



LightMix® in-vitro Diagnostik-Kit
HFE H63D S65C C282Y

Kat.-Nr.: 40-0340-32

Nachweis der DNA-Varianten des HFE-Gens
, die für p.H63D, p.S65C und p.C282Y
kodieren, in aus peripherem Blut extrahierter DNA

zur Anwendung mit einem

LightCycler® von Roche Diagnostics

Reagenzien für 96 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. Produktinformation	4
1.1 Inhalt: LightMix® Kit HFE H63D S65C C282Y	4
1.2 Verwendungszweck	5
1.3 Technische Vorgaben	5
1.3.1 Klinische Proben	5
1.3.2 Geräte, Software und Produktionsleistung	6
1.4 Lagerung und Stabilität	6
2. Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien	8
2.1 Erforderliche Ausrüstung	8
2.2 Optionale Ausrüstung	8
2.3 Vorbereitung der Probe	8
3. Hintergrundinformationen	9
3.1 Medizinischer Hintergrund	9
3.2 Methode und Funktionsprinzip des Assays	10
3.3 Leistungsmerkmale	12
4. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	13
5. Programmierung	15
5.1 Farbkompensation	15
5.2 LightCycler® mit Kapillartechnik	15
5.3 Roche 480 Instrumente	16
5.4 LightCycler® Nano	17
6. Versuchsprotokoll	18
6.1 Vorbereitung der Probe	18
6.2 Ansetzen der Reagenzien	18
6.2.1 Ansetzen des LightCycler® FastStart DNA Masters	18
6.2.2 Ansetzen der parameterpezifischen Reagenzien (PSR)	18
6.2.3 Ansetzen der Standards	19
6.2.4 Ansetzen der Standards für die Genotypisierung	19
6.3 Ansetzen des Reaktionsgemischs	19
6.3.1 Ansetzen von 32 LightCycler®-Reaktionsgemischen	19
6.3.2 Ansetzen eines einzelnen LightCycler® -Reaktionsgemischs	20
6.3.3 Laden der Kapillaren / Wells	20
6.4 Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten	21
6.5 Laden der Kontrollen und der Standards für die Genotypisierung	22
6.5.1 Geräte mit Kapillartechnik	22
6.5.2 Roche 480 Instrumente	22
6.5.3 LightCycler® Nano	23
7. Datenanalyse und Interpretation	25
7.1 Grenzen und Interferenzen	25
7.2 Kalibrierung	25
7.3 Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien	25
7.3.1 Negativkontrolle	25
7.3.2 Standards (Positivkontrollen)	25
Bezüglich der erwarteten Schmelztemperaturen siehe 7.6 Interpretation der Ergebnisse.	26
7.3.3 DNA der Standards für die Genotypisierung	26
7.3.4 Proben	26
7.3.5 Anormale Schmelzkurven	26
7.4 Speichern der externen Standards für die Genotypisierung	27
7.4.1 Geräte mit Kapillartechnik	27
7.4.2 Geräte vom Typ 480 von Roche	27
7.5 Lesen der Ergebnisse	27
7.5.1 Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik	27
7.5.2 Schmelzanalyse: Geräte vom Typ 480 von Roche	28
7.5.3 Schmelzanalyse: LightCycler® Nano	29
7.6. Interpretation der Ergebnisse - Risikoallele	31
7.6. Interpretation der Ergebnisse (Fortsetzung)	32
7.7 Zusätzliche Informationen	34
7.7.1 Typische Amplifikationsdaten	34
7.7.2 Interpretation von problematischen Profilen	35
7.7.3 Seltene Varianten	35
8. Fehlersuche und -behebung	36
9. Literaturnachweis	38

1. Produktinformation

1.1 Inhalt: LightMix® Kit HFE H63D S65C C282Y

Lyophilisierte vorgemischte PCR-Reagenzien

⚠ Bei 4 °C bis 25 °C im Dunkeln lagern.

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion / Röhrensta-tus	Insgesamt	
3 x	Rot	PSR	Parameterspezifisches Reagenz (PSR) enthält vorgemischte und getrocknete Primer und Sonden für 32 Reaktionen <100 µg unmarkierte Oligonukleotide <100 µg SimpleProbe 519 markierte Sonde (H63D, S65C) <100 µg LightCyclerRed 640 markierte Sonde (C282) <100 µg Fluorescein-markierte Sonde (C282Y)	32 Reaktionen grün-blaues Pellet lyophilisiert	96 Reak.

Standards (Kontroll-DNA)

⚠ Bei 4 °C bis 25 °C im Dunkeln lagern.

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion Röhren-status	Insgesamt	
1 x	Gelb	Standard 1	Positivkontrolle HFE-Mutation 282Y und Wildtyp für alle anderen Positionen <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	32 Reaktionen blaues Pellet lyophilisiert	32 Reak.
1 x	Gelb	Standard 2	Positivkontrolle HFE-Mutation 63D und Wildtyp für alle anderen Positionen <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	32 Reaktionen blaues Pellet lyophilisiert	32 Reak.
1 x	Gelb	Standard 3	Positivkontrolle HFE-Mutation 65C und Wildtyp für alle anderen Positionen <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	32 Reaktionen blaues Pellet lyophilisiert	32 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 HFE-Kits, die von Roche Diagnostics oder dessen Vertriebspartner vor Ort geliefert werden, nicht enthalten.

Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion Röhrenlage-rung	Insgesamt	
3 x	Rot	1a	LightCycler® FastStart Enzym	32 Reaktionen gefroren	96 Reak.
3 x	Weiß	1b	LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe, 10x konz.	32 Reaktionen gefroren	96 Reak.
3 x ⁽²⁾	Farblos	Wasser	H ₂ O mit PCR-Qualität	gefroren	96 Reak.
3 x ⁽²⁾	Blau	MgCl ₂	MgCl ₂ , 25 mM	32 Reaktionen gefroren	96 Reak.

1) Die FastStart DNA Master HybProbe wird von TIB MOLBIOL bei Raumtemperatur versandt.

2) Die von Roche Diagnostics gelieferte FastStart DNA Master HybProbe enthält nur 2 Röhren H₂O und 1 Röhren MgCl₂, die gelieferte Menge ist jedoch für die beschriebene Verwendung dieses Kits ausreichend.

1.2 Verwendungszweck

Mit diesem Kit können häufige Mutationen im HFE-Gen (OMIM: 235200) in genomischer menschlicher DNA nachgewiesen werden, wobei die DNA aus einem Nukleinsäureextrakt stammt, welches aus peripherem Blut gewonnen wurde.

Die *Hämochromatose* Typ 1 (HFE1) ist erblich und mit verschiedenen Mutationen im HFE-Gen verbunden. Eine *Hämochromatose* führt durch eine vermehrte Eisenablagerung zu Funktionsstörungen bei mehreren Organen.

Dieses Produkt soll dem Arzt dabei helfen, den genetischen Hintergrund von Patienten mit einer Lebererkrankung unbekannter Ätiologie, Patienten mit Leberzirrhose, Diabetes mellitus, bronzefarbener Hautpigmentierung in Verbindung mit erhöhten Serumeisenspiegeln, erhöhter Transferrinsättigung und erhöhten Serumferritinwerten zu analysieren.

Dieser Test kann zusätzlich oder nach einem biochemischen Assay zur Feststellung einer Eisenüberladung über die Transferrinsättigung 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® von Roche oder einem cobas z 480 Analyzer 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 HFE H63D S65C C282Y* ist ein *in-vitro* Diagnostikum, mit dem die klinisch relevanten Varianten mit einem Einzelbasen-Polymorphismus p.H63D, p.S65C und p.C282Y im HFE-Gen nachgewiesen und identifiziert werden können.

Andere Genvarianten können den Test möglicherweise beeinflussen. Die folgenden seltenen Varianten des Exons 4 werden auch nachgewiesen (siehe 3.1 und 7.7.3) jedoch nicht „identifiziert“:

p.T281M	c.842C>T	rs915273578	≈ ΔTm -15 °C
p.T281T	c.843G>A	rs369354634	
p.Q283P	c.848A>C	rs111033563	≈ ΔTm - 8 °C

1.3.1 Klinische Proben

Für den Test werden 5 µl aufgereinigte genomische DNA in wässriger Lösung benötigt, die aus einer klinischen Probe (peripherem Blut) extrahiert wurden und 3 ng/µl bis 100 ng/µl genomische DNA (15 ng - 500 ng Gesamtmenge) enthalten, was das Zehnfache der technisch erforderlichen Mindestmenge entspricht

(1.5 ng, siehe Abschnitt 3.3), wobei die DNA-Konzentration mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt wird (1 OD₂₆₀ = 50 µg DNA/ml).

1.3.2 Geräte, Software und Produktionsleistung

Ein Kit enthält Reagenzien für 96 Reaktionen, die jeweils in einem Volumen von 20 µl durchgeführt werden.

Für jeden Lauf werden drei Standards 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	28 + 4 Kontr.	81	18
LC 1.5	4.10 ⁽¹⁾	60 min	28 + 4 Kontr.	81	18
LC 2.0	4.05	60 min	28 + 4 Kontr.	81	18
LC480 (96 Wells)	1.5	100 min	92 + 4 Kontr.	89	18
LC480 (384 Wells)	1.5	100 min	380 ⁽⁵⁾ + 4 Kontr.	89	18
Z 480 (offener Kanal)	1.5	100 min	92 + 4 Kontr.	89	18
Nano	1.0 ⁽⁶⁾	60 min	28 + 4 Kontr.	84	18

- 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 der Software 3.5, 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 3 Standards und eine Negativkontrolle (NTC = No-Target Control) mitgeführt werden, d. h. insgesamt 4 Kontrollreaktionen.
- 3 Wenn das Kit das erste Mal verwendet wird, müssen beim ersten Lauf 7 Kontrollen (statt 4) 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 7 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 vier 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

LightMix® Kit – Color Compensation HybProbe
(für LightCycler® Nano nicht erforderlich)

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

LightCycler® 480

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

LightCycler® Nano

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

LightCycler® 1.x

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

2.2 Optionale Ausrüstung

Geräte:

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 Volt)
Capping Tool

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.

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

TIB Molbiol

Kat.-Nr. 40-0318-00

Roche Diagnostics

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

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

Roche Diagnostics

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

Roche Diagnostics

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

Kat.-Nr. 03 709 582 001

Kat.-Nr. 03 357 317 001

Roche Diagnostics

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

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

Die erbliche oder auch hereditäre Hämochromatose gilt als eine der häufigsten Erbkrankheiten in der Bevölkerung kaukasischer Herkunft.

Für die Prävalenz der Hämochromatose bei europäischen Kaukasiern wird ein Wert von 1:400 angegeben (Feder et al., 1996)¹. Etwa 90 % der Hämochromatose-Patienten tragen eine homozygote Mutation, bei der die Aminosäure 282 Cys durch Tyr ersetzt wurde (282 Y/Y). Weitere 5 % sind Compound-heterozygot, d. h. sie tragen die 282 C/Y-Variante in Kombination mit einem Austausch von 63 His in Asp für das andere Allel (63 H/D), oder sie tragen eine homozygote 63 D/D-Mutation, die nur eine leichte Form der Hämochromatose verursacht.

Die heterozygote 282 C/Y-Variante allein ist nicht mit einem Risiko für eine Hämochromatose verbunden. Heterozygote 63 H/D- oder 65 S/C-Mutationen und kombinierte heterozygote 63/65-Mutationen ohne den zusätzlichen Aminosäurewechsel 282 C/Y zeigen kein erhöhtes Risiko. Eine 63D- und 282Y-Mutation auf dem gleichen Allel ist extrem selten (Best et al., 2001¹¹).

Die HGVS-Nomenklatur bezieht sich auf das **p**.rotein oder die **c**.DNA-Positionen:

p.H63D	c.187C>G	63 H/D	(hier verwendet)
p.S65C	c.193A>T	65 S/C	
p.C282Y	c.845G>A	282 C/Y	

Klinische Symptome

Die erbliche oder hereditäre Hämochromatose ist durch eine unangemessen hohe Aufnahme von Eisen durch die Magen-Darm-Schleimhaut gekennzeichnet, was zu einer übermäßigen Speicherung von Eisen insbesondere in der Leber, der Haut, der Bauchspeicheldrüse, dem Herzen, den Gelenken und den Hoden führt.

Eine bekannte Art von Gewebeschäden durch eine Eisenspeicherung ist die Leberzirrhose, die zu einem Leberzellkarzinom führen kann. (Willis et al., 2000)². Ebenfalls häufig bei Hämochromatose sind Arthropathien, Hypogonadismus, eine Schädigung der Bauchspeicheldrüse, Herzversagen und Insulinresistenz (Diabetes) (Edwards et al., 1980³, Pietrangelo, A., 2004⁴, Mc Dermott et al., 2005⁵, Franchini, M., 2006⁶).

Gentests

In klinischen Studien wurde festgestellt, dass HFE-Mutationen in Proben von kranken Menschen deutlich häufiger vorkommen als in Kontrollproben (Willis et al., 2000)².

Die Analyse von Genen hilft uns, den genetischen Hintergrund bestimmter Krankheiten zu verstehen. Mit Gentests können lediglich Personen identifiziert werden, die eine Krankheit entwickeln könnten, es kann nicht die Krankheit selbst festgestellt werden.

Genetische Varianten können z. B. durch DNA-Sequenzierung, Hybridisierung mit immobilisierten Sonden in Arrays bzw. auf Streifen oder praktischer mittels Real-Time PCR nachgewiesen werden. Der Nachweis von Mutationen im Zusammenhang mit dem HFE-Gen mittels einer Schmelzkurvenanalyse unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden wurde bereits 1999 veröffentlicht (Mangasser et al. 1999⁷, Bollhalder et al. 1999⁸).

Für Einzelheiten und weitere Informationen siehe Abschnitt 3.2.

3.2 Methode und Funktionsprinzip des Assays

Mit der PCR-Methode werden zwei Fragmente des HFE-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.

Exon 4: Variante p.C282Y

Ein 284 bp langes PCR-Fragment, in dem sich der c.845G>A (C282Y)-Polymorphismus befindet, wird mit einem LightCycler® Red 640 roten Oligomer

analysiert, das mit dem mutierten Allel 282Y übereinstimmt. In der Schmelzkurvenanalyse zeigen die 282Y-Proben eine höhere Temperatur als das Wildtyp-Allel C282.

Andere Varianten, z. B. 281M oder 283P ergeben andere Schmelztemperaturen (siehe 7.8).

Exon 2: Varianten p.H63D und p.S65C

Ein 163 bp langes PCR-Fragment, in dem sich der c.187C>G (63 H/D)- und der c.193A>T (65 S/C)-Polymorphismus befinden, wird mit einem SimpleProbe® 519 Oligomer analysiert, das mit dem mutierten Allel 63D übereinstimmt.

```
      F58          H63      S65
CTGTTTCGTGTTCTATGATCATGAGAGTCCGC
TACAAGCACAAAGATACTAGTACTCTCAGCGC
```

Die Sonde bindet an einen Teil des amplifizierten Fragments, und zwar ab der Aminosäure 58 Ph bis hinter die Mutationsstellen.

In der Schmelzkurvenanalyse zeigen die 63D-Proben eine höhere Temperatur als das Wildtyp-Allel 63H, während die 65C-Proben eine niedrigere Schmelztemperatur aufweisen. Andere Varianten ergeben andere Schmelztemperaturen (siehe 7.8).

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“).

Die automatisch ausgelesenen Genotypisierungsergebnisse müssen genau angesehen/ überprüft werden, wobei auf abweichende Kurven und andere Schmelztemperaturen zu achten ist. 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 automatisierte Genotypisierung kann fehlschlagen, wenn die zur Verfügung gestellten Standards viel höhere Signale liefern als die durchschnittlichen Patientenproben. Es dürfen bekannte (vortypisierte) klinische DNA-Proben als Referenz zum Teachen der Genotypen verwendet werden.

Die Schmelztemperaturen, die für andere Varianten erwartet werden, können Abschnitt 7.8 entnommen werden.

Das Kit enthält DNA-Standards, die für die Varianten 282 C/Y, 63 H/D und 65 S/C kodieren, 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, die zur eine direkte Sequenzierung des Amplikons für *HFE H63D S65C* und des Amplikons für *HFE C282Y* erhalten wurden, nachgewiesen.

Analytische Sensitivität

Der Nachweis in Verdünnungsreihen verschiedener heterozygoter menschlicher genomischer DNA hat gezeigt, dass die Nachweisgrenze dieses Kits bei 250 DNA-Kopien (1,5 ng) liegt. **Die kleinste Menge, die für Tests verwendet werden darf, beträgt 15 ng (siehe Abschnitt 1.3.1).**

Diagnostische Spezifität und Sensitivität

Es wurden insgesamt 120 verschiedene genomische DNA-Proben von Personen kaukasischer Herkunft parallel mittels Sequenzierung und diesem Kit analysiert. In der Studie wurden die mit dem Kit erzielten Ergebnisse mit ABI 3730xl DNA Sequenzierungsdaten verglichen, die von LGC Genomics GmbH, Berlin zur Verfügung gestellt wurden.

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

Im Detail bedeutet das:

HFE p.H63D S65C: 17 der Proben waren heterozygote c.187 C/G (63 H/D) und homozygote c.193 A/A (65 S/S)- Wildtypen, 93 homozygote 187 C/C- und 193 A/A (63 H/H 65 S/S)-Wildtypen, 4 homozygote 187 C/C (63 H/H)- und heterozygote 193 A/T (65 S/C)-Wildtypen, 6 homozygote 187 G/G (63 D/D)-Mutationen und homozygote 193 A/A (65 S/S)-Wildtypen. Die doppelt homozygote kombinierte Mutation 187 G/G und 193 T/T wurde nicht festgestellt.

HFE p.C282Y:118 Proben waren homozygote 845 G/G (282 C/C)-Wildtypen, 2 waren heterozygote 845 G/A (282 C/Y), keine war eine homozygote 845 A/A (282 Y/Y)-Mutation.

Studienergebnisse:

93 Proben	homozygoter „Wildtyp“	63 H/H	65 S/S	282 C/C
4 Proben	heterozygot für 65	63 H/H	65 S/C	282 C/C
15 Proben	heterozygot für 63	63 H/D	65 S/S	282 C/C
6 Proben	homozygote Mutation für 63	63 D/D	65 S/S	282 C/C
2 Proben	heterozygot für 63 und für 282	63 H/D	65 S/S	282 C/Y

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 Probenliste 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 „Programmierung“ 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 HFE H63D S65C C282Y* ist eine Farbkompensation erforderlich.

Die Daten mit „Farbkompensation“ analysieren (TIB Molbiol CC 530-640).

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.
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 HFE-Lauf mit dem LightCycler® geladen werden kann.

Die Anzahl der Zyklen kann auf bis zu 50 Zyklen erhöht werden, um die Signale im Kanal 530 zu verstärken.

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 Roche 480 Instrumente

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler.

Nachweisformat: TIB MOLBIOL 530-640

Siehe folgende Anleitung:

LightMix® Kit- Color Compensation HybProbe.

Kat.-Nr. 40-0318-00



Reaktionsvolumen: 20 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.

Anmerkung:

- a) Das Programm und die Standardwerte als „**RUN Template**“ speichern, das bei jedem HFE-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.
- c) Die Anzahl der Zyklen kann auf bis zu 50 Zyklen erhöht werden, um die Signale im Kanal 530 zu verstärken.

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

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „**Experiment file**“ speichern, die bei jedem HFE-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 nachlesen).

Die angegebene Leistung des Assays kann nur bei Verwendung mit den LightCycler®-Systemen von Roche Diagnostics oder einem cobas z 480 Analyzer 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)

▶	Jedes PSR -Reagenzröhrchen reicht für 32 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 20 Öl PCR-Reaktion **2 Öl PSR-Reagenz** verwenden.

6.2.3 Ansetzen der Standards

►	Das Standard -Reagenzröhrchen reicht für 32 Reaktionen.
1	Die drei 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 160 Öl 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 20 Öl PCR-Reaktion **5 Öl** von jedem **Standard** verwenden.
 - In jedem Lauf müssen alle drei **Standards** mitgeführt werden.
- Hinweis:** Beim  ffnen der Röhrchen kann der Arbeitsplatz kontaminiert werden (Aerosol).

6.2.4 Ansetzen der Standards für die Genotypisierung

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

►	Ansetzen der Standards für die Genotypisierung: 3 saubere Röhrchen vorbereiten und mit 5, 6 und 7 beschriften.
Röhrchen 5	5 Öl des Standards 1 mit 5 Öl des Standards 3 mischen Genotyp für p.C282Y und p.S65C
Röhrchen 6	5 Öl des Standards 1 mit 5 Öl des Standards 2 mischen Genotyp für p.C282Y und p.H63D
Röhrchen 7	5 Öl des Standards 2 mit 5 Öl des Standards 3 mischen Genotyp für 65C / 63D

- Für eine 20 Öl PCR-Reaktion **5 Öl** Standards für die Genotypisierung (Röhrchen 5-7) verwenden.
- Im ersten Lauf des Kits müssen alle drei Standards für die Genotypisierung verwendet werden, um das Genotypisierungsmodul zu kalibrieren.

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

6.3 Ansetzen des Reaktionsgemischs

6.3.1 Ansetzen von 32 LightCycler[®]-Reaktionsgemischen

Wir empfehlen, 32 Reaktionen vorzubereiten, um die Lagerung von gelösten oder aktivierten Reagenzien in unterschiedlichen Volumina zu vermeiden (6.2). Bezüglich der Lagerung und Stabilität der verd nnnten 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	32 Reaktionen
In das PSR -Röhrchen (roter Deckel) mit bereits	66,0 Öl

Folgendes hinzufügen:	
H ₂ O, PCR-Qualität (farbloser Deckel)	310,2 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	495,0 µl

Tab. 4: Volumen der Komponenten zum Ansetzen von 32 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 fünf Reaktionen (**Negativkontrolle**, drei **Standards**, ein zusätzlicher Ansatz) und (optional) drei **Standards für die Genotypisierung** multiplizieren.

Das Reaktionsgemisch in einem gekühlten Röhrchen ansetzen:

Bestandteile	Eine Reaktion
H ₂ O, PCR-Qualität (farbloser Deckel)	9,4 µl
Mg ²⁺ -Lösung 25 mM (blauer Deckel)	1,6 µl
PSR (roter Deckel), siehe 6.2.2	2,0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (roter Deckel), siehe 6.2.1	2,0 µl
Volumen des Reaktionsgemischs	15,0 µl

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

Das Reaktionsgemisch vorsichtig durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette mischen.

Ein hoher Prozentsatz fehlgeschlagener Versuche ist auf ein nicht homogenes Reaktionsgemisch zurückzuführen!



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 HFE-PCR-Produkten vorliegen. Zudem müssen drei Standards 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	15 µl Reaktionsgemisch pro Kapillare/ Well pipettieren.
3	Pflicht: 5 µl H₂O mit PCR-Qualität als Negativkontrolle (NTC) in Position 1 (A1) pipettieren.

	5 µl des Standards 1 in Position 2 (A2) pipettieren. 5 µl des Standards 2 in Position 3 (A3) pipettieren. 5 µl des Standards 3 in Position 4 (A4) pipettieren.
	Optional*: 5 µl aus dem Röhrchen 5 Standard für die Genotypisierung in Position 5 (A5) pipettieren. 5 µl aus dem Röhrchen 6 Standard für die Genotypisierung in Position 6 (A6) pipettieren. 5 µl aus dem Röhrchen 7 Standard für die Genotypisierung in Position 7 (A7) pipettieren.
4	5 µl der Probe in die verbleibenden Kapillaren/ Wells geben.
5	 Die Kapillaren/ Platte verschließen und zentrifugieren. Kontrollieren, ob auch wirklich keine Luftblasen vorhanden sind.
6	Den Rotor/die Platte in das Gerät 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 (2 °C bis 8 °C) 30 Tage lang aufbewahrt werden. Das fertige Gemisch nicht einfrieren.

Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

Parameterspezifisches Reagenz (PSR)

Tägliche Verwendung. Nachdem es verdünnt wurde, das PSR gekühlt (2 °C bis 8 °C) maximal 30 Tage lang aufbewahren.

Um es langfristig zu lagern, muss es eingefroren werden (-15 °C bis -25 °C) (bis zum Verfalldatum). Möglichst selten auftauen.

Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Das angesetzte FastStart DNA Master HybProbe Mastermix (1a+1b) kann gekühlt (2 °C bis 8 °C) 30 Tage lang aufbewahrt werden.

Positivkontrolle und Standards für die Genotypisierung

Tägliche Verwendung. Die gelösten Kontrollen sind gekühlt (2 °C bis 8 °C) 30 Tage lang stabil.

Um sie langfristig zu lagern, müssen sie eingefroren werden (-15 °C bis -25 °C) (bis zum Verfalldatum). Möglichst selten auftauen.

Den Tag der ersten Verwendung, die Lagerbedingungen/Gefrierzyklen protokollieren.

6.5 Laden der Kontrollen und der Standards für die Genotypisierung

Die Proben in den Positionen 1 bis 4 (Platte: A1 bis A4) müssen bei jedem Lauf wie in der nachstehenden Tabelle beschrieben eingefüllt werden. Die Proben in den Positionen 5 bis 7 (Platte: A5 bis A7), die zum Testen der Standards für die Genotypisierung erforderlich sind, müssen nur im ersten Lauf des Kits mitlaufen.



Die Genotyp-Ergebnisse basieren auf den Schmelztemperaturen. Die Anwendung des automatisierten Genotypisierungsmoduls, das derLightCycler® 2.0 und die LightCycler® 480-Software bieten, ist optional.

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des Geräts.

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“ auswählen. Nur Kanal 530 und 640 auswählen! Im Drop-down-Menü „Sample Type“ anklicken und die „Genotype“ -Beschreibung kopieren.

Pos	Name der Probe	Kanal	Name des Targets	Probentyp	Genotyp (Aminosäuren)
1	NTC	530	Target 1	Negativkontrolle	
		640	Target 4	Negativkontrolle	
2	Standard 1	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 63H 65S Wildtyp
		640	Target 4	Standard für die Genotypisierung	HFE 282Y Mutation
3	Standard 2	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 63D Mutation
		640	Target 4	Standard für die Genotypisierung	HFE 282C Wildtyp
4	Standard 3	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 65C Mutation
		640	Target 4	Unbekannt	
5	Röhrchen 5	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 65 S/C Heterozygot
		640	Target 4	Standard für die Genotypisierung	HFE 282 C/Y Heterozygot
6	Röhrchen 6	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 63 H/D Heterozygot
		640	Target 4	Unbekannt	
7	Röhrchen 7	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 65C / 63D Heterozygot
		640	Target 4	Unbekannt	

6.5.2 Roche 480 Instrumente

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

Pos	Filterkombination	Name der Probe	Melt Geno Probenotyp	Melt Geno Genotyp
A1	Fluos (465-510)	NTC	Negativkontrolle	
A1	Rot 640 (498-640)	NTC	Negativkontrolle	
A2	Fluos (465-510)	Standard 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 63H 65S Wildtyp
A2	Rot 640 (498-640)	Standard 1	Standard für die Genotypisierung	HFE 282Y Mutation
A3	Fluos (465-510)	Standard 2	Standard für die Genotypisierung	HFE 63D Mutation
A3	Rot 640 (498-640)	Standard 2	Standard für die Genotypisierung	HFE 282C Wildtyp
A4	Fluos (465-510)	Standard 3	Standard für die Genotypisierung	HFE 65C Mutation
A4	Rot 640 (498-640)	Standard 3	Unbekannt	
A5	Fluos (465-510)	Röhrchen 5	Standard für die Genotypisierung	HFE 65 S/C Heterozygot
A5	Rot 640 (498-640)	Röhrchen 5	Standard für die Genotypisierung	HFE 282 C/Y Heterozygot
A6	Fluos (465-510)	Röhrchen 6	Standard für die Genotypisierung	HFE 63 H/D Heterozygot
A6	Rot 640 (498-640)	Röhrchen 6	Unbekannt	
A7	Fluos (465-510)	Röhrchen 7	Standard für die Genotypisierung	HFE 65C / 63D Heterozygot
A7	Rot 640 (498-640)	Röhrchen 7	Unbekannt	

Bei einem cobas z 480 Analyzer Kanal 498-645 anstelle von 498-640 verwenden.

6.5.3 LightCycler® Nano

Proben:

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

Proben:

Farbe	Name	Anmerkung
	NTC	
	Standard 1	
	Standard 2	
	Standard 3	
	Röhrchen 5	
	Röhrchen 6	
	Röhrchen 7	

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		Standard 1	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A3	3		Standard 2	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A4	4		Standard 3	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A5	5		Röhrchen 5	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A6	6		Röhrchen 6	Kanal 640	U	Kanal 530	U
A7	7		Röhrchen 7	Kanal 640	U	Kanal 530	U

7. Datenanalyse und Interpretation

7.1 Grenzen und Interferenzen

Der Test ist spezifisch und ermöglicht den Nachweis von HFE-Genvarianten am/in der Nähe des Codons 63, 65 und 282. Es sind keine Interferenzen bekannt.

7.2 Kalibrierung

Wie in den Absätzen 6.2.4, 6.3.3, 6.5, 7.3.2 und 7.3.3. beschriebenen kalibrieren.

7.3 Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien

Um eine zuverlässige Analyse des Genotyps durchführen zu können, müssen die Negativkontrolle **NTC** und alle drei **Standards** 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 SW 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 7.6 Interpretation der Ergebnisse).

7.3.2 Standards (Positivkontrollen)

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer Folgendes zeigen:

HFE **Standard 1** (Pflicht - Position 2).

ein Schmelzpeak im Kanal 530

ein Schmelzpeak im Kanal 640
HFE **Standard 2** (Pflicht - Position 3).

ein Schmelzpeak im Kanal 530

ein Schmelzpeak im Kanal 640

HFE **Standard 3** (Pflicht - Position 4).

ein Schmelzpeak im Kanal 530

ein Schmelzpeak im Kanal 640

Die bereitgestellten **Standards** ahmen **homozygote** klinische Proben nach (siehe 7.5).

Bezüglich der erwarteten Schmelztemperaturen siehe **7.6 Interpretation der Ergebnisse**.

7.3.3 DNA der Standards für die Genotypisierung

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer Folgendes zeigen:

Röhrchen 5 Standard für die Genotypisierung (Optional - Position 5).

zwei Schmelzpeaks im Kanal 530

zwei Schmelzpeaks im Kanal 640

Röhrchen 6 Standard für die Genotypisierung (Optional - Position 6).

zwei Schmelzpeaks im Kanal 530

zwei Schmelzpeaks im Kanal 640

Röhrchen 7 Standard für die Genotypisierung (Optional - Position 7).

zwei Schmelzpeaks im Kanal 530

ein Schmelzpeak im Kanal 640

Die **Standards für die Genotypisierung** ahmen **heterozygote** klinische Proben nach.

Bezüglich der erwarteten Schmelztemperaturen siehe **7.6 Interpretation der Ergebnisse**.



Bevor ein Lauf wiederholt wird, an häufige/allgemeine Fehler denken. Vor allem das Amplifikationsprofil überprüfen und kontrollieren, ob das Master-Mix richtig ist und die verwendete MgCl₂-Konzentration stimmt. Außerdem ist zu bedenken, dass auch eine unsachgemäße Lagerung der Reagenzien zu einem Versagen des Produktes führen kann.

7.3.4 Proben

Das Ergebnis dieses Assays muss immer einen oder zwei Schmelzpeaks für jeden Kanal zeigen. Bezüglich der **erwarteten Schmelztemperaturen** siehe 7.6 Interpretation der Ergebnisse.

 Es werden nicht mehr als zwei Peaks pro Probe im Kanal 530 erwartet.

Die Schmelzpeakprofile müssen mit den in diesem Kapitel und in Kapitel **7.6 Interpretation der Ergebnisse** beschriebenen Akzeptanzkriterien übereinstimmen. Siehe auch **7.7.2 Problematische Profile** und **7.7.3 Seltene Varianten**.

7.3.5 Anormale Schmelzkurven

Wenn wiederholt eine anormale Schmelzkurve auftritt, könnte dies auf einen Defekt im Produkt zurückzuführen sein oder durch andere Variationen (Mutationen)

in der Sondenbindungsregion verursacht werden (siehe **7.7.3 Seltene Varianten**). Im letzteren Fall muss dann eine andere Methode zum Vergleichen/ zur Überprüfung der Sequenz verwendet werden.

Senden Sie das PCR-Fragment zur DNA-Sequenzierung ein, um die Sequenz zu bestätigen oder evtl. unbekannte Mutationen zu identifizieren. 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.

7.4 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 7 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 Geräte vom Typ 480 von Roche

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

7.5 Lesen der Ergebnisse

Die Datenanalyse wie in der Betriebsanleitung des Geräts beschrieben durchführen.

7.5.1 Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik

Die Schmelzkurvenpeaks (Abb. 1 und 2) zeigen homozygote Genotypen.

 Die Farbkompensation aktivieren, um falsche Ergebnisse zu vermeiden.

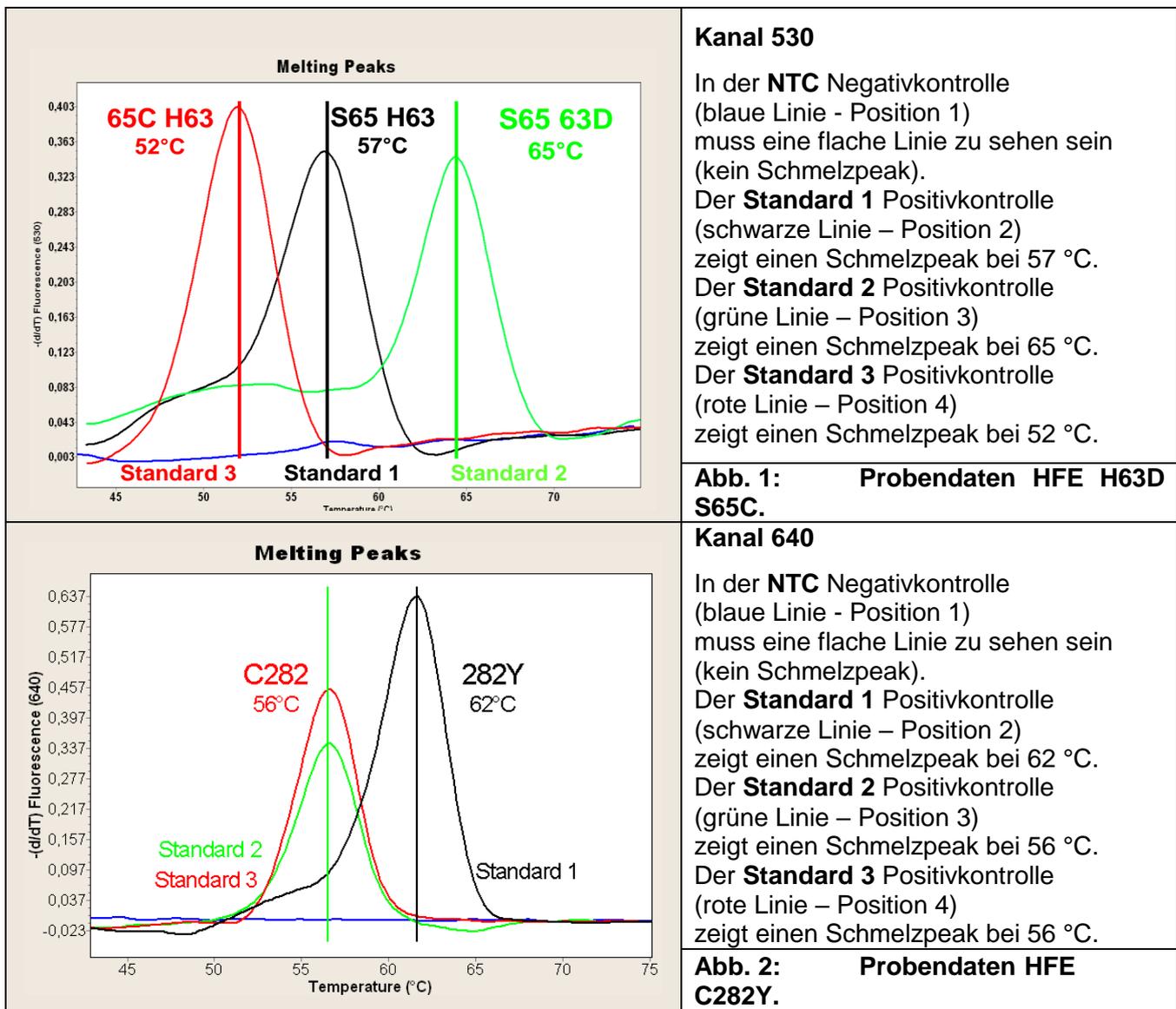
Die Schmelzdaten für HFE H63D S65C C282Y werden wie folgt angezeigt:

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

Die Schmelzdaten für HFE H63D S65C im Kanal 530 (Abb. 1) und für C282Y im Kanal 640 (Abb. 2) ansehen. Analysetyp „Melting Curve Analysis – Genotyping“ (Schmelzkurvenanalyse – Genotyping)-Modus.

LC1.x, Softwareversion 3.5.3

Die Schmelzdaten für HFE H63D S65C in F1 (Abb. 3) und für C282Y in F2 (Abb. 4) ansehen. „Melting Curve“ (Schmelzkurve)-Modus.



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 **7.7.3 Seltene Varianten**

Bei schwachen Signalen im Kanal 530 kann die Anzahl der Zyklen auf bis zu 50 Zyklen erhöht werden.

Falls das automatische Genotyp-Modul versagt (Score $<0,6$ oder $res <0,4$), zur manuellen Identifizierung der Schmelzkurve (T_m calling) wechseln und mit Tabelle 6 (**7.6. Interpretation**) vergleichen.

7.5.2 Schmelzanalyse: Geräte vom Typ 480 von Roche

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

! Die Farbkompensation aktivieren, um falsche Ergebnisse zu vermeiden.

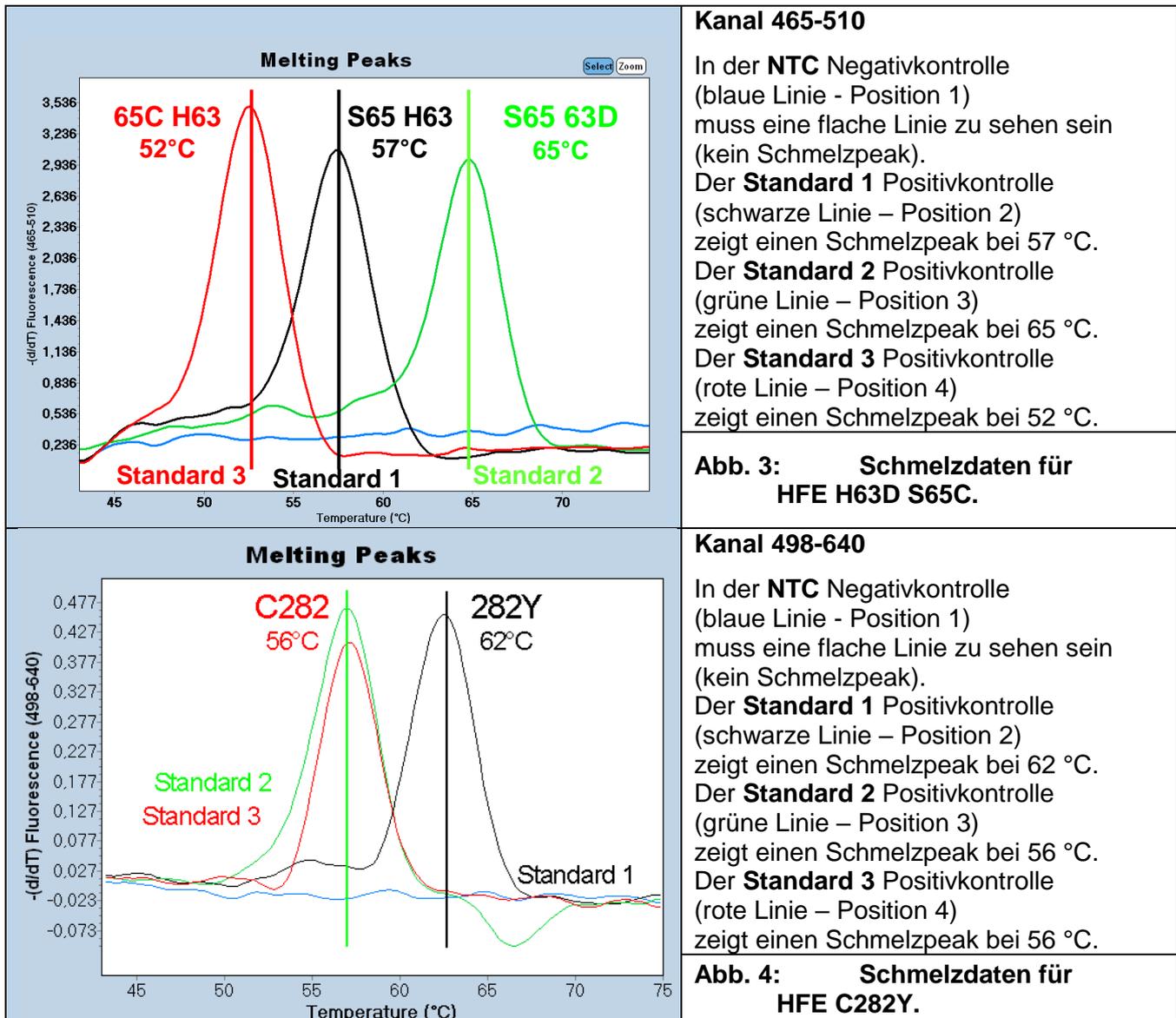
Die Schmelzdaten werden wie folgt angezeigt:

Geräte vom Typ 480 von Roche:

Wenn ein LightCycler® 480 verwendet wird, die Schmelzdaten für HFE H63D S65C im Kanal 483-533 und für HFE C282Y im Kanal 483-640 ansehen, „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.

Wenn ein LightCycler® 480 II verwendet wird, die Schmelzdaten für HFE H63D S65C im Kanal 465-510 (Abbildung 3) und für HFE C282Y im Kanal 498-640 (Abbildung 4) ansehen, „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.

Wenn ein cobas z 480 Analyzer verwendet wird, die Schmelzdaten für HFE H63D S65C im Kanal 465-510 und für HFE C282Y im Kanal 498-645 ansehen. Analysetyp „Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.



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 **7.7.3 Seltene Varianten**.

Bei schwachen Signalen im Kanal 530 kann die Anzahl der Zyklen auf bis zu 50 Zyklen erhöht werden.



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 6 (**7.6. Interpretation der Ergebnisse**) vergleichen.

7.5.3 Schmelzanalyse: LightCycler® Nano

Die Schmelzkurvenpeaks (Abb. 5 und 6) zeigen homozygote 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“)

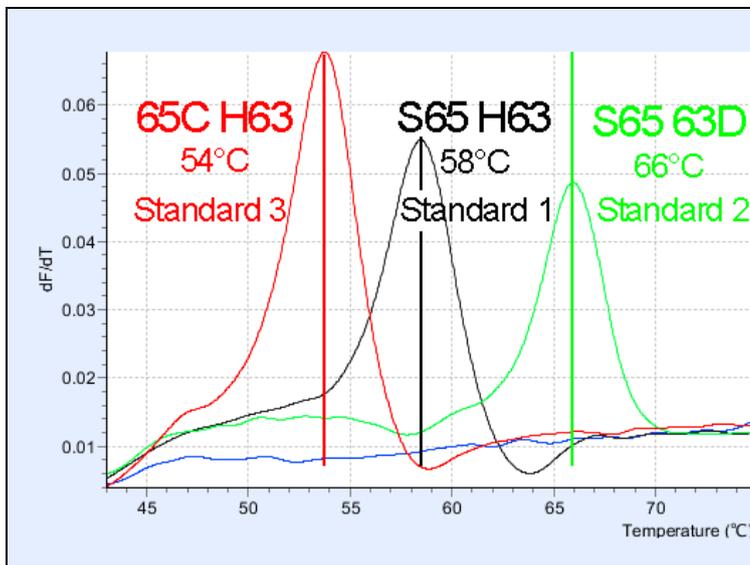
Folgendes auswählen: Noise Reduction Range (Bereich Rauschreduktion) (°C) = 1

Folgendes auswählen: Target: Kanal 530 für HFE H63D S65C

Folgendes auswählen: Target: Kanal 640 für HFE C282Y

Schmelzpeaks

Die Schmelzkurve jedes Patienten manuell mit der Schmelzkurve der Standards in beiden Kanälen vergleichen und die Tabelle 6 im Kapitel **7.6 Interpretation der Ergebnisse** zum Vergleichen verwenden.



Kanal 530

In der **NTC** Negativkontrolle (blaue Linie - Position 1) muss eine flache Linie zu sehen sein (kein Schmelzpeak).

Der **Standard 1** Positivkontrolle (schwarze Linie – Position 2)

zeigt einen Schmelzpeak bei 58 °C.

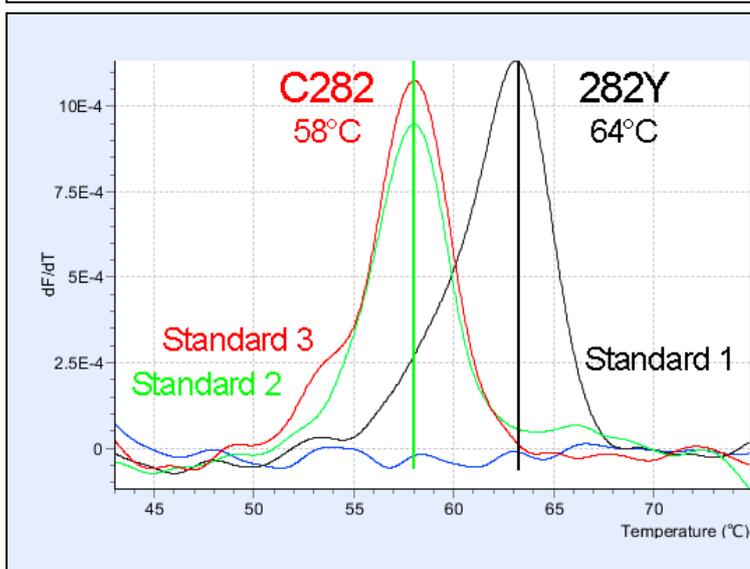
Der **Standard 2** Positivkontrolle (grüne Linie – Position 3)

zeigt einen Schmelzpeak bei 66 °C.

Der **Standard 3** Positivkontrolle (rote Linie – Position 4)

zeigt einen Schmelzpeak bei 54 °C.

Abb. 5: Schmelzdaten für HFE H63D S65C.



Kanal 640

In der **NTC** Negativkontrolle (blaue Linie - Position 1) muss eine flache Linie zu sehen sein (kein Schmelzpeak).

Der **Standard 1** Positivkontrolle (schwarze Linie – Position 2)

zeigt einen Schmelzpeak bei 64 °C.

Der **Standard 2** Positivkontrolle (grüne Linie – Position 3)

zeigt einen Schmelzpeak bei 58 °C.

Der **Standard 3** Positivkontrolle (rote Linie – Position 4)

zeigt einen Schmelzpeak bei 58 °C.

Abb. 6: Schmelzdaten für HFE C282Y.

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (Tm) 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 **7.7.3 Seltene Varianten**.

Bei schwachen Signalen im Kanal 530 kann die Anzahl der Zyklen auf bis zu 50 Zyklen erhöht werden.

7.6. Interpretation der Ergebnisse - Risikoallele

- 1) Zuerst die Ergebnisse im Kanal 640 lesen und alle Personen mit einem **hohen Risiko** aufgrund einer homozygoten **282 Y/Y**-Mutation identifizieren (ein hoher Schmelzpeak) [1].

Anmerkung: Homozygote 282 Y/Y-Proben müssen vom 63 His-Wildtyp sein, siehe Kanal 530).

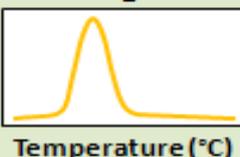
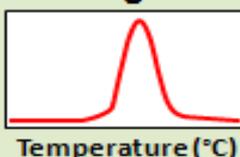
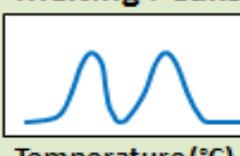
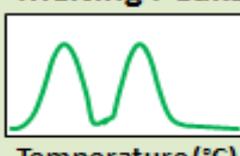
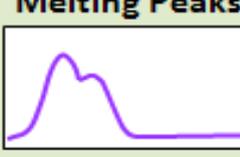
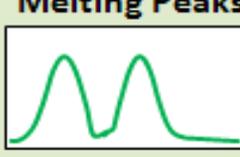
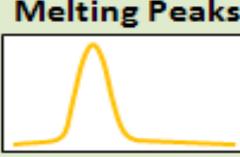
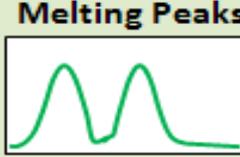
- 2) Dann im Kanal 640 alle **282 H/Y**-heterozygoten Personen auswählen und diese im Kanal 530 analysieren, um **63H/D**-Personen mit einem **geringen Risiko** zu identifizieren [2].

Die verbleibenden 282 H/Y heterozygoten, die entweder **63 H/H** und **65 S/S** oder **65S/C** sind, als „kein Risiko“ (normales Risiko in der Bevölkerung) protokollieren [3,4].

Anmerkung: 282 H/Y heterozygote Proben können weder 63 D/D noch 65 C/C oder 63 D/65 C sein.

- 3) Kanal 530 auslesen, um alle Personen mit dem einzelnen hohen Schmelzpeak auszuwählen, die homozygot **63 D/D (milde Form)** sind [5]

Anmerkung: Homozygote 63 D/D-Proben sind in der Regel ein Wildtyp im Kanal 640. Siehe Ref. 11.

Kanal 530			Kanal 640		Üblicher Name	Erkrankung
63H 65C	63H 65S	63D 65S	C282	282Y	HFE-Genotyp	Risiko
Melting Peaks 530  Temperature (°C)			Melting Peaks 640  Temperature (°C)		282Y homozygot H63 S65 H63 S65 282Y 282Y	[1] Hohes Risiko
-	57	-	-	62		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)			Melting Peaks 640  Temperature (°C)		H63D heterozygot C282Y heterozygot Compound-heterozygot 63D S65 63D S65 C282 282Y	[2] Geringes Risiko
-	57	65	56	62		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)			Melting Peaks 640  Temperature (°C)		S65C heterozygot C282Y heterozygot Compound-heterozygot H63 S65 H63 65C C282 282Y	[3] Vermutlich erhöhtes Risiko (umstritten)
52	57	-	56	62		
Melting Peaks 530  Temperature (°C)			Melting Peaks 640  Temperature (°C)		C282Y heterozygot H63 S65 H63 S65 C282 282Y	[4] Normales Risiko in der Bevölkerung
-	57	-	56	62		

Melting Peaks 530 Temperature (°C)			Melting Peaks 640 Temperature (°C)			63D homozygot 63D S65 63D S65 C282 C282		[5] Milde Form	
-	-	65	56	-					
ΔTm 5 °C		ΔTm 8 °C		ΔTm 6 °C		Tab. 6.1: HFE 282 und Varianten mit Krankheitsrisiko			
ΔTm 13 °C				Siehe auch 7.3.4 und 7.3.5.					

7.6. Interpretation der Ergebnisse (Fortsetzung)

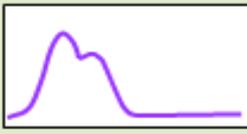
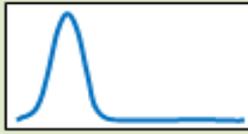
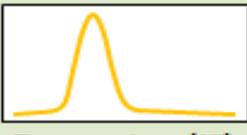
- 4) Den Status aller verbleibenden **282 C/C (Wildtyp)** -Patienten aufgrund ihres Schmelzprofils im Kanal 530 als „**kein Risiko**“ (normales Risiko in der Bevölkerung) protokollieren [6-10].

Anmerkung: 65 S/C heterozygote Proben können auch nur eine Schulter anstelle eines separaten Peaks bei der Temperatur für 63 H aufweisen. Die Form der Kurven ist für alle Varianten ist signifikant, weshalb sie visuell überprüft werden sollten, da sie von der Gerätesoftware als falsch bezeichnet werden können, und zwar unabhängig davon, ob das Modul „Genotyping“ (Genotypisierung) oder das Programm „Tm Calling“ verwendet wird.

Anmerkung: Die Werte für die Schmelztemperaturen (Tm) können innerhalb der verschiedenen Läufe um $\pm 2,5$ °C schwanken. Das ΔT zwischen zwei Schmelzpeaks kann bei heterozygoten Genotypen um ± 1.5 °C schwanken.

Falls die Peaks im Kanal 530 schwach sind, bis zu 50 Zyklen in Betracht ziehen.

Kanal 530			Kanal 640		Üblicher Name	Erkrankung	
63H 65C	63H 65S	63D 65S	C282	282Y	HFE-Genotyp	Risiko	
Melting Peaks 530 Temperature (°C)			Melting Peaks 640 Temperature (°C)		65C / 63D heterozygot Compound-heterozygot H63 65C 63D S65 C282 C282		[6] Normales Risiko in der Bevölkerung
52	-	65	56	-			
Melting Peaks 530 Temperature (°C)			Melting Peaks 640 Temperature (°C)		H63D heterozygot 63D S65 63D S65 C282 C282		[7] Normales Risiko in der Bevölkerung
-	57	65	56	-			
Melting Peaks 530 Temperature (°C)			Melting Peaks 640 Temperature (°C)		65C homozygot H63 65C H63 65C C282 C282		[8] Normales Risiko in der Bevölkerung
52	-	-	56	-			

<p>Melting Peaks</p> <p>530</p>  <p>Temperature (°C)</p> <p>52 57 -</p>	<p>Melting Peaks</p> <p>640</p>  <p>Temperature (°C)</p> <p>56 -</p>	<p>S65C heterozygot</p> <p>H63 S65 H63 65C C282 C282</p>	<p>[9] Normales Risiko in der Bevölke- rung</p>
<p>Melting Peaks</p> <p>530</p>  <p>Temperature (°C)</p> <p>- 57 -</p>	<p>Melting Peaks</p> <p>640</p>  <p>Temperature (°C)</p> <p>56 -</p>		
<p>ΔT_m 5 °C ΔT_m 8 °C</p> <p>ΔT_m 13 °C</p>	<p>ΔT_m 6 °C</p>	<p>Tab. 6.2: C282 mit häufigen 63/65 Varianten</p> <p>Siehe auch 7.3.4 und 7.3.5.</p>	

7.7 Zusätzliche Informationen

7.7.1 Typische Amplifikationsdaten

Die **Amplifikationskurven** enthalten keine für die Analyse relevanten Informationen (siehe Abschnitt 7.3 **Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien**), unten ist jedoch ein Beispiel abgebildet, auf dem Kurven zu sehen sind, die typischerweise mit einem LightCycler® 2.0 erhalten werden (Abb. 7 und 8).

Die Amplifikationsdaten werden wie folgt angezeigt:

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

Die HFE H63D S65C-Amplifikation im Kanal 530 und die HFE C282Y-Amplifikation im Kanal 640 ansehen, Analysemodus: „Absolute Quantification“ (Absolute Quantifizierung).

Geräte vom Typ 480 von Roche:

Wenn ein LightCycler® 480 verwendet wird, die HFE H63D S65C-Amplifikation im Kanal 483-533 und die HFE C282Y-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 HFE H63D S65C-Amplifikation im Kanal 465-510 und die HFE C282Y-Amplifikation im Kanal 498-640 ansehen, Modus: „Abs Quant/2nd Derivative Max“ (Abs Quant/Max. 2. Ableitung).

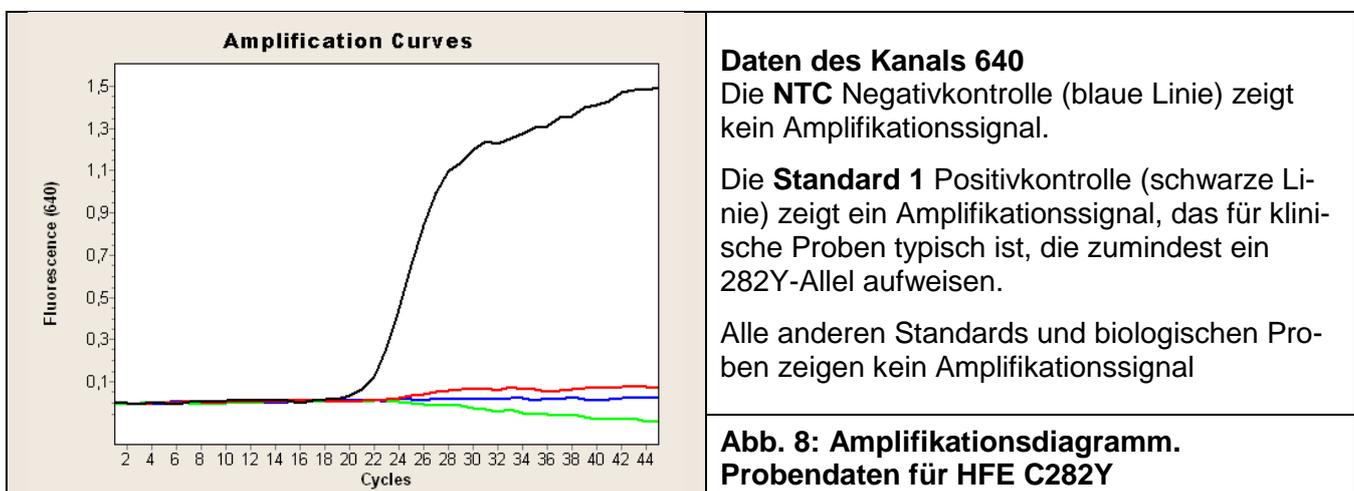
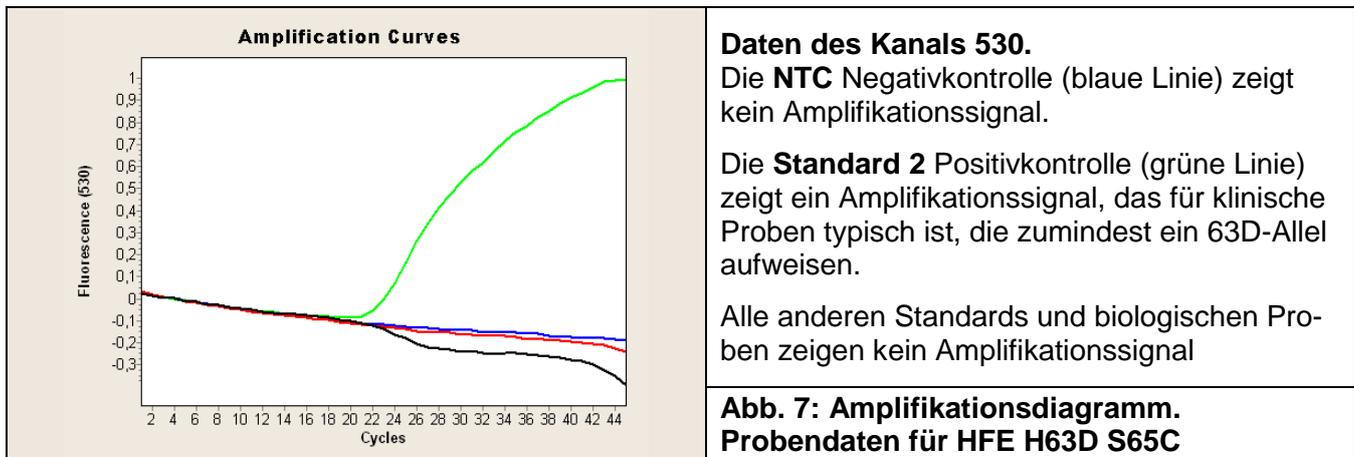
Wenn ein cobas z 480 Analyzer verwendet wird, die HFE H63D S65C-Amplifikation im Kanal 465-510 und die HFE C282Y-Amplifikation im Kanal 498-645 ansehen.

LC Nano:

Die HFE H63D S65C-Amplifikation im Modus „Automatic Quantification“ (Automatische Quantifizierung) im Kanal 530 und die HFE C282Y-Amplifikation im Kanal 640 ansehen.

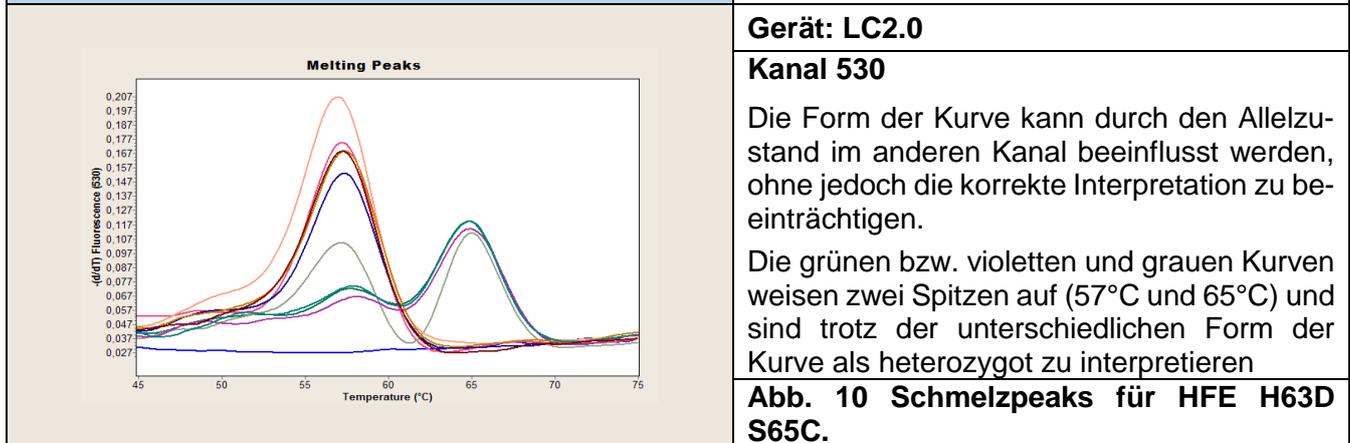
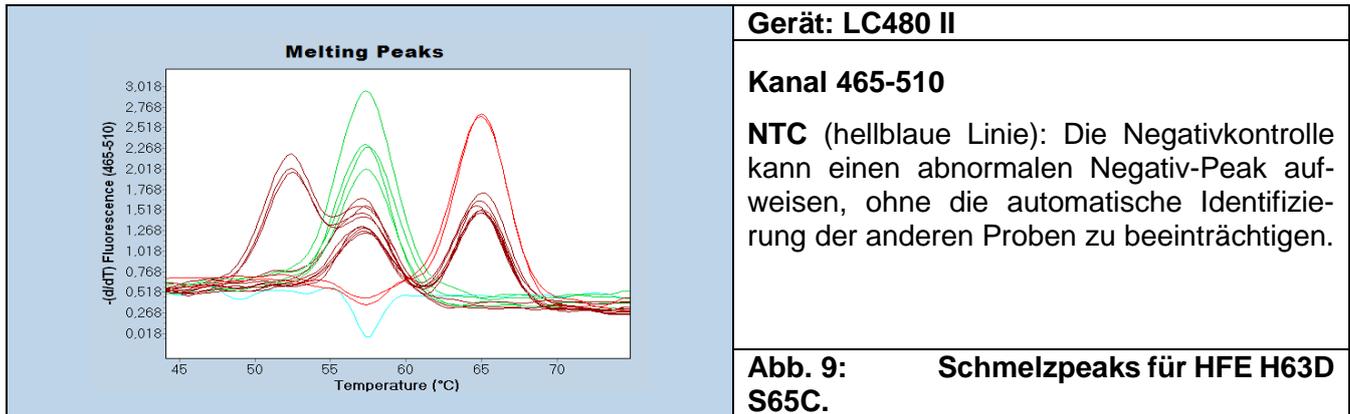
LC1.x, Softwareversionen 3.5:

Die HFE H63D S65C-Amplifikation im Fluoreszenzkanal F1 und die HFE C282Y-Amplifikation im Kanal F2 ansehen, Modus: „Abs Quant/2nd Derivative Max“ (Abs Quant/Max. 2. Ableitung).



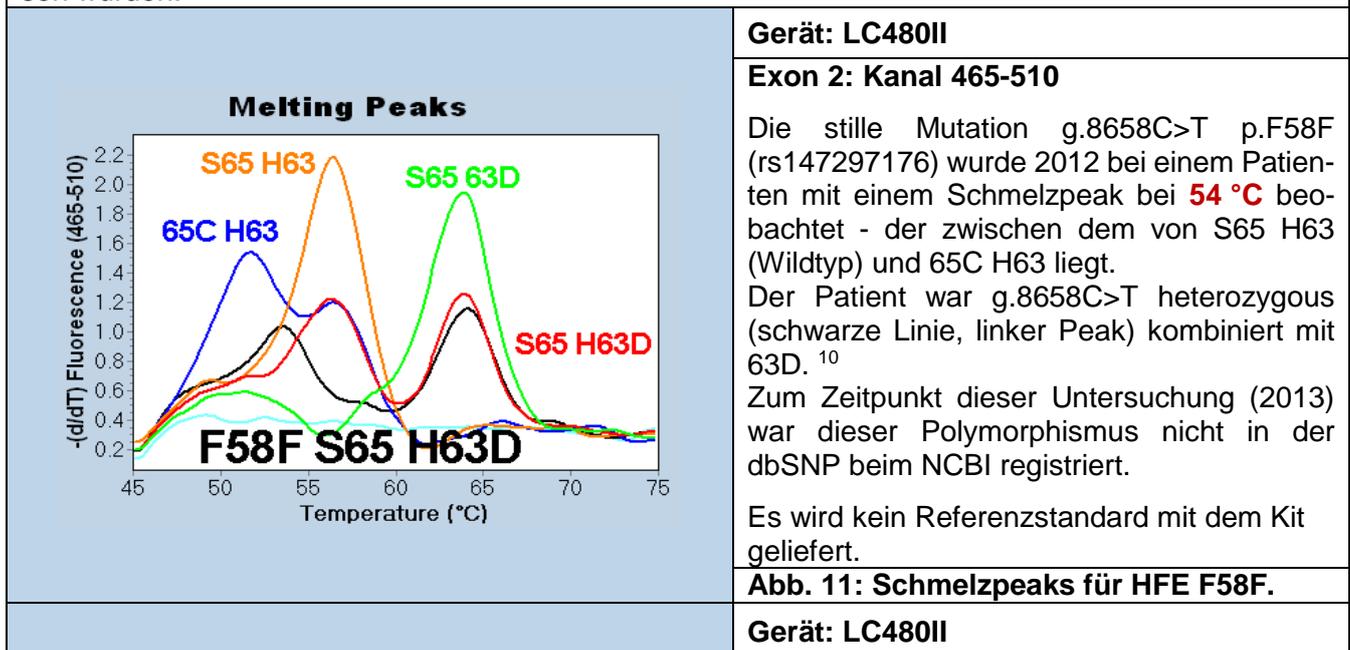
7.7.2 Interpretation von problematischen Profilen

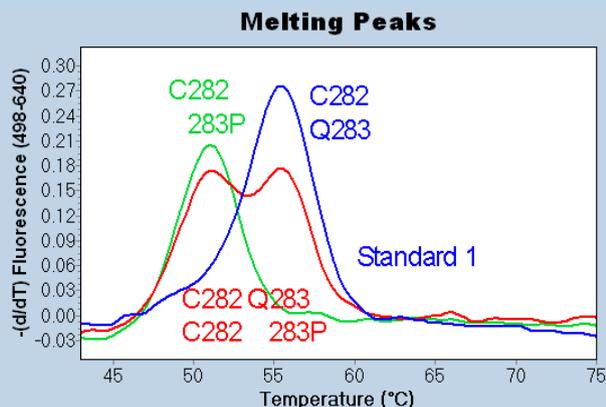
Auf den folgenden Abbildungen sind Schmelzpeakprofile von klinischen Proben dargestellt.



7.7.3 Seltene Varianten

Andere Varianten, die von der Nachweissonde erfasst werden, ergeben einen Schmelzpeak, der sich von der vollständigen Übereinstimmung unterscheidet und in der Regel eine verschobene Temperatur im Vergleich zu den häufigen Mutationen aufweist. Auf den folgenden Abbildungen unten sind einige Beispiele für seltene Varianten dargestellt, die von Benutzern dieses Geräts nachgewiesen wurden.





Exon 4: Kanal 498-640

Die Variante p.**T281M** (rs915273578) erzeugt einen Tm bei **47 °C** (nicht abgebildet), veröffentlicht von Biasiotto et al, 2008¹²

Die Variante p.**Q283P** (rs111033563) erzeugt einen Tm bei **51 °C** (grün), veröffentlicht von Ka et al. 2005⁹

282C 283Q / 282C 283Q (Wildtyp, blau) 56 °C

282C 283Q / 282C 283P (rot) 56 °C / 51 °C.

282C 283P / 282C 283P (grün) 51 °C

Es werden keine Referenzstandards mit dem Kit geliefert.

Abb. 12: Schmelzpeaks für HFE Q283P.

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 PCR's sind negativ	Es wurde ein falscher Nachweiskanal gewählt	Vor der Analyse den richtigen Kanal einstellen
	Falsches Amplifikationsprotoll	Das Programm des Geräts kontrollieren
Schwache 530-Signale	Es ist bekannt, dass das HFE 63/65-Fragment eine geringere PCR-Effizienz aufweist	Mehr PCR-Zyklen durchführen. Es wurden bis zu 50 Zyklen evaluiert/sie ergeben die gleichen Ergebnisse
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 Negativkontrolle NTC	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
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) Feder et al., 1996

A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis
Nature Genet. 13: 399-408

2) Willis, G., Wimperis, J.Z., Lonsdale, R., Fellows, I.W., Watson, M. A., Skipper, L.M., Jennings, B.A. 2000

Incidence of liver disease in people with HFE mutations

Gut Mar; 46(3):401-404

3) Edwards, C.Q., Cartwright, G. E., Skolnick, M. H., Amos, D.B. 1980

Homozygosity for hemochromatosis: clinical manifestations

Ann Intern Med Oct; 93 (4):519-525

4) Pietrangelo, A.

Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease

N Engl J Med. 2004 Jun 3;350(23):2383-97

5) McDermott, J. H., Walsh, C.H. 2005

Hypogonadism in hereditary hemochromatosis

J Clin Endocrinol Metab Apr; 90(4):2451-2455

6) Franchini, M.

Hereditary iron overload: pathophysiology, diagnosis, and treatment

Am J Hematol. 2006 Mar;81(3):202-9

7) Mangasser-Stephan, K., Tag. C., Reiser, A. and Gressner, A.M. 1999

Rapid Genotyping of HFE Gene Mutations with Hybridization Probes

Clinical Chemistry 45:10, 1875-1878

8) Bollhalder, M., Mura, C., Landt, O., Maly, F.E. 1999

LightCycler PCR Assay for Simultaneous Detection of the H63D and S65C Mutations in HFE Based on Opposite Melting Temperature Shifts

Clinical Chemistry 45, No. 12

9) Ka, C., Le Gac, G., Dupradeau, F.Y., Rochette, J., Ferec, C. 2005

The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for mutated 282Y HFE protein

Hum Genet 117: 467-475

10) Variant observed September 2012 in Dublin, not published

11) Best LG, Harris PE, and Spriggs EL.

Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in 'cis' phase.

Clin Genet. 2001 Jul;60(1):68-72.

12) Biasiotto G. et al.,

HFE mutations in a population of Italian Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14(5):426-30

Klassifizierung / Referenzen

Referenz	Klassifizierung
EDMA	16 01 01 05 00
CPV	33694000-1
EAN	4260159331073
Roche SAP-Nr.	05945798001

Hinweis für den Käufer - Patente und Warenzeichen

Das LightMix® Kit HFE wird unter Lizenz von Roche Diagnostics verkauft. 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

Bestandteile und Sicherheitsdatenblatt

Das Produkt enthält:

99,8 % Synthetische Oligonukleotides (< 0,01 pg)
 0,1 % CAS 77-86-1 Tris (hydroxymethyl) aminomethan
 0,1 % CAS 60-00-4 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Das Produkt ist nicht gefährlich, nicht giftig und unterliegt nicht den IATA-Einschränkungen.

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.

Zolltarif-Nr. (HS-Code) 3822 0000

Gewicht: 58 Gramm

Überarbeitungsverlauf

Rot gekennzeichnete Änderungen sind mit einer Änderung der Labortechniken verbunden

Blau gekennzeichnete Änderungen sind Verbesserungen oder Änderungen in der Zusammensetzung

Version	Änderung	Datum
V110620	Erste Ausgabe	20.06.2011
V110815	Produktinformation, Farbcode der Röhren, Kapitel, Abschnitt 6 (Protokoll)	04.07.2011
V110822	Korrektur der Standard-Reihenfolge in den Abschnitten 6.3.3 und 6.5.1.	22.08.2011
V110906	Korrektur in Abschnitt 3.2 für Genotypen/Schmelztemperaturen	06.09.2011
V120116	Ehemalige „Positive Kontrolle“ in „Standard“ umbenannt Kapitel 1.3 Produktionsleistung 7.6 Problematische Profile, 7.7 Interpretation der Ergebnisse, neue Tabelle 6. LightCycler® Nano aufgenommen, Probanden Q283P (Abb. 12).	23.01.2012
V120209	Inkubationszeiten LightCycler® 480 korrigiert.	09.02.2012
V120504	Ein Primer, 282, ausgetauscht (640, Verbesserung), ab Chargennummer 1775xx Kapitel 6: Schmelzen beginnt ab 43 °C statt 45 °C	04.05.2012
V130503	Reverse-Primer 63/65 ausgetauscht (530, Verbesserung) Chargennummer 2480xx Genaue Vorgaben für die Lagerung der PSR (Abs. 6.4) Anleitung, wenn Modul für automatisierte Genotypisierung versagt (3.2) (7.3.1). Kapitel 7.6 und 7.7 vertauscht und verbessert Abschnitt Fehlersuche und -behebung Schwache 530-Signale / mehr PCR-Zyklen durchführen	27.06.2013
V130704	MagNa Pure 96 und MagNa Pure Compact wurden aufgenommen. Anleitung, wenn Modul für automatisierte Genotypisierung versagt (7.5.2).	04.07.2013
V131211	Referenz (11) hinzugefügt - seltene Fälle von 63D und 282Y auf dem gleichen Allel. Abschnitt 3.2 Signalstärken von Standards und Verwendung für automatisierte Typisierung.	11.12.2013
V140626	Charge 2929xxxx: Anpassung der Fluoreszenzsignale zur Verringerung der im Kanal 530 aufgezeichneten negativen Peaks. Keine Änderungen in den Tm-Werten.	26.06.2014
V150202	MagNa Pure 96 IVD aufgenommen, Korrekturen HGVS-Gennomenklatur	06.02.2015
V160101	Redaktionelle Änderungen. Abschnitt 1.3: 7.7.3 Tm für Variante T281M erwähnt	04.01.2016
V160626	Lagerung (1.1, 1.4) Redaktionelle Änderungen.	26.06.2016
V170303	Redaktionelle Änderung. rs915273578 (=T281M) aufgelistet (1.3); Irreführende Formulierung korrigiert (7.3.1); Aktualisierung Referenz Abbildungsbeschriftung (7.5.1 und 7.5.2). Lagerungsbedingungen klargestellt (1.1, 1.4, 6.4)	11.10.2017

Hergestellt von:

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

4260159331073

