

FMF-SAA1 StripAssay[®]

Kat. číslo 4-390



20 testů



2-8°C



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	Warning
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	
13.	Instructions For Use	1	
14.	Collector™ Sheet	1	

ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

Fax: (+43-1) 8120156-19

info@viennalab.com

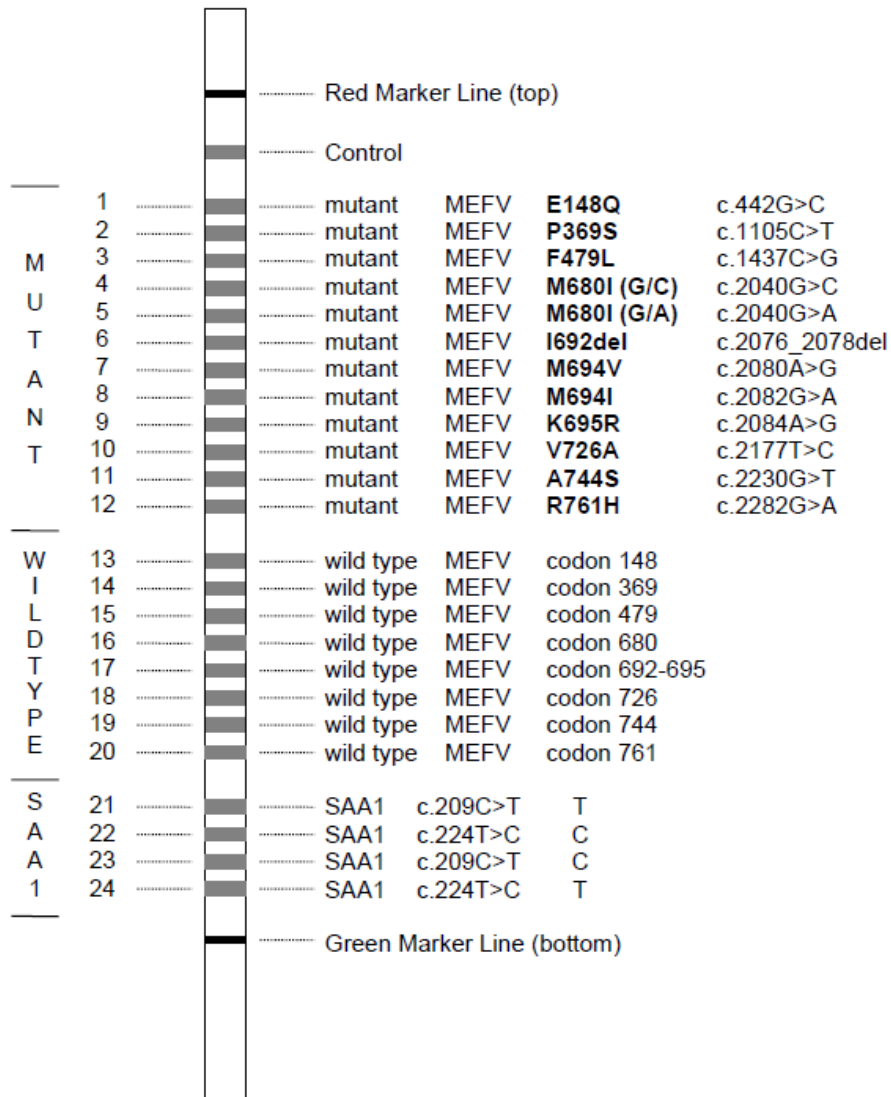


ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com

Popis stripu

Ref.Seq. NM_000243.2 (MEFV)
Ref.Seq. NM_000331.4 (SAA1)



Obr. 1: Testovací proužek

Pozn: Testovací proužek není nakreslen ve skutečné velikosti a nesmí být použit pro interpretaci výsledků!

Pracovní postup

Účel použití

Test pro identifikaci mutací genu MEFV a SAA1 založených na polymerázové řetězové reakci (PCR) a reverzní hybridizaci. Pro diagnostiku in vitro u člověka.

Metodika

Postup zahrnuje tři kroky: (1) izolace DNA, (2) PCR amplifikace s použitím biotinylovaných primerů, (3) hybridizace produktů amplifikace na testovací proužek obsahující alely specifické oligonukleotidové sondy imobilizované jako paralelní linie (obr. 1). Navázané biotinylované sekvence se detekují pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevných substrátů.

Test zahrnuje 12 mutací v genu MEFV: E148Q, P369S, F479L, M680I (G / C), M680I (G / A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H a 2 polymorfní lokusy v Gen SAA1: 209 C> T, 244 T> C.

Další genetické informace jsou k dispozici na OMIM Online Mendelian Inheritance in Man: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Složky kitu

Seznam všech součástí soupravy na straně I.

DNAT obsahuje 1,6% NaOH.



Varování

H315: Dráždí kůži

H319: Způsobuje vážné podráždění očí

P280: Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít

P337 + P313: Pokud podráždění očí přetrvává: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření

Amplification Mix, Taq Dilution Buffer, Conjugate solution, Wash Buffer B obsahují

0,05% NaN₃. Conjugate solution obsahuje streptavidin-alkalickou fosfatázu. Color

Developer obsahuje tetrazolium (NBT) a 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP).

Pokud se nepoužívají, skladujte všechna činidla při 2-8 ° C!

Potřebný materiál, který není součástí kitu

Kromě standardního vybavení molekulárně biologické laboratoře je třeba:

- *Nastavitelná mikrocentrifuga schopná 3000 - 12 000 ot / min (1 000 - 12 000 x g)*
- *Inkubátor (např. vyhřívaný blok, vodní lázeň) schopný 56 ° C a 98 ° C (± 2 ° C)*
- *Thermocycler a vhodné tenkostěnné plastové zkumavky / stripy*
- *Taq DNA polymeráza (ViennaLab TAQ-500 / TAQ-2500)*
- *Vodní lázeň s protřepávací plošinou a nastavitelnou teplotou (45 ° C \pm 0,5 ° C)*
- *Vakuové odsávací zařízení*
- *Třepačka (rocker nebo orbitální třepačka)*
- *Volitelné: elektroforéza na agarózovém gelu (pro kontrolu produktů amplifikace)*

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 použita DNA izolovaná protokolem uvedeným výše (odstavec Izolace DNA), doporučujeme použít koncentraci DNA v rozmezí 2-20 ng/μl (= 10-100 ng DNA na reakci).

- 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 206, 236, 269, 318, 402 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). 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 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 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 **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.

Vyhodnocení

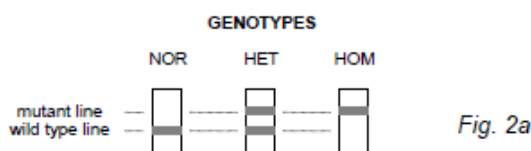
Genotyp vzorku je stanoven pomocí přiloženého Collector™ sheetu.

Umístěte zpracovaný testovací proužek do jednoho z označených polí, zarovnejte jej se schematickým výkresem pomocí červené značky (horní) a zelené značky (dole) a připevněte jej lepicí páskou.

Pozitivní reakce nejvyšší kontrolní linie naznačuje správnou funkci Conjugate solution a Color developeru. Tato linie by měla být vždy pozitivní.

Pro každou polymorfní polohu by měl být získán jeden z následujících vzorů obarvení:

Poznámka: Intenzita barvení pozitivních linií se může lišit. To nemá pro výsledek žádný význam.



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

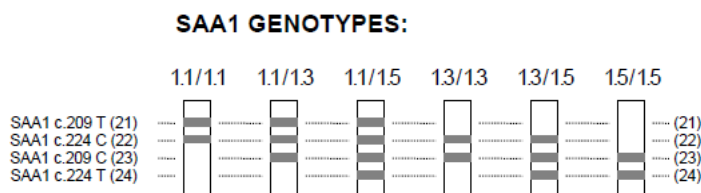
Některé z mutací pokrytých FMF-SAA1 StripAssay® jsou umístěny v několika nukleotidech na genu MEFV. Na testovacích proužcích jsou reprezentovány společnou wild type sondou, takže 12 mutací je pokryto pouze 8 wild type sondami.

line	wild type probe	mutation
13	codon 148	E148Q
14	codon 369	P369S
15	codon 479	F479L
16	codon 680	M680I (G/C), M680I (G/A)
17	codon 692-695	I692del, M694V, M694I, K695R
18	codon 726	V726A
19	codon 744	A744S
20	codon 761	R761H

Vzorky, které jsou heterozygotní pro dvě z těchto mutací (např. M694V + M694I, M694V + K695R), postrádají wild type signál (viz příklady I a J).

Pro tři izofomy SAA1 1.1, 1.3 a 1.5 se získají následující vzory barvení obr.2:

1.1 (52: Val, 57: Ala)	lines (21) + (22)
1.3 (52: Ala, 57: Ala)	lines (22) + (23)
1.5 (52: Ala, 57: Val)	lines (23) + (24)



Výsledkem šesti možných homozygotních a heterozygotních genotypů SAA1 (1.1 / 1.1, 1.1 / 1.3, 1.1 / 1.5, 1.3 / 1.3, 1.3 / 1.5, 1.5 / 1.5) bude kombinace příslušných jednotlivých izoforem (obr.2).

Příklady výsledků StripAssay níže (obr. 3).

Poradenství při řešení problémů lze získat kontaktováním ViennaLab prostřednictvím místního distributora nebo přímo na techhelp@viennalab.com.

Zhodnocení kvality

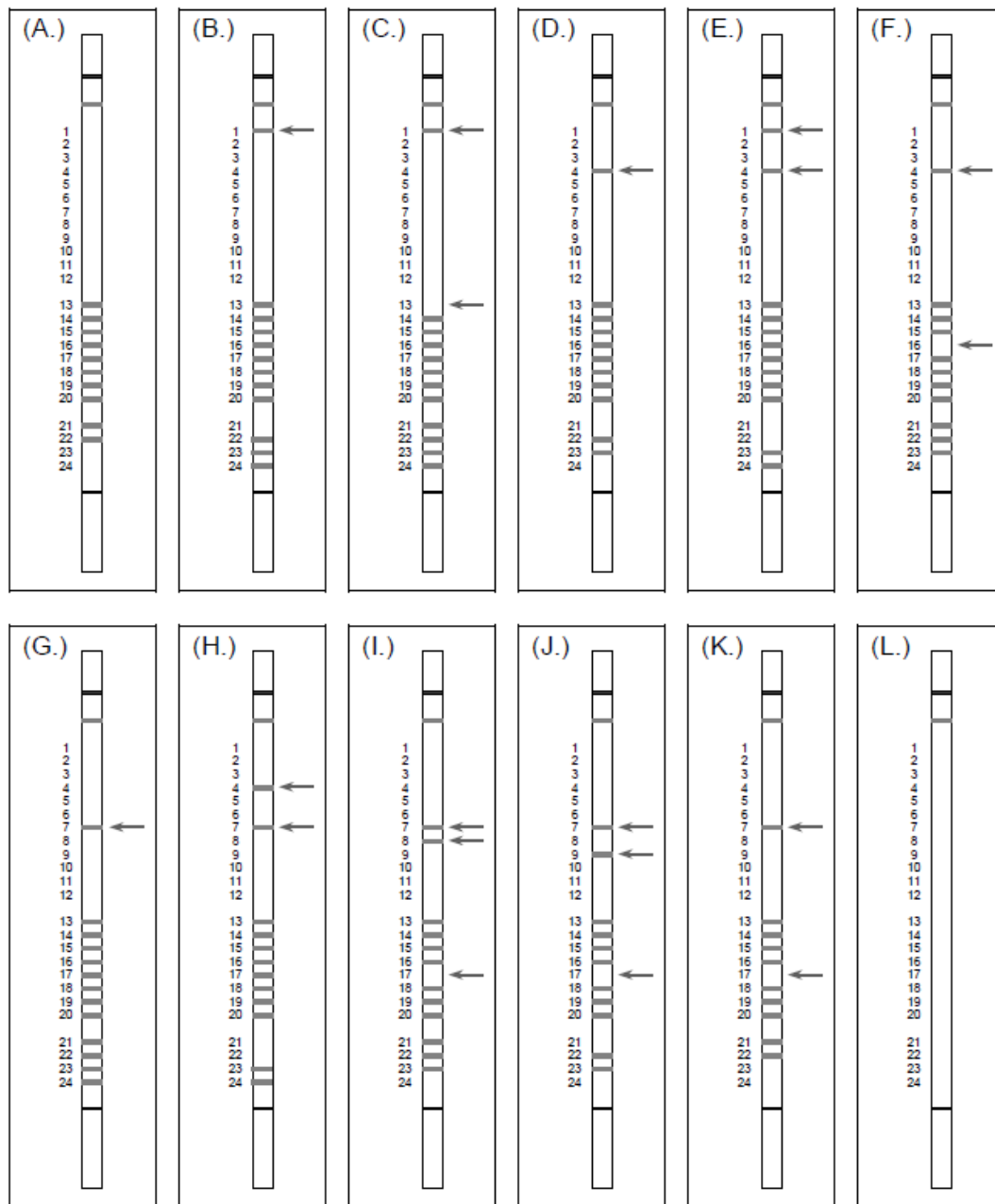
- Důkladné porozumění zde popsanému postupu a přesné laboratorní vybavení a techniky jsou nutné k získání spolehlivých výsledků. Používání StripAssay pro diagnostiku in vitro u člověka musí být omezeno na vhodně vyškolený personál.
- Nepoužívejte komponenty StripAssay po uplynutí doby použitelnosti vyznačené na vnější straně krabičky soupravy. Nemíchejte činidla z různých šarží.
- Vyvarujte se mikrobiální kontaminace a křížové kontaminace činidel nebo vzorků pomocí sterilních jednorázových pipetovacích špiček. Neměňte uzávěry lahví.
- Kontrolní linie imobilizovaná na každém testovacím proužku umožňuje kontrolu chromogenního detekčního systému. Pro sledování a ověření specifčnosti hybridizačních a promývacích kroků by měly být do každého jednotlivého experimentu zahrnuty kontrolní DNA známého genotypu.

BEZPEČNOST

- Na určených pracovních místech nepijte, nejezte, nekuřte ani neaplikujte kosmetiku. Při manipulaci se vzorky a reagensy soupravy používejte laboratorní pláště a jednorázové rukavice. Poté si důkladně umyjte ruce.
- Zacházejte se vzorky, jako by byly schopné přenášet infekční agens. Důkladně očistěte a dezinfikujte všechny materiály a povrchy, které byly ve styku se vzorky. Zlikvidujte veškerý odpad spojený s klinickými vzorky v nádobě na biologický odpad.

- Vyvarujte se kontaktu DNAT s kůží, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě je omyjte velkým množstvím vody. Pokud dojde k rozlití, zředte jej vodou před setřením.
- Dodržujte všechny místní a federální bezpečnostní a environmentální předpisy, které mohou platit.

Příklady výsledků:



- (A.) MEFV: normální / SAA1: 1.1/1.1
 (B.) MEFV: E148Q heterozygot / SAA1: 1.3/1.5
 (C.) MEFV: E148Q homozygot / SAA1: 1.1/1.5
 (D.) MEFV: M680I (G/C) heterozygot / SAA1: 41.3/1.3
 (E.) MEFV: E148Q-M680I heterozygot / SAA1: 1.5/1.5
 (F.) MEFV: M680I (G/C) homozygot / SAA1: 1.1./1.3
 (G.) MEFV: M694V heterozygot / SAA1: 1.1/1.5
 (H.) MEFV: M680I (G/C) – M694V heterozygot / SAA1: 1.5/1.5
 (I.) MEFV: M694V - M694I heterozygot / SAA1: 1.1/1.3
 (J.) MEFV: M694V - K695R heterozygot / SAA1: 1.3/1.3
 (K.) MEFV: M694V homozygot / SAA1: 1.1/1.1
 (L.) MEFV: negativní kontrola nebo selhání PCR

REF

4-230	FMF StripAssay®	20 tests
4-390	FMF-SAA1 StripAssay®	20 tests
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 tests
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 tests
TAQ-500	Taq DNA Polymerase	500 units
TAQ-2500	Taq DNA Polymerase	5x 500 units
2-014	GEN ^X TRACT™ Blood DNA Extraction System	100 extractions
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extractions
6-080	Typing Trays	5