



1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KV0905100

Der MutaGEL[®] CYP1A2-Testkit erlaubt die Untersuchung des wichtigsten Polymorphismus im Cytochrom P450 1A2-Gen (CYP1A2), welches für das entsprechende Entgiftungsenzym der Phase I codiert: es handelt sich dabei um die Mutation CYP1A2*1F (A-163C).

2. Einleitung

Chemische Fremdstoffe im menschlichen Organismus werden über körpereigene Entgiftungsreaktionen abgebaut. Dabei unterstützt das Cytochrom P450 1A2 das ca. 70% homologe Isoenzym Cytochrom P450 1A1 bei der Aktivierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. Das Enzym spielt auch eine bedeutende Rolle bei der Verstoffwechslung von Medikamenten (Antidepressiva bzw. Mexiletin, Naproxen, Warfarin etc.). Punktmutationen im CYP1A2-Gen verändern die Enzymaktivität negativ und verringern dadurch die Detoxifikationsleistung des Organismus. Die *1F-Mutation (A-163C-Basenaustausch) kommt in der kaukasischen Bevölkerung relativ häufig vor - im Durchschnitt je nach untersuchter Population zwischen 7% - 15%.

3. Testprinzip

Im Kit „MutaGEL[®] CYP1A2“ sind spezifische Primer für die Untersuchung des individuell vorliegenden Cytochrom P450 1A2-Genotyps enthalten: Diese generieren ein Amplifikat, welches durch nachfolgenden spezifischen Restriktionsenzym-Verdau auf das Vorhandensein der *1F-Mutation hin untersucht wird (die Mutation CYP1A2*1F bildet für die entsprechende Restriktionsendonuklease eine Schnittstelle). Die Identifizierung des Genotyps jeder einzelnen Probe erfolgt anschließend durch gelelektrophoretische Auftrennung der bei diesem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente.

4. Inhalt der Testpackung (24 Bestimmungen)

Primer-Mix CYP1A2	1 x 300 µl (grün)	Lösung mit für das CYP1A2-Gen spezifischen Oligonukleotiden (für CYP1A2*1F)
PCR Enzym (Master Mix)	1 x 350 µl (blau)	TAQ-Polymerase mit Puffer, dNTPs
Positiv-Kontroll-DNA	1 x 20 µl (rot)	Lösung mit (für *1F-Mutation heterozygoter) DNA des CYP1A2- Gens
Restriktionsenzym C2	1 x 28 µl (braun)	Restriktionsendonuklease (CYP1A2*1F)
Puffer für Enzym C2	1 x 28 µl (braun)	Puffer für die Restriktionsendonuklease (CYP1A2*1F)
Negativ-Kontrolle	1 x 50 µl (weiß)	PCR-Reinstwasser (deionisiert)

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN[®] DNA Blood von Immundiagnostik, KG1033)
- Reagenzien für die Gelelektrophorese (TBE-Laufpuffer, Gel-Ladepuffer, Ethidiumbromid-Bad (5 µg/ ml))
- Thermocycler (möglichst mit Deckelheizung)
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (möglichst mit Filter)
- Sterile Reagenzgefäße
- Geräte für die Gelelektrophorese (Spannungsgeber, Laufkammer, UV-Transilluminator)

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. Vor Gebrauch: Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen kurz zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

7. 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.
- 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 für beide zu analysierende Regionen des CYP1A2-Gens in vier Phasen:

- Behandlung zur Probenaufarbeitung.
- Amplifikation mit für die *1F-Mutation spezifischen Primer.
- Verdau des Amplifikats mit einer für diese Mutation spezifischen Restriktionsendonuklease.
- Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der aus dem Amplifikat entstandenen DNA-Fragmente.



8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA aus z. B. 250 µl Vollblut extrahieren, indem ein kommerzieller DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN[®] DNA Blood von Immundiagnostik, KG1033) entsprechend der jeweiligen Anleitung 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: 25 µl	Master-Mix- Volumen
Primer-Mix CYP1A2	10,5 µl	10,5 µl x (N+1)
PCR Master Mix (TAQ-Polymerase mit Enzympuffer)	12,5 µl	12,5 µl x (N +1)

- je **23 µl** des Master-Mix in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren
- Proben: **2 µl** der **extrahierten DNA** zum Master-Mix zupipettieren
- Positiv-Kontrolle: **2 µl** der **Positiv-Kontroll-DNA** (CYP1A2) zum Master-Mix zupipettieren
- Negativ-Kontrolle: **2 µl** des **PCR-Reinstwasser** zum Master-Mix zupipettieren
- PCR-Gefäße in Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten) und folgendes PCR- Protokoll durchführen:

Anfangsphase:	94°C für 5 min
35 Zyklen:	94°C für 30 sec / 60°C für 30 sec / 72°C für 30 sec
Endphase:	72°C für 7 min, danach RT

10) Restriktionsendonukleasen-Verdau

Jedes Amplifikat (einschließlich der Positiv- und Negativ- Kontrolle) 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: 10 µl	Volumen des Verdau -Mix
Restriktionsenzym C2	1 µl	1 µl x (N+1)
Puffer für Enzym C2	1 µl	1 µl x (N+1)

- 10 µl** des entstandenen Amplifikats in sterile Reaktionsgefäße aliquotieren (wahlweise können auch PCR-Gefäße verwendet werden).
- 2 µl** des hergestellten Verdau-Mix zugeben.
- Reaktionsgefäße im Heizblock (alternativ PCR-Gefäße im Thermocycler) bei **25°C** für mind. **4 h** inkubieren (optimal über Nacht).

11) Untersuchung des Genotyps des CYP1A2*1F-Allels und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese durchführen (**2%** Agarose): mindestens **10 µl** Restriktionsverdauansatz mit **2 µl** Ladepuffer versetzen und 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.
- Die Verwendung des pBS/ *MspI* - Molekulargewichts-Standards (Art.-Nr.: KBR311005) kann empfohlen werden.
- Die PCR liefert vor dem Enzymverdau für alle Proben (außer der Negativkontrolle) DNA-Fragmente von **265 bp**.
- Das Vorhandensein der **Mutation** wird durch **das Vorhandensein** einer Restriktionsschnittstelle für das Enzym im CYP1A2*1F -Allel identifiziert: das Amplifikat, welches vom mutierten Gen erhalten wurde, wird vom Restriktionsenzym in zwei kleinere Fragmente (58 + 207 bp) geschnitten. Hingegen wird das vom **Wildtyp**-Gen abgeleitete Amplifikat **nicht** geschnitten und behält daher seine ursprüngliche Größe (265 bp) bei.
- Entsprechend des in der Probe vorliegenden Genotyps liefert die durchgeführte Elektrophorese folgende mögliche Restriktionsmuster im Gel:

GENOTYP	DNA-Fragmentlängen (in Basenpaaren)
wt / wt (A / A)	265
wt / mut (A / C)	265 / 207 / 58
mut / mut (C / C)	/ 207 / 58

- Die **CYP1A2-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt den Genotyp **wt / mut**.
- Die Amplifikation der Negativ-Kontrolle darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlängen ergeben.
- Das zweite (kleinere) Restriktionsfragment kann aufgrund seiner geringen Größe (58 bp) möglicherweise im Agarosegel nicht oder nur schwer erkennbar sein - eine zweifelsfreie Auswertung ist jedoch durch die Entstehung/ Nachweis des ersten (größeren) Fragments (207 bp) gegeben!

12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrolle die angegebenen DNA-Fragmente und für die Proben DNA zumindest ein Amplifikat von 265 bp. Falls dies nicht der Fall ist, muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden (bzw. die PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden).

Ein vollständiger Restriktionsverdau der Amplifikate muss gewährleistet sein (um Falsch-Negative „Mutations-Ergebnisse“ auszuschließen) und kann über die korrekte Generierung der Positivkontroll-Spaltprodukte abgesichert werden (bei fehlenden Positivkontroll-Spaltprodukten erfolgte kein korrekter Restriktionsenzym-Verdau und die Restriktions-Bedingungen müssen überprüft werden).