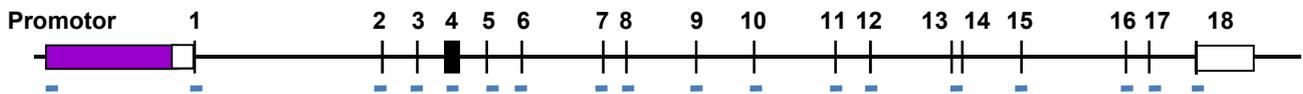


# EOSAL-CNV LDLR



## Gen LDLR



Esquema del gen LDLR (indicando promotor y exones) y localización de los diferentes fragmentos analizados

EOSAL-CNV para el gen RLDL permite la identificación de CNVs que afecten a este gen en la región promotora o en sus exones.

El sistema es sencillo y rápido basándose en la amplificación y marcado de las regiones de interés en una sola PCR de forma proporcional al número de copias que hay en el ADN problema de cada uno de estas regiones.

Para obtener estos resultados se sigue un protocolo muy sencillo:

- Añadir el ADN problema a la mezcla de reacción.
- Someter a la mezcla anterior a los ciclos de PCR indicados en el protocolo.
- Analizar directamente mediante un secuenciador capilar los productos de la reacción (no se precisa purificación).
- Analizar mediante un sencillo software, EOSAL-CA, los datos obtenidos para determinar la presencia o ausencia de CNVs en las regiones analizadas.

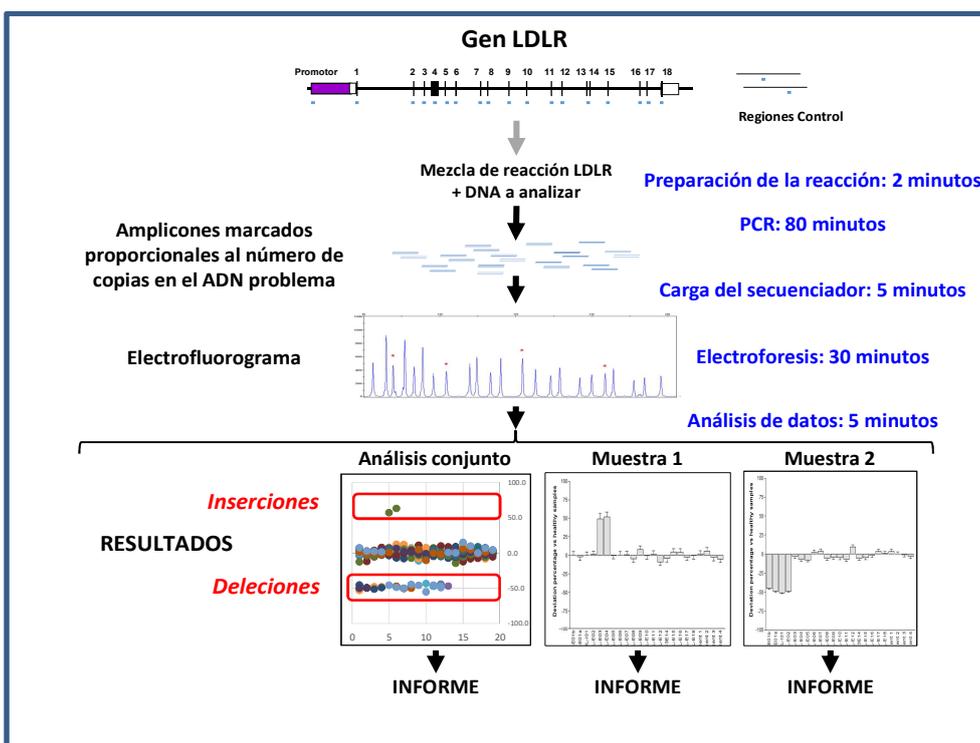
Mutaciones en el gen RLDL son causantes de un 70-80% de los casos de Hipercolesterolemia Autosómica Dominante (HAD) con diagnóstico genético. Tradicionalmente, la enfermedad causada por mutaciones en el RLDL se ha denominado Hipercolesterolemia Familiar (OMIN 143890).

Esta enfermedad se caracteriza principalmente por los niveles elevados de LDL-colesterol y, asociado a estos, un elevado riesgo cardiovascular. La forma heterocigota esta presente en 1 de cada 80 o 250 individuos, dependiendo de la población. La forma homocigota presenta unos niveles mucho más elevados de LDL-Colesterol y es mucho menos frecuente (1 de cada 160.000-250.000 individuos).

En el gen LDLR, en general, un 10% de las mutaciones descritas son CNVs; si bien, en algunas poblaciones el porcentaje puede ser mucho mayor.

Los principales genes causantes de HADs son LDLR, APOB y PCSK9. Siendo muy importante el estudio de CNVs del LDLR dado que suponen hasta el 10% de los casos. Este porcentaje es mucho mayor que el que representan las mutaciones en los otros dos genes conjuntamente.

Los fragmentos analizados se basan en la secuencia ENST00000558518.5.



REFS.  
EOS-LDLR-24  
EOS-LDLR-96

RUO (solo para su uso en investigación)

DATOS DE CONTACTO:  
[www.seqplexing.com](http://www.seqplexing.com)  
e-mail: [info@seqplexing.com](mailto:info@seqplexing.com)  
Tel: +34 96 35432 63  
Móvil: +34 685679263

# EOSAL-CNV LDLR

Refs. EOS-LDLR-24, EOS-LDLR-96  
(24 o 96 reacciones; RUO)



## PROTOCOLO REACCIÓN DE PCR.

Se deben realizar las siguientes reacciones: 3 controles normales por duplicado, un control negativo, cada muestra por duplicado y un control positivo (opcional). Preparar todos los ADN a 10 ng/μl.

- Descongelar la mezcla de reacción.
- Distribuir 12,5 μl del mix de reacción en tubos (tubos, strips o placas) para el termociclador del que se disponga marcados/identificados convenientemente.
- Se añaden 2,5 μl de ADN al tubo correspondiente, mezclar pipeteando 3-4 veces.
- Se realizan los ciclos de PCR siguientes:

PROGRAMA REACCIÓN		
Temp °C	Tiempo.	
95	15 min	
98	30 seg	
62	30 seg	<b>x 10 ciclos</b>
72	50 seg	
95	30 seg	
65	30 seg	<b>x 20 ciclos</b>
72	50 seg	
72	5 min	
4	∞	

## CARGA EN EL SECUENCIADOR CAPILAR (APPLIED BIOSYSTEMS/THERMO FISHER).

- Realizar la electroforesis según las instrucciones del equipo para análisis de fragmentos con la matriz G5.
- Identificar o marcar las muestras que van a cada pocillo.

- Preparar una mezcla de carga con Formamida (5μl) y patrón de tamaños LIZ 500 (0.05μl) por cada muestra a cargar en el secuenciador. Ejemplo de volúmenes cuando se utilizan una placa de 384.
- Distribuir 5 μl en cada pocillo de una placa donde se cargará una muestra.
- Añadir 1.5 μL de los productos de PCR en el pocillo correspondiente.
- Se cierra la placa con la tapa adhesiva y se centrifuga unos segundos.
- Desnaturalizar las muestras: Se coloca en un termociclador con tapa termostatazada, calentar a 95°C durante 2 minutos, bajar a 4°C o dejar en hielo hasta que se ponga en el secuenciador.
- Colocar la placa en el secuenciador y realizar la electroforesis.

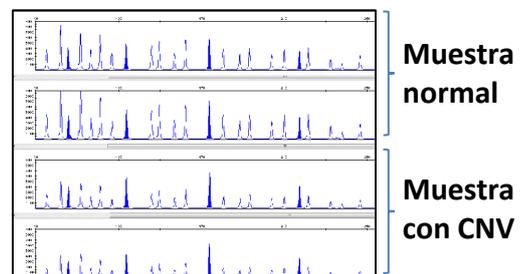
Patrón de tamaños LIZ 500 (GeneScan™ 500 LIZ® size standar, Applied Biosystems, Ref 4322682).

## ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Para analizar los resultados mediante nuestro software se deben realizar los siguientes pasos:

- Analizar los resultados de la carrera mediante el software GeneMapper (Applied Biosystems).
- Identificar los picos utilizando solo los tamaños de LIZ500 a partir de 90 (preferible entre 90 y 300).
- Exportar la tabla con los datos de los picos obtenidos de todas las muestras analizadas.
- Analizar los datos según el software EOSAL-SA ([www.seplexing.com](http://www.seplexing.com)) siguiendo las instrucciones del mismo. Básicamente :
  - Una vez abierta la aplicación web : Importar el archivo de datos.
  - Identificar qué muestras son controles y sus duplicados.
  - Identificar cada muestra problema y sus correspondientes duplicados.
  - Realizar el análisis.

Los resultados mostrarán la desviación de cada fragmento analizado en el gen en relación a los valores normales. Esto se puede visualizar por muestra o por fragmento analizado. En la siguiente figura se pueden ver algunos ejemplos de este gen:



Exportar

Software EOSAL-CA

Análisis de datos

