

gb GENETIC Gilbert

Cat. No.: 3216-025
3216-050



generi biotech

KLINIKINĖS IŠVADOS

Diagnostikos rinkinys „gb GENETIC Gilbert“ naudojamas UGT1A1 geno promotoriuje TA pasikartojimų skaičiaus pokyčiams nustatyti. Šis genas koduoja fermentą UDP-gliukuronoziltransferazę, kuri yra atsakinga už bilirubino biotransformacijos konjugacijos fazę. Nemutuoto geno varianto promotoriuje yra 6 TA pakartojimai, mutavęs geno variantas dažniausiai turi 7 TA kartojimus (haplotipo žymėjimas UGT1A1*28). Rečiau gali būti variacijų su 5 TA pakartojimais (UGT1A1*36) arba 8 (UGT1A1*37).

Homozigotiniai genotipo nešiotojai su TA įterpimu (UGT1A1*28/*28) yra paveikti vadinamojo Gilberto sindromo, pasireiškiančio lengva lėtine nekonjuguota hiperbilirubinemija. Tai sukelia iki 20–30% sumažėjęs fermento UDP-gliukuronoziltransferazės gliukuronizacijos aktyvumas. Daugybė genetinių variantų gali sukelti Gilberto sindromo fenotipą, tačiau polimorfizmas UGT1A1 * 28 yra dažniausiai pasireiškiantis Kaukazo ir Afroamerikiečių populiacijose. Azijiečiai, sergantys Gilberto sindromu, dažnai turi polimorfizmą UGT1A1*6, haplotipus UGT1A1*36 ir UGT1A1*37 dažniausiai aptinkami tarp afroamerikiečių.

Gilberto sindromas yra gerybinė liga, kuriai nereikia gydymo; nepaisant to, diagnozė yra reikalinga tam, kad atmesti sunkių kepenų funkcijos sutrikimą, susijusį su hiperbilirubinemija. Gilberto sindromas indoeuropiečių populiacijoje yra 3–15%.

Žmonės, kurių genotipas UGT1A1*1/*28 (heterozigotai), yra Gilberto sindromo nešiotojai. Sindromas taip pat pasireiškia junginių heterozigotų atvejais, kurių viename UGT1A1 TA geno alelyje yra įterpta seka, o antrame - kita mutacija (UGT1A1*28 / kita mutacija). Tokių Gilberto sindromu sergančių pacientų yra apie 2 %.

Aptikti šią mutaciją taip pat naudinga prieš pradedant gydymą vaistais, kuriuos metabolizuoja UDP-gliukuronoziltransferazė (pvz., chemoterapiu irinotekanu), o ribota vaistų biotransformacija gali sukelti toksišią poveikį (leukopeniją, viduriavimą, hematologinį toksiškumą). Genotipų nustatymas leidžia laiku sumažinti dozę arba pasirinkti alternatyvų gydymą.

ETIKETĖSE NAUDOTI SIMBOLIAI

	Partijos numeris
	Galiojimo laikas
	Gamintojas
	Testų kiekis pakuotėje
	Turinys
	Naudoti <i>in vitro</i> diagnostikai
	Laikymo sąlygos

PAPILDOMI PRODUKTAI

gb GENETIC HFE

Kat. Nr.: 3208

NUORODA

„gb GENETIC Gilbert“ rinkinys yra tinkamas naudojant šiuos realaus laiko PGR ciklerius:

- Rotor-Gene 3000/6000/Q (Corbett Research, Qiagen)
- CFX96/CFX96Touch (Bio-Rad)
- ABI 7500/7500 Fast (Applied Biosystems)
- AriaMx/Stratagene Mx3000P/Mx3005P (Agilent Technologies)
- MIC (Bio Molecular Systems)

Prieš naudodami rinkinį kartu su kitais realaus laiko PGR cikleriais, peržiūrėkite konkretaus instrumento naudotojo instrukcijas.

Norėdami gauti daugiau informacijos, susisiekite su mumis el. pašto adresu info@generibiotech.com arba telefono numeriu +420 495 056 314. Daugiau informacijos taip pat rasite mūsų svetainėje: www.generi-biotech.com.

PROBLEMŲ SPRENDIMAS

Rezultatai gali būti laikomi galiojančiais tik tuo atveju, jei griežtai laikomasi instrukcijų, pateiktų pridedamame vartotojo vadove. Teigiamas kontrolės signalas turi būti aptiktas atitinkamame fluorescenciniame kanale, neigiamos kontrolės signalas neturi būti aptiktas jokiame kanale. Jei kontrolinių mėginių rezultatai neteisingi, dar kartą patikrinkite:

- Reagentų galiojimo laiką
- Laikymo sąlygas
- Realaus laiko PGR ciklo ir pipetės nustatymus



GENERI BIOTECH s.r.o.

Mačkova 587/42

CZ-500 11, Hradec Králové 11 - Třebeš

ČEKIJOS RESPUBLIKA

www.generi-biotech.com

Tel.: +420 495 056 314

paštas: info@generi-biotech.com

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

Siuntimo ir sandėliavimo sąlygos

Realaus laiko PGR rinkinys siunčiamas sausame lede ir iškart gavus turi būti laikomas žemesnėje nei –20 °C temperatūroje pastovios temperatūros šaldiklyje ir tamsoje (rinkinys yra jautrus šviesai). Laikant tokiomis sąlygomis ir tinkamai naudojant šį produktą galima naudoti iki galiojimo datos (žr. etiketę ant dėžutės ir buteliuko), nesumažinant jo veikimo. Jei numatomas dažnas naudojimas (daugiau nei 5 užšaldymo-atšildymo ciklai), rekomenduojame paruošti atitinkamas alikvotas.

Saugos priemonės

- Tik profesionaliam naudojimui.
- Dirbdami su šiais reagentais visada mūvėkite pirštines ir venkite sąlyčio su oda. Patekus į akis ar odą, nedelsiant praplaukite dideliu kiekiu vandens.
- Dirbant su kiekybinės PGR (angl. *qPCR*) reakcijos reagentais draudžiama valgyti, gerti ir rūkyti.
- Naudokite tik automatines mikropipetes.

Techninės atsargumo priemonės

- Prieš pradėdami, iki galo ir atidžiai perskaitykite instrukcijas (naudokite galiojančią versiją). Įsitikinkite, kad visa ten parašyta informacija suprantama.
- Netinkamas tvarkymas arba darbo tvarkos pakeitimai gali turėti įtakos rezultatams. Todėl griežtai laikykitės pipetės tūrio, inkubacijos laiko ir temperatūros pagal instrukcijas.
- Laikykitės galiojimo datos, nenaudokite pasibaigusio galiojimo reagentų.
- Jei pakuotė pažeista, nedelsdami kreipkitės į gamintoją. Nenaudokite sugadintų komponentų, bet saugokite juos dėl problemų, susijusių su skundais.
- Naudokite dejonizuotą vandenį (įtrauktą).
- Paruošti arba panaudoti reagentai turi būti apdorojami pagal nacionalines saugos gaires arba taisykles.
- Naudokite kalibruotas pipetes ir instrumentus.

Užteršimo prevencija

Laikykitės šių rekomendacijų:

- Ruošdami PGR mišinius, dėvėkite švarų laboratorinį chalātą ir vienkartinę pirštines (anksčiau nedėvėta ruošiant mėginį).
- Pakeiskite pirštines, kai įtariate, kad jos užterštos.
- Išlaikykite atskiras zonas, specialią įrangą ir reikmenis mėginiams paruošti ir PGR nustatymui.
- Niekada neatidarykite amplifikuotų PGR produktų PGR nustatymo srityje.
- Reakcijų mišinius ir jų komponentus laikykite kiek įmanoma uždarytus.
- Naudokite vienkartinis pipetės antgalius su filtrais, kad sumažintumėte kryžminį užteršimą.

TIKSLAS IR TURINYS






Prekės paskirtis

Rinkinys skirtas žmogaus genominėje DNR geno UGT1A1 polimorfizmui TA (alelis 7TA) aptikti realaus laiko PGR metodu. Naudoti *in vitro* diagnostikai.

Tyrimo principas

Rinkinys pagrįstas polimerazės grandininė reakcija (PGR) su lydymosi kreivių analize naudojant fluorescenciniu būdu pažymėtą zondą. Rinkinyje yra visi komponentai, reikalingi analizei.

Turinys

**	Aprašymas	Kiekis	Koncentracija	Tikslas
	Assay CQ UGT1A1 6TA/7TA mišinys	1x0,4 ml*	1,25x	Aptikimo tyrimas – 25 reakcijos
		2x0,4 ml		Aptikimo tyrimas – 50 reakcijos
	Dejonizuotas vanduo	1x1,0 ml		Neigiama kontrolė
	WT UGT1A1 6TA Standartas	1x0,2 ml	1x10 ⁴ kopijų/μl	Teigiama kontrolė
	MUT UGT1A1 7TA Standartas	1x0,2 ml	1x10 ⁴ kopijų/μl	Teigiama kontrolė
	HET UGT1A1 6TA/7TA Standartas	1x0,2 ml	1x10 ⁴ kopijų/μl	Teigiama kontrolė

* 25 rxn – reakcijų skaičius skaičiuojamas 20 μl tūriui / PGR reakcijai
** Dangčio spalva

CQ tyrimas (angl. contact quenching)

„Assay qPCR CQ UGT1A1“ yra amplifikacinių pradmenų, fluorescenciniu būdu pažymėto zondo, buferio, nukleotidų ir polimerazės mišinys. DNR amplifikuojama pradmenimis. Reagentų mišinyje taip pat yra DNR zondų. Hibridizuotoje būsenoje fluorescencinis zondas nutildomas, lydymosi kreivės analizės metu zondo ir šablono duplexas atsiskiria ir padidėja fluorescencinis signalas. Šis pokytis diagramoje dF/dT parodo smailę su maksimumu esant temperatūrai, kai disocijuoja lygiai pusė duplexo (lydymosi temperatūra – Tm). Dvipusio zondo ir visiškai vienas kitą papildančio šablono (tobulas atitikimas) lydymosi temperatūra yra aukštesnė nei dvipusio zondo ir šablono, kuriame yra mutacija (neatitikimas). Remiantis dvipusio zondo šablono lydymosi temperatūros analize, nustatomas genotipas.

UGT1A1 Standartai (Teigiamos Kontrolės)

Rinkinyje yra kiekvieno genotipo teigiamos kontrolės:

- WT UGT1A1 6TA Standartas (laukinio tipo homozigotas)
- MUT UGT1A1 7TA Standartas (mutuotas homozigotas)
- HET UGT1A1 6TA/7TA Standartas (heterozigotas)

Kiekvienai analizei reikia pridėti bent vieną teigiamą kontrolę kiekvienam genotipui. Teigiamas standarto rezultatas reiškia teisingą analizę (pirmavimas ir zondas veikia tinkamai). Jei rezultatas yra neigiamas, analizė yra neteisinga ir būtina iš naujo išanalizuoti visus įtrauktus mėginius. Atkreipkite dėmesį į kitų rinkinio komponentų užteršimą teigiamomis kontrolėmis, nes tai gali sukelti klaidingą pozityvumą. Rekomenduojama teigiamas kontroles (standartus) naudoti vietoje, atskirtoje nuo vietos, kurioje ruošiami PGR mišiniai. Prieš dedant teigiamą kontrolę, patariama uždaryti mėgintuvėlius su mėginiais ir neigiamą kontrolę. Tai apsaugo nuo kitų mėginių / neigiamos kontrolės kryžminio užteršimo, kai pridama teigiamos kontrolės.

Dejonizuotas vanduo (neigiama kontrolė)

Kad būtų išvengta užteršimo, kiekviena analizė turi apimti neigiamą kontrolinę reakciją kiekvienam aptikimo tyrimui. Vietoj mėginio įpilkite dejonizuoto vandens kaip šablono. Neigiami rezultatai rodo, kad ruošiant kiekybinės PGR reakcijos mišinį nėra užteršimo. Jei neigiamos kontrolės analizės rezultatas yra teigiamas, tokia analizė yra neteisinga ir nepatikima, todėl būtina iš naujo išanalizuoti visus įtrauktus mėginius. Prieš atlikdami naują analizę, pabandykite surasti ir pašalinti galimas užteršimo priežastis.

Papildomi reagentai ir instrumentai

- DNR išskyrimo rinkinys arba reagentai.
- Mėgintuvėliai reagentams maišyti, realaus laiko PGR mėgintuvėliai, juostelės arba plokštelės, suderinamos su realaus laiko PGR cikleriu.
- Reguluojamos automatinės mikropipetės (10–1000 μl).
- Sterilūs vienkartiniai pipetės antgaliai su filtrais.
- Sūkurys (vorteksas) ir laboratorinė centrifuga.
- Realaus laiko PGR cikleris su programine įranga.

Realaus laiko ciklo nustatymų instrukcijas rasite mūsų GENERI BIOTECH svetainėje ([Real-time PCR cyclers Settings](#)).

DARBO TVARKA

Reagento paruošimas

- Reagentų koncentracijos paruoštos tiesioginiam naudojimui.
- Prieš naudojimą atšildykite visus reagentus.
- Darbo metu reagentus, kurių tuo metu nenaudojate, laikykite šaldytuve ir tamsoje.
- Sumaišykite visus tirpalus ir prieš pat naudojimą nusukite centrifugoje.
- Visada paruoškite tikslų reagentų kiekį, kurio pakanka kiekvienai analizei.

- Jei naudojamas dažniau nei 5 užšaldymo atšildymo ciklai, rekomenduojame paruošti atitinkamas alikvotas.

Mėginio paruošimas

Rinkinys skirtas žmogaus genominės DNR mutacijai aptikti. Bendras genominės DNR kiekis vienoje reakcijoje turi būti 10–400 ng, o tai atitinka 2,5–100 ng/μl mėginio koncentraciją.

qPCR mišinio paruošimas

Atšildykite „Assay qPCR“ mišinį, prieš pat naudojimą gerai suplakite ir nusukite. Bendras kiekybinis PGR reakcijos tūris yra 20 μl. Paskirstykite 16 μl „Assay qPCR (CQ UGT1A1)“ mišinį į reakcijos mėgintuvėlius. Įpilkite 4 μl šablono (DNR mėginio arba standarto UGT1A1). Jei mėginio tūris mažesnis, užpildykite reakciją dejonizuotu vandeniu iki 20 μl. Kaip neigiamą kontrolę naudokite 4 μl dejonizuoto vandens. Švelniai sumaišykite ir trumpai centrifugoje nusukite galutinį kiekybinės PGR reakcijos mišinį. Geriau atlikti kiekybinę PGR analizę iš karto po mišinio paruošimo. Prieš atliekant analizę, mišinius galima laikyti šaldytuve, bet ne ilgiau kaip vieną valandą.

Terminio profilio nustatymai

Nustatykite terminių ciklų sąlygas realiojo laiko PGR cikleryje. Rekomenduojamas terminis programos profilis yra toks:

Amplifikacija:		
Pirminis denatūravimas	95 °C	3 min
50 ciklų:		
Denatūravimo	95 °C	10 s
Atkaitinimo	60 °C	10 s*
		(fluorescencijos gavimas)
Pailginimo	72 °C	20 s
Lydymosi analizė:		
Denatūravimo	95 °C	1 min
Hibridizavimo	35 °C	3 min
Lydymosi	35-70 °C	1 °C/5s**
		(fluorescencijos gavimas)

*cikleriui ABI 7500/7500 Fast (Applied Biosystems) nustatykite atkaitinimo laiką iki 30 s

**cikleriui CFX 96™ (BioRad) būtina sureguliuoti lydymosi analizės jautrumą iki 0,5 °C / 5 s.

**cikleriui AriaMx (Agilent Technologies) nustatykite lydymosi temperatūrą 40–70 °C

Fluorescencija gaunama atkaitinimo fazės metu (tačiau tai nėra būtina, nes fluorescencinis signalas nesikeičia amplifikacijos fazės metu) ir lydymosi analizės metu FAM/Sybr kanale (sužadinimo bangos ilgis 495 nm, emisijos bangos ilgis 520 nm). Prieš pradėdami tyrimą būtina sukalibruoti Rotor-Gene ciklerio jautrumą. Nustatykite stiprinimą taip, kad mėginių fluorescencija 60 °C temperatūroje būtų nuo 30 iki 60 RFU.

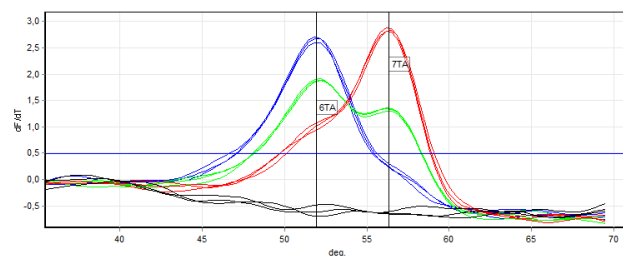
/Vertimas iš anglų k./

Realaus laiko ciklo nustatymų instrukcijas galima rasti adresu <http://www.generibiotech.com/manuals-for-setting-cyclers> (Real-time PCR ciklerio nustatymai).

REZULTATŲ AIŠKINIMAS

- Norėdami įvertinti, ar tiriamajame mėginyje yra mutacijos, naudokite realaus laiko PGR programinę įrangą lydimosi kreivių analizei.
- Analizės rezultatas yra kreivė su viena ar daugiau smailių T_m srityje. Gautą kreivių formą ir lydimosi temperatūrą reikia palyginti su teigiamų kontrolinių bandinių kreivėmis.
- Lydimosi kreivės analizės grafikas dažniausiai parodo fluorescencijos sumažėjimą priklausomai nuo temperatūros padidėjimo ($-dF/dT$). Šiame rodinyje kreivės rodo neigiamą orientaciją. Jei programinė įranga neanalizuoja neigiamų smailių, kreives reikia konvertuoti taip, kad būtų parodytas fluorescencijos padidėjimas, priklausomai nuo temperatūros padidėjimo (dF/dT). Šiai operacijai atlikti Rotor-Gene ciklerio programinėje įrangoje naudojama „Flip“ funkcijos dF/dT . Šią funkciją būtina išjungti, kad analizė būtų sėkminga.
- Norint teisingai interpretuoti rezultatus, būtina išanalizuoti teigiamą kontrolę. Pirmiausia patikrinkite tik visų teigiamų kontrolinių mėginių (WT, MUT ir HET) ir neigiamą kontrolę.
- Nustatykite slenkstį (angl. *threshold*) į padėtį, kai teisingai nustatomi genotipai (žr. 1 Pav.).
- Nustatykite standartų 6TA ir 7TA T_m . Šablono 7TA lydimosi temperatūra yra cikleryje Rotor-Gene 3000 apie 56,5 °C, o šablono 6TA apie 52 °C. Tarp ciklerių T_m gali skirtis.
- Patikrinkite HET etalonų nustatymo teisingumą, kreivė turi parodyti dvi subalansuotas smailes 6TA ir 7TA genotipų T_m srityje.
- Kai kuriuose termocikleriuose MUT 7TA standarto kontrolei gali atsirasti nedidelis smailės 6TA regione. Šiuo atveju mėginiai negali būti automatiškai įvertinti pagal gautą T_m . Mėginiai turi būti įvertinti lyginant lydimosi kreivės formą su teigiama kontrole.
- Išanalizuokite DNR mėginį. Analizuojant rekomenduojamą DNR kiekį, smailės turėtų viršyti pakoreguotą slenkstį ir analizę galima įvertinti automatiškai, naudojant modulį „Genotipai“. Kitu atveju reikia išanalizuoti mėginius su sumažinta slenksne verte, tada vizualiai apžiūrėti kreivių bangos formą ir nustatyti panašumą su atitinkamais standartais. Turi būti atlikta vizualinė kreivių apžiūra.
- Alelio 5TA atveju didžiausias T_m yra maždaug 3 °C mažesnis, palyginti su šablonu 6TA. 8TA alelio negalima atskirti T_m nuo 6TA alelio.
- Jei visų teigiamų ir neigiamų kontrolinių mėginių rezultatai yra teisingi, tačiau tiriamajame mėginyje matuojamas silpnas signalas, būtina išanalizuoti naują DNR izoliatą. Jei kontrolinių

mėginių rezultatai yra neteisingi, pakartokite visų šios serijos mėginių PGR analizę.



1 Pav. Lydimosi kreivės UGT1A1 Rotor-Gene 3000 programinėje įrangoje WT (6TA) mėlyna, MUT (7TA) raudona, HET (6TA/7TA) žalia, NTC juoda. Slenkstis pažymėtas mėlyna linija.