

# MutaPLATE® MTHFR (TM)

## Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der C677T und A1298C  
Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) des MTHFR-Gens*

*For the analysis of the C677T and A1298C  
single nucleotide polymorphism (SNP) of the  
MTHFR gene*

Gültig ab / Valid from 2022-03-04



**KF1901432**  
**KF1901496**



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>3</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>7</b>
<b>11</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>10</b>
<b>12</b>	<b>GRENZEN DES TESTS</b>	<b>10</b>
<b>13</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>11</b>
<b>14</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>11</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLATE® MTHFR (TM) Real-Time-PCR-Kit ist ein molekularbiologischer Test zum parallelen Nachweis der beiden häufigen Punktmutationen an den Positionen 677 und 1298 des 5,10-Methylentetrahydrofolatereduktase (MTHFR)-Gens in offenen Real-Time PCR-Systemen (z. B. RotorGene, SmartCycler, LightCycler, ABI, Stratagene, Amplifa). Die Substitution von Cytosin gegen Thymin bzw. Adenin gegen Cytosin bewirkt eine Änderung der der Aminosäuresequenz von Alanin zu Valin (Ala222Val) und im Falle von A1298C von Glutamin zu Alanin (Glu429Ala).

## 2 EINLEITUNG

Hyperhomocysteinämie ist das Ergebnis eines gestörten Homocysteinestoffwechsels, der häufig aufgrund eines genetischen Defekts auftritt. Der Anstieg des Homocystein-Plasmaspiegels ist daher ein Risikofaktor für kardio- oder zerebrovaskuläre Komplikationen sowie für Venenthrombosen und Migräne. Die Patienten tragen vielfach die verbreitete C677T-Mutation im MTHFR-Gen, die für eine thermolabile Variante des MTHFR-Enzyms mit reduzierter Aktivität kodiert. Die A1298C-Mutation im MTHFR-Gen erhöht den Homocystein-Plasmaspiegel nur bei C677T Heterozygotie. Aus diesem Grund sollten beide Mutationen in Kombination, als genetische Risikofaktoren für Hyperhomocysteinämie, analysiert werden. [1], [2], [3]

## 3 TESTPRINZIP

Das MutaPLATE® MTHFR (TM) Real-Time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und zusätzliches Material für den Nachweis der Polymorphismen C677T und A1298C. Die variablen Regionen der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Bindungsstelle des Methylentetrahydrofolat Reduktase-Gens (MTHFR) wird durch die PCR unter Verwendung genomischer DNA als Vorlage vervielfältigt. Die im Kit verwendeten spezifischen Primer flankieren den variablen Bereich und erzeugen Amplifikate von 180 bp und 109 bp unter Verwendung der TaqMan-Technologie.

Die Standard-PCR enthält zusätzlich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (TaqMan-Sonden). Beide Sonden binden an die jeweilige amplifizierte Ziel-DNA, die den Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) enthält. Hierdurch wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt und von der optischen Einheit des verwendeten Real-Time-PCR-Gerätes detektiert. Die TaqMan-Sonde für das C- und A-Allel (Wildtyp) ist markiert mit FAM (**510 - 530 nm, grün**) und die TaqMan-Sonde für das T- und C-Allel (Mutation) ist mit YAK (**555 - 560 nm, gelb**) markiert.

## 4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF1901432) oder 96 (KF1901496) Reaktionen.

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

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Enzymmix	blau	1 x 875 µl	3 x 875 µl
Detektionsmix 1 C677T	gelb	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Detektionsmix 2 A1298C	weiß	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive Kontrolle	rot	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)
- Offenes Real-Time-PCR-System (mit Platten/Streifen oder Tubes)
- Sterile PCR Reaktionsgefäße oder 96-well Platten/Streifen (weiß)
- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

## 6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

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

Schützen Sie die 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 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 MutaPLATE® MTHFR (TM) Real-Time-PCR-Kit ist genomische DNA, die mittels eines geeigneten Extraktionskits aus klinischen Proben (Blut) isoliert wurde.

## 9 REAL-TIME-PCR

### 9.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf alle Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien schonend aufgetaut, gründlich gemischt (nicht vortexen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Die Detektionsmische vor Lichteinwirkung schützen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien und den Ansatz während des Arbeitens stets in einem Kühlblock (+4 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

### 9.2 Durchführung

Für die Amplifikation werden zwei Reaktionsgefäße pro Probe und zwei zusätzliche Reaktionsgefäße pro Mastermix 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 Master Mix wird wie in Tabelle 2 und 3 beschrieben pipettiert:

## Master Mix C677T

Tabelle 2: Herstellung des Master Mix C677T

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 1 ( <b>gelb</b> )	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzymmix ( <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 **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

## Master Mix A1298C

Tabelle 3 Herstellung des Master Mix A1298C

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 2 ( <b>weiß</b> )	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzymmix ( <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 **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.



### 9.3 Geräteeinstellungen

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

Tabelle 4: 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	45	keine
Primer Anlagerung und Elongation	60 s	58 °C	20 °C/s		<b>Single</b>
Kühlen	30 s	40 °C	20 °C/s	1	-

## 10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Analyse für die Polymorphismen C677T und A1298C werden bei **510 - 530 nm / grün** und **555 - 560 nm / gelb** (entsprechend des verwendeten Real-Time-PCR-Gerätes) dargestellt.

Die folgenden Abbildungen zeigen typische Beispiele sowohl für homozygote als auch für heterozygote Proben auf einem LightCycler® 2.0. Bei einigen Real-Time-PCR-Geräten (z.B. LightCycler® 2.0) kann ein Color Compensation File erforderlich sein.

### MTHFR C667T

**C-Allel** bei 530 nm

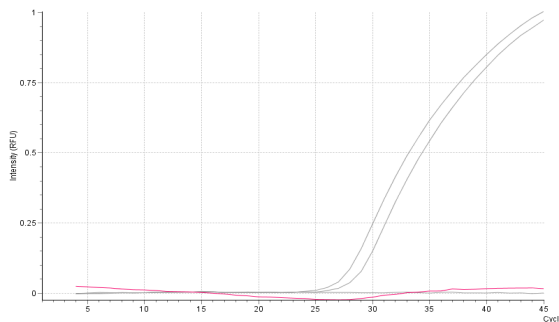


Abb. 1: Auswertung zu MTHFR C667T - C-Allele

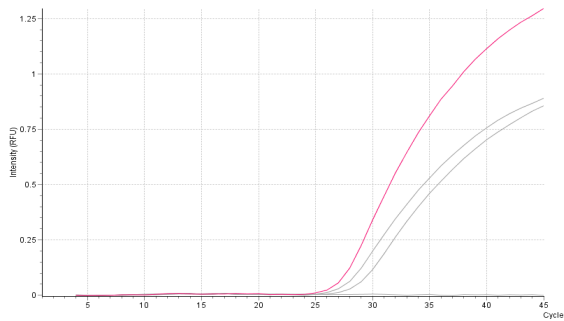
**MTHFR C667T****T-Allel** bei 560 nm

Abb. 2: Auswertung zu MTHFR C667T - T-Allele

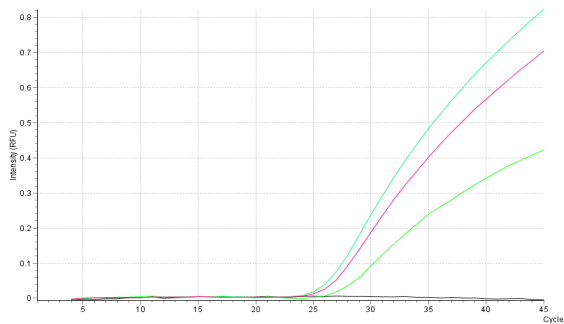
**MTHFR A1298C****A-Allel** bei 530 nm

Abb. 3: Auswertung zu MTHFR A1298C - A-Allele

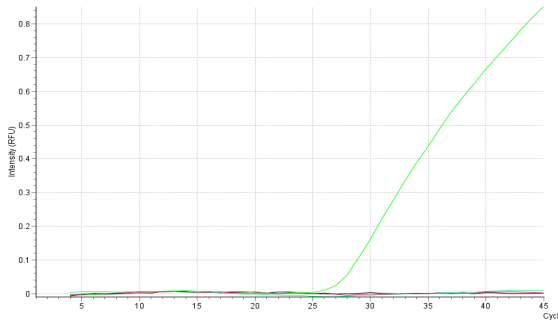
**C-Allel** bei 560 nm

Abb. 4: Auswertung zu MTHFR A1298C - C-Allele

Die mitgelieferte Positive Kontrolle enthält ein Template, welches für den C667T und A1298C Polymorphismus **heterozygot** ist.

Für jeden der Polymorphismen sind die folgenden drei Unterscheidungen möglich:

**C667T**1. Homozygot **C/C**:

Zunahme des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, kein Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

2. Heterozygot **C/T**:

Zunahme des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde und Zunahme des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

3. Homozygot **T/T**:

Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, Zunahme des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

**A1298C**1. Homozygot **A/A**:

Zunahme des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, kein Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

2. Heterozygot **A/C**:

Zunahme des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde und Zunahme des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

3. Homozygot **C/C**:

Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, Zunahme des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

## 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 Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben bei 510 nm - 530 nm oder 555 - 560 nm:**

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

### **Geringe Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben bei 510 nm - 530 nm oder 555 - 560 nm:**

Einzelne Komponenten vor Gebrauch sorgfältig mischen (nur durch mehrmaliges pipettieren - nicht vortexen!

Alle Stammlösungen während der Arbeitsschritte in geeigneter Weise kühlen und die Detektionsmische vor Lichteinstrahlung schützen.

Auf Eis oder mit einem gekühlten Block (4 °C) arbeiten.
















## 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. 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 1		Obere Temperaturgrenze
	Detektionsmix 2		Hersteller
	Positive Kontrolle		Chargennummer
	Negative Kontrolle		Arbeitsanleitung beachten
	Inhalt		<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Verwendbar bis JJJJ-MM-TT		

### 14 LITERATUR

1. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van de Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998 May; 62(5):1044-51.
2. Khandanpour N, Willis G, Meyer FJ, Armon MP, Loke YK, Wright AJ, Finglas PM, Jennings BA. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. *J Vasc Surg.* 2009 Mar; 49(3):711-8.
3. Hertfelder HJ, Gnida C, Pötzsch B, Hanfland P. MTHFR-Polymorphismus C677T: Sinn und Unsinn der Diagnostik. *Dtsch Arztebl* 2004; 101(46): A-3101 / B-2625 / C-2501. Seguí et al., *British Journal of Haematology*, 2000, 111:122-8



# MutaPLATE<sup>®</sup> MTHFR (TM)

## Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the C677T and A1298C  
single nucleotide polymorphism (SNP) of the  
MTHFR gene*

Valid from 2022-03-04



**KF1901432**  
**KF1901496**



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>15</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>19</b>
<b>11</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>22</b>
<b>12</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>23</b>
<b>13</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>23</b>
<b>14</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>24</b>



## 1 INTENDED USE

The MutaPLATE® MTHFR (TM) Real-Time PCR Kit is a molecular biological test for the parallel detection of the two common point mutations at positions 677 and 1298 of the 5,10-methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) gene in open real-time PCR systems (e.g. RotorGene, SmartCycler, LightCycler, ABI, Stratagene, Amplifa). The substitution of cytosine against thymine or adenine against cytosine causes a change in the amino acid sequence from alanine to valine (Ala222Val) and in the case of A1298C from glutamine to alanine (Glu429Ala).

## 2 INTRODUCTION

Hyperhomocysteinemia is the result of a disturbed homocysteine metabolism often due to genetic defects. The increase of homocysteine plasma level is therefore a risk factor for cardio- or cerebrovascular complications as well as for venous thrombosis and mirgaine. Patients often carry the common C677T mutation in the MTHFR gene coding for a thermolabile variant of the MTHFR enzyme with reduced activity. The A1298C mutation in the MTHFR gene increases the homocysteine plasma level only in case of C677T heterozygosity. Due to this fact both mutations should be analysed in combination as genetically risk factors for hyperhomocysteinemia. [1], [2], [3]

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLATE® MTHFR (TM) Real-Time PCR Kit contains specific primers and additional material for the detection of the C677T and A1298C polymorphisms. The variable regions of the flavin adenine dinucleotide (FAD) binding site of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene are amplified by PCR using genomic DNA as a template. The specific primers used in the kit flank the variable region and generate amplicons of 180 bp and 109 bp using TaqMan technology.

The standard PCR additionally contains two sequence-specific oligonucleotides labelled with a fluorescent dye (TaqMan probes). Both probes bind to the respective amplified target DNA containing the single nucleotide polymorphism (SNP). This generates a fluorescence signal which is detected by the optical unit of the real-time PCR device used. The TaqMan probe for the C and A allele (wild type) is marked with FAM (510 - 530 nm, green) and the TaqMan probe for the T and C allele (mutation) is marked with YAK (555 - 560 nm, yellow).

## 4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF1901432) or 96 (KF1901496) reactions.

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

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Enzyme mix	blue	1 x 875 µl	3 x 875 µl
Detection mix 1 C677T	yellow	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Detection mix 2 A1298C	weiß	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive control	red	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 150 µl

## 5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA extraction kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Open real-time PCR system (with plates/strips or tubes)
- Sterile PCR reaction tubes or 96-well plate/strips (white)
- Sterile reaction tubes
- Calibrated pipettes (variable volumes) and sterile disposable tips with filter
- Optional: Liquid handling system for automation

## 6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLATE® MTHFR (TM) 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 label 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 MutaPLATE® MTHFR (TM) real-time PCR kit is genomic DNA isolated from clinical samples (blood) using a suitable extraction kit.

## 9 REAL-TIME-PCR

### 9.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.
- Before setting up the Real-Time-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take 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 are needed per sample plus two additional reaction tubes per master mix for the negative and the positive controls. 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 mixes are pipetted as described in tables 2 and 3:

### Master mix C677T

Table 2: Preparation of master mix C677T

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 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.
- 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.

### Master mix A1298C

Table 3: Preparation of master mix A1298C

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 2 (white)	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.
- 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.

### 9.3 Instrument settings

For the Real-Time-PCR use the thermal profile shown in table 4.

Table 4: 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	45	none
Primer annealing and elongation	60 s	58 °C	20 °C/s		<b>single</b>
Cooling	30 s	40 °C	20 °C/s	1	-

## 10 DATA ANALYSIS

The results of the analysis for the **C677T** and **A1298C** polymorphisms are shown at **510-530 nm / green** and **555-560 nm / yellow** (corresponding to the Real-Time PCR instrument used).

The following figures show typical examples for both homozygous and heterozygous on a LightCycler® 2.0. With some real-time PCR devices (e.g. LightCycler® 2.0) a colour compensation file may be required.

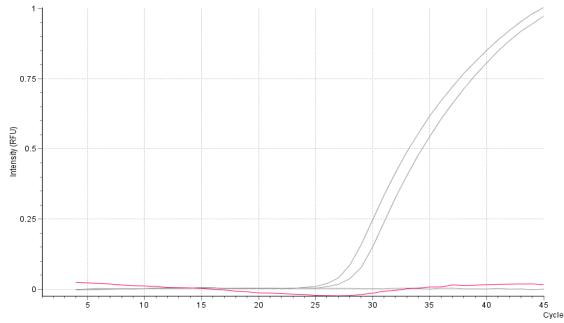
**MTHFR C667T****C-Allele** at 530 nm

Fig. 1: Evaluation of MTHFR C667T - C-Allele

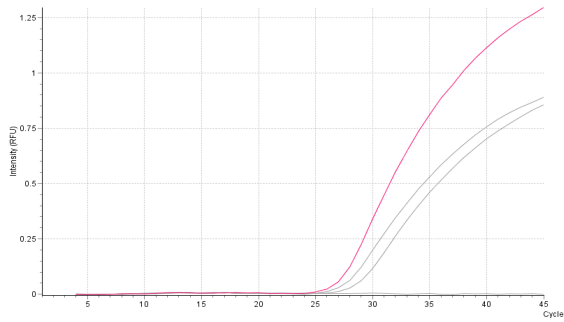
**MTHFR C667T****T-Allele** at 560 nm

Fig. 2: Evaluation of MTHFR C667T - T-Allele

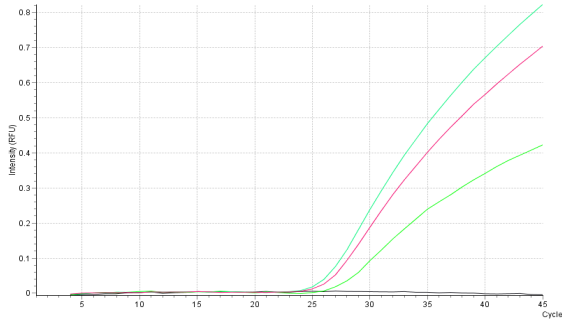
**MTHFR A1298C****A-Allele** at 530 nm

Fig. 3: Evaluation of MTHFR A1298C - A-Allele

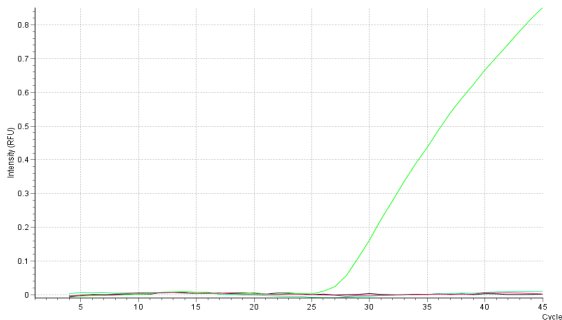
**C-Allele** at 560 nm

Abb. 4: Evaluation of MTHFR A1298C - C-Allele

The Positive Control provided contains a template that is **heterozygous** for the C667T and A1298C polymorphisms.

The following three discriminations for each of the polymorphisms are possible:

### **C677T**

1. Homozygous **C/C**:

Increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe, no increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

2. Heterozygous **C/T**:

Increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe and increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

3. Homozygous **T/T**:

No increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe, increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

### **A1298C**

1. Homozygous **A/A**:

Increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe, no increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

2. Heterozygous **A/C**:

Increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe and increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

3. Homozygous **C/C**:

No increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe, increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

## **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 fluorescence peak in the positive control or samples at about 510 - 530 nm or 555 - 560 nm.**

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

### Low fluorescence peak at about 510 - 530 nm or 555-560 nm

Mix individual components carefully before use (only by pipetting several times - do not vortex!).

Cool all stock solutions appropriately during the working steps and protect the detection mixes from light irradiation.

Work on ice or with a cooled block (4 °C).









## 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. 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 mix		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix 1		Upper limit of temperature
	Detection mix 2		Manufacturer



Positive control



Lot number



Negative control



Consult instructions for use



Content

*In vitro* diagnostic medical device

Use by YYYY-MM-DD

## 14 LITERATURE

1. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van de Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998 May; 62(5):1044-51.
2. Khandanpour N, Willis G, Meyer FJ, Armon MP, Loke YK, Wright AJ, Finglas PM, Jennings BA. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. *J Vasc Surg.* 2009 Mar; 49(3):711-8.
3. Hertfelder HJ, Gnida C, Pötzsch B, Hanfland P. MTHFR-Polymorphismus C677T: Sinn und Unsinn der Diagnostik. *Dtsch Arztebl* 2004; 101(46): A-3101 / B-2625 / C-2501. Seguí et al., *British Journal of Haematology*, 2000, 111:122-8



## **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)

