

# CVD StripAssay®

Kat. číslo 4-240





20 testů



2-8°C



---

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



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

## Popis stripu:

				Red Marker Line (top)
				Control
1	mutant	Factor V	G1691A (Leiden)	
2	wild type	Factor V	G1691A (Leiden)	
3	mutant	Factor V	H1299R (R2)	
4	wild type	Factor V	H1299R (R2)	
5	mutant	Prothrombin	G20210A	
6	wild type	Prothrombin	G20210A	
7	mutant	Factor XIII	V34L	
8	wild type	Factor XIII	V34L	
9	mutant	$\beta$ -Fibrinogen	-455 G>A	
10	wild type	$\beta$ -Fibrinogen	-455 G>A	
11	5G	PAI-1	4G/5G	
12	4G	PAI-1	4G/5G	
13	1b	HPA1	a/b	
14	1a	HPA1	a/b	
15	mutant	MTHFR	C677T	
16	wild type	MTHFR	C677T	
17	mutant	MTHFR	A1298C	
18	wild type	MTHFR	A1298C	
19	del	ACE	I/D	
20	ins	ACE	I/D	
21	mutant	Apo B	R3500Q	
22	wild type	Apo B	R3500Q	
23	(1)	Apo E	codon 112: TGC (Cys)	
24	(2)	Apo E	codon 112: CGC (Arg)	
25	(3)	Apo E	codon 158: TGC (Cys)	
26	(4)	Apo E	codon 158: CGC (Arg)	
				Green Marker Line (bottom)

## 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<sup>X</sup>TRACT 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<sup>X</sup>TRACT řádným protřepáním lahvičky.
- Přidejte **200 µl GEN<sup>X</sup>TRACTu** k peletu. Uzavřete zkumavku a vortexujte 10 s.  
➔Pryskyřice GEN<sup>X</sup>TRACT 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 reagenty 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 2 PCR reakční mixy:

<b>15 μl Amplification Mix</b> (žluté víčko) <b>5 μl naředěné Taq DNA Polymerase</b> (tj. 1 U) <b>5 μl vyizolované DNA</b>	<b>15 μl Amplification Mix</b> (zelené víčko) <b>5 μl naředěné Taq DNA Polymerase</b> (tj. 1 U) <b>5 μl vyizolované DNA</b>
--	---

*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 (35 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: 134, 156, 173, 202, 223, 254, 297, 324 bp (amplifikační produkt A) 225, 248, 283, 346 bp (amplifikační produkt B)

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

*Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtko. Vyhřejte lázeň přesně na 45°C (±0,5°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 A**, **10 μl PCR produktu B** 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.*

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

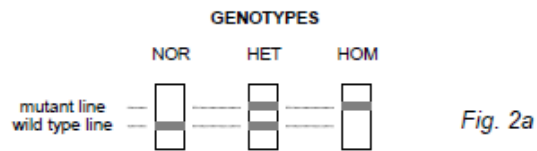
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předehřátý na 45°C). Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).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

### 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	<b>positive</b>	negative	normal
HET	<b>positive</b>	<b>positive</b>	heterozygous
HOM	negative	<b>positive</b>	homozygous mutant

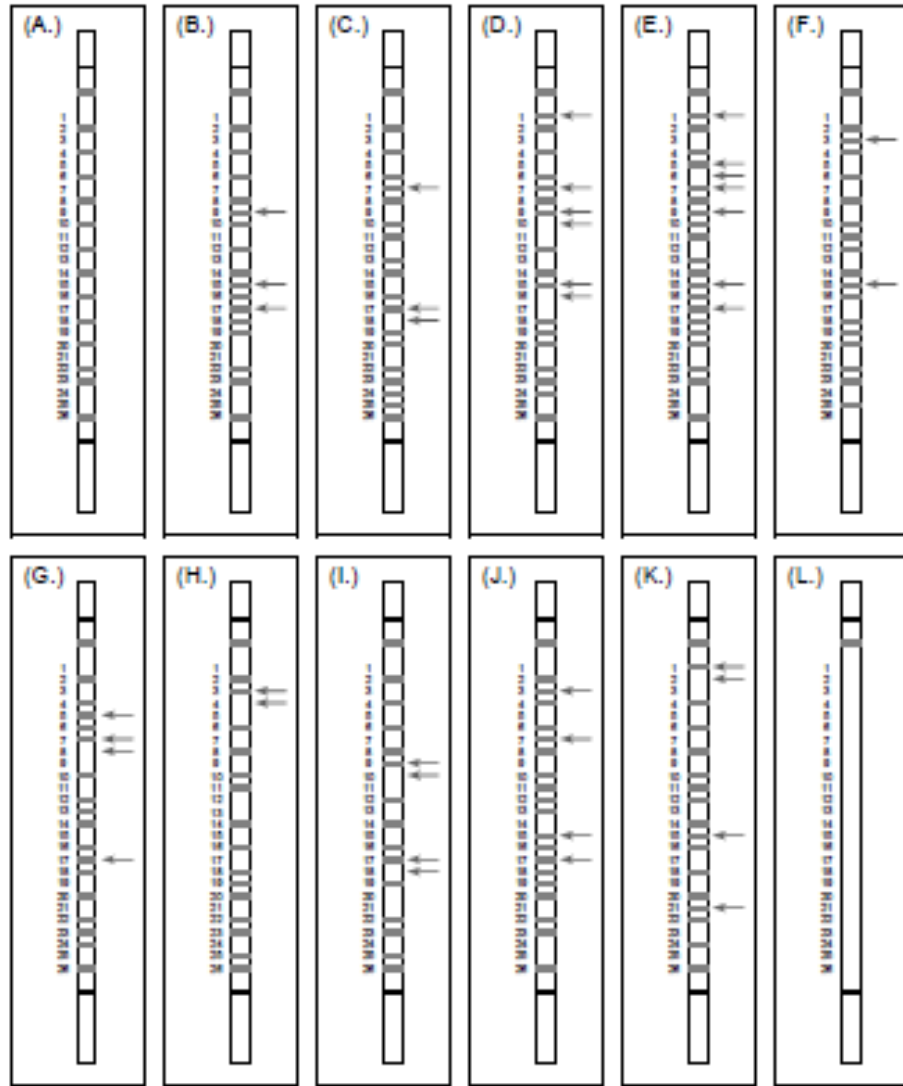
- Pro tři detekované izoformy apo E2, E3 a E4 lze obdržet následující výsledky.
- Pozn. Intenzita proužku se může lišit. Intenzita nemá žádný význam pro výsledek.

E2 (112: Cys, 158: Cys)	lines (1) + (3)
E3 (112: Cys, 158: Arg)	lines (1) + (4)
E4 (112: Arg, 158: Arg)	lines (2) + (4)



Příklady výsledků:

Fig. 3: Examples of test results



	FV L	FV R2	PTH	FXIII	FGB	PAI-1	HPA1	M 677	M 1298	ACE	Apo B	Apo E
(A.)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	4G/4G	a/a	NOR	NOR	I/I	NOR	E3/3
(B.)	NOR	NOR	NOR	NOR	HET	4G/4G	a/a	HET	HET	D/D	NOR	E3/3
(C.)	NOR	NOR	NOR	HET	NOR	5G/5G	a/b	NOR	HOM	I/D	NOR	E2/4
(D.)	HET	NOR	NOR	HET	HOM	4G/4G	a/a	HOM	NOR	I/D	NOR	E3/4
(E.)	HET	NOR	HOM	HET	HET	5G/5G	a/b	HET	HET	I/D	NOR	E3/3
(F.)	NOR	HET	NOR	NOR	NOR	4G/5G	a/a	HET	NOR	I/D	NOR	E2/2
(G.)	NOR	NOR	HET	HOM	NOR	4G/4G	a/b	NOR	HET	I/I	NOR	E3/4
(H.)	NOR	HOM	NOR	NOR	NOR	5G/5G	a/a	NOR	NOR	I/D	NOR	E2/3
(I.)	NOR	NOR	NOR	NOR	HOM	4G/4G	a/a	NOR	HOM	D/D	NOR	E2/3
(J.)	NOR	HET	NOR	HET	NOR	4G/5G	b/b	HET	HET	I/D	NOR	E3/3
(K.)	HOM	NOR	NOR	NOR	NOR	4G/5G	a/a	HET	NOR	I/I	HET	E4/4