

ELUCIGENE™ Gaucher



Amplification Refractory Mutation System (ARMS™) skyddas av europeiskt patent nr 0332435, amerikanskt patent nr 5595890 och motsvarande globala patent.

ARMS™ är ett varumärke som tillhör AstraZeneca UK Ltd. och används under licens.

ELUCIGENE™ är ett varumärke som tillhör Tepnel Diagnostics Ltd.

NuSieve® är ett varumärke som tillhör Cambrex BioScience. AmpliTaq Gold® är ett varumärke som tillhör Roche Molecular Systems Inc.

ELUCIGENE™ kit har utvecklats och tillverkas av Tepnel Diagnostics Ltd enligt kvalitetssystem som ackrediterats i enlighet med ISO 9001:2000 och ISO 13485 (EN 46001).

Tepnel Diagnostics Ltd
12 Blacklands Way
Abingdon Business Park
Abingdon
Oxfordshire
OX14 1DY
Storbritannien

För kundsupport:

E-post elucigene@tepneldiagnostics.co.uk

GA005BY/007SE
06/2009
Copyright © 2003 Tepnel Diagnostics



ELUCIGENE™ Gaucher

Katalognummer - GA005B2 – 50 tester

Användningsområde

För samtidig kvalitativ detektion in vitro av mutationer (och vildtyps-DNA-sekvens vid N370S och L444P) i (glukocerebrosidas)genen vid Gauchers sjukdom i flytande helblod (EDTA) och torkade blodfläckar vid laboratorier som innehar servicelicens för polymeraskedjereaktion (PCR) från F. Hoffman-La Roche och/eller Roche Molecular Systems, Inc.

Principer för förfarandet

Den metod som används av ELUCIGENE™-reagensen baseras på teknologin Amplification Refractory Mutation System (ARMS™), som kan påvisa punktmutationer eller små deletioner i deoxiribonukleinsyra (DNA) (1).

Varningar och försiktighetsåtgärder

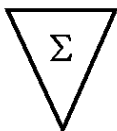
1. Dessa ELUCIGENE™-reagens är avsedda för yrkesmässig in vitro-diagnostisk testning. Produkten tillhandahåller inte någon licens under de PCR-patent som innehas av F. Hoffman-La Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Diagnostics, CH-4070 Basel, Schweiz) och Roche Molecular Systems, Inc (Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501).
2. Den normala DNA-kontroll som levereras tillsammans med detta kit har humant ursprung och har genomgått oberoende tester med en PCR-baserad analys och befunnits vara negativ för hepatit B-virus (HBV), hepatit C-virus (HCV) och humant immunbristvirus 1 (HIV1).
3. Var försiktig vid hantering av material av humant ursprung. Alla prover ska anses vara potentiellt smittsamma. Ingen testmetod kan garantera fullständig frånvaro av HBV, HCV, HIV 1 eller andra smittsamma agens. Följ gällande bestämmelser för biologiskt riskmaterial beträffande hantering av prover och testkomponenter samt användning, förvaring och kassation av dem.
4. Det kan erfordras licenser för att utföra in vitro-diagnostisk analys av genmutationer som detekteras av dessa reagens. Köparen av reagenset ansvarar själv för sådana eventuella licenser.
5. Denna produkt ska valideras med laboratoriets procedurer före diagnostisk användning.

Symboler på etiketter

Dessa symboler som används på alla etiketter och förpackningar överensstämmer med den harmoniserade standarden EN 980.



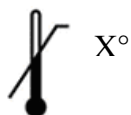
Tillverkare



Antal tester



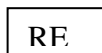
Se bruksanvisningen



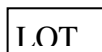
Förvaras kallare än angiven temperatur



Används före angivet datum



Katalognummer



Lot- eller partinummer

Material som medföljer

Reagensen ska förvaras på en plats som är fri från kontaminerande DNA- eller PCR-produkt.

Använd inte reagensen efter det utgångsdatum som anges på förpackningsetiketten. Alla reagens levereras bruksfärdiga. Förvara oöppnade och öppnade reagens i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Öppnade reagens kan förvaras i upp till 3 månader.

Tillräckligt material för 50 tester medföljer:

1. 2 ampuller vardera av 3 primermixer (TA, TB och TC) innehållande primrar som påvisar följande mutationer som förknippas med Gauchers sjukdom i glukocerebrosidasgenen (N370S, 84GG, IVS2+1, R496H och L444P). (2 x 450 μL vardera av GA005TA, GA005TB och GA005TC)
2. 1 ampull x 200 μL CR000TV spädningsbuffert (DB).
3. 1 ampull x 600 μL CR000TR laddningsfärg (LD).
4. 1 ampull x 50 μL GA005TX DNA-kontroll (DC), normal för de mutationer som påvisas av ELUCIGENE™ Gaucher.

Material som behövs men inte medföljer

Laboratorieförbrukningsmaterial: handskar, mikrofugrör med skruvkork, pipettspetsar, tunnväggiga 0,2 mL eller 0,5 mL PCR-rör (användning av tre olikfärgade rör underlättar identifiering av primermix).

DNA-preparation: Sterilt avjoniserat vatten av god kvalitet, natriumklorid (NaCl), dinatriumsalt av etylendiamintetraättisyra (EDTA), natriumhydroxidpellets (NaOH), kristalliserad 2-amino-2-(hydroximetyl)-1,3-propandiol (Tris-bas), saltsyra (HCl) 36 % densitet 1,18, ammoniumklorid (NH_4Cl).

PCR-amplifiering: Lätt vit mineralolja* (Sigma), sterilt destillerat vatten av god kvalitet, AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems Inc.).

Elektrofores: Material för gelelektrofores bestående av NuSieve® 3:1 agaros (Cambrex Bio Science), 50 basparsstege (Amersham Pharmacia Biotech), etidiumbromid.

* För amplifiering som utförs i 0,5 mL PCR-rör eller värmecykel utan uppvärmda lock

Utrustning som behövs

Laboratorieutrustning: precisionspipetter (2 satser: 1 för hantering pre-amplifiering och 1 för hantering post-amplifiering, helst pipetter med positiv förskjutning), glas, skyddskläder, vortexblandare, mikrofug, våg, rörställ.

DNA-preparation: Värmeblock (uppvärmning till $100\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Amplifiering: Värmecykel som rymmer 0,5 mL eller 0,2 mL rör (med en temperaturnoggrannhet på $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ mellan $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ och $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ och statisk temperaturjämnhet på $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), valfritt med uppvärmt lock.

Elektrofores: Horisontell submarin geltank, strömförsörjningsdel, mikrovåg, vattenbad för kylning av agaros, UV-transilluminator, fotografiskt system.

Provtagning och förvaring av prover

Helblodprover (EDTA) eller blodfläcksprover ska användas.

Provtagningsutrustning har ibland rapporterats ha skadlig inverkan på vissa analyter och kan störa vissa metodteknologier (2). Användaren bör tillförsäkra att den valda utrustningen används enligt tillverkarens anvisningar och att både provtagningsutrustning och alternativa DNA-preparationsmetoder är kompatibla med testet.

Blodprover ska förvaras i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ före preparation av DNA. Undvik upprepad frysning och tining.

Preparation av DNA från helblodprover (EDTA)

1. Pipettera $80\text{ }\mu\text{L}$ av varje blodprov i ett mikrofugrör med skruvkork.
2. Pipettera $320\text{ }\mu\text{L}$ 170 mM ($9,09\text{ g/L}$) NH_4Cl -lösning i varje rör.
3. Blanda i 20 minuter genom att försiktigt snurra och vända. Undvik kraftig omrörning och skumbildning.
4. Centrifugera varje rör i 2 minuter vid $12\ 000\text{ g}$ tills en cellpellet bildas.
5. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
6. Pipettera $300\text{ }\mu\text{L}$ 10 mM ($0,58\text{ g/L}$) NaCl / 10 mM ($3,72\text{ g/L}$) EDTA i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
7. Centrifugera varje rör i 1 minut vid $12\ 000\text{ g}$ tills en cellpellet bildas.
8. Upprepa steg 5 till 7 minst ytterligare två gånger tills all synlig röd färg i supernatantvätskan har avlägsnats.
9. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
10. Pipettera $200\text{ }\mu\text{L}$ 50 mM (2 g/L) NaOH -lösning i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
11. Inkubera i värmeblock vid $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 10 minuter.
12. Pipettera $40\text{ }\mu\text{L}$ 1 M ($121,1\text{ g/L}$) Tris-bas/HCl ($\text{pH } 7,5$) i varje rör och vortexa.
13. Tillsätt 1 mL sterilt avjoniserat vatten till varje mikrofugrör så att en total DNA-provvolym på $1,24\text{ mL}$ erhålls.
14. Centrifugera varje rör i 1 minut vid $12\ 000\text{ g}$ tills en pellet av cellfragment bildas. Supernatantvätskan innehåller DNA.

Preparation av DNA från torkade blodfläckar

1. Stansa ut rondeller på $2 \times 3\text{ mm}^{(b)}$ från provkort i ett $1,5\text{ mL}$ rör med skruvkork.

Fläckarna ska stansas ut från ett område på kortet som är helt mättat med blod.

Stansa flera ”rena” kortfläckar som avfall före varje prov för att förhindra smitta mellan prover.

2. Tillsätt 1 mL 10 mM ($0,58\text{ g/L}$) NaCl / 10 mM ($3,72\text{ g/L}$) EDTA och blanda i rotationsblandare i 15–20 minuter. Om rotationsblandare inte finns tillgänglig, kan tvättarna behöva utökas till upp till 30 minuter vardera.
3. Avlägsna och kassera tvättilösningen.
4. Upprepa steg 2 och 3 ytterligare en gång.
5. Nu bör det mesta av hempigmentet vara eluerat från rondellen. En svag röd-brun färgning av blodfläckarna är inte ovanlig på detta stadium.
6. Kör kort i mikrofug (3 s) så att återstående tvättilösning i botten av röret samlas upp. Avlägsna och kassera så mycket tvättilösning som möjligt med hjälp av en pipett, utan att störa fläckarna.

7. Detta korta mikrofugsteg avlägsnar vanligtvis ytterligare hempigment från blodfläckarna.
 8. Tillsätt 150 µL 50 mM (2 g/L) NaOH till varje rör. Blanda genom att knäppa försiktigt med fingret.
 9. Inkubera i värmeblock vid 100 °C i 10 minuter.
 10. Kör kort i mikrofug så att supernatanten i botten av röret samlas upp.
 11. Tillsätt 30 µL 1 M (121,1 g/L) Tris-bas/HCl (pH 7,5) till varje rör för att neutralisera och blanda noga.
 12. Tillsätt 420 µL sterilt avjoniserat vatten till varje DNA-prov så att en total volym på 600 µL erhålls.
 13. Blanda proverna väl och samla upp i mikrofug.
 14. Överför supernatanten till ett nytt märkt rör med skruvkork.
 15. Förvara extraherat DNA vid –20 °C.
- ^(b) Det totala området blodprov som används ska motsvara minst 2 x 3 mm cirkulära blodfläckar. Till exempel kan 1 x 6 mm kortfläckar användas om det är lämpligt.

Obs! - På grund av varierande kvalitet och utbyte av DNA:t kan det ibland vara nödvändigt att späda den slutliga DNA-lösningen ytterligare 5 gånger för att säkerställa effektiv amplifiering.

Alternativa metoder:

De DNA-preparationsmetoder som beskrivs ovan rekommenderas av Tepnel Diagnostics och har visat sig ge konsekventa och tillförlitliga resultat. DNA som prepareras med andra metoder eller från andra provtyper är eventuellt inte optimalt för ELUCIGENE™ Gaucher-testet och kan ge suboptimala resultat. De viktigaste kriterierna för alternativa DNA-preparationsmetoder är optimal DNA-koncentration och frånvaro av PCR-hämmare.

Alternativa metoder och provtyper bör noga utvärderas med ELUCIGENE™ Gaucher-testet innan resultaten används för diagnostik. Tester av DNA-prover vid koncentrationer <10 ng/5 µL rekommenderas inte. Vid optimala PCR-förhållanden erhålls konsekventa resultat vid DNA-koncentrationer mellan 10 och 100 ng/5 µL.

Obs! QIAamp® DNA-blodkit (Qiagen) har även använts för DNA-preparation från flytande helblod och har befunnits ge reproducerbara och tolkningsbara resultat

Testprotokoll - amplifieringsförfarande

Mix A (GA005TA)

1. Programmera värmecykeln med en tidsfördröjningsfil som aktiverar AmpliTaq Gold vid 94 °C i 20 minuter, länkad till ett amplifieringscykelprogram på 30 sekunder vid 94 °C (denaturering), 1 minut vid 61 °C (annealing) och 1 minut vid 72 °C (extension) i 35 cykler. Detta bör länkas till en 30-minuters tidsfördröjningsfil vid 72 °C (extension) på den slutliga cykeln.
2. Tina och centrifugera ampullerna innehållande primermix (TA), AmpliTaq Gold (medföljer ej), spädningsbuffert (DB) och laddningsfärg (LD) i 10 sekunder vid 12 000 g, blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera ampullerna igen i 10 sekunder.

Obs! Steg 3–5 måste utföras i ett utrymme som är fritt från DNA

3. Med ledning av tabell 1 bereds tillräcklig spädningsav AmpliTaq Gold i medföljande spädningsbuffert och laddningsfärg samt sterilt destillerat vatten för det antal prover och kontroller som ska testas. Blanda väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.

Tabell 1. Spädning av AmpliTaq Gold i spädningsbuffert

	Antal erforderliga tester			
	10	20	30	40
Volym sterilt destillerat vatten (µL)	21	42	63	84
Volym spädningsbuffert (µL)	6	12	18	24
Volym laddningsfärg (µL)	30	60	90	120
Volym AmpliTaq Gold (µL)	3	6	9	12
Total volym (µL)	60	120	180	240

4. Bered reaktionsblandningen med ledning av tabell 2. Pipettera rätt portion av primermix (GA005TA) i ett märkt mikrofugrör. Använd en ny pipettspets och tillsätt rätt volym av AmpliTaq Gold-spädningen (från steg 3) till mikrofugröret. Blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera röret i 10 sekunder vid 12 000 g.

Tabell 2. Beredning av reaktionsblandningar

	Antal erforderliga tester			
	10	20	30	40
Volym primermix (µL)	165	330	495	660
Volym spädd enzym (µL)	55	110	165	220
Total volym (µL)	220	440	660	880

5. Pipettera 20 µL i botten av rätt antal tunnväggiga PCR-rör och sätt på korken igen.
6. Använd separat pipettspets varje gång och tillsätt 5 µL test-DNA-prov eller normal DNA-kontroll (DC) i varje rör. Tillsätt en droppe lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.
7. Tillsätt inget DNA till rör med negativ kontroll. Tillsätt 1 droppe lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.
8. Centrifugera rören i 10 sekunder vid 12 000 g.

9. Placera alla rör stadigt i värmecykelblocket. Starta först 94 °C tidsfördröjningsfilen och sedan amplifieringscykelprogrammet.
10. Kassera all återstående oanvänd beredd reaktionsblandning.
11. När amplifieringscykelprogrammet är avslutat, kan proverna förvaras i rumstemperatur över natt eller i 2–8 °C i upp till 7 dagar före analys med gelelektrofores.

Mix B (GA005TB)

1. Programmera värmecykeln med en tidsfördröjningsfil som aktiverar AmpliTaq Gold vid 94 °C i 20 minuter, länkad till ett amplifieringscykelprogram på 30 sekunder vid 94 °C (denaturering), 1 minut vid 61 °C (annealing) och 1 minut vid 72 °C (extension) i **20 cykler**. Detta bör länkas till en 30-minuters tidsfördröjningsfil vid 72 °C (extension) på den slutliga cykeln.
2. Centrifugera ampullerna med primermix (TB), AmpliTaq Gold och spädningsbuffert i 10 sekunder vid 12 000 g, blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera ampullerna igen i 10 sekunder.

Obs! Steg 3–5 måste utföras i ett utrymme som är fritt från DNA

3. Med ledning av tabell 3 bereds tillräcklig spädning av AmpliTaq Gold i medföljande spädningsbuffert och sterilt destillerat vatten för det antal prover och kontroller som ska testas. Blanda väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.

Tabell 3. Spädning av AmpliTaq Gold i spädningsbuffert (utan laddningsfärg)

	Antal erforderliga tester			
	10	20	30	40
Volym sterilt destillerat vatten (µL)	51	102	153	204
Volym spädningsbuffert (µL)	6	12	18	24
Volym AmpliTaq Gold (µL)	3	6	9	12
Total volym (µL)	60	120	180	240

4. Bered reaktionsblandningen med ledning av tabell 2. Pipettera rätt portion av primermix (GA005TB) i ett märkt mikrofugrör. Använd en ny pipettspets och tillsätt rätt volym av AmpliTaq Gold-spädningen (från steg 3) till mikrofugröret. Blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera röret i 10 sekunder vid 12 000 g.
5. Pipettera 20 µL reaktionsblandning i botten av rätt antal tunnväggiga PCR-rör och sätt på korken igen.
6. Pipettera 5 µL test-DNA-prov eller normal DNA-kontroll (DC) i varje rör. Tillsätt en droppe lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.

Obs! En L444P av vildtyp bör analyseras bredvid testprover som kontroll.

7. Tillsätt inget DNA till rör med negativ kontroll. Tillsätt 1 droppe lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.

- Centrifugera rören i 10 sekunder vid 12 000 g.
- Placera alla rör stadigt i värmecykelblocket. Starta först 94 °C tidsfördröjningsfilen och sedan amplifieringscykelprogrammet.
- Kassera all återstående oanvänd beredd reaktionsblandning.

Mix C (GA005TC)

- Programmera värmecykeln med en tidsfördröjningsfil som aktiverar AmpliTaq Gold vid 94 °C i 20 minuter, länkad till ett amplifieringscykelprogram på 30 sekunder vid 94 °C (denaturering), 1 minut vid 61 °C (annealing) och 1 minut vid 72 °C (extension) i **32 cykler**. Detta bör länkas till en 30-minuters tidsfördröjningsfil vid 72 °C (extension) på den slutliga cykeln.
- Centrifugera ampullerna med primermix (TC), AmpliTaq Gold, spädningsbuffert och laddningsfärg i 10 sekunder vid 12 000 g, blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera ampullerna igen i 10 sekunder.

Obs! Steg 3–5 måste utföras i ett utrymme som är fritt från DNA

- Med ledning av tabell 1 bereds tillräcklig spädning av AmpliTaq Gold i medföljande spädningsbuffert och laddningsfärg samt sterilt destillerat vatten för det antal prover och kontroller som ska testas. Blanda väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.
- Bered reaktionsblandningen med ledning av tabell 2. Pipettera rätt portion av primermix (GA005TC) i ett märkt mikrofugrör. Använd en ny pipettspets och tillsätt rätt volym av AmpliTaq Gold-spädningen (från steg 3) till mikrofugröret. Blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera röret i 10 sekunder vid 12 000 g.
- Pipettera 20 µL i botten av rätt antal tunnväggiga PCR-rör och sätt på korken igen.

Beredning av reaktionsblandning

Inom ett post-PCR-område

- Späd 2 µL av PCR-produkten från mix B-reaktionen i 500 µL vatten i ett 1,5 mL rör med skruvkork. Blanda noga.
- Pipettera 5 µL av den spädda PCR-produkten från steg 6 i rätt PCR-rör. Tillsätt en droppe lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.
- Tillsätt inget DNA till rör med negativ kontroll. Tillsätt 1 droppe lätt vit mineralolja så att den täcker vattenfasen*. Sätt tillbaka korken ordentligt.
- Centrifugera rören i 10 sekunder vid 12 000 g.
- Placera alla rör stadigt i värmecykelblocket. Starta först 94 °C tidsfördröjningsfilen och sedan amplifieringscykelprogrammet.
- Kassera all återstående oanvänd beredd reaktionsblandning.
- När amplifieringscykelprogrammet är avslutat, kan proverna förvaras i rumstemperatur över natt eller i 2–8 °C i upp till 7 dagar före analys med gelelektrofores.

* För amplifiering som utförs i 0,5 mL PCR-rör eller värmecykel utan uppvärmda lock

Gelelektrofores

Användaren bör säkerställa att den valda utrustningen används i enlighet med tillverkarens anvisningar och är kompatibel med detta test. I detta sammanhang är de viktigaste parametrarna gelmatrisen och måtten på kammen (brunnsformaren). Resultat har erhållits med nedanstående elektroforesförhållanden:

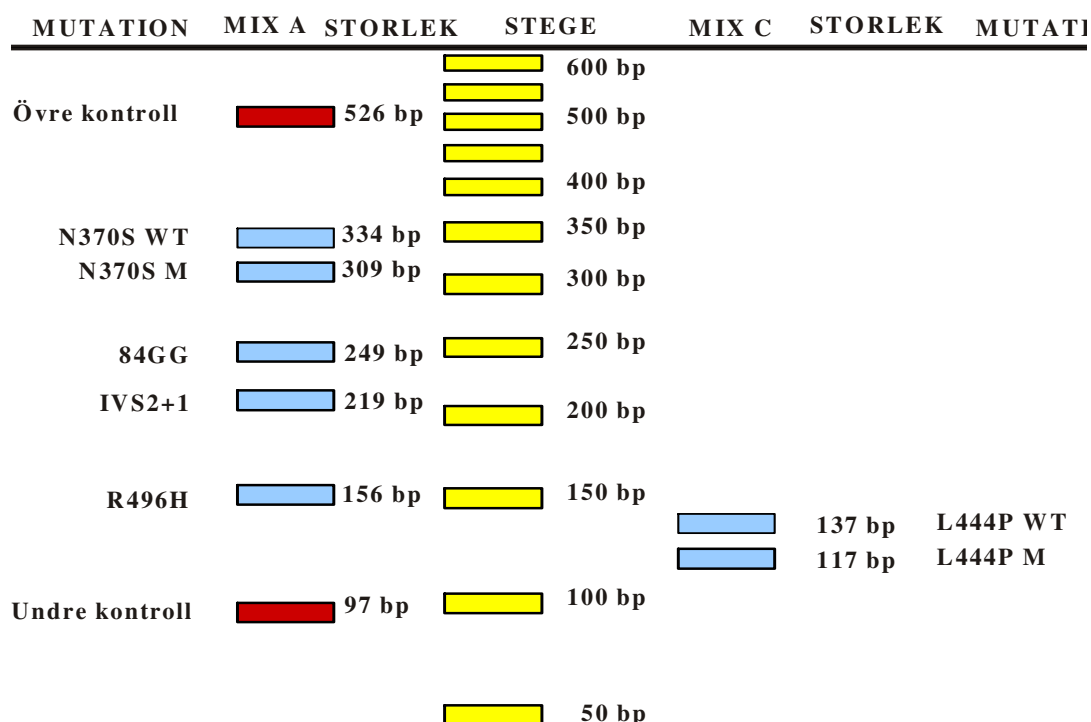
1. PCR-produkten elektroforesbehandlades i 3 % NuSieve 3:1 agarosgel med hjälp av tris-borat med etidiumbromid (TBE/EtBr) som löpande buffert. TBE/EtBr bereddes som 134 mM (16,2 g/L) Tris-bas, 74,9 mM (4,63 g/L) borsyra, 2,55 mM (0,95 g/L) EDTA-buffert med 0,1 µg/mL etidiumbromid.
2. 3 g NuSieve 3:1 agaros upplöstes i 100 mL TBE/EtBr och hälldes i en 15 x 12 cm horisontell gelbricka med 1,5 mm x 5 mm brunnsformar upphängda 1 mm ovanför botten.
3. 15µL av PCR-produkten från PCR-röret (mix A och mix C) laddades i intilliggande brunnspositioner på den förberedda agarosgelen.
4. En 50 basparsstege (Amersham-Pharmacia Biotech) på 1,5 µg/15 µL bereddes i den medföljande laddningsfärgen (80 µL destillerat vatten/10 µL laddningsfärg/10 µL 50 basparsstege) och 15 µL laddades intill varje rad av laddade prover på gelen som en molekylviktsmarkör.
5. Elektroforesen utfördes vid 5 till 6 V/cm mellan elektroderna tills färgen hade vandrat 5 cm från laddningsbrunnarna mot anoden (1,5 till 2 timmar).
6. Efter elektroforesen placerades gelbrunnarna på en UV-transilluminator vid 260 nm, visualiserades och fotograferades.

Tolkning av resultat

PCR-produkterna iakttogs som band i gelens rörspår.

1. De övre & undre kontrollbanden måste vara tydligt synliga i alla prover (se figur 1, endast mix A).
2. De övre och undre kontrollbandens position ska ange rätt molekylstorlek (se figur 1, endast mix A).
3. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna N370S, 84GG, IVS2+1, R496H eller L444P iakttas som band och identifieras genom att positionen för varje band jämförs med ett intilliggande markörspår. Produktbandstorlekarna i baspar (bp) visas i figur 1.
4. **L444P-mutationen påvisas genom ett band vid 117 bp från amplifieringen av mix C. Detta band måste ha samma intensitet som kontrollbandet vid 137 bp för att det ska identifiera L444P-mutationen. Svaga band med betydligt lägre intensitet än kontrollbandet kan ibland iakttas i positionen 117 bp. Detta är artefakter av analysen och de ska inte tolkas som positiva för mutationen. L444P-homozygota mutantprover identifieras som ett enda kraftigt band vid 117 bp och inget synligt band i positionen 137 bp.**
5. Den negativa kontrollen visar inte några band inom det område som anges av de övre och undre kontrollbanden.

Figur 1



Prestandaegenskaper

Validering av testet

Etthundratjugo prover testades i en företagsintern studie. Samtliga prover var helblod (EDTA) och DNA preparerades med hjälp av QIAamp® 96 DNA-blodkit (Qiagen). Alla erhållna resultat konfirmerades externt. Av de 120 personer som testades var 91 prover normala, 5 var N370s-homozygota, 9 var N370S-heterozygota, 5 hade 84GG-, 4 hade IVS2+1- och 3 hade R496H-mutationer. 3 sammansatta heterozygoter påvisades även:

N370S / 84GG (2)

R496H / 84GG

Metodens begränsningar

1. Resultat som erhålls från denna eller andra diagnostiska reagens ska användas och tolkas tillsammans med den totala kliniska bilden. Tepnel Diagnostics ansvarar inte för kliniska beslut.
2. Frånvaron av de mutationer som påvisas med detta kit är ingen garanti för att andra genmutationer vid Gauchers sjukdom inte förekommer. Andra mutationer är möjliga och påvisas inte av detta kit.
3. Användaren av dessa reagens ska betona dessa synpunkter vid rapportering av resultat till klinikern som ställer diagnos eller till den genetiska rådgivaren.

Referenser

1. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Nucleic Acid Res 17: 2503-2516 (1989).
2. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343:1509-1510 (1994).