RIDA®GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Germania
+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com

1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV viene usato per la calibrazione del colore in cicli di PCR in tempo reale di RIDA®GENE 2-plex e superiori sul LightCycler® 480 II. Il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV può essere utilizzato per generare un file di compensazione del colore per consentire l'analisi dei test di PCR in tempo reale RIDA®GENE qualitativi e quantitativi 2-plex e superiori sul LightCycler® 480 II.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

Nei test di PCR in tempo reale, il segnale di fluorescenza emesso di un colorante reporter fluorescente può sovrapporsi a un canale di colore adiacente, generando così un segnale (interferenza) in questo canale. L'interferenza dei segnali fluorescenti può inficiare l'esito dei risultati a meno che non venga effettuata una correzione tramite un file di compensazione del colore. I file di compensazione del colore sono in grado di compensare l'interferenza tra i canali di colore.

3. Principio del test

Il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV viene usato per la calibrazione del colore in cicli di PCR in tempo reale di RIDA®GENE 2-plex e superiori sul LightCycler® 480 II.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 3 cicli di compensazione del colore).

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Blank	1 ×	400 µl	Bianco
2	Dye 1	1 ×	400 µl	Blu
3	Dye 2	1 ×	400 µl	Verde
4	Dye 3	1 ×	400 µl	Giallo
5	Dye 4	1 ×	400 µl	Arancione
6	Dye 5	1 ×	400 µl	Rosso

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV dalla luce e conservarlo a una temperatura di -20 °C. Prima dell'apertura può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Prima dell'uso, scongelare il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV con cura (ad esempio, in un frigorifero a 2-8 °C).
- Durante la preparazione della compensazione del colore, tutti i reagenti devono essere adeguatamente raffreddati (2-8 °C).

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

Il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV è adatto all'uso con il seguente strumento di PCR in tempo reale:

Tabella 2: Attrezzatura necessaria

Strumento di PCR real-time	
Roche	LightCycler® 480 II

Prima di utilizzare altri strumenti per la PCR real-time contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de per verificarne la compatibilità.

- Materiali di consumo per PCR real-time (piastra di microtitolazione, pellicola ottica)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione o piastre
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco

7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

- Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.
- Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.
- Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.
- Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.
- Assicurarsi che l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare contaminazioni incrociate.
- I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Per ulteriori dettagli consultare le schede di dati di sicurezza (SDS)
su www.r-biopharm.com.

8. Protocollo per la generazione di un file di compensazione del colore sul LightCycler® 480 II

8.1 Preparazione della compensazione del colore

Per un ciclo di compensazione del colore, pipettare cinque reazioni con 20 µl di ciascun colorante, compreso lo sfondo (bianco) in una piastra per microtitolazione (v. Fig.1).

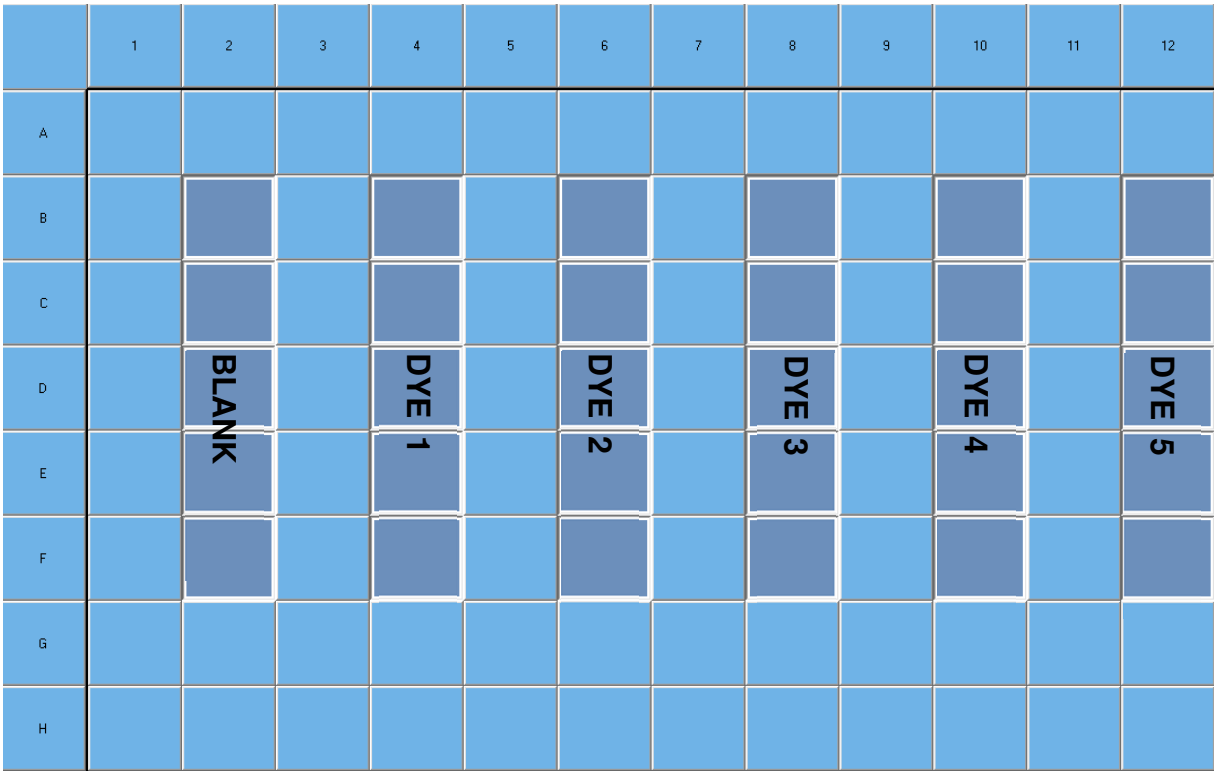


Figura 1: Schema di pipettaggio per la compensazione del colore sul LightCycler® 480 II.

Scongelare, mescolare e centrifugare brevemente i reagenti prima dell'uso.
Raffreddare adeguatamente i reagenti durante le fasi di lavoro (da 2 a 8 °C).

Tabella 3: Preparazione della compensazione del colore LightCycler® 480 II

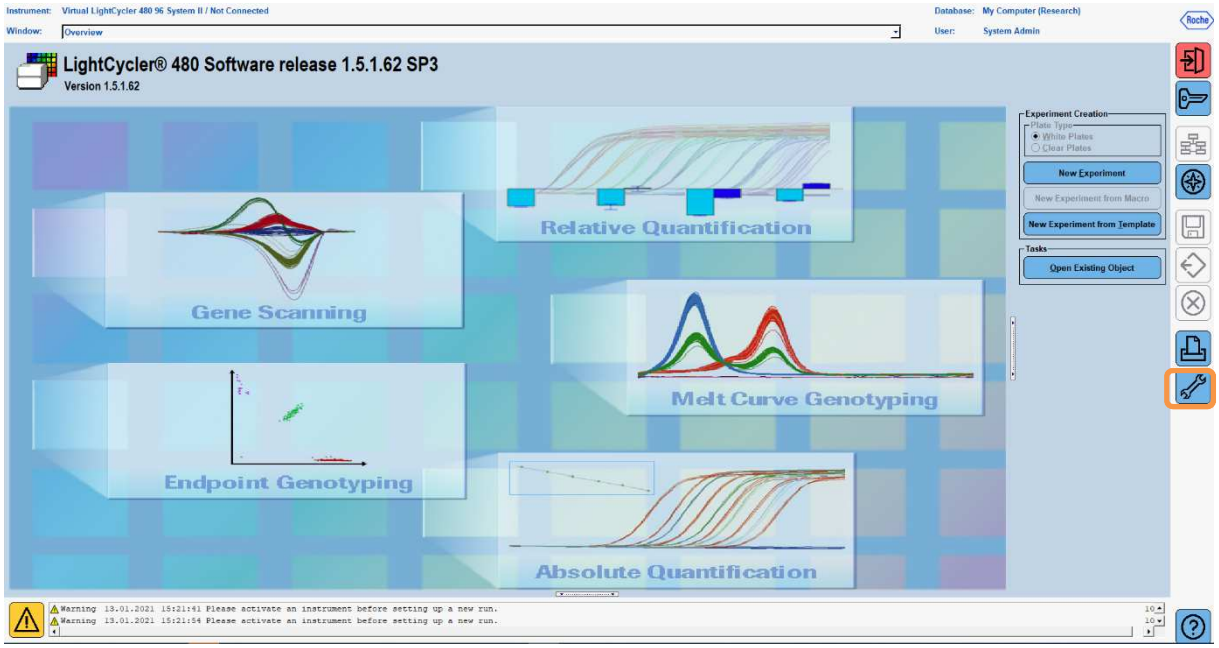
Codice del kit	Reagente	Quantità per reazione	Pipettare 20 µl ciascuno nei seguenti pozzetti
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µl	B12, C12, D12, E12, F12

Dopo aver pipettato i reagenti, sigillare la piastra di microtitolazione con pellicola ottica e centrifugare, se possibile. Avviare la PCR in tempo reale secondo le impostazioni del dispositivo.

8.2 Impostazione dello strumento per PCR

Nota: Accedere al software come amministratore per impostare il formato di rilevamento.

1. Dopo aver aperto il software, fare clic sull'icona "**Tools**" per programmare il formato di rilevamento.



2. Si aprirà la seguente finestra. Nella finestra Strumenti, selezionare “**Detection Formats**”. Fare clic sul pulsante “**New**” per creare un nuovo formato di rilevamento (v. Tab. 5) e salvarlo come “**RIDA®GENE”**. Fare clic sul pulsante “**Close**” per uscire dalla finestra Tools.

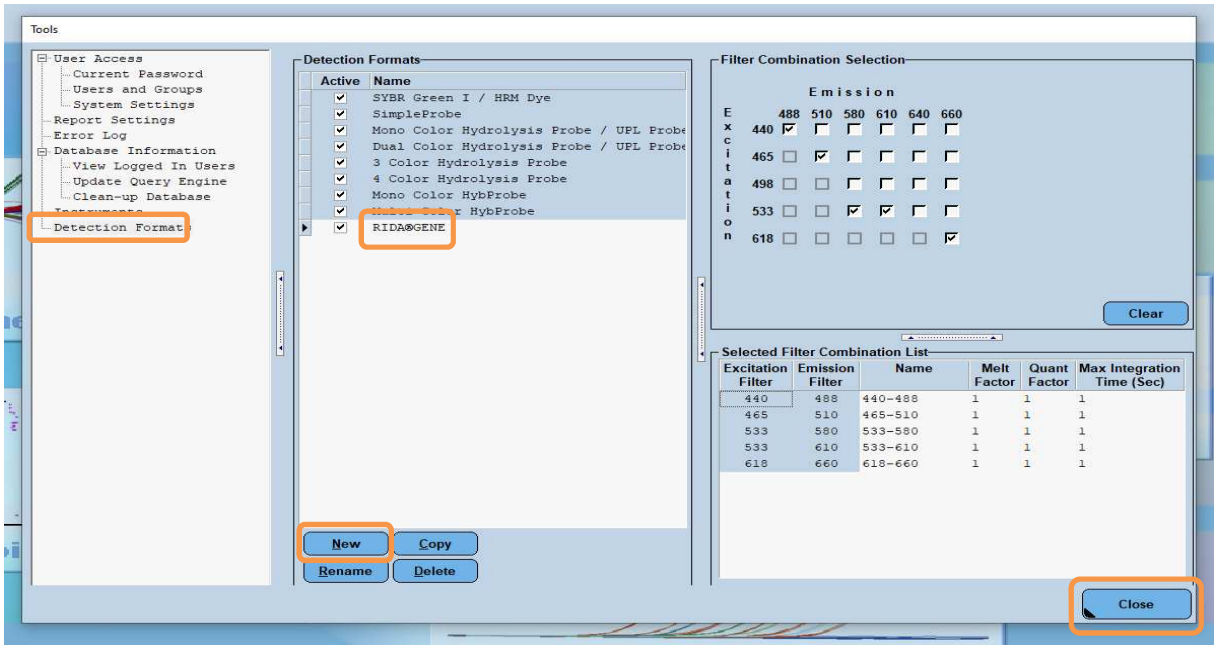
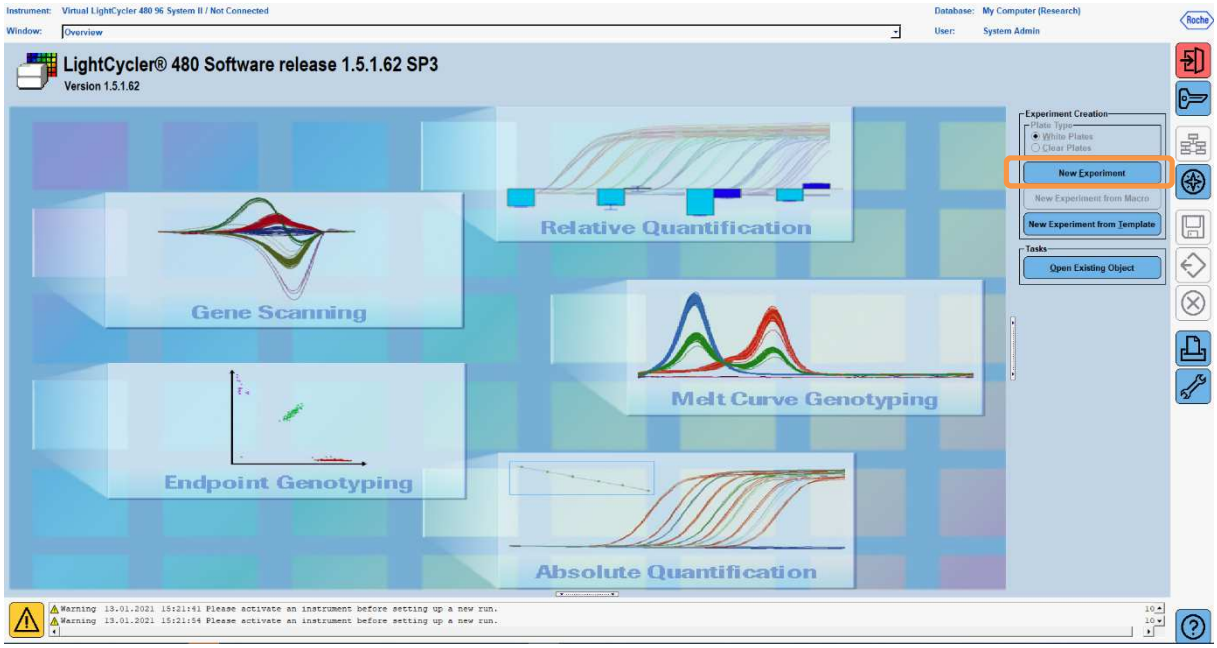


Tabella 4: Configurazione del canale di rivelazione per il LightCycler® 480 II

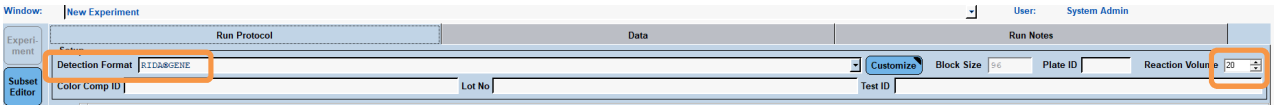
Combinazione filtri
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Nota: Impostare il valore di Quant Factor, Melt Factor e Integration Time su 1 (predefinito).

3. Dopo aver programmato il formato di rilevamento, fare clic sul pulsante “**New Experiment**”.



4. Selezionare il formato di rilevamento “**RIDA®GENE”** e inserire un volume di reazione di 20 µl (predefinito).



5. Programmare il profilo termico (v. Tab. 5).

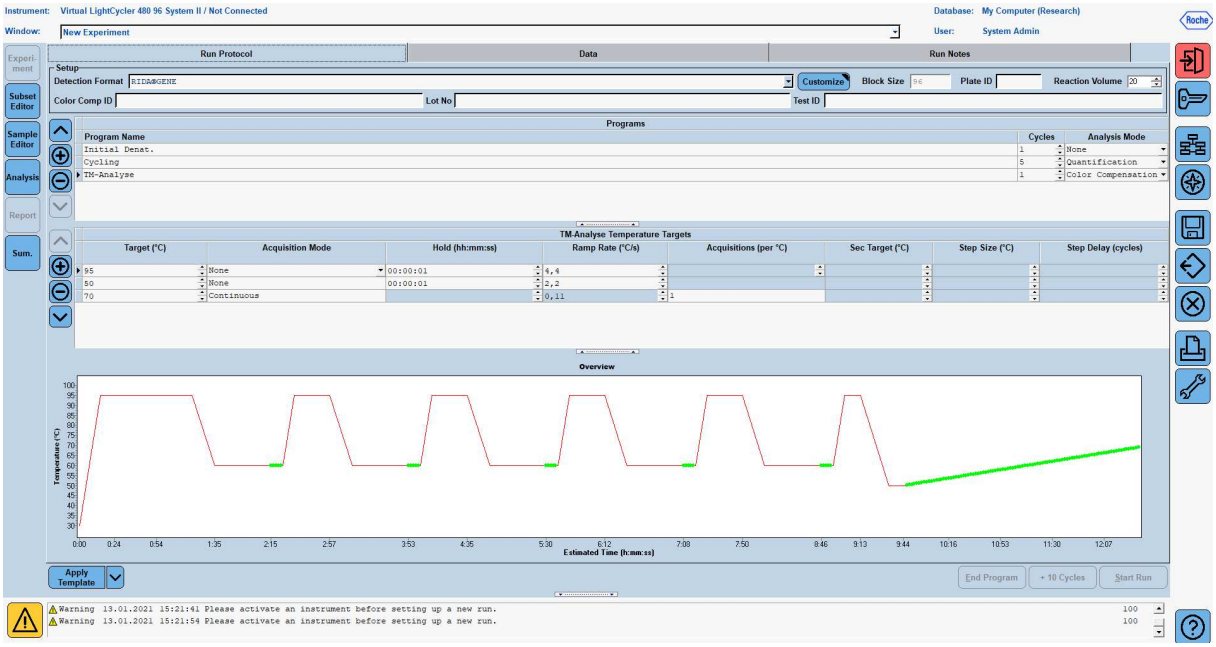
Tabella 5: Profilo termico

		Target temperatura			
Programma	Cicli / Modalità di analisi	Target [°C]	Modalità di acquisizione	Mant. [hh:mm:ss]	Vel. di rampa [°c/s]
Denat. iniziale	1 / nessuna	95	nessuna	00:00:30	4,4
Sequenza	5 / Quantificazione	95	nessuna	00:00:15	4,4
		60	singola	00:00:30	2,2
Analisi TM	1 / Compensazione del colore	95	nessuna	00:00:01	4,4
		50	nessuna	00:00:30	2,2
		70	continua		Acquisizioni (per °C) = 1 0,14*

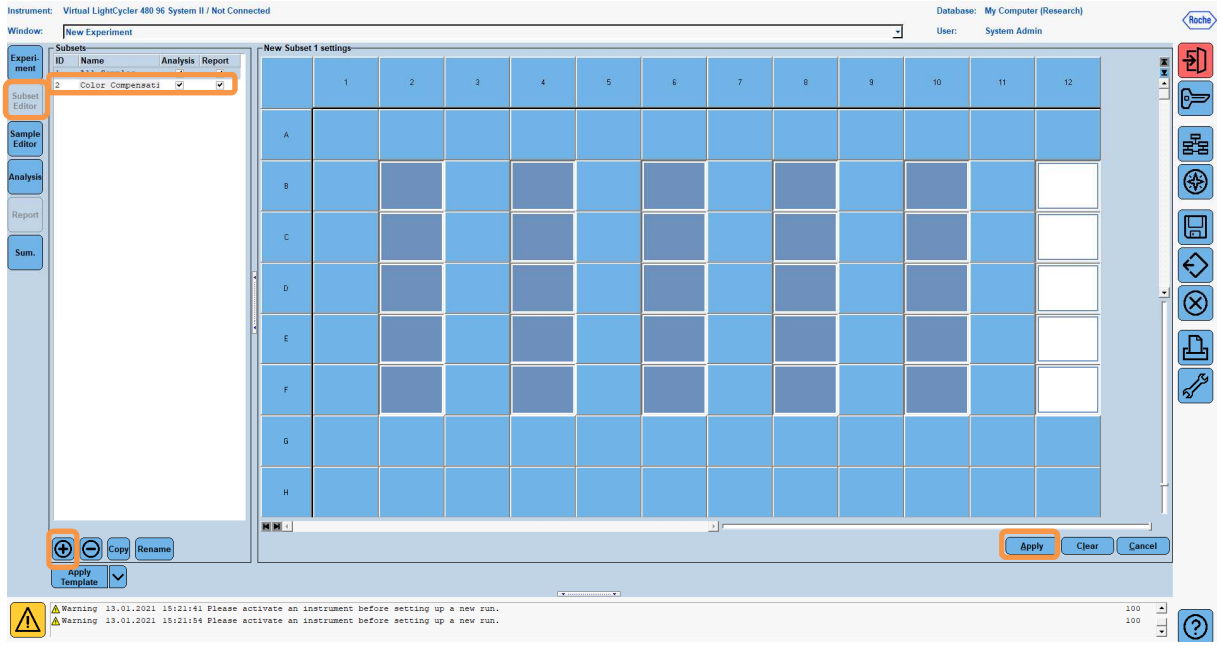
Nota: Verificare che il numero di “**Cycles**” e l’“**Analysis Mode**” siano corretti.

** La velocità di rampa può variare leggermente a seconda del formato del rilevatore selezionato.*

6. Dopo aver completato la programmazione, l'esperimento dovrebbe apparire come segue**.**



7. Per programmare il layout della piastra di microtitolazione, passare al **"Subset Editor"**. Fare clic sull'icona "**Plus**" per creare un nuovo sottoinsieme e inserire un nome per il layout (ad esempio, Compensazione del colore). Tenere premuto il tasto Ctrl e il tasto sinistro del mouse ed evidenziare tutti i pozzetti contenenti reagenti nella piastra di microtitolazione (vedi Fig. 1 e 2). Fare clic sul pulsante **"Apply"** per concludere il sottoinsieme. Lo schermo dovrebbe apparire come segue.



8. Passare al **“Sample Editor”**. Dal punto 1: **“Select Workflow”**, scegliere **“Color Comp”**. Al punto 2: **“Select Samples”**, scegliere il sottoinsieme precedentemente impostato (Compensazione del colore). Per concludere il layout, selezionare il canale dominante corrispondente per ogni reagente (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) nel campo **“Dominant Channel”** (v. Tab. 6). Selezionare **“Water”** per le reazioni con lo sfondo colorato (Bianco).

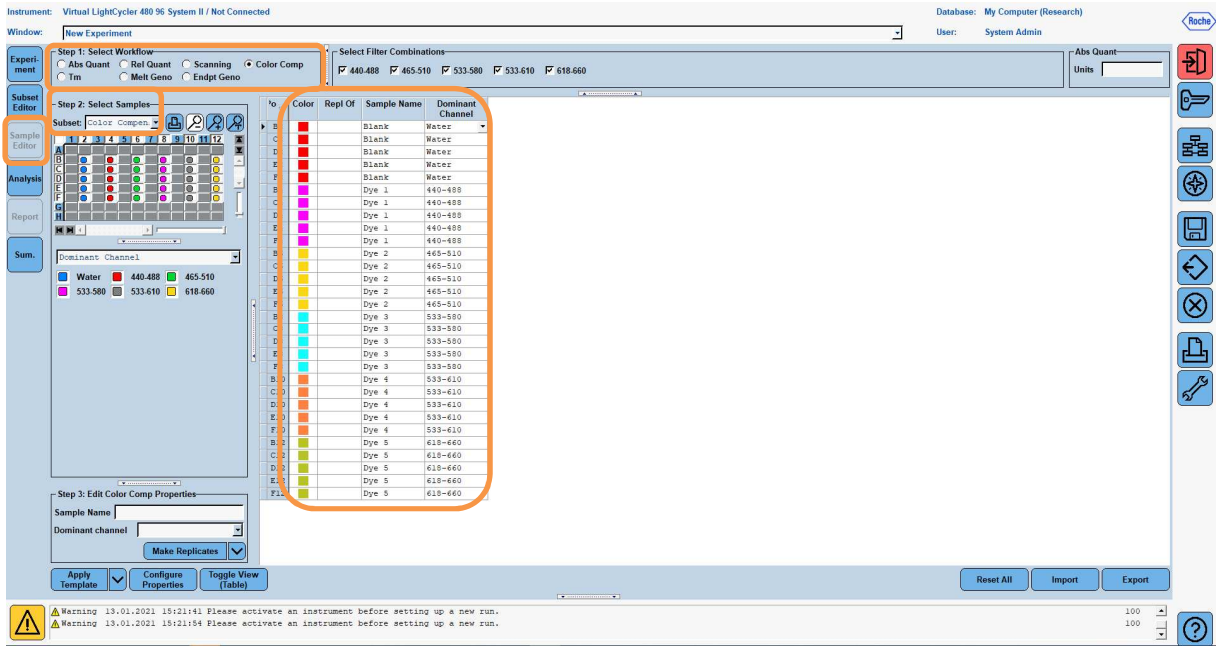
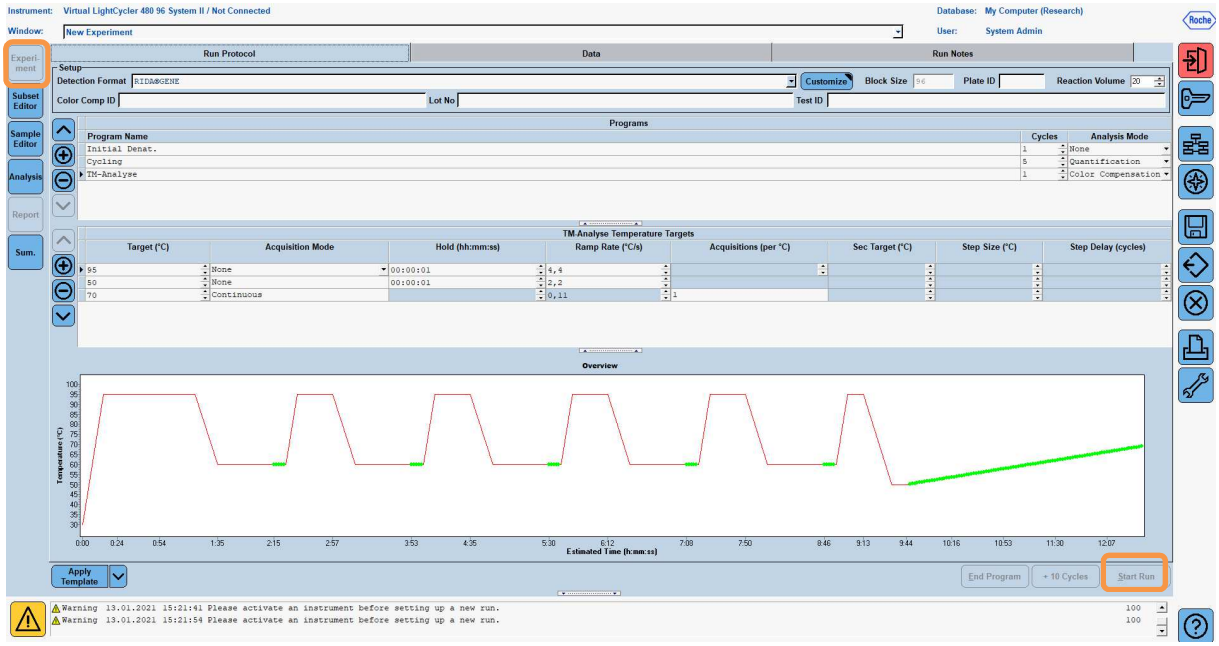


Tabella 6: Impostazioni del canale dominante per i reagenti (LightCycler® 480 II)

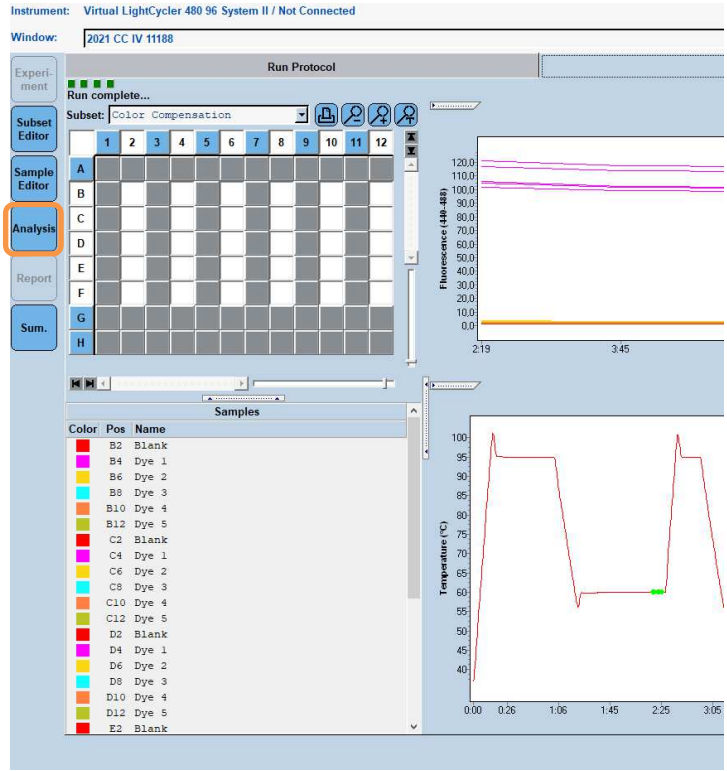
Reagente	Canale dominante
Blank	Acqua
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

9. Posizionare la piastra con le reazioni preparate nel dispositivo. Fare clic su “**Experiment**”, quindi su “**Start Run**” per avviare l’esperimento.

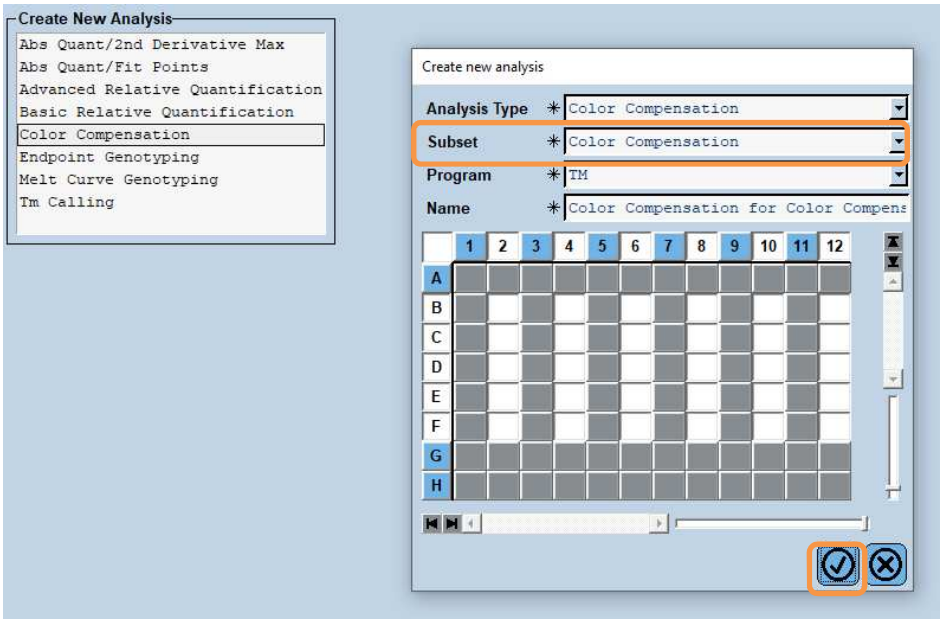


8.3 Valutazione e creazione di un file di compensazione del colore

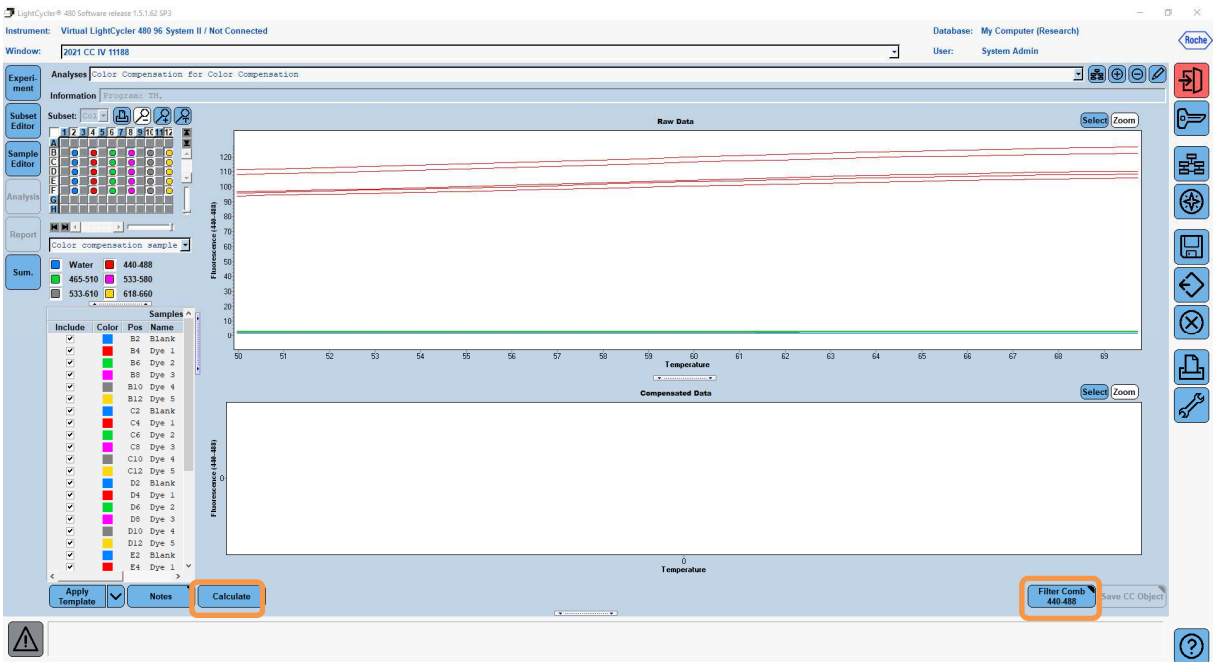
1. Dopo aver completato l’esperimento su LightCycler®, fare clic sul pulsante “**Analysis**”.



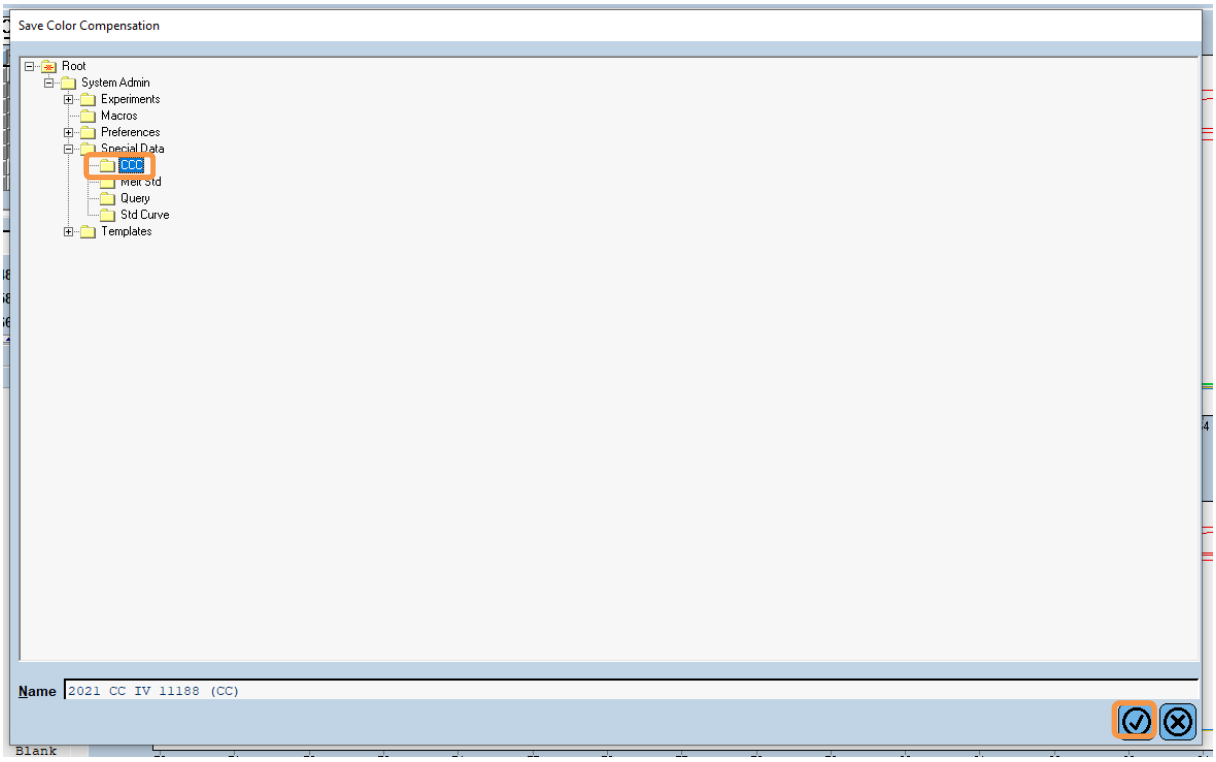
2. Nella finestra di dialogo **“Create New Analysis”**, selezionare **“Color Compensation”**. Selezionare e confermare il sottoinsieme appropriato (per esempio, Compensazione del colore) nella finestra di dialogo aperta.



3. Una volta aperta l’analisi, fare clic su **“Calculate”**, quindi su **“Save CC Object”**.



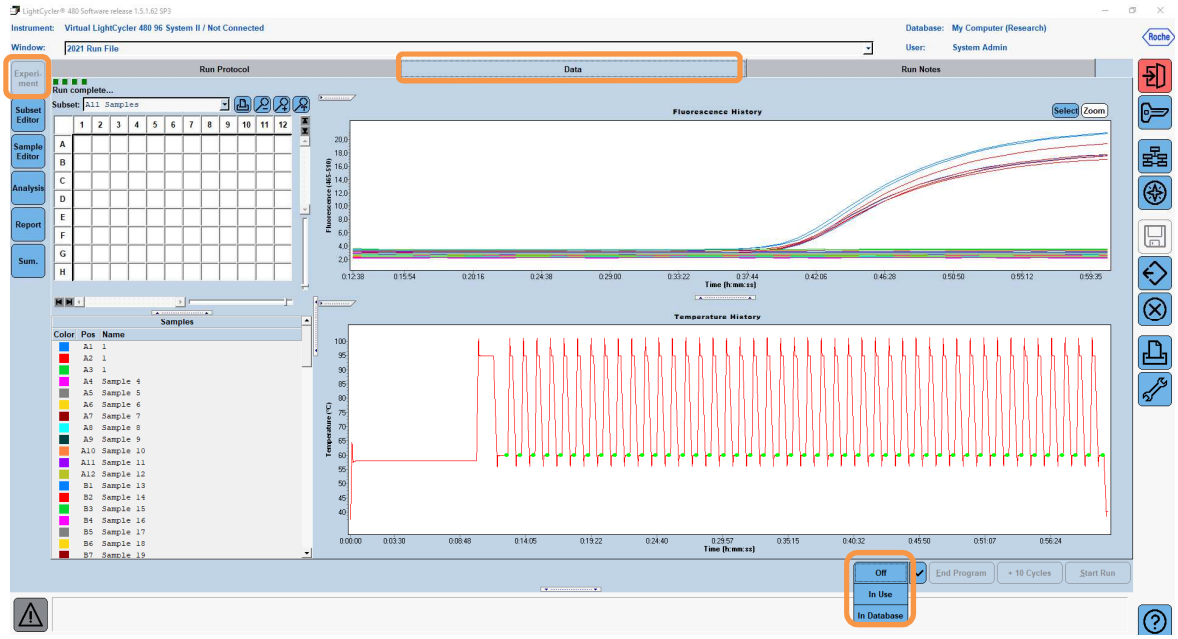
4. Salvare il file di compensazione del colore come **“RIDA®GENE CCIV”** nella cartella **“CCC”**.



Questo file sarà disponibile successivamente per altri esperimenti sul LightCycler® 480 II. La generazione del file di compensazione del colore è ora completa.

8.4 Uso del file di compensazione del colore

Per utilizzare il file di compensazione del colore, aprire l'esperimento di test PCR in tempo reale RIDA®GENE in questione e caricare la compensazione del colore desiderata da "**Experiment**" "**Data**". Nel menu a discesa "Color Comp (Off)" (Comp. colore disattivata), selezionare **"in Database"**, quindi il file di compensazione del colore salvato.



Una volta selezionata la compensazione del colore, il pulsante **"Color Comp (Off)"** passerà a **"Color Comp (On)"**. La compensazione del colore selezionata viene applicata automaticamente a tutti i filtri dell'analisi. È ora possibile analizzare il ciclo di PCR in tempo reale RIDA®GENE come di consueto.

Nota: Il file di compensazione del colore è specifico per ciascun LightCycler® 480 II. In caso di sostituzione del dispositivo o di riparazione dell'unità ottica, è necessario generare un nuovo file di compensazione del colore.

9. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
16/03/2021	Versione precedente
09/09/2021	Adattamento / Correzione Titolo pagina

10. Descrizione dei simboli

Simboli generali

IVD	Uso per la diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
LOT	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
REF	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Blank

Dye 1

Dye 2

Dye 3

Dye 4

Dye 5