imegen

Bringing genomics to health

CE IVD

Instrucciones de uso

imegen® HBB

Análisis genético molecular del gen HBB mediante secuenciación Sanger

REF **IMG-156**



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

ISO 13485
BUREAU VERITAS Certification
Nº ES069949-1

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 diagnóstico *in vitro*. 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-HBB** 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 03	Cambio introducido: Adaptación a los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

imegen

Índice

1. **Información general** 4
2. **Uso previsto** 5
3. **Características técnicas** 5
4. **Advertencias y precauciones de seguridad** 6
5. **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 7
6. **Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran** 8
7. **Protocolo de ensayo** 9
   - 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación 9
   - 7.2 Purificación de los productos de PCR 10
   - 7.3 Preparación de las reacciones de secuenciación 10
   - 7.4 Purificación de las reacciones de secuenciación 11
   - 7.5 Electroforesis capilar 12
8. **Troubleshooting** 13
9. **Limitaciones** 18
   - 9.1 Equipos 18
   - 9.2 Reactivos 18
   - 9.3 Estabilidad del producto 18

1. Información general

La beta-talasemia (β-talasemia) se caracteriza por un déficit en la síntesis de la subunidad beta de la hemoglobina, dando lugar a anemia microcítica hipocrómica, recuento anormal de glóbulos rojos nucleados en sangre periférica y cantidades reducidas de hemoglobina A (HbA) en el análisis de hemoglobina.

La β-talasemia (MIM # 141900) sigue un patrón de herencia recesivo autosómico asociado a mutaciones en el gen HBB, ubicado en la región cromosómica 11p15.5.

Las tres afecciones clínicas y hematológicas más severas son el estado de portador de β-talasemia, talasemia intermedia y talasemia mayor. El estado de portador de β-talasemia provocado por mutaciones en heterocigosis en el gen *HBB*, es clínicamente asintomático y se define por características hematológicas específicas. Mientras que la talasemia mayor se manifiesta clínicamente como una anemia grave dependiente de transfusión. Por otro lado, la talasemia intermedia comprende un grupo muy heterogéneo clínica y genotípicamente de trastornos similares a la talasemia, cuyo grado de gravedad va desde el característico del estado de portador, al propio de la talasemia mayor. Este grado de gravedad clínico se relaciona con el nivel de desequilibrio entre las cadenas alfa y no alfa de la globina.

A nivel molecular, las β-talasemias forman un grupo muy heterogéneo. Han sido descritas más de 200 mutaciones patológicas, siendo la mayoría de ellas mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones que dan lugar a un cambio en la pauta de lectura, aunque en raras ocasiones la β-talasemia se ha dado como resultado de una deleción génica generalizada.

Referencias

- Beta-thalassemia. Cao A, Galanello R. Genet Med. 2010 Feb;12 (2):61-76. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed.
- Ten Years of Routine α- and β-Globin Gene Sequencing in UK Hemoglobinopathy Referrals Reveals 60 Novel Mutations. Henderson SJ, Timbs AT, McCarthy J, Gallienne AE, Proven M, Rugless MJ, Lopez H, Eglinton J, Dziedzic D, Beardsall M, Khalil MS, Old JM. Hemoglobin. 2016;40(2):75-84. doi: 10.3109/03630269.2015.1113990.

2. Uso previsto

El kit **imegen-HBB** ha sido diseñado para identificar las mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones en las regiones codificantes, así como en los sitios de *splicing* del gen *HBB*. Este kit no permite detectar grandes deleciones ni duplicaciones.

El kit **imegen-HBB** usa la tecnología de secuenciación por Sanger. Esta método, altamente exhaustivo, se basa una replicación del ADN *in vitro,* durante la cual tiene lugar la incorporación selectiva por parte de una DNA polimerasa de dideoxinucleotidos terminadores de cadena, marcados fluorescentemente. Este proceso genera fragmentos de distintos tamaños que son analizados mediante electroforesis capilar y dan lugar a una secuencia de nucleótidos completa de la región amplificada del gen mediante el análisis de dos cadenas de ADN complementarias (*Forward* y *Reverse*).

El kit **imegen-HBB** es sólo para uso diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando material de referencia procedente de HAPMap Project obtenidas a través de Coriell Institute for Medical Research. En dicha validación se ha comprobado que se detectan de manera específica las variantes presentes en las regiones diana del producto, especificadas en el apartado 2 de este documento, y que dicho análisis fuera reproducible.

Especificidades técnicas:

- Tipo de muestra: ADN genómico procedente de sangre periférica.
- Cantidad de ADN requerida: 50 ng (25 ng por reacción).

Este producto cumple con los requisitos de calidad especificados por la ISO 13845 en lo referente a los materiales empleados en su proceso de fabricación

4. 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.

5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 24 determinaciones.

- HBB Master Mix: Master Mix de PCR con las cantidades necesarias de tampón, $MgCl_2$, dNTPs y agua para llevar a cabo las reacciones de PCR.
- HBB Taq: DNA polimerasa necesaria para las reacciones de PCR.
- HBB PCR: Oligonucleótidos específicos para las reacciones de PCR.
- HBB Sec F: Oligonucleótidos específicos para las reacciones de secuenciación.
- HBB Sec R: Oligonucleótidos específicos para las reacciones de secuenciación.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
HBB Master-Mix	Disco amarillo	3 x 350 µl	-20ºC
HBB Taq	Tapa amarilla	10 µl	-20ºC
HBB PCR (Exons: 1-2 and 3)	Disco verde	66 µl	-20ºC
HBB Sec F (Exons: 1-2 and 3)	Disco azul	75 µl	-20ºC
HBB Sec R (Exons: 1-2 and 3)	Disco rojo	75 µl	-20ºC

Tabla 1. Componentes del kit imegen-HBB

6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

Equipos:

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

Reactivos:

- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems cat. No. 4336919)
- Hi-Di™ formamide
- Exosap-IT
- Recomendado: Optima DTR-pate (EdgeBio)

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 necesarios para llevar a cabo las reacciones de secuenciación ni la electroforesis capilar.

7. Protocolo de ensayo

7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

Para el desarrollo de este protocolo se deben realizar dos reacciones de amplificación por muestra, una para la amplificación conjunta de los exones 1 y 2 y otra para la amplificación del exón 3.

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.

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras. Agitar en vortex cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. En dos tubos de 1,5 mL preparar los mix de PCR con las siguientes cantidades:

Reactivo	Exones 1-2	Exón 3
HBB Master Mix	19.9 µL	19.9 µL
HBB Taq	0.1 µL	0.1 µL
HBB PCR Ex 1-2	2.5 µL	-
HBB PCR Ex 3	-	2.5 µL

3. Dispensar en tubos de 0.2 mL o en una placa de PCR, 22.5 µL de cada uno de los masters de PCR.
4. Una vez dispensados los mixes de PCR añadir a los pocillos correspondientes:
   - 2.5 µL de las muestras de ADN genómico (10 ng/µL)
   - 2.5 µL de agua libre de nucleasas (control negativo de PCR)
   - 2.5 µL del control de extracción (Cext).
5. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación con el apropiado ratio de las rampas (4ºC/s).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95ºC	15 minutos	1
95ºC	30 segundos	40
55ºC	30 segundos	
72ºC	45 segundos	
72ºC	10 minutos	1
4ºC	∞	1

Tabla 2. Programa de PCR óptimo para Biometra T3 y GeneAmp® PCR System 2720 (Applied Biosystems)

Posteriormente se recomienda analizar, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, los productos de PCR para verificar la presencia de amplificados en todas las reacciones de PCR y la ausencia de amplificación en los controles negativos.

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

7.2 Purificación de los productos de PCR

Antes de llevar a cabo la secuenciación es necesario realizar la purificación de los productos de PCR. Esta purificación se puede realizar empleando el siguiente protocolo:

1. Añadir 5 µL de cada uno de los amplificados que se vaya a purificar en una placa nueva o en un tubo de 0.2 mL.
2. Añadir 2 µL de ExosapIT a cada pocillo.
3. Incubar las muestras 15 minutos a 37ºC y 15 minutos a 80ºC en un termociclador.

Mantener a 4ºC si se va a proceder con la secuenciación en las siguientes 24 horas o conservar a -20ºC.

7.3 Preparación de las reacciones de secuenciación

A partir de cada productos de PCR purificados se prepararán dos reacciones de secuenciación: una con el cebador directo y la otra con el reverso. Las reacciones de secuenciación se realizan en un volumen final de 10 µL.

Nota: Los reactivos de secuenciación utilizados en esta sección no se incluyen en el kit.

1. Preparar una mezcla que contenga, 2 µL de Buffer BigDye 5x y 3.4 µL de agua libre de nucleasas, por reacción.
2. Añadir 1 µL del ADN purificado de la PCR.
3. Añadir 1.6 µL de cada uno de los cebadores a los pocillos correspondientes. Para realizar la secuenciación con los cebadores directos emplear los tubos de disco azul (Sec F-HBB) y con los cebadores reversos emplear los tubos de disco rojo (Sec R-HBB).
4. Tapar los tubos de las reacciones de secuenciación, dar un spin y desnaturalizar en un termociclador durante 5 minutos a 98ºC.

5. Sacar los tubos del termociclador, manteniéndolos en una gradilla de frío, y dar un spin.
6. Añadir 2 µL Big Dye a cada una de las reacciones y dar un spin.
7. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de secuenciación con el apropiado ratio de las rampas (4ºC/s).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96ºC	1 minuto	1
96ºC	10 segundos	30
50ºC	5 segundos	
60ºC	4 minutos	
4ºC	∞	1

Tabla 3. Programa de secuenciación óptimo para SimpliAmp Thermal Cycler y GeneAmp PCR System 9700

Mantener a 4ºC si se va a proceder con la purificación en las siguientes 24 horas o conservar a -20ºC.

7.4 Purificación de las reacciones de secuenciación

Para la purificación de las reacciones de secuenciación se emplean las placas Optima DTR (EdgeBio) según el siguiente protocolo:

1. Manteniendo la placa Optima DTR en posición horizontal, abrir el envoltorio que protege la placa del kit y quitar el adhesivo que sella la parte inferior.
2. Colocar la placa Optima DTR encima de una placa desechable, retirar el adhesivo que sella la parte superior y centrifugar 3 minutos a 2300 rpm y 4ºC.
3. Colocar la placa Optima DTR sobre una placa de 96 pocillos con faldón, compatible con el secuenciador.
4. Dar un spin a la placa de las reacciones de secuenciación.
5. Transferir las reacciones a purificar a la placa Optima DTR, con ayuda de una pipeta multicanal, colocándolas en el centro del pocillo y sin tocar ni las paredes ni el gel del fondo del pocillo.
6. Centrifugar 5 minutos a 2300 rpm y 4ºC.
7. Desechar la placa Optima DTR.
8. Añadir 5 µL de formamida a cada una de las reacciones de secuenciación y desnaturalizar 5 minutos a 98ºC.

Conservar a 4ºC la placa con las reacciones de secuenciación purificadas hasta el momento de introducirla en el secuenciador.

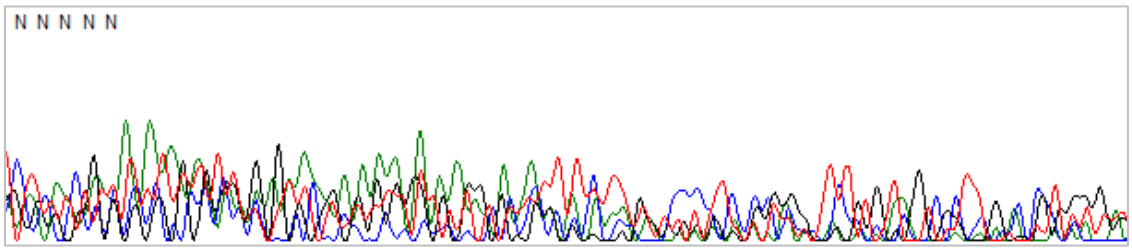
7.5 Electroforesis capilar

Una vez purificadas, las reacciones de secuenciación deben ser analizadas mediante electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se empleará el polímero recomendado por el fabricante. Para programar las condiciones de electroforesis se tendrá en cuenta que el amplificon de menor tamaño tiene 528 pb y el amplificon de mayor tamaño tiene 823 pb.

8. Troubleshooting

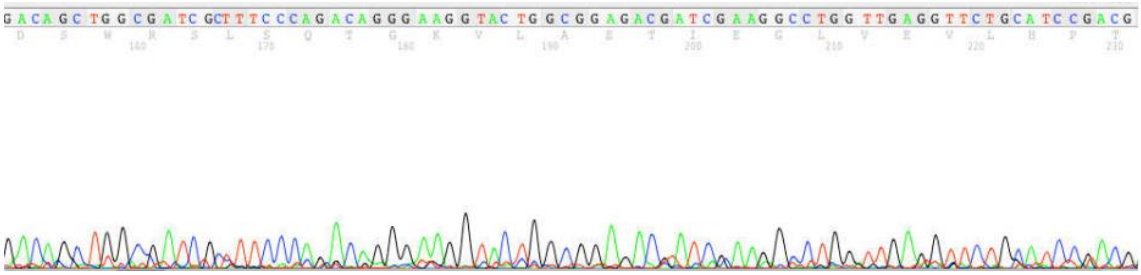
A continuación se listan los posibles resultados inesperados, obtenidos tras la realización del protocolo de amplificación y secuenciación de las dianas del kit **imegen-HBB,** así como las causas más probables de dichos resultados y la solución propuesta.

- **Ausencia de datos de secuencia**



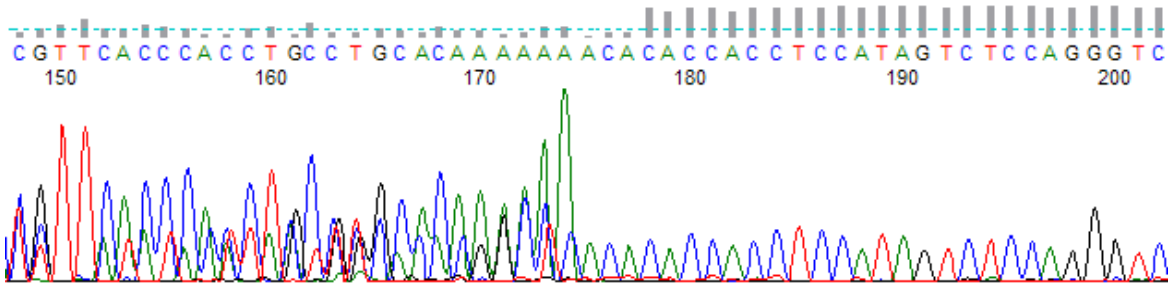
Causa probable	Solución
Cantidad de ADN molde no óptima, ya sea por exceso o por escasez	Comprobar que la concentración de la muestra es la recomendada y ajustarla a la cantidad de ADN especificada en estas instrucciones de uso
ADN degradado	Repetir la reacción de PCR y/o la extracción del ADN molde
Presencia de contaminantes inhibidores de PCR en las muestras (ej, sales, fenoles, EDTA, etanol)	Purificar el ADN molde

- **Señal de fluorescencia débil (picos bajos)**



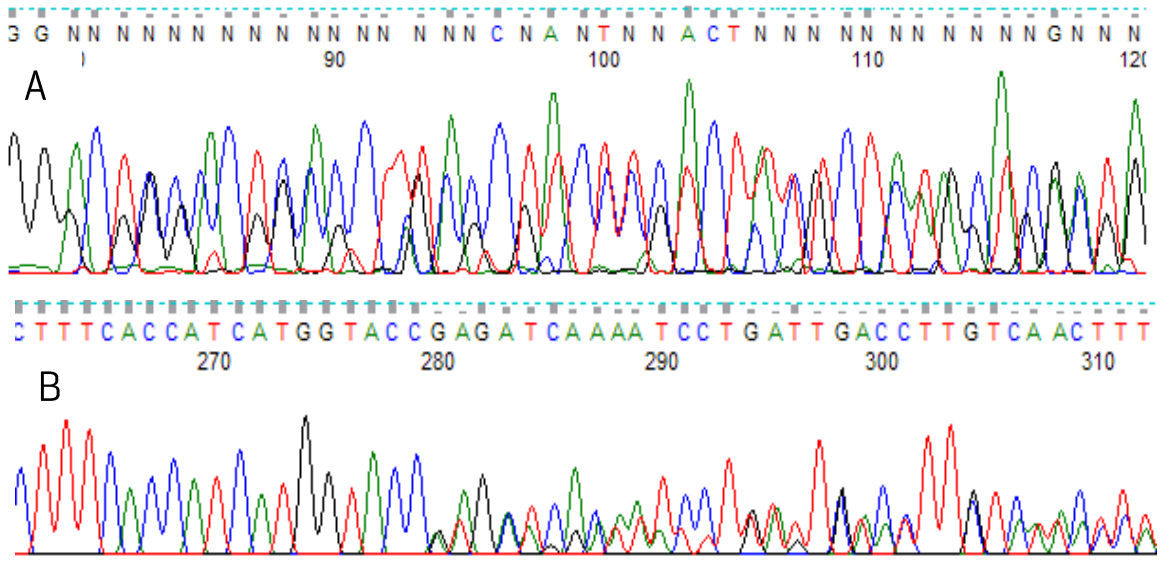
Causa probable	Solución
Cantidad de ADN molde no óptima, ya sea por exceso o por escasez	Comprobar que la concentración de la muestra es la recomendada y ajustarla a la cantidad de ADN especificada en estas instrucciones de uso
Presencia de contaminantes inhibidores de PCR en las muestras (ej, sales, fenoles, EDTA, etanol)	Purificar el ADN molde

- Inicio de baja calidad seguido de una señal de fluorescencia débil



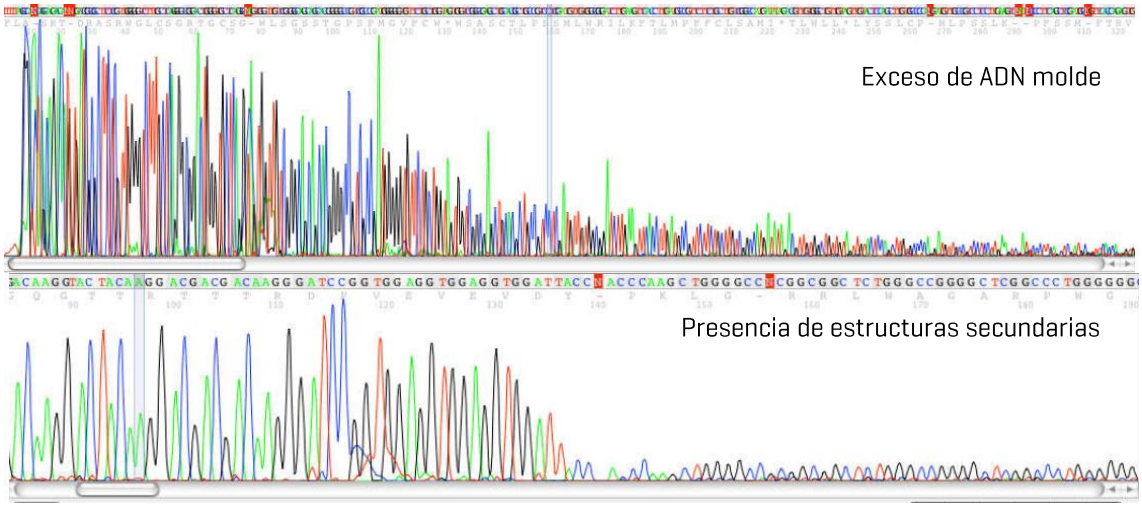
Causa probable	Solución
Presencia de oligonucleótidos en el purificado de PCR	Confirmar que la purificación de los productos de PCR se ha llevado a cabo correctamente, de lo contrario, repetir dicho paso del protocolo

- Presencia de múltiples picos



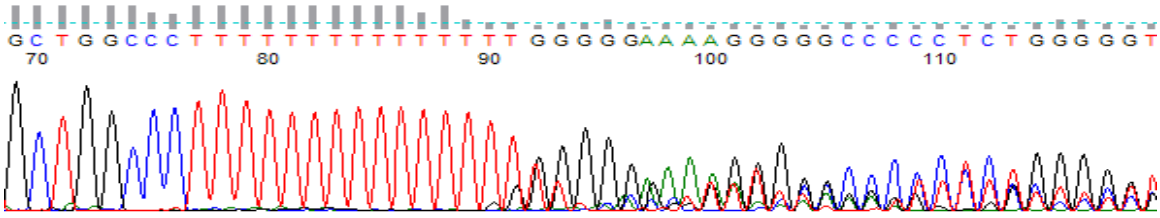
Causa probable	Solución
[A] Presencia de oligonucleótidos en el purificado de PCR	Confirmar que la purificación de los productos de PCR se ha llevado a cabo correctamente, de lo contrario, repetir dicho paso del protocolo
[B] Presencia de un INDEL en el producto de PCR	Analizar la secuencia de la hebra complementaria para confirmar la presencia del evento mencionado

- Interrupción de la señal de secuencia



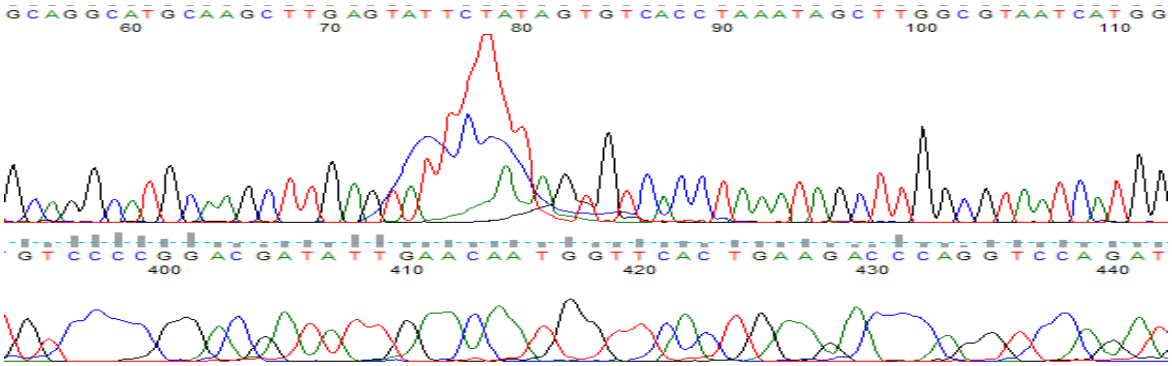
Problema	Causa probable	Solución
La señal de fluorescencia desaparece bruscamente	Presencias de estructuras secundarias (regiones ricas en GC y AT pueden causar estructuras como bucles y horquillas en el ADN)	Con el fin de desnaturalizar las estructuras secundarias, añadir DMSO o betaina a la reacción de secuenciación (recomendamos sustituir el volumen de agua por el de alguno de estos reactivos)
La señal de fluorescencia se debilita gradualmente (efecto ski-slope)	Exceso de ADN molde (una sobrecarga de ADN dará lugar a un número excesivo de fragmentos pequeños)	Añadir menos ADN molde en la reacción de secuenciación
La señal de fluorescencia se debilita rápidamente	Presencia de regiones repetitivas (sobre todo repeticiones GC y GT pueden causar un desvanecimiento de la señal por agotamiento de reactivos, deslizamiento de la polimerasa, o formación de estructuras secundarias)	1. Añadir DMSO o betaina a la reacción de secuenciación 2. Analizar la secuencia de la hebra complementaria

- Múltiples picos *downstream* de un homopolímero



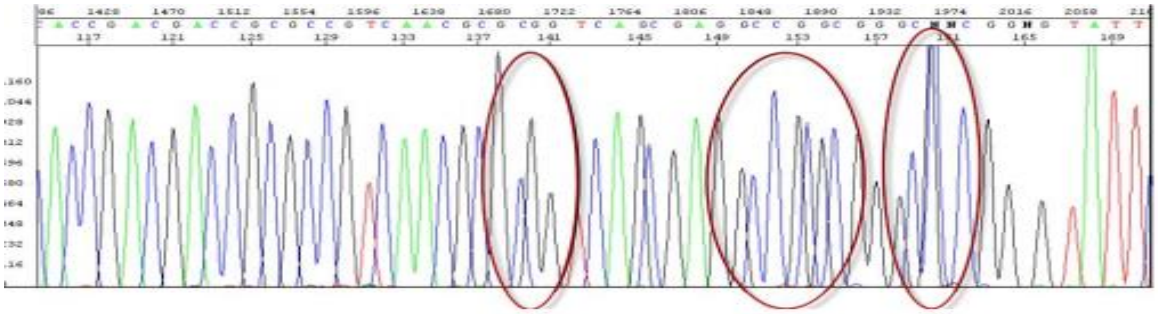
Causa probable	Solución
Deslizamiento de la enzima provocado por el homopolímero, dando lugar a longitudes variables de la misma secuencia tras dicha región (poblaciones n-1, n-2 y n-3)	Analizar la secuencia de la hebra complementaria

- Artefactos de secuenciación



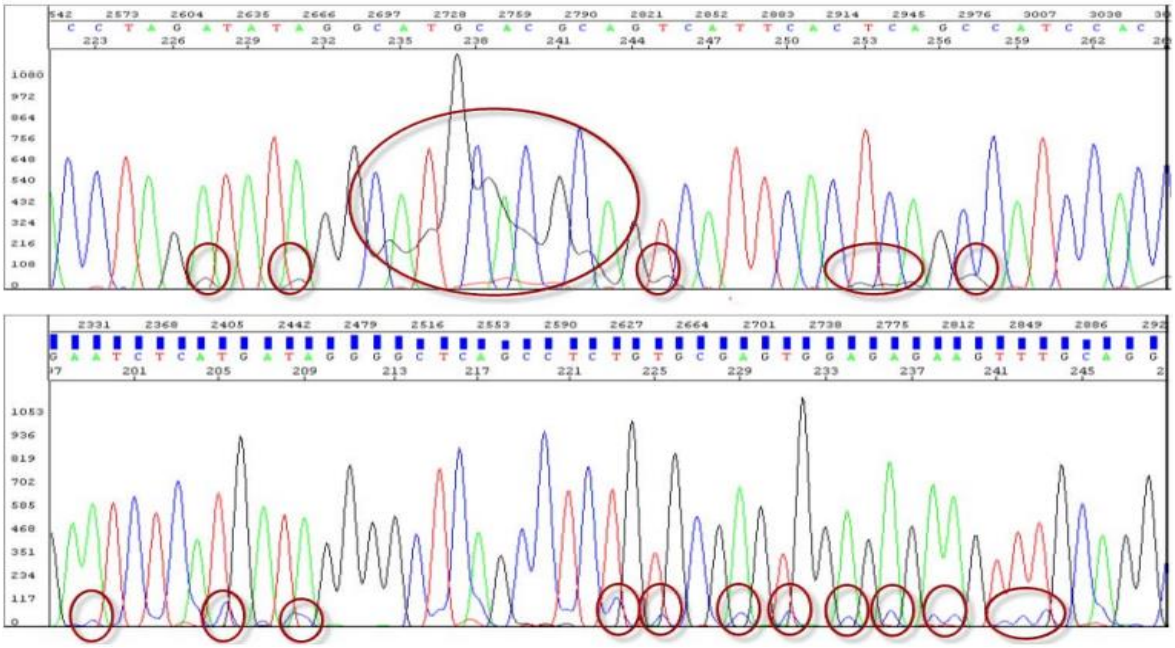
Problema	Causa probable	Solución
Presencia de grandes picos que enmascaran la secuencia real	Los *blobs* debidos al BigDye no incorporado, suelen verse a 70 pb y 120 pb. Normalmente se deben a secuencias fallidas o débiles. En ocasiones la secuencia real puede llegar a leerse bajo estos *blobs*.	Añadir más ADN molde o menos BigDye a la reacción de secuenciación
Pico multicolor que cubre 1-2 bases	Presencia de una pequeña burbuja de aire en el polímero del capilar	Revisar los capilares y repetir la secuenciación
Baja resolución de los picos en las primeras 500 pb de secuencia	1. Si el problema se da en alguna muestra en particular, se deberá a la presencia de contaminantes en la muestra o a una sobrecarga del capilar	1. Limpiar el ADN molde 2. Usar menos ADN molde en la reacción de secuenciación
	2. Si el problema se da en varias muestras, se deberá a una degradación del polímero o a una matriz antigua (polímero con muchos usos)	Si la matriz se ha usado en exceso, es posible que deba reemplazarse

- **Compresión de G/C (moldes ricos en G/C)**



Causa probable	Solución
Desnaturalización incompleta del ADN	Añadir DMSO o Betaina a la reacción de secuenciación

- **Degradación de los dideoxinucleótidos (ddNTPs) G/C**



Causa probable	Solución
En reactivos de secuenciación en mal estado, los dd-NTPs pueden estar degradados. Una degradación leve da lugar a picos de rebote tras los verdaderos picos C y/o G. Niveles de degradación superiores dan lugar a pequeños picos C y/o G o a la desaparición completa de estos	Repetir la secuenciación con alícuotas nuevas de reactivos de secuenciación.

9. Limitaciones

9.1 Equipos

Imegen-HBB ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific)
- GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific)
- Biometra T3 (ThermoFisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 2720 (ThermoFisher Scientific)

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-HBB ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación:

- 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific)

En caso de utilizar otros equipos de secuenciación distintos al 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific), tendrá que ajustarse a las especificaciones de los protocolos de dichos equipos.

9.2 Reactivos

Imegen-HBB 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.