



1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KT0002

Mit dem MutaGEL-Kit Hämochromatose wird der Genotyp der drei häufigsten Mutationsstellen des HFE-Gens auf Chromosom 6 in Kodon 63 (His nach Asp = DNA-Basen C nach G mutiert), in Kodon 65 (Ser nach Cys = A nach T mutiert) und in Kodon 282 (Cys nach Tyr = G nach A mutiert) bestimmt.

2. Einleitung

Die häufigste rezessive Erbkrankheit des Menschen ist die durch - wegen eines Proteindefektes deregulierte - chronisch zu hohe Eisenaufnahme in der zweiten Lebenshälfte symptomatische erbliche Hämochromatose (auch Siderophilie und Bronzediabetes genannt), deren Voraussetzung fast immer Homozygotie der Adenosin-Mutation (Tyrosin) im 282ten Kodon des HFE-Gens ist, selten zusammengesetzte Heterozygotie 282A (Tyrosin) mit 63G (Asp) oder 63G/63G (Asp/ Asp) und verstreut Heterozygotie mit 65T (Cys) und lokal anderen, die in ¼ der so mutierten Personen mit Leberdefekt und Diabetes zum Ausbruch kommt. Die Auswirkung der veränderten HFE-Proteine wird v. a. zwischen einer Blockade des eisenaufnehmenden Rezeptors (Duodenalkryptenzellhypothese) und einem Verlust ihrer Eisensensorfunktion (Hepcidinhypothese) erwogen. Diagnostisch ist die erhöhte Transferrin-Eisensättigung (stadiums-charakteristisch eine Leberbiopsie). Die frühe Behandlung ist einfach. Frühzeitige Symptome sind Asthenie + Arthralgie + erhöhte Aminotransferase, bei deren Vorhandensein erhöhtes Transferrineisen den HFE-Gentest nötig macht und im Diagnosefall die Testung der Patientenverwandten.

3. Testprinzip

Der PCR-Kit MutaGEL Hämochromatose besteht aus drei Bestecken: 1 allelspezifischer Doppelansatztest für Kodon 282 sowie 2 RFLP-Tests (also PCR mit anschließender Restriktion) für Kodon 63 und 65. Dafür werden die beiden möglichen Basen im Kodon 282 mit 2 PCR's nebeneinander und die beiden möglichen Basen in Kodon 63 bzw. 65 durch 2 überstreichende Amplifikationen und anschließenden Enzymrestriktionen untersucht - d. h. es werden insgesamt 4 PCR-Ansätze pro Patient verwendet!

4. Inhalt der Testpackung (12 Bestimmungen für G282A und 2x6 Bestimmungen für C63G bzw. A65T und Kontrollen)

▪ PCR Mix 282 (Normal)	1 x 280 µl (grün)	PCR-Fertigmix für den Nachweis der Normalsequenz des Kodons 282 im HFE-Gen
▪ PCR Mix 282 (Mutation)	1 x 280 µl (lila)	PCR-Fertigmix für den Nachweis der Mutationssequenz des Kodons 282 im HFE-Gen
▪ PCR Mix 63	1 x 140 µl (gelb)	PCR-Fertigmix zur Amplifikation des Kodons 63 im HFE-Gen
▪ PCR Mix 65	1 x 140 µl (braun)	PCR-Fertigmix zur Amplifikation des Kodons 65 im HFE-Gen
▪ Restriktionsenzym 63	1 x 30 µl (blau)	Restriktionsenzym für den Kodon 63 – RFLP-Test
▪ Restriktionsenzym 65	1 x 30 µl (weiß)	Restriktionsenzym für den Kodon 65 – RFLP-Test
▪ Restriktionspuffer	1 x 500 µl (transparent)	Puffer für die Restriktionsenzyme 63 bzw. 65
▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 80 µl (rot)	Positivkontroll-DNA für alle 3 Mutationen des HFE-Gens

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H₂O (Reinstwasser)
- Thermocycler (optional Mineralöl für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel) + PCR-Tubes
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (mit Filter)
- Thermoblock + sterile Reagenzgefäße
- Reagenzien und Geräte für die Gelelektrophorese (Puffer, Färbelösung, Kammer, Spannungsgeber)

6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagenzien

Die Aufbewahrung erfolgt bei ≤ -18°C. Bei korrekter Lagerung sind die Reagenzien mindestens bis zum Verfallsdatum (auf jeder Einzelverpackung aufgedruckt) stabil. Es empfiehlt sich, die Hämochromatose-Positivkontroll-DNA nur 2x aufzutauen + daher bei Bedarf zu aliquotieren. *Vor Gebrauch:* Alle Reagenzien sollten vor dem Öffnen gemischt und dann für einige Sekunden zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro-Diagnostik
- Test nur durch geschultes Personal nach GLP (Good Laboratory Practice)- Richtlinien durchführen lassen.
- Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Es wird empfohlen, die Enzym-Mixe auf Eis zu pipettieren – insbesondere bei Raumtemperaturen > 25°C.
- Alle in der Testpackung enthaltenen Reagenzien/ Reaktionsgefäße können nach ihrer Verwendung im Restmüll entsorgt werden.
- Die PCR-Technologie ist extrem sensitiv. Die Amplifikation eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Daher in drei räumlich voneinander abgetrennten Bereichen für a) Probenaufbereitung, b) PCR-Reagenz-Vorbereitung und c) DNA-Detektion arbeiten.
- Sterile Spitzen mit Filter und von für PCR-Zwecke geeigneten Pipetten verwenden (für jeden Bereich extra Pipettensatz reservieren).
- Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und extra Kittel benutzen.
- Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.
- Aerosolbildung (beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.
- Methode nach Dr. M. Eßrich, Denzlingen/ Freiburg (Germany).

Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in vier Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion).
2. Amplifikation mit den für die fraglichen Basen spezifischen PCR-Fertigmixen: 2 für Kodon 282, 1 für Kodon 63 und 1 für Kodon 65.
3. Restriktion der Amplifikate für HFE-63 und HFE-65.
4. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der allelspezifischen Amplimere (Kodon HFE-282) bzw. der verdauten Amplifikate (Kodon HFE-63 bzw. HFE-65) mit anschließender Detektion im UV-Licht.

HINWEIS: MutaGEL[®] HFE benötigt speziell eine PCR mit Annealing bei **60°C** und einer max. **Zykluszahl von 37** (das liegt an der allelspezifischen PCR für HFE-282). Zudem muss die Restriktion für den **HFE-65-Test** bei **65°C** erfolgen!

8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA aus z.B. 200 µl Vollblut extrahieren, indem ein handelsüblicher DNA-Extraktionskit entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers verwendet wird.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die DNA bei $\leq -18^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

9. Amplifikation

- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten.
- Für jede einzelne Probe, die Positiv- und die Negativ-Kontrolle sollte wie folgt ein Master-Mix bereitgestellt werden (Anzahl „N“ der Proben + 10% virtuelles Volumen zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit): für die HFE-282-Untersuchung je 1x Ansatz für Normal- und Mutations-Sequenz (zusammen also 2) und für die HFE-63- bzw. HFE-65- Untersuchung jeweils 1x Ansatz für die Restriktions-PCR.
- Das Gesamtvolumen je PCR-Ansatz (mit Proben-DNA) ist 25 µl (Thermocycler entsprechend einstellen).
- Die Amplifikationen für jede Probe werden nach dem folgenden Schema durchgeführt.

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 25 µl	Master-Mix- Volumen: 20µl
PCR-Mix 282 „Normal“	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%
PCR-Mix 282 „Mutation“	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%
PCR-Mix 63	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%
PCR-Mix 65	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%

- je 20 µl der PCR-Fertigmixe in ein steriles PCR-Gefäß (geeignet für Thermocycler) aliquotieren.
- Proben: Je 5 µl der **extrahierten DNA** zum jeweiligen PCR-Mix zupipettieren
- Positiv-Kontrolle: 5 µl der **Positiv-Kontroll-DNA** zum PCR-Mix des jeweiligen Kontrollansatz zupipettieren (die Positivkontrolle funktioniert bei allen 3 Mutationen).
- Negativ-Kontrolle: 5 µl H₂O (Reinstwasser) zum jeweiligen PCR-Mix zupipettieren
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten)

Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

Anfangsphase:	95°C für 5 min
37 Zyklen:	95°C für 30 sec / 60°C für 30 sec / 72°C für 30 sec
Endphase:	72°C für 10 min, danach 4°C

10. Restriktionsendonukleasen-Verdau nur für die HFE-63- bzw. HFE-65- Ansätze

Für jedes Amplifikat von HFE-63 bzw. HFE-65, einschließlich der Positiv-Kontroll-DNA, wird **parallel** in **separaten** Gefäßen folgender Restriktionsverdau Mix angesetzt (das Reaktionsvolumen jeweils mit der Anzahl N der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und ca. 10 % Volumen addieren). Das Gesamtvolumen pro Verdau-Ansatz beträgt 50 µl.

Reagenzien für den VERDAU	Volumen pro VERDAU-Ansatz: 40 µl	Volumen des VERDAU- Master Mix
Puffer für Restriktionsenzyme (für beide gleich)	36 µl	36 µl x N + 10 %
Restriktionsenzym für HFE-63 bzw. HFE-65	4 µl	4 µl x N + 10 %

- 40 µl** des Verdau-Mix jeder Probe in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Gefäße verwendet werden).
- 10 µl** des jeweiligen Amplifikats (HFE-63 bzw. HFE-65) zum entsprechenden Enzymverdau-Mix zugeben, mischen, kurz abzentrifugieren.
- Reaktionsgefäße in einen Heizblock (alternativ PCR-Gefäße in den Thermocycler) einstellen:
 - für **HFE-63** bei **37°C** für **3 h** (optional **über Nacht**) inkubieren.
 - für **HFE-65** bei **65°C** für **3 h** (optional **über Nacht**) inkubieren.

11. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2,5 %** Agarose (oder 20 % Polyacrylamid) für **ca. 130 Vh** (z.B. 80 min bei 100 Volt) durchführen: ca. **15 µl** von jedem Ansatz (PCR oder Verdau) mit 4 µl Ladebuffer (z.B. KAN01070) versetzen und in die Geltaschen laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KBR311005) abgeglichen werden. Die im Gel aufgetrennte DNA wird im Ethidiumbromidbad (5µg/ml) oder SybrGreen für ca. 5 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert.
- HFE-282:** Die allelspezifische PCR liefert in beiden Ansätzen eine spezifische Bande von **110 bp** Länge (sowohl wenn im Normalansatz ein Normalallel vorhanden ist, als auch wenn im Mutationsansatz ein mutiertes Allel vorhanden ist). In beiden Fällen erscheint zudem auch eine **Kontrollbande von 400 bp** zur Absicherung der funktionierenden PCR. Das HFE-282-Ergebnis setzt sich somit aus dem Ablesen der beiden Ansätze Normalsequenz-PCR und Mutationssequenz-PCR zusammen, d.h. es werden 2 Gelspuren pro Patient benötigt.
- HFE-63:** die PCR liefert ein Fragment von **160 bp**. Bei Vorhandensein einer 63-Mutation wird das Fragment durch die Restriktion in **110 + 50 bp** geschnitten, bei **HFE-63-** Normalsequenz bleibt das Fragment von 160 bp unberührt.
- HFE-65:** die PCR liefert ein Fragment von **150 bp**. Bei Vorhandensein einer 65-Mutation wird das Fragment durch die Restriktion in **115 + 35 bp** geschnitten, bei **HFE-65-** Normalsequenz bleibt das Fragment von 150 bp erhalten.

Allelspezifische PCR	Cys282Tyr (C282Y)			RFLP-PCR	His63Asp (H63D)			Ser65Cys (S65C)		
Kontrollfragment	400	400	400	Amplimer	160	160		150	150	
Normalfragment	110	110		Fragment A		110	110		115	115
Mutationsfragment		110	110	Fragment B		50	50		35	35
Genotyp	C282	C282/282Y	282Y	Genotyp	H63	H63/63D	63D	S65	S65/65C	65C

12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrollen DNA-Fragmente von 135, 150, 200 und 400bp. Falls dies nicht der Fall ist, muss die Proben-DNA anderweitig getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden. Bei fehlenden Positivkontrollprodukten erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden.

MutaGEL[®] HFE

Hemochromatosis (C282Y, H63D, S65C)



Immundiagnostik AG, D-64625 Bensheim, Stubenwald-Allee 8a, Tel: +49(0)6251-70190-0, Fax: +49(0)6251-849430, www.immundiagnostik.com

1. Intended Use of the Kit

Art.-Nr.: KT0002

The MutaGEL HFE-PCR kit allows for the genotyping of the three most abundant mutations of the human HFE gene on chromosome 6: in codon 63 amino acid change His to Asp = DNA base change C to G, in codon 65 Ser to Cys = A to T and in codon 282 Cys to Tyr = G to A.

2. Introduction

The most frequent recessive heritable disease of Homo sapiens is the chronically upregulated iron uptake of the organ tissues called idiopathic hemochromatosis, which becomes symptomatic with severe liver failure and diabetes in the second part of life and which is accompanied mostly by homozygosity of DNA mutations of the HFE gene in its codon 282 (282Tyr/Tyr) or combined heterozygosity 63Asp/282Tyr or 63Asp/63Asp and very rarely 65Tyr together with others. The pathogenic effect of the mutated HFE proteins is today discussed as being the iron receptor block at crypt cells of the duodenum or loss of HFE's function as sensor of the iron concentration in the blood (hepcidin hypothesis). The most accurate test for confirmation of the disease is the iron saturation of transferrin. Early therapy (bleeding) of the severe and common disease is easy and therefore prophylactic measurement of transferrin saturation and HFE genotype both as confirmational test and for screening of the relatives of a patient for identification of undetected disease is helpful. Early symptoms are „the three As“ arthralgia + asthenia + elevated aminotransferases.

3. Principle of the Test

The PCR kit MutaGEL hemochromatosis consists of three test sets: 1 (double) allele specific kit for typing of the most abundant mutation in codon 282 and two RFLP kits for the typing of the mutations in codon 63 and 65. Therefore in the 282 set of reagents the both possible DNA bases are detected by two allele-specific PCRs in parallel and the two possible DNA bases in codon 63 and 65 each are detected by regional PCRs, followed by restriction enzyme digestion, the enzymes cutting in the case of existent mutations and not cutting in the case of normal sequences.

4. Contents of the Kit (12 Tests for G282A and 2 x 6 Tests for C63G and A65T each and controls)

▪ PCR-Mix 282 (Normal)	1 x 280 µl (green)	PCR-Mix for proof of the normal sequence in codon 282 of the HFE gene.
▪ PCR-Mix 282 (Mutation)	1 x 280 µl (lilac)	PCR-Mix proof of the mutated sequence in codon 282 of the HFE gene.
▪ PCR-Mix 63	1 x 140 µl (yellow)	PCR-Mix for amplification of the codon 63 of the HFE gene.
▪ PCR-Mix 65	1 x 140 µl (brown)	PCR-Mix for amplification of the codon 65 of the HFE gene.
▪ Restriction Enzyme 63	1 x 25 µl (blue)	Restriction enzyme for the codon 63 RFLP-test.
▪ Restriction Enzyme 65	1 x 25 µl (white)	Restriction enzyme for the codon 65 RFLP-test.
▪ Restriction Buffer	1 x 400 µl (transparent)	Buffer for restriction enzymes 63 and 65
▪ Positive-control DNA	1 x 80 µl (red)	Positive-control DNA for all 3 mutations of the HFE gene.

5. Laboratory Equipment and Small Tools

- Kit for DNA-Extraction (e. g. BLOOD MINIPREP: KBR3005).
- H₂O (Pure Water).
- Thermocycler (optional mineral oil for thermocycler without heatable lid) + PCR tubes.
- Pipettes (0.5 -200 µl) und sterile tips (with filter).
- Thermoblock + sterile reaction tubes.
- Reagents and equipment for gel electrophoresis (buffer, gel colour, gel chamber, power supply)

6. Stability and Storage of the Kit

Storage of the kit is at ≤ -18°C. When stored correctly the reagents are stable at least until the expiry date (printed on each reagent box). It is recommended to thaw the positive control DNA only twice and to freeze aliquots for further uses. Before start of pipetting all reagents should be mixed and shortly centrifuged for collection of the volumes on the bottom of the tubes before opening of the tubes.

7. General Hints and Precautions

- Only for In vitro diagnostic use.
- Use of the reagents only for work of persons educated for Good Laboratory Practice.
- Don't use the test kit after the expiration date.
- Pipetting should be done on ice, especially when temperature exceeds 25°C.
- All of the kit reagents can be disposed to house waste after their use.
- The PCR technique is extremely sensitive, so that the amplification of a single nucleic acid molecule generates millions of copies. Therefore the method should separate the three parts of the work to different rooms with separate laboratory equipment: a) Extraction of nucleic acids, b) Preparation of PCR and c) Detection of PCR products.
- Use sterile tips with aerosol filters and pipettes suitable for PCR (use separate pipettes for each working area).
- Use new gloves and separate clothing for each working area
- The surface of the laboratory equipment should be decontaminated from nucleic acids from time to time.
- Avoid production of aerosols by the working process
- The PCR method used comes from the laboratory of Dr. M. Eßrich, Denzlingen/ Freiburg (Germany).

7b. Analytical Procedure

The working procedure consists of **four** parts:

1. Sample treatment for the purification of DNA.
2. Amplification with the PCR mixes specific for the codon 63, 65 and 282 regions.
3. Restriction digest of the amplification products for HFE-63 and HFE-65.
4. Analysis of the genotypes of the sample by electrophoretic separation of the allele-specific amplimers (codon 282) and the cleaved amplimers (codon 63 and/or 65) and documentation of the light emission under UV radiation.

HINT: This kit is a little bit specific and different from other MutaGEL kit in that it needs a thermocycling protocol with annealing at 60°C and a maximum of 37 cycle repeats (the reason for that is the specific need of the allele-specific 282-PCR) and that the restriction digest of the codon 65-PCR must be done at 65°C.



8. Treatment for Sample Preparation

- Isolate genomic DNA from about 200µl blood by using a commercially available DNA extraction kit following the manufacturers working procedure.
- The DNA must be stored at $\leq -20^{\circ}\text{C}$, if it is not proceeded immediately.

9. Amplification

- Each Set-up of a genotyping procedure should contain a negative- and a positive-control.
- Be sure to have enough Master Mix for a new set-up by multiplying the number „N“ of the probes by **20 µl** and adding 10% surplus. For each HFE **282 (Normal)**, **282 (Mutation)**, **63-** or **65** typing one 20µl volume of the specific master mix must be calculated and for a HFE282- typing two 20µl volumes (1 for each allele-specific test) must be calculated.
- The total volume of any PCR procedure is **25 µl** (please program the thermocycler in this way)
- The amplifications for each probe and for each HFE codon are prepared due to the following scheme:

PCR Reagents	Reaction Volume: 25 µl	Master Mix Volume: 20µl
PCR Mix 282 „Normal“	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%
PCR Mix 282 „Mutation“	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%
PCR Mix 63	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%
PCR Mix 65	20 µl + 10%	N x 20 µl + 10%

- Pipet **20 µl** of each PCR Mix in a sterile PCR tube suitable to your thermocycler.
- Samples: Add **5 µl** of **extracted DNA** to its specific PCR Master Mix tube.
- Positive control: add 5 µl of the **positive** control DNA to a specific master mix tube (the positive control works for all of the three mutations)
- Negative control: add 5 µl of pure water as **negative** control to the PCR Master Mix tube.
- Close the PCR tubes and put them to the heating block of the thermocycler (add 50 µl of mineral oil if the thermocycler has no heatable lid)
- Use the following cycling protocol:

Starting phase:	95°C for 5 min
37 cycles:	95°C for 30 sec / 60°C for 30 sec / 72°C for 30 sec
End phase:	72°C for 10 min, then 4°C

10. Restriction Endonuclease Digestion (only for Typing of HFE-63 or 65)

For each PCR sample of HFE**63** or **65** - probes, positive control included, restriction digests are set up in the following way: prepare a volume of restriction digest mix for HFE **63** and for HFE **65** by multiplying **31 µl** with the number of samples and add 10% surplus. Then add restriction enzymes to **35 µl** per sample: the total volume of each restriction is **45 µl**.

Reagents for Restriction	Volume of each Restriction Set-up: 35 µl	Volume of the Restriction Master Mix
Buffer for restriction enzymes (equal for both)	31 µl	31 µl x N + 10 %
Restriction enzyme for HFE- 63 or HFE- 65 respectively	4 µl	4 µl x N + 10 %

- Pipet **35 µl** of each restriction master mix in a sterile reaction tube (it is possible to incubate the enzyme restriction in PCR tubes also)
- Add **10 µl** of each PCR product (HFE-63 or -65) to its specific restriction mix, vortex the tube and briefly centrifuge it.
- Put the reaction tubes to a thermobloc (or to a thermocycler, if using PCR tubes) and cleave:
 - for HFE **63** at **37°C** for **3h** (or optional over night)
 - for HFE **65** at **65°C** for **3h** (or optional over night)

11. Documentation of the Genotyping Results

- Gel electrophoresis is in **2.5 %** agarose (or 20 % polyacrylamide) for about **130 Vh** (e.g. 80min at 100V): mix about **15µl** of each sample (PCR or cleavage) with **4 µl** loading buffer) and load the volume to the gel pocket. The size of the PCR fragments can be normalized by a suitable DNA marker (e.g. KBR311005). The separated DNA is coloured by ethidium bromide(5 µg/ ml) or SybrGreen for **5 – 10 min** and visualized under UV light (**312nm**).
- HFE 282:** The allele-specific PCR produces in **both** cases fragments of **110 bp** length for the normal-specific sequence **and** for the mutation-specific sequence). **Both** reactions produce a control fragment of **400 bp** in addition, which must appear as a control for the function of the PCR reaction. Therefore the result of a HFE 282 typing experiments consists of a conspection of the result of a normal-specific PCR and a mutation-specific PCR, means that two lines of separated PCR products are used for each patient.
- HFE 63:** the PCR produces here an amplification product of **160 bp**. When a 65 mutation is contained in the sample this amplificate is cleaved by the restriction enzyme to **110 + 50 bp** fragments. In the case of HFE normal sequences the 160 bp product remains uncut.
- HFE 65:** the PCR produces an amplification product of **150 bp**. In cases with a codon 65 mutation this amplificate is cleaved to **115 + 35 bp** fragments. In HFE 65 normal sequences the 150 bp product remains uncut.

Allele-specific PCR	Cys282Tyr (C282Y)			RFLP-PCR	His63Asp (H63D)			Ser65Cys (S65C)		
Control fragment	400	400	400	Amplimers	160	160		150	150	
Normal fragment	110	110		Fragment A		110	110		115	115
Mutation fragment		110	110	Fragment B		50	50		35	35
Genotype	C282	C282/282Y	282Y	Genotype	H63	H63/63D	63D	S65	S65/65C	65C

12. Restrictions

The PCR reactions of the kit are producing DNA segments of 135, 150, 160 and 400 bp. If this is not the case, the sample DNA must be tested by another procedure or the inspection must be repeated with freshly isolated DNA. In cases of negative positive-controls the PCR procedure must be reexamined and/ or corrected.