

MANUALE TECNICO

OncoMate™ 5C Matrix Standard

Istruzioni per l'uso del prodotto
MD3850



ISTRUZIONI PER L'USO
DEL PRODOTTO
MD3850



Rev 0
TM597



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



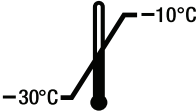












MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania

OncoMate™ 5C Matrix Standard

1. Nome prodotto	3
2. Uso previsto	3
3. Riepilogo e spiegazione	3
4. Principio del test.....	3
5. Componenti del prodotto e condizioni di conservazione	4
5.1 Materiali in dotazione.....	4
5.2 Conservazione e manipolazione.....	4
5.3 Materiali non in dotazione	5
6. Requisiti dello strumento per l'elettroforesi capillare.....	6
7. Preparazione dello strumento per elettroforesi capillare	6
8. Analisi dello standard di matrice	7
9. Interpretazione dei risultati	9
10. Risoluzione dei problemi	10
11. Prodotti correlati	13

Legenda dei simboli

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Numero lotto
	Conservare a temperature comprese fra -30°C e -10°C.		Fabbricante
	Non riutilizzare		Irritante
	Numero catalogo		Contenuto sufficiente per <n> test
	Utilizzare entro		Proteggere dalla luce
	Consultare le istruzioni per l'uso		Mandatario nella Comunità Europea
	Conformità alle normative europee		

1. Nome prodotto

OncoMate™ 5C Matrix Standard

N. parte MD3850

2. Uso previsto

L'OncoMate™ 5C Matrix Standard è destinato all'uso diagnostico in vitro come accessorio di un dispositivo medico IVD utilizzato con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System (N. cat. MD3140). Lo standard è utilizzato per la calibrazione spettrale degli strumenti per elettroforesi capillare prima dell'analisi dei prodotti di amplificazione generati con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Questo prodotto è destinato esclusivamente a un uso professionale.

3. Riepilogo e spiegazione

L'OncoMate™ MSI Dx Analysis System utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) multiplex per generare frammenti di DNA marcati con tre diversi coloranti fluorescenti: fluoresceina, JOE e TMR-ET. Durante l'analisi mediante elettroforesi capillare, i frammenti di DNA marcati mediante colorante vengono separati e rilevati dallo strumento insieme al Size Standard 500 marcato con colorante WEN. Prima dell'analisi, lo strumento per elettroforesi capillare deve essere calibrato con l'OncoMate™ 5C Matrix Standard per distinguere i segnali fluorescenti dai coloranti specifici utilizzati nell'analisi. L'OncoMate™ 5C Matrix Standard^(a,b) è costituito da frammenti di DNA marcati con cinque diversi coloranti fluorescenti (fluoresceina, JOE, TMR-ET, CXR-ET e WEN) in un'unica provetta. La calibrazione spettrale viene eseguita secondo le istruzioni del produttore dello strumento.

Seguire le istruzioni per l'uso del produttore dello strumento per le procedure di manutenzione appropriate per il proprio strumento. Ad esempio, una nuova calibrazione spettrale deve essere eseguita dopo aver eseguito una manutenzione rilevante del sistema per elettroforesi capillare, come la modifica della sorgente di eccitazione (ad es., il laser), la calibrazione o la sostituzione della telecamera CCD o la modifica del tipo di polimero o dell'array di capillari. Una nuova calibrazione spettrale deve essere eseguita anche se si osservano pull-up peak che interferiscono con l'analisi dei dati.

4. Principio del test

Durante la fase di raccolta dati di una corsa dello strumento di elettroforesi capillare, i frammenti di DNA marcati con coloranti fluorescenti sono esposti a una sorgente luminosa ed emettono luce di diverse lunghezze d'onda. Queste emissioni sono catturate da una telecamera integrata per ulteriori analisi. Vengono utilizzati più coloranti fluorescenti per consentire la rilevazione simultanea di frammenti di DNA di dimensioni simili.

Ogni colorante fluorescente utilizzato dall'OncoMate™ MSI Dx Analysis System ha la massima emissione luminosa a un'unica lunghezza d'onda, ma emette luce su una gamma di lunghezze d'onda. Laddove le emissioni spettrali di questi coloranti si sovrappongono, l'identificazione della sorgente di emissione del colorante è confusa, e interferisce con l'analisi dei dati. Pertanto, per analizzare i dati dei microsatelliti derivanti dall'uso di più coloranti fluorescenti, il software di analisi dello strumento deve distinguere gli spettri di emissione del colorante.

4. Principio del test (continua)

Uno standard di calibrazione spettrale, o standard a matrice, consiste in frammenti di DNA marcati con colorante fluorescente, che vengono analizzati durante una calibrazione spettrale. Il software di raccolta dati per elettroforesi capillare analizza gli spettri di emissione di questi frammenti marcati con coloranti, per caratterizzare la sovrapposizione spettrale e creare una matrice di deconvoluzione multicomponente specifica per ogni capillare della matrice calibrata. La matrice di deconvoluzione viene applicata automaticamente ai dati del campione grezzi nei successivi cicli di analisi per isolare e attribuire la fluorescenza osservata alle singole sorgenti di colorante.



5. Componenti del prodotto e condizioni di conservazione

5.1 Materiali in dotazione

Questo prodotto contiene reagenti sufficienti per eseguire cinque calibrazioni spettrali. Sono inclusi i seguenti materiali:

COMPONENTE	DIMENSIONE	N. PARTE
5C Matrix Mix	150 µl	MD430A

Include: frammenti di DNA marcati tramite fluorescenza

Condizioni di conservazione: area post-amplificazione;  -30°C prima dell'uso;  2°C dopo il primo uso. Proteggere dalla luce.

COMPONENTE	DIMENSIONE	N. PARTE
Matrix Dilution Buffer	5 × 200 µl	MD191A

Include: tampone contenente Tris-EDTA

Condizioni di conservazione: Area post-amplificazione;  -30°C prima dell'uso;  2°C dopo il primo uso.

5.2 Conservazione e manipolazione

Conservare l'OncoMate™ 5C Matrix Standard con reagenti post-amplificazione. Al ricevimento, conservare tutti i componenti a una temperatura compresa tra -30°C e -10°C in un congelatore no-frost, al riparo dalla luce. Non conservare i reagenti nello sportello del congelatore, dove la temperatura può variare. Dopo il primo utilizzo, conservare i componenti dell'OncoMate™ 5C Matrix Standard a 2-10°C, al riparo dalla luce, per un massimo di 3 mesi. L'OncoMate™ 5C Matrix Standard è sensibile alla luce; diluire il 5C Matrix Mix in Matrix Dilution Buffer nella provetta color ambra in dotazione. Conservare il 5C Matrix Mix diluito a 2-10°C per un massimo di 6 giorni.

Nota: non ricongelare i componenti dell'OncoMate™ 5C Matrix Standard.

5.3 Materiali non in dotazione

Reagenti di laboratorio

- Hi-Di™ Formamide (ad es., Applied Biosystems N. cat. 4404307)

L'uso di Hi-Di™ Formamide è necessario per la calibrazione spettrale con OncoMate™ 5C Matrix Standard. Congelare la formamide in aliquote a -20°C. Cicli multipli di congelamento-scongelo o la conservazione a lungo termine a 4°C può causare la decomposizione della formamide.



La formamide è irritante e teratogena; evitare l'inalazione e il contatto con la pelle. Leggere l'etichettatura di avvertimento e adottare le appropriate precauzioni durante la manipolazione di questa sostanza. Indossare guanti, indumenti protettivi e occhiali di sicurezza durante l'esecuzione dei protocolli descritti di seguito.

La mancata osservanza dei protocolli raccomandati per la conservazione dei reagenti per calibrazione spettrale, l'esecuzione della calibrazione spettrale o l'accettazione o il rifiuto dei risultati della calibrazione spettrale può causare picchi di artefatti "pull-up" durante l'analisi dell'elettroforesi capillare dei prodotti di amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System. I pull-up peak possono occultare i risultati del test o complicare l'interpretazione dei dati.

Attrezzature di laboratorio

- set di pipette di precisione calibrate in grado di erogare da 1 µl a 1000 µl
- puntali per pipette resistenti all'aerosol (da 10 µl a 1000 µl)
- provette per microcentrifuga da 1,5 ml
- centrifuga compatibile con piastre a 96 pozzetti (ad es., "centrifuga per micropiastre")
- rack per provette per microcentrifuga
- agitatore vortex
- congelatore no-frost con temperature da -30°C a -10°C
- frigorifero con temperature da 2°C a 10°C

Strumenti e accessori

- Strumento per elettroforesi capillare e materiali di consumo associati, inclusi polimero, array, tamponi, acqua e articoli di manutenzione raccomandati dal produttore dello strumento.
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (ad es., ThermoFisher N. cat. 4306737)

6. Requisiti dello strumento per l'elettroforesi capillare

I prodotti per amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System vengono separati e analizzati mediante elettroforesi capillare dopo calibrazione spettrale con l'OncoMate™ 5C Matrix Standard. Le prestazioni dell'OncoMate™ 5C Matrix Standard e dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System sono state valutate usando una corsa dell'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con impostazioni di Fragment Analysis (Analisi dei frammenti) e configurate con POP-7® Polymer e un array di capillari di 50 cm. Gli strumenti compatibili con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System e l'OncoMate™ 5C Matrix Standard condivideranno le seguenti specifiche:

Numero di coloranti rilevati: ≥ 5

Lunghezza dell'array di capillari: lunghezze dell'array adatte per la risoluzione a base singola, tra cui 50 cm

Matrice di separazione: POP-7® Polymer o equivalente


Lunghezza d'onda di eccitazione (approssimativa): da 480 nm a 520 nm

Ottica di rilevamento: i coloranti Promega richiedono la cattura delle emissioni da circa 500 nm a 630 nm

Gamma di risoluzione: risoluzione di 1 bp da 60 bp a ≥ 300 bp


Precisione di dimensionamento (ripetibilità, espressa come deviazione standard): $\leq 0,15$ bp in un range da 60 bp a ≥ 300 bp

7. Preparazione dello strumento per elettroforesi capillare

 Per il funzionamento e la manutenzione dello strumento per elettroforesi capillare selezionato seguire le istruzioni del produttore. La calibrazione spettrale deve essere eseguita utilizzando lo stesso tipo di polimero per elettroforesi capillare e lo stesso array utilizzato per la successiva analisi dei prodotti di amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

1. Assicurarsi che il polimero e i tamponi dello strumento non siano scaduti e che sia disponibile un numero sufficiente di campioni o iniezioni per completare la calibrazione.
2. Se pertinente, preriscaldare la camera termostata per elettroforesi capillare secondo le istruzioni del produttore per almeno 30 minuti prima di iniziare un ciclo.
3. Prima di eseguire la calibrazione spettrale, può essere necessaria una calibrazione spaziale dello strumento. Per ulteriori informazioni, consultare il manuale d'uso dello strumento selezionato. Se lo strumento per elettroforesi capillare richiede una calibrazione spaziale e questa non è stata ancora eseguita, procedere ora.
Nota: per ottenere i migliori risultati, si consiglia l'uso di un array di capillari nuovo, polimero fresco e tampone fresco.

8. Analisi del Matrix Standard

- 
1. Al primo utilizzo, scongelare completamente il 5C Matrix Mix e il Matrix Dilution Buffer. Dopo il primo utilizzo, conservare i reagenti a 2-10°C, al riparo dalla luce.
 2. Agitare al vortex il 5C Matrix Mix per 10-15 secondi alla massima velocità. Aggiungere 10 µl di 5C Matrix Mix in una provetta di Matrix Dilution Buffer. Agitare al vortex per 10-15 secondi alla massima velocità. Registrare la data di diluizione sulla provetta.

Nota: il 5C Matrix Mix diluito può essere conservato a 2-10°C per un massimo di 6 giorni.

3. Aggiungere 10 µl di 5C Matrix Mix diluito (preparato al punto 2) a 500 µl di Hi-Di™ Formamide. Agitare al vortex per 10-15 secondi alla massima velocità.
4. Aggiungere 15 µl di miscela formammide-matrice (preparata al punto 3) in ciascun pozzetto che l'array di capillari campionerà durante la calibrazione spettrale. Il numero di pozzetti necessari per la calibrazione spettrale dipende dallo strumento specifico e dall'array selezionato per l'analisi a valle dei prodotti di amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.
5. Coprire la piastra secondo le istruzioni del costruttore dello strumento e centrifugarla brevemente per portare la miscela sul fondo di ogni pozzetto e per rimuovere le bolle d'aria.



Nota: non denaturare mediante calore la piastra a 96 pozzetti contenente la miscela formammide-matrice. Eliminare eventuale miscela non utilizzata di formammide-matrice.

6. Caricare la piastra sullo strumento per elettroforesi capillare selezionato ed eseguire la calibrazione spettrale secondo le istruzioni fornite nel manuale d'uso dello strumento. La Tabella 1 fornisce le impostazioni dello strumento utilizzate per la calibrazione spettrale con l'OncoMate™ 5C Matrix Standard. Alcune impostazioni descritte nella Tabella 1 potrebbero non essere applicabili a tutte le piattaforme di strumenti per elettroforesi capillare. Per ulteriori informazioni, consultare il manuale d'uso dello strumento per elettroforesi capillare o contattare la filiale o il distributore Promega locale o inviare un'e-mail a: genetic@promega.com.

Nota: prima di completare la prima calibrazione spettrale con l'OncoMate™ 5C Matrix Standard, sarà necessario creare un nuovo Dye Set (Set coloranti). Utilizzare come modello un Dye Set (Set coloranti) specifico per i coloranti utilizzati nella matrice standard (fluoresceina, JOE, TMR-ET, CXR-ET e WEN) o un Dye Set (Set coloranti) generico (ad esempio, "AnyDye" o equivalente). L'uso di un Dye Set (Set coloranti) inadeguato per la calibrazione spettrale può determinare una riduzione del bilanciamento del segnale del colorante tra i frammenti rilevati durante l'analisi dei frammenti.

Tabella 1. Impostazioni utilizzate per la calibrazione spettrale con l'OncoMate™ 5C Matrix Standard.

Categoria	Impostazioni
Numero di coloranti (ovvero colori)	5
Dye Set (Set coloranti)	Specifico per colorante ¹ , AnyDye o equivalente
Dye Order (Ordine coloranti)	1, arancione; 2, rosso; 3, giallo; 4, verde; 5, blu
Minimum Quality Value (Valore qualità minimo)	0,95
Maximum Condition Number (Numero di condizionamenti massimo)	8,0
Sensitivity (Sensibilità)	0,4
Locate Start Point After Scan (Individua punto iniziale dopo la scansione)	300
Locate Start Point Before Scan (Individua punto iniziale prima della scansione)	5000
Limit Scans to (Limita scansioni a)	6500

¹Dye Set (Set coloranti) specifico per la fluoresceina, JOE, TMR-ET, CXR-ET e WEN

9. Interpretazione dei risultati

- Al termine del ciclo di calibrazione spettrale, rivedere i risultati della calibrazione spettrale. Per ogni capillare, controllare Quality Value (Valore qualità) e Condition Number (Numero condizionamenti) della calibrazione spettrale e controllare i dati di emissione spettrale visualizzati. Il passaggio dei capillari avrà un Quality Value (Valore qualità) $\geq 0,95$ e un Condition Number (Numero condizionamenti) $\leq 8,0$. Assicurarsi che l'ordine (da sinistra a destra) dei picchi dei frammenti risolti nel display dell'intensità rispetto al numero di scansione sia arancione, rosso, giallo, verde e blu (Figura 1, Pannello A). Assicurarsi che l'ordine (da sinistra a destra) dei segnali del colorante nel display degli spettri di emissione sia blu, verde, giallo, rosso e arancione (Figura 1, Pannello B).

Nota: il Quality Value (Valore qualità) per ogni capillare per una calibrazione spettrale riuscita è di solito $\geq 0,98$.

- Se tutti i capillari hanno superato la calibrazione e se i dati di emissione corrispondenti sono stati visualizzati correttamente, accettare la calibrazione spettrale. In caso contrario, rifiutare la calibrazione spettrale e fare riferimento alla Sezione 10, Risoluzione dei problemi.

Nota: se durante la calibrazione spettrale è stata utilizzata un'opzione "borrowing" (in prestito), vedere il manuale d'uso dello strumento per l'elettroforesi capillare per il numero richiesto di capillari che superano la calibrazione.

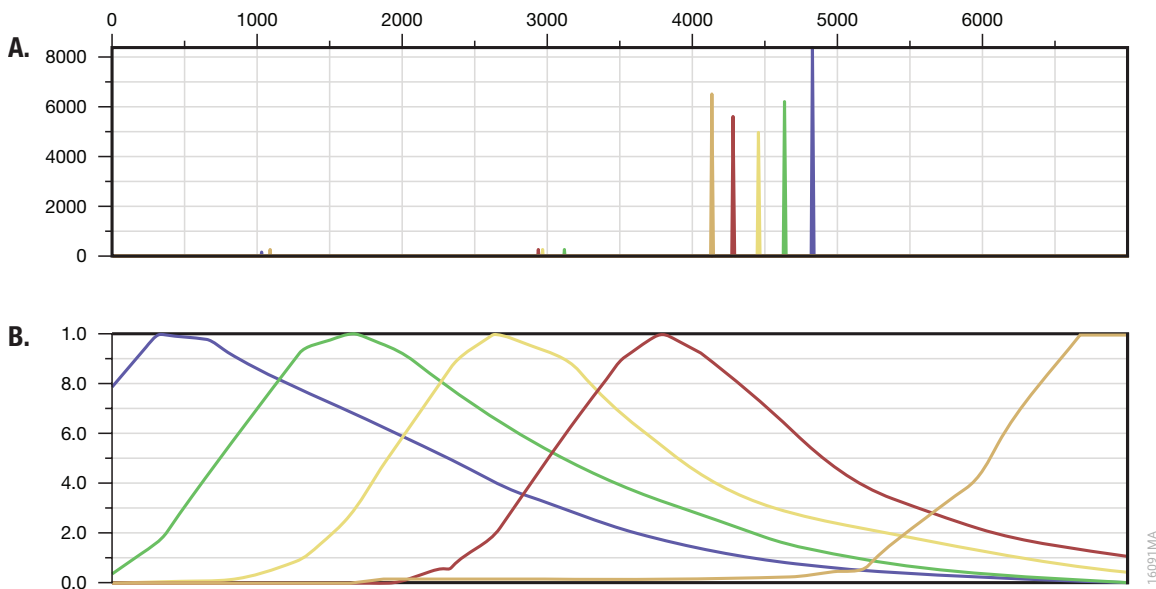


Figura 1. Dati rappresentativi per l'OncoMate™ 5C Matrix Standard. Pannello A. Picchi di frammenti risolti. **Pannello B.** Spettri di emissione del colorante.

10. Risoluzione dei problemi

Per domande non trattate qui, consultare il manuale d'uso dello strumento per elettroforesi capillare o contattare la filiale o il distributore Promega locale. Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo:

www.promega.com; e-mail: **genetic@promega.com**.

Problema	Cause e commenti
Picco di segnale di elettroforesi capillare o errore di ordine di coloranti rilevato	<p>Nel polimero erano presenti contaminanti o depositi di cristalli. Assicurarsi che il nuovo polimero aggiunto sia portato a temperatura ambiente seguendo le istruzioni del produttore. Ripetere la calibrazione spettrale. Se necessario, sostituire il polimero.</p> <p>Nei fluidi dello strumento erano presenti bolle. Consultare il manuale dello strumento per elettroforesi capillare per determinare come eliminare le bolle nei fluidi dello strumento, quindi ripetere la calibrazione spettrale.</p>
Calibrazione spettrale non riuscita o non è stato rilevato alcun segnale	<p>Si è verificato un errore sul computer di sistema. Riavviare lo strumento per elettroforesi capillare e il computer dello strumento seguendo le istruzioni del produttore. Ripetere la calibrazione spettrale.</p> <p>Lo strumento non è stato adeguatamente preriscaldato. Se necessario, assicurarsi che la camera termostata dello strumento sia stata preriscaldata a 60°C per almeno 30 minuti prima della calibrazione. Ripetere la calibrazione spettrale.</p> <p>I materiali di consumo dello strumento sono scaduti o la loro qualità era compromessa. Per ottenere risultati di calibrazione spettrale ottimali, utilizzare polimero fresco, tamponi freschi e una matrice di capillari con meno di 100 iniezioni.</p> <p>È stato selezionato un dye set (set di coloranti) non appropriato per la calibrazione spettrale o le impostazioni di calibrazione spettrale per il dye set (set di coloranti) sono state programmate in modo errato. Assicurarsi che venga utilizzato un dye set (set di coloranti) a 5 colori e che le impostazioni di analisi per il dye set (set di coloranti) a 5 colori siano programmate accuratamente (vedere Tabella 1).</p>

Problema

Calibrazione spettrale non riuscita o non è stato rilevato alcun segnale (continua)

Cause e commenti

Durante la calibrazione spettrale è stato rilevato un numero troppo basso di picchi di frammenti o sono stati rilevati picchi di frammenti errati. Era presente carryover da precedenti iniezioni oppure i reagenti della matrice sono scaduti o sono stati conservati in modo improprio. Ripetere la calibrazione spettrale utilizzando reagenti adeguatamente conservati o non ancora scaduti, se pertinente. Può essere necessario completare un'iniezione a vuoto (solo Hi-Di™ Formamide) prima di ripetere la calibrazione spettrale.

L'OncoMate™ 5C Matrix Standard è stato preparato in modo errato. Preparare il 5C Matrix Mix appena diluito come descritto nella Sezione 8 ed eseguire una nuova calibrazione spettrale.

L'OncoMate™ 5C Matrix Standard è scaduto o degradato a causa di una conservazione non corretta. Verificare la data di scadenza e le condizioni di conservazione del Matrix Standard. Se necessario, ripetere la calibrazione spettrale utilizzando reagenti conservati correttamente e non scaduti.

Uno o più capillari sono stati bloccati. Riempire l'array di capillari e ripetere la calibrazione spettrale. Installare un nuovo array di capillari se necessario.

Il Matrix Standard era troppo diluito. Un Matrix Standard troppo diluito causerà altezze ridotte dei picchi di calibrazione spettrale, con potenziale fallimento della calibrazione spettrale. Ripetere la calibrazione spettrale, assicurandosi che il 5C Matrix Mix sia sufficientemente agitato con vortex prima dell'uso e che venga utilizzato il corretto rapporto tra 5C Matrix Mix diluito e Hi-Di™ Formamide. Se necessario, aumentare il volume del 5C Matrix Mix diluito aggiunto alla formamide durante la preparazione del campione.

10. Risoluzione dei problemi (continua)

Problema	Cause e commenti
Calibrazione spettrale non riuscita o non è stato rilevato alcun segnale (continua)	<p data-bbox="665 326 1241 708">Il Matrix Standard era troppo concentrato. Un Matrix Standard troppo concentrato comporta un'eccessiva altezza dei picchi di calibrazione spettrale. Altezze di picco eccessive possono portare a "pull-up" o sovrasottrazione in altri colori del colorante e a errori di calibrazione spettrale. Se necessario, ridurre il volume del 5C Matrix Mix diluito aggiunto alla formammide durante la preparazione del campione. Ripetere la calibrazione spettrale, assicurandosi che il 5C Matrix Mix sia sufficientemente agitato con il vortex prima dell'uso e che venga utilizzato il corretto rapporto tra 5C Matrix Mix e Hi-Di™ Formamide.</p> <hr/> <p data-bbox="665 730 1241 1107">È stata utilizzata una formammide di scarsa qualità. La qualità della formammide è fondamentale. Con l'OncoMate™ 5C Matrix Standard usare solo Hi-Di™ Formamide. Congelare la formammide in aliquote a -20°C. Cicli multipli di congelamento-scongelo o stoccaggio a lungo termine a 4°C possono causare la decomposizione della formammide. Formammide di scarsa qualità e formammide esposta a cicli di congelamento-scongelo contengono ioni che competono con il DNA durante l'iniezione. Ciò si traduce in altezze di picco inferiori e sensibilità ridotta durante l'elettroforesi capillare.</p> <hr/> <p data-bbox="665 1130 1241 1286">Le punte dei capillari non erano a contatto con il Matrix Standard. Prima di iniziare la calibrazione spettrale, assicurarsi che a ciascun pozzetto della piastra a 96 pozzetti siano stati aggiunti 15 µl di miscela formammide-matrice e che la piastra sia stata sufficientemente centrifugata.</p>

11. Prodotti correlati

Prodotto	Dimensioni	N. cat.
OncoMate™ MSI Dx Analysis System	100 reazioni	MD3140

^(a)Brevetto USA n. 9.139.868, brevetto europeo n. 2972229 e altri brevetti in corso di registrazione.

^(b)I coloranti TMR-ET, CXR-ET e WEN sono proprietari.

© 2019 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

OncoMate è un marchio di Promega Corporation.

Applied Biosystems è un marchio registrato di Applied Biosystems. Hi-Di è un marchio di Applied Biosystems. MicroAmp e POP-7 sono marchi registrati di Thermo Fisher Scientific.

I prodotti possono essere coperti da brevetti già rilasciati o in corso di rilascio o possono essere soggetti a determinate limitazioni. Per ulteriori informazioni, visitare il nostro sito Web. Specifiche e prezzi sono soggetti a modifica senza preavviso.

Le descrizioni dei prodotti sono soggette a modifica. Per informazioni aggiornate sui prodotti Promega rivolgersi all'assistenza tecnica Promega oppure consultare il catalogo Promega online.