

## 1. Verwendungszweck

Best.- Nr.: MG0001

Der **MutaGEL® ACE** Testkit erlaubt die Untersuchung des **I/D**- Polimorphismus im Angiotensin I Converting Enzym (ACE) - Gen. Der Polymorphismus entsteht durch die Insertion repetitiver "Alu" - Sequenzen ins Intron 16 des Gens.

## 2. Einleitung

Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) stellt den wichtigsten Regulator im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) dar. Es wandelt Angiotensin 1 in die physiologisch aktive Form Angiotensin 2 um, welches direkt an den Erfolgsorganen (wie Herz, Niere und Gefäßwände) seine stark vasokonstriktorische Wirkung entfaltet. Der im ACE-Gen vorhandene Insertions/ Deletions-Polymorphismus ist unmittelbar mit der Menge an zirkulierendem ACE assoziiert und beeinflusst dadurch das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen.

## 3. Testprinzip

Im Kit **MutaGEL® ACE** sind die spezifischen Primer für die Identifizierung der beiden Allelformen enthalten (Primer ACE):

- Allel **I** (Insertion), von welchem sich ein Fragment mit 490 bp ableitet.
- Allel **D** (Deletion), von welchem sich ein Fragment mit 190 bp ableitet.

Das Amplifikationsgemisch wird anschließend mit gelelektrophoretischen Methoden detektiert.

## 4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)

|                                   |                      |                                                                                          |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| ▪ Primer ACE                      | 1 x 55 µl (grün)     | Lösung mit den für das ACE-Gen spezifischen Oligonukleotiden.                            |
| ▪ PCR-Master Mix                  | 1 x 275 µl (violett) | gebrauchsfertige PCR-Reagenzien (hot start Taq-Enzym, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, Puffer). |
| ▪ ACE Positiv Kontrolle           | 1 x 18 µl (rot)      | wässrige Lösung mit DNA-Pool des Genotyps I/ D.                                          |
| ▪ (H <sub>2</sub> O) Reinstwasser | 1 x 200 µl (weiß)    | PCR-Wasser                                                                               |

## 5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B.: BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- Reagenzien für die Gelelektrophorese
- Mineralöl (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)
- Thermocycler
- Pipetten (0,5 -200 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, den PCR-Master Mix und die ACE Positiv-Kontroll-DNA nur zweimal aufzutauen (schonend bei 4°C) 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.

- Proben wie potentiell infektiöses Material behandeln.
- Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- In drei (möglichst räumlich) voneinander abgetrennten Bereichen arbeiten und zwar zur:
  - 1) Probenaufbereitung
  - 2) Amplifikation
  - 3) Detektion der Amplifikate.
- 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 Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.
- Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) vermeiden.
- Mit den im Testkit enthaltenen Reagenzien können 24 Bestimmungen durchgeführt werden.



## Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in drei Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für ACE spezifischen Primern.
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate.

## 8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA (z.B. aus ca. 200 µl Vollblut) mit Hilfe eines kommerziellen DNA-Isolierungskits entsprechend der Anleitung des Herstellers extrahieren.
- 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 in einem sterilen Reaktionsgefäß folgender Master-Mix hergestellt werden (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und weitere 10 % Volumen addieren).

| PCR- Reagenzien                 | Reaktions- Volumen: 25 µl | Master-Mix- Volumen |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Primer ACE                      | 2 µl                      | 2 µl x (N + 10%)    |
| PCR-Master Mix                  | 10 µl                     | 10 µl x (N + 10%)   |
| H <sub>2</sub> O (Reinstwasser) | 10 µl                     | 10 µl x (N + 10%)   |

- Je 22 µl dieses Master-Mix in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren.
- Proben: 3 µl der extrahierten DNA zum Reaktionsansatz zupipettieren (ca. 20 ng/ µl).
- Positiv-Kontrolle: 3 µl der **ACE-Positiv-Kontroll-DNA** zum Master-Mix zupipettieren.
- Negativ-Kontrolle: 3 µl **Reinstwasser** zum Master-Mix zupipettieren.
- Falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten.
- Die PCR-Gefäße in den Thermocycler einstellen.
- Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

|                      |                                                     |
|----------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Anfangsphase:</b> | 94°C für 5 min                                      |
| <b>30 Zyklen:</b>    | 94°C für 60 sec / 57°C für 60 sec / 72°C für 90 sec |
| <b>Endphase:</b>     | 72°C für 5 min, danach 4°C                          |

## 10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **1,5 %** Agarose (oder 10 % Polyacrylamid) für ca. **75 Vh** (z.B. 50 min bei 90 volt) in 1x TBE-Puffer durchführen: ca. **15-20 µl** von jedem PCR-Ansatz mit **4 µl** Ladepuffer (z.B. KAN01070) mischen und in die Geltaschen laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KBR311005) 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 (+ fotodokumentiert).
- Die PCR liefert Amplifikate, deren Länge vom Genotyp der vorhandenen DNA-Probe abhängt:

| GENOTYP | Amplifikatlänge (in Basenpaaren) |
|---------|----------------------------------|
| I/I     | 490 bp                           |
| I/D     | 490 190 bp                       |
| D/D     | 190 bp                           |

- Die **ACE-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt den Genotyp **I / D**.
- Die Amplifikation der Negativ-Kontrolle darf keinesfalls eine Bande ergeben, welche der Länge eines für die **I-** bzw. **D-** Genotypen erwarteten DNA-Fragmente entspricht.

## 12. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrollen die angegebenen DNA-Fragmente und für die Proben DNA zumindest eines der beiden Amplifikate. Falls dies nicht der Fall ist, muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden. Bei fehlenden Positivkontroll-Banden im Gel erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden.

| 1. Intended Use                                                                                                                                                                                                                                       | Code: MG0001 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| The kit "MutaGEL® ACE" allows to detect the insertion / deletion (I / D) DNA polymorphism in the intron 16 of the ACE gene coding for the human angiotensin converting enzyme. The insertion itself corresponds to an <i>alu</i> repetitive sequence. |              |

| 2. Introduction                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The angiotensin converting enzyme (ACE) is the most important regulator of the renin/ angiotensin/ aldosteron system (RAAS). The enzyme converts angiotensin 1 into the physiological active form angiotensin 2. Latter one unfolds its vasoconstrictive effect directly into the organs (heart, kidney, vessels). The insertion/ deletion polymorphism in the ACE gene is associated immediately at the circulating ACE level. Therefore the I / D - polymorphism influences the risk for cardiovascular complications. |

| 3. Test Principle                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The kit <b>MutaGEL® ACE</b> contains a set of primers which amplify the region of the gene where the insertion or deletion occurs. This leads to the following amplification pattern:                                                                 |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>amplicon with 490 bp length when the <i>alu</i> sequence is <b>inserted</b> (allele <b>I</b>)</li> <li>amplicon with 190 bp length when the <i>alu</i> sequence is <b>deleted</b> (allele <b>D</b>)</li> </ul> |
| After PCR, the amplicates are subsequently detected by gelelectrophoretic methods.                                                                                                                                                                    |

| 4. Materials Supplied (24 determinations) |                      |                     |                                                                                    |
|-------------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| ▪                                         | Primer ACE           | 1 x 55 µl (green)   | solution of oligonucleotides specific for the ACE gene.                            |
| ▪                                         | PCR master mix       | 1 x 275 µl (violet) | ready to use PCR reagents (hot start TAQ enzyme, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, buffer) |
| ▪                                         | ACE positive control | 1 x 18 µl (red)     | aqueous solution of human DNA pool with genotype ACE I/D.                          |
| ▪                                         | (H2O) deionized      | 1 x 200 µl (white)  | PCR water                                                                          |

| 5. Material required but not Supplied                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Reagents and Instruments:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA extraction kit (e. g. BLOOD MINIPREP, Code: KBR3005)</li> <li>Reagents for gelelectrophoresis</li> <li>Mineral oil (for thermal cyclers without heated lid)</li> <li>Thermal cycler</li> <li>Pipettes (0,5 - 200 µl) and sterile pipette tips</li> <li>Sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use</li> <li>Instruments for gel electrophoresis</li> </ul> |

| 6. Storage and Stability                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Storage at < -18°C. The reagents are stable in the unopened micro tubes until the expiration date indicated. Don't thaw out the content of the "ACE positive control DNA" more than twice. If necessary, make suitable aliquots. |
| <i>Before use:</i> Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).                                                                                                                            |

| Warnings and Precautions                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>For in vitro diagnostic use.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Specimens and controls should be handled as if potentially infectious.</li> <li>Don't use the kit after its expiration date.</li> <li>Set up (if possible) three separate working areas:             <ol style="list-style-type: none"> <li>DNA isolation</li> <li>Preparing amplification</li> <li>Detection of the amplification products</li> </ol> </li> <li>Use different tips and wear separate coats and gloves in each area</li> <li>Use sterile plugged tips for pipetting or use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.</li> <li>Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.</li> <li>Avoid aerosols.</li> <li>The kit allows performance of 24 amplifications.</li> </ul> |

## Procedure

The complete procedure is divided in three steps:

- 1) Sample preparation
- 2) Amplification with primers specific for the ACE gene
- 3) Analysis of genotype by gelelectrophoretical detection of the amplified DNA

## 8. Sample preparation

- Extract total genomic DNA (e.g. from 200 µl whole blood) using a commercial extraction kit after the manufacturer's instruction.
- 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 volume).

| Reagents for PCR | Total volume for each reaction: 25 µl | Volume in the Master-Mix |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Primer ACE       | 2 µl                                  | 2 µl x (N+1)             |
| PCR master mix   | 10 µl                                 | 10 µl x (N+1)            |
| PCR water        | 10 µl                                 | 10 µl x (N+1)            |

- aliquot 22 µl of the master mix in sterile micro tubes suitable for the thermal cycler
- samples: add 3 µl of the extracted DNA to the master mix (about 20 ng/µl).
- positive control: add 3 µl of the "ACE positive control DNA" to the master mix
- negative control: add 3 µl of PCR water 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 cycles:

|                      |                                                                 |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Initial Hold:</b> | 94°C for 5 minutes                                              |
| <b>30 cycles:</b>    | 94°C for 60 seconds / 57°C for 60 seconds / 72°C for 90 seconds |
| <b>Final Hold:</b>   | 72°C for 5 minutes, 4°C follow up                               |

## 10. Detection of the amplified DNA

- Carry out gel electrophoresis in **1,5 %** agarose (or polyacrylamide 20%) for about **75 Vh** (e. g. 50 min at 90 volt) in 1x TBE-buffer: mix **15 - 20 µl** of each digestion mix with **4 µl** loading buffer (e.g. KAN01070) and load the gel. The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (e.g. KBR311005).
- The separated DNA is colored by ethidiumbromide or SybrGreen (5 µg/ml) for 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The amplification produces following amplificates with fragment-lengths corresponding to the present genotype:

| GENOTYPE | Length of the amplified DNA (in base pairs) |    |
|----------|---------------------------------------------|----|
| I/I      | 490                                         | bp |
| I/D      | 490    190                                  | bp |
| D/D      | 190                                         | bp |

- **The ACE positive control DNA has the genotype I / D.**
- In any case the negative controls must be negative for any amplification product.

## 12. Restrictions

The PCR results for positive control in DNA fragments of indicated length and for the samples at least one of both amplification products must be detectable. 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.