

MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

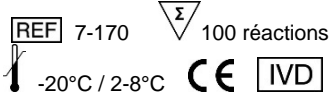
Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com



1. Utilisation

Le MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay est un test PCR en temps réel précis et rapide pour détecter la mutation 1298A>C dans le gène *méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR)*. Cette mutation est liée à une activité enzymatique réduite, qui peut entraîner une hyperhomocystéinémie et des effets secondaires toxiques d'un traitement par méthotrexate. Ce kit permet d'identifier les patients prédisposés à développer des maladies cardiovasculaires et de constater une intolérance au méthotrexate. Ce test qualitatif permet d'identifier les trois génotypes MTHFR 1298A>C dans un extrait d'ADN humain: AA (normal), AC (hétérozygote) ou CC (homozygote muté).
Séquence de référence: HGVS: NG_013351.1 g.16685A>C; dbSNP: rs1801131.

2. Introduction

Des taux élevés d'homocystéine, un produit intermédiaire du métabolisme de la méthionine, représentent un facteur de risque pour l'athérosclérose et la thrombose artérielle. L'anémie hyperhomocystéine entraîne un dysfonctionnement endothélial et est associée à l'activation de thrombozytes et de la formation de thrombus. Des formes légères et modérées peuvent être entraînées par le point de mutation homozygote 677C>T ou bien par le point de mutation complexe hétérozygote 677C>T/1298A>C. La mutation MTHFR 1298A>C est également liée à une activité enzymatique réduite. Chez les sujets avec les deux mutations, le taux d'homocystéine est sensiblement bien plus haut que chez ceux qui ne portent qu'une mutation hétérozygote 677C>T. L'anémie hyperhomocystéine peut affecter la sensibilité à la méthotrexate et contribuer à la toxicité, car la MTHFR est une enzyme importante pour le maintien de la présence de folates cellulaires. Une mutation homozygote 677C>T ou hétérozygote combinée 677C>T/1298A>C représente un risque sensiblement plus important pour l'apparition d'effets secondaires en cas de traitement par méthotrexate.

3. Composants du kit

RealFast™ 2x Genotyping Mix 1 Vial couvercle blanc 1000 µl
MTHFR 1298A>C Assay Mix 1 Vial couvercle violet 550 µl
MTHFR 1298A>C WT-Control 1 Vial couvercle vert 75 µl
MTHFR 1298A>C MUT-Control 1 Vial couvercle rouge 75 µl

Le kit comprend des réactifs pour 100 réactions de chacune d'un volume final de 20 µl.

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le MTHFR 1298A>C Assay Mix se compose de primers génospécifiques *MTHFR* et de deux sondes d'hydrolyse spécifiques d'allèle munies d'un double marqueur. De plus vous disposez dans le kit des matrices témoins pour le génotype normal (WT-Control) et le génotype homozygote muté (MUT-Control).

4. Stockage et stabilité

Le MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception à -20°C. Ou bien si vous l'utilisez à court terme en l'espace d'un mois, conservez-le de 2 à 8°C. Les réactifs perdurent sans perdre leur activité jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation. Evitez les expositions prolongées à la lumière directe. Stocké de manière correcte, le kit conserve toute sa fonctionnalité jusqu'à la date de péremption indiquée.

5. Description du produit

5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan®-Assay. Chaque réaction contient une paire de primers génospécifiques qui amplifie un fragment 144 bp du gène *MTHFR* et deux sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques, munies d'un marqueur double, qui s'hybride à la séquence cible du fragment amplifié. La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' sur une sonde intacte inhibe la fluorescence. Au cours de la PCR l'activité exonucléase 5' – 3' de la polymérase ADN Taq clive l'indicateur fluorescent 5' de l'échantillon hybridisé. La séparation spatiale du fluorophore du quencher provoque un signal fluorescent en temps réel, qui est proportionnel à la quantité du produit de la PCR.

Dans les échantillons normaux, la **sonde de type sauvage 1298A>C marquée HEX** s'hybride au brin complémentaire du fragment de gène amplifié. Il en résulte un fort signal fluorescent dans le canal HEX (556nm) et aucun signal ou un moins fort situé sur la ligne de base dans le canal FAM (520nm). Inversement, dans des échantillons mutés homozygotes, la **sonde mutante 1298A>C marquée FAM** s'hybride au brin complémentaire du fragment de gène amplifié. On peut ainsi détecter un signal fluorescent fort dans le canal FAM et aucun ou un signal plus faible situé sur la ligne de base dans le canal HEX. Pour les échantillons hétérozygotes, les deux sondes se lient aux amplicons et génèrent un signal intermédiaire dans les deux canaux de détection.

5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

Le kit est compatible avec différentes machines de la PCR en temps réel standards du commerce capables de détecter la fluorescence FAM et HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Remarque:** RealFast™ Genotyping QuickGuides pour la programmation et l'exploitation des RealFast™ Assays sur différents types d'appareils peuvent être téléchargées à partir de: www.viennalab.com.

Si vous utilisez le AB StepOne™, il faut mettre le colorant de référence passif sur "ROX"! «

Le kit est livré **sans ROX**. Pour l'utilisation d'appareils PCR en temps réel nécessitant une haute concentration pour la normalisation des données (par ex. Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), il faut ajouter du ROX dans une concentration finale de 1 µM à 2x Genotyping Mix.

5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 65 allèles, qui ont été testées positives à la mutation MTHFR 1298A>C à partir d'un test de référence marqué CE. Le MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay a typé positives 65 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 71 allèles, qui ont été testées négatives à la mutation MTHFR 1298A>C à partir d'un test de référence marqué CE. Le MTHFR 1298A>C RealFast™ Assay a typé négatives 71 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

Limite de détection: 0.2 ng ADN génomique (par réaction). Concentration d'ADN recommandée: 2 à 20 ng/µl ADN génomique.

6. Matériel nécessaire, mais non fourni

Appareil de la PCR en temps réel avec des filtres FAM (520 nm) et HEX (556 nm), tubes PCR optiques compatibles avec l'appareil, gants non-poudrés à usage unique, vortexer, minicentrifugeuse pour des tubes de 2.0 ml, racks pour tubes, set de micropipettes calibrées (0.5 – 1000 µl), des pointes de pipettes stériles avec des filtres aérosol, eau ultrapure, système d'extraction d'ADN, réfrigérateur et congélateur, contenant pour déchets biomédicaux.

7. Procédure

7.1. Extraction de l'ADN

Les réactifs d'extraction d'ADN **ne sont pas inclus** dans le kit.

L'ADN isolé à partir de différents échantillons (par ex. sang total, gouttes de sang séché, frottement à l'intérieur de la joue ou salive) peut être utilisé. L'extrait d'ADN doit bien sûr convenir à une amplification en terme de concentration, de pureté et d'intégrité.

Pour réaliser un génotypage fiable, la quantité d'ADN pour chaque réaction doit se situer dans une fourchette de 10 à 100 ng pour tous les échantillons.

7.2. Contrôle de la PCR

Incluez **toujours** un **No Template Control** (NTC) dans chaque test pour contrôler la présence d'éventuelles contaminations. Il est recommandé d'effectuer les NTC (utilisez une eau ultrapure à la place de l'ADN) comme duplicat.

Effectuez **toujours** le MTHFR 1298A>C **WT-Control** et le MTHFR 1298A>C **MUT-Control** pour chaque test comme signaux de référence pour des échantillons inconnus. Certains logiciels de la PCR en temps réel, comme par ex. AB 7500 Fast, nécessitent pour interpréter correctement les résultats des signaux pour l'ensemble des trois génotypes possibles dans la "Allelic Discrimination Plot". Pour réaliser un contrôle hétérozygote (HET-Control) mélangez une aliquote du WT-Control et du MUT-Control dans un rapport 1:1.

» **Remarque:** les WT-et MUT-Controls représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

7.3. Préparation du MTHFR 1298A>C RealFast™ Master-Mix

Décongelez complètement toutes les solutions, centrifugez-les brièvement après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master-Mix** pour le nombre total d'amorces PCR prévues (N échantillons + contrôles positifs + contrôles négatifs) et calculez en plus au moins une réaction supplémentaire pour compenser une imprécision de pipetage:

Composants	Par réaction	Par ex. 24+1 réactions
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
MTHFR 1298A>C Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Mettez **15 µl** de **Master-Mix** dans chaque godet. Pipetez et ajoutez **5 µl** d'**ADN** ou de **Control** Template pour obtenir un volume final de 20 µl.

Pour minimiser les risques de contaminations, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite les échantillons, et finalement les contrôles positifs. Fermez immédiatement les récipients de réaction.

» **Remarque:** évitez les bulles d'air dans les mélanges finaux de réaction et les empreintes digitales sur les surfaces optiques des récipients de réaction qui peuvent toutes les deux altérer la mesure de la fluorescence. Centrifugez si nécessaire. «

7.4. Programme de la PCR

Programmez la machine PCR en temps réel comme indiqué par le fabricant pour les expériences de discrimination allélique ou de génotypage. Mettez les échantillons PCR dans le thermocycleur et lancez le programme suivant:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P
et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95 °C	3 min	Dénaturation initiale
40	95 °C	15 sec	Dénaturation
	60 °C	1 min	Annealing/Extension –
			Réception de données dans le canal FAM et HEX

Rotor-Gene® 6000:

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95 °C	3 min	Dénaturation initiale
40	95 °C	15 sec	Denaturation
	36-well rotor: 56 °C	1 min	Annealing/Extension –
			Réception de données dans le canal Green et Yellow

8. Analyse des données / interprétation des résultats

Le génotype d'un échantillon est déterminé à partir du rapport de signal entre les canaux de réception. Le signal détecté dans le **canal HEX (normal)** est pour ce faire comparé au signal détecté dans le **canal FAM (muté)**. La plupart des programmes d'évaluation PCR en temps réel représentent automatiquement les données issues des deux canaux sous forme d'un nuage de points. Les points de données se situant le long des axiales X- à savoir Y correspondent au génotype normal, à savoir homozygote muté, tandis que les points de données situés au milieu du nuage de points correspondent au génotype hétérozygote. La NTC apparaît en bas à gauche.

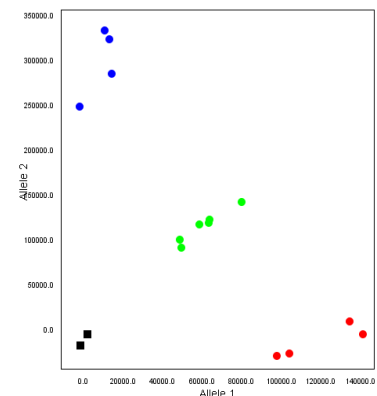
Contrôles	Amplification dans le canal FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)	Génotype
WT-Control	NON	OUI	normal
HET-Control	OUI	OUI	hétérozygote
MUT-Control	OUI	NON	homozygote muté
NTC	NON	NON	----

Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

Recommandations pour le réglage de la valeur seuil (C_q):

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM juste au-dessus du signal fluorescent de fond généré par le WT-Control (HEX positif). Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX juste au-dessus du signal fluorescent de fond du MUT-Control (FAM positif).

Suivez les instructions de votre logiciel d'évaluation de la PCR en temps réel, pour analyser les données que vous avez obtenues.



9. Mises en garde et précautions

- Le kit est à utiliser uniquement pour des diagnostics *in vitro*.
- Pour manipuler les échantillons et les réactifs, mettez toujours des gants poudrés à usage unique et des vêtements de laboratoire appropriés.
- Effectuez l'extraction de l'ADN dans un endroit strictement séparé de celui où vous réalisez la préparation de la PCR.
- Utilisez un jeu de pipettes uniquement destiné à la préparation de la PCR et utilisez des pointes de pipettes avec un filtre aérosol.
- Utilisez uniquement des récipients PCR compatibles avec la machine, aux parois fines, avec un couvercle approprié à faire des mesures optiques.
- Ne mélangez pas de réactifs avec différents numéros de lot.
- N'utilisez pas de kits et de composants de kit périmés.