

# MutaREAL® COMT

## Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der Val158Met Mutation im COMT Gen.*

*For the analysis of the Val158Met mutation in the  
COMT gene.*

Gültig ab / Valid from 2024-09-03



**KF291532**  
**KF291596**



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](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

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

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaREAL® COMT Real-Time-PCR-Kit ist ein FRET-basierter molekularbiologischer Test für die Untersuchung der Mutation Val158Met im Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Gen.

## 2 EINLEITUNG

Die Catechol-O-Methyltransferase katalysiert als Phase II - Enzym die Übertragung von Methylgruppen auf endogene / exogene Catechole und ist damit an deren Inaktivierung beteiligt. So ist z.B. die O-Methylierung von Neurotransmittern wie Dopamin, Adrenalin oder Noradrenalin ein Hauptabbauweg dieser Catecholamine. Zusätzlich zur Rolle im Metabolismus endogener Substanzen ist das Enzym aber auch wichtig bei der Verstoffwechslung von Catecholen, welche z.B. bei der Therapie von Bluthochdruck, Asthma und Parkinson eingesetzt werden.

Der Austausch von Valin nach Methionin an Position 158 der Catechol-O-Methyltransferase hat zur Folge, dass (bei homozygotem Genotyp) die Aktivität des Enzyms 3-4 fach verringert ist (Low Activity Allel). [1], [2]

## 3 TESTPRINZIP

Der sequenzspezifische MutaREAL® COMT Real-Time-PCR-Kit basiert auf dem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Der Assay beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und zwei Hybridisierungssonden, die benachbart an die Zielsequenz binden. Eine der Hybridisierungssonden ist mit einem Donor-Fluorophor markiert und überträgt nach entsprechender Anregung seine Energie auf das Akzeptor-Fluorophor, mit welchem die andere Hybridisierungssonde markiert ist, wenn diese sich in unmittelbarer Nähe befinden. Nach dem Energietransfer emittiert der Akzeptor-Farbstoff Licht mit einer längeren Wellenlänge. Ein Energietransfer kann nur stattfinden, wenn beide Hybridisierungssonden an die Zielsequenz gebunden haben. Die Menge hybridisierter Sondenpaare 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. Eine der Hybridisierungssonden bindet an einen Teil der Zielsequenz, der bei Wildtyp und der Mutation vorliegt. Die zweite Hybridisierungssonde überspannt die Mutationsstelle. Bei steigender Temperatur dissoziieren die fehlgepaarten und damit weniger stabilen Sonden zuerst und die Fluoreszenz nimmt ab. Die perfekt gepaarten Hybridisierungs-

sonden 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 (KF291532) oder 96 (KF291596) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaREAL® COMT 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
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)
- Roche LightCycler® 1.5, 2.0 oder 480 II Real-Time-PCR-System  
\* Die CE Konformität besteht nur, wenn eins der genannten Gerät verwendet wird.
- Roche LightCycler® Kapillaren bzw. 96-well Platten/Streifen (weiß)
- Roche LightCycler® Cooling Block
- 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® COMT 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 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 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 amplifizierten 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® COMT 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 Detektionsmische 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 wird ein Reaktionsgefäß 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 Kontrollen) (N) plus 10% herzustellen, um Ungenauigkeiten auszugleichen. Der Mastermix wird wie in der Tabellen 2 beschrieben pipettiert:

## Master Mix - COMT

Tabelle 2: Herstellung des Master Mix

Reagenz	Volumen pro 20 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix ( <b>gelb</b> )	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzym Mix ( <b>blau</b> )	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jede Kapillare / 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 die entsprechende Kapillare / das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

LightCycler® 1.5 und 2.0: Die Kapillaren mit den Deckeln verschließen, in das LightCycler® Karussell 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 Karussell in den LightCycler® überführen und das unter 9.3 beschriebene PCR Programm starten.

LightCycler® 480 II: Die Wells mit einer Verschlussfolie (Sealing-Folie) verschließen und die Platte/Streifen abzentrifugieren (2000 rpm für 15 s). Anschließend die Platte/Streifen in den LC 480 überführen und das unter 9.3 beschriebene PCR Programm starten.



### 9.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-PCR das in Tabelle 3 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 3: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Heizrate	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	120 s	94 °C	20 °C/s	1	keine
Denaturierung	10 s	94 °C	20 °C/s	40	keine
Primer Anlagerung	25 s	57 °C	20 °C/s		<b>Single</b>
Elongation	25 s	72 °C	20 °C/s		keine
Schmelzkurve	20 s	95 °C	20 °C/s	1	keine
	20 s	50 °C	20 °C/s	1	keine
	0 s	85 °C	0,1 - 0,3 °C/s *	1	<b>Konstant</b>
Kühlen	30 s	40 °C	20 °C/s	1	-

\* abhängig von der Anzahl der ausgewählten Filter beim LightCycler® 480 II, kann es notwendig sein die Aquisitions per °C anzupassen.

## 10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Schmelzkurven eine Analyse des Typs „Genotypisierung“ hinzufügen. Hierdurch wird die Ableitung der Fluoreszenzkurve gebildet. Die Detektionswellenlänge liegt bei 640 nm.

### COMT\*Val158Met (LightCycler® 1.5 & 2.0)

Temperatur Mutations-Allel: 61,0°C (+/- 2°C)

Temperatur Wildtyp-Allel: 68,0°C (+/- 2°C)

Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für die möglichen Genotypen: **blaue Kurve** - negative Kontrolle, **grüne Kurve** - homozygot Wildtyp, **rote Kurve** - Heterozygot mutiert, **schwarze Kurve** - homozygot mutiert.

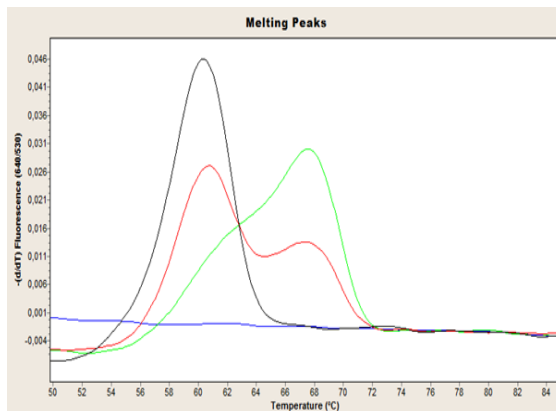


Abb. 1: Auswertung zu COMT\*Val158Met - LightCycler® 2.0.

### COMT\*Val158Met (LightCycler® 480 II)

Temperatur Mutations-Allel: 61,0 °C (+/- 2 °C)

Temperatur Wildtyp-Allel: 68,0 °C (+/- 2 °C)

Die folgende Grafik zeigt die typischen Ergebnisse für die möglichen Genotypen: **blaue Kurve** - negative Kontrolle, **rote Kurve** - homozygot Wildtyp bzw. homozygot mutiert, **grüne Kurve** - heterozygot mutiert.

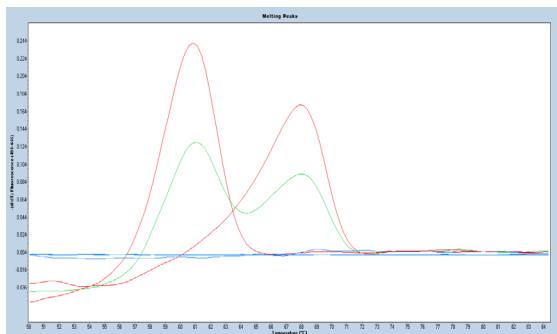


Abb. 2: Auswertung zu COMT\*Val158Met - LightCycler® 480 II.

Die mitgelieferte positive Kontrolle (**rot**) enthält ein Template, das für die Punktmutation Val158Met **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 Detektions 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 Detektions Mix.

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

Der Detektions Mix wurde 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		Hersteller
	Negative Kontrolle		Chargennummer
	<i>In-vitro</i> Diagnostikum		Arbeitsanleitung beachten
	Verwendbar bis JJJJ-MM-TT		Inhalt

## **14 LITERATUR**

1. Milikan et al., Carcinogenesis 199 (11), 1998
2. Egan et al., PANS 98, 18917-22, 1998



# MutaREAL<sup>®</sup> COMT

## Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the Val158Met mutation in the  
COMT gene.*

Valid from 2024-09-03



**KF291532**  
**KF291596**



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](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1</b>	<b>INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>16</b>
<b>7</b>	<b>WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>16</b>
<b>8</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>17</b>
<b>9</b>	<b>REAL-TIME-PCR</b>	<b>17</b>
	9.1 <i>Important points before starting</i>	17
	9.2 <i>Procedure</i>	18
	9.3 <i>Instrument settings</i>	19
<b>10</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>20</b>
<b>11</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>21</b>
<b>12</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>22</b>
<b>13</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>22</b>
<b>14</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>23</b>



## 1 INTENDED USE

The MutaREAL® COMT Real-Time PCR Kit is a FRET-based molecular biology test for the investigation of the Val158Met mutation in the catechol-O-methyl transferase (COMT) gene.

## 2 INTRODUCTION

As a phase II enzyme, catechol-O-methyltransferase catalyses the transfer of methyl groups to endogenous/exogenous catechols and is thus involved in their inactivation. For example, the O-methylation of neurotransmitters such as dopamine, adrenalin or noradrenaline is a main degradation pathway of these catecholamines. In addition to the role in the metabolism of endogenous substances, the enzyme is also important in the metabolism of catecholamines, which are used, for example, in the treatment of high blood pressure, asthma and Parkinson's disease.

The exchange of valine for methionine at position 158 of catechol-O-methyltransferase results in a 3-4-fold reduction in the activity (low activity allele) of the enzyme (in the case of a homozygous genotype). [1], [2]

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The sequence-specific MutaREAL® COMT real-time PCR kit is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). The assay includes two specific primers flanking the target sequence and two hybridisation probes that bind adjacent to the target sequence. One of the hybridisation probes is labelled with a donor fluorophore and, after appropriate excitation, transfers its energy to the acceptor fluorophore with which the other hybridisation probe is labelled when they are in close proximity. After the energy transfer, the acceptor dye emits light with a longer wavelength. Energy transfer can only occur when both hybridisation probes have bound to the target sequence. The amount of hybridised probe pairs and thus the fluorescence signal increases with the amount of amplified PCR product. Here, the fluorescence signal is proportional to the amount of PCR product.

Genotyping is carried out after completion of amplification by 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. One of the hybridisation probes binds to a part of the target sequence that is present in the wild type and the mutation. The second hybridisation probe spans the mutation site. As the temperature rises, the mismatched and thus less stable probes dissociate first and the fluorescence decreases. The perfectly paired hybridisation probes dissociate later due to their higher binding energy and thus the fluorescence signal decreases only at a higher temperature.

## 4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF291532) or 96 (KF291596) reactions.

Table 1: Components of the MutaREAL® COMT 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)
- Roche LightCycler® 1.5, 2.0 or 480 II real-time PCR system  
\* CE conformity only exists if one of the mentioned devices is used.
- Roche LightCycler® capillaries or 96-well plate/stripes (white)
- Roche LightCycler® Cooling Block
- 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® COMT 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 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 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® COMT 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 the Positive Control and the 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 mix 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 is needed per sample plus two additional reaction tubes per for the negative and the positive control. The following tables show 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 controls) (N) plus 10 % to compensate for inaccuracies. The master mix is pipetted as described in table 2:

### Master mix - COMT

Table 2: Preparation of master mix - COMT

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 capillary/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 capillary/reaction tube.

**LightCycler® 1.5 and 2.0:** Close the capillaries with the lids, transfer them into the LightCycler® carousel and centrifuge them in the LightCycler® centrifuge (if a table-top centrifuge is used, centrifuge the capillaries in the inserts of the cooling block at 3000 rpm for 15 s). Then transfer the carousel to the LightCycler® and start the PCR programme described in 9.3.

**LightCycler® 480 II:** Close the wells with the sealing-foil and centrifuge the plate for 15 s at 2000 rpm. Subsequently transfer the plate into the LightCycler® 480 and use the protocol 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	20 °C/s	1	none
Denaturation	10 s	94 °C	20 °C/s	40	none
Primer annealing	25 s	57 °C	20 °C/s		<b>single</b>
Elongation	25 s	72 °C	20 °C/s		none
Melting curve	20 s	95 °C	20 °C/s	1	none
	20 s	50 °C	20 °C/s	1	none
	0 s	85 °C	0.1 - 0.3 °C/s *	1	<b>constant</b>
Cooling	30 s	40 °C	20 °C/s	1	-

\* depending on the number of selected filters for the LightCycler® 480 II, it can be necessary to adjust the acquisitions per °C.

## 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 640 nm.

### COMT\*Val158Met (LightCycler® 1.5 & 2.0)

Temperature mutation allele: 61.0°C (+/- 2°C)

Temperature wild type allele: 68.0°C (+/- 2°C)

The following graph shows the typical results for the possible genotypes: **blue curve** - negative control, **green curve** - homozygous wild type, **red curve** - heterozygous mutant, **black curve** - homozygous mutant.

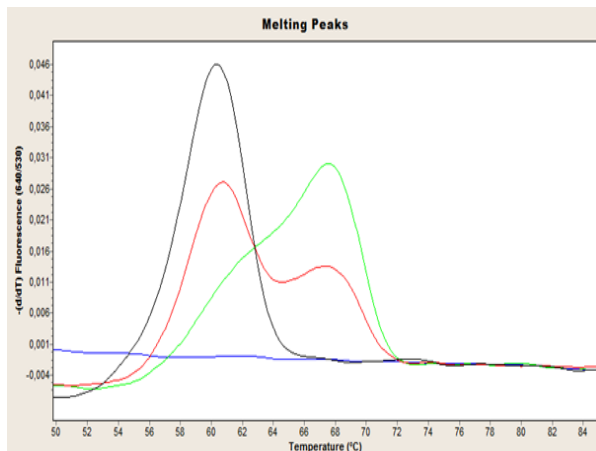


Fig. 1: Evaluation of COMT\*Val158Met - LightCycler 2.0.

### COMT\*Val158Met (LightCycler® 480 II)

Temperature mutation allele: 61.0 °C (+/- 2 °C)

Temperature wild type allele: 68.0 °C (+/- 2 °C)

The following graph shows the typical results for the possible genotypes: **blue curve** - negative control, **red curve** - homozygous wild type resp. homozygous mutation, **green curve** - heterozygous mutation.

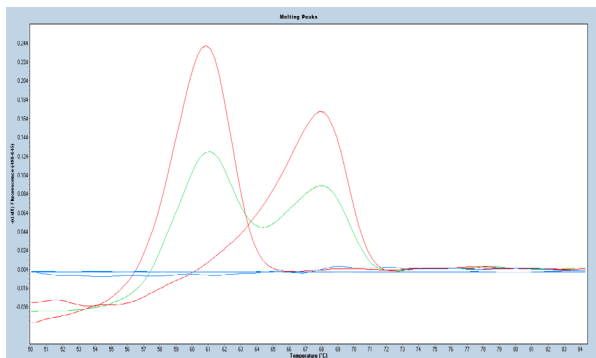


Fig. 2: Evaluation of COMT\*Val158Met - LightCycler® 480 II

The positive control (**red**) provided contains a template that is **heterozygous** for the mutation.

## 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](mailto: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 mix has been subjected to more than two freeze cycles or has been stored at 2-8 °C for more than four days. 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 mix was 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 analyses only 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 for a 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		Manufacturer
	Negative control		Lot number
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Consult instructions for use
	Use by YYYY-MM-DD		Content



## **14 LITERATURE**

1. Milikan et al., Carcinogenesis 199 (11), 1998
2. Egan et al., PANS 98, 18917-22, 1998





## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

