



MOLBIOL

## ***LightMix® kit de diagnóstico in-vitro para MTHFR C677T***

**Cat.-No.: 40-0129-64**

Detección de la variación del ADN C677T  
en el gen de la *MTHFR*

Para usar con los

Instrumentos Roche Diagnostics LightCycler®

Formato SimpleProbe®

Reactivos para 64 reacciones

**A la llegada:**

**Almacenar los reactivos pre-mezclados de la PCR y los Controles protegidos de la luz y a temperatura ambiente (No congelar)**

**Almacenar los reactivos FastStart DNA Master HybProbe congelados a (-20°C); (Si fueron incluidos)**





<b>1. INFORMACION DEL PRODUCTO</b>	<b>3</b>
1.1. Contenidos <i>LightMix</i> <sup>®</sup> Kit MTHFR C677T	3
1.2. Uso previsto	4
1.3. Especificaciones	4
1.3.1. Muestras Clínicas	4
1.3.2. Instrumentos, Software y Productividad	5
1.4. Almacenamiento y estabilidad	5
<b>2. DISPOSITIVOS ADICIONALES Y REACTIVOS</b>	<b>6</b>
2.1. Necesario	6
2.2. Opcional	6
2.3. Preparación de las muestras	6
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
3.1. Antecedentes Médicos	7
3.2. Metodología y principio del ensayo	8
3.3. Características de rendimiento	8
<b>4. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS</b>	<b>9</b>
<b>5. PROGRAMACION</b>	<b>10</b>
5.1. Compensación de color	10
5.2. Instrumentos <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> de capilares	10
5.3. Instrumentos <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 480	11
5.4. Instrumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 96 t	12
5.5. Instrumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> Nano	13
<b>6. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES</b>	<b>14</b>
6.1. Preparación de muestras	14
6.2. Preparación de reactivos	14
6.2.1. Preparación de la mezcla <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> FastStart DNA Master HybProbe	14
6.2.2. Preparación de los reactivos parámetro específicos	14
6.2.3. Preparación del control positivo de ADN	15
6.2.4. Preparación de estándares de genotipado	15
6.3. Preparación de la mezcla de reacción	15
6.3.1. Preparación de mezcla de reacción para 64 muestras	15
6.3.2. Preparación de mezcla de reacción individual	16
6.3.3. Capilar / Pocillo procedimiento de carga	16
6.4. Almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos	17
6.5. Carga de los controles y estándares de genotipado	17
6.5.1. Instrumentos de capilares	17
6.5.2. Instrumentos <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 480	18
6.5.3. Instrumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 96	18
6.5.4. Instrumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> Nano	18
<b>7. ANALISIS DE LOS DATOS E INTERPRETACION</b>	<b>19</b>
7.1. Límites e interferencias	19
7.2. Calibración	19
7.3. Control de calidad – Criterios de Aceptación	19
7.3.1. Control negativo (NTC)	19
7.3.2. Control positivo	19
7.3.3. Estándares Genotipado	20
7.3.4. Muestras	20
7.3.5. Curvas de <i>melting</i> Anómalas	20
7.4. Salvar externamente estándares de genotipado	20
7.4.1. Instrumentos de capilares	20
7.4.2. Instrumentos <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 480	20
7.5. Lectura de los resultados	21
7.5.1. Análisis <i>Melting</i> : Instrumentos de capilares	21
7.5.2. Análisis <i>Melting</i> : Instrumentos <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 480	21
7.5.3. Análisis <i>Melting</i> : Instrumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 96t	22
7.5.4. Análisis <i>Melting</i> : Instrumento <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> Nano	22
7.6. Temperaturas de <i>melting</i> esperadas y resultados	22
7.7. Interpretación de los resultados	23
7.8. Información adicional	24
7.8.1. Datos típicos para amplificación n	24
7.8.2. Variantes raras	24
<b>8. SOLUCION DE PROBLEMAS</b>	<b>26</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>27</b>

# 1. Información del producto

## 1.1 Contenidos: LightMix® Kit MTHFRC677T

Reactivos de PCR pre-mezclados liofilizados				
 <b>Almacenar entre 4°C a 25°C en la oscuridad</b>				
	Color tapón	Etiqueta	Descripción contenido	Total Reacciones
1 x	Rojo	PSR	Reactivo Parámetro Específico (PSR) contiene primers y sondas pre-mezclados y liofilizado para 64 reacciones. <0,01pg oligonucleótido no marcado; <0,01pg oligonucleótido marcado con SimpleProbe 519	64 Pellet verde azul liofilizado

Estándares (Control ADN)				
 <b>Almacenar entre 4°C a 25°C en la oscuridad</b>				
	Color tapón	Etiqueta	Descripción contenido	Total Reacciones
1 x	Amarillo	HT	Control Positivo Heterocigoto <0,01pg ADN plásmido sintético [cerca de 10E4 genoma equivalente]	40 Pellet azul liofilizado
1 x	Amarillo	WT	Genotipo Estándar Salvaje <0,01pg ADN plásmido sintético [cerca de 10E4 genoma equivalente]	40 Pellet azul liofilizado
1 x	Amarillo	MT	Genotipo Estándar Mutante <0,01pg ADN plásmido sintético [cerca de 10E4 genoma equivalente]	40 Pellet azul liofilizado

Mezcla Polimerasa: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe				
 <b>Almacenar a -20°C a la llegada</b>				
	Color tapón	Etiqueta	Descripción contenidos	Total Reacciones
1 x	Rojo	1a	LightCycler® FastStart Enzyme	64 congelado
1 x	Blanco	1b	LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe	64 congelado
1 x	Transparente	Agua	H <sub>2</sub> O grado-PCR	congelado
1 x	Azul	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	congelado

La FastStart DNA Master HybProbe está incluida en los kits suministrados directamente por TIB MOLBIOL exclusivamente para clientes en Europa Central <sup>(1)</sup>.

La FastStart DNA Master HybProbe no está incluida en kits de MTHFR suministrados a través de Roche Diagnostics o su distribuidor local.

La enzima FastStart es enviada por TIB MOLBIOL a temperatura ambiente

## 1.2. Uso previsto

Este kit permite la detección de la Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR, OMIM: 607093) C677T polimorfismo de nucleótido único rs1801133 en el ADN genómico humano a partir de una extracción de ácidos nucleicos obtenida de sangre periférica.

La mutación del gen C677T codifica una variante de la enzima que exhibe una disminución de su actividad. Portadores homocigotos de la variante del gen 677 T/T, y en menor medida en individuos heterocigotos con la combinación alélica C677T y A1298C, pueden presentar niveles elevados de homocisteína en plasma, dando lugar a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, trombosis e hipertensión.

Este producto pretende ayudar en los análisis clínicos de personas con antecedentes genéticos que muestran niveles elevados de homocisteína o una predisposición a la trombosis. El presente ensayo puede realizarse en adición o después de un ensayo fenotípico de los niveles de homocisteína.

Pacientes heterocigotos C677T también deben ser analizados para el segundo polimorfismo prevalente la MTHFR A1298C, usando por ejemplo el LightMix® Kit 40-0269.

Los resultados obtenidos usando éste KIT no están destinados a ser la única base para cualquier decisión terapéutica. El estado de la mutación del paciente debe ser considerado junto con los factores de riesgo.

Nota: El rendimiento del ensayo sólo puede ser garantizado cuando se utiliza con los Instrumentos LightCycler® (para detalles véase 1.3.2).

## 1.3. Especificaciones

El *Kit LightMix® MTHFR C677T* es un test de diagnóstico in-vitro y permite la detección del polimorfismo de un solo nucleótido de la MTHFR C677T (SNP) como se ha demostrado con muestras de referencia.

### 1.3.1. Muestras clínicas

El test requiere de 2 µl de ADN genómico purificado en solución acuosa extraídos de muestras clínicas, conteniendo desde 5 a 100 ng/µl de ADN genómico (10 ng – 200 ng cantidad total), como se determina por espectrofotometría UV (1 OD = 50 µg ADN/ml).

### 1.3.2. Instrumentos, Software y Productividad

El kit contiene reactivos para 64 reacciones realizadas en un volumen de 10 µl. Cada ejecución requiere incluir un estándar y un control negativo. La siguiente tabla resume algunas de las características del kit:

Instrumento LightCycler®	Versión Software (o superior)	Tiempo Ejecución (aprox.)	Máximo de muestras por ejecución (2)	Máxima Productividad del kit (3)	Mínima Productividad del kit (4)
LC 1.2	4.10 (1)	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC 1.5	4.10 (1)	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC 2.0	4.05	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC480 (96 pocillos)	1.5	100 min	94 + 2 ctrl.	60	20
LC480 (384 pocillos)	1.5	100 min	382 <sup>(5)</sup> + 2 ctrl.	60	20
z480 (canal abierto)	1.5	100 min	94 <sup>(5)</sup> + 2 ctrl.	60	20
LC96	1.6 (6)	100 min	94 <sup>(5)</sup> + 2 ctrl.	60	20
Nano	1.0 (6)	60 min	30 + 2 ctrl.	60	21

- 1 Ejecutando el test con los instrumentos LightCycler® 1.2 o 1.5 con la versión del software 3.5 se producen resultados comparables. Instrucción para la programación, análisis de datos e interpretación de resultados no son descritos en éste manual. Actualizar a la versión 4.10 o superior cuando sea posible. El software LightCycler® 3.5.3 no contiene el módulo automático de genotipado; resultados equivalentes pueden ser obtenidos por personal capacitado que deben analizar cada muestra manualmente.
- 2 Cada ejecución debe incluir un control heterocigoto y un control No-Target (NTC) por un total de 2 controles de reacción.
- 3 La primera ejecución del kit requiere que se incluyan el total de los 4 controles para enseñar el módulo de genotipado (no aplicable para Nano y LC96). El número máximo de muestras que pueden ser procesadas se reduce en consecuencia.  
Dependiendo de las regulaciones locales, los 4 controles de genotipado podrían tener que ser incluidos en cada ejecución, reduciendo el total del número de muestras de pacientes que pueden ser analizadas
- 4 Calculado teniendo en cuenta una muestra clínica única analizada en cada ejecución.
- 5 Se requiere el uso de más de un kit.
- 6 El software del Nano LightCycler® 1.0 y el software del LC96 1.6 no contiene el módulo de genotipado automático, por lo tanto no es necesario agregar dos estándares de genotipado; resultados equivalentes pueden ser obtenidos por personal capacitado que deben analizar cada muestra manualmente.

### 1.4. Almacenamiento y estabilidad

Tenga en cuenta las diferentes condiciones de almacenamiento para los reactivos y la mezcla de polimerasa!

#### Reactivos y controles:

Almacenar los reactivos liofilizados (PSR y Estándares) protegidos de la luz refrigerados o a temperatura ambiente (4°C to 25°C). No congelar los reactivos liofilizados. La fecha de vencimiento está impresa en la etiqueta del kit.

**Mezcla de la Polimerasa:** Almacenar la LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe entre -15°C a - 5°C.

Ver fecha de caducidad en la etiqueta del tubo de la polimerasa.

#### Envío:

Los productos son enviados a temperatura ambiente. La estabilidad en el transporte de los reactivos y los componentes de la enzima han sido probados en esas condiciones de envío.

## 2. Aparatos y reactivos adicionales

### 2.1. Requeridos

#### Instrumento **LightCycler® 2.0**

Instrumento **LightCycler® 2.0**  
Software **LightCycler®** Versión 4.05 o  
Software **LightCycler®** Versión 4.10 o superior  
Capilares **LightCycler®** (20 µl)

○

#### Instrumentos **LightCycler® 480**

Instrumento **LightCycler® 480** (modelo I)  
Instrumento **LightCycler® 480** II  
Sistema Cobas® 4800 (Instrumento Z480)  
Software **LightCycler®** Versión 1.5 o superior  
**LightCycler® 480** Multiwell Plate 96 o  
**LightCycler® 480** Multiwell Plate 384 white

○

#### Instrumento **LightCycler® 96**

Instrumento **LightCycler® 96**  
**LightCycler®** Software Version 1.0 o superior  
**LightCycler® 480** Multiwell Plate 96  
**LightCycler® 8 tube strips (white)**

○

#### Instrumento **LightCycler® Nano**

Instrumento **LightCycler® Nano**  
Software **LightCycler®** Versión 1.0 o superior  
tubos **LightCycler® Nano**

○

#### Instrumentos **LightCycler® 1.x**

Instrumentos **LightCycler® 1.2** y 1.5  
Software **LightCycler®** Versión 4.10  
Capilares **LightCycler®** (20 µl)

### 2.2. Opcional

#### Instrumentos:

LC Centrífuga Carrusel 2.0 (230 Volt)  
*Capping Tool*

### 2.3. Preparación de las muestras

#### Preparación manual de muestra:

Kit de Preparación High Pure PCR Template  
Agua grado-PCR libre de Nucleasas  
Etanol p.a.  
alcohol isopropílico p.a.

#### Preparación automática de muestra:

Instrumento MagNA Pure  
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I  
Instrumento MagNA Pure 2.0  
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I  
Instrumento MagNA Pure Compact  
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I  
Instrumento MagNA Pure 96  
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit  
Instrumento MagNA Pure 96 IVD  
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit

#### Roche Diagnostics

Cat.-No. 12 011 468 001  
Descatalogado  
Cat.-No. 04 779 584 001  
Cat.-No. 11 909 339 001

#### Roche Diagnostics

Descatalogado  
Cat.-No. 05 015 278 001  
Cat.-No. 05 200 881 001  
Cat.-No. 04 994 884 001  
Cat.-No. 04 729 692 001  
Cat.-No. 04 729 749 001

#### Roche Diagnostics

05 815 916 001  
Incluido con el instrumento  
Cat.-No. 04 729 692 001  
Cat.-No. 06 612 601 001

#### Roche Diagnostics

Cat.-No. 06 407 773 001  
Incluido con el instrumento  
Cat.-No. 06 327 672 001

#### Roche Diagnostics

Descatalogado  
Cat.-No. 04 779 584 001  
Cat.-No. 11 909 339 001

#### Roche Diagnostics

Cat.-No. 03 709 582 001  
Cat.-No. 03 357 317 001

#### Roche Diagnostics

Cat.-No. 11 796 828 001  
cualquier proveedor  
cualquier proveedor  
cualquier proveedor

#### Roche Diagnostics

Descatalogado  
Cat.-No. 03 003 990 001  
Cat.-No. 05 197 686 001  
Cat.-No. 03 003 990 001  
Cat.-No. 03 731 146 001  
Cat.-No. 03 730 964 001  
Cat.-No. 05 195 322 001  
Cat.-No. 05 467 497 001

Cat.-No. 06 541 089 001  
Cat.-No. 06 543 588 001

## 3. Antecedentes

### 3.1. Antecedentes Médicos

La deficiencia de la Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) es un error común innato del metabolismo del folato. El espectro fenotípico puede variar desde un grave deterioro neurológico y la muerte prematura a un aumento del riesgo a desarrollar enfermedades vasculares, trombosis e hipertensión, mientras que en algunos casos también puede ser asintomática.

La variante MTHFR C677T del gen que consiste en la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 codifica una enzima termolábil, exhibiendo una disminución de su actividad (Rosenblatt et al., 1992)<sup>1</sup>

La nueva nomenclatura para esta variante es c.665C>T (posición en el ADN que codifica) y p.A222V (posición en la proteína).

Portadores homocigotos de la variante del gen 677 T/T, y en menor medida en individuos heterocigotos que tienen ambos alelos 677C/T y 1298A/C (Glu 429 Ala), pueden manifestar elevados niveles de homocisteína en plasma, lo que resulta en un mayor riesgo a desarrollar enfermedades vasculares, trombosis, e hipertensión.

### Enfermedades Vasculares

La mutación C677T parece representar un importante factor de riesgo genético en enfermedades vasculares (Frosst et al., 1995)<sup>2</sup>.

Los estudios de la mutación C677T en pacientes con enfermedades cardiovasculares y controles muestran que la homocigosis para esta frecuente mutación en el gen MTHFR se asocia con un incremento de 3 veces en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares prematuras (Kluijtmans et al., 1996)<sup>3</sup>.

### Trombosis

Tanto la hiperhomocisteinemia, debida a la mutación C677T y el factor V Leiden son factores de riesgo recurrentes de trombosis venosa. Se encontró que la amenaza de trombosis era más alta para los individuos que tenían ambos factores de riesgo (Keijzer et al., 2002)<sup>4</sup>.

### Hipertensión

En un análisis que combina 26 estudios Ingleses y Chinos en poblaciones Caucásicas y Asiáticas se encuentra una asociación significativa entre el polimorfismo C677T y la hipertensión/hipertensión en el embarazo (Quian et al., 2007)<sup>5</sup>.

### Frecuencia alélica

La frecuencia alélica de la MTHFR 677 T para individuos de origen caucásico en Europa está en el rango del 8% (Alemania) al 18% (Italia), mientras que está reportado por encima del 35-40% para América del Norte.

### **3.2. Metodología y Principios del ensayo**

Usando la metodología de PCR, un fragmento de 288 pb del gen de la MTHFR es amplificado con primers específicos. El fragmento es detectado con una sonda de detección mutación-específica.

Durante el análisis de la curva de melting la temperatura se incrementa lentamente. La sonda se disocia a un valor específico, provocando una disminución de la fluorescencia. Cualquier mismatch cubierto por la sonda desestabiliza el híbrido y disminuye la  $T_m$

En éste producto la sonda es complementaria a la secuencia del genotipo salvaje y la presencia de la variante mutada dará como resultado una  $T_m$  inferior.

La lectura de los resultados de genotipado se basa en comparar las temperaturas de melting con los estándares suministrados. Si el software del instrumento lo permite, la lectura de los resultados de genotipo puede ser realizada por el genotipado automático (disponible según el instrumento utilizado, módulo 'Melt Curve Genotyping').

Los resultados de genotipado automático deben ser revisados visualmente para desviaciones de curvas y temperaturas de *melting* intermedias. En caso en que el software de genotipado automático no esté disponible o falle en la lectura de los datos, los resultados deben ser obtenidos de las temperaturas de melting siguiendo los criterios descritos en el capítulo 7.

### **3.3. Características de rendimiento**

#### **Especificidad Analítica**

La especificidad para el gen target y la idoneidad de la amplificación de PCR empleada en el presente ensayo se demostró por secuenciación del amplicon.

#### **Sensibilidad Analítica**

La detección de diluciones en series de varios ADNs genómicos heterocigotos humanos han revelado que el límite de detección del presente ensayo es de 250 copias (1.5 ng).

#### **Especificidad y Sensibilidad del Diagnóstico**

Un total de 132 muestras diferentes de ADN genómico de individuos de origen Caucásico fueron analizados en paralelo por secuenciación y con el presente kit. Los estudios comparan los resultados obtenidos del kit con los datos de secuenciación del instrumento ABI 3730xl obtenidos por LGC Genomics GmbH, Berlín.

Resultados del estudio: el resultado para ambos métodos analíticos fue de una concordancia del 100%. En particular, 36 muestras fueron homocigotas tipo salvaje, 80 heterocigotos, y 16 mutantes homocigotas.



## 4. Precauciones y Advertencias

### Requerimientos de manipulación

El presente producto es un dispositivo in-vitro para diagnóstico y por lo tanto debe ser utilizado únicamente por personal cualificado.

Son requeridas precauciones generales para el manejo de materiales genéricos de laboratorio.

El laboratorio de trabajo debe cumplir con las prácticas estándares. Debido al riesgo de contaminación, la preparación y amplificación de la PCR debe realizarse en zonas físicas separadas.

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.

Utilice la versión del manual que se entrega con el Kit (Ver etiqueta del Kit).

### Procedimientos de laboratorio

Todos los materiales de origen humano y los residuos relacionados deben ser considerados como potencialmente infecciosos. Limpiar a fondo y tratar todas las superficies con desinfectantes aprobados por las autoridades locales.

No comer, beber o fumar en el área de trabajo del laboratorio.

No pipetear con la boca.

Usar guantes desechables, batas de laboratorio y protección ocular adecuada durante la manipulación de las muestras y los componentes establecidos.

Evitar la contaminación microbiana o de nucleasas de los reactivos durante el pipeteado de las alícuotas. El uso de puntas desechables estériles es esencial.

Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los componentes del Kit.

### Preparación de muestras

En cuanto a la manipulación y eliminación, consulte las instrucciones de seguridad adjuntas en el prospecto del producto empleado (véase capítulo 2.3).

### Amplificación y Detección

Antes de utilizar este producto, por favor lea el manual del operador del LightCycler®.

Por favor salvar un archivo de ejemplo para identificar en cada posición una correcta identificación de la muestra.

Comprobar la configuración del instrumento LightCycler® y asegúrese de que coinciden con los reportados en la siguiente sección “protocolo PCR” específico para su instrumento.

No tocar la superficie de los capilares o la cubierta de la placa sin guantes.

Por favor consulte todas las instrucciones operativas y de seguridad del instrumento LightCycler®.

## 5. Programación

### 5.1. Compensación de color

No se requiere compensación de color para el uso de este kit. La lectura de los datos con la 'compensación de color' activada no va a cambiar la lectura de los resultados

### 5.2. Instrumentos LightCycler® Capilares

Para más detalles consulte el manual del operador del LightCycler®.

#### Programación:

El protocolo consiste en cuatro pasos (Tab.1):

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Step:	1	2			3			4
Parameter:								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Hold [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
Ramp Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sec Target [°C]	0	0	0	0	0	0	0	0
Step Size [°C]	0	0	0	0	0	0	0	0
Step Delay [cycles]	0	0	0	0	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

Tab. 1. Programación de Instrumentos de capilares

#### Nota:

Durante la programación mantener los valores por defecto del software: channel = 530, max. samples = 32, seek temperature = 30°C and capillary size = 20 µl. No cambiar el valor de "capillary size" a 100 µl.

Guardar el programa y los valores por defecto como '**RUN Template**', que se puede cargar al iniciar cada ejecución.

Justo antes de comenzar la ejecución, modificar max. samples (default = 32) al número de muestras más controles incluidos en la ejecución para evitar la parada del instrumento debido a la falta de capilares.

Los instrumentos LightCycler 1.x que usan la versión de software 3.5.3 leen "Temperature Transition Rate" en lugar de "Ramp Rate".

### 5.3. Instrumentos Roche 480

Para más detalles, véase el manual del operador

#### Formato de detección: SimpleProbe

**Nota:** Este kit puede ser ejecutado en combinación con el LightMix® kit HFE H63D S65C C282Y CE (cat. 40-0340-32), siguiendo las instrucciones para detección y programación descritas en el manual del kit de la HFE.

#### Volumen de reacción: 10 µl

#### Programación:

El protocolo consiste en cuatro pasos:

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Step:	1	2			3			4
Parameter:								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Hold [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
Ramp Rate [C°/ s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.29	1.5
Ramp Rate [C°/ s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	0.29	2.0
Acquisitions [per °C]	-	-	-	-	-	-	2	-
Sec Target [°C]	0	0	0	0	-	-	-	-
Step Size [°C]	0	0	0	0	-	-	-	-
Step Delay [cycles]	0	0	0	0	-	-	-	-

Tab. 2. Programacion familia de instrumentos 480

#### Nota:

Guardar el programa y los valores predefinidos como '**RUN Template**', que se puede cargar al inicio de cada ejecución.

Asegurarse de programar **2 adquisiciones por segundo** en lugar del valor predeterminado 5; más adquisiciones reducen la pendiente la curve *melting*, aumentando el tiempo de experimentación y ocasionando fallas en el kit.

## 5.4. Instrumento LightCycler® 96

Para más detalles, véase el manual del operador

### Medición

<b>Detection Format: 470/514 FAM</b>			<b>General</b>
Quant Factor	Melt Factor	Integration Time (S)	Volumes (µl)
10.00	1.20	Dynamic	10

### Programación:

El protocolo consiste en cuatro pasos:

1. **Pre-incubación** de las muestras y activación de la enzima
2. **Paso de amplificación** PCR-amplificación del ADN *target*
3. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada
4. **Enfriamiento** del Instrumento

Step:	1	2			3			4
Parameter:								
Cycles	1	45			1			1
Ramp [°C/ s]	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.20	1.5
Duration [s]	600	5	10	15	30	120	1	30
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Mode		Standard	Standard	Standard				
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Readings /°C							5	

Tab. 3. Programacion instrumentos LightCycler® 96

### Nota:

Guardar el programa y los valores por defecto como '**Experiment file**' que se puede cargar al inicio de cada ejecución

## 5.1 Instrumento LightCycler® Nano

Para más detalles, véase el manual del operador.

### Run Setting / Optical setting

Intercalating Dyes

Normal Quality

### Perfil:

El protocolo consiste en cuatro pasos (Tab.4):

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Desnaturalización** del producto de PCR amplificado.
4. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada por PCR

Step:	1	2			3	4	
Parameter:							
Name	Hold	3 Step Amplification			Hold	Melting Stage	
						Initial Stage	Final Stage
Cycles		45					
Temp [°C]	95	95	60	72	95	43	75
Ramp (°C/s)	5	5	4	5	5	4	0.2
Hold (s)	600	10	15	20	30	120	1
Acquire			√				

Tab. 4. Programming of LightCycler® Nano Instrument

### Note:

Store the program and the default values as 'Experiment file' which can be loaded to start every run.

## 6. Protocolo experimental

Programar el instrumento antes de preparar las soluciones (véase sección 5. Programación y lectura, para más detalles véase el manual del operador).

La desempeño descrito del ensayo solamente puede ser garantizado cuando se utiliza con sistemas PCR de Roche Diagnostics.

### 6.1. Preparación de muestras

Para la preparación de ADN genómico utilizar sangre periférica humana (EDTA, citrato). El uso de heparina es desaconsejado ya que este anticoagulante podría interferir con la PCR.

Lleve a cabo la purificación manual de los ácidos nucleicos utilizando el High Pure PCR Template Preparation Kit o con el instrumento MagNA Pure LC eligiendo el kit de extracción apropiado al modelo utilizado (véase 2. Aparatos y reactivos adicionales) como se describe en los protocolos respectivos

En los ensayos descritos (7.8.1. Datos típicos para amplificación) el ADN fue extraído manualmente de 200 µl de sangre usando el Kit High Pure PCR Template siguiendo las instrucciones del fabricante; 100 µl de buffer de elución fueron usados para la elución final del ADN purificado de la columna.

### 6.2. Preparación de los reactivos

#### 6.2.1. Preparación de la LightCycler® FastStart DNA Master

1	Mantener la Enzima LightCycler® FastStart <b>1a</b> fría.
2	Descongelar la mezcla de reacción LightCycler® FastStart <b>1b</b> calentando el tubo a 30°- 35°C por 3 - 5 minutos.
3	Centrifugar rápidamente los tubos para recoger las gotas.
4	La solución debe estar libre de partículas.
5	Agregar 60 µl de <b>1b</b> al tubo <b>1a</b> .
6	Mezclar la solución cuidadosamente con una pipeta. No usar el vortex! Evitar la producción de burbujas.
7	Centrifugar rápidamente los tubos para recoger las gotas.
8	Utilizar reactivo para preparar mezcla de reacción (sección 6.3).
9	Almacenar el reactivo sobrante a 4°C.



#### 6.2.2. Preparación del Reactivo Parámetro Específico (PSR)

▶	Cada tubo de reactivo <b>PSR</b> es suficiente para 64 reacciones.
1	Centrifugar el tubo con la pre-mezcla <b>PSR</b> a 10,000 RPM por 1'
2	Comprobar que el pellet se encuentra en la parte inferior.
3	Por cada tubo de <b>PSR</b> agregar <b>66 µl</b> de <b>Agua</b> grado-PCR.
4	Incubar por 20 segundos a temperatura ambiente.
5	Mezclar con el <i>Vortex</i> por 10 segundos.
6	Centrifugar los tubos para colectar las gotas.

▶ Usar 1 µl del reactivo **PSR** para una reacción de 10 µl de PCR.

### 6.2.3. Preparación del Control Positivo

▶	El <b>HT Control Positivo</b> es suficiente para 40 reacciones.
1	Centrifugar los tres tubos a 10,000 RPM por 1 minuto.
2	Controlar que el pellet azul se encuentre localizado en el fondo del tubo.
3	Disolver el pellet agregando 80 µl <b>Agua</b> grado-PCR.
4	Incubar por 20 segundos a temperatura ambiente.
5	Mezclar la solución con el <i>Vortex</i> por 10 segundos.
6	Centrifugar los tubos para recoger las gotas.

▶ Usar **2 µl** de cada **Control Positivo** para una reacción de PCR de 10 µl.

▶ **Control positivo** se debe utilizar en cada ejecución.

**A tener en cuenta:** La apertura de los viales puede provocar contaminaciones del espacio de trabajo (aerosol).

### 6.2.4. Preparación de Estándares de Genotipado

El software LightCycler® 4.05 y posteriores (instrumentos de capilares) y el software 1.5 (instrumentos LightCycler®480) pueden ser calibrados con estándares de referencia para llevar a cabo una determinación automática de genotipado de muestras clínicas desconocidas.

▶	Estándares de Genotipado <b>WT</b> y <b>MT</b> son suficientes para 40 reacciones.
	Si no se utiliza, mantener los Estándares de Genotipado liofilizados; desechar los reactivos cuando el kit esté agotado o después de haber alcanzado la fecha de caducidad.
1	Centrifugar los tubos Estándares de Genotipado <b>WT</b> y <b>MT</b> a 10,000 RPM por 1 minuto.
2	Controlar que el pellet azul se encuentra localizado en el fondo del tubo.
3	Disolver el pellet agregando 80 µl <b>Agua</b> grado-PCR.
4	Incubar por 20 segundos a temperatura ambiente.
5	Mezclar la solución con el <i>Vortex</i> por 10 segundos
6	Centrifugar los tubos para recoger las gotas.

▶ Usar 2 µl de Estándares de Genotipado **WT** y **MT** para una reacción de PCR de 10 µl.

▶ Ambos **Estándares de Genotipado** deben ser utilizados en la primera ejecución del kit para calibrar el módulo de determinación del genotipo.


**A tener en cuenta:** La apertura de los viales puede provocar contaminaciones del espacio de trabajo (aerosol).

## 6.3. Preparación de la Mezcla de Reacción

### 6.3.1. Preparación de la mezcla de reacción para 64 muestras

Recomendamos preparar las 64 reacciones para evitar el almacenamiento de los reactivos disueltos o activados en diferentes volúmenes. Véase el capítulo 6.4 para almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos. Para la preparación de la mezcla de reacción para menos reacciones, por favor ir al punto 6.3.2 “Mezcla de Reacción para reacción única”.

**Preparar la mezcla de reacción en el tubo PSR (refrigerado):**

Componentes	64 reacciones
Al tubo <b>PSR</b> (tapa roja) que ya contiene	66.0 µl
Agregar:	
H <sub>2</sub> O, grado-PCR (tapa transparente)	343.2 µl
Solución Mg <sup>2+</sup> 25 mM (tapa azul)	52.8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapa rojo), véase <b>6.2.1</b>	66.0 µl
<b>Sustituir la “tapa larga roja” del tubo PSR con la tapa roja de la enzima FastStart</b>	
<b>Volumen Total</b>	<b>528.0 µl</b>

Tab. 5. Volúmenes de los componentes para la preparación de una mezcla para 64 reacciones

### 6.3.2. Preparación de la mezcla para reacción individual

Preparar la mezcla de reacción multiplicando cada volumen (Tab. 6) por el número de muestras biológicas a ser analizadas más tres reacciones (Control Negativo, **Control Positivo**, una reacción en exceso) y (opcionalmente) los dos **Estándares de Genotipado**.

**Preparar la mezcla de reacción en un tubo refrigerado:**

Componentes	reacción simple
H <sub>2</sub> O, PCR-grade (colorless cap)	5.2 µl
Mg <sup>2+</sup> solution 25 mM (blue cap)	0.8 µl
<b>PSR</b> (red cap), see 6.2.2	1.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (red cap), see 6.2.1	1.0 µl
<b>Volumen de la mezcla de reacción</b>	<b>8.0 µl</b>

Tab. 6. Volúmenes de los componentes para preparar una mezcla de reacción única

**Pipetear suavemente arriba y abajo la mezcla de reacción**

**¡Un alto porcentaje del fracaso en los experimentos son debidos a una mezcla de reacción no homogénea!**



### 6.3.3. Carga de capilares / placas

Cada ejecución debe incluir un Control Negativo (**NTC**) para demostrar la ausencia de contaminación con ADN genómico o producto de PCR de MTHFR y un **Control Positivo** para identificar ejecuciones específicas de temperatura de *melting*. Organismos reguladores o normas de laboratorio locales pueden requerir que se incluyan los dos estándares de genotipado.

▶	Recuerde incluir siempre los controles en la configuración de la ejecución.
1	Mezclar suavemente la mezcla de reacción, centrifugar brevemente y controlar que no se formaron burbujas de aire.
2	Cargar <b>8 µl</b> de la mezcla de reacción por capilar/pocillo.
3	<b>Es obligatorio:</b> Agregar <b>2 µl</b> de H <sub>2</sub> O grado-PCR como <b>Control Negativo (NTC)</b> Agregar <b>2 µl</b> de <b>Control Positivo HT</b>
	<b>Opcional*:</b> Agregar <b>2 µl</b> de <b>WT</b> Genotipado estándar. Agregar <b>2 µl</b> de <b>MT</b> Genotipado estándar.
4	Agregar <b>2 µl</b> de <b>Muestra</b> en los restantes capilares / pocillos.
5	Cerrar el capilar/pocillo y centrifugar. Controlar que no haya burbujas de aire.
6	Colocar el rotor/placa en el instrumento LightCycler®.
7	Solo en instrumentos de capilares: ingresar el número de muestras.
8	Iniciar la ejecución.
9	Ingresar el nombre del experimento, cuando se le indique.
10	Salvar los datos de las muestras en la ventana "samples".

Véase sección 6.5 para la carga de las muestras y calibración de los Estándares de genotipado.



## 6.4. Almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos Reactivos Parámetro Específicos (PSR)

Uso diario. Una vez disuelto, almacenar el PSR refrigerado (2°C a 8°C) por un periodo máximo 30 días. Evitar la exposición prolongada a la luz.  
Para almacenamientos de largo plazo almacenar entre -15 a -25°C (> expiración). Minimizar los eventos de descongelamiento.

### LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

La mezcla combinada FastStart DNA Master HybProbe (1a+b) puede ser almacenada en frigorífico (2 - 8°C) por 30 días.

## Control Positivo y Estándares de Genotipado (=controles)

Uso diario. El control positivo disuelto es estable por 30 días cuando se almacena refrigerado (2 - 8°C). Para largos periodos de almacenamiento, mantener a -15 a -25 °C (180 días). Minimizar los eventos de descongelación.  
REGISTRAR cuándo se disolvió, cuándo se mezcló y cómo fue almacenada a solución.

## 6.5. Cargado de Controles y Estándares de Genotipado

Las muestras en posiciones 1 a 2, deben ser cargadas en cada ejecución; muestras 3 y 4 son necesarias para la enseñanza de los estándares de genotipado (sólo en la primera ejecución del kit).



**Los resultados de genotipado están basados en las temperaturas de melting. El uso del módulo automático de genotipado presente en el software del LightCycler® 2.0 y el LightCycler® 480 es opcional**

### 6.5.1. Instrumentos de Capilares

En la ventana "Samples data - Capillary View", introducir el nombre de la muestra cómo se describe en la segunda columna.

Seleccionar "Analysis Type – Genotyping". Seleccionar solo el canal 530 y deseleccionar todos los demás. Desde el menú desplegable seleccione "Sample Type" y copie la descripción "Genotype":

Pos	Sample Name	Channel	Target Name	Sample Type	Genotype
1	NTC	530	Target 1	Negative Control	
2	HT	530	Target 1	Melting Standard	MTHFR C677T Heterozygous
3	WT	530	Target 1	Melting Standard	MTHFR C677 Wildtype
4	MT	530	Target 1	Melting Standard	MTHFR 677T Mutant

### 6.5.2. Instrumentos Roche 480

En la ventana “Sample Editor”, en la sección “Step1: Select Workflow”, seleccionar “Melt Geno”. Seleccionar la combinación de filtros 465-510 y deseleccionar todos los demás. Introducir la descripción del **Control Positivo** y los **Estándares de Genotipado** como sigue

Pos	Sample Name	Melt Geno Sample Type	Melt Geno Genotype
1	<b>NTC</b>	Negative Control	
2	<b>HT</b>	Melting Standard	MTHFR C677T Heterozygous
3	<b>WT</b>	Melting Standard	MTHFR C677 Wildtype
4	<b>MT</b>	Melting Standard	MTHFR 677T Mutant

### 6.5.3. Instrumento LightCycler® 96

En la ventana “Sample Editor”, agregar las descripciones del **Control negativo**, **Control Positivo** y opcionalmente **Estándares de Genotipado** como está descrito en la siguiente tabla:

Table View:

Color	Position	Sample Name	Sample Type	Dye
	A1	<b>NTC</b>	Unknown	FAM
	A2	<b>HT</b>	Unknown	FAM
	A3	<b>WT</b>	Unknown	FAM
	A4	<b>MT</b>	Unknown	FAM

Dejar en blanco el resto de las casillas que no se describen.

### 6.5.4. Instrumento LightCycler® Nano

Introducir, como se describe a continuación, la descripción de **Control Positivo** y opcionalmente **Estándares de Genotipado** en la ventana de “Samples”; introducir el nombre y seleccionar el marcaje en la ventana “Target”:

Samples:

Color	Name	Note
	<b>NTC</b>	
	<b>HT</b>	
	<b>WT</b>	
	<b>MT</b>	

Target:

Color	Name	Dye	Reference
	channel 530	FAM	

Well as table:

Pos	#	Note	Sample	FAM	Type
A1	1		<b>NTC</b>	channel 530	U
A2	2		<b>HT</b>	channel 530	U
A3	3		<b>WT</b>	channel 530	U
A4	4		<b>MT</b>	channel 530	U

## 7. Análisis e interpretación de los datos

### 7.1. Límites e interferencias

El presente ensayo es específico para la región del gen MTHFR 677. Se predice que las variantes génicas rs773410203, rs748571395 y rs772698730 dan la misma  $T_m$  (diferencia de 1°C para rs772698730) que para el alelo de riesgo 677T; las frecuencias de los alelos son inferiores a 1 en 100.000, por lo que la probabilidad de informar un riesgo de paciente no existente es muy baja. No se conocen ni informan interferencias.

### 7.2. Calibración

La calibración se tiene que realizar siguiendo los procedimientos descritos en 6.2.4 y 6.3.3, 6.5, 7.3.2 y 7.3.3

### 7.3. Control de calidad – Criterios de aceptación

Con el fin de realizar un análisis fiable de genotipificación, es esencial que el Control Negativo **NTC** y Control Positivo **HT** sean incluidos en cada ejecución.

**NOTA:** El test se lleva a cabo a una temperatura de *annealing* de 60°C; a ésta temperatura la sonda sensor no se unirá al amplicón muy fuertemente y la amplificación puede parecer ineficaz o incluso inexistente. Por esta razón, los criterios de aceptación de los resultados de los análisis están basados solamente en la definición de los patrones de la curva de *melting* como se describe a continuación

#### 7.3.1. Control Negativo

**NTC Control Negativo** (Obligatorio - posición 1).

El análisis de la curva de Melting del NTC siempre debe proporcionar un resultado negativo: **Ningún pico de melting debe ser detectado** (véase 7.6).

En caso que el **NTC** reportara uno o dos picos específicos (comparar la señal con los resultados de las muestras para evitar que el software amplíe el ruido de fondo a tamaño de ventana lo que sugiere la presencia de picos de melting), una contaminación o un error en el pipeteo ha ocurrido; la sesión no es válida y el proceso debe ser repetido. Si el problema persiste, cambiar el agua y/o los reactivos y repetir. No dude en pedir ayuda a [service@tib-molbiol.de](mailto:service@tib-molbiol.de)

En caso de que un pico es detectado a una temperatura inespecífica (véase parrafo 7.3.5 y 7.6), el software podría identificarlo incorrectamente como positivo, causando la imposibilidad del genotipado automático (en particular en software 1.5 del LightCycler® 480 reporta: “Sample NTC in position A1 is a negative control not in the negative group”).

En este caso, para poder usar el genotipado automático la muestra NTC debe ser colocada como “Unknown” en lugar de “Negative Control” (Véase 6.5 Carga de las muestras y calibración de los Estándares de genotipado); alternativamente, los resultados deben ser leídos de las temperaturas de melting (Véase 7.7).

#### 7.3.2. Control Positivo de ADN

**Control Positivo HT** (Obligatorio - posición 2).

El análisis de la curva de Melting debe mostrar siempre dos picos.

**HT** está representando una muestra clínica **heterocigota**.

Ver **7.7 Interpretación de resultados** para las temperaturas de *melting* esperadas

### 7.3.3. Estándares de Genotipado

Estándar de Genotipado **WT** (Opcional - posición 3).

El análisis de la curva de *Melting* debe mostrar siempre un único pico.

**WT** está representando una muestra clínica homocigota **wild type**.

**MT** está representando una muestra clínica homocigota **mutante**.

Ver **7.7 Interpretación de resultados** para las temperatura de *melting* esperadas.

### 7.3.4. Muestras

Los resultados del presente ensayo siempre deben mostrar uno o dos picos de *melting*.

No se esperan más de dos picos por muestra.

Los perfiles de los picos de fusión deben ajustarse a los criterios de aceptación descritos en el presente capítulo y en **7.7 Interpretación de los resultados**.



Antes de repetir una ejecución considerar errores comunes; comprobar en particular el perfil de amplificación, concentración de mezcla y MgCl<sub>2</sub> usadas, y tener en cuenta que un inadecuado almacenamiento de los reactivos puede causar un fallo en el dispositivo

### 7.3.5. Curvas de *Melting* anómalas

Si una curva de *melting* anormal persiste, puede deberse a un defecto en el producto o puede ser causado por otras variaciones (mutaciones) en la región de unión de la sonda. En éste último caso, otro método debe ser utilizado para la comparación / verificación de la secuencia.

Enviar el fragmento de la PCR para la secuenciación del ADN con el fin de confirmar la secuencia o identificar las mutaciones desconocidas

Reportar desviaciones a [service@tib-molbiol.de](mailto:service@tib-molbiol.de).

Siéntase libre de enviar muestras que presenten una desviación en la curva de *melting* a los laboratorios de TIB MOLBIOL en Berlín, para confirmar los resultados obtenidos y/o identificar otras mutaciones por secuenciación de ADN. Ejemplo de variantes conocidas se describe en el párrafo **7.8.2 Variantes raras**.

## 7.4. Salvado de Estándares de Genotipado Externos



(No aplicable para LC1.x versiones de software anteriores a 4.0, LightCycler® 96 y para el Instrumento LightCycler® Nano).

Tras el análisis de los genotipos, si las muestras 1 a 4 cumplen con los criterios de aceptación (véase parrafo 7.3), salvar los estándares de genotipado como se explica a continuación y usar el estándar externo en todas las ejecuciones sucesivas

### 7.4.1. Instrumentos de Capilares

En la ventana “Melting Curve analysis- Genotyping” abrir el menú “Standard (Int)” y seleccionar “Save standards as External”.

### 7.4.2. Roche 480 Instruments

En la ventana de análisis “Melt Curve Genotyping” abrir el menú “Standards (In-run)” y seleccionar “Save as ext.”

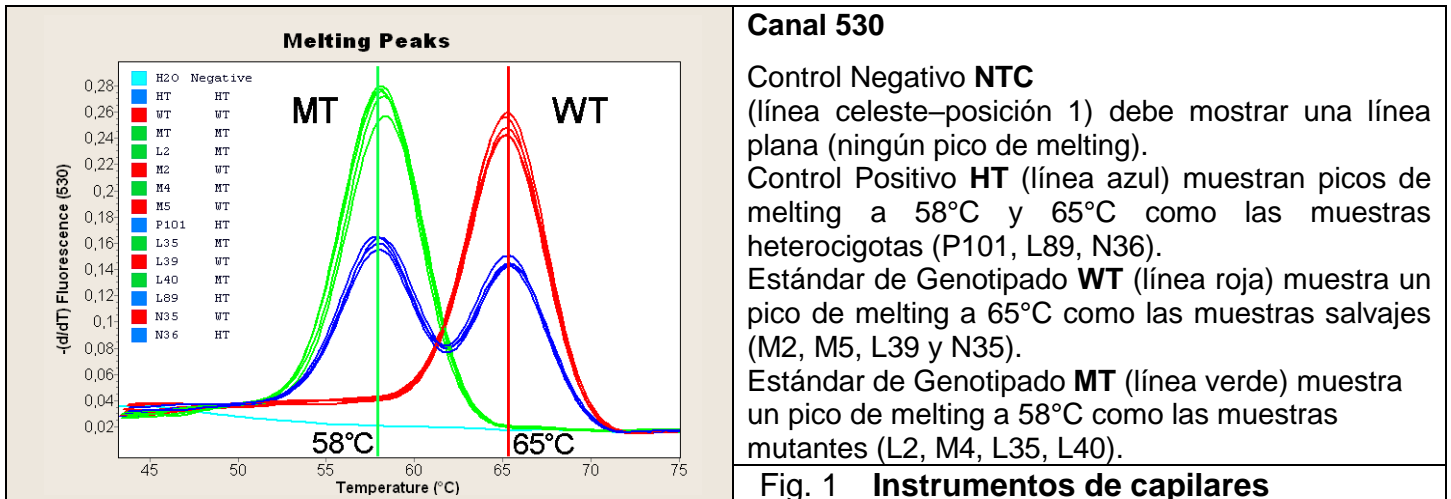
## 7.5. Lectura de los resultados

Los picos de *melting* discriminan entre genotipos: heterocigotos, wild type y mutante. El uso del software de módulo de genotipado presente en el LightCycler® 2.0 y LightCycler® 480 es opcional; en caso que el módulo automático de genotipado falle (score <0.6 o res<0.4), cambiar a identificación manual de la curva de *melting* (Tm calling) y comparar los resultados con la tabla del capítulo 7.7. Interpretación de los resultados.



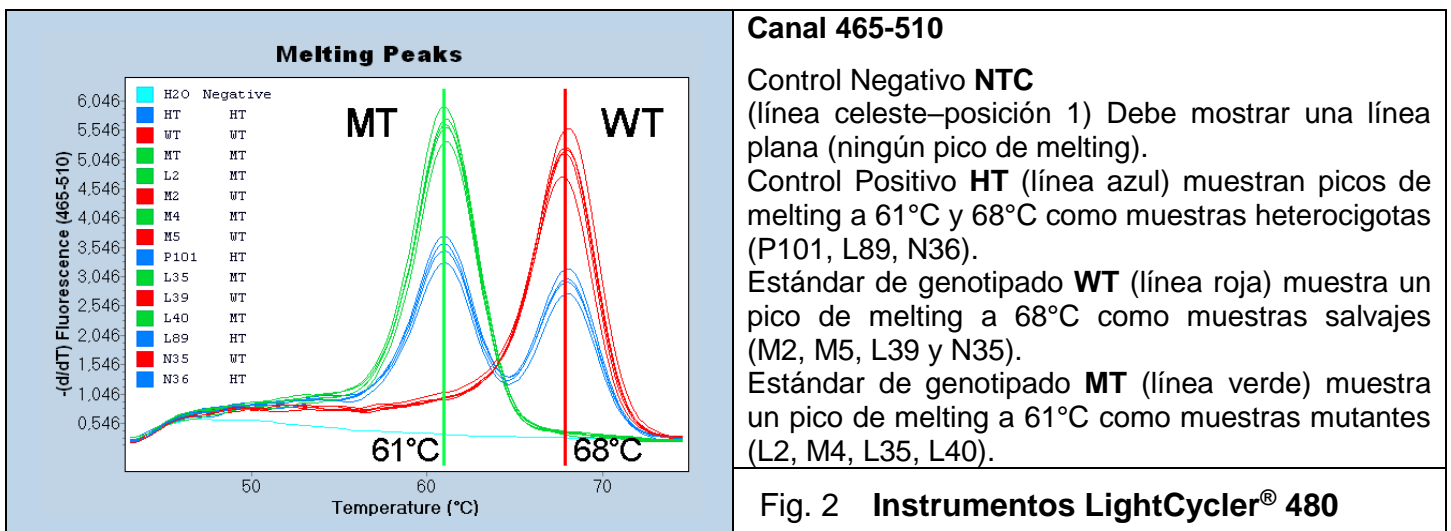
### 7.5.1. Análisis de Melting: Instrumentos de Capilares

Ver datos de *melting* en el 530 (canal F1 para LC1.x, software versión 3.5.3).



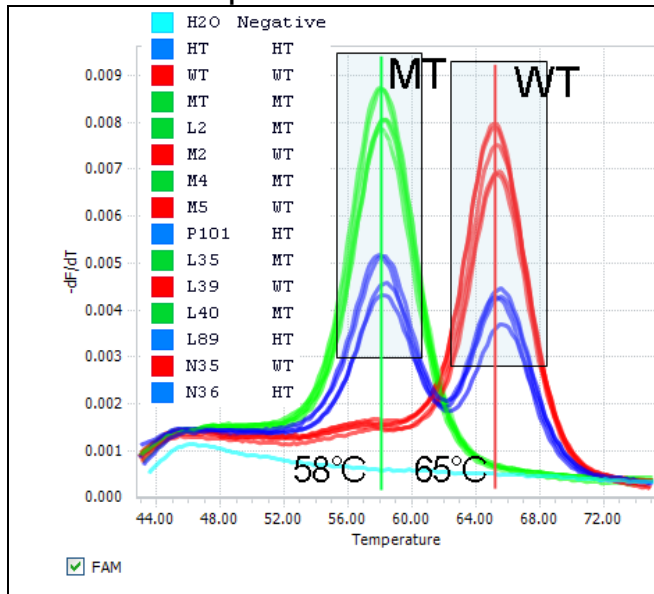
### 7.5.2. Análisis de Melting: Instrumentos LightCycler® 480

Ver datos de melting en el canal SimpleProbe.



### 7.5.3. Análisis de *Melting*: Instrumento LightCycler® 96

Agregar análisis: **Tm Calling**  
 Visualizar los datos en: **Melting peak**  
 Seleccionar picos usando el: **Area marker tool**



#### Canal FAM

#### Control Negativo NTC

(línea celeste—posición 1) Debe mostrar una línea plana (ningún pico de *melting*).

Control Positivo HT (línea azul) muestran picos de *melting* a 58°C y 65°C como muestras heterocigotas (P101, L89, N36).

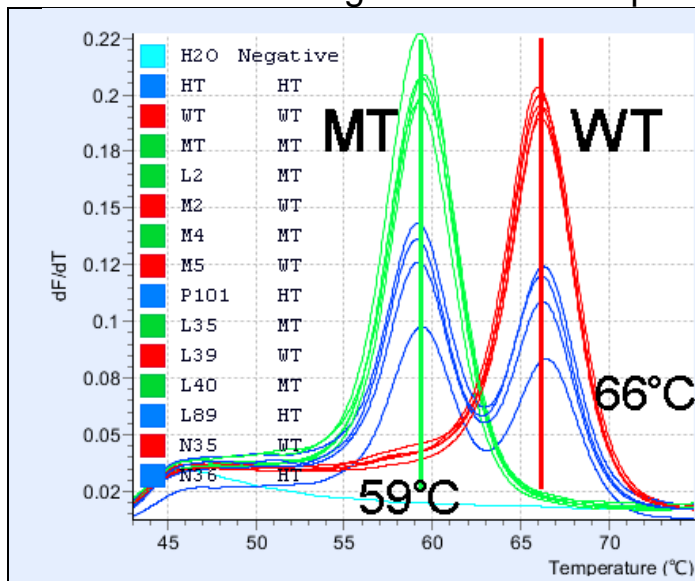
Estándar de Genotipado WT (línea roja) muestra un pico de *melting* a 65°C como muestras salvajes (M2, M5, L39 y N35).

Estándar de Genotipado MT (línea verde) muestra un pico de *melting* a 58°C como muestras mutantes (L2, M4, L35, L40).

Fig. 3 Instrumento LightCycler® 96

### 7.5.4. Melting Analysis: LightCycler® Nano Instrument

Ver datos de *melting* en el canal SimpleProbe.



#### Canal 530

#### Control Negativo NTC

(línea celeste—posición 1) Debe mostrar una línea plana (ningún pico de *melting*).

Control Positivo HT (línea azul) muestran picos de *melting* a 59°C y 66°C como muestras heterocigotas (P101, L89, N36).

Estándar de Genotipado WT (línea roja) muestra un pico de *melting* a 66°C como muestras salvajes (M2, M5, L39 y N35).

Estándar de Genotipado MT (línea verde) muestra un pico de *melting* a 59°C como muestras mutantes (L2, M4, L35, L40).

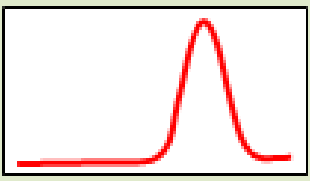
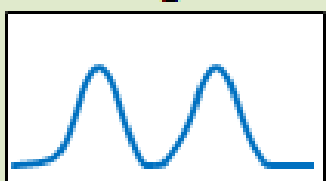
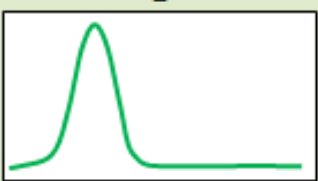
Fig. 4 Instrumentos LightCycler® Nano

### 7.6. Temperaturas de *melting* esperadas

Genotipo ►	MTHFR 677C/C	heterocigoto MTHFR 677C/T	mutante homocigoto MTHFR 677T/T
Número de picos de <i>melting</i>	1	2	1
Temperatura de los picos de <i>melting</i>	65-68°C	58-61 y 65-68°C	58-61°C
Diferencia de temperatura entre los picos	---	7°C	---
Fenotipo	Riesgo general de la población	Riesgo general población A menos que se combine con otros factores de riesgo	Hiperhomocisteinemia

Tab. 7. Resultados típicos de análisis

## 7.7. Interpretación de los Resultados

MTHFR C677T Canal 530 Pico (s) Melting		MTHFR Genotipos	Metabolizers Fenotipos
677T	C677		
<b>Melting Peaks</b>  530 Temperature (°C)		<b>Wild Type</b>  <b>MTHFR 677 C/C</b>	<b>Riesgo General de la Población</b>
-	65-68		
<b>Melting Peaks</b>  530 Temperature (°C)		<b>Heterocigoto</b>  <b>MTHFR 677 C/T</b>	<b>Riesgo General de la Población</b> (A menos que se combine con otros factores de riesgo)
58-61	65-68		
<b>Melting Peaks</b>  530 Temperature (°C)		<b>Mutante homocigoto</b>  <b>MTHFR 677 T/T</b>	<b>Hiperhomocisteinemia</b>
58-61	-		
<b>ΔTm 7°C</b>			

Tab. 8. Resultados típicos de análisis



### Variaciones permitidas de las temperaturas de *melting*

±0.5°C	Entre muestras de mismo genotipo
±1.5°C	Entre el genotipado estándar y muestras biológicas
±1.5°C	Entre el ΔT de los picos de <i>melting</i> de las muestras heterocigotos
±1.5°C	Entre picos de <i>melting</i> con el mismo genotipo entre ejecuciones
±5.0°C	Entre las temperaturas reportadas en el certificado y los valores obtenidos por el instrumento local. La variación es instrumento dependiente: Siempre utilizar como referencia la temperatura del <b>Control Positivo HT</b> incluida en la ejecución.

## 7.8. Información adicional

### 7.8.1. Datos típicos para la amplificación

Las curvas de amplificación no contienen ninguna información analítica (véase sección 7.3 Control de Calidad – Criterio de Aceptación), pero, sin embargo, un ejemplo del LightCycler® 2.0 (Fig. 5).

Ver los datos de amplificación que se muestran a continuación:

Instrumento LC 2.0 (o LC1.x con software versión 4.1):

Ver la amplificación en el canal 530, modo de análisis “Absolute Quantification”.

Instrumentos LC 480 :

Ver la amplificación en modo análisis “Abs Quant/2nd Derivative Max”.

Para el instrumento LightCycler® 480 seleccionar el canal 483-533.

Para el instrumento LightCycler® 480 II seleccionar el canal 465-510.

Para el instrumento cobas z 480 Analyzer seleccionar el canal 465-510.

Instrumento LC 96:

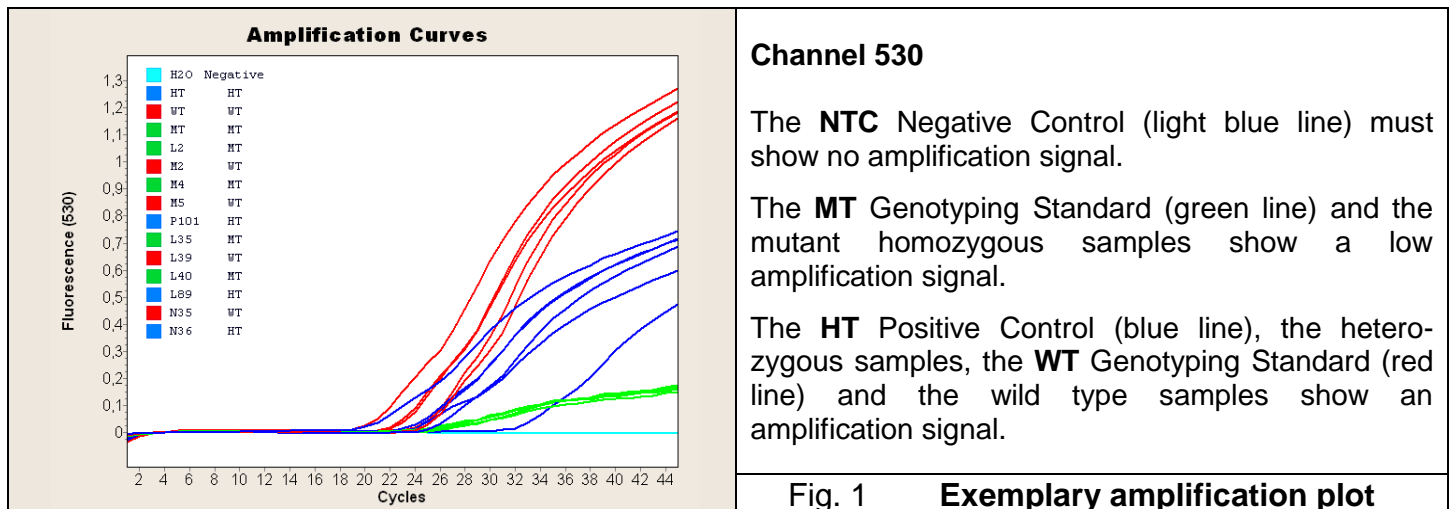
Ver la amplificación en modo análisis “Abs Quant”.

Instrumento LC Nano:

Ver la amplificación en modo “Automatic Quantification”.

LC1.x, software versions 3.5:

Ver la amplificación en fluorescencia canal F1 modo “Quantification – Second Derivative Maximum”.



### 7.8.2. Variantes raras

Las secuencias utilizadas en el dispositivo fueron diseñadas para evitar interferencias con otras variantes del gen conocidas; nuevas variantes generalmente generarán un pico de  $T_m$  diferente de la WT o la MT. Para demostrar la habilidad del ensayo para discriminar el genotipo correcto, *targets* sintéticos fueron utilizados para imitar todas las variantes reportadas en GeneBank (Jan-2015). Los valores absolutos de  $T_m$  obtenidos con *targets* sintéticos pueden diferir de los que resultan de muestras biológicas, mientras que el  **$\Delta T_m$  relativo debe permanecer constante**.

El presente kit no está destinado a identificar variaciones distintas a las especificadas en la sección **1.2 Uso previsto**. Se debe usar otro método para la identificación de secuencias que presentan picos de *melting* anormales (véase **7.3.5** y **7.7**).



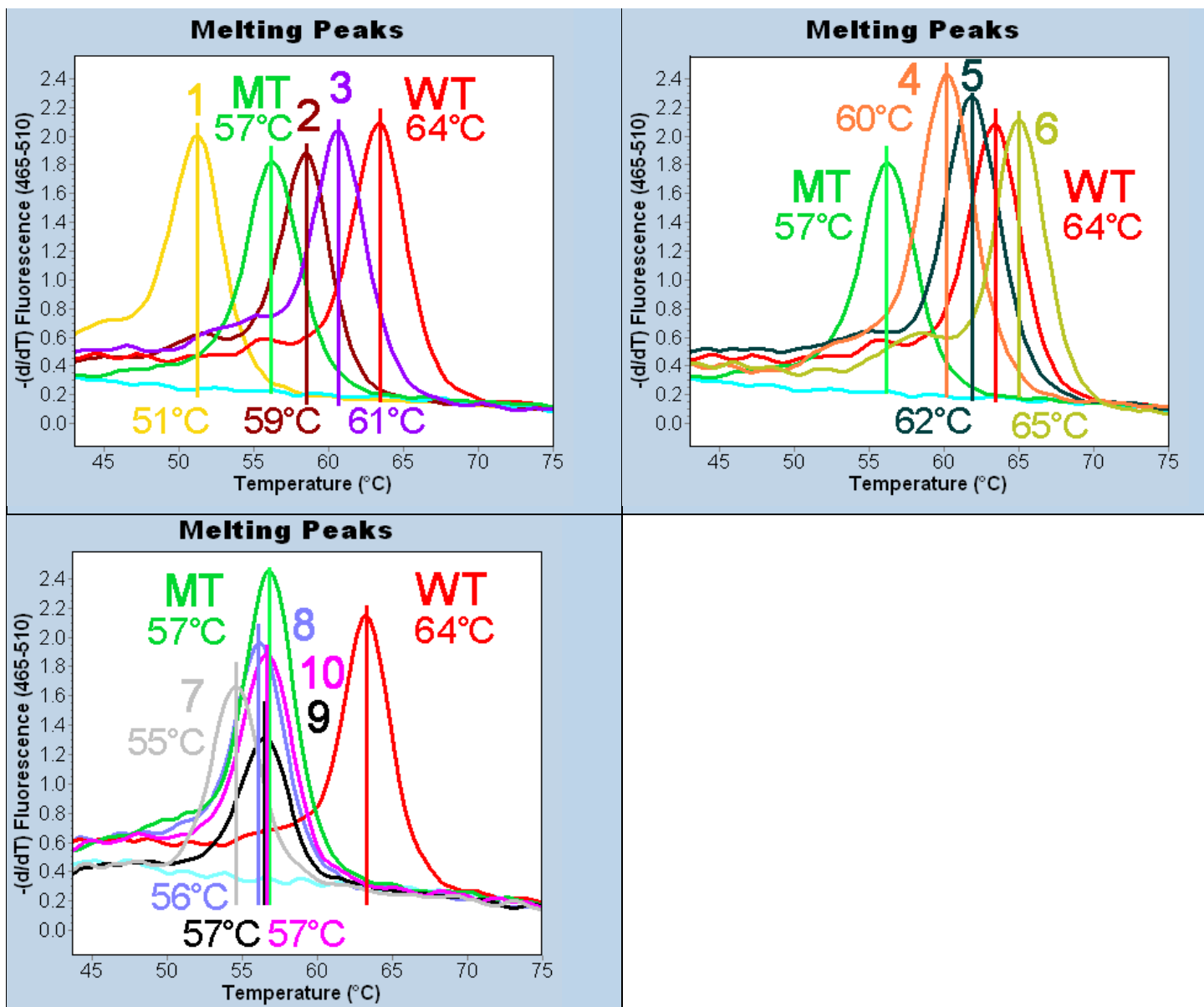


Fig. 2 Melting data of rare variants

#	RS	Tm	name	HGVS	MAF
WT		64°C	wild type		
MT	rs1801133	57°C	C677T	NM_005957.4:c.665C>T	A=0.2454
1	rs1801133 + rs774825800	51°C		NM_005957.4:c.665C>T NM_005957.4:c.681G>A	1R
2	rs774825800	59°C	G693A	NM_005957.4:c.681G>A	T=0,0001, 1R
3	rs150847674	61°C	G679A	NM_005957.4:c.667G>A	T=0.0008
4	rs45438591	60°C	G673A	NM_005957.4:c.661G>A	T=0.000008
5	rs141060174	62°C	G672A	NM_005957.4:c.660G>A	T=0.00008, 1R
6	rs200100285	65°C	A685G	NM_005957.4:c.673A>G	C=0.0002
7	rs776956662	55°C	C678T	NM_005957.4:c.666C>T	A=0.00002
8	rs772698730	56°C	C690A	NM_005957.4:c.678C>A	T=0.000008
9	rs773410203	57°C	A688G	NM_005957.4:c.676A>G	C=0.000008
10	rs748571395	57°C	C692T	NM_005957.4:c.680C>T	A=0.000008

MAF = Minor Allele Count (frequency of the variant); 1R = Single Report NA= not available

## 8. Solución de problemas

Instrumentos	Instrumentos Capilares	Instrumentos LightCycler® 480
Códigos específicos:	LightCycler® Nano	Instrumento LightCycler® 96
Problema	Posible Razón	Solución
No se detectan las muestras	No se ha centrifugado	Centrifugar los capilares
Todas la PCRs negativas	Incorrecta selección del canal de detección del canal	Seleccione el canal correcto antes de analizar
	Protocolo de amplificación Incorrecto	Controlar el programa del instrumento
Línea de base no homogénea entre varias muestras	Pipeteado incorrecto	Garantizar la homogeneidad de la cantidad de la mezcla en cada muestra
	No se realizó mezcla de reacción homogénea	Pipetear la mezcla de reacción arriba y abajo 10 veces con una punta limpia de 200µl antes de la distribución en el recipiente de reacción
	Placa mal sellada	Asegurarse que la placa esté bien sellada
Línea de base "como dientes de sierra"	Burbuja en el pocillo	Centrifugar la placa antes de la ejecución
	Burbuja en el pocillo	Centrifugar la placa antes de la ejecución
	Posicionamiento incorrecto de los capilares en el carrusel	Presione firmemente los capilares en el carrusel
Sin señal en el Control Positivo	Error al configurar el instrumento	Controlar que la posición del Control Positivo sea la correcta
	Concentración incorrecta del PSR / MgCl <sub>2</sub>	Repetir el ensayo
	Degradación del Control Positivo o estándar	Usar una nueva alícuota del Control Positivo o estándar
Señal Positiva en el Control Negativo <b>NTC</b>	Error al configurar el instrumento	Controlar los ajustes de posición del control negativo
	Error de dispensación	Cumplir con la hoja de trabajo al dispensar muestras, Controles Negativos, Controles Positivos y estándares
	Error de dispensación	Siempre cambie puntas entre las muestras
	Error de dispensación	Evitar que se derrame el contenido del tubo de ensayo de la muestra
	Contaminación del agua grado-PCR.	Usar una nueva alícuota del agua grado-PCR
	Contaminación de la mezcla de reacción	Usar nuevas alícuotas de los reactivos para preparar la mezcla de reacción
	Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación	Limpiar las superficies e instrumentos con detergentes acuosos, lavar batas de laboratorio, reemplazar tubos de ensayo y puntas en uso
	Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación	Agregar LightCycler® Uracil-DNA Glycosylasa (Cat.-No.03 539 806 001) a la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones
No hay señal en las muestras	Baja cantidad de ADN	Controlar la concentración de ADN
	Inhibición de las muestras	Diluir la muestra y repetir la PCR, o Repetir la extracción y la PCR, o agregar Control Positivo y repetir
Curva de melting fuera del rango de temperatura esperada	Picos con TM iguales al Control Positivo: Concentración de reactivo incorrecta	Asignar manualmente los resultados en consecuencia al Control Positivo
	Picos con TM distintas al Control Positivo: Posible inhibidor de extracción	Repetir el ensayo diluyendo el ADN 1:3

Picos con TM distintas al Control  
Positivo:  
Posible mutación diferente

Repetir el ensayo por secuenciación y  
reportar la variante inesperada a  
[service@tib-molbiol.de](mailto:service@tib-molbiol.de)

## 9. Referencias

1) Rosenblatt, D. S.; Lue-Shing, H.; Arzoumanian, A.; Low-Nang, L.; Matiaszuk, N.

**Methylenetetrahydrofolate reductase (MR) deficiency: thermolability of residual MR activity, methionine synthase activity, and methylcobalamin levels in cultured fibroblasts.**

*Biochem. Med. Metab. Biol.* 47: 221-225, 1992

2) Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C. A.; Matthews, R. G.; Boers, G. J. H.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L. A. J.; van den Heuvel, L. P.; Rozen, R.

**A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetra-hydrofolate reductase.**

*Nat Genet* 10: 111-113, 1995

3) Kluijtmans, L. A. J.; van den Heuvel, L. P. W. J.; Boers, G. H. J.; Frosst, P.; Stevens, E. M. B.; van Oost, B. A.; den Heijer, M.; Trijbels, F. J. M.; Rozen, R.; Blom, H. J.

**Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.**

*Am J Hum Genet* 58: 35, 1996

4) Keijzer, M. B. A. J.; den Heijer, M.; Blom, H. J.; Bos, G. M. J.; Willems, H. P. J.; Gerrits, W. B. J.; Rosendaal, F. R.

**Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis.**

*Thromb. Hemost.* 88: 723-728, 2002

5) Quian, X., Lu, Z., Tan, M. et al.

**A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofo-late reductase gene and hypertension.**

*European Journal of Human Genetics* 15, 1239-1245, 2007

## Clasificación / Referencia

Reference	Classification
EDMA	16 01 04 90 00
CPV	33694000-1
EAN	4260159332230
Roche SAP No.	06896367001

### Aviso al comprador – Patentes y Marcas

La compra del presente producto otorga el derecho a utilizarlo con el fin de llevar a cabo la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos para el diagnóstico in-vitro en muestras de origen humano. Ningún tipo de licencia se transfiere a excepción del derecho de uso del presente producto derivado de la compra.

Aparte de las licencias expresamente indicadas, TIB MOLBIOL no garantiza que este kit y/o su uso (s) no infringan los derechos de terceros.

LightCycler®, MagNA Pure® y High Pure® son marcas comerciales registradas propiedad de Roche Diagnostics.

ABI 3730xl Genetic Analyzer y Sequencing Analysis son productos registrados por Applied.

LightMix® es una marca comercial propiedad de TIB MOLBIOL. SimpleProbe®, hybridization probes y LightMix® Kits son producidos bajo licencia de Roche

### Enzima FastStart

La enzima FastStart DNA Master HybProbe es incluida en el paquete de TIB MOLBIOL solamente para clientes de Europa Central.

Cuando el presente kit es distribuido por Roche Diagnostics o sus distribuidores locales,

La enzima FastStart DNA Master HybProbe es suministrada como un producto separado:

Roche Diagnostics Cat.-No. 03 003 248 001 kit para 96 reacciones

Roche Diagnostics Cat.-No. 12 239 272 001 kit para 480 reacciones

### Productos relacionados

El mismo reactivo está disponible en tiras de 8 pocillos pre-pipeteados : Kit 40-2129-64.

## Ficha de seguridad

Según la directiva OSHA 29CFR1910.1200, Commonwealth of Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] y la directivas de la Unión Europea 67/548/EC y 1999/45/EC cualquiera de los productos que no contengan más del 1% de componentes clasificados como peligrosos o carcinogénicos no requieren una ficha de seguridad.

El Producto no es peligroso, tóxico, y no presenta restricciones IATA. El producto no es de origen humano, animal o vegetal. El producto contiene oligonucleótidos sintéticos (primers) y sondas.

## Versión Histórica

**Notas en rojo: variaciones que requieren cambiar los procesos de laboratorio**

**Notas en azul: marcan mejoras y cambios en la composición**

Version	Event	Date
V120504	Primera versión (formato <i>Simple Probe</i> )	04-05-2012
V121024	Inclusión del Instrumento LightCycler® 96. <b>Se agregó ajuste de volumen de reacción para los instrumentos LightCycler® 480 (section 5.3). Especificaciones detalladas para almacenar PSR (section 6.4)</b> Instrucciones en caso de fallo del módulo automático de genotipado (7.3.1).	24-10-2012
V130704	MagNa Pure 96 y MagNa Pure Compact incluidos. Instrucciones en caso de fallo del módulo automático de genotipado (7.5.2)	04-07-2013
V131211	Adición punto 7.7 Picos de <i>melting</i> para variantes raras. Cambios de redacción	11-12-2013
V150101	<b>Sección 5.4 LC96 ajustes instrumento</b>	11-01-2015
V160101	Se agregó "Información adicional" (7.8). Incluido códigos HGVS (7.8.2).	01-01-2016
V170303	7.1 Otras variantes 7.3.1 Wording 7.8.2 actualizado MAFs, posiciones ref a 677	20-10-2017

Producido por:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH  
Eresburgstrasse 22-23  
12103 Berlin, Germany  
www.tib-molbiol.com

4260159332230

