



Color Compensation Set (FAM, HEX, Texas Red[®], Cy5[®])

Zestaw do wykonywania kompensacji kolorów na urządzeniach
LightCycler[®] 2.0

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
OTH03	4 procedury kompensacji koloru

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>
Mix Probe	Mieszanina reakcyjna	2 × 200 µL	czarny
Mix (FAM)	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	zielony
Mix (Hex)	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	żółty
Mix (Texas Red®)	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	czerwony
Mix (Cy5®)	Mieszanina reakcyjna	2 × 40 µL	fioletowy
Water (Color Compensation Set)	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 wynosi 12 miesięcy.
- 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® 2.0.

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 (530 nm), ale również w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX. W przypadku wykonania reakcji typu „duplex” z barwnikami FAM i HEX urządzenie w kanale 560 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[®] 2.0 (Roche)

WSTĘPNA KONFIGURACJA URZĄDZENIA

1. Należy uruchomić oprogramowanie LightCycler Software 4.1.
2. Utworzyć nowy eksperyment. W tym celu z menu „File” wybrać opcję „New”. Po pojawieniu się okna dialogowego „Create New Object” kliknąć dwukrotnie ikonkę „LightCycler Experiment”.
3. Po pojawieniu się okna „Run” wybrać zakładkę „Programs”.
4. W panelu „Setup” ustawić następujące wartości znajdujących się tam opcji:
 Default channel: **530**
 Seek Temperature: **30**
 Max. Seek Pos.: **5***
 Instrument Type: **6 Ch.**
 Capillary Size: **20 µL**
 * Wartość „5” należy ustawić w przypadku wykonywania kompensacji dla czterech kolorów (reakcji typu fourplex). W przypadku wykonywania kompensacji dla dwóch lub trzech kolorów (reakcje typu duplex lub triplex) należy ustawić wartości odpowiednio „3” lub „4”.
5. W panelu „Programs” utworzyć programy zdefiniowane w Tabeli 1.

Tabela 1

<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

6. W panelu „Temperature Targets” utworzyć etapy poszczególnych programów zdefiniowane w Tabeli 2.

Tabela 2

<i>Program</i>	<i>Target (°C)</i>	<i>Hold (hh:mm:ss)</i>	<i>Ramp Rate</i>	<i>Sec Target</i>	<i>Step Sec</i>	<i>Step Delay</i>	<i>Acquisition mode</i>
Pre-inkubacja	95	00:02:00	20	0	0	0	None
Amplifikacja	95	00:00:10	20	0	0	0	None
	55	00:00:25	20	0	0	0	Single
Kompensacja	95	00:00:10	20	0	0	0	None
	40	00:00:30	20	0	0	0	None
	95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Schłodzenie	30	00:00:10	30	0	0	0	None

7. Kliknąć przycisk „Samples” znajdujący się na bocznym pasku narzędziowym znajdującym się po lewej stronie ekranu.
8. Po pojawieniu się okna „Sample data” upewnić się, że w panelu „Selected channels” jest zaznaczony przynajmniej jeden przycisk (np. „530”).
9. Kliknąć przycisk „Analysis Type”. Z menu, które się pojawiło wybrać pozycję „Color Compensation”.
10. Przejść do zakładki „Color Comp”, która się pojawiła po wykonaniu poprzedniego kroku i zdefiniować parametry poszczególnych próbek według Tabeli 3.

Tabela 3

<i>Pos</i>	<i>Sample Name</i>	<i>Dominant Channel</i>	<i>Uwagi</i>
1	W	Water	Próbka referencyjna
2	F	530	Barwnik FAM
3	H	560	Barwnik HEX
4	T	610	Barwnik Texas Red
5	C	670	Barwnik Cy5

W przypadku wykonywania kalibracji dla dwóch lub trzech barwników (reakcje typu duplex lub triplex) w kolumnie „Pos” zakładki „Color Comp” będą widoczne odpowiednio 3 lub 4 pozycje. W takim przypadku na pozycji pierwszej należy zdefiniować próbkę referencyjną („Water”), zgodnie z powyższą tabelą, a na kolejnych pozycjach zdefiniować kapilary z barwnikami, dla których będzie wykonywana kompensacja kolorów.

REAKCJA REAL TIME PCR

- 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.**
- Przygotować 5 kapilar schłodzonych do 2-8°C. Odpipetować do nich składniki zestawu zgodnie z Tabelą 5.

Tabela 5

<i>Składnik zestawu</i>	<i>Probówka</i>				
	<i>W</i>	<i>F</i>	<i>H</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
<i>Mix Probe</i>	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
<i>Water (Color compensation)</i>	10 µL				
<i>Mix(FAM)</i>		10 µL			
<i>Mix(HEX)</i>			10 µL		
<i>Mix(Texas Red)</i>				10 µL	
<i>Mix(Cy5)</i>					10 µL

W przypadku wykonywania kalibracji dla dwóch lub trzech barwników (reakcje typu duplex lub triplex) należy pominąć przygotowanie kapilar zawierających barwniki, dla których kompensacja kolorów nie będzie wykonywana. Na przykład, w przypadku wykonywania kompensacji kolorów dla barwników FAM i HEX należy pominąć przygotowanie kapilar oznaczonych jako „T” i „C”.

- Zamknąć kapilary, przenieść je do karuzeli i zwirować. Karuzelę umieścić w urządzeniu LightCycler® 2.0. Kolejność umieszczenia kapilar na poszczególnych pozycjach musi odpowiadać kolejności zdefiniowanej w zakładce „Color Comp” (Tabela 3).
- Rozpocząć reakcję naciskając przycisk „Start run” znajdujący się w lewym górnym rogu okna „Run”.

TWORZENIE OBIEKTU CC

- Po zakończonej reakcji nacisnąć przycisk „Analysis...” znajdujący się w górnym menu.
- W oknie dialogowym „Create New Analysis” zaznaczyć opcję „Color Compensation”, a następnie kliknąć przycisk „OK”.
- W utworzonym oknie „Color Compensation” kliknąć przycisk „Save CC Object”, aby zapisać obiekt CC. W oknie dialogowym, które się pojawiło należy wskazać miejsce zapisu obiektu CC. Zazwyczaj jest to podkatalog „/Special Data/CCC”.

WYKORZYSTANIE OBIEKTU CC W ANALIZIE WYNIKÓW

Wariant I: Zastosowanie kompensacji kolorów przed rozpoczęciem nowego eksperymentu

- Podczas projektowania nowego eksperymentu w oknie „Run” kliknąć przycisk „Color Compensation (Off)” i z menu, które się pojawiło wybrać pozycję „Select Color Compensation...”.
- W oknie dialogowym „Select Object” wybrać utworzony obiekt CC, a następnie kliknąć przycisk „OK”. Pojawi się okno dialogowe „Color Compensation Channels”, w którym można wybrać kanały, dla których będzie zastosowana kompensacja kolorów. Domyślnie zaznaczone są wszystkie kanały, dla których wykonano kompensację kolorów w wybranych obiekcie CC. Należy dokonać ewentualnych korekt w wybranych kanałach a następnie kliknąć przycisk „OK”. Po tej operacji przycisk „Color Comp (Off)” powinien się zmienić na przycisk „Color Comp (On)”.

Wariant II: Zastosowanie kompensacji kolorów po zakończeniu eksperymentu

- Utworzyć nową analizę klikając przycisk „Analysis...” znajdujący się w menu w górnej części ekranu.
- W oknie dialogowym „Create New Analysis” zaznaczyć żadaną analizę (np. Absolute Quantification) i kliknąć przycisk „OK”.
- Wybrać utworzoną analizę klikając odpowiadający jej przycisk w bocznym pasku znajdującym się po lewej stronie ekranu.
- Kliknąć przycisk „Color Compensation” znajdujący w górnej części okna utworzonej analizy i wybrać z menu pozycję „Select Color Compensation...”.
- W oknie dialogowym „Select Object” wybrać utworzony obiekt CC, a następnie kliknąć przycisk „OK”. Po tej operacji przycisk „Color Comensation” powinien się zmienić na przycisk „Color Compensation (On)”.

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