

ELUCIGENE™ CF29 v.2



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

CF029BY010SE
03/2007
Copyright © 2002 Tepnel Diagnostics Ltd



ELUCIGENE™ CF29 v.2

Katalognr - **CF029B1** – 25 tester med AmpliTaq Gold

CF029B2 – 50 tester med AmpliTaq Gold

YF029B2 – 50 tester **utan** AmpliTaq Gold

Användningsområde

För samtidig kvalitativ detektion *in vitro* av CFTR-genmutationer (cystisk fibros transmembran konduktansregulator) D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, ΔF508, 3849+10kbC>T, 394delTT, 621+1G>T, S1251N, G551D, R117H, R1162X, R334W, A455E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, ΔI507, R347P, R553X, E60X, 3120+1G>A, 2789+5G>A, 1898+1G>A, 711+1G>T, G85E, 2184delA och R560T i humant helblod eller torkade blodfläckar. Dessutom kan testet skilja på personer som är heterozygota och homozygota för ΔF508-mutationen.

Principer för förfarandet

Den metod som tillämpas med ELUCIGENE™ CF29 v.2 kit använder ARMS™ allelspecifik amplifieringsteknologi, som påvisar punktmutationer eller små deletioner i deoxiribonukleinsyra (DNA)⁽⁶⁾. Principen för ARMS™ är att oligonukleotider med en 3' felparad rest inte fungerar som PCR-primrar (polymeraskedjereaktion) under specificerade förhållanden. Vid val av rätt oligonukleotider kan specifika mutant- eller normala DNA-sekvenser amplifieras och påvisas.

Varningar och försiktighetsåtgärder

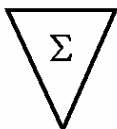
1. Endast för yrkesmässig *in vitro*-diagnostik.
2. Den normala DNA-kontroll som levereras tillsammans med detta kit har genomgått oberoende tester och befunnits vara negativ för hepatit B-virus (HBV), hepatit C-virus (HCV) och humant immunbristvirus (HIV) 1 och 2.
3. Var försiktig vid hantering av material av humant ursprung. Alla prover ska anses vara potentiellt smittsamma. Ingen testmetod kan garantera fullständig frånvaro av HBV, HCV, HIV eller andra smittsamma agens.
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. Följ gällande bestämmelser för biologiskt riskmaterial beträffande hantering av prover och testkomponenter samt användning, förvaring och kassation av dem.
6. Förvara alla komponenter kallare än -20 °C . Kasseras 3 månader efter öppnandet såvida inte uppdelning skett i portioner.

Symboler på etiketter

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



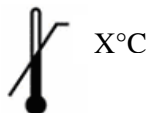
Tillverkare



Antal tester



Se bruksanvisningen



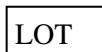
Förvaras kallare än angiven temperatur



Används före angivet datum



Katalognummer



Lot- eller partinummer

Material som medföljer

- 1 (2) ampull(er) x 450 µL vardera av CF029TA, CF029TB, CF029TC och CF029TD). Räcker till 25 (50) teströr vardera av 4 primermixer (TA,TB,TC och TD) innehållande primrar för detektion av följande 29 CFTR-mutationer: D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, ΔF508, 3849+10kbC>T, 394delTT, 621+1G>T, S1251N, G551D, R117H, R1162X, R334W, A455E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, ΔI507, R347P, R553X, E60X, 3120+1G>A, 2789+5G>A, 1898+1G>A, 711+1G>T, G85E, 2184delA och R560T. Varje primermix innehåller även primrar och deoxinukleotidtrifosfater i buffert
- 1 ampull x 200 µL CR000TV spädningsbuffert (DB)
- 1 (2) ampull(er) x 600 µL CR000TR laddningsfärg (LD) till 25 (50) tester
- 1 (2) ampull(er) x 40 µL CR00TW AmpliTaq Gold® (AG), tillräckligt för 25 (50) tester.
Obs! Medföljer ej YF029B2
- 1 x 50 µL ampull CF029TX DNA-kontroll (DC), normal för de mutationer som påvisas av ELUCIGENE™ CF29 v.2

25 (50) färgade PCR-rör (orange, violett, grönt och blått) kan levereras, om så önskas.

Material som behövs men inte medföljer

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 (NH₄Cl).

PCR-amplifiering: Sigma lätt vit mineralolja^(a), sterilt destillerat vatten av god kvalitet.

^(a) Behövs för värmecykel utan uppvärmda lock och för PCR-amplifiering i 0,5 mL PCR-rör.

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

Material som behövs

Allmänt

Laboratorieförbrukningsmaterial: handskar, mikrofugrör med skruvkork, röställ, pipettspetsar.

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.

DNA-preparation: Värmeblock (uppvärmning till 100 °C).

PCR-amplifiering: Värmecykel som rymmer 0,5 mL eller 0,2 mL rör med en temperaturnoggrannhet på +/-1,0 °C mellan 33 °C och 100 °C och statisk temperaturjämnhet på +/-1 °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 torkade blodfläckar ska användas.

Provtagningsutrustning har ibland rapporterats ha skadlig inverkan på vissa analyter och kan störa vissa metodteknologier⁽⁹⁾. 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.

Blodprover (EDTA)

Preparation av DNA från helblodprover (EDTA)

1. Pipettera 80 μL av varje blodprov i ett mikrofugrör med skruvkork.
2. Pipettera 320 μL 170 mM (9,09 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 g tills en cellpellet bildas.
5. Avlägsna och kassera supernatantvätskan med hjälp av en pipett.
6. Pipettera 300 μL 10 mM (0,58 g/L) NaCl /10 mM (3,72 g/L) EDTA i varje rör och återsuspendera cellerna genom att vortexa.
7. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 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 μL 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 μL 1 M (121,1 g/L) Tris-bas/ HCl (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 mL erhålls.
14. Centrifugera varje rör i 1 minut vid 12 000 g tills en pellet av cellfragment bildas. Supernatantvätskan innehåller DNA.

Preparation av DNA från torkade blodfläckar

1. Stansa ut rondeller på 2 x 3 mm^(b) från provkort i ett 1,5 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 g/L) NaCl/10 mM (3,72 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 tvättlösningen.

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 tvättlösning i botten av röret samlas upp. Avlägsna och kassera så mycket tvättlösning 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 Sigma-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.

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.

IsoCode-kortet – DNA-isoleringsanordning för amplifieringskit (Schleicher and Schuell, Inc.) har använts för DNA-preparation från blodfläckar och har även befunnits ge tolkningsbara resultat.

Alternativa metoder för DNA-preparation

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™ CF29 v.2-testet och kan ge suboptimala resultat. De viktigaste kriterierna för alternativa DNA-preparationsmetoder är DNA-koncentration och frånvaro av PCR-hämmare.

Alternativa metoder och provtyper bör noga utvärderas med ELUCIGENE™ CF29 v.2-testet innan resultaten används för diagnostik. Tester av DNA-prover vid koncentrationer <0,5ng/5µL rekommenderas inte. Vid optimala PCR-förhållanden erhålls konsekventa resultat vid DNA-koncentrationer mellan 0,5 och 50ng/5µL.

Testprotokoll - amplifieringsförfarande

Obs! För att minimera risken för kontamination måste steg 4–7 utföras i ett utrymme som är fritt från DNA. Åtgärder ska också vidtas för att undvika kontamination med PCR-produkt.

1. Programmera värmecykeln med en enstegscykel som aktiverar AmpliTaq Gold vid 94°C i 20 minuter, länkad till ett amplifieringscykelprogram på 30 sekunder vid 94°C (denaturering), 2 minuter vid 58°C (annealing) och 1 minut vid 72°C (extension) i 35 cykler. Detta bör länkas till en 20-minuters tidsfördröjningsfil vid 72°C (extension) på den slutliga cykeln.

Obs! Välj alternativet för "block"-metod om det är tillgängligt på värmecykeln för PCR i 0,5 mL-rör.

2. En negativ kontroll måste medtas i varje PCR-körning.
3. Tina och centrifugera ampullerna innehållande primermixer (TA,TB,TC,TD), AmpliTaq Gold (AG), spädningbuffert (DB) och laddningsfärg (LD) i 10 sekunder vid 12 000 g, blanda försiktigt genom att vortexa och centrifugera ampullerna igen i 10 sekunder.
4. Bered tillräcklig spädning av AmpliTaq Gold med medföljande spädningbuffert och laddningsfärg i sterilt destillerat vatten för det antal prover och kontroller som ska testas. Till 10 prover eller kontroller pipetteras 85µL sterilt avjoniserat vatten, 25µL spädningbuffert, 125µL laddningsfärg och 15µL AmpliTaq Gold i ett mikrofugrör. Blanda enzymspädningen väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.
5. Bered en reaktionsblandning genom att tillsätta rätt volym primermix till enzymspädningen från steg 4. Till 10 prover eller kontroller pipetteras separat 165µL av varje primermix (A, B, C och D) i 55µL av den enzymspädning som bereddes i steg 4 i märkta rör. Blanda väl genom att försiktigt pipettera upp och ned.
6. Pipettera 20µL av varje reaktionsblandning i botten av rätt antal tunnväggiga PCR-rör och sätt på korken igen. **Obs! Färgade PCR-rör bör användas för att särskilja reaktionsblandningarna av primrarna TA,TB,TC och TD.**
7. Märk ett färgat PCR-rör för varje prov eller kontroll.

8. Använd separat pipettspets varje gång och tillsätt 5µL testprov till vart och ett av de fyra färgade PCR-rören. Tillsätt 1 droppe Sigma lätt vit mineralolja om tillämpligt^(c) och sätt på korken ordentligt igen. Tillsätt inte DNA till det PCR-rör som används som negativ kontroll.
9. Centrifugera PCR-rören i 10 sekunder vid 12 000 g.
10. Placera alla rör stadigt i värmecykelblocket. Starta först 94°C enstegscykeln och sedan amplifieringscykelprogrammet.
11. Kassera all återstående oanvänd AmpliTaq Gold-spädning.
12. 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.

^(c) För amplifiering som utförs i 0,5mL PCR-rör eller värmecykler 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 bereddades som 134mM (16,2g/L) Tris-bas, 74,9mM (4,63 g/L) borsyra, 2,55mM (0,95g/L) EDTA-buffert med 0,1µg/mL etidiumbromid.
2. 3g NuSieve 3:1 upplöstes i 100 mL TBE/EtBr och hälldes i en 15 x 12cm horisontell gelbricka med 1,5mm x 5mm brunnsformar upphängda 1 mm ovanför botten.
3. 15µL av PCR-produkten (med laddningsfärg tillsatt under PCR-förberedelseprocessen) laddades på en gel.
4. En 50-basparsstege (Amersham-Pharmacia Biotech) på 1,5µg/15µL preparerades i medföljande laddningsfärg (80µL destillerat vatten/10µL laddningsfärg/10µL 50 basparsstege). Observera att mixen kan ha orange färg innan den laddas på gelen. 15µL av denna spädning laddades på gelen och kördes bredvid proverna som en molekylviktsmarkör.
5. Elektroforesen utfördes vid 5 till 6 V/cm^(d) mellan elektroderna tills färgen hade vandrat 5cm från laddningsbrunnarna mot anoden (1,5 till 2 timmar).
6. Efter elektroforesen placerades gelbrunnarna på en UV-transilluminator vid 260nm, visualiserades och fotograferades.

^(d) Beräknat med avståndet i cm mellan elektroderna.

Tolkning av resultat

PCR-produkterna iakttas som band i gelens rörspår.

1. Det övre och undre kontrollbandet måste vara tydligt synligt i alla prover (se figur 1).

2. Alla spår ska vara fria från smet och bakgrundsfluorescens.
3. De övre och undre kontrollbandens position ska ange rätt molekylstorlek (se figur 1).
4. Den negativa kontrollen får inte visa några band inom det område som anges av de övre och undre kontrollbanden. Ett diagnostiskt band ska inte tolkas om ett liknande band också syns i den negativa kontrollen för den aktuella PCR-körningen, eftersom detta tyder på kontamination med genomiskt DNA.

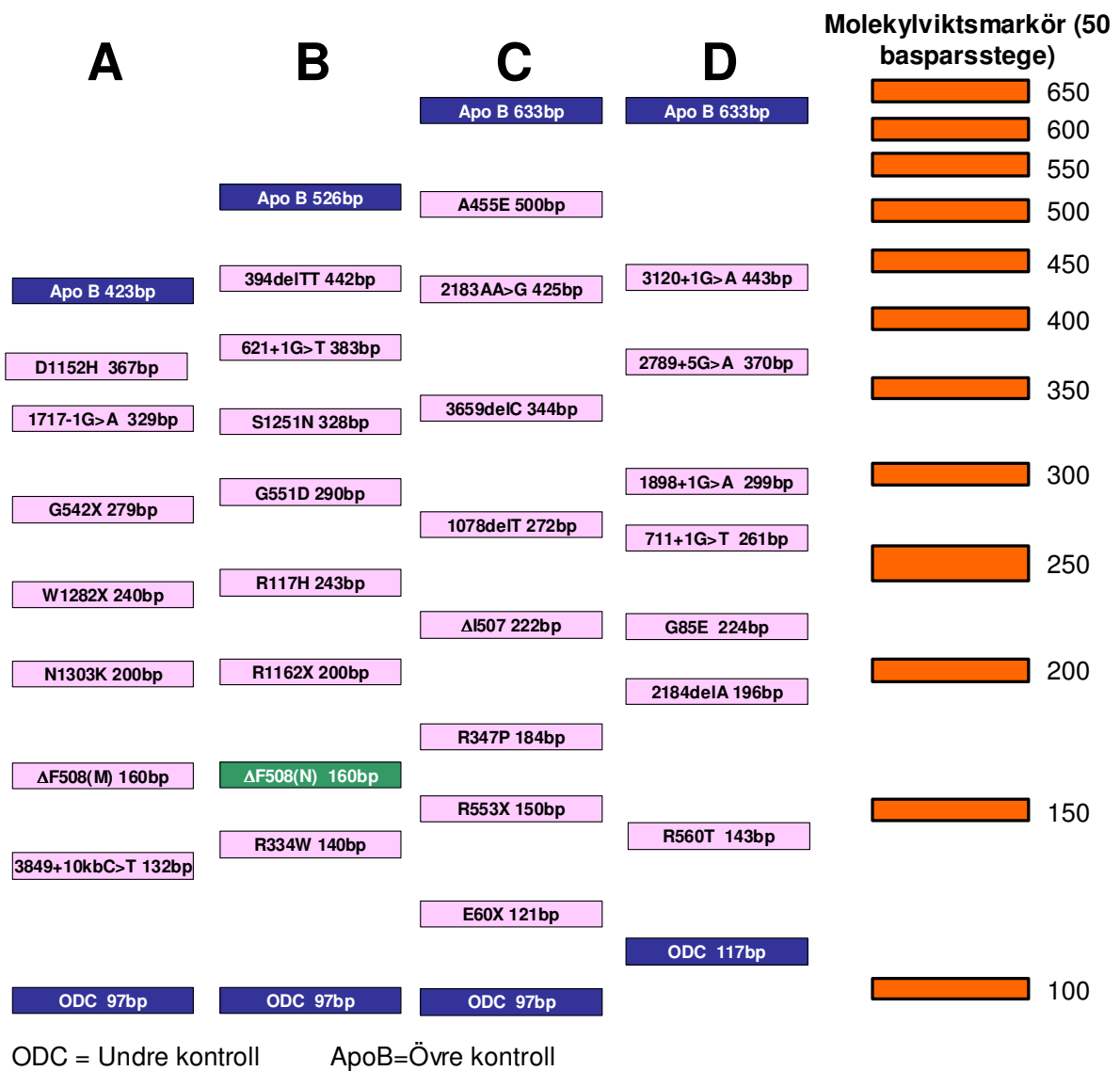
Om någon av ovanstående punkter inte iakttas, ska resultaten inte utvärderas och testet upprepas.

5. En person har två kopior av CFTR-genen. Om dessa kopior har samma sekvens för ett visst givet ställe, beskrivs personen som homozygot för detta ställe. Om kopiorna skiljer sig i sekvens vid ett givet ställe, beskrivs personen som heterozygot för detta ställe.
6. Närvaron av PCR-produkt som genererats från den normala $\Delta F508$ -primern i rör B tyder på att provet innehåller den normala sekvensen för detta ställe. Den normala PCR-produkten iakttas i rör B-spåret i gelen vid 160 bp och identifieras genom att bandpositionen jämförs med ett intilliggande markörspår.
7. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, $\Delta F508$ eller 3849+10kbC>T iakttas i rör A-spåret i gelen och identifieras genom att bandpositionen jämförs med ett intilliggande markörspår. Produktbandstorlekarna i baspar visas i figur 1. Endast produktband i rätt storlek ska tolkas.
8. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna 394delTT, 621+1G>T, S1251N, G551D, R117H, R1162X eller R334W iakttas i rör B-spåret i gelen och identifieras genom att bandpositionen jämförs med ett intilliggande markörspår. Produktbandstorlekarna i baspar visas i figur 1. Endast produktband i rätt storlek ska tolkas.
9. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna A455E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, $\Delta I507$, R347P, R553X eller E60X iakttas i rör C-spåret i gelen och identifieras genom att bandpositionen jämförs med ett intilliggande markörspår. Produktbandstorlekarna i baspar visas i figur 1. Endast produktband i rätt storlek ska tolkas.
10. PCR-produkter från en person som bär på någon av mutationerna 3120+1G>A, 2789+5G>A, 1898+1G>A, 711+1G>T, G85E, 2184delA eller R560T iakttas i rör D-spåret i gelen och identifieras genom att positionen för varje band jämförs med ett intilliggande markörspår. Produktbandstorlekarna i baspar (bp) visas i figur 1. Endast produktband i rätt storlek ska tolkas.

Obs! Till följd av primermixernas komplexitet i varje rör kan primerartefakter ses motsvarande en storlek på <97 baspar i testprovs- och kontrollrörsspår.

Figur 1 visar schematiskt storleken i baspar och den relativa placeringen av PCR-produkter i en gel för samtliga testade mutationer. Även om inte alla kombinationer av mutationer har utvärderats, är det möjligt att påvisa sammansatta heterozygoter med hjälp av ELUCIGENE™ CF29 v.2 kit.

Figur 1



Validering av testet

Matchande helblods- och torkade blodfläcksprover vars genotyp är känd testades i en företagsintern studie. DNA preparerades enligt de metoder som beskrivs i denna bruksanvisning. Sammansatta heterozygoter upptäcktes framgångsrikt av detta kit och alla resultat överensstämde med den kända genotyp som erhöles genom alternativa metoder.

Korsreaktivitet

Åtgärder har vidtagits under utveckling av testet för att undvika störning av testfunktionen vid förekomst av andra rapporterade polymorfismer och mutationer i CFTR-genen⁽⁸⁾.

Följande sällsynta mutationer har utvärderats för korsreaktivitet och påvisades inte med ELUCIGENE™ CF29 v.2 kit: R1283M, 1717-2A>G, R117C, 621+2T>C, R117L, I506V. Dessutom påvisades inte följande polymorfismer med testet: 3617G/T, 1655T/G (F508C), 1651A/G.

Utvärdering av kända mutationer och polymorfismer i CFTR-genen har uppmärksammat följande effekter på resultaten från ELUCIGENE™ CF29 v.2 kit:

1. Δ I507 i kombination med dup1716+51>61 ger en PCR-produkt på 233 bp i C-röret i stället för den förväntade på 222 bp.
2. Lätt korsreaktivitet hos R347P primern i C-röret med den sällsynta R347H-mutationen har iakttagits, vilket resulterar i att svag PCR-produkt syns i R347P-positionen i C-röret.
3. En nyligen rapporterad mutation, 2184insG⁽¹²⁾, kommer teoretiskt att korsreagera med 2183AA>G-primern i C-röret. Ett diagnostiskt 2183AA>G-band kan tyda på närvaro av mutationen 2184insG.
4. **Primern 2184delA korsreagerar med 2183AA>G-mutant DNA-sekvens och resulterar i ett synligt "diagnostiskt" band på gelen från D-röret. En 2184delA-mutation resulterar därför endast i ett diagnostiskt band från D-röret, medan en 2183AA>G-mutation resulterar i ett diagnostiskt band från både C- och D-röret.**
5. Följande mutationer, som inte har kontrollerats på grund av att relevanta prover inte varit tillgängliga, kan störa testfunktionen: R117P, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S och den sällsynta kombinationen av Δ I507 med polymorfismen 1651A/G.
6. En nyligen rapporterad mutation F316L⁽¹²⁾, ger korsreaktivitet med primern 1078delT. Ett diagnostiskt band vid position 1078delT i C-blandningen kan tyda på att F316L-mutationen är närvarande.

Metodens begränsningar

1. Resultat som erhålls från detta eller andra diagnostiska kit 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 mutationer i CFTR-genen inte förekommer. Många andra mutationer är möjliga och påvisas inte av detta kit.
3. Frekvensen för mutationer varierar mellan olika populationer. Mutationsfrekvensdata för olika populationer kan erhållas från The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium ⁽⁸⁾.

Användaren av detta kit ska betona dessa synpunkter vid rapportering av resultat till klinikern som ställer diagnos/den genetiska rådgivaren.

Referenser

1. Welsh MJ *et al.* I Scriver CR *et al* (redaktör), The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York: 3799-3876 (1995).
2. Elborn JS *et al.* Cystic Fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* **46**: 881-885 (1991).
3. Riordan JR *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis Gene. Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073 (1989).
4. Rommens JM *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science* **245**: 1059-1065 (1989).
5. Webbplatsen för The Cystic Fibrosis Mutation Database: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
6. Newton CR *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acids Res* **17**: 2503-2516 (1989).
7. Estivill X *et al.* Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mut* **10**:135-154 (1997).
8. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat* **4**: 167- 177 (1994). Information är även tillgänglig från: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
9. Satsangi J *et al.* Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* **343**: 1509-1510 (1994).
10. de Vries HG *et al.* Validation of the determination of $\Delta F508$ mutations of the CF gene in over 11000 mouthwashes. *Hum Genet* **97**: 334-336 (1996).
11. Riley J *et al.* Rapid determination of DNA concentration in multiple samples. *Nucleic Acids Res* **17**: 8383 (1989).
12. Leoni GB *et al.* Webbplatsen för The Cystic Fibrosis Mutation Database: <http://www.genet.sickkids.on.ca> .