

CF StripAssay[®]

Kat. číslo 4-410



10 testů



2-8°C



1. Lysis Solution	50 ml
2. GEN ^x TRACT Resin	5 ml
<i>Promíchejte před každým použitím aliquotu</i>	
3a. Amplifiacion Mix A1 (žluté víčko)	250 µl
3b. Amplifiacion Mix B (zelené víčko)	250 µl
4. Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl
5. HS Taq DNA Polymerase (5U/µl) (červené víčko)	125 U
6. DNAT (modré víčko)	1,5 ml
	Varování
7. Typing Trays	3
8a. Teststrips A (černé víčko)	10
8b. Teststrips B (bílé víčko)	10
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



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com

Popis stripů:

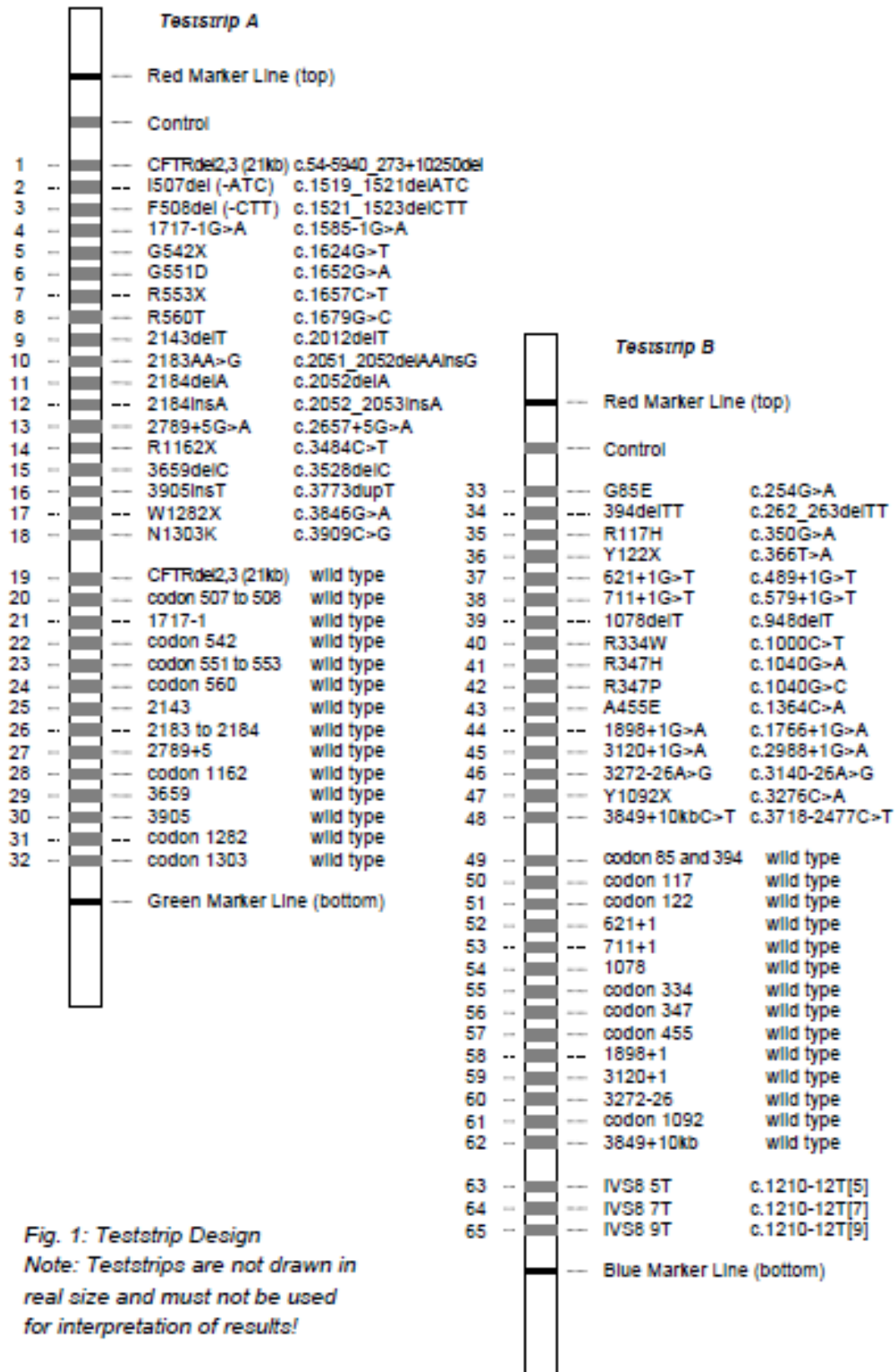


Fig. 1: Teststrip Design

Note: Teststrips are 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. 600 μl **Taq Dilution Buffer** přidejte do zkumavky s **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 A (žluté víčko)	15 μl Amplification Mix B (zelené víčko)
5 μl naředěné Taq DNA Polymerase (tj.1U)	5 μl naředěné Taq DNA Polymerase (1U)
5 μl vyizolované DNA	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/3 min**

PCR: **94°C/15 s – 60°C/45 s – 72°C/1min (35 cyklů)**

konečná syntéza: **72°C/3 min**

- Pevně uzavřete zkumavky.
- Vložte reakční zkumavky do předehřátého cyklieru a spusťte příslušný program.

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

472, 345, 315, 278, 257, 236 and/or 213, 194, 165 bp (amplification product A)

386, 350, 322, 297, 248, 225, 200, 172, 155 bp (amplification product B)

2. Hybridizace – 2 stripy na vzorek(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 odsávačkou.
Okamžitě pokračujte, nikdy během celé procedury nenechte proužek oschnout.

3. Promývání (45°C, třepaná lázeň)

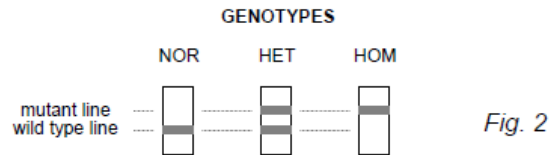
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předehřátý na 45°C). Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).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

5. Vyhodnocení

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



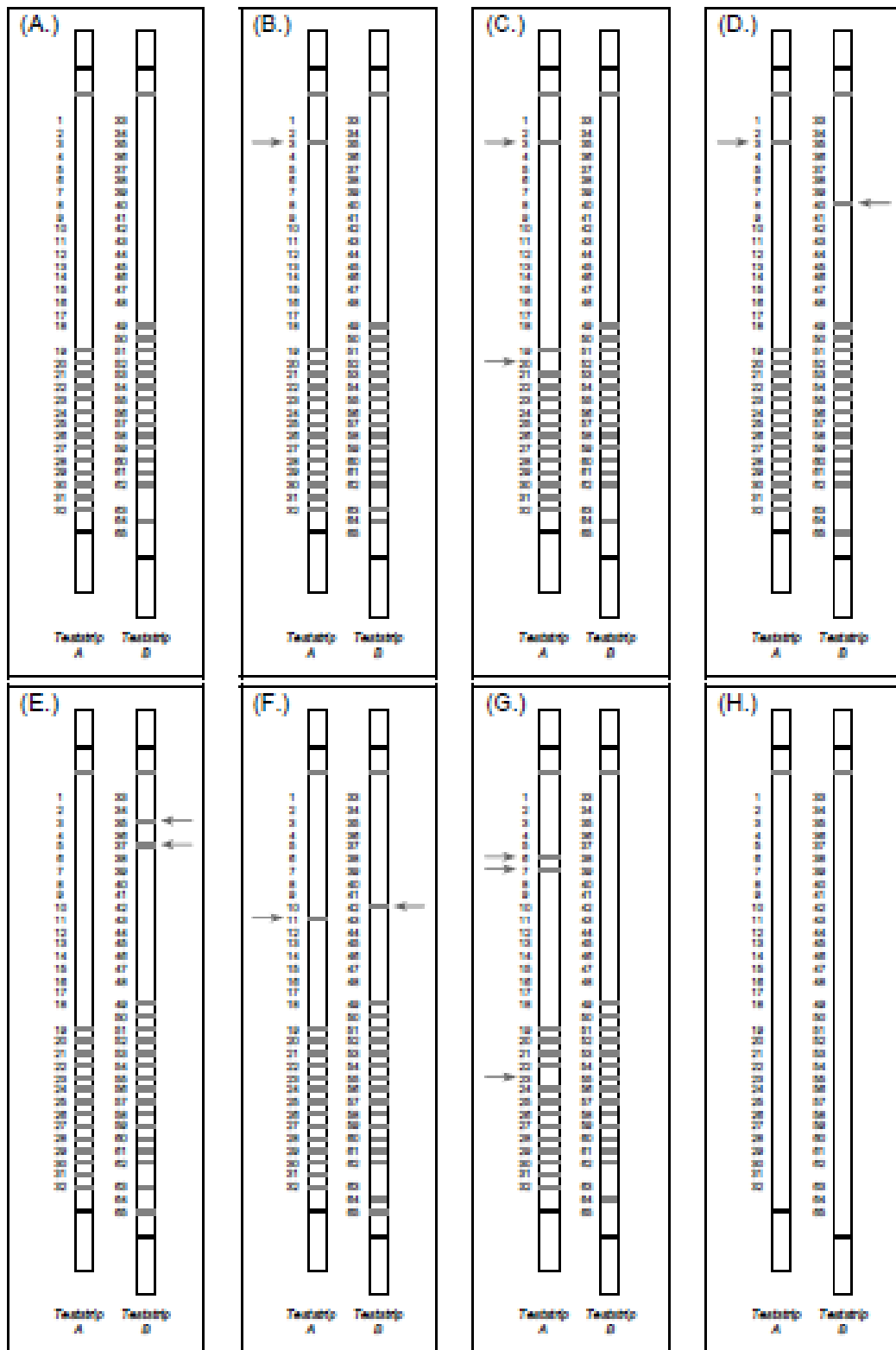
	wild type line	mutant line	genotype
NOR	positive	negative	normal
HET	positive	positive	heterozygous
HOM	negative	positive	homozygous mutant

- Některé mutace mají společný wild type proužek, takže 34 mutací má jen 28 wild type proužků. Vzorky, které jsou složenými heterozygoty pro mutace uvedené v tabulce (např. I507del + F508del, nebo G551D + R553X) budou postrádat wild type proužek. Tyto mutace jsou uvedeny v následující tabulce.

line	wild type probe	mutation
20	codon 507 to 508	I507del (-ATC), F508del (-CTT)
23	codon 551 to 553	G551D, R553X
26	2183 to 2184	2183AA>G, 2184delA, 2184insA
49	codon 85 and 394	G85E, 394delTT
56	codon 347	R347H, R347P

- Benigní varianty I506V, I507V a F508C neinterferují a výsledek bude vyhodnocen jako vzorek bez mutace v genu CFTR.

- Příklady výsledků:



- (A.) normal [7T/7T] (E.) R117H/621+1G>T compound heterozygous + 5T/9T
 (B.) F508del heterozygous [5T/7T] (F.) 2184delA/R347P compound heterozygous [7T/9T]
 (C.) F508del homozygous [7T/7T] (G.) G551D/R553X compound heterozygous [7T/7T]
 (D.) F508del/R334W compound heterozygous [9T/9T] (H.) negative control or PCR failure