



EOSAL-CNV

Manual

## ÍNDICE

¿Qué es EOSAL-CNV? ..... 3

¿En qué consiste el análisis de CNVs mediante EOSAL? ..... 5

Principales ventajas del uso de EOSAL-CNV... 6

Componentes de los Kits EOSAL-CNV y reactivos necesarios no suministrados ..... 7

¿Cómo se analizan los resultados obtenidos con EOSAL-CNV?..... 8

## ¿QUÉ ES EOSAL-CNV?

**EOSAL-CNV** es el resultado del desarrollo de nuestra tecnología **EOSAL-CNV (Easy One-Step Amplification and Labelling** para la detección de CNVs o “**Copy Number Variations**”).

**EOSAL** es una tecnología desarrollada por Seqplexing e INCLIVA, que ha sido protegida con la correspondiente patente.

Una de las principales aplicaciones de esta técnica es la detección de polimorfismos o mutaciones en las que se produce una ganancia o pérdida de material genético de 50 bp o más bases, hasta cromosomas enteros. Este tipo de variantes genéticas se conocen como variaciones en el número de copias (CNVs). Las CNVs pueden causar enfermedades debido a la alteración de los genes involucrados en las

mismas o de las regiones cromosómicas que los contienen (por ejemplo, la duplicación de uno o varios exones, o la pérdida total o parcial de un gen). Hay CNVs que no tienen efectos conocidos sobre el fenotipo, pero muchos de ellos causan enfermedades hereditarias.

Los CNVs que afectan a un gen no se detectan mediante secuenciación Sanger estándar y muchas veces tampoco por NGS. Hasta el momento, las tecnologías existentes para la detección de este tipo de alteraciones requieren mucho tiempo, por lo cual no es habitual el análisis de las mismas en los protocolos de diagnóstico genético de muchos genes. En los últimos años se está viendo que este tipo de alteraciones son más frecuentes de lo inicialmente pensado, de ahí el interés de disponer de métodos fiables, sencillos y rápidos para su detección de manera rutinaria. **EOSAL-CNV** cumple con estas expectativas.

Seqplexing ha desarrollado y validado varios kits para la detección de estas alteraciones en varios genes:

- EOSAL-CNV para BRCA1 (ref. EOS-BRCA1): analiza el gen BRCA1, implicado en cáncer de mama y ovario.
- EOSAL-CNV para BRCA2 y CHEK2 (ref. EOS-BRCA2): analiza el gen BRCA2 al completo, y los exones 9 y 10 del gen CHEK2 donde se han identificado grandes reordenamientos). Ambos genes están también implicados en cáncer de mama y ovario
- EOSAL-CNV para el Síndrome de Lynch (ref. EOS-HPNCC): analiza la totalidad de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y parte del gen EPCAM (exones 8 y 9). Estos genes están implicados en el Síndrome de Lynch,

o cáncer colorectal no polipósico hereditario.

- EOSAL-CNV para la Hipercolesterolemia Familiar (ref. EOS-LDLR): analiza el gen LDLR, responsable de Hipercolesterolemia Familiar.

Para más información sobre estos productos, puede consulte nuestra web: [www.seqplexing.com](http://www.seqplexing.com).

Actualmente Seqplexing se encuentra trabajando en el desarrollo y validación de nuevos kits para el análisis de diferentes genes mediante **EOSAL-CNV**. Por otro lado, nuestra empresa también puede desarrollar kits a medida o “custom”.

## ¿EN QUÉ CONSISTE EL ANÁLISIS DE CNVs MEDIANTE EOSAL?

Los diferentes kits **EOSAL-CNV** contienen la mezcla de reacción ya preparada, y sólo es necesario distribuirla en tubos y añadir el ADN a analizar. En algunos casos se necesitarán 2 mezclas de reacción diferentes para analizar los diferentes genes incluidos como en el caso del kit EOSAL-HPNCC. Posteriormente, los tubos se colocan en termociclador, se realizan una serie de ciclos de PCR (indicados en el protocolo), y al acabar éstos, los productos de la reacción (que es una mezcla de amplicones marcados fluorescentemente y en cantidad proporcional al número de copias del molde de cada uno de ellos) se analizan directamente en un secuenciador capilar, sin necesidad de purificación entre un paso y otro. Por último, los resultados son analizados de forma sencilla y fiable mediante un programa desarrollado

específicamente para ello. La siguiente figura muestra un esquema general de nuestro procedimiento.

**EOSAL-CNV** trabaja con dos tipos de controles, INTERNOS y EXTERNOS, que son necesarios para una correcta normalización de los resultados y posterior interpretación de los mismos. Los controles internos son fragmentos de ADN de diferentes regiones del genoma y que ya se incluyen en la mezcla de reacción. Los controles externos no vienen incluidos en el kit, ya que son deben ser al menos 3 ADNs de individuos que no presenten ninguna alteración en los genes a analizar. Estos controles deben haber sido extraídos en las mismas condiciones y con los mismos procedimientos que los ADNs de las muestras que se vayan a estudiar. Estos 3 controles externos deben analizarse por duplicado



## PRINCIPALES VENTAJAS DEL USO DE EOSAL-CNV

- **Poco tiempo de trabajo manual:** aproximadamente 15 minutos dependiendo del número de muestras a analizar.
- **Rapidez** en la obtención de los resultados: en aproximadamente dos hora y media pueden tenerse los resultados.
- **Sencillez del procedimiento:** Solo hay que distribuir la mezcla de reacción y añadir los ADNs a estudiar. No es necesaria la purificación de los productos de la reacción de PCR. La reducción de la manipulación de muestras y reactivos disminuye el riesgo de contaminación y posibles errores.

## COMPONENTES DE LOS KITS DE EOSAL-CNV Y REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

### Cada kit de EOSAL-CNV incluye:

- 1 o 4 tubos con la mezcla de reacción, dependiendo del número de muestras (formato 24 o 96 muestras). En algunos kits se incluirán el doble de tubos debido a que se requieren dos mezclas de reacción para el análisis de las diferentes regiones incluidas en el mismo.
- Un tubo con el ADN normal que sirve como control positivo de amplificación.
- Instrucciones: protocolo de uso y de análisis (descargable desde [www.seqplexing.com](http://www.seqplexing.com)).

### El siguiente material o equipamiento es necesario y NO se suministra con el kit:

- Sistema para la cuantificación de ADN: absorbancia o fluorimetría.

- Termociclador de 96 pocillos con tapa térmica para tubos de 200  $\mu$ l, respectivamente. El protocolo se ha realizado en diferentes termocicladores de Thermo Fisher (Applied Biosystems antiguamente), y en Eppendorf y se ha verificado con tubos de diferentes volúmenes.
- Pipetas que permitan manejar volúmenes de 2 y 20  $\mu$ l.
- Centrífuga para los tubos, strips o placas que se vayan a utilizar.
- Analizador o Secuenciador Capilar de Applied Biosystems (Thermo Fisher).
- Consumibles como:
  - Tubos, strips o placas (incluyendo tapa adhesiva) para termocicladores de 96 o 384 pocillos.
  - Formamida desionizada (según recomendaciones del fabricante del Secuenciador) para la carga de los

productos de la reacción en el secuenciador capilar

- Marcador de tamaños para el secuenciador capilar: LIZ500
- Reactivos para el funcionamiento del Secuenciador Capilar.

Se deben seguir las **recomendaciones generales para el trabajo con ADN y PCR**: espacios limpios de ADN, zona pre-PCR y postPCR, guantes, puntas con filtro, trabajar en campana (limpiada con sustancias descontaminantes de ADN).

El kit debe ser almacenado a -20 °C. Se recomienda descongelar en nevera o sobre hielo y dejar en hielo una vez descongelado mientras se trabaja con el mix.

## ¿CÓMO SE ANALIZAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EOSAL-CNV?

El procedimiento de análisis es muy sencillo y consiste en extraer los datos de los picos y sus áreas del software “fragment Analyzer” después de la electroforesis. Se deben obtener los datos de controles normales y de las muestras, cargar en “EOSAL Software for CNV Analysis” EOSAL-SC, indicar cuales son las muestras de referencia y las muestras problema. Ejecutar con click el análisis y se obtendrá la visualización de los resultados por cada muestra y un informe indicando la ausencia o presencia de un CNV. Si está presente indicará, además, de los fragmentos insertados o deletados.