



imegen

Bringing
genomics
to health

Instrucciones de Uso

imegen[®] Huntington

Detección de la expansión CAG en el gen *HTT*
mediante electroforesis capilar

REF IMG-154

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. 3 02/02/2019



Página 1 de 16



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.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. **Imegen-Huntington** 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
Versión 03	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 la placa de fragmentos	10
6.3 Electroforesis capilar	10
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 enfermedad de Huntington (HD, OMIM #143100) es una enfermedad hereditaria que ocasiona la degeneración progresiva de las neuronas del cerebro. La enfermedad de Huntington tiene un amplio impacto en las capacidades funcionales de una persona y, generalmente, ocasiona trastornos del movimiento, pensamiento [cognitivos] y psiquiátricos.

La mayoría de las personas que padecen la enfermedad de Huntington presentan signos y síntomas entre los 35 y los 50 años. No obstante, la enfermedad puede aparecer antes o más adelante en la vida. Cuando la enfermedad se presenta antes de los 20 años, se la denomina «enfermedad de Huntington juvenil». El comienzo más temprano suele provocar un grupo de síntomas algo distintos y una progresión más rápida de la enfermedad.

La enfermedad de Huntington se hereda de forma autosómica dominante y es debida, en el 100% de los casos, a la expansión de la repetición del tri-nucleótido CAG del extremo 5' del primer exón del gen de la huntingtina (HTT; MIM 613004), localizado en la región cromosómica 4p16.3.

El diagnóstico de la enfermedad de Huntington se establece en función del número de repeticiones del triplete CAG, considerando el genotipo normal un valor inferior a 26 repeticiones. Además, se ha establecido una relación inversamente proporcional entre el número de repeticiones y la edad al inicio de los síntomas. Esta relación es particularmente fuerte para repeticiones altas. La Tabla 1 indica el rango de repeticiones CAG en los alelos normales y mutantes.

Alelo	Repeticiones
Normal	6-26 repeticiones CAG
Intermedios	27-35 repeticiones CAG
Patológico	> 36 repeticiones CAG

Tabla 1. Información de las expansiones analizadas en el kit imegen-Huntington

Referencias

- Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. Potter NT, Spector EB, Prior TW. Genet Med. 2004 Jan-Feb;6[1]:61-5.
- Losekoot M1, van Belzen MJ, Seneca S, Bauer P, Stenhouse SA, Barton DE [2013] EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. European Molecular Genetic Quality Network [EMQN]. Eur J Hum Genet. 21[5]:480-486.

2. Uso previsto

imegen-Huntington permite el análisis de la expansión CAG del extremo 5' del primer exón del gen *HTT* mediante dos PCRs (PCR corta y PCR larga). En la PCR corta (HTT-C) se amplifica únicamente el fragmento poli-CAG causante de la enfermedad, mientras que mediante la PCR larga (HTT-L) se amplifica el fragmento poli-CAG y un fragmento polimórfico poli-CCG adyacente.

Es necesario evaluar los resultados de la HTT-L PCR en aquellas muestras donde solo se haya detectado un alelo mediante el uso de la PCR corta (HTT-C) pudiendo deberse a una pérdida alélica debida a la presencia de un polimorfismo en la zona de unión de uno de los cebadores de la PCR corta (HTT-C). La PCR larga (HTT-L) amplifica de forma simultánea el fragmento poli-CAG y el polimorfismo CCG que puede variar entre 7 y 11 repeticiones.

Los productos de PCR marcados con 6-Carboxifluoresceína [6-FAM] y NED™ se separan mediante electroforesis capilar para analizar el tamaño de los amplicones.

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

3. Advertencias y precauciones

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 mediante los siguientes reactivos:

- Huntington Master Mix: Buffer de amplificación con dNTPs, $MgCl_2$ y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones de amplificación.
- HTT-L Master Mix: Oligonucleótidos específicos marcados con el fluoróforo NED™ para llevar a cabo la reacción de amplificación de la PCR larga, incluye el fragmento poli-CAG y el fragmento polimórfico poli-CCG adyacente.
- HTT-C Master Mix: Oligonucleótidos específicos marcados con el fluoróforo 6-FAM para llevar a cabo la reacción de amplificación de la PCR corta, incluye el fragmento poli-CAG.
- General Master Mix IV: Polimerasa de ADN necesaria para llevar a cabo las reacciones de amplificación.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Huntington Master Mix	Disco amarillo	460 μ L	-20°C
HTT-L Master Mix	Disco verde	66 μ L	-20°C
HTT-C Master Mix	Disco morado	66 μ L	-20°C
General Master Mix IV	Tapa amarilla	10 μ L	-20°C

Tabla 2. Componentes del kit imegen-Huntington

5. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

- Termociclador convencional
- Micropipetas de 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- Vortex
- Centrífuga
- Equipo de electroforesis capilar

Reactivos:

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

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos de 0.2 mL
- Placas de 96 pocillos compatibles con el equipo de electroforesis capilar
- 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.

6. Protocolo de ensayo

6.1 Preparación de las reacciones de amplificación

El kit **imegen-Huntington** está diseñado para realizar dos reacciones de PCR por cada muestra que se desea analizar. Además, se recomienda analizar en cada tanda de amplificación un control negativo para descartar la presencia de contaminación en los reactivos de PCR y un control positivo [no incluido en el kit].

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se recomienda tener en cuenta el número total de muestras y controles a analizar simultáneamente e incrementar un 10% adicional del volumen de cada reactivo.

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 la PCR corta (HTT-C):

Reactivos	Cantidad por reacción
Huntington Master Mix	17,3 µL
General Master Mix IV	0,2 µL
HTT-C Master Mix	5 µL

3. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix de la PCR larga (HTT-L):

Reactivos	Cantidad por reacción
Huntington Master Mix	17,3 µL
General Master Mix IV	0,2 µL
HTT-L Master Mix	5 µL

4. Agitar en vortex y dar spin a los mixes de HTT-C y HTT-L.
5. Dispensar 22.5 µL a los correspondientes tubos de 0.2 mL y añadir 2.5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL.

Nota: Se recomienda incluir un control negativo de PCR por cada tanda de amplificación para confirmar la ausencia de contaminación y también controles positivos 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	
N° 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 las PCRs HTT-C y HTT-L, 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.

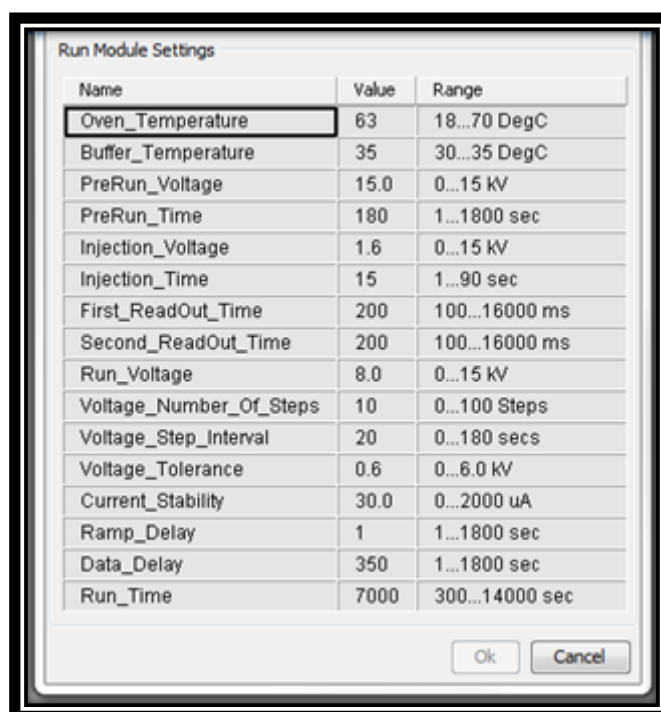
2. Dispensar 18.5 µL de la mezcla anterior en cada pocillo.
3. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR y TP-PCR.
Nota: El volumen de muestra puede ser aumentado o disminuido [diluyendo las muestras] para ajustar la intensidad de los picos.
4. Tapar la placa, dar un spin y desnaturalizar 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 100 y 500 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y NED™ 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

El análisis de los resultados se lleva a cabo con un programa específico para el análisis de fragmentos y el fichero resultante de la electroforesis capilar. El resultado será un electroferograma con picos con una intensidad determinada [altura] y a una distancia directamente proporcional al tamaño del fragmento [ver figura 2].

Para calcular el número exacto de repeticiones de un alelo desconocido se puede emplear la siguiente formula:

Cálculo HTT-C:

$$\text{Número Repeticiones [CAG]} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo x}} - 68 \text{ pb}}{3}$$

Cálculo HTT-L:

$$\text{Número Repeticiones [CAG+CCG]} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo x}} - 86 \text{ pb}}{3}$$

Nota: El valor de 68 bp [HTT-C] y 86 bp [HTT-L] procede de una conversión del tamaño de amplicón obtenido con los oligonucleótidos diseñados para este kit, confirmado tanto *in silico*, como en nuestros laboratorios durante la validación del kit.

Del mismo modo, se puede realizar el cálculo de las repeticiones utilizando los tamaños de amplicones generados a partir de una muestra con un número conocido de repeticiones de tamaño [Ejemplo: 21 repeticiones CAG y 7 repeticiones CCG]:

$$\text{Número Repeticiones [CAG]} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo x}} - \text{Tamaño}_{\text{Alelo 21 rep.}}}{3} + 21$$

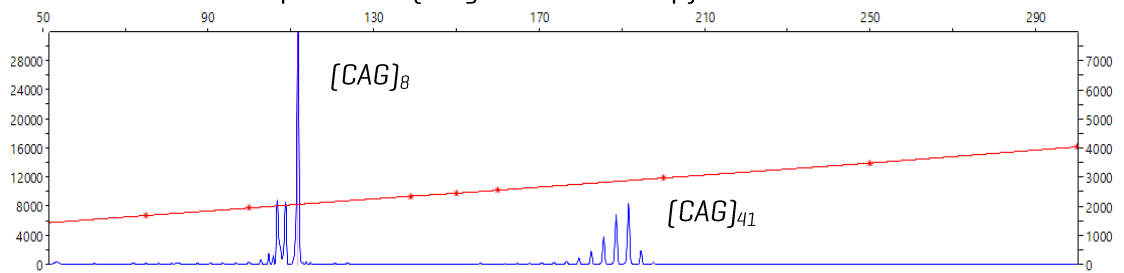
$$\text{Número Repeticiones [CAG + CCG]} = \frac{\text{Tamaño}_{\text{Alelo x}} - \text{Tamaño}_{\text{Alelo 21+7 rep.}}}{3} + (21+7)$$

A continuación se muestran unas imágenes como ejemplo de los posibles resultados.

Resultados HTT-C (FAM):

Alelo 1: 8 CAG repeticiones (Fragmento de 92 bp)

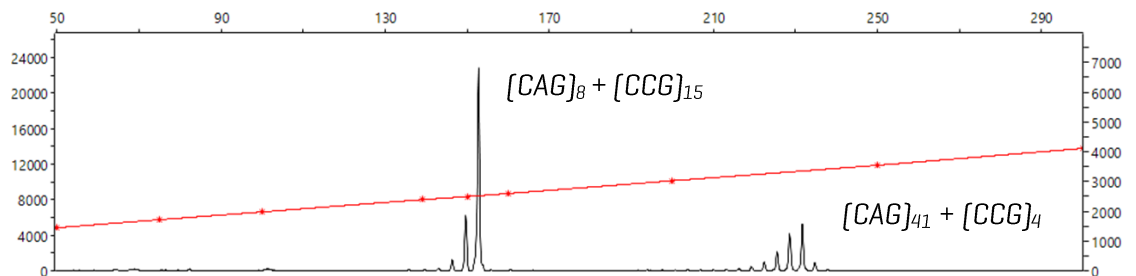
Alelo 2: 41 CAG repeticiones (Fragmento de 191 bp)



Resultados HTT-L (NED):

Alelo 1: 8 CAG repeticiones + 15 CCG repeticiones (Fragmento de 155 bp)

Alelo 2: 41 CAG repeticiones + 4 CCG repeticiones (Fragmento de 221 bp)



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 en la siguiente tabla.

Problema	Muestras analizadas	Positivo control	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 Mosaicismo ⁹
	✓	✓			Artefactos característicos de las expansiones ⁸

Tabla 7. Interpretación de los posibles resultados con el kit imegen-SCAs

¹ **Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente:** Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN molde. 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 molde 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.

⁴**Fallo en la desnaturalización:** Para una correcta desnaturalización las muestras deben ser calentadas el tiempo indicado en el apartado 7 de este documento, 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 y negativos, derivando todo ello en problemas en la interpretación de los resultados. Use puntas de pipeta con filtro y cambie los guantes regularmente.

⁸**Artefactos característicos de las expansiones:** La amplificación de expansiones genera artefactos que aparecen como picos más pequeños, y alejados 3 pares de bases del pico predominante.

⁹**Mosaicismo:** En algunos SCAs, como el SCA2 y el SCA6, han sido descritos casos de mosaicismo, por lo tanto es posible, aunque poco probable, encontrar más de un genotipo en una muestra. En este caso aconsejamos repetir la PCR, y en caso de obtener el mismo patrón, utilizar una nueva muestra del paciente, a ser posible de otro tejido [ej. mucosa bucal].

9. Limitaciones

9.1 Equipos

imegen-Huntington 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.

imegen-Huntington 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) y NED™. En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

9.2 Reactivos

imegen-Huntington 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.