

MutaPLATE[®] HLA DQ 2+8 (TM)

Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der HLA-Allele DQA1*05, DQA1*03
DQB1*02 und DQB1*03:02/*03:05*

*For the analysis of the HLA-alleles DQA1*05, DQA1*03
DQB1*02 und DQB1*03:02/*03:05*

Gültig ab / Valid from 2023-09-01



KF190532+
KF190596+



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	4
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>	6
10	ANALYSE DER ERGEBNISSE	7
11	PROBLEMBEHANDLUNG	10
12	GRENZEN DES TESTS	10
13	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	11
14	LITERATUR	11

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kit ist ein molekularbiologischer Test zum Nachweis der HLA-Allele DQA1*05, DQA1*03, DQB1*02¹ und DQB1*03:02/*03:05^{2,3} in offenen Real-Time PCR-Systemen mittels Taq-Man-Technologie.

¹ Die Kopienanzahl von DQB1*02 wird mit dieser Methode nicht bestimmt.

² Auf Grund der Sequenzhomologie kann mit dieser Methode DQB1*03:05 nicht von DQB1*03:02 unterschieden werden. Die Häufigkeit von DQB1*03:05 ist jedoch sehr gering, ca. 0,4% in der Kaukasischen Bevölkerung, während DQB1*03:02 eine Häufigkeit von ca. 15% aufweist ([http:// www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net), Nov. 2018). Weltweit beträgt die Häufigkeit von DQB1*03:05 0,07% und die Häufigkeit von DQB1*03:02 11,5% (Solberg et al., Hum Immunol, 2008).

³ Die Detektion anderer sehr seltener Allele kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

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 HLADQB1*02) oder HLA-DQ8 (HLA-DQB1*03:02, häufig in Kombination mit DQA1*03). Wenn kein DQ2 und DQ8 nachgewiesen werden kann, kann mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95% eine Glutenunverträglichkeit ausgeschlossen werden.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kit beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und eine Hydrolysesonden (TaqMan Sonden), die allelspezifisch bindet. Zusätzlich beinhaltet der Kit eine interne Amplifikationskontrolle um die korrekte PCR anzuzeigen, falls kein HLA Allel in der Probe vorliegt.

Die 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 Reporter-moleküls. 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 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF190532+) oder 96 (KF190596+) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		KF190532+	KF190596+
Reaktionsmix 1 (DQA1*05 / DQB1*02)	gelb	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Reaktionsmix 2 (DQA1*03 / DQB1*03:02)	braun	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Positive Kontrolle	rot	1 x 30 µl	1 x 90 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) z.B. Bio-Rad CFX 96 bzw. CFX Opus 96 oder Roche LightCycler® 480 II.
 - Die CE-Konformität besteht nur mit diesen Geräten.
- sterile PCR Reaktionsgefäße oder 96-Well Platten/Streifen (weiß)
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) 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 acht Gefrierzyklen sind zu vermeiden (wenn nötig, Aliquots herstellen). Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Schützen Sie die Reaktionsmixe 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 Einmal-schutzhandschuhe 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 MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) 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 Arbeiten 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 je zwei zusätzliche Reaktionsgefäße pro Reaktionsmix für die negative und die positive Kontrolle benötigt.

Die Reaktionsmixe enthalten alle für die PCR benötigten Komponenten außer der Probe.

Reaction Mix 1: DQA1*05 / DQB1*02

- Den Reaction Mix 1 vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Reaction Mix 1 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 (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Reaction Mix 2: DQA1*03 / DQB1*03:02

- Den Reaction Mix 2 vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Reaction Mix 2 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 (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Die Reaktionsgefäße sorgfältig durchmischen, die Reaktionsgefäße verschließen 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	Heizrate	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	120 s	94 °C	max.	1	keine
Denaturierung	10 s	94 °C	max.	45	keine
Primer Anlagerung und Elongation	50 s	60 °C	max.		Single
Kühlen	30 s	40 °C	max.	1	-

10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Das MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time Kit detektiert das Vorliegen der HLA Allele DQA1*05, DQA1*03, DQB1*02 und DQB1*03:02. Die entsprechenden TaqMan Sonden für die vier Allele sind FAM bzw. ROX markiert. Wenn die HLA-Allele nicht vorliegen, findet keine Amplifikation statt und es wird somit keine Fluoreszenz von der FAM bzw. ROX-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 wird auf dem YAK-Kanal gemessen.

Entsprechend des Genotyps können folgende Resultate erzielt werden:

1. HLA-Allel ist vorhanden:

Anstieg des Fluoreszenzsignals von der **FAM** bzw. **ROX** 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** bzw. **ROX** markierten TaqMan Sonde, Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK** markierten TaqMan Sonde.

Zur **Auswertung** eines **Bio-Rad CFX 96 / CFX Opus 96** Laufs empfehlen wir folgende Einstellungen in der CFX Maestro Software:

- Cq Determination Mode: Regression
- Baseline Setting: Baseline Substracted Curve Fit + Apply Fluorescence Drift Correction
- Cycles to Analyze: 10 to 45

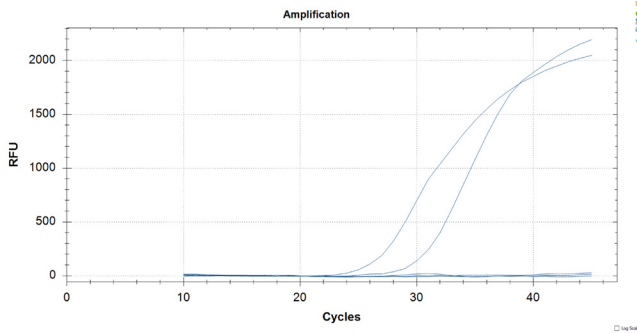
Reaction Mix 1:**FAM** - Kanal: Nachweis des Allels DQA1*05

Abb. 1: Auswertung zu HLA DQA1*05

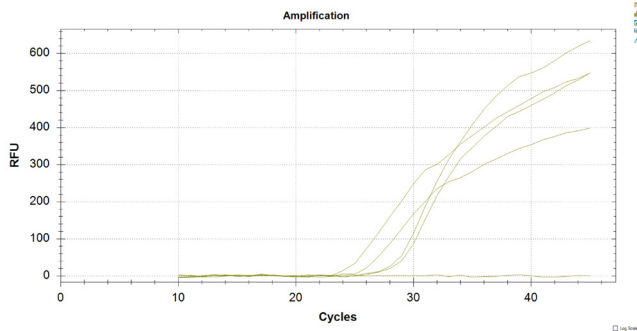
YAK - Kanal: Interne Amplifikationskontrolle

Abb. 2: Auswertung zu Reaction Mix 1 - Interne Amplifikationskontrolle

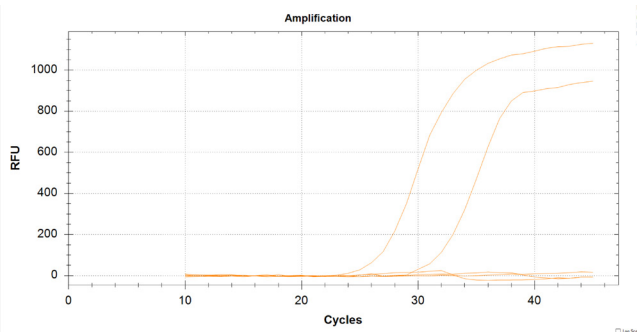
ROX - Kanal: Nachweis des Allels DQB1*02

Abb. 3: Auswertung zu HLA DQB1*02.

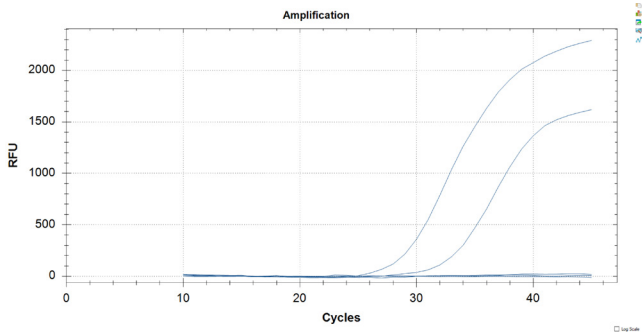
Reaction Mix 2:**FAM**-Kanal: Nachweis des Allels DQB1*03:02

Abb. 4: Auswertung zu HLA DQB1*03:02

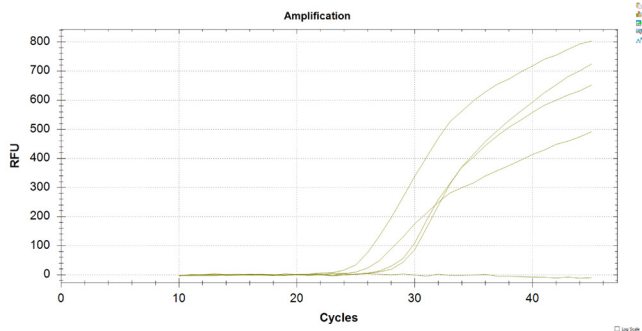
YAK - Kanal: Interne Amplifikationskontrolle

Abb. 5: Auswertung zu Reaction Mix 2 - Interne Amplifikationskontrolle

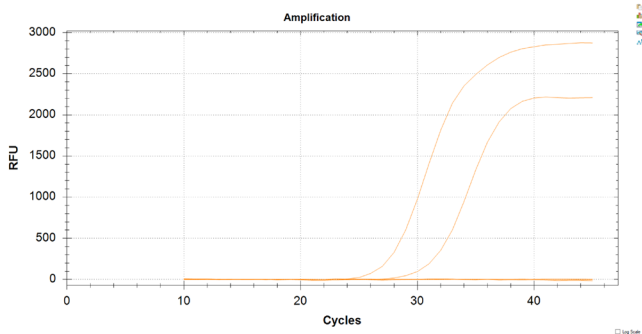
ROX - Kanal: Nachweis des Allels DQA1*03

Abb. 6: Auswertung zu HLA DQA1*03.

Die mitgelieferte positive Kontrolle (**rot**) enthält ein Template, das für die Allele DQA1*05, DQA1*03, DQB1*02 und DQB1*03:02 positiv ist.

Die negative Kontrolle (**grün**) muss in allen Kanälen negativ sein.

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 Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben im FAM, YAK oder ROX-Kanal:

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

Der Reaktionsmix wurde mehr als acht Gefrierzyklen unterzogen. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Reaktionsmix.

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

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

Geringe Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben im FAM, YAK oder ROX-Kanal:

Einzelne Komponenten vor Gebrauch sorgfältig mischen (nur durch mehrmaliges pipettieren - nicht vortexen!

Alle Stammlösungen während der Arbeitsschritte in geeigneter Weise kühlen und die Reaktionsmische vor Lichteinstrahlung schützen.

Auf Eis oder mit einem gekühlten Block (4 °C) arbeiten.















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. 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
	Reaktionsmix 1		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Reaktionsmix 2		Obere Temperaturgrenze
	Positive Kontrolle		Hersteller
	Negative Kontrolle		Chargennummer
	<i>In-vitro</i> Diagnostikum		Arbeitsanleitung beachten
	Inhalt		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT

14 LITERATUR

1. Solberg et al., Hum Immunol, 2008

MutaPLATE[®] HLA DQ 2+8 (TM)

Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the HLA-alleles DQA1*05, DQA1*03
DQB1*02 und DQB1*03:02/*03:05*

Valid from 2023-09-01



KF190532+
KF190596+



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	15
2	INTRODUCTION	15
3	PRINCIPLE OF THE TEST	15
4	PACKAGE CONTENTS	16
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	16
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	16
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	17
8	SAMPLE MATERIAL	18
9	REAL-TIME-PCR	18
	9.1 <i>Important points before starting</i>	18
	9.2 <i>Procedure</i>	18
	9.3 <i>Instrument settings</i>	19
10	DATA ANALYSIS	20
11	TROUBLESHOOTING	23
12	LIMITATIONS OF THE METHOD	23
13	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	24
14	LITERATURE	24

1 INTENDED USE

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time PCR Kit is a molecular biological assay for the detection of the HLA alleles DQA1*05, DQA1*03, DQB1*02¹ and DQB1*03:02/*03:05^{2,3} based on the TaqMan-technology.

¹ The number of copies of DQB1*02 is not determined by this method.

² Due to sequence homologies this method cannot differentiate between DQB1*03:02 and DQB1*03:05. However, the frequency of DQB1*03:05 is very low, about 0.4% in the Caucasian population, whereas DQB1*03:02 has a frequency of about 15% (<http://www.allelefrequencies.net>, Nov. 2018). Worldwide the frequency of DQB1*03:05 is 0.07% and the frequency of DQB1*03:02 is 11.5% (Solberg et al., Hum Immunol, 2008).

³ The detection of other very rare alleles cannot be completely excluded.

2 INTRODUCTION

Celiac disease / gluten intolerance is one of the most frequent chronic gastrointestinal diseases. It is a genetic disease, in which the body is not able to process the gluten present in many cereals. Almost all celiac disease patients are carrier of HLA-DQ2 (HLADQA1*05 and HLA-DQB1*02) or HLA-DQ8 (HLA-DQB1*03:02, often in combination with DQA1*03). If DQ2 and DQ8 are not detected, celiac disease can be excluded with a probability of over 95%.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) real-time PCR kit contains two specific primers that flank the target sequence and a hydrolysis probe (TaqMan probes) that binds allele specifically. In addition, the kit includes an internal amplification control to indicate correct PCR if no HLA allele is present in the sample.

The hydrolysis probes are labelled at the 5' end with different fluorophores (reporter dyes), which are used to distinguish the alleles. At the 3' end the probes are labelled with a non-fluorescent quencher. The proximity of the reporter dye to the quencher inhibits the fluorescence of the reporter molecule. During amplification, the probes bind specifically to the DNA fragments. The 5' nuclease activity of the polymerase cleaves the hybridised probes, separating the reporter from the quencher and generating a fluorescent signal.

4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF190532+) or 96 (KF190596+) reactions.

Table 1: Components of the MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR Kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction mix 1 (DQA1*05 / DQB1*02)	yellow	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Reaction mix 2 (DQA1*03 / DQB1*03:02)	brown	1 x 805 µl	3 x 805 µl
Positive control	red	1 x 30 µl	1 x 90 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), e.g.: Bio-Rad CFX 96 or CFX Opus 96 or Roche LightCycler® 480 II.
 - *The CE conformity is only given with these instruments.*
- Sterile PCR reaction tubes or 96-well plates/strips (white)
- Calibrated pipettes (variable volumes) and sterile disposable tips with filter
- Optional: Liquid handling system for automation

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) 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 eight freeze-thaw cycles (make aliquots if necessary). Do not use after the expiry date indicated on the package.

Be sure to protect the reaction 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 components.
- 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 MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) 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 reaction 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 required per sample and two additional reaction tubes per reaction mix are required for the negative and the positive control.

The Reaction Mixes contain all of the components needed for PCR except the sample:

Reaction Mix 1: DQA1*05 / DQB1*02

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

Reaction Mix 2: DQA1*03 / DQB1*03:02

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

Thoroughly mix the PCR reaction tubes, close the reaction tubes and briefly centrifuge. Then transfer to the real-time PCR device and start the PCR programme 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	Ramp rate	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	120 s	94 °C	max.	1	none
Denaturation	10 s	94 °C	max.	45	none
Primer annealing and elongation	50 s	60 °C	max.		single
Cooling	30 s	40 °C	max.	1	-

10 DATA ANALYSIS

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 Real-Time PCR kit detects the presence of the HLA alleles DQA1*05 DQA1*03, DQB1*02 and DQB1*03:02. The corresponding Taq-Man probes for the four alleles are FAM or ROX labelled. If the HLA alleles are not present, no amplification takes place and thus no fluorescence is detected by the FAM or ROX labelled TaqMan probe. In order to guarantee a successful PCR in this case, an internal amplification control (IC) is incorporated into the PCR. The TaqMan probe for the internal amplification control is measured on the YAK channel.

Corresponding to the genotype the following results can be achieved:

1. HLA allele present:

Increase of the fluorescence signal of the **FAM** resp. **ROX**-labeled TaqMan probe and increase of the fluorescence signal of the **YAK**-labeled TaqMan probe.

2. HLA allele is not present:

No increase of the fluorescence signal of the **FAM** resp. **ROX**-labeled TaqMan probe and increase of the fluorescence signal of the **YAK**-labeled TaqMan probe.

For the **evaluation** of a **Bio-Rad CFX 96 / CFX Opus 96** run we recommend the following settings in the CFX Maestro software:

- Cq Determination Mode: Regression
- Baseline Setting: Baseline Substracted Curve Fit + Apply Fluorescence Drift Correction
- Cycles to Analyze: 10 to 45

Reaction Mix 1:

FAM - channel: Detection of the allele DQA1*05

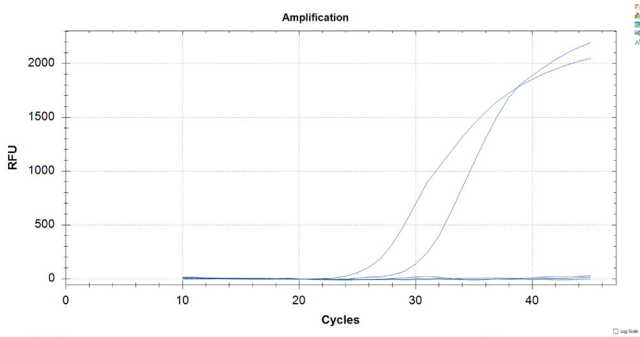


Fig. 1: Evaluation for HLA DQA1*05

YAK - channel: Internal amplification control

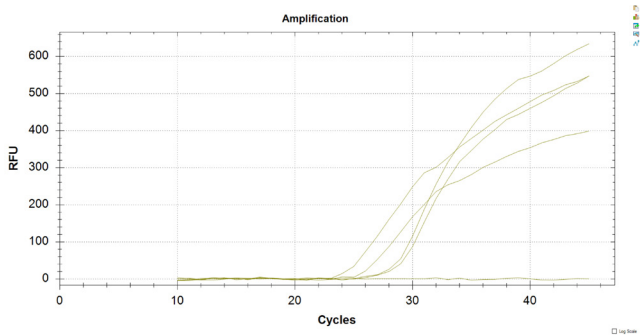


Fig. 2: Evaluation for Reaction Mix 1 - Internal amplification control

ROX - channel: Detection of the allele DQB1*02

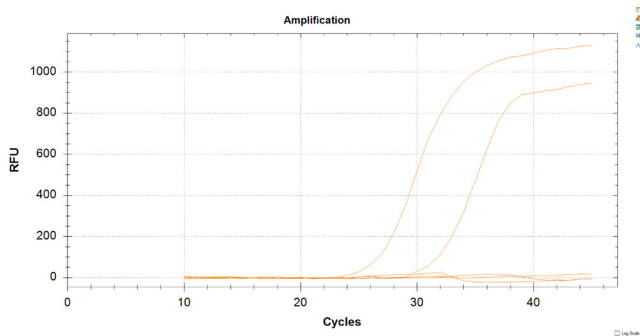


Fig. 3: Evaluation for HLA DQB1*02.

Reaction Mix 2:

FAM - channel: Detection of the allele DQB1*03:02

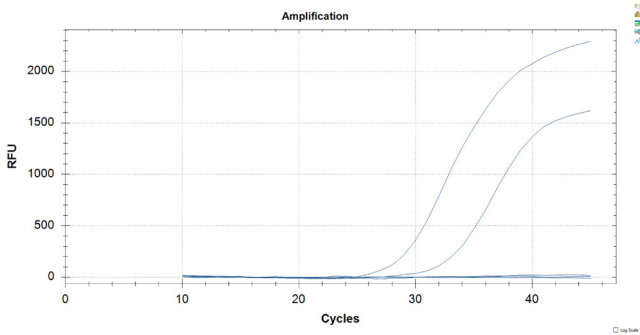


Fig. 4: Evaluation for HLA DQB1*03:02

YAK - channel - Internal amplification control

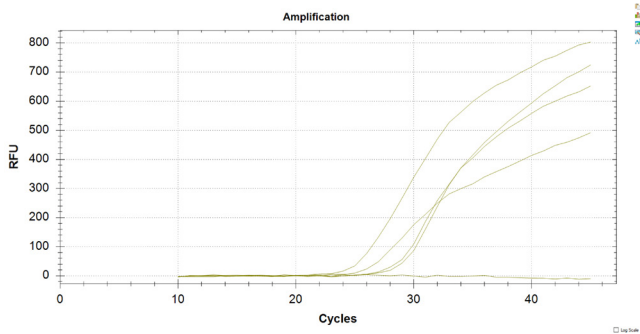


Fig. 5: Evaluation for Reaction Mix 2 - Internal amplification control

ROX - channel: Detection of the allele DQA1*03

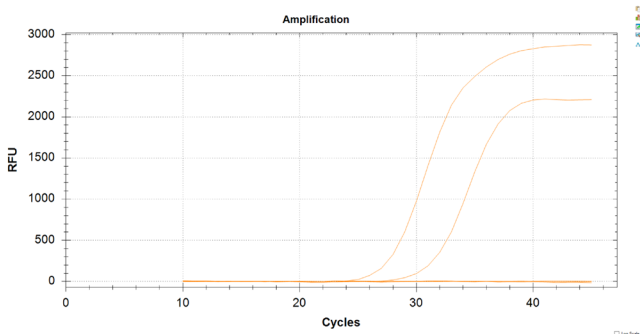


Fig. 6: Evaluation for HLA DQA1*03.

The provided positive control (**red**) contains a template, which is positive for the alleles DQA1*05, DQA1*03, DQB1*02 and DQB1*03:02.

The negative control (**green**) has to be negative in all channels.

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 fluorescence peak in the positive control or samples in the FAM, YAK or ROX channel:

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

Reaction mixes have been subjected to more than eight freeze cycles. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new reaction 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.

Low fluorescence peak in the positive control or samples in the FAM, YAK or ROX channel:

Mix individual components carefully before use (only by pipetting several times - do not vortex!).

Cool all stock solutions appropriately during the working steps and protect the reaction mixes from light irradiation.

Work on ice or with a cooled block (4 °C).















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. 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
	Reaction mix 1		Contains sufficient for <n> test
	Reaction mix 2		Upper limit of temperature
	Positive control		Manufacturer
	Negative control		Lot number
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Consult instructions for use
	Content		Use by YYYY-MM-DD

14 LITERATURE

1. Solberg et al., Hum Immunol, 2008

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

