

RIDA® GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania

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

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV se utiliza para la calibración del color de las corridas de PCR en tiempo real de 2-plex y superiores de RIDA®GENE en el LightCycler® 480 II. El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV puede utilizarse para generar un archivo de compensación de color que permita el análisis de ensayos de PCR en tiempo real cualitativos y cuantitativos de 2-plex y superiores de RIDA®GENE en el LightCycler® 480 II.

Este producto está previsto para uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

En una PCR en tiempo real, la señal fluorescente emitida de un colorante indicador fluorescente puede superponerse a un canal de color adyacente, generando así una señal (diafonía) en este canal. La diafonía de las señales fluorescentes puede causar resultados incorrectos a menos que se realice una corrección mediante un archivo de compensación de color. Un archivo de compensación de color puede compensar la diafonía entre los canales de color.

3. Principio del ensayo

El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV se utiliza para la calibración del color de las corridas de PCR en tiempo real de 2-plex y superiores de RIDA®GENE en el LightCycler® 480 II.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 3 corridas de compensación de color).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Blank	1 ×	400 µl	Blanco
2	Dye 1	1 ×	400 µl	Azul
3	Dye 2	1 ×	400 µl	Verde
4	Dye 3	1 ×	400 µl	Amarillo
5	Dye 4	1 ×	400 µl	Naranja
6	Dye 5	1 ×	400 µl	Rojo

5. Instrucciones de almacenamiento

- Proteja el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV de la luz y consérvelo a -20 °C. Si no se abre, puede utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Antes de utilizarlo, descongele cuidadosamente el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (por ejemplo, en un refrigerador a 2 – 8 °C).
- Durante la preparación de la compensación de color, todos los reactivos deben enfriarse adecuadamente (2 – 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV es apropiado para utilizarse con el siguiente dispositivo de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Dispositivo de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 480 II

Si necesita usar otros procedimientos de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm para comprobar la compatibilidad en mdx@r-biopharm.de.

- Consumibles para PCR en tiempo real (placa de microtitulación, aluminio óptico)
- Centrífuga con rotor para placas o viales de reacción
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.
- Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.
- No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.
- Asegúrese de que la extracción, la preparación de PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad. Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta y responsable todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Para obtener información más detallada, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Protocolo para generar un archivo de compensación de color en el LightCycler® 480 II

8.1 Preparación de la compensación de color

Para una corrida de compensación de color, agregue cinco reacciones con 20 µl de cada colorante incluyendo el fondo (blanco) en una placa de microtitulación (s. Fig.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												

Figura 1: Esquema de pipeteo para la compensación de color en el LightCycler® 480 II.

Descongele, mezcle y centrifugue brevemente los reactivos antes de utilizarlos. Refrigere siempre los reactivos de forma adecuada durante las etapas del trabajo (2 °C - 8 °C).

Tabla 3: Preparación de la compensación de color LightCycler® 480 II

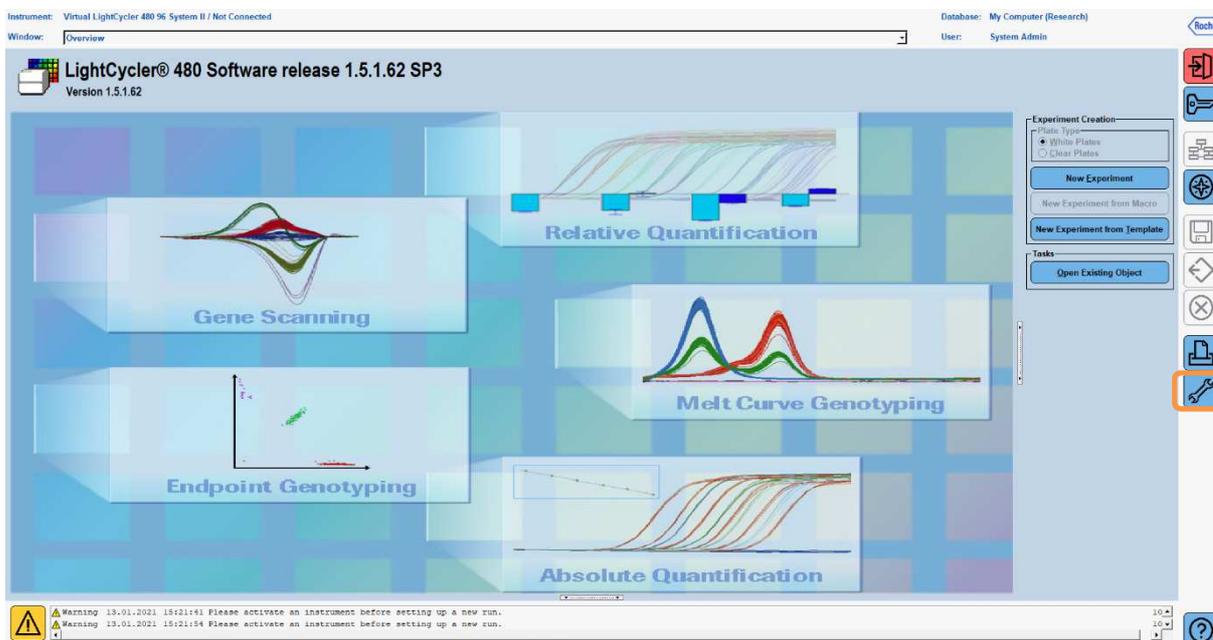
Código del kit	Reactivo	Cantidad por reacción	Agregar 20 µl en cada uno de los siguientes pocillos
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10
6	Blank	20 µl	B12, C12, D12, E12, F12

Después de agregar los reactivos, selle la placa de microtitulación con aluminio óptico y centrifugue si es posible. Inicie la PCR en tiempo real de acuerdo con la configuración del dispositivo.

8.2 Configuración del equipo de PCR

Nota: Inicie sesión en el software como administrador para configurar el formato de detección.

1. Tras abrir el software, haga clic en el icono "**Herramientas**" para programar el formato de detección.



2. Se abre la siguiente ventana. En la ventana Herramientas, seleccione “**Detection Formats**”. Pulse el botón “**New**” para crear un nuevo formato de detección (ver Tabla 5) y guárdelo como “**RIDA®GENE**”. Haga clic en el botón “**Close**” para salir de la ventana Herramientas.

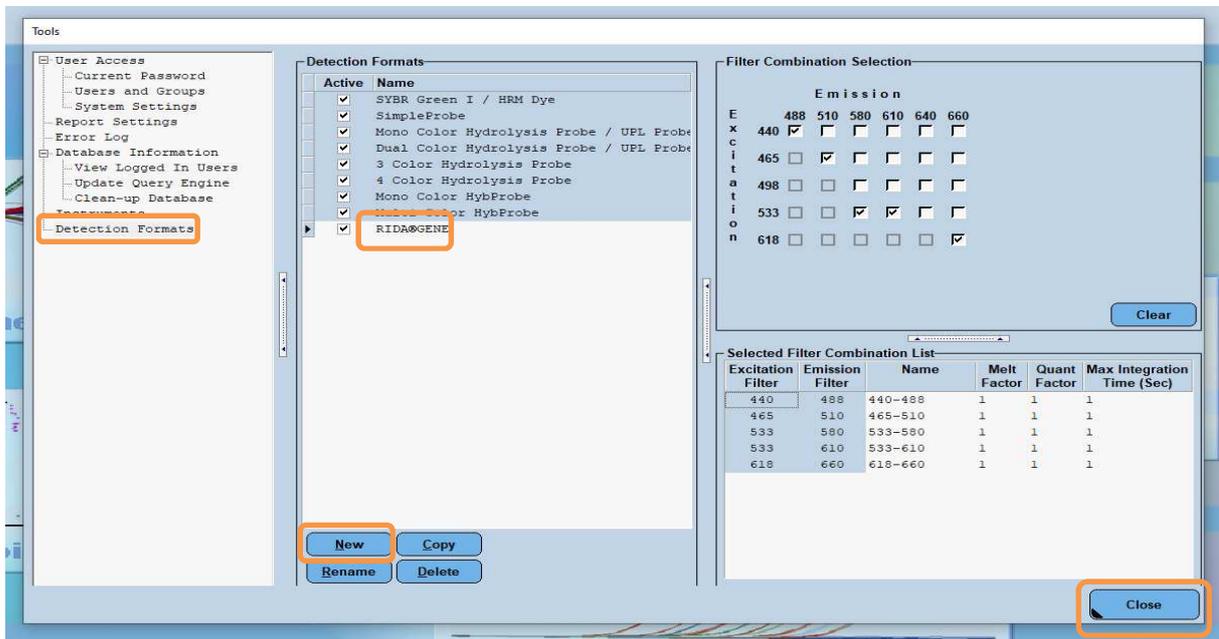
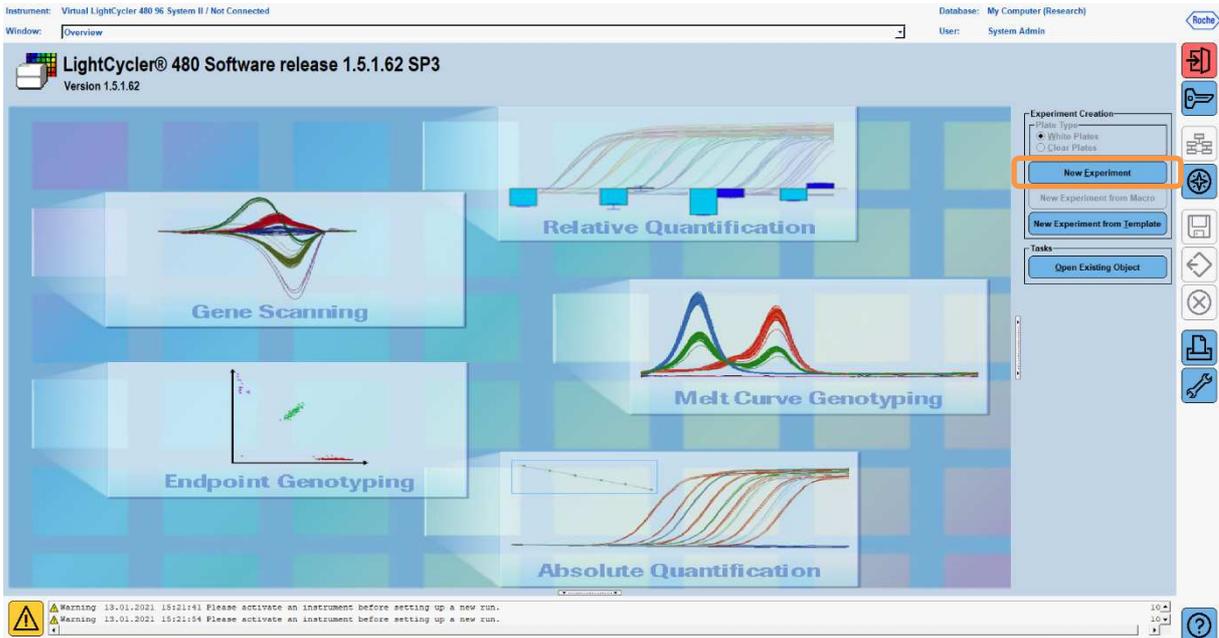


Tabla 4: Configuración del canal de detección para el LightCycler® 480 II

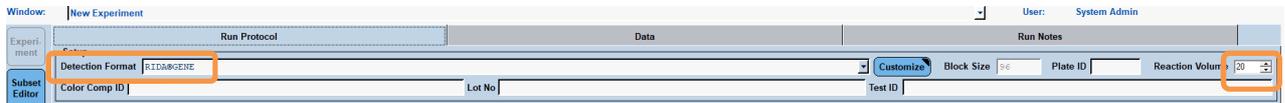
Combinación de filtros
440/488
465/510
533/580
533/610
618/660

Nota: Ajuste el valor de Factor Cuantitativo, Factor de Fusión y Tiempo de Integración a 1 (predeterminado).

3. Después de programar el formato de detección, haga clic en el botón “**New Experiment**”.



4. Seleccione el formato de detección "RIDA®GENE" e introduzca un volumen de reacción de 20 µl (predeterminado).



5. Programar el perfil térmico (ver Tabla 5).

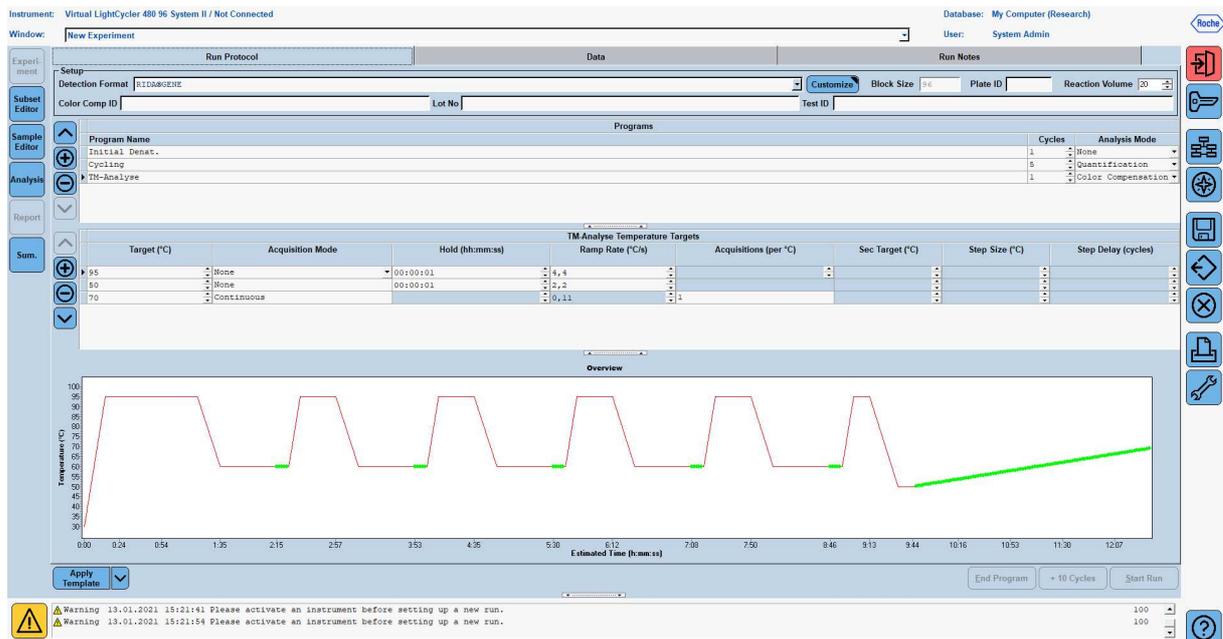
Tabla 5: Perfil térmico

Programa	Ciclos / Modo de análisis	Objetivos de temperatura			
		Objetivo [°C]	Modo de adquisición	Espera [hh:mm:ss]	Velocidad de rampa [°c/s]
Denat inicial.	1 / ninguno	95	ninguna	00:00:30	4.4
Ciclos	5 / Cuantificación	95	ninguna	00:00:15	4.4
		60	único	00:00:30	2.2
Análisis de la TM	1 / Compensación de color	95	ninguna	00:00:01	4.4
		50	ninguna	00:00:30	2.2
		70	continuo		Adquisiciones (por °C) = 1 0.14*

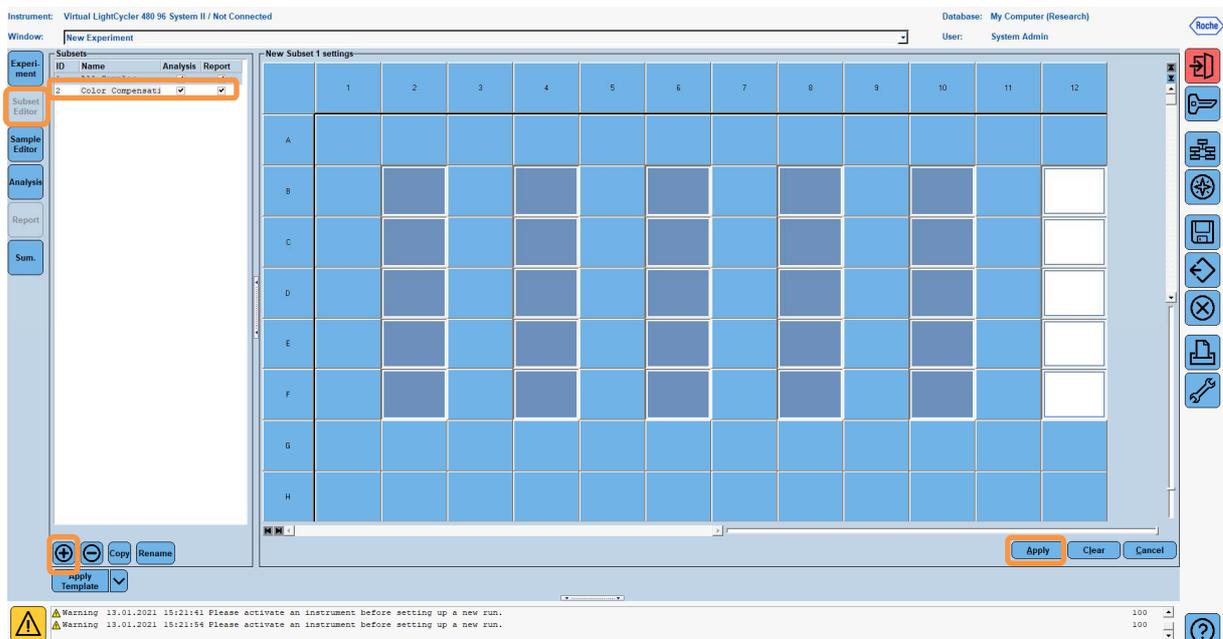
Nota: Asegúrese de que el número de "Ciclos" y el "Modo de análisis" sean correctos.

* La velocidad de rampa puede variar ligeramente en función del formato de detector seleccionado.

6. Una vez terminada la programación, el experimento debería tener el siguiente aspecto.



7. Para programar la disposición de la placa de microtitulación, pase al **“Subset Editor”**. Haga clic en el icono **“Más”** para crear un nuevo subconjunto e introduzca un nombre para la disposición (por ejemplo, Compensación de color). Mantenga pulsada la tecla Ctrl y el botón izquierdo del ratón y marque todos los pocillos que contengan reactivos en la placa de microtitulación (ver Fig. 1 y 2). Haga clic en el botón **“Apply”** para finalizar el subconjunto. La pantalla debería aparecer de la siguiente manera.



8. Pase al “**Sample Editor**”. Del paso 1: “**Select Workflow**”, elija “**Color Comp**”. En el paso 2: “**Select Samples**”, elija el subconjunto previamente establecido (Compensación de color). Para finalizar la disposición, seleccione el canal dominante correspondiente para cada reactivo (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) en el campo “**Dominant Channel**”, (ver Tabla 6). Seleccione “**Water**” para las reacciones con el fondo de color (Blanco).

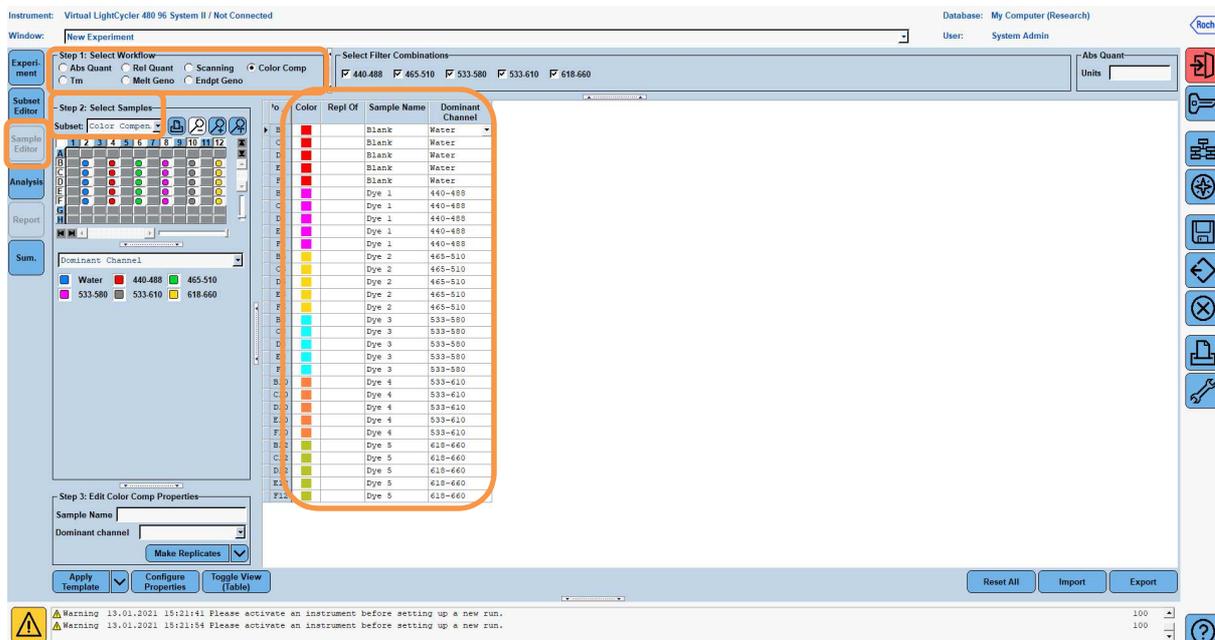
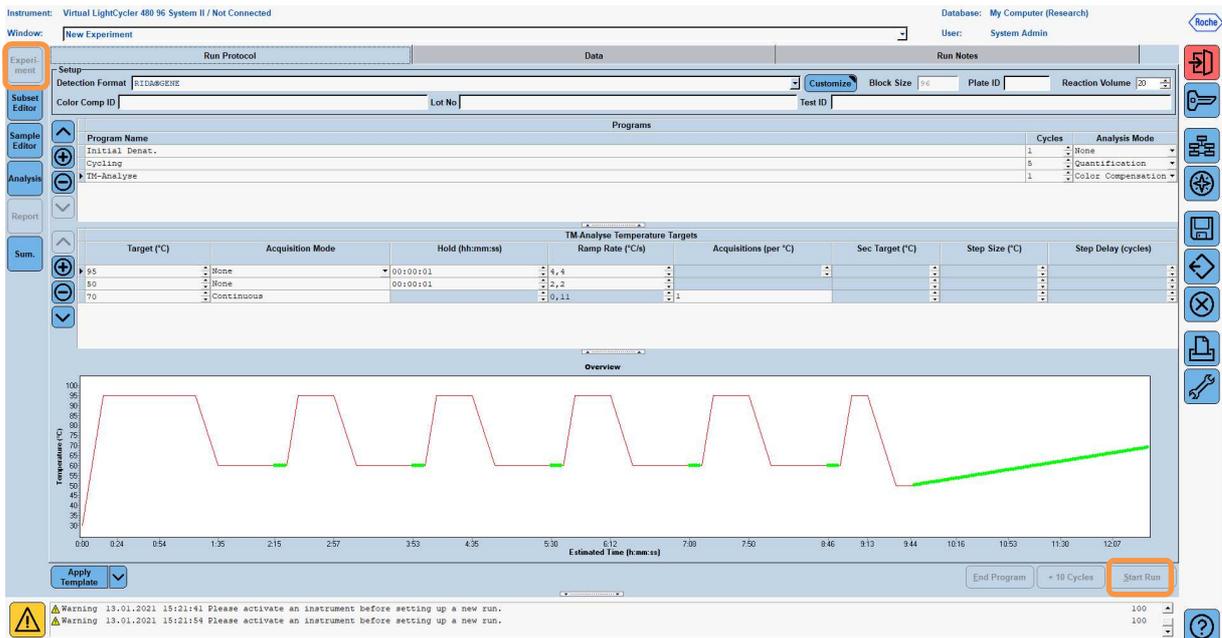


Tabla 6: Ajustes del canal dominante para los reactivos (LightCycler® 480 II)

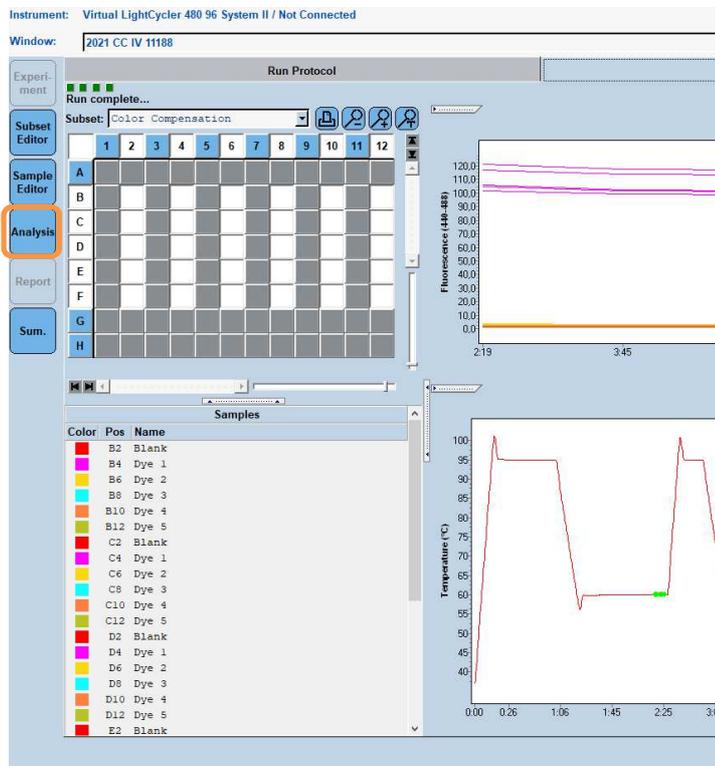
Reactivo	Canal dominante
Blank	Agua
Dye 1	440/488
Dye 2	465/510
Dye 3	533/580
Dye 4	533/610
Dye 5	618/660

9. Coloque la placa con las reacciones preparadas en el dispositivo. Haga clic en “**Experiment**” y luego en “**Start Run**” para iniciar el experimento.

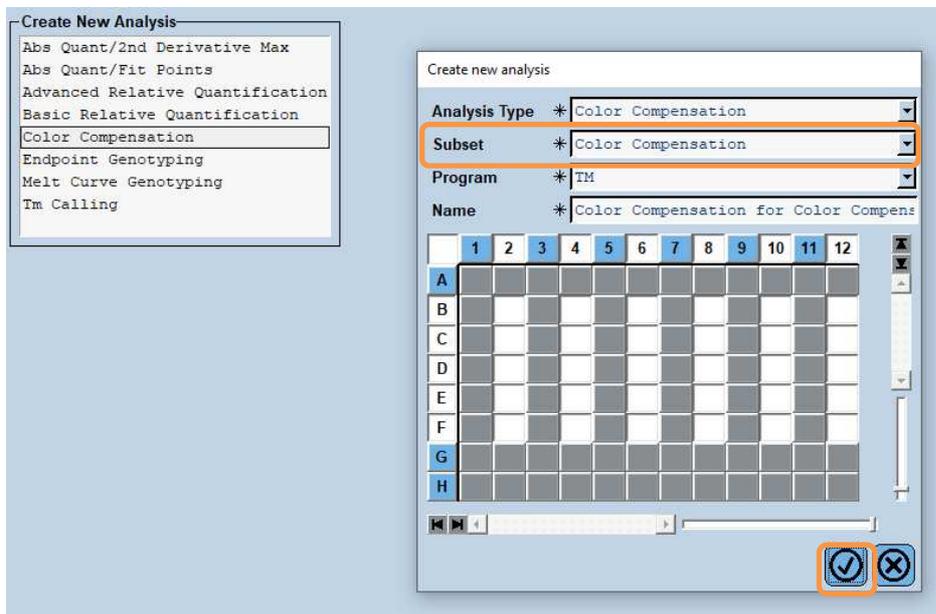


8.3 Evaluación y creación de un archivo de compensación de color

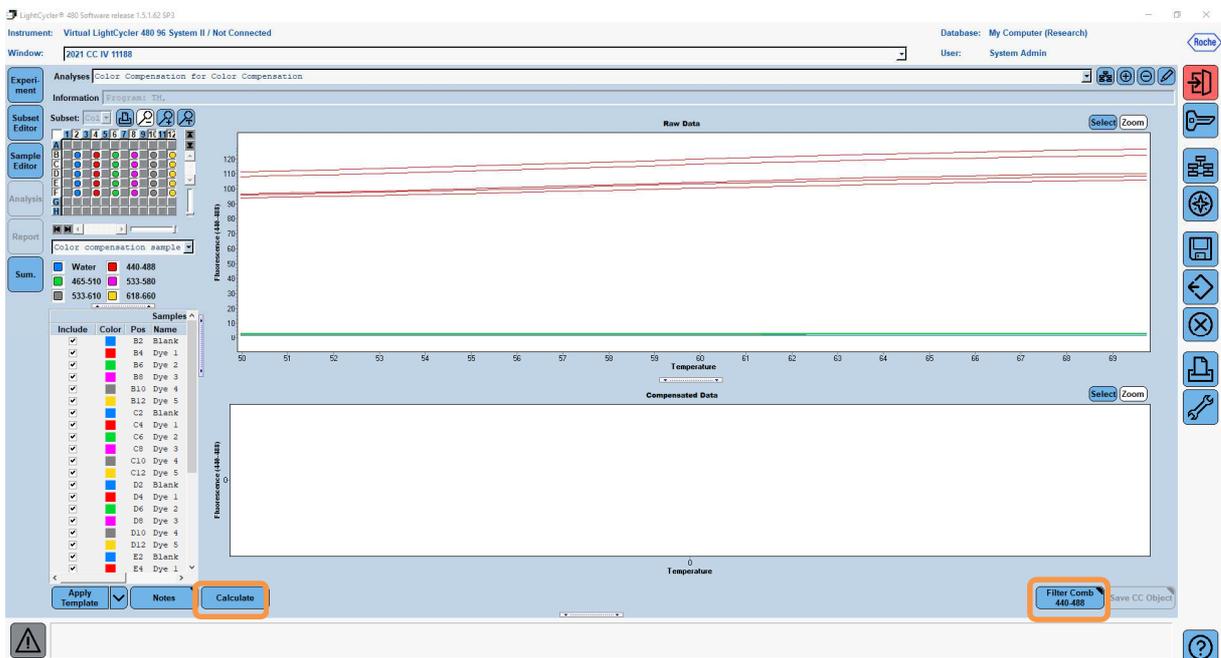
1. Una vez completado el experimento con el LightCycler®, haga clic en el botón “**Analysis**”.



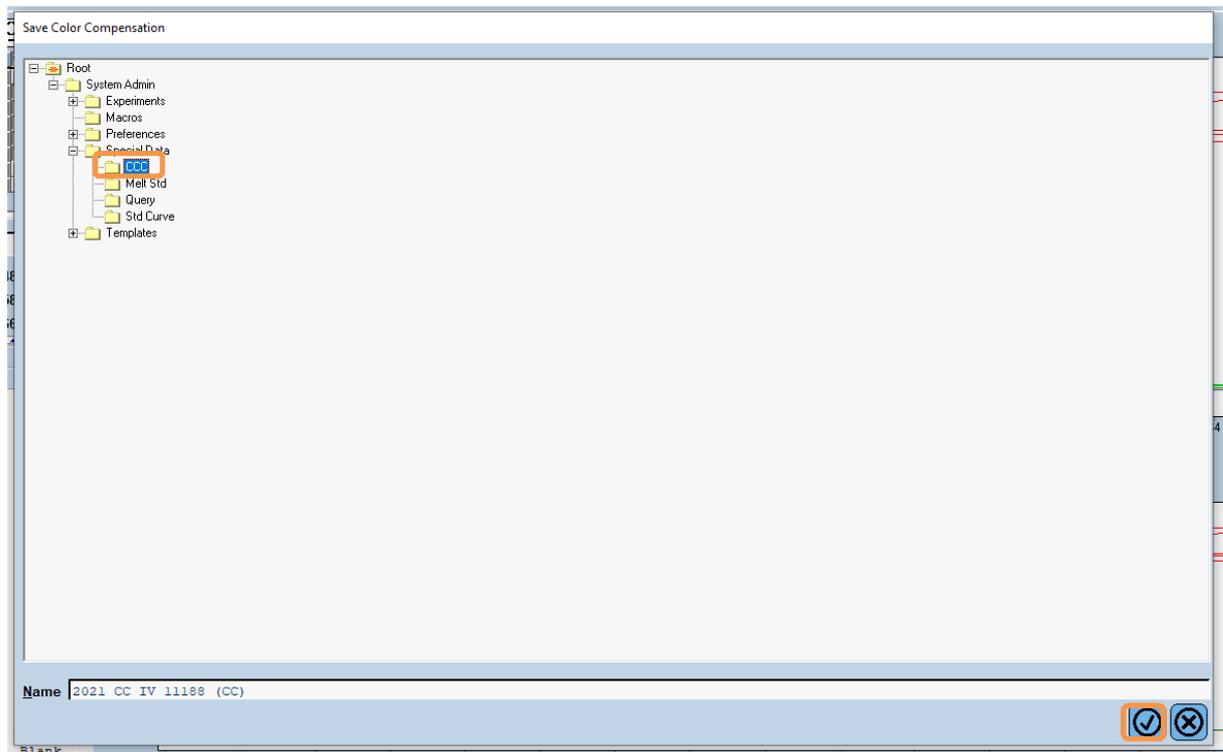
- En el cuadro de diálogo **“Create New Analysis”** vaya a **“Color Compensation”**.
 Seleccione y confirme el subconjunto adecuado (por ejemplo, Compensación de color)
 en el cuadro de diálogo que se abre.



- Se abre el análisis; haga clic en **“Calculate”** y luego en **“Save CC Object”**.



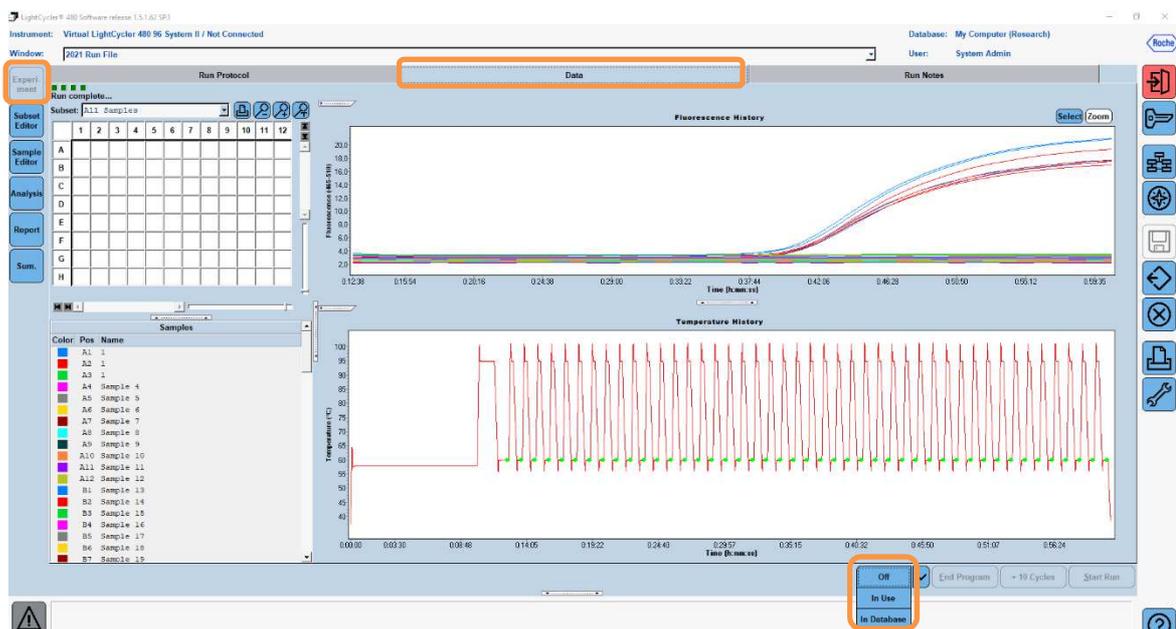
4. Guarde el archivo de compensación de color como "RIDA®GENE CCIV" en la carpeta "CCC".



Este archivo está entonces disponible para otros experimentos de LightCycler® 480 II. La generación del archivo de compensación de color finalizó.

8.4 Uso del archivo de compensación de color

Para utilizar el archivo de compensación de color, abra el Experimento de PCR en tiempo real RIDA®GENE y cargue la compensación de color deseada en "Experiment" "Data". En el menú desplegable "Color Comp (Off)", seleccione "in Database" y, a continuación, el archivo de compensación de color guardado.



Cuando se selecciona la compensación de color, el botón “**Color Comp (Off)**” cambia a “**Color Comp (On)**”. La compensación de color seleccionada se aplica automáticamente a todos los filtros del análisis. La corrida de la PCR en tiempo real de RIDA®GENE puede analizarse ahora como de costumbre.

Nota: El archivo de compensación de color es específico para cada LightCycler® 480 II. Se necesita un nuevo archivo de compensación de color si se cambia el dispositivo o se repara la unidad óptica.

9. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
16/03/21	Versión anterior
09/09/21	Adaptación / Corrección Página de título

10. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso.
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Blank

Dye 1

Dye 2

Dye 3

Dye 4

Dye 5