

# **artus<sup>®</sup> TPMT LC PCR Kit**

## **Handbuch**



24 (Katalog Nr. 4622063)

Qualitatives In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem *LightCycler<sup>®</sup>* Instrument

April 2007 – Version 1



4622063



1046980DE



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

**MAT**

1046980DE

*artus* TPMT LC PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Gruppe); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

Registrierte Namen, Warenzeichen, usw. in diesem Dokument können nicht, auch bei fehlender Kennzeichnung als solche, als gesetzlich ungeschützt betrachtet werden.

Der *artus* TPMT LC PCR Kit ist ein CE-markierter diagnostischer Kit in Übereinstimmung mit der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich..

Die QIAamp Kits sind für den allgemeinen Laborgebrauch. Die Produktangaben oder Produktdarstellungen sind nicht dazu vorgesehen, Informationen für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Erkrankung zu liefern.

Der Erwerb der *artus* PCR Kits beinhaltet eine limitierte Lizenz für ihre Verwendung zur Durchführung des Polymerasekettenreaktion-Verfahrens (PCR) in der humanen und veterinären In-vitro-Diagnostik in Verbindung mit einem Thermocycler, dessen Einsatz bei der automatisierten Durchführung der PCR durch die up-front Lizenzgebühr abgedeckt ist, die entweder an Applied Biosystems abgeführt wird oder durch den Erwerb eines autorisierten Thermocyclers entrichtet wird. Das PCR Verfahren ist geschützt durch entsprechende nationale Schutzrechte der U.S. Patente der Nummern 5.219.727 und 5.322.770 und 5.210.015 und 5.176.995 und 6.040.166 und 6.197.563 und 5.994.056 und 6.171.785 und 5.487.972 und 5.804.375 und 5.407.800 und 5.310.652 und 5.994.056; Eigentum der F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhalt.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Lagerung .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....</b>	<b>5</b>
<b>4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen .....</b>	<b>5</b>
<b>5. Hintergrund-Informationen .....</b>	<b>6</b>
<b>6. Prinzip des Testverfahrens .....</b>	<b>7</b>
<b>7. Produktbeschreibung.....</b>	<b>7</b>
<b>8. Protokoll .....</b>	<b>8</b>
8.1 DNA-Isolierung .....	8
8.2 Vorbereitung der PCR .....	8
8.3 Programmierung des <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> Instruments .....	11
<b>9. Auswertung .....</b>	<b>14</b>
<b>10. Troubleshooting .....</b>	<b>19</b>
<b>11. Spezifikationen .....</b>	<b>20</b>
11.1 Analytische Sensitivität.....	20
11.2 Analytische Spezifität .....	20
11.3 Diagnostische Sensitivität und Spezifität.....	21
<b>12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch .....</b>	<b>21</b>
<b>13. Sicherheitsinformationen.....</b>	<b>21</b>
<b>14. Qualitätskontrolle .....</b>	<b>22</b>
<b>15. Literatur .....</b>	<b>22</b>
<b>16. Erklärung der Symbole .....</b>	<b>23</b>

## **artus<sup>®</sup> TPMT LC PCR Kit\***

Für die Verwendung mit dem *LightCycler<sup>®</sup>* Instrument.

### **1. Inhalt**

	<b>Beschriftung und Inhalt</b>	<b>Art. Nr. 4622063 24 Reaktionen</b>
<b>Blau</b>	<i>TPMT LC Master A</i>	2 x 12 rxns
<b>Blau</b>	<i>TPMT LC Master B</i>	2 x 12 rxns
<b>Gelb</b>	<i>TPMT LC Mg-Sol<sup>†</sup></i>	1 x 400 µl
<b>Rot</b>	<i>TPMT LC Control Aw</i>	1 x 200 µl
<b>Rot</b>	<i>TPMT LC Control Av</i>	1 x 200 µl
<b>Rot</b>	<i>TPMT LC Control B</i>	1 x 200 µl
<b>Weiß</b>	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 µl

<sup>†</sup> *Mg-Sol* = *Magnesium-Lösung*

### **2. Lagerung**

Die Komponenten des *artus* TPMT LC PCR Kits werden bei -20°C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Sollte die Notwendigkeit bestehen, die Komponenten bei +4°C zu lagern, darf ein Zeitraum von fünf Stunden nicht überschritten werden.

---

\* TPMT = Thiopurin S-Methyltransferase

### 3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Laborhandschuhe
- DNA-Isolierungskit (siehe **8.1 DNA-Isolierung**)
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Kat.-Nr. 2 158 850) zur Erstellung einer *Crosstalk Color Compensation*-Datei
- *LightCycler*<sup>®</sup> Kapillaren (20 µl)
- *LightCycler*<sup>®</sup> Cooling Block
- *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument
- *LightCycler*<sup>®</sup> Capping Tool

### 4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Analysieren Sie pro PCR-Lauf bitte **maximal zwölf Proben**, da es bei der parallelen Analyse von mehr als zwölf Proben zu einem technisch bedingten untypischen Schmelzkurvenverlauf der heterozygoten Variante nt 238 kommen kann.
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien lagern, aufreinigen und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur auftauen.
- Anschließend die Komponenten gründlich durchmischen und kurz zentrifugieren.
- Zügig auf Eis oder im *LightCycler*<sup>®</sup> Cooling Block arbeiten.

## 5. Hintergrund-Informationen

Neben Einflüssen wie Alter, Geschlecht, Ernährung und Komedikation können insbesondere genetische Faktoren die Enzymaktivität beeinflussen. Es ist bekannt, dass Patienten, die genetisch bedingt keine oder eine reduzierte Aktivität des Enzyms Thiopurin S-Methyltransferase (TPMT) aufweisen, unter Therapie mit 6-Thioguanin, 6-Mercaptopurin oder Azathioprin ein erhöhtes Risiko für das Auftreten schwerer Nebenwirkungen (z. B. hämatologische Toxizitäten, Hepatotoxizitäten) haben (1 - 3). Eine Untersuchung des TPMT-Gens erlaubt die Einschätzung des genetisch bedingten Risikos von therapieinduzierten Nebenwirkungen. Träger einer genetischen Variante des TPMT-Gens können somit vor Beginn einer Therapie ermittelt und ggf. mit einer alternativen Therapie oder mit deutlich reduzierter Dosierung behandelt werden.

Die Enzymaktivität der Thiopurin S-Methyltransferase wird u. a. durch Veränderungen im TPMT-Gen bestimmt. Genetische Veränderungen können beispielsweise einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Die dadurch veränderte Konformation des Enzyms hat Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms. Die häufigsten genetischen Varianten im TPMT-Gen betreffen die Nukleotide (nt) 238, 460 und 719. Es sind weitere genetische Varianten in der Literatur beschrieben, die aber selten bzw. nur einmalig in einer Population beobachtet wurden. Etwa 10 % der weißen Bevölkerung haben eine um ca. 75 % reduzierte TPMT-Aktivität, während ca. 0,3 % keine messbare Enzymaktivität aufweisen. Vergleichende Genotyp-Phänotyp Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die Genotypisierung mit der TPMT-Aktivität in 87 % der Fälle korrelierte.

Die Genotypisierung kann helfen, medikamentöse Therapien individuell zu optimieren. Insbesondere bei Tumorthérapien mit Thiopurinen, Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder nach Transplantationen ist die Analyse des TPMT-Gens sinnvoll und kann unerwünschte Nebenwirkungen und dadurch entstehende Kosten (verlängerter Krankenhausaufenthalt etc.) senken.

## 6. Prinzip des Testverfahrens

Bei der genetischen Diagnostik mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem humanen Genom amplifiziert. Die Detektion findet bei der Real-Time PCR mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das PCR-Amplifikat binden. Die Schmelzkurvenanalyse im unmittelbaren Anschluss an die PCR-Amplifikation ermöglicht die Identifizierung und Diskriminierung von Genvarianten. Da die Probenröhrchen nach dem PCR-Lauf nicht mehr geöffnet werden müssen, wird das Kontaminationsrisiko deutlich reduziert (Mackay, 2004).

## 7. Produktbeschreibung

Mit dem *artus* TPMT LC PCR Kit wird humane DNA einfach, schnell und sicher auf das Vorhandensein klinisch relevanter genetischer Varianten im TPMT-Gen untersucht. Diese Analyse ermöglicht die Abschätzung therapieinduzierter Risiken, z. B. bei Behandlung mit Thiopurinen.

Die Analyse wird anhand des Nachweises der genetischen Varianten innerhalb des TPMT-Gens mit Hilfe des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments durchgeführt. Die Reagenzien enthalten Primer zur Amplifikation von Abschnitten des humanen TPMT-Gens sowie fluoreszenzmarkierte Sonden zum Nachweis der genetischen Varianten an den Nukleotidpositionen nt 238 im Exon 5, nt 460 im Exon 7 und nt 719 im Exon 10. Zusätzlich werden als Kontrollen der Reaktionen in gesonderten Ansätzen die Positivkontrollen A (*Aw* / *Av*) und B mitgeführt.

Da der Test auf der Amplifikation humaner genomischer DNA basiert, müssen Fluoreszenzsignale im Schmelzkurvenabschnitt unabhängig vom Vorliegen einer allelischen Variante zu erkennen sein. Ist dies nicht der Fall, deutet dies auf eine ineffiziente Extraktion der DNA oder eine PCR-Inhibition hin. Eine zusätzliche interne Kontrolle ist in diesem genetischen Test daher nicht nötig.

**Beachte:** Entscheidend für die Auswertung sind die Signale der Schmelzkurvenanalyse. Bei Anwendung des *artus* TPMT LC PCR Kits ist eine

quantitative Amplifikation während des *LightCycler*<sup>®</sup>-Laufes in den meisten Fällen nicht zu beobachten. Dies hat keinen Einfluss auf die Schmelzkurvenanalyse.

## 8. Protokoll

### 8.1 DNA-Isolierung

Kits zur DNA-Isolierung aus Blut werden von verschiedenen Herstellern angeboten. In Abhängigkeit vom Protokoll des gewählten Herstellers setzen Sie die angegebene Probenmenge in die Aufreinigung ein und führen die DNA-Isolierung entsprechend der Vorschrift durch. Folgender Isolierungskit wird empfohlen:

Probenmaterial	Aufreinigungskit	Katalognummer	Hersteller
Blut	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN

- Der *artus* TPMT LC PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.
- Bei Aufreinigungen, die **Ethanol**-haltige Waschpuffer benutzen, stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 Upm) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert mögliche PCR-Inhibitionen durch Ethanol.

### 8.2 Vorbereitung der PCR

**Beachte:** Analysieren Sie pro PCR-Lauf bitte **maximal zwölf Proben**, da es bei der parallelen Analyse von mehr als zwölf Proben zu einem technisch bedingten untypischen Schmelzkurvenverlauf der heterozygoten Variante nt 238 kommen kann.

Stellen Sie sicher, dass der Cooling Block mit den darin enthaltenen Adaptern (Zubehör des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments) auf +4 °C vorgekühlt ist. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl *LightCycler*<sup>®</sup> Kapillaren in die Adapter des Cooling Blocks. Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn



vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortexen) und anschließend anzentrifugiert werden.

Bei jeder Anwendung sind die in dem *artus* TPMT LC PCR Kit enthaltenen Positivkontrollen (*TPMT LC Control Aw*; *TPMT LC Control Av* und *TPMT LC Control B*) und eine Negativkontrolle (*Water, PCR grade*) zu berücksichtigen.

Zum Ansetzen der PCR-Reaktionen verwenden Sie bitte das folgende Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 1):

Anzahl der Proben		1
1. Ansetzen des Master Mixes	<i>TPMT LC Master A</i> oder <i>TPMT LC Master B</i>	16 µl
	<i>TPMT LC Mg-Sol</i>	2 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>18 µl</b>
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	18 µl
	Probe	2 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Pipettieren Sie in das Plastikreservoir jeder Kapillare 18 µl des Master Mixes. Anschließend geben Sie 2 µl des Eluats aus der DNA-Isolierung hinzu. Entsprechend müssen als Positivkontrolle jeweils 2 µl der *TPMT LC Control A* (*Aw / Av*) oder *TPMT LC Control B* und als Negativkontrolle 2 µl Wasser (*Water, PCR grade*) eingesetzt werden. Verschließen Sie die Kapillaren. Um den Ansatz aus dem Plastikreservoir in die Kapillare zu überführen, zentrifugieren Sie die Adapter mit den darin enthaltenen Kapillaren in einer Tischzentrifuge für zehn Sekunden bei maximal 400 x g (2.000 Upm).

**Beachte:** Das Aufsetzen der Deckel auf die Kapillaren sollte zur Vermeidung von Kontaminationen mit dem *LightCycler*® Capping Tool erfolgen.

## Vorbereitung der PCR

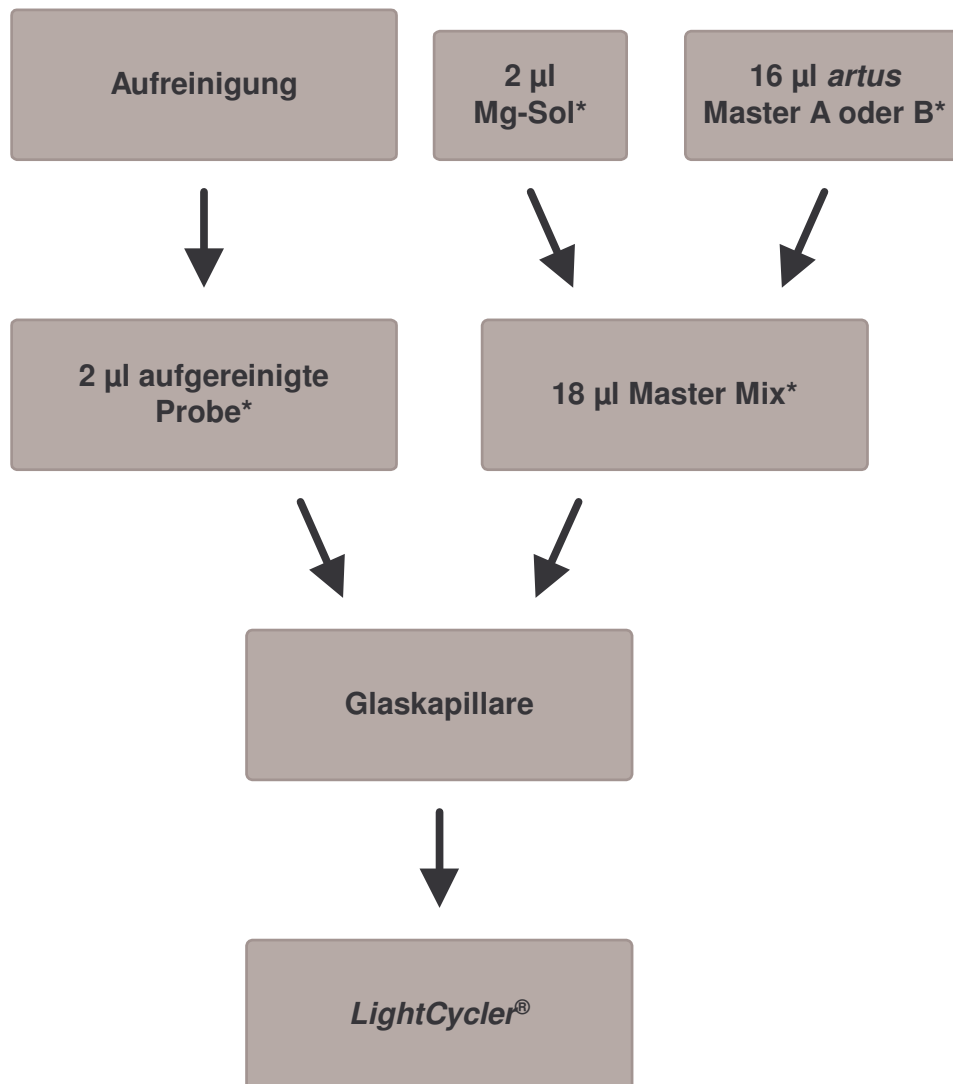


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf.

\* Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.

### 8.3 Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments

Zur Detektion genetischer Varianten im TPMT-Gen erstellen Sie auf Ihrem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument ein Temperaturprofil gemäß den folgenden fünf Arbeitsschritten (siehe Abb. 2 - 6).

- |  |        |
|--|--------|
| A. Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms | Abb. 2 |
| B. Touch Down-Schritt                        | Abb. 3 |
| C. Amplifikation der DNA                     | Abb. 4 |
| D. Schmelzkurve                              | Abb. 5 |
| E. Kühlung                                   | Abb. 6 |

Beachten Sie insbesondere die Einstellungen für *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* und *Temperature Targets*. In den Abbildungen sind diese Einstellungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Hinweise zur Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments finden Sie im *LightCycler Operator's Manual*.

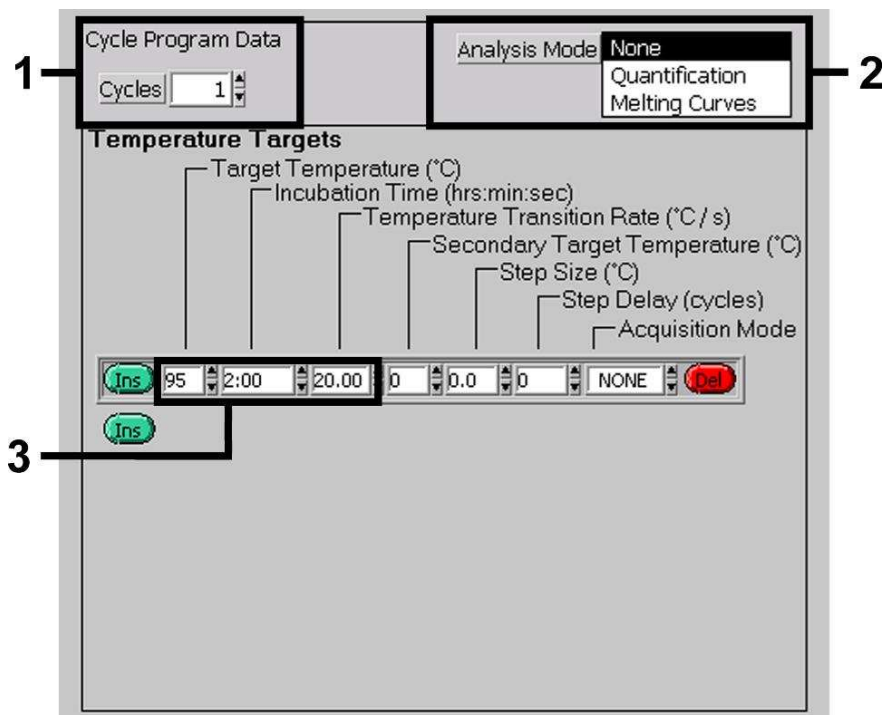


Abb. 2: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

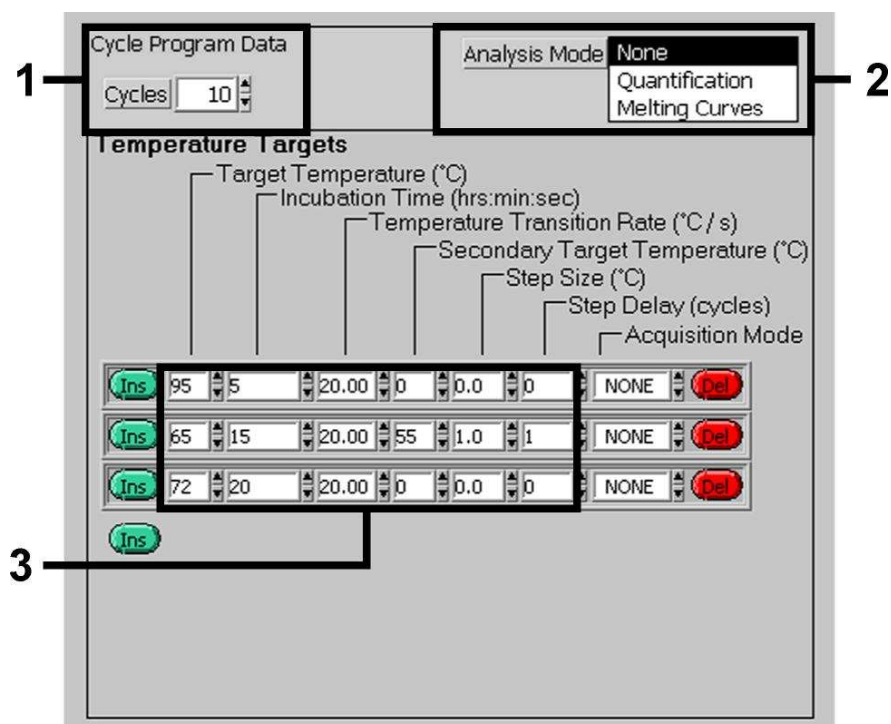


Abb. 3: Touch Down-Schritt.

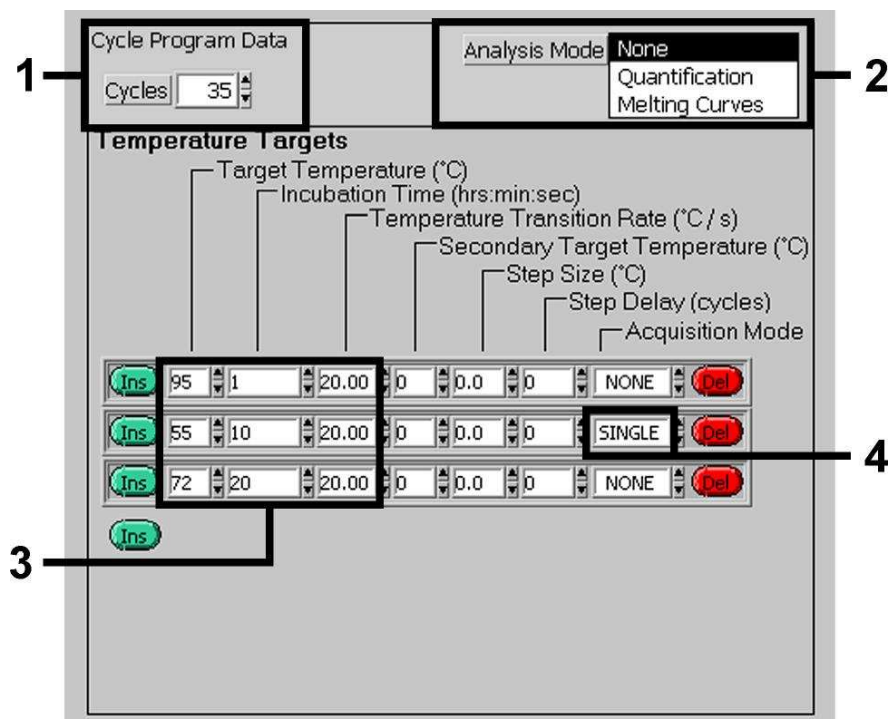


Abb. 4: Amplifikation der DNA.

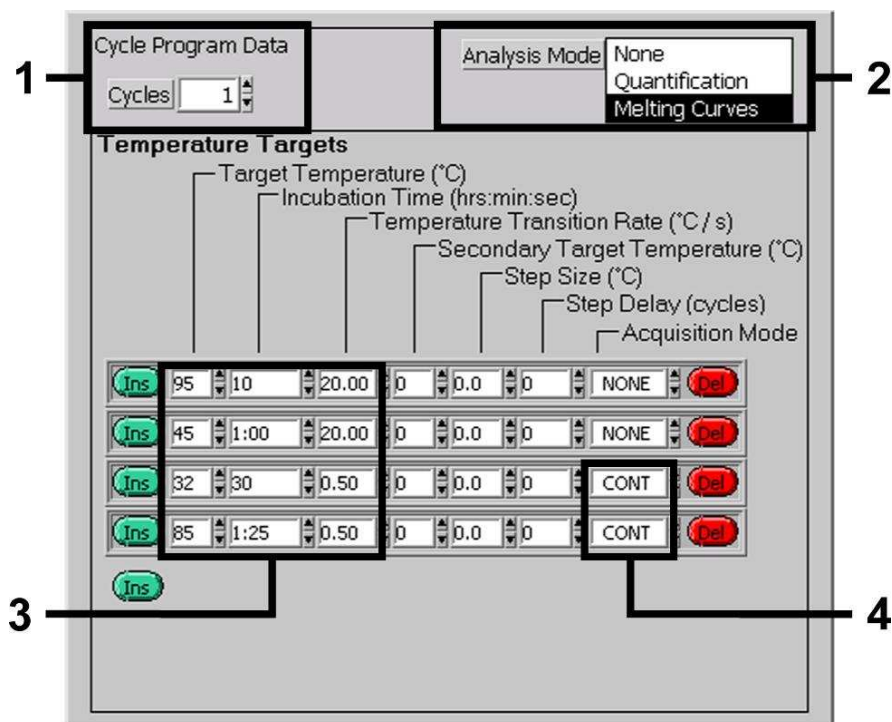


Abb. 5: Schmelzkurve.

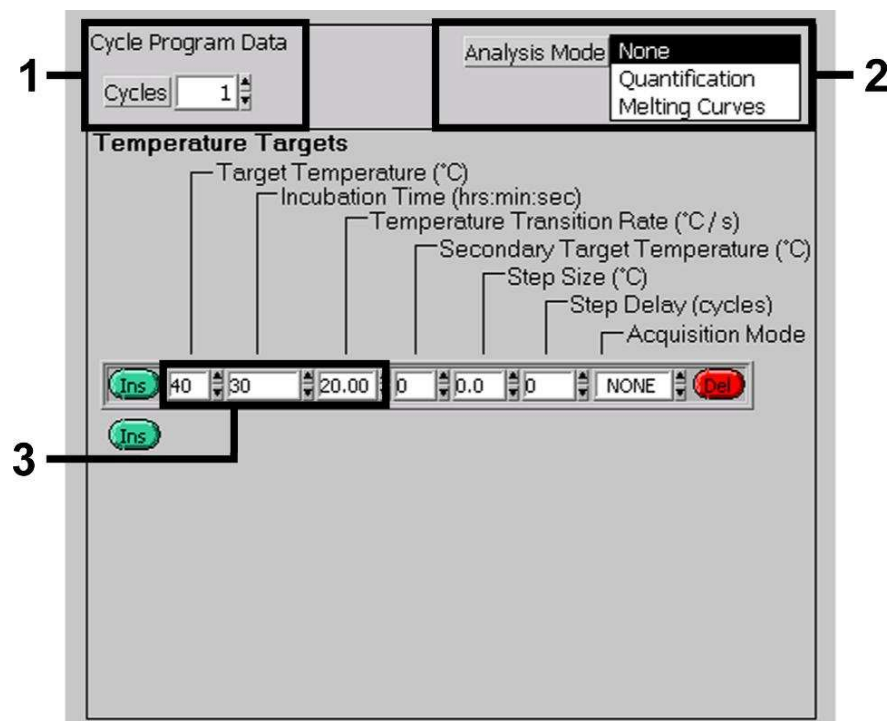


Abb. 6: Kühlung.

## 9. Auswertung

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments enthält eine als *Color Compensation File* bezeichnete Datei, welche diese Einstrahlungen kompensiert. Diese Datei öffnen Sie vor, während oder im Anschluss des PCR-Laufs durch Aktivierung der Schaltfläche *Choose CCC File* bzw. *Select CC Data*. Sollte kein *Color Compensation File* installiert sein, erstellen Sie die Datei bitte unter Beachtung der Anleitung im *LightCycler Operator's Manual*. Nach Aktivierung des *Color Compensation File* erscheinen in den Fluorimeter-Kanälen F1, F2 und F3 getrennte Signale. Zur Analyse der PCR-Ergebnisse, die mit dem *artus* TPMT LC PCR Kit gewonnen werden, wählen Sie bitte die Ansichtsfunktionen F2/Back-F1 und F3/Back-F1 für die TPMT-PCR. Bei Anwendung des *artus* TPMT LC PCR Kits ist eine quantitative Amplifikation während des *LightCycler*<sup>®</sup>-Laufes in den meisten Fällen nicht zu beobachten.

Die Komponenten des *artus* TPMT LC PCR Kits dienen dem Nachweis der genetischen Varianten (Wildtyp = wt; Variante = var) an den Nukleotidpositionen (nt) 238, 460 und 719 im TPMT-Gen. Die Bestimmung der genetischen Varianten erfolgt mit Hilfe des Programms *Melting Curve*. Im Fluorogramm weisen die Schmelzpunkte bei den in nachfolgender Tabelle (siehe Tab. 1) aufgeführten Temperaturen auf das Vorliegen des Wildtyps bzw. der genetischen Variante hin. Bei Heterozygotie erscheint die Kurve zweigipflig.

Tab. 1: Schmelzpunkte des Wildtyps (wt) bzw. der genetischen Varianten (var).

Master	Kanal F2			Kanal F3		
	nt	wt	var	nt	wt	var
A	238	54 °C	64 °C	-	-	-
B	460	57 °C	47 °C	719	42 °C	54 °C

Bitte beachten Sie, dass die Schmelzpunkte um  $\pm 2^\circ\text{C}$  von der angegebenen Temperatur abweichen können. Zur besseren Darstellung des Fluorogramms empfiehlt es sich in vielen Fällen den *Digital Filter* auszuschalten.

Die folgenden Abbildungen (siehe Abb. 7 - 9) zeigen die Fluorogramme des Nachweises der Polymorphismen an den Nukleotidpositionen nt 238, nt 460 und nt 719 in homozygoter Wildtypform sowie in der heterozygot bzw. homozygot veränderten Form. Die mit dem *artus* TPMT LC PCR Kit gelieferten Positivkontrollen (*TPMT LC Control A* (*Aw / Av*) und *B*) weisen den heterozygoten Zustand der jeweiligen genetischen Variante auf.

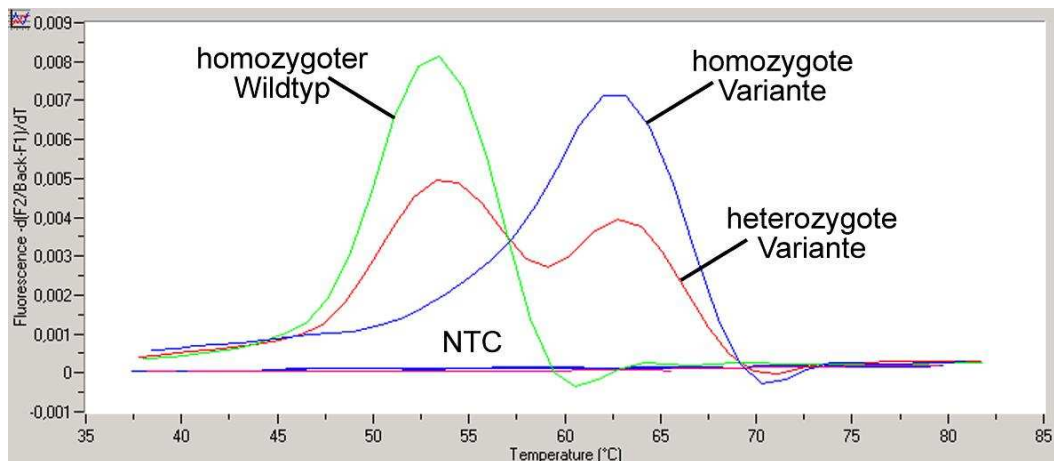


Abb. 7: Fluorogramm zum Nachweis des Nukleotidaustausches nt 238 mit Hilfe des *artus* TPMT LC PCR Kits (**Master A**) im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

**Beachte:** Analysieren Sie pro PCR-Lauf bitte **maximal zwölf Proben**, da es bei der parallelen Analyse von mehr als zwölf Proben zu einem technisch bedingten untypischen Schmelzkurvenverlauf der heterozygoten Variante nt 238 kommen kann.

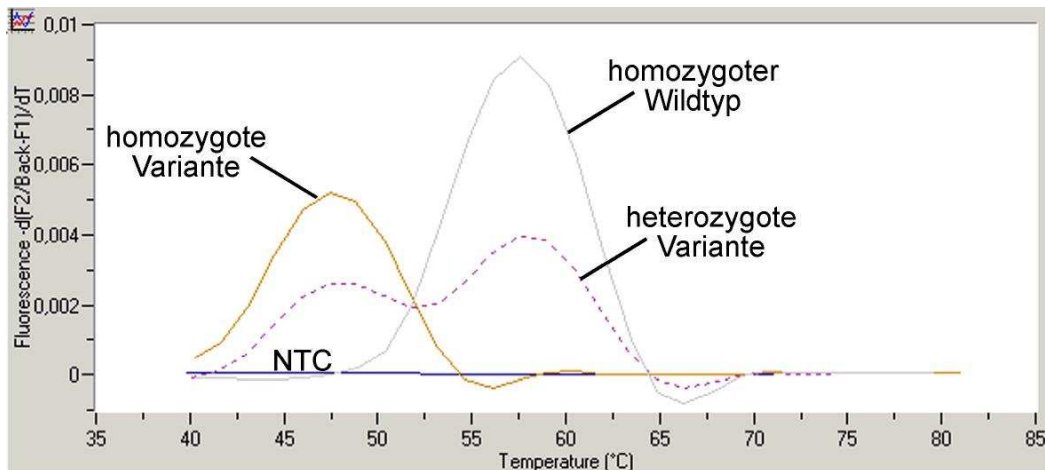


Abb. 8: Fluorogramm zum Nachweis des Nukleotidaustausches nt 460 mit Hilfe des *artus* TPMT LC PCR Kits (**Master B**) im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

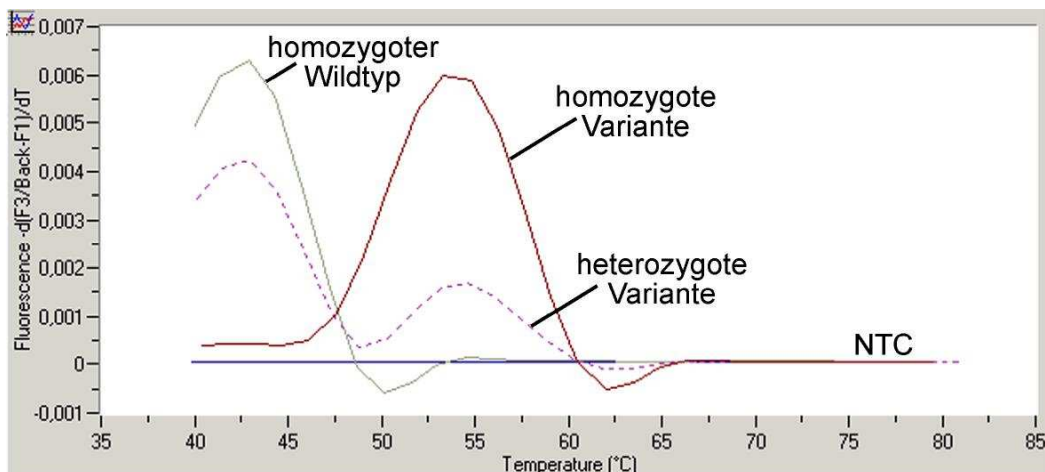


Abb. 9: Fluorogramm zum Nachweis des Nukleotidaustausches nt 719 mit Hilfe des *artus* TPMT LC PCR Kits (**Master B**) im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).



Die Bestimmung des Genotyps ist durch die Kombination der allelischen Varianten möglich (siehe Tab. 2). Dabei ist zu beachten, dass bei Vorliegen von zwei heterozygoten Varianten diese auf einem Allel gemeinsam als auch auf zwei Allelen liegen können. In jedem Fall kann bei Vorliegen wenigstens einer genetischen Variante eine Reduktion der TPMT-Enzymaktivität erwartet werden.

Eine normale Enzymaktivität ist bei Trägern zweier Wildtypallele zu erwarten, vorausgesetzt, es beeinflussen keine anderen nicht-genetischen Faktoren die Enzymaktivität. Eine eingeschränkte Enzymaktivität ist bei Trägern mindestens eines genetisch veränderten Allels zu erwarten. Beispielsweise kann bei Vorliegen einer Heterozygotie an der Position nt 460 **und** nt 719 der Genotyp TPMT\*3A/\*1 aber auch TPMT\*3B/\*3C lauten. Sind beide Allele betroffen, steigt das Risiko einer genetisch bedingten Nebenwirkung. Mit Hilfe des *artus* TPMT LC PCR Kits werden die Nukleotidvarianten an drei verschiedenen Positionen im TPMT-Gen untersucht, was den Nachweis der Allele TPMT\*1, TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B und TPMT\*3C ermöglicht.

Tab. 2: Genetische Varianten im TPMT-Gen.

Allel	nt 238 F2	nt 460 F2	nt 719 F3	Enzymaktivität
TPMT*1				Normal
TPMT*2	x			Reduziert
TPMT*3A		x	x	Keine Aktivität
TPMT*3B		x		Reduziert
TPMT*3C			x	Reduziert

Aus den vorab beschriebenen Allelen resultieren verschiedene mögliche Genotypen. Diese sind in nachfolgender Tabelle (siehe Tab. 3) aufgelistet.

Tab. 3: Einfluss des Genotyps auf die TPMT Enzymaktivität.

Homozygoter Wildtyp Genotyp	Heterozygoter oder homozygot varianter Genotyp	Homozygot varianter Genotyp
TPMT*1/*1	TPMT*1/*2	TPMT*3A/*3A
	TPMT*1/*3A	
	TPMT*1/*3B	
	TPMT*1/*3C	
	TPMT*2/*2	
	TPMT*2/*3A	
	TPMT*2/*3B	
	TPMT*2/*3C	
	TPMT*3A/*3B	
	TPMT*3A/*3C	
	TPMT*3B/*3B	
	TPMT*3B/*3C	
	TPMT*3C/*3C	
<b>normale Enzymaktivität</b>	<b>reduzierte Enzymaktivität</b>	<b>keine Enzymaktivität</b>

## 10. Troubleshooting

**Kein Signal bei der Positivkontrolle (*TPMT LC Control Aw, Av oder B*) oder den Proben im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 bzw. F3/Back-F1:**

- Die Programmierung des Temperaturprofils des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments ist fehlerhaft.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.3 Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
  - Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.2 Vorbereitung der PCR**) und wiederholen Sie ggf. die PCR.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus* TPMT LC PCR Kits wurde überschritten.
  - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.
- Die PCR wurde inhibiert.
  - Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren benutzen (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.
  - Vergewissern Sie sich, dass bei der DNA-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde (siehe **8.1 DNA-Isolierung**).
- Es liegen aufreinigungsbedingte DNA-Verluste vor.
  - Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren anwenden (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich an die Herstellervorschrift.

**Kein Signal bei dem *TPMT LC Master A* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1:**

Der *TPMT LC Master A* generiert nur ein Signal im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1.

## **Untypischer Schmelzkurvenverlauf beim Nachweis des Nukleotidaustausches nt 238 im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1:**

- Es wurden mehr als zwölf Proben parallel analysiert.

### **Schwacher Fluoreszenz-Peak**

- Mischen Sie die Komponenten gründlich vor deren Verwendung.
- Prüfen Sie die Amplifikationsbedingungen.
- Kühlen Sie den Cooling Block mit den darin enthaltenen Adaptern auf etwa +4 °C vor.
- Kühlen Sie alle Reagenzienbestandteile während des Pipettierens.

Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

## **11. Spezifikationen**

### **11.1 Analytische Sensitivität**

Der *artus* TPMT LC PCR Kit dient dem Nachweis der individuellen genetischen Konstitution hinsichtlich der genetischen Varianten nt 238, nt 460 und nt 719 im humanen TPMT-Gen mit Hilfe der *LightCycler*<sup>®</sup>-Technologie. Humane genomische DNA wurde aus Blutproben aufgereinigt, spektralphotometrisch quantifiziert und in seriellen Verdünnungsstufen verdünnt. Ein Minimum von 0,12 ng genomischer DNA (20 Kopien) pro PCR (entspricht 0,005 - 0,02 µl Blut, je nach Blutspender und Aufreinigung) reicht für die Detektion der genetischen Varianten aus.

### **11.2 Analytische Spezifität**

Die Spezifität des *artus* TPMT LC PCR Kits wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie die Wahl stringenter Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die Primer und Sonden sind anhand einer Sequenzvergleichs-Analyse auf eventuelle Homologien zu allen in Genbanken publizierten Sequenzen überprüft worden. Ferner wurde die Spezifität zum Nachweis dieser genetischen Polymorphismen durch

Sequenzierung der einzelnen Allelvarianten und anschließend Sequenzvergleich in internationalen Datenbanken sichergestellt.

### **11.3 Diagnostische Sensitivität und Spezifität**

Anhand von 300 DNA-Proben wurde unter Verwendung der Kitbestandteile die Frequenz der Polymorphismen in der kaukasischen Population, wie in der Literatur beschrieben, bestätigt.

## **12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch**

- Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostika-Verfahren (EN375) unterrichtet und ausgebildet wurde.
- Die genaue Einhaltung des Protokolls ist unbedingt erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erreichen.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien sind nicht zu benutzen.

## **13. Sicherheitsinformationen**

Sicherheitsinformationen zum *artus* TPMT LC PCR Kit können Sie dem entsprechenden Materialsicherheits-Datenblatt entnehmen (material safety data sheet, MSDS). Dieses finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter [www.qiagen.com/support/msds.aspx](http://www.qiagen.com/support/msds.aspx).

## 14. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO 9001 und ISO 13485-zertifizierten Qualitäts-Management-System von QIAGEN wurde jede Charge des *artus* TPMT PCR Kits gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

## 15. Literatur

- (1) Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr.* 1998 Jan; 87 (1): 108 - 11.
- (2) Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Feb 14; 92 (4): 949 - 53.
- (3) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (4) Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, Kaskas BA. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2002 Aug; 12 (6): 429 - 36.

## 16. Erklärung der Symbole



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Hersteller



Bestellnummer



Materialnummer



Handbuch



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Inhalt reicht für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich

**Mg-Sol**

*Magnesium-Lösung*











**Austria ■ QIAGEN Vertriebs GmbH ■** Löwengasse 47/6 ■ 1030 Wien

Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

**Canada ■ QIAGEN Inc. ■** 2800 Argentia Road ■ Unit 7 ■ Mississauga ■ Ontario ■ L5N 8L2

Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**France ■ QIAGEN S.A. ■** 3 avenue du Canada ■ LP 809 ■ 91974 COURTABOEUF CEDEX

Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

**Germany ■ QIAGEN GmbH ■** QIAGEN Strasse 1 ■ 40724 Hilden

Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Italy ■ QIAGEN S.p.A. ■** Via Grosio, 10/10 ■ 20151 Milano

Orders 02-33430-411 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

**Japan ■ QIAGEN K.K. ■** Forefront Tower II ■ 13-1, Kachidoki 3 Chome ■ Chuo-ku, Tokyo 104-0054

Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

**Switzerland ■ QIAGEN AG ■** Garstligweg 8 ■ 8634 Hombrechtikon

Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**USA ■ QIAGEN Inc. ■** 27220 Turnberry Lane ■ Valencia ■ CA 91355

Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046980DE 127132194