




## VisionArray HPV PreCise Master Mix

REF ES-0007-50

 50 Reaktionen

Für die Amplifikation von HPV-spezifischen Sequenzen



In-vitro-Diagnostikum  
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

### 1. Verwendungszweck

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix ist für die Amplifikation und Biotinylierung von spezifischen Sequenzen der L1-Region von Genomen des humanen Papilloma-Virus (HPV) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt.

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix wurde entwickelt, um unter anderem die DNA von HPV-Typen, welche durch die entsprechenden VisionArray HPV Chips nachgewiesen werden können, sowie genomische Sequenzen des menschlichen HLA-DQA1-Gens als PCR-Positivkontrolle zu amplifizieren.

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix ist für die Verwendung mit dem VisionArray Detection Kit sowie den entsprechenden VisionArray HPV Chips vorgesehen. Die automatisierte Analyse ist mit einem VisionArray Analysis Package durchzuführen.

Dieses Produkt wurde für den Einsatz als In-vitro-Diagnostikum (gemäß EU-Richtlinie 98/79/EC) konzipiert. Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

### 2. Klinische Relevanz

Die Gebrauchsanweisung des jeweiligen Chips beachten.

### 3. Prinzip der Methode

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Sequenzen selektiv vervielfältigt werden. Das Grundprinzip der PCR basiert auf einem sich wiederholenden Zyklus von drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Wiederholung dieser Schritte führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenzen.

Der erste Schritt von jedem Zyklus ist die Denaturierung, bei der durch Erhitzen des Reaktionsansatzes DNA-Einzelstränge gebildet werden. Während des Annealings binden komplementäre Primer an die einzelsträngige DNA. Die Primer flankieren die Zielsequenz und dienen als Ausgangspunkt für die Integration von Nukleotiden während der Elongationsphase, sodass identische Kopien der Template-DNA entstehen. Die in diesem Kit verwendeten Primer sind mit Biotinmolekülen gelabelt. Daher ist jedes neue PCR-Produkt automatisch biotinyliert, was später den Nachweis mit Antikörpern ermöglicht.

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix ist eine Weiterentwicklung des GP5/GP6-Systems (Snijders et al., 1990) und ist gegen das L1-Gen gerichtet, eine hochkonservierte Region des HPV-Genoms. Abhängig von dem HPV-Genotyp resultiert die Amplifikation in PCR-Produkte von einer Fragmentlänge von 139-148 bp.

Primer für das humane HLA-DQA1-Gen werden in den Human Papillome Virus Laboratory Manuals der WHO als Positivkontrolle empfohlen und sind daher ebenfalls im HPV Primer Mix 2.0 enthalten.

Um eine Kontamination mit PCR-Amplifikationsprodukten zu vermeiden, sind Uracil-Nukleotide im VisionArray HPV PreCise Master Mix enthalten. Durch einen Uracil-DNA-Glykosylaseschritt vor der PCR (vom Hersteller empfohlen) können alle Sequenzen, die Uracil enthalten, und damit mögliche Kontaminationen mit PCR-Produkten aus vorherigen VisionArray PCRs entfernt werden. Die Uracil-DNA-Glykosylase wird bei Temperaturen über 95°C deaktiviert, sodass die PCR-Reaktion wie gewohnt durchgeführt werden kann.

### 4. Enthaltene Komponenten

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix besteht aus:

- VisionArray HPV Primer
- PreCise Taq DNA Polymerase
- VisionArray Uracil-DNA Glykosylase
- H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>
- PCR-Buffer
- dNTP/dUTP Solution

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix ist verfügbar in einer Größe:

- ES-0007-50: 0.75 ml (50 Reaktionen von je 15 µl)

### 5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

**Reagenzien:**

- H<sub>2</sub>O (PCR-Qualität)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

**Ausstattung:**

- PCR Gefäße
- Thermocycler
- Pipetten
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) oder VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

*Bitte beachten: Für einen erfolgreichen Scan müssen die VisionArray Analysis Packages einen VisionArray HPV Chip File enthalten.*

### 6. Lagerung und Handhabung

Den VisionArray HPV PreCise Master Mix bei -16...-22°C in einer aufrechten Position lagern. Wird das Produkt unter diesen Lagerbedingungen aufbewahrt, ist das Produkt ohne Leistungsverlust mindestens bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum funktionsfähig.

Das Produkt als Arbeitslösungen aliquotiert lagern, um die Anzahl der Einfrier/Auftau-Zyklen auf maximal 10 zu minimieren. Das Produkt nach dem Öffnen innerhalb von 6 Monaten verwenden.

Das PCR-Produkt nur für eine möglichst kurze Zeitspanne bei Raumtemperatur lagern.

## 7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Jegliche Art von Kreuzkontaminationen und mikrobakterieller Kontamination der Reagenzien vermeiden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.
- Eine räumliche Trennung der Arbeitsschritte mit und ohne DNA sowie die Vorbereitung des PCR-Mastermix unter einer Cleanbench sind notwendig, um Kontaminationen zu vermeiden.

## 8. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.
- Es ist wichtig, die angegebenen Mengen der Komponenten zu verwenden, um Beeinträchtigungen in den Reaktionsabläufen zu vermeiden.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der DNA-Proben kann zu einer Beeinträchtigung der Nachweisreaktion führen.

## 9. Störsubstanzen

- Geringe PCR-Effizienz durch Inhibitoren aus dem DNA-Ausgangsmaterial (z.B. Blut).
- Hohe Konzentrationen von EDTA in DNA-Elutionspuffern können zur Inhibition der PCR führen. Ausschließlich die empfohlenen DNA-Mengen verwenden.

## 10. Vorbereitung der Proben

Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebe, Zervikalabstriche/ Bürstenproben sowie ThinPrep-Proben können als Ausgangsmaterial zur HPV-Genotypisierung verwendet werden.

### Empfohlene DNA Extraktionskits:

- FFPE Präparate: VisionArray FFPE DNA Extraction Kit (VI-0001).
- ThinPrep Proben: VisionArray Cytology DNA Extraction Kit (VI-0002).

Nach der Extraktion ist die Messung der DNA-Konzentration notwendig, um die Qualität und Quantität der DNA zu überprüfen. Jede Probe sollte eine DNA-Konzentration von mindestens 15 ng/µl mit einem hohen Reinheitsgrad (260/280: ~1,8) aufweisen.

Während der Extraktion DNA-Kreuzkontaminationen vermeiden. Bei der Verwendung eines Mikrotoms sollten die Gewebeschnitte direkt nach dem Schneiden in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Das Mikrotommesser sollte zwischen verschiedenen Gewebeproben gewechselt werden. Das Gleiche gilt für bereits fixierte Gewebeproben auf Objektträgern. Die Schaber sollten zwischen verschiedenen Präparaten gewechselt werden.

## 11. Vorbereitung der Reagenzien

Als erster Schritt wird die Anzahl der benötigten PCRs (n) bestimmt, welche sich aus der Anzahl an DNA-Proben und einer Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne DNA-Template) ergibt.

### Pipettierschema:

Nr.	Reagenzien	1x (finale Konz.)	nx
1	<u>VisionArray HPV PreCise Master Mix</u>	15 µl (1x)	
2	DNA-Probe	2,5-5 µl	
3	H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>	

- Den VisionArray HPV PreCise Master Mix in DNA/DNase-freie PCR-Gefäße aliquotieren.
- Die DNA-Probe in den Master Mix pipettieren (Nr. 2 im Pipettierschema). Für die Negativkontrolle 10 µl DNA/DNase-freies Wasser hinzufügen.
- Falls notwendig, mit Wasser auf das finale Reaktionsvolumen von 25 µl auffüllen (Nr. 3 im Pipettierschema).
- Die Proben in den vorgewärmten und kalibrierten Thermocycler überführen.

## 12. Durchführung

Das Amplifikationsprotokoll in dieser Gebrauchsanweisung wurde in 0,2 ml PCR-Gefäßen unter Verwendung der empfohlenen Enzyme mit dem Biometra TProfessional Thermocycler System etabliert. Falls notwendig müssen bei Verwendung eines anderen Thermocyclers Modifikationen entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt werden. Dieses Protokoll muss daher für Anwendung auf Kompatibilität getestet werden. Der verwendete Thermocycler muss gemäß den Angaben des Herstellers kalibriert werden.

### Thermoprofil:

Dauer	Temperatur	Wiederholungen	Schritt
10 min	25°C	x1	Uracil-DNA-Glykosylase Inkubation
10 min	95°C	x1	Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase, Deaktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase
20 s	95°C	x10	Denaturierung
30 s	55°C		Annealing
80 s	60°C		Elongation
20 s	95°C	x35	Denaturierung
30 s	38°C		Annealing
80 s	60°C		Elongation
1 min	95°C	x1	Denaturierung
∞	8°C	x1	

Ramping-Zeit: Δ 5°C/s

Das Thermoprofil wurde für die in dieser Gebrauchsanweisung empfohlenen Reagenzien optimiert. Änderungen in der chemischen Zusammensetzung oder dem Ablauf müssen vor Verwendung durch den Anwender validiert werden.

Sobald die PCR beendet ist, sollten die Reaktionsgefäße bei -16°C...-22°C aufbewahrt werden.

## 13. Interpretation der Ergebnisse

Der VisionArray HPV PreCise Master Mix ist zur Verwendung mit dem VisionArray HPV Chips und dem VisionArray Detection Kit bestimmt. Die Interpretation der Ergebnisse ist mit einem VisionArray Analysis Package durchzuführen.

## 14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verarbeiteten Proben und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von extern validierten positiven und negativen Kontrollproben begleitet werden. Wenn interne und/oder externe Kontrollen keine angemessene Färbung nachweisen können, sind die Ergebnisse mit Patientenproben als ungültig anzusehen.

Die Kontrolle der PCR und der Amplifikate kann anschließend durch Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese erfolgen. Die Bande der HPV-Typen zeigt eine Fragmentlänge von etwa 140 bp und ist nur in einer HPV-positiven Probe nachweisbar. Die Positivkontrolle zeigt eine Bande bei 227 bp.

Durch die geringe Annealingtemperatur und aufgrund von PCR-Bedingungen, die einzelsträngige Produkte begünstigen, sind nicht bei jedem Test klar abgegrenzte Banden vorhanden. Eine erfolgreiche Chip-Hybridisierung ist jedoch dennoch möglich. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt zur Fehlerbehebung.

## 15. Leistungsmerkmale

Bitte die Leistungsmerkmale des jeweiligen VisionArray HPV-Chips Beachten.

## 16. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

## 17. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu einer Beeinträchtigung des Nachweises der Zielsequenz führen.

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Fehlende oder geringe Ausbeute an Amplifikations-Produkten	Abgelaufene oder degenerierte PCR-Reagenzien; falsches Thermocycler-Programm.	PCR-Reagenzien und Thermocycler-Programm prüfen.
	Degradierte Template-DNA; geringe DNA-Ausbeute.	Die DNA bei -16...-22°C lagern; Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden; ein alternatives Extraktionsprotokoll verwenden.
	PCR-Inhibitoren im Reaktionsmix.	Ein alternatives Extraktionsprotokoll verwenden; die Probe vor Durchführung der PCR mit H <sub>2</sub> O (PCR-Qualität) auf die empfohlene DNA-Konzentration verdünnen.
PCR-Amplifikate in der Negativkontrolle	Kontamination der Reagenzien während der Probenvorbereitung oder während der Vorbereitung der PCR.	Frische Reagenzien verwenden; Proben-Kontamination vermeiden; vor der PCR-Amplifikation einen Uracil-DNA-Glykosylaseschritt durchführen.

## 18. Literatur

- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 100, 2012; ISBN 978 92 832 1319 2
- WHO Human Papillomavirus Laboratory Manual, First edition, 2009.
- Snijders P. J. F., et al. (1990) *Journal of General Virology* **71**:173-181.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.  
Bitte kontaktieren Sie [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



42 life sciences GmbH & Co. KG  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Deutschland  
Telefon: +49 471 4832-500  
Fax: +49 471 4832-308  
www.42ls.com  
Email: info@42ls.com

### Vertrieb durch:

ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Deutschland  
Telefon: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
www.zytovision.com  
Email: info@zytovision.com

### Warenzeichen:

VisionArray® ist ein Warenzeichen der  
42 life sciences GmbH & Co. KG