


MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-170

 -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

MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci 1298A>C 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 1298A>C v DNA: AA (normální), AC (heterozygot) nebo CC (homozygótní mutant).

Referenční sekvence: HGVS: NG_01351.1 g.16685A>C; dbSNP: rs1801131.

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 heterozygosita 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 1298A>C Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
MTHFR 1298A>C WT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl
MTHFR 1298A>C MUT-Control	1 zkumavka		červené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. MTHFR 1298A>C 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 1298A>C 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 144 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 1298A>C 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 1298A>C 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 1298A>C 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 65 vzorcích pozitivních na MTHFR 1298A>C mutaci s CE referenčním kitem. MTHFR 1298A>C RealFast™ kit stanovil všech 65 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 71 vzorcích negativních na MTHFR 1298A>C mutaci s CE referenčním kitem. MTHFR 1298A>C RealFast™ kit stanovil všech 71 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 1298A>C WT-Control** a **MTHFR 1298A>C 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 1298A>C 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 1298A>C 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	Amplifikace v HEX	Genotyp
----------	--------------------	-------------------	---------



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

Některé softwary potřebují pro přesné určení genotypu nastavit Treshold manuálně.

Doporučení pro nastavení Tresholdu (C_q):

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.