

# Kit GEMPLEX CGG

*Manual Técnico*

*Para determinação do número de repetições  
CGG da região 5' não traduzida do gene  
FMR1 (Fragile X Mental Retardation-1)*

# 1. Introdução

O gene responsável pela Síndrome do X frágil denominado *FMR1* está localizado em Xq27.3, apresenta 38Kb e é formado por 17 exons e 16 introns, sendo altamente conservado evolutivamente (Eichler et al, 1993). O gene *FMR1* codifica pelo menos 12 tipos distintos de mRNA, originados pelo mecanismo de *splicing* alternativo, com expressão em diferentes tecidos, em especial no cérebro, testículos e epitélio. A proteína resultante da expressão do gene *FMR1* é denominada FRMP (Verkek et al, 1991).

A principal mutação envolvida nessa doença é a expansão de uma repetição polimórfica de trinucleotídeos CGG, repetida em *tandem*, presente em uma região 5' não-traduzida (5'UTR) do primeiro exon do gene *FMR1*. Essa mutação é classificada como mutação dinâmica e ocorre em mais de 99% dos afetados pela síndrome (Verkek et al, 1991; Yu et al, 1991).

Indivíduos não afetados pela doença apresentam geralmente entre 5 e 55 trinucleotídeos CGG, enquanto que pessoas apresentando o aspecto mais grave da síndrome apresentam expansão da mutação acima de 200 repetições. A progressão para a mutação completa (acima de 200 repetições CGG) pode ocorrer a partir do estágio de pré-mutação, caracterizado pela presença de 56 a 200 repetições CGG.

Nesses casos há produção normal da proteína FMRP e os portadores não estão associados a fenótipos alterados (Weinhausel e Hass, 2001). Esse número de repetições é considerado instável, pelo fato de ser capaz de sofrer aumento quando transmitida para futuras gerações.

Indivíduos portadores da pré-mutação (entre 56 e 200 CGG) apresentam o risco para a insuficiência ovariana primária associada ao X frágil (FXPOI), principal causa de disfunção ovariana em mulheres.

Os fenótipos de pré-mutação são caracterizados por excesso de mRNA de *FMRI* e desequilíbrio de numerosas proteínas. Déficits de desenvolvimento, particularmente na atenção e comunicação social, foram observados em muitas crianças portadoras da pré-mutação.

### *GEMPLEX CGG*

Para faixa compreendida entre 45 a 55 repetições há uma sobreposição entre os alelos normais e pré-mutados, freqüentemente referida como zona cinzenta. Para esses alelos intermediários, somente a observação da instabilidade intrafamiliar pode identificá-los como pré-mutados, uma vez que em algumas famílias eles permanecem estáveis e em outras eles sofrem o aumento de repetições. Esses alelos podem se apresentar estáveis ao longo de muitas gerações.

Uma característica epigenética relacionada à expansão da repetição CGG é a metilação da região promotora do gene *FMRI* nos pares CpG. Em homens apresentando a doença, todos os pares CpG são metilados, enquanto que a metilação é totalmente ausente em indivíduos masculinos não afetados. A metilação da região promotora do gene suprime a transcrição do RNA mensageiro e elimina a síntese protéica. As repetições CGG localizam-se a 250pb 5' da ilha CpG associada ao promotor do gene *FMRI*. Nos indivíduos afetados, tanto a zona de repetição quanto o promotor do gene encontram-se metilados, a perda da expressão do gene resulta na manifestação da doença. Esta inativação é um evento importante na patogênese da síndrome e, portanto, a presença da metilação no gene *FMRI* pode ser usada como marcador genético da doença (Pieretti et al, 1991; Verkek et al, 1991).

O risco de expansão na próxima geração para uma mutação cheia (acima de 200 repetições CGG) aumenta com o tamanho. Alelos com a mutação completa podem conter mais de 1000 repetições de CGG. Acima de 200 repetições, o

fenótipo FXS é associado com o status de metilação e não necessariamente ao número exato de repetições.

Pacientes com a mutação cheia frequentemente apresentam a clássica Síndrome do X Frágil (FXS) caracterizada por retardo mental, autismo e grandes distúrbios emocionais e psiquiátricos. Ao contrário da pré-mutação, esses indivíduos têm níveis mais baixos de expressão da proteína *FMRI* devido à inativação de sua transcrição.

A avaliação clínica da FXS e a interpretação dos sintomas relacionados são definidos pelo número de repetições CGG e o estado de metilação do gene. É possível distinguir quatro tipos de alelos: normal (menor do que 45 repetições), intermediário (de 45 a 55 repetições), pré-mutação (de 56 a 199 repetições) e mutação cheia (acima de 200 repetições). Esses intervalos correspondem ao número mínimo de repetições necessárias para que ocorra expansão e foram estabelecidas pelo *American College of Medical Genetics*.

### *GEMPLEX CGG*

Em adição aos riscos relacionados com o total de repetições, muitos alelos de *FMRI* contêm trincas AGG que se intercalam entre os CGG. Essas interrupções conferem estabilidade ao DNA e reduz o risco de expansão da região na próxima geração. Portadoras sem interrupções de AGG apresentam um risco maior de expansão do que portadoras com o mesmo número de repetições, mas com pelo menos uma interrupção de AGG e, assim, menos sequências consecutivas de CGG.

O **Kit** GEMPLEX CGG é usado para diagnóstico *in vitro* e detecta as regiões de repetição CGG na região 5' não traduzida do gene *FMRI*. O teste consiste em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese capilar em sequenciador automático e conversão do tamanho dos produtos em número de repetições CGG.

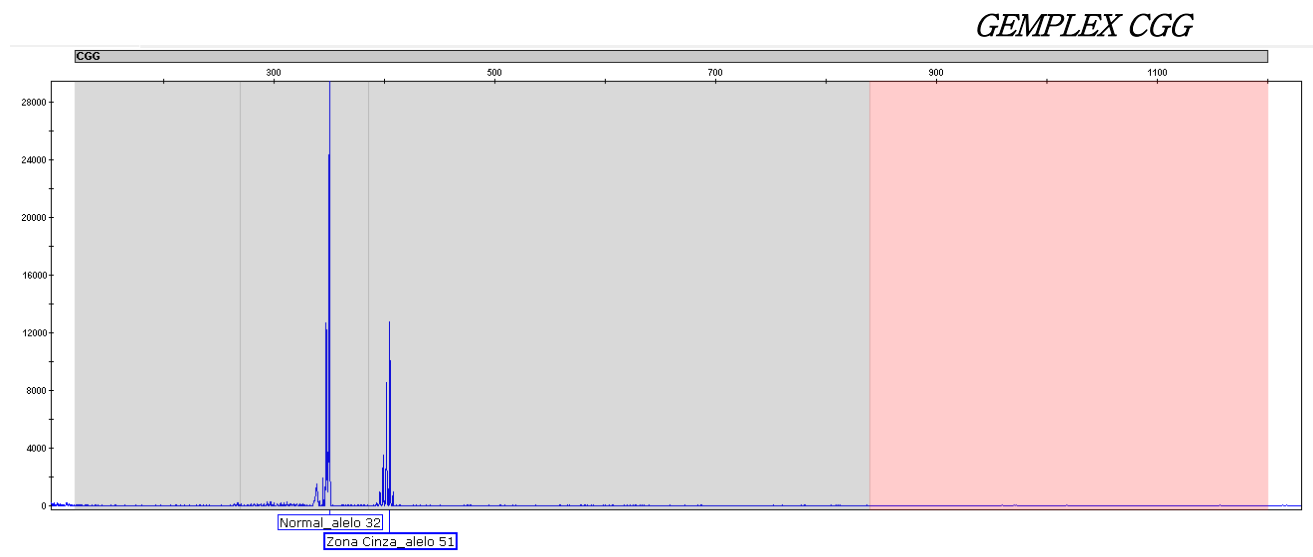
### *Princípios do Kit*

A maioria dos testes de diagnóstico para distúrbios no gene *FMRI* que são realizados por PCR tem a limitação de detectar apenas expansões de 100 a 150

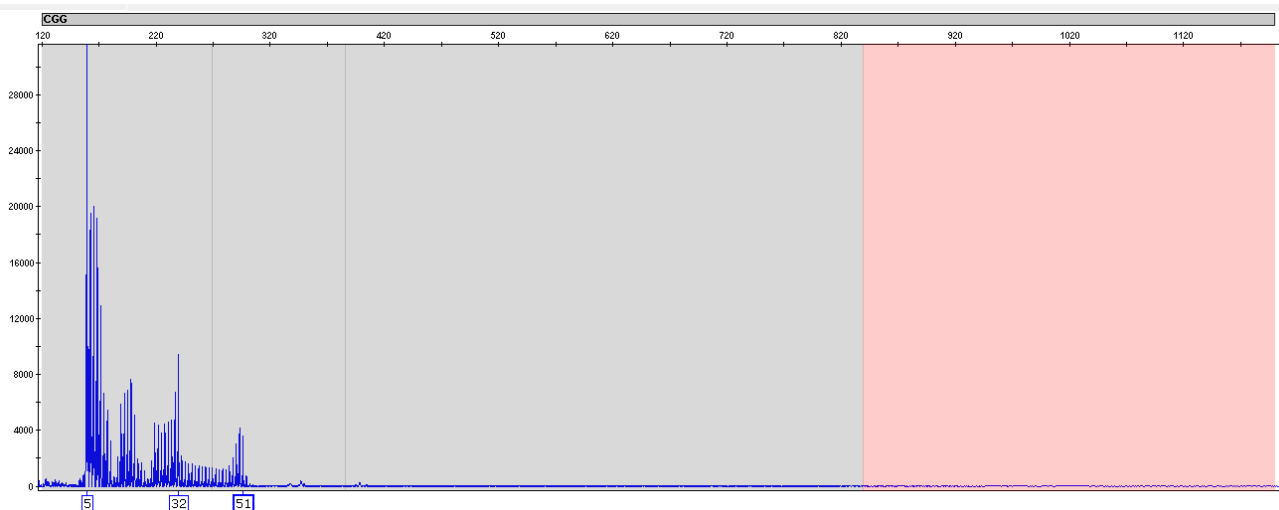
repetições CGG. Para alterações maiores pode ser utilizada a análise por *Southern blot* que por sua vez é uma técnica que requer muito tempo e muita quantidade de DNA genômico; sendo a metodologia inadequada para rastreamento populacional e não é facilmente utilizada em testes de rotina.

O **Kit** GEMPLEX CGG é usado para determinar o número de repetições CGG no gene *FMRI* através de reação de PCR. O sistema é composto por dois pares de *primers* capazes de amplificar o gene específico e cada uma das trincas CGG, uma solução tampão e a DNA polimerase. Um dos *primers* é marcado com o fluoróforo FAM e possibilita a análise dos alelos através de eletroforese capilar.

O tamanho do produto de PCR correspondente ao do gene específico (Figura 01) é então convertido em número de repetições CGG usando fatores de conversão de tamanho e mobilidade. Os amplicons produzidos pelo *primer* CGG (Figura 02) correspondem a cada combinação da região repetida com o *primer forward* fluorescente. Esses picos são separados por 3pb de diferença e provê informação confirmatória sobre o número de repetições, além de zigosidade e presença de interrupções de AGG.



**Figura 01** – Amplificação gene específico



**Figura 02** – Amplificação repetição CGG

## *Fluxo*

O fluxo de trabalho deve proceder de uma maneira unidirecional começando em uma área exclusiva de pré-amplificação e movendo-se para uma área de pós-amplificação. O produto amplificado deve permanecer na área de pós-amplificação para minimizar o risco de contaminação.

O DNA genômico é adicionado ao PCR mix juntamente com o Primer mix (gene específico ou CGG) e a DNA polimerase. Posteriormente, é colocado no termociclador, levando de 4 a 5 horas para o término da reação. Os produtos de PCR gerados são misturados com formamida Hi-Di e o padrão de peso molecular GEMROX-1000 e então submetidos à eletroforese capilar em sequenciador 3500 Genetic Analyzer usando capilar de 50cm e polímero POP-7.

A determinação do número de repetições CGG é feita a partir da conversão do tamanho em pares de bases utilizando parâmetros que influenciam a mobilidade dos fragmentos (Veja em *Conversão da migração em número de repetições CGG*).

Até 200 repetições CGG, os picos são detectados dentro da gama linear do instrumento. Os picos são convertidos em repetições CGG a partir do tamanho em pares de bases usando-se fatores de correção obtidos para o sequenciador automático em uso. Acima de 200 repetições, o tamanho dos produtos da PCR excede o limite de resolução do polímero POP7, pois fragmentos superiores a este

limite têm uma taxa de migração independente do tamanho do produto. Assim, os produtos superiores a 200 CGG são identificados como >200 CGG.

### *Considerações Gerais*

- Antes de usar o sequenciador automático, assegurar que o aparelho possua matriz capaz de detectar os fluoróforos FAM e ROX, segundo as instruções do fabricante.

#### *GEMPLEX CGG*

- Ajustar as condições de injeção e tempo de corrida de acordo com as configurações do instrumento, como o comprimento do capilar, por exemplo.
- Em um pequeno número de indivíduos com FXS, o mecanismo de expansão das trincas CGG não são as responsáveis pela síndrome. Nestes casos, estudos de citogenética ou o sequenciamento do gene e/ou ensaios para identificar mutações raras, tais como as mutações de ponto, podem fornecer informações importantes.



## 2. Composição do kit

### Componentes fornecidos

Todos os reagentes necessários para a amplificação são fornecidos com o kit (Tabela 1).

Tabela 1: Componentes do kit e suas respectivas quantidades.

Componente	Descrição	Volume
PCR Mix	Dois tubos contendo uma mistura de $MgCl_2$ , desoxirribonucleotídeos trifosfatos em solução tampão apropriada.	928 $\mu$ L /tubo
Primer Mix Alelo Específico	Um tubo contendo <i>primers</i> para amplificação dos alelos específicos do gene <i>FMR1</i> .	53 $\mu$ L/tubo
Primer Mix CGG	Um tubo contendo <i>primers</i> para amplificação das trincas CGG de cada alelo do gene <i>FMR1</i> .	53 $\mu$ L/tubo
Controle Positivo	Um tubo contendo DNA genômico feminino a 100 ng/ $\mu$ L (32/51 CGG).	15 $\mu$ L/tubo
DNA Polimerase	Um tubo contendo enzima DNA polimerase em glicerol	53 $\mu$ L/tubo
GEMROX-1000	Um tubo contendo padrão interno de peso molecular. Este componente deve ser armazenado na área de pós-PCR após a abertura do kit.	60 $\mu$ L/tubo

Os controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada rotina. A água pode ser utilizada como um controle negativo.



Os reagentes fornecidos são suficientes para 50 reações específicas, 50 reações CGG e 100 eletroforeses capilares. Recomenda-se o uso de até quatro ciclos de congelamento e descongelamento.

*GEMPLEX CGG*

### *Reagentes não fornecidos*

Alguns reagentes necessários e que não são fornecidos com este kit são: reagentes para a extração de DNA genômico, água *nuclease-free*, polímero POP7, formamida Hi-Di e kit para calibração do sequenciador automático (DS-33).

### *Armazenamento dos Componentes*

Os fluoróforos ligados aos *primers* são sensíveis à luz. Portanto, devem ser protegidos quando não estiverem em uso. Todos os componentes são entregues congelados. Armazenar os reagentes de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Para descongelar os reagentes, deixar à temperatura ambiente antes do uso, exceto a enzima DNA polimerase. Sempre centrifugar brevemente cada componente antes de utilizá-los.

O ensaio deve ser realizado à temperatura ambiente (aproximadamente  $22^{\circ}\text{C}$ ).



# 3. Procedimentos

## *Pré-análise*

Amostras de sangue devem ser coletadas em EDTA e o DNA genômico deve ser extraído por metodologias bem estabelecidas, incluindo-se a análise de pureza. Entre as substâncias que podem interferir com o Kit está a heparina.

Para a amplificação do gene específico utilizar 30 ng de DNA genômico em cada reação (1  $\mu$ L de DNA em uma concentração de 30ng/ $\mu$ L).

Para a amplificação da repetição CGG utilizar 200 ng de DNA genômico em cada reação (1  $\mu$ L de DNA em uma concentração de 200ng/ $\mu$ L).

## *Preparo da Reação*

Preparar todas as reações em volume 10% maior que o total requerido. Lembre-se de considerar os controles positivos e negativos. **Cuidado ao pipetar a enzima, pois excesso de polimerase pode inibir a reação.**

Vortexar o mix de reação antes de aliquotá-lo nos tubos de PCR para garantir a mistura adequada de todos os reagentes.

Fazer o mix de reação sem a amostra de DNA na ordem especificada abaixo:

Componente	1 reação ( $\mu$ L)
PCR Mix	17,5
Primer Mix (gene específico ou CGG)	1,0
DNA Polimerase	0,5
Amostra	1,0
Volume total	20,0

Dispensar 19 µL do mix em cada tubo e adicionar 1 µL da amostra de DNA (ou controle), homogeneizando-se de duas a três vezes. Centrifugar brevemente para remover as bolhas e colocar no termociclador. Após a termociclagem, as amostras podem ser estocadas congeladas de -15°C a -30°C por até 10 dias.

*GEMPLEX CGG*

### *Programa de PCR*

Submeter à ciclagem de acordo com o programa abaixo:

95°C	5 minutos	
97°C	35 segundos	10 x
62°C	35 segundos	
68°C	4 minutos	
97°C	35 segundos	
62°C	35 segundos	20 x
68°C	4 minutos mais 20 segundos a cada ciclo	
68°C	12 minutos	
10°C	Indeterminado	

### *Eletroforese Capilar*

1. Descongelar o padrão de peso molecular GEMROX-1000 (fornecido no kit) e a formamida Hi-Di.
2. Preparar um mix conforme descrito abaixo. Escalonar conforme o número de reações analisadas.

Formamida Hi-Di	11,5 µL
GEMROX-1000	0,5 µL
Volume final por amostra	12,0µL

3. Vortexar a mistura e dar um spin.

4. Misturar 1  $\mu\text{L}$  do produto de PCR com 12  $\mu\text{L}$  da mistura acima em cada poço da placa usada no sequenciador automático.
5. Selar a placa com septa e centrifugar para eliminar as bolhas.
6. Desnaturar as amostras a  $96^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos e colocar no gelo por 3 minutos.
7. Usar o protocolo de corrida descrito abaixo, variando o tempo de injeção conforme a intensidade de amplificação da amostra.

[Instrument Protocol Setup Help ?](#)

Application Type: <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">Fragment</span>	Capillary Length: <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">50</span> cm	Polymer: <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">POP7</span>
Dye Set: <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">F</span>	<input type="checkbox"/> Disable Name Filter	

**Instrument Protocol Properties**

\* Run Module: FragmentAnalysis50\_POP7 Run Modules for 8 capillary are only available in the list.

\* Protocol Name: FragmentAnalysis50\_POP7\_1  Locked

Description: FRAXA

Oven Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">60</span>	Run Voltage (kVolts): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">19.5</span>	PreRun Voltage (kVolts): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">15</span>	Injection Voltage (kVolts): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">1.6</span>
Run Time (sec.): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">2500</span>	PreRun Time (sec.): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">180</span>	Injection Time (sec.): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">20</span>	Data Delay (sec.): <span style="border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">1</span>

▶ Advanced Options

*GEMPLEX CGG*

Os produtos podem ser armazenados em gelo e protegido da luz após o passo de desnaturação devendo ser injetadas no sequenciador em até 24 horas após a desnaturação.

---

## 4. Análise das reações

Após a injeção no sequenciador automático, o cálculo do número de repetições CGG da amostra é feito em três etapas:

1. Confirmação de que todos os picos do padrão interno GEMROX-1000 estão definidos corretamente.
2. Identificação dos picos correspondentes à amplificação do gene específico.
3. Conversão da migração desses picos em número de repetições CGG (planilha Excel).
4. Confirmação do número de repetições através da contagem do número de picos produzidos pelo *primer* CGG e contagem das inserções AGG.

### *Confirmação dos picos do marcador interno GEMROX-1000*

Os arquivos gerados no sequenciador automático (.fsa) de cada amostra deverão ser analisadas no GeneMapper® (ID V5) com método de análise *microsatellite default* e painel *CGG*.

A triagem dos picos do GEMROX-1000 deverá apresentar **25** picos (tamanhos: 73, 90, 110, 131, 151, 182, 202, 235, 274, 306, 335, 365, 398, 442, 489, 511, 560, 611, 661, 710, 773, 821, 878, 945 e 1008), como mostrado na Figura 03.

Se for observado algum *pull up*, este deve ser ignorado, clicando em *override SQ*. O pico de 90 pb pode apresentar-se duplo, entretanto, não interfere na leitura da amostra.

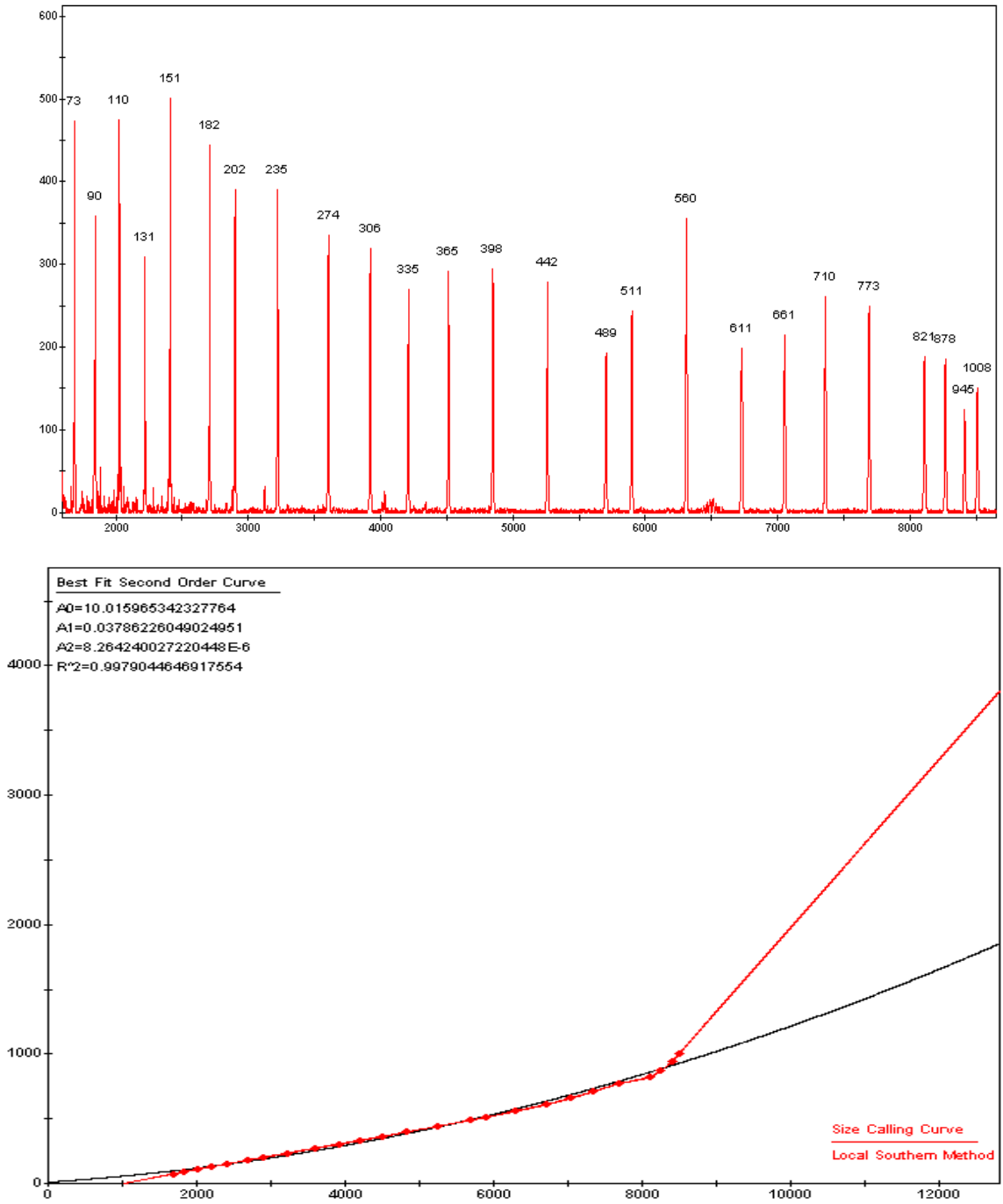


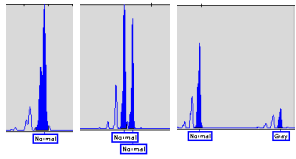
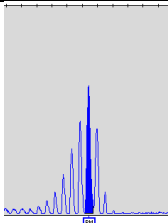
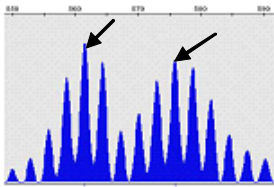

Figura 03: Picos do GEMROX-1000 e Curva de Calibração.

## *Identificação dos picos correspondentes à amplificação do gene específico*

O eletroferograma do gene específico apresentará um ou dois picos de amplificação da região CGG inteira (amostra homozigota ou heterozigota, respectivamente) e o eletroferograma referente ao anelamento do primer CGG apresentará vários picos que diminuem de intensidade, como mostrado na Figura 02. É importante identificar qualquer irregularidade nos parâmetros e amostras sem picos corretamente nomeados devem ser excluídos da análise posterior.

Assegurar que o controle negativo não obteve amplificação e que o controle positivo atenda às especificações.

Os picos referentes à amplificação inteira devem ser analisados de acordo com a tabela abaixo:

Tamanho do pico	Características	Instruções	Exemplos
245-400 bp	Alelos Normais ou Intermediários	Selecione o pico mais alto, geralmente o mais alto da direita deste intervalo. Podem ser picos múltiplos. Confirme a seleção de todos os picos.	
~400-820 bp	Alelos Pré-mutação com uma única população de picos menor do que 8 picos do centro para o fim.	Selecione o pico mais alto, geralmente o pico central.	
	Alelos de Pré-mutação com distribuição complexa de picos.	Selecione o pico central de cada grupo de alelos. Se os picos entre os alelos excedem o <i>cutoff</i> , identifique ambos os grupos separados por hífen.	
> 820 bp	Alelos de mutação cheia menores do que 1000 bp que podem ser resolvidos a partir de picos mais largos.	Selecione apenas o componente do grupo de picos contendo o pico mais alto. Retirar a seleção dos outros picos dentro deste grupo. Identifique os picos como >200 CGG.	

## *Conversão da migração em número de repetições CGG*

Após a eletroforese capilar, o tamanho do amplicon é derivado da comparação com o padrão interno GEMROX-1000. Entretanto, o produto de PCR das repetições CGG tem uma migração mais rápida do que o DNA do padrão. Essa migração maior, atribuída a estrutura do DNA rica em CG, pode resultar em número de repetições fora do esperado caso não seja utilizado um fator de correção apropriado.

O **Kit** GEMPLEX CGG incorpora dois fatores de correção para a conversão de tamanho em pares de bases para número de repetições CGG para cada alelo. O tamanho de cada pico pode ser convertido em número de repetições através da equação abaixo:

$$CGG = \frac{P - c_0}{m_0}$$

onde: **P** é a migração do pico correspondente ao alelo analisado, **c<sub>0</sub>** é o fator de correção de tamanho e **m<sub>0</sub>** é o fator de correção de mobilidade para cada repetição CGG.

Fatores como a migração e a mobilidade são dependentes do instrumento, do tipo de polímero, do comprimento do capilar e das condições de corrida utilizadas, podendo variar ligeiramente de laboratório para laboratório. Os valores desses parâmetros para o equipamento 3500 e capilar de 50 cm, de acordo com o protocolo do ensaio, é:

$$CGG = \frac{P - 255,3}{2,9191}$$

Após identificar os valores de migração dos picos referentes aos alelos observados no eletroferograma, copiá-los do GeneMapper® e colá-los no arquivo de Excel no espaço nomeado como **migração alelo 1 e 2** (caso a amostra seja heterozigota). Essa planilha já contém a equação de conversão de migração em número de repetições.

Os valores de migração serão convertidos automaticamente em número de repetições e serão mostrados nas colunas nomeadas como **Alelo 1** e **Alelo 2**. Para



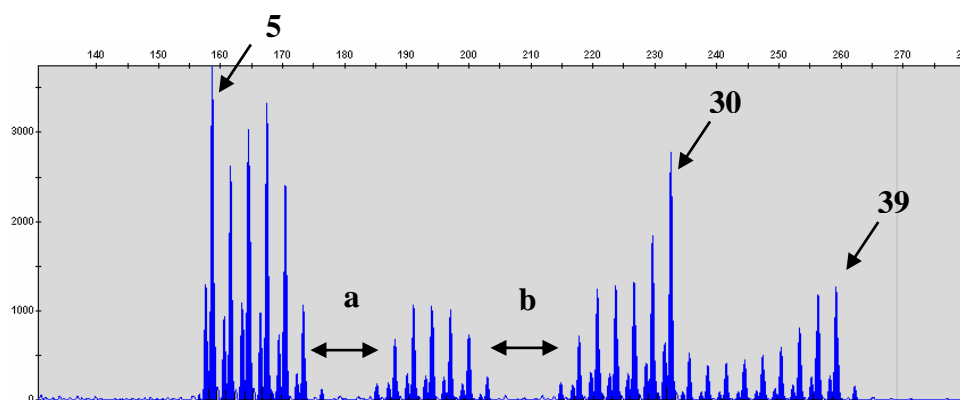
amostras homozigotas, isto é, com apenas um pico amplificado, utilizar apenas o espaço **migração alelo 1**. O número de repetições será mostrado na coluna **Alelo 1**. Em casos de mosaicism, pode ser necessário o uso do espaço **migração alelo 3**. Da mesma forma, o número de repetições será mostrado na coluna **Alelo 3**.

*GEMPLEX CGG*

### *Confirmação dos resultados obtidos*

O *primer* CGG produz número de picos igual ao número de repetições do maior alelo que amostra apresenta e por isso poder ser utilizado para confirmar o resultado obtido acima.

Assim, o primeiro pico observado é contado como **cinco repetições**, como mostra a Figura 04, uma vez que esse é o tamanho correspondente ao *primer* CGG. A partir dele, os demais picos vão sendo adicionados à contagem como mais uma repetição.



**Figura 04:** Exemplo de eletroferograma de uma amostra feminina contendo 30/39 CGGs.

Podem ocorrer *gaps*, isto é, grupo de picos que ficam bem mais baixos do que o conjunto total (espaços **a** e **b** na Figura 04) e caracterizam a interferência de uma repetição AGG. O *primer* específico para repetições CGG não hibridiza com sequências AGG comumente encontradas nos alelos do gene *FMRI*, o que diminui a

intensidade do sinal. Apesar de diminuir a intensidade da amplificação, é possível observar as pontas dos picos que devem ser considerados durante a contagem.

Caso o número de picos produzidos pelo *primer* CGG não corresponder ao número calculado pela migração, checar se o padrão interno GEMROX-1000 foi corretamente nomeado. Se o padrão interno estiver correto, recalibrar o equipamento com o padrão de picos da curva de calibração para a obtenção de uma nova equação de conversão.

As inclusões de AGG podem ocorrer em ambas as fitas ou em apenas uma das fitas. Quando o conjunto de picos está mais baixo do que os demais, porém visível, apenas uma das fitas foi amplificada e não contém AGG. Quando somente as pontas dos picos são visualizadas há evidência de AGG em ambas as fitas.

---

---

*GEMPLEX CGG*

# 6. Referências

Eichler, E.E.; Richards, S.; Gibbs, R.A. & Nelson, L. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 8: 1147-1153, 1993.

Pieretti M.; Zhang F.P.; Fu Y.H.; Warren S.T.; Oostra B.A.; Caskey C.T.; Nelson D.L. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 66: 817-22, 1991.

Verkerk A.J.; Pieretti M.; Sutcliffe J.S.; Fu Y.H.; Kuhl D.P.; Pizzuti A. *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65: 905-14, 1991.

Weinhäusel A.; Haas O.A. Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum. Genet.*, 6: 450-8, 2001.

Yu S.; Pritchard M.; Kremer E.; Lynch M.; Nancarrow J.; Baker E.; Holman K.; Mulley J.; Warren S.; Schlessinger D. *et al.* Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*, 24; 252 (5009):1179-81, 1991.

---

---

*GEMPLEX CGG*

# 7. Contato

*GENOMIC Engenharia Molecular*

*Rua Itapeva, 500 Conjunto 5AB*

*São Paulo- SP*

*Responsável técnico: Dr. Martin Whittle*

Contato: *mwhittle@genomic.com.br*