

QPCR POLE Mutation Analysis Kit

Realtime PCR Amplification Kit

Handbuch

RUO

Nur für wissenschaftliche Anwendungen – nicht für
medizinische Diagnostik

QPOLHB01v1de
23. Mai 2023

REF

35-14900-0100

LOT

Chargennummer



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Website: www.biotype.de
Email: support@biotype.de

Änderungshinweis

Bitte beachten Sie die folgenden Anpassungen gegenüber der vorherigen Handbuch-Version:

Dokumentnummer	Änderungen	Datum
QPOLHB01v1de	Initiale Version des Handbuches	23.05.2023

Für weitere Fragen, kontaktieren Sie uns gerne:

unter +49 351 8838 400 oder

support@biotype.de

Inhalt

Produktbeschreibung	4
Zusammenfassung und Erläuterung	4
Mitgelieferte Materialien	5
Reagenzienlagerung und -Handhabung	6
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	6
Allgemeine Laborausstattung.....	6
Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial.....	7
Geräte und Software	7
Probenmaterial	8
Warnungen und Sicherheitshinweise	8
Protokoll	10
Übersicht über den experimentellen Ablauf	10
Probenvorbereitung.....	10
DNA Extraktion	10
DNA Quantifizierung und Verdünnung	11
DNA Lagerung	12
Vorbereitung der Kontrollproben	12
Positivkontrolle PC	12
Mastermix Ansatz	12
PCR Amplifikation	15
Datenanalyse	16
Übersicht des Arbeitsablauf	16
Allgemeine Einstellungen	17
Laufvalidierung	17
Probenanalyse.....	18
Troubleshooting	20
Qualitätskontrolle	21
Technische Unterstützung	21

Referenzen	21
Einschränkungen	21
Bestellinformation	22
Marken und Haftungsausschluss	22
Symbole	23

Produktbeschreibung

Das QPCR POLE Mutation Kit ist ein qualitativer Multiplex-PCR-Assay zur Analyse humaner DNA, welche aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingeschlossen (FFPE) Proben extrahiert wurde. Er weist 6 Einzelnukleotidmutationen innerhalb der Exonuklease-Domäne des POLE-Gens nach, wobei 5 Mutationen differenziert werden.

Der Assay darf nur von qualifiziertem und geschultem Personal in professionellen Laboren verwendet werden.

Die Ergebnisse sind ausschließlich für Forschungszwecke und nicht für Diagnoseverfahren bestimmt.

Das Detektionslimit der qualitativen Analyse liegt bei 1 % Allelfrequenz (VAF), welches in etwa 2 % Tumor DNA entspricht.

Die optimale Probeneinsatz entspricht 4 ng DNA pro Reaktion unter Standardbedingungen.

Zusammenfassung und Erläuterung

Das menschliche Gen POLE kodiert die katalytische Untereinheit (Exonukleasedomäne) der DNA Polymerase Epsilon. Die Hauptfunktion der Exonukleasedomäne (EDM) ist ihre Korrekturlesungsaktivität – eine Exonukleasefunktion, welche aufgrund von fehlerhafter Paarung mit dem Mutterstrang falsch eingesetzte Basen im Tochterstrang detektiert und entfernt [1].

Das QPCR POLE Mutation Analysis Kit ist ein Multiplex qPCR Assay zum qualitativen Nachweis von 6 Mutationen, wobei die 5 Hauptmutationen in DNA Proben aus FFPE Material differenziert werden können. Interne sowie externe Kontrollen stellen die Funktionalität des Assays sicher. [Tabelle 1](#) listet die nachweisbaren Mutationen des QPCR POLE Mutation Analysis Kit auf.

Tabelle 1 Liste der nachweisbaren POLE Mutationen

Assay	AA Austausch	CDs Mutation
Primer Mix A	A456P	c.1366G>C
	P286R	c.857C>G
	V411L (G>C) und (G>T)	c.1231G>C/ c.1231G>T
Primer Mix B	S297F	c.890C>T
	S459F	c.1376C>T

Mitgelieferte Materialien

Tabelle 2 Inhalt des QPCR POLE Mutation Analysis Kit

Komponente	Reagenz	Deckel- farbe	Volumen pro Kit (2 x 50 Reaktionen)	Lagerung
Nuclease-Free Water	Nuklease-freies Wasser	Hellblau	1 x 1,5 mL	
QPCR POLE Master Mix	PCR Mastermix	Schwarz	1 x 500 µL	-25 °C bis -15 °C, vor Licht geschützt
QPCR POLE Positive Control	Positivkontrolle	Weiß	1 x 80 µL	
QPCR POLE Primer Mix A	Primermix A	Rot	1 x 50 µL	
QPCR POLE Primer Mix B	Primermix B	Gelb	1 x 50 µL	

HINWEIS



Bitte beachten Sie, dass die Verpackungsgröße die Anzahl der Testungen beschreibt, **ohne** die Anzahl der erforderlichen Kontrollen oder den erforderlichen Pipettierüberschuss zu berücksichtigen.

HINWEIS



Das Kit enthält Reagenzien zur Durchführung von bis zu 50 Tests mit jedem QPCR POLE Primer Mix.

Reagenzienlagerung und -Handhabung

Das Kit wird auf Trockeneis versandt. Die Komponenten des Kits sollten gefroren ankommen, mit Ausnahme des QPCR POLE Master Mixes. Dieser ist mit einem Puffer versetzt, der das Einfrieren des Reagenzes verhindert.

Bitte überprüfen Sie bei Erhalt des Kits dessen Vollständigkeit. Wenden Sie sich bitte sofort an BIOTYPE GmbH, wenn eine oder mehrere Komponenten nicht gefroren sind oder wenn die Röhrchen oder die Verpackung während des Transports beschädigt wurden.

Lagern Sie alle Komponenten bei -25 °C bis -15 °C ohne Lichteinwirkung und vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren. Insbesondere QPCR POLE Primer Mix A und QPCR POLE Primer Mix B müssen lichtgeschützt gelagert werden.

Die QPCR POLE Positive Control sollte getrennt von den PCR-Reagenzien gelagert werden.

Das Ablaufdatum des Kits ist auf dem Etikett der Verpackung angegeben.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Allgemeine Laborausstattung

- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 mL Reaktionsgefäße
- Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten
- Vortex-Mischer
- Kalibrierte, einstellbare Pipetten mit aerosoldichten Filterspitzen
- Geeignete* 200 μL 96-Well-Reaktionsplatten mit geeigneter optischer Folie, PCR-Qualität
- Geeignete Rack für 2 mL-Reaktionsgefäße
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Qubit Fluorometer (Best. Nr. Q33238, Thermo Fisher Scientific)
- PCR-Arbeitsplatz oder Sterilbank

*abhängig vom Gerätehersteller

HINWEIS



Das gesamte für die PCR verwendete Material muss von angemessener Qualität sein (DNA-frei und für die Molekularbiologie geeignet). Bitte stellen Sie sicher, dass alle verwendeten Geräte gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial

Tabelle 3 Erforderliche aber nicht mitgelieferte Materialien

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
Qubit™ dsDNA HS Assay	Thermo Fisher Scientific	Q32851
Qubit™ dsDNA BR Assay	Thermo Fisher Scientific	Q32850
TE Puffer pH 8.0 (Ambion)	Fisher Scientific GmbH	10742317
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen	56404
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093
RNase A (100 mg/mL)	Qiagen	19101

Geräte und Software

Das QPCR POLE Mutation Analysis Kit wurde für die Verwendung mit den folgenden PCR-Cyclern überprüft:

- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Best. Nr.: A28139, Thermo Fisher Scientific)
- QuantStudio™ Design and Analysis Software (V. 1.5.1 oder höher)

HINWEIS



Vergewissern Sie sich, dass alle verwendeten Instrumente gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

HINWEIS



Die Anwendung des QPCR POLE Mutation Analysis Kits auf anderen Instrumenten als den oben genannten, muss vom Anwender eigenverantwortlich verifiziert werden.

Probenmaterial

Die folgenden Proben wurden mit dem QPCR POLE Mutation Analysis Kit verifiziert: DNA, die aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Endometriumgewebe extrahiert wurden, wurden auf die Verwendung mit dem QPCR POLE Mutation Analysis Kit getestet.

Zusätzlich wurde FFPE-Material getestet, das mit Plasmiden versetzt wurde, welche wiederum die POLE Mutationen enthalten.

Die gewonnene DNA ist unverdünnt bei -25 °C bis -15 °C zu lagern.

Warnungen und Sicherheitshinweise

Achtung! Gültig für den QPCR POLE Master Mix:



Achtung **H302** Gesundheitsschädlich beim Verschlucken



Achtung **H371** Kann das zentrale Nervensystem schädigen. Weg der Exposition: Oral.

- P101** Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
- P102** Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- P103** Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
- P260** Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P264** Nach Gebrauch ... gründlich waschen.

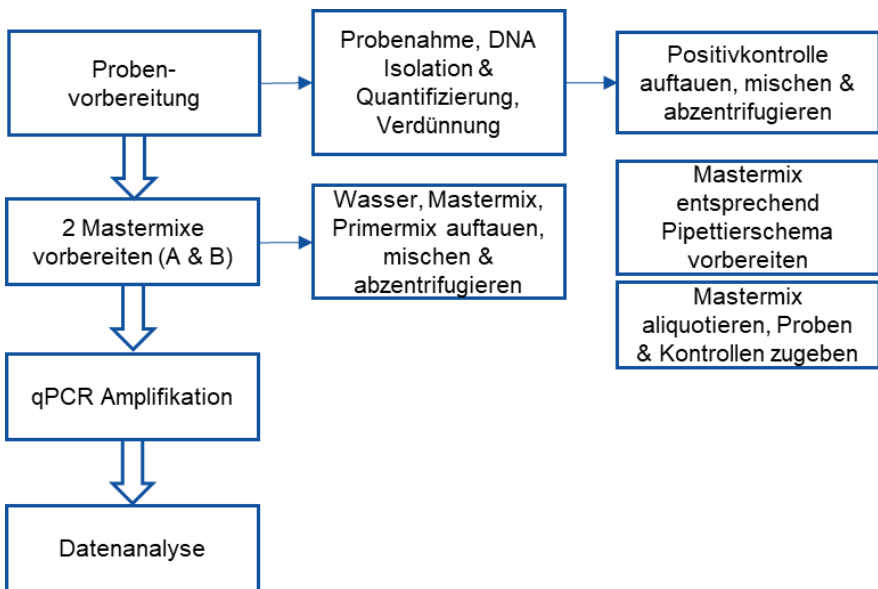
- P301+** BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein
P312 GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/...anrufen.
- P330** Mund ausspülen.
- P405** Unter Verschluss aufbewahren.
- P501** Inhalt/Behälter in Übereinstimmung mit den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften entsorgen.

- Lesen Sie die Anweisungen sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.
- Lesen Sie die Sicherheitsdatenblätter (SDS) für alle BIOTYPE Produkte, die auf Anfrage erhältlich sind. Bitte wenden Sie sich an die jeweiligen Hersteller, um Kopien der SDS für zusätzlich benötigte Reagenzien zu erhalten.
- Kitkomponenten verschiedener Kitchargen dürfen nicht gemischt werden.
- Das Aliquotieren der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht erlaubt.
- Dieses Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die speziell in PCR-Techniken unterwiesen und geschult sind.
- Überprüfen Sie das Produkt und seine Komponenten vor dem ersten Gebrauch auf:
 - Unversehrtheit
 - Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Füllung (siehe Kapitel Mitgelieferte Materialien)
 - Korrekte Beschriftung
 - Zustand bei der Ankunft (Komponenten gefroren).
- Verwenden Sie kein Kit, dessen Verfallsdatum überschritten ist.
- Entsorgen Sie Proben- und Assayabfälle entsprechend den örtlichen Sicherheitsvorschriften.

- Alle verwendeten Geräte wurden gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet.

Protokoll

Übersicht über den experimentellen Ablauf



Probenvorbereitung

DNA Extraktion

Die DNA sollte aus makro-dissektiertem FFPE Material nach den Richtlinien des Herstellers aufgereinigt werden. Es wird empfohlen, die DNA mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit mittels der Deparaffinization Solution und RNase A zu isolieren. Ein weiterer optimaler Schritt ist ein Verdau mit Proteinase K über Nacht, mit jeweils 3 bis zu 10 µm (Oberfläche bis zu 250 mm²) FFPE-Schnitten.

Die DNA muss direkt nach der Extraktion quantifiziert werden.

HINWEIS



Für die Verdünnung der Proben wird der 1 x TE (Tris-EDTA)-Puffer, pH Wert 8,0 und ein Probenvolumen von > 1,5 µL empfohlen.

HINWEIS



Die langfristige Lagerung von Rohproben kann zu der Fragmentierung von genetischem Material und daher zu einer unzureichenden Qualität des Materials führen. Dies kann Analyseergebnisse beeinflussen, z. B. durch unvollständige Profile. Das QPCR POLE Mutation Analysis Kit wurde für kurze PCR Produkte entwickelt; stark fragmentierte DNA beeinflusst die Leistung des Tests.

DNA Quantifizierung und Verdünnung

Die Quantifizierung der DNA erfolgt durch fluorometrische Quantifizierung mit dem Qubit™ 3.0 Fluorometer. Für geringe FFPE Gewebemengen (z. B. Gewebebiopsien) sollte der Qubit™ dsDNA HS Assay unter Befolgung des Protokolls des Herstellers verwendet werden. Alternativ ist die Nutzung des Qubit™ ds DNA BR Assays möglich.

HINWEIS



Verwenden Sie für das QPCR POLE Mutation Analysis Kit **4 ng DNA** (entspricht 5 µL Template mit einer Konzentration von 0,8°ng/µL). DNA-Mengen unter 4 ng pro Reaktion verwendet resultieren in geringeren PCR- Ausbeuten und das Signal kann unter das Target-spezifische Detektionslimit fallen.

DNA Lagerung

Lagern Sie die DNA-Proben bei -25 °C bis -15 °C. Unverdünnte DNA Proben können 4 Wochen lang bei 2 °C bis 8 °C oder bei -25 °C bis 15 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Kontrollproben

Positivkontrolle PC

Tauen Sie die QPCR POLE Positive Control (weißer Deckel) auf, homogenisieren Sie diese durch vorsichtiges vortexen, gefolgt von kurzem Abzentrifugieren.

Verwenden Sie die im Kit vorhandene QPCR POLE Positive Control als Positivkontrolle PC anstelle einer Probe. Es sind keine weiteren Verdünnungsschritte notwendig.

Mastermix Ansatz

Entnehmen Sie dem QPCR POLE Mutation Analysis Kit die folgenden Komponenten und lassen sie auftauen:

- Nuclease-Free Water (Hellblauer Deckel)
- QPCR POLE Primer Mix A (Roter Deckel)
- QPCR POLE Primer Mix B (Gelber Deckel)
- QPCR POLE Master Mix (Schwarzer Deckel)

Während Sie den PCR Mastermix ansetzen, wird empfohlen den QPCR POLE Master Mix kühl zu lagern (z. B. auf einem Kühlrack). Alle gefrorenen Komponenten müssen bei Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C, ca. 30 min, vor Licht geschützt) aufgetaut werden und anschließend durch invertieren, pipettieren oder vorsichtiges Vortexen der Röhrchen homogenisiert werden. Die Reagenzien sollten anschließend kurz (ca. 10 s) zentrifugiert werden.

HINWEIS



Stellen Sie sicher, dass jede Probe mit jedem QPCR POLE Primer Mix analysiert wird, um die vollständige Auswertung des Assays sicher zu stellen. Stellen Sie dafür zwei separate PCR Mastermixe her, jeweils einen für jeden Primer Mix.

Bereiten Sie den PCR-Mastermix für jeden Primermix (2 separate Mastermixe für jede Probe) gemäß

Tabelle 4 für die Gesamtzahl der zu testenden Proben in einem Reaktionsgefäß geeigneter Größe in einem DNA-freien Bereich vor. Beziehen Sie dabei mindestens eine PC und eine NTC für jeden QPCR POLE PCR Mix (A°&°B) mit in Ihre Berechnungen ein.

Beispiel für eine Plattenbelegung für 46 Proben:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
B	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12
C	Probe 13	Probe 14	Probe 15	Probe 16	Probe 17	Probe 18	Probe 13	Probe 14	Probe 15	Probe 16	Probe 17	Probe 18
D	Probe 19	Probe 20	Probe 21	Probe 22	Probe 23	Probe 24	Probe 19	Probe 20	Probe 21	Probe 22	Probe 23	Probe 24
E	Probe 25	Probe 26	Probe 27	Probe 28	Probe 29	Probe 30	Probe 25	Probe 26	Probe 27	Probe 28	Probe 29	Probe 30
F	Probe 31	Probe 32	Probe 33	Probe 34	Probe 35	Probe 36	Probe 31	Probe 32	Probe 33	Probe 34	Probe 35	Probe 36
G	Probe 37	Probe 38	Probe 39	Probe 40	Probe 41	Probe 42	Probe 37	Probe 38	Probe 39	Probe 40	Probe 41	Probe 42
H	Probe 43	Probe 44	Probe 45	Probe 46	PC	NTC	Probe 43	Probe 44	Probe 45	Probe 46	PC	NTC
	PCR Master Mix A aus Primer Mix A						PCR Master Mix B aus Primer Mix B					

HINWEIS



Als Richtwert gilt: Wenn Sie weniger als 10 Proben testen, verwenden Sie genug Mastermix für eine zusätzliche Probe. Wenn Sie 10 oder mehr Proben testen, verwenden Sie ein überschüssiges Mastermix Volumen von +10 %.

Tabelle 4 PCR Mastermix Reaktionsansatz

Komponente	Volumen		
	# 1	# 10	# 50
Nuclease-free Water	9 µL	90 µL	450 µL
QPCR POLE Primer Mix A ODER	1 µL	10 µL	50 µL
QPCR POLE Primer Mix B			
QPCR POLE Master Mix	5 µL	50 µL	250 µL
10 x 5 µL DANN-Template oder Kontrolle	5 µL	10 x 5 µL	50 x 5 µL
Gesamtvolumen	20 µL	200 µL	1000 µL

Mixen Sie den PCR Mastermix vorsichtig ohne Luftblasen zu erzeugen und zentrifugieren Sie anschließend kurz ab.

HINWEIS



Vortexen Sie den PCR Mastermix nicht, um Blasenbildung zu vermeiden. Vermischen Sie den PCR Master Mix vorsichtig durch invertieren oder pipettieren.

Aliquotieren Sie 15,0 µL der PCR Master Mixe in eine geeignete 200 µL PCR Platte und zentrifugieren Sie die verschlossene Platte kurz.

Anwendung von DNA-Templates und Kontrollen

Fügen Sie 5,0 µL der folgenden Proben typen der vorbereiteten PCR Platte hinzu, welche bereits den PCR Mastermix enthält.

NTC: Fügen Sie 5,0 µL des Nuclease-free Waters anstelle einer Probe hinzu.

DNA-Probe: Fügen Sie 5,0 µL der vorbereiteten, verdünnten DNA Probe (0,8 ng/µL) hinzu. Technische Replikate sind nicht notwendig für die qualitative Analyse.

PC: Fügen Sie 5,0 µL der QPCR POLE Positive Control anstelle einer Probe hinzu.

HINWEIS



Verwenden Sie mindestens eine Positivkontrolle PC und eine no-Template Kontrolle NTC pro PCR Mastermix (A & B). Andernfalls kann der Lauf nicht bewertet werden.

Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer für das verwendete qPCR-Gerät geeigneten Folie, anschließend vorsichtig mischen und herunterzentrifugieren.

PCR Amplifikation

Programmieren Sie den qPCR-Cycler mit dem folgenden Amplifikationsprofil. Achten Sie darauf, die Rampinggeschwindigkeit auf 1,6 °C/s einzustellen. Führen Sie eine "Hot Start"-PCR durch, um die Polymerase zu aktivieren und die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu verhindern.

Tabelle 5 PCR Protokoll

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	3 min (Hot Start aktiviert Polymerase)	1 x
95 °C	10 s	45 x
62 °C	20 s	

HINWEIS



Wenn Thermocycler mit schnellen Heiz- und Kühlschritten (> 2°C/s) verwendet werden, muss das Ramping auf 1,6 °C/s eingestellt werden, um eine optimale Leistung des Kits zu gewährleisten.

Definieren Sie die folgenden Eigenschaften für die korrekte Signalerkennung während des Set-ups:

Tabelle 6 Einstellungen für eine korrekte Signaldetektion während des qPCR Laufes

Primer Mix	Target	Reporter (Fluoreszenz)	Quencher
A	A456P	FAM	none
A	P286R	VIC	none
A	V411L	ROX	none
B	S297F	FAM	none
B	S459F	VIC	none
A & B	POLE IC	Cy5	none

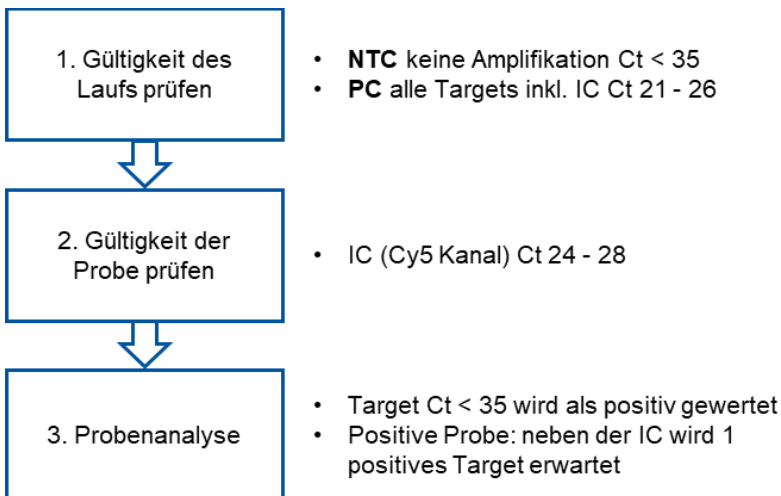
HINWEIS



Grundlegende Informationen zur Einrichtung, Programmierung und Wartung der verschiedenen qPCR-Geräte finden Sie im Benutzerhandbuch des jeweiligen Geräts.

Datenanalyse

Übersicht des Arbeitsablauf



Allgemeine Einstellungen

- Verwenden Sie die „Standard Curve“ Methode ohne Passivreferenz.
- Stellen Sie die folgenden Schwellenwerte in der QuantStudio™ Design & Analysis Software ein:

Tabelle 7 Verwendete spezifische Grenzwerte in der Datenanalyse mit QuantStudio™ 5 Geräten

Primer Mix	Target	Reporter (Fluoreszenz)	Grenzwert in ΔRn
A	A456P	FAM	12 000
A	P286R	VIC	10 000
A	V411L	ROX	40 000
B	S297F	FAM	30 000
B	S459F	VIC	20 000
A & B	POLE IC	Cy5	10 000

HINWEIS



Um ein Experiment in der QuantStudio™ Design und Analyse Software zu erstellen, erstellen Sie eine Dateivorlage mit den gewünschten Proben und den oben beschriebenen Parametern. Diese kann gesichert und wiederverwendet werden um die Analyseeinstellungen zu standardisieren.

Laufvalidierung

- Prüfen Sie, dass die **NTC keine Amplifikation Ct < 35** zeigt.
- Prüfen Sie, dass in der **PC** alle Targets (inklusive IC) mit Ct-Werten zwischen **21 - 26** detektiert werden.

HINWEIS



Es wird empfohlen die Platte gleichmäßig mit dem selben Layout für PCR Mastermix A und PCR Mastermix B aufzuteilen, um den Arbeitsablauf zu vereinfachen. Wählen Sie bei der Einrichtung des Laufs das entsprechende Target je nach Test in den jeweiligen Wells aus.

Probenanalyse

Lassen Sie sich die Amplifikationsplots für den gesamten qPCR-Lauf anzeigen. Eine detaillierte Analyse der Rohdaten hängt von dem verwendeten qPCR-Gerät ab.

Die Grenzwerte für das "Grundlinienrauschen" sollten entweder automatisch oder für bestimmte Zyklen (z. B. 3 - 15) vordefiniert sein. Verwenden Sie die NTC, um den jeweiligen Schwellenwert zu bestimmen.

Da die Standardkurven-Methode für den qualitativen Nachweis von Mutationsallelen verwendet wird, sind die oben genannten Schwellenwerte und der Cut-off bei Zyklus 35 erforderlich, um eine positive bzw. negative Probe korrekt zuzuordnen.

Informationen zum Datenexport und zur Datenverarbeitung finden Sie in den jeweiligen Handbüchern der Hersteller der qPCR-Geräte. Exportieren Sie den "Probenamen" und die "Ct-Werte" für spätere Berechnungen.

HINWEIS



Wenn andere qPCR-Geräte als das QuantStudio™ 5 verwendet werden, müssen die Datenanalyseschritte angepasst und das Verfahren in der Verantwortung des Anwenders überprüft werden.

Wenn PC und NTC gültig sind (siehe Laufvalidierung), fahren Sie mit der Analyse der Probandaten fort.

Die Interne Kontrolle im Cy5-Kanal sollte mit einem Ct-Wert zwischen **24 - 28** detektiert werden. Ist dies nicht der Fall, passen Sie die DNA-Konzentration entsprechend an um innerhalb des Bereichs der höchsten Assay-Sensitivität und -Spezifität zu messen.

In einer validen Probe wird jedes Target mit einem Ct-Wert unter dem Cutoff-Wert von **C_t < 35** als positiv angesehen.

HINWEIS



Für eine POLE positive Probe wird, abgesehen von der IC, ein positives Target erwartet. Wenn mehr als ein Mutationstarget positiv detektiert wird, ziehen Sie die Wiederholung der Analyse in Erwägung und/oder die Bestätigung durch eine weitere Methode (z. B. MODAPLEX POLE/POLD1 Analysis Kit oder Sanger Sequenzierung).

Troubleshooting

Der Leitfaden zur Fehlerbehebung kann bei der Lösung von Problemen, die auftreten können, hilfreich sein. Der BIOTYPE-Kundendienst beantwortet gerne alle Fragen zu den in diesem Handbuch enthaltenen Informationen und Protokollen (siehe [Technische Unterstützung](#)).

Fehler	Kommentare und Empfehlungen
<p>Ungültige no template control (NTC)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Targets und/oder interne Kontrollen wurden in der NTC nachgewiesen. Bei der Vorbereitung der qPCR ist eine Kontamination aufgetreten. Wiederholen Sie die qPCR mit neuen Reagenzien in Replikaten. Verschließen Sie die PCR-Gefäße nach Möglichkeit direkt nach Zugabe der zu testenden Probe. Sorgen Sie dafür, dass der Arbeitsbereich und die Instrumente regelmäßig dekontaminiert werden. Wechseln Sie gelegentlich die Handschuhe. 2. Überprüfen Sie das Wartungsintervall für alle verwendeten Geräte (z. B. Pipetten).
<p>Ungültige Positivkontrolle (PC)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Unvollständiger Nachweis von Targets und/oder internen Kontrollen. Bei der Vorbereitung der qPCR und/oder der Positivkontrolle wurde unsachgemäß vorgegangen. Wiederholen Sie die qPCR mit neuen Reagenzien in Replikaten. Verschließen Sie die PCR-Gefäße nach Möglichkeit direkt nach Zugabe der zu testenden Probe. Stellen Sie sicher, dass der Arbeitsbereich und die Instrumente regelmäßig dekontaminiert werden. 2. Überprüfen Sie das Wartungsintervall für alle verwendeten Geräte (z. B. Pipetten). 3. Wenn nur der Ct-Wert des Targets V411L > 28 ist, könnte die Primerkonzentration zu niedrig sein. Überprüfen Sie das Pipettierschema, um sicherzustellen, dass 1 µL QPCR POLE Primer Mix pro Reaktion und 20 µL Gesamtreaktionsvolumen verwendet werden
<p>Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kitkomponenten entsprechen nicht den Anweisungen unter Reagenzienlagerung und -Handhabung</p>	<p>Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Verfallsdatum (siehe Etikett auf der Kit-Verpackung). Bitte verwenden Sie ein neues Kit, wenn die Reagenzien unsachgemäß gelagert wurden.</p>

Qualitätskontrolle

Alle Kitkomponenten durchlaufen bei der BIOTYPE GmbH einen intensiven Qualitätssicherungsprozess. Die Qualität der Testkits wird permanent überwacht, um eine uneingeschränkte Verwendbarkeit zu gewährleisten. Bitte kontaktieren Sie uns, wenn Sie Fragen zur Qualitätssicherung haben.

Technische Unterstützung

Für technische Beratung wenden Sie sich bitte an unseren Kundensupport:

E-mail: support@biotype.de

Telefon: +49 (0)351 8838 400

Referenzen

- [1] S. Briggs and I. Tomlinson. "Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers." J Pathol. 2013 Jun;230(2):148-53

Einschränkungen

- Die in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren müssen genau eingehalten werden. Jegliche Abweichungen können zum Versagen des Assays oder zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf Personal beschränkt, das speziell in qPCR-Techniken geschult und ausgebildet ist.
- Für die optimale Durchführung dieses Tests sind geeignete Verfahren für die Entnahme, den Transport, die Lagerung und die Verarbeitung der Proben erforderlich.
- Dieser Assay darf nicht direkt an der Probe durchgeführt werden. Vor der Verwendung dieses Assays müssen geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren durchgeführt werden.
- Der Test wurde nur mit den im Kapitel Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial beschriebenen Kits für die DNA-Extraktion und Aufreinigung verifiziert.

- Verifiziert für die Verwendung mit einem optimalen Input von 4 ng DNA pro Reaktion.
- Gute Laborpraxis ist erforderlich, um die Leistung des Kits zu gewährleisten.
- Die Ergebnisse müssen von einem geschulten professionellen Anwender interpretiert werden.
- Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Komponenten.

Bestellinformation

Richten Sie Ihre Bestellungen per E-Mail an sales@biotype.de.

Produkt	Verpackungsgröße	Bestellnummer
QPCR POLE Mutation Analysis Kit	100 Reaktionen (2 x 50 Reaktionen)	35-14900-0100

Marken und Haftungsausschluss

Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, sind nicht als gesetzlich ungeschützt zu betrachten.

© 2023 BIOTYPE GmbH; alle Rechte vorbehalten.

Symbole



Hersteller



Chargenbezeichnung



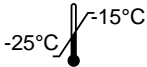
Ausreichend für <N> Tests



Hinweis auf die eIFU



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Artikelnummer



Vor Licht schützen



Trocken aufbewahren

Weitere in diesem Handbuch verwendete Bezeichnungen:



Nützliche Tipps



Achtung, beachten Sie unbedingt diesen Hinweis!

[Blau
unterstrichener
Text](#)

Links, die zu externen Inhalten wie Homepages oder E-Mail-Adressen führen

Schwarz
unterstrichener
Text

Querverweise im Dokument zur einfachen Navigation

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN, GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Bestellungen

sales@biotype.de

Kundenservice & Support

support@biotype.de

