

EGFR XL StripAssay

Kat. číslo 5-630



20 testů



2-8°C



1a.	Amplification Mix A (žluté víčko)	500 µl
1b.	Amplification Mix B (zelené víčko)	500 µl
2.	Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl
3.	HS Taq DNA Polymerase (5U/µl) (červené víčko)	125 U
4.	DNAT (modré víčko)	1,5 ml  Varování
5.	Typing Trays	3
6.	Teststrips	20
7.	Hybridization Buffer (bílé víčko)	25 ml
8.	Wash Solution A (bílé víčko)	80 ml
9.	Conjugate Solution	25 ml
10.	Wash Solution B	80 ml
11.	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

Ref.Seq. NM_005228.3

	-----	Red Marker Line (top)		
	-----	Control		
1	-----	EGFR	ex18 p.G719A	c.2156G>C
2	-----	EGFR	ex18 p.G719C	c.2155G>T
3	-----	EGFR	ex18 p.G719S	c.2155G>A
4	-----	EGFR	ex19 p.K745_E749del	c.2233_2247del
5	-----	EGFR	ex19 p.E746_A750del	c.2235_2249del
6	-----	EGFR	ex19 p.E746_A750delinsIP	c.2235_2248delinsAATTC
7	-----	EGFR	ex19 p.E746_A750del	c.2236_2250del
8	-----	EGFR	ex19 p.E746_T751delinsIP	c.2235_2251delinsAATTC
9	-----	EGFR	ex19 p.E746_T751del	c.2236_2253del
10	-----	EGFR	ex19 p.E746_T751delinsA	c.2237_2251del
11	-----	EGFR	ex19 p.E746_T751delinsV	c.2237_2252delinsT
12	-----	EGFR	ex19 p.E746_T751delinsVA	c.2237_2253delinsTTGCT
13	-----	EGFR	ex19 p.E746_S752delinsI	c.2235_2255delinsAAT
14	-----	EGFR	ex19 p.E746_S752delinsA	c.2237_2254del
15	-----	EGFR	ex19 p.E746_S752delinsV	c.2237_2255delinsT
16	-----	EGFR	ex19 p.E746_S752delinsD	c.2238_2255del
17	-----	EGFR	ex19 p.E746_P753delinsVS	c.2237_2257delinsTCT
18	-----	EGFR	ex19 p.L747_E749del	c.2239_2247del
19	-----	EGFR	ex19 p.L747_A750delinsP	c.2238_2248delinsGC
20	-----	EGFR	ex19 p.L747_A750delinsP	c.2239_2248delinsC
21	-----	EGFR	ex19 p.L747_T751delinsP	c.2239_2251delinsC
22	-----	EGFR	ex19 p.L747_T751delinsS	c.2240_2251del
23	-----	EGFR	ex19 p.L747_T751del	c.2240_2254del ^{*)}
24	-----	EGFR	ex19 p.L747_S752del	c.2239_2256del
25	-----	EGFR	ex19 p.L747_S752delinsQ	c.2239_2256delinsCAA
26	-----	EGFR	ex19 p.L747_P753delinsQ	c.2239_2258delinsCA
27	-----	EGFR	ex19 p.L747_P753delinsS	c.2240_2257del
28	-----	EGFR	ex20 p.T790M	c.2369C>T
29	-----	EGFR	ex21 p.L858R	c.2573T>G
30	-----	EGFR	ex21 p.L861Q	c.2582T>A
31	-----	EGFR	ex18 PCR Negative Control	
32	-----	EGFR	ex19 PCR Negative Control	
33	-----	EGFR	ex20 PCR Negative Control	
34	-----	EGFR	ex21 PCR Negative Control	
35	-----	PCR	Positive Control A	
36	-----	PCR	Positive Control B	
	-----	Green Marker Line (bottom)		

^{*) identical to c.2238_2252del and c.2239_2253del}

Pracovní postup

1. Izolace DNA

*Pro izolaci DNA použijte vhodný izolační kit. Doporučené kity jsou následující:
Pro izolaci čerstvých nebo mražených biopsií použijte soupravy Qiagen QIAamp 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.

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** 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 dvě PCR zkumavky. Umístěte zkumavky na led.
- Pro každý vzorek připravte na ledu výsledný PCR reakční mix A a B:
 - 15 µl Amplification Mix** (žluté nebo zelené 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.
- Rychlost vyhřívání zvolte 2-5°C/s.
 - pre-PCR: 37°C /10 min
 - pre-PCR: 94°C /2 min
 - PCR: 94°C /15 s – 70°C /60 s – 58°C /90s (33 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 107, 140-149, 204bp (amplification product A).

90, 107, 133, 147bp (amplification product B).

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 **20 µl DNAT** (modré víčko). Jeden sloupec pro každý vzorek.
- Přidejte **10 µl PCR produktu A** vždy přímo do kapky DNAT.
- Přidejte do téže kapky DNA s PCR produktem A **10 µl PCR produktu B**.
- 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 **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.
- Pridajte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** pri **pokožové teplotě** na lineárni nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Pridajte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** pri **pokožové teplotě** na lineárni nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Pridajte **1 ml Color Developer**.
- Inkubujte **15 min** pri **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.

Obsah soupravy:

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

Vyhodnocení výsledků:

Pro vyhodnocení použijte Collector sheet, který je součástí kitu.

Proužek u Control line v horní části stripu indikuje správnou funkčnost roztoků Conjugate a Color Developer, takže kontroluje správnost provedení hybridizace.

Proužek u PCR positive control indikuje přítomnost a kvalitu komponent PCR reakce a také kvalitu a přítomnost DNA. Pokud je PCR positive control negativní (bez proužku), zopakujte test včetně nové izolace DNA.

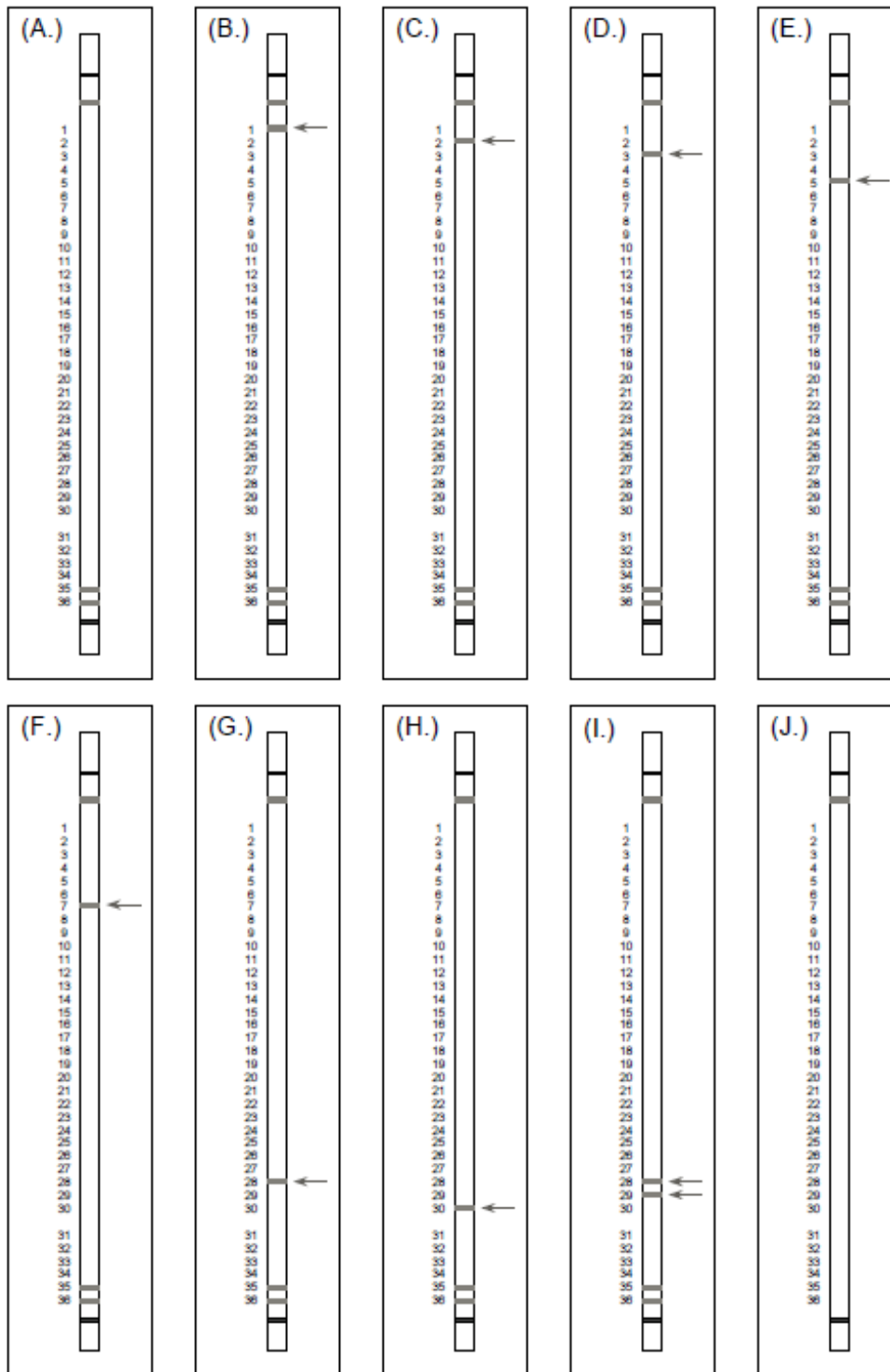
Nepřítomnost proužku u PCR negativních kontrol indikuje úplné potlačení amplifikace wild type EGFR. Pokud je Negative control pozitivní (má proužek), tak to indikuje příliš velké množství DNA přidané do reakce, což snižuje sensitivitu reakce.

Interpretation of results:

EGFR (lines 1-30)	PCR Negative Control (lines 31-34)	PCR Positive Control (lines 35,36)	Interpretation
one or more positive	negative	positive	respective EGFR mutation present
negative	negative	positive	none of the EGFR mutations present
any result	positive	positive	reduced sensitivity for mutant EGFR
negative	negative	negative	negative control or experimental failure

Pozn. Intenzita proužku může být různá u různých vzorků

Výsledky



(A.) no EGFR mutation present
 (B.) EGFR ex18 c.2156G>C
 (C.) EGFR ex18 c.2155G>T
 (D.) EGFR ex18.c.2155G>A
 (E.) EGFR ex19 c.2235_2249del

(F.) EGFR ex19 c.2236_2250del
 (G.) EGFR ex20 c.2369C>T
 (H.) EGFR ex21 c.2582T>A
 (I.) EGFR ex20 c.2369C>T + ex21 c.2573T>G
 (J.) negative control or PCR failure