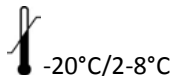


IL28B RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-200



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





IL28B RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci TT>ΔG dvounukleidového frameshiftu v genu/pseudogenu lidského *interferonu lambda 4 (IFNL4)*, který je lokalizován před kódující oblasti genu pro interleukin 28B (IL28B). Genotypizace pomáhá v predikci terapeutické odpovědi pacientů s infekcí hepatitidy C (HCV), kteří prodělávají terapii peginterferonem/ribavirinem (pegIFN/RBV). Homozygótní nosiči příznivé alely TT jsou predisponováni k až třikrát vyšší trvalé virologické odpovědi na léčbu (SVR) než nosiči alely ΔG. Kvalitativní test rozlišuje tři možné genotypy *IFNL4* TT>ΔG v lidské DNA, spojené s vysokou (TT/TT), nebo nízkou (TT/ΔG a ΔG/ΔG) léčbou indukovanou, nebo spontánní HCV clearance.

Referenční sekvence: HGVS: NG_042193.1: g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Úvod

Chronická infekce HCV postihuje přibližně 3% světové populace a je hlavní příčinou cirhózy, rakoviny jater a transplantace jater. Úspěch doporučené standardní léčby pegIFN / RBV závisí na virových i hostitelských faktorech. Pacienti infikovaní nepříznivým typem HCV typu 1 nebo 4 mají nižší SVR než pacienti infikovaní typem 2 nebo 3. Hostitelské faktory ovlivňující odpověď na léčbu zahrnují věk, pohlaví, etnický původ a genetické polymorfismy ovlivňující antivirovou aktivitu. Varianta *IFNL4* rs368234815 TT> ΔG je silně spojena s variantou rs12979860 C> T, dobře zavedeným markerem pro dlouhodobý terapeutický úspěch. Několik studií prokázalo rs368234815 jako funkční variantu pro regulaci IL28B mRNA a ve srovnání s rs12979860 a jako lepší prediktor clearance SVR a HCV, zejména u pacientů s africkým původem. *IFNL4* genotyp TT / TT podporuje spontánní i léčebně indukovanou virovou clearance u pacientů s HCV, primárně u těch infikovaných typem 1 nebo 4.

3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 μl
IL28B Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 μl
IL28B TT/TT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 μl
IL28B ΔG/ΔG -Control	1 zkumavka		červené víčko	75 μl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. IL28B Assay Mix obsahuje *IFNL4* gen-specifické primery a dvě alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy. Kit obsahuje kontroly zastupující IL28B TT/TT a ΔG/ΔG genotypy. Kit obsahuje reagentie pro 100 reakcí o objemu 20 μl každá.

4. Skladování a Stabilita

IL28B 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 110 bp fragment genu *IFNL4* a dvě dvojitě 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 homozygotních TT/TT vzorcích se **HEX-značená TT 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 homozygotních $\Delta G/\Delta G$ vzorcích se **FAM-značená ΔG sonda** váže na genový fragment. V kanálu FAM je detekován silný fluorescenční signál a žádný nebo pouze výchozí signál v HEX kanálu. U heterozygotních TT/ ΔG vzorků se obě sondy váží na amplikony a generují signály v obou kanálech.

5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

IL28B 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**. 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 1 μ M do 2x Genotyping Mixu.

5.3. Výkonnostní specifikace kitu

IL28B RealFast™ kit a referenční kit pro detekci rs12979860 C>T polymorfismu vykázal 99,4% shody v genotypizaci 84 vzorků.

Ze 168 alel IL28B RealFast Assay kit identifikoval 113 prospěšných TT a 55 zhoršujících ΔG alel, zatímco referenční kit identifikoval 114 prospěšných C alel a 54 zhoršujících T alel. Sekvenování neshodných vzorků ukázalo přítomnost ΔG alely, která nebyla v korelaci s alelou rs12979860T na jednom chromozómu.

Sensitivita a specifita IL28B RealFast Assay kit ukazuje 100% pravdivě pozitivních a 100% pravdivě negativních.

Limit detekce: 0,2 ng genomové DNA (v reakci)

Doporučení koncentrace DNA: 2 – 20 ng/ μ l 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 μ l), 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 IL28B **TT/TT-Control** a IL28B **ΔG/ΔG -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 (TT/ΔG-Control), smíchejte aliquot TT-Control a ΔG-Control v poměru 1:1.

Poznámka: TT- a ΔG/ΔG-controls jsou potenciálními zdroji kontaminace. Pracujte s nimi opatrně.

7.3. Příprava IL28B 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 Genotyping Mix	10 µl	250 µl
IL28B_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

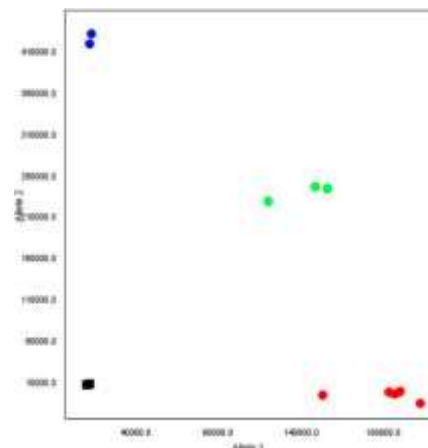
Rotor-Gene® 6000:

Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	36well rotor: 56°C 72well rotor: 60°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 (TT)** a signály zaznamenanými v **kanálu FAM (ΔG)**. Většina real-time PCR softwarů automaticky uspořádává data obou kanálů do clusterů v scatterplotu. Datové body vynesené podél os x a y odpovídají TT a ΔG genotypům. Datové body seskupené uprostřed scatterplotu představují heterozygotní TT/ΔG genotypy. NTC se objeví v levém dolním rohu.

Kontroly	Amplifikace ve FAM kanálu (520 nm)	Amplifikace v HEX kanálu (556 nm)	Genotyp/HCV clearance
TT/TT-Control	NE	ANO	homozygót TT/vysoká
TT/ Δ G-Control	ANO	ANO	heterozygót TT/ Δ G/nízká
Δ G/ Δ G-Control	ANO	NE	homozygót Δ G/nízká
NTC	NE	NE	-



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/TT-Control (HEX-pozitivní). A naopak, nastavte hodnotu tresholdu pro kanál HEX přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný Δ G/ Δ G-Control (FAM-pozitivní).

Pro analýzu dat postupujte dle návodu výrobce přístroje.

9. Varování a opatření

- Určeno pro *in vitro* diagnostiku.
- Při používání reagentů 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 zkušavky kompatibilní s přístrojem s opticky čistými víčky nebo sealery.
- Nemíchejte reagentie z různých šarží.
- Nepoužívejte expirované kity nebo jejich součásti.