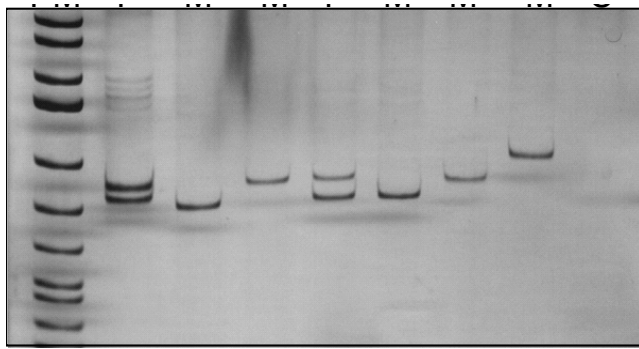




Pre-FRAXA

Sistema para la detección del número de repetidos CGG en el gene FMR1



Reg. MSP 2287

Valdense 3616. 11700. Montevideo. Uruguay.
Teléfono (598) 2 336 83 01. Fax (598) 2 336 71 60.
www.atgen.com.uy

Solo para su uso en investigación.

Los resultados del test solo deben usarse para análisis preliminares.

La compra de este producto no proporciona licencia para su uso en aplicaciones patentadas.

Utilidad del Kit

El test permite identificar el número de repetidos CGG en la región 5' UTR del gene FMR1 en el rango de normalidad (6 a 60). El número de repetidos se estima a partir del tamaño del producto de amplificación mediante electroforesis en gel de acrilamida.

En paralelo se amplifica un fragmento en 5' de la región repetida como control de la amplificación del gene FMR1.

Principio de Ensayo

El kit Pre-FRAXA de ATGen se basa en la amplificación por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de un fragmento de la región 5' UTR del gene FMR1 que contiene la región de repetidos CGG.

X Frágil

El síndrome de X Frágil es una de la causa más frecuente de retardo mental hereditario. El gene FMR1 se encuentra localizado en la región Xq27.3 del cromosoma X. Dentro de la región 5' no traducida (UTR) del gene FMR1 existe un repetido CGG polimórfico cuya expansión genera la mayor parte de las mutaciones asociadas al síndrome de X frágil. Esta expansión coincide con un sitio frágil del cromosoma X conocido por la citogenética como FRAXA. Los repetidos CGG tienen cuatro formas de presentación: común de 6 a 40 repetidos, intermedia de 41 a 60, la premutación de 61 a 200 repetidos y la mutación completa > de 230 repetidos^{1,2}.

En individuos normales esta región varía de 5 a 50 repeticiones. En pacientes con síndrome de X Frágil esta región presenta una expansión de más de 200 repeticiones.

Validez de la prueba

Para el rango de 6 a 60 repetidos el test posee 100% de sensibilidad cuando se realiza en varones y en mujeres heterocigotas (diferente número de repetidos CGG en cada alelo).

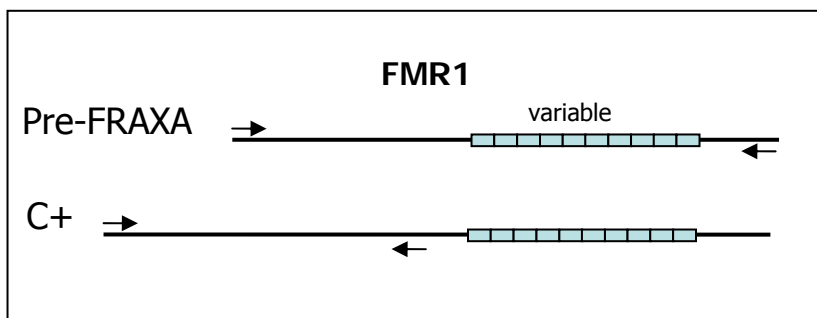
El test no permite distinguir mujeres con un genotipo homocigota normal (mismo número de repetidos en ambos alelos) y mujeres con un alelo normal y un alelo con mas de 60 repetidos CGG.

El test no permite el diagnóstico de X-Frágil (detección de más de 200 repeticiones CGG), sino la confirmación de los casos normales.

¹. OMIM : 309550 FRAGILE SITE MENTAL RETARDATION 1 GENE; FMR1

². Crawford et al. FMR1 and the Fragil X Syndrome. *Genetics in Medicine* 2001. 3: 359-71. HuGe Reviews. HGEN. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Estrategia experimental:



Presentación del kit

Tipo: Diagnóstico de uso *in vitro*

El kit de ATGen Pre-FRAXA incluye:

- 1 tubo Pre-FRAXA Mezcla de Reacción.
 - Contiene KCl, Tris-HCl, Tritón, MgSO₄, dNTPs, y oligonucleótidos.
- 1 tubo C+ Pre-FRAXA Mezcla de Reacción.
 - Contiene KCl, Tris-HCl, Tritón, MgCl₂, dNTPs y oligonucleótidos.
- 1 tubo Pre-FRAXA ADN control positivo.
 - Contiene una solución de ADN heterocigota en TE (Tris-HCl, EDTA) (una vez descongelado se recomienda guardar a 4 °C)
- 1 tubo Pre-FRAXA Taq ADN polimerasa.
- 1 tubo C+ Pre-FRAXA Taq ADN polimerasa.

Todos los reactivos incluidos en el kit Pre-FRAXA están en solución líquida.

Los kits se comercializan en formato de 10 o 20 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

Descongelar ambas mezclas de reacción (Pre-FRAXA y C+) y luego agitar vigorosamente en vortex.

Realizar las manipulaciones en frío.

Preparación de la mezcla para la amplificación.

Llevar a cabo en la zona de Pre-amplificación.

Preparar una mezcla de amplificación con cada una de las mezclas de reacción que componen el kit.

1. Utilizar por cada muestra a analizar 18 μl de cada mezcla de reacción en diferentes tubos.
2. Agregar 0,3 μl de Taq ADN polimerasa Pre-FRAXA a la mezcla de reacción Pre-FRAXA por cada muestra a analizar.
3. Agregar 0,5 μl de Taq ADN polimerasa C+ Pre-FRAXA a la mezcla de reacción C+ Pre-FRAXA por cada muestra a analizar.
4. Agitar moderadamente en vortex o pipetear (homogeneizar correctamente).

Se recomienda 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. Se recomienda realizar un control positivo y un control negativo en cada análisis.

Nota: Se sugiere agregar un 10 % de cada reactivo para compensar errores que puedan surgir en el pipeteo, ya que ese porcentaje está contemplado en los volúmenes del kit.

Amplificación:

1. Alicuotar cada mezcla para amplificación en tubos de PCR diferentes debidamente rotulados colocando 18 μ l en cada uno.
2. En cada tubo agregar 2 μ l de ADN de la muestra.

Las muestras deben contener entre 150 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 μ l de ADN control Pre-FRAXA en el tubo control positivo y 2 μ l del agua utilizada para disolver el ADN de las muestras en el tubo control negativo.
4. Iniciar el programa para Pre-FRAXA y para C+ Pre-Fraxe.

Programa Pre-FRAXA: 30 ciclos de 95 °C/1:00', 65 °C/2:00'; una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C y una extensión final de 10 minutos a 65 °C.

Programa C+ Pre-Fraxe: 35 ciclos de 94 °C/1:00', 68 °C/1:00', 72 °C/1:00'; una desnaturalización inicial de 7 minutos a 94 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

5. Colocar los tubos en el termociclador cuando alcance los 94°C.

Nota: para termocicladores sin tapa calefactora, añadir una gota de aceite mineral estéril.

Obtención de los resultados:

1. Cargar en gel de acrilamida-bis-acrilamida 29:1 al 10 %, 5 μ l de cada producto de amplificación de las dos mezclas (Pre-FRAXA y C+ Pre-Fraxe) y un marcador de peso molecular. Preparar cada muestra con la cantidad adecuada de buffer de carga.
2. Migrar hasta que el colorante azul de bromofenol llegue al final del gel.
3. Teñir con nitrato de plata. (ver anexo)

Interpretación de resultados:

- A partir del perfil electroforético de un marcador de peso conocido, se puede determinar el tamaño del fragmento amplificado.

El producto de PCR obtenido con la mezcla C+ Pre-Fraxa es siempre de 301 pb.

El producto de PCR obtenido con la mezcla Pre FRAXA es variable según el número de repetidos CGG. Una banda de 221 pb indica la presencia de 6 repetidos CGG.

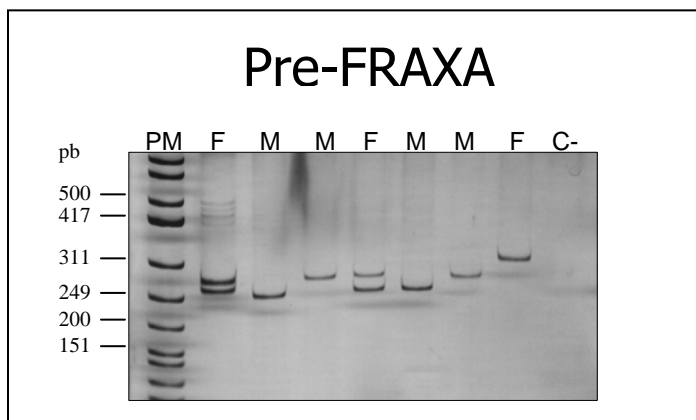
- Se pueden obtener los siguientes resultados con muestras procedentes de varones:

Producto de PCR	Resultado
Banda en el rango comprendido entre 221 y 400 pb	Normal
Banda en el rango comprendido entre 401 y 800 pb	Pre-mutado
No hay amplificación	No concluyente

- Se pueden obtener los siguientes resultados con muestras procedentes de mujeres:

Producto de PCR	Resultado
2 bandas en el rango comprendido entre 221 y 400 pb	Normal
1 banda en el rango comprendido entre 221 y 400 pb y 1 banda en el rango comprendido entre 400 y 800 pb	Portadora de pre-mutación
2 bandas en el rango comprendido entre 400 y 800 pb	Pre-mutada
1 única banda en el rango comprendido entre 221 y 800	No concluyente
No hay amplificación	No concluyente

Ejemplo de la interpretación de resultados:



Gel de acrilamida 10 % teñido con nitrato de plata mostrando la variabilidad del número de repetidos cgg en el gene FMR1 en muestras de ADN femeninas (F) y masculinas (M) utilizando el kit Pre-FRAXA de ATGen.

Las muestras F con dos bandas de amplificación resultan NORMALES.

Las muestras M con una banda de amplificación resultan NORMALES.

La muestra F con una banda de amplificación resulta NO Concluyente (posee un alelo en el rango de la normalidad pero no se puede concluir sobre el segundo alelo, que puede ser del mismo PM que el primero o de un tamaño imposible de amplificar).

Bibliografía:

1. OMIM : 309550 FRAGILE SITE MENTAL RETARDATION 1 GENE; FMR1
2. Crawford et al. FMR1 and the Fragil X Syndrome. *Genetics in Medicine* 2001. 3: 359-71. HuGe Reviews. HGEN. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).