

**SureCC Color Compensation Kit I**

Art. Nr. F4009

Februar 2017

Beschreibung

Dieses Kit dient der Farbstoffkalibrierung am LightCycler® 480I und II sowie am cobas z 480 Analyzer, um bei tetraplex real-time PCR-Läufen den Farbstoff-Crosstalk zwischen den Kanälen zu kompensieren. Mit Hilfe von fünf Lösungen kann ein Color Compensation File erstellt werden. Damit ist es möglich, Ergebnisse von tetraplex real-time PCR-Läufen mit den Farbstoffen FAM, VIC, ROX und Cy5 zu analysieren.

Kit-Inhalt und Lagerung

Der Kit-Inhalt ist für drei Kalibrierungsläufe ausgelegt.

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Blank	1 x 400 µl	Weiß
2	Dye 1	1 x 400 µl	Grün
3	Dye 2	1 x 400 µl	Gelb
4	Dye 3	1 x 400 µl	Orange
5	Dye 4	1 x 400 µl	Rot

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät: LightCycler® 480I, LightCycler® 480II oder cobas z 480 Analyzer (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Folien)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern

Protokoll

1. Ansatz der Farbstoffkalibrierungsplatte

Für einen Kalibrierungslauf müssen je Farbstoff, inklusive dem Farbstoffhintergrund (Blank), fünf Reaktionen mit je 20 µl wie folgt in eine real-time PCR Platte pipettiert werden:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		Blank		Dye 1		Dye 2		Dye 3		Dye 4		
D												
E												
F												
G												
H												

Bild 1

Vor der Benutzung bitte die Lösungen auftauen, vortexen und zentrifugieren.

Lösung	Farbstoff	Menge pro Reaktion	Je 20 µl pipettieren in die folgenden Wells
Blank	Hintergrund	20,0 µl	B2, C2, D2, E2, F2
Dye 1	FAM	20,0 µl	B4, C4, D4, E4, F4
Dye 2	VIC	20,0 µl	B6, C6, D6, E6, F6
Dye 3	ROX	20,0 µl	B8, C8, D8, E8, F8
Dye 4	Cy5	20,0 µl	B10, C10, D10, E10, F10

Die komplette Platte nach dem Verteilen der Lösungen mit einer optischen Folie verschließen.

2. Geräteeinstellungen und starten des Experimentes

Nach Anmeldung an der Software ist es erforderlich, unter dem Button für Einstellungen, das benötigte Detektionsformat zu programmieren:

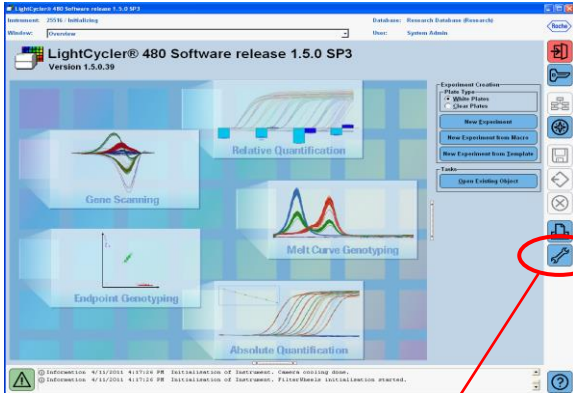


Bild 2

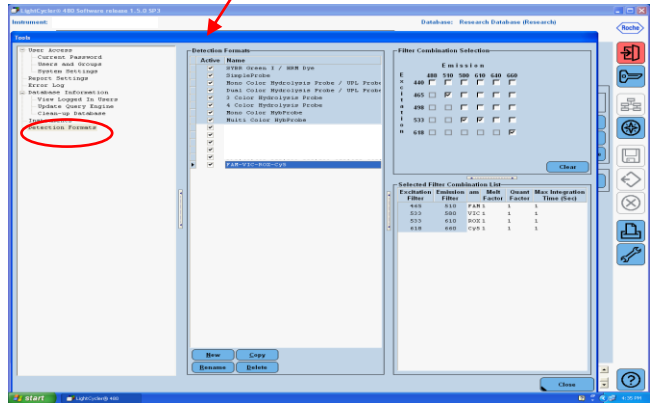


Bild 3

Folgendes Detektionsformat ist einzustellen und als Detektionsformat unter z.B. folgendem Namen „FAM-VIC-ROX-Cy5“ abzuspeichern:

Farbstoff-Name	Filter Kombination LightCycler® 480I	Filter Kombination LightCycler® 480II	Filter Kombination cobas z 480 Analyzer
FAM	450 - 500	465 - 510	465 - 510
VIC	523 - 568	533 - 580	540 - 580
ROX	558 - 610	533 - 610	540 - 610
Cy5	615 - 670	618 - 660	610 - 670

Quant und Meltfaktoren sowie Integration Time jeweils auf 1 setzen

Nach der Programmierung des Detektionsformates ist im Bild 2 der Button „New Experiment“ anzuwählen. Folgendes Fenster öffnet sich:

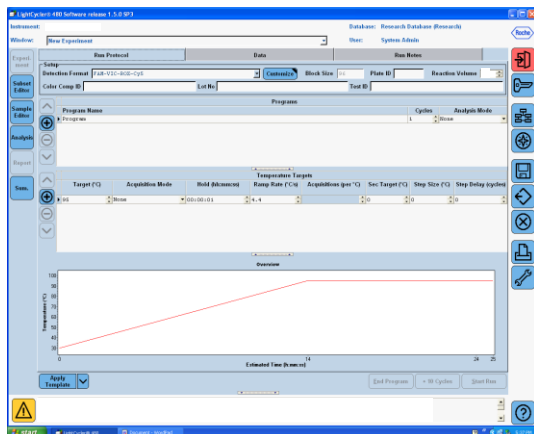


Bild 4

Als erster Schritt sollte hier das richtige Detektionsformat (siehe Vorgehen in Bildern 2 und 3) und das Reaktionsvolumen von 20 µl gewählt werden.

Anschließend sind folgende Programmschritte einzustellen: (Bitte auch auf die richtige Einstellung der Anzahl der Cycles und des Analysis Mode achten.)

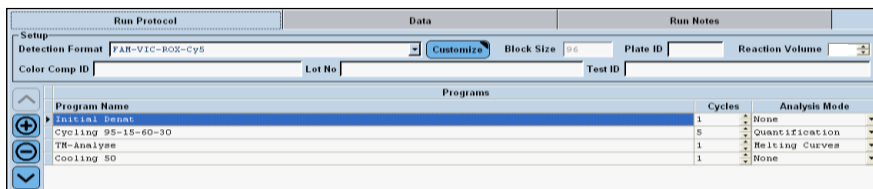


Bild 5

Folgende Temperatur- und Messpunkte werden programmiert:

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 95-15-60-30	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 50	1 / none	50	none	00:00:01	2.2

Nach Abschluss der Programmierung ergibt sich folgendes Bild des Experimentes:

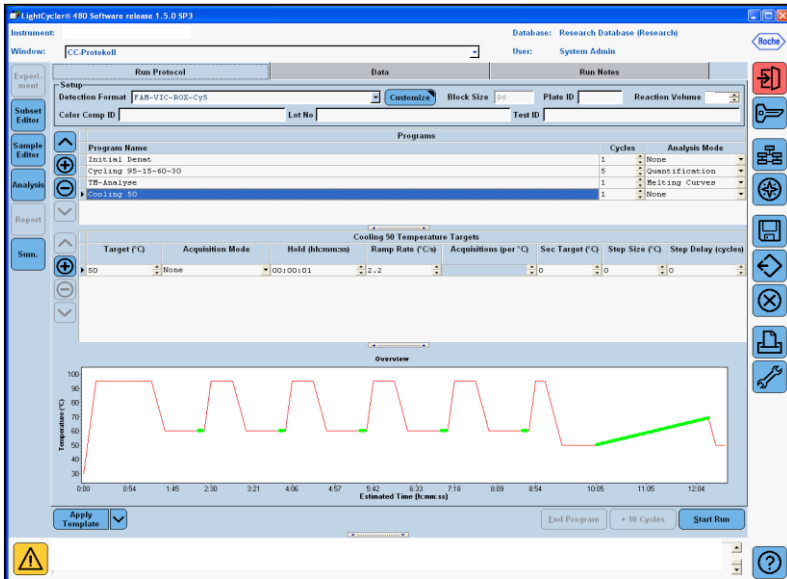


Bild 6

Für das Programmieren des Layouts der PCR Platte, links auf den Button „Subset Editor“ klicken. Hier nun ein Subset durch Klicken auf den Plus-Button erstellen und dem Layout die Bezeichnung z.B. CC Layout geben. Nun mit gedrückter Strg-Taste und der linken Maustaste alle Wells anclicken, in denen sich die Lösungen in der Platte befinden. Danach auf „Apply“ klicken und das Subset ist fertiggestellt und es sollte sich folgendes Bild ergeben:

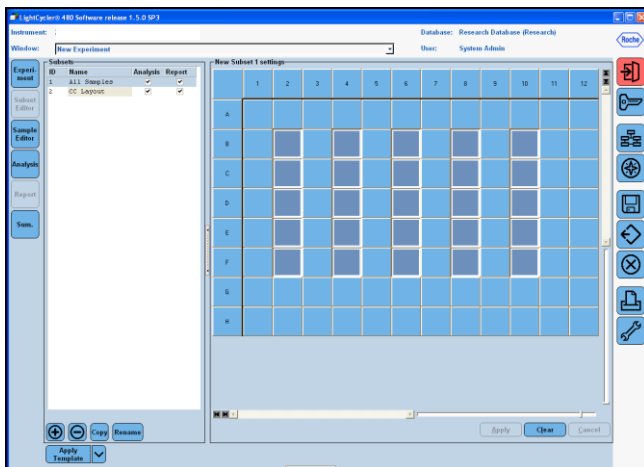


Bild 7

Anschließend links auf den Button für „Sample Editor“ klicken. Hier nun bei Step 1 „Select Workflow“ die Auswahl „Color Comp“ markieren. Dann im Step 2 das vorher erstellte Subset auswählen. Zum fertigen Programmieren des Layouts den jeweiligen Farbstoff (FAM, VIC, ROX, Cy5) im Dominant Channel auswählen. Für die Reaktionen mit dem Farbstoffhintergrund bitte „Water“ wählen. Es ist nicht nötig, einen „Sample Name“ anzugeben.

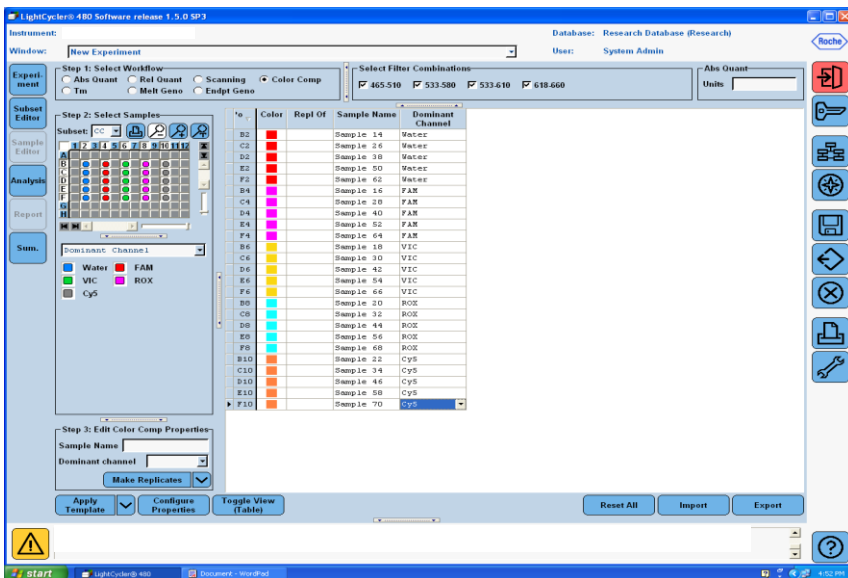


Bild 8

Bitte die Änderungen und damit das Experiment mit einem Klick auf das Diskettensymbol speichern. Die Platte mit den vorbereiteten Reaktionen in den LightCycler® 480I oder II oder cobas z 480 Analyser einsetzen. Im Experiment Fenster (auf der linken Seite Button „Experiment“ anklicken) den Lauf durch Klick auf den Button „Start Run“ (unten rechts) starten.

Auswertung und Erstellung eines CC-Files

Nach Abschluss des Experimentes auf den Button „Analysis“ auf der linken Seite klicken und hier in der Dialog Box „Create New Analysis“ auf „Color Compensation“ gehen sowie die Auswahl bestätigen.

In der sich nun öffnenden Box das entsprechende Subset auswählen und die Auswahl bestätigen. In der sich öffnenden Analyse auf den Button „Calculate“ klicken und durch Klicken auf den Button „Save CC Object“ am rechten unteren Rand diesen Lauf als ein CC Objekt unter dem Ordner „CCC“ abspeichern. Damit ist die Generierung einer Farbstoff-Kalibrierungsdatei abgeschlossen.

Zum Anwenden der Farbstoffkalibrierung den jeweiligen multiplex Lauf öffnen und unter „Analyse“ den jeweiligen Kanal auswählen. Durch Klicken auf den Pfeil am Button „Color Comp (Off)“ die abgespeicherte Farbstoff-Kalibrierungsdatei aus der Datenbank auswählen. Durch Wechseln des Buttons „Color Comp (Off)“ in „Color Comp (On)“ wird angezeigt, dass eine Farbstoffkalibrierung angewählt ist. Der multiplex PCR Lauf kann nun ausgewertet werden.

Hinweis: Die Farbstoffkalibrierungsdatei ist spezifisch für das jeweilige Gerät, d.h. bei einem Wechsel des Gerätes (oder auch bei Reparatur der optischen Einheit) ist eine neue Farbstoffkalibrierung nötig.

Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an info@congen.de.

Description

This kit is intended for the generation of color compensation objects for the LightCycler® 480I and II and cobas z 480 Analyzer system. With 5 solutions it is possible to perform a color compensation experiment. Fluorescence data are collected and used to generate a color compensation file containing information for correcting crosstalk between detection channels in tetraplex real-time PCR runs. The generated color compensation object can subsequently be used to analyze tetraplex real-time PCR experiments with the dyes FAM, VIC, ROX and Cy5.

Kit components and storage

The kit is designed for 3 calibration runs.

Kit Code	Reagent	Amount	Lid color
1	Blank	1 x 400 µl	White
2	Dye 1	1 x 400 µl	Green
3	Dye 2	1 x 400 µl	Yellow
4	Dye 3	1 x 400 µl	Orange
5	Dye 4	1 x 400 µl	Red

Store all reagents at -20°C and protected from light.

Additionally required equipment and materials

- Real-time PCR device: LightCycler® 480I, LightCycler® 480II or cobas z 480 Analyzer (Roche)
- Real-time PCR consumables (plates, foils)
- Pipettes with filter tips

Protocol

1. Preparation of the color compensation plate

For a color compensation experiment it is necessary to pipette 5 reactions with 20 µl for each dye and 5 reactions with 20 µl for the fluorescence background. See the layout below:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		Blank		Dye 1		Dye 2		Dye 3		Dye 4		
D												
E												
F												
G												
H												

Fig. 1

Allow the reagents to thaw, mix by vortexing and centrifuge before opening and use.

Solution	Dye	Amount per reaction	Pipetting of 20 µl in following wells
Blank	Background	20.0 µl	B2, C2, D2, E2, F2
Dye 1	FAM	20.0 µl	B4, C4, D4, E4, F4
Dye 2	VIC	20.0 µl	B6, C6, D6, E6, F6
Dye 3	ROX	20.0 µl	B8, C8, D8, E8, F8
Dye 4	Cy5	20.0 µl	B10, C10, D10, E10, F10

Close the plate with an optical sealing foil after pipetting the solutions.

2. Setup and start of the experiment

Open the LightCycler® 480 software. Please program under the button for tools the necessary detection format:

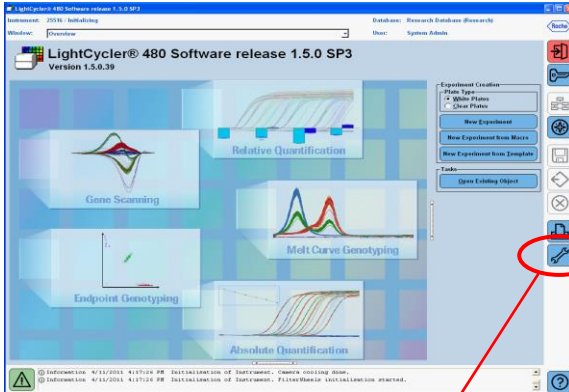


Fig. 2

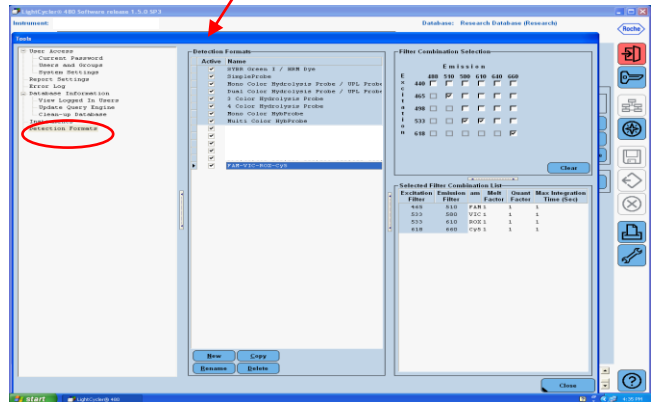


Fig. 3

Generate and save the following detection format for example as „FAM-VIC-ROX-Cy5“:

Dye-Name	Filter Combination LightCycler® 480I	Filter Combination LightCycler® 480II	Filter Combination cobas z 480 Analyzer
FAM	450 - 500	465 - 510	465 - 510
VIC	523 - 568	533 - 580	540 - 580
ROX	558 - 610	533 - 610	540 - 610
Cy5	615 - 670	618 - 660	610 - 670

Value for Quant- and Melt Factors as well as the Integration Time please set 1

After the programming of the detection format please choose the button „New Experiment“ in the screen of figure 2. Following window will open:

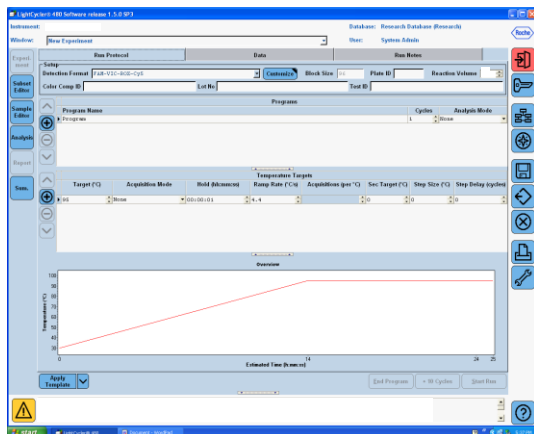


Fig. 4

As the first step select the right detection format (please choose the right name – see procedure in figures 2 and 3) and correct reaction volume (20 µl).

Following protocol steps are to program:
(Please pay attention to the correct Cycle number und Analysis Mode.)

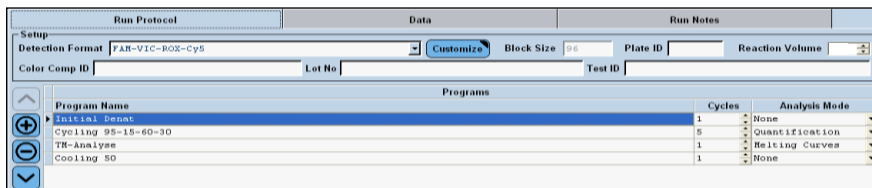


Fig. 5

Please program following protocol steps, temperature targets and measurement points:

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 95-15-60-30	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 50	1 / none	50	none	00:00:01	2.2

The final screen should look like the screenshot below:

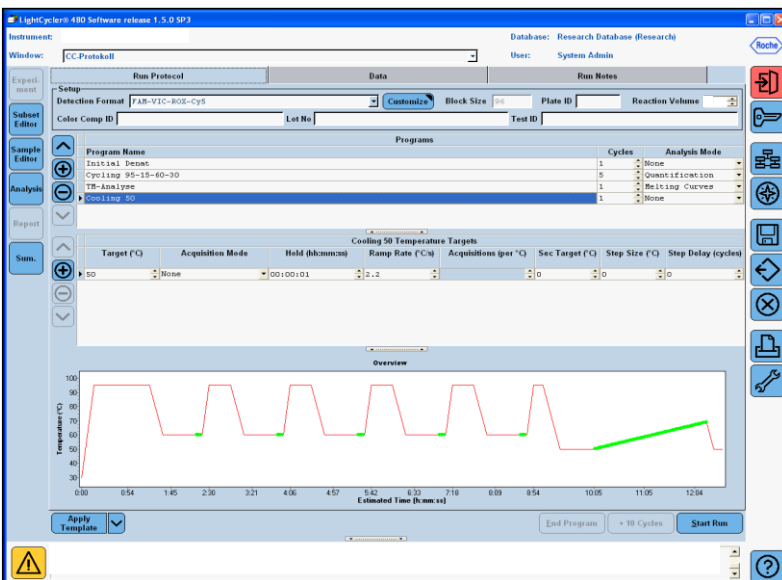


Fig. 6

For selecting the right PCR layout please click on the "Subset Editor" button on the left side. Please create a subset through a click on the Plus-Button and give the subset a name for example "CC Layout". Now please press the Strg-key and the left mouse button simultaneously, Mark all wells with the solution inside the plate. Then click on the "Apply" button and the subset is ready. The final screen should look like the screenshot below:

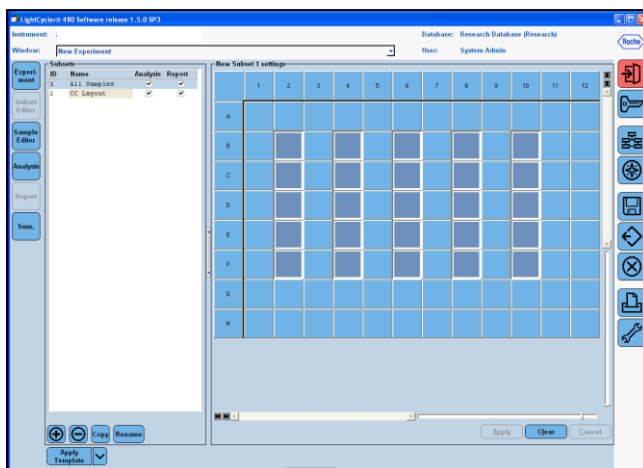


Fig. 7

In the next step please select the "Sample Editor" button on the left side. Here please choose in the Step 1 „Select Workflow“-box the "Color Comp" tab. Now please select in Step 2 dialog box the subset of the programming step before. In the "Dominant Channel" dialog fields select the corresponding dyes (FAM, VIC, ROX, Cy5) in the different wells. For the replicate samples containing no dye, select "Water". It is not necessary to give a sample name for the wells.

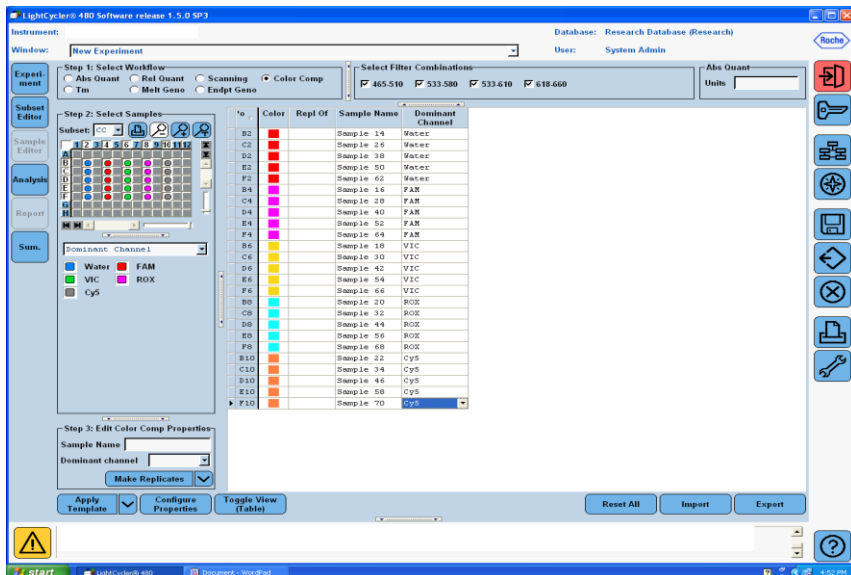


Fig. 8

Please save your changes and the experiment by clicking on the disc icon. Place the PCR plate (which contains the reactions prepared before) into the LightCycler® 480I or II or cobas z 480 Analyzer. Click the "Start run" button in the Experiment window (on the left side) to start the experiment.

Evaluation and creation of a CC-File

After the experiment ends, click the "Analysis" button in the left side of the window to open the "Create New Analysis" dialog box. Select "Color Compensation" and confirm your choice.

In the next dialog-box please select the subset and confirm your selection. Click now the button „Calculate“ in the analysis window to perform color compensation analysis. Click „Save CC Object“ button to save the Color Compensation file in the "CCC" folder. The Color Compensation file is now ready to use.

To apply a Color Compensation file for data analysis please open the multiplex assay and click the „Filter Combination“ button to select the filter combination you want to display. In the Color Comp drop-down menu, select “in Database” and choose the stored Color Compensation file you want to apply to the assay. The “Color Comp” button switches to “Color Comp (On)” to confirm that Color Compensation is applied.

Note: As the Color Compensation is instrument-specific, it is necessary to generate a Color Compensation object for every LightCycler® 480 system. A new object also has to be created after the optical system has been repaired.

Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to info@congen.de.