

# Braf 600/601 StripAssay<sup>®</sup>

Kat. číslo 5-560



20 testů



2-8°C



---

1. <b>Amplifiacion Mix</b> (žluté víčko)	250 µl
2. <b>Taq Dilution Buffer</b> (průhledné víčko)	500 µl
3. <b>HS Taq DNA Polymerase (5U/µl)</b> (červené víčko)	75 U
4. <b>DNAT</b> (modré víčko)	1,5 ml ⚠ Varování
5. <b>Typing Trays</b>	3
6. <b>Teststrips</b>	20
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

---

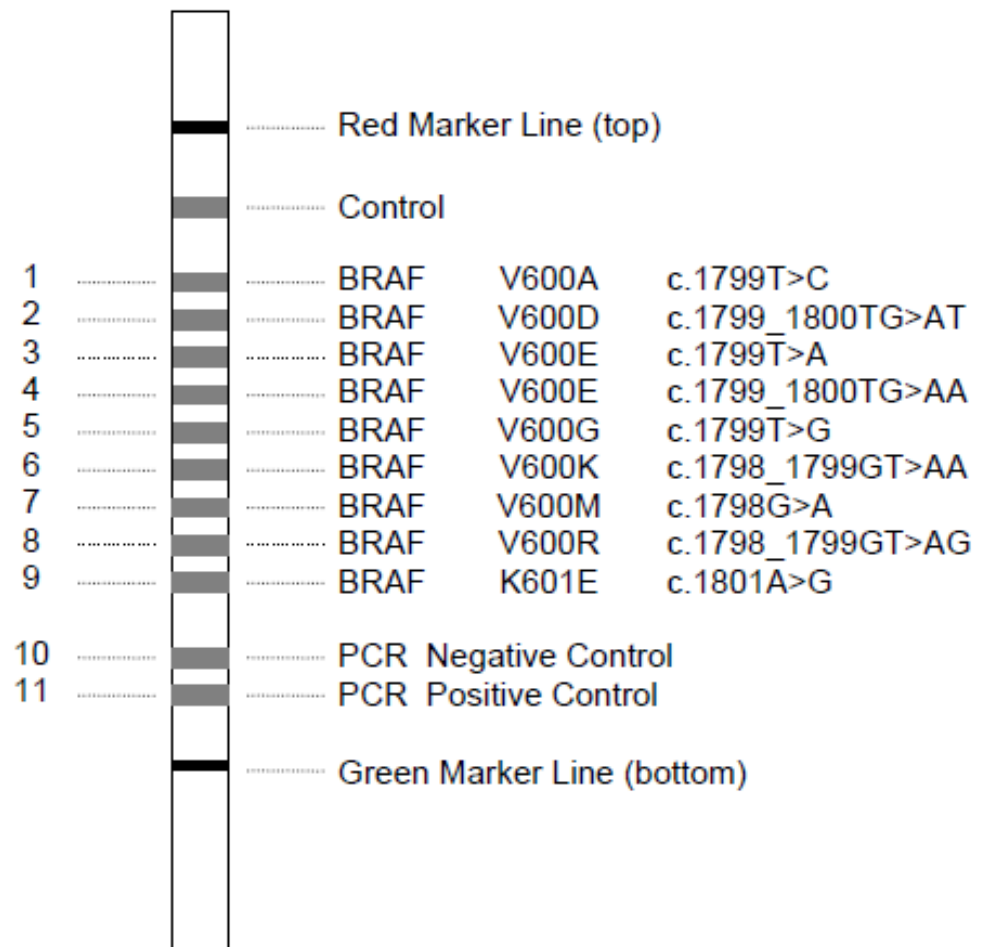
**ViennaLab Diagnostics GmbH**  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (-43-1) 8120156-0  
Fax: (-43-1) 8120156-19  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

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

## Popis stripu:



# Pracovní postup

*Kit umožňuje detekci 9 mutací v genu BRAF (kodón 600 a 601)*

*Další informace najdete v OMIM Online Mendelian Inheritance in Man:*

[www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)

DNAT obsahuje 1,6% NaOH (R 36/38).

Amplification mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash Solution V obsahují 0,05% NaN<sub>3</sub>. Conjugate Solution obsahuje streptavidin-alkaline phosphatázu. Color Developer obsahuje nitro blue tetrazolium (NBT) a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (BCIP).

***Skladujte všechny reagenty při 2-8°C pokud nejsou používány!***

## 1. Izolace DNA

*Pro izolaci čerstvých nebo mražených biopsií použijte soupravy Qiagen QIAmp DNA Mini nebo Micro.*

*Pro izolaci parafinovaných vzorků použijte QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (cat.no. 56404).*

***DNA koncentraci upravte na 1-10 µg/ml.***

*DNA z formalin fixovaných preparátů (FFPE) nemohou být přesně kvantifikovány UV fotometrií! Je pro ně nutno použít fluorometrickou kvantifikaci, např. Invitrogen Qubit. Naředte vzorek destilovanou vodou optimálně na 5 µg/ml.*

*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 .*

## 2. Amplifikace DNA

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

- Naředte pracovní koncentraci (0,2 U/µl) **Taq DNA Polymerase** (červené víčko) 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**

- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocykler na 37°C.
  - Vložte reakční zkumavky do cyklu a spusťte příslušný program.
  - U rychlých termocyklerů zpomalte rychlost vyhřívání na max. 2°C/s.
    - pre-PCR: 37°C /10 min
    - pre-PCR: 94°C /2 min
    - PCR: 94°C /1 min – 70°C /50 s – 56°C /50s - 60°C /1 min (35 cyklů)
    - konečná syntéza: 60°C /3 min
- 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 154 a 204bp.*

### 3. Hybridizace (45°C, třepaná vodní lázeň)

*Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtka. Vyhřejte lázeň přesně na 45°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Inkubátor Biosan nastavte na 46°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 **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 korýtka **1 ml Hybridization Buffer** (předehřátého na 45°C). Jemně korýtkem zamíchejte (modrá barva zmizí.)
- Vložte proužek 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 odsávačkou. *Okamžitě pokračujte, nikdy během celé procedury nenechte proužek oschnout.*

#### 4. Promývání (45°C, třepaná lázeň)

- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předehřátý 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.

#### 5. Barvení (pokojová teplota)

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

Obsah soupravy:

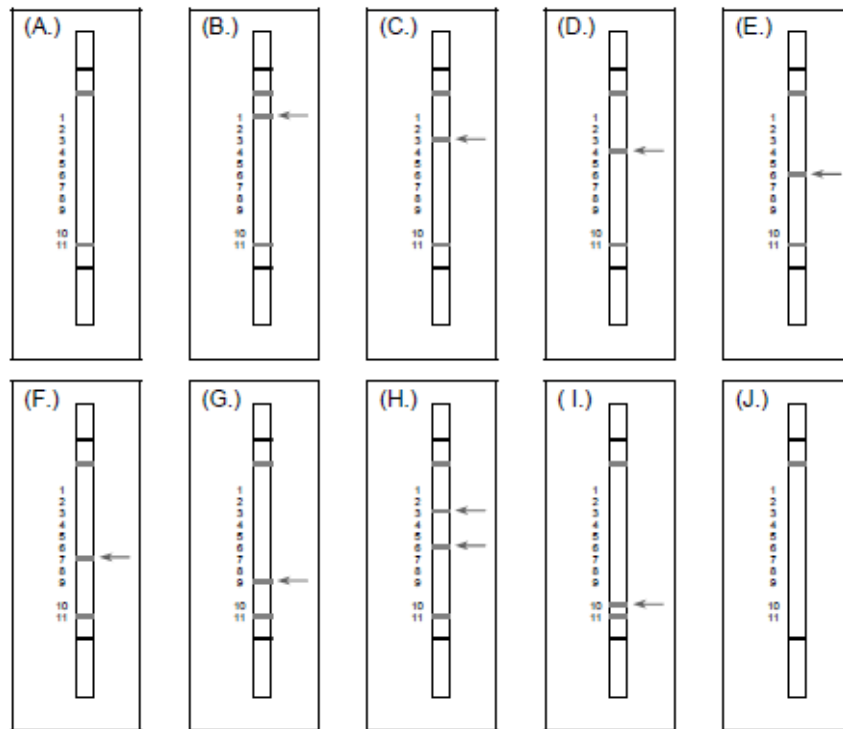
---

1.	<b>Amplification Mix</b> ( <i>yellow cap</i> )	500 $\mu$ l	
2.	<b>Taq Dilution Buffer</b> ( <i>transparent cap</i> )	500 $\mu$ l	
3.	<b>Taq DNA Polymerase (5 U/<math>\mu</math>l)</b> ( <i>red cap</i> )	75 U	
4.	<b>DNAT</b> ( <i>blue cap</i> )	1.5 ml	✘ R 36/38
5.	<b>Typing Trays</b>	3	
6.	<b>Teststrips</b>	20	
7.	<b>Hybridization Buffer</b> ( <i>white cap</i> )	25 ml	
8.	<b>Wash Solution A</b> ( <i>white cap</i> )	80 ml	
9.	<b>Conjugate Solution</b>	25 ml	
10.	<b>Wash Solution B</b>	80 ml	
11.	<b>Color Developer</b>	25 ml	

---

Možnosti výsledků:

Fig. 3: Examples of test results



- (A.) Vzorek bez mutace v genu BRAF
- (B.) Vzorek s mutací BRAF V600A
- (C.) Vzorek s mutací V600E (c.1799T>A)
- (D.) Vzorek s mutací V600E (c.1799\_1800TG>AA)
- (E.) Vzorek s mutací V600K
- (F.) Vzorek s mutací V600M
- (G.) Vzorek s mutací K601E
- (H.) Vzorek s mutací V600E + V600K
- (I.) Vzorek bez mutace BRAF, snížená citlivost
- (J.) Negativní kontrola nebo selhala analýza

Vyhodnocení výsledků:

<b>BRAF</b> (lines 1-9)	<b>PCR Negative Control</b> (line 10)	<b>PCR Positive Control</b> (line 11)	<b>Interpretation</b>
one or more positive	negative	positive	respective BRAF mutation present
negative	negative	positive	none of the BRAF mutations present
any result	positive	positive	reduced sensitivity for mutant BRAF
negative	negative	negative	negative control or experimental failure

Upozornění: Intenzita proužků může být různá.