

MutaREAL[®] HFE

Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der drei wichtigsten Mutationen
(C282Y, H63D und S65C) des Hämochromatose
(HFE)-Gens*

*For the analysis of the three most important mutations
(C282Y, H63D and S65C) of the haemochromatosis
(HFE) gene*

Gültig ab / Valid from 2024-02-16



KF291032
KF291096



32/96



-20°C



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	2
2	EINLEITUNG	2
3	TESTPRINZIP	2
4	INHALT DER TESTPACKUNG	3
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	3
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	3
8	PROBENMATERIAL	5
9	REAL-TIME-PCR	5
	9.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	9.2 <i>Durchführung</i>	5
	9.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	7
10	ANALYSE DER ERGEBNISSE	7
11	PROBLEMBEHANDLUNG	11
12	GRENZEN DES TESTS	11
13	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	12
14	LITERATUR	12

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaREAL® HFE Real-Time-PCR-Kit ist ein FRET-basierter molekularbiologischer Test für die Untersuchung der Mutationen C282Y, H63D und S65C im HFE Gen.

2 EINLEITUNG

Primäre Hämochromatose ist eine vererbte Krankheit, bei der es zu einer übermäßigen Aufnahme von Eisen in den Körper kommt. Dies kann unter anderem zu Leberschäden, Diabetes und Herzproblemen führen.

Mutationen in dem Gen für HFE können zu Hämochromatose führen. Wildtypisches HFE interagiert mit β 2-Mikroglobulin und reguliert die Eisenaufnahme über den Transferrin-Rezeptor. Bei einer HFE Mutation kann die Eisenaufnahme gestört sein, wodurch sich Eisen im Körper ansammelt. Homozygotes sowie, in selteneren Fällen, auch heterozygotes Vorliegen von Mutationen können zu einem Ausbruch der Krankheit führen. [1]

3 TESTPRINZIP

Der sequenzspezifische MutaREAL® HFE Real-Time-PCR-Kit basiert auf dem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Der Assay beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und zwei Hybridisierungssonden, die an die Zielsequenzen binden. Die Menge hybridisierter Sonde und damit das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge des amplifizierten PCR Produktes. Hierbei ist das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des PCR Produktes.

Die Genotypisierung wird nach Abschluss der Amplifikation durch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wird nach einem Denaturierungsschritt die Temperatur langsam erhöht und unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz das Dissoziationsverhalten der Hybridisierungssonden erfasst. Die Hybridisierungssonden binden an dem Teil der Zielsequenz, der bei Wildtyp und der Mutation vorliegt. Bei steigender Temperatur dissoziieren die fehlgepaarten und damit weniger stabilen Sonden zuerst und die Fluoreszenz nimmt ab. Die perfekt gepaarten Hybridisierungssonden dissoziieren aufgrund ihrer höheren Bindungsenergie erst später und somit nimmt das Fluoreszenzsignal erst bei einer höheren Temperatur ab.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF290732) oder 96 (KF290796) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaREAL® HFE Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Detektionsmix 1 (C282Y)	gelb	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Detektionsmix 2 (H63D & S65C)	weiß	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Positive Kontrolle 1 (H63D & C282Y)	rot	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive Kontrolle 2 (S65C)	orange	1 x 15 µl	1 x 45 µl
Negative Kontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 150 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Offenes Real-Time-PCR-System (mit Platten/Streifen oder Tubes)
- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaREAL® HFE Real-Time-PCR-Kits erfolgt gefroren auf Trockeneis oder Kühlakkus. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei mindestens -20 °C zu lagern. Mehr als 4 Frier-Auftau-Zykeln sind zu vermeiden (wenn nötig, Aliquots herstellen). Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch können die Detektionsmische für bis zu 3 Monaten bei +4 bis +8 °C gelagert werden.

Schützen Sie die Detektionsmische unbedingt während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.

- Alle Proben müssen als potentiell infektiös und/oder biogefährdend betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Die Real-Time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmalschutzhandschuhe zu tragen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierte Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Alle PCR-Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen

8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaREAL® HFE Real-Time-PCR-Kit ist genomische DNA, die mittels eines geeigneten Extraktionskits aus klinischen Proben (Blut) isoliert wurde.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf alle Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien schonend aufgetaut, gründlich gemischt (nicht vortexen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Die Detektionsmixe vor Lichteinwirkung schützen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien und den Ansatz während des Arbeitens stets in einem Kühlblock (+4 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

9.2 Durchführung

Für die Amplifikation werden zwei Reaktionsgefäße pro Probe und zwei bzw. drei zusätzliche Reaktionsgefäße pro Mastermix für die negative und die positive Kontrolle benötigt.

Detektionsmix 1 (C282Y)

- Den Detektionsmix 1 (**gelb**) vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Detektionsmix 1 (**gelb**) vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (**rot**) dazugeben.

- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Detektionsmix 2 (H63D & S65C)

- Den Detektionsmix 2 (**weiß**) vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Detektionsmix 2 (**weiß**) vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positiven Kontrolle je **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (**rot**) und 2 (**orange**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Die PCR-Reaktionsgefäße verschließen, sorgfältig durchmischen und kurz abzentrifugieren. Anschließend in das Real-Time PCR-Gerät überführen und das unter 9.3 beschriebene PCR-Programm starten.

9.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-PCR das in Tabelle 2 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 2: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	180 s	95 °C	1	keine
Denaturierung	10 s	95 °C	45	keine
Primer Anlagerung	15 s	53 °C		Single
Elongation	15 s	72 °C		keine
Schmelzkurve	20 s	94 °C	1	keine
	20 s	40 °C	1	keine
	0 s	75 °C	1	Konstant
Kühlen	30 s	40 °C	1	-

10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Schmelzkurven eine Analyse des Typs „Genotypisierung“ hinzufügen. Hierdurch wird die Ableitung der Fluoreszenzkurve gebildet. Die Detektionswellenlänge ist 530 nm für alle drei Mutationen.

H63D und S65C:

Für H63D ist die Sonde derart gestaltet, dass die H63D Mutation genau auf die Mutation passt und einen Mismatch beim Wildtyp aufweist. Zusätzlich ist die Sonde derart entworfen, dass der S65C Genotyp bei 47 °C detektiert wird. Im sehr seltenen Fall heterozygoter Mutationen von H63D und S65C entsteht kein Wildtyp-Peak, da aufgrund der eingesetzten Simple-Probe Verfahrens und der räumlichen Nähe dieser beiden Mutationen nur die genau passenden Mut-Sonden binden können. Der Wildtyp-Sonde bleibt der „Zugang“ verwehrt. Dennoch entsteht ein Resultat wie bei einer (bislang nicht beschriebenen) homozygoten Doppelmutation aus H63D + S65C.

Aufgrund des Basenunterschied von nur 4 bp bei den SNPs für H63D und S65C muss eine gemeinsame Sonde für beide SNPs eingesetzt werden. Dies führt bei der sehr seltenen Kombination eines jeweils heterozygoten H63D- und S65C-Allelträger zu einem Wegfall des Wildtyp Peaks, da die FRET Technologie nur zwei Mutations-Peaks generiert. Da dieses Schmelzprofil dann wie ein homozygoter H63D- und S65C-Allelträger aussieht, wird eine Stufendiagnostik dieser Probe empfohlen, (z.B. durch Sequenzierung) um eine Ho-

mozygotie des jeweiligen SNPs auszuschließen. Andererseits ist aber bislang ein solcher doppelt homozygoter Genotyp noch nicht beschrieben worden.

Die Abbildungen 1-3 zeigen typische Beispiele homozygoter und heterozygoter Proben. Die Temperaturen sollten sich in diesem Bereich $\pm 2^\circ\text{C}$ befinden:

H63D & S65C

Temperatur Mutations-Allel (S65C): $47,0^\circ\text{C}$ ($\pm 2^\circ\text{C}$)

Temperatur Wildtyp-Allel: $52,0^\circ\text{C}$ ($\pm 2^\circ\text{C}$)

Temperatur Mutations-Allel (H63D): $61,0^\circ\text{C}$ ($\pm 2^\circ\text{C}$)

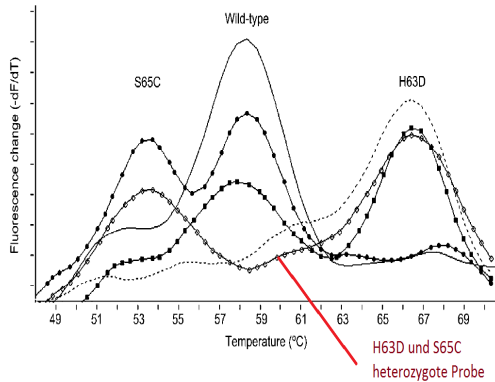


Abb. 1: Beispielbild aus *Clin Chem Lab Med* 2008;46(7):985–986 mit allen bekannten Genotypen bei der H63D und S65C Analyse mittels des SimpleProbe-Verfahrens.

Die folgenden Abbildungen 2 zeigen die typischen Ergebnisse für einige der möglichen Genotypen für H63D.

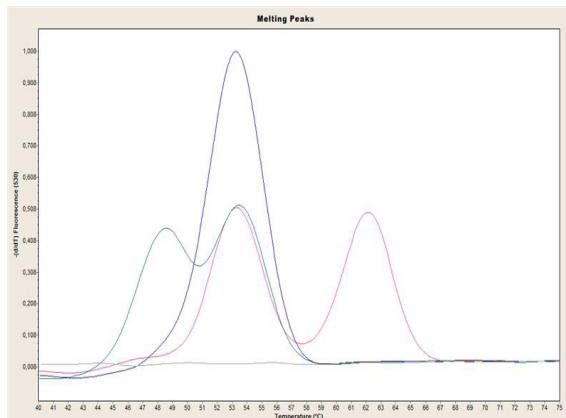


Abb. 2: Auswertung zu den Mutationen H63D & S65C auf einem Roche LightCycler® 2.0.

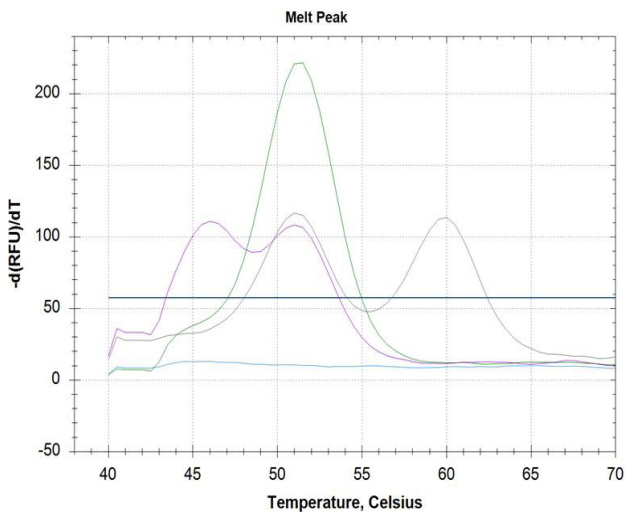


Abb. 3: Auswertung zu den Mutationen H63D & S65C auf einem Bio-Rad CFX Opus 96.

C282Y

Temperatur Wildtyp-Allel: 60,0°C (+/-2°C)

Temperatur Mutations-Allel: 49,0°C (+/-2°C)

Die folgenden Abbildungen zeigen die typischen Ergebnisse für einige der möglichen Genotypen für C282Y.

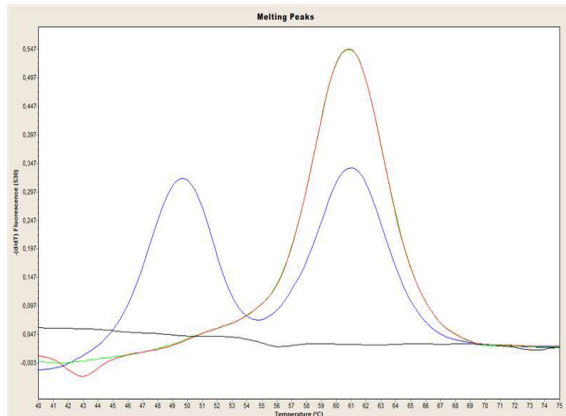


Abb. 4: Auswertung zur Mutation C282Y auf einem Roche LightCycler® 2.0.

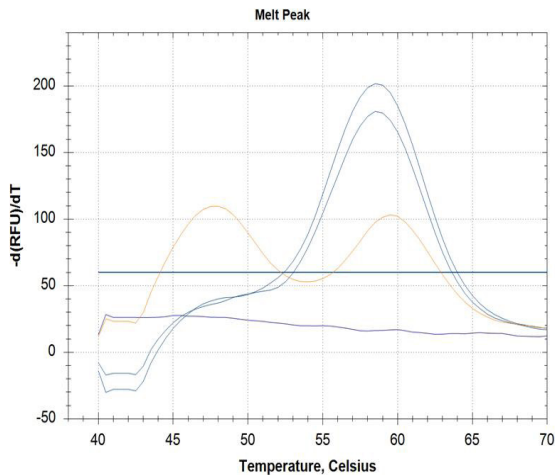


Abb. 5: Auswertung zur Mutation C282Y auf einem Roche LightCycler® 2.0.

Die mitgelieferte Positivkontrolle 1 (**rot**) enthält ein Template das für die Mutationen **H63D & C282Y heterozygot** ist. Die Positivkontrolle 2 (**orange**) enthält ein Template das für die Mutation **S65C heterozygot** ist.

11 PROBLEMBEHANDLUNG

Folgende Problembeschreibung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-Time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik AG.

Keine oder schwache Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben.

Überprüfung des PCR Programms des Real-Time-PCR Systems und Wiederholung der Analyse mit dem korrigierten Protokoll.

Die Detektionsmische wurden mehr als vier Gefrierzyklen unterzogen oder wurde länger als 3 Monate bei 2 - 8°C gelagert. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Detektionsmix.

Die Qualität der Ausgangs-DNA ist nicht ausreichend. Nutzen Sie frisch extrahierte DNA und bestimmen Sie die Konzentration/Reinheit vor der Nutzung.

Die Detektions Mische wurden nicht vor Lichteinwirkung geschützt. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuen PCR Reagenzien.











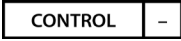




12 GRENZEN DES TESTS

Das Ergebnis wird dem behandelnden Arzt als unterstützendes Material zur Verfügung gestellt und sollte niemals ausschließlich zur Diagnostik oder zu Behandlungsempfehlungen herangezogen werden. Die Diagnose sowie die einzuleitenden Behandlungsentscheidungen bleiben in der vollen Verantwortung des Arztes.

Die Genauigkeit von genetischen Tests beträgt nicht 100%. Es wurde jedoch eine Genauigkeit von über 98% basierend auf den Validierungsdaten für diesen Test festgestellt. Weiterhin müssen Ergebnisse von genetischen Tests im Kontext der klinischen Repräsentation des Patienten sowie bekannten familiären Risiken im Umfeld des Patienten betrachtet werden.

Der Test analysiert nur eine Auswahl an Markern. Beim Nachweis von Allelen ist der untersuchte Polymorphismus angegeben. Andere seltene Allele können vorliegen und werden mit dieser Methode nicht abgedeckt. Daher schließt ein negatives Testergebnis des Patienten ein Risiko jedweder Art nicht vollständig aus.

13 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure		Katalognummer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Zu verwenden mit
	Detektionsmix 1		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Detektionsmix 2		Obere Temperaturgrenze
	Positive Kontrolle 1		Hersteller
	Positive Kontrolle 2		Chargennummer
	Negative Kontrolle		Arbeitsanleitung beachten
	<i>In-vitro</i> Diagnostikum		Inhalt
	Verwendbar bis JJJJ-MM-TT		

14 LITERATUR

1. Robson et al. (2000) DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF HAEMOCHROMATOSIS SINCE THE DISCOVERY OF THE HFE GENE: A EUROPEAN EXPERIENCE, British Journal of Haematology, 2000, 108, 31±39

MutaREAL[®] HFE

Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the three most important mutations
(C282Y, H63D and S65C) of the haemochromatosis
(HFE) gene*

Valid from 2024-02-16



KF291032
KF291096



32/96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	17
2	INTRODUCTION	17
3	PRINCIPLE OF THE TEST	17
4	PACKAGE CONTENTS	17
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	18
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	18
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	18
8	SAMPLE MATERIAL	19
9	REAL-TIME-PCR	19
	9.1 <i>Important points before starting</i>	19
	9.2 <i>Procedure</i>	20
	9.3 <i>Instrument settings</i>	21
10	DATA ANALYSIS	21
11	TROUBLESHOOTING	25
12	LIMITATIONS OF THE METHOD	25
13	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	26
14	LITERATURE	26

1 INTENDED USE

The MutaREAL® HFE Real-Time PCR Kit is a FRET-based molecular biology test for the investigation of the point mutations C282Y, H63D and S65C in the HFE gene.

2 INTRODUCTION

Primary haemochromatosis is an inherited disease in which there is excessive absorption of iron into the body. absorption of iron into the body. This can lead to liver damage, diabetes and heart problems, among other things, diabetes and heart problems. Mutations in the gene for HFE can lead to haemochromatosis. Wild-type HFE interacts with β 2-microglobulin and regulates iron uptake via the transferrin- receptor. In the case of an HFE mutation, iron uptake can be impaired, causing iron to accumulate in the body. iron accumulates in the body. Homozygous as well as, in rarer cases, also heterozygous presence of mutations can lead to an outbreak of the disease. [1]

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The sequence-specific MutaREAL® HFE real-time PCR kit is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). The assay contains two specific primers that flank the target sequence and two hybridisation probes that bind to the target sequences. The amount of hybridised probe and thus the fluorescence signal increases with the amount of amplified PCR product. The fluorescence signal is proportional to the amount of PCR product.

Genotyping is carried out after completion of the amplification by means of a melting curve analysis. For this purpose, the temperature is slowly increased after a denaturation step and the dissociation behaviour of the hybridisation probes is recorded while continuously measuring the fluorescence. The hybridisation probes bind to the part of the target sequence that is present in the wild type and the mutation. As the temperature increases, the mismatched and therefore less stable probes dissociate first and the fluorescence decreases. The perfectly paired hybridisation probes dissociate later due to their higher binding energy and therefore the fluorescence signal only decreases at a higher temperature.

4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF290732) or 96 (KF290796) reactions.

Table 1: Components of the MutaREAL® HFE Real-Time-PCR Kit .

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Detection mix 1 (C282Y)	yellow	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Detection mix 2 (H63D & S65C)	white	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Positive control 1 (H63D & C282Y)	red	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive control 2 (S65C)	orange	1 x 15 µl	1 x 45 µl
Negative control	green	1 x 150 µl	1 x 150 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA extraction kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Open real-time PCR system (with plates/strips or tubes)
- Sterile reaction tubes
- Calibrated pipettes (variable volumes) and sterile disposable tips with filter
- Optional: Liquid handling system for automation

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaREAL® HFE real-time PCR kit is transported frozen on dry ice or cool packs. All components are to be stored protected from light at a minimum of -20 °C immediately after receipt. Avoid more than 4 freeze-thaw cycles (if necessary, make aliquots). Do not use after the expiry date indicated on the package.

After opening, the detection mixes can be stored at +4 to +8 °C for up to 3 months. Be sure to protect the detection mixes from direct sunlight during the entire test procedure.

7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the instructions for use carefully before using the product.

- All samples must be considered potentially infectious and/or biohazardous and all items that come into contact with the specimens must be considered potentially contaminated.
- Real-time PCR must be performed in laboratories suitable for this purpose and by specially trained personnel.
- The assay must always be carried out according to the instructions supplied with the kit.

- Areas for sample preparation and preparation of the PCR master mix should be strictly separated.
- Pipettes, tubes and other working materials must not circulate from one area to the other.
- Always use pipette tips with filters.
- Always wear powder-free disposable gloves when using the kit
- Clean pipettes and work surfaces regularly with suitable decontamination solution (no ethanol-containing agents).
- Contamination of eluates and kit components with microbes or nucleases (RNAs and DNAses) should be avoided.
- Positive and potentially positive material must be kept separate from all other kit components at all times.
- Do not open reaction tubes/plates after amplification in order to avoid contamination.
- In accordance with guidelines or requirements of local, state or federal regulations or authorised organisations, additional controls may be tested.
- Do not autoclave reaction tubes after PCR as this will not degrade the amplified nucleic acid and risks contaminating the laboratory area.
- Dispose of samples and test waste according to your local safety regulations.
- Refrigerate all PCR reagents while working.
- The purity (A260/A280) of the genomic DNA should be between 1.8 and 2.0.

8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaREAL® HFE real-time PCR kit is genomic DNA isolated from clinical samples (blood) using a suitable extraction kit.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.
- Before setting up the Real-Time-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run all Positive Controls and one Negative Control should be included.

- Before each use, all reagents must be gently thawed, thoroughly mixed (do not vortex) and briefly centrifuged.
- Protect the detection mixes from exposure to light.
- We recommend always cooling the reagents and the preparation in a cooling block (+4 to +8 °C) or on ice while working.

9.2 Procedure

For amplification, two reaction tubes are needed per sample plus two or three additional reaction tubes per detection mix for the negative and the positive controls.

Detection mix 1 (C282Y)

- Mix the Detection Mix 1 (**yellow**) carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Detection Mix 1 (**yellow**) to each reaction tube.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control 1 (**red**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding reaction tube.

Detection mix 2 (H63D & S65C)

- Mix the Detection Mix 2 (**white**) carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Detection Mix 2 (**white**) to each reaction tube.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** each of the supplied positive control 1 (**red**) and 2 (**orange**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding reaction tube.

Close the reaction tubes, mix carefully and shortly spin down. Then transfer to the real-time device and start the PCR protocol described in 9.3.

9.3 Instrument settings

For the Real-Time-PCR use the thermal profile shown in table 2.

Table 2: Real-Time-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	180 s	95 °C	1	none
Denaturation	10 s	95 °C	45	none
Primer annealing	15 s	53 °C		single
Elongation	15 s	72 °C		none
Melting curve	20 s	94 °C	1	none
	20 s	40 °C	1	none
	0 s	75 °C	1	constant
Cooling	30 s	40 °C	1	-

10 DATA ANALYSIS

Add an analysis of the type „genotyping“ for the evaluation of the melting curves. This forms the derivation of the fluorescence curve. The detection wavelength is 530 nm for all three mutations.

H63D and S65C

For H63D, the probe is designed in such a way that the H63D mutation exactly matches the mutation and has a mismatch with the wild type. In addition, the probe is designed to detect the S65C genotype at 47 °C.

In the very rare case of heterozygous mutations of H63D and S65C, there is no wild-type peak, because due to the Simple-Probe method used and the spatial proximity of these two mutations, only the exactly matching mutation probes can bind. The „access“ for the wild-type probe is denied. Nevertheless, the result is similar to that of a (not described so far) homozygous double mutation of H63D + S65C.

Due to the base difference of only 4 bp in the SNPs for H63D and S65C, a joint probe must be used for both SNPs. The very rare combination of a heterozygous H63D and S65C allele carrier leads to an omitted wild-type peak, because the FRET technology only generates two mutation peaks. Since this melting profile then looks like a homozygous H63D- and S65C- allele carrier a stepwise diagnosis of this sample is recommended, (e.g. through sequencing) to exclude homozygosity of the respective SNP.

On the other hand, such a double homozygous genotype has not yet been described.

Figures 1-3 show typical examples of homozygous and heterozygous samples. Temperatures should be in the range ± 2 °C:

H63D & S65C

Temperature mutation allele (S65C): 47.0 °C (± 2 °C)

Temperature wild type allele: 52.0 °C (± 2 °C)

Temperature mutation allele (H63D): 61.0 °C (± 2 °C)

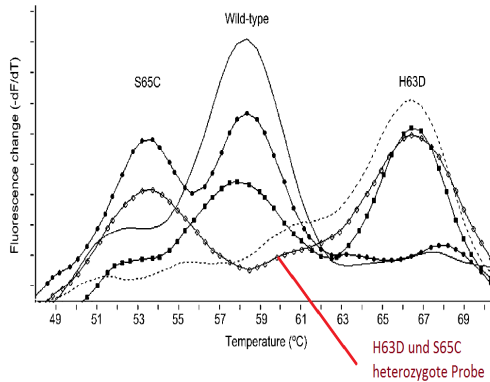


Fig. 1: Example figure from *Clin Chem Lab Med* 2008;46(7):985-986 showing all known genotypes in H63D and S65C analysis using the SimpleProbe method.

The following figures show the typical results for some of the possible genotypes for H63D.

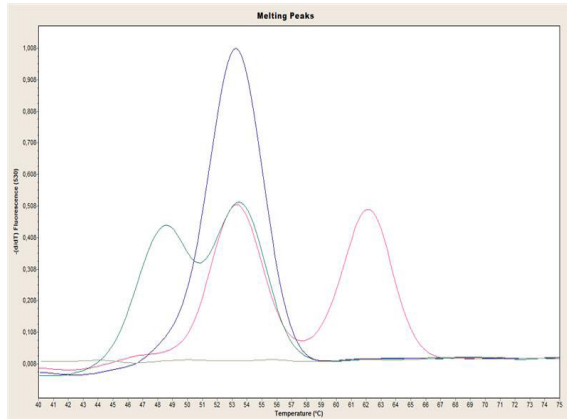


Fig. 2: Evaluation of the mutations H63D & S65C on a Roche LightCycler® 2.0.

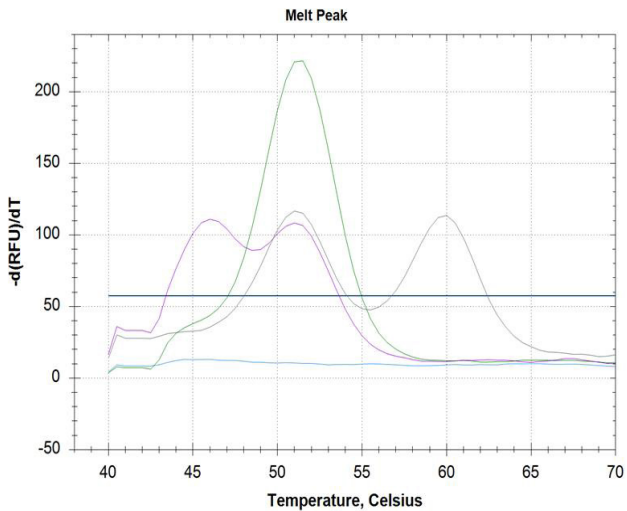


Fig. 3: Evaluation of the mutations H63D & S65C on a Bio-Rad CFX Opus 96.

C282Y

Temperature wild type allele: 60.0°C (+/-2°C)

Temperature mutation allele: 49.0°C (+/-2°C)

The following figures show the typical results for some of the possible genotypes for C282Y.

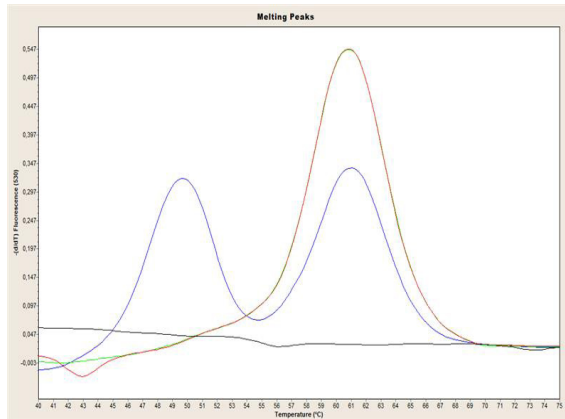


Fig. 4: Evaluation of the mutation C282Y on a Roche LightCycler® 2.0.

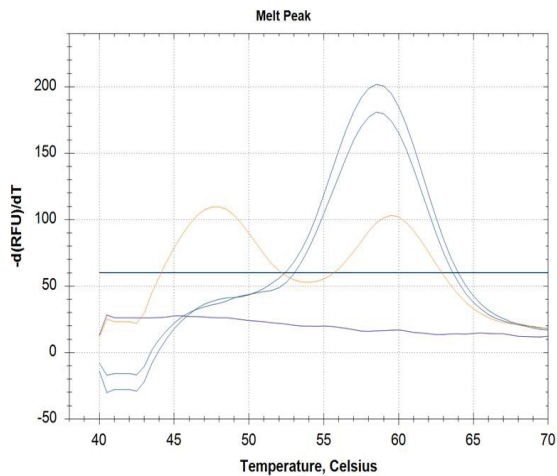


Fig. 5: Evaluation of the mutation C282Y on a Bio-Rad CFX Opus 96.

The supplied positive control 1 (**red**) contains a template that is **heterozygous** for the mutations **H63D & C282Y**. The positive control 2 (**orange**) contains a template that is **heterozygous** for the mutation **S65C**.

11 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a Real-Time-PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on info@immundiagnostik.com.

No or weak fluorescence in the positive control or samples.

Check the PCR programme of the real-time PCR system and repeat the analysis with the corrected protocol.

Detection mixes have been subjected to more than four freeze cycles or have been stored at 2-8°C for more than 3 month. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new detection mix.

The quality of the starting DNA is not sufficient. Use freshly extracted DNA and determine the concentration/purity before use.

The detection mixes were not protected from light exposure. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new PCR reagents.











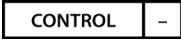




12 LIMITATIONS OF THE METHOD

The result is provided to the treating physician as supporting material and should never be used exclusively for diagnosis or treatment recommendations. The diagnosis as well as the treatment decisions to be taken remain the full responsibility of the physician.

The accuracy of genetic tests is not 100%. However, it has been found to be over 98% accurate based on validation data for this test. Furthermore, genetic test results must be considered in the context of the patient's clinical representation and known familial risks in the patient's environment.

The test only analyses a selection of markers. When alleles are detected, the investigated polymorphism is indicated. Other rare alleles may be present and are not covered by this method. Therefore, a negative test result of the patient does not completely exclude a risk of any kind.

13 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleic acid		Catalog number
PCR	Polymerase chain reaction		To be used with
	Detection mix 1		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix 2		Upper limit of temperature
	Positive control 1		Manufacturer
	Positive control 2		Lot number
	Negative control		Consult instructions for use
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Content
	Use by YYYY-MM-DD		

14 LITERATURE

1. Robson et al. (2000) DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF HAEMOCHROMATOSIS SINCE THE DISCOVERY OF THE HFE GENE: A EUROPEAN EXPERIENCE, British Journal of Haematology, 2000, 108, 31±39

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

