

# $\alpha$ -Globin StripAssay<sup>®</sup>

Kat. číslo 4-160



10 testů



2-8°C



---

1a. <b>Amplifiacion Mix A1</b> (žluté víčko)	250 $\mu$ l
1b. <b>Amplifiacion Mix A2</b> (bílé víčko)	250 $\mu$ l
1c. <b>Amplifiacion Mix B</b> (zelené víčko)	250 $\mu$ l
2. <b>Taq Dilution Buffer</b> (průhledné víčko)	500 $\mu$ l
3. <b>HS Taq DNA Polymerase (5U/<math>\mu</math>l)</b> (červené víčko)	125 U
4. <b>DNAT</b> (modré víčko)	1,5 ml  Varování
5. <b>Typing Trays</b>	3
6a. <b>Teststrips A</b> (černé víčko)	10
6b. <b>Teststrips B</b> (bílé víčko)	10
7. <b>Hybridization Buffer</b> (bílé víčko)	25 ml
8. <b>Wash Solution A</b> (bílé víčko)	80 ml
9. <b>Conjugate Solution</b>	25 ml
10. <b>Wash Solution B</b>	80 ml
11. <b>Color Developer</b>	25 ml

---

**ViennaLab Diagnostics GmbH**

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (-43-1) 8120156-0

Fax: (-43-1) 8120156-19

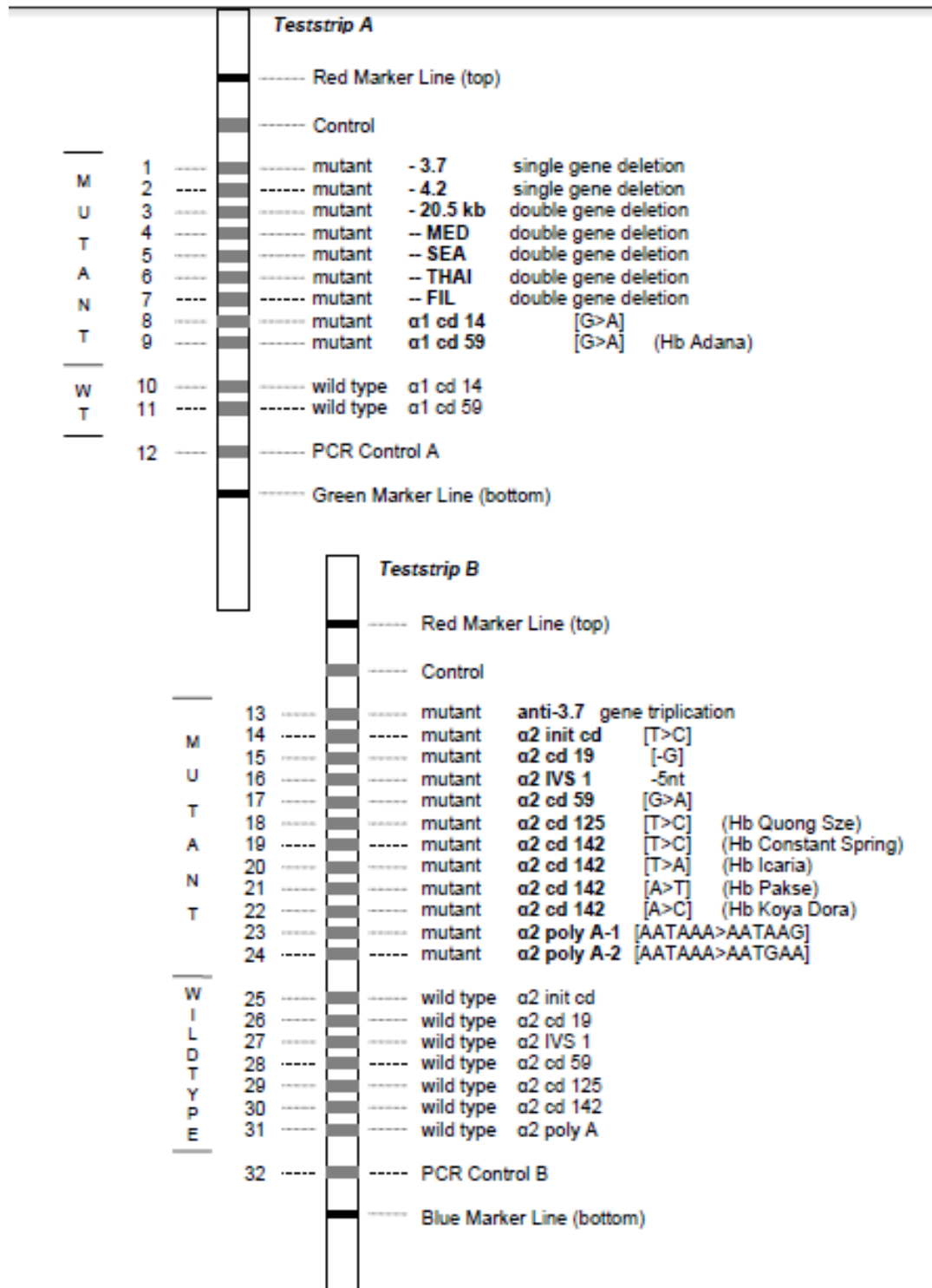
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## Popis stripů:



## Pracovní postup

### Izolace DNA

Doporučujeme použít následující kit pro izolaci DNA z plné krve nebo jiných typů vzorků:

#### **Spin Micro DNA Extraction kit, kat. číslo: 2-020**

Použití jiných izolačních kitů vyžaduje validaci.

### Amplifikace DNA (3 separátní reakce pro každý vzorek)

*Během celé procedury uchovávejte PCR reagenty a DNA templát zchlazený. Všechny kroky před startem vyhřívání cyklieru provádějte na ledu (0-4°C).*

- Naředěte pracovní koncentraci (1:15, 0,33 U/μl) **Taq DNA Polymerase** v **Taq Dilution Buffer** (čiré víčko).
- Pro každý vzorek připravte tři zkumavky pro tři PCR amplifikační mixy. Umístěte zkumavky na led.
- Pro každý vzorek připravte na ledu tři PCR reakční mixy:

<b>A1</b>	<b>15 μl Amplification Mix A1</b> (žluté víčko) <b>5 μl naředěné Taq DNA Polymerase</b> (1,66U) <b>5 μl vyizolované DNA</b>
<b>A2</b>	<b>15 μl Amplification Mix A2</b> (bílé víčko) <b>5 μl naředěné Taq DNA Polymerase</b> (tj.1,66 U) <b>5 μl vyizolované DNA</b>
<b>B</b>	<b>15 μl Amplification Mix B</b> (zelené víčko) <b>5 μl naředěné Taq DNA Polymerase</b> (1,66 U) <b>5 μl vyizolované DNA</b>

*Pokud není DNA vyizolována izolačním kitem Spin Micro DNA Extraction, doporučujeme použít DNA s koncentrací 5-40 μg/ml (=25-200 ng DNA na reakci).*

*Program termocyklieru:*

pre-PCR: **95°C/5 min**

PCR: **97°C/40 s – 64°C/40 s – 72°C/90 s (3 cykly)**

**97°C/40 s – 58°C/40 s – 72°C/90 s (37 cyklů)**

konečná syntéza: **72°C/5 min**

- Pevně uzavřete zkumavky.
- Vložte reakční zkumavky do předehřátého cyklieru na 95°C a spusťte příslušný program.

*Uložte amplifikační produkty na led, nebo při 2-8°C pro další použití.*

*Příležitostně můžete analyzovat produkty gelovou elektroforézou (např. 3% agarózový gel).*

*Délky fragmentů : 881 bp; delece: 1783 bp (A1)*

*296 bp; delece: 250, 329, 373, 474, 578, 1025 bp (A2)*

*302, 864 bp; delece: 1772 bp (B)*

## **1. Hybridizace – 2 stripy na vzorek(45°C, třepaná vodní lázeň)**

*Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtka. Vyhřejte lázeň přesně na 45°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Zkontrolujte teplotu kalibrovaným teploměrem a nastavenou teplotu případně upravte. Vytemperujte Hybridization Buffer a Wash Solution A na 45°C. (Dbejte, aby se rozpustil veškerý precipitát, vysrážený při 2-8°C.) Testovací proužky, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer nechte vytemperovat na pokojovou teplotu. Připravte si promývací korýtka. Vyjměte jeden proužek pro každý vzorek pomocí čisté pinzety. (Proužků se můžete rukou dotknout pouze v rukavicích!). Na okraji proužku jej označte obyčejnou tužkou. (Žádné propisky ani fixy !).*

- Napipetujte do spodní části korýtka vždy **20 µl DNAT pro TESTSTRIPY A1 a A2** a **10 µl DNAT pro TESTSTRIP B** (modré víčko). Jeden sloupec pro každý vzorek.
- Přidejte **10 µl PCR produktů A1, A2** a **10 µl DNAT pro TESTSTRIP B** (jedno korýtko) a **B** (druhé korýtko) vždy přímo do kapky DNAT.
- Promíchejte vzniklý roztok pipetou. Zůstane modrý.
- Nechte stát **5 min** při pokojové teplotě.
- Přidejte do každého sloupce korýtka **1 ml Hybridization Buffer** (předehřátého na 45°C). Jemně korýtkem zamíchejte (modrá barva zmizí.)
- Vložte proužek A do příslušného sloupce korýtka s označením a čárkami nahoru. Úplně ponořte.
- Inkubujte **30 min** při **45°C** na třepané platformě vodní lázně. *Nastavte střední frekvenci třepání (cca 50 rpm), aby se tekutina pohybovala, ale nestříkala ven. Uzavřete vodní lázeň víkem, aby byla teplota stabilní.*
- Po skončení inkubace odsajte hybridizační roztok vakuovou odsávacíčkou. *Okamžitě pokračujte, nikdy během celé procedury nenechte proužek oschnout.*

## **2. Promývání (45°C, třepaná lázeň)**

- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předehřátý na 45°C). Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.

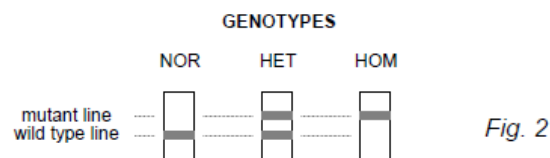
## **3. Barvení (pokojová teplota)**

- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.

- Inkubujte **15 min** při **pokožové teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** při **pokožové teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** při **pokožové teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Color Developer**.
- Inkubujte **15 min** při **pokožové teplotě ve tmě** (zakrýt krabičkou) na třepačce.  
*Při pozitivní reakci se vytvoří purpurové proužky.*
- Několikrát proužky opláchněte destilovanou vodou.
- Usušte proužky **ve tmě** na filtračním papíru.  
*Proužky nikdy nevystavujte intenzivnímu světelnému záření.*

#### 4. Vyhodnocení

- Každá mutace musí mít alespoň jeden nebo oba proužky.
- Pozn. Intenzita proužku se může lišit. Intenzita nemá žádný význam pro výsledek.



	wild type line	mutant line	genotype
NOR	<b>positive</b>	<b>negative</b>	normal
HET	<b>positive</b>	<b>positive</b>	heterozygous
HOM	<b>negative</b>	<b>positive</b>	homozygous mutant

- Některé mutace mají společný wild type proužek, takže 21 mutací má jen 9 wild type proužků.

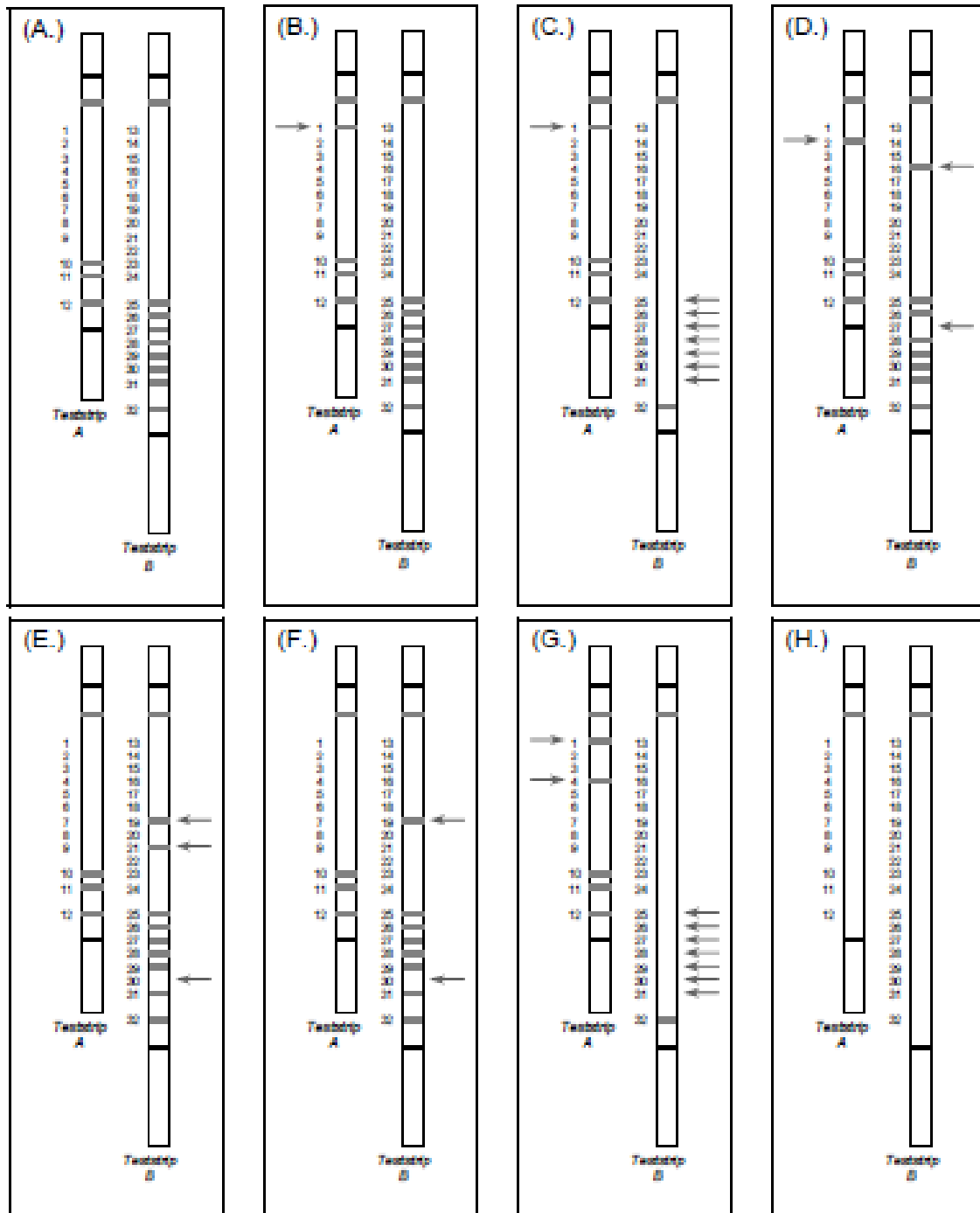
line	wild type probe	mutation
10	$\alpha 1$ cd 14	$\alpha 1$ cd 14 [G>A]
11	$\alpha 1$ cd 59	Hb Adana
25	$\alpha 2$ init cd	$\alpha 2$ init cd [T>C]
26	$\alpha 2$ cd 19	$\alpha 2$ cd 19 [-G]
27	$\alpha 2$ IVS 1	$\alpha 2$ IVS 1 -5nt
28	$\alpha 2$ cd 59	$\alpha 2$ cd 59 [G>A]
29	$\alpha 2$ cd 125	Hb Quong Sze
30	$\alpha 2$ cd 142	Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Pakse, Hb Koya Dora
31	$\alpha 2$ poly A	$\alpha 2$ poly A-1, $\alpha 2$ poly A-2

- Vzoroky, které jsou složenými heterozygoty pro dvě mutace uvedené v tabulce (např. Hb Constant spring + Hb Pakse) budou postrádat wild type proužek. Tyto mutace jsou uvedeny v následující tabulce.

deletion	heterozygous	homozygous mutant
- 3.7	all WT signals present	WT signals 25-31 absent
- 4.2	all WT signals present	WT signals 25-31 absent
- 20.5 kb	all WT signals present	WT signals 10 and 25-31 absent
-- MED	all WT signals present	all WT signals absent
-- SEA	all WT signals present	all WT signals absent
-- THAI	all WT signals present	all WT signals absent
-- FIL	all WT signals present	all WT signals absent

- $\alpha$ -Globin StripAssay neumožňuje rozlišit mezi heterozygoty a homozygoty pro anti-3.7 gene triplication (anti-3.7/ $\alpha\alpha$  a anti-3.7/anti-3.7)

- Příklady výsledků:



- (A.) normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) (E.) Hb Constant Spring / Hb Pakse compound heterozygous  
 (B.) -3.7 heterozygous (-3.7/ $\alpha\alpha$ ) (F.) Hb Constant Spring homozygous  
 (C.) -3.7 homozygous (-3.7/-3.7) (G.) -3.7 / -MED compound heterozygous  
 (D.) -4.2 / IVS1-5nt compound heterozygous (H.) negative control or PCR failure