

CVD-T StripAssay[®]

Kat. číslo 4-360



20 testů



2-8°C



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

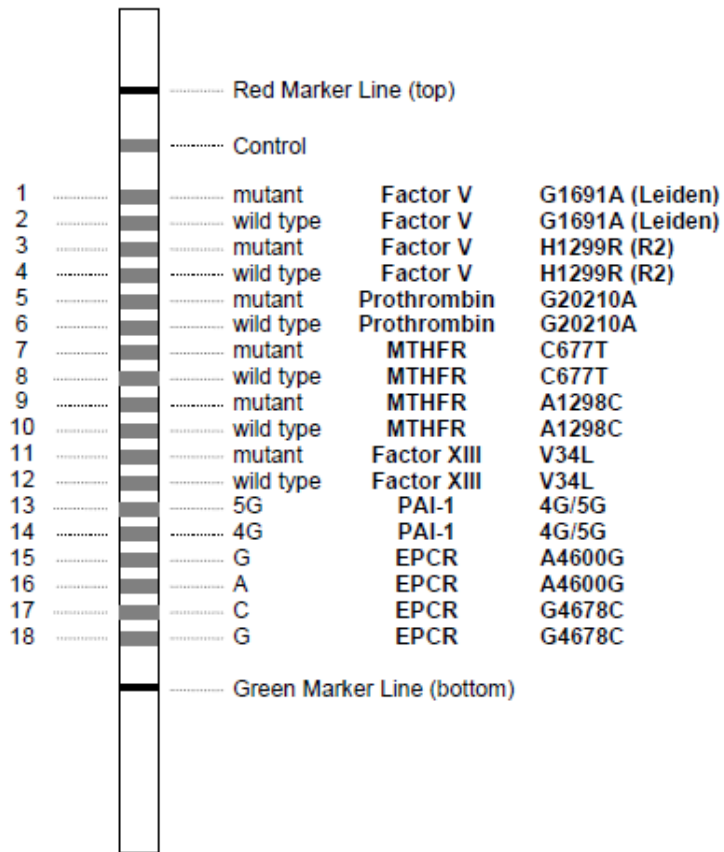


Fig. 1: Teststrip Design

Note: Teststrip is not drawn in real size and must not be used for interpretation of results!

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^XTRACT 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^XTRACT řádným protřepáním lahvičky.
- Přidejte **200 µl GEN^XTRACTu** k peletu. Uzavřete zkumavku a vortexujte 10 s.
➔Pryskyřice GEN^XTRACT 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 výsledný PCR reakční mix:

15 μl Amplification Mix (žluté víčko)

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

5 μl vyizolované DNA

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, 165, 173, 202, 223, 254, 283, 324 bp.

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

Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtka. 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 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 odsávacíčkou.
Okamžitě pokračujte, nikdy během celé procedury nenechte proužek oschnout.

3. Promývání (45°C, třepaná lázeň)

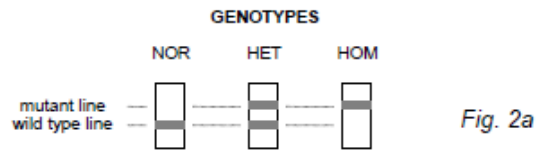
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předehřátý na 45°C). Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A**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

4. Barvení (pokojová teplota)

- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojevé teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** při **pokojevé teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubujte **5 min** při **pokojevé teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- 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.

5. Vyhodnocení

- Každá mutace musí mít alespoň jeden nebo oba proužky.
- Pozn. Intenzita proužku se může lišit. Intenzita nemá žádný význam pro výsledek.

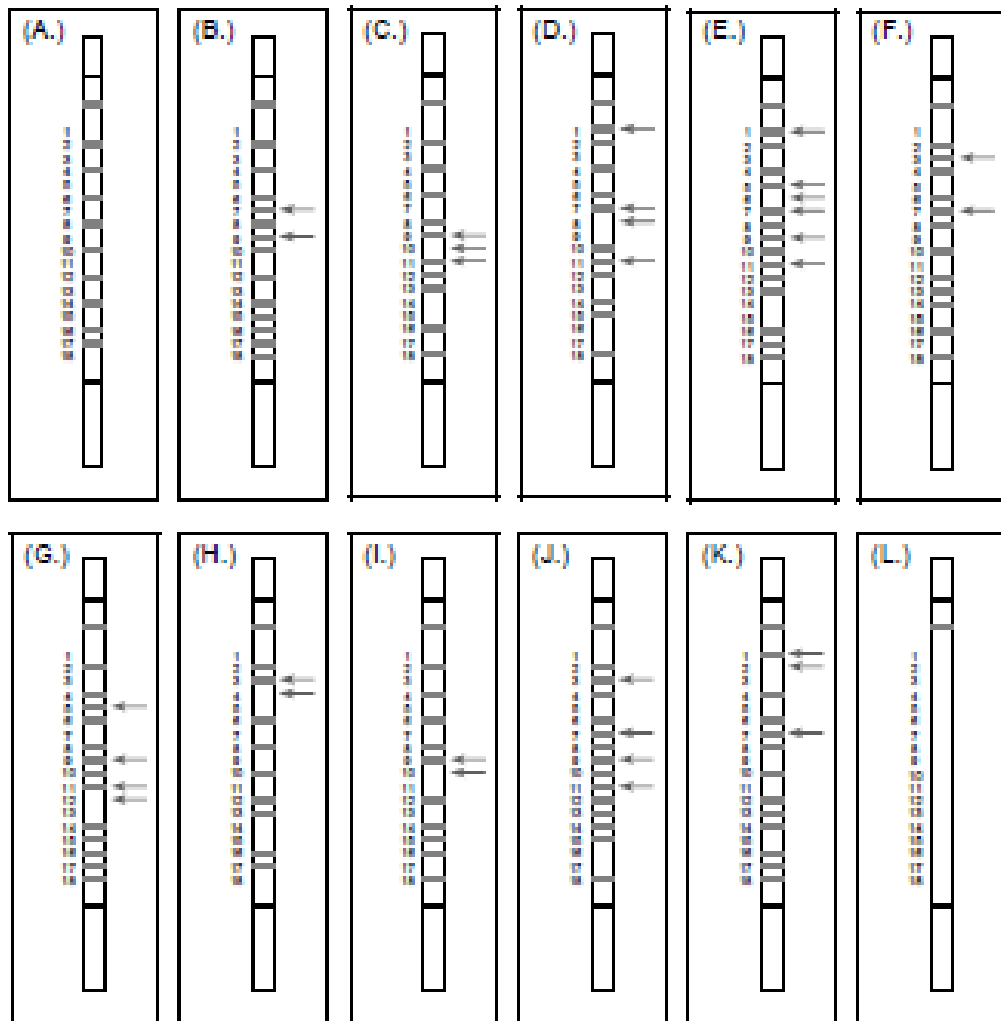


	wild type line	mutant line	genotype
NOR	positive	negative	normal
HET	positive	positive	heterozygous
HOM	negative	positive	homozygous mutant

- EPCR haplotypy A1 (H1), A2 (H2), A3 (H3) a jejich homozygotní a heterozygotní genotypy jsou vyjádřeny sondami pro mutace 4600 A>G a 4678 G>C.
- Pozn. Intenzita proužku se může lišit. Intenzita nemá žádný význam pro výsledek.



Příklady výsledků



	FV Lelden	FV R2	PTH	M 677	M 1298	FXIII	PAI-1	EPCR
(A.)	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	4G/4G	A1/A1
(B.)	NOR	NOR	NOR	HET	HET	NOR	4G/4G	A1/A3
(C.)	NOR	NOR	NOR	NOR	HOM	HET	5G/5G	A2/A2
(D.)	HET	NOR	NOR	HOM	NOR	HET	4G/4G	A3/A3
(E.)	HET	NOR	HOM	HET	HET	HET	5G/5G	A1/A2
(F.)	NOR	HET	NOR	HET	NOR	NOR	4G/5G	A2/A2
(G.)	NOR	NOR	HET	NOR	HET	HOM	4G/4G	A1/A3
(H.)	NOR	HOM	NOR	NOR	NOR	NOR	5G/5G	A1/A1
(I.)	NOR	NOR	NOR	NOR	HOM	NOR	4G/4G	A2/A3
(J.)	NOR	HET	NOR	HET	HET	HET	4G/5G	A3/A3
(K.)	HOM	NOR	NOR	HET	NOR	NOR	4G/5G	A1/A2
(L.)	negative control or PCR failure							