



<b>1. Verwendungszweck</b>	<b>KE09009</b>
Das <b>MutaGEL<sup>®</sup> Laktase</b> -Testkit ist für die Untersuchung des -13910 C/T - Polymorphismus im Laktase-Gen (Laktase Phlorizin Hydrolase, LPH) durch direkte allelspezifische PCR-Amplifikation. Dieser LCT-Polymorphismus kodiert für die genetisch bedingte (primäre) Laktose-Intoleranz beim Menschen.	

<b>2. Einleitung</b>
<p>Patienten mit Laktose-Intoleranz können Milchzucker nicht verdauen und bekommen daher beim Genuss von Milchprodukten Durchfälle, Blähungen, Übelkeit und Bauchschmerzen. Häufigster Grund hierfür ist ein genetisch bedingter Mangel des Enzyms LPH (Laktase Phlorizin Hydrolase), welches für den Abbau von Milchzucker verantwortlich ist. Die genetische Ursache liegt in einem häufigen C/T-Basenaustausch (Polymorphismus) an der Stelle -13910 von der regulatorischen Region des Laktasegens, wobei das Fehlen des Enzyms Laktase ausschließlich an den C/C-Genotyp gekoppelt ist, welcher somit allein klinische Relevanz besitzt. Die Laktose-Intoleranz manifestiert sich dabei häufig erst im späteren Jugendalter – als Kind werden die Milchprodukte von den meisten Patienten noch gut vertragen. Die Prävalenz des homozygoten C/C-Genotyps beträgt in Deutschland ca. 15%, in Mittelmeerländern ca. 40-50% und in Asien sogar nahezu vollständig.</p>

<b>3. Testprinzip</b>
<p>Im Kit <b>MutaGEL<sup>®</sup> Laktase (AS)</b> sind die spezifischen Primer für die Untersuchung des Laktasegens enthalten (LCT-Mix). Der PCR-Test stellt ein amplifikationsrefraktäres Mutationssystem (ARMS) dar, welches auf dem biochemischen Prinzip beruht, dass PCR-Primer mit passender Endbase Zehnerpotenzen besser an den Gegenstrang binden und amplifizieren als solche mit einer endständigen Fehlpaarung. Wenn von Primern, die auf der Polymorphimusstelle enden in einem Test nur die eine Variante (z.B. "C") angeboten wird und in einem parallelen Test nur die andere (im Beispiel "T"), findet eine Amplifikation in begrenztem Rahmen von Zyklusdurchgängen nur bei der spezifischen Basenpaarung statt. Auf Grund dieser Tatsache lässt sich ein Test entwickeln, mit dem sich aus zwei je spezifischen Ansätzen pro Untersuchungsprobe der vorhandene "verborgene" Genotyp diagnostizieren lässt. Er kann in zwei nebeneinanderliegenden Gelspuren abgelesen werden (Methode nach Dr. Essrich, Biologisches Labor, Denzlingen).</p>

<b>4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PCR-Mix 1 "Primer C"     1 x 550 µl (grün)     Lösung mit für die C-Variante der regulatorischen Region des Laktasegens spezifischen Oligonukleotiden (Hotstart).</li> <li>▪ PCR-Mix 2 "Primer T"     1 x 550 µl (lila)     Lösung mit für die T-Variante der regulatorischen Region des Laktasegens spezifischen Oligonukleotiden (Hotstart).</li> <li>▪ Positiv-Kontroll-DNA     1 x 30 µl (rot)     wässrige DNA-Lösung heterozygot für den -13910 LCT-Polymorphismus.</li> <li>▪ Negativkontrolle     1 x 200 µl (weiss)     gepufferte (Tris) Lösung für die no template control (NTC).</li> </ul>

<b>5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel</b>
<p>Reagenzien und Instrumente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN<sup>®</sup> Universal RNA/ DNA, KG1037, Immundiagnostik AG)</li> <li>▪ Reagenzien für die Gelelektrophorese</li> <li>▪ Thermocycler (optional Mineralöl für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)</li> <li>▪ Pipetten (0,5 - 200 µl) und sterile Spitzen (mit Filter)</li> <li>▪ sterile Reagenzgefäße</li> <li>▪ Puffer (TBE) und Geräte für die Gelelektrophorese</li> </ul>

<b>6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagenzien</b>
<p>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 LCT-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.</p>

<b>7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Test nur durch geschultes Personal nach GLP (Good Laboratory Practice)- Richtlinien durchführen lassen.</li> <li>▪ Nur zur in vitro-Diagnostik - Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr weiter verwenden.</li> <li>▪ Alle in der Testpackung enthaltenen Reagenzien/ Reaktionsgefäße können nach ihrer Verwendung im Restmüll entsorgt werden.</li> <li>▪ 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.</li> <li>▪ Sterile Spitzen mit Filter und von für PCR-Zwecke geeigneten Pipetten verwenden (für jeden Bereich extra Pipettensatz!).</li> <li>▪ Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und extra Kittel benutzen.</li> <li>▪ Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.</li> <li>▪ Aerosolbildung (beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.</li> </ul>



## 8. Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in **drei** Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für das Laktasegen spezifischen PCR-Mixen/ Primern.
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate.

## 9. Amplifikation

- Für jede Probe werden nebeneinander zwei Ansätze mit der **C-Base** und der **T-Base** vorbereitet und parallel amplifiziert.
- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten, für die insgesamt nur ein Mix verwendet werden muss.
- Die zwei Amplifikationen für jede Probe werden nach dem folgenden Schema durchgeführt:

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 25 µl	Master-Mix- Volumen
PCR-Mix	20 µl	20 µl x ( N + 10%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ je <b>20 µl</b> des Master-Mixe "<b>C-Primer</b>" (<b>Mix 1</b>) bzw. "<b>T-Primer</b>" (<b>Mix 2</b>) in zwei separate (sterile) PCR-Gefäße aliquotieren.</li> <li>▪ Proben: je <b>5 µl</b> der <b>extrahierten DNA</b> zu den beiden Master-Mixen zupipettieren. Korrespondierende Probengefäße korrekt beschriften!</li> <li>▪ Positiv-Kontrolle: je <b>5 µl</b> der <b>LCT-Positiv-Kontroll-DNA</b> zu den beiden Master-Mixen der positiven Referenz zupipettieren (die Kontrolle ist heterozygot "<b>C/T</b>", d.h. sie funktioniert bei beiden Reagenzien in Mix 1 bzw. Mix 2).</li> <li>▪ Negativ-Kontrolle: <b>5 µl Negativkontrolle</b> zu den beiden Master-Mixen der No Template Control (NTC) – Referenz zupipettieren.</li> <li>▪ Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten).</li> <li>▪ Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen (Zykluszahl exakt einhalten).</li> </ul>		
<b>Anfangsphase:</b>	94°C für 5 min	
<b>37 Zyklen:</b>	94°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 30 sec	
<b>Endphase:</b>	72°C für 5 min, danach Abkühlung (20°C) bzw. RT	

## 10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2 – 2,5 %** Agarose (oder 20 % Polyacrylamid) für **> 100 Vh** (z.B. 60 min bei 100 volt) durchführen: ca. **15 µl** von jedem PCR-Ansatz mit **4 µl** Ladebuffer versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der zu detektierenden 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 Elektrophorese sollten TBE-Laufpuffer bzw. Ladebuffer Ladebuffer (ggf. als verkaufsfertige Konzentrate) und ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (z.B. pUC19/Mspl-Molekulargewichts-Standard, KBR311005) eingesetzt werden.
- Die PCR liefert in spezifischen Ansätzen **für beide Allele** (außer der Negativkontrolle) **DNA-Fragmente von 170 bp**.
- Zusätzlich erscheint in jedem PCR-Ansatz eine Bande von **400 bp** Länge **als interne Amplifikationskontrolle**. Diese kann bei vorhandenen diagnostisch relevanten Fragmenten (170 bp-Fragmente) schwächer ausgeprägt sein oder sogar ganz fehlen.
- Das Vorhandensein (+) der Base "C" wird durch das Auftreten einer Bande im **Mix 1** („C-Primer“) angezeigt, das Vorhandensein der Base "T" durch das Auftreten einer Bande im **Mix 2** ("T"-Primer“). Daher erhält man nach der Elektrophorese folgende mögliche Muster:

GENOTYP	PCR-Mix 1: C-Primer	PCR-Mix 2: T-Primer
<b>C / C</b>	+	--
<b>C / T</b>	+	+
<b>T / T</b>	--	+

- Die **LCT-Positiv-Kontroll-DNA** besitzt für den -13910-Polymorphismus den Genotyp **C / T**, ist also **heterozygot**.
- Die **interne Amplifikations-Kontrollbande** erscheint bei **400 bp** Länge.
- Die Amplifikation der Negativ-Kontrolle darf keinesfalls eine Bande der angegebenen Fragmentlänge ergeben.

## 11. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrolle neben der internen Kontrollbande die angegebenen DNA-Fragmente von 170 bp. Falls dies nicht der Fall ist, bzw. falls bei der eingesetzten Proben-DNA keine DNA-Fragmente amplifiziert werden (auch nicht die interne Kontrolle), muss die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden. Bei fehlenden Positivkontrollprodukten erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden.