

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay

REF 7-420

Σ 100 reactions

-30°C -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennialab.com

www.viennialab.com

1. Intended Use

The CYP2D6 RealFast™ CNV Assay is a fast and accurate real-time PCR test to determine copy number variations (CNV) of the human *CYP2D6* gene. Deletions and duplications of this gene are associated with altered activity of the drug metabolizing enzyme CYP2D6. The kit is designed to identify patients with heterozygous and homozygous deletions (*5 allele) or duplications of the *CYP2D6* gene. For the comprehensive determination of the metabolizer status, it should be used in conjunction with the CYP2D6 XL StripAssay® or DNA sequencing. The semi-quantitative assay discriminates between deletions, duplications and normal copy number status in a human genomic DNA extract. Reference sequence: HGVS: NG_008376.3

2. Introduction

Various drugs like tamoxifen, opiates, antidepressives or antipsychotics are metabolized by the cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme. Besides several single nucleotide polymorphisms, variations in the copy number of the *CYP2D6* gene are responsible for altered enzymatic activity which frequently leads to inefficacious or adverse drug reactions. Phenotypes showing no (homozygous deletion), decreased (one copy) or increased (duplication) enzyme function constitute poor (PM), intermediate (IM) or ultrarapid (UM) metabolizers, respectively. According to the guidelines of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) and the Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), the CYP2D6 metabolizer status of the patient should be determined prior to prescription of certain drugs (refer to www.pharmgkb.org).

3. Kit Contents

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial	□ white cap	1000 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	1 vial	■ purple cap	550 µl
CYP2D6 CNV Calibrator	1 vial	■ green cap	75 µl

The RealFast™ 2x Probe Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The CYP2D6 CNV Assay Mix consists of gene-specific primers as well as dual-labeled hydrolysis probes for *CYP2D6* and the endogenous control (EC) gene. A CYP2D6 CNV Calibrator representing the normal status with two functional *CYP2D6* copies is supplied with the kit.

The kit contains reagents for 100 reactions in a final volume of 20 µl each.

4. Storage and Stability

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -30 to -15°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

5. Product Description

5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains gene-specific primer pairs for amplification of *CYP2D6* and endogenous control (EC) gene fragments with 141 bp each. Further components are two dual-labeled, gene-specific hydrolysis probes, the **FAM-labeled CYP2D6 probe** and the **HEX-labeled EC probe**, which hybridize to an internal sequence of the amplified fragments. The proximity of the 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dye on intact probes prevents the reporter from fluorescing. During the extension phase of PCR the 5' - 3' exonuclease activity of Taq DNA polymerase cleaves the 5'-fluorescent reporter from the hybridized probe. The physical separation of the fluorophore from the quencher dye generates a fluorescent signal in real-time, which is proportional to the accumulated PCR product.

The CYP2D6 RealFast™ CNV Assay is a relative quantitation assay and compares the amount of both nucleic acid targets (*CYP2D6* and EC) in relation to the CYP2D6 CNV Calibrator. The EC gene is used to normalize fluorescence signals between different samples and serves as a PCR positive control.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The CYP2D6 RealFast™ CNV Assay is validated for use with the AB 7500 Fast instrument.

The kit is compatible with various common real-time PCR instruments capable of recording FAM and HEX fluorescence:

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

» **Note:** RealFast™ CNV QuickGuides for setting up and analyzing experiments on different types of instruments can be downloaded from www.viennialab.com.

When using AB 7500 Fast, StepOne™ or Mx3005P set passive reference dye to "ROX"! «

The kit is supplied with **low ROX**. For use with real-time PCR instruments requiring high ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), add ROX to a final concentration of 1 µM to the 2x Probe Mix.

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 26 samples testing positive for a *CYP2D6* deletion / duplication with a reference method. The CYP2D6 RealFast™ CNV Assay determined all 26 samples as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 72 samples testing negative for a *CYP2D6* deletion / duplication with a reference method. The CYP2D6 RealFast™ CNV Assay determined all 72 samples as negative, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 0.5 ng genomic DNA (per reaction). Recommended DNA concentration: 2 to 20 ng/µl genomic DNA.

6. Materials Required but not Supplied

Real-time PCR instrument with FAM (520 nm) and HEX (556 nm) filters, instrument-compatible reaction vessels, disposable powder-free gloves, vortexer, mini-centrifuge for 2.0 ml tubes, tube racks, set of calibrated micropipettes (0.5 – 1000 µl), sterile tips with aerosol-barrier filter, molecular grade water, DNA extraction system, freezer, biohazard waste container.

7. Experimental Protocol

7.1. DNA Extraction

DNA extraction reagents are **not supplied** with the kit. The use of Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020) is recommended.

DNA isolated from various specimens (e.g. whole peripheral blood, buccal swabs) can be used. Ensure extracted DNA is suitable for amplification in terms of concentration, purity and integrity. For accurate analysis the DNA amount per reaction should be within the range of 10 to 100 ng for all samples.

7.2. No Template Control

Always include a **No Template Control** (NTC) in each experiment to confirm absence of potential contaminations. Use PCR-grade water instead of DNA.

7.3 CYP2D6 CNV Calibrator

Always include the CYP2D6 CNV **Calibrator**. The Calibrator (also "reference sample" or "control") has to be defined in the real-time PCR software.

» **Note:** Control samples like the CYP2D6 CNV Calibrator are potential sources of contamination. Make sure to handle them carefully«.

7.4. Replicates

In order to obtain the desired precision of measurements it is necessary to run the NTC, all samples and the Calibrator in **triplicate**.

7.5. Preparation of Master Mix

Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing. Set up PCR at room temperature. Prepare sufficient **Master Mix** for all replicates (3 x N samples + 3 x Calibrator + 3 x NTC) plus four to six additional reactions to compensate for pipetting inaccuracies:

Component	per reaction	e.g. 36 reactions
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	360 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Preparation of reactions in triplicate

Prepare the reactions for the NTC, all samples and the CYP2D6 CNV Calibrator. To appropriately sized tubes, add the volumes of master mix and sample listed below:

Tube	Master Mix Volume	Sample Name	Sample Volume
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Sample	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrator	16.5 µl

Mix gently and centrifuge the tubes briefly. Run your reactions in **triplicate** and dispense **20 µl** into the appropriate wells of the reaction vessels. To minimize risk of contaminations always pipette templates in the following order: first NTC, then samples, last Calibrator. Immediately close reaction vessels.

» **Note:** Avoid creating bubbles in the final reaction mix and avoid touching the optical surface of the cap or sealing film without gloves. Both may interfere with fluorescence measurements. Centrifuge briefly if needed. «

7.7. PCR Program

Program the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions for relative quantitation experiments.

Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P and other Peltier heating block-based instruments:

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	10 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Data acquisition on FAM- and HEX-channel

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	10 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C *for 36-well rotor use 56°C	1 min	Annealing/Extension – Data acquisition on Green and Yellow channel

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The **copy number variation** (CNV) of each sample is determined by calculating the relative quantity of **CYP2D6 (FAM-channel)** by means of the normalizer **EC (HEX-channel)** and comparing it to the CYP2D6 CNV **Calibrator**. Most real-time PCR software automatically resolve data of both channels into a bar chart of relative quantities which is normally used for gene expression experiments. The calibrator is set to one and normal samples will have relative quantities close to one, whereas duplications result in significantly higher values and deletions in significantly lower values. Due to potential measuring errors it is advisable to repeat test reactions which show relative quantities close (± 0.05) to the minimum and maximum for normal samples. A list containing instrument-specific terminology, threshold settings (Cq) and measuring range in relation to the CNV status is given below.

» **Note:** only the total number of CYP2D6 copies in the genome can be determined. A duplication on one chromosome and a deletion on the other chromosome cannot be identified by the assay, as such samples will appear as normal i.e. having two copies.

Homozygous deletions cause a dropout of the CYP2D6 signal in the FAM-channel. Only the signal for the endogenous control (EC) is detected in the HEX-channel.«

Real-time PCR Instrument	Threshold	Relative Quantities			Terminology
		Deletion	Normal	Duplication	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.76	0.76 - 1.27	> 1.27	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	< 0.75	0.75 - 1.18	> 1.18	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	FAM=1;HEX=2	< 0.69	0.69 - 1.15	> 1.15	Normalized Ratio (Basic Rel. Quant.)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.85	0.85 - 1.36	> 1.36	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.81	0.81 - 1.41	> 1.41	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.77	0.77 - 1.34	> 1.34	Relative Concentration

9. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostics use only.
- Always use disposable powder-free gloves and wear suitable lab coat when handling specimens and reagents.
- Perform reaction setup in an area separate from nucleic acid preparation and PCR product analysis.
- Use pipettes dedicated for PCR setup only, use aerosol-guarded pipette tips.
- Use instrument-compatible reaction vessels with optically clear caps or sealers.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use expired kits or kit components.

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

REF 7-420 Σ 100 Reaktionen
-30°C -15°C CE IVD



1. Verwendungszweck

Der CYP2D6 RealFast™ CNV Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion von Veränderungen der Kopienzahl (engl.: copy number variation, CNV) des *CYP2D6* Gens. Deletionen und Duplikationen des Gens verändern die Aktivität des Stoffwechsellzyms CYP2D6. Der Kit ermöglicht die Identifizierung einer heterozygoten oder homozygoten Deletion (*5 Allel) sowie einer Duplikation des *CYP2D6* Gens. Zur eindeutigen Bestimmung des Metabolizer-Status sollte der Kit zusammen mit dem PGX-CYP2D6 XL StripAssay® oder DNA Sequenzierung verwendet werden. Der semi-quantitative Test unterscheidet zwischen Deletionen, Duplikationen und normaler Kopienzahl in einem humanen DNA-Extrakt. Referenzsequenz: HGVS: NG_008376.3

2. Einleitung

Zahlreiche Medikamente, wie z.B. Tamoxifen, Opiate, Antidepressiva oder Antipsychotika werden durch das Enzym CYP2D6 verstoffwechselt. Neben verschiedenen Punktmutationen beeinflussen Änderungen in der Kopienzahl des *CYP2D6* Gens die Enzymaktivität und folglich die Medikamentenwirksamkeit. Fehlende (homozygote Deletion), verringerte (eine Kopie) oder verstärkte (Duplikation) Enzymaktivität entsprechend dem Phänotyp eines „poor“ (PM), „intermediate“ (IM) oder „ultrarapid“ (UM) Metabolizer. Gemäß dem Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) und den Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) Richtlinien sollte vor der Verabreichung der darin angeführten Medikamente der CYP2D6 Genotyp des Patienten bestimmt werden, um damit die Verstoffwechslung und in Folge die Wirksamkeit sowie Nebenwirkungen abschätzen zu können (www.pharmgkb.org).

3. Kit Bestandteile

RealFast™ 2x Probe Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> weisser Deckel	1.000 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> violetter Deckel	550 µl
CYP2D6 CNV Calibrator	1 Vial	<input type="checkbox"/> grüner Deckel	75 µl

Der RealFast™ 2x Probe Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffer. Der CYP2D6 CNV Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern und zwei allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolysesonden für *CYP2D6* und das endogene Kontrollgen (EC). Weiters ist ein CYP2D6 CNV Calibrator, der den Normalzustand von zwei intakten *CYP2D6* Kopien repräsentiert, im Kit vorhanden.

Der Kit beinhaltet Reagenzien für 100 Reaktionen mit je 20 µl Endvolumen.

4. Lagerung und Stabilität

Der CYP2D6 RealFast™ CNV Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°C, oder bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2 bis 8°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 20 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

5. Produktbeschreibung

5.1. Testprinzip

Der Test basiert auf dem fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, bekannt auch als TaqMan®-Assay. Jede Reaktion enthält genspezifische Primerpaare zur Amplifizierung eines je 141 bp großen Genfragments für *CYP2D6* und die endogene Kontrolle (EC), sowie zwei doppelt-markierte, genspezifische Hydrolysesonden (**FAM-markierte CYP2D6-Sonde** und **HEX-markierte EC-Sonde**), die an die Zielsequenzen der amplifizierten Fragmente binden. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist. Der CYP2D6 RealFast™ CNV Assay ist ein Test zur relativen Quantifizierung und vergleicht die Menge an PCR-Produkt der beiden Zielsequenzen (*CYP2D6* und EC) in Relation zum CYP2D6 CNV Calibrator. Das EC-Gen wird zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals in allen Proben herangezogen und dient zudem als PCR Positivkontrolle.

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der CYP2D6 RealFast™ CNV Assay ist für die Verwendung mit dem AB 7500 Fast Gerät validiert.

Der Kit ist mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM- and HEX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

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

» **Anmerkung:** RealFast™ CNV QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: www.viennalab.com.

Bei Verwendung von AB 7500 Fast, StepOne™ oder Mx3005P muss der passive Referenzfarbstoff auf "ROX" gesetzt werden! «

Der Kit enthält **low ROX**. Bei Verwendung von real-time PCR Geräten, die eine hohe ROX- Konzentration zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), muss ROX in einer Endkonzentration von 1 µM dem 2x Probe Mix zugefügt werden.

5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 26 Proben, die mit einer Referenzmethode positiv auf die *CYP2D6* Deletion / Duplikation getestet wurden, bestimmt. Der CYP2D6 RealFast™ CNV Assay typisierte alle 26 Proben als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 72 Proben, die mit einer Referenzmethode negativ auf die *CYP2D6* Deletion / Duplikation getestet wurden, bestimmt. Der CYP2D6 RealFast™ CNV Assay typisierte alle 72 Proben als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.5 ng genomische DNA (pro Reaktion). Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 20 ng/µl genomische DNA.

6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM-(520 nm) und HEX-(556 nm) Filter, gerätekompatible optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipetten-spitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionskit, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter.

7. Arbeitsanleitung

7.1. DNA Extraktion

DNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten. Es wird empfohlen den Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020) zu verwenden. DNA aus verschiedenen Proben (z.B. Vollblut oder Wangenabstriche) kann verwendet werden. Gereinigte DNA muss für die Amplifizierung in hochmolekularer Form sowie in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen. Für eine zuverlässige Analyse sollte die DNA Menge pro Reaktion für alle Proben zwischen 10 und 100 ng liegen.

7.2. No Template Control

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** eine **No Template Control (NTC)** zur Kontrolle potentieller Kontaminationen mit ein. Es ist empfehlenswert hochreines Wasser anstelle von DNA einzusetzen.

7.3 CYP2D6 CNV Calibrator

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** den CYP2D6 CNV **Calibrator** mit ein. Der Kalibrator (auch "Reference Sample" oder "Control") muss in der jeweiligen real-time PCR Software definiert werden.

» **Anmerkung:** Kontrollproben wie der CYP2D6 CNV Calibrator stellen potentielle Kontaminationsquellen dar und müssen daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

7.4. Replikate

Um die gewünschte Messgenauigkeit zu erreichen, ist es notwendig alle Kontrollen, Proben und den Kalibrator als **Triplikate** anzusetzen.

7.5. Vorbereitung des Master Mixes

Alle Lösungen komplett auftauen, vorsichtig mischen und kurz abzentrifugieren. Das Ansetzen der PCR erfolgt bei Raumtemperatur. Bereiten Sie ausreichend **Master-Mix** für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze (3 x N Proben + 3 x CYP2D6 CNV Calibrator + 3 x NTC) vor, und berechnen Sie mindestens vier bis sechs zusätzliche Reaktionen ein um Pipettiergenauigkeiten auszugleichen:

Komponente	pro Reaktion	z.B. 36 Reaktionen
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	360 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Vorbereitung der Reaktionen in Triplikaten:

Bereiten Sie die Reaktionen für NTC, alle Proben und den CYP2D6 CNV Calibrator vor. Pipettieren Sie das unten angeführte Volumen an Master Mix und Proben in ein geeignetes Röhrchen:

Probe	Volumen Master Mix	Name Probe	Volumen Probe
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Sample	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrator	16.5 µl

Mischen und zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz. Setzen Sie die Reaktionen als **Triplikate** an und geben Sie je **20 µl** in die passenden Gefäße der Reaktionsplatte. Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos pipettieren Sie die Proben in dieser Reihenfolge: Zuerst NTC, danach Ihre Proben, zuletzt den CYP2D6 CNV Calibrator. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

» **Anmerkung:** Vermeiden Sie Luftblasen im PCR-Ansatz und Fingerabdrücke auf den optischen Oberflächen der Reaktionsgefäße. Beides kann die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. «

7.7. PCR Programm

Programmieren Sie Ihr real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für Experimente zur "relativen Quantifizierung". Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P und andere Peltier-Heizblock-basierende Geräte:

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	10 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	1 min	Annealing/Extension - Datenaufnahme im FAM- und HEX-Kanal

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	10 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C *)für 36-well Rotor: 56°C	1 min	Annealing/Extension – Datenaufnahme im Green und Yellow channel

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Die Variation der **Kopienzahl (CNV)** wird über eine relative Quantifizierung von **CYP2D6 (FAM-Kanal)** mittels Normalisierung durch die endogene Kontrolle **EC (HEX-Kanal)** und anschließendem Vergleich mit dem CYP2D6 CNV **Calibrator** erreicht. Die meisten real-time PCR Auswertprogramme stellen die Daten beider Kanäle automatisch als Tabelle dar, welche normalerweise der relativen Quantifizierung bei Genexpressions-Experimenten dient. Der Kalibrator wird auf Eins gesetzt und normale Proben werden relative Mengen um Eins zeigen, wohingegen Duplikationen in signifikant höhere Werte, und Deletionen in signifikant niedrigere Werte resultieren. Aufgrund der Möglichkeit von Messfehlern ist es empfehlenswert Reaktionen, die relative Mengen nahe (± 0.05) des Minimums und Maximums für normale Proben zeigen, zu wiederholen. Eine Liste mit instrumentenspezifischer Terminologie, Threshold Einstellungen (Cq) und Messbereich in Bezug auf den CNV Status ist unten angeführt.

» **Anmerkung:** Es wird lediglich die Anzahl der vorhandenen CYP2D6 Kopien im Genom bestimmt. Proben, die eine Duplikation auf einem Chromosom und eine Deletion auf dem anderen Chromosom aufweisen, können nicht identifiziert werden. Bei derartigen Proben würde das Ergebnis 2 Kopien entsprechen.

Homozygote Deletionen verursachen einen Ausfall des Signals für CYP2D6 im FAM-Kanal. Es kann nur das Signal für die endogene Kontrolle (EC) im HEX-Kanal detektiert werden. «

Real-time PCR Instrument	Schwellenwert	Relative Mengen			Terminologie
		Deletion	Normal	Duplikation	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.76	0.76 - 1.27	> 1.27	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	< 0.75	0.75 - 1.18	> 1.18	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	FAM=1;HEX=2	< 0.69	0.69 - 1.15	> 1.15	Normalized Ratio (Basic Rel. Quant.)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.85	0.85 - 1.36	> 1.36	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.81	0.81 - 1.41	> 1.41	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.77	0.77 - 1.34	> 1.34	Relative Concentration

9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist ausschließlich für *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Tragen Sie beim Hantieren der Proben und Reagenzien immer puderfreie Einweghandschuhe und geeignete Laborkleidung.
- Bereiche für die DNA Extraktion und den Ansatz des PCR Mastermixes sollten räumlich streng getrennt sein.
- Benützen Sie ein eigenes Pipettenset nur für den PCR-Ansatz und verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Benützen Sie ausschließlich dünnwandige, gerätekompabile PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.

CYP2D6 RealFast™ CNV 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 RealFast™ Assay CYP2D6 est un test PCR rapide et précis en temps réel pour déterminer les altérations du nombre de copies (anglais : copy number variation, CNV) du gène *CYP2D6*. Les délétions et les duplications du gène altèrent l'activité de l'enzyme métabolique. Le kit permet d'identifier une délétion homozygote ou hétérozygote (allèle *5) tout comme la duplication du gène *CYP2D6*. Pour un résultat sans équivoque du statut métabolique, le kit doit être utilisé conjointement avec le StripAssay® PGX-CYP2D6 XL ou le séquençage ADN. Le test semi-quantitatif distingue les délétions, les duplications et le nombre normal de copies dans un extrait d'ADN humain.

Séquence de référence: HGVS: NG_008376.3

2. Introduction

De nombreux médicaments, comme par ex. les tamoxifènes, les opiacés, les antidépresseurs ou bien encore les antipsychotiques sont métabolisés grâce à l'enzyme CYP2D6. En plus de différents polymorphismes nucléotidiques, les variations dans le nombre de copies du gène influencent l'activité de l'enzyme et ainsi l'efficacité du médicament. Une activité enzymatique faisant défaut (délétion homozygote), affaiblie (une copie) ou bien renforcée (duplication) correspondent au phénotype d'un métaboliseur «pauvre» (PM), «intermédiaire» ou bien «ultrarapide» (UM). Conformément aux directives du Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) et du Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) il faudrait déterminer le statut métaboliseur CYP2D6 du patient avant de lui administrer le médicament afin de pouvoir estimer sa métabolisation et par conséquent son efficacité et ses effets secondaires (www.pharmgkb.org).

3. Composants du kit

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial	<input type="checkbox"/> couvercle blanc	1000 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	1 vial	<input type="checkbox"/> couvercle violet	550 µl
CYP2D6 CNV Calibrator	1 vial	<input type="checkbox"/> couvercle vert	75 µl

Le RealFast™ 2x Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le CYP2D6 CNV Assay Mix se compose de primers géno-spécifiques tout comme de deux sondes d'hydrolyse spécifique d'allèle munie d'un double marqueur et d'un gène témoin endogène (EC). Le kit renferme en plus un CYP2D6 CNV Calibrator représentant l'état normal de deux copies intactes du *CYP2D6*.

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

4. Stockage et stabilité

Le CYP2D6 RealFast™ CNV Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception de -30 à -15°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 géno-spécifiques pour amplifier un fragment de *CYP2D6* de chacun 141 bp et un fragment du gène témoin endogène (EC) de 141 bp, ainsi que deux sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques (la sonde **marquée FAM CYPD6** et la sonde de **contrôle EC marquée HEX**), qui s'hybrident à la séquence cible du fragment amplifié. La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' inhibe la fluorescence sur la sonde intacte. 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. Le CYP2D6 RealFast™ CNV Assay est un test de quantification relative et compare le nombre de séquences cibles d'acide nucléique (*CYP2D6* et EC) par rapport au CYP2D6 CNV Calibrator. Le gène témoin EC est utilisé pour normaliser la fluorescence entre les différents échantillons et sert de contrôle positif à la PCR.

5.2. Compatibilité avec les appareils de la PCR en temps réel

Le CYP2D6 RealFast™ CNV 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)
- ✓ MIC qPCR Cyclers (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Remarque:** RealFast™ CNV 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 7500 Fast, le StepOne™ ou le Mx3005P, il faut mettre le colorant de référence passif sur "ROX" ! «

Le kit est livré du **low 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 Probe Mix.

5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 26 échantillons qui ont été testées positives à la délétion / duplication CYP2D6 à partir d'une méthode de référence. Le test CYP2D6 RealFast™ CNV a typé positives 26 échantillons, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 72 échantillons, qui ont été testées négatives à la délétion / duplication CYP2D6 à partir d'une méthode de référence. Le test CYP2D6 RealFast™ CNV a typé négatives 72 échantillons, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

Limite de détection: 0.5 ng ADN génomique (par réaction). Concentration d'ADN recommandée: 2 to 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. Il est recommandé d'utiliser le kit Spin Micro DNA Extraction (REF 2-020).

L'ADN isolé à partir de différents échantillons (par ex. sang total, gouttes de sang séché) 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. No Template Control

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.

7.3 CYP2D6 CNV Calibrator

Incluez **toujours** le CYP2D6 CNV **Calibrator**. Le calibreur (aussi « échantillon de référence » ou de « contrôle ») doit être défini dans le logiciel de la PCR en temps réel.

» **Remarque:** les échantillons de contrôle comme le CYP2D6 CNV Calibrator représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

7.4. Repliques

Afin d'obtenir la précision souhaitée, il est nécessaire d'effectuer le NTC, tous les échantillons et le calibreur en **trois exemplaires**.

7.5. Préparation du Master Mix:

Centrifugez toutes les solutions après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master Mix** pour l'ensemble des amorces PCR prévues (3 x N échantillons + 3 x calibreur + 3 x NTC), comptez quatre à six réactions supplémentaires pour compenser une imprécision de pipetage:

Composant	par réaction	Par ex. 36 réactions
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	360 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Préparation des réactions en triple exemplaire:

Préparez les réactions pour le NTC, tous les échantillons et le CYP2D6 CNV Calibrator. Pipetez les volumes indiqués ci-dessous de Master Mix et d'échantillons dans des godets de taille appropriée:

Tube	Volume du Master Mix	Nom de l'échantillon	Volume de l'échantillon
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Sample	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrator	16.5 µl

Mélangez et centrifugez les tubes brièvement. Effectuez vos réactions en **triple exemplaire** et ajoutez **20 µl** dans les récipients appropriés de la plaque de réaction. Pour minimiser les risques de contamination, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite vos échantillons, et finalement le Calibrator. 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 brièvement si nécessaire. »

7.7. Programme de la PCR

Programmez la machine PCR en temps réel comme indiqué par le fabricant pour « quantification relative ». 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	10 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Réception de données dans le canal FAM et HEX

MIC qPCR Cyclor, Rotor-Gene® 6000*):

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	10 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation
	60°C <i>*)pour 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension – Réception de données dans le canal Green et Yellow

8. Analyse des données / interprétation des résultats

La **variabilité du nombre de copies (CNV)** de chaque échantillon est déterminée en calculant la quantité relative de **CYP2D6 (canal-FAM)** au moyen de la normalisation par le contrôle endogène **EC (canal-HEX)** et en comparant ensuite au CYP2D6 CNV **Calibrator**. La plupart des programmes d'évaluation PCR en temps réel représentent automatiquement les données issues des deux canaux sous forme de graphique servant normalement à la quantification relative lors d'expériences sur l'expression génétique. Le calibreur est mis sur un et les échantillons normaux auront des quantités relatives proches de un, tandis que les duplications apparaissent dans des valeurs bien plus élevées et les délétions dans des valeurs bien plus basses. En raison d'éventuelles erreurs de mesure il est recommandé de répéter les réactions qui ont des quantités relatives proches du minimum et du maximum (± 0.05) pour les échantillons normaux. Vous trouverez ci-dessous une liste avec la terminologie spécifique à chaque appareil, le réglage du seuil (Cq) et la plage de mesure par rapport au statut CNV.

« **Remarque:** seul le nombre de copies CYP2D6 dans le génome peut être déterminé. Les échantillons qui montrent une duplication sur un chromosome et une délétion sur un autre ne peuvent pas être identifiés. Pour de tels échantillons le résultat correspondrait à 2 copies. Les délétions homozygotes provoquent la défaillance du signal pour CYP2D6 dans le canal FAM. Seul le signal pour le contrôle endogène (EC) dans le canal HEX peut être détecté. »

Machines PCR en temps réel	Seuil	Quantités relatives			Terminologie
		Délétion	Normal	Duplication	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.76	0.76 - 1.27	> 1.27	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatique	< 0.75	0.75 - 1.18	> 1.18	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	FAM=1;HEX=2	< 0.69	0.69 - 1.15	> 1.15	Normalized Ratio (Basic Rel Quant)
MIC qPCR Cyclor (bms)	automatic	< 0.85	0.85 - 1.36	> 1.36	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.81	0.81 - 1.41	> 1.41	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.77	0.77 - 1.34	> 1.34	Relative Concentration

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 ou de composants de kit périmés.

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

REF 7-420



100 reazioni



-30°C -15°C



1. Utilizzo

Il CYP2D6 RealFast™ CNV Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione delle variazioni del numero di copie (CNV) del gene *CYP2D6*. Le delezioni e le duplicazioni di questo gene sono associate a un'alterata attività dell'enzima CYP2D6 che metabolizza il farmaco. Il kit è disegnato per l'individuazione di pazienti con delezioni in eterozigosi e in omozigosi (allele *5) o con duplicazioni del gene *CYP2D6*. Per la determinazione completa dello status di metabolizzatore, va utilizzato in abbinamento al CYP2D6 XL StripAssay® o alla sequenziamento del DNA. Il test semiquantitativo discrimina tra delezioni, duplicazioni e numero normale di copie in un estratto di DNA genomico umano.

Sequenza di riferimento: HGVS: NG_008376.3

2. Introduzione

Diversi farmaci come il tamoxifene, gli oppiacei, gli antidepressivi o gli antipsicotici sono metabolizzati dall'enzima CYP2D6. Oltre a vari polimorfismi a singolo nucleotide, le variazioni nel numero di copie del gene CYP2D6 sono responsabili di un'alterata attività enzimatica che di frequente causa reazioni farmacologiche inefficaci o avverse. I fenotipi che non mostrano alcuna funzione enzimatica (delezione in omozigosi), o che mostrano una funzione enzimatica ridotta (una copia) o aumentata (duplicazione) costituiscono rispettivamente dei metabolizzatori deboli (PM), intermedi (IM) o ultrarapidi (UM). Secondo le linee guida del Consorzio per l'attuazione della farmacogenetica clinica (CPIC) e del Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), lo stato metabolizzante CYP2D6 del paziente andrebbe determinato prima di prescrivere certi farmaci (consultare www.pharmgkb.org).

3. Contenuto del kit

RealFast™ 2x Probe Mix 1 fiala □ tappo bianco 1000 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix 1 fiala ■ tappo viola 550 µl
CYP2D6 CNV Calibrator 1 fiala ■ tappo verde 75 µl

Il kit contiene reagenti per 100 reazioni in un volume finale di 20 µl ciascuno.

Il RealFast™ 2x Probe Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato. Il CYP2D6 CNV Assay Mix consiste di primer specifici per il gene e di sonde di idrolisi a doppia etichetta per *CYP2D6* e il gene di controllo endogeno (EC). Insieme al kit viene fornito un CYP2D6 CNV Calibrator che rappresenta lo stato normale con due copie del gene *CYP2D6* funzionali.

4. Conservazione e stabilità

Il CYP2D6 RealFast™ CNV Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit da -30 a -15°C. In alternativa, il kit può essere conservato a una temperatura tra i 2 °C e gli 8 °C per un uso a breve termine entro un mese. Il kit sopporta fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza perdita di attività. Evitare un'esposizione prolungata a luce intensa. Se conservato in modo adeguato, il kit manterrà piena attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

5. Descrizione del prodotto

5.1. Principio del Test

Il test è basato sul saggio fluorogenico della 5' nucleasi, anche denominato TaqMan® assay. Ciascuna reazione contiene coppie di primer gene-specifici che amplificano frammenti di 141 bp del gene *CYP2D6* e del gene di controllo endogeno (EC). Altre componenti includono due sonde di idrolisi gene-specifiche a doppia etichetta, la **sonda CYP2D6 marcata con FAM** e la **sonda EC marcata con HEX**, che ibridano con una sequenza interna dei frammenti amplificati. La prossimità del reporter fluorescente in 5' e del quencher colorante in 3' quench sulle sonde intatte induce la soppressione della fluorescenza del reporter. Durante la fase di estensione della PCR, l'attività 5' – 3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi cliva il reporter fluorescente in 5' dalla sonda ibridata. La separazione fisica del fluoroforo dal quencher colorante genera un segnale fluorescente in tempo reale, che è proporzionale al prodotto della PCR accumulato.

Il CYP2D6 RealFast™ CNV Assay è un metodo di quantificazione relativa che confronta la quantità di entrambi i target di acido nucleico (*CYP2D6* ed EC) in rapporto al CYP2D6 CNV Calibrator. Il gene EC ha lo scopo di normalizzare i segnali di fluorescenza tra campioni diversi e funge da controllo positivo per la PCR.

5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

Il CYP2D6 RealFast™ CNV Assay è validato per l'utilizzo con lo strumento AB 7500Fast.

Il kit è compatibile con vari strumenti comuni Real-time PCR in grado di registrare la fluorescenza FAM e HEX:

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

» **Note:** Le RealFast™ CNV QuickGuide per l'allestimento e l'analisi di esperimenti su strumenti di tipo diverso possono essere scaricate dal sito www.viennalab.com.

Qualora si utilizzi l'AB 7500 Fast, StepOne™ o Mx3005P, impostare il colorante di riferimento su "ROX"! «

Poiché viene fornito con **basso ROX**, per utilizzare il kit con strumenti Real-time PCR che richiedono un ROX elevato per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), aggiungere ROX in una concentrazione finale di 1 µM al 2x Probe Mix.

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 26 campioni risultati positivi per la delezione/duplicazione del gene *CYP2D6* con un metodo di riferimento. Il CYP2D6 RealFast™ CNV Assay ha determinato la positività di tutti i 26 campioni, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 72 campioni risultati negativi per una delezione/duplicazione del gene *CYP2D6* con un metodo di riferimento. Il CYP2D6 RealFast™ CNV Assay ha determinato la negatività di tutti i 72 campioni, con una percentuale di veri negativi pari al 100%.

Limite di rilevazione: 0.5 ng di DNA genomico (per reazione). Concentrazione di DNA raccomandata: da 2 a 20 ng/µl di DNA genomico.

6. Materiali richiesti ma non forniti

Strumento Real-time PCR con filtri FAM (520 nm) e HEX (556 nm), contenitori di reazione compatibili con lo strumento, quantoi monouso senza polvere, vortex, minicentrifuga per provette da 2.0 ml, portaprovette, set di micropipette calibrate (0.5 – 1000 µl), punte sterili con filtro barriera antiaerosol, acqua di grado molecolare, sistema per l'estrazione del DNA, congelatore, contenitore per rifiuti biologici.

7. Protocollo sperimentale

7.1. Estrazione del DNA

I reagenti per l'estrazione del DNA **non sono forniti** con il kit. Si raccomanda l'uso dello Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020).

E' possibile utilizzare DNA isolato da campioni diversi (per es. sangue periferico intero, campioni di sangue secco). Accertarsi che il DNA estratto sia idoneo per l'amplificazione dal punto di vista della concentrazione, della purezza e dell'integrità. Per un'accurata analisi, la quantità di DNA per reazione dev'essere compresa tra 10 e 100 ng per tutti i campioni.

7.2. No Template Control

Includere **sempre** un **No Template Control** (NTC) in ciascun esperimento per confermare l'assenza di potenziali contaminazioni. Utilizzare acqua di grado PCR invece di DNA.

7.3 CYP2D6 CNV Calibrator

Includere **sempre** il CYP2D6 CNV **Calibrator** (anche denominato "campione di riferimento" o "controllo") che va definito nel software real-time PCR.

» **Nota:** I campioni di controllo come il CYP2D6 CNV Calibrator costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Accertarsi di maneggiarli con cautela«.

7.4. Repliche

Al fine di ottenere la desiderata precisione delle misurazioni è necessario eseguire l'NTC, tutti i campioni e il calibratore in **tre repliche**.

7.5. Preparazione del Master Mix

Una volta scongelate, vortexare leggermente e centrifugare brevemente tutte le soluzioni. Allestire la PCR a temperatura ambiente. Preparare una quantità di **Master Mix** che sia sufficiente per tutte le repliche (3 x N campioni + 3 x calibratore + 3 x NTC) nonché da quattro a sei reazioni aggiuntive per rimediare a eventuali imprecisioni nel pipettaggio:

Componente	per reazione	Per es. 36 reazioni
RealFast™2x Probe Mix	10 µl	360 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Preparazione delle reazioni in triplice copia:

Preparare le reazioni per l'NTC, tutti i campioni e il CYP2D6 CNV Calibrator. In provette di dimensione adeguata, versare i volumi di Master Mix e di campione specificati qui di seguito:

Provetta	Volume di Master Mix	Nome del campione	Volume del campione
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Campione	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrator	16.5 µl

Mescolare delicatamente e centrifugare brevemente le provette. Eseguire le reazioni in **triplice copia** e dispensarne **20 µl** negli appropriati pozzetti dei contenitori di reazione. Al fine di minimizzare il rischio di contaminazioni, pipettare sempre i template nell'ordine seguente: prima l'NTC, quindi i campioni e per ultimo il calibratore. Chiudere immediatamente i contenitori di reazione.

» **Nota:** Evitare la creazione di bolle nel mix di reazione finale ed evitare di toccare la superficie ottica del tappo o la pellicola sigillante senza guanti. Entrambi possono interferire con le misurazioni della fluorescenza. Centrifugare brevemente se necessario. «

7.7. Programma della PCR

Programmare lo strumento real-time PCR in base alle istruzioni del produttore per gli esperimenti di quantificazione relativa. Collocare i campioni nel termociclatore e svolgere il seguente programma:

AB 7500Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler®480, Mx3005P e altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento:

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	95°C	10 min	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione
	60°C	1 min	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nel canale FAM e HEX

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	95°C	10 min	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione
	60°C *per 36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nel canale Green e Yellow

8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

La **variazione del numero di copie** (CNV) di ciascun campione viene determinata calcolando la quantità relativa del gene **CYP2D6 (canale FAM)** mediante il normalizzatore **EC (canale HEX)** e confrontandola con il CYP2D6 CNV **Calibrator**. La maggior parte del software Real-time PCR traduce automaticamente i dati di entrambi i canali in un diagramma a barre di quantità relative utilizzato normalmente per gli esperimenti di espressione genica. Il calibratore viene impostato sul valore uno e i campioni normali avranno quantità relative vicine a uno, mentre le duplicazioni portano a valori significativamente più elevati e le delezioni a valori significativamente più bassi. A causa dei potenziali errori di misurazione, si raccomanda di ripetere le reazioni di test che mostrino quantità relative vicine (± 0.05) al valore minimo e massimo per i campioni normali. Qui di seguito è disponibile una lista con la terminologia relativa agli strumenti, le impostazioni del valore di soglia (Cq) e i range delle misurazioni relative allo stato di CNV.

» **Nota:** è possibile determinare soltanto il numero totale delle copie di CYP2D6 nel genoma. Il test non è in grado di identificare una duplicazione in un cromosoma e una delezione nell'altro cromosoma, poiché tali campioni appaiono normali, ovvero aventi due copie. Le delezioni omozigote provocano una caduta del segnale CYP2D6 nel canale FAM. Nel canale HEX è rilevato soltanto il segnale del controllo endogeno (EC). «

Strumento Real-time PCR	Soglia	Quantità relative			Terminologia
		Delezione	Normale	Duplicazione	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.76	0.76 - 1.27	> 1.27	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatica	< 0.75	0.75 - 1.18	> 1.18	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	FAM=1;HEX=2	< 0.69	0.69 - 1.15	> 1.15	Normalized Ratio (Basic Rel Quant)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.85	0.85 - 1.36	> 1.36	Expression Rate
Mx3005P (Agil. Technol.)	0.2	< 0.81	0.81 - 1.41	> 1.41	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene®6000 (Qiagen)	0.05	< 0.77	0.77 - 1.34	> 1.34	Relative Concentration

9. Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Indossare sempre guanti monouso senza polvere e un camice da laboratorio appropriato quando si maneggiano campioni e reagenti.
- Allestire la reazione in un'area separata da quella della preparazione dell'acido nucleico e dell'analisi del prodotto della PCR.
- Utilizzare pipette dedicate soltanto all'allestimento della PCR, avvalersi di punte per pipette provviste di barriera antiaerosol.
- Utilizzare contenitori di reazione compatibili con lo strumento provvisti di tappi otticamente trasparenti o di pellicole sigillanti.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare kit, o componenti di kit, scaduti.

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay

REF 7-420 Σ 100 reacciones
-30°C -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Aplicación

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección de cambios del número de copia (ingl.: copy number variation, CNV) del gen CYP2D6. Deleciones y duplicaciones del gen varían la actividad de la enzima metabólica CYP2D6. El kit permite la identificación de una deleción homocigótica o heterocigótica (* 5 alelo), así como una duplicación del gen CYP2D6. Para la determinación inequívoca del estado metabolizador el kit debe utilizarse junto con el PGX-CYP2D6 XL StripAssay® o secuenciación de ADN. La prueba semi-cuantitativa distingue entre deleciones, duplicaciones y número de copias normales en un extracto de ADN humano. Secuencia de referencia: HGVS: NG_008376.3

2. Introducción

Muchos fármacos, tales como el tamoxifeno, opiáceos, antidepresivos o fármacos antipsicóticos son metabolizados por la enzima CYP2D6. Además de las diversas mutaciones puntuales los cambios pueden afectar al número de copias de la actividad enzimática del gen CYP2D6 y por tanto la eficacia del fármaco o provocar reacciones adversas a los medicamentos.

Los fenotipos que muestran una función enzimática faltante (homozygote Deletion) disminuida (una copia) o aumentada (duplicación) constituyen metabolizadores pobres (PM), intermedios (IM) o ultrarápidos (UM), respectivamente. Según las directrices del Consorcio de Implementación Farmacogenética Clínica (CPIC) y del Grupo de Trabajo Farmacogenética Holandés (DPWG) debe determinarse el genotipo CYP2D6 del paciente antes de la prescripción de los fármacos indicados, con el fin de valorar el metabolismo y en consecuencia la efectividad, así como los efectos secundarios. (www.pharmgkb.org)

3. Componentes del kit

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial	<input type="checkbox"/> tapón blanco	1000 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	1 vial	<input type="checkbox"/> tapón violeta	550 µl
CYP2D6 CNV Calibrator	1 vial	<input type="checkbox"/> tapón verde	75 µl

El RealFast™ 2x Probe Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tapón o buffer. El CYP2D6 CNV Assay Mix consta de primers específicos del gen y dos sondas de hidrólisis doblemente marcadas para CYP2D6 específicas de alelo y el gen de control endógeno (CE). Además el kit tiene un CYP2D6 CNV Calibrator, que representa el estado normal de dos copias intactas de CYP2D6.

El kit contiene reactivos para 100 reacciones con cada 20 µl de volumen final.

4. Almacenamiento y estabilidad

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay se suministra sobre bloques de refrigeración. Conserve el kit de -30 a -15°C después de su adquisición o bien durante su utilización durante el transcurso de un mes a una temperatura de 2 a 8°C. Los reactivos sobreviven sin pérdida de actividad hasta 20 ciclos de congelación/ descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz directa. Cuando se conserva correctamente, el kit mantiene su funcionalidad hasta la fecha de caducidad indicada.

5. Descripción del producto

5.1. Principio de la prueba

La prueba se basa en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica también conocida como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene un par de primers (cebadores) específicos de gen para la amplificación de un fragmento de gen por 141 pb para CYP2D6 y control endógeno (CE), así como también dos sondas de hidrólisis específicamente de gen, doblemente marcadas (FAM-marcada CYP2D6-Sonda y HEX-marcada CE-Sonda), que se enlazan a las secuencias de objetivo de los fragmentos amplificados. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' - 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del quencher produce una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

El CYP2D6 RealFast™ CNV Assay es una prueba para la cuantificación relativa y compara la cantidad de producto de PCR de las dos secuencias de objetivo (CYP2D6 y CE) en relación con el CYP2D6 CNV Calibrator. El gen CE se utiliza para normalizar la señal de fluorescencia en todas las muestras y además sirve como un control de positivo PCR.

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay ha sido validado para su uso con el dispositivo fast 7500.

El kit es compatible con diferentes aparatos usuales de PCR en tiempo real, que puedan detectar fluorescencia FAM y HEX:

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

» **Nota:** RealFast CNV QuickGuides para la programación y evaluación de RealFast™ Assays en diferentes aparatos están disponibles para su descarga en www.viennalab.com.

¡Al utilizar AB 7500 Fast, StepOne™ o Mx3005P el colorante de referencia pasivo debe ponerse a "ROX"! «

El kit contiene **low ROX**. El uso de dispositivos de PCR en tiempo real, que requieren una alta concentración de ROX para normalizar los datos (por.ej.: Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), ROX tiene que ser añadido a una concentración final de 1 µM al 2x Probe Mix.

5.3. Especificaciones de la prueba

La **sensibilidad** se basa en 26 muestras, que fueron probados con un método de referencia positiva sobre la CYP2D6 deleción / duplicación. CYP2D6 RealFast™ CNV Assay tipificó las 26 muestras como positivo = 100% correcto- positivo- tanto por ciento.

La **especificidad** se basa en 72 muestras, que fueron probados con un método de referencia negativa sobre la CYP2D6 deleción / duplicación. CYP2D6 RealFast™ CNV Assay tipificó las 72 muestras como negativo = 100% correcto- negativo- tanto por ciento.

Límite de detección: 0.5 ng de ADN genómico (por reacción). Concentración de ADN recomendada: de 2 a 20 ng/µl de ADN genómico

6. Materiales necesarios, pero no proporcionados

El aparato PCR en tiempo real con filtro FAM (520 nm) y HEX (556 nm), recipientes PCR compatibles con aparatos ópticos, guantes desechables sin polvo, agitador tipo vórtex, mini centrífuga para 2.0 ml tubos, bastidor de tubos, juego de micro pipetas calibradas (0.5 - 1 000 µl), puntas de pipeta estériles con filtros de aerosol, agua de gran pureza, sistema de extracción de ADN, refrigerador o congelador, contenedor de residuos.

7. Instrucciones

7.1. Extracción ADN

Reactivos de extracción de ADN **no se incluyen en el kit**. Se recomienda el uso de Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020). Se puede utilizar ADN de diferentes muestras (por ejemplo, sangre total, tarjetas de sangre). El ADN purificado debe estar disponible para la amplificación de forma altamente molecular y en cantidad y pureza suficientes. Para determinar el genotipo fiable la cantidad de ADN por reacción para todas las pruebas debe ser entre 10 y 100 ng.

7.2. No Template Control

Incluya en cada ejecución **siempre** un **No Template Control** (NTC) para controlar la posibilidad de una contaminación potencial. Se recomienda utilizar agua ultra pura en lugar de ADN.

7.3 CYP2D6 CNV Calibrator

Incluya en cada ejecución **siempre** el CYP2D6 CNV **Calibrator**. El calibrador (también llamado "Reference Sample" o "Control") debe definirse en el correspondiente software PCR en tiempo real.

»**Nota:** Las pruebas de control como el CYP2D6 CNV Calibrator representan un fuente de contaminación en potencia y por lo tanto deben manejarse con mucho cuidado. «

7.4. Réplicas

Para lograr la exactitud de la medida deseada, es necesario realizar todos los controles, las muestras y el calibrador por **triplicado**.

7.5. Preparación de Master Mix

Descongelar completamente todas las soluciones, mezclar con cuidado y centrifugar brevemente. La preparación de PCR debe llevarse a cabo a temperatura ambiente. Preparar suficiente **Master Mix** para el número total del depósito de PCR planificado (3 x N pruebas + 3 x Calibrator + 3 x NTC), y calcular al menos de cuatro a seis reacciones adicionales para nivelar inexactitudes del pipeteando:

Componentes	por reacción	p. ej. 36 reacciones
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	360 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Preparación de las reacciones por triplicado

Prepare las reacciones para NTC, todas las muestras y el CYP2D6 CNV Calibrator. Pipetear el volumen abajo indicado al Master Mix y la muestra en un tubo adecuado:

Prueba	Volumen Master Mix	Nombre prueba	Volumen prueba
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Sample	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrator	16.5 µl

Mezcle y centrifugue los tubos brevemente. Ponga las reacciones por **triplicado** e introduzca **20 µl** en cada receptáculo adecuado de la placa de reacción. Para minimizar el riesgo de contaminación, pipetee las muestras en este orden: en primer lugar NTC, después sus muestras y por último CYP2D6 CNV Calibrator. Cerrar los tubos de reacción inmediatamente.

» **Nota:** Evite las burbujas de aire en la mezcla de PCR y las huellas dactilares sobre las superficies ópticas de los recipientes de reacción. Las dos cosas pueden afectar la medición de fluorescencia. «

7.7. Programa PCR

Programa su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para los experimentos en la "cuantificación relativa". Ejecute los depósitos de PCR en el termociclador y ejecute el siguiente programa:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P
y otros dispositivos basados en bloques de calentamiento Peltier:

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	10 min	Desnaturalización inicial
	95°C	15 seg	Desnaturalización
40	60°C	1 min	Annealing/Extensión – registro de datos en el canal FAM y HEX

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	10 min	Desnaturalización inicial
	95°C	15 seg	Desnaturalización
40	60°C <i>*) por 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extensión – adquisición de datos en el canal Green y Yellow

8. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

La variación en el **número de copias (CNV)** se logra a través de una cuantificación relativa de **CYP2D6 (canal FAM)** por la normalización por el control endógeno **CE (canal HEX)** y la comparación posterior con el CYP2D6 CNV **Calibrator**. La mayoría de los programas de análisis de PCR en tiempo real proporcionan los datos de los dos canales de forma automática como una tabla, que por lo general sirve para la cuantificación relativa en los experimentos de expresión génica. El calibrador se establece en uno y muestras normales mostrarán cantidades relativas a uno, mientras que las duplicaciones resultarán en valores significativamente más altos y deleciones en valores significativamente más bajos. Debido a la posibilidad de errores de medición, se recomienda repetir las cantidades relativas próximas a (± 0.05) del mínimo y del máximo para las muestras normales. A continuación se presenta una lista de la terminología específica del instrumento, el ajuste del umbral (Cq) y el rango de medición con respecto al estado de CNV.

»**Nota:** Sólo se determina el número de copias CYP2D6 existentes en el genoma. Las muestras con una duplicación en un cromosoma y una deleción en otro cromosoma no pueden ser identificados. En este tipo de pruebas, el resultado correspondería a dos copias. Deleciones homocigóticas provoca un fallo de la señal de CYP2D6 en el FAM-canal. Sólo se puede detectar la señal para el control endógeno (CE) en el HEX-canal. «

Aparato PCR en tiempo real	Valor límite	Cantidad Relativa			Terminología
		Deleciones	Normales	Duplicaciones	
7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.76	0.76 - 1.27	> 1.27	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	< 0.75	0.75 - 1.18	> 1.18	Rel. Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	FAM=1;HEX=2	< 0.69	0.69 - 1.15	> 1.15	Normalized Ratio (BasicRelQuant)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.85	0.85 - 1.36	> 1.36	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.81	0.81 - 1.41	> 1.41	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.77	0.77 - 1.34	> 1.34	Relative Concentration

9. Indicaciones y medidas de seguridad

- El kit se destina únicamente para uso diagnóstico in vitro.
- Al manipular muestras y reactivos utilice siempre guantes desechables sin polvo y vestimenta adecuada de laboratorio.
- Entre las áreas para la extracción de ADN y el depósito PCR Master Mix debe mantenerse un espacio de separación estricto.
- Utilice solamente un set de pipetas propio sólo para el depósito de PCR y utilice puntas de pipeta con filtro de aerosol.
- Utilice únicamente recipientes de paredes finas, recipientes de PCR compatibles con los aparatos para mediciones ópticas, cierre adecuado.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.

CYP2D6 RealFast™ CNV Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Utilização prevista

O CYP2D6 RealFast™ CNV Assay é um teste de PCR em tempo real rápido e preciso para determinar variações do número de cópias (*copy number variations*, CNV) do gene *CYP2D6* humano. As deleções e as duplicações deste gene estão associadas à alteração da atividade da enzima metabolizadora de fármacos CYP2D6. O kit foi concebido para identificar doentes com deleções heterozigóticas e homozigóticas (alelo *5) ou duplicações do gene *CYP2D6*. Para uma determinação abrangente do estado metabolizador, deve ser utilizado em conjunto com o CYP2D6 XL StripAssay® ou sequenciação de ADN. O ensaio semiquantitativo discrimina entre deleções, duplicações e estado quanto ao número normal de cópias num extrato de ADN genómico humano. Sequência de referência: HGVS: NG_008376.3

2. Introdução

Diversos fármacos, tais como tamoxifeno, opiáceos, antidepressivos ou antipsicóticos são metabolizados pela enzima CYP2D6. Além de vários polimorfismos de nucleótido único, as variações do número de cópias do gene *CYP2D6* são responsáveis por alterações da atividade enzimática, que frequentemente provocam ineficácia do medicamento ou reações adversas medicamentosas. A ausência (deleção homozigótica), diminuição (uma cópia) ou aumento (duplicação) da função enzimática correspondem ao fenótipo de “poor” (PM), “intermediate” (IM) ou “ultrarapid” (UM) metabolizante. Segundo as orientações do Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) e do Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), o estado metabolizador do doente em termos de CYP2D6 deve ser determinado antes da prescrição de determinados fármacos (consultar www.pharmgkb.org).

3. Conteúdo do kit

RealFast™ 2x Probe Mix 1 ampola tampa branca 1000 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix 1 ampola tampa roxa 550 µl
CYP2D6 CNV Calibrator 1 ampola tampa roxa 75 µl

A RealFast™ 2x Probe Mix inclui HotStart Taq DNA polymerase e dNTP num sistema tampão otimizado. A CNV CYP2D6 Assay Mix consiste em iniciadores específicos para o gene, assim como sondas de hidrólise com marcação dupla para *CYP2D6* e o gene de controlo endógeno (CE). É fornecido com o kit um CNV CYP2D6 Calibrator que representa o estado normal com duas cópias funcionais do *CYP2D6*.

O kit contém reagentes para 100 reações, num volume final de 20 µl cada.

4. Armazenamento e estabilidade

O CYP2D6 RealFast™ CNV Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit de -30 a -15°C. Em alternativa, armazene entre 2 °C e 8°C para utilização a curto prazo, dentro de um mês. O kit suporta até 20 ciclos de congelamento/descongelamento sem ocorrer perda de atividade. Evitar a exposição prolongada a luz intensa. Se for armazenado corretamente, o kit permanece totalmente ativo até à data de validade indicada no rótulo.

5. Descrição do produto

5.1. Princípio do teste

O teste utiliza o ensaio fluorogénico 5' nuclease, também conhecido como ensaio TaqMan®. Cada reação contém pares de iniciadores específicos do gene para a amplificação de *CYP2D6* e fragmentos do gene de controlo endógeno (CE) com 141 pb cada. Existem outros componentes com sondas de hidrólise específicas para o gene e de marcação dupla, a sonda **CYP2D6 marcada com FAM** e a **sonda EC, marcada com HEX**, que se hibridam em sequências internas dos fragmentos amplificados. A proximidade do gene repórter fluorescente 5' e o corante supressor 3' em sondas intactas impede a fluorescência do gene repórter. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade da exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase cliva o gene repórter fluorescente 5' da sonda hibridada. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

O CYP2D6 RealFast™ CNV Assay é um ensaio de quantificação relativa e compara a quantidade de ambos os alvos de ácido nucleico (*CYP2D6* e CE) em relação ao CNV CYP2D6 Calibrator. O gene CE é usado para normalizar os sinais de fluorescência entre diferentes amostras e serve como controlo positivo da PCR.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O CYP2D6 RealFast™ CNV Assay está validado para a utilização com o instrumento AB 7500 Fast.

O kit é compatível com vários equipamentos comuns de PCR em tempo real com capacidade de registar fluorescência FAM e HEX:

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

» **Nota:** É possível transferir os RealFast™ CNV QuickGuides para informações sobre a configuração e análise de experiências com diferentes tipos de instrumentos em www.viennalab.com.

Ao utilizar o AB 7500 Fast, StepOne™ ou Mx3005P, configure o supressor de referência passiva para “ROX”!

O kit é fornecido **com pouco ROX**. Para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX elevado para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), adicione ROX a uma concentração final de 1 µM à 2x Probe Mix.

5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 26 amostras com resultado positivo quanto à mutação do *CYP2D6* utilizando um método de referência. O CYP2D6 RealFast™ CNV Assay determinou todos os 26 amostras como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 72 amostras com resultado negativo quanto à deleção/duplicação do gene *CYP2D6* utilizando um método de referência. O CYP2D6 RealFast™ CNV Assay determinou todos os 72 amostras como negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

Limite de deteção: 0.5 ng de ADN genómico (por reação).

Concentração de ADN recomendada: 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

Instrumento de PCR em tempo real com filtros FAM (520 nm) e HEX (556 nm), recipientes de reação compatíveis com o instrumento, luvas sem talco descartáveis, vórtex, minicentrífugadora para tubos de 2.0 ml, suportes para tubos, conjunto de micropipetas calibradas (0.5 – 1000 µl), pontas estéreis com filtro de barreira de aerossóis, água de grau molecular, sistema de extração de ADN, congelador, recipiente para resíduos de risco biológico.

7. Protocolo experimental

7.1. Extração do ADN

Os reagentes de extração do ADN **não são fornecidos** com o kit. Recomenda-se a utilização do Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020). É possível utilizar ADN isolado de vários tipos de amostra (p. ex., sangue periférico total ou gota seca de sangue). Certifique-se de que o

ADN extraído é adequado para a amplificação em termos de concentração, pureza e integridade. Para uma análise exata, da quantidade de ADN por reação deve situar-se entre 10 e 100 ng em todas as amostras.

7.2. No Template Control

Inclua **sempre** um **No Template Control** (NTC) em cada experiência para confirmar a ausência de potenciais contaminações. Use água de grau PCR em vez de ADN.

7.3 CYP2D6 CNV Calibrator

Inclua **sempre** o CYP2D6 CNV **Calibrator**. O calibrador (também "amostra de referência" ou "controlo") tem de ser definido no software da PCR em tempo real.

» **Nota:** As amostras de controlo, como o CNV CYP2D6 Calibrator, são fontes potenciais de contaminação. Manuseie com cautela. «

7.4. Réplicas

A fim de obter a precisão desejada das medições, é necessário executar o NTC, todas as amostras e o calibrador em **triplicado**.

7.5. Preparação da Master Mix

Agite lentamente no vórtex e centrifugue rapidamente todas as soluções após o descongelamento. Configure a PCR à temperatura ambiente. Preparar **Master Mix** suficiente para todas as réplicas (3 x N amostras + 3 x calibrador + 3 x NTC) e mais quatro a seis reações adicionais para compensar imprecisões pipetagem:

Componente	por reação	p. ex., 36 reações
2x RealFast™ Probe Mix	10 µl	360 µl
CYP2D6 CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
Master Mix	15 µl	540 µl

7.6. Preparação de reações em triplicado:

Prepares as reações para o NTC, todas as amostras e o CYP2D6 CNV Calibrator. Adicione os volumes da mistura principal e da amostra, indicados abaixo, a tubos de tamanhos apropriado:

Tubo	Volume da Master Mix	Nome da Amostra	Volume da Amostra
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Amostra	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrador	16.5 µl

Misture suavemente e centrifugue os tubos por um momento. Execute as suas reações em **triplicado** e distribua **20 µl** nos devidos poços dos recipientes de reação. Para minimizar os riscos de contaminação, pipete sempre modelos pela seguinte ordem: primeiro o NTC, seguido das amostras e, por último, o calibrador. Feche imediatamente os recipientes de reação.

» **Nota:** Evite a formação de bolhas na mistura de reação final e evite tocar na superfície ótica da tampa ou na película de vedação sem luvas. Isto pode interferir com as medições de fluorescência. Se necessário, centrifugue brevemente. «

7.7. Programa de PCR

Programe o instrumento de PCR em tempo real de acordo com as instruções do fabricante para experiências de quantificação relativa. Coloque as amostras no termociclador e execute o seguinte programa:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P® e outros instrumentos à base do bloco de calor de Peltier:

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	95°C	10 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 s	Desnaturação
	60°C	1 min	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados no canal FAM e HEX

MIC qPCR Cyler, Rotor-Gene® 6000*):

Ciclos	Temp	Tempo	Passos
1	95°C	10 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 sec	Desnaturação
	60°C *para 36-well rotor: 56°C	1 min	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados no canal Green e Yellow

8. Análise dos dados/interpretação dos resultados

A **variação do número de cópias** (CNV) de cada amostra é determinada pelo cálculo da quantidade relativa de **CYP2D6 (canal FAM)** por meio do normalizador **CE (canal HEX)** e comparando-a com o CYP2D6 CNV **Calibrator**. A maioria do software de PCR em tempo real resolve automaticamente dados de ambos os canais em gráficos de barras de quantidades relativas, que é normalmente usado para experiências de expressão genética. O calibrador está definido como um e as amostras normais terão quantidades relativas perto de um, enquanto que as duplicações resultam em valores significativamente mais altos e deleções em valores significativamente mais baixos. Devido a potenciais erros de medição, é aconselhável repetir as reações de teste, que apresentem quantidades relativas perto de erros de medição (± 0.05) para o mínimo e máximo para amostras normais. Abaixo encontra-se uma lista que contém a terminologia do instrumento específico, configurações de limiar (Cq) e a escala de medição em relação ao estado de CNV.

» **Nota:** apenas é possível determinar o número total de cópias de CYP2D6 no genoma. O ensaio não permite identificar uma duplicação num cromossoma e uma deleção noutra, dado que tais amostras aparentarão ser normais, ou seja, tendo duas cópias.

As deleções homozigóticas provocam uma quebra do sinal de CYP2D6 no canal FAM. Apenas o sinal de controlo endógeno (endogenous control, EC) é detetado no canal HEX. «

Instrumento em tempo real	Limite	Quantidades relativas			Terminologia
		Deleção	Normal	Duplicação	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.76	0.76 - 1.27	> 1.27	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automático	< 0.75	0.75 - 1.18	> 1.18	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	FAM=1;HEX=2	< 0.69	0.69 - 1.15	> 1.15	Normalized Ratio (Basic Rel. Quant.)
MIC qPCR Cyler (bms)	automatic	< 0.85	0.85 - 1.36	> 1.36	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.81	0.81 - 1.41	> 1.41	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.77	0.77 - 1.34	> 1.34	Relative Concentration

9. Avisos e precauções

- Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Utilizar sempre luvas sem talco descartáveis e vestuário de laboratório adequado ao manusear as amostras e os reagentes.
- Preparar a reação numa área separada da preparação de ácidos nucleicos e da análise do produto de PCR.
- Utilizar pipetas dedicadas apenas à configuração da PCR e pontas de pipeta com filtro de barreira de aerossóis.
- Utilizar recipientes de reação compatíveis com o instrumento e com tampas ou vedantes transparentes.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes.
- Não utilizar kits ou componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.