


RIDA[®] GENE Color Compensation Kit II

Art. Nr.: PG0002

3 Reaktionen

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

1. Verwendungszweck

Das RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II dient der Farbstoffkalibrierung von duplex und triplex real-time PCR-Läufen auf dem LightCycler[®] 1.5 und 2.0. Mit dem RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II kann ein Color Compensation File erstellt werden, das es ermöglicht multiplex real-time PCR Läufe von RIDA[®]GENE real-time PCR Kits auf dem LightCycler[®] 1.5 und 2.0 zu analysieren.

2. Erläuterung

Bei einer multiplex real-time PCR kann sich das emittierte Fluoreszenzsignal eines Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes auf einen benachbarten Farbstoffkanal überlagern und in diesem Kanal ein Signal erzeugen (Crosstalk). Der Crosstalk von Fluoreszenzsignalen kann zu falschen Ergebnissen führen, wenn keine Korrektur durch ein Color Compensation File durchgeführt wird. Mit dem Color Compensation File können Farbstoffüberlagerungen zwischen den Farbstoffkanälen kompensiert werden.

3. Packungsinhalt

Tab.1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 3 Color Compensation Läufe)

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Blank	1x 80 µl	weiß
2	Dye 1	1x 80 µl	grün
3	Dye 2	1x 80 µl	gelb
4	Dye 3	1x 80 µl	rot

4. Reagenzien und ihre Lagerung

- Das RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II muss lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und kann bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden.
- Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollte das RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Alle Reagenzien während der Herstellung der Color Compensation geeignet kühlen (2 - 8 °C).

5. Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- LightCycler[®] 1.5 oder 2.0 (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (LightCycler[®] Kapillaren)
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern

6. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Reagenzien Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

7. Protokoll zur Erstellung eines Color Compensation Files auf dem LightCycler® 1.5

7.1 Herstellung der Color Compensation

Für einen Color Compensation Lauf muss je Farbstoff, inklusive dem Farbstoffhintergrund (Blank), eine Reaktion mit je 20 µl des entsprechenden Reagenz in eine LightCycler® Kapillare pipettiert werden. In Kapillare 4 muss zu den 20 µl Dye 3 noch 1 µl Dye 1 pipettiert werden (s. Tab.2).

Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab.2: Herstellung der Color Compensation

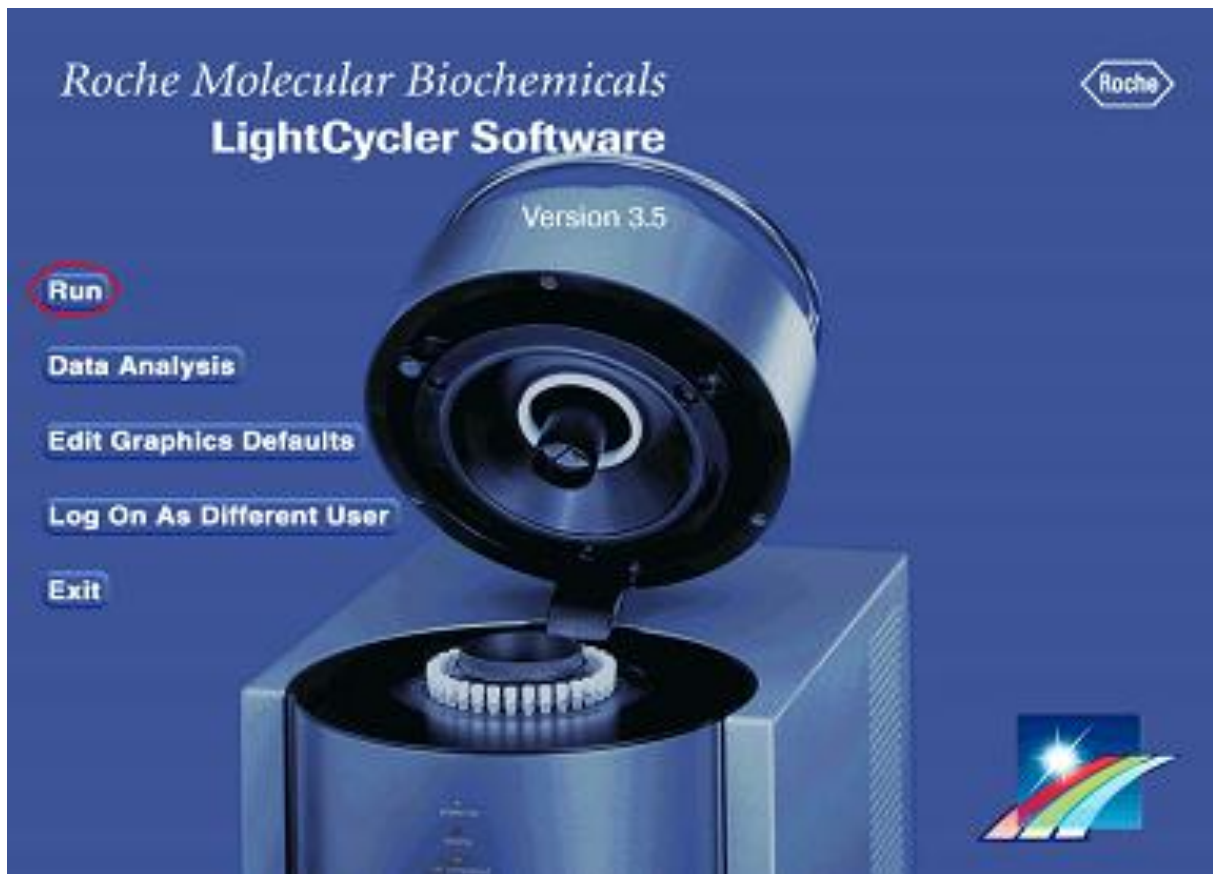
Kit Code	Reagenz	Menge pro Reaktion			
		Kapillare Position 1	Kapillare Position 2	Kapillare Position 3	Kapillare Position 4
1	Blank	20 µl	-	-	-
2	Dye 1	-	20 µl	-	1 µl
3	Dye 2	-	-	20 µl	-
4	Dye 3	-	-	-	20 µl

Die LightCycler® Kapillaren nach dem Pipettieren verschließen und anschließend kurz zentrifugieren. Die real-time PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten.

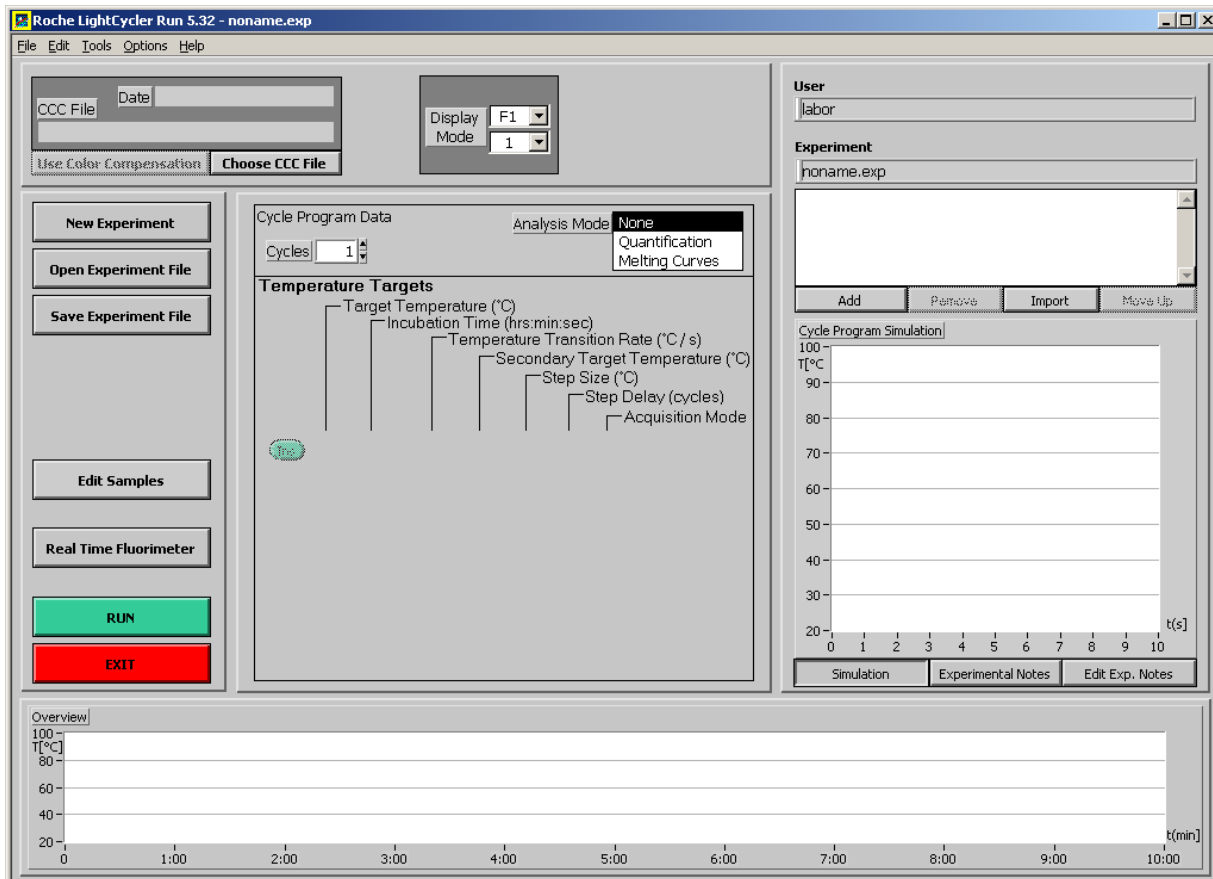
Hinweis: Die Reihenfolge der LightCycler® Kapillaren im LightCycler®-Karussell einhalten.

7.2 Geräteeinstellung LightCycler® 1.5

1. Nach dem Öffnen der LightCycler® Software ist es erforderlich, durch Drücken des Buttons **“Run”** ein neues **“LightCycler Experiment“** zu öffnen.



2. Das folgende Fenster öffnet sich.

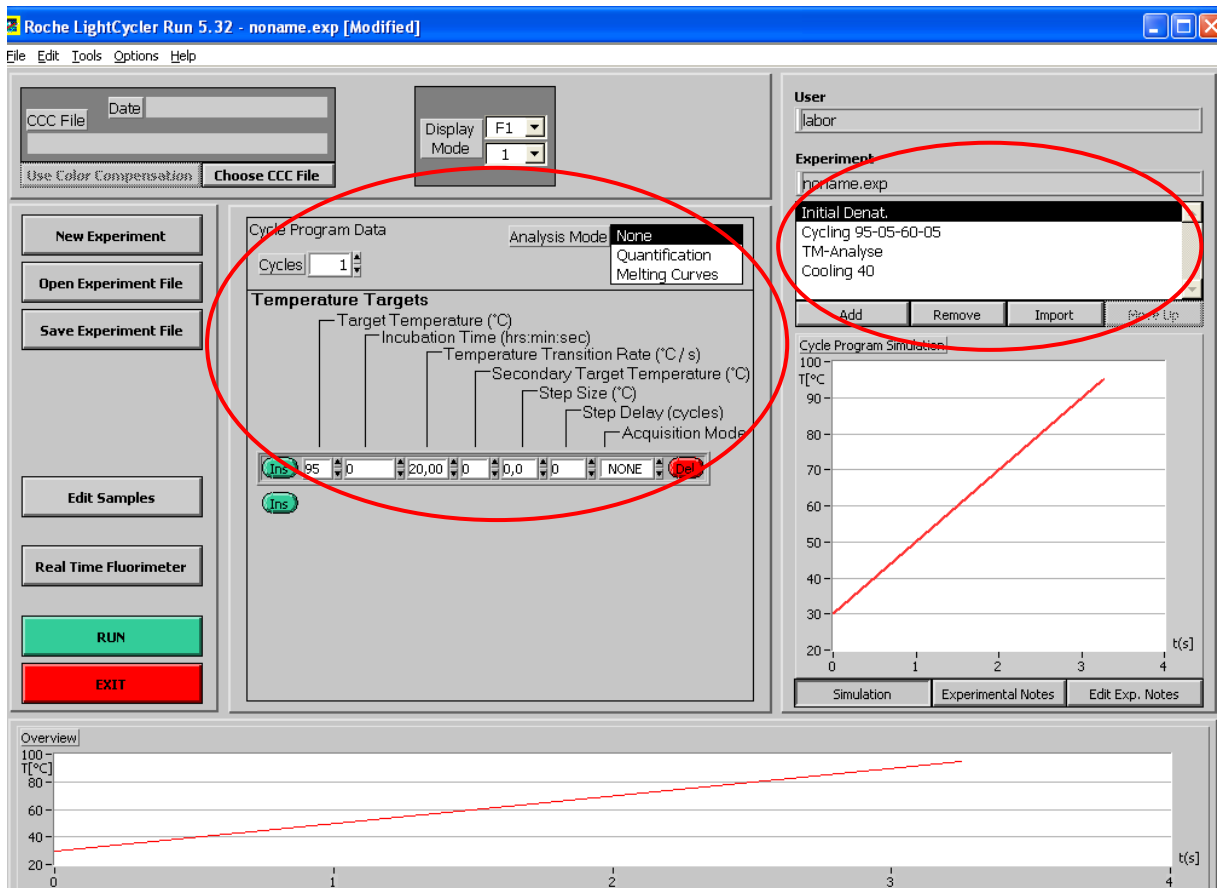


3. Den LightCycler[®] entsprechend des real-time PCR-Profiles (Tab.3) programmieren. Die 4 Programmschritte mit dem Button „Add“ erstellen.

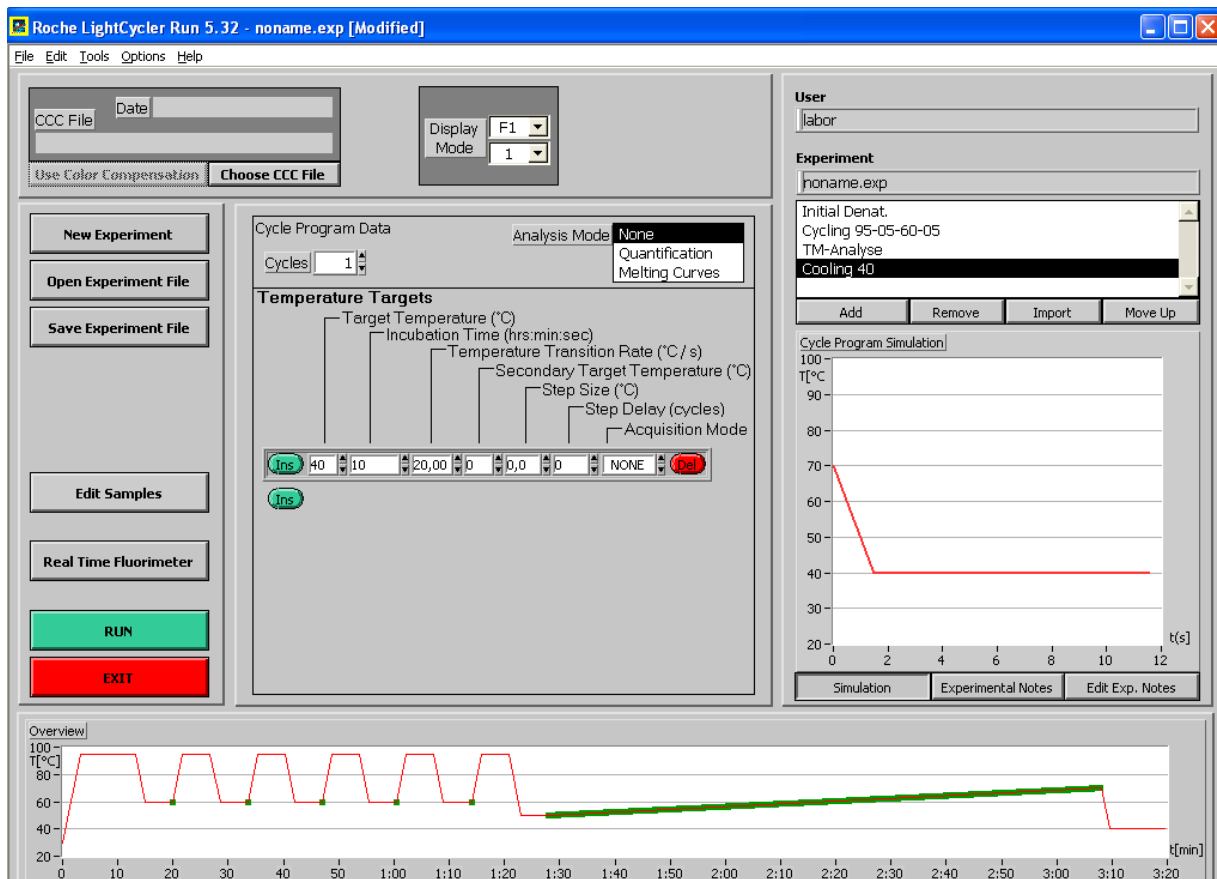
Tab.3: LightCycler[®] real-time PCR Profil

Program	Cycles / Analysis Mode	Temperature targets			
		Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°C/s]
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:05	20
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:05	20
		60	single	00:00:05	20
TM-Analyse	1 / Color Compensation	95	none	00:00:05	20
		50	none	00:00:05	20
		70	continuous		0.2 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling 40	1 / none	40	none	00:00:10	20

Hinweis: Auf die richtige Einstellung der Anzahl der “Cycles” und des “Analysis Mode” achten.



4. Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des “LightCycler Experimentes“.



5. Die Kapillaren in das LightCycler®-Karussell überführen und in den LightCycler® 1.5 setzen. Links mit dem Button "Run" den Lauf starten und in dem entsprechenden Ordner abspeichern.

Es öffnet sich nun das Fenster zum Programmieren des Layouts. Hier wird nun die Anzahl an Kapillaren bei "Maximum Position" eingetragen und mit Enter bestätigt. Durch Drücken des Buttons "Done" startet anschließend der Lauf.

File Edit Help

LC Carousel Please edit the sample data for this run.

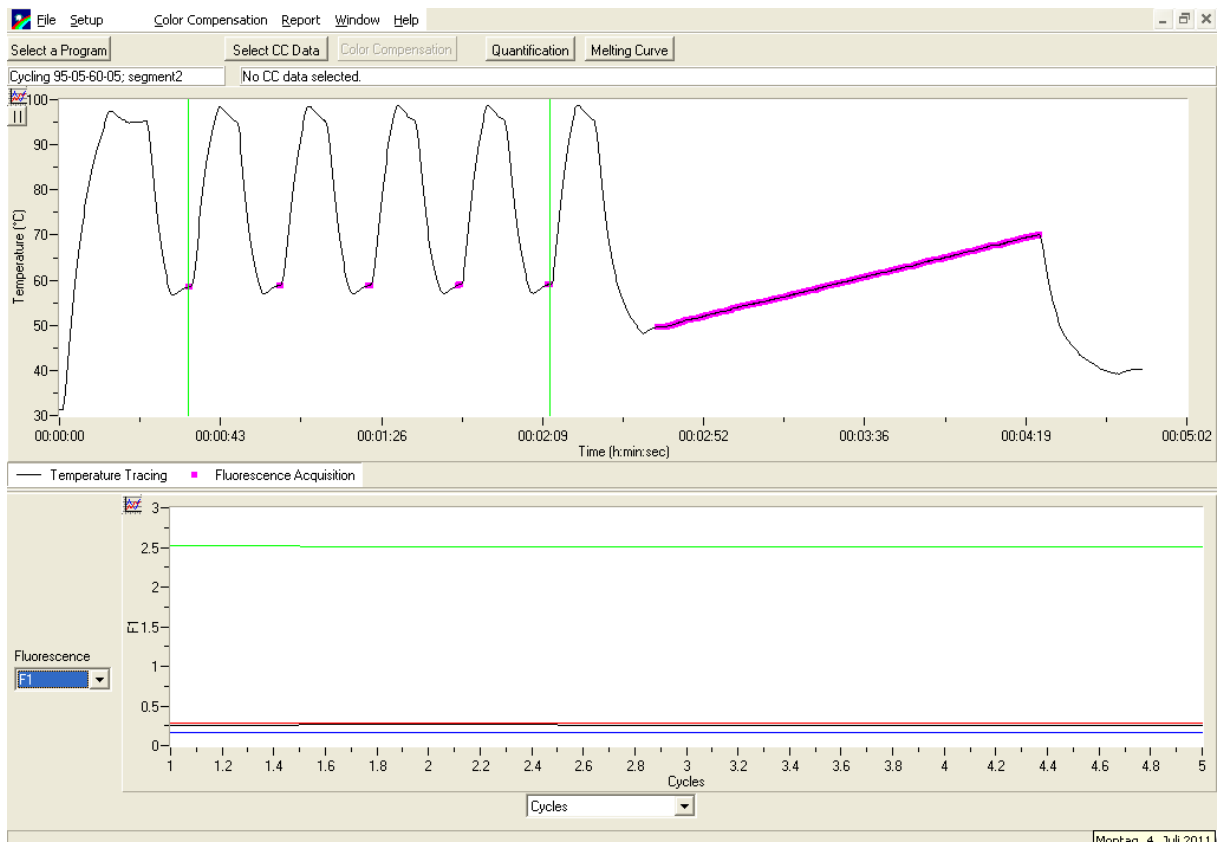
#	Sample Name	Type	Replicate of	Concentration	Notes	#	Sample Name	Type	Replicate of	Concentration	Notes
1	Sample 1	Unknown	0	0,00E+0		17	Sample 17	Unknown	0	0,00E+0	
2	Sample 2	Unknown	0	0,00E+0		18	Sample 18	Unknown	0	0,00E+0	
3	Sample 3	Unknown	0	0,00E+0		19	Sample 19	Unknown	0	0,00E+0	
4	Sample 4	Unknown	0	0,00E+0		20	Sample 20	Unknown	0	0,00E+0	
5	Sample 5	Unknown	0	0,00E+0		21	Sample 21	Unknown	0	0,00E+0	
6	Sample 6	Unknown	0	0,00E+0		22	Sample 22	Unknown	0	0,00E+0	
7	Sample 7	Unknown	0	0,00E+0		23	Sample 23	Unknown	0	0,00E+0	
8	Sample 8	Unknown	0	0,00E+0		24	Sample 24	Unknown	0	0,00E+0	
9	Sample 9	Unknown	0	0,00E+0		25	Sample 25	Unknown	0	0,00E+0	
10	Sample 10	Unknown	0	0,00E+0		26	Sample 26	Unknown	0	0,00E+0	
11	Sample 11	Unknown	0	0,00E+0		27	Sample 27	Unknown	0	0,00E+0	
12	Sample 12	Unknown	0	0,00E+0		28	Sample 28	Unknown	0	0,00E+0	
13	Sample 13	Unknown	0	0,00E+0		29	Sample 29	Unknown	0	0,00E+0	
14	Sample 14	Unknown	0	0,00E+0		30	Sample 30	Unknown	0	0,00E+0	
15	Sample 15	Unknown	0	0,00E+0		31	Sample 31	Unknown	0	0,00E+0	
16	Sample 16	Unknown	0	0,00E+0		32	Sample 32	Unknown	0	0,00E+0	

Seek Temperature: 30 Maximum Position: 4 Done

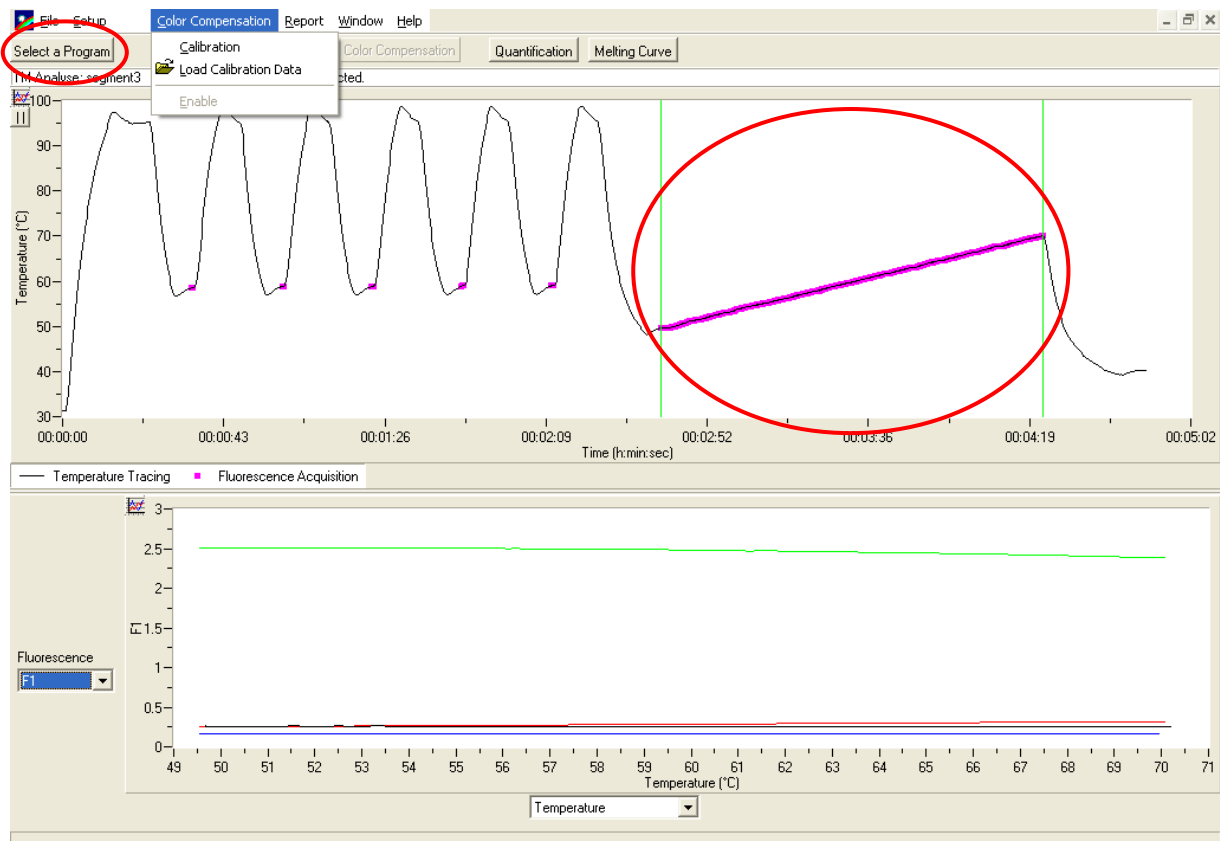
Enter Samples later Clear Sample List Default Sample List Concentration Units

7.3 Auswertung und Erstellung eines Color Compensation Files

1. Nach Abschluss des LightCycler Experiments bietet sich folgendes Bild.



2. Über **“Select A Program“** das Segment 3 (TM-Analyse) für die Color Compensation auswählen. Es ist nach Wahl des Segmentes 3 darauf zu achten, dass tatsächlich die grünen Linien den Beginn und das Ende der Schmelzkurve zeigen. Danach wird über den Menüpunkt **„Color Compensation“** der Punkt **„Calibration“** ausgewählt.



Anschließend wird das Color Compensation File abgespeichert. Danach steht dieser File für andere LightCycler®-Läufe zur Verfügung. Damit ist die Generierung der Farbstoff-Kalibrierungsdatei abgeschlossen.

Zum Anwenden der Color Compensation den jeweiligen multiplex Lauf öffnen und unter **„Select CC Data“** das entsprechende Color Compensation File importieren und auswählen. Dann den entsprechenden Kanal (z.B. F1 oder F2) auswählen und durch drücken des Buttons **„Quantification“** den Lauf zur Analyse öffnen.

Hinweis: Das Color Compensation File ist spezifisch für das jeweilige Gerät, d.h. bei einem Wechsel des Gerätes oder bei Reparatur der optischen Einheit ist eine neue Color Compensation nötig.

8. Protokoll zur Erstellung eines Color Compensation Files auf dem LightCycler® 2.0

8.1 Herstellung der Color Compensation

Für einen Color Compensation Lauf muss je Farbstoff, inklusive dem Farbstoffhintergrund (Blank), eine Reaktion mit je 20 µl des entsprechenden Reagenz in eine LightCycler® Kapillare pipettiert werden (s. Tab.4).

Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab.4: Herstellung des Color Compensation Laufes

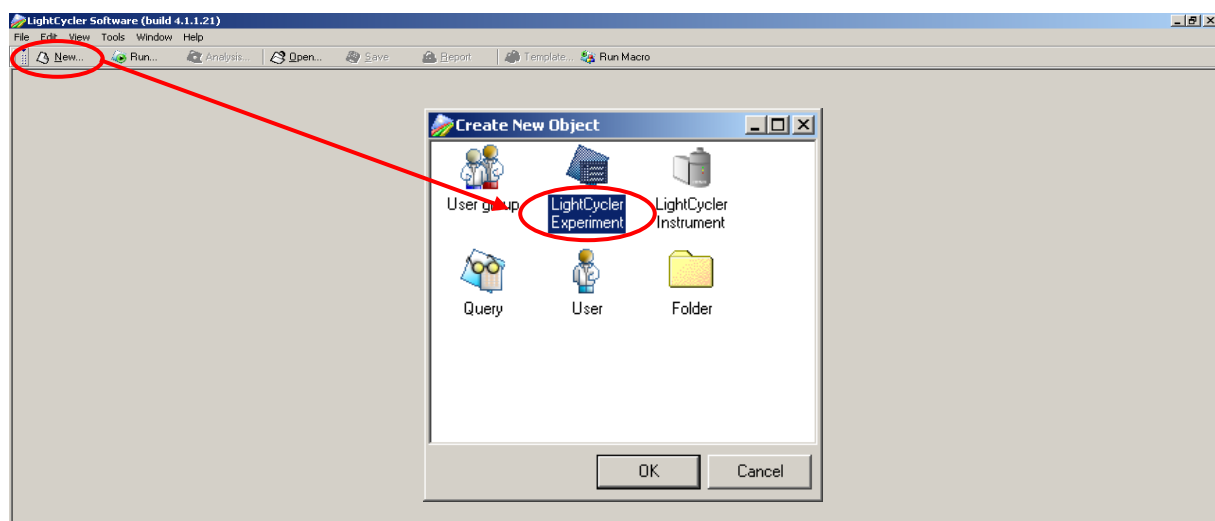
Kit Code	Reagenz	Menge pro Reaktion	Position der Kapillare
1	Blank	20 µl	1
2	Dye 1	20 µl	2
3	Dye 2	20 µl	3
4	Dye 3	20 µl	4

Die LightCycler® Kapillaren nach dem Pipettieren verschließen und anschließend kurz zentrifugieren. Die real-time PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten.

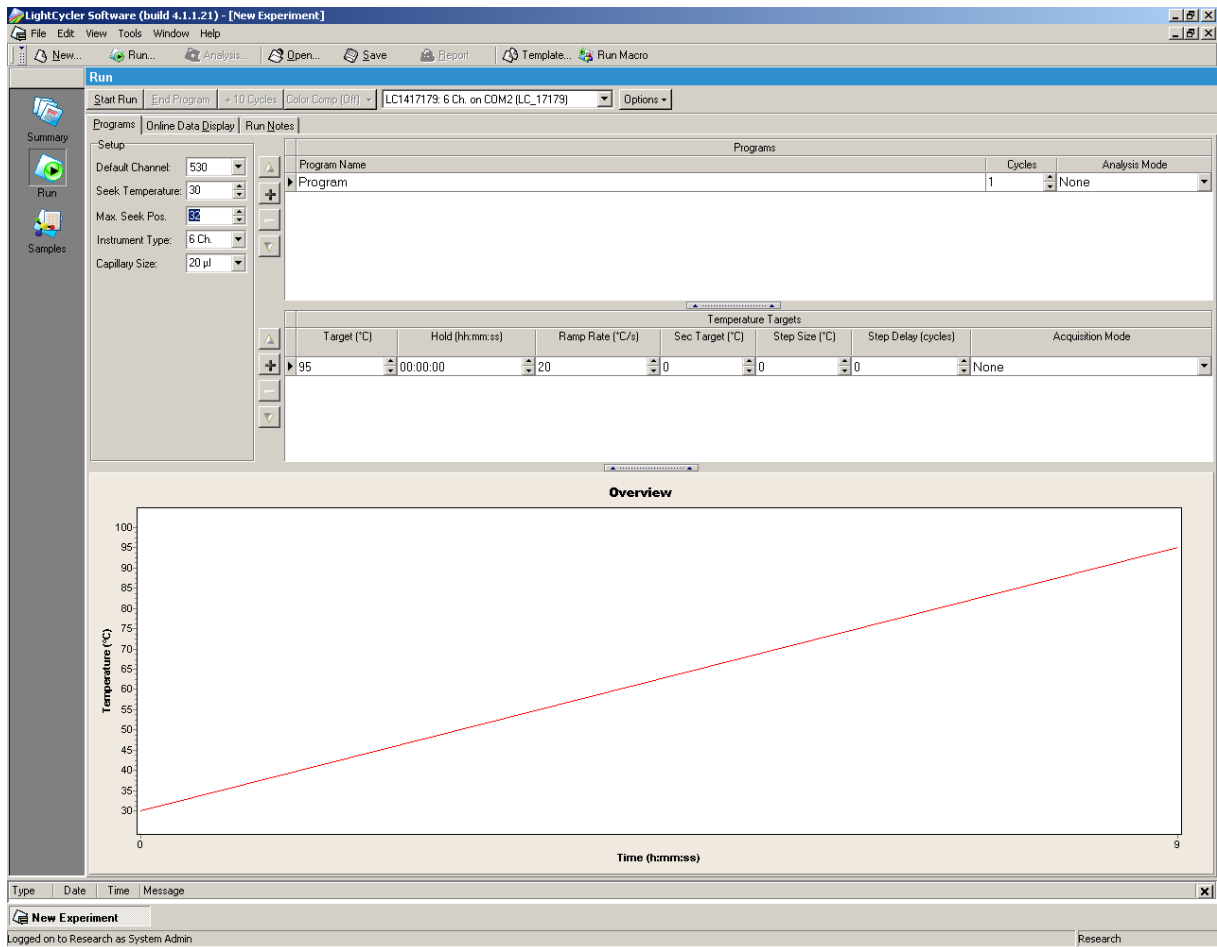
Hinweis: Die Reihenfolge der LightCycler® Kapillaren im LightCycler®-Karussell einhalten.

8.2. Geräteeinstellung LightCycler® 2.0

1. Nach dem Öffnen der LightCycler® Software ist es erforderlich, durch Drücken des Buttons "New..." ein neues "LightCycler Experiment" zu öffnen.



2. Das folgende Fenster öffnet sich.



3. Den LightCycler[®] entsprechend der Einstellungen (Tab.5) und der Programmschritte des real-time PCR-Profiles (Tab.6) programmieren.

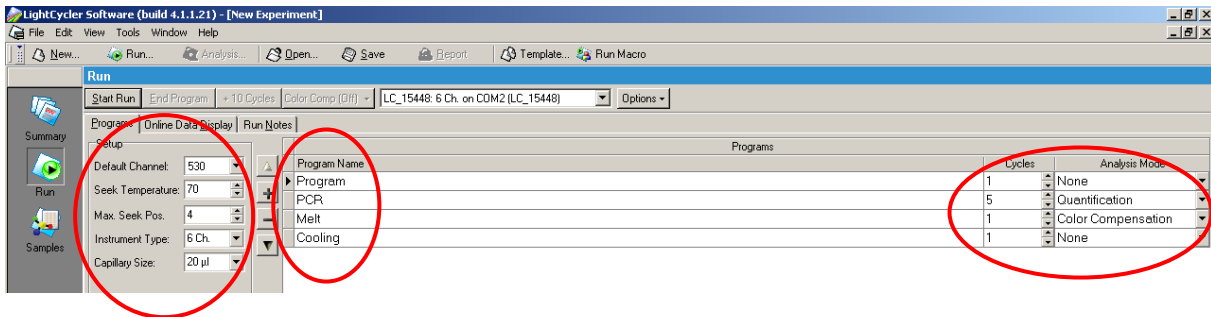
Tab.5: LightCycler[®] Einstellungen

Parameter	Einstellung
Default Channel	530
Seek Temperature	70 °C
Max. Seek Pos.	4
Instrument Type	6 Ch.
Capillary Size	20 µl

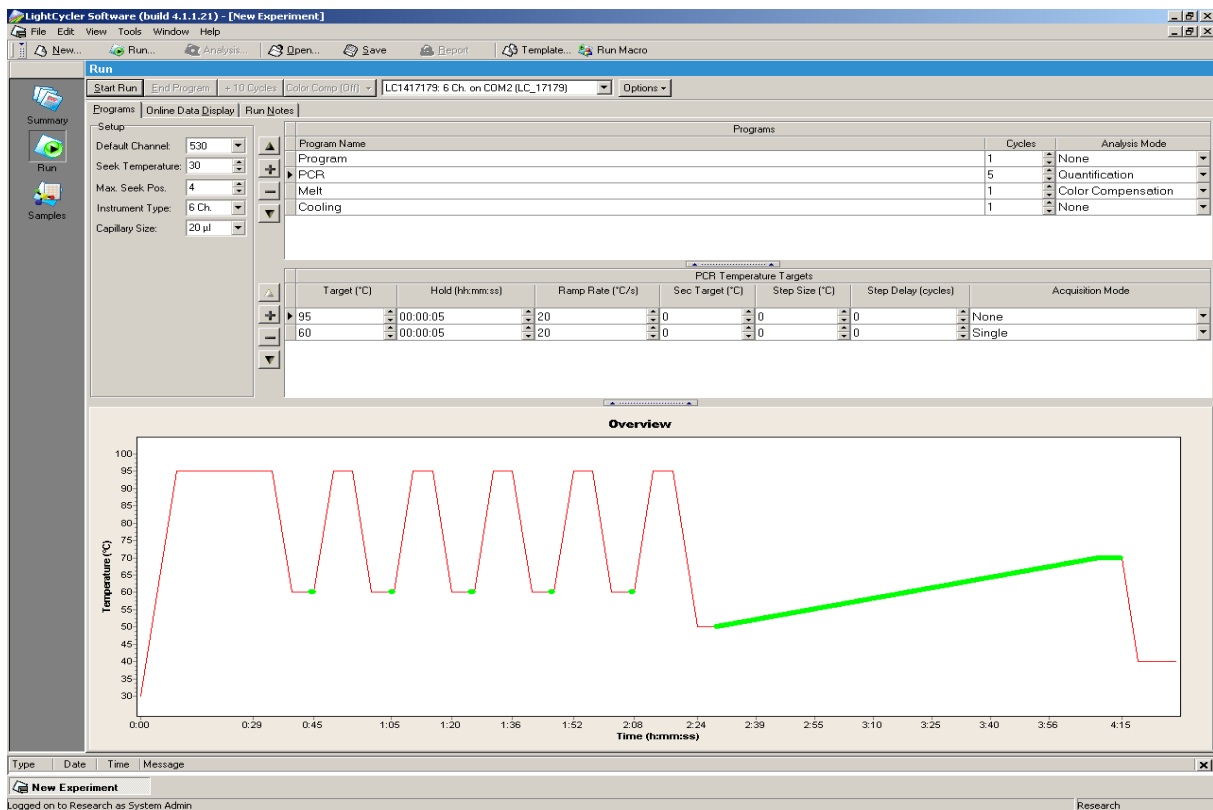
Tab.6: LightCycler® real-time PCR Profil

Program	Cycles / Analysis Mode	Temperature targets			
		Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°c/s]
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:05	20
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:05	20
		60	single	00:00:05	20
TM-Analyse	1 / Color Compensation	95	none	00:00:05	20
		50	none	00:00:05	20
		70	continuous		0.2 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling 40	1 / none	40	none	00:00:10	20

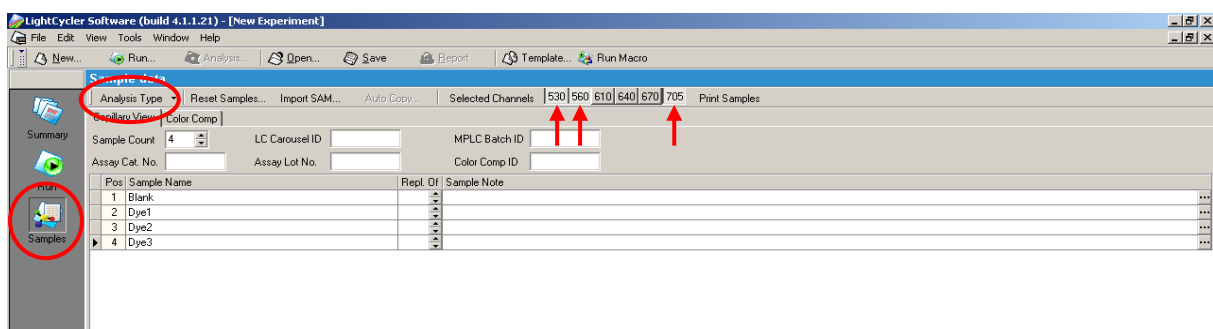
Hinweis: Auf die richtige Einstellung der Anzahl der “Cycles“ und des “Analysis Mode“ achten.



4. Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des **“LightCycler Experimentes“**.



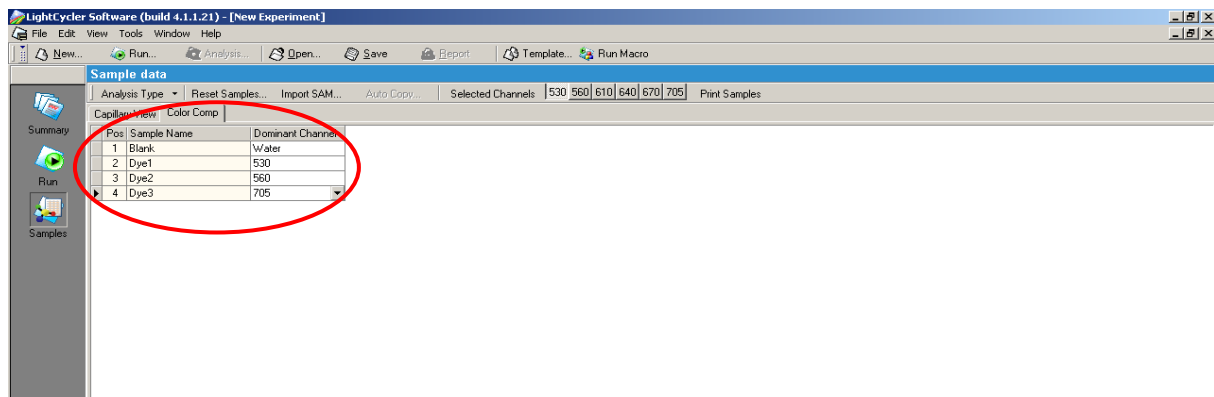
5. Für das Programmieren des Layouts für den Color Compensation Lauf, links auf den Button **“Samples“** klicken. Hier nun unter **“Analysis Type“** die Auswahl **“Color Compensation“** wählen.



6. Den jeweiligen Farbstoffen im Dialogfeld **“Dominant Channel“** einen Kanal zuordnen (s.Tab. 7). Für das Reagenz **“Blank“** den Kanal **“Water“** wählen. Es ist nicht nötig einen **“Sample Name“** anzugeben.

Tab.7: Detektionskanaleinstellung

Reagenz	Detektionskanal
Blank	Water
Dye1	530
Dye2	560
Dye3	705



Die Kapillaren in das LightCycler®-Karussell überführen und in den LightCycler® 2.0 setzen. Links mit dem Button "Run" den Lauf starten und in dem entsprechenden Ordner abspeichern.

8.3 Auswertung und Erstellung eines Color Compensation Files

Nach Abschluss des Experimentes auf den Button "Analysis" (in der oberen Leiste) klicken und die Dialog-Box "Create New Analysis" öffnen. Unter "Other Methods" auf "Color Compensation" gehen und die Auswahl bestätigen. In der sich öffnenden Analyse auf den Button "Save CC Object..." klicken und diesen Lauf als ein CC Objekt unter dem Ordner "CCC" abspeichern. Damit ist die Generierung Color Compensation Files abgeschlossen.

Zum Anwenden der Color Compensation den jeweiligen multiplex Lauf öffnen und unter "Analysis" die Analyse öffnen. Durch Klicken auf den Button "Color Compensation (Off)" das abgespeicherte Color Compensation File auswählen. Durch Wechseln des Buttons "Color Compensation (Off)" in "Color Compensation (On)" wird angezeigt, dass eine Farbstoffkalibrierung ausgewählt ist. Der multiplex real-time PCR Lauf kann nun ausgewertet werden.

Hinweis: Das Color Compensation File ist spezifisch für das jeweilige Gerät, d.h. bei einem Wechsel des Gerätes oder bei Reparatur der optischen Einheit ist eine neue Color Compensation nötig.