



1. Verwendungszweck	Art.-Nr.: KV0904100
Der MutaGEL® CYP1A1-Testkit erlaubt die Untersuchung des T6235C-Polymorphismus im Cytochrom P4501A1-Gen (CYP1A1), welches für das entsprechende Entgiftungsenzym der Phase I codiert.	

2. Einleitung
Chemische Fremdstoffe im menschlichen Organismus werden über körpereigene Entgiftungsreaktionen abgebaut. Dabei ist das induzierbare Phase I-Enzym Cytochrom P4501A1 entscheidend an der Aktivierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt. Diese treten in der Regel bei Verbrennungsprozessen auf (z. B. im Zigarettenrauch oder gebratenen Fleisch etc.). Die T6235C-Punktmutation im CYP1A1-Gen bewirkt eine erhöhte Enzymaktivität und als Folge die Anreicherung toxischer Metabolite im Körper. Diese können zur Zellschädigung führen und dadurch die Entstehung von Krebs begünstigen. Die Häufigkeit der T6235C-Mutation bei Kaukasiern beträgt ca. 5 - 8 %.

3. Testprinzip
Im Kit „MutaGEL® CYP1A1“ sind die spezifischen Primer für die Untersuchung des Cytochrom P4501A1- Gens enthalten (Primer CYP1): Das Amplifikationsprodukt des mutierten Genotyps kann durch einen spezifischen Verdau mit einer Endonuklease charakterisiert werden, für welche sich in Folge der Mutation 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 (24 Bestimmungen)																					
<table border="0"> <tr> <td>▪ Primer CYP1</td> <td>1 x 30 µl</td> <td>Lösung mit den für das CYP1A1-Gen spezifischen Oligonukleotiden.</td> </tr> <tr> <td>▪ Primer-Puffer</td> <td>1 x 2,0 ml</td> <td>wässrige Pufferlösung, die auch als Negativkontrolle eingesetzt wird.</td> </tr> <tr> <td>▪ dNTP-Mix</td> <td>1 x 30 µl</td> <td>Nukleotidlösung</td> </tr> <tr> <td>▪ Positiv-Kontroll-DNA</td> <td>1 x 30 µl</td> <td>wässrige Lösung mit (klonierter) DNA des CYP1A1- Gens.</td> </tr> <tr> <td>▪ Enzym C1</td> <td>1 x 60 µl</td> <td>Restriktionsendonuklease</td> </tr> <tr> <td>▪ Puffer für Enzym C1</td> <td>1 x 120 µl</td> <td>Puffer für die Restriktionsendonuklease</td> </tr> <tr> <td>▪ BSA-Lösung</td> <td>1 x 120 µl</td> <td>Zusatz für Restriktionsverdau</td> </tr> </table>	▪ Primer CYP1	1 x 30 µl	Lösung mit den für das CYP1A1-Gen spezifischen Oligonukleotiden.	▪ Primer-Puffer	1 x 2,0 ml	wässrige Pufferlösung, die auch als Negativkontrolle eingesetzt wird.	▪ dNTP-Mix	1 x 30 µl	Nukleotidlösung	▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 30 µl	wässrige Lösung mit (klonierter) DNA des CYP1A1- Gens.	▪ Enzym C1	1 x 60 µl	Restriktionsendonuklease	▪ Puffer für Enzym C1	1 x 120 µl	Puffer für die Restriktionsendonuklease	▪ BSA-Lösung	1 x 120 µl	Zusatz für Restriktionsverdau
▪ Primer CYP1	1 x 30 µl	Lösung mit den für das CYP1A1-Gen spezifischen Oligonukleotiden.																			
▪ Primer-Puffer	1 x 2,0 ml	wässrige Pufferlösung, die auch als Negativkontrolle eingesetzt wird.																			
▪ dNTP-Mix	1 x 30 µl	Nukleotidlösung																			
▪ Positiv-Kontroll-DNA	1 x 30 µl	wässrige Lösung mit (klonierter) DNA des CYP1A1- Gens.																			
▪ Enzym C1	1 x 60 µl	Restriktionsendonuklease																			
▪ Puffer für Enzym C1	1 x 120 µl	Puffer für die Restriktionsendonuklease																			
▪ BSA-Lösung	1 x 120 µl	Zusatz für Restriktionsverdau																			

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel
<p>Reagenzien:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA-Extraktionskit (z.B. Blood Miniprep KBR3005) ▪ Taq-Polymerase (5 U/ µl) mit Taq-Reaktionspuffer (10x) (z.B. KDTO100) ▪ Reagenzien für die Gelelektrophorese ▪ Mineralöl (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel) <p>Instrumente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Thermocycler ▪ Pipetten (0,5 -1000 µl) und sterile Spitzen (möglichst mit Filter) ▪ Sterile Reagenzgefäße ▪ 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 CYP1A1- Positiv-Kontroll-DNA nur zweimal aufzutauen und daher bei Bedarf zu aliquotieren. <i>Vor Gebrauch:</i> Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen für einige Sekunden zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 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 (DNA CLEANER; Art.-Nr.: KDDC001). ▪ Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.

Analyseverfahren
Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in vier Phasen:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Behandlung zur Probenaufarbeitung. 2. Amplifikation mit den für CYP1A1 spezifischen Primern. 3. Verdau der Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease. 4. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate.



8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA z.B. aus ca. 200 µl EDTA-Vollblut extrahieren, indem ein kommerzieller Isolierungskit entsprechend der 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 ein weiteres Volumen addieren).

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 45 µl	Master-Mix- Volumen
Primer-Puffer	37,5 µl	37,5 µl x (N+1)
Taq- Reaktionspuffer (10 X)	5 µl	5 µl x (N +1)
dNTP-Mix	1 µl	1 µl x (N+1)
CYP1 - Primer	1 µl	1 µl x (N+1)
Taq- Polymerase	0,5 µl	0,5 µl x (N+1)

- je 45 µl des Master-Mix in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren
- Proben: 5 µl der **extrahierten DNA** zum Master-Mix zupipettieren
- Positiv-Kontrolle: 5 µl der **CYP1A1-Positiv-Kontroll-DNA** zum Master-Mix zupipettieren
- Negativ-Kontrolle: 5 µl des **Primer-Puffers** zum Master-Mix zupipettieren
- Falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen
- Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

Anfangsphase:	94°C für 3 min
35 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

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 ein weiteres Volumen addieren).

Reagenzien für den Verdau	Volumen des Verdau: 40 µl	Volumen des Verdau -Mix
Enzym C1	2 µl	2 µl x (N+1)
Puffer für Enzym C1	4 µl	4 µl x (N+1)
BSA-Lösung	4 µl	4 µl x (N+1)

- 10 µl des Verdau-Mix in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Gefäße verwendet werden)
- 30 µl des Amplifikats zum Verdau-Mix zugeben
- Reaktionsgefäße in einen Heizblock (alternativ PCR-Gefäße in den Thermocycler) einstellen
- Bei 37°C für 3 h inkubieren (optimal über Nacht)

11. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese durchführen (2 % Agarose): ca. 15 µl von jedem Verdauansatz in die Geltaschen laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard 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.
- zur Durchführung der Gelelektrophorese können Polyacrylamid-Fertiggele (Art.-Nr.: KAN20112), 5 x Laufpuffer (Art.-Nr.: KAN10060) 6 x Lade-puffer (Art.-Nr.: KAN01070) und pBS/Mspl - Molekulargewichts-Standard (KDGC-015001) eingesetzt werden.
- Die PCR liefert für alle Proben (außer der Negativkontrolle) DNA-Fragmente von **340 bp**.
- Das Vorhandensein der **Mutation** wird durch die Bildung einer Restriktionsschnittstelle für das Enzym im CYP1A1-Gen identifiziert: das Amplifikat, welches vom Wildtyp-Gen erhalten wurde, wird vom Restriktionsenzym nicht geschnitten, während das vom mutierten Gen abgeleitete Amplifikat einmal geschnitten wird. Daher erhält man nach dem Restriktionsendonukleasen-Verdau folgende mögliche Restriktionsmuster:

GENOTYP	Amplifikatlänge (in Basenpaaren)
wt/ wt	340
wt/ mut	340 / 200 / 140
mut/ mut	200 / 140

- Die **CYP1A1-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt den Genotyp **wt/mut**.
- 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 zumindest das Amplifikat von 340 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: KV0904100
The kit "MutaGEL CYP1A1" allows the detection of the T6235C polymorphism in the CYP1A1-gene encoding for the corresponding cytochrome P450 detoxifying enzyme (phase I).	

2. Introduction
Foreign chemical substances in the human organism are eliminated by own detoxifying enzymes of the body. The inducible cytochrome P450 1A1 (phase I) enzyme is mainly responsible for the activation of polycyclic aromatic hydrocarbons (resulting from burning processes like cigarette smoke or fried meat etc.). The T6235C-mutation in the CYP1A1 gives rise to a higher enzyme activity causing accumulation of toxic metabolites in the body. These are responsible for cell damage and promote the development of cancer. The prevalence of the T6235C mutation in Caucasians is about 4 %.

3. Test Principle
The kit "MutaGEL CYP1A1" contains a set of primer which amplify a specific sequence within the human CYP1A1 gene (primer CYP1). 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 mutation will be cut once. Identification of genotype is done by analysis of amplification products and the cut fragments using gel electrophoresis.

4. Materials Supplied (for 24 determinations)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ primer CYP1 1 x 30 µl solution of oligonucleotides specific for the human gene CYP1A1. ▪ primer buffer 1 x 2.0 ml buffered aqueous solution, used also as negative control. ▪ dNTP-Mix 1 x 30 µl solution of the four dNTPs. ▪ positive control DNA 1 x 30 µl aqueous solution of human DNA with the (cloned) DNA of CYP1A1. ▪ enzyme C1 1 x 60 µl restriction enzyme. ▪ buffer enzyme C1 1 x 120 µl buffer for the restriction enzyme. ▪ BSA solution 1 x 120 µl supplement for restriction.

5. Material Required but not Supplied
Reagents and instruments: <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA extraction kit (f.e. Code.: KBR3005) ▪ reagents for gel electrophoresis ▪ Taq polymerase with (5 U / µl ; f.e. Code : KDTO100) ▪ Taq reaction buffer (10 x, with 15 mM MgCl₂) ▪ mineral oil (for thermal cyclers without heated lid) ▪ thermal cycler ▪ pipettes (0.5 - 1000 µl) and sterile pipette tips ▪ 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). Don't thaw out the content of the "CYP1A1 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. Warnings and Precautions
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 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 four steps: <ol style="list-style-type: none"> 1) Sample preparation. 2) Amplification with primers specific for the CYP1A1 gene. 3) Digestion of the amplified product with a restriction enzyme. 4) Detection of the amplified and digested DNA.



8. Sample Preparation

- Extract total genomic DNA f.e. from 200 µl of 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 one more volume).

PCR Reagents	reaction volume: 45 µl	Master-Mix volume
primer buffer	37.5 µl	37.5 µl x (N+1)
Taq- reaction buffer (10 X)	5 µl	5 µl x (N +1)
dNTP Mix	1µl	1 µl x (N+1)
primer CYP1	1 µl	1 µl x (N+1)
Taq polymerase	0.5 µl	0.5 µl x (N+1)

- aliquot 45 µl of the Master-Mix in sterile micro tube suitable for the thermal cycler.
- samples: add 5 µl of the **extracted DNA** to the Master-Mix
- positive control: add 5 µl of the **CYP1A1 positive control DNA** to the Master-Mix
- negative control: add 5 µl of **primer buffer** to the Master-Mix
- if necessary overlay the Mix with 60 µl of mineral oil
- transfer the micro tubes into the thermal cycler
- perform the following amplification protocol:

Initial hold:	94°C for 3 min
35 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

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 one volume).

Reagents for DIGESTION	Total volume for each DIGESTION: 40 µl	Volume in the Digestion-Mix
buffer enzyme C1	4 µl	4 µl x (N+1)
enzyme C1	2 µl	2 µl x (N+1)
BSA solution	4 µl	4 µl x (N+1)

- Aliquot 10 µl of the Digestion-Mix into tubes suitable for the incubator (a thermal cycler may be used for the incubation too).
- Add 30 µl of the amplification product to the digestion Mix.
- Transfer the tubes to the incubator and incubate at **37°C for 3 hours** (optimal over night).

11. Detection of the amplified and digested DNA

- Carry out a gel electrophoresis in 2 % agarose (or polyacrylamide 20 %) with about 10-15 µl of the amplified and digested DNA in order to obtain a complete separation of the different fragments.
- The use of 5x TBE running buffer (Code: KAN10060), 6x loading buffer (Code: KAN01070), molecular weight marker pUC19/ *MspI* (KBR311005) and (in case of using pre-cast gels) polyacrylamide gels (Code: KAN20112) is recommended.
- The amplification leads to a fragment of **340 bp** length.
- The mutation in the CYP1A1 gene leads to a modified amplification product with a sequence recognised by the restriction enzyme. Therefore, the following restriction enzyme patterns are obtained:

GENOTYPE	Length of the digested DNA (in base pairs)		
wt / wt	340		
wt / mut	340	200	140
mut / mut	200		140

- The "**CYP1A1 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 340 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.

