

RIDA® GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



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

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Das RIDA®GENE Color Compensation Kit IV dient der Farbstoffkalibrierung von 2-plex und höherplexigen RIDA®GENE real-time PCR-Läufen auf dem LightCycler® 480 II. Mit dem RIDA®GENE Color Compensation Kit IV kann ein Color Compensation File erstellt werden. Dieser ermöglicht es qualitative und quantitative 2-plex und höherplexe RIDA®GENE real-time PCR Tests auf dem LightCycler® 480 II zu analysieren.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Bei einer 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. Testprinzip

Das RIDA®GENE Color Compensation Kit IV dient der Farbstoffkalibrierung von 2-plex und höherplexigen RIDA®GENE real-time PCR-Läufen auf dem LightCycler® 480 II.

4. Packungsinhalt

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

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

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Das RIDA®GENE Color Compensation Kit IV muss lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und kann ungeöffnet 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 IV schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Alle Reagenzien während der Herstellung der Color Compensation geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Color Compensation Kit IV ist geeignet für die Verwendung mit folgendem real-time PCR-Gerät:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Real-time PCR-Gerät	
Roche	LightCycler® 480 II

Sollten Sie weitere real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Mikrotiterplatte, optische Folie)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

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

8.1 Herstellung der Color Compensation

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

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

Abb. 1: Pipettierschema Color Compensation Lauf für LightCycler® 480 II.

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

Tab.3: Herstellung der Color Compensation LightCycler® 480 II

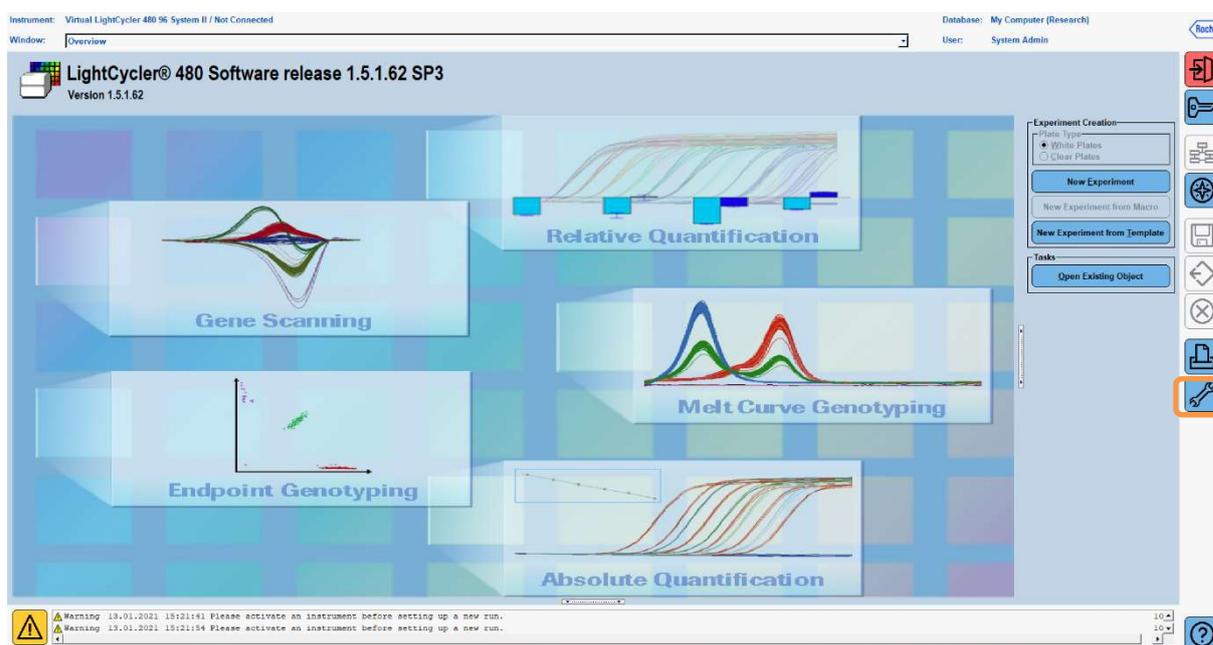
Kit Code	Reagenz	Menge pro Reaktion	Je 20 µl in folgende Wells pipettieren
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µl	B12, C12, D12, E12, F12

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

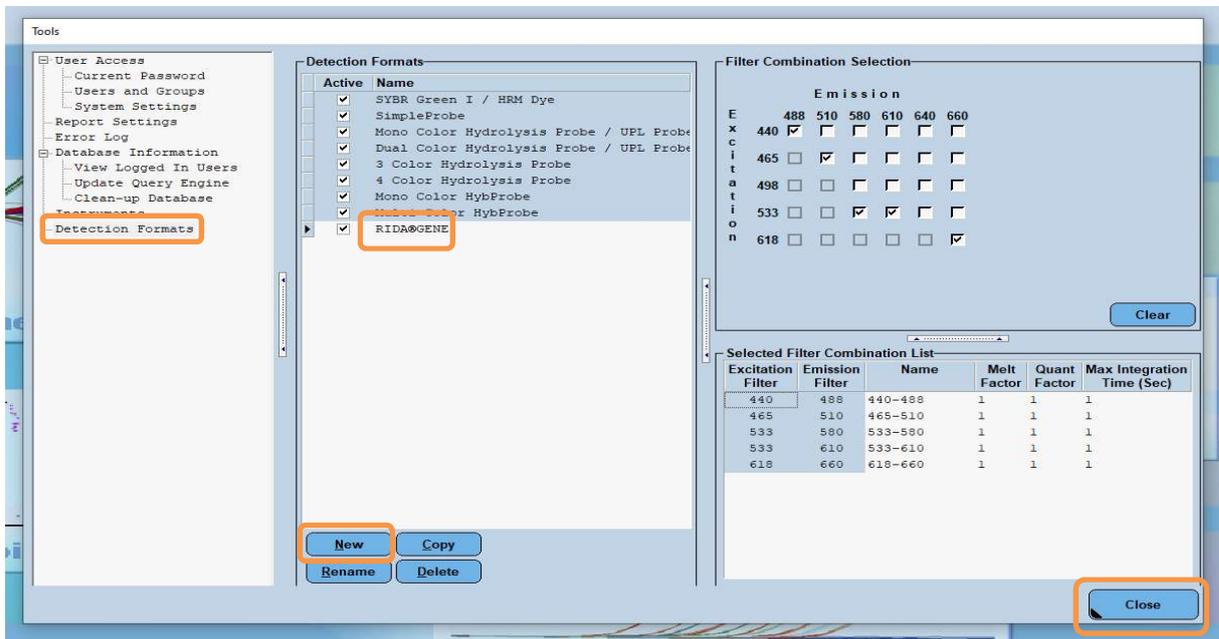
8.2 Geräteeinstellung

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

1. Nach dem Öffnen der 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.5) und als „**RIDA®GENE**“ benennen. Das Tools Fenster durch Drücken des Buttons „**Close**“ schließen.

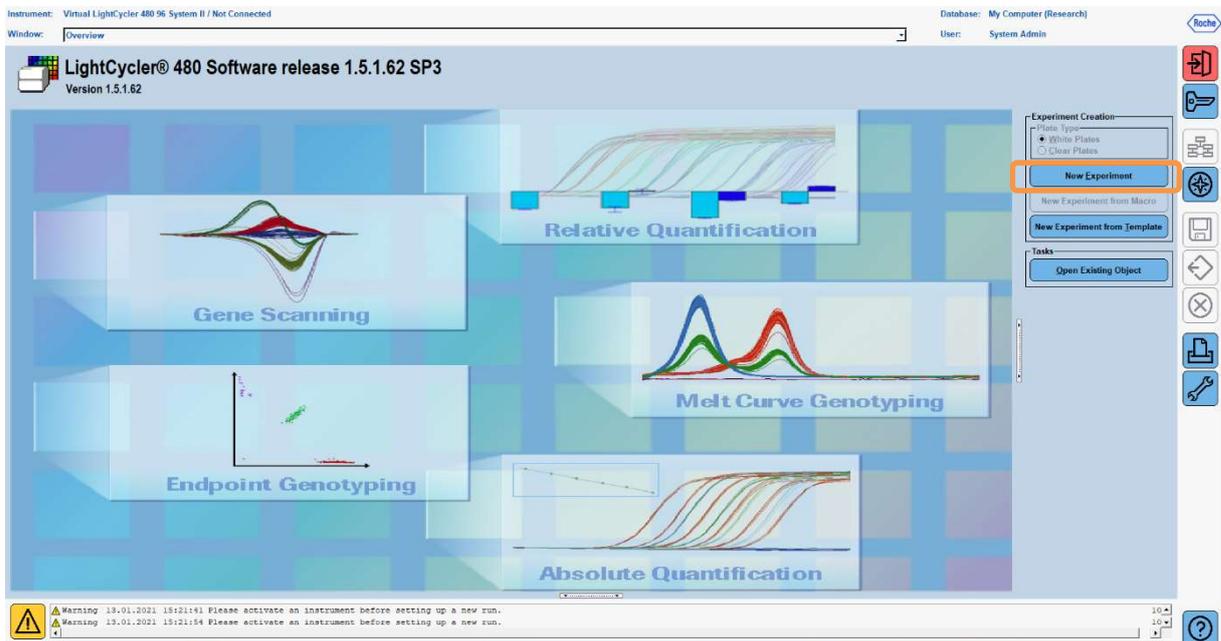


Tab.4: Detektionskanal Einstellung für den LightCycler® 480 II

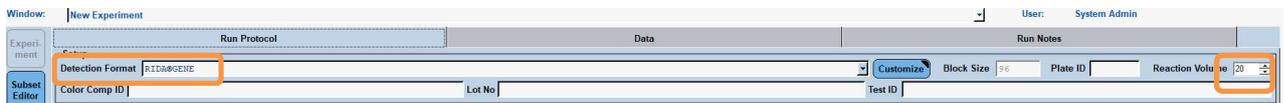
Filter Kombination
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Hinweis: Quant- und Melfaktoren sowie Integration Time jeweils auf 1 setzen (default).

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



4. Zunächst das Detektionsformat „**RIDA®GENE**“ wählen und ein Reaktionsvolumen von 20 µl eintragen (default).



5. Das Thermalprofil (s. Tab.5) programmieren.

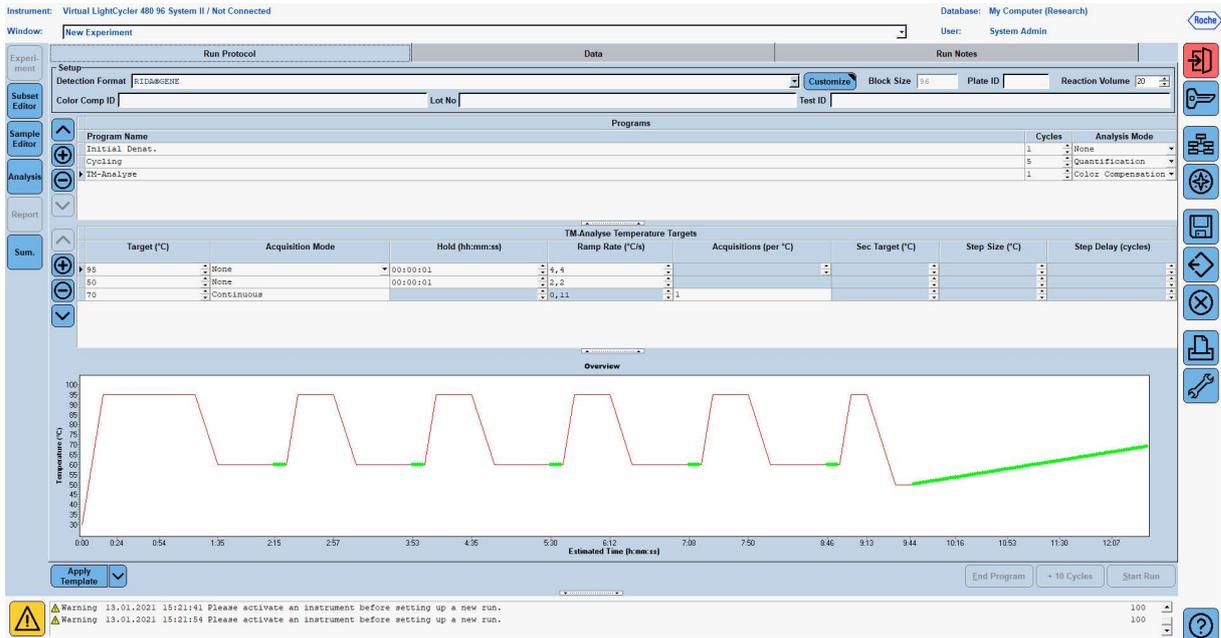
Tab.5: Thermalprofil

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		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*

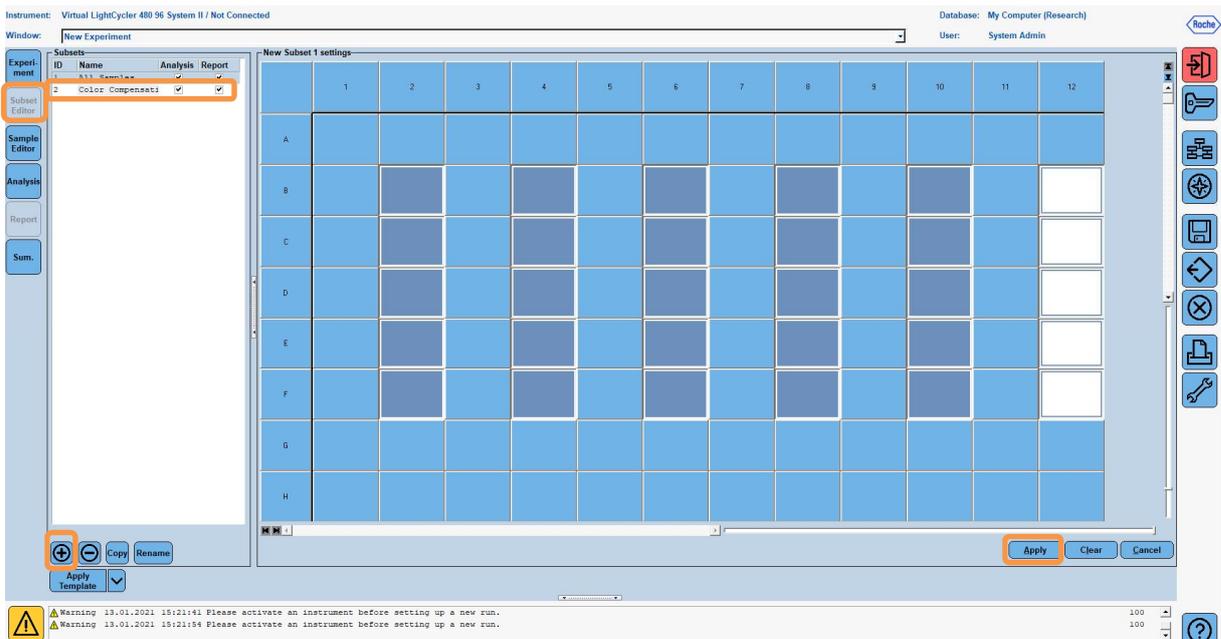
Hinweis: Auf die richtige Einstellung der Anzahl der „**Cycles**“ und des „**Analysis Mode**“ achten.

*Ramp rate kann je nach gewähltem Detektionsformat geringfügig variieren.

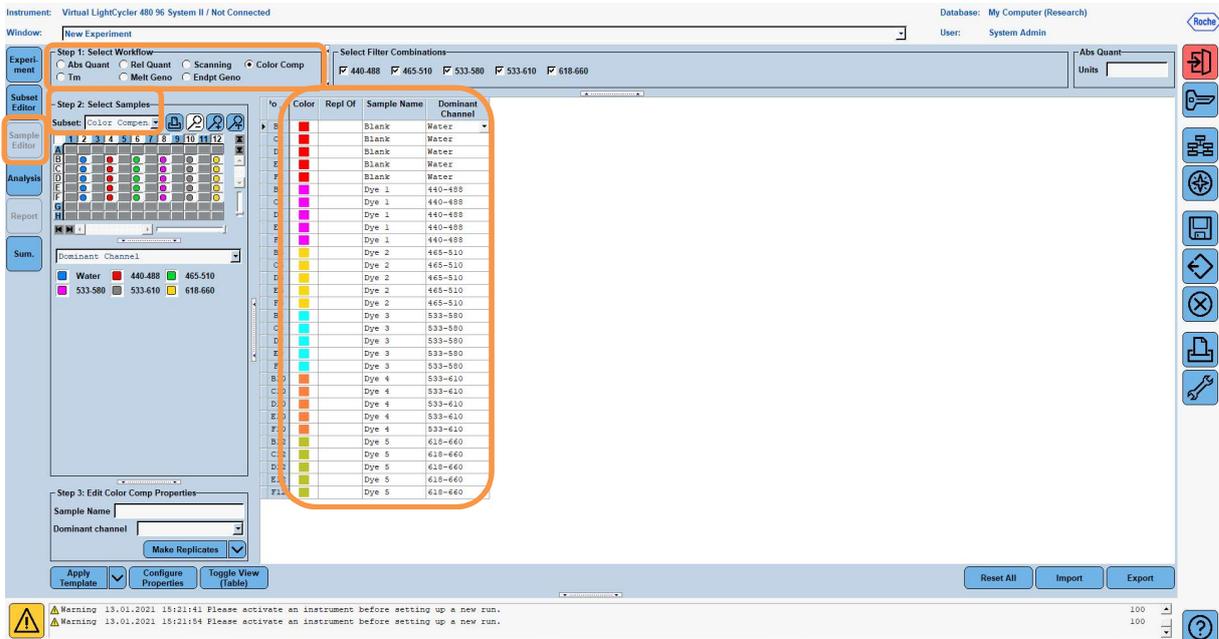
6. Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des Experiments.



7. Für das Programmieren des Layouts der Mikrotiterplatte in den „Subset Editor“ wechseln. Durch das Drücken auf das „Plus“ Symbol ein neues Subset erstellen und dem Layout eine Bezeichnung geben (z.B. Color Compensation). Die Strg-Taste sowie linke Maustaste gedrückt lassen und alle Wells anwählen, in denen sich die Reagenzien in der Mikrotiterplatte befinden (siehe Abb 1 und 2). Zur Fertigstellung des Subsets den Button „Apply“ drücken. Folgendes Subset Bild ergibt sich.



8. In den „**Sample Editor**“ wechseln. Bei Step 1: „**Select Workflow**“ die Auswahl „**Color Comp**“ markieren. In Step 2: „**Select Samples**“ das vorher eingestellte Subset auswählen (Color Compensation). Zur Fertigstellung des Layouts für das jeweilige Reagenz (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) den entsprechenden Dominant Channel im „**Dominant Channel**“ Feld auswählen (s. Tab.6). Für die Reaktionen mit dem Farbstoffhintergrund (Blank) bitte „**Water**“ wählen.

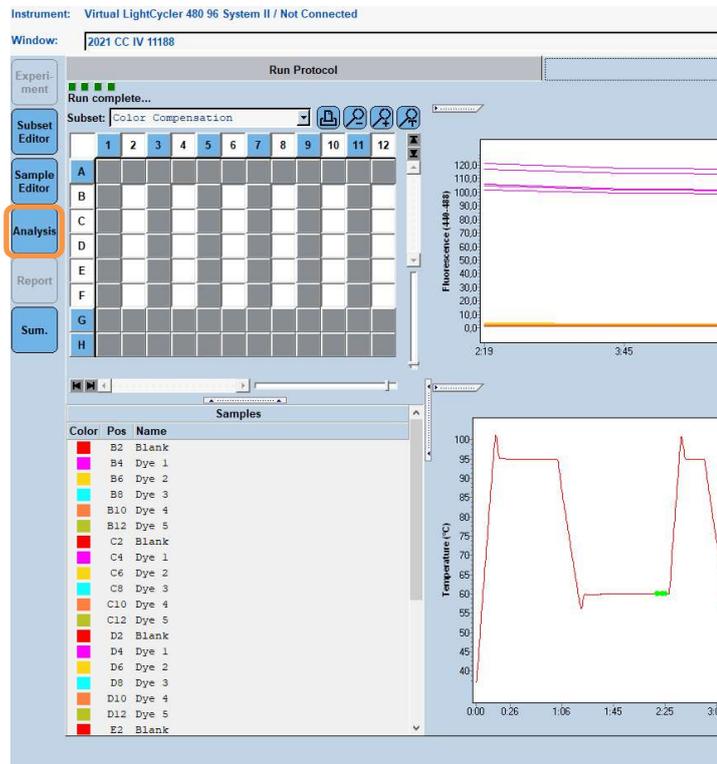


Tab. 6: Dominant Channel Einstellung für Reagenzien (LightCycler® 480 II)

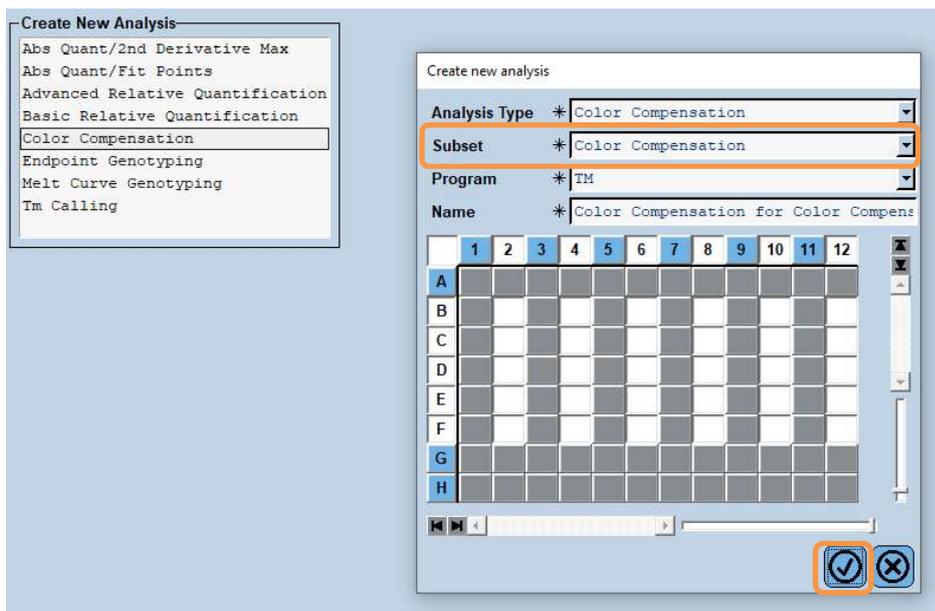
Reagenz	Dominant Channel
Blank	Water
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

8.3 Auswertung und Erstellung eines Color Compensation Files

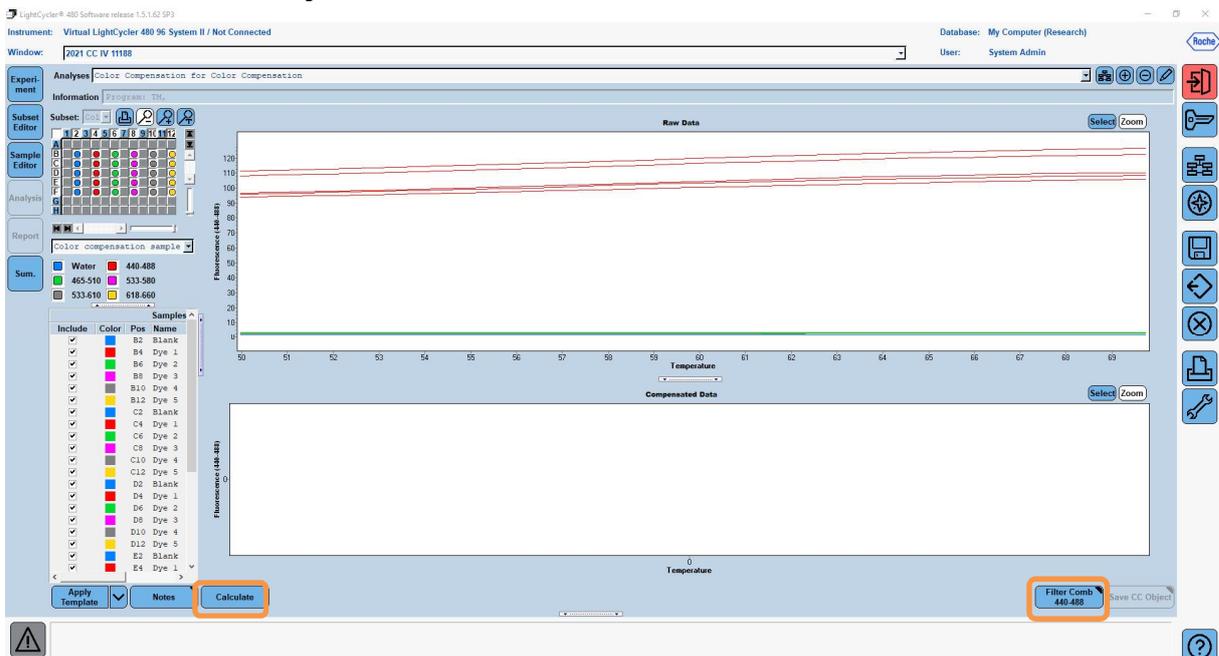
1. Nach Abschluss des LightCycler® Experiments den Button „**Analysis**“ drücken.



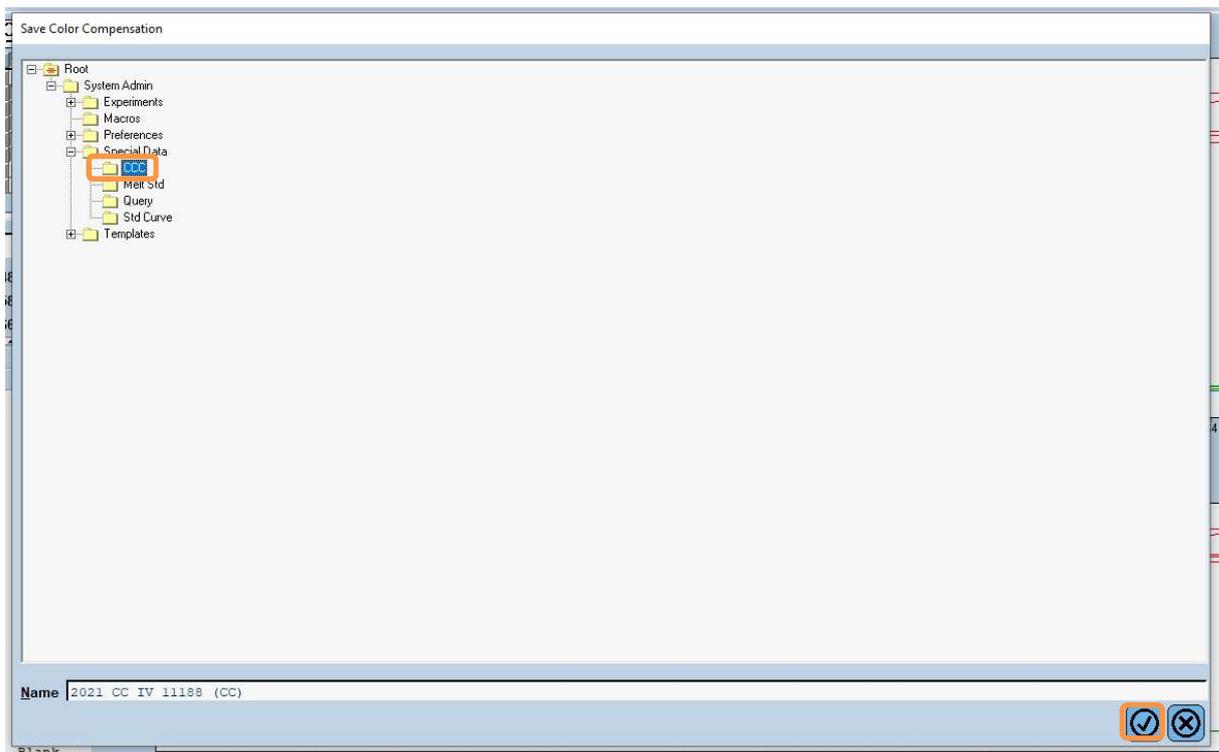
2. In der Dialog Box „**Create New Analysis**“ auf „**Color Compensation**“ gehen. In der sich nun öffnenden Dialog Box das entsprechende Subset auswählen (z.B. Color Compensation) und dieses bestätigen.



- In der sich öffnenden Analyse den Button „**Calculate**“ und dann den freigegebenen Button „**Save CC Object**“ drücken.



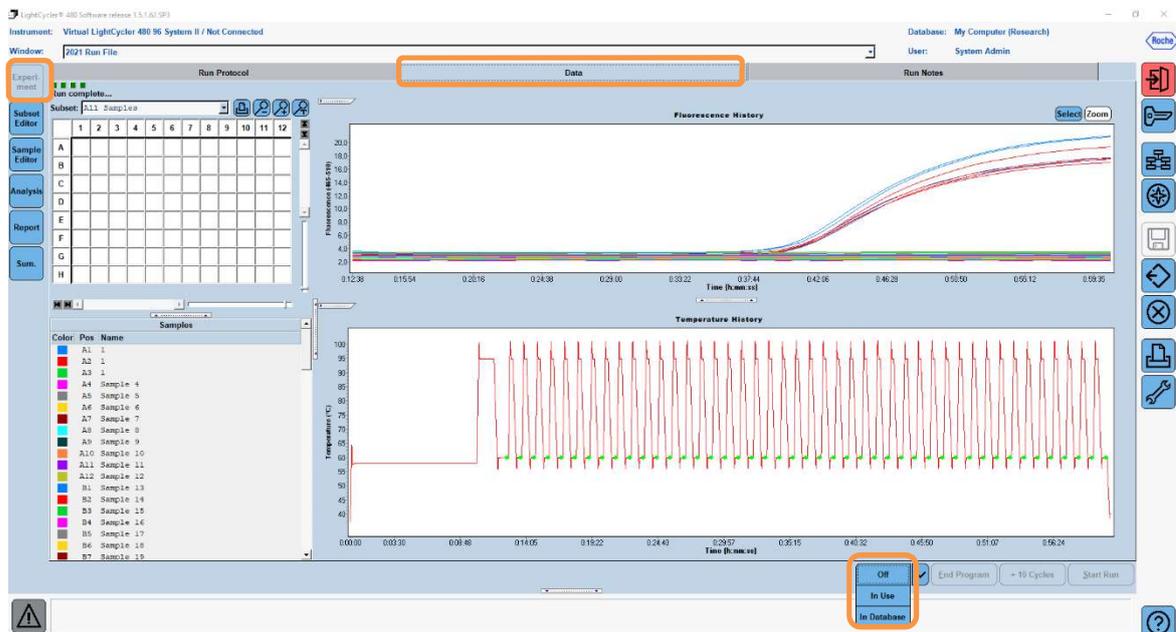
- Das Color Compensation File als „**RIDA®GENE CCIV**“ unter dem Ordner „**CCC**“ abspeichern.



Danach steht dieses File für andere LightCycler® 480 II Läufe zur Verfügung. Damit ist die Generierung des Color Compensation File abgeschlossen.

8.4 Anwendung des Color Compensation Files

Zum Anwenden der Color Compensation den jeweiligen RIDA®GENE real-time PCR Lauf öffnen und unter „**Experiment**“ „**Data**“ die gewünschte Color Compensation einladen. Dazu unter dem „Color Comp (Off)“ Button „**in Database**“ auswählen und das bereits gespeicherte Color Compensation File anwählen.



Der „**Color Comp (Off)**“ Button wechselt in „**Color Comp (On)**“, um anzuzeigen, dass die Color Compensation angewählt ist. Die gewählte Color Compensation wird automatisch auf alle Filter der Analyse angewendet. Der RIDA®GENE real-time PCR Lauf kann nun wie gewohnt ausgewertet werden.

Hinweis: Das Color Compensation File ist spezifisch für jeden LightCycler® 480 II d.h. bei einem Geräteaustausch oder bei Reparatur der optischen Einheit ist eine neue Color Compensation notwendig.

9. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2021-03-16	Vorversion
2021-09-09	Anpassung / Korrektur Titelseite

10. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Blank

Dye 1

Dye 2

Dye 3

Dye 4

Dye 5