

HybriDetect

Universal lateral flow dipstick for the detection of biotin- and FITC-labeled analytes (proteins, genomic amplicates); development platform
English: Page 1-8

Universeller Lateralfuss-Dipstick zum Nachweis von Biotin- und FITC-markierten Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate); Entwicklungsplattform
Deutsch: Seite 9-16

REF:

MGHD 1



Milenia Biotec GmbH

Versailler Straße 1

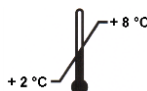
D-35394 Gießen, Germany

Tel.: +49-(0)641-94 88 83 - 0

Fax: +49-(0)641-94 88 83 - 80

E-Mail: info@milenia-biotec.de

Web: <http://www.milenia-biotec.de>






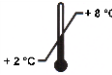




Note: Significant changes are indicated by dotted lines in the margin. In the end of the IFU you will find a table listing the reasons for the introduced changes.

Table of Contents

Explanation of Symbols	3
Warnings and Precautions	3
Intended Use	3
Materials Supplied, Storage and Stability	4
Materials Required (not included)	4
Necessary Development Work - Development Platform	4
Method	5
Common Testprinciple	6
Control Band Dipstick	6
Interpretation of Results	7
Assay Performance "PCR-Products"	8
Interpretation of „PCR“ Results	8
Trouble Shooting „PCR“	9
Assay Sensitivity „PCR“	9
Literature References	9
Additional Available Products	9

Explanation of Symbols

Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung	Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung
	Expiry date Haltbarkeitsdatum		Package size Packungsgröße
	Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten		Manufacturer Hersteller
	Batch code Los-Bezeichnung		Storage conditions Lagerungsbedingungen
	Catalogue number Katalognummer		Consult attended documents Begleitdokumente beachten

Warnings and Precautions

- All reagents should be stored at 2 – 8° C in their original containers.
- Before use, bring all reagents to room temperature (18 – 28° C).
- The expiration date of all components must be observed.
- Protect dipsticks from humidity; Container must always be closed.
- Touch and label only the foil- covered areas of the dipsticks (labeling area).
- The disposal of waste materials must be carried out according to current local regulations.
- The assay buffer contains an anti-microbial reagent; therefore avoid contact with skin and/or mucous membranes.
- For professional users

Intended Use

HybriDetect is a universal lateral flow dipstick for the detection of analytes (proteins, genomic amplicates) labelled with FITC and biotin. It is a development platform. The test is for research use only, not for diagnostic purposes.

Materials Supplied, Storage and Stability

Components	Cat.-No.	Content	Preparation	Storage	Shelf Life
HybriDetect Dipsticks: Membrane coated with biotin-ligand; polyclonal (rabbit) anti-FITC antibody in gold conjugate	MGDS	2 x 50 tests	Ready-to use	2 –8°C; Container must be always closed (protected from moisture)!	until expiry date
HybriDetect Assay Buffer: Tris-buffered saline	MGCB	2 vials à 10 mL	Ready-to use	2 –8°C	until expiry date

Material Safety Data Sheets are available on request or from the company website (www.milenia-biotec.de)

Materials Required (not included)

- Pipets
- Pipet tips (containing protective filters for PCR)
- Reaction tubes or 96-well microtiter plate

Necessary Development Work - Development Platform

Development of a solution, containing two different labeled detectors for the analyte.

Following conditions are necessary:

- 1) Detectors must be labeled with:
 - FITC (fluorescein isothiocyanate)
 - Biotin
- 2) Use about 100 µL fluid (sample material and analyte-specific solution) for the assay procedure.
- 3) The provided assay buffer (MGCB) may be used as a basic buffer for this analyte-specific solution.

Example of use:

20 µl sample material and 80 µl analyte-specific solution with 5 min incubation time.

Notice:

Volumes, analyte-specific solution, and incubation time are part of the individual test development.

A basic procedure for the detection of genomic amplicons is explained on page 7: "Assay performance PCR products". The amplification product should be biotinylated and the specific hybridization probe should be FITC labeled. In principle all amplification procedures (Polymerase Chain Reaction or isothermal amplifications like LAMP or RPA) can be used.

Method

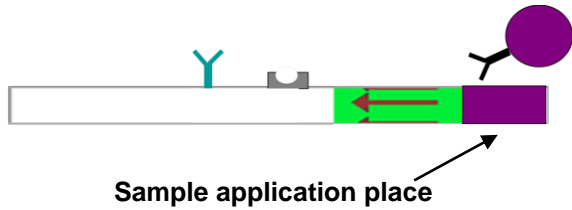
Milenia[®] HybriDetect is a ready-to-use, universal test strip (dipstick), which is based on the lateral flow technology using gold particles. The dipstick is designed to develop qualitative or semi-quantitative rapid test systems for several analytes such as proteins, antibodies, or gene amplicons. The user needs to develop an analyte-specific solution, which contains a first detector (e.g. antibody, antigen, specific probe) labeled with FITC and a second one (e.g. antibody, primer) labeled with biotin, (see “Common Testprinciple” on page 5).

The sample to be determined is mixed with the developed analyte-specific solution, and then the dipstick is placed into the solution.

The complexed analyte, labeled with FITC and biotin, binds first to the gold-labeled FITC-specific antibodies in the sample application area of the dipstick. The gold complexes travel through the membrane, driven by capillary forces. Only the analyte captured gold particles will bind when they pass the line with the immobilized biotin-ligand molecules and generate a red-blue band over the time. Unbound gold particles migrate over the control band and will be captured by species-specific antibodies. With prolonged incubation time, the formation of an intensely colored control band appears.

Common Testprinciple

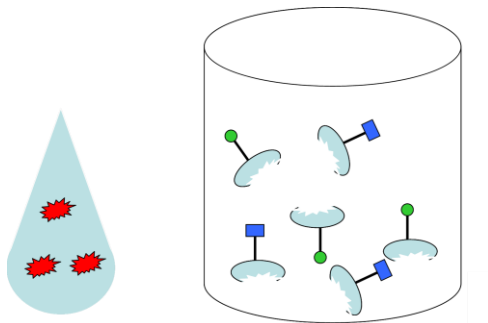
1) Ready-to-use universal dipstick (analyte-independent)



Symbols:

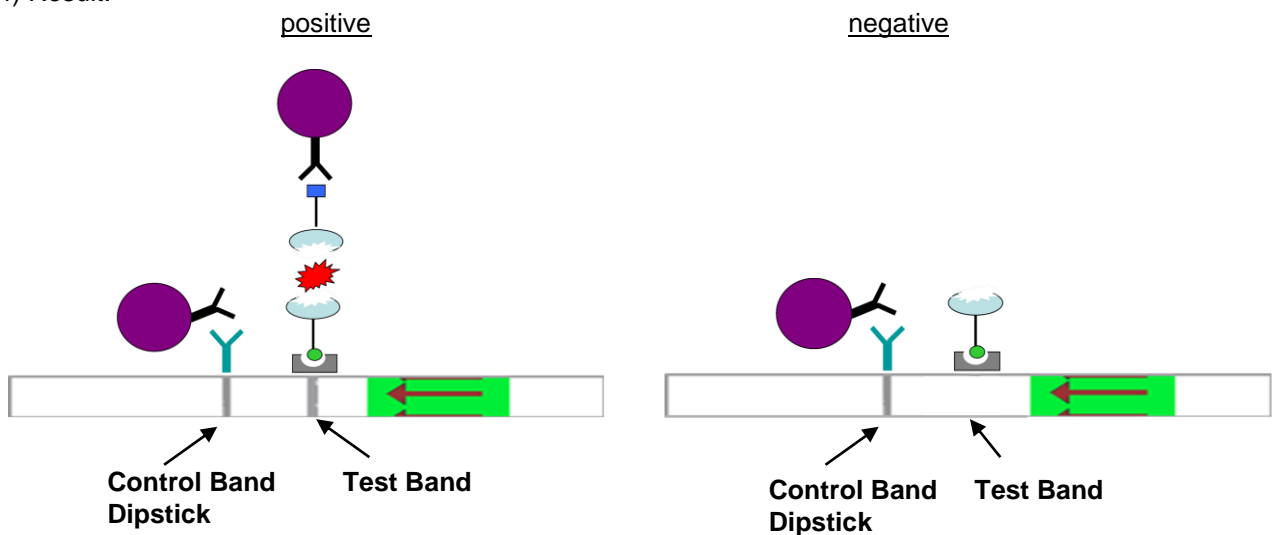
	FITC
	Biotin
	Goldparticle
	anti-FITC Antibody
	Analyte Detector 1 + 2
	Analyte (Protein, antibody, genetic amplicon)
	Biotin-Ligand
	anti-rabbit Antibody

2) Addition of sample and analyte-specific solution



3) Incubation

4) Result:



Control Band Dipstick

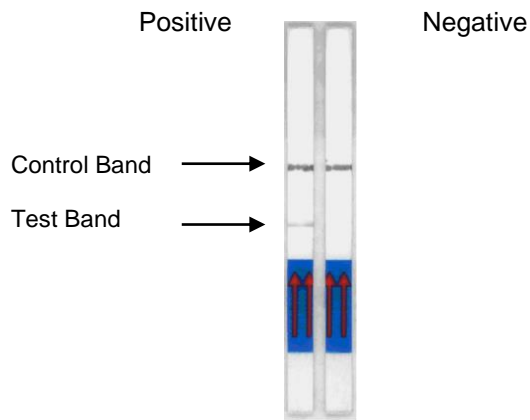
In any case, the control band must be visible!

It is a control function and can not be used to assess the quality of the result of the test band. If the control band is not visible after the incubation period, the result is invalid! The test must be repeated with a new dipstick!

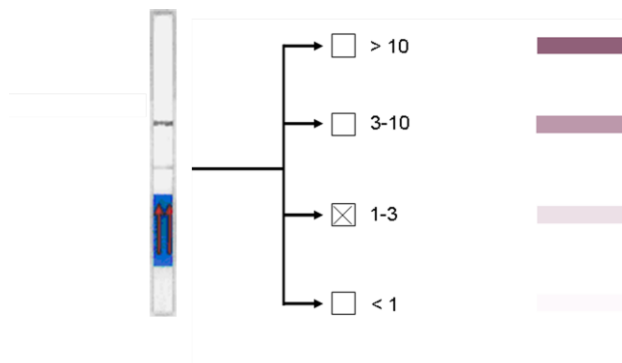
Interpretation of Results

There are two possibilities to interpret Milenia® HybriDetect dipstick results:

1) Qualitative by visual interpretation

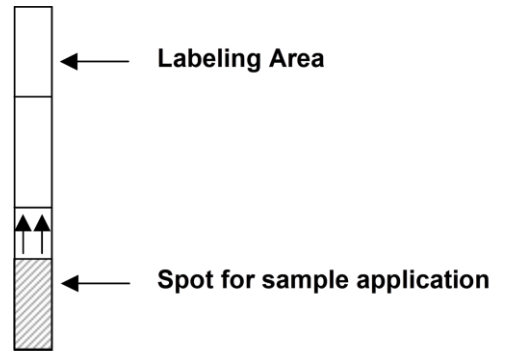


2) Semi-quantitative, e. g. by evaluation cards



Assay Performance “PCR-Products”

1. Take the required number of dipsticks out of the container and mark them.
2. For each sample to be analyzed pipet **100 µL** HybriDetect Assay Buffer or individual developed buffer into a reaction tube or a well of a microtiter plate.
3. Pipet **5 – 10 µl** of the hybridization product directly on the sample application area, or **alternatively**: add **5 – 10 µl** of the hybridization product into the solution of the reaction tube / well.
4. Place the dipsticks with the sample application area into the solution and incubate them e. g. for **5 - 15 minutes** in an upright position.
5. In the end of incubation period, remove dipsticks from assay solution and interpret test results immediately.

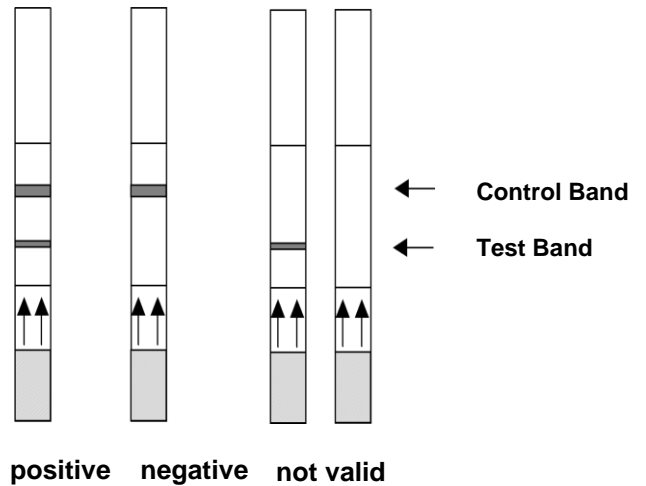


Notice:

- If a higher analytical sensitivity is required, it could be helpful to increase the volume of the PCR product.
- Volumes, analyte-specific solution, and incubation time are always part of the individual test development.

Interpretation of „PCR“ Results

<p>1. Test band <u>and</u> control band are clearly formed red bands</p> <p>Notes:</p> <p>1.1 Weakly stained test bands have to be regarded as positive</p> <p>1.2 Positive results may be visible within 1-2 minutes.</p> <p>1.3 In case of very high concentrations of hybridization product, control band's intensity may go down. Nevertheless, the control band should be still visible clearly.</p>	<p>The PCR amplicon was detected (positive).</p>
<p>2. Only control band is visible as red line.</p>	<p>No PCR amplicon was detected (negative).</p>



Important note:

To check specificity of the reaction the introduction of a PCR negative control is strongly recommended.

Trouble Shooting „PCR“

Problem	Possible cause(s)	Recommendation
Control band is not visible.	a) wrong or degraded assay buffer b) expiration date of dipsticks is exceeded c) wrong storage conditions of dipsticks	apply new (fresh) chemicals
Negative result with dipstick but clearly visible band in agarose gel	a) detection of an unspecific PCR product in agarose gel b) hybridization was not successful	Check identity of PCR product by Southern blotting oder sequence analysis Check conditions of hybridization.
Mineral oil	a) mineral oil affects flow characteristics of the assay b) development of test band might be hampered.	Remove PCR product very slowly from the bottom of the reaction vial.

Assay Sensitivity „PCR“

Analytical sensitivity of the Milenia® HybriDetect is equivalent or up to 1.000 fold higher than a Ethidium Bromide stained agarose gel. Dependent on the size of the PCR product and the number of amplification cycles up to 5 pg DNA can be detected.

Literature References

Kiatpathomchai W, et al, J Virol Methods (2008); 153: 214-217
 Puthawibool T, et al, J Virol Methods (2009); 156 (1-2): 27-31
 Jaroenram W, et al, Mol Cell Probes (2009); 23 (2): 65-70
 Nimitphak T, et al, Mol Cell Probes (2009); 24 (1): 1-5
 Kikuchi T, et al, Nematology (2009) ; 99 (12): 1365-1369
 Piepenburg O, et al, PloS Biology 2006, Volume 4, Issue 7, e204

Additional Available Products

Product Name	Order No.	Content	Description
Milenia® HybriDetect 2T	MGHD2 1	100 tests	Dipsticks with two different test bands (as third labeling with digoxigenine is required)

For any questions and suggestions, please contact us:

Telefon: +49 641 – 94 88 83 – 0
Fax: +49 641 – 94 88 83 – 80
Web: www.milenia-biotec.de

HybriDetect

Universal lateral flow dipstick for detection of biotin- and FITC-labeled analytes (proteins, genomic amplicates);
development platform
English: Page: 1-8
Revision: Page: 17

**Universeller Lateralfuss-Dipstick zum Nachweis von Biotin- und FITC-markierten Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate);
Entwicklungsplattform
Deutsch: Seite: 9-16
Revision: Seite: 17**

REF:

MGHD 1



100



Milenia Biotec GmbH

Versailler Straße 1

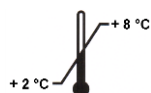
D-35394 Gießen, Germany

Tel.: +49-(0)641-94 88 83 - 0

Fax: +49-(0)641-94 88 83 - 80

E-Mail: info@milenia-biotec.de

Web: www.milenia-biotec.de








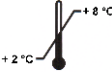


Hinweis: Signifikante Änderungen sind mit einer gepunkteten Linie am Rand gekennzeichnet. Eine Änderungshistorie befindet sich am Ende der Gebrauchsanweisung.

MGHD2 / C / 2019-09-09

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	11
Erklärung der Symbole.....	12
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	12
Verwendungszweck.....	12
Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität.....	13
Erforderliche Materialien.....	13
Nötige Entwicklungsarbeiten - Entwicklungsplattform.....	13
Methodik.....	14
Allgemeines Testprinzip.....	15
Kontroll-Bande Dipstick.....	15
Auswertung der Ergebnisse.....	16
Testdurchführung „PCR- Produkte“.....	17
Interpretation der „PCR“-Ergebnisse.....	17
Fehlerquellen und Lösungen „PCR“.....	18
Testsensitivität „PCR“.....	18
Literatur-Referenzen.....	18
Zusätzlich verfügbare Produkte.....	18

Erklärung der Symbole

Symbols Symbole	Explanation (GB) Erklärung (DE)	Symbols Symbole	Explanation (GB) Erklärung (DE)
	Expiry date Haltbarkeitsdatum		Sufficient for <n> tests Ausreichend für <n> Prüfungen
	Consult attended documents Begleitdokumente beachten		Manufacturer Hersteller
	Batch code Los-Bezeichnung		Storage conditions Lagerungsbedingungen
	Catalogue number Artikel-Nummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Die Lagerung der Reagenzien sollte bei 2 – 8 °C in den Originalverpackungen erfolgen.
- Vor der Verwendung sind die erforderlichen Reagenzien auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) zu bringen.
- Die angegebenen Verfallsdaten aller Komponenten sind zu beachten.
- Die Dipsticks sind empfindlich gegenüber Feuchtigkeit; Vorratsgefäß immer verschlossen halten.
- Nur die mit Folie bedeckten Bereiche des Dipsticks (Schriftfeld) berühren und beschriften
- Der Puffer dieses Testkits enthält ein Konservierungsmittel zum Schutz gegen mikrobielles Wachstum; daher ist die Berührung mit der Haut und/ oder Schleimhäuten zu vermeiden.
- Die Abfallentsorgung muss gemäß den örtlichen Bestimmungen durchgeführt werden.
- Für Fachpersonal

Verwendungszweck

HybriDetect ist ein universeller Lateralfloss Dipstick zum Nachweis von verschiedenen Analyten (Proteine, Gen-Amplifikate) markiert mit FITC und Biotin. Es handelt sich um eine Entwicklungsplattform. Dieses Produkt ist nur für Forschungszwecke bestimmt, nicht für diagnostische Anwendungen.

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Art-Nr.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
HybriDetect Dipsticks: Membran beschichtet mit Biotin-Ligand, polyklonaler (Kaninchen) anti-FITC-Antikörper im Goldkonjugat	MGDS	2 x 50 Stück (grüne Laminierung)	gebrauchsfertig	2 – 8 °C Vorratsgefäß verschlossen halten (Feuchtigkeitschutz)!	bis zum Verfallsdatum
HybriDetect Puffer (HybriDetect Assay Buffer): Tris-gepufferte Salzlösung	MGCB	2 Fl. à 10 ml (roter Deckel)	gebrauchsfertig	2 – 8 °C	bis zum Verfallsdatum

Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich (siehe auch unter www.milenia-biotec.de).

Erforderliche Materialien

- Pipetten
- Pipettenspitzen (mit Kontaminationsschutz für PCR)
- Reaktionsgefäße oder eine 96-well Mikrotiterplatte

Nötige Entwicklungsarbeiten - Entwicklungsplattform

Entwicklung einer Lösung, die **zwei verschieden markierte** Detektoren für den gesuchten Analyten enthält.

Es gelten folgende Rahmenbedingungen:

- 1) Detektoren müssen markiert werden mit:
 - FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)
 - Biotin
- 2) Im Testsystem kann ca. 100 µl Flüssigkeit eingesetzt werden (Probe + Analyt-spezifische Lösung).
- 3) Der im Kit enthaltene Puffer (MGCB) kann als Basis für diese Analyt-spezifische Lösung verwendet werden.

Anwendungsbeispiel:

20 µl Probe und 80 µl Analyt-spezifische Lösung bei 5-minütiger Inkubation.

Wichtig:

Volumina, Analyt-spezifische Lösung und Inkubationszeit sind Teil der individuellen Testentwicklung!

Eine Basis-Anleitung für den **Nachweis von Gen-Amplifikaten** ist unter „Testdurchführung PCR-Produkte“ auf Seite 15 beschrieben. Hierbei sollte das Amplifikationsprodukt biotinyliert und die spezifische Hybridisierungssonde mit FITC markiert sein. Im Prinzip können alle Amplifikationsmethoden (Polymerase-Kettenreaktion oder isothermale Amplifikationen wie LAMP oder RPA) eingesetzt werden.

Methodik

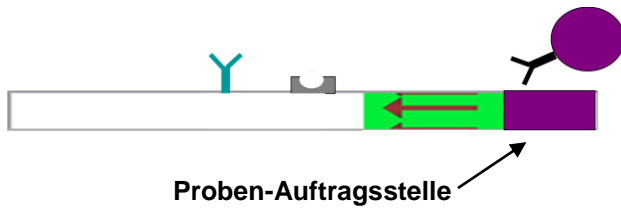
Milenia® HybriDetect ist ein gebrauchsfertiger, universeller Teststreifen (Dipstick), welcher auf der Lateralfuss-Technologie mittels Goldpartikeln basiert. Der Dipstick kann zur Entwicklung von qualitativen oder quantitativen Schnelltest-Nachweissystemen für verschiedenste Analyte wie Proteine, Antikörper oder Gen-Amplifikate verwendet werden. Der Anwender muss dazu eine Analyt spezifische Lösung entwickeln, die einen ersten Detektor (z.B. Antikörper, Antigen, Gensonde) markiert mit FITC enthält sowie einen zweiten Detektor (z.B. Antikörper, Primer) markiert mit Biotin (Aufbau siehe Schemazeichnungen „Allgemeines Testprinzip“ Seite 13).

Die zu untersuchende Probe wird mit der entwickelten, Analyt-spezifischen Pufferlösung gemischt und der Dipstick dann in die Lösung gestellt.

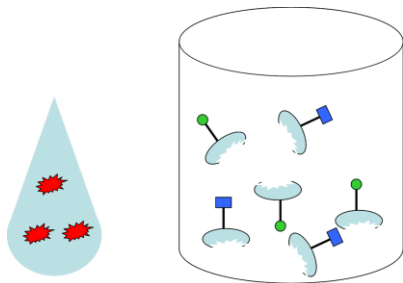
Der komplexierte Analyt, markiert mit FITC und Biotin, bindet als erstes an die mit Gold-markierten FITC-spezifischen Antikörper im Probenauftrag des Dipsticks. Durch Kapillarkräfte, diffundieren die Gold-Komplexe über die Membran. Beim Überströmen des an der Testbande immobilisierten Biotin-Liganden werden nur die an den Analyt gekoppelten Goldpartikel gebunden und bilden mit zunehmender Testzeit eine rot-blaue Testbande. Nicht abgefangene Goldpartikel überströmen die Kontrollbande und werden dort durch Spezies-spezifische Antikörper gebunden. Mit zunehmender Testzeit wird die Bildung einer intensiv gefärbten Kontrollbande beobachtet.

Allgemeines Testprinzip

1) Gebrauchsfertiger universeller Dipstick (Analyt-unabhängig)

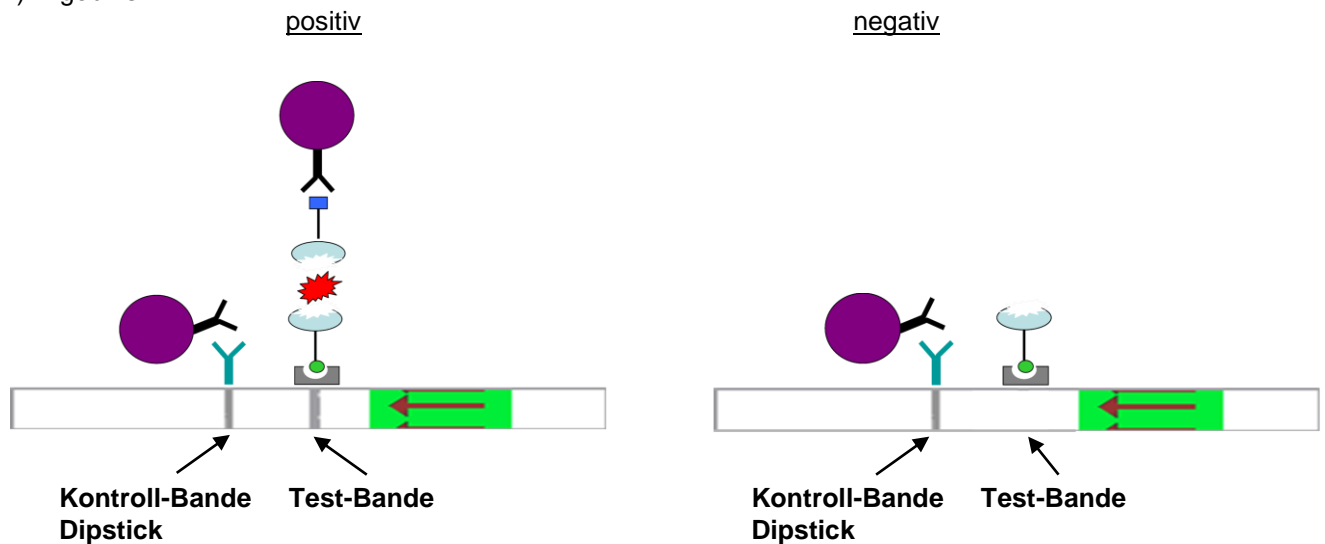


2) Zugabe von Probe und Analyt-spezifischer Lösung



3) Inkubation

4) Ergebnis:



Symbole:

	FITC
	Biotin
	Goldpartikel
	anti-FITC-Antikörper
	Analyt-Detektor 1 + 2
	Analyt (Protein, Antikörper, genetisches Amplifikat)
	Biotin-Ligand
	anti-Kaninchen-Antikörper

Kontroll-Bande Dipstick

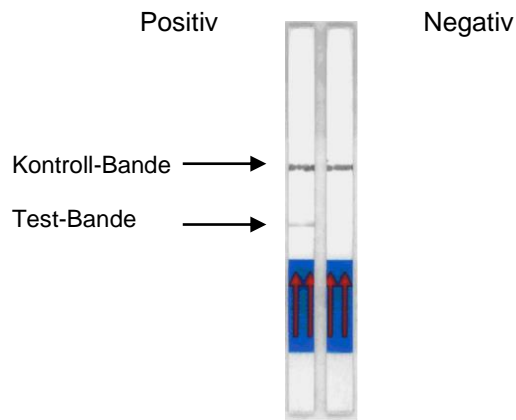
Die Kontroll-Bande muss immer sichtbar werden!

Sie dient als Funktionskontrolle und kann nicht zur Beurteilung der Testbande herangezogen werden. Wenn die Kontroll-Bande nach der Inkubationszeit nicht sichtbar ist, ist das Ergebnis ungültig! Der Test muss mit einem neuen Dipstick wiederholt werden!

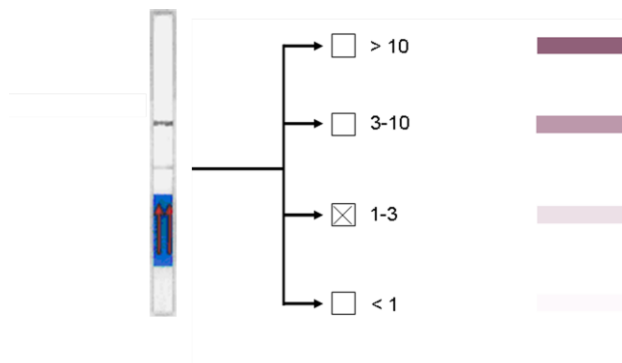
Auswertung der Ergebnisse

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten die Milenia® HybriDetect Dipstick-Ergebnisse auszuwerten:

1) Qualitativ mittels visueller Auswertung

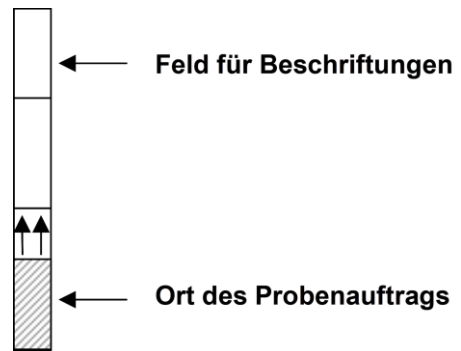


2) Semi-quantitativ, z. B. mit Auswertekarte



Testdurchführung „PCR- Produkte“

1. Die erforderliche Anzahl Dipsticks aus dem Röhrchen nehmen und beschriften.
2. Für jede zu untersuchende Probe **100 µl** HybriDetect Puffer bzw. individuell entwickelten Puffer in einzelne Reaktionsgefäße oder in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorlegen.
3. **5 – 10 µl** des Hybridisierungsansatzes direkt auf den Probenauftrag pipettieren oder **alternativ: 5 – 10 µl** des Hybridisierungsansatzes zu der Lösung im Reaktionsgefäß / in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettieren.
4. Dipsticks mit dem Probenauftrag in die Lösung stellen und z.B. **5 - 15 Minuten** aufrecht stehend inkubieren.
5. Nach Ablauf der Testzeit die Dipsticks aus der Lösung nehmen und auswerten.

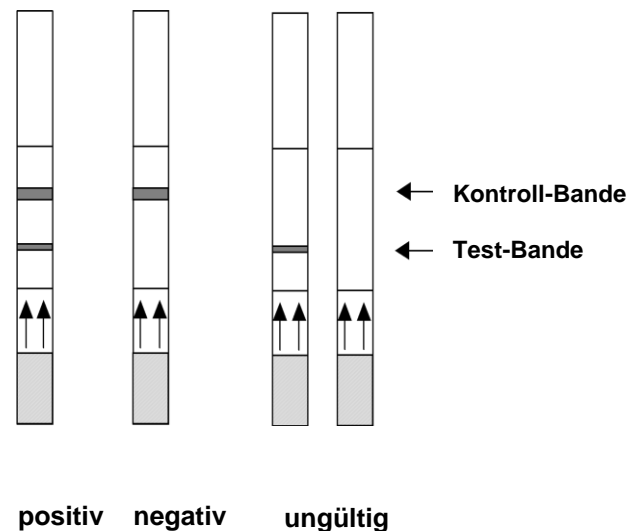


Hinweise:

- Für eine höhere Nachweisempfindlichkeit des Tests kann es hilfreich sein, ein größeres Volumen des PCR-Produktes einzusetzen.
- Volumina, Pufferlösung und Inkubationszeit sind immer Teil der individuellen Testentwicklung!

Interpretation der „PCR“-Ergebnisse

<p>1. Testbande <u>und</u> Kontrollbande sind sichtbar.</p> <p>Achtung:</p> <p>1.1 Auch eine schwach gefärbte Test-Bande ist als positiv zu werten.</p> <p>1.2 Positive Resultate können bereits nach 1-2 Minuten sichtbar werden.</p> <p>1.3 Bei sehr hoher Konzentration des Hybridisierungsproduktes kann die Intensität der Kontrollbande deutlich verringert sein. Allerdings muss die Kontrollbande immer noch klar sichtbar sein.</p>	<p>Das Amplifikationsprodukt ist nachweisbar (positiv).</p>
<p>2. Nur die Kontrollbande ist sichtbar.</p>	<p>Das Amplifikationsprodukt ist nicht nachweisbar (negativ).</p>



Achtung:

Um die Spezifität der Reaktionen im Milenia® HybriDetect zu überprüfen, wird die Verwendung einer PCR-Negativkontrolle empfohlen.

Fehlerquellen und Lösungen „PCR“

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
Es ist keine Kontroll-Bande sichtbar.	a) falsche oder nicht mehr funktionsfähige Lösung b) Haltbarkeit der Dipsticks überschritten c) falsche Lagerung der Dipsticks	Neue Chemikalien verwenden
Mit dem Teststreifen wird ein negatives Ergebnis erhalten, aber auf einem Agarosegel ist eine Bande sichtbar.	a) Die Bande auf dem Gel resultiert von einem unspezifischen PCR-Produkt b) Die Hybridisierung war nicht erfolgreich	PCR-Produkt auf Identität überprüfen (z. B. Southern Blot oder Sequenzierung) Hybridisierungsbedingungen überprüfen.
Mineralöl	a) Mineralöl auf dem Dipstick verlangsamt oder behindert die Entwicklung.	PCR-Produkt langsam vom Boden des Reaktionsgefäßes pipettieren.

Testsensitivität „PCR“

Die analytische Sensitivität des Milenia® HybriDetect entspricht derjenigen eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels oder ist bis zu 1.000-fach empfindlicher, abhängig von der Größe der Amplifikate. Abhängig von der Größe des PCR-Produktes sowie der Zahl der durchgeführten Amplifikationszyklen können bis zu 5 pg DNS nachgewiesen werden.

Literatur-Referenzen

Kiatpathomchai W, et al, J Virol Methods (2008); 153: 214-217
 Puthawibool T, et al, J Virol Methods (2009); 156 (1-2): 27-31
 Jaroenram W, et al, Mol Cell Probes (2009); 23 (2): 65-70
 Nimitphak T, et al, Mol Cell Probes (2009); 24 (1): 1-5
 Kikuchi T, et al, Nematology (2009); 99 (12): 1365-1369
 Piepenburg O, et al, PloS Biology 2006, Volume 4, Issue 7, e204

Zusätzlich verfügbare Produkte

Produktname	Bestell-Nr.	Inhalt	Beschreibung
Milenia® HybriDetect 2T	MGHD2 1	100 Tests	Dipsticks mit zwei verschiedenen Testbanden (als dritte Markierung ist Digoxigenin nötig)

Für Fragen und Anregungen erreichen Sie uns unter:

Telefon: 0 641 – 94 88 83 – 0
Fax: 0 641 – 94 88 83 – 80
Web: www.milenia-biotec.de

Date/ Datum	Revision	Cause of Revision/ Änderungsgrund
10.01.2013	MGHD/B/2013-01-10	Symbols adapted according DIN EN ISO15223 Symbole gemäß DIN EN ISO15223 angepasst
09.09.2019	MGHD/C/2019-09-09	Removal of evaluation by „PocScan“ Entfernung der Auswertung über „PocScan“