

β -Globin StripAssay[®]

Kat. číslo 4-130, 4-140, 4-150





20 testů



2-8°C



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

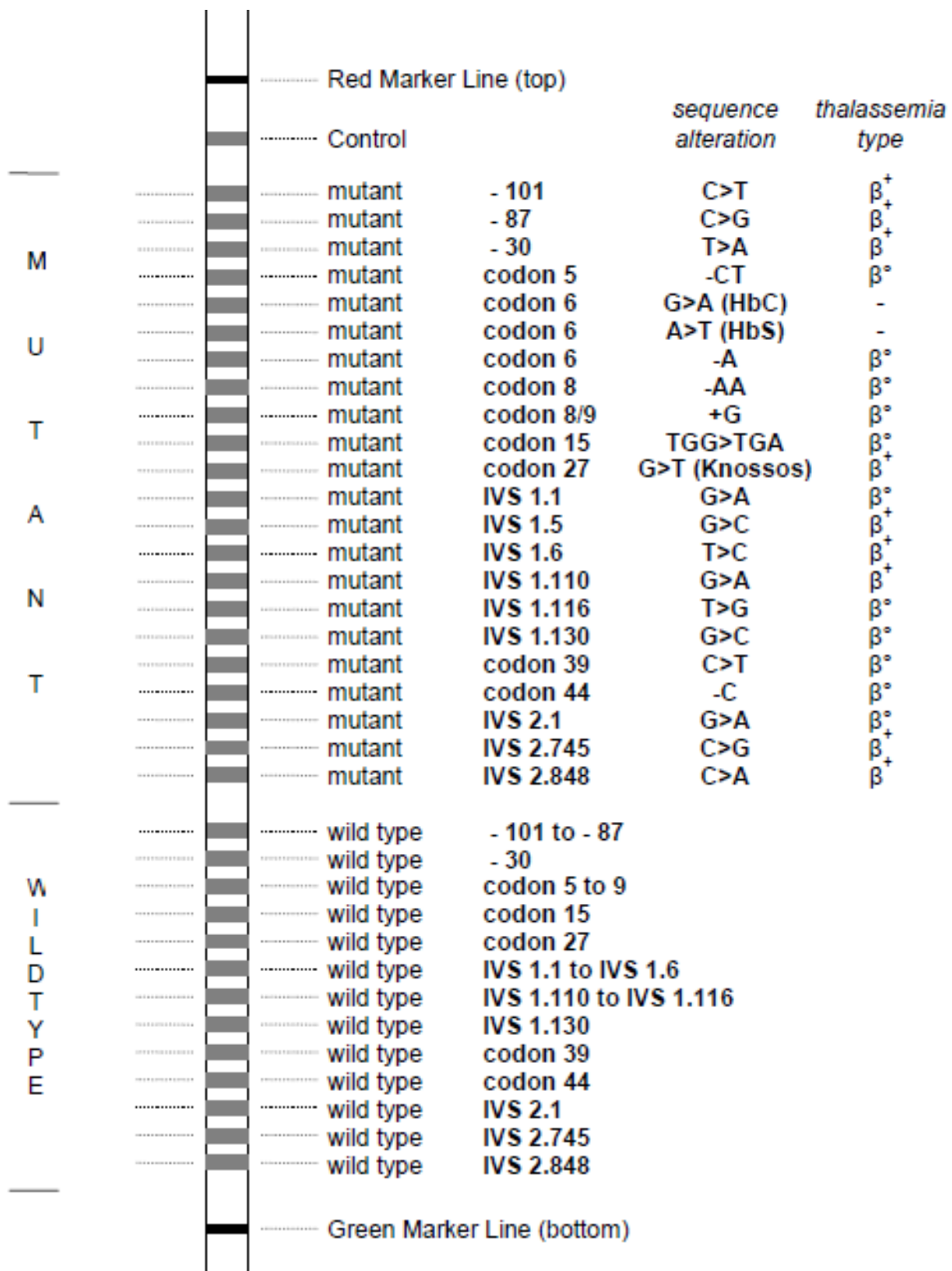
ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (-43-1) 8120156-0
Fax: (-43-1) 8120156-19
info@viennalab.com



ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

www.viennalab.com

Popis stripu 4-130:



Popis stripu 4-140:

			<i>sequence alteration</i>	<i>thalassemia type</i>	
	 Red Marker Line (top)			
	 Control			
M mutant	cap+1	β^+	
 mutant	codon 5	β^o	
 mutant	codon 6	-	
 mutant	codon 8	β^o	
 mutant	codon 8/9	β^o	
	U mutant	codon 15	β^o
	 mutant	codon 16	β^o
	T mutant	codon 22	β^o
	 mutant	codon 30	β^o
	A mutant	IVS 1.1	β^o
.....	 mutant	IVS 1.1	β^o	
N mutant	IVS 1.5	β^+	
 mutant	IVS 1.6	β^+	
T mutant	IVS 1.110	β^+	
 mutant	IVS 1-25	β^o	
T mutant	codon 36/37	β^o	
 mutant	codon 39	β^o	
T mutant	codon 41/42	β^o	
 mutant	codon 44	β^o	
T mutant	IVS 2.1	β^o	
 mutant	IVS 2.745	β^+	
T mutant	619bp del	β^o	
 mutant	619bp del	β^o	
W I L D T Y P E wild type	cap+1		
 wild type	codon 5 to 9		
 wild type	codon 15 to 16		
 wild type	codon 22		
 wild type	codon 30 to IVS 1.6		
 wild type	IVS 1.110 and IVS 1-25		
 wild type	codon 36 to 39		
 wild type	codon 41 to 44		
 wild type	IVS 2.1		
 wild type	IVS 2.745 and 619bp del		
	 Green Marker Line (bottom)			

Popis stripu 4-150:

			<i>sequence alteration</i>	<i>thalassemia type</i>	
		Red Marker Line (top)			
		Control			
M		mutant	- 31	β^+	
		mutant	- 29	β^+	
		mutant	- 28	β^+	
		mutant	cap+1	β^+	
		mutant	init codon	β^0	
	U		mutant	codon 8/9 +G	β^0
			mutant	codon 15 TGG>TAG	β^0
	T		mutant	codon 17 A>T	β^+
			mutant	codon 19 A>G (Malay)	β^+
	A		mutant	codon 26 G>A (HbE)	-
		mutant	codon 27/28 +C	β^0	
N		mutant	IVS 1.1 G>T	β^+	
		mutant	IVS 1.5 G>C	β^+	
T		mutant	codon 41/42 -TTCT	β^0	
		mutant	codon 43 G>T	β^0	
T		mutant	codon 71/72 +A	β^0	
		mutant	codon 89/90 -GT	β^0	
T		mutant	codon 90 G>T	β^0	
		mutant	codon 95 +A	β^0	
T		mutant	IVS 2.1 G>A	β^+	
		mutant	IVS 2.654 C>T	β^+	
T		mutant	codon 121 G>T	β^0	
		mutant			
W I L D T Y P E		wild type	- 31 to - 28		
		wild type	cap+1		
		wild type	initiation codon		
		wild type	codon 8/9		
		wild type	codon 15 to 19		
		wild type	codon 26 to 28		
		wild type	IVS 1.1 to IVS 1.5		
		wild type	codon 41 to 43		
		wild type	codon 71 to 72		
		wild type	codon 89 to 95		
	wild type	IVS 2.1			
	wild type	IVS 2.654			
	wild type	codon 121			
		Green Marker Line (bottom)			

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 .

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).
- Pro každý vzorek připravte na ledu výsledný PCR reakční mix:

15 μl Amplification Mix A (žluté víčko)
5 μl naředěné Taq DNA Polymerase (tj.1U)
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 termocyklu:

pre-PCR: **94°C/2 min**

PCR: **94°C/15 s – 58°C/30 s – 72°C/45 s (35 cyklů)**

konečná syntéza: **72°C/3 min**

- Pevně uzavřete zkumavky.
- Vložte reakční 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:

4-130: 310, 381, 755 bp.

4-140: 310, 381, 755 bp.

4-150: 310, 381, 755 bp.

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 ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). 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 **20 μl DNAT pro TESTSTRIPY A1 a A2** a **10 μl DNAT pro TESTSTRIP B** (modré víčko). Jeden sloupec pro každý vzorek.

- Přidejte **10 µl PCR produktů A1, A2 10 µl DNAT pro TESTSTRIP B** (jedno korýtko) a **B** (druhé korýtko) 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 A do příslušného sloupce korýtko 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)

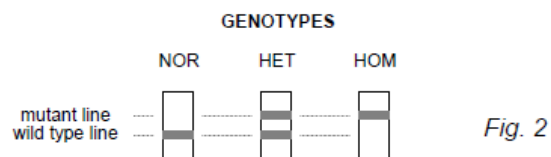
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (předehřátý na 45°C). Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubujte **15 min** při **45°C** v třepané lázni.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution A** (45°C).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

- 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:
- Kit 4-130 detekuje 22 mutací, ale má jen 13 wild type proužků.

line	wild type probe	mutation
23	- 101 to - 87	- 101, - 87
24	- 30	- 30
25	codon 5 to 9	codon 5, HbC, HbS, codon 6, codon 8, codon 8/9
26	codon 15	codon 15
27	codon 27	codon 27
28	IVS 1.1 to IVS 1.6	IVS 1.1, IVS 1.5, IVS 1.6
29	IVS 1.110 to IVS 1.116	IVS 1.110, IVS 1.116
30	IVS 1.130	IVS 1.130
31	codon 39	codon 39
32	codon 44	codon 44
33	IVS 2.1	IVS 2.1
34	IVS 2.745	IVS 2.745
35	IVS 2.848	IVS 2.848

- Kit 4-140 detekuje 22 mutací, ale má jen 13 wild type proužků.

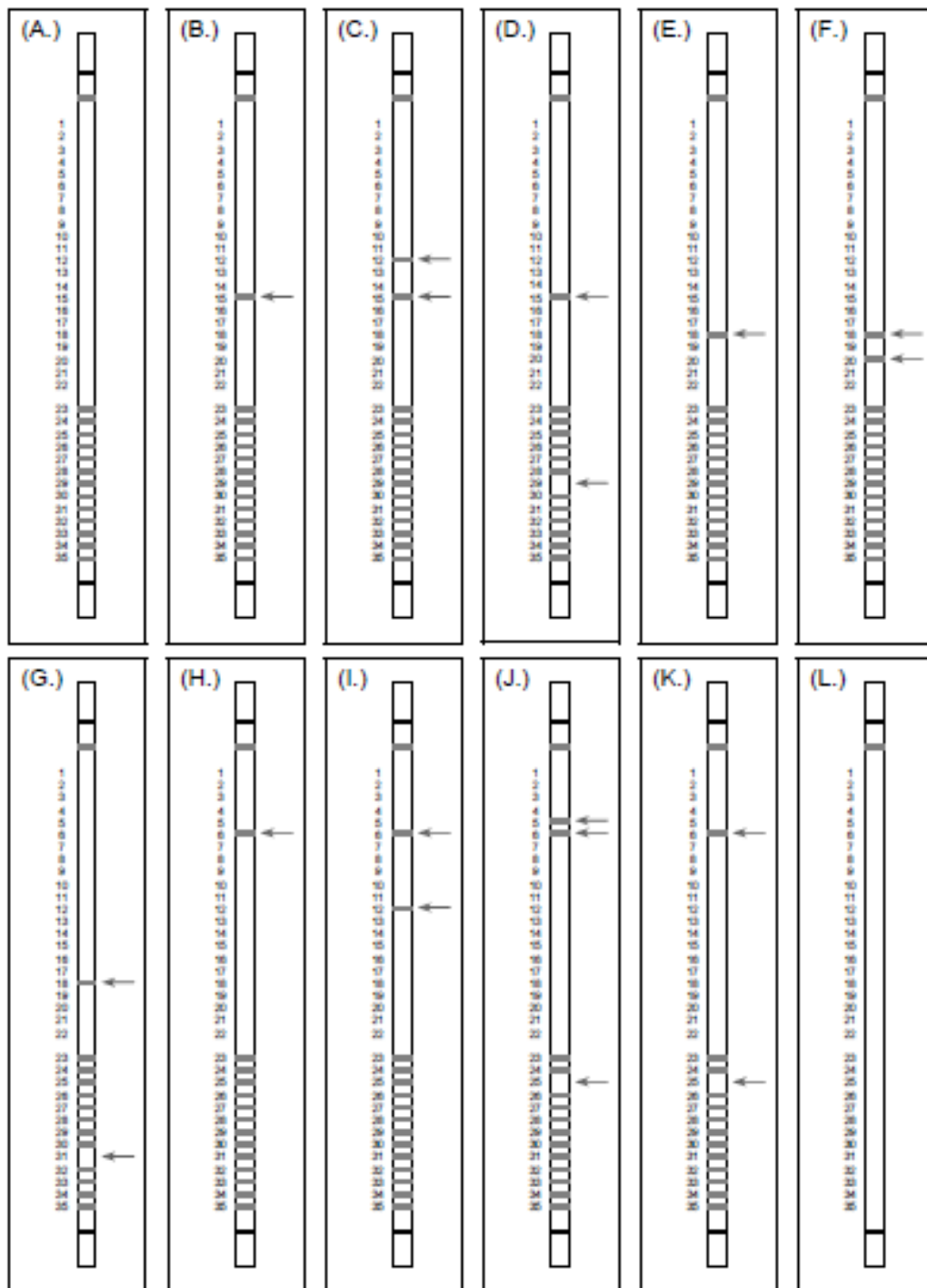
line	wild type probe	mutation
23	cap+1	cap+1
24	codon 5 to 9	codon 5, HbS, codon 8, codon 8/9
25	codon 15 to 16	codon 15, codon 16
26	codon 22	codon 22
27	codon 30 to IVS 1.6	codon 30, IVS 1.1, IVS 1.5, IVS 1.6
28	IVS 1.110 and IVS 1-25	IVS 1.110, IVS 1-25
29	codon 36 to 39	codon 36/37, codon 39
30	codon 41 to 44	codon 41/42, codon 44
31	IVS 2.1	IVS 2.1
32	IVS 2.745 and 619bp del	IVS 2.745, 619bp del

- Kit 4-150 detekuje 22 mutací, ale má jen 13 wild type proužků.

line	wild type probe	mutation
23	- 31 to - 28	- 31, - 29, - 28
24	cap+1	cap+1
25	initiation codon	initiation codon
26	codon 8/9	codon 8/9
27	codon 15 to 19	codon 15, codon 17, codon 19
28	codon 26 to 28	HbE, codon 27/28
29	IVS 1.1 to IVS 1.5	IVS 1.1, IVS 1.5
30	codon 41 to 43	codon 41/42, codon 43
31	codon 71 to 72	codon 71/72
32	codon 89 to 95	codon 89/90, codon 90, codon 95
33	IVS 2.1	IVS 2.1
34	IVS 2.654	IVS 2.654
35	codon 121	codon 121

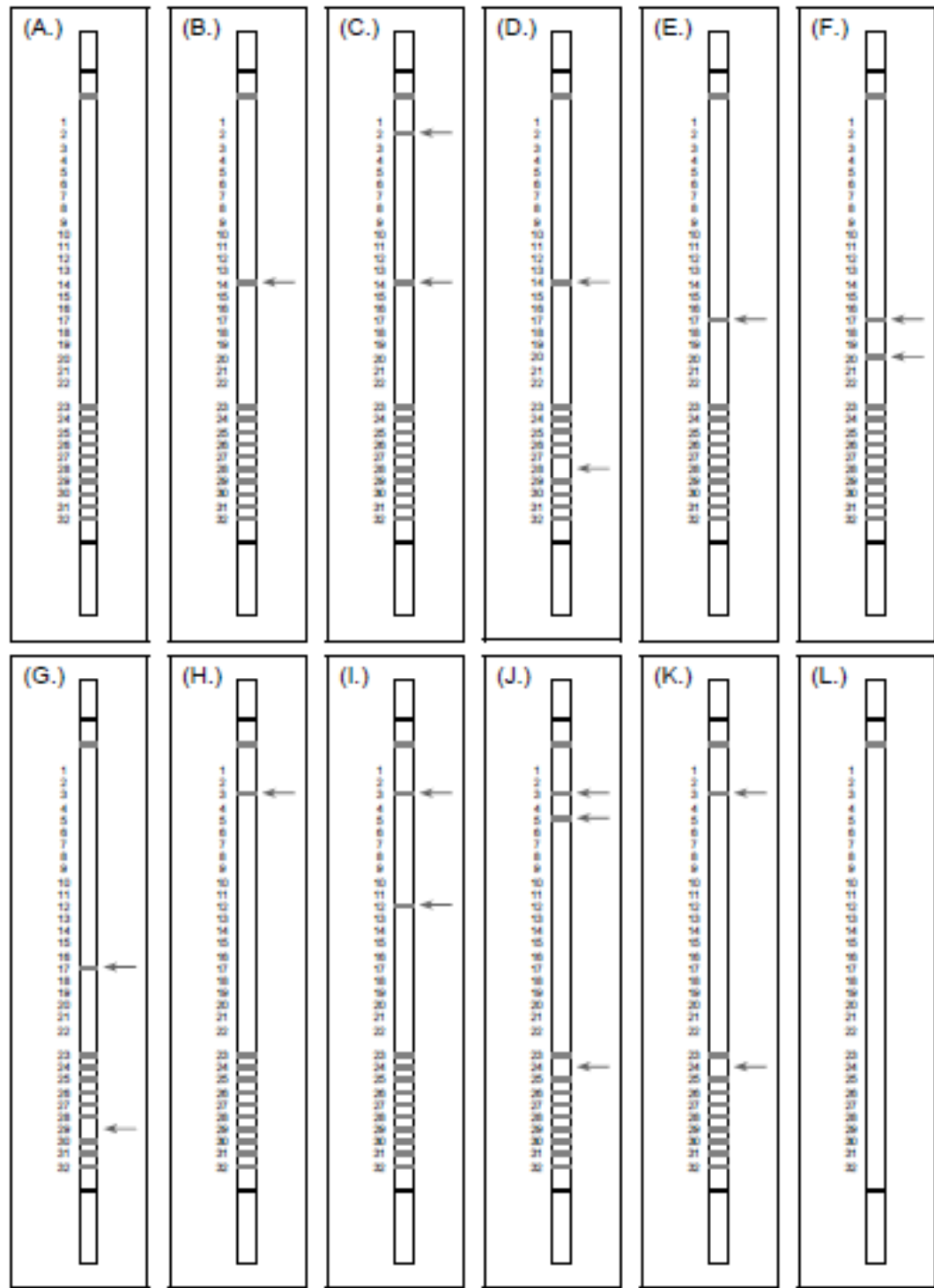
- Vzoroky, které jsou složenými heterozygoty pro dvě mutace budou postrádat wild type proužek.

- Příklady výsledků 4-130:



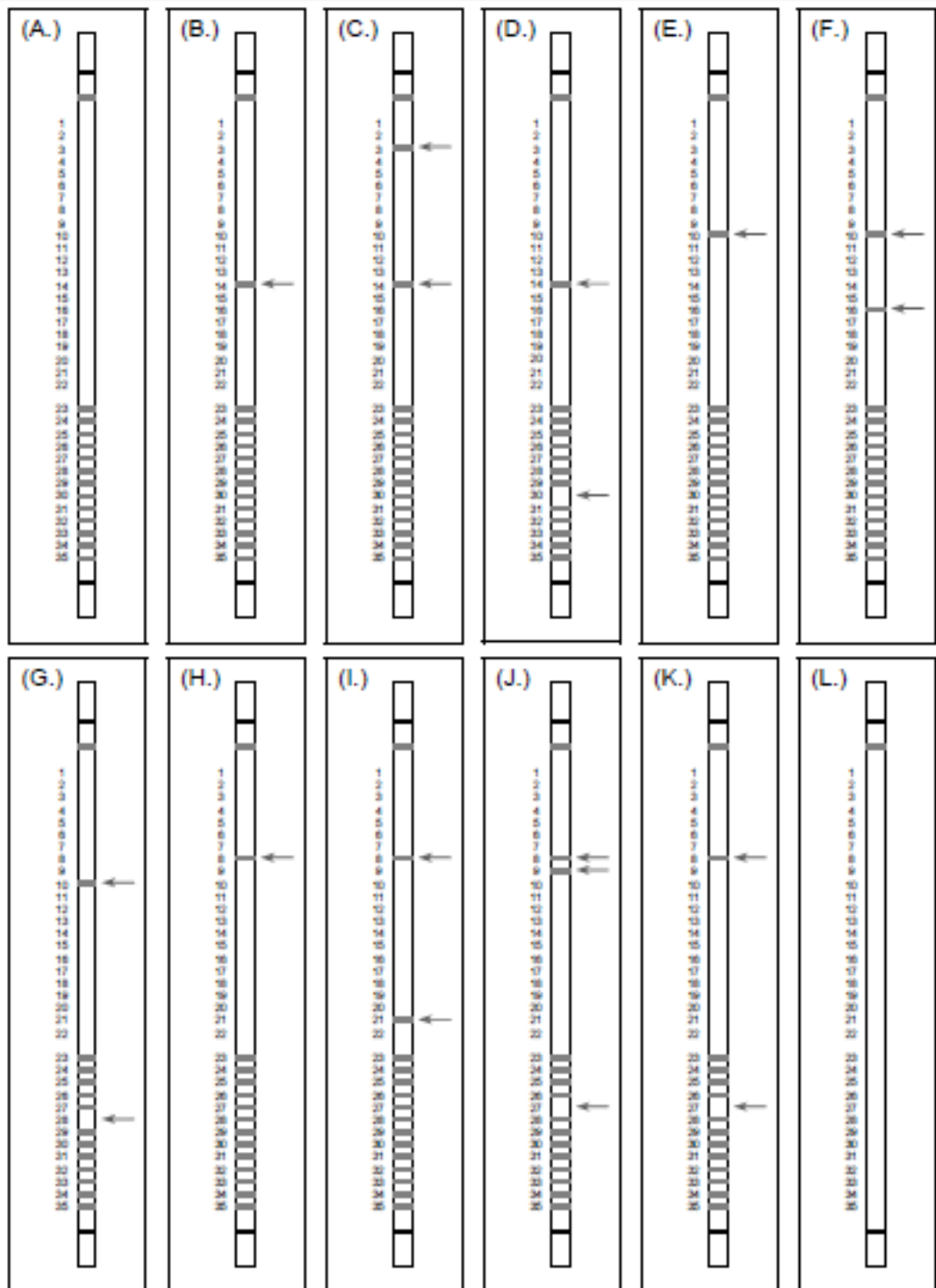
- | | |
|--|--|
| (A.) normal | (G.) cd 39 homozygous |
| (B.) IVS 1.110 heterozygous | (H.) HbS heterozygous |
| (C.) IVS 1.1 - IVS 1.110 compound heterozygous | (I.) HbS - IVS 1.1 compound heterozygous |
| (D.) IVS 1.110 homozygous | (J.) HbC - HbS compound heterozygous |
| (E.) cd 39 heterozygous | (K.) HbS homozygous |
| (F.) cd 39 - IVS 2.1 compound heterozygous | (L.) negative control or PCR failure |

- Příklady výsledků 4-140:



- | | |
|---|--|
| (A.) normal | (G.) cd 39 homozygous |
| (B.) IVS 1.110 heterozygous | (H.) HbS heterozygous |
| (C.) cd 5 - IVS 1.110 compound heterozygous | (I.) HbS - IVS 1.5 compound heterozygous |
| (D.) IVS 1.110 homozygous | (J.) HbS - cd 8/9 compound heterozygous |
| (E.) cd 39 heterozygous | (K.) HbS homozygous |
| (F.) cd 39 - IVS 2.1 compound heterozygous | (L.) negative control or PCR failure |

- Příklady výsledků 4-150:



- | | |
|---|--|
| (A.) normal | (G.) HbE homozygous |
| (B.) cd 41/42 heterozygous | (H.) cd 17 heterozygous |
| (C.) -28 - cd 41/42 compound heterozygous | (I.) cd 17 - IVS 2.854 compound heterozygous |
| (D.) cd 41/42 homozygous | (J.) cd 17 - cd 19 compound heterozygous |
| (E.) HbE heterozygous | (K.) cd 17 homozygous |
| (F.) HbE - cd 71/72 compound heterozygous | (L.) negative control or PCR failure |