

ELUCIGENE™ CF7



Amplification Refractory Mutation System (ARMS™) skyddas av europeiskt patent nr 0332435, amerikanskt patent nr 5595890 och motsvarande globala patent.

ARMS™ är ett varumärke som tillhör AstraZeneca UK Ltd. och används under licens.

ELUCIGENE™ är ett varumärke som tillhör Tepnel Diagnostics Ltd.

NuSieve® är ett varumärke som tillhör Cambrex BioScience. AmpliTaq Gold® är ett varumärke som tillhör Roche Molecular Systems Inc.

ELUCIGENE™ kit har utvecklats och tillverkas av Tepnel Diagnostics Ltd enligt kvalitetssystem som ackrediterats i enlighet med ISO 9001:2000 och ISO 13485 (EN 46001).

Användning av denna produkt CF007B4 för human *in vitro*-diagnostisk testning omfattas av en PCR-licens från F. Hoffmann - La Roche och Roche Molecular Systems, Inc.

Tepnel Diagnostics Ltd
12 Blacklands Way
Abingdon Business Park
Abingdon
Oxfordshire
OX14 1DY
Storbritannien

För kundsupport:

E-post elucigene@tepneldiagnostics.co.uk

CF007BY006SE
06/2004
Copyright © 2002 Tepnel Diagnostics Ltd



ELUCIGENEä CF7

Katalognummer - CF007B4 – 100 tester

Användningsområde

För samtidig kvalitativ detektion *in vitro* av humana CFTR-genmutationer (cystisk fibros transmembran konduktansregulator) D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, ΔF508 och 3849+10kbC>T i humana helblods- och munsköljningsprover.

Principer för förfarandet

Med ELUCIGENE™ CF7 kit kan närvaro eller frånvaro av 7 mutationer i CFTR-genen påvisas samtidigt (ett multiplextest). Den metod som tillämpas med ELUCIGENE™ CF7 kit använder ARMS™ allelspecifik amplifieringsteknologi, som påvisar punktmutationer eller små deletioner i DNA⁽¹⁾.

Varningar och försiktighetsåtgärder

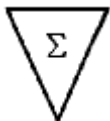
1. Endast för yrkesmässig *in vitro*-diagnostik.
2. Den normala DNA-kontroll som levereras tillsammans med detta kit har genomgått oberoende tester och befunnits vara negativ för hepatit B-virus (HBV), hepatit C-virus (HCV) och humant immunbristvirus 1 (HIV 1).
3. Var försiktig vid hantering av material av humant ursprung. Alla prover ska anses vara potentiellt smittsamma. Ingen testmetod kan garantera fullständig frånvaro av HBV, HCV, HIV 1 eller andra smittsamma agens. Följ gällande bestämmelser för biologiskt riskmaterial beträffande hantering av prover och testkomponenter samt användning, förvaring och kassation av dem.
4. Kitet ska förvaras på en plats som är fri från kontaminerande DNA- eller PCR-produkt.
5. Använd inte reagensen efter det utgångsdatum som anges på förpackningsetiketten. Alla reagens levereras bruksfärdiga. Förvara öppnade och öppnade reagens i –20 °C.

Symboler på etiketter

Dessa symboler som används på alla etiketter och förpackningar överensstämmer med den harmoniserade standarden EN 980.



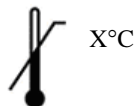
Tillverkare



Antal tester



Se bruksanvisningen



Förvaras kallare än angiven temperatur



Används före angivet datum



Katalognummer



Lot- eller partinummer

Material som medföljer

Tillräckligt material för 100 tester medföljer:

1. 4 ampuller primermix (TA) innehållande primrar (mutant D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, ΔF508 och 3849+10kbC>T), kontrollprimrar och deoxinukleotidtrifosfater i buffert (4 x 500 μL), (CF007TA).
2. 1 ampull x 200 μL CR000TV spädningsbuffert (DB).
3. 1 ampull x 40 μL CR000TW AmpliTaq Gold (AG).
4. 1 ampull x 600 μL CR000TR laddningsfärg (LD).
5. 1 ampull x 50 μL CF007TX DNA-kontroll (DC), normal för de mutationer som påvisas av ELUCIGENE™ CF7.

Material som behövs men inte medföljer

Laboratorieförbrukningsmaterial: handskar, mikrofugrör med skruvkork, pipettspetsar, tunnväggiga 0,2 mL eller 0,5 mL PCR-rör.

DNA-preparation: Sterilt avjoniserat vatten av god kvalitet, natriumklorid (NaCl), dinatriumsalt av etylendiamintetraättisyra (EDTA), natriumhydroxidpellets (NaOH), kristalliserad 2-amino-2-(hydroximetyl)-1,3-propandiol (Tris-bas), saltsyra (HCl) 36 % densitet 1,18, ammoniumklorid (NH₄Cl).

PCR-amplifiering: Sigma lätt vit mineralolja*, sterilt destillerat vatten av god kvalitet.

Elektrofores: Material för gelelektrofores bestående av NuSieve® 3:1 agaros (FMC Bioproducts), 50 basparsstege (Amersham Pharmacia Biotech).

* För amplifiering som utförs i 0,5 mL PCR-rör eller värmecykler utan uppvärmda lock

Utrustning som behövs

Laboratorieutrustning: precisionspipetter (2 satser: 1 för hantering pre-amplifiering och 1 för hantering post-amplifiering, helst pipetter med positiv förskjutning), glas, skyddskläder, vortexblandare, mikrofug, våg, rörställ.

DNA-preparation: Centrifug (för munsköljningsprover), värmeblock (uppvärmning till 100 °C).

Amplifiering: Värmecykel som rymmer 0,5 mL eller 0,2 mL rör (med en temperaturnoggrannhet på +/-1 °C mellan 33 °C och 100 °C och statisk temperaturjämnhet på +/-1 °C), valfritt med uppvärmt lock.

Elektrofores: Horisontell submarin geltank, strömförsörjningsdel, mikrovåg, vattenbad för kylning av agaros, UV-transilluminator, fotografiskt system.

Provtagning och förvaring av prover

Helblodprover (EDTA) eller munsköljningsprover ska användas. Den person som ska testas bör avstå från att äta eller dricka omedelbart innan munsköljningsprovet lämnas.

Provtagningsutrustning har ibland rapporterats ha skadlig inverkan på vissa analyter och kan störa vissa metodteknologier ⁽²⁾. Användaren bör tillförsäkra att den valda utrustningen används enligt tillverkarens anvisningar och att både provtagningsutrustning och alternativa DNA-preparationsmetoder är kompatibla med testet.

Blodprover ska förvaras i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ före preparation av DNA. Undvik upprepad frysning och tining. Munskölningsprover ska förvaras i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ och DNA-preparation ska utföras inom 7 dagar.

Preparation av DNA från helblodprover (EDTA)

1. Pipettera $80\text{ }\mu\text{L}$ av varje blodprov i ett mikrofugrör med skruvkork.
2. Pipettera $320\text{ }\mu\text{L}$ 170 mM ($9,09\text{ g/L}$) NH_4Cl -lösning i varje rör.
3. Blanda i 20 minuter genom att försiktigt snurra och vända. Undvik kraftig omrörning och skumbildning.
4. Centrifugera varje rör i 2 minuter vid $12\ 000\text{ g}$ tills en cellpellet bildas.
5. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
6. Pipettera $300\text{ }\mu\text{L}$ 10 mM ($0,58\text{ g/L}$) NaCl / 10 mM ($3,72\text{ g/L}$) EDTA i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
7. Centrifugera varje rör i 1 minut vid $12\ 000\text{ g}$ tills en cellpellet bildas.
8. Upprepa steg 5 till 7 minst ytterligare två gånger tills all synlig röd färg i supernatantvätskan har avlägsnats.
9. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
10. Pipettera $200\text{ }\mu\text{L}$ 50 mM (2 g/L) NaOH -lösning i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
11. Inkubera i värmeblock vid $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 10 minuter.
12. Pipettera $40\text{ }\mu\text{L}$ 1 M ($121,1\text{ g/L}$) Tris-bas/HCl ($\text{pH } 7,5$) i varje rör och vortexa.
13. Tillsätt 1 mL sterilt avjoniserat vatten till varje mikrofugrör så att en total DNA-provvolym på $1,24\text{ mL}$ erhålls.
14. Centrifugera varje rör i 1 minut vid $12\ 000\text{ g}$ tills en pellet av cellfragment bildas. Supernatantvätskan innehåller DNA.

Preparation av DNA från munskölningsprover

1. Skölj runt 10 mL $0,9\%$ koksaltlösning i munnen i 20 sekunder. Samla suspensionen i ett sterilt universalrör av plast.
2. Pelletera cellerna genom centrifugering vid 800 g i 10 minuter i $18\text{--}28\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Avlägsna och kassera supernatantvätskan försiktigt med hjälp av en pipett.
4. Pipettera $500\text{ }\mu\text{L}$ 10 mM ($0,58\text{ g/L}$) NaCl / 10 mM ($3,72\text{ g/L}$) EDTA i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.

5. Överför varje prov till ett mikrofugrör med skruvkork.
6. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en cellpellet bildas.
7. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
8. Pipettera 500 µL 50 mM (2 g/L) NaOH-lösning i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
9. Inkubera i värmeblock vid 100 °C i 10 minuter.
10. Pipettera 100 µL 1 M (121,1 g/L) Tris-bas/HCl (pH 7,5) i varje rör och vortexa.
11. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en pellet av cellfragment bildas. Supernatantvätskan innehåller DNA.
12. Överför 100 µL av supernatanten (DNA-prov) till ett nytt, märkt mikrofugrör.
13. Tillsätt 420 µL sterilt avjoniserat vatten till varje DNA-prov så att en total volym på 500 µL erhålls.

Den DNA-preparationsmetod som beskrivs ovan rekommenderas av Tepnel Diagnostics och har visat sig ge konsekventa och tillförlitliga resultat. DNA som prepareras med andra metoder eller från andra provtyper är eventuellt inte optimalt för ELUCIGENE™ CF7-testet och kan ge suboptimala resultat. De viktigaste kriterierna för alternativa DNA-preparationsmetoder är optimal DNA-koncentration och frånvaro av PCR-hämmare.

Alternativa metoder och provtyper bör noggrant utvärderas med ELUCIGENE™ CF7-testet innan resultaten används för diagnostik. Tester av DNA-prover vid koncentrationer <10 ng/5 µL rekommenderas inte. Vid optimala PCR-förhållanden erhålls konsekventa resultat vid DNA-koncentrationer mellan 10 och 100 ng/5 µL.

Testprotokoll - amplifieringsförfarande

Obs! För att minimera risken för kontamination måste steg 4–7 utföras i ett utrymme som är fritt från DNA. Åtgärder ska också vidtas för att undvika kontamination med PCR-produkt.

1. Programmera värmecykeln med en enstegscykel som aktiverar AmpliTaq Gold vid 94 °C i 20 minuter, länkad till ett amplifieringscykelprogram på 30 sekunder vid 94 °C (denaturering), 2 minuter vid 58°C (annealing) och 1 minut vid 72 °C (extension) i 35 cykler. Detta bör länkas till en 20-minuters tidsfördröjningsfil vid 72 °C (extension) på den slutliga cykeln.

Obs! Välj alternativet för "block"-metod på värmecykeln för PCR i 0,5 mL-rör.

2. En negativ kontroll måste medtas i varje PCR-körning. En DNA-kontroll (DC) medföljer för konfirmering av amplifieringen om det behövs.
3. Tina och centrifugera ampullerna innehållande primermix (TA), AmpliTaq Gold (AG), spädningsbuffert (DB) och laddningsfärg (LD) i 10 sekunder vid 12 000 g, blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera ampullerna igen i 10 sekunder.
4. Bered tillräcklig spädning av AmpliTaq Gold med medföljande spädningsbuffert och laddningsfärg i sterilt destillerat vatten för det antal prover och kontroller som ska testas. Till

10 prover eller kontroller pipetteras 20,4 µL sterilt avjoniserat vatten, 6,0 µL spädningsbuffert, 30,0 µL laddningsfärg och 3,6 µL AmpliTaq Gold i ett mikrofugrör. Blanda enzymspädningen väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.

5. Bered en reaktionsmix genom att tillsätta rätt volym primermix till enzymspädningen från steg 4. Till 10 prover eller kontroller pipetteras 180 µL primermix i 60 µL av den enzymspädning som bereddes i steg 4. Blanda väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.
6. Pipettera 20 µL i botten av rätt antal tunnväggiga PCR-rör och sätt på korken igen.
7. Märk ett PCR-rör för varje prov och kontroll.
8. Använd separata pipettspetsar och tillsätt 5 µL testprov eller DNA-kontroll (DC) till rätt PCR-rör. Tillsätt 1 droppe Sigma lätt vit mineralolja * och sätt på korken ordentligt igen. Tillsätt inte DNA till det PCR-rör som används som negativ kontroll.
9. Centrifugera PCR-rören i 10 sekunder vid 12 000 g.
10. Placera alla rör stadigt i värmecykelblocket. Starta först 94 °C enstegscykeln och sedan amplifieringscykelprogrammet.
11. Kassera all återstående oanvänd AmpliTaq Gold-spädning.
12. När amplifieringscykelprogrammet är avslutat, kan proverna förvaras i rumstemperatur över natt eller i 2–8 °C i upp till 7 dagar före analys med gelelektrofores.

* För amplifiering som utförs i 0,5 mL PCR-rör eller värmecykler utan uppvärmda lock

Gelelektrofores

Användaren bör säkerställa att den valda utrustningen används i enlighet med tillverkarens anvisningar och är kompatibel med detta test. I detta sammanhang är de viktigaste parametrarna gelmatrisen och måtten på kammen (brunnsformaren). Resultat har erhållits med nedanstående elektroforesförhållanden:

1. PCR-produkten elektroforesbehandlades i 3 % NuSieve® 3:1 agarosgel med hjälp av tris-borat med etidiumbromid (TBE/EtBr) som löpande buffert. TBE/EtBr bereddes som 134 mM (16,2 g/L) Tris-bas, 74,9 mM (4,63 g/L) borsyra, 2,55 mM (0,95 g/L) EDTA-buffert med 0,1 µg/mL etidiumbromid.
2. 3 g NuSieve® 3:1 upplöstes i 100 mL TBE/EtBr och hölls i en 15 x 12 cm horisontell gelbricka med 1,5 mm x 5 mm brunnsformar upphängda 1 mm ovanför botten.
3. 15µL av PCR-produkten (med laddningsfärg tillsatt under PCR-förberedelseprocessen) laddades på en gel.
4. En 50 basparsstege (Pharmacia Biotech) på 1,5 µg/15 µL preparerades i medföljande laddningsfärg (80 µL destillerat vatten/10 µL laddningsfärg/10 µL 50 basparsstege). Observera att mixen kan ha orange färg innan den laddas på gelen. 15µL av denna spädning laddades på gelen och kördes bredvid proverna som en molekylviktsmarkör.
5. Elektroforesen utfördes vid 5 till 6 V/cm mellan elektroderna tills färgen hade vandrat 5 cm från laddningsbrunnarna mot anoden (1,5 till 2 timmar).

6. Efter elektroforesen placerades gelbrunnarna på en UV-transilluminator vid 260 nm, visualiserades och fotograferades.

Tolkning av resultat

PCR-produkterna iakttas som band i gelens rörspår.

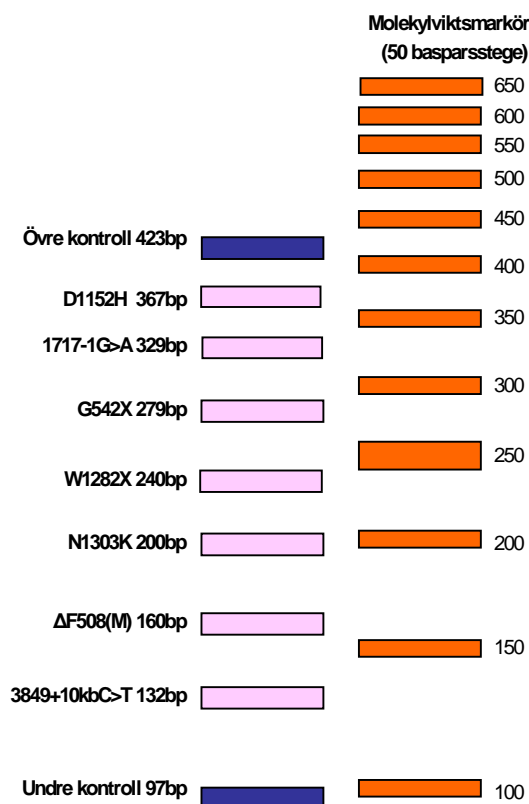
1. De övre & undre kontrollbanden måste vara tydligt synliga i alla prover (se figur 1).
2. Alla spår ska vara fria från smet och bakgrundsfluorescens.
3. De övre och undre kontrollbandens position ska ange rätt molekylstorlek (se figur 1).
4. Den negativa kontrollen får inte visa några band inom det område som anges av de övre och undre kontrollbanden. Ett diagnostiskt band ska inte tolkas om ett liknande band också syns i den negativa kontrollen för den aktuella PCR-körningen, eftersom detta tyder på kontamination med genomiska DNA- eller PCR-produkter.

Om någon av ovanstående punkter inte iakttas, ska resultaten inte utvärderas och testet upprepas.

5. En person har två kopior av CFTR-genen. Om dessa kopior har samma sekvens för ett visst givet ställe, beskrivs personen som homozygot för detta ställe. Om kopiorna skiljer sig i sekvens vid ett givet ställe, beskrivs personen som heterozygot för detta ställe.
6. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, Δ F508 eller 3849+10kbC>T iakttas som band och identifieras genom jämförelse av positionen för varje band med det intilliggande markörspåret. Produktbandstorlekarna i baspar (bp) visas i figur 1. Endast produktband i rätt storlek ska tolkas.

Figur 1 visar schematiskt storleken i baspar och den relativa placeringen av PCR-produkter i en gel för samtliga testade mutationer. Även om inte alla kombinationer av mutationer har utvärderats, är det möjligt att påvisa sammansatta heterozygoter med hjälp av ELUCIGENE™ CF7 kit.

Figur 1



Validering av testet

Sex av de sju mutationerna (1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, ΔF508 och 3849+10kb C>T) testades på etthundra prover med hjälp av ELUCIGENE™ CF6 kit i en företagsintern studie. Samtliga prover utgjordes av helblod (EDTA) och DNA preparerades enligt den metod som beskrivs i bipacksedeln. Varje erhållet resultat konfirmerades för var och en av de 6 mutationerna med hjälp av alternativa metoder. Av de 100 testade personerna var 92 normala och 8 ΔF508-mutationer påvisades. En amplifiering misslyckades och testet måste upprepas. Vid det upprepade testet kunde detta DNA-prov amplifieras med ELUCIGENE™ CF6 kit. Alla sju mutationerna (ELUCIGENE CF7 kit) testades igen på 20 av personerna, alla kunde amplifieras och var normala, i överensstämmelse med ELUCIGENE™ CF6-data.

På samma sätt testades sex av de sju mutationerna (1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, ΔF508 och 3849+10kb C>T) på blod- och munskölningsprover från 40 personer med hjälp av ELUCIGENE™ CF6 kit. Resultatet som erhöles från munskölningsprovet överensstämde med det resultat som erhöles från blodprovet från samma person. Alla sju mutationerna (ELUCIGENE CF7 kit) testades igen på 20 av de parade blod- och munskölningsproverna, alla kunde amplifieras och var samstämmiga och i överensstämmelse med ELUCIGENE™ CF6-data.

Ett antal sammansatta heterozygoter har sökts upp och analyserats med ELUCIGENE™ CF7 kit. I samtliga fall påvisades båda mutationerna. Följande testades:

1717-1G>A / ΔF508	G542X / N1303K
G542X / ΔF508	W1282X / N1303K
W1282X / ΔF508	W1282X / 3849+10kbC>T
N1303K / ΔF508	ΔF508 / 3849+10kbC>T

Korsreaktivitet

Åtgärder har vidtagits under utveckling av testet för att undvika störning av testfunktionen vid förekomst av andra rapporterade polymorfismer och mutationer i CFTR-genen ⁽³⁾. Följande sällsynta mutationer har utvärderats för korsreaktivitet och påvisades inte: R1283M, 1717-2A>G. Dessutom påvisade testet inte polymorfismen 1655T/G (F508C).

Det har nyligen rapporterats att den sällsynta och nya CFTR-mutationen 1717-2A>T ⁽⁵⁾ visar korsreaktivitet med primern 1717-1G>A, som då ger ett diagnostiskt band i den position som förväntas för 1717-1G>A.

Metodens begränsningar

1. Resultat som erhålls från detta eller andra diagnostiska kit ska användas och tolkas tillsammans med den totala kliniska bilden. Tepnel Diagnostics ansvarar inte för kliniska beslut.
2. Frånvaron av de mutationer som påvisas med detta kit är ingen garanti för att andra mutationer i CFTR-genen inte förekommer. Många andra mutationer är möjliga och påvisas inte av detta kit.
3. Frekvensen för mutationer varierar mellan olika populationer. Mutationsfrekvensdata för olika populationer kan erhållas från The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium ⁽⁴⁾.

Användaren av detta kit ska betona dessa synpunkter vid rapportering av resultat till klinikern som ställer diagnos/den genetiska rådgivaren.

Referenser

1. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503-2516 (1989).
2. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343: 1509-1510 (1994).
3. Webbplatsen för The Cystic Fibrosis Mutation Database: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
4. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat* 4: 167-177 (1994). Information är även tillgänglig från: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
5. Yau S et al. *Journal of Medical Genetics* 38: suppl. 1, sid. S71