



VisionArray Detection Kit

REF VK-0003-50 Σ 50 testów

Do jakościowej detekcji sekwencji DNA na
VisionArray Chips.



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

1. Przeznaczenie

VisionArray Detection Kit został opracowany do stosowania z VisionArray PreCise Master Mix i odpowiedniego VisionArray DNA Chip do jakościowej detekcji specyficznych sekwencji DNA. Zautomatyzowana analiza musi zostać przeprowadzona za pomocą VisionArray Analysis Package.

Produkt jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro* (zgodnie z dyrektywą UE 98/79/EC). Interpretacja wyników musi być dokonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście historii klinicznej pacjenta, w odniesieniu do dalszych danych klinicznych i patologicznych pacjenta.

2. Znaczenie kliniczne

Należy zapoznać się z instrukcją obsługi odpowiedniej macierzy na szkiełku.

3. Zasada testu

Fragmety DNA o określonej sekwencji są wykrywane z puli fragmentów DNA na szklanej macierzy za pomocą unieruchomionych sekwencji wychwytyjących DNA przez hybrydyzację DNA / DNA. W pierwszym etapie sekwencje docelowe w tych próbkach muszą być amplifikowane i biotynylowane w reakcji PCR. Następnie, powielone sekwencje hybrydują z komplementarnymi sekwencjami DNA na szklanej macierzy. Po hybrydyzacji niespecyficznym DNA jest wyłukiwany przez krótkie i ostre etapy przemywania. Specyficznie związane biotynylowane sekwencje są następnie znakowane wtórnie za pomocą koniugatu streptawidyna-peroksydaza i wizualizowane przez barwienie tetrametylobenzydyną (TMB).

4. Dostarczone odczynniki

Następujące składniki są zawarte:

Nr. kat.	Składniki	Objętość	Opakowanie
HY-0001-1	Hybridization Solution	1 ml	Naczynie reakcyjne, czerwona zakrętka
WB-0012-250	100x Wash Buffer	250 ml	Butelka z zakrętką (duża)
AB-0016-5	Detection Solution	5 ml	Butelka z zakrętką (mała)
SB-0009-5	Blue Spot Solution	5 ml	Butelka z zakrętką (mała), brązowa
	Instrukcja użycia	1	

Odczynniki Hybridization Solution, Detection Solution i Blue Spot Solution wystarczają na 50 reakcji. Odczynnik 100x Wash Buffer wystarcza na 50 testów w 6 barwiaczach po 70 ml każdy.

5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

Odczynniki:

- Produkty reakcji PCR opracowane przy pomocy VisionArray PreCise Master Mix
- Dejonizowana lub destylowana woda

Wyposażenie:

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) lub VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray DNA Chips
- Hybrydyzator lub ciepłarka do hybrydyzacji z komorą wilgotnościową
- Wirówka do szkiełek
- Barwiacz 50-80 ml
- Pipety

Uwaga: VisionArray Analysis Package do prawidłowego skanowania musi zawierać odpowiednie pliki VisionArray Chip File.

6. Przechowywanie i obsługa

Składniki zestawu muszą być przechowywane w temperaturze 2...8°C w pozycji pionowej. Przechowywać Blue Spot Solution chroniąc przed światłem. Jeśli te warunki przechowywania są przestrzegane, zestaw będzie funkcjonował, bez utraty wydajności, co najmniej do daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować odczynników po przekroczeniu daty ważności!
- Należy unikać jakiegokolwiek zanieczyszczenia odczynników krzyżowego czy bakteryjnego.
- Niektóre składniki zestawu zawierają substancje (w niskich stężeniach i objętości), które są szkodliwe dla zdrowia. Należy unikać bezpośredniego kontaktu z odczynnikami. Podejmij odpowiednie środki ochronne (użyj jednorazowych rękawiczek, okularów ochronnych i odzieży laboratoryjnej)!
- Jeśli odczynniki wejdą w kontakt ze skórą, natychmiast przemyj skórę dużą ilością wody!
- Nigdy nie pipetuj roztworów ustami!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznych jest dostępna na żądanie dla profesjonalnego użytkownika.

8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja wyników musi być dokonana w kontekście historii klinicznej pacjenta w odniesieniu do dalszych danych klinicznych i patologicznych przez wykwalifikowanego patologa.
- Komponenty zestawu są dokładnie dopasowane do siebie, a zastąpienie jednego lub więcej komponentów może prowadzić do błędów w wydajności.

- Ważne jest stosowanie wskazanych ilości składników, aby uniknąć zaburzenia procesu reakcji.
- Wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie próbek DNA może prowadzić do zaburzenia reakcji wykrywania.
- Nie pracować przy włączonym laminarze podczas przeprowadzania procedury testu, ponieważ może to prowadzić do pogorszenia wyników.

9. Substancje zakłócające

- Niska wydajność reakcji PCR spowodowana hamowaniem PCR w DNA materiału wyjściowego (np. krwi).
- Zastosowanie dodatków PCR, które mogłyby wpłynąć na hybrydyzację (np. DMSO, betaina, moczniak).

10. Przygotowanie próbek

Materiałem wyjściowym dla tego systemu wykrywania są produkty amplifikacji PCR, które zostały wyprodukowane przy użyciu VisionArray PreCise Master Mix.

11. Obróbka wstępna produktu

- Przygotowanie 1x Wash Buffer: Rozcieńczyć 1 część 100x Wash Buffer z 99 częściami dejonizowanej lub destylowanej wody (w zamkniętym pojemniku rozcieńczony 1x Wash Buffer jest stabilny przez jeden miesiąc w temperaturze pokojowej (18...22°C)).
- Przenieść do temperatury pokojowej (18...22°C) Hybridization Solution, Detection Solution, Blue Spot Solution i 1x Wash Buffer. Możliwe osady w Hybridization Solution muszą być rozpuszczone przez krótkie ogrzewanie (max. 37°C).
- Przed użyciem podgrzać do 42°C hybrydyzator lub ciepłarkę do hybrydyzacji.

12. Procedura testu

- 1 Zdjąć osłonę ochronną z niebieskich ramek na polu macierzy.
- 2 Przygotowanie mieszaniny hybrydyzacyjnej:
 - 20 µl Hybridization Solution
 - + 10 µl produktu PCR
 - 30 µl mieszanina hybrydyzacyjna (na jedną szklaną macierz)

Wymieszać dokładnie mieszaninę hybrydyzacyjną przez pipetowanie w górę i w dół.
- 3 Nanieść ostrożnie pipetą 30 µl mieszaniny hybrydyzacyjnej po lewej stronie pola macierzy (etykieta po prawej stronie) unikając uwięzienia pęcherzyków powietrza. Przykryć całe pole macierzy zaczynając od lewej strony dostarczoną plastikową nakrywką.
- 4 Przenieść szybko całą szklaną macierz do podgrzanego wcześniej hybrydyzatora lub ciepłarki z komorą wilgotnościową i inkubować 30 min w 42°C (+/- 1°C).

Uwaga: Ten krok należy wykonać dla każdej szklanej macierzy jedna po drugiej, nigdy równolegle. Należy unikać odchyień powyżej 1°C. Zalecamy stosowanie skalibrowanego termometru.
- 5 W międzyczasie przygotować 3 barwiacze z 1x Wash Buffer.
- 6 Po upływie czasu inkubacji w ciepłarce/hybrydyzatorze należy wyjąć szklaną matrycę i ostrożnie usunąć plastikową nakrywkę. Następnie ostrożnie odsączyć mieszaninę hybrydyzacyjną na bibułce papierowej i natychmiast przemyć szkiełko w 1x Wash Buffer. W tym celu delikatnie wstrząsnąć szkiełko 3x dwukierunkowo w pierwszym barwiaczu. Powtórzyć procedurę płukania w drugim barwiaczu. Na koniec przenieść macierz do trzeciego barwiacza, wstrząsnij 3x i inkubuj przez 1 min.

Uwaga: Nie używaj więcej niż 6 preparatów na jeden barwiacz. Nieobsługiwane preparaty powinny pozostawać w temperaturze hybrydyzacji. Narażenie na temperaturę pokojową powinno być jak najkrótsze.
- 7 Wyjąć macierz z barwiacza, odsączyć ją krótko na bibule i wysuszyć przez odwirowanie w wirówce na szkiełka podstawowe przez 15-30s.

Uwaga: Zastosowanie wirówki na szkiełka podstawowe jest absolutnie obowiązkowe, aby zapobiec pozostawieniu kropelek na macierzy.

- 8 Nanieś ostrożnie pipetą 100 µl Detection Solution na suche pole macierzy bez dotykania jej powierzchni. Pole macierzy musi być równomiernie przykryte, a pęcherzyki powietrza muszą zostać usunięte.
- 9 Inkubować przez 10 min na równej i wypoziomowanej powierzchni w temperaturze pokojowej (18...22°C).
- 10 W międzyczasie przygotować 3 barwiacze z 1x Wash Buffer.
- 11 Po inkubacji przepłukać i wysuszyć tak jak zostało to opisane w pkt. 6 i 7. Zatrzymaj barwiacz, który był użyty, jako ostatni do pkt. 13.
- 12 Nanieś ostrożnie 100 µl Blue Spot Solution na całe pole macierzy i inkubuj przez 5 min w temperaturze pokojowej (18...22°C). Zmianę koloru można obserwować wizualnie. W przypadku szybkiego i intensywnego barwienia inkubację można zatrzymać wcześniej.

Uwaga: Odczynnik Blue Spot Solution powinien być przechowywany i inkubowany w ciemności.
- 13 Zmyć odczynnik Blue Spot Solution z macierzy w barwiaczu z 1x Wash Buffer z pkt. 10, przez ok. 15 s.
- 14 Odsączyć krótko macierz na bibułce papierowej i wysuszyć przez odwirowanie w wirówce na szkiełka podstawowe przez 30 s.

Szkiełko z macierzą jest teraz gotowe do analizy przy pomocy zestawu VisionArray Analysis Package.

13. Interpretacja wyników

13.1 Uwagi ogólne

Z pomocą VisionArray DNA Chip możliwe jest uzyskanie informacji o obecności lub braku specyficznych sekwencji DNA. Na intensywność sygnałów wpływa dominacja sekwencji docelowych w próbce, a także różne czynniki systemu detekcji. Bez względu na liczbę intensywności sygnału nie można użyć do kwantyfikacji stężenia DNA.

13.2 Ocena

Po wykonaniu tego protokołu szklaną macierz można ocenić. Pozytywne sygnały są widoczne na szkiełku jako ciemnoniebieskie okrągłe obszary. Zautomatyzowana ocena układu jest wykonywana za pomocą odpowiedniego oprogramowania VisionArray Analyzer Software.

13.3 Ocena oparta na oprogramowaniu

Zautomatyzowaną ocenę wyników wykonuje odpowiednie oprogramowanie VisionArray Analyzer Software. Obszerny podręcznik do analizy macierzy jest dołączony do oprogramowania.

14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

Aby monitorować prawidłowe działanie przygotowanych próbek i odczynników testowych, każdemu testowi powinny towarzyszyć zewnętrzne zwalidowane próbki kontroli pozytywnej i negatywnej. Jeśli jakkolwiek kontrola wewnętrzna i / lub zewnętrzna nie wykaże odpowiedniego barwienia, wyniki z próbkami pacjenta należy uznać za nieważne.

15. Charakterystyka wydajności

Zapoznaj się z instrukcją użytkownika odpowiedniego VisionArray DNA Chip.

16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbyć się zgodnie z lokalnymi przepisami.

17. Rozwiązywanie problemów

Wszelkie odstępstwa od instrukcji obsługi mogą prowadzić do pogorszenia reakcji wykrywania sekwencji docelowej.

Problem	Możliwa przyczyna	Działanie
Brak sygnału	Zła temperatura	Sprawdź temperaturę hybrydyzacji
	Przetknięte odczynniki	Sprawdź odczynniki

Tylko sygnały nawigacyjne i żadne inne	Problemy z produktami PCR (PCR nie jest wystarczająco wydajny lub matryca DNA uległa degradacji)	Sprawdź wydajność PCR z kontrolą pozytywną; Sprawdź odczynniki do PCR i program termocyklera; Sprawdź produkt PCR w żelu agarozowym
	Niewłaściwy materiał wyjściowy	Sprawdź materiał wyjściowy
	Niewłaściwa kombinacja macierzy i próbki	Sprawdź kombinację próbki/macierzy
Tylko sygnały nawigacyjne i kontrole PCR obecne oraz żadne inne sygnały	Brak sekwencji docelowej	Zastosuj kontrolę pozytywną
Tylko sygnały nawigacyjne i specyficzne sygnały obecne oraz brak kontroli pozytywnej	Zdegradowana próbka	Nowa ekstrakcja DNA; przechowywać w temperaturze -16...-22°C
Za duże tło	Zbyt długa inkubacja z Detection Solution lub Blue Spot Solution; zbyt wysoka temperatura w czasie inkubacji	Sprawdź czas i temperaturę inkubacji z Detection Solution i Blue Spot Solution
	Szkiełka nie są odpowiednio wysuszone	Sprawdź krok suszenia
Zbyt silne sygnały	Zbyt długa inkubacja z Detection Solution lub Blue Spot Solution; zbyt wysoka temperatura w czasie inkubacji	Stopniowa regulacja czasu inkubacji i temperatury z Detection Solution i Blue Spot Solution
Słabe sygnały	Niewłaściwa temperatura hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę
	Zbyt krótki czas hybrydyzacji	Wydłuż czas hybrydyzacji do maksymalnie 30 min
	Zbyt krótki czas inkubacji z Detection Solution lub Blue Spot Solution	Wydłuż czas inkubacji z Detection Solution lub Blue Spot Solution
	Słaba amplifikacja PCR/zła jakość matrycy DNA	Sprawdź matrycę DNA
Sygnały hybrydyzacji krzyżowej, sygnały fałszywie dodatnie	Zanieczyszczenie odczynników do PCR lub produktów reakcji PCR	Wymień odczynniki do PCR
	Zanieczyszczenie podczas przygotowywania do PCR lub mieszaniny hybrydyzacyjnej	Unikaj przenoszenia próbki podczas przygotowywania mieszaniny
	Zbyt niska temperatura hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę hybrydyzacji
	Zbyt długa inkubacja kilku macierzy w tym samym buforze płuczącym	Szybkie wykonanie etapów płukania
Pojedyncze sygnały zamiast duplikatów	Mechaniczne usunięcie drugiego sygnału, np. podczas kontaktu z końcówką pipety	Unikać bezpośredniego kontaktu z powierzchnią macierzy
	Nieregularne pokrycie pola matrycy przez pęcherzyki powietrza	Nanieś roztwory bez pęcherzy powietrza
	Słabe sygnały wokół progu (1 powyżej i 1 poniżej)	Powtórzyć PCR i detekcję z uwzględnieniem warunków wymaganych w instrukcji

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania.
Prosimy o kontakt help@zytovision.com



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

Dystrybutor:

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

Znaki towarowe:

VisionArray® to znaki towarowe
42 life sciences GmbH & Co. KG