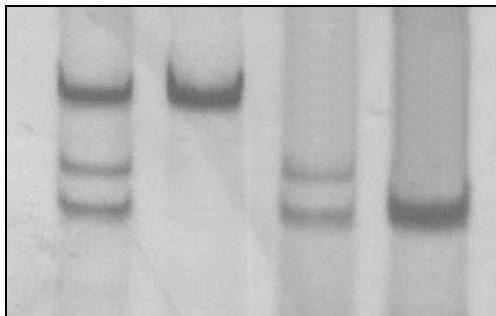




MTHFR A1298C

Sistema para detección de la alteración A1298C en el gene de la Mutilen Tetrahydrofolato Reductasa



Reg. MSP 21199

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 A1298C en el gen que codifica para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa.

Principio de Ensayo

El análisis para detección de la mutación A1298C en el gene de la MTHFR 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.

Existen tres posibles resultados:

Homocigota AA, cuando no se detecta la mutación A1298C en ninguno de los dos alelos del gen.

Heterocigota AC, cuando se detecta la mutación A1298C en uno de los dos alelos del gen.

Homocigota CC, cuando se presenta la mutación en ambos alelos.

Introducción

La enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza la reducción del 5,10 metileno tetrahidrofolato (THF) a 5-metilTHF, la forma primaria de folato sérico co-sustrato para la remetilación de homocisteína a metionina.

El polimorfismo genético A1298C en la MTHFR, produce un cambio de un glutamato por una alanina en la secuencia de la proteína, disminuyendo la actividad de esta enzima.

Otro polimorfismo, denominado C677T, produce una versión termolábil del enzima, que presenta también menor actividad e influye directamente en los niveles séricos de homocisteína

Presentación del kit

Color que identifica al kit: Rosado

El kit de ATGen para la detección de la alteración A1298C en el gen codificante para la metilentetrahidrofolato reductasa incluye:

- 1 tubo MTHFR A1298C Mezcla de Reacción.
- 1 tubo MTHFR A1298C Enzima de Restricción.
- 1 tubo MTHFR A1298C ADN control positivo, conteniendo ADN control heterocigoto (una vez descongelado se recomienda guardar a 4°C).
- 1 tubo MTHFR A1298C Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo MTHFR A1298C Peso Molecular, el cual presenta 3 bandas: el 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 MTHFR A1298C 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 50 y 100 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 50 y 100 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 MTHFR A1298C en el tubo control positivo y 2 µl del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.

Página 4 de 6

7. Iniciar el programa para MTHFR A1298C.

Programa MTHFR A1298C: 30 ciclos de 94 °C/0:30'; 56 °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.

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 216 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 3 hs a 37°C (se puede incubar overnight).

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 MTHFR A1298C en gel de acrilamida al 6% o 15 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) hasta que llegue al final en acrilamida o 3 cm en agarosa.
4. Teñir con nitrato de plata la acrilamida o visualizar la agarosa al UV.

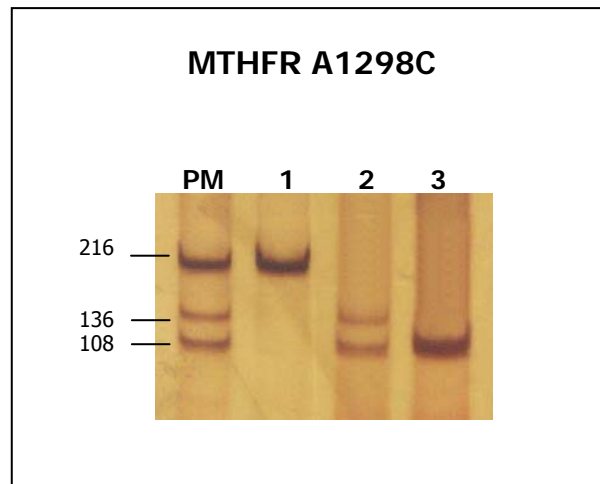
Interpretación de resultados:

Análisis	Homocigota AA	Heterocigota AC	Homocigota CC
MTHFR A1298C	108 pb	136 + 108 pb	136 pb

Nota:

La banda correspondiente al producto de amplificación de 216 pb no debe aparecer nunca después de la digestión. Si aparece esta banda (la mas alta del marcador) es que hay digestión parcial. Se recomienda agregar 1µl más de enzima de restricción a los productos que mostraron digestión parcial e incubar 2 horas más a 37°C.

Ejemplo de la interpretación de resultados:



Gel de acrilamida 6% teñido con nitrato de plata mostrando dos de los posibles resultados:

1. Producto de PCR (216 pb)
 2. Individuo heterocigota AC (El ADN control A1298C debe dar este resultado)
 3. Individuo homocigota AA.
- PM. Marcador de peso molecular A1298C que presenta la banda de amplificación y todas las bandas posibles de digestión.

Bibliografía

1. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151:862-77.
2. OMIM, 607093 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE; MTHFR

