

RIDA® GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemanha
☎ +49 (0) 61 51 81 02-0 / 📠 +49 (0) 61 51 81 02-20 / 🌐 www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O RIDA®GENE Color Compensation Kit IV é usado para a calibração de cor em execuções RIDA®GENE real-time PCR 2-plex e superior no LightCycler® 480 II. O RIDA®GENE Color Compensation Kit IV pode ser usado para gerar um arquivo de compensação de cor para permitir a análise qualitativa e quantitativa de RIDA®GENE real-time PCR tests 2-plex e superior no LightCycler® 480 II.

O produto é destinado ao uso profissional.

2. Sumário e explicação do teste

Em um PCR em tempo real, o sinal fluorescente emitido de um corante de repórter fluorescente pode sobrepor um canal de cor adjacente, gerando assim, um sinal (interferência). A interferência de sinais fluorescentes pode causar resultados incorretos, a menos que uma correção seja realizada por um arquivo de compensação de cor. Um arquivo de compensação de cor pode compensar a interferência entre os canais de cor.

3. Princípio do teste

O RIDA®GENE Color Compensation Kit IV é usado para a calibração de cor em execuções RIDA®GENE real-time PCR 2-plex e superior no LightCycler® 480 II.

4. Reagentes fornecidos

Tabela 1: Reagentes fornecidos (os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 3 execuções de compensação de cor).

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Blank	1 ×	400 µL	branco, pronto para uso
2	Dye 1	1 ×	400 µL	azul, pronto para uso
3	Dye 2	1 ×	400 µL	verde, pronto a usar
4	Dye 3	1 ×	400 µL	amarelo, pronto para uso
5	Dye 4	1 ×	400 µL	laranja, pronto para uso
6	Dye 5	1 ×	400 µL	vermelho, pronto para uso

5. Instruções de armazenamento

- Siga as diretrizes de manuseamento da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz de -16 °C a -28 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetido até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação do PCR (2 - 8 °C).

Tabela 2: Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-16 °C a -28 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-16 °C a -28 °C	3 ciclos de descongelamento-congelamento

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1 Reagentes

Nenhum.

6.2 Equipamento laboratorial

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA®GENE Color Compensation Kit IV:

Equipamentos
Instrumento de PCR em tempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
Consumíveis PCR em tempo real (placas (baixo perfil, poços brancos, armação transparente), tubos de ensaio, filmes)
Centrífuga com rotor para placas / tubos de ensaio
Vortexer
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pontas da pipeta com filtros
Luvas descartáveis sem pó

Para perguntas, entre em contato com a R-Biopharm AG em pcr@r-biopharm.de.

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para uso em Diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.

Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR, o PCR deve ser usado para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre a Folha de Dados de Segurança (Safety Data Sheet, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

8. Protocolo para a geração de arquivo de compensação de cor no LightCycler® 480 II

8.1 Preparação da compensação de cor

Descongele, misture e centrifugue brevemente os reagentes antes de usá-los. Sempre resfrie todos os reagentes durante as etapas de trabalho (2 a -8 °C). Para uma execução de compensação de cor, pipete cinco reações com 20 µL de cada corante incluindo o fundo (Blank) em uma placa de microtitulação (ver Fig.1).

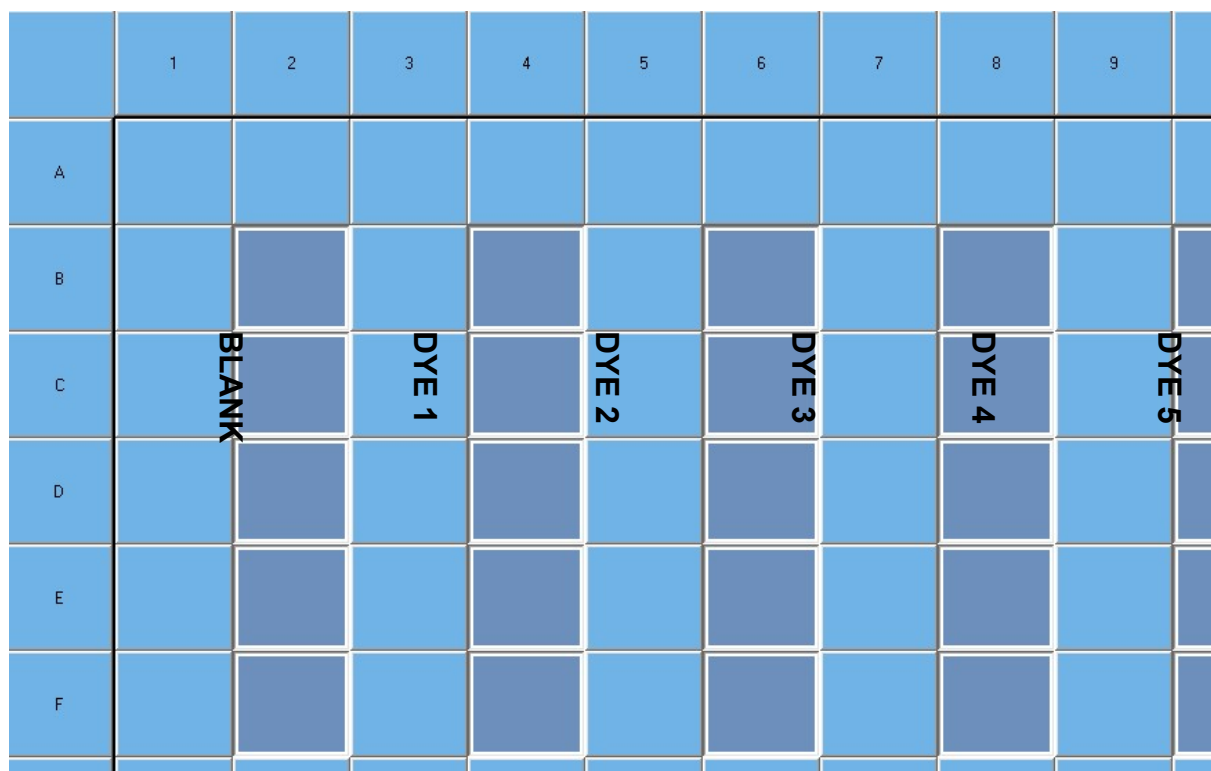


Figura 1: Esquema de pipetagem para compensação de cor no LightCycler® 480 II.

Tabela 3: Preparação da compensação de cor no LightCycler® 480 II

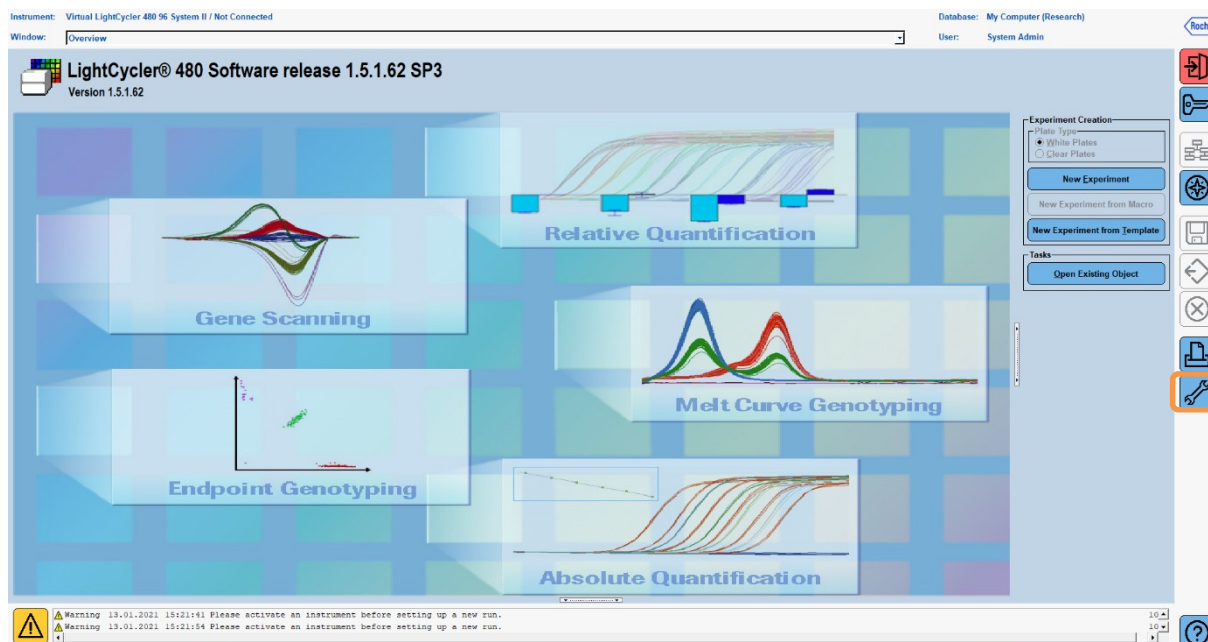
Código do kit	Reagente	Quantidade por reação	Pipete 20 µL cada um nos seguintes poços
1	Blank	20 µL	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µL	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µL	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µL	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µL	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µL	B12, C12, D12, E12, F12

Após pipetar os reagentes, selar a placa de microtitulação com lâmina óptica e centrifugar, se possível. Iniciar o PCR em tempo real de acordo com as configurações do dispositivo.

8.2 Configuração do instrumento de PCR

Nota: Faça o login no software como administrador para configurar o formato de detecção.

1. Após abrir o software, clique no ícone “**Tools**” para programar o formato de detecção (consulte a figura seguinte).



2. A janela a seguir é aberta. Na janela Tools, selecione “**Detection Formats**”. Clique no botão “**New**” para criar um novo formato de detecção (ver Tab. 4) e guarde como “**RIDA®GENE**” (consulte a figura seguinte).

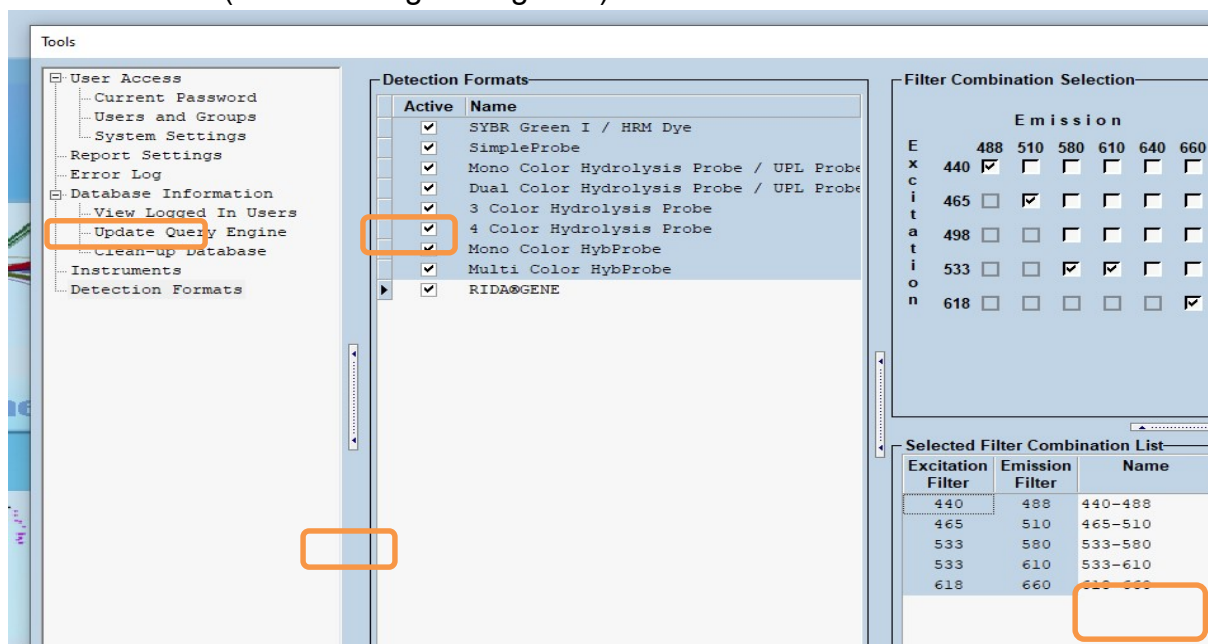


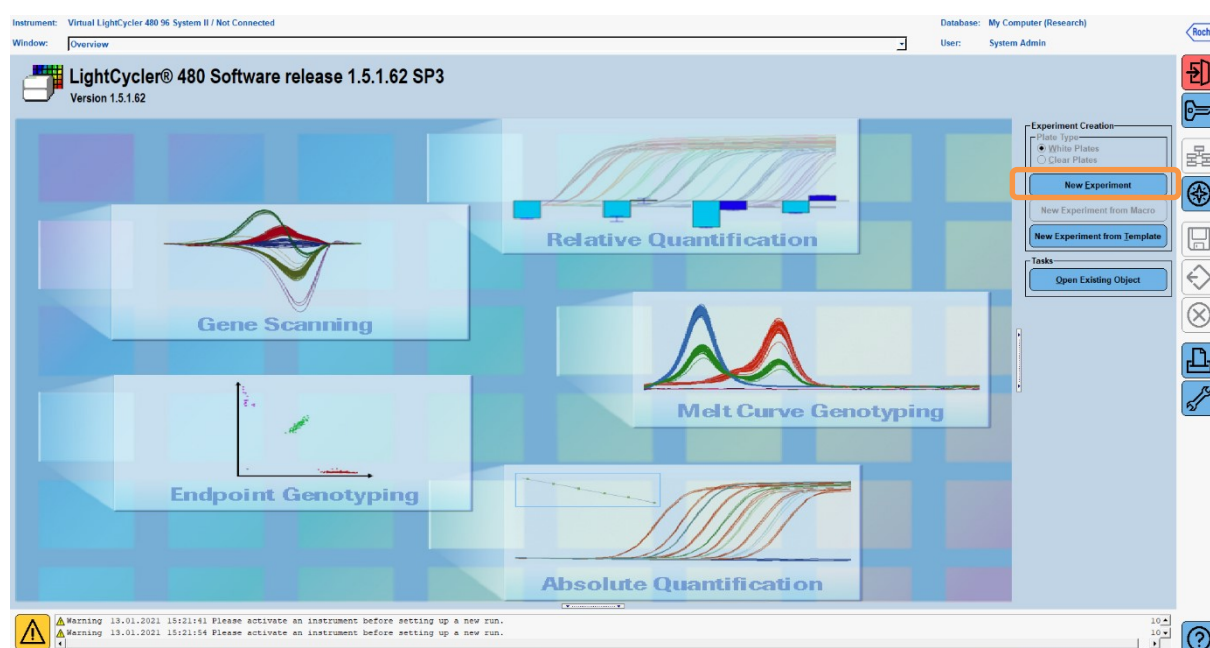
Tabela 4: Configuração do canal de detecção para o LightCycler® 480 II

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

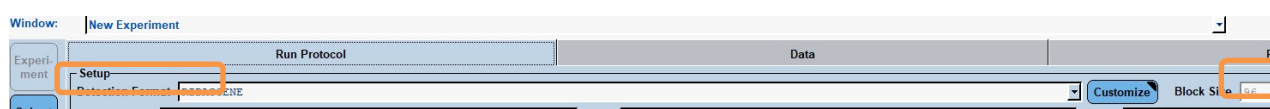
Nota: Defina o valor para Quant Factor, Melt Factor e Integration Time para 1 (padrão).

Clique no botão “**Close**” para sair da janela Ferramentas.

3. Após programar o formato de detecção, clique no botão “**New Experiment**” (consulte a figura seguinte).



4. Selecione o formato de detecção “**RIDA®GENE**” e insira um volume de reação de 20 µL (padrão) (consulte a figura seguinte).



5. Programe o perfil térmico (ver Tab. 5).

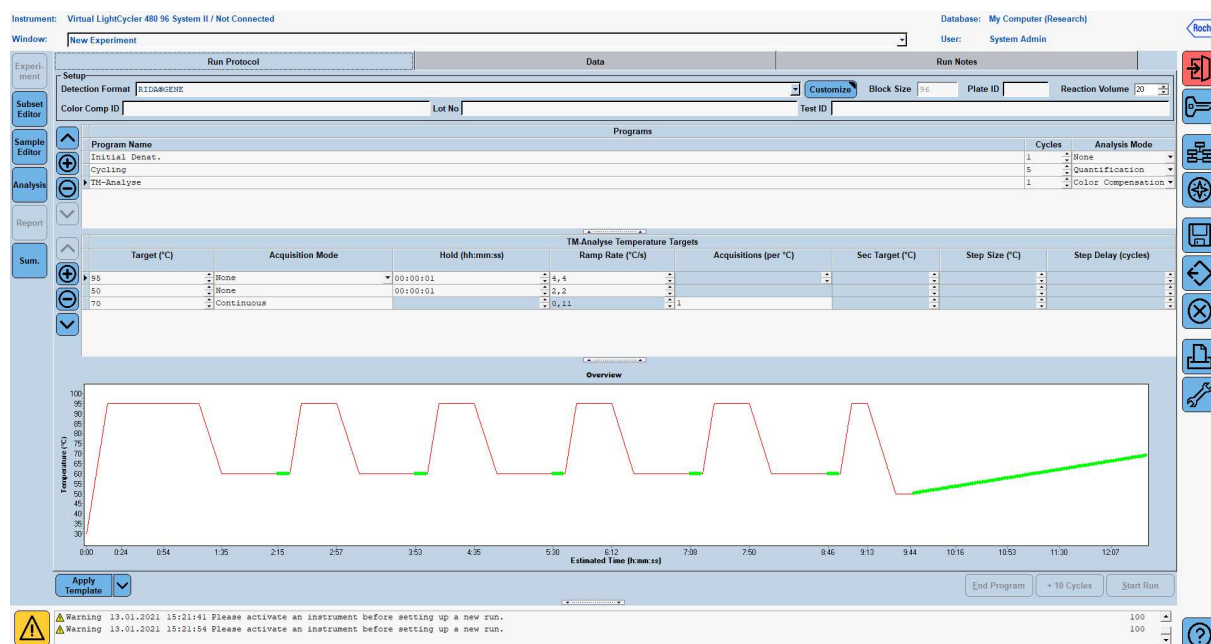
Tabela 5: Perfil térmico

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) = 1 0.14*

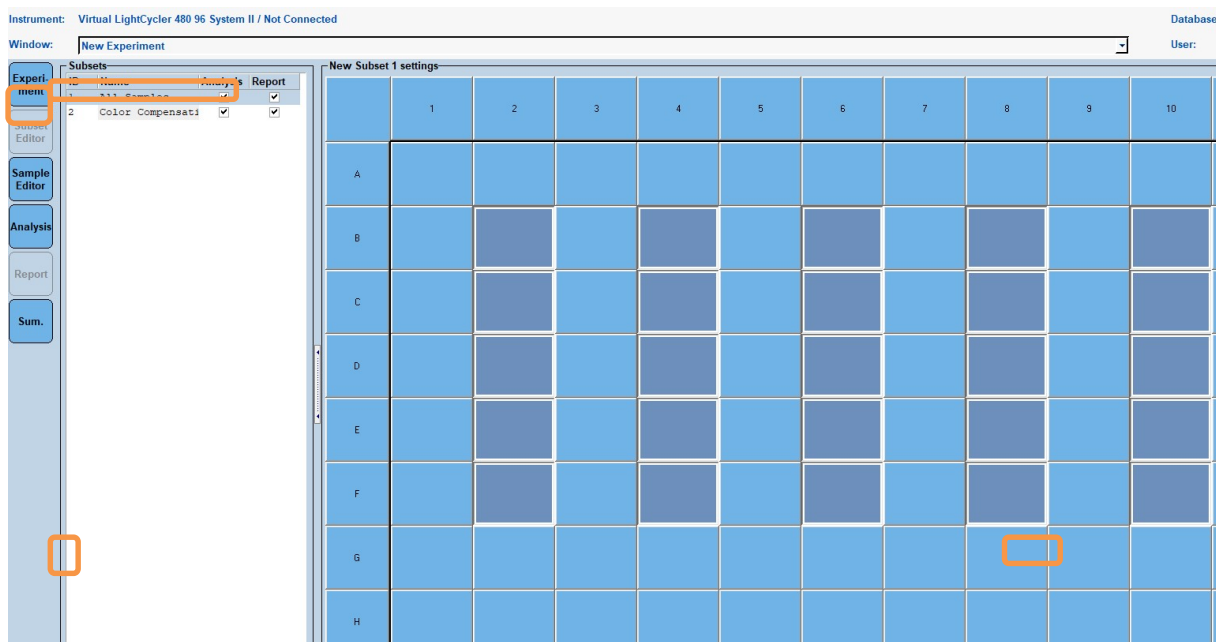
Nota: Certifique-se de que os números de “Cycles” e “Analysis Mode” estejam corretos.

* O índice de subida pode variar ligeiramente dependendo do formato do detector selecionado.

6. Após a conclusão da programação, o experimento deve ser feito da seguinte forma (consulte a figura seguinte).



7. Para programar o layout da placa de microtitulação, mude para o “**Subset Editor**”. Clique no ícone “**Plus**” para criar um novo subconjunto e digite um nome para o layout (por exemplo, Color Compensation). Mantenha pressionada a tecla Ctrl e o botão esquerdo do mouse e marque todos os poços contendo reagentes na placa de microtitulação (consulte a Fig. 1 e 2). Clique no botão “**Apply**” para terminar o subconjunto. A tela deve aparecer da seguinte forma (consulte a figura seguinte).



8. Mude para o “**Sample Editor**”. A partir da Etapa 1: “**Select Workflow**”, escolha “**Color Comp**”. Na Etapa 2: “**Select Samples**”, escolha o subconjunto previamente definido (Color Compensation). Para terminar o layout, selecione o canal dominante correspondente para cada reagente (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) no campo “**Dominant Channel**” (ver Tab. 6). Selecione “**Water**” para as reações com o fundo de cor (Blank) (consulte a figura seguinte).

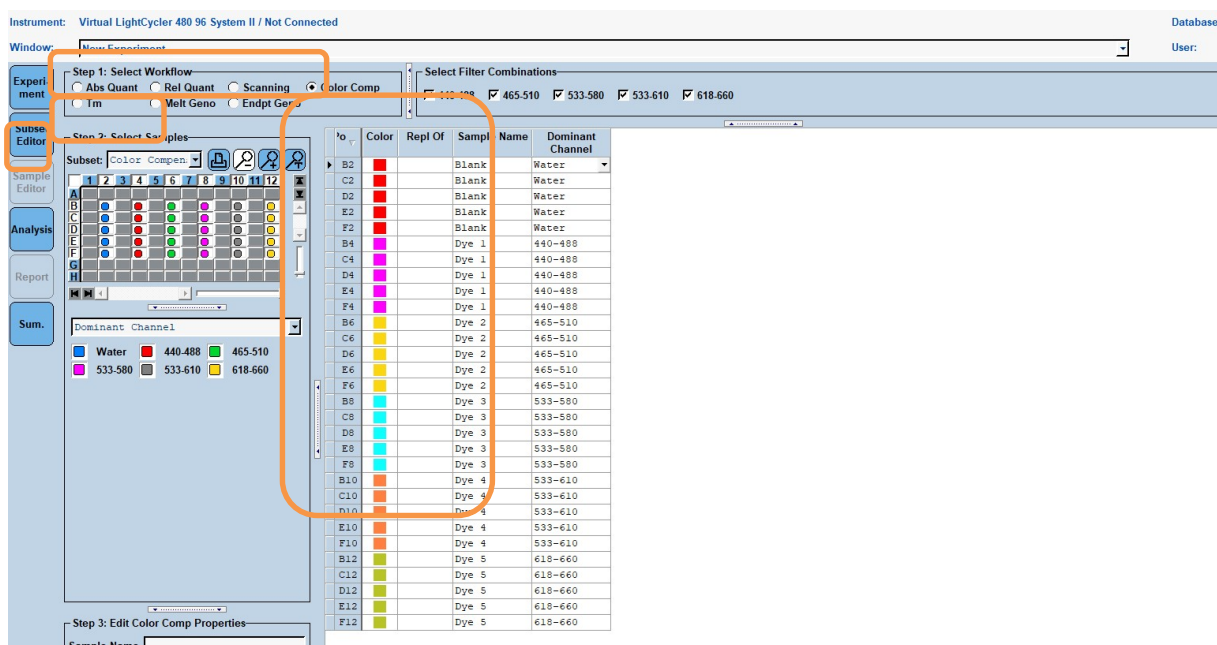
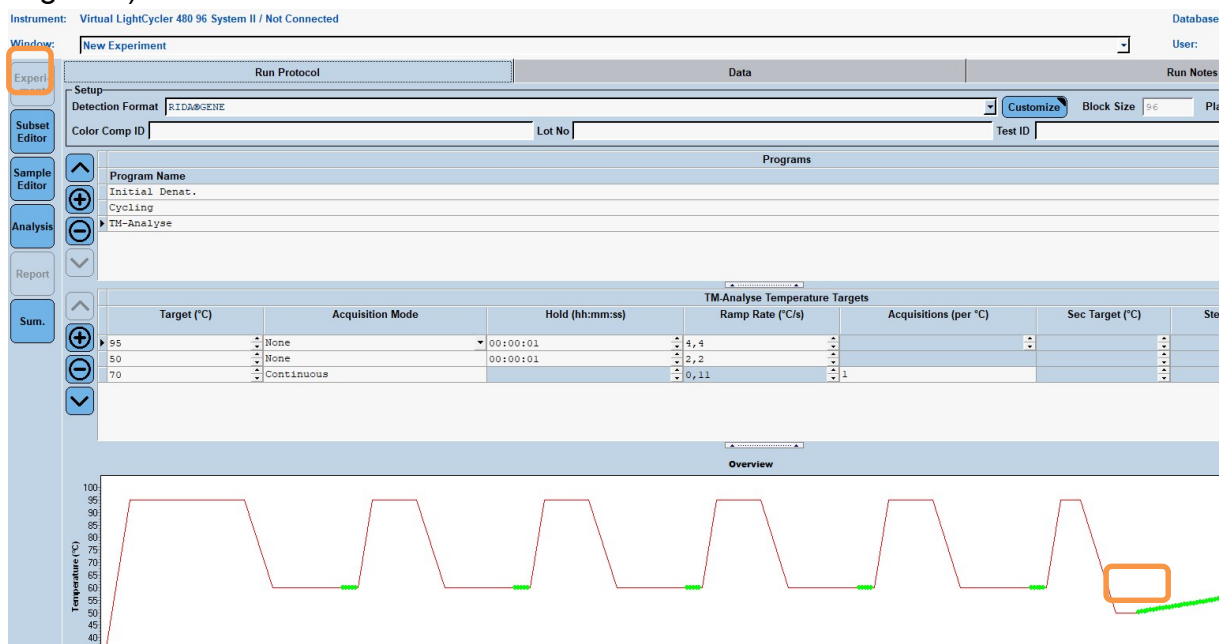


Tabela 6: Configuração de Dominant Channel para os reagentes (LightCycler® 480 II)

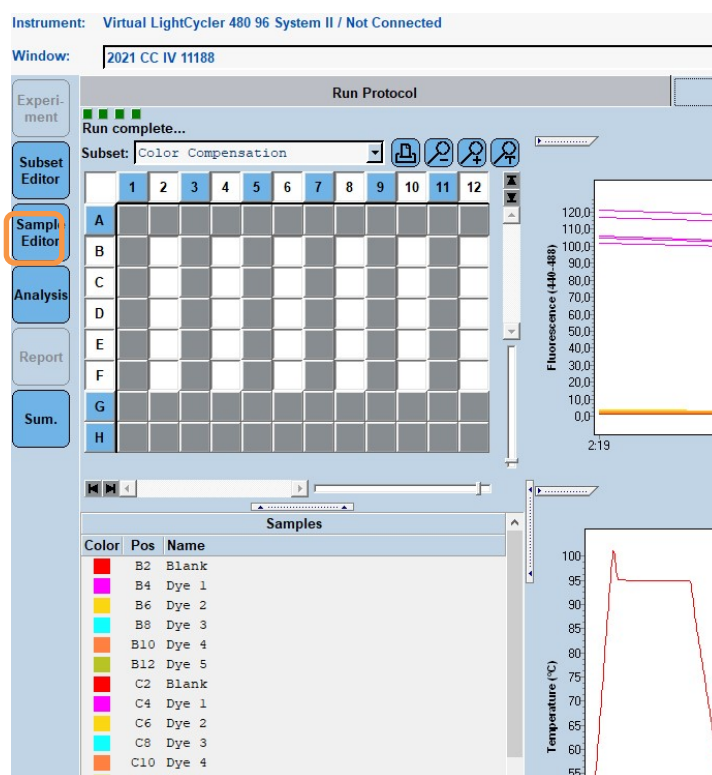
Reagente	Dominant Channel
Blank	Water
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

9. Coloque a placa com as reações preparadas dentro do dispositivo. Clique em “**Experiment**” e depois em “**Start Run**” para iniciar o experimento (consulte a figura seguinte).

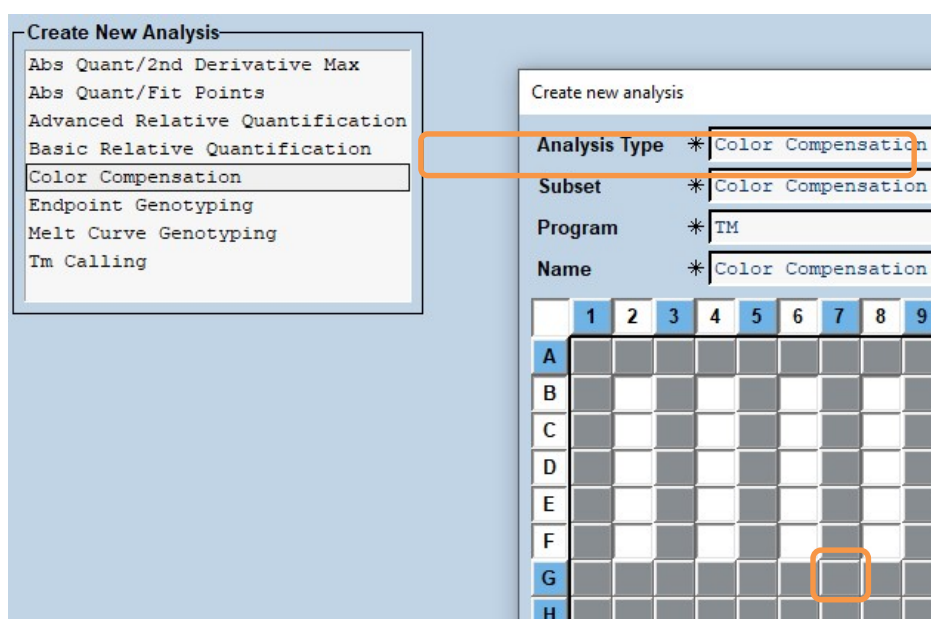


8.3 Avaliação e criação de um arquivo de compensação de cor

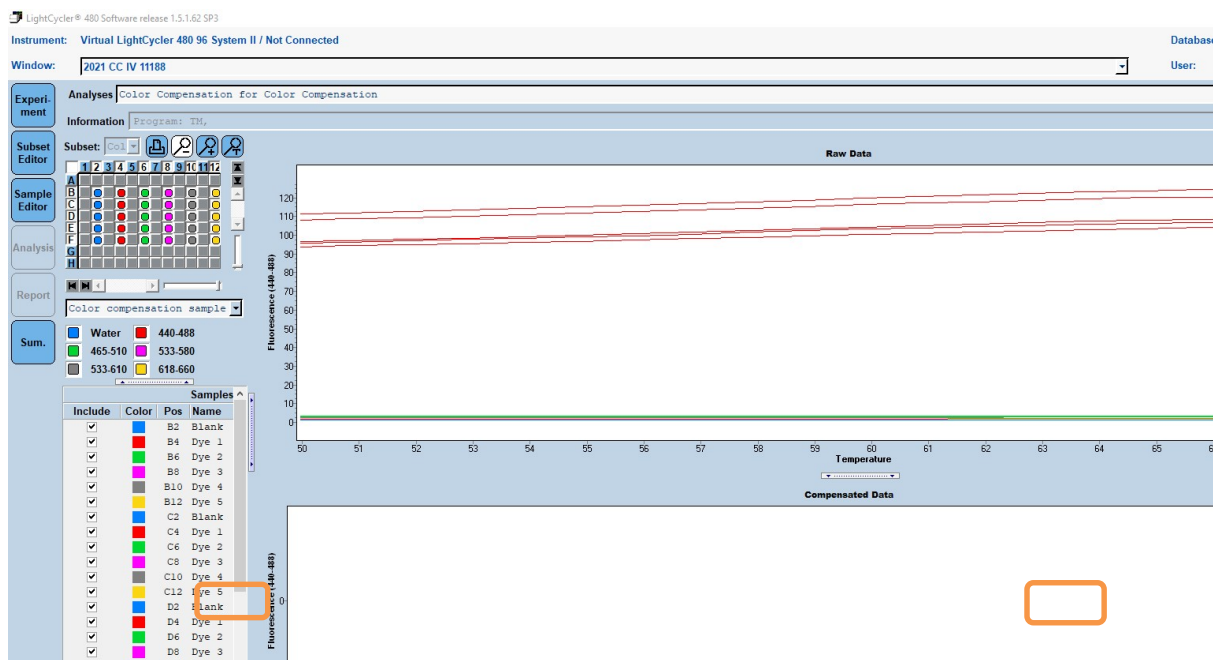
1. Após completar o experimento LightCycler®, clique no botão **“Analysis”** (consulte a figura seguinte).



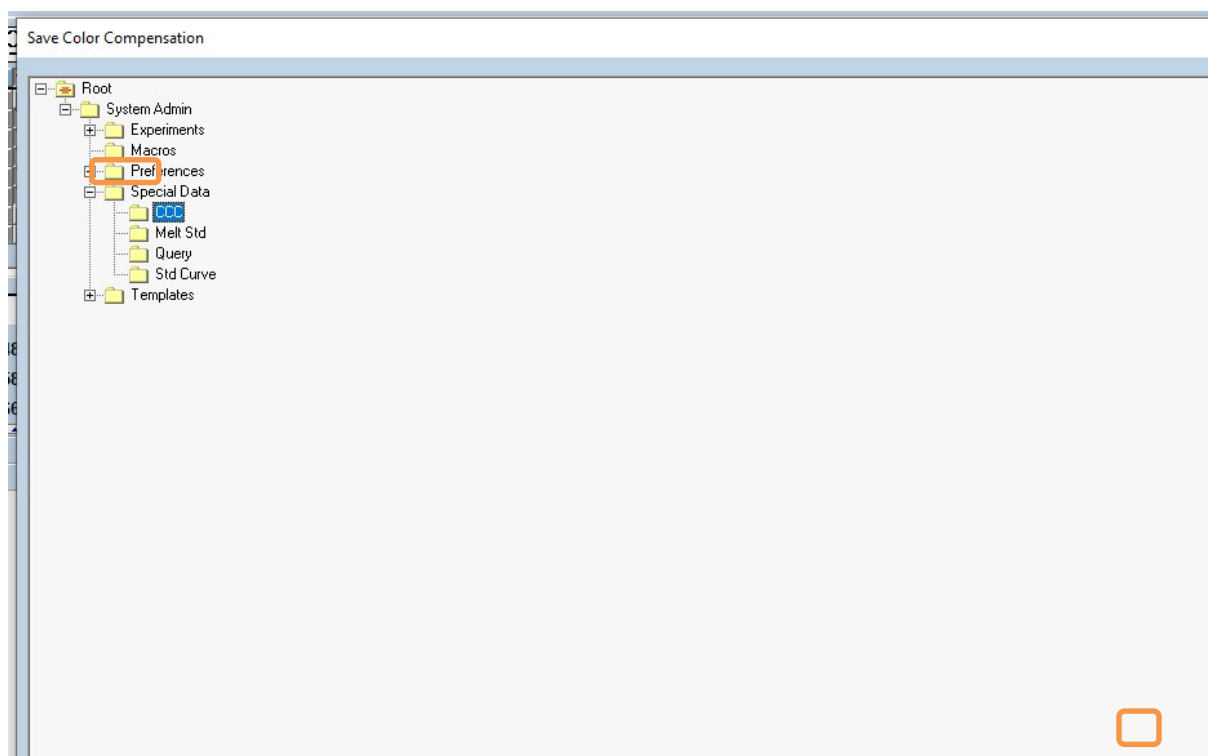
2. Na caixa de diálogo **“Create New Analysis”**, vá para **“Color Compensation”**.
Selecione e confirme o subconjunto apropriado (por exemplo, Color Compensation) na caixa de diálogo que se abre (consulte a figura seguinte).



3. A análise se abre; clique em **“Calculate”** em seguida **“Save CC Object”** (consulte a figura seguinte).



4. Salve o arquivo de compensação de cor como **“RIDA®GENE CCIV”** na pasta **“CCC”** (consulte a figura seguinte).



Este arquivo estará então disponível para outros experimentos no LightCycler® 480 II. A geração do arquivo de compensação de cor está agora completa.

8.4 Utilização do arquivo de compensação de cor

Para usar o arquivo de compensação de cor, abra o experimento de PCR em tempo real RIDA®GENE e carregue a compensação de cor desejada em “**Experiment**” “**Data**”. No menu suspenso “**Color Comp (Off)**”, selecione “**in Database**” e, então, o arquivo de compensação de cor salvo (consulte Fig. 2).

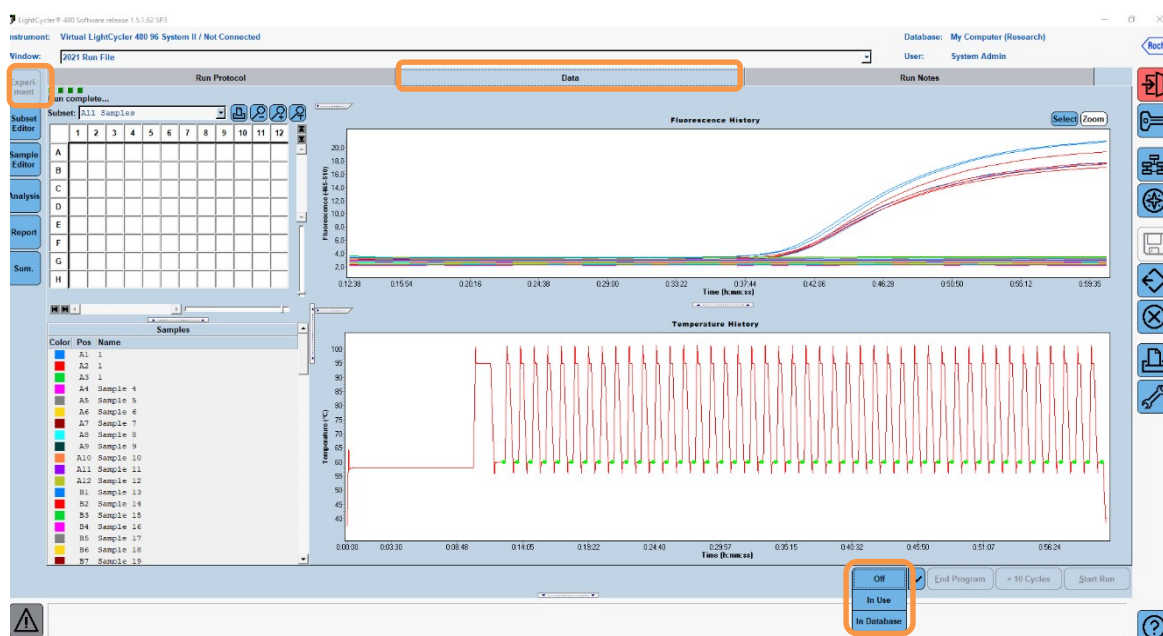


Figura 2: Uso da compensação de cor

Quando é selecionada a compensação de cor, o botão “**Color Comp (Off)**” muda para “**Color Comp (On)**”. A compensação de cor selecionada é aplicada automaticamente a todos os filtros da análise. O PCR em tempo real RIDA®GENE pode agora ser analisado como usualmente.

Nota: O arquivo de compensação de cor é específico para cada LightCycler® 480 II. Um novo arquivo de compensação de cor é necessário se o dispositivo for trocado ou se a unidade óptica for reparada.

9. Histórico de versões

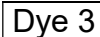
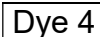
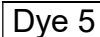
Número da versão	Seção e designação
2021-09-09	Versão anterior
2022-02-03	Revisão geral: 4. Reagentes fornecidos 5. Instruções de armazenamento 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

10. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte o manual de operação
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

	Em branco
	Corante 1
	Corante 2
	Corante 3
	Corante 4
	Corante 5