

NRAS XL StripAssay[®]

Kat. číslo 5-620



20 testů



2-8°C



1.	Amplification Mix (žluté víčko)	500 µl
2.	Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl
3.	HS Taq DNA Polymerase (5U/µl) (červené víčko)	75 U
4.	DNAT (modré víčko)	1,5 ml ⚠ Varování
5.	Typing Trays	3
6.	Teststrips	20
7.	Hybridization Buffer (bílé víčko)	25 ml
8.	Wash Solution A (bílé víčko)	80 ml
9.	Conjugate Solution	25 ml
10.	Wash Solution B	80 ml
11.	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:

		Red Marker Line (top)
		Control
1	NRAS	p.Gly12Ala c.35G>C
2	NRAS	p.Gly12Arg c.34G>C
3	NRAS	p.Gly12Asp c.35G>A
4	NRAS	p.Gly12Cys c.34G>T
5	NRAS	p.Gly12Ser c.34G>A
6	NRAS	p.Gly12Val c.35G>T
7	NRAS	p.Gly13Arg c.37G>C
8	NRAS	p.Gly13Asp c.38G>A
9	NRAS	p.Gly13Cys c.37G>T
10	NRAS	p.Gly13Val c.38G>T
11	NRAS	p.Ala59Asp c.176C>A
12	NRAS	p.Ala59Thr c.175G>A
13	NRAS	p.Gly60Arg c.178G>C
14	NRAS	p.Gly60Glu c.179G>A
15	NRAS	p.Gln61Arg c.182A>G
16	NRAS	p.Gln61Glu c.181C>G
17	NRAS	p.Gln61His c.183A>C
18	NRAS	p.Gln61His c.183A>T
19	NRAS	p.Gln61Leu c.182A>T
20	NRAS	p.Gln61Lys c.181C>A
21	NRAS	p.Gln61Pro c.182A>C
22	NRAS	p.Ala146Thr c.436G>A
23	NRAS 12/13 PCR Negative Control	
24	NRAS 59/60/61 PCR Negative Control	
25	NRAS 146 PCR Negative Control	
26	PCR Positive Control	
		Green Marker Line (bottom)

Pracovní postup

1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA musí být použita vhodná metoda vzhledem k typu tkáně vzorku. Pro doporučení vhodné metody kontaktujte ViennaLab, nebo distributora PentaGen, s.r.o.

DNA koncentraci upravte na 1-10 µg/ml.

DNA z formalin fixovaných preparátů (FFPE) nemohou být přesně kvantifikovány UV fotometrií! Je pro ně nutno použít fluorometrickou kvantifikaci, např. Invitrogen Qubit.

2. 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 (1:25, finální koncentrace 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. Předehejte termocykler na 37°C.
- Vložte reakční zkumavky do cyklu a spusťte příslušný program.
- U rychlých termocyklerů zpomalte rychlost vyhřívání na max. 2°C/s.
 - pre-PCR: 37°C /10 min
 - pre-PCR: 94°C /2 min
 - PCR: 94°C /1 min – 70°C /50 s – 56°C /50s - 60°C /1 min (35 cyklů)
 - konečná syntéza: 60°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 101, 128, 134, 204bp.

3. Hybridizace (45°C, třepaná vodní lázeň)

Nastavte vodní hladinu zhruba do ½ výšky promývacího korýtko. Vyhřejte lázeň přesně na 45°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). Inkubátor Biosan nastavte na 46°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 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.

4. Promývání (45°C, třepaná lázeň)

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

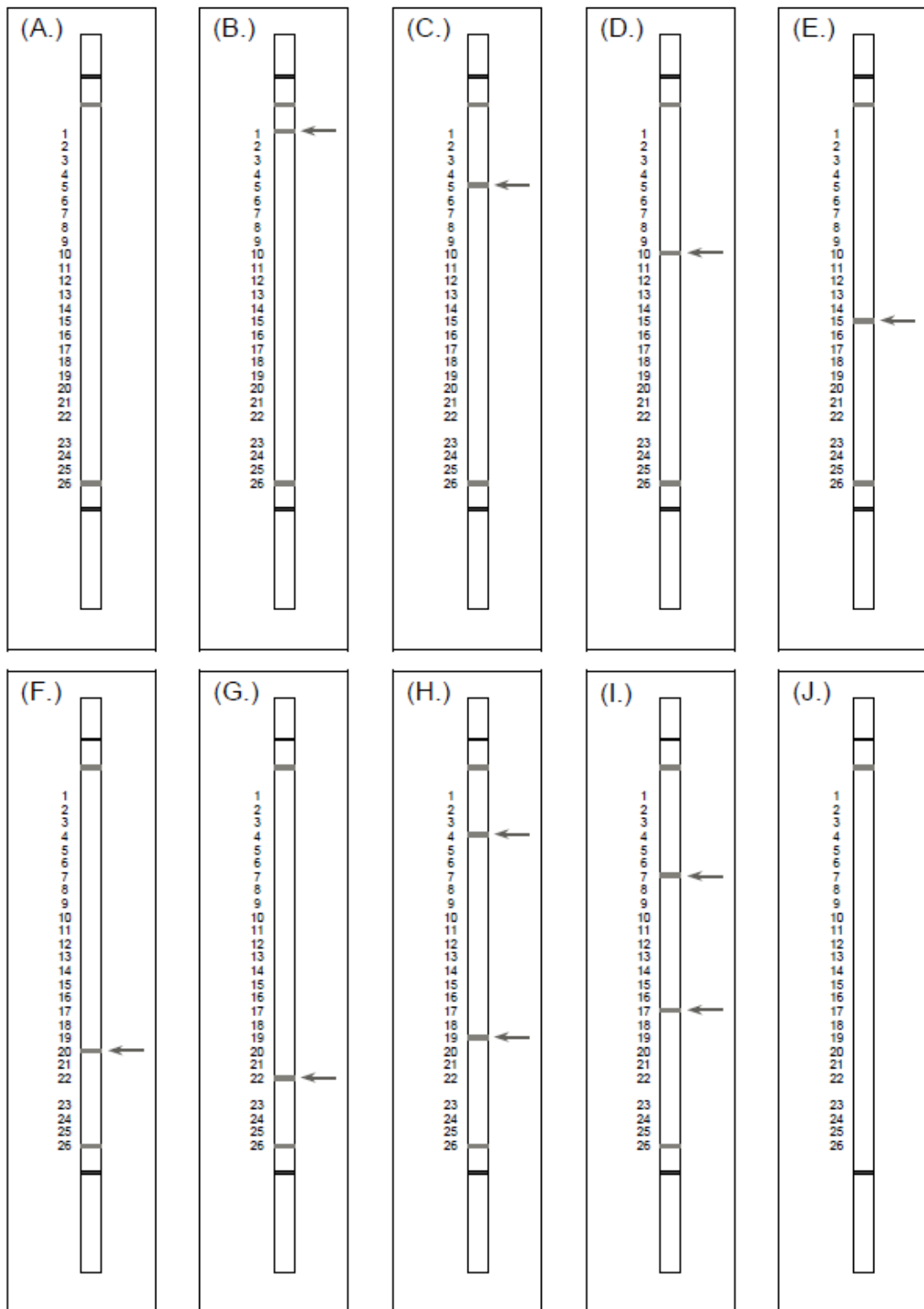
5. Barvení (pokojová teplota)

- 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.

Obsah soupravy:

1.	Amplification Mix (<i>yellow cap</i>)	500 µl	
2.	Taq Dilution Buffer (<i>transparent cap</i>)	500 µl	
3.	Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (<i>red cap</i>)	75 U	
4.	DNAT (<i>blue cap</i>)	1.5 ml	✘ R 36/38
5.	Typing Trays	3	
6.	Teststrips	20	
7.	Hybridization Buffer (<i>white cap</i>)	25 ml	
8.	Wash Solution A (<i>white cap</i>)	80 ml	
9.	Conjugate Solution	25 ml	
10.	Wash Solution B	80 ml	
11.	Color Developer	25 ml	

Možné výsledky:



(A.) Vzorek bez mutace NRAS

(B.) Vzorek s mutací NRAS cd 12Ala

(C.) Vzorek s mutací NRAS cd 12Ser

(D.) Vzorek s mutací NRAS cd 13Val

(E.) Vzorek s mutací NRAS cd 61Arg

(F.) Vzorek s mutací NRAS cd 61Lys

(G.) Vzorek s mutacemi NRAS cd 146Thr

(H.) Vzorek s mutacemi NRAS cd 12Cys + cd 61Leu

(I.) Vzorek s mutacemi NRAS cd 13Arg + cd 61His

(J.) Negativní kontrola nebo selhání analýzy

6. Vyhodnocení výsledků

Proužek u Control line v horní části stripu indikuje správnou funkčnost roztoků Conjugate a Color Developer, takže kontroluje správnost provedení hybridizace.

Proužek u PCR positive control indikuje přítomnost a kvalitu komponent PCR reakce a také kvalitu a přítomnost DNA. Pokud je PCR positive control negativní (bez proužku), zopakujte test včetně nové izolace DNA.

Nepřítomnost proužku u PCR negativní control indikuje úplné potlačení amplifikace wild type NRASu. Pokud je Negative control pozitivní (má proužek), tak to indikuje příliš velké množství DNA přidané do reakce, což snižuje sensitivitu reakce.

Interpretation of results:

NRAS (lines 1-22)	PCR Negative Control (lines 23-25)	PCR Positive Control (line 26)	Interpretation
one or more positive	negative	positive	respective NRAS mutation present
negative	negative	positive	none of the NRAS mutations present
any result	positive	positive	reduced sensitivity for mutant NRAS
negative	negative	negative	negative control or experimental failure

Pozn. Intenzita proužku může být různá u různých vzorků.