


FV Leiden RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-110

 -20°C/2-8°C



100 testů



Výrobce:

ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Použití





FV Leiden RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci 1691G>A mutace v genu pro lidský koagulační Faktor V (FV). Bodová mutace, uváděná jako FV Leiden, je spojená s dědičnou trombofilií. Kit je určen k identifikaci pacientů s rizikem venózního tromboembolismu. Kvalitativní test rozlišuje tři možné genotypy FV 1691G>A v DNA: GG (normální), GA (heterozygot) nebo AA (homozygótní mutant).

Referenční sekvence: HGVS: NG_011806.1 g.41721G>A; NCBI dbSNP: rs6025.

2. Úvod

FV je hlavní hráč v koagulační kaskádě. Aktivovaný FV je štěpen a degradován aktivovaným proteinem C, čímž omezuje nadměrné srážení krve. Mutace 1691G>A způsobuje záměnu jedné aminokyseliny v pozici 506 (R506Q), která mění místo štěpení a následně brání efektivní inaktivaci FV. U nosičů alely A přetrvávající aktivita FV usnadňuje tvorbu dalších aktivovaných koagulačních faktorů a následně zvyšuje riziko tvorby sraženin v žilách. Přibližně 5% bělochů je heterozygotními nosiči mutace FV Leiden. Objevuje se u nich 5 až 10krát vyšší riziko vzniku žilní trombózy, zatímco homozygotní nosiči mají 50 až 100krát vyšší riziko ve srovnání se zdravými. Jedinci s dalšími rizikovými faktory, jako je přítomnost jiných trombofilních mutací, obezity, hypertenze, diabetu typu 2, kouření nebo užívání perorální antikoncepce, jsou ještě více náchylní k žilním trombotickým příhodám.

3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 µl
FV Leiden Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
FV WT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl
FV MUT-Control	1 zkumavka		červené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. FV Leiden Assay Mix obsahuje FV gen-specifické primery a dvě alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy. Kit obsahuje kontrolní genotypy wild type (WT-Control) a homozygótně mutantní kontrolu (MUT-Control).

Kit obsahuje reagentie pro 100 reakcí o objemu 20 µl každá.

4. Skladování a Stabilita

FV Leiden RealFast™ Assay je dodávána na chladících blocích. Po dodání skladujte kit při -20°C. Pro rychlé použití je možné skladování při 2-8°C po dobu 1 měsíce. Kit odolá až 20 cyklům zmrazení/rozmrazení bez ztráty aktivity. Vyhněte se dlouhodobému působení intenzivního světla. Při správném skladování kitu bude zachována plná aktivita až do data expirace uvedeného na štítku.

5. Popis produktu

5.1. Princip testu

Test je založen na principu fluorogenní 5' nukleázy, známém také jako TaqMan® test. Každá reakce obsahuje genově specifický primer, který amplifikuje 142 bp fragment genu FV a dvě dvojité značené alel-specifické hydrolytické sondy, které hybridizují s cílovou sekvencí amplifikovaného fragmentu. Blízkost 5'-fluorescenčního reportéru a 3'-zhášeče na intaktních sondách zabraňuje reportéru fluoreskovat. Během prodloužené fáze PCR 5' - 3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy se 5'-fluorescenční reportér štěpí z hybridizované sondy. Fyzikální separace fluoroforu od barvicího činidla

způsobujícího zhášení vytváří fluorescenční signál v reálném čase, který je úměrný kumulativnímu produktu PCR.

V normálních vzorcích se HEX-značená FV wild type sonda hybridizuje s komplementárním řetězcem fragmentu genu. V kanálu HEX (556nm) je detekován silný fluorescenční signál a žádný nebo pouze výchozí signál v kanálu FAM (520nm). Naopak, v homozygotně mutantních vzorcích se FAM-značená FV mutantní sonda váže na genový fragment. V kanálu FAM je detekován silný fluorescenční signál a žádný nebo pouze výchozí signál v HEX kanálu. U heterozygotních vzorků se wild type i mutantní sondy vážají na amplicony a generují signály v obou kanálech.

5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

FV Leiden RealFast™ Assay je validován s použitím přístroje AB 7500 Fast.

Kit je kompatibilní s různými dalšími real-time PCR přístroji umožňujícími detekci fluorescence FAM a HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ Mx3005P™ (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

Poznámka: RealFast™ Genotyping QuickGuides pro přípravu a analýzu experimentu na různých typech přístrojů lze stáhnout z www.viennalab.com. Pokud používáte ABI 7500 Fast, nastavte passive reference na „None“!

Kit je dodáván **bez ROX**, a proto jej nelze použít s real-time PCR přístroji, které ROX vyžadují pro normalizaci dat (např. Applied Biosystems®: StepOne, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Výkonnostní specifikace kitu

Stanovení **sensitivity** bylo provedeno na 73 vzorcích pozitivních na FV Leiden mutaci s CE referenčním kitem. FV Leiden RealFast™ kit stanovil všech 73 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 165 vzorcích negativních na FV Leiden mutaci s CE referenčním kitem. FV Leiden RealFast™ kit stanovil všech 165 vzorků jako negativních, což odpovídá 100% pravdivě negativních hodnot.

Limit detekce: 0,2 ng genomové DNA (v reakci)

Doporučení koncentrace DNA: 2 – 20 ng/μl genomové DNA

6. Nutný materiál, který není součástí kitu

Real-time PCR přístroj s filtry pro FAM (520 nm) a HEX (556 nm), s přístrojem kompatibilní reakční zkumavky, jednorázové bezpudrové rukavice, vortex, mini-centrifuga pro 2.0 ml zkumavky, stojánky na zkumavky, set kalibrovaných mikropipet (0,5 – 1000 μl), sterilní špičky s filtrem, molecular grade voda, DNA izolační kit, mrazák, koš na biohazardní odpad.

7. Protokol experimentu

7.1. Izolace DNA

Reagencie pro izolaci DNA nejsou součástí kitu.

Lze použít DNA izolovanou z různých zdrojů (např. z plné krve, suché kapky, bukalního stěru nebo slin).

Ujistěte se, že je izolovaná DNA vhodná k amplifikaci vzhledem k její koncentraci, čistotě a integritě.

Pro přesné stanovení genotypu by mělo být množství DNA v reakci v rozmezí od 10 do 100 ng u všech vzorků.

7.2. PCR kontroly

Vždy přidejte **Netemplátovou kontrolu (NTC)** do každého experimentu, aby bylo možné vyloučit případnou kontaminaci. Je vhodné analyzovat NTC (použijte PCR-grade vodu místo DNA) v duplikátu.

Vždy přidejte **FV WT-Control** a **FV MUT-Control** jako pozitivní kontroly k Vaším neznámým vzorkům.

Některé real-time PCR softwary, např. AB 7500 Fast, požadují pro správnou alelickou diskriminaci

výsledky pro všechny tři možné genotypy. V případě nutnosti analyzovat heterozygotní kontrolu (HET-Control), smíchejte aliquot WT-Control a MUT-Control v poměru 1:1.

Poznámka: WT- a MUT-control jsou potenciálními zdroji kontaminace. Pracujte s nimi opatrně.

7.3. Příprava FV Leiden RealFast™ Master Mixu

Po rozmrazení lehce zvortexujte a krátce stočte všechny roztoky. PCR mix připravujte při laboratorní teplotě. Připravte si dostatek **Master Mixu** pro všechny Vaše reakce (N vzorků + pozitivní kontroly + negativní kontrola/y) plus alespoň jedna další reakce navíc pro korekci pipetovací chyby:

Roztok	Na 1 reakci	např. na 24+1 reakcí
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Dávkujte **15 µl Master Mixu** do každé zkumavky. Přidejte **5 µl** přečištěné **DNA** nebo **Kontroly** do finálního reakčního objemu 20 µl.

Pro minimalizování rizika kontaminace, vždy pipetujte templát v následujícím pořadí: první NTC, potom vzorky a poslední pozitivní kontroly. Okamžitě uzavřete zkumavky.

Poznámka: Zabraňte vzniku bublin ve finálním reakčním mixu a nesahejte na povrch víček nebo sealing filmu bez rukavic. Obojí může mít vliv na měření fluorescence. Krátce stočte je-li to nutné.

7.4. PCR program

Programujte real-time PCR přístroj dle manuálu výrobce pro alelickou diskriminaci/genotypovací experiment. Vložte vzorky do cycleru a spusťte následující program:

AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480,

Mx3005P® a ostatní přístroje s Peltier blokem:

Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	60°C	1 min	Annealing/Extenze – Data acquisition ve FAM a HEX kanálu

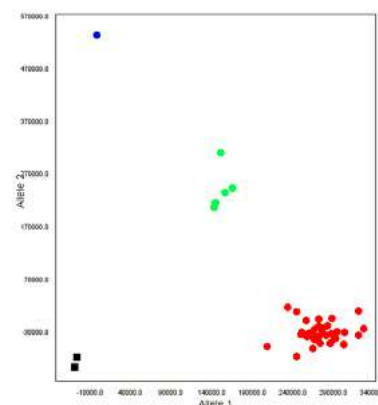
Rotor-Gene® 6000:

Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	56°C	1 min	Annealing/Extenze – Data acquisition ve FAM a HEX kanálu

8. Analýza dat / Interpretace výsledků

Genotyp každého vzorku je určen výpočtem poměru mezi signály zaznamenanými v HEX kanálu (normální) a signály zaznamenanými v kanálu FAM (mutant). Většina real-time PCR softwarů automaticky uspořádává data obou kanálů do clusterů v scatterplotu. Datové body vynesené podél os x a y odpovídají normálním a homozygotně mutantním genotypům. Datové body seskupené uprostřed scatterplotu představují heterozygotní genotypy. NTC se objeví v levém dolním rohu.

Kontroly	Amplifikace ve FAM kanálu (520 nm)	Amplifikace v HEX kanálu (556 nm)	Genotyp
WT-Control	NE	ANO	normální
HET-Control	ANO	ANO	heterozygot
MUT-Control	ANO	NE	homozygotní mutant
NTC	NE	NE	-



Některé softwary potřebují pro přesné určení genotypu nastavit Threshold manuálně.

Doporučení pro nastavení Thresholdu (C_q):

Nastavte hodnotu thresholdu pro kanál FAM přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný WT-Control (HEX-pozitivní). A naopak, nastavte hodnotu thresholdu pro kanál HEX přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný MUT-Control (FAM-pozitivní).

Pro analýzu dat postupujte dle návodu výrobce přístroje.

9. Varování a opatření

- Určeno pro *in vitro* diagnostiku.
- Při používání reagensů a vzorků vždy používejte jednorázové bezpudrové rukavice a vhodný laboratorní oděv.
- Přípravu PCR reakce provádějte v prostoru odděleném od prostoru pro přípravu nukleových kyselin a prostoru pro analýzu PCR produktů.
- Používejte pipety určené pro přípravu PCR reakcí, používejte filtrované špičky.
- Používejte reakční zkumavky kompatibilní s přístrojem s opticky čistými víčky nebo sealery.
- Nemíchejte reagensie z různých šarží.
- Nepoužívejte expirované kity nebo jejich součásti.