



## EliGene® Lactose intolerance RT

REF 90092-RT (pro 50 stanovení)

### Složení soupravy:

5 x 150 µl C/T/G/A Mix  
1 x 100 µl PC DNA C/G  
1 x 100 µl PC DNA T/A  
Návod k použití

### Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

### Účel použití

Souprava **EliGene® Lactose intolerance RT** slouží k DNA detekci polymorfismu C-13910T a G-22018A v regulační oblasti genu pro laktázu z izolované DNA.

### Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR genotypizace (diskriminace alel). Pro detekci jednobodových polymorfismů C-13910T a G-22018A v genu *MCM6* v izolované DNA jsou použity primery a duálně značené sondy (C-13910T FAM a HEX a G-22018A TexasRed a Cy5).

### Obecný úvod

V klinických laboratořích jsou běžně testováni pacienti s laktózovou intolerancí na přítomnost jednobodových polymorfismů C-13910T a G-22018A nacházejících se v genu *MCM6*, u kterých byla nalezena asociace s geneticky podmíněnou laktózovou intolerancí spojenou se sníženou produkcí enzymu laktázy. Genotypizace těchto polymorfismů umožňuje odlišit diagnózu laktózové intolerance způsobenou v důsledku genetických předpokladů nebo sekundárních vlivů. Tento genotypizační test umožňuje rychlou a rutinní analýzu výše zmíněných polymorfismů u velkého počtu vzorků. EliGene® Lactose intolerance RT souprava poskytuje správné výsledky rovněž u pacientů nesoucí mutace C-13907G, T-13913C, G-13914A a T-13915G.

### Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Doporučená izolace DNA:

Krev, stěry

Manuální: EliGene® Urine Isolation Kit

Automatická: **ZEPHYRUS Magneto** (ELISABETH PHARMACON)

**Upozornění:** Pro zachování uvedené senzitivity testu striktně doporučujeme zachovávat preanalytické postupy uvedené v tomto návodu k použití. Zvláště pak nemějte doporučené postupy z hlediska výchozího množství vzorku, rychlosti otáček při centrifugacích atd. Pro izolaci DNA lze využít také jiné soupravy, avšak preanalytické postupy skladování, transportu a centrifugace musejí být dodrženy.

**Krev:***Manuální izolace:*

Ke vzorku přidejte 10 µl Proteinázy K a poté pokračujte dle standardního izolačního protokolu kitu EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) pro izolaci DNA z krve. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

*Automatická izolace:*

Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu dle protokolu pro vzorky krve s elucí do 50 µl elučního pufru.

**Stěry:**

Tyto vzorky odebírejte dle standardního protokolu do sterilních zkumavek. Vzorky je nutno uchovávat a přepravovat při 4 °C. Pro diagnostické účely je nezbytné vzorek zpracovat v den odběru.

*Manuální izolace:*

1. Do 2,0 ml zkumavky napipetujte 400 µl roztoku MI3 a 20 µl Proteinázy K.
2. Odběrový tampón vložte do připravené 2 ml zkumavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček – stříhejte zhruba 0,5 cm nad štětečkem. Zkumavku uzavřete
3. Inkubujte 20 min při 56 °C v termostrepačce při 1000 otáčkách. Poté zkumavku krátce stočte. 4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a k lyzátu přidejte 330 µl roztoku MI4. Jemně zvortexujeme a stočte.
5. Poté pokračujte dle standardního izolačního protokolu kitu EliGene Urine Isolation Kit. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

*Automatická izolace:*

1. Do 2,0 ml zkumavky napipetujte 450 µl Lysis Bufferu, 200 µl PCR vody a 10 µl Proteinázy K.
2. Stěrovku vložte do připravené 2 ml zkumavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček – stříhejte zhruba 0,5 cm nad štětečkem. Zkumavku uzavřete.
3. Inkubujte 20 min při 56 °C v termostrepačce při 1000 otáčkách. Poté zkumavku krátce stočte. 4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a zkumavku krátce stočte.
5. Napipetujte celý objem vzorku do pozice H na Deep well destičce z MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu.
6. Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu dle protokolu pro vzorky plasmu s elucí do 50 µl elučního pufru.

Doporučená koncentrace analyzované DNA je min. 10 ng/µl. Nedoporučuje se testovat vzorky o koncentraci nižší než 10 ng/µl.

**Nezbytné vybavení pro laboratoř**

- Sterilní automatická pipeta 5–20 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE)
- Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz
- Zařízení pro Real Time PCR – kit je optimalizován pro přístroje Quant Studio 5 (ThermoFisher Scientific),



CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný Real Time PCR přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

### **Konfigurace RealTime PCR přístroje**

**Při použití soupravy se řiďte manuálem výrobce daného cycleru. Níže je uveden seznam cycleru včetně nastavení, které byly použity při testování EliGene® Lactose intolerance RT.**

- Pro detekci alely T použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci alely C použita sonda značená HEX barvou (exc.520 nm – em. 548nm)
- Pro detekci alely G použita sonda značená TxRed barvou (exc. 589 nm – em. 615nm)
- Pro detekci alely A použita sonda značená Cy5 barvou (exc. 650nm – em. 670nm)

### **QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):**

Vyberte možnosti Experiment type, "Genotyping", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard".

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

*Udržovací fáze (Holding stage)*

95°C 3 min Ramp rate (1.6°C/s)

*Cyklovací fáze (Cycling stage) – 39 cyklů*

95°C 10 s Ramp rate (1.6°C/s)

58°C 10 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

67°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s)

*Post-Read Stage*

40°C 1 min Ramp rate (1.6°C/s)

*Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 58 °C.*

Dle návodu k použití výrobce cycleru zadejte k destičce jednotlivé alely s příslušnými reportérovými barvami – alela 13910 T (FAM), C (VIC); alela 22018 G (ROX), A (Cy5) a jako pasivní referenční barvivo zvolte NONE.

Kompletní teplotní profil s nastavením alel může být načten jako Run Template "EliGene\_LAC\_QS5\_v00.edt". Run Template může být importován do softwaru z CD přiloženého v kitu.

### **CFX96 Touch (Bio-Rad):**

V úvodní možnosti "Startup Wizard" založte "New Experiment" a vytvořte nový protokol "Create New Protocol".

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

Step 1	95°C	3 min
Step 2	95°C	10 s
Step 3	58°C	10 s + Plate Read
Step 4	67°C	20 s
Step 5	GOTO Step 2	39x
Step 6	40°C	60 s

Doplňte "Sample Volume" na 20µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 2 při 58 °C.



Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX, TxRed, Cy5. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene LAC\_CFX96\_v00.pcr1" anebo může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

### **Příprava reagensí**

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.
- V kroku izolačního protokolu, kdy se k izolovanému vzorku přidává Proteináza K, přidejte také 20 µl interní kontroly (IAC DNA). V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k vyizolované DNA těsně před analýzou.
- Pokud nespoteřebujete celý objem MasterMixu, skladujte zkumavku v temnu při teplotě 4°C až 14 dní. Pro dlouhodobé skladování použijte mrazák (-20 °C, tma). MasterMix by neměl projít více než pěti cykly zmrazení-rozmrazení.

### **Příprava reakčního mixu pro přístroje Quant Studio 5 a CFX96**

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s C/T/G/A Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení napipetujte do amplifikační zkumavky, nebo jamky 15 µl mixu a přidejte 5 µl izolované DNA.
2. Standardy: Do amplifikační jamky napipetujte po 15 µl C/T/G/A MaterMixu a přidejte do jednotlivých jamek 5 µl každého standardu.

Vložte zkumavky nebo destičku do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

### **Odečet výsledků**

#### **QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific)**

V okně „Analysis settings“ vyberte pro obě alely v záložce „Call Settings“ možnost „Analyze Relat-Time dRn data“, v záložce „Ct Settings“ zvolte možnost „Baseline Start Cycle 3 – end cycle 15“ a analyzujte výsledky kliknutím na možnost „Apply“.

Software automaticky vyhodnotí přítomnost jednotlivých alel.

#### **CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):**

V okně „Data Analyse“ zvolte možnost „Allelic Discrimination“. V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Threshold“ a vyberte v „Baseline Cycles“ možnost „Auto Calculated“ a v Single „Threshold“ možnost „Auto Calculated“.

V okně Allelic Discrimination zvolte příslušnou kombinaci fluoroforů pro danou alelu. 13910 – FAM (T), HEX (C), 22018 - TxRed (G), Cy5 (A). Software automaticky vyhodnotí genotyp na základě RFU hodnot.

**Vzorky s hodnotami RFU < 500 u obou fluoroforů nejsou hodnotitelné.**



Fluorofory nastavte následovně:

X= FAM

Y= HEX

Allela 1=genotyp TT, Allela 2 = genotyp CC

X= TxRed

Y= Cy5

Allela 1 = genotyp GG, Allela 2 = genotyp AA

### Interpretace výsledků

Alela	Laktózoová intolerance (snížená aktivita laktázy)	Laktózoová tolerance	
13910T	CC	TT	CT
22018A	GG	AA	GA

### Kontrolní postup

Souprava EliGene® Lactose intolerance RT zahrnuje pozitivní kontroly (PC DNA C/G, PC DNA T/A)

Pozitivní kontrola sleduje správnou funkci MasterMixu. Minimální Cp pro pozitivní kontrolu musí být 30 nebo méně. Cp vyšší než 30 nemůže být akceptováno a detekce DNA musí být provedena s novým vzorkem. V případě opakovaně vyššího Cp kontaktujte výrobce ELISABETH PHARMACON.

Používejte negativní kontrolu pro každý běh. Jako negativní kontrolu použijte vodu pro molekulární biologii používanou ve vaší laboratoři. Pro negativní kontrolu použijte pipetu pro vzorky DNA.

### Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít referenční materiál pozitivní pro individuální genotypy. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

### Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.

### Funkční charakteristiky

#### Analytické funkční charakteristiky:

Souprava EliGene® Lactose intolerance RT specificky detekuje přítomnost genotypů CC, CT a TT polymorfismu C-13910T a genotypů GG, GA a AA polymorfismu G-22018A. Kit je určen pro detekci lidské DNA o koncentraci vyšší než 10 ng/μl.

**Analytická citlivost** je 10 ng DNA v reakční směsi.

**Analytická specifita** metodiky je 100% a byla ověřena prohledáváním DNA databází.



**Klinická specifita** soupravy EliGene® Lactose intolerance RT byla testována na 31 vzorcích lidské DNA s genotypy určenými na základě referenční metody.

### **Diagnostické funkční charakteristiky:**

Specifita soupravy EliGene® Lactose intolerance RT byla testována pomocí 31 vzorků analyzovaných referenční metodou, kdy bylo zjištěno 8 vzorků pozitivních na rizikový genotyp. Při porovnání výsledků testů byla dosažena stoprocentní shoda. Analytická specifita soupravy EliGene® Lactose intolerance RT je 100%.

### **Měřicí interval**

Souprava umožňuje detekci  $\geq 10$  ng DNA molekul v reakční směsi.

### **Interní kontrola kvality**

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost MasterMixu.

### **Limitace testovacího postupu**

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace DNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

### **Biologické referenční intervaly**

Žádné použitelné informace pro tento kit.

### **Upozornění**

Po smíchání je MasterMix stabilní při  $-20$  °C. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem více než 5x. Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

### **Obecná varování a bezpečnostní opatření**

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při  $121$  °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započítáním práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.





- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagentie poskytované v rámci kitu a reagentie doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagentie z různých šarží!
- Nepoužívejte reagentie ze souprav jiných výrobců!

### **Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii**

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagentii musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

### **Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy**

- Mikrozkušavky obsahující mixy jsou určeny pouze pro jedno použití a musejí být použity pouze pro přípravu reakční směsi.
- Mikrozkušavky obsahující pozitivní kontroly jsou určeny pouze pro jedno použití.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

**P280** Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

**P281** Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

## **Literatura**

**Ridefelt P, Håkansson LD. 2005.** Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. Scand J Gastroenterol. 40(7):822-6.



**Bulhões AC, Goldani HA, Oliveira FS, Matte US, Mazzuca RB, Silveira TR. 2007.** Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adulttype hypolactasia. *Braz J Med Biol Res.* 40(11):1441-6.

**Tomczonek-Moruś J, Wojtasik A, Zeman K, Smolarz B, Bąk-Romaniszyn L.** 13910C>T and 22018G>A LCT gene polymorphisms in diagnosing hypolactasia in children. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(2):210-216.

**Friedrich, D. C., Santos, S. E. B., Ribeiro-Dos-Santos, Â. K. C., Hutz, M. H., Crawford, D. C., 2012.** Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS ONE.* 7(9).

## Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

## Výrobce

**ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.**

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: [info@elisabeth.cz](mailto:info@elisabeth.cz)