



MOLBIOL

LightMix® in-vitro Diagnostik-Kit **VKORC1**

Kat.-Nr.: 40-0302-64

Nachweis der DNA-Variante C1173T
im Gen VKORC1

zur Anwendung mit einem

LightCycler® von Roche Diagnostics

SimpleProbe®-Format

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. Produktinformation	3
1.1 Inhalt: LightMix® Kit VKORC1 C1173T	3
1.2 Verwendungszweck	4
1.3 Technische Vorgaben	4
1.3.1 Klinische Proben	4
1.3.2 Geräte, Software und Produktionsleistung	5
1.4 Lagerung und Stabilität	5
2. Zusätzliche Ausrüstung und Reagenzien	6
2.1 Erforderliche Ausrüstung	6
2.2 Optionale Ausrüstung	6
2.3 Vorbereitung der Probe	6
3. Hintergrundinformationen	8
3.1 Medizinischer Hintergrund	8
3.2 Methode und Funktionsprinzip des Assays	9
3.3 Leistungsmerkmale	9
4. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	10
5. Programmierung	12
5.1 Farbkompensation	12
5.2 LightCycler® mit Kapillartechnik	12
5.3 Geräte vom Typ 480 von Roche	13
5.4 LightCycler® 96	14
5.5 LightCycler® Nano	15
6. Versuchsprotokoll	16
6.1 Vorbereitung der Probe	16
6.2 Ansetzen der Reagenzien	16
6.2.1 Ansetzen des LightCycler® FastStart DNA Masters	16
6.2.2 Ansetzen der parameterpezifischen Reagenzien (PSR)	16
6.2.3 Ansetzen der Positivkontrolle	16
6.2.4 Ansetzen der Standards für die Genotypisierung	17
6.3 Ansetzen des Reaktionsgemischs	18
6.3.1 Ansetzen von 64 LightCycler®-Reaktionsgemischen	18
6.3.2 Ansetzen eines einzelnen LightCycler®-Reaktionsgemischs	18
6.4 Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten	20
6.5 Laden der Kontrollen und der Standards für die Genotypisierung	21
6.5.1 Geräte mit Kapillartechnik	21
6.5.3 LightCycler® 96	22
6.5.4 LightCycler® Nano	22
7. Datenanalyse und Interpretation	23
7.1 Grenzen und Interferenzen	23
7.2 Kalibrierung	23
7.3 Qualitätskontrolle - Akzeptanzkriterien	23
7.3.1 Negativkontrolle	23
7.3.2 DNA der Positivkontrolle	23
7.3.3 DNA der Standards für die Genotypisierung	24
7.3.4 Proben	24
7.3.5 Anormale Schmelzkurven	24
7.4 Speichern der externen Standards für die Genotypisierung	24
7.4.1 Geräte mit Kapillartechnik	25
7.4.2 Geräte vom Typ 480 von Roche	25
7.5 Lesen der Ergebnisse	25
7.5.1 Typische Amplifikationsdaten	25
7.5.2 Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik	26
7.5.3 Schmelzanalyse: Geräte vom Typ 480 von Roche	27
7.5.4 Schmelzanalyse: LightCycler® 96	28
7.5.5 Schmelzanalyse: LightCycler® Nano	29
7.6. Interpretation der Ergebnisse	31
7.7. Seltene Varianten	32
8. Fehlersuche und -behebung	34
9. Literaturnachweis	36
Klassifizierung / Referenz	37
Sicherheitsdatenblatt	38
Überarbeitungsverlauf	38

1. Produktinformation

1.1 Inhalt: LightMix® Kit VKORC1 C1173T

Lyophilisierte vorgemischte PCR-Reagenzien

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

	Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion / Röhrenstatus	Insgesamt
1 x	Rot	PSR	Parameterspezifische Reagenzien (PSR) mit vorgemischten und lyophilisierten Primern und Sonden für 64 Reaktionen. <0,01 pg unmarkierte Oligonukleotide (VKORC1 C1173T Primer); <0,01pg SimpleProbe 519 markierte VKORC1 C1173T-Sonde	64 Reaktionen / Lyophilisiert gelbes Pellet	64 Reak.

Standards (Kontroll-DNA)

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

	Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion Röhrenstatus	Insgesamt
1 x	Gelb	HT	C1173T-Positivkontrolle Heterozygot VKORC1 <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 Reaktionen / lyophilisiert blaues Pellet	40 Reak.
1 x	Gelb	WT	Standard für die Genotypisierung des Wildtyps C1173 <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 Reaktionen / lyophilisiert blaues Pellet	40 Reak.
1 x	Gelb	MT	Standard für die Genotypisierung der Mutation 1173T <0,01 pg Plasmid-Target (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 Reaktionen / lyophilisiert blaues Pellet	40 Reak.

Polymerase-Mix: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

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

	Deckel-farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktion Röhrenla-gerung	Insgesamt
1 x	Rot	1a	LightCycler® FastStart Enzym	64 Reaktionen / gefroren	64 Reak.
1 x	Weiß	1b	LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe	64 Reaktionen / gefroren	64 Reak.
1 x	Farblos	Wasser	H ₂ O mit PCR-Qualität	gefroren	
1 x	Blau	MgCl ₂	MgCl ₂ , 25 mM	gefroren	

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 VKORC1 Kits, die von Roche Diagnostics oder dessen Vertriebspartner vor Ort geliefert werden, nicht enthalten.

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

1.2 Verwendungszweck

Mit diesem Kit kann der Einzelbasen-Deletionspolymorphismus 1173 C>T im Gen der Untereinheit 1 des Vitamin-K-Epoxid-Reduktase-Komplexes (VKORC1) in genomischer menschlicher DNA nachgewiesen werden, wobei die DNA aus einem Nukleinsäureextrakt stammt, der aus peripherem Blut gewonnen wurde, die zu 100 % mit der Promotorvariante VKORC1 -1639 G>A (rs9923231) verknüpft ist.

Die Warfarin-Dosierung kann auf Basis von Cytochrom 2C9-Genvarianten und in zweiter Linie auf der Grundlage von VKORC1-Genvarianten angepasst werden. Die folgende Tabelle wurde aus [1] angepasst übernommen:

VKORC1 1173	CYP 2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
CC	5 - 7 mg	5 - 7 mg	3 - 4 mg	3 - 4 mg	3 - 4 mg	0,5 - 2 mg
CT	5 - 7 mg	3 - 4 mg	3 - 4 mg	3 - 4 mg	0,5 - 2 mg	0,5 - 2 mg
TT	3 - 4 mg	3 - 4 mg	0,5 - 2 mg	0,5 - 2 mg	0,5 - 2 mg	0,5 - 2 mg

Tägliche Dosis Warfarin

Dieses Kit sollte in Verbindung mit einem CYP 2C9-Gentest verwendet werden und ist nicht als alleinige Grundlage für eine Behandlungsentscheidung gedacht. Die Dosisbereiche stammen aus verschiedenen Studien. Es müssen noch weitere Faktoren wie Alter, Rasse, Körpergewicht, Geschlecht, begleitende Arzneimittel und Begleiterkrankungen berücksichtigt werden. Es ist auch an seltener Mutationen zu denken, die einen Einfluss auf die Warfarin-Wirkung haben könnten.

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

1.3 Technische Vorgaben

Das *LightMix® Kit VKORC1 C1173T* ist ein *in-vitro* Diagnostikum und ermöglicht den Nachweis des Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP = single nucleotide polymorphism) VKORC1 C1173T, wie mit Hilfe von Referenzproben gezeigt wurde.

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 aufgereinigte 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(5) + 2 Kontr.	60	20
LC480 (384 Wells)	1.5	100 min	382(5) + 2 Kontr.	60	20
Z480 (offener Kanal)	1.5	100 min	94(5) + 2 Kontr.	60	20
LC96	1.6 (6)	100 min	94(5) + 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 eine heterozygote Kontrolle 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 mitgeführt werden, um das Genotypisierungsmodul zu teachen (nicht LC Nano und LC96). 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 Es muss mehr als ein Kit verwendet werden.

6 Die Nano LightCycler®-Software 1.0 und die LC96-Software 1.6 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!

Reagenzien und Kontrollen

Die lyophilisierten Reagenzien (PSR und Standards) vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur (18 °C bis 25 °C) lagern. Die 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

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 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® 96

LightCycler® 96
LightCycler®-Software Version 1.0 oder höher
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, weiß
LightCycler® 8 Röhrchen mit Streifen (weiß)
Oder

Roche Diagnostics
05 815 916 001
Wird mit dem Gerät geliefert
Kat.-Nr. 04 729 692 001
Kat.-Nr. 06 612 601 001

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

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 Volt)
Capping Tool
Nukleasefreies Wasser mit PCR-Qualität

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

2.3 Vorbereitung der Probe

Vorbereitung der Probe von Hand:

High Pure PCR Template Preparation Kit
Ethanol p.a.
Isopropanol p.a.

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

Automatisierte Probenvorbereitung:

MagNA Pure

Roche Diagnostics
Außer Handel

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	Kat.-Nr. 03 003 990 001
MagNA Pure 2.0	Kat.-Nr. 05 197 686 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	Kat.-Nr. 03 003 990 001
MagNA Pure Compact	Kat.-Nr. 03 731 146 001
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	Kat.-Nr. 03 730 964 001
MagNA Pure 96	Kat.-Nr. 05 195 322 001
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Kat.-Nr. 05 467 497 001
MagNA Pure 96 IVD	Kat.-Nr. 06 541 089 001
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Kat.-Nr. 06 543 588 001

3. Hintergrundinformationen

3.1 Medizinischer Hintergrund

Warfarin gehört zur Gruppe der Cumarine und wird zur Vorbeugung von Thrombosen und Thromboembolien eingesetzt. Das Arzneimittel bewirkt eine dosisabhängige Hemmung der Aktivität des VKORC1-Proteins.

Das individuelle Ansprechen auf Warfarin hängt von der Menge an VKORC1 und der Geschwindigkeit, mit der das Arzneimittel abgebaut wird, ab.

VKORC1-Aktivität

Die Untereinheit 1 des Vitamin-K-Epoxid-Reduktase-Komplexes (VKORC1, OMIM: 608547) ist ein Membranprotein, das sich im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten befindet. Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der Vitamin-K-Rückgewinnung.

Warfarin senkt die Verfügbarkeit von Vitamin K, was zu einer Abnahme der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie der gerinnungshemmenden Proteine C und S führt, wodurch der Gerinnungsprozess verlangsamt oder sogar gehemmt wird.

Es wird angenommen, dass die häufig vorkommende VKORC1-Promotorvariante -1639 G>A mit einer geringeren Proteinexpression verbunden ist. Diese Variante bindet komplett mindestens vier andere Varianten, darunter 1173 C>T (rs9934438, NG_011564.1:g.6399C>T) [2].

Infolgedessen benötigen Patienten mit dem Genotyp VKORC1 1173 TT eine niedrigere Dosis Warfarin als Träger von 1173 CC und CT [3].

Ethnisch bedingte Unterschiede

Die Allelhäufigkeit von VKORC1 variiert in den verschiedenen ethnischen Gruppen. In asiatischstämmigen Populationen ist 1173 T das Hauptallel, bei Kaukasiern kommt es in ca. 40 % und bei Afroamerikanern in nur 14 % der Personen vor.

Abbau von Warfarin

Warfarin wird von Cytochrom P450 CYP2C9 verstoffwechselt. Die stärkere klinische Wirkung ist insbesondere auf Langsammetabolisierer-Varianten von CYP2C9 zurückzuführen, die ebenfalls niedrigere Warfarin-Dosierungen erfordern.

Die beiden häufigen Langsammetabolisierer-CYP2C9-Allele *2 und *3 können mit dem LightMix® Kit CYP 2C9 identifiziert werden.

Algorithmus für die Antikoagulationstherapie

Die US-amerikanische FDA und das IWPC verwenden VKORC1 und diese beiden CYP 2C9-Varianten zur Gestaltung der Antikoagulationstherapie (IWPC-Algorithmus siehe: www.warfarindosing.org).

Genetische Varianten und Empfindlichkeit gegenüber Warfarin

Es sind weitere Genvarianten bekannt, die die Empfindlichkeit gegenüber Warfarin beeinflussen, jedoch bei Menschen kaukasischer Herkunft nicht routinemäßig getestet werden: VKORC1-Missense-Mutationen, CYP 24F2, EPHX1 und GGX mit einer Rolle im Vitamin-K-Zyklus, CALU, ein Cofaktor im VKOR-Complex, und insbesondere die Langsammetabolisierer mit den CYP 2C9-Allele *6 und *8.

3.2 Methode und Funktionsprinzip des Assays

Mithilfe der PCR-Methode wird ein Fragment von 176 bp des VKORC1-Gens mit spezifischen Primern amplifiziert. Das Fragment wird mit einer mutationsspezifischen Sonde nachgewiesen, die intern mit dem Reagenz SimpleProbe® 519 markiert ist.

SimpleProbe® Sonden fluoreszieren nur, wenn sie an die komplementäre DNA gebunden sind.

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.

Bei diesem Produkt stimmt die Sonde mit der Sequenz der mutierten Variante 1173 überein und die Präsenz des Wildtyp-Genotyps C1173 führt zu einer niedrigeren T_m.

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 mitgelieferten Kontroll-DNA-Standards ermöglichen einen Vergleich mit klinischen Proben.

3.3 Leistungsmerkmale

Analytische Spezifität

Die Spezifität für das Target-Gen und die Eignung der für diesen Test zum Nachweis der Mutationsstelle verwendeten Amplifikation mittels PCR wurden mithilfe einer direkten Sequenzierung des erzeugten Amplikons 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 31 verschiedene genomische DNA-Proben von Personen kaukasischer Herkunft mit veröffentlichten Assays [4] verglichen. Zudem wurden 12 Proben auch mittels Sequenzierung analysiert.

In der Studie verglichenen Ergebnisse wurden mit dem Kit erhalten und 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.

5 Proben (16,1 %) waren homozygot CC, 13 Proben (41,9 %) waren heterozygot CT und 13 Proben (41,9 %) waren homozygot 1173 TT.

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 „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

Für die Verwendung dieses Kits ist keine Farbkompensation erforderlich. Wenn die Daten mit aktivierter Farbkompensation gelesen werden, ändert dies nichts an der Ausgabe der Ergebnisse.

5.2 LightCycler® mit Kapillartechnik

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Programmierung:

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

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 Lauf 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.

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“.

5.3 Roche 480 Instrumente

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Nachweisformat: SimpleProbe

Anmerkung: Dieses Kit kann in Kombination mit dem LightMix® Kit HFE H63D S65C C282Y CE (Kat.-Nr. 40-0340-32) angewendet werden, wobei die Anweisungen für das Nachweisformat und die Programmierung in der Anleitung des HFE Kits zu befolgen sind.

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]	-	-	-	-	-	-	2	-
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 Lauf geladen werden kann.
- b) Darauf achten, dass **2 Erfassungen pro Sekunde** programmiert werden und nicht der Standardwert 5. Mehr Erfassungen verringern die Steigung der Schmelzkurve, erhöhen die Versuchsdauer und führen zu Fehlfunktionen des Kits.

5.4 LightCycler® 96 Instrumente

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Messung:

Detection Format: 470/514 FAM			Allgemeines
Quant Factor	Melt Factor	Integration Time (S)	Volumen (µl)
10.00	1.20	Dynamic	10

Programmierung

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

1. **Vorinkubation** der Probe und Aktivierung des Enzyms
2. **Amplifikation** 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								
Cycles	1	45			1			1
Ramp [°C/ s]	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.20	1.5
Duration [s]	600	5	10	15	30	120	1	30
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Mode		Standard	Standard	Standard				
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Readings /°C							5	

Tab. 3: Programmierung des LightCycler® 96

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „Experiment file“ speichern, die bei jedem Lauf geladen werden kann.

5.5 LightCycler® Nano Instrumente

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des LightCycler®.

Laufereinstellungen / Optische Einstellungen

Interkalierende Farbstoffe
Normale Qualität

Programmierung Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten (Tab. 4):

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	
<u>Parameter</u>							
Name	Hold	3 Step Amplification			Hold	Melting Stage	
		Initial Stage			Schlussphase		
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. 4: Programmierung des LightCycler® Nano

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „**Experiment file**“ speichern, die bei jedem Lauf 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. Sorgfältig die Seiten des Röhrchens überprüfen, wenn Partikel vorhanden sind, erneut bei Schritt 3 beginnen.
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 2 °C - 8 C lagern.

6.2.2 Ansetzen der parameterspezifischen 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

▶	Das Röhrchen mit der HT Positivkontrolle 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** der **Positivkontrolle** 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.

▶	Wenn die Standards für die Genotypisierung nicht verwendet werden, sollten sie im lyophilisierten Zustand gelassen werden. Die Reagenzien entsorgen, wenn das Kit aufgebraucht oder das Haltbarkeitsdatum überschritten wurde.
1	Das Röhrchen mit dem Standard für die WT-Genotypisierung und das mit dem Standard für die MT-Genotypisierung 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 des **Standards für die WT- und die MT-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. 5: Volumen der Komponenten zum Ansetzen von 64 Reaktionsgemischen

6.3.2 Ansetzen eines einzelnen LightCycler® -Reaktionsgemischs

Das Reaktionsgemisch ansetzen und hierzu jedes Volumen (Tab. 6) 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. 6: 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 VKORC1-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.

	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 der NTC Negativkontrolle in Position 1 (A1) pipettieren. H₂O mit PCR-Qualität verwenden 2 µl der HT Positivkontrolle in Position 2 (A2) pipettieren.
	Optional*: 2 µl des Standards für die WT -Genotypisierung in Position 3 (A3) pipettieren. 2 µl des Standards für die MT -Genotypisierung 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 (2 °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 bei 2 °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 (2 °C - 8 °C) 30 Tage lang gelagert werden.

Positivkontrolle

Die gelöste **Positivkontrolle** ist gekühlt (2 °C - 8 °C) 30 Tage lang stabil.

Standards für die Genotypisierung

Die gelöste **Positivkontrolle** ist 30 Tage stabil, wenn sie gekühlt (2 °C - 8 °C) aufbewahrt wird.

6.5 Laden der Kontrollen und Standards für Genotypisierung

Die Proben in den Positionen 1 und 2 müssen bei jedem Lauf eingefüllt werden. Die Proben 3 und 4 sind nur zum Teachen der Standards für die Genotypisierung erforderlich (nur beim ersten Lauf des Kits).



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.

Einzelheiten hierzu können der Betriebsanleitung des LightCycler® entnommen werden.

6.5.1 Geräte mit Kapillartechnik

Auf der Displayseite „Samples data - Capillary View“ den Namen der Probe, wie in der zweiten Spalte angegeben, eingeben. „Analysis Type – Genotyping“ auswählen. Den Kanal 530 auswählen und alle anderen abwählen. Im Drop-down-Menü „Sample Type“ anklicken und die „Genotype“-Beschreibung kopieren:

Pos	Name der Probe	Kanal	Name des Targets	Probentyp	Genotyp
1	NTC	530	Target 1	Negativkontrolle	
2	HT	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	VKORC1 C1173T Heterozygot
3	WT	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	VKORC1 C1173 Wildtyp
4	MT	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	VKORC1 1173T Mutation

6.5.2 LightCycler® 480

Im Fenster „Sample Editor“ (Proben-Editor) im Bereich „Step 1: Select Workflow“ (Schritt 1: Arbeitsablauf auswählen) die Option „Melt Geno“ wählen. Filterkombination 465-510. Die Beschreibung der **Positivkontrolle** und der **Standards für die Genotypisierung** wie folgt eingeben:

Pos	Name der Probe	Melt Geno Probentyp	Melt Geno Genotyp
1	NTC	Negativkontrolle	
2	HT	Standard für die Genotypisierung	VKORC1 C1173T Heterozygot
3	WT	Standard für die Genotypisierung	VKORC1 C1173 Wildtyp
4	MT	Standard für die Genotypisierung	VKORC1 1173T Mutation

6.5.3 LightCycler® 96

Im Fenster „Sample Editor“ (Proben-Editor), wie nachstehend beschrieben, die Beschreibung der **Positivkontrolle** und optional der **Standards für die Genotypisierung** eingeben:

Tabellenansicht:

Farbe	Position	Name der Probe	Probentyp	Farbstoff
	A1	NTC	Unbekannt	FAM
	A2	HT	Unbekannt	FAM
	A3	WT	Unbekannt	FAM
	A4	MT	Unbekannt	FAM

Alle anderen, nicht beschriebenen Felder leer lassen.

6.5.4 LightCycler® Nano

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	
	HT	
	WT	
	MT	

Target:

Farbe	Name	Farbstoff	Referenz
	Kanal 530	FAM	

Well wie in der Tabelle

Pos	Nr.	Anmerkung	Probe	FAM	Typ
A1	1		NTC	Kanal 530	U
A2	2		HT	Kanal 530	U
A3	3		WT	Kanal 530	U
A4	4		MT	Kanal 530	U

7. Datenanalyse und Interpretation

7.1 Grenzen und Interferenzen

Dieser Assay ist für die VKORC1 C1173T-DNA spezifisch.
Es sind keine Interferenzen für diesen Assay bekannt.

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 **HT** 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). Alternativ müssen die Ergebnisse anhand der Schmelztemperaturen abgelesen werden (siehe **7.3.4 Proben** und **7.6 Interpretation der Ergebnisse**).

7.3.2 DNA der Positivkontrolle

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer Folgendes zeigen:

HT Positivkontrolle (Pflicht - Position 2).

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer zwei Schmelzpeaks im Kanal 530 zeigen. **HT** ahmt eine **heterozygote** klinische Probe nach. Bezüglich der erwarteten Schmelztemperatur siehe **7.6 Interpretation der Ergebnisse**.

7.3.3 DNA der Standards für die Genotypisierung

Standard für die **WT**-Genotypisierung (Optional - Position 3).

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer einen einzigen Schmelzpeak im Kanal 530 zeigen.

WT ahmt eine klinische Probe mit einem homozygoten **Wildtyp** nach.

Standard für die **MT**-Genotypisierung (Optional - Position 4).

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer einen einzigen Schmelzpeak im Kanal 530 zeigen.

MT ahmt eine klinische Probe mit einer homozygoten **Mutation** nach.

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

7.3.4 Proben

Das Ergebnis dieses Assays muss immer einen oder zwei Schmelzpeaks zeigen.

 Es werden nicht mehr als zwei Peaks pro Probe erwartet.

Die Schmelzpeakprofile müssen mit den in diesem Kapitel beschriebenen Akzeptanzkriterien und den in Kapitel **7.6 Interpretation der Ergebnisse** beschriebenen erwarteten Schmelztemperaturen und zulässigen Abweichungen übereinstimmen.



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 $MgCl_2$ -Konzentration stimmt. Außerdem ist zu bedenken, dass auch eine unsachgemäße Lagerung der Reagenzien zu einem Versagen des Produktes führen kann.

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. 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. Im Abschnitt 7.7 Seltene Varianten sind Beispiele von bekannten Varianten dargestellt.

7.4 Speichern der externen Standards für die Genotypisierung

 (Nicht zutreffend für die LC1.x-Softwareversionen unter 4.0, LightCycler®96 und Nano).

Wenn die Proben 1 bis 4 nach der Genotypisierungsanalyse die Akzeptanzkriterien erfüllen (siehe Abschnitt 7.3), 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 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).

Die PCR wurde mit etwa 100 ng genomischer DNA aus zuvor sequenzierten Proben, einer Negativkontrolle **NTC**, einer **Positivkontrolle** und **Standards für die Genotypisierung** durchgeführt.

Die Amplifikationsdaten werden wie folgt angezeigt:

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

Die Amplifikation im Kanal 530 ansehen, Analysemodus: „Absolute Quantification“ (Absolute Quantifizierung).

Geräte vom Typ 480:

Die Amplifikationsdaten im Analysemodus „Abs Quant/2nd Derivative Max“ (Abs Quant/Max. 2. Ableitung) ansehen.

Wenn ein LightCycler® 480 verwendet wird, Kanal 483-533 wählen.

Wenn ein LightCycler® 480 II verwendet wird, Kanal 465-510 wählen.

Wenn ein cobas z 480 Analyzer verwendet wird, Kanal 465-510 wählen.

LC 96:

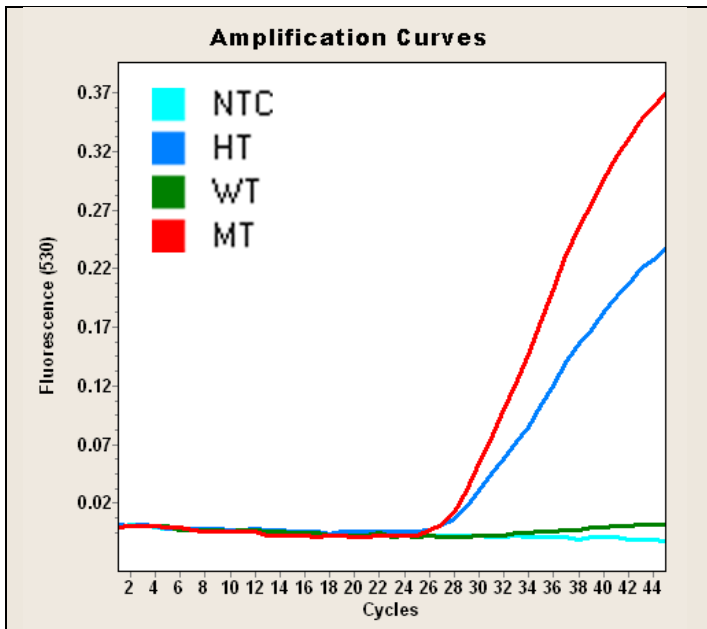
Die Amplifikation im Analysemodus „Abs Quant“ ansehen.

LC Nano:

Die Amplifikation im Modus „Automatic Quantification“ (Automatische Quantifizierung) ansehen.

LC1.x, Softwareversionen 3.5:

Die Amplifikation im Fluoreszenzkanal F1 ansehen, Modus: „Quantification – Second Derivative Maximum“ (Quantifizierung - Maximum 2. Ableitung).



Daten des Kanals 530.

Die **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) darf kein Amplifikationssignal aufweisen.

Die **HT** Positivkontrolle (blaue Linie), die heterozygoten Proben, der Standard für die **MT**-Genotypisierung (rote Linie) und die Proben Mutation zeigen ein Amplifikationssignal.

Der Standard für die **WT**-Genotypisierung (grüne Linie) und die homozygoten Wildtyp-Proben zeigen ein schwaches (oder nicht sichtbares) Amplifikationssignal.

Abb. 1: Amplifikationsdiagramm.

7.5.2 Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik

Mithilfe der Schmelzkurvenpeaks (Abb. 2) können die Genotypen des Wildtyps, der heterozygoten und der homozygoten Mutation unterschieden werden.

Die Schmelzdaten werden wie folgt angezeigt:

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

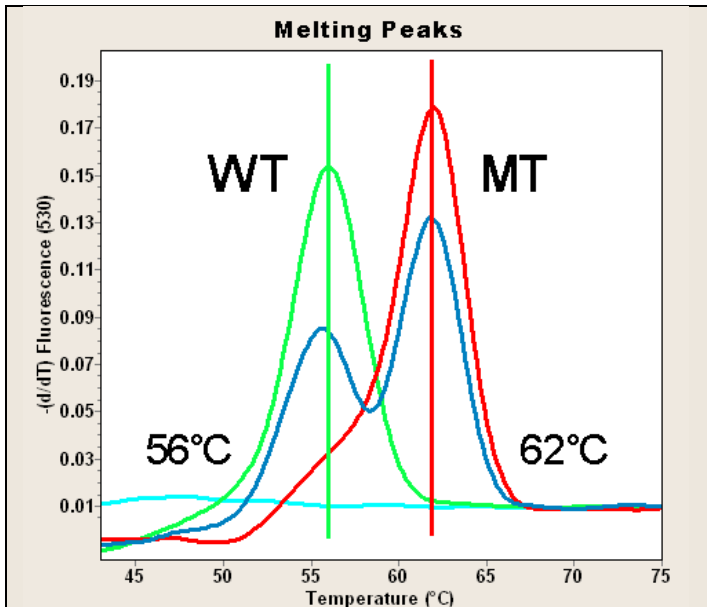
Die Schmelzdaten im Kanal 530 ansehen.

Analysetyp „Melting Curve Analysis – Genotyping“ (Schmelzkurvenanalyse – Genotyping)-Modus.

LC1.x, Softwareversion 3.5.3

Die Schmelzdaten im Kanal F1 statt im Kanal 530 ansehen.

„Melting Curve“ (Schmelzkurve)-Modus.



Kanal 530

In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie - Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein.

Die **HT** Positivkontrolle (blaue Linie) zeigt Schmelzpeaks bei 56 °C und 62 °C.

Der Standard für die **MT**-Genotypisierung (rote Linie) zeigt einen Schmelzpeak bei 62 °C

Der Standard für die **WT**-Genotypisierung (grüne Linie) zeigt einen Schmelzpeak bei 56 °C.

Abb. 2: Schmelzdaten.

Interpretation der Ergebnisse

Genotyp:	homozygot VKORC1 C1173	heterozygot VKORC1 C1173T	homozygot VKORC1 1173T
Anzahl der Schmelzpeaks	1	2	1
Schmelztemperatur der Peaks	56 °C	56 °C und 62 °C	62 °C
Temperaturunterschied zwischen den Peaks	---	6 °C	---
Phänotyp	Asymptomatisch	Kombiniert mit CYP2C9 *1/*2 oder *2/*3 erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin	Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin

Tab. 7: Typische Analyseergebnisse

Anmerkung:

Die Werte für die Schmelztemperaturen (T_m) können zwischen unterschiedlichen Geräten/Läufen um ±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.**



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 der Tabelle oben vergleichen oder Tabelle 11 in Kapitel 7.6. **Interpretation der Ergebnisse** verwenden.

7.5.3 Schmelzanalyse: Geräte vom Typ 480 von Roche

Mithilfe der Schmelzkurvenpeaks (Abb. 3) können die Genotypen des Wildtyps, der heterozygoten und der homozygoten Mutation unterschieden werden.

Die Schmelzdaten werden wie folgt angezeigt:

Geräte vom Typ LC 480:

Wenn ein LightCycler® 480 verwendet wird, die Schmelzdaten im Kanal 483-533 ansehen.

Wenn ein LightCycler® 480 II verwendet wird, die Schmelzdaten im Kanal 465-510 ansehen.

Wenn ein cobas z 480 Analyzer verwendet wird, die Schmelzdaten im Kanal 465-510 ansehen.

„Melt Curve Genotyping“ (Schmelzkurven-Genotypisierung)-Modus.

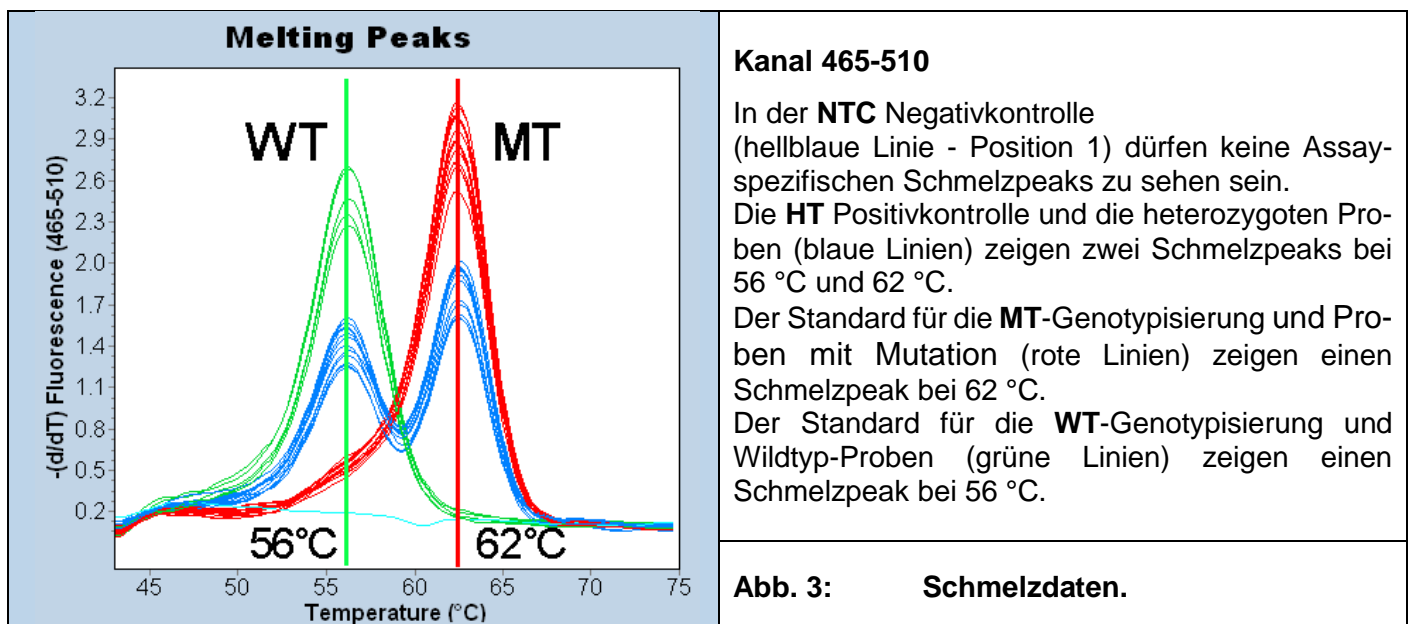


Abb. 3: Schmelzdaten.

Interpretation der Ergebnisse

Genotyp:	homozygot VKORC1 C1173	heterozygot VKORC1 C1173T	homozygot VKORC1 1173T
Anzahl der Schmelzpeaks	1	2	1
Schmelztemperatur der Peaks	56 °C	56 °C und 62 °C	62 °C
Temperaturunterschied zwischen den Peaks	---	6 °C	---
Phänotyp	Asymptomatisch	Kombiniert mit CYP2C9 *1/*2 oder *2/*3 erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin	Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin

Tab. 8: Typische Analyseergebnisse

Anmerkung:

Die Werte für die Schmelztemperaturen (T_m) können zwischen unterschiedlichen Geräten/Läufen um ±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.**



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 der Tabelle oben vergleichen oder Tabelle 11 in Kapitel 7.6. **Interpretation der Ergebnisse** verwenden.

7.5.4 Schmelzanalyse: LightCycler® 96

Mithilfe der Schmelzkurvenpeaks (Abb. 4) können die Genotypen des Wildtyps, der heterozygoten und der homozygoten Mutation unterschieden werden.

Analyse hinzufügen: **Tm Calling**

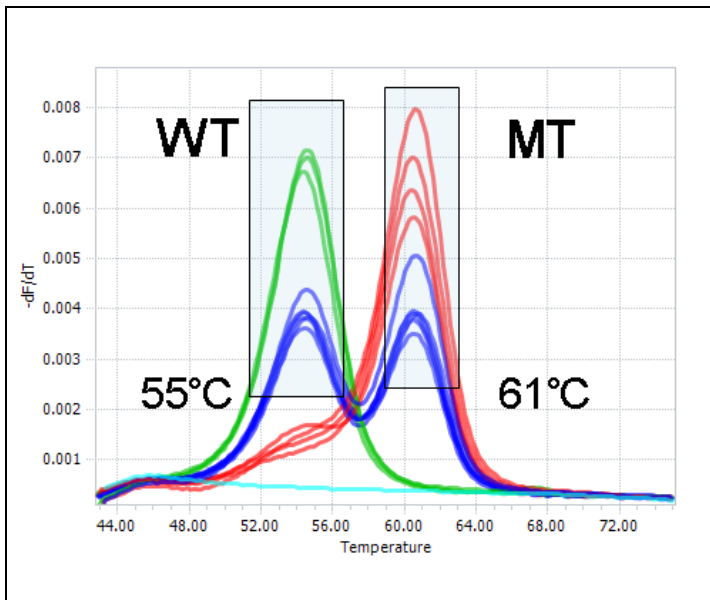
Daten ansehen in: **Schmelzpeak**

Peaks auswählen mit: **Tool zum Markieren eines Bereichs (Marker-Tool)**

Anmerkung: Beim LightCycler® 96 muss der Bereich, der für die Bestimmung des Schmelzpeaks verwendet werden soll, von Hand eingegeben werden. Wenn der Peak sich nicht in dem Kasten (Marker-Tool) befindet, gibt die Software keinen T_m-Wert aus.

Die Schmelzkurve jedes Patienten mit der Schmelzkurve der **Positivkontrolle** der vergleichen (visuell).

Für den Vergleich auch Tabelle 9 unten oder Tabelle 11 in Kapitel 7.6 **Interpretation der Ergebnisse** heranziehen.



Kanal FAM

In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie - Position 1) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **HT** Positivkontrolle und die heterozygoten Proben (blaue Linien) zeigen zwei Schmelzpeaks bei 55 °C und 61 °C. Der Standard für die **MT**-Genotypisierung und Proben mit Mutation (rote Linien) zeigen einen Schmelzpeak bei 61 °C. Der Standard für die **WT**-Genotypisierung und Wildtyp-Proben (grüne Linien) zeigen einen Schmelzpeak bei 55 °C.

Abb. 4: Schmelzdaten.

Interpretation der Ergebnisse

Genotyp:	homozygot VKORC1 C1173	heterozygot VKORC1 C1173T	homozygot VKORC1 1173T
Anzahl der Schmelzpeaks	1	2	1
Schmelztemperatur der Peaks	55 °C	55 °C und 61 °C	61 °C
Temperaturunterschied zwischen den Peaks	---	6 °C	---
Phänotyp	Asymptomatisch	Kombiniert mit CYP2C9 *1/*2 oder *2/*3 erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin	Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin

Tab. 9: Typische Analyseergebnisse

Anmerkung:

Die Werte für die Schmelztemperaturen (Tm) können zwischen unterschiedlichen Geräten/Läufe um ±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.**

7.5.5 Schmelzanalyse: LightCycler® Nano

Mithilfe der Schmelzkurvenpeaks (Abb. 5) können die Genotypen des Wildtyps, der heterozygoten und der homozygoten Mutation unterschieden werden.

Die Schmelzdaten werden wie folgt angezeigt:

Analyse

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

Folgendes auswählen: Tm Calling

Im Fenster: **Setting (Einstellungen)**

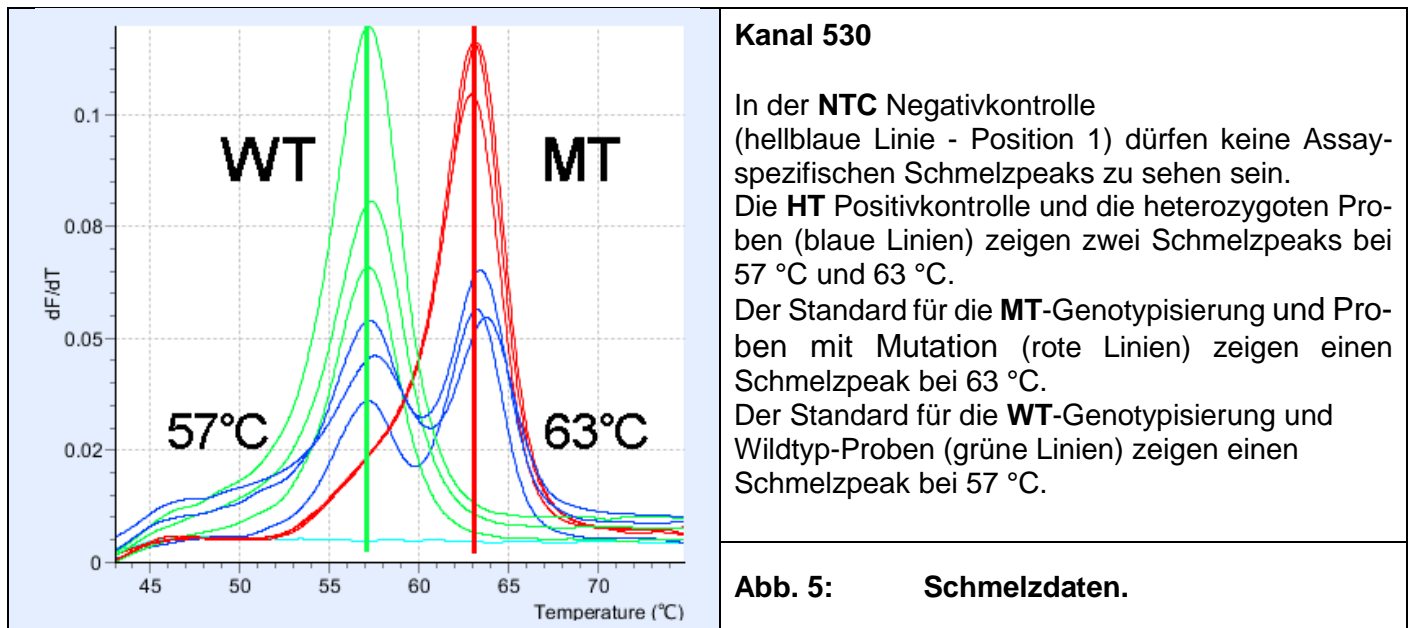
Folgendes auswählen: Use negative Derivative "Yes" (Negative Ableitung verwenden „Ja“)

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

Folgendes auswählen: Target: Kanal 530

Schmelzpeaks

Die Schmelzkurve jedes Patienten manuell mit der Schmelzkurve der Standards vergleichen und die Tabelle 10 unten oder die Tabelle 11 im Kapitel **7.6 Interpretation der Ergebnisse** zum Vergleichen verwenden.



Interpretation der Ergebnisse

Genotyp:	homozygot VKORC1 C1173	heterozygot VKORC1 C1173T	homozygot VKORC1 1173T
Anzahl der Schmelzpeaks	1	2	1
Schmelztemperatur der Peaks	57 °C	57 °C und 63 °C	63 °C
Temperaturunterschied zwischen den Peaks	---	6 °C	---
Phänotyp	Asymptomatisch	Kombiniert mit CYP2C9 *1/*2 oder *2/*3 erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin	Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cumarin

Tab. 10: Typische Analyseergebnisse

Anmerkung:

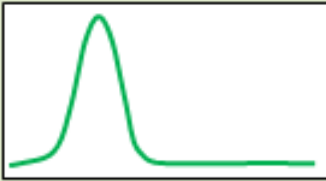
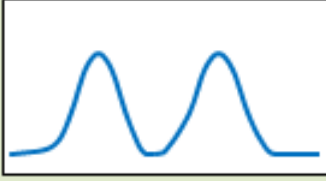
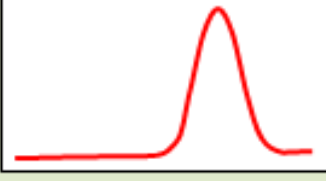
Die Werte für die Schmelztemperaturen (Tm) können zwischen unterschiedlichen Geräten/Läufe um ± 5 °C schwanken.

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

Bei Variationen siehe: **7.3.5 Anormale Schmelzkurven.**

7.6. Interpretation der Ergebnisse

Falls das automatische Genotyp-Modul versagt, zur manuellen Identifizierung der Schmelzkurve (Tm calling) wechseln und die Ergebnisse vergleichen

VKORC C1173T Schmelzpeak(s)		VKORC1-Genotypen	Metabolizer Phänotyp
C1173	1173T		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		VKORC1 C1173 Wildtyp	Normale Warfarin-Dosis sofern keine CYP2C9- o- der andere Genmutationen vorliegen
55 - 57	-		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		VKORC1 C1173T	Nur in Kombination mit bestimmten CYP2C9-Alle- len leicht erhöhte Empfindlichkeit gegen- über Cumarin
55 - 57	61 - 63		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		VKORC1 1173T	Erhöhte Empfindlichkeit gegen- über Cumarin (zusätzlich zu CYP2C9)
-	61 - 63		
ΔTm 6 °C			Tab. 11: Typische Analyseergeb- nisse

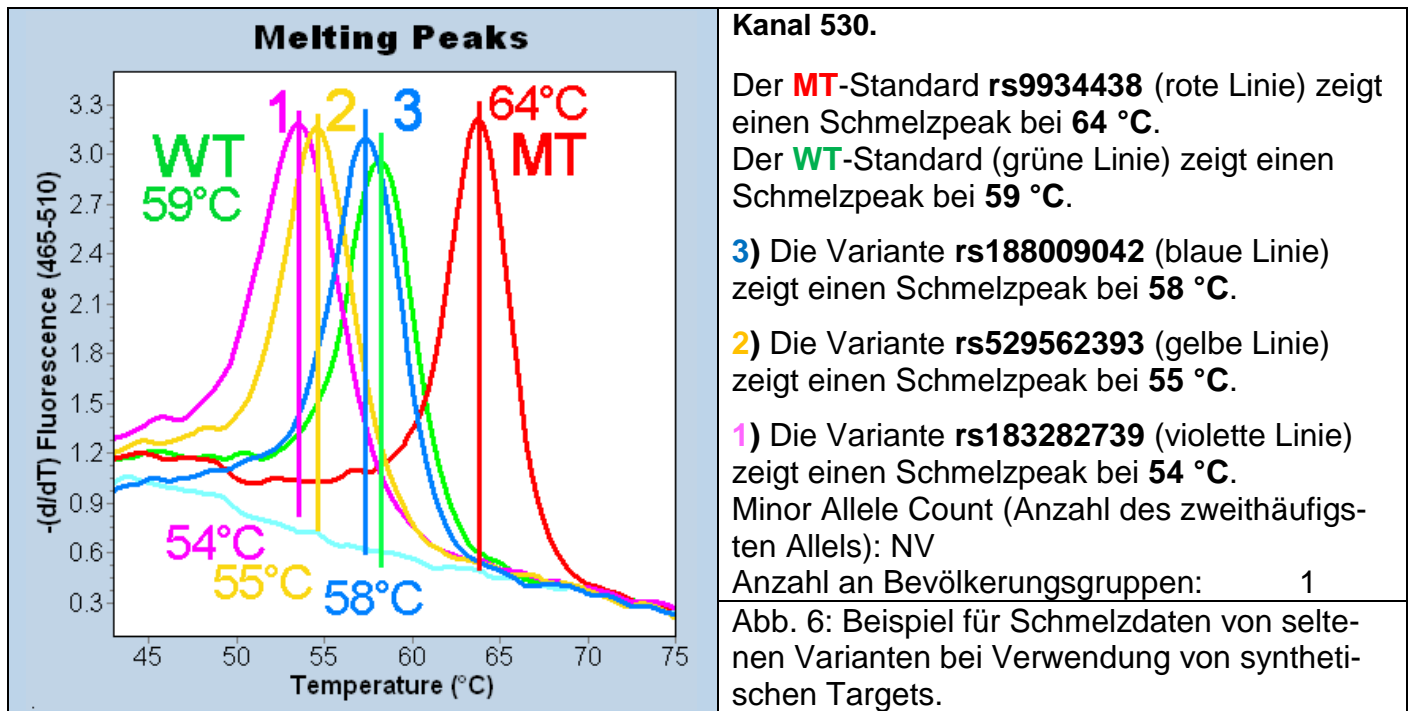


Zulässige Abweichungen der Schmelztemperaturen:

- ±0,5 °C innerhalb von Proben des gleichen Genotyps
- ±1,5 °C zwischen dem Standard für die Genotypisierung und den biologischen Proben
- ±1,5 °C des ΔT zwischen zwei Schmelzpeaks bei heterozygoten Genotypen
- ±1,5 °C zwischen den Schmelzpeaks mit demselben Genotyp in verschiedenen Läufen
- ±5,0 °C zwischen den im Diagramm oben angegebenen Temperaturen und den mit den Geräten vor Ort ermittelten Werten. Diese Abweichungen sind geräteabhängig: Immer die Temperatur als Referenz verwenden, die mit der im Lauf enthaltenen **Positivkontrolle** erhalten wurde.

Die erhaltenen Ergebnisse mit der bekannten Allelhäufigkeit vergleichen.
 Bei Kaukasiern beträgt die Allelhäufigkeit für das T-Allel = 0,3558, so dass etwa 13 % T- und 41 % C-homozygote Ergebnisse zu erwarten sind.
 Bei Variationen siehe: **7.3.5 Anormale Schmelzkurven**

7.7. Seltene Varianten



Nr.	RS	Tm	HGVS	MAF
WT		59 °C		
MT	rs9934438	64 °C	NG_011564.1:g.6399C>T	A = 0,3558/1782
1	rs183282739	54 °C	NG_011564.1:g.6407T>G	C = 0,0002/1
2	rs529562393	55 °C	NG_011564.1:g.6388A>G	C = 0,0002/1
3	rs188009042	58 °C	NG_011564.1:g.6393A>G	NV
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

MAF = Minor Allele Count (Häufigkeit der Variante); **NV** = nicht verfügbar

Experimentell getestete Varianten mit rs-Code (dbSNP), Nomenklatur der Human Genome Variation Society (HGVS) und Allelhäufigkeiten (basierend auf TOPMed-Daten).

Die Temperaturen (Tm) wurden mit synthetischen Targets erhoben.

Die Tm-Werte dürfen nicht zur Vorhersage des Genotyps verwendet werden. Die Informationen in den Abschnitten 7.5 bis 7.7 verwenden.

Es gibt keine veröffentlichten Angaben zur VKORC1-Aktivität für diese seltenen Varianten (2015).

8. Fehlersuche und -behebung

Gerät	Geräte mit Kapillartechnik	LightCycler® 480
Spezifische Codes:	LightCycler® Nano	LightCycler® 96
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- μ l-Pipettenspitze aufziehen und erst dann in das Reaktionsgefäß pipettieren.
	Die Mikrotiterplatte wurde schlecht verschlossen	Sicherstellen, dass die Mikrotiterplatte fachgerecht verschlossen ist
Baseline mit „Sawtooth“-Profil	Es befinden sich Blasen im Well	Die Mikrotiterplatte vor dem Lauf zentrifugieren
	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
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) Dean, L.

Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1.

JMedical Genetics Summaries, 2013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84174/>

2) M.J. Rieder, A.P. Reiner, B.F. Gage, D.A. Nickerson, C.S. Eby, H.L. McLeod, D.K. Blough, K.E. Thummel, D.L. Veenstra and A.E. Rettie.

Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose

New England Journal of Medicine 352; 22: June 2, 2005

3) Laurent Bodin, Céline Verstuyft, David-Alexandre Tregouet, Annie Robert, Liliane Dubert, Christian Funck-Brentano, Patrice Jaillon, Philippe Beaune, Pierre Laurent-Puig, Laurent Becquemont, and Marie-Anne Lorient

Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity

BLOOD, 1 July 2005; volume 106, number 1

4) E. Hatch, E. A. Sconce, A. K. Daly and F. Kamali

A rapid genotyping method for the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) gene.

J Thromb Haemost 2006; 4: 1158–9.

NCBI Reference: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs9934438>

Klassifizierung / Referenz

Referenz	Klassifizierung	
EDMA	16.01.04.90	[Anderer Polymorphismus-Tests]
CPV	33694000-1	
EAN	4260159332100	
Roche SAP-Nr.	07805985001	

Hinweis für den Käufer - Patente und Warenzeichen

Der Kaufpreis dieses Produkts beinhaltet eine begrenzte, nicht übertragbare Lizenz gemäß den US-amerikanischen

Patentansprüchen und den entsprechenden Patentansprüchen außerhalb der Vereinigten Staaten, die von BioFire Defense lizenziert wurde und die den Käufer dazu berechtigt, nur diese Menge des Produkts für HybProbe-Assays und damit zusammenhängende Verfahren, die in den genannten Patenten beschrieben sind, für humandiagnostische Zwecke sowie für Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten zu verwenden.

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 Diagnostics. ABI 3730xl Genetic Analyzer und Sequencing Analysis sind von Applied Biosystems eingetragene Produkte. LightMix® ist ein Markenzeichen von TIB MOLBIOL. SimpleProbe®, Hybridisierungssonden 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 und Änderungen in der Zusammensetzung

Version	Änderung	Datum
V150801	Erste Ausgabe (SimpleProbe-Format)	20.09.2015
V170303	Redaktionelle Änderungen (Formulierungen) 7.3.1, 7.3.5.	03.08.2017
V170717	Abb. 6 und Temperaturen	01.09.2017
V180404	7.8.2 Tabelle mit MAF-Werten aufgenommen	04.04.2018
V190123	7.7 Disclaimer hinzugefügt; MAF-Werte aktualisiert; EDMA korrigiert	11.02.2019

Hergestellt von:

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



4260159332100