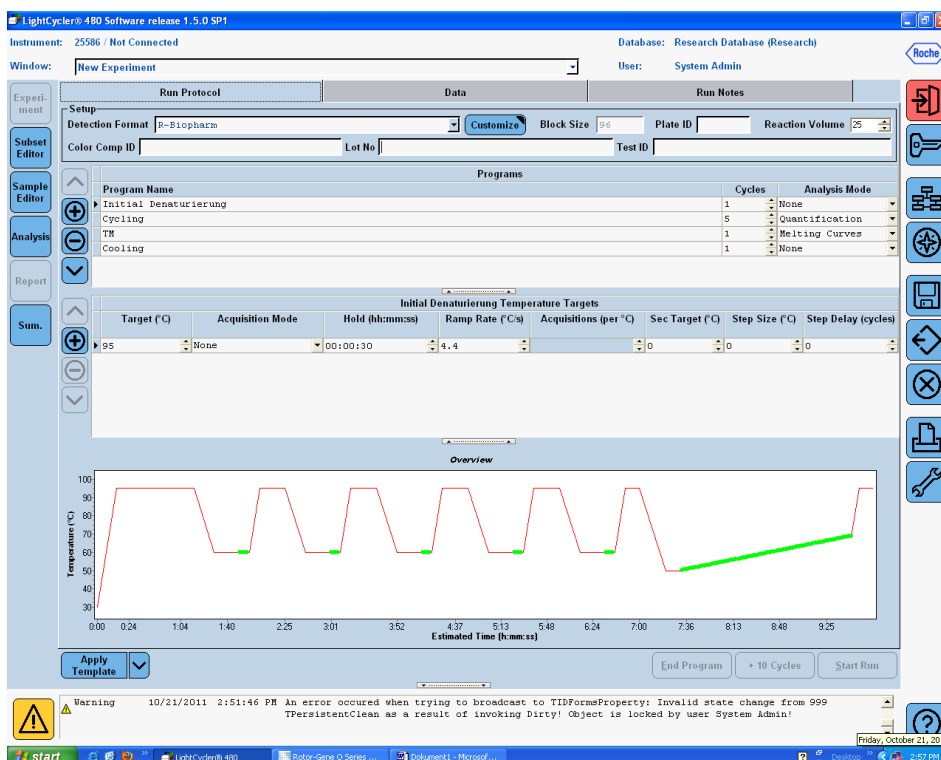


Tab.4: LightCycler® 480 real-time PCR Profil

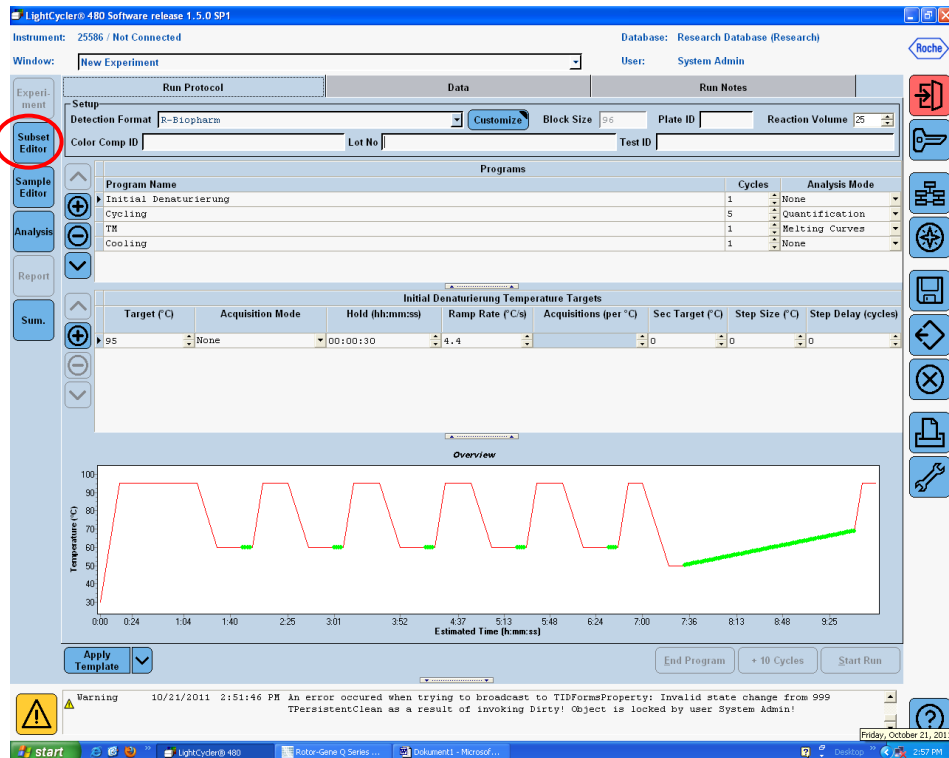
Program	Cycles / Analysis Mode	Temperature targets			
		Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°C/s]
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:30	4.4
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4.4
		60	single	00:00:30	2.2
TM-Analyse	1 / Color Compensation	95	none	00:00:01	4.4
		50	none	00:00:30	2.2
		70	continuous		0.14 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling	1 / none	50	none	00:00:01	2.2

Hinweis: Auf die richtige Einstellung der Anzahl der „Cycles“ und des „Analysis Mode“ achten.

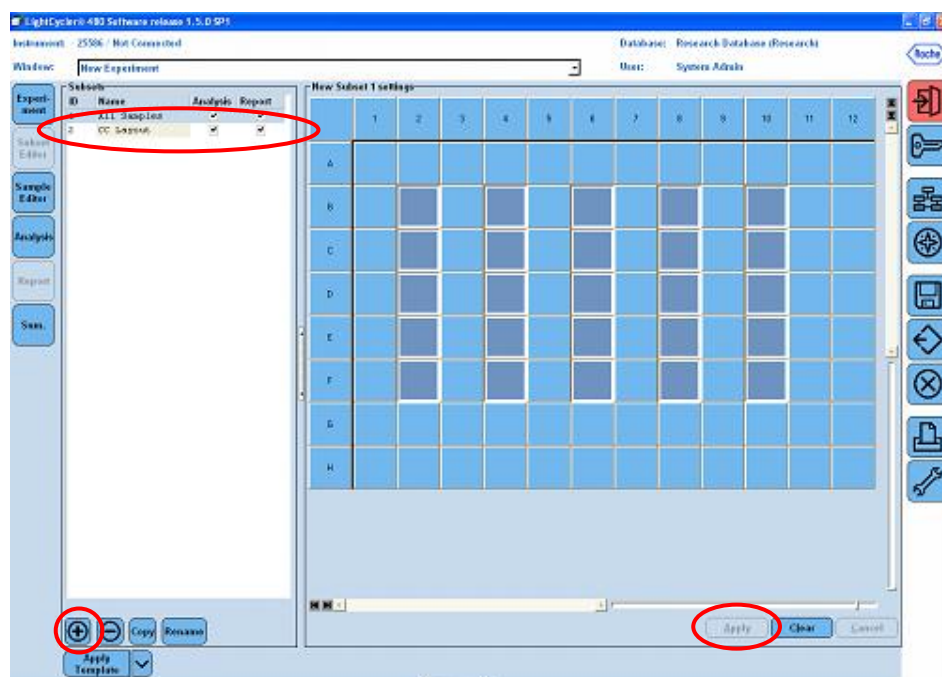
6. Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des LightCycler® Experimentes.



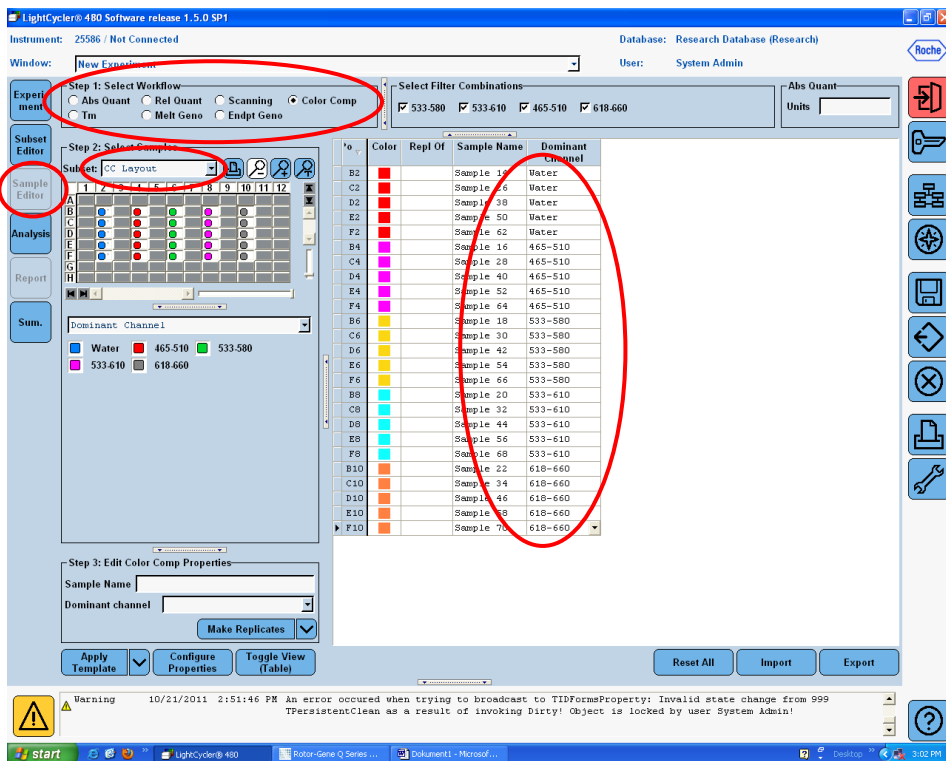
7. Für das Programmieren des Layouts der Mikrotiterplatte den Button „Subset Editor“ drücken.



8. Durch das Drücken auf das „Plus“ Symbol ein neues Subset erstellen und dem Layout eine Bezeichnung geben (z.B. CC Layout). Die Strg-Taste sowie linke Maustaste gedrückt lassen und alle Wells anwählen, in denen sich die Reagenzien in der Mikrotiterplatte befinden. Zur Fertigstellung des Subsets den Button „Apply“ drücken. Folgendes Subset Bild ergibt sich.



9. Den Button für „**Sample Editor**“ drücken. Bei Step 1: „**Select Workflow**“ die Auswahl „**Color Comp**“ markieren. In Step 2: „**Select Samples**“ das vorher eingestellte Subset auswählen (CC Layout). Zur Fertigstellung des Layouts für das jeweilige Reagenz (Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4) den entsprechenden Dominant Channel im „**Dominant Channel**“ Feld auswählen (s. Tab.5). Für die Reaktionen mit dem Farbstoffhintergrund (Blank) bitte „**Water**“ wählen. Es ist nicht nötig einen „**Sample Name**“ einzugeben.



Tab. 5: Dominant Channel Einstellung für Reagenzien

Reagenz	Dominant Channel		
	LightCycler® 480I	LightCycler® 480II	LightCycler® 480z
Blank	Water	Water	Water
Dye 1	450 / 500	465 / 510	465 / 510
Dye 2	523 / 568	533 / 580	540 / 580
Dye 3	558 / 610	533 / 610	540 / 610
Dye 4	615 / 670	618 / 660	610 / 670

10. Die Platte mit den vorbereiteten Reaktionen in den LightCycler® 480 einsetzen. Den Button „**Experiment**“ drücken und durch Drücken des Buttons „**Start Run**“ den Lauf starten.

The screenshot shows the LightCycler 480 Software interface. The 'Experiment' button is circled in red. The 'Start Run' button is also circled in red. The interface includes a 'Setup' section with 'Detection Format' set to 'R-Biopharm', a 'Programs' table, and an 'Initial Denaturation Temperature Targets' table. A temperature profile graph is visible at the bottom.

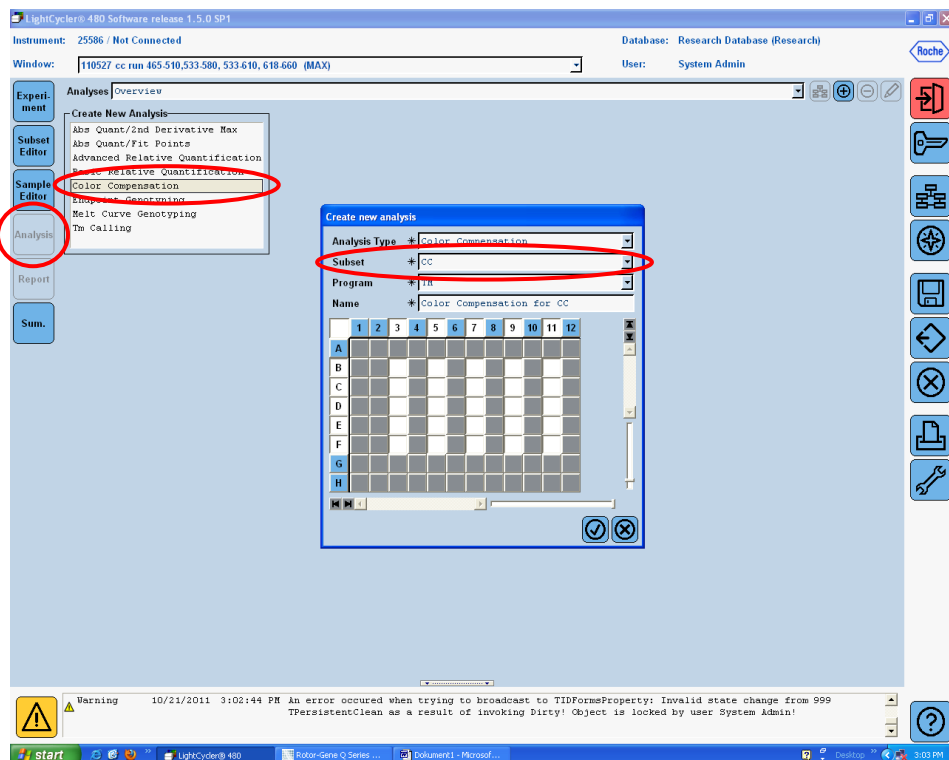
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Initial Denaturierung	1	None
Cycling	5	Quantification
TM	1	Melting Curves
Cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4.4		0	0	0

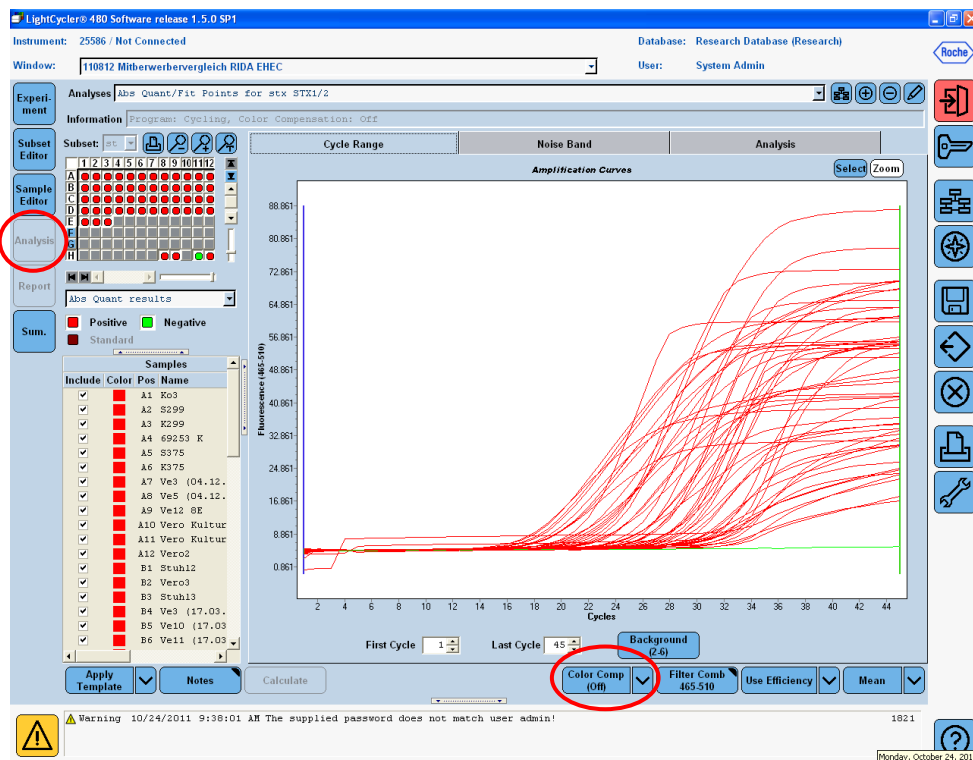
The temperature profile graph shows a series of heating and cooling cycles. The temperature starts at 30°C, ramps up to 95°C, holds for 30 seconds, ramps down to 60°C, and then repeats this cycle five times. The final cycle ends at 7:36, and the temperature then ramps up to 92.5°C.

7.3 Auswertung und Erstellung eines Color Compensation Files

Nach Abschluss des LightCycler® Experiments den Button „**Analysis**“ drücken und hier in der Dialog Box „**Create New Analysis**“ auf „**Color Compensation**“ gehen. In der sich nun öffnenden Dialog Box das entsprechende Subset auswählen (z.B. CC Layout) und dieses bestätigen. In der sich öffnenden Analyse den Button „**Calculate**“ und den Button „**Save CC Object**“ drücken. Das Color Compensation File als „**R-Biopharm**“ unter dem Ordner „**CCC**“ abspeichern. Danach steht dieses File für andere LightCycler® 480-Läufe zur Verfügung. Damit ist die Generierung des Color Compensation File abgeschlossen.



Zum Anwenden der Color Compensation den jeweiligen multiplex Lauf öffnen und unter „**Analysis**“ die gewünschte Filterkombination auswählen. Im Color Compensation drop-down Menü „**in Database**“ auswählen und das bereits gespeicherte Color Compensation File anwählen, das bei dem Experiment angewendet werden soll. Der „**Color Comp (Off)**“ Button wechselt in „**Color Comp (On)**“, um anzuzeigen, dass die Color Compensation angewählt ist. Der multiplex PCR Lauf kann nun ausgewertet werden.



Hinweis: Das Color Compensation File ist spezifisch für das jeweilige Gerät, d.h. bei einem Wechsel des Gerätes oder bei Reparatur der optischen Einheit ist eine neue Color Compensation nötig.