

CAH StripAssay®

Kat. číslo 4-380



20 testů



2-8°C



1. Lysis Solution	50 ml
2. GEN^xTRACT Resin	5 ml
<i>Promíchejte před každým použitím aliquotu</i>	
3a. Amplifiaction Mix A1 (žluté víčko)	500 µl
3b. Amplifiaction Mix B (bílé víčko)	500 µl
3c. Amplifiaction Mix C (zelené víčko)	500 µl
4. Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl
5. HS Taq DNA Polymerase (5U/µl) (červené víčko)	175 U
6. DNAT (modré víčko)	1,5 ml Varování
7. Typing Trays	3
8. Teststrips A	20
9. Hybridization Buffer (bílé víčko)	25 ml
10. Wash Solution A (bílé víčko)	80 ml
11. Conjugate Solution	25 ml
12. Wash Solution B	80 ml
13. Color Developer	25 ml

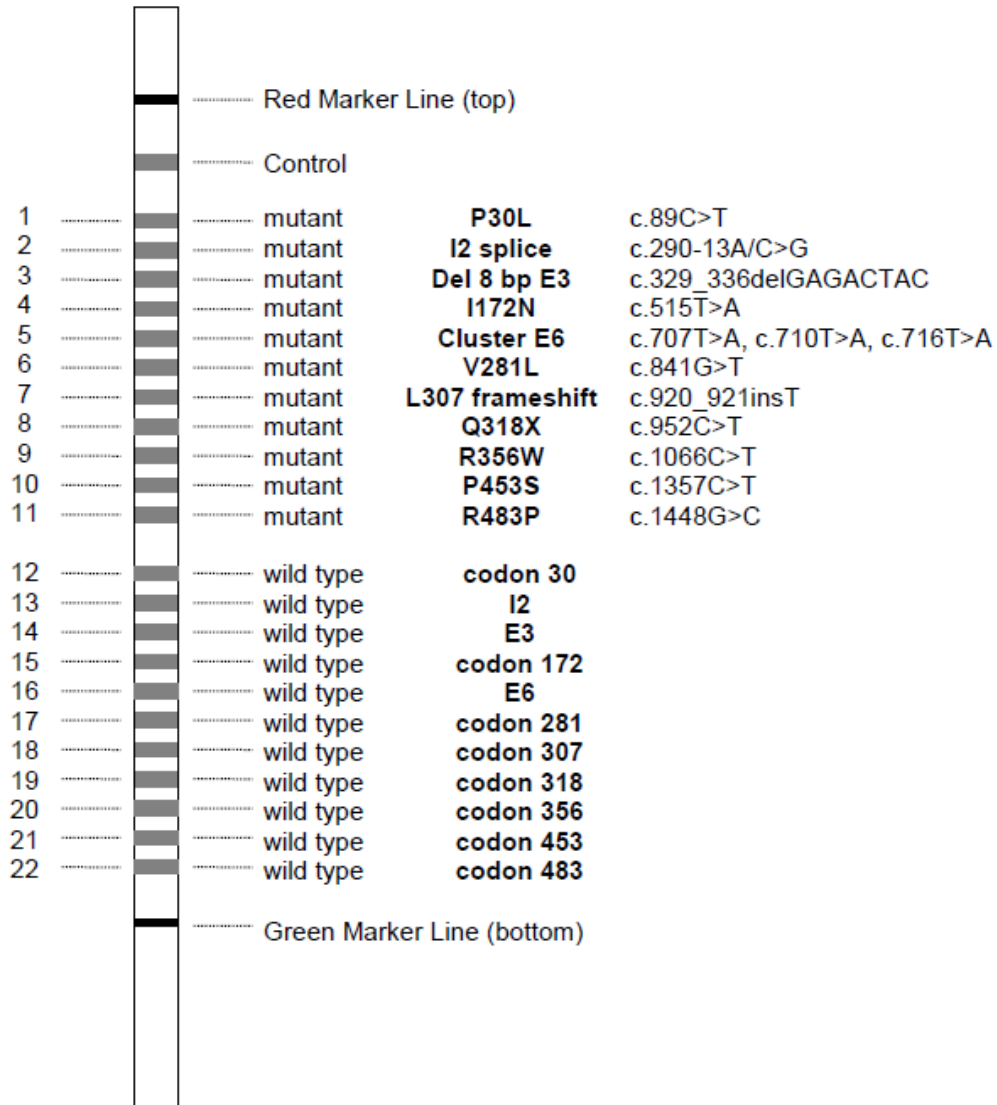
ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (-43-1) 8120156-0
Fax: (-43-1) 8120156-19
info@viennalab.com



www.viennalab.com

Popis stripu

Ref.Seq. NM_000500.6



Obrázek 1

Pracovní postup

Zamýšlené použití

Kit je určen k identifikaci mutací spojených s Kongenitální Adrenální Hyperplasií (CAH) metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a reverzní hybridizace. Pro *humánní in vitro diagnostiku*.

Metodika

Procedura se skládá ze tří kroků: (1) Izolace DNA, (2) PCR amplifikace s použitím biotinylovaných primerů, (3) hybridizace amplifikovaných produktů na test-strip obsahující alel-specifické oligonukleotidové sondy imobilizované do řady paralelních proužků (viz obrázek 1). Navázané biotinylované sekvence jsou detekovány s použitím streptavidin-alkalické fosfatázy and jejího barevného substrátu.

Kit pokrývá 11 mutací v genu CYP21A2: P30L,I2 splice (I2 G), Del 8 bp E3 (G110del8nt), I172N, Kluster E6 (I236N, V237E, M239K), V281L,L307 frameshift (F306 + T), Q318X, R356W, P453S, R483P.

Ostatní genetické informace jsou dostupné v OMIM Online Mendelian Inheritance in Man: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Obsah kitu

Viz seznam komponent na straně 1 v originálním anglickém manuálu.

DNAT obsahuje 1.6% NaOH.



Varování

H315: Způsobuje podráždění kůže.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný plášť/ochranu očí/ochranu obličeje.

P337 + P313: Pokud přetrvává podráždění očí: Kontaktujte lékaře.

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate Solution, Wash Solution B obsahují 0.05% NaN₃. Conjugate Solution obsahuje streptavidin-alkalickou fosfatázu. Color Developer obsahuje nitro blue tetrazolium (NBT) a 5-bromo-5-chloro-3-indolyl fosfatázu (BCIP).

Skladujte všechny reagentie při 2-8°C pokud je nepoužíváte!

Materiál který není součástí kitu

Kromě standardního laboratorního vybavení molekulárně genetické laboratoře je třeba následující:

- Nastavitelná mikrocetrifuga pro 3 000 – 12 000rpm (1 000 – 12 000 x g).
- Inkubátor (například heating blok, vodní lázeň) nastavitelný na 56°C a 98°C (± 2°C).
- Thermocycler a vhodné tenkostěnné plastové reakční zkumavky/stripy.
- Třepaná vodní lázeň a nastavenou teplotou (45°C ± 0.5°C)

- Vakuová odsávačka.
- Vortex (Rocker nebo orbitální třepačka)
- *Volitelný: agarózový gel a elektroforetická aparatura (pro kontrolu amplifikačních produktů).*

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 .

Amplifikace DNA (PCR; 3 separátní reakce na jeden vzorek)

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

- Naředte pracovní koncentraci (1:20, finální koncentrace 0,2 U/μl **HS Taq DNA Polymerase** červené víčko) v **Taq Dilution Buffer** (čiré víčko).
- Připravte pro každý vzorek tři PCR zkumavky. Umístěte zkumavky na led.
- Pro každý vzorek připravte na ledu výsledný 3 PCR reakční mixy (A,B, C):
 - A: **15 μl Amplification Mix A** (žluté víčko)
5 μl naředěné Taq DNA Polymerase (tj. 1.25 U)
5 μl vyizolované DNA
 - B: **15 μl Amplification Mix B** (bílé víčko)
5 μl naředěné Taq DNA Polymerase (tj. 1.25 U)
5 μl vyizolované DNA
 - C: **15 μl Amplification Mix B** (zelené víčko)
5 μl naředěné Taq DNA Polymerase (tj. 1.25 U)
5 μl vyizolované DNA

Pokud není DNA vyizolována izolačním protokolem ViennaLab, doporučujeme použít DNA s koncentrací 2-20 μg/ml (=10-100 ng DNA na reakci).

- *Uzavřete pevně zkumavky. Předehřejte thermocycler na 95°C.*
- *Vložte zkumavky do thermocycleru a spusťte následující teplotní program:*
 - pre-PCR: 95°C / 2 min
 - PCR: 95°C / 30 s – 62°C / 30 s – 72°C / 2:30 min (40 cyklů)
 - konečná syntéza: 72°C / 7 min

Skladujte amplifikační produkty při 2-8°C pro následné použití.

Použijte vyhřívání víka, rychlost vyhřívání max. 2°C /s.

Volitelně můžete analyzovat produkty gelovou elektroforézou (např. 3% agarózový gel). Délky fragmentů: 1460 bp (A), 2071 bp (B), 1675 bp (C).

Hybridizace (45°C, třepaná vodní lázeň)

Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtka. Vyhřejte lázeň přesně na 45°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). 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 **40 µl DNAT** (modré víčko). Jedna tray pro každý vzorek.
- Přidejte **20 µl PCR produktu A** přímo do kapky DNAT.
- Přidejte **20 µl PCR produktu B** přímo do stejné kapky DNAT.
- Přidejte **20 µl PCR produktu C** přímo do stejné 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.

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.

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.

Vyhodnocení

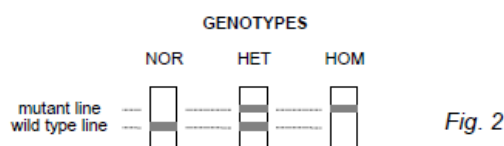
Genotyp vzorku lze určit po přiložení k příslušnému Collector™ Sheetu.

Přiložte hotový Teststrip do označených políček, tak, aby červený proužek seděl na červeném proužku na sheetu (horní) a zelený proužek na zeleném proužku na sheetu (dolní) a přelepte průhlednou lepící páskou.

Pozitivní reakce horní kontroly (Control) indikuje správnou funkci Conjugate solution a Color Developeru. Tento proužek by měl být vždy pozitivní.

Pro každou pozici polymorfismu lze vidět jeden z následujících výsledků:

Poznámka: Intenzita pozitivních proužků může být různá. Toto nemá vliv na vyhodnocení výsledku.



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

Viz příklady výsledků na následujících stranách.

Delece a duplikace v genu CYP21A2, nebo velké konverze mezi funkčním genem a jeho vysoce homologním pseudogenem (CYP21A1P) obsahuje asi 30% genetických alterací nalezených u pacientů s kongenitální adrenální hyperplázií (CAH). Je proto vždy doporučeno kombinovat výsledek CAH StripAssay s daty o počtu kopií genu CYP21A2, získanými například pomocí qPCR (např. Parajes et al. 2007, Clin Chem 53:1577-84) nebo s Multiplexní ligačně dependentní amplifikací se sondou (MLPA). V některých případech může neobvyklý výsledek StripAssay indikovat konverze (např. častou „30 kb E1-E3 delecí“; viz příklady E-H uvedené níže).

CAH StripAssay nerozlišuje mezi homozygótní mutací (přítomnou u obou alel) a hemizygótní mutací (delece přítomná na druhé alele; viz příklady C, H a K uvedené níže).

Ke specifické amplifikaci funkčního genu CYP21A2, musely být některé primery vybrány v rámci potenciálně mutované oblasti. Proto přítomnost mutace klusteru E6 interferuje s amplifikací regionu mutací P30L a I2 splice. Pokud je přítomna jedna z těchto mutací přítomna v kombinaci s klusterem E6, výsledek

vypadá jako pseudo-homozygot (viz příklad J uvedený níže). Pokud je přítomen kluster E6 v homozygótním nebo hemizygótním stavu, wildtype signály pro P30L a I2 splice nejsou přítomny (viz příklad K uvedený níže).

Pro radu kontaktujte ViennaLab skrze lokálního distributora nebo přímo na adrese techsupport@viennalab.com.

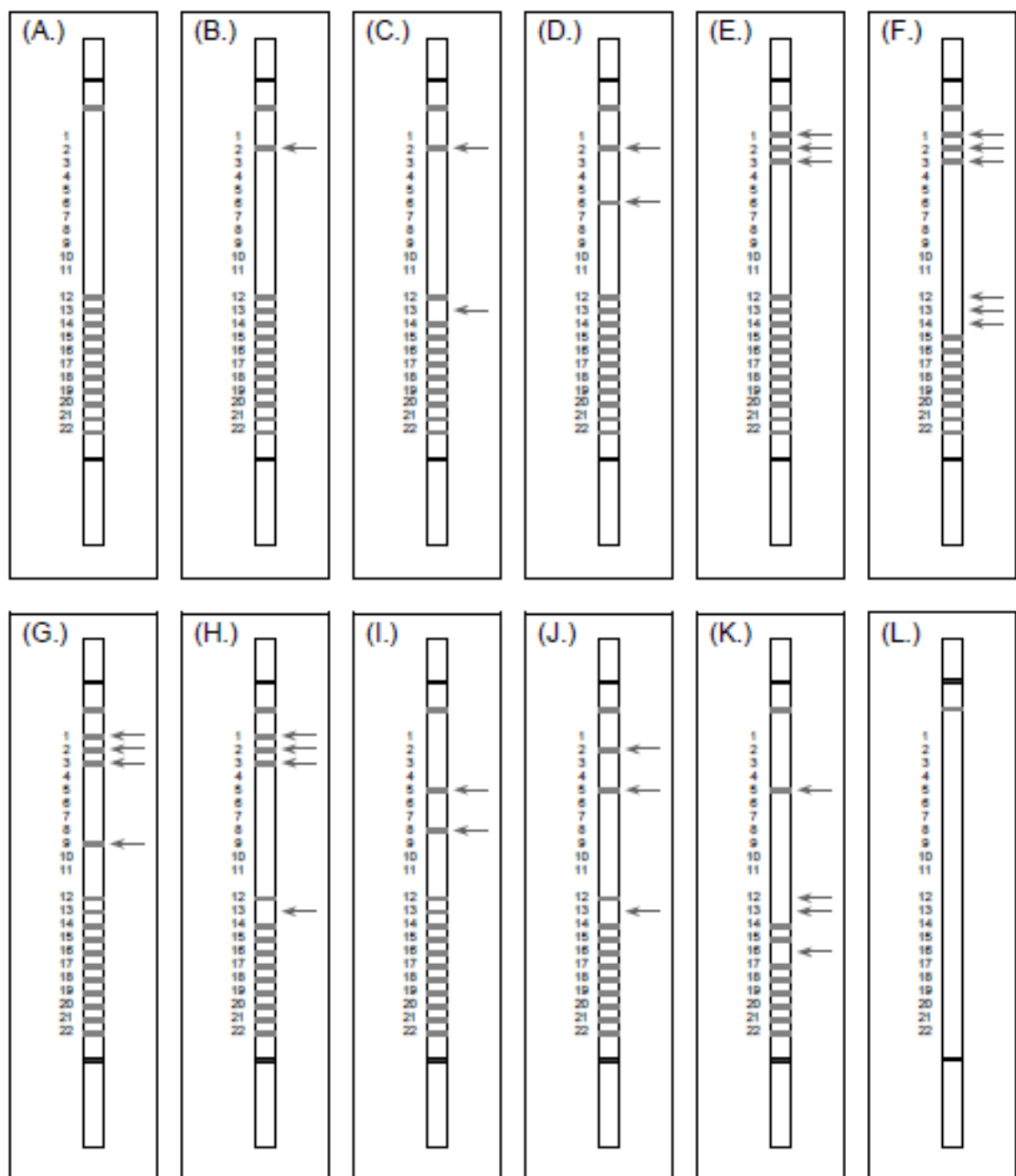
Kvalita

- Pro získání spolehlivých výsledků je třeba důkladné porozumění použitých procedur a precizní laboratorní vybavení a techniky. Použití StripAssay kitů pro lidskou *in vitro* diagnostiku je nutný důkladně proškolený personál.
- Nepoužívejte prošlé složky StripAssay kitu. Datum expirace je uvedeno na krabici kitu. Nemíchejte reagenty z různých šarží kitů.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci a kros-kontaminaci reagenty a používejte kontrolu barevného detekčního systému. Pro monitoring a validaci specifity hybridizace a wash kroků, lze použít kontrolní DNA se známým genotypem do každého jednotlivého experimentu.

Bezpečnost

- Při používání kitu nepijte, nejezte, nekuřte a neaplikujte kosmetiku v pracovním prostoru. Používejte laboratorní pláště a jednorázové rukavice. Po použití si řádně umyjte ruce.
- Nakládejte se vzorky jako potenciálně infekčním materiálem. Pečlivě vyčistěte a desinfikujte všechny materiály a povrchy, které byly v kontaktu se vzorky. Vyhoďte všechny odpady spojené s klinickými vzorky do odpadu označeného jako nebezpečný.
- Zabraňte kontaktu s pokožkou, očima a sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě opláchněte velkým množstvím vody. V případě rozlití, naředte vodou před vytřením do sucha.
- Dodržujte veškerá místní nařízení a regulace týkající se životního prostředí.

Příklady výsledků:



- (A.) Normální
- (B.) I2 splice heterozygot
- (C.) I2 splice homozygot nebo hemizygot
- (D.) I2 splice – V281L složený heterozygot
- (E.) P30L – I2 splice – Del ábp složený heterozygot (heterozygot „30 kb E11-E3 delece“)
- (F.) P30L – I2 splice – Del8 bp složený homozygot (homozygot „30 kb E1-E3 delece“)
- (G.) P30L – I2 splice – Del 8 bp – R356W složený heterozygot (E1-E3 del – R356W)
- (H.) P30L – Del 8 bp složený heterozygot, I2 splice hemizygot (E1-E3 del -I2 splice)
- (I.) Kluster E6 – Q318X složený heterozygot
- (J.) Kluster E6 -I2 splice složený heterozygot
- (K.) Kluster E6 homozygot nebo hemizygot
- (L.) E1-E6 homozygótní delece nebo negativní kontrola nebo selhání PCR

REF

4-380
2-014
2-020

CAH StripAssay®
GEN^XTRACT Blood DNA Extraction System
Spin Micro DNA Extraction Kit



20 testů
100 izolací
20 izolací

Distribučováno:

PentaGen, s.r.o.

www.pentagen.cz

Tel.: +420 602 376 797

kpehlikova@pentagen.cz



Výrobce:

ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Tel.: (+43-1) 8120156-0

Fax: (+43-1) 8120156-19

info@viennalab.com



www.viennalab.com