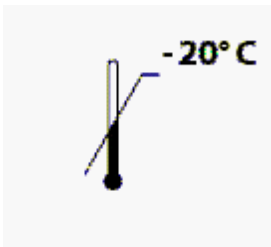


MutaPLATE[®] GST-M1/T1 (TaqMan)


Real-Time PCR Kit


PCR-Test zur Analyse der GSTM1- und GSTT1-Gendeletionen mit offenen Echtzeit-PCR-Systemen (z. B. RotorGene, SmartCycler, LightCycler, ABI, Amplifa, Stratagene) durch TaqMan-Technologie



Nur für in-vitro Diagnostik



REF KF1902132  **32**

REF KF1902196  **96**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com Tel.: +49 (0)6251/ 701900
info@immundiagnostik.com Fax: +49 (0)6251/ 849430

Version 1.2 / Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Verwendungszweck	3
2	Einleitung	3
3	Testprinzip	3
4	Kitbestandteile	3
5	Erforderliche Materialien	4
6	Lagerung und Haltbarkeit	4
7	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
8	Testdurchführung	5
	8.1 PCR Ansatz	5
	8.2 PCR Protokoll	6
9	Auswertung	7
10	Troubleshooting	10

1 Verwendungszweck

Das GST-M1 / T1 (TaqMan) -Real-Time-PCR-Kit ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von GSTM1- und GSTT1-Deletionen aus genomischer DNA. Der Test basiert auf der TaqMan-Technologie und kann mit allen offenen Echtzeit-PCR-Instrumenten (z. B. RotorGene, SmartCycler, LightCycler, ABI, Stratagene, Amplifa) verwendet werden.

2 Einleitung

Die Glutathion-S-Transferase (GST) wird in eine Vielzahl von Klassen eingeteilt und spielt eine Schlüsselrolle bei der zellulären Entgiftung, da sie die Konjugation toxischer Substanzen in ihre ausscheidbaren Metaboliten reguliert. Daher beeinflusst die individuelle Enzymaktivität die Empfindlichkeit gegenüber Umweltgiften, Karzinogenen, Krebs und anderen Krankheiten.

3 Testprinzip

Der Assay beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und zwei Hydrolysesonden (TaqMan Sonden), die spezifisch in der Region der Mutation binden. Die beiden Hydrolysesonden sind am 5' Ende mit unterschiedlichen Fluorophoren (Reporter Farbstoffen) markiert, welche für die Unterscheidung der Allele genutzt werden. Am 3' Ende sind die Sonden mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert. Die Nähe des Reporter Farbstoffes zu dem Quencher inhibiert die Fluoreszenz des Reportermoleküls. Während der Amplifikation binden die Sonden spezifisch an die DNA Fragmente. Die 5' Nukleaseaktivität der Polymerase spaltet die hybridisierten Sonden, wodurch der Reporter vom Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal generiert wird.

4 Kitbestandteile

GST-M1/T1 Kit	Volumen	
	32-rxn	96-rxn
Enzyme Mix (blau)	875 µL	2 x 1314 µL
Detection Mix 1 GSTM1 (gelb)	210 µL	630 µL
Detection Mix 2 GSTT1 (braun)	210 µL	630 µL
Detection Mix IC (weiß)	315 µL	945 µL
Positive Control - GSTM1/T1 WT (rot)	30 µL	90 µL
Positive Control - GSTM1/T1 Del (orange)	30 µL	90 µL
Negative Control (grün)	50 µL	150 µL

5 Erforderliche Materialien

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

- Offenes Real-Time System
- PCR Reaktionsgefäße (steril)
- Kühlblock für PCR Reaktionsgefäße
- Pipetten (0,5 – 200 µL)
 - 0,5 - 10 µL
 - 10 - 200 µL
- 1,5 mL Reaktionsgefäße (steril)

6 Lagerung und Haltbarkeit

- Alle Reagenzien sollen bis zum unmittelbaren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.
- Mehrfache Gefrierzyklen sind zu vermeiden (wenn nötig, Aliquots herstellen).
- Die Detektionsmische unbedingt vor Lichteinwirkung schützen.

7 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Vorschriften und Grundsätze für molekularbiologisches Arbeiten müssen eingehalten werden.

- Die Arbeitsschritte zügig durchführen.
- Alle PCR Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

8 Testdurchführung

8.1 PCR Ansatz

Alle Kitbestandteile schonend auftauen lassen, vorsichtig vor dem Benutzen durchmischen (nicht vortexen) und kurz anzentrifugieren. Den Detektionsmix vor Lichteinwirkung schützen. Während der Arbeiten alle PCR Reagenzien und den PCR Ansatz kühlen.

Für die Amplifikation werden pro Probe zwei PCR-Röhrchen (Mastermix 1 und 2) sowie zusätzliche Röhrchen für die Negativ- und Positivkontrolle benötigt. Wir empfehlen, die Positivkontrolle - GST-M1 / T1 WT (rot) zu verwenden, damit Sie die Amplifikation im jeweiligen Setup sehen. Die Positivkontrolle - GST-M1 / T1 Del (orange) trägt die Deletion für beide Gene homozygot und kann optional mitverwendet werden.

Die folgende Tabelle zeigt das Volumen der einzelnen Reagenzien pro Probe. Der Mastermix muss für die Anzahl der Proben (inkl. Negativ- und Positivkontrolle) (N) plus 10% vorbereitet sein, um Ungenauigkeiten auszugleichen.

Mastermix 1:

Reagent	Volume	Master Mix Volume
Detection Mix 1 GSTM1 (gelb)	6.0 µL	6.0 µL * (N + (N * 0.1))
Detection Mix IC (weiß)	4.5 µL	4.5 µL * (N + (N * 0.1))
Enzyme Mix (blau)	12.5 µL	12.5 µL * (N + (N * 0.1))

- Den Mastermix vorsichtig durch auf- und abpipettierten oder durch Invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren. In jede Kapillare/Well 23 µL des Mastermix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten negativen Kontrolle (grün) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (rot) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils 2 µL der Proben-DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Mastermix 2:

Reagent	Volume	Master Mix Volume
Detection Mix 2 GSTT1 (braun)	6.0 µL	6.0 µL * (N + (N * 0.1))
Detection Mix IC (weiß)	4.5 µL	4.5 µL * (N + (N * 0.1))
Enzyme Mix (blau)	12.5 µL	12.5 µL * (N + (N * 0.1))

- Den Mastermix vorsichtig durch auf- und abpipettierten oder durch Invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren. In jede Kapillare/Well 23 µL des Mastermix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten negativen Kontrolle (grün) dazugeben.

- Für die positive Kontrolle 2 µL von der mitgelieferten positiven Kontrolle1 **(rot)** dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils 2 µL der Proben-DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Die PCR-Reaktionen müssen sorgfältig durchmischt und kurz abzentrifugiert werden. Anschließend stellen Sie diese in das Real-Time-PCR-Instrument und verwenden das in 8.2 beschriebene PCR-Protokoll.

8.2 PCR Protokoll

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen	Acquisition
Lid Heizung (ggf.)	99	---	---	---
Initiale Denaturierung	94	120	1 x	keine
Denaturierung	94	10	37 x	keine
Primer Anlagerung	58	25		Single
Elongation	72	25		keine
Lid Heizung (ggf.)	off	---	---	---
Kühlen	40	30	1 x	---

9 Auswertung

Bei den Genen GSTM1 und GSTT1 wird das Vorhandensein des Gens nachgewiesen. Die entsprechenden TaqMan-Sonden für beide Gene sind mit FAM (**510 nm, grün**) markiert. Im Falle einer homozygoten Deletion findet keine Amplifikation statt und somit wird kein Fluoreszenzsignal von der FAM-markierten TaqMan-Sonde detektiert. Um eine erfolgreiche PCR sicherzustellen, wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) in die PCRs integriert. Die TaqMan-Sonde, die die interne Kontrolle nachweist, ist mit YAK (**555 nm, gelb**) gekennzeichnet und sollte immer ein Fluoreszenzsignal liefern.

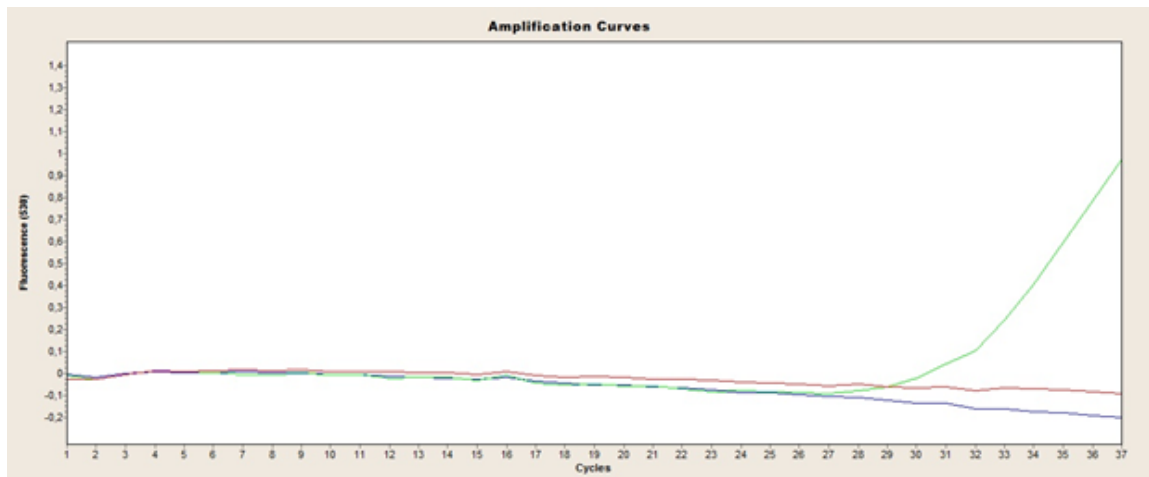
Entsprechend den drei Genotypen können für GSTM1 und GSTT1 folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Homozygoter und heterozygoter Wildtyp (Gen ist vorhanden):
Zunahme des Fluoreszenzsignals von der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde und Zunahme des Fluoreszenzsignals von der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.
2. Homozygote Deletion (Gen ist nicht vorhanden):
Keine Zunahme des Fluoreszenzsignals von der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, Zunahme des Fluoreszenzsignals von der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

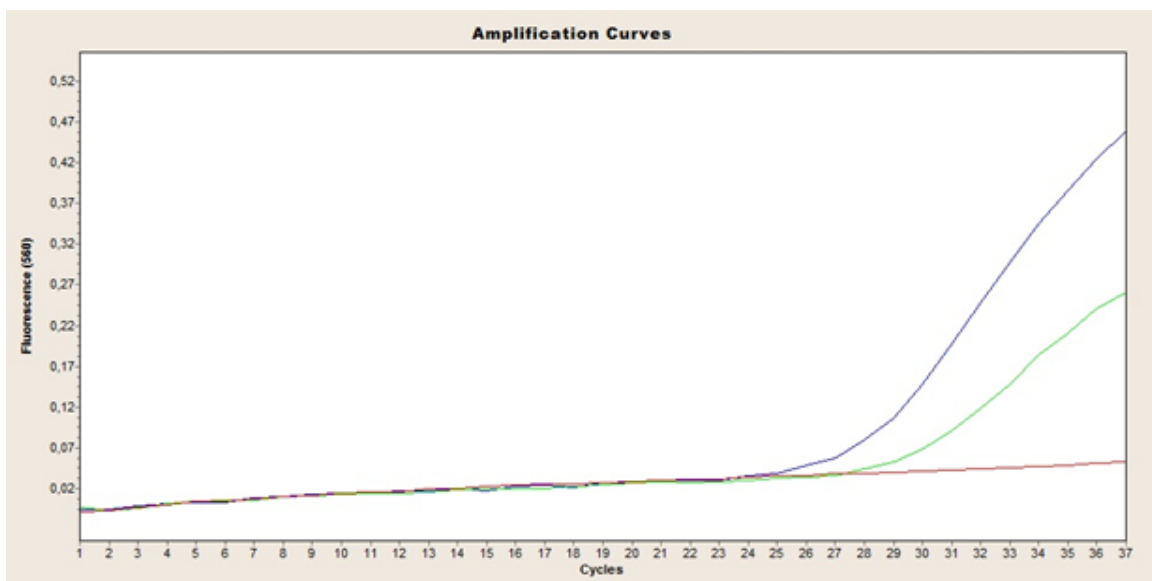
Die Ergebnisse der Analyse der GSTM1- und GSTT1-Deletionen werden für die möglichen Ergebnisse bei **510 - 530 nm / Grün** und der IAC bei **550 - 560 nm / Gelb** angezeigt (wählen Sie den entsprechenden Kanal Ihres Real-Time-PCR-Instruments). Verwenden Sie gegebenenfalls eine geeignete Farbkompensationsdatei, z. LightCycler®).

Die folgenden Abbildungen zeigen typische Beispiele des mit dem LightCycler® durchgeführten GSTM1-Experiments: **rote Kurve** - negative Kontrolle, **grüne Kurve** - homozygote Wildtyp- oder heterozygote Deletion, **blaue Kurve** - homozygote Deletion.

FAM (530 nm, grün) - Vorhandensein eines Gens (Wildtyp)

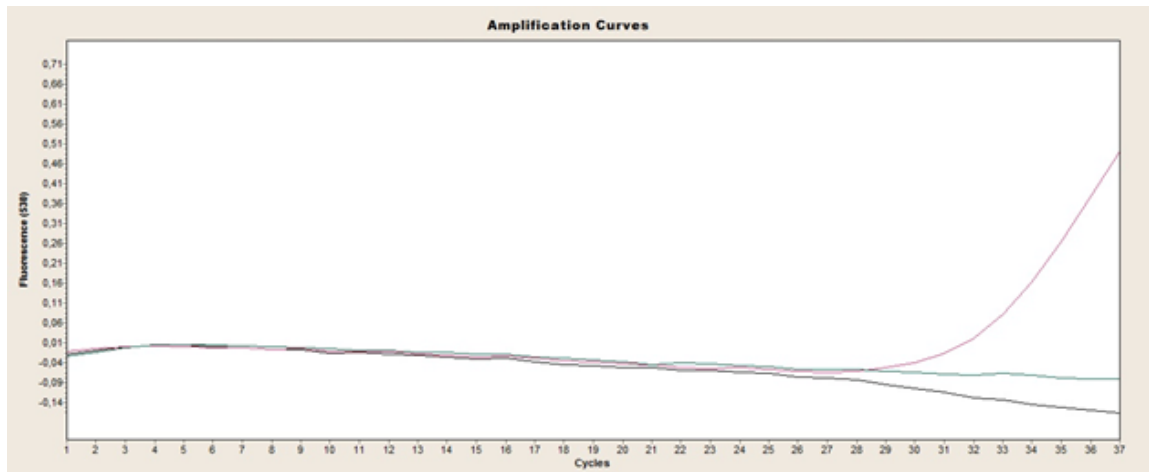


YAK (560nm, gelb) - Interne Kontrolle

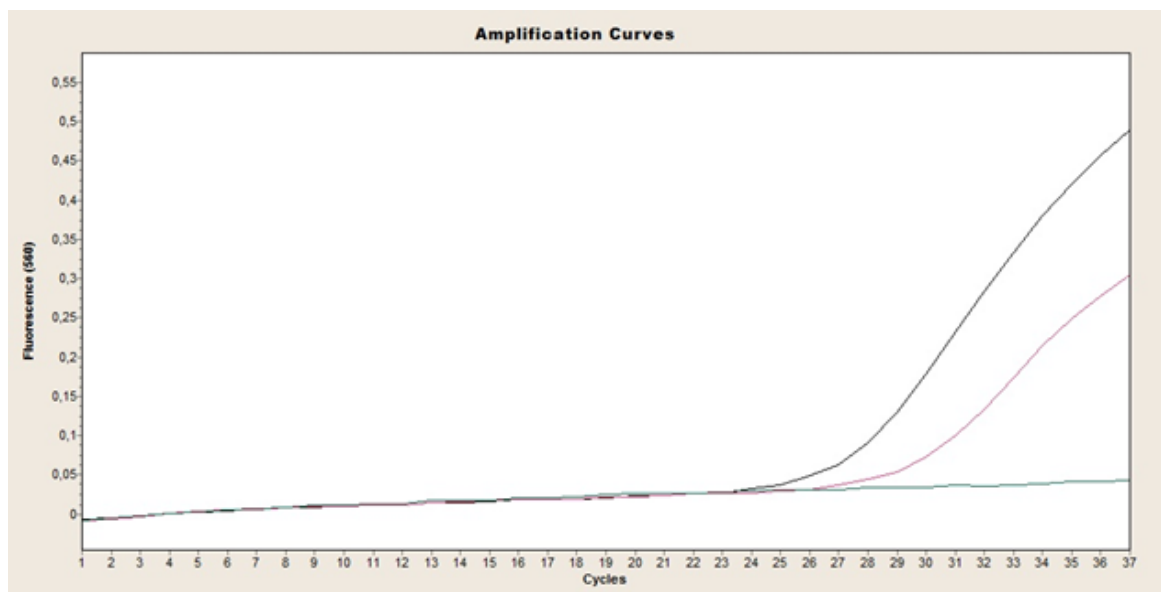


Die folgenden Abbildungen zeigen typische Beispiele für das mit dem LightCycler® durchgeführte GSTT1-Experiment: **blaue Kurve** - negative Kontrolle, **lila Kurve** - homozygote Wildtyp- oder heterozygote Deletion, **schwarze Kurve** - homozygote Deletion.

FAM (530 nm, grün) - Vorhandensein eines Gens (Wildtyp)



YAK (560nm, gelb) - Interne Kontrolle



Das Kit enthält zwei Positivkontrollen: Positivkontrolle - GST-M1 / T1 WT (**rot**), die eine Wildtyp-DNA für das GSTM1- und das GSTT1-Gen enthält, und Positivkontrolle - GST-M1 / T1 Del (**orange**), die eine DNA mit homozygoter Deletion für die Gene GSTM1 und GSTT1 enthält.

10 Troubleshooting

Problem	Lösung
Keine oder schwache Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben	Überprüfung des PCR Programms des Real-Time-PCR-Systems und Wiederholung der Analyse mit dem korrigierten Protokoll.
	Der Detection Mix wurde mehr als zwei Gefrierzyklen unterzogen oder wurden länger als vier Tage bei 2-8 °C gelagert. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Detection Mix.
	Die Qualität der Ausgangs-DNA ist nicht ausreichend. Nutzen Sie frisch extrahierte DNA und bestimmen Sie die Konzentration/Reinheit vor der Nutzung.
	Der Detection Mix wurde nicht vor Lichteinwirkung geschützt. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuen PCR Reagenzien.