

# Haemochromatosis StripAssay A<sup>®</sup>

Kat. číslo 4-220



20 testů



2-8°C



---

1. Lysis Solution	50 ml	
2. GEN <sup>x</sup> TRACT <sup>™</sup> Resin	5 ml	
<i>Ihned resuspendujte pokaždé před odebráním alikvotu</i>		
3. Amplification Mix (žluté víčko)	500 µl	
4. Taq Dilution Buffer (čiré víčko)	500 µl	
5. DNAT (modré víčko)	1,5 ml	Warning
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	Warning
13. Instructions For Use	1	
14. Collector <sup>™</sup> Sheet	1	

---

**ViennaLab Diagnostics GmbH**

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

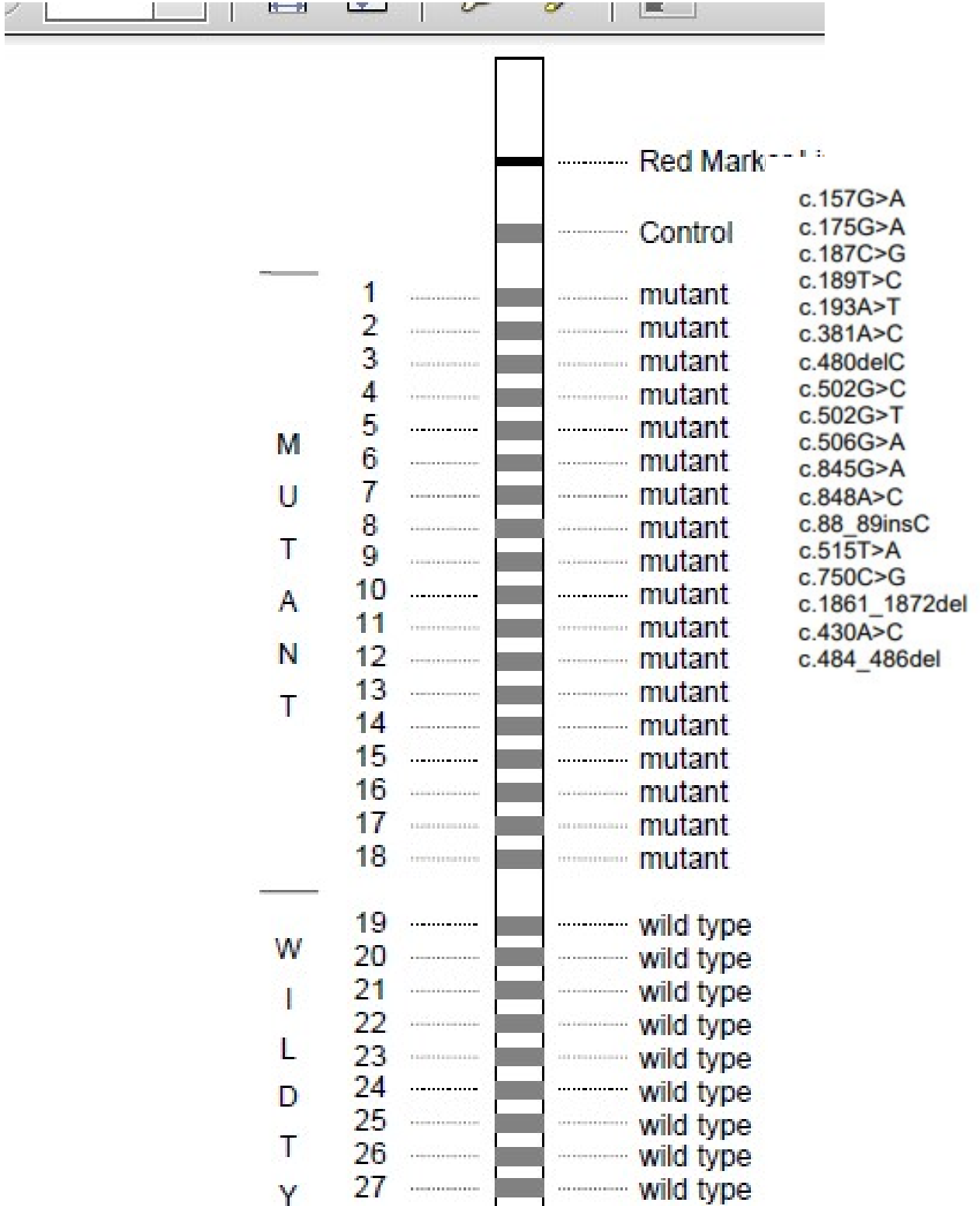
Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com



www.viennalab.com

# Popis stripu



## Pracovní postup

### Účel použití

*Test na identifikaci mutací genů HFE, TFR2 a FPN1 na základě polymerázové řetězové reakce (PCR) a reverzní hybridizace.*

### Izolace DNA

*Použijte čerstvou nebo zmraženou krev s EDTA nebo citrátem, jako antikoagulant, 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<sup>X</sup>TRACT 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<sup>X</sup>TRACT řádným protřepáním lahvičky.
- Přidejte **200 µl GEN<sup>X</sup>TRACTu** k peletu. Uzavřete zkumavku a vortexujte 10 s.  
➔ *Pryskyřice GEN<sup>X</sup>TRACT 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 cyklu 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 2-10 ng/μl (=10-50 ng DNA na reakci).*

*Program termocyklu:*

pre-PCR:	94°C / 2 min	
PCR:	94°C / 15 s	35x
	58°C / 30 s	
	72°C / 30s	
konečná syntéza:	72°C / 3 min	

- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocyklu na 94°C.
- Vložte zkumavky do předehřátého cyklu 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 118, 169, 183, 201, 247, 287, 310, 347 bp*

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

*Nastavte vodní hladinu zhruba do 1/2 výšky promývacího korýtko. 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 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 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 jej 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)

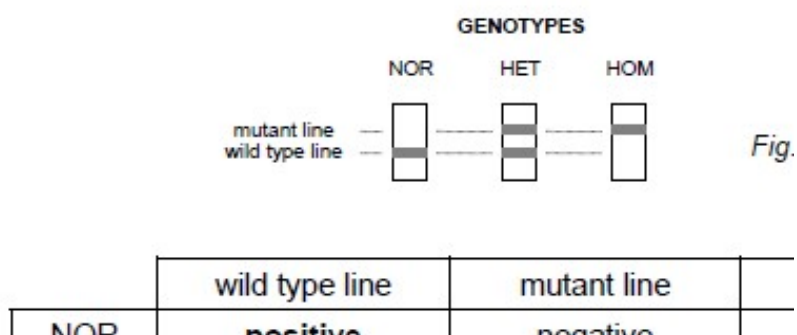
- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojové teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.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

## 5. Vyhodnocení

Genotyp vzorku je určen pomocí přiloženého listu Collector™. Umístěte zpracovaný testovací proužek do jednoho z určených polí a zarovnejte jej podle nakresleného schématu k červené značkovací lince (nahore) a zelené značkovací lince (dole) a zafixujte ji pomocí lepicí pásky.

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

*Note: Staining intensities of positive lines may vary. This is of no*

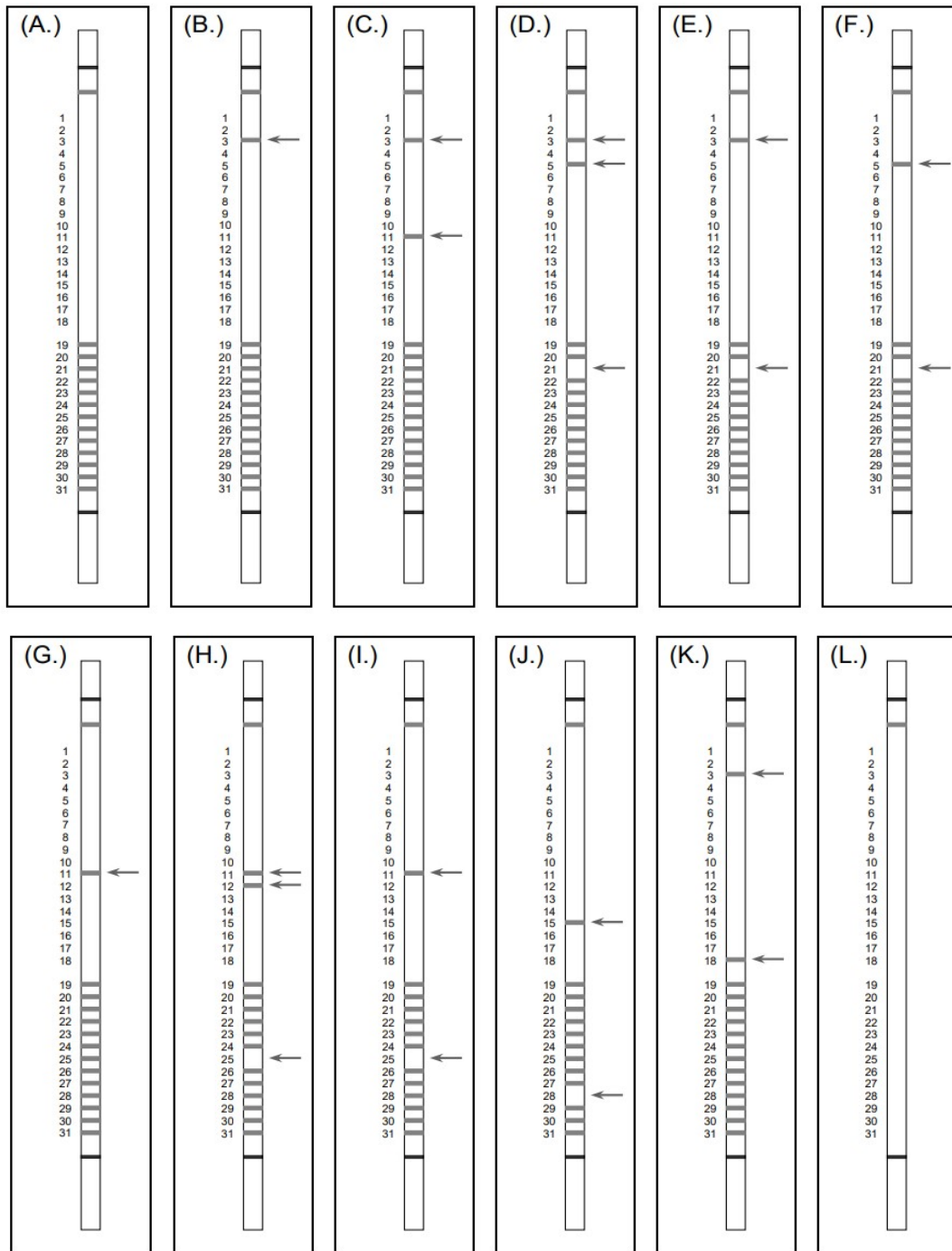


- Některé mutace mají společný wild type proužek, takže 18 mutací má jen 13 wild type proužků. Vzorky, které jsou složenými heterozygoty dvě uvedené mutace (např. H63D + S65C, C282Y + Q283P) budou postrádat wild type proužek (viz příklady D a H v tabulce na následující straně). Tyto mutace jsou uvedeny v následující tabulce.

Some of the mutations covered by the Haemochromatosis StripAssay A™ few nucleotides on their respective genes. On the Teststrips these are common wild type probe, so that the 18 mutations are covered by 13 wild ty

line	wild type probe	mutation
19	HFE: codon 53	HFE: V53M
20	HFE: codon 59	HFE: V59M
21	HFE: codon 63 to 65	HFE: H63D; H63H,
22	HFE: codon 127	HFE: Q127H
23	HFE: codon 160	HFE: P160del
24	HFE: codon 168 to 169	HFE: E168Q, E168X
25	HFE: codon 282 to 283	HFE: C282Y, Q2

Příklad výsledků:



- (A.) normal
- (B.) H63D heterozygous
- (C.) H63D + C282Y heterozygous
- (D.) H63D + S65C heterozygous
- (E.) H63D homozygous
- (F.) S65C homozygous

- (G.) C282Y heterozygous
- (H.) C282Y + Q283P heterozygous
- (I.) C282Y homozygous
- (J.) Y250X homozygous
- (K.) H63D + V162del heterozygous
- (L.) negative control or PCR failure