



VisionArray Detection Kit



VK-0003-50



50 Reaktionen

Für den qualitativen Nachweis von DNA-Sequenzen auf
VisionArray Chips



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

1. Verwendungszweck

Das VisionArray Detection Kit wurde für den qualitativen Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen mit einem VisionArray PreCise Master Mix sowie einem entsprechenden VisionArray DNA Chip entwickelt. 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

Sequenzspezifische DNA-Fragmente in einem Pool von DNA-Fragmenten werden durch DNA/DNA-Hybridisierung mit immobilisierten DNA-Fängern auf einem Glaschip nachgewiesen. Zunächst werden die Zielsequenzen in diesem Material mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotinmolekülen markiert. Anschließend hybridisieren die amplifizierten Sequenzen mit den komplementären DNA-Fängern auf dem Glaschip. Nach der Hybridisierung werden unspezifisch gebundene DNA-Fragmente durch kurze Stringenzwaschschritte entfernt. Die spezifisch gebundenen und biotinylierten Sequenzen werden durch eine sekundäre Bindung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und einer Färbung mit Tetramethylbenzidin (TMB) visualisiert.

4. Enthaltene Komponenten

Die folgenden Komponenten sind enthalten:

Code	Komponente	Tests	Gefäß
HY-0001-1	Hybridization Solution	1 ml	Reaktionsgefäß, roter Deckel
WB-0012-250	100x Wash Buffer	250 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
AB-0016-5	Detection Solution	5 ml	Schraubverschlussflasche (klein)
SB-0009-5	Blue Spot Solution	5 ml	Schraubverschlussflasche (klein), braun
	Gebrauchsanweisung	1	

Die Hybridization Solution, Detection Solution sowie die Blue Spot Solution sind ausreichend für 50 Reaktionen. Der 100x Wash Buffer ist ausreichend für 50 Reaktionen mit 6 Küvetten à 70 ml.

5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

Reagenzien:

- PCR-Produkt, hergestellt mit einem VisionArray PreCise Master Mix
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser

Ausstattung:

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) oder VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray DNA Chips
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Zentrifuge für Objektträger
- Küvetten, 50-80 ml
- Pipetten

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

6. Lagerung und Handhabung

Die Komponenten des Kits bei 2...8°C in einer aufrechten Position lagern. Die Blue Spot Solution lichtgeschützt aufbewahren. Wird das Kit unter diesen Lagerbedingungen aufbewahrt, ist das Kit ohne Leistungsverlust mindestens bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum funktionsfähig.

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.
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Nicht mit dem Mund pipettieren!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.

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.
- Die Bestandteile des Kits sind sorgfältig aufeinander abgestimmt und das Austauschen einzelner oder mehrerer Komponenten kann zu Leistungseinbußen führen.

- 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.
- Während der Durchführung nicht unter einer Laminar-Flow Werkbank arbeiten, da dies zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse führen kann.

9. Störsubstanzen

- Geringe PCR-Effizienz durch Inhibitoren aus dem DNA-Ausgangsmaterial (z.B. Blut).
- Verwendung von PCR-Additiven, welche die Hybridisierung beeinflussen können (z.B. DMSO, Betain, Urea).

10. Vorbereitung der Proben

Ausgangsmaterial für dieses Nachweissystem sind DNA-Sequenzen, die mit einem VisionArray PreCise Master Mix amplifiziert und biotinyliert wurden.

11. Vorbereitung der Reagenzien

- Vorbereitung von 1x Wash Buffer: 1 Teil 100x Wash Buffer mit 99 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen (in einem geschlossenen Behälter ist der verdünnte 1x Wash Buffer für einen Monat bei RT (18...22°C) stabil).
- Hybridization Solution, Detection Solution, Blue Spot Solution sowie 1x Wash Buffer auf RT (18...22°C) bringen. Mögliche Präzipitate in der Hybridization Solution müssen durch kurzes Erwärmen (max. 37°C) gelöst werden.
- Vor Verwendung den Hybridizer oder den Hybridisierungssofen auf 42°C vorwärmen.

12. Durchführung

- 1 Schützende Folie vom blauen Rahmen des Chips entfernen.
- 2 Vorbereiten des Hybridisierungsmix:
 - 20 µl Hybridization Solution
 - + 10 µl PCR-Produkt
 - 30 µl Hybridisierungsmix (ausreichend für einen Chip)

Den Hybridisierungsmix durch Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.
- 3 30 µl des Hybridisierungsmix vorsichtig auf die linke Seite des Array Feldes auftragen (mit dem Etikett auf der rechten Seite), dabei Luftbläschen vermeiden. Das gesamte Array Feld mit dem beigelegten Plastikdeckel vorsichtig von der linken zur rechten Seite abdecken.
- 4 Den Chip zügig in den vorgewärmten Hybridizer bzw. den Hybridisierungssofen mit Feuchtekkammer überführen und bei 42°C (+/- 1°C) für 30 min inkubieren.

Bitte beachten: Dieser Schritt sollte für jeden Array einzeln durchgeführt werden, niemals mit mehreren Arrays parallel. Abweichungen von mehr als 1°C sollten vermieden werden. Es wird empfohlen, ein kalibriertes Thermometer zu verwenden.

- 5 In der Zwischenzeit 3 Küvetten mit 1x Wash Buffer vorbereiten.
- 6 Sobald die Inkubationszeit vorbei ist, den Chip aus dem Inkubator nehmen und vorsichtig den Plastikdeckel entfernen. Vorsichtig den Hybridisierungsmix auf einem Papiertuch abtropfen lassen und den Objektträger unmittelbar in 1x Wash Buffer waschen. Dazu den Objektträger behutsam 3x bidirektional in der ersten Küvette schwenken. Diesen Waschvorgang in der zweiten Küvette wiederholen. Anschließend den Chip in die dritte Küvette überführen, 3x schwenken und für 1 min inkubieren.

Bitte beachten: Nicht mehr als 6 Objektträger pro Küvette verwenden. Nicht behandelte Objektträger sollten auf Hybridisierungstemperatur gehalten werden. Nur so kurz wie möglich der Raumtemperatur aussetzen.

- 7 Den Chip aus der Küvette nehmen, kurz auf einem Tuch abtropfen lassen und in einer Zentrifuge für Objektträger für 15-30 s trocknen.

Bitte beachten: Die Verwendung einer Zentrifuge für Objektträger ist zwingend erforderlich, um zu verhindern, dass Tröpfchen auf dem Array zurückbleiben.

- 8 100 µl Detection Solution vorsichtig auf das getrocknete Array Feld pipettieren, ohne die Oberfläche zu berühren. Das Array Feld muss gleichmäßig bedeckt sein und Luftbläschen müssen entfernt werden.
- 9 Für 10 min auf einem ebenen Untergrund bei RT (18...22°C) inkubieren.
- 10 In der Zwischenzeit 3 Küvetten mit 1x Wash Buffer vorbereiten.
- 11 Nach der Inkubation wie in Schritt 6 und 7 beschrieben waschen und trocknen. Die zuletzt verwendete Küvette für Schritt 13 aufheben.
- 12 100 µl Blue Spot Solution vorsichtig auf das gesamte Array Feld auftragen und für 5 Minuten bei RT (18...22°C) inkubieren. Die Farbentwicklung kann durch visuelle Inspektion beobachtet werden. Im Fall einer schnellen und starken Färbung kann die Inkubationszeit frühzeitig beendet werden.
- 13 Die Blue Spot Solution in der Küvette mit 1x Wash Buffer aus Schritt 10 für etwa 15 s von dem Chip waschen.
- 14 Den Chip kurz auf einem Papiertuch abtropfen lassen und in einer Zentrifuge für Objektträger für 30 s trocknen.

Die Chips sind nun bereit für die Analyse durch die VisionArray Analysis Packages.

13. Interpretation der Ergebnisse

13.1 Allgemeine Anmerkung

Mit Hilfe eines VisionArray DNA Chips ist es möglich, eine Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von spezifischen DNA-Sequenzen zu treffen. Die Intensität des Signals wird durch die Häufigkeit der Zielsequenz in der Probe sowie durch weitere Faktoren des Nachweissystems beeinflusst. Es ist nicht möglich, die absoluten Werte der Signalintensität zur Bestimmung der DNA-Konzentration zu verwenden.

13.2 Auswertung

Der Chip kann nach Anwendung dieses Protokolls ausgewertet werden. Positive Signale werden als dunkelblaue runde Flächen auf dem Objektträger sichtbar. Die automatisierte Auswertung des Chips wird mit der entsprechenden VisionArray Analyzer Software durchgeführt.

13.3 Software-basierte Auswertung

Die automatisierte Auswertung der Ergebnisse wird mit der entsprechenden VisionArray Analyzer Software durchgeführt. Eine umfangreiche Gebrauchsanweisung zur Chip-Analyse liegt der Software bei.

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.

15. Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale des jeweiligen VisionArray DNA Chip 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
Kein Signal	Falsche Temperatur	Hybridisierungstemperatur prüfen
	Abgelaufene Reagenzien	Reagenzien prüfen
Nur Guide Dots und keine weiteren Signale	Probleme mit dem PCR-Produkt (PCR ist nicht effizient genug oder die Template-DNA ist degradiert)	Mit einer Positivkontrolle die PCR-Effizienz überprüfen; PCR-Chemikalien und Thermocycler-Programm prüfen; PCR-Produkt im Agarosegel prüfen
	Falsches Ausgangsmaterial	Ausgangsmaterial prüfen
	Falsche Kombination von Chip und Probe	Kombination aus Probe/Chip prüfen
Nur Guide Dots und PCR-Kontrolle, aber keine weiteren Signale	Keine Zielsequenz vorhanden	Positivkontrolle verwenden
Nur Guide Dots und spezifische Signale, aber keine positive Kontrolle	Degradierte Probe	Neue DNA-Extraktion; bei -16...-22°C lagern
Zu viel Hintergrundsignal	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu lang; Temperatur während der Inkubation zu hoch	Inkubationszeit und -temperatur mit Detection Solution und Blue Spot Solution prüfen
	Objektträger nicht ausreichend getrocknet	Trocknungsschritt prüfen
Starke, auslaufende Signale	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu lang; Temperatur während der Inkubation zu hoch	Schrittweise Anpassung der Inkubationsdauer und -temperatur mit Detection Solution und Blue Spot Solution
Schwache Signale	Hybridisierungstemperatur inkorrekt	Temperatur prüfen
	Hybridisierungszeit zu kurz	Hybridisierungszeit bis maximal 30 min verlängern
	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu kurz	Inkubationszeit mit Detection Solution und Blue Spot Solution verlängern
	Schwache PCR-Amplifikation/ schlechte Qualität der Template-DNA	Template-DNA prüfen
Kreuzhybridisierungs-Signale, falsch positive Signale	Kontamination der PCR-Chemikalien oder des PCR-Produkts	Verwendete PCR-Chemikalien ersetzen
	Kontamination während der Vorbereitung der PCR oder des Hybridisierungsmix	Transfer der Probe während der Vorbereitung des Mix vermeiden
	Hybridisierungstemperatur zu gering	Hybridisierungstemperatur prüfen
	Mehrere Chips zu lange im gleichen Wash Buffer inkubiert	Schnelle Durchführung der Waschschrte
Einzelne Signale statt Duplikate	Mechanische Eliminierung des zweiten Signals, z.B. durch Kontakt mit der Pipettenspitze	Direkten Kontakt mit dem Array Feld vermeiden
	Unregelmäßige Abdeckung des Array Feldes aufgrund von Luftblasen	Lösungen ohne Luftblasen auftragen
	Schwache Signale um den Schwellenwert (1 drüber und 1 drunter)	PCR und Detektion unter Berücksichtigung der in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Bedingungen wiederholen

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie help@zytovision.com



42 life sciences GmbH & Co. KG
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