



## Ppar $\gamma$

Sistema para detección de la variante PPAR $\gamma$  Pro12Ala en el gene PPAR $\gamma$ -2.



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 la mutación en el codón 12 (Pro12Ala) en el gene que codifica para el receptor PPAR $\gamma$ -2.

### **Principio de Ensayo**

El análisis para detección de la mutación Pro12Ala en el gene PPAR $\gamma$ -2 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:

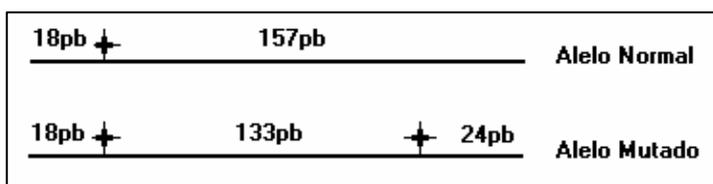
- Homocigota Pro/Pro, cuando no se detecta la mutación Pro12Ala en ninguno de los dos alelos del gen.
- Heterocigota Pro/Ala, cuando se detecta la mutación Pro12Ala en uno de los dos alelos del gen.
- Homocigota Ala/Ala, cuando se presenta la mutación Pro12Ala en ambos alelos.

### **Introducción**

Los PPARs son miembros de una subfamilia factores transcripcionales: los receptores hormonales nucleares. El PPAR $\gamma$ -2, cuyo gen está ubicado en el cromosoma 3, está presente principalmente en el tejido adiposo y tiene un rol en la diferenciación y función de los adipocitos. La variante en el codon 12 (Pro12Ala) es un polimorfismo frecuente en el gene PPAR $\gamma$ -2 y se ha visto asociado con una susceptibilidad aumentada a la obesidad. Es uno de los mejores predictores genéticos de ganancia de peso y se asocia a un mayor Índice de Masa Corporal y con el desarrollo de diabetes tipo 2.



## Estrategia experimental



## Presentación del kit

Color que identifica al kit: Amarillo

El kit de ATGen para la detección de la mutación G>C (Pro12Ala) en el gene PPAR $\gamma$ -2 incluye:

- 1 tubo PPAR $\gamma$  Mezcla de Reacción.
- 1 tubo PPAR $\gamma$  Enzima de Restricción.
- 1 tubo PPAR $\gamma$  ADN control positivo, conteniendo ADN control heterocigota (una vez descongelado se recomienda guardar a 4 °C).
- 1 tubo PPAR $\gamma$  Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo PPAR $\gamma$  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 PPAR $\gamma$  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 /  $\mu$ l, 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  $\mu$ l de la mezcla de reacción.
2. Agregar 1  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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).

3. Agregar de la misma forma 2  $\mu$ l de ADN PPAR $\gamma$  en el tubo control positivo y 2  $\mu$ l del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.
4. Iniciar el programa para PPAR $\gamma$ .

Programa: 35 ciclos de 94  $^{\circ}$ C/0:30', 56  $^{\circ}$ C/0:30', 72  $^{\circ}$ C/0:30'; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94  $^{\circ}$ C y una extensión final de 5 minutos a 72  $^{\circ}$ C.



5. 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 175 pb.

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

#### **Digestión:**

6. 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.
7. Homogeneizar utilizando la pipeta.
8. Incubar 2:30 hs a 37°C (se puede incubar overnight).

#### **Obtención de los resultados:**

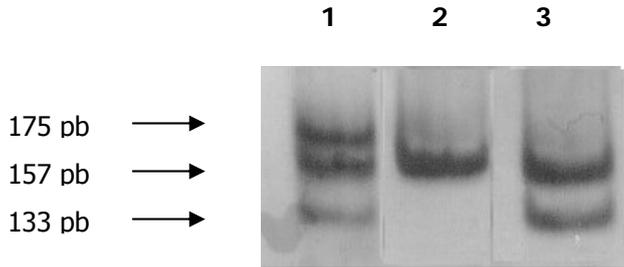
1. Preparar las muestras con la cantidad indicada del buffer de carga adecuado (p. ej. glicerol 30% p/v, azul xilen-cianol 0,25% p/v, azul de bromofenol 0,25% p/v)
2. Cargar 5 ul de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular PPAR $\gamma$  en gel de acrilamida al 6% o 20 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                 |
|------------------------|---------------------------|
| 133 pb                 | Homocigota mutado Ala/Ala |
| 157 + 133 pb           | Heterocigoto Pro/Ala      |
| 157 pb                 | Homocigota normal Pro/Pro |

**Ejemplo de la interpretación de resultados;**



Gel de acrilamida al 6% mostrando los posibles resultados:

En el carril identificado como 1 se muestran las tres bandas correspondientes al peso molecular de Ppar  $\gamma$  (bandas de 175, 157 y 142 pb).

En el carril identificado como 2 se muestra el resultado que corresponde al individuo normal Pro/Pro para la mutación en Ppar  $\gamma$  (banda de 157 pb)

En el carril identificado como 3 se muestra el resultado correspondiente a un individuo heterocigoto Pro/Ala para la mutación en Ppar  $\gamma$  (bandas de 157 y 133 pb).

Es importante siempre verificar la desaparición de la banda de 175 pb luego de la digestión enzimática, lo que indica que la digestión fue completa.

**Bibliografía:**

1. OMIM \*601487 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma; ppar $\gamma$
2. Pisabarro R, Stoll M, Sanguinetti C., Prendez D. High incidence of type 2 Diabetes in PPAR  $\gamma$ 2 Pro12Ala carriers exposed to a high chronic intake of Trans fatty acids and saturated fatty acids. Diabetes Care 2004, Vol 27, 2251-2252.