

1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KE09005

Der Testkit „MutaGEL[®] r-Estrogen“ erlaubt die Untersuchung zweier DNA-Varianten („P-X“-Haplotyp) im Intron 1 des humanen Estrogenrezeptorgens (ESR1), welches für das entsprechende Protein der Steroidrezeptorsignalkette kodiert.

2. Einleitung

Der Estrogenrezeptor ist ein Molekül zur Funktionsübermittlung des hormonellen Liganden Estrogen im Reproduktionsmetabolismus und im Wachstum. In mehreren klinischen Studien ist eine Auswirkung der Variabilität seiner Sequenz in der Population auf die Osteoporose entdeckt worden, insbesondere die Entstehung von Wirbelkörperbrüchen. Es gibt einen durch zwei Punktmutationen definierten Haplotyp, der protektive oder pathogene Faktoren charakterisiert. Das seltenere **pathogene** Allel bzw. der pathogene Genotyp heißt „**px**“ (klein geschrieben) bzw. „**px/ px**“. „**PX**“ (groß geschrieben) bzw. „**PX/ PX**“ ist **protektiv**.

3. Testprinzip

Im Kit „MutaGEL[®] r-Estrogen“ sind die spezifischen Primer für die Amplifikation einer spezifischen Sequenz im Estrogenrezeptorgen (ESR1) enthalten. Die Amplifikationsprodukte der variierenden „PX“-Haplotypen können durch spezifischen Restriktionsenzymverdaul charakterisiert werden. Die seltene (pathogene) DNA-Variante besitzt Schnittstellen für zwei spezifische Endonukleasen - die häufigere (protektive) DNA-Variante hingegen nicht. Die Amplifikationsprodukte der pathogenen DNA-Variante werden daher in 2 kleinere Fragmente gespalten, während das Amplifikat der protektiven Variante erhalten bleibt. Die Identifizierung der verschiedenen Genotypen erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung der aus den Amplifikaten entstandenen Restriktionsverdaufragmenten jeder einzelnen Probe (Methode nach Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Inhalt der Testpackung (24 Bestimmungen)

▪ PCR Master Mix	1 x 480 µl (gelb)	- gebrauchsfertiger PCR-Mix (Pufferlösung, <i>hotstart</i> -Taq, dNTP, Mg ²⁺).
▪ Primer ESR	1 x 80 µl (grün)	- Lösung mit den für das Estrogenrezeptorgen spezifischen Oligonukleotiden.
▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 50 µl (rot)	- gepufferte Lösung mit (amplifizierter) DNA des Estrogenrezeptorgens.
▪ Enzymmix ESR	1 x 20 µl (blau)	- Restriktionsendonuklease-Mix.
▪ Puffer für ESR-Enzymmix	1 x 350 µl (weiß)	- Puffer für Restriktionsendonuklease-Mix.

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H₂O (Reinstwasser)
- Thermocycler und optional Mineralöl (für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)
- Pipetten (0,5 -1000 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 ESR-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 das Estrogenrezeptorgen spezifischen Primern.
3. Verdau der Amplifikate mit den Restriktionsendonukleasen.
4. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate/ Restriktionsverdaul-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 ≤ -18°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	Ansatzvolumen: 25 µl	Master-Mix- Volumen
PCR-Mix-Volumen (inklusive ESR-Primer)	20 µl	20 µl x N + 10 %
- Pro zu analysierenden Ansatz: je 17 µl PCR Master-Mix in ein (steriles) PCR-Gefäß aliquotieren. - Zugabe der Primer: 3 µl der Primerlösung zum PCR-Gefäß zusetzen + durch mehrmaliges auf-/ abpipettieren einmischen. - Proben: 5 µl der extrahierten DNA zum PCR Mix zupipettieren. - Positiv-Kontrolle: 5 µl der ESR-Positivkontroll-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:	95°C für 5 min	
37 Zyklen:	95°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 60 sec	
Endphase:	74°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 Mix ESR	0,7 µl	0,7 µl x N + 10 %
Puffer für Enzym Mix ESR	11,8 µl	11,8 µl x N + 10 %
12,5 µl des Verdaumixes in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Gefäße verwendet werden). 12,5 µl des Amplifikats zum Verdaumix zugeben. - Reaktionsgefäße in einen Heizblock (alternativ PCR-Gefäße in den Thermocycler) einstellen. - bei 37°C für mind. 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 amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard abgeglichen werden. Die im Gel aufgetrennte DNA wird im Ethidiumbromid-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 **213 bp**.
- Es werden zwei dicht beieinanderliegende variable Stellen **N1** und **N2** im Estrogenrezeptorgen gemessen. Das Vorhandensein der häufigeren protektiven **Genmorphen** (**prot** = "**P**" bzw. "**X**" – groß geschrieben) wird durch das Fehlen der Restriktionsschnittstellen im Estrogenrezeptorgen identifiziert: das Amplifikat, welches von den selteneren pathogenen **Genvarianten** (**pat** = "**p**" bzw. "**x**" – klein geschrieben) erhalten wurde, wird aufgrund der Basenaustausche vom Restriktionsenzym-Mix geschnitten, während das jeweils vom häufigeren Allel abgeleitete Amplifikat nicht geschnitten wird. Daher erhält man nach Durchführung des Restriktionsendonukleaseverdaus folgende mögliche Restriktionsmuster:

GENOTYP: Estrogenrezeptor Haplotyp (je Allel !)	Fragmentlängen (in bp) je Allel (!)
N1 prot / N2 prot = "PX"	213
N1 prot / N2 pat = "Px"	178 / 35
N1 pat / N2 pat = "px"	131 / 47 / 35
N1 pat / N2 prot = "pX" (<i>bisher nicht beobachtet</i>)	131 / 81
INTERPRETATION (humangenetischer Befund nach den diagnostisch relevanten Banden 213, 178 + 131): Das Ergebnis (Genotyp) setzt sich stets aus der Berücksichtigung beider Allele zusammen. Das relative Risiko des Patienten steigt mit zunehmender Anzahl pathogener Varianten in der Patientenfragmentkombination (PFK) an (1. bis 6.). Das relative Risiko ist soweit bekannt angegeben:	1. PFK: 213/ 213 = Genotyp: PX / PX (relatives Risiko: 1,0)
	2. PFK: 213/ 178 = Genotyp: PX / Px
	3. PFK: 213/ 131 = Genotyp: PX / px (relatives Risiko: 1,9)
	4. PFK: 178/ 178 = Genotyp: Px / Px
	5. PFK: 178/ 131 = Genotyp: Px / px
	6. PFK: 131/ 131 = Genotyp: px / px (relatives Risiko: 3,9)

- Die **ESR-Positiv-Kontroll-DNA** ist ein *künstliches* Probengemisch, welches zur Fragmentdemonstration alle bekannten Varianten in beiden Sequenzpunkten des Estrogenrezeptorgens zusammenführt (**P + X + p + x**). Sie stellt daher keinen in der Natur vorkommenden Genotypen dar sondern zeigt nach Restriktion entsprechend **alle** diagnostisch relevanten Banden 213, 178 und 131 bp (sowie die im Gel zumeist nicht sichtbaren kleineren Spaltprodukte).
- 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: KE09005

The **MutaGEL[®] r-Estrogen** test kit allows the detection of the codon changing DNA variability ("PX"-haplotype) in intron 1 of the human estrogen receptor gene (ESR1) which encodes for the corresponding protein involved in the steroid receptor signal cascade.

2. Introduction

Estrogen receptor is a molecule for the functional transmission of activity generated from the hormonal ligand estrogen. It's thereby involved in reproduction metabolism as well as in growth processes. Furthermore, several clinical studies showed significant associations between variabilities of DNA sequence of estrogen receptor and the onset of osteoporosis. Especially the risk for fractures of the vertebral bones was altered in dependence of present polymorphisms (also in different populations). The investigated haplotype is defined by two point mutations causative protective or respectively pathogenic properties. The major alleles "**PX**" (in big letters) encode for the **protective** genotype "PX/PX", whereas the more rare alleles "**px**" (in small letters) define the **pathogenic** genotype "px/px".

3. Principle of the Test

The kit **MutaGEL[®] r-Estrogen** contains a set of primer for amplification of the specific sequence within the human estrogen receptor gene ESR1. Amplificates of varying "PX"-haplotypes are characterized by subsequent specific restriction enzyme digestion. The **rare (pathogen)** DNA-variant possesses restriction sites for specific endonucleases, whereas the **major (protective)** DNA-variant does not. The amplified products obtained from the pathogen DNA-variant will therefore be cut into smaller fragments, whereas the major protective DNA-variant will not be cut. The identification of the present genotype is done through subsequent analysis of present DNA-fragments by gel electrophoretic methods (Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Material Supplied (for 24 Determinations)

▪ PCR Master Mix	1 x 480 µl (yellow)	- ready to use PCR reagent (buffer, <i>hot start</i> Taq enzyme, Mg ²⁺ , dNTP)
▪ primer ESR	1 x 80 µl (green)	- solution with oligonucleotides specific for the human estrogen receptor gene.
▪ positive control DNA	1 x 50 µl (red)	- buffered solution with (amplified) DNA of the estrogen receptor gene
▪ enzyme ESR	1 x 20 µl (blue)	- restriction enzyme mix
▪ buffer for enzyme ESR	1 x 350 µl (white)	- buffer for restriction enzyme mix

5. Materials Required but not Supplied

Reagents and Instruments:

- DNA extraction kit (f.e. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- H₂O (deionized)
- Mineral oil (optional, for thermocycler without heated lid)
- thermal cycler
- pipettes (0.5 - 200 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 "ESR 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.
- 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 ESR 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 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 (ESR)	20 µl	20 µl x N + 10 %

- For each reaction aliquot **17 µl** of the PCR Mix in a sterile microtube suitable for the thermal cycler
- Primer: add **3 µl** of primer solution to each PCR microtube and mix by pipetting up an down several times
- Samples: add **5 µl** of the **extracted DNA** to the Master-Mix
- Positive control: add **5 µl** of the **ER positive control DNA** to the master mix
- Negative control: add **5 µl** of **H₂O** to the master mix
- Transfer the micro tubes into the thermal cycler (if necessary overlay the Mix with 60 µl of mineral oil)
- Perform the following amplification protocol:

Initial Hold:	95°C for 5 min
37 cycles:	95°C for 30 sec / 58°C for 30 sec / 72°C for 60 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
enzyme ESR	0,7 µl	0,7 µl x N + 10 %
buffer for enzyme ESR	11,8 µl	11,8 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 incubator.
- incubate at **37°C for minimal 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 **213 bp** (= amplificate before digestion).
- Two variable loci **N1** and **N2** (closly together) of the estrogen receptor gene are analysed. The presence of the major **protective gene variants** (**pro** = "**P**" resp. "**X**" – big letters) is identified by lack of corresponding restriction sites in the gene for estrogen receptor. Due to this, the amplificates generated from these alleles are **not cut** by the restriction enzymes. In contrast, the amplificates generated from the rare **pathogen gene variants** (**pat** = "**p**" resp. "**x**" – small letters) are **cut**, resulting in smaller DNA-fragments .
- In consequence, the following restriction enzyme patterns are obtained in relation to the present genotype:

GENOTYPE: ESR	Fragment Length (bp):
N1 pro / N2 pro = "PX"	213
N1 pro / N2 pat = "Px"	178 / 31
N1 pat / N2 pat = "px"	131 / 48 / 35
(N1 pat / N2 pro = "pX" not found)	131 / 82

INTERPRETATION The result (individual genotype) is composed by both alleles). The relative risk of the patient increases rises with increasing quantity (1-6) of pathogen variants in the patient fragment combination (PFC). The relative risk is indicated far as known.	- PFC: 213/ 213 = Genotyp: PX / PX (relative risk: 1,0) - PFC: 213/ 178 = Genotyp: PX / Px - PFC: 213/ 131 = Genotyp: PX / px (relative risk: 1,9) - PFC: 178/ 178 = Genotyp: Px / Px - PFC: 178/ 131 = Genotyp: Px / px - PFC: 131/ 131 = Genotyp: px / px (relative risk: 3,9)
---	---

- The **ESR-positive control DNA** is an artificial mixture leading (after restriction digestion) to all diagnostic relevant DNA fragments (213, 178 and 131 bp) for both polymorphisms in estrogen receptor gene (**P + X + p + x**). It is a non natural existing but a mixture of genotypes".
- 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 been proven/ corrected.