



MOLBIOL

Sada LightMix[®] pro diagnostiku in-vitro MTHFR A1298C

Kat. č.: 40-0269-64

SAP č. Roche: 06896383001

Detekce varianty A1298C DNA
v genu MTHFR

pro použití s přístroji

Roche Diagnostics LightCycler[®]

Formát SimpleProbe[®]

Reagencie pro 64 reakcí

Při převzetí:

**Uložte sušené předmíchané reagencie a kontroly PCR
na místo chráněné před světlem při pokojové teplotě nebo s chlazením
(nezmrazujte).**



Obsah

1. INFORMACE O PRODUKTU	3
1.1. Obsah: LightMix® Kit MTHFR A1298C	3
1.2. Zamýšlené použití	3
1.3. Specifikace	4
1.3.1. Klinické vzorky	4
1.3.2. Přístroje, software a produktivita	5
1.4. Skladování a stabilita	5
2. POŽADOVANÁ ZAŘÍZENÍ A REAGENCIE	7
2.1. Přístroje LightCycler®	7
2.2. Přístroje:	7
2.3. Příprava vzorků	7
2.4. Reagencie	7
3. ZÁKLADNÍ INFORMACE	8
3.1. Zdravotnické základy	8
3.2. Metodologie a princip testu	8
3.3. Výkonové charakteristiky	9
4. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ	10
5. PROGRAMOVÁNÍ	11
5.1. Kompenzace barev	11
5.2. Kapilární přístroje LightCycler®	11
5.3. Přístroje LightCycler® 480	13
5.4. Přístroje LightCycler® 96	14
5.5. Přístroje LightCycler® PRO	15
6. PROTOKOL EXPERIMENTU	16
6.1. Příprava vzorků	16
6.2. Příprava reagentů	16
6.2.1. Příprava LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	16
6.2.2. Příprava reagentů pro specifické parametry	17
6.2.3. Příprava pozitivní kontroly	17
6.2.4. Příprava genotypizačních standardů	17
6.3. Příprava reakční směsi	18
6.3.1. Příprava 64 reakčních směsí LightCycler®	18
6.3.2. Příprava jednotlivé reakční směsi LightCycler®	18
6.3.3. Postup plnění kapilár / jamek	19
6.4. Skladování a stabilita rozpuštěných složek	19
6.5. Nakládání kontrol a genotypizačních standardů	20
6.5.1. Kapilární přístroje	20
6.5.2. Přístroje LightCycler® 480	20
6.5.3. Přístroje LightCycler® 96	21
6.5.4. Přístroje LightCycler® PRO	21
7. ANALÝZA A INTERPRETACE DAT	22
7.1. Limity a interference	22
7.2. Kalibrace	22
7.3. Kontrola kvality – kritéria přijatelnosti	22
7.3.1. Negativní kontrola	22
7.3.2. Pozitivní kontrola DNA	22
7.3.3. Genotypizační standardy DNA	23
7.3.4. Vzorky	23
7.3.5. Abnormální tavné křivky	23
7.4. Uložení externích genotypizačních standardů	23
7.4.1. Kapilární přístroje	24
7.4.2. Přístroje LightCycler® 480	24
7.4.3. Přístroje LightCycler® PRO	24
7.5. Čtení výsledků	24
7.5.1. Analýza tavení: Kapilární přístroje	24
7.5.2. Analýza tavení: Přístroje LightCycler® 480	25
7.5.3. Analýza tavení: Přístroje LightCycler® 96	25
7.5.4. Genotypizační analýza: Přístroje LightCycler® PRO	25
7.6. Očekávané teploty tavení	26
7.7. Interpretace výsledků	26
HETEROZYGOTNÍ	26
7.8. Další informace	27
7.8.1. Typická data pro amplifikaci	27
7.8.2. Vzácné varianty	27
8. ODSTRAŇOVÁNÍ ZÁVAD	29
9. LITERATURA	30

1. Informace o produktu

1.1. Obsah: LightMix® Kit MTHFR A1298C

Sušené předmíchané reagencie PCR:				
 Skladujte při teplotě 4 °C až 25 °C a chraňte před světlem.				
	Barva víčka	Etiketa	Obsah popisu	Celkem reakcí
1 x	Červená	PSR	Reagencie pro specifické parametry (PSR) obsahující předmíchané a sušené primery a sondy pro 64 reakcí. ≤73 % syntetických oligonukleotidů ≥27 % pufru	64 zelenomodré pelety sušené

Sušené standardy (kontrolní DNA)				
 Skladujte při teplotě 4 °C až 25 °C a chraňte před světlem.				
	Barva víčka	Etiketa	Obsah popisu	Celkem reakcí
1 x	Žlutá	HT	Pozitivní heterozygotní kontrola [asi 4E5 ekvivalentů genomů]	40 modré pelety sušené
1 x	Žlutá	WT	Genotypizační standard Divoký typ [asi 4E5 ekvivalentů genomů]	40 modré pelety sušené
1 x	Žlutá	MT	Genotypizační standard Mutant [asi 4E5 ekvivalentů genomů]	40 modré pelety sušené

1.2. Zamýšlené použití

Tato sada umožňuje detekovat jednonukleotidový polymorfismus (SNP) rs1801131 pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (MTHFR, OMIM: 607093) A1298C v genomické lidské DNA z extraktu nukleových kyselin získaného z periferní krve.

Mutace MTHFR mohou přispívat ke zvýšenému homocysteinu v plazmě, což představuje rizikový faktor pro arteriosklerotickou vaskulární chorobu a hlubokou žilní trombózu, ale také pro defekty neurální trubice a nevysvětlené opakované potraty v raném stadiu těhotenství.

Polymorfismus v genu MTHFR A1298C kóduje variantu enzymu se sníženou aktivitou.

Většina publikací bere v úvahu jako rizikový faktor pouze kombinované heterozygotní složení s kombinací alel A1298C a C677T.

Pacienti, kteří jsou 1298 C/C homozygotní nebo A/C heterozygotní, musí být analyzováni také s ohledem na polymorfismus MTHFR C677T, například s použitím sady LightMix® 40-0129-64 (SAP č. Roche: 06896367001).

Tento produkt je indikován jako pomůcka pro lékaře při analýzách genetického pozadí vykazujícího zvýšené úrovně homocysteinu nebo náchylnost k trombóze. To pak společně s výsledky z testování MTHFR C677T pomůže lékařům analyzovat možné příčiny, které mohou přispívat ke spontánnímu potratu (SA) tkání plodu, zejména v raném stadiu těhotenství, ale také deficiencie neurální trubice.

Tento test lze provádět společně s fenotypovým testem úrovně homocysteinu, nebo po něm.

Sada není zamýšlena jako jediný základ pro terapeutické rozhodnutí. Stav mutace u pacienta je třeba posuzovat společně s dalšími faktory nemoci.

Poznámka: Fungování testu lze garantovat jen při použití s přístroji LightCycler® (podrobnosti viz 1.3.2).

1.3. Specifikace

Sada *LightMix® MTHFR A1298C* je diagnostický test *in vitro*, který umožňuje detekovat jednonukleotidový polymorfismus (SNP) MTHFR A1298C na základě demonstrace pomocí referenčních vzorků.

1.3.1. Klinické vzorky

Test vyžaduje 2 µl purifikované genomické DNA ve vodném roztoku, odebrané z klinického vzorku a obsahující od 5 do 100 ng/µl genomické DNA (celkové množství 10 ng – 200 ng), podle určení pomocí UV spektrofotometrie (1 OD = 50 µg DNA/ml).

1.3.2. Přístroje, software a produktivita

Jedna sada obsahuje reagentie pro 64 reakcí provedených v reakčním objemu 10 µl.

Každá série musí obsahovat jeden standard a jednu negativní kontrolu.

U LightCycler® PRO je nutné použít pro každou sérii všechny tři standardy a jednu negativní kontrolu.

V následující tabulce jsou shrnuty některé vlastnosti sady:

Přístroj Roche PCR	Softwarová verze (nebo vyšší)	Doba chodu (cca)	Max. počet vzorků na sérii ⁽²⁾	Maximální produktivita sady ⁽³⁾	Minimální produktivita sady ⁽⁴⁾
LC 1.2	4.10 ⁽¹⁾	60 min	30 + 2 kontroly	58	20
LC 1.5	4.10 ⁽¹⁾	60 min	30 + 2 kontroly	58	20
LC 2.0	4.05	60 min	30 + 2 kontroly	58	20
LC480 (96 jamek)	1.5	100 min	94 + 2 kontroly	60	20
LC480 (384 jamek)	1.5	100 min	382 ⁽⁵⁾ + 2 kontroly	60	20
z480 (otevřený kanál)	1.5	100 min	94 ⁽⁵⁾ + 2 kontroly	60	20
LC96	1.6	100 min	94 ⁽⁵⁾ + 2 kontroly	60	20
LC PRO	1.X.X	70 min	92 ⁽⁶⁾ + 4 kontroly	60	12

- 1 Provedení testu s přístroji LightCycler® 1.2 nebo 1.5 se softwarovou verzí 3.5 dává srovnatelné výsledky. Pokyny pro programování, analýzu dat a interpretaci výsledků nejsou v tomto návodu uvedeny. Pokud je to možné, přejděte na verzi 4.10 nebo vyšší. Software LightCycler® 3.5.3 neobsahuje automatický genotypizační modul; ekvivalentní výsledky může získat vyškolený personál, který analyzuje každý vzorek ručně.
- 2 Každá série musí zahrnovat jednu heterozygotní kontrolu a jednu netemplátovou kontrolu (NTC) pro celkem 2 kontrolní reakce.
- 3 První série sady vyžaduje zahrnutí 4 kontrol pro zaučení genotypizačního modulu (ne LC96). Tím se úměrně sníží maximální počet vzorků, které lze zpracovat. V závislosti na místních předpisech mohou být všechny 4 genotypizační kontroly zahrnuty v každé sérii, čímž se sníží celkový počet vzorků pacienta, které lze analyzovat.
- 4 Výpočty jsou provedeny s použitím jednoho jednotlivého klinického vzorku analyzovaného v každé sérii.
- 5 Je tedy nutné použít více než jednu sadu.
- 6 Každá série musí zahrnovat jednu heterozygotní kontrolu (HT), oba genotypizační standardy (WT a MT) a jednu netemplátovou kontrolu (NTC).

1.4. Skladování a stabilita

Reagentie a kontroly

Sušené reagentie (PSR a standardy) skladujte chráněné před světlem a při pokojové teplotě nebo v chladu (4 °C – 25 °C).

Nezmrazujte tyto sušené reagentie. Datum expirace je vytištěno na etiketě sady.

Přeprava

Produkty se přepravují při teplotě okolního prostředí. Stabilita reagensů během přepravy byla testována v přepravních podmínkách.

2. Požadovaná zařízení a reagencie

2.1. Přístroje LightCycler®

Přístroj LightCycler® 2.0
Softwarová verze LightCycler® 4.05 nebo
Softwarová verze LightCycler® 4.10 nebo vyšší
Kapiláry LightCycler® (20 µl)

Nebo

Přístroje LightCycler® 480

Přístroj LightCycler® 480 (model I)
Přístroj LightCycler® 480 II
Analyzátor cobas® z 480
Softwarová verze LightCycler® 1.5 nebo vyšší
Destička s 96 jamkami LightCycler® 480 bílá nebo
Destička s 384 jamkami LightCycler® 480 bílá

Nebo

Přístroje LightCycler® 96

Přístroj LightCycler® 96
Softwarová verze LightCycler® 1.0 nebo vyšší
Destička s 96 jamkami LightCycler® 480 bílá
Stripy s 8 zkumavkami LightCycler® (bílé)

Nebo

Přístroje LightCycler® 1.x

Přístroje LightCycler® 1.2 a 1.5
Softwarová verze LightCycler® 4.10
Kapiláry LightCycler® (20 µl)

Nebo

Přístroje LightCycler® PRO

Přístroj LightCycler® PRO
Softwarová verze LightCycler® 1.X.X

Volitelně:

2.2. Přístroje:

Karuselová centrifuga LC 2.0 (230 V)
Víčkovací nástroj

2.3. Příprava vzorků

Ruční příprava vzorků:

Sada na přípravu vysoce čistého PCR templátu
Voda jakosti PCR, neobsahující nukleázu
Ethanol p.a.
Isopropanol p.a.

Automatická příprava vzorků:

Přístroj MagNA Pure
Sada pro izolaci DNA MagNA Pure LC I

Přístroj MagNA Pure 2.0
Sada pro izolaci DNA MagNA Pure LC I

Přístroj MagNA Pure Compact
Sada pro izolaci nukleových kyselin MagNA Pure Compact I

Přístroj MagNA Pure 96
Sada pro malé objemy DNA a virové NA MagNA Pure 96

Přístroj MagNA Pure 24
Sada pro izolaci celkové NA MagNA Pure 24

2.4. Reagencie

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe

Roche Diagnostics

Již se nedodává
Již se nedodává
Kat. č. 04 898 915 001
Již se nedodává

Roche Diagnostics

Již se nedodává
Kat. č. 05 015 278 001
Kat. č. 05 200 881 001
Kat. č. 04 994 884 001
Kat. č. 04 729 692 001
Kat. č. 04 729 749 001

Roche Diagnostics

Kat. č. 05 815 916 001
Dodává se s přístrojem
Kat. č. 04 729 692 001
Kat. č. 06 612 601 001

Roche Diagnostics

Již se nedodává
Kat. č. 04 898 915 001
Již se nedodává

Roche Diagnostics

Kat. č. 09 541 713 001
Dodává se s přístrojem

Roche Diagnostics

Kat. č. 03 709 582 001
Kat. č. 03 357 317 001

Roche Diagnostics

Kat. č. 11 796 828 001
jakýkoli dodavatel
jakýkoli dodavatel
jakýkoli dodavatel

Roche Diagnostics

Již se nedodává
Kat. č. 03 003 990 001

Kat. č. Již se nedodává
Kat. č. 03 003 990 001

Kat. č. Již se nedodává
Kat. č. 03 730 964 001

Kat. č. 06 541 089 001
Kat. č. 06 543 588 001

Kat. č. 07 290 519 001
Kat. č. 07 658 036 001

Roche Diagnostics

Kat. č. 12 239 272 001

3. Základní informace

3.1. Zdravotnické základy

Deficience methylenetetrahydrofolát reduktázy je častá vrozená vada v metabolismu folátu. Spektrum fenotypů sahá od závažných neurologických poruch a předčasného úmrtí po asymptomatické dospělé jedince.

V genu MTHFR bylo identifikováno několik polymorfismů, mezi nimiž jsou MTHFR C677T a MTHFR A1298C dva nejběžnější.

Existuje domněnka, že kombinovaní heterozygotní jedinci s kombinací alel MTHFR A1298C a C677T jsou vystaveni také vyššímu riziku projevů několika nemocí.

Nomenklatura HGVS pro A1298C je c.1286A>C (pozice v kódování DNA) a p.Q429A (pozice v proteinu).

Onemocnění věnčitých tepen

V klinické případové kontrolní studii bylo zjištěno, že alela A1298C je výrazně spojena s časným vypuknutím onemocnění věnčitých tepen (CAD) (Szczeklik A. et al., 2001)¹.

Defekty neurální trubice (NTD)

Existuje domněnka, že ve spojení s nízkým stavem folátu souvisí polymorfismus A1298C se zvýšeným rizikem defektů neurální trubice (Van der Put, NMJ, et al., 1998)².

Spontánní potraty

Klinické studie ukazují, že polymorfismus MTHFR A1298C představuje rizikový faktor pro opakovaný potrat v raném stadiu těhotenství (Zetterberg, H. et al., 2002)³.

Frekvence alely MTHFR 1298 C u bílých jedinců je v rozsahu 35–40 % (dbSNP at NCBI).

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801131

3.2. Metodologie a princip testu

S použitím metodologie PCR je fragment 269 bp genu MTHFR amplifikován se specifickými primery. Fragment PCR je analyzován s použitím interně značeného oligomeru SimpleProbe[®], který se váže k regionu překlenujícímu místo mutace.

Během analýzy tavné křivky je zvolna zvyšována teplota. Sonda vychází při specifické teplotě (T_m) a způsobuje pokles fluorescence. Jakákoli porucha pokrytá sondou destabilizuje hybrid a snižuje T_m.

V tomto produktu sleduje sonda sekvenci genotypu divokého typu a přítomnost mutace dává sníženou hodnotu T_m.

Čtení výsledků genotypu je založeno na teplotách tavení ve srovnání s dodanými standardy. Pokud to umožňuje software přístroje, může se čtení výsledků genotypu provádět pomocí automatizovaného genotypizačního modulu (v závislosti na přístroji: softwarový modul „Melt Curve Genotyping“) nebo pomocí specifické sady analytického balíčku LightCycler[®] (LCAP) pro přístroj LightCycler[®] PRO.

Výsledky automatizované genotypizace je třeba ručně revidovat s ohledem na odlišné křivky a mezilehlé teploty bodů tavení. V případě, že automatizovaná typizace není schopná poskytnout konzistentní výsledky genotypu, je nutné odvodit genotyp z teplot tavení podle kritérií popsanych v kapitole 7.

3.3. Výkonové charakteristiky

Analytická specifita

Specifita pro cílový gen a vhodnost PCR amplifikace použité v tomto testu byly demonstrovány sekvenováním ampliconu.

Analytická senzitivita

Detekce sériových ředění několika heterozygotních lidských genomických DNA zjistila, že limit detekce této sady je 250 kopií (1,5 ng).

Diagnostická specifita a senzitivita

Celkový počet 132 různých vzorků genomické DNA od jedinců bělošského původu byl paralelně analyzován sekvenováním a s použitím této sady. Studie porovnávala výsledky získané se sadou a sekvenační data ABI 3730xl DNA získaná společností LGC Genomics GmbH, Berlín.

Výsledky studie: Výsledky pro obě analytické metody byly ve 100% shodě.

Konkrétně, 56 vzorků bylo homozygotních divokého typu, 67 vzorků bylo heterozygotních, a 9 vzorků bylo homozygotních mutantních.

4. Bezpečnostní opatření a varování

Požadavky na zacházení

Tento produkt je diagnostický prostředek *in-vitro*, a proto smí být používán jen kvalifikovanými pracovníky.

Jsou vyžadována všeobecná bezpečnostní opatření pro zacházení s generickými laboratorními materiály.

Průběh laboratorních prací musí odpovídat standardním postupům. Vzhledem k nebezpečí kontaminace je nutné provádět přípravu PCR a amplifikaci PCR ve fyzicky oddělených prostorách.

Nemíchejte reagenty z různých šarží.

Nepoužívejte reagenty po datu expirace.

Používejte verzi návodu, která je dodána se sadou (viz etiketa sady).

Laboratorní postupy

Veškeré materiály lidského původu a související odpad musí být považovány za potenciálně infekční. Důkladně očistěte a ošetřete všechny pracovní povrchy dezinfekčními prostředky schválenými místními úřady.

Nejezte, nepijte ani nekuřte v pracovním prostoru laboratoře.

Nepipetujte ústy.

Během manipulace se vzorky a součástmi sady používejte jednorázové ochranné rukavice, laboratorní plášť a vhodnou ochranu očí.

Zabraňte mikrobiální nebo nukleázové kontaminaci reagentů během pipetování alikvotů. Je nezbytné používat jednorázové sterilní hroty s filtrem.

Po skončení manipulace se vzorky a se součástmi sad si důkladně umyjte ruce.

Příprava vzorků

Pokud jde o správné zacházení a likvidaci, dodržujte bezpečnostní pokyny uvedené v příbalovém letáku použitého produktu (viz kapitola 2.3).

Amplifikace a detekce

Před použitím tohoto produktu si přečtěte návod k obsluze přístroje LightCycler®.

Uložte soubor vzorku s identifikací každé pozice pro správnou identifikaci vzorku.

Zkontrolujte nastavení přístroje LightCycler® a ujistěte se, že se shodují s údaji uvedenými v následující kapitole „Protokol PCR“ pro váš přístroj.

Nedotýkejte se povrchu kapilár nebo krytu destičky bez rukavic.

Dodržujte všechny pracovní a bezpečnostní pokyny pro přístroj LightCycler®.

Vždy zkontrolujte nejnovější verzi LCAP. Ke stažení na webové stránce navifyportal.roche.com.

Zacházení s odpadními materiály

Nepoužité reagenty a odpadní materiály zlikvidujte podle platných zákonů.

5. Programování

5.1. Kompenzace barev

Při použití této sady není vyžadována žádná kompenzace barev; čtení dat s aktivovanou ‚kompenzací barev‘ nemění odečet výsledků.

5.2. Kapilární přístroje LightCycler®

Podrobnosti najdete v návodu k obsluze přístroje.

Programování

Protokol se skládá ze čtyř kroků programu:

1. **Denaturace** vzorku a aktivace enzymu
2. **Cyklování** – PCR amplifikace cílové DNA
3. **Tavení** – identifikace PCR amplifikované sekvence DNA
4. **Chlazení** přístroje

Krok:	1	2			3			4
Parametr:								
Analytický režim	Žádný	Kvantifikační režim			Režim tavných křivek			Žádný
Cykly	1	45			1			1
Cíl °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Udržování hh:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Rychlost rampy °C/s	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sek. cíl °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Velikost kroku °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Zpoždění kroku Cykly	0	0	0	0	0	0	0	0
Akviziční režim	Žádný	Žádný	Jednotlivý	Žádný	Žádný	Žádný	Kontinuální	Žádný

Tab. 1. Programování kapilárních přístrojů

Poznámka:

Během programování zachovejte standardní hodnoty softwaru: kanál = 530, max. počet vzorků = 32, hledanou teplotu = 30 °C a velikost kapilár = 20 µl. Neměňte hodnotu velikosti kapilár na 100 µl. Uložte program a výchozí hodnoty jako šablonu ‚**RUN Template**‘, kterou pak můžete načíst při spuštění každé série.

Těsně před spuštěním série změňte max. počet vzorků (standardní = 32) na počet vzorků plus kontrol zahrnutých v sérii, abyste předešli zastavení přístroje kvůli chybějícím kapilárám.

U přístrojů LightCycler 1.x, které používají softwarovou verzi 3.5.3, čtete ‚Rychlost teplotního přechodu‘ místo ‚Rychlosti rampy‘.

5.3. Přístroje LightCycler® 480

Podrobnosti najdete v návodu k obsluze přístroje.

Formát detekce: SimpleProbe

Poznámka: Tato sada může pracovat v kombinaci se sadou LightMix® HFE H63D S65C C282Y CE

(kat. 40-0340-32) podle pokynů pro formát detekce a programování uvedených v návodu k sadě HFE.

Reakční objem: 10 µl

Programování

Protokol se skládá ze čtyř kroků programu:

1. **Denaturace** vzorku a aktivace enzymu
2. **Cyklování** – PCR amplifikace cílové DNA
3. **Tavení** – identifikace PCR amplifikované sekvenční DNA
4. **Chlazení** přístroje

Krok:	1	2			3			4
Parametr:								
Analytický režim	Žádný	Kvantifikační režim			Režim tavných křivek			Žádný
Cykly	1	45			1			1
Cíl °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Akviziční režim	Žádný	Žádný	Jednotlivý	Žádný	Žádný	Žádný	Kontinuální	Žádný
Udržování hh:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Rychlost rampy °C/s 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.29	1.5
Rychlost rampy °C/s 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	0.29	2.0
Akvizice na °C	-	-	-	-	-	-	2	-
Sek. cíl °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Velikost kroku °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Zpoždění kroku Cykly	0	0	0	0	-	-	-	-

Tab. 2. Programování přístrojů řady LightCycler® 480

Poznámka:

Uložte program a výchozí hodnoty jako šablonu „**RUN Template**“, kterou pak můžete načíst při spuštění každé série.

Naprogramujte **2 akvizice za sekundu** místo standardní hodnoty 5; více akvizic zmenšuje strmost tavné křivky, prodlužuje dobu experimentu a vede k nefunkčnosti sady.

5.4. Přístroje LightCycler® 96

Podrobnosti najdete v návodu k obsluze přístroje.

Měření

Formát detekce: 470/514 FAM			Všeobecně
Kvantifikační faktor	Tavný faktor	Integrační doba (S)	Objemy (µl)
10.00	1.20	Dynamický	10

Programování

Protokol se skládá ze čtyř kroků programu:

1. **Denaturace** vzorku a aktivace enzymu
2. **Cyklování** – PCR amplifikace cílové DNA
3. **Tavení** – identifikace PCR amplifikované sekvence DNA
4. **Chlazení** přístroje

Krok:	1	2			3			4
Parametr:								
Cykly	1	45			1			1
Rampa °C/s	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.20	1.5
Doba trvání s	600	5	10	15	30	120	1	30
Cíl °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Režim		Standardní	Standardní	Standardní				
Akviziční režim	Žádný	Žádný	Jednotlivý	Žádný	Žádný	Žádný	Kontinuální	Žádný
Odečty/°C							5	

Tab. 3. Programování přístrojů LightCycler® 96

Poznámka:

Uložte program a výchozí hodnoty jako ‚soubor Experiment‘, který pak můžete načíst při spuštění každé série.

5.5. Přístroje LightCycler® PRO

Používejte softwarovou verzi 1.X.X. Podrobnosti najdete v asistenci uživatelů systému LightCycler® PRO.

Vhodný soubor analytického balíčku LightCycler® (LCAP) pro sadu LightMix® MTHFR A1298C si můžete stáhnout na webové stránce navifyportal.roche.com. Zkontrolujte nejnovější verzi LCAP.

Součástí LCAP je profil chodu pro konkrétní sadu, který je ekvivalentní podmínkám chodu uvedeným výše.

Analytický balíček LightCycler®: 1002_MTHFRA1298C_96

Uložte soubor LCAP ve složce testů na zařízení SFTP nebo USB.

Naimportujte a nainstalujte stažený soubor LCAP do přístroje LightCycler® PRO a aktivujte ho.

Vytvořte nebo naimportujte uspořádání destičky na kartě Destičky.

6. Protokol experimentu

Před přípravou roztoků naprogramujte přístroj (viz kapitola 5. Programování a podrobnosti v návodu k obsluze přístroje).

Popsané fungování testu lze garantovat jen při použití s uvedenými systémy Roche Diagnostics PCR.

6.1. Příprava vzorků

Pro přípravu genomické DNA používejte lidskou periferní krev (EDTA, citrát). V žádném případě nedoporučujeme použít heparinovou krev, protože tento antikoagulant může interferovat s PCR.

Pomocí sady pro přípravu templátů High Pure PCR nebo přístroje MagNA Pure proveďte purifikaci nukleových kyselin s použitím odběrové sady vhodné pro použitý přístroj MagNA Pure (viz kapitola 2. Požadovaná zařízení a reagensie), jak je popsáno v příslušných protokolech.

V uvedených testech (viz bod 7.5. Čtení výsledků) byla DNA ručně odebrána z 200 µl krve s použitím sady pro přípravu templátů High Pure PCR podle pokynů výrobce; pro finální eluci purifikované DNA z kolony bylo použito 100 µl elučního pufru.

6.2. Příprava reagensií

6.2.1. Příprava LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Podrobnosti najdete v metodickém listu LightCycler®Fast Start DNA Master HybProbe.

1	Udržujte enzym LightCycler® FastStart 1a v chladu.
2	Rozmrazte reakční směs LightCycler® FastStart 1b zahříváním zkumavky na 30 °C – 35 °C po dobu 3–5 minut.
3	Rychle odstředte zkumavky, abyste shromáždili kapky.
4	Roztok nesmí obsahovat žádné částice.
5	Přidejte 60 µl 1b do nádoby 1a .
6	Pečlivě promíchejte roztok pipetou. Nerozvířte! Zabraňte vytváření bublin.
7	Odstředte zkumavky, abyste shromáždili kapky.
8	S použitím reagensie připravte reakční směs (6.3).
9	Uskladněte zbylou reagensii při 2 °C – 8 °C.



6.2.2. Příprava reagensií pro specifické parametry

►	Dodaná zkumavka PSR postačuje na 64 reakcí.
1	Odstředějte předběžně promíchanou zkumavku PSR 1 minutu při 10 000 ot./min.
2	Zkontrolujte, jestli je peleta usazena na dně zkumavky.
3	Přidejte 66 µl vody jakosti PCR do zkumavky PSR .
4	Inkubujte 20 sekund při pokojové teplotě.
5	Viřte 10 sekund.
6	Odstředěte zkumavky, abyste shromáždili kapky.

► Použijte **1 µl** rozpuštěného **PSR** pro 10 µl reakce PCR.

6.2.3. Příprava pozitivní kontroly

►	Zkumavka HT Positive Control postačuje na 40 reakcí.
1	Odstředějte zkumavku HT 1 minutu při 10 000 ot./min.
2	Zkontrolujte, jestli je modrá peleta usazena na dně zkumavky.
3	Rozpusťte peletu přidáním 80 µl vody jakosti PCR.
4	Inkubujte 20 sekund při pokojové teplotě.
5	Viřte 10 sekund.
6	Odstředěte zkumavky, abyste shromáždili kapky.

► Použijte **2 µl** rozpuštěné **pozitivní kontroly** pro 10 µl reakce PCR.

► **Pozitivní kontrola** musí být použita v každé sérii.

Pamatujte si: Otevření nádoby může způsobit kontaminaci pracovního prostoru (aerosol).

6.2.4. Příprava genotypizačních standardů

Software LightCycler® 4.05 a pozdější (kapilární přístroje), software 1.5 a pozdější (přístroje LightCycler®480) a software 1.X.X (LightCycler® PRO) mohou být kalibrovány s referenčními standardy pro provádění automatizované genotypizace neznámých klinických vzorků.

►	Genotypizační standardy WT a MT postačují na 40 reakcí.
	Pokud genotypizační standardy nepoužíváte, nechte je sušené; při použití sady v den expirace nebo po něm zlikvidujte reagenty.
1	Odstředějte zkumavky WT a MT 1 minutu při 10 000 ot./min.
2	Zkontrolujte, jestli je modrá peleta usazena na dně zkumavky.
3	Rozpusťte peletu přidáním 80 µl vody jakosti PCR.
4	Inkubujte 20 sekund při pokojové teplotě.
5	Viřte 10 sekund.
6	Odstředěte zkumavky, abyste shromáždili kapky.

► Použijte **2 µl** genotypizačního standardu **WT** a **MT** pro 10 µl reakce PCR.

► Oba **genotypizační standardy** musí být použity v první sérii sady pro kalibraci genotypizačního modulu. U LightCycler® PRO musí být oba **genotypizační standardy** použity v **každé** sérii.

Pamatujte si: Otevření nádobek může způsobit kontaminaci pracovního prostoru (aerosol).

6.3. Příprava reakční směsi

6.3.1. Příprava 64 reakčních směsí LightCycler®

Doporučujeme připravit 64 reakcí, aby nebylo nutné skladovat rozpuštěné nebo aktivované reagensy v různých objemech. Pokyny pro skladování a stabilitu naředěných složek najdete v kapitole 6.4.

Při přípravě reakční směsi pro méně vzorků postupujte podle bodu 6.3.2 „Reakční směs pro jednotlivou reakci“.

Příprava reakční směsi ve zkuševce PSR (ochlazené):

Součásti	64 reakcí
Do zkuševky PSR (červené víčko) již obsahující	66.0 µl
Přidejte:	
H ₂ O, jakost PCR (bezbarvé víčko)	343.2 µl
roztok MgCl ₂ 25 mM (modré víčko)	52.8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (červené víčko), viz 6.2.1	66.0 µl
Nahradte „víčko dlouhého hrdla“ zkuševky PSR červeným víčkem z FastStart.	
Celkový objem	528.0 µl

Tab. 4. Objemy složek pro přípravu 64 reakčních směsí

6.3.2. Příprava jednotlivé reakční směsi LightCycler®

Reakční směs se připravuje vynásobením každého objemu (tab. 6) počtem biologických vzorků, které mají být analyzovány, plus tři reakce (**negativní kontrola**, **pozitivní kontrola**, jedna navíc) a (volitelně) dva **genotypizační standardy**. U LightCycler® PRO jsou oba **genotypizační standardy**, **pozitivní kontrola** a **negativní kontrola** povinné pro každou sérii.

Příprava reakční směsi v ochlazené zkuševce:

Součásti	Jednotlivá reakce
H ₂ O, jakost PCR (bezbarvé víčko)	5.2 µl
roztok MgCl ₂ 25 mM (modré víčko)	0.8 µl
PSR (červené víčko), viz 6.2.2	1.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (červené víčko), viz 6.2.1	1.0 µl
Objem reakční směsi	8,0 µl

Tab. 5. Objemy složek pro přípravu jednotlivé reakční směsi



**Jemně pipetujte nahoru a dolů reakční směs.
Vysoké procento chyb experimentu je způsobeno
nehomogenní reakční směsí!**



6.3.3. Postup plnění kapilár / jamek

Každá série musí zahrnovat jednu negativní kontrolu (**NTC**) pro demonstraci nepřítomnosti kontaminací genomickou DNA nebo produktem MTHFR PCR a **pozitivní kontrolu** pro identifikaci specifických teplot tavení série. Regulační orgány, požadavky na přístroje nebo místní pravidla laboratoře mohou vyžadovat zahrnutí obou genotypizačních standardů.

►	Při přípravě série nezapomeňte zahrnout kontroly.
1	Jemně promíchejte, odstředěte a zkontrolujte nepřítomnost vzduchových bublinek v nádobce s reakční směsí.
2	Dávkujte 8 µl reakční směsi na kapiláru / jamku.
3	Povinně: Přidejte 2 µl H₂O jakosti PCR jako negativní kontrolu (NTC) . Přidejte 2 µl pozitivní kontroly HT . U LightCycler® PRO je nutné použít oba genotypizační standardy (WT, MT) . Volitelně: Přidejte 2 µl genotypizačního standardu WT . Přidejte 2 µl genotypizačního standardu MT .
4	Přidejte 2 µl vzorku do zbývajících kapilár / jamek.
5	Zavřete kapiláru / destičku a odstředěte. Zkontrolujte, jestli nejsou přítomné žádné vzduchové bublinky.
6	Vložte rotor / destičku do přístroje LightCycler®.
7	Pouze uživatelé kapilár: zadejte počet vzorků.
8	Spusťte sérii.
9	Až dostanete pokyn, zadejte název experimentu.
10	Uložte data vzorků v okně vzorků.

Pokyny pro nakládání vzorků a kalibraci genotypizačních standardů najdete v kapitole 6.5.

6.4. Skladování a stabilita rozpuštěných složek

Reakční směs

Kompletní reakční směs, obsahující reagenty pro specifické parametry (**PSR**), LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe a MgCl₂, může být uskladněna v chladu (2 °C – 8 °C) po dobu až 30 dnů.

Zabraňte delší expozici světlu.

Reagenty pro specifické parametry (PSR)

Po rozpuštění skladujte PSR v chladu při 2 °C – 8 °C po dobu až 30 dnů.

Zabraňte delší expozici světlu.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Kombinovaná hlavní směs FastStart DNA Master HybProbe (1a+1b) může být skladována v chladu (2 °C – 8 °C) po dobu až 30 dnů.

Pozitivní kontrola

Rozpuštěná pozitivní kontrola je stabilní až 30 dnů, je-li skladována v chladu (2 °C – 8 °C).

Genotypizační standardy

Rozpuštěné **genotypizační standardy** jsou stabilní až 30 dnů, jsou-li skladovány v chladu (2 °C – 8 °C).

6.5. Nakládání kontrol a genotypizačních standardů

Vzorky popsané jako pozice 1 a 2 musí být plněny v každé sérii; vzorky 3 a 4 jsou nutné pro zaučení genotypizačních standardů jen v první sérii sady. U LightCycler® PRO musí být oba **genotypizační standardy** použity v **každé** sérii.



Výsledky genotypů jsou založeny na teplotách tavení.

Použití automatizovaného genotypizačního modulu, který je k dispozici

v softwaru LightCycler® 2.0 a LightCycler® 480, je volitelné, ale povinné pro LightCycler® PRO.

Podrobnosti najdete v návodu k obsluze přístroje LightCycler®.

6.5.1. Kapilární přístroje

Pod položkou „Data vzorků – Zobrazení kapilár“ zadejte název vzorku, jak je popsáno ve druhém sloupci. Zvolte „Typ analýzy – Genotypizace“. Vyberte kanál 530 a zrušte výběr všech ostatních. Z rozbalovacího menu vyberte „Typ vzorku“ a okopírujte popis „Genotyp“.

Poz .	Název vzorku	Kanál	Název cíle	Typ vzorku	Genotyp
1	NTC	530	Cíl 1	Negativní kontrola	
2	HT	530	Cíl 1	Tavný standard	MTHFR A1298C Heterozygotní
3	WT	530	Cíl 1	Tavný standard	MTHFR A1298 Divoký typ
4	MT	530	Cíl 1	Tavný standard	MTHFR 1298C Mutant

6.5.2. Přístroje LightCycler® 480

V okně „Editor vzorků“ v oddíle „Krok 1: Volba pracovního postupu“ vyberte „Tavná genotypizace“, kombinace filtrů 465-510. Zadejte popis **pozitivní kontroly** a **genotypizačních standardů** takto:

Poz .	Název vzorku	Tavná genotypizace Typ vzorku	Tavná genotypizace Genotyp
1	NTC	Negativní kontrola	
2	HT	Tavný standard	MTHFR A1298C Heterozygotní
3	WT	Tavný standard	MTHFR A1298 Divoký typ
4	MT	Tavný standard	MTHFR 1298C Mutant

6.5.3. Přístroje LightCycler® 96

V okně „Editor vzorků“ zadejte podle níže uvedených pokynů popis **pozitivní kontroly** a volitelně **genotypizačních standardů**.

Tabulkové zobrazení:

Barva	Pozice	Název vzorku	Typ vzorku	Barvivo
	A1	NTC	Neznámé	FAM
	A2	HT	Neznámé	FAM
	A3	WT	Neznámé	FAM
	A4	MT	Neznámé	FAM

6.5.4. Přístroje LightCycler® PRO

Při přípravě destičky je nutné vybrat odpovídající LCAP. Tavné standardy a NTC musí být přiřazeny k příslušné pozici jamky.

Poz .	ID vzorku	Role vzorku	Genotyp
1	1002_MTHFRA1298C_NTC	Kontrola bez templátu	
2	MTHFR A1298C_HT	Tavný standard	MTHFR A1298C Heterozygotní
3	MTHFR A1298C_WT	Tavný standard	MTHFR A1298 Divoký typ
4	MTHFR A1298C_MT	Tavný standard	MTHFR 1298C Mutant

7. Analýza a interpretace dat

7.1. Limity a interference

Tento test je specifický pro MTHFR A1298C DNA.
Nejsou známy žádné interference.

7.2. Kalibrace

Kalibrace musí být provedena podle pokynů uvedených v kapitolách 6.5, 7.3.1, 7.3.2 a 7.3.3.

7.3. Kontrola kvality – kritéria přijatelnosti

Aby bylo možné provést spolehlivou genotypizační analýzu, je nezbytné zahrnout do každé série negativní kontrolu **NTC** a pozitivní kontrolu **HT**.

U přístroje LightCycler® PRO je nezbytné zahrnout do každé série kromě **NTC** a pozitivní kontroly **HT** také oba genotypizační standardy **WT** a **MT**.

Poznámka: Test se provádí při teplotě žíhání 60 °C, při které se vzorky dobře nevážou, což dává nízké nebo dokonce vůbec žádné signály v „kvantifikaci“. Z tohoto důvodu jsou kritéria přijatelnosti založena pouze na definici charakteristik tavné křivky, jak je popsáno níže.

7.3.1. Negativní kontrola

Negativní kontrola **NTC** (povinná – pozice 1).

Analýza tavné křivky negativní kontroly musí dávat negativní výsledek: nesmí být detekovány žádné špičky tavení specifické pro test (viz 7.6).

V případě, že **NTC** hlásí jednu nebo více specifických špiček (porovnejte signál s výsledky vzorků, abyste předešli tomu, že by software zvětšil šum pozadí na velikost okna, což by vypadalo jako přítomnost špiček tavení), znamená to, že došlo ke kontaminaci nebo chybě pipetování; běh není platný a je třeba opakovat postup. Pokud problém trvá, vyměňte vodu a/nebo reagenty a opakujte.

Zjištěné změny, odchylky a problémy na zařízení hlase s číslem šarže (číslu šarží) a stručným popisem chyby svému místnímu zástupci společnosti Roche.

Je-li detekována špička při nespecifické teplotě (viz kapitoly 7.3.5 a 7.6), může ji software nesprávně identifikovat jako pozitivní, což znemožní automatickou genotypizaci.

V takovém případě – abyste umožnili automatickou genotypizaci – změňte vzorek **NTC** z „Negativní kontroly“ na „Neznámý“ (viz kapitola 6.5); alternativně je nutné číst výsledky z teplot tavení (viz kapitola 7.7). Na přístroji LightCycler® PRO se toto nevztahuje.

7.3.2. Pozitivní kontrola DNA

Pozitivní kontrola **HT** (povinná – pozice 2).

Analýza tavné křivky musí vždy ukázat dvě špičky tavení.

HT napodobuje **heterozygotní** klinické vzorky.

Očekávanou teplotu tavení najdete v kapitole **7.7 Interpretace výsledků**.

7.3.3. Genotypizační standardy DNA

Genotypizační standardy jsou **povinné** v **každé** sérii provedené na přístroji **LightCycler® PRO**.

Genotypizační standard **WT** (volitelný – pozice 3).

Analýza tavné křivky musí vždy ukázat jednu jednotlivou špičku tavení.

WT napodobuje homozygotní klinický vzorek **divokého typu**.

Genotypizační standard **MT** (volitelný – pozice 4).

Analýza tavné křivky musí vždy ukázat jednu jednotlivou špičku tavení.

MT napodobuje homozygotní **mutantní** klinický vzorek.

Očekávanou teplotu tavení najdete v kapitole **7.7 Interpretace výsledků**.

7.3.4. Vzorky

Výsledek tohoto testu musí ukázat jednu nebo dvě špičky tavení.

Více než dvě špičky na vzorek se neočekávají.

Profily špiček tavení musí odpovídat kritériím přijatelnosti popsaným v této kapitole a v kapitole **7.7 Interpretace výsledků**.



Před opakováním série vezměte v úvahu běžné chyby; zkontrolujte zejména amplifikační profil, upravte hlavní směs a použitou koncentraci $MgCl_2$ a mějte na paměti, že nevhodné skladování reagentů může způsobit závadu zařízení.

7.3.5. Abnormální tavné křivky

Neočekávaná tavná křivka může být zapříčiněna nesprávnou přípravou vzorků, defektem v produktu nebo variantou pod oblastí vazby sondy. Je nutné opakovat celý postup (příprava vzorků, amplifikace a detekce). Pokud abnormální tavná křivka trvá, je třeba použít pro identifikaci sekvence jinou metodu. Použijte fragment PCR pro sekvenování DNA a potvrďte sekvenci nebo identifikujte případné neznámé mutace.

S ohledem na vylepšení produktu a pro účely poprodejního dozoru zašlete nevyhovující tavné vzorky do laboratoří společnosti TIB Molbiol GmbH, Berlín. Před zasláním kontaktujte service@tib-molbiol.de. Příklady známých variant jsou znázorněny v kapitole **7.8.2 Vzácné varianty**.

7.4. Uložení externích genotypizačních standardů



(Nevztahuje se na softwarové verze LC1.x nižší než 4.0, na LightCycler®96 a na přístroje LightCycler® PRO.)

Pokud po genotypizační analýze splňují vzorky 1 až 4 kritéria přijatelnosti (viz kapitola 7.3), uložte genotypizační standardy níže popsaným způsobem a použijte ve všech následných sériích externí standard.

7.4.1. Kapilární přístroje

V analýze tavné křivky v okně Genotypizace otevřete menu „Standard (Int)“ a zvolte „Uložit standardy jako externí“.

7.4.2. Přístroje LightCycler® 480

V okně genotypizační analýzy tavné křivky otevřete menu „Standardy (v sérii)“ a zvolte „Uložit jako externí“.

7.4.3. Přístroje LightCycler® PRO

Genotypizační standardy musí být použity v **každé** sérii.

7.5. Čtení výsledků

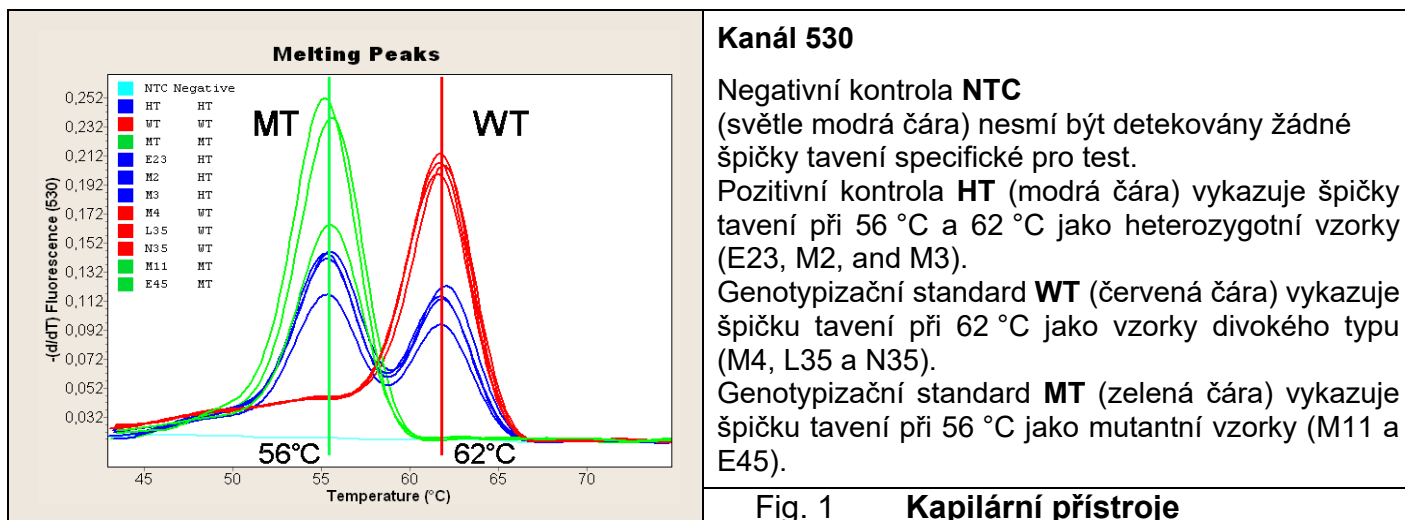
Špičky tavení rozlišují mezi těmito genotypy: heterozygotní, divoký typ a mutant. Amplifikační křivky neobsahují žádné analytické informace (viz kapitola 7.3 Kontrola kvality – kritéria přijatelnosti).



Použití genotypizačního modulu zahrnutého v softwaru LightCycler® 2.0 a LightCycler® 480 je volitelné; v případě výpadku automatického genotypizačního modulu (skóre <0,6 nebo res <0,4) přepněte na ruční identifikaci tavné křivky (volání T_m) a porovnejte výsledky s tabulkou v kapitole 7.7. Interpretace výsledků

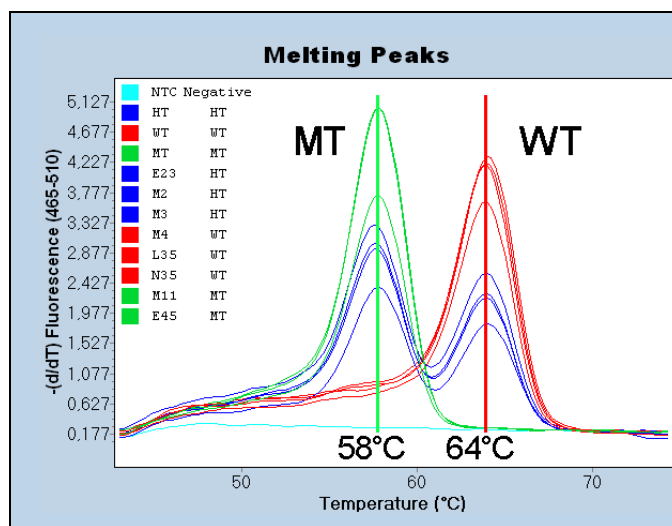
7.5.1. Analýza tavení: Kapilární přístroje

Zobrazte data tavení v kanálu 530 (kanál F1 pro LC1.x, softwarová verze 3.5.3).



7.5.2. Analýza tavení: Přístroje LightCycler® 480

Zobrazte data tavení v kanálu SimpleProbe.



Kanál 465-510 (SimpleProbe)

Negativní kontrola NTC

(světle modrá čára) nesmí být detekovány žádné špičky tavení specifické pro test.

Pozitivní kontrola **HT** (modrá čára) vykazuje špičky tavení při 58 °C a 64 °C jako heterozygotní vzorky (E23, M2, and M3).

Genotypizační standard **WT** (červená čára) vykazuje špičku tavení při 64 °C jako vzorky divokého typu (M4, L35 a N35).

Genotypizační standard **MT** (zelená čára) vykazuje špičku tavení při 58 °C jako mutantní vzorky (M11 a E45).

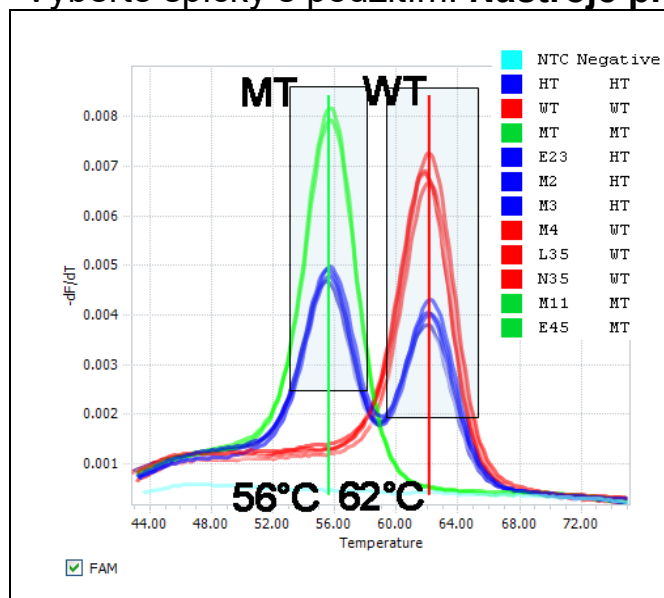
Fig. 2 Přístroje LightCycler® 480

7.5.3. Analýza tavení: Přístroje LightCycler® 96

Přidejte analýzu: **Volání Tm**

Zobrazte data: **Špička tavení**

Vyberte špičky s použitím: **Nástroje pro značkování oblastí**



Kanál FAM

Negativní kontrola NTC

(světle modrá čára) nesmí být detekovány žádné špičky tavení specifické pro test.

Pozitivní kontrola **HT** (modrá čára) vykazuje špičky tavení při 56 °C a 62 °C jako heterozygotní vzorky (E23, M2, and M3).

Genotypizační standard **WT** (červená čára) vykazuje špičku tavení při 62 °C jako vzorky divokého typu (M4, L35 a N35).

Genotypizační standard **MT** (zelená čára) vykazuje špičku tavení při 56 °C jako mutantní vzorky (M11 a E45).

Fig. 3 Přístroje LightCycler® 96

7.5.4. Genotypizační analýza: Přístroje LightCycler® PRO

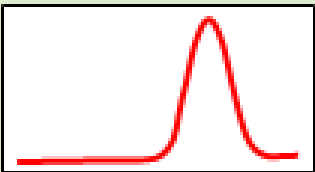
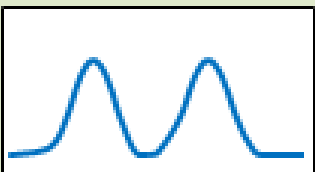
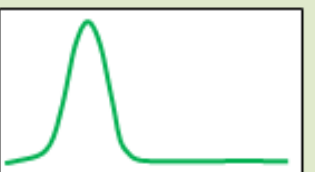
Proved'te analýzu dat podle pokynů v asistenci uživatelů systému LightCycler® PRO. Revidujte a schvalte výsledky na kartě Výsledky cíle. Výsledky tavných standardů (**WT**, **HT**, **MT**) a **NTC** je třeba schválit před schválením výsledků neznámých vzorků. Je možné přepsat výsledky, přepsané výsledky jsou označeny. Na kartě Výsledky vzorků je možné schválené výsledky uvolnit.

7.6. Očekávané teploty tavení

Genotyp:	mutantní homozygotní MTHFR 1298C/C	heterozygotní MTHFR 1298A/C	divoký typ MTHFR 1298A/A
Počet špiček tavení	1	2	1
Teplota tavení špiček	56 - 58 °C	56 – 58 °C a 62 - 64 °C	62 - 64 °C
Rozdíl teplot mezi špičkami	---	6 °C	---
Fenotyp	Hyperhomocysteinémie	Hyperhomocysteinémie pouze v kombinaci s MTHFR 677 C/T	Riziko v obecné populaci

Tab. 6. Typické výsledky analýz provedených na přístrojích LightCycler® 480

7.7. Interpretace výsledků

MTHFR A1298C Kanál 530 Špička(y) tavení		Genotypy MTHFR	Metabolizátory Fenotyp
1298C	A1298		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Divoký typ MTHFR 1298 A/A	Riziko v obecné populaci
-	62-64		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Heterozygotní MTHFR 1298 A/C	Hyperhomocysteinémie v kombinaci s MTHFR 677 C/T pro kombinované heterozygotní jedince
56-58	62-64		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Mutantní homozygotní MTHFR 1298 C/C	Hyperhomocysteinémie (kombinace s 677T nebyla nikdy hlášena)
56-58	-		
ΔTm 6 °C		Tab. 7. Typické výsledky analýzy	



Povolené odchylky teplot tavení

±0.5 °C	mezi vzorky stejného genotypu
±1.5 °C	mezi genotypizačním standardem a biologickými vzorky
±1.5 °C	ΔT mezi špičkami tavení heterozygotních vzorků
±1.5 °C	mezi špičkami tavení se stejným genotypem mezi sériemi
±5.0 °C	mezi teplotami uvedenými v tabulce 8 a hodnotami získanými pomocí místních přístrojů. Tato odchylka závisí na přístroji: vždy berte v úvahu teplotu získanou s pozitivní kontrolou HT zahrnutou v sérii.

7.8. Další informace

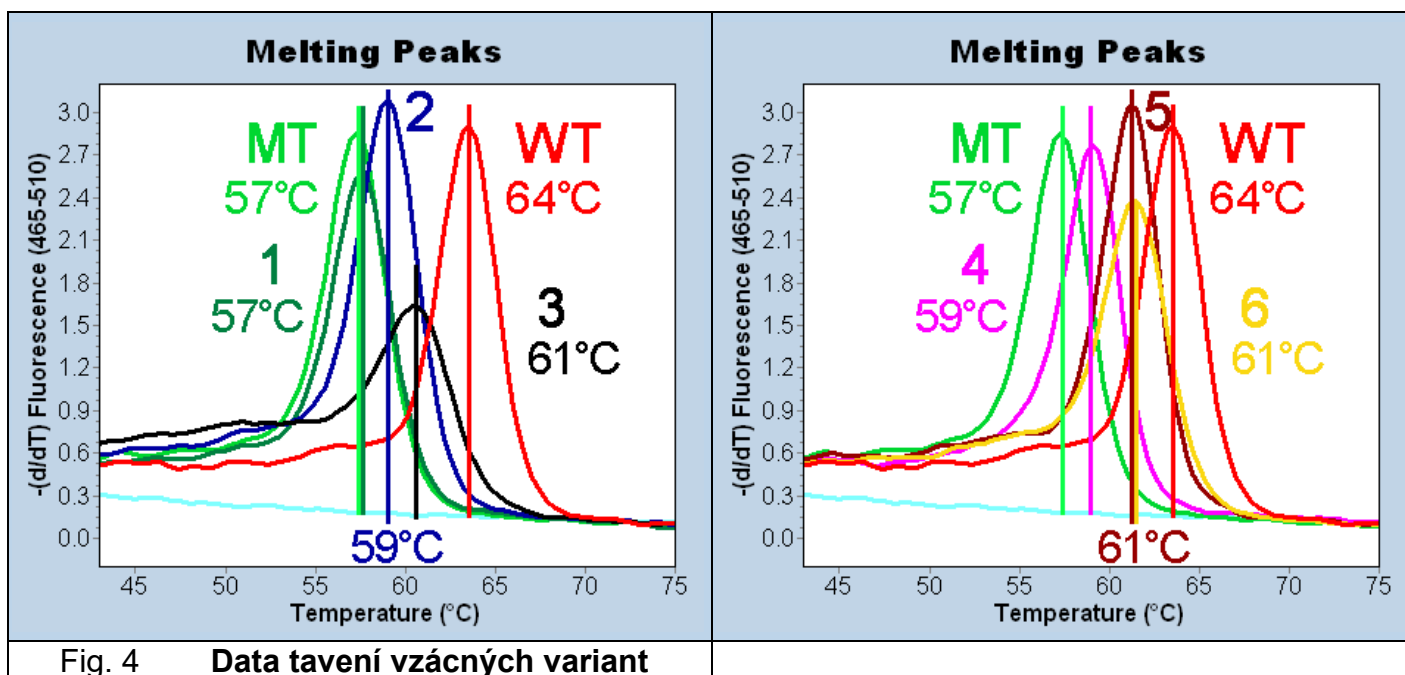
7.8.1. Typická data pro amplifikaci

Amplifikační křivky neobsahují žádné analytické informace (viz kapitola 7.3 Kontrola kvality – kritéria přijatelnosti).

7.8.2. Vzácné varianty

Sekvence používané v tomto zařízení neinterferují s jinými známými variantami genů; nové varianty obvykle generují jinou špičku T_m než WT nebo MT. Pro demonstraci schopnosti testu rozlišit správný genotyp jsou použity syntetické cíle, které napodobují všechny varianty uvedené v GeneBank (listopad 2023). Absolutní hodnoty T_m získané se syntetickými cíli se mohou lišit od hodnot vyplývajících z biologických vzorků, zatímco **relativní ΔT_m musí zůstat konstantní**.

Tato sada není určena k identifikaci jiných variant, než jsou uvedeny v kapitole **1.2 Zamýšlené použití**. Pro identifikaci sekvencí prezentujících abnormální špičky tavení (viz kapitoly 7.3.5 a 7.7) je třeba použít jinou metodu.



#	RS	Tm	HGVS	MAF
WT		64 °C		
MT	rs1801131	57 °C	NG_013351.1:g.16685A>C	G=0,24909 (31278/125568)
1	rs72552099	57 °C	NG_013351.1:g.16687A>C	NA
2	rs765619217	59 °C	NG_013351.1:g.16692C>G	C=0,00002 (2/12556)
3	rs397507444	61 °C	NG_013351.1:g.16697A>C	NA
4	rs149533586	59 °C	NG_013351.1:g.16680T>C	G=0,00025 (32/125568)
5	rs763953323	61 °C	NG_013351.1:g.16676C>T	A=0,00002 (3/125568)
6	rs759796920	61 °C	NG_013351.1:g.16699G>C	G=0,00000 (1/246258)

MAF = menší počet alel (četnost výskytu varianty); **NA**= není k dispozici

Experimentálně testované varianty s kódem rs (dbSNP), Společnost pro varianty v lidském genomu (HGVS) nomenklatura a frekvence alel (na základě dat TOPMed). Teploty (Tm) získané s použitím syntetických cílů. Hodnoty Tm z této tabulky nesmí být použity pro predikci genotypů. Používejte jen informace v kapitolách 7.5 až 7.7.

8. Odstraňování závad

Specifické kódy přístroje	Kapilární přístroje	Přístroje LightCycler® 96, 480 a PRO
Udalost	Možná příčina	Řešení
Není detekován žádný vzorek	Žádné odstředění	Odstřed'te kapiláru.
Všechny PCR negativní	Nesprávná volba detekčního kanálu	Před analýzou nastavte správný kanál.
	Nesprávný amplifikační protokol	Zkontrolujte program přístroje.
Nekonzistentní základní čára mezi různými vzorky	Nesprávné pipetování	Zajistěte homogenitu množství směsi v každém vzorku.
	Nehomogenní reakční směs	Před rozdělením do reakční nádoby pipetujte reakční směs 10 x nahoru a dolů s čistým 200µl hrotem.
	Vícejamková destička špatně utěsněná	Dbejte na to, aby vícejamková destička byla správně utěsněná.
Základní čára Podobná zubům pily	Bublinka v jamce	Před spuštěním chodu odstřed'te destičku.
	Nesprávné umístění kapiláry v karuselu	Pevně zatlačte kapiláru do karuselu.
Žádný signál v pozitivní kontrole	Chyba během nastavení přístroje	Zkontrolujte nastavení pozice pozitivní kontroly.
	Nesprávná koncentrace PSR / MgCl ₂	Opakujte test.
	Pozitivní kontrola nebo degradace standardu	Použijte nový alikvot pozitivní kontroly nebo standardu.
Pozitivní signál v negativní kontrole NTC	Chyba během nastavení přístroje	Zkontrolujte nastavení pozice negativní kontroly.
	Chyba dávkování	Při dávkování vzorků, negativních kontrol, pozitivních kontrol a standardů dodržujte pokyny v pracovním listu.
	Chyba dávkování	Mezi vzorky vždy vyměňte hroty.
	Chyba dávkování	Dbejte na to, aby se nevyžil obsah testovací zkumavky se vzorkem.
	Kontaminace vody jakosti PCR	Použijte nový alikvot vody jakosti PCR.
	Kontaminace reakční směsi	Použijte nové alikvoty reagensů pro přípravu reakční směsi.
	Kontaminace oblasti odběru/přípravy pro amplifikační reakce	Očistěte povrchy a přístroje čisticím prostředkem na bázi vody, vyperte laboratorní textilie, vyměňte použité testovací zkumavky a hroty.
	Kontaminace oblasti odběru/přípravy pro amplifikační reakce	Přidejte do reakční směsi LightCycler® Uracil-DNA glykosylázu kat. č. 03 539 806 001) podle pokynů.
Žádný signál ve vzorcích	Nízké množství DNA	Zkontrolujte koncentraci DNA.
	Inhibice vzorku	Nařed'te vzorek a opakujte PCR, nebo opakujte odběr a PCR, nebo přidejte pozitivní kontrolu a opakujte.
Tavná křivka mimo očekávaný rozsah teplot	Se špičkami TM ve shodě s pozitivní kontrolou: Nesprávná koncentrace reagensie	Ručně přiřad'te výsledky podle pozitivní kontroly.
	Se špičkami TM v neshodě s pozitivní kontrolou: Možný inhibitor extrakce	Opakujte test s ředěním DNA 1:3.
	Se špičkami TM v neshodě s pozitivní kontrolou: Možná odlišná mutace	Opakujte test se sekvenováním a hlášením neočekávaných variant. service@tib-molbiol.de

9. Literatura

1) Szczeklik A, Sanak M, Jankowski M, Dropiński J, Czachór R, Musiał J, Axenti I, Twardowska M, Brzostek T, Tendera M.

Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia.

Am J Med Genet. 2001 Jun 1;101(1):36-9.

2) van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ.

A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?

Am J Hum Genet. 1998 May;62(5):1044-51.

3) Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K.

Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos.

Eur J Hum Genet. 2002 Feb;10(2):113-8.

Upozornění pro kupující – patenty a ochranné známky

Zakoupením tohoto produktu je získáno právo tento produkt používat k provádění amplifikací a detekcí sekvencí nukleových kyselin pro účely diagnostiky in vitro na vzorcích lidského původu. Kromě práva na používání tohoto produktu, odvozeného z jeho zakoupení, není poskytnuta licence žádného jiného druhu. V případě jiných než výslovně uvedených licencí neposkytuje společnost TIB MOLBIOL žádnou záruku, že tato sada a/nebo její použití neporuší práva třetích stran.

LightCycler®, MagNA Pure® a High Pure® jsou ochranné známky vlastněné společností Roche Diagnostics.

ABI 3730xl Genetic Analyzer a Sequencing Analysis jsou produkty registrované společností Applera.

LightMix® je ochranná známka vlastněná společností TIB MOLBIOL. SimpleProbe®, hybridizační sondy a sady LightMix® se vyrábějí v licenci společnosti Roche.

Historie verzí

Červené poznámky označují události, které vyžadují změnu laboratorních postupů.

Modré poznámky označují vylepšení a změny ve složení.

Verze	Činnost	Datum
V180404	Přidání 1.1 Teploty a 7.8.2 Reference pro hodnoty MAF, a změna přístupových čísel na genomická	04-12-2018
V190123	7.8.2 Aktualizace hodnot MAF a zahrnutí nového vyloučení odpovědnosti	05-02-2019
V240326	Přidání LightCycler® PRO a MagNa Pure24 Odstranění LightCycler® Nano a FastStart DNA Master HybProbe Redakční změny	26-03-2024

Výrobce:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstrasse 22-23
12103 Berlín, Německo
www.tib-molbiol.de

