



LactoStrip

Souprava pro genotypizaci polymorfizmů spojených
s perzistencí laktázy



LACTOSTRIP

Souprava pro genotypizaci polymorfizmů asociovaných s perzistencí laktázy

POUŽITÍ

LactoStrip je souprava, která umožňuje detekci dvou polymorfizmů genu MCM6 asociovaných s perzistencí laktázové aktivity u dospělých: C/T 13910 a G/A 22018.

U řady lidí se po ukončení období kojení snižuje schopnost trávit laktózu (hlavní sacharide přítomný v mléce (primární laktózová intolerance). Důvodem je snížení enzymu laktoza-phlorizin hydroláza (LPH), zodpovědné za hydrolýzu laktózy na glukózu a galaktózu – cukry, které jsou vstřebávány ve střevech. Naopak určití jedinci, zejména potomci chovatelů skotu mají aktivitu tohoto enzymu zachovanou i v dospělosti.

Frekvence perzistence laktázové aktivity je vysoká v populaci severní Evropy (>90 % ve Švédsku a Dánsku) a snižuje se směrem na jih Evropy a středního východu (ca 50 % ve Francii, Španělsku a některých arabských populacích) a je velice nízká v asijských a Afrických populacích, které se nevěnovaly pastevectví. (ca 1 % v Číně. 5-20 % ve východní Africe).

Laktózová intolerance se projevuje různými způsoby, od netypičtějších (bolesti břicha, nadýmání, průjem) až po různé typy nevolností, zvracení, bolestí hlavy, nízké koncentrace, vážné únavy, svalových a kloubních bolestí atd.

Tato souprava je pouze nástroj, který má pomoci odborníkům diagnostikovat výše uvedené patologie. Tato souprava není určena jako jediný prostředek diagnostiky.

PRINCIP

Souprava LactoStrip je založena na principu reverzní hybridizace a umožňuje identifikaci dvou polymorfizmů lokalizovaných na intronech 9(C/T 13980) a 13 (G/A 22018) genu MCM6.

Pracovní postup má 3 kroky: a) extrakce DNA (reagencie nejsou součástí soupravy) b) PCR amplifikace c) hybridizace/detekce

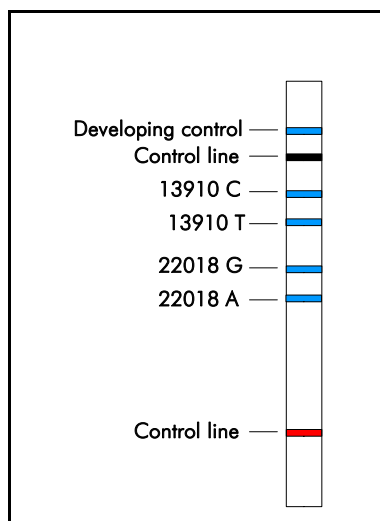
Dva fragmenty MCM6 genu (introny 9 a 13), kde jsou testované polymorfismy lokalizovány, jsou současně amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí. Během této PCR je přidána značka (biotin) k amplifikovaným fragmentům DNA.

Na testovací membráně jsou kovalentně navázány próby, specifické pro fragmenty sekvencí amplifikovaných PCR. Pro každý polymorfismus jsou 2 próby. Jedna pro každou možnou sekvenci. Próba pro kontrolu vývoje a červená a černá linie pro pozici stripu při vyhodnocování.

Během hybridizace se próby specificky navážou na amplifikované fragmenty DNA vzniklé během PCR.

Poté, co jsou produkty PCR hybridizovány s próbami na membráně a po několika následujících promytí, aby se vyloučily nespecifické vazby je hybridizace detekována („vývoj“). Membrána je inkubována se konjugátem streptavidin-peroxidáza, který se naváže na biotin v molekule. Poté je přidán substrát peroxidázy (TMB), který vytvoří modrý precipitát v místě hybridizace.

Konečným výsledkem reakce je vzorec linií, který je interpretován pomocí diagramu a kontrolního stripu. Každý polymorfismus může být charakterizován třemi situacemi: pro pozici 13910 jsou možné genotypy CC, CT, TT a pro pozici 22018 jsou možné GG, GA a AA.



OBSAH SOUPRAVY

LACTOSTRIP			16 testová souprava
	Membrány	STRIPS	16
	8-pozic rámeček	PL	2
PCR Reagent REAG PCR	PCR směs	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primery	REAG PRIMER	0,1 ml
	Taq	REAG TAQ	0,030
	Denaturace	SOLN DN	1 ml
	Hybridizační pufr	BUF HYB	60 ml
	Promývací pufr 1	BUF WASH 1	100 ml
	Konjugát	CONJ HRP	60 ml
	Promývací pufr 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrát	SUBS TMB	30 ml
	Návod		1
	Interpretační tabulka		1

MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY:

Pro použití soupravy je potřeba následující materiál:

1. Mikrokumavky pro PCR.
2. Mikropipety a příslušné špičky (sterilní nebo ošetřené UV, ideálně s filtrem).
3. Pinzeta/kleštičky a tužka (volitelné).
4. Hodiny.
5. Teploměr.

VYBAVENÍ, KTERÉ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

1. Thermoshaker – třepačka pro destičky
Souprava byla validována pro: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio).
2. Termocykler
Následující přístroje byly úspěšně používány se soupravou: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).

UPOZORNĚNÍ

1. Pouze pro *in vitro* použití.
2. Přesně následujte pracovní postup. Modifikace předepsaných **kroků a teplot** může významně ovlivnit výsledek
3. Všechny materiály musí být bez kontaminace DNA. Doporučuje se použití špiček s filtrem pro zamezení kontaminace aerosolem. Ujistěte se, že byla provedena všechna obvyklá opatření pro amplifikaci. Používejte autoklávaný materiál pro hybridizaci a vývoj.
4. Součásti soupravy skladujte podle návodu.
5. Nekombinujte části souprav různých šarží.
6. Nepoužívejte reagentie po datu expirace.
7. Stripy jsou pro jedno použití.
8. Dodávaná plata jsou pro jedno použití.
9. Do každého žlábků dejte pouze jeden strip.
10. V případě, že je poškozený vnější obal soupravy, ale komponenty nebyly poškozeny, je možné soupravu používat
11. Jednotlivé komponenty je třeba likvidovat podle místních zákonů o odpadu.
12. Se vzorky pacientů je třeba vždy nakládat jako s potenciálně infekčním. Je třeba dodržet standardy ochrany prostředí a bezpečnosti práce.
13. Po použití doporučujeme se stripy manipulovat se stejnou opatrností, jako se vzorky. Je třeba je pokládat za nebezpečný biologický materiál.
14. Denaturační roztok obsahuje <2 % NaOH a může podráždit zrak i kůži (H314 a P280, P305, P351, P338, P310).
15. Nelikvidujte vnější obal soupravy, dokud jste zcela nespotřebovali obsah Vnější obal obsahuje důležité informace o CE značení a šarži složek.

SKLADOVÁNÍ

Všechny reagentie skladujte při 2-8 °C. V některých roztocích se během skladování při nízké teplotě mohou objevit precipitáty (hybridizační pufr, promývací pufr 1 a 2, konjugát), to neovlivní kvalitu testu. Při temperování reagentií dojde k opětovnému rozpuštění: při laboratorní teplotě (konjugát) nebo při 42 °C (hybridizační pufr a promývací pufr 1 a 2).

Datum expirace je vytištěno na nálepce.

VZORKY

Základním materiálem pro provádění testu je DNA o známé koncentraci. Tato DNA může být extrahována z krve (EDTA nebo citrát), ze slin nebo z tkáně a měla by mít dostatečnou kvalitu na PCR amplifikaci. ($R_{260/280} > 1,5$).

Některé extrakční protokoly, které zajišťují dobrý výsledek LactoStripu byly následující:

- a) Vysolování (DNA extrakce precipitací solí).
- b) Extrakce pomocí silika-kolonek.
- c) Extrakce z kapky krve na FTA filtračním papíru za použití soupravy Chelex (8 mm průměr kruhu, 25 μ l Chelexu, PCR s 5 μ l).
- d) Extrakce z kapky krve na FTA filtračním papíru za použití soupravy Whatman (2 mm průměr kruhu).

DNA vzorky uchovávejte při 2-8 °C pro použití ihned nebo při -20 °C pro delší dobu skladování.

LACTOSTRIP – PRACOVNÍ POSTUP

1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Příprava PCR:

Důležité: před otevřením víček reagentie krátce centrifugujte. To zajistí, že celý obsah bude na dně zkumavky.

- Připravte potřebný počet PCR zkumavek podle počtu DNA na amplifikaci.
- Do každé PCR zkumavky přidejte: 39 μ l PCR premixu + 5 μ l primerů + 1 μ l Taq + 5 μ l DNA (50 ng/ μ l).

Kdekoliv je možné během přípravy udržujte reagentie a směsi při 2-8 °C

Pokud budou amplifikovány různé vzorky DNA, připravte běžnou směs tak, aby bylo možné přidat 45 μ l směsi + 5 μ l DNA (50 ng/ μ l). Například:

Počet PCR	PCR premix	Primery	Taq
1	39 μ l	5 μ l	1 μ l
3	136.5 μ l	17.5 μ l	3.5 μ l
5	214.5 μ l	27.5 μ l	5.5 μ l
8	351 μ l	45 μ l	9 μ l

* Směs obsahující všechny PCR komponenty by měla být vždy připravena v nadbytku s ohledem na kompenzaci ztráty během pipetování.

Vzhledem k požadavkům „správné laboratorní praxe“ by měla být v každé sérii zařazena negativní kontrola, aby byly vyloučena kontaminace a je-li vyžadováno, také pozitivní kontrola

Amplifikace:

Odpovídající koncentrace DNA je důležitá pro dobrý výsledek.

Umístěte zkumavky do termocykleru, pokud je třeba, přidejte kapku Nujol mineral oil do každé PCR reakce a amplifikujte podle následujícího programu:

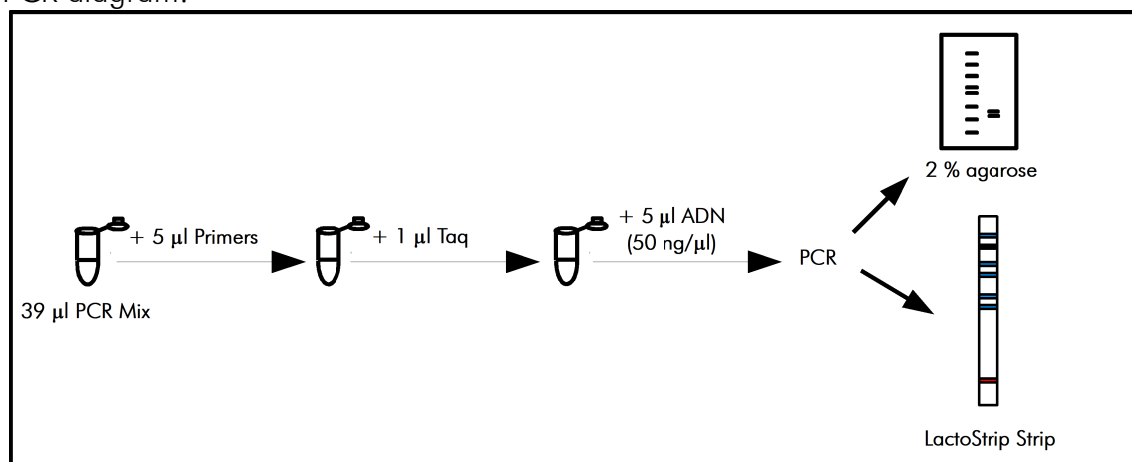
94 °C, 3 min
30 cyklů: 94 °C, 30 s
 52 °C, 30 s
 72 °C, 30 s
72 °C, 5 min
4 °C

Verifikace PCR

Výsledek může být ověřen na 2 % agarózovém gelu. Aplikujte 5 μ l z každé PCR do jamky na gelu. PCR premix obsahuje loading pufr a 2 barvy pro kontrolu elektroforézou). Elektroforéza probíhá při 100 V 40 min a odečítá se pod UV světlem. Měly by být nalezeny 2 linie: 278 a 228 pb.

Po ukončení amplifikace proveďte buď ihned vyvíjení stripu nebo vzorky uchovejte po dobu 24 hod. při 2-8 °C nebo po delší dobu zmražené při -20°C.

PCR diagram:



2. Hybridizace/ Vývoj stripu

Na vyžádání Operon poskytne pracovní postup na specifický přístroj (Profiblot oř Autoblot3000H) nebo pro manuální provádění analýzy (PST-60HL manuální – thermoshaker – postup na konci pracovního návodu).

<http://www.OPERON,S.A..es/es/products/protocols>.

V denaturačním kroku se pipetuje do žlábků **12,5µl denaturačního roztoku + 12,5 µl směsi PCR**.

Produkt byl testován na řadě různých obecných platform komerční názvy ověřených byly výše specifikované nicméně nejsou určeny výlučně. Souprava a pracuje korektně na kterémkoliv systému, důležité je zajištění správné teploty a dodržení pracovního protokolu.

3. Interpretacja pasków

Interpretacja pasków może być wykonana wzrokowo, stosując tablicę ewaluacyjną zawartą w zestawie (patrz instrukcję wykonania dla każdego instrumentu) lub automatycznie, stosując skannery (BIOSCITEC) -BLOTRix R2 lub BLOTRix S1.

Na życzenie, OPERON,S.A. dostarczy użytkownikowi instrukcję do automatycznej interpretacji pasków z użyciem skanerów (DO-09053004 "Instructions of use BLOTRix R2_S1"). Alternatywnie prosimy odnieść się do następującego adresu w sieci:

<http://www.OPERON,S.A..es/es/products/protocols>.

WAŻNE: wyniki interpretacji pasków za pomocą skanerów muszą być zawsze weryfikowane wzrokowo: bardzo słabe prążki mogą być nie wykryte przez instrumenty.

VÝSLEDKY:

Pro každý z testovaných polymorfizmů je možné získat 3 výsledky:

13910

T/T (asociovaný s perzistencí laktázové aktivity) jedna modrá linie se objeví na pozici pro tento polymorfismus (nižší pozice).

T/C (asociovaný s perzistencí laktázové aktivity) dvě modré linie se objeví na pozici pro tento polymorfismus (nižší pozice).

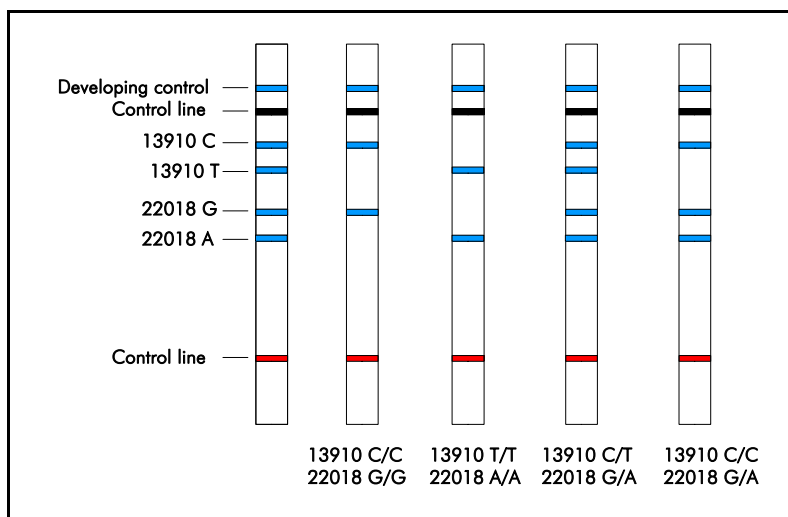
C/C (asociovaný s ne-perzistencí laktázové aktivity) jedna modrá linie se objeví na pozici pro tento polymorfismus (vyšší pozice).

A/A (asociovaný s perzistencí laktázové aktivity) jedna modrá linie se objeví na pozici pro tento polymorfismus (nižší pozice).

A/G (hlavní asociovaný s perzistencí laktázové aktivity) dvě modré linie se objeví na pozici pro tento polymorfismus (nižší pozice).

G/G (asociovaný s ne-perzistencí laktázové aktivity) jedna modrá linie se objeví na pozici pro tento polymorfismus (vyšší pozice).

Příklady:



Ve studii zahrnující 196 finských subjektů; 137 s perzistencí laktázové aktivity a 59 s nízkou laktázovou aktivitou byly získány následující výsledky:

- Ze 137 subjektů s perzistencí laktázové aktivity: žádný neměl genotyp CC13910 –GG22018. 74 mělo genotyp TT13910 – AA22018; 63 mělo genotyp TC13910 – GA22018
- Z 59 subjektů s nízkou laktázovou aktivitou: Všechny 59 subjektů představovalo genotyp CC13910; 6/59 představovalo genotyp GA22018 a 53/59 GG22018.

Ve studii bylo zahrnující 40 případů ne-finských subjektů (Jižní Korea, Itálie, Německo) s nízkou laktázovou aktivitou. Všechny 40 představovalo genotyp CC13910; 1/40 představovalo genotyp GA22018; a 39/40 představovalo genotyp GG22018.

KONTROLA KVALITY

Proužek kontroly kvality vývoje se vždy objeví nad černou linií. Jeho nepřítomnost ukazuje na problémy během hybridizace / vývoje stripu.

Strip odpovídající negativní kontrole amplifikace musí vykazovat pouze kontrolní linii. V každém vzorku se musí objevit alespoň jedna modrá linie pro každý polymorfismus. (kromě případu potenciální delece genu) ale maximálně dvě. Nepřítomnost linií asociovaných s polymorfismem ukazuje na chybu v PCR (ověřte kvalitu DNA na 2 % agarózovém gelu) nebo hybridizaci (ověřte teplotu hybridizace).

VLASTNOSTI/ EXTERNÍ A INTERNÍ HODNOCENÍ

Použití tohoto testu je omezené na školené odborníky, zvláště v molekulárně biologických metodách.

Test byl ověřen 64 DNA vzorky a výsledky 100 % odpovídaly jiným standardním genotypizačním metodám (sekvenování nebo restrikční testy)

U 14 pacientů byly porovnány výsledky testů pro primární laktázovou intoleranci pomocí LactoStripu oproti s dechovému testu. Tyto výsledky korelovaly ve 100 %.

MOŽNÉ PROBLÉMY

1. Na stripu se neobjeví žádný proužek, ani kontrolní

- Konjugát nebo substrát nebyl vytemperován na správnou teplotu.
- Nebyl přidán konjugát nebo substrát nebo byl v příliš nízké koncentraci.

2. Objeví se pouze kontrolní proužek

- PCR amplifikace neproběhla správně (ověřte na agarózovém gelu).
- Nebyl přidán vzorek nebo byl v příliš nízké koncentraci pro hybridizaci.
- Nesprávná hybridizace nebo teplota promývacího pufru 1 (vyšší než v návodu).
- Nesprávná teplota inkubace (vyšší než v návodu)

3. Na stripu je silné barevné pozadí

- Promývací krok nebyl proveden efektivně (špatné načasování, malý objem promývacího pufru, studený pufr).

4. Nehomogenní zbarvení stripu

- Neadekvátní třepání (zkontrolujte program thermoshakeru – třepačky).
- Stripy nebyly dobře ponořeny během inkubace.

5. Neočekávané výsledky

- Neadekvátní inkubace nebo teplota reagensů.
- Kontaminace PCR (ověřte pomocí negativní kontroly).
- Kontaminace žlábků během přenášení reagensů během přidávání hybridizačního pufru.

Následující tabulka ukazuje v šedé oblasti rozsah odpovídající pracovní teploty pro každou пробу (hybridizace/ vývoj testované na termotřepačce PST-60HL) (dobrá intenzita hybridizace, žádné zkřížené reakce)

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
13910C							
13910T							
22018G							
22018A							

SENZITIVITA

Senzitivita soupravy LactoStrip byla stanovena několika výrobními šaržemi Nejmenší množství detekce DNA na PCR, které lze správně genotypovat je 5-10 ng (linie s dobrou intenzitou) menší množství než 5 ng způsobuje slabé linie, které je obtížné hodnotit.

SPECIFICITA

Specificita soupravy LactoStrip pro detekci polymorfizmů byla hodnocena 64 vzorky o známém genotypu třemi různými šaržemi. Ve všech případech se výsledky shodovaly 100%.

Diagnostická specificita soupravy LactoStrip soupravy byla srovnávána s dechovým testem. Celkově bylo analyzováno 14 pacientů a výsledky se shodovaly.

HOOK EFFECT

Byl posuzován vliv vysoké koncentrace DNA (až 5000 ng) na výsledky LactoStrip souprav. Nebyl zjištěn inhibiční vliv PCR ani se nezměnila intenzita zbarvení.

Při koncentraci vyšší, než 1000ng DNA byla pozorována slabá zkřížená reakce na 13910C a stejná zkřížená reakce byla pozorována při koncentraci 5000ng DNA na linii 22018A.

SPOLEHLIVOST MEZI SÉRIEMI (INTRA-ASSAY PRECISION)

Bylo analyzováno 5 replik 3 vzorků DNA pomocí tří různých šarží LactoStripu. Analýzy byly prováděny jednou osobou a výsledky byly identické ve všech případech. To představuje vysokou spolehlivost mezi sériemi analýz.

SPOLEHLIVOST MEZI DNY (INTER-DAY PRECISION)

Tři vzorky DNA byly analyzovány v dubletech třemi šaržemi v 5 po sobě následujících dnech. Analýza byla prováděna jednou osobou a získané výsledky byly identické ve všech případech., což dokazuje vysokou spolehlivost analýzy mezi dny.

SPOLEHLIVOST NA PROVEDENÍ (INTER-LABORATORY PRECISION)

Tři lidé analyzovali 3 vzorky DNA v dubletech pomocí soupravy LactoStrip jedné šarže. Analýza byla prováděna ve stejný den; získané výsledky byly identické, což dokazuje vysokou spolehlivost LactoStripu v rámci zastupitelnosti personálu.

SPOLEHLIVOST VÝSLEDKŮ U RŮZNÝCH ŠARŽÍ (INTER-LOT PRECISION)

Tři různé vzorky DNA byly analyzovány v tripletech třemi různými šaržemi LactoStrip soupravy. Analýza byla prováděna stejnou osobou v jeden den a byly získány identické výsledky, což dokazuje vysokou spolehlivost výsledků mezi šaržemi.

LITERATURA:

1. "Identification of a variant associated with adult -type hypolactasia". Enattah N. et al. Nature Genetics (2002). Vol 30; 233-237.
2. "Transcriptional downregulation of the lactase (LCT) gene during childhood". Rasinperä H. et al. Gut (2005). 54: 1660-1661.
3. "Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe". Tishkoff S. et al. Nature Genetics (2007). Vol 39 (N° 1): 31-40.
4. "The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in africans". Mulcare C.A. et al. American Journal of Human Genetics (2004). 74: 1102-1110.
5. "Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem". Matthews S.B. et al. Postgraduate Medical Journal (2005). 81: 167-173.
6. "A genetic test wich can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children". Rasinperä H. et al. Gut (2004). 53: 1571-1576.

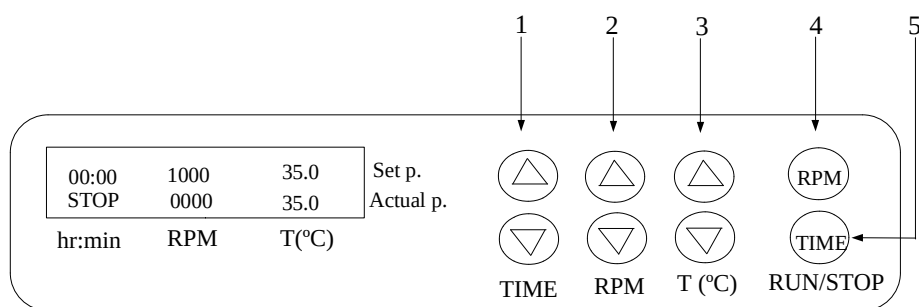
PRACOVNÍ POSTUP PRO MANUÁLNÍ THERMOSHAKE PST-60HL

(Verze: 2, Datum: 10/06/2016)

Příprava:

1. Naprogramujte thermoshaker pro destičky: rychlost třepání 450 rpm při teplotě 42°C.
 - a) Připojte přístroj, pro dosažení požadované teploty nechte víko zavřené
 - b) Nastavte šipkami označenými RPM (č.2 na obrázku) rychlost třepání na 450 rpm.
 - c) Nastavte šipkami označenými T (°C) (č.3 na obrázku) teplotu na 42°C. Začne zahřívání.Pozn.: Pokud si přejete, můžete také naprogramovat inkubační čas pomocí šipek označených TIME (č.1 na obrázku). V tomto případě začne odpočítávání po stisknutí tlačítka TIME (č.5 na obrázku) nebo tlačítkem RPM (č.4 na obrázku), pokud krok vyžaduje třepání).
2. Předehřejte hybridizační pufr, promývací pufr 1 a promývací pufr 2 na 42°C. Můžete udělat ve vodní lázni nebo v ohřívači (nastavte teplotu o 1 °C vyšší než požadovaná teplota, tj. na 43 °C). Pokud se objevil precipitát v pufru, po jeho zahřátí, mírným promícháváním urychlíte jeho rozpuštění.

3. Přeneste ostatní reagenty (denaturační roztok, konjugát a substrát) do pokojové teploty. Pokud jsou uvnitř konjugátu precipitáty, měly by být při pokojové teplotě pomocí jemného promíchávání zcela rozpuštěny.



4. Hybridizace / Vývoj Stripu:

1. Opatrně odstříhněte hliníkový obal obsahující stripy nad zipovým zavíráním. Pomocí kleštíček vyjměte potřebný počet stripů uchycením na jednom konci stripu. Uzavřete obal zipem. Pod červenou linií můžete stripy grafitovou tužkou označit. **Nikdy se nedotýkejte rukou membrány rukou.**

2. Vyjměte hybridizační stojánek ze sáčku a umístěte strip do každého žlábků tak, že je strip blíže horního konce stojánku. Strip je umístěn popsanou stranou vzhůru (barevné linie jsou vidět).

3. Přidejte potřebné množství denaturačního činidla do spodní části každého žlábků ve stojánku (viz Návod k použití soupravy, bod Vývoj stripu).

4. Na špičku denaturačního roztoku přidejte potřebné množství PCR (viz Návod k použití soupravy, bod Vývoj stripu) jeden vzorek na každý žlábků a dobře pipetováním promíchejte. V tuto chvíli by se směs neměla dotýkat membrány

5. Vložte tácek do thermoshakeru na vyznačenou pozici., tak, že konce stojánku jsou vloženy do obdélníku uvnitř thermoshakeru. Uzavřete kryt thermoshakeru a inkubujte 10 min., aby došlo k denaturaci PCR.

6. Po 10 min. přidejte 2 ml předehřátého hybridizačního pufru do každého žlábků se stripem na horní stranu žlábků. Pracujte rychle, aby nedošlo k vychladnutí pufru. Jemně promíchejte pomalým pohybem nahoru a dolů.

7. Uzavřete thermoshaker a zapněte RPM tlačítko (č.4 na obrázku) pro promíchávání. Teplotu 42 °C a třepání udržujte konstantní po celou dobu hybridizace/ Vývoje stripu.

8. Inkubujte 30 min.

9. Otevřete thermoshaker a pomocí pipety/ mikropipety nebo aspirační vakuové pumpy odstraňte hybridizační pufr (je možné použít stejnou špičku). Nedotýkejte se stripu. Pokud vyjímáte stojánek ze žlábků z thermoshakeru, uzavřete víko, aby nedošlo ke snížení teploty. Uvnitř přístroje. Po odsátí vraťte co nejdříve žlábků se stripy zpět.

10. Přidejte 2 ml předehřátého promývacího pufru 1 do každého žlábků hybridizačního stojánku. Zavřete kryt a inkubujte 10 min. 42 °C při třepání 450 rpm.

11. Odstraňte pufr a opakujte postup.

12. Odsajte promývací roztok a přidejte 2 ml konjugátu (laboratorní teploty) do každého žlábků. Inkubujte 30 min. 42 °C 450 rpm.

13. Odsajte konjugát a přidejte 2 ml předehřátého promývacího pufru 2. Inkubujte 5 min. 42 °C při třepání 450 rpm.

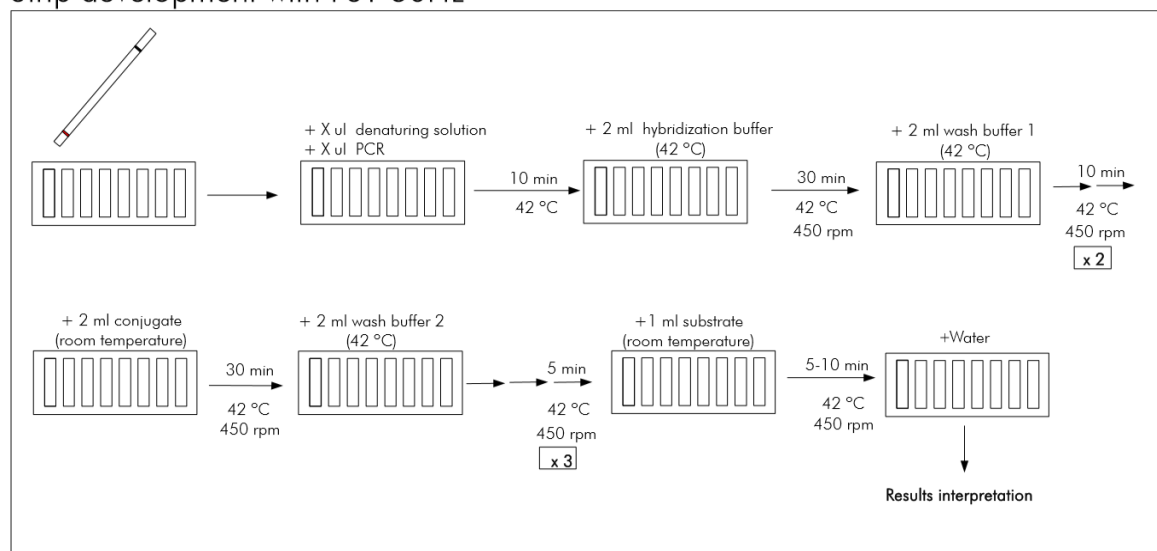
14. Odsajte promývací pufr 2 a opakujte postup ještě dvakrát.

15. Odsajte promývací roztok 2 a přidejte 1 ml substrátu (laboratorní teploty) do každého žlábků. Inkubujte 5-10 minut při 42 °C 450 rpm.

16. Vyjměte stojánek z thermoshakeru a několikrát promyjte 2 ml destilované vody. Vyjměte stripy z korýtek, položte je na rovnou plochu a nechte je uschnout. Chraňte před světlem

17. Nalepte stripy na papír (pro lepší uchování je překryjte průhlednou celofánovou folií Za pomoci odečítací tabulky a kontrolního stripu interpretujte výsledky. Zarovnejte stripy podle černé a červené linie na stripu a identifikujte linie vzhledem k jejich pozici na stripu.

Strip development with PST 60HL



Poznámky:

1. Pokud se špička nedostane do kontaktu s vnitřkem plotny, můžete použít stejnou špičku na přidávání pufru do všech žlábků. (špičkuje třeba vyměnit při výměně reagentů nebo pufrů).
2. Stejnou špičku můžete použít při odsávání reagentů ze všech žlábků.
3. Třepání je potřebné po přidání hybridizačního pufru, (stiskem tlačítka RPM). Můžete nechat třepat po celou dobu během celého postupu nebo deaktivovat a aktivovat pro každý krok odsávání a/ přidávání pufru (tj. Zastavit třepání, odsát pufr, přidat další pufr/reagent a znovu aktivovat třepání).
4. Vždy, když vyndáváte stojánek z thermoshakeru uzavřete víko, aby nedocházelo ke snížení teploty.

KROKY	AKCE	TIMING
1 nastavení,		42 °C 450 rpm
2 denaturace	12,5 µl denat + 12,5 µl PCR	10 min
3 hybridizace	+ 2 ml hybridiz	30 min.
4 promytí 1	+ 2 ml + 2 ml	10 min 10 min
5 konjugát	+ 1 ml konjugátu	30 min
6 promytí 2	+ 2 ml + 2 ml + 2 ml	5 min 5 min 5 min
7 substrát	+ 1 ml substrátu	5-10 min
		sušení
TOTAL		Ca 2 hodiny inkuba



Expirace



Šarže



Pro *in vitro* diagnostiku



Tento výrobek splňuje požadavky direktivy 98/79/CE



Katalogové číslo



Čtěte prosím příbalový leták



Výrobce



Určeno pro <n> vyšetření



Skladujte při



Opatrnost



Žíravina



DO-09051003 Rev. 9 – 25.10.2018

- OPERON S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN