

MutaPLATE[®] Laktase (TM)

Real-Time-PCR-Kit

Für die Analyse der T-13910C Mutation im LCT Gen

For the analysis of the T-13910C mutation in the LCT gene

Gültig ab / Valid from 2022-03-15



KF1907232
KF1907296



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

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	2
2	EINLEITUNG	2
3	TESTPRINZIP	2
4	INHALT DER TESTPACKUNG	2
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	3
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	3
8	PROBENMATERIAL	4
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	6
11	PROBLEMBEHANDLUNG	8
12	GRENZEN DES TESTS	8
13	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	8
14	LITERATUR	9

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLATE® Laktase (TM) Real-Time-PCR-Kit ist ein auf der TaqMan-Technologie basierender molekularbiologischer Test zur Untersuchung der Punktmutation T-13910C im LCT Gen.

2 EINLEITUNG

Laktose ist eine in Milch enthaltene Form von Zucker. Damit Laktose aufgenommen werden kann, muss Sie durch das Enzym Laktase aufgespalten werden. Variationen im Laktase-(LCT)-Gen können zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität führen, wodurch Laktose nicht oder nur teilweise gespalten wird und daher nicht aufgenommen werden kann. Im Darm verbleibende Laktose wird von Bakterien zu Milchsäure verarbeitet. Dies kann zu den bei einer Laktoseintoleranz typischen Symptomen wie Bauchkrämpfe, Übelkeit und Durchfall führen. [1]

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLATE® Laktase (TM) Real-Time-PCR-Kit 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 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF1907232) oder 96 (KF1907296) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLATE® Laktase (TM) Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Enzymmix	blau	1 x 438 µl	3 x 438 µl
Detektionsmix	gelb	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive Kontrolle	rot	1 x 15 µl	1 x 45 µl

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
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
- Kühlblock für PCR-Reaktionsgefäße
- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

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

Schützen Sie die Detektionsmixe 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 beigefügten 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 Dekontaminations-lösung 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 bundes-staatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierten Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Labor-bereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheits-vorschriften.
- 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® Laktase (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 an zentrifugiert 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 wird ein Reaktionsgefäß (Typ abhängig vom verwendeten Gerät) 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 in Tabelle 2 beschrieben pipettiert:

Tabelle 2: Herstellung des Mastermix

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix (gelb)	10,5 µl	$10,5 \mu\text{l} * (N + (N * 0,1))$
Enzymmix (blau)	12,5 µl	$12,5 \mu\text{l} * (N + (N * 0,1))$

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz an zentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Master Mix 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 Reaktionsgefäß verschließen und 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 5 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 3: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Heizrate	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	120 s	94 °C	max.	1	keine
Denaturierung	30 s	94 °C	max.	45	keine
Primer Anlagerung und Elongation	60 s	66 °C	max.		Single
Kühlen	30 s	40 °C	max.	1	-

10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Die TaqMan Sonde für das C-Allel (Mutation) ist mit **FAM (510 - 530 nm, grün)** markiert und die TaqMan Sonde für das T-Allel (Wildtyp) ist mit **YAK (550 - 570 nm, gelb)** markiert.

Entsprechend des Genotyps können folgende Resultate erzielt werden:

1. Homozygot mutiert:

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

2. Heterozygot mutiert:

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

3. Homozygot Wildtyp:

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

Die Auswertung der Amplifikationskurven (Bestimmung der Crossing Points) wird mit einer Analyse des Typs „Absolute Quantifikation“ vorgenommen. Das Ergebnis

des Mutation-Allels wird bei **510 - 530 nm / grün** und für das Ergebnis des Wildtyp-Allels bei **550 - 570 nm / gelb** analysiert. **Zur Analyse auf Roche LightCycler® Geräten ist der Colour Compensation Kit MutaPLATE® CC-1 (KF19-2-CC) notwendig.**

Auswertung LCT T-13910C

Die folgenden Grafiken zeigen die typischen Ergebnisse für Proben mit den Genotypen homozygot Wildtyp, heterozygot mutiert und homozygot mutiert: **blaue Kurve** - negative Kontrolle, **grüne Kurve** - homozygot Wildtyp, **rote Kurve** - heterozygot mutiert, **schwarze Kurve** - homozygot mutiert

FAM (510 - 530 nm, grün) - Nachweis des C-Alleles (Mutation)

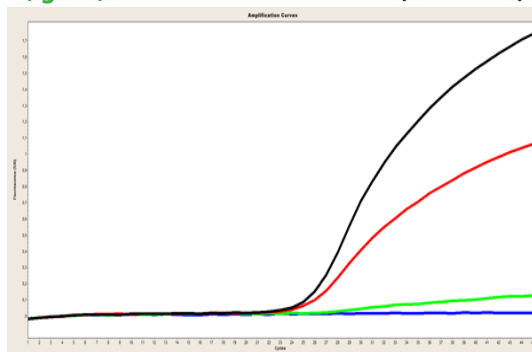


Abb. 1: Auswertung **FAM (510 - 530 nm, grün)** - Nachweis des C-Alleles (Mutation).

YAK (550 - 570 nm, gelb) - Nachweis des T-Alleles (Wildtyp)

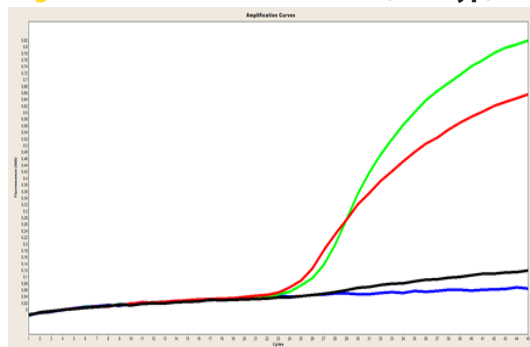


Abb. 2: Auswertung **YAK (550 - 570 nm, gelb)** - Nachweis des T-Alleles (Wildtyp).

Die mitgelieferte Positive Kontrolle (**rot**) enthält ein Template, das für die Punktmutation T-13910C 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.

Der Detection Mix wurde mehr als zwei Gefrierzyklen unterzogen oder wurde 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 Detektions Mixe 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

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

14 LITERATUR

1. Mattar et al., Clinical and Experimental Gastroenterology 2012, 5:113-121

MutaPLATE® Laktase (TM)

Real-Time-PCR Kit

For the analysis of the T-13910C mutation in the LCT gene

Valid from 2022-03-15



KF1907232
KF1907296



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

1 INTENDED USE

The MutaPLATE® Laktase (TM) Real-Time PCR Kit is a molecular biology assay based on TaqMan technology for testing the T-13910C point mutation in the LCT gene.

2 INTRODUCTION

Lactose is a form of sugar found in milk. In order for lactose to be absorbed, it must be broken down by the enzyme lactase. Variations in the lactase (LCT) gene can lead to an impairment of the enzyme activity, whereby lactose is not or only partially split and therefore cannot be absorbed. Lactose remaining in the intestine is processed by bacteria into lactic acid. This can lead to the symptoms typical of lactose intolerance, such as abdominal cramps, nausea and diarrhoea. [1]

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLATE® Laktase (TM) Real-Time PCR Kit contains two specific primers that flank the target sequence and two hydrolysis probes (TaqMan probes) that bind specifically in the region of the mutation. The two 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 (KF1907232) or 96 (KF1907296) reactions.

Table 1: Components of the MutaPLATE® Laktase (TM) Real-Time-PCR Kit .

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Enzyme mix	blue	1 x 438 µl	3 x 438 µl
Detection mix	yellow	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive control	red	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 Instrument
- Cooling block for PCR reaction 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 MutaPLATE® Laktase (TM) real-time PCR kit is transported frozen on dry ice or cold packs. All components are to be stored protected from light at a minimum of -20 °C immediately after receipt. Avoid multiple freeze-thaw cycles (make aliquots if necessary). Do not use after the expiry date indicated on the package.

Be sure to protect the detection mixes from direct sunlight during the entire test period.

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 surfLaktases 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® Laktase (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 pILaktase before the PCR set up.
- In every PCR run one Positive Control 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, one reaction tube (Type depending on the device used) per sample and two additional reaction tubes for the negative and the positive control are required. The following table shows the volumes to be pipetted per sample. For the analysis it is recommended to prepare a master mix for the number of samples (incl.

negative and positive control) (N) plus 10 % to compensate for inaccuracies. The master mix is pipetted as described in Table 2:

Table 2: Preparation of master mix

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix (yellow)	10.5 µl	10.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix (blue)	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix 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.

Close the reaction tubes and 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 3.

Table 3 Real-Time-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Heating rate	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	120 s	94 °C	max.	1	none
Denaturation	30 s	94 °C	max.	45	none
Primer annealing and Elongation	60 s	66 °C	max.		single
Cooling	30 s	40 °C	max.	1	-

10 DATA ANALYSIS

The TaqMan probe for the C allele (mutation) is marked with **FAM (510 - 530 nm, green)** and the TaqMan probe for the T allele (wild type) is marked with **YAK (550 - 570 nm, yellow)**.

According to the genotype, the following results can be obtained:

1. homozygous mutation:

Increase in fluorescence signal from **FAM** labelled TaqMan probe and no increase in fluorescence signal from **YAK** labelled TaqMan probe.

2. heterozygous mutation:

Increase in fluorescence signal from the **FAM** labelled TaqMan probe and increase in fluorescence signal from the **YAK** labelled TaqMan probe.

3. homozygous wild type:

No increase in fluorescence signal from the **FAM** labelled TaqMan probe and increase in fluorescence signal from the **YAK** labelled TaqMan probe.

The evaluation of the amplification curves (determination of the crossing points) is carried out with an analysis of the type „absolute quantification“. The result of the mutation allele is analysed at **510 - 530 nm / green** and for the result of the wild-type allele at **550 - 570 nm / yellow**. **The Colour Compensation Kit MutaPLATE® CC-1 (KF19-2-CC) is required for the analysis on Roche LightCycler® devices.**

Analysis LCT T-13910C

The following graphs show the typical results for samples with the genotypes homozygous wild type, heterozygous mutated and homozygous mutated: **blue curve** - negative control, **green curve** - homozygous wild type, **red curve** - heterozygous mutated, **black curve** - homozygous mutated.

FAM (510 - 530 nm, green) - detection of the C allele (mutation)

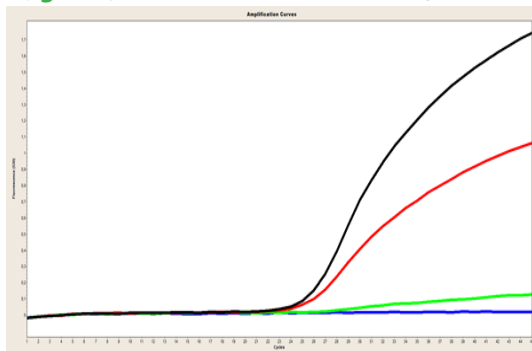


Fig. 1: Evaluation **FAM (510 - 530 nm, green)** - detection of the C allele (mutation).

YAK (550 - 570 nm, yellow) - detection of the T allele (wild type)

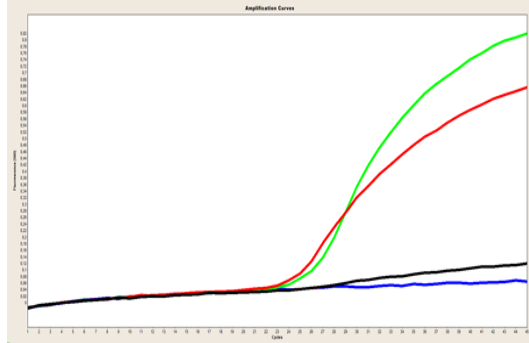


Fig. 2: Evaluation **YAK (550 - 570 nm, yellow)** - detection of the T allele (wild typ).

The supplied Positive Control (**red**) contains a template that is heterozygous for the point mutation T-13910C.

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.

The Detection Mix has been subjected to more than two freeze cycles or have been stored at 2-8 °C for more than four days. Repeat the analysis with a fresh aliquot or a 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.









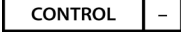





12 LIMITATIONS OF THE METHOD

The result is provided to the treating physician as supportive material and should never be used and should never be used solely for diagnostic or treatment recommendations for treatment. The diagnosis and the treatment decisions remain the full responsibility of the physician.

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

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 in a patient 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
	Enzyme mix		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix		Upper limit of temperature
	Positive control		Content
	Negative control		Manufacturer
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Lot number
	Use by YYYY-MM-DD		Consult instructions for use

14 LITERATURE

1. Mattar et al., Clinical and Experimental Gastroenterology 2012, 5:113-121

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

