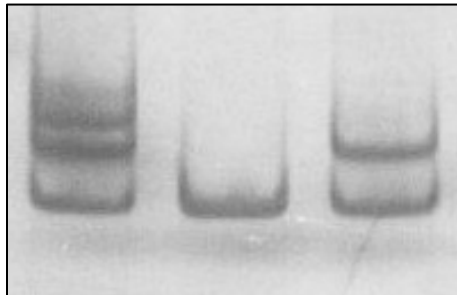




CYP 2C9 A1075C – CYP2C9*3

Sistema para la detección de la mutación A1075C en el gene del citocromo P450 2C9.



Valdense 3616. 11700. Montevideo. Uruguay.
Teléfono (598) 2 336 83 01.
Fax (598) 2 336 71 60.
Info@atgen.com.uy
www.atgen.com.uy



Uso exclusivo en investigación.

Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar.

La compra de este producto no incluye ni proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas.

Utilidad del Kit

El kit de ATGen analiza el polimorfismo puntual en la posición 1075 (A1075C) del gene que codifica para el citocromo P450 CYP2C9 (alelo cyp2C9*3).

Principio de Ensayo

El análisis para detección de la mutación A1075C en gene cyp2C9 (alelo cyp2C9*3) involucra una amplificación por PCR del segmento que contiene la mutación. Sobre el producto de amplificación se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante digestión con una enzima de restricción (RFLP).

Existen tres posibles resultados:

- Homocigota AA, cuando no se detecta la mutación A1075C en ninguno de los dos alelos del gen.
- Heterocigota AC, cuando se detecta la mutación A1075C en uno de los dos alelos del gen.
- Homocigota CC, cuando se presenta la mutación en ambos alelos.

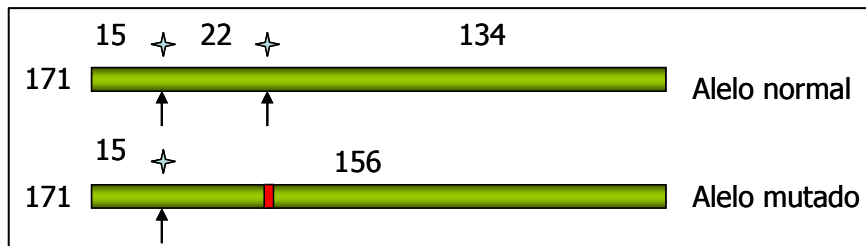
Introducción

El citocromo P450 (CYP) 2C9 es una monooxigenasa que hidroxila alrededor del 16% de las drogas de uso corriente. Metaboliza distintos xenobióticos, incluidos la S-warfarina, tolobutamida y fenitoína, las cuales pueden presentar dificultades de ajuste de dosis o toxicidad, si hay se encuentra alterada la actividad de CYP2C9.

Se han identificados polimorfismos de cambio de un nucleótido en el gen de CYP2C9 que determinan fenotipos metabólicos sustentando las diferencias interindividuales y étnicas. Aparte de la proteína salvaje CYP2C9*1, existen al menos cinco variantes alélicas que producen aloenzimas con reducida o deficiente actividad metabólica. Entre las poblaciones caucásicas solo las variantes CYP2C9*2 y CYP2C9*3 son significativas, con frecuencias alélicas de 0.08-0.14 y 0.04-0.016, respectivamente. Ha sido descrito que las enzimas codificadas por las variantes alélicas CYP 2C9*2 (sustitución C430T a nivel del ADN, R144C en la proteína) y CYP 2C9*3 (sustitución A1075C en el ADN, I359L en la proteína) presentan una efectividad muy reducida con respecto a la hidroxilación in vitro de la warfarina.



Estrategia experimental:



Presentación del kit

Color que identifica al kit : Gris oscuro

El kit de ATGen para CYP2C9*3 incluye:

- 1 tubo CYP2C9*3 Mezcla de Reacción.
- 1 tubo CYP2C9*3 Enzima de Restricción.
- 1 tubo CYP2C9*3 ADN control positivo, conteniendo ADN control heterocigota (una vez descongelado se recomienda guardar a 4 °C).
- 1 tubo CYP2C9*3 Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo CYP2C9*3 Peso Molecular, el cual presenta el producto de amplificación y todas las bandas posibles de digestión. Este tubo debe mantenerse dentro de la zona post-amplificación si es posible.

Todos los reactivos incluidos en el kit CYP2C9*3 están en solución líquida. Los kits se comercializan en formato de 20 o 50 reacciones.

Materiales necesarios y no suministrados

- Acrilamida, buffer de electroforesis y buffer de carga.
- Contenedor para descarte con bioseguridad.
- Fuente y cubeta de electroforesis vertical.
- Guantes y túnica.
- Pipetas adecuadas.
- Puntas de pipeta (tips) con filtro.
- Sistema de tinción de geles con nitrato de plata.
- Termociclador.
- Tubos de PCR libres de ADN.
- Vortex.

Precauciones

1. Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
2. Todas las muestras, reactivos y controles pueden tener potencialmente riesgo biológico.
3. No utilizar después de la fecha de caducidad.



Condiciones de almacenamiento

El Kit se conserva a -20 °C, para asegurar un óptimo funcionamiento hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase.



Características de la muestra

La muestra necesaria para realizar el diagnóstico es una solución de ADN con una concentración entre 50 y 100 ng/ul, apta para amplificación por PCR. ATGen recomienda el uso del kit ADN Fácil para muestras de sangre.

Instrucciones de uso

Zona de preamplificación:

Descongelar la mezcla de reacción y luego agitar vigorosamente en vortex. Si es posible realizar todas las manipulaciones en frío.

Preparación de la mezcla para la amplificación:

1. Utilizar por cada muestra a analizar 18 µl de la mezcla de reacción.
2. Agregar 1 µl de Taq ADN polimerasa a la mezcla de reacción por cada muestra a analizar.
3. Agitar moderadamente en vortex o pipetear (homogeneizar correctamente).

Se recomienda para los pasos 1, 2 y 3 realizar una sola mezcla para amplificación que contenga las cantidades necesarias de mezcla de reacción y de Taq ADN polimerasa, según el número de muestras a analizar. Tener en cuenta que es necesario sumar 2 reacciones, una para el control positivo y otra para el control negativo. Realizar esta etapa permite que el resultado del kit tenga validez.

Amplificación:

1. Alicuotar la mezcla para amplificación en tubos de PCR debidamente rotulados colocando 18 µl en cada uno.

Observar que en los pasos previos se planteó un volumen en exceso del 5 %. Si el número de muestras a analizar es mayor que 10 considerar una reacción más como inutilizada en el cálculo de la mezcla para amplificación debido a los errores de pipeteo. Este 10 % está contemplado en los volúmenes que vienen con el kit.

2. En cada tubo agregar 2 µl de muestra.

Las muestras deben contener entre 100 y 200 ng de ADN (se recomienda realizar la extracción de ADN de las muestras con el kit ADN fácil de ATGen). Agregar de la misma forma 2 µl de ADN CYP2C9*3 en el tubo control positivo y 2 µl del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.

3. Iniciar el programa para CYP2C9*3.

Programa: 35 ciclos de 94 °C/0:30'; 58 °C/0:30'; 72 °C/0:30' una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.



4. Colocar los tubos en el termociclador cuando alcance los 94°C.

Una vez que termina el programa y opcionalmente, la amplificación se puede testar por electroforesis en gel de acrilamida al 6% cargando 5 µl del producto. El tamaño esperado de la amplificación es 171 pb.

De no proseguir con el paso 1 del apartado Digestión conservar los tubos a 4 °C hasta su digestión.

Digestión:

1. Luego de terminado el ciclado, permitir que la temperatura descienda hasta la temperatura ambiente y adicionar a cada tubo de amplificación 1 µl de la enzima de restricción.
2. Homogeneizar utilizando la pipeta.
3. Incubar overnight a 37°C.

Obtención de los resultados:

1. Preparar las muestras con la cantidad indicada del buffer de carga adecuado (p. ej. glicerol 30% p/v, azul xilen-cianol 0,25% p/v, azul de bromofenol 0,25% p/v)
2. Cargar 5 ul de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular CYP2C9*3 en gel de acrilamida al 10%.
3. Migrar el colorante azul de bromofenol (del buffer de carga) 8 cm en acrilamida.
4. Teñir con nitrato de plata la acrilamida.



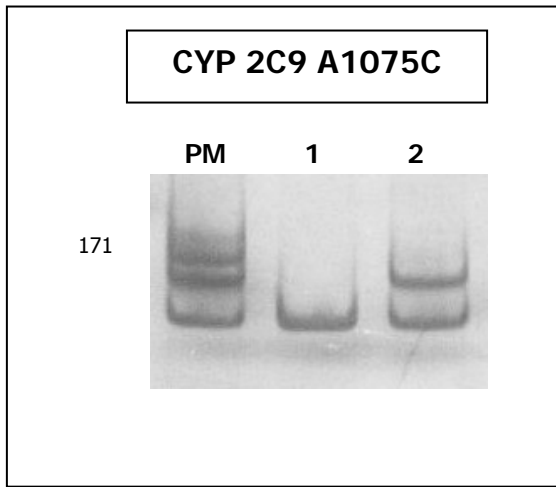
Interpretación de resultados:

Análisis	Homocigota 1075 AA	Heterocigota 1075 AC	Homocigoto 1075 CC
CYP 2C9	134 pb	156 + 134 pb	156 pb

Nota:

La banda correspondiente al producto de amplificación no debe aparecer nunca después de la digestión. Si aparece esta banda de 170 pb (la mas alta del marcador) es que hay digestión parcial.

Ejemplo de la interpretación de resultados



Gel de acrilamida 10 % teñido con nitrato de plata mostrando los posibles resultados:

1. Individuo homocigota AA.
 2. Individuo heterocigota AC. El ADN control debe dar este resultado
- PM. Marcador de peso molecular CYP2C9*3 que presenta la banda de amplificación y todas las bandas posibles de digestión.

Bibliografía:

1. Lancet 1999; 353: 717-719
2. J.A.M.A. 2002; 287: 1690-1698