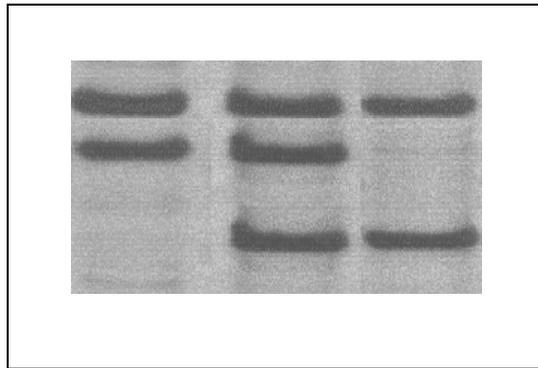




Factor V Leiden

Sistema para detección de la alteración G1691A en el gene que codifica para el Factor V de la coagulación humana



Reg. MSP 21200

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 1691 (G1691A) del gene que codifica para el FV de la coagulación humana.¹

Principio de Ensayo

El análisis requiere una amplificación por PCR de un fragmento del exón X del gene que codifica para el FV de la coagulación humana. 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 normal. Cuando se amplifica un alelo que presenta la mutación desaparece un sitio de clivado y se mantiene el otro. Esta estrategia presenta como ventaja que en la secuencia amplificada siempre existe un sitio control de digestión. En el patrón electroforético luego de la digestión se pueden definir una "banda control", una "banda mutada" y una "banda normal".

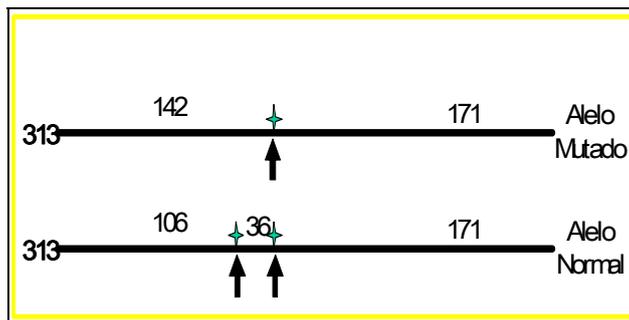
Introducción: Factor V

El Factor V es una glicoproteína de 300 Kd, codificada por el gene F5 que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (locus 1q23) y está compuesto por 25 exones. La mutación conocida como Leiden se produce por sustitución de G por A en el nucleótido 1691 (G1691A), en el exón 10, lo que genera un reemplazo en el aminoácido 506 de la proteína de una Arginina (R) por una Glutamina (Q) (R506Q o alelo Q506). Esta posición es uno de los sitios de clivado por PCa (Proteína C activada) en el factor V normal. El cambio aminoacídico destruye el sitio natural de clivado y limita la degradación del Factor V. Funcionalmente resulta en una resistencia a la PCa, por lo que se pierde el efecto anticoagulante del FV activado. Para revisión ver^{1,2}.

¹. OMIM *227400 FACTOR V DEFICIENCY

². American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing .Wayne W. Grody et al. (ACMG Factor V Leiden Working Group)

Estrategia experimental:



Presentación del kit

Color que identifica al kit : Amarillo

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

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

Todos los reactivos incluidos en el kit FV Leiden 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

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:

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 100 y 200 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 FV Leiden 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 FV Leiden.

Programa: 33 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.

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 313 pb.

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

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

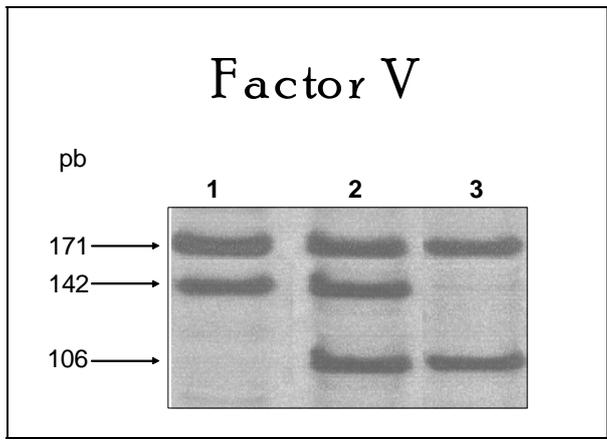
Obtención de los resultados:

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 ul de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular FV Leiden en gel de acrilamida al 6% o 20 ul de cada uno en gel de agarosa al 2% preteñido con bromuro de etidio (0,5 ug/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
142 + 171 pb	Homocigota mutado
36 + 106 + 142 + 171 pb	Heterocigoto
36 + 106 + 171pb	Homocigota normal

Ejemplo de la interpretación de resultados;



Gel de acrilamida al 6% mostrando los posibles resultados:

- Carril 1. Individuo homocigota mutado.
- Carril 2. Individuo heterocigota mutado.
(El ADN control debe dar este resultado)
- Carril 3. Individuo normal

Banda de 171 pb = "banda control"
 Banda de 142 pb = "banda mutada"
 Banda de 106 pb = "banda normal"

La banda de 313 pb no debe estar presente si existe una digestión completa.

Bibliografía:

1. OMIM *227400 FACTOR V DEFICIENCY
2. American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing .Wayne W. Grody et al. (ACMG Factor V Leiden Working Group)