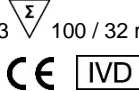


CF F508del RealFast™ Assay

REF 7-260 / 7-263 100 / 32 reactions
-30°C -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennalab.com
www.viennalab.com

1. Intended Use

The CF F508del RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR test for the detection of the F508del mutation in the human *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)* gene. The deletion of phenylalanine at position 508 of the CFTR polypeptide is the most prevalent mutation in Cystic Fibrosis (CF) patients and carriers. The kit is designed for the targeted analysis of the **F508del mutation only** and will not detect the I507del mutation. The benign, not CF-causing variants I506V, I507V and F508C do not interfere with the assay and will appear as normal alleles. The kit is used as an aid to diagnosis for patients with CF symptoms or individuals with a positive family history and as a second or third tier diagnostic test in newborn screening programs. The qualitative assay discriminates three possible F508del genotypes in human DNA: N/N (normal), N/F508del (heterozygous) or F508del/F508del (homozygous mutant).
Reference sequence: HGVS NM_000492.3 c.1521_1523delCTT; NCBI dbSNP: rs113993960.

2. Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is a very common autosomal recessive disorder in European populations. The pathogenic F508del variant, which shows a decreasing prevalence from Northwest to Southeast Europe, is the major mutation accounting for approximately two thirds of all *CFTR* alleles in patients with CF. Morbidities include progressive obstructive lung disease with bronchiectasis, frequent hospitalizations for pulmonary disease, pancreatic insufficiency and malnutrition, recurrent sinusitis and bronchitis, and male infertility due to congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD).

3. Kit Contents

		100 / 32 Rxn
RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial □ white cap	1000 / 320 µl
CF F508del Assay Mix	1 vial ■ purple cap	550 / 550 µl
CF F508del WT-Control	1 vial ■ green cap	75 / 75 µl
CF F508del MUT-Control	1 vial ■ red cap	75 / 75 µl

The kit contains reagents for 100 / 32 reactions in a final volume of 20 µl each.

The RealFast™ 2x Genotyping Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The CF F508del Assay Mix consists of *CFTR* gene-specific primers and allele-specific, dual-labeled hydrolysis probes. Controls representing wild type (WT-Control) and homozygous mutant (MUT-Control) genotypes are supplied with the kit.

4. Storage and Stability

CF F508del RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -30 to -15°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

5. Product Description

5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains a gene-specific primer pair which amplifies a 101 bp fragment of the *CFTR* gene, and dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequence of the amplified fragment. The proximity of the 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dye on intact probes prevents the reporter from fluorescing. During the extension phase of PCR, the 5' – 3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase cleaves the 5'-fluorescent reporter from the hybridized probe. The physical separation of the fluorophore from the quencher dye generates a fluorescent signal in real-time, which is proportional to the accumulated PCR product.

In normal samples the **HEX-labeled F508del wild type probe** hybridizes to the complementary strand of the gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the HEX channel (556nm) and no or only a baseline signal in the FAM channel (520nm). Vice versa, in homozygous mutant samples the **FAM-labeled F508del mutant probe** binds to the gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the FAM channel and no or only a baseline signal in the HEX channel. In heterozygous samples both wild type and mutant probes bind to the amplicons and generate intermediate signals in both channels.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The CF F508del RealFast™ Assay is validated for use with the AB 7500 Fast instrument.

The kit is compatible with various common real-time PCR instruments capable of recording FAM and HEX fluorescence:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Note:** RealFast™ Genotyping QuickGuides for setting up and analyzing experiments on different types of instruments can be downloaded from www.viennalab.com.

When using AB StepOne™, set passive reference dye to "ROX"! «

The kit is supplied **without ROX**. For use with real-time PCR instruments requiring high ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), add ROX at a final concentration of 1 µM to the 2x Genotyping Mix.

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 30 alleles testing positive for the CF F508del mutation with a reference method. The CF F508del RealFast™ Assay determined all 30 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 298 alleles testing negative for the CF F508del mutation with a reference method. The CF F508del RealFast™ Assay determined all 298 alleles as negative, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 0.2 ng genomic DNA (per reaction)

Recommended DNA concentration: 2 to 10 ng/µl genomic DNA

6. Materials Required but not Supplied

Real-time PCR instrument with FAM (520 nm) and HEX (556 nm) filters, instrument-compatible reaction vessels, disposable powder-free gloves, vortexer, mini-centrifuge for 2.0 ml tubes, tube racks, set of calibrated micropipettes (0.5 – 1000 µl), sterile tips with aerosol-barrier filter, molecular grade water, DNA extraction system, freezer, biohazard waste container.

7. Experimental Protocol

7.1. DNA Extraction

DNA extraction reagents are **not supplied** with the kit.

DNA isolated from various specimens (e.g. whole peripheral blood, dried blood spots, buccal swabs) can be used. Ensure extracted DNA is suitable for amplification in terms of concentration, purity and integrity.

For accurate genotype calling, the DNA amount per reaction should be within the range of 10 to 50 ng for all samples.

7.2. PCR Controls

Always include a **No Template Control (NTC)** in each experiment to confirm absence of potential contamination. It is advisable to run the NTC (use PCR-grade water instead of DNA) in duplicate.

Always include the CF F508del **WT-Control** and CF F508del **MUT-Control** as positive reference signals for your unknown samples. Some real-time PCR software, e.g. AB 7500 Fast, requires signals for all three possible genotypes for correct allelic discrimination. In order to obtain a heterozygous control (HET-Control), mix an aliquot of WT-Control and MUT-Control in a ratio of 1:1.

» **Note:** WT- and MUT-Controls are potential sources of contamination. Make sure to handle them carefully. «

7.3. Preparation of CF F508del RealFast™ Master Mix:

Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing. Set up PCR at room temperature. Prepare sufficient **Master Mix** for all your reactions (N samples + positive controls + negative controls) plus at least one additional reaction to compensate for pipetting inaccuracies:

Component	per reaction	e.g. 24+1 reactions
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
CF F508del Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Dispense **15 µl Master Mix** into each well. Add **5 µl purified DNA** or **Control** template to reach a final reaction volume of 20 µl.

To minimize risk of contamination, always pipette templates in the following order: first NTC, then samples, last positive controls. Immediately close reaction vessels.

» **Note:** Avoid creating bubbles in the final reaction mix and avoid touching the optical surface of the cap or sealing film without gloves. Both may interfere with fluorescence measurements. Centrifuge briefly if needed. «

7.4. PCR Program

Program the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions for allelic discrimination / genotyping experiments. Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480,
and **other** Peltier heating block-based instruments:

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension –
			Data acquisition on FAM and HEX channel

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension –
			Data acquisition on Green and Yellow channel

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The genotype of each sample is determined by calculating the ratio between signals recorded in the **HEX channel (normal)** and signals recorded in the **FAM channel (mutant)**. Most real-time PCR software automatically resolves data of both channels into clusters in a scatterplot. Data points plotted along the x- and y-axes correspond to normal and homozygous mutant genotypes, respectively. Data points clustered in the middle of the scatterplot represent heterozygous genotypes. The NTC appears in the lower left corner.

» **Note:** The CF F508del RealFast™ Assay detects only F508del; other mutations neighboring F508del cannot be detected. The presence of such mutations may affect correct genotyping, e.g. heterozygous I507del samples will appear as normal, homozygous I507del samples will lack amplification in both channels, and compound heterozygous I507del / F508del samples will appear as homozygous F508del. «

Controls	Amplification in FAM channel (520 nm)	Amplification in HEX channel (556 nm)	Genotype
WT-Control	NO	YES	normal
HET-Control	YES	YES	heterozygous
MUT-Control	YES	NO	homozygous mutant
NTC	NO	NO	----

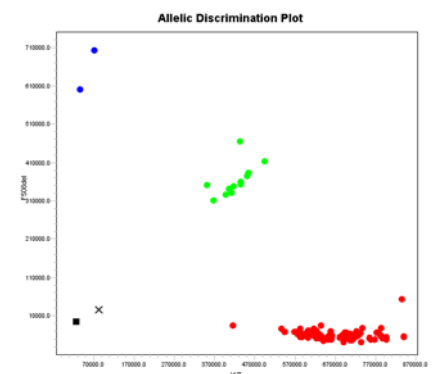
Some instrument software needs manual threshold settings for accurate genotype calling.

Recommendations for Threshold Settings (C_q):

Set threshold value for the FAM channel just above the background fluorescent signal generated by the WT-Control (HEX-positive). Vice versa, set threshold value for the HEX channel just above the background fluorescent signal of the MUT-Control (FAM-positive).

Samples crossing the threshold line beyond C_q 37 give invalid results and must be repeated.

To analyze acquired data, please follow your instrument software instructions.



9. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostics use only.
- Always use disposable powder-free gloves and wear suitable lab coat when handling specimens and reagents.
- Perform reaction setup in an area separate from nucleic acid preparation and PCR product analysis.
- Use pipettes dedicated for PCR setup only, use aerosol-guarded pipette tips.
- Use instrument-compatible reaction vessels with optically clear caps or sealers.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use expired kits or kit components.

CF F508del RealFast™ Assay

REF 7-260 / 7-263 Σ 100 / 32 reactions
-30°C -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennalab.com
www.viennalab.com

1. Verwendungszweck

Der CF F508del RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR-Test zum Nachweis der F508del Mutation im menschlichen *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) Gen. Die Deletion von Phenylalanin an Position 508 des *CFTR*-Polypeptids ist die häufigste Mutation bei Mukoviszidose-Patienten und -Trägern. Der Kit ist ausschließlich für die gezielte Analyse der F508del Mutation konzipiert und erkennt die I507del Mutation nicht. Die gutartigen, nicht CF-verursachenden Varianten I506V, I507V und F508C stören den Test nicht und erscheinen als normale Allele. Der Kit dient als Diagnosehilfe für Patienten mit CF-Symptomen oder Personen mit positiver Familienanamnese, sowie als diagnostischer Test zweiter oder dritter Stufe in Neugeborenen-Screening-Programmen. Der qualitative Test unterscheidet drei mögliche F508del Genotypen in zweiter DNA: N/N (normal), N/F508del (heterozygot) oder F508del/F508del (homozygot mutiert). Referenzsequenz: HGVS NM_000492.3 c.1521_1523delCTT; NCBI dbSNP: rs113993960.

2. Einleitung

Zystische Fibrose (CF) ist eine sehr häufige autosomal-rezessive Erkrankung vor allem in europäischen Bevölkerungen. Die pathogene F508del-Variante, deren Prävalenz von Nordwest- nach Südosteuropa abnimmt, ist die häufigste Mutation und für etwa zwei Drittel aller *CFTR* Allele bei CF-Patienten verantwortlich. Zu den Morbiditäten zählen progressive obstruktive Lungenerkrankung mit Bronchiektasien, häufige Krankenhausaufenthalte aufgrund von Lungenerkrankungen, Pankreasinsuffizienz und Mangelernährung, wiederkehrende Sinusitis und Bronchitis sowie männliche Unfruchtbarkeit aufgrund des angeborenen beidseitigen Fehlens der Samenleiter (CBAVD).

3. Kit Bestandteile 100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> weisser Deckel	1000 / 320 µl
CF F508del Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> violetter Deckel	550 / 550 µl
CF F508del WT-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> grüner Deckel	75 / 75 µl
CF F508del MUT-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> roter Deckel	75 / 75 µl

Der RealFast™ 2x Genotyping Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der CF F508del Assay Mix besteht aus *CFTR* genspezifischen Primern und zwei allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolysesonden. Weiters sind Kontrolltemplates für den normalen (WT-Control) und homozygot mutierten (MUT-Control) Genotyp im Kit vorhanden.

Der Kit beinhaltet Reagenzien für 100 / 32 Reaktionen mit je 20 µl Endvolumen.

4. Lagerung und Stabilität

Der CF F508del RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°C. Alternativ bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2-8°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 20 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

5. Produktbeschreibung

5.1. Testprinzip

Der Test basiert auf dem fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, bekannt auch als TaqMan®-Assay. Jede Reaktion enthält ein genspezifisches Primerpaar zur Amplifizierung eines 101 bp Fragments im *CFTR* Gen und zwei doppelt-markierte, allelspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz des amplifizierten Fragments binden. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

In normalen Proben hybridisiert die **HEX-markierte F508del Wildtyp-Sonde** an den komplementären Strang des amplifizierten Genfragments. Das Resultat ist ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX-Kanal (556nm) und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im FAM-Kanal (520nm). Im umgekehrten Fall von homozygot mutierten Proben hybridisiert die **FAM-markierte F508del Mutanten-Sonde** an den komplementären Strang des amplifizierten Genfragments. Somit wird ein starkes Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im HEX-Kanal detektiert. Bei heterozygoten Proben binden beide Sonden an die Zielregion der Amplikons und verursachen ein intermediäres Signal in beiden Detektionskanälen.

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der CF F508del RealFast™ Assay ist für die Verwendung mit dem AB 7500 Fast Gerät validiert.

Der Kit ist mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM- und HEX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Anmerkung:** RealFast™ Genotyping QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: www.viennalab.com.
Bei Verwendung von AB StepOne™ muss der passive Referenzfarbstoff auf "ROX" gesetzt werden! «

Der Kit enthält **kein ROX**. Bei Verwendung von real-time PCR Geräten, die eine hohe ROX- Konzentration zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), muss ROX in einer Endkonzentration von 1 µM dem 2x Genotyping Mix zugefügt werden.

5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 30 Allelen, die mit einem Referenztest positiv auf die CF F508del Mutation getestet wurden, bestimmt. Der CF F508del RealFast™ Assay typisierte alle 30 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 298 Allelen, die mit einem Referenztest negativ auf die CF F508del Mutation getestet wurden, bestimmt. Der CF F508del RealFast™ Assay typisierte alle 298 Allele als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA (pro Reaktion)

Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 10 ng/µl genomische DNA

6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM-(520 nm) und HEX-(556 nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionssystem, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter.

7. Arbeitsanleitung

7.1. DNA Extraktion

DNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten.

Es kann DNA aus verschiedenen Proben (z.B. Vollblut, Blutkärtchen, Wangenabstriche oder Speichel) verwendet werden. Gereinigte DNA muss für die Amplifizierung in hochmolekularer Form sowie in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen.

Für eine zuverlässige Genotypisierung sollte die DNA Menge pro Reaktion für alle Proben zwischen 10 und 50 ng liegen.

7.2. PCR Kontrollen

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** eine **No Template Control** (NTC) zur Kontrolle potentieller Kontaminationen mit ein. Es ist empfehlenswert die NTC (hochreines Wasser anstelle von DNA) als Duplikat einzusetzen.

Führen Sie in jedem Lauf **immer** die **CF F508del WT-Control** und die **CF F508del MUT-Control** als Referenzsignale für unbekannte Proben durch. Einige real-time PCR Programme, beispielsweise für AB 7500 Fast, erfordern zur korrekten Auswertung im "Allelic Discrimination Plot" Signale für alle drei möglichen Genotypen. Zur Herstellung einer heterozygoten Kontrolle (HET-Control) mischen Sie ein Aliquot von WT-Control und MUT-Control im Verhältnis 1:1.

» **Anmerkung:** WT- und MUT-Controls stellen potentielle Kontaminationsquellen dar und müssen daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

7.3. Vorbereitung des CF F508del RealFast™ Master-Mixes

Alle Lösungen komplett auftauen, vorsichtig mischen und kurz abzentrifugieren. Das Ansetzen der PCR erfolgt bei Raumtemperatur. Bereiten Sie ausreichend **Master-Mix** für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze (N Proben + Positivkontrollen + Negativkontrollen) vor, und berechnen Sie mindestens eine zusätzliche Reaktion ein um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen:

Komponente	pro Reaktion	z.B. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
CF F508del Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Legen Sie **15 µl Master-Mix** in jedes Gefäß vor. Pipettieren Sie **5 µl** gereinigte **DNA** oder **Control** Template dazu um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen.

Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos pipettieren Sie die Proben in dieser Reihenfolge: Zuerst NTC, danach Ihre Proben, zuletzt die Positivkontrollen. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

» **Anmerkung:** Vermeiden Sie Luftblasen im PCR-Ansatz und Fingerabdrücke auf den optischen Oberflächen der Reaktionsgefäße. Beides kann die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. «

7.4. PCR Programm

Programmieren Sie Ihr real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für "Allelic Discrimination" oder "Genotyping" Experimente. Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480
und andere Peltier-Heizblock-basierende Geräte:

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	1 min	Annealing/Extension - Datenaufnahme im FAM- und HEX-Kanal

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension - Datenaufnahme im Green- und Yellow-Kanal

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Der Genotyp einer Probe wird aufgrund des Signalverhältnisses zwischen den Aufnahmekanälen berechnet. Dabei wird das im **HEX-Kanal (normal)** detektierte Signal mit dem im **FAM-Kanal (mutiert)** detektierten Signal verglichen. Die meisten real-time PCR Auswertprogramme stellen die Daten beider Kanäle automatisch als Streudiagramm (Scatterplot) dar. Datenpunkte entlang der X- bzw. Y-Achsen entsprechen normalen bzw. homozygot mutierten Genotypen, während Datenpunkte in der Mitte des Scatterplots heterozygoten Genotypen entsprechen. Die NTC erscheint links unten.

» **Anmerkung:** Der CF F508del RealFast™ Assay erkennt nur F508del; andere Mutationen in der Nähe von F508del können nicht erkannt werden. Das Vorhandensein solcher Mutationen kann die korrekte Genotypisierung beeinträchtigen, z.B. erscheinen heterozygote I507del-Proben als normal, homozygote I507del-Proben weisen in beiden Kanälen keine Amplifikation auf und I507del/F508del heterozygote Proben erscheinen als homozygot F508del. «

Kontrollen	Amplifikation im FAM-Kanal (520 nm)	Amplifikation im HEX-Kanal (556 nm)	Genotyp
WT-Control	NEIN	JA	normal
HET-Control	JA	JA	heterozygot
MUT-Control	JA	NEIN	homozygot mutiert
NTC	NEIN	NEIN	---

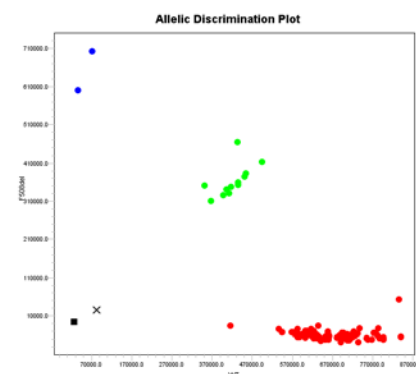
Einige Auswertprogramme benötigen manuell gesetzte Schwellenwerte (Threshold) zur korrekten Genotypisierung.

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C_q):

Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der WT-Control (HEX positiv). Setzen Sie umgekehrt den Schwellenwert für den HEX-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der MUT-Control (FAM positiv).

Proben, die den Schwellenwert nach C_q 37 übersteigen, gelten als ungültiges Resultat und müssen wiederholt werden.

Folgen Sie der Anleitung Ihres real-time PCR Auswertprogrammes um die gewonnenen Daten zu analysieren.



9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist ausschließlich für *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Tragen Sie beim Hantieren der Proben und Reagenzien immer puderfreie Einweghandschuhe und geeignete Laborkleidung.
- Bereiche für die DNA Extraktion und den Ansatz des PCR Mastermixes sollten räumlich streng getrennt sein.
- Benützen Sie ein eigenes Pipettenset nur für den PCR-Ansatz und verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Benützen Sie ausschließlich dünnwandige, gerätekompabile PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.