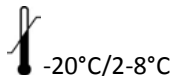


# SLCO1B1 c.521T>C RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-210



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

SLCO1B1 c.521T>C RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci c.521T>C varianty v lidském genu *solute carrier organic anion transporter 1B1*. Varianta c.521T>C, která je obsažena v alelách SLCO1B1\*5, \*15 a \*17, vede ke zhoršené funkci kódovaného transportního proteinu a následně ke snížené absorpci v játrech a ke zvýšení plazmatické koncentrace různých léků, jako jsou statiny. Kvalitativní test umožňuje rozlišit tři možné genotypy SLCO1B1 c.521T>C spojené s normálním (T/T), zvýšeným (T/C) nebo vysokým (C/C) rizikem vzniku myopatií.

Referenční sekvence: HGVS: NG\_011745.1: g.52422T>C; NCBI dbSNP: rs414056.

## 2. Úvod

Statiny jsou nejčastěji předepisované hypolipidemické léky pro snížení a kontrolu cholesterolu s nízkou hustotou lipoproteinu. Jsou obecně považovány za bezpečné a dobře snášené. Někteří pacienti však mají nežádoucí svalové příznaky a následně se rozhodnou přerušit léčbu. Klinické spektrum se může pohybovat od časté bolesti s nebo bez důkazů svalové degradace až po velmi vzácné, ale závažné poškození svalů s akutním poškozením ledvin (rabdomyolýza). Riziko myopatie související s simvastatinem je závislé na dávce a 4krát vyšší u pacientů nesoucích jednu alelu c.521C a 17krát vyšší u pacientů nesoucích dvě alely c.521C. Guidelines konsorcia klinické farmakogenetické implementace (CPIC) pro SLCO1B1 a simvastatinem indukovanou myopatii doporučují upravit dávku simvastatinu podle genotypu pacienta (viz [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)).

## 3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 µl
SLCO1B1 c.521T>C Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
SLCO1B1 c.521T>C TT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl
SLCO1B1 c.521T>C CC-Control	1 zkumavka		červené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. SLCO1B1 c.521T>C Assay Mix obsahuje *SLCO1B1* gen-specifické primery a dvě alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy. Kit obsahuje kontroly zastupující SLCO1B1 c.521 TT a CC genotypy.

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

## 4. Skladování a Stabilita

SLCO1B1 c.521T>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 91 bp fragment genu *SLCO1B1* 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 SLCO1B1 c.521TT vzorcích se **HEX-značená c.521 T 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 SLCO1B1 c.521CC vzorcích se **FAM-značená c.521 C 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 (SLCO1B1 c.521TC) se obě sondy váží na amplicony a generují signály v obou kanálech.

## 5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

SLCO1B1 c.521T>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](http://www.viennalab.com). Pokud používáte ABI 7500 Fast, nastavte passive reference na „None“!

Kit je dodáván **bez ROX**. Pro použití s real-time PCR přístroji, které ROX vyžadují pro normalizaci dat (např. Applied Biosystems®: StepOne, 7300, 7900/7900HT) přidejte ROX ve finální koncentraci 1µM do 2x Genotyping Mixu.

## 5.3. Výkonnostní specifikace kitu

Stanovení **sensitivity** bylo provedeno na 40 vzorcích pozitivních na SLCO1B1 c.521C polymorfismus s referenčním kitem. SLCO1B1 c.521T>C RealFast™ kit stanovil všech 40 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 124 vzorcích negativních na SLCO1B1 c.521C polymorfismus s referenčním kitem. SLCO1B1 c.521T>C RealFast™ kit stanovil všech 124 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 SLCO1B1 c.521T>C **TT-Control** a SLCO1B1 c.521T>C **CC-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 (TC-Control), smíchejte aliquot TT-Control a CC-Control v poměru 1:1.

**Poznámka:** TT- a CC-controls jsou potenciálními zdroji kontaminace. Pracujte s nimi opatrně.

### 7.3. Příprava SLCO1B1 c.521T>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
SLCO1B1 c.521T>C_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:**

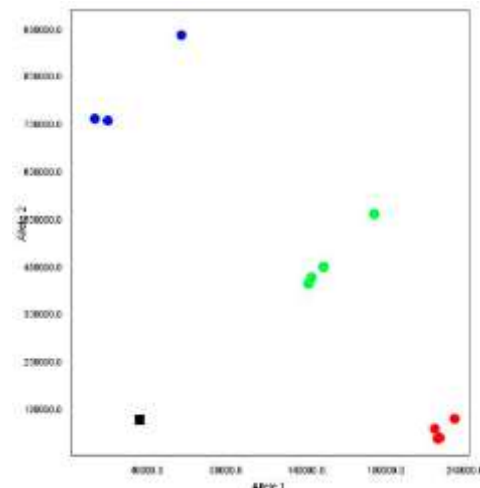
Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	36well rotor:56°C 72well rotor:60°C	1 min	Annealing/Extenze – <b>Data acquisition</b> ve FAM a HEX kanálu

## 8. Analýza dat / Interpretace výsledků

Genotyp každého vzorku je určen výpočtem poměru mezi signály zaznamenanými v **HEX kanálu (T)** a signály zaznamenanými v **kanálu FAM (C)**. Většina real-time PCR softwarů automaticky uspořádává data obou kanálů do clusterů v scatterplotu. Datové body vynesené podél os x a y odpovídají c.521TT a c.521CC genotypům. Datové body seskupené uprostřed scatterplotu představují heterozygotní c.521TC genotypy. NTC se objeví v levém dolním rohu.

Kontroly	Amplifikace ve FAM kanálu (520 nm)	Amplifikace v HEX kanálu (556 nm)	Genotyp/riziko myopatie
TT-Control	<b>NE</b>	<b>ANO</b>	TT/normální
TC-Control	<b>ANO</b>	<b>ANO</b>	TC/zvýšené
CC-Control	<b>ANO</b>	<b>NE</b>	CC/vysoké
NTC	<b>NE</b>	<b>NE</b>	-

Některé softwarey 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 TT-Control (HEX-positivní). A naopak, nastavte hodnotu tresholdu pro kanál HEX přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný CC-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.