

Kras XL StripAssay[®]

Kat. číslo 5-680



20 testů



2-8°C



1.	Amplification Mix (žluté víčko)	500 µl
2.	Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl
3.	HS Taq DNA Polymerase (5U/µl) (červené víčko)	75 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:

			Red Marker Line (top)
			Control
1	KRAS	p.Gly12Ala	c.35G>C
2	KRAS	p.Gly12Arg	c.34G>C
3	KRAS	p.Gly12Asp	c.35G>A
4	KRAS	p.Gly12Cys	c.34G>T
5	KRAS	p.Gly12Ile	c.34_35delGGinsAT
6	KRAS	p.Gly12Leu	c.34_35delGGinsCT
7	KRAS	p.Gly12Ser	c.34G>A
8	KRAS	p.Gly12Val	c.35G>T
9	KRAS	p.Gly13Ala	c.38G>C
10	KRAS	p.Gly13Arg	c.37G>C
11	KRAS	p.Gly13Asp	c.38G>A
12	KRAS	p.Gly13Cys	c.37G>T
13	KRAS	p.Gly13Ser	c.37G>A
14	KRAS	p.Gly13Val	c.38G>T
15	KRAS	p.Ala59Glu	c.176C>A
16	KRAS	p.Ala59Gly	c.176C>G
17	KRAS	p.Ala59Thr	c.175G>A
18	KRAS	p.Gly60Val	c.179G>T
19	KRAS	p.Gln61Arg	c.182A>G
20	KRAS	p.Gln61His	c.183A>C
21	KRAS	p.Gln61His	c.183A>T
22	KRAS	p.Gln61Leu	c.182A>T
23	KRAS	p.Gln61Lys	c.181C>A
24	KRAS	p.Lys117Asn	c.351A>C
25	KRAS	p.Lys117Asn	c.351A>T
26	KRAS	p.Lys117Glu	c.349A>G
27	KRAS	p.Ala146Pro	c.436G>C
28	KRAS	p.Ala146Thr	c.436G>A
29	KRAS	p.Ala146Val	c.437C>T
30	KRAS 12/13 PCR Negative Control		
31	KRAS 59/60/61 PCR Negative Control		
32	KRAS 117 PCR Negative Control		
33	KRAS 146 PCR Negative Control		
34	PCR Positive Control		
			Green Marker Line (bottom)

Pracovní postup

1. Izolace DNA

Musí být použity vhodné metody extrakce DNA, v závislosti na typu vzorku, který má být vyšetřován. Doporučení je možné získat kontaktováním ViennaLab prostřednictvím místního distributora nebo přímo na adresu www.viennalab.com.

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.

2. Amplifikace DNA

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

- Naředte pracovní koncentraci (1:25, finální koncentrace 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**
- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocycler na 37°C.
- Vložte reakční zkumavky do cycleru a spusťte příslušný program.
 - 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 151, 153, 157, 165, 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** (předeřhřátý 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.

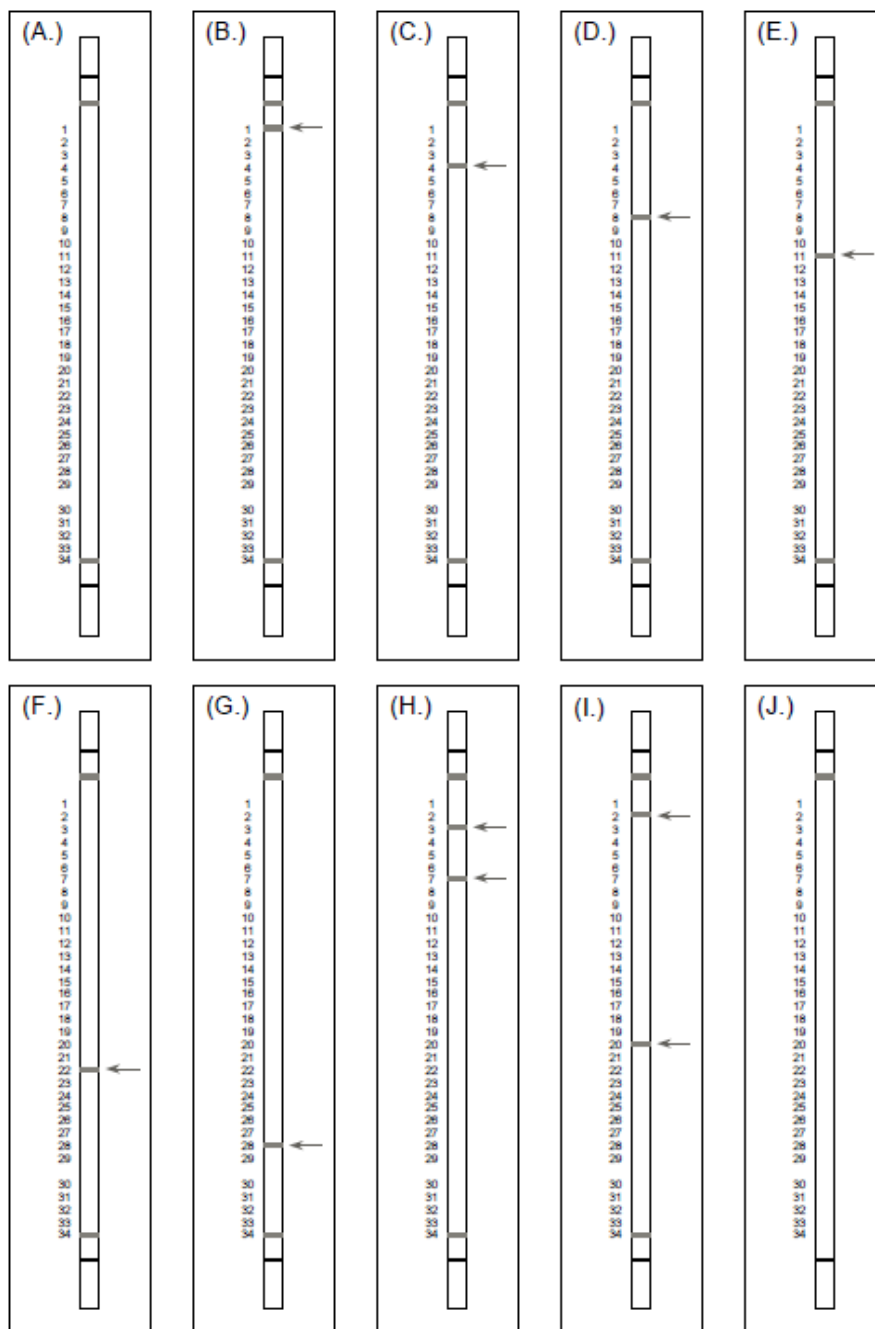
5. Barvení (pokojová teplota)

- 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.
- 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.

Obsah soupravy:

1.	Amplification Mix (<i>yellow 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	

Možné výsledky:



- (A.) Vzorek bez mutace KRAS (F.) Vzorek s mutací KRAS cd 61Leu
 (B.) Vzorek s mutací KRAS cd 12Ala (G.) Vzorek s mutacemi KRAS cd 146Thr
 (C.) Vzorek s mutací KRAS cd 12Cys (H.) Vzorek s mutacemi KRAS cd 12Asp + cd 12Ser
 (D.) Vzorek s mutací KRAS cd 12Val (I.) Vzorek s mutacemi KRAS cd 12Arg + cd 61His
 (E.) Vzorek s mutací KRAS cd 13Asp (J.) Negativní kontrola nebo selhání analýzy

Genotyp vzorku se určuje pomocí přiložené Collector™ sheet.

Umístěte zpracované Teststrip do některého z určených políček, srovnejte ho tak, aby byla červená linka na červené lince (nahore) a zelená linka na zelené (dole), a upevněte ho lepicí páskou.

Pozitivní reakce na vrchním „Control“ řádku indikuje správnou funkci konjugátu a Colour Developeru. Tato reakce by měla být vždy pozitivní.

Pozitivní reakce PCR pozitivní kontroly indikuje přítomnost a dostatečnou kvalitu PCR komponent a templátu DNA pro analýzu KRAS. V případě, že je PCR pozitivní kontrola negativní je třeba analýzu opakovat počínaje extrakcí DNA.

Negativní reakce PCR negativní kontroly označuje úplné potlačení wild typu KRAS kodonu 12/13, 59/60/61, 117 a 146. V případě, že je PCR negativní kontrola pozitivní (například v důsledku přebytku templátu DNA použitého pro PCR), citlivost testu může být snížena.

KRAS (lines 1-29)	PCR Negative Control (lines 30-33)	PCR Positive Control (line 34)	Interpretation
one or more positive	negative	positive	respective KRAS mutation present
negative	negative	positive	none of the KRAS mutations present
any result	positive	positive	reduced sensitivity for mutant KRAS
negative	negative	negative	negative control or experimental failure

Pozn. intenzita proužků může být různá.

- Použití kitu StripAssay vyžaduje důkladné pochopení postupu zde nastíněných a přesné laboratorní vybavení. Použití StripAssay v humánní diagnostice in vitro musí být provedeno výhradně vhodně vyškoleným personálem.
- Nepoužívejte komponenty kitu StripAssay po datu expirace vytištěného na vnější straně krabice soupravy. Nemíchejte reagentie z různých šarží.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci a křížové kontaminaci činidel nebo vzorků používáním pipet se sterilními špičkami pro celou analýzu. Nezaměňujte uzávěry lahví.
- Kontrolní proužek (Control) na každém Teststrip umožňuje kontrolu hybridizace (chromogenního detekčního systému). Pro monitorování a ověření specifičnosti hybridizace a promývání, měly by být zahrnuty kontrolní DNA o známém genotypu do každého experimentu.