

Elucigene[®] CF-EU2v1 Návod na použitie

ELUCIGENE[®] je ochranná známka spoločnosti Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[®] je registrovaná ochranná známka spoločnosti AstraZeneca UK Ltd.

QIAamp[®] je registrovaná ochranná známka spoločnosti Qiagen Group.

Súpravy Elucigene vyvinula a vyrába spoločnosť Gen-Probe Life Sciences Ltd. v rámci kvalitatívnych systémov akreditovaných podľa normy ISO9001:2008 a ISO13485:2003.

GeneMarker[®] je ochranná známka spoločnosti SoftGenetics LLC.

GeneMapper[®] je registrovaná ochranná známka spoločnosti Life Technologies Corporation.

VIC[®] a PET[®] sú registrované ochranné známky spoločnosti Life Technologies Corporation.

NED[™], POP-6[™], POP-7[™] a Hi-Di[™] sú ochranné známky spoločnosti Life Technologies Corporation.

OZNÁMENIE NÁKUPCOVI: OBMEDZENÁ LICENCIA

Polynukleotidy označené ako VIC[®], NED[™] a farbivá PET[®] a ich použitie môžu byť kryté jedným alebo viacerými patentmi vlastnenými spoločnosťou Applied Biosystems, LLC. Kúpna cena tohto produktu zahŕňa obmedzené, neprenosné práva na základe určitých tvrdení určitých patentov vlastnené spoločnosťou Applied Biosystems, LLC na použitie len tohto množstva produktu výlučne na aktivity nákupcu pri detekcii cieľa (cieľov) v oblasti ľudskej diagnostiky. Žiadne iné práva sa neposkytujú. Ďalšie informácie o nákupných licenciách týkajúcich sa vyššie spomínaných farbív možno získať kontaktovaním riaditeľa pre licencie Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Vyrobené pre spoločnosť Gen-Probe Life Sciences Ltd.

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

Predaj, zákaznícke služby a technická podpora:

T: +49 (0) 6122 7076 451

F: +49 (0) 6122 7076 155

E: customerservice@gen-probe.eu

E: technicalsupport@gen-probe.eu

Copyright © 2011 Gen-Probe Life Sciences Ltd.



Elucigene CF-EU2v1

Katalógový kód: CF2EUB2 – 50 testov

Určené použitie

Na simultánnu kvalitatívnu detekciu in vitro nasledujúcich ľudských genetických mutácií transmembránového regulátora vodivosti cystickej fibrózy (CFTR) v DNA extrahovanej z plnej krvi (konzervovanej v EDTA) a vzoriek suchých kvapiek krvi:

Tradičná	Podľa smerníc HGVS	Tradičná	Podľa smerníc HGVS
CFTRdele2,3	c.54-5940_273+1025del21kb	G551D	c.1652G>A; p.Gly551Asp
E60X	c.178G>T; p.Glu60X	R553X	c.1657C>T; p.Arg553X
P67L	c.200C>T; p.Pro67Leu	R560T	c.1679G>C; p.Arg560Thr
G85E	c.254G>A; p.Gly85Glu	1811+1.6kbA>G	c.1679+1.6kbA>G
394delTT	c.262_263delTT; p.Leu88Ilefs*22	1898+1G>A	c.1766+1G>A
444delA	c.313delA; p.Ile105Serfs*2	2143delT	c.2010delT; p.Leu671X
R117C	c.349C>T; p.Arg117Cys	2184delA	c.2052delA; p.Lys684fs
R117H	c.350G>A; p.Arg117His	2347delG	c.2215delG; p.Val739Tyrfs*16
Y122X	c.366T>A; p.Tyr122X	W846X	c.2538G>A; p.Trp846X
621+1G>T	c.489+1G>T	2789+5G>A	c.2657+5G>A
711+1G>T	c.579+1G>T	Q890X	c.2668C>T; p.Gln890X
L206W	c.617T>G; p.Leu206Trp	3120+1G>A	c.2988+1G>A
1078delT	c.948delT; p.Phe316fs	3272-26A>G	c.3140-26A>G
R334W	c.1000C>T; p.Arg334Trp	R1066C	c.3196C>T ; p.Arg1066Cys
R347P	c.1040G>C; p.Arg347Pro	Y1092X(C>A)	c.3276C>A; p.Tyr1092X
R347H	c.1040G>A; p.Arg347His	M1101K	c.3302T>A; p.Met1101Lys
A455E	c.1364C>A; p.Ala455Glu	D1152H	c.3454G>C; p.Asp1152His

Tradičná	Podľa smerníc HGVS	Tradičná	Podľa smerníc HGVS
I507del	c.1519_1521delATC; p.Ile507del	R1158X	c.3472C>T p.Arg1158X
F508del	c.1521_1523delCTT; p.Phe508del	R1162X	c.3484C>T; p.Arg1162X
1677delTA	c.1545_1546delTA; p.Tyr515X	3659delC	c.3528delC; p.Lys1177fs
V520F	c.1558G>T; p.Val 520Phe	3849+10kbC>T	c.3717+10kbC>T
1717-1G>A	c.1585-1G>A	S1251N	c.3752G>A; p.Ser1251Asn
G542X	c.1624G>T; p.Gly542X	3905insT	c.3773dupT; p.Leu1258fs
S549R(T>G)	c.1647T>G; p.Ser549Arg	W1282X	c.3846G>A; p.Trp1282X
S549N	c.1646G>A; p.Ser549Asn	N1303K	c.3909C>G; p.Asn1303Lys

CF-EU2v1 dokáže rozlíšiť osoby, ktoré sú heterozygotné a homozygotné pre všetky vyššie uvedené mutácie a varianty okrem S549R(T>G).

Zhrnutie a vysvetlenie

Cystická fibróza (CF) je najbežnejšia život obmedzujúca autozomálna recesívna porucha u belošskej populácie. Výskyt choroby je 1:3200 živonarodených detí medzi belochmi (1). V belošskej populácii je frekvencia heterozygotu približne 1:25.

Cystická fibróza postihuje epitel vo viacerých orgánoch, čo má za následok komplexnú, multisystémovú chorobu, ktorá zahŕňa exokrinný pankreas, črevá, dýchacie cesty, mužský genitálny trakt, hepatobiliárny systém a exokrinné potné žľazy. Prejav choroby sa líši podľa závažnosti mutácií *CFTR* (2), genetických modifikátorov (3) a faktorov životného prostredia (4). Rozsah siaha od smrti v ranom detstve v dôsledku progresívnej obštrukčnej choroby pľúc s bronchiektázou, cez pankreatickú insuficienciu s postupnou progresívnou obštrukčnou chorobou pľúc v adolescencii a zvýšenou frekvenciou hospitalizácií pre pľúcne choroby v ranej dospelosti, až po opakované sínusitídy a bronchitídy alebo mužskú neplodnosť v ranej dospelosti.

Diagnóza cystickej fibrózy sa najčastejšie stanovuje u osôb s jednou alebo viacerými charakteristickými fenotypickými znakmi CF plus dôkazom abnormality vo funkcii génu *CFTR* na základe jedného z nasledujúcich: prítomnosť dvoch mutácií spôsobujúcich chorobu v géne *CFTR* alebo dve abnormálne hodnoty kvantitatívnej pilokarpínovej iontoforézy (>60 mEq/l) alebo merania transepitelového nazálneho rozdielu potenciálov (NPD) charakteristické pre CF. Miera detekcie mutácie *CFTR* sa líši podľa metódy testovania a etnického pôvodu. U niektorých symptomatických osôb sa dá zistiť len jedna alebo ani jedna mutácia spôsobujúca chorobu, u niektorých nositeľov sa mutácia spôsobujúca chorobu nedá zistiť.

Poruchy spojené s CFTR sa dedia autosomal recessive autozomálnym recesívnym spôsobom. Súrodenci probanda s cystickou fibrózou majú 25 % pravdepodobnosť, že budú postihnutí, 50% pravdepodobnosť, že budú asymptomatickí nositelia a 25 % pravdepodobnosť, že nebudú postihnutí ani nositelia. Molekulárne genetické testovanie na mutácie spôsobujúce chorobyv géne CFTR sa používa na detekciu nositeľov v populačných skriningových programoch. K dispozícii je prenatálne testovanie u tehotenstiev so zvýšeným rizikom chorôb spojených s CFTR, ak sú v rodine známe mutácie spôsobujúce choroby.

Od objavu génu CFTR v roku 1989 (5) bolo popísaných vyše 1700 mutácií a variantov v géne (6). Mnohé z týchto mutácií sú „súkromné“, teda popísané len u jedného pacienta alebo rodiny. Bežné testovanie na všetky možné mutácie nie je prakticky ani finančné možné, a preto sa testovanie obmedzuje na najbežnejšie mutácie. CF-EU2v1 je súprava na testovanie na cystickú fibrózu, špeciálne určená pre najbežnejšie mutácie zisťované u populácií európskeho pôvodu. Rozbor identifikuje celkovo 50 mutácií a tiež analyzuje trakt intron 8 polyT s presným meraním príťažľého opakovania TG.

Polymorfný tymidínový trakt v spojení intronu 8 a exonu 9 ovplyvňuje transkripciu. Počet tymidínových rezíduí (5T, 7T alebo 9T) ovplyvňuje účinnosť spojenia exonu 9; ak je prítomná alela 5T, časť transkriptov exonu 9 bude neprítomná, čo bude mať za následok nefunkčný proteín a variabilné príznaky CF. Bolo hlásené, že počet opakovaní TG 5' v polytymidínovom trakte tiež môže ovplyvniť spojenie exonu 9 (7). Ak je prítomný v tej istej alele ako variant 5T, čím vyšší počet opakovaní TG, tým vyššiemu podielu transkriptov CFTR bude chýbať exon 9. Počet opakovaní TG možno zistiť pomocou CF-EU2v1 zmeraním vrcholov amplikónu 5T.

Princípy postupu

Metóda uplatnená v súprave Elucigene CF-EU2v1 používa fluorescenčnú technológiu na amplifikáciu špecifických alel ARMS (amplifikačný refrakčný mutačný systém), ktorý zisťuje bodové mutácie, vložky alebo vymazania v dezoxiribonukleovej kyseline (DNA) (8). Princíp systému ARMS je, že oligonukleotidy s 3' nesprávne priradeným rezíduom nebudú fungovať ako priméry reakcie polymerázového reťazca (PCR) za určitých podmienok. Voľba vhodných oligonukleotidov umožňuje amplifikáciu a detekciu špecifických mutantných alebo normálnych sekvencií DNA.

Varovania a bezpečnostné upozornenia

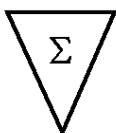
1. Na diagnostické použitie in vitro.
2. Kontrola DNA dodaná v tejto súprave je ľudského pôvodu a bola nezávisle testovaná pomocou rozboru na báze PCR, a bola negatívna na vírus hepatitídy B (HBV), vírus hepatitídy C (HCV) a vírus ľudskej imunodeficiencie 1 (HIV 1).
3. Pri manipulácii s materiálom ľudského pôvodu postupujte opatrne. Všetky vzorky sa musia pokladať za potenciálne infekčné. Žiadna testovacia metóda nedokáže absolútne zaručiť, že HBV, HCV, HIV 1 alebo iné infekčné látky sú neprítomné. Manipulácia so vzorkami a zložkami testu, ich použitie, uchovávanie a likvidácia musia byť v súlade s postupmi definovanými príslušnými národnými bezpečnostnými smernicami alebo predpismi pre biologické nebezpečenstvo.
4. Všetky zložky uchovávajúte v tme pri teplote nižšej ako -20 °C. Fluorescenčné farbivá použité v tomto produkte sú citlivé na svetlo, vyhýbajte sa predĺženému vystaveniu svetlu. Zlikvidujte 3 mesiace po otvorení, ak nebola súprava rozdelená na časti.
5. V súlade s aktuálnou dobrou laboratórnou praxou musia laboratória spracovávať svoje vlastné interné vzorky na kontrolu kvality známeho genotypu v každom rozbere, aby sa mohla vyhodnotiť validita postupu.

Symboly použité na označeniach

Symboly použité na všetkých označeniach a obaloch vyhovujú harmonizovanej norme EN 980



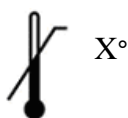
Výrobca



Počet testov



Pozri návod na použitie



Uchovávajte pri nižšej teplote, než je uvedené



Použite do uvedeného dátumu



Katalógový kód



Číslo šarže alebo dávky

Dodávaný materiál

Reagencie sa musia uchovávať v oblasti, ktorá nie je kontaminovaná DNA alebo produktom PCR.

Všetky reagencie sa dodávajú pripravené na použitie. Neotvorené a otvorené reagencie uchovávať pri teplote nižšej ako -20 °C. Otvorené reagencie možno uchovávať maximálne 3 mesiace.

Dodané sú materiály, dostatočné na 50 testov:

2 x 120 µl skúmavky CF-EU2v1 reakčnej zmesi A, obsahujúce priméry na amplifikáciu mutančných alel R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X a R1158X. Táto zmes tiež obsahuje priméry divokého typu na detekciu normálnej alely F508del, priméry na detekcie polytymidínových variantov, IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T a priméry na identifikáciu 2 hypervariabilných znakov STR – (CF2EUTA).

2 x 120 µl skúmavky CF-EU2v1 reakčnej zmesi B, obsahujúce priméry divokého typu na amplifikáciu mutančných alel R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X a R1158X. Táto zmes tiež obsahuje priméry na identifikáciu 2 hypervariabilných znakov STR – (CF2EUTB).

2 x 400 µl skúmavky hlavnej zmesi PCR obsahujúcej polymerázu HotStartTaq DNA a deoxynukleotid trifosfáty v pufrí – (CR000TM).

1 x 50 µl skúmavka kontroly DNA, normálnej pre mutácie zistené súpravou Elucigene CF-EU2v1 – (CR006TX).

Materiály potrebné, no nedodávané

Laboratórne spotrebné materiály – rukavice, skúmavky do mikroadstredivky so závitovým uzáverom, 0,2 ml skúmavky PCR, špičky pipiet.

Príprava DNA – Súprava QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, katalógové číslo 51304/51306) alebo ekvivalent.

Kapilárna elektroforéza – veľkostný štandard GeneScan 600 LIZ (katalógové číslo ABI 4366589), veľkostný štandard GeneScan 600v2 LIZ (katalógové číslo ABI 4408399), multikapilárny matricový štandard DS-33 (súprava farbiva G5) (katalógové číslo ABI 4345833), polymér POP-6 (katalógové číslo ABI 4316357) alebo polymér POP-7 (katalógové číslo ABI 4352759), 10 x pufer pre genetický analyzátor (katalógové číslo ABI 402824) a Hi-Di formamid (katalógové číslo ABI 4311320).

Potrebné vybavenie

Laboratórne vybavenie – presné pipety (2 súbory: 1 na manipuláciu pred amplifikáciu a 1 po amplifikácii, podľa možnosti pipety s pozitívnym posunom), ochranné oblečenie, vírivý mixér, mikroadstredivka, odstredivka, 96-jamková mikrotitračná platnička.

Amplifikácia PCR – termálny cyklér na umiestnenie 96-jamkových mikrotitračných platničiek alebo 0,2 ml skúmaviek s teplotnou presnosťou ± 1 °C medzi 33 °C a 100 °C a statickou teplotnou vyrovnanosťou ± 1 °C.

Kapilárna elektroforéza – genetický analyzátor ABI 3100/3130/3500 (so softvérom na fragmentovanú analýzu), 36 cm alebo 50 cm (ABI3500) kapilárny rad, 96-jamkové optické platničky, 96-jamkové priehradky, 96-jamkové kazety.

Odber a uchovávanie vzoriek

Možno použiť vzorky plnej krvi (EDTA) a suché kvapky krvi.

Občas bolo hlásené, že zariadenia na odber vzoriek sú škodlivé pre neporušenosť určitých analytov a mohli by rušiť niektoré metodické technológie (9). Odporúča sa, aby každý používateľ zaistil, aby sa zvolené zariadenie používalo podľa pokynov výrobcu a aby zariadenia na odber vzoriek boli kompatibilné s týmto testom.

Pred prípravou DNA sa vzorky krvi musia skladovať pri teplote -20 °C. Opakovane nezmrádzajte a nerozmrazujte.

Príprava DNA zo vzoriek plnej krvi (EDTA)

Dôsledné výsledky sa získavajú s DNA extrahovanou pomocou súpravy QIAamp 96 DNA Blood Kit (alebo súpravy QIAamp DNA Mini Kit s použitím proteinázy K) pri dodržaní protokolu tak, ako je popísané v príručke s QIAamp, počínajúc s 200 μ l tekutej plnej krvi a vylúhovaním v 200 μ l vody molekulárnej biologickej kvality.

Príprava DNA zo suchých kvapiek krvi

Dôsledné výsledky sa získavajú s DNA extrahovanou pomocou súpravy QIAamp DNA Mini Kit pri dodržaní protokolu tak, ako je popísané v príručke s QIAamp, no počínajúc s 2 x 3 mm diskami zo suchých kvapiek krvi a vylúhovaním v 100 μ l vody molekulárnej biologickej kvality.

Obe súbory QIAamp DNA Mini Kit a QIAamp 96 DNA Blood Kit sa úspešne používajú na extrakciu DNA.

Za optimálnych podmienok PCR a pri použití odporúčaných nastavení nástreku vzoriek (pozri poznámku v časti Kapilárna elektroforéza) uvedených v moduloch chodu kapilárnych stĺpcov, dôsledné výsledky sa získavajú s DNA extrahovanou pomocou súpravy QIAamp DNA Mini Kit a QIAamp 96 DNA Blood Kit. Pre menej koncentrované vzorky DNA možno použiť väčší objem vody na vylúhovanie. Pre koncentrovanejšie vzorky DNA možno použiť menší objem vody na vylúhovanie.

Prijateľné výsledky sa bežne získavajú z DNA extrahovanej pomocou vyššie uvedených metód pri koncentráciách medzi 1,5 ng/ μ l a 25 ng/ μ l.

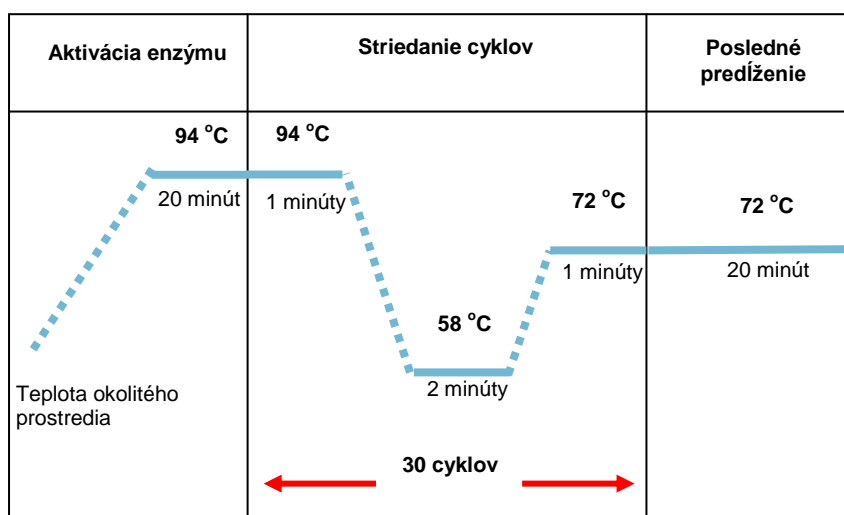
Odporúča sa dôkladné vyhodnotenie alternatívnych metód extrakcie DNA a typov vzoriek testom Elucigene CF-EU2v1 skôr, než sa výsledky použijú na diagnostické účely.

Protokol testu

Amplifikačný postup

Poznámka: Na minimalizáciu rizika kontaminácie sa kroky 3 – 5 musia vykonať v oblasti, kde sa nenachádza produkt PCR. V každom chode PCR musí byť zahrnutá negatívna kontrola.

1. Termálny cyklér naprogramujte na jednostupňový cyklus na aktiváciu HotStart Taq pri teplote 94 °C na 20 minút, prepojený na program striedania amplifikácií na 1 minútu pri 94 °C (denaturácia), 2 minúty pri 58 °C (žihanie) a 1 minútu pri 72 °C (predĺženie) na 30 cyklov. To má byť napojené na súbor s 20-minútovým časovým oneskorením pri teplote 72 °C (predĺženie) v poslednom cykle.
2. V každom chode PCR musí byť zahrnutá negatívna kontrola.
3. Rozmrazte zmesi priméru a hlavnú zmes PCR a krátko ich odstredzte, aby sa získal obsah na spodku skúmaviek. Jemne premiešajte vírením a skúmavky znovu krátko odstredzte. Pripravte dostatočné množstvo reakčnej zmesi na počet vzoriek a kontrol, ktoré sa idú testovať (tabuľka 1).



Tabuľka 1: Zloženie reakčnej zmesi

	Počet vzoriek na testovanie			
	1	10	25	50
Zmes priméru (µl)	4,5	45	112,5	225
Hlavná zmes PCR (µl)	7,5	75	187,5	375
Celkom (µl)	12	120	300	600

4. Pipetujte 10 µl každej reakčnej zmesi na dno príslušne označených 0,2 ml skúmaviek PCR.
5. Pomocou osobitných špičiek pipiet pridajte 2,5 µl skúšobnej vzorky DNA do každej skúmavky a nasadzte vrchnák. Pre negatívnu kontrolu nepridávajte do skúmavky DNA, nahradzte ju 2,5 µl sterilnej deionizovanej vody.
6. Skúmavky PCR krátko odstredzte, aby sa získal obsah na spodku skúmaviek.
7. Skúmavky pevne zasaďte do bloku termálneho cykléra. Spustíte jednostupňový cyklus pri teplote 94 °C a po ňom program striedania amplifikácií.

- Po ukončení programu striedania amplifikácií možno vzorky uchovávať pri izbovej teplote cez noc, alebo pri teplote 2 – 8 °C maximálne 7 dní pred analýzou kapilárnou elektroforézou.

Kapilárna elektroforéza

Odporúča sa, aby každý používateľ zaistil, aby sa zvolené prístroje používali podľa pokynov výrobcu a boli kompatibilné s týmto testom. V tomto kontexte sú kľúčovými parametrami polymér a kapilárny rad. Optimálne výsledky možno získať za nasledujúcich podmienok kapilárnej elektroforézy:

- Zmiešajte 6,8 µl veľkostného štandardu GS600v2 LIZ s 250 µl Hi-Di formamidínom a dôkladne ich premiešajte (dostatočnú zmes na 16 jamiek). Do každej jamky 96-jamkovej optickej platničky nadávajte 15µl zmesi.
- Pridajte 3 µl produktu PCR do zmesi veľkostného štandardu (z kroku 1), ktorá už je nadávkovaná v platničke.
- Produkt PCR nadávkovaný na optickej platničke denaturujte na termálnom cykléri s použitím nasledujúcich parametrov: 94 °C na 3 minúty s prepojením na 4 °C na 30 sekúnd.
- Platničku krátko odstredte, aby sa získal obsah na spodku skúmaviek a aby sa odstránili všetky bubliny v jamkách, potom ju vložte do genetického analyzátoru.

Poznámka: Nastavenia nástreku vzoriek možno upraviť tak, aby vyhovovali množstvu amplikónu vyprodukovanému počas PCR, ktoré sa môže líšiť podľa množstva vstupnej pridanej genomickej DNA. Menej amplikónu možno aplikovať na stípec na analýzu znížením buď času alebo napätia nástreku. A naopak, viac amplikónu možno aplikovať na stípec na analýzu zvýšením buď času alebo napätia nástreku. Vzorky, ktoré už boli amplifikované, možno nastrekovať viackrát na opakovanú analýzu.

Inštrumenty 3100 ABI:

Je potrebné vytvoriť modul CF-EU2, ktorý potom možno použiť na každý chod CF-EU2.

- Vytvorte modul CF-EU2 v editorovi modulov softvéru na zber údajov 3100.
- Skontrolujte, či je ako šablóna zvolené GeneScan36_POP6.
- Zadajte nastavenia uvedené v tabuľke nižšie:

36 cm kapilárny modul

č.	Názov parametra	Hodnota	Rozsah
1	Run Temperature (Teplota chodu)	60	int 18...65 stup. C
2	Cap Fill Volume (Objem kapilárneho plnenia)	184	int 1...200 krokov
3	Current Tolerance (Aktuálna tolerancia)	100	int 1...100 uAmp
4	Run Current (Prúd chodu)	100	int 1...200 uAmp
5	Voltage Tolerance (Tolerancia napätia)	0,6	premenlivé 0,25... 2,0 kVlt
6	Pre Run Voltage (Napätie pred chodom)	15	premenlivé 0...15 kVlt
7	Pre Run Time (Čas pred chodom)	180	int 1...1000 s
8	Injection Voltage (Napätie nástreku)	3	premenlivé 1...15 kVlt
9	Injection Time (Čas nástreku)	12	int 1...600 s
10	Run Voltage (Napätie chodu)	15	premenlivé 0...15 kVlt
11	Number of Steps (Počet krokov)	10	int 1...100 nk
12	Voltage Step Interval (Interval kroku napätia)	20	int 1...60 s
13	Data Delay Time (Čas oneskorenia údajov)	1	int 1...3600 s
14	Run Time (Čas chodu)	3000	int 300...14000 s

Poznámka: Potrebný „čas chodu“ sa bude líšiť v závislosti na teplote okolitého prostredia v lokalite, kde je nainštalovaný genetický analyzátor. Viac informácií ako vytvárať moduly chodov nájdete v používateľskej príručke k inštrumentu.

Na spustenie vzoriek si vytvorte hárok so vzorkami pomocou editora platničky. Skontrolujte, či sú zvolené nasledujúce parametre:

- Farbivo: oranžové
- Súprava farbív: G5
- Modul chodu: CF-EU2 (pozri vyššie)

Inštrumenty 3130 ABI:

Je potrebné vytvoriť modul chodu a protokol CF-EU2, ktorý potom možno použiť na každý chod CF-EU2.

Vytvorte modul chodu CF-EU2 v manažérovi modulov softvéru na zber údajov 3130. Skontrolujte, či sú zvolené nasledujúce parametre:

- Typ: bežný
- Šablóna: FragmentAnalysis36_POP7
- Zadať nastavenia uvedené v tabuľke nižšie:

36 cm kapilárny modul

č.	Názov parametra	Hodnota	Rozsah
1	Oven Temperature (Teplota pece)	60	int 18...65 stup. C
2	Poly_Fill_Vol	6500	6500...38000 krokov
3	Current Stability (Aktuálna stabilita)	5,0	int 0...2000 uAmp
4	PreRun_Voltage (Napätie pred chodom)	15,0	0...15 kVOLT
5	Pre_Run_Time (Čas pred chodom)	180	1...1000 s
6	Injection_Voltage (Napätie nástreku)	3,0	1...15 kVOLT
7	Injection_Time (Čas nástreku)	12,0	1...600 s
8	Voltage_Number_Of_Steps (Počet krokov napätia)	20	1...100 nk
9	Voltage_Step_Interval (Interval kroku napätia)	15	1...60 s
10	Data_Delay_Time (Čas oneskorenia údajov)	60	1...3600 s
11	Run_Voltage (Napätie chodu)	15,0	0...15 kVOLT
12	Run_Time (Čas chodu)	1200	300...14000 s

Poznámka: Potrebný „čas chodu“ sa bude líšiť v závislosti na teplote okolitého prostredia v lokalite, kde je nainštalovaný genetický analyzátor. Viac informácií ako vytvárať moduly chodov nájdete v používateľskej príručke k inštrumentu.

Vytvorte protokol CF-EU2 v manažérovi protokolu a skontrolujte, či sú zvolené nasledujúce parametre:

- Typ: bežný
- Modul chodu: CF-EU2 (pozri modul chodu vyššie)
- Súprava farbív: G5

Na spustenie vzoriek si vytvorte hárok so vzorkami pomocou manažéra platničky a skontrolujte, či je zvolený správny protokol pre CF-EU2v1 ako protokol inštrumentu (pozri vyššie).

Inštrumenty 3500 ABI:

Je potrebné vytvoriť protokol inštrumentu CF-EU2, ktorý potom možno použiť na každý chod CF-EU2v1.

Vytvorte protokol inštrumentu CF-EU2 prostredníctvom databázy 3,500 protokolov inštrumentu. Skontrolujte, či sú zvolené nasledujúce parametre:

- Modul chodu: FragmentAnalysis50_POP7
- Zadať nastavenia uvedené na obrázku nižšie:

Dialog box titled "Edit Instrument Protocol CFEU2" with the subtitle "Setup an Instrument Protocol".

Fields and values:

- Application Type: Fragment
- Capillary Length: 50 cm
- Polymer: POP7
- Dye Set: G5
- Run Module: FragmentAnalysis50_POP7
- Protocol Name: CFEU2
- Description: (empty)
- Oven Temperature (°C): 60
- Run Voltage (kVolts): 19.5
- PreRun Voltage (kVolts): 15
- Injection Voltage (kVolts): 3
- Run Time (sec.): 1200
- PreRun Time (sec.): 180
- Injection Time (sec.): 12
- Data Delay (sec.): 1

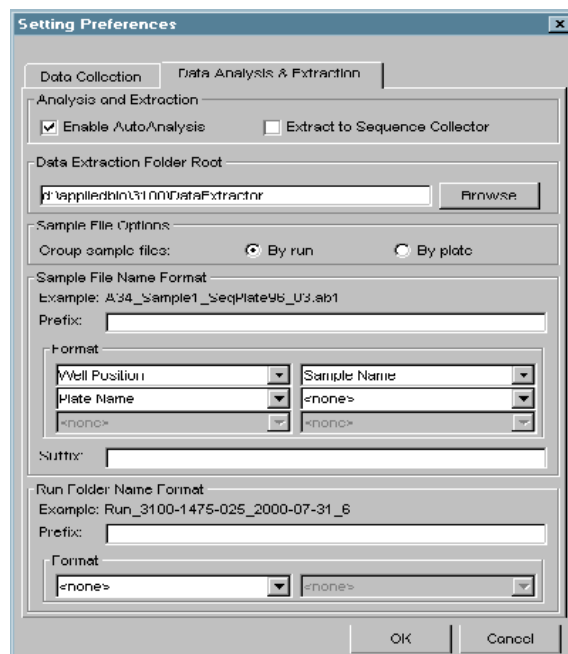
Buttons: Close, Save

Na spustenie chodu vzoriek vytvorte platničku so vzorkami kliknutím na „**Create Plate from Template**“ (vytvoriť platničku podľa šablóny) na „**Dashboard**“ (ovládacom paneli) a skontrolujte, či bol priradený správny protokol inštrumentu pre CF-EU2v1 (pozri vyššie).

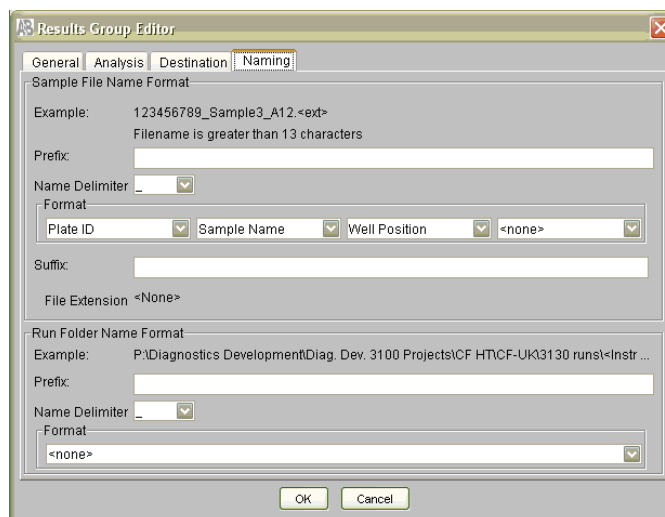
Nastavenie hárku so vzorkami pre GeneMarker:

Softvér GeneMarker umožňuje priame porovnanie údajov A a B tej istej osoby. Preto je dôležité, aby bolo pomenovávanie súboru fsa dôsledné pri všetkých vzorkách a zmesiach. Hárky so vzorkami musí obsahovať jedinečný názov vzorky pre každú vzorku, ktorá sa testuje, s pridaním koncovky buď _A alebo _B, podľa toho, ktorá zmes sa testuje. Ak sa má do názvu súboru fsa pridať ID platničky, potom sa musí zakaždým používať pevný formát, napríklad CFEU2 DDMMRRRR.

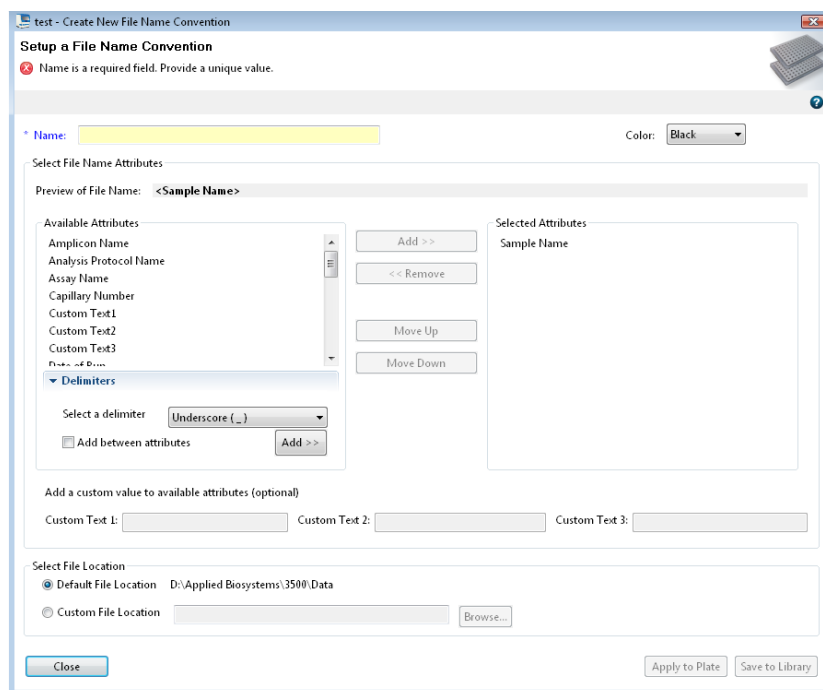
Na inštrumente **3100** má byť „Setting Preferences“ (nastavenie preferencií) nastavené tak, aby bol názov vzorky zahrnutý do názvu súboru fsa, napríklad A01_1234,5_A_CFEU2 DDMMRRRR.



Na inštrumente **3130** majú byť „Results Destination“ (umiestnenie výsledkov) parameter nastavené tak, aby bol názov vzorky zahrnutý do názvu súboru fsa, napríklad CFEU2 DDMMRRRR_1234,5_A_A01.



Na inštrumente **3500** má byť spôsob pomenovania súboru nastavený tak, aby bol názov vzorky zahrnutý do názvu súboru fsa, napríklad CFEU2 DDMMRRRR_1234,5_A_A01.



Interpretácia výsledkov

Počas zberu údajov sa budú pozorovať fragmenty PCR ako modré (mutantné) vrcholy alebo zelené (divokého typu) vrcholy na elektroferograme nespracovaných údajov. Človek má dve kópie génu CFTR. Tam, kde majú tieto kópie rovnakú sekvenciu pre ktorékoľvek dané miesto, sa osoba popisuje ako homozygotná pre toto miesto. Tam, kde sa kópie líšia v sekvencii pre dané miesto, sa osoba popisuje ako heterozygotná pre toto miesto.

Po ukončení zberu údajov sa veľkosť fragmentov CF-EU2v1 PCR má porovnať s veľkosťou veľkostných štandardov GS600v2 LIZ pomocou softvéru na analýzu fragmentov.

Dokument príručky k analytickému softvéru Elucigene CF-EU2v1 uvádza ďalšie podrobné informácie o nastavení, analýze a interpretácii softvéru. Postupy v príručke k analytickému softvéru sú dostupné pre softvér GeneMapper a GeneMarker na webovej stránke spoločnosti Gen-Probe: www.gen-probe.com

(Mutantná) zmes A určuje, či je osoba nositeľom mutácie a preukazuje sa prítomnosťou modrého vrcholu. Mutantná zmes tiež obsahuje priméry pre normálnu alelu F508del, preto táto zmes môže určiť, či je osoba normálna pre F508del (len zelený vrchol), homozygotná pre F508del (len modrý vrchol) alebo heterozygotná pre F508del (modrý a zelený vrchol).

Ak sa pozoruje akákoľvek iná mutácia, vzorku možno amplifikovať zmesou B (WT) na stanovenie homozygotného alebo heterozygotného stavu. Prítomnosť zeleného vrcholu pre konkrétnu alelu v zmesi WT indikuje, že osoba je heterozygotná a neprítomnosť zeleného vrcholu indikuje, že osoba je homozygotná pre konkrétnu mutáciu.

V oboch zmesiach sa nachádzajú hypervariabilné znaky STR (červené). To umožňuje porovnanie vzorky amplifikovanej mutantnou zmesou a vzorky amplifikovanej zmesou WT na zníženie možnosti zámenny vzoriek, odlišný profil STR u každej z dvoch zmesí indikuje zmenu vzoriek. Neprítomnosť týchto znakov STR indikuje neúspešnú vzorku. Prítomnosť znakov STR pri veľmi nízkych relatívnych fluorescenčných jednotkách indikuje slabú vzorku, ktorá sa musí analyzovať opatrne.

Poznámka: Návod na riešenie problémov sa nachádza v prílohe 1.

Zistené znaky

Nižšie uvedená tabuľka uvádza súhrn znakov zistených zmesou CF-EU2v1. Znaky sú zoradené podľa rozsahu veľkostí pozorovaného produktu PCR.

Zistené znaky

Znak č.	Znak	Rozsah veľkostí základných párov pre produkt (údaje 3130/POP7)
01	R347H	110,5-116,5
02	R347P	117-123
03	2789+5G>A	124-130
04	3120+1G>A	132,5-138,5
05	711+1G>T	141,5-147,5
06	R334W	147,5-154
07	I507del	156-162,5
08	F508del	163-169
09	3849+10KbC>T	172-178
10	1677delTA	180-188
11	1078delT	193-199
12	V520F	205-214
13	L206W	219-222
14	W1282X	224,5-230,5
15	R560T	234,5-240,5
16	2347delG	242-247
17	Q890X	250-255
18	R553X	255,5-261,5
19	G551D	264-270
20	S549R(T>G)*	267,5-269
21	S549N	275-280
22	M1101K	282-288
23	G542X	289-295,5
24	3905insT	297-303,5
25	Y1092X(C>A)	308-314
26	S1251N	315-321
27	444delA	323-330
28	1811+1,6kbA>G	332-338
29	1717-1G>A	341,5-347,5
30	R117H	349-355
31	R117C	357-361
32	N1303K	360-366,5
33	Y122X	367-373
34	394delTT	377-383
35	G85E	384-390
36	R1066C	391-397
37	1898+1G>A	398,5-404,5
38	W846X	406-411
39	2184delA	413-419,5
40	D1152H	423-429
41	CFTRdel2,3	433-439
42	P67L	439,5-445,5
43	2143delT	447-451,5
44	E60X	453,5-460,5
45	3659delC	461-466,5

Znak č.	Znak	Rozsah veľkostí základných párov pre produkt (údaje 3130/POP7)
46	3272-26A>G	470-476
47	621+1G>T	485,5-491,5
48	A455E	496-503
49	R1162X	506-512
50	R1158X	518,5-524,5
5T**	IVS8-5T	110-130
7T	IVS8-7T	140-160
9T	IVS8-9T	175-195

***S549R(T>G)**

Vrchol 20 je prítomný len v zmesi A.

**** Veľkosti alel 5T**

Znak	Rozsah veľkostí základných párov pre produkt POP7/3130 Rozsah (údaje 3130/POP7)
5T (9)	117,25 – 118,75
5T (10)	119,25 – 120,75
5T (11)	121,25 – 122,75
5T (12)	123,25 – 124,75
5T (13)	125,25 – 126,75

POZNAMKA: Veľkosti znakov sa môžu líšiť podľa použitého inštrumentu a polyméru.

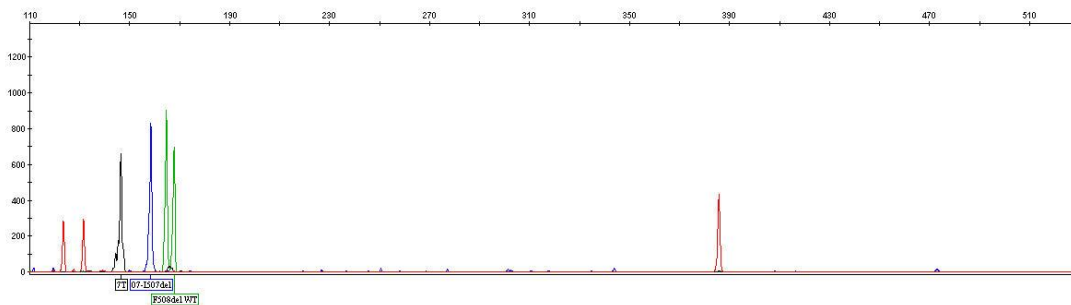
Príklady interpretácie

I507del

Vďaka lokalite I507del v géne CFTR možno zistiť prítomnosť tohto znaku pomocou posunu 3 základných párov vo veľkosti vrcholu F508del, ako aj vrcholu špecifického pre mutant I507del.

Tam, kde je prítomná jedna mutantná alela I507del, sa bude pozorovať mutantný vrchol I507del ako modrý vrchol pri približne 159 základných pároch. Vrchol divokého typu F508del sa bude pozorovať ako prítomný, no s približne polovičnou výškou vrcholu zvyčajne spájaného s homozygotným genotypom divokého typu; toto sa ukazuje ako zelený vrchol pri asi 167 základných pároch. Okrem toho sa bude pozorovať ďalší zelený vrchol pri asi 164 základných pároch.

Heterozygotná vzorka I507del

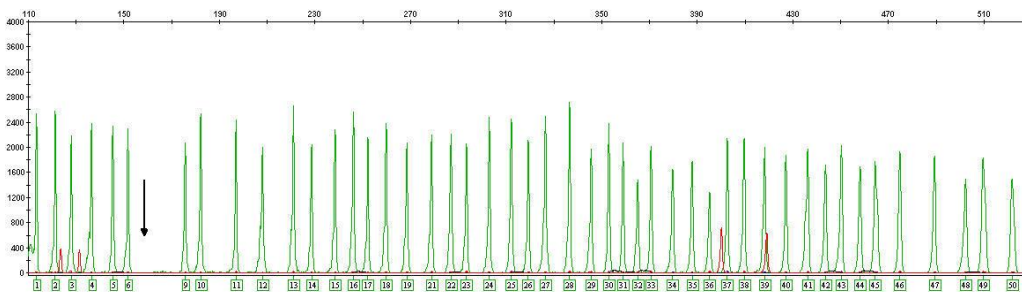


Vzorka I507del/F508del vytvorí posunutý zelený vrchol F508del WT pri približne 164 základných pároch (o 3 základné páry menej než normálne), modrý vrchol M F508del pri 166 základných pároch a modrý vrchol M I507del pri asi 159 základných pároch.

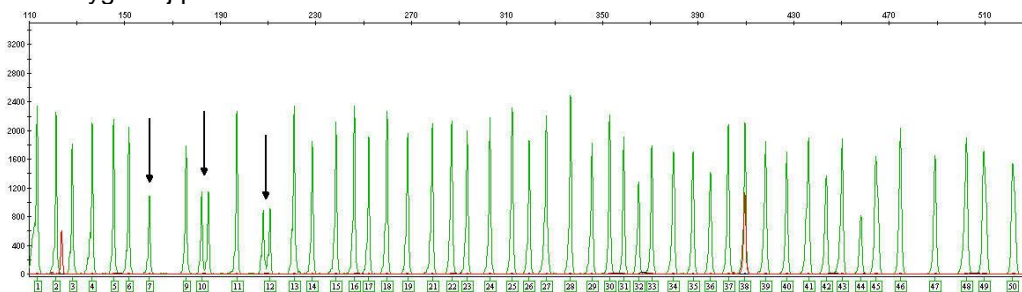
Vzorka I507del/I507vytvorí modrý vrchol pri približne 159 základných pároch a jeden zelený vrchol pri približne 164 základných pároch (o 3 základné páry menej než normálny vrchol F508del pozorovaný, keď I507del nie je prítomná).

F508del

Prítomnosť mutácie F508del bráni funkcii priméru I507del. Preto osoba homozygotná pre F508del nebude mať žiadny vrchol F508del WT v zmesi WT (pozri nižšie).



Znížená výška vrcholu I507del WT a 2 vrcholy v rozstupe 3 základných párov v pozíciách 10 a 12 v zmesi WT (pozri nižšie) sa budú pozorovať vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre F508del.



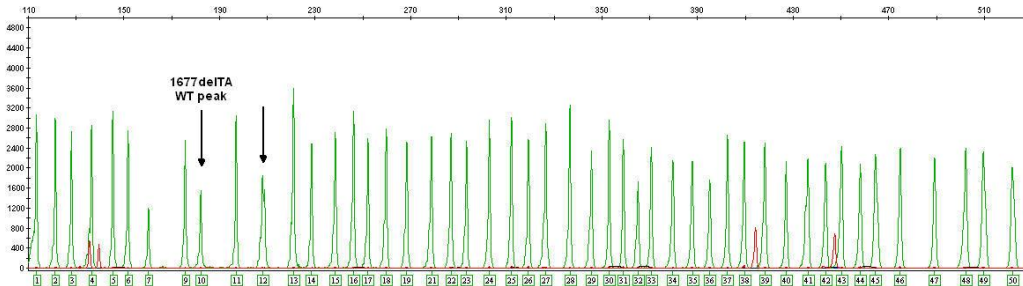
Vložky a vymazania

Kvôli povahe dizajnu súpravy CF-EU2v1, prítomnosť vložiek a vymazaní, pre ktoré nie sú v zmesi zahrnuté priméry, možno zistiť zmenou veľkosti amplikónov v zmesi divokého typu (B). Tieto boli vyrátané a sú k dispozícii v osobitnom dokumente na webovej stránke spoločnosti Gen-Probe: www.gen-probe.com

Príklady dopadu na vložky a vymazania zistené súpravou na profil zmesi B sú ukázané nižšie.

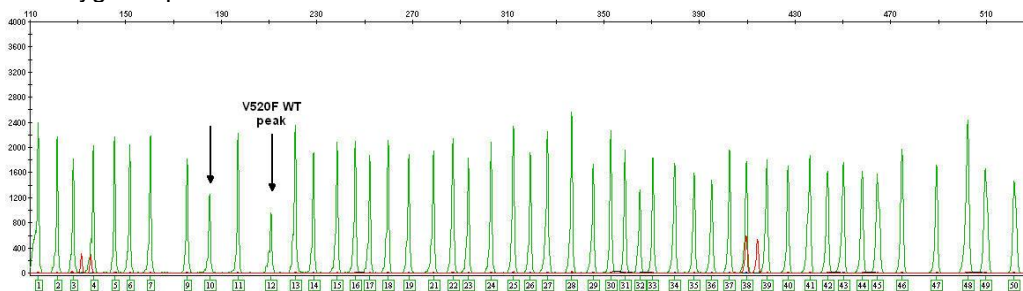
F508del/1677delTA

Dva vrcholy v rozstupe 1 základného páru v pozícii 12 (V520F WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutácie F508del/1677delTA.



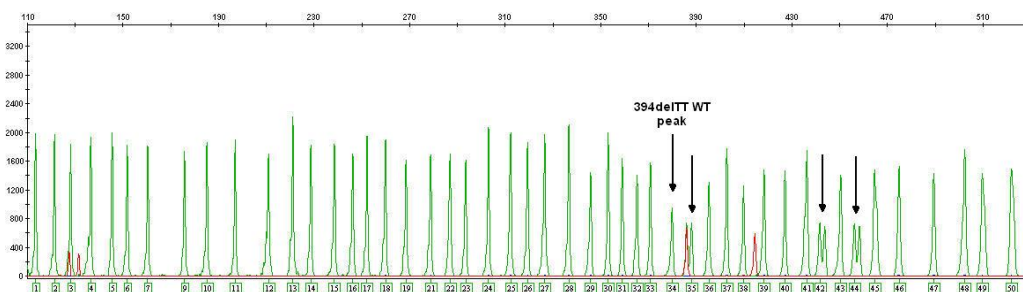
V520F

Vrchol divokého typu so zníženou výškou v pozícii 10 (1677delTA WT) bude pozorovaný vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu V520F, pretože to bráni funkcii priméru 1677delTA WT. Vrcholy 10 a 12 vypadnú z výsledkov pre osobu homozygotnú pre mutáciu V520F.



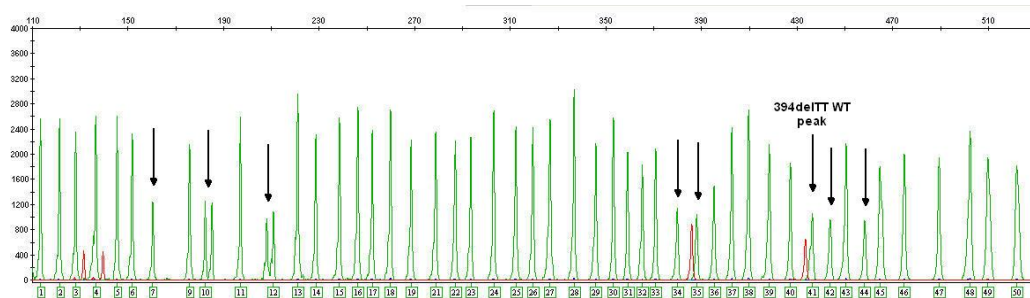
394delTT

Dva vrcholy v rozstupe 2 základných párov v pozícii 35 (G85E WT), 42 (P67L WT) a 44 (E60X WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu 394delTT. Vrchol 34 vypadne a vrcholy 35, 42 a 44 budú mať očakávanú výšku, no s posunom o 2 základné páry menším, než je očakávaná veľkosť vo výsledkoch pre osobu homozygotnú pre mutáciu 394delTT.



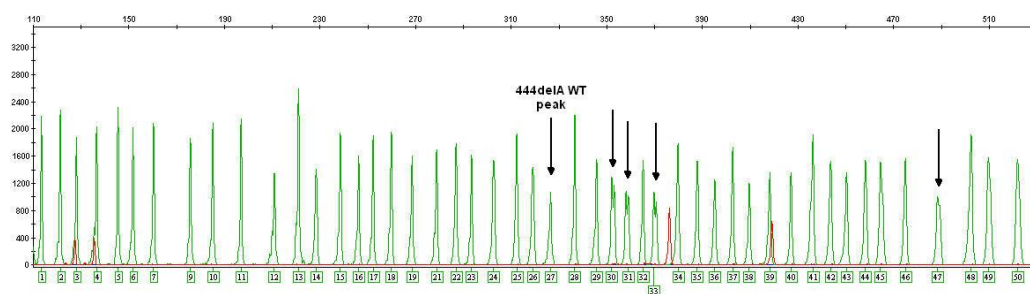
F508del/CFTRdele2,3

Znížené výšky vrcholu v pozícii 34 (394delTT), 35 (G85E WT), 41 (CFTRdele2,3 WT), 42 (P67L WT) a 44 (E60X WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu CFTRdele2,3. Vrcholy 34, 35, 41, 42 a 44 vypadnú z výsledkov pre osobu homozygotnú pre mutáciu CFTRdele2,3.



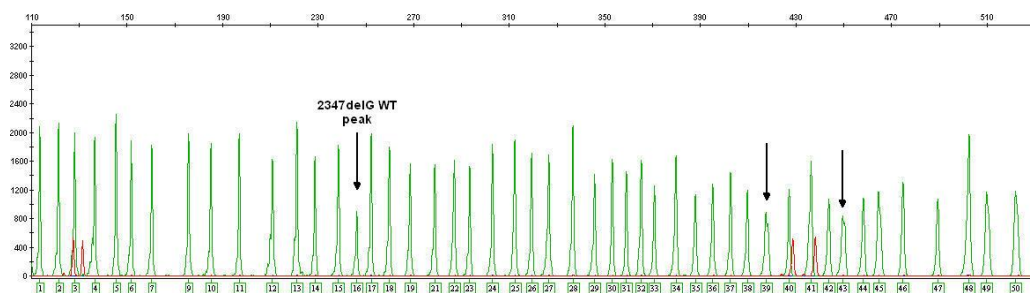
444delA

Dva vrcholy v rozstupe 1 základného páru v pozícií 30 (R117H WT), 31 (R117C WT), 33 (Y122X WT) a 47 (621+1 WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu 444delA. Vrchol 27 vypadne a vrcholy 30, 31, 33 a 47 budú mať očakávanú výšku, no s posunom o 1 základný pár menším, než je očakávaná veľkosť vo výsledkoch pre osobu homozygotnú pre mutáciu 444delA.



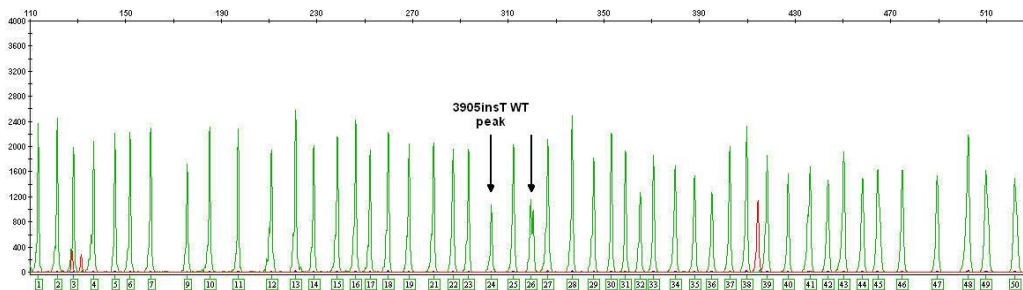
2347delG

Dva vrcholy v rozstupe 1 základného páru v pozícií 39 (2184delA WT) a 43 (2143delT WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu 2347delG. Vrchol 16 vypadne a vrcholy 39 a 43 budú mať očakávanú výšku, no s posunom o 1 základný pár menším, než je očakávaná veľkosť vo výsledkoch pre osobu homozygotnú pre mutáciu 2347delG.



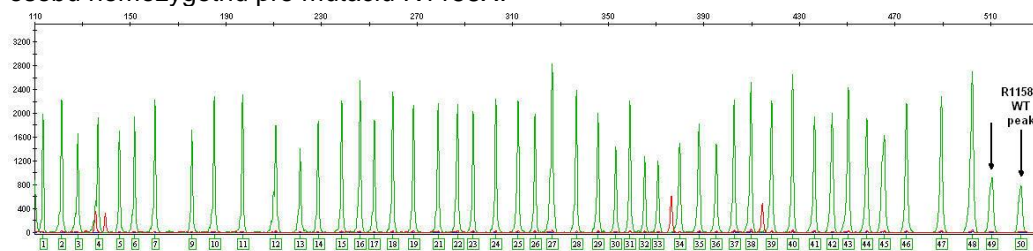
3905insT

Dva vrcholy v rozstupe 1 základného páru v pozícií 26 (S1251N WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu 3905insT. Vrchol 24 vypadne a vrchol 26 bude mať očakávanú výšku, no s posunom o 1 základný pár väčší, než je očakávaná veľkosť vo výsledkoch pre osobu homozygotnú pre mutáciu 3905insT.



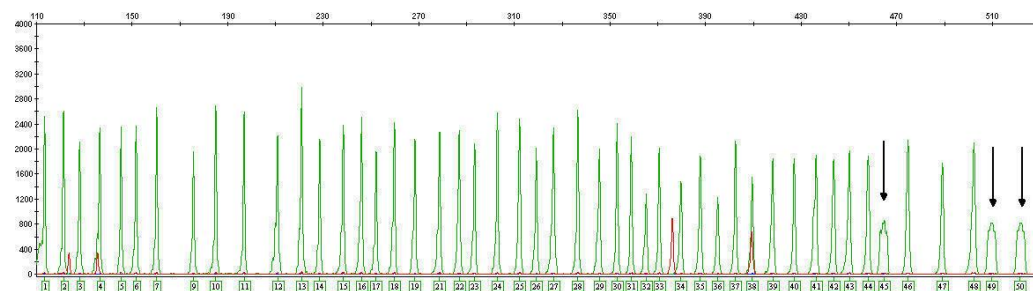
R1158X

Znížená výška vrcholu v pozícii 49 (R1162X WT) bude pozorovaná vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre mutáciu R1158X. Vrchol 49 vypadne z výsledkov pre osobu homozygotnú pre mutáciu R1158X.



Polymorfizmus rs4148721 (delAT) v introne 19

Dva vrcholy v rozstupe 2 základných párov v pozícii 45 (3659delC WT), 49 (R1162X WT) a 50 (R1158X WT) budú pozorované vo výsledkoch zmesi B od osoby heterozygotnej pre polymorfizmus rs4148721 (vymazanie AT) v introne 19. Vrcholy 45, 49 a 50 budú mať očakávanú výšku, no s posunom o 2 základné páry menším, než je očakávaná veľkosť vo výsledkoch pre osobu homozygotnú pre polymorfizmus rs4148721.



Križová reaktivita

Pri vývoji testu sa vynaložilo maximálne úsilie, aby nedošlo k rušeniu funkcie testu prítomnosťou iných hlásených polymorfizmu a mutácií génu CFTR.

Zriedkavá mutácia R1283M bola vyhodnotená na križovú reaktivitu a súprava Elucigene CF-EU2v1 ju nezistila, Okrem toho test nezistil nasledujúce polymorfizmy: 1655T/G (F508C), 1651A/G.

Hodnotenie známych mutácií a polymorfizmov v géne CFTR zvýraznilo nasledujúce účinky na výsledky súpravy Elucigene CF-EU2v1:

1. Primér mutantu G551D v zmesi A tiež zistí mutáciu S549RT>G, Softvér toto označí ako vrchol 20. V zmesi B nebude korešpondujúci vrchol divokého typu.
2. Primér mutantu 2184delA v zmesi A bude križovo reagovať s mutantnou sekvenciou DNA 2183AA>G a spôsobí mutantný vrchol v pozícii 2184delA.

3. Primér mutantu 1078delT v zmesi A bude krížovo reagovať s mutantnou sekvenciou DNA F316L a spôsobí mutantný vrchol v pozícii 1078delT.
4. Primér mutantu R347P v zmesi A bude krížovo reagovať s mutantnou sekvenciou DNA R347H a spôsobí mutantný vrchol v pozícii R347P so zníženou výškou v porovnaní so skutočným vrcholom R347P.
5. Prítomnosť polymorfizmu F508C (1655T>G) spôsobí zmenšenie výšky vrcholu I507del v zmesi CF-EU2v1 B.
6. Prítomnosť R117H spôsobí zmenšenie výšky vrcholu R117C v zmesi CF-EU2v1 B. Vo vzorke homozygotnej pre R117H bude vrchol R117C neprítomný.
7. Prítomnosť G85E spôsobí zmenšenie výšky vrcholu 394delTT v zmesi CF-EU2v1 B. Vo vzorke homozygotnej pre G85E bude vrchol 394delTT neprítomný.
8. Niekedy možno pozorovať veľmi malý vrchol artefaktu v pozícii I507del vo výsledkoch z heterozygotu F508del a konkrétne v homozygotnej vzorke F508del.
9. Nasledujúce mutácie, ktoré neboli skontrolované na možnú krížovú reaktivitu kvôli nedostupnosti relevantných vzoriek, a môžu rušiť funkciu testu: R117P, R117L, 1717-2A>G, 621+2T>C, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S, I506V a zriedkavá kombinácia I507del s polymorfizmom 1651A/G.

Výkonnostné charakteristiky

Vykonal sa slepý test stodesať vzoriek DNA extrahovanej z tekutej plnej krvi (EDTA) pomocou súpravy Elucigene CF-EU2v1. Päť vzoriek zlyhalo po PCR kvôli nízkej koncentrácii DNA (menej než 1,5 ng/ul). Zo vzoriek, ktorých výsledky bolo možné interpretovať, 96 bolo normálnych, 5 bolo heterozygotných pre F508del, 1 bola heterozygotná pre 1717-1, 1 bola heterozygotná pre G551D, 1 bola heterozygotná pre 621+1, 1 bola heterozygotná pre G542X a 1 bola zmiešaná heterozygotná pre G542X/F508del.

Vykonal sa slepý test stotri vzoriek DNA extrahovanej zo suchých kvapiek krvi pomocou súpravy Elucigene CF-EU2v1. 39 vzoriek zlyhalo po PCR kvôli zlej kvalite/nízkej koncentrácii DNA (menej než 1,5 ng/ul). Zo vzoriek, ktorých výsledky bolo možné interpretovať, 55 bolo normálnych, 3 boli heterozygotné pre F508del, 2 boli heterozygotné pre G551D, 1 bola heterozygotná pre G542X, 1 bola heterozygotná pre W1282X, 1 bola heterozygotná pre R553X a 1 bola heterozygotná pre D1152H.

Okrem toho sa amplifikovalo 46 vzoriek DNA s potvrdeným stavom mutácie pri piatich rôznych príležitostiach. Všetky vzorky mali očakávané výsledky bez akýchkoľvek falošných negatívnych alebo falošných pozitívnych výsledkov, čo preukázalo 100 % klinickú špecifickosť a citlivosť.

Obmedzenia postupu

1. Výsledky získané pomocou tohto alebo akéhokoľvek iného diagnostického testu sa musia používať a interpretovať len v kontexte celkového klinického obrazu. Spoločnosť Gen-Probe Life Sciences Ltd. nie je zodpovedná za žiadne klinické rozhodnutia, ktoré sa urobia.
2. Neprítomnosť mutácií zistených touto súpravou nie je zárukou, že nie sú prítomné iné mutácie génu CFTR. Iné mutácie sú možné a táto súprava ich nezistí.
3. Frekvencia mutácií sa líši u rôznych populácií. Údaje o frekvencii mutácií u populácií sú dostupné od Konzorcia pre genetickú analýzu cystickej fibrózy (6).

Používateľ tejto súpravy musí zdôrazniť tieto body pri hlásení výsledkov diagnostickému lekárovi/genetickému poradcovi.

Ďalšie podrobnosti o interpretácii údajov sú dostupné v postupoch v príručke k analytickému softvéru Elucigene CF-EU2v1.

Referencie

1. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132:589–95.
2. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet*. 1997;101:208–11.
3. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1443–53.
4. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:816–21.
5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis." *Science* 1989; **245** (4922): 1073-8.
6. Cystic Fibrosis Mutation Database, www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app
7. Joshua D. Groman et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. *Am J Hum Genet*. 2004; 74(1): 176–179.
8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).

Príloha 1

Návod na riešenie problémov – Elucigene CF-EU2v1

Ak test Elucigene CF-EU2v1 nepodáva rovnaký výkon vo vašom laboratóriu, pozrite si navrhované riešenia v nižšie uvedených tabuľkách. Normálna kontrola DNA dodaná v súprave poskytuje cenné informácie na pomoc pri procese riešenia problémov. Ak sa normálna kontrola DNA neamplifikuje rovnako, postup riešenia problémov sa musí sústrediť na PCR a podmienky elektroforézy. Ak normálna kontrola DNA nie je ovplyvnená, príčina problému je pravdepodobnejšie v testovaných vzorkách alebo metóde prípravy DNA.

Ak potrebujete ďalšie rady, kontaktujte skupinu technickej podpory, ktorá vám s radosťou pomôže pri riešení problémov.

1. Žiadne diagnostické vrcholy alebo vrcholy STR

	Možná príčina	Navrhovaný krok
DNA	Nedostatočná šablóna DNA.	Vzorku znovu nastreknite do genetického analyzátoru na dlhšiu dobu, napríklad 24 sekúnd. Znovu extrahujte vzorku.
PCR	Nesprávny protokol, napríklad hlavná zmes PCR nie je zmiešaná so zmesou priméru. Použil sa nesprávny program.	Pozrite si protokol odkazujúci na návod na použitie. Zopakujte testy a dodržiavajte metódy popísané v návode na použitie.

2. Slabé diagnostické vrcholy alebo vrcholy STR

	Možná príčina	Navrhovaný krok
DNA	Slabá kvalita DNA alebo prítomnosť inhibítora PCR. Malé množstvo šablóny DNA.	Skontrolujte metódu prípravy, roztoky a uchovávanie. Zriedte extrahovanú DNA 1 ku 5 a zopakujte test. Znovu pripravte DNA pomocou odporúčanej metódy a zopakujte test. Znížte prah amplitúdy vrcholu na 50 a zopakujte analýzu. Vzorku znovu nastreknite do genetického analyzátoru na dlhšiu dobu, napríklad 24 sekúnd. Znovu extrahujte vzorku.
PCR	Použil sa nesprávny program. Nesprávny protokol, napríklad hlavná zmes PCR nie je zmiešaná so zmesou priméru v správnom pomere.	Skontrolujte termálny cyklér a rozpis kalibrácií/servisu a zopakujte test. Pozrite si protokol odkazujúci na návod na použitie. Zopakujte testy a dodržiavajte metódy popísané v návode na použitie.

3. Prelomové vrcholy

	Možná příčina	Navrhovaný krok
D N A	Nadmerná šablóna DNA.	Zvýšte prah amplitúdy vrcholu a zopakujte analýzu. Vzorku znovu nastreknite do genetického analyzátoru na kratšiu dobu, napríklad 3 sekundy. Zried'te DNA a znovu amplifikujte.
P C R	Použil sa nesprávny program.	Skontrolujte termálny cyklér a rozpis kalibrácií/servisu a zopakujte test.