

Elucigene[®] CF poli T Uputstvo za upotrebu

Elucigene[®] je zaštitni znak kompanije Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[®] je zaštitni znak kompanije AstraZeneca UK Ltd.

QIAamp[®] je zaštitni znak kompanije Qiagen Group

NuSieve[®] je zaštitni znak kompanije Lonza. AmpliTaq Gold[®] je zaštitni znak kompanije Roche Molecular Systems Inc.

Komplet Elucigene razvija i proizvodi kompanija Gen-Probe Life Sciences Ltd. u skladu sa sistemima kvaliteta koje propisuju standardi ISO9001:2008 i ISO13485:2003.

Proizvodi kompanija Gen-Probe Life Sciences Ltd.

Heron House
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Kontakt podaci za prodaju, korisnički servis i tehničku podršku:

Tel.: +49 (0) 6122 7076451

Telefaks: +49 (0) 6122 7076155

E-pošta: customerservice@gen-probe.eu

E-pošta: technicalsupport@gen-probe.eu



Elucigene[®] CF Poly-T

Kataloška šifra : PT003B2 – 50 analiza

Namena

Za istovremenu in vitro kvalitativnu detekciju politimidinskih alela 5T, 7T i 9T na mestu prekrajanja u intronu 8 ljudskog gena regulatora transmembranske provodljivosti cistične fibroze (CFTR). Ovom analizom dobijaju se genotipske informacije o alelima 5T, 7T i 9T iz DNK ekstrahovane iz pune ljudske krvi i ispiraka iz usta.

Kratak pregled i objašnjenje

Politimidinski trakt (poli T) jeste niz timidinskih baza koji se nalazi u intronu 8 gena *CFTR* i on se dovodi u vezu sa poremećajima povezanim sa *CFTR*, koji zavise od njegove veličine. Tri najčešće varijante poli T trakta su 5T, 7T i 9T. 7T i 9T se smatraju polimorfnim varijantama, dok se 5T smatra varijabilnom penetrantnom mutacijom. Smatra se da varijanta 5T smanjuje efikasnost prekrajanja u intronu 8. Analiza poli T pogodna je kao dalja analiza kada se otkrije mutacija R117H, kao i kada se kod odraslog muškarca ispituje kongenitalni nedostatak oba semevoda (CBAVD).

Različiti genotipovi CFTR gena (regulator transmembranske provodljivosti cistične fibroze) mogu da uzrokuju cističnu fibrozu različite težine. Uočene varijacije dužine politimidinskog trakta (poli T) u intronu 8 dovode se u vezu sa raznolikom efikasnošću prekrajanja egzona i raznolikom fenotipskom ekspresijom stanja oboljenja koja iz toga proističe (1).

Naročito je značajna uloga koju poli T trakt ima kod muške neplodnosti usled kongenitalnog nedostatka oba semevoda (CBAVD). Veza između poli T genotipova i CBAVD pokazana je kod statusa nosioca cistične fibroze (CF), čak i u odsustvu poznatih CF mutacija (2). Zbog toga je kod slučajeva neplodnosti gde se sumnja na CBAVD važno odrediti status poli T.

Ako osoba ima mutaciju R117H, kao dalja analiza preporučuje se analiza na varijante 5T/7T/9T. Ako osoba ima alel 5T, preporučuje se da se obavi porodično ispitivanje da bi se utvrdilo da li alel 5T ima konfiguraciju cis ili trans u odnosu na alel R117H. Težina oboljenja pluća kod osoba sa jednom ili dve mutacije R117H zavisi od prisustva varijacije u poli T traktu introna 8 (3). Kod osoba koje imaju mutaciju na *CFTR* koja izaziva oboljenje i varijantu 5T u cis konfiguraciji u odnosu na mutaciju R117H obično se ispolji oboljenje pluća CF, dok kod osoba sa R117H i varijantom 7T ili 9T postoji izuzetno raznolik fenotip, od odsustva simptoma do blagog oboljenja pluća (1)(4).

Principi postupka

Metod koji koristi analiza Elucigene CF poli T zasniva se na sistemu amplifikacije refraktornih mutacija (Amplification Refractory Mutation System, ARMS), tehnologiji amplifikacije PCR-om koja može da otkrije tačkaste mutacije ili sitne delecije na dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK)(5). ARMS se zasniva na principu da oligonukleotidi sa nekomplementarnim ostatkom na 3' u određenim uslovima neće funkcionisati kao prajmeri polimerazne lančane reakcije (PCR). Pažljiv odabir i raspoređivanje oligonukleotidnih prajmera omogućava amplifikaciju i detekciju specifičnih mutiranih ili normalnih sekvenci DNK.

Analiza podrazumeva jednu reakcionu smešu koja sadrži posebne prajmere za amplifikaciju svake od sledećih sekvenci DNK politimidinskih varijanti: 5T, 7T i 9T. Reakciona smeša sadrži i prajmere za amplifikaciju nepolitimidinskih sekvenci DNK kao unutrašnju kontrolu amplifikacije analize, kojom se potvrđuje uspešnost amplifikacije. Amplifikovani proizvodi (amplikoni) u PCR-u odvajaju se elektroforezom na agaroznom gelu, pri čemu prisustvo ili odsustvo traka na gelu pokazuje status CF poli T, 5T, 7T ili 9T.

Upozorenja i mere predostrožnosti

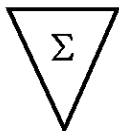
1. Za upotrebu u in vitro dijagnostici.
2. Kontrolna DNK koja se nalazi u ovom kompletu je ljudskog porekla i nezavisno je ispitana pomoću analize zasnovane na PCR-u pri kojoj se pokazala negativnom na virus hepatitisa B (HBV), hepatitisa C (HCV) i virus humane imunodeficijencije 1 (HIV1).
3. Morate biti obazrivi pri rukovanju supstancama ljudskog porekla. Sve uzorke treba smatrati potencijalno zaraznim. Nijedna analitička metoda ne pruža stopostotnu garanciju da HBV, HCV, HIV 1 ili drugi zarazni činioci nisu prisutni. Prilikom rukovanja, upotrebe, skladištenja i odlaganja na otpad uzoraka i analitičkih komponenata moraju se slediti postupci definisani važećim državnim bezbednosnim smernicama ili propisima u pogledu biološki opasnih supstanci.
4. Sve komponente čuvajte na temperaturi nižoj od -20 °C. Ako nije podeljeno naaliquote, odložite na otpad 3 meseca nakon otvaranja.
5. Aktuelna dobra laboratorijska praksa nalaže da laboratorija treba da obradi sopstvene uzorke kontrole kvaliteta poznatog genotipa u svakoj analizi, kako bi se mogla proceniti valjanost postupka.

Simboli na nalepnicama

Simboli na svim nalepnicama i pakovanjima usklađeni su sa harmonizovanim standardom EN 980



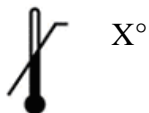
Proizvođač



Broj analiza



Pogledajte uputstvo za upotrebu



Čuvajte na temperaturi nižoj od navedene



Upotrebite pre navedenog datuma



Kataloška šifra



Broj serije

Isporučeni materijal

Reagense treba čuvati u području u kome nema proizvoda sa DNK ili PCR proizvoda koji mogu da kontaminiraju reagense.

Svi reagensi se isporučuju u stanju spremnom za upotrebu. Neotvorene i otvorene reagense čuvajte na temperaturi nižoj od -20 °C. Otvoreni reagensi se mogu čuvati najviše 3 meseca.

Isporučuje se materijal dovoljan za 50 analiza:

1. 2 bočice smeše prajmera A (TA) koja sadrži posebne prajmere za amplifikaciju alela 5T, 7T i 9T u intronu 8 gena CFTR, kontrolni prajmeri i dezoksinukleotidni trifosfati u puferu (2 x 450 µl).
2. 1 bočica x 40 µl CR000TW AmpliTaq Gold (AG).
3. 1 bočica x 200 µl pufera za razblaživanje CR000TV (DB).
4. 1 bočica x 600 µl boje za punjenje CR000TR (LD).
5. 1 bočica x 50 µl kontrolne DNK CR002TX (DC), sadrži ljudsku DNK genotipa 7T/9T.

Materijal koji je potreban ali se ne isporučuje

Laboratorijski potrošni materijal - rukavice; epruvete za mikrocentrifugu sa navojnim zatvaračem; vrhovi za pipetiranje; epruvete tankog zida od 0,2 ml ili epruvete za PCR od 0,5 ml (upotreba dveju epruveta različitih boja olakšaće raspoznavanje smeše prajmera).

Priprema DNK - Sterilna dejonizovana voda dobrog kvaliteta; natrijum-hlorid (NaCl); dinatrijumova so etilendiamin-tetrasirćetne kiseline (EDTA); pelete natrijum hidroksida (NaOH); kristalizovan 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol (Trisbaza); 36%-na hlorovodonična kiselina spec. težine 1,18 (HCl); amonijum-hlorid (NH₄Cl).

Amplifikacija PCR-om - Sigma svetlo belo mineralno ulje*; sterilna destilovana voda dobrog kvaliteta.

Elektroforeza - Materijal za gel elektroforezu koji obuhvata NuSieve[®] 3:1 agarozu (Lonza); lestvični marker od 50 baznih parova (GE Healthcare); etidijum-bromid.

* Kod amplifikacije u epruvetama za PCR od 0,5 ml ili amplifikatorima DNK-a bez grejne ploče

Potrebna oprema

Laboratorijska oprema - precizne pipete (2 kompleta: jedan za rukovanje pre amplifikacije i jedan za rukovanje posle amplifikacije, po mogućstvu pipete sa klipom bez vazduha); stakleno posuđe; zaštitna odeća; vorteks mešalica; mikrocentrifuga; vaga; stalci za epruvete.

Priprema DNK - Centrifuga (za uzorke ispiraka iz usta), grejni blok (koji zagreva do 100 °C).

Amplifikacija - amplifikator DNK u koji staju bočice od 0,5 ml ili 0,2 ml (sa temperaturnom tačnošću +/-1 °C za temperaturu od 33 °C do 100 °C i statičnom temperaturnom ravnomernošću od +/-1 °C), grejna ploča nije obavezna.

Elektroforeza - Horizontalna kadica za gel; jedinica napajanja; mikrotalasna pećnica; vodeno kupatilo za hlađenje agaroze; UV transiluminator; fotografski sistem.

Prikupljanje i skladištenje uzoraka

Treba koristiti uzorke pune krvi (EDTA) ili uzorke ispiraka iz usta. Preporučuje se da se osoba kojoj se radi analiza uzdržava od jela i pića neposredno pre davanja uzorka ispirka iz usta.

U izvesnim prilikama zapaženo je da uređaji za prikupljanje uzoraka mogu da naruše integritet analita i da utiču na neke tehnologije(6) metode. Preporuka je da se svaki korisnik postara da se izabrani uređaj koristi u skladu sa uputstvima proizvođača i da uređaji za prikupljanje uzoraka i alternativne metode za pripremu DNK budu kompatibilni sa ovom analizom.

Uzorke krvi treba čuvati na temperaturi od -20 °C pre pripreme DNK. Nemojte ponovo zamrzavati i odmrzavati. Uzorci ispiraka iz usta treba da se čuvaju na temperaturi od 4 °C, a njihova DNK se mora pripremiti u roku od 7 dana.

Priprema DNK iz uzoraka pune krvi (EDTA)

1. Pipetirajte 80 µl svakog uzorka krvi u epruvetu za mikrocentrifugu sa navojnim zatvaračem.
2. Pipetirajte 320 µl rastvora NH₄Cl konc. 170 mmol/l (9,09 g/l) u svaku epruvetu.
3. Mešajte 20 minuta kružnim mešanjem i okretanjem gore-dole. Vodite računa da ne mešate jako da se ne bi stvorila pena.
4. Svaku epruvetu centrifugirajte 2 minuta pri 12000 g, dok se ne stvori talog ćelija.
5. Pipetom izvadite tečni supernatant i bacite ga.
6. Pipetirajte 300 µl rastvora NaCl konc. 10 mmol/l (0,58 g/l)/EDTA konc. 10 mmol/l (3,72 g/l) u svaku epruvetu i resuspendujte ćelije vorteks mešanjem.
7. Svaku epruvetu centrifugirajte 2 minuta pri 12000 g, dok se ne stvori talog ćelija.
8. Ponovite korake od 5. do 7. još najmanje dva puta, sve dok se ne ukloni sva vidljiva crvena prebojenost tečnog supernatanta.
9. Pipetom izvadite tečni supernatant i bacite ga.
10. Pipetirajte 200 µl rastvora NaOH konc. 50 mmol/l (2 g/l) u svaku epruvetu i resuspendujte ćelije vorteks mešanjem.
11. Inkubirajte u grejnom bloku 10 minuta na 100 °C.
12. Pipetirajte 40 µl Trisbaze konc. 1 mol/l (121,1 g/l)/HCl (pH 7,5) u svaku epruvetu i promešajte vorteks mešanjem.
13. Dodajte 1 ml sterilne dejonizovane vode u svaku epruvetu za mikrocentrifugu kako bi ukupna zapremina uzorka DNK iznosila 1,24 ml.
14. Svaku epruvetu centrifugirajte 1 minut pri 12000 g, dok se ne stvori talog ćelija. DNK se nalazi u tečnom supernatantu.

Priprema DNK iz uzoraka ispiraka iz usta

1. Mućkajte u ustima 10 ml 0,9%-nog fiziološkog rastvora 20 sekundi. Prikupite suspenziju u univerzalnu sterilnu plastičnu epruvetu.
2. Centrifugirajte ćelije da bi se stvorio talog 10 minuta pri 800 g na temperaturi od 18 °C do 28 °C.
3. Pažljivo izvadite tečni supernatant pipetom i bacite ga.

- Pipetirajte 500 μ l rastvora NaCl konc. 10 mmol/l (0,58 g/l)/EDTA konc. 10 mmol/l (3,72 g/l) u svaku epruvetu i resuspendujte ćelije vorteks mešanjem.
- Svaki uzorak prebacite u epruvetu za mikrocentrifugu sa navojnim zatvaračem.
- Svaku epruvetu centrifugirajte 2 minuta pri 12000 g, dok se ne stvori talog ćelija.
- Pipetom izvadite tečni supernatant i bacite ga.
- Pipetirajte 500 μ l rastvora NaOH konc. 50 mmol/l (2g/l) u svaku epruvetu i resuspendujte ćelije vorteks mešanjem.
- Inkubirajte u grejnom bloku 10 minuta na 100 °C.
- Pipetirajte 100 μ l Trisbaze konc. 1 mol/l (121,1 g/l)/HCl (pH 7,5) u svaku epruvetu i promešajte vorteks mešanjem.
- Svaku epruvetu centrifugirajte 1 minut pri 12000 g, dok se ne stvori talog ćelija. DNK se nalazi u tečnom supernatantu.
- Prebacite 100 μ l supernatanta (uzorak DNK) u novu, označenu epruvetu za mikrocentrifugu.
- Dodajte 400 μ l sterilne dejonizovane vode svakom uzorku DNK kako bi njegova ukupna zapremina iznosila 500 μ l.

Alternativne metode za pripremu DNK

Komplet za DNK iz krvi QIAamp (Qiagen) se takođe koristi za pripremu DNK iz pune tečne krvi i pokazalo se da ova metoda daje reproducibilne rezultate koji se mogu tumačiti.

Gen-Probe Life Sciences preporučuje goreopisane metode za pripremu DNK, pošto se pokazalo da one daju dosledne i pouzdane rezultate. DNK pripremljena drugim metodama ili iz drugih vrsta uzoraka možda neće biti optimalna za analizu Elucigene CF poli T i mogu se dobiti suboptimalni rezultati. Glavni kriterijumi za korišćenje alternativnih metoda za pripremu DNK jesu koncentracija DNK i nedostatak inhibitora za PCR.

Preporučuje se temeljna procena upotrebe alternativnih metoda i vrsta uzoraka sa analizom Elucigene CF poli T pre nego što se rezultati iskoriste za postavljanje dijagnoze. Ne preporučuje se analiza uzoraka DNK koncentracije <10 ng/5 μ l. Pod optimalnim uslovima za PCR, dosledni rezultati se dobijaju pri koncentracijama DNK od 10 do 100 ng/5 μ l.

Napomena: Zbog promenljivog kvaliteta i količine DNK, ponekad je potrebno razblažiti finalni rastvor DNK još 5 puta da bi se postigla efikasna amplifikacija.

Protokol analize

Postupak amplifikacije

Vrednosti date u Tabeli 1 i Tabeli 2 mogu se proporcionalno povećati ako je broj analiza veći od naznačenog. Međutim, s obzirom da se u postupku koriste male zapremine, Gen-Probe Life Sciences preporučuje da se za jedan postupak pripremi najmanje 5 uzoraka.

- Programirajte amplifikator DNK tako da vremenski program aktivira AmpliTaq Gold 20 minuta na 94 °C, povezano sa programom amplifikacije od 30 sekundi na 94 °C (denaturacija), 2 minuta na 58 °C (sparivanje) i 1 minut na 72 °C (elongacija) tokom 35 ciklusa. Ovo treba povezati sa vremenskim programom od 20 minuta na 72 °C (elongacija) u poslednjem ciklusu.

Napomena: Na amplifikatoru DNK za PCR izaberite metodu „Blok“ u epruветama od 0,5 ml.

2. Odmrznite i centrifugirajte bočice sa smešom prajmera A (TA), AmpliTaq Gold (AG), bojom za punjenje (LD) i puferom za razblaživanje (DB) 10 sekundi pri 12000 g, promešajte blagim vorteks mešanjem, a zatim ponovo centrifugirajte 10 sekundi.

Napomena: Koraci 3. - 5. moraju se izvesti u području u kome nema DNK

3. Vodeći se Tabelom 1, razblažite AmpliTaq Gold u priloženom puferu za razblaživanje i boji za punjenje i sterilnoj destilovanoj vodi kako biste dobili količinu koja je dovoljna za broj uzoraka i kontrola koje će se analizirati. **Dobro promešajte tako što ćete pipetom lagano izvlačiti i ponovo vraćati rastvor.**

Tabela 1. Razblaživanje AmpliTaq Gold

	Broj potrebnih analiza			
	5	10	20	50
Količina sterilne destilovane vode (μl)	10,2	20,4	40,8	102
Količina boje za punjenje (μl)	15	30	60	150
Količina pufera za razblaživanje (μl)	3	6	12	30
Količina AmpliTaq Gold (μl)	1,8	3,6	7,2	18
Ukupna količina (μl)	30	60	120	300

4. Vodeći se Tabelom 2, pripremite reakcione smeše A. Prebacite odgovarajući alikvot smeše prajmera A u označenu epruветu za mikrocentrifugu. Zasebnim vrhovima za pipetiranje dodajte odgovarajuću količinu AmpliTaq Gold (pripremljenog u 3. koraku) u svaku epruветu za mikrocentrifugu. Promešajte blagim vorteks mešanjem, a zatim centrifugirajte epruветe 10 sekundi pri 12000 g.

Tabela 2. Priprema A reakcionih smeša

	Broj potrebnih analiza			
	5	10	20	50
	A	A	A	A
Količina smeše prajmera A (μl)	82,5	165	330	825
Količina razblaženog enzima (μl)	27,5	55	110	275
Ukupna količina (μl)	110	220	440	1100

5. Pipetirajte 20 μl pripremljene reakcione smeše na dno svih epruветa za PCR koje su vam potrebne. Označite jednu epruветu za PCR za svaki uzorak i kontrolu.
6. U svaku epruветu dodajte 5 μl uzorka DNK koji se analizira, svaki put koristeći zasebne vrhove za pipetiranje. Dodajte jednu kap Sigma svetlo belog mineralnog ulja za prekrivanje vodene faze *. Čvrsto pritegnite zatvarač.
7. U epruветu sa negativnom kontrolom nemojte dodavati DNK. Dodajte 1 kap Sigma svetlo belog mineralnog ulja za prekrivanje vodene faze *. Čvrsto pritegnite zatvarač.
8. Centrifugirajte epruветe 10 sekundi pri 12000 g.
9. Postavite sve bočice da stoje čvrsto u amplifikatoru DNK. Pokrenite vremenski program na 94 °C i program amplifikacije posle vremenskog programa.
10. Bacite sav preostali razblaženi AmpliTaq Gold koji niste iskoristili i pripremljenu reakcionu smešu.

11. Po završetku programa amplifikacije, pre analize gel elektroforezom uzorci se mogu čuvati na sobnoj temperaturi do sledećeg dana ili 7 dana na temperaturi od 2 °C do 8 °C.

* Kod amplifikacije u bočicama za PCR od 0,5 ml ili amplifikatorima DNK-a bez grejne ploče.

Gel elektroforeza

Preporuka je da se svaki korisnik postara da se izabrana oprema koristi u skladu sa uputstvima proizvođača i da je kompatibilna sa ovom analizom. U ovom kontekstu najznačajniji parametri su dimenzije matrice gela i češlja (za formiranje jamica). Rezultati su dobijeni pod sledećim uslovima elektroforeze:

1. PCR proizvod je podvrgnut elektroforezi u 3%-nom NuSieve[®] 3:1 agaroznom gelu koristeći tris-borat sa etidijum-bromidom (TBE/EtBr) kao radnim puferom. TBE/EtBr je pripremljen od Trisbaze konc. 134 mmol/l (16,2 g/l), borne kiseline konc. 74,9 mmol/l (4,63 g/l), pufera EDTA konc. 2,55 mmol/l (0,95 g/l) sa etidijum-bromidom konc. 0,1 µg/ml.
2. 3 g NuSieve[®] 3:1 rastvoreno je u 100 ml TBE/EtBr, zatim je dobijeni rastvor sipan u horizontalnu kadicu za gel dimenzija 15 cm x 12 cm, a 1 mm iznad baze postavljen je češalj za formiranje jamica dimenzija 1,5 mm x 5 mm.
3. 15 µl PCR proizvoda iz svake epruvete za PCR treba sipati u naspramne jamice pripremljene na agaroznom gelu.
4. Lestvični marker od 50 baznih parova (GE Healthcare) obrađen je naspram uzoraka kao marker molekularne težine.
5. Elektroforeza je vršena pri naponu od 5 do 6 V/cm između elektroda sve dok se prednja ivica boje nije pomerila 4 cm od jamica prema anodi (1 do 1,5 časova).
6. Nakon elektroforeze, gel je postavljen u UV transiluminator pri 260 nm, a zatim vizuelizovan i fotografisan.

Tumačenje rezultata

PCR proizvodi će se videti kao trake na putanjama epruveta u gelu.

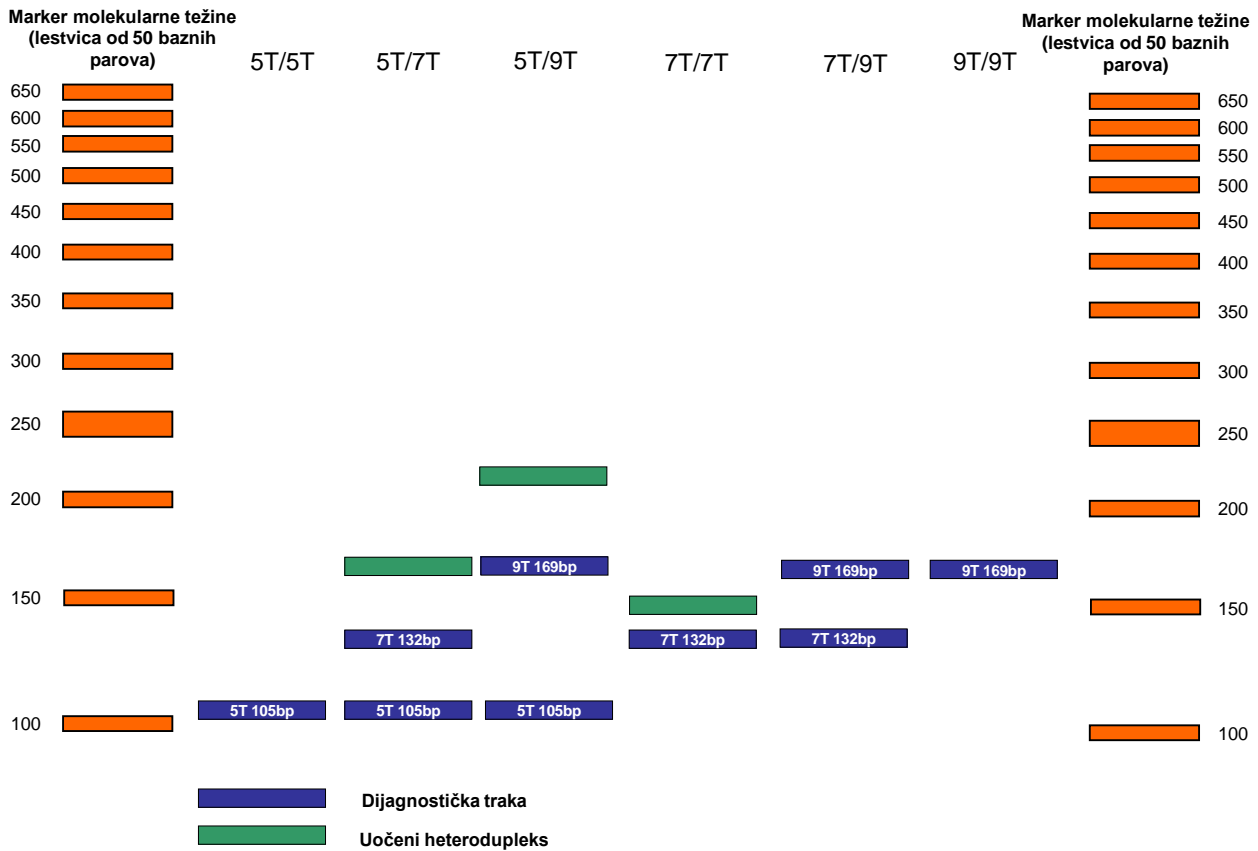
1. Dijagnostičke trake moraju biti jasno vidljive za sve uzorke i moraju biti sličnog intenziteta sve do 250. trake baznog para (bp) na lestvici od 50 baznih parova (kada je 1,5 µg lestvice stavljeno na gel). Kao vodič za intenzitet traka služiće i kontrolna DNK.
2. Na svakoj putanji uzorka koji se analizira ili kontrolne DNK mora postojati barem jedna dijagnostička traka.
3. Nijedna traka ne sme biti previše izmrljana i ne sme imati previše fluorescencije iz pozadine.
4. Pozicije dijagnostičkih traka treba da ukazuju na tačnu veličinu molekula (pogledajte Sliku 1).
5. Negativna kontrola ne sme imati trake.

Ako bilo šta od gorenavedenog nije ispunjeno, dobijene rezultate ne treba tumačiti i treba ponoviti analizu.

6. Svaki čovek ima dve kopije CFTR gena. Ako kopije imaju isti redosled na bilo kom mestu, za tu osobu se kaže da je homozigotna na tom mestu. Ako kopije imaju različit redosled na datom mestu, za tu osobu se kaže da je heterozigotna na tom mestu.

7. Prisustvo PCR proizvoda koji je nastao iz prajmera alela 5T videće se na putanji gela na 105. baznom paru, a identifikuje se poređenjem pozicije i intenziteta trake sa naspramnom trakom markera i kontrolnom DNK. Treba tumačiti samo trake proizvoda ispravne veličine.
8. Prisustvo PCR proizvoda koji je nastao iz prajmera alela 7T videće se na putanji gela na 132. baznom paru, a identifikuje se poređenjem pozicije i intenziteta trake sa naspramnom trakom markera i kontrolnom DNK. Treba tumačiti samo trake proizvoda ispravne veličine.
9. Prisustvo PCR proizvoda koji je nastao iz prajmera alela 9T videće se na putanji gela na 169. baznom paru, a identifikuje se poređenjem pozicije i intenziteta trake sa naspramnom trakom markera i kontrolnom DNK. Treba tumačiti samo trake proizvoda ispravne veličine.
10. Zbog elongacije alela u mikrosatelitskom području (TG)₈₋₁₃ na 1342-13 do 1342-26 (graniči se sa amplifikovanim politimidinskim područjem), dužina dijagnostičkih PCR proizvoda može biti različita. Zato se tokom elektroforeze može opaziti vrlo mala promena veličine trake proizvoda. Ove promene ne dovode do promene u tumačenju rezultata.
11. Zbog prirode sekvence oko lokusa poli T, ponekad se mogu formirati heterodupleksi iz PCR proizvoda, koji se tada mogu videti na nekim putanjama uzoraka. Pozicija ovih heterodupleksa, koji su manjeg intenziteta od odgovarajućih dijagnostičkih traka, prikazane su kao osenčene na Slici 1. Prisustvo heterodupleksane utiče negativno na rezultate analize.
12. Pri proveri valjanosti analize, povremeno je uočena zaprljana ili bleđa traka u uzorcima sa 7T/7T blizu pozicije alela 9T. Ovaj artefakt PCR amplifikacije nije dijagnostički PCR proizvod niti formacija heterodupleksa, te ga ne treba računati kao dijagnostičku traku.

Slika 1



Heterodupleksi prikazani na Slici 1 uočeni su tokom razvoja analize. Zbog varijabilnosti sekvence u području blizu ponovljenog poli T, mogu se uočiti dodatni (do sada neopaženi) heterodupleksi.

Karakteristike performanse

U jednoj internoj studiji analizirano je stotinu uzoraka pomoću kompleta Elucigene CF poli T. Svi uzorci su bili uzorci pune krvi (EDTA), a DNK je pripravljena u skladu sa preporučenom metodom za ekstrakciju DNK. Za svaki dobijeni rezultat alternativnom metodom je obavljena potvrda politimidinskih alela na mestu prekrajanja u intronu 8. Od 100 analiziranih osoba, 5 osoba je imalo 5T/7T, 71 osoba 7T/7T, 21 osoba 7T/9T, a 3 osobe 9T/9T. Svi uzorci DNK uspešno su amplifikovani pomoću kompleta Elucigene CF poli T i nijedan uzorak nije morao ponovo da se analizira.

Svakoj od 100 osoba uzeti su uzorci krvi i ispiraka iz usta, koji su analizirani pomoću kompleta Elucigene CF poli T. Dobijeni rezultat iz svakog uzorka ispirka iz usta poklapao se sa rezultatom uzorka krvi iste osobe.

Uticaj drugih varijacija sekvenci

Tokom razvoja analize preduzeti su koraci sa ciljem da prisustvo drugih zabeleženih polimorfizama i mutacija gena CFTR ne utiče na rad analize (7).

Postoji izvestan broj varijanti sekvenci gena CFTR čija učestalost nije poznata i koje se nalaze blizu varijanti IVS8 5T, 7T i 9T. Procenom zabeleženih varijanti sekvenci istakli su se sledeći efekti na rezultate kompleta Elucigene CF poli T:

1. Mutacija 1342-11TTT>G koja za rezultat ima osobu sa (TG)₁₃(T)₃ sa statusom očiglednog oboljenja 5T proizvešće dijagnostički PCR proizvod iz prajmera za 5T.
2. Polimorfizam 1342-13G/T koji menja konačni ponovljeni TG u TT zamenom konačnog G ne utiče na učinak analize, pošto ovaj polimorfizam menja status osoba u pogledu dužine politimidinskog trakta.
3. Efekti mutacija 1342-1G>C, 1342-2A>C i 1342-2delAG nisu ispitani i oni mogu uticati na učinak analize Elucigene CF poli T.

Ograničenja postupka

1. Rezultate ove i drugih dijagnostičkih analiza treba tumačiti udruženo sa ostalim laboratorijskim i kliničkim podacima koje kliničar ima.
2. Ako se analizom pomoću ovog kompleta ne otkriju mutacije, to ne znači da ne postoje druge mutacije gena CFTR. Moguće je prisustvo drugih mutacija koje ovaj komplet ne detektuje.
3. Učestalost mutacija se razlikuje među različitim populacijama. Podaci o učestalosti mutacija u populacijama dostupni su u Udruženju za genetsku analizu cistične fibroze (7).
4. Kao i kod svake genetske analize, pogrešni rezultati se mogu dobiti iz uzoraka uzetih nakon nedavne transfuzije krvi.

Korisnik ovih analiza treba da naglasi ove pojedinosti prilikom podnošenja rezultata kliničaru koji uspostavlja dijagnozu ili savetniku za genetiku.

Reference

1. Kiesewetter S, Macek M, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J. et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet.* 1993; 5: 274–8.
2. Dork T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Wiczorek D, Bohm I, Mayerova A, Seydewitz HH, Nieschlag E, Meschede D, Horst J, Pander HJ, Sperling H, Ratjen F, Passarge E, Schmidtke J, Stuhmann M. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet.* 1997; 100: 365–77.
3. Massie RJ, Poplawski N, Wilcken B, Goldblatt J, Byrnes C, Robertson C. Intron-8 polythymidine sequence in Australasian individuals with CF mutations R117H and R117C. *Eur Respir J.* 2001; 17: 1195–200.
4. Chmiel JF, Drumm ML, Konstan MW, Ferkol TW, Kerckmar CM. Pitfall in the use of genotype analysis as the sole diagnostic criterion for cystic fibrosis. *Pediatrics.* 1999;103: 823–6.
5. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
6. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).
7. The Cystic Fibrosis Mutation Data base at www.genet.sickkids.on.ca