



# FastFraX™

## FMR1 Identification Kit

Katalogové číslo: F1-100-V

Ver B

F1-050-V

Ver B



---

## Manuál

### Pro In vitro diagnostické použití

Skladování: 2-8°C při okamžitém použití  
-20°C při dlouhodobém skladování  
Chraňte před světlem

## 1. Úvod

Syndrom fragilního X (FXS) je způsoben mutacemi v genu FMR1 (fragile X mental retardation gene) na chromozomu X. Mutace způsobuje expanzi CGG repetice v 5' regionu (UTR-untranslated region) genu FMR1 a spolu s jejich možnou metylací má za následek umlčení genu a zastavení produkce FMR1 proteinu. Na základě závažnosti mutace rozdělujeme pacienty do následujících genotypů: normální, šedá zóna, premutace a plná mutace. Typ genotypu určuje klinickou závažnost FXS.

Plně mutované alely jsou metylovány a inaktivovány a vykazují obvykle více než 200 opakovaná repetice CGG. Inaktivace genu FMR1 má za následek nulovou expresi FMR1 proteinu (FMRP) [1], který se dominantně vyskytuje v neuronech, kde se podílí na stabilitě, transportu a translaci mRNA. FMRP má významnou roli v synaptické plasticitě a dendritickém rozvoji [2]. Přibližně 1 ze 4000 mužů a 1 ze 6000 žen má plně mutovanou alelu, což vede k rozvoji FXS. Z těchto jedinců je 30% autistických a dalších 30% vykazuje pervazivní vývojové poruchy [3]. Premutované alely vykazují také expanzi – typicky 55-200 opakování, ale jsou nemetylované. Dříve se předpokládalo, že nosiči premutované alely jsou nepostížení, nicméně nyní je známo, že i tito nosiči mají zvýšené riziko rozvoje zdravotních potíží v dospělosti, jako je fragilní X-vázané primární ovariální selhání (FXPOI) i žen a syndrom tremor/ataxie (FXTAS) u obou pohlaví. Nejrizikovější je však předání plně mutované alely z matky na děti.

Jedinci s normálním počtem repetice (6 až 44) mají normální hladinu FMRP a jsou klinicky nepostížení. Jedince z šedé zóny (45 až 54 repetice) najdeme v zóně mezi normálními a premutovanými jedinci a jsou svázáni s repetiční instabilitou, ačkoliv asociace s fenotypovým projevem je stále nejasná. Dříve se uvádělo, že pouze premutace a plná mutace jsou spojeny s klinickými potížemi. Avšak poslední zjištění ukazují, že i jedinci s alelami FMR1 v šedé zóně a dokonce i jedinci s normálním, avšak vysokým počtem repetice, mají zvýšené riziko rozvoje počátečních potíží spojených s fragilním X [4]. Proto je kladen vyšší důraz na jedince s těmito rozšířenými expanzemi.

Proto je genetické testování důležité pro potvrzení klinické diagnózy FXS a asociovaných onemocnění a k identifikaci nosičů expandovaných alel, kteří plánují děti.

## 2. Skladování a použití

Reagencie mohou být skladovány při 2-8°C v případě, že budete okamžitě používat a při -20°C při dlouhodobém skladování. Před otevřením zkumavek je krátce centrifugujte, abyste odstranili kapky z víčka. Přípravu reakčních mixů je možné provádět při laboratorní teplotě.

## 3. Použití

**Identifikační kit FastFraX™ FMR1** detekuje expanzní mutaci v CGG oblasti FMR1 genu. Kit umožňuje zjistit expanzi opakování CGG v genu FMR1. Je určen pro screening pre-mutace a plné mutace FMR1 alel (> 55 RPT), čímž pomáhá v diagnostice syndromu fragilního X a jiných souvisejících onemocnění, jako je například nestabilní X primární ovariální nedostatečnost a syndromu fragilní X tremor / ataxie. Kit se zakládá na metodě přímé triplet-primované polymerázové řetězové reakce (dTP-PCR). Repetice CGG v oblasti 5' UTR genu FMR1 je amplifikována z genomové DNA a amplikony následně procházejí analýzou křivky tání (MCA) pro rozlišení alel na základě opakování velikosti.

Tento kit je určena pro profesionální použití v klinických laboratořích.

#### 4. Princip testu

Obvykle se pro detekci přítomnosti repetice CGG v genu FMR1 u fragilního X využívá kombinace klasických PCR metod a Southern blot analýzy. Nicméně tato metoda je nevhodná pro rutinní testování ve větším měřítku, protože je časově náročná, nákladná a vyžaduje zásahy uživatele. Kit FastFraX™ překonal tyto nedostatky tím, že se jedná o jednu PCR reakci bez následné další analýzy. Kit používá inovativní PCR techniky, které umožňují snížit náklady a časovou náročnost a zvýšit citlivost a specifickou analýzy.

**Identifikační kit FastFraX™ FMR1** je jednoduchým testem prvního sledu, který umožňuje rozlišit normální alely od expandovaných alel. Tím se podstatně snižuje počet vzorků, které vyžadují potvrzení počtu repetice.

**Poznámka:** Pro následné určení počtu repetice použijte **Rozlišovací kit FastFraX™ FMR1**. Tento kit Vám umožní získat komplexní informaci o počtu repetice a stavu metylace.

#### **FastFraX™ FMR1 Identifikační Kit využívá dTP-PCR a MCA pro detekci expandovaných FMR1 alel**

FastFraX™ FMR1 Identifikační kit klasifikuje jedince jako bez expanze nebo s expanzí na základě velikosti opakování FMR1. Jedná se o kombinaci amplifikace s primery umístěnými přímo v CGG repetici. Používá se sada primerů, které jsou určeny k amplifikaci z 3' konce CGG repetice nemodifikované genomové DNA. Po amplifikaci se provádí MCA zvyšováním teploty v malých krocích a sledování fluorescenčního signálu při každém kroku. Jakmile dojde vlivem teploty k denaturaci dsDNA ampliconů, fluorescence prudce klesne. Teplota denaturace je úměrná velikosti ampliconu.

Negativní první derivace fluorescence proti teplotě ( $-dF/dT$ ) a teplota tání ampliconů jsou vyjádřeny pomocí melt píků. Amplicony expandovaných alel jsou delší a bohatší na opakování CG než amplicony normálních alel, což má za následek její vyšší teplotu tání. V důsledku toho je možno pomocí  $-dF/dT$  a teploty rozlišit melt píky expandovaných alel od normálních alel.

Proto, na základě odlišných profilů píků, je možné rozlišit jednotlivce na základě velikosti jejich FMR1 repetice.

#### **Použití kontrol s různou velikostí opakování umožňuje flexibilitu v klasifikaci jednotlivců.**

Souprava klasifikuje jednotlivce jako neexpandované nebo expandované, vzhledem k vybrané cut-off hodnotě.

Tabulka 1 ukazuje matici vykazovaných výsledků v závislosti na výběru hodnoty cut-off. Je doporučeno používat referenční vzorek s 53 CGG rpt, protože taková hodnota cut-off umožňuje efektivní detekci postižených jedinců s diferenciací normální ( $\leq 44$ ), šedou zónu ( $\geq 45$ , ale  $\leq 54$ ), s premutací ( $\geq 55$ ) a s plnou mutací ( $> 200$ , ACMG guidelines). Nicméně, podrobnější detekce šedé zóny, nebo dokonce normálních vzorků s vyšší repeticí může být dosaženo zařazením 41 nebo 30 rpt cut-off referenčních vzorků. Uživatelé mohou zařadit referenční vzorky na základě jejich potřeb.

Tabulka 1. Klasifikace FMR alel v závislosti na výběru referenčních vzorků

Počet repetic referenčního vzorku (N)	Výsledky z analýzy FastFraX™ FMR1 Identifikační kit	
	Vzorky vyhodnocené jako neexpandované (≤N)	Vzorky vyhodnocené jako expandované (>N)
53	Normální (≤30 rpts) Normální s vyšším počtem repetic (31-44 rpts) Šedá zóna (45-54 rpts)	Premutace (55-200 rpts) Plná mutace (>200 rpts)
41	Normální Normální s vyšším počtem repetic	Šedá zóna Premutace Plná mutace
30	Normální	Normální s vyšším počtem repetic Šedá zóna Premutace Plná mutace

## 5. Materiál

*Reagencie, které jsou součástí kitu*

Ref. číslo	Komponenta	Objem	
		F1-100-V	F1-050-V
<b>F1-PR13-02</b>	<b>Identification Primer Mix</b>	<b>220 µl</b>	<b>100 µl</b>
<b>F1-PCR3-04</b>	<b>Identification PCR Mix A</b>	<b>375 µl</b>	<b>187,5 µl</b>
<b>FX-PCRB-02</b>	<b>FastFraX PCR Mix B</b>	<b>1 250 µl</b>	<b>625 µl</b>
<b>FX-TaQ-01</b>	<b>FastFraX Taq</b>	<b>60 µl</b>	<b>30 µl</b>
<b>FX-SYBR-01</b>	<b>100X SYBR® Green I</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

*Doporučené kontroly, které nejsou součástí kitu*

- Coriell Cell Repositories DNA samples: NA20230 (53 rpt kontrola), NA20244 (41 rpt kontrola) a NA06890 (30 rpt kontrola).

*Reagencie, které nejsou součástí kitu*

- Reagencie pro izolaci genomové DNA
- Ultračistá voda (molecular biology grade)

*Spotřební materiál a vybavení, které nejsou součástí kitu*

- Minicentrifuga
- Mikrocentrifuga
- LightCycler® 480 (Roche Applied Science, #05015278001) a bílá 96-well optická destička s fólií (Roche Applied Science, #04729692001) **NEBO**
- ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Life Technologies, #4351107), MicroAmp® Fast 96-well reakční destička, 0,1 ml (Life Technologies, #4346907) a MicroAmp® Optical adhesive film (Life Technologies, #4360954) **NEBO**
- RotorGene Q HRM system (Qiagen) a strip tubes and caps, 0,1 ml (Qiagen, #981103)  
**Poznámka:** Tento kit byl testován pouze pro uvedené přístroje a uvedené destičky, zkumavky s víčky a fólie.
- Pipety

## 6. Doporučení a varování

- FastFraX™ FMR1 Identifikační kit je screeningový test a není možné jej využít pro přesné určení počtu FMR1 repetice nebo pro určení klinické diagnózy.
- Nepoužívejte při hodnocení výsledků kitu cut-off hodnotu vyšší než je doporučena velikost opakování, (tj. >53 opakování). Nedoporučuje se používat jinou kontrolu pro stanovení cut-off hodnoty neznámých vzorků.
- Všechny použité a nepoužité reagenty je nutné likvidovat v souladu s místními předpisy o chemické bezpečnosti, s biologické bezpečnosti a předpisy na ochranu životního prostředí.
- Všechny vzorky DNA by měly být považovány za potenciálně nebezpečné. Při práci by se měly používat ochranné prostředky. Vyvarujte se rozlití a kontaktu s pokožkou. Dezinfikujte pomocí 10% bělidla nebo 70% alkoholu, pokud je třeba. Řezy a rány musí být chráněny. Ruce musí důkladně být umyty před a po použití kitu a vzorků.
- Nepoužívejte prošlé reagenty.
- Nemíchejte reagenty z různých kitů a šarží.
- Ujistěte se, že použité vybavení je kalibrováno a používáno v souladu s doporučením výrobce.
- Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování kitu.
- Po otevření má kit trvanlivost 3 měsíce, pokud je skladován při -20°C.

## 7. Příprava vzorků

### Izolace DNA

Genomová DNA izolovaná z plné krve (v EDTA) běžnými izolačními metodami je kompatibilní s Identifikačním kitem FastFraX™ FMR1. Po izolaci a přečištění (pokud je nutné) změřte koncentraci genomové DNA (OD 260) a její čistotu (OD 260/280) a skladujte při -20°C pokud není použita ihned.

## 8. Protokol identifikačního kitu FastFraX™ FMR1

Doporučujeme použít v každé analýze:

- 53/41/30 rpt cut-off referenční kontrolu, a
- netemplátovou negativní kontrolu.

Použití cut-off kontroly s CGG expanzí větší než 53 opakování nebylo validováno a není doporučeno (viz sekce Doporučení a varování).

### Část I. Příprava dTP-PCR reakce a melting analýzy

1. Nechte rozmrazit všechny komponenty při laboratorní teplotě s výjimkou Taq polymerázy. Polymerázu vložte do chladicího stojánku, nebo na led. Po rozmrznutí zvortexujte a krátce centrifugujte.
2. Naředte **100X SYBR® Green I (100X)** na 10X. Zvortexujte a krátce centrifugujte.

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
<b>100X SYBR® Green I</b>	2,0
Ultračistá voda	18
<b>Celkem</b>	<b>20</b>

3. Pro každý vzorek napipetujte master mix, do zvláštní jamky, dle následující tabulky 2.

**Tabulka 2. Příprava dTP-PCR reakce**

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
Identification Primer mix	2,0
Identification PCR mix A	3,75
Identification PCR mix B	12,5
FastFraX Taq	0,6
10X SYBR® Green I	0,25
DNA templát (50 ng)	X
Ultračistá voda	5,9 – X
<b>Celkem</b>	<b>25,0</b>

4. Uzavřete destičku fólií, nebo uzavřete zkumavky víčky.  
 5. Lehce centrifugujte destičku/zkumavky.  
 6. Vložte destičku/zkumavky do Real-Time PCR přístroje a spusťte program dle části II.

### **Část II. dTP-PCR cyklování a melting analýza**

Poznámka: Zanechte všechny parametry defaultně, pokud není specifikováno jinak.

#### **Pro LightCycler® 480**

- Nastavte „New Experiment“:
  - Nastavte „Detection Format“ na SYBR Green 1/HRM Dye.
  - Nastavte „Block Size“ na 96.
  - Nastavte „Reaction Volume“ na 25 μl.
- V „Subset Editor“ nastavte následující PCR protokol:

**Tabulka 3a. Nastavení analýzy dNT-PCR reakce pro LightCycler 480**

Fáze	Teplotní nastavení	Počet cyklů
<b>Hot Start</b>	95°C; 15 min	1
<b>Cyklování</b> Nastavte „Analysis Mode“ na Quantification	99°C; 2 min	40
	65°C; 2 min	
	72°C; 3 min Single acquisition mode	
<b>Finální extenze</b>	72°C; 10 min	1
<b>Denaturace</b>	95°C; 1 min	1
<b>MCA</b> Nastavte „Analysis Mode“ na Melting Curves	60°C; 1 min	1
	99°C; N/A Continuos acquisition mode 50 acquisitions per °C Ramp rate 0,01°C/sec;	1

### Pro ABI 7500 Fast:

1. v „Experiment Properties“ vyberte:
  - Nastavte experiment type na Quantitation – Comparative CT ( $\Delta\Delta CT$ ).
  - Vyberte „Sybr Green“ jako reagents.
  - Nastavte ramp speed na „Standard“.
2. V „Plate Setup“:
  - V „Assign Targets and Samples“.
  - Nastavte „Passive Reference“ na „None“.
3. V „Run Method“ nastavte PCR protokol dle následující tabulky:
  - Nastavte „Reaction Volume per well“ na 25  $\mu$ l.

**Tabulka 3b. Nastavení analýzy dNT-PCR reakce pro ABI 7500 Fast**

Fáze	Teplotní nastavení	Počet cyklů
Hot Start	95°C; 15 min	1
Cyklování Nastavte „Analysis Mode“ na Quantification	99°C; 2 min	40
	65°C; 2 min	
	72°C; 3 min	
	Nastavit data collection na hold	
Finální extenze	72°C; 10 min	1
Denaturace	95°C; 1 min	1
MCA	60°C; 1 min	1
	99.9°C; 30 sec Nastavit data collection na ramp Ramp percentage 0,5%	1

### Pro Rotor-Gene Q (HRM)

1. Při nastavení „New Run“ vyberte „HRM with Pre-Amplification“.
  - Vyberte příslušný typ rotoru.
2. Klikněte „Edit Profile“ a nastavte PCR protokol dle následující tabulky:

**Tabulka 3c. Nastavení analýzy dNT-PCR reakce pro Rotor-Gene Q HRM**

Fáze	Teplotní nastavení	Počet cyklů
Hot Start	95°C; 15 min	1
Cyklování Nastavte „Analysis Mode“ na Quantification	99°C; 2 min	40
	65°C; 2 min	
	72°C; 3 min	
	Nastavit data acquisition na Green channel	
Finální extenze	72°C; 10 min	1
Denaturace	95°C; 1 min	1
HRM	75°C → 99°C Rising by 0,5°C each step Wait for 5 sec for each step afterwards Ověřte, že je „Gain optimisation“ nastaveno	1

### Část III. Generování křivek tání a píků

#### **Pro LightCycler® 480:**

1. Klikněte na políčko „Analysis“. V okně „Create New Analysis“ vyberte „T<sub>m</sub> calling“.
2. Klikněte na políčko „Max Peaks“ v dolní části obrazovky a vyberte „Max Peaks (6 or less)“.
3. Klikněte na políčko „HybProbe Format“ v dolní části obrazovky a vyberte „SYBR Green I Format“.
4. Klikněte na „Calculate“ a software provede analýzu a zobrazí MCA profily.

#### **Pro ABI 7500 Fast:**

1. Klikněte na tabulku „Analysis“. V „Melt Curve“ vyberte „Derivate Reporter“ pro vygenerování MCA profilů.

#### **Pro Rotor-Gene Q (HRM):**

1. Klikněte na políčko „Analysis“. V okně „Melt“ vyberte „HRM“ a software provede analýzu a zobrazí MCA profily.

## **9. Interpretace dat**

Identifikační kit FastFraX™ FMR1 umožňuje rozlišit vzorky s normální a expandovanou FMR1 alelou. Rozlišení normálních od premutovaných a plně mutovaných alel je umožněno analýzou teplot tání PCR amplikonů. Hodnota cut-off je nastavena jako teplota, při které profil MCA zvolené referenční kontroly spadne na baseline. Porovnáním teploty, při které se profil MCA vzorku (-dF/dT) spadl na baseline a teploty referenční kontroly (zvolená cut-off hodnota), lze vzorky klasifikovat jako neexpandované nebo expandované, v porovnáním k vybrané referenční kontrole.

**Tabulka 4. Předpokládaná kritéria pro klasifikaci na základě teploty, při které profily spadly na baseline**

Počet repetic referenčního vzorku (N)	Klasifikační kritérium (°C)*	
	Neexpandované (≤N)	Expandované (>N)
53	≤ 92,6	> 92,6
41	≤ 91,4	> 91,4
30	≤ 90,0	> 90,0

\*Teploty zde uvedené byly vytvořeny a ověřeny na základě referenčních vzorků použitých při studii 528 vzorků genomové DNA odvozené z plné krve. Referenční vzorky byly získány z Coriell a dříve charakterizovány pomocí PCR a / nebo analýzou Southern blot.

Typicky, MCA profily, které mají hladinu -dF/dT před nebo v cut-off teplotě referenční kontroly jsou považovány za **neexpandované** (vzhledem k vybrané kontrole).

Naproti tomu, MCA profily, které vracejí do výchozí -dF/dT hladiny až po cut-off teplotě



referenční kontroly jsou považovány jako **expandované neexpandované** (vzhledem k vybrané kontrole). Pokud byla použita cut-off kontrola s 30 resp. 40 opakováními a MCA profily vzorků se vracejí na hladinu  $-dF/dT$  v cut-off teplotě této kontroly, jsou tyto vzorky považovány za **neexpandované** (viz obr. 3). Pokud byla použita cut-off kontrola s 53 opakováními, MCA profily vzorků, které se vracejí na hladinu  $-dF/dT$  v cut-off teplotě této kontroly jsou považovány za expandované.

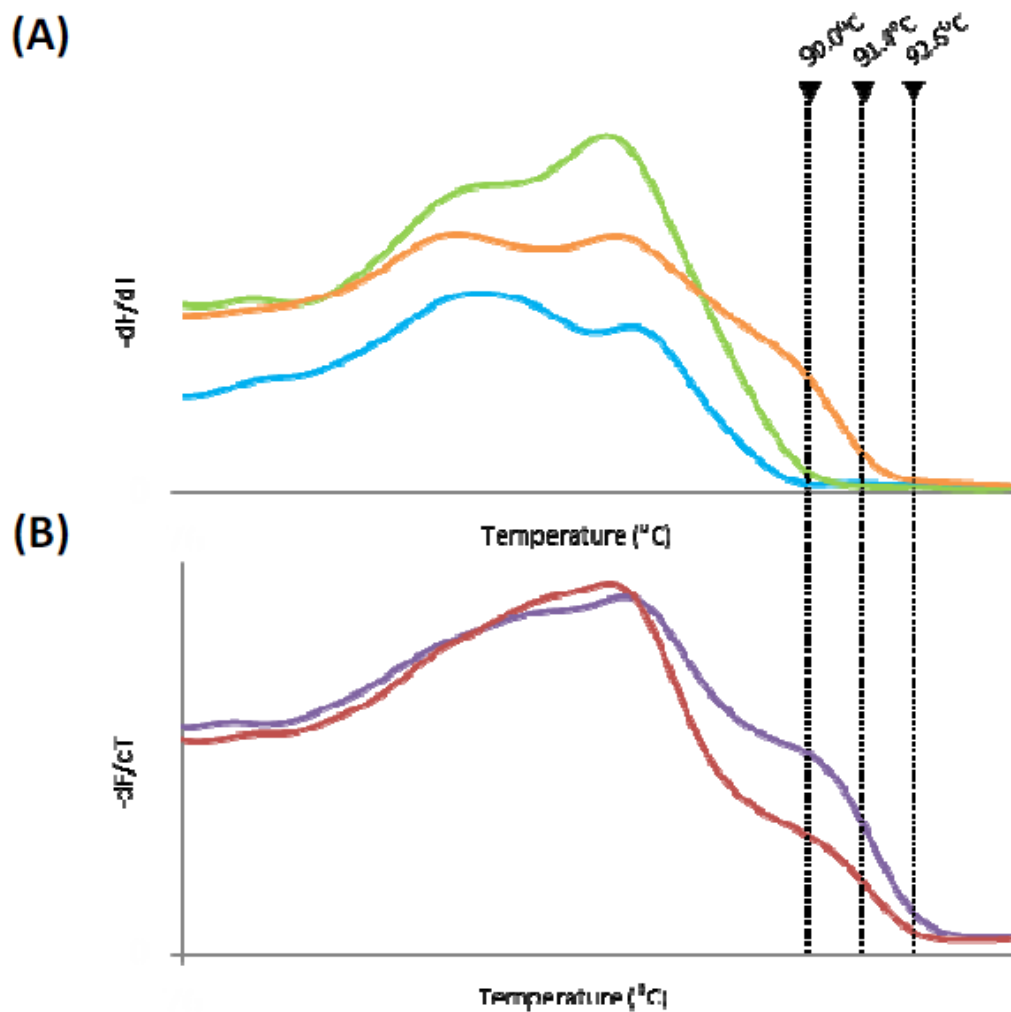
*Poznámka: Pokud jsou použity jiné, než uvedené cut-off referenční kontroly (viz sekce 5: Materiál), musí si uživatel u dalšího testování dát větší pozor při klasifikaci MCA profilů, které se vracejí na baseline v cut-off teplotě.*

Vzorky, které mají nulovou hodnotu nebo atypické profily MCA (profil, který se má hodnotu  $-dF/dT$  před nebo při teplotě cut-off referenční kontroly, ale amplituda signálu je o 30% nižší, než je u kontroly) nebo profily překrývající se s referenčním profilem tak, že těžké rozeznat mezi nimi rozdíl, mohou být kvalifikovány jako **neurčitě**. Tyto vzorky by měly být znovu testovány, aby byla vyloučena technická chyba. **Opakující se neurčitý výsledek** znamená, že vzorek může mít delecí ve FMR1, a měl by být testován pomocí sady FastFraX™ FMR1 Sizing kit nebo FastFraX™ FMR1 Methylation status kit.

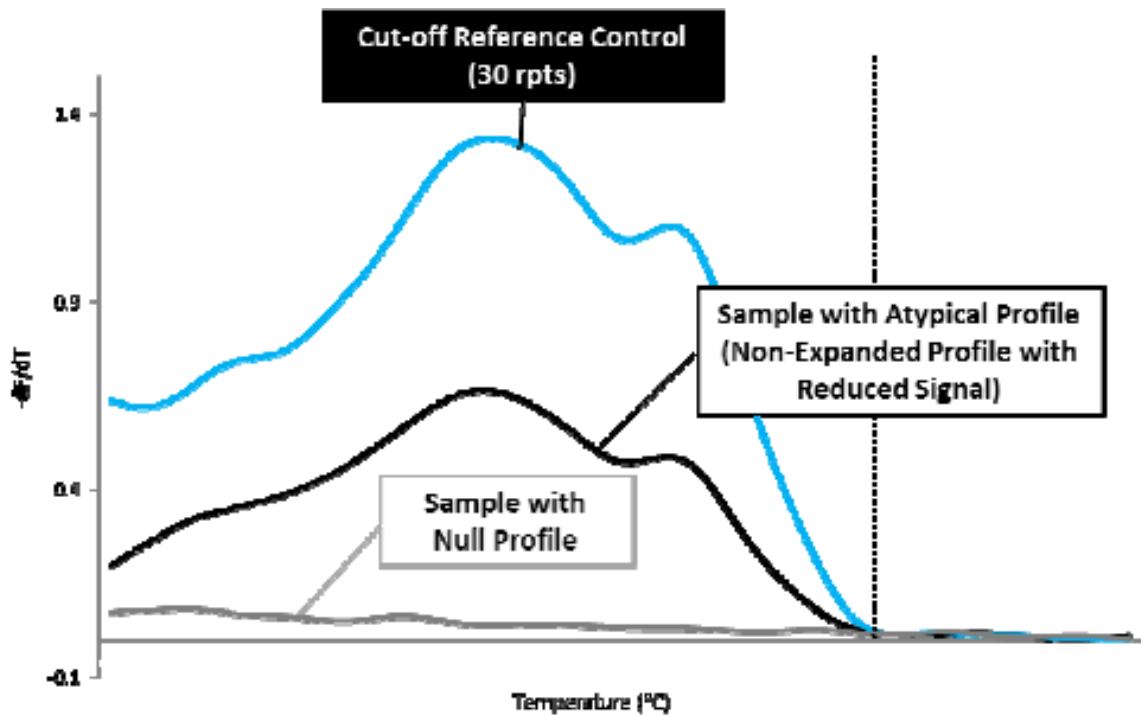
Reprezentativní profily MCA, jak je znázorněno na Obr. 1 byly získány s genomickou DNA z FXS referenčních standardních buněčných linií z Coriell Cell Repository a s analýzou pomocí Rotor-Gene Q HRM. Jedná se o typické profily, které mohou být použity jako obecné vodítko pro interpretaci dat. MCA profil z expandovaného vzorku pokračuje na baseline hladinu  $-dF/dT$  až po referenční teplotě cut-off.

Nicméně, teplota cut-off se může lišit v závislosti na typu Real-Time PCR přístroje (rozdíl může být  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) a proto je, dle zásad správné laboratorní praxe, důležité, aby byl v každém runu přítomen vzorek o známé délce repetice (viz také tabulka 1), který poté slouží jako kontrola pro získání referenční cut-off hodnoty specifické pro každý run. Cut-off hodnota je teplota, při které dosáhne MCA profil (pík) referenční kontroly baseline a je možné ji použít k rozlišení vzorků.

Jen data získaná z validních runů by měla být analyzována. Run je validní, pokud referenční kontrola generuje typický MCA profil a cut-off, a nejsou v profilu MCA žádné známky kontaminace DNA templátem u netemplátové negativní kontroly. Pro analýzu výsledků je na obrázku 3 uvedeno doporučené schéma interpretace dat.



Obrázek 1 (A). MCA profily doporučených kontrol: 30 rpt (modrá), 41 rpt (zelená) a 53 rpt (oranžová). Cut-off referenčních kontrol jsou označeny svislými černými čarami. U netemplátové negativní kontroly můžeme pozorovat malý primer dimer pík v rozmezí teplot 75-76°C (není na obrázku vidět) a tento pík neovlivňuje analýzu. (B) MCA profily expandovaných vzorků: NA06907, 29/85 rpts (fialová) a NA07537, 28-29/>200 rpts (červená).



Obrázek 2. MCA profil doporučené 30 rpt kontroly 30 (modrá). Cut-off referenční kontroly je označena svislou přerušovanou černou čarou. Vzorek s atypickým profilem (černá) dosáhl hodnotou  $-dF/dT$  baseline před cut-off referenční kontrolou, ale signál je oproti 30 rpt referenční kontrole nižší. Vzorek s nulovým profilem (šedá) má plochý profil.

**Pro kompletní manuál (obsahující detaily analytického stanovení a troubleshooting) kontaktujte, prosím, email: [product@thebiofactory.com](mailto:product@thebiofactory.com).**

## 10. Prohlášení o odmítnutí záruk

Výrobce omezuje záruku na testovací kit, stejně jako, že test bude fungovat jako diagnostický test in vitro v rámci omezení a specifikace, jak je popsáno v návodu k výrobku, pokud je použit přesně v souladu s instrukcemi obsaženými v něm. Výrobce se zříká jakékoli záruky výslovně uvedené nebo odvozené včetně takové výslovně uvedené nebo odvozené záruky, pokud jde o prodejnost, vhodnosti pro použití nebo implicitní nástroj pro jakýkoli účel. Odpovědnost výrobce je omezena buď výměnou výrobku nebo vrácení kupní ceny výrobku, a v žádném případě není výrobce povinen uhradit částku vyšší než je kupní cena zboží, které je poškozeno. Výrobce neručí kupujícímu nebo třetím stranám za škodu, poškození nebo ekonomické ztráty, způsobené jakýmkoli způsobem výrobkem v provozu nebo při použití.

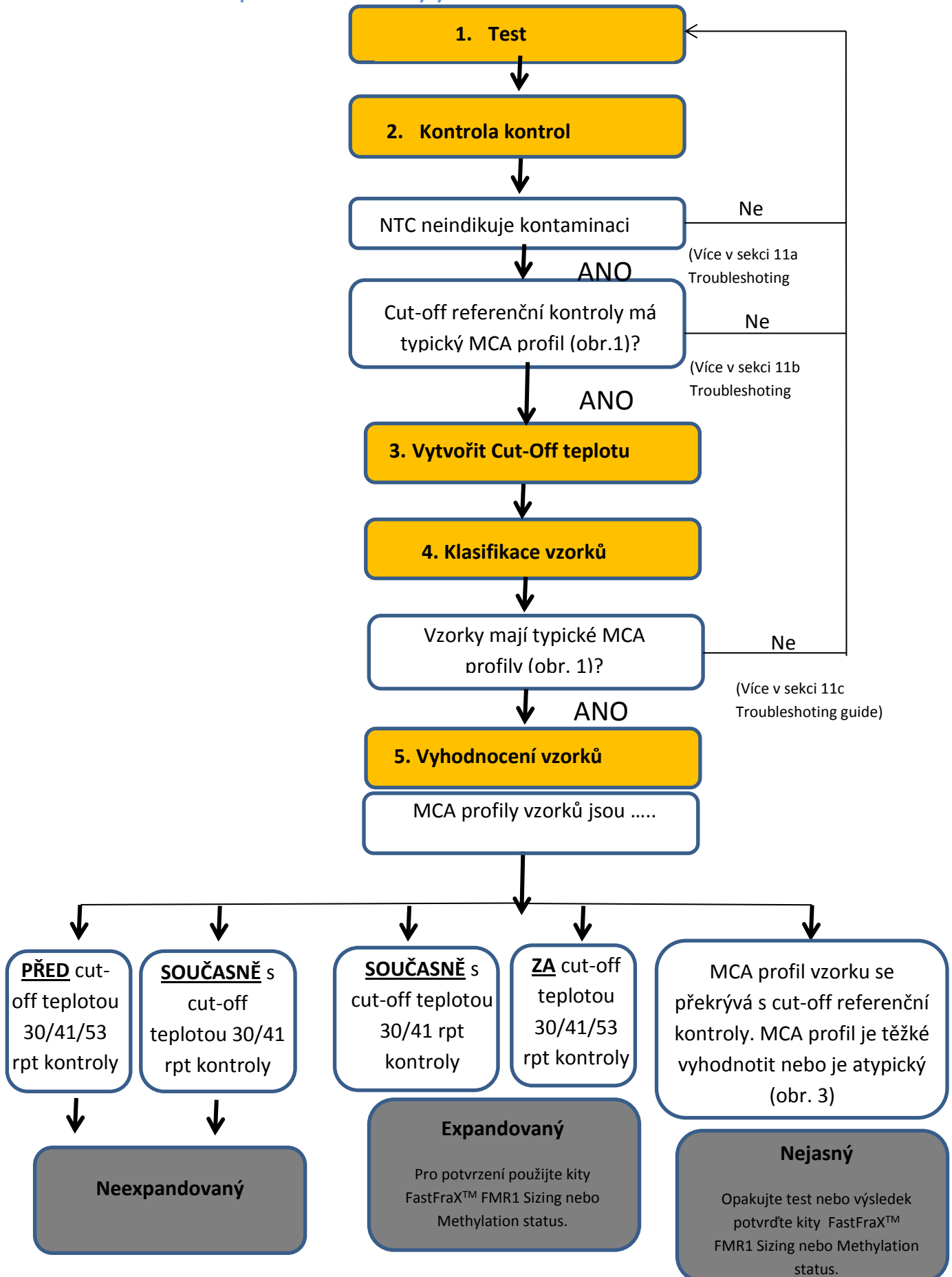
OZNÁMENÍ: Každý kit je vyroben, dodán a odeslán dle objednávky, ale vzhledem k neustálému vývoji si společnost vyhrazuje právo zlepšit / změnit některé specifikace / komponenty bez předchozího informování / oznámení kupujícímu.

## 11. Reference

1. Willemsen, R., J. Levenega, and B.A. Oostra, CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clinical genetics*, 2011. 80(3): p. 214-25.
2. Bassell, G.J. and S.T. Warren, Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*, 2008. 60(2): p. 201-14.

3. Wang, L.W., E. Berry-Kravis, and R.J. Hagerman, Fragile X: leading the way for targeted treatments in autism. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2010. 7(3): p. 264-74.
4. Bretherick, K.L., Fluker, M.R. and Rbinson, W.P., FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet*, 2005. 117: p. 376-82.

Obrázek 3. Interpretační schéma analýzy vzorků.



## 2. Parametry kitu

### **Analytická sensitivita a specifita**

Pro analytickou sensitivitu byla mez detekce ověřena pomocí ředící řady DNA. Doporučený rozsah je 50 ng genomové DNA na test.

Pro analytickou specifitu bylo množství DNA zvýšeno, aby se zjistilo, zda zvýšení koncentrace nepovede k potenciálně zkřížené reaktivity a nebude mít vliv na výkon. Dokonce i se zvýšením množství DNA, nedošlo k významnému kolísání amplitudy, tvaru profilu a teploty, při které  $-dF / dT$  baseline byla stanovena. Nedošlo k žádné změně ve výkonu kitu, pokud jde o rozlišování mezi neexpandovanou a expandovanou FMR1 alelou, což naznačuje vysokou analytickou specifitu soupravy.

### **Přesnost**

Opakovatelnost a reprodukovatelnost byly hodnoceny. Variační koeficient teploty byly obecně nízké pro intra-assay a inter-test variaci (CV <1%).

### **Klinická výkonnost**

Studie hodnocení výkonnosti byla provedena na 528 vzorků genomové DNA (od krve odvozené), které byly dříve charakterizovány na svou velikost FMR1 opakování prostřednictvím kombinace PCR a Southern blotting. Vzorky byly testovány s FastFraX™ FMR1 Identifikační kit, pomocí 53, 41 a 30 rpt referenčních kontrol jako cut-off hodnoty. Vzorky byly klasifikovány jako neexpandované nebo expandované, vzhledem k hodnotám cut-off. Všechny tři soubory dat uvádějí minimální falešně negativní výsledky, maximální klinickou senzitivitu a negativní prediktivní hodnotu (tabulka 5, níže). Zejména použití 53 rpt referenční kontroly, jako standard pro určení cut-off hodnoty, přinesly vynikající výsledky, správné podávání výsledků o všech premutacích a plných mutacích jako expandované.

**Tabulka 5. Sumarizace klinické výkonnosti**

Velikost cut-off referenční kontroly	Klinická sensitivita	Klinická specifita	Výkonnost (%)	
			Pozitivní prediktivní hodnota	Negativní prediktivní hodnota
53	100,00	99,59	95,12	100,00
41	97,62	96,09	68,33	99,79
30	93,67	81,35	68,20	96,78

### 3. Troubleshooting guide

#### A) Ne templátová negativní kontrola

Problém	Pravděpodobná příčina	Doporučení
MCA profile netemplátové negativní kontroly má pík v oblasti >80°C	Kontaminace master mixu DNA templátu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Opakujte test, s opatrností pipetujte vzorky DNA tak, abyste zabránili kontaminaci master mixu</li> </ul>

#### B) Cut-off referenční kontroly

Problém	Pravděpodobná příčina	Doporučení
Není přítomen žádný MCA profile NEBO získané MCA profily se nepodobají předpokládanému referenčnímu profilu (viz obr. 1)	Pipetovací chyba	<ul style="list-style-type: none"> <li>Opakujte test, dejte pozor, abyste přidali všechny reagenty do master mixu</li> </ul>
	Nedostatečná/degradovaná DNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ověřte koncentraci a kvalitu použité DNA</li> <li>Pokud je třeba, použijte čerstvý vzorek DNA (použijte novou šarži referenční DNA) a opakujte test</li> </ul>
	Nesprávné nastavení PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ověřte v run report nastavení přístroje</li> <li>Pokud je nastavení PCR v přístroji v pořádku, opakujte MCA protokol u ampliconů (uložených při 4°C)</li> <li>Pokud je špatné nastavení jak PCR tak i MCA, opakujte test</li> </ul>
	Expirované reagenty	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ověřte datum expirace na zkumavkách a na kitu</li> <li>Pokud je potřeba, opakujte test s novým neexpirovaným kitem</li> </ul>

#### C) Vzorky

Problém	Pravděpodobná příčina	Doporučení
---------	-----------------------	------------

<p>Získané MCA profily se nepodobají předpokládanému referenčnímu profilu (viz obr. 1)</p> <p><b>NEBO</b></p> <p>získané MCA profily jsou atypické (viz obr. 2)</p> <p><b>NEBO</b></p> <p>MCA profil je nulový (viz obr. 2)</p>	<p>Nedostatečná/degradovaná DNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ověřte koncentraci a kvalitu použité DNA</li> <li>• Pokud je třeba, použijte čerstvý vzorek DNA (použijte novou šarži referenční DNA) a opakujte test</li> </ul> <p><b>Poznámka:</b></p> <p>Pokud se opakují nulové/atypické výsledky a pipetovací nebo technické chyby byly odstraněny, vzorek má zřejmě delecí v FMR1 sekvenci a vzorek musí být otestován kitem FastFraX™ FMR1 Sizing nebo Methylation Status.</p>
---	-------------------------------------	--



**The BioFactory Pte Ltd**  
 10 Ubi Crescent Lobby C  
 #02-41 Ubi Techpark  
 Singapore 408564

Email: [product@thebiofactory.com](mailto:product@thebiofactory.com)  
 Tel: +65 6848 1028



**MT Promedt Consulting GmbH**  
 Altenhofstr. 80  
 66386 St. Ingbert  
 Germany

Email: [ear@mt-procons.com](mailto:ear@mt-procons.com)  
 Tel: +49 (0) 6894 581020