



## 1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KE09001

Der MutaGEL<sup>®</sup> CETP-Testkit erlaubt die Untersuchung der beiden relevanten Polymorphismen in Intron 1 und 8 des Cholesterinestertransferprotein-Gens (CETP), welches für das entsprechende Enzym des Cholesterintransports kodiert.

## 2. Einleitung

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen. Der Cholesterinstoffwechsel reguliert die individuelle Serumlipidkonzentrationen, welche ein Hauptauslöser für kardiovaskuläre Erkrankungen sind. Die Speicher- und Transportform des Cholesterins sind vor allem seine Ester mit ungesättigten Fettsäuren. Das Cholesterinestertransferprotein ist am Transport dieser Speicherform in die Leber beteiligt. Polymorphismen im CETP-Gen beeinflussen die Serumlipidkonzentrationen, allen voran die HDL-Konzentration sowie den LDL/HDL-Quotient. Sowohl der biallelische Polymorphismus im Intron 1, als auch im Intron 8 ist mit einem verringerten Risiko für koronare Herzerkrankungen assoziiert, d.h. an beiden variablen Stellen kommen Schutzfaktoren für arteriosklerotische Erkrankungen vor. Die protektive Eigenschaft der homozygoten Variante im Intron 8 ist stärker als bei homozygoten Personen im Intron 1. Sind beide Schutzvarianten gleichzeitig vorhanden, zeigen sich synergistische Effekte.

## 3. Testprinzip

Im Kit „MutaGEL<sup>®</sup> CETP“ sind die spezifischen Primer für die Untersuchung beider relevanten Polymorphismen im Cholesterinestertransferprotein-Gen enthalten. Die Amplifikationsprodukte der variablen Genotypen können jeweils durch spezifischen Verdau mit einer Endonuklease charakterisiert werden, für welche in Folge der Sequenzänderung eine Restriktionsschnittstelle verloren gegangen ist. Die Identifizierung der verschiedenen Genotypen erfolgt durch die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate und der entstandenen Restriktionsverdau-Fragmente jeder einzelnen Probe.

## 4. Inhalt der Testpackung (24 Bestimmungen)

▪ PCR-Master Mix	1 x 550 µl (grün)	gebrauchsfertige PCR-Reagenzien ( <i>hot start</i> Taq-Enzym, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, Puffer).
▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 30 µl (rot)	gepufferte Lösung mit (amplifizierter) DNA des CETP- Gens.
▪ Enzyme CETP 1+2	1 x 30 µl (blau)	Restriktionsendonuklease - Mix
▪ Puffer für Enzyme CETP 1+2	1 x 550 µl (weiß)	Puffer für die Restriktionsendonukleasen (2x,mit BSA)

## 5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H<sub>2</sub>O (Reinstwasser)
- Thermocycler (+ optional Mineralöl für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (mit Filter)
- Sterile Reagenzgefäße
- Thermoblock
- Reagenzien und Geräte für die Gelelektrophorese

## 6. Stabilität und Aufbewahrung

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 CETP- Positiv-Kontroll-DNA nur zweimal aufzutauen und daher bei Bedarf zu aliquotieren.

*Vor Gebrauch:* Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen 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.
- 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.
- Es empfiehlt sich der Einsatz steriler Spitzen mit Filter und von für PCR-Zwecke geeigneten Pipetten (für jeden Bereich sollte ein extra Pipettensatz reserviert werden).
- Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.
- Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.

## Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in vier Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für CETP spezifischen Primern.
3. Verdau der Amplifikate mit den Restriktionsendonukleasen.
4. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate/ Restriktionsverdau-Fragmente.



## 8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA (z.B. aus ca. 200 µl Vollblut) extrahieren, indem ein handelsüblicher DNA-Extraktionskit entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers eingesetzt 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-Kontrolle und die Negativ-Kontrolle sollte folgender Master-Mix hergestellt werden (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10% Volumen addieren). Das Gesamtvolumen ist 25 µl.

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 20 µl	Master-Mix- Volumen
PCR-Master Mix	20 µl	20 µl x N + 10 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>je <b>20 µl</b> des Master-Mix in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren.</li> <li>Proben: <b>5 µl</b> der <b>extrahierten DNA</b> zum Master-Mix zupipettieren.</li> <li>Positiv-Kontrolle: max. 5 µl der <b>CETP-Positiv-Kontroll-DNA</b> zum Master-Mix zupipettieren.</li> <li>Negativ-Kontrolle: <b>5 µl H<sub>2</sub>O</b> zum Master-Mix zupipettieren.</li> <li>Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten).</li> <li>Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:</li> </ul>		
<b>Anfangsphase:</b>	94°C für 5 min	
<b>35 Zyklen:</b>	94°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 90 sec	
<b>Endphase:</b>	72°C für 5 min, danach 4°C	

## 10. Restriktionsendonukleasen-Verdau

Für jedes Amplifikat, einschließlich der Positiv-Kontroll-DNA, wird folgender Restriktionsverdau-Mix angesetzt (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10 % Volumen addieren). Das Volumen des Gesamt-Verdau beträgt **30 µl**.

Reagenzien für den Verdau	Volumen des Verdau-Ansatz	Volumen des Verdau – Master Mix
Enzym CETP 1+2	1,1 µl	1,1 µl x N + 10 %
Puffer für Enzym CETP 1+2	18,9 µl	18,9 µl x N + 10 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>20 µl des Verdau-Mix in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Gefäße verwendet werden).</li> <li>10 µl des Amplifikats zum Verdau-Mix zugeben.</li> <li>Reaktionsgefäße in einen Heizblock (alternativ PCR-Gefäße in den Thermocycler) einstellen und bei <b>37°C für 3 - 5 h</b> (optimal über Nacht) inkubieren.</li> </ul>		

## 11. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **1,5 – 2,5 %** Agarose (oder 10 % Polyacrylamid) für ca. **110 Vh** (z.B. 70 min bei 90 volt) in 1x TBE-Puffer durchführen: ca. **15-20 µl** von jedem Verdauansatz mit **4 µl** Ladepuffer (z.B. KAN01070) mischen 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 (5 µg/ml) für ca. 5 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert.
- Die PCR liefert für alle Proben vor der Restriktion (außer der Negativkontrolle) DNA-Fragmente von **526 bp** (Intron 1) und **242 bp** (Intron 8).
- Das Vorhandensein der **protektiven Genmorphen (mut)** wird durch das Fehlen der jeweiligen Restriktionsschnittstelle im CETP-Gen für die Basenaustausche im Intron 1 bzw. 8 identifiziert: das Amplifikat, welches von der **nicht mutierten Genvariante (wt)** erhalten wurde, wird vom Restriktionsenzym geschnitten, während das jeweils vom mutierten Gen abgeleitete Amplifikat nicht geschnitten wird. Daher erhält man nach Durchführung des Restriktionsendonukleasen-Verdau folgende mögliche Restriktionsmuster:

GENOTYP:	Intron 1	Intron 8	Fragmentlänge (bp):	Enzym CETP 1	Enzym CETP 2
	mut/ mut	mut/ mut		526	242
	mut/ mut	wt/ mut		526	242 / 121
	wt/ mut	wt/ mut		526 / 354 / 172	242 / 121
	wt/ mut	mut/ mut		526 / 354 / 172	242
	wt/ wt	wt/ wt		354 / 172	121

- Die **CETP-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt für den Polymorphismus im **Intron 1** den Genotyp **wt/mut** und für den Polymorphismus im **Intron 8** den Genotyp **wt/wt**. Eine kleine Menge (ca. 3 %) des Intron 8 - Amplimers ist in der Regel restriktionsresistent (Drayna et al., Nucleic Acid Research, 1987) und kann ev. ganz schwach die Position des unverdauten 242 bp - Fragments anzeigen.
- Die Amplifikation der Negativ-Kontrolle darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlängen ergeben.

## 12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrollen die angegebenen DNA-Fragmente und für die Proben-DNA die Amplikate der angegebenen Größe. Falls dies nicht der Fall ist, müssen die gewählten PCR-Bedingungen überprüft/ korrigiert bzw. die Proben-DNA erneut frisch isoliert werden. Bei fehlenden Positivkontroll-Spaltprodukten erfolgte kein korrekter Restriktionsenzymverdau und der Verdauansatz muss wiederholt werden.



## 1. Intended Use

Code: KE09001

The MutaGEL<sup>®</sup> CETP test kit allows the detection of both relevant polymorphisms (**intron 1 and 8**) in the gene of the cholesterinestertransferprotein (CETP).

## 2. Introduction

Cholesterin is an essential component of cell membranes and lipoproteins. The cholesterin metabolism regulates the individual serum lipid concentration – one of the main factors of cardiovascular diseases. Esters with unsaturated lipid acids are the mainly storage- and transport form of cholesterin. The cholesterin-estertransferprotein (CETP) controls the transport from this storage form to the liver. Polymorphisms in the CETP-Gen influence the serum lipid concentration resulting in changes of HDL concentration and LDL/HDL quotient. The biallelic polymorphism in intron 1 as well as in intron 8 of the CETP gene is associated with a lower risk for cardiovascular disease. These protective features are for the homozygous variants of intron 8 even higher than for intron 1. Both protective variants in parallel show even synergistic effects.

## 3. Principle of the Test

The kit MutaGEL<sup>®</sup> CETP contains a set of primer which amplify two specific sequences within the human CETP-gene in a specific multiplex PCR. The amplified products obtained from wild type DNA will be cut by the restriction enzyme mix in the kit, whereas the mutation constellation will not be cut. The identification of the present genotype is done by analysis of the amplification products and their cut fragments through gel electrophoresis (Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

## 4. Material Supplied (24 determinations)

▪ PCR Mix (CETP)	1 x 550 µl (green)	ready to use PCR reagent ( <i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, buffer) with oligo-nucleotides specific for the human CETP gene.
▪ Positive control DNA	1 x 30 µl (red)	buffered solution with (amplified) DNA of the CETP gene.
▪ Enzyme CETP 1+2	1 x 30 µl (blue)	restriction enzyme mix.
▪ Buffer for enzyme CETP 1+2	1 x 550 µl (white)	buffer for restriction enzyme mix.

## 5. Materials Required but not Supplied

Reagents and Instruments:

- DNA extraction kit (e.g. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H<sub>2</sub>O (deionized)
- Thermal cycler (+ optional mineral oil for thermocycler without heated lid)
- pipettes (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips
- sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use
- thermoblock
- reagents and instruments for gel electrophoresis

## 6. Storage and Stability

Store at ≤ -18°C. The reagents are stable in the unopened micro tubes until the expiration date indicated (see print on the package). Do not thaw out the content of the "CETP positive control DNA" for more than two times. If necessary, make suitable aliquots.

*Before use:* Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).

## 7. Warning and Precautions

- For in vitro diagnostic use only.
- Test should only be performed only by skilled persons considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines.
- Don't use the kit after its expiration date.
- After usage, dispose all reagents and test components included in the kit in conventional garbage.
- PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates million identical copies. Therefore set up three separate working areas for a) sample preparation, b) PCR reagent preparation and c) DNA detection. For each working area a different set of pipettes should be reserved.
- Wear separate coats and gloves in each working area.
- Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- Avoid aerosols.

## Procedure

The complete procedure is divided in four steps:

1. Sample preparation.
2. Amplification with primers specific for CETP gene.
3. Digestion of the amplified product with the restriction enzyme mix.
4. Detection of the amplified and digested DNA by gel electrophoresis (size resolution).



## 8. Sample Preparation

- Extract total genomic DNA f.e. from 200 µl whole blood using a commercial available DNA extraction kit according to the manufacturers' manual.
- Start immediately with the amplification procedure or store the extracted DNA at ≤ -18°C.

## 9. Amplification

- Every set of amplifications should include a positive and a negative control.
- Prepare for each sample, positive control, and negative control the following Master Mix (multiply volumes necessary for each reaction with number **N** of reactions and add 10% more volume).

PCR reagents	Reaction Volume: 25 µl	Master Mix Volume
PCR Mix (CETP)	20 µl	20 µl x N + 10 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>For each reaction aliquot <b>20 µl</b> of the PCR Mix into a sterile microtube suitable for the thermal cycler</li> <li>Samples: add <b>5 µl</b> of the <b>extracted DNA</b> to the PCR Mix in the tube</li> <li>Positive control: add <b>5 µl</b> of the <b>CETP positive control DNA</b> to the PCR Mix in the tube</li> <li>Negative control: add <b>5 µl</b> of <b>H<sub>2</sub>O</b> to the PCR Mix in the tube</li> <li>Transfer the microtubes into the thermal cycler (if necessary overlay the Mix with 60 µl of mineral oil)</li> <li>Perform the following amplification protocol:</li> </ul>		
<b>Initial Hold:</b>	94°C for 5 min	
<b>35 cycles:</b>	94°C for 30 sec / 58°C for 30 sec / 72°C for 90 sec	
<b>Final Hold:</b>	72°C for 5 min, 4°C follow up	

## 10. Digestion of the Amplified DNA

Prepare for each sample, and the positive control the following Digestion Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions, and add 10% more volume). The total volume for each Digestion Mix is **30 µl**.

Reagents for DIGESTION	Volume for single DIGESTION	Volume in the Digestion – Master Mix
Enzyme CETP 1+2	1.1 µl	1.1 µl x N + 10 %
Buffer for enzyme CETP 1+2	18.9 µl	18.9 µl x N + 10 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>aliquot <b>20 µl</b> of the Digestion Mix into tubes suitable for the incubator (a thermal cycler may be used for the incubation too).</li> <li>add <b>10 µl</b> of the amplification product to the Digestion Mix.</li> <li>transfer the tubes to the thermoblock.</li> <li>incubate at <b>37°C for 3 - 5 hours</b> (optional over night).</li> </ul>		

## 11. Detection of the Amplified/ Digested DNA and Interpretation of the Results

- Carry out gel electrophoresis in **1,5 - 2,5%** agarose (or polyacrylamide 20%) for at least **110 Vh** (e. g. 70 min at 90 volt) in 1xTBE-buffer: mix about **15 - 20 µl** of each digestion mix with **4 µl** loading buffer (e.g. KAN01070) and load the gel. The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (e.g. KBR311005). The separated DNA is colored by ethidiumbromide or SybrGreen (5 µg/ml) for 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The PCR amplification leads to a fragment of **526 bp** length for the **intron 1** sequence and respectively **242 bp** length of the **intron 8** sequence.
- The presence of the **protective** gene variants (**mut**) is identified by the lack of the restriction sites in the CETP gene sequence corresponding to either intron 1 or intron 8. The amplification product obtained from the **not mutated** gene variant (**wt**) will be cut by the restriction enzyme whereas the mutated DNA sequence is not cuttable. Therefore, the following restriction enzyme patterns are obtained in relation to the present genotype:

GENOTYPE:	Intron 1	Intron 8	DNA Fragments (bp):	Enzym CETP 1	Enzym CETP 2
	mut/ mut	mut/ mut		526	242
	mut/ mut	wt/ mut		526	242 / 121
	wt/ mut	wt/ mut		526 / 354 / 172	242 / 121
	wt/ mut	mut/ mut		526 / 354 / 172	242
	wt/ wt	wt/ wt		354 / 172	121

- The **CETP positive control DNA** possesses for polymorphism in **Intron 1** genotype **wt/ mut** and for polymorphism in **Intron 8** genotype **wt/ wt**. Small amounts (about 3 %) of Intron 8- amplimer is in general restriction resistant (Drayna et al., Nucleic Acid Research, 1987) and could indicate as very weak band the position of the undigested 242 bp fragment.
- In any case the negative controls must be negative for any amplification product.

## 12. Restrictions

The PCR results for all positive controls in DNA fragments of indicated length and for samples at least in the amplification product indicated length. If this is not the case, the sample must be tested a second time or the complete analysis must be repeated with freshly isolated DNA. If there are no positive control DNA fragments present, the amplification was incorrect and the chosen PCR conditions have to be proven/ corrected.

