

Haemochromatosis StripAssay B[®]

Kat. číslo 4-210



20 testů



2-8°C



1. Lysis Solution	50 ml	
2. GEN^xTRACT Resin	5 ml	
<i>Promíchejte před každým použitím aliquotu</i>		
3. Amplification Mix (žluté víčko)	500 µl	
4. Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl	
5. DNAT (modré víčko)	1,5 ml	Varování
6. Typing Trays	3	
7. Teststrips	20	
8. Hybridization Buffer (bílé víčko)	25 ml	
9. Wash Solution A (bílé víčko)	80 ml	
10. Conjugate Solution	25 ml	
11. Wash Solution B	80 ml	
12. Color Developer	25 ml	

ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (-43-1) 8120156-0

Fax: (-43-1) 8120156-19

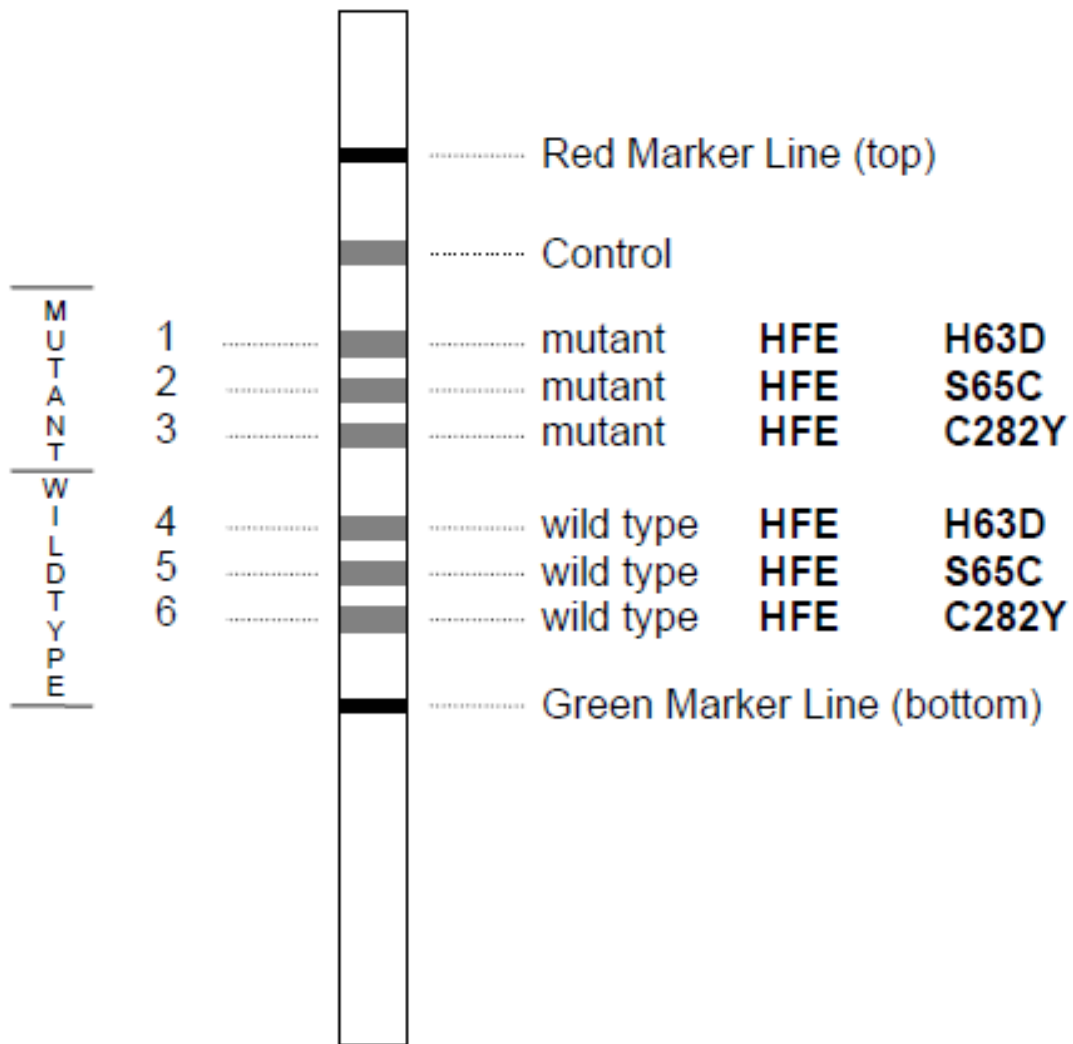
info@viennalab.com



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com

Popis stripu



Pracovní postup

Izolace DNA

Použijte čerstvou nebo zmraženou krev s EDTA nebo citrátem, jako antikoagulans, vyhněte se krvi s obsahem heparinu. Neskladujte krev před použitím déle, než 3 dny při pokojové teplotě nebo 1 týden při 2-8°C. Nepoužívejte krev zmraženou déle než 1 rok, nebo takovou, která byla více než třikrát opakovaně zmražená a opět rozmražená.

Vytemperujte vzorky na pokojovou teplotu. Opatrně promíchejte opakovaným převrácením uzavřené odběrové zkumavky. Před každým odebráním dalšího alikvotu opakujte promíchání. Vytemperujte Lysis Solution a pryskyřici GEN^XTRACT na pokojovou teplotu.

- Do 1,5 ml mikrozkušavky se šroubovacím víčkem napipetujte **100 µl krve**.
- Přidejte **1 ml Lysis Solution**, uzavřete zkumavku a promíchejte opakovaným převrácením zkumavky.
- Nechte zkumavku stát **15 min** při pokojové teplotě.
- Centrifugujte **5 min** při **3000 rpm** (cca 1000 x g) v centrifuze.
- Odsajte a vylijte horní 1 ml supernatantu.
- Přidejte **1 ml Lysis Solution**, uzavřete zkumavku a promíchejte opakovaným převrácením zkumavky.
- Centrifugujte **5 min** při **12000 rpm** (cca 12,000 x g).
- Odsajte a vylijte supernatant kromě cca 50 µl viditelného, měkkého peletu.
- Resuspendujte pryskyřici GEN^XTRACT řádným protřepáním lahvičky.
- Přidejte **200 µl GEN^XTRACTu** k peletu. Uzavřete zkumavku a vortexujte 10 s.
➔Pryskyřice GEN^XTRACT rychle sedimentuje. Opakujte resuspenzi pokaždé těsně před odebráním dalšího alikvotu.
- Inkubujte **20 min** při **56°C** . Vortexujte 10 s.
- Inkubujte **10 min** při **98°C** . Vortexujte 10 s.
- Centrifugujte **5 min** při **12,000 rpm**. Zchladte na ledu.

Výsledný supernatant obsahuje DNA templát vhodný pro okamžité použití v PCR. Pro další uchování je nutné přepipetovat supernatant do čisté zkumavky a uskladnit ho (při 2-8°C až týden), nebo zmražený při -20°C .

1. Amplifikace DNA

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

- Naředte pracovní koncentraci (0,2 U/µl) **Taq DNA Polymerase** v **Taq Dilution Buffer** (čiré víčko). Tj. např. pro 5 vzorků smíchejte 24 µl Taq Dilution Buffer + 1 µl Taq DNA Polymerase.

- Připravte pro každý vzorek jednu PCR zkumavku. Umístěte zkumavky na led.
- Pro každý vzorek připravte na ledu výsledný PCR reakční mix:

15 µl Amplification Mix (žluté víčko)

5 µl naředěné Taq DNA Polymerase (tj. 1 U)

5 µl vyizolované DNA

Pokud není DNA vyizolována izolačním protokolem ViennaLab, doporučujeme použít DNA s koncentrací 5-40 µg/ml (=25-200 ng DNA na reakci).

Program termocyklieru:

pre-PCR: 94°C /2 min

PCR: 94°C /15 s – 58°C /30 s – 72°C /30s (30 cyklů)

konečná syntéza: 72°C /3 min

- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocyklier na 94°C.
- Vložte reakční zkumavky do předehřátého cyklieru a spusťte příslušný program.
- Použijte vyhřívání víka, rychlost vyhřívání max. 2°C /s.

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 287, 310 bp

2. Hybridizace (45°C, třepaná vodní lázeň)

Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtko. 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 korýtko. 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 korýtko vždy **10 µl DNAT** (modré víčko). Jeden sloupec pro každý vzorek.
- Přidejte **10 µl PCR produktu** vždy přímo do kapky DNAT.
- Promíchejte vzniklý roztok pipetou. Zůstane modrý.
- Nechte stát **5 min** při pokojové teplotě.
- Přidejte do každého sloupce korýtko **1 ml Hybridization Buffer** (předehřátého na 45°C). Jemně korýtkem zamíchejte (modrá barva zmizí.)
- Vložte proužek do příslušného sloupce korýtko 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 odsávačkou.
Okamžitě pokračujte, nikdy během celé procedury nenechte proužek oschnout.

3. Promývání (45°C, třepaná lázeň)

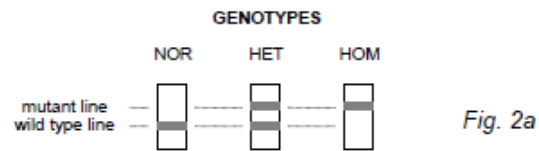
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (přehřátý na 45°C). Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).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

4. Barvení (pokojová teplota)

- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojové 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 **pokojové teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** při **pokojové teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Color Developer**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojové 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.

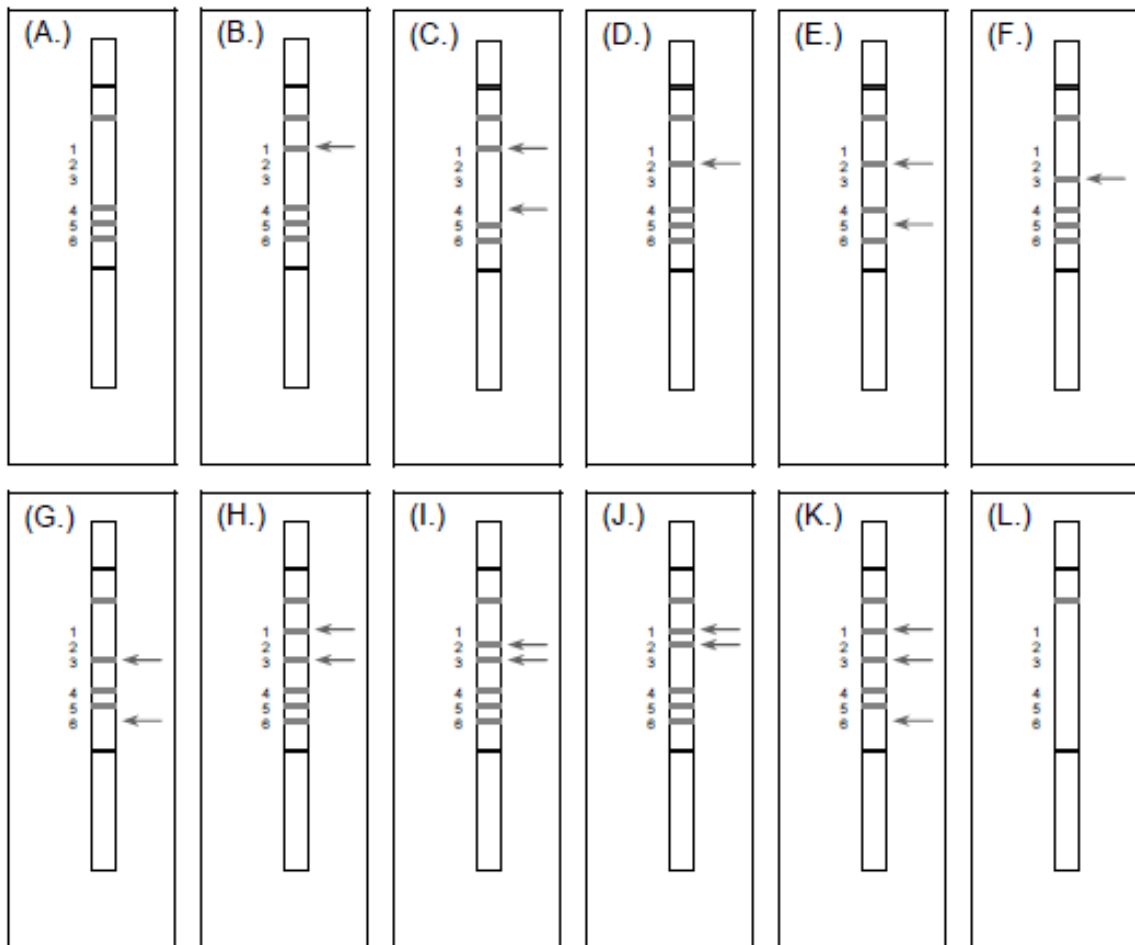
5. Vyhodnocení

- 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	positive	negative	normal
HET	positive	positive	heterozygous
HOM	negative	positive	homozygous mutant

Příklad výsledků:



- (A.) normal
- (B.) H63D heterozygous
- (C.) H63D homozygous
- (D.) S65C heterozygous
- (E.) S65C homozygous
- (F.) C282Y heterozygous

- (G.) C282Y homozygous
- (H.) H63D - C282Y compound heterozygous
- (I.) S65C - C282Y compound heterozygous
- (J.) H63D - S65C compound heterozygous
- (K.) H63D heterozygous; C282Y homozygous
- (L.) negative control or PCR failure