

HLA-B27 StripAssay[®]

Kat. číslo 4-320





20 testů



2-8°C



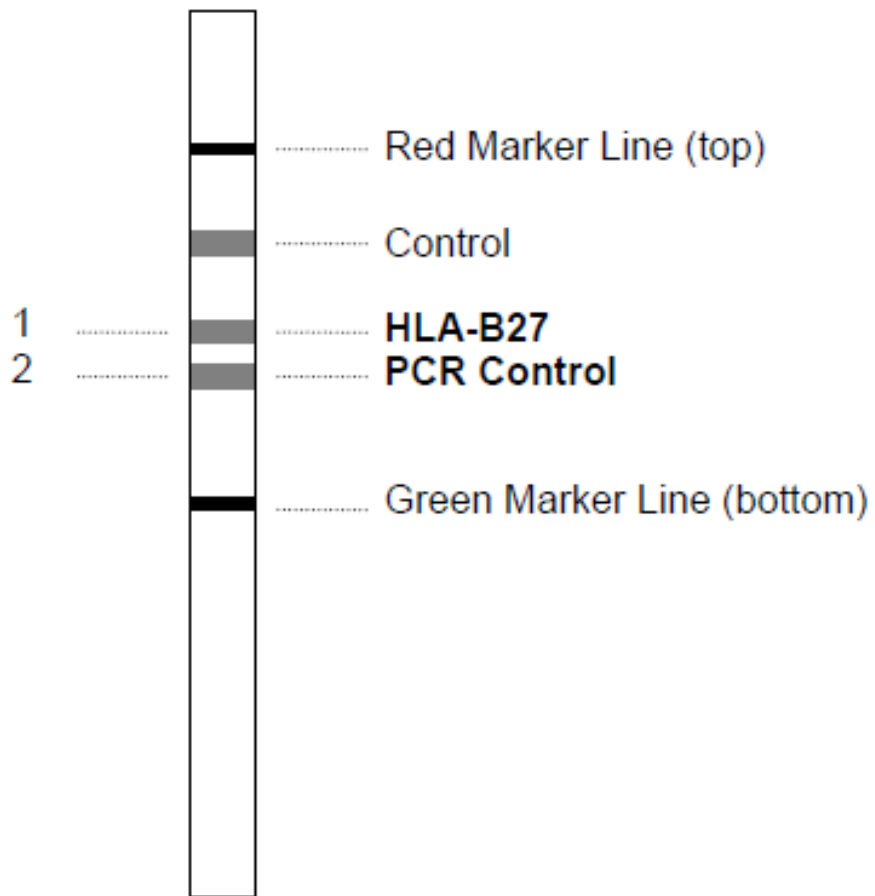
1. Lysis Solution	50 ml
2. GEN^xTRACT Resin <i>Promíchejte před každým použitím aliquotu</i>	5 ml 
3. Amplification Mix (žluté víčko)	500 µl
4. Taq Dilution Buffer (průhledné víčko)	500 µl
5. DNAT (modré víčko)	1,5 ml  R36/38
6. Typing Trays	3
7. Teststrips	20
8. Hybridization Buffer (bílé víčko)	25 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



www.viennalab.com

Popis stripu



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. 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 5-40 μg/ml (=25-200 ng DNA na reakci).

Program termocyklieru:

pre-PCR: 94°C /2 min

PCR: 94°C /15 s – 54°C /30 s – 72°C /30s (32 cyklů)

konečná syntéza: 72°C /3 min

- Pevně uzavřete zkumavky. Předehřejte termocyklier na 94°C.
- Vložte reakční zkumavky do předehřátého cyklieru a spusťte příslušný program.
- Použijte vyhřívání víka, rychlost vyhřívání max. 2°C /s.

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 viz příslušný orig. manuál.

2. Hybridizace (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)

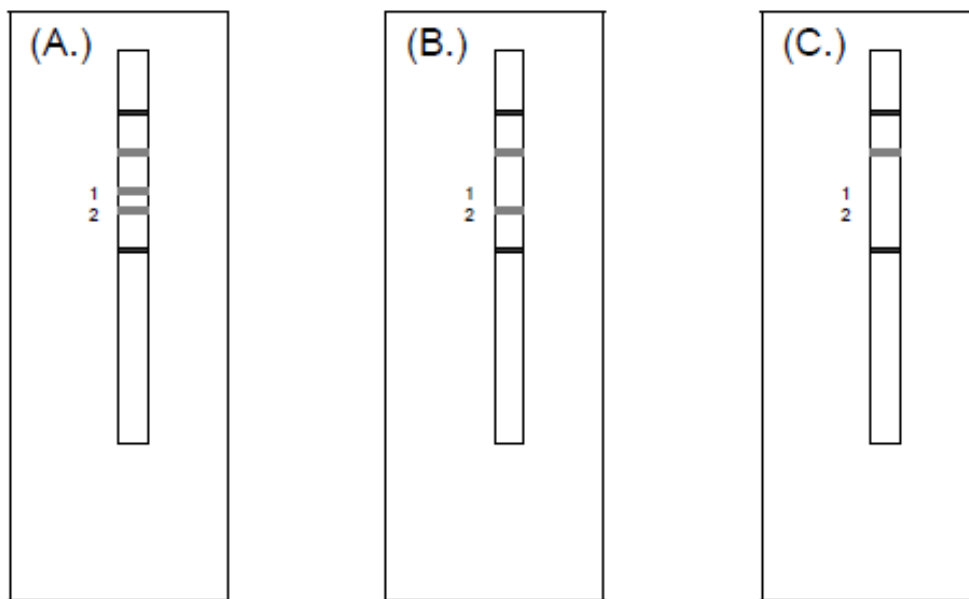
- Přidejte **1 ml Conjugate Solution**.
- Inkubujte **15 min** při **pokojevé teplotě** na lineární nebo orbitální třepačce.
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**. Krátce opláchněte (10 s).
- Odsajte tekutinu vakuovou odsávačkou.
- Přidejte **1 ml Wash Solution B**.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

"HLA-B27" line	"PCR Control" line	genotype
positive	positive	HLA-B27 positive
negative	positive	HLA-B27 negative
negative	negative	negative control or experimental failure

Příklad vyhodnocení:



- (A.) HLA-B27 positive
(B.) HLA-B27 negative
(C.) negative control or PCR failure