

1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KE09003

Der Testkit „MutaGEL[®] r-Calcitonin“ erlaubt die Untersuchung einer kodonändernden DNA-Variabilität (T → C-Mutation) im Kalzitininrezeptorgen (CTR), welches für das entsprechende Enzym im Knochenmetabolismus kodiert.

2. Einleitung

Der Kalzitininrezeptor ist ein von Osteoklasten gebildetes Membraneiweiß, das die knochenresorptionshemmende Wirkung des Peptidhormons Kalzitinin übermittelt. Sequenzstudien haben eine verbreitete aminosäureändernde Basenvariabilität (Leu → Pro) des Rezeptors aufgedeckt, die beim Vergleich von Gesunden und osteoporotisch Kranken und von Bevölkerungsgruppen verschiedener Skelettmaße ihre Auswirkung auf die Knochenmineraldichte und die Bruchhäufigkeit zeigen. Der Polymorphismus betrifft eine Phosphorylierungsregion in der 4. intrazellulären Domäne des CTR-Gens. Das vom Test durch Restriktion erkannte, bei Kaukasiern meist im Durchschnitt häufigere Allel „T“ (Leucin) vermittelt den Schutz vor dem pathogenen Effekt (des bei Kaukasiern selteneren Allels „C“, Prolin).

3. Testprinzip

Im Kit „MutaGEL[®] r-Calcitonin“ sind die spezifischen Primer für die Untersuchung der T → C-Mutation im Kalzitininrezeptorgen enthalten. Die Amplifikationsprodukte der variablen Genotypen können im Kit durch spezifischen Verdau mit einer Endonuklease charakterisiert werden, für welche im Falle der einen Sequenzvariante (T, protektiv) eine Restriktionsschnittstelle besteht, im anderen (C, pathogen) hingegen nicht. Die Identifizierung der verschiedenen Genotypen erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung der aus den Amplifikaten entstandenen Restriktionsverdaufragmente jeder einzelnen Probe (Methode nach Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Inhalt der Testpackung (24 Bestimmungen)

▪ PCR Mix (rCAL)	1 x 550 µl (grün)	gebrauchsfertige PCR-Lösung (<i>hot start</i> Taq-Enzym, MgCl ₂ , dNTP, Puffer) mit den für das Kalzitininrezeptorgen spezifischen Oligonukleotiden.
▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 30 µl (rot)	gepufferte Lösung mit (amplifizierter) DNA des CTR-Gens.
▪ Enzym rCAL	1 x 22 µl (blau)	Restriktionsendonuklease.
▪ Puffer für Enzym rCAL	1 x 320 µl (weiß)	Puffer für die Restriktionsendonuklease.

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H₂O (Reinstwasser)
- Thermocycler + Mineralöl (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (mit Filter)
- Sterile Reagenzgefäße
- Reagenzien für die Gelelektrophorese
- 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 Kalzitininrezeptorgen-Positivkontroll-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.
- Methode nach Dr. M. Eßrich, Denzlingen/ Freiburg (Germany).

Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in vier Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für das Kalzitininrezeptorgen spezifischen Primern.
3. Verdau der Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease.
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).

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 25 µl	Master Mix- Volumen
PCR Mix (CTR)	20 µl	20 µl x N + 10 %
- je 20 µl des PCR Mix in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren. - Proben: 5 µl der extrahierten DNA zum PCR Mix zupipettieren. - Positiv-Kontrolle: 5 µl der CTR-Positiv-Kontroll-DNA zum PCR Mix zupipettieren. - Negativ-Kontrolle: 5 µl H₂O (Reinstwasser) zum Master-Mix zupipettieren. - Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten). - Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:		
Anfangsphase:	94°C für 15 min	
35 Zyklen:	94°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 90 sec	
Endphase:	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 Gesamtvolumen des Verdau-Mix beträgt 25 µl.

Reagenzien für den Verdau	Volumen pro VERDAU-Ansatz: 12,5 µl	Volumen des VERDAU- Master Mix
Enzym rCAL	0,8 µl	0,8 µl x N + 10 %
Puffer für Enzym rCAL	11,7 µl	11,7 µl x N + 10 %
12,5 µl des Verdau-Mix in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Gefäße verwendet werden). 12,5 µl des Amplifikats zum Verdau-Mix zugeben. - Reaktionsgefäße in einen Heizblock (alternativ PCR-Gefäße in den Thermocycler) einstellen. - bei 37°C für 3 h (oder über Nacht) inkubieren.		

11. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2,5%** Agarose (oder 20% Polyacrylamid) für ca. **110 Vh** (z.B. 70 min bei 90 volt) in 1xTBE-Puffer durchführen: dazu ca. **15 µl** von jedem Verdauansatz mit **4 µl** Ladepuffer versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der zu detektierenden DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KBR311005) abgeglichen werden. Die im Gel aufgetrennte DNA wird im Ethidiumbromid- bzw. SybrGreen- Bad (5 µg/ml) für ca. 5 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert.
- Zur Durchführung der Gelelektrophorese können 5x TBE-Laufpuffer (Art.-Nr.:KAN10060), 6x Ladepuffer (Art.-Nr.: KAN01070), pUC/MspI - Molekulargewichts-Standard (KBR311005) und (bei Verwendung von Polyacrylamid-Gelen) Fertiggele (Art.-Nr.: KAN20112) eingesetzt werden.
- Die PCR liefert für alle Proben vor der Restriktion (außer der Negativkontrolle) DNA-Fragmente von **228 bp**.
- Das Vorhandensein der **protektiven Genmorphie (pro: T)** wird durch das Vorhandensein der Restriktionsschnittstelle im Kalzitoninrezeptorgen identifiziert: das Amplifikat, welches von der pathogenen **Genvariante (pat: C)** erhalten wurde, wird aufgrund des Basenaustauschs vom Restriktionsenzym nicht mehr erkannt, während das vom protektiven Allel abgeleitete Amplifikat geschnitten wird. Daher erhält man nach Durchführung des Restriktionsendonuklease-Verdau folgende mögliche Restriktionsmuster:

GENOTYP:	a1-Kollagen Intron 1	Fragmentlänge (in bp):
	pat: C / pat: C	228
	pat: C / pro: T	228 / 120 / 108
	pro: T / pro: T	120 / 108

- Die **Positiv-Kontroll-DNA** besitzt für den Polymorphismus den Genotyp **pat/ pro (C/ T)**, ist also heterozygot.
- 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 Amplifikate 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: KE09003

The **MutaGEL® r-Calcitonin** test kit allows the detection of the codon changing DNA variability (T→C mutation) in the gene of calcitonin receptor (CTR) which encodes for the corresponding protein involved in bone metabolism.

2. Introduction

Calcitonin receptor is a membrane protein produced by osteoclasts and it functions as transmitter of the peptide hormone calcitonin leading to decreased bone resorption processes. Sequence analysis detected an frequently amino acid changing variability (Leu → Pro) in the receptor gene. This polymorphism alters the bone density and fracture frequency if healthy persons are compared with osteoporotic patients or even between populations with different skeletal measurement. It could be shown that the polymorphism changes a phosphorylation region of the 4th intracellular domain. By this, the in Caucasian population more frequent allele "T" (Leucin) protects from the described pathogen effect (due to the in Caucasian population more rare allele "C", Prolin). The "T" allele can be detected by specific restriction digest due to creation of a new restriction site in the gene.

3. Principle of the Test

The kit **MutaGEL® r-Calcitonin** contains a set of primer for amplification of the specific sequence within the human calcitonin receptor gene **CTR**. Amplificates of varying genotypes (T → C polymorphism) are characterized by subsequent specific restriction enzyme digestion. The variant (T, protective) possesses a restriction site for the endonuclease whereas the other variant (C, pathogen) does not. The amplified products obtained from the protective DNA-variant will therefore be cut into two fragments, whereas the pathogen DNA-variant will not be cut. The identification of the present genotype is done by analysis of present DNA-fragments by gel electrophoretic methods (Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Material Supplied (for 24 Determinations)

▪ PCR Mix (CTR)	1 x 550 µl (green)	ready to use PCR reagent (<i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl ₂ , dNTP, buffer) with oligo-nucleotides specific for the human calcitonin receptor gene.
▪ positive control DNA	1 x 30 µl (red)	buffered solution with (amplified) DNA of the calcitonin receptor gene CTR.
▪ enzyme CTR	1 x 22 µl (blue)	restriction enzyme.
▪ buffer for enzyme CTR	1 x 320 µl (white)	buffer for restriction enzyme mix.

5. Materials Required but not Supplied

Reagents:

- DNA extraction kit (f.e. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H₂O (deionized)
- Mineral oil (optional, for thermocycler without heated lid)

Instruments:

- thermal cycler
- pipettes (0.5 - 1000 µl) and sterile pipette tips
- sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use
- thermoblock 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 "CTR 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 CTR gene.
3. Digestion of the amplified product with a restriction enzyme.
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 the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions and add 10% more volume).

PCR reagents	Reaction Volume: 25 µl	Master Mix Volume
PCR Mix (CTR)	20 µl	20 µl x N + 10 %

- For each reaction aliquot **20 µl** of the PCR Mix in a sterile microtube suitable for the thermal cycler
- Samples: add **5 µl** of the **extracted DNA** to the PCR Mix in the tube
- Positive control: add **5 µl** of the **CTR positive control DNA** to the PCR mix in the tube
- Negative control: add **5 µl** of **H₂O** to the PCR mix in the tube
- Transfer the microtubes into the thermal cycler (if necessary overlay the Mix with 60 µl of mineral oil)
- Perform the following amplification protocol:

Initial Hold:	94°C for 15 min
35 cycles:	94°C for 30 sec / 58°C for 30 sec / 72°C for 90 sec
Final Hold:	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 **25 µl**.

Reagents for DIGESTION	Volume DIGESTION each Reaction: 12,5 µl	Volume DIGESTION Master Mix	r Mix
enzyme CTR	0.8 µl	0.8 µl x N + 10 %	
buffer for enzyme CTR	11.7 µl	11.7 µl x N + 10 %	

- aliquot **12,5 µl** of the Digestion Mix into tubes suitable for the incubator (a thermal cycler may be used for the incubation too).
- add **12,5 µl** of the amplification product to the Digestion Mix.
- transfer the tubes to the thermoblock.
- incubate at **37°C for 3 hours** (optional over night).

11. Detection of the Amplified and Digested DNA

- Carry out gel electrophoresis in **2,5%** agarose (or polyacrylamide 20%) for at least **110 Vh** (f.e. 70 min at 90 volt) in 1xTBE-buffer: mix about **15 µl** of each digestion mix with **4 µl** loading buffer (f.e. KAN01070) and load the gel. The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (f.e. KBR311005). The separated DNA is colored by ethidium bromide or SybrGreen (5 µg/ml) for 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The PCR amplification leads for positive control and all samples to a DNA-fragment of **228 bp** (= amplicate before digestion).
- The presence of the **protective gene variant (pro = T)** is identified by presence of a restriction site in the gene for calcitonin receptor. Due to this, the amplicate generated from this allele is **cut once** by the restriction enzyme resulting in two smaller DNA-fragments. In contrast, the amplicate generated from the **pathogen gene variant (pat = C)** is **not cut**.
- In consequence, the following restriction enzyme patterns are obtained in relation to the present genotype:

GENOTYPE: CTR	fragment length (bp):
pat: C / pat: C	228
pat: C / pro: T	228 / 120 / 108
pro: T / pro: T	120 / 108

- The **CTR positive control DNA** possesses for the polymorphism in calcitonin receptor gene the genotype **pat/ pro (C/ T = heterozygous)**.
- In any case the negative controls must be negative for any amplification product of indicated length.

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.