


HFE C282Y RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-130

 -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





HFE C282Y RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci C282Y mutace v genu *HFE* (High Fe), který kóduje atypickou molekulu MHC třídy I. Homozygositá této missence mutace je spojena s nejčastějším typem dědičné hemochromatózy (HFE-HH). Kit je určen pro identifikaci HH pacientů nesoucích mutaci HFE C282Y. Kvalitativní kit rozlišuje tři možné genotypy HFE C282Y v DNA: CC (normální), CY (heterozygot) nebo YY (homozygótní mutant).

Referenční sekvence: HGVS: NG_008720.2 g.10633G>A; dbSNP: rs1800562.

2. Úvod

HH zahrnuje heterogenní skupinu zděděných poruch hromadění železa s odlišnými základními molekulárními defekty a různými klinickými příznaky. Příčinou poruch HH je relativní nedostatek hormonu hepcidinu, který kontroluje systémové hladiny železa udržováním plazmatických koncentrací železa ve fyziologickém rozmezí. Jakékoli poruchy regulátorů hepcidinu, jako jsou mutace genů *HH*, jako je *HFE*, *Transferrinový receptor 2*, *Hemojuvelin*, samotný *Hepcidin a /* nebo *Ferroportin 1*, přispívají k patofyziologii související s železem. V rámci této skupiny se mutace v genu *HFE* vyskytují u nejběžnějších forem HH. Přibližně 80% pacientů s HH je homozygotních pro C282Y a významně méně je složených heterozygotů pro mutaci C282Y a H63D. Homozygotní nosiči mutací H63D typicky vykazují malý nárůst absorpce železa a zřídka rozvíjejí HH.

3. Obsah kitu

| | | | | |
|-----------------------------|------------|---|---------------|---------|
| RealFast™ 2x Genotyping Mix | 1 zkumavka |  | bílé víčko | 1000 µl |
| HFE C282Y Assay Mix | 1 zkumavka |  | fialové víčko | 550 µl |
| HFE C282Y WT-Control | 1 zkumavka |  | zelené víčko | 75 µl |
| HFE C282Y MUT-Control | 1 zkumavka |  | červené víčko | 75 µl |

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. HFE C282Y Assay Mix obsahuje *FII* 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

HFE C282Y 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 *FII* 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 HFE C282Y 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 HFE C282Y 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

HFE C282Y 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 60 vzorcích pozitivních na HFE C282Y mutaci s CE referenčním kitem. HFE C282Y RealFast™ kit stanovil všech 60 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 60 vzorcích negativních na HFE C282Y mutaci s CE referenčním kitem. HFE C282Y RealFast™ kit stanovil všech 60 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 **HFE C282Y WT-Control** a **HFE C282Y 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 HFE C282Y 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 |
| HFE C282Y 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 |

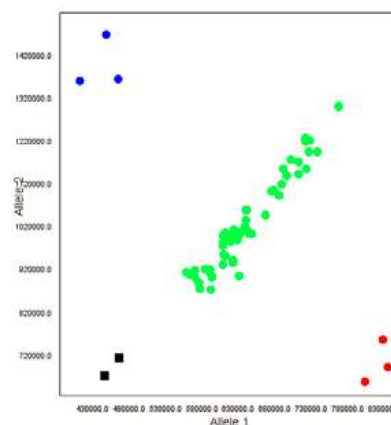
Rotor-Gene® 6000:

| 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.