

RIDA® GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV se utiliza para la calibración del color de las corridas de PCR en tiempo real de dos analitos (2-plex) y más de RIDA®GENE real-time PCR en el LightCycler® 480 II. El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV puede utilizarse para generar un archivo de compensación de color que permita el análisis de ensayos de PCR en tiempo real cualitativos y cuantitativos de dos analitos (2-plex) y más de RIDA®GENE real-time PCR en el LightCycler® 480 II.

El producto está previsto para uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

En una PCR en tiempo real, la señal fluorescente emitida de un colorante fluorescente indicador puede superponerse a un canal de color adyacente y generar así una señal (diafonía). La diafonía de las señales fluorescentes puede causar resultados incorrectos a menos que se realice una corrección mediante un archivo de compensación de color. Un archivo de compensación de color puede compensar la diafonía entre los canales de color.

3. Principio del ensayo

El RIDA®GENE Color Compensation Kit IV se utiliza para la calibración del color de las corridas de PCR en tiempo real de dos analitos (2-plex) y más de RIDA®GENE en el LightCycler® 480 II.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 3 corridas de compensación de color).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Blank	1 ×	400 µL	blanco, listo para usar
2	Dye 1	1 ×	400 µL	azul, listo para usar
3	Dye 2	1 ×	400 µL	verde claro, listo para usar
4	Dye 3	1 ×	400 µL	amarillo, listo para usar
5	Dye 4	1 ×	400 µL	naranja, listo para usar
6	Dye 5	1 ×	400 µL	rojo, listo para usar

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a una temperatura de entre -16 °C y -28 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (por ejemplo, en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- La congelación y descongelación repetida hasta 3 veces no afecta a las propiedades de la prueba.
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 - 8 °C).

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de almacenamiento	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-16 °C a -28 °C	Puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa
abierto	-16 °C a -28 °C	3 ciclos de descongelación y congelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1 Reactivos

Ninguna.

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar la prueba RIDA®GENE Color Compensation Kit IV:

Equipo
Equipo de PCR en tiempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
Consumibles para PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], viales de reacción, cubiertas de plástico)
Centrífuga con rotor para placas/viales de reacción
Mezclador vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

Si tiene preguntas, póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el uso diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Deben utilizarse salas diferentes, ropa especial y equipos para la extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha para evitar la contaminación cruzada y los resultados falsos positivos.

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad. Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) bajo el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

8. Protocolo para generar un archivo de compensación de color en el LightCycler® 480 II

8.1 Preparación de la compensación de color

Descongele, mezcle y centrifugue brevemente los reactivos antes de utilizarlos. Refrigere siempre todos los reactivos durante las etapas del trabajo (2 °C a -8 °C). Para una corrida de compensación de color, agregue cinco reacciones con 20 µL de cada colorante, incluido el fondo (Blank) en una placa de microtitulación (consulte la figura 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D		BLANK		DYE 1		DYE 2		DYE 3		DYE 4		DYE 5
E												
F												
G												
H												

Figura 1: Esquema de pipeteo para la compensación de color en el LightCycler® 480 II.

Tabla 3: Preparación de la compensación de color LightCycler® 480 II

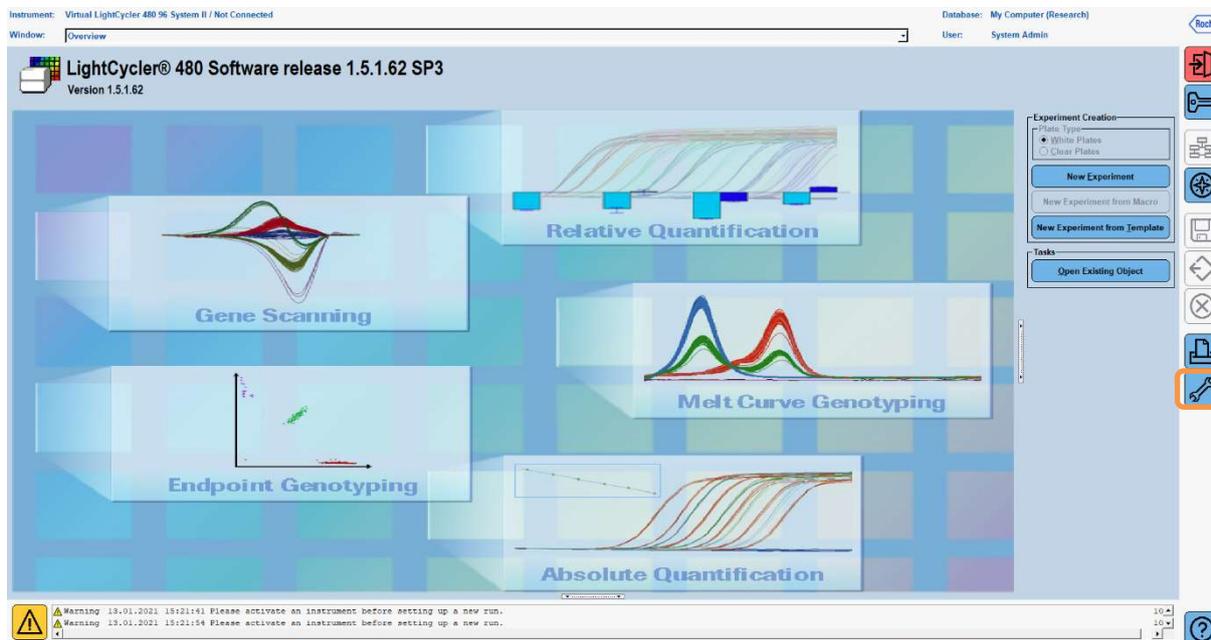
Código del kit	Reactivo	Cantidad por reacción	Agregar 20 µL en cada uno de los siguientes pocillos
1	Blank	20 µL	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µL	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µL	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µL	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µL	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µL	B12, C12, D12, E12, F12

Después de agregar los reactivos, selle la placa de microtitulación con aluminio óptico y centrifugue si es posible. Inicie la PCR en tiempo real de acuerdo con la configuración del dispositivo.

8.2 Configuración del equipo de PCR

Nota: Inicie sesión en el software como administrador para configurar el formato de detección.

1. Tras abrir el software, haga clic en el icono "**Tools**" para programar el formato de detección (consulte la figura siguiente).



2. Se abre la siguiente ventana. En la ventana Tools, seleccione "**Detection Formats**". Pulse el botón "**New**" para crear un nuevo formato de detección (consulte la tabla 4) y guárdelo como "**RIDA®GENE**" (consulte la figura siguiente).

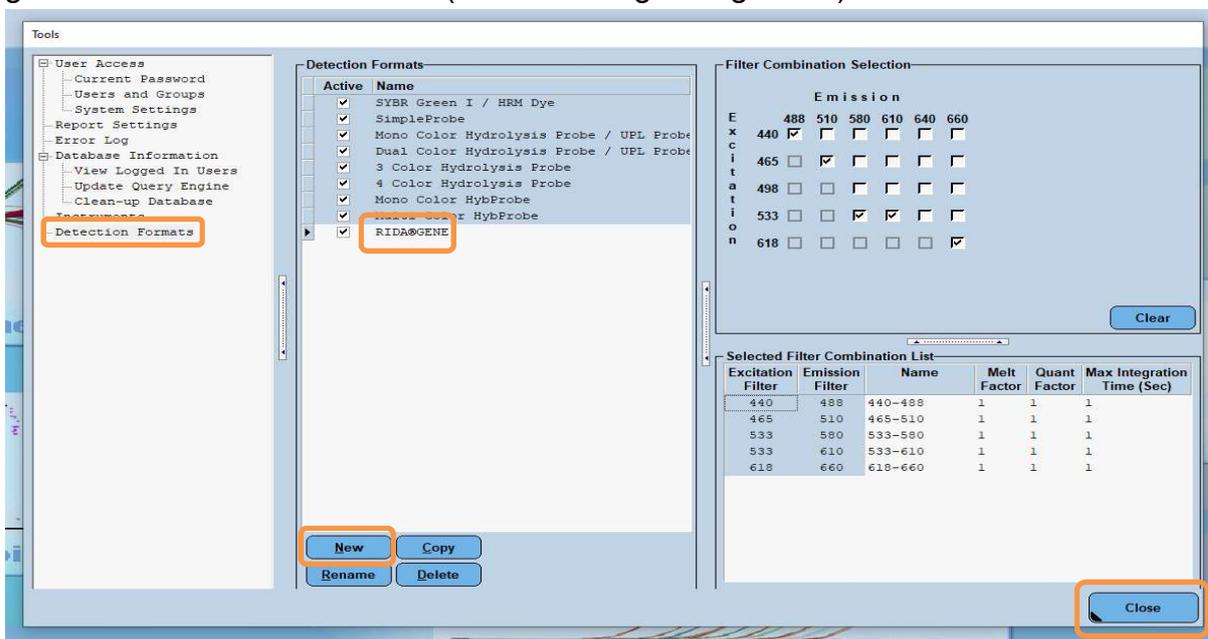


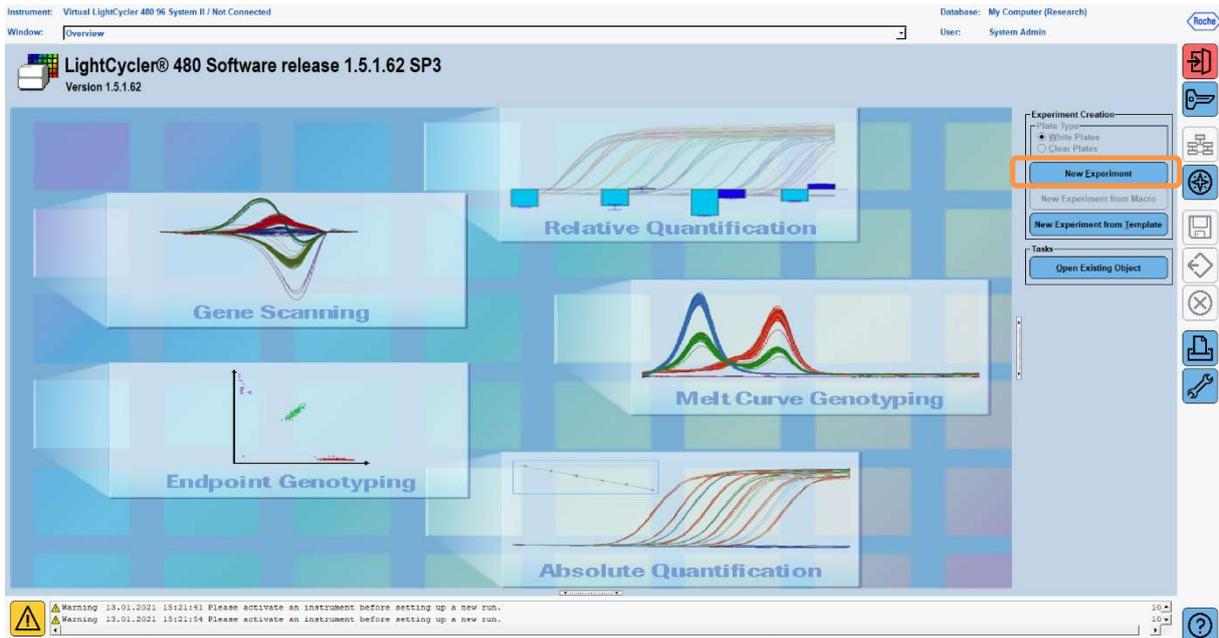
Tabla 4: Configuración del canal de detección para el LightCycler® 480 II

Combinación de filtros
440/488
465/510
533/580
533/610
618/660

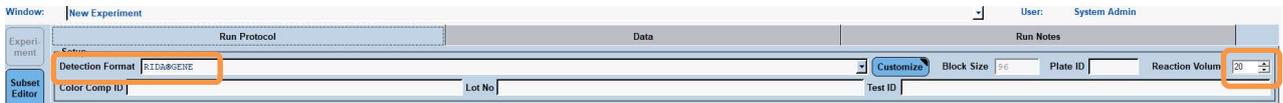
Nota: Ajuste el valor de Quant Factor, Melt Factor y Integration Time a 1 (predeterminado).

Haga clic en el botón "**Close**" para salir de la ventana Tools.

3. Después de programar el formato de detección, haga clic en el botón "New Experiment" (consulte la figura siguiente).



4. Seleccione el formato de detección "RIDA®GENE" e introduzca un volumen de reacción de 20 µL (predeterminado) (consulte la figura siguiente).



5. Programe el perfil térmico (consulte la tabla 5).

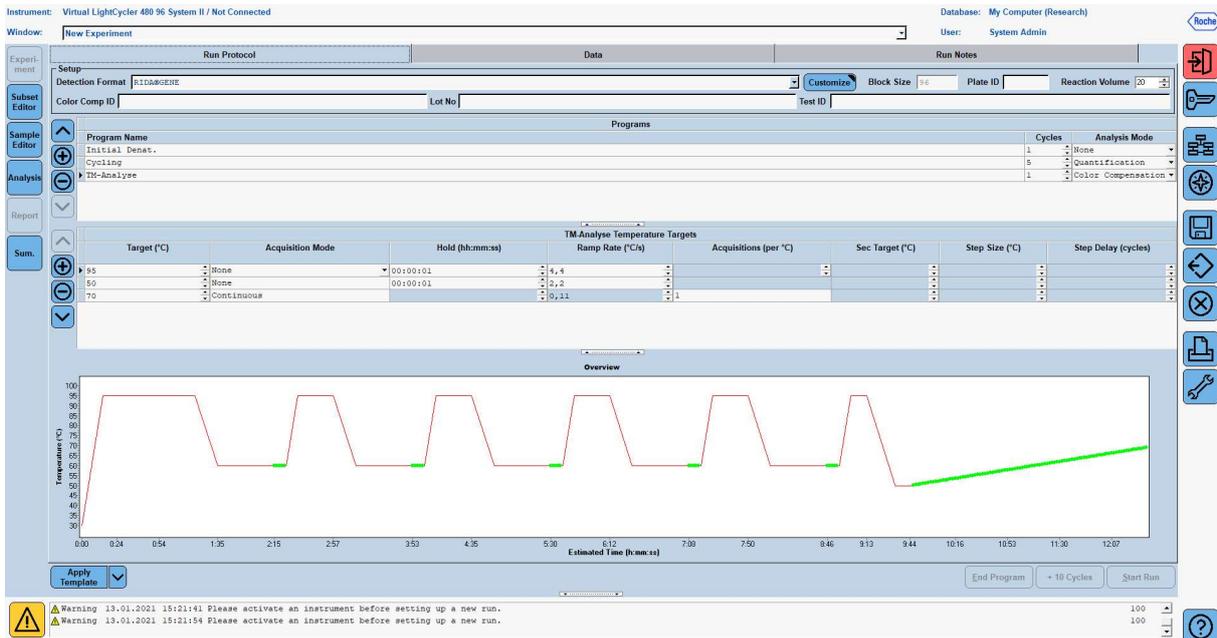
Tabla 5: Perfil térmico

Program	Cycles / Analysis Mode	Temperature targets			
		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
		60	single	00:00:30	2.2
TM Analysis	1 / Color Compensation	95	none	00:00:01	4.4
		50	none	00:00:30	2.2
		70	continuous		Acquisitions (per °C) = 10.14*

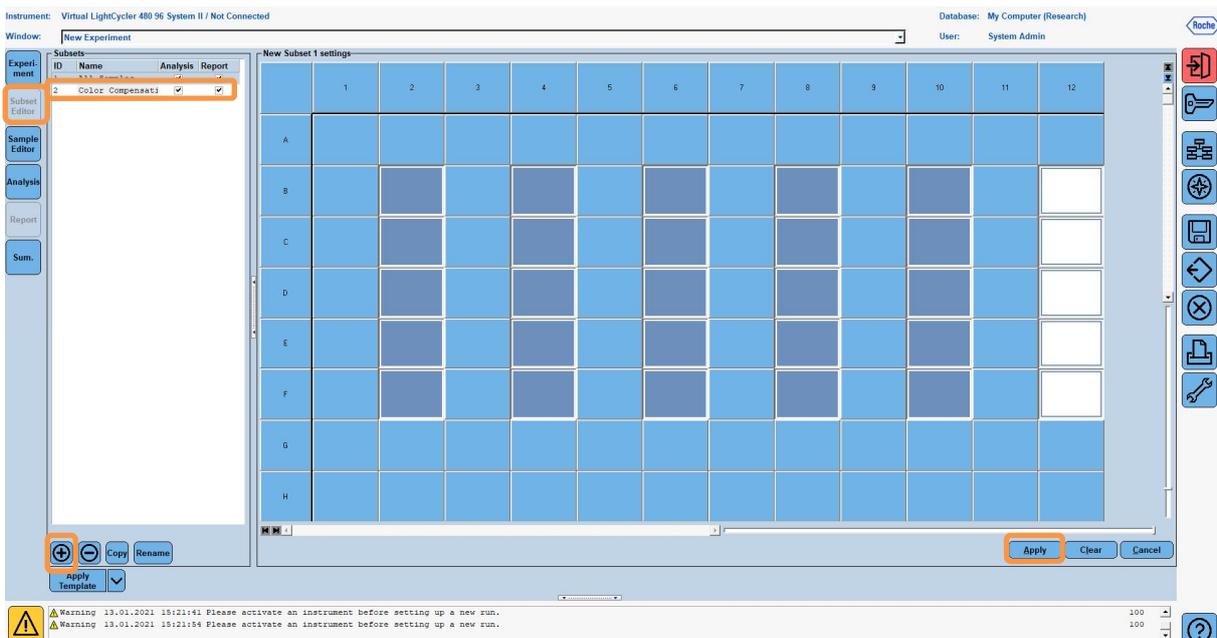
Nota: Asegúrese de que el número de "Cycles" y el "Analysis Mode" sean correctos.

* La velocidad de rampa puede variar ligeramente en función del formato de detector seleccionado.

6. Una vez terminada la programación, el experimento debería tener el siguiente aspecto (consulte la siguiente figura).



7. Para programar la disposición de la placa de microtitulación, pase al **"Subset Editor"**. Haga clic en el icono **"Plus"** para crear un nuevo subconjunto e introduzca un nombre para la disposición (por ejemplo, Color Compensation). Mantenga pulsada la tecla Ctrl y el botón izquierdo del ratón y marque todos los pocillos que contengan reactivos en la placa de microtitulación (consulte las figuras 1 y 2). Haga clic en el botón **"Apply"** para finalizar el subconjunto. La pantalla debería aparecer de la siguiente manera (consulte la siguiente figura).



8. Pase al **"Sample Editor"**. Del paso 1: **"Select Workflow"**, elija **"Color Comp"**. En el paso 2: **"Select Samples"**, elija el subconjunto previamente establecido (Color Compensation). Para finalizar la disposición, seleccione el canal dominante correspondiente para cada reactivo (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) en el campo **"Dominant Channel"** (consulte la tabla 6). Seleccione **"Water"** para las reacciones con el fondo de color (Blank) (consulte la figura siguiente).

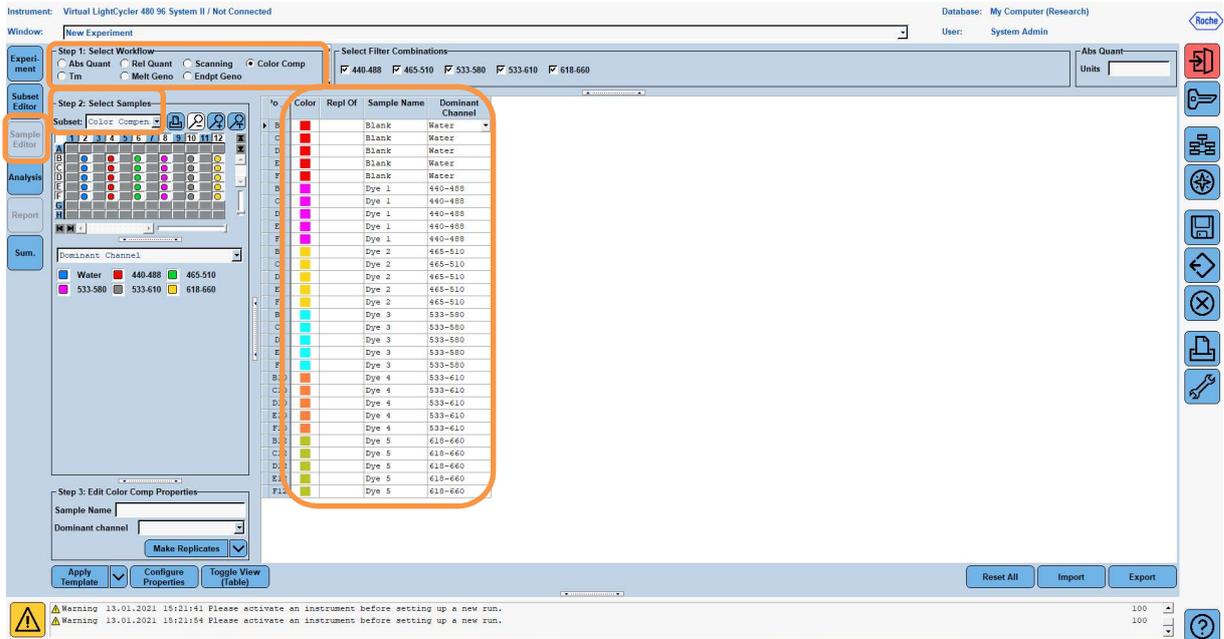


Tabla 6: Ajustes del canal dominante para los reactivos (LightCycler® 480 II)

Reactivo	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. Coloque la placa con las reacciones preparadas en el dispositivo. Haga clic en "Experiment" y luego en "Start Run" para iniciar el experimento (consulte la figura siguiente).

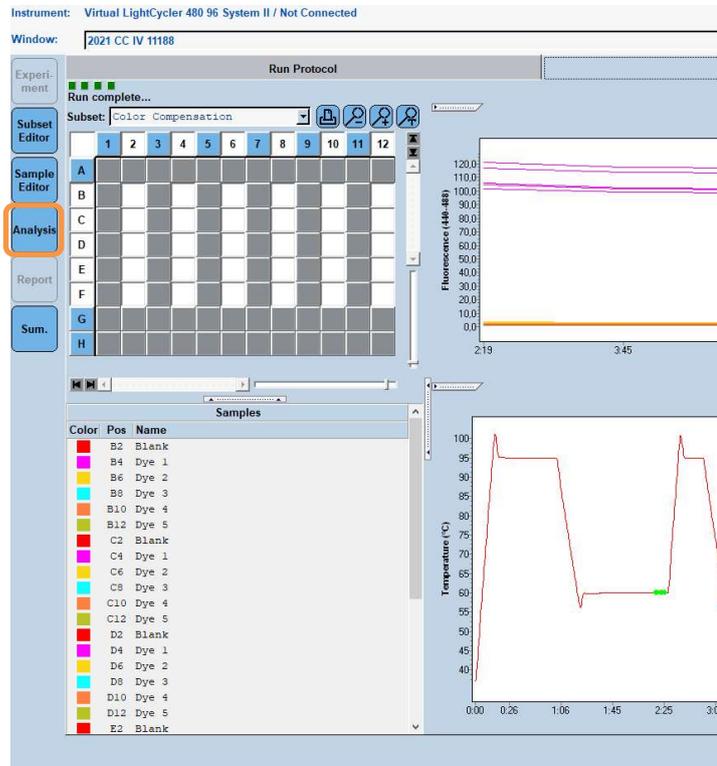
The screenshot displays the software interface for a Virtual LightCycler 480 96 System II. The 'Experiment' tab is highlighted in orange. Below it, the 'TM-Analyze' program is configured with the following parameters:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	TM-Analyze Temperature Targets Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:01	4,4				
50	None	00:00:01	2,2				
70	Continuous		0,11	1			

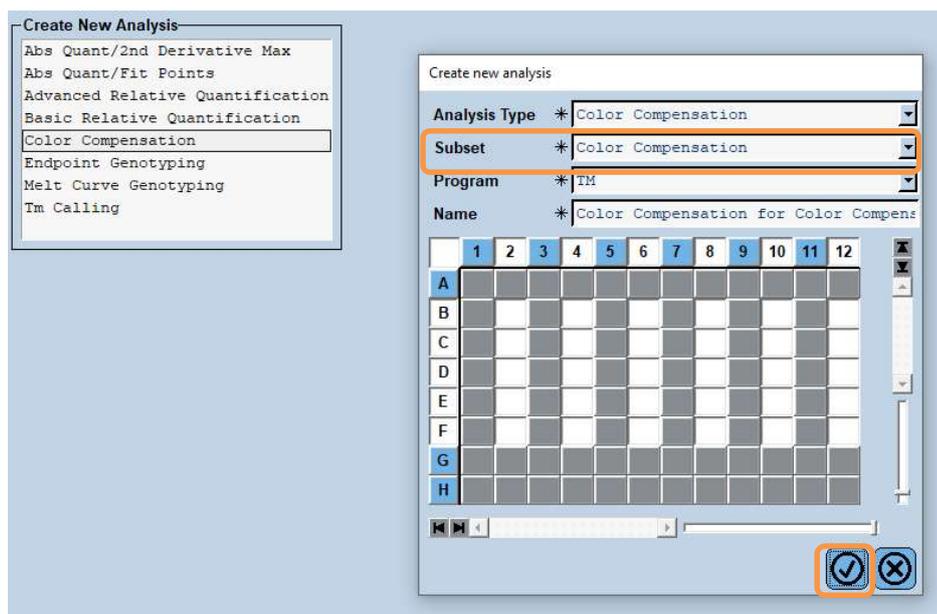
The 'Overview' graph shows a temperature profile starting at 30°C, ramping up to 95°C, holding for 1 second, ramping down to 50°C, holding for 1 second, ramping up to 70°C, and then continuing with a series of smaller ramps and holds. The x-axis represents 'Estimated Time (h:mm:ss)' from 0:00 to 12:07, and the y-axis represents 'Temperature (°C)' from 30 to 100. The 'Start Run' button at the bottom right is highlighted in orange.

8.3 Evaluación y creación de un archivo de compensación de color

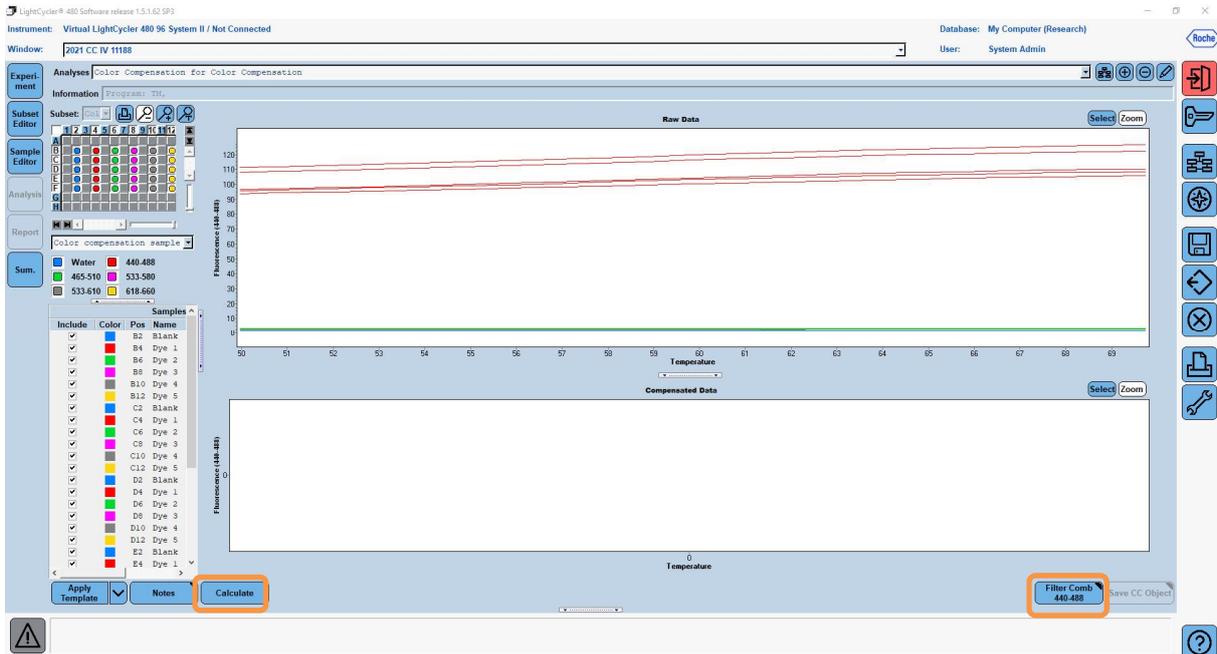
1. Una vez completado el experimento con el LightCycler®, haga clic en el botón "Analysis" (consulte la figura siguiente).



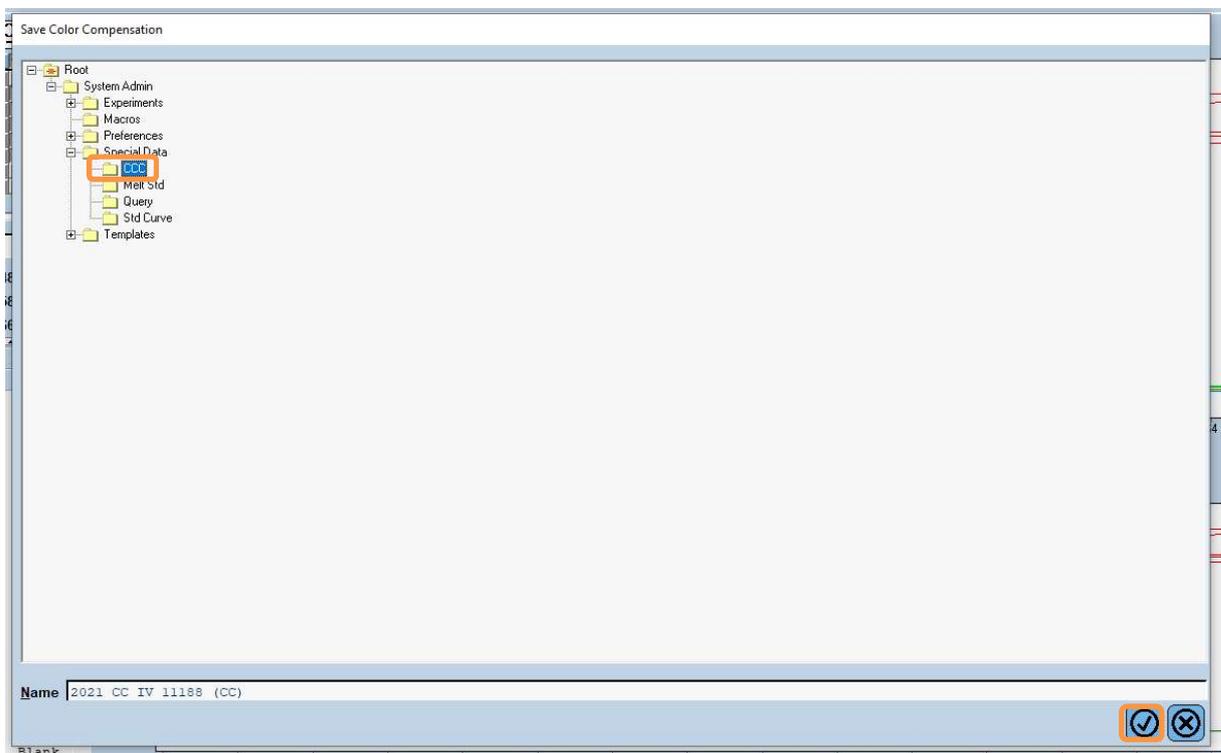
2. En el cuadro de diálogo "Create New Analysis", vaya a "Color Compensation". Seleccione y confirme el subconjunto adecuado (por ejemplo, Color Compensation) en el cuadro de diálogo que se abre (consulte la figura siguiente).



3. Se abre el análisis; haga clic en "**Calculate**" y luego en "**Save CC Object**" (consulte la figura siguiente).



4. Guarde el archivo de compensación de color como "**RIDA®GENE CCIV**" en la carpeta "**CCC**" (consulte la figura siguiente).



Este archivo está entonces disponible para otros experimentos con el LightCycler® 480 II. La generación del archivo de compensación de color finalizó.

8.4 Uso del archivo de compensación de color

Para utilizar el archivo de compensación de color, abra el experimento de RIDA®GENE real-time PCR en cuestión y cargue la compensación de color deseada en "**Experimento**" "**Datos**". En el menú desplegable "**Color Comp (Off)**", seleccione "**in Database**" (En la base de datos) y, a continuación, el archivo de compensación de color guardado (consulte la figura 2).

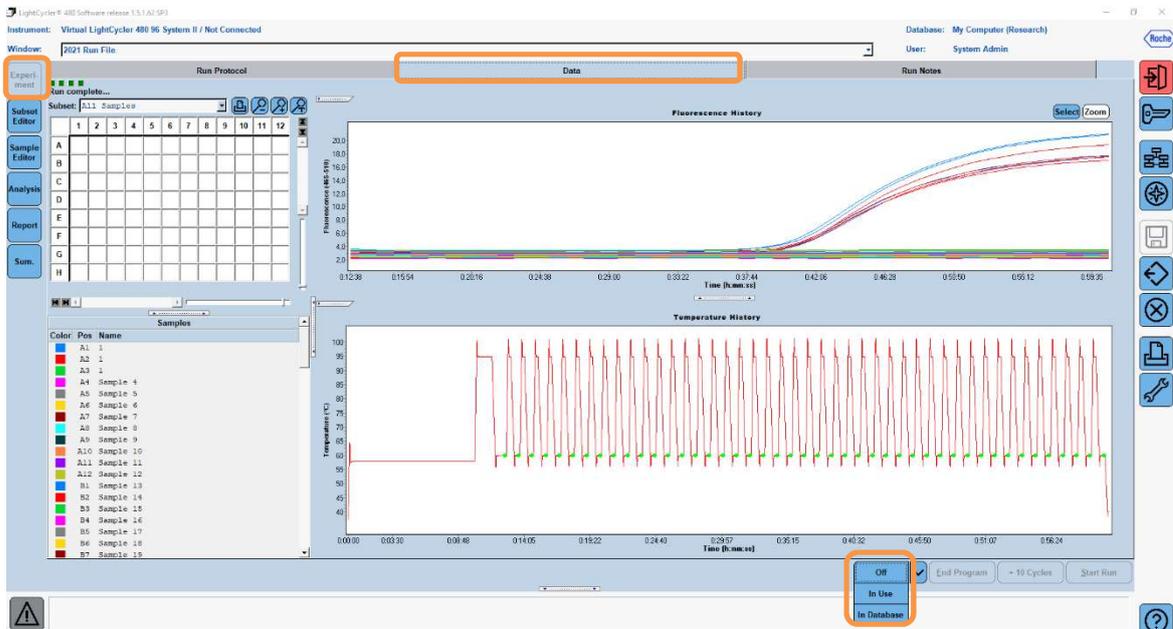


Figura 2: Uso de la compensación de color

Cuando se selecciona la compensación de color, el botón "**Color Comp (Off)**" cambia a "**Color Comp (On)**". La compensación de color seleccionada se aplica automáticamente a todos los filtros del análisis. La corrida de RIDA®GENE real-time PCR puede analizarse ahora como de costumbre.

Nota: El archivo de compensación de color es específico para cada LightCycler® 480 II. Se necesita un nuevo archivo de compensación de color si se cambia el dispositivo o se repara la unidad óptica.

9. Historial de versiones

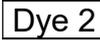
Número de versión	Sección y designación
2021-09-09	Versión anterior
2022-02-03	Revisión general: 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos necesarios no suministrados 7. Advertencias y precauciones para los usuarios

10. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Observe el manual de funcionamiento
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Blanco
	Colorante 1
	Colorante 2
	Colorante 3
	Colorante 4
	Colorante 5