


FV-PTH mpx RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-115/7-118

 -30°C/-15°C



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-PTH mpx RealFast™ Assay je rychlý a přesný multiplexní real-time PCR test pro současnou detekci dvou nejdůležitějších trombofilních mutací. Bodová mutace 1691G>A mutace v genu pro lidský koagulační Faktor V (FV), známá jako FV Leiden a mutace 20210G>A ve *Faktoru II* (F2) genu pro prothrombin (PTH), jsou spojeny se zvýšeným rizikem Trombotických chorob. Kvalitativní test rozlišuje tři možné genotypy pro každou mutaci v lidské genomové DNA: normální, heterozygot nebo homozygotní mutant.

Referenční sekvence: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025/ PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; dbSNP: rs1799963.

2. Úvod

FV a PTH jsou hlavní hráči v koagulační kaskádě. 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. PTH mutace 20210G>A v 3' nekódující oblasti genu vede ke zvýšení syntézy mRNA vede ke zvýšení plazmatické hladiny protrombinu, což zase vede ke zvýšení tvorby trombinu a následně k nadměrné tvorbě fibrinových sraženin. Heterozygotními nosiči mutace FV Leiden mají 5 až 10krát vyšší riziko vzniku žilní trombózy, zatímco homozygotní nosiči mají 50 až 100krát vyšší riziko ve srovnání se zdravými. Heterozygotní nosiči mutace PTH 20210G>A mají 3krát, a homozygotní nosiči až 20krát vyšší riziko ve srovnání se zdravými. Jedinci s dalšími rizikovými faktory, jako je přítomnost jiných genetických predispozic, obezity, hypertenze, diabetu typu 2, kouření nebo užívání perorální antikoncepce, jsou ještě více náchylní k žilním trombotickým příhodám. 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

				100/32 testů
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000/320 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550/550 µl
FV-PTH mpx WT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75/75 µl
FV-PTH mpx MUT-Control	1 zkumavka		červené víčko	75/75 µl

RealFast™ 2x mpx Probe Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. FV-PTH mpx Assay Mix obsahuje F5 a F2 gen-specifické primery a čtyři alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy. Kit obsahuje kontrolní genotypy wild type (WT-Control) a homozygotně mutantní kontrolu (MUT-Control).

Kit obsahuje reagencie pro 100/32 reakcí o objemu 20 µl každá.

4. Skladování a Stabilita

FV-PTH mpx RealFast™ Assay je dodávána na chladících blocích. Po dodání skladujte kit při -30 až -15°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 dva genově specifické primery, který amplifikují 142 bp fragment genu *F5* a 110bp fragment *F2* genu, a také čtyři dvojitě značené alel-specifické hydrolytické sondy, které hybridizují s cílové sekvence amplifikovaných fragmentů. 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 zhasnutí vytváří fluorescenční signál v reálném čase, který je úměrný kumulativnímu produktu PCR.

Hydrolytická sonda	Fluorofor	Kanál
FV mutant	FAM	520 nm
FV wild type	HEX	556 nm
PTH mutant	ROX	605 nm
PTH wild type	Cy5	670 nm

V normálních vzorcích **wild type sondy** generují silnou fluorescenci v HEX a Cy5 kanálu a žádný nebo jen baseline signál ve FAM a ROX kanálu. Naopak, v homozygotně mutantních vzorcích **mutantní sondy** generují silný fluorescenční signál ve FAM a ROX kanálu a žádný nebo pouze baseline signál v HEX a Cy5 kanálu. U heterozygotních vzorků se wild type i mutantní sondy váží na amplikony a generují signály ve všech kanálech.

5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

FV-PTH mpx RealFast™ Assay je validován s použitím přístroje AB 7500 Fast.

Kit je kompatibilní s různými dalšími real-time PCR přístroji umožňujícími detekci fluorescence FAM, HEX, Cy5 a ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

Poznámka: RealFast™ Genotyping QuickGuides pro přípravu a analýzu experimentu na různých typech přístrojů lze stáhnout z www.viennalab.com.

Kit **není vhodný** pro použití s real-time PCR přístroji vyžadujícími ROX normalizaci dat (např. Applied Biosystems®: StepOne, 7300, 7900/7900HT) nebo s přístroji, které neumožňují detekci v uvedených kanálech.

5.3. Výkonnostní specifikace kitu

Stanovení **sensitivity** bylo provedeno na 39 vzorcích pozitivních na FV Leiden alely a 37 pozitivních na PTH 20210G>A alely, s CE referenčními kity. FV-PTH mpx RealFast™ kit stanovil všechny pozitivní alely, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 235 negativních vzorcích na FV Leiden alely a 247 negativních na PTH 20210G>A alely, s CE referenčními kity. FV-PTH mpx RealFast™ kit stanovil všechny negativní alely, 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), HEX (556 nm), ROX (605 nm) a Cy5 (670 nm), s přístrojem kompatibilními reakčními zkumavkami, 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-PTH mpx **WT-Control** a FV-PTH mp **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-PTH mpx RealFast™ Master Mixu

Po rozmrznutí 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 Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx 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:

Program			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, a další přístroje s Peltier systémem ohřevu	MIC, Rotor-Gene®6000 (s 36-well a 72-well rotorem)
Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace	Denaturace
	60°C	1 min	Annealing/Extenze – Data acquisition ve FAM, HEX, ROX a Cy5 kanálech	Annealing/Extenze – Data acquisition v Green, Yellow, Orange a Red kanálech

8. Analýza dat / Interpretace výsledků

Genotyp každého vzorku je určen výpočtem poměru mezi signály zaznamenanými v **HEX** nebo **Cy5 kanálu (normální)** a signály zaznamenanými v kanálu **FAM** nebo **ROX kanálu (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/vzorky	Amplifikace v kanálu				Genotyp FV/PTH
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NE	ANO	NE	ANO	normální FV / normální PTH
mpx HET-Control	ANO	ANO	ANO	ANO	heterozygot FV / heterozygot PTH
mpx MUT-Control	ANO	NE	ANO	NE	homozygótní mutant FV / homozygótní mutant PTH
NTC	NE	NE	NE	NE	-
Vzorek 1	ANO	ANO	NE	ANO	heterozygot FV / normální PTH
Vzorek 2	ANO	NE	NE	ANO	homozygótní mutant FV / normální PTH
Vzorek 3	NE	ANO	ANO	ANO	normální FV / heterozygot PTH
Vzorek 4	NE	ANO	ANO	NE	normální FV / homozygótní mutant PTH

Některé softwary potřebují pro přesné určení genotypu nastavit Treshold manuálně.

Doporučení pro nastavení Tresholdu (C_q):

Nastavte hodnotu tresholdu pro kanál FAM a ROX přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný WT-Control (HEX-/Cy5-pozitivní). A naopak, nastavte hodnotu tresholdu pro kanál HEX a Cy5 přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný MUT-Control (FAM-/ROX-pozitivní).

Vzorky, které protnou treshold za hodnotou C_q 37 jsou invalidní a musí být zopakovány.

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.