


# MTHFR 677C>T RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-160

 -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](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Použití

MTHFR 677C>T RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci 677C>T mutace v genu *methylenetetrahydrofolat reduktázy (MTHFR)*. Mutace je spojená se sníženou aktivitou enzymu, která vede k hyperhomocysteinémii a toxickým vedlejším účinkům terapie methotrexáty.





Kit je určen k identifikaci pacientů s predispozicí ke kardiovaskulárním chorobám a intolerancí na methotrexát. Kvalitativní test rozlišuje tři možné genotypy MTHFR 677C>T v DNA: CC (normální), CT (heterozygot) nebo TT (homozygótní mutant).

Referenční sekvence: HGVS: NG\_01351.1 g.14783C>T; dbSNP: rs1801133.

## 2. Úvod

Zvýšené hladiny homocysteinu, meziproductu metabolismu methioninu, jsou rizikovým faktorem pro aterosklerózu a arteriální trombózu. Hyperhomocysteinémie nakonec vede k endoteliální dysfunkci s přidruženou aktivací trombocytů a tvorbou trombů. Mírné až středně těžké formy mohou být způsobeny homozygotitou pro běžnou bodovou mutaci 677C> T v kódující oblasti genu MTHFR. Druhá běžná mutace MTHFR 1298A> C také přispívá ke snížené enzymové aktivitě, zejména pokud se vyskytuje současně s 677C> T. Prevalence homozygotních 677C> T nosičů v normální populaci je až 15%, což odráží vysoké procento heterozygotů (40%). Hladiny homocysteinu nalačno jsou výrazně vyšší u jedinců heterozygotních pro obě substituce ve srovnání s jednotlivci nesoucími pouze heterozygotní mutaci 677C> T. Hyperhomocysteinémie může ovlivnit citlivost na methotrexát a přispět k toxicitě, neboť MTHFR je důležitým enzymem při udržování hladiny buněčných folátů. Proto homozygotnost pro 677C> T nebo složená heterozygotita pro 677C> T / 1298A> C přináší významně vyšší riziko nežádoucích vedlejších účinků léčby methotrexátem.

## 3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 µl
MTHFR 677C>T Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
MTHFR 677C>T WT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl
MTHFR 677C>T MUT-Control	1 zkumavka		červené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. MTHFR 677C>T Assay Mix obsahuje *MTHFR* gen-specifické primery a dvě alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy. Kit obsahuje kontrolní genotypy wild type (WT-Control) a homozygotně mutantní kontrolu (MUT-Control).

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

## 4. Skladování a Stabilita

MTHFR 677C>T 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 185 bp fragment genu 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 677C>T 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 677C>T 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 váží na amplikony a generují signály v obou kanálech.

## 5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

MTHFR 677C>T 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](http://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 67 vzorcích pozitivních na MTHFR 677C>T mutaci s CE referenčním kitem. MTHFR 677C>T RealFast™ kit stanovil všech 67 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 65 vzorcích negativních na MTHFR 677C>T mutaci s CE referenčním kitem. MTHFR 677C>T RealFast™ kit stanovil všech 65 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 **MTHFR 677C>T WT-Control** a **MTHFR 677C>T MUT-Control** jako pozitivní kontroly k Vaším neznámým vzorkům. Některé real-time PCR softwary, např. AB 7500 Fast, požadují pro

správnou alelickou diskriminací 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 MTHFR 677C>T 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
MTHFR 677C>T Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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 – <b>Data acquisition</b> ve FAM a HEX kanálu

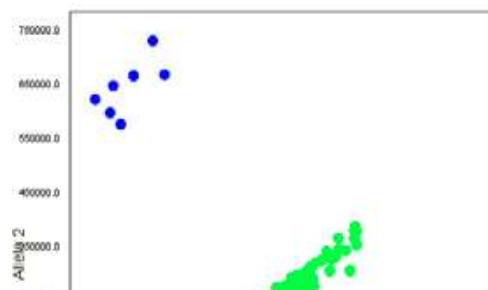
**Rotor-Gene® 6000:**

Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	56°C	1 min	Annealing/Extenze – <b>Data acquisition</b> 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	Amplifikace v HEX	Genotyp
----------	--------------------	-------------------	---------



	kanálu (520 nm)	kanálu (556 nm)	
WT-Control	<b>NE</b>	<b>ANO</b>	normální
HET-Control	<b>ANO</b>	<b>ANO</b>	heterozygot
MUT-Control	<b>ANO</b>	<b>NE</b>	homozygótní mutant
NTC	<b>NE</b>	<b>NE</b>	-

Některé softwary potřebují pro přesné určení genotypu nastavit Treshold manuálně.

Doporučení pro nastavení Tresholdu (C<sub>q</sub>):

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

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.