




## VisionArray Detection Kit

REF VK-0003-50  50 test

Per la rilevazione qualitativa delle sequenze di DNA con  
VisionArray Chips.



Dispositivo medico – diagnostico in vitro  
in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC

### 1. Scopo previsto

Il VisionArray Detection Kit è stato sviluppato per essere utilizzato con u VisionArray PreCise Master Mix e il corrispondente VisionArray DNA Chip per la rilevazione quantitativa di sequenze specifiche di DNA. L'analisi automatica deve essere condotta con un VisionArray Analysis Package.

Questo prodotto è progettato per usi diagnostici in vitro (in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC). L'interpretazione dei risultati deve essere condotta da un patologo qualificato, analizzando il contesto della storia clinica del paziente nel rispetto degli altri dati clinici e patologici del paziente.

### 2. Rilevanza clinica

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del rispettivo chip.

### 3. Principio del test

Frammenti di DNA, specifici per determinate sequenze, vengono rilevati in un pool di frammenti di DNA per mezzo di un'ibridazione DNA/DNA tramite sequenze cattura presenti sul vetrino chip. Come prima cosa, le sequenze target devono essere amplificate tramite PCR e contemporaneamente marcate con molecole di biotina. Successivamente, le sequenze amplificate sono ibridate con le sequenze DNA cattura complementari presenti sul chip. Dopo l'ibridazione, i frammenti di DNA legati in modo aspecifico vengono rimossi con brevi lavaggi stringenti. Le sequenze legate in modo specifico e biotinilate vengono visualizzate tramite una seconda marcatura con un coniugato streptavidina-perossidasi e una colorazione con tetrametilbenzidina (TMB).

### 4. Reagenti forniti

I seguenti componenti sono inclusi:

Codice	Componenti	Quantità	Contenitore
HY-0001-1	Soluzione d'ibridazione	1 ml	Flacone con tappo rosso
WB-0012-250	100x Wash Buffer	250 ml	Flacone con tappo a vite (grande)
AB-0016-5	Soluzione di rilevazione	5 ml	Flacone con tappo a vite (piccolo)
SB-0009-5	Blue Spot Solution	5 ml	Flacone con tappo a vite (piccolo), marrone
	Istruzioni per l'uso	1	

La soluzione d'ibridazione, la soluzione di rilevazione e la Blue Spot Solution sono sufficienti per 50 reazioni. Il tampone 100x Wash Buffer è sufficiente per 50 test con 6 vaschette di colorazione da 70 ml l'una.

### 5. Materiali richiesti ma non forniti

#### Reagenti:

- Prodotto di PCR creato con un VisionArray PreCise Master Mix
- Acqua deionizzata o distillata

#### Attrezzatura:

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) o VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray DNA Chips
- Ibridizzatore o stufa d'ibridazione con camera umida
- Centrifuga per vetrini
- Vaschetta di colorazione, 50-80 ml
- Pipette

*Nota: I VisionArray Analysis Package devono contenere il rispettivo VisionArray Chip File per una scansione di successo.*

### 6. Conservazione e stoccaggio

I componenti del kit devono essere conservati a 2/8°C in posizione verticale. Conservare la Blue Spot Solution al riparo dalla luce. Se si seguono correttamente queste condizioni di stoccaggio, il kit funzionerà senza nessuna perdita di performance, almeno fino alla data di scadenza indicate in etichetta.

### 7. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'uso.
- Non utilizzare i reagenti una volta superata la data di scadenza.
- Evitare qualsiasi cross-contaminazione e contaminazione microbatterica dei reagenti.
- Alcuni componenti del kit contengono sostanze (in basse concentrazioni e volumi) che sono pericolosi per la salute. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure protettive (utilizzare guanti monouso, occhiali e indumenti di protezione)
- Se i reagenti entrano in contatto con la pelle, risciacquare immediatamente con un'abbondante quantità di acqua.
- Non dispensare mai le soluzioni con la bocca.
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per utilizzatori professionali.

### 8. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- L'interpretazione dei risultati deve essere condotta da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente, rispettando gli altri dati clinici e patologici.
- I componenti del kit sono stati scrupolosamente determinati e definiti insieme e la sostituzione di uno o più componenti può portare a errori di interpretazione.
- È importante che vengano utilizzati i quantitativi indicati dei diversi componenti per evitare di danneggiare la reazione.

- Ripetuti scongelamenti e congelamenti dei campioni di DNA possono comportare un deterioramento della reazione di rilevazione.
- Non lavorare sotto flusso laminare, poiché ciò potrebbe portare a una compromissione dei risultati.

## 9. Sostanze interferenti

- Bassa efficienza di PCR per inibizione di PCR da parte della materia prima del DNA (per esempio: sangue).
- Uso di additivi di PCR che possano influenzare l'ibridazione (e.g. DMSO, betaina, urea).

## 10. Trattamento preparatorio dei campioni

Il materiale di partenza per questo sistema di rivelazione sono sequenze di DNA che sono state amplificate e biotinilate con un VisionArray PreCise Master Mix.

## 11. Trattamento preparatorio del prodotto

- Preparazione del tampone 1x Wash Buffer: diluire 1 parte del tampone 100x Wash Buffer con 99 parti di acqua deionizzata o distillata (in un contenitore chiuso, il tampone Wash Buffer 1x è stabile per un mese a temperatura ambiente (18/22°C)).
- Portare a temperatura ambiente (18/22°C) le soluzioni: Hybridization Solution, Detection Solution, Blue Spot Solution, e il tampone 1x Wash Buffer. Eventuali precipitati presenti nella soluzione Hybridization solution devono essere eliminati riscaldando brevemente (max. 37°C).
- Riscaldare l'ibridizzatore o la stufa d'ibridazione a 42°C prima dell'uso.

## 12. Procedura di lavoro

- 1 Rimuovere la protezione dalle cornici blu dell'array.
- 2 Preparare la miscela di ibridazione:
  - 20 µl Hybridization Solution
  - + 10 µl prodotto di PCR
  - 30 µl miscela di ibridazione (sufficiente per un chip)

Mescolare la miscela di ibridazione utilizzando una pipetta.
- 3 Dispensare attentamente 30 µl della miscela di ibridazione sul lato sinistro dell'array (con l'etichetta sul lato destro) evitando la formazione di bolle d'aria all'interno. Coprire tutta la superficie dell'array con il coperchio fornito, appoggiandolo partendo dal lato sinistro al lato destro dell'array.
- 4 Trasferire velocemente il chip all'ibridizzatore o alla stufa d'ibridazione con camera umida pre-riscaldati e incubare per 30 minuti a 42°C (+/- 1°C).

*Nota: questo passaggio dovrebbe essere eseguito per ciascun array, uno dopo l'altro, mai in parallelo. Devono essere evitate variazioni di temperature superiori a 1°C. raccomandiamo l'uso di un termometro calibrato.*

- 5 Nel frattempo, preparare 3 vaschette di colorazione con il tampone Wash Buffer 1x.
- 6 Quando il tempo di incubazione è scaduto, estrarre il chip dall'incubatore e rimuovere il coperchio, prestando attenzione. Rimuovere la miscela di ibridazione facendola sgocciolare su un pezzo di carta da filtro/banco e lavare il vetrino immediatamente con il tampone 1x Wash Buffer. Successivamente, agitare con moderazione per tre volte in modo bidirezionale il vetrino nella prima vaschetta. Ripetere lo stesso passaggio nella seconda vaschetta. Infine, trasferire il chip nella terza vaschetta, agitare tre volte e incubare per 1 minuto.

*Nota: Non utilizzare più di sei vetrini per vaschetta. Non maneggiare vetrini che dovrebbero rimanere alla temperatura d'ibridazione. Il tempo d'esposizione a temperature ambiente dovrebbe essere il più breve possibile.*

- 7 Estrarre il chip dalla vaschetta, farlo sgocciolare velocemente su un panno e asciugarlo centrifugandolo in una centrifuga per vetrini per 15-30 s.

*Nota: L'utilizzo di una centrifuga per vetrini è obbligatorio per evitare che rimangano gocce sull'array.*

- 8 Dispensare 100 µl di Detection Solution sull'array asciutto, prestando attenzione a non toccare la superficie. La superficie dell'array deve essere coperta in modo uniforme e qualsiasi bolla deve essere rimossa.
  - 9 Incubare per 10 minuti su una superficie piana a temperature ambiente (18/22°C).
  - 10 Nel frattempo preparare 3 vaschette con il tampone 1x Wash Buffer.
  - 11 Dopo l'incubazione, lavare e asciugare come descritto nei passaggi 6 e 7. Tenere la vaschetta usata per ultima per il passaggio 13.
  - 12 Applicare 100 µl di Blue Spot Solution su tutta la superficie dell'array, prestando attenzione e incubare per 5 minuti a temperature ambiente (18/22°C). Lo sviluppo del colore può essere osservato tramite ispezione visiva. Nel caso di una colorazione rapida e intensa, accorciare il tempo di incubazione.
- Nota: La soluzione Blue Spot Solution dovrebbe essere stoccata e incubata al buio.*
- 13 Risciacquare la soluzione Blue Spot Solution dal chip utilizzando il tampone 1x Wash Buffer, contenuto nella vaschetta del passaggio 10, per circa 15 secondi.
  - 14 Sgocciolare velocemente il chip su un pezzo di carta e asciugarlo centrifugandolo in una centrifuga per vetrini per 30 secondi.

I chip sono ora pronti per essere esaminati con i VisionArray Analysis Package.

## 13. Interpretazione dei risultati

### 13.1 Note generali

Con l'aiuto del VisionArray DNA Chip è possibile determinare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA. L'intensità dei segnali è influenzata dalla quantità di sequenze target nel campione e da altri fattori legati al sistema di rivelazione. Non è possibile utilizzare i valori assoluti di intensità del segnale per la determinazione della concentrazione di DNA.

### 13.2 Valutazione

Dopo aver seguito questo protocollo, può essere eseguita l'analisi del chip. I segnali positive sono visibili sul vetrino come piccole aree circolari di colore blu scuro. La valutazione automatica del chip è condotta utilizzando il rispettivo VisionArray Analyzer Software.

### 13.3 Valutazione tramite software

La valutazione automatica dei risultati è condotta utilizzando il rispettivo VisionArray Analyzer Software. Un manuale esplicativo per l'analisi del chip è compreso nel Software.

## 14. Procedure di controllo qualità raccomandate

Per monitorare che le performance dei campioni processati e dei reagenti utilizzati per i test siano corrette, ogni test dovrebbe essere condotto utilizzando un controllo positivo e un controllo negativo esterni validati. Se il controllo interno e/o esterno non si colora correttamente, come previsto, allora i risultati ottenuti con i campioni provenienti dai pazienti potrebbero essere ritenuti non validi.

## 15. Caratteristiche di performance

Fare riferimento alle caratteristiche di performance del rispettivo chip VisionArray DNA Chip.

## 16. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve essere effettuato in conformità alle regolamentazioni locali vigenti.

## 17. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica alle istruzioni d'uso può comportare un risultato diverso nella rilevazione delle sequenze target.

Problema	Possibile causa	Azione
Nessun segnale	Temperatura sbagliata	Controllare la temperatura di ibridazione
	Reagenti scaduti	Controllare i reagenti
Solo spot guida e nessun altro segnale	Problemi con il prodotto di PCR (PCR non abbastanza efficiente o DNA template degradato)	Controllare l'efficienza della PCR con un controllo positivo; Controllare i reagenti della PCR e il programma del termociclatore; Controllare i prodotti della PCR in gel d'agarosio
	Materie prime errate	Controllare le materie prime
	Errata combinazione di chip e campioni	Controllare la combinazione di chip e campione
Solo gli spot guida e il controllo di PCR, ma nessun altro segnale	Nessuna sequenza target presente	Usare un controllo positivo
Solo gli spot guida e i segnali specifici, ma nessun controllo positivo	Campione degradato	Nuova estrazione del DNA; conservare tra i -16 e i -22°C
Troppo background	Tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution troppo lungo; temperature durante l'incubazione troppo elevata	Controllare il tempo di incubazione e la temperatura della soluzione di rivelazione o della Blue Spot Solution
	Vetrini non asciugati adeguatamente	Controllare il passaggio di asciugatura
Segnali forti o persi	Tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution troppo lungo	Aggiustamento progressivo del tempo e della temperatura di incubazione nella soluzione di rivelazione e nella Blue Spot Solution
Segnali deboli	Temperatura di ibridazione non corretta	Controllare la temperatura
	Tempo di ibridazione troppo corto	Allungare il tempo di ibridazione fino a un Massimo di 30 minuti
	Tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution troppo breve	Allungare il tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution
	Amplificazione PCR debole/ cattiva qualità del DNA Template	Controllare il DNA template
Cross-ibridazione dei segnali, segnali falsi positivi	Contaminazione dei reagenti di PCR o del prodotto di PCR	Sostituzione dei reagenti di PCR in uso
	Contaminazione durante la preparazione della PCR o della miscela di ibridazione	Evitare di trasferire i campioni durante la preparazione della miscela
	Temperatura di ibridazione troppo bassa	Controllare la temperatura di ibridazione
	Diversi chip incubati per un tempo troppo lungo nello stesso tampone di lavaggio	Velocizzare i tempi di lavaggio
Segnale singolo anziché doppio	Eliminazione meccanica del secondo segnale, per esempio per contatto con il puntale della pipetta	Evitare il contatto diretto con la superficie del vetrino
	Copertura irregolare della zona di array per la formazione di bolle	Applicare le soluzioni evitando la formazione di bolle
	Segnali deboli vicini al limite (1 sopra e 1 sotto)	Ripetere la PCR e rivelare seguendo le condizioni indicate nel manuale d'uso

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande. Contattare per cortesia [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



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

**Distribuito da:**

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

**Marchi registrati:**

VisionArray® è un marchio registrato di  
42 life sciences GmbH & Co. KG