

PGX- TPMT StripAssay[®]

Kat. číslo 4-740



20 testů



2-8°C



1. Lysis Solution	50 ml	
2. GEN^xTRACT Resin	5 ml	
<i>Promíchejte před každým použitím aliquotu</i>		
3. Amplification Mix (žluté víčko)	500 µl	
4. Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl	
5. DNAT (modré víčko)	1,5 ml	✘ R36/38
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

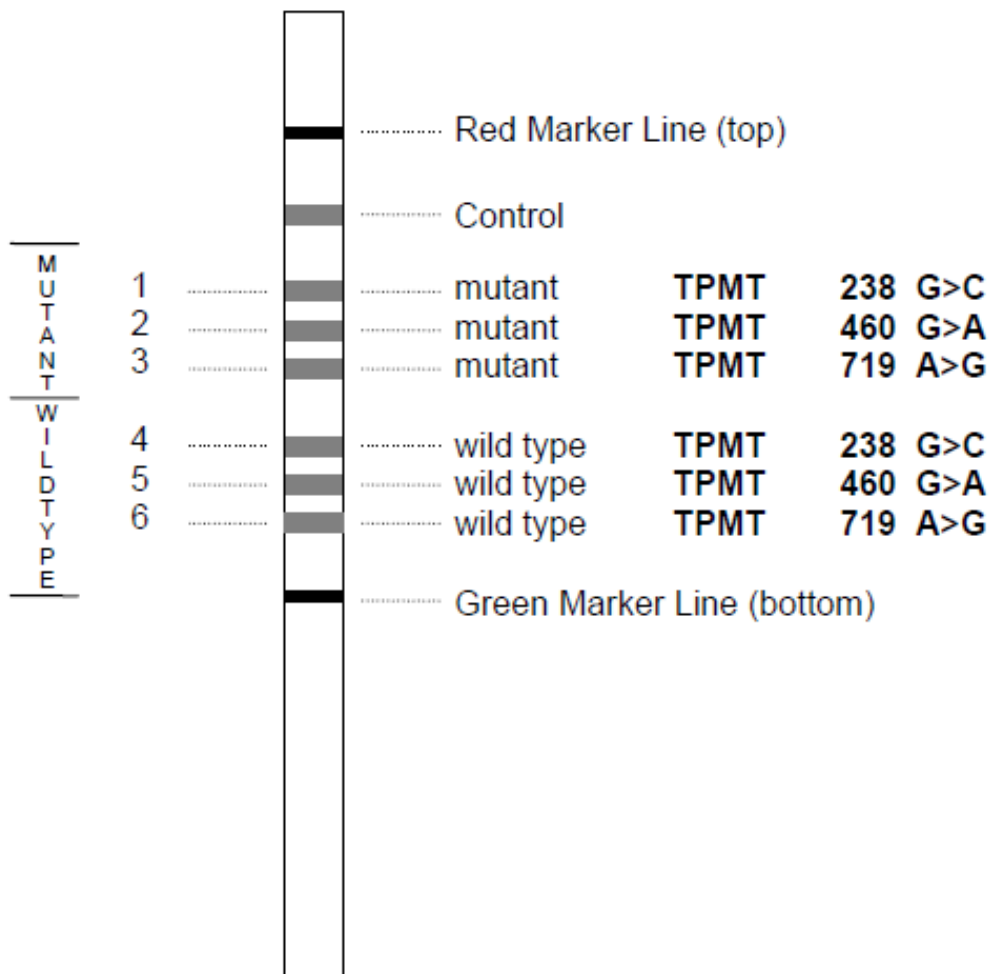
info@viennalab.com



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com

Popis stripu



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^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 .

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**
- 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 (30 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 137, 165, 255 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 48°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 korýtko **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.

4. Promývání (45°C, třepaná lázeň)

- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předeřtý 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.

5. Barvení (pokojová teplota)

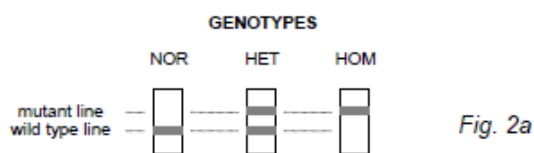
- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojevé teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávacíčkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution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

Obsah soupravy:

1.	Lysis Solution	50 ml	
2.	GEN^XTRACT Resin	5 ml	
	<i>Resuspend each time <u>immediately</u> before removing an aliquot.</i>		⚠
3.	Amplification Mix (yellow cap)	500 µl	
4.	Taq Dilution Buffer (transparent cap)	500 µl	
5.	DNAT (blue cap)	1.5 ml	☒ R 36/38
6.	Typing Trays	3	
7.	Teststrips	20	
8.	Hybridization Buffer (white cap)	25 ml	
9.	Wash Solution A (white cap)	80 ml	
10.	Conjugate Solution	25 ml	
11.	Wash Solution B	80 ml	
12.	Color Developer	25 ml	

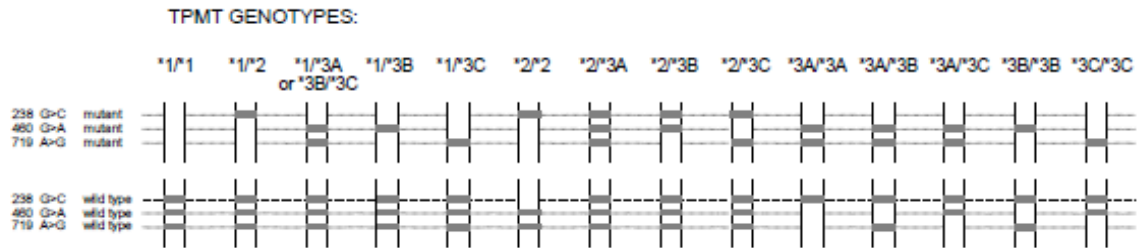
6. Vyhodnocení

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

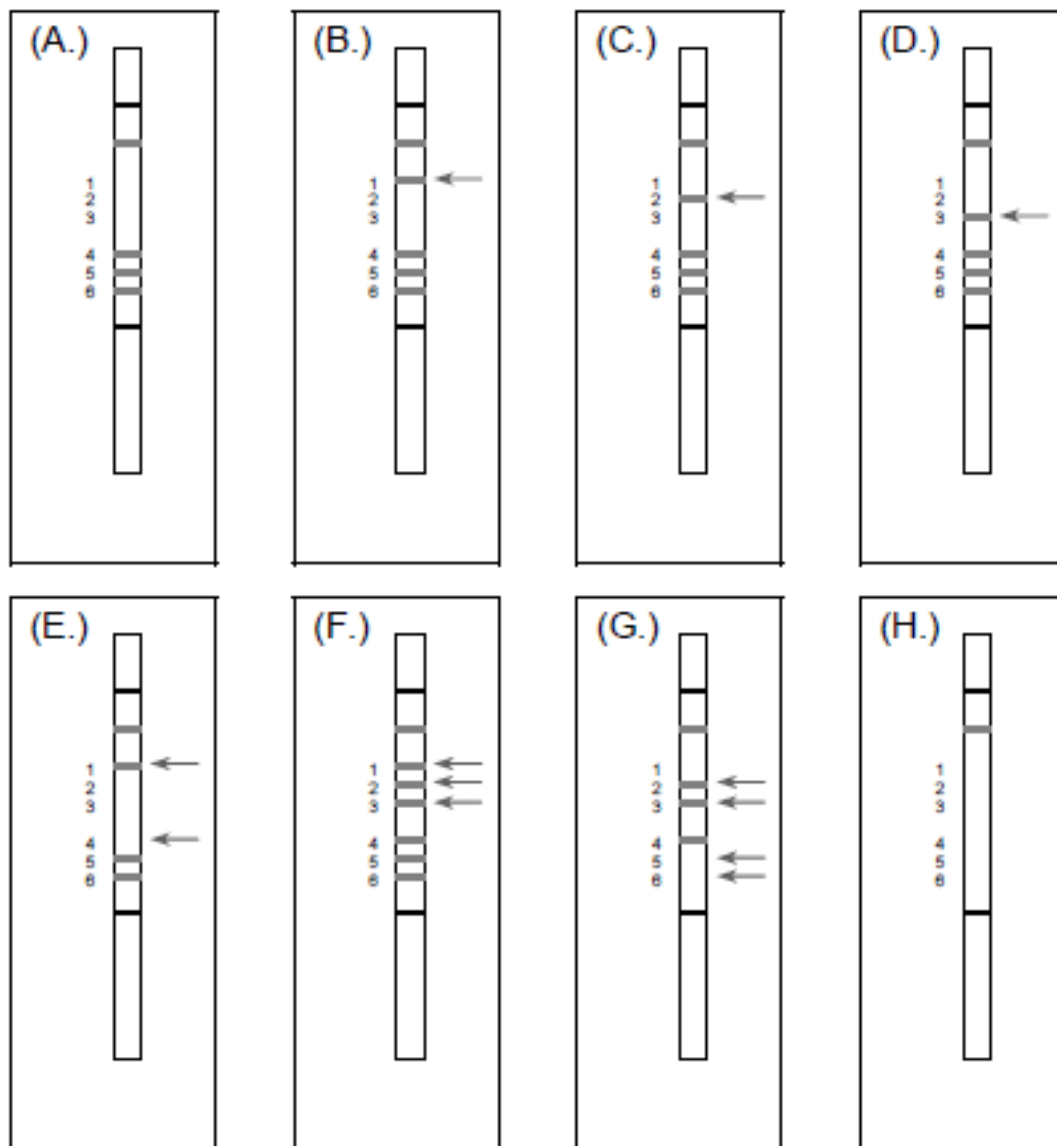


	wild type line	mutant line	genotype
NOR	positive	negative	normal
HET	positive	positive	heterozygous
HOM	negative	positive	homozygous mutant

- TPMT alely *1 (wild type), *2, *3A, *3B, *3C a jejich homozygotní a heterozygotní genotypy (*1/*1, *1/*2, atd.) jsou vyjádřeny sondami pro mutace 238 G>C a 460 G>A a 719 A>G..
- Pozn. Intenzita proužku se může lišit. Intenzita nemá žádný význam pro výsledek.



Příklad výsledků:



- (A.) TPMT *1/*1
- (B.) TPMT *1/*2
- (C.) TPMT *1/*3B
- (D.) TPMT *1/*3C
- (E.) TPMT *2/*2
- (F.) TPMT *2/*3A
- (G.) TPMT *3A/*3A
- (H.) negative control or PCR failure