

MutaPLATE[®] HLA DQ 2+8 (TM)

Real-Time PCR Kit

Real-Time PCR Kit für den Nachweis der HLA-Allele DQA1*05,
DQB1*02 und DQB1*03:02 auf Basis der TaqMan Technologie
für den LightCycler 1.5, 2.0, 480 und MyGo Pro



Nur für in-vitro Diagnostik



REF KF190532

Σ **32**

REF KF190596

Σ **96**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Deutschland
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com
Tel.: +49 (0)6251/ 701900
Fax: +49 (0)6251/ 849430

Version 2.1 / Juni 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Verwendungszweck	3
2	Einleitung	3
3	Testprinzip	3
4	Kitbestandteile	3
5	Erforderliche Materialien	3
6	Lagerung und Haltbarkeit	4
7	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
8	Testdurchführung	5
	8.1 PCR Produktherstellung	5
	8.2 PCR Protokoll	7
9	Auswertung	8
10	Troubleshooting	11
11	Grenzen des Tests	11

1 Verwendungszweck

Das HLA DQ 2+8 (TaqMan) Real-Time PCR Kit ist ein auf der TaqMan-Technologie basierender Test für den Nachweis der HLA-Allele DQA1*05, DQB1*02 und DQB1*03:02.

2 Einleitung

Zöliakie / Glutenunverträglichkeit (GU) stellt eine der häufigsten chronisch gastrointestinalen Erkrankungen dar. Es handelt sich um eine genetisch bedingte Erkrankung, bei der der Körper das in vielen Getreidesorten enthaltene Gluten nicht verarbeiten kann. Nahezu alle Zöliakie-Patienten sind Träger von HLA-DQ2 (HLA-DQA1*05 und HLA-DQB1*02) oder HLA-DQ8 (HLA-DQB1*03:02). Wenn kein DQ2 und DQ8 nachgewiesen werden kann, kann mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % eine Glutenunverträglichkeit ausgeschlossen werden. Mit dem HLA DQ 2 + 8 Real-Time Kit werden die Allele HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02 und HLA-DQB1*03:02 untersucht.

3 Testprinzip

Der Assay beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und zwei Hydrolysesonden (TaqMan Sonden), die spezifisch in der Region der Mutation binden. Die beiden Hydrolysesonden sind am 5' Ende mit unterschiedlichen Fluorophoren (Reporter Farbstoffen) markiert, welche für die Unterscheidung der Allele genutzt werden. Am 3' Ende sind die Sonden mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert. Die Nähe des Reporter Farbstoffes zu dem Quencher inhibiert die Fluoreszenz des Reportermoleküls. Während der Amplifikation binden die Sonden spezifisch an die DNA Fragmente. Die 5' Nukleaseaktivität der Polymerase spaltet die hybridisierten Sonden, wodurch der Reporter vom Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal generiert wird.

4 Kitbestandteile

HLA DQ 2+8 Real-Time PCR-Kit	Volumen	
	32er Kit	96er Kit
Enzyme Mix (blauer Deckel)	1313 µL	2 x 1970 µL
Detection Mix 1 (DQA1*05) (gelber Deckel)	210 µL	630 µL
Detection Mix 2 (DQB1*02) (brauner Deckel)	210 µL	630 µL
Detection Mix 3 (DQB1*03:02) (lila Deckel)	210 µL	630 µL
Detection Mix IC (weißer Deckel)	473 µL	1419 µL
Positive Control 1 (DQA1*05/DQB1*02) (roter Deckel)	30 µL	90 µL
Positive Control 2 (DQB1*03:02) (roter Deckel)	15 µL	45 µL
Negative Control (grüner Deckel)	50 µL	200 µL

5 Erforderliche Materialien

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

- Roche LightCycler® 1.5, 2.0, 480 und LTF MyGo Pro Real-Time PCR-System

- Die CE Konformität besteht nur, wenn eins der genannten Gerät verwendet wird.
- LightCycler® Kapillaren, Roche bzw. 96-well Platten/Streifen (weiß)
- LightCycler® Cooling Block, Roche
- Pipetten (0,5 – 200 µl)
 - 0,5 - 10 µL
 - 10 - 200 µL
- 1,5 mL Reaktionsgefäße (steril)

6 Lagerung und Haltbarkeit

- Alle Reagenzien sollen bis zum unmittelbaren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.
- Mehrfache Gefrierzyklen sind zu vermeiden (wenn nötig, Aliquots herstellen).
- Die Detektionsmixe unbedingt vor Lichteinwirkung schützen.

7 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Vorschriften und Grundsätze für molekularbiologisches Arbeiten müssen eingehalten werden.

- Die Arbeitsschritte zügig durchführen.
- Alle PCR Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

8 Testdurchführung

8.1 PCR Produktherstellung

Alle Kitbestandteile schonend auftauen lassen, vorsichtig vor dem Benutzen durchmischen (nicht vortexen) und kurz anzentrifugieren. Den Detektionsmix vor Lichteinwirkung schützen. Während der Arbeiten alle PCR Reagenzien und den PCR Ansatz kühlen.

Für die Amplifikation wird ein Reaktionsgefäß (LightCycler® Kapillare) pro Probe und zwei zusätzliche Reaktionsgefäße für die negative und die positive Kontrolle benötigt. Die folgende Tabelle zeigt die zu pipettierenden Volumina pro Probe. Für die Analyse wird empfohlen ein Mastermix für die Anzahl an Proben (inkl. negativer und positiver Kontrolle) (N) plus 10 % herzustellen, um Ungenauigkeiten auszugleichen. Der Mastermix wird wie im Folgenden beschrieben pipettiert:

Mastermix 1 (DQA1*05):

Reagenz	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz	Master Mix Volumen
Detection Mix 1 (gelber Deckel)	6 µL	6 µL * (N + 0,1)
Detection Mix IC (weißer Deckel)	2,25 µL	2,25 µL * (N + 0,1)
Wasser (grüner Deckel)	2,25 µL	2,25 µL * (N + 0,1)
Enzyme Mix (blauer Deckel)	12,5 µL	12,5 µL * (N + 0,1)

- Den Mastermix vorsichtig durch auf- und abpipettierten oder durch Invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren. In jede Kapillare/Well 23 µL des Mastermix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grüner Deckel**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (**roter Deckel**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils 2 µL der Proben-DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Mastermix 2 (DQB1*02):

Reagenz	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz	Master Mix Volumen
Detection Mix 2 (brauner Deckel)	6 µL	6 µL * (N + 0,1)
Detection Mix IC (weißer Deckel)	2,25 µL	2,25 µL * (N + 0,1)
Wasser (grüner Deckel)	2,25 µL	2,25 µL * (N + 0,1)
Enzyme Mix (blauer Deckel)	12,5 µL	12,5 µL * (N + 0,1)

- Den Mastermix vorsichtig durch auf- und abpipettierten oder durch Invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren. In jede Kapillare/Well 23 µL des

Mastermix vorlegen.

- Für die negative Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grüner Deckel**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten positiven Kontrolle1 (**roter Deckel**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils 2 µL der Proben-DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Mastermix 3 (DQB1*03:02):

Reagenz	Volumen pro 25 µL-Reaktionsansatz	Master Mix Volumen
Detection Mix 3 (lila Deckel)	6 µL	6 µL * (N + 0,1)
Detection Mix IC (weißer Deckel)	2,25 µL	2,25 µL * (N + 0,1)
Wasser (grüner Deckel)	2,25 µL	2,25 µL * (N + 0,1)
Enzyme Mix (blauer Deckel)	12,5 µL	12,5 µL * (N + 0,1)

- Den Mastermix vorsichtig durch auf- und abpipettierten oder durch Invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren. In jede Kapillare/Well 23 µL des Mastermix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grüner Deckel**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten positiven Kontrolle 2 (**roter Deckel**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils 2 µL der Proben-DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

LightCycler® 1.5 und 2.0: Die Kapillaren mit den Deckeln verschließen, in das LightCycler® Karusel überführen und in der LightCycler® Zentrifuge abzentrifugieren (sollte eine Tischzentrifuge verwendet werden die Kapillaren in den Einsätzen des Cooling Blocks bei 3000 rpm für 15 s zentrifugieren). Anschließend das Karusel in den LightCycler® überführen und das unter 8.2 beschriebene PCR Programm starten.

LightCycler® 480: Die Wells mit einer Verschlussfolie (Sealing-Folie) verschließen und die Platte abzentrifugieren (2000 rpm für 15 s). Anschließend die Platte in den LC 480 überführen und das unter 8.2 beschriebene PCR Programm starten.

8.2 PCR Protokoll

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Heizrate [°C/s]	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	94	120	max.	1 x	keine
Denaturierung	94	10	max.	45 x	keine
Primer Anlagerung / Elongation	60	50	max.		Single
Kühlen	40	30	max.	1 x	---

9 Auswertung

Das HLA DQ 2+8 PCR Real-Time Kit detektiert das Vorliegen der HLA Allele DQA1*05, DQB1*02 und DQB1*03:02. Die entsprechenden TaqMan Sonden für die drei Allele sind FAM (510 nm, grün) markiert. Wenn die HLA-Allele nicht vorliegen, findet keine Amplifikation statt und es wird somit keine Fluoreszenz von der FAM-markierten TaqMan Sonde detektiert. Um in diesem Fall eine erfolgreiche PCR zu gewährleisten, ist eine interne Amplifikationskontrolle (IC) in die PCR eingearbeitet. Die TaqMan Sonde für die interne Amplifikationskontrolle ist markiert mit YAK (555 nm, gelb) und sollte immer ein Fluoreszenzsignal geben.

Entsprechend des Genotyps können folgende Resultate erzielt werden:

1. HLA-Allel ist vorhanden:

Anstieg des Fluoreszenzsignals von der **FAM** markierten TaqMan Sonde und Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK** markierten TaqMan Sonde.

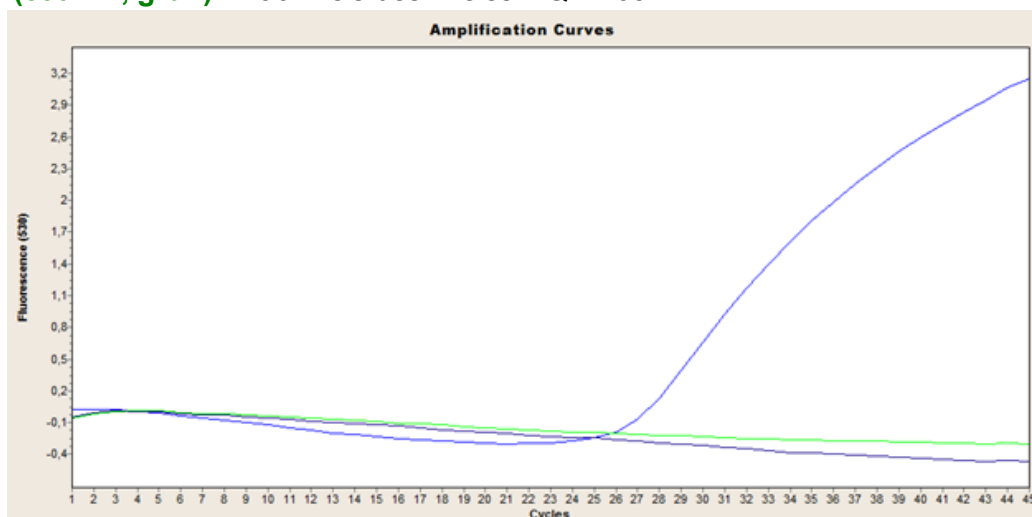
2. HLA-Allel ist nicht vorhanden:

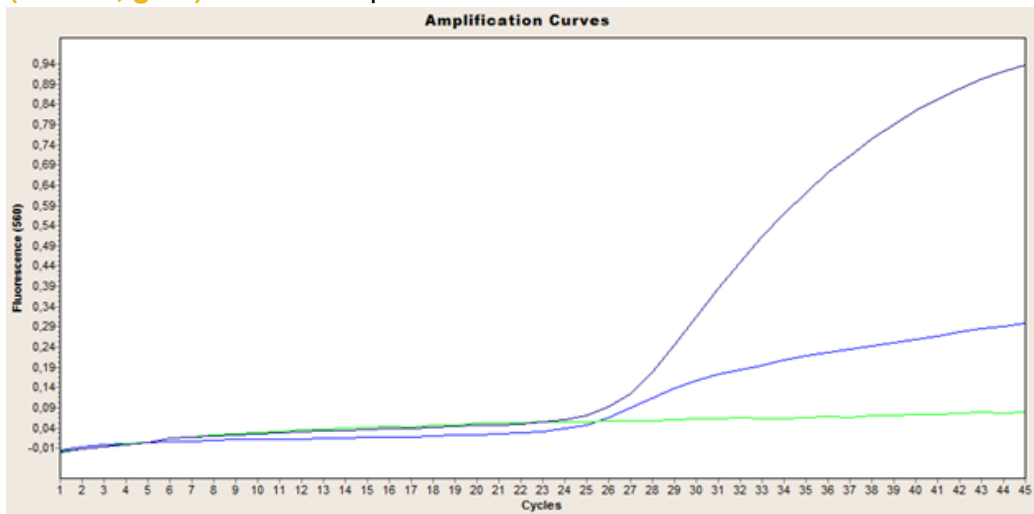
Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals von der **FAM** markierten TaqMan Sonde, Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK** markierten TaqMan Sonde

Für die Auswertung der Schmelzkurven eine Analyse des Typs "Absolute Quantifikation" hinzufügen. Die Ergebnisse der Analyse für die HLA-Allele DQA1*05, DQB1*02 und DQB1*03:02 werden bei **510 - 530 nm / grün** und für die IC bei **550 - 570 nm / gelb** analysiert. Verwenden sie eine geeignete Farbkompensationsdatei (engl. Color Compensation File).

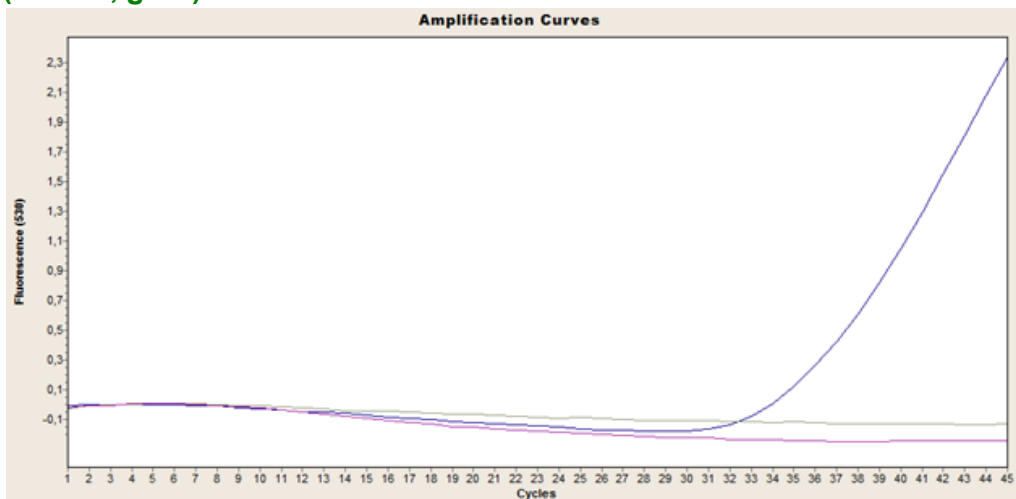
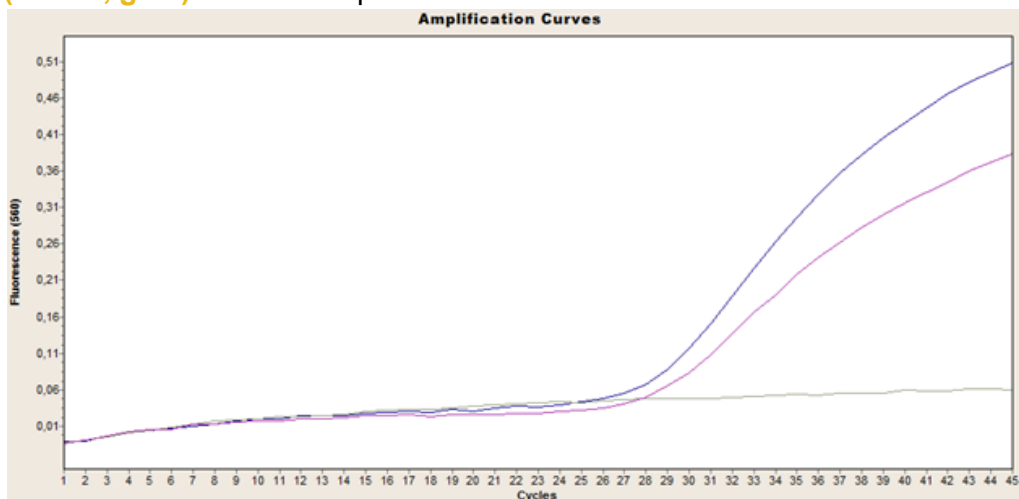
Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für den Nachweis des HLA-Allels DQA1*05: **grüne Kurve** - negative Kontrolle, **dunkelblaue Kurve** - DQA1*05 nicht detektiert, **blaue Kurve** - DQA1*05 detektiert.

FAM (530 nm, grün) - Nachweis des Alleles DQA1*05



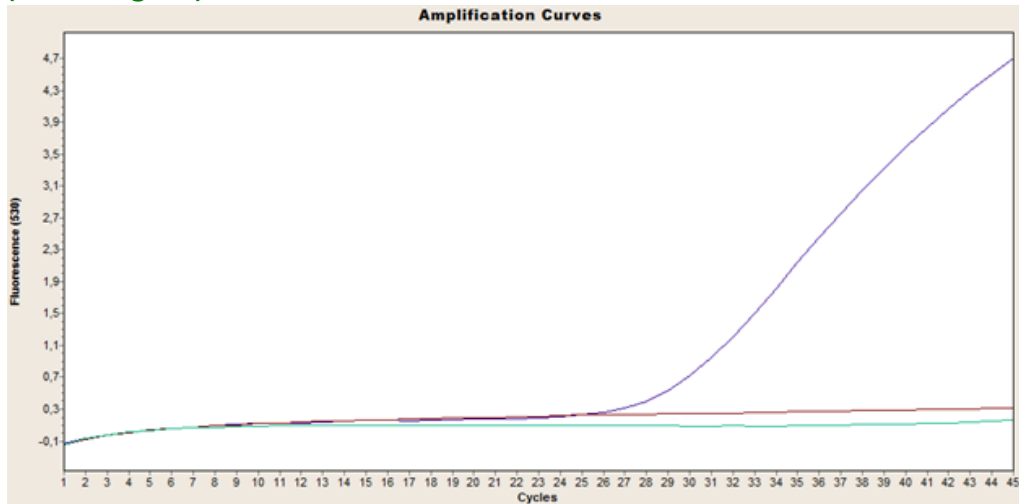
YAK (555 nm, gelb) - Interne Amplifikationskontrolle

Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für den Nachweis des HLA-Allels DQB1*02: **graue Kurve** - negative Kontrolle, **lila Kurve** - DQB1*02 nicht detektiert, **blaue Kurve** - DQB1*02 detektiert.

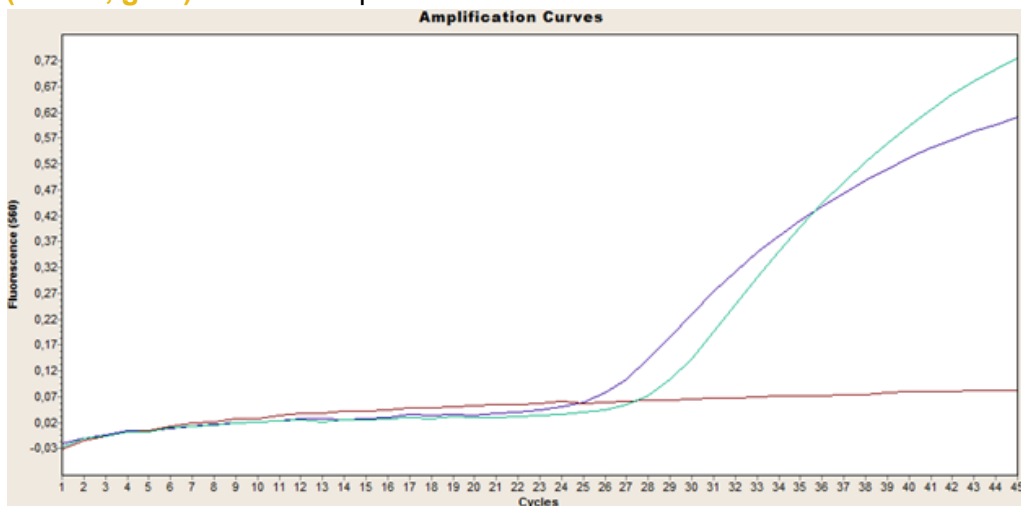
FAM (530 nm, grün) - Nachweis des Alleles DQB1*02**YAK (560nm, gelb) - Interne Amplifikationskontrolle**

Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für den Nachweis des HLA-Allels DQB1*03:02: **rote Kurve** - negative Kontrolle, **türkise Kurve** - DQB1*03:02 nicht detektiert, **blaue Kurve** - DQB1*03:02 detektiert.

FAM (530 nm, grün) - Nachweis des Alleles DQB1*03:02



YAK (560nm, gelb) - Interne Amplifikationskontrolle



Die mitgelieferte Positivkontrolle 1 enthält ein Template, das für die Allele DQA1*05 und DQB1*02 positiv ist. Die mitgelieferte Positivkontrolle 2 enthält ein Template, das für das Allel DQB1*03:02 positiv ist.

10 Troubleshooting

Problem	Lösung
Kein 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.
	Der Detection Mix hat mehr als zwei Gefrierzyklen oder wurden länger als vier Tage bei 2-8 °C gelagert. Wiederholen sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Detection Mix.
	Die Qualität der Ausgangs-DNA ist nicht ausreichend. Nutzen sie frisch extrahierte DNA und bestimmen Sie die Konzentration/Reinheit vor der Nutzung.
	Die Detektionsmische wurden nicht vor Lichteinwirkung geschützt. Wiederholen sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuen PCR Reagenzien.

11 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. Daher schließt ein negatives Testergebnis des Patienten ein Risiko jedweder Art nicht vollständig aus.