

CE

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



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

1. Предназначение

За *in vitro* диагностична употреба. RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV се използва за цветово калибриране на 2- и повече сетов RIDA[®]GENE real-time PCR с LightCycler[®] 480 II. RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV може да се използва за генериране на файл за цветова компенсация, позволявайки анализ на качествен и количествен 2-и повече сетов тест RIDA[®]GENE real-time PCR с LightCycler[®] 480 II.

Продуктът е предназначен за професионална употреба.

2. Резюме и обяснение на теста

При PCR в реално време излъчваният флуоресцентен сигнал от флуоресцентно репортерно багрило може да се насложи върху съседен цветен канал, като по този начин генерира сигнал (кръстосани смущения). Кръстосаните смущения от флуоресцентни сигнали могат да доведат до неправилни резултати, освен ако не се извърши корекция чрез файл за цветова компенсация. Файлът за цветова компенсация може да компенсира кръстосаните смущения между цветните канали.

3. Принцип на теста

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV се използва за цветово калибриране на 2- и повече сетов RIDA[®]GENE real-time PCR с LightCycler[®] 480 II.

4. Предоставени реагенти

Таблица 1: Предоставени реагенти (реагентите, предоставени в комплекта, са достатъчни за 3 цикъла на цветова компенсация.)

Код на комплекта	Реагент	Кол	ичество	Цвят на капака
1	Blank	1 ×	400 µL	бял, готов за употреба
2	Dye 1	1 ×	400 µL	син, готов за употреба
3	Dye 2	1 ×	400 μL	зелен, готов за употреба
4	Dye 3	1 ×	400 μL	жълт, готов за употреба
5	Dye 4	1 ×	400 μL	оранжев, готов за употреба
6	Dye 5	1 ×	400 μL	червен, готов за употреба

5. Инструкции за съхранение

- Следвайте указанията за работа в таблица 2 и съхранявайте комплекта непосредствено след употреба в съответствие с посочената информация.
- Всички реагенти трябва да се съхраняват далеч от светлина при -16 °С до -28 °С и ако не са отворени, могат да се използват до срока на годност, отпечатан върху етикета. След изтичане на срока на годност гаранцията за качество вече не е валидна.
- Всички реагенти трябва внимателно да се размразят преди употреба (напр. в хладилник при 2 8 °C).
- Повтарящото се замразяване и размразяване до 3 пъти не влияе на тестовите свойства.
- Охладете всички реагенти по съответния начин по време на подготовката на PCR (2 8 °C).

	Температура на	Максимален срок на
	съхранение	съхранение
в неотворено състояние	-16 °С до -28 °С	Може да се използва до отпечатания срок на годност
в отворено състояние	-16 °С до -28 °С	3 цикъла на размразяване и замразяване

Таблица 2: Условия и информация за съхранение

6. Необходими, но непредоставени реагенти

6.1 Реагенти

Няма.

6.2 Лабораторно оборудване

Необходимо е следното оборудване за извършване на теста RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV:

Оборудване

Инструмент за PCR в реално време: LightCycler[®] 480 II (Roche)

Консумативи за PCR в реално време (плочи (нископрофилни, бели кладенчета, прозрачна рамка), реакционни флакони, покрития)

Центрофуга с ротор за плочи / реакционни флакони

Вортекс

Пипети (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)

Накрайници за пипети с филтри

Ръкавици за еднократна употреба без пудра

За въпроси се свържете с R-Biopharm AG на адрес pcr@r-biopharm.de.

7. Предупреждения и предпазни мерки за потребителите

Само за *in vitro* диагностична употреба.

Този тест трябва да се извършва само от квалифициран лабораторен персонал.

Трябва да се спазват указанията за работа в медицински лаборатории.

Винаги се придържайте стриктно към ръководството за експлоатация, когато извършвате този тест.

Не пипетирайте проби или реагенти с устата си. Избягвайте контакт с наранена кожа и лигавици.

Носете лични предпазни средства (подходящи ръкавици, лабораторна престилка, предпазни очила), когато боравите с реагенти и проби, и измийте ръцете си след завършване на теста.

Не пушете, не се хранете и не пийте течности в зони, където се обработват проби. Трябва да се използват отделни помещения, специално облекло и инструменти за екстракция, подготовка за PCR и PCR, за да се предотврати кръстосано контаминиране и фалшиво положителни резултати.

Клиничните проби трябва да се разглеждат като потенциално инфекциозни и трябва да се изхвърлят по подходящ начин, както всички реагенти и материали, които влизат в контакт с потенциално инфекциозни проби.

Не използвайте комплекта след изтичане на срока на годност. Потребителите са отговорни за правилното изхвърляне на всички реагенти и материали след употреба. За изхвърляне спазвайте националните разпоредби.

Допълнителни подробности за информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) можете да намерите под номера на елемента на адрес https://clinical.r-biopharm.com/search/.

За потребители в Европейския съюз: докладвайте всички сериозни нежелани събития, свързани с продукта, на R-Biopharm AG и подходящите национални органи.

8. Протокол за генериране на файл за цветова компенсация на LightCycler[®] 480 II

8.1 Подготовка за цветова компенсация

Размразете, разбъркайте и центрофугирайте за кратко реагентите преди употреба. Винаги охлаждайте всички реагенти по време на работните стъпки (2 °С до -8 °С). За цикъл на цветова компенсация пипетирайте пет реакции с 20 µL от всяко багрило, включително фона (Blank), върху микротитърна плака (вж. фиг. 1).



Фигура 1: Схема на пипетиране за цветова компенсация на LightCycler[®] 480 II.

Код на комплекта	Реагент	Количество на реакция	Пипетирайте по 20 µL в следните кладенчета						
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						

Таблица 3:	Подготовка на цветова компенсация за LightCycler [®] 480
гаолица з:	подготовка на цветова компенсация за LigniCycler [®] 480

След пипетиране на реагентите запечатайте микротитърната плака с оптично фолио и центрофугирайте, ако е възможно. Стартирайте PCR в реално време според настройките на устройството.

8.2 Настройка на инструмента за PCR

- **Забележка:** Влезте в софтуера като администратор, за да настроите формата за откриване.
- **1.** След като отворите софтуера, щракнете върху иконата "**Tools**", за да програмирате формата за откриване (вижте следващата фигура).



2. Отваря се следният прозорец. В прозореца с инструменти изберете "Detection Formats". Щракнете върху бутона "New" за да създадете нов формат за откриване (вж. табл. 4), и го запишете като "RIDA®GENE" (вижте следващата фигура).



Таблица 4: Настройка на канал за откриване за LightCycler[®] 480 II

Комбинация от филтри
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Забележка: Задайте стойност от 1 за Quant Factor, Melt Factor и Integration Time (по подразбиране).

Щракнете върху бутона "Close", за да излезете от прозореца с инструменти.

3. След като програмирате формата за откриване, щракнете върху бутона "**New Experiment**" (вижте следващата фигура).



4. Изберете формата за откриване "**RIDA**[®]**GENE**" и въведете реакционен обем от 20 µL (по подразбиране) (вижте следващата фигура).

Window:	New Experiment			<u>-</u>	User: System Admin	
Experi-		Run Protocol	Data		Run Notes	
ment	Detection Format RIDA®GENE			Customize Block Size	96 Plate ID	Reaction Volum
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID		

5. Програмирайте топлинния профил (вж. табл. 5).

Таблица 5: Топлинен профил

		Temperature targets									
Program	Cycles / Analysis Mode	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°c/s]						
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:30	4,4						
Cualing	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4,4						
Cycling		60	single	00:00:30	2,2						
		95	none	00:00:01	4,4						
		50	none	00:00:30	2,2						
TM Analysis	1 / Color Compensation	70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*						

Забележка: Уверете се, че броят "Cycles" и "Analysis Mode" са правилни.

* Скоростта на нарастване може да варира леко в зависимост от избрания формат за откриване.

6. След като програмирането приключи, експериментът трябва да изглежда по следния начин (вижте следващата фигура).



7. За да програмирате оформлението на микротитърната плака, отворете "Subset Editor". Щракнете върху иконата "Plus", за да създадете нова подгрупа, и въведете име за оформлението (напр. Color Compensation). Натиснете и задръжте клавиша Ctrl и левия бутон на мишката и маркирайте всички кладенчета, съдържащи реагенти върху микротитърната плака (вижте фиг. 1 и 2). Щракнете върху бутона "Apply", за да завършите подгрупата. Екранът трябва да се появи, както следва (вижте следващата фигура).

Instrume	nt: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Conn	ected										Databas	e: My Compute	r (Research)	(Roche
Window:	New Experiment										-	User:	System Adm	in		\smile
Experi- ment Subset Editor	Subsets ID Name Analysis Report 2 Color Compensati	New Subse	et 1 settings	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		€) }>
Sample Editor		A														器
Analysis		в														*
Report Sum.		c														
		D													- 	€) Ø
		E														L L
		F														<i>[</i>]
		G														
		н													Ī	
													Арг	ly Clear	Cancel	
	Apply Template															
\triangle	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please at ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please at	otivate an i otivate an i	nstrument bef	ore setting u ore setting u	p a new run. p a new run.										100 100	\bigcirc

8. Отворете "Sample Editor". От Стъпка 1: "Select Workflow" изберете "Color Comp". В Стъпка 2: "Select Samples" изберете предварително зададената подгрупа (Цветова компенсация). За да завършите оформлението, изберете съответния доминиращ канал за всеки реагент (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) в полето "Dominant Channel" (вж. табл. 6). Изберете "Water" за реакциите с цветен фон (Blank) (вижте следващата фигура).



Таблица 6:	Настройки на Dominant Channel за	реагентите (LightCycler [®] 480 II)
------------	----------------------------------	--

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

9. Поставете плаката с подготвените реакции в устройството. Щракнете върху "Experiment" и после върху "Start Run", за да започнете експеримента (вижте следващата фигура).



8.3 Оценка и създаване на файл за цветова компенсация

1. След завършване на експеримента LightCycler[®] щракнете върху бутона "**Analysis**" (вижте следващата фигура).



2. В диалоговия прозорец "Create New Analysis" отидете на "Color Compensation". В отворилия се диалогов прозорец изберете и потвърдете подходящата подгрупа (напр. Color Compensation) (вижте следващата фигура).



3. Анализът се отваря; щракнете върху "Calculate" и после върху "Save CC Object" (вижте следващата фигура).

J LightCycle	er @ 480 Software release 1.5.1.62 SP3																			-	σ×
Instrument:	Virtual LightCycler 480 96 System	n II / Not	Connected														Databas	e: My Compute	r (Research	1)	Roche
Window:	2021 CC IV 11188															•	User:	System Admi	in		Hoche
Experi-	Analyses Color Compensation f	for Cold	or Comper	sation															_		12
ment	Information Program: TH,																				
Subset S	Subset: Col V P P P	1																		Calant Zama	6
Editor	12 34 56 78 91(11)	í	·									Raw Data								(Serrect (200m)	
Sample		1	20										_				_	_	_		
Editor		11	10		_	_		_													88
Anabusia		10	10			_	_								_	-					
Analysis		(11)	30																		
Report		(10)-	70																		
Report	Color compensation sample 💌	0000	50																		
Sum	📕 Water 📕 440-488	Inores	50																		
		L 4	40- 30-																		\odot
	533-610 616-660	-	20-																		Ě
	Include Color Pos Name	` I I	10																		\otimes
	B2 Blank		U																		
	B6 Dye 2		50	51	52	53	54	515	56	57	58	59 60 Temperature	61	62	63	64	65 1	6 67	68	69	L.D.
	B8 Dye 3 B10 Dye 4												•								
	B12 Dye 5											Compensated Dat	а							Select Zoom	19
	C2 Blank																				51
	C6 Dye 2																				
	C8 Dye 3	40-46																			
	C12 Dye 5	e (†																			
	D2 Blank																				
	✓ D6 Dye 2	Fluor																			
	D8 Dye 3																				
	D12 Dye 5																				
	E2 Blank											, Ó									
	<>											I emperature						C			-
(Apply Template V Notes	Cal	culate																Filter Cor 440-488	Save CC Obje	ct
											••••••										-
\wedge																					6
<u>حن</u>																					\odot

4. Запишете файла за цветова компенсация като "**RIDA[®]GENE CCIV**" в папка "**CCC**" (вижте следващата фигура).

Save Color Compensation	
B-Se Root	
E System Admin	
Experiments	
Macros	
B Preferences	
D-C-Special Data	
Carl Query	
La Curve	
🗄 💼 Templates	
2021 CC IV 11188 (CC)	
8	$\mathbf{\nabla}$

След това този файл е достъпен за други експерименти с LightCycler[®] 480 II. Генерирането на файла за цветова компенсация вече е завършено.

8.4 Използване на файла за цветова компенсация

За да използвате файла за цветова компенсация, отворете съответния експеримент RIDA[®]GENE real-time PCR и заредете желаната цветова компенсация под "**Experiment"**, "**Data"**. В падащото меню **"Color Comp (Off)"** изберете "**in Database"** и след това записания файл за цветова компенсация (вж. фиг. 2).



Фигура 2: Използване на цветовата компенсация

Когато е избрана цветова компенсация, бутонът "**Color Comp (Off)**") се променя на "**Color Comp (On)**". Избраната цветова компенсация се прилага автоматично към всички филтри на анализа. Изпълнението на RIDA[®]GENE real-time PCR вече може да се анализира както обикновено.

Забележка: Файлът за цветова компенсация е специфичен за всеки LightCycler[®] 480 II. Необходим е нов файл за цветова компенсация, ако устройството бъде сменено или оптичният модул бъде ремонтиран.

9. История на версиите

Номер на версията	Раздел и задание
2021-09-09	Предходна версия
2022-02-03	Обща редакция: 4. Предоставени реагенти 5. Инструкции за съхранение 6. Необходими, но непредоставени реагенти 7. Предупреждения и предпазни мерки за потребителите

10. Пояснение на символите

Общи символи

IVD	За <i>in vitro</i> диагностична употреба
Ĩ	Спазвайте ръководството за експлоатация
LOT	Партиден номер
R	Да се използва преди
X	Температура на съхранение
REF	Номер на елемент
₹ Z	Брой тестове
<u>سا</u>	Дата на производство
	Производител

Специфични за теста символи

Blank	Контрола
Dye 1	Багрило 1
Dye 2	Багрило 2
Dye 3	Багрило 3
Dye 4	Багрило 4
Dye 5	Багрило 5