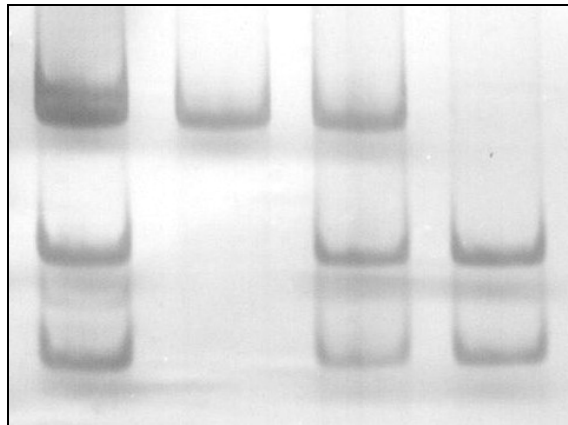




Proteína G – C825T

Sistema para la detección de la mutación C825T en el gene de la proteína G.



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 825 del exón 10 del gen que codifica para la proteína G humana.

Principio de Ensayo

El análisis para detección de la mutación C825T en el exón 10 del gene de la proteína G 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 CC, cuando no se detecta la mutación C825T en ninguno de los dos alelos del gen.

Heterocigota CT, cuando se detecta la mutación C825T en uno de los dos alelos del gen.

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

Introducción:

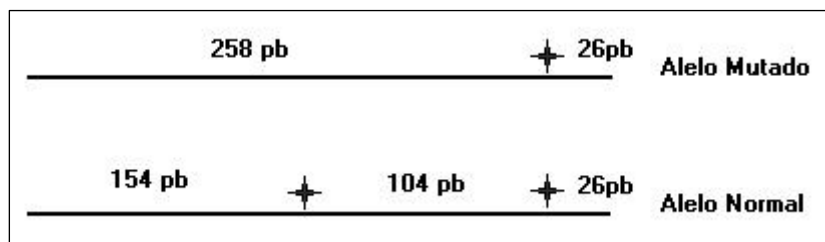
El gene GNB3 que codifica la subunidad G β 3 de la proteína G se localiza en el cromosoma 12.

El polimorfismo C825T en el exón 10 asocia el alelo T a la aparición de una variante de splicing que pierde los nucleótidos 498 al 620 del exón 9 del transcripto primario y la pérdida de 41 aminoácidos en la proteína codificada. Fue asociado a hipertensión.

La Proteína G corresponde a una clase de receptores celulares, transductores de señales intracelulares, blanco de una variedad de diferentes drogas por lo que juegan un rol importante en su acción farmacológica.

Se ha demostrado la asociación de este polimorfismo a obesidad, ganancia de peso en gravidez e hipertensión. La respuesta a sildenafil en pacientes con disfunción eréctil se ha reportado disminuida en los genotipos CC y CT.

Estrategia experimental:



Presentación del kit

El kit de ATGen ProG 825 incluye:

- 1 tubo Proteína G Mezcla de Reacción.
- 1 tubo Proteína G Enzima de Restricción.
- 1 tubo Proteína G ADN control positivo, conteniendo ADN control heterocigota (una vez descongelado se recomienda guardar a 4 °C).
- 1 tubo Proteína G Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo Proteína G 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 Proteína G – C825T 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 / 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 μ l de la mezcla de reacción.
2. Agregar 1 μ 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:

4. Alicuotar la mezcla para amplificación en tubos de PCR debidamente rotulados colocando 18 μ 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.

5. En cada tubo agregar 2 μ 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).

6. Agregar de la misma forma 2 μ l de ADN Proteína G en el tubo control positivo y 2 μ l del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.

7. Iniciar el programa para Proteína G.

Programa Proteína G C825T: 35 ciclos de 95 °C/0:30'; 60 °C/0:30'; 72 °C/0:30' una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °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 μ l del producto. El tamaño esperado de la amplificación es 284 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 μ l de la enzima de restricción.
10. Homogeneizar utilizando la pipeta.
11. Incubar 3 hs a 60°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 μ l de cada producto de amplificación digerido y del marcador de peso molecular Proteína G en gel de acrilamida al 10%.
3. Migrar el colorante azul de bromofenol (del buffer de carga) al final del gel
4. Teñir con nitrato de plata la acrilamida.

Interpretación de resultados:

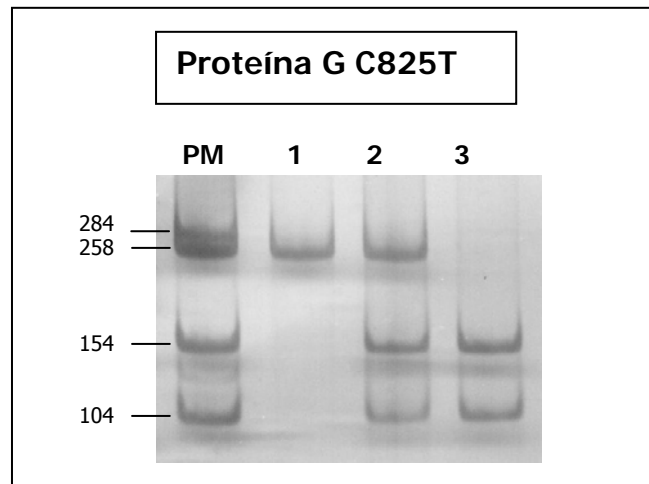
Análisis	Homocigota CC	Heterocigota CT	Homocigota TT
Proteína G C825T	154 + 104 pb	258 + 154 + 104 pb	258 pb

Nota:

La banda correspondiente al producto de amplificación no debe aparecer nunca después de la digestión. Si aparece esta banda de 284 pb (la mas alta del marcador) existe una digestión parcial.



Ejemplo de la interpretación de resultados:



Gel de acrilamida 10 % teñido con nitrato de plata mostrando los posibles resultados:

1. Individuo homocigota TT
2. Individuo heterocigota CT (El ADN control ProG 825 debe dar este resultado)
3. Individuo homocigota CC.

PM. Marcador de peso molecular ProG 825 que presenta la banda de amplificación y todas las bandas posibles de digestión.

Bibliografía:

1. Hypertension. 2001; 37: 882-886.
2. Pharmacogenetics. 2003; 13:241-242.
3. Lancet. 2000; 355: 1240-1241
4. Nature Genet. 1998; 18: 45-48.
5. Journal of Urology. 2003; 169:1048-1051.