

RIDA® GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. RIDA®GENE Color Compensation Kit IV viene usato per la calibrazione del colore in cicli di RIDA®GENE real-time PCR 2-plex e superiori su LightCycler® 480 II. RIDA®GENE Color Compensation Kit IV può essere utilizzato per generare un file di compensazione del colore per consentire l'analisi dei test RIDA®GENE real-time PCR qualitativi e quantitativi 2-plex e superiori su LightCycler® 480 II.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

Nei test di PCR real-time, il segnale di fluorescenza emesso di un colorante reporter fluorescente può sovrapporsi a un canale di colore adiacente, generando un segnale (interferenza). L'interferenza dei segnali fluorescenti può inficiare l'esito dei risultati, a meno che non venga effettuata una correzione tramite un file di compensazione del colore. I file di compensazione del colore sono in grado di compensare l'interferenza tra i canali di colore.

3. Principio del test

RIDA®GENE Color Compensation Kit IV viene usato per la calibrazione del colore in cicli di RIDA®GENE real-time PCR 2-plex e superiori su LightCycler® 480 II.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 3 cicli di compensazione del colore).

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del tappo
1	Blank	1 ×	400 µL	bianco, pronto per l'uso
2	Dye 1	1 ×	400 µL	blu, pronto per l'uso
3	Dye 2	1 ×	400 µL	verde, pronto per l'uso
4	Dye 3	1 ×	400 µL	giallo, pronto per l'uso
5	Dye 4	1 ×	400 µL	arancione, pronto per l'uso
6	Dye 5	1 ×	400 µL	rosso, pronto per l'uso

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- I reagenti devono essere conservati lontano dalla luce, a una temperatura compresa fra -16 °C e -28 °C e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2–8 °C).
- Cicli di congelamento e scongelamento ripetuti fino a 3 volte non influenzano le proprietà del test.
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2–8 °C).

Tabella 2: Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
prima dell'apertura	da -16 °C a -28 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza stampata
dopo l'apertura	da -16 °C a -28 °C	3 cicli di scongelamento e congelamento

6. Reagenti necessari ma non forniti

6.1 Reagenti

Nessuno.

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire i test RIDA®GENE Color Compensation Kit IV occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Strumento di PCR real-time: LightCycler® 480 II (Roche)
Materiali di consumo per PCR real-time (piastre [profilo basso, pozzetti bianchi, telaio trasparente], cuvette di reazione, pellicole)
Centrifuga con rotore per piastre/cuvette di reazione
Agitatore a vortice
Pipette (0,5–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL)
Puntali per pipette con filtri
Guanti monouso senza talco

Per qualsiasi domanda contattare R-Biopharm AG all'indirizzo pcr@r-biopharm.de.

7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato.

Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'eseguire il test attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Per prevenire la contaminazione crociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare stanze separate e indumenti e strumenti dedicati per l'estrazione, la preparazione e l'esecuzione della PCR.

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Per gli utenti nell'Unione europea: segnalare tutti gli eventi avversi gravi associati al prodotto a R-Biopharm AG e alle autorità nazionali competenti.

8. Protocollo per la generazione di un file di compensazione del colore su LightCycler® 480 II

8.1 Preparazione della compensazione del colore

Scongelare, mescolare e centrifugare brevemente i reagenti prima dell'uso. Raffreddare tutti i reagenti durante le fasi di lavoro (2 °C e -8 °C). Per un ciclo di compensazione del colore, pipettare cinque reazioni con 20 µL di ciascun colorante, compreso lo sfondo (Blank) in una piastra per microtitolazione (vedere 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: Schema di pipettaggio per la compensazione del colore su LightCycler® 480 II.

Tabella 3: Preparazione della compensazione del colore su LightCycler® 480 II

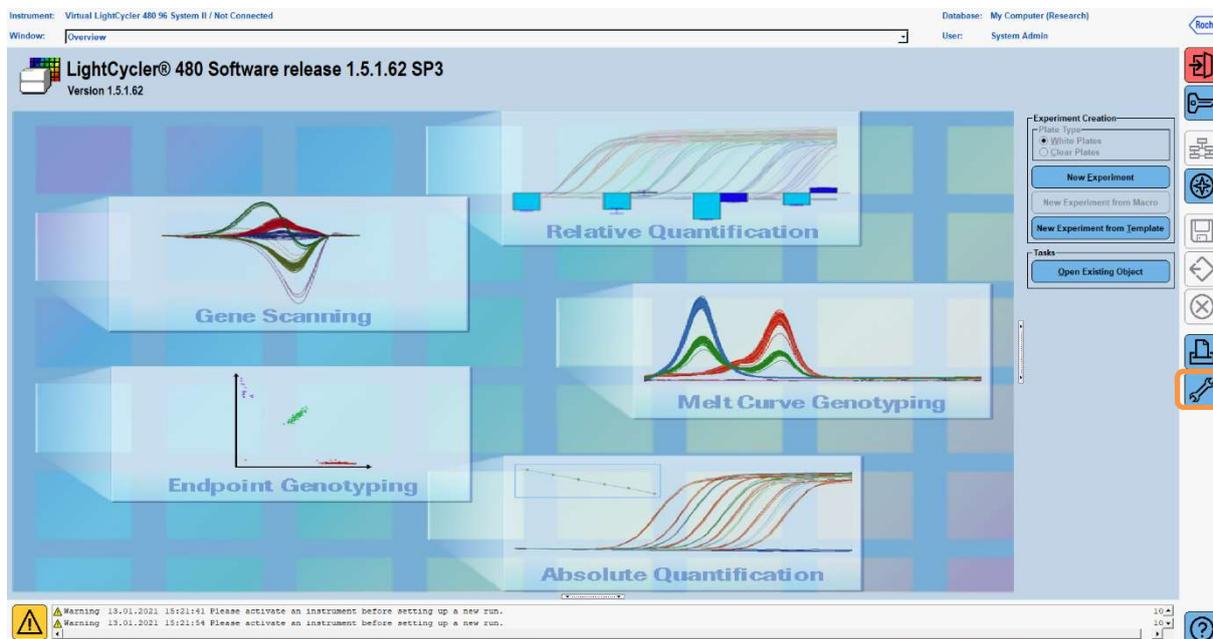
Codice del kit	Reagente	Quantità per reazione	Pipettare 20 µL in ciascuno dei seguenti pozzetti
1	Blank	20 µL	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µL	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µL	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µL	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µL	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µL	B12, C12, D12, E12, F12

Dopo aver pipettato i reagenti, sigillare la piastra di microtitolazione con pellicola ottica e centrifugare, se possibile. Avviare la PCR real-time secondo le impostazioni del dispositivo.

8.2 Impostazione dello strumento per PCR

Nota: Accedere al software come amministratore per impostare il formato di rilevamento.

1. Dopo aver avviato il software, fare clic sull'icona **"Tools"** per programmare il formato di rilevamento (vedere figura seguente).



2. Si aprirà la finestra illustrata di seguito. Nella finestra Tools, selezionare “**Detection Formats**”. Fare clic sul pulsante “**New**” per creare un nuovo formato di rilevamento (vedere Tabella 4) e salvarlo come “**RIDA®GENE**” (vedere figura seguente).

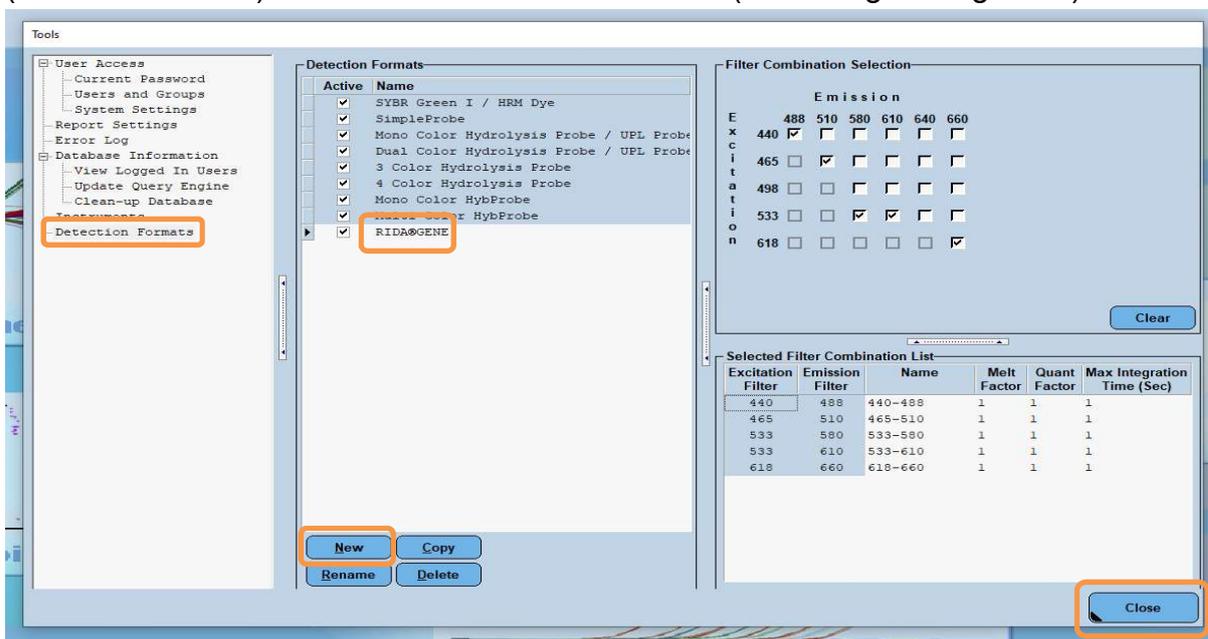


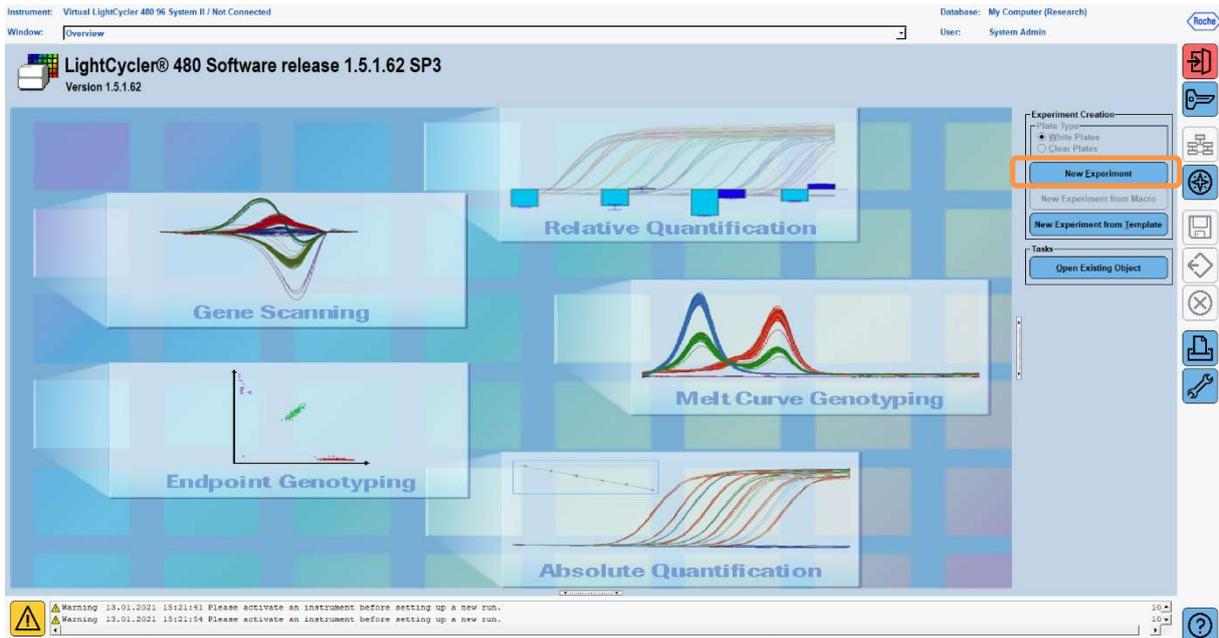
Tabella 4: Configurazione del canale di rivelazione per il LightCycler® 480 II

Combinazione filtri
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

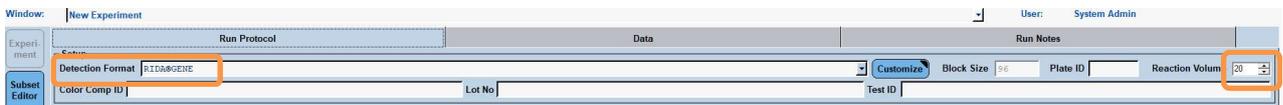
Nota: Impostare il valore di Quant Factor, Melt Factor e Integration Time su 1 (predefinito).

Fare clic sul pulsante “**Close**” per uscire dalla finestra Tools.

3. Dopo aver programmato il formato di rilevamento, fare clic sul pulsante **“New Experiment”** (vedere figura seguente).



4. Selezionare il formato di rilevamento **“RIDA®GENE”** e inserire un volume di reazione di 20 µL (predefinito) (vedere figura seguente).



5. Programmare il profilo termico (vedere Tabella 5).

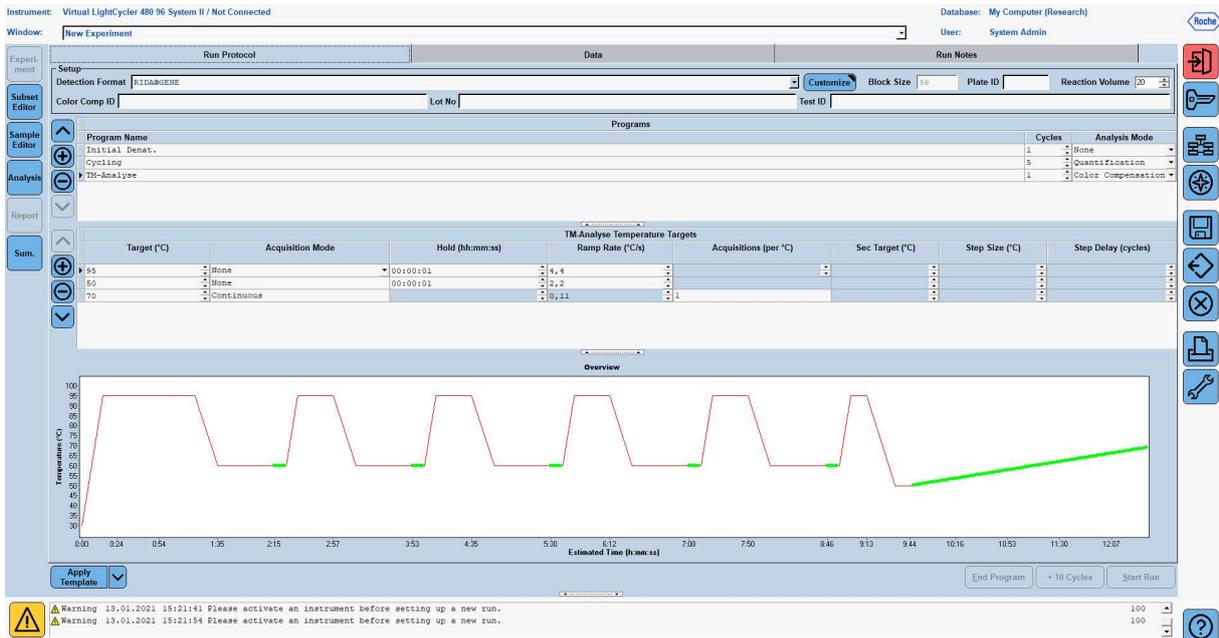
Tabella 5: Profilo termico

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) = 1 0.14*

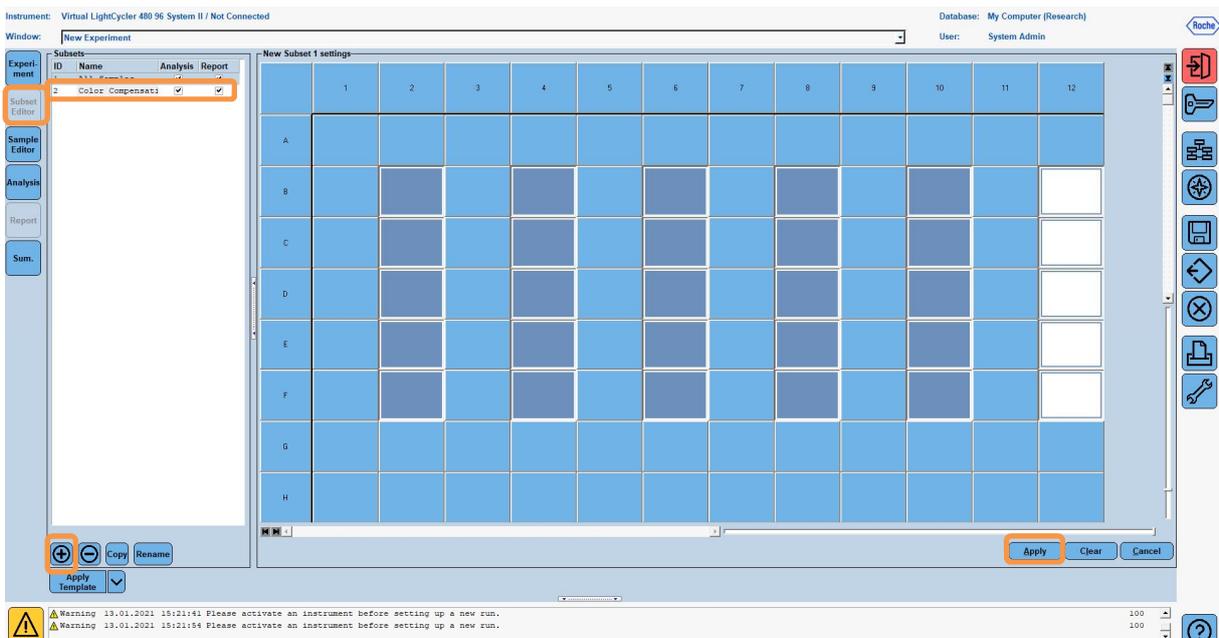
Nota: Verificare che il numero di **“Cycles”** e l**“Analysis Mode”** siano corretti.

* La velocità di rampa può variare leggermente a seconda del formato del rivelatore selezionato.

6. Dopo aver completato la programmazione, l'esperimento dovrebbe apparire come segue (vedere figura seguente).



7. Per programmare il layout della piastra di microtitolazione, passare al “**Subset Editor**”. Fare clic sull’icona “**Plus**” per creare un nuovo sottoinsieme e inserire un nome per il layout (ad esempio, Color Compensation). Tenere premuto il tasto Ctrl e il tasto sinistro del mouse ed evidenziare tutti i pozzetti contenenti reagenti nella piastra di microtitolazione (vedere Figura 1 e 2). Fare clic sul pulsante “**Apply**” per concludere il sottoinsieme. La schermata dovrebbe apparire come segue (vedere figura seguente).



8. Passare al “**Sample Editor**”. Dal punto 1: “**Select Workflow**”, scegliere “**Color Comp**”. Al punto 2: “**Select Samples**”, scegliere il sottoinsieme impostato in precedenza (Color Compensation). Per concludere il layout, selezionare il canale dominante per ogni reagente (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) nel campo “**Dominant Channel**” (vedere Tabella 6). Selezionare “**Water**” per le reazioni con lo sfondo colorato (Blank) (vedere figura seguente).

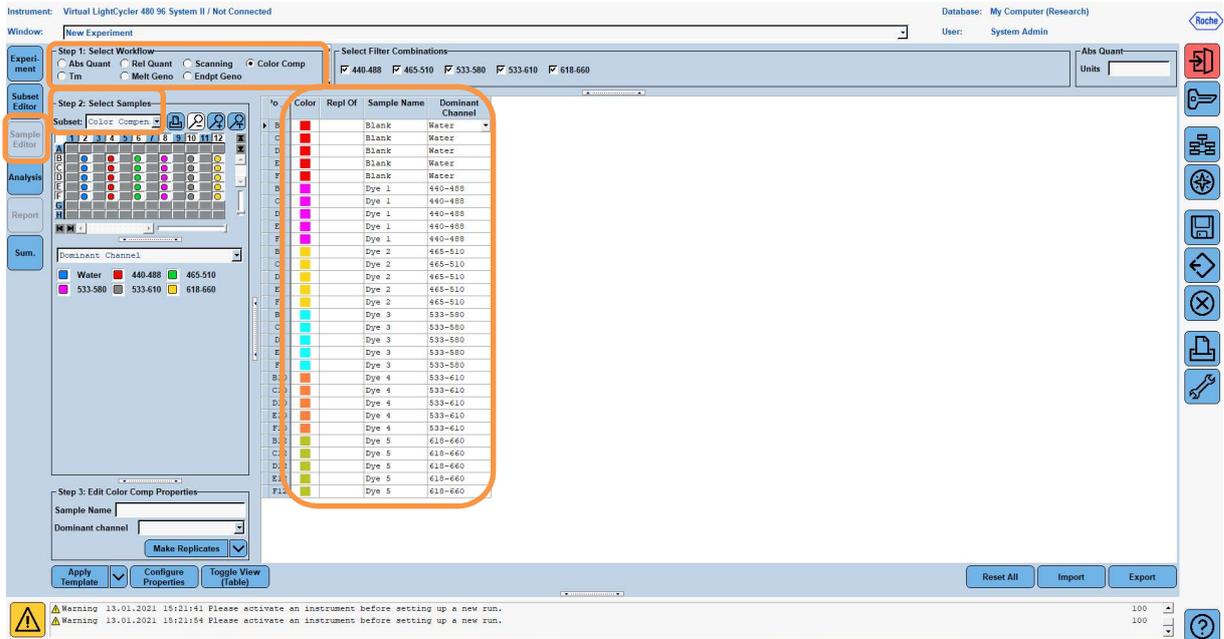


Tabella 6: Impostazioni del canale dominante per i reagenti (LightCycler® 480 II)

Reagente	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. Posizionare la piastra con le reazioni preparate nel dispositivo. Fare clic su **“Experiment”**, quindi su **“Start Run”** per avviare l’esperimento (vedere figura seguente).

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Research) User: System Admin

Window: New Experiment

Experiment

Run Protocol

Setup

Detection Format: RIDA@GENE

Block Size: 50 Plate ID: Reaction Volume: 20

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Programs

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Initial Denat.	1	None
Cycling	5	Quantification
TM-Analyze	1	Color Compensation

TM-Analyze Temperature Targets

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

Overview

Apply Template

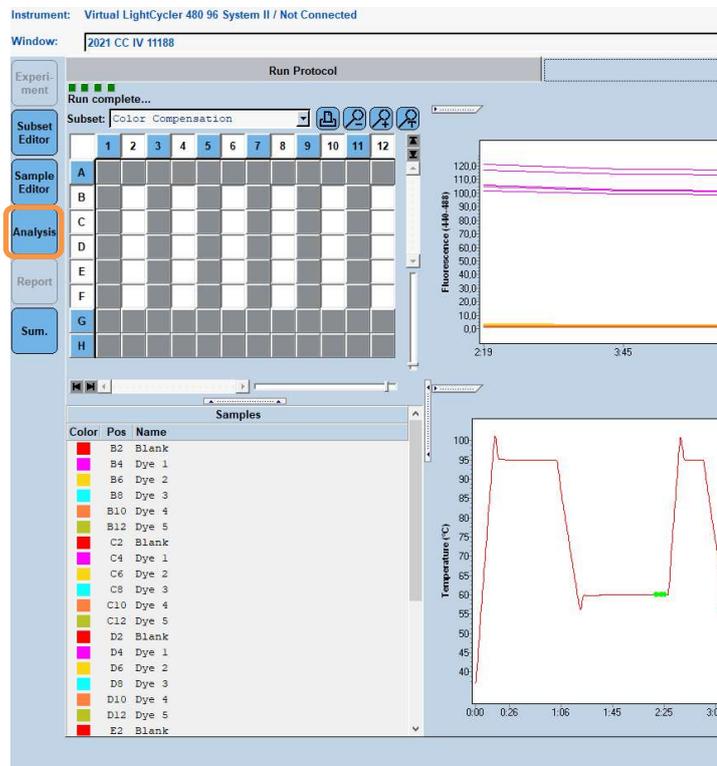
End Program +10 Cycles Start Run

Warning 13.01.2021 15:21:41 Please activate an instrument before setting up a new run. 100

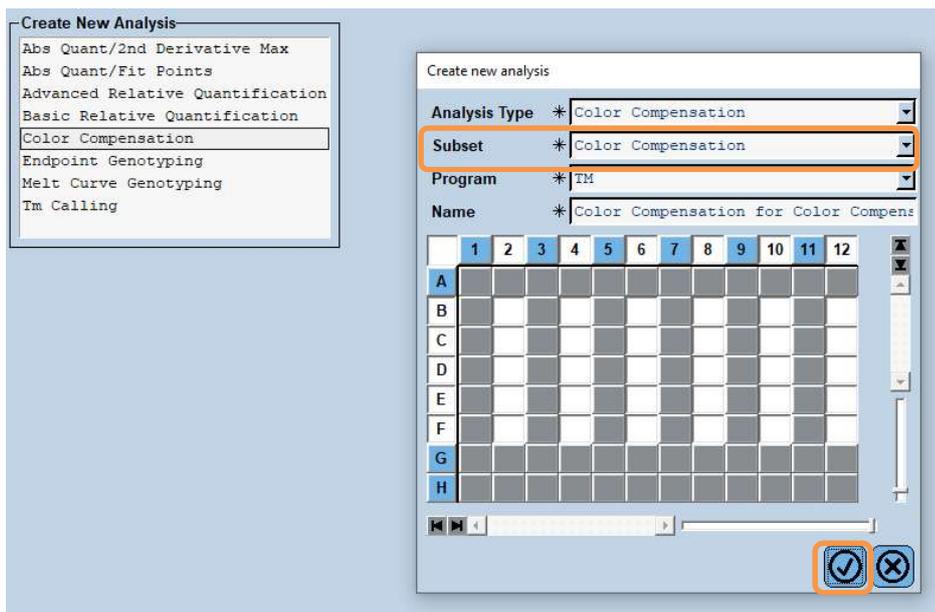
Warning 13.01.2021 15:21:54 Please activate an instrument before setting up a new run. 100

8.3 Valutazione e creazione di un file di compensazione del colore

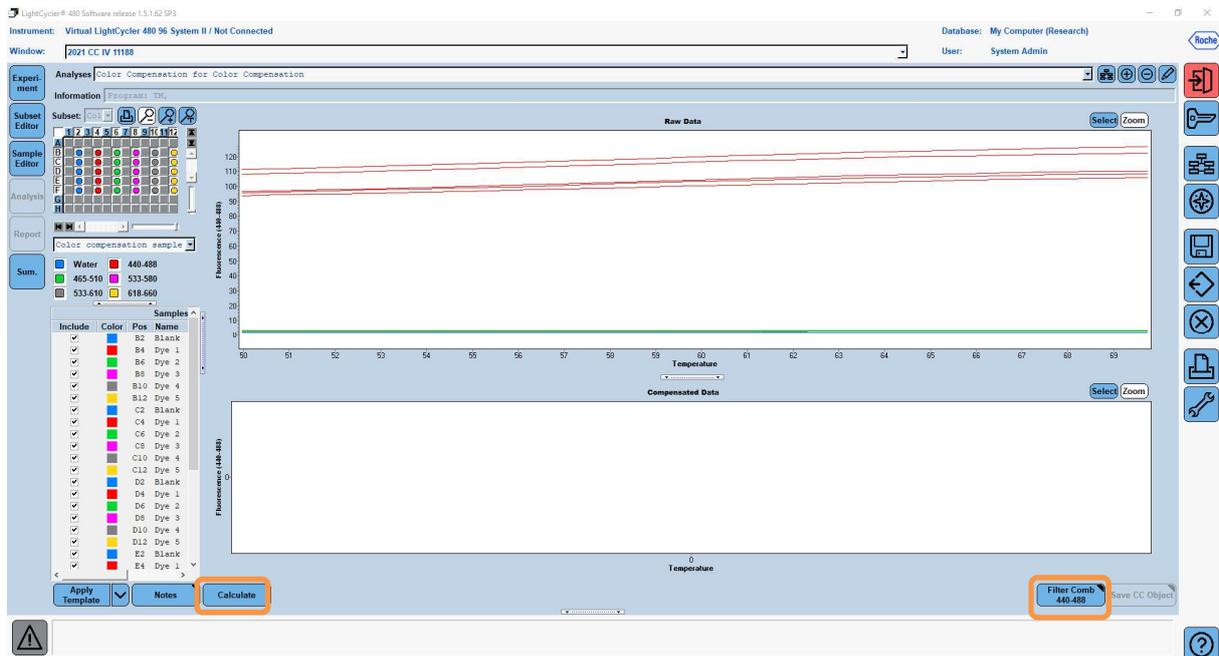
1. Dopo aver completato l'esperimento su LightCycler®, fare clic sul pulsante **“Analysis”** (vedere figura seguente).



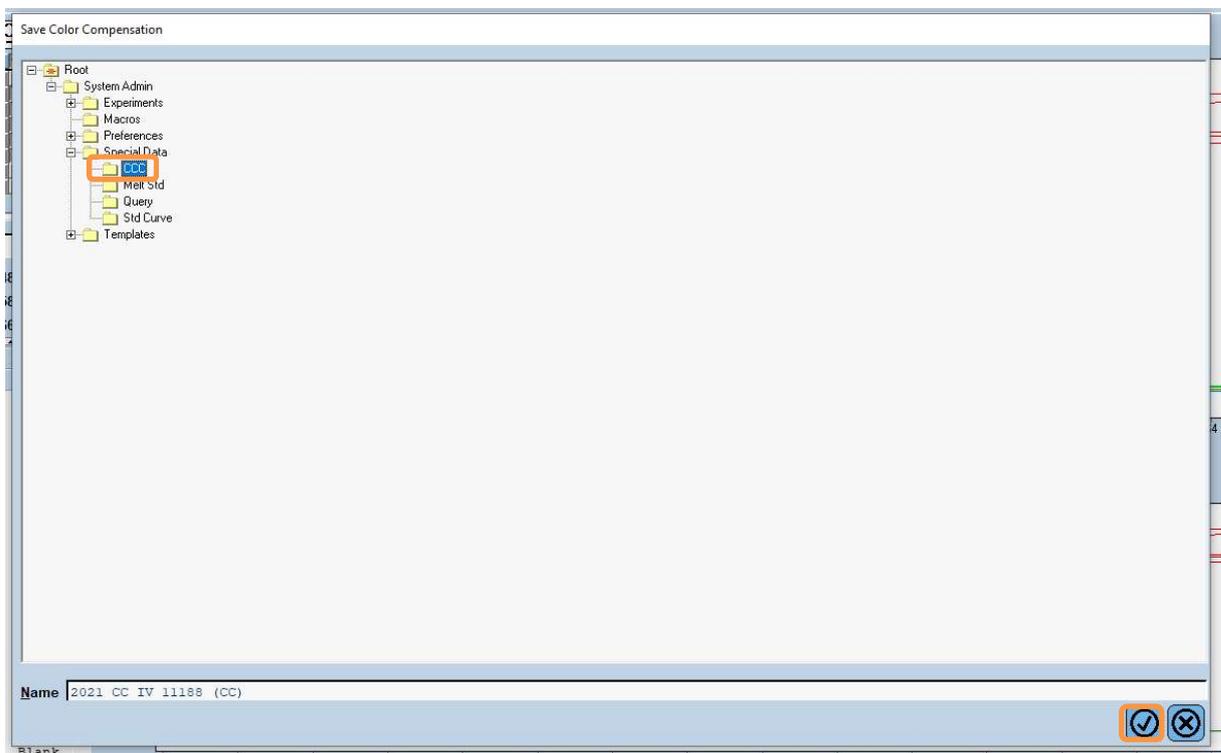
2. Nella finestra di dialogo **“Create New Analysis”**, selezionare **“Color Compensation”** (Color Compensation). Selezionare e confermare il sottoinsieme appropriato (per esempio, Compensazione del colore) nella finestra di dialogo aperta (vedere figura seguente).



3. L'analisi si apre; fare clic su **“Calculate”**, quindi su **“Save CC Object”** (vedere figura seguente).



4. Salvare il file di compensazione del colore come **“RIDA®GENE CCIV”** nella cartella **“CCC”** (vedere figura seguente).



In questo modo il file sarà disponibile per altri esperimenti sul LightCycler® 480 II. La creazione del file di compensazione del colore è completata.

8.4 Uso del file di compensazione del colore

Per utilizzare il file di compensazione del colore, aprire l'esperimento RIDA®GENE real-time PCR in questione e caricare la compensazione del colore desiderata da **“Experiment” “Data”**. Nel menu a discesa **“Color Comp (Off)”**, selezionare **“in Database”**, quindi il file di compensazione del colore salvato (vedere Figura 2).

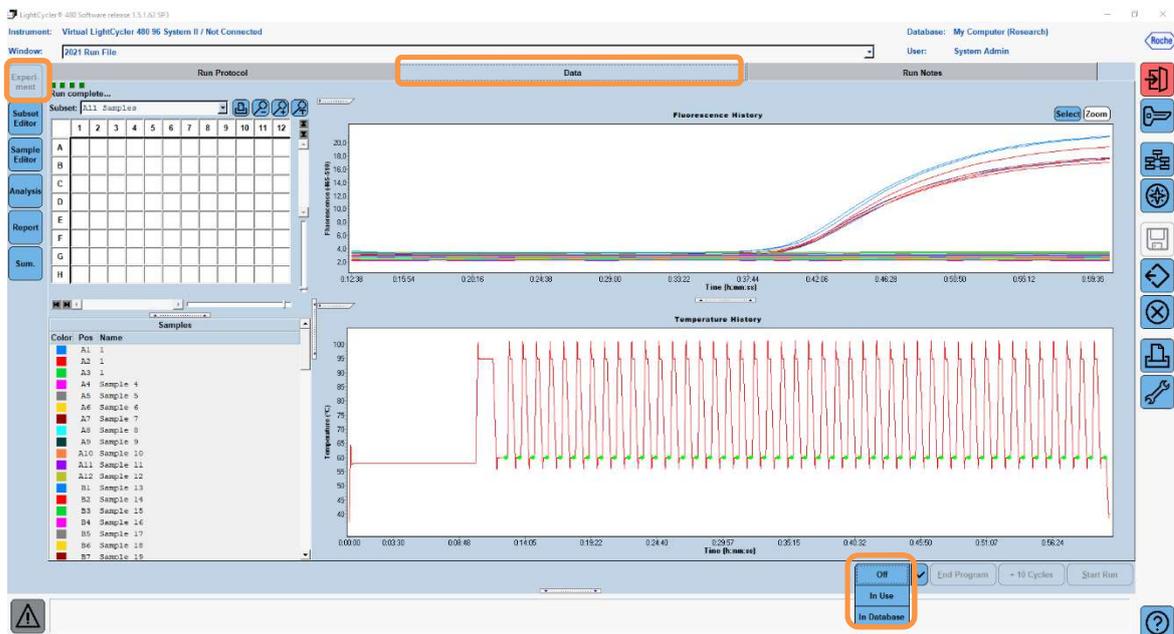


Figura 2: Uso della compensazione del colore

Una volta selezionata la compensazione del colore, il pulsante **“Color Comp (Off)”** passerà a **“Color Comp (On)”**. La compensazione del colore selezionata viene applicata automaticamente a tutti i filtri dell’analisi. Ora è possibile analizzare il ciclo di RIDA®GENE real-time PCR come di consueto.

Nota: Il file di compensazione del colore è specifico per ciascun LightCycler® 480 II. In caso di sostituzione del dispositivo o di riparazione dell’unità ottica, è necessario generare un nuovo file.

9. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2021-09-09	Versione precedente
2022-02-03	Revisione generale: 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti necessari ma non forniti 7. Avvertenze e misure precauzionali

10. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Attenersi al manuale operativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

Simboli specifici del test

	Bianco
	Colorante 1
	Colorante 2
	Colorante 3
	Colorante 4
	Colorante 5