

Elucigene[®] AAT

Bestellnummer: AA002B2

Elucigene[®] ist ein Warenzeichen von Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[™] ist ein Warenzeichen von AstraZeneca UK Ltd.

NuSieve[®] ist ein Warenzeichen von Lonza. AmpliTaq Gold[®] ist ein Warenzeichen von Roche Molecular Systems Inc.

Elucigene Kits werden von Gen-Probe Life Sciences Ltd. gemäß ISO9001:2008 und ISO13485:2003 akkreditierter Qualitätssysteme entwickelt und hergestellt.

Hersteller:

Gen-Probe Life Sciences Ltd.
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Vertrieb, Kundendienst und Technischer Kundendienst:

T: +49 (0) 6122 7076451

F: +49 (0) 6122 7076155

E: customerservice@gen-probe.eu

E: technicalsupport@gen-probe.eu



Elucigene[®] AAT

Bestellnummer: AA002B2 – 50 Tests

Verwendungszweck

Zum qualitativen simultanen *In-vitro* Nachweis der PI*S und PI*Z Allele des menschlichen Alpha-1-Antitrypsin (AAT) Gens in aus Vollblut (mit EDTA konserviert) oder Trockenblutproben extrahierter DNA.

Zusammenfassung und Erläuterung

Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Mangel ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, die praktisch nur bei Kaukasiern europäischer Abstammung auftritt und die häufigste genetisch bedingte Ursache für Lebererkrankungen bei Kindern ⁽¹⁾ und von Lungenemphysem bei Erwachsenen ⁽²⁾ darstellt.

Alpha-1-Antitrypsin (AAT) ist ein Serinproteaseinhibitor (PI) in der Blutbahn, der vom PI-Locus (HUGO-Symbol; SERPINA1) auf Chromosom 14q kodiert wird und die Aktivität proteolytischer Enzyme und primär der Neutrophilen-Elastase insbesondere in den unteren Atemwegen hemmt. Ein AAT-Mangel führt zu einer erhöhten Aktivität der Neutrophilen-Elastase in der Lunge und dadurch bedingt zu einer Schädigung der Alveolarwand. Die Folge ist die Entwicklung von chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), die unter den klinischen Manifestationen bei AAT-Mangel die höchste Prävalenz aufweist. Bereits im Kindesalter können Symptome von Leberanomalien auftreten. ^(3,4) Bei Nichtrauchern mit AAT-Mangel treten die ersten Symptome der Lungenerkrankung durchschnittlich in einem Alter von 45 Jahren auf, bei Rauchern bereits mit 35 Jahren. Bei AAT-defizienten Rauchern verläuft der Abbau von Lungengewebe außerdem erheblich schneller als bei Nichtrauchern und die Überlebensrate ist schlechter. ⁽⁵⁾

Aktuelle Tests auf AAT-Mangel beinhalten im Allgemeinen einen automatisierten biochemischen Routinescreeningtest zur Identifizierung von Patienten mit niedriger AAT-Glykoproteinkonzentration im Serum. Anschließend wird eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt, um Proteinvarianten aufzutrennen und zu identifizieren. Unter den zahlreichen identifizierten Varianten des AAT-Gens verursachen nur relativ wenige einen schweren AAT-Mangel. Es gibt drei Hauptvarianten – M, Z und S. Die M-Variante ist normal und wird in Subtypen klassifiziert. Die Varianten Z und S sind die Folge von Punktmutationen im AAT-Gen und mit einer Reduzierung der AAT-Plasmaspiegel verbunden, das Z-Protein weist darüber hinaus eine Funktionsanomalie auf.

Bei Kaukasiern liegt ein AAT-Mangel bei etwa 1 von 2500 Personen vor. In den USA sind dies rund 70.000 bis 100.000 Menschen und auch die Zahl der Betroffenen in Europa ist erheblich. ⁽⁶⁾

Mit einer Trägerhäufigkeit bei Kaukasiern von 0,3-4% bzw. 0,6-11% machen die Varianten PI*Z und PI*S die Mehrzahl der Fälle von AAT-Mangel aus. ⁽⁷⁾ Elucigene AAT ist ein einfacher robuster Labortest für den Routinenachweis von PI*Z und PI*S. Die Methodologie ist schnell und direkt und bringt leicht auswertbare Ergebnisse hervor. Der Test liefert Genotypinformationen, anhand derer eine Person eindeutig als heterozygot (d. h. eine Kopie besitzend) oder homozygot (d. h. zwei Kopien besitzend) in Bezug auf die PI*Z und PI*S Allele identifiziert werden kann.

Testprinzip

Die Methode des Elucigene AAT-Tests basiert auf dem Amplification Refractory Mutation System (ARMS), einer allelspezifischen PCR-Amplifikationstechnologie, mit der Punktmutationen oder kleine Deletionen in Desoxyribonukleinsäure (DNA) nachgewiesen werden können. ⁽⁸⁾ Der Test enthält zwei komplementäre Reaktionsgemische. Das erste Reaktionsgemisch amplifiziert spezifisch alle AAT-Allele, die nicht von der S- und der Z-Mutation betroffen sind, d. h. den Wildtyp. Das zweite Reaktionsgemisch enthält dagegen Primer, die spezifisch nur die S- und Z-Allelmutanten amplifizieren. Jedes Reaktionsgemisch enthält außerdem Primer zur Amplifizierung von Nicht-AAT-DNA-Sequenzen als interne Amplifikationskontrolle des Tests zur Bestätigung einer erfolgreichen Amplifikation. Die amplifizierten Produkte (Amplikons) der beiden Reaktionen werden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, wobei das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Banden im Gel den Status der PI*S und PI*Z Allele anzeigt.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

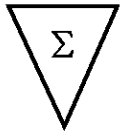
1. *In-vitro*-Diagnostikum.
2. Die in diesem Kit enthaltene DNA-Kontrolle ist menschlicher Herkunft und hat sich in unabhängigen Tests auf PCR-Basis als negativ auf Hepatitis B-Virus (HBV), Hepatitis C-Virus (HCV) und das Humane Immundefizienzvirus 1 (HIV1) erwiesen.
3. Bei der Arbeit mit Humanmaterial vorsichtig vorgehen. Alle Proben sind als potenziell infektiös zu betrachten. Keine Testmethode kann das Vorhandensein von HBV, HCV, HIV 1 oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen. Die Handhabung der Proben und Testkomponenten, sowie deren Gebrauch, Lagerung und Entsorgung muss gemäß der durch nationale Richtlinien und Verordnungen definierten Verfahren für infektiöses Material erfolgen.
4. Alle Komponenten bei unter -20 °C aufbewahren. Sofern keine Aufteilung in Aliquots erfolgt, 3 Monate nach dem Öffnen entsorgen.
5. Im Einklang mit der aktuellen guten Laborpraxis sollten Labore eigene interne Qualitätskontrollproben bekannten Genotyps in jedem Assay mitführen, damit die Validität des Verfahrens beurteilt werden kann.
6. Reagenzien aus verschiedenen Kitchargen oder verschiedener Hersteller nicht gegeneinander austauschen oder mischen.

Symbole auf den Etiketten

Die Symbole, die auf allen Etiketten und Verpackungen verwendet werden, entsprechen dem harmonisierten Standard EN980.



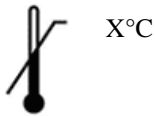
Hersteller



Anzahl der Tests



Gebrauchsanweisung beachten



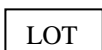
Unterhalb der angegebenen Temperatur lagern



Nicht mehr nach dem angegebenen Datum verwenden



Bestellnummer



Los- oder Chargennummer

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Die Reagenzien sollten in einer Umgebung, die frei von kontaminierenden DNA- und PCR-Produkten ist, aufbewahrt werden.

Reagenzien nach dem auf dem Etikett angegebenen Datum nicht mehr verwenden. Alle Reagenzien werden in gebrauchsfertigem Zustand geliefert. Verschlussene und geöffnete Reagenzien bei -20 °C lagern. Geöffnete Reagenzien können bis zu 3 Monate aufbewahrt werden.

Das mitgelieferte Material reicht für 50 Tests aus:

1. 2 Gefäße x 450 µl Primergemisch A (TA) mit speziellen Primern für die Amplifikation von S- und Z-mutationsfreien Allelen, Kontrollprimern und Desoxynukleotidtriphosphaten in Puffer. (AA002TA)
2. 2 Gefäße x 450 µl Primergemisch B (TB) mit speziellen Primern für die Amplifikation von Allelen mit vorhandenen S- oder Z-Mutationen, Kontrollprimern und Desoxynukleotidtriphosphaten in Puffer. (AA002TB)
3. 1 Gefäß x 600 µl Loading-Farbstoff (LD). (CR000TR)
4. 1 Gefäß x 200 µl Verdünnungspuffer (DB). (CR000TV)
5. 1 Gefäß x 50 µl DNA-Kontrolle (DC), die im Elucigene AAT als heterozygot für die S-Mutation nachgewiesen wurde. (CR002TX)

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Labor-Verbrauchsmaterial - Handschuhe Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss; Pipettenspitzen; dünnwandige 0,2 ml oder 0,5 ml PCR Gefäße (2 verschiedenfarbige Gefäße erleichtern die Unterscheidung der Primergemische).

DNA-Isolierung - Steriles entionisiertes Wasser guter Qualität; Natriumchlorid (NaCl); Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz; Natriumhydroxidpellets (NaOH); 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris-Base) kristallisiert; Salzsäure 36%, spez. Gew. 1,18 (HCl); Ammoniumchlorid (NH₄Cl).

PCR-Amplifikation - Sigma leichtes weißes Mineralöl;* steriles destilliertes Wasser guter Qualität; AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Elektrophorese - Materialien für die Gelelektrophorese: NuSieve[®] 3:1 Agarose (Lonza); 50 Base-Pair Ladder (GE Healthcare); Ethidiumbromid.

* Zur Amplifikation in 0,5 ml PCR Gefäßen oder Thermocyclern ohne beheizte Deckel

Erforderliche Ausrüstung

Laboraüstung - Präzisionspipetten (2 Sets: je 1 zur Verwendung vor bzw. nach der Amplifikation: vorzugsweise Pipetten mit Direkt-Verdrängungsprinzip); Glasware; Schutzkleidung; Vortexmixer; Mikrozentrifuge; Waage; Gefäßständer.

DNA-Isolierung - Heizblock (Erwärmung auf 100 °C).

Amplifikation - Thermocycler für 0,5 ml oder 0,2 ml gefäße (Temperaturgenauigkeit +/-1 °C zwischen 33 °C und 100 °C und statische Temperaturgleichheit +/-1 °C), beheizter Deckel optional.

Elektrophorese - Horizontaler Submarine-Geltrog; Stromaggregat; Mikrowelle; Wasserbad für die Agarosekühlung; UV-Transilluminator; Fotoausrüstung.

Entnahme und Lagerung der Proben

Es müssen Vollblut- (EDTA) oder Trockenblutproben verwendet werden.

Wie gelegentlich beobachtet, können sich Probenentnahnehilfen nachteilig auf die Unversehrtheit bestimmter Analyte auswirken und einige Verfahrenstechnologien beeinträchtigen.⁽⁹⁾ Es wird daher jedem Anwender empfohlen, sicherzustellen, dass das gewählte Instrument gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wird und dass Probenentnahnehilfen und alternative DNA-Präparationsmethoden mit diesem Test kompatibel sind.

Blutproben sollten vor der Aufbereitung der DNA bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

DNA-Isolierung aus Vollblutproben (EDTA)

1. 80 µl von jeder Blutprobe in ein Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss pipettieren.
2. In jedes Gefäß 320 µl der 170 mM (9,09 g/l) NH₄Cl-Lösung pipettieren.
3. 20 Minuten durch leichtes Schwenken und Kippen mischen. Kräftiges Schütteln und Schaumbildung vermeiden.
4. Jedes Gefäß 2 Minuten lang bei 12.000 x g zentrifugieren, bis sich ein Zellpellet gebildet hat.
5. Den Überstand mit einer Pipette abnehmen und verwerfen.
6. In jedes Gefäß 300 µl von 10 mM (0,58 g/l) NaCl/10 mM (3,72 g/l) EDTA pipettieren und die Zellen durch Mischen auf dem Vortex resuspendieren.
7. Jedes Gefäß 1 Minute lang bei 12.000 x g zentrifugieren, bis sich ein Zellpellet gebildet hat.
8. Schritte 5 bis 7 mindestens noch zweimal wiederholen, bis keine rote Färbung mehr im Überstand sichtbar ist.
9. Den Überstand mit einer Pipette abnehmen und verwerfen.
10. In jedes Gefäß 200 µl der 50 mM (2g/l) NaOH-Lösung pipettieren und die Zellen durch Mischen auf dem Vortex resuspendieren.
11. Im Heizblock 10 Minuten lang bei 100 °C inkubieren.
12. In jedes Gefäß 40 µl von 1 M (121,1 g/l) Tris-Base/HCl (pH 7,5) pipettieren und auf dem Vortex mischen.

13. 1 ml steriles entionisiertes Wasser in jedes Mikrozentrifugenröhrchen geben, sodass ein Gesamtvolumen der DNA-Probe von 1,24 ml vorliegt.
14. Jedes Gefäß 1 Minute lang bei 12.000 x g zentrifugieren, bis sich ein Pellet aus den Zelltrümmern gebildet hat. Die DNA ist im Überstand enthalten.

DNA-Isolierung aus Trockenblutproben

1. Aus der Probenkarte 2 x 3 mm Plättchen^(b) in ein 1,5 ml Gefäß mit Schraubverschluss drücken.

Die Spots müssen aus einem komplett mit Blut gesättigten Bereich der Karte stammen.

Vorab mehrere „saubere“ Plättchen herausdrücken und werfen, um einen Verschleppungseffekt zu vermeiden.

2. 1 ml 10 mM (0,58 g/l) NaCl/10 mM (3,72 g/l) EDTA zugeben und auf dem Rotationsmixer 15 bis 20 Minuten mischen. Wenn kein Rotationsmixer zur Hand ist, können die Waschschriffe jeweils auf 30 Minuten ausgedehnt werden.
3. Waschlösung entnehmen und entsorgen.
4. Schritte 2 und 3 nochmals wiederholen.
5. Danach sollte der Großteil des Häm aus den Plättchen herausgelöst sein. Eine ausgebleichene rotbraune Färbung der Blutspots ist bei diesem Schritt häufig.
6. Kurz zentrifugieren (3 Sekunden), um verbliebene Waschlösung auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln. Mit einer Pipette soviel Waschlösung wie möglich entfernen und werfen, ohne die Spots zu beschädigen.
7. Diese kurze Zentrifugierung entfernt normalerweise weiteres Häm aus den Blutspots.
8. In jedes Gefäß 150 µl 50 mM (2 g/l) NaOH pipettieren. Zum Mischen mit dem Finger vorsichtig an das Gefäß schnippen.
9. In einem Heizblock 10 Minuten bei 100 °C inkubieren.
10. Kurz zentrifugieren, um Überstand auf dem Boden des Gefäßes zu sammeln.
11. Zum Neutralisieren in jedes Gefäß 30 µl 1 M (121,1 g/l) Tris-Base/HCl (pH 7,5) pipettieren und sorgfältig mischen.
12. In jede DNA-Probe 420 µl steriles entionisiertes Wasser geben, um ein Gesamtvolumen von 600 µl herzustellen.
13. Proben gut mischen und durch Zentrifugieren in der Mikrozentrifuge auf dem Gefäßboden sammeln.

^(b) Die Gesamtgröße der verwendeten Blutprobe muss mindestens einer 2 x 3 mm Trockenblutprobe entsprechen. Es können z.B. auch 1 x 6 mm Plättchen verwendet werden.

14. Überstand in ein neu etikettiertes Gefäß mit Schraubverschluss transferieren.

15. Extrahierte DNA bei -20 °C aufbewahren.

Die oben beschriebenen Verfahren der DNA-Isolierung werden von Gen-Probe Life Sciences Ltd. empfohlen und haben nachweislich zu einheitlichen und zuverlässigen Ergebnissen geführt. DNA, die mit anderen Verfahren oder aus anderen Probenarten isoliert wird, kann u.U. nicht ideal für den Elucigene AAT-Test sein und zu suboptimalen Ergebnissen führen. Die Hauptkriterien für alternative Verfahren der DNA-Isolierung sind die optimale DNA-Konzentration und das Fehlen von PCR-Hemmern.

Es wird empfohlen, alternative Verfahren und Probenarten auf die Verwendung mit dem Elucigene AAT-Test gründlich zu prüfen, bevor die Ergebnisse für diagnostische Zwecke genutzt werden. Tests von DNA-Proben mit Konzentrationen <10 ng/5 µl werden nicht empfohlen. Unter idealen PCR-Bedingungen werden mit DNA-Konzentrationen zwischen 10 und 100 ng/5 µl einheitliche Ergebnisse erzielt.

Testdurchführung

Amplifikationsverfahren

Die in den Tabellen 1 und 2 enthaltenen Zahlen können für eine größere Anzahl von Tests proportional erhöht werden. Da nur kleine Mengen erforderlich sind, empfiehlt, Gen-Probe Life Sciences Ltd. die gleichzeitige Durchführung von mindestens 5 Tests.

1. Den Thermocycler auf eine 20-minütige Vorstufe bei 94 °C zur Aktivierung von AmpliTaq Gold in Verbindung mit einem zyklischen Amplifikationsprogramm (35 Zyklen) von 30 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung), 1 Minute bei 62 °C (Annealing) und 1 Minute bei 72 °C (Extension) programmieren. Zusätzlich muss eine 10-minütige Verlängerung der Extension bei 72 °C im letzten Zyklus eingegeben werden.

Hinweis: Für eine PCR in 0,5 ml Gefäßen am Thermocycler die Option „Block“ wählen.

2. Gefäße mit Primergemisch A (TA) und B (TB), AmpliTaq Gold (nicht im Lieferumfang enthalten), Loading-Farbstoff (LD) und Verdünnungspuffer (DB) auftauen und 10 Sekunden lang bei 12.000 x g zentrifugieren, vorsichtig mit dem Vortexmischer mischen und noch einmal 10 Sekunden lang zentrifugieren.

Hinweis: Schritt 3 - 5 müssen in einem DNA-freien Bereich durchgeführt werden.

3. Entsprechend der Tabelle 1 eine ausreichende Verdünnung von AmpliTaq Gold (nicht im Lieferumfang enthalten) mit mitgeliefertem Verdünnungspuffer und sterilem destilliertem Wasser für die zu testenden Proben und Kontrollen vorbereiten. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.

Tabelle 1. Verdünnung von AmpliTaq Gold in Verdünnungspuffer

| | Anzahl der erforderlichen Tests | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 |
| Steriles destilliertes Wasser (µl) | 42 | 84 | 126 | 168 |
| Verdünnungspuffer (µl) | 12 | 24 | 36 | 48 |
| Loading-Farbstoff (µl) | 60 | 120 | 180 | 240 |
| AmpliTaq Gold (µl) | 6 | 12 | 18 | 24 |
| Gesamtvolumen (µl) | 120 | 240 | 380 | 480 |

- Entsprechend Tabelle 2 Reaktionsgemische A und B herstellen. Aus Primergemisch A ein passendes Aliquot entnehmen und in ein beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen geben. Mit Primergemisch B und einem zweiten beschrifteten Gefäß wiederholen. Unter Verwendung verschiedener Pipettenspitzen die jeweils erforderliche Menge AmpliTaq Gold Verdünnung (aus Schritt 3) in jedes Mikrozentrifugenröhrchen geben. Mit dem Vortex vorsichtig mischen und bei 12.000 x g für 10 Sekunden zentrifugieren.

Tabelle 2. Herstellung der Reaktionsgemische A und B

| | Anzahl der erforderlichen Tests | | | | | | | |
|-----------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 10 | | 20 | | 30 | | 40 | |
| | A | B | A | B | A | B | A | B |
| Primergemisch A (µl) | 165 | | 330 | | 495 | | 660 | |
| Primergemisch B (µl) | | 165 | | 330 | | 495 | | 660 |
| Verdünntes Enzym (µl) | 55 | 55 | 110 | 110 | 165 | 165 | 220 | 220 |
| Gesamtvolumen (µl) | 220 | 220 | 440 | 440 | 660 | 660 | 880 | 880 |

- Für jede Probe und Kontrolle jeweils ein Gefäß mit „A“ und eines mit „B“ beschriften oder, falls bunte Gefäße verwendet werden, für jedes Primergemisch ein andersfarbiges Gefäß verwenden.
- Jeweils 20 µl des hergestellten Reaktionsgemisches A auf den Boden der entsprechenden Zahl der mit „A“ beschrifteten PCR-Gefäße pipettieren. Dasselbe mit Reaktionsgemisch B und der entsprechenden Zahl der mit „B“ beschrifteten PCR-Gefäße wiederholen.
- Jeweils 5 µl jeder Test-DNA oder DNA Kontrolle (DC) in jedes Paar von A- und B-Gefäßen geben und dabei jedes Mal eine neue Pipettenspitze verwenden. Einen Tropfen Sigma leichtes weißes Mineralöl hinzufügen, um die wässrige Phase zu bedecken.* Fest verschließen.
- Für die Negativkontrolle keine DNA in das A- und B-Gefäßepaar geben. Einen Tropfen Sigma leichtes weißes Mineralöl hinzufügen, um die wässrige Phase zu bedecken.* Fest verschließen.
- Die A- und B-Gefäße bei 12.000 x g für 10 Sekunden zentrifugieren.
- Alle Gefäße fest im Block des Thermocyclers platzieren. Die 94 °C-Vorstufe, gefolgt vom zyklischen Amplifikationsprogramm, starten.
- Unbenutzte AmpliTaq Gold Verdünnung sowie die zubereiteten A- und B-Reaktionsgemische verwerfen.
- Nach Beendigung des zyklischen Amplifikationsprogramms können die Proben entweder bei Raumtemperatur über Nacht oder bis zu 7 Tage lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden, bevor die Gelelektrophorese durchgeführt wird.

*Zur Amplifikation in 0,5 ml PCR-Gefäßen oder Thermocyclern ohne beheizten Deckel

Gelelektrophorese

Dem Anwender wird empfohlen, sicherzustellen, dass die gewählte Ausrüstung gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wird und mit diesem Test kompatibel ist. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Gelmatrix und die Abmessungen des Kamms zu überprüfen. Die Ergebnisse wurden unter folgenden Elektrophorese-Bedingungen erzielt:

1. Die Elektrophorese des PCR-Produkts erfolgte in einem 3%igen NuSieve® 3:1 Agarosegel unter Verwendung von Trisborat und Ethidiumbromid (TBE/EtBr) als Laufpuffer. TBE/EtBr wurde als 134 mM (16,2 g/l) Tris-Base, 74,9 mM (4,63 g/l) Borsäure, 2,55 mM (0,95 g/l) EDTA-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt.
2. 3 g NuSieve® 3:1 wurden in 100 ml TBE/EtBr gelöst und in einen 15 x 12 cm horizontalen Geltrog mit 1,5 mm x 5 mm Zahnkamm (1 mm über dem Boden) gegossen.
3. 15 µl des PCR-Produkts (mit dem während der PCR-Vorbereitung zugegebenen Loading-Farbstoff) wurden auf ein Gel aufgetragen.
4. Neben den Proben wurde eine 50 Base-Pair Ladder (GE Healthcare) als Molekulargewichtsmarker verwendet.
5. Die Elektrophorese wurde bei 5 bis 6 V/cm zwischen den Elektroden durchgeführt, bis die Farbstofffront 4 cm von den Probenvertiefungen in Richtung Anode gewandert war (1 bis 1,5 Stunden).
6. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einen UV-Transilluminator (bei 260 nm) gelegt und anschließend betrachtet und fotografiert.

Interpretation der Ergebnisse

1. Die Negativkontrolle darf in den Bahnen der Proben in den A- und B-Gefäßen keine Banden im Bereich zwischen 148 Basenpaaren (bp) und 499 bp aufweisen.
2. Die obere und die untere Kontrollbande müssen in jeder zu A- und B-Gefäßepaaren gehörenden Bahn deutlich sichtbar sein. Alle diagnostischen Produktbanden müssen deutlich sichtbar sein und eine ähnliche Intensität wie die Kontrollbanden des jeweiligen Gefäßes aufweisen.
3. Alle Bahnen müssen frei von übermäßigen Schlieren oder Hintergrundfluoreszenz sein.
4. Die Position der oberen und der unteren Kontrollbande muss jeweils das korrekte Molekulargewicht angeben, d.h. 499 und 148 bp.

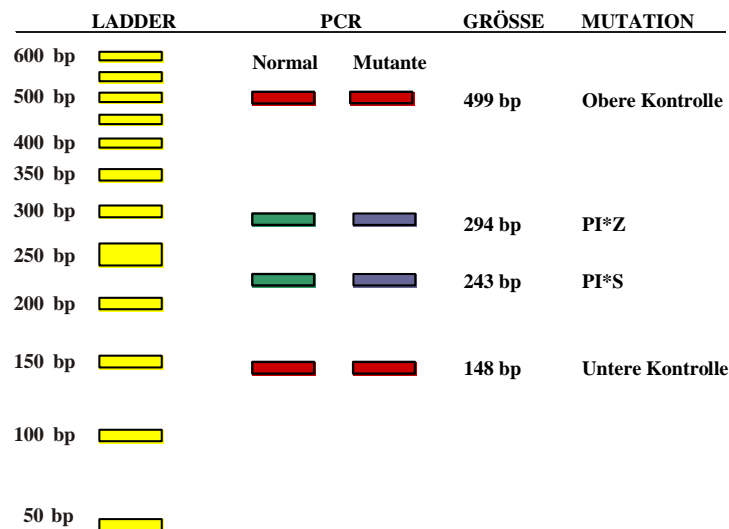
Sind die obigen Kriterien nicht erfüllt, dürfen die Ergebnisse nicht verwendet werden, und der Test muss wiederholt werden.

5. Ein Mensch besitzt zwei Kopien des AAT-Gens. Besitzen diese Kopien an einer bestimmten Stelle die gleiche Sequenz, ist die Person an dieser Stelle homozygot (z.B. PI*ZZ). Unterscheiden sich die Sequenzen der Kopien an einer bestimmten Stelle, ist die Person an dieser Stelle heterozygot.
6. PCR-Produkte der oberen und unteren Kontrollprimer werden in der Bahn des A-Gefäßes als auch in der Bahn der B- Gefäßes jeweils bei 499 bp bzw. 148 bp als Bande sichtbar.
7. PCR-Produkte einer Person ohne PI*S- oder PI*Z-Allel werden an den in Abbildung 1 gezeigten Positionen jeweils als Banden sichtbar.
8. PCR-Produkte einer Person mit PI*Z-Allel werden jeweils in der Bahn der B-Gefäße des Gels als Bande bei 294 bp sichtbar. PCR-Produkte einer Person ohne PI*Z-Allel werden jeweils als Bande in der benachbarten Position der Bahn des A-Gefäßes angezeigt. Daraus folgt, dass PCR-Produkte eines PI*Z-Heterozygoten sowohl in der Bahn des A-Gefäßes als auch in der Bahn der B- Gefäßes als Bande bei 294 bp sichtbar werden.
9. PCR-Produkte einer Person mit PI*S-Allel werden jeweils in der Bahn der B-Gefäße als Bande bei 243 bp sichtbar. PCR-Produkte einer Person ohne PI*S-Allel werden jeweils als Bande in der benachbarten Bahn des A-Gefäßes angezeigt. Daraus folgt, dass PCR-Produkte eines PI*S-Heterozygoten sowohl in der Bahn des A- Gefäßes als auch in der Bahn der B- Gefäßes als Bande bei 243 bp sichtbar werden.
10. Mit dem Elucigene AAT ist es möglich, PI*SZ-Heterozygote nachzuweisen.

Hinweis: Bei Verwendung des Primers zur Amplifikation des Normalallels der Z-Mutationsstelle können PI*ZZ-Proben eine geringe Menge an PCR-Produkt hervorbringen. Dieses Artefakt kann in der Gelbahn von Gefäß A vorhanden sein, wenn nicht die optimierten und in der Produktliteratur empfohlenen PCR-Bedingungen eingehalten wurden.

Abbildung 1 zeigt in einem Diagramm die Größe (in Basenpaaren) und die relative Position der PCR-Produkte in einem Gel, wie sie beim normalen AAT-Genotyp (ohne S- oder Z-Mutation) unter Verwendung von Elucigene AAT zu erwarten sind.

Abbildung 1



Leistungsmerkmale

Die im Beipackzettel empfohlene Methode arbeitet nachweislich auf dieselbe Weise, wie eine vorangegangene mit zweihundert EDTA-Blutproben validierte Methode, die in einer internen 'Blindstudie' unter Verwendung von Elucigene AAT getestet wurde. Jedes Ergebnis für die PI*S und PI*Z Allele wurde durch eine alternative Methode überprüft. Die Ergebnisse waren übereinstimmend. Von den 200 getesteten Individuen waren 179 normal (ohne S- oder Z-Mutation), 15 waren PI*S-heterozygot und 6 waren PI*Z-heterozygot. Alle DNA-Proben konnten erfolgreich amplifiziert werden, kein Test musste wiederholt werden.

Grenzen des Verfahrens

1. Die Ergebnisse, die mit diesem oder anderen diagnostischen Reagenzien erzielt werden, sollten nur im Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtbild verwendet und ausgewertet werden. Gen-Probe Life Sciences Ltd übernimmt keine Verantwortung für klinische Entscheidungen.
2. Es muss beachtet werden, dass der Genotyp eines Organempfängers nach Lebertransplantation (aufgrund des AAT-Mangels) nicht mehr mit dem scheinbaren Phänotyp übereinstimmt.
3. Wie bei jedem Gentest können durch Blutproben, die im Anschluss an eine kürzliche Bluttransfusion entnommen wurden, fehlerhafte Ergebnisse entstehen.
4. Das Nichtvorhandensein der zwei, durch diesen Test nachweisbaren Mutationen schließt das Vorliegen anderer Varianten des AAT-Gens nicht aus.

Der Anwender dieser Reagenzien sollte diese Hinweise in seinem Bericht an die verantwortlichen Arzt oder Genetiker besonders hervorheben.

Literaturangaben

1. Sveger, T. 1988. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr.Scand.* 77:847-851.
2. Eriksson, S. 1964. Pulmonary emphysema and alpha-antitrypsin deficiency. *Acta Med.Scand.* 175:197-205.
3. Brantly, M., Nukiwa, T., and Crystal, R.G. 1988. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am.J.Med.* 84 (suppl. 6A):13-31.
4. Crystal, R.G., Brantly, M.L., Hubbard, R.C., Curiel, D.T., States, D.J., and Holmes, M.D. 1989. The alpha-antitrypsin gene and its mutations: Clinical consequences and strategies for therapy. *Chest* 95:196-206.
5. Silverman, E.K., Pierce, J.A., Province, M.A., Rao, D.C., and Campbell, E.J. 1989. Variability of pulmonary function in alpha-1-antitrypsin deficiency: Clinical correlates. *Ann.Intern.Med.* 111:982-991.
6. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the Diagnosis and Management of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency - *Am J Respir Crit Care Med* Vol 168. pp 818–900, 2003
7. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest* 2002; 122: 1818–1829
8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).