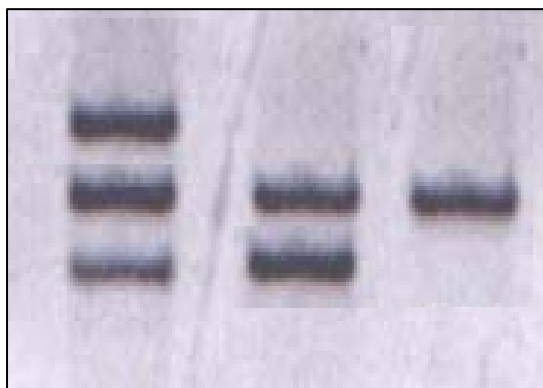




MTHFR C677T

Sistema para detección de la alteración C677T en el gene que codifica para la Metilen-tetrahidrofolato reductasa humana



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 citosina por timina en la posición 677 (C677T) en el exón 4 del gene que codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa. Esta alteración se traduce en un cambio alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína.

Principio de Ensayo

El análisis requiere la amplificación por PCR de un fragmento del gene que codifica para la MTHFR humana sobre el que 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. En el patrón electroforético luego de la digestión se pueden definir una "banda mutada" y una "banda normal".

Introducción: MTHFR

El gene de la MTHFR se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p36.3. 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 cambio de citosina por timina en la posición 677 (C677T) del gene que codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa produce una versión termolábil de la enzima que presenta menor actividad, influyendo los niveles séricos de homocisteína.

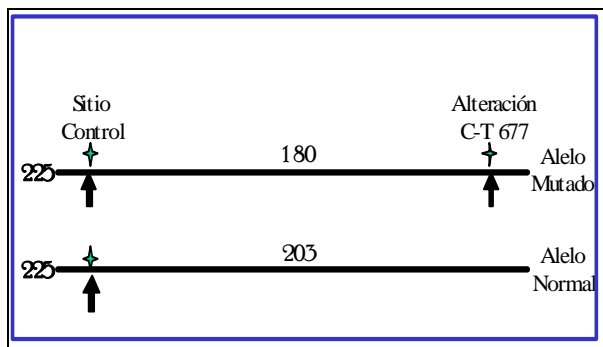
Un segundo polimorfismo genético en la MTHFR denominado A1298C (ATGen A1298C) también disminuye la actividad de esta enzima. Para revisión ver¹²

Validez de la prueba

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

²² OMIM, 607093 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE; MTHFR

Estrategia experimental:



Presentación del kit

Color que identifica al kit : Azul cielo

El kit de ATGen para la detección de la alteración MTHFR C677T incluye:

- 1 tubo MTHFR C677T Mezcla de Reacción (solución de color azul).
- 1 tubo MTHFR C677T Enzima de Restricción.
- 1 tubo MTHFR C677T ADN control positivo conteniendo ADN control heterocigota (una vez descongelado se recomienda guardar a 4 °C).
- 1 tubo MTHFR C677T Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo MTHFR C677T Peso Molecular, el cual presenta todas las bandas posibles correspondientes al 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 C677T 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 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.
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 control MTHFR C677T 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 MTHFR C677T.

Programa: 30 ciclos de 94 °C/0:30', 59 °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% o agarosa 2% cargando 5 µl del producto. El tamaño esperado de la amplificación es 225 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

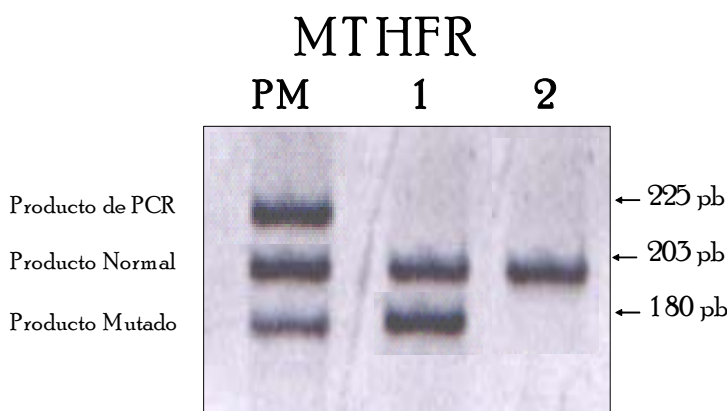
Obtención de los resultados:

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 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
203 pb	Homocigota normal
203 + 180 pb	Heterocigota
180 pb	Homocigota mutado

Ejemplo de la interpretación de resultados;



Gel de acrilamida al 6% mostrando los siguientes resultados:

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

Banda de 203 pb = "banda normal"
 Banda de 180 pb = "banda mutada"

La banda de 225 pb no debe estar presente si existe una digestión completa.

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