

# CAH RealFast™ CNV Assay

REF 7-410  $\Sigma$  100 reactions  
-30°C -15°C CE IVD



**ViennaLab Diagnostics GmbH**  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Intended Use

The CAH RealFast™ CNV Assay is a fast and accurate real-time PCR test to determine copy number variations (CNV) of the *CYP21A2* gene. Partial or complete deletions of *CYP21A2* are known to be associated with defective adrenal steroid metabolism. The kit is designed to identify patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH) and should be used in conjunction with the CAH 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\_007941.2

## 2. Introduction

CAH is an autosomal recessive disorder of the adrenal cortex (incidence 1:10,000-15,000) caused in about 95% of cases by genetic defects in the steroid 21-hydroxylase gene *CYP21A2*. The resulting lack of cortisol and aldosterone biosynthesis is ultimately leading to androgen excess. The wide range of clinical manifestations includes classic salt-wasting CAH, classic simple-virilizing CAH as well as mild non-classic forms. The underlying aberrations within the *CYP21A2* gene are (1) point mutations, (2) small deletions/conversions and (3) chromosomal rearrangements like complete *CYP21A2* deletions, duplications or chimeric *CYP21A1P/CYP21A2* genes. Large deletions including *CYP21A1P/CYP21A2* chimeras account for 27% to 39% of mutant alleles in Europe and are in most cases associated with a severe form of the disease.

## 3. Kit Contents

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial	□ white cap	1000 µl
CAH CNV Assay Mix	1 vial	■ purple cap	550 µl
CAH 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 CAH CNV Assay Mix consists of gene-specific primers as well as dual-labeled hydrolysis probes for *CYP21A2* and the endogenous control (EC) gene. A CAH CNV Calibrator representing the normal status with two functional *CYP21A2* 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

CAH 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 *CYP21A2* and endogenous control (EC) gene fragments with 141 bp each. Further components are two dual-labeled, gene-specific hydrolysis probes, the **FAM-labeled CYP21A2 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 CAH RealFast™ CNV Assay is a relative quantitation assay and compares the amount of both nucleic acid targets (*CYP21A2* and EC) in relation to the CAH 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 CAH 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 Cycler (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.viennalab.com](http://www.viennalab.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 at a final concentration of 1 µM to the 2x Probe Mix.

### 5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 107 alleles testing positive for a *CYP21A2* deletion / duplication with a reference kit. The CAH RealFast™ CNV Assay determined all 107 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 435 alleles testing negative for a *CYP21A2* deletion / duplication with a reference kit. The CAH RealFast™ CNV Assay determined all 435 alleles as negative, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 0.2 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. DNA isolated from various specimens (e.g. whole peripheral blood or dried blood spots) 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 CAH CNV Calibrator

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

» **Note:** Control samples like the CAH 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
2x RealFast™ Probe Mix	10 µl	360 µl
CAH CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>540 µl</b>

### 7.6. Preparation of reactions in triplicate

Prepare the reactions for the NTC, all samples and the CAH 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
	<b>60°C</b>	1 min	Annealing/Extension – <b>Data acquisition</b> 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
	<b>60°C</b> <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension – <b>Data acquisition</b> 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 **CYP21A2 (FAM-channel)** by means of the normalizer **EC (HEX-channel)** and comparing it to the CAH 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 (as well as most CYP21A1P/CYP21A2 chimeric genes) in significantly lower values. Due to potential measuring errors it is advisable to repeat test reactions which show relative quantities close ( $\pm 0.05$ ) 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.

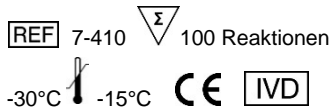
» **Note:** The 8bp deletion in exon 3 (c.329\_336del GAGACTAC) leads to the same results as a complete CYP21A2 deletion or most CYP21A1P/CYP21A2 chimeric genes. Only CYP21A1P/CYP21A2 chimeras which do not include the 8bp deletion will appear normal.

Homozygous deletions, as well as homozygous chimeric genes and 8bp deletions result in a drop-out of signal for CYP21A2. Only a signal for the EC can be detected.«

Real-time PCR Instrument	Threshold	Relative Quantities			Terminology
		Deletion	Normal	Duplication	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel. Quant.)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.34	> 1.34	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	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.



## 1. Verwendungszweck

Der CAH RealFast™ CNV Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion von Veränderungen der Kopienzahl (engl.: copy number variation, CNV) des *CYP21A2* Gens. Partielle oder komplette Deletionen von *CYP21A2* sind ein bekannter Grund für einen gestörten Steroid-Metabolismus. Der Kit ermöglicht die Identifizierung von Patienten mit Adrenogenitalem Syndrom (AGS; engl.: Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH) und sollte zusammen mit dem CAH 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\_007941.2

## 2. Einleitung

AGS ist eine autosomal rezessive Erkrankung der Nebennierenrinde (Inzidenzrate 1:10,000-15,000), die in ca. 95% der Fälle durch genetische Defekte im Steroid-21-Hydroxylase-Gen *CYP21A2* verursacht wird. Der daraus resultierende Mangel an Cortisol und Aldosteron führt letztlich zu einem Überschuss an Androgenen. Das weite Spektrum an klinischen Manifestationen beinhaltet klassische (Salzverlustsyndrom, Virilisierung) und nicht klassische Formen von AGS. Die zugrundeliegenden Anomalien des *CYP21A2* Gens sind (1) Punktmutationen, (2) kleinere Deletionen/Genkonversionen und (3) chromosomale Änderungen wie komplette *CYP21A2* Deletionen, Duplikationen oder chimäre *CYP21A1P/CYP21A2* Gene. In Europa sind 27% bis 39% aller mutierten Allele große Deletionen inklusive *CYP21A1P/CYP21A2* Chimären, wobei diese Mutationen meist mit der schwersten Form der Erkrankung verbunden sind.

## 3. Kit Bestandteile

RealFast™ 2x Probe Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> weisser Deckel	1000 µl
CAH CNV Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> violetter Deckel	550 µl
CAH CNV Calibrator	1 Vial	<input type="checkbox"/> grüner Deckel	75 µl

Der 2x RealFast™ Probe Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffer. Der CAH CNV Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern und zwei allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolysesonden für *CYP21A2* und das endogene Kontrollgen (EC). Weiters ist ein CAH CNV Calibrator, der den Normalzustand von zwei intakten *CYP21A2* Kopien repräsentiert, im Kit vorhanden.

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

## 4. Lagerung und Stabilität

Der CAH RealFast™ CNV Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°C. Alternativ bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2-8°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 *CYP21A2* und die endogene Kontrolle (EC), sowie zwei doppelt-markierte, genspezifische Hydrolysesonden (**FAM-markierte CYP21A2-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 CAH RealFast™ CNV Assay ist ein Test zur relativen Quantifizierung und vergleicht die Menge an PCR-Produkt der beiden Zielsequenzen (*CYP21A2* und EC) in Relation zum CAH 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 CAH 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 Cycloer (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](http://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 107 Allelen, die mit einem Referenztest positiv auf die *CYP21A2* Deletion / Duplikation getestet wurden, bestimmt. Der CAH RealFast™ CNV Assay typisierte alle 107 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 435 Allelen, die mit einem Referenztest negativ auf die *CYP21A2* Deletion / Duplikation getestet wurden, bestimmt. Der CAH RealFast™ CNV Assay typisierte alle 435 Allele als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 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, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionskit, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter.

## 7. Arbeitsanleitung

### 7.1. DNA Extraktion

DNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten. DNA aus verschiedenen Proben (z.B. Vollblut oder Blutkärtchen) 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 CAH CNV Calibrator

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** den CAH 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 CAH 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 CAH 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
2x RealFast™ Probe Mix	10 µl	360 µl
CAH CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>540 µl</b>

### 7.6. Vorbereitung der Reaktionen in Triplikaten:

Bereiten Sie die Reaktionen für NTC, alle Proben und den CAH 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 CAH 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 -
			<b>Datenaufnahme</b> 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 <i>*für 36-well Rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension -
			<b>Datenaufnahme</b> im Green und Yellow channel

## 8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Die Variation der **Kopienzahl (CNV)** wird über eine relative Quantifizierung von **CYP21A2 (FAM-Kanal)** mittels Normalisierung durch die endogene Kontrolle **EC (HEX-Kanal)** und anschließendem Vergleich mit dem CAH 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 (und die meisten **CYP21A1P/CYP21A2** Chimären) in signifikant niedrigere Werte resultieren. Aufgrund der Möglichkeit von Messfehlern ist es empfehlenswert Reaktionen, die relative Mengen nahe ( $\pm 0.05$ ) 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:** Die 8bp Deletion in Exon 3 (c.329\_336del GAGACTAC) führt zum gleichen Ergebnis wie eine komplette CYP21A2 Deletion oder die meisten CYP21A1P/CYP21A2 chimären Gene. Nur CYP21A1P/CYP21A2 Chimären, welche keine 8bp Deletion enthalten, erscheinen als normal.

Homozygote Deletionen, als auch homozygote chimäre Gene und 8bp Deletionen verursachen einen Ausfall des Signals für CYP21A2. Es kann nur das Signal für die endogene Kontrolle (EC) detektiert werden. «

Real-time PCR Instrument	Schwellenwert	Relative Mengen			Terminologie
		Deletion	Normal	Duplikation	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel. Quant.)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.34	> 1.34	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	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.

# CAH RealFast™ CNV Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

REF 7-410  $\Sigma$  100 réactions

-30°C -15°C



## 1. Utilisation

Le CAH RealFast™ CNV Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter les variabilités du nombre de copies du gène *CYP21A2* (anglais: copy number variation, CNV). Les délétions partielles ou complètes du gène *CYP21A2* sont une cause connue d'un métabolisme perturbé des stéroïdes. Ce kit permet d'identifier les patients atteints d'une hyperplasie surrénale congénitale (HSC; anglais: congenital adrenal hyperplasia, CAH) et devrait être utilisé conjointement avec le CAH StripAssay® ou un séquençage ADN. Ce test semi-quantitatif permet de différencier entre délétions, duplications, un nombre normal de copies dans l'extrait d'ADN génomique humain. Séquence de référence: HGVS: NG\_007941.2

## 2. Introduction

Le HSC est un trouble autosomique récessif des surrénales (incidence 1:10,000-15,000), causé dans 95% des cas par une déficience génétique dans le gène hydroxylase *CYP21A2* stéroïde 21. Le manque résultant de cortisol et d'aldostérone mène finalement à un excès d'androgènes. Le large spectre des manifestations cliniques inclut des formes classiques et non-classiques de HSC (perte de sel, virilisation). Les anomalies sous-jacentes au sein du gène *CYP21A2* sont les (1) mutations de points, (2) les petites délétions/conversions de gènes, (3) les réarrangements chromosomiques comme des délétions complètes du gène *CYP21A2*, des duplications ou des gènes chimériques *CYP21A1P/CYP21A2*. En Europe de 27% à 39% des allèles mutés sont de grandes délétions incluant les chimères *CYP21A1P/CYP21A2* et sont liées la plupart du temps à des formes des plus sévères de la maladie.

## 3. Composants du kit

RealFast™ 2x Probe Mix 1 vial  couvercle blanc 1000 µl  
CAH CNV Assay Mix 1 vial  couvercle violet 550 µl  
CAH CNV Calibrator 1 vial  couvercle vert 75 µl

Le RealFast™ 2x Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le CAH CNV Assay Mix se compose de primers gène-spécifiques *CYP21A2* 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 CAH CNV Calibrator représentant l'état normal de deux copies intactes du *CYP21A2*.

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

## 4. Stockage et stabilité

Le CAH 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 gène-spécifiques pour amplifier un fragment de *CYP21A2* 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 CYP21A2** 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 CAH RealFast™ CNV Assay est un test de quantification relative et compare le nombre de séquences cibles d'acide nucléique (*CYP21A2* and EC) par rapport au CAH 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 CAH 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)
- ✓ LightCycle® 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](http://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 107 allèles qui ont été testées positives à la délétion / duplication *CYP21A2* à partir d'un test de référence. Le test CAH RealFast™ CNV a typé positives 107 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 435 allèles, qui ont été testées négatives à la délétion / duplication *CYP21A2* à partir d'un test de référence. Le test CAH RealFast™ CNV a typé négatives 435 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

Limite de détection: 0.2 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. 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 CAH CNV Calibrator

Incluez **toujours** le CAH CNV **Calibrator**. Le calibre (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 CAH 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 calibre 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 calibre + 3 x NTC), comptez quatre à six réactions supplémentaires pour compenser une imprécision de pipetage:

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

## 7.6. Préparation des réactions en triple exemplaire:

Préparez les réactions pour le NTC, tous les échantillons et le CAH 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 CAH CNV 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
	<b>60°C</b>	1 min	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal FAM et HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	10 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation
	<b>60°C</b> <i>*)pour 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> 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 **CYP21A2 (canal-FAM)** au moyen de la normalisation par le contrôle endogène **EC (canal-HEX)** et en comparant ensuite au CAH 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 calibre 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 (tout comme la plupart des gènes chimériques CYP21A1P/CYP21A2) 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 ( $\pm 0.05$ ) 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:** La délétion 8bp en exon 3 (c.329\_336del GAGACTAC) mène au même résultat qu'une délétion complète CYP21A2 ou la plupart des gènes chimérique CYP21A1P/CYP21A2. Seules les chimères CYP21A1P/CYP21A2 qui n'incluent pas la délétion 8bp, apparaîtront normales.

Les délétions homozygotes tout comme les gènes chimériques homozygotes et les délétions 8bp provoquent une défaillance du signal pour CYP21A2. On peut seulement détecter un signal pour le contrôle endogène (EC). »

Machines PCR en temps réel	Seuil	Quantités relatives			Terminologie
		Délétion	Normal	Duplication	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatique	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel Quant)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.34	> 1.34	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	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.

# CAH RealFast™ CNV Assay

REF 7-410  $\Sigma$  100 reazioni  
-30°C -15°C CE IVD



**ViennaLab Diagnostics GmbH**  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilizzo

Il CAH RealFast™ CNV Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione delle variazioni del numero di copie (inglese: copy number variation, CNV) del gene *CYP21A2*. È noto che le delezioni parziali o complete di *CYP21A2* siano associate a un difettoso metabolismo steroideo surrenale. Il kit è progettato per identificare i pazienti affetti da iperplasia surrenalica congenita (inglese: congenital adrenal hyperplasia, CAH) e va utilizzato in associazione al kit CAH StripAssay® o al sequenziamento del DNA. Il test semi-quantitativo discrimina tra delezioni, duplicazioni e numero normale di copie in un estratto di DNA genomico umano. Sequenza di riferimento: HGVS: NG\_007941.2

## 2. Introduzione

La CAH è un disturbo autosomico recessivo della corteccia surrenale (incidenza 1:10,000-15,000) provocato in circa il 95% dei casi da difetti genetici del gene steroide 21-idrossilasi *CYP21A2*. La conseguente assenza di biosintesi di cortisolo e aldosterone comporta alla fine un eccesso di androgeni. Nel vasto spettro di manifestazioni cliniche vanno menzionate la CAH classica con perdita di sali, la CAH classica con virilizzazione semplice nonché forme lievi non classiche. Le aberrazioni soggiacenti al gene *CYP21A2* sono (1) le mutazioni puntiformi, (2) piccole delezioni/conversioni e (3) riarrangiamenti cromosomici come delezioni complete del gene *CYP21A2*, duplicazioni o geni *CYP21A1P/CYP21A2* chimerici. Le delezioni di maggiore entità, come le chimere *CYP21A1P/CYP21A2*, rappresentano dal 27% al 39% degli alleli mutanti in Europa e nella maggior parte dei casi sono associate a forme severe della patologia.

## 3. Contenuto del kit

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

Il RealFast™ 2x Probe Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato. Il CAH CNV Assay Mix consiste di primer specifici per il gene e di sonde di idrolisi a doppia etichetta per *CYP21A2* e il gene di controllo endogeno (EC). Insieme al kit viene fornito un CAH CNV Calibrator che rappresenta lo stato normale con due copie del gene *CYP21A2* funzionali.

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

## 4. Conservazione e stabilità

Il CAH 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 *CYP21A2* e del gene di controllo endogeno (EC). Altre componenti includono due sonde di idrolisi gene-specifiche a doppia etichetta, la **sonda CYP21A2 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' quencher 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 CAH RealFast™ CNV Assay è un metodo di quantificazione relativa che confronta la quantità di entrambi i target di acido nucleico (*CYP21A2* ed EC) in rapporto al CAH 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 CAH 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 Cycler (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](http://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 107 alleli risultati positivi per la delezione/duplicazione del gene *CYP21A2* con un kit di riferimento. Il CAH RealFast™ CNV Assay ha determinato la positività di tutti i 107 alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 435 alleli risultati negativi per una delezione/duplicazione del gene *CYP21A2* con un kit di riferimento. Il CAH RealFast™ CNV Assay ha determinato la negatività di tutti i 435 alleli, con una percentuale di veri negativi pari al 100%.

Limite di rilevazione: 0.2 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.

È 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 CAH CNV Calibrator

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

» **Nota:** I campioni di controllo come il CAH 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
2x RealFast™ Probe Mix	10 µl	360 µl
CAH CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>540 µl</b>

## 7.6. Preparazione delle reazioni in triplice copia:

Preparare le reazioni per l'NTC, tutti i campioni e il CAH 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 – <b>Acquisizione dei dati</b> 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 <i>*) per 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Estensione – <b>Acquisizione dei dati</b> 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 **CYP21A2 (canale FAM)** mediante il normalizzatore **EC (canale HEX)** e confrontandola con il CAH 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 (nonché la maggior parte dei geni chimerici CYP21A1P/CYP21A2) 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 ( $\pm 0.05$ ) 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:** La delezione di 8bp nell'esone 3 (c.329\_336 del GAGACTAC) comporta gli stessi risultati di una delezione completa del gene CYP21A2 o della maggior parte dei geni chimerici CYP21A1P/CYP21A2. Appariranno normali soltanto le chimere CYP21A1P/CYP21A2 che non includono la delezione di 8 bp.

Le delezioni omozigote, nonché i geni chimerici omozigoti e le delezioni di 8bp provocano una perdita del segnale del gene CYP21A2. Resta rilevabile soltanto il segnale del gene EC. «

Strumento Real-time PCR	Soglia	Quantità relative			Terminologia
		Delezione	Normale	Duplicazione	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatica	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel Quant)
MIC qPCR Cycler (bms)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.34	> 1.34	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	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.



# CAH RealFast™ CNV Assay

REF 7-410  $\Sigma$  100 reacciones  
-30°C -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Aplicación

CAH RealFast™ CNV Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección de la variación del número de copias del gen *CYP21A2* (en inglés: copy number variation, CNV). Eliminaciones parciales o completas de *CYP21A2* son una causa conocida de un metabolismo de los esteroides perturbado. El kit permite la identificación de los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita (HSC; en inglés: Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH) y debería utilizarse junto con CAH StripAssay® o con la secuenciación del ADN. La prueba semi-cuantitativa diferencia entre deleciones, duplicaciones y número de copias normales en un extracto de ADN humano. Secuencia de referencia: HGVS: NG\_007941.2

## 2. Introducción

HSC es un trastorno autosómico recesivo de la corteza suprarrenal (incidencia 1: 10,000-15,000), ocasionado en el 95% de los casos por defectos genéticos en el gen esteroide 21-hidroxilasa *CYP21A2*. La falta de cortisol y aldosterona resultante conduce a un exceso de andrógenos. El amplio espectro de manifestaciones clínicas incluye las formas clásicas (síndrome de pérdida de sodio, virilización) y no clásicas del HSC. Las anomalías subyacentes en el gen *CYP21A2* son (1) mutaciones puntuales, (2) pequeñas deleciones / conversión de genes y (3) cambios cromosómicos como las deleciones, duplicaciones completas *CYP21A2* o bien genes quiméricos *CYP21A1P/CYP21A2*. En Europa en el 27% al 39% de todos los alelos mutantes son grandes deleciones inclusive los quiméricos *CYP21A1P/CYP21A2*, estas mutaciones se asocian generalmente con la forma más severa de la enfermedad.

## 3. Componentes del kit

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial	<input type="checkbox"/> tapón blanco	1000 µl
CAH CNV Assay Mix	1 vial	<input type="checkbox"/> tapón violeta	550 µl
CAH 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 tampón o buffer. El CAH CNV Assay Mix consta de primers específicos del gen y dos sondas de hidrólisis doblemente marcadas para *CYP21A2* específicas de alelo y el gen de control endógeno (CE). Además el kit tiene un CAH CNV Calibrator, que representa el estado normal de dos copias intactas de *CYP21A2*.

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

## 4. Almacenamiento y estabilidad

CAH RealFast™ CNV Assay se suministra sobre bloques de enfriamiento. Conserve el kit de 30 a -15°C después de su recepción. Alternativamente para su utilización en el espacio de un mes a 2 hasta 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 *CYP21A2* y control endógeno (CE), así como también dos sondas de hidrólisis específicamente de gen, doblemente marcadas (**FAM-marcada CYP21A2-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 CAH RealFast™ CNV Assay es una prueba para la cuantificación relativa y compara la cantidad de producto de PCR de las dos secuencias de objetivo (*CYP21A2* y CE) en relación con el CAH CNV Calibrator. El gen EC 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

CAH 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 Cyclyer (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](http://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 107 alelos, que fueron probados con una prueba de referencia positiva sobre la *CYP21A2* deleción / duplicación. CAH RealFast™ CNV Assay tipificó los 107 alelos como positivo = 100% correcto- positivo- tanto por ciento.

La **especificidad** se basa en 435 alelos, que fueron probados con una prueba de referencia negativa sobre la *CYP21A2* deleción / duplicación. CAH RealFast™ CNV Assay tipificó los 435 alelos como negativo = 100% correcto- negativo- tanto por ciento.

Límite de detección: 0.2 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 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 CAH CNV Calibrator

Incluya en cada ejecución **siempre** el CAH 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 CAH 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 CAH CNV Calibrator + 3 x NTC), y calcular al menos de cuatro a seis reacciones adicionales para nivelar inexactitudes del pipeteado:

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

## 7.6. Preparación de las reacciones por triplicado

Prepare las reacciones para NTC, todas las muestras y el CAH 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 CAH 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". Fije 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
40	95°C	15 seg	Desnaturalización
	<b>60°C</b>	1 min	Annealing/Extensión – <b>registro de datos</b> en el canal FAM y HEX

**MIC qPCR Cyclor, Rotor-Gene® 6000\*):**

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	10 min	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización
	<b>60°C</b> *por 36-well rotor: <b>56°C</b>	1 min	Annealing/Extensión – <b>adquisición de datos</b> 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 **CYP21A2 (canal FAM)** por la normalización por el control endógeno **CE (canal de HEX)** y la comparación posterior con el CAH 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 (y la mayoría de genes quiméricos CYP21A1P/CYP21A2). Debido a la posibilidad de errores de medición, se recomienda repetir las cantidades relativas próximas a ( $\pm 0.05$ ) 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.

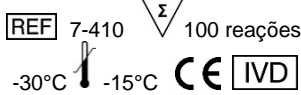
»**Nota:** La deleción 8bp en el exón 3 (GAGACTAC c.329\_336del) produce el mismo resultado que una deleción CYP21A2 completa o la mayoría de genes quiméricos CYP21A1P / CYP21A2. Sólo los quiméricos CYP21A1P / CYP21A2 que no contienen una deleción 8bp aparecen como normal.

Deleciones homocigóticas, así como los genes quiméricos homocigotos y las deleciones 8bp ocasionan una pérdida de la señal para CYP21A2. Sólo puede detectarse la señal para el control endógeno (CE). «

Aparato PCR en tiempo real	Valor límite	Cantidad Relativa			Terminología
		Deleciones	Normales	Duplicaciones	
7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Rel. Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel Quant)
MIC qPCR Cyclor (bms)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.34	> 1.34	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	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.



## 1. Utilização prevista

O CAH RealFast™ CNV Assay é um teste de PCR em tempo real rápido e exato para a determinação da variação do número de cópias (inglês: copy number variation, CNV) do gene *CYP21A2*. Sabe-se que as deleções parciais ou completas do *CYP21A2* estão associadas a defeitos do metabolismo dos esteroides suprarrenais. O kit foi concebido para identificar doentes com hiperplasia suprarrenal congénita (HSC; inglês: congenital adrenal hyperplasia, CAH) e deve ser usado em conjunto com o CAH StripAssay® ou a sequenciação de ADN. O ensaio quantitativo discrimina entre deleções, duplicações e estado em termos do número de cópias normal num extrato de ADN genómico humano. Sequência de referência: HGVS: NG\_007941.2

## 2. Introdução

A HSC é uma doença autossómica recessiva do córtex suprarrenal (incidência 1:10,000-15,000) provocada, em cerca de 95% dos casos, por defeitos genéticos no gene *CYP21A2*, da 21-hidroxiase de esteroides. A consequente falta de biossíntese de cortisol e aldosterona é acaba por provocar um excesso de andrógenos. A ampla gama de manifestações clínicas inclui a clássica HSC com perda de sais, a HSC clássica simples virilizante e ainda formas não-clássicas ligeiras. As aberrações subjacentes dentro do gene *CYP21A2* são mutações pontuais (1), (2) pequenas deleções/conversões e (3) rearranjos cromossómicos tais como deleções totais do *CYP21A2*, duplicações ou genes *CYP21A1P/CYP21A2* quiméricos. As grandes deleções, incluindo as quimeras *CYP21A1P/CYP21A2*, são responsáveis por 27% a 39% dos alelos mutantes na Europa e maioria dos casos, estão associados a formas graves da doença.

## 3. Conteúdo do kit

RealFast™ 2x Probe Mix	1 ampola	<input type="checkbox"/>	tampa branca	1000 µl
CAH CNV Assay Mix	1 ampola	<input type="checkbox"/>	tampa roxa	550 µl
CAH CNV Calibrator	1 ampola	<input type="checkbox"/>	tampa roxa	75 µl

A RealFast™ 2x Probe Mix inclui HotStart Taq DNA polymerase e dNTP num sistema tampão otimizado. A CNV CAH Assay Mix consiste em iniciadores específicos para o gene, assim como sondas de hidrólise com marcação dupla para *CYP21A2* e o gene de controlo endógeno (CE). É fornecido com o kit um CNV CAH Calibrator que representa o estado normal com duas cópias funcionais do *CYP21A2*.

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

## 4. Armazenamento e estabilidade

O CAH 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 *CYP21A2* 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 **CYP21A2 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 CAH RealFast™ CNV Assay é um ensaio de quantificação relativa e compara a quantidade de ambos os alvos de ácido nucleico (*CYP21A2* e CE) em relação ao CNV CAH 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 CAH 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 Cycloer (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](http://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 107 alelos com resultado positivo quanto à mutação do *CYP21A2* utilizando um kit de referência. O CAH RealFast™ CNV Assay determinou todos os 107 alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 435 alelos com resultado negativo quanto à deleção/duplicação do gene *CYP21A2* utilizando um kit de referência. O CAH RealFast™ CNV Assay determinou todos os 435 alelos como negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

Limite de deteção: 0.2 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. 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 CAH CNV Calibrator

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

» **Nota:** As amostras de controlo, como o CNV CAH 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
CAH CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>540 µl</b>

## 7.6. Preparação de reações em triplicado:

Prepare as reações para o NTC, todas as amostras e o CAH 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	Calibrator	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
	<b>60°C</b>	1 min	Hibridação/Extensão– <b>Aquisição de dados</b> 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
	<b>60°C</b> <i>*)para 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Hibridação/Extensão– <b>Aquisição de dados</b> 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 **CYP21A2 (canal FAM)** por meio do normalizador **CE (canal HEX)** e comparando-a com o CAH 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 (bem como a maioria dos genes quiméricos **CYP21A1P/CYP21A2**) em valores significativamente mais baixos. Devido a potenciais erros de medição, é aconselhável repetir as reações de teste, que apresentam quantidades relativas perto de erros de medição ( $\pm 0.05$ ) 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:** A deleção de 8bp no exão 3 (c.329\_336del GAGACTAC) leva aos mesmos resultados que a deleção de CYP21A2 completa ou da maioria dos genes de quimérico CYP21A1P/CYP21A2. Só as quimeras CYP21A1P/CYP21A2 que não incluem a deleção de 8bp aparecerão normais.

As deleções homozigóticas, assim os genes quiméricos homozigóticos, resultam numa perda de sinal de CYP21A2. Apenas se consegue detetar um sinal para o CE. «

Instrumento em tempo real	Limite	Quantidades relativas			Terminologia
		Deleção	Normal	Duplicação	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automático	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel. Quant.)
MIC qPCR Cyler (bms)	automatic	< 0.69	0.69 – 1.34	> 1.34	Expression Rate
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	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.