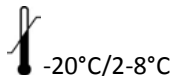


VKORC1 -1639G>A RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-190



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





VKORC1 -1639G>A RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci -1639G>A jednonukleidového polymorfismu (SNP) v promotoru genu lidského *Vitamin K Epoxid Reduktázového komplexu 1 (VKORC1)*. Tento polymorfismus je nejrelevantnější taq-SNP spojený s interpacientskou variabilitou dávkování orálních antikoagulancií, jako je warfarin, phenprocoumon nebo acenocoumarol. Kvalitativní test rozlišuje tři možné genotypy VKORC1 -1639G>A v DNA: GG (normální dávka), GA (intermediální dávka) nebo AA (nízká dávka).

Referenční sekvence: HGVS: NG_011564.1 g.3588G>A; NCBI dbSNP: rs9923231.

2. Úvod

VKORC1 je klíčový protein v cestě vitamínu K a cíl antagonistů vitamínu K, které se používají jako perorální antikoagulantia při prevenci a léčbě tromboembolických poruch. Tyto léky jsou široce předepisovány, ale jejich úzký terapeutický rozsah a široká variace léčebné odpovědi komplikují léčbu zejména na začátku. Empirické dávkování vede k častým změnám dávkování, neboť mezinárodní normalizovaný poměr (INR) je příliš vysoký nebo příliš nízký, takže pacienti jsou vystaveni riziku krvácení (nadměrné antikoagulaci) nebo tromboembolie (podkoagulace). Kromě věku, pohlaví, indexu tělesné hmotnosti a použití souběžného léku je varianta VKORC1 -1639G>A nejdůležitějším genetickým faktorem, který ovlivňuje požadavky na terapeutické dávky. Homozygotní nosiči alely A vyžadují nižší dávku perorálních antikoagulancií než heterozygotní nebo homozygotní nosiči alely G.

3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 µl
VKORC1 -1639G>A Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
VKORC1 -1639G>A WT-Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl
VKORC1 -1639G>A MUT-Control	1 zkumavka		červené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. VKORC1 -1639G>A Assay Mix obsahuje 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

VKORC1 -1639G>A 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 120 bp fragment genu VKORC1 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.

Ve vzorcích VKORC1 -1639GG se HEX-značená VKORC1 -1639G 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, ve vzorcích VKORC1 -1639AA se FAM-značená VKORC1 -1639A 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 (VKORC1 -1639GA) se obě sondy váží na amplikony a generují signály v obou kanálech.

5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

VKORC1 -1639G>A 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 77 vzorcích pozitivních na VKORC1 -1639A polymorfismus s CE referenčním kitem. VKORC1 -1639G>A RealFast™ kit stanovil všech 77 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 95 vzorcích negativních na VKORC1 -1639A polymorfismus s CE referenčním kitem. VKORC1 -1639G>A RealFast™ kit stanovil všech 95 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 VKORC1 -1639 **GG-Control** a VKORC1 -1639 **AA-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 (GA-Control), smíchejte aliquot GG-Control a AA-Control v poměru 1:1.

Poznámka: GG- a AA-controls jsou potenciálními zdroji kontaminace. Pracujte s nimi opatrně.

7.3. Příprava VKORC1 -1639G>A 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
VKORC1 -1639G>A_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

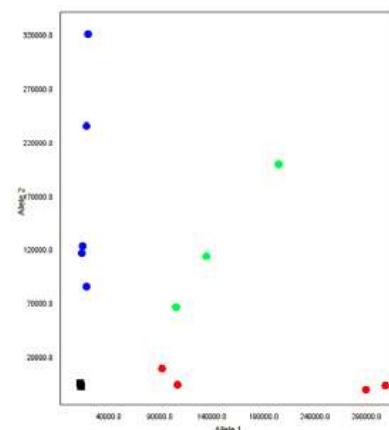
Rotor-Gene® 6000:

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 (-1639G) a signály zaznamenanými v kanálu FAM (-1639A). Většina real-time PCR softwarů automaticky uspořádává data obou kanálů do clusterů v scatterplotu. Datové body vynesené podél os x a y odpovídají -1639GG a -1639AA genotypům. Datové body seskupené uprostřed scatterplotu představují heterozygotní -1639GA genotypy. NTC se objeví v levém dolním rohu.

Kontroly	Amplifikace ve FAM kanálu (520 nm)	Amplifikace v HEX kanálu (556 nm)	Genotyp
GG-Control	NE	ANO	GG/normální dávka
GA-Control	ANO	ANO	GA/intermediální dávka
AA-Control	ANO	NE	AA/nízká dávka
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 GG-Control (HEX-pozitivní). A naopak, nastavte hodnotu tresholdu pro kanál HEX přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný AA-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.