



MutaCHIP[®] ARTERO

DNA-Makroarray Kit für die Untersuchung der genetischen Prädisposition von arteriosklerotischen sowie kardiovaskulären Erkrankungen



Nur für in-vitro Diagnostik



KF391009



10



KF390009



20



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com

Tel.: +49 (0)6251/ 701900
 Fax: +49 (0)6251/ 849430

Inhaltsverzeichnis

1 Verwendungszweck	3
2 Einleitung	3
3 Testprinzip	4
4 Kitbestandteile	4
5 Erforderliche Materialien	5
6 Lagerung und Haltbarkeit	5
7 Arbeitsbedingungen	5
8 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6
9 Probengewinnung	6
10 Testdurchführung	7
1 PCR Produktherstellung.....	7
2 Probenzusammenführung und Verdünnung.....	8
3 MutaChip Protokoll.....	9
11 Auswertung	10
12 Troubleshooting	14

1 Verwendungszweck

Der MutaCHIP[®] ARTERO Test ist ein molekularbiologischer Test zur Untersuchung von Mutationen in Genen, die zu kardiovaskulären Erkrankungen führen können. Die untersuchten Genvarianten stehen im Zusammenhang mit Genen, die den Blutdruck, die Lipid Balance, den Nährstoffmetabolismus, Entzündungen und Oxydativen Stress regulieren. Für diesen Test wird genomische DNA mittels DNA-Makroarray Technologie untersucht.

Eigenschaft	Gen	Variation
Cholesterin Metabolismus und Regulation	ApoE	Cys112Arg Cys158Arg
	CETP	Taq1B Val405Ile Asp442Gly
	SeIE	Ser128Arg
Methylierung/Homocystein Metabolismus	MTHFR	C677T A1298C
Bluthochdruck	GNB3	C825T
	AGT	Met235Thr
Gerinnung	Faktor II	G20210A
	Faktor V Leiden	Arg506Gln
	GP3a	C1565T
	PAI-I	4G/5G
Oxidierung	CYBA*8	Cys242Thr

2 Einleitung

Arteriosklerose ist eine progressive Krankheit charakterisiert durch die Ansammlung von Lipiden und fibrotischen Elementen in den Arterien. Die frühen arteriosklerotischen Läsionen bestehen aus subendothelialen Akkumulationen von fetthaltigen Makrophagen, sogenannten Schaumzellen. Diese Läsionen, auch ‚fatty streaks‘ genannt, können in der Aorta und mit fortschreitendem Alter auch in den koronaren und den zerebralen Arterien nachgewiesen werden. Die ‚fatty streaks‘ sind Vorläufer von fortgeschrittenen Läsionen, die durch die Akkumulation von Lipid-reichem nekrotischem Debris und glatten Muskelzellen charakterisiert sind. Diese Plaques können durch Kalkeinlagerungen, Geschwürbildung und Blutungen zunehmend komplexer werden. Obwohl diese Ansammlungen ausreichend groß werden können um den Blutfluss zu stoppen, ist die wichtigste klinische Komplikation eine akute Verstopfung durch die Bildung eines Embolus, der zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall führen kann. Zu den Risikofaktoren von Arteriosklerose zählen Umweltfaktoren, fettreiche Ernährung, Nikotinkonsum, Bewegungsmangel und Infektionen. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Faktoren mit einer starken genetischen Komponente wie erhöhtes LDL/VLDL (low density- und very-low density Lipoprotein), verringertes HDL (high density Lipoprotein), Bluthochdruck, erhöhte hämostatische Faktoren, erhöhtes Homocystein, Diabetes mellitus, Adipositas und das Geschlecht. Genomisch-epidemiologische Studien haben Kandidatengene

identifiziert, die eine signifikante oder suggestive Erkrankungsassoziation aufzeigen. Folgende Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und Variationen konnten mit der Entstehung von Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen assoziiert werden (siehe Abschnitt 1).

Durch eine Genotypisierung können diejenigen Personen erkannt werden, die ein erhöhtes Risiko haben an Atherosklerose und deren Folgeerscheinungen zu erkranken. Dies ermöglicht eine frühe Prävention und Intervention.

Referenzen:

Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407 (2000), 233-241

Libby P., Ridker P. M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473 (2011), 317-325

3 Testprinzip

Zur Analyse der Mutationen werden die variablen Bereiche der unterschiedlichen Gene mittels PCR amplifiziert, wobei frisch extrahierte genomische DNA des Patienten als Matrize dient. Das Amplifikationsprodukt wird anschließend auf den MutaCHIP gegeben und nach mitgeliefertem Protokoll bearbeitet. Die Analyse mittels Präzipitationsreaktion lässt eine eindeutige Genotypisierung aller auf den MutaCHIP gespotteten Allele der verschiedenen Gene zu.

Das amplifizierte Produkt wird auf den MutaCHIP gegeben und bindet an den dort immobilisierten Sonden. Durch einen Waschschrift werden unspezifisch gebundene Fragmente wieder entfernt. Im Anschluss wird das Enzym hinzugegeben, welches an den Sonden-Fragment-Komplex bindet. Nach Zugabe des Substrats tritt eine Fällungsreaktion an den Stellen, an denen noch DNA gebunden ist, auf. Das farbige Präzipitat wird mit dem Imagereader detektiert und von der dazugehörigen Software ausgelesen und bewertet.

4 Kitbestandteile

Jedes Testkit enthält die folgenden Reagenzien zur Durchführung von 20 MutaCHIP Assays, sowie eine Gebrauchsanweisung.

Bezeichnung	Gefäßgröße	Menge
PCR Mix A (grüner Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix B (gelber Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Mix C (roter Deckel)	2 mL Schraubröhre	1
PCR Buffer (inkl. Polymerase)	2 mL Schraubröhre	1
Hybridisation Buffer	30 mL Plastikgefäß	1
Washing Buffer	60 mL Plastikgefäß	1
Enzyme Mix	4 mL Plastikgefäß	1
Substrate	30 mL Plastikgefäß (braun)	1
DNA Ref	2 mL Schraubgefäß	1
MutaCHIPs	1,5 mL Gefäß	20
Gebrauchsanweisung	/	1

5 Erforderliche Materialien

Benötigte Geräte - von PharmGenomics erhältlich:

- Macroarray Analysing Tool (MAAT):
 - Notebook + ARTERO Genomics Software
 - MutaCHIP Imagereader
 - Thermocycler für PCR (Peqlab Primus 25 advanced)
 - Thermomixer mit Kühlfunktion (BIOR Mixing Block MB-102)

Benötigte Geräte und Verbrauchsmaterialien - nicht mitgeliefert:

- Pipetten:
 - 0.1 - 2.5 µL
 - 0.5 - 10 µL
 - 10 - 200 µL
 - 100 - 500 µL
- 0,2 ml PCR Gefäße (steril)

6 Lagerung und Haltbarkeit

- Alle Komponenten sind bei 2-8 °C zu lagern.
- Das Substrat ist unbedingt vor Lichteinwirkung zu schützen.
- Im Inneren des Beutels befinden sich 5x MutaCHIPs mit jeweils geöffnetem Deckel. Wenn ein Lichtschutzfolien-Beutel geöffnet wurde, müssen die Deckel der darin verbleibenden MutaCHIPs unbedingt geöffnet bleiben, da das Schutzgas entweicht.
- Die MutaCHIPs können im wieder lose (nicht luftdicht) verschlossenen (keine Klebestreifen verwenden!) Lichtschutzfolien-Beutel mehrere Wochen bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden. Dabei einen dunklen und trockenen (vor Feuchtigkeit schützen) Ort zur Aufbewahrung auswählen.
- Um selbst minimale Performanceverluste zu vermeiden, empfehlen wir jedoch den Verbrauch eines geöffneten MutaCHIP Beutels möglichst innerhalb von zwei Wochen!
- Die MutaCHIPs sind gegen direkte Sonneneinstrahlung und Staub zu schützen.

7 Arbeitsbedingungen

- Die MutaCHIPs dürfen niemals zentrifugiert werden.
- Die Oberfläche des MutaCHIPs darf nicht mit der Pipettenspitze berührt werden
- Der MutaCHIP darf nur mit den im Protokoll erwähnten Substanzen verwendet werden.

8 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Vorschriften und Grundsätze für molekularbiologisches Arbeiten müssen eingehalten werden.

- Der Test ist zur Verwendung mit **frisch** extrahierter genomischer DNA aus EDTA-Vollblut als Ausgangsmaterial geeignet. Nur dann können optimale Ergebnisse sichergestellt werden.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Lots.
- Die MutaCHIPs sind:
 - nur für den Einmalgebrauch bestimmt
 - nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden
- Der MutaCHIP darf während den Arbeitsschritten nicht austrocknen!
- Der MutaCHIP ist für den Gebrauch mit dem MAAT und der dazugehörigen Software von PharmGenomics ausgelegt.
- Die Arbeitsschritte zügig durchführen.
- Alle Ausgangslösungen während des Arbeitens kühlen.
- Das MutaCHIP-Gefäß mit zwei Händen öffnen. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Druck auf den MutaCHIP ausgeübt wird.

9 Probengewinnung

Als Matrize für die PCR Amplifikation dient genomische DNA aus EDTA-Vollblut. Die DNA-Konzentration sollte zwischen 15-30ng/µl liegen. Die Reinheit ($OD_{260/280}$) der DNA sollte höher als 1.8 sein.

Für den Assay darf nur hochmolekulare (frisch extrahierte) DNA verwendet werden.

10 Testdurchführung

10.1 PCR Produktherstellung

- Vor Beginn der Arbeiten sollte sichergestellt sein, dass die Arbeitsflächen und eingesetzten Geräte dekontaminiert sind
- Die Komponenten des Kits, die zur Durchführung der PCR benötigt werden, bereitstellen

Zur Amplifikation der Ziel-DNA werden drei PCR-Ansätze pro Probe benötigt – für jeden Primer Mix einer! Diese werden wie in folgenden Tabellen beschrieben pipettiert.

PCR Mix A:

Bestandteil	Volumen pro 29,1 µL-Reaktionsansatz
DNA	4,0 µL
PCR Mix A (grüner Deckel)	12,6 µL
PCR Buffer (inkl. Polymerase)	12,5 µL

PCR Mix B:

Bestandteil	Volumen pro 27,5 µL-Reaktionsansatz
DNA	4,0 µL
PCR Mix B (gelber Deckel)	11,0 µL
PCR Buffer (inkl. Polymerase)	12,5 µL

PCR Mix C:

Bestandteil	Volumen pro 27,5 µL-Reaktionsansatz
DNA	4,0 µL
PCR Mix C (roter Deckel)	11,0 µL
PCR Buffer (inkl. Polymerase)	12,5 µL

Die Proben in den Thermocycler stellen und das in 10.2 beschriebene PCR Protokoll verwenden.

10.2 Probenzusammenführung und Verdünnung

Das PCR-Protokoll muss für jedes Labor erneut etabliert werden, da die verschiedenen Thermocycler unterschiedliche Heizraten haben. Diese Etablierung entfällt, wenn der empfohlene Thermocycler verwendet wird (Peqlab Primus 25 advanced). Für die Etablierung kann mit dem folgenden Standard-Protokoll begonnen werden:

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Start	95	2	
Denaturation	95	0,5	5 Zyklen
Primer Hybridisation	59	1	
Elongation	72	1	
Denaturation	95	0,5	5 Zyklen
Primer Hybridisation	58	0,5	
Elongation	72	0,5	
Denaturation	95	0,5	30 Zyklen
Primer Hybridisation	55	0,5	
Elongation	72	0,5	
Final Elongation	72	5	
Store at	8	8	

10.3 MutaChip Protokoll

A) Vorbereitung des Hybridisierungspuffers

Falls der Hybridisation Buffer trüb oder flockig geworden ist, kann dieser für wenige Sekunden in der Mikrowelle (240 W) oder in einem Wasserbad erwärmt und durch Schwenken homogenisiert werden, bis er wieder klar ist. Vor dem Verwenden muss der Puffer auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt werden.

B) Vorbereitung der DNA Proben

- Thermoshaker auf **50°C** vorheizen.
- **5 µL** PCR-Produkt A, **4 µL** PCR-Produkt B und **4 µL** PCR Produkt C in ein frisches PCR Reaktionsgefäß überführen und kurz vortexen.
- Die so vorbereitete Probe für **2 min.** bei **95°C** denaturieren.
- Anschließend die denaturierte Probe mit **90 µL** Hybridisation Buffer auffüllen und durch auf- und abpipettieren mischen.
- Das Gemisch vollständig in den MutaCHIP überführen, ohne dabei den Boden des MutaCHIPS zu berühren.

C) Hybridisierung

- Hybridisieren der Probe bei **50°C, 550rpm** für **45 min.**

D) Waschschritte nach der Hybridisierung

Den Thermoshaker auf **50°C** temperiert lassen!

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Hybridisation Buffer aus Schritt C) vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Waschen des MutaCHIPS bei **50°C, 550 rpm** für **5 min.**

E) Enzymkonjugation

Den Thermoshaker auf **30 °C** temperieren.

Achtung: Während des Herunterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden! Der Washing Buffer muss auf dem MutaCHIP verbleiben bis die Zieltemperatur erreicht ist!

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten!

- Den Washing Buffer aus Schritt D) vollständig entfernen
- **100 µL** Enzyme Mix vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren
- Konjugation des MutaCHIPS bei **30°C, 550 rpm** für **10 min.**
- Den Enzyme Mix vollständig entfernen
- **500 µL** Washing Buffer vorsichtig auf den MutaCHIP pipettieren

F) Zweiter Waschschritt

Den Thermoshaker auf **21°C** temperieren.

Achtung: Während des Herunterkühlens des Thermoshakers muss der MutaCHIP unbedingt aus dem Shaker entnommen werden!

- Waschen des MutaCHIPS bei **21°C, 550 rpm** für **5 min.**

G) Färbung

Achtung: Auf korrekte Einstellung des Volumens achten! **Der Chip darf während und nach dem Färben nicht geschüttelt werden!**

- Den Washing Buffer aus Schritt F) vollständig entfernen.
- **100 µL** Substrate in den MutaCHIP geben und für **5 min** bei **21°C** inkubieren. Dazu den MutaCHIP in den Thermoshaker überführen (**keine Schüttelfunktion aktivieren**)
- Danach das Substrate wieder vollständig entfernen (Pipette) und umgehend **500 µl** Washing Buffer hinzugeben
- MutaCHIP in den Imagereader überführen (auf korrekte Platzierung achten), Bild erstellen und mit der Analyse/ Auswertung beginnen (siehe folgendes Kapitel)

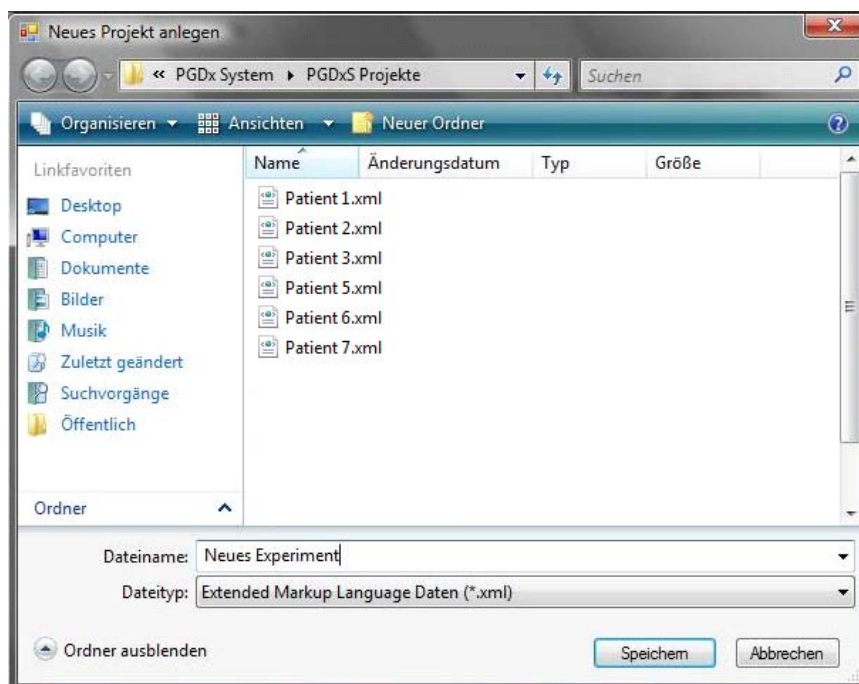
11 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über das MAAT und die ARTERO Genomics Software. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Software in einem Report zusammengestellt. Für die Auswertung des Chips folgen Sie der folgenden kurzen Anleitung. Für weitere und detailliertere Informationen sehen Sie bitte im ARTERO Genomics Software Handbuch nach.

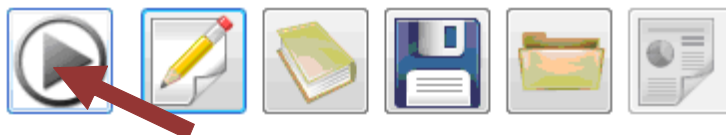
Schritt 1: Ein neues Projekt erstellen



Klicken Sie auf die Schaltfläche *Neues Experiment*. Vergeben Sie einen beliebigen Namen für das Experiment und speichern Sie es anschließend, indem Sie auf die Schaltfläche *Speichern* klicken.

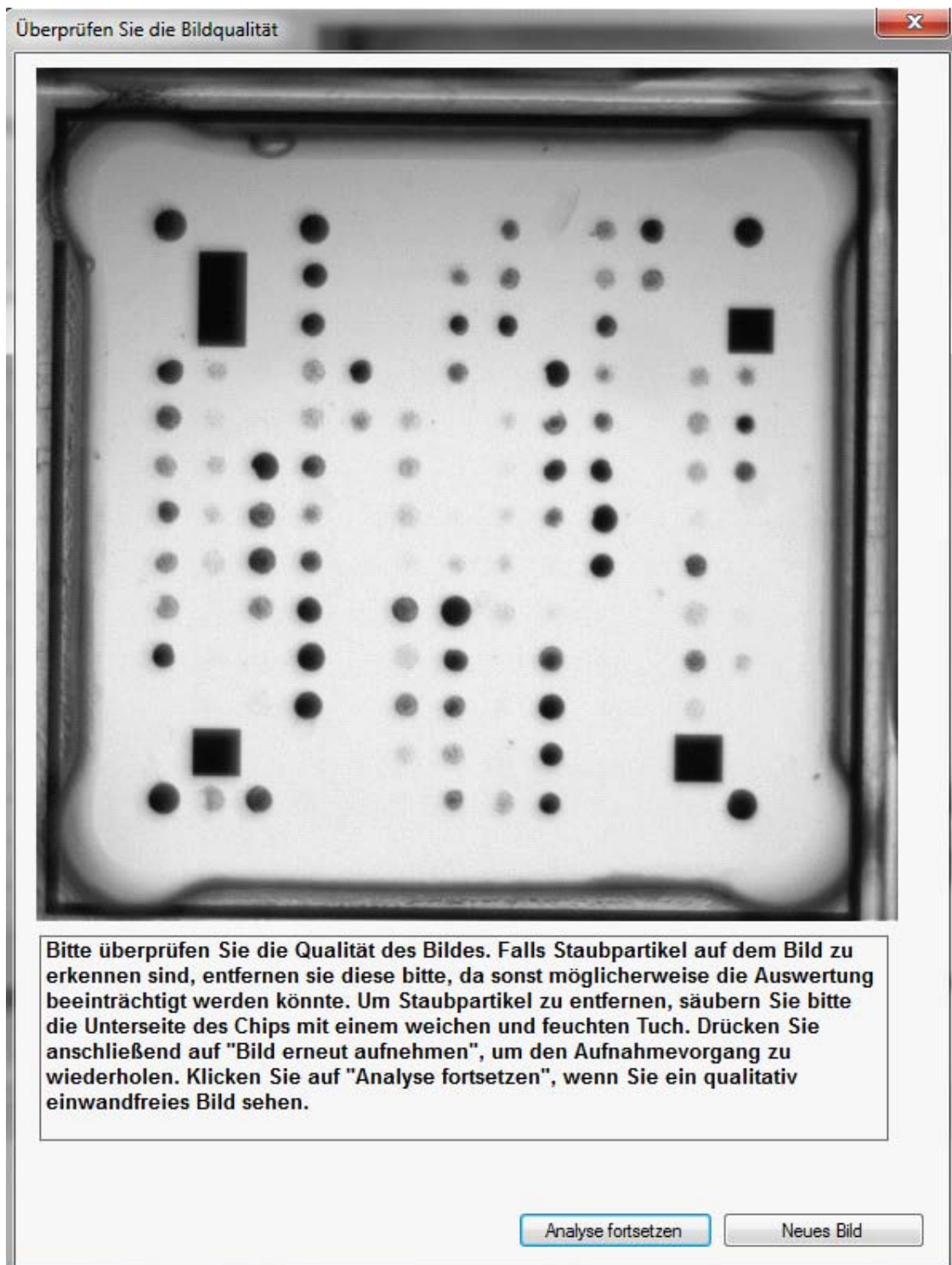


Schritt 2: Analyseprozess starten



Klicken Sie auf die Schaltfläche *Start*, um die Datenanalyse zu starten.

Schritt 3: Qualitätsprüfung des MutaCHIPs



Um ein einwandfreies Analyseergebnis zu erhalten, muss zunächst die Bildqualität des MutaCHIPs überprüft werden. Staubpartikel auf der Unterseite des MutaCHIPs können die Analyse beeinträchtigen. Diese können durch das Säubern mit einem weichen und feuchten Tuch entfernt werden. Klicken Sie auf die Schaltfläche Analyse fortsetzen, falls die Bildqualität der in der oberen Abbildung entspricht.

Schritt 4: Genotypisierungsergebnisse

The screenshot shows the PharmGenomics Diagnostic System interface. On the left, there is a 'Projekte' pane with a list of patient files (Patient 5.xml to Patient 6.xml). Below it is an 'Analyseprotokoll' pane with a list of steps. The main area is titled 'CYP2D6 Genotypisierungstest' and contains a table with the following data:

Allel	Homozygot Wildtyp	Heterozygot	Homozygot Mutation
*3	✓		
*4		⚠	
*6	✓		
*7		⚠	
*8	✓		
*9	✓		
*10	✓		
*11	✓		
*17	✓		
*29	✓		
*41	✓		
*5	Keine Gen Deletion detektiert		
*n	Keine Gen Duplikation detektiert		

Below the table, a red banner reads 'Defekte Allele entdeckt'. To the right of the table is a microarray image showing a grid of spots. Below the image, the text 'Genotypisierung abgeschlossen' is displayed. The PharmGenomics logo is in the top right corner.

Nach der vollständigen Datenanalyse können Sie die Ergebnisse im Analysemodul / Genotypisierungsmodul oder im Diagnosebericht abrufen. Die dabei verwendete Symbole werden in der unten stehenden Tabelle erläutert.

Symbole der Software und ihre Bedeutung

	Der Patient trägt auf beiden Allelen die gesunde Variante der untersuchten genetischen Variation.
	Der Patient trägt auf einem Allel die gesunde und auf dem anderen Allel die mutierte genetische Variation.
	Der Patient trägt auf beiden Allelen die mutierte genetische Variation in homozygoter Form.
	Die Signalwerte der Sonden für diese genetische Variation sind zu gering, um ein valides Ergebnis zu erzeugen. Dies könnte auf Sequenzveränderungen in direkter Nähe zur untersuchten Variation hindeuten. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.
	Beide Sonden für diese genetische Variation erzeugen ein nicht gültiges Signal. Dies könnte auf eine Verschmutzung auf der Chipoberfläche zurückzuführen sein. Die anderen Signale werden jedoch durch den Ausfall nicht beeinträchtigt.

Schritt 5: Diagnostischer Report



Um die Daten auszuwerten, lassen Sie sich den diagnostischen Report anzeigen. Klicken Sie hierfür auf die Schaltfläche *Report*.

Zusätzlich können Sie auch ein .pdf Dokument erstellen oder den Report direkt ausdrucken.

The screenshot shows a web browser window with the URL `http://localhost/PGDx_System_diag_Rep/Tamox/Rep`. The browser's menu bar includes File, Edit, View, Favorites, Tools, and Help. The File menu is open, showing options like New tab, Duplicate tab, New window, New session, Open..., Edit with Notepad, Save, Save as..., Close tab, Page setup..., Print... (Ctrl+P), Print preview..., Send, Import and export..., Properties, Work offline, and Exit. A red arrow points from the 'Print...' menu item to a 'Print' dialog box that is open over the report content.

The report content is titled 'armGenomics GenoChip Tamox T' and 'Analysis Result'. It features a table with the following data:

Sample
Type of sample:
Draw date:
Processing date:
Report date: 05.07.2011

Below the table, the text 'Results and Interpretation' is displayed, followed by a grey box containing the text 'Defective CYP2D6 alleles detected'. The 'Print' dialog box is open, showing the 'General' tab. It lists 'PDFCreator' as the selected printer. The status is 'Ready', location is 'eDoc Printer', and comment is 'eDoc Printer'. The page range is set to 'All' (1 page), and the number of copies is 1. The 'Collate' checkbox is checked. Buttons for 'Print', 'Cancel', and 'Apply' are visible at the bottom of the dialog.

12 Troubleshooting

Problem	Lösung
Software Meldung: Warnung! Die Signale des Biotinreferenzmarkers sind zu niedrig. Dies kann ein Zeichen für einen fehlgeschlagenen oder nicht ausgeführten Konjugationsschritt sein oder das Enzym ist nicht mehr funktional. Das System muss gestoppt werden.	Prüfen Sie das Enzym und/oder Substrat. Wiederholen Sie den Assay mit neuem Enzym/Substrat.
Software Meldung: keine Fehlerangabe ErrorCode - 3011	Der Reader ist nicht richtig angeschlossen. Halten Sie „Esc“ für 3 Sekunden gedrückt und schließen Sie den Reader in der richtigen Art und Weise an - bitte wenden Sie sich an das Benutzerhandbuch des PGDx-Systems.
Schlechte Bildqualität	Reinigen Sie die Bodenunterseite des Arraygefäßes. Benutzen Sie ein weiches Tuch, das mit Desinfektionsmittel angefeuchtet ist. Wiederholen Sie das Foto (es kann notwendig sein diesen Schritt mehrfach zu wiederholen).
Unscharfes Bild	Reinigen Sie vorsichtig die Kamera mit einem Tuch oder einem Wattstäbchen.



MutaCHIP[®] ARTERO

DNA-Macroarray Kit for the Analysis of Genetic Predisposition of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases



For in vitro diagnostics only



KF391009



10



KF390009



20



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com

Tel.: +49 (0)6251/ 701900
 Fax: +49 (0)6251/ 849430

Content

1 Application	3
2 Introduction	3
3 Concept of the Assay	4
4 Components	5
5 Materials	5
6 Storage and Shelf life	6
7 Working Conditions	6
8 Considerations and Precautions	6
9 Sample Collection	6
10 Test Procedure	7
1 PCR Product Generation.....	7
2 PCR Protocol.....	8
3 MutaCHIP Protocol.....	9
11 Evaluation and Interpretation of Results	10
12 Trouble shooting	14

1 Application

The MutaCHIP[®] ARTERO Test is a biomolecular test for the analysis of mutations in marker genes, which can lead to atherosclerotic cardiovascular diseases. The analyzed gene variations are associated with genes, which regulate blood pressure, lipid balance, nutrient metabolism and oxidative stress. For this purpose genomic DNA is analyzed using MutaCHIP technology.

Feature	Gene	Variation
Cholesterol metabolism and regulation	ApoE	Cys112Arg Cys158Arg
	CETP	Taq1B Val405Ile Asp442Gly
	SeI	Ser128Arg
Methylation/Homocysteine metabolism	MTHFR	C677T A1298C
High blood pressure	GNB3	C825T
	AGT	Met235Thr
	AGTR1	A1166C
Coagulation	Faktor II	G20210A
	Faktor V Leiden	Arg506Gln
Coagulation	GP3a	C1565T
	PAI-I	4G/5G
Oxidation	CYBA*8	Cys242Thr

2 Introduction

Atherosclerosis is a progressive disease characterized by the accumulation of lipids and fibrotic elements in the arteries. The early atherosclerotic lesions are made up of subendothelial accumulations of fat-containing macrophages, so called foam cells. These lesions, also called 'fatty streaks', can be detected in the aorta and with increasing age also in the coronary and cerebral arteries. The 'fatty streaks' are the precursors of advanced lesions, which are characterized by the accumulation of lipid-rich necrotic debris and smooth muscle cells. These plaques can become more complex by calcium inclusion, ulcer formation and bleedings. Although these accumulation can become large enough to inhibit the blood flow, the most important clinical complication is an acute blockage caused by the formation of a thrombus or blood clot, which can lead to a myocardial infarction or stroke.

Risk factors of atherosclerosis are environmental factors, like nutrition rich in fat, nicotine consumption, lack of movement and infection. In addition, there are several factors with a strong genetic component like increased LDL/VLDL (low density and very-low density

lipoproteins), decreased HDL (high density lipoprotein), high blood pressure, increased haemostatic factors, increased homocysteine, diabetes, adiposity and gender.

Genomic-epidemiologic studies have identified candidate genes showing a significant or suggestive disease association. The following single nucleotide polymorphisms (SNP) and variations can be associated with the development of atherosclerosis and its resulting complications (See Application). By genotyping those patients can be identified, who have an increased risk to develop atherosclerosis or its resulting complications. This will allow an early prevention and intervention. In addition, the differentiation of the varying forms of the disease is possible, which will allow an individualized therapy.

References:

Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407 (2000), 233-241

Libby P., Ridker P. M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473 (2011), 317-325

3 Concept of the Assay

To analyse the mutations a PCR is performed, which amplifies the relevant genes using freshly extracted genomic DNA as template. The amplification product is transferred to the MutaCHIP and is treated following the provided protocol. The analysis allows distinct genotyping of all variants of the amplified genes that are spotted onto the MutaCHIP.

The amplified product binds onto the MutaCHIP to the immobilised probes. In a washing step the unspecific fragments are removed from the surface. Subsequently, the Enzyme Mix is added to the MutaCHIP, coupling with the probe-target complex. After addition of the substrate, a precipitate will form. This precipitate is then detected by the Image reader and the signals are evaluated by the software.

4 Components

Each test kit contains the following components for 20 MutaCHIP assays and the instruction manual:

Description	Size of Reaction Tube or Flask	Number
PCR Mix A (green lid)	2 mL Reaction Tube	1
PCR Mix B (yellow lid)	2 mL Reaction Tube	1
PCR Mix C (red lid)	2 mL Reaction Tube	1
PCR Buffer (incl. Polymerase)	2 mL Reaction Tube	1
Hybridisation Buffer	30 mL Plastic Flask	1
Washing Buffer	60 mL Plastic Flask	1
Enzyme Mix	4 mL Plastic Flask	1
Substrate	30 mL Plastic Flask (brown)	1
DNA Ref	2 mL Reaction Tube	1
MutaCHIPs	1.5 mL Reaction Tube	20
Instruction manual	/	1

5 Materials

Required materials that can be ordered separately from PharmGenomics:

- Macroarray Analysing Tools (MAAT):
 - Notebook + ARTERO Genotyping Software
 - MutaCHIP image reader
 - Thermocycler (Pepqab Primus 25 advanced)
 - Thermoshaker with cooling function(BIOR Mixing Block MB-102)

Required Materials – not provided

- pipettes:
 - 0.1 - 2.5 µL
 - 05 - 10 µL
 - 10 - 200 µL
 - 100 - 500 µL
- 0.2 mL PCR tubes (sterile)

6 Storage and Shelf life

- All components are stored at 2-8 °C.
- The substrate has to be strictly protected against light exposure.
- The bags contain each 5x MutaCHIPs with open lids. After unsealing a bag, the lids of the remaining MutaCHIPs have to remain open as the protection gas escapes.
- The MutaCHIPs can be stored in the loosely (not airtight) closed (do not use tape) light-protection bag up to several weeks and room temperature (RT). For storage choose a dry and dark place.
- To avoid even minimal loss of performance, we recommend using up one bag of MutaCHIPs within two weeks.
- The MutaCHIPs have to be protected against direct exposure to sunlight and dust.

7 Working Conditions

- Never centrifuge the MutaCHIPs.
- Do not touch the surface of the MutaCHIPs with a pipette.
- Use only substances that are mentioned in the protocol.

8 Considerations and Precautions

The guidelines and principles for working in a biomolecular laboratory have to be followed.

- The test is suitable for genomic DNA **freshly** extracted from whole EDTA blood as starting material. Only then optimal results are guaranteed.
- Do not mix reagents from different lots.
- The MutaCHIPs are:
 - for single-use only
 - only for *in vitro* diagnostics
- Do not let the MutaCHIP dry out while performing the analysis!
- The MutaCHIP is designed for the use with the MAAT and the software provided by PharmGenomics.
- Perform all steps in a timely manner.
- Keep all stock solutions cooled while working.
- Always open the MutaCHIP with both hands. Do not apply pressure to the tube.

9 Sample Collection

The template for PCR amplification is genomic DNA from EDTA whole blood. The DNA concentration should be between 15 and 30 ng/μL. The minimum DNA purity (A260/A280 ratio) should be higher than OD 260/280 1.8.

For the assay high molecular (freshly extracted) DNA has to be used.

10 Test Procedure

10.1 PCR Product Generation

- Before starting, make sure that all working surfaces and utilized devices are decontaminated.
- Prepare all components of the kit required for the procedure of the PCR
- Subsequently, perform the PCR according to the protocol listed below.
- For the amplification of target DNA, three PCR reactions per sample are required - one for each mastermix! Those are pipetted as described in the following tables.

PCR Mix A:

Component	Volume per 29.1 µL- reaction mixture
DNA	4.0 µL
PCR Mix A (green lid)	12.6 µL
PCR Buffer (incl. Polymerase)	12.5 µL

PCR Mix B:

Component	Volume per 27.5 µL- reaction mixture
DNA	4.0 µL
PCR Mix B (yellow lid)	11.0 µL
PCR Buffer (incl. Polymerase)	12.5 µL

PCR Mix C:

Component	Volume per 27.5 µL- reaction mixture
DNA	4.0 µL
PCR Mix C (red lid)	11.0 µL
PCR Buffer (incl. Polymerase)	12.5 µL

The samples are placed in the Thermocycler and the program described in 10.2 is to be applied.

10.2 PCR Protocol

The PCR protocol has to be established anew for each laboratory, as different thermocyclers have different heating rates. This establishment can be omitted when using the recommended thermocycler (Peqlab Primus 25 advanced). The following standard protocol can be used to start the establishing process:

	Temperature [°C]	Time [min]	
Start	95	2	
Denaturation	95	0.5	5 Cycles
Primer Hybridisation	59	1	
Elongation	72	1	
Denaturation	95	0.5	5 Cycles
Primer Hybridisation	58	0.5	
Elongation	72	0.5	
Denaturation	95	0.5	30 Cycles
Primer Hybridisation	55	0.5	
Elongation	72	0.5	
Final Elongation	72	5	

10.3 MutaCHIP Protocol

A) Preparation of the Hybridisation Buffer

If the Hybridisation Buffer is turbid or a precipitate can be seen, it has to be heated in a microwave for several seconds (240 W) or in a water bath. Gently shake the Hybridisation Buffer until it gets clear, to homogenise it again. Before usage, it has to be cooled to room temperature (RT).

B) Preparation of DNA samples

- Preheat the thermoshaker to **50°C**
- Add **7 µL** PCR product A, **4 µL** PCR product B und **4 µL** PCR product C in a separate tube and mix by brief vortexing
- Denature the mixture for **2 min** at **95°C** in a thermocycler
- After denaturation, add **90 µL** Hybridization Buffer
- Pipette the denatured mixture into the MutaCHIP without touching the bottom of the tube

C) Hybridisation

- Perform the hybridisation at **50°C**, **550rpm** for **45 min**.

D) Washing steps after Hybridisation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Hybridisation Buffer from step C)
- Add carefully **500 µL** of Washing Buffer onto the MutaCHIP
- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **50°C** for **5 min**

E) Enzyme conjugation

Set the thermoshaker to **30°C**.

Note: During the cooling period the MutaCHIP has to be removed from the thermoshaker! The Washing Buffer has to remain on the MutaCHIP until the target temperature is reached!

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume!

- Completely remove the Washing Buffer from step D)
- Add **100 µL** of Enzyme Mix to the MutaCHIP
- Incubate the MutaCHIP at **550 rpm** and **30°C** for **10 min**
- Completely remove the Enzyme Mix from step
- Add of **500 µL** Washing Buffer to the MutaCHIP

F) Washing step after Enzyme conjugation

Set the thermoshaker to **21°C**.

Note: During the cooling period the MutaCHIP has to be removed from the thermoshaker!

- Wash the MutaCHIP at **550 rpm** and **21°C** for **5 min**

G) Precipitation

Caution: Pay attention to the correct adjustment of volume! **Do not shake the MutaCHIP during the precipitation!**

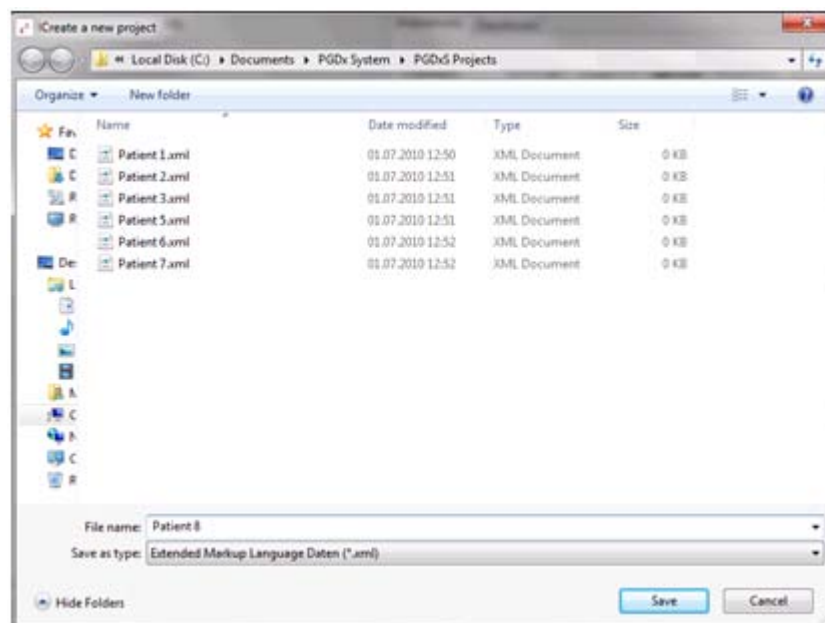
- Completely remove the Washing Buffer from step F)
- Add **100 µL** of Substrate to the MutaCHIP and incubate for **5 min** at **21°C**. To do so, put the MutaCHIP into the thermoshaker (**Do not activate shaking function**)
- Thereafter, remove the Substrate completely (pipette) and immediately add **500 µL** of Washing Buffer
- Place the MutaCHIP into the image reader (pay attention to the correct orientation), take a picture and start with the analysis/evaluation of the results (see following chapter)

11 Evaluation and Interpretation of Results

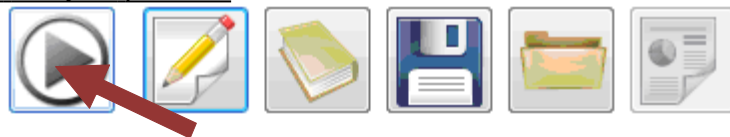
The evaluation is performed using the MAAT and the ARTERO Genotyping Software. The results are compiled with help of the software into a report. For the evaluation of the chip, follow the short instructions below. For further and detailed information, please refer to the ARTERO Genotyping Software handbook.

Step 1: Create a new project

Click on the button *New experiment*. Assign an arbitrary name for the experiment and subsequently save it by clicking on the button *save*.

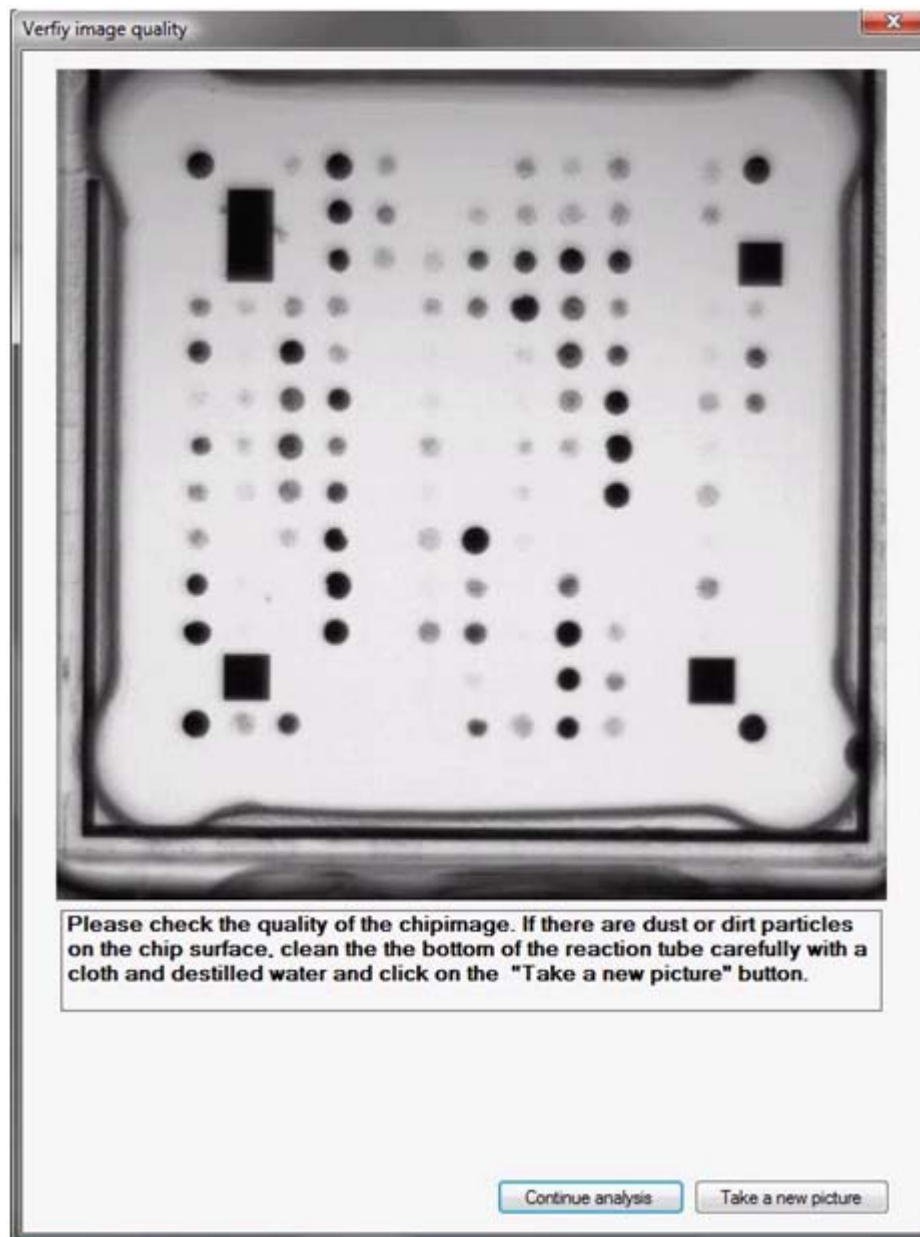


Step 2: Start the analysis process



Click on the *Start* button to initiate data analysis.

Step 3: Quality check of the chip



To ensure a correct analysis result, the picture quality of the MutaCHIP has to be checked. Particles of dust on the bottom side of the MutaCHIP can affect the analysis. These can be removed by cleaning with a soft and wet tissue. Follow the instructions given in the screen shown here. Press *Continue analysis* if the quality of the picture is comparable to the figure above.

Step 4: Genotyping results

The screenshot displays the PharmGenomics Diagnostic System interface. On the left, a 'Projekte' pane lists several patient files. The main window is titled 'CYP2D6 Genotypisierungstest'. It features a table with the following columns: 'Allel', 'Homozygot Wildtyp', 'Heterozygot', and 'Homozygot Mutation'. The table contains data for alleles *3 through *41. A red banner at the bottom of the table area reads 'Defekte Allele entdeckt'. To the right of the table is a microarray image with the text 'Genotypisierung abgeschlossen' below it. The PharmGenomics logo is visible in the top right corner.

Allel	Homozygot Wildtyp	Heterozygot	Homozygot Mutation
*3	✓		
*4		⚠	
*6	✓		
*7		⚠	
*8	✓		
*9	✓		
*10	✓		
*11	✓		
*17	✓		
*20	✓		
*41	✓		
*5	Keine Gen Deletion detektiert		
*N	Keine Gen Duplikation detektiert		

After the complete data analysis, the results can be accessed in the analysis module / genotyping module or in the diagnostic report. The used icons are explained in the following table.

Symbole der Software und ihre Bedeutung

	The patient carries on both alleles the healthy variant of the investigated genetic variants.
	The patient carries on one allele the healthy and on the other allele the mutated genetic variant.
	The patient carries on both alleles the mutated genetic variation in homozygous form.
	The signal values of the probes for this genetic variation are too weak for a valid result. This could be caused by other sequence variations in close proximity to the investigated variant. The remaining signals of the assay are not influenced.
	Both probes for this genetic variant show an invalid signal. This might be caused by impurities or dust particles on the MutaCHIP surface. The remaining signals of the assay are not influenced.

Step 5: Diagnostic report



To evaluate the results open the diagnostic Report Main. Therefore click on the button *Report*.

Additionally a .pdf document can be created or the report can be directly printed.

The screenshot shows a web browser window with the URL `http://localhost/PGDx_System_diag_Rep/Tamox/Rep`. The browser's 'File' menu is open, and the 'Print...' option (Ctrl+P) is selected. A 'Print' dialog box is overlaid on the right side of the browser window. The dialog box has two tabs: 'General' and 'Options'. The 'General' tab is active, showing 'Select Printer' with 'PDFCreator' selected. Below this, there are fields for 'Status: Ready', 'Location: eDoc Printer', and 'Comment: eDoc Printer'. There are also buttons for 'Print to file', 'Preferences', and 'Find Printer...'. The 'Page Range' section has radio buttons for 'All' (selected), 'Selection', and 'Pages: 1'. The 'Number of copies' is set to 1, and the 'Collate' checkbox is checked. At the bottom of the dialog box are 'Print', 'Cancel', and 'Apply' buttons.

The report content is partially visible behind the dialog box. It includes the following text:

- armGenomics GenoChip Tamox T**
- Analysis Result**
- Sample**
- Type of sample:
- Draw date:
- Processing date:
- Report date: 05.07.2011
- Results and Interpretation**
- Defective CYP2D6 alleles detected**

12 Trouble shooting

Problem	Solution
<p>Software Message: Warning! The signals of the biotin reference markers are too low. This could be a sign of a failed or missed conjugation step. Alternatively the enzyme could be degraded. The system will be stopped.</p>	<p>Check enzyme and/or substrate. Repeat the assay with new enzyme/substrate</p>
<p>Software Message: Warning! The signals of the DNA probes indicate a failed amplification. However, there might be a homozygous deletion of the CYP2D6 gene. Please refer to the handbook under section "Detection of *5 homozygous"</p>	<p>Please read paragraph 11.1</p>
<p>Software Message: No error description Error Code -3011</p>	<p>The reader is not plugged in properly: Keep "Esc" pressed for 3 seconds and plug in the reader in the right manner – please refer to the user manual of the PGDx System</p>
<p>Poor image quality</p>	<p>Clean the bottom side of the MutaCHIP using a cotton swab or a cloth wet with disinfectant Repeat the photograph (it can be necessary to repeat this procedure several times)</p>
<p>Blurred picture</p>	<p>Carefully clean the camera with a cotton swab</p>