



**SZABO  
SCANDIC**

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](http://linkedin.com/company/szaboscandic)





## MTHFR A1298C

REF: RT-55

### Determination of the A1298C mutation on MTHFR in Real Time PCR

#### INTRODUCTION AND PURPOSE OF USE

Heredity thrombophilia is a genetically determined tendency to develop thromboembolic disease at a young age with recurrent character. Environmental risk factors (smoking, alcohol, stress, diet, ...) and genetic mutations, such as the A1298C mutation localized on the MTHFR gene, interact resulting in the expression of this disease.

The MTHFR A1298C Kit is a qualitative test that allows the allelic discrimination, by means of *Real Time PCR*, of A1298C mutation associated to Hereditary Thrombophilia.

The Procedure allows the amplification of Wild-type alleles and mutated alleles of MTHFR A1298C. Allelic discrimination is performed making a scatter plot of mutated allele's fluorescence (Y axis) versus wild-type allele's fluorescence (X axis), discriminating in this way the three possible genotype: Homozygote Wild-Type, Heterozygote Mutated and Heterozygote Mutated.

The analysis of the results is made by an instrument of Real Time PCR, composed by a thermal cycler with a system of fluorescence detection.

#### CONTENT

The kit contains reagents enough to perform 48 amplification tests:

Quantity	Description
R1 3 x 220 µl	Amplification mMix: dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl <sub>2</sub> , Taq Polymerase, Nuclease-free water (Blue cap)
R2 3 x 130 µl	MTHFR A1298C probes Mix Upstream primer, downstream primer, Target probe (FAM for Wild Type and VIC for Mutant), Nuclease-free water (Green cap)
R3 3 x 35 µl	Positive Control Homozygote Wild-Type cloned DNA corresponding to MTHFR A1298C Wild-Type gene.
R4 3 x 35 µl	Positive Control Homozygote Mutated cloned DNA corresponding to MTHFR A1298C Mutated gene.
R5 1 x 30 µl	Negative Control (Yellow cap)

Instruction for use: ST. RT55-ENG.7

#### MATERIALS AND STRUMENTATION REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Disposable latex powder-free gloves or similar material;  
Bench microcentrifuge (12,000 - 14,000 rpm);  
Micropipettes and Sterile tips with aerosol filter;  
Vortex;  
Plastic materials (microplate and optical adhesive cover);  
Heat block (only for extraction)  
Dry block shacker for 1.5ml conical tubes  
Magnetic rack for 1.5ml conical tubes  
EZ1 ADV XL DSP DNA Blood Card (ref. 9018702)

#### Reagents

The MTHFR A1298C kit was developed and validated to be used with the following extraction method:

#### Manual Extraction

Ref. 51304/51306

QIAamp DNA mini kit. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 50/250 samples. (QIAGEN)

#### Automatic extraction

Ref. 62124

EZ1 DSP DNA Blood kit. The kit allows the automatic DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 48 samples. (QIAGEN)

#### Manual/Automatic extraction (Siemens)

10629800 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 96 samples.

10629801 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 96 samples.

#### Strumentation

##### Automatic Extraction

Ref. 9001492.

EZ1 Advanced XL. Robotic Workstation. (QIAGEN) for the automatic nucleic acid purification up to 14 samples simultaneously (QIAGEN).

#### Real Time PCR

The MTHFR A1298C kit was developed and validated to be used with the following real time PCR instruments:

- 7500 Fast from Lifetechnologies
- StepOne Plus from Lifetechnologies
- Rotor-Gene Q MDx from QIAGEN
- Versant kPCR AD from Siemens or Stratagene MX3005P/MX3000P
- CFX96 Real Time PCR System from BioRad

#### SAMPLES AND STORAGE

The MTHFR A1298C system must be used with extracted DNA from the following biological samples: Whole Blood EDTA. Collected samples must be shipped and stored at +2 - +8°C and used within 3 days from the collected data.

Store the sample at -20°C if it is used after 3 days.

#### PRECAUTIONS USE

This kit is for *in vitro* diagnostic (IVD), for professional use only and not for in vivo use.

**After reconstitution, the amplification master mix must be used in one time (16 reactions). Do not re-frost already used material. Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.**

At all times follow Good Laboratory Practice (GLP) guidelines. Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.

Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimens collection and testing.

Handle and dispose all used materials into appropriate bio-hazard waste containers. It should be discarded according to local law. Keep separated the extraction and the reagents preparation.

Never pipette solutions by mouth.

Avoid the air bubbles during the master mix dispensing. Eliminate them before starting amplification.

Wash hands carefully after handling samples and reagents.

Do not mix reagents from different lots.

It is not infectious and hazardous for the health (see Material Safety data Sheet - MSDS).

Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.

Read carefully the instructions notice before using this test.

Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.

Do not use a test from a damaged protective wrapper.

Follow the instructions inside the kit QIAamp DNA Mini Kit. Elute the sample in 50 µl of buffer AE.

#### Automatic extraction

Ref. 62124 - EZ1 DSP DNA Blood kit on EZ1 Advanced XL instrument.

Follow the instructions inside the kit EZ1 DSP DNA Blood kit. Start from 200 µl of sample and elute it in 50 µl of buffer AE.

#### Manual extraction (SIEMENS)

Ref. 10629800 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1.

Ref. 10629801 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2.

Follow the instructions supplied by Siemens and elute it in 70 µl of Elution buffer. Transfer 55 µl of eluted sample to an appropriately size tube.

Sample can be stored at -20°C.

#### SOFTWARE SETTING:

##### Lifetechnologies 7500 fast/StepOne plus

Turn the instrument and the computer on and open the control software. Click on "Advance Setup": by default the software will shows the page "experiment properties". Write in the "experiment name" the file name, choose the type of instrument (ABI7500 o ABI7500fast), the type of reaction (Genotyping), the type of used reagent (Taqman®Reagents) and the reaction time of analysis (Standard ~ 2 hours to complete a run).

Open the page named "page setup".

In the window "Assign SNP assay to the selected wells" open "Create new SNP Assay" and set:

SNP Assay Name: MTHFR A1298C:

	Reporter	Quencher
Allele 1 Name: MTHFR A1298C WT	FAM	NFQ
Allele 2 Name: MTHFR A1298C MUT	VIC	NFQ

In the page "plate setup", move on the area "Assign Sample to the selected Wells": set the name of the analyzing samples, of positive controls and negative controls.

Choose an area of the plate where positive controls will be placed: select in the blank "Assign SNP assay to the selected well" and assign the MTHFR A1298C SNP Assay. After set these tasks:

- "task Positive control Allele1/Allele1" for MTHFR A1298C Wild Type homozygote target;
- "task Positive control Allele2/Allele2" for MTHFR A1298C mutated homozygote target;

Choose an area of the plate where negative control will be placed: select "Assign SNP assay to the selected well" the "task Negative control" for MTHFR A1298C SNP.

Select an area of the plate where samples will be placed: select the wells and set MTHFR A1298C SNP. Link every well to a sample, through the window "Assign samples to selected wells".

Verify the correct setting of fluorescent reporters gains: In the setting menu choose and then "Filter set gain setting"

Reporter	Gain
FAM	8
JOE/HEX	2
ROX	1

From the major screen of the software it will open a window "New option - Select experiment/Project type": select "Allelic Discrimination/SNPs Real Time". The software automatically open the window plate setup.

Choose a plate zone where you can put the positive control MTHFR A1298C Wild Type and select in the bar on the right from the menu.

Well type:	Collect	Reference	Replicate
Pos. Control FAM	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every well it will appear the dialogue window "well information" here you can set the name of the calibrator: MTHFR-A1298C WT

It's possible to set the name of the dye near the name of the analyzed target:

FAM	HEX
MTHFR A1298C-WT	MTHFR A1298C-MUT

Choose a plate zone where you can put the positive control MTHFR A1298C mutated and select in the bar on the right from the menu.

Well type:	Collect	Reference	Replicate
Pos. Control HEX	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every well it will appear the dialogue window "well information" here you can set the name of the calibrator: MTHFR-A1298C MUT

It's possible to set the name of the dye near the name of the analyzed target:

1	95°C 10 min
35	95°C 15 sec

Select the annealing / extension from the thermal profile and click on "Acquiring A to cycling."

In the next window, select yellow from the available channels and add it to acquiring channel along with the green channel and click "OK". In the next window click on "OK" and then click "Next".

click on "Edit Gain" button and set the following values for each channel:

Reporter	Gain
Green	8
Yellow	2

To begin the course, click on the button "Start Run". You can save the model before you begin your run by clicking on "Save Template".

After clicking on the button "Start Run" window appears "Save As". The stroke can be saved in the desired position by the user.

Once the run started, the window "Edit Samples" allows you to set the name of samples and controls in the positions in which they were loaded on the instrument.

Select the locations where they were positioned the Wild Type and Mutant controls designate them as **MTHFR A1298C WT positive CTR** and **MTHFR A1298C Mutant Positive CTR**. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analyzed. Select "Positive Controls".

Select the location where you placed the Negative Control and name it as **Negative Control**. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analyzed. Select "Negative Controls".

Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analyzed. Select "Unknown".

At the end of the operation click "OK" in the "edit samples" and wait until the end of the race for the analysis (see "Interpretation of Results").

Analysis (see "Interpretation of Results").

#### Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P/MX3000P</h

## QUALITATIVE ANALYSIS

### Lifetechnologies 7500 Fast, StepOne Plus.

#### Scatter Plot Analysis

At the end of the amplification reaction, the software automatically shows the obtained results in the "Allelic Discrimination Plot".

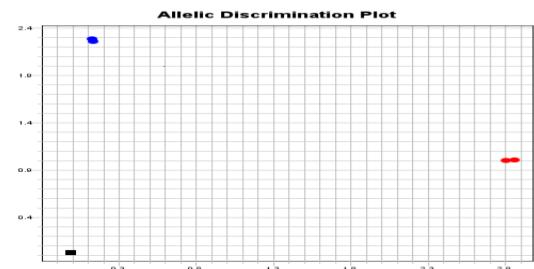
The Lifetechnologies 7500Fast/StepOne Plus instrument automatically perform the genotyping of unknown samples by comparing controls versus homozygous wild-type and homozygous mutated contained in the kit.

A proper results' analysis needs a correct settings of the instrumentation. For this aim, set:

Baseline fluorescence level from cycle 6;

	MTHFR-A1298C WT - FAM Threshold	MTHFR-A1298C MUT - VIC Threshold
7500 Fast	0.35	0.3
StepOne Plus	0.35	0.3

It is recommended to verify correct placement of each individual sample on the scatter plot. For viewing the report containing all data obtained during the analysis, click the sheet "view table well".



The position of the negative control in other plot region could be a contamination of the reaction mix.  
Be sure that in the negative control not be increasing of specific fluorescence by examining targets (FAM and VIC).

#### ΔCt Analysis

Further analysis can be performed with the ΔCt study of the results. For this purpose it is necessary a correct setting of the software

Set the level of background fluorescence (Baseline) from cycle 6; Set the following threshold:

	MTHFR-A1298C WT - FAM Threshold	MTHFR-A1298C MUT - VIC Threshold
7500 Fast	0.25	0.25
StepOne Plus	0.25	0.25

Export data to Excel and set the formula for each sample and control:

### Allele2 Ct (MTHFR A1298C -MUT) – Allele1 Ct (MTHFR A1298C -WT)

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

## ROTOR - GENE Q MDx

#### Scatter Plot Analysis

At the end of the amplification reaction, click on **Analysis** from RotorGene Software. In the **Analysis window** select **Allelic Discrimination** sheet, click on **Cycling A green-Cycling A yellow** using **CTRL** button and click "**show**". The amplification plot will appear.

Set in the "CT calculation – Threshold" the following value:

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
RotorGene-Q	0.2	0.2

Click **genotypes** button and set:

	Reacting Channel	Reacting Channel
Wild type	cycling A (green)	cycling A (green)
Heterozygous	cycling A (green)	cycling A (yellow)*
None		
Mutant		cycling A (yellow)*

In the **Analysis window** select "Scatter graph analisys" sheet, click on **Cycling A green-Cycling A yellow** and click "**show**". The scatter plot will appear with the 2 clouds: Wild Type (bottom right) and Mutant (high left). Is it possible to print the final report.

#### ΔCt Analysis

Further analysis can be performed with the ΔCt study of the results. For this purpose you need a different setting of analysis and a correct setting of the software:

### CFX96 real time PCR system

#### Scatter Plot Analysis

At the end of the PCR, select the "Allelic Discrimination" sheet.

On the bottom of the screen, set "Selected fluorophores": X = FAM and Y = VIC. Choose RFU from "Display Mode" and "Normalize data". Set the following Threshold:

At the end of the PCR run open the "Analysis" window. Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (green)".

Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".

Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation – Threshold".

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
RotorGene-Q	0.05	

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
RotorGene-Q	0.05	

Open the "Analysis" window. Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (yellow)".

Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".

Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation – Threshold".

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
RotorGene-Q	0.05	

Export data to Excel, save the file as "Excel Analysis Sheet" and enter the following formula for each sample and control:

### Yellow Ct (MTHFR A1298C -MUT) – Green Ct (MTHFR A1298C -WT)

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

### Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P/MX3000P

#### Scatter Plot Analysis

Click on button "Analysis" in the toolbar. The software immediatetly open sheet "Analysis Term Setting". Activate the keys FAM and HEX in below screen and select the samples and disposable controls.

On the window "Analysis Term Setting" open the sheet "Results". Select in the right screen the voice "Amplification Plot" in the area "Area to Analysis".

Set the values in the area "Threshold Fluorescence" the values:

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
Kpcr Versant	0.55	0.55

Select in the right screen the voice "Dual Color Scatter Plot" in the area "Area to Analysis".

Select "Fluorescence" in the area "Display value for" and choose from menu "Rlast/Rfirst".

Select in the area "Allele Association":

A Allele: MTHFR A1298C Wild Type

B Allele: MTHFR A1298C Mutated

At the end it will be possible obtain the detailed account, clicking "Text Report" in the area "Area to Analysis".

### Only for Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P/MX3000P

If the software can't discriminate the wild type and mutated positive controls click "Show all genotypes". It will be now possible to modify the genotyping windows, select the samples placed near the positive wild type and identify them as wild type. Select the samples placed near the positive mutated and identify them as mutated. Select the samples placed in an intermediate position between wild type positive control and mutated positive control and identify them as Heterozygote for the A1298C Mutation.

#### ΔCt Analysis

Further analysis can be performed with the ΔCt study of the results. For this purpose you need a different setting of analysis and a correct setting of the software:

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
MX300P – MX3005P	0.1	0.1

From the Text Report window you can export the results by clicking on the main menu: file, export

Export data to Excel and set the formula for each sample and control:

### HEX Ct (MTHFR A1298C -MUT) – FAM Ct (MTHFR A1298C -WT)

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

### CFX96 real time PCR system

#### Scatter Plot Analysis

At the end of the PCR, select the "Allelic Discrimination" sheet.

On the bottom of the screen, set "Selected fluorophores": X = FAM and Y = VIC. Choose RFU from "Display Mode" and "Normalize data". Set the following Threshold:

	MTHFR A1298C -WT - FAM Vertical Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Horizontal Threshold
CFX 96	0.2	0.3

You can export the report pushing the paper block figure on the top of the screen.

#### ΔCt Analysis

Further analysis can be performed with the ΔCt study of the results. For this purpose you need a different setting of analysis and a correct setting of the software:

At the end of the PCR, select the sheet "Quantitation". Analyzing a fluorophore at a time, open in the menu "Setting" the voice Baseline Threshold and set the following values of the Threshold in the "User Defined"

	MTHFR A1298C -WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C -MUT - VIC Threshold
CFX 96	50	50

You can export the report by clicking on the figure notepad at the top of the screen.

Export data to Excel, save the file as "Excel Analysis Sheet" and enter the following formula for each sample and control:

### VIC Ct (MTHFR A1298C -MUT) – FAM Ct (MTHFR A1298C -WT)

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

## INTERPRETATION OF RESULTS

The use of positive and negative control in each amplification session allows to verify the correct functioning of the amplification and the absence of any contamination.

The instrument software is able to analyze the fluorescences that are emitted by the specific probe for MTHFR A1298C Wild-Type (FAM) and by the specific probe for the MTHFR A1298C mutated (VIC/HEX).

#### Scatter Plot Analysis

A regular functioning of the amplification mix can be verified analyzing the correct position of positive controls and negative controls on the scatter plot.

- Positive control Homozygote Wild-Type: horizontal position on X axis (down on the right) Ct < 30
- positive Control homozigote Mutated: vertical position on Y axis (up on the left) Ct < 30
- negative Control: placed at the origin of cartesian plane (down on the left)

Genotyping tests (allelic discrimination) are endpoint experiments: fluorescence data are collected at the end of the reaction (Post PCR Read) and subtracted to initial read fluorescence (Pre PCR Read).

The software makes a scatter plot with obtained results: Y axis is the normalized fluorescence of Mutated Allele, while X axis shows the normalized fluorescence of Wild-Type Allele. The diagnosis obtained with the comparison between unknown samples and Homozygote Wild-Type and Homozygote Mutate, given by the kit. Selecting the controls, we obtain their disposition on the scatter plot, depending of their relation between fluorescence emitted by two probes FAM (Wild-Type) and VIC/HEX (Mutated).

#### ΔCt Analysis

By analyzing ΔCt you can identify the correct genotype of the sample being analyzed by performing subtraction of the assigned Mutated allele Ct to assigned wild-type allele Ct. The genotype is determined by following the table below:



## MTHFR A1298C

REF: RT-55

Determinazione della mutazione A1298C a carico del gene MTHFR mediante Real Time PCR

### INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

La trombofilia ereditaria è una tendenza geneticamente determinata a sviluppare la malattia tromboembolica in giovane età, con carattere ricorrente. Fattori di rischio ambientale (fumo, alcool, stress, dieta, ...) e mutazioni genetiche, come la mutazione A1298C localizzata sul gene MTHFR, interagiscono con conseguente espressione di questo malattia.

Il Kit MTHFR A1298C è un saggio qualitativo che consente la discriminazione allelica, mediante metodica Real-Time PCR, della mutazione A1298C associata alla Trombofilia Ereditaria.

La procedura prevede l'amplificazione degli alleli Wild-Type e Mutato del gene MTHFR. La discriminazione allelica viene eseguita riportando in uno scatter plot la fluorescenza dell'allele Mutato (asse Y) verso la fluorescenza dell'allele Wild-Type (asse X), discriminando in questo modo i tre genotipi possibili: Wild-Type Omozigote, Mutato Omozigote e Mutato Eterozigote.

L'analisi dei risultati viene effettuata tramite uno strumento di Real Time PCR, composto da un thermal cycler provvisto di un sistema di rilevamento della fluorescenza.

### COMPOSIZIONE

Il sistema contiene reagenti sufficienti per l'esecuzione di 48 test.

Quantity	Description
R1	3 x 220 µl Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl <sub>2</sub> , Taq Polymerase, Nuclease-free water (Tappo Blu)
R2	3 x 130 µl MTHFR A1298C probes Mix Upstream primer, downstream primer, Target probes (FAM per Wild Type e VIC per Mutato), Nuclease-free water (Tappo Verde)
R3	3 x 35 µl Controllo Positivo Omozigote Wild-Type DNA clonato corrispondente al gene MTHFR Wild-Type.
R4	3 x 35 µl Controllo Positivo Omozigote Mutato DNA clonato corrispondente al gene MTHFR Mutato.
R5	1 x 30 µl Controllo Negativo (Tappo giallo)

Istruzioni per l'uso: ST. RT55-ITA.7

### MATERIALE E STRUMENTAZIONE NECESSARIA MA NON FORNITA

Guanti senza polvere monouso in lattice o simili;  
Microcentrifuga da banco (12,000 - 14,000 rpm);  
Micropipette e puntali sterili con filtro incorporato per la prevenzione di aerosoli;  
Vortex;  
Materiale plastico monouso sterile (Micropiastra e pellicole ottiche adesive);  
Termoblocco (solo per estrazione manuale)  
Dry block shacker per tubi da 1.5ml  
Magnetic rack per tubi da 1.5ml (estrazione Siemens)  
EZ1 ADV XL DSP DNA Blood Card (ref. 9018702)

### Reagenti

Il Kit MTHFR A1298C è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti metodi di estrazione:

### Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306

QIAmp DNA mini kit. Il Sistema consente l'estrazione manuale di DNA dai campioni umani in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

### Estrazione Automatica

Ref. 62124

EZ1 DSP DNA Blood kit. Il Sistema consente l'estrazione automatica di DNA dai campioni umani in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

### Estrazione Manuale/Automatica (Siemens)

10629800 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1. Il Sistema consente l'estrazione del DNA dai campioni in esame. Il kit contiene reagenti utili per 96 estrazioni.

10629801 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2. Il Sistema consente l'estrazione del DNA dai campioni in esame. Il kit contiene reagenti utili per 96 estrazioni.

### Strumentazione:

#### Estrazione Automatica

Ref. 9001492.

EZ1 Advanced XL Robotic Workstation. (QIAGEN) per la purificazione automatica degli acidi nucleici fino a 14 campioni simultaneamente (QIAGEN).

#### Real Time PCR

Il kit MTHFR A1298C è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di real time PCR:

- 7500 Fast fornito da Lifetechnologies
- StepOne Plus fornito da Lifetechnologies
- Rotor-Gene Q MDx fornito da QIAGEN
- Versant kPCR AD fornito da Siemens o Stratagene MX3005P/MX3000P
- CFX96 Real Time PCR System fornito da BioRad

### CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il prodotto MTHFR A1298C è progettato per essere utilizzato con DNA estratto dai seguenti campioni biologici: Sangue intero EDTA. I campioni raccolti devono essere trasportati e conservati a +2-8°C ed utilizzati entro 3 giorni dalla data del prelievo. Conservare il campione a -20°C se utilizzato dopo 3 giorni.

### PRECAUZIONI D'USO

Il kit è per un uso diagnostico *in vitro* (IVD), per uso professionale e non per uso in vivo.

**Una volta ricostituita, la miscela di amplificazione deve essere utilizzata in un'unica sessione (16 reazioni). Non ricongelare il materiale già utilizzato.** Il congelamento e scongelamento dei reagenti più di due volte dovrebbe essere evitato, in quanto questo potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote e non ripetutamente.

Gli utilizzatori devono seguire le norme "Good Laboratory Practice" (GLP).

Indossare abiti protettivi come camice di laboratorio e guanti monouso durante la manipolazione di campioni.

Evitare il contatto con le mani e occhi o naso durante la raccolta ed uso dei campioni.

La raccolta di tutti i materiali utilizzati deve essere fatto in appositi contenitori e lo smaltimento svolto in accordo con le leggi locali.

Disporre aree separate per l'estrazione e l'allestimento delle reazioni.

Aprire la pagina "page setup".

Nella finestra "Assign SNP assay to the selected wells" aprire "Create new SNP Assay" e impostare:

### PROCEDURA ANALITICA

#### Estrazione di DNA genomico

##### Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306 - QIAmp DNA mini kit (QIAGEN).

Seguire le istruzioni riportate nel kit QIAmp DNA mini kit. Eluire il campione in 50 µl di buffer AE.

#### Estrazione Automatica

Ref. 62124 - EZ1 DSP DNA Blood kit su strumento EZ1 Advanced XL.

Seguire le istruzioni riportate nel kit EZ1 DSP DNA Blood kit. Partire da un volume di campioni pari a 200 µl di sample ed eluire il campione in 50 µl di buffer AE.

#### Manual extraction (SIEMENS)

Ref. 10629800 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1.

Ref. 10629801 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2.

Seguire le istruzioni fornite da Siemens ed eluire il DNA estratto in 70 µl di Elution buffer. Trasferire 55 µl di eluato in una provetta appropriata.

Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C.

### IMPOSTAZIONI DEL SOFTWARE:

#### Lifetechnologies 7500 fast/StepOne plus

Accendere lo strumento, il computer ed avviare il software di controllo. Dalla schermata principale del software cliccare sul bottone "Advanced Setup": di default il software vi mostra la pagina "experiment properties". Digitare nella finestra "experiment name" il nome con il quale verrà salvato l'esperimento. Scegliere il tipo di strumento che si utilizza (7500/7500fast o StepOne/StepOne Plus), scegliere il tipo di esperimento (Genotyping), il tipo di reagenti utilizzati (Taqman@reagents) ed il tempo di reazione (Standard ≈ 2 hours to complete a run).

Aprire la pagina "page setup".

Nella finestra "Assign SNP assay to the selected wells" aprire "Create new SNP Assay" e impostare:

Reporter	Quencher
FAM	NFQ
VIC	NFQ

Sempre nella pagina "plate setup" spostarsi sulla sezione "Assign Sample to the selected Wells": impostare il nome dei campioni in analisi, dei controlli positivi e dei controlli negativi.

Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i controlli positivi: selezionare nello spazio "Assig SNP assay to the selected well" e assegnare il SNP Assay MTHFR A1298C. Di seguito impostare i rispettivi task:

"task Positive control Allele1/Allele1" per il target MTHFR Wild Type omozigote;

"task Positive control Allele2/Allele2" per il target MTHFR Mutato omozigote;

Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo negativo: selezionare nello spazio "Assig SNP assay to the selected well" il "task Negative control" per il SNP MTHFR A1298C.

Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i campioni: selezionare i pozetti della piastra ed impostare il SNP MTHFR A1298C. Associare, ad ogni pozetto un campione in analisi mediante la finestra "Assign samples to selected wells".

Selezionare per ciascun campione nell'apposito spazio "Assign SNP Assay to the selected wells" il "task UnKnown (U)" per il SNP MTHFR A1298C.

Impostare come passive reference, utilizzato come normalizzatore della fluorescenza rilevata, il ROX.

Aprire la pagina "Run Method" (sheet Graphic View) ed impostare il ciclo termico corretto:

Cicli	Pre PCR Read	Denaturazione	Annealing extension	Post PCR Read
1	60°C 1min			
1		95°C 10min		
35		95°C 15sec	60°C 1min	
1				60°C 1min

Nella finestra "Reaction volume plate per well" impostare il volume di 25µl.

Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Start Run".

### ROTOR-GENE Q MDx

Nuovi esperimenti possono essere impostati utilizzando la procedura guidata di avvio rapido o la procedura guidata avanzata, che appare quando il software viene avviato.

Selezionare la procedura guidata "Advanced". Come primo passo, selezionare il modello "Two Step Reaction" con un doppio clic nella finestra "New Run".

Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore montato sullo strumento dalla lista che appare. Controllare il "Locking Ring Attached", spuntare la casella di controllo e quindi fare clic su "Avanti".

Inserire il nome dell'operatore e il volume di reazione di 25 µl e fare clic su "Avanti".

Nella finestra successiva fare clic su "edit profile". Impostare ciclo termico seguente:

Cicli	Denaturazione	annealing/extension
1	50°C 2 min	
	95°C 10 min	
35	95°C 15 sec	60°C 1 min

Selezionare la fase di annealing/extension dal profilo termico e fare clic su "Acquiring to cycling A".

Nella finestra successiva, selezionare il giallo da available channel e aggiungerlo a acquiring channel insieme al canale verde e fare clic su "ok". Nella finestra successiva fare clic su "ok" e poi su "Avanti".

Cliccare sul pulsante "Edit Gain" ed impostare i seguenti valori per i due canali interessati:

Reporter	Gain
Green	8
Yellow	2

Per avviare la corsa, fare clic sul pulsante "Start Run". E' anche possibile salvare il modello prima di iniziare la corsa facendo clic su "Save Template".

Dopo aver fatto clic sul pulsante "Start Run", viene visualizzata la finestra "Save As". La corsa può essere salvata nella posizione desiderata dell'utente.

Una volta che la corsa è iniziata, la finestra "Edit Samples" permette di impostare il nome di campioni e controlli nelle posizioni in cui sono stati caricati sullo strumento.

Selezionare la posizione dove sono stati posizionati i controlli WT e Mutato e nominarla come MTHFR A1298C WT positive CTR e MTHFR A1298C MUT Pos CTR. Cliccando sulla casella "Type" corrispondente, nel menu a tendina "Samples" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "Positive Controls"

Selezionare la posizione dove è stato posizionato il controllo Negativo e nominarla come Negative Control. Cliccando sulla casella "Type" corrispondente, nel menu a tendina "Samples" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "Negative Controls"

Selezionare la

## ALLEGATO DELLE REAZIONI:

Scongelare una provetta di **Amplification mMix**; Scongelare una provetta di **MTHFR A1298C probes Mix**; Miscelare accuratamente mediante vortex 210 $\mu$ l di **Amplification mMix** e 126 $\mu$ l di **MTHFR A1298C probes Mix**;

La miscela prodotta è sufficiente per l'esecuzione di **16 reazioni** di amplificazione: **2 controlli positivi, 1 controllo negativo e 13 campioni**.

Dispensare, nella piastra di amplificazione, **20  $\mu$ l della miscela appena scongelata** nelle posizioni prescelte e già predisposte sul software dello strumento.

Dispensare, nella posizione del controllo negativo, **5 $\mu$ l** di soluzione prelevata dalla vial **controllo negativo**.

Dispensare, nelle posizioni predefinite per ciascun campione, **5 $\mu$ l del campione corrispondente**.

Dispensare, nelle posizioni predisposte per i controlli positivi, **5 $\mu$ l di un controllo positivo Wild-Type Omozigote e Controllo positivo Mutato Omozigote**.

Sigillare accuratamente la piastra mediante l'utilizzo di optical film e verificare che, nella miscela, non vi siano bolle d'aria che possano interferire con l'amplificazione.

Trasferire la piastra nello strumento e premere il pulsante "Start Run".

## ANALISI QUALITATIVA

Lifetechnologies 7500 Fast, StepOne Plus.

### Analisi Scatter Plot

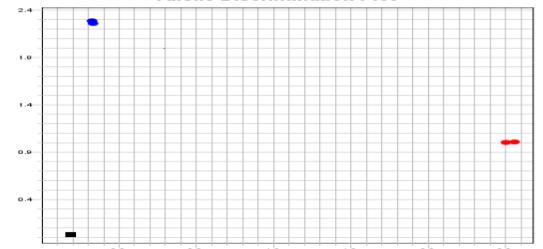
Al termine della reazione di amplificazione, il software mostra automaticamente i risultati ottenuti nella finestra "Allelic Discrimination Plot". Lo strumento Lifetechnologies esegue automaticamente la genotipizzazione dei campioni incogniti confrontandoli versus i controlli omozigote wild type ed omozigote mutato.

Una corretta analisi dei risultati necessita di un corretto setting della strumentazione. A tale scopo impostare:  
Livello di Fluorescenza di fondo (Baseline) dal ciclo 6;

	MTHFR A1298C-WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C-MUT - VIC Threshold
RotorGene-Q	0.05	0.3
7500 Fast	0.35	0.3
StepOne Plus	0.35	0.3

Si consiglia di verificare il corretto posizionamento di ogni singolo campione sullo scatter plot. Per visualizzare il report contenente tutti i dati ottenuti durante l'analisi cliccare lo sheet "view well table".

### Allelic Discrimination Plot



Il posizionamento del controllo negativo in altra regione del plot potrebbe segnalare una contaminazione della miscela di reazione. Assicurarsi che non vi sia nel controllo negativo alcun aumento della fluorescenza specifica per i targets in esame (FAM e VIC).

**Analisi  $\Delta Ct$**   
Ulteriore analisi può essere eseguita con lo studio del  $\Delta Ct$  dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un corretto setting del software:

Impostare i livelli di Fluorescenza di fondo (Baseline) dal ciclo 6; Impostare i seguenti Threshold:

	MTHFR A1298C-WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C-MUT - VIC Threshold
Kpcr Versant	0.25	0.25
7500 Fast	0.25	0.25
StepOne Plus	0.25	0.25

Esporre i dati in un foglio excel ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo:

**Allele2 Ct (MTHFR A1298C-MUT) – Allele1 Ct (MTHFR A1298C-WT)**

Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

### ROTOR - GENE Q MDX

#### Analisi Scatter Plot

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisis" e selezionare lo sheet "others". Selezionare "Allelic Discrimination" e fare doppio clic spuntando premendo il tast CTRL le voci "cycling A (green)"/ "cycling A (yellow)".

Impostare nell'apposito spazio "CT calculation – Threshold" il valore indicato nella tabella.

	MTHFR A1298C-WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C-MUT - VIC Threshold
RotorGeneQ	0.2	0.2

Cliccare il tasto "Genotype" e impostare le corrette fluorescenza per i genotipi differenti:

	Reacting Channel	Reacting Channel
Wild type	cycling A (green)	cycling A (yellow)
Heterozygous	cycling A (green)	cycling A (yellow)
None		
Mutant		cycling A (yellow)

Aprire nuovamente la finestra "Analisis". Selezionare lo sheet "Scatter graph analysis" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (green)/cycling A (yellow)".

Anche in questo caso è possibile stampare un report dell'analisi cliccando sulla finestra "Report" e selezionando nella sezione "Allelic discrimination" il file **cycling A (green)/cycling A (yellow)**.

#### Analisi $\Delta Ct$

Ulteriore analisi può essere eseguita con lo studio del  $\Delta Ct$  dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un diverso setting di analisi e un corretto setting del software:

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisis". Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (green)".

Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct".

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation – Threshold" ed impostare:

	MTHFR A1298C-WT – Green (FAM) Threshold
RotorGene-Q	0.05

Aprire nuovamente la finestra "Analisis". Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (yellow)".

Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct".

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation – Threshold".

	MTHFR A1298C-MUT – Yellow (VIC) Threshold
RotorGene-Q	0.05

Esportare i dati in un foglio excel, salvando il file come "Excel Analysis Sheet" ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo:

**Yellow Ct (MTHFR A1298C-MUT) – Green Ct (MTHFR A1298C-WT)**

Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

### Versant kPCR AD o Stratagene MX3005P/MX3000P

#### Analisi Scatter Plot

Fare clic sul pulsante "Analysis" nella barra degli strumenti. Il software aprirà di default lo sheet "Analysis Term Setting". Attivare i pulsanti FAM e HEX nella parte inferiore dello schermo e selezionare i campioni ed i controlli disponibili.

Dalla finestra "Analysis Term Setting" aprire lo sheet "Results". Selezionare nella parte a destra dello schermo nell'area "Area to Analysis" la voce "Amplification Plot".

Impostare nell'area "Threshold Fluorescence" i valori:

	MTHFR A1298C-WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C-MUT - HEX Threshold
Kpcr Versant	0.55	0.55

Selezionare nella parte a destra dello schermo nell'area "Area to Analysis" la voce "Dual Color Scatter Plot".

Selezionare nell'area "Display value for" la casellina "Fluorescence" e scegliere nel menu a tendina la voce "Rlast/Rfirst".

Selezionare nell'area "Allele Association":

Allele A: **MTHFR A1298C Wild Type**

Allele B: **MTHFR A1298C Mutato**

Esporre i dati in un foglio excel ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo:

**Allele2 Ct (MTHFR A1298C-MUT) – Allele1 Ct (MTHFR A1298C-WT)**

Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

In fine sarà possibile, cliccando . nell'area "Area to Analysis" la voce "Text Report", ottenere il report dettagliato dei risultati conseguiti.

### Solo per Versant kPCR AD o Stratagene MX3005P/MX3000P

Nel caso in cui il software non discriminari automaticamente i controlli positivi wild type e mutato, cliccare sul pulsante "Show all genotypes". Sarà ora possibile modificare le finestre di genotipizzazione in modo da selezionare i campioni posizionati accanto al controllo positivo wild type ed identificare come tali, i campioni posizionati accanto al controllo positivo Mutato ed identificare come tali ed i campioni posizionati nella porzione intermedia ai due controlli ed identificare come Eterozigoti per la Mutazione A1298C

#### Analisi $\Delta Ct$

Ulteriore analisi può essere eseguita con lo studio del  $\Delta Ct$  dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un corretto setting del software:

Fare clic sul pulsante "Analysis" nella barra degli strumenti. Cliccare lo sheet "Results"; e scegliere l'analisi "Amplification plot". Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposita finestra "Threshold fluorescence" ed impostare i seguenti valori:

	MTHFR A1298C - WT - FAM Threshold	MTHFR A1298C - MUT - HEX Threshold
MX3000P – MX3005P	0.1	0.1

Dalla finestra Text Report è possibile esportare i risultati ottenuti cliccando dal menù principale il comando **file, export**

Esportare i dati in un foglio excel ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo:

**HEX Ct (MTHFR A1298C-MUT) – FAM Ct (MTHFR A1298C-WT)**

Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

#### CFX96 real time PCR system

#### Analisi Scatter Plot

Alla fine della reazione di PCR selezionare lo sheet "Allelic Discrimination". Nella parte bassa dello schermo, selezionare "settings" dal menù e scegliere da "Selected fluorophores": X = FAM e Y = VIC. Scegliere RFU da "Display Mode" e "Normalize data". Impostare manualmente seguenti Threshold:

	MTHFR A1298C-WT - FAM Vertical Threshold	MTHFR A1298C - MUT - VIC Horizontal Threshold
CFX 96	0.2	0.3

È possibile esportare il report cliccando sulla figura block notes posta nella parte superiore dello schermo.

#### Analisi $\Delta Ct$

Ulteriore analisi può essere eseguita con lo studio del  $\Delta Ct$  dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un diverso setting di analisi e un corretto setting del software:

Alla fine della reazione di PCR, selezionare lo sheet "Quantitation". Analizzando un fluoroforo per volta, aprire dal menù "Setting" la voce Baseline Threshold e impostare i seguenti valori di Threshold nella casella "User Defined":