

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Γερμανία \$\$\screwtcolored{c}\$+49 (0) 61 51 81 02-0 / \$\$\lefter{a}\$+49 (0) 61 51 81 02-20 / \$\$\$\$ www.r-biopharm.com

1. Προβλεπόμενη χρήση

Για διαγνωστική *in vitro* χρήση. Το RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση χρωμάτων σε κύκλους λειτουργίας της δοκιμασίας RIDA[®]GENE real-time PCR 2-plex και άνω στον αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ. Το RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή ενός αρχείου αντιστάθμισης χρωμάτων που επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με τις δοκιμασίες RIDA[®]GENE real-time PCR 2-plex και άνω στον αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες.

2. Περίληψη και επεξήγηση της δοκιμασίας

Στην PCR πραγματικού χρόνου, το σήμα φθορισμού που εκπέμπεται από μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς μπορεί να επικαλύπτει ένα παρακείμενο χρωματικό κανάλι, και με τον τρόπο αυτό να παράγεται σήμα (παρεμβολή, crosstalk). Η παρεμβολή από σήματα φθορισμού μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα εάν δεν πραγματοποιεί διόρθωση βάσει ενός αρχείου αντιστάθμισης (compensation) χρωμάτων. Ένα αρχείο αντιστάθμισης χρωμάτων μπορεί να αντισταθμίσει την παρεμβολή μεταξύ χρωματικών καναλιών.

3. Αρχές της δοκιμασίας

Το RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση χρωμάτων σε κύκλους λειτουργίας της δοκιμασίας RIDA[®]GENE real-time PCR 2-plex και άνω σε αναλυτή LightCycler[®] 480 II.

4. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Πίνακας 1:	Παρεχόμενα αντιδραστήρια (Τα αντιδραστήρια που παρέχονται μαζί με το
	κιτ επαρκούν για 3 κύκλους αντιστάθμισης χρωμάτων.)

Κωδικός κιτ	Αντιδραστήριο	Ποσότητα		Χρώμα καλύμματος
1	Blank	1 ×	400 µL	λευκό, έτοιμο για χρήση
2	Dye 1	1 ×	400 µL	μπλε, έτοιμο για χρήση
3	Dye 2	1 ×	400 µL	πράσινο, έτοιμο για χρήση
4	Dye 3	1 ×	400 µL	κίτρινο, έτοιμο για χρήση
5	Dye 4	1 ×	400 µL	πορτοκαλί, έτοιμο για χρήση
6	Dye 5	1 ×	400 µL	κόκκινο, έτοιμο για χρήση

5. Οδηγίες αποθήκευσης

- Ακολουθήστε τις οδηγίες χειρισμού που φαίνονται στον Πίνακα 2 και αποθηκεύστε το κιτ αμέσως μετά τη χρήση, σύμφωνα με τις πληροφορίες που αναγράφονται.
- Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -16 °C έως -28 °C και, εάν δεν ανοιχτούν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως την ημερομηνία λήξης που είναι εκτυπωμένη στην ετικέτα. Μετά την ημερομηνία λήξης, η εγγύηση ποιότητας παύει να ισχύει.
- Όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποψύχονται προσεκτικά πριν τη χρήση (π.χ. σε ψυγείο στους 2 8 °C).
- Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης έως και 3 φορές δεν επηρεάζουν τις ιδιότητες της δοκιμασίας.
- Διατηρείτε όλα τα αντιδραστήρια σε χαμηλή θερμοκρασία κατά την προετοιμασία της PCR (2 - 8 °C).

	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Μέγιστος χρόνος αποθήκευσης
μη ανοιγμένη συσκευασία	-16 °C με -28 °C	Μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως την τυπωμένη ημερομηνία λήξης
ανοιγμένη συσκευασία	-16 °C με -28 °C	3 κύκλοι κατάψυξης/απόψυξης

Πίνακας 2: Συνθήκες φύλαξης και πληροφορίες

6. Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα αντιδραστήρια

6.1 Αντιδραστήρια

Κανένα.

6.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Για τη διενέργεια της δοκιμασίας RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV απαιτείται ο παρακάτω εξοπλισμός:

Εξοπλισμός

Όργανο PCR πραγματικού χρόνου: LightCycler[®] 480 II (Roche)

Αναλώσιμα PCR πραγματικού χρόνου [πλάκες (χαμηλό προφίλ, λευκά βοθρία, διαυγές πλαίσιο), φιαλίδια αντίδρασης, μεμβράνες]

Φυγόκεντρος με ρότορες για πλάκες / φιαλίδια αντίδρασης

Αναδευτήρας vortex

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

Μύτες πιπέτας με φίλτρο

Γάντια μιας χρήσης χωρίς πούδρα

Για ερωτήσεις, επικοινωνήστε με την R-Biopharm AG στη διεύθυνση pcr@r-biopharm.de.

7. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για τους χρήστες

Αποκλειστικά για διαγνωστική in vitro χρήση.

Αυτή η δοκιμασία πρέπει να διεξάγεται μόνο από πιστοποιημένο προσωπικό εργαστηρίου. Τηρείτε τις οδηγίες σχετικά με την εργασία σε ιατρικά εργαστήρια.

Τηρείτε πάντα αυστηρά τις οδηγίες χρήσης του εγχειριδίου για τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμασίας.

Μην μεταφέρετε μέσω πιπέτας δείγματα ή αντιδραστήρια χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Αποφύγετε την επαφή με δέρμα που παρουσιάζει τραύματα και βλεννογόνους υμένες. Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό ατομικής προστασίας (κατάλληλα γάντια, εργαστηριακή ποδιά, προστατευτικά γυαλιά) κατά τον χειρισμό αντιδραστηρίων και δειγμάτων και πλένετε τα χέρια μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας.

Μην καπνίζετε, τρώτε ή πίνετε σε χώρους όπου γίνεται χειρισμός δειγμάτων.

Προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση και ψευδώς θετικά αποτελέσματα διαχωρίστε τα δωμάτια όπου εργάζεστε, διατηρείτε ειδικό ρουχισμό και ειδικά μηχανήματα για την απομόνωση, την προετοιμασία και την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR.

Τα κλινικά δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται ως πιθανώς μολυσματικά και θα πρέπει να απορρίπτονται κατάλληλα, όπως και όλα τα αντιδραστήρια και τα υλικά που έρχονται σε επαφή με δείγματα τα οποία χαρακτηρίζονται ως πιθανώς μολυσματικά.

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ μετά την ημερομηνία λήξης. Οι χρήστες είναι υπεύθυνοι για τη δέουσα απόρριψη όλων των αντιδραστηρίων και των υλικών μετά τη χρήση. Εφαρμόστε τους εθνικούς κανονισμούς για τη διαδικασία απόρριψης.

Μπορείτε να βρείτε περαιτέρω λεπτομέρειες για το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheet, SDS) με τον κωδικό προϊόντος στη διεύθυνση https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Για τους χρήστες στην Ευρωπαϊκή Ένωση: Αναφέρετε όλες τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το προϊόν στην R-Biopharm AG και τις αρμόδιες κρατικές αρχές.

8. Πρωτόκολλο για τη δημιουργία αρχείου αντιστάθμισης χρωμάτων στον αναλυτή LightCycler[®] 480 II

8.1 Προετοιμασία αντιστάθμισης χρωμάτων

Αποψύξτε, αναμίξτε, και φυγοκεντρήστε σύντομα τα αντιδραστήρια πριν από τη χρήση. Διατηρείτε πάντα δροσερά τα αντιδραστήρια κατά τα βήματα εργασίας (2 έως -8 °C). Για έναν κύκλο αντιστάθμισης χρωμάτων, μεταφέρετε με πιπέτα υλικά για πέντε αντιδράσεις με 20 μL από κάθε χρώμα συμπεριλαμβανομένου του υποβάθρου (blank) σε μία πλάκα μικροτιτλοδότησης (βλ. Εικ.1).



Εικόνα 1: Σχεδιάγραμμα για αντιστάθμιση χρωμάτων σε αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ.

Κωδικός κιτ	Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Μεταφέρετε με πιπέτα 20 μL από το κάθε αντιδραστήριο στα παρακάτω βοθρία
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

Πίνακας 3: Προετοιμασία για αντιστάθμιση χρωμάτων στον αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ

Αφού μεταφέρετε με πιπέτα τα αντιδραστήρια, σφραγίστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης με διάφανη μεμβράνη και φυγοκεντρήστε, εάν είναι εφικτό. Ξεκινήστε την PCR πραγματικού χρόνου σύμφωνα με τις ρυθμίσεις της συσκευής.

8.2 Ρύθμιση του οργάνου PCR

1. Αφού εκκινήσετε το λογισμικό, κάνετε κλικ στο εικονίδιο "**Tools**" για να προγραμματίσετε το detection format (βλ. την παρακάτω εικόνα).



Υπόδειξη: Συνδεθείτε στο λογισμικό ως διαχειριστής για να ρυθμίσετε το detection format.

2. Ανοίγει το παρακάτω παράθυρο. Στο παράθυρο Εργαλεία, επιλέξτε "Detection Formats". Κάνετε κλικ στο πλήκτρο "New" για να δημιουργήσετε ένα νέο detection format (βλ. Πίν. 4) και αποθηκεύστε το ως "RIDA®GENE" (βλ. την παρακάτω εικόνα).



Πίνακας 4: Ρύθμιση καναλιών ανίχνευσης για τον αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ

Συνδυασμός φίλτρων
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Υπόδειξη: Ορίστε τις τιμές του Quant Factor, Melt Factor και Integration Time στο 1 (προεπιλογή).

Επιλέξτε "Close" για να μεταβείτε στο παράθυρο Εργαλεία.

3. Αφού προγραμματίσετε το detection format, επιλέξτε "New Experiment" (βλ. την παρακάτω εικόνα).



4. Επιλέξτε το detection format "RIDA[®]GENE" και εισάγετε όγκο αντίδρασης of 20 μL (προεπιλογή) (βλ. την παρακάτω εικόνα).

Window:	New Experiment			<u>ب</u>	User: System Admin	
Experi-	[Run Protocol	Data		Run Notes	
ment	Detection Format RIDA@GENE			Customize Block Size	96 Plate ID Reaction Volum	20 🚖
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID		

5. Προγραμματίστε το θερμικό προφίλ (βλ. Πίν. 5).

Πίνακας 5: Θερμικό προφίλ

		Temperature targets							
Program	Cycles / Analysis Mode	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°c/s]				
Initial Denat.	1 / none	95	none	12:00:30 πµ	4,4				
O valia a	5 / Quantification	95	none	12:00:15 πµ	4,4				
Cycling	5 / Quantinication	60	single	12:00:30 πμ	2,2				
		95	none	12:00:01 πµ	4,4				
TM Analysis	1 / Color Componention	50	none	12:00:30 πμ	2,2				
		70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*				

Υπόδειξη: Βεβαιωθείτε ότι οι αριθμοί "Cycles" και "Analysis Mode" είναι σωστοί.

* Ο ρυθμός μεταβολής μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς ανάλογα με το detector format που έχει επιλεγεί.

6. Αφού ολοκληρωθεί ο προγραμματισμός, το πείραμα θα πρέπει να μοιάζει ως εξής (βλ. την παρακάτω εικόνα).



7. Για να προγραμματίσετε τη διαμόρφωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης, μεταβείτε στον "Subset Editor". Κάνετε κλικ στο εικονίδιο "Plus" για να δημιουργήσετε νέο υποσύνολο και εισάγετε όνομα για τη διαμόρφωση (λ.χ., Color Compensation). Πατήστε παρατεταμένα το πλήκτρο Ctrl και αριστερό κλικ και επισημάνετε όλα τα βοθρία της πλάκας μικροτιτλοδότησης που περιέχουν αντιδραστήρια (βλ. Εικ. 1 και 2). Επιλέξτε "Apply" για να ολοκληρώσετε το υποσύνολο. Η οθόνη θα πρέπει να φαίνεται ως εξής (βλ. την παρακάτω εικόνα).

Instrume	strument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Research)										Boche						
Window:	idow: New Experiment User: System Admin																
Francis	Subsets		New Subset	1 settings													T ED
Subset Editor	ID Name Analysis Report 2 Color Compensati Image: Color Color Compensati Image: Color Color Color Compensati Image: Color Color Compensati			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	×	
Sample Editor			A														
Analysis			в														
Report			c														
			D							-						÷	€ Ø
			E														L L
			F														5
			G														
			н													Ī	-
	Apply Template																
\triangle	A Warning 13.01.2021 15:21:61 Please activate an instrument before setting up a new run. 100 100 A Warning 13.01.2021 15:21:64 Please activate an instrument before setting up a new run. 100 100																

8. Μεταβείτε στον "Sample Editor". Από το Βήμα 1: "Select Workflow" επιλέξτε "Color Comp" Αντιστάθμιση χρωμάτων. Στο Βήμα 2: "Select Samples", επιλέξτε το υποσύνολο που ορίσατε προηγουμένως (Color Compensation). Για να ολοκληρώσετε τη διαμόρφωση, επιλέξτε το αντίστοιχο κύριο κανάλι για κάθε αντιδραστήριο (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) στο πεδίο "Dominant Channel" (βλ. Πίν. 6). Επιλέξτε "Water" για τις αντιδράσεις με χρώμα υποβάθρου (Blank) (βλ. την παρακάτω εικόνα).

Instrument	t: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Conne	ected					Database:	My Computer (Rese	arch)	Ranha
Window:	New Experiment					-	User:	System Admin		Indenie
Experiment	Step 1: Select Workflow Abs Quant C Rel Quant C Scanning (* C Tm C Melt Geno C Endpt Geno	Color Comp	Select Filter Combin	ations i10 F 533-580	₽ 533.610 ₽ 618.660				Abs Quant	2)
Subset Editor	Step 2: Select Samples	'o Color	Repl Of Sample Name	Dominant Channel						67
Sample Editor	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 X	B C D	Blank Blank Blank	Water • Water Water						뮲
Analysis		2 7 8	Blank Blank Dye 1	Water Water 440-488						•
Report		C D E	Dye 1 Dye 1 Dye 1	440-488 440-488 440-488						
Sum.	Dominant Channel	F B C	Dye 1 Dye 2 Dye 2	440-488 465-510 465-510						A
	533-580 533-610 618-660	E	Dye 2 Dye 2 Dye 2	465-510 465-510 465-510						Ň
		C	Dye 3 Dye 3 Dye 3	533-580 533-580 533-580						n.
		8 BD	Dye 3 Dye 3 Dye 4	533-580 533-580 533-610						
		D.D E:D	Dye 4 Dye 4 Dye 4	533-610 533-610 533-610						51
		F.D BLD CLD	Dye 4 Dye 5 Dye 5	533-610 618-660 618-660						
	Step 3: Edit Color Comp Properties	D.2 E1 F11	Dye 5 Dye 5 Dye 5	618-660 618-660 618-660						
	Sample Name Dominant channel Make Replicates									
	Apply Configure Toggle Vie Properties (Table)	**						Reset All Im	port Export	
	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please ac ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please ac	stivate an ins stivate an ins	trument before setti: trument before setti:	ng up a new r ng up a new r	un. un.				100 🔺 100 🗸	0

Πίνακας 6:	Ρυθμίσεις κύριου	καναλιού για τα	αντιδραστήρια	(LightCycler [®]	480 II)
------------	------------------	-----------------	---------------	---------------------------	---------

Αντιδραστήριο	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. Τοποθετήστε την πλάκα με τα αντιδραστήρια που έχετε προετοιμάσει στην συσκευή. Επιλέξτε "Experiment" και μετά "Start Run" για να ξεκινήσετε το πείραμα (βλ. την παρακάτω εικόνα).



8.3 Αξιολόγηση και δημιουργία ενός αρχείου αντιστάθμισης χρωμάτων

 Αφού ολοκληρώσετε το πείραμα στον αναλυτή LightCycler[®] επιλέξτε "Analysis" (βλ. την παρακάτω εικόνα).



2. Στο πλαίσιο διαλόγου "Create New Analysis", μεταβείτε στο "Color Compensation". Επιλέξτε και επιβεβαιώστε το κατάλληλο υποσύνολο (λ.χ. Color Compensation) στο πλαίσιο διαλόγου που εμφανίζεται (βλ. την παρακάτω εικόνα).



3. Ανοίγει η ανάλυση· επιλέξτε "**Calculate**" και μετά " **Save CC Object**" (βλ. την παρακάτω εικόνα).



4. Αποθηκεύστε το αρχείο αντιστάθμισης χρωμάτων "RIDA®GENE CCIV" στον φάκελο "CCC" (βλ. την παρακάτω εικόνα).

Save Color Compensation	
P-Se Boot	
B Sustem Admin	
Macros	
Preferences	
Mek Std	
Query	
Std Curve	
E Templates	
Name 2001 CC TV 11188 (CC)	
Mame 2021 CC 1V 11100 (CC)	
Blank	

Το αρχείο είναι πλέον διαθέσιμο για άλλα πειράματα στον αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ. Η δημιουργία ενός αρχείου αντιστάθμισης χρωμάτων έχει ολοκληρωθεί.

8.4 Χρήση του αρχείου αντιστάθμισης χρωμάτων

Για να χρησιμοποιήσετε το αρχείο αντιστάθμισης χρωμάτων, ανοίξτε τη δοκιμασία RIDA®GENE real-time PCR που επιθυμείτε και φορτώστε την επιθυμητή αντιστάθμιση χρωμάτων που βρίσκεται στην επιλογή "**Experiment**" "**Data**". Στο μενού ολίσθησης Αντιστάθμιση χρωμάτων (απενεργοποιημένη), "**Color Comp (Off)"**, επιλέξτε "**in Database**" και μετά το αποθηκευμένο αρχείο αντιστάθμισης χρωμάτων (βλ. Εικ.2).



Εικόνα 2: Χρήση της Color Compensation

Όταν είναι επιλεγμένη η αντιστάθμιση χρωμάτων, το πλήκτρο "Color Comp (Off)" αλλάζει σε "Color Comp (On)". Η επιλεγμένη αντιστάθμιση χρωμάτων εφαρμόζεται αυτόματα σε όλα τα φίλτρα της ανάλυσης. Η δοκιμασία RIDA®GENE real-time PCR μπορεί πλέον να αναλυθεί ως συνήθως.

Υπόδειξη: Το αρχείο αντιστάθμισης χρωμάτων είναι εξειδικευμένο για κάθε αναλυτή LightCycler[®] 480 ΙΙ. Εάν η συσκευή αλλαχθεί ή εάν επισκευασθεί η οπτική μονάδα απαιτείται νέο αρχείο αντιστάθμισης χρωμάτων.

9. Ιστορικό εκδόσεων

Αριθμός έκδοσης	Ενότητα και ονομασία
2021-09-09	Προηγούμενη έκδοση
2022-02-03	Γενική αναθεώρηση: 4. Παρεχόμενα αντιδραστήρια 5. Οδηγίες αποθήκευσης 6. Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα αντιδραστήρια 7. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για τους χρήστες

10. Επεξήγηση συμβόλων

Γενικά σύμβολα

IVD	Διαγνωστικό <i>in vitro</i>	
i	Ακολουθήστε το εγχειρίδιο λειτουργίας	
LOT	Αριθμός παρτίδας	
X	Χρήση πριν από	
X	Θερμοκρασία αποθήκευσης	
REF	Κωδικός προϊόντος	
∑ ∑ ∕	Αριθμός δοκιμασιών	
\sim	Ημερομηνία παραγωγής	
	Κατασκευαστής	

Ειδικά σύμβολα δοκιμασίας

Blank	Τυφλό
Dye 1	Χρωστική 1
Dye 2	Χρωστική 2
Dye 3	Χρωστική 3
Dye 4	Χρωστική 4
Dye 5	Χρωστική 5