

CE

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Německo \$+49 (0) 61 51 81 02-0 / 2 +49 (0) 61 51 81 02-20 / 3 www.r-biopharm.com

1. Účel použití

K diagnostickému použití *in vitro*. Souprava RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV se používá pro kalibraci barev 2-plex a vyšších cyklů RIDA[®]GENE real-time PCR na přístroji LightCycler[®] 480 II. Soupravu RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV lze použít k vytvoření souboru kompenzace barev, který umožňuje analýzu kvalitativních a kvantitativních 2-plex a vyšších testů RIDA[®]GENE real-time PCR na přístroji LightCycler[®] 480 II.

Produkt je určen pro profesionální použití.

2. Souhrn a vysvětlení testu

U metody real-time PCR může emitovaný fluorescenční signál fluorescenčního reportérového barviva překrýt sousední barevný kanál, čímž vzniká signál (crosstalk - křížová komunikace). Křížová komunikace (crosstalk) způsobená fluorescenčními signály může vést k nesprávným výsledkům, pokud není provedena korekce pomocí souboru kompenzace barev. Soubor kompenzace barev může kompenzovat křížovou komunikaci (crosstalk) mezi barevnými kanály.

3. Princip testu

Souprava RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV se používá pro kalibraci barev 2-plex a vyšších cyklů metody RIDA[®]GENE real-time PCR na přístroji LightCycler[®] 480 II.

4. Dodávaná činidla

kompenzace barev.)							
	Kód soupravy	Činidlo	Množství		Barva víčka		
	1	Blank	1×	400 µL	bílá, připraveno k použití		

Tabulka 1:Dodávaná činidla (Činidla dodávaná v soupravě vystačí na 3 cykly
kompenzace barev.)

1	Blank	1×	400 µL	bílá, připraveno k použití
2	Dye 1	1×	400 µL	modrá, připraveno k použití
3	Dye 2	1×	400 µL	zelená, připraveno k použití
4	Dye 3	1×	400 µL	žlutá, připraveno k použití
5	Dye 4	1×	400 µL	oranžová, připraveno k použití
6	Dye 5	1×	400 µL	červená, připraveno k použití

2

5. Pokyny k uskladnění

- Dodržujte pokyny k manipulaci uvedené v tabulce 2 a uskladněte soupravu bezprostředně po použití v souladu s uvedenými informacemi.
- Všechna činidla musí být uskladněna mimo dosah světla, při teplotě -16 °C až -28 °C.
 Pokud zůstanou neotevřená, lze je používat až do data použitelnosti vytištěného na štítku. Po datu použitelnosti již není platná záruka kvality.
- Všechna činidla je třeba před použitím důkladně rozmrazit (např. v chladničce při teplotě 2 8 °C).
- Opakované zmrazení a rozmrazení až třikrát neovlivní vlastnosti testu.
- Během přípravy PCR všechna činidla náležitě zchlaďte (2 8 °C).

	Uskladňovací teplota	Maximální doba uskladnění
neotevřené	-16 °C až -28 °C	Lze používat do vytištěného data použitelnosti
otevřené	-16 °C až -28 °C	3 cykly rozmrazení a zmrazení

Tabulka 2: Podmínky uskladnění a související informace

6. Potřebná činidla, která nejsou součástí dodávky

6.1 Činidla

Žádná.

6.2 Laboratorní vybavení

K provádění testu RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV je zapotřebí následující vybavení:

Vybavení

Přístroj pro real-time PCR: LightCycler[®] 480 II (Roche)

Spotřební materiál pro real-time PCR (destičky (nízký profil, bílé jamky, průhledný rámeček), reakční lahvičky, fólie)

Odstředivka s rotorem pro destičky / reakční lahvičky

Vortex

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

Špičky pipet s filtry

Jednorázové rukavice bez pudru

V případě jakýchkoli dotazů kontaktujte společnost R-Biopharm AG na e-mailové adrese pcr@r-biopharm.de.

7. Varování a bezpečnostní opatření pro uživatele

Pouze k diagnostickému použití in vitro.

Tento test smí provádět výhradně kvalifikovaný laboratorní personál. Dodržujte pokyny pro práci ve zdravotnických laboratořích.

Při provádění tohoto testu vždy striktně dodržujte provozní příručku.

Nepipetujte vzorky ani činidla ústy. Zabraňte kontaktu s poškozenou pokožkou a sliznicemi.

Při manipulaci s činidly a vzorky používejte osobní ochranné prostředky (vhodné rukavice, laboratorní plášť, ochranné brýle) a po dokončení testu si umyjte ruce.

V místech, kde se manipuluje se vzorky, nekuřte, nejezte ani nepijte.

Extrakci, přípravu PCR a PCR je nutné provádět v oddělených místnostech a používat při tom speciální oblečení a nástroje, aby se zabránilo křížové kontaminaci a falešně pozitivním výsledkům.

Na klinické vzorky se musí pohlížet jako na potenciálně infekční a je nutné je vhodným způsobem likvidovat, stejně jako všechna činidla a materiály, které přicházejí do styku s potenciálně infekčními vzorky.

Nepoužívejte soupravu po datu použitelnosti. Uživatelé jsou zodpovědní za správnou likvidaci všech použitých činidel a materiálů. Při likvidaci dodržujte národní předpisy.

Další podrobné informace o bezpečnostních listech (Safety Data Sheet, SDS) jsou k dispozici pod číslem položky na stránkách https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Pro uživatele v Evropské unii: Veškeré závažné nežádoucí účinky související s tímto produktem nahlaste společnosti R-Biopharm AG a příslušným vnitrostátním orgánům.

8. Protokol pro generování souboru kompenzace barev na přístroji LightCycler[®] 480 II

8.1 Příprava kompenzace barev

Před použitím činidla rozmrazte, promíchejte a krátce odstřeďte. Během pracovních kroků vždy všechna činidla ochlaďte (2 °C až -8 °C). Pro provedení kompenzace barev napipetujte do mikrotitrační destičky pět reakcí s 20 µL každého barviva včetně pozadí (Blank) (viz obr. 1).



Obrázek 1: Schéma pipetování pro kompenzaci barev na přístroji LightCycler® 480 II

Kód soupravy	Činidlo	Množství na jednu reakci	Napipetujte po 20 μL do následujících jamek
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

Tabulka 3:Příprava kompenzace barev pro přístroj LightCycler[®] 480 II

Po dokončení pipetování činidel mikrotitrační destičku uzavřete optickou fólií a pokud možno odstřeďte. Podle nastavení zařízení zahajte real-time PCR.

8.2 Nastavení přístroje pro PCR

Poznámka: Přihlaste se do softwaru jako správce a nastavte formát detekce.

1. Po otevření softwaru klikněte na ikonu nástroje "**Tools**" a naprogramujte formát detekce (viz následující obrázek).



 Otevře se následující okno. V okně Tools vyberte možnost "Detection Formats". Kliknutím na tlačítko "New" vytvoříte nový formát detekce (viz tabulka 4) a uložte jej jako "RIDA[®]GENE" (viz následující obrázek).



 Tabulka 4:
 Nastavení detekčního kanálu pro přístroj LightCycler[®] 480 II

Poznámka: Nastavte hodnoty Quant Factor, Melt Factor a Integration Time na 1 (výchozí hodnota).

Kliknutím na tlačítko "Close" ukončete okno Tools.

3. Po naprogramování formátu detekce klikněte na tlačítko "**New Experiment**" (viz následující obrázek).



 Vyberte formát detekce "RIDA[®]GENE" a zadejte objem reakce 20 μL (výchozí hodnota) (viz následující obrázek).

Window:	New Experiment				✓ User:	System Admin	
Experi-	[Run Protocol	Data		Run Notes		
ment	Detection Format RIDASGENE			Customize Block	k Size 96 Pla	ite ID Reaction Volum	20 🛨
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID			

5. Naprogramujte teplotní profil (viz tabulka 5).

Tabulka 5:Teplotní profil

			Ten	nperature targ	jets
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
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4,4
Cycling	J / Quantincation	60	single	00:00:30	2,2
		95	none	00:00:01	4,4
TM Analysis	1 / Color Compensation	50	none	00:00:30	2,2
		70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*

Poznámka: Ujistěte se, že počet "Cycles" a "Analysis Mode" je správný.

* Rychlost náběhu se může mírně lišit v závislosti na zvoleném formátu detektoru.

6. Po dokončení programování by měl experiment vypadat následovně (viz následující obrázek).



7. Chcete-li naprogramovat rozvržení mikrotitrační destičky, přepněte do režimu "Subset Editor". Kliknutím na ikonu "Plus" vytvořte novou podskupinu a zadejte název jejího schematu (např. Color Compensation). Stiskněte a podržte klávesu Ctrl a levé tlačítko myši a označte všechny jamky obsahující činidla v mikrotitrační destičce (viz obr. 1 a 2). Kliknutím na tlačítko "Apply" dokončete podskupinu. Obrazovka by se měla zobrazit následovně (viz následující obrázek).

Instrument	Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Conr	nected									Databas	e: My Computer	(Research)	(B
Vindow:	New Experiment									•	User:	System Admin	1	~
) -	Subsets	- New Subs	et 1 settings											
Experi- ment Subset Editor	2 Color Compensati V		1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	
Sample Editor		A												E
Analysis		В												C
Report		C												
		D												
		E			_			-		-				
		F				 		-		-				
		G												
		н												Ē
	Copy Rename							<u>)</u>				Appl	y Clear	
	Template					 •								
A	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please a ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please a	octivate an octivate an	instrument bef	ore setting u ore setting u	p a new run. p a new run.									100 -

8. Přepněte na kartu "Sample Editor". V kroku 1: "Select Workflow" vyberte možnost "Color Comp". V kroku 2: "Select Samples" vyberte dříve nastavenou podskupinu (Color Compensation). Chcete-li schema dokončit, vyberte odpovídající dominantní kanál pro každé činidlo (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) v poli "Dominant Channel" (viz tabulka 6). Pro reakce s barevným pozadím (Blank) vyberte možnost "Water" (viz následující obrázek).



 Tabulka 6:
 Nastavení dominantního kanálu pro činidla (LightCycler[®] 480 II)

Činidlo	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. Vložte destičku s připravenými reakcemi do přístroje. Kliknutím na tlačítko "Experiment" a poté na tlačítko "Start Run" spustíte experiment (viz následující obrázek).



8.3 Vyhodnocení a vytvoření souboru kompenzace barev

1. Po dokončení experimentu LightCycler[®] klikněte na tlačítko "**Analysis**" (viz následující obrázek).



2. V dialogovém okně "Create New Analysis" přejděte na volbu "Color Compensation". V otevřeném dialogovém okně vyberte a potvrďte příslušnou podskupinu (např. Color Compensation) (viz následující obrázek).



3. Otevře se analýza; klikněte na možnost "**Calculate**" a poté na "**Save CC Object**" (viz následující obrázek).



 Uložte soubor kompenzace barev jako "RIDA[®]GENE CCIV" do složky "CCC" (viz následující obrázek).

Save Color Compensation	
Broot	
🖻 🧰 System Admin	
Experiments	
Meit Std	
Name 2021 CC IV 11188 (CC)	
Plank	

Tento soubor je poté k dispozici pro další experimenty LightCycler[®] 480 II. Generování souboru kompenzace barev je nyní dokončeno.

8.4 Použití souboru kompenzace barev

Chcete-li použít soubor kompenzace barev, otevřete daný experiment RIDA®GENE realtime PCR a načtěte požadovanou kompenzaci barev v části "**Experiment**" "**Data**". V rozbalovací nabídce **"Color Comp (Off)"** vyberte možnost "**in Database**" a poté uložený soubor kompenzace barev (viz obr. 2).



Obrázek 2: Použití souboru kompenzace barev

Po výběru kompenzace barev se tlačítko "**Color Comp (Off)**" změní na "**Color Comp (On)**". Vybraná kompenzace barev se automaticky použije na všechny filtry analýzy. Nyní lze cyklus RIDA[®]GENE real-time PCR analyzovat jako obvykle.

Poznámka: Soubor kompenzace barev je specifický pro každý přístroj LightCycler[®] 480 II. Při výměně zařízení nebo opravě optické jednotky je třeba vytvořit nový soubor kompenzace barev.

9. Historie verze

Číslo verze	Část a určení
2021-09-09	Předchozí verze
2022-02-03	Obecná revize: 4. Dodávaná činidla 5. Pokyny k uskladnění 6. Potřebná činidla, která nejsou součástí dodávky 7. Varování a bezpečnostní opatření pro uživatele

10. Vysvětlení symbolů

Obecné symboly

IVD	K diagnostickému použití <i>in vitro</i>
Ĩ	Dodržujte pokyny uváděné v provozní příručce.
LOT	Číslo šarže
×	Datum spotřeby
X	Uskladňovací teplota
REF	Číslo položky
∑∑∕	Počet testů
\sim	Datum výroby
	Výrobce

Symboly specifické pro test

Blank	Prázdný
Dye 1	Barvivo 1
Dye 2	Barvivo 2
Dye 3	Barvivo 3
Dye 4	Barvivo 4
Dye 5	Barvivo 5