


CAH RealFast™ CNV Assay

Kat. číslo 7-410

 -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

CAH RealFast™ CNV Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci copy number variací (CNV) *CYP21A2* genu. Parciální nebo kompletní delece genu *CYP21A2* jsou asociovány s defektním metabolismem adrenálních steroidů. Kit je určen k identifikaci pacientů s kongenitální adrenální hyperplázií (CAH) a lze je použít ve spojení s kitem CAH StripAssay® nebo DNA sekvenováním. Semi-kvantitativní test rozlišuje mezi delecemi, duplikacemi a normálním počtem kopií v genomové DNA. Referenční sekvence: HGVS: NG_007941.2.

2. Úvod

CAH je autosomálně recesivní porucha kůry nadledvinek (incidence 1: 10 000-15 000) způsobená v asi 95% případech genetickými defekty v genu steroid 21-hydroxylázy *CYP21A2*. Výsledný nedostatek biosyntézy kortizolu a aldosteronu vede nakonec k přebytku androgenu. Široká škála klinických projevů zahrnuje klasickou CAH, salt-wasting CAH, klasickou jednoduchou virilizující CAH a také mírných neklasických forem. Podkladové aberace v genu *CYP21A2* jsou (1) bodové mutace, (2) malé delece / konverze a (3) chromozomální přestavby jako úplné *CYP21A2* delece, duplikace nebo chimérické *CYP21A1P* / *CYP21A2* geny. Velké delece včetně chimér *CYP21A1P* / *CYP21A2* představují 27% až 39% mutantních alel v Evropě a jsou ve většině případů spojeny s těžkou formou onemocnění.

3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 µl
CAH CNV Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
CAH CNV Calibrator	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Probe Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. CAH CNV Assay Mix obsahuje gen-specifické primery a alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy pro *CYP21A2* genu a endogenní kontrolu (EC). Calibrator reprezentuje normální status se dvěma funkčními *CYP21A2* kopiemi.

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

4. Skladování a Stabilita

CAH RealFast™ CNV 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 specifické primerové páry pro amplifikaci *CYP21A2* a endogenní kontroly (EC) s fragmenty o délce 141 bp každý. Dalšími komponenty jsou dvojité značené gen-specifické hydrolytické sondy, **FAM-obarvenou *CYP21A2* sondu** a **HEX-obarvenou EC sondu**, 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.

5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

CAH RealFast™ CNV 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 107 vzorcích pozitivních na CYP21A2 delecii/duplikaci s CE referenčním kitem. CAH RealFast™ CNV kit stanovil všech 107 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 435 vzorcích negativních na CYP21A2 delecii/duplikaci s CE referenčním kitem. CAH RealFast™ CNV kit stanovil všech 435 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 nebo suché kapky). 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. Netemplátová kontrola

Vždy přidejte **Netemplátovou kontrolu (NTC)** do každého experimentu, aby bylo možné vyloučit případnou kontaminaci. Použijte PCR-grade vodu místo DNA.

7.3. CAH CNV Calibrator

Vždy přidejte CAH CNV **Calibrator**. Calibrator (také „referenční vzorek“ nebo „kontrola“) je nutno definovat v real-time PCR softwaru.

Poznámka: Kontrolní vzorky jako je CAH CNV jsou potenciálními zdroji kontaminace. Pracujte s nimi opatrně.

7.4. Replikáty

Pro získání přesného měření je nezbytné analyzovat NTC, všechny vzorky a Calibrator v **triplikátech**.

7.5. Příprava **Master Mixu**

Po rozmrazení lehce zvortexujte a krátce stočte všechny roztoky. PCR mix připravujte při laboratorní teplotě. Připravte si dostatek **Master Mixu** pro všechny replikáty (3 x N vzorků + 3x Calibrator + 3x NTC) plus 4-6 dalších reakcí navíc pro korekci pipetovací chyby:

Roztok	Na 1 reakci	např. na 36 reakcí
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	360 µl
CAH CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Příprava reakcí v triplikátech

Připravte reakce pro NTC, všechny vzorky a CAH CNV Calibrator. Do vhodných zkumavek přidejte objemy master mixu a vzorků tak, jak je uvedeno níže:

Zkumavka	Objem Master Mixu	Název vzorku	Objem vzorku
1	49,5 µl	NTC	16,5 µl
2	49,5 µl	Vzorek	16,5 µl
3	49,5 µl	Calibrator	16,5 µl

Lehce zvortexujte a krátce stočte. Provádějte analýzu v **triplikátech** a dávkujte **20 µl Master Mixu** do každé zkumavky. Pro minimalizování rizika kontaminace, vždy pipetujte templát v následujícím pořadí: první NTC, potom vzorky a poslední Calibrator.

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.

7.7. 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	1 min	Annealing/Extenze
	72well rotor: 60°C		– Data acquisition ve FAM a HEX kanálu

8. Analýza dat / Interpretace výsledků

Copy number variation (CNV) každého vzorku se stanoví výpočtem relativního množství **CYP21A2 (kanál FAM)** pomocí normalizátoru **EC (kanál HEX)** a porovnáním s CAH CNV Calibrator. Většina softwarů real-time PCR automaticky rozloží data z obou kanálů do sloupcového grafu relativních kvantit, který se běžně používá pro experimenty s genovou expresí. Calibrator je nastaven na jedna a normální vzorky budou mít relativní kvantitu blízkou jedna, zatímco duplikace vedou k výrazně vyšším hodnotám a delece (stejně jako většina chimérických genů CYP21A1P / CYP21A2) vedou k významně nižším hodnotám. Vzhledem k možným chybám měření je vhodné opakovat reakce, které pro normální vzorky vykazují relativní kvantitu blízkou ($\pm 0,05$) k minimu a maximu pro normální vzorky. Seznam, který obsahuje terminologii specifickou pro přístroj, nastavení tresholdu (Cq) a měřicí rozsah ve vztahu k CNV statusu, je uveden níže.

Poznámka: 8bp delece v exonu 3 (c.329_336del GAGACTAC) vede ke stejným výsledkům jako kompletní CYP21A2 delece nebo většina CYP21A1P/CYP21A2 chimerických genů. Pouze CYP21A1P/CYP21A2 chiméry, které neobsahují 8bp delecí vyjdou normální.

Homozygótní delece, stejně jako homozygótní chimerické geny a 8bp delece vedou k drop-outu signálu pro CYP21A2. Zde je detekován pouze signál EC.

Real-Time PCR přístroj	Treshold	Relativní kvantily			Terminologie
		Delece	Normální	Duplikace	
AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)	0,1	<0,61	0,61-1,24	>1,24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	<0,69	0,69-1,19	>1,19	Relative Normalised Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	<0,66	0,66-1,09	>1,09	Normalized Ratio
Mx3005P (Agilent Technologies)	0,2	<0,74	0,74-1,27	>1,27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® (Qiagen)	0,05	<0,63	0,63-1,20	>1,20	relative Concentration

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.