Referenzinstitut für Bioanalytik
Friesdorfer Str. 153
D-53175 Bonn
Telefon +49 228 926895-0
Internet: www.rfb.bio
E-Mail: info@spmd-rfb.de

Molekularbiologie MG2 1/25

Organisation und Durchführung:
Dr. Anja Kessler, Dr. Sascha Neumann, Julia Röchert M. Sc.

Wissenschaftliche Beratung:
PD Dr. Verena Haselmann, Mannheim; Prof. Dr. Parviz Ahmad-Nejad, Wuppertal

Ringversuchsleiter:
Prof. Dr. Cornelius Knabbe, Prof. Dr. Dr. Klaus P. Kohse, Prof. Dr. Michael Neumaier

Versuchsanleitung

Der Ringversuch wird in Kooperation mit der niederländischen Organisation ECAT durchgeführt.

Bitte beachten Sie, dass für diesen ingversuch die **Online-Eingabe Ihrer Resultate verpflichtend ist.** Für den internen Gebrauch finden Sie einen Messwertbogen auf unserer Website www.rfb.bio. Dort wählen Sie über die Ringversuchsauswahl den aktuellen Ringversuch aus und klicken auf die dort hinterlegte Anleitung. Neben der Versuchsanleitung finden sie die Vorlage eines Messwertbogens für den internen Gebrauch.

Termine

Versuchszeitraum
Für die Untersuchung der Proben stehen drei Wochen zur Verfügung (s. Terminplan Ringversuche "Versuchszeitraum").

Einsendeschluss
05.04.2025

Probenmaterial

Bei allen Proben handelt es sich um genomische DNA aus humanen Leukozyten oder Zelllinien. Die Proben werden teils mittels Whole Genome Amplification (WGA) hergestellt. Alle Proben liegen Ihnen lyophilisiert vor. Das Material wurde vor und nach Lyophilisation erfolgreich auf Amplifizierbarkeit geprüft.

Empfohlene Lagertemperatur: +2 °C bis +8 °C.

Die Homogenität der Proben wurde überprüft.

Die Stabilität der Proben wird über den Ringversuchszeitraum gewährleistet.

Kontrollproben sind potentiell infektiös und daher mit der entsprechenden Sorgfalt zu behandeln.

Falls die Proben nicht in einwandfreiem Zustand beim Teilnehmer eintreffen, bitten wir um sofortige telefonische Reklamation mit Angabe der Teilnehmernummer und des Ringversuchs.

Probenvorbereitung

Zentrifugieren Sie die Proben (800 ng) bitte vor Rekonstitution kurz (z. B. 30 sec bei 12.000 xg) und lösen Sie die gDNA anschließend in jeweils 50 Mikroliter aqua dest.. Bitte lassen die Proben mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren und zentrifugieren Sie die Proben anschließend kurz (z. B. 30 sec bei 12.000 xg).
Die Wahl von Analysenmethode und Protokoll ist freigestellt.

Achtung: Für die Analyse von **Cyp2D6 in Set D** enthalten die Proben insgesamt 4000 ng lyophilisierte gDNA. Bitte rekonstituieren Sie diese Proben in jeweils **20 Mikroliter aqua dest.**, um eine Konzentration von ungefähr 200 ng/µl zu erhalten. Weitere Verdünnungen können entsprechend der verwendeten Analysemethode vorgenommen werden.

Bestimmbare Analyte pro Set:

Set A (Proben 01 + 02):
- Thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*)
- TPMT*2 (*TPMT*, NM_000367.5:c.238G>C, rs1800462)
- TPMT*3B (*TPMT*, NM_000367.5:c.460G>A, rs1800460)
- TPMT*3C (*TPMT*, NM_000367.5:c.719A>G, rs1142345)
- Thiopurine S-methyltransferase (TPMT – Genotypisierung)
- CYP2C8*3 (*CYP2C8*, NM_000770.3:c.1196A>G, rs10509681)
- Cytochrom P450 2C9 (*CYP2C9*)

Hinweis: Einzelne Teile des Ringversuchs-Programms (z. B. Verpackung, Datenübertragung, Probenvorbereitung/ -herstellung) können zeitweise im Unterauftrag vergeben werden. Im Falle einer Unterauftragsvergabe erfolgt diese an einen kompetenten Unterauftragnehmer. Das RfB ist für dessen Arbeit verantwortlich.

- CYP2C9*2 (*CYP2C9*, NM_000771.4:c.430C>T, rs1799853)
- CYP2C9*3 (*CYP2C9*, NM_000771.4:c.1075A>C, rs1057910)
- CYP2C9 (2C9 – Genotypisierung)
- UGT1A1*28 (*UGT1A1*, NM_000463.3:c.-41_-40dupTA, rs3064744)
- Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD)
- DPYD*2A (*DPYD*, NM_000110.4:c.1905+1G>A, rs3918290)
- DPYD*13 (*DPYD*, NM_000110.4:c.1679T>G, rs55886062)
- DPYD p.D949V (*DPYD*, NM_000110.4:c.2846A>T, rs67376798)
- DPYD c.1129-5923C>G (*DPYD*, NM_000110.4:c.1129-5923C>G, rs75017182)
- DPYD c.1236G>A (*DPYD*, NM_000110.4:c.1236G>A, rs56038477)
- DPYD HapB3 (*DPYD*, NM_000110.4:c.1129-5923C>G, rs75017182 oder *DPYD*, NM_000110.4:c.1236G>A rs56038477)
- DPD activity score acc. to CPIC
- DPD activity score acc. to DGHO
- BCHE A (D70G) (*BCHE*, NM_000055.4:c.293A>G, rs1799807)
- BCHE K (A567T) (*BCHE*, NM_000055.4:c.1699G>A, rs1803274)

Set B (Proben 03 + 04):
- KRAS p.G12/p.G13 (*KRAS*, NP_004976.2:p.G12/G13)
- KRAS p.G12 (*KRAS*, NM_004985.5:c.34G>T>C>A, rs121913530)
- KRAS p.G12 (*KRAS*, NM_004985.5:c.35G>T>C>A, rs121913529)
- KRAS p.G13 (*KRAS*, NM_004985.5:c.37G>T>C>A, rs121913535)
- KRAS p.G13 (*KRAS*, NM_004985.5:c.38G>T>C>A, rs112445441)
- KRAS p.G12 (*KRAS*, NP_004976.2:p.G12
- KRAS p.G12 (*KRAS*, NM_004985.5:c.34G>T>C>A, rs121913530)
- KRAS p.G12 (*KRAS*, NM_004985.5:c.35G>T>C>A, rs121913529)
- KRAS p.G13 (*KRAS*, NP_004976.2:p.G13)
- KRAS p.G13 (*KRAS*, NM_004985.5:c.37G>T>C>A, rs121913535)
- KRAS p.G13 (*KRAS*, NM_004985.5:c.38G>T>C>A, rs112445441)
- KRAS p.Q61 (*KRAS*, NP_004976.2:p.Q61)
- KRAS p.Q61 (*KRAS*, NM_004985.5:c.181C>G>A, rs121913238)
- KRAS p.Q61 (*KRAS*, NM_004985.5:c.182A>T>G>C, rs121913240)
- KRAS p.Q61 (*KRAS*, NM_004985.5:c.183A>T>C, rs17851045)
- BRAF p.V600 (*BRAF*, NP_004324.2:p.V600E/K)
- BRAF p.V600 (*BRAF*, NM_004333.6:c.1799T>A, rs113488022)
- BRAF p.V600 (*BRAF*, NM_004333.6:c.1798_1799delinsAA, rs121913227)
- cKIT p.D816V (*KIT*, NM_000222.3:c.2447A>T, rs121913507)
- NRAS (*NRAS*, NP_002515.1:p.Q61)
- NRAS (*NRAS*, NM_002524.5:c.181C>T>G>A, rs121913254)
- NRAS (*NRAS*, NM_002524.5:c.182A>T>G>C, rs11554290)
- NRAS (*NRAS*, NM_002524.5:c.183A>T>C, rs121913255)

Set C (Proben 05 + 06):
- HLA-B*27 (*HLA-B*, NM_005514.8)
- TNF alpha 238 (*TNF*, NM_000594.3:c.-418G>A, rs361525)
- TNF alpha 308 (*TNF*, NM_000594.3:c.-488G>A, rs1800629)

Set D (Proben 07 + 08):
- Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6)
- CYP2D6*2-296 (*CYP2D6*2*, NM_000106.6:c.886C>T, rs16947)
- CYP2D6*2-486 (*CYP2D6*2*, NM_000106.6:c.1457G>C, rs1135840)
- CYP2D6*3 (*CYP2D6*3*, NM_000106.6:c.775del, rs35742686)
- CYP2D6*4 (*CYP2D6*4*, NM_000106.6:c.506-1G>A, rs3892097)
- CYP2D6*6 (*CYP2D6*6*, NM_000106.6:c.454del, rs5030655)
- CYP2D6*7 (*CYP2D6*7*, NM_000106.6:c.971A>C, rs5030867)
- CYP2D6*8 (*CYP2D6*8*, NM_000106.6:c.505G>T, rs5030865)
- CYP2D6*9 (*CYP2D6*9*, NM_000106.6:c.841_843del, rs5030656)
- CYP2D6*10 (*CYP2D6*10*, NM_000106.6:c.100C>T, rs1065852)
- CYP2D6*17 (*CYP2D6*17*, NM_000106.6:c.320C>T, rs28371706)
- CYP2D6*35 (*CYP2D6*35*, NM_000106.6:c.31G>A, rs769258)
- CYP2D6*41 (*CYP2D6*41*, NM_000106.6:c.985+39G>A, rs28371725)
- CYP2D6*5 (*CYP2D6*, Deletion)
- CYP2D6*xN (*CYP2D6*, Duplikation/Amplifikation)
- Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19)
- CYP2C19*2 (*CYP2C19*, NM_000769.4:c.681G>A, rs4244285)
- CYP2C19*3 (*CYP2C19*, NM_000769.4:c.636G>A, rs4986893)
- CYP2C19*17 (*CYP2C19*, NM_000769.4:c.-806C>T, rs12248560)
- CYP2C19 Genotypisierung

Set E (Proben 09 + 10):
- HLA B*57:01 (NM_005514.8)
- Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6)
- CYP2B6*4 (*CYP2B6*, NM_000767.5:c.785A>G, rs2279343)
- CYP2B6*9 (*CYP2B6*, NM_000767.5:c.516G>T, rs3745274)

- CYP2B6*6 (*CYP2B6*, NM_000767.5:c.785A>G, rs2279343 + NM_000767.5:c.516G>T, rs3745274)
- ABCB1 c.3435T>C (*ABCB1*, NM_001348946.2:c.3435T>C, rs1045642)
- CCR5-del32bp (*CCR5*, NM_001394783.1:c.554_585del, rs333)

Set F (Proben 11 + 12):
- IL28B (C/T Polymorphismus) (*IFNL4*, NM_001276254.2:c.151-152G>A, rs12979860)
- IL6 G(-174)C (*IL6*, NM_000600.4:c.-237C>G rs1800795)
- CYP3A4*22 (*CYP3A4*, NM_017460.6:c.522-191C>T, rs35599367)

Dokumentation und zusätzliche Angaben

Als Ringversuchsergebnisse sollen die ermittelten Genotypen eingegeben werden.

Bitte beachten Sie, dass bei der Analyse von CYP2D6 (Analyt 30 bis 43) nicht der Genotyp, sondern jeweils nur die hinter der rs-Nummer stehende genetische Variante überprüft wird. Bitte beachten Sie, dass für die Analyse von Cyp2D6 wegen der Vielzahl an möglichen Genotypkombinationen das Ergebnis der Genotypisierung im Klartext unter Analyt 57 einzutragen ist. Nur wenn der ermittelte Genotyp dort eingetragen ist, kann ein Zertifikat für die Genotypisierung erteilt werden.

Bitte beachten Sie weiterhin, dass für Analyt 27 (HLA-B27) bei positivem Nachweis von HLA-B*27 die Möglichkeit besteht, das identifiziete Allel aufgrund der Vielzahl an Varianten im Klartext einzugeben.

Für die Analysen von KRAS, BRAF und NRAS besteht ebenfalls die Möglichkeit zur Freitexteingabe.

Bitte geben Sie bei der Ergebniseingabe auch die folgenden Informationen entsprechend dem unten angegebenen Schlüssel an:

Amplifikationsmethode (**A**)
- 100 Standard PCR
- 101 LightCycler realtime PCR
- 102 TaqMan realtime PCR
- 103 andere realtime PCR (Hersteller)
- 104 andere
- 105 Allel-spezifische PCR

Produkt-Analyse (**B**)
- 200 Agarose Gel
- 201 Polyacrylamide Gel
- 202 Schmelzpunktbestimmung
- 203 Chip-Analytik
- 204 andere

Genotyp-Identifikation (**C**)
- 300 RFLP
- 301 Allel-spezifische Amplifikation (Hersteller)
- 302 reverser DotBlot (Hersteller)
- 303 FRET Sonden
- 304 TaqMan Sonden
- 305 Molecular Beacons
- 306 andere
- 307 DNA-Sequenzierung (Hersteller)
- 308 Chip-Analytik
- 309 Pyro-Sequenzierung
- 310 Next-Generation-Sequencing
- 311 hauseigenes Verfahren
- 312 Light cycler
- 313 MLPA
- 314 MALDI
- 315 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)
- 316 droplet digital PCR (ddPCR)

Hinweise

Kontrollieren Sie Ihre Eintragungen bitte, denn nachträgliche Änderungen können nicht berücksichtigt werden.

Nach der Eingabe Ihrer Resultate übermitteln Sie uns bitte die Messwerte durch Anklicken des entsprechenden Buttons. Zur Kontrolle Ihrer Eingaben können Sie jederzeit während des Versuchszeitraumes eine Protokoll-E-Mail anfordern.

Für Rückfragen senden Sie bitte eine E-Mail direkt an:
mgl@spmd-rfb.de

Auswertung

Der Abschlussbericht Ihrer Untersuchungsergebnisse steht ca. 8 Wochen nach Einsendeschluss im RfB Online-Konto zur Verfügung.