

1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KE09009

Das Testkit „MutaGEL® Laktase (AS)“ erlaubt die Untersuchung des -13910 C/T-Polymorphismus im Laktase-Gen (LCT) durch direkte allelspezifische PCR-Amplifikation. Nur zur „in vitro Diagnostik“.

2. Einleitung

Patienten mit Laktose-Intoleranz können Milchzucker nicht verdauen und bekommen daher beim Genuss von Milchprodukten Durchfälle, Blähungen, Übelkeit und Bauchschmerzen. Häufigster Grund hierfür ist bei der weißen Rasse ein Enzymdefekt der Darmlaktase, welche den Milchzucker abbaut. Die Ursache kennzeichnet ein C/T-Basenpolymorphismus an der Stelle -13910 der regulatorischen DNA-Region des Laktasegens, wobei das Fehlen des Enzyms Laktase bei Personen des C/C-Genotyp besteht. Die Laktoseintoleranz ist ontogenetisch reguliert und manifestiert sich meist im höheren Jugendalter – während der Säuglingszeit und als Kind werden Milchprodukte noch gut vertragen. Die Prävalenz des homozygoten C/C-Genotyps beträgt in Deutschland ca. 15 %, in Mittelmeerländern sogar bis ca. 50%. Zur Herstellung des laktasepersistenten Phänotyps genügt das T-Allel der Heterozygoten.

3. Testprinzip

Der PCR-Test „Mutagel Laktase (AS)“ gehört zur Sorte der amplifikationsrefraktären Mutationssysteme (ARMS), die auf dem biochemischen Prinzip beruhen, daß PCR-Primer mit passender Endbase Zehnerpotenzen besser an den Gegenstrang binden und amplifizieren als solche mit einer endständigen Fehlpaarung. Wenn von Primern, die auf der Polymorphusstelle enden in einem Test nur die eine Variante (z.B. "C") angeboten wird und in einem parallelen Test nur die andere (im Beispiel "T"), findet eine Amplifikation in begrenztem Rahmen von Zyklusdurchgängen nur bei der spezifischen Basenpaarung statt. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich ein Test entwickeln, mit dem sich aus zwei je spezifischen Ansätzen pro Untersuchungsprobe der vorhandene "verborgene" Genotyp diagnostizieren läßt. Er kann in zwei nebeneinanderliegenden Gelspuren abgelesen werden (Methode nach Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)

▪ PCR-Mix 1 "Primer C"	1 x 550 µl	(grün)	- Lösung mit für die C-Variante der regulatorischen Region des Laktasegens spezifischen Oligonukleotiden (Hotstart).
▪ PCR-Mix 2 "Primer T"	1 x 550 µl	(lila)	- Lösung mit für die T-Variante der regulatorischen Region des Laktasegens spezifischen Oligonukleotiden (Hotstart).
▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 30 µl	(rot)	- wässrige Lösung mit DNA der heterozygoten C/T-Variante der -13910 Laktase-Genregion.
▪ Negativkontrolle	1 x 200 µl	(transparent)	- PCR-Wasser deionisiert (Reinstwasser)

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien:

- DNA-Extraktionskit (z.B. Art.-Nr.: KBR3005)
- Reagenzien für die Gelelektrophorese
- Mineralöl oder PCR-Wachs (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)
- H₂O deionisiert (Reinstwasser)

Instrumente:

- Thermocycler
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (mit Filter)
- sterile Reagenzgefäße
- Geräte für die Gelelektrophorese

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.

Vor Gebrauch: Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen gemischt und 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.
- 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.

8. Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in drei Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für das Laktasegen spezifischen PCR-Mixen.
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate.

9. Behandlung und Probenvorbereitung

- Die genomische DNA (z.B. aus 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.

10. Amplifikation

- Für jede Probe werden nebeneinander zwei Ansätze mit der **C-Base** und der **T-Base** vorbereitet und parallel amplifiziert.
- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten, für die nur ein Mix verwendet werden muß.
- Die zwei Amplifikationen für jede Probe werden nach dem folgenden Schema durchgeführt.

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 25 µl	Master-Mix- Volumen
PCR-Mix	20 µl	20 µl x (N + 10%)
- je 20 µl des Master-Mixe "C-Primer" (Mix 1) bzw. "T-Primer" (Mix 2) in zwei separate (sterile) PCR-Gefäße aliquotieren. - Proben: je 5 µl der extrahierten DNA zu den beiden Master-Mixen zupipettieren. - Positiv-Kontrolle: je 5 µl der LCT-Positiv-Kontroll-DNA zu den beiden Master-Mixen zupipettieren (die Kontrollle ist heterozygot "C/T", d.h. sie funktioniert bei beiden Reagenzien in Mix 1 bzw. Mix 2). - Negativ-Kontrolle: 5 µl H₂O (Reinstwasser) zu den beiden Master-Mixen zupipettieren. - Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten). - Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen (Zykluszahl exakt einhalten).		
Anfangsphase:	94°C für 5 min	
37 Zyklen:	94°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 30 sec	
Endphase:	72°C für 5 min, danach 4°C	

11. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2 – 2,5 %** Agarose (oder 20 % Polyacrylamid) für **> 100 Vh** (z.B. 60 min bei 100 volt) durchführen: ca. **15 µl** von jedem PCR-Ansatz mit **4 µl** Ladepuffer versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der zu detektierenden DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (KBR311005) und (bei Verwendung von Polyacrylamid-Gelen) Fertiggele (Art.-Nr.: KAN20112) eingesetzt werden.
- Die PCR liefert in spezifischen Ansätzen **für beide Allele** (außer der Negativkontrolle) **DNA-Fragmente von 170 bp**.
- Zusätzlich erscheint in jedem PCR-Ansatz eine Bande von **400 bp** Länge, die **als interne Amplifikationskontrolle** dient. Diese kann bei vorhandenen diagnostisch relevanten Fragmenten (170 bp-Fragmente) schwächer ausgeprägt sein oder sogar ganz fehlen.
- Das Vorhandensein (+) der Base "C" wird durch das Auftreten einer Bande im **Mix 1** („C-Primer“) angezeigt, das Vorhandensein der Base "T" durch das Auftreten einer Bande im **Mix 2** ("T"-Primer"). Daher erhält man nach der Elektrophorese folgende mögliche Muster:

GENOTYP	PCR-Mix 1: C-Primer	PCR-Mix 2: T-Primer
C / C	+	--
C / T	+	+
T / T	--	+

- Die **LCT-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt für den -13910-Polymorphismus den Genotyp **C / T**, ist also **heterozygot**.
- Die **interne Amplifikations-Kontrollbande** erscheint bei **400 bp** Länge.
- Die Amplifikation der Negativ-Kontrolle darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlänge ergeben.

12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrolle neben der internen Kontrollbande die angegebenen DNA-Fragmente von 170 bp. Falls dies nicht der Fall ist, bzw. falls bei der eingesetzten Proben-DNA keine DNA-Fragmente amplifiziert werden (auch nicht die interne Kontrolle), muss 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.

1. Intended Use	Code: KE09009
The kit "MutaGEL" Laktase (AS)" allows the detection of the common -13910 T/C polymorphism in the lactase gene by direct allele-specific detection of genotype. For in vitro diagnostic use only.	

2. Introduction
Patients with lactose intolerance are not able to digest milk sugar taken in with the food. Due to this fact this persons suffer subsequently under malabsorption problems like nausea, flatulence, diarrhoea or stomach pain. The most important reason of lactose intolerance is founded in a genetically caused lack of the enzyme lactase which is responsible for the degradation of milk sugar in the organism. This common gene defect is very easy to detect by analysing the T/C base replacement at position -13910 from the regulatory region of lactase gene (LCT). If this base pair exchange from T to C is homozygous, a lactase-deficiency and subsequently lactose intolerance is predetermined. The manifestation of the disease occurs with about 20 years and the prevalence of the homozygous C / C – genotype in Germany is about 15 %, in Mediterranean countries up to 50%.

3. Test Principle
The kit „MutaGEL" Laktase (AS)" is an amplification refractory mutation system (ARMS) containing two sets of primers for both allelspecific sequences within the lactase gene. The sequence specific primers can be used directly for PCR with extracted DNA. The resulting amplification products are subsequently identified with gelelectrophoretic methods. If there is no specific allele-product detectable, the correct PCR procedure is proved by an internal control. The present genotype of unknown samples is interpreted by detection of corresponding DNA-amplificates for wildtype- and mutation- constellation in two separate lanes of the gel (method by Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Materials Supplied (for 24 determinations)
- PCR-Mix 1 "Primer C" 1 x 550 µl (green) - ready to use PCR reagent (<i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl₂, dNTP, buffer) with oligonucleotides specific for C-allele of the human lactase gene. - PCR-Mix 2 "Primer T" 1 x 550 µl (lilac) - ready to use PCR reagent (<i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl₂, dNTP, buffer) with oligonucleotides with oligonucleotides specific for T-allele of the human lactase gene. - positive control DNA 1 x 30 µl (red) - solution with DNA of heterozygous C/ T- variant of -13910 lactase gene - negative control 1 x 200 µl (transparent) - pure PCR water (deionized)

5. Material Required but not Supplied
Reagents and Instruments: - DNA extraction kit (e. g. Code.: KBR3005) - reagents for gel electrophoresis - thermal cycler (and optional mineral oil or PCR-wax for cycler without heated lid) - pipettes (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips (with filter) - sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use - 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). Before use: Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).

7. Warnings 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.

8. Procedure
The complete procedure is divided in three steps: - Sample preparation. - Amplification with two sets of primers allele-specific for the lactase gene. - detection of the amplified DNA by gel-electrophoresis and subsequent analysis of genotype.



9. Sample preparation

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

10. 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 for each reaction with the "C"-base as well as with the "T"-base in parallel (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions and add one more volume).

PCR Reagent	Reaction Volume: 25 µl	Master Mix Volume
PCR-Mix	20 µl	20 µl x (N + 10%)
- Aliquot 20 µl of the Master-Mix "C-Primer" (Mix 1) respectively "T-Primer" (Mix 2) in two separate (sterile) micro tubes suitable for thermal cyclers. - Samples: add 5 µl of the extracted DNA to each of both Master-Mixes. - Positive control: add 5 µl of the positive control DNA to each of both Master-Mixes (the control DNA is heterozygous (C/T) and therefore suited for both reagents in Mix 1 and Mix 2). - Negative control: add 5 µl of pure PCR water to each of both Master-Mixes. - Transfer the micro tubes into the thermal cycler (if necessary overlay the Mix with 60 µl of mineral oil). - Perform exactly the following amplification protocol:		
Initial hold:	94°C for 5 min	
37 cycles:	94°C for 30 seconds / 58°C for 30 seconds / 72°C for 30 seconds	
Final hold:	72°C for 5 minutes, 4°C follow up	

11. Analysis of Genotype and Interpretation of Results

- Carry out a gel electrophoresis in **2 - 2.5 %** agarose (or polyacrylamide 20 %) for about **100 Vh** (e. g. 60 min at 100 volts): mix about **15 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 ethidium bromide or SybrGreen (5 µg/ ml) for 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The PCR amplification leads for both alleles (f. e.: positive control) and all samples to DNA-fragments of **170 bp**.
- Additionally an **internal control** fragment for PCR performance is detectable at **400 bp**. (*Please consider: if the diagnostic relevant fragment of 170 bp is present, the internal control can be weaker or even absent*).
- The presence (+) of base "C"-base is indicated by detection of the DNA-fragment (170 bp) in **Mix 1** ("C"-Primer), whereas the presence of "T"-base is indicated by detection of the DNA-fragment (170 bp) in **Mix 2** ("T"-Primer). Therefore the following pattern are possible:

GENOTYPE	PCR-Mix 1 (C-Primer)	PCR-Mix 2 (T-Primer)
C / C	+	--
C / T	+	+
T / T	--	+

- The **positive control DNA** possesses for the analysed -13910-polymorphism of LCT-gene the genotype **C / T (= heterozygous)**.
- The **internal amplification control** appears at **400 bp**.
- In any case the negative controls must be negative for any amplification product of indicated lengths.

12. Restrictions

The PCR results for positive control in DNA fragments of indicated length (170 bp) and for samples at least one amplification product (170 bp) must appear in one of both PCR-Mixes. 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 neither positive control DNA fragments nor the internal control fragment (400 bp) present, the amplification was incorrect and the chosen PCR conditions have to be proven/ corrected.