



LightMix® in-vitro Diagnostik-Kit
Alpha1-Antitrypsin (AAT) Pi*S und Pi*Z

Kat.-Nr.: 40-0576-64

Nachweis der Pi*S- und Pi*Z-
DNA-Varianten im AAT-Gen

zur Anwendung mit einem

LightCycler® von Roche Diagnostics

Reagenzien für 64 Reaktionen

Bei Ankunft:

Vorgemischte PCR-Reagenzien und Kontrollen vor Licht geschützt bei Raumtemperatur oder gekühlt (nicht einfrieren) lagern.

FastStart DNA Master HybProbe Reagenzien gefroren lagern (-15 °C bis -25 °C) (sofern mitgeliefert)



Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Produktinformation</u>	3
1.1	<u>Inhalt <i>LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z</i></u>	3
1.2	<u>Verwendungszweck</u>	4
1.3	<u>Technische Vorgaben</u>	4
1.3.1	<u>Klinische Proben</u>	4
1.3.2	<u>Geräte, Software und Produktionsleistung</u>	5
1.4	<u>Lagerung und Stabilität</u>	5
2.	<u>Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien</u>	6
2.1	<u>Erforderliche Ausrüstung</u>	6
2.2	<u>Optionale Ausrüstung</u>	6
2.3	<u>Vorbereitung der Probe</u>	6
3.	<u>Hintergrundinformationen</u>	7
3.1	<u>Medizinischer Hintergrund</u>	7
3.2	<u>Methode und Funktionsprinzip des Assays</u>	8
3.3	<u>Leistungsmerkmale</u>	9
4.	<u>Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise</u>	10
5.	<u>Programmierung</u>	11
5.1	<u>Farbkompensation</u>	11
5.2	<u>LightCycler® mit Kapillartechnik</u>	11
5.3	<u>LightCycler® 480</u>	12
5.4	<u>LightCycler® Nano</u>	13
6.	<u>Versuchsprotokoll</u>	14
6.1	<u>Vorbereitung der Probe</u>	14
6.2	<u>Ansetzen der Reagenzien</u>	14
6.2.1	<u>Ansetzen des LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Mixes</u>	14
6.2.2	<u>Ansetzen der parameterpezifischen Reagenzien</u>	14
6.2.3	<u>Vorbereitung der DNA für die Positivkontrolle</u>	15
6.2.4	<u>Ansetzen der Standards für die Genotypisierung</u>	15
6.3	<u>Ansetzen des Reaktionsgemischs</u>	15
6.3.1	<u>Ansetzen von 64 LightCycler®-Reaktionsgemischen</u>	15
6.3.2	<u>Ansetzen des Reaktionsgemischs für eine einzelne LightCycler® -Reaktion</u>	16
6.3.3	<u>Laden der Kapillaren / Wells</u>	16
6.4	<u>Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten</u>	17
6.5	<u>Laden der Kontrollen und der Standards für die Genotypisierung</u>	18
6.5.1	<u>Geräte mit Kapillartechnik</u>	18
6.5.2	<u>LightCycler® 480</u>	18
6.5.3	<u>LightCycler® Nano</u>	19
7.	<u>Datenanalyse und Interpretation</u>	20
7.1.	<u>Grenzen und Interferenzen</u>	20
7.2.	<u>Kalibrierung</u>	20
7.3.	<u>Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien</u>	20
7.3.1	<u>Negativkontrolle (NTC)</u>	20
7.3.2	<u>Positivkontrolle</u>	20
7.3.3	<u>Standards für die Genotypisierung</u>	21
7.3.4	<u>Proben</u>	21
7.3.5	<u>Anormale Schmelzkurven</u>	21
7.3.6	<u>Fehlen von Peaks in beiden Kanälen</u>	21
7.4.	<u>Speichern der externen Standards für die Genotypisierung</u>	21
7.4.1	<u>Geräte mit Kapillartechnik</u>	21
7.4.2	<u>LightCycler® 480</u>	21
7.5.	<u>Lesen der Ergebnisse</u>	22
7.5.1	<u>Typische Amplifikationsdaten</u>	22
7.5.2	<u>Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik</u>	23
7.5.3	<u>Schmelzanalyse: LightCycler® 480</u>	24
7.5.4	<u>Schmelzanalyse: LightCycler® Nano</u>	25
7.6	<u>Für seltene Varianten erwartete Schmelztemperaturen.</u>	26
7.7	<u>Interpretation der Ergebnisse</u>	28
8.	<u>Fehlersuche und -behebung</u>	29
9.	<u>Literaturnachweis</u>	30
	<u>Klassifizierung / Referenzen</u>	31
	<u>Hinweis für den Käufer</u>	31
	<u>Sicherheitsdatenblatt (SDS)</u>	32
	<u>Überarbeitungsverlauf</u>	32

1. Produktinformation

1.1 Inhalt: LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z

Lyophilisierte vorgemischte PCR-Reagenzien

⚠ Bei 4 °C bis 25 °C (Raumtemperatur) im Dunkeln lagern.

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion / Röhren-status	Insgesamt	
1 x	Rot	PSR	Parameterspezifische Reagenzien (PSR) mit vorgemischten und lyophilisierten Primern und Sonden für 64 Reaktionen. <0,01 pg unmarkierte Oligonukleotide (AAT Pi*S- und Pi*Z-Primers), <0,01 pg SimpleProbe® 519 markierte Oligonukleotide (AAT Pi*S), <0,01 pg LightCycler-Rot 640 markierte Oligonukleotide (AAT Pi*Z-Sonde), <0,01 pg Fluorescein 0 markiertes Oligonukleotid (AAT Pi*Z-Anker-Sonde)	64 Reaktionen lyophilisiert	64 Reak.

Standards (Kontroll-DNA)

⚠ Bei 4 °C bis 25 °C (Raumtemperatur) im Dunkeln lagern.

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion Röhren-status	Insgesamt	
1 x	Gelb	AAT Pos	Positivkontrolle AAT Pi*S und Pi*Z und Compound-heterozygot <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 Reaktionen lyophilisiert	40 Reak.
1 x	Gelb	AAT Pi*S	Standard für die Genotypisierung von AAT Pi*S Homozygote Mutation (kanal 530 Mutation, 640 Wildtyp) <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 Reaktionen lyophilisiert	40 Reak.
1 x	Gelb	AAT Pi*Z	Standard für die Genotypisierung von AAT Pi*Z Homozygote Mutation (Kanal 530 Wildtyp, 640 Mutation) <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 Reaktionen lyophilisiert	40 Reak.

Polymerase-Mix: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

⚠ Nach der Anlieferung bei -15 bis -25 °C lagern

Die FastStart DNA Master HybProbe ist nur in Kits enthalten, die direkt von TIB MOLBIOL an Kunden in Mitteleuropa geliefert werden ⁽¹⁾.

Die FastStart DNA Master HybProbe ist in den AAT-Kits, die von Roche Diagnostics oder dessen Vertriebspartner vor Ort geliefert werden, nicht enthalten.

Deckel-farbe	Eti-kett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion Röhrenlage-rung	Insgesamt	
1 x	Rot	1a	LightCycler® FastStart Enzym	64 Reaktionen gefroren	64 Reak.
1 x	Weiß	1b	LightCycler® FastStart Reaction Mix Hyb-Probe	64 Reaktionen gefroren	64 Reak.
1 x	Farblos	Was-ser	H ₂ O mit PCR-Qualität	gefroren	64 Reak.

1 x	Blau	MgCl ₂	MgCl ₂ , 25 mM	gefroren	64 Reak.
-----	------	-------------------	---------------------------	----------	-------------

1) Das FastStart Enzym wird von TIB MOLBIOL bei Raumtemperatur versandt.

1.2 Verwendungszweck

Mit diesem Kit können Mutationen in den Codons 264 (Pi*S) und 342 (Pi*Z) im Alpha-Antitrypsin (AAT)-Gen, das auch als Protease-Inhibitor I (Pi) (OMIM 107400) bekannt ist, nachgewiesen werden. Wobei die genomische DNA, die für den Test erforderlich ist, aus einem Nukleinsäureextrakt stammt, der aus peripherem Blut gewonnen wurde.

Ein AAT-Mangel ist mit einer bestimmten Mutation in den Codons 264 und 342 verbunden. Andere SNP-Varianten, die mit dem Kit erkannt werden, sind nicht mit einem AAT-Mangel verbunden. Dieses Kit gibt einen Hinweis auf eine Deletion im AAT-Gen (Pi*00).

Dieses Kit soll dem Arzt helfen, den genetischen Hintergrund für das Risiko einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), eines Emphysems und einer Leberzirrhose abzuklären.

Dieser Test kann zusätzlich oder nach einem biochemischen Assay, mit dem die Serumspiegel von AAT gemessen werden, durchgeführt werden.

Die Ergebnisse, die mit diesem Kit erhalten werden, sind nicht als alleinige Grundlage für eine Behandlungsentscheidung gedacht. Der Mutationsstatus des Patienten muss zusammen mit anderen Krankheitsfaktoren betrachtet werden.

Anmerkung: Die Leistung des Assays kann nur bei Verwendung mit einem LightCycler® gewährleistet werden (für Einzelheiten hierzu siehe 1.3.2).

Dieses Produkt ist ein *in-vitro*-Diagnostikum, das ausschließlich von entsprechend ausgebildetem Fachpersonal angewendet werden darf.

1.3 Technische Vorgaben

Das *LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z* ist ein *in-vitro*-Diagnostikum, mit dem die klinisch relevanten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im Alpha1-Antitrypsin (AAT)-Gen, d. h. die als Pi*S- und Pi*Z-Varianten bekannten SNP, nachgewiesen werden.

Andere Varianten, die ebenso mit dem Kit erkannt werden, sind in Abschnitt 7.6 aufgelistet.

1.3.1 Klinische Proben

Für den Test werden 2 µl aufgereinigte genomische DNA in wässriger Lösung benötigt, die aus einer klinischen Probe extrahiert wurden und 5 bis 100 ng/µl genomische DNA (10 ng - 200 ng Gesamtmenge) enthalten (Bestimmung mittels UV-Spektrophotometrie (1 OD = 50 µg DNA/ml)).

1.3.2 Geräte, Software und Produktionsleistung

Ein Kit enthält Reagenzien für 64 Reaktionen, die jeweils in einem Volumen von 10 µl durchgeführt werden.

Für jeden Lauf werden ein Standard und eine Negativkontrolle benötigt.

In der nachstehenden Tabelle sind einige der Merkmale des Kits zusammengefasst:

PCR-Gerät von Roche	Softwareversion (oder höher)	Laufzeit (ca.)	Max. Probenanz. pro Lauf (2)	Max. Produktionsleistung des Kits (3)	Min. Produktionsleistung des Kits (4)
LC 1.2	4.10 (1)	60 min	30 + 2 Kontr.	58	20
LC 1.5	4.10 (1)	60 min	30 + 2 Kontr.	58	20
LC 2.0	4.05	60 min	30 + 2 Kontr.	58	20
LC480 (96 Wells)	1.5	100 min	94 + 2 Kontr.	60	20
LC480 (384 Wells)	1.5	100 min	382 ⁽⁵⁾ + 2 Kontr.	60	20
Z 480 (offener Kanal)	1.5	100 min	94 + 2 Kontr.	60	20
Nano	1.0 (6)	60 min	30 + 2 Kontr.	60	21

- 1 Wenn der Test mit einem LightCycler® 1.2 oder 1.5 und der Softwareversion 3.5 durchgeführt wird, werden vergleichbare Ergebnisse erhalten. Die Anleitung für die Programmierung, die Datenanalyse und die Interpretation der Ergebnisse sind in dieser Anleitung nicht enthalten. **Falls möglich, auf die Softwareversion 4.10 oder höher upgraden.**
Die LightCycler® Software 3.5.3 enthält kein automatisches Genotypisierungsmodul. Geschultes Personal kann gleichwertige Ergebnisse erzielen, wobei dann jede Probe manuell analysiert werden muss.
- 2 In jedem Lauf müssen 1 Standard und eine Negativkontrolle (NTC = No-Target Control) mitgeführt werden, d. h. insgesamt 2 Kontrollreaktionen.
- 3 Wenn das Kit das erste Mal verwendet wird, müssen beim ersten Lauf 4 Kontrollen (statt 2) mitgeführt werden, um das Genotypisierungsmodul zu teachen. Die maximale Anzahl an bearbeitbaren Proben ist dann dementsprechend geringer.
Je nach den Vorschriften vor Ort müssen möglicherweise alle 4 Genotypisierungskontrollen in jeden Lauf mitgeführt werden, wodurch sich die Gesamtzahl der Patientenproben, die analysiert werden können, dann entsprechend verringert.
- 4 Für die Berechnung wurde die Analyse einer einzigen klinischen Probe pro Lauf zugrunde gelegt.
- 5 Hierfür sind sechs Kits erforderlich.
- 6 Die Nano LightCycler®-Software 1.0 enthält kein automatisches Genotypisierungsmodul. Aus diesem Grund müssen zwei Standards für die Genotypisierung hinzugefügt werden. Geschultes Personal kann jedoch mithilfe einer manuellen Analyse jeder einzelnen Probe gleichwertige Ergebnisse erzielen.

1.4 Lagerung und Stabilität

Auf die **unterschiedlichen Lagerbedingungen** für die Reagenzien und den Polymerase-Mix achten!

Lagerungsbedingungen

Reagenzien und Kontrollen:

Die lyophilisierten Reagenzien (PSR und Standards) vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur oder gekühlt (4 °C / 25 °C) lagern.

Diese trockenen Reagenzien nicht einfrieren. Das Verfalldatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben.

Polymerase-Mix:

Die LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe bei -15 °C bis -25 °C lagern. Siehe Verfalldatum auf dem Etikett des Polymerase-Röhrchens.

Transport/Versand:

Die Produkte werden bei Umgebungstemperatur transportiert bzw. versandt. Die Transportstabilität der Reagenzien und Enzymkomponenten wurde unter Versandbedingungen getestet.

2. Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien

2.1 Erforderliche Ausrüstung

TIB Molbiol

LightMix® Kit – Color Compensation 530-640-690
(für LightCycler® Nano nicht erforderlich)

Kat.-Nr. 40-0318-00

LightCycler® 2.0

LightCycler® 2.0
LightCycler®-Software Version 4.05 oder
LightCycler®-Software Version 4.10 oder höher
LightCycler® Capillaries (Kapillaren, 20 µl)
Oder

Roche Diagnostics

Kat.-Nr. 12 011 468 001
Außer Handel
Kat.-Nr. 04 779 584 001
Kat.-Nr. 11 909 339 001

LightCycler® 480

LightCycler® 480 (Modell I)
LightCycler® 480 II
Cobas 4800 System (z 480 Analyzer)
LightCycler®-Software Version 1.5 oder höher
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, weiß oder
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, weiß
Oder

Roche Diagnostics

Außer Handel
Kat.-Nr. 05 015 278 001
Kat.-Nr. 05 200 881 001
Kat.-Nr. 04 994 884 001
Kat.-Nr. 04 729 692 001
Kat.-Nr. 04 729 749 001

LightCycler® Nano

LightCycler® Nano
LightCycler®-Software Version 1.0 oder höher
LightCycler® Nano Röhrchen
Oder

Roche Diagnostics

Kat.-Nr. 06 407 773 001
Wird mit dem Gerät geliefert
Kat.-Nr. 06 327 672 001

LightCycler® 1.x

LightCycler® 1.2 und 1.5
LightCycler®-Software Version 4.10
LightCycler® Capillaries (Kapillaren, 20 µl)

Roche Diagnostics

Außer Handel
Kat.-Nr. 04 779 584 001
Kat.-Nr. 11 909 339 001

2.2 Optionale Ausrüstung

Geräte:

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 Volt)
Capping Tool

Kat.-Nr. 03 709 582 001
Kat.-Nr. 03 357 317 001

2.3 Vorbereitung der Probe

Vorbereitung der Probe von Hand:

High Pure PCR Template Preparation Kit
Nukleasefreies Wasser mit PCR-Qualität
Ethanol p.a.
Isopropanol p.a.

Roche Diagnostics

Kat.-Nr. 11 796 828 001
jeder Hersteller
jeder Hersteller
jeder Hersteller

Automatisierte Probenvorbereitung:

MagNA Pure
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I
MagNA Pure 2.0
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I
MagNA Pure Compact
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I
MagNA Pure 96
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit
MagNA Pure 96 IVD
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit

Roche Diagnostics

Außer Handel
Kat.-Nr. 03 003 990 001
Kat.-Nr. 05 197 686 001
Kat.-Nr. 03 003 990 001
Kat.-Nr. 03 731 146 001
Kat.-Nr. 03 730 964 001
Kat.-Nr. 05 195 322 001
Kat.-Nr. 05 467 497 001
Kat.-Nr. 06 541 089 001
Kat.-Nr. 06 543 588 001

3. Hintergrundinformationen

3.1 Medizinischer Hintergrund

Der Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (A1AD) wurde 1963 von C.B. Laurell durch die Proteinanalyse von Patienten mit einem Emphysemen im jungen Alter entdeckt¹.

Alpha-1-Antitrypsin ist ein Protease-Inhibitor aus der Überfamilie der Serpine. Die offizielle Bezeichnung lautet Serpin-Peptidase-Inhibitor (SERPINA1). In der Vergangenheit wurde das Protein auch Alpha-1-Proteinase-Inhibitor (A1PI) genannt.

Heute wissen wir, dass es sich bei A1AD um eine genetische Störung handelt, die zur Bildung eines defekten Enzyms mit verminderter A1AT-Aktivität im Blut und in der Lunge sowie zur Ablagerung von übermäßigem abnormalem A1AT-Protein in der Leber führt, was durch das Fehlen des AAT-Enzyms im Falle einer Gendeletion verursacht wird.

A1AD verursacht ein Emphysem, eine langfristig fortschreitende Erkrankung der Lunge, die in erster Linie zu Kurzatmigkeit führt, oder zu einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung² (COPD) und seltener zu Leberschäden. Die Erkrankung wird durch die Vermeidung schädlicher Inhalate - Träger sollten das Rauchen aufgeben - und in schweren Fällen mit Infusionen des AAT-Proteins oder sogar durch Transplantation von Leber oder Lunge behandelt. A1AD verkürzt die Lebenserwartung. Ein Übersichtsartikel hierzu wurde 2005 von Stoller und Aboussouan³ veröffentlicht.

Es sind Träger von zwei defekten Allelen betroffen, wobei die Pi*Z-Mutation (p.E342K Austausch von Glutamat 342 durch Lysin) mit einer signifikant höheren Morbidität verbunden ist als Pi*S (p.E264V Austausch von Glutamat 264 durch Valin). Es wurden viele andere AAT-Mutationen in der Nähe der Aminosäure 342 beschrieben, es liegen jedoch keine Berichte über einen Zusammenhang mit A1AD vor. Die Deletion des Gens (Allel Pi*00) verursacht ebenfalls A1AD, jedoch ohne Leberschäden.

Bezeichnung der 342 und 264 AAT-Mutationen (COSMIC und NCBI):

Aminosäure	Allel	cDNA-Position	Genom-Position	dbSNP
p.E342K	Pi*Z	c.1024G>A	g.11940G>A	rs28929474
p.E264V	PiS	c.791A>T	g.9628T>A	rs17580

Die Häufigkeit, mit der die Allele Pi*Z und Pi*S vorkommen, liegt bei 1,5 % bzw. 3 %. Die Prävalenz von A1AD liegt Schätzungen zufolge zwischen 1:1.600 und 1:5.000. Die American Association for Clinical Chemistry beziffert die Prävalenz mit 1:3.000.

Die Erstdiagnose basiert auf Serumspiegel von A1AT, gefolgt von einer AAT-Protein-Phänotypisierung und/oder Genotypisierung⁴. Die Analyse der AAT-Mutation anhand von Schmelzkurven wurde bereits 1999 von Aslanidis et al.⁵ veröffentlicht.

3.2 Methode und Funktionsprinzip des Assays

Mit der PCR-Methode werden zwei Fragmente des AAT-Gens gleichzeitig mit spezifischen Oligonukleotid-Primern amplifiziert. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Sonden wird das PCR-Produkt identifiziert und mittels einer Schmelzkurvenanalyse der Genotyp bestimmt.

Die Sonde bindet an einen Teil des amplifizierten Fragments, in dem sich die Mutationsstelle befindet. Jede Fehlpaarung, die von der Sonde abgedeckt wird, destabilisiert das Hybrid. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur langsam erhöht. Die Sonde schmilzt bei einer bestimmten Schmelztemperatur ab, wodurch die Fluoreszenz abnimmt.

Pi*Z-Allel (p.E342K)

Ein 229 bp langes PCR-Fragment, in dem sich G11940A (rs28929474) befindet, wird mit einem LightCycler® Rot 640 markierten SimpleProbe®-Oligomer analysiert, das mit der seltenen Variante 11937A (SNP rs143370956) übereinstimmt. In der Schmelzkurvenanalyse zeigen die 11937A-Proben eine höhere Temperatur als das Wildtyp-Allel, während das Pi*Z-Risiko-Allel 11940A die niedrigste Schmelztemperatur aufweist. Die Schmelztemperaturen anderer Varianten liegen dazwischen (siehe 7.6).

Pi*S-Allel (p.E264V)

Das zweite PCR-Produkt hat eine Länge von 177 Basen und enthält die polymorphe Stelle T9628A (rs17580). Es wird mit einem 519-markierten SimpleProbe®-Oligomer analysiert, das mit dem 9628A-Allel identisch ist, was eine hohe Schmelztemperatur für die Pi*S-Variante und eine niedrigere Schmelztemperatur für das Wildtyp-Allel ergibt.

Pi*00-Allel (Gendeletion)

Im Falle einer Deletion des AAT-Gens sind keine Schmelzpeaks sichtbar. Bei solch einem Ergebnis kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die Proben-DNA fehlt oder nicht ausreicht, oder ob ein anderer Fehler bei der Durchführung der PCR aufgetreten ist, oder ob es sich tatsächlich um eine Deletion des Gens handelt. Bei Proben, die keine Schmelzpeaks aufweisen, muss der Test wiederholt und das Ergebnis mit einer zweiten Methode überprüft werden.

Zum Lesen der Genotyp-Ergebnisse, müssen die Schmelztemperaturen mit denen der mitgelieferten Standards verglichen werden. Wenn die Gerätesoftware dies zulässt, können die Genotypisierungsergebnisse mit dem automatischen Genotypisierungsmodul ausgearbeitet werden (geräteabhängig: Softwaremodul „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)).

Die automatisch ausgelesenen Genotypisierungsergebnisse müssen genau angesehen/ überprüft werden, um abweichende Kurven und intermediäre

Schmelztemperaturen zu erkennen. Falls die automatisierte Typisierung keine konsistenten Ergebnisse für den Genotyp ergibt, muss er aus den Schmelztemperaturen und gemäß den in Kapitel 7 beschriebenen Kriterien abgeleitet werden. Die Schmelztemperaturen, die für andere Varianten erwartet werden, können Abschnitt 7.6 entnommen werden.

Das Kit enthält DNA-Standards, die für die Pi*S-, Pi*Z- und Wildtyp-Allele, um einen Vergleich mit den klinischen Proben zu ermöglichen.

3.3 Leistungsmerkmale

Analytische Spezifität

Die Spezifität für das Target-Gen und die Eignung der für diesen Test verwendeten Amplifikation mittels PCR wurden mithilfe eines Vergleichs mit den Ergebnissen einer direkten Sequenzierung nachgewiesen.

Analytische Sensitivität

Der Nachweis in Verdünnungsreihen verschiedener heterozygoter menschlicher genomischer DNA hat gezeigt, dass die Nachweisgrenze dieses Kits bei 250 Kopien (1,5 ng) liegt.

Diagnostische Spezifität und Sensitivität

Es wurden insgesamt 98 genomische DNA-Proben von Personen kaukasischer Herkunft analysiert und mit den Ergebnissen eines anderen AAT-Typisierungskits verglichen, das bekanntermaßen andere Primer- und SONDENSEQUENZEN verwendet. Zusätzlich wurden 2 Referenzproben EV/EE, 4 Proben EE/EK und 2 Proben EE/KK aufgenommen.

Beide Assays zeigten 100 % Übereinstimmung. 98 Proben waren EE/EE und 2 Proben waren EV/EE. Die Referenzproben ergaben den erwarteten Genotyp.

Zusätzlich wurden 8 Proben der Variante EE/EE, 4 Proben vom Typ EE/EK, 2 Proben vom Typ EV/EE und 2 Proben vom Typ EE/KK durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt.

Wurden keine anderen Varianten gefunden.

Studienergebnisse: Die Ergebnisse der beiden Analysemethoden stimmten zu 100 % überein.

Die diagnostische Empfindlichkeit betrug 100 %, die diagnostische Spezifität ebenso 100 %.

4. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Vorschriften für den Umgang mit dem Produkt

Dieses Produkt ist ein *in-vitro*-Diagnostikum und darf ausschließlich von entsprechend ausgebildetem Fachpersonal angewendet werden.

Es sind die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu berücksichtigen, die für den Umgang mit typischen Labormaterialien generell gelten.

Bei den Arbeitsabläufen müssen die Grundprinzipien der guten Laborpraxis befolgt werden. Aufgrund des Kontaminationsrisikos müssen die Vorbereitung der PCR und die Amplifikation mittels PCR in räumlich getrennten Bereichen durchgeführt werden.

Keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen miteinander mischen.

Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.

Die Version der Anleitung benutzen, die mit dem Kit geliefert wurde (siehe Etikett des Kits).

Labortechniken

Alle Materialien menschlichen Ursprungs und die zugehörigen Abfälle sind als potenziell infektiös zu betrachten. Alle Arbeitsflächen gründlich mit von den Behörden vor Ort zugelassenen Desinfektionsmitteln reinigen.

Im Arbeitsbereich des Labors darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.

Nicht mit dem Mund pipettieren.

Bei der Arbeit mit den Proben und den Bestandteilen des Kits Einweghandschuhe, Laborkittel und einen angemessenen Augenschutz tragen.

Beim Pipettieren der Reagenzien diese weder mikrobiell noch mit Nukleasen kontaminieren. Es müssen unbedingt sterile Einwegspitzen verwendet werden.

Nach der Arbeit mit den Proben und den Bestandteilen des Kits gründlich die Hände waschen.

Vorbereitung der Probe

Für eine sachgerechte Handhabung und Entsorgung wird auf die Sicherheitshinweise

in der Packungsbeilage des verwendeten Produktes verwiesen (siehe Kapitel 2.3).

Amplifikation und Nachweis

Vor der Anwendung dieses Produkts bitte die Betriebsanleitung des LightCycler® lesen.

Eine Probendatei mit der genauen Belegung speichern, damit die Proben fehlerfrei identifiziert werden können.

Die Einstellungen des LightCycler® kontrollieren und sicherstellen, dass sie mit denen übereinstimmen, die im folgenden Abschnitt „PCR-Protokoll“ für Ihr Gerät angegeben sind.

Die Kapillaroberfläche oder Plattenabdeckung nicht ohne Handschuhe berühren.

Bitte die Bedienungsanleitung und die Sicherheitshinweise in der Betriebsanleitung des LightCycler® lesen.

Umgang mit Abfällen

Alle nicht verwendeten Reagenzien und Abfälle gemäß den vor Ort geltenden Gesetzen entsorgen.

5. Programmierung

5.1 Farbkompensation



Bei der Verwendung des *LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z* ist eine Farbkompensation erforderlich.

Die Daten mit „Farbkompensation“ analysieren.

Die Deaktivierung führt zu einem ungültigen Auslesen der Ergebnisse.

Die Farbkompensation ist beim LightCycler® Nano nicht erforderlich.

5.2 LightCycler® mit Kapillartechnik

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten (Tab. 1):

1. **Denaturierung** der Probe und Aktivierung des Enzyms
2. **Cycling** Amplifikation der Target-DNA mittels PCR
3. **Schmelzen** Identifizierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenz
4. **Abkühlung** des Geräts

Step:	1	2			3			4
<u>Parameter</u>								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]*	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sec Target [°C]	0	0	0	0	0	0	0	0
Step Size [°C]	0	0	0	0	0	0	0	0
Step Delay [cycles]	0	0	0	0	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

* Geräte vom Typ LightCycler 1.x, die mit der Softwareversion 3.5.3 arbeiten, lesen die „Temperature Transition Rate“ [°C/s] statt der „Ramp Rate“.

Tab. 1:

Programmierung von Geräten mit Kapillartechnik für die Verwendung des *LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z*

Anmerkung:

Bei der Programmierung die Standardwerte der Software beibehalten: Kanal = 530, max. Proben = 32, Suchtemperatur = 30 °C und Größe der Kapillaren = 20 µl. Die Kapillarengöße nicht auf 100 µl ändern.

Das Programm und die Standardwerte als „**RUN Template**“ speichern, das bei jedem AAT-Lauf mit dem LightCycler® geladen werden kann.

Erst kurz vor dem Start des Laufs die Anzahl der Proben (Standard = 32) auf die tatsächliche Anzahl der Proben plus Kontrollen in dem Lauf ändern, damit das Gerät nicht aufgrund fehlender Kapillaren stehen bleibt.

5.3 LightCycler® 480 Instrumente

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Nachweisformat: TIB MOLBIOL 530-640

Siehe folgende Anleitung:

LightMix® Kit- Universal HybProbe Color Compensation.

Kat.-Nr. 40-0318-00



Reaktionsvolumen: 10 µl

Programmierung:

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten (Tab. 2):

1. **Denaturierung** der Probe und Aktivierung des Enzyms
2. **Cycling** Amplifikation der Target-DNA mittels PCR
3. **Schmelzen** Identifizierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenz
4. **Abkühlung** des Geräts

Step:	1	2			3			4
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [C°/ s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.29	1.5
Ramp Rate [C°/ s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	0.29	2.0
Acquisitions [per °C]	-	-	-	-	-	-	1	-
Sec Target [°C]	0	0	0	0	-	-	-	-
Step Size [°C]	0	0	0	0	-	-	-	-
Step Delay [cycles]	0	0	0	0	-	-	-	-

Tab. 2: Programmierung des LightCycler® 480 (96 Well- und 384 Well-Formate) und des cobas z 480 Analyzers für die Verwendung des LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z

Anmerkung:

- a) Das Programm und die Standardwerte als „**RUN Template**“ speichern, das bei jedem AAT-Lauf mit dem LightCycler® geladen werden kann.
- b) Darauf achten, dass nur 1 Erfassung pro Sekunde programmiert wird und nicht der Standardwert 3. Mehr Erfassungen verringern die Steigung der Schmelzkurve, erhöhen die Versuchsdauer und führen zu Fehlfunktionen des Kits.

5.4 LightCycler® Nano

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Die Farbkompensation ist nicht erforderlich!



Laufeinstellungen / Optische Einstellungen

Interkalierende Farbstoffe
Normale Qualität

Profil

Das Temperaturprofil besteht aus vier Programmabschnitten (Tab. 3):

1. **Denaturierung** der Probe und Aktivierung des Enzyms
2. **Cycling** Amplifikation der Target-DNA mittels PCR
3. **Denaturierung** des mittels PCR amplifizierten Produkts
4. **Schmelzen** Identifizierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenz

Step:	1	2			3	4	
Parameter							
Name	Hold	3 Step Amplification			Hold	Melting Stage	
						Initial Stage	Final Stage
Cycles		45					
Temp [°C]	95	95	60	72	95	43	75
Ramp (°C/s)	5	5	4	5	5	4	0,2
Hold (s)	600	10	15	20	30	120	1
Acquire			√				

Tab. 3: Programmierung des LightCycler® Nano für die Verwendung des LightMix® Kit AAT Pi*S und Pi*Z

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „**Experiment file (Versuchsdatei)**“ speichern, die bei jedem AAT-Lauf des LightCycler® geladen werden kann.

6. Versuchsprotokoll

Zuerst das Gerät programmieren und dann die Lösungen vorbereiten (siehe 5. Programmierung und die Details in der Betriebsanleitung des LightCycler® nachlesen).

Die angegebene Leistung des Assays kann nur bei Verwendung mit den LightCycler®-Systemen von Roche Diagnostics gewährleistet werden.

6.1 Vorbereitung der Probe

Für die Präparation der genomischen DNA menschliches peripheres Blut (EDTA, Citrat) verwenden. Von der Verwendung von Heparin wird dringend abgeraten, da dieses Antikoagulans die PCR beeinträchtigen könnte.

Die Nukleinsäure mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit oder mit den MagNA Pure LC Systemen in Kombination mit dem für das verwendete MagNA Pure-Gerät geeigneten Extraktionskit aufreinigen (siehe 2. Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien). Hierbei die jeweils zugehörigen Protokolle befolgen.

In den dargestellten Assays (siehe 7.5. Lesen der Ergebnisse) wurde die DNA mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers manuell aus 200 µl Blut extrahiert. Es wurden 100 µl Elutionspuffer für die endgültige Elution der aufgereinigten DNA von der Säule verwendet.

6.2 Ansetzen der Reagenzien

6.2.1 Ansetzen des LightCycler® FastStart DNA Masters

1	Das LightCycler® FastStart Enzym 1a immer kühlen.
2	Das LightCycler® FastStart Reaktionsgemisch 1b auftauen. Hierzu das Röhrchen 3 - 5 Minuten lang bei 30 °C- 35 °C erwärmen.
3	Die Röhrchen kurz anzentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.
4	Die Lösung muss partikelfrei sein.
5	60 µl von 1b in das Röhrchen 1a pipettieren.
6 	Die Lösung vorsichtig mit einer Pipette mischen. Nicht vortexen! Blasenbildung vermeiden.
7	Die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.
8	Das Reagens verwenden, um das Reaktionsgemisch anzusetzen (6.3).
9	Übrig gebliebenes Reagens bei 4 °C lagern.

6.2.2 Ansetzen der parameterpezifischen Reagenzien (PSR)

▶	Das PSR -Reagenzröhrchen reicht für 64 Reaktionen.
1	Das PSR -Röhrchen bei 10.000 rpm 1 Minute lang zentrifugieren.
2	Kontrollieren, ob sich das Pellet am Boden des Röhrchens befindet.
3	In jedes PSR -Röhrchen 66 µl Wasser mit PCR-Qualität hinzugeben.
4	20 s bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
5	10 s vortexen.
6	Die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.

▶ Für eine 10 µl PCR-Reaktion **1 µl PSR**-Reagenz verwenden.

6.2.3 Ansetzen der Positivkontrolle

▶	Jedes Positivkontrolle -Reagenzröhrchen reicht für 40 Reaktionen.
1	Das Röhrchen bei 10.000 rpm 1 Minute lang zentrifugieren.
2	Kontrollieren, ob sich das blaue Pellet am Boden des Röhrchens befindet.
3	Das Pellet durch Hinzufügen von 80 µl Wasser mit PCR-Qualität lösen.
4	20 s bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
5	10 s vortexen.
6	Die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.

- ▶ Für eine 10 µl PCR-Reaktion **2 µl** von jedem **Standard** verwenden.
 - ▶ In jedem Lauf muss eine **Positivkontrolle** mitgeführt werden.
- Hinweis:** Beim Öffnen der Röhrchen kann der Arbeitsplatz kontaminiert werden (Aerosol).

6.2.4 Ansetzen der Standards für die Genotypisierung

Die LightCycler®-Software 4.05 und höher (Geräte mit Kapillartechnik) und die Software 1.5 und höher (Geräte vom Typ LightCycler®480) können mit Referenzstandards kalibriert werden, um unbekannte klinische Proben automatisch zu genotypisieren.

▶	Das Standard -Reagenzröhrchen reicht für 40 Reaktionen.
1	Das Röhrchen bei 10.000 rpm 1 Minute lang zentrifugieren.
2	Kontrollieren, ob sich das blaue Pellet am Boden des Röhrchens befindet.
3	Das Pellet durch Hinzufügen von 80 µl Wasser mit PCR-Qualität lösen.
4	20 s bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
5	10 s vortexen.
6	Die Röhrchen zentrifugieren, um die Tropfen zu sammeln.

- ▶ Für eine 10 µl PCR-Reaktion **2 µl** von jedem **Standard für die Genotypisierung** verwenden.
- ▶ Im ersten Lauf des Kits müssen beide **Standards für die Genotypisierung** verwendet werden, um das Genotypisierungsmodul zu kalibrieren.

Hinweis: Beim Öffnen der Röhrchen kann der Arbeitsplatz kontaminiert werden (Aerosol).

6.3 Ansetzen des Reaktionsgemischs

6.3.1 Ansetzen von 64 LightCycler®-Reaktionsgemischen

Wir empfehlen, 64 Reaktionen vorzubereiten, um die Lagerung von gelösten oder aktivierten Reagenzien in unterschiedlichen Volumina zu vermeiden (6.2). Bezüglich der Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten wird auf Kapitel 6.4 verwiesen. Wie das Reaktionsgemisch für weniger Proben angesetzt wird, ist im Schritt 6.3.2 „Reaktionsgemisch für eine Reaktion“ beschrieben.

Das Reaktionsgemisch im PSR-Reagenzröhrchen (gekühlt) ansetzen:

Bestandteile	64 Reaktionen
In das PSR -Röhrchen (roter Deckel) mit bereits	66.0 µl
Folgendes hinzufügen:	
H ₂ O, PCR-Qualität (farbloser Deckel)	343.2 µl

Mg ²⁺ -Lösung 25 mM (blauer Deckel)	52.8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (roter Deckel), siehe 6.2.1	66.0 µl
 Den „langhalsigen Deckel“ des PSR -Röhrchens durch den roten Deckel des FastStarts ersetzen	
Gesamtvolumen	528.0 µl

Tab. 4: Volumen der Komponenten zum Ansetzen von 64 Reaktionsgemischen

6.3.2 Ansetzen eines einzelnen LightCycler® -Reaktionsgemischs

Das Reaktionsgemisch ansetzen und hierzu jedes Volumen (Tab. 5) mit der Anzahl der zu analysierenden biologischen Proben plus drei Reaktionen (Negativkontrolle, **Positivkontrolle**, ein zusätzlicher Ansatz) und (optional) zwei **Standards für die Genotypisierung** multiplizieren.

Das Reaktionsgemisch in einem gekühlten Röhrchen ansetzen:

Bestandteile	Eine Reaktion
H ₂ O, PCR-Qualität (farbloser Deckel)	5.2 µl
Mg ²⁺ -Lösung 25 mM (blauer Deckel)	0.8 µl
PSR (roter Deckel), siehe 6.2.2	1.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (roter Deckel), siehe 6.2.1	1.0 µl
Volumen des Reaktionsgemischs	8.0 µl

Tab. 5: Volumen der Komponenten zum Ansetzen eines einzelnen Reaktionsgemischs

6.3.3 Laden der Kapillaren / Wells

In jedem Lauf muss eine Negativkontrolle (**NTC**) mitgeführt werden, um nachzuweisen, dass keine Kontaminationen mit genomischer DNA oder AAT-PCR-Produkten vorliegen. Zudem muss eine **Positivkontrolle** vorhanden sein, um die laufspezifischen Schmelztemperaturen bestimmen zu können. Aufsichtsbehörden oder lokale Laborvorschriften können verlangen, dass auch die beiden Standards für die Genotypisierung mitlaufen.

Laden der Kapillaren / Wells

▶	Beim Ansetzen des Laufs immer die Kontrollen berücksichtigen.
1	Vorsichtig mischen, herunterzentrifugieren und kontrollieren, ob sich auch wirklich keine Luftblasen in dem Reaktionsgemisch-Röhrchen befinden.
2	8 µl Reaktionsgemisch pro Kapillare/ Well pipettieren.
3	Pflicht: 2 µl H₂O mit PCR-Qualität als Negativkontrolle (NTC) in Position 1 (A1) pipettieren. 2 µl von AAT Pos in Position 2 (A2) pipettieren.
	Optional*: 2 µl von AAT Pi*S in Position 3 (A3) pipettieren.

	2 µl von AAT Pi*Z in Position 4 (A4) pipettieren.
4	2 µl der Probe in die verbleibenden Kapillaren/ Wells pipettieren.
5	 Die Kapillaren/ Platte verschließen und zentrifugieren. Kontrollieren, ob auch wirklich keine Luftblasen vorhanden sind.
6	Den Rotor/ die Platte in den LightCycler® einsetzen.
7	Nur bei der Kapillartechnik: die Anzahl der Proben eingeben.
8	Den Lauf starten.
9	Den Namen der Untersuchung eingeben, wenn dazu aufgefordert wird.
10	Die Probandaten im Proben-Fenster speichern.

Wie die Proben geladen und die Kalibrierung der Standards für die Genotypisierung vorgenommen wird, kann in Kapitel **6.5** nachgelesen werden.

6.4 Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten

Reaktionsgemisch

Das fertige Reaktionsgemisch mit den parameterspezifischen Reagenzien (**PSR**), der LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe und dem MgCl₂ kann gekühlt (4 °C bis 8 °C) 30 Tage lang aufbewahrt werden.

Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

Parameterspezifische Reagenzien (PSR)

Nachdem sie verdünnt wurden, können die PSR gekühlt (4 °C bis 8 °C) bis zu 30 Tage lang aufbewahrt werden.

Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Das angesetzte FastStart DNA Master HybProbe Mastermix (1a+1b) kann gekühlt (4 °C bis 8 °C) 30 Tage lang aufbewahrt werden.

Positivkontrolle

Die gelöste Positivkontrolle ist gekühlt (4 °C bis 8 °C) 30 Tage lang stabil.

Standards für die Genotypisierung

Der gelöste **Standard für die Genotypisierung** ist 30 Tage stabil, wenn er gekühlt (4 °C - 8 °C) aufbewahrt wird.

6.5 Laden der Kontrollen und der Standards für die Genotypisierung

Die Proben in den Positionen 1 bis 2 (Platte: A1 bis A2) müssen bei jedem Lauf wie in der nachstehenden Tabelle beschrieben eingefüllt werden.

 Die Ergebnisse für den Genotyp basieren auf den Schmelztemperaturen. Die Anwendung des automatisierten Genotypisierungsmoduls, das der LightCycler® 2.0 und die LightCycler® 480-Software bieten, ist optional. Die Standards für die Genotypisierung in den Positionen 3 bis 4 (Platte: A3 bis A4), die zum Teachen der Standards für die Genotypisierung erforderlich sind, müssen nur im ersten Lauf des Kits mitlaufen.

Einzelheiten hierzu können der Betriebsanleitung des LightCycler® entnommen werden.

6.5.1 Geräte mit Kapillartechnik

Auf der Displayseite „Samples data - Capillary View“ (Probendaten - Kapillarenansicht) den Namen der Probe, wie in der zweiten Spalte angegeben, eingeben.

„Analysis Type – Genotyping“ (Analysetyp - Genotypisierung) auswählen. Nur Kanal 530 und 640 auswählen!

Im Drop-down-Menü „Sample Type“ (Probentyp) anklicken und die „Genotype“ (Genotyp)-Beschreibung kopieren.

Pos	Name der Probe	Kanal	Name des Targets	Probentyp	Genotyp (Aminosäuren)
1	NTC	530	Target 1	Negativkontrolle	
		640	Target 4	Negativkontrolle	
2	AAT Pos	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	264 EV Pi*S Heterozygot
		640	Target 4	Standard für die Genotypisierung	342 EK Pi*Z Heterozygot
3	AAT Pi*S	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	264 VV Pi*S Mutation
		640	Target 4	Standard für die Genotypisierung	342 EE Pi*Z Wildtyp
4	AAT Pi*Z	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	264 EE Pi*S Wildtyp
		640	Target 4	Standard für die Genotypisierung	342 KK Pi*Z Mutation

6.5.2 LightCycler® 480 Instrumente

Im Fenster „Sample Editor“ (Proben-Editor) im Bereich „Step 1: Select Workflow“ (Schritt 1: Arbeitsablauf auswählen) die Option „Melt Geno“ wählen. Die Beschreibung der **Positivkontrolle** und der **Standards für die Genotypisierung** wie folgt eingeben:

Pos	Filterkombination	Name der Probe	Melt Geno Probentyp	Melt Geno Genotyp
-----	-------------------	----------------	---------------------	-------------------

A1	Fluos (465-510)	NTC	Negativkontrolle		
A1	Rot 640 (498-640)	NTC	Negativkontrolle		
A2	Fluos (465-510)	AAT Pos	Standard für die Genotypisierung	264 EV Pi*S	Heterozygot
A2	Rot 640 (498-640)	AAT Pos	Standard für die Genotypisierung	342 EK Pi*Z	Heterozygot
A3	Fluos (465-510)	AAT Pi*S	Standard für die Genotypisierung	264 VV Pi*S	Mutation
A3	Rot 640 (498-640)	AAT Pi*S	Standard für die Genotypisierung	342 EE Pi*Z	Wildtyp
A4	Fluos (465-510)	AAT Pi*Z	Standard für die Genotypisierung	264 EE Pi*S	Wildtyp
A4	Rot 640 (498-640)	AAT Pi*Z	Standard für die Genotypisierung	342 KK Pi*Z	Mutation

6.5.3 LightCycler® Nano

Proben:

Wie nachstehend beschrieben, die Beschreibung der **Positivkontrolle** und optional der **Standards für die Genotypisierung** in das Fenster „Samples“ (Proben) eingeben. Den Namen eingeben und den Farbstoff (Dye) im Fenster „Target“ auswählen:

Proben:

Farbe	Name	Anmerkung
	NTC	
	AAT Pos	
	AAT Pi*S	
	AAT Pi*Z	

Target:

Farbe	Name	Farbstoff	Referenz
	Kanal 530	FAM	
	Kanal 640	Cy5	

Well wie in der Tabelle

Pos	Nr.	Anmerkung	Probe	Cy5	Typ	FAM	Typ
A1	1		NTC	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A2	2		AAT Pos	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A3	3		AAT Pi*S	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A4	4		AAT Pi*Z	Kanal 640	U	Kanal 530	U

7. Datenanalyse und Interpretation

7.1 Grenzen und Interferenzen

Dieser Assay ist für das AAT-Gen spezifisch und ermöglicht den Nachweis der häufigen Varianten in den Codons 264E/V (Allel Pi*S) und 342E/K (Allel Pi*Z).

Der Test gibt Hinweise auf das Null-Allel (Pi 00), aber fehlende Schmelzpeaks allein sind kein eindeutiger Beweis für das Vorliegen dieses Genotyps.

7.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung muss wie in den Absätzen 6.2.4, 6.3.3, 6.5, 7.3.2 und 7.3.3 beschriebenen durchgeführt werden.

7.3 Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien

Um eine zuverlässige Analyse des Genotyps durchführen zu können, müssen die Negativkontrolle **NTC** und die **Positivkontrolle** in jedem Lauf mitgeführt werden.

ANMERKUNG: Der Test wird bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur binden die Sonden nicht gut, was zu geringen oder gar keinen Signalen bei der „Quantifizierung“ führt. Aus diesem Grund basieren die Akzeptanzkriterien nur auf der Interpretation der Schmelzkurvenmuster (siehe hierzu nachstehende Erklärung).

7.3.1 Negativkontrolle

NTC Negativkontrolle (Pflicht - Position 1).

Die Schmelzkurvenanalyse der Negativkontrolle muss ein negatives Ergebnis liefern: Es dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks (siehe 7.3.2) zu sehen sein.

Sollte die **NTC** einen oder mehrere spezifische Peaks aufweisen (das Signal mit den Probenergebnissen vergleichen, um zu vermeiden, dass die Software das Hintergrundrauschen auf die Fenstergröße vergrößert, was dann Schmelzpeaks nahelegen würde), ist eine Kontamination oder ein Pipettierfehler aufgetreten. Der Lauf ist dann ungültig und das Verfahren muss wiederholt werden. Wenn das Problem weiterhin besteht, das Wasser und/oder die Reagenzien wechseln und den Lauf wiederholen. Wenn Sie Fragen hierzu haben, wenden Sie sich bitte an service@tib-molbiol.de.

Wird ein Peak bei einer unspezifischen Temperatur detektiert (siehe Abschnitt 7.3.4), kann die Software ihn fälschlicherweise als positiv identifizieren, was eine automatische Genotypisierung unmöglich macht (die LightCycler® 480-Software 1.5 meldet dann: „*Sample NTC in position A1 is a negative control not in the negative group*“ (Die Probe NTC an Position A1 ist eine Negativkontrolle, die sich nicht in der negativen Gruppe befindet.)).

In diesem Fall - um die automatische Genotypisierung zu ermöglichen - die NTC-Probe von „Negativkontrolle“ in „Unbekannt“ umbenennen (siehe 6.5 Laden der Probe und Kalibrieren der Standards für die Genotypisierung). Alternativ müssen die Ergebnisse anhand der Schmelztemperaturen abgelesen werden (siehe 7.3.4 Proben und 7.7 Interpretation der Ergebnisse).

7.3.2 der Positivkontrolle

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer Folgendes zeigen:

AAT Pos Positivkontrolle (Pflicht - Position 2):

zwei Schmelzpeaks im Kanal 530 bei $50\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ und $56\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

zwei Schmelzpeaks im Kanal 640 bei $55\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ und $62\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

Die **Positivkontrolle** ahmt Compound-**heterozygote** klinische Proben nach (siehe 7.5).

7.3.3 Standards für die Genotypisierung

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer Folgendes zeigen:

Standard für die **AAT Pi*S**-Genotypisierung (Optional - Position 3):

ein Schmelzpeak im Kanal 530 bei $56\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

ein Schmelzpeak im Kanal 640 bei $62\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

Standard für die **AAT Pi*Z**-Genotypisierung (Optional - Position 4):

ein Schmelzpeak im Kanal 530 bei $50\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

ein Schmelzpeak im Kanal 640 bei $55\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

Die **Standards für die Genotypisierung** ahmen homozygote mutierte klinische Proben nach (siehe 7.5).

7.3.4 Proben

Das Ergebnis dieses Assays muss immer einen oder zwei Schmelzpeaks für jeden Kanal in jeder der möglichen Kombinationen zeigen:

im Kanal 530 bei $50\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ / $55\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

im Kanal 640 bei $55\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ / $62\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$

 Es werden nicht mehr als **zwei Peaks** pro Probe im Kanal 640 erwartet.

Die Schmelzpeakprofile müssen mit den in diesem Kapitel beschriebenen Akzeptanzkriterien übereinstimmen. Andernfalls ist das Ergebnis ungültig und das Verfahren muss wiederholt werden (Probenvorbereitung, Amplifikation und Nachweis).

Siehe auch **7.7 Interpretation der Ergebnisse** und **7.6 Seltene Varianten**.

7.3.5 Anormale Schmelzkurven

Es gibt mehrere benachbarte Genvarianten, die von den in diesem Produkt verwendeten Sonden abgedeckt werden. Die Probenergebnisse für die in der dbSNP aufgeführten SNP sind in Abschnitt 7.6 zu finden.

Abweichungen bitte an service@tib-molbiol.de melden. Sie können gerne Proben mit Abweichungen in der Schmelzkurve an die Labors von TIB Molbiol GmbH in Berlin schicken, um die erhaltenen Ergebnisse bestätigen zu lassen bzw. andere Mutationen durch DNA-Sequenzierung zu bestimmen.

7.3.6 Fehlen von Peaks in beiden Kanälen

Fehlende Peaks können auf eine geringe DNA-Menge in der Probe oder auf eine Inhibition zurückzuführen sein, oder auf den sehr seltenen Fall einer Deletion des AAT-Gens (Pi00-Allel), der mit einem AAT-Mangel (hohes Risiko) verbunden ist. Wir empfehlen dringend, solche Proben zur weiteren Analyse an ein spezialisiertes Labor zu schicken.

7.4 Speichern der externen Standards für die Genotypisierung

 (Nicht zutreffend für die LC1.x-Softwareversionen unter 4.0 und LightCycler® Nano).

Wenn die Proben 1 bis 4 nach der Genotypisierungsanalyse die Akzeptanzkriterien erfüllen (siehe Abschnitt **7.3 Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien**), die Standards für die Genotypisierung wie folgt speichern und den externen Standard dann in allen nachfolgenden Läufen verwenden.

7.4.1 Geräte mit Kapillartechnik

Im Fenster „Melting Curve analysis - Genotyping“ das Menü „Standard (Int)“ öffnen und „Save standards as External“ auswählen.

7.4.2 LightCycler®480

Im Fenster „Melt Curve Genotyping“ das Menü „Standard (In-run)“ öffnen und „Save as ext.“ auswählen.

7.5 Lesen der Ergebnisse

Die Daten wie in der Betriebsanleitung des LightCycler® beschrieben analysieren.

7.5.1 Typische Amplifikationsdaten

Die **Amplifikationskurven enthalten keine für die Analyse relevanten Informationen** (siehe Abschnitt **7.3 Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien**), unten ist jedoch ein Beispiel dargestellt, das mit einem LightCycler® 2.0 erhalten wurde (Abb. 1 und 2).

Die Amplifikationsdaten werden wie folgt angezeigt:

LC 2.0 (oder LC1.x mit Softwareversionen 4.1):

Die AAT Pi*S-Amplifikation im Kanal 530 und die AAT Pi*Z-Amplifikation im Kanal 640 ansehen, Analysemodus: „Absolute Quantification“ (Absolute Quantifizierung).

Geräte vom Typ LC 480:

Wenn ein LightCycler® 480 verwendet wird, die AAT Pi*S-Amplifikation im Kanal 483-533 und die AAT Pi*Z-Amplifikation im Kanal 483-640 ansehen, Modus: „Abs Quant/2nd Derivative Max“ (Abs Quant/Max. 2. Ableitung).

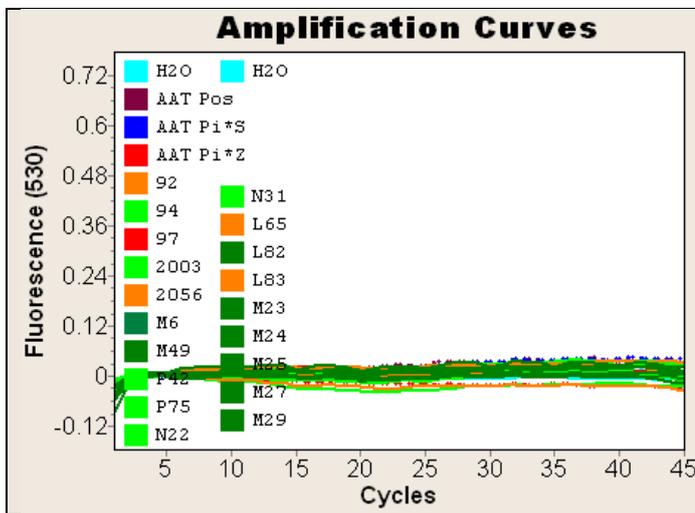
Wenn ein LightCycler® 480 II verwendet wird, die AAT Pi*S-Amplifikation im Kanal 465-510 und die AAT Pi*Z-Amplifikation im Kanal 498-640 ansehen, Modus: „Abs Quant/2nd Derivative Max“ (Abs Quant/Max. 2. Ableitung).

LC Nano:

Die AAT Pi*S-Amplifikation im Modus „Automatic Quantification“ (Automatische Quantifizierung) im Kanal 530 und die AAT Pi*Z-Amplifikation im Kanal 640 ansehen.

LC1.x, Softwareversionen 3.5:

Die AAT Pi*S-Amplifikation im Fluoreszenzkanal F1 und die AAT Pi*Z-Amplifikation im Kanal F2 ansehen, Modus: „Quantification - Second Derivative Max“ (Quantifizierung - Max. 2. Ableitung).

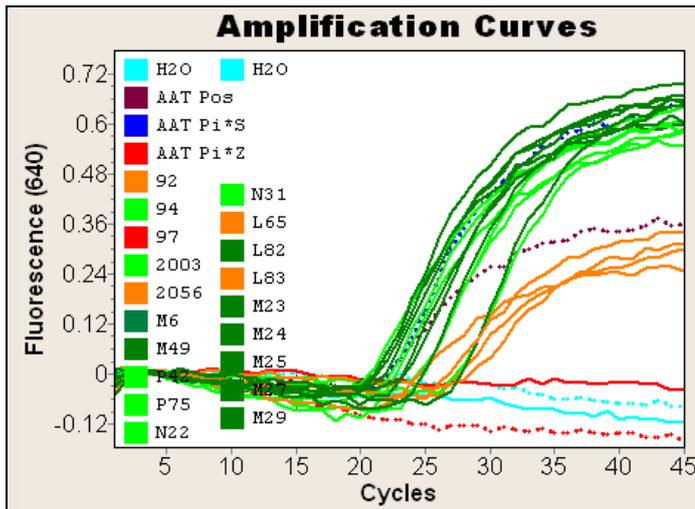


Daten des Kanals 530

Die **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) zeigt kein Amplifikationssignal.

Alle Standards und biologischen Proben zeigen kein Amplifikationssignal

Abb. 1: Amplifikationsdiagramm. Probendaten für AAT Pi*S



Daten des Kanals 640

Die **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) zeigt kein Amplifikationssignal.

Der Standard für die **AAT Pi*Z**-Genotypisierung (rote gestrichelte Linie) und biologische Probe **97 zeigen kein Amplifikationssignal**.

Die verbleibenden Standards und die biologischen Proben zeigen ein Amplifikationssignal, das für klinische Proben typisch ist, die zumindest ein Wildtyp-Allel aufweisen.

Abb. 2: Amplifikationsdiagramm. Probendaten für AAT Pi*Z

7.5.2 Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik

Die Schmelzkurvenpeaks (Abb. 3 und 4) zeigen alle Genotypen.



Die Farbkompensation aktivieren!

Die Analyse der Daten ohne „Farbkompensation“ (deaktiviert) führt zu einem ungültigen Auslesen der Ergebnisse.

Die Schmelzdaten für AAT werden wie folgt angezeigt:

LC 2.0 (oder *LC1.x* mit Softwareversionen 4.1):

Die Schmelzdaten für AAT Pi*S im Kanal 530 (Abbildung 3) und für AAT Pi*Z im Kanal 640 (Abbildung 4) ansehen. Analysetyp „Melting Curve Analysis – Genotyping“ Mode (Schmelzkurvenanalyse - Genotypisierung).

LC1.x, Softwareversion 3.5.3

Die Schmelzdaten für AAT Pi*S im Kanal F1 anstelle von Kanal 530 (Abbildung 3) und für AAT Pi*Z im Kanal F2 anstelle von Kanal 640 (Abbildung 4) ansehen. Modus „Melting Curve“ (Schmelzkurve).

Kanal 530

In der **NTC** Negativkontrolle

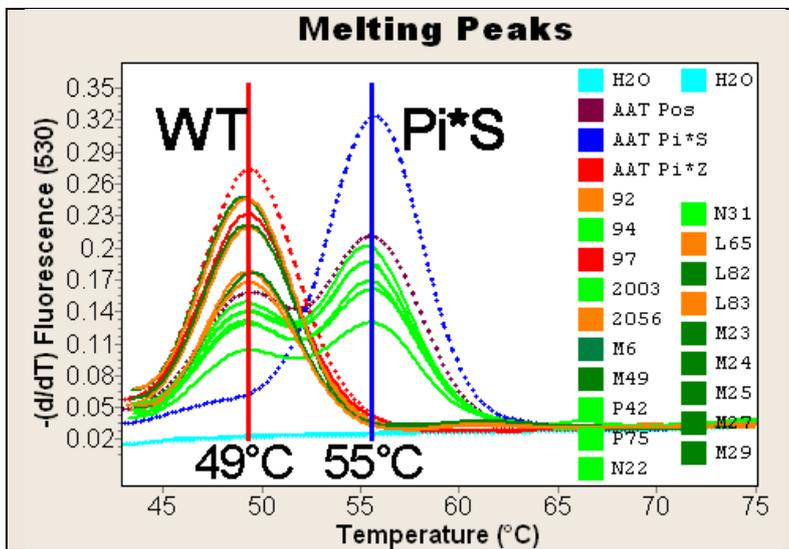


Abb. 3: Schmelzdaten für das Kit AAT Pi*S.

(hellblaue Linie – Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **AAT Pos** Positivkontrolle (dunkelrote gestrichelte Linie - Position 2) zeigt einen Schmelzpeak bei 49 °C und einen Schmelzpeak bei 55 °C wie bei heterozygoten Pi*S-Proben (E264V) (hellgrüne Linien). Standard für die **AAT Pi*S**-Genotypisierung (blaue gestrichelte Linie – Position 3) zeigt einen Schmelzpeak bei 55 °C und ahmt mutierte Pi*S-Proben (264V) nach. Der **Pi*Z-Standard** (rote gestrichelte Linie - Position 4) zeigt einen Schmelzpeak bei 49 °C wie Pi*S-Wildtyp-Proben (E264) (dunkelgrüne, rote und orangefarbene Linien).

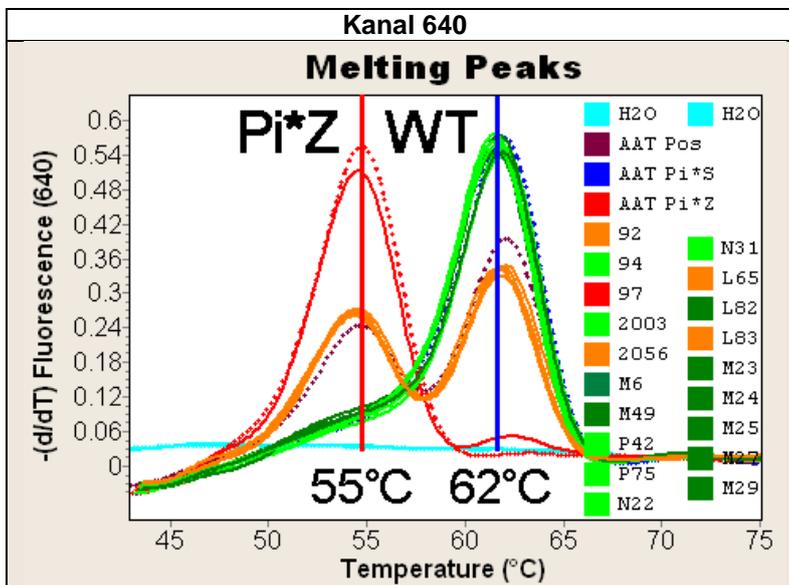


Abb. 4: Schmelzdaten für das Kit AAT Pi*Z.

In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie - Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **AAT Pos** Positivkontrolle (dunkelrote gestrichelte Linie - Position 2) zeigt einen Schmelzpeak bei 55 °C und einen Schmelzpeak bei 62 °C wie bei heterozygoten Pi*Z-Proben (E342K) (orangefarbene Linien). Der Standard für die **AAT Pi*S**-Genotypisierung (blaue gestrichelte Linie - Position 3) zeigt einen Schmelzpeak bei 62 °C für Pi*Z-Wildtyp-Proben (E342) (grüne Linien). Der Standard für die **AAT Pi*Z**-Genotypisierung (rote gestrichelte Linie - Position 4) zeigt einen Schmelzpeak bei 55 °C wie Pi*Z-Wildtyp-Proben (342K) (rote Linien).

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (T_m) können innerhalb der verschiedenen Läufe um $\pm 2,5$ °C schwanken.

Das ΔT zwischen zwei Schmelzpeaks kann bei heterozygoten Genotypen um $\pm 1,5$ °C schwanken.

Bei Variationen siehe: **7.3.5 Anormale Schmelzkurven** und **7.6 Seltene Varianten**



Falls das automatische Genotyp-Modul versagt (Score <0,6 oder res<0,4), zur manuellen Identifizierung der Schmelzkurve (T_m calling) wechseln und die Ergebnisse mit Tabelle 7 (**7.7. Interpretation der Ergebnisse**) vergleichen.

7.5.3 Schmelzanalyse: LightCycler® 480

Die Schmelzkurvenpeaks (Abb. 5 und 6) zeigen alle Genotypen.



Die Farbkompensation aktivieren!
Die Analyse der Daten ohne „Farbkompensation“ (deaktiviert) führt zu einem ungültigen Auslesen der Ergebnisse.

Die Schmelzdaten werden wie folgt angezeigt:

LightCycler® 480: Die AAT Pi*S-Schmelzdaten im Kanal 483-533 und die AAT Pi*Z-Schmelzdaten im Kanal 483-640 ansehen. Analysetyp „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.

LightCycler® 480 II: Die AAT Pi*S-Schmelzdaten im Kanal 465-510 (Abbildung 5) und die AAT Pi*Z-Schmelzdaten im Kanal 498-640 (Abbildung 6) ansehen. Analysetyp „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.

Cobas z 480 Analyzer: Die AAT Pi*S-Schmelzdaten im Kanal 465-510 und die AAT Pi*Z-Schmelzdaten im Kanal 498-645 ansehen. Analysetyp „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.

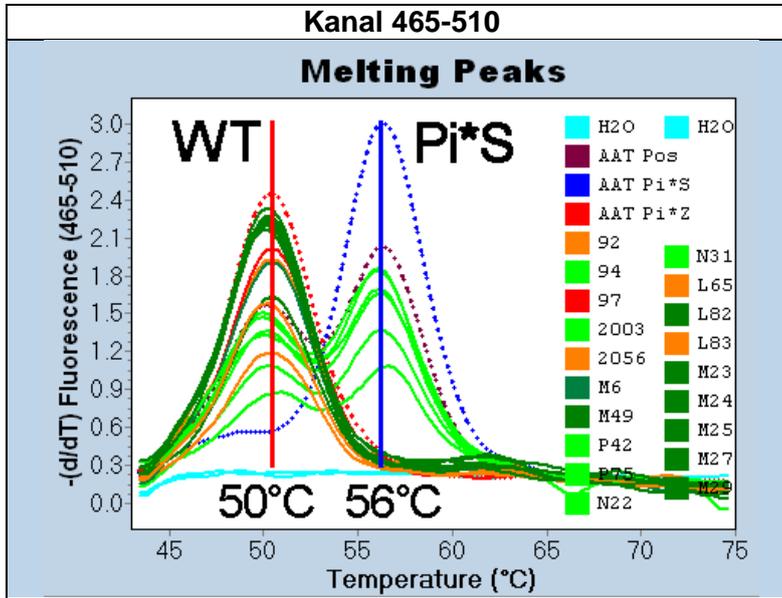


Abb. 5: Schmelzdaten für das Kit AAT Pi*S.

In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie – Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **AAT Pos** Positivkontrolle (dunkelrote gestrichelte Linie - Position 2) zeigt einen Schmelzpeak bei 50 °C und einen Schmelzpeak bei 56 °C wie bei heterozygoten Pi*S-Proben (E264V) (hellgrüne Linien). Der Standard für die **AAT Pi*S**-Genotypisierung (blaue gestrichelte Linie – Position 3) zeigt einen Schmelzpeak bei 56 °C und ahmt mutierte Pi*S-Proben (264V) nach. Der **Pi*Z-Standard** (rote gestrichelte Linie - Position 4) zeigt einen Schmelzpeak bei 50 °C wie Pi*S-Wildtyp-Proben (E264) (dunkelgrüne, rote und orangefarbene Linien).

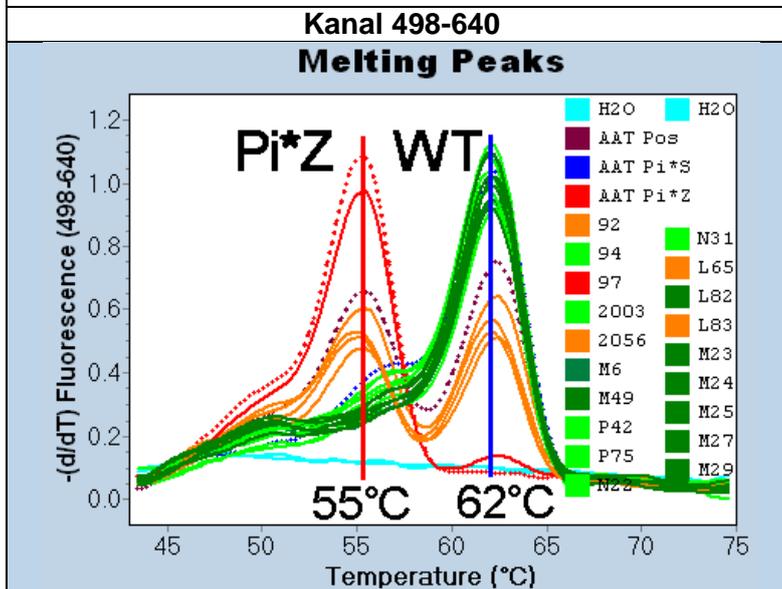


Abb. 6: Schmelzdaten für das Kit AAT Pi*Z.

In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie - Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **AAT Pos** Positivkontrolle (dunkelrote gestrichelte Linie - Position 2) zeigt einen Schmelzpeak bei 55 °C und einen Schmelzpeak bei 62 °C wie bei heterozygoten Pi*Z-Proben (E342K) (orangefarbene Linien). Der Standard für die **AAT Pi*S**-Genotypisierung (blaue gestrichelte Linie - Position 3) zeigt einen Schmelzpeak bei 62 °C wie Pi*Z-Wildtyp-Proben (E342) (grüne Linien). Der Standard für die **AAT Pi*Z**-Genotypisierung (rote gestrichelte Linie - Position 4) zeigt einen Schmelzpeak bei 55 °C wie Pi*Z-Wildtyp-Proben (342K) (rote Linien).

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (Tm) können innerhalb der verschiedenen Läufe um ± 2,5 °C schwanken.

Das ΔT zwischen zwei Schmelzpeaks kann bei heterozygoten Genotypen um ± 1,5 °C schwanken. Bei Variationen siehe: **7.3.5 Anormale Schmelzkurven** und **7.6 Seltene Varianten**



Falls das automatische Genotyp-Modul versagt, zur manuellen Identifizierung der Schmelzkurve (Tm calling) wechseln und die Ergebnisse mit Tabelle 7 (7.7. Interpretation der Ergebnisse) vergleichen.

7.5.4 Schmelzanalyse: LightCycler® Nano

Die Schmelzkurvenpeaks (Abb. 7 und 8) zeigen alle Genotypen.

Die Schmelzdaten werden wie folgt angezeigt:

Analyse

Im Fenster: **Select Analysis (Analyse auswählen)**

Folgendes auswählen: Tm Calling

Im Fenster: **Setting (Einstellungen)**

Folgendes Auswählen: Use negative Derivative "Yes"

(Negative Ableitung verwenden „Ja“)

Folgendes auswählen: Noise Reduction Range (Bereich Rauschre-

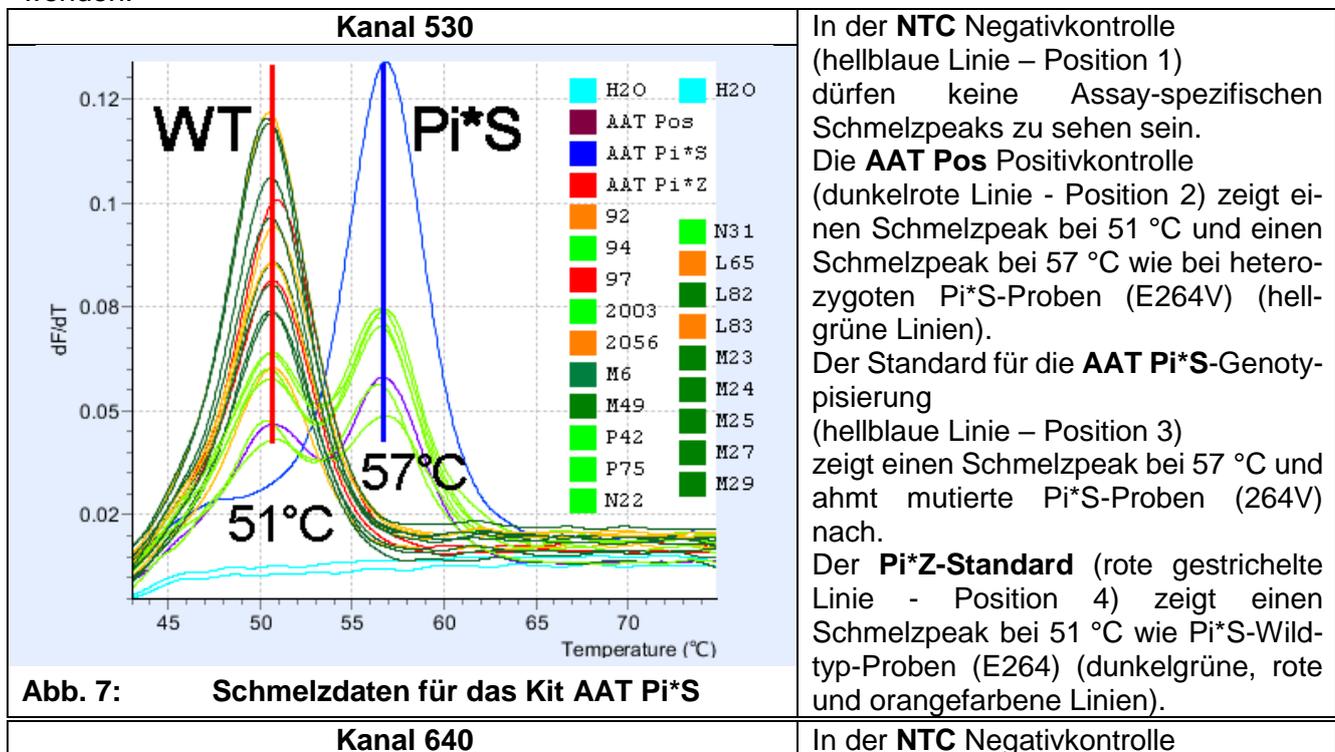
duktion) (°C) = 1

Folgendes auswählen: Target: Kanal 530 für **Pi*S**

Folgendes auswählen: Target: Kanal 640 für **Pi*Z**

Schmelzpeaks

Die Schmelzkurve jedes Patienten manuell mit der Schmelzkurve der Standards in beiden Kanälen vergleichen und die Tabelle 7 im Kapitel 7.7 Interpretation der Ergebnisse zum Vergleichen verwenden.



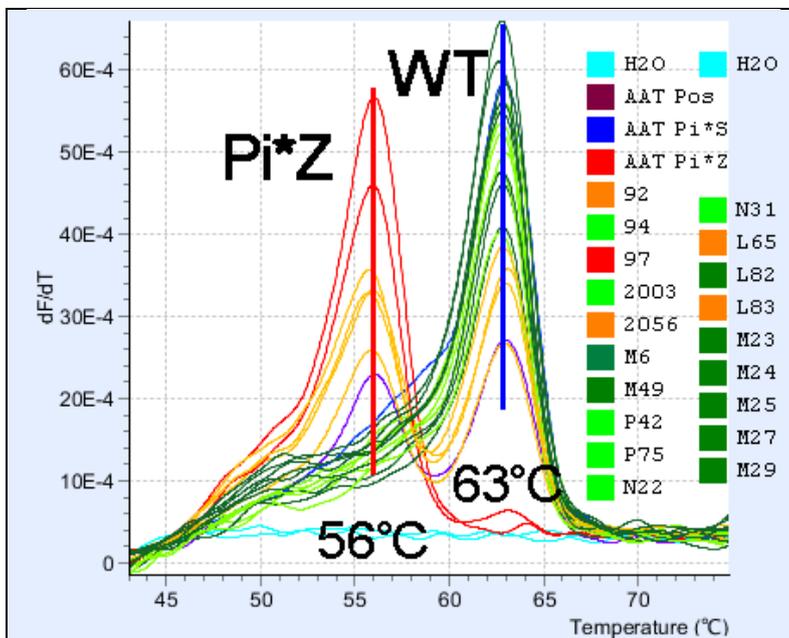


Abb. 8: Schmelzdaten für das Kit AAT Pi*Z

(hellblaue Linie - Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **AAT Pos** Positivkontrolle (dunkelrote Linie - Position 2) zeigt einen Schmelzpeak bei 56 °C und einen Schmelzpeak bei 63 °C wie bei heterozygoten Pi*Z-Proben (E342K) (orange-farbene Linien). Der Standard für die **AAT Pi*S**-Genotypisierung (blaue Linie - Position 3) zeigt einen Schmelzpeak bei 63 °C wie Pi*Z-Wildtyp-Proben (E342) (dunkel-/hellgrüne Linien). Der Standard für die **AAT Pi*Z**-Genotypisierung (rote Linie - Position 4) zeigt einen Schmelzpeak bei 56 °C wie Pi*Z-Wildtyp-Proben (342K) (rote Linien).

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (T_m) können innerhalb der verschiedenen Läufe um $\pm 2,5$ °C schwanken.

Das ΔT zwischen zwei Schmelzpeaks kann bei heterozygoten Genotypen um $\pm 1,5$ °C schwanken.

Bei Variationen siehe: **7.3.5 Anormale Schmelzkurven** und **7.6 Seltene Varianten**

7.6 Für seltene Varianten erwartete Schmelztemperaturen

In der dbSNP sind mehrere Varianten des AAT-Gens verzeichnet, darunter vier SNP in der Nähe von G11940A (rs28929474), die von der im Kit verwendeten Sonde abgedeckt werden. Für drei von ihnen ist keine Allelhäufigkeit angegeben, und es ist zu erwarten, dass diese Varianten sehr selten sind, während die dbSNP für die Variante G11937A (rs143370956) eine Häufigkeit von 0,1 % angibt.

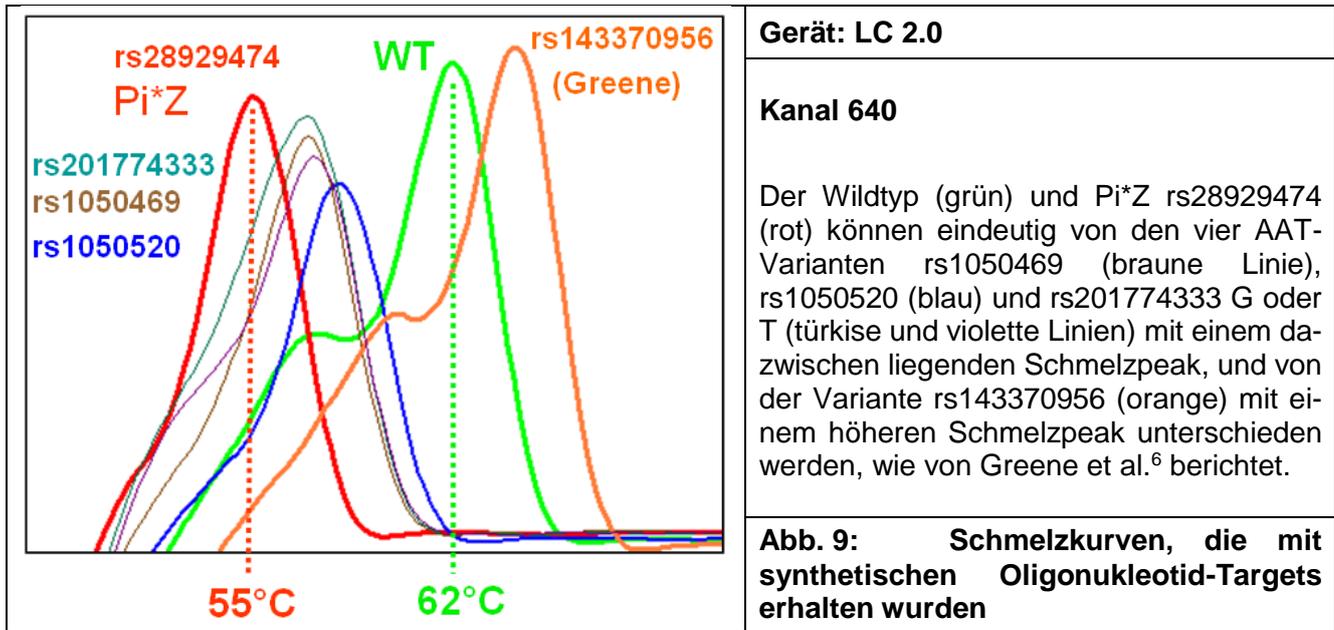
Die in diesem Kit verwendete Sonde wurde zur Identifizierung der Variante 11937A entwickelt, um falsche Pi*Z-Ergebnisse, wie die von Greene et al.⁶ für andere veröffentlichte Assays zur AAT-Genotypisierung berichteten, zu vermeiden.

Die Schmelztemperaturen, die mit synthetischen Kontrollen für alle bekannten Varianten in der Nähe von Pi*Z (rs28929474) ermittelt wurden, sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt:

Position	dbSNP rs-Nummer	ΔT_m	Anmerkung
11937A	rs143370956	+ 2,3 °C	0,1 % Greene et al. ⁶
11940G	-	[62 °C]	Wildtyp
11945G	rs1050520	- 4,3 °C	
11939G	rs201774333	- 4,8 °C	
11939T	rs201774333	- 4,9 °C	
11933G	rs1050469	- 5,0 °C	
11940A	rs28929474	- 7,0 °C	Pi*Z Mutation

Tab. 6: Schmelztemperaturen

Auf der folgenden Abbildung sind die Schmelzpeaks zu sehen, die mit synthetischen Kontrollen erhalten wurden.

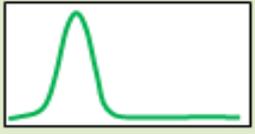
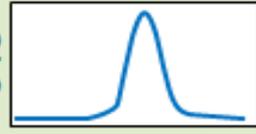
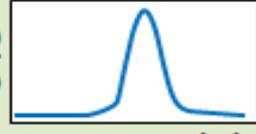
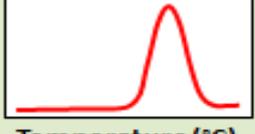
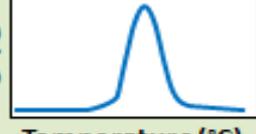
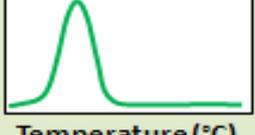
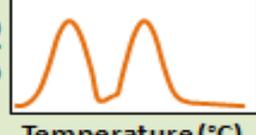
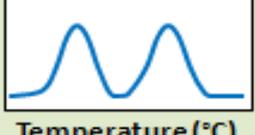
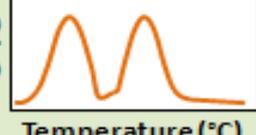
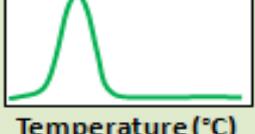
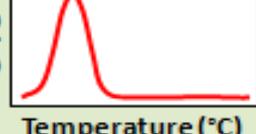


Experimentell getestete Varianten mit rs-Code (dbSNP NCBI), Nomenklatur der Human Genome Variation Society (HGVS) und Allelhäufigkeiten (basierend auf TOPMed-Daten). Die Temperaturen (T_m) wurden mit synthetischen Targets erhoben. **Die für die seltenen Varianten angegebenen T_m -Werte dürfen nicht zur Vorhersage von Genotypen verwendet werden. Nur die Informationen in den Abschnitten 7.5 bis 7.7 verwenden.**

In der Literatur gibt es derzeit keine Informationen über einen AAT-Mangel im Zusammenhang mit einer dieser Varianten.

Anmerkungen:

7.7. Interpretation der Ergebnisse

AAT Pi*S Kanal 530 Schmelzpeak(s)		AAT Pi*Z Kanal 640 Schmelzpeak(s)		AAT-Genotyp	AAT-Serumkonzentrationen
WT	Pi*S	Pi*Z	WT	Aminosäuren	Verbundenes Risiko
Melting Peaks 530  Temperature (°C)		Melting Peaks 640  Temperature (°C)		Pi MM 264 EE 342 EE (Wildtyp)	Normales Serum-AAT (1,5 - 3,0 g/l)
49-51	-	-	62-63		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)		Melting Peaks 640  Temperature (°C)		Pi MS 264 EV 342 EE	Normales Serum-AAT (1,0 - 2,7 g/l)
49-51	55-57	-	62-63		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)		Melting Peaks 640  Temperature (°C)		Pi SS 164 VV 342 EE	Normales Serum-AAT (1,0 - 1,4 g/l) Leicht erhöhtes Emphysem-Risiko
-	55-57	-	62-63		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)		Melting Peaks 640  Temperature (°C)		Pi MZ 264 EE 342 EK	Normales Serum-AAT (0,9 - 2,0 g/l) Leicht erhöhtes Emphysem-Risiko
49-51	-	55-56	62-63		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)		Melting Peaks 640  Temperature (°C)		Pi SZ 264 EV 342 EK	Reduziertes Serum-AAT (0,5 - 1,2 g/l) Erhöhtes Emphysem-Risiko (<50 %) Zirrhose-Risiko
49-51	55-57	55-56	62-63		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)		Melting Peaks 640  Temperature (°C)		Pi ZZ oder Pi ZO 264 EE 342 KK	AAT-Mangel (0,2 - 0,5 g/l) Hohes Emphysem-Risiko (80 - 100 %) Zirrhose-Risiko (20 %)
49-51	-	55-56	-		
Kein 530-Peak!		Kein 640-Peak!		Pi 00 AAT-Mangel	AAT (< 0,2 g/l) Emphysem-Risiko

Die AAT-Gendeletion ist sehr selten. Dieses Kit enthält keine Kontrollreaktionen zur Unterscheidung zwischen PCR-Inhibition, fehlender DNA oder dem tatsächlichen Vorliegen der Gendeletion. Den Lauf wiederholen und an einen Spezialisten wenden.

ΔTm 6 °C	ΔTm 7 °C	Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (Tm) können innerhalb der verschiedenen Läufe um ± 2,5 °C schwanken, während die ΔT eher gleichbleibend sind.
Tab. 7: Typische Analyseergebnisse		

8. Fehlersuche und -behebung

Gerät	Geräte mit Kapillartechnik	LightCycler® 480
Spezifische Codes:	LightCycler® Nano	
Ereignis	Mögliche Ursache	Lösung
Keine Probe erkannt	Keine Zentrifugation	Kapillare zentrifugieren
Alle PCRs sind negativ	Es wurde ein falscher Nachweiskanal gewählt	Vor der Analyse den richtigen Kanal einstellen
	Falsches Amplifikationsprotoll	Das Programm des Geräts kontrollieren
Die Baseline der verschiedenen Proben stimmt nicht überein	Pipettierfehler	Sicherstellen, dass die einzelnen Proben mit den gleichen Mengen angesetzt wurden
	Das Reaktionsgemisch ist nicht homogen	Das Reaktionsgemisch 10-mal mit einer sauberen 200-µl-Pipettenspitze aufziehen und erst dann in das Reaktionsgefäß pipettieren.
	Die Mikrotiterplatte wurde schlecht verschlossen	Sicherstellen, dass die Mikrotiterplatte fachgerecht verschlossen ist
Baseline mit „Saw teeth“ Profil	Es befinden sich Blasen im Well	Die Mikrotiterplatte vor dem Lauf zentrifugieren
	Die Kapillare steckt nicht richtig im Karussell	Die Kapillare fest in das Karussell drücken
Kein Signal für die Positivkontrolle	Fehler beim Einrichten des Geräts	Kontrollieren, welches Well für die Positivkontrolle eingerichtet wurde
	PSR/MgCl ₂ -Konzentration stimmt nicht	Den Assay wiederholen
	Positivkontrolle oder Standard ist degradiert	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden
Positives Signal in der NTC Negativkontrolle	Fehler beim Einrichten des Geräts	Kontrollieren, welches Well für die Negativkontrolle eingerichtet wurde
	Pipettierfehler	Beim Pipettieren der Proben, der Negativkontrollen, der Positivkontrollen und der Standards genau die Anweisungen auf dem Arbeitsblatt befolgen.
	Pipettierfehler	Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden
	Pipettierfehler	Der Inhalt des Probenröhrchens darf nicht tropfen
	Das PCR-Wasser ist kontaminiert.	Ein neues Aliquot PCR-Wasser verwenden
	Das Reaktionsgemisch ist kontaminiert	Neue Aliquote der Reagenzien verwenden, um das Reaktionsgemisch anzusetzen
	Der Extraktions-/Vorbereitungsbereich für die Amplifikationsreaktionen ist kontaminiert	Die Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, die Laborkittel waschen, die Röhrchen und Pipettenspitzen austauschen
	Der Extraktions-/Vorbereitungsbereich für die Amplifikationsreaktionen ist kontaminiert	LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (Kat.-Nr. 03 539 806 001) zum Reaktionsgemisch hinzugeben (siehe Anleitung)

Kein Signal in den Proben	Zu wenig DNA	Die DNA-Konzentration kontrollieren
	Die Probe wird inhibiert	Die Probe verdünnen und die PCR wiederholen, oder die Extraktion und die PCR wiederholen, oder Positivkontrolle hinzufügen und wiederholen
	PiOO-Allel	AAT-Mangel
Die Schmelzkurve liegt außerhalb des erwarteten Temperaturbereichs	Bei TM-Peaks, die mit der Positivkontrolle übereinstimmen : Reagenzienkonzentration stimmt nicht	Von Hand die Ergebnisse mit Hilfe der Positivkontrolle zuweisen
	Bei TM-Peaks, die nicht mit der Positivkontrolle übereinstimmen : Möglicherweise ist ein Extraktionsinhibitor vorhanden	Die DNA 1:3 verdünnen und dann mit der verdünnten DNA den Assay wiederholen
	Bei TM-Peaks, die nicht mit der Positivkontrolle übereinstimmen : Möglicherweise liegt eine andere Mutation vor	Den Assay mit Sequenzierung wiederholen und die unerwartete Variante an folgende E-Mail-Adresse melden: service@tib-molbiol.de

9. Literaturnachweis

1) Laurell CB, Eriksson S

The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in alpha 1-antitrypsin deficiency

Scand J Clin Lab Invest 15 (2): 132–140 (1963)

2) **What is COPD?**. National Heart Lung and Blood Institute. U.S. National Institutes of Health. June 1, 2010.

3) Stoller J, Aboussouan L

Alpha1-antitrypsin deficiency

Lancet 365 (9478): 2225–36. (2005).

4) Silverman EK, Sandhaus RA

Alpha1-Antitrypsin Deficiency

New England Journal of Medicine 360 (26): 2749–2757. (2009).

5) Aslanidis, C., Nauck M., and Schmitz G.

High-Speed Detection of the Two Common α 1-Antitrypsin Deficiency Alleles Pi*Z and Pi*S by Real-Time Fluorescence PCR and Melting Curves

Clin Chemistry 45.10 1872-5 (1999)

6) Greene DN, Procter M, Grenache DG, Lyon E, Bornhorst JA, Mao R.

Misclassification of an apparent AAT “Z” deficiency variant by melting analysis.

Clin Chim Acta (2011)

7) Potočnjak et al.,

Unusually difficult clinical presentation of an infant suffering from congenital cytomegalovirus (CMV) infection combined with alpha 1-antitrypsin (A1AT) deficiency

Biochimica Medica 2014;24(3):396–402

8) Denden et al.

Alpha-1 antitrypsin gene polymorphism in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Klassifizierung / Referenzen

Referenz	Klassifizierung
EDMA	16 01 01 90 00
CPV	33694000-1
EAN	4260159331912
Roche SAP-Nr.	07055684001

Hinweis für den Käufer - Patente und Warenzeichen

Der Kauf dieses Produkts berechtigt zu dessen Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum, d. h. zur Amplifikation und zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Proben menschlichen Ursprungs. Es wird keine andere Art von Lizenz übertragen, außer dem Recht, das vorliegende Produkt zu nutzen, was sich aus dem Kauf ergibt.

Abgesehen von den ausdrücklich genannten Lizenzen übernimmt TIB MOLBIOL keine Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder seine Verwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.

LightCycler®, MagNA Pure® und High Pure® sind Markenzeichen von Roche.

ABI 3730xl Genetic Analyzer und Sequencing Analysis sind von Applied Biosystems eingetragene Produkte.

LightMix® ist ein Markenzeichen von TIB MOLBIOL.

SimpleProbe und LightMix Kits werden unter Lizenz von Roche hergestellt.

FastStart Enzym

Die FastStart DNA Master HybProbe ist nur in den Kits für TIB MOLBIOL-Kunden in Mitteleuropa enthalten.

Wenn dieses Kit über Roche Diagnostics oder deren lokale Vertriebshändler vertrieben wird, wird die FastStart DNA Master HybProbe als separates Produkt geliefert:

Roche Diagnostics Kat.-Nr. 03 003 248 001 Kit für 96 Reaktionen

Roche Diagnostics Kat.-Nr. 12 239 272 001 Kit für 480 Reaktionen

Sicherheitsdatenblatt

Nach OSHA 29CFR1910.1200, Commonwealth of Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] und den EU-Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG benötigen alle Produkte, die nicht mehr als 1 % eines als gefährlich oder krebserregend eingestuften Bestandteils enthalten, kein Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt ist nicht gefährlich, nicht giftig und unterliegt nicht den IATA-Einschränkungen. Das Produkt ist weder menschlichen noch tierischen oder pflanzlichen Ursprungs. Das Produkt enthält synthetische Oligonukleotid-Primer und Sonden.

Überarbeitungsverlauf

Rot gekennzeichnete Änderungen sind mit einer Änderung der Labortechniken verbunden

Blau gekennzeichnete Änderungen sind Verbesserungen oder Änderungen in der Zusammensetzung

Version	Änderung	Datum
V121024	Erste Ausgabe	30.04.2013
V121024C	Korrektur des Inhalts, Abschnitte 6.2.2 und 6.3.1.	06.06.2013
V130704	MagNa Pure 96 und MagNa Pure Compact wurden aufgenommen. Anleitung, wenn Modul für automatisierte Genotypisierung versagt (7.5.2).	04.07.2013
V150101	Redaktionelle Änderungen	19.12.2014
V160626	Lagerung (1.1, 1.4)	26.06.2016
V170303	Irreführende Formulierung korrigiert (7.3.1)	05.10.2017
V190123	Disclaimer aufgenommen (7.6).	20.02.2019

Hergestellt von:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstrasse 22-23
12103 Berlin, Deutschland
www.tib-molbiol.com

