

CE

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 / \$\$\Brace{1}\$ +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 höherplexige 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 (Überstrahlen). Das Überstrahlen 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 CompensationLäufe)

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

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -16 °C bis -28 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 3 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 8 °C).

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-16 °C bis -28 °C	Bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-16 °C bis -28 °C	3 Tau-/Frier-Zyklen

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Reagenzien

Keine.

6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV Tests benötigt:

Zubehör
Real-time PCR Gerät: LightCycler [®] 480 II (Roche)
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten / Reaktionsgefäße
Vortexer
Pipetten (0,5 - 20 μl, 20 - 200 μl, 100 - 1000 μl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG unter pcr@r-biopharm.de.

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem 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, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse 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 zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

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

8.1 Herstellung der Color Compensation

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



Abb. 1: Pipettierschema Color Compensation Lauf für 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

Tab.3: Herstellung Color Compensation Lauf für LightCycler[®] 480 II

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 (s. folgende Abbildung).



 Das folgende Fenster öffnet sich. Im Tools Fenster "Detection Formats" auswählen. Durch Drücken des Buttons "New" ein neues Detektionsformat anlegen (s. Tab.4) und als "RIDA[®]GENE" benennen (s. folgende Abbildung).



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

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

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

Das Tools Fenster durch Drücken des Buttons "Close" schließen.

3. Nach der Programmierung des Detektionsformates den Button "**New Experiment**" drücken (s. folgende Abbildung).



4. Zunächst das Detektionsformat "**RIDA[®]GENE**" wählen und ein Reaktionsvolumen von 20 µl eintragen (default) (s. folgende Abbildung).

Window:	New Experiment				• User:	System Admin	
Experi-		Run Protocol	Data		Run Note	15	
ment	Detection Format RIDASGENE			Customize Block S	iize 96 P	late ID Reaction Volum	20 🛬
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID			

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

Tab.5: Thermalprofil

			Tem	perature targ	ets
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		60	single	00:00:30	2.2
		95	none	00:00:01	4.4
TM-Analyse	1 / Color Compensation	50	none	00:00:30	2.2
Tivi-Analyse		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 Detectionsformat geringfügig variieren.

6. Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des Experiments (s. folgende Abbildung).



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 (s. folgende Abbildung).



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 Dominat Channel im "Dominant Channel" Feld auswählen (s. Tab.6). Für die Reaktionen mit dem Farbstoffhintergrund (Blank) bitte "Water" wählen (s. folgende Abbildung).



	Tab.	6:	Dominant	Channel	Einstellung	für Reag	genzien	(LightC	Sycler [®]	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

9. Die Platte mit den vorbereiteten Reaktionen in das Gerät einsetzen. Den Button "**Experiment**" drücken und durch Drücken des Buttons "**Start Run**" den Lauf starten (s. folgende Abbildung).



8.3 Auswertung und Erstellung eines Color Compensation Files

1. Nach Abschluss des LightCycler[®] Experiments den Button "Analysis" drücken (s. folgende Abbildung).



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 (s. folgende Abbildung).



3. In der sich öffnenden Analyse den Button **"Calculate**" und dann den freigegebenen Button **"Save CC Object"** drücken (s. folgende Abbildung).



4. Das Color Compensation File als **"RIDA[®]GENE CCIV"** unter dem Ordner **"CCC"** abspeichern (s. folgende Abbildung).

		-
2	ave Color Compensation	
1		
З.,		_
	E- 🔁 Root	
81	a-ta-system Admin	
		F
	Macros	
		=
4		
4		
	uluery	
	In the second seco	
-	⊞- <u>⊡</u> Templates	
8		
18		
i€		
1		
		100
		4
		-
		F
		-
2	ame 2021 CC IV 11188 (CC)	
		1
	(V) (X)	AL
1		2

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 (s. Abb. 2)



Abb. 2: Anwendung der Color Compensation

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
2021-09-09	Vorversion
2022-02-03	Generelle Überarbeitung: 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen

10. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

IVD	In-vitro-Diagnostikum
Ĩ	Gebrauchsanweisung beachten
LOT	Chargennummer
	verwendbar bis
×	Lagertemperatur
REF	Artikelnummer
∑	Anzahl Tests
<u>سا</u>	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Blank	Leerwert
Dye 1	Farbstoff 1
Dye 2	Farbstoff 2
Dye 3	Farbstoff 3
Dye 4	Farbstoff 4
Dye 5	Farbstoff 5