



MOLBIOL

***LightMix[®] kit de diagnóstico in-vitro para
MTHFR A1298C***

Cat.-No.: 40-0269-64

Detección de la variación del ADN A1298C
en el gen de la MTHFR

Para usar con los

instrumentos Roche Diagnostics LightCycler[®]

Formato SimpleProbe[®]

Reactivos para 64 reacciones

**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)**



Tabla de Contenidos

1.	INFORMACION DEL PRODUCTO	3
1.1.	Contenidos <i>LightMix</i> [®] Kit MTHFR A1298C	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
2.	DISPOSITIVOS ADICIONALES Y REACTIVOS	6
2.1.	Necesario	6
2.2.	Opcional	6
2.3.	Preparación de las muestras	6
3.	ANTECEDENTES	7
3.1.	Antecedentes Médicos	7
3.2.	Metodología y principio del ensayo	8
3.3.	Características de rendimiento	8
4.	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	9
5.	PROGRAMACION	10
5.1.	Compensación de color	10
5.2.	Instrumentos <i>LightCycler</i> [®] de capilares	10
5.3.	Instrumentos <i>LightCycler</i> [®] 480	11
5.4.	Instrumento <i>LightCycler</i> [®] 96	12
5.5.	Instrumento <i>LightCycler</i> [®] Nano	13
6.	PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	14
6.1.	Preparación de muestras	14
6.2.	Preparación de reactivos	14
6.2.1.	Preparación de la mezcla <i>LightCycler</i> [®] 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> [®] 480	18
6.5.3.	Instrumento <i>LightCycler</i> [®] 96	18
6.5.4.	Instrumento <i>LightCycler</i> [®] Nano	18
7.	ANALISIS DE LOS DATOS E INTERPRETACION	19
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> [®] 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> [®] 480	21
7.5.3.	Análisis <i>Melting</i> : Instrumento <i>LightCycler</i> [®] 96	22
7.5.4.	Análisis <i>Melting</i> : Instrumento <i>LightCycler</i> [®] 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	24
7.8.2.	Variantes raras	24
8.	SOLUCION DE PROBLEMAS	26
9.	REFERENCIAS	27

1. Información del producto

1.1. Contenidos: LightMix® Kit MTHFR A1298C

Reactivos de PCR pre-mezclados liofilizados



Almacenar en frío o a temperatura ambiente (4-25°C) en la oscuridad

	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 SimpleProbe 519	64 Pellet verde-azul liofilizadas

Estándares (Control ADN)



Almacenar en frío o a temperatura ambiente (4-25°C) en la oscuridad

	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 liofilizadas
1 x	Amarillo	WT	Genotipo Estándar Salvaje <0,01pg ADN plásmido sintético [cerca de 10E4 genoma equivalente]	40 Pellet azul liofilizadas
1 x	Amarillo	MT	Genotyping Standard Mutant <0,01pg ADN plásmido sintético [cerca de 10E4 genoma equivalente]	40 Pellet azul liofilizadas

Mezcla Polimerasa: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe



Almacenar a -20°C a la llegada

	Color tapón	Etiqueta	Descripción contenido	Total Reacciones
1 x	Rojo	1a	LightCycler® FastStart Enzyme	64 congeladas
1 x	Blanco	1b	LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe	64 congeladas
1 x	Transparente	Agua	H ₂ O grado PCR	congeladas
1 x	Azul	MgCl ₂	MgCl ₂ , 25 mM	congeladas

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

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

(1) La enzima FastStart es enviada por TIB MOLBIOL a temperatura ambiente.

1.2. Uso previsto

El kit permite la detección de la Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR, OMIM: 607093) A1298C polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs1801131 en ADN genómico humano a partir de una extracción de ácidos nucleicos obtenida de sangre periférica.

Las mutaciones de la MTHFR pueden contribuir en el aumento de homocisteína en plasma, el cual representa un factor de riesgo para la enfermedad vascular arteriosclerótica y la trombosis venosa profunda, y además defectos del tubo neural e inexplicables pérdidas embrionarias recurrentes en el embarazo.

El polimorfismo del gen de la MTHFR A1298C codifica una variante de enzima que presenta una disminución de su actividad.

La mayoría de la publicaciones solo consideran que la composición heterocigota constituida por la combinación de los alelos A1298C y C677T se considera como un factor de riesgo. Los pacientes que se encontraron homocigotas 1298 C/C o heterocigotas A/C también deberían ser analizados para el polimorfismo de la MTHFR C677T, utilizando por ejemplo el LightMix® Kit 40-0129-64.

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. A la vez los resultados de las pruebas de MTHFR C677T ayudan a los médicos a analizar las posibles razones que podrían contribuir al aborto espontáneo (SA) de los tejidos fetales, especialmente al inicio del embarazo, y deficiencias del tubo neural.

El presente ensayo puede realizarse en adición o después de un ensayo fenotípico de los niveles de homocisteína.

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 (Véase 1.3.2 para detalles)

1.3 Especificaciones

El *Kit LightMix® MTHFR A1298C* es un test de diagnóstico in-vitro y permite la detección del polimorfismo de un solo nucleótido de la MTHFR A1298C (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 wells)	1.5	100 min	94 + 2 ctrl.	60	20
LC480 (384 wells)	1.5	100 min	382(5) + 2 ctrl.	60	20
z480 (open channel)	1.5	100 min	94(5) + 2 ctrl.	60	20
LC96	1.6 (6)	100 min	94(5) + 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 al 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 y a temperatura ambiente o refrigerados (4°C / 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 -25°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

2.3 Requeridos

LightCycler® 2.0 Instrument

Instrumento *LightCycler*® 2.0

Instrumento *LightCycler*® 2.0

Software *LightCycler*® Versión 4.05 o

Software *LightCycler*® Versión 4.10 o superior

○

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)

2.4 Opcional

Instrumentos:

LC Centrifuga Carrusel 2.0 (230 Volt)

Capping Tool

2.5 Preparación de las muestras

Preparación manual de la muestra:

High Pure PCR Template Preparation Kit

Agua grado PCR libre de nucleasas

Etanol p.a.

Isopropanol p.a.

Automatic Sample Preparation:

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

Cat.-No. 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

Discontinued

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 en la Metilentetrahidrofolato reductasa es un error común innato del metabolismo del folato. El espectro fenotípico puede variar desde un grave deterioro neurológico, muerte prematura o adultos asintomáticos.

Diversos polimorfismos en el gen de la MTHFR han sido identificados, entre los que la MTHFR C677T y MTHFR A1298C son los dos más comunes.

Individuos con la combinación alélica heterocigotos MTHFR A1298C y C677T también parecen tener un alto riesgo de presentar varias enfermedades.

La nomenclatura HGVS para A1298C es c.1286A>C (posición en el ADN codificante) y p.Q429A (posición en la proteína).

Enfermedades de las Arterias Coronarias

En un estudio de caso-control se indicó que el alelo A1298C fue significativamente asociado con la enfermedad de las arterias coronarias de aparición precoz (CAD) (Szczeklik A. et al., 2001)¹.

Defectos del tubo neural (NTDs)

Además de estar asociada con un bajo nivel de folato, el polimorfismo A1298C parece estar asociado con un aumento al riesgo de presentar defectos en el tubo neural (Van der Put, NMJ, et al., 1998)².

Abortos Espontáneos

Estudios clínicos indican que el polimorfismo de la MTHFR A1298C representa un factor de riesgo para la pérdida recurrente de embriones en el embarazo temprano (Zetterberg, H. et al., 2002)³.

La frecuencia alélica para el alelo de la MTHFR 1298 C de individuos Caucásicos está en el rango de 35-40% (dbSNP at NCBI).

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

3.2 Metodología y principio del ensayo

Usando la metodología de PCR, un fragmento de 269 bp del gen de la MTHFR es amplificado con primers específicos. El fragmento es detectado con una sonda de detección mutación-específica internamente marcada con el reactivo SimpleProbe® 519

Durante el análisis de la curva de *melting* la temperatura es incrementada lentamente. La sonda se desprende a una temperatura específica (T_m) causando una disminución de la fluorescencia. Cualquier *mismatch* cubierto por la sonda desestabiliza el híbrido y baja 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 (instrumento-dependiente: software module 'Melt Curve Genotyping').

Los resultados automáticos de genotipado deben ser revisados para curvas desviadas 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 para la detección del sitio de la mutación por secuenciación directa de un amplicón.

Especificidad y Sensibilidad del Diagnóstico

Un total de 132 muestras diferentes de ADN genómico de individuos de origen Caucásico fueron analizadas 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, 56 muestras fueron homocigotos tipo salvaje, 67 heterocigotos, y 9 mutante homocigotos.

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 los estándares requeridos. 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 las 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®.

Manejo de desechos

Deseche los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con la legislación vigente.

5. Programación

5.1 Compensación de color

No se requiere compensación de color para el uso del 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 instrumento

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
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 instrumentdo 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 de MTHFR LightCycler®.

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.

Para el instrumentos *LightCycler* 1.x usando la versión del software 3.5.3 leer 'Temperature Transition Rate' [°C/s] en lugar de Ramp Rate.

5.3 Instrumentos LightCycler® 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 40-0340-32_CE_HFE63-65-282, 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. Programación familia instrumentos 480

Nota:

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

Asegurarse de programar **2 adquisiciones por segundo** en lugar del valor predeterminado 5; más adquisiciones reducen la pendiente de la curva de *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

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

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:								
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. Programación Instrumento LightCycler® 96

Nota:

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

5.5 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. Programación Instrumento LightCycler® Nano

Nota:

Guardar el programa y los valores predefinidos como '**Experiment file**' que se puede cargar al inicio de cada ejecución del kit.

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 del LightCycler®).

El rendimiento descrito del ensayo solamente puede ser garantizado cuando se utiliza con sistemas LightCycler® 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 (véase 7.8.1. datos típicos de 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 1a fría.
2	Descongelar la mezcla de reacción LightCycler® FastStart 1b 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 1b al tubo 1a .
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 sobrante del reactivo a 4°C.



6.2.2 Preparación de reactivos of Parámetro-Específico

▶	Cada tubo de reactivo PSR es suficiente para 64 reacciones.
1	Centrifugar el tubo con la pre-mezcla PSR a 10,000 RPM por 1 minuto.
2	Comprobar que el pellet se encuentra en la parte inferior.
3	Por cada tubo de PSR agregar 66 µl de Agua 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 coleccionar las gotas.

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

6.2.3 Preparación del Control Positivo

▶	El HT Control Positivo 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 Agua 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** del **Control Positivo** para una reacción de PCR de 10 µl.

▶ **Control Positivo** debe ser usado en cada ejecución.

Tenga en cuenta: La apertura de los viales puede provocar contaminaciones por 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

▶	Los estándares de Genotipado WT y MT 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 WT y MT 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 Agua 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 los 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 genotipado.

Tenga 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 capítulo 6.4 para almacenamiento y estabilidad de los compuestos 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 PSR (tapa rojo) que ya contiene	66.0 µl
Agregar:	
H ₂ O, grado-PCR (tapa transparente)	343.2 µl
Solución Mg ²⁺ 25 mM (tapa azul)	52.8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapa rojo), véase 6.2.1	66.0 µl
Sustituir el "tapa larga roja" del tubo PSR con la tapa roja de la enzima FastStart	
Volumen Total	528.0 µl

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 ₂ O, grado-PCR (tapa transparente)	5.2 µl
Mg ²⁺ solución 25 mM (tapa azul)	0.8 µl
PSR (tapa rojo), véase 6.2.2	1.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapa rojo), véase 6.2.1	1.0 µl
Volumen de la mezcla de reacción	8.0 µl

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



Pipetear suavemente hacia arriba y abajo la mezcla de reacción. Un alto porcentaje en el fracaso experimental se debe 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
1	Mezclar suavemente la mezcla de reacción, centrifugar brevemente y controlar que no se formaron burbujas de aire.
2	Cargar 8 µl de la mezcla de reacción por capilar/pocillo.
3	Es obligatorio: Agregar 2 µl de H₂O grado-PCR como Control Negativo (NTC) Agregar 2 µl del Control Positivo HT .
	Opcional*: Agregar 2 µl de Standard Genotipado WT . Agregar 2 µl de Standard Genotipado MT .
4	Agregar 2 µl de Muestra 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 los instrumentos de capilares se debe 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 " <i>samples</i> ".

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

Mezcla de Reacción

La mezcla de reacción completa contiene el Reactivo parámetro-específico (**PSR**), LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe y MgCl₂ puede ser almacenada por 30 días refrigerada a 4°C / 8°C.

Evitar la exposición prolongada a la luz

Reactivos Parámetro Específicos (PSR)

Una vez disuelto, almacenar el PSR refrigerado a 4°C / 8°C por un período máximo de 30 días.

Evitar la exposición prolongada a la luz.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

La mezcla FastStart DNA Master HybProbe master (1a+1b) puede ser almacenada en frigorífico por 30 días a 4°C / 8°C.

Positive Control

The dissolved Positive Control is stable for 30 days when stored refrigerated (4°C - 8°C).

Control Positivo

El control positivo disuelto es estable por 30 días cuando se almacena a (4°C- 8 °C).

6.5 Cargado de Controles y Estándares de Genotipado

Las muestras en posiciones 1 a 2, deben ser cargadas en cada ejecución; las muestras 3 y 4 son requeridas para enseñar los estándares de genotipado (solamente 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

Consultar el manual del operador del LightCycler® para más detalles

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 A1298C Heterozygous
3	WT	530	Target 1	Melting Standard	MTHFR A1298 Wildtype
4	MT	530	Target 1	Melting Standard	MTHFR 1298C Mutant

6.5.2 Instrumentos LightCycler® 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:

P o s	Sample Name	Melt Geno Sample Type	Melt Geno Genotype
1	NTC	Negative Control	
2	HT	Melting Standard	MTHFR A1298C Heterozygous
3	WT	Melting Standard	MTHFR A1298 Wildtype
4	MT	Melting Standard	MTHFR 1298C 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	NTC	Unknown	FAM
	A2	HT	Unknown	FAM
	A3	WT	Unknown	FAM
	A4	MT	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”:

Muestras:

Color	Name	Note
	NTC	
	HT	
	WT	
	MT	

Target:

Color	Name	Dye	Reference
	channel 530	FAM	

Well as table:

P o s	#	Note	Sample	FAM	Type
A 1	1		NTC	channel 530	U
A 2	2		HT	channel 530	U
A 3	3		WT	channel 530	U
A 4	4		MT	channel 530	U

7 Análisis e interpretación de los datos

7.1 Límites e interferencias

El presente ensayo es específico para la MTHFR A1298C.
No se conocen interferencias para este ensayo.

7.2 Calibración

La calibración se tiene que realizar siguiendo los procedimientos descritos en los puntos 6.5, 7.3.1, 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: La PCR se lleva a cabo a una temperatura de *annealing* de 60°C; a ésta temperatura la sonda sensor no se unirá muy fuertemente al amplicón 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, 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

En caso de que un pico es detectado a una temperatura inespecífica (véase párrafo 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 párrafo 6.5); alternativamente, los resultados deben ser leídos a las temperaturas de melting (véase párrafo 7.7).

7.3.2 Control Positivo de ADN

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

Los análisis de las curva de *melting* siempre deben mostrar dos pico.

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

Véase **7.7 Interpretación de los resultados** para temperaturas de *melting* esperadas.

7.3.3 Estándares de Genotipado

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

El análisis de la curva de *melting* siempre debe mostrar un único pico de *melting*. **WT** está representando una muestra clínica homocigota **wild type**.

Estándar de Genotipado **MT** (Opcional – posición 4).

El análisis de la curva de *melting* siempre debe mostrar un único pico de *melting*. **MT** está representando una muestra clínica homocigota **mutante**.

Véase **7.7 Interpretación de los resultados** para temperaturas 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 *melting* deben ser conformes a los criterios de aceptación descritos en el siguiente capítulo **7.7 Interpretación de resultados**.



Antes de repetir un experimento considerar los errores más comunes; comprobar en particular el perfil de la amplificación, concentración de la mezcla de reacción y MgCl₂ usadas, y también tenga en cuenta que el almacenamiento inadecuado de los reactivos puede provocar un fallo en el dispositivo.

7.3.5 Curvas de *Melting* anómalas

Una curva de *melting* inesperada puede relacionarse con una incorrecta preparación de las muestras, a un defecto en el producto o a una variante en la región de unión de la sonda. Todo el procedimiento debe ser repetido (preparación de muestras, amplificación y detección). Si la curva de *melting* anómala persiste, otro método debe ser utilizado para la identificación de la secuencia. Enviar el fragmento de PCR para la secuenciación del DNA para confirmar la secuencia o identificar cualquier mutación desconocida.

Reportar desviaciones a service@tib-molbiol.de

Siéntase libre de enviar las muestras que presenten una desviación en las curvas de *melting* a nuestros laboratorios en Berlín para confirmar los resultados obtenidos y/o identificar otras mutaciones por secuenciación de ADN. Ejemplos de variantes conocidas están representadas 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 **7.3 Control de Calidad – Criterios de Aceptación**), 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 Instrumentos Roche 480

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).

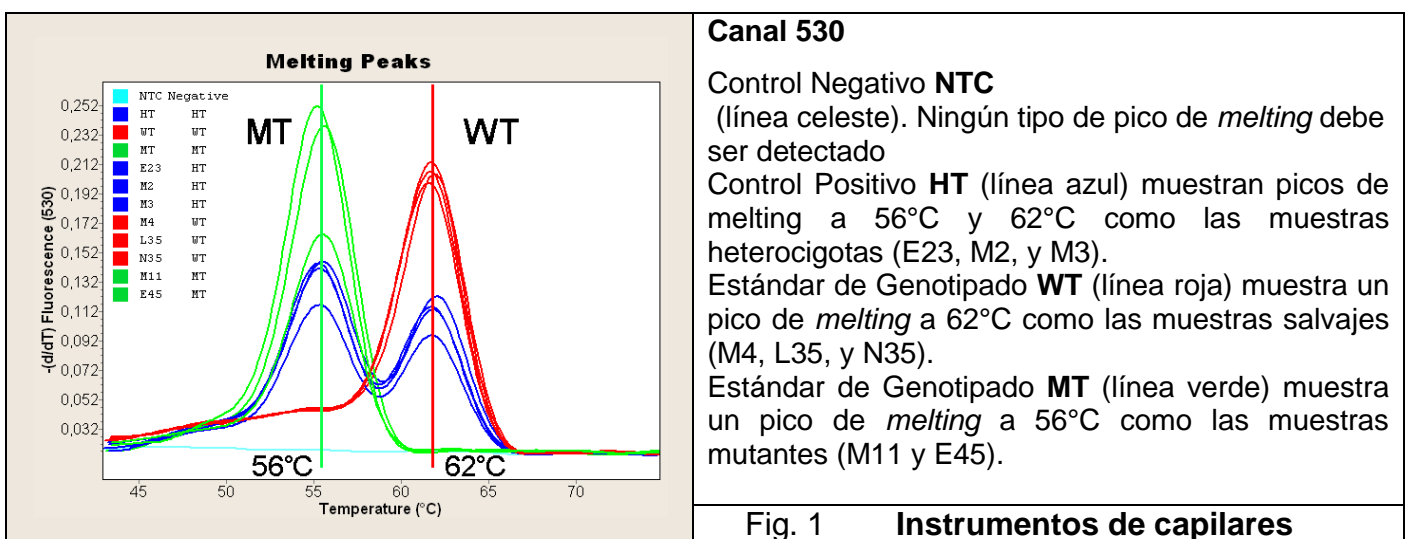


Fig. 1 Instrumentos de capilares

7.5.2 Análisis de *Melting*: Instrumentos LightCycler® 480

Ver datos de *melting* en el canal SimpleProbe.

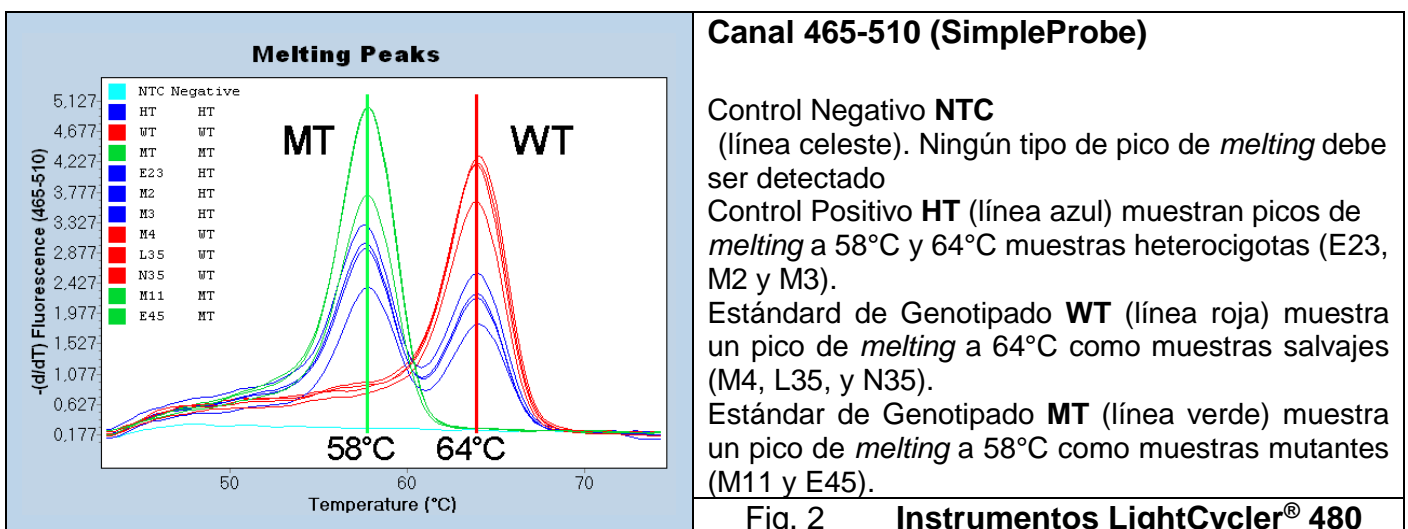
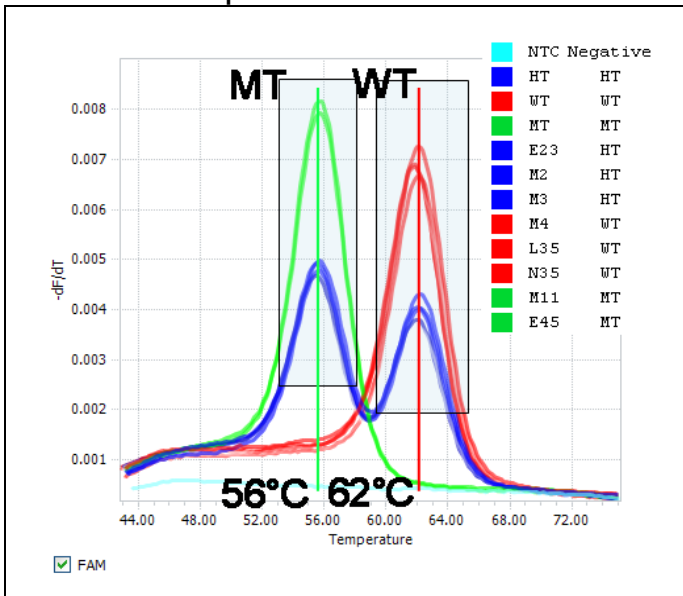


Fig. 2 Instrumentos LightCycler® 480

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**



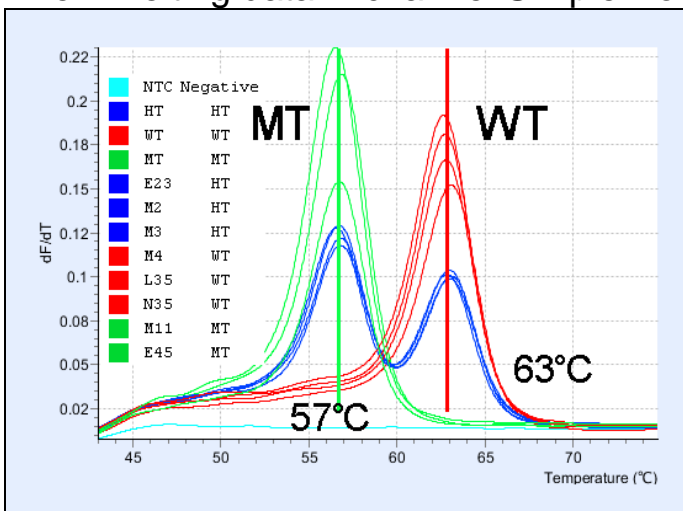
Canal FAM

Control Negativo **NTC** (línea celeste). Ningún tipo de pico de *melting* debe ser detectado
 Control Positivo **HT** (línea azul) muestran picos de *melting* a 56°C y 62°C como muestras heterocigotas (E23, M2 y M3).
 Estándar de Genotipado **WT** (línea roja) muestra un pico de *melting* a 62°C como muestras salvajes (M4, L35, y N35).
 Estándar de Genotipado **MT** (línea verde) muestra un pico de *melting* a 56°C como muestras mutantes (M11 y E45).

Fig. 3 Instrumento LightCycler® 96

7.5.4 Análisis de *Melting*: Instrumento LightCycler® Nano

View Melting data in channel SimpleProbe.



Channel 530 (FAM)

Control Negativo **NTC** (línea celeste). Ningún tipo de pico de *melting* debe ser detectado.
 Control Positivo **HT** (línea azul) muestran picos de *melting* a 57°C y 63°C como muestras heterocigotas (E23, M2 y M3).
 Estándar de Genotipado **WT** (línea roja) muestra un pico de *melting* a 63°C como muestras salvajes (M4, L35, y N35).
 Estándar de Genotipado **MT** (línea verde) muestra un pico de *melting* a 57°C como muestras mutantes (M11 y E45).

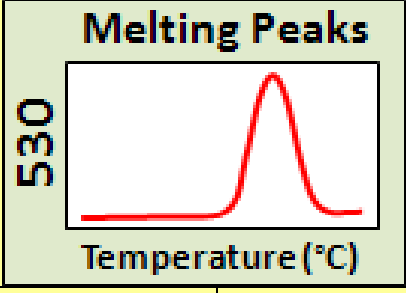
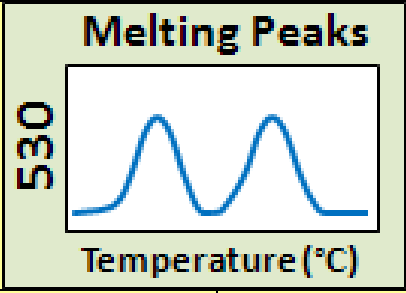
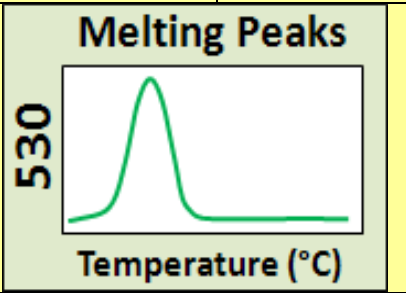
Fig. 4 Instrumentos LightCycler® Nano

7.6 Temperaturas de *melting* esperadas

Genotype:	mutante homocigoto MTHFR 1298C/C	heterocigoto MTHFR 1298A/C	wild type MTHFR 1298A/A
Número de picos de <i>melting</i>	1	2	1
Temperatura de los picos de <i>melting</i>	56-58°C	56-58°C y 62-64°C	62-64°C
Diferencia de temperatura entre los picos	---	6°C	---
Fenotipo	Hiperhomocisteinemia	Hiperhomocisteinemia Solo en combinación con MTHFR 677 C/T	Riesgo general de la población

Tab. 7. Resultados típicos de análisis

7.7 Interpretación de los Resultados

MTHFR A1298C Channel 530 Melting peak(s)		MTHFR Genotypes	Metabolizers Fenotipo
1298C	A1298		
 <p>Melting Peaks 530 Temperature (°C)</p>		<p>Wild Type</p> <p>MTHFR 1298 A/A</p>	<p>Riesgo General de la Población</p>
-	62-64		
 <p>Melting Peaks 530 Temperature (°C)</p>		<p>Heterocigoto</p> <p>MTHFR 1298 A/C</p>	<p>Hiperhomocisteinemia en combinación con MTHFR 677 C/T para individuos heterocigotos compuestos</p>
56-58	62-64		
 <p>Melting Peaks 530 Temperature (°C)</p>		<p>Mutante homocigoto</p> <p>MTHFR 1298 C/C</p>	<p>Hiperhomocisteinemia (La combinación con 677T nunca se ha reportado)</p>
56-58	-		
ΔTm 6°C			

Tab. 8. Typical analysis results



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 Control Positivo HT 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:

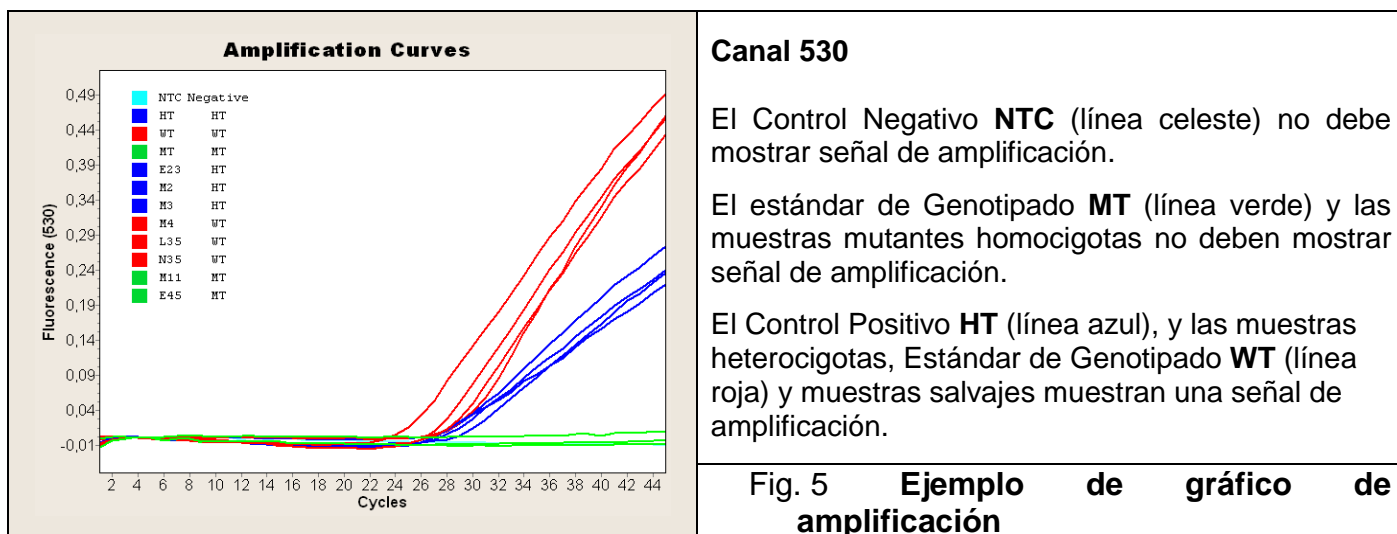
Ver la amplificación en modo análisis “Abs Quant”.

Instrumento LC Nano:

Ver la amplificación en modo “Automatic Quantification”.

LC1.x, software versions 3.5:

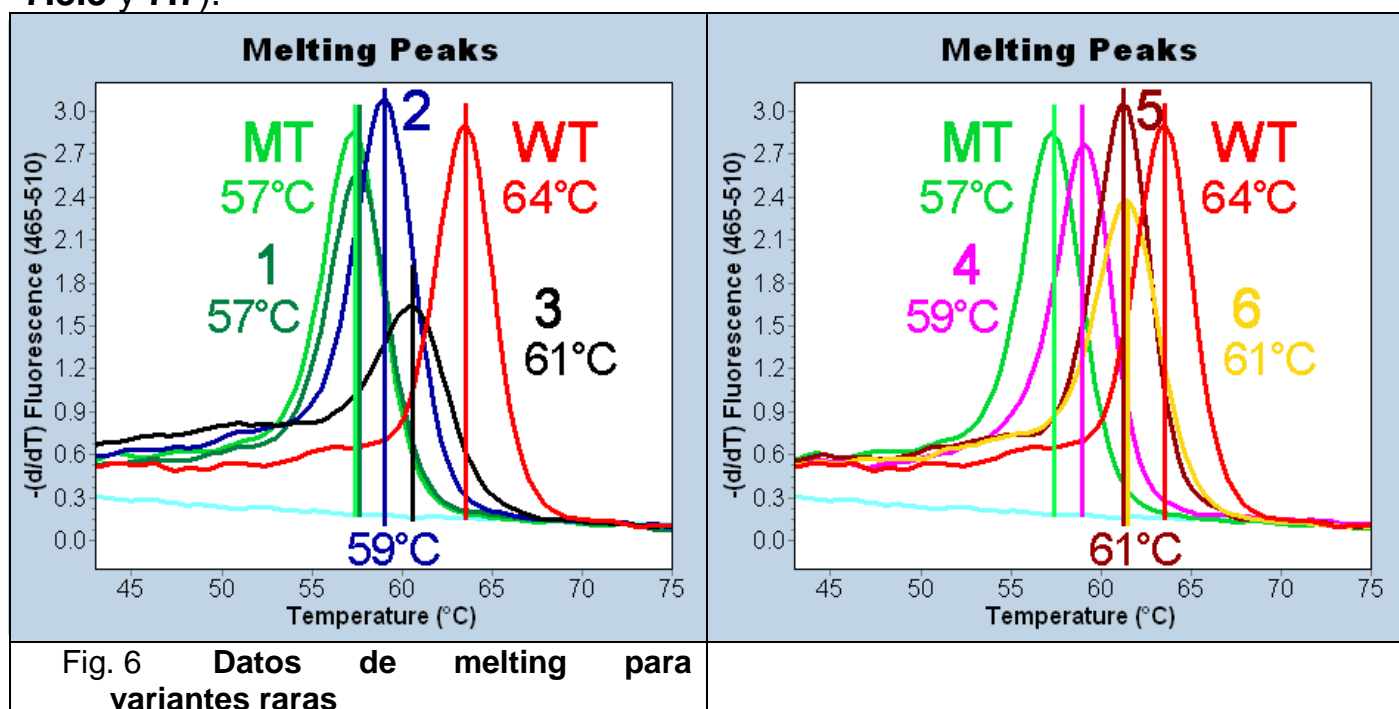
Ver la amplificación en fluorescencia canal F1 modo “Quantification – Second Derivative Maximum”.



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 ΔT_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).



#	RS	TM	HGVS	MAF
WT		64°C		
MT	rs1801131	57°C	NM_005957.4:c.1286A>C	G=0.2494
1	rs72552099	57°C	NM_005957.4:c.1288A>C	NA
2	rs765619217	59°C	NM_005957.4:c.1293C>G,	NA
3	rs397507444	61°C	NM_005957.4:c.1298A>C	NA
4	rs149533586	59°C	NM_005957.4:c.1281T>C	G=0.0004
5	rs763953323	61°C	NM_005957.4:c.1277C>T	NA
6	rs759796920	61°C	NM_005957.4:c.1300G>C	NA
7				
8				
9				
10				

MAF = Minor Allele Count (frequency of the variant);

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 ₂	Repetir el ensayo
	Degradación del Control Positivo o estándar	Usar una nueva alícuota del Control Positivo o estándar
Señal Positiva en el Control Negativo NTC	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

9 Referencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Clasificación / Referencia

Reference	Classification
EDMA	16 01 04 90 00
CPV	33694000-1
EAN	4260159330762
Roche SAP No.	06896383001

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 Biosystems.

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 se distribuye a través de Roche Diagnostics o sus distribuidores locales, La FastStart DNA Master HybProbe se suministra separadamente:

Productos relacionados

El mismo reactivo está disponible en tiras de 8 pocillos pre-pipeteados : Kit 40-2269-64.

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

Versión	Evento	Fecha
V120504	Primera versión (formato Simple Probe)	04-05-2012
V121024	Inclusión del Instrumento LightCycler® 96. Se agregó ajuste de volumen de reacción para los instrumentos LightCycler® 480 (sección 5.3).Especificaciones detalladas para el almacenamiento del PSR (sección 6.4) Instrucciones en el caso de fallo del módulo automático de genotipado (7.3.1).	24-10-2012
V130704	Se incluyó el MagNa Pure 96 y MagNa Pure Compact. Instrucciones para cuando el módulo de genotipado automático falla (7.5.2)	04-07-2013
V131211	Código EDMA 1601019000 cambio a 1601049000 Actualización de las referencias, nomenclatura HGVS, cambios de redacción.	11-12-2013
V150202	Formato de detección corregido LC96.	10-02-2015
V160101	Agregadas Sección "7.8 Información adicional". Incluidos códigos HGVS (7.8.2).	01-01-2016
V160909	7.6 y 7.7 Corregida Interpretación. (Fueron corregidas descripciones 1.2 Uso previsto 3.1 Antecedentes médicos). Permitidas condiciones de almacenado a 4°C.	20-09-2016
V170303	7.3.1 corrección de palabras engañosas	03-03-2017

Producido por:

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

4260159332179

