

1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KV0908100

Der MutaGEL® NAT2-Testkit ist für die parallele Untersuchung von Proben-DNA bezüglich der drei relevanten Punktmutationen C481T, G590A und G857A im N-Acetyltransferasegen 2 (NAT2) bestimmt. Nur zur in vitro Diagnostik verwenden.

2. Einleitung

Die Entgiftung des Körpers erfolgt durch das Zusammenspiel verschiedener Detoxifikationsenzyme. Die Toxine werden von Phase I-Enzymen (Cytochrom P450) modifiziert um nachfolgend von Phase II-Enzymen in wasserlösliche Formen überführt. Dadurch wird die Ausscheidung aus dem Körper ermöglicht. Die N-Acetyltransferase 2 stellt ein Schlüsselenzym der Phase II dar und ist hauptverantwortlich für den Abbau von polyzyklischen Aromaten. Individuen mit NAT2-Wildtypgenen sind „schnelle Acetylierer“ mit normaler Enzymaktivität, während Personen mit homozygoten (bzw. mit doppelt heterozygoten) Punktmutationen von C481T, G590A und G857A „langsame Acetylierer“ darstellen. Letztere besitzen aufgrund dieser Basenaustausche eine zum Teil stark eingeschränkte Entgiftungskapazität ihrer Körperzellen. Entsprechend haben diese Personen ein erhöhtes Risiko für die Krebsentstehung in unterschiedlichsten Organen – insbesondere bei vermehrter Aufnahme aromatischer Verbindungen, wie sie vor allem im Zigarettenrauch, Farben/Lösungsmittel, aber auch im gebratenen Fleisch vorkommen.

3. Testprinzip

Im Kit MutaGEL NAT2 sind die allelspezifischen Primer für die Untersuchung der drei Punktmutationen C481T, G590A und G857A im NAT2-Gen enthalten. Bei dem Testverfahren handelt es sich um eine Kombination sequenzspezifischer Primer (SSP), mit denen die NAT2-Polymorphismen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) direkt nachgewiesen werden können. Die in der jeweiligen Probe vorliegenden NAT2-Allele werden durch die Anwesenheit eines für die Wildtyp- bzw. Mutations-Konstellation spezifischen PCR-Produkts eindeutig bestimmt. -

4. Inhalt der Testpackung (für 20 Proben + 4 Kontrollen)

SSP-Primer NAT2 wt (481C, 590G, 857G)	1 x 60 µl	Primer-Mix für die wt-Allele.
SSP-Primer NAT2 mut (481T, 590A, 857A)	1 x 60 µl	Primer-Mix für die mut-Allele.
Primer-Puffer	1 x 2 ml	Primer-Puffer
dNTP-Mix	1 x 60 µl	dNTP-Mix.
Positiv-Kontroll-DNA (PK 1: wt)	1 x 50 µl	wässrige Lösung mit Plasmid-DNA (Genotyp wt/wt für alle drei Mutationen).
Positiv-Kontroll-DNA (PK 2: mut)	1 x 50 µl	wässrige Lösung mit Plasmid-DNA (Genotyp mut/mut für alle drei Mutationen).

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien:

- DNA-Extraktionskit (z.B. HELIX FAST BLOOD, KDH8010 bzw. BLOOD MINIPREP, KBR3005)
- Reagenzien für die Gelelektrophorese
- TAQ-Polymerase und TAQ-Puffer (mit MgCl₂)

Instrumente:

- Thermocycler
- variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und sterile Filtertips
- sterile PCR-Reaktionsgefäße
- Geräte für Gelelektrophorese

6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagenzien

Alle Reagenzien müssen bei ≤ -20°C gelagert werden. Bei korrekter Lagerung sind die Reagenzien mindestens bis zum angegebenen Verfallsdatum (auf jeder Einzelverpackung aufgedruckt) stabil. Es empfiehlt sich, die NAT2-Positiv-Kontroll-DNA nicht mehrmals 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 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 (z.B. DNA CLEANER; Art.-Nr.: KDDC001).
- Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.
- Die PCR- (Polymerase Chain Reaction) Rechte liegen bei Hoffmann-La Roche Ltd. Sie sind geschützt durch das europäische Patent Nr. 201.184e 200.362. Der Gebrauch von Hoffmann-La Roche - fremden PCR-Reagenzien bedarf einer Autorisierung seitens Hoffmann-La Roche Ltd. mittels eines Lizenzvertrags.

Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in drei Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion).
2. Amplifikation mit den für das NAT2-Gen spezifischen Primer-Paaren (sowohl für Wildtyp- und Mutations-Allele der 3 Punktmutationen).
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Amplifikate.

8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA aus 250 µl Vollblut extrahieren, indem kommerzielle DNA-Extraktionskits entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers eingesetzt werden.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die DNA bei ≤ -20°C aufbewahrt werden.

9. Amplifikation

- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten. Jeweils **pro DNA-Probe** parallel **2** PCR-Gefäße (für die **Wildtyp- bzw. Mutationsansätze**) verwenden!
- 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: 45 µl	Master-Mix- Volumen
SSP-NAT2 Primer-Mix (wt bzw. mut)	2 µl	2 µl x (N + 1)
10x Taq-Polymerase Puffer (mit MgCl ₂)	5 µl	5 µl x (N + 1)
dNTP-Mix	1 µl	1 µl x (N + 1)
Primer-Puffer	36,5 µl	36,5 µl x (N + 1)
Taq- Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	0,5 µl x (N + 1)

- je 45 µl des hergestellten Master-Mix in die PCR-Gefäße pipettieren:
- für die Proben: jeweils 5 µl der **extrahierten gDNA** zu jedem PCR-Gefäß zupipettieren (parallel in Ansatz für **wt bzw. mut**).
- Positiv-Kontrolle: 5 µl der **NAT2-Positiv-Kontroll-DNA (PK 1 bzw. PK 2)** zu jeweils einem separaten PCR-Gefäß zupipettieren.
- Negativ-Kontrolle: 5 µl Primer-Puffer zum Master-Mix in einem PCR-Gefäß zupipettieren.
- Die PCR-Gefäße in den Thermocycler einstellen.
- Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

Anfangsphase:	95°C für 3 min
30 Zyklen:	95°C für 1 min / 57°C für 1 min / 72°C für 1 min
Endphase:	72°C für 5 min

10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

Nach der Amplifikation die Gelelektrophorese durchführen (2 % Agarose): mind. 10 µl von jedem PCR-Ansatz direkt in die Geltaschen laden (d.h. pro Probe werden **zwei** Gelspuren für Wt- und Mut-Ansatz benötigt). Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichtsstandard (z.B. KDGC-015001) abgeglichen werden. Die PCR liefert in Abhängigkeit des Genotyps ein definiertes Bandenmuster aus allelspezifischen DNA-Fragmenten, welche für die jeweilige Punktmutation die folgend angegebenen Größen besitzen: Position **481**: 662 bp / Position **590**: 549 bp / Position **857**: 282 bp. Siehe nachstehende Tabelle zur Interpretation des Genotyps:

allelspezifische DNA-Fragmente	Wt-Ansatz	Mut-Ansatz	Genotyp
Position 481: 662 bp	+		C481C = Wildtyp
	+	+	C481T = Heterozygot
		+	T481T = Homozygot
Position 590: 549 bp	+		G590G = Wildtyp
	+	+	G590A = Heterozygot
		+	A590A = Homozygot
Position 857: 282 bp	+		G857G = Wildtyp
	+	+	G857A = Heterozygot
		+	A857A = Homozygot

- Für alle drei Positionen besitzt die **Positiv-Kontroll-DNA 1** den Genotyp **wt/wt** und die **Positiv-Kontroll-DNA 2** den Genotyp **mut /mut**.
- Die Amplifikation der **Negativ-Kontrolle** darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlängen ergeben.

11. Einschränkungen

Die allelspezifische PCR liefert für die Positivkontrolle die angegebenen DNA-Fragmente. Für die Proben muss in mind. einem der Ansätze (**wt bzw. mut**) ein Amplifikat erscheinen. Falls dies nicht der Fall ist, erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation. Die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden. In diesem Fall sollte die Proben-DNA erneut getestet bzw. mit neu isolierter DNA untersucht werden.



1. Intended Use	Code: KV0908100
The kit "MutaGEL NAT2" allows the parallel detection of three polymorphisms (C481T, G590A and G857A) in the N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene encoding the corresponding detoxifying enzyme (phase II).	

2. Introduction
Foreign chemical substances in human organism are eliminated by own detoxifying enzymes of the body. Inducible N-acetyltransferase 2 (NAT2) enzyme (phase II) transfers metabolites in water-soluble forms which can be secreted from the body. NAT2 is mainly responsible for activation of polycyclic aromatic hydrocarbons (f.e. resulting from burning processes like cigarette smoke or fried meat etc.). Individuals with NAT2 wildtype constellation are "rapid acetylators" showing normal enzyme activity. In contrast, persons with homozygous or double heterozygous mutations are "slow acetylators". Due to their restricted detoxifying capacity, these individuals have higher risk for cancer development in different organs.

3. Test Principle
The kit "MutaGEL NAT2" contains different sets of primer for analysis of the three mutations C481T, G590A and G857A within the human NAT2 gene. These primer sets allow a direct allele-specific amplification of the wildtype- or mutant gene constellation. Subsequent identification of present genotype is done using gel-electrophoretic methods.

4. Materials Supplied (for 24 determinations)
- SSP-primer NAT2 wt (481C, 590G, 857G) 1 x 60 µl solution of oligonucleotides specific for NAT2 wildtype-constellation. - SSP-primer NAT2 mut (481T, 590A, 857A) 1 x 60 µl solution of oligonucleotides specific for NAT2 mutation-constellation. - primer buffer 1 x 2 ml buffered aqueous solution, used also as negative control. - dNTP-Mix 1 x 60 µl solution of the four dNTPs. - positive control DNA (PK1: wt) 1 x 50 µl aqueous solution of human DNA with (cloned) DNA of NAT2 (genotype wt/wt). - positive control DNA (PK2: mut) 1 x 50 µl aqueous solution of human DNA with (cloned) DNA of NAT2 (genotype mut/mut).

5. Material Required but not Supplied
Reagents and instruments: - DNA extraction kit (f.e. BLOOD MINIPREP, KBR3005) - reagents for gel electrophoresis - Taq polymerase (5 U / µl) and Taq polymerase buffer (10 x, with 15 mM MgCl₂) (f.e. KDTO100) - 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 "NAT2 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
- 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: - Sample preparation. - Amplification with primers specific for wildtype- respectively mutation-constellation of NAT2 gene. - Detection of the amplification products by gel electrophoresis.



8. Sample Preparation

- Extract total genomic DNA from 200 µl of whole blood using a commercial available DNA isolation kit according to the manufacturer's manual.
- Start immediately with 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 following Master-Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions and add one more volume). Use for each sample two sterile PCR-micro tubes (one for **wildtype**- and **resp.** one for **mutation**- constellation)

PCR Reagents	reaction volume: 50 µl	Master-Mix volume
SSP-NAT2 primer (wt resp. mut)	2 µl	2 µl x (N+1)
Taq-polymerase buffer (10 X)	5 µl	5 µl x (N +1)
dNTP Mix	1 µl	1 µl x (N+1)
primer buffer	36.5 µl	36.5 µl x (N+1)
Taq polymerase (5U/ µl)	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 **extracted DNA** to Master-Mix in both PCR-micro tubes for each one sample (**wildtype**- and **resp. mutation** tube).
- positive control: add 5 µl of **positive control DNA (PK1 resp. PK2)** to the Master-Mix in the PCR-micro tubes for positive reference.
- negative control: add 5 µl of **primer buffer** to the Master-Mix in the PCR-micro tube for negative reference.
- 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:	95°C for 3 min
35 cycles:	94°C for 1 min / 57°C for 1 min / 72°C for 1 min
Final hold:	72°C for 5 minutes, 4°C follow up

10. Detection of the amplified DNA

- Carry out gel electrophoresis (2 % agarose): Load for each sample about 10 µl of every both PCR products (amplificates from wildtype and mutation reaction = two lanes for one DNA-sample). Length of detected DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard. Separated DNA is colored by ethidium bromide (5 µg/ml) for 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- In dependence of present genotype all samples show a defined pattern of DNA-fragments. These DNA fragments correspond to the mutations as follows: 662 bp correspond to mutation at position **481**, 549 bp correspond to mutation at position **590** and 282 bp corresponds to mutation at position **587**.

allelespecific DNA fragments	wt-tube	mut-tube	genotype
position 481: 662 bp	+		C481C = wildtype
	+	+	C481T = heterozygous
		+	T481T = homozygous
position 590: 549 bp	+		G590G = wildtype
	+	+	G590A = heterozygous
		+	A590A = homozygous
position 857: 282 bp	+		G857G = wildtype
	+	+	G857A = heterozygous
		+	A857A = homozygous

- For all three positions **positive control DNA 1** has genotype **wt/wt** and **positive control DNA 2** has genotype **mut /mut**.
- In any case the **negative control** must be negative for amplification products with indicated length.

12. Restrictions

The PCR results for all positive controls in DNA fragments of indicated length and for samples at least in any amplification product for wildtype- or mutation- constellation. 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.

