

VKORC1 -1639G>A RealFast™ Assay

REF 7-190
-20°C / 2-8°C

100 réactions
CE IVD



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 VKORC1 -1639G>A RealFast™ Assay est un test PCR en temps réel rapide et précis pour détecter le polymorphisme -1639G>A dans la région régulatrice du gène pour la sous-unité de la vitamine K epoxyde réductase 1 (VKORC1). Cette variante du gène est responsable de la grande variabilité de la posologie de warfarine, de l'acénocoumarol ou la phenprocoumone. Ce test qualitatif permet d'identifier dans un extrait d'ADN humain les trois génotypes possibles VKORC1 -1639G>A: GG (dose normal), GA (dose moyenne) ou AA (faible dose).
Séquence de référence: HGVS: NG_011564.1 g.3588G>A; NCBI dbSNP: rs9923231.

2. Introduction

VKORC1 est une enzyme clé dans le cycle régénératif de la vitamine K, elle est ainsi la cible des antagonistes de la vitamine K fréquemment mise en place comme anticoagulant oral dans les thérapies et dans la prévention de maladies thromboemboliques. L'étroite fenêtre thérapeutique, tout comme les fortes différences posologiques entre les patients rend difficile la mise en place du traitement avec des anticoagulants surtout au début. La posologie empirique conduit fréquemment à modifier les doses en cas d'INR (international normalized ratio) trop élevé ou trop bas. Les patients risquent en cas de surdosage une hémorragie et en cas de sous-dosage une thérapie inefficace. A côté de l'âge, du sexe, de l'index de masse corporelle et de la co-médication, le polymorphisme VKORC1 -1639G>A est le principal facteur génétique qui a une influence sur la posologie thérapeutique. Les patients de génotype AA ont besoin d'une dose sensiblement plus faible que les patients avec un génotype GA ou GG.

3. Composants du kit

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	□ couvercle blanc	1.000 µl
VKORC1 -1639G>A Assay Mix	1 Vial	■ couvercle violet	550 µl
VKORC1 -1639G>A GG-Control	1 Vial	■ couvercle vert	75 µl
VKORC1 -1639G>A AA-Control	1 Vial	■ couvercle rouge	75 µl

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le VKORC1 -1639G>A Assay Mix se compose de primers génospcifiques VKORC1 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 VKORC1 -1639GG et le génotype -1639AA.

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

4. Stockage et stabilité

Le VKORC1 -1639G>A 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 génospcifiques qui amplifie un fragment 120 bp du gène VKORC1 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 VKORC1 -1639GG, la sonde VKORC1 -1639G 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 VKORC1 -1639AA, la sonde VKORC1 -1639A 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 (VKORC1 -1639GA), 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 VKORC1 -1639G>A RealFast™ 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 77 allèles, qui ont été testées positives à la polymorphisme VKORC1 -1639A à partir d'un test de référence certifié CE. Le VKORC1 -1639G>A RealFast™ Assay a typé positives 77 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La spécificité a été déterminée à partir de 95 allèles, qui ont été testées négatives à la polymorphisme VKORC1 -1639A à partir d'un test de référence certifié CE. Le VKORC1 -1639G>A RealFast™ Assay a typé négatives 95 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 VKORC1 -1639 **GG-Control** et le VKORC1 -1639 **AA-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 (GA-Control) mélangez une aliquote du GG-Control et du AA-Control dans un rapport 1:1.

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

7.3. Préparation du VKORC1 -1639G>A 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
VKORC1 -1639G>A Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Mettez **15 µl de Master-Mix** dans chaque godet. Pipettez 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
	72-well rotor: 60 °C		

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 (-1639G)** est pour ce faire comparé au signal détecté dans le **canal FAM (-1639A)**. 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 -1639GG e -1639AA, tandis que les points de données situés au milieu du nuage de points correspondent au génotype hétérozygote -1639GA. La NTC apparaît en bas à gauche.

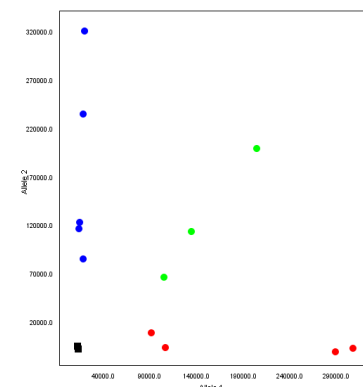
Contrôles	Amplification dans le canal FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)	Génotype / Phenotype
GG-Control	NON	OUI	GG / dose normal
GA-Control	OUI	OUI	GA / dose moyenne
AA-Control	OUI	NON	AA / faible dose
NTC	NON	NON	

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 GG-Control (HEX positif). Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX juste au-dessus du signal fluorescent de fond du AA-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.