

1. Verwendungszweck	Art.-Nr.: KE09012
Der Testkit „MutaGEL [®] Collagen“ erlaubt die Untersuchung einer regulatorischen DNA-Variante (G→T-Mutation: Sp1 -Polymorphismus) in Intron 1 des Typ 1 α- Kollagen-Gens (COL1A1), welches für das entsprechende Enzym im Knochenmetabolismus kodiert.	

2. Einleitung
Typ1 α- Kollagen ist das Hauptprotein des Knochens und spielt auch bei der Entwicklung von Osteoporose eine wichtige Rolle. Mit zunehmenden Lebensalter wird die Knochenstärke reduziert und die osteoporotische Bruchhäufigkeit erhöht. In mehreren klinischen Studien wurde eine Auswirkung der zwischen Individuen variierenden DNA-Sequenz des Kollagengens auf die Knochendicke (z. B. am Oberschenkelknochen und Wirbelkörper) gefunden. Der in diesem Zusammenhang am meisten untersuchte Polymorphismus im COL1A1-Gen besteht aus einer Basenvariation von G in der Normalsequenz zu T in der osteoporosegekoppelten Sequenz und befindet sich in einer Regulatorenbindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1. Das seltenere Allel transferiert den Krankheitsfaktor und zwar teils zusätzlich zum Einfluß auf die Knochenmineraldichte und unabhängig von und zusätzlich zur Variabilität weiterer genetischer Faktoren, welche insgesamt das genetische Osteoporoserisiko verursachen. Als weitere genetische Prädispositionsfaktoren sind neben Mutationen im VitaminD3-Rezeptor vor allem die des Calzitoninrezeptors, sowie des Östrogenrezeptors zu nennen.

3. Testprinzip
Im Kit „MutaGEL [®] Collagen-allelspezifisch“ sind zwei PCR-Tests je für normale oder mutierte DNA-Basen der Kollagen-Sp1-Bindungsstelle enthalten: die allelspezifischen Primer bilden jeweils Amplifikate nur dann, wenn eine der beiden Sequenzmöglichkeiten (normal oder pathogen) in der Patienten-Probe vorhanden ist. Die Identifizierung der Genotypen erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung der beiden PCR-Ansätze nach ihrem Amplifikationslauf (Methode nach Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen) und deren optische Auswertung.

4. Inhalt der Testpackung (24 Bestimmungen)
- PCR Mix 1 Normalbase 1 x 550 µl (grün) gebrauchsfertige PCR-Lösung (<i>hot start</i> Taq-Enzym, MgCl₂, dNTP, Puffer) mit den für das normale Kollagen-Gen spezifischen Oligonukleotiden. - PCR Mix 2 Mutationsbase 1 x 550 µl (violett) gebrauchsfertige PCR-Lösung (<i>hot start</i> Taq-Enzym, MgCl₂, dNTP, Puffer) mit den für die mutierte Kollagen-Sequenz spezifischen Oligonukleotiden. - Positiv-Kontroll-DNA 1 x 30 µl (rot) gepufferte Lösung mit (amplifizierter) DNA des COL1A1- Gens

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel
Reagenzien und Instrumente: - DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005) - H₂O (Reinstwasser) - Thermocycler (+ optional Mineralöl für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel) - Sterile Reagenzgefäße (PCR-Gefäße) - Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (mit Filter) - Reagenzien/ 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 COL1A1- 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 getrennten 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 drei Phasen: - Behandlung zur Probenaufarbeitung. - Amplifikation mit den für die fraglichen Basen des COL1A1-Gens spezifischen beiden PCR-Fertigmixen. - Analyse des Genotyps nach gelelektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten DNA-Bereiche.

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 folgende Menge an Mastermix vorhanden sein bzw. bereitgestellt werden (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl N der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10% Volumen addieren).
- Für jede Probe werden **2 parallele Ansätze** in **separaten** Reaktionsgefäßen amplifiziert.

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 25 µl	Master Mix- Volumen
PCR-Mix 1 bzw. – PCR Mix 2	(2 x) 20 µl	(2 x) 20 µl x N + 10 %
- je 20 µl der PCR-Mixe 1 und 2 in sterile PCR-Gefäße aliquotieren. - Proben: je 5 µl der extrahierten DNA zu den PCR-Mixen zupipettieren. - Positiv-Kontrolle: 5 µl der COL1A1-Positiv-Kontroll-DNA zu PCR-Mixen zupipettieren. - Negativ-Kontrolle: 5 µl H₂O zu PCR-Mixen zupipettieren. - Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten). - Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:		
Anfangsphase:	94°C für 5 min	
37 Zyklen:	94°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 90 sec	
Endphase:	74°C für 5 min, danach 4°C	

10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2,5 %** Agarose (oder 10 % Polyacrylamid) für ca. **130 Vh** (z.B. 90 min bei 90 volt) in 1x TBE-Puffer durchführen: ca. **15 µl** jeden Verdauansatzes mit **4 µl** Ladepuffer (z.B. KAN01070) mischen 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), pBS/MspI - Molekulargewichts-Standard (KBR311005) und (bei Verwendung von Polyacrylamid-Gelen) Fertiggele (Art.-Nr.: KAN20112) eingesetzt werden.
- Die PCR liefert für alle Proben (außer der Negativkontrolle) ein **Kontrollfragment von 140 bp**. Die diagnostisch relevanten **spezifischen** Fragmente in der Gelspur für normales oder mutiertes Kollagen sind jeweils **270 bp** lang.
- Das Vorhandensein der **protektiven Genvariante (pro: S)** wird durch das Auftreten der 270 bp-Bande in der Gelspur von PCR-Mix 1 identifiziert. Das Vorhandensein der **pathogene Genvariante (pat: s)** wird durch das Erscheinen der 270 bp-Bande in der Gelspur von PCR-Mix 2 angezeigt.

GENOTYP: COL1A1 (Intron 1)	Fragmentlänge (bp):			
pro: S / pro: S	(interne Kontrollbande 140 bp +)	270 bp (Mix 1-Spur)	+	keine Bande (Mix 2-Spur)
pro: S / pat: s	(interne Kontrollbande 140 bp +)	270 bp (Mix 1-Spur)	+	270 bp (Mix 2-Spur)
pat: s / pat: s	(interne Kontrollbande 140 bp +)	keine Bande (Mix 1-Spur)	+	270 bp (Mix 2-Spur)

- Die **Positivkontroll DNA** ist heterozygot bezüglich des analysierten COL1A1-Gens.
- Die **interne Amplifikationskontrolle 140 bp**.
- Die Amplifikation der Negativkontrolle darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlängen ergeben.

12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrolle 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.

1. Intended Use	Code: KE09012
The MutaGEL[®] Collagen test kit allows the detection of the regulatory variant (G→T mutation, Sp1 -polymorphism) in intron 1 of the type1 alpha1 collagen gene (COL1A1) encoding for the alpha 1 (I) protein chain of type I collagen, the major protein of the bone.	

2. Introduction
Type 1 α 1- Collagen is the major protein of bone and it's structure is essential for the development of osteoporosis. In several clinical studies an influence of the naturally variation of the DNA sequence from collagenase protein was shown. The pathogen variant results in lower mineral density of bone - especially for femoral neck and lumbar spine. Therefore the osteoporotic fracture risk increases with age in patients carrying this gene variant. The investigated COL1A1- polymorphism is biallelic and changes a regulatory binding site (for the transcription factor Sp1). The more rare allele (pathogen) transfers the disease factor independent and also additional to the variability of other genetic factors involved in alteration of whole osteoporotic risk (f. e. mutations in receptors for calcitonin, vitamin D3 or estrogen). The more frequent allele has protective properties.

3. Principle of the Test
The kit MutaGEL[®] Collagen (AS) is an amplification refractory mutation system (ARMS) containing two sets of primers for both allelspecific sequences within the human collagen gene COL1A1. The allele specific primers can be used directly for PCR with extracted DNA and generate amplicates only in case of presence of one from both sequence possibilities (normal or pathogen). 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-amplicates for normal- and pathogen-constellation in two separate lanes of the gel (method by Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).

4. Material Supplied (for 24 Determinations)
- PCR Mix 1 (normal) 1 x 550 µl (green) ready to use PCR reagent (<i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl₂, dNTP, buffer) with oligonucleotides specific for the normal human collagen type 1 alpha 1 gene. - PCR Mix 2 (pathogen) 1 x 550 µl (violett) ready to use PCR reagent (<i>hot start</i> Taq enzyme, MgCl₂, dNTP, buffer) with oligonucleotides specific for the pathogen human collagen type 1 alpha 1 gene. - positive control DNA 1 x 30 µl (red) buffered solution with (amplified) DNA of the heterozygous COL1A1gene.

5. Materials Required but not Supplied
Reagents: - DNA extraction kit (e. g. BLOOD MINIPREP: KBR3005) - H₂O (deionized) - Mineral oil (optional, for thermocycler without heated lid) Instruments: - 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 "COL1A1 positive control DNA" for more than two times. If necessary, make suitable aliquots. <i>Before use:</i> 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 three steps:
- Sample preparation. - Amplification with two sets of primers allele-specific for the COL1A1 gene. - Digestion of the amplified product and subsequent analysis of genotype.

8. Sample Preparation

- Extract total genomic DNA (e. g. 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).
- For each sample are prepared **two parallel** reactions in **separate** PCR tubes.

PCR reagents	Reaction Volume: 25 µl	Master Mix Volume
PCR Mix 1 respectively PCR Mix 2	(2 x) 20 µl	(2x) 20 µl x N + 10 %

- aliquot **20 µl** from each PCR Mix 1 and Mix 2 in separate sterile micro tube suitable for the thermal cycler.
- Samples: add **5 µl** of the **extracted DNA** to each PCR Mix in the tubes.
- Positive control: add **5 µl** of the **COL1A1 positive control DNA** to each PCR Mix in the tubes.
- Negative control: add **5 µl** of **H₂O** to each PCR Mix in the tubes.
- 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:	94°C for 5 min
37 cycles:	94°C for 30 sec / 58°C for 30 sec / 72°C for 90 sec
Final Hold:	74°C for 5 min, 4°C follow up

11. Analysis of Genotype and Interpretation of Results

- Carry out a gel electrophoresis in **2,5 %** agarose (or polyacrylamide 20 %) for about **130 Vh** (f. e. 90 min at 90 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 in positive control (not negative control) and all samples to clinical relevant DNA-fragments of **270 bp**.
- Additionally an **internal control** fragment for PCR performance is detectable at **140 bp**. (*Please consider: if the diagnostic relevant fragment of 270 bp is present, the internal control can be weaker or even absent*).
- The presence of protective gene variant (**pro: S**) is indicated by detection of the DNA-fragment (270 bp) in **Mix 1**, whereas the presence of **pathogene gene variant (pat: s)** is indicated by detection of the DNA-fragment (270 bp) in **Mix 2**. Therefore the following pattern are possible:

GENOTYP: COL1A1 (Intron 1)	fragment length (bp):			
pro: S / pro: S	(internal control 140 bp +)	270 bp (Mix 1-lane)	+	no DNA band (Mix 2-lane)
pro: S / pat: s	(internal control 140 bp +)	270 bp (Mix 1-lane)	+	270 bp (Mix 2-lane)
pat: s / pat: s	(internal control 140 bp +)	no DNA band (Mix 1-lane)	+	270 bp (Mix 2-lane)

- The **positive control DNA** possesses for the analysed gene the heterozygous genotype.
- 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 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.