

Phụ lục 3: Biểu mẫu theo dõi thực hiện quy trình xác định đột biến EGFR bằng kỹ thuật Stripassay

PHIẾU THEO DÕI THỰC HIỆN XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN EGFR BẰNG KỸ THUẬT STRIPASSAY

Nhân viên thực hiện:

Ngày thực hiện: dd/mm/yyyy

1. Hóa chất, sinh phẩm

Tên sinh phẩm	Số lô	Hạn sử dụng
EGFR XL StripAssay ®/ViennaLab (REF 5-630)		/...../.....

2. Thiết bị

Tên thiết bị	Sử dụng	Mã thiết bị
Tủ an toàn sinh học cấp 2	☐ Có ☐ Không	CNG.AT002
Bể ổn nhiệt	☐ Có ☐ Không	CNG.UN002; CNG.UN005
Máy đo nồng độ DNA (Nanodrop)	☐ Có ☐ Không	CNG.NN001
Tủ thao tác PCR	☐ Có ☐ Không	CNG.AT010; CNG.AT006
Máy điện di	☐ Có ☐ Không	CNG.BN001
Máy chụp gel	☐ Có ☐ Không	CNG.ML003
Pipet	☐ Có ☐ Không	CNG.PP008; CNG.PP004 CNG.PP011 CNG.PP012; CNG.PP014; CNG.PP027; CNG.PP028; CNG.PP030; CNG.PP031; CNG.PP032; CNG.PP040; CNG.PP041; CNG.PP046; CNG.PP047
Máy PCR	☐ Có ☐ Không	CNG.PC...
Máy real-time PCR 7500	☐ Có ☐ Không	275008962

3. Các bước thực hiện

a. Pha loãng DNA khuôn

- Tổng lượng DNA cần cho mỗi phản ứng: 10-100 ng
- Nồng độ: 2-20 ng/ul
- Thể tích tối thiểu: 5ul/test x 2 test/mẫu

STT	LID	Tên bệnh nhân	Nồng Độ (ng/μl)	Pha loãng (μl)			Nồng độ cuối cùng (ng/μl)
				V ADN	V H ₂ O	V tổng	
1							

b. Chuẩn bị Dilute Taq DNA polymerase

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Taq polymerase (5 U/μl)	1
2	Taq Dilution Buffer	24
	Tổng thể tích (0.2 U/μl)	25

3.3. Chuẩn bị PCR master mix

Mỗi xét nghiệm thực hiện 2 test A và B

STT	Sinh phẩm	1 test (ul)
1	EGFR Amplification Mix A (Yellow cap)	15
2	Diluted Taq DNA Polymerase	5
3	DNA template	5
	Tổng thể tích	25

STT	Sinh phẩm	1 test (ul)
1	EGFR Amplification Mix B (Yellow cap)	15
2	Diluted Taq DNA Polymerase	5
3	DNA template	5
	Tổng thể tích	25

3.4. Chu trình PCR

Bước	Chu Kỳ	Nhiệt Độ	Thời gian
1	1	37°C	10 phút
2	33	94°C	1 phút
		70°C	50 giây
		56°C	50 giây
3	1	60°C	3 phút
		4°C	∞

3.5. Phản ứng lai

* Chuẩn bị trước khi lai:

- Bật bể ổn nhiệt, chỉnh nhiệt độ 45 độ C. Cho các lọ Hybridization Buffer và Wash Solution A vào bể ổn nhiệt 30 đến 60 phút trước khi lai.
- Để bộ sinh phẩm lai ngoài nhiệt độ phòng 30 đến 60 phút trước khi lai.

* Tiến hành phản ứng lai:

- Đánh dấu 01 giếng lai mới theo mã bệnh nhân.
- Thêm 20 µl DNAT giếng lai.
- Thêm 10 µl sản phẩm PCR test A, mix đều.
- Thêm 10 µl sản phẩm PCR test B, mix đều..
- Để yên ở nhiệt độ phòng 5 phút.
- Thêm 1 ml Hybridization Buffer (đã ủ ở 45 độ) giếng lai (màu xanh biến mất).
- Chèn thanh lai teststrip vào giếng lai.
- Ủ khay lai ở 45 độ C trong 30 phút trên máy ủ lắc nhiệt; tốc độ lắc 250 rpm.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Thêm 1 ml Wash Solution A (đã ủ 45 độ C) vào mỗi giếng, lắc nhẹ khoảng 10 giây.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Thêm 1 ml Wash Solution A (đã ủ 45 độ C) vào mỗi giếng
- Ủ khay lai ở 45 độ C trong 15 phút trên máy ủ lắc nhiệt; tốc độ lắc 250 rpm.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Thêm 1 ml Wash Solution A (đã ủ 45 độ C) vào mỗi giếng để rửa thêm 01 lần nữa.

- Ủ khay lai ở 45 độ C trong 15 phút trên máy ủ lắc nhiệt; tốc độ lắc 250 rpm.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Hạ nhiệt độ máy ủ lắc về nhiệt độ phòng (khoảng 25 độ C)
- Thêm 1 ml Conjugate Solution vào mỗi giếng.
- Ủ khay lai ở nhiệt độ phòng trong 15 phút trên máy ủ lắc nhiệt; tốc độ lắc 250 rpm
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Thêm 1 ml Wash Solution B vào mỗi giếng, lắc nhẹ khoảng 10 giây.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Thêm 1 ml Wash Solution B vào mỗi giếng
- Ủ khay lai ở nhiệt độ phòng trong 5 phút trên máy ủ lắc nhiệt; tốc độ lắc 250 rpm.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút
- Thêm 1 ml Wash Solution B vào mỗi giếng để rửa thêm 01 lần nữa.
- Ủ khay lai ở nhiệt độ phòng trong 5 phút trên máy ủ lắc nhiệt; tốc độ lắc 250 rpm.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Thêm 1 ml Color Developer.
- Ủ khay lai ở nhiệt độ phòng trong 5 – 10 phút trên máy ủ lắc nhiệt (tốc độ lắc 250 rpm) cho đến khi các băng control hiện rõ. Đậy nắp máy để tránh ánh sáng. Lưu ý không ủ quá lâu, nếu ủ quá lâu tín hiệu nền, tín hiệu nhiễu quá cao sẽ khó phân tích kết quả.
- Loại bỏ dung dịch trong các giếng bằng máy bơm hút.
- Rửa thanh lai vài lần bằng nước cất sạch.
- Lấy thanh lai ra và làm khô trên giấy thấm và tránh ánh sáng trước khi scan và phân tích kết quả.

3.6. Phiên giải kết quả

- Dán thanh lai lên phiếu đọc kết quả.
- Đặt thanh lai lên máy scan và đọc kết quả bằng phần mềm StripAssay Evaluator.
- Kết quả:

Mã LID	Tên bệnh nhân	Kết quả	Ghi chú

Người xem xét

Ngày xem xét: