

# Lactose Intolerance StripAssay<sup>®</sup>

Kat. číslo 4-300



20 testů



2-8°C



---

1. <b>Lysis Solution</b>	50 ml	
2. <b>GEN<sup>x</sup>TRACT Resin</b>	5 ml	
<i>Promíchejte před každým použitím aliquotu</i>		
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	

---

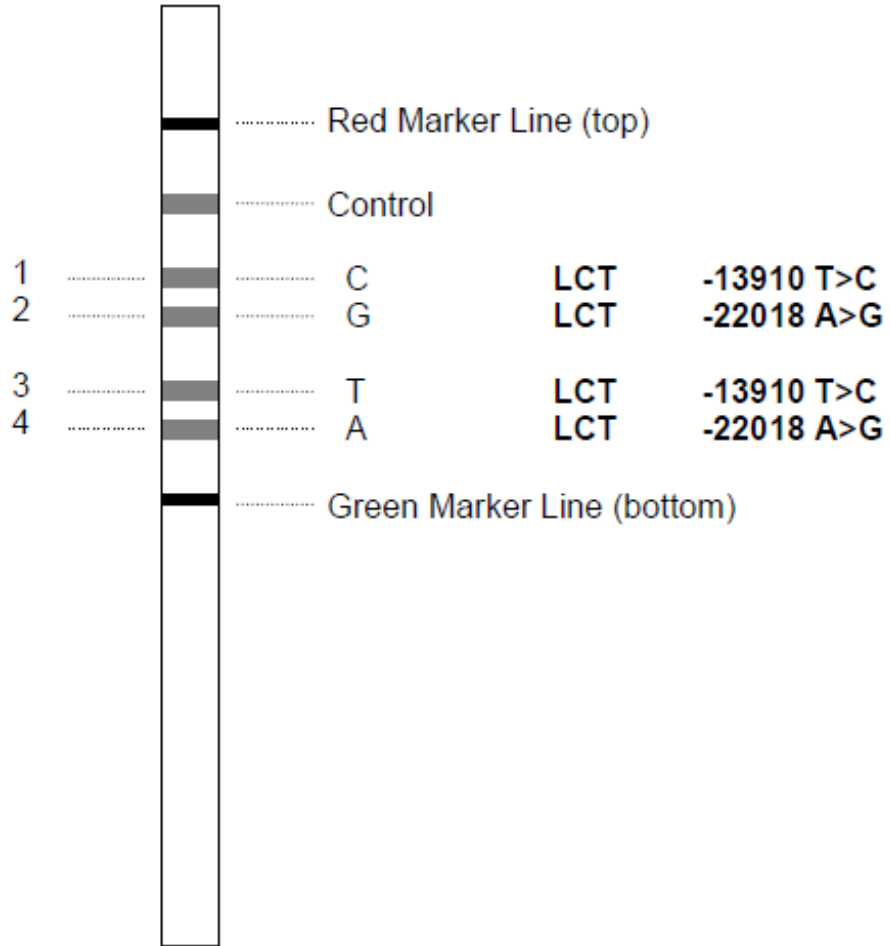
**ViennaLab Diagnostics GmbH**  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (-43-1) 8120156-0  
Fax: (-43-1) 8120156-19  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

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

# Popis stripu



# Pracovní postup

## 1. 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 .*

## 2. 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 výsledný PCR reakční mix:

**15 μl Amplification Mix** (žluté víčko)

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

**5 μl vyizolované DNA**

*Pokud nebyla DNA izolována kitem, který je součástí tohoto kitu, doporučujeme DNA naředit na 5-40 μg/ml (= 25-200 ng DNA do reakce).*

- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocyklier na 94°C.
- Vložte reakční zkumavky do cyklieru a spusťte příslušný program.
- U rychlých termocyklierů zpomalte rychlost vyhřívání na max. 2°C/s.

pre-PCR: 94°C / 2 min

PCR: 94°C / 15 s – 58°C / 30 s – 72°C / 30 s (35 cyklů)

konečná syntéza: 72°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 142, 319 bp.*

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

*Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtko. Vyhřejte lázeň přesně na 45°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Např. 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 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 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)

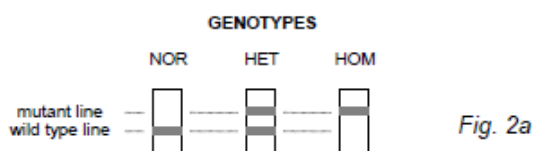
- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojevé teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.
- 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>Lysis Solution</b>	50 ml	
2.	<b>GEN<sup>X</sup>TRACT Resin</b>	5 ml	
	<i>Resuspend each time <u>immediately</u> before removing an aliquot.</i>		⚠
3.	<b>Amplification Mix (yellow cap)</b>	500 µl	
4.	<b>Taq Dilution Buffer (transparent cap)</b>	500 µl	
5.	<b>DNAT (blue cap)</b>	1.5 ml	☒ R 36/38
6.	<b>Typing Trays</b>	3	
7.	<b>Teststrips</b>	20	
8.	<b>Hybridization Buffer (white cap)</b>	25 ml	
9.	<b>Wash Solution A (white cap)</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	

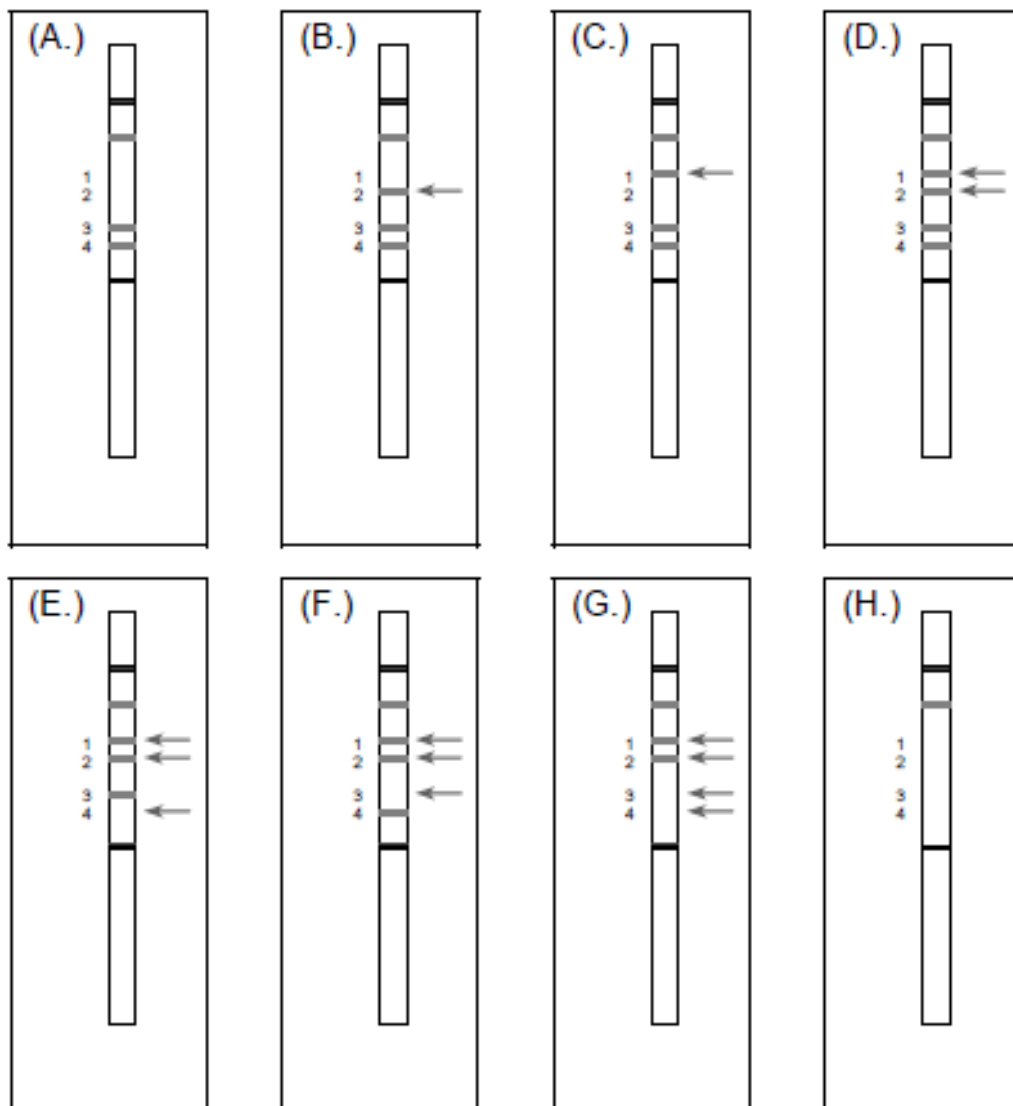
## 6. Vyhodnocení

- 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

Příklad výsledku:



- (A.) LCT -13910: T/T; LCT -22018: A/A  
(B.) LCT -13910: T/T; LCT -22018: A/G  
(C.) LCT -13910: T/C; LCT -22018: A/A  
(D.) LCT -13910: T/C; LCT -22018: A/G  
(E.) LCT -13910: T/C; LCT -22018: G/G  
(F.) LCT -13910: C/C; LCT -22018: A/G  
(G.) LCT -13910: C/C; LCT -22018: G/G  
(H.) negative control or PCR failure