

CE

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV





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

1. Avsedd användning

För *in vitro* -diagnostisk användning. RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV används för färgkalibrering av 2-plex och högre RIDA[®]GENE real-time PCR körs på LightCycler[®] 480 II. RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV kan användas för att generera en färgkompenseringsfil för att möjliggöra analys av kvalitativa och kvantitativa 2-plex och högre RIDA[®]GENE real-time PCR-tester på LightCycler[®] 480 II.

Produkten är avsedd för yrkesmässig användning.

2. Sammanfattning och förklaring av testet

I en realtid PCR, den utsända fluorescerande signalen av en fluorescerande reporter färgämne kan överlagra en intilliggande färgkanal, vilket genererar en signal (crosstalk). Överhörning från fluorescerande signaler kan orsaka felaktiga resultat om inte en korrigering utförs av en färgkompensationsfil. En färgkompenseringsfil kan kompensera för korstal mellan färgkanalerna.

3. Testprincip

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV används för färgkalibrering av 2-plex och högre RIDA[®]GENE real-time PCR körs på LightCycler[®] 480 II.

4. Reagenser som ingår

Tabell 1:Tillhandahållna reagenser (reagenserna i satsen är tillräckliga för tre
färgkompenseringskörningar.)

Kitkod	Reagens	М	ängd	Lockfärg			
1	Blank	1 ×	400 µL	vit, färdiga för användning			
2	Dye 1	1 ×	400 µL	blå, färdiga för användning			
3	Dye 2	1 ×	400 µL	grön, klar för användning			
4	Dye 3	1 × 400 µL		gul, klar för användning			
5	Dye 4	1 ×	400 µL	orange, färdiga för användning			
6	Dye 5	1 × 400 µL		röd, klar för användning			

5. Förvaringsanvisningar

- Följ riktlinjerna för hantering i tabell 2 och förvara satsen direkt efter användning enligt den angivna informationen.
- Testsatsen måste förvaras i ett mörkt utrymme i -16 °C till -28 °C och kan i oöppnat skick användas fram till utgångsdatumet på etiketten. Efter utgångsdatumet gäller inte kvalitetsgarantin längre.
- Alla reagenser ska tinas försiktigt före användning (t.ex. i kylskåp vid 2 8 °C).
- Upprepad frysning och upptining upp till 3 gånger påverkar inte testegenskaperna.
- Kyl alla reagenser på lämpligt vis under PCR-beredningen (2 8 °C).

Tabell 2:	Förvaringsförhållanden och information
-----------	--

	Förvaringstemperatur	Maximal förvaringstid
oöppnad	-16 °C till -28 °C	Kan användas fram till angivet utgångsdatum
öppnad	-16 °C till -28 °C	3 upptinings-/fryscykler

6. Nödvändiga reagenser som inte medföljer

6.1 Reagenser

-Ingen.

6.2 Laboratorieutrustning

Följande utrustning behövs för att utföra RIDA®GENE Color Compensation Kit IV-testet:

Utrustning
Instrument för direktanalys-PCR: LightCycler [®] 480 II (Roche)
Förbrukningsartiklar för direktanalys-PCR (plattor (låg profil, vita brunnar, genomskinlig ram), reaktionsflaskor, folier)
Centrifug med rotor för plattor / reaktionsflaskor
Vortexblandare
Pipetter (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)

Pipettspetsar med filter

Puderfria engångshandskar

För frågor, vänligen kontakta R-Biopharm AG på pcr@r-biopharm.de.

7. Varningar och försiktighetsåtgärder för användare

Endast för in vitro-diagnostisk användning.

Det här testet får endast utföras av utbildad laboratoriepersonal. Riktlinjerna för arbete i medicinska laboratorier måste följas.

Följ alltid bruksanvisningen för detta test noggrant.

Pipettera inte prover eller reagenser med munnen. Undvik kontakt med skadad hud och slemhinnor.

Använd personlig skyddsutrustning (lämpliga handskar, labbrock, skyddsglasögon) vid hantering av reagenser och prover, och tvätta händerna efter avslutat test.

Rök, ät eller drick inte i områden där prover eller testreagenser hanteras.

Separata rum, speciella kläder och instrument för extraktion, PCR-beredning och PCR måste användas för att förhindra korskontaminering och falska positiva resultat.

Kliniska prover måste betraktas som potentiellt smittsamma och bortskaffas på lämpligt sätt, precis som alla reagenser och material som kommer i kontakt med potentiellt smittsamma prover.

Använd inte kitet efter utgångsdatumet. Användare är ansvariga för korrekt kassering av alla reagenser och material efter användning. Följ nationella förordningar om kassering.

Ytterligare information om säkerhetsdatabladen (Safety Data Sheet, SDS) finns under artikelnumret på https://clinical.r-biopharm.com/search/.

För användare i Europeiska unionen: Rapportera alla allvarliga biverkningar som är förknippade med läkemedlet till R-Biopharm AG och relevanta myndigheter.

8. Protokoll för att generera en färgkompenseringsfil på LightCycler[®] 480 II

8.1 Förberedelse för färgkompensering

Tina, blanda och centrifugera reagenserna kort före användning. Kyl alltid alla reagenser under arbetssteg (2 °C till -8 °C). För en färgkompenseringskörning, pipettera fem reaktioner med 20 μ L av varje färgämne inklusive bakgrunden (Blank) till en mikrotiterplatta (s. Fig. 1).



Figur 1: Pipetteringsschema för färgkompensering på LightCycler[®] 480 II.

		0 1 0	0 ,
Kitkod	Reagens	Kvantitet per reaktion	Pipettera 20 µL vardera i följande brunnar
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

 Tabell 3:
 Förberedelse av färgkompensering för LightCycler[®] 480 II

Efter pipettering av reagenserna, försegla mikrotiterplattan med optisk folie och centrifugera om möjligt. Starta realtids-PCR enligt enhetsinställningarna.

8.2 Konfiguration av PCR-instrument

Obs: Logga in på programvaran som administratör för att ställa in detektionsformatet.

1. När du har öppnat programvaran klickar du på ikonen "**Tools**" för att programmera detektionsformatet (se följande figur).

Instrument:	Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected	Database	: My Computer (Research)	Roche
Window:	LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP3 Version 1.5.1.62	User:	System Aamin	1
	Gene Scanning	19	Experiment Creation White Plates Outer Plates Now Experiment from Macro New Experiment from Macro New Experiment from Jemplate	
	Endpoint Genotyping Absolute Quantification			
	Warning 13.01.2021 15:21:41 Please activate an instrument before setting up a new run. Warning 13.01.2021 15:21:54 Please activate an instrument before setting up a new run.		10_ 10_	(?)

 Följande fönster öppnas. I fönstret Verktyg väljer du "Detection Formats". Klicka på knappen "New" för att skapa ett nytt detektionsformat. Flik. 4) och spara den som "RIDA[®]GENE" (se följande figur).



Tabell 4:	Detekteringskanal för LightCycler [®] 480 II

Obs: Ställ in värdet för Quant Factor, Melt Factor och Integration Time på 1 (standard).

Klicka på knappen "Close" för att avsluta fönstret Verktyg.

3. När du har programmerat detektionsformatet klickar du på knappen "**New Experiment**" (se följande figur).

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected	Database: My Computer	(Research)
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP3 Version 1.5.1.62	user: System Admi	₽
Gene Scanning		Are Experiment from Macro Are Experiment from Are Experi
Endpoint Genotyping Absolute Quantification		101
Warning 13.01.2021 15:21:54 Flease activate an instrument before setting up a new run.		

4. Välj detektionsformatet "**RIDA[®]GENE**" och ange en reaktionsvolym på 20 μL (standard) (se följande figur).

Window:	New Experiment			<u> </u>
Experi-	Run Protocol	Data		Ru
mem	Ene		Customize Blo	ock Sile 96
Subset	C-ICID	L se Ma	Test ID	

5. Programmera den termiska profilen (s. Flik. 5).

Tabell 5:Termisk profil

		Temperature targets							
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				
Cualing	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4,4				
Cycling	5 / Quantinication	60	single	00:00:30	2,2				
		95	none	00:00:01	4,4				
TM Analysis	1 / Color Compensation	50	none	00:00:30	2,2				
Thir Analysis		70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*				

Obs: Se till att antalet "Cycles" och "Analysis Mode" är korrekta.

* Ramphastigheten kan variera något beroende på vilket detektorformat som valts.

6. Efter att programmeringen är klar ska experimentet se ut enligt följande (se följande figur).



7. För att programmera layouten på mikrotiterplattan, växla till "Subset Editor". Klicka på ikonen "Plus" för att skapa en ny delmängd och ange ett namn för layouten (t.ex. Color Compensation). Håll Ctrl-tangenten och vänster musknapp intryckta och markera alla brunnar som innehåller reagenser i mikrotiterplattan (se figurerna 1 och 2). Klicka på knappen "Apply" för att avsluta delmängden. Skärmen ska visas enligt följande (se följande figur).

Instrument	trument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Datab										Database		
Window:	New Experiment											•	User:
<u> </u>	Subsets		New Subset	1 settings									
ment	12 Hanne Annalys S	Report											
	2 Color Compensati	~		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Editor		_											
Luitor													
Sample Editor			A										
\equiv													
Analysis			в										
Report													
Sum.			С										
\square													
			D										
		È	E										
			F										
	J		G										
				(
			н										

Byt till "Sample Editor ". Från steg 1: "Select Workflow " välj "Color Comp ". I steg 2: "Select Samples ", välj den tidigare inställda delmängden (Color Compensation). För att avsluta layouten väljer du motsvarande dominerande kanal för varje reagens (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) i fältet "Dominant Channel" (s. Tab.). 6). Välj "Water" för reaktionerna med färgbakgrunden (Blank) (se följande figur).

Ins	trument	t: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Co	nnect	ted							Database
w	ndow:	New Experiment	_							-	User:
_	_	- Stop 1: Select Workflow				- Solost Filtor	ombin	ations		_	
E	kperi-	Abs Quant Rel Quant Scanning	•	olor C	omp	- Select Filter	Combina	auons			
	nent	📋 🔿 Tm 💦 Melt Geno 🔿 Endpt Gera			₩ 465-510 ₩ 533-580 ₩ 533-610 ₩ 618-660						
Ē											
F	ditor	- Stop 2: Select Sar ples-	_	°0	Color	Repl Of Sampl	Name	Dominant			
	/	Subset: Color Compen V B Q Q	וו		_		-	Channel			
S	mple		2	 B2 CO 		Blank		Water •			
E	ditor			C2		Blank		Water			
		B		D2		Blank		water			
ſ				E2		Blank		Water			
A	alysis		-1	F2		Blank		Water			
			r I I	B4		Dye 1		440-488			
				C4		Dye 1		440-488			
R	eport		-	D4		Dye 1		440-488			
				E4		Dye 1		440-488			
ſ				F4		Dye 1		440-488			
1	Sum.	Dominant Channel	7	B6		Dye 2		465-510			
			-	C6		Dye 2		465-510			
		Water 440-488 465-510		D6		Dye 2		465-510			
		533-580 533-610 618-660		E6		Dye 2		465-510			
				F6		Dye 2		465-510			
				B8		Dye 3		533-580			
				C8		Dye 3		533-580			
				D8		Dye 3		533-580			
			4	E8		Dye 3		533-580			
				F8		Dye 3		533-580			
				B10		Dye 4		533-610			
				C10		Dye 4		533-610			
				D10		D., 4		533-610			
				E10		Dye 4		533-610			
				F10		Dye 4		533-610			
				B12		Dye 5		618-660			
				C12		Dye 5		618-660			
				D12		Dye 5		618-660			
			_	E12		Dye 5		618-660			
		Step 3: Edit Color Comp Properties	_	F12		Dye 5		618-660			
		Sample Name	-						-		

 Tabell 6:
 Dominanta kanalinställningar för reagenserna (LightCycler[®] 480 II)

Reagens	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. Placera plattan med de förberedda reaktionerna i enheten. Klicka på **"Experiment**" och sedan **"Start Run**" för att starta experimentet (se följande figur).



8.3 Utvärdering och skapande av en färgkompenseringsfil

1. När du har slutfört LightCycler[®]-experimentet klickar du på knappen "**Analysis**" (se följande figur).



2. I dialogrutan "**Create New Analysis** " går dutill **"Color Compensation** ". Välj och bekräfta lämplig delmängd (t.ex. Color Compensation) i dialogrutan som öppnas (se följande figur).

Create New Analysis	
Abs Quant/2nd Derivative Max Abs Quant/Fit Points	Create new analysis
Advanced Relative Quantification Basic Relative Quantification	Analysis Type * Color Compensation
Color Compensation	Subset * Color Compensation
Endpoint Genotyping Melt Curve Genotyping	Program * TM
Tm Calling	Name * Color Compensation
1	1 2 3 4 5 6 7 8 9
	B
	C
	E
	F
	G

3. Analysen öppnas; klicka på "**Calculate**" och sedan på "**Save CC Object**" (se följande figur).



4. Spara färgkompenseringsfilen som "**RIDA**[®]**GENE CCIV"**i mappen "**CCC**" (se följande figur).

Save Color Compensation	
Save Collo Compensation	

Den här filen är sedan tillgänglig för andra LightCycler[®] 480 II-experiment. Generering av färgkompenseringsfilen är nu klar.

8.4 Användning av färgkompenseringsfilen

För att använda färgkompenseringsfilen, öppna det givna RIDA[®]GENE realtids-PCR-experimentet och ladda önskad färgkompensation under "**Experiment**" "**Data**". I rullgardinsmenyn "Color Comp (Off)" väljer du "**in Database**" och sedan den sparade färgkompenseringsfilen (s. Fig. 2).



Figur 2: Användning av färgkompensationen

När färgkompenseringen väljs ändras knappen "**Color Comp (Off)**" till "**Color Comp (On)**". Den valda färgkompenseringen tillämpas automatiskt på alla filter i analysen. RIDA[®] GENE realtids-PCR-körning kan nu analyseras som vanligt.

Obs: Färgkompenseringsfilen är specifik för varje LightCycler[®] 480 II. En ny färgkompenseringsfil behövs om enheten byts ut eller den optiska enheten repareras.

9. Versionshistorik

Versionsnummer	Avsnitt och benämning
2021-09-09	Föregående version
2022-02-03	Allmän revidering: 4. Reagenser som ingår 5. Förvaringsanvisningar 6. Nödvändiga reagenser som inte medföljer 7. Varningar och försiktighetsåtgärder för användare

10. Symbolförklaringar

Allmänna symboler

IVD	För in-vitro -diagnostisk användning
i	Se användarhandboken
LOT	Batchnummer
Σ	Använd före
X	Förvaringstemperatur
REF	Artikelnummer
\ ∑	Antal tester
<u>س</u>	Tillverkningsdatum
	Tillverkare

Testspecifika symboler

Blank	Tom
Dye 1	Färgämne 1
Dye 2	Färgämne 2
Dye 3	Färgämne 3
Dye 4	Färgämne 4
Dye 5	Färgämne 5