



MOLBIOL

LightMix[®] in-vitro Diagnostik-Kit MTHFR C677T

Kat.-Nr.: 40-0129-64

Nachweis der DNA-Variante C677T
im Gen MTHFR

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 MTHFR C677T	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	7
2.1. Erforderliche Ausrüstung	7
2.2. Optionale Ausrüstung	7
2.3. Vorbereitung der Probe	7
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. LightCycler® 480 Instrumente	13
5.4. LightCycler® 96 Instrumente	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	16
6.2.3. Ansetzen der Positivkontrolle	17
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
6.3.3. Laden der Kapillaren / Wells	19
6.4. Lagerung und Stabilität der verdünnten Komponenten	20
6.5. Laden von Kontrollen und Standards für Genotypisierung	20
6.5.1. Geräte mit Kapillartechnik	20
6.5.1. LightCycler® 480 Instrumente	21
6.5.2. LightCycler® 96	21
6.5.3. LightCycler® Nano	21
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	24
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	25
7.4.1. Geräte mit Kapillartechnik	25
7.4.1. LightCycler® 480 Instrumente	25
7.5. Lesen der Ergebnisse	26
7.5.1. Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik	26
7.5.2. Schmelzanalyse: Geräte vom Typ 480 von Roche	26
7.5.3. Schmelzanalyse: LightCycler® 96	27
7.5.4. Schmelzanalyse: LightCycler® Nano	27
7.6. Erwartete Schmelztemperaturen und Ergebnisse	27
7.7. Interpretation der Ergebnisse	28
7.8. Zusätzliche Informationen	29
7.8.1. Typische Amplifikationsdaten	29
7.8.2. Seltene Varianten	29
8. FEHLERSUCHE UND -BEHEBUNG	31
9. LITERATURNACHWEIS	32

1. Produktinformation

1.1. Inhalt: LightMix® Kit MTHFR C677T

Lyophilisierte vorgemischte PCR-Reagenzien:



Bei 4 °C bis 25 °C im Dunkeln lagern.

	Deckel farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktionen insgesamt
1 x	Rot	PSR	Parameterspezifische Reagenzien (PSR) enthält vorgemischte und getrocknete Primer und Sonden für 64 Reaktionen <0.01 pg unmarkierte Oligonukleotide <0.01 pg SimpleProbe 519 markierte Sonde	64 grün-blaues Pellet lyophilisiert

Standards (Kontroll-DNA)



Bei 4 °C bis 25 °C im Dunkeln lagern.

	Deckel farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktionen insgesamt
1 x	Gelb	HT	Positive Heterozygote Kontrolle <0.01 pg Plasmid-Target-Mischung (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 blaues Pellet lyophilisiert
1 x	Gelb	WT	Standard für die Genotypisierung des Wildtyps <0.01 pg Plasmid-Target-Mischung (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 blaues Pellet lyophilisiert
1 x	Gelb	MT	Standard für die Genotypisierung der Mutation <0.01 pg Plasmid-Target-Mischung (synthetisch) [ca. 10E4 Genomäquivalente]	40 blaues Pellet lyophilisiert

Polymerase-Mix: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe



Nach der Anlieferung bei -15 °C bis -20 °C lagern.

	Deckel farbe	Etikett	Beschreibung des Inhalts	Reaktionen insgesamt
1 x	Rot	1a	LightCycler® FastStart Enzym	64 gefroren
1 x	Weiß	1b	LightCycler® FastStart Reaktionsgemisch HybProbe	64 gefroren
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⁾. Der FastStart Master ist in den 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-Polymorphismus rs1801133 der Methylenetetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR, OMIM: 607093)-Mutation C677T in genomischer menschlicher DNA nachgewiesen werden, wobei die DNA aus einem Nukleinsäureextrakt stammt, welches aus peripherem Blut gewonnen wurde.

Die Genmutation C677T kodiert für eine Proteinvariante, die eine reduzierte Enzymaktivität aufweist. Homozygote Träger der Genvariante 677 T/T und in geringerem Maße auch compound heterozygote Menschen mit der Allelkombination C677T und A1298C können erhöhte Homocysteinspiegel im Plasma aufweisen, was zu einem höheren Risiko für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen, Thrombosen und Bluthochdruck führt.

Dieses Produkt kann dem Arzt bei der Analyse des genetischen Hintergrunds von Patienten mit einem erhöhten Homocysteinspiegel oder einer Thromboseneigung helfen: Der Test kann zusätzlich zu oder nach einer phänotypischen Untersuchung des Homocysteinspiegels durchgeführt werden.

C677T-heterozygote Patienten sollten auch auf den zweiten verbreiteten MTHFR-Polymorphismus A1298C untersucht werden, zum Beispiel mit dem LightMix® Kit 40-0269.

Das Kit ist nicht als alleinige Grundlage für eine Behandlungsentscheidung gedacht. Der Mutationsstatus des Patienten muss zusammen mit anderen Krankheitsfaktoren betrachtet werden.

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

1.3. Technische Vorgaben

Das *LightMix® Kit MTHFR C677T* ist ein *in-vitro* Diagnostikum und ermöglicht den Nachweis des Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP = single nucleotide polymorphism) MTHFR C677T, 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 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 Analysen, 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	Software version (oder höher)	Laufzeit (ca.)	Max. Probenanz. pro Lauf ⁽²⁾	Max. Produktionsleistung des Kits ⁽³⁾	Min. Produktionsleistung des Kits ⁽⁴⁾
LC 1.2	4.10 ⁽¹⁾	60 min	30 + 2 Kontr.	58	20
LC 1.5	4.10 ⁽¹⁾	60 min	30 + 2 Kontr.	58	20
LC 2.0	4.05	60 min	30 + 2 Kontr.	58	20
LC480 (96 Wells)	1.5	100 min	94 + 2 Kontr.	60	20
LC480 (384 Wells)	1.5	100 min	382 ⁽⁵⁾ + 2 Kontr.	60	20
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 oder gekühlt (4 °C / 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

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® 96

LightCycler® 96

LightCycler®-Software Version 1.0 oder höher

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, weiß

LightCycler® 8 Röhrchen mit Streifen (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)

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. 05 815 916 001

Wird mit dem Gerät geliefert

Kat.-Nr. 04 729 692 001

Kat.-Nr. 06 612 601 001

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

2.2. Optionale Ausrüstung

Geräte:

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 Volt)

Capping Tool

Roche Diagnostics

Kat.-Nr. 03 709 582 001

Kat.-Nr. 03 357 317 001

2.3. Vorbereitung der Probe

Vorbereitung der Probe von Hand:

High Pure PCR Template Preparation Kit

Nukleasefreies Wasser mit PCR-Qualität

Ethanol p.a.

Isopropanol p.a.

Roche Diagnostics

Kat.-Nr. 11 796 828 001

jeder Hersteller

jeder Hersteller

jeder Hersteller

Automatisierte Probenvorbereitung:

MagNA Pure

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

MagNA Pure 2.0

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

Roche Diagnostics

Außer Handel

Kat.-Nr. 03 003 990 001

Kat.-Nr. 05 197 686 001

Kat.-Nr. 03 003 990 001

MagNA Pure Compact

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I

Kat.-Nr. 03 731 146 001

Kat.-Nr. 03 730 964 001

MagNA Pure 96

MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit

Kat.-Nr. 05 195 322 001

Kat.-Nr. 05 467 497 001

MagNA Pure 96 IVD

MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit

Kat.-Nr. 06 541 089 001

Kat.-Nr. 06 543 588 001

3. Hintergrundinformationen

3.1. Medizinischer Hintergrund

Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)-Defizienz ist ein häufig vorkommender, angeborener Defekt im Folsäurestoffwechsel. Das phänotypische Spektrum reicht von einem schweren neurologischen Verfall und frühem Tod bis hin zu einem erhöhten Risiko für Gefäßerkrankungen, Thrombosen und Bluthochdruck, während einige Fälle auch asymptomatisch bleiben.

Die MTHFR-Genvariante C677T kodiert für eine thermolabile Enzymvariante, bei der sich an der Aminosäureposition 222 statt einem Alanin ein Valin befindet, was eine verminderte Aktivität zur Folge hat (Rosenblatt et al., 1992)¹.

Die HGVS-Bezeichnung für diese Variante ist c.665C>T (Position in der kodierenden DNA) und p.Ala222Val (Position im Protein, Genbank-Eintrag XP_005263517).

Homozygote Träger der Genvariante 677 T/T und in geringerem Maße auch compound heterozygote Menschen mit beiden Allelen 677 C/T und 1298 A/C (Glu 429 Ala) können erhöhte Homocysteinspiegel im Plasma aufweisen, was zu einem höheren Risiko für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen, Thrombosen und Bluthochdruck führt.

Gefäßerkrankungen

Die Mutation C677T scheint ein wichtiger genetischer Risikofaktor für Gefäßkrankheiten zu sein (Frosst et al., 1995)².

Studien zur Mutation C677T bei Herz-Kreislauf-Patienten und Kontrollpersonen zeigen, dass eine Homozygotie für diese häufige MTHFR-Genmutation mit einem dreifach erhöhten Risiko für vorzeitige Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbunden ist (Kluijtmans et al., 1996)³.

Thrombosen

Sowohl Hyperhomocysteinämie aufgrund der Mutation C677T als auch die Faktor-V-Leiden-Mutation sind Risikofaktoren für rezidivierende Venenthrombosen. Es wurde festgestellt, dass das Thromboserisiko bei den Menschen, die beide Risikofaktoren aufwiesen, höher war (Keijzer et al., 2002)⁴.

Bluthochdruck

In einer Meta-Analyse, die 26 englische und chinesische Studien in kaukasischen und asiatischen Populationen zusammenfasste, wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem C677T-Polymorphismus und Bluthochdruck/Hypertonie in der Schwangerschaft festgestellt (Quian et al., 2007)⁵.

Häufigkeit des Allels

Die Häufigkeit des MTHFR 677T-Allels bei Menschen kaukasischen Ursprungs in Europa bewegt sich in einem Bereich von 8 % (Deutschland) bis 18 % (Italien), für Nordamerika wird dagegen ein Bereich von bis zu 35 - 40 % gemeldet.

3.2. Methode und Funktionsprinzip des Assays

Mithilfe der PCR-Methode wird ein Fragment von 288 bp des MTHFR-Gens mit spezifischen Primern amplifiziert. Das PCR-Fragment wird mithilfe eines intern markierten SimpleProbe® Oligomers analysiert, das an die Region bindet, in der sich die Mutation befindet.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur langsam erhöht. Die Sonde löst sich bei einer bestimmten Temperatur (T_m), was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Jede Fehlpaarung, die von der Sonde abgedeckt wird, destabilisiert das Hybrid und senkt den T_m -Wert.

Bei diesem Produkt stimmt die Sonde mit der Sequenz des Genotyps des Wildtyps überein, wenn eine Mutation vorhanden ist, sinkt die 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 ausgelesen werden (geräteabhängig: Softwaremodul „Melt Curve Genotyping“).

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.

3.3. Leistungsmerkmale

Analytische Spezifität

Die Spezifität für das Target-Gen und die Eignung der für diesen Test verwendeten Amplifikation mittels PCR wurden mithilfe einer Sequenzierung des 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

Insgesamt wurden 132 verschiedene genomische DNA-Proben von Personen kaukasischer Herkunft mit dem vorliegenden Kit analysiert und mit der ABI 3730xl DNA-Sequenzierung verglichen, die von LGC Genomics GmbH, Berlin durchgeführt wurde.

Studienergebnisse: Die Ergebnisse der beiden Analysemethoden stimmten zu 100 % überein. 36 Proben waren homozygote Wildtypen, 80 Proben waren heterozygot und 16 Proben waren homozygot mutiert.

4. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Vorschriften für den Umgang mit dem Produkt

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

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

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

Keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen miteinander mischen.

Die Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.

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

Labortechniken

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

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

Nicht mit dem Mund pipettieren.

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

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

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

Vorbereitung der Probe

Für eine sachgerechte Handhabung und Entsorgung wird auf die Sicherheitshinweise in der Packungsbeilage des verwendeten Produktes verwiesen (siehe Kapitel 2.3).

Amplifikation und Nachweis

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

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

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

Die Kapillaroberfläche oder Plattenabdeckung nicht ohne Handschuhe berühren.
Bitte die Bedienungsanleitung und die Sicherheitshinweise in der Betriebsanleitung des LightCycler® lesen.

Umgang mit Abfällen

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

5. Programmierung

5.1. Farbkompensation

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

5.2. LightCycler® mit Kapillartechnik

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des Geräts.

Programmierung

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten:

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
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“ statt der „Ramp Rate“.

5.3. LightCycler® 480 Instrumente

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des Geräts.

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:

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 der Geräte vom Typ 480

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „**RUN Template**“ speichern, das bei jedem Lauf geladen werden kann.

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 Geräts.

Messung

Nachweisformat: 470/514 FAM			Allgemeines
Quant.Faktor	Melt Factor	Integration Time (S)	Volumen (µl)
10.00	1.20	Dynamisch	10

Programmierung

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten:

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:								
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 (Versuchsdatei)**“ speichern, die bei jedem Lauf geladen werden kann.

5.5. LightCycler® Nano

Für Einzelheiten siehe Betriebsanleitung des Geräts.

Laufereinstellungen / Optische Einstellungen

Interkalierende Farbstoffe

Normale Qualität

Programmierung

Das Protokoll besteht aus vier Programmabschnitten:

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. 4. Programmierung des LightCycler® Nano

Anmerkung:

Das Programm und die Standardwerte als „**Experiment file (Versuchsdatei)**“ 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 Geräts nachlesen). Die angegebene Leistung des Assays kann nur bei Verwendung mit den angegebenen PCR-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-Blut 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 7.8.1. Typische Amplifikationsdaten) 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

►	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 HT -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 des Röhrchens 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.

►	Die Standards für den WT - und den MT -Genotyp reichen für 40 Reaktionen.
	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 WT - und das MT -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** 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. 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 Folgendes hinzufügen:	66.0 µl
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 MTHFR-PCR-Produkt 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 H₂O mit PCR-Qualität als Negativkontrolle (NTC) hinzufügen 2 µl der HT Positivkontrolle hinzufügen
	Optional*: 2 µl des Standards für die Genotypisierung des WT hinzufügen 2 µl des Standards für die MT -Genotypisierung hinzufügen
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.

Das fertige Reaktionsgemisch nicht einfrieren. Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

Parameterspezifische Reagenzien (PSR)

Tägliche Verwendung. Nachdem sie verdünnt wurden, die PSR gekühlt (2 °C bis 8 °C) maximal 30 Tage lang aufbewahren. Eine längere Lichteinwirkung ist zu vermeiden.

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

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Das angesetzte FastStart-Mastermix (1a+1b) kann gekühlt (2 °C - 8 °C) 30 Tage lang aufbewahrt werden. Das angesetzte Mastermix nicht einfrieren.

Positivkontrolle und Standards für die Genotypisierung (= Kontrollen)

Tägliche Verwendung. Die gelösten Kontrollen sind gekühlt (2 °C - 8 °C) 30 Tage lang stabil. Um sie langfristig zu lagern, müssen sie eingefroren werden (-15 °C bis -25 °C) (180 Tage). Möglichst selten auftauen.

PROTOKOLLIEREN, wann die Lösung gelöst, angesetzt und wie sie gelagert wurde.

6.5. Laden von Kontrollen und Standards für Genotypisierung

Die Proben, die als Positionen 1 und 2 beschrieben sind, 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 derLightCycler® 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	MTHFR C677T Heterozygot
3	WT	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	MTHFR C677 Wildtyp
4	MT	530	Target 1	Standard für die Genotypisierung	MTHFR 677T Mutation

6.5.1. LightCycler® 480 Instrumente

Im Fenster „Sample Editor“ (Proben-Editor) im Bereich „Step 1: Select Workflow“ 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	MTHFR C677T Heterozygot
3	WT	Standard für die Genotypisierung	MTHFR C677 Wildtyp
4	MT	Standard für die Genotypisierung	MTHFR 677T Mutation

6.5.2. 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.

6.5.3. 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 Genregion MTHFR 677 spezifisch. Für die Genvarianten rs773410203, rs748571395 und rs772698730 ist die gleiche T_m (1 °C Unterschied für rs772698730) zu erwarten wie für das Risikoallel 677T. Die Allelhäufigkeiten liegen unter 1 von 100.000, so dass die Wahrscheinlichkeit, ein nicht vorhandenes Patientenrisiko zu befunden, sehr gering ist. Es besteht keine Gefahr, dass ein Patientenrisiko übersehen wird.

Es sind keine Interferenzen bekannt bzw. es wurden keine berichtet.

7.2. Kalibrierung

Die Kalibrierung muss wie in den Absätzen 6.5, 7.3.1, 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 7.6) 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 Abschnitte 7.3.5 und 7.6), 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 Abschnitt 6.5).

Alternativ müssen die Ergebnisse anhand der Schmelztemperaturen abgelesen werden (siehe Abschnitt 7.7).

7.3.2. DNA der Positivkontrolle

HT Positivkontrolle (Pflicht - Position 2).

Die Schmelzkurvenanalyse muss immer zwei Schmelzpeaks zeigen.

HT ahmt eine **heterozygote** klinische Probe nach.

Bezüglich der erwarteten Schmelztemperatur siehe **7.7 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 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 zeigen.

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

Bezüglich der erwarteten Schmelztemperatur siehe **7.7 Interpretation der Ergebnisse**.

7.3.4. Proben

Das Ergebnis 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 und in Kapitel **7.7 Interpretation der Ergebnisse** beschriebenen Akzeptanzkriterien 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 MgCl₂-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

Unerwartete Schmelzkurven können auf eine fehlerhafte Probenvorbereitung, auf einen Defekt im Produkt oder auf eine Variante in der Sondenbindungsregion zurückzuführen sein. In allen Fällen muss das gesamte Verfahren wiederholt werden (Probenvorbereitung, Amplifikation und Nachweis). Wenn auch dann wieder eine anormale Schmelzkurve erhalten wird, muss dann eine andere Methode zur Identifikation 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 **7.8.2 Seltenen 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 LightCycler® 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.

7.4.1. LightCycler® 480 Instrumente

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

7.5. Lesen der Ergebnisse

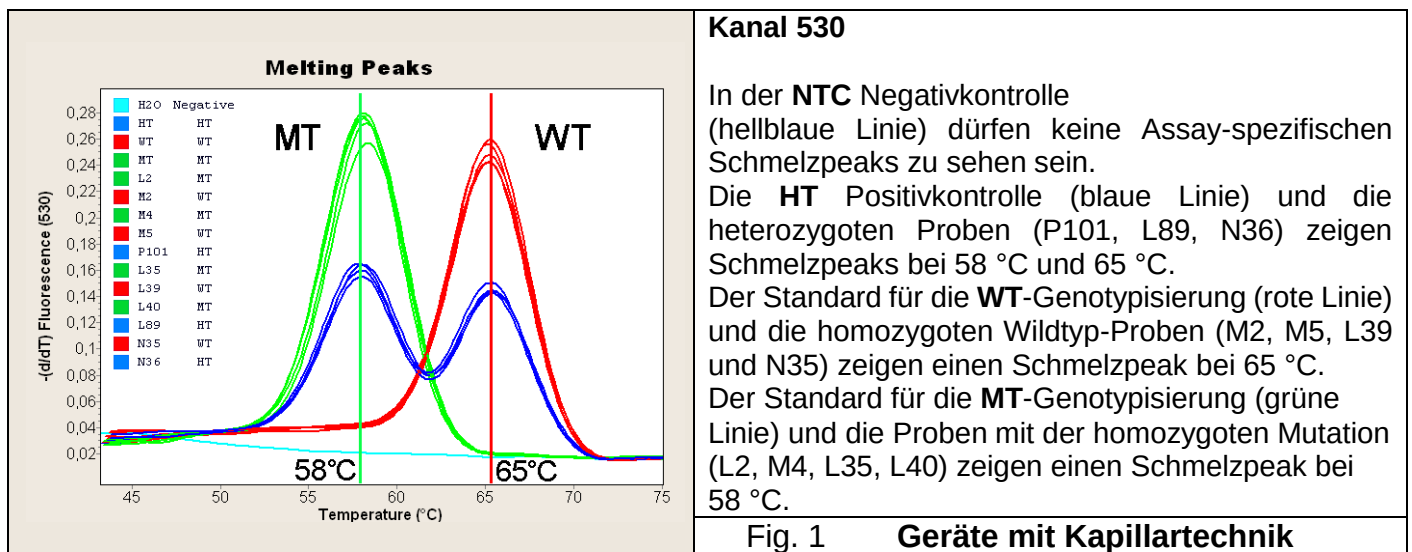
Die Schmelzpeaks unterscheiden zwischen den Genotypen: heterozygot, Wildtyp und Mutation.



Die Anwendung des Genotypisierungsmoduls, das der LightCycler® 2.0 und die LightCycler® 480-Software bieten, ist optional. 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 in Kapitel 7.7. **Interpretation der Ergebnisse** vergleichen.

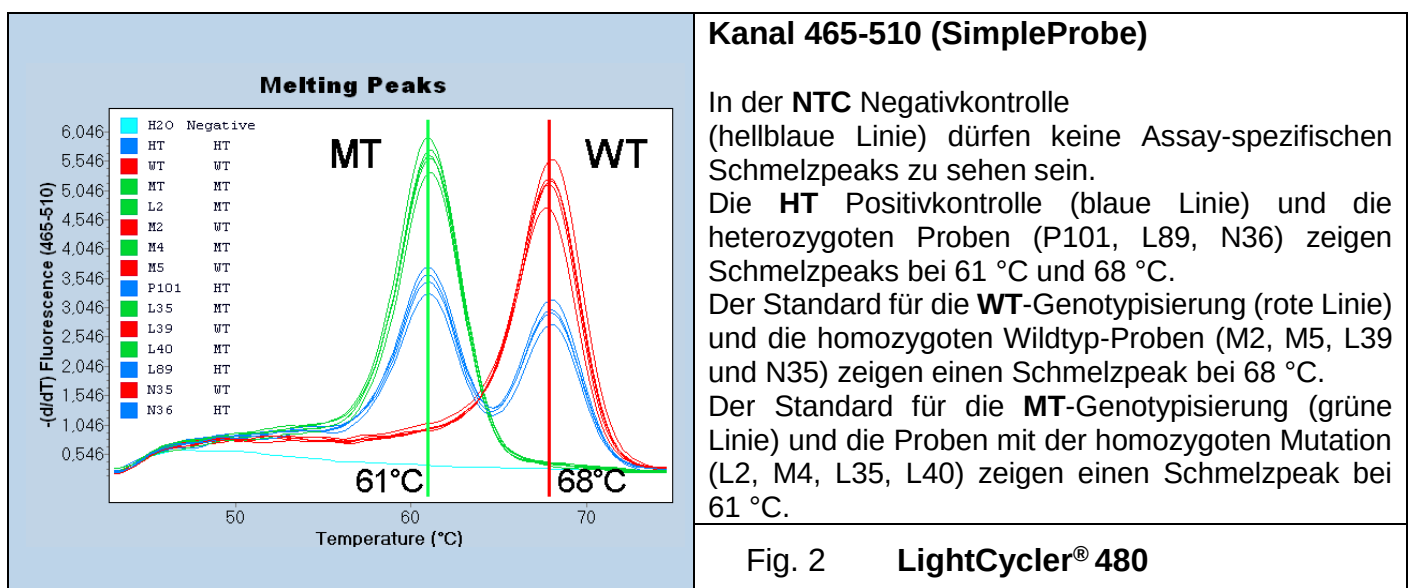
7.5.1. Schmelzanalyse: Geräte mit Kapillartechnik

Die Schmelzdaten im Kanal 530 ansehen (Kanal F1 bei LC1.x, Softwareversion 3.5.3).



7.5.2. Schmelzanalyse: Geräte vom Typ 480 von Roche

Die Schmelzdaten im Kanal SimpleProbe ansehen.

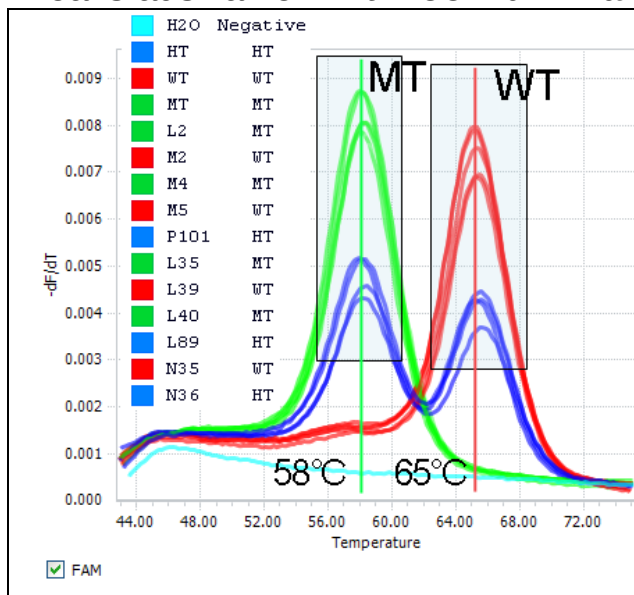


7.5.3. Schmelzanalyse: LightCycler® 96

Analyse hinzufügen: **Tm Calling**

Daten ansehen in: **Schmelzpeak**

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



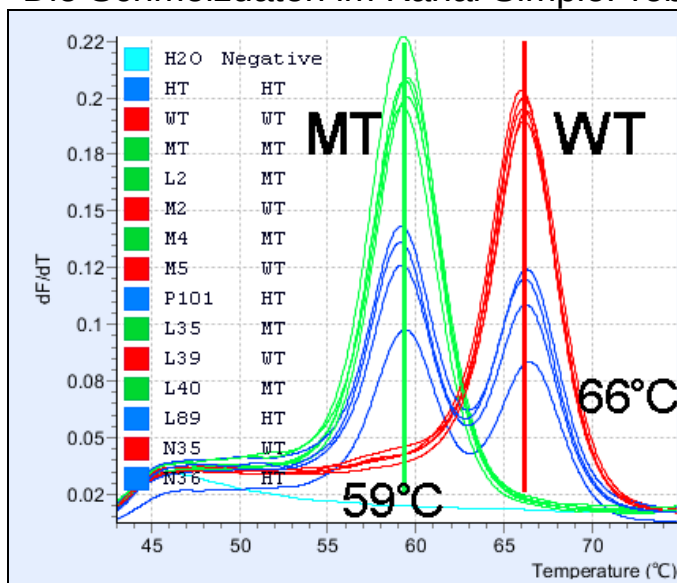
Kanal FAM

In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **HT** Positivkontrolle (blaue Linie) und die heterozygoten Proben (P101, L89, N36) zeigen Schmelzpeaks bei 58 °C und 65 °C. Der Standard für die **WT**-Genotypisierung (rote Linie) und die homozygoten Wildtyp-Proben (M2, M5, L39 und N35) zeigen einen Schmelzpeak bei 65 °C. Der Standard für die **MT**-Genotypisierung (grüne Linie) und die Proben mit der homozygoten Mutation (L2, M4, L35, L40) zeigen einen Schmelzpeak bei 58 °C.

Fig. 3 **LightCycler® 96**

7.5.4. Schmelzanalyse: LightCycler® Nano

Die Schmelzdaten im Kanal SimpleProbe ansehen.



Kanal 530 (FAM)

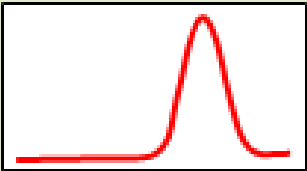
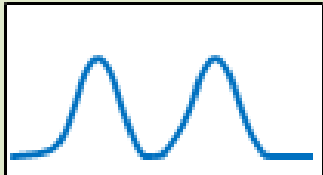
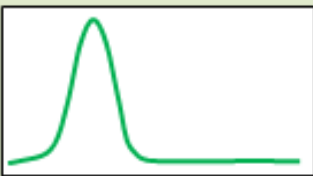
In der **NTC** Negativkontrolle (hellblaue Linie) dürfen keine Assay-spezifischen Schmelzpeaks zu sehen sein. Die **HT** Positivkontrolle (blaue Linie) und die heterozygoten Proben (P101, L89, N36) zeigen Schmelzpeaks bei 59 °C und 66 °C. Der Standard für die **WT**-Genotypisierung (rote Linie) und die homozygoten Wildtyp-Proben (M2, M5, L39 und N35) zeigen einen Schmelzpeak bei 66 °C. Der Standard für die **MT**-Genotypisierung (grüne Linie) und die Proben mit der homozygoten Mutation (L2, M4, L35, L40) zeigen einen Schmelzpeak bei 59 °C.

Fig. 4 **LightCycler® Nano**

7.6. Erwartete Schmelztemperaturen und Ergebnisse

Genotyp ►	MTHFR 677C/C	heterozygot MTHFR 677C/T	homozygote Mutation MTHFR 677T/T
Anzahl der Schmelzpeaks	1	2	1
Schmelztemperaturen	ein hoher Tm-Peak 65-68 °C	zwei Peaks 58-61 und 65-68 °C	ein niedriger Tm-Peak 58-61 °C
Temperaturunterschied	---	7 °C	---
Phänotyp	In der Bevölkerung normales Risiko	In der Bevölkerung normales Risiko sofern nicht mit anderen Risikofaktoren kombiniert	Hyperhomocysteinämie

7.7. Interpretation der Ergebnisse

MTHFR C677T Kanal 530 Schmelzpeak(s)		MTHFR-Genotypen	Metabolizer Phänotyp
677T	C677		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Wildtyp MTHFR 677 C/C	In der Bevölkerung normales Risiko
-	65-68		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Heterozygot MTHFR 677 C/T	In der Bevölkerung normales Risiko (sofern nicht mit anderen Risikofaktoren kombiniert)
58-61	65-68		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Homozygote Mutation MTHFR 677 T/T	Hyperhomocysteinämie
58-61	-		
ΔTm 7 °C		Tab. 8. Typische Analyseergebnisse	



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 den Schmelzpeaks der heterozygoten Proben
±1,5 °C	zwischen den Schmelzpeaks mit demselben Genotyp in verschiedenen Läufen
±5,0 °C	zwischen den oben angegebenen Temperaturen und den mit den Geräten vor Ort ermittelten Werten. Diese Abweichung ist geräteabhängig: Immer die Temperatur als Referenz verwenden, die mit der im Lauf enthaltenen HT Positivkontrolle erhalten wurde.

7.8. Zusätzliche Informationen

7.8.1. 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. 5).

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 LC 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:

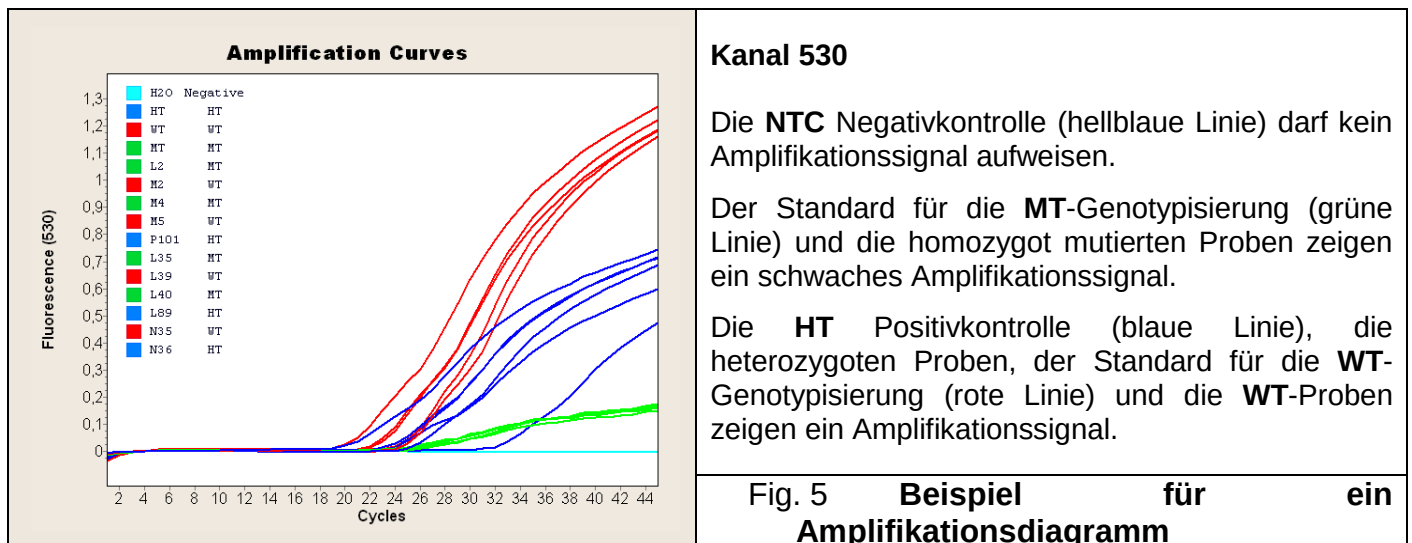
Die Amplifikation im Analysemodus „Abs Quant“ ansehen.

LC Nano:

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

LC1.x, Softwareversionen 3.5:

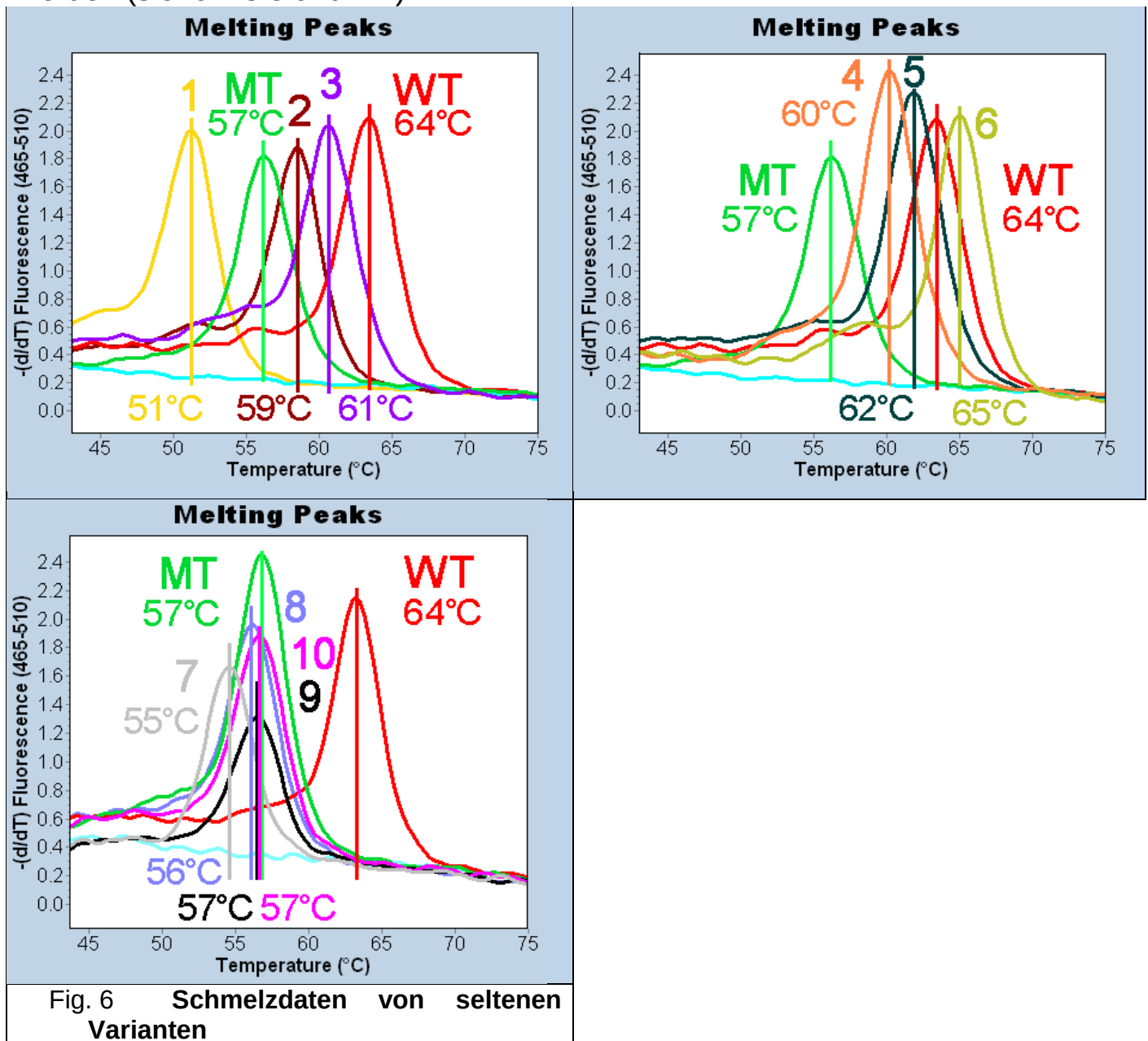
Die Amplifikation im Fluoreszenzkanal F1 Modus „Quantification – Second Derivative Maximum“ (Quantifizierung - Maximum 2. Ableitung) ansehen.



7.8.2. Seltene Varianten

Die in diesem Produkt verwendeten Sequenzen sind so gestaltet, dass Interferenzen mit anderen bekannten Genvarianten vermieden werden. Neue Varianten erzeugen normalerweise einen anderen T_m-Peak als WT oder MT. Um zu demonstrieren, dass der Test den richtigen Genotyp unterscheiden kann, werden synthetische Targets verwendet, die alle in der GeneBank (Jan-2015) vorhandenen Varianten nachahmen. Die absoluten T_m-Werte, die mit synthetischen Targets erzielt werden, können sich von denen aus biologischen Proben unterscheiden, der **relative ΔT_m-Wert muss jedoch konstant bleiben**.

Dieses Kit ist nicht dazu bestimmt, andere als die in Abschnitt **1.2 Verwendungszweck** genannten Varianten zu identifizieren. Zur Identifikation von Sequenzen mit anormalen Schmelzpeaks muss eine andere Methode verwendet werden (siehe 7.3.5 und 7.7).



Nr.	RS	Tm	Name	HGVS	MAF
WT		64 °C	Wildtyp		
MT	rs1801133	57 °C	C677T	NM_005957.4:c.665C>T	A = 0,2454
1	rs1801133 + rs774825800	51 °C		NM_005957.4:c.665C>T NM_005957.4:c.681G>A	1R
2	rs774825800	59 °C	G693A	NM_005957.4:c.681G>A	T = 0,0001, 1R
3	rs150847674	61 °C	G679A	NM_005957.4:c.667G>A	T = 0,0008
4	rs45438591	60 °C	G673A	NM_005957.4:c.661G>A	T = 0,000008
5	rs141060174	62 °C	G672A	NM_005957.4:c.660G>A	T = 0,00008, 1R
6	rs200100285	65 °C	A685G	NM_005957.4:c.673A>G	C = 0,0002
7	rs776956662	55 °C	C678T	NM_005957.4:c.666C>T	A = 0,00002
8	rs772698730	56 °C	C690A	NM_005957.4:c.678C>A	T = 0,000008
9	rs773410203	57 °C	A688G	NM_005957.4:c.676A>G	C = 0,000008
10	rs748571395	57 °C	C692T	NM_005957.4:c.680C>T	A = 0,000008

MAF = Minor Allel 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 (T_m) wurden unter Verwendung von synthetischen Targets erhoben.

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

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-µl-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) Rosenblatt, D. S.; Lue-Shing, H.; Arzoumanian, A.; Low-Nang, L.; Matiaszuk, N.
Methylenetetrahydrofolate reductase (MR) deficiency: thermolability of residual MR activity, methionine synthase activity, and methylcobalamin levels in cultured fibroblasts.
Biochem. Med. Metab. Biol. 47: 221-225, 1992
- 2) Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C. A.; Matthews, R. G.; Boers, G. J. H.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L. A. J.; van den Heuvel, L. P.; Rozen, R.
A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.
Nat Genet 10: 111-113, 1995
- 3) Kluijtmans, L. A. J.; van den Heuvel, L. P. W. J.; Boers, G. H. J.; Frosst, P.; Stevens, E. M. B.; van Oost, B. A.; den Heijer, M.; Trijbels, F. J. M.; Rozen, R.; Blom, H. J.
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.
Am J Hum Genet 58: 35, 1996
- 4) Keijzer, M. B. A. J.; den Heijer, M.; Blom, H. J.; Bos, G. M. J.; Willems, H. P. J.; Gerrits, W. B. J.; Rosendaal, F. R.
Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis.
Thromb. Hemost. 88: 723-728, 2002
- 5) Quian, X., Lu, Z., Tan, M. et al.
A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension.
European Journal of Human Genetics 15, 1239-1245, 2007

Klassifizierung / Referenz

Referenz	Klassifizierung
EDMA	16 01 04 90 00
CPV	33694000-1
EAN	4260159332230
Roche SAP-Nr.	06896367001

Hinweis für den Käufer - Patente und Warenzeichen

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

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

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

Verwandte/ähnliche Produkte

Das gleiche Reagenz ist in vorpipettierten 8-Well-Streifen erhältlich: Kit 40-2129-64.

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

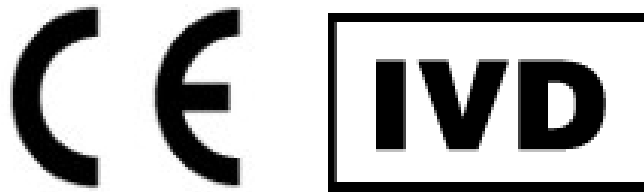
Rot gekennzeichnete Änderungen sind mit einer Änderung der Labortechniken verbunden

Blau gekennzeichnete Änderungen sind Verbesserungen und Änderungen in der Zusammensetzung

Version	Änderung	Datum
V120504	Erste Ausgabe (SimpleProbe-Format)	04.05.2012
V121024	LightCycler® 96 wurde aufgenommen. Einstellung des Reaktionsvolumens für LightCycler® 480 hinzugefügt (Abs. 5.3). Genaue Vorgaben für die Lagerung der PSR (Abs. 6.4) Anleitung, wenn Modul für automatisierte Genotypisierung versagt (7.3.1).	24.10.2012
V130704	MagNa Pure 96 und MagNa Pure Compact wurden aufgenommen. Anleitung, wenn Modul für automatisierte Genotypisierung versagt (7.5.2).	04.07.2013
V131211	Abschnitt 7.7 Schmelzpeak-Ergebnisse für seltene Varianten eingefügt. Redaktionelle Änderungen.	11.12.2013
V150101	Abschnitt 5.4 Geräteeinstellungen LC96	11.01.2015
V160101	„Zusätzliche Informationen“ (7.8) eingefügt. HGVS-Codes aufgenommen (7.8.2).	01.01.2016
V170303	7.1 Andere Varianten 7.3.1 Ausformulierung 7.8.2 MAFs aktualisiert, Positionen bzgl. 677	20.10.2017
V190123	Disclaimer aufgenommen (7.8.2).	07.02.2019

Hergestellt von:

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



4260159332230