



## **Color Compensation Set (FAM, HEX, Texas Red<sup>®</sup>, Cy5<sup>®</sup>)**

Zestaw do wykonywania kompensacji kolorów na urządzeniach  
LightCycler<sup>®</sup> 480 System I/II

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
<b>OTH02</b>	<b>2 procedury kompensacji koloru</b>

Zestaw do kompensacji kolorów jest przeznaczony do profesjonalnego stosowania w laboratoriach badawczych oraz diagnostycznych, w tym medycznych.

Przed użyciem należy zapoznać się z treścią niniejszej ulotki dołączonej do zestawu.

## TRANSPORT

Transport zestawu **Color Compensation Set** odbywa się w suchym lodzie. Po otrzymaniu przesyłki należy ją natychmiast rozpakować. Jeżeli stwierdzono uszkodzenie taśmy zabezpieczającej pudełko transportowe, uszkodzenie plomby opakowania handlowego lub brak suchego lodu w styropianowym pudełku transportowym należy o tym fakcie niezwłocznie powiadomić producenta zestawu.

## SKŁADNIKI ZESTAWU

<i>Nazwa</i>	<i>Opis</i>	<i>Ilość</i>	<i>Kolor wieczka probówki</i>
<b>Mix Probe</b>	Mieszanina reakcyjna	2 × 200 µL	czarny
<b>Mix (FAM)</b>	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	zielony
<b>Mix (Hex)</b>	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	żółty
<b>Mix (Texas Red®)</b>	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	czerwony
<b>Mix (Cy5®)</b>	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	fioletowy
<b>Water (Color Compensation Set)</b>	Woda	2 × 40 µL	biały

## WARUNKI PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- Składniki zestawu należy przechowywać w -20°C.
- UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKÓW Mix (FAM), Mix (Hex), Mix (Texas Red®) oraz Mix (Cy5®) NA ŚWIATŁO.**
- Termin ważności zestawu podany jest na opakowaniu.
- Okres trwałości składników zestawu po ich pierwszym otwarciu jest tożsamy z terminem ważności.
- Nie używać składników zestawu po upływie terminu ważności.

## OPIS ZESTAWU

### Zastosowanie

Zestaw **Color Compensation Set (FAM, HEX, Texas Red, Cy5)** jest przeznaczony do wykonania tzw. kompensacji kolorów, koniecznej przy wykonywaniu reakcji typu multiplex z użyciem barwników fluorescencyjnych FAM, HEX, Texas Red® oraz Cy5® na urządzeniach LightCycler® 480 System I i II.

### Zasada działania

Fluorescencja pochodząca od poszczególnych barwników fluorescencyjnych jest rejestrowana w poszczególnych kanałach urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR zdefiniowanych poprzez określony układ filtrów wzbudzenia/emisji. Jednakże ze względu na charakter widm emisji poszczególnych barwników fluorescencyjnych sygnał pochodzący od danego barwnika reporterowego jest wykrywany nie tylko w przeznaczonym dla niego kanale, ale jest również wykrywany w sąsiednich kanałach. Na przykład, fluorescencja pochodząca od barwnika FAM jest rejestrowana nie tylko w kanale przeznaczonym dla FAM (510 nm), ale również w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX. W przypadku wykonania reakcji typu „duplex” z barwnikami FAM i HEX urządzenie w kanale 580 nm będzie rejestrowało fluorescencję zarówno od HEX, jak i od FAM. Aby wskazać urządzeniu, jaka część rejestrowanego sygnału pochodzi od poszczególnych barwników reporterowych należy wykonać kompensację kolorów.

Kompensacja kolorów polega na wykonaniu szeregu reakcji Real Time PCR typu „singleplex” z sondami wyznakowanymi poszczególnymi barwnikami fluorescencyjnymi, które będą używane w reakcji typu „multiplex”. Następnie urządzenie odczytuje widma dla poszczególnych barwników ustalając intensywność sygnału fluorescencyjnego rejestrowanego w poszczególnych kanałach. Odczytane widma są kompilowane w tzw. „CC Object”, który jest wczytywany podczas analizy wyników z kolejnych reakcji Real Time PCR. Umożliwia to „oczyszczenie” sygnału rejestrowanego dla danego barwnika fluorescencyjnego w określonym kanale ze składowych pochodzących od innych barwników fluorescencyjnych.

## POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

- Urządzenie do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR LightCycler 480® (Roche)

## WSTĘPNA KONFIGURACJA URZĄDZENIA

1. Przejść do okna głównego „Overview” i wybrać ikonę „Open Tools”.
2. Wybrać zakładkę „Detection Formats” i utworzyć nowy format detekcji klikając ikonę „New” w panelu „Detection Formats”.
3. Wprowadzić nazwę nowego formatu detekcji (np. Fourplex hydrolysis probe).
4. W panelu „Filter Combination Selection” zdefiniować poszczególne kanały poprzez zaznaczenie następujących kombinacji układu filtrów wzbudzenia/emisji:
  - Dla urządzenia LightCycler® 480 System I będą to kombinacje: 483/533, 523/568, 558/610, 615/670 (Tabela 1)
  - Dla urządzenia LightCycler® 480 System II będą to kombinacje: 465/510, 533/580, 533/610, 618/660 (Tabela 1)
5. W panelu „Selected Filter Combination List” w polu „Name” wprowadzić nazwy barwników fluorescencyjnych dla odpowiednich kombinacji filtra wzbudzenia/emisji (Tabela 1).

Tabela 1

<i>System I</i>		<i>System II</i>		<i>Barwnik fluorescencyjny</i>
<i>Filtr wzbudzenia</i>	<i>Filtr emisji</i>	<i>Filtr wzbudzenia</i>	<i>Filtr emisji</i>	
483	533	465	510	FAM
523	568	533	580	HEX
558	610	533	610	Texas Red
615	615	618	660	Cy5

6. Zatwierdzić, klikając „Close”.
7. Utworzyć nowy eksperyment klikając ikonę „New Experiment”.
8. W panelu „Setup” z menu „Detection Format” wybrać nowo zdefiniowany format detekcji (np. Fourplex hydrolysis probe).
9. W panelu „Programs” utworzyć programy zdefiniowane w Tabeli 2.

Tabela 2

<i>Program name</i>	<i>Cycles</i>	<i>Analysis mode</i>
Pre-inkubacja	1	None
Amplifikacja	45	Quantification
Kompensacja	1	Color compensation
Schłodzenie	1	None

10. W panelu „Temperature Targets” utworzyć etapy poszczególnych programów zdefiniowane w Tabeli 3.

Tabela 3

<i>Program</i>	<i>Target (°C)</i>	<i>Acquisition mode</i>	<i>Hold (hh:mm:ss)</i>	<i>Ramp Rate (°C/s)</i>	<i>Acquisitions (per °C)</i>
Pre-inkubacja	95	None	00:02:00	4,4	
Amplifikacja	95	None	00:00:10	4,4	
	55	Single	00:00:25	2,2	
Kompensacja	95	None	00:00:10	4,4	
	40	None	00:00:30	2,2	
	80	Continuous		0,03	5
Schłodzenie	40	None	00:00:10	2,2	

11. Następnie, należy przejść do zakładki „Subset Editor” i dodać nowy subset klikając ikonę „+” w panelu „Subsets”, a następnie wprowadzić jego nazwę (np. Reakcje) w polu „Name”. Następnie na schemacie płytki PCR w panelu „Reakcje settings” zaznaczyć 5 bloków po 4 studzienki (C2-F2, C4-F4, C6-F6, C8-F8 oraz C10-F10). Zatwierdzić wybór klikając przycisk „Apply”.

12. Przejść do zakładki „Sample Editor”.

13. W panelu „Step 1: Select Workflow” zaznaczyć opcję „Color compensation”.

14. W panelu „Step 2: Select Samples” wybrać utworzony subset (np. Reakcje).

15. Na schemacie płytki zaznaczyć cztery studzienki C2-F2. Następnie w panelu „Step 3: Edit Color Comp Properties” ustawić wartość pola „Sample name” oraz „Dominant channel” zgodnie z Tabelą 4, po czym utworzyć powtórzenia reakcji klikając ikonę „Make Replicates”.

Tabela 4

<i>Studzienki</i>	<i>Sample Name</i>	<i>Dominant channel</i>
C2-F2	W	Water
C4-F4	F	FAM
C6-F6	H	HEX
C8-F8	T	Texas Red
C10-F10	C	Cy5

## REAKCJA REAL TIME PCR

1. Rozmrozić składniki zestawu. Po rozmrożeniu dokładnie wymieszać zawartość probówek i krótko je zwirować. **Składniki po rozmrożeniu przechowywać w 2-8°C lub na lodzie.**

**UNIKAĆ EKSPOZYCJI składników Mix(FAM), Mix(HEX), Mix(Texas Red®) oraz Mix(Cy5®) NA ŚWIATŁO.**

2. Przygotować 5 probówek typu Eppendorf schłodzonych do 2-8°C. Odpipetować do nich składniki zestawu zgodnie z Tabelą 5.

Tabela 5

Składnik zestawu	Probówka				
	W	F	H	T	C
Mix Probe	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL
Water (Color compensation)	40 µL				
Mix(FAM)		40 µL			
Mix(HEX)			40 µL		
Mix(Texas Red)				40 µL	
Mix(Cy5)					40 µL

- Zawartość każdej z probówek dokładnie wymieszać i nanieść po 20 µL do czterech studzienek płytki PCR wskazanych w Tabeli 6.

Tabela 6

Probówka	Studzienki
W	2C-2F
F	4C-4F
H	6C-6F
T	8C-8F
C	10C-10F

W przypadku stosowania probówek PCR każdą z przygotowanych mieszanin reakcyjnych należy przenieść do 4 probówek PCR, które następnie należy umieścić w bloku urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR w pozycjach wskazanych w Tabeli 6.

- Zakleić płytkę PCR folią, a następnie krótko ją zwirować.
- Włożyć płytkę PCR do urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR i rozpocząć reakcję naciskając przycisk „Start run” w zakładce „Experiment” / „Run protocol”.

## TWORZENIE OBIEKTU CC

- Po zakończonej reakcji należy przejść do zakładki „Analysis”. W panelu „Create New Analysis” wybrać opcję „Color Compensation”.
- W oknie „Create new analysis” zdefiniować pola „Subset” oraz „Program” poprzez wybranie utworzonego subsetu (Reakcje) oraz programu (Kompensacja).
- Aby wykonać analizę kompensacji kolorów nacisnąć przycisk „Calculate”.
- Zachować plik kompensacji kolorów poprzez kliknięcie przycisku „Save CC Object” i wskazanie nazwy pliku (np. „CC (FAM, HEX, Texas Red®, Cy5®”).

## WYKORZYSTANIE OBIEKTU CC W ANALIZIE WYNIKÓW

- Podczas projektowania nowego eksperymentu (zakładka „Experiment” / „Run Protocol”) w panelu „Setup” należy wybrać utworzony format detekcji (w polu „Detection format” wybrać właściwą pozycję, np. „Fourplex hydrolysis probe”).
- Po zakończonej reakcji przejść do zakładki „Experiment” / „Data” i z menu „Color comp” wybrać opcję „In Database”, a następnie wskazać plik z Obiektem CC („CC (FAM, HEX, Texas Red®, Cy5®”).

## OBSŁUGA KLIENTA

- Wszelkie problemy i nieprawidłowości, które pojawiły się podczas użytkowania zestawu diagnostycznego można zgłaszać telefonicznie lub drogą mailową.
- Zamówienia na zestaw **Color Compensation Set** można składać drogą mailową.

## KONTAKT

### Obsługa klienta, zgłaszanie problemów

+48 739 223 268  
contact@amplicon.pl

### Zamówienia

+48 739 223 268  
contact@amplicon.pl