

# PGX-5FU XL StripAssay<sup>®</sup>

Kat. číslo 4-780



20 testů



2-8°C



---

<b>1. Lysis Solution</b>	50 ml	
<b>2. GEN<sup>x</sup>TRACT<sup>™</sup> Resin</b>	5 ml	
<i>Promýchejte pokaždé pokaždé <u>bezprostředně</u> před odebráním alikvotního podílu. ⚠</i>		
<b>3. Amplification Mix (žluté víčko)</b>	500 µl	
<b>4. Taq Dilution Buffer (čiré víčko)</b>	500 µl	
<b>5. Taq DNA Polymerase (5U/µl) (červené víčko)</b>	75 U	
<b>6. DNAT (modré víčko)</b>	1,5 ml	⚠ Varování
<b>7. Typing trays</b>	3	
<b>8. Testovací stripy</b>	20	
<b>9. Hybridization Buffer (bílé víčko)</b>	25 ml	
<b>10. Wash Solution A (bílé víčko)</b>	80 ml	
<b>11. Conjugate Solution</b>	25 ml	
<b>12. Wash Solution B</b>	80 ml	
<b>13. Color Developer</b>	25 ml	
<b>14. Manuál</b>	1	
<b>15. Collector<sup>™</sup> Sheet</b>	1	

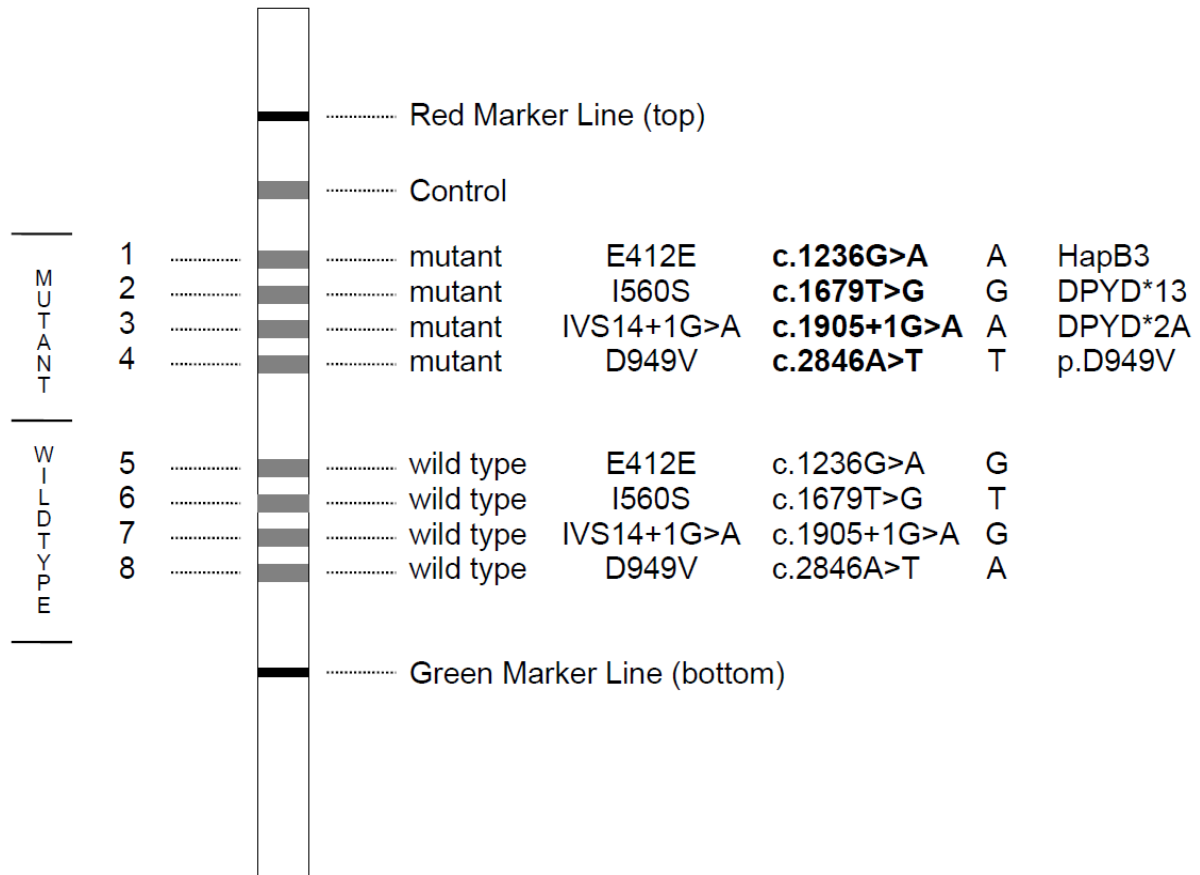
---

**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](http://www.viennalab.com)



Obr.1: Design testovacího stripu

Poznámka: Testovací strip není uveden v reálné velikosti a nesmí být použit pro interpretaci výsledků!

# Pracovní postup

## I. Účel použití

Test na identifikaci genotypů spojených s odpovědí na léčbu 5-fluorouracilem založený na polymerázové řetězové reakci (PCR) a reverzní hybridizaci. *Pro lidskou in vitro diagnostiku.*

## II. Metodologie

Postup zahrnuje tři kroky: (1) izolace DNA, (2) amplifikace PCR s použitím biotinylovaných primerů, (3) hybridizace amplifikačních produktů s testovacím stripem obsahujícím alelově specifické oligonukleotidové sondy imobilizované jako řada paralelních linií (obr. 1). Navázané biotinylované sekvence jsou detekovány pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevných substrátů.

Test zahrnuje 4 polymorfní lokusy v genu DPYD: c.1236G> A (HapB3), c.1679T> G (DPYD \* 13), c.1905 + 1G> A (DPYD \* 2A, IVS14 + 1G> A), c.2846A> T (str. D949V).

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

## III. Složení kitu

Viz list složení kitu na straně I.

DNAT obsahuje 1,6% NaOH.



Varování

H315: Způsobuje podráždění kůže

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

P280: Noste 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 Solution B obsahují 0.05% NaN<sub>3</sub>. Conjugate Solution obsahuje streptavidin-alkaline phosphatase. Color Developer obsahuje nitro blue tetrazolium (NBT) a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP).

***Skladujte všechny reagenty při 2-8°C pokud je nepoužíváte!***

## IV. Materiál, který je potřebný, ale není součástí kitu

Kromě standardního vybavení laboratoře pro molekulární biologii je zapotřebí:

- Nastavitelná mikrocetrifuga s 3 000–12 000 ot / min (1 000–12 000 x g)
- Inkubátor (např. vyhřívaný blok, vodní lázeň) s teplotou 56 ° C až 98 ° C (± 2 ° C)
- Termocykler a vhodné tenkostěnné plastové reakční zkumavky / stripy
- Vodní lázeň s třepací plošinou a nastavitelnou teplotou (45 ° C ± 0,5 ° C)
- Vakuové aspirační zařízení
- Třepačka (kolébková nebo orbitální třepačka)
- Volitelné: zařízení pro elektroforézu na agarózovém gelu (pro kontrolu produktů amplifikace)

## V. Postup

### 1. 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 GENXTRACT 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 .*

## **2. In Vitro Amplifikace (PCR)**

*Během celé procedury uchovávejte PCR reagenty a DNA templát zchlazený. Všechny kroky před startem vyhřívání cykleru provádějte na ledu (0-4°C).*

- Naředte pracovní koncentraci (1:25, finální koncentrace 0,2 U/µl) **Taq DNA Polymerase** (červené víčko) 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 2-20 µg/ml (= 10-100 ng DNA na reakci).*

- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocykler na 94°C.
- Vložte reakční zkumavky do předehřátého cykleru a spusťte následující program.

**pre-PCR: 94°C / 2 min**

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

**konečná syntéza: 72°C / 3 min**

*Skladujte amplifikační produkty na ledu nebo při 2-8°C pro následující použití.*

*Volitelné: Příležitostně můžete analyzovat produkty gelovou elektroforézou (např. 3% agarózový gel). Délky fragmentů: 95, 120, 150, 187 bp*

### **3. Hybridizace (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 **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.*

### **4. Stringent wash (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.

## 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.*

## VI. Vyhodnocení

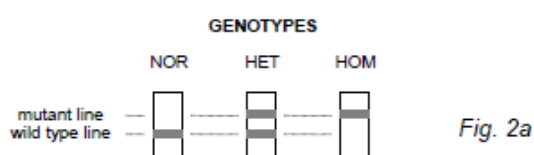
Genotyp vzorku je určen pomocí přiloženého listu Collector™.

Umístěte zpracovaný Testovací strip do jednoho z určených polí, zarovnejte jej podle schematického výkresu pomocí červené čáry značky (nahore) a zelené čáry značky (dole) a zafixujte jej lepicí páskou.

Pozitivní reakce nejvyšší kontrolní linie naznačuje správnou funkci Conjugate Solution a Color Developer. Tato čára by měla být vždy pozitivní.

Pro každou polymorfní pozici by měl být získán jeden z následujících vzorů barvení:

*Poznámka: Intenzity barvení čar se mohou lišit. To pro výsledek to nemá žádný význam.*

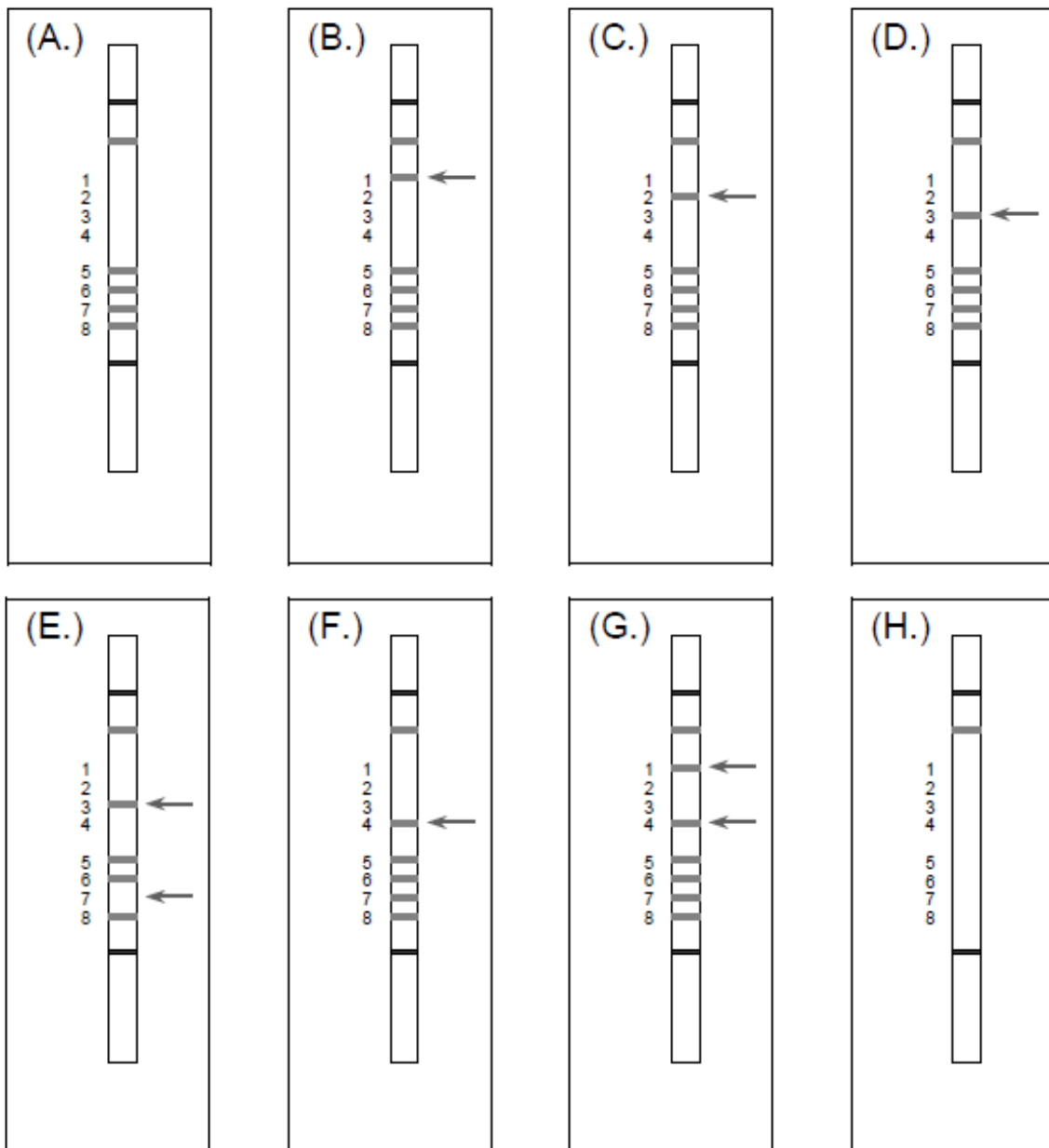


	wild type line	mutant line	genotype
NOR	<b>positive</b>	negative	normal
HET	<b>positive</b>	<b>positive</b>	heterozygous
HOM	negative	<b>positive</b>	homozygous mutant

Viz příklady výsledků StripAssay na straně III (obr. 3).

Radu v případě problémů lze získat kontaktováním ViennaLab prostřednictvím místního distributora nebo přímo na [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com).

Obr. 3: Příklady výsledků



(A.) normal / wildtype

(B.) DPYD c.1236G>A (HapB3) heterozygous

(C.) DPYD c.1679T>G (DPYD\*13) heterozygous

(D.) DPYD c.1905+1G>A (DPYD\*2A, IVS14+1G>A) heterozygous

(E.) DPYD c.1905+1G>A (DPYD\*2A, IVS14+1G>A) homozygous


(F.) DPYD c.2846A>T (p.D949V) heterozygous

(G.) DPYD c.1236G>A + c.2846A>T heterozygous

(H.) negative control or PCR failure



**REF**

4-780	PGX-5FU XL StripAssay®	 20 testů
CS-012	StripAssay® Detection Reagents	20 testů
CS-017	StripAssay® Detection Reagents 48	48 testů
2-014	GEN <sup>X</sup> TRACT™ Blood DNA Extraction System	100 extrakcí
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20 extrakcí
6-080	Typing Trays	5

Distributor:

**BioVendor – Laboratorní medicína**

Karásek 1767/1

621 00 Brno, Česká republika

Tel.: +420 549 124 111

Email: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz)

 **BioVendor**  
**LM<sup>®</sup>**

[www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)



Výrobce:

**ViennaLab Diagnostics GmbH**

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

Fax: (+43-1) 8120156-19

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

 **VIENNA**  
**LAB**

ESTABLISHED INNOVATIONS IN DIAGNOSTICS

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)