

1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KT0001

Der MutaGEL® MTHFR 2-Testkit ist für die gleichzeitige Untersuchung der beiden Punktmutationen in den Positionen 677 und 1298 im Gen des Enzyms 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) bestimmt. Dabei handelt es sich um den Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin bzw. Adenin gegen Cytosin. Dies verursacht an den betreffenden Aminosäure-Positionen des MTHFR-Enzyms den Austausch von Alanin zu Valin (Ala222Val) bzw. von Glutamin zu Alanin (Glu429Ala). Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. Einleitung

Störungen des Homocysteinestoffwechsels durch genetische Defekte verursachen Hyperhomocysteinämie. Ein Anstieg des Homocystein-Plasma-Level hat Gefäßerkrankungen zur Folge und stellt somit einen erhöhten Risikofaktor für kardio- bzw. zerebrovaskuläre Komplikationen, aber auch für venöse Thrombosen oder Migräne dar. Betroffene Patienten weisen in der Regel die bei Kaukasiern weit verbreitete C677T-Mutation im MTHFR-Gen auf, welche für eine thermolabile Enzymvariante mit geringerer Aktivität kodiert. Auch die häufige A1298C-Mutation im MTHFR-Gen bewirkt bei bereits vorliegender C677T-Heterozygotie einen Anstieg des Homocystein-Plasma-Levels. Daher sollten beide Mutationen als genetische Risikofaktoren für eine Hyperhomocysteinämie kombiniert untersucht werden.

3. Testprinzip

Im Kit MutaGEL® MTHFR 2 sind die spezifischen Primer für die Untersuchung der beiden Mutationen C677T und A1298C im MTHFR-Gen enthalten. Bei diesem Testverfahren handelt es sich um eine Kombination sequenzspezifischer Primer (SSP), mit denen die MTHFR-Polymorphismen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) direkt nachgewiesen werden können. Die jeweilig vorliegenden Allele werden durch die Anwesenheit eines spezifischen PCR-Produkts eindeutig bestimmt. Bei Fehlen dieser PCR-Produkte bestätigt eine interne Kontrolle den korrekten PCR-Ablauf. Die gebrauchsfertige PCR-Lösung erlaubt unmittelbar nach Beendigung der PCR-Reaktion das direkte Beladen der Geltaschen (zur Durchführung der gelelektrophoretischen Detektion entstandener DNA-Fragmente).

4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)

SSP-Primer MTHFR (WT)	24 x Gefäße	aliquotierte farbige PCR-tubes für die Wildtyp-Konstellation C677/A1298 (blau).
SSP-Primer MTHFR (Mut)	24 x Gefäße	aliquotierte farbige PCR-tubes für die Mutations-Konstellation 677T/1298C (orange).
PCR-Mastermix	1 x 350 µl	gebrauchsfertige PCR-Lösung (inklusive Puffer, dNTPs und Kresolrot).
Positiv-Kontroll-DNA	1 x 30 µl	wässrige Lösung mit humaner gDNA des Genotyps wt/mut C677T/A1298C.
PCR-Wasser	1 x 750 µl	deionisiertes Wasser
Taq Polymerase (5U/µl)	1 x 8 µl	PCR-Enzym (<i>hot start</i>)

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien:

- DNA-Extraktionskit (z.B. Blood Miniprep, KBR3005)
- Reagenzien für die Gelelektrophorese

Instrumente:

- Thermocycler
- Variable Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Filtertips
- Sterile Reagenzgefäße (für Master-Mix-Ansatz bei größerer Probenzahl)
- Geräte für die Gelelektrophorese

6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagenzien

Die Reagenzien sind bei 4°C (z. B. während Versand) bis zu 30 Tagen stabil. Die langfristige Aufbewahrung sollte bei ≤ -20°C erfolgen. Bei korrekter Lagerung sind die Reagenzien mindestens bis zum angegebenen Verfallsdatum (auf jeder Einzelverpackung aufgedruckt) stabil. Es empfiehlt sich, die MTHFR 2-Positiv-Kontroll-DNA nicht mehrmals aufzutauen und daher bei Bedarf zu aliquotieren.

Vor Gebrauch: Alle Gefäße mit Reagenzien sollten vor dem Öffnen kurz an 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 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:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion).
2. Amplifikation mit den für das MTHFR-Gen spezifischen Primern (je sowohl für die Wildtyp- und Mutations-Allele beider Punktmutationen).
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Amplifikate.

8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA aus ca. 200 µl Vollblut extrahieren, indem kommerzielle DNA-Extraktionskits entsprechend der jeweiligen Anleitung eingesetzt werden.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die DNA bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 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 ein weiteres halbes Volumen addieren).

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 12 µl	Master-Mix- Volumen
PCR-Mastermix	6 µl	6 µl x (N + 0,5)
PCR-Wasser (aq. dest)	10 µl	10 µl x (N + 0,5)
Taq- Polymerase (5U/µl)	0,12 µl	0,12 µl x (N + 0,5)

- je **16 µl** des hergestellten Master-Mix (**rot**) in die gebrauchsfertigen PCR-tubes (mit lyophilisierten SSP-MTHFR) pipettieren: jeweils pro DNA-Probe parallel ein Wildtyp-PCR-Gefäß (**blau**) und ein Mutations-PCR-Gefäß (**orange**) verwenden!
- Proben: jeweils **4 µl** der **extrahierten gDNA** (50 ng/µl) zum Wildtyp-tube (**blau**) und zum Mutations-tube (**orange**) zupipettieren.
- Positiv-Kontrolle: **4 µl** der **MTHFR-Positiv-Kontroll-DNA** zum Wildtyp-tube (**blau**) und zum Mutations-tube (**orange**) zupipettieren.
- Negativ-Kontrolle: **4 µl** PCR-Wasser (aq. dest.) zum Master-Mix zupipettieren.
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen.
- Folgendes Amplifikations-Protokoll (Gesamtlaufzeit ca. 1 h 20 min) durchführen:

Anfangsphase:	95°C für 7 min
10 Zyklen:	96°C für 15 sec / 65°C für 1 min
20 Zyklen:	96°C für 10 sec / 61°C für 50 sec / 72°C für 30 sec
Endphase:	10°C

10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2 %** Agarose (oder 10 % Polyacrylamid) für **ca. 75 Vh** (z.B. 50 min bei 90 volt) in 1x TBE-Puffer durchführen: dazu nach der Amplifikation ca. **15 µl** von jedem PCR-Ansatz (blau und orange nebeneinander, d.h. pro Probe zwei Gelspuren verwenden) auf das Gel laden (die PCR-Lösung kann aufgrund des beinhalteten Ladepuffers unmittelbar ohne weitere Vorbehandlung auf das Gel aufgetragen werden). Die Größe der zu detektierenden DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KBR311005) abgeglichen werden. Die im Gel getrennte DNA wird im Ethidiumbromid- bzw. SybrGreen-Bad (5 µg/ml) für ca. 5 min angefärbt und unter UV-Licht (312nm) visualisiert. Das erhaltene DNA-Bandenmuster sollte in geeigneter Weise dokumentiert werden (z.B. Digitalfoto).
- Die PCR liefert in Abhängigkeit des Genotyps ein definiertes Bandenmuster aus **300 bp-** bzw. **230 bp-** Amplifikaten sowie ein **1100 bp-** Fragment als interne Kontroll-Bande (*Beachte:* bei vorhandenen Wildtyp- bzw. Mutationsbanden kann die interne Kontrolle deutlich schwächer ausgeprägt sein oder sogar komplett fehlen!).
- Die Wildtyp-Allele werden über die SSP-Primer MTHFR (WT = **blaues** tube) und die Mutationstyp-Allele über die SSP-Primer MTHFR (Mut = **oranges** tube) angezeigt: Die Fragmentlänge von **300 bp** korrespondiert zu der untersuchten cDNA-Position **677**; die Fragmentlänge von **230 bp** korrespondiert zu der untersuchten cDNA-Position **1298**.
- Die **MTHFR-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt (für beide Punktmutationen) den Genotyp **wt/mut**.
- Die Amplifikation der **Negativ-Kontrolle** darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlängen ergeben.
- Die Bestimmung des in der Probe vorliegenden Genotyps erfolgt aufgrund des erzielten DNA-Bandenmusters gemäß der beigefügten **Interpretationstabelle** für die MTHFR-Polymorphismen an Position 677 bzw. 1298.

11. Einschränkungen

Die allelspezifische PCR liefert für die Positivkontrolle die angegebenen DNA-Fragmente und für Proben-DNA zumindest die interne Kontrolle von 1100 bp. Falls dies nicht der Fall ist, erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/korrigiert werden. In diesem Fall muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden.

Interpretationstabelle für die Mutationen MTHFR-C677T und MTHFR-A1298C:

MTHFR-SSP	1(Wildtyp) blau	2 (Mutation) orange	Genotypen	Allelfrequenz bei Kaukasiern [%] (*)
SSP-Mix	# 300 bp C677 * 230 bp A1298	# 300 bp 677T * 230 bp 1298C		
677	#		CC677	13,2
1298	*		AA1298	
677	#		CC677	30,7
1298	*	*	AC1298	
677	#		CC677	9,6
1298		*	CC1298	
677	#	#	CT677	19,3
1298	*		AA1298	
677	#	#	CT677	14,9
1298	*	*	AC1298	
677	#	#	CT677	>0,1
1298		*	CC1298	
677		#	TT677	10,5
1298	*		AA1298	
677		#	TT677	>5
1298	*	*	AC1298	
677		#	TT677	>0,1
1298		*	CC1298	

(*) **Literatur:** Skibola CF et al., 1999, PNAS, Vol. 96 (no. 22): 12810-815.

1. Intended Use

Code: KT0001

The kit "MutaGEL® MTHFR 2" allows the parallel detection of the both common point mutations in the position 677 and 1298 of the 5,10-methylenetetrahydrofolat-reduktase (MTHFR) gene. The substitution of cytosine against thymine and respectively adenine against cytosine causes a change in the amino acid sequence from alanine to valine (Ala222Val) and in case of A1298C from glutamine to alanine (Glu429Ala). For in vitro diagnostic use only.

2. Introduction

Hyperhomocysteinemia is the result of a disturbed homocysteine metabolism often due to genetic defects. The increase of homocysteine plasma level is therefore a risk factor for cardio- or cerebrovascular complications as well as for venous thrombosis and migraine. Patients often carry the common C677T mutation in the MTHFR gene coding for a thermolabile variant of the MTHFR enzyme with reduced activity. The A1298C mutation in the MTHFR gene increases the homocysteine plasma level only in case of C677T heterozygotie. Due to this fact both mutations should be analysed in combination as genetically risk factors for hyperhomocysteinemia.

3. Principle of the Test

The kit „MutaGEL® MTHFR 2“ contains different sets of primer for analysis of both mutations C677T and A1298C in the MTHFR gene. The primer sets are prepared in two separate mixes (for wildtype and mutation alleles) and are used for PCR directly with the 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.

4. Material Supplied (for 24 determinations)

SSP-primer MTHFR (wt)	24 x	tubes	aliquoted colored PCR tubes for the wildtype constellation C677/ A1298 (blue).
SSP-primer MTHFR (mut)	24 x	tubes	aliquoted colored PCR tubes for the mutation constellation 677T/ 1298C (orange).
PCR master mix	1 x	350 µl	ready to use PCR solution (inclusive buffer, dNTPs, cresol-red).
Positive control DNA	1 x	30 µl	aqueous solution of human gDNA of genotype wt/mut C677T/ A1298C.
PCR water	1 x	750 µl	deionized water
Taq polymerase (5 U/ml)	1 x	8 µl	PCR enzyme (hot start)

5. Materials Required but not Supplied

Reagents:

- DNA extraction kit (f.e. DNA Blood Miniprep, KBR3005)
- reagents for gel electrophoresis

Instruments:

- thermal cycler
- variable pipets (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips
- sterile micro tube (for master mix preparation)
- instruments for gel electrophoresis

6. Storage and Stability

The reagents are stable at 4°C for 30 d. For longer storage freeze 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 "MTHFR 2 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 three steps:

1. Sample preparation (DNA extraction).
2. Amplification with primers specific for the MTHFR gene (as well as for the wild-type alleles as for the mutant alleles).
3. Analysis of genotype by gel electrophoretical resolution of amplified DNA-fragments.

8. Sample Preparation

- For template use total genomic DNA which can be extracted (f. e. from about 200 µl whole blood) using commercial available DNA extraction kits according to the manufacturers instruction.
- Start immediately with the amplification procedure or store the extracted DNA at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

9. Amplification

- Every set of amplifications should include a positive as well as a negative control.
- For each sample, positive control and negative control prepare the following Master-Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions and add half more volume):

PCR reagents	reaktion volume: 12 µl	master mix volume
PCR master mix	6 µl	6 µl x (N+ 0.5)
aqua (dest.)	10 µl	10 µl x (N + 0.5)
Taq polymerase (5 U/µl)	0.12 µl	0.12 µl x (N+ 0.5)

- add **16 µl** of the prepared master mix (**red**) to each PCR-tube (with lyophilysed SSP-MTHFR) use for each sample in parallel a wildtype-PCR-tube (**blue**) and a mutation-PCR-tube (**orange**)!
- samples: add **4 µl** of the **extracted gDNA** (50 ng/µl) to the wildtype-tube (**blue**) and to the mutation-tube (**orange**).
- positive control: add **4 µl** of the **MTHFR positive control DNA** to the wildtype-tube (**blue**) and to the mutation-tube (**orange**).
- negative control: add **4 µl** of aqua (dest.) to the Master-Mix
- transfer the micro tubes into the thermal cycler
- perform the following amplification protocol (about 1 h 20 min):

Initial hold:	95°C for 7 min
10 cycles:	96°C for 15 sec / 65°C for 1 min
20 cycles:	96°C for 10 sec / 61°C for 50 sec / 72°C for 30 sec
Final hold:	10°C

10. Detection of the amplified DNA and Interpretation of the Results

- Carry out gel electrophoresis in **2 %** agarose (or 10 % polyacrylamid) for about **75 Vh** (f.e. 50 min at 90 volts) in 1x TBE-buffer: load after amplification about **15 µl** of each amplified material (products from **blue** and **orange** tubes side by side = two lanes for one DNA-sample) to the gel (due to the included loading buffer the PCR-solution can be added directly to the gel without any further preparation). The length of detected 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 detected DNA pattern should be documented in suited way (f.e. digital photo).
- In dependence of the present genotype the samples show a defined pattern of **300 bp**- or respectively **230 bp**- amplificats as well as a internal control fragment of **1100 bp**. (*Please consider: if the wildtype and mutation alleles are present, the internal control is expressed much weaker or could also lack completely !*).
- wildtype alleles are determined by the SSP-Primer MTHFR (**wt = blue** tubes) and the mutation alleles by the SSP-Primer MTHFR (**mut = orange** tubes): The fragment of **300 bp** length corresponds to analysed cDNA position **677**; the fragment of **230 bp** length corresponds to the analysed cDNA position **1298**.
- The **MTHFR 2 positive control DNA** has (for both point mutations) the genotype **wt/mut**.
- In any case the negative controls must be negative for any amplification product.
- The determination of the genotype present in the analysed sample is done according to the table for interpretation (showing the expectable DNA pattern for both MTHFR mutations C677T and A1298C).

11. Restrictions

The allele-specific PCR results for the positive control in DNA fragments of indicated length and for samples at least in the internal control fragment (1100 bp). 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.

Table for interpretation of MTHFR-677/1298- genotype

MTHFR-SSP	1(wildtype)	2 (mutation)	genotype	allele frequency Caucasian [%] ^(*)
SSP-Mix	# 300 bp C677 * 230 bp A1298	# 300 bp 677T * 230 bp 1298C		
677	#		CC677	13,2
1298	*		AA1298	
677	#		CC677	30,7
1298	*	*	AC1298	
677	#		CC677	9,6
1298		*	CC1298	
677	#	#	CT677	19,3
1298	*		AA1298	
677	#	#	CT677	14,9
1298	*	*	AC1298	
677	#	#	CT677	>0,1
1298		*	CC1298	
677		#	TT677	10,5
1298	*		AA1298	
677		#	TT677	>5
1298	*	*	AC1298	
677		#	TT677	>0,1
1298		*	CC1298	

^(*) **Literatur:** Skibola CF et al., 1999, PNAS, Vol. 96 (no. 22): 12810-815.