

MutaREAL[®] DPD-2

Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der Polymorphismen *2A, *13, *D949V und
des Haplotyp B3 im DPYD Gen*

*For the analysis of the polymorphisms *2A, *13, *D949V
and the haplotype B3 in the DPYD gene*

Gültig ab / Valid from 2025-01-09



KF292032
KF292096



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	3
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	4
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>	6
	9.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	8
10	ANALYSE DER ERGEBNISSE	8
11	PROBLEMBEHANDLUNG	11
12	GRENZEN DES TESTS	11
13	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	12
14	LITERATUR	12

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaREAL® DPD-2 Real-Time-PCR-Kit ist ein molekularbiologischer Test zur Untersuchung von Mutationen und Polymorphismen des Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Gens (DPYD) aus genomischer DNA. Der Test basiert auf der FRET-basierten real-time PCR. Die untersuchten Genvarianten stehen im Zusammenhang mit Dihydropyrimidin Dehydrogenase-Defizienz, welche einen Einfluss auf den Metabolismus von 5-Fluorouracil (5-FU) hat. Folgende Allele und Mutationen werden durch den Test detektiert:

Tabelle 1: Detektierbare Allele und Mutationen.

Allel / Mutation		rs-Nummer	Einfluss auf den 5-FU Metabolismus
*2A	IVS14+1G>A	rs3918290	sehr hoch
*13	1679T>G	rs55886062	sehr hoch
D949V	2846A>T	rs67376798	sehr hoch
Haplotyp B3	1236G>A	rs56038477	hoch

2 EINLEITUNG

Das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) gehört zu der Gruppe der Oxidoreduktasen und katalysiert den Abbau verschiedener Cytostatika wie beispielsweise 5-Fluorouracil (5-FU). Durch Mutationen im DPYD-Gen kommt es zu einer reduzierten Aktivität des Enzyms. Dadurch kann es bei einer Behandlung mit 5-FU zu einer Anreicherung des Zytostatikums im Körper kommen. Dies kann zu schweren Nebenwirkungen führen sowie lebensbedrohliche Vergiftungen auslösen. [1]

3 TESTPRINZIP

Der sequenzspezifische MutaREAL® DPD-2 Real-Time-PCR-Kit basiert auf dem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Der Assay beinhaltet spezifische Primer, die die jeweilige Zielsequenz flankieren und Hybridisierungssonden, die an die Zielsequenz im Bereich des SNP 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 Hybridisierungssonden dissoziieren aufgrund ihrer höheren Bindungsenergie erst später und somit nimmt das Fluoreszenzsignal erst bei einer höheren Temperatur ab.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF292032) oder 96 (KF292096) Reaktionen.

Tabelle 2: Inhalt des MutaREAL® DPD-2 Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Enzym / Puffer-Mix	blau	1 x 876 µl	2 x 1314 µl
Detektionsmix 1 (DPD*2A / *Haplo B3)	gelb	1 x 368 µl	2 x 552 µl
Detektionsmix 2 (DPD*13 / *D949V)	weiß	1 x 368 µl	2 x 552 µl
Positive Kontrolle 1 (DPD*2A)	rot	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive Kontrolle 2 (DPD*Haplo B3)	orange	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive Kontrolle 3 (DPD*D949V)	violett	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive Kontrolle 4 (DPD*13)	braun	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)
- Roche LightCycler® 1.5, 2.0, 480 II oder PRO Real-Time-PCR-System
- DNase/RNase-freie Roche LightCycler® Kapillaren bzw. 96-Well-Platten/Streifen (weiß)
- Roche LightCycler® Cooling Block

- sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Präzisionspipetten mit variablen Volumina von 2 - 1000 µl
- sterile Einwegpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
- (Tisch-)Zentrifuge (ohne spezifische Anforderungen)
- Vortex-Wirbelmischer (ohne spezifische Anforderungen)
- Wasser, PCR-Qualität
- EDTA-Plasma-Röhrchen zur Probengewinnung

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaREAL® DPD-2 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.

Nach Anbruch können die Detektionsmixe und der Enzym / Puffer-Mix für bis zu 6 Monaten bei +2 bis +8°C gelagert werden.

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 Einmalschutzhandschuhe zu tragen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierte Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Alle PCR-Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen

8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaREAL® DPD-2 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 drei zusätzliche Reaktionsgefäße pro Mastermix für die negative und die je 2 positiven Kontrollen 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 Master Mix wird wie in Tabelle 3 und 4 beschrieben pipettiert:

Master Mix 1 (*2A / *Haplo B3)

Tabelle 3: Herstellung des Master Mix 1 (*2A / *Haplo B3)

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 1 (gelb)	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzym / Puffer-Mix (blau)	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 jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grün**) dazugben.
- Für die positive Kontrolle 1 **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (**rot**) dazugben.
- Für die positive Kontrolle 2 **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 2 (**orange**) dazugben.

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

Master Mix 2 (*13 / *D949V)

Tabelle 4: Herstellung des Master Mix 2 (*13 / *D949V)

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 2 (weiß)	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzym / Puffer-Mix (blau)	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 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 3 **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 3 (**violett**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle 4 **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 4 (**braun**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

LightCycler® 1.5/2.0: 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 / PRO: Die Wells mit einer Verschlussfolie (Sealing-Folie) verschließen und die Platte abzentrifugieren (2000 rpm für 15 s). Anschließend die Platte in den LightCycler® 480 II / PRO 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 5: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	15 min	95 °C	1	keine
Denaturierung	10 s	94 °C	50	keine
Primer Anlagerung	25 s	56 °C		Single
Elongation	25 s	72 °C		keine
Schmelzkurve	30 s	95 °C	1	keine
	30 s	40 °C	1	keine
	0 s	80 °C	1	Konstant
Kühlen	30 s	40 °C	1	-

10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Schmelzkurven eine Analyse des Typs „Genotypisierung“ hinzufügen. Hierdurch wird die Ableitung der Fluoreszenzkurve gebildet. Die Detektionswellenlänge ist bei 640 nm (F2) bzw. 705 nm (F3) zu wählen.

Wichtig: Für den LightCycler 1.5 / 2.0 / 480 II ist zur Analyse der Color Compensation Kit MutaREAL® CC universal (KF29-4-CC) notwendig.

DPD*2A (F2 / 640 nm)

Temperatur Mutations-Allel*: 50,0 °C (+/-2 °C)

Temperatur Wildtyp-Allel*: 59,0 °C (+/-2 °C)

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

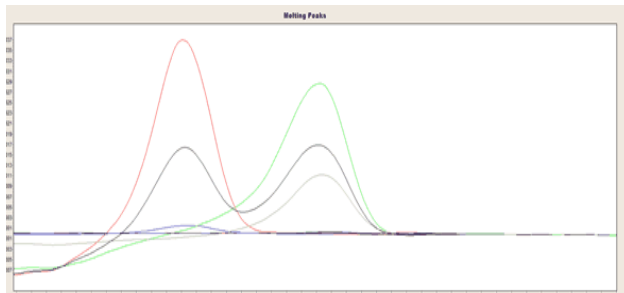


Abb. 1: Auswertung zu Master Mix 1 - F2 / 640 nm.

DPD*Haplotyp B3 (F3 / 705 nm)

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

Temperatur Wildtyp-Allel*: 67,0 °C (+/-2 °C)

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

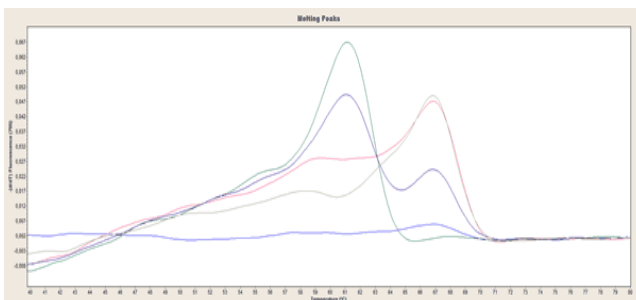


Abb. 2: Auswertung zu Master Mix 1 - F3 / 705 nm.

DPD*D949V (F2 / 640 nm)

Temperatur Mutations-Allel*: 55,0 °C (+/-2 °C)

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

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

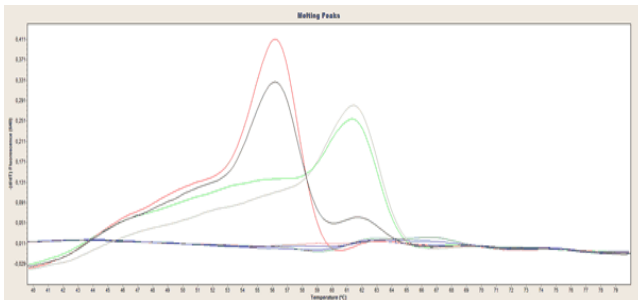


Abb. 3: Auswertung zu Master Mix 2 - F2 / 640 nm.

DPD*13 (F3 / 705 nm)

Temperatur Mutations-Allel*: 66,5 °C (+/-2 °C)

Temperatur Wildtyp-Allel*: 58,5 °C (+/-2 °C)

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

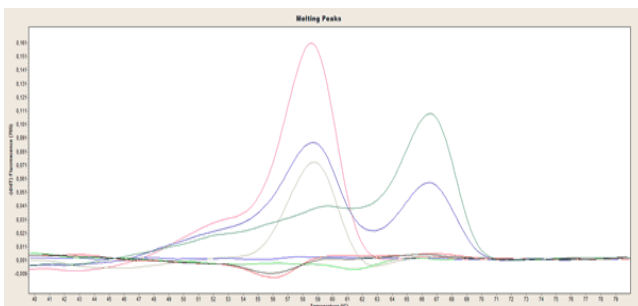


Abb. 4: Auswertung zu Master Mix 2 - F3 / 705 nm.

**Abhängig vom verwendeten PCR-Gerät können die ermittelten T_m -Werte mehr als +/- 2 °C abweichen. Hier sind die positiven Kontrollen (rot/orange/violett und braun) als Referenz zu verwenden und von diesen T_m -Werten +/- 2 °C anzusetzen.*

Die mitgelieferten Positiven Kontrollen 1, 2, 3 & 4 enthalten je eine DNA, die für die DPD*2A, DPD*Haplotyp B3, DPD*D949V oder DPD*13 Mutation heterozygot mutiert ist.

11 PROBLEMBEHANDLUNG

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

Keine oder schwache Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben

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

Die Detektions Mixe wurden mehr als zwei Gefrierzyklen unterzogen oder wurde länger als 6 Monate 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.

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

12 GRENZEN DES TESTS











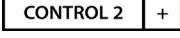

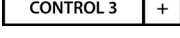

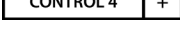



Das Ergebnis wird dem behandelnden Arzt als unterstützendes Material zur Verfügung gestellt und sollte niemals ausschließlich zur Diagnostik oder zu Behandlungsempfehlungen herangezogen werden. Die Diagnose sowie die einzuleitenden Behandlungsentscheidungen bleiben in der vollen Verantwortung des Arztes.

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
	Enzym / Puffer-Mix		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Detektionsmix 1		Obere Temperaturgrenze
	Detektionsmix 2		Hersteller
	Positive Kontrolle 1		Chargennummer
	Positive Kontrolle 2		Arbeitsanleitung beachten
	Positive Kontrolle 3		Inhalt
	Positive Kontrolle 4		<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Negative Kontrolle		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT

14 LITERATUR

1. Del Re et al., EPMA J. 2010 Sep; 1(3): 495–502

MutaREAL[®] DPD-2

Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the polymorphisms *2A, *13, *D949V and the haplotype B3 in the DPYD gene*

Valid from 2025-01-09



KF292032
KF292096



32/96



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	17
2	INTRODUCTION	17
3	PRINCIPLE OF THE TEST	17
4	PACKAGE CONTENTS	18
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	18
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	19
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
8	SAMPLE MATERIAL	20
9	REAL-TIME-PCR	20
	9.1 <i>Important points before starting</i>	20
	9.2 <i>Procedure</i>	21
	9.3 <i>Instrument settings</i>	22
10	DATA ANALYSIS	22
11	TROUBLESHOOTING	25
12	LIMITATIONS OF THE METHOD	25
13	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	26
14	LITERATURE	26

1 INTENDED USE

The MutaREAL® DPD-2 Real-Time PCR Kit is a molecular biological test for the investigation of mutations and polymorphisms of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) from genomic DNA. The test is based on FRET-based real-time PCR. The gene variants investigated are associated with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, which has an influence on the metabolism of 5-Fluorouracil (5-FU). The following alleles and mutations are detected by the test:

Table 1: Detected alleles and mutations.

Allele / Mutation		rs number	Influence on the 5-FU metabolism
*2A	IVS14+1G>A	rs3918290	very high
*13	1679T>G	rs55886062	very high
D949V	2846A>T	rs67376798	very high
Haplotype B3	1236G>A	rs56038477	high

2 INTRODUCTION

The enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) belongs to the group of oxidoreductases and catalyses the degradation of various cytostatic drugs such as 5-fluorouracil (5-FU). Mutations in the DPYD gene lead to reduced activity of the enzyme. This can lead to an accumulation of the cytostatic drug in the body during treatment with 5-FU. This can lead to severe side effects and life-threatening poisoning. [1]

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The sequence-specific MutaREAL® DPD-2 real-time PCR kit is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). The assay contains specific primers that flank the respective target sequence and hybridisation probes that bind to the target sequence in the region of the SNP. 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 if 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 (KF292032) or 96 (KF292096) reactions.

Table 2: Components of the MutaREAL® DPD-2 Real-Time-PCR Kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Enzyme / buffer mix	blue	1 x 876 µl	2 x 1314 µl
Detection mix 1 (DPD*2A / *Haplo B3)	yellow	1 x 368 µl	2 x 552 µl
Detection mix 2 (DPD*13 / *D949V)	white	1 x 368 µl	2 x 552 µl
Positive control 1 (DPD*2A)	red	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive control 2 (DPD*Haplo B3)	orange	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive control 3 (DPD*D949V)	purple	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive control 4 (DPD*13)	brown	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)
- Roche LightCycler® 1.5, 2.0, 480 II or PRO real-time PCR system
- DNase/RNase-free Roche LightCycler® capillaries or 96-well plates/strips (white)
- Roche LightCycler® Cooling Block
- Sterile reaction tubes
- Calibrated precision pipettes with variable volumes from 2 to 1000 µl
- Sterile single-use pipette tips with aerosol barrier
- (Table) centrifuge (without specific requirements)

- Vortex mixer (without specific requirements)
- Water, PCR grade
- EDTA plasma tubes for sample collection

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaREAL® DPD-2 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.

After opening, the detection mixes and the enzyme / buffer mix can be stored at +2 to +8°C for up to 6 months.

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

7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the instructions for use carefully before using the product.

- All samples must be considered potentially infectious and/or biohazardous and all items that come into contact with the specimens must be considered potentially contaminated.
- Real-time PCR must be performed in laboratories suitable for this purpose and by specially trained personnel.
- The assay must always be carried out according to the instructions supplied with the kit.
- Areas for sample preparation and preparation of the PCR master mix should be strictly separated.
- Pipettes, tubes and other working materials must not circulate from one area to the other.
- Always use pipette tips with filters.
- Always wear powder-free disposable gloves when using the kit
- Clean pipettes and work surfaces regularly with suitable decontamination solution (no ethanol-containing agents).
- Contamination of eluates and kit components with microbes or nucleases (RNAs and DNAses) should be avoided.

- Positive and potentially positive material must be kept separate from all other kit components at all times.
- Do not open reaction tubes/plates after amplification in order to avoid contamination.
- In accordance with guidelines or requirements of local, state or federal regulations or authorised organisations, additional controls may be tested.
- Do not autoclave reaction tubes after PCR as this will not degrade the amplified nucleic acid and risks contaminating the laboratory area.
- Dispose of samples and test waste according to your local safety regulations.
- Refrigerate all PCR reagents while working.
- The purity (A260/A280) of the genomic DNA should be between 1.8 and 2.0.

8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaREAL® DPD-2 real-time PCR kit is genomic DNA isolated from clinical samples (blood) using a suitable extraction kit.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.
- Before setting up the Real-Time-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run all Positive Controls and one Negative Control should be included.
- Before each use, all reagents must be gently thawed, thoroughly mixed (do not vortex) and briefly centrifuged.
- Protect the detection mixes from exposure to light.
- We recommend always cooling the reagents and the preparation in a cooling block (+4 to +8 °C) or on ice while working.

9.2 Procedure

For amplification, two reaction tubes per sample and three additional reaction tubes per master mix are required for the negative and the 2 positive controls. 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 controls) (N) plus 10 % to compensate for inaccuracies. The master mix is pipetted as described in tables 3 and 4:

Master mix 1 (*2A / *Haplo B3)

Table 3: Preparation of master mix 1 (*2A / *Haplo B3)

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 1 (yellow)	10.5 µl	10.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme / buffer 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 1 add **2 µl** of the supplied positive control 1 (red).
- For the positive control 2, add **2 µl** of the supplied positive control 2 (orange).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding reaction tube.

Master mix 2 (*13 / *D949V)

Table 4: Preparation of master mix 2 (*13 / *D949V)

Reagenz	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 2 (white)	10.5 µl	10.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme / buffer 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 3 add **2 µl** of the supplied positive control 3 (**purple**).
- For the positive control 4, add **2 µl** of the supplied positive control 4 (**brown**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding reaction tube.

LightCycler® 1.5 / 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® device and start the PCR program described in 9.3.

LightCycler® 480 II / PRO: Seal the wells with a sealing foil and centrifuge the plate (2000 rpm for 15 s). Then transfer the plate into the LC 480 II / PRO and start the PCR program described in 9.3.

9.3 Instrument settings

For the Real-Time-PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: Real-Time-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	15 min	95 °C	1	none
Denaturation	10 s	94 °C	50	none
Primer annealing	25 s	56 °C		single
Elongation	25 s	72 °C		none
Melting curve	30 s	95 °C	1	none
	30 s	40 °C	1	none
	0 s	80 °C	1	constant
Cooling	30 s	40 °C	1	-

10 DATA ANALYSIS

Add an analysis of the type „genotyping“ for the evaluation of the melting curves. This forms the derivation of the fluorescence curve. The detection wavelength is to be selected at 640 nm (F2) or 705 nm (F3).

Important: For the LightCycler 1.5 / 2.0 / 480 II, the Color Compensation Kit MutaREAL® CC universal (KF29-4-CC) is required for analysis.

DPD*2A (F2 / 640 nm)

Temperature mutation allele*: 50.0 °C (+/-2 °C)

Temperature wild type allele*: 59.0 °C (+/-2 °C)

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

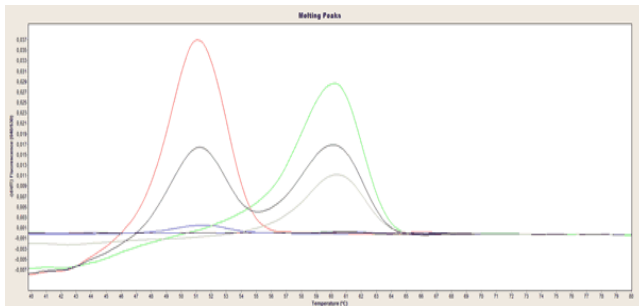


Fig. 1: Evaluation of master mix 1 - F2 / 640 nm.

DPD*Haplotype B3 (F3 / 705 nm)

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

Temperature wild type allele*: 67.0 °C (+/-2 °C)

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

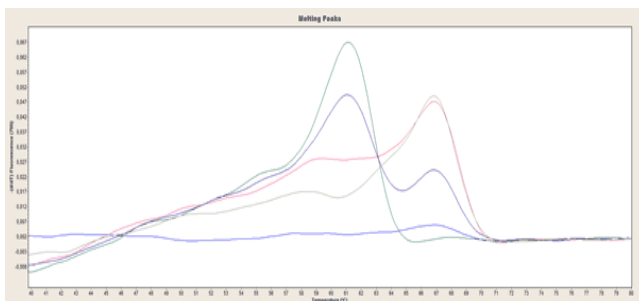


Fig. 2: Evaluation of master mix 1 - F3 / 705 nm.

DPD*D949V (F2 / 640 nm)

Temperature mutation allele*: 55.0 °C (+/-2 °C)

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

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

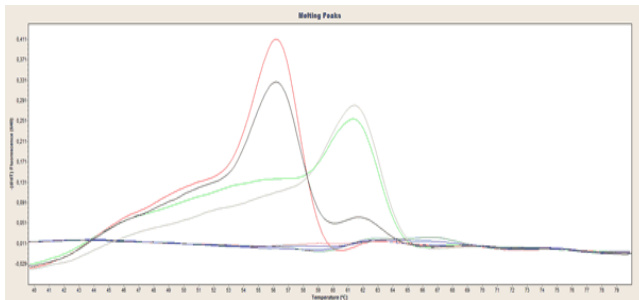


Fig. 3: Evaluation of master mix 2 - F2 / 640 nm.

DPD*13 (F3 / 705 nm)

Temperature mutation allele*: 66.5 °C (+/-2 °C)

Temperature wild type allele*: 58.5 °C (+/-2 °C)

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

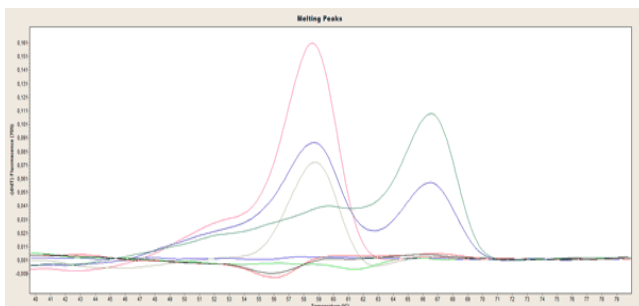


Fig. 4: Evaluation of master mix 2 - F3 / 705 nm.

** Depending on the PCR device used, the T_m values determined may deviate by more than $\pm 2^\circ\text{C}$. In this case use the positive controls (red / orange / purple and brown) as a reference and apply $\pm 2^\circ\text{C}$ to these T_m values.*

The positive controls 1, 2, 3 & 4 provided contain one DNA each which is heterozygous for the DPD*2A, DPD*Haplotype B3, DPD*D949V or DPD*13 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.

No or weak fluorescence in the positive control or samples.

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

Detection mixes have been subjected to more than two freeze cycles or have been stored at $2-8^\circ\text{C}$ for more than 6 months. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new detection mix.

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

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















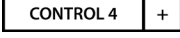

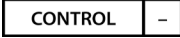

12 LIMITATIONS OF THE METHOD

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

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

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

13 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleic acid		Catalog number
PCR	Polymerase chain reaction		To be used with
	Enzyme / buffer mix		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix 1		Upper limit of temperature
	Detection mix 2		Manufacturer
	Positive control 1		Lot number
	Positive control 2		Consult instructions for use
	Positive control 3		Content
	Positive control 4		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Negative control		Use by YYYY-MM-DD

14 LITERATURE

1. Del Re et al., EPMA J. 2010 Sep; 1(3): 495–502

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

