



1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KV0903100

Der MutaGEL® GST-P1-Testkit ist für die Untersuchung des Ile105Val-Polymorphismus im Glutathion-S-Transferase P1- Gen (GST-P1) bestimmt. Zur in vitro Diagnostik.

2. Einleitung

Das Glutathion-S-Transferase-System stellt eines der wichtigsten Schutzsysteme gegen Peroxide und elektrophile Reaktionspartner dar, welche die körpereigenen Zellen schädigen. Die Funktion des in mehreren Isoformen vorkommenden Enzyms besteht in der Ankopplung von Glutathion an verschiedene Substrate. Dadurch wird die Wasserlöslichkeit des entsprechenden Metabolits zum Zwecke der Ausscheidung aus dem Körper erhöht. Ein Glutathion-S-Transferase-Mangel ist häufig genetisch bedingt. Neben dem vollständigen Fehlen der GST-M1- bzw. GST-T1- Gene (bei 50 % bzw. 20 % der europäischen Bevölkerung) beeinflusst vor allem der Ile105Val-Polymorphismus im GST-P1-Gen die Funktionalität des Glutathion-S-Transferase-Systems.

3. Testprinzip

Im Kit „MutaGEL® GST-P1“ sind die spezifischen Primer für die Untersuchung des Glutathion-S-Transferase P1-Gens enthalten (Primer GST-P1): Das Amplifikationsprodukt des mutierten Genotyps kann durch einen spezifischen Verdau mit einer Endonuklease charakterisiert werden, für welche sich in Folge der Mutation (105Val) eine Restriktionsschnittstelle gebildet hat. Die Identifizierung der verschiedenen Genotypen erfolgt anschließend durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate und der Restriktionsverdau-Fragmente jeder einzelnen Probe.

4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)

▪ PCR Master Mix	1 x 540 µl (grün)	gebrauchsfertiger PCR Mix (Pufferlösung, <i>hotstart</i> -Taq, dNTP, Mg ²⁺ , GST-P1-Gen spezifischen Oligonukleotide).
▪ Positivkontroll-DNA	1 x 35 µl (rot)	gepufferte Lösung mit (amplifizierter) heterozygoter DNA des GST-P1-Gens plus Kontroll-DNA.
▪ Restriktionsenzym G	1 x 70 µl (blau)	Restriktionsendonuklease für GST-P1- Mutationsstelle.
▪ Puffer für Restriktion	1 x 540 µl (weiß)	Puffer für die Restriktionsendonuklease G.

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. DNA BLOOD Miniprep, Art.-Nr. KBR3005).
- Reagenzien für die Gelelektrophorese (Agarose, Laufpuffer, DNA-Größenstandard, Ladepuffer, Ethidiumbromid).
- Mineralöl (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel).
- H₂O (Reinstwasser).
- Thermocycler.
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (möglichst mit Filter).
- Sterile Reagenzgefäße und PCR-Tubes.
- Geräte für die Gelelektrophorese (Spannungsgeber, Laufkammer).

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. Es empfiehlt sich, die GST-P1- 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

- 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. Essrich (Biologisches Labor, Denzlingen)

Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in vier Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für GST-P1 spezifischen Primern.
3. Verdau der Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease.
4. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der verdauten Amplifikate.

8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA z. B. aus ca. 200 µl Vollblut extrahieren, indem ein kommerzieller Isolierungskit entsprechend der Anleitung des Herstellers eingesetzt wird.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die isolierte 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 Negativkontrolle sollte folgender Master Mix hergestellt werden (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10% virtuelles Volumen addieren).

PCR- Reagenzien	Reaktionsvolumen: 25 µl	Master Mix Volumen
PCR Mix Volumen (inklusive Primer)	20 µl	20 µl x (N+10%)
- Pro zu analysierenden Ansatz: je 20 µl PCR Master Mix in ein (steriles) PCR-Gefäß aliquotieren. - Proben: 5 µl der extrahierten DNA zum PCR Mix zupipettieren. - Positivkontrolle: 5 µl der GST-P1-Positivkontroll-DNA zum PCR Mix zupipettieren. - Negativkontrolle: 5 µl H₂O (Reinstwasser) zum PCR 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 10 min, danach 4°C	

10. Restriktionsendonukleasen-Verdau

Für jedes Amplifikat, einschließlich der Positivkontroll-DNA, wird folgender Restriktionsverdau-Mix angesetzt (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10 % virtuelles Volumen addieren).

Reagenzien für den Verdau	Volumen des Verdau: 30 µl	Volumen des Verdau -Mix
Puffergemisch für Restriktionsenzym	19,6 µl	19,6 µl x (N+10%)
Enzym G	2,4 µl	2,4 µl x (N+10%)
15 µl des Verdau-Mix in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Tubes verwendet werden). 15 µl des Amplifikats zum Verdau-Mix zugeben. - Reaktionsgefäße in einen Heizblock (alternativ PCR-Tubes in den Thermocycler) einstellen. - Bei 55°C für mind. 3 h inkubieren (optimal über Nacht).		

11. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2-3 %** Agarose (oder 20% Polyacrylamid) für ca. **65 Vh** (z.B. 40 min bei 90 volt) durchführen: ca. **15-20 µl** von jedem Restriktionsverdauansatz mit **4 µl** Ladepuffer versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z. B. KDGC-015001) abgeglichen werden. Die im Gel aufgetrennte DNA wird im Ethidiumbromidbad (5 µg/ml) für ca. 5 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert.
- Die PCR liefert (ungeschnitten) für alle Proben (außer der Negativkontrolle) DNA-Fragmente von **180 bp**. Neben dieses GST-P1-Genabschnitts wird zusätzlich ein 400 bp großes Kontrollamplimer generiert.
- Das Vorhandensein der **Mutation** wird durch die Bildung einer Restriktionsschnittstelle für das Enzym im GST-P1-Gen erkennbar (zusätzlich besteht eine Prüfschnittstelle im Amplimer der Kontrollbande, die dieses um 40 bp (auf 360 bp) verkürzt, was in gut auflösenden Gelen sichtbar ist): das Amplifikat, welches vom **normalen** (Wildtyp)-Gen erhalten wurde, wird vom Restriktionsenzym **nicht** geschnitten, während das vom **mutierten** Gen abgeleitete Amplifikat **einmal** geschnitten wird. Daher erhält man nach dem Restriktionsendonukleasenverdau mit Enzym G folgende mögliche Restriktionsmuster:

GENOTYP	Amplifikatlänge (in Basenpaaren)
wt/ wt	180 / - / - (plus 360 bp Kontrollbande)
wt/ mut	180 / 100 / 80 (plus 360 bp Kontrollbande)
mut/ mut	100 / 80 (plus 360 bp Kontrollbande)

- Die **GST-P1-Positivkontroll-DNA** besitzt den Genotyp **wt/ mut**.
- Die Amplifikation der Negativkontrolle 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 zumindest das Amplifikat von 180 bp. Falls dies nicht der Fall ist, muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden. Bei fehlenden Positivkontroll-Spaltprodukten erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden.

1. Intended Use

Code: KV0903100

The kit MutaGEL[®] GST-P1 allows the detection of the Ile105Val polymorphism in the human glutathione-S-transferase gene (GST-P1). For in vitro diagnostic use.

2. Introduction

The glutathione-S-transferase system protects against peroxides and electrophilic reaction partners which both can damage the cells of the body. The enzyme exists in several different isoforms. The solubility of the (manifold) substrates is increased by the addition of glutathione leading to a better elimination of the toxic metabolites from the body. Glutathione-S-transferase deficiency can be genetically determined. The GST-P1 gene compensates (at least in parts) for the frequently deletion of GST-M1 or GST-T1 genes in Caucasians (about 50 % respectively 20 %).

3. Test Principle

The kit "MutaGEL GST-P1" contains a set of primer which amplify a specific sequence within the human GST-P1 gene (primer GST-P1). The amplified product obtained from a wild type DNA will not be cut by the restriction enzyme included in this kit, whereas the fragment obtained from DNA carrying the Ile105Val-mutation will be cut once. The identification of the present genotype is done by analysis of the amplification products and their cut fragments through gel electrophoresis.

4. Materials Supplied (for 24 determinations)

▪ PCR Master Mix	1 x 540 µl (grün)	ready to use PCR Mix (buffer solution, <i>hotstart</i> -Taq, dNTP, Mg ²⁺ , oligonukleotides specific for the human GST-P1 gene.
▪ Positive control DNA	1 x 35 µl (rot)	buffered solution with (amplified) heterozygous DNA of human GST-P1 plus control DNA.
▪ Restriction enzyme G	1 x 70 µl (blue)	restriction enzyme for GST-P1 mutation site.
▪ buffer for restriction	1 x 540 µl (white)	buffer for the restriction enzyme G.

5. Material Required but not Supplied

Reagents:

- DNA extraction kit (f.e. Code.: KDBR3005)
- reagents for gel electrophoresis (agarosis, running buffer TB, molecular weight standard, loading buffer, ethidium bromide)
- mineral oil (optional, for thermal cyclers without heated lid)

Instruments:

- thermal cycler
- pipettes (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips (with filter)
- sterile reagent tubes and PCR micro tubes suitable for the thermal cycler in use
- instruments for gel electrophoresis (power supply, running chamber)

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). Don't thaw out the content of the "GST-P1 positive control DNA" for more than three times. If necessary, make suitable aliquots.

Before use: Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).

7. Warnings 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.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- Avoid aerosols (use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes with filter for aerosol free pipetting)

Procedure

The complete procedure is divided in four steps:

- 1) Sample preparation.
- 2) Amplification with primers specific for the human GST-P1 gene.
- 3) Digestion of the amplified product with a restriction enzyme.
- 4) Detection of the amplified and digested DNA. by gel-electrophoresis.



8. Sample preparation

- Extract total genomic DNA e.g. from 200 µl of 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.

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 volume (inclusive primers)	20 µl	20 µl x (N + 10%)
- Per each analysis: aliquot 20 µl of PCR Master-Mix in sterile micro tube suitable for the thermal cycler - Samples: add 5 µl of the extracted DNA to the PCR Master-Mix - Positive control: add 5 µl of the GST-P1 positive control DNA to the PCR Master-Mix - Negative control: add 5 µl of H₂O (PCR grade) to the PCR 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 seconds / 58°C for 30 seconds / 72°C for 60 seconds	
Final hold:	74°C for 10 minutes, 4°C follow up	

10. Digestion of the Amplified DNA

Prepare for each sample, including positive control the following Digestion-Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions, and add 10% more volume).

Reagents for DIGESTION	Total volume for each DIGESTION: 30 µl	Volume in the Digestion-Mix
Buffer Mix for restriction enzyme G	19.6 µl	19.6 µl x (N + 10%)
Restriction enzyme G	2.4 µl	2.4 µl x (N+1)
- aliquot 15 µl of the Digestion-Mix into reaction tubes suitable for heating block incubator (a thermal cycler may be used for the incubation too). - add 15 µl of the amplification product to the digestion Mix. - transfer the reaction tubes to the heating block incubator. - incubate at 55°C for minimal 3 hours (optimal over night).		

11. Detection of the Amplified and Digested DNA

- Carry out a gel electrophoresis in **2 - 3 %** agarose (or polyacrylamide 20 %) for about **65 Vh** (e.g. 40 min 90 volts): load about **15 - 20 µl** of each restriction (with about **4 µl** loading buffer) to the gel in order to obtain a complete separation of the different fragments. The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (e.g. KDGC-015001). The separated DNA is colored by ethidium bromide (5 µg/ml) for about 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The amplification leads (without restriction) to a GST-P1 specific fragment of **180 bp** length. Additionally a **400 bp** control amplimer is generated.
- The mutation in the GST-P1 gene leads to a modified amplification product with a sequence recognised by the restriction enzyme G. Subsequently it will be cutted in case of present mutation and stay complete in case of normal sequence. Furthermore, the control amplimer contains a restriction site which shortens the amplimer by 40 bp (to 360 bp) after restriction. Therefore, the following restriction enzyme patterns are obtained:

GENOTYPE	Length of the digested DNA (in base pairs)			
wt / wt	180	/	-	/ - (+ 360 bp control fragment)
wt / mut	180	/	100	/ 80 (+ 360 bp control fragment)
mut / mut	-	/	100	/ 80 (+ 360 bp control fragment)
- The GST-P1 positive control DNA has the genotype wt/mut. - In any case the negative controls must be negative for any amplification product.				

12. Restrictions

The PCR results for all positive controls in DNA fragments of indicated length and for samples at least in the amplification product of 180 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.

