



imegen

Bringing
genomics
to health

[Redacted]

[Redacted]

Detección de la expansión GAA en el gen *FXN*
mediante PCR y TP-PCR

REF

IMG-155

Fabricado por:

Instituto de Medicina Genómica SL

Agustín Escardino 9,

Parc Científic de la Universitat de València

46980 Paterna (Valencia, España)

+34 963 212 340 - info@imegen.es

imegen.es

Rev. 2. 04/03/2019





Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para uso en investigación. Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. **imegen-Friedreich** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: 963 212 340
e-Mail: tech.support@imegen.es

imegen® es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Modificaciones de las Instrucciones de Uso [IFU]	
Versión 02	Cambio introducido: Revisión de contenido.

Índice

1. Información general	4
2. Uso previsto	5
3. Advertencias y precauciones de seguridad	6
4. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit	7
5. Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran	8
6. Protocolo de ensayo	9
6.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
6.2 Preparación de los fragmentos amplificados	10
6.3 Electroforesis capilar	11
7. Análisis de los resultados	12
8. Troubleshooting	14
9. Limitaciones	16
9.1 Equipos	16
9.2 Reactivos	16
9.3 Estabilidad del producto	16

1. Información general

La ataxia de Friedreich (FRDA; MIM#229300) es la ataxia hereditaria más frecuente, afecta aproximadamente a 1 de cada 29.000 individuos. Se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo, y en la mayoría de los pacientes [98%] es debida a la expansión en homocigosis de la repetición del tri-nucleótido GAA del intrón 1 del gen *FRAXA* (*FXN* o *X25*; MIM*606829), localizado en la región cromosómica 9q13.

Las características clínicas distintivas de la ataxia de Friedreich incluyen ataxia aferente y cerebelosa progresiva, disartria, alteración del sentido de vibración y propiocepción, ausencia de reflejos tendinosos en los miembros inferiores, debilidad piramidal, escoliosis, deformidad del pie y cardiomiopatía.

El diagnóstico de la ataxia de Friedreich se establece mediante la identificación del número de repeticiones GAA, estableciéndose el genotipo normal en menos de 33 repeticiones. La Tabla 1 muestra el rango de repeticiones GAA en los alelos normales y mutados.

Alelo	Repeticiones
Normal	< 33 repeticiones GAA
Pre-mutado	34-65 repeticiones GAA
Patológico	66-1300 repeticiones GAA

Tabla 1. Información de las expansiones analizadas en el kit imagen-Friedreich

Referencias

- Consensus clinical management guidelines for Friedreich ataxia. Louise A Corben, David Lynch, Massimo Pandolfo, Jörg B Schulz, Martin B Delatycki, On behalf of the Clinical Management Guidelines Writing Group. Orphanet J Rare Dis. 2014; 9: 184. Published online 2014 Nov 30. doi: 10.1186/s13023-014-0184-7

2. Uso previsto

Mediante el uso del kit **imegen-Friedreich** se puede analizar la expansión GAA del intrón 1 del gen *FRAXINA* (*FXN* o *X25*; MIM*606829) mediante PCR y posterior electroforesis capilar. Además el kit ofrece un sistema de TP-PCR [*triplet repeat primed PCR*], para los casos con expansiones de mayor tamaño, no detectables por PCR convencional.

El ensayo de TP-PCR emplea un oligonucleótido marcado específico de locus que flanquea la repetición, junto con oligonucleótidos emparejados que amplifican desde múltiples sitios de la expansión, permitiendo por PCR a tiempo final y posterior electroforesis capilar, la detección de los alelos expandidos no detectables por la PCR convencional.

Los productos de PCR serán separados por electroforesis capilar, y tanto la PCR como la TP-PCR serán detectados mediante el marcaje 6-Carboxifluoresceína (6-FAM).

Este kit está dirigido al diagnóstico de la Ataxia de Friedreich, por ello las muestras de estudio serán muestras de ADN genómico extraídas de sangre periférica, saliva o frotis bucales. Para el desarrollo del ensayo se necesitan 50 ng de gDNA.

Este kit ha sido validado utilizando muestras de ADN de la Unidad de Genética Médica de imegen previamente genotipadas mediante el uso de otras tecnologías.

Imegen-Friedreich es sólo para uso en investigación y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

3. Advertencias y precauciones de seguridad

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad [MSDS] de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.

4. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 12 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- Friedreich Master Mix A: Master Mix de PCR con las cantidades de nucleótidos, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- Friedreich Master Mix B: Master Mix de TP-PCR con las cantidades de nucleótidos, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- PCR Master Mix: Master Mix con los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación por PCR de la región diana del kit.
- TP-PCR Master Mix: Master Mix con los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la TP-PCR [triplet repeat primed PCR].
- Friedreich Taq: DNA polimerasa necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación de la PCR.
- General Master Mix IV: Master mix de PCR con las cantidades de enzima y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación de la TP-PCR.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Friedreich Master Mix A	Disco blanco	205 μ l	-20°C
Friedreich Master Mix B	Disco amarillo	208 μ l	-20°C
PCR Master Mix	Disco rojo	60 μ l	-20°C
TP-PCR Master Mix	Disco azul	60 μ l	-20°C
Friedreich Taq	Tapa naranja	6 μ l	-20°C
General Master Mix IV	Tapa amarilla	5 μ l	-20°C

Tabla 2. Componentes del kit imegen-Friedreich

5. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- Vortex
- Centrífuga
- Secuenciador

Reactivos:

- GeneScan™ 500 LIZ® [Applied Biosystems cat. no. 4322682]
- Hi-Di™ formamide

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos o placas de 96 pocillos de 0.2 mL
- Film para placas de 96 pocillos
- Guantes de látex

Nota: Este kit no incluye los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la electroforesis capilar.

5.1 Kits complementarios

Para el análisis de expansiones implicadas en otras enfermedades neurodegenerativas, imegen también ofrece los kits imegen-SCAs [Ref. IMG-152], imegen-SBMA [Ref. IMG-153], imegen-Huntington [Ref. IMG-154], imegen-DM1 [Ref. IMG-173]. Todos ellos junto con el kit imegen-Friedreich, han sido diseñados usando el mismo programa de PCR, por lo que se pueden analizar conjuntamente.

6. Protocolo de ensayo

6.1 Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Se prepararán dos mezclas de PCR distintas por muestra, una para la reacción de PCR y otra para la TP-PCR. A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
2. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Friedreich Master Mix A	17 µL
Friedreich Taq	0.5 µL
PCR Master Mix	5 µL

3. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix para la TP-PCR añadiendo los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Friedreich Master Mix B	17.3 µL
General Master Mix IV	0.2 µL
TP-PCR Master Mix	5 µL

4. Agitar en vortex y dar spin a los mixes de PCR y TP-PCR. Dispensar 22.5 µL a los correspondientes tubos de 0.2 mL.
5. Añadir 2.5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL. Es conveniente poner un control negativo de PCR y TP-PCR por cada tanda de amplificación para comprobar la ausencia de contaminación de los reactivos, y también controles positivos de genotipo conocido para verificar el tamaño de los alelos.
6. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación:

Campos	Etapa 1 Activación enzimática	Etapa 2 PCR o TP-PCR			Etapa 3	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial	30 ciclos			1 ciclo	
		Desnaturalización	Unión de cebadores	Extensión	Finalización de la PCR o TP-PCR y conservación	
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	5 minutos	1 minuto	1 minuto	2 minutos	10 minutos	∞

Tabla 3. Programa de PCR y TP PCR, óptimo para los equipos T3 de Biometra, SimpliAmp Thermal Cycler y GENEAMP® PCR System 2720 de Applied Biosystems

Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.

6.2 Preparación de los fragmentos amplificados

A partir de los productos de PCR y TP-PCR, preparar la placa para el análisis de fragmentos como se indica a continuación:

1. Añadir a un tubo de 1.5 mL los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Formamida	18 µL
Marcador GeneScan™ 500 LIZ	0.5 µL

Recomendamos realizar los cálculos considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Nota: El volumen del marcador de tamaño puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos.

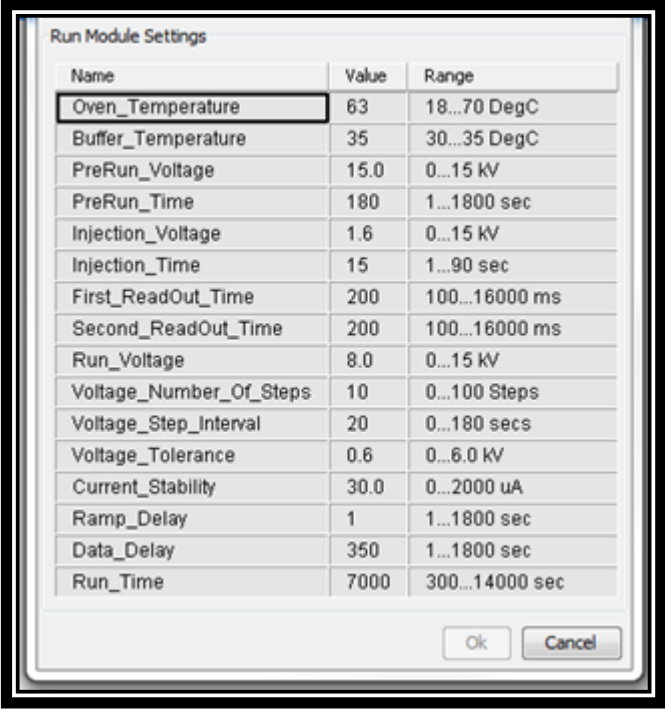
2. Dispensar 18.5 µL de la mezcla anterior en cada pocillo.
3. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR y TP-PCR.
Nota: El volumen de muestra puede ser aumentado o disminuido (diluyendo las muestras) para ajustar la intensidad de los picos.
4. Tapar la placa, dar un spin y desnaturalizar en un termociclador durante 5 minutos a 98°C.
5. Guardar a 4°C la placa hasta el momento de introducirla en el secuenciador.

6.3 Electroforesis capilar

Una vez preparada la placa de fragmentos, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se emplearán las condiciones de electroforesis recomendadas por el fabricante.

Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía aproximadamente entre 200 y 500 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ.

A continuación se muestra una imagen con las condiciones optimizadas para el secuenciador 3730xl DNA Analyzer [ThermoFisher Scientific], usando el polímero POP-7™.



Name	Value	Range
Oven_Temperature	63	18...70 DegC
Buffer_Temperature	35	30...35 DegC
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kV
PreRun_Time	180	1...1800 sec
Injection_Voltage	1.6	0...15 kV
Injection_Time	15	1...90 sec
First_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Second_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Run_Voltage	8.0	0...15 kV
Voltage_Number_Of_Steps	10	0...100 Steps
Voltage_Step_Interval	20	0...180 secs
Voltage_Tolerance	0.6	0...6.0 kV
Current_Stability	30.0	0...2000 uA
Ramp_Delay	1	1...1800 sec
Data_Delay	350	1...1800 sec
Run_Time	7000	300...14000 sec

Figura 1. Parámetros optimizados para el secuenciador 3730xl DNA

La intensidad de la detección puede variar entre los distintos equipos, dependiendo del modelo, del estado del sistema óptico del equipo y del tiempo y voltaje de inyección. Por ello, puede ser necesario, aumentar o disminuir la cantidad de marcador de tamaño o de producto de PCR requeridos para llevar a cabo la electroforesis capilar.

7. Análisis de resultados

Una vez con los resultados en el software de análisis, para calcular el número exacto de repeticiones de un alelo desconocido se puede emplear la siguiente fórmula:

$$\text{Número Repeticiones} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo x (pb)}} - 244}{3}$$

Nota: El valor 244 de la fórmula procede de una conversión del tamaño de amplicón obtenido con los oligonucleótidos diseñados para este kit, comprobado tanto in silico, como en nuestros laboratorios durante la validación del kit.

Debido a las variaciones descritas de una repetición entre distintos laboratorios, desde imegen recomendamos el uso de una muestra con una repetición de tamaño conocido, y usando la siguiente fórmula [Ejemplo: 36 repeticiones]:

$$\text{Número Repeticiones} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo x (pb)}} - \text{Tamaño}_{\text{Alelo conocido 36}}}{3} + 36$$

A continuación se muestran imágenes de diferentes perfiles genéticos de expansión en GAA:

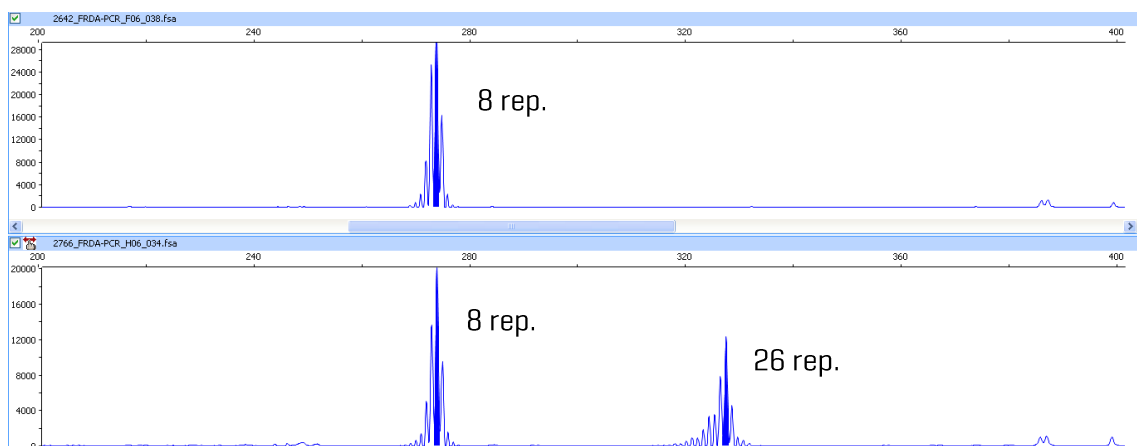


Figura 2. Ejemplos de resultados obtenidos con el mix de PCR del kit imegen-Friedreich.

7.1 Resultados TP-PCR

En aquellas muestras donde sólo se haya detectado un alelo mediante el uso del sistema de PCR, el genotipo de la muestra podría ser homocigoto para ese alelo o heterocigoto, con un alelo normal, y un alelo expandido, no detectable por PCR convencional.

Para poder diferenciar entre muestras homocigotas y heterocigotas con un alelo expandido no detectable por PCR convencional, ha sido diseñado el sistema de TP-PCR (Triplet Repeat primed Polymerase Chain Reaction) del kit **imegen-Friedreich**.

Al tratarse de una PCR en la que se emplea un oligonucleótido marcado específico de locus, y oligonucleótidos emparejados que amplifican en cualquier punto de la expansión, mediante esta técnica se podrán detectar expansiones de cualquier tamaño, aunque no permite la determinación del número de repeticiones.

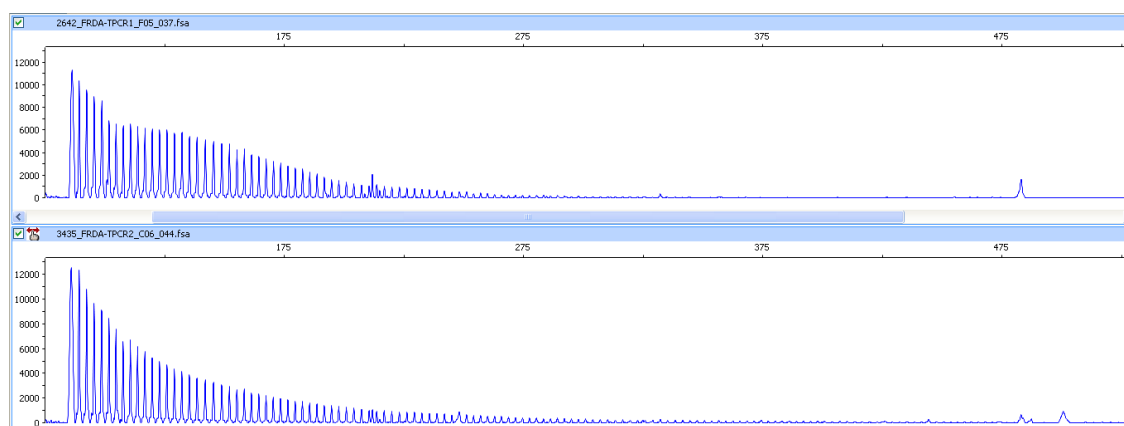


Figura 3. Resultados de TP-PCR. Perfiles compatibles con presencia de alelos expandidos en la muestra

8. Troubleshooting

La tabla siguiente representa los resultados que podrían ser obtenidos en las muestras analizadas, el control positivo, el marcador de tamaño, y el control negativo. En caso de obtener un resultado inesperado, la interpretación y la razón más probable de dicho resultado se muestran a continuación.

Problema	Muestras analizadas	Marcador de tamaño	Control negativo	Resultados / Interpretación
Señal de fluorescencia débil o nula			✓	Resultado esperado
	✓		✓	Cantidad y/o calidad del ADN molde insuficiente. ¹ ADN molde impuro. ²
	✓	✓	✓	Fallo en la electroforesis capilar. ³ Fallo en la desnaturalización. ⁴
	✓		✓	Fallo en la PCR. ⁵
Señal de fluorescencia excesiva	✓			Cantidad excesiva de ADN. ⁶
	✓			
Presencia de más picos de los esperados	✓		✓	Contaminación. ⁷
	✓			Contaminación. ⁷
	✓			Artefactos característicos de las expansiones. ⁸

Tabla 4. Interpretación de los posibles resultados con el kit imagen-SBMA

¹ **Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente:** Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN. En caso de que el ADN haya sido correctamente cuantificado, comprobar su integridad y llevar a cabo una nueva extracción si es necesario.

² **ADN molde impuro:** Altas concentraciones de sales o un pH alterado pueden inhibir la PCR. Si usa un ADN disuelto en un tampón de elución con un pH diferente de 8 o con concentraciones altas de EDTA, el volumen de ADN no debería exceder el 20% del volumen total de la reacción. Restos de los reactivos usados durante la extracción también pueden afectar a la reacción de PCR. Si es así, limpie el ADN o prepare una nueva extracción.

³ **Fallo en la electroforesis capilar:** Revise si los parámetros del equipo son los especificados y reinyecte las muestras.



imegen

- ⁴ **Fallo en la desnaturalización:** Para una correcta desnaturalización las muestras deben ser calentadas el tiempo indicado en el apartado 6 de estas instrucciones de uso, y posteriormente mantener en frío hasta la carga en el secuenciador.
- ⁵ **Fallo en la PCR:** Compruebe que el programa de PCR es el indicado.
- ⁶ **Cantidad excesiva de ADN:** Asegúrese de estar usando la cantidad adecuada de ADN. Si es así, diluya el producto de PCR en agua estéril desionizada y prepare de nuevo la desnaturalización y carga en el secuenciador.
- ⁷ **Contaminación:** Puede ser producida por otro ADN molde o por un ADN previamente amplificado. La contaminación cruzada puede dar lugar a falsos positivos dando lugar a errores en la interpretación de los resultados. Use puntas de pipeta con filtro y cambie los guantes regularmente.
- ⁸ **Artefactos característicos del análisis de expansiones:** La amplificación de expansiones genera artefactos (picos en el electroferograma) que aparecen como picos menos intensos y de menor tamaño (3 pares de bases menores) que el pico predominante.

9. Limitaciones

9.1 Equipos

imagen-Friedreich ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- SimpliAmp Thermal Cycler [ThermoFisher Scientific]
- GeneAmp PCR System 2720 [ThermoFisher Scientific]
- T3000 Thermocycler 48 [Biometra]

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

imagen-Friedreich ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación:

- 3730xl DNA Analyzer [ThermoFisher Scientific]

Este kit es válido para los polímeros compatibles con el marcaje 6-Carboxifluoresceína [6-FAM]. En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

9.2 Reactivos

imagen-Friedreich se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual [Equipos y materiales necesarios que no se suministran].

Para la electroforesis capilar se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: ThermoFisher Scientific.

En caso de duda, por favor contacte con nuestro servicio técnico.

9.3 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.