



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com


www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV

Art. Nr.: PG0004

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 IV dient der Farbstoffkalibrierung von 5-plex real-time PCR-Läufen auf dem LightCycler[®] 480II. Mit dem RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV kann ein Color Compensation File erstellt werden. Dieser ermöglicht 5-plex real-time PCR Läufe von RIDA[®]GENE real-time PCR Kits auf dem LightCycler[®] 480II zu analysieren.

2. Erläuterung

Bei einer 5-plex 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 400 µl	weiß
2	Dye 1	1x 400 µl	blau
3	Dye 2	1x 400 µl	grün
4	Dye 3	1x 400 µl	gelb
5	Dye 4	1x 400 µl	orange
6	Dye 5	1x 400 µl	rot

4. Reagenzien und ihre Lagerung

- Das RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV 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 IV 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[®] 480II (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Mikrotiterplatte, optische Folie)
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Zentrifuge
- Puderfreie Einmalhandschuhe

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 Einmalhandschuhe 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® 480II

7.1 Herstellung der Color Compensation

Für einen Color Compensation Lauf müssen je Farbstoff, inklusive dem Farbstoffhintergrund (Blank), fünf Reaktionen mit je 20 µl des entsprechenden Reagenz in eine Mikrotiterplatte pipettiert werden (s. Abb.1).

Abb.1 Pipettierschema Color Compensation Lauf

	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												

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

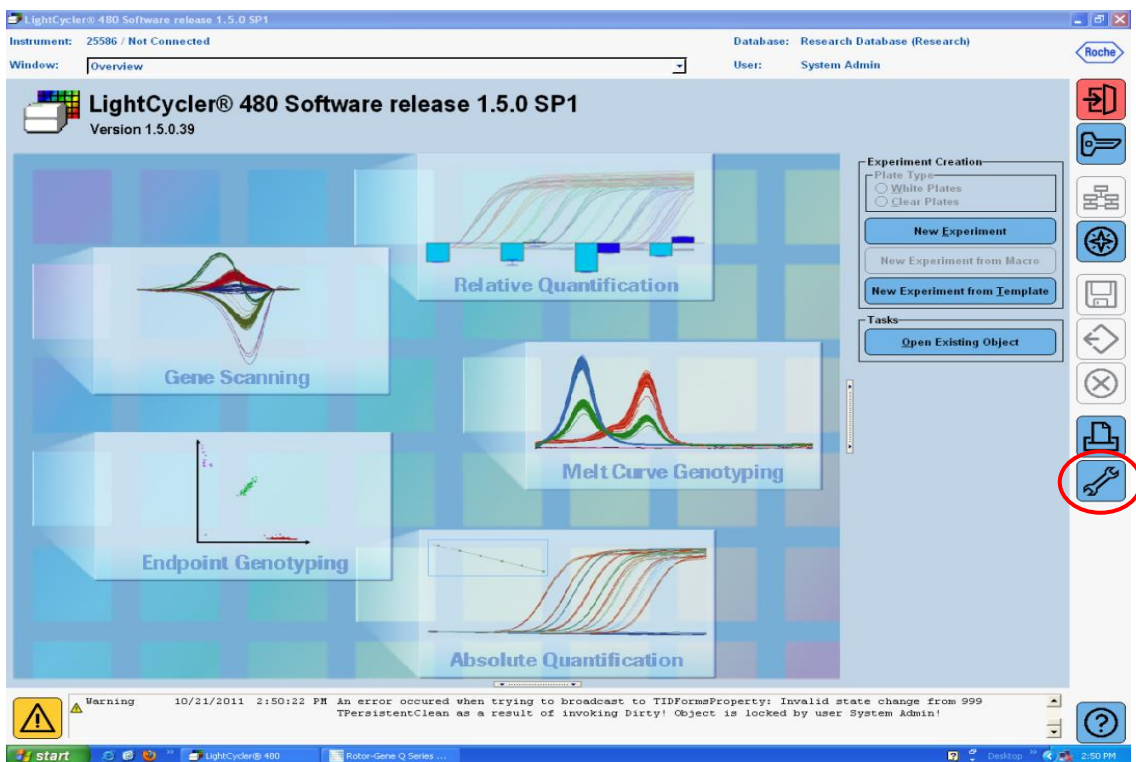
Kit Code	Reagenz	Menge pro Reaktion	Je 20 µl in folgende Wells pipettieren
1	Blank	20 µl	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µl	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µl	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µl	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µl	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µl	B12, C12, D12, E12, F12

Die Mikrotiterplatte nach dem Pipettieren mit einer optischen Folie verschließen. Die real-time PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten.

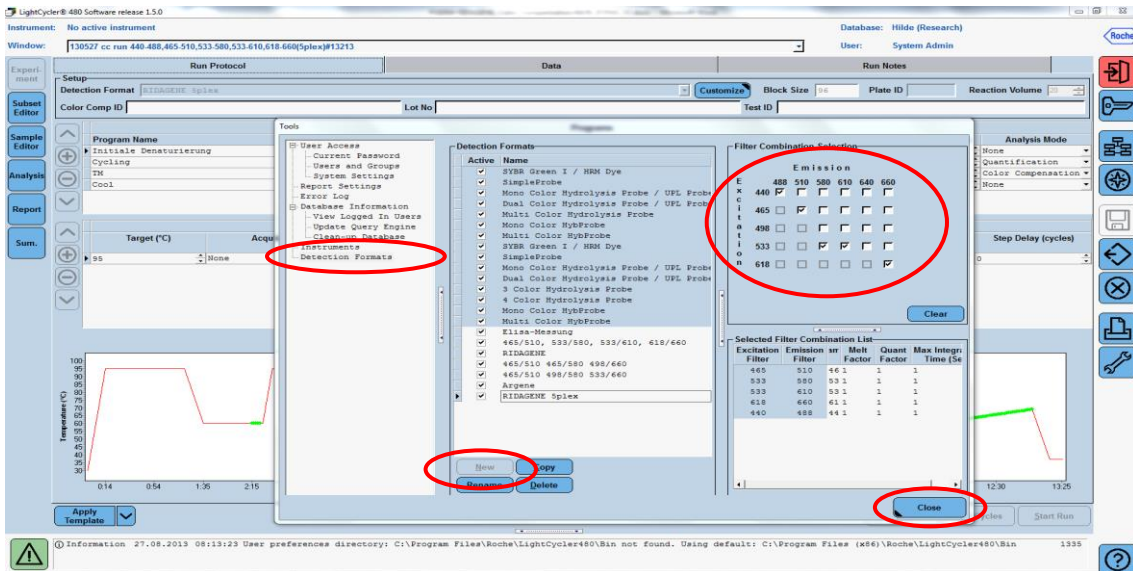
7.2 Geräteeinstellung LightCycler® 480II

Hinweis: Die Anmeldung der LightCycler® 480II Software muss als Administrator erfolgen um eine Einstellung des Detektionsformates durchzuführen.

1. Nach dem Öffnen der LightCycler® 480II Software ist es erforderlich, durch Drücken des **“Einstellungen”** Symbols, dass benötigte Detektionsformat zu programmieren.



2. Das folgende Fenster öffnet sich. Im Tools Fenster „**Detection Formats**“ auswählen. Durch Drücken des Buttons „**New**“ ein neues Detektionsformat anlegen (s. Tab.3) und als „**RIDA® GENE 5-plex**“ abspeichern. Das Tools Fenster durch Drücken des Buttons „**Close**“ schließen.

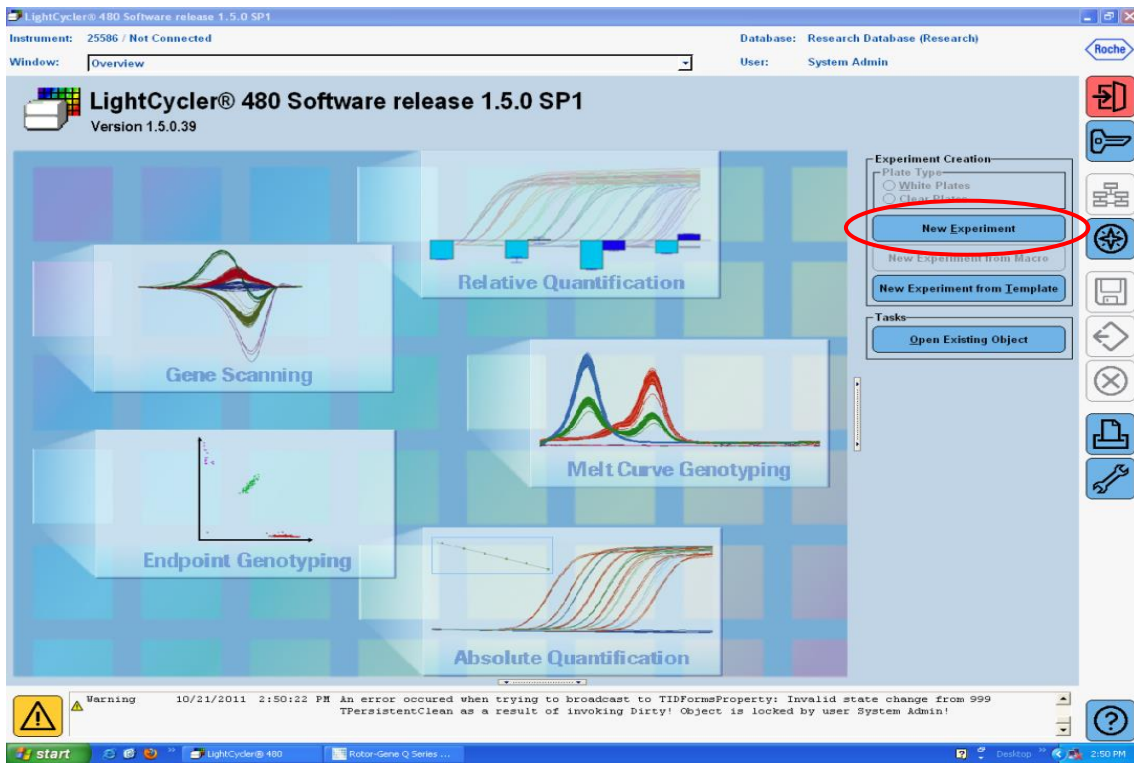


Tab.3: Detektionskanal Einstellung für den LightCycler® 480II

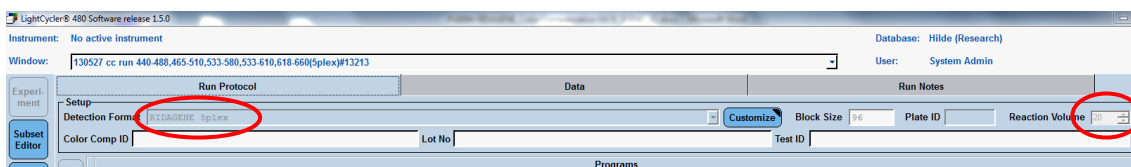
Filter Kombination
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Hinweis: Quant- und Melfaktoren sowie Integration Time jeweils auf 1 setzen.

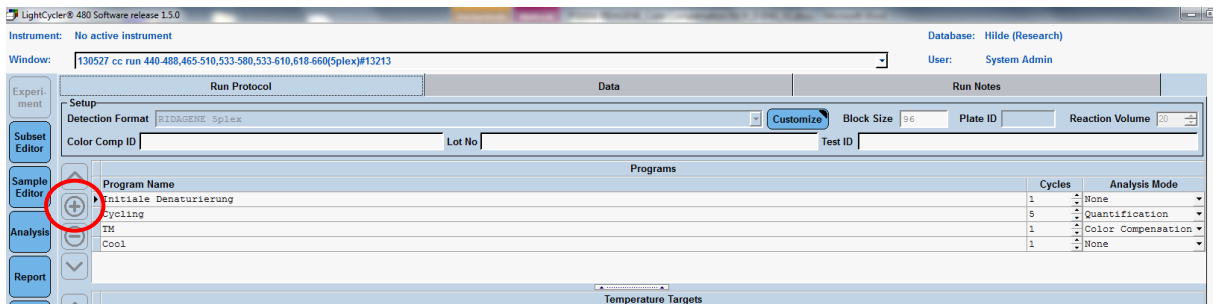
3. Nach der Programmierung des Detektionsformates den Button „New Experiment“ drücken.



4. Zunächst das Detektionsformat „RIDA[®]GENE 5-plex“ wählen und ein Reaktionsvolumen von 20 µl eintragen.



5. Den LightCycler® 480II entsprechend des real-time PCR-Profiles (s. Tab.4) programmieren. Die 4 Programmschritte mit dem „Plus“ Symbol erstellen.



Tab.4: LightCycler® 480II 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	00:00:30	4.4
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4.4
		60	single	00:00:30	2.2
TM-Analyse	1 / Melting Curves	95	none	00:00:01	4.4
		50	none	00:00:30	2.2
		70	continuous		0.14 (Acquisitions per °C = 1)
Cooling	1 / none	50	none	00:00:01	2.2

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

6. Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des LightCycler® 480II Experiments.

The screenshot displays the LightCycler 480 Software interface with the following components:

- Header:** LightCycler® 480 Software release 1.5.0 SP1. Instrument: 25586 / Not Connected. Database: Research Database (Research). User: System Admin.
- Navigation:** Experiment, Subset Editor, Sample Editor, Analysis, Report, Sum.
- Setup:** Detection Format: R-Biopharm. Block Size: 96. Plate ID: [blank]. Reaction Volume: 20.
- Programs Table:**

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Initial Denaturierung	1	None
Cycling	5	Quantification
TM	1	Melting Curves
Cooling	1	None
- Initial Denaturierung Temperature Targets Table:**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4.4	0	0	0	0
- Overview Graph:** A line graph showing Temperature (°C) on the y-axis (30 to 100) versus Estimated Time (hh:mm:ss) on the x-axis (0:00 to 9:25). The profile shows a series of heating and cooling cycles, with a final ramp up to 70°C.
- Buttons:** Apply Template, End Program, + 10 Cycles, Start Run.
- Warning Message:** 10/21/2011 2:51:46 PM An error occurred when trying to broadcast to TIDFormeProperty: Invalid state change from 999 TPersistentClean as a result of invoking Dirty! Object is locked by user System Admin!
- Taskbar:** Windows taskbar showing the start button, system tray, and open applications (LightCycler® 480, Rotor-Gene Q Series, Dokument1 - Microsoft...).

7. Für das Programmieren des Layouts der Mikrotiterplatte den Button „Subset Editor“ drücken.

The screenshot shows the LightCycler 480 Software interface. The 'Subset Editor' button is highlighted with a red circle. The interface includes a 'Run Protocol' section with 'Detection Format' set to 'R-Biopharm'. Below this is a 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Initial Denaturierung	1	None
Cycling	5	Quantification
TH	1	Melting Curves
Cooling	1	None

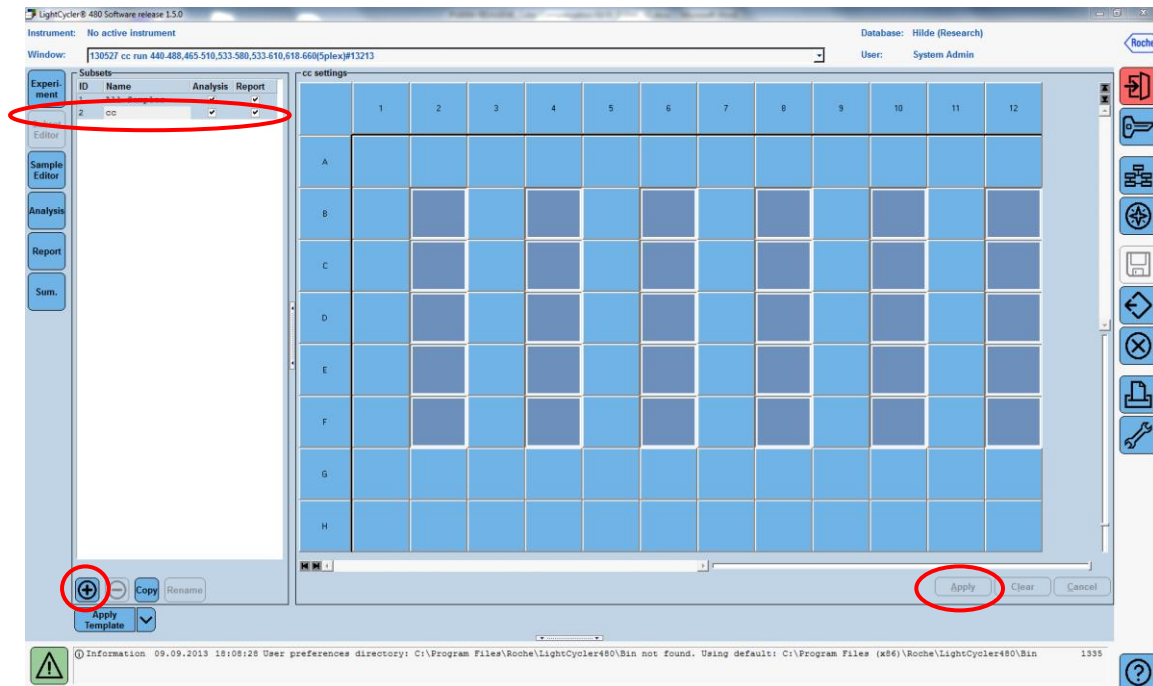
Below the programs table is an 'Initial Denaturierung Temperature Targets' table with the following data:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (h:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:30	4.4	0	0	0	0

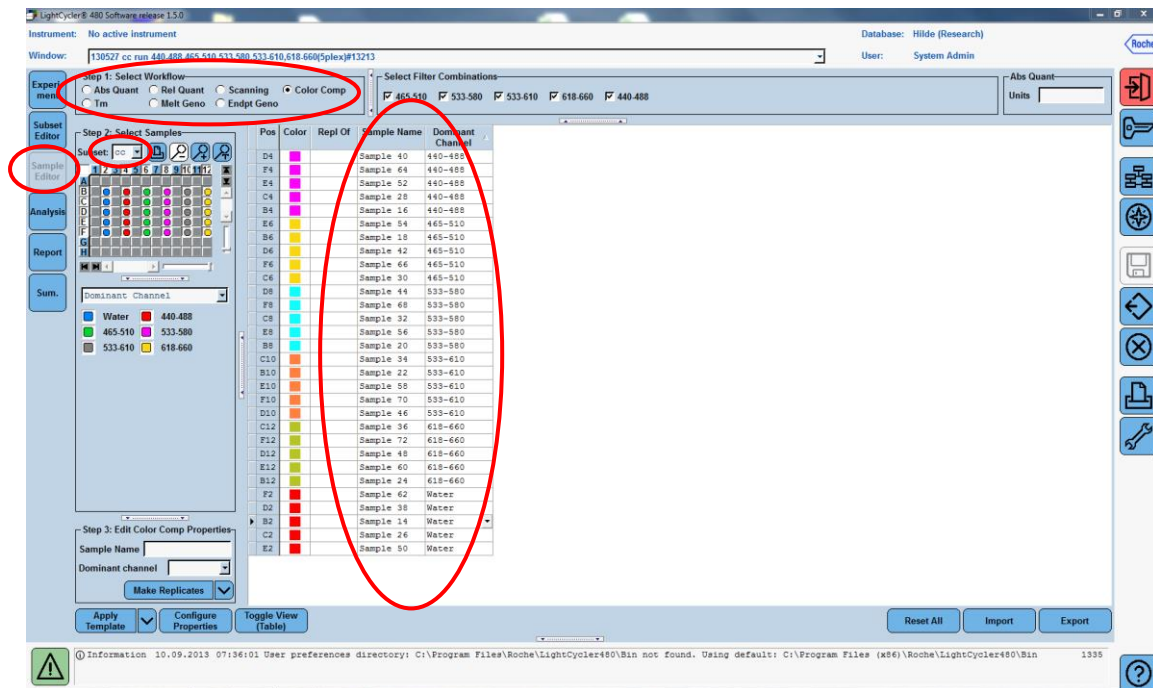
At the bottom of the interface is a graph titled 'Overview' showing Temperature (°C) on the y-axis (ranging from 30 to 100) and Estimated Time (h:mm:ss) on the x-axis (ranging from 0:00 to 9:25). The graph shows a series of temperature steps: a ramp up to 95°C, a hold, a ramp down to 60°C, a ramp up to 95°C, a hold, a ramp down to 60°C, and so on, ending with a final ramp up to 95°C.

A warning message is displayed at the bottom of the software window: "Warning 10/21/2011 2:51:46 PM An error occurred when trying to broadcast to TIDFormsProperty: Invalid state change from 999 TPersistentClean as a result of invoking Dirty! Object is locked by user System Admin!"

8. Durch das Drücken auf das „**Plus**“ Symbol ein neues Subset erstellen und dem Layout eine Bezeichnung geben (z.B. CC). Die Strg-Taste sowie linke Maustaste gedrückt lassen und alle Wells anwählen, in denen sich die Reagenzien in der Mikrotiterplatte befinden. Zur Fertigstellung des Subsets den Button „**Apply**“ drücken. Folgendes Subset Bild ergibt sich.



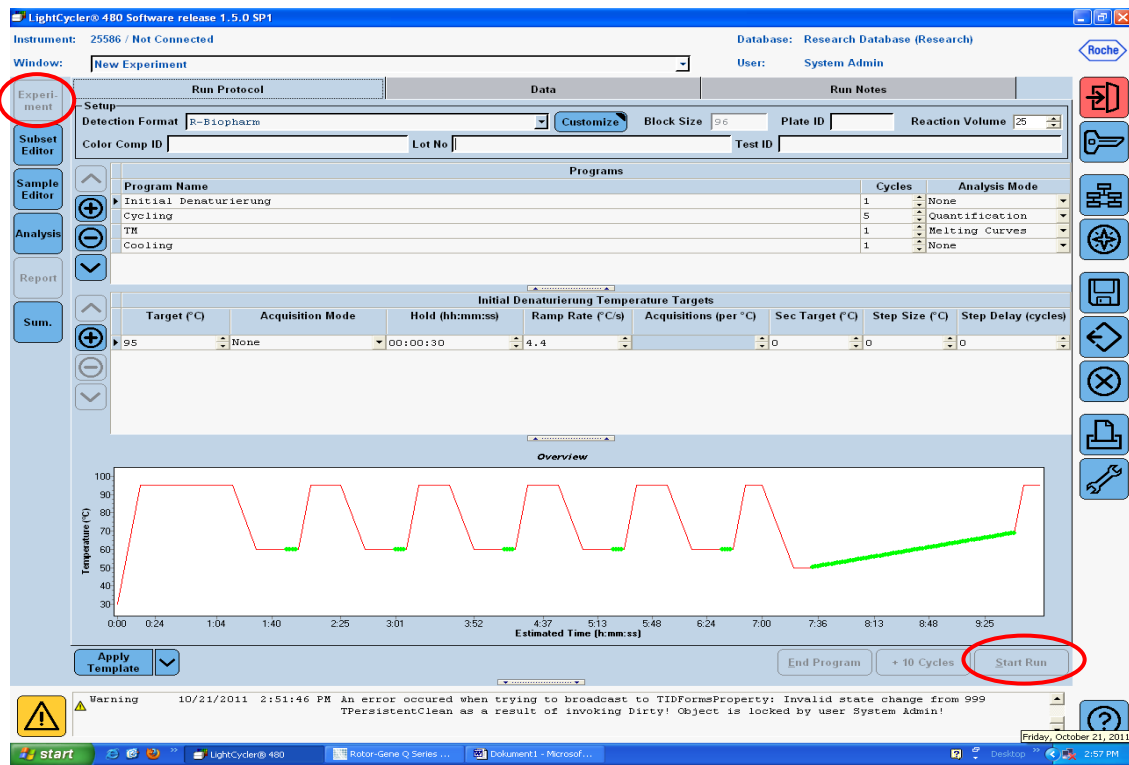
9. Den Button für „**Sample Editor**“ drücken. Bei Step 1: „**Select Workflow**“ die Auswahl „**Color Comp**“ markieren. In Step 2: „**Select Samples**“ das vorher eingestellte Subset auswählen (CC). Zur Fertigstellung des Layouts für das jeweilige Reagenz (Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) den entsprechenden Dominat Channel im „**Dominant Channel**“ Feld auswählen (s. Tab.5). Für die Reaktionen mit dem Farbstoffhintergrund (Blank) bitte „**Water**“ wählen. Es ist nicht nötig einen „**Sample Name**“ einzugeben.



Tab. 5: Dominant Channel Einstellung für Reagenzien auf dem LightCycler® 480II

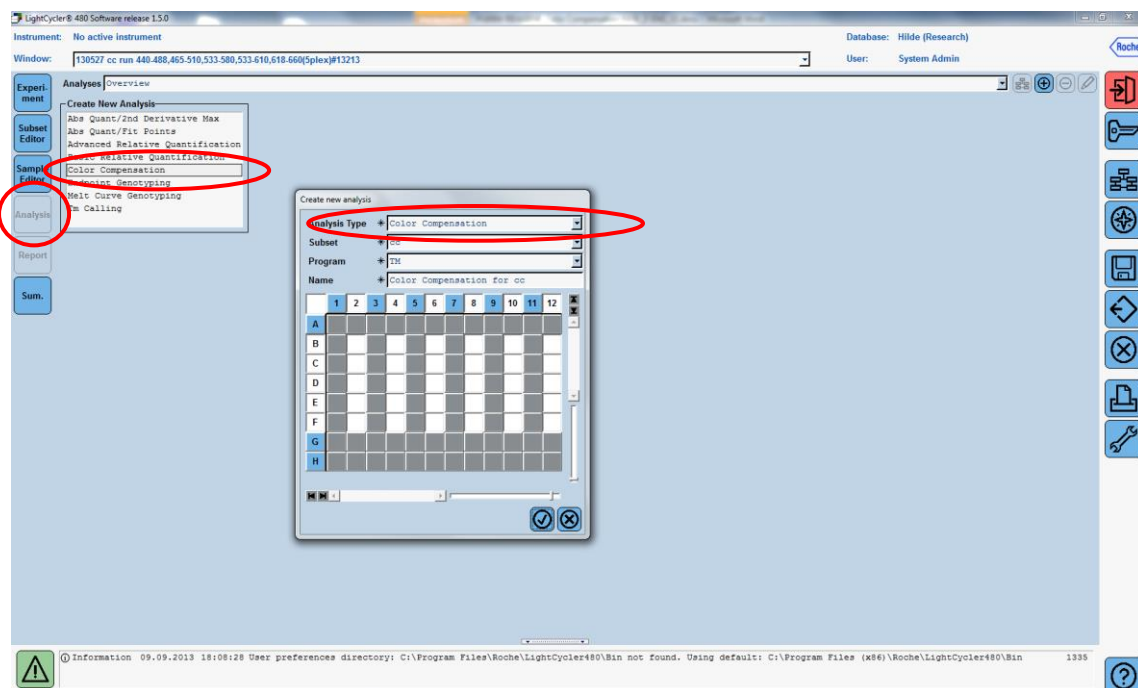
Reagenz	Dominant Channel
Blank	Water
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

10. Die Platte mit den vorbereiteten Reaktionen in den LightCycler® 480II einsetzen. Den Button „**Experiment**“ drücken und durch Drücken des Buttons „**Start Run**“ den Lauf starten.

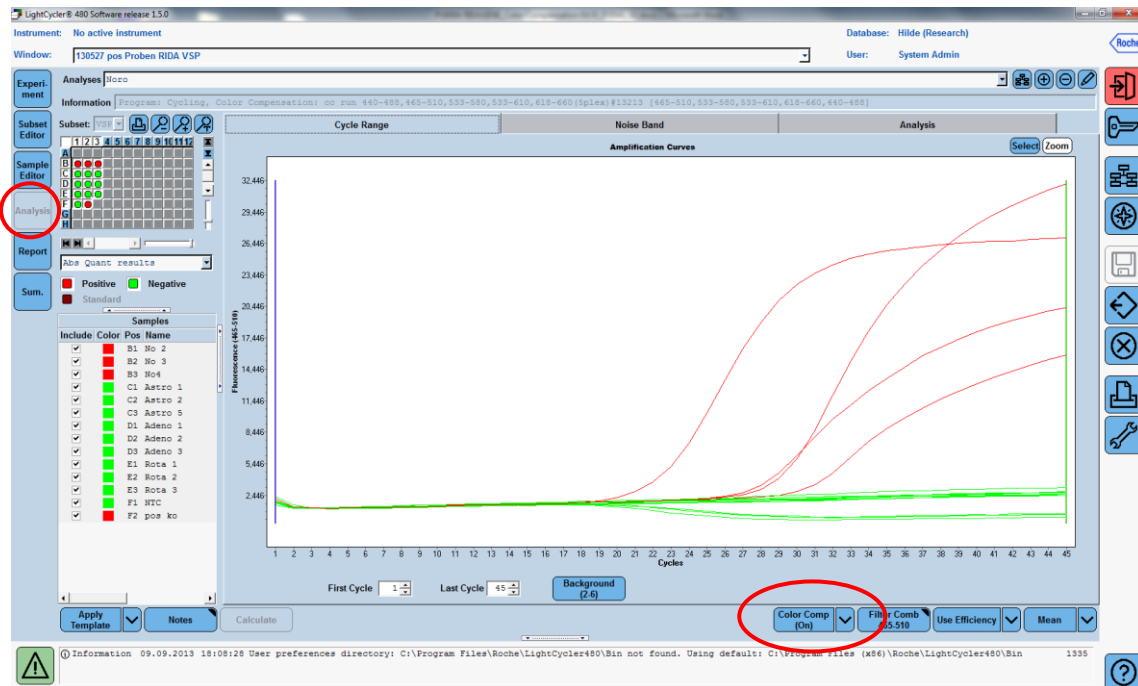


7.3 Auswertung und Erstellung eines Color Compensation Files

Nach Abschluss des LightCycler® Experiments den Button „**Analysis**“ drücken und hier in der Dialog Box „**Create New Analysis**“ auf „**Color Compensation**“ gehen. In der sich nun öffnenden Dialog Box das entsprechende Subset auswählen (z.B. CC) und dieses bestätigen. In der sich öffnenden Analyse den Button „**Calculate**“ und den Button „**Save CC Object**“ drücken. Das Color Compensation File als „**RIDA® GENE 5-plex**“ unter dem Ordner „**CCC**“ abspeichern. Danach steht dieses File für andere LightCycler® 480II-Läufe zur Verfügung. Damit ist die Generierung des Color Compensation File abgeschlossen.



Zum Anwenden der Color Compensation den jeweiligen 5-plex Lauf öffnen und unter „**Analysis**“ die gewünschte Filterkombination auswählen. Im Color Compensation drop-down Menü „**in Database**“ auswählen und das bereits gespeicherte Color Compensation File anwählen, das bei dem Experiment angewendet werden soll. Der „**Color Comp (Off)**“ Button wechselt in „**Color Comp (On)**“, um anzuzeigen, dass die Color Compensation angewählt ist. Der 5-plex PCR Lauf kann nun ausgewertet werden.



Hinweis: Das Color Compensation File ist spezifisch für jeden LightCycler® 480II, d.h. bei einem Wechsel des LightCycler® 480II oder bei Reparatur der optischen Einheit ist eine neue Color Compensation nötig.