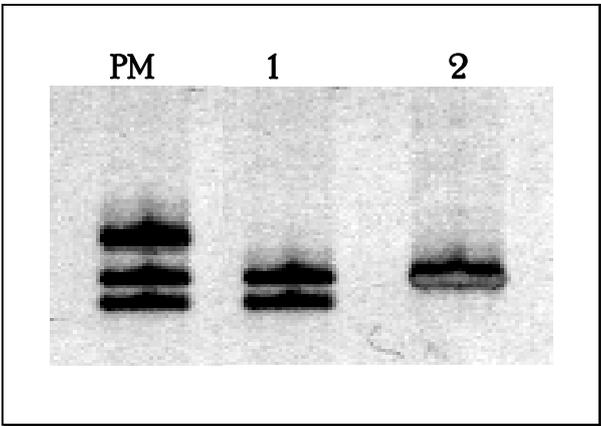




Factor II 20210

Sistema para detección de la alteración G20210A en el gene que codifica para el Factor II de la coagulación humana



Reg. MSP 21201

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 un polimorfismo puntual que involucra un cambio de guanina por adenina en el nucleótido 20210 (G20210A) de la región 3'UT del gene que codifica para el Factor II de la coagulación humana.

Principio de Ensayo

El análisis para detección de la mutación del factor II involucra una amplificación por PCR del segmento 3'UT del gene de la protrombina que contiene el sitio polimórfico. Sobre el producto de amplificación se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante digestión con una enzima de restricción (RFLP).

La enzima de restricción reconoce dos sitios de corte en el fragmento amplificado de un individuo mutado. Cuando se amplifica un alelo normal, un sitio de clivado desaparece y el otro se mantiene. Esta estrategia presenta como ventaja que en la secuencia amplificada siempre existe un sitio control de digestión. Luego de la digestión no debe estar presente el producto de amplificación, lo cual indica una correcta digestión. En el patrón electroforético luego de la digestión se pueden definir una "banda mutada" y una "banda normal".

Introducción: Factor II

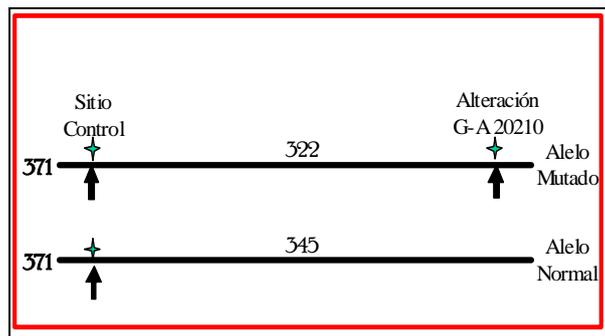
El gene de la protrombina humana (Factor II) se encuentra en el cromosoma 11 en la región 11p11.2 y contiene 622 a.a. La mutación FII 20210G-A genera una ganancia de función con acumulación de ARNm y síntesis de la proteína que explicaría la patogénesis de la trombofilia.¹

1. OMIM*176930 COAGULATION FACTOR II; F2

2 Poort, S. R.; Rosendaal, F. R.; Reitsma, P. H.; Bertina, R. M. : **A common genetic variation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.** *Blood* 88: 3698-3703, 1996.

3 Gehring, N. H.; Frede, U.; Neu-Yilik, G.; Hundsdoerfer, P.; Vetter, B.; Hentze, M. W.; Kulozik, A. E. : **Increased efficiency of mRNA 3-prime end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia.** *Nature Genet.* 28: 389-392, 2001.

Estrategia experimental:



Presentación del kit

Color que identifica al kit : Rojo

El kit de ATGen para la detección de la mutación G20210A incluye:

- 1 tubo FII 20210 Mezcla de Reacción (solución de color rojo).
- 1 tubo FII 20210 Enzima de Restricción.
- 1 tubo FII 20210 ADN control positivo (una vez descongelado se recomienda guardar a 4°C)
- 1 tubo FII 20210 Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo FII 20210 Peso Molecular, el cual presenta 3 bandas: producto de amplificación y las dos bandas posibles de digestión. Este tubo debe mantenerse dentro de la zona post-amplificación si es posible.

Todos los reactivos incluidos en el kit FII 20210 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 150 y 200 ng / μl , apta para amplificación por PCR. ATGen recomienda el uso del kit ADN Fácil para muestras de sangre.

Instrucciones de uso

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 control positivo del kit tenga validez.

Amplificación:

4. 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.

5. En cada tubo agregar 2 μl de muestra.

Las muestras deben contener entre 30 y 50 ng de ADN (se recomienda realizar la extracción de ADN de las muestras con el kit ADN fácil de ATGen).

6. Agregar de la misma forma 2 µl de ADN FII en el tubo control positivo y 2 µl del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.

7. Iniciar el programa para FII.

Programa : 37 ciclos de 94 °C/0:30', 53 °C/0:30', 72 °C/0:30'; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

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

De no proseguir con el paso 8 conservar los tubos a 4 °C hasta su digestión una vez que termina el programa. Opcionalmente, la amplificación se puede testar por electroforesis en gel de acrilamida al 6% cargando 5 µl del producto. El resultado esperado de la amplificación es 371 pb.

Digestión:

9. 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.

10. Homogeneizar utilizando la pipeta.

11. Incubar 2:30 hs a 37°C (se puede incubar overnight) y luego 10 minutos a 65°C

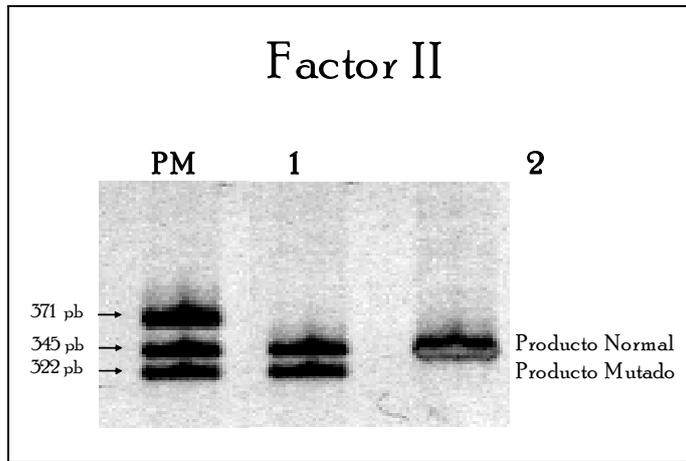
Obtención de los resultados:

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 µl de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular FII 20210 en gel de acrilamida al 6% o 20 µl de cada uno en gel de agarosa al 2% preteñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).
3. Migrar el colorante azul de bromofenol (del buffer de carga) 8 cm en acrilamida o 3,5 cm en agarosa.
4. Teñir con nitrato de plata la acrilamida o visualizar la agarosa al UV.

Interpretación de resultados:

Perfil electroforético	Resultado
345 pb	Homocigota normal
345 + 322 pb	Heterocigota
322 pb	Homocigota mutado

Ejemplo de la interpretación de resultados;



Gel de acrilamida al 6% mostrando los posibles resultados:

- Carril 1. Individuo heterocigota mutado.
(El ADN control debe dar este resultado)
- Carril 2. Individuo normal

Banda de 345 pb = "banda normal"
Banda de 322 pb = "banda mutada"

La banda de 371 pb no debe estar presente si existe una digestión completa.

Bibliografía:

1. OMIM*176930 COAGULATION FACTOR II; F2
2. Poort, S. R.; Rosendaal, F. R.; Reitsma, P. H.; Bertina, R. M. : A common genetic variation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 88: 3698-3703, 1996.
3. Gehring, N. H.; Frede, U.; Neu-Yilik, G.; Hundsdorfer, P.; Vetter, B.; Hentze, M. W.; Kulozik, A. E. : Increased efficiency of mRNA 3-prime end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. Nature Genet. 28: 389-392, 2001.